

LEFLUNOMİD'İN SÜREKLİ AKIŞ
ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ

DUYGU YENİCELİ
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Ağustos 2004

**Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 040323**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Duygu Yeniceli'nin 'LEFLUNOMİD'İN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ' başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans Tezi ~~25.08.2004~~...tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : *Prof. Dr. Dilek Doğruel-Ak*

Üye : *Prof. Dr. Mustafa Tuncel*

Üye : *Doç. Dr. Banu Uslu*

Üye :

Üye :

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

~~16.08.2004~~... tarih ve ~~23/1~~ sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi
LEFLUNOMİD'İN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
TABLETLERİNDE MİKTAR TAYİNİ

DUYGU YENİCELİ

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Dilek Doğrukol-Ak
2004

Bu çalışmada, leflunomid (LEF) 'in film tabletlerinde miktar tayini için sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi tarif edilmektedir. Taşıyıcı çözelti olarak, %25 etanol çözeltisi kullanılmıştır ve akış hızı 0.8 mL/dk'dır. LEF sinyalleri, UV-spektrofotometrik detektör kullanılarak 260 nm'de kaydedilmiştir. Miktar tayini için pik alanı sinyalleri kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği ve doğrusalığı bu sinyallerle gösterilmiştir. Sinyal/gürültü oranı 3.3 kriterine göre yöntemin saptama sınırı olarak 7.43×10^{-7} M ve sinyal/gürültü oranı 10 kriterine göre tayin sınırı olarak 2.25×10^{-6} M değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin uygulanması ile elde edilen sonuçlar, standart bir yöntem olan UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen sürekli akış enjeksiyon analizinin kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler : Leflunomit (LEF), Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**DETERMINATION OF LEFLUNOMIDE IN PHARMACEUTICAL
TABLETS BY FLOW-INJECTION ANALYSIS**

DUYGU YENİCELİ

**Anadolu University
Institute of Health Sciences
Department of Analytical Chemistry**

**Supervisor :Prof.Dr.Dilek Doğrukol-Ak
2004**

A flow injection analysis (FIA) method is described for the determination of leflunomide (LEF) in the pharmaceutical tablets in this study. 25 % ethanol was used as carrier solvent at 0.8 mL/min of flow rate. LEF signals were detected at 260 nm using UV-spectrophotometric detector. Peak area signals were used for quantification of LEF and the precision and linearity of the FIA were shown with these signals. The detection limit and determination limit of the method (signal / noise 3.3 and 10) were 7.43×10^{-7} M and 2.25×10^{-6} M, respectively. The results obtained with the application of the method were compared with UV spectrophotometry as standard method. It was found that the difference of the standard method and FIA was not statistically significant by using peak area response of FIA. It can be concluded that FIA developed with this study is a precise, accurate, sensitive and cheap method.

Keywords : Leflunomide (LEF), Flow-injection analysis.

TEŞEKKÜR

Değerli fikirleri ile beni ynlendiren ve yapıcı eleştirileri ile alışmalarımı destekleyen Sayın Hocam, Eczacılık Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e,

Tezim süresince ve daima yanımda olan, beni sonsuz anlayış ve hoşgörüsü ile destekleyip,yönlendiren, ğrencisi olmaktan gurur duyduğum, değerli hocam Prof. Dr. Dilek DOğRUKOL-AK'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım ve sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Herşeyden önce, beni bugünlere getiren, her zaman yanımda ve aklımda olan sevgili annem Nesrin YENİCELİ ve babam Hasan YENİCELİ'ye,

ğrenim hayatım boyunca, beni sürekli destekleyen tüm aileme,
En içten teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. LEF'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.2. LEF'in Farmakolojik Özellikleri.....	3
2.3. LEF ve Aktif Metaboliti A77 1726 ile İlgili Stabilite Çalışmaları.....	5
2.4. LEF Tayini ile İlgili Çalışmalar.....	5
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	10
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	10
3.2. Kullanılan Aletler.....	10
3.3. Analitik İşlemler.....	10
3.3.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile İlgili Analitik İşlemler	10
3.3.2. UV-Spektrofotometrik Analiz ile İlgili Analitik İşlemler...	11
3.4. Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması.....	11
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	12
4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi.....	12
4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu.....	12
4.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Yönteminin Validasyonu	15
4.2.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Kesinliği.....	15

4.2.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı.....	16
4.2.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama ve Tayin Sınırı.....	17
4.2.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğruluğu.....	18
4.2.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile LEF İçeren Tabletlerde Miktar Tayini.....	19
4.3. LEF'in UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi.....	20
4.3.1. UV Spektrofotometri Yönteminin Doğrusallığı.....	20
4.3.2. UV Spektrofotometri Yönteminin Doğruluğu ve Kesinliği.	21
4.3.3. UV Spektrofotometrik Yöntemle LEF İçeren Tabletlerde Miktar Tayini.....	22
4.4. Tablet Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	22
4.5. Sonuç ve Değerlendirme.....	23
5. KAYNAKLAR.....	24
ÖZGEÇMİŞ.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. LEF'in kimyasal yapısı.....	3
Şekil 4.1. % 25 etanol içerisindeki standart LEF (5.49×10^{-5} M) çözeltisinin 200-350 nm aralığındaki UV spektrumu.....	12
Şekil 4.2. Akış hızının LEF (1.1×10^{-5} M) sinyallerine etkisi.....	13
Şekil 4.3. pH'nın LEF sinyallerine etkisi.....	14
Şekil 4.4. Standart LEF (1.1×10^{-5} M) sinyallerinin tekraredilebilirliği....	15

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	LEF'in (5.49×10^{-6} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.....	16
Çizelge 4.2.	LEF'in (1.1×10^{-5} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.....	16
Çizelge 4.3.	LEF'in (5.49×10^{-5} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.....	16
Çizelge 4.4.	2.75×10^{-6} - 1×10^{-4} M derişim aralığındaki LEF'in 0.8 mL/dk akış hızında ve 260 nm'deki pik alanı sinyallerinin doğrusallığı	17
Çizelge 4.5.	Tablet matriks çözeltilisini hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri	18
Çizelge 4.6.	Sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin doğruluk sonuçları (n=8).....	19
Çizelge 4.7.	Sürekli akış enjeksiyon analizi ile LEF'in farmasötik tabletlerdeki miktar tayini sonuçları.....	20
Çizelge 4.8.	UV-Spektrofotometrik yöntemin doğruluk sonuçları (n=8)	21
Çizelge 4.9.	UV-Spektrofotometrik yöntem ile LEF'in farmasötik tabletlerdeki miktar tayini sonuçları.....	22
Çizelge 4.10.	Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV-Spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması	23

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Leflunomit (LEF), anti-inflamatuar ve immunosupresif özelliklere sahip izoksazol türevi yeni bir ön ilaçtır ve son yıllarda romatoit artritli hastaların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaç, aktif romatoit artritli yetişkin hastalarda, inflamasyonlu artrit in işaretlerini ve semptomlarını azaltan ve radyolojik ilerlemeleri geciktiren hastalık modifiye edici antiromatizmal özelliklere sahiptir. İnsandaki oral uygulamayı takiben moleküldeki izoksazol halkasının hidrolizi ile aktif metaboliti olan A77 1726 ya hızla dönüşür ve bağışıklık sisteminde modulator özellik gösterir [1].

Yeni bir ilaç olması nedeniyle LEF ve tayinini konu alan çalışmalar bağıl olarak azdır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar, genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminin kullanıldığı, LEF'in aktif metaboliti olan A77 1726 nın kan ve plazmada farmakokinetiğinin gösterilmesine yönelik olan çalışmalardır [2-7]. Ayrıca, LC/MS/MS ve afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak LEF'in hücre düzeyindeki etkileşimlerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır [8,9]. Yapılan literatür araştırmasına göre LEF'in farmasötik tabletlerinde tayinini konu alan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi, detektörün önünden akan taşıyıcı çözeltiliye numunenin enjeksiyonu ile, numunenin sistemde sürüklenmesi sırasında karşılık gelen sinyallerinin kaydedilmesini temel alan bir yöntemdir. Yöntem, basitlik, çok yönlü kullanım, otomasyon kolaylığı ve düşük maliyetli cihaz ve kimyasal madde olmak üzere birçok avantaja sahiptir [10]. Bu avantajlar, analitik kimyanın pek çok alanındaki rutin analizler için sürekli akış enjeksiyon analizini uygun bir teknik haline getirir. Bu yöntem, saatte en az 90 enjeksiyonla, zamandan önemli bir kazanç sağlar. Ayrıca numune hazırlama basamakları kolaydır ve bunlardan yardımcı maddeler etkilenmez.

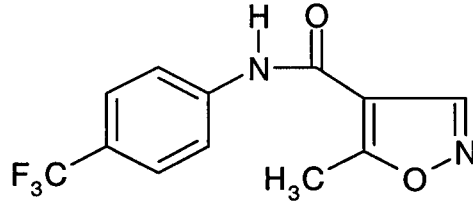
Bu çalışmanın amacı, LEF'in farmasötik tabletlerinde tayini için kullanılabilecek bir sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi geliştirilmesi, yöntemin validasyonunun ve tabletlerdeki tayininin gösterilmesidir. Sürekli akış parametrelerinin en uygun koşulları incelendikten sonra yöntemin kesinliği, doğrusallığı, doğruluğu, saptama ve tayin sınırı belirlenmiştir. Sürekli akış

enjeksiyon analizi ile elde edilen sonuçlar, UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. LEF'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

LEF, kimyasal olarak [N-(4-trifluorometilfenil)-5-metilizoksazol-4-karboksamid] şeklinde adlandırılır. $C_{12}H_9N_2O_2F_3$ kapalı formülüne sahiptir [8]. Açık kimyasal formülü Şekil 2.1.'de görülmektedir.



Şekil 2.1. LEF'in kimyasal yapısı

LEF'in molekül ağırlığı 270.21'dir. Beyaz kristaller halindedir. 163-168 °C de erir. Metanol ve dimetil sülfoksit içerisinde kolayca çözünür. Etanol ve pH'sı 2.3 olan tampon çözeltilerinde çözünürken, çözünürlüğün pH artışı ile azaldığı bildirilmektedir [11].

2.2. LEF'in Farmakolojik Özellikleri

LEF, aktif romatoit artritli yetişkin hastalarda, inflamasyonlu artritlin işaretlerini ve semptomlarını azaltan ve radyolojik ilerlemeleri geciktiren hastalık modifiye edici antiromatizmal bir ön ilaçtır. LEF, insandaki oral uygulamayı takiben moleküldeki izoksazol halkasının hidrolizi ile aktif metaboliti olan A77 1726 ya hızla dönüşerek bağışıklık sisteminde modulator özellik gösterir. Bu dönüşüm, muhtemelen mide-barsak sisteminde, plazma ve karaciğerde gerçekleşir [1].

A77 1726, romatoit artritli hastaların aktif hale gelmiş olan lenfositlerindeki hücre çoğalmasını inhibe eder, fakat etkinin kesin mekanizması henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. İn vitro verilere göre, ilaç, aktif olarak bölünen hücrelerde dihidro-orotat dehidrogenaz aktivitesini ve protein tirozin

aktivitesini engellemektedir. Dihidro-ototat dehidrogenaz, aktif olarak bölünen hücrelerdeki pirimidin nükleotidi için prekürsör olan üridin monofosfat sentezi için gerekli bir enzimdir. Lenfositlerin aktivasyonu, dihidro-ototat dehidrogenaz aktivitesinin indüksiyonuna öncülük eder. Bu enzimin inhibisyonu, üridin monofosfat düzeyinin düşmesine, DNA ve RNA sentezinin azalmasına ve hücre bölünmesinin, G1 faz hücre döngüsünün inhibisyonuna neden olur. Dihidro-ototat dehidrogenaz aktivitesi, immünglobulin (Ig) sentezi gibi diğer hücre fonksiyonlarla da ilişkilidir [1,8].

LEF'in bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi ise lenfosit tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek, T ve B hücre aktivitesini baskılamasına bağlanmıştır. Ayrıca son veriler, T hücre proliferasyonunun LEF tarafından inhibisyonunda, interlökin-2'ye olan cevabın engellenmesinin rol oynadığını göstermektedir [2].

A77 1726, 0,13 L/kg dağılma hacmine sahiptir ve % 99,38 oranında plazma proteinlerine bağlanır. A77 1726, enterohepatik döngüye girmekte ve bu durum, eliminasyon yarı ömrünün uzun olmasına neden olmaktadır. İlgili süre yaklaşık 2 hafta olarak verilmektedir. Uzun eliminasyon yarı ömründen dolayı, LEF'le olan tedaviye, kararlı plazma konsantrasyonuna ulaşımı hızlandırmak için üç gün süreyle günde bir kez 100 mg'lık bir yükleme dozuyla başlanmalıdır [1].

A77 1726, sitokrom P450 yi inhibe ettiği için, aynı enzim tarafından metabolize olan diklofenak, ibuprofen ve tolbutamid gibi ilaçlarla etkileşme riski vardır. LEF'in, sulfasalazin veya metotreksat kadar iyi tolere edilebilir ve etkili olduğu ve aktif romatoid artritli yetişkin hastalarda bu ajanlara uygun bir alternatif olduğu bildirilmektedir. LEF, Amerika, Avrupa Birliği, Orta ve Güney Amerika ve Avustralya'da romatoid artritli hastalarda kullanım için hastalık-modifiye edici ajan (disease modifying agents, DMARDS) olarak kabul edilmiştir. Oral uygulamayı takiben, 4 hafta içinde eklem hassaslığı ve şişliklerinde, ayrıca fonksiyonel bozukluklarda önemli ölçüde azalma olduğu görülmüştür. LEF, ilerlemiş solid tümörler, sistemik lupus eritamus veya Wegener's granulomatosis gibi rahatsızlıkları bulunan hastalarda klinik incelemelerde de kullanılmaktadır [1].

2.3. LEF ve Aktif Metaboliti A77 1726 ile İlgili Stabilit e alışmaları

Dias ve ark. [2], insan kanındaki A77 1726 için, 10 günlük bir  n stabilit e çalışması yapmışlardır. Bunun için kan örneklerine 1.0 $\mu\text{g/L}$ ve 10.0 $\mu\text{g/L}$ derişimde A77 1726 ekleyip, 4 $^\circ\text{C}$, -20 $^\circ\text{C}$ ve -70 $^\circ\text{C}$ de saklamışlardır. -20 $^\circ\text{C}$ ve -70 $^\circ\text{C}$ de saklanan örneklerde istatistiksel olarak ($p>0.05$)  nemsiz değişiklikler görülürken, 4 $^\circ\text{C}$ de saklanan 10.0 $\mu\text{g/L}$ lik örneklerde 10 gün içinde % 1.9 gibi önemli bir düşüş gerçekleşmiştir. Buradan, A77 1726 nın -20 $^\circ\text{C}$ ve -70 $^\circ\text{C}$ de saklanana oranla 4 $^\circ\text{C}$ de saklandığında, insan kanında daha az stabil olduğu sonucuna varılmıştır.

Schmidt ve ark. [5], LEF ve A77 1726 nın stabilitesini, -80 $^\circ\text{C}$ de saklanan ve plazma içine karıştırılan standart etkin madde çözeltilerini kullanarak, bir ay süreyle izlemişlerdir. Ayrıca, üç ayrı konsantrasyondaki çözeltilerle bir ay süreyle yapılan alışmalar, HCl ile pH 2'ye ayarlanan plazma içerisinde bulunan LEF ve A77 1726 nın stabil olduğunu göstermiştir. Dondurulmadan önce ve dondurulduktan sonraki değerler arasındaki fark % 5 den azdır. Asitlendirilmemiş plazma, -80 $^\circ\text{C}$ de aynı süre saklandığında, eklenen konsantrasyonun % 40'ına kadar varan oranda LEF'den A77 1726 dönüşümü gözlenmiştir.

Zhang ve ark. [8], LC/MS/MS yöntemi ile LEF ve aktif metabolitinin tayini için yaptıkları çalışmalarında, asetonitrilde 1.0 $\mu\text{g/ml}$ derişimde hazırlanan standart çözeltileri, asetonitril-sitrat tamponu (90:10, h/h) ile seyreltmişlerdir. Sitrat tamponunun pH sınırın 1.5 civarında tutulması ile LEF'in metabolitine dönüşümünün engellendiği bildirilmektedir.

2.4. LEF Tayini ile İlgili alışmalar

Dias ve ark. [2], yaptıkları çalışmada insan ve tavşanın kan ve plazmasında LEF'in aktif metaboliti olan A77 1726 nın analizi için bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin duyarlılığı kullanılan numune hacmi ile ilişkili bulunmuştur. Numune hacmi 0.25 ml kullanıldığında, yöntemin duyarlılığı 400 $\mu\text{g/L}$ iken; 1.0 ml numune hacmi için duyarlılığın 40 $\mu\text{g/L}$ olduğu bildirilmektedir. A77 1726 nın -20 veya -70 $^\circ\text{C}$ de 10 güne kadar dayanıklı olduğu bildirilmektedir. LEF ve A77 1726 standartlarının

stok çözeltisi 10.0 µg/L konsantrasyonda, % 95 etanol ve tuz çözeltisi içinde hazırlanmış ve -70 °C de saklanmıştır. 17-β-estradiol, internal standart olarak seçilmiş ve stok çözeltisi 1000 mg/L konsantrasyonda % 95 etanol içinde hazırlanmış, 4 °C de saklanmıştır. Kromatografik ayırma, izokratik olarak gerçekleştirilmiş ve mobil faz olarak asetronitril-metanol-su (40:20:40, h/h/h) seçilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dk ve kolon sıcaklığı 70°C olarak ayarlanmıştır. Pikler 280 nm'de saptanmış ve konsantrasyon pik yanıtı ilişkisi, internal standarda göre pik alan oranı kullanılarak hesaplanmıştır. İnsan kanında 0.4 mg/L ile 100 mg/L aralığındaki ilaç konsantrasyonları için yöntemin % 78 – 108 aralığında analitik geri kazanım sağladığı bildirilmektedir. İnsan ve tavşan kanı ya da plazmasında yapılan çalışmalarda fark önemli bulunmamıştır.

Lucien ve ark. [3], LEF'in kandaki dağılımı ve farmakokinetiğini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 0.4-100 mg/L derişim aralığında, test edilen tüm konsantrasyonlarda A77 1726 plazmanın lipoproteinsiz fraksiyonunda % 95 den fazla bulunmuştur. Plazma içermeyen fraksiyonda, YPSK ile analizlenen A77 1726 nın saptanabilir düzeyi olan 0.34 ± 0.18 mg/L derişim, sadece test edilen en yüksek konsantrasyonda (100 mg/L) bulunmuştur. LEF ve aktif metabolitin tek doz farmakokinetiği tavşanlarda incelenmiş ve yarı ömrü sırasıyla 3.88 ± 2.3 saat ve 3.18 ± 1.6 saat olarak bulunmuştur. İntravenöz ve oral uygulama ile belirlenen dağılım hacmi, dokulara minimal dağılım göstermektedir. A77 1726 nın ortalama rezidans süresi, oral LEF uygulamasından daha büyüktür ve biyoyararlanımın % 100 olduğu görülmektedir.

LEF, pirimidin biyosentezinin dördüncü enzimi olan dihidroorotik asit dehidrogenaz'ın inhibisyonu şeklinde etki gösteren immüno-modulatör bir ilaçtır. Fairbanks ve ark. [4] nın geliştirdikleri YPSK yöntemi, LEF ile inkübe edilmiş, mitojen uyarımlı insan T-lenfositlerindeki asıl metabolitin dihidroorotik asit değil, karbamoil aspartat olduğunu göstermeye yöneliktir. Tayin, [¹⁴C] karbamoil aspartat'ın, [¹⁴C] aspartik asit ve memeli aspartat transkarbamoilazından hazırlanmasıyla ilişkilidir.

Schmidt ve ark. [5] nın yaptıkları bir başka çalışmada, insan plazmasındaki LEF ve aktif metaboliti A77 1726 nın tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyona dayalı ters faz bir YPSK yöntemi tanıtılmaktadır. LEF standart çözeltisi, etanol ve % 0.9 luk

(a/h) tuz çözeltisi içinde (95/5), A77 1726 standart stok çözeltisi ise % 0.005 doygun NaOH içeren distile suda hazırlanmıştır. İki stok çözelti de, -80°C de bir ay süreyle saklanmıştır. Bu çalışmada LEF ve A77 1726, asetonitril-su-formik asit (40:59.8:0.2, h/h/h)'den oluşan bir mobil faz kullanılarak, 0.5 ml/dk akış hızında ve 261 nm'de UV deteksiyonla ayrılmıştır. İnternal standart olarak warfarin seçilmiştir. Bulunan alıkonma zamanları, A77 1726 için 8.2 dk, LEF için 16.2 dk ve warfarin için 12.2 dk'dır. Valide edilmiş tayin aralığı LEF için 0.05-100 µg/mL ve A77 1726 için 0.1-100 µg/mL dir. İki durumda da korelasyon katsayıları 0.995 den büyüktür. Ortalama geri kazanım, LEF için % 90-96 iken A77 1726 için % 85-90 dır. Geliştirilen prosedür, 10 mg/gün ve 20 mg/gün dozda LEF ile tedavi edilen romatoid artritli hastalardaki A77 1726 nın kararlı durum plazma konsantrasyonlarını belirlemek için uygulanmıştır.

Chan ve ark. [6], LEF'in aktif metaboliti A77 1726 nın plazmada YPSK ile tayininde, proteinlerin çökeltilmesi için asetonitrilin kullanıldığı basit bir yöntem geliştirmişlerdir. A77 1726 ve internal standart olan α-fenilsinnamik asidin kromatografik ayrımı, C₁₈ kolon kullanılarak, UV deteksiyon ile 305 nm de sağlanmıştır. Kullanılan mobil faz, asetonitril-0.05 M pH 2.5 asetat tamponu (35:65, h/h) dur. Yöntem, A77 1726 için 0.5-60.0 µg/ml konsantrasyon aralığında 0.997 den büyük korelasyon katsayısı değerleri ile tekraredilebilir bir doğrusallık göstermiştir. Tekraredilebilirlik % 5' den azdır. LOQ, 0.8 µg/ml olup, ortalama bağıl geri kazanım 100 % dür. Bu yöntem, LEF kullanan hastaların plazmalarında A77 1726 tayini için uygundur ve diğer HPLC metodlarından basittir.

Roon ve ark. [7], insan serumunda A77 1726 nın saptanabilmesi için basit ve hızlı bir ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Mobil faz, KH₂PO₄ tamponu (45 mM; pH=3) ve metanol (50:50, h/h) olup, akış hızı 1 mL/dk'dır. A77 1726 UV absorpsiyonla 295 nm'de görüntülenmiş ve alıkonma zamanı 8.9 dk olarak bulunmuştur. İnternal standart olarak, demoxepam kullanılmıştır. Düşük ve yüksek LOQ değerleri sırasıyla 0,5 ve 100 mg/L olarak bulunmuştur. Yöntem, 0,5 - 100 mg/L konsantrasyon aralığında doğrusaldır ($r^2 > 0,999$). Güniçi ve günlerarası kesinlik, tüm konsantrasyon aralığında % 15 gibi bir varyasyon katsayısı göstermiş ve doğruluk % 8 bulunmuştur. Romatoit artrit tedavisinde kullanılan diğer ilaçlar ve metabolitleri, A77 1726 dan 2 den büyük bir

rezolüsyonla ayrılmıştır. LEF kullanan 37 hastanın serumundaki A77 1726 düzeyleri tarif edilen YPSK yöntemi ile belirlenmiştir. Ölçülen serum konsantrasyonları 3.0 – 176.0 mg/L aralığında farklılık göstermektedir.

LEF, Zhang ve ark. [8] nın çalışmasında SU0020 ile gösterilen ve in vivo olarak açık halka izomerik şekli olan aktif metaboliti A77 1726 ya metabolize olur. Bu çalışma, LEF ve SU0020'nin hücresel düzeyini daha iyi anlayabilmek için 3T3/PDGFr α ve β hücrelerindeki LEF konsantrasyonunu değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. 3T3/PDGFr hücrelerinin ikisi (α ve β) 1, 6, 24 ve 48 saat süreyle 1, 25 ve 100 μ M konsantrasyonundaki LEF ile inkübe edilmiştir. Bu hücrelerdeki LEF ve SU0020 tayini, spesifik ve duyarlı bir sıvı kromatografisi-ikili kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) yöntemiyle yapılmıştır. İlginç olarak, α ve β hücre lizatlarında LEF, SU0020'den daha konsantre halde bulunmuştur. Bu durum, LEF'in hücrelere seçimli partisyonuna bağlı olabilir ve bu, ana ilaç seviyesinin, PDGF (platelet derived growth factor) reseptörlerinin inhibisyonu için gerekli farmakolojik düzeye ulaşabileceğini göstermektedir. Elde edilen verilere göre, bu hücrelerdeki LEF-SU0020 dönüşümü, inkübasyon ortamında olduğundan daha yavaş gerçekleşmektedir.

Mangold ve ark. [9], hücresel rol oynadığı düşünülen LEF bağlayıcı proteinlerin belirlenmesi ve saflaştırılmasında afinite kromatografisi kullanmışlardır. Bir LEF türevi olan A 0273, fractogel matrikse kovalent olarak bağlanmıştır. Bu kolon, seçilen spesifik gradient elüsyon basamakları yolu ile makrofaj hücre çizgisi RAW 264.7'nin sitozolik bir protein ekstraktının ayrılmasında kullanılmıştır. LEF'in aktif metaboliti olan A77 1726 yolu ile spesifik olarak elue edilen proteinler, protein dizi analizi ile aydınlatılmıştır. Bu durum, yüksek afinite ile matrikse bağlanan 10 sitozolik proteinin aydınlatılmasına da imkan verir. Bunlardan üçü, gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz, pirüvat kinaz, fosfogliserat mutaz, glikolitik yolağın ikinci kısmını oluşturur. Bu protein-ilaç etkileşmelerinin bağlanma spesifikliği, BIAcore analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz, pirüvat kinaz ve laktik dehidrogenaz enzimlerinin Kd değerleri, bilinen LEF hedef proteini olan dihidroorotat dehidrogenaz'ın Kd değerine yakındır. Sonuçları aydınlatmak için, diğer hücre çizgileri MOLT-4, A20.2J, HeLa'nın sitozolik

fraksiyonları aynı kromatografik protokol uygulanarak karşılaştırılmıştır. Elüsyon profilinin, makrofaj hücre çizgisi RAW 264.7 için önceden elde edilen verilerle uyumlu olduğu bildirilmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Standart LEF, Sigma (St.Louis, MO)'dan temin edilmiştir. pH taraması için kullanılan sodyum asetat, sodyum dihidrojen fosfat, hidroklorik asit ve sodyum hidroksit Merck (Darmstadt, Almanya)'ten temin edilmiştir ve analitik ölçülerde saftır. Deneyler sırasında kullanılan distile etanol ve bidistile su laboratuvarımızda tümü pyrex camdan yapılmış cihazlarda üretilmiştir.

3.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometrik deneyler sırasında Shimadzu marka UV-2401 PC spektrofotometre kullanılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde; LC 6A marka sıvı kromatograf, pompa, ve SPD-10A marka UV detektörle yapılan deneylerde elde edilen verilerin işlenmesi, CR-7A marka integratör ile gerçekleştirilmiştir. Numune enjeksiyonları SCL-6B marka otosampler ile yapılmıştır (hepsi Shimadzu, Japonya).

Tüm çözeltilerdeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için B-220 (Branson, ABD) model ultrasonik banyo kullanılmıştır. pH taramasında, çözeltilerin pH'ları Elektromag M822 model pH metre ile ölçülmüştür.

3.3. Analitik İşlemler

3.3.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile İlgili Analitik İşlemler

Sürekli akış enjeksiyon analizi deneyleri için önce 3.66×10^{-3} M'lık % 100 etanol içeren bir stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra, % 25 etanol içerecek şekilde gerekli seyreltmeler yapılarak, 2.75×10^{-6} , 5.49×10^{-6} , 1.1×10^{-5} , 5.49×10^{-5} ve 1×10^{-4} M'lık çözeltilerden oluşan kalibrasyon seti belirlenmiştir.

Tekraredilebilirlik çalışmalarında, 5.49×10^{-6} , 1.1×10^{-5} ve 5.49×10^{-5} M'lık LEF çözeltileri kullanılmıştır.

3.3.2. UV-Spektrofotometrik Analiz ile İlgili Analitik İşlemler

LEF'in 200-350 nm aralığındaki UV spektrumunun kaydedilmesi için 5.49×10^{-5} M LEF çözeltisi kullanılmıştır. Spektrofotometrik kalibrasyon çalışması için hazırlanan çözeltilerin % 25 etanol içerisindeki son derişimleri, 1.1×10^{-5} , 1.46×10^{-5} , 1.83×10^{-5} , 2.2×10^{-5} , 2.56×10^{-5} , 2.93×10^{-5} , 3.29×10^{-5} M'dir. Ölçümler kuartz küvetlerde yapılmış ve kör olarak % 25 lik etanol çözeltisi kullanılmıştır.

3.4. Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

LEF'in tayini için kullanılan farmasötik preparatı, Aventis Pharma (Türkiye) firmasının üretimi olan Arava® adlı tablettir. 20 mg LEF içeren tablet formu lokal eczanelerden temin edilerek kullanılmıştır.

Tablet numunelerinin hazırlanması için, 20 mg LEF içeren 10 tablet ağırlığı tam olarak tartıldıktan sonra tabletler havanda toz edilmiş ve ağzı sıkı kapanan ve ışık geçirmeyen bir kaba konulmuştur. Bir tabletin ortalama ağırlığı hesaplanarak, bu ağırlığa karşılık gelen miktar tam tartıldıktan sonra 10 ml etanol ile çözülmüş ve ağzı kapalı bir kaptaki 30 dk sonike edildikten sonra 5000 rpm de santrifüj edilerek, analize hazır numune haline getirilmiştir. Gerekli seyreltme işlemleri ölçüm sırasındaki etanol konsantrasyonu % 25 olacak şekilde yapılmıştır.

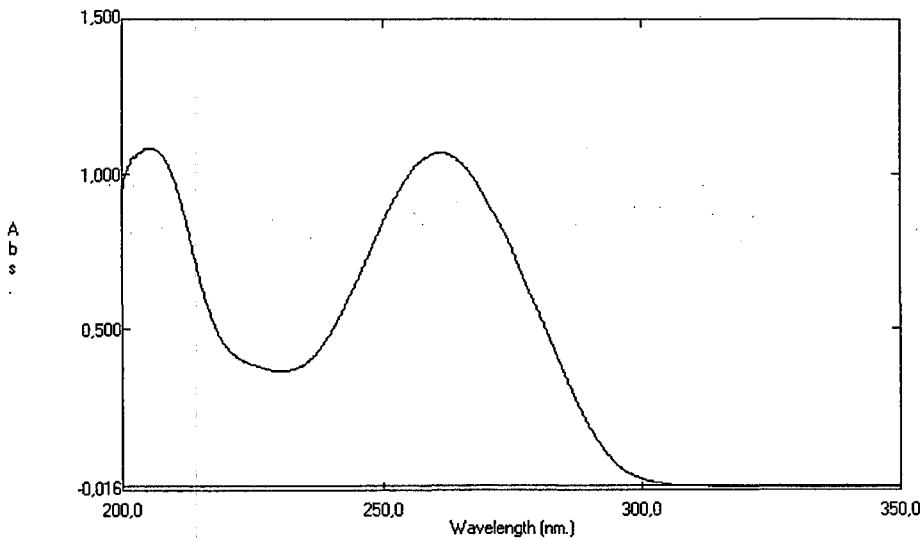
Sürekli akış enjeksiyon analizi ve UV-spektrofotometri yöntemleri ile yapılan ölçümlerde, tablet numunesi çözeltisinin çalışılan kalibrasyon aralığındaki uygun derişimi stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandıktan sonra 260 nm'de yanıt sinyalleri ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler, kalibrasyon eşitliklerinde çözüldükten sonra tablet içindeki LEF miktarı ve % LEF içeriği hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi

4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu

Sürekli akış enjeksiyon analizi sinyallerini saptamak amacıyla UV detektör kullanıldığı için UV alandaki çalışma dalga boyunu belirlemek gereklidir. LEF için seyreltme ortamı ve oranının belirlenmesi de çalışma dalga boyu kadar önemli bir parametredir. LEF'in metanol, etanol ve dimetilsülfoksit içerisinde çözündüğü bilinmektedir [2-7,11]. Bu bilgilerin ışığında en ekonomik çözücü ortamı olan etanolün farklı yüzdelerinin LEF'in UV spektrumuna etkisi incelenmiştir. Kör olarak aynı etanol yüzdesindeki çözeltilerin kullanıldığı işlemlerde, çözücü ortamının etanol yüzdeleri % 100, % 75, % 50 ve % 25 olacak şekilde, 5.49×10^{-5} M LEF çözeltisinin 200-350 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları kaydedilmiştir. Söz edilen yüzde aralığındaki bütün etanol çözeltileri için, aynı UV spektrum şekli ve absorbans büyüklüğü elde edilmiştir. LEF'in 200-350 nm dalga boyu aralığında, % 25 etanol içeren çözücü ortamındaki absorbans spektrumu Şekil 4.1.'de verilmektedir.

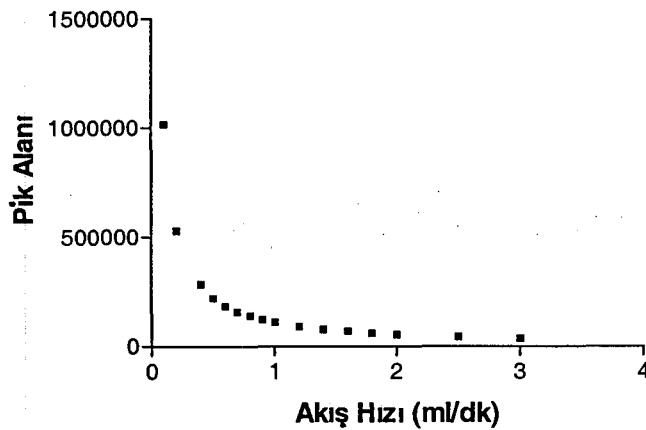


Şekil 4.1. % 25 etanol içerisindeki standart LEF (5.49×10^{-5} M) çözeltisinin 200-350 nm aralığındaki UV-spektrumu

Elde edilen verilere dayanarak ve daha az organik çözücü harcanması göz önüne alınarak, LEF ölçümlerindeki seyreltme ve ölçüm ortamı olarak % 25 etanol çözeltisi seçilmiş ve deneyler süresince tüm seyreltme işlemleri % 25 etanol içerecek şekilde yapılmıştır. Sürekli akış enjeksiyon analizi deneyleri için de söz edilen gerekçelerden dolayı, sürükleyici çözücü olarak % 25 etanol ortamı seçilmiştir.

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi, 200-350 nm dalga boyu aralığında LEF'in en yüksek absorbands verdiği dalga boyları, 205 ve 260 nm olarak gözlenmiş ve olası girişimlerden kaçınmak için sürekli akış enjeksiyon analizinde kullanılacak UV alandaki dalga boyu değeri olarak 260 nm seçilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde en uygun pik sinyallerinin elde edildiği akış hızı değerinin belirlenmesi, optimizasyonda önemli olan bir başka parametredir. Akış hızınının LEF pik sinyallerine olan etkisi 0.1-3.0 mL/dk akış hızı aralığında incelenmiştir. Elde edilen pik yanıtı şekillerine göre, düşük akış hızlarında büyük pik alanları ve keskin olmayan pikler belirmiştir. Yüksek akış hızlarında ise pikler simetrik şeklini kaybetmiş ve pik alanları oldukça düşük bulunmuştur. Belirtilen akış hızı aralığında elde edilen pik alanı değerleri akış hızına karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.2. elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Akış hızınının LEF (1.1×10^{-5} M) sinyallerine etkisi

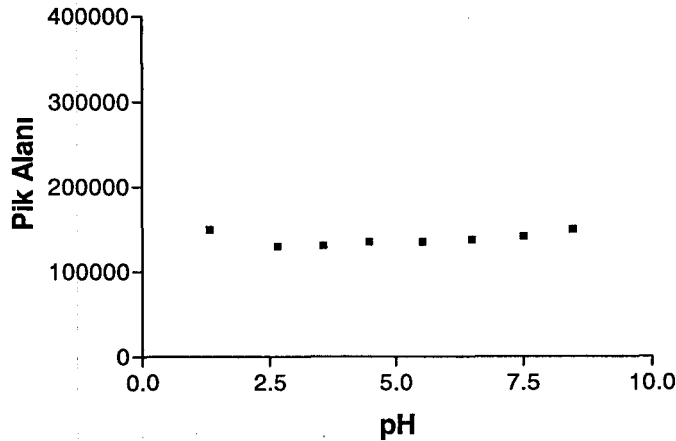
Şekil 4.2. de görüldüğü gibi, akış hızı artarken, pik alanı azalmaktadır. Pik alanının tersi ile akış hızı arasında

$$(\text{Pik Alanı})^{-1} = -6.2 \times 10^{-8} + 9.06 \times 10^{-6} \text{ Akış hızı}, r = 0.9998$$

eşitliğine uyan doğrusal bir ilişki bulunmuştur.

Akış hızının incelenmesinde elde edilen verilere göre, kantitatif tayine olanak sağlayacak en uygun akış hızı değerinin 0.8 mL/dk olduğuna karar verilmiş ve deneysel çalışmanın devamında bu akış hızı değeri kullanılmıştır.

Optimizasyon işlemlerinin diğer basamağında pH'nın pik alanına etkisi araştırılmıştır. Yine % 25 etanol içerecek şekilde hazırlanan 0.05 M HCl, 0.05 M asetat tamponu (pH 2.5, 3.5, 4.5 ve 5.5), 0.05 M fosfat tamponu (pH 6.5, 7.5, 8.5) ve 0.05 M NaOH çözeltileri taşıyıcı çözücü olarak kullanılmış ve 1.1×10^{-5} M LEF'in 0.8 ml/dk akış hızında ve 260 nm'deki pik sinyalleri kaydedilmiştir. Elde edilen pik alanı değerleri, pH ya karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.3. elde edilmiştir.



Şekil 4.3. pH'nın LEF sinyallerine etkisi

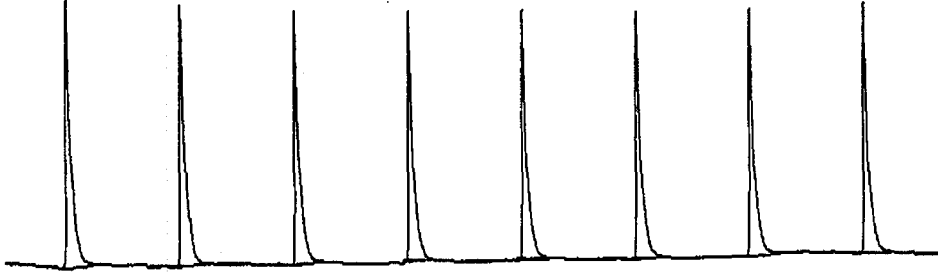
Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi, pH'nın değişmesi LEF pik alanı yanıtlarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizinin optimizasyonu için yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, kantitatif analize olanak sağlayacak en uygun koşullar olan 0.8 ml/dk akış hızı, 260 nm saptama dalga boyu ve % 25 etanol çözücü sisteminde validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

4.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Yönteminin Validasyonu

4.2.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Kesinliği

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla, 5.49×10^{-6} M, 1.1×10^{-5} M ve 5.49×10^{-5} M LEF içeren çözeltiler kullanılarak 3 set ve her set için de 8'er enjeksiyonluk deneyler yapılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda elde edilen sürekli akış enjeksiyon analizi sinyalleri, Şekil 4.4.'de görülmektedir.



Şekil 4.4. Standart LEF (1.1×10^{-5} M) sinyallerinin tekraredilebilirliği

Verilen derişimlerde elde edilen pik alanı sinyalleri, yöntemin kesinliğinin gösterilmesi için istatistiksel olarak değerlendirilmiştir [12]. Sonuçlar, Çizelge 4.1., Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de verilmektedir.

Çizelgelerden de görüldüğü gibi, duyarlılık arttıkça (5.49×10^{-6} M LEF) yöntemin kesinliği azalmaktadır. Diğer konsantrasyonlardaki kesinlik sonuçlarına göre, % 1-2 dolayında bağıl standart sapma değerleri ile yüksek düzeyde tekraredilebilirlik elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. LEF'in (5.49×10^{-6} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları

5.49×10^{-6} M LEF	Günüçi ortalama kesinlik			Günlerarası kesinlik
	I gün (n=8)	II gün (n=8)	III. gün (n=8)	
Ortalama Pik Alanı	84641	95940	102629	94403.3
Std. Sapma	1560	3353	4909	3548.5
% Rel.Std.Sapma	1.84	3.49	4.78	10.25
Güven Aralığı	± 1300.9	± 2796.1	± 4093.7	± 2959.2

Çizelge 4.2. LEF'in (1.1×10^{-5} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları

1.1×10^{-5} M LEF	Gün içi ortalama kesinlik			Günler arası kesinlik
	I gün (n=8)	II gün (n=8)	III. gün (n=8)	
Ortalama Pik Alanı	152251	155705	153712	153889.3
Std. Sapma	1017	4321	784.1	2602.6
% Rel.Std.Sapma	0.667	2.77	0.51	1.94
Güven Aralığı	± 848.1	± 3603.4	± 653.9	± 2170.4

Çizelge 4.3. LEF'in (5.49×10^{-5} M) günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları

5.49×10^{-5} M LEF	Gün içi ortalama kesinlik			Günler arası kesinlik
	I gün (n=8)	II gün (n=8)	III. gün (n=8)	
Ortalama Pik Alanı	694318	688501	686961	689926.7
Std. Sapma	7887	5450	4879	6210.5
% Rel.Std.Sapma	1.12	0.79	0.71	1.01
Güven Aralığı	± 6577.1	± 4544.9	± 4068.7	± 5179.1

4.2.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı

LEF'in 2.75×10^{-6} - 1×10^{-4} M derişim aralığında beş ayrı çözeltisi hazırlanmış ve yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla, sürekli akış enjeksiyon sistemine enjekte edilmiştir. Günüçi ve günlerarası tekraredilebilirliği göstermek için belirtilen konsantrasyon aralığında, üç ayrı set çözelti hazırlanarak, birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiştir. Artan LEF derişimleri ile karşılık gelen pik alanı değerleri arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.4.'de verilmektedir.

Çizelge 4.4. 2.75×10^{-6} - 1×10^{-4} M derişim aralığındaki LEF'in 0.8 mL/dk akış hızında ve 260 nm'deki pik alanı sinyallerinin doğrusallığı

	Güniçi			Günlerarası
	1.gün (n=5)	2.gün (n=5)	3.gün (n=5)	Tüm günler (n=15)
Eğim, a	1.28×10^{10}	1.27×10^{10}	1.25×10^{10}	1.27×10^{10}
Kesim, b	1.12×10^4	1.62×10^4	2.09×10^4	1.61×10^4
Korelasyon katsayısı, r	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998
Regresyon denkleminin standart sapması, $\pm S_r$	2.44×10^4	3.22×10^4	2.71×10^4	5.25×10^4
Eğimin % bağıl standart sapması	2.25	2.99	2.57	2.83
Güven Aralığı (p<0.05)	$\pm 2.76 \times 10^8$	$\pm 3.63 \times 10^8$	$\pm 3.06 \times 10^8$	$\pm 1.65 \times 10^8$

LEF derişimi ve pik alan yanıtı arasındaki doğrusal ilişkiyi incelemek üzere yapılan istatistiksel hesaplamalarda, LEF'in tabletlerdeki miktar tayinine izin verecek ölçüde, oldukça yüksek korelasyon katsayısına sahip, kesim değeri sıfıra yakın doğrusal eşitlikler elde edilmiştir.

4.2.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama ve Tayin Sınırı

LEF'in sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemiyle saptama sınırı (Limit of detection, LOD) değerinin belirlenmesi amacıyla sinyal/gürültü = 3.3 (S/N=3.3) için pik alanı sinyali dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Tayin sınırının (Limit of quantification, LOQ) belirlenmesi için ise sinyal/gürültü = 10 (S/N=10) eşitliğine göre pik alanı sinyali dikkate alınmıştır. Belirtilen koşullarda, [kalibrasyon denkleminin kesim değerlerinin standart sapması/kalibrasyon denkleminin eğimi] oranı sırasıyla 3.3 ve 10 ile çarpılarak, yöntemin saptama sınırı 7.43×10^{-7} M ve tayin sınırı 2.25×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır [13].

4.2.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğruluğu

Sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin doğruluğunu araştırmak için, tableti oluşturan etkin madde dışındaki maddelerden oluşan bir matriks ortamı hazırlanması, etkin maddenin bu matrikse eklenmesi ve yapılan ölçüm sonunda matriks ortamındaki yüzde geri kazanımın belirlenmesi yolu izlenmiştir [13]. LEF'in farmasötik şekli olan Arava® tablet için yapılan literatür araştırmasında, LEF tabletlerinde yardımcı madde olarak koloidal silikon dioksit, crospovidone, hypromellose, laktoz monohidrat, magnezyum stearat, polietilen glikol, povidon, nişasta, talk, titanyum dioksit ve sarı ferrik oksit içeriği verilmektedir [14]. Çizelge 4.5'de verilen yardımcı maddeler, ortalama tablet ağırlığı ve LEF içeriği göz önüne alınarak çizelgede belirtilen oranlarda karıştırılarak tablet matriks çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. Tablet matriks çözeltisini hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri

Kullanılan yardımcı maddeler	Yüzdeleri (%)
HPMC	7
Laktoz	60
Mg Stearat	1
PEG 4000	5
Povidon	5
Starch	5
Talk	1
TiO ₂	1

Matriks çözeltisinin hazırlanması sırasında, standart LEF çözeltisi ile aynı analitik koşulların sağlanmasına özen gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin verilen aralığında bulunan üç farklı derişimdeki standart LEF çözeltisi (1.46×10^{-5} , 4.03×10^{-5} , 7.03×10^{-5} M) matriks çözeltisine eklenerek karıştırılmış ve sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi kullanılarak her bir set için 8 enjeksiyon yapılmak suretiyle optimum koşullarda ölçülmüştür. LEF içeriğine karşılık gelen pik alanı değerleri kalibrasyon eşitliğinde çözülerek, yüzde geri kazanım, doğruluk ve tekraredilebilirlik hesaplanmıştır. Doğruluk değerlerinin hesaplanması için,

$$\text{Doğruluk} = [(\text{ölçülen derişim} - \text{eklenen derişim}) / \text{eklenen derişim}] \times 100$$

eşitliği kullanılmıştır. Yüzde geri kazanım ve doğruluk değerleri, Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin doğruluk sonuçları (n=8)

Eklenen LEF	Bulunan LEF(M) (ortalama±SD)	(%) Geri kazanım	Doğruluk	RSD %
1.46×10^{-5}	$1.51 \times 10^{-5} \pm 2.75 \times 10^{-7}$	103.3	3.28	1.82
4.03×10^{-5}	$4.15 \times 10^{-5} \pm 6.79 \times 10^{-7}$	103.0	3.01	1.64
7.03×10^{-5}	$7.35 \times 10^{-5} \pm 6.24 \times 10^{-7}$	104.6	4.57	0.85

Doğruluk için, kabul edilebilirlik kriteri, % 15'den fazla sapmanın olmamasıdır [15]. Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi, yardımcı maddelerin LEF tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı söylenebilir ve doğruluk sonuçları, bu kriterin oldukça altında bulunmuştur.

4.2.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile LEF İçeren Tabletlerde Miktar Tayini

Validasyonu 4.2.1. - 4.2.4. alt bölümlerinde gösterilen sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin uygulaması, 20 mg LEF içerdiği bilinen farmasötik tabletlerde miktar tayini yapılarak gösterilmiştir. Deneysel kısımda tarif edildiği şekilde hazırlanan tablet numuneleri söz edilen optimum koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, doğrusallık bölümünde verilen günler arası eşitlikte çözülerek LEF içeren tabletlerdeki miktarlar ve karşılık gelen yüzdeleri hesaplanmıştır. Tablet bileşenlerinden kaynaklanan ve ölçümleri etkileyecek düzeyde girişim gözlenmemiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler, Çizelge 4.7.'de sunulmaktadır.

USP XXIV farmakopesinde, birim etkin madde içeriği için sağlanması gerekli bulunan koşullar bildirilmektedir [16]. Farmakopeye göre, 10 adet tablet ölçümü yapılmasının ardından etkin madde içeriğinin % 85-115 aralığında bulunması ve ölçümün % bağıl standart sapma değerinin ise % 6 dan az veya eşit olması gereklidir. Geliştirilen yöntemle yapılan ölçümlerde, ARAVA® tablet

içeriği farmakopenin gerektirdiği aralıkta bulunmuştur. Ölçümlerin % bağıl standart sapma değeri % 6 dan oldukça azdır.

Çizelge 4.7. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile LEF'in farmasötik tabletlerindeki miktar tayini sonuçları

Deney No	LEF (mg)	% LEF
1	19.48	97.40
2	19.10	95.50
3	19.10	95.50
4	19.70	98.50
5	19.60	98.00
6	19.14	95.70
Ortalama	19.3	96.8
Standart Sapma	0.27	1.36
% Bağıl Standart Sapma	1.41	1.41
Güven Aralığı (p=0.05)	±0.28	±1.43

4.3. LEF'in UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

4.3.1. UV Spektrofotometri Yönteminin Doğrusallığı

Spektrofotometri, ilaç içerisindeki etken madde tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [17-24]. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile yapılan tablet içerisindeki LEF tayini sonuçlarının doğruluğunu ve kesinliğini karşılaştırmak için UV spektrofotometrik yöntemin kullanılabilceği koşullar araştırılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemle yapılan çalışmalarda LEF'in % 25 etanol içerisinde hazırlanmış olan çözeltisi kullanılmıştır. Maddenin spektrumu 200-350 nm dalga boyu aralığında kuartz küvetler kullanılarak kaydedilmiştir. Kör olarak, % 25 lik etanol çözeltisi kullanılmıştır. LEF, UV dalga boyu alanında 205 nm ve 260 nm lerde iki maksimum absorbans veren spektrum sergilemiştir. Spektrum şekli, Şekil 4.1.'de görülmektedir. 250 nm altındaki dalga boyu değerlerinde absorbans veren maddelerin girişim etkisi arttığı için, 260 nm, çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve kalibrasyon eşitliğinin belirlenmesi için, 1.1×10^{-5} , 1.46×10^{-5} , 1.83×10^{-5} , 2.2×10^{-5} , 2.56×10^{-5} , 2.93×10^{-5} , 3.29×10^{-5} M'lık standart LEF çözeltileri hazırlanarak, 260 nm'deki absorbans değerleri

okunmuştur. Belirtilen derişimler ve bunlara karşılık gelen absorbands değerleri grafiğe geçirildiğinde,

$$A = - 0,0267 + 18543,99 C(M), r = 0.9999$$

eşitliği elde edilmiştir. Elde edilen bu yüksek korelasyon katsayılı doğrusal kalibrasyon eğrisi kullanılarak UV spektrofotometrik yöntemle LEF'in miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.

4.3.2. UV Spektrofotometri Yönteminin Doğruluğu ve Kesinliği

Sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin doğruluğunun incelenmesi amacıyla yapılan deneyler için hazırlanan matriks çözeltisi, spektrofotometrik yöntemin doğruluğunun incelenmesinde de kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan matriks çözeltisine eklenmiş standart LEF çözeltileri, UV-spektrofotometrik yöntem için verilen kalibrasyon aralığında bulunacak şekilde seyreltikten sonra absorbandsları 260 nm de ölçülmüştür. Absorbans değerleri, UV-spektrofotometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eşitliğinde çözülmüş ve karşılık gelen LEF miktarları hesaplanmıştır. UV-spektrofotometrik yöntemle elde edilen doğruluk değerleri, Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. UV-Spektrofotometrik yöntemin doğruluk sonuçları (n=8)

Eklenen LEF (M)	Bulunan LEF(M) (ortalama±SD)	% Geri kazanım	% Doğruluk	% RSD
1.46×10^{-3}	$1.56 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-8}$	106.70	6.69	0.58
4.03×10^{-3}	$4.13 \times 10^{-3} \pm 9.7 \times 10^{-8}$	102.51	2.51	0.24
7.03×10^{-3}	$7.20 \times 10^{-3} \pm 4.03 \times 10^{-7}$	102.50	2.50	0.56

Doğruluk değerleri, kabul kriteri olan % 15 değerinden oldukça düşüktür. Yöntemin kesinliğini gösteren % bağıl standart sapma değerleri, sürekli akış enjeksiyon analizinin doğruluğunun incelenmesi ile elde edilen sonuçlardan daha iyi bulunmuştur. Etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin LEF tayininin doğruluğuna etkisinin olmadığı görülmektedir. Elde edilen verilere göre, spektrofotometrik yöntem kullanılarak tabletlerdeki LEF tayini için doğru ve kesin sonuçlar elde edilebileceği söylenebilir.

4.3.3. UV-Spektrofotometrik Yöntem ile LEF İçeren Tabletlerde Miktar Tayini

LEF'in farmasötik tabletlerinde UV-spektrofotometrik tayini için, tablet numuneleri deneysel kısımda tarif edildiği şekilde hazırlanarak 260 nm dalga boyunda absorbanş değerleri okunmuştur. Bulunan numune absorbanşları, UV-spektrofotometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eşitliğinde çözüldükten sonra tabletlerdeki LEF içeriği ve % LEF miktarları hesaplanmıştır. UV-spektrofotometrik yöntem ile elde edilen tablet analizi sonuçları, Çizelge 4.9.'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.9. UV-spektrofotometrik yöntem ile LEF'in farmasötik tabletlerindeki miktar tayini sonuçları

Deney No	Bulunan LEF (mg)	% LEF
1	19.04	95.20
2	19.50	97.50
3	19.58	97.90
4	19.46	97.30
5	19.34	96.70
6	19.28	96.40
Ortalama	19.4	96.8
Standart Sapma	0.19	0.97
% Bağıl Standart Sapma	0.99	0.99
Güven Aralığı (p=0.05)	±0.20	±1.01

Çizelge 4.9.'dan da görüldüğü gibi tabletlerdeki ortalama LEF miktarı % 96.8 bulunmuştur ve yöntemin % bağıl standart sapması %1'in altındadır.

4.4. Tablet Analizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Geliştirilen sürekli akış enjeksiyon analizi ile elde edilen tablet analiz sonuçları, standart bir yöntem olan UV-spektrofotometrik yöntem sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin doğruluğunu karşılaştırmak için student t- testi, kesinliğini karşılaştırmak için F-testi kullanılarak, sonuçlar % 95 önem düzeyinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları Çizelge 4.10.'da verilmektedir.

Çizelge 4.10. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV-spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması.

	Sürekli akış enjeksiyon analizi	UV-spektrofotometri
Ortalama (n = 6)	19.3	19.4
Standart sapma	0.27	0.19
% Bağıl standart sapma	1.41	0.99
t-testi (p<0.05)	0.15	Tablo $t_{0.05}=2.57$
F testi (p<0.05)	2.02	Tablo $F_{0.05}=5.05$

Standart yöntem olarak kullanılan UV-spektrofotometrik yöntem ile elde edilen tablet içeriği sonuçları, sürekli akış enjeksiyon analizi sonuçları ile kesinlik ve doğruluk açısından karşılaştırıldığında yöntemler arasındaki farkın % 95 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur.

4.5. Sonuç ve Değerlendirme

Sürekli akış enjeksiyon analizi, son yıllarda basitliği, hızlı oluşu, az miktarda numune gerektirmesi ve ucuz olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında; kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekraredilebilirliği ve kısa analiz süresi sağlaması nedenleriyle daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur. Geliştirilen sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin söz edilen niteliklerin yanısıra doğru, kesin ve duyarlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizi, geçerli bir yöntem olan UV-spektrofotometri ile karşılaştırılmıştır. t- ve F- testi sonuçlarına dayanarak yöntemler arasındaki farkın % 95 önem düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz olduğu söylenebilir. Ayrıca yöntemin uygulaması sırasında elde edilen tabletlerdeki LEF içerikleri USP XXIV farmakopesinde verilen koşullarını sağlamaktadır [16].

Burada önerilen sürekli akış enjeksiyon analizi yönteminin basit, doğru, hızlı, duyarlı, ucuz ve kesin bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile geliştirilen yöntem, LEF'in laboratuvarlardaki rutin analizi için önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. PRAKASH, A., JARVIS, B., *Drugs*, **58(6)**, 1137-1164, 1999.
2. DIAS, V.C., LUCIEN, J., LEGATT, D.F., YATSCOFF, R.W., *Ther. Drug Monit.*, **17**, 84-88, 1995.
3. LUCIEN, J., DIAS, V.C., LEGATT, D.F., YATSCOFF, R.W., *Ther. Drug Monit.*, **17**, 454-459, 1995.
4. FAIRBANKS, L.D., CARREY, E.A., RUCKEMANN, K., SWAMINATHAN, R., KIRSCHBAUM, B., SIMMONDS, H.A., *J. Chromatogr. B.*, **732**, 487-493, 1999.
5. SCHMIDT, A., SCHWIND, B., GILLICH, M., BRUNE, K., HINZ, B., *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 276-281, 2003.
6. CHAN, V., CHARLES, B.G., TETT, S.E., *J. Chromatogr. B.*, **803**, 331-335, 2004.
7. ROON, E.N., YSKA, J.P., RAEMAEEKERS, J., JANSEN, T.L.Th.A., WANROOY, M., BROUWERS, J.R.B.J., *J. Pharm. Biom. Anal.*, IN PRESS
8. ZHANG, Q., PANG, W.L., CHEN, H., CHERRINGTON, J., LIPSON, K., ANTONIAN, L., SHAWVER, L.K., *J. Pharm. Biom. Anal.*, **28**, 701-709, 2002.
9. MANGOLD, U., DAX, C.I., SAAR, K., SCHWAB, W., KIRSCHBAUM, B., MULLNER, S., *Eur. J. Biochem.*, **266**, 1184-1191, 1999.
10. SAURINA, J., HERNANDEZ-CASSOU, S., *Anal. Chim. Acta*, **438(1-2)**, 335-352, 2001.
11. www.pharm-marketing.com/bulk_drug_raoa_eng.htm
12. CAPORAL-GAUTIER, J., NIVET, J.M., ALGRANTI, P., GUILLOTEAU, M., HÏSTE, M., LALLIER, M., N'GUYEN-HUU, J.J. and RUSSOTTO, R. *S.T.P. Pharm Pratiques* **2**, 205, 1992.
13. SHABIR, G.A., *J. Chromatogr. A*, **987**, 57-66, 2003.
14. www.rxlist.com/cgi/generic3/leflunomide.htm
15. SHAH, V.P., MIDHA, K.K., DIGHE, S., MCGILVERAY, I.J., SKELLY, J.P., JACOBI, A., *J. Pharm. Sci.*, **81**, 309-312, 1992.

16. The United States Pharmacopeia XXIV, Marck Printing Co., Easton, 2000, s: 2001-2002.
17. TUNÇEL, M., YAZAN, Y., DOĞRUKOL, D., ATKOŞAR, Z., *Analytical Letters*, **24(10)**, 1837-1846, 1991.
18. DOĞRUKOL, D., TUNÇEL, M., *Portugaliae Electrochimica Acta*, **9**, 331-338, 1991.
19. TUNÇEL, M., DOĞRUKOL, D., *Analytical Letters*, **25(6)**, 1087-1094, 1992.
20. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **49(12)**, 928-929, 1994.
21. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **50(10)**, 701-702, 1995.
22. TUNÇEL, M., DOĞRUKOL-AK, D., *Pharmazie*, **52(1)**, 73-74, 1997.
23. DOĞRUKOL-AK, D., GÖKÖREN, N., TUNÇEL, M., *Analytical Letters*, **31(1)**, 105-116, 1998.
24. DOĞRUKOL-AK, D., TUNALIER, Z., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **53(4)**, 272-273, 1998.