

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**FARMASÖTİK JELLERDE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ ile
DEKSPANTENOL, MEPİRAMİN MALEAT ve LİDOKAİN
HİDROKLORÜR MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülden BAŞMAKCI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

ANKARA

(EKİM 2009)

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**FARMASÖTİK JELLERDE KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİ ile DEKSPANTENOL, MEPİRAMİN MALEAT ve LİDOKAİN
HİDROKLORÜR MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülden BAŞMAKCI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

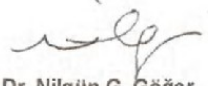
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 02/2009-13 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
(EKİM 2009)

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir


Tez Savunma Tarihi : 07/10/2009



Prof. Dr. Nilgün G. Göger
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Sibel A. Özkan
Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Nusret Ertaş
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	VI
Tablolar	VII
Simgeler ve Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.2. Dermatolojik İlaçların Sınıflandırılması	2
2.3. Dekpantenol ile İlgili Genel Bilgiler	6
2.3.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	6
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri	6
2.4. Mepiramin ile İlgili Genel Bilgiler	8
2.4.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	8
2.4.2. Farmakolojik Özellikleri	9
2.5. Lidokain ile İlgili Genel Bilgiler	10
2.5.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	10

2.5.2.	Farmakolojik Özellikleri	10
2.6.	Tayin Yöntemleri	12
2.6.1.	Dekspantenol için Tayin Yöntemleri	12
2.6.2.	Mepiramin için Tayin Yöntemleri	14
2.6.3.	Lidokain için Tayin Yöntemleri	15
2.7.	Kapiler Elektroforez	19
2.7.1.	Teorik Bilgiler	19
2.7.2.	Kapiler Elektroforez Cihazının Kısımları	26
2.7.3.	Kapiller Özellikleri	27
2.7.4.	Numune Enjeksiyonu	29
2.7.5.	Güç Kaynağı	30
2.7.6.	Kullanılan Dedektörler	31
2.7.7.	Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi	33
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	36
3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	36
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	36
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.1.3.	Kullanılan Farmasötik Preparatlar	37

3.2.	Ön Deneysel Çalışmalar	37
3.2.1.	Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.2.2.	Farmasötik Preparatın Analize Hazırlanması	38
3.3.	Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Deneyleri	38
3.3.1.	Kapilerin Şartlandırılması	38
3.3.2.	Numunenin Cihaza Verilmesi	39
3.3.3.	Yöntemin Optimizasyonu	39
3.3.4.	Kalibrasyon Doğrularının Çizimi	40
3.4.	Validasyon Deneyleri	41
4.	BULGULAR	42
4.1.	Optimum Yöntem Parametresinin Seçimi	42
4.1.1.	Elektrolit Seçimi	42
4.2.	Cihaz Parametresinin Belirlenmesi	42
4.3.	Geliştirilen Yöntem ile Elde Edilen Bulgular	48
4.3.1.	Kalibrasyon Bulguları	48
4.3.2.	Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları	52
4.3.3.	Farmasötik Preparatın Analiz Bulguları	55
4.3.4.	Geri Kazanım Çalışması Bulguları	58
5.	TARTIŞMA	60

6.	SONUÇ	64
7.	ÖZET	65
8.	SUMMARY	66
9.	KAYNAKLAR	67
10.	EKLER	72
11.	ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER

		<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1.	Kapiler zon elektroforez'de iyonların elüsyon sırası	22
Şekil 2.	Tipik bir elektroferogram	23
Şekil 3.	Elektroosmotik akış ve basınç altındaki akış	24
Şekil 4.	Kapiler elektroforez cihazının şeması	26
Şekil 5.	Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti	28
Şekil 6.	Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri	30
Şekil 7.	Enjeksiyon süresinin sinyal üzerine etkisi	44
Şekil 8.	Enjeksiyon basıncının sinyal üzerine etkisi	45
Şekil 9.	Uygulanan voltajın sinyal üzerine etkisi	46
Şekil 10.	Kapiler sıcaklığının sinyal üzerine etkisi	47
Şekli 11.	Lidokain kalibrasyon doğrusu	48
Şekil 12.	Mepiramin kalibrasyon doğrusu	49
Şekil 13.	Dekspantenol kalibrasyon doğrusu	50
Şekil 14.	Geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroferogramlar	56

TABLolar

Sayfa No.

Tablo 1.	Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler	32
Tablo 2.	Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler	40
Tablo 3.	Optimizasyon parametreleri	43
Tablo 4.	Geliştirilen yöntemin analitik performans verileri	51
Tablo 5.	Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	52
Tablo 6.	Mepiramin gün içi ve günler arası analiz sonuçları	53
Tablo 7.	Lidokain gün içi ve günler arası analiz sonuçları	54
Tablo 8.	Dekspantenol gün içi ve günler arası analiz sonuçları	54
Tablo 9.	Geliştirilen CE yönteminde sistem uygunluk testi sonuçları	55
Tablo 10.	Mepiramin miktar tayini sonuçları	57
Tablo 11.	Lidokain miktar tayini sonuçları	57
Tablo 12.	Dekspantenol miktar tayini sonuçları	58
Tablo 13.	Mepiramin geri kazanım sonuçları	59
Tablo 14.	Lidokain geri kazanım sonuçları	59

i. SİMGELER VE KISALTMALAR

\bar{X}	Aritmetik ortalama
%BH	% Bağıl Hata
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
ACE	Afinite kapiler elektroforezi
BSS	Bağıl standart sapma
CE	Kapiler elektroforez
CCE	Kiral kapiler elektroforez
CEC	Kapiler elektrokromatografi
CGE	Kapiler jel elektroforez
CIEF	Kapiler izoelektrik odaklama
CITP	Kapiler izotakoforez

CZE	Kapiler zon elektroforez
DEK	Dekspantenol
EOF	Elektroosmotik akış
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kV	Kilovolt
LID	Lidokain
LOD	Gözlenebilme sınırı, Limit of Detection
LOL	Doğrusallık limiti, Üst tayin sınırı, Limit of Linearity
LOQ	Alt Tayin sınırı, Limit of Quantification
N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı)
r	Korelasyon katsayısı
R, r ²	Determinasyon Katsayısı
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
t _{enj}	Enjeksiyon süresi

P_{enj}	Enjeksiyon basıncı
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-VIS	Ultraviyole – Görünür Bölge
V	Volt

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Dekspantenol (DEK), mepiramin (MEP) ve lidokain (LID)'in üçlü kombinasyonları çabuk etki gösteren antialerjik, antienflamatuar, antipruritik ve anestezi preparatlarıdır. Aynı zamanda antiseptik özelliklere de sahiptirler. Bu etken maddeleri içeren farmasötik preparatın analizi için valide edilmiş, doğru, kesin, kolay uygulanabilen, özellikle de düşük maliyetli analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Kapiler elektroforez, ilaç analizlerinde sıkça uygulanan bir yöntemdir. Adı geçen üçlü kombinasyondaki maddelerin aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine kaynaklarda rastlanmamış olması, bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

Bu çalışmanın amacı, üçlü karışım halindeki farmasötik preparatlardan Dekspantenol, Mepiramin ve Lidokain'in aynı anda analizi için var olan yöntemlere göre üstünlükleri olan alternatif bir analiz yöntemi geliştirmektir. Kapiler elektroforez, diğer analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, kimyasal tüketimi ve maliyeti daha az, ayırım etkinliği yüksek, hızlı, doğru, tutarlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Bu nedenle kapiler elektroforez yöntemiyle Dekspantenol, Mepiramin ve Lidokain içeren jel preparatlarda her bir maddenin aynı anda miktar tayini için optimum yöntem parametreleri araştırılmış, optimize edilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gözlenebilirlik sınırı, alt ve üst tayin sınırları, doğrusallık aralığı, kesinlik, doğruluk, seçicilik ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Dekspantenol, mepiramin ve lidokain üçlü kombinasyon olarak jel formundaki farmasötik preparatlarda kullanılmaktadır. Bu preparatlar çabuk etki gösteren antialerjik, antienflamatuar, antipruritik ve anestezik bir preparatlardır ve aynı zamanda antiseptik özelliğe de sahiptirler.

Bu preparatlar güneş yanıkları, böcek sokmaları, ürtiker, kaşıntı ve birinci sınıf yanıkların tedavisinde kullanılır¹.

2.2.Dermatolojik İlaçların Sınıflandırılması

I.Kortikosteroidler (Glukokortikoidler) (Topikal Dermatolojik)

II. Antihistaminikler (Topikal Dermatolojik)

III. Lokal Anestezikler ve Antipruritikler (Topikal Dermatolojik)

IV. Antipsöriyatik İlaçlar

IV-I.Antipsöriyatik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

Amonyaklı Civa

Antralin

Huşağacı katran yağı

Kalsipotrien

Katran

Katran ve katran yağları

Kömür katranı

Metoksalen

IV-2.Antipsöriyatik İlaçlar (Sistemik Dermatolojik)

Alefasept

Asitretin

Efaluzumab

Etretinat

İkatibant

Metoksalen

Metotreksat

Metotreksat Sodyum

Siklosporin

V.Astrenjan Ajanlar (Topikal Dermatolojik)

VI.Güneş Işığına Karşı Koruyucu İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

VII.Antiinfektif İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

VII-1Antiseptik ve Dezenfektanlar (Topikal Dermatolojik)

Kinolin Türevleri

Biguanidler ve Amidinler

Kuaterner Amonyum Bileşikleri

Fenol ve Türevleri

Nitrofuran Türevleri

İyotlu İlaçlar

Cıvalı Bileşikler

Diğer Antiseptik ve Dezenfektanlar

VII-2.Antibiyotikler (Topikal Dermatolojik)

Tetrasiklinler (Topikal Dermatolojik)

Diğer Antibiyotikler (Topikal Dermatolojik)

VII-3.Antiviral İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

VII-4.Diğer Antiinfektifler (Topikal Dermatolojik)

VII-5.Sülfonamidler (Topikal Dermatolojik)

VII-6.Ektoparazitisidler

VII-7.Antifungaller

VII-7-1.Topikal Kullanılan Antifungaller (Topikal Dermatolojik)

Antibiyotikler

İmidazol ve Triazol Türevleri

Topikal Olarak Kullanılan Diğer Antifungaller

VII-7-2. Sistemik Kullanılan Antifungaller

VII-8 Antineoplastik İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

VII-9. Pigmentasyon Ajanları (Topikal Dermatolojik)

VII-10. Hidrotik, Emoliyan ve Koruyucu Preparatlar (Topikal Dermatolojik)

Emoliyanlar ve Yağ Banyoları (Topikal Dermatolojik)

Deride Bariyer Oluşturan Preparatlar

Üre Preparatları

VII-11. Enzimler (Topikal Dermatolojik)

VII-12. İmmünosüpresifler (Topikal Dermatolojik)

VII-13. İmmüno stimulanlar (Topikal Dermatolojik)

VII-14. Akne Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Anti-Akne İlaçlar (Topikal Dermatolojik)

Retinoidler (Topikal Antiakne)

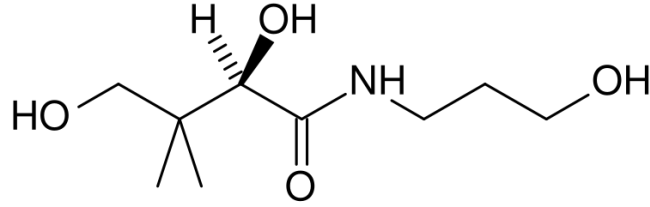
Kükürtlü İlaçlar

Peroksitler (Topikal Antiakne)

Antiinfektifler (Topikal Antiakne)²

2.3. Dekspantenol ile İlgili Genel Bilgiler

2.3.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri



Kapalı formülü : C₉H₁₉NO₄

Molekül ağırlığı : 205.3 g/mol

Kimyasal adı : (R)-2,4-Dihidroksi-N-(3-hidroksipropil)-3,3-dimetilbutanamid

Diğer adları : D-pantenol, dekstro-pantotenil alkol, pantotenol³.

Dekspantenol (DEK) berrak, kokusuz veya hafif karakteristik kokulu, higroskopik ve viskoz bir sıvıdır. Su, metil alkol ve propilen glikolde serbestçe çözünür; kloroform ve eterde çözünür; gliserolde hafifçe çözünür. Bekletildiğinde kristallenebilir⁴.

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Dekspantenol, parenteral yoldan kullanılan gastrointestinal bir stimulandır. Koenzim A'nın bileşimine giren pantotenik asit, çeşitli metabolik olaylara katılır. Kolin'in asetilkolin'e dönüştürülmesini sağlayan asetilasyonu kolaylaştırır. Epitel dokusunun oluşumunda ve normal işlevini sürdürmesinde pantotenik asit önemli rol oynar. Dekspantenol, B vitamini

kompleksinin bir faktörü olan pantotenik asit'in alkol formudur. Dekspantenol, pantotenik asitten daha hızlı ve daha çok absorbe olur; bu durum özellikle topikal uygulama açısından önem taşır. Dekspantenol, cerrahi girişim sonrası ileus'un önlenmesi için proflaktik olarak da kullanılır. Gastrointestinal aktivitenin zayıfladığı durumlarda da endikedir. Pantotenik asit için gerçek bir eksiklik tablosu tanımlanmamıştır. Buna rağmen multivitamin preparatlarında D-pantotenik asit veya rasemik şekli, kalsiyum veya sodyum tuzları ya da dekspantenol şeklinde katılır.

Pantotenik asit besinlerde yaygın olarak bulunur. Hububat ve baklagiller pantotenik asit bakımından en zengin besin kaynaklarıdır. Pantotenik asit koenzim A'nın bileşimine girer. Koenzim A, asetilkoenzim A şeklinde vücutta birçok metabolitik olayda rol oynar. Karbonhidrat metabolizması, asetilkolin sentezi, kolestol sentezi, karaciğerde ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin asetillenmesi ve biyotransformasyonu bunlardan başlıcalarıdır. Ayrıca, süksinilkoenzim A şeklinde sitrik asit döngüsünde ve hem sentezinde rol oynar.

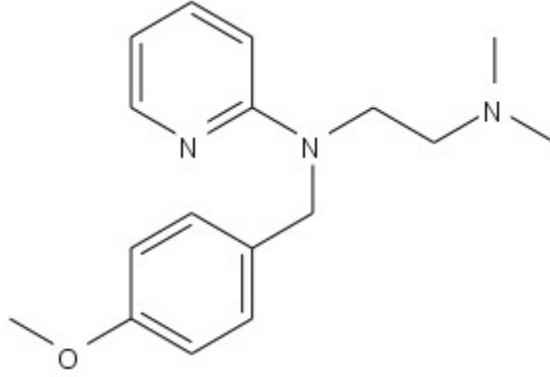
Dekspantenol asetilkolin sentezi için gereksinim duyulan öncü maddedir. Asetilkolin normal gastrointestinal aktivitenin sürdürülmesini sağlayan parasempatik aktivite için gereklidir. Bu dekspantenolün dinamik ileus tedavisindeki etki mekanizmasını açıklayabilir.

Dekspantenol oral, paranteral ve topikal olarak uygulanır. Absorbe olduktan sonra karaciğerde pantotenik asite dönüşür ve endorejen vitamin depolarına katılır. Topikal olarak pomat, losyon ve benzeri farmasötik şekiller halinde uygulandığında deriden hızla absorbe olur. Pantotenik asit, kanda başta β -globulinler ve albümine olmak üzere plazma proteinlerine bağlanır. Sağlıklı erişkinlerde tam kanda yaklaşık 500-1000 $\mu\text{g/L}$ ve serumda 100 $\mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda bulunur.

Pantotenik asit insan vücudunda metabolize olmaz; bu nedenle de oral dozu %60-70 idrar yoluyla, geri kalan bölümü de dışkıyla değişmemiş halde atılır. Erişkinlerde idrarla itrah edilen pantotenik asit miktarı 2-7 mg, çocuklarda ise 2-3 mg'dır^{2,5}.

2.4. Mepiramin ile İlgili Genel Bilgiler

2.4.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri



Kapalı formülü : $C_{17}H_{23}N_3O \cdot C_4H_4O_4$

Molekül ağırlığı : 401.5 g/mol

Kimyasal adı : 2- [(2-Dimetilaminoetil)(p-methoksibenzil)amino]piridin maleat

Diğer adları : Pirilamin maleat³

Mepiramin (MEP) kokusuz veya hafif kokulu, beyaz veya sarımsı beyaz renkte kristalize bir tozdur. Erime sıcaklığı 99°C'dir. Suda çok çözünür; alkol ve kloroformda serbestçe çözünür, eterde çok hafif çözünür^{4,6}.

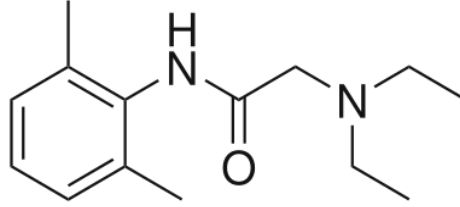
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Mepiramin antimuskarinik ve santral sedatif etkileri güçlü ve etilendiamin türevi bir antihistaminiktir. Esas olarak aşırı duyarlık reaksiyonları ve pruritik cilt hastalıklarının semptomatik tedavisinde kullanılır. Ayrıca öksürük ve soğuk algınlığının semptomatik tedavisi için kullanılan preparatların bileşimine girer. Bu tip preparatlarda bulunmasının nedeni antikolinergik etkisine bağlı olarak nazal ve sinüs boşluklarını kurutmasıdır. Mepiramin maleat'ın gözdeki alerjik durumların tedavisinde kullanılan oftalmik preparatları da bulunmaktadır. %2'lik jelleri topikal olarak böcek ısırma ve sokmalarında; ciltte aşırı duyarlılık ve kaşıntı ile seyreden durumların semptomatik tedavisinde kullanılır. Bazı ülkelerde parenteral kullanımına özgü preparatları da vardır.

H₁-reseptör antagonistleri kromolin ve nedokromilinin yaptığı gibi histaminin salıverilmesini engellemez; bunun yerine H₁- reseptörlerine bağlanmak için serbest histamin ile yarışmaya girer. Böylece gastrointestinal kanal, genel kan damarları ve bronş düz kasında H₁-reseptörleri düzeyinin de histaminin etkilerini bloke eder. H₁-reseptörlerinin blokajı etkilenen bölgede histamine bağlı ödem, kızarıklık ve pruritusu baskılar. H₁- antagonistleri değişen derecede antikolinergik etki de gösterir; etilendiamin türevi antihistaminiklerin antikolinergik etkileri güçlüdür. Mepiramin maleat öksürük merkezi üzerinde direkt süpresif etki yapar ve SSS'de yaptığı depresyonla sedasyon oluşturur. Böcek ısırılmalarında, küçük yanıklarda veya zedelenmelerde topikal olarak uygulandığında lokal iyileşme sağlayabilir. Bu etkisi sinir membranında sodyum iyonlarına karşı geçirgenliği azaltmasına bağlıdır ve böylece sinir uyarılarının iletimi inhibe olur. Uzun süreli kullanıldığında etkilerine karşı tolerans gelişir^{2,5}.

2.5. Lidokain ile İlgili Genel Bilgiler

2.5.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri



Kapalı formülü : C₁₄H₂₂N₂O

Molekül ağırlığı : 234.3 g/mol

Kimyasal adı : 2-Dietilaminoaseto-2',6'-ksilidid
veya 2-(Dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil)
asetamid³

Lidokain (LID) beyazdan sarıya çalan renkte karakteristik kokulu kristal bir tozdur. Erime sıcaklığı 66-70°C arasında değişir. Pratik olarak suda çözünmez; alkol, kloroform veya metilen klorürde çok çözünür; eterde serbestçe çözünür; yağlarda çözünür. Lidokain, prilidokain ile erime noktası her iki bileşenden daha düşük olan bir karışım oluşturur. Bu ötektik karışım topikal dozaj formlarında kullanılır⁴.

2.5.1. Farmakolojik Özellikleri

Lidokain yaygın olarak kullanılan bir antiaritmik ve lokal anesteziktir. Antiaritmik ilaçlar sınıflandırılmasında Ib grubunda yer alır; meksiletin, tokainid ve fenitoin de bu grupta yer alırlar. Paranteral yoldan etkin bir antiaritmik olarak aktivite gösterir ve yaşamı tehdit eden akut

aritmilere karşı ilk sıra ilaç durumundadır. Migren baş ağrısı, hıçkırık, ve kanser ağrısında kullanılır. Lokal anestezi için kullanılmak üzere ointment, jel veya oral çözeltileri ile lokal anesteziye özel enjeksiyonluk preparatları vardır.

Lidokain'in antiaritmik etkileri miyokard hücre membranında bulunan "hızlı" kanallardan sodyumun hücre içine girişini inhibe etmesine dayanır, böylece repolarizasyon sonrası dinlenme periyodu uzar. Diğer lokal anestezikler gibi hücre membranından sinirsel uyarıların oluşumu ve iletimini de inhibe eder. Lokal anesteziklerin sistemik absorpsiyonu santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde etkilere yol açabilir. Terapötik dozlarda ulaşılan kan konsantrasyonlarında, kalpteki iletim, eksitabilite, refrakterlik ve periferik vasküler dirençte değişiklikler olabileceği bildirilmiştir. Toksik kan konsantrasyonları bazen ölümcül olabilen Atriyoventriküler (AV) blok, ventriküler aritmi ve kalp durması ile sonuçlanan kardiyak iletim ve eksitabilite depresyonuna yol açar.

Lidokain oral, paranteral veya perkütan yoldan uygulanır. Oral verilmesini takiben hemen hemen bütünüyle absorbe olur, fakat karaciğerde yoğun bir ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve bu nedenle sistemik biyoyararlanımı sadece %35 düzeyinde kalır. Lidokain sistemik etki için oral yoldan kullanılmamasına rağmen, ağızda topikal uygulama için hazırlanmış konsantre oral çözeltilerinin bir bölümünün absorpsiyonu mümkündür.

İntravenöz(IV) enjeksiyonundan sonra ilaç iki faza ayrılır. Erken faz Lidokain'in çok fazla kanlanan dokulara dağıldığı fazdır. İkinci faz esnasında ilaç yağ dokusu ve iskelet kaslarına dağılır. IV yoldan verilen dozların etkisi hemen başlarken, intramuskuler (IM) verilen bir dozun etkisinin başlaması 5-15 dakika sonra olur. IV bir dozun süresi 10-20 dak. ve IM bir dozun etki süresi ise 60-90 dak.'dır.

Lidokain karaciğerde kapsamlı bir şekilde iki aktif bileşiğe metabolize olur. Bunlardan biri lidokain kadar güçlü aktivite gösteren monoetilglisineksilid, diğeri ise Lidokain'in ancak %25'i kadar aktivite gösteren glisineksilid'tir. Lidokain'in sağlıklı bireylerde başlangıç yarı ömrü 7-30 dak., terminal yarı ömrü ise 1.5-2 saattir. Lidokain subkütan enjeksiyondan sonra dolaşıma sadece çok küçük miktarda girer. Mukoz membranlara topikal olarak uygulandığında etkisi 1-2 dak. içerisinde başlar ve 30-60 dak. devam eder^{2,7}.

2.6. Tayin Yöntemleri

2.6.1. Dekspantenol için Tayin Yöntemleri

Moreno ve Salvado multivitamin içeren farmasötik preparatlarda suda ve yağda çözünen vitaminlerin aynı anda tayinini ters faz HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Suda çözünen vitaminlerden olan dekspantenol tayini için katı faz ekstraksiyonunu takiben ters faz Nova-Pack C₁₈ (150x3.9 mm, 4µm) kolon, mobil faz olarak 0.05 M amonyum asetat ve metanol karışımı gradient olarak kullanılmıştır. Akış hızı 1mL/dak olup, tayin 270 nm'de UV dedektör ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğu %78-%116 geri kazanım oranlarıyla test edilmiştir⁸.

Shehata ve çalışmaları arkadaşları kozmetik ürünlerde ve farmasötik formülasyonlarda pantenol tayini için iki yöntem önermişlerdir. İlk yöntem pantenolün alkali hidrolizine maruz kaldığı kolorimetrik yöntemdir. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan β-alanol vanilin (Duqënois reaktifi) ile reaksiyona sokulmuş, oluşan renkli türevin absorbansı 406 nm'de ölçülmüştür. Bu yöntemde doğrusal aralık 50-500 µg/mL olarak belirlenmiştir. İkinci yöntemde opantenol alkali hidrolizinden sonra ninhidrin ile muamele edilmiştir. Oluşan floresans ürünün uyarma dalga boyu 385 nm ve emisyon dalga boyu 465 nm olarak bulunmuştur. Doğrusal aralık 0.01-3 µg/mL olarak belirlenmiştir⁹.

Havlikova ve çalışma arkadaşları topikal jel içersindeki kalsiyum pantotenat ve koruyucu maddeler olan metil paraben ve propil paraben tayinlerini aynı anda ters faz-HPLC-UV yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada Zorbax TSM (250 mmx4.6 mm, 5µm) ve Hypersil ODS(250 mmx4.6 mm, 5µm) kolonları, mobil faz olarak metanol: fosforik asit pH: 2.5, 65: 35 (v/v) karışımı kullanılmış, tayin 214 nm'de yapılmıştır. Akış hızı 0.7 mL/dak olarak belirlenmiştir ve analiz süresi 12 dakikadır¹⁰.

Kulikov ve Zinchenko aerosol ve jel içerisindeki dekspantenolün tayini için isokratik HPLC yöntemi geliştirmişler ve yöntemi valide etmişlerdir. Çalışmada Vydac Proteins C4 kolon, mobil faz olarak sulu trifloroasetik asit çözeltisi kullanılmış ve tayin 206 nm'de yapılmıştır. 13.0-130 µg/mL aralığında doğrusaldır. Yöntemin geri kazanımı oldukça iyidir ve gün içi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri %1.0' den küçüktür. Validasyon parametrelerinden spesifiklik, doğruluk, sağlamlık da belirlenmiştir¹¹.

Golubitskii ve çalışma arkadaşları farmasötik preparatlarda bazı multikomponentlerin tayini için gradient HPLC yöntemini kullanmışlardır. Nazal spreylerde dekspantenol tayini için mobil faz olarak 0.025 M CH₃CN ve KH₂PO₄ (pH:3.0)'ın değişen oranlardaki karışımı kullanılmış akış hızı 1mL/dak olarak belirlenmiş ve tayin 210 nm'de UV dedeksiyonla yapılmıştır¹².

USP 32, BP 2007 ve Avrupa Farmakopesi 6.0 dekspantenol miktar tayini için 0.1 M perklorik asit çözeltisindeki dekspantenolün naftolbenzein indikatörü kullanılarak 0.1 M potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile titrasyona dayalı bir yöntem önermektedir^{6,13,14}.

Xie ve çalışma arkadaşları bulk ilaçlarda pantenolün enantiyomerik saflığını saptamak için bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve

yöntemi valide etmişlerdir. Bu yöntem pantenolün 3,5-dinitrobenzoil klorür içinde türevlendirilmesine dayanmaktadır. Çalışmada Kromasil CHI-DMB (250 9 4.6 mm) kolon, mobil faz olarak n-hekzan: etanol (95:5 v/v) karışımı kullanılmış akış hızı 1.5 mL/dak olarak belirlenmiş ve tayin 265 nm'de yapılmıştır. Geri kazanımlar %98.3 ve %101.4 arasındadır ve bağıl standart sapma değeri %1.6'dan azdır¹⁵.

2.6.2 Mepiramin için Tayin Yöntemleri

Aksu ve çalışma arkadaşları mepiramin maleat, lidokain hidroklorür ve dekspantenolü içeren farmasötik preparatlarda eşzamanlı tayini için kemometrik yöntem geliştirmişlerdir. Deneysel kalibrasyon için 27 örnek hazırlanmıştır. Konsantrasyon aralıkları Mepiramin için 2, 3, 4 µg/mL, Lidokain için 2, 3, 4 µg/mL ve Dekspantenol için 8, 10, 12 µg/mL' dir. Absorbans değerleri 190 ve 340 nm aralığında kaydedilmiştir¹⁶.

BP 2007 ve Avrupa Farmakopesi 6.0 mepiramin miktar tayini için susuz asetik asitte çözünen mepiraminin 0.1 M perklorik asitle titrasyonuna dayalı potansiyometrik bir yöntem önermektedir^{6,14}.

Louhaichi ve çalışma arkadaşları dekstrometorfan hidro bromür, prilamin maleat ve sodyum benzoat içeren soğuk algınlığı şuruplarında eş zamanlı tayin için bir LC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem iyon çiftleştirici ajan olarak sodyum klorür ile heptan sülfonatın yer değiştirmesi esasına dayanmaktadır. Mobil faza sodyum klorür ilavesiyle ilaçların alıkonma davranışları değişmektedir. Kromasil C₁₈ kolon ve mobil faz olarak 29: 71 oranında asetonitril: 0.1 M dihidrojen fosfat (0.1 M NaCl içeren) karışımı izokratik olarak kullanıldığında maddelerin ayrımı 8 dakika daha erken gerçekleşmiştir. Analiz 1mL/dak akış hızı ve 220 nm dalga boyunda UV dedeksiyonla gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusallık aralığı

1-140 µg/mL' dir ve r^2 0.999'dan daha iyidir. Dekstrometorfan hidrobromür ve prilamin maleat'ın tayin alt sınırları sırasıyla 0.10 ve 0.12 µg/mL olarak tespit edilmiştir¹⁷.

2.6.3. Lidokain için Tayin Yöntemleri

Rehim ve çalışma arkadaşları lidokain ve altı metabolitinin kromatografik davranışlarını incelemek için gaz kromatografi yöntemini kullanmışlardır. Farklı üreticilerin ürettiği geniş polarite aralıklarında on farklı silika kaplı kapiler kolon denenmiştir. Nonpolar kolonlar olan HP1 ve Rtx-1 kolonu ile yapılan analizlerde rezolüsyon ve pik simetrisinin, HT5 ile yapılan analizlere göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Yüksek polariteye sahip BPX70 kolonu ile yedi analitten sadece beşi ayrılabilmiştir. Genellikle orta polariteye sahip kolonlar DB17, HP50 ve BPX35 pik simetrisinde en iyi performansı göstermiş ve tüm metabolitlerin ayrımı 10 dakika sürmüştür. Farklı enjeksiyon sıcaklıklarının (200-350°C), birleşenlerin stabilitesi üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Lidokain ve metabolitlerinin LOQ değerleri, azot fosfor dedeksiyonu ile 30-400 fmol aralığında bulunmuştur¹⁸.

Anderson ve çalışma arkadaşları Lidokain ve altı metabolitinin plazmadan ayrımı için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım 35 mM fosfat tamponunun pH'sı Tris ile 3.0'a ayarlanarak, 6 mM setiltrimetilamonyumbromür (CTAB) ve metanol karışımı (%9 h/h) kullanılarak yapılmıştır. CTAB ve metanol oranı optimize edilmiştir. Göç zamanının tekrarlanabilirliğini artırmak için her analiz sonrası kapiler, etanol ile yıkanmıştır. Optimize edilen koşullar altında yedi analit 8.1 dakika içerisinde ayrılmaktadırlar¹⁹.

Gilabert ve çalışma arkadaşları içlerinde lidokainin de olduğu altı farklı lokal anestezi madde tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım için Spherisorb ODS kolon kullanılmış ve UV dedeksiyon 230 nm'de yapılmıştır. Miseller mobil faz olarak sodyum dodesil sülfat ve 1-propanol'ün farklı oranlardaki karışımları incelenmiştir ve 0.15 M SDS+ %1-propanol karışımında (pH 3) en iyi ayırım sağlanmıştır. Sekiz farklı farmasötik formülasyonun analizi sonucu geri kazanım değerleri %93-100.2 arasında tespit edilmiştir²⁰.

Liawruangrath ve çalışma arkadaşları tolperizon ve lidokainin eş zamanlı ayırımı için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Ayırım için Spherisorb ODS kolon, mobil faz olarak %5.5 trietilamin: asetonitril (70/30 h/h) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 0.7 mL/dak'dır ve UV dedeksiyon dalga boyu 254 nm'dir. Dedeksiyon limitleri tolperizon ve lidokain için sırasıyla 0.20 ng/20 µL ve 100 ng/ µL'dir. Tolperizon için geri kazanım değerleri % 99.9 ve %99.7 arasındadır ve RSD değeri 0.66- 0.67'dir. Lidokain için ise geri kazanım değeri %98.9, RSD ise %0.59'dır²¹.

Wang ve çalışma arkadaşları Lidokain ve altı metabolitinin hem sulu elektrolit sistemleri ve hem de düşük pH'da susuz elektrolit sistemleri kullanarak ayırımını kapiler elektroforez yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Sulu sistemde bileşiklerin en iyi ayırımı %15 metanol içeren 60 mM trifloroasetik asit/trietilamin (pH 2.5) karışımında sağlanmıştır. Bu elektrolit sistemi ile yedi bileşik en yüksek verimle ayrılmıştır ve göç zamanları tekrarlanabilir. Ayırımlar fused-silika ve poliakrilamit kaplı kapiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Susuz ortam için ise metanol ve trifloroasetik asit (99:1, h/h) içerisinde 40 mM amonyum asetat kullanılmıştır²².

Wiberg ve çalışma arkadaşları farmasötik solüsyonlarda lidokain tayini için Diyot Array dedektörlü klasik bir HPLC sistemini kolon

bağlanmadan kullanmışlardır. Önerilen yöntemde HPLC sisteminin pompası ve otomatik örnekleyicisi, numunenin dedektöre girişi için otomatik bir yol olarak işlev görmüştür(Akışa enjeksiyon yöntemi, FIA). Absorbans değerleri 190 ve 340 nm aralığında kaydedilmiştir. Deneysel kalibrasyon için konsantrasyon aralıkları 0.02-0.2 mg/mL olan 14 örnek ve 0.1- 0.2 mg/mL olan 12 örnek hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlardan geliştirilen yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğuna karar verilmiştir. Yöntem HPLC ile karşılaştırıldığında daha kısa analiz süresi, basit analitik prosedürler ve az organik çözücü tüketimi gibi üstünlüklere sahiptir²³.

Youngvises ve çalışma arkadaşları lidokain ve tolperizon'un eş zamanlı ayırım ve tayini için miseller LC yöntemini geliştirmişlerdir. Tayin C18 kolon, 0.075 mol/L sodyum dodesil sülfat'ın %7.5 (h/h) isopropanol içindeki çözeltisi mobil faz olarak kullanılarak 0.7 ml/dak akışla ve 210 nm'de Diyod Array Dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon limitleri lidokain ve tolperizon için sırasıyla 0.73 ng/20 µL, 1.43 ng/20 µL'dir. Doğrusallık aralıkları lidokain için 0.124-500 µg/mL ve tolperizon için 1.00-500 µg/mL'dir. Her iki madde için geri kazanım değerleri %98-103 olarak hesaplanmıştır²⁴.

Yin ve çalışma arkadaşları bakterisit, analjezik veya anestezi etkileri olan ofloksazin ve lidokainin hastalardaki medikal prosesini incelemek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla elektrokemilüminesans ile birleştirilmiş kapiler elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Analiz süresini kısaltmak ve analitik performansı arttırmak için ayırma 10 cm kapiler kullanılarak yapılmıştır. 40 cm'lik kapiler elektroforezle karşılaştırıldığında geliştirilen yöntem daha dar bantlarla avantaj sağlamıştır. Optimum koşullar altında Lidokain ve ofloksazin için tayin sınırları 3×10^{-8} M ve 5×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır. Lidokain ve ofloksazinin peşpeşe beş enjeksiyonu için göç zamanı ve pik yüksekliğine ait %RSD değerleri 3.2-3.9 ve 4.7-5.3 olarak bulunmuştur²⁵.

Candioti ve çalışma arkadaşları farmasötik preparatlardaki dört etken madde olan vitamin B₆, vitamin B₁₂, deksametazon ve lidokain analizi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz kapiler zon elektroforez ile silika kapiler kullanılarak gerçekleştirilmiş ve UV dedeksiyon 240 nm dalga boyunda yapılmıştır. Optimum koşullar sodyum fosfat tampon çözeltisi pH 7.0 ve 17.2 kV voltaj uygulanmasıyla sağlanmıştır. Geri kazanım değerleri %98.5- 102.6 olarak bulunmuştur²⁶.

Oliveira ve çalışma arkadaşları lokal anestezi preparatlarda lidokain tayini için elektrokimyasal bir yöntem geliştirmişlerdir. Analiz boron- doped diamond (BDD) elektrot kullanılarak siklik ve kare- dalga voltametri yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10.0 ve 34.4 µg/L olarak tespit edilmiştir. Lidokain geri kazanım değerleri %97.6 ve %99.2 arasındadır²⁷.

Sun ve çalışma arkadaşları, insan idrarında lidokain, prolin ve lomefloksasin tayini için elektrokemilüminesans dedeksiyonlu bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada elektrokemilüminesans reaktif olarak Luminol ve tris(2,2'- bipyridin)rutenyum kullanılmıştır. En iyi rezolüsyon 20 mM pH 6.7 fosfat tamponu kullanılarak gerçekleşmiştir. LOD değerleri lidokain için 0.02 µg/mL, prolin için 0.03 µg/mL ve lomefloksasin için 0.06 µg/mL bulunmuştur. Ayırım 360 saniyede sağlanmıştır. Geri kazanım değerleri %93.3-97.2 arasında ve % RSD değerleri 3.8-4.9 arasında tespit edilmiştir²⁸.

BP 2007 ve Avrupa Farmakopesi 6.0 lidokain miktar tayini için %96'lık etanolde çözünen lidokainin 0.1 M sodyum hidroksitle titrasyonuna dayalı bir potansiyometrik yöntem önermektedir^{6,14}.

USP 32, Lidokain miktar tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermektedir. Yöntemde, mobil faz olarak pH: 3,4 glasiyel asetik asit çözeltisi ve asetonitril (4:1) karışımı, C₁₈ (3,9 mm x 30

cm) kolon, mobil faz akış hızı 1,5 ml/dak, UV dedektör 254 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir¹³.

Lombardo-Agui ve çalışma arkadaşları aralarında lidokainin de olduğu lokal anestezipler ve opium alkaloidleri için kapiler zon elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz bir katı faz ekstraksiyonu sonrası gerçekleştirilmiştir. İdrar örneklerinden geri kazanım değerleri %81-107 arasında bulunmuştur. Yöntem, bu bileşenlerin tayinine uygundur ve elektroforetik analizlerden önceki numune hazırlama basamağı kısadır²⁹.

2.7. Kapiler Elektroforez

2.7.1. Teorik Bilgiler

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu ayırma yöntemini bulan İsveçli kimyacı Arna Tiselius bu buluşu ile 1948' de Nobel Ödülü almıştır. Bu teknikle inorganik anyon ve katyonlar, katekolaminler, amino asitler, ilaçlar, vitaminler, peptitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler, nükleotitler ve polinükleotitler gibi pek çok madde ayrılabilir.

Elektroforez, bir düzlemde bulunan destek ortamında gerçekleşiyorsa "tabaka elektroforezi", kapiler tüp içinde gerçekleşiyorsa "kapiler elektroforez" adını alır.

Elektroforetik ayırmanın temeli ince bir tüp içersindeki sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir miktarının enjeksiyonu sonrası tampon çözeltiye iki ucundaki elektrotlar yardımıyla yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanması sonucu ortamdaki iyonların elektrotlardan birine

göç etmesidir. Numunede bulunan taneciklerin göç hızları taneciklerin yüküne ve büyüklüklerine bağlıdır. Elektroforetik olaylarda numune içersindeki analizi yapılan maddelerin ayırımı, maddenin yük/boyut oranlarının farklı olması esasına dayanır. Bu oranın büyük olması durumunda elektrik alanda iyon daha hızlı hareket eder.

Kapiler elektroforezde uygulanan yöntemlerin sınıflandırılması ve İngilizce kısaltmaları şöyledir^{30,31,32}.

- 1) Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 3) Kapiler izotakofrez (CITP)
- 4) Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5) Kapiler elektromatografi
 - 5.a) Dolgulu kolon elektromatografi (CEC)
 - 5.b) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC)
 - 5.c) Mikroemülsiyon elektrokinetik kapiler kromatografi (MEECC)
 - 5.d) Kiral kapiler elektroforez (CCE)
 - 5.e) Afinite kapiler elektroforez (ACE)
- 6) Mikroçip kapiler elektroforez ve elektrokromatografi (MCE veya MCEC)

CZE, kapiler elektroforezin ilk uygulanmış olan temel türüdür. CZE'de, kapiler içindeki iyonlara iki kuvvet etki eder. Birincisi, uygulanan voltajdan kaynaklanan elektriksel alanın iyon üzerinde oluşturduğu kuvvet

(elektroforetik kuvvet), ikincisi de iyonun bulunduğu tampon çözeltinin akışıdır (elektroosmotik akış). Elektriksel alan, pozitif yüklü iyonlar (katyonlar) üzerinde negatif yüklü elektrot (katot) yönüne doğru bir kuvvet oluştururken, negatif yüklü iyonlar (anyonlar) üzerinde de pozitif yüklü elektrot (anot) yönünde bir kuvvet oluşturur. Çözeltideki nötr moleküller elektriksel alandan etkilenmezler. Elektriksel alanın oluşturduğu kuvvet, iyonlarda elektroforetik göç denen harekete neden olur. İyonların elektroforetik göç hızları yük/çap oranına bağlıdır. Yük/çap oranı büyük olan iyonlar daha hızlı göç ederken, küçük olan iyonlar daha yavaş göç ederler. İyonların göçünü etkileyen diğer kuvvet elektroosmotik akıştır. Bu akışın nedeni, kapilerin iç çeperinde çalışma elektroliti ile SiO^- grupları arasında çift tabaka oluşmasıdır. Kapilerin iç çeperinde pH 3.0'ın üzerinde silanol gruplarının ayrışması ile negatif yüklü SiO^- grupları oluşur. Çalışma elektrolitindeki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşırlar. Çepere çok yakın pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasında elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektrota (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir.

Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}), eşitlik 2.1.'e göre açıklanır.

$$v_{\text{EOF}} = E \cdot \mu_{\text{EOF}} \quad (2.1.)$$

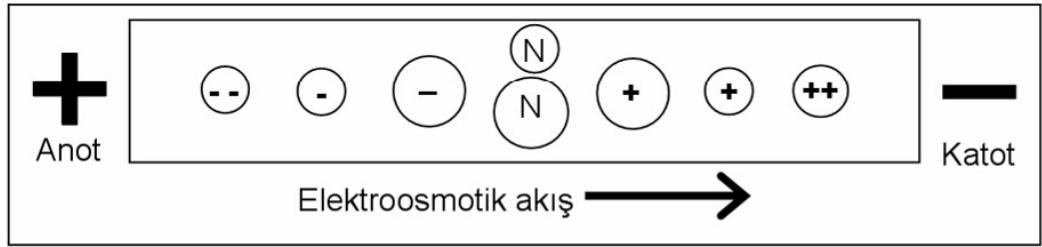
v_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı

E: Elektriksel alan (V cm^{-1})

μ_{EOF} : Elektroosmotik hareketlilik

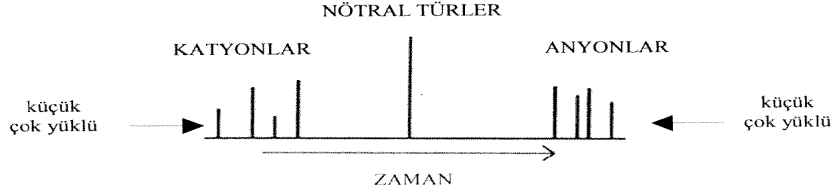
Kapiler çeperine yakın olan hareketli katman ile merkeze yakın olan hareketli katmanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir. Çalışma elektrolitinin dielektrik sabiti arttıkça zeta potansiyeli düşer. Zeta potansiyeli arttıkça, çalışma elektrolitinin elektroosmotik hareketliliği artar.

Elektroosmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE'de elüsyon sırası aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1. Kapiler zon elektroforez'de iyonların elüsyon sırası

Yüklü çözünen maddeler, farklı elektroforetik hareketliliklere sahip oldukları için birbirlerinden ayrılırlar. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden değil yüklü çözünen maddelerden ayrılırlar. Yüksek hareketliliğe sahip, daha fazla yüklü ve boyut olarak daha küçük katyonlar kapilerden ilk olarak geçerler. Kapilerden en son fazla yüklü küçük anyonlar geçerler. Şekil 2'de tipik bir elektroferogram görülmektedir. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden farklı tip kapiler elektroforez ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografi kullanılarak ayrılırlar.



Şekil 2. Tipik bir elektroferogram

EOF'nin ölçülmesi için numune içine iyonize olmayan, dedektörde tanımlanabilen, saf, kapiler duvarıyla etkileşmeyen ve tamponda çözünebilen bir madde eklenebilir. Bu amaçla en sık metanol kullanılmakta olup, aseton ve dimetilsülfoksit de kullanılabilir.

Elektroforetik hız, kapillerin etkin uzunluğu (başlangıçtan dedektöre kadar olan uzunluğu) ve maddenin göç zamanından hesaplanır (Eşitlik 2.2).

$$v_a = v_{ep} + v_{EOF} = l_{etkin} / t_g \quad (2.2.)$$

v_a : Gözlenen elektroforetik hız

v_{ep} : Maddenin elektroforetik hızı

v_{EOF} : EOF hızı

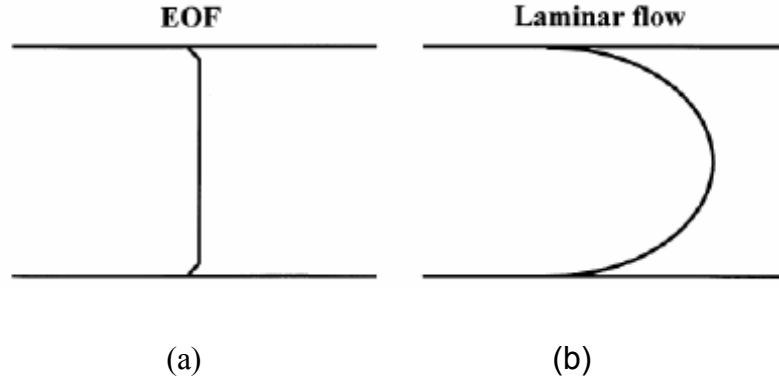
l_{etkin} : Kapillerin etkin uzunluğu

t_g : Göç zamanı

EOF'yi hızlandırmak, yavaşlatmak, durdurmak veya tersine çevirmek için kapillerin iç yüzeyi değişik maddelerle kaplanabilir veya tampona değişik maddeler eklenebilir. Katyonik yüzey aktif maddeler

tampona az miktarda eklenince EOF yavaşlamakta, katyonik yüzey aktif madde derişimi arttırılınca EOF durmakta, daha fazla eklenince de EOF ters yöne dönmektedir. Genelde pH'nın artmasıyla EOF artmaktadır. Çünkü yüksek pH'da kapiler iç çeperindeki SiO^- artar bu da EOF'de artışa neden olur.

Elektroosmotik akış göreceli olarak düz bir profile sahiptir. Şekil 3'de HPLC'deki laminer ve pompa akışı ile bir elektroosmotik akışın karşılaştırılması görölmektedir.



Şekil 3. a) Elektroosmotik akış b) Basınç altındaki akış

Akış profilinin düz olması nedeniyle EOF, kolon kromatografisinde olduğu gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez. Kapiler elektroforezde bant genişlemesi iki nedenle meydana gelir. Numune iyonlarının kapiler çeperinde adsorbsiyonu bantın geriye doğru kuyruklanmasına neden olurken Joule ısınması da bölgesel mikro konveksiyonlar oluşturarak bantın genişlemesine neden olur.

Uygulanabilecek maksimum voltaj deneysel olarak bulunur. Voltajdaki artış elektroosmotik akışı artırır ve göç zamanını azaltır bu da kısa analiz süresine neden olur. Buna rağmen yüksek voltaj normal

koşullarda uygulanmaz. Yüksek voltaj daha yüksek akım demektir ve Joule ısını artırır. Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. 40 kV üzeri voltaj normal koşullarda uygulanmaz çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur³³.

Kapiler sıcaklığındaki değişim tamponun viskozitesinde azalma meydana getirecek ve daha fazla akımın akışına imkan tanıyacaktır. Kapiler içindeki sıcaklığın artışı geniş piklere, tekrar edilemeyen göç zamanlarına, örneğin bozulmasına hatta kapilerde yalıtkan bölgeler oluşması sonucu elektroforetik sistemin kapanışı sonucuna kadar varabilecek şekilde tamponun kaynamasına neden olur. Sonuçların tekrarlanabilirliği için termostatlı sistem sayesinde sıcaklık sabit tutulur.

Kapiler sıcaklığı kontrol edildiği zaman, tamponun iyonik gücündeki veya derişimindeki artış, zeta potansiyelini düşürdüğü için, elektroosmotik akışta azalma meydana gelecektir. Düşük tampon derişimi daha kısa analiz süresi sağlarken, çok düşük derişimler de ise geniş ve simetrik olmayan pikler meydana gelir. Eğer tampon derişimi numune derişiminden düşük ise pik genişlemesi ve kuyruklanma gözlenir. Genel bir kural olarak, tampon derişimi numune derişiminin 100 katı kadar olmalıdır. Tipik tampon derişimi 10-100 mM arasındadır.

Çalışma elektrolitine eklenen organik çözücüler viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli gibi bir takım değişkenleri etkilediğinden sonuçları tahmin etmek zordur. Elektrolite metanol eklenmesi pik simetrisini ve ayırıcılığı iyileştirirken, asetonitril eklenmesi analiz süresini kısaltmaktadır^{34,35}.

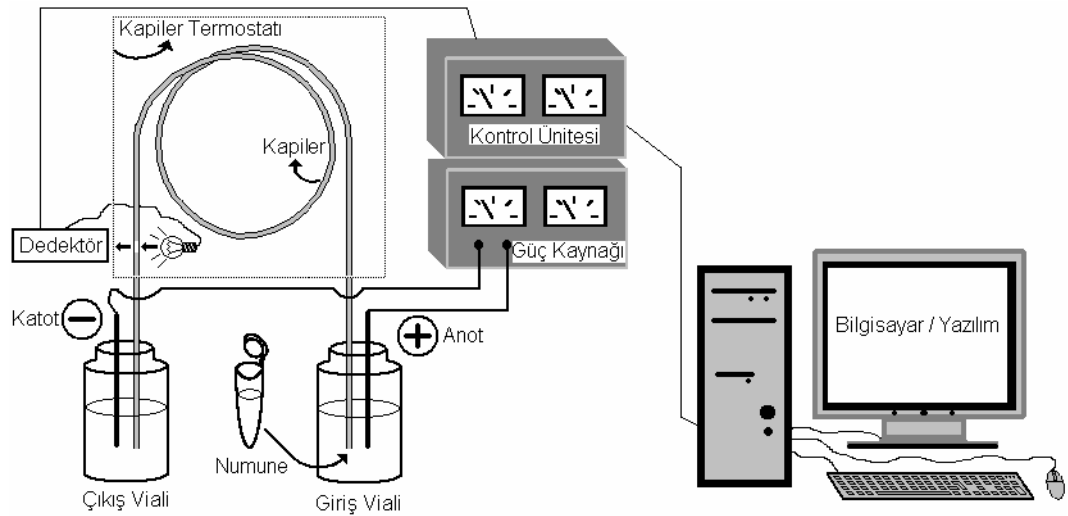
CZE' deki en önemli değişkenlerden biri çalışma elektrolitinin pH' sıdır. Anyonik çözünen maddelerin hareketliliği, yüksek pH' da baskın

olarak negatif yüklü formlar olduğu için, pH arttıkça artar. Düşük pH'da negatif yüklerin çoğu, nötralize olurlar ve hareketlilikleri azalır³⁶.

2.7.2. Kapiler Elektroforez Cihazının Kısımları

Bir kapiler elektroforez cihazının başlıca bileşenleri, bir örnek vialı, kaynak ve hedef vialleri, kapiler, dedektör, yüksek gerilim destekleyicisi ve bilgisayardan ibarettir.

Şekil 4'de bir kapiler elektroforez cihazının şeması görülmektedir.



Şekil 4. Kapiler elektroforez cihazının şeması

Elektroforez, kaynak vialı, kapiler ve hedef vialinin genellikle bir sulu tampon çözeltisi gibi bir elektrolitle doldurulmasıyla başlar. Kapiler başlangıcı, numune vialinin içersine konulur, numune içeri verilir, daha sonra kapiler girişi kaynak vialine yerleştirilir, kaynak ve hedef vialleri arasında bir elektriksel alan uygulanır. Çözünen maddeler kapilerden göç ettiği için, bunlar dedektör tarafından belirlenir. Çıktı, dedektör yanıtının

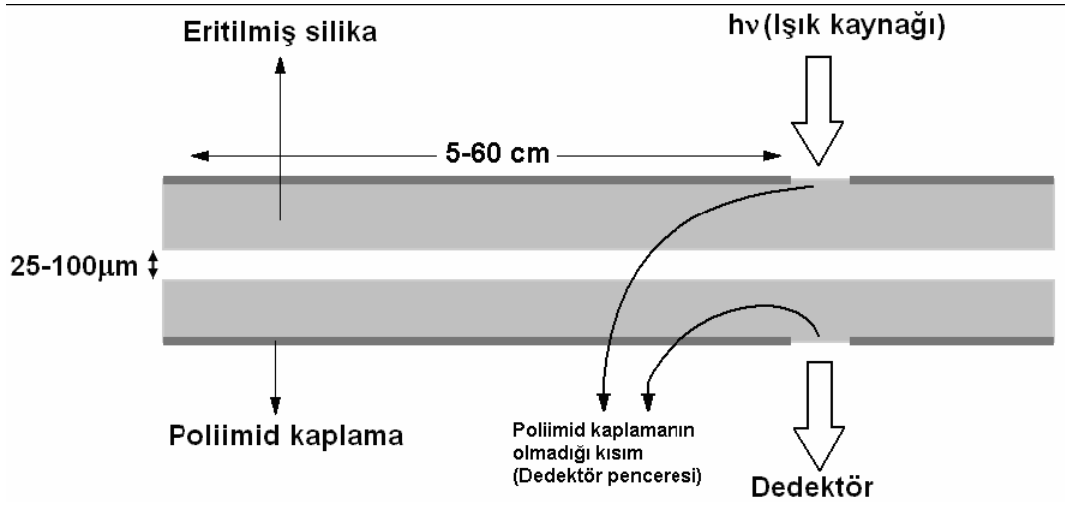
zamana karşı belirtildiği ve pikler halinde görüldüğü elektroferogram olarak verilir.

2.7.3. Kapiler Özellikleri

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin türü ve boyutları uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre seçilir. Kapilerden beklenen, kısa analiz süresinde yeterli ayırımı sağlayabilmesidir. Kapilerin üretildiği materyalin elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması, dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışınları absorblamaması), ayrıca kapilerin kolay kırılmaması gerekir.

Eritilmiş silika, günümüzde en çok kullanılan kapiler materyalidir. Genellikle 30-100 cm uzunluğunda ve 50-70 µm iç çapında ve 375 µm dış çapındadır. Büyük çaplı kapilerlerde yüksek sıcaklık açığa çıkar ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki sıcaklık farkı çok büyük olur. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV dedektörlerde ışık yolunun küçültülmesinden dolayı absorpsiyon düşer ve duyarlılık azalır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı yüksektir³³. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimit ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimit kaplama bu bölgeden kaldırılır. Bu durum aşağıdaki şekilde görülmektedir. Böylece çözünen maddeler kapiler içersinde de dedekte edilebilir. Bu da off- column dedeksiyonuna karşı on-column dedeksiyonu olarak adlandırılır ki bunun içersinde kapiler ve dedektörün arasında bir tüp kısmı bulunur.

Şekil 5'de eritilmiş silika kapilerin buyuna kesiti görülmektedir.



Şekil 5. Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işlemlerinden geçirilmesi gerekir³³. Şartlandırmayla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Eritilmiş silika kapilerin içinden ilk kullanımdan önce 1,0 N NaOH 15 dakika süre ile geçirilir. Bundan sonra yapılacak her analizden önce sırasıyla 0,1 N NaOH, su, ardından çalışma elektroliti geçirilir. Şartlandırma için gereken zaman kapiler uzunluğuyla ilgili olup deneysel olarak tespit edilir.

Kapiler elektroforezde tekrarlanabilir sonuçlar almak için kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numunenin bozulmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerin içinde bulunduğu kasetin içine, termostatlı sistem ile istenen sıcaklığa ayarlanmış havanın fan ile üflenmesi ile sağlanır.

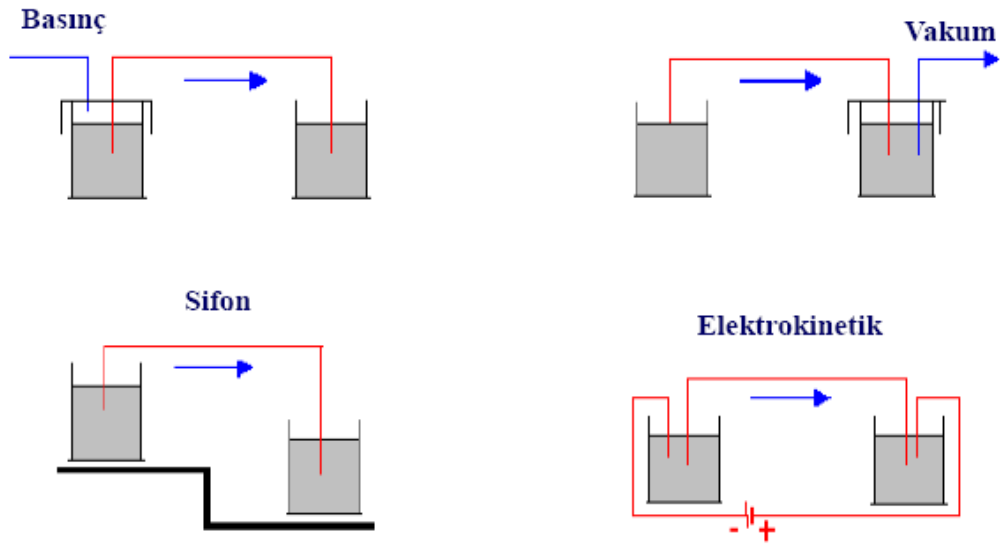
2.7.4. Numune Enjeksiyonu

Numune enjeksiyonu numuneyi kapiler içerisine almak anlamına gelir. Numuneler genellikle birkaç μL 'den birkaç mL'ye kadar hacme sahip numune viallerine doldurulur. Kapilere yalnızca birkaç nL enjekte edildiği için küçük hacimde bir numune yeterlidir.

Kapiler içine numune enjeksiyonu *hidrodinamik* veya *elektrokinetik* olarak yapılabilir. *Hidrodinamik* enjeksiyon basınç veya sifonlama ile yapılır. Sifon enjeksiyonu diğer bir tanımlama ile yer çekimi enjeksiyonu numune vialini numuneyi kapiler içindeki sifona yerleştirecek şekilde kaldırmakla yapılır. Basınç enjeksiyonu ise, ya numune vialini basınca tabi tutmakla ya da hedef vialine vakum uygulamakla gerçekleştirilir. Uygulanan vakumla istenen miktarda numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkartılıp çalışma elektroli viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Elektrokinetik enjeksiyonda ise kapilerin giriş kısmına yerleştirilen numune vialine numune bileşenlerinin kapiler içersinde g etmelerini sağlayacak bir elektriksel alan uygulanır.

şekil 6'da kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri grlmektedir.



Şekil 6. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri

2.7.5. Güç Kaynağı

Güç kaynağının amacı kapiler üzerinde bir elektrik alanı oluşturmaktır. Genelde 30 kV'a kadar voltaj sağlayabilen, voltajı 0.01 kV duyarlılıkta ayarlanabilen doğru akım kaynakları kullanılır. Voltajın analiz süresince sabit kalması için cihaz kesintisiz güç kaynağına bağlanmalıdır. Kapilerden geçen akımın 50 μ A'den az olması istenir. 100 μ A'e kadar

akım kabul edilebilirken 125 μ A'den fazla akım Joule ısınmasına neden olur³⁷.

Pek çok elektroforez ayırımında moleküller anottan katoda doğru göç eder. Bazı durumlarda ise göç yönünün tersine döndüğü görülmüştür. Bu tür durumlarda uygulanan elektrik alanının polaritesi de tersine dönmüştür. Negatif elektrot kapilerin girişinde pozitif elektrot da kapilerin çıkışındadır. Göçün yönü değiştiğinde polaritenin de yönünü değiştirmek gerekir. Yoksa çözünen madde kaynak vialine doğru göç eder, kapilerin veya dedektörün içerisine girmez.

40 kV üstündeki voltajlar normal koşullarda uygulanamaz, çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur³³. Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. Ancak özel elektrik kanalları kullanılarak 120 kV'a kadar voltaj uygulanmıştır³⁹.

2.7.6. Kullanılan Dedektörler

Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtikleri için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları HPLC'de kullanılanlara benzer. Tablo 1' de Kapiler elektroforezde kullanılan dedektör tipleri ve gözlenebilme sınırları verilmiştir³⁰.

Dedektör tipi	Gözlenebilme sınırı ^a
Spektrofotometri	
Absorbsiyon ^b	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻¹⁶
Floresans	
Kapilerden önce türevlendirme	10 ⁻¹⁷ - 10 ⁻²⁰
Kapilerden türevlendirme	8x10 ⁻¹⁶
Kapilerden sonra türevlendirme	2x10 ⁻¹⁷
Dolaylı floresans	5x10 ⁻¹⁷
Termal mercekle ^b	4x10 ⁻¹⁷
Raman ^b	2x10 ⁻¹⁷
Kütle spektrometri	
Elektrokimyasal	10 ⁻¹⁷
İletkenlik ^b	10 ⁻¹⁶
Potansiyometri	Belirtilmemiştir.
Amperimetri	7x10 ⁻¹⁷
Radyometri ^b	10 ⁻¹⁹

Tablo 1. Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler

^a Burada verilen gözlenebilme sınırları 18 pL ile 10 nL'lik geniş bir enjeksiyon hacmi aralığından hesaplanmıştır.

^b Kütle gözlenebilme sınırı 1 nL enjeksiyon hacmi kullanılarak derişim gözlenebilme sınırından çevrilmiştir.

2.7.7. Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi

Kapiler elektroforezde ayırma ve miktar tayininde geliştirilen yöntemin başarılı sayılması için analiz süresinin kısa, etkinliğin, seçiciliğin ve ayırıcılığın yüksek olması gerekmektedir.

Analiz süresinin kısa olması için, yapılması gereken ön işlemlerin ve kapiler şartlandırılmasının az zaman alması, ayrıca cihazdan elde edilen verilerle sonuca kısa zamanda ulaşılabilmesi gerekir. Kapiler elektroforezde ön işlemlerin basit olması ve kısa zaman alması, cihazdan elde edilen verinin yazılım yardımıyla anında sonuca dönüştürülmesi, analiz süresini kısaltmaktadır. Analizin tamamlanması için tüm numune bileşenlerinin dedektöre ulaşması gerektiğinden, bileşenlerin göç zamanlarının kısa olması önemlidir. Eşitlik 2.3' e göre, yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilebilir³⁷.

$$t_g = l_{\text{etkin}} \cdot L_{\text{toplam}} / \mu_g \cdot V \quad (2.3.)$$

t_g : Göç zamanı

V : Uygulanan voltaj

l_{etkin} : Kapilerin etkin uzunluğu

L_{toplam} : Kapilerin toplam uzunluğu

μ_g : Gözlenen elektroforetik hız

Kapiler elektroforezde etkinlik, teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir. Teorik tabaka sayısı göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır. Kapiler uzunluğu teorik tabaka sayısına bölünerek teorik tabaka sayısına eşdeğer yükseklik bulunabilir.

$$N = 16 (t_g / w)^2 \quad (2.4.)$$

N : Teorik tabaka sayısı

t_g : Göç zamanı

w : Pik genişliği

Eşitlik 2.4'e göre, sabit göç zamanında pik genişliği küçüldükçe etkinlik artar.

Eşitlik 2.5'e göre, kapiler elektroforezde uygulanan voltaj arttıkça etkinlik artmaktadır³⁰.

$$N = \mu_e \cdot V / 2D \quad (2.5.)$$

N : Teorik tabaka sayısı

μ_e : Maddenin elektroforetik hareketliliği

V : Uygulanan voltaj

D : Maddenin difüzyon katsayısı

Eşitlik 2.6'da seçicilik katsayısının hesaplanması görülmektedir.

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (2.6.)$$

α : Seçicilik katsayısı

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

t_0 : Sadece EOF ile sürüklenen maddenin göç zamanı

CZE'de çalışma elektrolitinin pH'sı ve organik çözücüler seçiciliği etkiler.

Ayırıcılık, komşu iki pikin birbirine olan uzaklığı ile ilgilidir ve Eşitlik 2.7'ye göre elektroferogramlardan hesaplanır.

$$R = 2. (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (2.7.)$$

R : Ayırıcılık (Rezolüsyon)

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

w_1, w_2 : Komşu piklerin pik genişliği

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Kapiler Elektroforez (Hewlett Packard Agilent 3D-CE, UV diyot array dedektörlü, bilgisayar kontrollü)
- pH metre (Mettler- Toledo, 0,01 pH hassasiyetli)
- Hassas terazi (Shimadzu xx200, 0,1 mg hassasiyetli)
- Bilgisayar (Microsoft Windows® işletim sistemi yüklü)
- Santrifüj (Nüve Fuge CN 090)
- Ultrasonik Banyo (Bondelin Sonorex)
- Vorteks
- Manyetik karıştırıcı
- Otomatik pipet

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Dekspantenol T.C. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
- Lidokain T.C. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
- Mepiramin T.C. Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı

- Fosforik asit Merck
- Sodyum Hidroksit (NaOH) Merck
- Hidroklorik Asit (HCl) Merck
- Metanol Merck

3.1.3. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Geliştirilen analiz yöntemi Stilex® jel (Abdi İbrahim, Türkiye) isimli farmasötik preparatta Dekspantenol, Lidokain, Mepiramin tayininde uygulanmıştır.

1 gram Jel 50 mg Dekspantenol, 15 mg Lidokain Hidroklorür ve Mepiramin maleat ve koruyucu olarak Benzalkonyum Klorür içermektedir.

3.2. Ön Deneysel Çalışmalar

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok Dekspantenol çözeltisinin hazırlanması (5000 µg/mL):
50.0 mg Dekspantenol tartılıp 5 mL su ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 10.0 mL'ye tamamlanmış ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart Dekspantenol çözeltileri, bu stok çözeltiden istenen derişime çalışma tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Stok Mepiramin ve Lidokain çözeltilerinin hazırlanması (1500 µg/mL): 15.0 mg Mepiramin ve 15.0 mg Lidokain tartılıp 5 mL su ile çözüldükten sonra aynı çözücü ile 10.0mL'ye tamamlanmış ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart Mepiramin ve Lidokain çözeltileri, bu stok çözeltilerinden istenen derişime çalışma tamponu ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

100 mL 20 mM Fosfat tamponu hazırlaması: %85' lik fosforik asit çözeltilisinden 136 µL alınarak 100 mL'lik balon jøjeye aktarılmış, üzerine 80.0 mL su ilave edilmiştir. 1M sodyum hidroksit çözeltilisi yavaş yavaş eklenerek pH istenen değere geldiğinde çözeltili 100 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

3.2.2. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

Dekspantenol, mepiramin ve lidokaini birlikte içeren jelden 1.0 g hassas olarak tartılarak 10 mL'lik balon jøjeye alınmıştır. 5 mL su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilmiştir. Su ile hacim 10.0 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltili 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, berrak çözeltiliden otomatik pipetle 200.0 µL alınıp 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmış ve çalışma elektroliti ile tamamlandığında, 100 µg/mL Dekspantenol, 30 µg/mL Mepiramin ve Lidokain içermesi gereken bir çözeltili elde edilmiştir. Bu çözeltili, kapiler elektroforez cihazının vialine konularak geliştirilen analiz yöntemi etken maddelerin tayini için uygulanmıştır.

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Deneyleri

3.3.1. Kapilerin Şartlandırılması

Analizler, 75 µm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Kapilerin toplam uzunluğu 50 cm, etkin uzunluğu 41 cm'dir.

İlk kullanımda, kapilerden 15'er dakika 1.0 M NaOH ve distile su geçirilmiştir. Her numune enjeksiyonundan önce sırasıyla 0.1 M NaOH, distile su ve çalışma elektroliti (20 mM pH 3.0 fosfat tamponu) 2'şer dakika süreyle kapilerden geçirilerek şartlandırma yapılmıştır. Analiz sonrası cihazın kapatılmasından önce kapilerden 10'ar dakika 0.1 M NaOH ve distile su geçirilerek kapiler içerisindeki tampon çözeltinin temizlenmesi sağlanmıştır. Analize uzun süre ara verileceği zaman kapiler kaseti kutusunda saklanmıştır.

3.3.2. Numunenin Cihaza Verilmesi

Miktar tayini yapılacak her numune, vialer konularak cihaza yerleştirilir. Kapiler şartlandırılması yapıldıktan sonra, 5 saniye süreyle 50 mbar basınçla hidrodinamik olarak numune enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, kapiler çalışma elektrolitine daldırılarak 20°C'de 30 kV potansiyel uygulanıp analiz başlatılmıştır. Dizi diyot dedektör kullanılarak yapılan 200 nm dalga boyundaki dedeksiyonla elektroferogram elde edilmiştir.

3.3.3. Yöntemin Optimizasyonu

Dekspantenol, Lidokain ve Mepiramin'in aynı anda analizi için seçilen kapiler elektroforez yönteminde çalışma tamponuna (çalışma tamponu türü, pH'ı, derişimi ve organik çözücü etkisi) ve cihaza (enjeksiyon süresi, uygulanan voltaj, analiz sıcaklığı ve dedektör dalga boyu) ait parametrelerin duyarlılığa, analiz süresine ve ayırma verimliliğine etkisi incelenerek en uygun deneysel şartlar araştırılmıştır. Bu çalışmalar sırasında Dekspantenol derişimi 100 µg/ mL, Lidokain ve Mepiramin

derişimleri 30 µg/ mL' dir. Tablo 2'de yöntem optimizasyonunda denenen tamponlar ve pH değerleri gösterilmektedir.

Tablo 2. Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler

Tampon adı	pKa değeri	Hazırlanan tamponun pH'sı
Fosfat	2,12 (pK _{a1})	3,0
Asetat	4,74	4,0
Asetat	4,74	5,0
Asetat	4,74	6,0
Fosfat	7.2 (pK _{a2})	7,0
Fosfat	7.2 (pK _{a2})	8,0
Borat	9.2	9,0

3.3.4. Kalibrasyon Doğrularının Çizimi

Dekspantenol standart çözeltilisinde 25, 37.5, 50, 100, 200 µg/mL, Mepiramin ve Lidokain standart çözeltilerinin her birinden 7.5, 10, 15, 30, 60 µg/mL içeren çözeltiler, standart stok çözeltilerinden gerekli

miktarlar alınarak çalışma elektroliti içerisinde hazırlanmıştır. Analiz sonucunda elde edilen elektroferogramlardan, birbirinden ayrılan maddelerin göç zamanları ve pik alanları, bilgisayar yazılımı ile tespit edilmiştir.

Elektroferogram verileri Microsoft Excel® programına aktarılarak, madde derişimlerine karşı pik alanları grafiği çizilerek doğrusal regresyon analizi sonucunda kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri elde edilmiş, korelasyon (r) ve determinasyon (r^2) katsayıları hesaplanmıştır.

3.4. Validasyon Deneyleri

Gözlenebilme sınırı (LOD), sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişim dikkate alınarak bulunmuştur³⁸.

Doğrusallık aralığı, alt ve üst tayin sınırları belirlenmiş, alt tayin sınırı (LOQ), S/G oranının 10 olduğu değer ölçülerek bulunmuştur. Üst tayin sınırı (LOL), kalibrasyon doğrusunda doğrusallığın bozulduğu noktadır³⁸.

Gün içi kesinlik ve doğruluk çalışmaları, üç paralel çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise üç paralel çözelti yeniden hazırlanarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Yöntem tekrarlanabilirliği için, aynı derişimde standart maddeleri içeren karışım, geliştirilen yöntemle 7 kez analiz edilip, sonuçlar arasındaki bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Kapiler elektroforez cihazının tekrarlanabilirliği için, aynı derişimdeki standart, 7 kez enjekte edilerek elde edilen elektroferogramlarda pik alanları ve göç zamanları incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Optimum Yöntem Parametrelerinin Seçimi

4.1.1. Elektrolit Seçimi

Çalışma elektroliti olarak pH 7,0 ve 8,0 fosfat tamponu, pH 9,0 amonyak tamponu, pH 9,0 borat tamponu ve pH 4,0, 5,0 ve 6,0 asetat tamponları denenmiş ancak yeterli bir ayırım elde edilememiştir. Fosfat tamponu pH 3,0 ile yapılan denemeler sonucunda en iyi ayırım elde edilmiştir.

Kullanılan pH 3,0 fosfat tamponunun derişimi, 10-40 mM aralığında denenerek en iyi ayırım 20 mM tampon derişimi ile elde edilmiştir.

20 mM pH 3,0 fosfat tamponuna metanol ilavesi ayırım üzerine olumlu etki yapmamakla beraber, elektroosmotik akışı etkileyerek analiz süresini uzatmıştır. Bu nedenle metanolün tampona eklenmemesine karar verilmiştir.

4.2. Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

Elektroforez sırasında enjeksiyon süresini (t_{enj}) belirlemek için, enjeksiyon basıncı (P_{enj}) olarak 50 mbar sabit basınç ile hidrodinamik enjeksiyonlar yapılarak farklı enjeksiyon süreleri denenmiştir. En uygun enjeksiyon süresinin 5 s olduğuna karar verilmiştir. Şekil 7’de enjeksiyon süresinin analiz üzerine etkisi görülmektedir.

Uygulanacak enjeksiyon basıncını (P_{enj}) belirlemek amacıyla farklı basınçlarda hidrodinamik enjeksiyonlar yapılmış, en uygun enjeksiyon basıncının 50 mbar olduğuna karar verilmiştir. Şekil 8’de enjeksiyon basıncının analiz üzerine etkisi görülmektedir.

Çalışma elektrolitine uygulanacak voltajın belirlenmesi için, uygulanan voltaja karşı akım değerleri incelenmiştir. Voltaj değeri artıkça akım değerinin de doğrusal olarak arttığı ve yüksek voltajda doğrusallığın bozulmadığı gözlenmiştir. Uygulanacak voltaj 30 kV olarak belirlenmiştir. Şekil 9’da uygulanan voltajın analize üzerine etkisi görülmektedir.

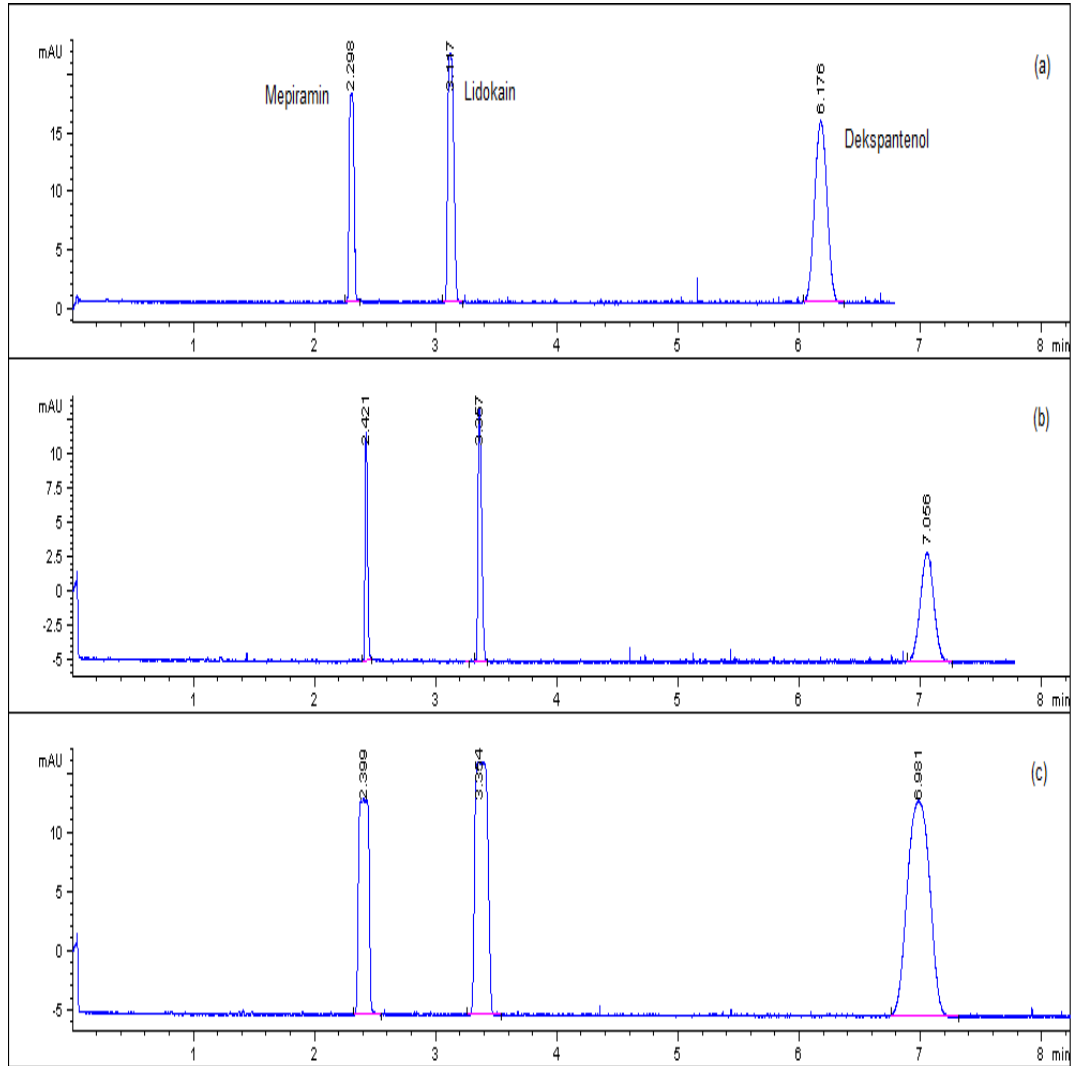
Kapilerin çalışma sıcaklığı 20-30°C arasında değiştirilerek en uygun sıcaklık 20 °C seçilmiştir. Şekil 10’da kapiler sıcaklığının analiz üzerine etkisi görülmektedir.

Yöntemin geliştirilmesi sırasında optimizasyonu yapılan parametreler Tablo 3’ te açıklanmıştır.

Tablo 3. Optimizasyon parametreleri

Araştırılan parametreler	Seçilen Parametreler
Tampon bileşimi ve pH' sı	Fosfat pH 3,0
Tamponunun derişimi	20 mM Fosfat
Organik çözücü	Organik çözücü eklenmemesine karar verilmiştir
Dedektör dalga boyu	200 nm
Uygulanan voltaj	30 kV

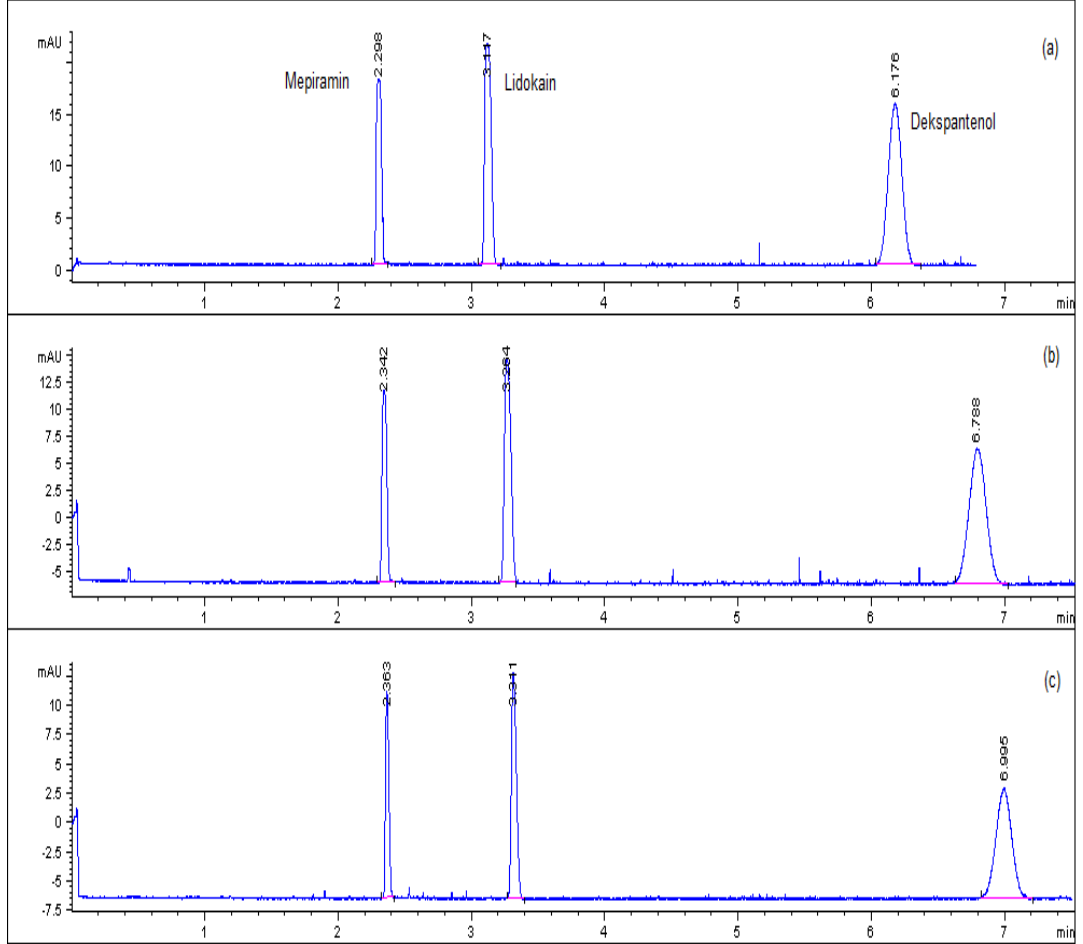
Kapiler sıcaklığı	20°C
-------------------	------



Şekil.7. Enjeksiyon Süresinin (t_{enj}) sinyal üzerine etkisi

a) 5 s, b) 3s, c) 10 s

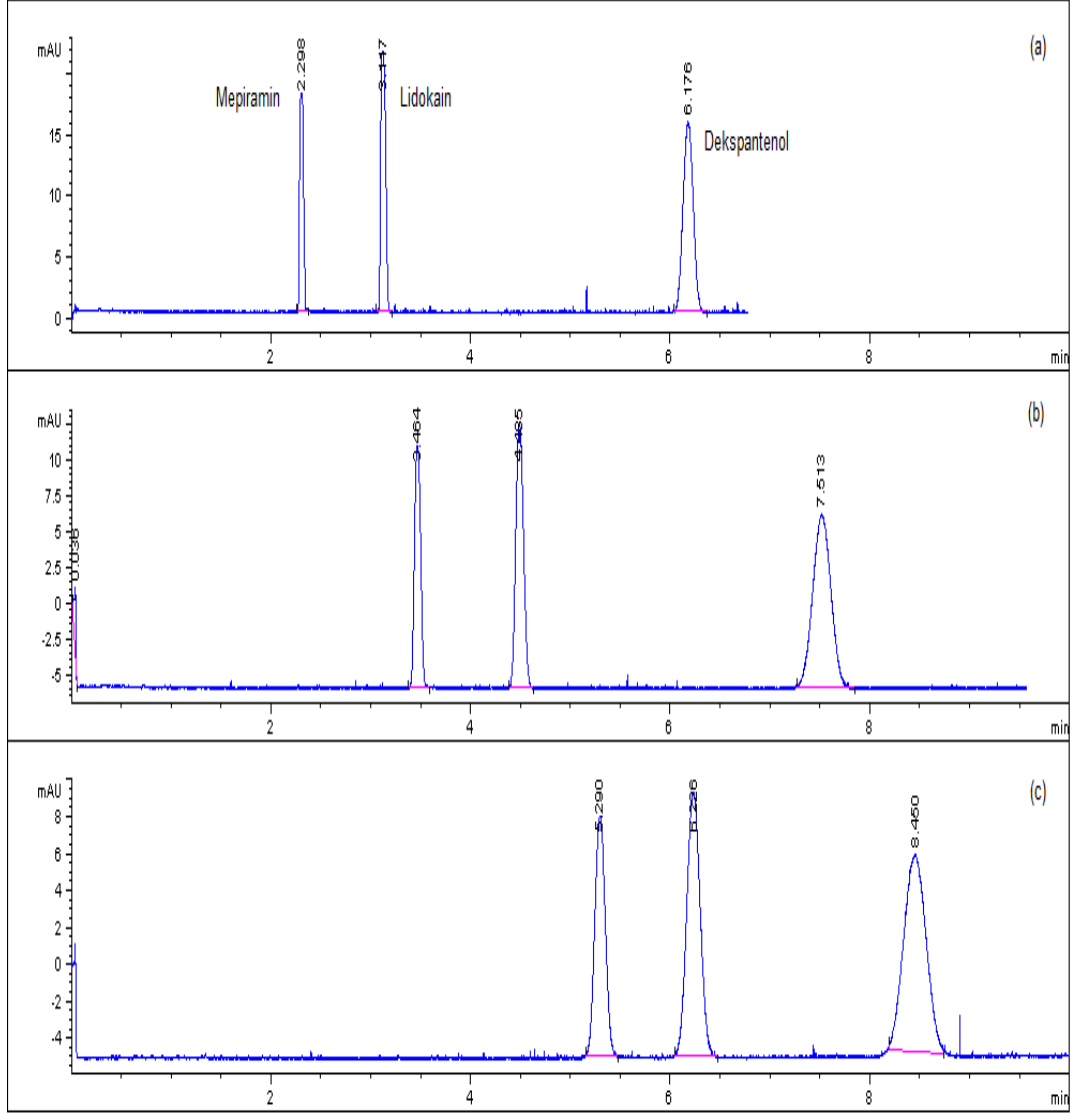
Koşullar: 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu, P_{enj} = 50mbar, V =30 kV, 20°C, λ = 200nm, Mepiramin ve Lidokain derişimi: 30 μ g/mL, Dekspantenol derişimi: 100 μ g/mL.



Şekil.8. Enjeksiyon Basıncının (P_{enj}) sinyal üzerine etkisi

a) 50mbar, b) 40mbar, c) 30mbar

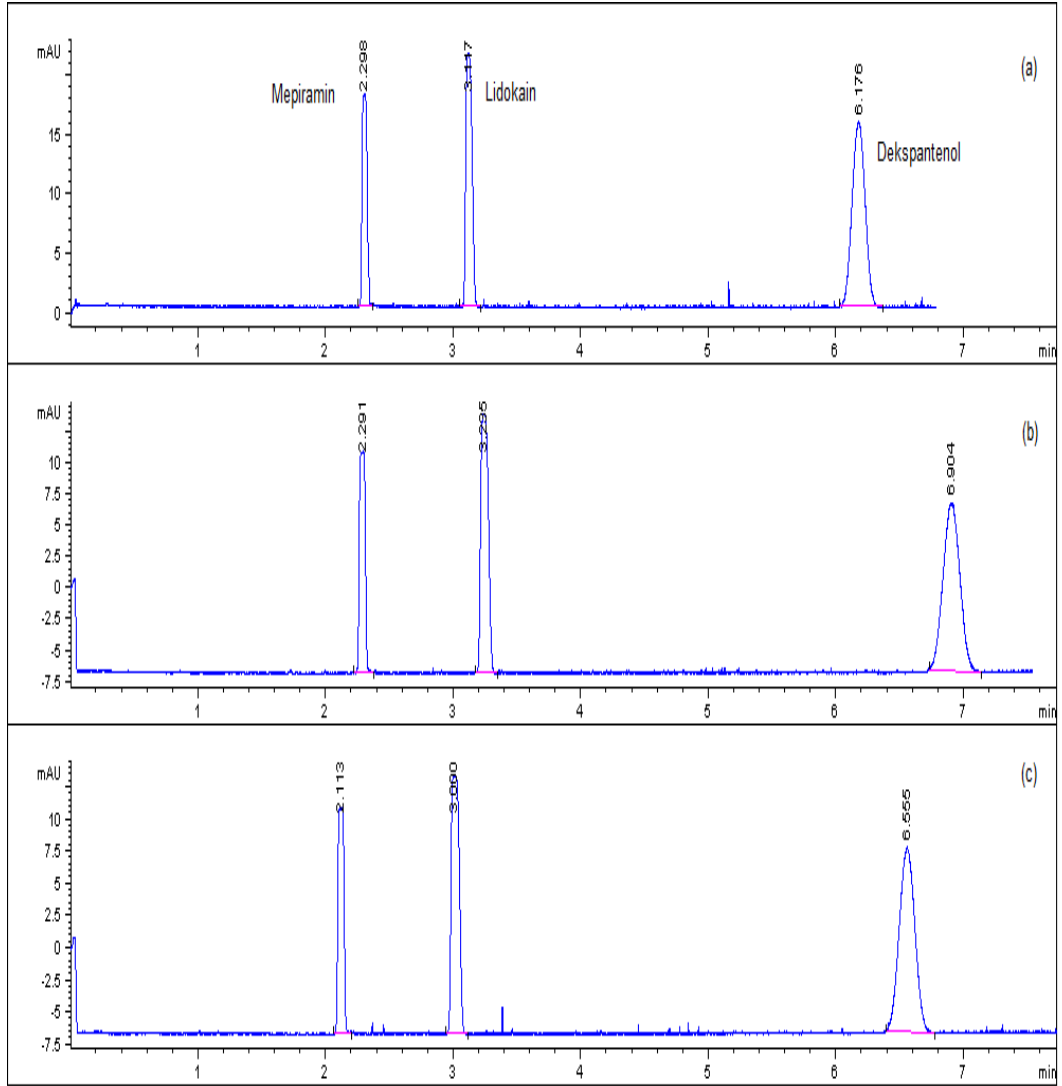
Koşullar: 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu, t_{enj} = 5s, V=30 kV, 20°C, λ = 200nm, Mepiramin ve Lidokain derişimi: 30 μ g/mL, Dekspantenol derişimi: 100 μ g/mL.



Şekil.9. Uygulanan voltajın sinyal üzerine etkisi

a) 30kV, b) 20 kV c) 10 kV

Koşullar: 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu, t_{enj} = 5s, P_{enj} = 50mbar, 20°C, λ = 200nm, Mepiramin ve Lidokain derişimi: 30 μ g/mL, Dekspantenol derişimi: 100 μ g/mL.



Şekil.10. Kapiler sıcaklığının sinyal üzerine etkisi

a) 20°C b) 25°C c) 30°C

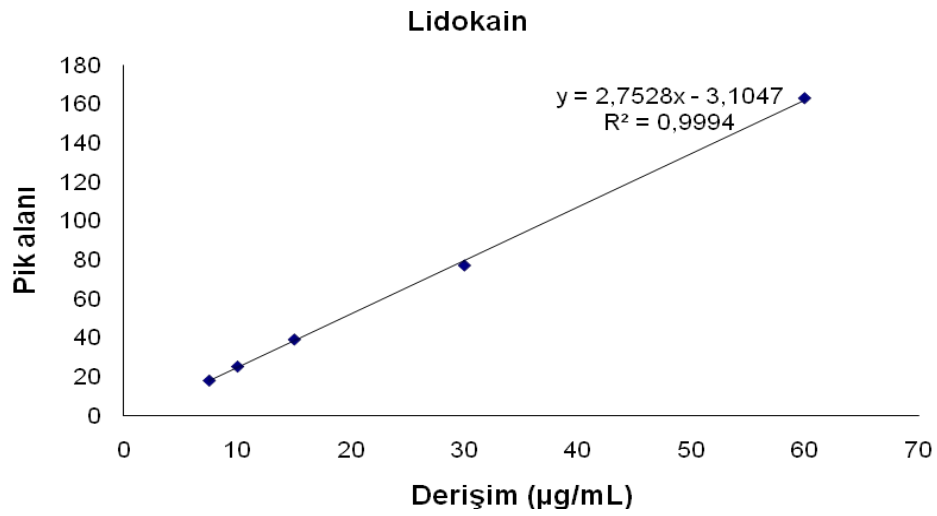
Koşullar: 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu, t_{enj} = 5s, P_{enj} = 50mbar, V=30 kV, λ =200nm

Mepiramin ve Lidokain derişimi: 30 μ g/mL, Dekspantanol derişimi: 100 μ g/mL.

4.3. Geliştirilen Yöntem ile Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Kalibrasyon Bulguları

Jel içerisindeki etken maddelerin miktarının hesaplanması için standart madde derişimlerine karşı pik alanları değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.



Şekil 11. Lidokain kalibrasyon doğrusu

Kalibrasyon Doğrusunun denklemi : $y=2,7528x - 3,1047$

Kalibrasyon aralığı : 7,5 – 60 µg/mL

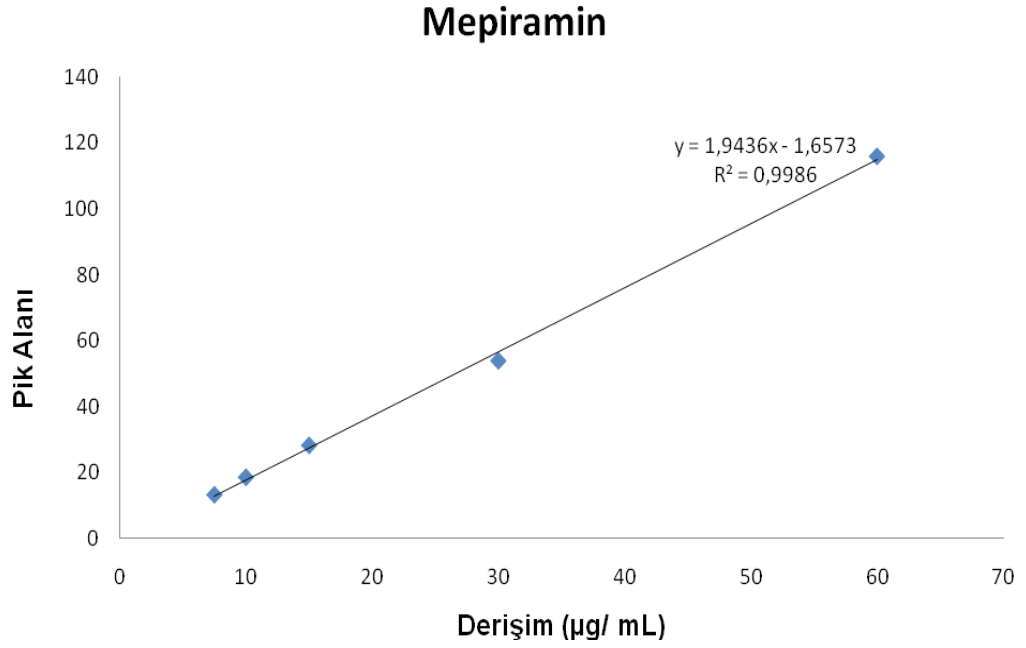
$r = 0,9997$, $R^2 = 0,9994$

LOD : 1,75 µg/mL

LOQ : 5,84 µg/mL

Eğimin standart hatası : 0,033

Kesişimin standart hatası : 1,0466



Şekil 12. Mepiramin kalibrasyon doğrusu

Kalibrasyon Doğrusunun denklemini : $y = 1,9436x - 1,6573$

Kalibrasyon aralığı : 7,5 – 60 µg/mL

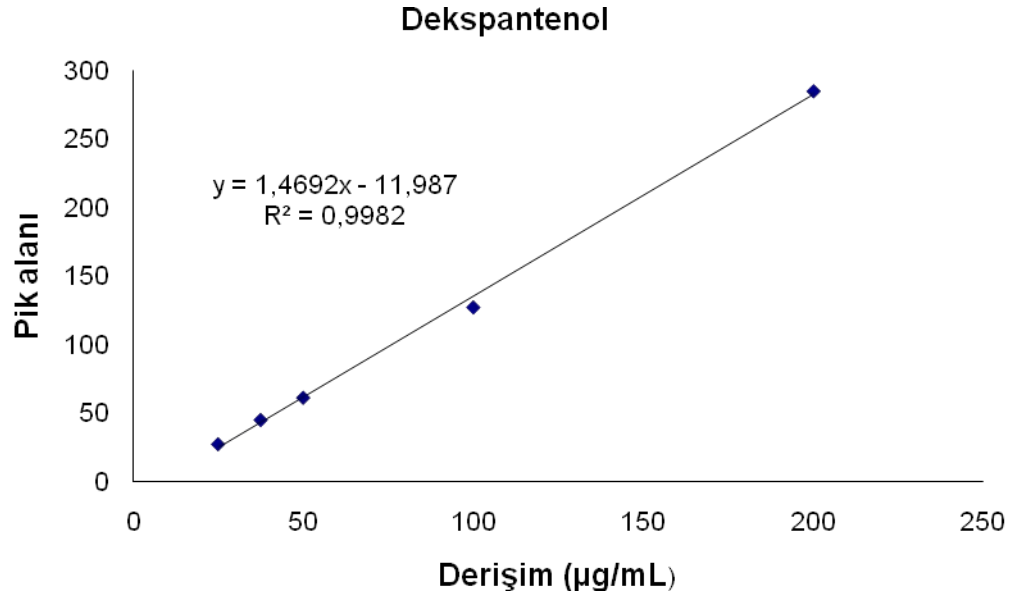
$r = 0,9993$, $R^2 = 0,9986$

LOD : 0,76 µg/mL

LOQ : 2,53 µg/mL

Eğimin standart hatası : 0,034

Kesişimin standart hatası : 1,0626



Şekil 13. Dekspantenol kalibrasyon doğrusu

Kalibrasyon Doğrusunun denklemi : $1,4692x - 11,987$

Kalibrasyon aralığı : $25 - 200 \mu\text{g/mL}$

$r = 0,9991, R^2 = 0,9982$

LOD : $3,06 \mu\text{g/mL}$

LOQ : $10,21 \mu\text{g/mL}$

Eğimin standart hatası : $0,038$

Kesişimin standart hatası : $3,9840$

Geliştirilen yöntemin analitik performans verileri Tablo 4' te sunulmuştur.

Tablo 4. Geliştirilen yöntemin analitik performans verileri

	DEK	MEP	LID
Regresyon denklemleri	$y=1,4692x-12$	$y=1,9436x-1,657$	$y=2,7528x-3,10$
Eğimin standart hatası	0,038	0,034	0,033
Kesişimin standart hatası	3,9840	1,0626	1,0466
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9982	0,9986	0,9994
Kalibrasyon aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	25 – 200	7,5 – 60	7,5 – 60
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	3,06	0,76	1,75
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	10,21	2,53	5,84

4.3.2. Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

Geliştirilen yöntemin enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için 100 µg/mL Dekspantenol, 30 µg/mL Mepiramin ve 30 µg/mL Lidokain çözeltisi yedi kez enjekte edilmiş ve her bir enjeksiyonun pik alanı, pik yüksekliği ve göç zamanı okunarak bu verilerin standart sapma değerleri ve Bağıl Standart Sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır. Her bir etken madde için elde edilen %BSS değerlerinin %3'den küçük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar yapılan enjeksiyonların tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Tablo 5. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Num no	Mepiramin			Lidokain			Dekspantenol		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	59,7	16,4	2,502	82,7	17,7	3,582	128,2	10,4	7,46
2	57,3	16,5	2,455	81,3	17,7	3,512	133,2	10,1	7,177
3	58,0	16,3	2,439	81,9	18,0	3,493	134,2	10,5	7,149
4	59,0	16,2	2,418	82,7	17,9	3,457	137,9	10,7	7,255
5	58,7	16,3	2,491	79,1	17,4	3,578	136,1	10,4	7655
6	58,6	16,4	2,480	81,0	17,6	3,557	133,0	10,3	7,476
7	58,0	16,4	2,416	79,2	17,3	3,466	138,3	10,6	7,372
x_{ort}	58,5	16,3	2,457	81,1	17,6	3,520	134,4	10,4	7,363
SD	0,78	0,09	0,03	1,49	0,25	0,05	3,47	0,20	0,18
RSD	1,34	0,55	1,22	1,84	1,42	1,42	2,58	1,89	2,44

Yöntemin kesinliğinin belirlenebilmesi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 30 µg/mL Lidokain, 30 µg/mL Mepiramin ve 100 µg/mL Dekspantenol çözeltileri hazırlanarak gün içersindeki ve günler arasındaki tekrarlanabilirlik test edilmiştir. Tablo 6, 7 ve 8' de görüldüğü gibi elektroferogramlardan elde

edilen veriler doğrultusunda %BSS değerleri 3'den küçüktür. Bu veri geliştirilen yöntemin kesinliğinin bir ölçüsüdür.

Tablo 6. Mepiramin gün içi ve günler arası analiz sonuçları

		1.Gün (Pik Alanı)	2.Gün (Pik Alanı)	3.Gün (Pik Alanı)
30 µg/mL Mepiramin		58,7	61,7	59,0
		58,7	60,9	59,0
		58,0	60,2	59,7
Gün içi	X _{ort}	58,4	60,9	59,2
	SD	0,40	0,75	0,40
	%RSD	0,69	1,23	0,68
Günler arası	X _{ort}	59,53		
	SD	0,25		
	%RSD	0,42		

Tablo 7. Lidokain gün içi günler arası analiz sonuçları

		1.Gün (Pik Alanı)	2.Gün (Pik Alanı)	3.Gün (Pik Alanı)
30 µg/mL Lidokain		81,9	84,9	82,7
		81,0	84,4	82,7
		81,3	84,4	83,6
Gün	X _{ort}	81,4	84,5	83,0
	SD	0,45	0,29	0,52

İç	%RSD	0,55	0,34	0,62
Günler arası	X _{ort}	82,9		
	SD	0,23		
	%RSD	0,28		

Tablo 8. Dekspantenol Gün iç ve günler arası analiz sonuçları

		1.Gün (Pik Alanı)	2.Gün (Pik Alanı)	3.Gün (Pik Alanı)
100 µg/mL Mepiramin		133,2	129,5	137,9
		133,0	127,3	136,2
		134,2	128,2	138,3
Gün iç	X _{ort}	133,4	128,3	137,4
	SD	0,64	1,10	1,11
	%RSD	0,48	0,85	0,81
Günler arası	X _{ort}	133,0		
	SD	0,80		
	%RSD	0,60		

Geliştirilen yöntemde sistem uygunluk testleri yapılmış, elde edilen sonuçlar Tablo 9' da gösterilmiştir. Çalışmalar sırasında Dekspantenol 100 µg/mL, Mepiramin ve Lidokain 30 µg/mL' dir.

Tablo 9. Geliştirilen CE yönteminde sistem uygunluk testi sonuçları

	MEP	LİD	DEK
Ortalama göç zamanı(dak)	2,457	3,520	7,363
Pik simetrisi	0,99	0,80	0,97
Taban pik genişliği(dak)	0,056	0,07	0,195
Etkinlik (teorik tabaka sayısı)	10766	14307	8143

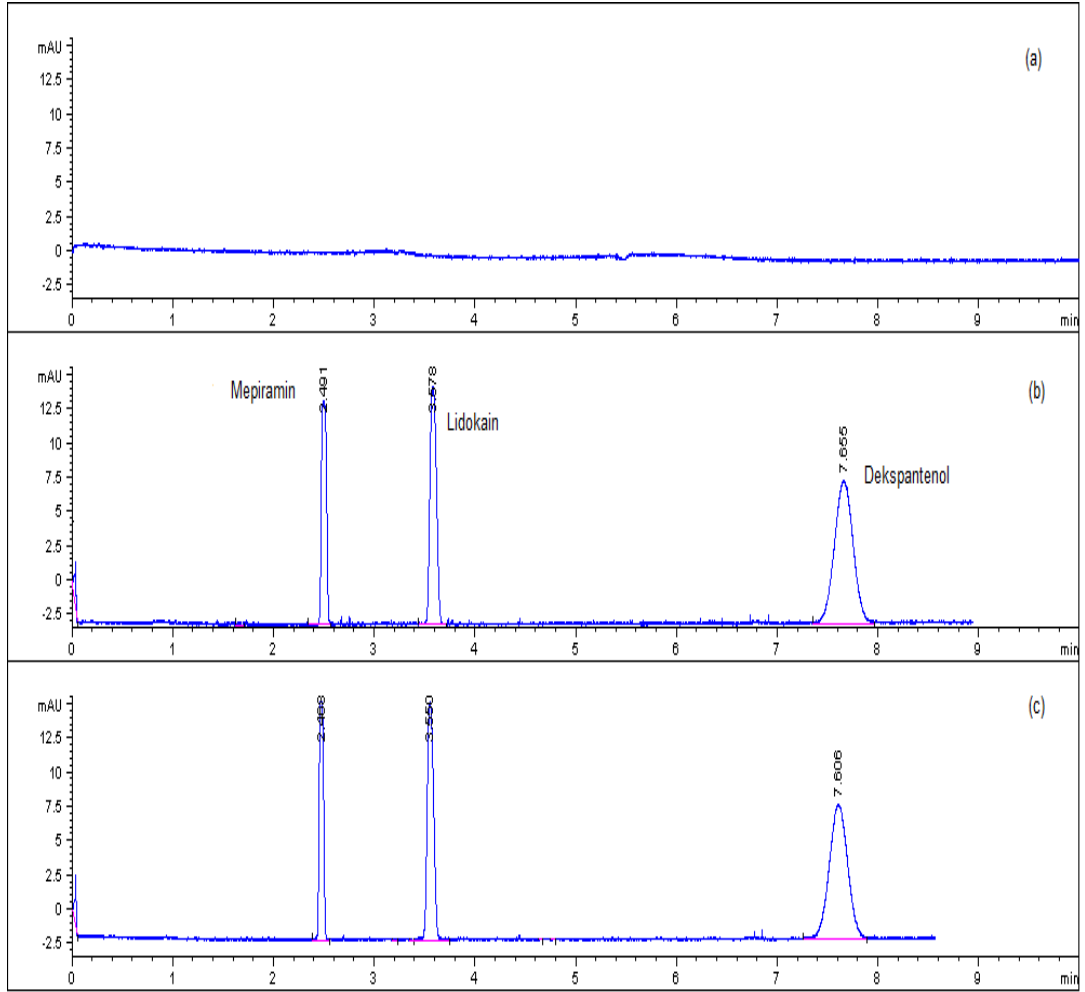
Alan	58,5	81,1	134,4
Pik yüksekliği	16,3	17,6	10,4
Ayırıcılık (R)	10,03	17,37	
Seçicilik (α)	1,43	2,10	

4.3.3. Farmasötik Preparatın Analiz Bulguları

Tez çalışmasında, 1 g jel içersinde 50 mg Dekspantenol, 15 mg Lidokain ve 15 mg Mepiramin içeren bir farmasötik preparat olan Stilex® Jel analiz edilmiştir.

Kapiler elektroforez yöntemi ile yapılan miktar tayininde Bölüm 3.2.2.'de anlatılan yol izlenerek elektroferogramlar elde edilmiştir. Şekil 14'te tampon çözeltisi, standart mepiramin, lidokain, dekspantenol karışımı ve farmasötik preparatların geliştirilen kapiler elektroforez yöntemiyle elde edilen elektroferogramları görölmektedir.

Tayinlerde sonuçlar 5 paralel numune çözeltisinin ortalamasına karşılık gelmektedir. Tayin sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 10, 11 ve 12' de verilmektedir.



Şekil.14. Geliştirilen Kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroferogramlar

- a) Tampon çözeltisi
- b) Standart mepiramin, lidokain ve dekspantenol karışımı
- c) Farmasötik preparat (Stilex[®] Jel)

Koşullar: 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu, t_{enj} = 5s, P_{enj} = 50mbar, V=30 kV, λ = 200nm, 20°C.
Mepiramin: 30 µg/mL, Lidokain: 30 µg/mL, Dekspantenol:100 µg/mL.

Tablo 10. Mepiramin miktar tayini sonuçları		
Numune	Bulunan miktar	Belirtilen miktar
no.	mg /1gr jel	15 mg / 1gr jel
1	15,05	X_{ort} = 14,96 SS= 0,20 %BSS= 1,33 $t.SD/\sqrt{n}$ = 0,25 GA=15,21- 14,71 p=0,05
2	14,74	
3	15,10	
4	14,74	
5	15,15	

Tablo 11. Lidokain miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg /1gr jel	Belirtilen miktar 15 mg / 1gr jel
1	14,82	$X_{ort} = 14,85$ $SS = 0,34$ % $BSS = 2,28$ $t.SD/\sqrt{n} = 0,42$ $GA = 15,27 - 14,43$ $p = 0,05$
2	15,28	
3	15,10	
4	14,59	
5	14,46	

Tablo 12. Dekspantenol miktar tayini sonuçları

Numune	Bulunan miktar	Belirtilen miktar
--------	----------------	-------------------

no.	mg /1gr jel	50 mg / 1gr jel
1	49,90	$X_{ort}=49,26$ $SS=1,32$ % $BSS=2,69$ $t.SD/\sqrt{n}= 1,64$ $GA= 50,9- 47,62$ $p=0,05$
2	50,40	
3	47,90	
4	50,35	
5	47,75	

4.3.4. Geri Kazanım Çalışması Bulguları

Geliştirilen yöntemin doğruluğunun belirlenebilmesi için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, daha önce tayini yapılmış olan jel çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda standart etken madde çözeltileri ilave edilmiştir. Bu çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen elektroferogramlardan hareketle standart çözeltiler ile hazırlanan kalibrasyon doğruları kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar Tablo 13, 14 ve 15' de gösterilmiştir. Tablolarda görüldüğü gibi her bir etken madde için elde edilen geri kazanım değerlerinin %100'e yakın olması geliştirilen yöntemin doğru olduğunu göstermektedir.

Tablo 13. Mepiramin geri kazanım sonuçları

Numune no.	% Mepiramin	$X_{ort}=101,1$ $SS= 0,5$ % $BSS= 0,49$ $t.SD/\sqrt{n}= 1,24$ $GA= 102,3- 99,86$ $p=0,05$
1	100,6	
2	101,1	
3	101,6	

Tablo 14. Lidokain geri kazanım sonuçları

Numune no.	% Lidokain	$X_{ort}=99,8$ $SS= 1,83$ % $BSS= 1,83$ $t.SD/\sqrt{n}= 4,54$ $GA= 104,3- 95,26$ $p=0,05$
1	101,8	
2	99,4	
3	98,2	

Tablo 15. Dekspantenol geri kazanım sonuçları

Numune no.	% Dekspantenol	$X_{ort}=98,9$ $SS= 1,73$ % $BSS= 1,75$ $t.SD/\sqrt{n}= 4,29$ $GA= 103,2- 94,61$ $p=0,05$
1	100,9	
2	97,9	
3	97,9	

5. TARTIŞMA

Mepiramin, Lidokain ve Dekspantenol'ü birlikte içeren farmasötik preparatlar, çabuk etki gösteren antialerjik, antienflamatuar, antipruritik ve anesteziik ilaçlardır. Bu preparatların rutin analizleri, üretim ve kalite kontrol aşamasında yapılmaktadır. Kalite kontrol laboratuvarlarında kısa zamanda doğru ve tutarlı sonuç veren, uygulaması kolay, maliyeti düşük, aynı zamanda çevreyi kirletmeyen, valide edilmiş analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Kaynaklarda, adı geçen maddelerin tek tek miktar tayinleri için yöntemler mevcuttur, ancak üçlü karışımın tek bir yöntemle aynı anda analiz edildiği yöntemler, zaman ve maliyet üstünlüğü açısından tercih edilmektedir. Adı geçen üçlü karışımın aynı anda miktar tayini için kaynaklarda herhangi bir kapiler elektroforez yöntemine rastlanmamıştır.

Kalite kontrol laboratuvarlarında miktar tayini amacıyla genelde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ve UV-Spektrofotometrik yöntemler uygulanmaktadır. Kapiler elektroforez, diğer analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, sarf malzeme tüketimi ve maliyeti daha az, ayırım etkinliği daha yüksek olan, hızlı, doğru, tutarlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir³⁹.

Mepiramin, Lidokain ve Dekspantenol'ü birlikte içeren jel formundaki farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine rastlanmadığı için, bu yöntemin geliştirilmesi tez çalışması kapsamında seçilmiştir.

Kapiler elektroforez, elektriksel ortamda iyonların hareketine dayalı bir yöntem olduğu için kullanılan elektrolit çözeltilerinin pH değeri ve konsantrasyonu, ayırımı büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle analizlerde küçük pH değişimlerini tolere edebilmek için tampon çözeltilerle çalışılır. Maddelerin ayrılabilmesi için farklı bileşim ve derişimlerdeki çalışma elektrolitleri kullanılarak pH 3,0- 10 aralığında

denemeler yapılmıştır. Farklı pH aralıklarında tamponlama kapasitesine sahip fosfat, asetat ve borat tampon çözeltileri denenmiştir. Asetat ve borat tamponlarında yeterli ayırım sağlanamamıştır. En iyi ayırım ve etkinlik pH 3,0 fosfat tamponunda gözlenmiştir. Çalışma tamponunun konsantrasyonunu belirlemek için 10-40 mM fosfat tamponu çözeltileri hazırlanmış ve yeterli ayırımın sağlandığı ve etkinliğin gözlemlendiği ve zeminin düzgün olduğu pH 3,0 fosfat tamponu seçilmiş ve derişimi 20mM olarak belirlenmiştir.

Elektroforez sırasında çalışma elektrolitine uygulanacak voltajın belirlenmesi için, uygulanan voltaja karşı akım değerleri incelenmiş, voltaj değeri artıkça akım değerinin de doğrusal olarak arttığı ve yüksek voltajda doğrusallığın bozulmadığı gözlenmiştir. Uygulanacak voltaj 30 kV olarak belirlenmiştir.

Çalışmalar sırasında numune verme yöntemi olarak hidrodinamik enjeksiyon kullanılmış ve enjeksiyon basıncı farklı değerlere ayarlanmış, en iyi sonuç 50mBar'la sağlanmıştır.

Enjeksiyon süresi optimizasyonu için etken maddeleri belirtilen oranlarda içeren bir çözelti hazırlanmış ve 3, 5, 10 saniye enjeksiyon sürelerinde analizler yapılmıştır. Enjeksiyon süresi 5 saniye olduğunda elektroferogramda pik şekillerinin keskin ve simetrik oldukları görülmüştür. Bu sırada enjeksiyon basıncı 50mBar ve uygulanan voltaj 30 kV'dur.

Kapiler çalışma sıcaklığı 20-30°C arasında değiştirilerek, en uygun sıcaklık olarak 20 °C seçilmiştir.

Tüm çalışma boyunca 50 cm uzunluğunda (41 cm etkin uzunluk) ve 75 µm iç çapta kapiler kullanılmış ve iyi bir rezolüsyon ve kısa

analiz süresi elde edildiği için farklı çap ve uzunlukta kapiler denenmesine gerek kalmamıştır.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, hazırlanan karışım çözeltisinin belirtilen çalışma koşullarında 7 kez enjeksiyonu yapılmıştır. Her bir analit için elde edilen pik alanı, pik yüksekliği ve migrasyon zamanı verilerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her üç analit için elde edilen bağıl standart sapma değerleri, yöntemin tekrarlanabilir olduğunun göstergesidir. Miktar tayini hesaplamalarında pik alanı değerleri kullanılmıştır.

Kalibrasyon çalışmalarında, üçlü kalibrasyon yapılmıştır. Yani her bir dilüsyon, analitlerin üçünü de birlikte içermektedir. Böylece kalibrasyona ortamdaki gelebilecek etkiler minimuma indirilmiştir. Her bir analit için konsantrasyonlarına karşılık pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayısı değerleri 0,999'dan büyüktür. Bu da, çalışılan konsantrasyon aralıklarında, pik alanı ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemle Mepiramin, Lidokain ve Dekspantenol miktar tayini çalışmalarında elde edilen ortalama değerler, jel üzerinde belirtilen değerle uyumludur. Jel sonuçlarının bağıl standart sapma değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir.

Geri kazanım çalışmalarının sonucunda elde edilen ortalama geri kazanım ve %95 olasılık düzeyine göre hesaplanan güven aralığı değerleri sırasıyla, Mepiramin için %101,1 ve %101,1±1,24, Lidokain için %99,8 ve %99,8±4,54 ve Dekspantenol için %98,9 ve %98,9±4,29'dir. Her üç analit için de geri kazanım çalışması sonuçları, kabul edilebilir değerler içindedir ve yöntemin doğruluğunun bir göstergesidir.

Önerilen yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğu, analit piklerinin ayırım için yeterli rezolüsyonu sağladığı ve analiz süresinin kısa olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu tez çalışmasında önerilen ve optimize edilen kapiler elektroforez yönteminin Mepiramin, Lidokain ve Dekspantenol'ü bir arada içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için uygun olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ

Tez çalışmamızda dekspantenol, mepiramin ve lidokainin üçlü kombinasyonunu içeren farmasötik jellerde bu maddelerin aynı anda analizi için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. En iyi ayırım çalışma elektroliti olarak 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda ayırım eritilmiş silika kapilerde (75 µm iç çap, 50 cm toplam uzunluk, 41 cm etkin uzunluk) 20°C'de, enjeksiyon süresi 5 sn ve 50 mbar basınçta hidrodinamik enjeksiyon ve 30 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör dalga boyu olarak 200 nm seçilmiştir. Optimum koşullar altında göç zamanları Dekspantenol için 7.363 dakika, Mepiramin için 2.457 dakika ve Lidokain için 3.520 dakika olarak bulunmuştur. Yöntem Dekspantenol için 25- 200 µg/mL, Mepiramin için 7,5- 60µg/mL ve Lidokain için 7,5- 60µg/mL derişim aralığında doğrusaldır. Yöntemin gözlenebilme sınırı Dekspantenol için 3,06 µg/mL, Mepiramin için 0,76 µg/mL ve Lidokain için 1,75 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin validasyonu için doğrusallık, tekrarlanabilirlik, alt ve üst tayin sınırları, geri kazanım parametreleri değerlendirilmiş, bütün parametrelerin kabul kriterlerini sağladığı saptanmıştır. Valide edilen kapiler elektroforez yöntemi Türkiye ilaç piyasasında satılan Stilex® Jel isimli farmasötik preparata uygulanmıştır. Geri kazanım çalışması sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve yöntemin doğruluğu belirlenmiştir. Geliştirilen ve valide edilen kapiler elektroforez yönteminin, doğru, seçici, kesin, tekrarlanabilir olması, ön işlemlere gerek duyulmadan analize imkan sağlaması nedeni ile rutin analizler için uygun olacağı düşünülmektedir.

7. ÖZET

Farmasötik jellerde kapiler elektroforez yöntemi ile dekspantenol, mepiramin maleat ve lidokain hidroklorür miktar tayini

Dekspantenol, mepiramin ve lidokainin üçlü kombinasyonunu içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. En iyi sonuçlar, çalışma elektroliti olarak 20 mM pH 3,0 fosfat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ayırım eritilmiş silika kapilerde (75 µm iç çap, 50 cm toplam uzunluk, 41 cm etkin uzunluk) 20°C'de, 50 mbar basınçla 5 sn süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 30 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör dalga boyu 200 nm'dir. Bu şartlardaki göç zamanları DEK için 7.363, MEP için 2.457 ve LID için 3.520 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusal aralığı DEK için 25- 200 µg/mL, MEP için 7,5- 60µg/mL ve LID için 7,5- 60µg/mL olarak saptanmıştır. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı DEK için 3,06 µg/mL, MEP için 0,76 µg/mL ve LID için 1,75 µg/mL olarak bulunmuştur. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin doğru, kesin, duyarlı, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu ispatlanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Dekspantenol, mepiramin, lidokain, üçlü karışım, kapiler elektroforez

8. SUMMARY

Simultaneous determination of dexphantenol, mepyramine and lidocaine in combined pharmaceutical gels by capillary electrophoresis

A new capillary electrophoresis method was developed to analyze pharmaceutical preparations containing ternary combination of dexphantenol, mepyramine and lidocaine simultaneously. Best results were obtained by use of 20 mM pH 3,0 phosphate buffer as the background electrolyte. The separation was performed through a fused-silica capillary (75 μm internal diameter, 50 cm total length, 41 cm effective length) at 20°C with the application of 5 seconds of hydrodynamic injection at 50 mbar pressure and potential of 30 kV. Detection wavelength was 200 nm. Under these conditions, the migration times were found to be 7.363 min for dexphantenol, 2.457 min for mepyramine and 3.520 min for lidocaine. Linearity ranges for the method were 25- 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DEK, 7,5- 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MEP and 7,5- 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LID. Limit of detection values were found as 3,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for DEK, 0,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MEP and 1,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for LID. According to the validation study, it was proved that the developed method was accurate, precise, sensitive, specific and repeatable.

Keywords : Dexphantenol, mepyramine, lidocaine, ternary mixture, capillary electrophoresis.

9. KAYNAKLAR

- 1) Ommaty, R., Vademecum 2009, 30. Baskı, Ankara: Feryal Matbaası; 2009.
- 2) Rx Media Pharma. İnter Aktif İlaç Bilgi kaynağı. Üstünes L., Gemaş Yayıncılık; 2009.
- 3) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals, 12nd Ed., Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., USA, 2001.
- 4) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3th Ed. London: Pharmaceutical Press; 2004.
- 5) Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Dokuzuncu Baskı. Ankara: Feryal Matbaası; 2000.
- 6) British Pharmacopoeia 2007, Volume 1-2, Her Majesty's Stationary Office, London, 2007.
- 7) Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. Lipincot's Illustrated Reviews Serisinden Farmakoloji. Atagündüz P.(Çev), 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2000.
- 8) Moreno P., Salvado V., Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. A. 2000; 870: 2007-215.
- 9) Shehata M.A.M., Tawakkol S.M., Fattah L.E.A., Colorimetric and fluorometric methods for determination of phantanol in cosmetic and pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002; 27: 729-735.
- 10) Havlikova L., Matysova L., Novakova L., Solich P., HPLC determination of calcium pantothenate and two preservatives in topical cream. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006; 41: 671-675.

- 11) Kulikov A.U., Zinchenko A.A., development and validation of reserved phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007; 43: 983-988.
- 12) Golubitskii G.B., Basova E.M., Ivanov V.M., Application of gradient high- performance liquid chromatography to analysis of some multicomponent pharmaceutical preparations. J. Anal. Chem. 2008; 63: 875-880.
- 13) The United States Pharmacopoeia 32, United States Pharmacopoeia Convention: Rockville; 2009.
- 14) European Pharmacopoeia 6th Edition, Council of Europe: Strazburg; 2007.
- 15) Xie Y.M., Luo J., Tang H., Yang D., Huo X.F., Liu A., et al. An improved and validated LC method for resolution of phantenol. Chrom. 2009; 69: 1025
- 16) Aksu Ö., Bozdoğan A., Kunt G., Simultaneous determination of mepyramine maleate, lidocaine hydrochloride and dexpanthenol in pharmaceutical preparation by partial least- square multivariate calibration. Anal. Let. 2006; 38: 751-761.
- 17) Louhaichi M.R., Jebali ., Loueslati M.H., Monser L., Simultaneous determination of dextromethorphan hydrobromide, prilamine maleate and sodium benzoate in a cough cold syrup by LC. Chrom. 2009; 69 : 421-427.
- 18) Rehim M.A., Bielenstein M., Arvidsson T., Chromatographic behavior of underivatized lidocaine and metabolites in CGC. J. Micro. Sep. 1998; 10: 589-596.

- 19) Anderson M.S., Wan H., Rehim M.A., Blomberg A.G., Characterization of lidocaine and its metabolites in human plasma using capillary electrophoresis. *J. Micro. Sep.* 1999; 11: 620-626.
- 20) Gilabert L.E., Sagrado S., Camadas V.R.M., Hernandez M.J.M., Analysis of pharmaceutical preparation containing local anesthetics by micellar liquid chromatography and spectrophotometric detection. *Chrom.* 1999; 49: 85-90.
- 21) Liawruangrath S., Liawruangrath B., Pibool P., Simultaneous determination of tolperisone and lidocaine by high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 26: 865-872.
- 22) Wang Z., Wan H., Anderson M.S., Rehim A.M., Blomberg G.L., Separation of lidocaine and its metabolites by capillary electrophoresis using volatile aqueous and nonaqueous electrolyte systems. *Electrophoresis* 2001; 22: 2495-2502.
- 23) Wiberg K., Hagman A., Jacobsson S.P. Rapid determination of lidocaine solutions with non- column chromatography diode array UV spectroscopy and multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 30: 1575-1586.
- 24) Youngvises N., Liawruangrath B., Liawruangrath S., Simultaneous determination of lidocaine and tolperisone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 31: 629-638.
- 25) Yin X.B., Kang J., Fang L., Yang X., Wang E., Short- capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection using porous etched joint for fast analysis of lidocaine and ofloxacin. *J. Chrom. A.* 2004; 1055: 223-228.

- 26) Candioti L.V., Robles C.J., Mantovani V.E., Goicoechea C.H., Multiple response optimization applied to development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006; 69: 140-147.
- 27) Oliveira R.T.S., Salanza-Banda G.R., Ferreira V.S., Oliveira S.C., Avaca L.A., Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron -doped diamond electrodes. *Electrophoresis* 2007; 19: 1189-1194.
- 28) Sun H., Li L., Su M., Simultaneous determination of lidocaine, proline and lomefloxacin in human urine by CE with electrochemiluminescence detection. *Chrom.* 2008; 67: 399-405.
- 29) Lumbardo M., Bloanco C., Campana A.M., Capillary zone electrophoresis with diode- array detection for analysis of local anaesthetics and opium alkaloids in urine samples. *J. Chrom. B.* 2009; 877: 833-836.
- 30) Skoog D., Holler F.J., Nieman T.A., *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Çeviri Editörleri: Kılıç E., Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998; 778-795.
- 31) Belder D., Ludwig M., Surface modification in microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 2003; 24: 3595-3606.
- 32) Stachowiak T.B., Svec F., Frchet J.M.J., Chip electrochromatography. *J. Chrom. A.* 2004; 1044: 97-111.
- 33) Poppe H., Some reflection on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *J. Chrom. A.* 1997; 778: 3-21

- 34)** Nemutlu E., Kır S., Method development and validation for analysis of meloxicam in tablets by CZE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 31: 393-400.
- 35)** Nemutlu E., Özaltın N., Altınöz S., Determination of rofecoxib, in the presence of its photodegradation product, in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 378: 504-509.
- 36)** Altria K.D., Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Trends in Anal. Chem.* 1998; 17: 204-214.
- 37)** Heiger D.N., HP CE Partner, 3DCE- Basics, Hewlett Packard (CD-ROM) 1997; 176.
- 38)** Taverniers I., Loose M.D., Bockstaele E.V., Trend in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Anal. Chem.* 2004; 23: 535-552
- 39)** Altria K.D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chrom. A.* 1999; 856: 443-463.

10. EKLER

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıdaki kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür ederim;

Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER, tez danışmanım olarak bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösterdiği, destek olduğu ve emeğini esirgemediği için,

Doç. Dr. Nusret ERTAŞ, çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemediği, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağladığı için,

Sayın Yard. Doç. Dr. H.Eda ŞATANA, çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olduğu, zamanını ve bilimsel desteğinin yanı sıra moral desteğini de esirgemediği için,

Analitik kimya anabilim dalımızın saygıdeğer öğretim üyeleri, teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için,

T.C. Refik Saydam Hıfzısıha Merkez Başkanlığı İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü, bu çalışmanın yapılabilmesi için gerekli imkanı sağladıkları için,

Hayatta en değerli varlığım olan ailem, bana her konuda olduğu gibi yüksek lisans eğitimi almamda destek oldukları için.

11. ÖZGEÇMİŞ

- Adı** : Gülden
- Soyadı** : BAŞMAKCI
- Doğum Tarih** : 29.09.1983
- Doğum yeri** : Ankara-Beypazarı
- Eğitim** : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(2001-2005)
Beypazarı Anadolu Lisesi
(1994-2001)
Sanayi İlköğretim Okulu
(1989-1994)
- Yabancı Dil** : İngilizce
- İş Deneyimleri** : T.C.Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi
Başkanlığı İlaç ve Kozmetikler Araştırma Müdürlüğü
(2006-2008)
Can Eczanesi/ Beypazarı
(2008-...)

