

**FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ DEKSKETOPROFENİN TAYİNİ İÇİN
YENİ BİR SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Aylin Ece ZİTOUNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Aylin Ece ZİTOUNİ'nin "Farmasötik Preparatlardaki Deksketoprofenin Tayini İçin Yeni Bir Sıvı Kromatografisi Yönteminin Geliştirilmesi" başlıklı tezi 04/01/2018 tarihinde jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisans Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN
Üye	: Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Musa ŞÖLENER

Enstitü Müdürü

Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN

ÖZET

FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ DEKSKETOPROFENİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Aylin Ece ZİTOUNİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN

Piyasada çeşitli farmasötik formları bulunan ve nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar grubuna ait olan deksketoprofen ağrı kesici olarak kullanılan bir maddedir. Antiinflamatuar etkisi dışında analjezik, antipiretik ve antiplatelet etkileri de bulunmaktadır. Bu çalışmada amaç; deksketoprofenin farmasötik jel formundaki ilaçlardan miktar tayini için, az maliyetli, hızlı, güvenilir bir analitik yöntem geliştirmektir. Bu deneysel çalışmada ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Geliştirilen analizde Phenomenex® marka Kinetex® model 1.3 µm partikül çaplı 50×2,1 mm ebatlarında C₁₈ kolon kullanılmıştır. Analizler 6 dakikada tamamlanmış ve maddeler 256 nm dalgaboyuna ayarlı fotodiyot dizisi dedektör ile izlenmiştir. Geliştirilen yöntem uluslararası validasyon uygulamaları kapsamında değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Deksketoprofen, Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi, İlaç analizi

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NEW LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE DETERMINATION OF DEXKETOPROFEN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

Aylin Ece ZİTOUNİ

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2018

Supervisor: Assoc.Prof.Dr Nafiz Öncü CAN

Dexketoprofen which belongs to the non-streoidal anti-inflammatory drugs group and also can be found in different pharmaceutical forms in the market, is a compound that is used as anti-inflammatory. Aside from being used as an anti-inflammatory, it is also used as an analgesic, anti-pyretic and anti-platelet. In this study, we propose to find a low-cost, fast and reliable analytic methodology for quantitative determination of dexketoprofen in the form of pharmaceutical gel. In this experimental study, we used an ultra high performance liquid chromatography technique. For the implemented analysis, we utilized a Phenomenex[®] Kinetex[®] C₁₈ column with 1,3 μm particles. The analysis was completed in 6 minutes, and the compounds were traced with photodiode array detector set at 256 nm. The implemented methodology is evaluated according to international validation application.

Keywords: Dexketoprofen, Ultra high performance liquid chromatography, Drug analysis

TEŞEKKÜR

Öncelikle tezimin her anında yanımda olan, benimle birlikte itina ve özveri ile çalışan, bilgisini esirmeyen Uzm. Kim. Murat KOZANLI'ya

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında engin bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yeni bilgiler edinmemi sağlayan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN'a

Almış olduğum dersler süresince, bilgi birikimini sabırla aktarmaya çabalayan Sayın Hocalarım Doç. Dr. Erol ŞENER'e, Prof. Dr. Dilek AK'a, Doç. Dr. Arın Gül DAL'a

Hayatımın her anında yanımda olduğu gibi yüksek lisans tezimde de bilgisini, ilgisini ve sevgisini eksik etmeyen canım annem ve Sayın Hocam Prof. Dr. Gülhan TURAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi, bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Aylin Ece ZİTOUNİ

04.01.2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	4
2.1. Deksketoprofen Trometamol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ..	4
2.2. Deksketoprofen Trometamol'ün Farmakolojik Özellikleri	4
2.3. Deksketoprofen Trometamol'ün Farmakokinetik Özellikleri.....	4
2.4. Deksketoprofen Trometamol Analizleri ile İlgili Çalışmalar.....	5
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	9
3.1. Kullanılan Kimyasallar	9
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	9
3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı.....	9
3.4. Hareketli Fazın Hazırlanışı	10
3.5. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı	10
3.6. Analiz Parametreleri.....	11
3.7. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti	11
3.7.1. Sistem uygunluk testleri	12
3.7.2. Doğrusallık	13

3.7.3. Doğruluk.....	13
3.7.4. Kesinlik	13
3.7.5. Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ).....	14
3.7.6. Spesifiklik	14
3.7.7. Kararlılık.....	14
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	15
4.1. Yöntem Geliştirme	15
4.2. Yöntem Geçerliliğinin Doğrulanması.....	21
4.3. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
KAYNAKÇA	37
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 DKP ile ilgili yapılmış olan çalışmalar	5
Tablo 3.1 Analizlerde kullanılan çözeltilere ilişkin hesaplamalar.....	10
Tablo 3.2. Analizler boyunca uygulanan değişken bileşimli hareketli faz.....	11
Tablo 3.3. USP'ye göre sistem uygunluk testleri hesaplama eşitlikleri	12
Tablo 4.1. UYPSK analizlerinde kullanılan kolonun özellikleri	15
Tablo 4.2. Değişken hareketli faz sistemi- I.....	17
Tablo 4.3. Değişken hareketli faz sistemi- II.....	17
Tablo 4.4. Değişken hareketli faz sistemi- III	18
Tablo 4.5. Değişken hareketli faz sistemi- IV	18
Tablo 4.6. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları	21
Tablo 4.7. Doğruluk çalışmalarının sonuçları	23
Tablo 4.8. Kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi	25
Tablo 4.9. Doğrusallık çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi.....	25
Tablo 4.10. Gradient akış-A	27
Tablo 4.11. Gradient akış-B.....	27
Tablo 4.12. Kararlılık çalışmaları	30
Tablo 4.13. Spesifilik çalışmaları	34
Tablo 4.14. Tiyokas Jel® 30 g (Nobel İlaç AŞ) analizlerinin sonuçları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. DKP (üstte) ve etil esterinin (altta) kimyasal yapısı	2
Şekil 1.2. Ketoprofenin sterokimyasal yapısı.	2
Şekil 3.1. Değişken hareketli faz sistemi B bileşeninin zaman karşı değişimi	11
Şekil 4.1. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi I ile elde edilen kromatogramı.....	17
Şekil 4.2. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi II ile elde edilen kromatogramı.....	17
Şekil 4.3. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi III ile elde edilen kromatogramı.....	18
Şekil 4.4. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi IV ile elde edilen kromatogramı.....	18
Şekil 4.5. 205 nm dalga boyunda görülen kromatogram	19
Şekil 4.6. 210 nm dalga boyunda görülen kromatogram.....	19
Şekil 4.7. 233 nm dalga boyunda görülen kromatogram	19
Şekil 4.8. DKP için dalga boyu taraması	20
Şekil 4.9. 256 nm dalga boyunda görülen kromatogram	20
Şekil 4.10. DKP standart çözeltisinin optimize edilen koşullar altında kaydedilen kromatogramı	22
Şekil 4.11. DKP' nin LOQ (1.25×10^{-4} mg.mL ⁻¹) seviyesindeki geri kazanım kromatogramı	23
Şekil 4.12. DKP' nin %80 geri kazanım (2.49×10^{-3} (mg.mL ⁻¹) kromatogramı	24
Şekil 4.13. DKP' nin %100 geri kazanım (3.12×10^{-3} (mg.mL ⁻¹) kromatogramı .	24
Şekil 4.14. DKP' nin %120 geri kazanım (3.74×10^{-3} (mg.mL ⁻¹) kromatogramı ..	24
Şekil 4.15. DKP' nin doğrusallık çalışması grafiği.....	26
Şekil 4.16. DKP' nin kararlılık çalışması (gradient akış-A) kromatogramı	27
Şekil 4.17. DKP' nin kararlılık çalışması (gradient akış-B) kromatogramı.....	28
Şekil 4.18. DKP' nin kararlılık çalışması (38°C kolon sıcaklığı) kromatogramı .	28
Şekil 4.19. DKP' nin kararlılık çalışması (40°C kolon sıcaklığı) kromatogramı .	29
Şekil 4.20. DKP' nin kararlılık çalışması (0.23 mL/dk akış) kromatogramı	29
Şekil 4.21. DKP' nin kararlılık çalışması (0.27 mL/dk akış) kromatogramı	29
Şekil 4.22. DKP' nin %LOD kromatogramı (4.16×10^{-5} mg.mL ⁻¹)	30

Şekil 4.23. DKP' nin %LOQ kromatogramı ($1.25 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$).....	31
Şekil 4.24. DKP'nin standart (a), test (b) ve standart katılmış plasebo (c) için 256 nm dalga boyunda kromatogramları.....	32
Şekil 4.25. Standart (a), numune (b) ve standart katılmış plasebo (c) çözeltileri kromatogramlarındaki DKP sinyallerinin pik saflığını gösteren grafikler.....	33
Şekil 4.26. Tiyokas Jel® 30 g (Nobel İlaç A.Ş.) ilaç jel çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram.....	34

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Alan
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACN	: Asetonitril
α	: Seçicilik faktörü
As	: Asimetri faktörü
BSS	: Bağlı standart sapma
CAS	: Kimyasal kuramlar servisi
COX-1	: Siklooksijenaz-1 enzim
COX-2	: Siklooksijenaz-2 enzim
DAD	: Diyod dizisi dedektör
DKP	: Deksketoprofen Trometamol
EE	: Etil Ester
EtOH	: Etanol
EP	: Avrupa Farmakopesi
K	: Kapasite faktörü
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LC	: Sıvı Kromatografisi
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin alt sınırı
MeOH	: Metanol
N	: Teorik tabaka sayısı
NSAİİ	: Non-steroidal antiinflamatuar ilaç
PTFE	: Politetrafloretilen
PDA	: Foto diyot dedektör

<i>r</i>	: Korelasyon katsayısı
<i>R_s</i>	: Ayrım gücü
<i>R_t</i>	: Alıkonma zamanı
SEM	: Ortalamanın standart hatası
SS	: Standart sapma
<i>T</i>	: Sıcaklık
<i>T</i>	: Kuyruklanma faktörü
USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UYPSK	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi
UV	: Mor ötesi ve görünür bölge spektrofotometrisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bütün dünyada yaygın olarak tüketilen nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar (NSAİİ); romatizmal hastalıklar, kas iskelet sistemi ağrıları ve baş ağrıları nedeniyle kullanılmalarının yanı sıra, bel ağrısı, diş ağrısı, artrit ve gut hastalığı gibi durumlarda da endikedirler (Öner 2010). Bu ilaçlar, enflamasyonu baskılayan narkotik olmayan analjezikler olarak da adlandırılmaktadırlar. Ancak hem farmakolojik etkileri hem de yapıları açısından steroid yapıda olmamaları nedeniyle daha çok nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar olarak bilinmektedirler. NSAİİ antienflamatuvar etkilerinden başka analjezik, antipiretik ve antiplatelet etkileri de bulunmaktadır.

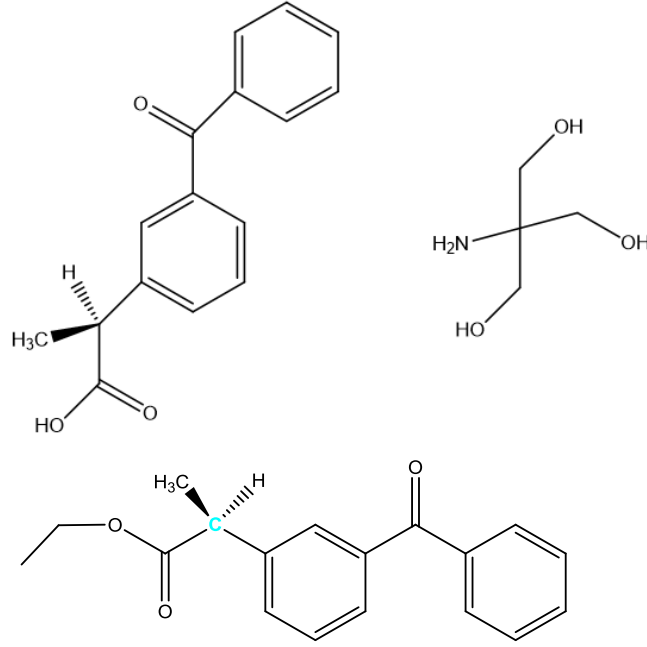
Çoğu NSAİİ, siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) izoenzimlerinin her ikisini de inhibe ederek etkiler. COX, araşidonik asitten tromboksan ve prostoglandin yapımında görev alan bir enzimdir. Prostaglandinler, inflamasyon oluşum sürecinde diğer görevli maddelerle birlikte iletim molekülü olarak rol oynar. NSAİİ kullanımı ile COX enzimlerinin inhibisyonu gerçekleşir ve ağrıyı oluşturan prostoglandinlerin sentezi bloke edilir. Böylece ağrı oluşumu engellenmiş olur (Demirhan 2008, Aykaç 2010,).

NSAİİ'lerin COX-1 ve COX-2 izoenzimleri üzerine olan selektiviteleri aynı değildir ve belirgin farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, NSAİİ'lerin bu iki izoenzime karşı selektivite derecelerinin incelenmesine ve COX-2'yi inhibe eden ve COX-1'e olumsuz etki etmeyen, dolayısıyla COX-1 inhibisyonuna bağlı ülserasyon gibi yan etkilerin ortaya çıkmasına izin vermeyen yeni ilaçların geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda COX-2 selektivitesi olan ilaçlar üzerinde durulmaktadır. Bu yeni ajanların güçlü antienflamatuvar etki göstermelerine karşın daha az gastrointestinal yan etki gösterdikleri ileri sürülmektedir (Zegpi, 2009, s. 291-297).

NSAİİ'ler santral etkili analjeziklerden farklı olarak bağımlılık oluşturmama, tolerans geliştirmeme, solunum depresyonu ve sedasyona yol açmama gibi avantajlara sahiptirler.

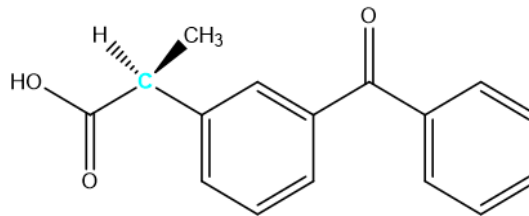
Bu çalışmada, bir NSAİİ etken maddesi olan deksketoprofen trometamolün sıvı kromatografik miktar tayini için yeni geliştirilen bir yöntemden bahsedilecektir. Deksketoprofen trometamol (DKP) (Şekil 1.1) non-steroidal antienflamatuvar bir madde

olan, ketoprofenin aktif S (+) enansiyomeridir ve onun analjezik ve antiinflamatuvar aktivitesinden sorumludur; aril-propionik asit grubundan olup, ülkemizde son yıllarda kullanıma sunulan bir ilaç etken maddesidir.



Şekil 1.1 DKP (üstte) ve etil esterinin (altta) kimyasal yapısı

Ketoprofen ((RS)-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid), S(+) ile R(-) enansiyomerlerinin eşit miktarlarından oluşan rasemik bir karışımdır. Ketopropende R(-) ve S(+) enansiyomerlerini oluşturan bir tane asimetric karbon atomu vardır (Şekil 1.2). Ketoprofenin her iki enansiyomeri de farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. İnaktif R(-) enansiyomeri ketoprofenin terapötik özelliklerine katkıda bulunmaz, fakat metabolizma sürecine katılır (Barbonaj, 2001, s. 245-262; Tuncer, 2006, s. 30-34; Duman, 2007, s. 145-149; Serrano-Rodriguez, 2014, s. 523-525; Willams, 2011, s. 130-138).



Şekil 1.2 Ketoprofenin stereokimyasal yapısı.

Yapılan literatür incelemelerine göre geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda DKP tayini için geliştirilmiş morötesi ve görünür bölge spektrofotometrisi (UV), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ve ince tabaka kromatografisi (İTK) teknikleri ile yapılan analiz yöntemleri mevcuttur. Bu tezin amacı DKP'nin jel formundaki farmasötik preparattan tayini için hızlı, güvenilir ve ucuz bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UYPSK) yönteminin geliştirilmesi, geçerliliğinin sağlanması ve gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin gösterilmesidir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Deksketoprofen Trometamol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

CAS numarası 156604-79-4 olan DKP'nin CAS adlandırması 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol(S)-3benzoil alfa metil benzen asetat olup molekül formülü $C_{20}H_{25}NO_6$ 'dır. Molekül ağırlığı 375,43 g/mol'dür (http-1).

DKP kokusuz beyaz renkli katı toz halinde bulunur. Su ve metanolde kolaylıkla çözünür, etil eterde çözünmez. Işıktan etkilendiği bilinmektedir. 0.01 mg/mL derişimdeki sudaki çözeltisinin pH değeri 5,5-7,0 aralığındadır. Log P değeri yaklaşık olarak 3,88 olarak belirtilmiştir (http-1).

2.2. Deksketoprofen Trometamol'ün Farmakolojik Özellikleri

Deksketoprofen antiinflamatuvar etkilerini prostoglandin sentezini inhibe ederek gösterir. Prostoglandin sentezinde yaptığı inhibasyon siklooksijenaz enzimlerini (COX-1 ve COX-2) inhibe etmesine bağlıdır. Deksketoprofenin analjezik etkisinin de prostoglandin sentezini inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Deksketoprofenin hem periferik ve hem de santral etkileri vardır. Antipiretik etkilerini santral sinir sisteminde (SSS) hipotalamusu etkilemesine bağlı vazodilatasyon yaparak gösterirler. Ketoprofenin R(-) enansiyomerinin ülserojenik aktivitesi bulunur. Bu da COX-1 enzimini inhibe ediyor olmasından kaynaklanır. Deksketoprofenin tek başına kullanımı çift doz ketoprofenin analjezik etkisine eşittir. Deksketoprofen ameliyat sonrası ağrılarda da kullanılır (Kesimci, 2011, s. 153-159).

Deksketoprofen santral etkili analjeziklerden farklı olarak bağımlılık oluşturmama, tolerans geliştirmeme, solunum depresyonu ve sedasyona yol açmama gibi avantajlara sahiptir.

2.3. Deksketoprofen Trometamol'ün Farmakokinetik Özellikleri

Oral yolla verildiğinde 15-45 dakika sonra maksimum kan değerine ulaşır. Analjezik etki 4-6 saat sürer. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %99 dur. Deksketoprofen trometamol tuzunun çözünürlüğü fazla olduğu için oral emilim daha hızlıdır. Eliminasyonunun hızlı oluşu nedeniyle tekrarlanan dozlarda birikim söz konusu olmaz. Yiyeceklerle birlikte alınır absorpsiyon hızı azalır. Deksketoprofen karaciğerde biyotransformasyona uğrar. Dozun %1'i idrarla değişmeden atılır. Ana metabolit

glükronit konjugatıdır. Metabolit farmakolojik olarak etkisizdir. Uygulanan dozun %70-80 kadarı ilk 12 saat içinde böbreklerden atılır (Chandrasekharan, 2007; Moore, 2008; Barbonaj, 2001, s. 245-262).

DKP aynı zamanda topikal kullanıma da sahiptir. Topikal kullanılan DKP az miktarlarda perkütanöz absorpsiyon gösterir. Düşük sistematik biyoyararlanım nedeniyle sistematik etki beklenmez. DKP'nin dağılım yarılanma ömrü 0,35 saat olup eliminasyon yarı ömrü 1,65 saattir (http-2).

2.4. Deksketoprofen Trometamol Analizleri ile İlgili Çalışmalar

DKP'nin farmasötik alanda çokça kullanılan bir madde olması, birçok farmasötik preparatta yer alması ve vücudun farklı dokularına geçişinin yüksek olması nedeniyle üzerinde birçok analitik çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yayınlanmış olan miktar tayini odaklı çalışmalar Tablo 2.1'de listelenmiştir.

Tablo 2.1 DKP ile ilgili yapılmış olan çalışmalar

Bileşik/ Örnek	Analitik yöntem	Kolon, Kolon sıcaklığı	Hareketli faz, Akış hızı, Alıkonma zamanı	Dedektör, Dalga boyu, Enjeksiyon hacmi	LOD, LOQ, Doğrusallık Aralığı	Referans
DKP-TCS	RP- HPLC	KROMASİL C ₁₈ (250mm × 4,6mm) 5,0µm 35°C	MeOH: Su (60:40) 0,7 ml dk ⁻¹ , 10,0 dk	PDA, 254 nm, 10,0µL	2,5- 0,4 µg/ml	Dhaneshwar vd., 2013, s.604-608
DKP-TMD- HLP	LC	C ₁₈ modified sol-gel	ACN: Sodium Dihydrogen Phosphate (pH:4,10 ;0.1M) (50:50), 1 ml dk ⁻¹ , 9,0 dk	DAD, 210nm,	100,0-225,0 mg.mL ⁻¹ , 200,0- 400,0 mg.mL ⁻¹ , 2,0-4,0 mg.mL ⁻¹	Salmerón- García vd., 2008, s.767- 772

DKP	RP-HPLC	Thermo Hypersil BDS -C ₁₈ (250mm × 4,6 mm) 5 μm	MeOH: Acetate Buffer (pH: 4 with Glacial Acetic Acid) (65:35) 1,0 ml dk ⁻¹ 12,0 dk	UV, 255nm 20 μL	2,0 μg/ml, 4,0 μg/ml, 5,0-10,0 μg/ml	Bhusari vd., 2012, s.321-326
DKP	RP-HPLC	C ₁₈ (250mm × 4,6mm) 25°C	MeOH: ACN (75:25) 0,9 ml dk ⁻¹ ,	UV, 262 nm, 20,0μL	0,01298 μg/ml, 0,05544 μg/ml, 30,0-70,0 μg/ml	Archana vd., 2013, s.395-400
DKP-THC	RP-HPLC	C ₁₈ (250mm × 4,6mm) 5 μm	MeOH: Sodium Phosphate Buffer (pH: 4,5) (70:30) 1,0 ml dk ⁻¹ 8,40 dk	UV 280 nm,	4,0156-12,1686 μg/ml, 30-240 μg/ml	Patel vd., 2016, s.178-195
DKP-THC	RP-HPLC	Purosphere Star RP-18e (250mm × 4,0mm i.d) 5 μm	MeOH: Phosphate Buffer (pH: 4,5 with Orthophosphoric Acid; 0.035M) (65:35) 1,0 ml dk ⁻¹ 8,91 dk	UV, 260 nm 20 μL	1,5 μg/ml, 5,0 μg/ml, 5,0-30,0 μg/ml	Harde vd., 2012, s.1797-1802
DKP-PCM	RP-HPLC	Thermo Hypersil ODS-C ₁₈ (250mm × 4,6mm) 5 μm	MeOH: Amonium Acetate Buffer (65:35) 1,0 ml dk ⁻¹ , 5,94 dk	UV/VIS, 256 nm, 20 μL	2,0 μg/ml, 4,0 μg/ml, 5,0-10,0μg/ml	Mulla vd., 2011, s.1-4
DKP	RP-HPLC	Luna C ₁₈ (250mm × 4,6mm) 5 μm,100A 25°C	MeOH: Phosphate Buffer (pH: 6.8) (70:30) 1,0 ml dk ⁻¹ 4,31 dk	UV/VIS 260 nm,	2,0- 12,0 μg/ml	Krunal vd., 2011, s.78-85
DKP-PCM	RP-HPLC	Hypersil BDS- C ₁₈ (250mm × 4,5mm) 5 μm 40°C	ACN: Potassium Dihydrogen Phosphate Buffer (pH: 6,0 with Triethyladke; 0,01M) (25:75) 1,0 ml dk ⁻¹ 6,732 dk	PDA, 254 nm	0,4-2,3 μg/ml, 1,3-7,0 μg/ml, 50,0-150,0 μg/ml	Pokharkar vd., 2011, s.49-57

DKP	RP-HPLC	Nucleodur C ₁₈ (250mm × 4,5 mm) 5 µm	ACN: MEOH (25:75) 1,0 ml dk ⁻¹	UV, 258 nm 25 µL	0,5613 µg/ml, 1,7010 µg/ml, 10,0-80,0 µg/ml	Öztürk vd., 2017, s.33-41
DKP-SA-DIC	UPLC	İnertsil ODS-C ₄ (50mm × 2,1mm) 2 µm	ACN (%100), MEOH: Water (1:1) 0,734 dk	PDA, DKP: 254 nm SA: 292 nm DIC: 254 nm 20 µL	0,00325 µg/ml, 0,00985 µg/ml, 0,39-20,0 µg/ml	Tamer, 2017, s.1-8
DKP-PCM	RP-HPLC	Hypersil BDS- C ₈ (250mm × 4,5mm) 5 µm	Sodium Dihydrogen Phosphate (0,05 M): ACN: MEOH (60:20:20) 1,0 ml dk ⁻¹ DKP: 8,51 dk	PDA, 256 nm 25 µL	0,4 µg/ml, 2,3µg/ml, 50,0-150,0µg/ml	Khambe vd., 2015, s.279-292
DKP-PCM	UV	-	-	UV, 284,64-368 nm,	0,14 µg/ml, 0,42 µg/ml, 2,0-24,0 µg/ml	Chaudhari vd., 2012, s.179-183
DKP-PCM	HPTLC	Silica Gel G 60F ₂₅₄	Toluene: Ethyl Acetate: Acetic Acid (6:4:0.2),	256 nm,	15,0 ng spot ⁻¹ , 25,0 ng spot ⁻¹ , 100,0-600,0 ng spot ⁻¹	Rao vd., 2011, s.32-38
DKP-THC	RP-HPLC	Thermo Hypersil BDS -C ₁₈ (250mm × 4,6 mm) 5 µm 30C	ACN: Potassium Dihydrogen Phosphate Buffer (pH: 6.0 with Triethyladke; 0,05M) (25:75) 1,0 ml dk ⁻¹ , 8,732 dk	UV, 260nm, 20 µL	50,0-150,0 µg/ml	Vyavahare vd., 2014

Tablo 2.1’de görüldüğü üzere; DKP analizleri için ağırlıklı olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Bu teknikle yapılan analizlerde ise genellikle ilaç kalite-kontrol uygulamalarında sıkça tercih edilen 250x4,6 mm

ebatlarında C₁₈ kolon kullanılmıştır; dedektör olarak genellikle absorpsiyon bazlı dedektörler tercih edilmiştir.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Standart madde olarak kullanılan DKP %99,2 saflıkta Huangshi Shixing Pharmaceutical Co., Ltd. (Çin Halk Cumhuriyeti) firmasından satın alınmıştır. YPSK saflıktaki asetonitril J. T. Baker (ABD) firmasından, asetat tamponu hazırlamak için kullanılan %99,0 saflıktaki amonyum asetat Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, HCl Merck (Almanya) firmasından, tip 1 saflıktaki su (>18 MOhm dirençte) Millipore (Fransa) firmasının ürünü olan ultra saf su cihazından temin edilmiştir. Tiyokas® Jel (30 g) ilaç örneği ise Nobel İlaç A.Ş. (Düzce) firmasından tedarik edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

UYPSK analizlerinin tamamında Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan Nexera-i LC-2040C DAD (3D) dedektörlü kompakt model bir sıvı kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Kullanılan UYPSK cihazının yanında Intel(R) Core(TM) i3-4170 CPU @ 3.70 GHz işlemcili bilgisayar ve Shimadzu LabSolution Version 5.81 veri analiz programı kullanılmıştır.

Analiz cihazlarının yanı sıra analizler öncesi hazırlık aşamalarında kimyasal maddelerin tartımında Mettler-Toledo (İsviçre) marka TLE204 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanmasında 20-100 µL ve 100-1000 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, çözeltilerde homojenliği sağlamak için ISOLAB Laborgeraete GmbH (Almanya) Advanced model vorteks karıştırıcı, çözeltileri içinde barındırdığı çözünmüş gazlardan arındırmak için Jeiotech Lab Companion (Kore) marka UCS-20 model ultrasonik banyo ve çözeltilerin pH'ını ayarlanmasında Thermo Scientific (ABD) marka Orion Versa Star Advanced Electrochemistry Meter model pH metre kullanılmıştır. Analiz kolonu olarak Phenomenex® (ABD) marka Kinetex® model 1,3 µm partikül çaplı C₁₈ (50×2,1 mm) analitik kolon kullanılmıştır.

3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

DKP standart stok çözeltisi için 23,0 mg standart madde tartılıp 250 mL balon jode hareketli faz A çözeltisi içinde çözülmüştür. İlerleyen aşamalarda gerçekleştirilen yöntem geçerliliği çalışmalarında kullanılan kalite kontrol çözeltileri bu stok çözeltinin Hareketli faz A çözeltisi ile seyreltilmesi yoluyla hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler

0,22 µm politetrafloroetilen (PTFE) filtreden süzülerek analize tabi tutulmuştur. Hazırlanan çözeltilere ilişkin seyreltme hesaplamaları Tablo 3.1’de sunulmuştur.

Tablo 3.1 Analizlerde kullanılan çözeltilere ilişkin hesaplamalar

DKP (µL)	Hareketli faz A (µL)	Son hacim (µL)	C _{DKP} (mg.mL ⁻¹)
20	9.980	10.000	1,25×10 ⁻⁴
50	9.950	10.000	3,12×10 ⁻⁴
80	9.920	10.000	4,99×10 ⁻⁴
100	9.900	10.000	6,24×10 ⁻⁴
120	9.880	10.000	7,48×10 ⁻⁴
250	9.750	10.000	1,56×10 ⁻³
400	9.600	10.000	2,49×10 ⁻³
500	9.500	10.000	3,12×10 ⁻³
600	9.400	10.000	3,74×10 ⁻³

3.4. Hareketli Fazın Hazırlanışı

Analizler boyunca bileşimi sürekli değişen bir hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli faz A için Asetonitril: Su: Tampon (3 M, pH: 3,5 asetat tamponu) (28:70:2, *h/h/h*)’dan oluşan bir çözelti hazırlanmıştır. Asetat tamponu hazırlamak için %99,0 saflıktaki katı amonyum asetatın 25,0 g tartılıp 100 mL’lik balon jöjeye aktarılmış, üzerine 25,0 mL saf su eklenerek çözündürülmüştür. Bu çözeltilere 38,0 mL 7 M HCl eklenmiş ve son çözeltilerin pH’ı 2 M HCl çözeltisi ile pH 3,5’a ayarlanarak su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. Daha sonra çözelti 0,22 µm filtreden süzülerek katı partiküllerden arındırılmıştır. Hareketli faz B çözeltisi için Asetonitril:Su (70:30, *h/h*) karışımı kullanılmıştır. Tüm çözücüler, yaklaşık 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek çözülmüş gazların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son aşamada YPSK cihazının pompa ünitesinde bulunan karıştırıcı valf kullanılarak çözücülerin istenilen oranda karıştırılarak hareketli fazın oluşturulması ve sisteme gönderilmesi sağlanmıştır.

3.5. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı

Analizler için Nobel İlaç A.Ş. firmasının ürünü olan Tiyokas Jel 30 g adlı ilaç numunesi kullanılmıştır. Numune hazırlanışında yaklaşık 6,25 mg DKP içerdiği beyan edilen 500 mg jel doğrudan 10 mL’lik balon jöjeye tartılmış, hareketli faz A ile çözündürülmüş ve hacmine tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltilerden 500 µL alınmış, 10

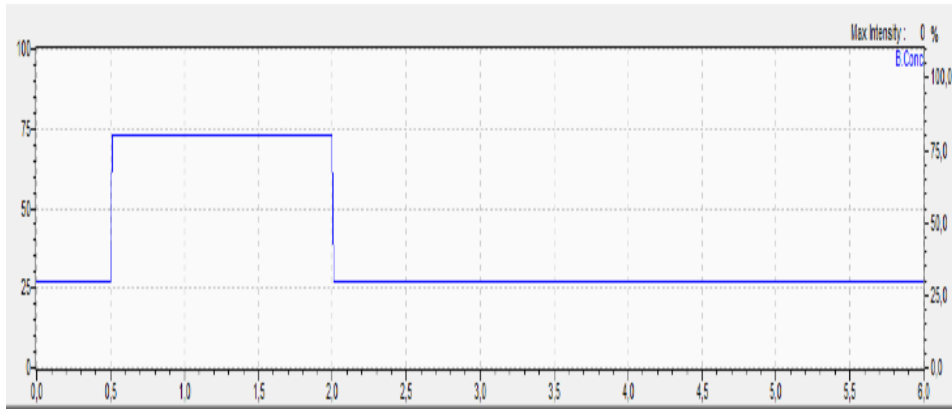
mL'lik balon jøjeye aktarılmış ve hacmine hareketli faz A çöztelisi ile tamamlanmıştır. Elde edilen son çözteli 0,22 µm gözenek çaplı PTFE filtreden süzölerek sisteme enjekte edilmiştir. Son çöztelideki beklenen DKP derişimi $3,12 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

3.6. Analiz Parametreleri

Analizler boyunca kullanılan değişken bileşimli hareketli fazın içeriği Tablo 3.2'de verilen programa gore duzenlenmiştir. Akış hızı tüm analizlerde 0,25 mL.dk⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır. Değişken hareketli faz bileşiminin Hareketli Faz B bileşimi yönünden grafiksel gösterimi şekil 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Analizler boyunca uygulanan değişken bileşimli hareketli faz

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (yüzde)	Hareketli Faz B (yüzde)
0	70	30
0,50	70	30
0,51	20	80
2,00	20	80
2,01	70	30
6,00	70	30



şekil 3.1. Değişken hareketli faz sistemi B bileşeninin zamana karşı değişimi

Enjeksiyon hacmi 1 µL, kolon sıcaklığı 40 °C ve numune bekleme sıcaklığı 10 °C olarak uygulanmıştır. Analitlerin dedektör yanıtları 256 nm dalga boyunda izlenmiştir. Dedektörün sinyal toplama frekansı 40 Hz ve slit genişliği 8 nm olarak ayarlanmıştır.

3.7. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti

Yöntem geçerliliği uygulamaları, geliştirilen yönteme Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) tavsiye ettiği şekilde uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı test edilmiştir. Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, LOD, LOQ, sistem uygunluk ve kararlılık testleri yapılmıştır.

3.7.1. Sistem uygunluk testleri

Analizler sırasında kullanılan UYPSK cihazının ve metodun analitik açıdan değerlendirmeye uygun sinyal ürettiğinin doğrulanması amacıyla sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k') ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini oluşturur. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri DKP için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan formüller Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. USP'ye göre sistem uygunluk testleri hesaplama eşitlikleri

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	N : teorik tabaka sayısı t_R : alıkonma zamanı W : pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$= \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$	T : kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Simetri faktörü	$A_s = \frac{\beta_{0.10}}{\alpha_{0.10}}$	A_s : asimetri faktörü $\beta_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Ayırım gücü	$R_s = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	R : ayırım gücü t_R : alıkonma zamanı t_{Rp} : önceki pikin alıkonma zamanı W : pik genişliği W_p : önceki pikin pik genişliği

Kapasite faktörü	$k' = \frac{t}{t_0} - 1$	k' = kapasite faktörü t : alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman
Bağıl alıkonma zamanı	$= \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	α : bağıl alıkonma zamanı k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman

3.7.2. Doğrusallık

Geliştirilen yöntemde analit cevabının konsantrasyona karşı doğru orantılı olarak değişmesi ve kalibrasyon grafiğinde noktaların düz bir çizgi üzerinde yer alması doğrusallığın bir göstergesidir; eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) ile ifade edilen bir parametredir. Doğrusallığı belirleyebilmek için en az 5 değişik derişimde olmak üzere bir seri çözeltinin analiz edilmesi uygun görülmektedir; bu derişim seviyelerinin alt sınırı örnek analizlerinde beklenen hedef seviyenin %50 sinden düşük ve üst sınırı ise %120'sinden yüksek olacak şekilde seçilmelidir. Bu amaçla, 9 farklı derişimde hazırlanan DKP çözeltileri ($1,25 \times 10^{-4}$, $3,12 \times 10^{-4}$, $4,99 \times 10^{-4}$, $6,24 \times 10^{-4}$, $7,48 \times 10^{-4}$, $1,56 \times 10^{-3}$, $2,49 \times 10^{-3}$, $3,12 \times 10^{-3}$ ve $3,74 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹) geliştirilmiş olan yöntem ile analiz edilerek derişime karşı analit cevabının yer aldığı kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır.

3.7.3. Doğruluk

Analizler sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanan doğruluk için elde edilen sonuçlar ortalama yüzde geri kazanım olarak verilmiştir. Önceden analiz edilen plasebo çözeltisi içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelere denk gelecek şekilde DKP standart maddesi ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.7.4. Kesinlik

Geliştirilen yöntemle yapılan tekrarlı analizlerin birbirine yakınlığının ölçüsü kesinlik olarak kabul edilmektedir. Kesinlik çalışmaları günler içi ve günler arası

deneyleri içermektedir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan $3,12 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ derişimdeki DKP standart çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyonu ile kesinlik çalışması yapılmıştır. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve ortalamanın %95 güven seviyesindeki olası sınırları verilmiştir.

3.7.5. Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)

LOD, analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği, ancak miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişim olarak değerlendirilmektedir. LOQ ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyi olarak bilinir. LOD ve LOQ değerleri, ICH'in tavsiyeleri baz alınarak hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri saptama sınırı için 3,3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır.

3.7.6. Spesifiklik

Yöntemin seçicilik parametresi, hedef bileşikle girişim yapabilecek özellikte olan ve örneklerde var olma olasılığı olan safsızlıkların yanında hedef bileşimin ölçülebilme yeteneği olarak değerlendirilir. DKP safsızlıklarının ve bozunma ürünlerinin muhtemel etkisini ve ürünlerdeki katkı maddelerinin oluşturabileceği girişimleri incelemek için çeşitli incelemeler yapılmıştır. Bu amaçla; derişimi bilinen DKP çözeltisi çeşitli bozundurma işlemlerine tabi tutularak bozunma ürünleri yönünden incelenmiştir. Elde edilen kromatogramlar standart çözeltilerinkilerle karşılaştırılmış ve olası pozitif ve negatif girişimler araştırılmıştır. Ayrıca analit piklerinin saflıkları diyot dizisi dedektör (DAD) ile kontrol edilmiştir.

3.7.7. Kararlılık

Kararlılık; yöntemin analiz parametrelerindeki küçük değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir ve normal kullanımındaki güvenilirliğin bir ölçüsüdür. Kararlılık çalışmalarında kullanılan $3,12 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ derişimdeki DKP çözeltileri; geliştirilen yöntemdeki rutin analiz parametrelerinin dışında farklı akış hızları, kolon sıcaklıkları ve çözücü yüzdeleri kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların başlangıç koşullarına oranla yüzde simetri faktörü değişimi hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Yöntem Geliştirme

Geliştirilen bu yöntemde DKP'nin fiziksel ve kimyasal yapısı ile geçmişten günümüze DKP ile ilgili yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak uygun bir hareketli faz ve sabit faz seçimi yapılmıştır. Analitik yöntemlerin sahip olması gereken genel özelliklerin yanı sıra analiz süresini kısa tutabilmek ve hızlı sonuç elde edebilmek adına yöntem geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde hızlı ve güvenilir analiz yöntemleri geliştirmenin en tercih edilen yollarından biri, yeni ve gelişmiş analitik cihazlar ve donanım kullanımınıdır. Sıvı kromatografisinde ise etkili ayırımı geliştirmek için en temel yollarından biri, küçük partiküllere sahip kolonları kullanmaktır. UYPSK tekniğinde özellikle 2 µm'nin altında partikülleri ve dar boşlukları olan kolonlar kullanılarak düşük çözücü tüketimi, yüksek kolon verimi ve kısa analiz süresi elde etmek mümkündür. (Badulla, 2017; Özdemirhan, 2013). Bu çalışmada da yukarıda belirtilen gerekçelere uygun olarak çekirdek-kabuk veya solid-core yapısı olarak da nitelendirilen “Core-Shell” teknolojisi ile üretilmiş olan Phenomenex® (ABD) marka Kinetex® model kolon ve kompakt bir UYPSK sistemi kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan kolonun özellikleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. UYPSK analizlerinde kullanılan kolonun özellikleri

Parametre	Değer
Partikül boyutu	1,3 µm
Kolon uzunluğu	50 mm
Kolon iç çapı	2,1 mm
Yüzey alanı (m ² .g ⁻¹)	200
Karbon yüzdesi (%)	12
Por çapı	100 Å
Çalışılabilir pH aralığı	1,5-8,5

Çekirdek-kabuk parçacık yapısına sahip kolonlar ticari olarak “Core-Shell”, “Fused-Core”, “Solid-Core” vb adlar altında pazarlanmaktadır. Bu tip partiküller merkezde katı bir çekirdek etrafında düzgün bir şekilde yerleşmiş poröz yapılı bir kabuk kısmından oluşmaktadır. Merkezdeki çekirdek kısmı bir taraftan kabuk kısmını desteklerken diğer taraftan maddelerin parçacık içine gereğinden fazla difüze olmasını

engeller. Kabuk kısmı ise alıkonmada gereken ana etmen olarak çalışır ve az bir difüzyon mesafesi ile maddelerin ayrılmasını sağlar. Sonuçta sivri piklere sahip analit sinyalleri elde edilir. Ayrım kalitesi aynı ebatlı, klasik poröz parçacıklı dolgu maddeleri ile doldurulmuş kolonlara göre daha iyidir ve sistem basıncı beklenenden daha düşüktür. Sonuçta 400 bar seviyesinde klasik sıvı kromatografisi cihazları ile yapılabilen ama UYPSK seviyesinde verime sahip analizlere olanak sağlanmış olur. Doğal olarak, parçacık boyutu daha da düşürüldüğünde (bu tez çalışmasında kullanılan kolonda olduğu gibi) basınç artar, fakat buna rağmen 500 bar seviyesindeki orta düzeyde UYPSK cihazları ile çok daha yüksek verimli ve seçiciliği yüksek analizler yapılabilir. Difüzyon mesafesi kısa olduğu için hem sivri pikler elde edilir, hem de analizler kısa sürede tamamlanabilir. Kısa sürede analiz yapılabilmesi toplam analiz maliyetleri ve kolon ömrü açısından da avantajlar sağlar.

Bu tez çalışmasında da yukarıda sayılan temeller doğrultusunda yüksek verimli analizler elde edebilmek adına ticari olarak piyasada bulunan en küçük parçacıklı çekirdek-kabuk dolgululu kolon olan Phenomenex firmasının ürünü Kinetex serisi 1,3 mikron parçacık çaplı C₁₈ kolon sabit faz olarak kullanılmıştır.

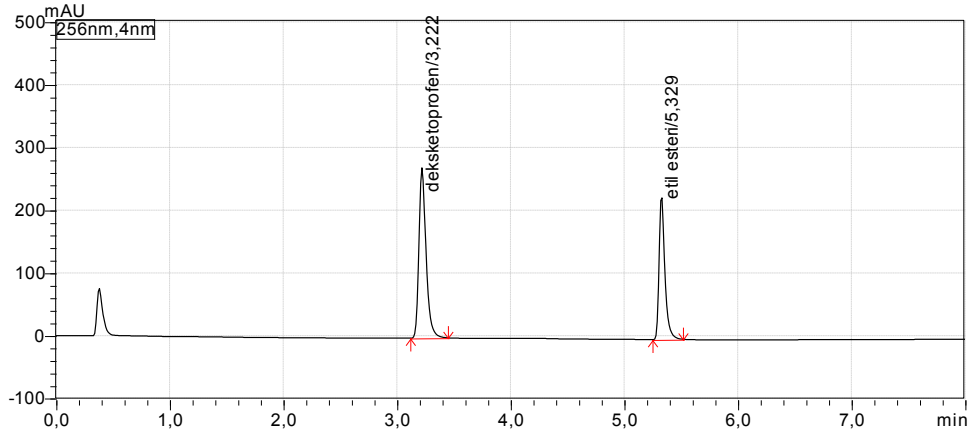
Literatürde yer alan çalışmalar ve sıvı kromatografisindeki genel uygulamalar göz önünde bulundurularak, hareketli faz bileşenlerinin seçiminde başlangıç aşamasında asetonitril, metanol, su çözücüleri ve çeşitli tampon türleri denenmiştir. Bu aşamada, analitik yöntemlerin en önemli parametrelerinden olan spesifiklik de eşzamanlı olarak değerlendirilmiştir. DKP sinyali, izokratik koşullar altında ve görece daha basit hareketli faz bileşimleri ile gözlenebilmiş olmakla birlikte, analizlerde DKP'nin en önemli safsızlığı ve bozunma ürünü olan DKP etil esterinin de gözlenebilmesi ve spesifikliğin bu şekilde kuvvetlendirilebilmesi amacıyla analiz boyunca bileşimi değişen (gradient) bir hareketli faz kullanılması uygun görülmüştür. Yapılan ön denemeler sonucunda pH'ı 3,5 olan asetat tamponunun DKP'nin alıkonulma, pik kalitesi ve diğer analitik özellikler yönünden optimum sonuçları verdiği gözlenmiştir.

Hareketli faz seçimi sırasında analiz çözeltisi olarak DKP ve etil esterini içeren yer belirleme çözeltisi kullanılmıştır. Etil ester yer belirleme çözeltisi DKP'nin metanollü kuvvetli asidik ortamda bozundurulması sonucu elde edilmiştir. Aşağıda, yöntem geliştirme sırasında yapılan seri incelemelerde kullanılan hareketli faz bileşimleri (Tablo

4.2., 4.3., 4.4. ve 4.5.) ve ilgili kromatogramlar (Şekil 4.1., 4.2., 4.3 ve 4.4.) yer almaktadır.

Tablo 4.2. Değişken hareketli faz sistemi- I

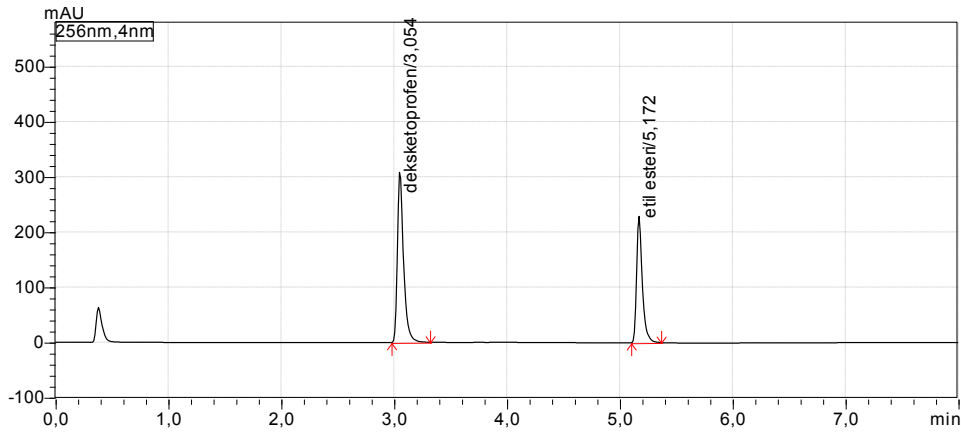
Zaman (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış hızı (mL/dk)
0-1	90	10	0,25
2,5-3,8	90→30	70	0,25
4,5-8	30→90	10	0,25



Şekil 4.1. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi I ile elde edilen kromatogramı

Tablo 4.3. Değişken hareketli faz sistemi- II

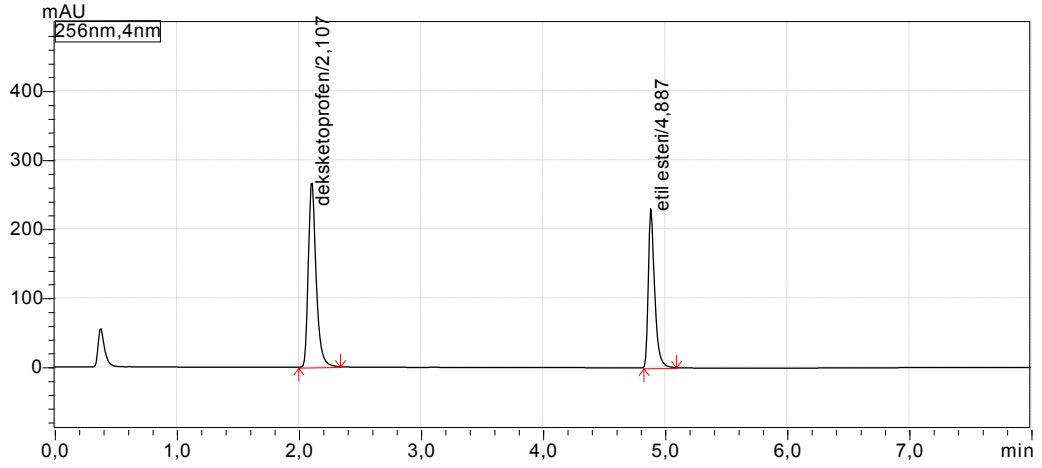
Zaman (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış hızı (mL/dk)
0-0,5	90	10	0,25
2,5-3,8	90→30	70	0,25
4,5-8	30→90	10	0,25



Şekil 4.2. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi II ile elde edilen kromatogramı.

Tablo 4.4. Değişken hareketli faz sistemi- III

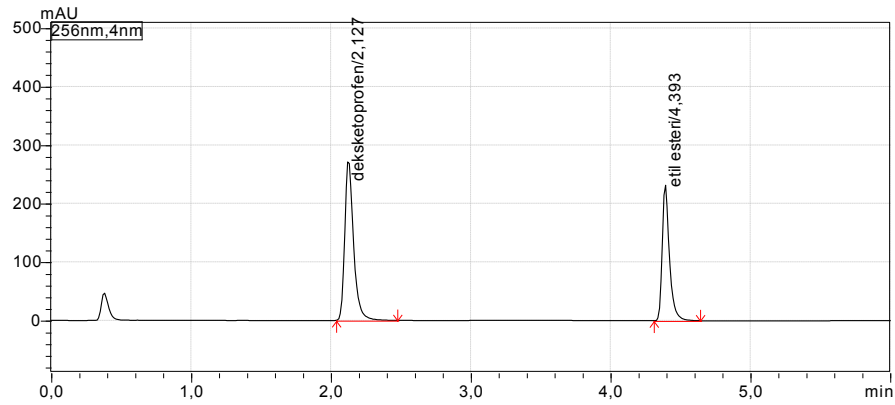
Zaman (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış hızı (mL/dk)
0-0,5	80	20	0,25
2,5-3,8	80→30	70	0,25
4,5-8	30→80	20	0,25



Şekil 4.3. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi III ile elde edilen kromatogramı

Tablo 4.5. Değişken hareketli faz sistemi- IV

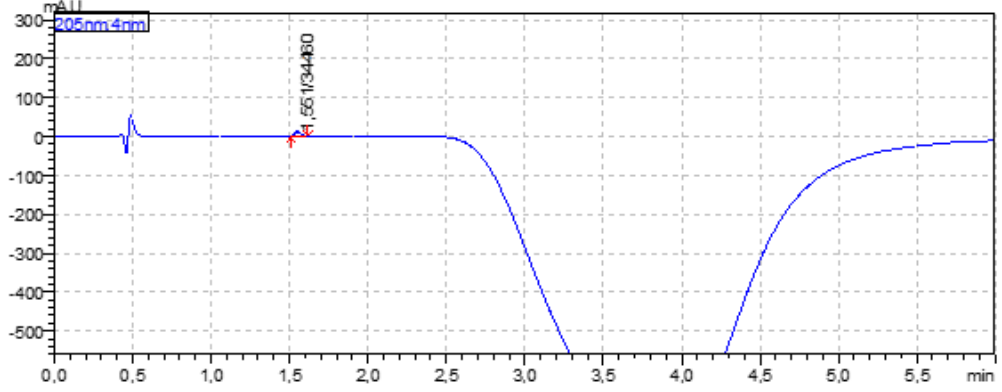
Zaman (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış hızı (mL/dk)
0-1	80	20	0,25
1,01-3,0	80→30	70	0,25
3,01-6	30→80	20	0,25



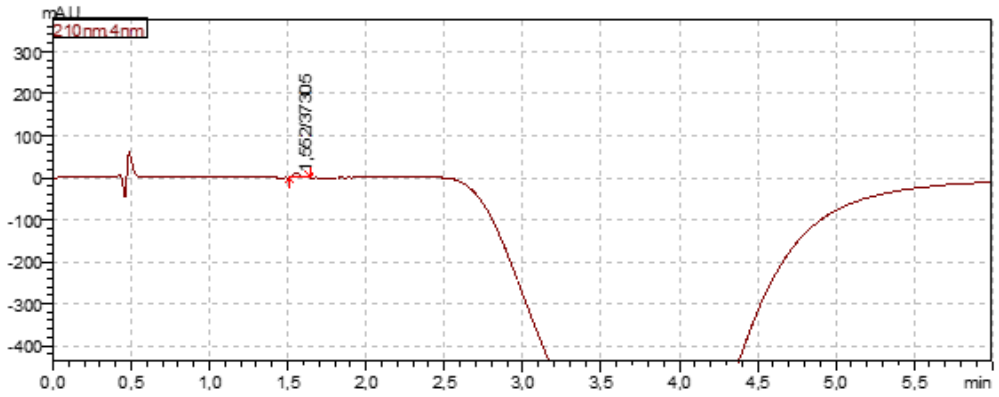
Şekil 4.4. DKP ve DKP-EE içeren çözeltinin değişken hareketli faz sistemi IV ile elde edilen kromatogramı

Yöntemde kullanılan değişken bileşimli hareketli faz akış programı, temel çizgi dalgalanmalarına yol açtığından düşük dalga boylarında düz bir temel çizgi elde

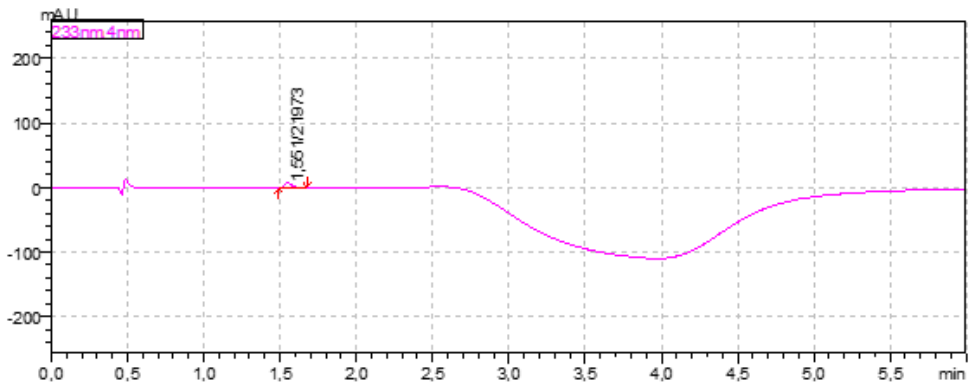
edilememiştir. Eş zamanlı yürütülen deneyler sonucunda Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de sırasıyla 205, 210 ve 233 nm dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4.5. 205 nm dalga boyunda görülen kromatogram

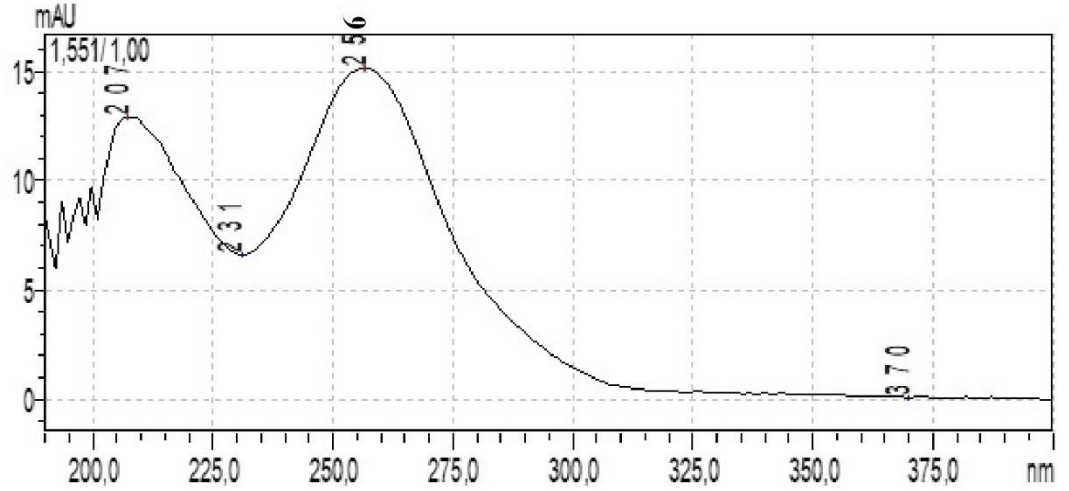


Şekil 4.6. 210 nm dalga boyunda görülen kromatogram



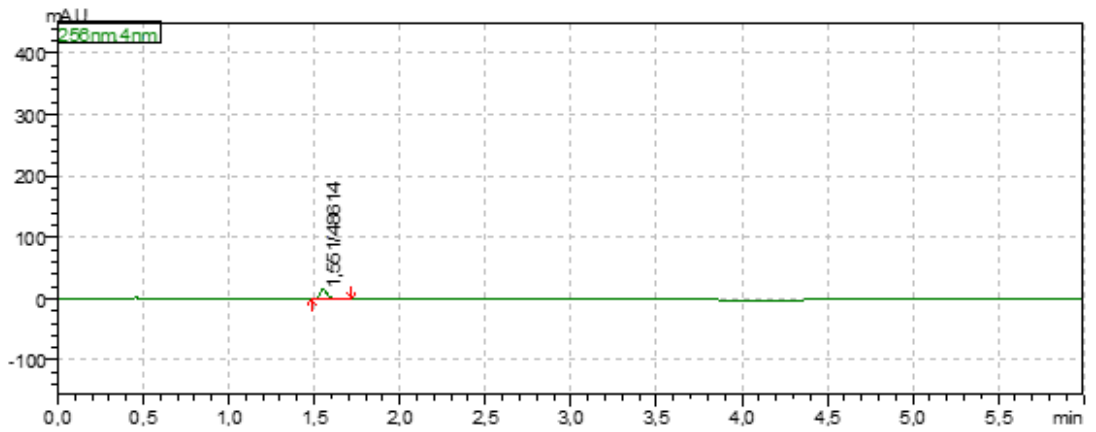
Şekil 4.7. 233 nm dalga boyunda görülen kromatogram.

Hareketli faz seçimine paralel olarak yürütülen çalışmalardan hedef bileşenlerin en yüksek verimle izlenebilmesi için yapılan dalga boyu taramasında; en yüksek absorbans veren dalga boyu Şekil 4.8’de görüldüğü üzere 256 nm olarak tespit edilmiştir. Fotodiyot dizisi dedektör kullanıldığından gözlenen temel çizgi gürültüsü, klasik mor ötesi-görünür alan dedektörlerine oranla biraz fazladır; bu sebeple en uygun dalga boyu seçimi kromatogramın netliği açısından önemlidir. Yüksek absorptivite elde edilen dalga boyunun tercih edilmesi, bu eksikliği bir ölçüde gidermektedir.



Şekil 4.8. DKP için dalga boyu taraması

256 nm dalgaboyunda kaydedilen kromatogram ise Şekil 4.9.’da görülmektedir.



Şekil 4.9. 256 nm dalga boyunda görülen kromatogram

Aletsel parametrelerden akış hızının incelenmesi sırasında kolon dolgu maddesinin çok küçük parçacıklara sahip olması nedeniyle klasik yöntem geliştirme çalışmalarında olduğu gibi geniş bir aralıkta akış hızı incelemesi yapılamamıştır. Bununla birlikte, çok düşük akış hızlarında piklerin yayvanlaştığı ve maddelerin kolondan çok geç çıktığı, buna bağlı olarak “hızlı ayırma” hedefinden uzaklaşıldığı ortaya çıktığından kromatografik sistemin izin verdiği ölçüde kabul edilebilir basınç altında kullanılabilir en yüksek akış hızı tercih edilmiştir. 1,3 mikron çaplı partiküller ve 2,1 mikron çaplı kolon dolayısıyla dakikada 0,25 mL hacimle pompalanan hareketli fazın optimum ayırma için en hızlı sonucu verdiği tespit edilmiştir. Bu akış hızında sistem basıncı 480 -500 bar civarında gözlenmiştir.

Kolon sıcaklığı ile ilgili incelemelerde ise sıcaklık artışının sistem basıncında düşmeye neden olduğu ve bu nedenle yüksek hızlı analizlere olanak sağladığı için yine analiz kolonunun güvenli çalışma sıcaklığı olarak 40°C sıcaklık tercih edilmiştir.

4.2. Yöntem Geçerliliğinin Doğrulanması

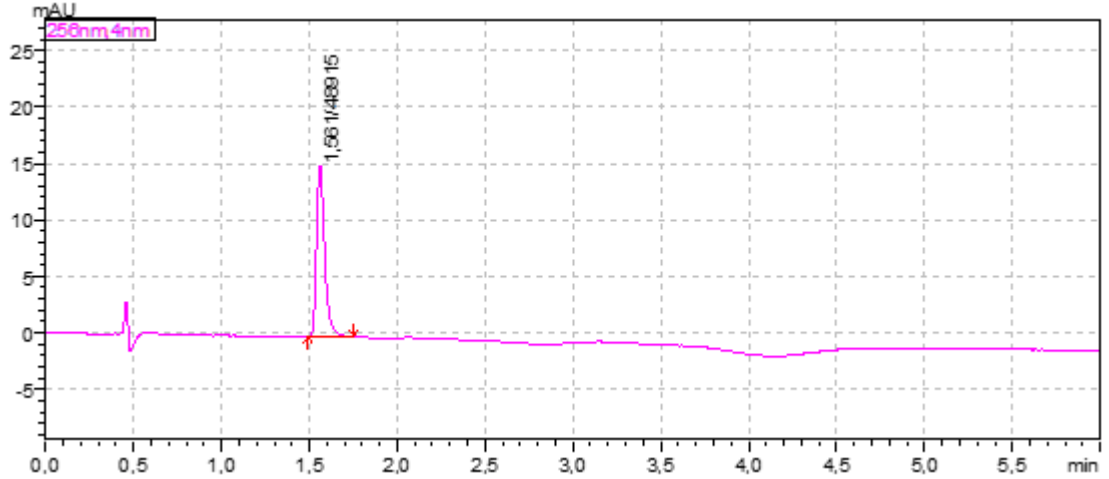
Jel formundaki DKP tayini için geliştirilmiş olan UYPSK yönteminin doğrulanması için ICH, USP, EP gibi otoritelerin görüşleri ile bazı değerlendirmeler yapılmış olup, geliştirilmiş olan analiz yönteminin ne derece kesin, güvenilir, tekrar edilebilir, doğru ve seçicilikte olduğu belirlenmiştir.

Öncelikle UYPSK cihazının ve yöntemin performansını gösteren sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu testlerde teorik tabaka sayısı (N), ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), seçicilik faktörü (α) ve kapasite faktörü (k) gibi parametreler hesaplanmıştır. Analizler sırasında elde edilen kromatogram hesaplamaları UYPSK cihazının bağlı olduğu bilgisayara yüklü olan LabSolution LCsolution Version 5.81 veri analiz programı kullanılarak elde edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları

Parametre	Yöntem Değeri	Tavsiye Edilen Değer
RT (dk)	1,561	
N	5982	>2000
T	1,392	<2
A_s	1,12	$0.95 < A_s < 1.2$
k	2,417	$2 < k < 10$
RT %BSS	0,332	<1

Hareketli faz seçimi çalışmalarında sistem ölü hacmi, maddelerin kolondan çıkış süreleri ve sistem basıncı göz önüne alınarak Tablo 3.2.'de verilen programa göre yürütülen analizlerde Şekil 4.10.'da görülen temsili kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 4.10. DKP standart çözeltisinin optimize edilen koşullar altında kaydedilen kromatogramı

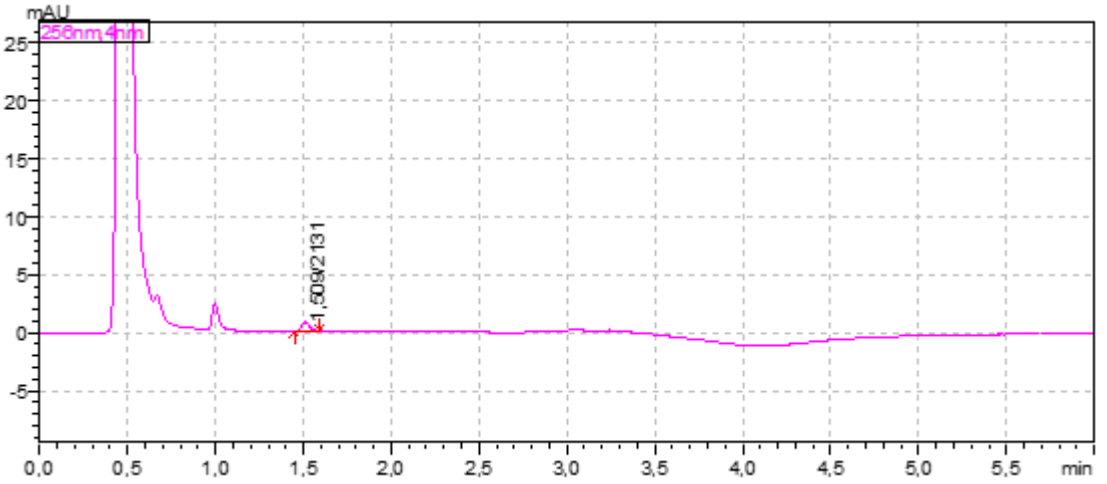
Doğruluk, analizler sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Sonuçlar genellikle yüzde ortalama geri kazanım olarak verilir. Bu amaçla, önceden analiz edilen ve analit içermediği doğrulanan plasebo çözeltisi içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelerine denk gelecek şekilde DKP standart maddesi ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Geri kazanım verileri %LOQ, %80, %100 ve %120'lik konsantrasyonlarda hammadde içeren plasebo çözeltileri ile hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon için hazırlanan plasebo çözeltilerine, hazırlanan 3 ayrı standart çözeltiliden ($3,12 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹) sırasıyla yaklaşık $1,25 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹, $2,49 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹, $3,12 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ ve $3,74 \times 10^{-3}$ mg.mL⁻¹ derişimlerde olacak şekilde eklenmiştir. Her bir örnek tipi 3'er adet hazırlanmış ve 3'er kez analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler doğrusallık çalışmaları sonucu elde edilen kalibrasyon denklemini kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen değerler, numune bileşenlerinin DKP tayinine kabul edilenden daha olumsuz bir etki yapmadığını göstermektedir.

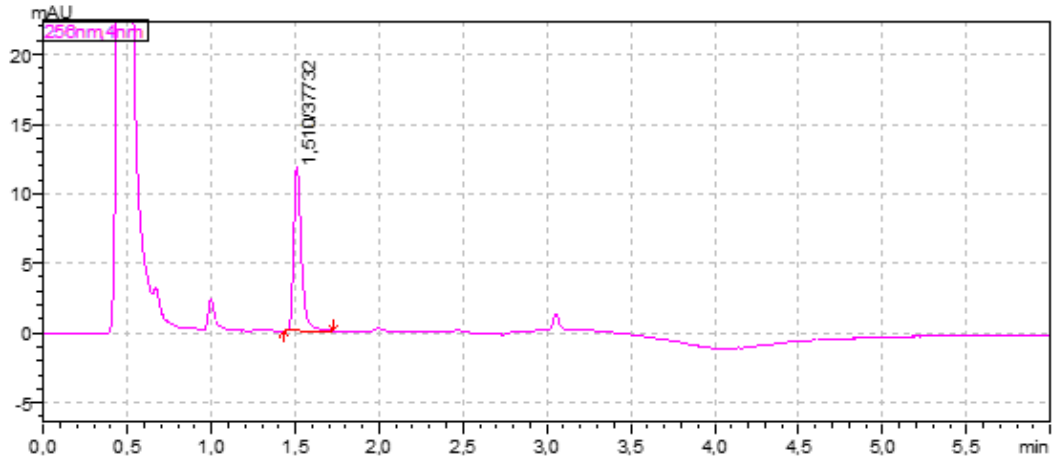
Yöntemin doğruluğu ile ilgili veriler Tablo 4.7’te verilmektedir. Geri kazanım kromatogramları Şekil 4.11, Şekil 4., Şekil 4., Şekil 4.14’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Doğruluk çalışmalarının sonuçları

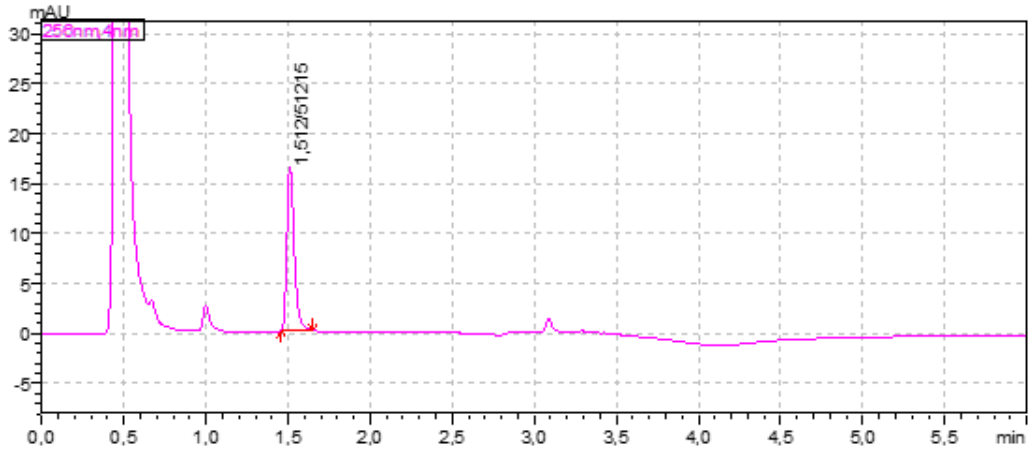
Geri Kazanım Seviyesi	Eklenen (mg.mL ⁻¹)	Bulunan (mg.mL ⁻¹)	Yüzde Geri Kazanım	Ortalama Geri Kazanım Yüzdesi
%LOQ	1,28x10 ⁻⁴	1,38x10 ⁻⁴	108,24	101,65
%80	2,50x10 ⁻³	2,41x10 ⁻³	96,59	
%100	3,19x10 ⁻³	3,32x10 ⁻³	103,84	
%120	3,76x10 ⁻³	3,68x10 ⁻³	97,95	



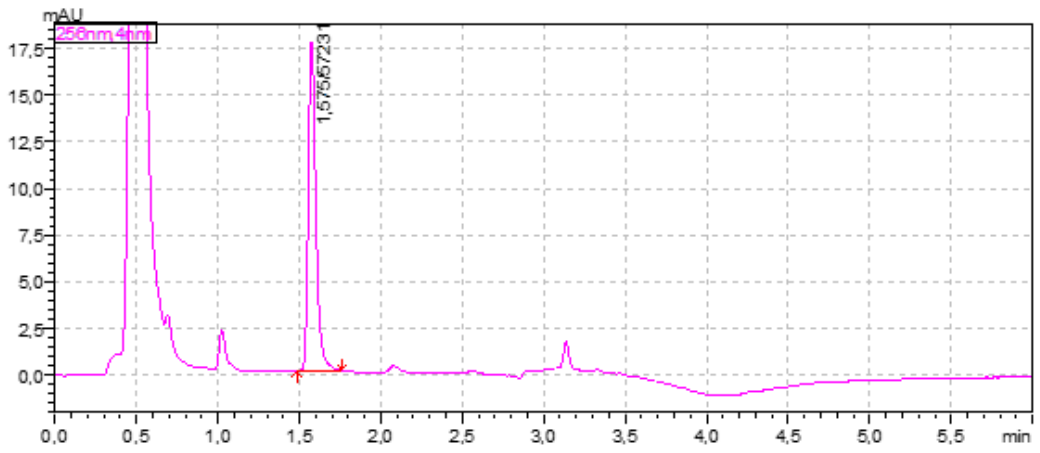
Şekil 4.11. DKP'nin LOQ (1,25x10⁻⁴ mg.mL⁻¹) seviyesindeki geri kazanım kromatogramı



Şekil 4.12. DKP'nin %80 geri kazanım ($2,49 \times 10^{-3}$ (mg.mL^{-1})) kromatogramı



Şekil 4.13. DKP'nin %100 geri kazanım ($3,12 \times 10^{-3}$ (mg.mL^{-1})) kromotogramı



Şekil 4.14. DKP'nin %120 geri kazanım ($3,74 \times 10^{-3}$ (mg.mL^{-1})) kromotogramı

Yöntem ve cihaz kesinliği, enjeksiyon tekrarlanabilirliği çalışmaları yardımıyla tayin edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan $3.12 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ DKP içeren standart çözeltinin 6 ardışık enjeksiyonu ile elde edilen pik alanı ve alıkonma zamanı sonuçları ele alınarak SS, BSS, güven sınırı ve %95 güven aralığı parametreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemin kesinlik yönünden analitik açıdan yeterli düzeyde olduğu görülmüştür. Kesinlik sonuçları standart çözeltiler için Tablo 4.8’te verilmiştir.

Tablo 4.8. Kesinlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi (n=6)

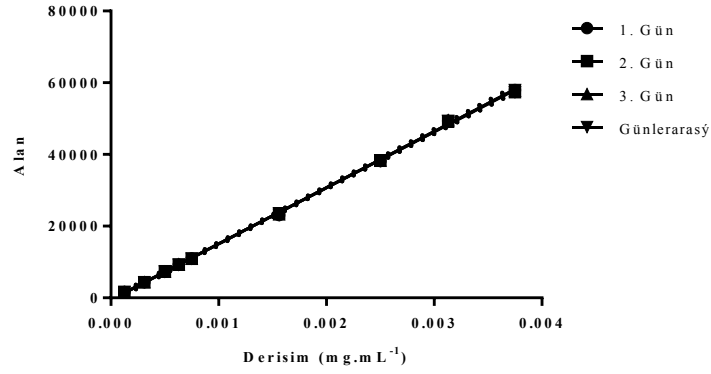
Parametre	Alıkonulma Zamanı	Pik Alanı	Pik Yüksekliği	T	N
Ortalama	1,551	49027	15042	1,390	5838
Standart Sapma	0,005154	249,9	134,9	0,01447	116,9
Ortalamanın Standart Hatası	0,002104	102,0	55,09	0,005907	47,71
Medyan	1,551	49065	14985	1,390	5857
Varyasyon Katsayısı	%0,33	%0,51	%0,90	%1,04	%2,00
Güven Alt Sınırı	1,546	48765	14901	1,375	5715
Güven Üst Sınırı	1,557	49289	15184	1,405	5960

Yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla $1,25 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $3,12 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $4,99 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $6,24 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $7,48 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,56 \times 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, $2,49 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$, $3,12 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ ve $3,74 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ sabit derişimlerinde olmak üzere 9 noktalı kalibrasyon seti hazırlanmıştır. Doğrusallık çalışmalarında her bir derişim seviyesinde hazırlanan çözelti 3’er defa analiz edilmiştir. Elde edilen veriler en küçük kareler metoduyla değerlendirilmiş, buna göre eğim ve kesim ile bu değerlerin SS’ları, ayrıca korelasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. DKP için bu yöntemin belirtilen derişim aralığında doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert – Beer Yasası’na uyduğu görülmüştür. Yöntemin doğrusallığına ilişkin istatistiksel veriler Tablo 4.9’da, doğrusallık grafiği Şekil 4.15’ de verilmiştir.

Tablo 4.9. Doğrusallık çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

Parametre	Gün içi			Günler arası
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	
Eğim	$1,568 \times 10^7 \pm 132646$	$1,558 \times 10^7 \pm 116872$	$1,568 \times 10^7 \pm 144218$	$1,564 \times 10^7 \pm 70384$

Kesim	$-642,7 \pm 257,3$	$-488,4 \pm 226,7$	$-595,8 \pm 279,7$	$-575,6 \pm 136,5$
R²	0,9995	0,9996	0,9994	0,9995
Eğim GA %95	$1,536 \times 10^7 - 1,599 \times 10^7$	$1,530 \times 10^7 - 1,585 \times 10^7$	$1,533 \times 10^7 - 1,602 \times 10^7$	$1,550 \times 10^7 - 1,579 \times 10^7$
Kesim GA %95	$-1251 - -34,17$	$-1025 - 47,79$	$-1257 - 65,79$	$-856,9 - -294,4$
LOQ (mg.mL⁻¹)	$1,25 \times 10^{-4}$			
LOD (mg.mL⁻¹)	$0,38 \times 10^{-4}$			

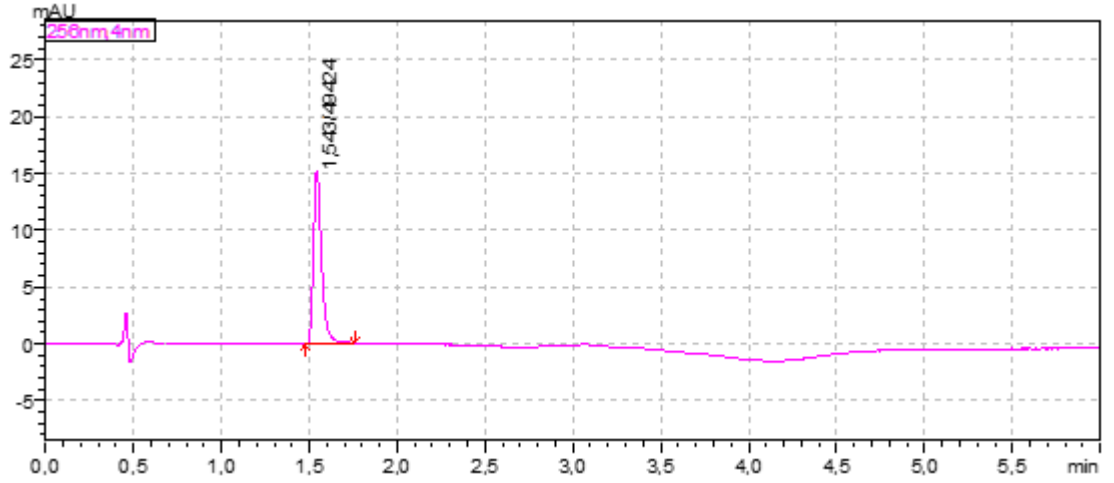


Şekil 4.15. DKP' nin doğrusallık çalışması grafiği

Yöntemin kararlılığını test etmek amacıyla, yöntemde küçük fakat sonuçlara etki edebilecek ölçüde etkili değişiklikler yapılmış ve standart çözeltiler değiştirilmiş şartlar altında tekrar analiz edilmiştir. $3,12 \times 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ derişimde hazırlanmış olan standart çözelti öncelikle farklı 2 hareketli faz oranı, 2 kolon sıcaklığı ve 2 akış hızı ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen kromatogramlarda DKP piklerinin simetri faktörleri başlangıç koşullarındaki DKP pikinin simetri faktörü ile karşılaştırılmış ve yüzde değişim hesaplanmıştır. ICH validasyon kriterlerine göre yüzde değişim başlangıç değerinin %2'sinden fazlası olmamalıdır. Farklı 2 hareketli faz oranı, gradient akış-A ve gradient akış-B olarak adlandırılmıştır. Gradient akış-A ve gradient akış-B Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de gösterildiği biçimde uygulanmıştır; karşılık gelen kromatogramlar ise Şekil 4. ve Şekil 4.17'de sunulmuştur.

Tablo 4.10. *Gradient akış-A*

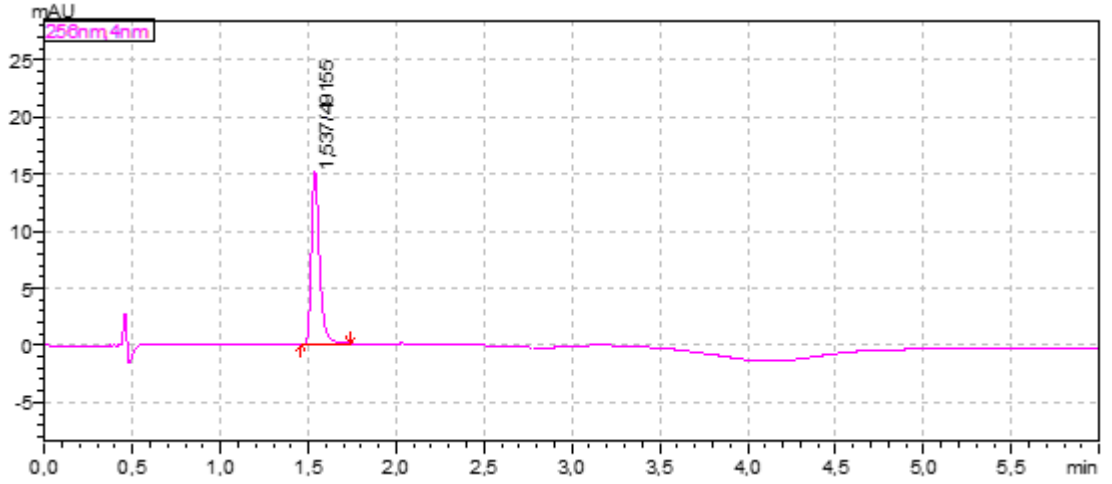
Zaman (dakika)	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B
0	70	30
0,50	70	30
0,51	22	78
2,00	22	78
2,01	70	30
6,00	70	30



Şekil 4.16. *DKP' nin kararlılık çalışması (gradient akış-A) kromotogramı*

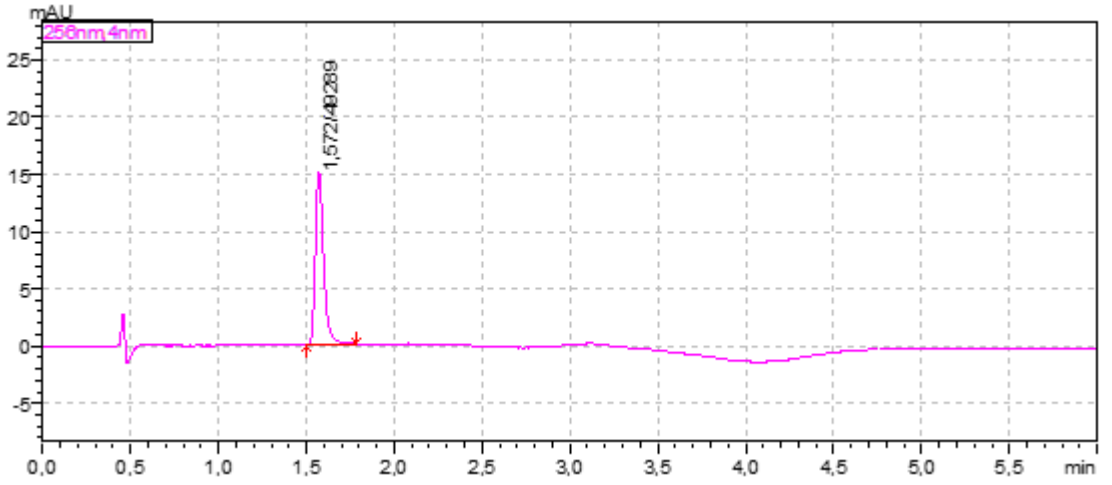
Tablo 4.11. *Gradient akış-B*

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B
0	70	30
0,50	70	30
0,51	18	82
2,00	18	82
2,01	70	30
6,00	70	30

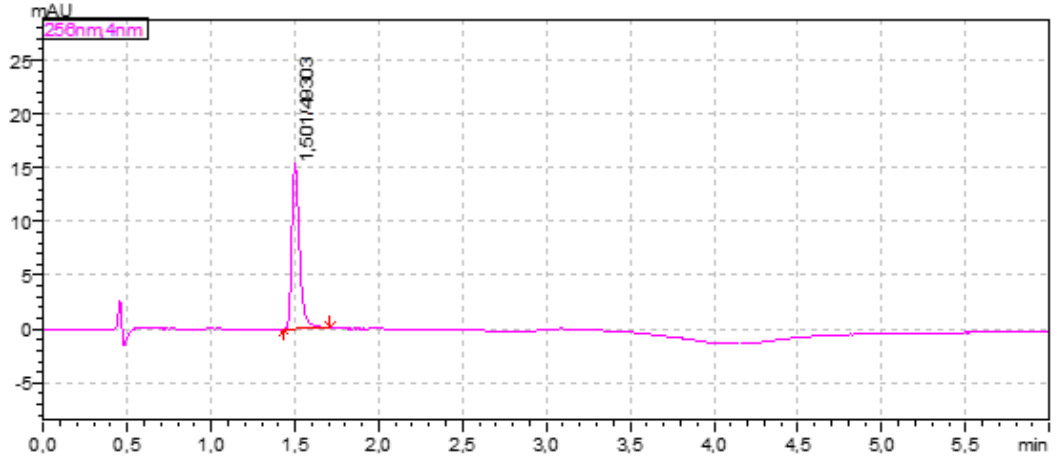


Şekil 4.17. DKP'nin kararlılık çalışması (gradient akış-B) kromatogramı

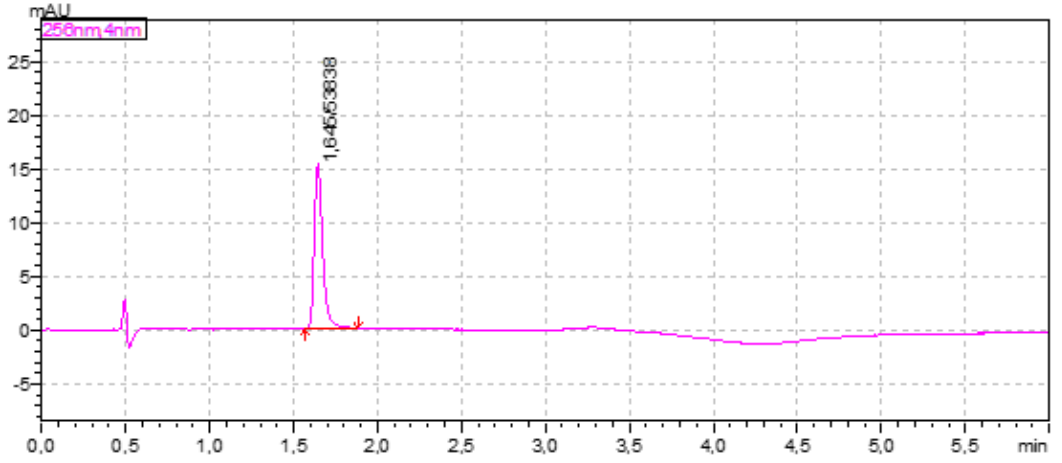
Kararlılık çalışmaları, farklı 2 kolon sıcaklığı ve farklı 2 akış hızı ile devam etmiştir. Değiştirilen koşullar altında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.' de sunulmuştur.



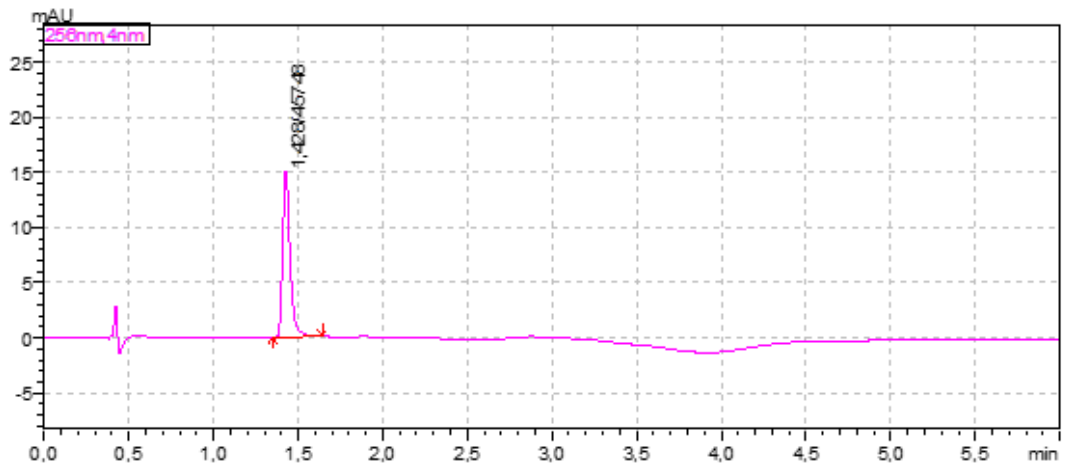
Şekil 4.18. DKP'nin kararlılık çalışması (38°C kolon sıcaklığı) kromatogramı



Şekil 4.19. DKP' nin kararlılık çalışması (40°C kolon sıcaklığı) kromotogramı



Şekil 4.20. DKP' nin kararlılık çalışması (0,23 mL/dk akış) kromotogramı



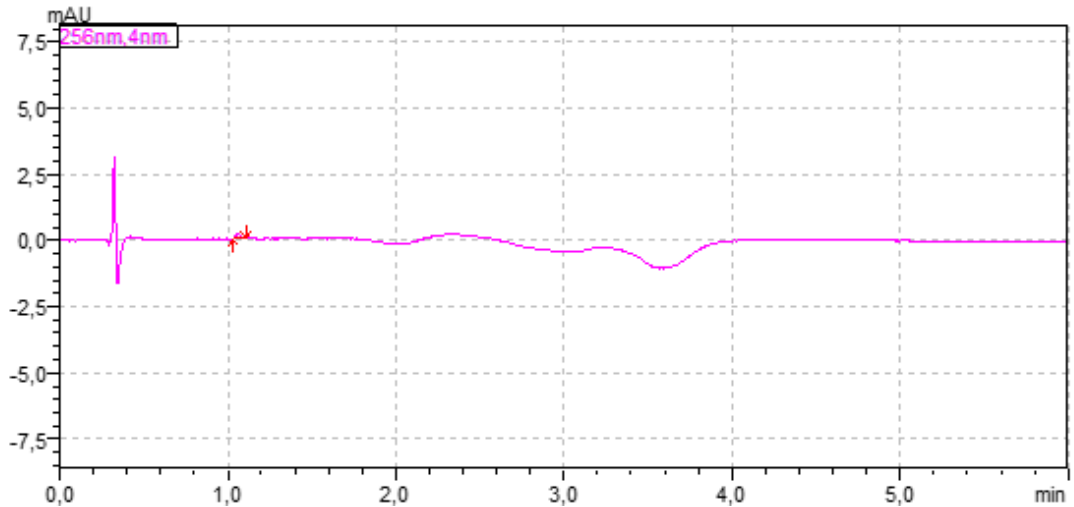
Şekil 4.21. DKP' nin kararlılık çalışması (0,27 mL/dk akış) kromotogramı

Yöntemin kararlılık çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre ICH kriterlerine uyulmaktadır. Simetri faktörü değişimi % 2'den fazla değildir. Veriler Tablo 4.12'de sunulmuştur.

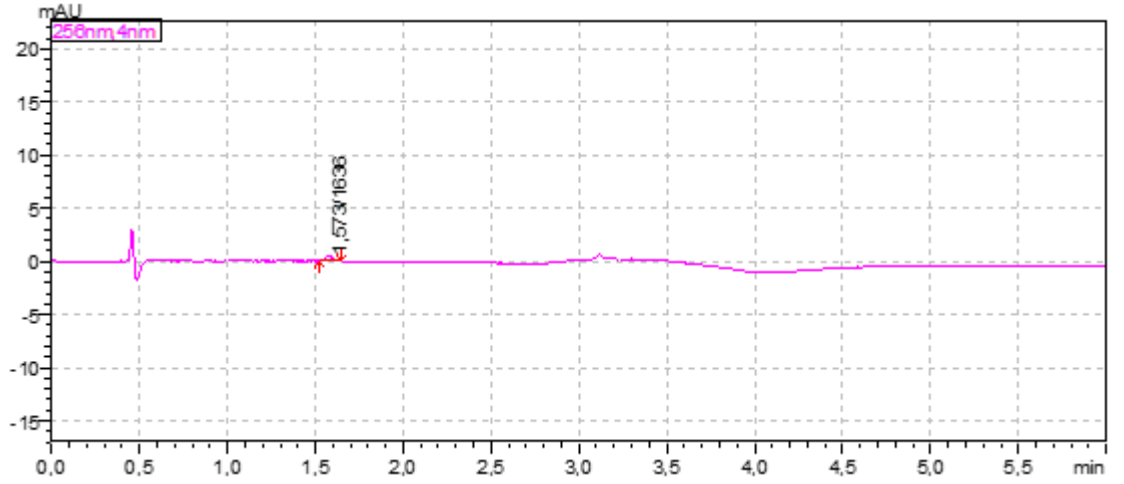
Tablo 4.12. Kararlılık çalışmaları

	Başlangıç simetri faktörü ortalaması (n=2)	Değişim sonrası simetri faktörü ortalaması (n=2)	%Simetri faktörü değişimi (n=2)
Gradient akış-a	1,395	1,408	0,932
Gradient akış-b	1,395	1,400	0,323
Akış (0,23 mL/dk)	1,395	1,393	-0,143
Akış (0,27 mL/dk)	1,395	1,414	1,326
Kolon sıcaklığı 38°C	1,395	1,385	-0,717
Kolon sıcaklığı 48°C	1,395	1,420	1,792

Geliştirilen UYPSK yönteminin LOD ve LOQ değerleri, kromatogramlardaki sinyal ve en yakın gürültü oranları kullanılarak hesaplanmıştır. Sinyal şiddetinin gürültüye oranının kullanıldığı hesaplamalar sonucu elde edilen oran değeri LOD için 3,3, LOQ için ise 10 ile çarpılmıştır. Bu şekilde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri DKP standart çözeltisi için yukarıdaki doğrusalılık sonuçlarının verildiği Tablo 4.9.'da yer almaktadır. DKP'nin LOD ve LOQ derişimlerinde elde edilen kromatogramları sırasıyla Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de verilmiştir.

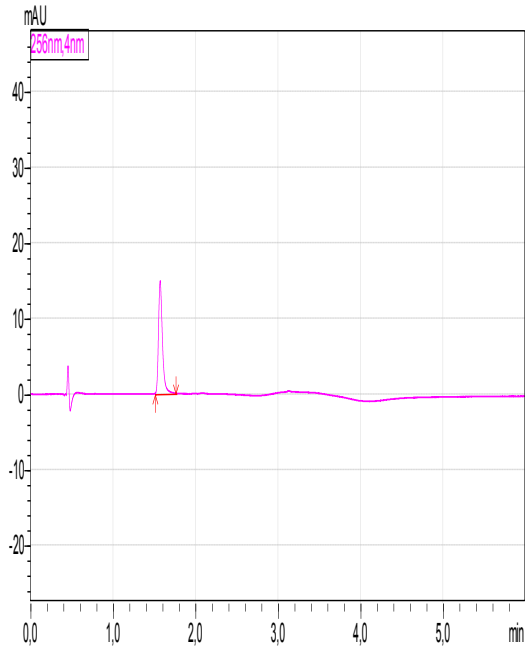


Şekil 4.22. DKP' nin %LOD kromatogramı ($4,16 \times 10^{-5}$ mg.mL⁻¹)

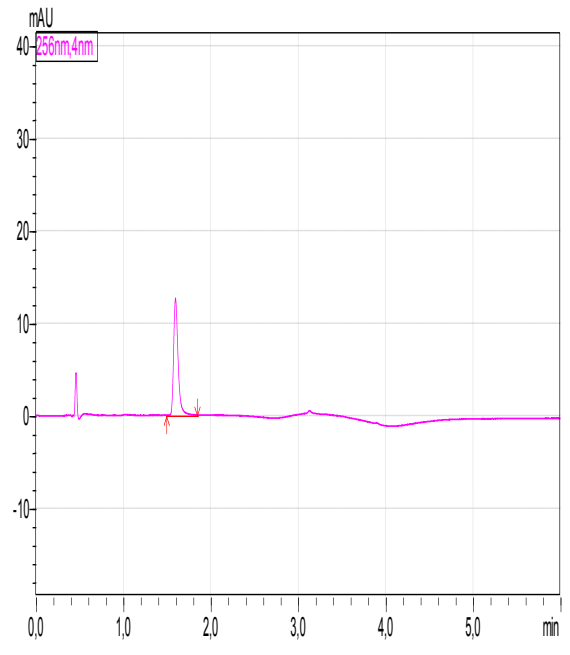


Şekil 4.23. DKP' nin %LOQ kromatogramı ($1,25 \times 10^{-4}$ mg.mL⁻¹)

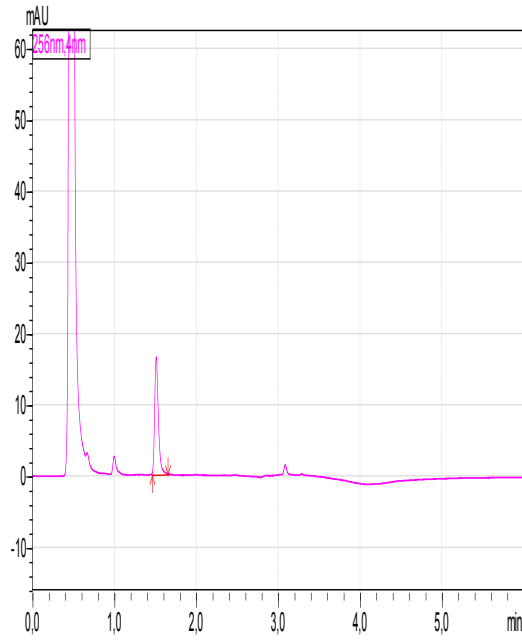
Analizi yapılacak numunenin yapısındaki ve bu maddeyle fiziksel veya kimyasal girişim yapabilecek safsızlıkların varlığında analiz edilmek istenen maddenin doğru şekilde ölçülebilme yeteneği olan spesifiklik de incelenen parametreler arasındadır. Elde edilen kromatogramlarda herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Bununla birlikte kromatogramlardaki DKP piklerinin saflıkları fotodiyot dizisi dedektör ile kontrol edilmiş ve girişime sebebiyet veren bir madde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda analitik yöntemin yeterli spesifikliğe sahip olduğu Tablo 4.13'de gösterilmiştir. kabul edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar ve spesifiklik değerleri standart, numune, standart katılmış plasebo olmak üzere aşağıda belirtilen Şekil 4.24 ve Şekil 4.25' de gösterilmiştir.



(a)

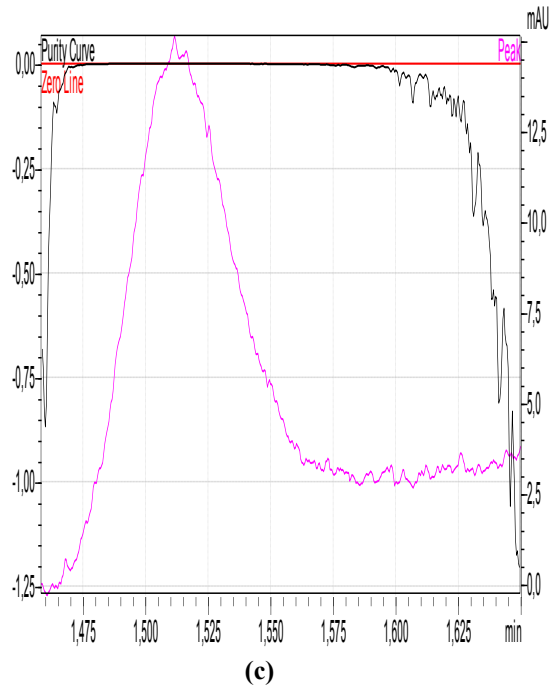
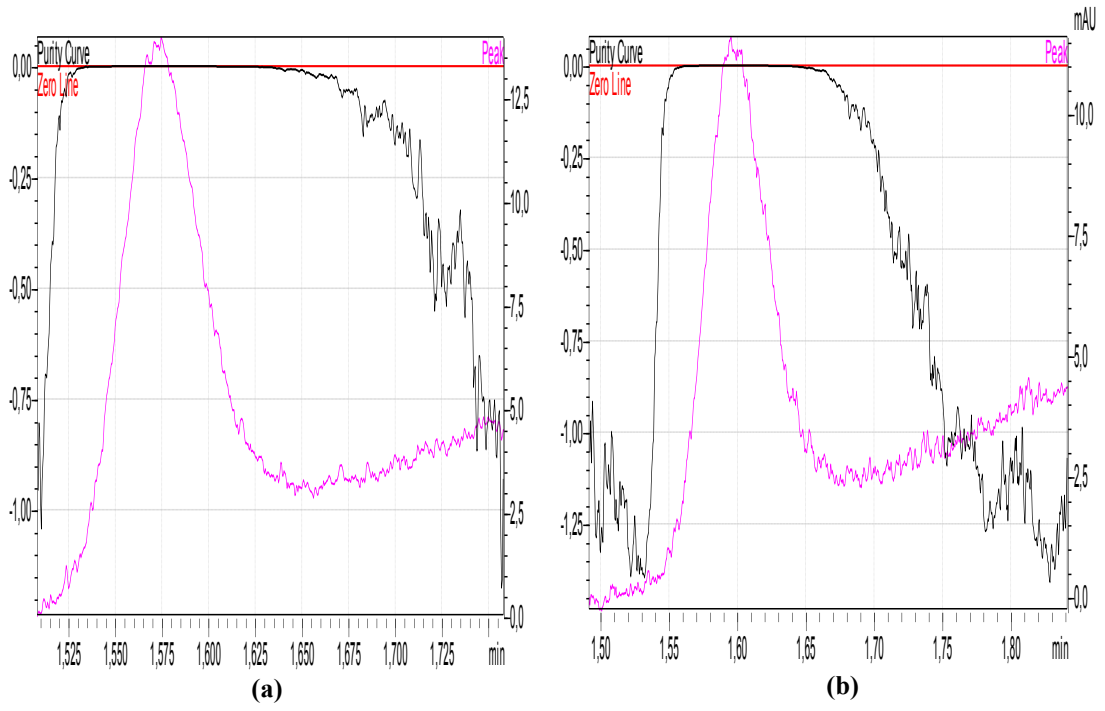


(b)



(c)

Şekil 4.24. DKP'nin standart (a), numune (b) ve standart katılmış plasebo (c) için 256 nm dalga boyunda kromatogramları



Şekil 4.25. Standart (a), numune (b) ve standart katılmış plasebo (c) çözeltileri kromatogramlarındaki DKP sinyallerinin pik saflığını gösteren grafikler

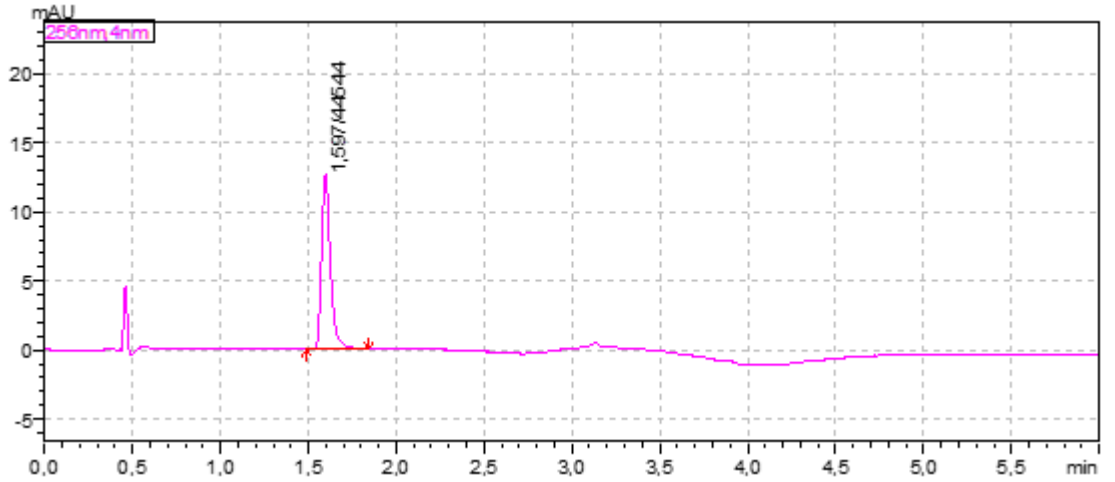
Tablo 4.13. Spesifilik çalışmalarının sonuçları.

Parametre	RT	Pik saflığı açısı	Pik saflığı eşiği
Standart	1,76	0,176	1,000
Numune	1,83	0,409	1,000
Standart katılmış plasebo	1,65	0,204	1,000
Plasebo	-	-	-

4.3. Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

Bu çalışmada, geliştirilen yöntemin gerçek numunelere uygulanabilirliğinin gösterilebilmesi amacıyla piyasada ticari olarak bulunan ve Nobel İlaç A.Ş'nin bir ürünü olan Tiyokas Jel® 30 g adlı ilaç geliştirilen yöntemle analize tabi tutulmuştur.

Bu amaca yönelik olarak firmadan tedarik edilen Tiyokas Jel® 30 g numunesi daha önce deneysel kısımda bahsedildiği şekilde ön işlemlerden geçirilmiş ve analiz edilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen temsili bir kromatogram Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Tiyokas Jel® 30 g (Nobel İlaç A.Ş.) ilaç jel çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram

Tablo 4.14. Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen Tiyokas Jel® 30 g (Nobel İlaç AŞ) analizlerinin sonuçları (n=6)

Parametre	Sonuç
Ortalama	18,50
Minimum	18,41
Maksimum	18,56
Medyan	18,53
Standart sapma	0,07342
SEM	0,02998
En dűřük ortalama GA % ₉₅	18,42
En yűksek ortalama GA % ₉₅	18,58
Varyasyon katsayısı	0,40%

Analizler sonucunda yűntemin gerçek őrneklere uygulanabilirliėi de gűsterilmiřtir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda belirtildiği gibi YPSK analizleri ilaç sektöründe sıkça kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra gıda, tarım, biyoteknoloji, tıp ve daha birçok alanda nitelik ve nicelik tespitleri yapmak için yoğun bir şekilde kullanılır. Ancak günümüzde YPSK analizlerinde kullanılan kolonlar üzerindeki yarış; dolgu maddesinin yarıçaplarının olabildiğince küçültülüp, daha çok ayırım gücü elde etmek üzerinedir. Bu yarışın sebebi çevreci ve ekonomik anlamda kazanç sağlama yaklaşımıdır. Daha düşük maliyetle; daha hızlı, daha etkili, daha kolay ve yorucu olmayan analizlerin yapılması sağlanmaktadır. Bu amaçla geliştirilen kolonların çoğaltılması YPSK yöntemlerinin yerini UYPSK yöntemlerine bırakmaktadır. UYPSK sistemleri YPSK sistemlerine oranla daha kısa sürede daha iyi ayırım gücüne sahiptir ve daha uzun ömürlüdür.

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerde Phenomenex® marka Kinetex® model kolon kullanılmıştır. Önceki bölümlerde de belirtildiği üzere, bu kolon piyasada ticari olarak bulunan en küçük çekirdek-kabuk partiküllü kolondur. Bu özellik sayesinde çok yüksek verimle analiz yapılmış ve yaklaşık 1.5 dk sürede keskin madde piki gözlenmiştir. Bu süre, literatürde olan birçok çalışmada yer alan yöntemlere göre çok daha kısadır. Daha önce yapılan analizlerde izokratik sisteme dayalı yöntemler kullanılmıştır. Bu çalışmada iki ayrı mobil faz ve gradient akış yöntemi geliştirilmiştir. Bu açıdan diğer çalışmalara oranla fazla maliyetli ve karmaşık hale gelmiş olmakla birlikte düşük akış hızıyla daha kısa sürede analiz yapılabilmesi bu açığı kapatmıştır. Kısa süreli yöntemler zaman ve analiz giderlerinde ciddi tasarruf sağlar. Örneğin analizlerde kullanılan zaman kısılacığından daha az çözen kullanımı, daha fazla enerji tasarrufu ve daha az atık çözen ortaya çıkışı sağlanır. Bu durum daha çevreci bir yaklaşım sergileyecektir. Az sayıda analizde bu durum çok önemli olmasa da çok sayıda örnek söz konusu olduğunda önemlidir. Ayrıca az zamanda çok analiz yapılabilmesi de yukarıda sayılan nedenlerle sağlanmış olur. Özellikle ilaç sektöründe yoğun iş temposu göz önünde bulundurulursa bu özellik çok kullanışlıdır.

Sunulan bu analiz yönteminin, ilaç endüstrisinde kolaylıkla ve kısa zamanda uygulanabilme avantajlarını taşıyan, doğru ve kesin sonuçlar veren özellikte bir yöntem olduğu değerlendirilmesi yapılabilir.

KAYNAKÇA

Archana, K. And Vikas, P. (2013). Development and validation of ReversedPhase High Performance Liquid Chromatographic method for estimation of dexketoprofen trometamol in bulk and tablet dosage, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 4, 395-400.

Aykaç, E. (2010). *Spinal anestezi altındaki elektif sezaryen olgularında iv deksketoprofen trometamolün postoperatif analjezik etkinliğinin lornoksikam ve plasebo ile karşılaştırılması*. Yayınlanmamış tıpta uzmanlık tezi. Kırıkkale: Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, Kırıkkale.

Badulla, W.F.S. (2017). *Analysis of escitalopram oxalate by various analytical methods*. Yayınlanmış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü.

Barbonaj, M.J., Antonijuan, R.M., and Gich, I. (2001). Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. *Clinical Pharmacokinetics*, 40(4), 245-262.

Bhusari, V.K. and Dhaneshwar, S.R. (2012). Development of a validated stability-indicating HPLC assay method for dexketoprofen trometamol. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 321-326.

Brooks, P.M. (2010). *NSAIDs*. In: Klippel JH, Dieppe PA (eds). *Textbook of Rheumatology*, 2th ed. London: Harcourt Publisher Ltd, 2000; 3.5.1-6.

Chaudhari, B.G. and Trivedi, J.B. (2012). Simultaneous spectrophotometric estimation of thicolchicoside and dexketoprofen trometamol in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 3(3), 179–183.

Chandrasekharan, N.V. (2007). *Dexketoprofen*. Brigham Young University, USA: Elsevier Inc., 1-4.

Demirhan A. (2009) *Toraks cerrahisinde postoperatif uygulanan intravenöz tramadolün ve tramadole deksmedetomidin ilavesinin analjezi ve solunum parametreleri*

üzerine etkileri. Yayınlanmamış uzmanlık tezi. Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.

Dhaneshwar, S.R. and Jagtap, V.N. (2013). Development and validation of RP-HPLC-PDA method for simultaneous determination of dexketoprofen and thiocolchicoside in pharmaceutical dosage form. *J. Pharm. Res.*, 6, 604-608.

Duman, E.N. (2007). NSAİ İlaçların kronik ağrı tedavisindeki yeri. *Klinik*, 145-149.

Harde, M.T., Dharam, D.L., Jadhav, S.B. and Balap, A.R. (2012) Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of thiocolchicoside and dexketoprofen in bulk and tablet dosage form. *International Journal of PharmTech Research*, 4(4),1797-1802.

İlbasmış Tamer, S. (2017). Development and validation of an ultra performance liquid chromatography method for the determination of dexketoprofen trometamol, salicylic acid and diclofenac sodium. *Turk J Pharm Sci*, 14(1), 1-8. DOI: 10.4274/tjps.76588.

Kesimci, E., Gümüş, T., İzdeş, S., Sen, P. and Kanbak, O. (2011). Comparison of efficacy of dexketoprofen versus paracetamol on postoperative pain and morphine consumption in laminectomy patients. *Ağrı*, 23(4), 153-159.

Khambe, G.S., Salunkhe, V.R., Korhale, R., Jadhav, S., Choudhari, P., Wagh, N. and Birdar, N. (2015). RP-HPLC Method development for dexketoprofen trometamol and paracetamol in pharmaceutical dosage form and its validation including short term stability study. *International Journal of Institutional Pharmacy an Life Sciences*, 5(1), 279-292.

Krunal, P., Dhaval, M., Krunal, P., Dr. Patel, J., Shah, N. (2011). Development and validation of UV Spectroscopic and RP_HPLC Methods for estimation of dexketoprofen rometamol in tablet dosage form. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*, 1(1), 78-85.

Moore, R.A. and Barden, J. (2008). Systematic review of dexketoprofen in acute and chronic pain. *BMC Clin Pharmacol*, 8, 11.

Mulla, T.S., Rao, J.R., Yadav, S.S., Bharekar, V.V. and Rajput, M.P. (2011). Development and validation of HPLC method for simultaneous quantitation of paracetamol and dexketoprofen in bulk drug and formulation. *Pharmacie Globale (IJCP)*, 2 (7), 1-4.

Öner, S.F. (2010). *Ortopedik alt ekstremite cerrahisinde, postoperatif analjezi için intravenöz verilen deksketoprofen trometamol'un optimal dozunun araştırılması*. Yayınlanmamış tıpta uzmanlık tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi.

Özdemirhan, M.E. (2013). *Agomelatinin sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak tabletlerden analizi*. Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Öztürk, A.A., Yenilmez, E. And Yazan, Y. (2017) Development and validation of high performance liquid chromatograph (HPLC) modified method for dexketoprofen trometamol. *European International Journal of Science and Technology*, 6(5), 33-41.

Patel, A., Shah, B., Patel, K., Paul, A. and Desai, R. (2017). RP-HPLC Method development and validation using experimental design approach for simultaneous estimation of thiocolchicoside and dexketoprofen with forced degradation studies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* (accepted).

Pokharkar, D.V., Korhale, R., Jadhav, S., Birdar, N., Puri, D.C., Wani, N.P. (2011). Stability Indicating RP-HPLC-PDA Method for Simultaneous Determination of Dexketoprofen Trometamol and Paracetamol from tablet dosage form. *Der Pharmacia Lettre*, 3(6), 49-57.

Rao, J.R., Mulla, T.S, Bharekar, VV., Yadev, S.S., Rajput, M.P. (2011). Simultaneous HPTLC determination of paracetamol and dexketoprofen trometamol in pharmaceutical dosage form. *Der Pharma Chimica*, 3(3), 32-38.

Salmerón-García, A., Lopez-Lopez, E., Eva Román, E, Cabeza, J., Navas, N and Capitán-Vallvey, L.F. (2008). Development of an LC–DAD method for analysis of dexketoprofen, tramadol, and haloperidol. Study of the stability of mixtures used for patient-controlled analgesia. *Chromatographia*, 68, 767-772.

Serrano-Rodriquez, J.M., Serrano, J.M., Morgaz Rodriquez, J., Granados Machuca, M.M., Gomez-Villamandos, R.J. and Navarrete-Calvo, R. (2014). Pharmacokinetics of the individual enansiyomer S- (+)- ketoprofen after intravenous and oral administration in dogs at two dose levels. *Research in Veterinary Science*, 96, 523-525.

Tuncer, S., Tavlan, A., Köstekçi, H., Reisli, R. ve Otelcioğlu, Ş. (2006). Postoperatif ağrıda deksketoprofen kullanımı. *Ağrı*, 18(3), 30-34.

Vonkeman, H.E. and Ma, V.L. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Semin Arthritis Rheum*, 39(4), 294-312.

Willams, B.S. and Buvanendran, A. (2011). Nonopioid analgesics: nsoids, cox-2 inhibitors, and acetaminophen. *Pharmacology and Pharmacologic Modalities, USA:Elsevier Inc*, 130-138.

Vyavahare, P.S., Ghodeswar, B.C., Chaudhari, S.R., Antre, R.V. (2014). Stability indicating assay method for simultaneous estimation of dexketoprofen trometamol and thiocolchicoside in formulation by RP-HPLC method. *Research Article*.

Zegpi, C., Gonzalez, C., Pinardi, G. and Miranda, H.F. (2009). The effect of opioid antagonists on synergism between dexketoprofen and tramadol. *Pharmacological Research*, 60(4), 291-295.

http-1: <https://www.chemicalbook.com/> (Erişim tarihi: 06.11.2017)

http-2: <https://www.ilacprospektusu.com/> (Erişim tarihi: 22.11.2017)

Badulla, W.F.S. (2017). *Analysis of escitalopram oxalate by various analytical methods*. Yayımlanmış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü.

EKLER

EK 1 Core-Shell Technology Phenomenex® Kinetex® 1.3 µm C-18e 100Å (50×2.1 mm) kolon analiz sertifikası

PHASE: Kinetex 1.3µm C18
BATCH NO.: 5626-0022

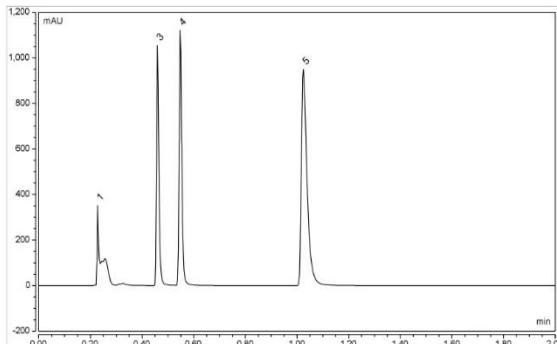
SILICA ANALYSIS

PARAMETER:	SPECIFICATION	BATCH RESULT
Pore Diameter(Å)	80 - 95	88
Particle Size (µm)	1.25 - 1.40	1.34
Particle Size Distribution: dp90/10	<= 1.2	1.2

BONDED PHASE ANALYSIS

PARAMETER	SPECIFICATION	BATCH RESULT
Surface Coverage(µmole/m2)	2.7 - 3.2	2.9

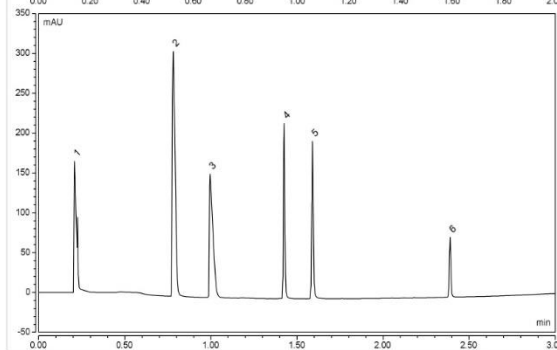
CHROMATOGRAPHIC RESULTS



PHENOMENEX QC MIX 870

CONDITION:
 Column dimensions: 50 x 2.1 mm
 Mobile Phase: 20 mM KH2PO4 pH7.0/ MeOH (20:80)
 Flow Rate: 0.4 mL/min
 Injection Volume: 1µL
 Temperature: 30 °C
 Detector: UV @ 254 nm
 Sample:
 1. uracil
 2. toluene
 3. ethyl benzene
 4. amitriptyline

PARAMETER:	SPECIFICATION:	BATCH RESULT:
USP tailing (Amitriptyline)	<= 2.20	1.84
a2,3	1.32 - 1.40	1.38
k3	1.34 - 1.52	1.41



ABN6

CONDITIONS
 Column Dimensions: 50 x 2.1 mm
 Mobile Phase: A=0.1%FA in 5:95 ACN/Water
 Mobile Phase: B=0.1%FA in 95:5 ACN/Water
 Gradient: 0-100%B in 3.0 min, Re-equilibrate at 0%B for 2.0 min
 Flow Rate: 0.5 mL/min
 Injection Volume: 1 µL
 Temperature: 30 °C
 Detector: UV @ 254 nm
 Sample:
 1. uracil
 2. pindolol
 3. chlorpheniramine
 4. 3-methyl, 4-nitrobenzoic acid
 5. 2-hydroxy, 5-methylbenzaldehyd
 6. hexanophenone

PARAMETER:	SPECIFICATION:	BATCH RESULT:
a2,6	3.80 - 4.30	3.80
a4,6	1.70 - 1.92	1.79

QUALITY ASSURANCE

Approved By: *[Signature]*

Date Approved: June 28, 2016

EK 3Deksketoprofen trometamol standart maddesinin analiz sertifikası



黄石世星药业有限责任公司

Huangshi Shixing Pharmaceutical Co., Ltd.

Add: No.73 East Jinshan Road, Huangshi Development Zone, Huangshi, Hubei, China.

Tel: 0086-714-3184007 Fax: 0086-714-3184000

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT	Dexketoprofen/Trometamol		
PRODUCT CODE	10001222	PACKAGING	25kg
BATCH / LOT NO	C05-201511007	QUANTITY	200kg
MANU. DATE	Nov. 06,2015	EXPIRY DATE	Nov. 05,2017
ANALYSIS DATE	Nov. 11,2015	RETEST DATE	Nov. 05,2017
OTHER INFORMATION: Email:sxpharma8@163.com			
STORAGE CONDITIONS: Preserve in tight containers,protected from light.			

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
Description	White crystalline powder, having a biting odor.	Conforms
Solubility	Freely soluble in water and in methanol, insoluble in ethyl ether.	Conforms
Identification	(1) A orange precipitate develops.	Conforms
	(2) A black color develops.	Conforms
	(3) IR	Conforms
Specific rotation	+56.0°-+60.0°	+57.2°
Absorption coefficient	425 ~ 451	430
pH	5.5 ~ 7.0	6.3
Loss on drying	NMT 0.5%	0.01%
Residue on ignition	NMT 0.1%	0.07%
Heavy metals	NMT 10ppm	< 10ppm
Particle size	D ₉₀ < 50μ	Conforms
Assay	98.5% ~ 101.0% of C ₂₀ H ₂₅ NO ₆ (On the dried basis)	99.2%
N-octyl-D-Glucamine	TLC: NMT 0.2%	ND
L-ketoprofen	NMT 2.0%	1.0%
Related substances	Any single impurity : NMT 0.1%	0.05%
	Total impurities : NMT 1.0%	0.09%
Bacterial endotoxin	NMT 4EU/mg	< 4 EU/mg
Residual solvents	(1) Ethanol: NMT 0.5% (5000ppm)	0.02%
	(2) Ethyl acetate: NMT 0.5% (5000ppm)	0.003%
Microbial Test	(1)Total bacteria count: NMT 10 ³ cfu/g	< 10 cfu/g
	(2)Total fungi count: NMT 10 ² cfu/g	< 10 cfu/g
	(3)Specified microorganism :Absence of Escherichia coli (1g).	ND

CONCLUSION: Conformed to the requirement of enterprise's standard.

ANALYST / DATE 2015.11.16	CONTROLLER / DATE 2015.11.16	APPROVAL / DATE 2015.11.16
------------------------------	---------------------------------	-------------------------------