

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE  
LETROZOLÜN FARMASÖTİK PREPARATLARDA  
MİKTAR TAYİNİ**

**CEM KAPLAN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. DURİŞEHVAR ÖZER ÜNAL**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2015**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Cem KAPLAN tarafından hazırlanan Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile Letrozolün farmasötik preparatlarda miktar tayini başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 08 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1. Prof. Dr. Durişehvar ÜNAL (İ.Ü. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD)	
2. Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN (İ.Ü. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD.)	
3. Yrd. Doç. Dr. Ebru TÜRKÖZ ACAR (Yeditepe Üni. Eczacılık Fak. Analitik Kimya AD)	
4.	
5.	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Cem Kaplan

(İmza)

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Araştırma ve çalışmalarım sırasında bana gerek bilgi gerek laboratuvar imkanları açısından her zaman destekleyen Prof. Dr. Sevgi Tatar Ulu'ya

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarım İbrahim Daniş, Merve Keşkek, Ali Rahmi Alp'e, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: BAP-48406

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Letrozol.....	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi .....	3
2.1.3. Yan Etkileri .....	5
2.1.4. Floresans Spektroskopisi.....	6
2.1.5. Sıvı Kromatografisi.....	9
2.1.5.1. Sıvı Kromatografi Sistemleri .....	9
2.1.5.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	9
2.1.5.3. Çözücü Sistemi.....	12
2.1.5.4. Pompa.....	13
2.1.5.5. Kolon.....	13
2.1.5.6. Dedektör .....	14
2.1.6. Sistem Uygunluk Testi.....	14
2.1.7. Analiz Yöntemleri.....	16
2.1.7.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri.....	16
2.1.7.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler .....	19

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....	19
3.1.2. Çözeltiler .....	20
3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi .....	20
3.1.2.2. Letrozol Çözeltileri .....	20
3.2. Aletler ve Gereçler .....	22
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi .....	23
3.4. Sistem Uygunluk Verileri .....	24
3.5. Letrozolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi.....	25
3.5.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi .....	25
3.5.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması .....	25
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu .....	26
3.6.1. Spesifiklik ve seçicilik .....	26
3.6.2. Doğrusallık.....	26
3.6.3. Doğruluk ve Kesinlik .....	26
3.6.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti .....	27
3.6.5. Validasyon Serisinin Hazırlanması .....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Letrozolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Metod Geliştirme.....	28
4.2. Yöntem Validasyonu .....	28
4.2.1. Seçicilik.....	28
4.2.2. Doğrusallık.....	29
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik .....	31
4.2.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini limiti.....	33
4.3. Farmasötik Preparatların Hazırlanması.....	33
5. TARTIŞMA .....	34
KAYNAKLAR .....	36
ÖZGEÇMİŞ .....	39

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 2-1: HPLC’de kullanılan bazı çözeltiler ve özellikleri.....	12
Tablo 2-2: HPLC’de kullanılan temel kolon çeşitleri.....	13
Tablo 2-3: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.....	15
Tablo 3-1:Referans standart.....	19
Tablo 3-2: Kimyasallar.....	19
Tablo 3-3: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	21
Tablo 3-4: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı.....	21
Tablo 3-5:Ekipmanlar.....	22
Tablo 3-6:Destek ekipmanlar.....	22
Tablo 3-7: Moleküle ait özel dedektör parametreleri.....	24
Tablo 3-8: Letrozolün için sistem uygunluk parametreleri.....	24
Tablo 4-1: Validasyon serlerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	30
Tablo 4-2: Kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları.....	31
Tablo 4-3: Birinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları.....	31
Tablo 4-4: İkinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları.....	32
Tablo 4-5: Üçüncü validasyon serisinin gün içi hesaplamaları.....	32
Tablo 4-6: Validasyon serisinin günler arası hesaplamaları.....	32



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Letrozolün molekül yapısı.....	3
Şekil 2-2: Aromatoz inhibitörün etki mekanizması (11). .....	5
Şekil 2-3: Bir molekülün çeşitli spin halleri (a,b diamagnetik, c paramagnetiktir). .....	7
Şekil 2-4: Bir HPLC cihazının şematik gösterimi .....	9
Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogramda taban genişliğinin gösterilmesi .....	11
Şekil 2-6: Laboratuvarında kullanılan bir HPLC sistemi .....	12
Şekil 3-1: Letrozolün spektrofloreometrede 0.1 µg/mL konsantrasyonda alınmış spektrumu.....	25
Şekil 4-1: 0.3 µg/mL letrozole ait örnek kromatogram .....	28
Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram .....	29
Şekil 4-3: Plasebo çözeltisinin kromatogramı .....	29
Şekil 4-4: Kalibrasyon eğrisi .....	30
Şekil 4-5: 0.05 µg/mL letrozol enjeksiyonuna ait bir kromatogram .....	33
Şekil 4-6: 0.025 µg/mL tablet enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	33

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

MS: Kütle spektrometrisi

HPLC/MS/MS: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

LC/MS/MS: Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

UPLC/MS-MS: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi (Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S Food and Drug Administration)

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (International Conference on Harmonisation)

UV: Ultraviyole

HCl: Hidroklorik asit

NaOH: Sodyum Hidroksit

ACN: Asetonitril

MeOH: Metanol

mM: miliMolar

$\lambda$ eks: Uyarılma dalgaboyu

$\lambda$ emis: Emisyon dalgaboyu

v: hacim

g: gram

mg: miligram

$\mu$ g: mikrogram

ng: nanogram

mL: mililitre

$\mu$ L: mikrolitre

nm: nanometre

C: konsantrasyon

SD: Standart sapma

RSD: Bağıl standart sapma

%CV: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)

LOD : Teşhis sınırı

LOQ : Tayin sınırı

IARC : Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer)

tmaks: Damar dışı uygulamadan sonra kan veya plazma konsantrasyonunun doruğa erişmesi için geçen süre

EAA: Eğri altında kalan alan

Cmaks: Tek bir dozajdan sonraki maksimal plazma

KD: Kolonda dağılma sabiti

k': Alıkonma faktörü

$\alpha$ : Seçicilik faktörü

N: Teorik tabaka sayısı

H: Tabaka yüksekliği

L: Kolon dolgu maddesinin uzunluğu

Rs: Rezolüsyon

## ÖZET

Kaplan, C. (2015). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Letrozolün Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasında, letrozolün tabletlerde tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem ters fazlı kolonda; asetonitril-50mM fosforik asit çözeltisi (pH:7), (50:50,h/h) hareketli fazı ile 0.7 mL/dak akış hızında fluorimetrik dedektör ile geliştirilmiştir. Doğal floresans özelliğine sahip letrozol için dedeksiyon dalgaboyu; 256 nm uyarılma ve 585 nm emisyon olarak ayarlanmıştır. Maddenin doğrusal aralığı 0.05-0.7 µg/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme ve tayin sınırları ise 0.014-0.042 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem valide edilerek tabletlerdeki analizine başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntem kolay ve tekrarlanabilir olup tablet analizlerinde güvenle kullanılabilir niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Letrozol, HPLC-floresans dedektör, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Tablet Analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 48406

## ABSTRACT

Kaplan, C. (2015). Determination of Letrozol from pharmaceutical preparat by using high performance liquid chromatography. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

In this study, high performance liquid chromatography method has been developed for determination of letrozole in tablets. Method has developed in reverse phase coloumn with acetonitrile-50.0 mM phosphoric acid solution, pH 7 (50:50, v/v) and 0.7ml/min flow rate by using fluorimetric dedector. For letrozole that has natural fluorensence property the detector was set at 256, 585 nm for excitation and emission wavelength. The linear range was found 0.05-0.7 µg/mL. The limit of dedection and quantification for letrozole was found 0.014-0.042 µg/mL respectively. The developed method has validated and successfully applied to tablet analysis of drug substance. This method is simple, reproducible and can be used safely routine analysis of letrozole in tablets.

Key Words: Letrozole, HPLC-floresans detector, High Performance Liquid Chromatography, Tablet Analysis

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.  
Project No: 48406

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye kanser görülme sıklığı dünyadaki diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında, hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük hızda olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkeler ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri (66,0/100000 kişide), kadınlarda ise meme kanseri (38,6/100000 kişide) en sık görülen kanser türleridir (1). Çocukluk çağı kanserlerinde ise çocukluk çağı lösemileri en sık görülen kanser türüdür. Çocukluk çağında her iki cinsiyette de lenfomalar, merkezi sinir sistemi tümörleri ve nöroblastomalar lösemileri takip etmektedir. Gençlerde (15-24 yaş grubu) erkeklerde testis kanseri ve kemik kanserinin, genç kadınlarda ise tiroid ve Hodgkin Hastalığının ön planda olduğu görülmektedir. Kanser genellekle ileri yaş hastalığı olmasından dolayı, yaş ilerledikçe ilk sıralarda görülmekte olan kanserler genel Türkiye örüntüsüne yaklaşmaktadır (2).

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Ülkemizde ise tüm kanserlerin %24.1'ini meme kanserinin oluşturduğu bildirilmektedir. Kansere bağlı ölümlerin de %18'inden meme kanseri sorumludur (3-5).

Letrozol, kadınlarda östrojen seviyesini düşüren aromataz inhibitörü olarak bilinen yeni ilaç türlerinden biridir. Aromataz inhibitörleri, hormon-reseptörü pozitif olan meme kanserli hastalarda tedavide kullanılan ajanlardandır. Aromataz inhibitörleri, postmenopozal östrojenin büyük bölümünü oluşturan ve androjenin östrojene dönüşmesini sağlayan aromataz adlı enzimi durdurmakta ve böylece östrojen miktarını azaltmaktadır. Bu da kan dolaşımında daha az östrojen olması ve daha az kanser hücresi çoğalması anlamına gelmektedir (6). Letrozol, ayrıca aromataz enzim sisteminin nonsteroidal yarışmacı inhibitörüdür. Sitokrom P450 enziminin alt ünitesi olan heme kompetitif olarak bağlanmak suretiyle aromataz enzimini inhibe eder; bunun sonucunda bütün dokularda östrojen biyosentezi azalır. Bazı kanser hücrelerinin gelişimi östrojen tarafından uyarılır veya devam ettirilir (7). Göğüs kanserinin tedavisinin östrojen veya progesterona duyarlı olduğu düşünülür. Letrozol, androjenin, östrojene dönüşmesini inhibe eder ve lokal veya metastaz göğüs kanserinin tedavisinde kullanılır.

Gastrointestinal sistem tarafından tamamen absorplanır. Karaciğerde yavaşça inaktif karbonil metabolitine metabolize olur. Daha sonra idrarda glukroniti olarak atılır.

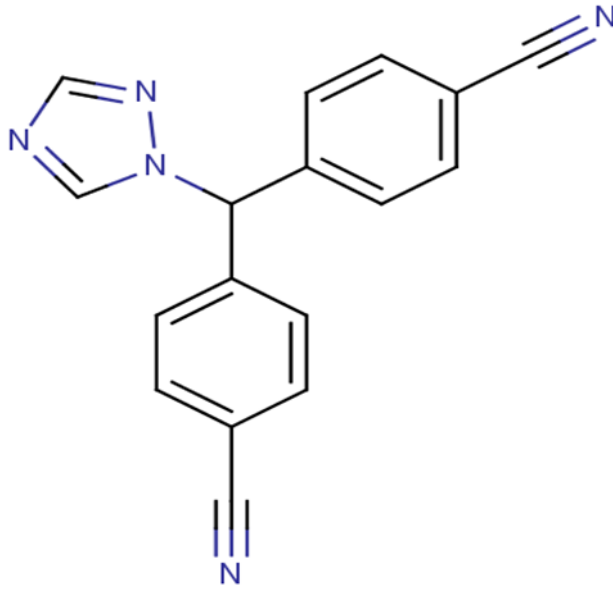
Östrojen biyosentezinin bloke edilmesi androjenik ön maddelerde birikime yol açmaz. Hastalarda, LH ve FSH plazma düzeyleri veya TSH, T4 ve T3 rezin geri alma testi ile değerlendirilen tiroid fonksiyonu letrozol tarafından etkilenmez. Letrozolün plazma proteinlerine bağlanması başlıca albumine (%55) olmak üzere yaklaşık %60'dır. Letrozolün eritrositteki konsantrasyonu plazmadakinin yaklaşık %80'idir (8). Metabolitlerin genel sistemik yapıya etkileri minimaldir. Letrozol hızla ve yaygın bir şekilde dokulara dağılır. Bizim çalışmamıza esas olan Letrozol on yılı aşkın bir süredir güvenilir ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Letrozolün farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde literatürde yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi, UV spektrofotometrik yöntemlere rastlanmıştır (25-29). Letrozol farmasötik preparatların kullanımını da hastalığın görülme sıklığı ile orantılıdır. Bu nedenle farmasötik preparatlardan analizi önemlidir. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde literatürde kısıtlı çalışmalara rastlanmaktadır (16-25). Bu çalışmamızda, basit ve güvenilir floresans dedeksiyonuna dayanan bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi ve bu geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Letrozol

#### 2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



**Şekil 2-1: Letrozolün molekül yapısı**

Letrozolün kimyasal adı 4,4'-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metilen)dibenzonitril'dir. Kapalı formülü  $C_{17}H_{11}N_5$  olan letrozolün molekül ağırlığı 285.303 g/mol'dür (Şekil 2-1). Letrozol diklorometanda kolay, etanol orta derecede, suda çok az çözünen beyaz-sarımsı kristal toz halinde bir bileşiktir. Erime noktası 184-185 °C arasındadır (9,10).

#### 2.1.2. Farmakolojisi

Letrozol, non-steroidal aromataz inhibitörüdür ve antineoplastik bir ajandır ve beyaz-sarımsı renkte kristal tozdur. Letrozolün pratik olarak suda çözünürlüğü yoktur. Letrozol gastrointestinal kanaldan hızla ve tamamen emilir (ortalama mutlak biyoyararlanımı: %99.9). Besinler emilim hızını biraz azaltır (ortalama  $t_{maks}$ : aç karnına 1 saat olmasına karşın tok karnına 2 saat; ortalama  $C_{maks}$ : aç karnına 129±20.3 nmol/L olmasına karşın tok karnına 98.7±18.6 nmol/L ). Fakat emilen miktar [EAA (Eğri altında kalan alan)] değişmez. Emilim hızının düşüklüğü etkisinin klinik olarak



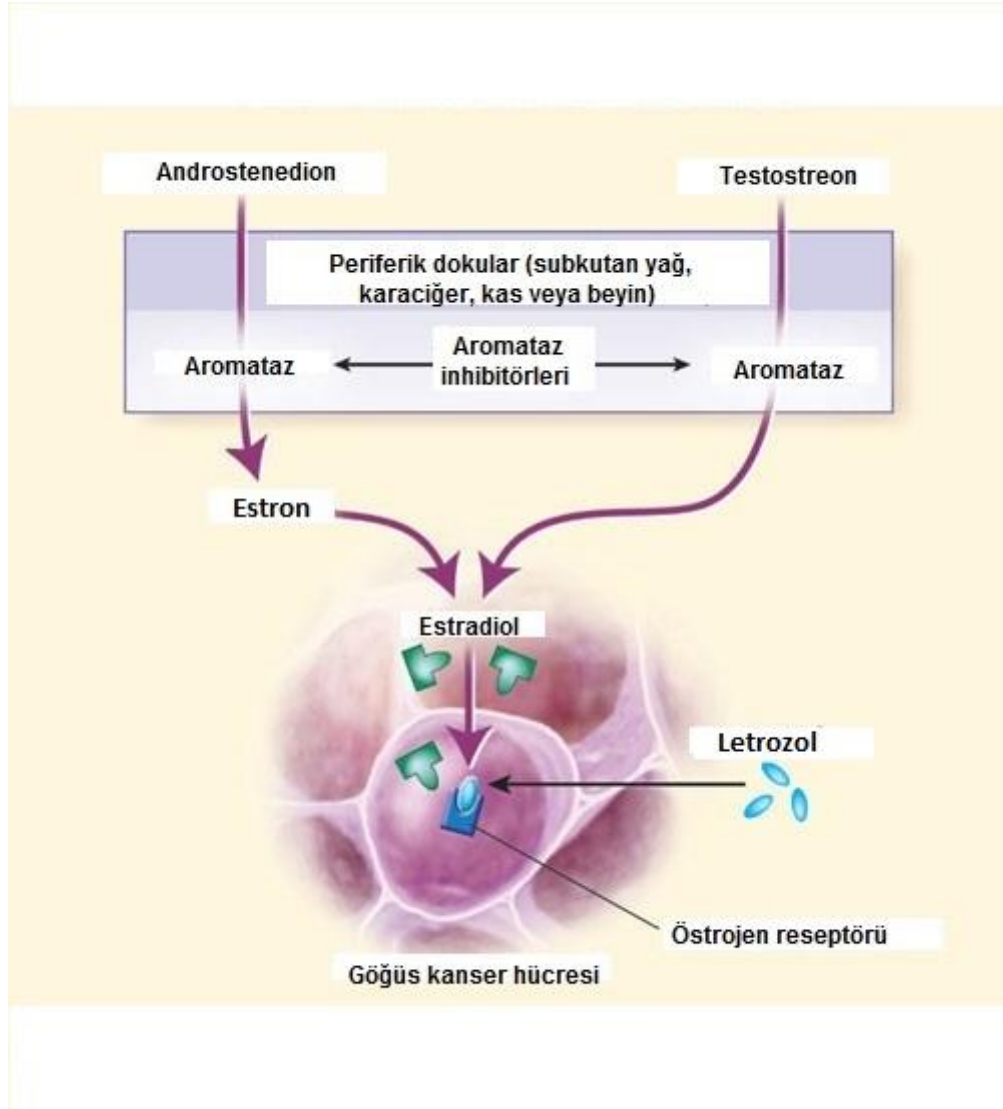
ilişkisi kabul edilmemektedir ve bundan dolayı yemek zamanları dikkate alınmadan letrozol kullanılabilir.

Tümör dokusundaki büyümenin östrojenin varlığına bağlı olduğu durumlarda östrojen aracılı tümör dokusunun büyümesini elimine eder veya durdurur (Şekil2-2). Postmenopozal kadınlarda östrojenler esas olarak adrenal androjenleri (öncelikle androstenedion ve testosteron) östron (E1) ve östradiole (E2)'ye dönüştüren aromataz enziminin aktivitesi sonucu meydana gelirler. Bu nedenle spesifik olarak aromataz enzimini inhibe ederek periferik dokularda ve kanser dokusunda östrojen biyosentezi baskılanabilir. Letrozol, steroid olmayan bir aromataz inhibitörüdür. Enzimin sitokrom P450 alt ünitesinde heme yarışmalı biçimde bağlanarak aromataz enzimini inhibe eder ve bunun sonucunda tüm dokularda östrojen biyosentezi azalır.

Sağlıklı postmenopozal kadınlarda, tek 0.1 mg, 0.5 mg ve 2.5 mg dozlarda letrozol serum estron ve estradiol seviyelerini başlangıç değerine oranla sırasıyla %75-78 ve %78 baskılar. Maksimum baskılanma 48-78 saat içerisinde gerçekleşir. İleri evre kanseri olan postmenopozal hastalarda, 0.1 mg ila 5.0 mg'lık günlük dozlar tedavi edilen tüm hastalarda östradiol, östron ve östron sülfat plazma konsantrasyonlarını başlangıca göre %75-95 oranında baskılamıştır. 0.5 mg veya daha yüksek dozlarla, birçok östron ve östron sülfat değerinin analizlerde belirleme sınırının altında olması, bu dozlarla daha yüksek östrojen baskılanmasının sağlandığına işaret etmektedir. Östrojen baskılanması bu hastaların tümünde tedavi boyunca korunmuştur. Letrozol aromataz aktivitesinin inhibisyonunda yüksek spesifiteye sahiptir. Adrenal steroidogenez bozukluğu gözlenmemiştir. 0.1 ila 5.0 mg'lık günlük letrozol dozları ile tedavi edilen postmenopozal kadınlar arasında plazma kortizol, aldosteron, 11-deoksikortizol, 17-hidroksiprogesteron ve ACTH konsantrasyonlarında veya plazma renin aktivitesinde klinik açıdan ilgili bir değişiklik tespit edilmemiştir. Günlük 0.1 mg, 0.25 mg, 1 mg, 2.5 mg ve 5 mg'lık dozlarla tedavinin 6 ve 12 haftasından sonra yapılan ACTH stimülasyonu testi, aldosteron veya kortizol üretiminde bir azalmaya işaret etmemiştir. Bu nedenle, glukokortikoid ve mineralokortikoid takviyesi gerekli değildir (8).

Sağlıklı postmenopozal kadınlarda 0.1 mg, 0.5 mg ve 2.5 mg'lık tekli letrozol dozlarını takiben plazma androjen konsantrasyonlarında (androstenedion ve testosteron) ya da 0.1 mg ila 5 mg'lık günlük dozları ile tedavi edilen postnemopozal hastalarda plazma androstenedion konsantrasyonlarında bir değişiklik not edilmemiş olup, bu

durum östrojen biyosentezi blokajının androjenik öncül maddelerin birikimine yol açmadığı anlamına gelmektedir. Plazma LH ve FSH düzeyleri hastalarda letrozolden etkilenmez, aynı durum TSH, T4 ve T3 alım testi ile değerlendirilen tiroid fonksiyonu için de geçerlidir (7,10).



Şekil 2-2: Aromatoz inhibitörün etki mekanizması (11).

### 2.1.3. Yan Etkileri

Letrozol, ilerlemiş meme kanserinin ilk veya ikinci basamak tedavisi, erken evre meme kanserinin adjuvan tedavisi ve daha önce standart tamoksifen tedavisi görmüş olan kadınlarda uzatılmış adjuvan tedavi olarak kullanıldığı bütün çalışmalarda genellikle iyi tolere edilmiştir. Letrozol ile metastatik, neoadjuvan ve uzatılmış adjuvan tedavi gören hastaların yaklaşık üçte birinde, adjuvan tedavi amacıyla letrozol verilen

hastaların %70-75'inde (hem letrozol hem tamoksifen kolunda) ve uzatılmış adjuvan tedavi gören hastaların %40'ında (hem letrozol hem tamoksifen kolunda) advers reaksiyonlarla karşılaşılması beklenebilir. Gözlemlenen advers reaksiyonlar genelde daha çok hafif ve orta şiddettedir ve hemen her zaman için estrogen yoksunluğundan kaynaklanır. Metastatik ve neoadjuvan tedavi sırasında Sıcak basması (%10.8), bulantı (%6.9) ve yorgunluk (%5.0), klinik çalışmalar sırasında en sık bildirilmiş olan advers reaksiyonlardır. Çok sayıda advers reaksiyon (sıcak basması, alopecia ve vajinal kanama), estrogen açığının normal farmakolojik sonuçları olarak kabul edilebilir (7).

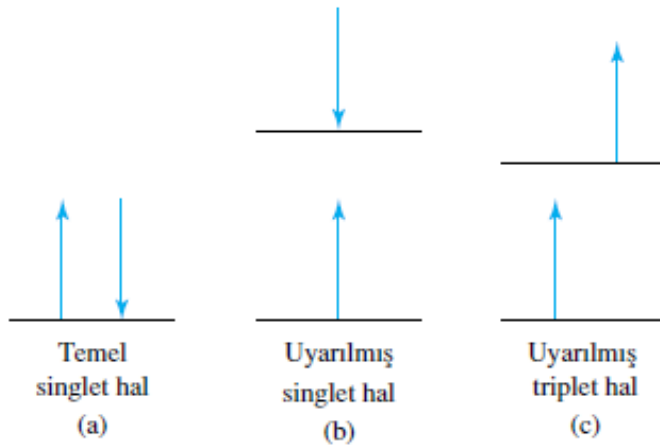
#### **2.1.4. Floresans Spektroskopisi**

Floresans, atom veya moleküllerin elektromagnetik ışık demetinin absorpsiyonu ile uyarılması sonucu oluşan, analitik açıdan önemli bir emisyon türüdür. Uyarılmış türler daha sonra kazanılmış enerjilerini fotonlar şeklinde salarak temel durumlarına dönerler (12). Uyarılan maddenin aldığı enerjiyi geri vererek ilk haline dönmesi esnasında davranışları incelenir. Bu inceleme sonucunda madde hakkında kalitatif ve kantitatif çok değerli bilgiler elde edilir. Madde üzerine gönderilen ışınlar, ultraviyole, görünür alan nadiren de infrared ışınlarıdır. Bu ışınlar madde tarafından önce çok kısa bir süre absorplanır ve ondan sonra floresans veya fosforesans ışınları olarak etrafa yayılır. Yayılan ışınlar genelde absorplanan ışıdan daha uzun dalga boylu veya daha düşük enerjilidir. Bilindiği gibi bir ışının enerjisi dalga boyuyla ters orantılıdır.

Floresan ışın yayan maddelerin ışın yayma ömrü, fosforesan ışın yayan maddelerin ömründen daha kısadır. Şöyle ki, floresan maddelerin ışın yayma ömrü genel olarak  $10^{-5}$ - $10^{-8}$  saniye olduğu halde, fosforesan maddelerinki, genel olarak  $10^{-4}$  saniyeden çok daha fazladır. Hatta bazen saatlerle ifade edilecek kadar uzundur. Örneğin,  $ZnSiO_3$ 'ün ömrü 340 saattir. Floresans ışınları sadece madde üzerine ışın gönderildiği sürece görülür. Işın gönderilmesi durdurulduğu anda o da durur. Maddenin floresans ışınlarını yayması genelde, madde üzerine ultraviyole ışınları gönderilmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle, floresans ışınlarının dalga boyları yaklaşık 380-720 nm arasında değişir. Bunlar da gözle görülebilir. Ancak göze görünen ışınlarla uyarılan maddelerden bazılarının yaydığı ışınlar yakın infrared bölgesine kayar ve gözle görülmez. Hem floresans, hem de fosforesans metodu çok hassastır. Milyarlarla ifade edilecek kadar düşük konsantrasyonlara uygulanabilir. Ayrıca bu spektroskopilerle konsantrasyon çalışma aralıkları, absorpsiyon spektroskopisindeki konsantrasyon

çalışına aralıklarından genelde daha geniştir. Bu metotların bir başka üstün yanları da daha spesifik olmalarıdır (bir maddenin tayini yapılırken, bir başka maddenin bu tayini karıştırma veya bozma ihtimalinin az olmasıdır). Buna karşılık bu metotların uygulanma alanları oldukça sınırlıdır. Zira floresans özelliği gösteren maddelerin sayıları az, fosforesans özelliği gösterenlerinkiyse, daha da azdır. Öte yandan floresans ışınları, fosforesans ışınlarından genellikle daha şiddetlidir. Floresans, maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinde görülen bir olay olmasına karşılık fosforesans, maddenin genelde katı halinde görülen bir olaydır.

Floresans ve fosforesans olayında maddenin bir kromofor grubunda bulunan bir elektron, molekül üzerine gönderilen kısa dalga boylu ışını  $10^{-14}$  saniye gibi çok kısa bir zamanda absorplar ve bir üst (bazen iki veya üç üst) enerji seviyesine çıkar. Buradan çeşitli mekanizmalarla temel hale döner. Madde floresans ışınları yaydığı zaman uyarılan elektronun spinini değiştirmez. Elektronun spinini değiştirmeden bir üst veya iki üst seviyelerine çıkması durumundaki haline uyarılmış singlet hali denir. Uyarılmış singlet halinde bulunan bir molekül temel halinde olduğu gibi hâlâ diamagnetiktir, (Şekil 2-3). Diamagnetik maddelere elektronları çiftleşmiş maddeler de denir. Buna karşılık, madde fosforesans ışınları yaydığı zaman elektronunun spinini değiştirir. Başka bir deyişle, uyarılmış elektronunun spinini değiştiren molekül fosforesans ışınları yayar. Molekülün bu haline triplet denir. Triplet haldeki bir molekülde iki ortaklanmamış elektron bulunur, (Şekil 2-3). Bir molekül bir elektronunu kaybetmişse, böyle bir moleküle radikal denir. Radikal moleküller paramagnetik özellik gösterirler. Böyle moleküllere de dublet denir (13).



**Şekil 2-3: Bir molekülün çeşitli spin halleri (a,b diamagnetik, c paramagnetiktir).**

Dublet moleküller magnetik alan içinde iki türlü yönelme gösterir. Bu nedenle de dubletlerin enerjice farklı iki hali vardır. Bir molekül uyarıldığı zaman doğrudan doğruya triplet hale geçemez. Uyarılmış hali, daha önce de söylendiği gibi hâlâ siglettir. Madde bu singlet halinden triplet haline geçebilir. Bu daha sonra görülecek olan sistemler arası bir geçişle gerçekleşir. Singlet halin ömrü  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  saniye olduğu halde, triplet halin ömrü  $10^{-4}$  saniyeden dakikalara ve hatta saatlere kadar değişir ( $ZnSiO_3$ ). Bir molekülün absorptivitesi ne kadar büyükse ( $10^4$ - $10^5$  gibi) ömrü o kadar kısadır. Bu gibi hallerde fosforesansın meydana gelme ihtimali çok azdır (13).

### Floresansı Etkileyen Etmenler

Bir maddenin floresans yapıp yapmayacağına, hem moleküler yapı hem de kimyasal çevre etki eder. Bunlardan birincisini ele alırsak, molekülde  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişini kolaylaştıracak konjuge  $\pi$  bağları olmalıdır. Örneğin kinolin ve indol gibi maddeler oldukça şiddetli floresans özelliği gösterirler.

Konjuge  $\pi$  bağları içeren moleküllere süstitüe grupların etkisi ise şöyle verilebilir; elektron verici gruplar (örneğin  $-NH_2$ ,  $-OH$  gibi) floresansı arttırdığı halde, elektron alıcı olan gruplar (örneğin,  $-NO_2$ ,  $-X$ ,  $-CHO$ ,  $-N=N-$  gibi) floresansı azaltır, bazen de ortadan kaldırır.

Floresansı etkileyen ikinci etmen ise; sıcaklığın artmasıdır ve birçok molekülde floresansın azalmasına neden olur. Çünkü yüksek sıcaklıklarda moleküllerin çarpışmasının artmasıyla uyarılmış molekül dış geçiş yaparak temel hale gelir. Benzer şekilde çözücünün viskozitesinin azalması da çarpışmayı arttırdığından floresansı düşürür. Ağır atomlu çözücüler de (karbon tetrabromür gibi ( $CBr_4$ )) floresansı azaltır. Ağır atom safsızlıkları bulunması durumunda da floresans azalır.

Asidik veya bazik süstitüentleri içeren ( $-SO_3H$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$  gibi) bir aromatik bileşiğin floresansı genellikle pH'ye bağlıdır. Bu tür maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin hem floresans şiddetleri, hem de yaydıkları floresans ışınların dalga boyları farklıdır. Bazı bileşiklerin floresansı pH'ye bağımlı olarak asit/baz titrasyonlarında (1-naftol-4-sulfonik asitte olduğu gibi) dönüm noktasının tayininde kullanılmaktadır.

Analizi yapılacak çözeltide, çözülmüş oksijenin varlığı, genellikle floresans şiddetini azaltır. Bu etki, floresans yapan moleküllerin oksijen ile fotokimyasal olarak yükseltgenmesinin bir sonucu olabilir. Ayrıca oksijenin paramagnetik özelliğinin bir

sonucu olarak sistemler arası geçiş, dış geçiş ve uyarılmış molekülün triplet hale geçişi artar. Diğer paramagnetik maddeler de floresansı azaltırlar (14).

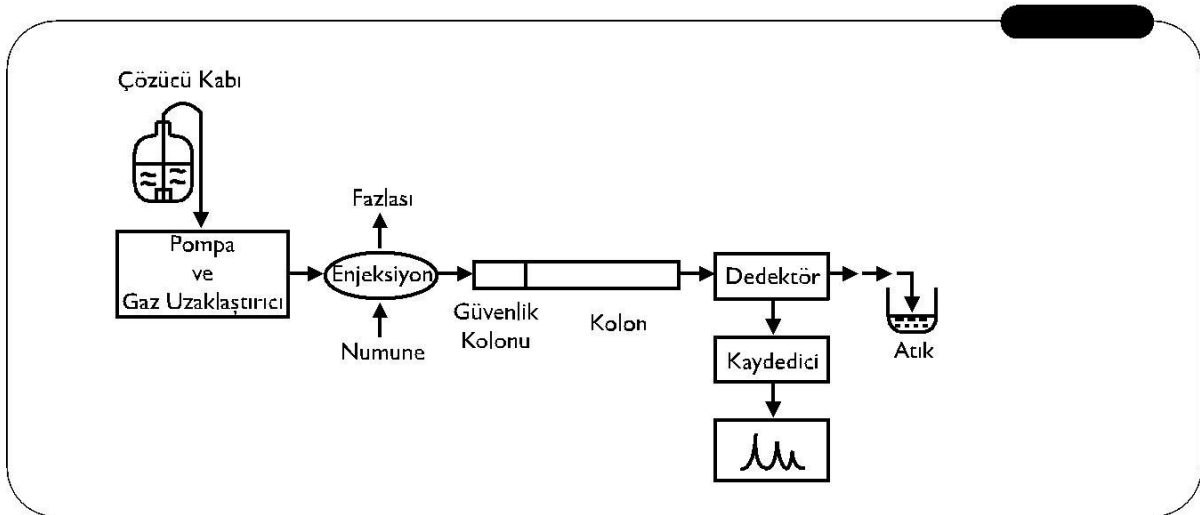
## 2.1.5. Sıvı Kromatografisi

### 2.1.5.1. Sıvı Kromatografi Sistemleri

Laboratuvarlarda kullanılan birçok farklı model sıvı kromatografi sistemi mevcuttur. Burada yüksek performanslı sıvı kromatografisinin genel yapısı verilecektir.

### 2.1.5.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bir HPLC cihazına ait başlıca bileşenler (Şekil 2-4)'de basit haliyle gösterilmiştir. (Şekil 2-6)'da ise laboratuvarda kullanılan bir HPLC sistemine ait resim verilmiştir.



Şekil 2-4: Bir HPLC cihazının şematik gösterimi

Sıvı kromatografisinde; genellikle çok küçük tanecikleri içeren kolonların kullanımıyla tabaka sayıları iyileştirilmiş ve kolona basınç uygulanarak akış hızı artırılmış olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazları kullanılmaktadır. HPLC, sağladığı yüksek doğruluk, kesinlik ve hassaslığı ayrıca uçucu olmayan türler için de kullanılabilmesi nedeniyle en çok tercih edilen enstrümental kromatografi türüdür.

Bilindiği gibi kromatografi tekniğinde kullanılan yöntem ne olursa olsun türler, kolonda dağılma sabiti (KD) değerlerine bağlı olarak ilerler ve kolonu belli bir sıra ile terk ederler. Modern aletli tekniklerinde, kolondan çıkan her bir tür, uygun bir dedektörün kullanımıyla bir sinyal olarak algılanır ve zamana veya hareketli fazın

hacmine bağılı olarak bir kromatogram şeklinde gösterilir. (Şekil 2-5)'de, iki bileşenli bir numuneye ait bir kromatogram görülmektedir.

(Şekil 2-5)'de görülen  $t_0$  değeri, kolonda hiç tutulmayan bir türe ait alıkonma zamanıdır. Yani  $t_0$  için, hareketli fazın enjeksiyon kısmından başlayıp detektöre ulaşması için geçen zaman da diyebiliriz.  $t_{R1}$  ve  $t_{R2}$  ise sırasıyla kolondan ilk çıkan ve ikinci çıkan türlere ait alıkonma zamanlarıdır. Alıkonma zamanı; analitlerin türü, sabit fazın türü, hareketli fazın türü, akış hızı ve kolon uzunluğu faktörlerine bağılı olarak değişebilir. Kolonda ilerleyen bileşenlerin göç hızlarıyla ilgili olarak kromatografide sıkça kullanılan bir parametre alıkonma veya kapasite faktörüdür. Alıkonma faktörü,  $k'$  ile gösterilir ve aşağıdaki eşitlikte verildiği gibi bulunur:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Alıkonma faktörünün 2'den küçük olması elüsyonun çok hızlı olduğunun, 10'dan büyük olması ise elüsyonun çok yavaş olduğunun göstergesidir. Her iki durumda kromatografik olarak sakıncalıdır. Bu nedenle ideal bir ayırmada çözünen türlere ait  $k'$  değerlerinin 2 ile 10 arasında olması istenir. Bir kolondaki türlerin göç hızlarının bağılı bir ifadesi olan seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) ise aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

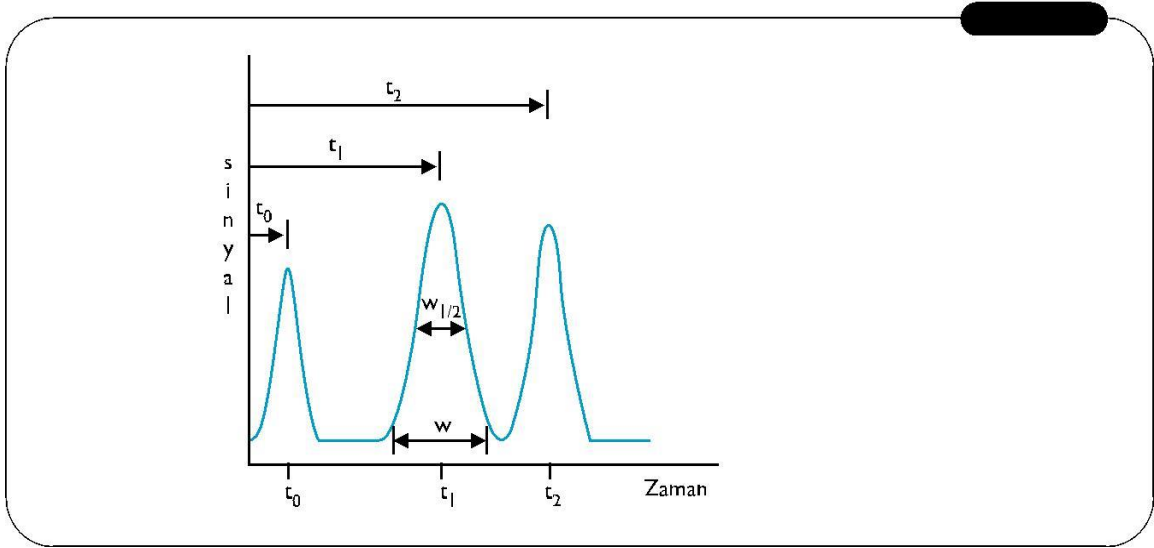
Bir kromatografik kolonun verimliliğinin göstergesi elde edilen kromatogramdaki piklerin keskinliğidir. Kolona enjeksiyon yapılması ile türler kolonda ilerlerken kolonun sonuna doğru, türlere ait bantlarda genişleme olduğu görülür. Bu duruma; boyuna difüzyon ve fazlar arası kütle aktarımları gibi bazı kinetik olaylar neden olmaktadır. Kolon verimliliği kuramsal tabaka sayısı (N) adı verilen bir nicelik ile ölçülür:

$$N = 16x \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

Bu eşitliklerde yer alan  $w$ , Şekil 2-5'den de görüleceği gibi bir pike ait taban genişliği,  $t_R$  ise aynı pikin elde edildiği alıkonma zamanıdır. Kolon verimliliğinin başka bir nicel ölçüsü ise  $(H)$  tabaka yüksekliğidir ve tabaka yüksekliği ile tabaka sayısı arasında aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi ters orantı vardır:

$$H = \frac{L}{N}$$

Bu eşitlikteki  $L$ , kolon dolgu malzemesinin uzunluğudur.



**Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogramda taban genişliğinin gösterilmesi**

Bir kolonun ayırıcılığı ya da ayırma gücü, kolonun bir numunede bulunan türleri birbirinden ne derece ayırabildiğinin nicel bir ölçüsüdür. Ayırma gücü (rezolüsyon)  $R_s$  ile gösterilir ve aşağıda verilen eşitlikten bulunabilir:

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$R_s$  değerinin 1'den büyük olması iyi bir ayırıcılık göstergesidir. Yüksek  $R_s$  değerlerinin elde edilebilmesi için  $N$ ,  $\alpha$  ve  $k'$  değerlerinin de mümkün olduğunca büyük olması gerekir (14).





**Şekil 2-6: Laboratuvarda kullanılan bir HPLC sistemi**

### 2.1.5.3. Çözücü Sistemi

Bir HPLC analizinin başarısı büyük oranda doğru çözücü sisteminin belirlenmesine bağlıdır. HPLC’de hareketli faz olarak kullanılan bir çok çözücü vardır. Bunlardan bazıları Tablo 2-1’de verilmiştir. HPLC’de kullanılacak çözücünün kaynama noktası fazla yüksek olmamalıdır, viskozitesi düşük olmalıdır, kullanılan dedektörle uyumlu olmalıdır ve toksisitesi düşük olmalıdır.

**Tablo 2-1: HPLC’de kullanılan bazı çözeltiler ve özellikleri**

Çözücü	Kaynama Noktası (°C)	Viskozite (cp)	Polarite (p’)	Kırılma indisi
Hekzan	69	0,31	0,1	1,376
Diklorometan	40	0,44	3,1	1,424
Etil asetat	77	0,43	4,4	1,372
Kloroform	61	0,57	4,1	1,446
Tetrahidrofuran	66	0,55	4,0	1,407
Asetonitril	82	0,38	5,8	1,344
Metanol	65	0,55	5,1	1,328
Su	100	1,00	10,2	1,333

HPLC’de elüent olarak genellikle iki ya da daha fazla çözücünden oluşan bir karışım kullanılır. Bu karışımlarda da sıklıkla belli oranlarda zayıf çözücü olarak su ve kuvvetli çözücü olarak da tetrahidrofuran, metanol ve asetonitril gibi organik çözücüler kullanılır.

Bazı çok bileşenli numunelerde, analiz boyunca aynı çözücü bileşimi kullanıldığında bazı elüsyon problemleri ortaya çıkabilir. Bazı bileşenler kolondan çok çabuk, bazıları ise çok geç çıkabilir. Bu sorun, analiz boyunca elüent bileşiminin bir çözücü programlaması ile değiştirilmesi ile çözülebilir. Sıvı kromatografide bu şekilde yapılan elüsyonlara gradient elüsyon, analiz boyunca sabit bileşimli bir elüentin kullanılmasıyla yapılan elüsyona ise izokratik elüsyon denir (14).

#### 2.1.5.4. Pompa

HPLC’de ileri-geri hareket eden pistonlu yüksek basınç pompaları kullanılır. Bu şekilde çalışan üç tip pompa vardır, bunlar; silindir yollu pompalar, şırınga benzeri pompalar, pnömatik pompalardır. Bu tip pomplar ile 8000 psi basınca çıkılabilir ve 0.2-10 ml/dak akış aralığında çalışabilir. Sıvı faz çok sıkıştırılabilen bir faz olmadığı için ani basınç artmalarında cihazın herhangi bir yerinden sıvı kaçağı sorunu olabilir. Bu sorunda genellikle cihaz ile metod oluştururken girilen bir basınç üst limit değeri ile çözülür. Cihaz bu basıncın üstüne çıkılması durumunda otomatik olarak sıvı akışını keser (14).

#### 2.1.5.5. Kolon

HPLC’de kolon olarak çeşitli büyüklük ve çaplarda, cam veya paslanmaz çelikten yapılmış ve içinde uygun bir sabit faz bulunan malzemeler kullanılır. HPLC cihazlarında kullanılan üç temel kolon tipi vardır (Tablo2-2).

**Tablo 2-2: HPLC’de kullanılan temel kolon çeşitleri**

Kolon	Yarıçapı (mm)	Numune miktarı (mg)	Akış Hızı (ml dak <sup>-1</sup> )
Mikro analitik	1-2	0,01	0,1
Standart analitik	3-5	0,1	1
Preperatif	5-20	10,0	10,0

Kolon içlerinde bulunan dolgu malzemelerinin yarıçapları ise 3-20 µm arasında olabilmektedir. Kolon dolgu malzemesini oluşturan taneciklerin yarıçapı ne kadar

küçük olursa teorik tabaka yüksekliği o kadar az olur ve kolonun verimliliği de o kadar fazla olur. Ancak çok küçük taneciklerin kullanılması durumunda da kolonda oluşan geri basınç artabilir. Bu nedenle optimum koşulları sağlayan dolgu malzemeleri seçilmelidir. Ayrıca kolon dolgu malzemeleri, kolona doldurulmadan önce, ölçekli bir elek sisteminden geçirilmeli ve belirli bir aralıktaki tanecikler kolona doldurulmalıdır. Böylece kolon geçirgenliği artırılır ve daha düşük basınçlarla çalışabilir. Yine, tanecik şekillerinin düzenli olması da kolon geçirgenliğini artırır.

HPLC sistemlerinde genellikle, kullanılan ana kolonun ön tarafına daha kısa boyutta, fakat ana kolonla aynı malzemeyle dolgulu, emniyet kolonu adı verilen bir kolon bağlanır. Emniyet kolonları ana kolonlara göre daha ucuzdur ve ana kolonu olabilecek yüksek derişim ve kirliliklerden korur. Kirlendiğinde çok daha rahat değiştirilebilir (14).

#### **2.1.5.6. Dedektör**

HPLC’de kullanılan floresans dedektörleri, florometre ve spektroflorometrelerde kullanılan dedektörlerin aynıdır. En basit floresans dedektörlerinde, uyarıcı olarak cıva lambası, ışınları süzmek için de bir veya birkaç filtre kullanılır. Daha iyi cihazlarda uyarıcı olarak ksenon ark lambası ve bir greyting monokromatörü bulunur. Gelecekte bu alanda belki de ayarlanabilir lazerler kullanılacaktır ve böylece daha seçici ve hassas ölçmeler yapmak mümkün olacaktır. Floresans metodunun başlıca avantajı, her hangi bir absorbans metodundan en az 10 defa daha hassas olmasıdır. Bu avantaj sıvı kromatografisinde daha da ileri gider. Çünkü, sıvı kromatografisi metoduyla ayrılan doğal maddeler, farmasötik maddeler, kriminal maddeler, klinik maddeler, petrol ürünleri olduğundan bunların büyük bir kısmı şiddetli floresanstır. Floresan olmayan maddeler de, dansil klorürle muamele edilerek floresan hale getirilir (13).

#### **2.1.6. Sistem Uygunluk Testi**

Sistem uygunluk testi genelde tüm analitik sistemin (cihaz, reaktif, kolon ve analist dahil) istenilen uygulamaya uygun olduğundan emin olmak için laboratuvarlar tarafından kullanılır. Sistem uygunluk testinin genel amacı kromatografik uygunluk (örneğin: kuyruklanma faktörünü test ederek, kritik pik çiftlerinin kolon etkinliği ve rezolüsyonunu test ederek) ve istikrarlı sistem performansından (örneğin: test

standartlarının tekrar enjeksiyonuyla) emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir.

USP'ye göre sistem uygunluk testleri gaz ve sıvı kromatografisi metodlarının ayrılmaz bir parçasıdır. Bunlar analizin yapılabilmesi için kromatografik sistemin rezolüsyon ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olduğunu doğrulamak için kullanılır. Testler cihaz, elektronik, analitik işlemler ve analiz edilecek örnekler ayrılmaz bir bütünü oluşturur ve böyle değerlendirilir.

Tipik kromatografik metodlar için beklenen limitleri detaylandıran sayısız kaynaklar vardır. FDA'in şu anki kılavuzunda "Analitik metodların validasyonu" aşağıdaki kabul limitleri başlangıç kriteri olarak önerilmiştir (Tablo 2-3 ) (15).

**Tablo 2-3: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.**

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon kesinliği	$RSD < \%1$ , $n \geq 5$
Rezolüsyon	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$

Kapasite faktörü, rezolüsyon ve teorik plaka sayısından bölüm 2.1.5.2.'de bahsedilmiştir.

Enjeksiyon kesinliği, RSD (rölatif standart sapma) olarak ifade edilir ve kromatografik sistemin performansını gösterir. Bu, numunelerin analizleri sırasında pompanın, kolonun ve çevresel koşulların değerlendirilmesidir. Numune hazırlığı ve üretim değişkenleri bu parametreler ile değerlendirilemez.

Kuyruklanma faktörünü aşağıdaki formülle hesaplayabiliriz. Piktteki kuyruklanma arttıkça miktar tayininin doğruluğu azalır.

$$T = \frac{W \cdot 0.05}{2F}$$

$W \times 0,05$  = Pik yüksekliğinin 20'de 1'inde pik genişliği

$f$  = Pikin maksimumdan dik olarak indirilen dikme ile pik yüksekliğinin 20'de 1'inde pikin kenarına kadar olan mesafe.

## 2.1.7. Analiz Yöntemleri

### 2.1.7.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Marfil F. ile arkadaşları plazmada ve letrozol ile onun metaboliti olan CGP 44 645'i idrarda tayini için sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma ODS Hypersil C18 kolonda asetonitril-fosfat tamponu pH:7 mobil fazı kullanılarak 1.5 mL/dak akışta gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini için fluorimetrik dedektör kullanıldı. Uyarılma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 230 ve 295 nm'dir. Letrozolün plazma ve idrarda tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 1.40nmol/L (0.4ng/L) ve 2.80 nmol/L'dir (16).

J. Rodriguez ve arkadaşları letrozol, citalopram ve onların metabolitlerini idrarda eş zamanlı tayinini floresans dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yüksek kesinlik ve doğrulukta bir yöntem geliştirmişlerdir. Ayırım Kromasil C18 (150mmx4.6mm ) kolonda gerçekleştirilmiş ve mobil faz olarak (65:35); pH:3 fosfat tamponu ve asetonitril kullanılmıştır. Analitler 295 nm'de uyarılmadan sonra 230 nm'de dedekte edildi. Letrozol ve metaboliti için doğrusallık aralığı 1.0-1000 ng/mL ve sitalopram ve metabolitleri için 2.5-1000 ng/mL olarak bulunmuştur (17).

Letrozol tabletlerinin stabilite analizleri için yüksek-performanslı sıvı kromatografisi yöntemi M. Mathrusri ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Ters faz kromatografisi ile Lichrocart/Lichrosphere 100 C-18 (250mmx4.5mm, 5µm) kolon ile metanol: tetrabutil amonyum hidrojen fosfat (80:20 V/V) mobil faz olarak 1 mL/dak akışta 240 nm'de UV dedeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık 0.5-150 µg/mL konsantrasyon aralığında ( $R^2=0.9998$ ), regresyon denklemi  $y=102582x+43185$  olarak gözlemlendi (18).

Afshin Zarghi ve arkadaşları, letrozolün insan plazmasındaki analizi için kolay, hızlı ve hassas bir HPLC metodu geliştirmiş ve valide etmiştir. Ayırma monolitik silika kolonda asetonitril-fosfat tamponu kullanılarak başarılmıştır. Miktar tayini için uyarılma ve emisyon dalga boyları 230 ve 295 nm'de floresans dedektör kullanılmıştır. Terapötik ilaç izleme için 0.5 ng/mL tayin sınırında ( LOQ ) letrozölü plazmadan analizini gerçekleştirmiştir (19).

Nita Mondal ve arkadaşları, nanopartiküller ve orta salınımlı letrozol farmasötik preparatlarında analizi için sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Ayrıca C<sub>8</sub> kolonda, (50:30:20 h/h/h) deiyonize su, asetonitril ve metanol karışımı ile sağlanmıştır.

240 nm'de UV dedeksiyon ile 1-50 µg/mL doğrusal aralığında analiz gerçekleştirilmiştir (20).

Pallavi ve arkadaşları ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodunu letrozolün bulk ve dozaj formlarında tayini için geliştirmiştir. Ayrım kromasil ODS C<sub>18</sub> kolonda (250mmx4.6mm,5µ) mobil faz karışımı tampon ve metanol (85:15, h/h) kullanarak 1.0 mL/dak. akışta gerçekleştirilmiştir. Tayin 230 nm'de gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanı 3.443±0.08 dakika olarak bulundu. Letrozolün kalibrasyon eğrisi 20-120 µg/mL aralığında doğrusaldır (21).

Moussa ve arkadaşları letrozolün bulk ve farmasötik preparatlarda tayini için kolay, doğru ve kesin spektrofiorimetrik ve kromatografik metodlar geliştirmiş ve valide etmiştir. Spektrofiorimetrik metod letrozölü 587nm'de uyarıldıktan sonra 239nm'de metanolde ölçümüne dayanmaktadır. Ters faz HPLC yönteminde mobil faz olarak asetonitril:su:metanol (50:35:15, h/h/h) ile 1.5mL/dak. Akışta C<sub>18</sub> kolonda geliştirildi. Bulk ve farmasötik preparatta letrozol UV dedektör ile 239 nm'de dedekte edildi. Metod ICH kılavuzuna göre valide edildi (22).

Ranganathan ve arkadaşlarının çalışmasının amacı letrozolün bulk ve tablet dozaj formlarında bozunma ürünleri varlığında tayini için stabilite gösteren bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmek ve ilgili bileşikle olası kararlı koşulları saptamaktır. Tayin su, asetonitril, ve fosfat tampon (pH:5.8;0,1M), (70:20:10, h/h/h) kullanılarak izokratik mobil faz kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon olarak Intersil ODS 3 kolon, 1,0mL/dak. akışta 230nm'de UV dedeksiyon ile gerçekleştirildi. Letrozolün alıkonma süresi 9,454 dak. olarak bulundu. Metod 600-1400 µg/mL ( $r^2 = 0,9997$ ) konsantrasyon aralığında doğrusal bulundu (23).

Narataj ve arkadaşları kararlılık gösteren HPLC metodunu letrozolün tabletlerde tayini için geliştirmiş ve valide etmiştir. Zodiac SIL 120-C<sub>18</sub>H kolon, su ve asetonitril (30:70) oranında mobil fazı 1mL/dak. akışta 230nm'de UV dedeksiyonu ile geliştirmiştir. Metod 0,0115-1,278 µg/mL aralığında doğrusaldır (24).

### 2.1.7.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Mondal N. ve arkadaşları yeni bir aromataz inhibitörü olan letrozolüham ham madde ve tabletlerde tayini için basit, hassas, doğru bir UV spektrofotometrik bir metod geliştirmiştir. 238 nm maksimum absorpsiyonda doğrusallık 2-20 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur (25).

Sasmita Kumari Acharjya ve arkadaşları letrozolün farmasötik preparatlarda tayini için ultraviyole ( UV ) birinci türev, ikinci türev ve eğri altı alan spektrometrik metodlarını geliştirmiştir. UV-spektrofotometri için standart çözeltiler 240 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi  $dA/d\lambda$  değerlerinin 0.25-20.0 µg/ml konsantrasyonlardaki letrozole karşı çizilerek oluşturulmuştur (26).

Ganesh ve ark., kolay, hassas, spektrofotometrik metod UV bölgesinde letrozolün bulk ve tablet dozaj formları için geliştirilmiştir. Letrozolün standart çözeltileri 240 nm'de, belirgin molar absobtivite  $3.3016 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$  ile maksimum absorbans gösterir. Beers kanununa 1-10µg/mL aralığında regresyon ile, eğim ve kesim noktası sırasıyla 0.9998-0.016 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak yüzde geri kazanım 100.63'tür (27).

Mareck U. ve arkadaşları letrozol ile tedavi gören metastasik kadın göğüs kanseri hastalarının idrarını toplamış ve letrozolün metabolitlerini tayin yöntemi geliştirmek için analiz etmiştir. Analiz gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) ve letrozolün metabolite (bis-4-siyanofenilmetanol) dayanmaktadır (28).

Snehal ve arkadaşları hızlı ve basit bir sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi yöntemini metformin ve letrozolün insan plazmasında eşzamanlı tayini için bir metod geliştirmiş ve valide etmiştir. Kolon olarak Hypurity C18 kolon, 5mM amonyum format ve asetonitril (20:80) oranında kullanılmıştır. LOQ metformin ve letrozol için sırasıyla 5.0 ng/mL ve 0.5 ng/mL olarak bulunmuştur (29).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2014-2015 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

#### 3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında referans standart kullanılmıştır (Tablo 3-1). Referans standartın Analiz Sertifikası Ek-1’de verilmiştir.

**Tablo 3-1:Referans standart**

Standart	Üretici – Lot no	Kullanım Amacı
Letrozol	Natco Pharma Limited	Analit

Metod geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-2’de belirtilmiştir.

**Tablo 3-2: Kimyasallar**

Kimyasallar	Marka
Metanol (HPLC saflığında)	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibazik dihidrat (Analitik saflıkta)	Riedel-de Haen
Asetonitril (HPLC saflığında)	VWR
Ortofosforik asit (%85 ağı/ağı) (analitik saflıkta)	Ferak Berlin
Ultra saf su	Elga Purelab Option



### 3.1.2. Çözeltiler

#### 3.1.2.1. Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz olarak asetonitril, metanol, farklı konsantrasyonlar da fosfat tamponu çözeltileri farklı oranlarda denenmiş en uygun ayırım asetonitril-fosfat tamponu karışımından elde edilmiştir. Mobil faz çözeltisi olarak asetonitril-80mM fosfat tamponu (pH:7) (50:50, h/h ) karışımı kullanıldı. Mobil faz süzme sisteminden süzülerek analize hazır hale getirildi.

##### *80 mM Fosfat tamponununun hazırlanması*

14.2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılıp 1L saf suda çözüldü. Ortofosforik asit (%85 ağı/ağı) alınarak ile pH 9 bulundu. pH 7'ye düşürmek için 5M ortofosforik asit çözeltisi hazırlandı.

##### *5 M Fosforik asit çözeltisinin hazırlanması*

Ortofosforik asitten ( %85 ağı/ağı ) 84.7 mL alınarak 250 mL'lik balon jodede saf su ile hacmine tamamlandı.

#### 3.1.2.2. Letrozol Çözeltileri

##### *Ana Stok çözelti:*

1 mg letrozol olarak tartıldıktan sonra 10 mL'lik bir balonjodede metanolde çözümlenerek hacmine tamamlandı (0.1mg/mL, LTZ-DS1).

Stok çözeltiden metanol ile 1µg/mL'lik (LTZ-DS2) ara stok hazırlandı. Daha sonra 0.05-0.70µg/mL aralığında standart çözeltiler asetonitril ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin hazırlanışı Tablo 3-3 ve 3-4'de verilmiştir.

**Tablo 3-3: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı**

<b>Standart Adı</b>	<b>Analit</b>	<b>Konsantrasyon (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Konsantrasyonu ve Hacmi</b>	<b>Final Hacim Metanol</b>
ST1	LTZ	0,05	250 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
ST2	LTZ	0,1	500 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
ST3	LTZ	0,3	1500 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
ST4	LTZ	0,5	2500 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
ST5	LTZ	0,7	3500 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL

Kalibrasyon eğrisi standartları hazırlandıktan sonra düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen noktalarda kalite kontrol örnekleri hazırlanmıştır (Tablo 3-4).

**Tablo 3-4: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanışı**

<b>Standart Adı</b>	<b>Analit</b>	<b>Konsantrasyon (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>DS Konsantrasyonu ve Hacmi</b>	<b>Final Hacim Metanol</b>
KK1	LTZ	0,05	250 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
KK2	LTZ	0,2	1000 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
KK3	LTZ	0,4	2000 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL
KK4	LTZ	0,7	3500 $\mu\text{L}$ LTZ-DS2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5mL

### 3.2. Aletler ve Gereçler

Shimadzu (Kyoto, Japonya) LC 20 serisi HPLC sistemi analitik çalışmalarda kullanılmıştır (Tablo3-5).

**Tablo 3-5: Ekipmanlar**

<b>HPLC-DD Sistemi</b>	<b>Marka - Model</b>
Pompa	Shimadzu LC-20AT
Otoörnekleyici	SIL-20HT
Dedektör	Shimadzu RF-10A XL
Kolon Fırını	Shimadzu CTO-10AS VP
Degazer	DGU-20A5
Analitik Kolon	İntersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm, C18
Yazılım	LC Solution

Sistem Kontrol Ünitesi (Shimadzu SCL-20A VP)

Validasyon çalışması sırasında kullanılan destek ekipmanlar Tablo 3-6'da belirtilmiştir.

**Tablo 3-6: Destek ekipmanlar**

<b>Destek Ekipmanlar</b>	<b>Marka - Model</b>
Spektrofluorimetre	Shimadzu RF-1501
1 cm'lik kuartz küvetler	QS 1000 10 x10 x 45 mm
Ultra saf su cihazı	Elga Purelab Option

Ultrasonik banyo	Elma Ultrasonics LC 30 H
pH metre	WTW pH Meter pH 526
Otomatik pipetler	Eppendorf 100-1000 $\mu$ L ve 10-100 $\mu$ L
Pipet Uçları	Eppendorf 1000 $\mu$ L ve 100 $\mu$ L
Otoörnekleyici Vialleri	Isolab
Vial Kapakları	Isolab
Girdap karıştırıcı	Tetra
Analitik Terazi	Denver Instrument
Mobil Faz Filtresi	Millipor, 0,45 $\mu$ m
Enjektör	Hamilton, düz uçlu, 50 $\mu$ L
PTFE Filtre 0,45 $\mu$ m	Macherey-Nagel

### 3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

Enstrümantal Şartlar :

- a. LC 10 serisi HPLC sisteminin bilgisayarı güç düğmesine basılarak açılır.
- b. HPLC kısımları sırasıyla açılır.
- c. Floresans dedektörünün güç düğmesine basılarak açılır ve 1-2 dakika bağlantı sağlanana kadar beklenir.
- d. Ardından masaüstünden LC Solution ikonuna basılarak yazılım açılır.
- e. 3.1.2.1'e uygun olarak hazırlanan mobil faz çözeltisi sistemin kanallarına yerleştirilir.
- f. Kullanılan hatlar Auto Purge seçilerek purge işlemi yapılır.

- g. Purge işlemi bittikten sonra akış 0.1 mL/dak olarak ayarlanır ve kolon bağlantısına kadar mobil faz geçmesi sağlanır.
- h. Akış kademeli bir şekilde artırılır. Final akış 0.7 mL/dak olacaktır.
- i. Analiz süresi 14 dakikadır.
- j. Kolon sıcaklığı 25<sup>0</sup>C'dır
- k. Enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlanmıştır.
- l. Dedektör Tablo 3-7'deki verilere göre ayarlanmıştır.
- m. Letrozol için hazırlanan metod seçilmiştir.

**Tablo 3-7: Moleküle ait özel dedektör parametreleri**

Molekül Adı	Eksitasyon Dalga Boyu	Emisyon Dalga Boyu
Letrozol	256 nm	585nm

### 3.4. Sistem Uygunluk Verileri

Sistem uygunluk testi verileri Tablo 3-8'de verilmiştir ve uygun değerler elde edilmiştir.

**Tablo 3-8: Letrozolün için sistem uygunluk parametreleri**

Summary(Compound)

<< Detector A >>

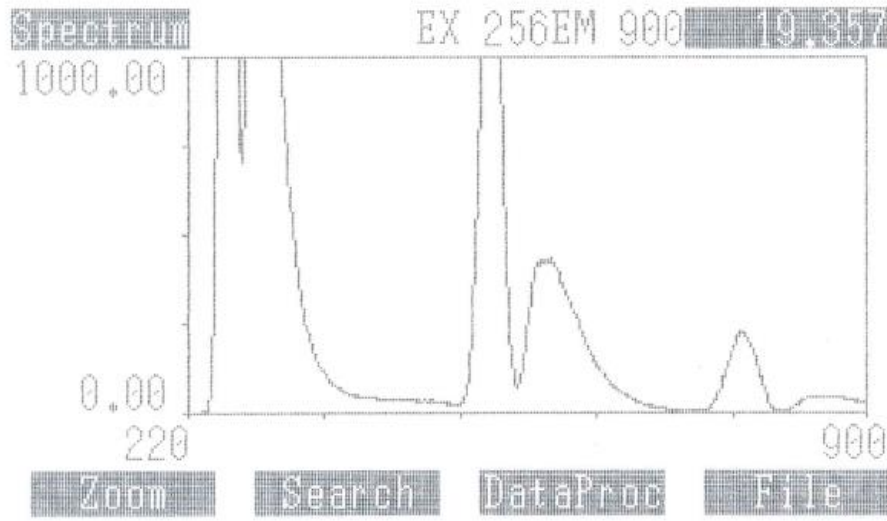
ID#1 Compound Name: Letrozole

Title	Ret. Time	Area	Height	Conc.	k'	Tailing Factor	Theoretical Plate#
0,05ltz_kal1_4.lcd	9.991	189065	11477	0.050	2.223	1.120	7830.783
0,1ltz_kal1_4.lcd	9.989	428129	25201	0.100	2.222	1.134	7700.118
0,3ltz_kal1_4.lcd	9.980	1085090	63898	0.298	2.219	1.134	7760.786
0,5ltz_kal1_4.lcd	9.977	1783137	104200	0.499	2.218	1.133	7660.238
0,7ltz_kal1_4.lcd	9.970	2527196	148730	0.704	2.216	1.140	7752.800
Average	9.981	1202524	70701	0.330	2.220	1.132	7740.945
%RSD	0.086	80.329	80.119	83.067	0.125	0.651	0.837
Maximum	9.991	2527196	148730	0.704	2.223	1.140	7830.783
Minimum	9.970	189065	11477	0.050	2.216	1.120	7660.238
Standard Deviation	0.009	965977	56645	0.274	0.003	0.007	64.780

### 3.5. Letrozolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi

#### 3.5.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Letrozolün gösterdiği maksimum uyarılma ve emisyon dalga boyları spektrofotometri yöntemiyle belirlendi. Uyarılma dalga boyu 256 nm emisyon dalga boyu ise 586 nm olarak bulundu (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Letrozolün spektrofotometrede 0.1 µg/mL konsantrasyonda alınmış spektrumu

#### 3.5.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 1 µg/mL konsantrasyondaki letrozol çözeltisinden 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.7 µg/mL konsantrasyonlarında 5 mL'lik balon jöjelerde hazırlandı, 15 saniye vortekslendi. Doğrusal konsantrasyon aralığı alınmıştır.

20 µL enjeksiyon yapılarak alanlar hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

### 3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metod parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Tek bir laboratuvar veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir (30).

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, *International Conference Harmonization Q2(R1)*) kılavuza göre validasyon yapıldı. (31).

#### 3.6.1. Spesifiklik ve seçicilik

Analitik yöntemin analiti diğer bileşenlerden ayırabildiğinin ölçüsüdür. Bunun için etken maddenin içinde bulunduğu matriks bileşenlerinden ayrılabilmesinin gösterilmesi gerekir. Etken madde için pik saflığı testi yapılarak analit pikinin tamamen analite ait olduğunun gösterilmesidir. Bu yöntem diyode array-UV spektrumları ve kütle de geçerlidir.

#### 3.6.2. Doğrusallık

Analitik seyreltmelerde azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Analitin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapılır. Korelasyon katsayısı, y (ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edilir. Analitik çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallık gösterilmeli ve korelasyon katsayısı 0.99.. dan büyük olmalıdır.

#### 3.6.3. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk, gerçek değer ile analiz edilen değerlerin birbirine yakınlığını göstermektedir. Doğruluğu belirlemek için çeşitli yöntemler vardır.

- Analitin bilinen konsantrasyonlarda çözeltilerinin analizi ile belirlenir.
- Başka bir belirlenmiş metod ile analiz yapılır.

Analitin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki 3 örnek analiz edilerek miktar tayini yapılır ve doğruluk hesaplanır.

Kesinlik ise belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Analizin en az 3 farklı konsantrasyonunda düşük orta ve yüksek konsantrasyonda en az 3 örnek analiz edilerek relatif standart sapma (varyasyon sabiti, cv) hesaplanır.

### 3.6.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini Limiti

Dedeksiyon limiti tayin edilebilen en düşük düzeydir. Farklı yollarla belirlenebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: dedeksiyon limiti için sinyal/gürültü oranı 3'den büyük kabul edilebilirdir.

b) Cevap ve eğrinin standart sapmasına bağlı olarak da hesaplanabilir.

$$LOD = 3 \sigma / S$$

$\sigma$ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

$\sigma$  regresyon eğrisinin y kesim noktasının standart sapması cevabın standart sapması olarak kullanılabilir (32).

En düşük analiz edilebilen miktardır. Farklı yöntemlerle tayin edilebilir.

a) Sinyal/gürültü oranı: en düşük tayin limiti için S/N oranı 10'dan büyük olmalıdır.

b) Ya da kalibrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanır.

$$LOQ = 10 \times \sigma / S$$

$\sigma$ : Cevabın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi.

### 3.6.5. Validasyon Serisinin Hazırlanması

Validasyon serisi boş, kalibrasyon eğrisi ve kalite kontrol örnekleri olarak hazırlandı. Boş viallere mobil faz karışımı, kalibrasyon eğrisi için konsantrasyonlar, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 0.70  $\mu\text{g/mL}$ , kalite kontrol örnekleri ise 0.05, 0.20, 0.40, 0.70  $\mu\text{g/mL}$  olarak seçildi. Validasyon serisi; Boş, Kalibrasyon standartları (ST1-ST5) Boş, Kalite kontrol örnekleri ( KK1, KK2, KK3, KK4, her birinden 6 örnek) boş ve tekrar standart kalibrasyon standartları şeklindedir.

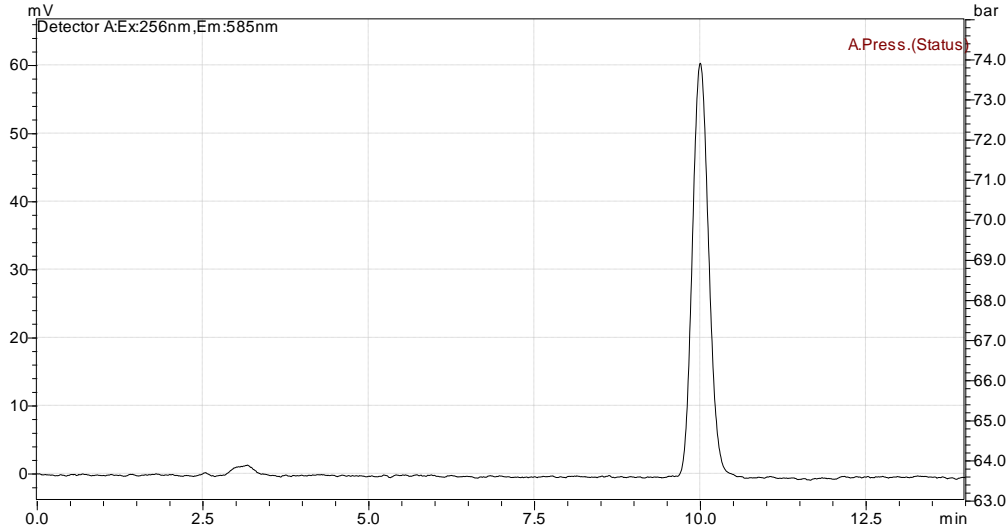
Bu seri 2 kez hazırlanarak analizi yapılmış daha sonra 2. seri tekrar analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden validasyon parametreleri hesaplanmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Letrozolün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Metod Geliştirme

Letrozol için en uygun dedeksiyon dalgaboyu; 256 nm uyarılma ve 585 nm emisyon olarak bulunduğundan sonra en uygun koşullar belirlenmiştir. Yöntem C<sub>18</sub> analitik kolonda (İntersil ODS, 5 µm, 250x4.6mm); asetonitril-50mM fosforik asit çözeltisi (pH:7), (50:50,h/h) hareketli fazı ile 0.7 mL/dak akış hızında fluorimetrik dedektör ile geliştirilmiştir. 0.3 µg/mL letrozol çözeltisine ait bir kromatogram Şekil 4-1'de verilmiştir.

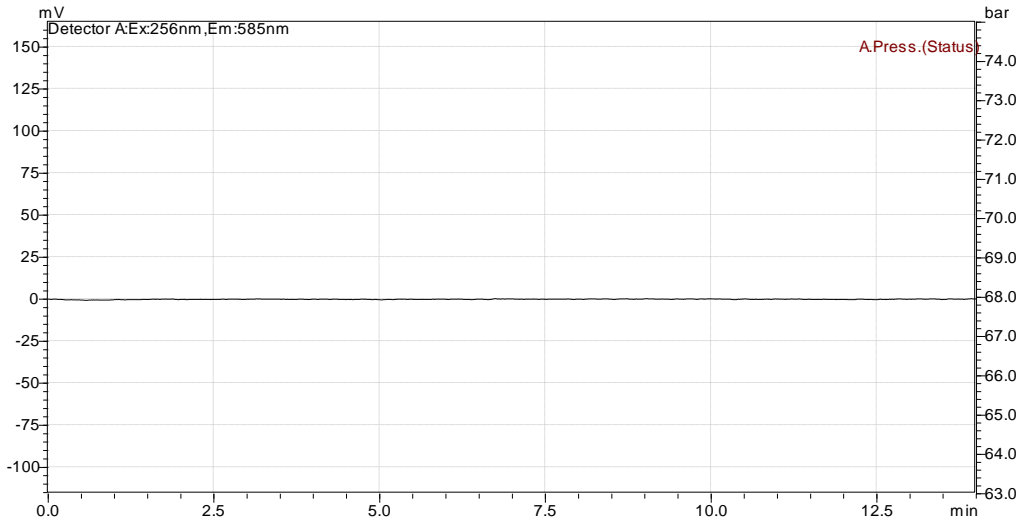


Şekil 4-1: 0.3 µg/mL letrozole ait örnek kromatogram

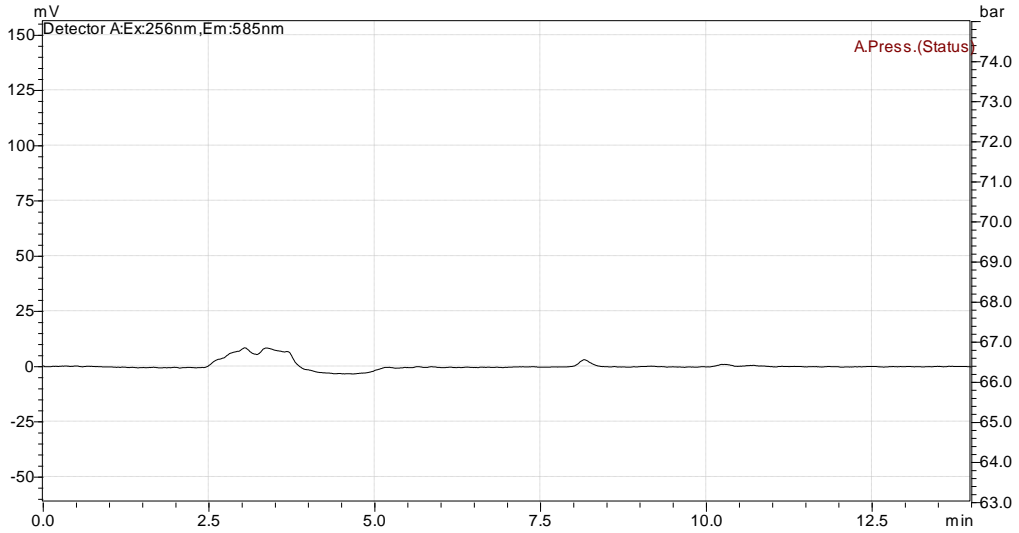
### 4.2. Yöntem Validasyonu

#### 4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin sınanması için plaseboya ait kromatogramlar (Şekil 4-2, 4-3) verilmiştir. Mobil faz ve plasebo kromatogramlarında analitin alıkonma zamanında herhangi bir girişim görülmemiştir. Plasebonun içinde; Koloidal susuz silika, mikrokristalize selüloz, laktoz monohidrat, magnezyum stearat, mısır nişastası, sodyum karboksimetil nişastası, hidroksipropil metilselüloz, polietilen glikol 8000, talk, titanyum dioksit (E171), sarı demir oksit (E172), etanol, saf su vardır.



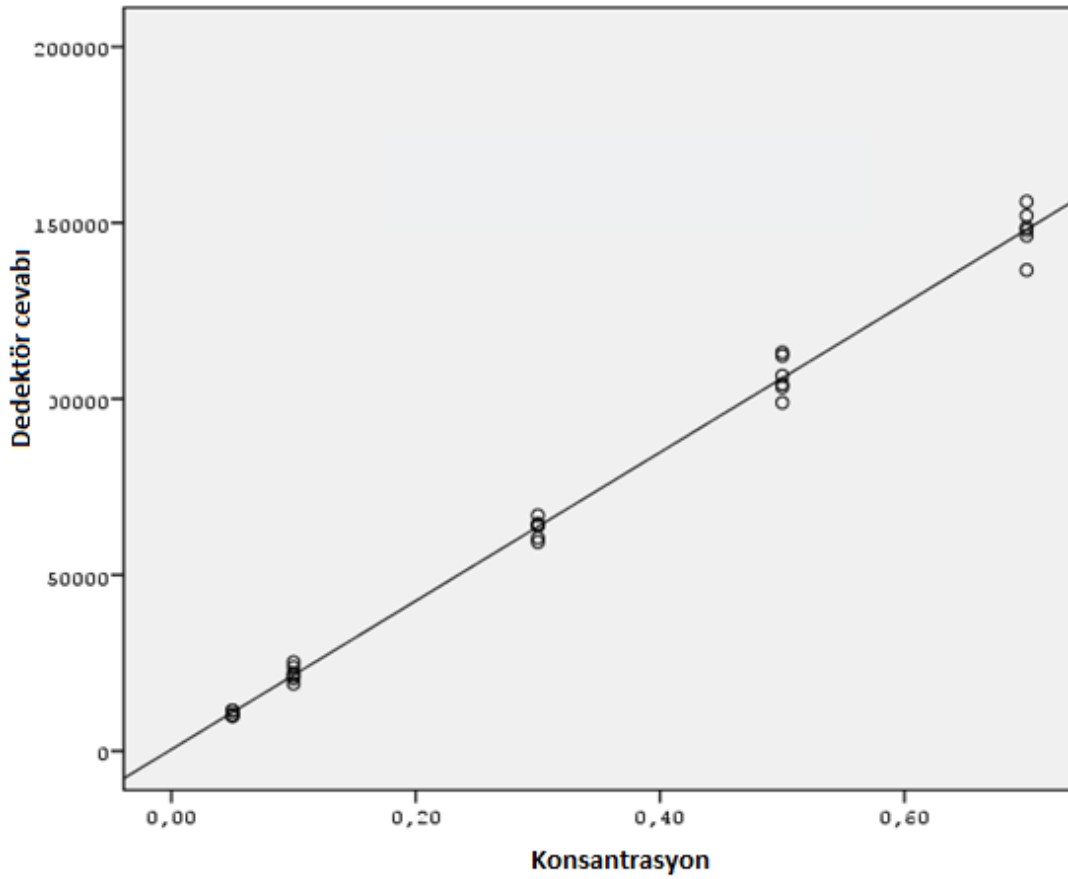
**Şekil 4-2: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram**



**Şekil 4-3: Plasebo çözeltisinin kromatogramı**

#### 4.2.2. Doğrusallık

Letrozol çözeltileri 0.05-0.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aralığında 5 farklı konsantrasyonda 6'şar örnek hazırlandı ve ortalama pik yüksekliğine karşı grafiğe geçirildi. Validasyon serilerinde 2'şer adet kalibrasyon standartları hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4-4'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları 0.999 mertebesinde kabul edilebilir sınırlardadır (Tablo 4-1). Kalibrasyon eğrisi konsantrasyon değerlerinin doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir. Eğri değerleri doğru ve kesin olarak bulunmuştur.



Şekil 4-4: Kalibrasyon eğrisi

Tablo 4-1: Validasyon serlerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri no	Korelasyon Katsayısı	Doğru Denklemi
VAL 1.1	0.99984	$y=223827.0x+56.36$
VAL 1.2	0.99919	$y=220157.2x-628.36$
VAL 2.1	0.99951	$y=211067.0x-1163.81$
VAL 2.2	0.99928	$y=208847.4x-335.16$
VAL 3.1	0.99912	$y=207441.0x+2245.91$
VAL 3.2	0.99985	$y=196005.6x+77.83$

**Tablo 4-2: Kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
ST1	0.05	0.0496	99.20	0.0022	4.4171	6
ST2	0.10	0.0992	99.17	0.0033	3.2780	6
ST3	0.30	0.2952	98.39	0.0068	2.2920	6
ST4	0.50	0.4970	99.40	0.0114	2.2871	6
ST5	0.70	0.6893	98.48	0.0204	2.9541	6

#### 4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik hesaplamaları Bölüm 3.6'ya göre yapıldı. Düşük orta ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen kalite kontrol örnekleri gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4-3, 4-4, 4-5 ve 4-6'da verilmiştir. Bulunan değerlere göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulunmuştur. Bu değerlerle yöntemin tekrarlanabilir olduğuda görülmektedir.

**Tablo 4-3: Birinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0.05	0.0487	97.33	0.0008	1.6777	6
KK2	0.20	0.1978	98.92	0.0034	1.7339	6
KK3	0.40	0.3905	97.63	0.0021	0.5310	6
KK4	0.70	0.6722	96.02	0.0050	0.7374	6

**Tablo 4-4: İkinci validasyon serisinin gün içi hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0.05	0.0525	105.00	0.0006	1.0433	6
KK2	0.20	0.2000	100.00	0.0035	1.7607	6
KK3	0.40	0.3990	99.75	0.0062	1.5531	6
KK4	0.70	0.6962	99.45	0.0089	1.2829	6

**Tablo 4-5: Üçüncü validasyon serisinin gün içi hesaplamaları**

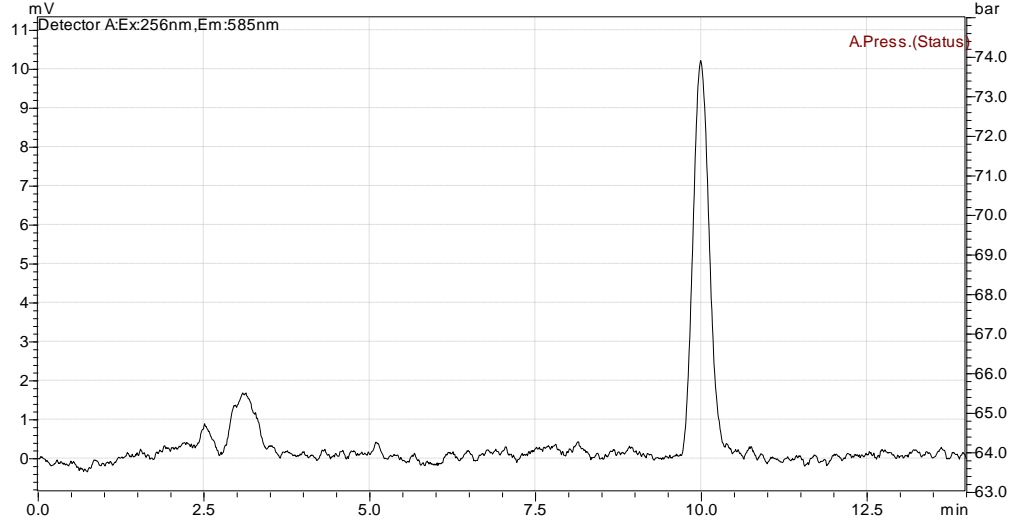
Numune	Konsantrasyon	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0,05	0.0410	82.00	0.0008	1.9915	6
KK2	0.20	0.1893	94.67	0.0071	3.7743	6
KK3	0.40	0.4250	106.25	0.0231	5.4339	6
KK4	0.70	0.6988	99.83	0.0023	0.3315	6

**Tablo 4-6: Validasyon serisinin günler arası hesaplamaları**

Numune	Konsantrasyon	Ortalama	%Ort	Sapma(SD)	%CV	n
KK1	0.05	0.0482	99.64	0.0047	9.6810	18
KK2	0.20	0.1957	97.86	0.0067	3.4108	18
KK3	0.40	0.4023	100.58	0.0178	4.4350	18
KK4	0.70	0.6891	98.44	0.0136	1.9714	18

#### 4.2.4. Dedeksiyon ve Miktar Tayini limiti

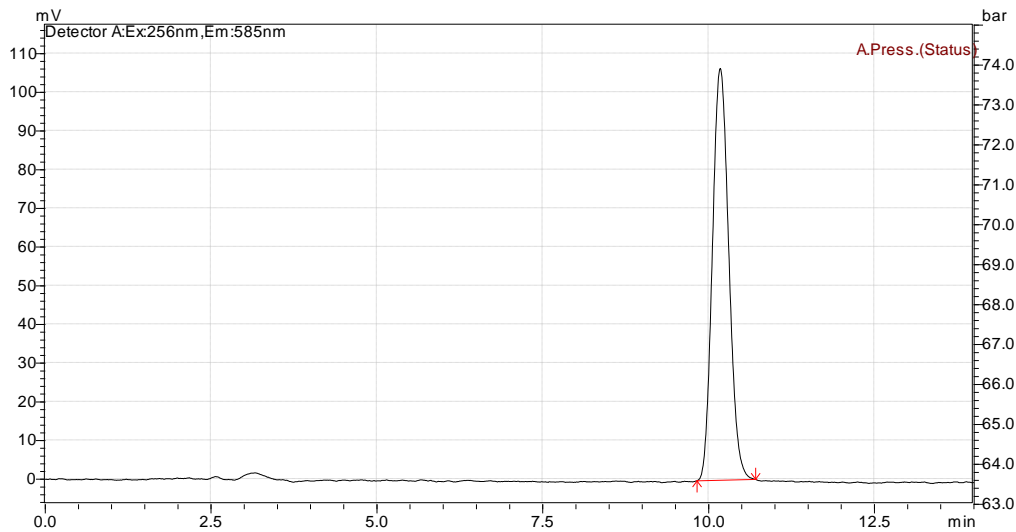
Bölüm 3.6.4’de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri letrozol için sırasıyla 0.014-0.042  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuştur. 0.05 $\mu\text{g/mL}$  letrozol çözeltisine ait bir kromatogram Şekil 4-5’de verilmiştir.



Şekil 4-5: 0.05  $\mu\text{g/mL}$  letrozol enjeksiyonuna ait bir kromatogram

#### 4.3. Farmasötik Preparatların Hazırlanması

10 adet letrozol içeren tablet ( Femera™) toz haline getirilip bir tablet ağırlığında 6 tartım alınarak 100 mL’lik balon jodede hacmine metanol ile tamamlandı (25 $\mu\text{g/mL}$ ). Bu çözeltiden 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ’lik çözelti hazırlanır. Kromatografik analizi yapılır (Şekil 4-6). Farmasötik preparat analizlerinden geri kazanım %98.8 olarak bulunmuştur.



Şekil 4-6: 0.025  $\mu\text{g/mL}$  tablet enjeksiyonuna ait bir kromatogram

## 5. TARTIŞMA

Letrozol, non steroidal aromataz inhibitörüdür. Meme kanserinin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Letrozol içeren farmasötik preparatların analizi kalite kontrol açısından önemlidir. Bu nedenle kolay, seçici ve hassas bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-floresans dedektörü sistemi kullanılarak letrozolün farmasötik preparattan analizi gerçekleştirilmiştir.

Letrozol doğal floresans özelliğe sahiptir. Molekülünde  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişini kolaylaştıracak konjuge  $\pi$  bağlarının olması ve elektron verici azot ve ikili-üçlü bağların bulunması floresansı artırmaktadır. Letrozol de yapısı itibariyle triazal grubu-konjuge nitril grupları ve benzen halkaları bulunmaktadır. Bunlar da letrozolün floresans özellik göstermesini sağlamaktadır.

Letrozolün uyarılma dalga boyu 256 nm, emisyon dalga boyu ise 585 nm olarak bulunmuştur (Tablo-3.7).

İyonizasyon floresans şiddetini değiştirebilmektedir. Letrozolün pKa'sı 2.17 dir. Mobil faz pH'si 7'de en uygun kromatografik sonuç bulunmuştur. pKa'ya yakın pH'lerde çalışıldığında Henderson-Hasselbalch eşitliğinde iyonlaşmayan denge olmalıdır. İyonlaşma olmaması için nötr pH'de uygun sonuç bulunması doğaldır.

Letrozol polar yapıda bir bileşiktir. C18 apolar kolonda polar mobil faz ile alıkonma sağlanmıştır.

Sistem uygunluğu testi yapıldığında tüm parametrelerin uygun olduğu görülmüştür. Tablo 3-8 de elde edilen veriler görülmektedir. Kabul limitleri ise Tablo 2-3 de verilmiştir.

Kalibrasyon eğrisi 0.05-0.70  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları aralığında seçilmiştir. Hesaplanan LOD ve LOQ değeri 0.014-0.042  $\mu\text{g/mL}$  dir.

Seçilen kalibrasyon konsantrasyonları en yüksek ve en düşük değer alınıp orta konsantrasyon belirlenerek kalite kontrol örnekleri oluşturulmuştur. Validasyon serilerinden elde edilen korelasyon katsayıları 0.999 mertebesinde ve analitik açıdan kabul edilebilir değerlerdir. Kalibrasyon standartlarının doğruluk ve kesinlik değerleri %CV kabul sınırı 5'in altında ve standart sapma 2'nin altındadır. Bu sonuçlarla yöntemin doğruluk ve kesinliği uygun görülmektedir (Tablo 4-2,4-4). Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri de (Tablo 4-3, 4-4, 4-5, 4-6) uygun bulunmuştur.

Yöntem tabletlere uygulanmış ve geri kazanım % 98.8 bulunmuştur. Bulunan geri kazanım değerleri kabul limitleri içindedir.

Letrozolün farmasötik preparatlardan analizi çeşitli yöntemler ile yapılmıştır. Bu konuda yapılmış çok sayıda çalışma yoktur.

Mathrusri ve arkadaşları (18) HPLC-UV sistemi ile yaptıkları analizlerde letrozolün farmasötik preparatlardan analizi için geliştirdikleri yöntemde 0.5 LOQ değerini bulmuşlardır. Pallavi ve arkadaşları (21) 20-120 µg/mL değerleri aralığında HPLC-UV metodu geliştirmişlerdir.

UV Spektrofotometrik analizlerde ise minimum tayin sınırı 2 ve 0,25 µg/mL bulunmuştur (25,26). Bu çalışmada geliştirilen ve valide edilen yöntemde minimum tayin sınırı 0.05 µg/mL olarak kalibrasyon eğrisinde alınmıştır. Kalibrasyon eğrisinden hesaplanan değerler ise daha düşüktür. LOD = 0.014 µg/mL LOQ = 0.042 µg/mL dir. Literatürde geliştirilen yöntemlere göre daha düşük Konsantrasyonlarda analiz geliştirilen ve valide edilen bu yöntemle mümkündür.

Geliştirilen ve valide edilen yöntem ile letrozolün farmasötik preparatlardan analizi doğru, hassas, seçici ve özgün bir şekilde kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu yöntem düşük konsantrasyonlara inebilme açısından biyolojik materyele de uygulanabileceği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Türkiye'nin Durumu. Erişim 5.8.2015,  
[http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_istatistikleri.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/Turkiye_Kanser_istatistikleri.pdf)
2. Türkiye kanser istatistikleri Ocak 2014. Erişim 5.8.2015,  
[http://kanser.gov.tr/Dosya/ca\\_istatistik/2009kanseraporu.pdf](http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf)
3. Özmen V. (2008). Breast cancer in the world and Turkey. *Meme Sağlığı Dergisi*, **4**:7-12.
4. Eti A., Gürkan A. (2007). Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*, **3**: 63-8.
5. Karamanoğlu Y., Gök Ö. (2008). Mastektomili hastalarda evde bakım. *Meme Sağlığı Dergisi*, **4**:3-8.
6. Monica M., Gautam J., David A. (2009). Anastrozole use in early stage breast cancer of post-menopausal women. *Clinical Medical: Therapeutics*, **1**,141-156.
7. Femara, RxMedia pharma 2013.
8. Femara, Erişim 5.8.2015,  
[http://www.novartis.com.tr/Default.aspx?sayfa=urunler\\_ilac&ustmenu=](http://www.novartis.com.tr/Default.aspx?sayfa=urunler_ilac&ustmenu=)
9. Letrozole,Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Letrozole>
10. Femara, <https://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/Femara.pdf>
11. Smith I, Dowsett M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, **348**, 2431-2442.
12. West S. (1999) Analitik Kimya, *Bilim Yayıncılık*.
13. Gündüz T. (2007). İnstürmental Analiz, *Gazi Kitabevi*.
14. Diltemiz S. ve ark. (2011). Aletli Analiz Laboratuvarı, *T.C. Anadolu Üniversitesi yayını*, 2092.
15. System suitability testing. Erişim 7.8.2015,  
<https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/TN-708-Automate-System-Suitability-Testing-TN70092-EN.pdf>
16. Marfil F., Pineau V., Sioufi A., Godbillon S. (1996). High-performance liquid chromatography of the aromatase inhibitor, letrozole, and its metabolite in

- biological fluids with automated liquid-solid extraction and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B.*, **683**, 251-258.
17. Rodríguez J., Castaneda G., Munoz L. (2013). Rapid determination of letrozole, citalopram and their metabolites by high performance liquid chromatography fluorescence detection in urine: Method validation and application to real samples. *Journal of Chromatography B*, **913–914**, 12– 18.
  18. Annapurna M., Mohapatro C., Narendra A. (2012). Stability-indicating liquid chromatographic method for the determination of Letrozole in pharmaceutical formulatios. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2**, 298–305.
  19. Zarghi A., Foroutan S., Shafaati A., Khoddam A. (2007). HPLC Determination of Letrozole in Plasma Using Fluorescence Detection: Application to Pharmacokinetic Studies. *Chromatographia*, **66**, 747–750.
  20. Mondal N., Pal T., Ghosal S. (2009) Development validation of RP-HPLC method to determine letrozole in different pharmaceutical formulations and its application to studies of drug release from nanoparticles. *Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research*, **66**, 11-17.
  21. Pallavi S., Vasanth M., Ramesh, T., (2012). Development and validation of RP-HPLC method for the determination of Letrozole in bulk and dosage form. *International Research Journal of Pharmacy*, **3**, 202-204.
  22. Moussa, Bahia A., El-Bagary, Ramzia I., Osman, Essam A. (2013). Determination of Letrozole in Pharmaceutical and Human Plasma Based on Fluorometric Dedection. *Analytical Chemistry Letters*, **2**, 139-146
  23. Ranganathan, Prasad H., Govindrajulu, Geetha, Palaniyappan, Venkatesh. (2012). Forced degradation study of letrozole-A validated stability indicating HPLC assay for bulk and tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**, 582-586.
  24. Nataraj ve ark. (2012). Stability indicating method developoment and validation for related substances for letrozole tablets by RP-HPLC. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **4**, 658-676
  25. Mondal N., Pal T., Ghosal S. (2007). Development and validation of a spectrophotometric method for estimation of letrozole in bulk and pharmaceutical formulation. *Pharmazie*, **62**, 597-598.

26. Acharjya S., Mallick P., Panda P., Kumar K., Annapurna M. (2010). Spectrophotometric methods for the determination of letrozole in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **1**, 348 -353
27. Ganesh ve ark. (2008). A validated UV spectrophotometric method for the determination of letrozole in bulk and solid dosage form. *Rasayan Journal of Chemistry*, **1**, 55-58
28. U. Mareck ve ark. (2005). Identification of the aromatase inhibitör letrozole in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 3689-3693
29. S. Gomes, (2013). Application of sensitive, rapid and validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of letrozole and metformin in human plasma. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, **3**, 84-94
30. Yılmaz A., Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu. *Türklab*, 5
31. ICHQ2(R1) Validation of Analytical Procedures: *Text and Methodology*
32. Determination of LOD&LOQ of HPLC analysis method. Erişim 5.8.2015, <http://dadangatotp.blogspot.com.tr/2009/09/penentuan-lod-loq-pada-metolisa-hplc.html>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Cem	<b>Soyadı</b>	Kaplan
<b>Doğ.Yeri</b>	Bakırköy	<b>Doğ.Tar.</b>	15.07.1988
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	44059941624
<b>Email</b>	cemkaplan_cktmail.com	<b>Tel</b>	5557815995

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2012
<b>Lise</b>	Şişli Lisesi	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	65		
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MİCROSOFT OFFİCE	ORTA

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Aikido

Ek-1

İZİN	
TÜRÜ	Mazeret İznî (S)
İZNE ÇIKIŞ TARİHİ	15.12.2011 15:2
İŞE BAŞLAMA TARİHİ	15.12.2011 17:2

supplied by : anshul bv., amsterdam the netherlands

http://ileon/izin\_form.asp?colno=2701&1



**Natco Pharma Limited**  
 Regd. Off. : NATCO HOUSE, Road No. 2, Banjara Hills,  
 Hyderabad - 500 011, INDIA.  
 Tel : +91 40 23547512, Fax : +91 40 23546243



**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Name of the Product : LETROZOLE			
Grade : Ph.Eur	A.R. No. : CAP2551/11		
Batch No : LTZ/1161011	Date of Analysis : 24.10.2011		
Batch Size : 1.000 KG	Retest date : 12.03.2015		
Date of Manufacture : 13.05.2011	Page : 1 of 2		
Inspection Lot No : 04000095436			
S.No	TESTS	RESULTS	SPECIFICATIONS
1.0	Characters 1.1) Appearance 1.2) Solubility	White crystalline powder Complies	White or yellowish, crystalline powder Practically insoluble in water, freely soluble in methylene chloride, sparingly soluble in methanol.
2.0	Identification 2.1) IR Absorption spectrum 2.2) HPLC	Complies Complies	The sample IR spectrum should be concordant with that of working standard IR spectrum. The sample HPLC retention time should be concordant with that of working standard HPLC retention time
3.0	Related substances (HPLC) a) Impurity A b) Impurity B c) Unspecified impurity d) Total impurities	Not detected Not detected 0.13 % 0.35 %	Not more than 0.3 % Not more than 0.1 % Not more than 0.10 % Not more than 0.3 %
4.0	Water (KF)	0.07 %w/w	Not more than 0.3 %w/w
5.0	Assay (HPLC)	99.4 %w/w	Between 98.0%w/w and 102.0%w/w on anhydrous basis
<b>Additional Tests</b>			
6.0	Heavy metals	<10 ppm	Not more than 10 ppm
7.0	Sulphated ash	0.01 %w/w	Not more than 0.1 %w/w
PREPARED BY	CHECKED BY	APPROVED BY	
Name: V. Venkatesh Reddy	Name: M. Rajeshwar C	Name: M. Venkatesh Reddy	
Date: 29-10-11	Date: 29-10-11	Date: 29-10-11	

Signature of Inspector

28.11.2011  
SS

supplied by : amphar bv., amsterdam - the netherlands



**Natco Pharma Limited**  
 Regd. Off. : NATCO HOUSE, Road No. 2, Banjara Hills,  
 Hyderabad - 500 031, INDIA.  
 Tel : +91 40 23547532, Fax +91 40 23548243



**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Name of the Product : LETROZOLE			
Grade : Ph.Eur		A.R. No. : CAPUS51911	
Batch No : LTZ/1161011		Date of Analysis : 24.10.2011	
Batch Size : 1.000 KG		Retest date : 12.05.2016	
Date of Manufacture : 13.05.2011		Page : 2 of 2	
Inspection Lot No : 040000055436			
S.No	TESTS	RESULTS	SPECIFICATIONS
8.0	Residual solvents		
	a) Methanol	277 ppm	Not more than 2000 ppm
	b) Dimethyl formamide	< 29 ppm	Not more than 300 ppm
	c) Isopropyl ether	< * ppm	Below detection (<1ppm)
	d) Hexane	< 1 ppm	Not more than 100 ppm
	e) Isopropyl alcohol	< 1 ppm	Not more than 100 ppm
	f) Acetone	< 1 ppm	Not more than 100 ppm
	g) Methylene chloride	< 1 ppm	Not more than 100 ppm
	h) Chloroform	< 1 ppm	Not more than 60 ppm
8.0	Particle size		
	90%	61.5 µm	Less than 75µm
SPECIFICATION REF NO: NPCD/QA/FP/SP/E017/amphar b.v./R2			
Remarks: The product conforms / Does-not-conform to the above specifications.			
PREPARED BY <i>Rand</i>		CHECKED BY <i>CF</i>	APPROVED BY <i>Waddy</i>
Name: <i>Vicarius-Rand</i>		Name: <i>T. Brückner</i>	Name: <i>M. W. Reddy</i>
Date: <i>29.10.11</i>		Date: <i>29.10.11</i>	Date: <i>29.10.11</i>

Chemical Division

28.11.2011

55