

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİLM KAPLI FİNASTERİD TABLETLERİ'NDE
SAFSIZLIK METODUNUN ANALİTİK VALİDASYONU

SERAP SAKARYA
(Kimyager)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMANLAR
Yrd. Doç. Dr. Hülya DEMİR
Yrd. Doç. Dr. Ayşen CÜCÜ

İSTANBUL 2005

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİLM KAPLI FİNASTERİD TABLETLERİ'NDE
SAFSIZLIK METODUNUN ANALİTİK VALİDASYONU**

**SERAP SAKARYA
(Kimyager)
141100120020005**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMANLAR
Yrd. Doç. Dr. Hülya DEMİR
Yrd. Doç. Dr. Ayşen CÜCÜ**

İSTANBUL 2005

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL VE ONAY BELGESİ

TEZ ADI

.....*Sarap SAKARYA*.....'in *Film Kaplı Finasterid Tabletleri'nde* *Safsızlık Metadolan Analitik Uzaklaşması*..... isimli Lisansüstü tez çalışması,
M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun *07.10.2005*... tarih ve *2005.21-21*... sayılı kararı
ile oluşturulan jüri tarafından *KİMYA*..... Anabilim Dalı *ANALİTİK KİMYA*.....
Programında YÜKSEK LİSANS/DOKTORA Tezi-olarak Kabul edilmiştir.

Danışman : (Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite) *Yrd.Doç.Dr. Hülya Demir (M.Ü.)*.....
Üye : (Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite) *Prof. Dr. Adnan AYDIN (M.Ü.)*.....
Üye : (Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite) *Yrd.Doç.Dr. Bahattin Yalçın (M.Ü.)*.....
Üye : (Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)
Üye : (Ünvanı, Adı Soyadı)(Üniversite)
Tezin Savunulduğu Tarih : *07.10.2005*.....

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı
ile *Sarap SAKARYA*.....'in *KİMYA*..... Anabilim Dalı
ANALİTİK KİMYA..... Programında Y.Lisans (MSc.) / -Doktora (Dr., PhD-) derecesi alması
onanmıştır.

Marmara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Adnan AYDIN

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında bana yol gösteren, yardım ve desteklerini esirgemeyen özverili danışmanlarım Yrd. Doç. Dr. Hülya Demir, Yrd. Doç. Dr. Ayşen Cücü'ye, Biofarma İlaç Sanayi Genel Koordinatör'ü Sayın Kim. Müh. Hatice Öncel'e, her zaman her konuda maddi-manevi destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Serap SAKARYA

Ekim 2005

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	vi
SUMMARY.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.FİNASTERİD.....	2
2.1.1. Farmakolojik özellikleri.....	2
2.1.2.Yapısal formülü.....	2
2.1.3.Kimyasal adı.....	3
2.1.4.Moleküler formülü.....	3
2.1.5.Moleküler ağırlığı.....	3
2.1.6.Erime noktası.....	3
2.1.7.Tanımı.....	3
2.1.8. Çözünürlük.....	3
2.1.9. Diğer özellikleri.....	3

2.2. AVRUPA FARMAKOPESİ'NDE YER ALAN FİNASTERİD'İN SAFSIZLIKLARINA AİT METOD KABUL KRİTERLERİ.....	3
2.3. SAFSIZLIĞIN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI.....	4
2.4.FİNASTERİD'İN SAFSIZLIKLARI HAKKINDA BİLGİLER.....	5
2.5.YÖNTEM DOĞRULAMASI (VALİDASYON) NEDİR VE KARAKTERİSTİK PARAMETRELERİ.....	7
2.5.1.Validasyon nedir?.....	7
2.5.2.Validasyonun yapılması gereken durumlar.....	7
2.5.3.Validasyonun tekrarlanmasını gerektiren durumlar.....	7
2.5.4.Validasyonun karakteristik parametreleri.....	7
2.5.4.1. Özgünlük (Specificity).....	8
2.5.4.2. Doğrusallık (Linearity).....	8
2.5.4.3. Konsantrasyon aralığı (Range).....	9
2.5.4.4. Doğruluk (Accuracy).....	9
2.5.4.5. Kesinlik(Precision).....	9
2.5.4.6. Dedeksiyon limiti.....	10
2.5.4.7. Kantitatif tayin limiti.....	11
2.5.4.8. Sağlamlık.....	11
2.5.4.9. Sistem uygunluk testi (System Suitability Testing).....	12
2.5.5. Validasyonun kabul kriterleri.....	12
2.6. ÇALIŞMADA UYGULANMIŞ OLAN HIZLANDIRILMIŞ BOZUNDURMA ÇALIŞMALARI.....	13
2.7. PİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN PARAMETRELER.....	14
2.7.1 Kapasite faktörü (k1).....	14
2.7.2.Teorik plaka Sayısı (N).....	14
2.7.3. Ayırma faktörü (α).....	15
2.7.4 Kuyruklanma faktörü (T).....	15
2.7.5. Ayırma gücü (R).....	15
2.7.6. Tutulma zamanı (Tr).....	15
2.8. KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.....	16
2.8.1. Standart sapma (SD).....	16
2.8.2. Bağlı standart sapma (RSD).....	16
2.8.3. Ortalamanın güven aralığı (μ)	16

2.8.4. Standart hata (STH).....	16
2.8.5.En küçük kareler yöntemi.....	17
2.8.6.Doğrunun eğimi.....	17
2.8.7.Doğrunun kesme noktası.....	17
2.8.8.Korelasyon katsayısı.....	17
2.8.9. Dedeksiyon limiti.....	17
2.8.10.Kantitatif tayin limiti.....	18
2.8.11.İki ortalamanın karşılaştırılması.....	18
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1.KİMYASAL MADDELER.....	19
3.2.GEREÇLER.....	19
3.3. SAFSIZLIK TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	20
3.3.1.Hareketli faz.....	20
3.3.2. Seyreltme çözeltisi.....	20
3.3.3.Tablet analizlerinde kullanılan çözeltiler.....	20
3.3.3.1. Test çözeltisi.....	20
3.3.3.2. Referans çözeltisi (a)	20
3.3.3.3. Referans çözeltisi (b).....	20
3.3.4. Validasyonda kullanılan çözeltiler.....	21
3.3.4.1. Seçicilik için hazırlanan çözeltiler.....	21
3.3.4.2.Doğrusallık için hazırlanan stok ve seyreltme çözeltileri...21	
3.3.4.3. Doğruluk çözeltileri.....	23
3.3.4.4.Kesinlik çözeltileri (tekrar elde edebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik).....	23
3.3.4.5. Sağlık analizinde hazırlanan çözeltiler ve uygulanan değişiklikler.....	24
3.3.5. Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	24
3.4. AVRUPA FARMAKOPESİ HAMMADDE FİNASTERİD İÇİN SAFSIZLIK TAYİNİ KROMATOĞRAFİK KOŞULLARI.....	25
4. BULGULAR.....	26

4.1.AVRUPA FARMAKOPESİ'NDE BELİRTİLEN METODUN İŞLENEBİLİRLİĞİNİN SAPTANMASI VE DAD DEDEKTÖR İLE UYGUN DALGA BOYU TARAMASI.....	26
4.2.VALİDASYON.....	28
4.2.1.Safsızlık Metodunun Validasyonu.....	28
4.2.1.1.Seçicilik.....	28
4.2.1.2.Doğrusallık.....	28
4.2.1.3.Doğruluk.....	31
4.2.1.4.Kesinlik.....	33
4.2.1.5. Dedeksiyon ve kantitatif tayin limiti.....	37
4.2.1.6.Sağlamlık.....	37
4.2.1.7. Sistem uygunluk testleri.....	38
4.2.1.8. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları.....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR.....	44

ÖZET

Bu çalışmada finasterid etken maddesinin safsızlıkları için Avrupa Farmakopesi referans alınıp hammadde finasterid için belirtilen safsızlık metodunun film kaplı tabletlerde uygunluğunun araştırılması ve analitik metod validasyonu yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmada hareketli faz olarak H₂O/ACN/THF (80:10:10 h/h), $\lambda=210$ nm UV dedektör kullanılmıştır. Bu kromatografik şartlarda metotta verilen finasterid'in yapısına uygun, etken madde ile etkileşime girmeyen, metal safsızlıkları bulunmayan Nova-Pak C18 60 A°, 4 μ m, 4,6 × 250 mm özellikte kolon seçilmiştir.

Safsızlık metodunda safsızlık A için geri kazanım % 95 güven düzeyinde 100.18 ± 1.97, safsızlık B için 101.35 ± 1.55, safsızlık C için 102.89 ± 1.00 olarak saptanmıştır. Tüm safsızlıklar için 0.0015- 0.0045 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık bulunmuştur.

Gün içinde tekrarlanabilirlik testinde safsızlık A, safsızlık B, safsızlık C pik alanı değerlerinin bağıl standart sapması sırasıyla, 1.03, 0.54, 0.29 olarak tespit edilmiştir.

Safsızlık metodu sonuçları farklı analist ve farklı cihaz kullanılarak tekrar edildiğinde % 99 güven düzeyinde sonuçların birbirinden farklı olmadığı bulunmuştur. Sağlamlık testinde metodun yapılan değişimlerden anlamlı bir şekilde etkilenmediği gözlenmiştir. Sistem uygunluk testleri sonucunda safsızlık B ve safsızlık C pikleri arasında rezolüsyon 5.420 safsızlık A ve finasterid arasında rezolüsyon 2.456 bulunmuştur.

Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları ile finasterid'nin, ısı, ışık ve okside edici maddelerden korunması gerektiği saptanmıştır. Böylece metodun finasterid'in safsızlıkları için seçici olduğu saptanmıştır.

Ekim 2005

Serap SAKARYA

SUMMARY

Finasterid Impurity Method Validation

In the present work, the aim is search appropriateness of impurities, which taken reference from European Pharmacopoeia, for film coated tablets and do method validation.

Mobile phase was H₂O/ACN/THF (80:10:10 v/v), the detector was UV at $\lambda=210$ nm.

At this chromatographic condition, stationary phase experiments were done. Finally Nova Pak C18 properties column was selected because of its suitable structure with finasterid. There was no interaction between column and active substance and there had no metal impurities in this column.

In impurity method, recovery was 100.18 ± 1.97 for impurity A, 101.35 ± 1.55 for impurity B, 102.89 ± 1.00 for impurity C with 95% confidence limits. Linearity was obtained in the concentration range of 0.0015- 0.0045 mg/mL for all impurities, repeatability was calculated from the relative standard deviation of peak area values of impurity A was 1.03, impurity B was 0.54, impurity C was 0.29.

Impurity method was repeated by different analyst and different instrument tests and results were not different from each other at 99 % confidence level. In robustness test it was observed that, the method was not influenced from variations. For system suitability the resolution between impurty B and impurty C 5.420, the resolution between impurty A and finasterid 2.456.

In accelerated analysis on finasterid decomposition rate increased by the effect of extensive heat light and the presence of oxygen. The results suggest that finasterid must be kept in absence of light, oxygen and ambient temperature. So it observed that this was selective method for finasterid's impurities.

KISALTMALAR VE SİMGELER

ACN	: Asetonitril
BPH	: Benign Prostatic Hyperplazis
DAD	: Diod Array Dedektör
DHT	: Dihidrotestosterona
EP	: European Pharmacopea (Avrupa Farmakopesi)
FDA	: Food and Drug Administration
GMP	: Good Manufacturing Practices
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performans Likit Kromatografisi)
ICH	: International Committee of Harmonization
k'	: Kapasite Faktörü
LOD	: Limit of Detection (Tayin alt sınırı)
LOQ	: Limit of Quantification (Kantitatif alt sınır)
MeOH	: Metanol
N	: Teorik Plaka Sayısı
N	: Normalite
R	: Rezolüsyon
r²	: Korelasyon katsayısının karesi
RSD	: Relative Standart Deviation
T	: Tailing (Kuyruklanma)
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1: DAD Dedektör ile uygun dalga boyu taraması.....	26
Şekil 2: Nova-Pak C18 60 °A, 4µm, 250 x 4,6 mm kolon ile safsızlık metodu denemesi.....	27

TABLolar LİSTESİ

	SAYFA NO
Tablo 1: Safsızlıkların sınıflandırılması.....	4
Tablo 2: Nova PAK C18 250 x 4,6 mm(4µm) kolon ile finasterid ve safsızlıklarına ait k', T, N ve R değerleri.....	27
Tablo 3: Seçicilik analizi sonucunda bulunan RT ve R değerleri.....	28
Tablo 4: Safsızlık A 'ya ait doğrusallık sonuçları.....	29
Tablo 5: Safsızlık B 'ye ait doğrusallık sonuçları.....	29
Tablo 6: Safsızlık C 'ya ait doğrusallık sonuçları.....	29
Tablo 7: Safsızlık A'ya ait doğruluk sonuçları.....	32
Tablo 8: Safsızlık B'ye ait doğruluk sonuçları.....	32
Tablo 9: Safsızlık C'ye ait doğruluk sonuçları.....	32
Tablo 10: Safsızlık A'ya ait tekrar elde edebilirlik sonuçları.....	33
Tablo 11: Safsızlık B'ye ait tekrar elde edebilirlik sonuçları.....	33
Tablo 12: Safsızlık C'ye ait tekrar elde edebilirlik sonuçları.....	34
Tablo 13: Safsızlık A'ya ait tekrarlanabilirlik sonuçları.....	34
Tablo 14: Safsızlık B'ye ait tekrarlanabilirlik sonuçları.....	35
Tablo 15: Safsızlık C'ye ait tekrarlanabilirlik sonuçları.....	35
Tablo 16: Safsızlık A'ya ait ara kesinlik sonuçları	36
Tablo 17: Safsızlık B'ye ait ara kesinlik sonuçları	36
Tablo 18: Safsızlık C'ye ait ara kesinlik sonuçları.....	37
Tablo 19: Safsızlık metodu sağlamlık analizinde sıcaklık değişimi sonucunda elde edilen k', T ve N değerleri.....	38
Tablo 20: Safsızlık metodu sağlamlık analizinde kolon değişimi sonucunda elde edilen k', T ve N değerleri.....	38
Tablo 21: 10.0 N NaOH ile yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları.....	38
Tablo 22: 0.1 N NaOH ile yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları.....	39

Tablo 23: MeOH hidroklorür ile yapılan hızlandırılmış bozundurma	
çalışması sonuçları.....	39
Tablo 24: Görünür ışık altında bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma	
çalışması sonuçları.....	39
Tablo 25: Ultraviyole ışık altında bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma	
çalışması sonuçları.....	40
Tablo 26: 60 °C sıcakta bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma	
çalışması sonuçları.....	40

GRAFİKLER LİSTESİ

	SAYFA NO
Grafik 1: Safsızlık A doğrusallık grafiği.....	30
Grafik 2: Safsızlık B doğrusallık grafiği.....	31
Grafik 3: Safsızlık C doğrusallık grafiği.....	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmada Avrupa Farmakopesinde hammadde finasterid için belirtilmiş olan safsızlık tayini metodunun film kaplı tabletler için işlenebilirliği üzerinde çalışılmış ve metodun analitik yöntem doğrulaması (validasyonu) yapılması amaçlanmıştır.

İlaç etken maddesi olan finasterid'in üç safsızlığı vardır. Safsızlık A:N-(1,1-dimetiletıl) -3- oxo -4- aza - 5 α - androstane -17 β - karboksamid (dihidrofinasterid), Safsızlık B:metil 3 - oxo - 4-aza-5 α -androst - 1 - ene-17 β - karboksilat (Δ -1-aza-ester), Safsızlık C:N-(1,1-dimetiletıl) 3-oxo - 4 azaandrost - 1,5 - diene - 17 β - karboxamid (Δ - 1 - aza - amid).

Finasterid etken maddesi, selim prostat hiperplazisi (benign prostatic hyperplazis, BPH) tedavi ve kontrolünde, genişlemiş prostat bezinin küçültülmesi, buna bağılı olarak idrar akımında rahatlama ve BPH semptomlarının hafifletilmesi amacıyla kullanılır. Tedaviye başlamadan önce prostat hiperplazisini taklit edebilen enfeksiyon, prostat kanseri, uretral striktür, hipotonik mesane hastalıkları elimine edilmelidir.

HPLC yöntemi ve ultraviyole (UV) dedektör kullanılarak safsızlık ürünleri seçici bir şekilde ayrıldı ve kantitatif açıdan uygun pik parametreleriyle safsızlık tayini yapıldı. Ayrıca Diod dizi dedektör (DAD) ile dalga boyu taraması yapılıp uygun dalga boyu tespiti yapılmıştır.

Safsızlık metodu validasyonu yapılarak finasterid içeren farmasötik preparata uygulanacağı için ilaç sanayisine katkısı olacaktır.

Günümüzde ilaç endüstrisinde GMP kuralları, analitik yöntem validasyonunu araştırma-geliştirme ve kalite kontrol laboratuvarlarında gerekli kılmaktadır. Bu kuralları düzenleyen kurumlar ICH (International Conference on Harmonization), FDA (U.S. Food and Drug Administration) ve farmakopelerdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FİNASTERİD

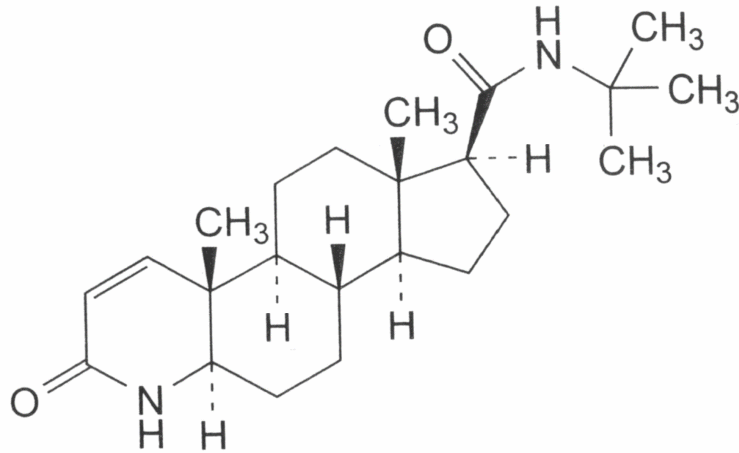
2.1.1. Farmakolojik Özellikleri

Finasterid, sentetik bir 4-azasteroid bileşiği olup, yeni bir sınıf olan spesifik 5 alfa redüktaz inhibitörlerinin ilk üyesidir (23).

5 α - redüktaz, testesteronu daha güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona (DHT) metabolize eden hücre içi bir enzimdir (21). DHT BPH' ın gelişiminde birinci sorumlu androjen olarak bilinir (24).

Finasterid BPH'ın ve kelliğin tedavisinde oral olarak etkilidir. 5 mg'lık tek bir doz hızlı bir cevap verir (25).

2.1.2. Yapısal Formülü

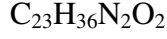


Formül 1: Finasterid bileşiği

2.1.3. Kimyasal Adı

N-(1,1-Dimetiletıl)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -karboxamid

2.1.4. Moleküler Formülü



2.1.5. Moleküler Ağırlığı

372,6 g/mol

2.1.6. Erime Noktası

252-254 °C (14)

2.1.7. Tanımı

Beyaz, beyazımsı renkte kristal tozdu.

2.1.8. Çözünürlük

Metilen klorid, metanol, n-propanol de iyi çözünür. 0.1 N HCl, 0.1 NaOH de çok az çözünür.

2.1.9. Diğer Özellikleri

Nem ve ışıktan koruyarak saklanmalıdır (22).

2.2. AVRUPA FARMAKOPESİ'NDE YER ALAN FİNASTERİD'İN SAFSIZLIKLARINA AİT METOD KABUL KRİTERLERİ

Safsızlık Limitleri:

Safsızlık A, Safsızlık B ve Safsızlık C için pik alanları, 3.3.3.2' de belirtilen referans çözelti (b)'den elde edilen pik alanının % 0,3' ünden fazla olmamalı.

Diğer safsızlıklar için pik alanları referans çözelti (c)'den elde edilen finasterid pik alanının %0,1'inden fazla olmamalı.

Toplam safsızlık için, elde edilen pik alanları referans çözelti (c)' den elde edilen ana pik alanının % 0,6' sından fazla olmamalıdır.

İhmal edilecek limitler referans çözelti (c)' den elde edilen finasterid pik alanının 0.25 katı olan alan değerleridir.

2.3. SAFSIZLIĞIN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI

Safsızlık (impürite):

Yeni ilaç hammaddesi gibi kimyasal olarak bağımsız bir şekilde belirtilemeyen, yeni ilacın herhangi bir bileşenine verilen isimdir (26).

Safsızlıkların sınıflandırılması

Tablo 1: Safsızlıkların Sınıflandırılması

Safsızlıkların tipi	Örnek	Tipik kaynak
Organik	Başlangıç maddeleri; üründen meydana gelen, ara ürün* olarak oluşan, degradasyon ile meydana gelenler, reaktifler, ligandlar.	Kimyasal üretim; degrede olan bileşikler aktif farmasötik üründen meydana gelir.
İnorganik	Reaktifler**, ligandlar***, katalizörler, kalıcı metaller, inorganik tuzlar, filtre kalıntıları	Kimyasal üretim; üretim ekipmanları, üretime yardımcı maddeler (filtreler)
Çözücü	Reaksiyon çözücüleri; apirolitik izole çözücüler, kromatografik çözücüler	Kimyasal reaksiyon; kristallendirme, çöktürme, ekstraksiyon veya ayırma, kromatografik saflaştırma

* Ara ürün olarak meydana gelen safsızlıklar: Yeni ilaç etken maddesinin sentezi esnasında, yeni ilaçtan önce meydana gelen maddelerdir (17).

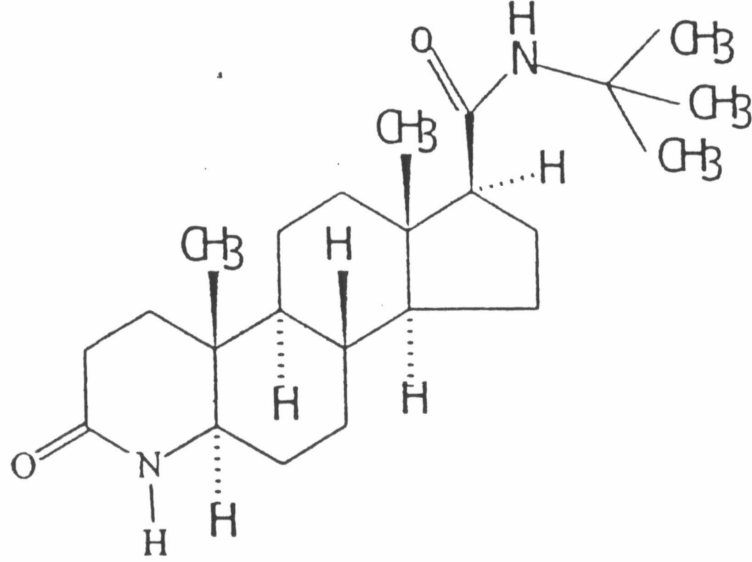
** Reaktifler: Başlangıç maddesi, ara ürün veya yeni ilaç molekülü üretiminde kullanılan çözücüler (17).

*** Ligandlar: Metal iyonlarına yüksek eğilimi olan ajanlardır (17).

2.4. FİNASTERİD'İN SAFSIZLIKLARI HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Safsızlık A

Yapısı:



Formül 2: Safsızlık A Bileşiği

Kimyasal adı:

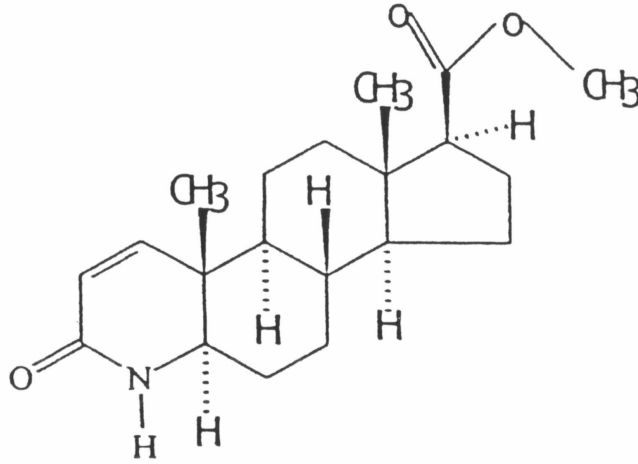
N - (1, 1 - dimetiletil) - 3 - oxo - 4 - aza - 5 α - androstane - 17 β - carboxamide
(dihidrofinasterid)

Finasterid bileşiğinin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılır* .

* Bileşik üretici firmanın kendi üretiminden meydana gelen safsızlık olup bu veri Biofarma İlaç Sanayi Hammadde Analiz Raporundan alınmıştır.

Safsızlık B

Yapısı



Formül 3: Safsızlık B Bileşiği

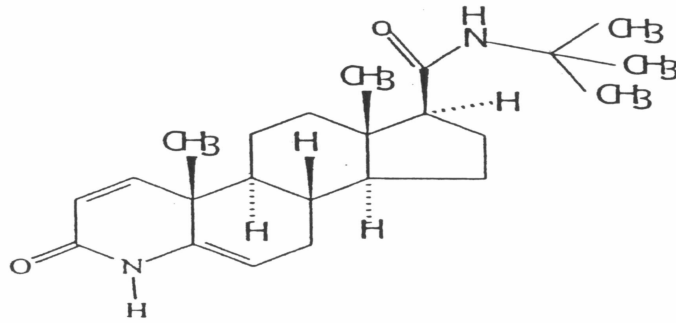
Kimyasal adı:

Metil 3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -karbosilat(Δ -1-aza- ester)

Sentezde meydana gelmiştir*.

Safsızlık C

Yapısı:



Formül 4: Safsızlık C Bileşiği

Kimyasal adı:

N-(1,1-dimetiletıl)3-oxo-4 azaandrost-1,5-diene-17 β -carboxamide (Δ -1-aza- amid).

Sentez esnasında oluşan yan üründür*.

* Bileşik üretici firmanın kendi üretiminden meydana gelen safsızlık olup bu veri Biofarma İlaç Sanayi Hammadde Analiz Raporundan alınmıştır.

** Bileşik üretici firmanın kendi üretiminden meydana gelen safsızlık olup bu veri Biofarma İlaç Sanayi Hammadde Analiz Raporundan alınmıştır.

2.5. YÖNTEM DOĞRULAMASI (VALIDASYON) NEDİR VE KARAKTERİSTİK PARAMETRELERİ

2.5.1. Validasyon Nedir?

Verilen metot için gerekli olan test ve kabul kriterlerinin seçilmesi ile gerçekleştirilen, metodun doğruluk ve kesinliğinin laboratuvar çalışmaları ile ispatlanması işlemidir (3,20).

Düşünülen kabul kriterleri metodun kriterleri metodun kullanımına göre (miktar tayini analizi, safsızlık analizi) değiştirilebilir. Validasyonda amaç metodu daha iyi ya da yeterli hale getirmek değil, metodun yeterli ve güvenilir olduğunu tespit etmektir. Bunun için validasyonda gerekli olan en önemli iki kriter doğruluk ve hassasiyettir.

ICH tarafından farmasötiklerle ilgili olan her metodun valide edilmesi tavsiye edilir.

2.5.2. Validasyonun Yapılması Gereken Durumlar

Safsızlıkların miktar tayini

Safsızlıkların limit testleri

Bitmiş üründe etken maddenin (ya da seçilen başka bir maddenin) kantitatif analizi

2.5.3. Validasyonun Tekrarlanmasını Gerektiren Durumlar

Etken maddenin sentez metodunda, bitmiş ürünün içeriğinde ve analitik metotta yapılan değişiklik sonucunda validasyon parametreleri tekrar edilir (6).

2.5.4. Validasyonun Karakteristik Parametreleri

1. Özgünlük (Specificity)
2. Doğrusallık (Linearity)
3. Konsantrasyon aralığı (Range)
4. Doğruluk (Accuracy)
5. Kesinlik (Precision)

- a) Gün içinde tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - b) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (Intermediate Precision)
 - c) Tekrar elde edebilirlik (Reproducibility)
6. Dedeksiyon limiti (Detection Limit-LOD)
 7. Kantitatif tayin limiti (Quantitation Limit-LOQ)
 8. Sağlamlık (Robustness)
 9. Sistem uygunluk testi (System Suitability Testing)

2.5.4.1. Özgünlük (Specificity)

Validasyonun en önemli parametresidir, metod geliştirilirken ilk yapılması gereken testir. İki şekilde gerçekleştirilir:

- a) Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin standartları mevcutsa, geliştirilen yöntemde bu maddelerin etken maddeden uygun bir ayrılma gücü değerleriyle ayrıldığı ispatlanmalıdır.
- b) Girişim yapan maddelerin standartları sağlanamıyorsa; ısı, ışık, nem, asit, baz, oksidasyon gibi stres şartlarına maruz bırakılıp sonuçlar referans maddeyle karşılaştırılır.

2.5.4.2. Doğrusallık (Linearity)

Bu test, standart stok çözeltisinin seyreltilmesiyle ve/veya ayrı tartımlar alınarak gerçekleştirilir. Dedektör cevabına karşılık konsantrasyon grafiği çizilir(kalibrasyon eğrisi). Eğrinin doğrusallığı en küçük kareler yöntemiyle değerlendirilir. Doğrunun eğimi, kayım değeri, korelasyon katsayısı doğrusallığı belirler.

Belirlenen konsantrasyon aralığında hazırlanan numunelerin içindeki etken madde miktarının konsantrasyon ile orantılı olarak artması ile edilir (5).

Doğrusallık parametresinin incelenebilmesi için en az 5 konsantrasyonda çalışmak gerekir (10). Doğrusallık en küçük kareler yöntemine göre oluşturulan doğrunun regresyon katsayısı ile değerlendirilir (7). (Regresyon katsayısının değeri) $r^2 \geq 0.98$ olmalıdır.

2.5.4.3. Konsantrasyon Aralığı (Range)

Metodun doğruluk, kesinlik, doğrusallık, testlerini geçtiği konsantrasyon aralığıdır ve doğrusallık çalışmalarından metodun sınırları belirlenir. İncelenen konsantrasyon aralığı metodun kullanımına göre değişir. Etken madde ya da bitmiş üründe metod validasyonunda %80 - %120 konsantrasyon aralığı olarak kabul edilir (10). Etken madde ve safsızlık tayini tek bir metod ile yalnızca % 100 standart kullanılarak yapılıyor ise konsantrasyon aralığı safsızlığın dedekte edildiği en küçük değer ile % 120 konsantrasyon arası olarak kabul edilir (7).

2.5.4.4. Doğruluk (Accuracy)

Bir yöntemin doğruluğu, ölçülen miktarın gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Analitik prosedürün belirlenen konsantrasyon aralığı üstünden yapılır (5). Doğruluğun tayin edilebilmesi için en az 3 farklı konsantrasyonda 3 enjeksiyon tekrarı ile elde edilen 9 data verisine ihtiyaç duyulur (10). Analizin yapılabilmesi için tavsiye edilen konsantrasyon değerleri %80, %100 ve % 120'dir (3).

2.5.4.5. Kesinlik(Precision)

Kesinlik aynı koşullar altında, aynı homojenlikte hazırlanmış olan birden fazla örnekten elde edilen ölçüm değerlerinin birbirine yakınlığını ifade eder. Üç bölümden oluşur (5). Bunlar;

a) Gün içi tekrarlanabilirlik (Repeatability):

Tekrarlanabilirlik zamanın çok kısa bir müddetinde aynı işlem şartları aynı gün, aynı analist ve aynı cihaz altındaki kesinliği ifade eder (5).

Tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi için analitik prosedürde belirlenen konsantrasyon aralığında en az 3 farklı konsantrasyonda 3 enjeksiyon tekrarı ile elde edilen 9 data verisine ya da % 100'lük test konsantrasyonundan elde edilen 6 enjeksiyon verisine ihtiyaç duyulur.

b) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (Intermediate Precision):

Farklı laboratuvarlarda yöntemin uygulanmasıdır.

Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır. Çevre koşullarında oluşan değişikliklerin analitik prosedürü nasıl

etkilediğini tayin eder. Tüm bu değişiklikler ayrı değil, aynı zamanda yapılarak değişimler tayin edilir (5,10).

c) Tekrar elde edebilirlik (Reproducibility):

Çalışmalar arasındaki kesinliği belirlemek için yapılır. Aynı anda yapılan işlemler esnasında metodu standardize etmek için başvurulan bir metottur (5). Standart sapma, bağıl standart sapma, güven aralığı her kesinlik parametresi için hesaplanmalıdır (10). Elde edilen RSD değerleri % 2,0' den küçük olmalıdır.

2.5.4.6. Dedeksiyon Limiti (Detection Limit – LOD)

Etken madde ya da safsızlığın dedekte edebileceği en düşük konsantrasyon değeridir.(5)

Dedeksiyon limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümental olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümental olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon aralığı bulunur.
- b) Sinyal / Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3:1 olmalıdır.
- c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel yöntem: Dedeksiyon limiti bu metotta şu şekilde ifade edilir:
$$DL=3.3\delta / S$$

δ: elde edilen cevapların standart sapması
S: kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

Dedeksiyon limiti bu metotta şu şekilde ifade edilir. Sigmanın bulunabilmesi için iki yol vardır; bunlardan ilki blank örneklerinin cevapları arasındaki bağıl standart sapma hesabı ile sigmanın bulunması, ikincisi kalibrasyon eğrisinde

regresyon çizgisinin bağıl standart sapması ya da regresyon çizgisinin y ekseninin standart sapmasının sigma olarak kullanılabilirdiği metottur.

2.5.4.7. Kantitatif Tayin Limiti (Quantitation Limit- LOQ)

Uygun kesinlik ve doğrulukta etken maddenin kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük limittir. Safsızlıkların ya da degradasyon ürünlerinin tayininde kullanılır.

Kantitatif tayin limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümental olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:

a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümental olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve örneğin doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır.

b) Sinyal / Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisiyle elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.

c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

Dedeksiyon limiti bu metotta şu şekilde ifade edilir:

$$DL = 10 \delta / S$$

δ : elde edilen cevapların standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

Sigmanın bulunabilmesi için iki yol vardır; bunlardan ilki blank örneklerinin responsları arasındaki bağıl standart sapma hesabı ile sigmanın bulunması ikincisi kalibrasyon eğrisinde regresyon çizgisinin bağıl standart sapması ya da regresyon çizgisinin y ekseninin standart sapmasının sigma olarak kullanılabilirdiği metottur.

2.5.4.8. Sağlamlık (Robustness)

Yöntem parametreleri üzerinde kasıtlı olarak değişiklik yapıldığında, sonuçların ne kadar etkilendiğinin saptanması amacıyla yapılan testtir.

Sıvı kromatografi yönteminde aşağıdaki değişiklikler yapılabilir:

Hareketli fazın pH'sı
Hareketli faz bileşeni
Farklı kolon(farklı lot numaralı farklı firmadan)
Sıcaklık
Akış hızı

Bu testler, analiz edilecek örneğe, analitik uygulamaya, kullanılan cihaza bağlı olarak geliştirilen testlerdir. Ayrıntılı bilgiler farmakopelerden sağlanır. HPLC yönteminde USP 26'ya göre uygulanması gereken sistem uygunluk parametreleri kapasite faktörü(k'), kolon ayırma gücü (R), pik kuyruklanma faktörü (T), tekrarlanan enjeksiyonların bağıl standart sapmasıdır. k' 1-5 arasında(2), R>2 (20), T=1 (12), RSD≤ 2 (12) olmalıdır.

2.5.4.9. Sistem Uygunluk Testi (System Suitability Testing)

Bilinmeyenlerin analizi öncesinde sistemin performansını kontrol etme işlemidir. Teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü, ayırma gücü ve tekrarlanabilirlik (6 kez tekrarlanan enjeksiyonların bağıl standart sapması ile elde edilir) sistemin performansını ölçen kriterlerdir (15).

2.5.5. Validasyonun Kabul Kriterleri

Doğrusallık parametresi:

Regresyon katsayısının karesi(r^2) 0.98'den az olmamalıdır. Tercih edilen r^2 değeri 0.99' dur.

Metotta gerçek değerler ile bulunan değerler arasında farklar görülmeye başladığı zaman r^2 değeri 0.99'dan daha aşağı çekilebilir. Eğer eğri doğrusal çıkmaz ise elde edilen değerler doğrusal bir eğri oluşturacak şekilde konsantrasyon aralığını azaltmak gerekir(16). Doğrusallık parametresinin incelenebilmesi için en az 5 konsantrasyonda çalışmak gerekir (10).

Keskinlik parametresi:

Etken madde ve plasebo ile hazırlanan çözeltilerin geri kazanımları $\leq \pm \% 10$ ise çok iyi, $\pm \% 11$ - $\% 20$ yeterli, $\pm \% 21$ - $\% 30$ sınıra yakın ama kabul edilebilir, $\pm \% 30$ 'dan fazlası kabul edilemez olarak belirlenmiştir. Ayrıca geri kazanımlar arasındaki bağıl standart sapma $\% 2,0$ 'den büyük olmamalıdır (16).

Doğruluk parametresi:

Safsızlık tayini analizleri için %90 - % 110 sınırları içinde olmalıdır (16).

Seçicilik parametresi:

Etken madde ile yardımcı maddeler arasında bir etkileşim olmamalıdır (16).

Dedeksiyon limiti:

Üst limit baseline gürültü seviyesinin 3 katı, Sinyal/ Gürültü oranı 2 ya da 3:1 olmalıdır (16).

Kantitatif limit:

Dedeksiyon limitinin 3 katı, Sinyal/Gürültü oranı 10:1 olmalı (16).

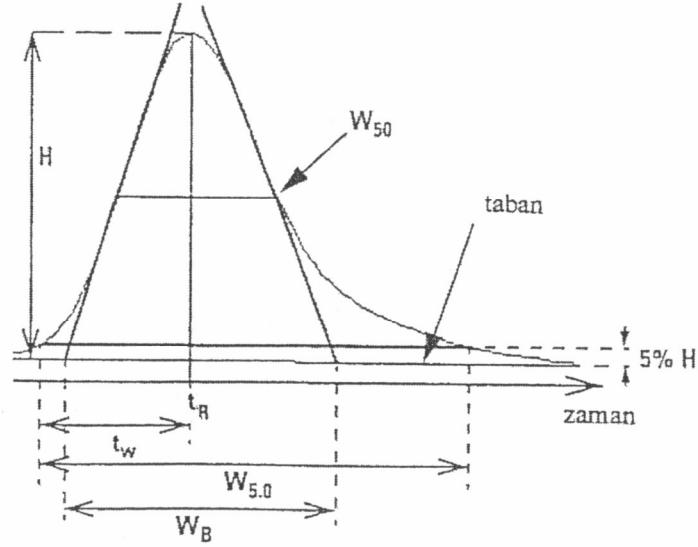
Sistem uygunluğu:

En az 5 enjeksiyon yapılarak bağıl standart sapma hesaplanır bu değer % 2'den küçük olmalıdır. Ayrıca sistem uygunluğu kromatogramından pikin kuyruklanma faktörü (2'den küçük olmalıdır) ve teorik plaka sayısı bulunabilir (16). Kuyruklanma faktörü 2 ya da daha küçük, teorik plaka sayısı 2000'den büyük, rezolüsyon ve kapasite faktörü 2'den büyük olmalıdır (15).

2.6. ÇALIŞMADA UYGULANMIŞ OLAN HIZLANDIRILMIŞ BOZUNDURMA ÇALIŞMALARI

Uygulanan analitik metot ile bilinmeyen safsızlıkları tespit etmek etken madde ya da bilinen safsızlıkları bozunmasını tespit edebilmek için hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılır (11).

2.7. PİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN PARAMETRELER (12)



2.7.1 Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü tutulma zamanının ölçüsü olarak ifade edilir (2). Kapasite faktörü 1–5 arasında olmalıdır (2).

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

k' : Kapasite faktörü

t₀ : Ölü zaman (dk)

t_R : Tutulma zamanı (dk)

2.7.2. Teorik Plaka Sayısı (N)

Teorik plaka sayısı kolon etkinliğinin ölçüsüdür. Akış süresi boyunca her birimden geçen pik sayısının ifade edilmesidir (3). Teorik plaka sayısının 2000'den büyük olması istenir.

$$N = 16 \cdot (t_R / t_w)^2$$

t_R : Etken maddenin tutulma zamanı (dk)

t_w : Pikin baseline üzerindeki iki kenarının arasındaki genişlik

2.7.3. Ayırma Faktörü (α)

Ayırma faktörü birbiri ile ilişkili iki pikin bağıl tutulmalarına denir (13).

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

k'_2 : Sonraki pikin kapasite faktörü

k'_1 : Önceki pikin kapasite faktörü

2.7.4 Kuyruklanma Faktörü (T)

Kuyruklanma faktörü kromatografik metotta pikin asimetrisini ölçmek için kullanılan değerdir (16). Kuyruklanma faktörü 2' den küçük olmalıdır.

$$T = W/2f$$

W: Pik yüksekliğinin karesinin % 5'i kadar olan pik genişliği

f: Pikin ön kenarından maksimum dikeyine olan uzaklığı

2.7.5. Ayırma Gücü (R)

Ayırma gücü iki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini tanımlayan parametredir.

$$R = (V_{R2} - V_{R1}) / [(w_1 + w_2) / 2]$$

V_{R2} : İkinci pikin tepe noktasından başlangıç noktasına olan uzaklık

V_{R1} : Birinci pikin tepe noktası başlangıç noktasına olan uzaklık

w_1 : Birinci pikin baseline üzerindeki genişliği

w_2 : İkinci pikin baseline üzerindeki genişliği

2.7.6. Tutulma Zamanı (t_R)

Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması arasında geçen süreye tutulma süresi denir ve t_R simgesiyle gösterilir (2).

$$t_R = V_R / F$$

V_R : Çözeltiyi elde etmek için kolondan geçen çözücü hacmi

F: Akış hızı

2.8. KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

2.8.1. Standart Sapma (SD)

Standart sapma analizle ilgili sistematik hatanın ölçüsüdür. Her bir değerin ortalamadan sapmasının karelerinin toplamının serbestlik derecesine bölümünün karekökü ile ifade edilir. Serbestlik derecesi sayısı, bir standart sapma hesaplamasında kullanılan bağımsız veri sayısını gösterir (18, 19).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

2.8.2. Bağıl Standart Sapma (RSD)

Bağıl standart sapma standart sapmanın numunelerin ortalamasına bölümü ile elde edilir (16).

$$RSD = \frac{100 \cdot SD}{\bar{x}}$$

2.8.3. Ortalamannın Güven Aralığı (μ)

Ortalamannın güven aralığı güven sınırının büyüklüğüdür (18, 19).

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t \cdot SD}{\sqrt{n}}$$

x : Numunelerin ortalaması

SD : Standart sapma

n : Veri sayısı

2.8.4. Standart Hata (STH)

Her bir ortalamannın standart sapması ortalamannın standart hatası olarak bilinir. Bir veri grubunun standart sapmasının gruptaki veri sayısının kareköküne bölümüdür (18).

$$STH = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

2.8.5. En Küçük Kareler Yöntemi

Bir grafikteki noktaların çizilen doğrudan olan düşey sapması olarak adlandırılır. En küçük kareler metodu ile elde edilen doğru, bütün noktalarının karelerinin toplamını en aza indiren bir doğrudur (18, 19).

2.8.6. Doğrunun Eğimi

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2]}$$

2.8.7. Doğrunun Kesme Noktası

$$\bar{a} = y - b \cdot \bar{x}$$

$y = a \cdot x + b$ denkleminde yukarıda hesaplanan a ve b değerleri yerine konularak doğru denklemi bulunur.

2.8.8. Korelasyon Katsayısı

Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki birleşimin ölçümünün derecesidir.

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2] \sum_i [(y_i - \bar{y})^2]}}$$

2.8.9. Dedeksiyon Limiti

Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapmasına ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntem:

Dedeksiyon limiti bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$LOD = 3.3 \sigma / S$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

2.8.10. Kantitatif Tayin Limiti

Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapmasına ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntem:

Kantitatif alt sınır bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$LOQ = 10 \sigma / S$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

2.8.11. İki Ortalamanın Karşılaştırılması

İki ortalamanın karşılaştırılması aynı analizin iki tahminin ortalamaları arasındaki bir farkın gerçek olup olmadığını ve numunelerin farklı olup olmadığını veya farklılığın rasgele hataların basit bir sonucu olup olmadığını anlaşılması için kullanılan bir metottür (18).

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

$$s^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KİMYASAL MADDELER

N-(1,1-Dimetiletil)-3-okso-4-aza-5 α -androst - 1 - ene - 17 - karboksiamide referans standartı, N-(1,1-dimetiletil)-3-okso-4-aza-5 α -androstane-17 β -karboksilat referans standartı, metil 3-okso-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -karboksilat referans standartı, N-(1,1-dimetiletil) - 3 - okso - 4 - azaandrosta - 1,5 - diene - 17 β -karboksiamid referans standartı Cipla Ltd&Biofarma İlaç San. A.Ş'den temin edilmiştir. Asetonitril (HPLC saflıkta) J.T Baker, Tetrahidrofuran(HPLC saflıkta) J.T Baker, distile su (HPLC saflıkta) ve Dilaprost 5 mg film tabletleri.

3.2. GEREÇLER

HPLC sisteminde Agilent 1100 model pompa, Agilent 1100 G1322A model gaz uzaklaştırıcı,G1329A ALS model autosampler enjeksiyon sistemi,100 μ l'lik loop, Nova Pak C18 60 A $^{\circ}$,4 μ ,250 \times 4,6 mm HPLC Cartridge Column özellikte kolon kullanılmıştır. Hareketli fazın süzülmesi için milipore Albet Schott Duran 0,2 μ m filtre, örneklerin süzülmesi için 0,45 μ m naylon filtreler kullanılmıştır.

Tartımlar için Mettler Toledo ax105 Delta Range tipi terazi, pH ölçümleri için Metrohm 654 pH metre ve elektrodu kullanılmıştır. pH metre kalibrasyonu için pH :4,00 ve pH: 7,00 tampon çözeltileri kullanılmıştır..

Isolab A tipi pipetler, Maxwell model ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında Labor magnetik karıştırıcı, tabletlerin süzülmesinde Scheicher&Schwell 125 mm beyaz bantlı süzgeç kâğıdı kullanılmıştır.

Sağlamlık testi farklı cihaz uygulamasında Shimadzu LC 2010 ile çalışıldı. Farklı kolon uygulamasında aynı firmanın aynı özellikte farklı lot numaralı kolonu kullanılmıştır.

Tüm analizler Biofarma İlaç Sanayi A.ř Araştırma Geliştirme Laboratuvarında yapılmıştır.

3.3. SAFSIZLIK TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Hareketli Faz

100.0 mL asetonitril, 800.0 mL su, 100.0 mL tetrahidrafuran karıştırıldı. Milliporede süzöldü ve ultrasonik banyoda degaze edildi.

3.3.2. Seyreltme özeltisi

1:1 oranında asetonitril ve su karışımı

3.3.3. Tablet Analizlerinde Kullanılan özeltiler

3.3.3.1. Test özeltisi

10.0 mg finasterid'e eşdeğer tablet tozu 10.0mL'lik balon jofeye tartıldı. Seyreltme özeltisiyle çözölerek hacmine tamamlandı.

3.3.3.2. Referans özeltisi (a)

10.0 mg finasterid çalışma standartı 10 mL'lik balon jofeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözölüp hacmine tamamlandı.

3.3.3.3. Referans özeltisi (b)

2.0 mL test çözeltisi 100.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. Bu özeltiden 1.0 mL alınarak 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisiyle seyreltildi.

3.3.4. Validasyonda Kullanılan Çözeltiler

3.3.4.1. Seçicilik İçin Hazırlanan Çözeltiler

Plasebo çözeltisi:

298.0 mg plasebo tozu 10.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.

Referans çözeltisi (c) :

3.0 mg safsızlık A çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.(c= 0.03 mg/mL)

Referans çözeltisi (d) :

3.0 mg safsızlık B çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.(c= 0.03 mg/mL)

Referans çözeltisi (e) :

3.0 mg safsızlık C çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.(c= 0.03 mg/mL)

Karışım çözeltisi:

Referans c, referans d ve referans e'den 1.0'er mL alındı,10.0 mg finasterid çalışma standardı 10.0 mL'lik balon jöjeye ilave edildi. Seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı (c=0,003 mg/mL).

3.3.4.2.Doğrusallık İçin Hazırlanan Stok ve Seyreltme Çözeltileri

Stok çözelti (a):

5.0 mg safsızlık A çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.(c=0.05 mg/mL)

Stok çözelti (b):

5.0 mg safsızlık B çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jöjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözümlü hacmine tamamlandı.(c=0.05 mg/mL)

Stok çözelti (c) :

5.0 mg safsızlık C çalışma standartı 100.0 mL'lik balon jøjeye tartıldı, seyreltme çözeltisiyle çözölüp hacmine tamamlandı.(c=0.05 mg/mL)

% 50'lik seyreltme çözeltisi:

Stok çözelti a, stok çözelti b ve stok çözelti c'den 100.0 mL'lik balon jøjeye 3.0'er mL alındı, 50.0 mg finasterid çalışma standartı ve 1490.0 mg plasebo tozu ilave edildi. Seyreltme çözeltisi ile çözölüdü ve hacmine tamamlandı.(c=0,00150 mg/mL)

% 75'lik seyreltme çözeltisi:

Stok çözelti a, stok çözelti b ve stok çözelti c'den 100.0 mL'lik balon jøjeye 4.5'er ml alındı, 50.0 mg finasterid çalışma standartı ve 1490.0 mg plasebo tozu ilave edildi. Seyreltme çözeltisi ile çözölüdü ve hacmine tamamlandı.(c=0,00225 mg/mL)

%100'lik seyreltme çözeltisi:

Stok çözelti a, stok çözelti b ve stok çözelti c'den 100.0 mL'lik balon jøjeye 6'şar ml alındı, 50.0 mg finasterid çalışma standartı ve 1490.0 mg plasebo tozu ilave edildi. Seyreltme çözeltisi ile çözölüdü ve hacmine tamamlandı.(c=0,00300 mg/mL)

%125'lik seyreltme çözeltisi:

Stok çözelti a, stok çözelti b ve stok çözelti c'den 100.0 mL'lik balon jøjeye 7.5'er mL alındı, 50.0 mg finasterid çalışma standartı ve 1490.0 mg plasebo tozu ilave edildi. Seyreltme çözeltisi ile çözölüdü ve hacmine tamamlandı. (c=0.00375 mg/mL)

%150'lik seyreltme çözeltisi:

Stok çözelti a, stok çözelti b ve stok çözelti c'den 100.0 mL'lik balon jøjeye 9.0'er mL alındı, 50.0 mg finasterid çalışma standartı ve 1490.0 mg plasebo tozu ilave edildi. Seyreltme çözeltisi ile çözölüdü ve hacmine tamamlandı (c=0.0045 mg/mL).

Her bir çözeltiden 3'er adet numune hazırlanıp 3'er kez enjeksiyon yaptırılmıştır.

3.3.4.3. Doğruluk Çözeltileri

Stok çözelti:

3.0'er mg safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C 100.0 mL'lik balon jojeye alındı. 1490.0 mg plasebo tozu ilave edilerek seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlandı (c=0.03 mg/mL).

Referans çözelti:

1.0 mL stok çözelti 10.0 mL balon jojeye alındı hacmine seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlandı (c=0.003 mg/mL).

% 80 numune çözeltisi:

Stok çözeltden 0.8 ml 10.0 mL'lik balon jojeye alındı.1490.0 mg plasebo tozu ilave edilerek seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlandı.(c=0.0024 mg/mL)

% 100 numune çözeltisi:

Stok çözeltden 1.0 ml 10.0 mL'lik balon jojeye alındı.1490.0 mg plasebo tozu ilave edilerek seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlandı.(c=0.0030 mg/mL)

% 120 numune çözeltisi:

Stok çözeltden 1.2 ml 10.0 mL'lik balon jojeye alındı.1490.0 mg plasebo tozu ilave edilerek seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlandı (c=0.0036 mg/mL).

Her bir çözeltden 3'er adet numune hazırlanıp 3'er kez enjeksiyon yaptırılmıştır.

3.3.4.4. Kesinlik Çözeltileri (Tekrar Elde Edebilirlik, Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik)

Tekrar elde edebilirlik ve ara kesinlik için 3.3.4.3. bölümünde belirtildiği gibi 6 adet %100 konsantrasyonda numune çözeltisi ve 1 adet referans çözeltisi hazırlanıp 3'er kez enjeksiyon yaptırıldı. Tekrarlanabilirlik için 3.3.4.3. bölümünde belirtildiği gibi %100 konsantrasyonda 1 adet numune çözeltisi hazırlanarak 6 kez enjeksiyon yaptırıldı.

3.3.4.5. Sağlamlık Analizinde Hazırlanan Çözeltiler ve Uygulanan Değişiklikler

Aynı tür farklı batch numaralı kolon kullanımı

Bölüm 3.3.3. de belirtildiği şekilde hazırlanan numune ve referans çözeltisi aynı türden farklı batch numaralı kolonlar ile analize tabi tutulmuştur.

1.kolon batch no :W31691

2.kolon batch no :W32961

Kolon sıcaklığında yapılan değişiklik

Bölüm 3.3.3. de belirtildiği şekilde hazırlanan numune ve referans çözeltisi sistemin normal şartlarda 60 °C olan sıcaklığının ± 5 °C değiştirilmesi ile elde edilen 55 °C ve 65 °C'lik kolon sıcaklıklarında analize tabi tutulup meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

3.3.5. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

10.0 N NaOH ile hazırlanan numune çözeltisi:

10.0 mg finasterid'e eşdeğer tablet tozu 10.0 ml'lik balon jøjeye tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözüldü, 2.0 mL 10.0 N NaOH ilave edilerek hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 72 saat süre ile bekletilerek meydana gelen değişimler saptandı.

0.100 N NaOH ile hazırlanan numune çözeltisi:

10.0 mg finasterid'e eş değer tablet tozu 10.0 ml'lik balon jøjeye tartıldı. 0.1 N NaOH ile çözüldü ve hacmine 0.1 N NaOH ile tamamlandı. Bu çözelti 72 saat süre ile bekletilerek meydana gelen değişimler saptandı.

Metanolik hidroklorür ile hazırlanan numune çözeltisi:

10.0 mg finasterid'e eş değer tablet tozu 10.0 ml'lik balon jøjeye tartıldı. 1.0 N N hidroklorik asidin metanol ile seyreltilerek hazırlanmış olan 0.1 N'lik çözeltisi

ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözelti 72 saat süre ile bekletilerek meydana gelen değişimler saptandı.

Etkili görünür ışık altında bekletme:

Finasterid 5.0 mg film tabletler 24 saat boyunca etkili bir görünür ışık altında bekletildi. Bölüm 3.3.3. de belirtildiği şekilde hazırlanan numuneler analize tabi tutularak meydana gelen değişimler saptandı.

Ultraviyole ışık altında bekletme:

Finasterid 5.0 mg film tabletler 24 saat boyunca ultraviyole ışık altında bekletildi. Bölüm 3.3.3. de belirtildiği şekilde hazırlanan numuneler analize tabi tutularak meydana gelen değişimler saptandı.

60 °C'lik etüvde bekletme:

Finasterid 5 mg film tabletler 24 saat boyunca 60 °C'lik etüvde bekletildi. Bölüm 3.3.3. de belirtildiği şekilde hazırlanan numuneler analize tabi tutularak meydana gelen değişimler saptandı.

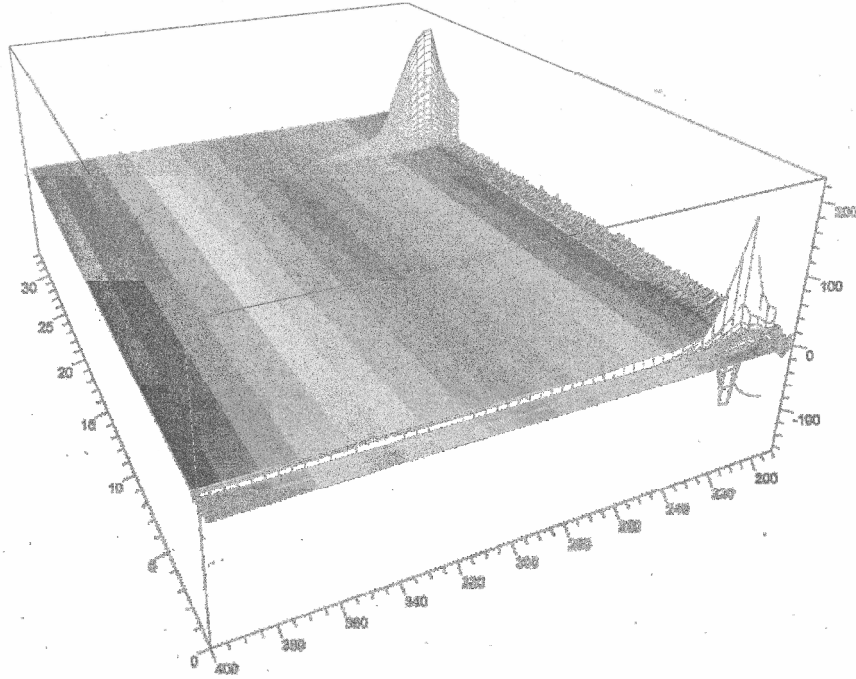
3.4. AVRUPA FARMAKOPESİ HAMMADDE FİNASTERİD İÇİN SAFSIZLIK TAYİNİ KROMATOĞRAFİK KOŞULLARI

Kolon	:End - capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R(5 µm) özellikte kolon (Nova-Pak C18 60 °A, 4µm, 250 x 4,6 mm)
Hareketli faz	:Su /ACN/ THF (80:10:10)
Dedektör	:210 nm, UV
Akış Hızı	: 1.5 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	:15 µL
Sıcaklık	:60 °C

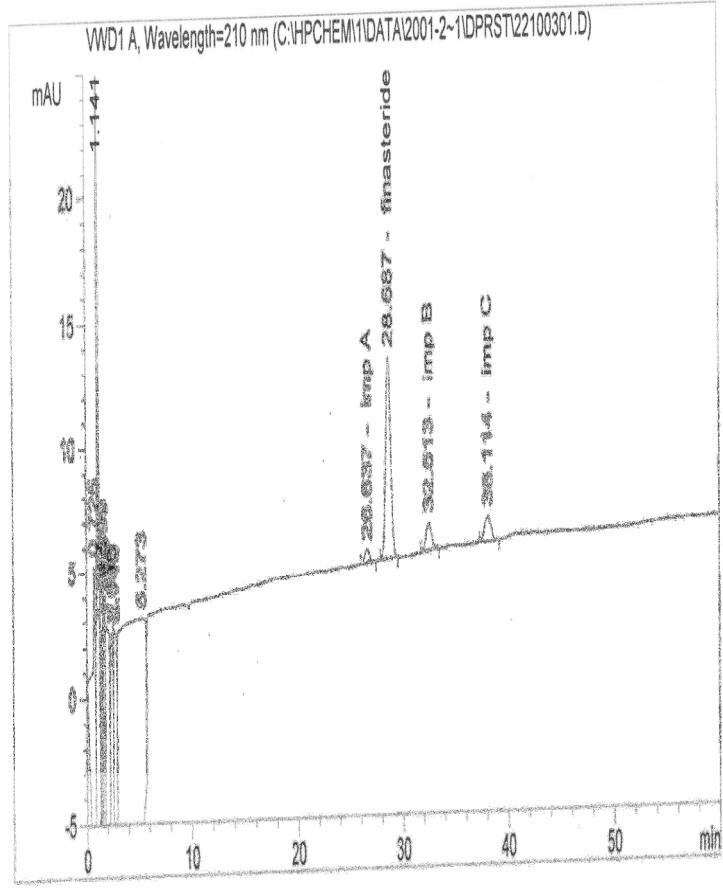
4. BULGULAR

4.1. AVRUPA FARMAKOPESİ'NDE BELİRTİLEN METODUN İŞLENEBİLİRLİĞİNİN SAPTANMASI VE DAD DEDEKTÖR İLE UYGUN DALGA BOYU TARAMASI

Metotta verilen özellikteki kolona eşdeğer kolon denenmiş ve pik parametrelerine uygun pik elde edilmiştir. Ayrıca DAD dedektör taraması ile uygun dalga boyu taraması yapılarak dalga boyu uygunluğu kanıtlanmıştır. Farmakopede belirtilen akış hızı, zamandan kazanmak amacıyla değiştirilip 2 mL/dk ile çalışılmıştır.



Şekil 1: DAD Dedektör ile uygun dalga boyu taraması



Şekil 2: Nova-Pak C18 60 °A, 4µm, 250 x 4,6 mm kolon ile safsızlık metodu denemesi.

Tablo 2: Nova- Pak C18 250 x 4,6 mm(4µm) kolon ile finasterid ve safsızlıklarına ait k', T, N ve R değerleri

	Kapasite faktörü (k')	Kuyruklanma (T)	Teorik plaka sayısı (N)	Rezolüsyon (R)
Safsızlık A	35.755	1.367	17376	12.994
Safsızlık B	43.863	1.341	17856	4.173
Safsızlık C	51.592	1.342	17889	5.423
Finasterid	38.583	1.02	17894	2.456

4.2. VALİDASYON

4.2.1. Safsızlık Metodunun Validasyonu

4.2.1.1. Seçicilik

3.3.4.1.'de belirtildiği gibi plasebo, safsızlık çözeltileri ve karışım çözeltisi hazırlanıp enjeksiyon yaptırılmıştır. Plasebo çözeltisinin uygulanan kromatografik şartlarda pik vermediği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 3: Seçicilik analizi sonucunda bulunan t_R ve R değerleri

Hazırlanan çözelti	İçerdiği madde	Tutulma süresi (t_R)	Rezölüsyon (R)
Referans a çözeltisi	Finasterid	28.687	2.456
Referans c çözeltisi	Safsızlık A	26.637	12.994
Referans d çözeltisi	Safsızlık B	32.513	4.173
Referans e çözeltisi	Safsızlık C	38.114	5.423

4.2.1.2. Doğrusallık

3.3.4.2.' de belirtildiği gibi hazırlanan %50, %75, %100, %125 ve %150'lik seyreltme çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen safsızlık A, safsızlık B ve Safsızlık C 'ye ait veriler Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6'da belirtildiği gibidir.

Tablo 4: Safsızlık A 'ya ait doğrusallık sonuçları

	%50	%75	%100	%125	%150
	0.00150 mg/mL	0.00225 mg/mL	0.00300mg/mL	0.00375mg/mL	0.00450mg/mL
Nu1	12.60	20.19	26.10	26.32	31.43
Nu2	10.42	18.36	21.79	26.34	31.61
Nu3	10.54	18.27	20.84	27.65	32.33
Ort.	11.19	18.94	22.91	26.77	31.79
SD	1.23	1.08	2.80	0.76	0.48
RSD	10.96	5.72	12.24	2.85	1.50

Tablo 5: Safsızlık B 'ye ait doğrusallık sonuçları

	%50	%75	%100	%125	%150
	0.00150 mg/mL	0.00225 mg/mL	0.00300mg/mL	0.00375mg/mL	0.00450 mg/mL
Nu1	32.55	44.59	60.83	74.25	88.60
Nu2	33.09	38.55	60.93	73.87	88.96
Nu3	27.55	47.64	60.14	76.54	89.39
Ort.	31.07	43.60	60.63	74.89	88.98
SD	3.06	4.62	0.43	1.44	0.40
RSD	9.83	10.61	0.71	1.93	0.44

Tablo 6: Safsızlık C 'ya ait doğrusallık sonuçları

	%50	%75	%100	%125	%150
	0.00150 mg/mL	0.00225 mg/mL	0.00300 mg/mL	0.00375 mg/mL	0.00450 mg/mL
Nu1	26.58	34.77	48.98	62.14	73.04
Nu2	23.71	34.20	48.19	61.07	74.68
Nu3	28.94	37.67	49.66	61.35	75.03
Ort.	26.41	35.55	48.94	61.52	74.25
SD	2.62	1.86	0.74	0.56	1.06
RSD	9.92	5.23	1.50	0.90	1.43

Safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C için en küçük kareler yöntemi ile elde edilen doğruların regresyon analizleri yapılmıştır. Bulunan sonuçlar sırasıyla yukarıda belirtilmiş olan safsızlıklara ait doğru denklemleridir.

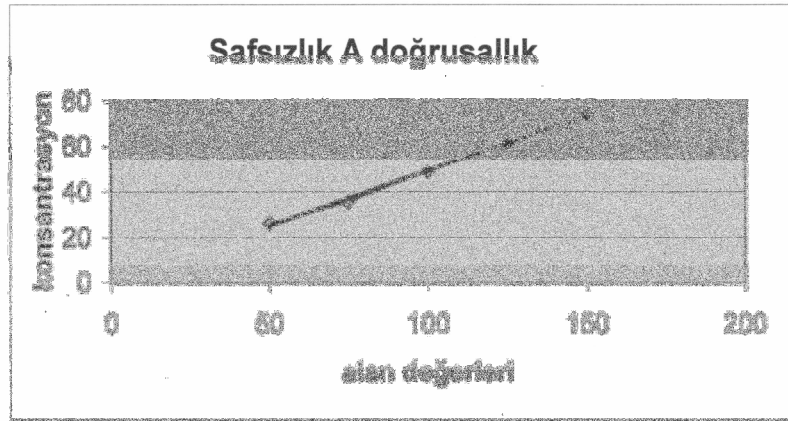
Safsızlık A için

Kesim değeri (a) : 0,1961

Eğim değeri: (b) : 2.708

Korelasyon katsayısının karesi (r^2) : 0,9807

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y= 0.1961x+2.708$, korelasyon katsayısının karesi (r^2) :0.9807'dir.



Grafik 1: Safsızlık A doğrusallık eğrisi

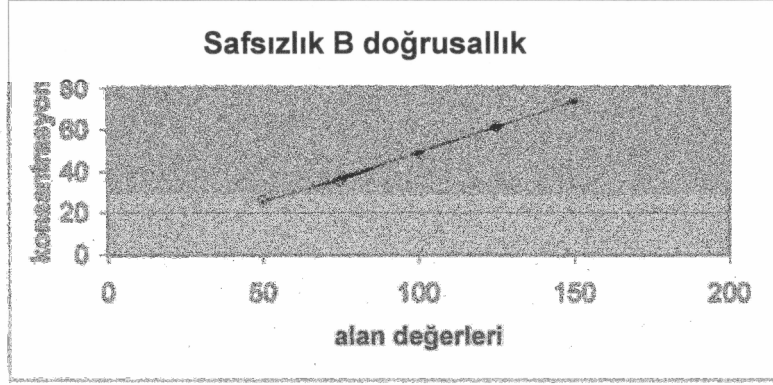
Safsızlık B için

Kesim değeri (a) : 0.5884

Eğim değeri: (b) : 0.9806

Korelasyon katsayısının karesi (r^2) : 0.9983

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y= 0.5885x + 0.9806$, korelasyon katsayısının karesi (r^2) :0.9983'tür.



Grafik 2: Safsızlık B doğrusallık eğrisi

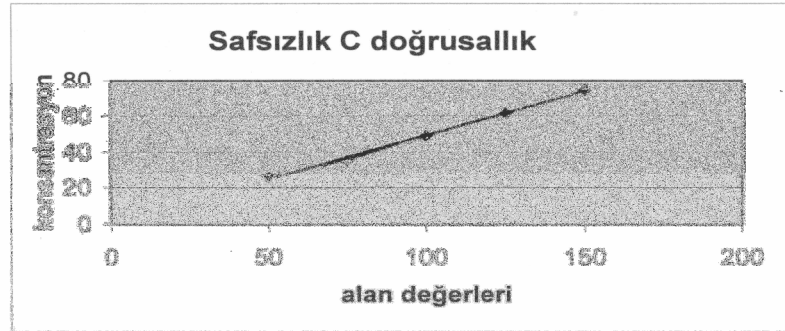
Safsızlık C için

Kesim değeri (a) : 0.4866

Eğim değeri: (b) : 0.674

Korelasyon katsayısının karesi (r^2) : 0.9966

Konsantrasyona karşı ortalama alan değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi $y= 0.4866x +0.6740$, korelasyon katsayısının karesi (r^2) :0.9929'dur.



Grafik 3: Safsızlık C doğrusallık eğrisi

4.2.1.3. Doğruluk

3.3.4.3. bölümde belirtildiği gibi hazırlanmış olan %80, %100 ve %120'lik çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen veriler safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C için sırasıyla Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9'de verilmiştir.

Tablo 7: Safsızlık A'ya ait doğruluk sonuçları

	%80 (c=0,0024mg/mL)	%100 (c=0,003mg/mL)	%120 (c=0,0036mg/L)
Nu 1	100.56	101.77	100.40
Nu 2	100.95	100.63	99.13
Nu 3	101.71	101.64	99.86
Ort.	101.77	101.35	99.80
SD	0.585	0.624	0.637
RSD	0.579	0.616	0.639

Tablo 8: Safsızlık B'ye ait doğruluk sonuçları

	%80 (c=0,0024mg/mL)	%100 (c=0,0030mg/mL)	%120 (c=0,0036mg/mL)
Nu 1	99.91	100.26	100.98
Nu 2	98.62	99.35	100.95
Nu 3	99.20	100.93	100.33
Ort.	99.24	100.18	100.74
SD	0.65	0.793	0.359
RSD	0.65	0.792	0.357

Tablo 9: Safsızlık C'ye ait doğruluk sonuçları

	%80 (c=0,0024mg/mL)	%100 (c=0,0030mg/mL)	%120 (c=0,0036mg/mL)
Nu 1	100.23	103.12	100.30
Nu 2	99.32	102.43	99.90
Nu 3	101.38	103.13	98.90
Ort.	100.31	102.89	99.70
SD	1.032	0.401	0.721
RSD	1.029	0.390	0.723

4.2.1.4. Kesinlik

A)Tekrar elde edebilirlik

3.3.4.4. de belirtildiği gibi hazırlanan çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen veriler safsızlık A,safsızlık B ve safsızlık C için sırasıyla Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 10: Safsızlık A’ya ait tekrar elde edebilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	21.09	99.57
2	21.33	100.71
3	21.10	99.62
4	20.59	97.21
5	21.24	100.28
6	21.41	101.09
Ort.	21.13	99.75
SD	0.29	1.38
RSD	1.38	1.38

Tablo 11: Safsızlık B’ye ait tekrar elde edebilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	50.71	100.77
2	50.28	99.92
3	50.78	100.89
4	50.73	100.80
5	50.85	101.03
6	50.31	99.98
Ort.	50.61	100.57
SD	0.25	0.49
RSD	0.49	0.48

Tablo 12: Safsızlık C'ye ait tekrar elde edilebilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	60.31	99.25
2	59.91	98.58
3	60.12	98.95
4	59.97	98.70
5	60.32	99.27
6	60.38	100.53
Ort.	60.13	98.95
SD	0.20	0.31
RSD	0.33	0.32

B) Tekrarlanabilirlik

3.3.4.4. de belirtildiği gibi hazırlanan çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen veriler safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C için sırasıyla Tablo 13, Tablo 14, ve Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 13: Safsızlık A'ya ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	20.90	98.68
2	20.93	98.82
3	20.49	96.74
4	20.73	97.88
5	20.78	98.11
6	20.61	97.31
Ort.	20.74	97.92
SD	0.17	0.80
RSD	0.82	0.82

Tablo 14: Safsızlık B'ye ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	50.50	100.34
2	50.07	99.49
3	50.41	100.17
4	50.31	99.97
5	50.95	101.24
6	50.66	100.66
Ort.	50.48	100.31
SD	0.30	0.54
RSD	0.60	0.54

Tablo 15: Safsızlık C'ye ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	60.31	100.28
2	59.91	99.60
3	60.12	99.97
4	59.97	99.72
5	60.32	100.30
6	60.22	100.13
Ort.	60.14	100.00
SD	0.173	0.29
RSD	0.29	0.29

C) Ara Kesinlik

3.3.4.4. de belirtildiği gibi hazırlanan çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen veriler safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C için sırasıyla Tablo 16, Tablo 17 ve Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 16: Safsızlık A'ya ait ara kesinlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	21.09	99.57
2	21.33	100.71
3	21.10	99.62
4	20.59	97.21
5	21.24	100.28
6	21.41	101.09
Ort.	21.13	99.75
SD	0.29	1.38
RSD	1.38	1.38

Tablo 17: Safsızlık B'ye ait ara kesinlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	50.87	100.28
2	50.59	99.72
3	50.19	98.94
4	50.24	99.03
5	50.71	99.96
6	50.27	99.09
Ort.	50.48	99.50
SD	0.28	0.56
RSD	0.56	0.56

Tablo 18: Safsızlık C'ye ait ara kesinlik sonuçları

Numune	Alan	% Geri Kazanım
1	60.88	99.85
2	61.27	100.49
3	60.96	99.98
4	60.71	99.57
5	60.66	99.49
6	60.63	99.44
Ort.	60.85	99.88
SD	0.24	0.40
RSD	0.40	0.40

4.2.1.5. Dedeksiyon ve Kantitatif Tayin Limiti

2.8.9. ve 2.8.10. da belirtilen formüllere göre safsızlıkların dedeksiyon ve kantitatif limiti hesaplanmıştır. Buna göre bulunan dedeksiyon ve kantitatif tayin limit değerleri verilmiştir.

Safsızlık A için;

Dedeksiyon Limiti (LOD) : 0.00075 mg/mL

Kantitatif Tayin Limiti (LOQ) : 0.00225 mg/mL

Safsızlık B için;

Dedeksiyon Limiti (LOD) : 0.00075 mg/mL

Kantitatif Tayin Limiti (LOQ) : 0.00225 mg/mL

Safsızlık C için;

Dedeksiyon Limiti (LOD) : 0.00075 mg/mL

Kantitatif Tayin Limiti (LOQ) : 0.00225 mg/mL

4.2.1.6.Sağlamlık

Sıcaklık Değişimi:

Tablo 19: Safsızlık metodu sağlamlık analizinde sıcaklık değişimi sonucunda elde edilen k', T ve N değerleri

	55 °C			60 °C			65 °C		
	k'	T	N	k'	T	N	k'	T	N
Safsızlık A	33.345	1.465	17258	35.859	1.365	17441	32.336	1.459	17361
Safsızlık B	40.691	1.220	17539	44.696	1.329	17869	40.129	1.223	17750
Safsızlık C	50.459	1.115	17795	52.469	1.006	17811	51.236	1.226	17951

Aynı tür farklı batch numaralı kolon:

Tablo 20: Safsızlık metodu sağlamlık analizinde kolon değişimi sonucunda elde edilen k', T ve N değerleri

	Kolon 1			Kolon 2		
	k'	T	N	k'	T	N
Safsızlık A	35.859	1.365	17441	39.456	1.442	17894
Safsızlık B	44.696	1.329	17869	47.983	1.543	17936
Safsızlık C	52.469	1.006	17811	55.669	1.242	177540

4.2.1.7. Sistem Uygunluk Testleri

3.3.4.1 de belirtildiği şekilde hazırlanan karışım çözeltisinde safsızlık A ve finasterid arasındaki rezolüsyon 2,456 olarak bulunmuştur.

4.2.1.8. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmaları

3.3.4. de belirtildiği gibi hazırlanan numune çözeltilerinin analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 21, Tablo 22, Tablo 23, Tablo 24, Tablo 25 ve Tablo 26' de verilmiştir.

A) 10.0 N NaOH ile yapılan çalışma:

Tablo 21: 10.0 N NaOH ile yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç %	72 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	0.12
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	0.14
Safsızlık C	0.11	0.26
Bilinmeyen Safsızlık	Dedekte edilemedi	0.055
Toplam Safsızlık	0.11	0.58

B) 0.1 N NaOH ile yapılan çalışma:

Tablo 22: 0.1 N NaOH ile yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç %	72 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	0.100
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	0.056
Safsızlık C	0.024	0.038
Bilinmeyen Safsızlık	0.043	0.053
Toplam Safsızlık	0.064	0.247

C) MeOH hidroklorür ile yapılan çalışma:

Tablo 23: MeOH hidroklorür ile yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç %	72 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	0.045
Safsızlık C	0.049	0.160
Bilinmeyen Safsızlık	0.069	0.092
Toplam Safsızlık	0.118	0.297

D) Görünür ışık altında bekletilerek yapılan çalışma:

Tablo 24: Görünür ışık altında bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç%	3 saat sonra %	24 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	0.035
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	0.088
Safsızlık C	0.039	0.090	0.190
Bilinmeyen Safsızlık	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	0.090
Toplam Safsızlık	0.039	0.090	0.403

E) Ultraviyole ışık altında bekletilerek ile yapılan çalışma:

Tablo 25: Ultraviyole ışık altında bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç%	3 saat sonra %	24 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	0.110
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	0.035
Safsızlık C	0.027	0.071	0.190
Bilinmeyen Safsızlık	0.019	0.028	0.033
Toplam Safsızlık	0.046	0.099	0.368

F) 60 °C sıcakta bekletilerek yapılan çalışma:

Tablo 26: 60 °C sıcakta bekletilerek yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışması sonuçları

	Başlangıç%	3 saat sonra %	24 saat sonra %
Safsızlık A	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi
Safsızlık B	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi	Dedekte edilemedi
Safsızlık C	0.0160	0.016	0.038
Bilinmeyen Safsızlık	0.015	0.021	0.066
Toplam Safsızlık	0.031	0.037	0.104

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geçmişte incelenen finasterid ile ilgili olarak çeşitli kromatografik şartlarda yüksek basınç sıvı kromatografisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (23).

Film kaplı tabletlerde safsızlık analizi için EP'de hammadde finasteridin safsızlık tayini için belirtilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi uygulanmıştır. Belirtilen metodun öncelikle 5.0 mg finasterid film tabletleri için işlenebilirliği incelenmiş ve metotta belirtilen kromatografik şartlar dahilinde uygun sabit fazın tespit edilmesi için pikler arası uygun rezolüsyon, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü tayin edilmiş ve film tabletlerde bu metodun işlediği saptanmıştır.

Finasteridin safsızlıklarından oluşan karışım enjekte edildiğinde uygun rezolüsyon, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı bulunmuştur. Elde edilen rezolüsyonların hepsi 2'den büyük, kuyruklanma faktörü 1 ile 5 arasındadır.

Bu metodun doğrulanması amacıyla yapılmış olan çalışmalardan seçicilik parametresinde safsızlık metodu için 5.0 mg film tabletlerin içinde bulunan yardımcı maddelerinin metotta uygulanan kromatografik şartlarda pik vermediği ayrıca etken madde piki ile safsızlık piklerinin birbiri ile girişim yapmadığı ayrımın iyi olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, kromatografik şartların film kaplı tabletler için uygun olduğunu göstermektedir.

Doğrusallık tayininde safsızlık metodunda doğrusallığın sağlanabilmesi için çalışılması gereken en az 5 konsantrasyonda tüm safsızlıklar 0,0015- 0,0045 mg /mL konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Safsızlık A, safsızlık B ve safsızlık C için r^2 değeri 0,98'den büyük bulunmuştur.

Doğruluk parametresinde safsızlık metodu için safsızlıkların % 80, %100 ve %120'sini içeren çözeltilerden elde edilen sonuçların %95 - %105 aralığında bulunduğu ve sınırlar içinde kaldığı tespit edilmiştir. Geri kazanım testinin sonuçları % 95 - % 105 aralığında bulunduğu ve sınırlar içinde kaldığı tespit edilmiştir. Geri kazanım testinin sonuçları % 95 güven aralığı sınırları içinde t_2 değeri 4.30 alınarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar safsızlık A'nın % 80,% 100 ve % 120'sini içeren

çözeltiler için sırasıyla; % 101.77±1.33, 101.35 ± 1.20, 98.80 ± 1.23, safsızlık B'nin % 80, %100 ve %120'sini içeren çözeltiler için sırasıyla;

99.24±1.25, 100.18±1.53, 100.74±0.690, safsızlık C'nin % 80, %100 ve %120'sini içeren çözeltiler sırasıyla; 100.31±1.99, 102.82±0.83, 99.70±1.39 olarak bulunmuştur(16).

Tekrar elde edilebilirlik parametresi için safsızlıkların %100 konsantrasyondaki çözeltilerinden hazırlanan 6 numunenin enjeksiyonu sonucu elde edilen sonuçların RSD değeri % 2'den küçük çıkmıştır. Metotların tekrar elde edilebilirlik parametresini sağladığı ispatlanmıştır (16).

Tekrarlanabilirlik parametresi için safsızlıkların %100 konsantrasyonda hazırlanmış olan çözeltilerin 6 kez enjeksiyonu sonucu elde edilen RSD değerleri % 1'den küçük bulunmuştur. Metodların tekrarlanabilirlik parametresini sağladığı ispatlanmıştır (16).

Ara kesinlik parametresi için metodun farklı analist, farklı gün ve farklı cihaz ile yapılmış olan safsızlık metodu için 4.2.1.4. bölümün A ve C maddelerindeki sonuçlardan iki sonucun ortalamaları ve RSD'leri arasındaki fark % 2'den az fark olduğu için yöntemin farklı analizci ve farklı cihaz uygulamalarından etkilenmediği kanıtlanmıştır.

Metotların sağlamlığını tespit etmek için elde edilen değişiklikler sonucu elde edilen tüm kapasite faktörleri 1–5 arasında, kuyruklanma faktörleri 2'den küçük ve teorik plaka sayıları 2000'den büyük olduğu için değişimler sonucu metotlarda anlamlı değişiklikler olmamış ve metotların sağlamlıkları ispat edilmiştir (16). Analiz 5.0 mg finasterid film tabletlerine yapıldığı için gözlenen değişimler yalnızca tabletlerin içerdiği safsızlıklara aittir.

Safsızlık metodunun doğrulanması için yapılan çalışmaların sonucunda safsızlık A için 0.00075 mg/mL– 0.0045 mg/mL, safsızlık B için 0.00075 mg/mL– 0.0045 mg/mL ve safsızlık C için 0.00075 mg/mL– 0.0045 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrulanmıştır.

Bilinmeyen safsızlıkların tespiti ve bilinen safsızlıklarda meydana gelen kantitatif değişimleri ölçmek için yapılmış olan hızlandırılmış bozundurma çalışmalarında safsızlıklarda artış meydana gelmiş fakat safsızlığın miktarı farmakopede belirtilen sınırlar dahilinde kalmıştır (22). Bozundurma çalışmalarında bilinmeyen safsızlık meydana gelmiş tabletlerin ısı, ışık ve neme karşı duyarlı olduğu ve metodun bu değişimleri tayin edebilecek kadar hassas olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak EP'de hammadde finasterid'in safsızlık tayini için belirtilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi metodu Dilaprost 5.0 mg film tabletleri için uygulandı ve bu doğrultuda uygun kolon seçimi yapıldı. Aynı sabit faz, hareketli faz ve dedektör sistemini içeren metot ile finasterid ve safsızlıklarının kalitatif ve kantitatif tayinin yapılabileceği ve metodun otoritelerce belirlenmiş olan validasyon kriterlerini sağladığı ispatlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Ommaty, R.: “Pharma Türk”, 1.cilt, 1. Basım, Ağustos, Ankara, (2000) 569.
- [2] Skoog West Holler: “Analitik Kimyanın Temelleri” 7. Basım, 2.cilt, (1999) 664-665.
- [3] Center for Drug Evaluation and Research: “Validation of Chromatographic Methods”, November (1994).
- [4] ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: “Methodology”, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, March, (1995).
- [5] Roger L.L.: “Approach to assay validation for the development of biopharmaceuticals”. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 34 (2001) 195-197.
- [6] ICH Q2A Text on Validation of Analytic Methods : “Definitions and terminology”, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, March (1995).
- [7] ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: “Methodology”, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, May , (1997).
- [8] Kayaalp S.O.: “Türkiye İlaç Kılavuzu 2001 Formüleri”, İstanbul,Türkiye, (2001) 271-272.
- [9] ICH Q1A (R2): “Stability Testing Of Existing Active Substances and Related Finished Products”, International Conference On Harmonization of Technical Requirements for Registration Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, April (1998).
- [10] ICH Validation: “Methodology”, International Conference On Harmonization of Technical Requirements for Registration Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, December, (1998).

- [11] Barbas C., Garcia A., Saavedra L., and Castro M.: "Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography Stress test for stability evaluation", *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) 97-103
- [12] USP 26 (The United States Pharmacopeia), Taunton MA, USA, (2003) 2135
- [13] Ergenç N., Gürsoy A. Ateş Ö.: "İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini", İstanbul, (1999) 158-173.
- [14] Maryadele J.O.:The Merck Index, 13 th Edition,Maryland,USA, (2001) 722.
- [15] Ghulam A.S.: "Validation of High-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International conference on harmonization". *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 57-66 .
- [16] James D.J., Gale E.V.B.: "Analytical Method Validation Analytical Method Validation", Special edition, (2001) 57-51.
- [17] ICHQ3A (R) : "Impurities in New Drug Substances" ,International Conference On Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, February (2002).
- [18] Skoog D.A.: "Fundamentals of Analytical Chemistry", 7.th edition, USA, 1. volume, (1996) 21-64.
- [19] Gennaro A. R.: "Remington's Pharmaceuticals Sciences", 17 th edition, USA, (1985) 104-128 .
- [20] Synder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L.: "Practical HPLC Method development".2. Edition,*Wiley-Interscience Publication*, USA, (1997) 13-14, 687-713.
- [21] Baxter F.O., Trivic S., Lee I.R.: "Structure-Function studies of human 5-alpha reductase type 2 using site directed mutagenesis".*Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 77 (2001),167-175.
- [22] Calam D.H. : The European Pharmacopeia, 4 th edition,France, (2002) 1888-1889.
- [23] Carlucci G., Mazzeo P.: "Finasteride in biological fluids, extraction and separation by a graphitized carbon black cartridge and quantification by liquid chromatography" .*Journal of Chromatography B*, 693 (1997) 245-248.

- [24] Gisleskop P.O., Hermann D, Udenaes M. H., Karlsson M.O.: “Validation of population pharmacokinetic / pharmacodynamic model for 5 α -reductase inhibitors”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (1999) 291-299.
- [25] Macek J.: “Seperation of finasteride and analogues”. *Journal of Chromatography B* 764 (2001) 207-215.
- [26] Orr J.D., Krull I.S., Swartz M.E: “ Validation of an Impurity Methods” Part I. *LCGC North America*,21(7) (2003) 629-633.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Aksaray'da doğdum. Lise öğrenimimi 1995 yılında tamamladım.1997 yılında Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü'nü kazandım ve 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. 2002 yılında Biofarma İlaç Sanayi Arge ve Ruhsatlandırma Departmanı'nda işe başladım. Halen aynı şirkette çalışmaya devam etmekteyim.