



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANTOPRAZOL SODYUM SAFSIZLIKLARININ TAYİNİ

ENGİN ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. AYŞEN KURT CÜCÜ

2016-İSTANBUL



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PANTOPRAZOL SODYUM SAFSIZLIKLARININ TAYİNİ

ENGİN ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. AYŞEN KURT CÜCÜ

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : Engin Öztürk
Tez Başlığı : Pantoprazol Sodyum Safsızlıklarının Tayini
Sınav Yeri : M.Ü. Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 15.01.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

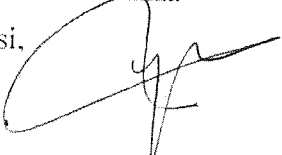


Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç.Dr. Ayşen Kurt Cücü
(Danışman)

Kurumu

Marmara Ü. Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd.Doç.Dr.Rabia Oba

Marmara Ü. Eczacılık Fakültesi,
Biyokimya

Yrd.Doç.Dr.Gülbin Erdoğan

Marmara Ü. Eczacılık Fakültesi,
Analitik Kimya

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28./01./2016 tarih ve 29. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Y 

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.

ENGİN ÖZTÜRK



I. TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Ayşen Kurt Cücü'ye,

Sandoz Syntek ilaç fabrikası LCM & Ruhsatlandırma bölümü yöneticisi Sayın Dr.Şebnur Merey'e,

Sandoz Syntek ilaç fabrikası LCM & Ruhsatlandırma bölümü Analitik Laboratuvarı çalışanlarına,

Çok ama çok kritik bir noktada sağladığı destekle tezimin bu hale gelmesinde önemli rol oynayan Sayın Tuna Öncü'ye,

Hamileliğinin son aylarında bile bana son derece destek olan sınıf arkadaşım Sayın Tuğba Uysal'a,

Her zaman her konuda maddi-manevi bana destek olan değerli anne ve babama,

Özellikle son dört ayda yapmam gereken babalık görevlerimi de sırtlayan bana tezimi bitirmemde sonsuz desteğini esirgemeyen sevgili eşime,

Son olarak benimle oyun oynamak için sabırla bekleyen, tezimin bitmesi için gün sayan hayattaki bütün başarılarımın altındaki itici güç olan minik meleğim sevgili oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

II. İÇİNDEKİLER

I.	TEŞEKKÜR.....	i
II.	İÇİNDEKİLER.....	ii
III.	KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xvii
IV.	TABLolar LİSTESİ.....	xix
V.	ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xxiii
VI.	RESİMLER LİSTESİ.....	xxiv
1.	ÖZET.....	1
2.	SUMMARY.....	2
3.	GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4.	GENEL BİLGİLER.....	4
4.1.	Proton Pompa İnhibitörleri (PPI).....	4
4.1.1.	Mide asidinin salgılanmasının fizyolojisi ve PPI'lerinin farmakolojisi.....	5
4.1.2.	Proton pompa inhibitörlerinin kullanımını teşvik eden olumlu yanları.....	7
4.1.3.	Proton pompa inhibitörlerinin kullanım süresine bağlı yan etkileri.....	8
4.1.3.1.	Tümör oluşumuna etkileri.....	8
4.1.3.2.	Enfeksiyonlar.....	11
4.1.3.2.1.	<i>Clostridium difficile</i> enfeksiyonu ve enterik enfeksiyon riskindeki artış...11	11
4.1.3.2.2.	Toplumsal kaynaklı zatürreler.....	14
4.1.3.2.3.	Mikroskobik kalın bağırsak iltihabı (mikroskobik kolit).....	15
4.1.3.3.	Besin maddelerinin sindirimini ve emiliminin bozulması.....	16

4.1.3.4.	İlaç etkileşimi ve kullanılan esas ilacın etkisinin azalması.....	18
4.1.3.5.	Uzun süreli PPI'ü kullanımının kemik kırıklarına etkisi	20
4.1.3.6.	Kronik böbrek fonksiyon bozukluğuna etkileri	21
4.2.	Pantoprazol Yapısal Özellikleri ve Sentez Yolu.....	21
4.2.1.	Pantoprazol sentezi	22
4.2.1.1.	Piridin HCl sentezi	22
4.2.1.2.	Merkapto sentezi.....	23
4.2.1.3.	Pantoprazol sentezi	23
4.3.	Pantoprazolun Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri	24
4.3.1.	Pantoprazolun etki mekanizması	24
4.3.2.	Pantoprazolun farmakokinetik özellikleri.....	24
4.4.	Pantoprazol Na.....	25
4.4.1.	Yapısal formülü	25
4.4.2.	Kimyasal adı	25
4.4.3.	Moleküler formül	26
4.4.4.	Moleküler ağırlığı	26
4.4.5.	Görünüş.....	26
4.4.6.	Çözünürlük.....	26
4.4.7.	Çözelti görünüşü	27
4.4.8.	Pantoprazol Na sentezi.....	27
4.5.	Pantoprazol Na Tanımlama Testleri	27
4.5.1.	IR absorpsiyon spektrumu	27
4.5.2.	İyon ve iyon gruplarının tanımlama reaksiyonu	28
4.5.3.	UV spektrum.....	28

4.5.4.	Avrupa Farmakopesi Ek 6.1' de yer alan polimorfizm (kristal yapı).....	28
4.5.5.	Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometri.....	28
4.5.5.1.	¹ H-NMR Spektrum	28
4.5.5.2.	¹³ C-NMR Spektrum	29
4.6.	Pantoprazol Na için Yapılmış Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları	33
4.7.	Avrupa Farmakopesi 7.0 Pantoprazol Na Safsızlık Tayin Yöntemi Kabul Kriterleri.....	35
4.7.1.	Safsızlık metodu için sistem uygunluğu	35
4.7.2.	Safsızlık limitleri.....	35
4.8.	Safsızlıklar ve Sınıflandırılması.....	36
4.8.1.	İlaç etken maddelerinde safsızlıklar.....	38
4.8.1.1.	Organik safsızlıklar	38
4.8.1.2.	Anorganik safsızlıklar	39
4.8.1.3.	Kalıntı uçucu çözücüler	39
4.8.2.	Etken maddelerin safsızlıklardan arındırılması	40
4.8.3.	Formülasyondan kaynaklanan safsızlıklar	40
4.9.	Pantoprazol Na Safsızlıkları ve Safsızlık Oluşturma Şekilleri	43
4.9.1.	Pantoprazol Sülfon (EP/USP: Safsızlık A).....	43
4.9.1.1.	Yapısı	43
4.9.1.2.	Kimyasal adı	43
4.9.1.3.	Tayin metodu	43
4.9.1.4.	Safsızlık oluşturma şekli	43
4.9.2.	Pantoprazol Sülfon-N-Oksit.....	44
4.9.2.1.	Yapısı	44

4.9.2.2. Kimyasal adı	44
4.9.2.3. Tayin metodu	45
4.9.2.4. Safsızlık oluşturma şekli	45
4.9.3. Pantoprazol-N-Oksit	46
4.9.3.1. Yapısı	46
4.9.3.2. Kimyasal adı	46
4.9.3.3. Tayin metodu	46
4.9.3.4. Safsızlık oluşturma şekli	46
4.9.3.5. Pantoprazol Sülfid (EP/USP: Safsızlık B)	47
4.9.3.6. Yapısı	47
4.9.3.7. Kimyasal adı	48
4.9.3.8. Tayin metodu	48
4.9.3.9. Safsızlık oluşturma şekli	48
4.9.4. Pantoprazol merkaptol (EP/USP: Safsızlık C)	48
4.9.4.1. Yapısı	48
4.9.4.2. Kimyasal adı	48
4.9.4.3. Tayin metodu	49
4.9.4.4. Safsızlık oluşturma şekli	49
4.9.5. Safsızlık D+F (EP/USP: Safsızlık D+F enantiyomer karışım)	49
4.9.5.1. Yapısı	49
4.9.5.2. Kimyasal adı	49
4.9.5.3. Tayin metodu	50
4.9.5.4. Safsızlık oluşturma şekli	50
4.9.6. Pantoprazol Dimer safsızlık E (EP/USP: Safsızlık E dimer yapısı)	50

4.9.6.1.	Yapısı	50
4.9.6.2.	Kimyasal adı	50
4.9.6.3.	Tayin metodu	51
4.9.6.4.	Safsızlık oluşturma şekli	51
4.10.	Validasyon Tanımı ve Safsızlık Validasyon Parametreleri	51
4.10.1.	Validasyon	51
4.10.2.	Valide edilmesi gereken analitik prosedürler	52
4.10.3.	Validasyonun tekrarlanmasını gerektiren durumlar.....	52
4.10.4.	Validasyon dökümantasyonu	52
4.10.5.	Validasyonun temel parametreleri	53
4.10.5.1.	Doğruluk (Accuracy)	53
4.10.5.2.	Kesinlik (Precision)	54
4.10.5.3.	Tekrarlanabilirlik (Repeatability)	54
4.10.5.3.1.	Ara Kesinlik (Intermediate precision).....	54
4.10.5.3.2.	Tekrar elde edebilirlik (Reproducibility)	55
4.10.5.4.	Seçicilik (Selectivity).....	55
4.10.5.5.	Tayin alt sınırı	55
4.10.5.5.1.	Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem.....	56
4.10.5.5.2.	Sinyal / Gürültü (Signal / Noise) oranına dayanan yöntem	56
4.10.5.5.3.	Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapmasına ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntem.....	56
4.10.5.6.	Kantitatif alt sınır	57
4.10.5.6.1.	Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem.....	57
4.10.5.6.2.	Sinyal / Gürültü (Signal / Noise) oranına dayanan yöntem	57

4.10.5.6.3. Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntem.....	58
4.10.5.7.Doğrusallık (Linearity)	58
4.10.5.8.Konsantrasyon aralığı (Range)	59
4.10.5.9.Sistem uygunluğu (System suitability)	59
4.10.5.10. Sağlamlık (Robustness).....	60
4.11. Validasyonun Kabul Kriterleri	60
4.11.1. Doğrusallık parametresi	60
4.11.2. Kesinlik parametresi	61
4.11.3. Doğruluk parametresi.....	61
4.11.4. Seçicilik parametresi.....	61
4.11.5. Tayin alt sınırı	61
4.11.6. Kantitatif alt sınırı	62
4.11.7. Sistem uygunluğu.....	62
4.11.8. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları	62
4.11.9. Literatürlerde yapılmış hızlandırılmış bozundurma çalışmaları uygulamaları .	63
4.12. Kromatogram Uygunluk Terimleri ve Açıklamaları	63
4.12.1. Kapasite Faktörü (k').....	63
4.12.2. Teorik Plaka Sayısı (N).....	64
4.12.3. Ayırma Faktörü (a)	64
4.12.4. Kuyruklanma Faktörü (T).....	65
4.12.5. Pik simetrisi	65
4.12.6. Ayırma Gücü (R)	66
4.12.7. Tutulma zamanı (t_R).....	66

4.13.	İstatistiksel Terimlerin Tanımları	67
4.13.1.	Standart Sapma (SD).....	67
4.13.2.	Bağıl Standart Sapma (RSD)	67
4.13.3.	Ortalamanın Güven Aralığı (p).....	68
4.13.4.	Standart Hata (STH)	69
4.13.5.	En Küçük Kareler Yöntemi	69
4.13.6.	Doğrunun eğimi	70
4.13.7.	Doğrunun kesme noktası.....	70
4.13.8.	Korelasyon katsayısı	70
4.13.9.	Tayin alt sınırı	71
4.13.10.	Kantitatif alt sınır	72
4.13.11.	İki ortalamanın karşılaştırılması	73
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	74
5.1.	Kimyasal Maddeler	74
5.2.	Gereçler	74
5.3.	Safsızlık Tayini Analitik Metod Validasyonunda İncelenecek Parametreler	75
5.4.	Validasyon Kromatografik Koşulları.....	76
5.4.1.	HPLC Kromatografik koşulları.....	76
5.4.2.	UPLC Kromatografik koşulları.....	76
5.5.	Mobil Fazın Hazırlanması.....	77
5.5.1.	Tampon çözeltisinin hazırlanması	77
5.5.2.	Mobil fazın hazırlanması	77
5.6.	Validasyonda Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanmaları ve Hesaplamalar	77
5.6.1.	Blank çözeltisinin hazırlanması	77

5.6.2.	Standart çözeltilisinin hazırlanması	77
5.6.3.	Numune çözeltilisinin hazırlanması	78
5.6.4.	Hesaplamalar.....	78
5.7.	Spesifiklik	79
5.7.1.	Safsızlık çözeltilerinin hazırlanması	79
5.7.1.1.	Blank çözeltilisinin hazırlanması	79
5.7.1.2.	Pantoprazol Sülfon (Safsızlık A) safsızlık standardının hazırlanması.....	79
5.7.1.3.	Pantoprazol-N-Oksit safsızlık standardının hazırlanması.....	80
5.7.1.4.	Pantoprazol D+F safsızlık standardının hazırlanması.....	80
5.7.1.5.	Pantoprazol Sülfid (Safsızlık B) safsızlık standardının hazırlanması.....	80
5.7.1.6.	Pantoprazol Merkapt (Safsızlık C) safsızlık standardının hazırlanması	81
5.7.1.7.	Standart çözeltilisinin hazırlanması	81
5.7.1.8.	Numune çözeltilisinin hazırlanması	81
5.7.1.9.	İlaveli numune çözeltilisinin hazırlanması.....	82
5.7.1.10.	Hızlandırılmış bozunma çalışmaları	82
5.7.1.10.1.	Stok çözeltilisinin hazırlanması.....	82
5.7.1.10.2.	Bozundurmaya maruz bırakılmayan numunenin hazırlanması.....	82
5.7.1.10.3.	Bozundurmaya maruz bırakılan numunelerin hazırlanması	83
5.7.1.10.3.1.	UV ışığı altında bozundurma.....	83
5.7.1.10.3.2.	Termal bozundurma	83
5.7.1.10.3.3.	Asidik bozundurma	83
5.7.1.10.3.4.	Bazik bozundurma.....	83
5.7.1.10.3.5.	Oksidatif bozundurma	84

5.7.1.10.4.	Bozundurmaya maruz bırakılan numunelerin blank çözeltilerinin hazırlanması.....	84
5.7.1.10.4.1.	UV ışığı altında bozundurma.....	84
5.7.1.10.4.2.	Termal bozundurma	84
5.7.1.10.4.3.	Asidik bozundurma	85
5.7.1.10.4.4.	Bazik bozundurma.....	85
5.7.1.10.4.5.	Oksidatif bozundurma	85
5.7.2.	Enjeksiyon sırası	86
5.7.3.	Kromatografik prosedür	87
5.7.4.	Data değerlendirme.....	87
5.8.	Doğrusallık (Linearity)	88
5.8.1.	Stok standart çözeltilerinin hazırlanması.....	88
5.8.2.	%150'lik Standart çözeltilerinin hazırlanması	88
5.8.3.	%120'lik Standart çözeltilerinin hazırlanması	88
5.8.4.	%110'luk Standart çözeltilerinin hazırlanması.....	88
5.8.5.	%100'lük Standart çözeltilerinin hazırlanması.....	89
5.8.6.	%90'lik Standart çözeltilerinin hazırlanması	89
5.8.7.	%80'lik Standart çözeltilerinin hazırlanması	89
5.8.8.	LOQ Çözeltilerinin hazırlanması	89
5.8.8.1.	%50'lik Çözeltinin hazırlanması.....	89
5.8.8.2.	%45,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	90
5.8.8.3.	%40,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	90
5.8.8.4.	%35,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	90
5.8.8.5.	%30,0'luk Çözeltinin hazırlanması.....	90

5.8.8.6.	%25,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	90
5.8.8.7.	%20,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	91
5.8.8.8.	%18,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	91
5.8.8.9.	%15,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	91
5.8.8.10.	%12,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	91
5.8.8.11.	%10,0'luk Çözeltinin hazırlanması.....	91
5.8.8.12.	%8,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	92
5.8.8.13.	%5,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	92
5.8.8.14.	%1,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	92
5.8.8.15.	%0,5'lik Çözeltinin hazırlanması.....	92
5.8.9.	LOD Çözeltilerinin hazırlanması	93
5.8.9.1.	%10,0'luk Çözeltinin hazırlanması.....	93
5.8.9.2.	%9,0'luk Çözeltinin hazırlanması.....	93
5.8.9.3.	%8,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	93
5.8.9.4.	%7,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	93
5.8.9.5.	%6,0'lık Çözeltinin hazırlanması.....	94
5.8.9.6.	%5,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	94
5.8.9.7.	%4,0'lük Çözeltinin hazırlanması.....	94
5.8.9.8.	%3,0'lük Çözeltinin hazırlanması.....	94
5.8.9.9.	%2,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	94
5.8.9.10.	%1,0'lik Çözeltinin hazırlanması.....	95
5.8.9.11.	%0,05'lik Çözeltinin hazırlanması.....	95
5.9.	Dedeksiyon Limiti (LOD).....	95
5.10.	Kantitasyon Limiti (LOQ)	95

5.11.	Aralık (Range)	96
5.12.	Enjeksiyon Sırası	96
5.13.	Doğrusallık, LOD, LOQ ve Aralık için Kromatografik Prosedür	97
5.14.	Doğrusallık, LOD, LOQ ve Aralık için Data Değerlendirme.....	97
5.15.	Doğruluk (Accuracy)	98
5.15.1.	%LOQ Seviyesinde standart çözeltisinin hazırlanması	98
5.15.2.	%100'lük Standart çözeltisinin hazırlanması.....	98
5.15.3.	%150'lik Standart çözeltisinin hazırlanması	99
5.15.4.	%LOQ Seviyesinde safsızlık ilaveli numune çözeltisinin hazırlanması.....	99
5.15.5.	%100'lük Safsızlık ilaveli numune çözeltisinin hazırlanması	99
5.15.6.	%150'lik Safsızlık ilaveli numune çözeltisinin hazırlanması	99
5.15.7.	Enjeksiyon Sırası	100
5.15.8.	Kromatografik Prosedür.....	100
5.15.9.	Data Değerlendirme	101
5.16.	Kesinlik (Precision)	101
5.16.1.	Tekrarlanabilirlik (Repeatability)	101
5.16.2.	Ara kesinlik (Intermediate Precision)	101
5.16.3.	Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility).....	102
5.16.3.1.	Blank çözeltisinin hazırlanması	102
5.16.3.2.	Standart çözeltisinin hazırlanması	102
5.16.3.3.	Numune çözeltisinin hazırlanması	102
5.16.3.4.	Enjeksiyon sırası	103
5.16.3.5.	Kromatografik Prosedür.....	103
5.16.3.6.	Data Değerlendirme	103

5.17.	Sağlamlık	104
5.17.1.	Çözelti stabilitesi.....	104
5.17.1.1.	Standart çözelti stabilitesi	104
5.17.1.2.	Numune çözeltisi stabilitesi	105
5.17.1.3.	Standart çözeltisinin hazırlanması	105
5.17.1.4.	Numune çözeltisinin hazırlanması	105
5.17.1.5.	Enjeksiyon sırası	106
5.17.1.6.	Data değerlendirme.....	106
5.17.2.	Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters).....	107
6.	BULGULAR	108
6.1.	HPLC Metot Geliştirme Denemeleri 1	108
6.1.1.	Kromatografik koşullar	108
6.1.2.	Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	109
6.1.2.1.	Mobil Faz A'nın Hazırlanması	109
6.1.2.2.	Mobil Faz B'nin Hazırlanması.....	109
6.1.2.3.	Çözücünün hazırlanması.....	109
6.1.2.4.	Sonuçlar	109
6.2.	HPLC Metot Geliştirme Denemeleri 2	118
6.2.1.	Kromatografik koşullar	118
6.2.2.	Mobil fazın hazırlanması	118
6.2.2.1.	0,01 M Na ₂ HPO ₄ Çözeltisinin hazırlanması.....	118
6.2.2.2.	Mobil faz A hazırlanması.....	118
6.2.2.3.	Mobil faz B hazırlanması.....	119

6.2.3.	Çözücülerin hazırlanması.....	119
6.2.3.1.	0,01 M Na ₂ HPO ₄ Çözeltisinin hazırlanması.....	119
6.2.3.2.	Seyreltme çözeltisi 1 hazırlanması.....	119
6.2.3.3.	Seyreltme çözeltisi 2 hazırlanması.....	119
6.2.3.4.	Sonuçlar	120
6.3.	Validasyon	130
6.3.1.	HPLC Validasyon.....	130
6.3.1.1.	Seçicilik (Selectivity).....	130
6.3.1.1.1.	HPLC Bozundurma çalışmaları	134
6.3.1.2.	Kantitasyon limitleri	136
6.3.1.3.	Dedeksiyon limitleri.....	137
6.3.1.4.	Linearite ve aralık (Linearity and Range).....	138
6.3.1.4.1.	Pantoprazol-N-Oksit grafiği.....	142
6.3.1.4.2.	Pantoprazol Sülfon grafiği	143
6.3.1.4.3.	Pantoprazol Merkapto grafiği	144
6.3.1.4.4.	Pantoprazol Na grafiği	145
6.3.1.4.5.	Pantoprazol D+F 1 grafiği.....	146
6.3.1.4.6.	Pantoprazol D+F 2 grafiği.....	147
6.3.1.4.7.	Pantoprazol Sülfid grafiği	148
6.3.1.5.	Doğruluk (Accuracy)	149
6.3.1.6.	Keskinlik (Precision)	150
6.3.1.6.1.	Tekrarlanabilirlik (Repeatability).....	150
6.3.1.6.2.	Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility).....	151
6.3.1.7.	Sağlamlık (Robustness)	153

6.3.1.7.1.	Solüsyon stabilitesi	153
6.3.1.7.2.	Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters).....	155
6.3.2.	UPLC validasyon	163
6.3.2.1.	Seçicilik (Selectivity).....	163
6.3.2.1.1.	UPLC Bozundurma çalışmaları	167
6.3.2.2.	Kantitasyon limitleri	169
6.3.2.3.	Dedeksiyon limitleri.....	170
6.3.2.4.	Linearite ve aralık (Linearity and Range).....	171
6.3.2.4.1.	Pantoprazol-N-Oksit grafiği.....	175
6.3.2.4.2.	Pantoprazol Sülfon grafiği	176
6.3.2.4.3.	Pantoprazol Merkapto grafiği	177
6.3.2.4.4.	Pantoprazol Na grafiği	178
6.3.2.4.5.	Pantoprazol D+F grafiği.....	179
6.3.2.4.6.	Pantoprazol Sülfid grafiği	180
6.3.2.5.	Doğruluk (Accuracy)	181
6.3.2.6.	Kesinlik (Precision)	182
6.3.2.6.1.	Tekrarlanabilirlik (Repeatability).....	182
6.3.2.6.2.	Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility).....	183
6.3.2.7.	Sağlamlık (Robustness)	185
6.3.2.7.1.	Solüsyon stabilitesi	185
6.3.2.7.2.	Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters).....	187
6.4.	Metotların Performans Maliyet Kıyaslamaları	194
7.	SONUÇ ve TARTIŞMA	196

8.	KAYNAKLAR	204
9.	ÖZGEÇMİŞ	216

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

ACN	: Asetonitril
ECL	: Enterochromaffin-like
EP	: (European Pharmacopoeia) Avrupa Farmakopesi
FDA	: (Food and Drug Administration) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GÖRH	: Gastroözofageal reflü hastalığı
H₂RA	: Hidrojen reseptör antagonistleri
HPLC	: (High Pressure Liquid Chromatography) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
GC	: (Gas Chromatography) Gaz Kromatografisi
ICH	: (International Committee of Harmonization) Uluslararası Harmonizasyon Komitesi
k'	: Kapasite faktörü
LOD	: (Limit of Detection) Tayin alt sınırı
LOQ	: (Limit of Quantification) Kantitatif alt sınır
N	: Teorik plaka sayısı
N	: Normalite
Hp	: <i>Helicobacter pylori</i>
R	: Rezolüsyon
I*	: Korelasyon katsayısının karesi
RSD	: (Relative Standard Deviation) Bağıl standart sapma
RT	: (Retention Time) Tutulma zamanı

- T** : (Tailing) Kuyruklanma
- PPI** : Proton pompa inhibitörü
- UV** : Ultraviyole
- NSAİİ** : (Non-steroid antiinflamatuvar ilaç) Steroid olmayan ödem giderici ilaçlar
- GİS** : Gastrointestinal sistem
- DMF** : (Drug Master File) İlaç Ana Dosyası
- WHO** : (World Health Organization) Dünya Sağlık Örgütü
- PGE2** : (Prostaglandin E2) Düz kas gevşemesine yardımcı hormon
- H⁺/K⁺-ATPaz** : (Hydrogen potassium ATPase) Mide asidi HCl'i oluşturan enzim
- TKP** : Toplum Kaynaklı Pnomoni
- İF** : B1–intrinsik faktör
- DMSO** : Dimetil Sülfoksit
- DAD** : (Diode array detector) Diyot Dizi Dedektörü
- USP** : (United States Pharmacopeia) Birleşik Devletler Farmakopesi
- GC–MS** : (Gas Chromatography Mass Spectrometry) Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi
- LC-MS** : (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi
- Ar-Ge** : Araştırma Geliştirme
- m-CPBA** : (Meta-Chloroperoxybenzoic acid) Meta-Kloroperoksibenzoik asit

IV. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4. 1. Pantoprazol Na çözünürlük verileri	26
Tablo 4. 2. ¹³ C-NMR spektrum rezonans bantları	30
Tablo 4. 3. Pantoprazol Na ¹³ C-NMR Spektrum	32
Tablo 4. 4. Avrupa Farmakopesi metodunda stres altında pik saflığı sonuçları	34
Tablo 4. 5. Avrupa Farmakopesi metodunda stres altında safsızlık sonuçları	34
Tablo 5. 1. Doğrusallık raporlama limitleri	97
Tablo 5. 2. Geri kazanım kabul limitleri	101
Tablo 5. 3. Tekrarlanabilirlik için bağıl standart sapma limitleri	104
Tablo 5. 4. Arakesinlik parametresi kabul limitleri	104
Tablo 5. 5. Sağlamlık parametresi standart kabul kriterleri	106
Tablo 5. 6. Sağlamlık parametresi numune kabul kriterleri	106
Tablo 5. 7. Analiz şartlarındaki değişiklik için koşul tablosu	107
Tablo 6. 1. Metot denemeleri akış değişim programı 1	110
Tablo 6. 2. Seçicilik parametresi standart tekrarlanabilirliği	130
Tablo 6. 3. Pantoprazol Na HPLC safsızlık tayini sonuçları	131
Tablo 6. 3. 1. Bozundurma şartları	135
Tablo 6. 3. 2. Stres numuneleri analiz sonuçları	135
Tablo 6. 3. 3. Stres numuneleri pik saflığı sonuçları	135
Tablo 6. 3. 4. Kantitasyon limiti standardı tekrarlanabilirliği	136
Tablo 6. 3. 5. Kantitasyon standardı S/N değerleri	137
Tablo 6. 3. 6. Dedeksiyon limiti standardı tekrarlanabilirliği	137
Tablo 6. 3. 7. Dedeksiyon standardı S/N değerleri	138
Tablo 6. 3. 8. LOQ Standart tekrarlanabilirliği	139
Tablo 6. 3. 9. %50 Standart tekrarlanabilirliği	139
Tablo 6. 3. 10. %80 Standart tekrarlanabilirliği	140
Tablo 6. 3. 11. %90 Standart tekrarlanabilirliği	140
Tablo 6. 3. 12. %100 Standart tekrarlanabilirliği	140

Tablo 6. 3. 13. %110 Standart tekrarlanabilirliği	141
Tablo 6. 3. 14. %120 Standart tekrarlanabilirliği	141
Tablo 6. 3. 15. %150 Standart tekrarlanabilirliği	141
Tablo 6. 3. 16. Tekrar uygulanabilirlik standart tekrarlanabilirliği	151
Tablo 6. 3. 17. Tekrar uygulanabilirlik safsızlık sonuçları	151
Tablo 6. 3. 18. Tekrar uygulanabilirlik ve kesinlik karşılaştırma tablosu	152
Tablo 6. 3. 19. Standart alan değişim tablosu	153
Tablo 6. 3. 20. Standart stabilite RSD tablosu	153
Tablo 6. 3. 21. Standart stabilite alan yüzde değişim tablosu	154
Tablo 6. 3. 22. Numune stabilite % safsızlık sonuçları	154
Tablo 6. 3. 23. Numune stabilite RSD sonuçları	154
Tablo 6. 3. 24. Numune stabilite % değişim tablosu	154
Tablo 6. 3. 25. N-Oksit parametre değişim etkisi tablosu	156
Tablo 6. 3. 26. Sülfon parametre değişim etkisi tablosu	157
Tablo 6. 3. 27. Merkapto parametre değişim etkisi tablosu	158
Tablo 6. 3. 28. Pantoprazol Na parametre değişim etkisi tablosu	159
Tablo 6. 3. 29. D+F 1 parametre değişim etkisi tablosu	160
Tablo 6. 3. 30. D+F 2 parametre değişim etkisi tablosu	161
Tablo 6. 3. 31. Sülfid parametre değişim etkisi tablosu	162
Tablo 6. 3. 32. UPLC Seçicilik standart tekrarlanabilirliği	163
Tablo 6. 3. 33. UPLC Metodu safsızlık sonuçları	163
Tablo 6. 3. 34. UPLC Seçicilik bozundurma şartları	167
Tablo 6. 3. 35. UPLC Seçicilik bozundurma safsızlık sonuçları	168
Tablo 6. 3. 36. UPLC Seçicilik bozundurma pik saflıkları	168
Tablo 6. 3. 37. UPLC Kantitasyon standardı tekrarlanabilirliği	169
Tablo 6. 3. 38. UPLC Kantitasyon standardı S/N tablosu	170
Tablo 6. 3. 39. UPLC Dedeksiyon standardı tekrarlanabilirliği	170
Tablo 6. 3. 40. UPLC Dedeksiyon standardı S/N tablosu	171
Tablo 6. 3. 41. Kantitasyon standardı tekrarlanabilirliği	172
Tablo 6. 3. 42. %50 Standart tekrarlanabilirliği	172

Tablo 6. 3. 43. %80 Standart tekrarlanabilirliği	173
Tablo 6. 3. 44. %90 Standart tekrarlanabilirliği	173
Tablo 6. 3. 45. %100 Standart tekrarlanabilirliği	173
Tablo 6. 3. 46. %110 Standart tekrarlanabilirliği	174
Tablo 6. 3. 47. %120 Standart tekrarlanabilirliği	174
Tablo 6. 3. 48. %150 Standart tekrarlanabilirliği	174
Tablo 6. 3. 49. LOQ Spike % geri kazanım tablosu	181
Tablo 6.3. 50. %100 Spike geri kazanım tablosu	181
Tablo 6. 3. 51. %150 Spike geri kazanım tablosu	182
Tablo 6. 3. 52. Numune tekrarlanabilirliği	182
Tablo 6. 3. 53. Tekrar uygulanabilirlik standart tekrarlanabilirliği	183
Tablo 6. 3. 54. Tekrar uygulanabilirlik safsızlık sonuçları	183
Tablo 6. 3. 55. Tekrar uygulanabilirlik ve kesinlik karşılaştırma tablosu	184
Tablo 6. 3. 56. Standart alan değişim tablosu	185
Tablo 6. 3. 57. Standart stabilite RSD tablosu	185
Tablo 6. 3. 58. Standart stabilite alan yüzde değişim tablosu	186
Tablo 6. 3. 59. Numune stabilite safsızlık değişim tablosu	186
Tablo 6. 3. 60. Numune stabilite % RSD tablosu	186
Tablo 6. 3. 61. Numune stabilite % değişim tablosu	186
Tablo 6. 3. 62. Pantoprazol-N-Oksit parametre değişim etkisi tablosu	188
Tablo 6. 3. 63. Pantoprazol Sülfon parametre değişim etkisi tablosu	189
Tablo 6. 3. 64. Pantoprazol Merkapto parametre değişim etkisi tablosu	190
Tablo 6. 3. 65. Pantoprazol Na parametre değişim etkisi tablosu	191
Tablo 6. 3. 66. Pantoprazol D+F parametre değişim etkisi tablosu	192
Tablo 6. 3. 67. Pantoprazol Sülfid parametre değişim etkisi tablosu	193
Tablo 7. 1. HPLC Alıkonma zamanları	197
Tablo 7. 2. UPLC Alıkonma zamanları	197
Tablo 7. 3. HPLC metodu ayırım verileri	199
Tablo 7. 4. UPLC metodu ayırım verileri	199
Tablo 7. 5. Pandey ve arkadaşlarına ait metodun LOD ve LOQ değerleri	199

Tablo 7. 6. HPLC metodu LOD ve LOQ değerleri	199
Tablo 7. 7. UPLC metodu LOD ve LOQ değerleri	200
Tablo 7. 8. Yıllık metot sarfiyatları	203

V. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4. 1. Pantoprazol	21
Şekil 4. 2. Pantoprazol Na ¹ H-NMR Spektrumu	29
Şekil 4. 3. Pantoprazol Na ¹³ C-NMR Spektrumu	30
Şekil 4. 4. Pantoprazol Kütle Spektrumu.....	31

VI. RESİMLER LİSTESİ

Resim 6. 1. Metot denemesi örnek kromatogram 1	110
Resim 6. 2. Metot denemeleri akış değişim programı 2	111
Resim 6. 3. Metot denemesi örnek kromatogram 2	111
Resim 6. 4. Metot denemeleri akış değişim programı 3	112
Resim 6. 5. Metot denemesi örnek kromatogram 3	112
Resim 6. 6. Metot denemeleri akış değişim programı 4	113
Resim 6. 7. Metot denemesi örnek kromatogram 4	113
Resim 6. 8. Metot denemeleri akış değişim programı 5	114
Resim 6. 9. Metot denemesi örnek kromatogram 5	114
Resim 6. 10. Metot denemeleri akış değişim programı 6	115
Resim 6. 11. Metot denemesi örnek kromatogram 6	115
Resim 6. 12. Metot denemeleri akış değişim programı 7	116
Resim 6. 13. Metot denemesi örnek kromatogram 7	116
Resim 6. 14. Metot denemeleri akış değişim programı 8	117
Resim 6. 15. Metot denemesi örnek kromatogram 8	117
Resim 6. 16. 4,6 x 150mm 1,8µ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi akış değişim programı	120
Resim 6. 17. 4,6 x 150mm 1,8µ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı.	120
Resim 6. 18. 4,6 x 150mm 3,0µ Hypersil Gold Thermo Separation kolon denemesi akış değişim programı.	121
Resim 6. 19. 4,6 x 150mm 3,0µ Hypersil Gold Thermo Separation kolon deneme kromatogramı.	121
Resim 6.20. 4,6 x 250mm 5,0µ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi akış değişim programı	122
Resim 6.21. 4,6 x 250mm 5,0µ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı.	122

Resim 6. 22. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi standart enjeksiyonu akış değişim programı	123
Resim 6. 23. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı standart enjeksiyonu	123
Resim 6. 24. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na sistem uygunluğuna ait kolon denemesi akış değişim programı.....	124
Resim 6. 25. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na sistem uygunluk kromatogramı	124
Resim 6. 26. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na karışım standardına ait kolon denemesi akış değişim programı.....	125
Resim 6. 27. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na karışım standardına ait kromatogram.....	125
Resim 6. 28. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Piridin HCl kromatogramı	126
Resim 6. 29. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Merkaptol kromatogramı.....	126
Resim 6. 30. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na kromatogramı.....	126
Resim 6. 31. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Sülfon-N-Oksit kromatogramı.....	127
Resim 6. 32. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Sülfon kromatogramı.....	127
Resim 6. 33. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş D+F kromatogramı	127
Resim 6. 34. 4,6 x 250mm 5,0 μ Thermo Separation Hypersil akış değişim programı .	128
Resim 6. 35. 4,6 x 250 5,0 μ Thermo Separation Hypersil seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş karışım standardı kromatogramı.....	128
Resim 6. 36. 4,6 x 250mm 5,0 μ Phenomenex C ₈ akış değişim programı	129

Resim 6. 37. 4,6 x 250mm 5,0 μ Phonemenex C ₈ kolonu seyreltme çözültisi 1 ile çözülmüş karışım standart kromatogramı.....	129
Resim 7. 1. Pandey ve arkadaşlarına ait metot kromatogramı.....	197
Resim 7. 2. Avrupa Farmakopesi metodu pik tanımlama standardı.....	198
Resim 7. 3. HPLC metodu pik tanımlama standardı	198
Resim 7. 4. UPLC metodu pik tanımlama standardı	198

1. ÖZET

Pantoprazol Sodyum Safsızlıklarının Tayini

Yüksek Lisans Öğrencisi: Engin Öztürk

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşen Kurt Cücü

Anabilim Dalı: Analitik Kimya

Amaç: Çalışmada, Pantoprazol Sodyum aktif ilaç bileşenine ait safsızlık tayini metotları geliştirilmesi ve bu metotların EP (European Pharmacopoeia) metodundan daha kısa sürede sonuç vermesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: HPLC cihazında Agilent Zorbax SB Phenyl C₁₈ (4,6 x 250 mm 5,0 µm) kolon UPLC cihazında ise Restek Ultra Biphenyl C₁₈ (2,1 x 100 mm 3,0 µm) kolon kullanıldı. Bu çalışma sırasında potasyum dihidrojen fosfat ve dipotasyum hidrojen fosfat ile hazırlanan tampon ile asetonitrilin 65:35(v:v) karışımı mobil faz ve çözücü olarak kullanıldı. Akış hızları HPLC için 1,0 mL dk⁻¹ ve UPLC için 0,25 mL dk⁻¹ olan metotlarda 290 nm ve 305 nm dalga boylarında analizler yapıldı.

Bulgular: Metot geliştirme denemelerinde kullanılan silica C₁₈ ve C₈ kolonlar ile sağlıklı bir ayırım sağlanamamış veya bazı safsızlıklar kromatogramlarda saptanamamıştır.

Sonuç: Safsızlık tayini için geliştirilen analitik metodların analiz süreleri, EP (European Pharmacopoeia) metoduna göre daha iyidir. EP (European Pharmacopoeia) metoduna göre; geliştirilen HPLC metodu 15 dk, UPLC metodu ise 30 dk daha kısadır. Geliştirilen bu metodların validasyonu kabul kriterleri sağlanarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Phenyl kolon, Analiz süresi, Metot, Validasyon, EP (European Pharmacopoeia)

2. SUMMARY

Determination of Pantoprazole Sodium Impurities

Msc Student: Engin Öztürk

Supervisor: Asst. Assoc. Dr. Ayşen Kurt Cücü

Department: Analytical Chemistry

Objective: In this study, the method for determination of impurities were developed for the active pharmaceutical ingredient of Pantoprazole Sodium and these methods was intended to give the results in less time than Ph. Eur. (European Pharmacopoeia) method.

Material and Methods: HPLC and UPLC studies were performed by Agilent Zorbax SB Phenyl C₁₈ (4,6 x 250 mm 5 µm) and Restek Ultra Biphenyl C₁₈ (2,1 x 100 mm 3,0 µm) columns and buffer (potassium dihydrogen phosphate and dipotassium hydrogen phosphate) and acetonitrile in 65:35 (v/v) ratio was used as mobile phase and dilution solution. The flow ratios were 1,0 mL min⁻¹ for HPLC and 0,25 mL min⁻¹ for UPLC and the elution was monitored at 290 nm and 305 nm.

Results: During the method development studies, good separation (resolution) could not be achieved or some impurities could not be detected in the chromatogram obtained with silica C₁₈ and silica C₈ columns.

Conclusion: The analysis times of developed methods for determination of impurities are better than Ph. Eur. (European Pharmacopoeia) method. HPLC method was less 15 min. than Ph. Eur. (European Pharmacopoeia) method and UPLC method was less 30 min. than Ph. Eur. (European Pharmacopoeia) method. Analytical method validation was performed for these developed method by meeting the acceptance criterias.

Key words: Phenyl column, analysis time, Method, Validation, EP (European Pharmacopoeia)

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Pantoprazol, bir süstitüye benzimidazol olup, selektif proton pompası inhibitörüdür. Pariyetal hücrelerin proton pompalarına spesifik etkisi ile midede hidroklorik asit salgılanmasını inhibe eder. İlaçlarda pantoprazol sodyum halinde kullanılır.

Pantoprazol sodyum safsızlıklarının tayini, ilaç saflığının üretim proseslerinde yüksek düzeylere ulaşması ve insan sağlığını tehdit edebilecek safsızlıklarının düşük limitlerde tutulması için önemli bir analizdir.

Günümüzde kullanılan EP (European Pharmacopoeia) metodunda 5 safsızlık tayini yapılabilmektedir. Bu metotla 45 dakikada analiz tamamlanmaktadır. Biz bu çalışmada daha fazla safsızlığı daha kısa sürede analiz edebilmek amacıyla farklı metotlar geliştirmeyi ve bu metotları valide etmeyi amaçlıyoruz.

Bu çalışmalar aynı zamanda iki farklı analitik teknolojinin performans maliyet kıyaslaması temeline de oturtulacaktır. Yeni teknoloji ürünü UPLC cihazlarının HPLC cihazlarına olan üstünlükleri bu metot geliştirme ve validasyon çalışmaları esnasında değinilecek unsurlardan biri olarak çalışmada yerini alacaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Proton Pompa İnhibitörleri (PPI)

Proton pompa inhibitörleri (PPI) dünyada ve ABD’de olduğu gibi, Türkiye’de de en çok reçetelenen ilaçların başında gelmektedir. 2012 yılı içerisinde, Türkiye’de 1 yılda toplam 31 342 307 adet, 1 ayda 2 576 080 adet, 1 günde 85 869 adet, PPI reçetesi yazılmıştır (IMS Dataview, 2012).

Mide fizyolojisi ile ilgili çalışmalar yaklaşık olarak 2 asır önce başlamış ve midede asidin varlığı bulunmuştur. Bunu takiben mide asidi ve bunun yaptığı peptik aktivite ile ilgili olan asitpeptik hastalıklar dediğimiz, peptik ülser, gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH) gibi hastalıkların oluşması için asit varlığının gerekli olduğu anlaşılmış ve takiben mide boşluğundaki asidin nötralize edilmesi ile bu hastalıklar tedavi edilmeye çalışılmıştır.

1972 yılında mide dokusundaki hücrelerde bulunan histamin-2 reseptörlerine karşı antagonist (H_2RA) geliştirilmesi asit-peptik hastalıkların tedavisinde ilk devrim olmuştur (Black ve ark., 1972). Bu devrimi takiben 1980’lerin başlarında proton pompasının keşfi ve 1988’de ilk PPI olan omeprazolün kullanılması ile asit-peptik hastalıkların tedavisinde ikinci devrim yaşanmıştır. Günümüze kadar lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol, esomeprazol ve dekslansoprazol geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur.

PPI’lerinin klinik kullanıma sunulması, gerçekten mide asidinin üretiminin baskılanmasında en büyük ilerlemedir. PPI’lerinin hasta tedavisinde çok iyi sonuçlar vermesinin yanında, tehlikeli ve istenmeyen etkilerde yapabilir.

Kullanım süresi kısa olduğunda pantoprazole ve rabeprazol'un birkaç üstünlüğü dışında hepsi aynı etkiyi gösterir. Bu kısa süreli kullanımda, diğerlerine nazaran pantoprazol ve rabeprazol hızlı ve güçlü etki gösterir.

PPI'leri günümüzde tüm dünyada, başta yemek borusunun mide asidi tarafından tahribatı sonucu oluşan reflü hastalığı olmak üzere mide asidiyle ilişkili tüm hastalıklarda yaygın olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kullanım alanları arasında reflü, peptik ülser, yemek borusu iltihabı , Helikobakter pilori (Hp) tedavisinde, steroid olmayan ödem giderici ilaçlara bağlı gastrik ülser riskinin azaltılması, ülser dışı şişkinlik, yoğun bakım hastalarında mide kanama riskinin azaltılması ve Zollinger-Ellison sendromu sayılabilir.

4.1.1. Mide asidinin salgılanmasının fizyolojisi ve PPI'lerinin farmakolojisi

Mide asidi; hem istirahatte hem de gıda alınması ile, mide dokusuna ait hücrelerin yüzeyindeki, asetilkolin, gastrin ve histaminlerin, kendi spesifik reseptörlerine bağlanması sonucu, sinirsel, hücrel ve hormonal uyarıyı takiben salınırlar. Asit salınımında asetilkolin, gastrin ve histamin salgılamayı aktive ederken, PGE₂ ve somatostatin inhibitör etkilidir.

Sırasıyla hücre içi ileti sistemi, asit üretimindeki paryetal hücrelerin, protein kinaz oluşum ve aktivasyonuna yol açarak aktive olur. Böylece hücre içi hidrojen iyonları ile hücre dışındaki potasyum iyonları yer değiştirir (Metz ve Yang, 2010; Schubert ve Peura, 2008).

Daha düşük pH, asit salınımı uygun bir dengede idame ettirmek için karşılıklı bir etki mekanizmasını aktive eder. Özet olarak, antral G hücrelerinden salgılanan gastrin, mide asit salgısını uyarır, gastrin bunu paryetal hücreleri direkt olarak etkileyerek ya da ECL hücrelerinden histamin açığa çıkmasına yol açarak gerçekleştirir. Gastrin, ECL

hücreleri ve paryetal hücreler üzerinde etki yapar. Gastrin asit salgılamasına yol açarken midede asidite arttığı zaman negatif feedback mekanizma ile gastrin salgınımı inhibe olur. Artan asidite D hücrelerinden somatostatin salgılamasına yol açar. Somatostatin de salgısal etki ile G hücrelerini inhibe eder. PPI'leri ile asit salgınımı bloke edilince negatif feedback mekanizması yıkılır ve gastrin salgınımı inhibe edilemez sonuçta hipergastrinemi meydana gelir.

Tüm PPI'leri genelde benzer özelliklere sahiptirler. PPI'leri paryetal hücredeki proton pompasında bulunan H^+/K^+ -ATPaz'ı inhibe ederek mide asidini inhibe ederler. Dolayısıyla parietal hücredeki reseptörlerden (asetilkolin, gastrin ve histamin) hangisi uyarılırsa uyarılsın etkili olur ve bazal ya da gıda alımı ile salınan asidi inhibe etmektedirler. İlaç kısa ömürlü olmasına rağmen, H^+/K^+ -ATPaz'ı dönüşümsüz olarak inhibe ettikleri için etkisi uzun süre devam eder. Bu nedenle hastalarda günde tek doz yeterli olmaktadır. Tekrarlanan çift dozlar asit inhibisyonunu daha fazla artırmaktadır. Bir hafta boyunca çift doz verilen PPI mide asidini %99 oranında azaltmaktadır. PPI'leri proton pompaları aktif oldukları zaman dilimi içerisinde etkileri daha fazla olmaktadır. Bu sebeple proton pompalarının %5'inin aktif olduğu açlık dönemi yerine, %70'i aktif hale geldiği yemek sonrası dönem dikkate alınmalıdır. Bu nedenle PPI'lerinin yemekten 20 dakika önce alınmaları klinik olarak tavsiye edilir. Günde tek doz kullanılacaksa, sabah kahvaltı öncesi alınması etkili bir şekilde tesir etmesini sağlayacaktır (Sharma ve ark., 1984; Wolfe ve Sachs, 2000; Heidelbaugh ve ark.,2012).

Tüm PPI'lerinin etkileri genelde benzer olmalarına karşın, ilk keşfedilen PPI'lerinin (omeprazol, lansoprazol) bazı kısıtlayıcı özellikleri vardır. Hastalarda farklı etkinlik derecelerine sahip olup diğer ilaçlarla istenilmeyen etkiler gösterebilirler. Yeni geliştirilen PPI'leri (pantoprazol, esomeprazol ve rabeprazol, dekslansoprazol) birçok önemli farmakokinetik üstünlüğe sahiptirler. Düşük oksidatif karaciğer yükü, parietal hücrelerde homojen dağılım gibi özellikler pantoprazol ve özellikle rabeprazolde öne çıkmaktadır. Rabeprazol ve pantoprazol'ün ilaç etkileşimleri açısından çok daha düşük risk taşımaktadırlar. Rabeprazolün vücuttan atılımı, bu sınıftaki diğer ilaçlara göre CYP2C19 enzim sistemine daha az bağımlıdır. Ayrıca rabeprazol ve pantoprazol diğer PPI'lerine göre, daha hızlı mide asit inhibisyonu yaparlar. En güçlüsü rabeprazol'dür

(De Korwin ve ark., 2004). PPI'lerinin yarılanma ömürleri kısadır. Ortalama 1-1,5 saattir. Fakat asit salınımı için yeni proton pompa sentezinin gerekliliğinden dolayı etkileri 24 saat sürebilir. Bütün PPI'leri hepatik P-450 CYP2C19, CYP3A4 enzimatik sistemlerinin etkisi ile karaciğerden elimine edilirler.

Proton pompa inhibitörlerinin uzun dönem kullanılmaları iyi etkilerinin yanısıra kötü yan etkilerinde olduğu gerçeği unutulmamalıdır.

4.1.2. Proton pompa inhibitörlerinin kullanımını teşvik eden olumlu yanları

1. 20. yüzyılda tıptaki en önemli keşiflerden birisidir.
2. Dünyada en sık reçete edilen ilaçlar sıralamasında antibiyotik ve statinlerden sonra üçüncü sıradaki ilaçlardır.
3. Etkili ve seçici şekilde gastrik asit inhibisyonu yaparlar.
4. Peptik ülser tedavisinde semptomların ve yaranın iyileşmesini sağlarlar.
5. Kanamalarda pıhtı oluşmasında, hücrenin kendini koruma mekanizmasının sağlanmasında ve idamesinde etkili bir şekilde rol alırlar.
6. Gastrik asidin değdiği mukozal bölgelerde meydana gelen, reflü, peptik ülser, eroziv özofajit, Hp enfeksiyonunda, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlara bağlı gastrik ülser tedavisinde, ülser dışı şişkinlik sendromunda, yoğun bakım hastalarında mide kanama riskinin azaltılmasında ve Zollinger-Ellison sendromunda çok güçlü ve etkili şekilde asit inhibisyonu yaparak semptom ve mukozal iyileşmede çok önemli iyi roller oynamaktadırlar.
7. Hücrenin kendini koruma sistemlerinin idamesinde ve tekrarlayan semptomların ortaya çıkmasında etkilidirler.
8. PPI'lerinin uzun süreli kullanılmalarının etkinliği ve güvenliği ispatlanmıştır.

4.1.3. Proton pompa inhibitörlerinin kullanım süresine bağlı yan etkileri

PPI kullanımının uzun süreye yayılması bazı kötü sonuçlar doğurur . Birincil olarak PPI kullananların %1-5'inde başağrısı, ishal, kabızlık, mide bulantısı ve deri döküntüsü gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadırlar. Hangi PPI'ü, hangi primer yan etkiye neden olmaktadır, bu konuda yapılmış karşılaştırmalı bir araştırma yoktur. Uzun süre PPI kullanılması ile bazı potansiyel ikincil yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkilerin, kontrol altında tutulabilmesi için uzun süre PPI kullanan hastaların belli aralıklarla takip edilmesi ve gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

4.1.3.1. Tümör oluşumuna etkileri

PPI kullanılması asit salgılanmasının azalmasına yol açar. Bu da somatostatin salınımını azaltır. Gastrinin G-hücrelerinden salınımı artar ve hipergastrinemi meydana gelir. Bu fizyolojik olay, midede bulunan G hücreleri, besinler ya da gerilmeye karşı cevap olarak, gastrin hormonu salgılanır. Gastrin, midede bulunan paryetal hücreleri uyararak asit salınımına neden olur. Salınan asit antrumdaki D hücrelerini uyarır ve bu da somatostatin salınımına neden olur. Somatostatin ise G hücrelerinde salınımı negatif yönde etkiler. Asidin yokluğunda G hücrelerinin inhibisyonu ortadan kalkar. Bu nedenle serum gastrini yükselir. PPI'ler asit inhibisyonu da asit salınımındaki negatif feedback mekanizmasını ortadan kaldırdığı için hipergastrinemi gelişmesine neden olabilir. PPI ile 2 haftalık tedavide serum gastrin seviyesi normalin 2-4 katına çıkabilir. Yükselen gastrin seviyeleri tedavinin kesilmesini takip eden 4 haftada normale dönmektedir. Bu durum PPI tedavisine özgü değildir. H₂RA kullanımında da görülebilmekte ancak yükseliş daha az olmaktadır.

Normal şartlarda midede pH 1-1,5 olup yiyecek içeceklerle alınan bakterilerin, mide ve ince bağırsakta kolonize olmalarına imkan vermez. Mide asit bariyeri, PPI'leri ile yapılan tedavilerden sonra bozulur. Midede bakteri kolonizasyonu ve enfeksiyon gelişimi kolaylaşır. Bakteriler nitratları nitritlere indirger, onlar da aminlerle birleşerek nitrozaminleri oluşturur. N-nitrozamin kanserojen olarak kabul edilmektedir. Uzun süre PPI kullanımına bağlı olarak, gerek bakteriyel aşırı gelişim riski sonucu nitrozaminlerin artışı, gerekse de hipergastrineminin gastrointestinal etkisinin kanser gelişimine neden olabileceği akla gelmektedir. Bu nedenle PPI'nin uzun süreli kullanımı sürekli endişelere neden olmaktadır. Uzun süre PPI kullanan bazı hastalarda mide fundusunda kansere meyilli dokuların gelişebileceği bilinmektedir. Geçmişe dönük bir çalışmada yaklaşık 3 yıl PPI kullanmış hastaların %7-10'unda bu kansere meyilli dokuların varlığı gösterilmiştir. Bu dokular iyi huyludur ve PPI kesilince gerilerler (Blanchi ve ark., 2008; Choudry ve ark., 1998).

Uzun süre PPI kullanılmasının, ECL hücre büyümesine yol açarak, insanlarda karsinoid tümör gelişebileceğine dair şüpheler uzun zamandır vardır. Gerçekte uzun süreli PPI kullanılması, ECL hücrelerinde büyüme ve hipergastrinemi ile sonuçlanabilir. Hipergastrinemi, uzun süreli PPI kullanılması ile oluşan nöroendokrin tümör gelişimi ile oluşan kaygıların artmasına sebep olmaktadır. Uzun süre PPI kullanımı ile gastrik karsinoid tümör geliştiği görülmüştür (Modlin ve ark., 2004). Uzun süre PPI kullanan hastaların toplumsal çalışmalarında bu nadir görülen tümörlerin oranında bir artış olmasına rağmen, PPI'lerinin insanlarda böyle bir etkisinin olup olmadığını değerlendirecek bir araştırma yoktur. Gastrik karsinoidler son derece nadir tümörlerdir. Bu artışa paralel olarak bu tümörde artış olduğunu gösteren araştırmalar da vardır (Hodgson ve ark., 2005; Chubineh ve Birk, 2012). Bu ilişkinin olup olmadığını ortaya koyacak çok geniş araştırmaya ihtiyaç vardır. Son yapılan araştırmalarda, reflü nedeniyle 12-15 yıl boyunca PPI kullanan hastalarda, hipergastrineminin diğer nedenlerinde olduğu gibi, PPI kullanımına bağlı oluşan hipergastrinemide de, insanlarda ve kemirgenlerde ECL hücre karsinoidlerinde ve gastrik kanserde artış olduğu tespit

edilmiştir (Jianu ve ark., 2012). Burada oluşan kanser riskinin, asit inhibisyonu için gereken etki ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. PPI kullanılmasını gerektiren özofagustaki endikasyonlar, özofagus kanser riskini; peptik ülser endikasyonları ise, kardiya dışı gastrik kanser riskini artırmaktadırlar. Burada oluşan kanser ilişkisinde, bu ajanların harap edici ya da zarar verici etkisinden ziyade, altta yatan tedavi etkisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan, beş yıl süre ile GÖRH'nın idame tedavisinde, 10 ve 20 mg rabeprazol ve 20 mg omeprazol kullanan hastalar karşılaştırılmış, 5 yıl boyunca özellikle rabeprazol güvenli ve tolere edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Teorik olarak, PPI kullanımına sekonder gelişen hipergastrinemili hastalarda, bu tümörlerin artmış olacağı kabul edilmesine rağmen, yukarıdaki yayınların aksine, 5 yıl boyunca ECL hücrelerde, mide biyopsi kontrollerinde herhangi bir artış olmadığı gözlenmiştir (Thjodleifsson ve ark., 2003).

Uzun süre PPI kullanılması ile kanser ilişkisinin tartışıldığı diğer bir konu Hp'dir. Hp'ye bağlı kronik gastritli hastaların yaklaşık %1'inde mide kanseri gelişir. Hp enfeksiyonu mide mukozası iltihabı (atrofik gastrik) gelişimine neden olan başlıca faktördür. Atrofik gastrit ise adenokansere neden olabilmektedir. Uzun süre PPI kullanılması, asit dengesinin değişmesine ve gastritin başka bölgelere göçmesine neden olmaktadır (Solcia ve ark., 1994). Bu göçüş asit inhibisyonunun olduğu bölgedir. Bu bölgedeki inflamasyon atrofiye neden olabilir. Bir çalışmada PPI kullanan hastalarda Hp enfeksiyonu var ise bu hastalarda atrofi geliştiği gösterilmiştir (Kupier ve ark., 1995). Bu çalışma ile Hp enfeksiyonu olanlarda uzun süre asid inhibisyonun sakıncalı olabileceği, bu nedenle uzun süre PPI tedavisi öncesi Hp varlığının ortadan kaldırılması gerektiği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Ancak daha sonra yapılan iki çalışmada bu durum doğrulanmamış, uzun süreli PPI kullanımının Hp pozitif vakalarda atrofiyi hızlandırmadığı görülmüştür (Kuipers ve ark., 1996; Lundell ve ark., 1999). Bu konu halen tartışılmaktadır ve bu konuda fikir birliği olmamakla birlikte uzun süre PPI tedavisi almak zorunda olanlarda Hp riskinin ortadan kaldırılması akılcı bir yaklaşım olarak önerilmektedir (Malfertheiner ve ark., 2012).

Bazı hayvan çalışmalarında, gastrinin kolon mukozasında yıpratıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Buna dayanılarak, uzun süreli PPI kullanımının insanda kolon kanseri gelişimine neden olabileceği düşünülmüştür. Hiper gastrinemi-kolon kanser ilişkisi konusunda çelişkili yayınlar mevcuttur. Ancak uzun süre PPI kullananlarda kolon kanseri riskinin arttığını gösteren yayın yoktur (Creutzfeldt ve ark., 1991).

4.1.3.2. Enfeksiyonlar

4.1.3.2.1. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ve enterik enfeksiyon riskindeki artış

Ağız yoluyla alınan bakterilere karşı ilk engel mide asididir. Bu nedenle mide asidinin, PPI kullanılması ile pH'sının 4'ün üstüne yükselmesi ile ortadan kalkan asit koruyucu engel, *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare ve enterik enfeksiyonların oluşmasına neden olabilir. *Aklorhidri vibrio kolera*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Listeria* ve *Salmonella* gibi enfeksiyonlara karşı risk oluşturabilir (Heidelbaugh ve ark., 2012; Wingate ve ark., 1990; Leonard ve ark.,2007).

Mide asidi mikroorganizmaların vejetatif formunu öldürür, sporları öldüremez, ama enfeksiyon yapma şanslarını azaltır. pH 4'ün üzerine çıkınca vejetatif form ölmez. PPI ayrıca gastrointestinal (GI) florada değişiklikler yaparak *Clostridium difficile* ve diğer enterik enfeksiyon ajanlarının kolonizasyonunu kolaylaştırır. Normalde gastrik asit ve intestinal peristaltizm, üst gastrointestinal traktı bakteriyel kolonizasyondan koruyan esas faktördür. Bakteriler aslında aside çok duyarlıdır. pH 4'ün altında ise bakteriler 10 dakikadan daha uzun süre yaşayamazlar. Normalde mL'de 10 000'den daha az koloni ünitesi vardır. Hem H₂RA hem de PPI ile gastrik asit inhibe olunca, sağlıklılarda ve

peptik ülser nedeniyle tedavi gören hastalarda bakteriyel aşırı çoğalma oluşmaktadır. Mide ve ince bağırsakta oral yollardan kolonizasyonla H₂RA hem de PPI ile gastrik asit inhibe olunca, sağlıklılarda ve peptik ülser nedeniyle tedavi gören hastalarda bakteriyel aşırı çoğalma oluşmaktadır. Kolonizasyonun sıklığı ve tipi gastrik asit inhibisyonunun süresine ve derecesine bağlıdır. Derin ve uzun süre gastrik asit inhibe edilirse üst gastrointestinal traktta fekal tip bakteri aşırı çoğalması olacaktır. İnce bağırsakta fekal tip aşırı bakteri çoğalması, farklı mekanizmalarla, vitamin, mineral ve makrobesin maddelerinin absorpsiyonunu bozmaktadır. Bakteriler direkt olarak ince bağırsak mukozasını harap ederek, absorpsiyonu bozabilirler. Ayrıca bakteriler safra tuzlarını dekonjuge ederek, bağırsak mukozası ile emilim için geçen süreyi hızlandırarak lipidlerin emilimini bozabilirler ve emilim için gereken eşik değerin altında kalarak yavaş emilime yol açabilirler. Bu konuda omeprazol ile yapılmış araştırmada ince bağırsakta bakteri aşırı çoğalması tespit edilmiştir (Sarkar ve ark., 2008).

Clostridium difficile ile ilişkili diyarenin hastanede yatan hastalarda oluşması halinde, beraberinde PPI kullanılıyorsa kesilmesi ya da doz azaltılması yönünde telkinler mevcuttur. Ancak *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarenin hastane dışındaki ayaktan tedavi gören hastalarda da görülmesi üzerine, uygun endikasyonunda en düşük dozda PPI kullanılması önerilmektedir. Şayet acil etki yok ise kesilmesi önerilmektedir (Thachil ve ark.,2008; Metz ve ark., 2008). Maalesef bu konuda, hastanede yatan hastalarda oluşan *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarenin tedavisinde, PPI'nün azaltılması ya da kesilmesi noktasında karar vermek için yeterli veri yoktur. Bu konuda iyi tasarlanmış ve takip edilmiş araştırma yoktur.

İngiltere'de yapılan, 170 hastaneyi kapsayan bir çalışmada, hastanede yatan hastalarda PPI kullanılmasının, *Clostridium difficile* ile ilişkili diyareyi 2,5 kat artırdığı, beraberinde şayet değişik antibiyotikler kullanılıyorsa o zaman *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarenin 5,5 kat arttığı tespit edilmiştir (Cunningham ve ark., 2003). Kanada'da ise 6 hastanede 15 ay süren prospektif bir çalışmada, 8 hafta süre ile hastanede yatan ve beraberinde antibiyotik ve PPI alan hastalarda, *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarenin 5,25 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak H₂RA alan hastalarda kolonizasyon artmış, fakat böyle enfeksiyon görülmemiştir (Loo ve ark., 2011).

Son zamanlarda yapılan başka bir araştırmada, gastrik asidin sindirim sistemi patojenlerine karşı major bir savunma mekanizması olduğu ve azalmış mide asidinin yani artmış mide asit pH'ının normalde steril olan üst gastrointestinal sistem (GİS)'de kolonizasyona yol açabileceği ve bu bariyerin bozulacağı savunulmuştur. Burada PPI ve H₂RA gibi tedavi sonucunda gastrik pH'nın artması ile lökosit fonksiyonlarının etkilendiği ileri sürölmektedir. Bunun sonucunda, gerek enterik enfeksiyonlarda, gerek *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarede, gerekse solunum sistemi enfeksiyonlarında artış olduğu ve bu enfeksiyonların daha virus kaynaklı seyrettiği tespit edilmiştir. Özellikle 65 yaş üstü hastalarda, tedavi ve beraberinde antibiyotik kullanılıyorsa ve bu hastalarda inflamatuvar bağırsak hastalığı ve renal yetmezlik varsa *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare oluşma riskinin % 2,9-% 3,7 oranında arttığı tespit edilmiştir (Dial ve ark., 2005). Birleşik Devletler'de bir şehir hastanesindeki araştırmada, 5 yıldan fazla PPI kullanan hastalarda aynı sürede, % 60'dan daha fazla oranda *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare gözlenmiştir. Bu araştırmada doz, süre ve cevap ilişkisi yoktur (Jayatilaka ve ark., 2007). Bir başka araştırmada, PPI kullanan hastalarda, *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare oluşma oranı 3 kat, H₂RA kullanan hastalar ile *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare oluşma olasılığı 2 kat, böbrek yetmezliği olan hastalarda PPI kullanımı ile *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare oluşma olasılığı 6 kat fazla bulunmuştur (Aseeri ve ark., 2008). Bütün yukarıda bahsedilen yayınlarda vurgulanan, uzun süre PPI kullanımı ile *Clostridium difficile*'nin yol açtığı diyare arasındaki ilişkinin aksine, batı Avustralya'da yapılan ve 2012'de yayınlanan bir araştırmada; hastanede yatan hastalarda, anılan diyarenin başlangıcından önce 3 aylık sürede antibiyotiğe maruz kalınması ile diyare oluşması arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğu, aynı zamanda tüm yukarıda bahsedilen bilgilere aykırı olarak, hem PPI'ünün uzun süre kullanılması, hem de kısa sürede yüksek doza maruz kalınmasıyla, *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edilmiştir (Leonard ve ark., 2012). Bu bulguyu destekleyen yayınlar da az değildir.

Hastanede yatan hastalarda, antibiyotik ve beraberinde PPI kullanılması ile gerek *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare gerekse akut viral gastroenterit ve *Campylobacter* enteriti dahil, enterik enfeksiyonlarda artış görüldüğü vurgulanmıştır (Ament ve ark., 2012; Howell ve ark., 2010; Linksy ve ark., 2010).

2012'de yayınlanan 101 796 hastayı kapsayan, hastanede yatış süresinde 665 *Clostridium difficile* ile ilişkili diyarenin meydana geldiği araştırmada; asit inhibisyonu ile doz cevap ilişkisi aşağıdaki gibidir; H₂RA kullananlarda % 53, günde 1 doz PPI kullananlarda % 74, günde 2 doz PPI kullananlarda % 40 oranında *Clostridium difficile* ile ilişkili diyare görülmüştür. Bu hastalarda antibiyotik kullanılması ve sürenin uzatılması riski sırasıyla % 0,2 ve % 1,1 artırmıştır (Kwok ve ark., 2012; Goel ve ark., 2012).

Sonuç olarak, PPI ilişkili aşırı bakteriyel çoğalma sık oluşur. PPI, özellikle uzun dönem kullanım sonrasında, hastanede yatan, inflamatuvar bağırsak hastalığı, renal yetmezliği olan hastalarda, büyük ihtimalle dozla ilişkili olarak klinik önemi olan ishal ile seyreden hastalıklara neden olur. Sırf bu şüphe bile PPI tedavisinin, endikasyonu olmadan yapılmaması gerektiğini, gereken en az dozun uygulanması gerektiğini göstermiştir. Eğer ishal gelişmiş ise ve acil kullanım zorunluluğu yoksa PPI kesilmeli veya en düşük dozda kullanılmalıdır.

4.1.3.2.2. Toplumsal kaynaklı zatürreler

PPI kullanılması ile pH artar, bu aşırı bakteriyel çoğalmaya ve akciğerlerde kolonizasyona neden olarak, toplum kökenli zatürre (TKP) riskini arttırabilir. Hollanda'da yapılan bir araştırmada; son 6 ayda PPI kullanmayan hastalarla, halen PPI kullanmakta olan hastalar karşılaştırılmış, TKP gelişim riski açısından anlamlı fark bulunmuştur. PPI almayanlarda % 0,6; PPI alanlarda ise % 2,45 olduğu tespit edilmiştir. (Sarkar ve ark., 2008). Yapılan başka bir araştırmada ise, PPI kullanılıyor olması genel olarak pnömoni riskini arttırmazken; son 30 gün içinde yeni başlanan kullanımla

beraber, zatürre riskini arttırdığı görülmüştür (Sarkar ve ark., 2008). Başka bir metaanalizde, 6 zatürre vakası değerlendirilmiştir. Bu analizde PPI kullanımı ile TKP riskinin arttığı saptanmış; alt grup analizinde ise kısa süreli PPI kullanımının TKP riskini daha çok arttırdığı, sürekli PPI kullanımında ise riskin daha düşük olduğu görülmüştür (Johnstone ve ark., 2010). Bunun aksine sonuç bildiren çalışmalarda mevcuttur.

Esomeprazol kullanan 28 000 hasta içerisinde 31 adet rastgele yapılan kontrollü çalışmadan oluşan bir metaanalizde ise esomeprazol kullanımı ile zatürre dahil herhangi bir solunum yolu enfeksiyonu gelişim riski arasında anlamlı ilişki tespit edilememiştir (Estborn ve Joelsen, 2008). Dublin ve ark.'nın çalışmalarında; 2000-2003 yılları arasında TKP tanısı almış 65-94 yaş arası, 1125 hasta 2235 kontrol vakası ile karşılaştırılmış, PPI kullanımı zatürre grubunda % 21, kontrol grubunda % 16 olarak bulunmuştur (Dublin ve ark., 2010). Aynı şekilde Sultan ve ark.'nın yaptıkları 70 rastgele kontrollü çalışmadan oluşan metaanalizde ise PPI'lerinin pnömoni riskini arttırdığına dair bir veri bulunmamıştır (Sultan ve ark., 2008). Sonuçta PPI kullanımı ile TKP arasında çok kesin bir bağ bulunmamakla birlikte, hastanede yatan hastalarda PPI kullanılması ile zatürre riski artmaktadır. PPI yakın zamanlı, 1 aydan daha az sürede özellikle zatürre tanısından 2-14 gün önce PPI kullanılması ile zatürre ilişkisini göstermektedir. Özellikle hastanede yatan hastalarda ve/veya zatürre nedeniyle tedavi gören hastalarda, PPI tedavisi planlanıyorsa yukarıda bahsi geçen verilere dayanılarak kar zarar hesabı iyi yapılmalıdır.

4.1.3.2.3. Mikroskobik kalın bağırsak iltihabı (mikroskobik kolit)

Mikroskobik kolit; kronik sulu ishal, kramp tarzı karın ağrısı, endoskopik olarak normal kolon mukozası görünümü olmasına rağmen biyopside kronik iltihaplı dışkı olması ile tanımlanır (Veress ve ark., 1995).

İki tipi vardır. Birincisi kollajenöz kolit, ikincisi lenfositik kolittir (Lindstrom, 1976). Kolitin sebebi açık değildir, önceleri immünolojik anormalliklerle ilişkilendirilmesine rağmen, daha sonra yersinia gibi enfeksiyonlar ve non-steroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ)'lar, antibiyotikler, tiklopidin, simetidin ve ranitidin gibi çeşitli ilaçlarla ilişkisi tespit edilmiştir (Cappell, 2004). Son zamanlarda, omeprazol, esomeprazol ve yoğunlukla lansoprazol kullananlarda kollajenöz kolit ve lenfositik kolit olguları vaka ve vakalar şeklinde çok sayıda bildirilmiştir (Wilcox ve Mattia, 2009; Ghilain ve ark., 2000; Wilcox ve Mattia, 2002; Thomson ve ark., 2002; Mukherjee, 2003; Rammer ve ark., 2005; Hilmer ve ark., 2006; Chande ve Driman, 2007).

4.1.3.3. Besin maddelerinin sindiriminin ve emiliminin bozulması

Besin maddelerinin sindirim ve emilinde yaşanacak problemleri şu maddeler altında toplanabilir.

1. Vitamin-B12
2. Demir
3. Kalsiyum
4. Çinko eksikliği
5. Hipofosfatemi
6. Hipomagnezemi

Yoğun ve uzun süre PPI veya H₂RA'leri ile gastrik asit inhibe edilirse, dışkı kökenli bakterilerde aşırı çoğalma olacaktır. İnce bağırsakta dışkı kökenli aşırı bakteri çoğalması, farklı mekanizmalarla, vitamin, mineral ve makrobesin maddelerinin emilimini bozmaktadır. Bakteriler direkt olarak ince bağırsak dokusunu harap ederek, emilimi bozabilirler. Ayrıca bakteriler safra tuzlarını bozar, bağırsak mukozası ile emilim için gereken temas süresini hızlandırarak, lipidlerin emilimini aksatabilirler.

Emilim için gereken eşik sürenin altında kalan bağırsaklarda emilim bozukluğu meydana gelebilir. Ayrıca vitamin B12, demir, kalsiyum, fosfor, magnezyum, çinko emiliminde de bozukluğa neden olabilirler. Asit inhibisyonu ile kalsiyum emiliminin azalması arasında ilişki tespit edilmiş ve bunun kemik kırıklarında sebebi olduğu düşünülmüştür (Recjer, 1985; O'Connell ve ark., 2005).

Uzun süre PPI kullanımı sonucundaki oluşabilecek diğer bir durum ise hipomagnezemi. 2011'de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kurumu, uzun süre PPI kullanımı sonucunda 30 ciddi hipomagnezemi bulgusu nedeniyle, doktorların bu konuda dikkatini çekmiştir. Özellikle idrar söktürücü ve kalp ritmi düzenleyen ilaçlar kullanan hastalarda dikkat edilmesi gerekir. PPI alımı durdurulunca hipomagnezemi süratle düzelmektedir.

Uzun süre PPI ile tedavi sonucunda, vitamin B12 emiliminin bozulduğunu gösteren çalışmalarda vardır. B12 vitaminini yiyeceklerden proteine bağlı halde alırız. B12'nin serbest hale gelmesi için midedeki asit ve pepsin enzimine ihtiyaç vardır. Vitamin B12 midedeki asidik ortamda, proteinlerden ayrıldıktan sonra, özellikle tükürük kaynaklı R-proteinlerine, duodenuma geçmeden midede bağlanır. Duodenumda R proteini ile B12 kompleksi pankreas kaynaklı enzimlerle çözülür, daha sonra B1-intrinsik faktör (IF) kompleksi oluşur. Bu kompleks ise bağırsağın ileum kısmında absorbe olur. Midede asit salınımı yapan paryetal hücrelerden, aynı zamanda intrinsik faktör de salgılanmaktadır. PPI'lerinin uzun süre kullanılması ile intrinsik faktör salınımı da bozulacaktır. PPI'leri uzun süre yüksek dozda kullanıldığında, B12 emilim bozukluğu geliştiğini gösteren araştırmaların karşısında, serum B12 seviyesini normal bulan karşıt görüşteki çalışmalar da mevcuttur. Genel inanış uzun süre PPI kullananlarda serum B12 seviyesinin takibinin gerektiği yönündedir (Heidelbaugh ve ark., 2012; Suter ve ark., 1991; Andres ve ark., 2004; Valuck ve ark., 2004). PPI kullanımı ile ortaya çıkan hipomagnezemi oldukça nadirdir. Fakat hayatı tehdit eden bir yan etkidir. Derhal PPI kesilmelidir (Hutchinson ve ark., 2007; Broeren ve ark., 2009; Regolisti ve ark., 2010; Cundy ve Mackay., 2011).

Tüm dünyada en sık kullanılan ilaçlardan birisi olan PPI'lerinin kullanılması ile midenin üstünde yer alan bariyer bölümünün fonksiyonunun etkilendiği

düşünülmektedir. PPI'lerinin transmukozal olarak, peptid ve proteinlerin bariyeri aşım kaçaklara sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla esomeprazolun, midenin üst tarafında bariyer fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini anlamak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Esomeprazolun etkisini değerlendirmek için, sakkaroz emilim testi kullanılmış, esomeprazolun ilk alındığı günler içinde hızlı bir şekilde, transmukozal kaçığa neden olduğu tespit edilmiş, ilaç bırakıldıktan sonra, günler içinde kaçık düzelmiştir (Mullin ve ark., 2008).

4.1.3.4. İlaç etkileşimi ve kullanılan esas ilacın etkisinin azalması

PPI'leri mide içerisinde alkaliye neden olarak ilaç absorpsiyonunu etkileyebilirler. Bazen doz ayarlanması gereken durumlar olabilir. PPI'leri sitokrom P450 (CYP) sistemini çökerterek ilaçların etkisini bozabilirler. Örneğin, ketokonazol ve demir preparatlarının emilimini azaltırlar, fenitoin, diazepam, varfarin ve digoksin emilimini artırır. Klopidoğrel (Plavix) kuvvetli bir antiplatelet ilaçtır. Aterosklerotik olaylarda, aspirinle beraber kullanılmaları tavsiye edilir. GİS kanamalarından dolayı trombosit inhibisyonu tedavisi ile beraber kanamayı durdurma amaçlı kullanılırlar. Klopidoğrel; karaciğerde sitokrom P450 2C19 (CYP2C19 ve CYP3A4) enzim sistemiyle aktif tiyol metabolitine dönüşen bir öncü ilaçtır ve aktif metabolite dönüştükten sonra trombosit yüzeyindeki P2Y12 ADP reseptörü ile inaktif disülfid bağı oluşturarak trombosit inhibisyonu etkinliğini gösterir. Akut koroner sendrom ya da böbrek taşı operasyonları sonrası uzun dönem tedavide klopidoğrel ve aspirin kombinasyon tedavisinin kullanımı tek başına aspirin kullanımından daha üstün trombosit inhibisyonu üstünlüğüne sahiptir (Sabatine ve ark., 2005). Bu ikili tedavinin en büyük yan etkisi gastrointestinal sistem kanama riskidir.

Tionopridinler sindirim sisteminde erozyon veya ülserlere sebep olmazlar, Hp, NSAİİ'lar ve aspirine bağı oluşun lezyonların kanamasına yardımcı olur. Klopidoğre kullanan hastalarda beraberinde aspirin kullanımı da varsa ve/veya daha önce GİS

kanama geçirdiyse, kortikosteroid kullanımı, 60 yaşından büyük, birlikte antikoagülan kullanımı, dispepsi ya da reflü semptomlarından en az biri varsa PPI ile gastrointestinal sistemin kanama riskine karşı korunması önerilmektedir (Chen ve ark., 2005). PPI'leri sitokrom CYP2C19 enzimi üzerinden klopidogrel'in aktif metabolitine dönüşümünde mekanizmayı inhibe eder. PPI'leri klopidogrel gibi karaciğerde aynı izoenzimler ile metabolize olmaları nedeniyle, bu ilaçların muhtemelen CYP2C19 enzim sistemi düzeyindeki ortak metabolik etkileri sonucu klopidogrel'in etkinliğini azaltır. Böylelikle dolaşım sistemi rahatsızlıkları ihtimalini riskini arttırmaları. Başta omeprazol olmak üzere PPI'lerinin, klopidogrel'in etkinliğini azaltıklarının saptanmasına karşın birkaç karşılaştırmalı çalışmada da bu yönde bir sonuç görülmemiştir. Pantoprazol ve klopidogrel'in etkinlik azalması arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Aynı şekilde rabeprazol ve pantoprazol bu konuda seçilecek PPI olabilir. Bir başka görüşde PPI'leri ile mide asidinin baskılanması sonucu klopidogrel'in emiliminin azalmasıdır (Gilard ve ark., 2008).

Karaciğerde sitokrom P450 izoenzimlerinin aktivitelerini değiştirebilen ilaç etkileşimleri klopidogrel'in etkinliğini azalttığı bilinen bir gerçektir. Bu konuda özellikle lipofilik statinler, kalsiyum antagonistleri ve PPI'leri suçlanmaktadır. İnvitro çalışmalarda sırasıyla çoktan aza doğru omeprazol, lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol ve pantoprazolle CYP2C19 enzim inhibisyonu yaptığı tespit edilmiştir. Klopidogrelle etkileşen en önemli PPI omeprazol olarak bulunmuştur; lansoprazol en güçlü CYP2C19 enzim inhibitörüdür. Fakat bu konudaki çalışmalar net bir şekilde sonuca varamamıştır. FDA klopidogrelle birlikte omeprazol ve esomeprazol kullanımını konusunda olumsuz görüş bildirmiştir (Food and Drug Administration, 2011). Klopidogrel idame tedavisi alan hastalarda PPI tedavisi konusunda değerlendirme çok dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Pantoprazol ve rabeprazol tercih edilmelidir. Rabeprazol CYP2C19 enzim sistemini çok düşük oranda inhibe eder. PPI kullanımında bu bir avantaj olabilir. Klopidogrelle etkisini azaltmaması için, PPI'lerinin sabah, klopidogrel'in ise gece kullanılması birbirlerine olan etkiyi azaltacaktır. Klopidogrel ile etkileşen tek H₂RA

simetidindir (Heidelbaugh ve ark., 2012; Abraham ve ark., 2010; Angiolillo ve ark., 2011; Hsu ve ark., 2011; Bhatt ve ark., 2010).

4.1.3.5. Uzun süreli PPI'ü kullanımının kemik kırıklarına etkisi

Son zamanlarda, uzun süre PPI'lerinin kullanılmasının kalsiyum metabolizmasını etkileyerek, kemik mineral metabolizmasını bozduğu ve osteoporoza neden olup vertebra ve kalça kırıklarına sebep olduğu kaygıları giderek artmıştır. Uzun dönem PPI kullanımının kırık riskini arttırması konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Gastrointestinal sistemdeki asidik ortam iyonize kalsiyumun, kalsiyum tuzlarından ayrılmasını sağlayarak emilmesi için kalsiyumu hazırlar. İnvitro ortamda kalsiyumun çözünmesi pH'a direkt bağlıdır. Ortamdaki pH arttıkça çözünmeside ters orantılı olarak azalmaktadır. Özellikle yüksek yaşa sahip hastalarda mide içindeki düşük klor seviyesi kalsiyum emilim bozukluğuna yol açabilir. Uzun süreli PPI kullanımı vitamin B12 düzeyinde azalmasına yol açabilmektedir. Vitamin B12, folik asit, riboflavin absorpsiyonu azalınca homosistein düzeyinde azalma görülmektedir. Bu durumun da kırık riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Gastrik paryetal hücrelerin, östrojen salgılamasında potansiyel hormon rolü mevcuttur, gastrik atrofiye salgılamada azalmaktadır. Gastrik östrojenler ghrelin üretimi ve ekspresyonunda potansiyel rolleri vardır. Ghrelin salgılamasında kemik formasyonunda önemi olduğu yadsınamaz bir gerçektir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada 13 556 kalça kırığı vakası, 135 386 kontrolle karşılaştırılmış, lojistik regresyon analizinde 1 yıldan uzun süre (maksimum 15 yıl) PPI kullanımının kalça kırığı riskini 1,44 kat arttırdığı ve PPI dozu 1,75 kat arttıkça kırık riskinin 2,65'e çıktığı tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2006). Bunun yanı sıra kalça kırığı riski ile PPI kullanımı arasında herhangi bir ilişki olmadığını gösteren geniş çaplı çalışmalar da yapılmıştır (Kaye ve Jick, 2008). Sonuçta toplumda en sık kullanılan ilaç grubu olan PPI kullanımı sadece gerekli endikasyonlarda kullanılmalı ve gereksiz

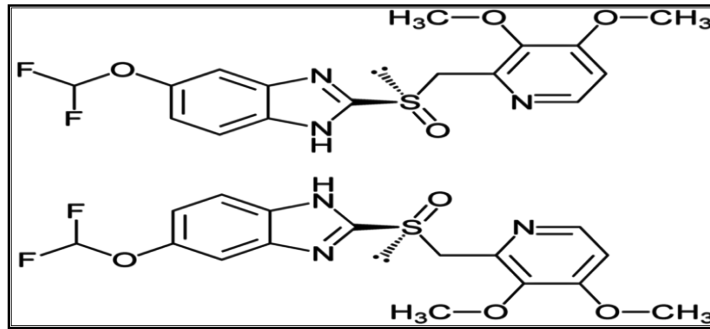
kullanımından kaçılmalıdır. Özellikle osteoporozlu hastaların uzun süreli PPI kullanması gerekiyorsa; Ca, Mg ve D vitamin düzeyleri takip edilmeli, takviye ilaçlarla eksikliğin ortadan kaldırılması gerekir (Targownik ve ark., 2010; Gray ve ark., 2010).

4.1.3.6. Kronik böbrek fonksiyon bozukluğuna etkileri

Kronik böbrek fonksiyon bozuklukları nadirdir fakat, bütün PPI'leri ile oluşabilmektedir (Ray ve ark., 2010). PPI'leri çok sayıda yemek borusu rahatsızlığında kullanılmaktadır. PPI tedavisinin yan etkisi yoktur denilemez. Uzun süre PPI tedavisi yapılırsa bu tedavi çok iyi programlanmalıdır. PPI ile yan etkileri arasındaki etki ve yan etkileri için geniş, rastgele, prospektif bir araştırmaya ihtiyaç vardır.

4.2. Pantoprazol Yapısal Özellikleri ve Sentez Yolu

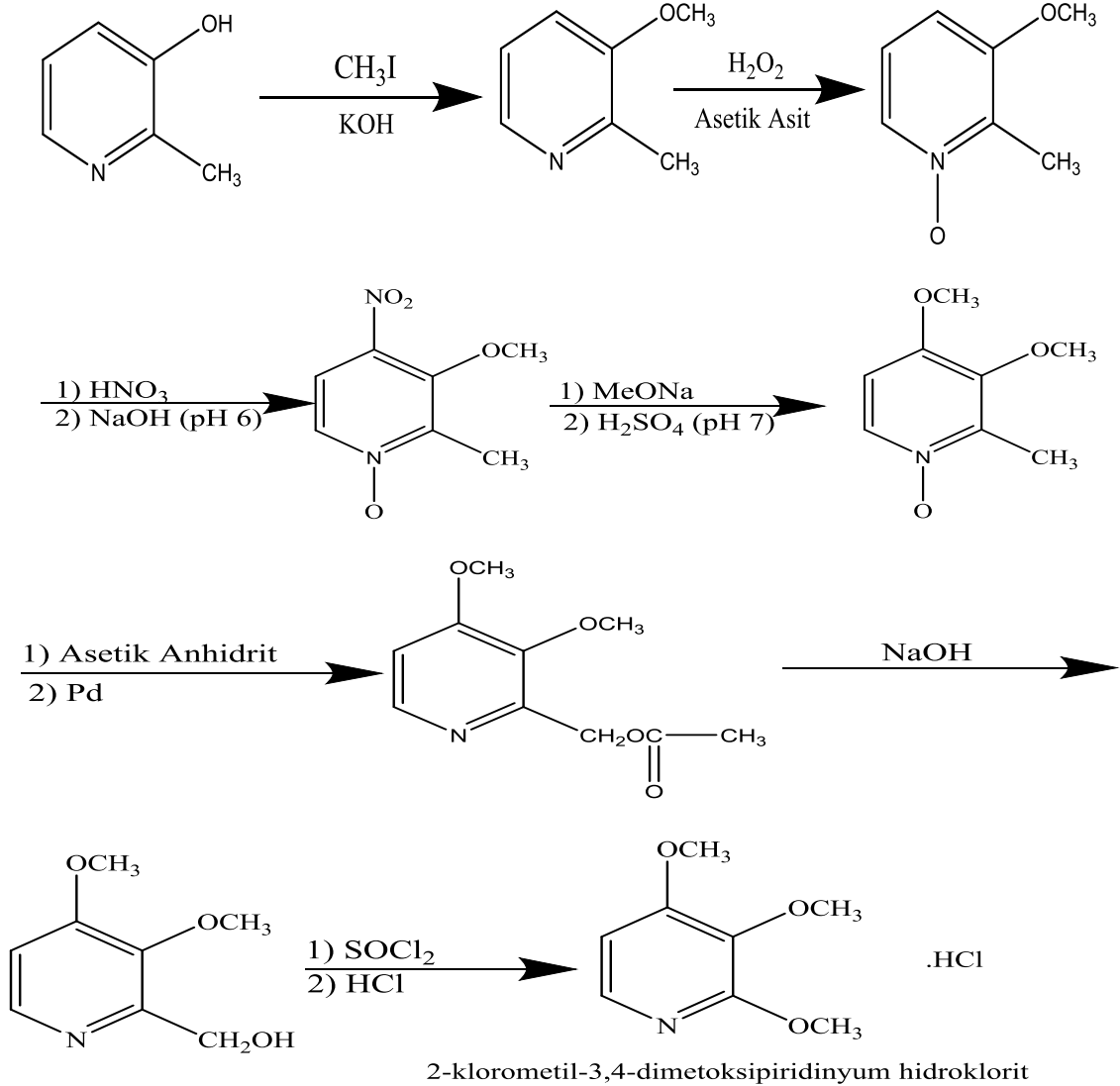
Pantoprazol bir süstitüye benzimidazol olup molekül ağırlığı 383,371 g/mol' dür. Spesifikasyonunda beyaz veya hemen hemen beyaz toz olarak tanımlanmıştır. Numunenin KBr dispersiyonundan elde edilen IR absorpsiyon spektrumu aynı şekilde hazırlanan referans ile aynı dalga boylarında maksimum verir. 1027, 1180, 1244, 1264 ve 1385 cm^{-1} de maksimumlar göstermektedir. Ağzı sıkıca kapatılmış kaplarda nemden ve ışıktan korunarak 2-8°C sıcaklıkta saklanmalıdır.



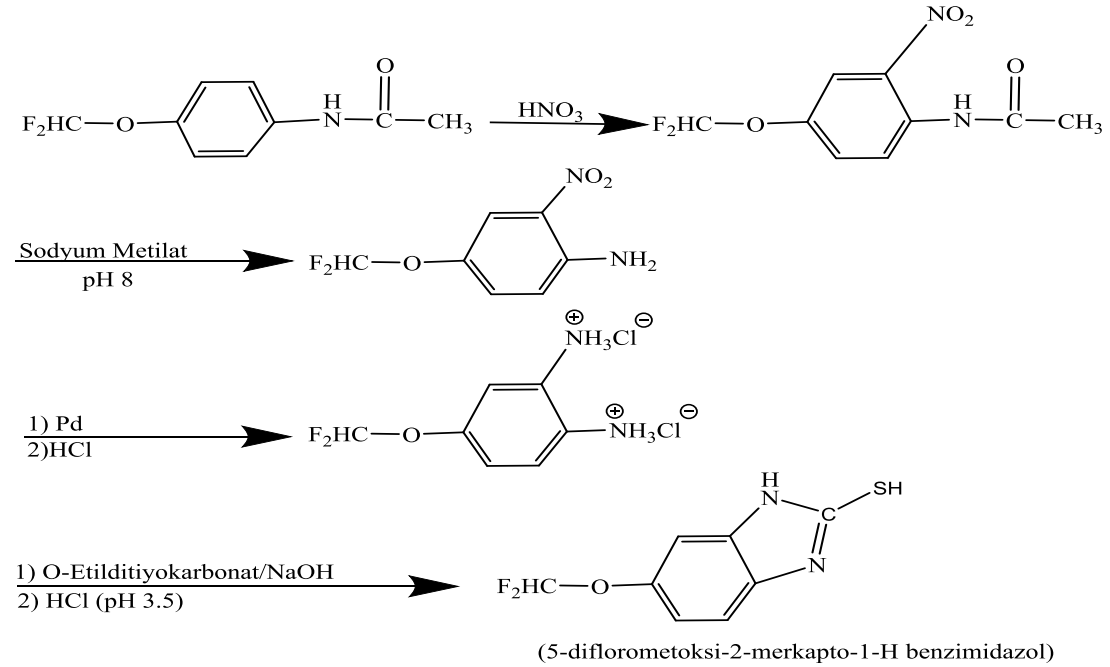
Şekil 4. 1. Pantoprazol

4.2.1. Pantoprazol sentezi

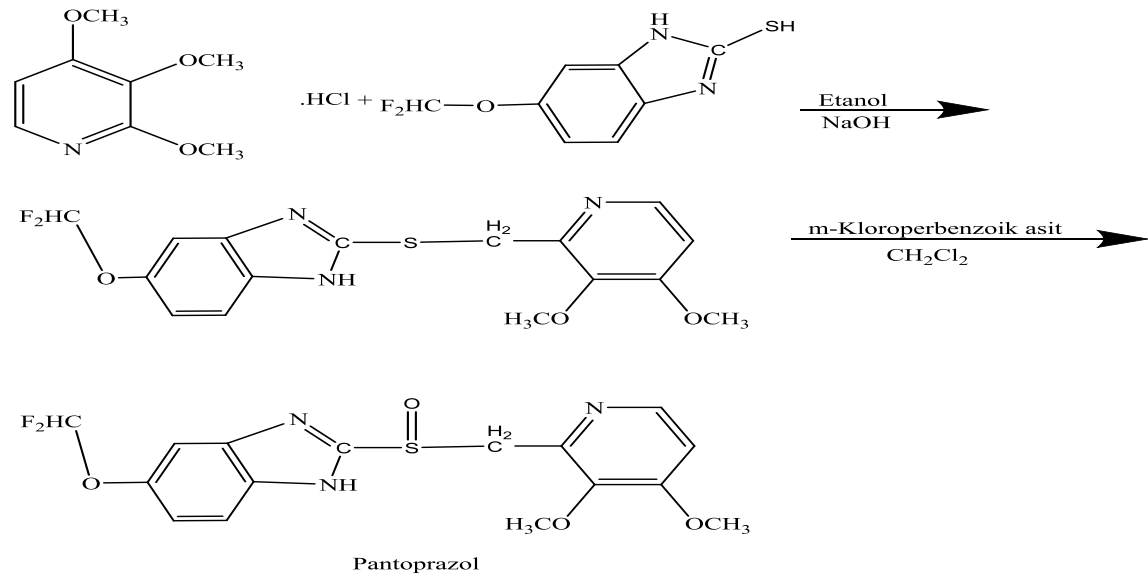
4.2.1.1. Piridin HCl sentezi



4.2.1.2. Merkпто sentezi



4.2.1.3. Pantoprazol sentezi



4.3. Pantoprazolun Etki Mekanizması ve Farmakokinetik Özellikleri

4.3.1. Pantoprazolun etki mekanizması

Pariyetal hücrelerin asidik ortamında aktif formuna dönüşür ve midede hidroklorik asit üretiminin son aşaması olan H^+ , K^+ - ATPaz enziminin inhibisyonunu sağlar. İnhibisyon doza bağlı olup, bazal ve stimule asit salgılanmasını etkiler. Diğer proton pompası veya H_2 reseptör inhibitörleri gibi, pantoprazol tedavisi mide asiditesinin azalmasına ve asiditenin azalmasıyla orantılı tersinir bir gastrin artışına neden olur. Pantoprazol hücre reseptör düzeyinde enzim distaline bağlandığından, hidroklorik asit salgılanmasını asetilkolin, histamin, gastrin gibi diğer maddelerin uyarısından bağımsız olarak etkiler. Oral veya intravenöz uygulamada aynı etki görülür (Fitlon ve Wiseman, 1996).

4.3.2. Pantoprazolun farmakokinetik özellikleri

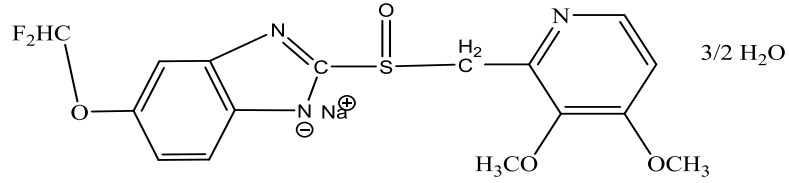
Pantoprazol hızla absorbe edilir ve 40 mg oral tek dozdan sonra bile maksimum plazma düzeyine ulaşır. Tek veya tekrarlanan dozlardan sonra farmakokinetik değişmez. Doz sınırı 10-80 mg olup, hem oral hem intravenöz uygulamadan sonra plazma kinetiği hemen hemen doğrusaldır. Dağılım hacmi yaklaşık 0,15 L/kg'dır, esas itibariyle ekstraselüler sıvıda dağılır. Serum proteinlerine, başlıca albumine olmak üzere, % 98 oranında bağlanır. Total serum klerensi yaklaşık 0,1 L/saat/kg'dır. Terminal yarı ömrü yaklaşık 1 saat olarak bulunmuştur (Fitlon ve Wiseman, 1996; Huber ve ark., 1996; Anderson, 1996).

Pantoprazolün hemen tamamı karaciğerde sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi aracılığı ile metabolize olur. Metabolizması, uygulama yolundan (oral ya da intravenöz) bağımsızdır. Pantoprazol metabolitlerinin anlamlı farmakolojik aktivitesi olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur (Anderson, 1996).

Pantoprazol metabolitleri başlıca renal yolla, kalanı feçes yolu ile atılır. C¹⁴ ile işaretlenmiş, tek doz, intravenöz pantoprazol dozunun sağlıklı, normal metabolize edici deneklere uygulanmasından sonra, dozun yaklaşık %71'i idrar ile ve yaklaşık %18'i safra yoluyla feçeste atılmıştır. Değişmemiş pantoprazolün renal yolla atılımı yoktur (Anderson, 1996).

4.4. Pantoprazol Na

4.4.1. Yapısal formülü

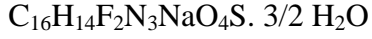


Pantoprazol Na

4.4.2. Kimyasal adı

6-(Diflorometoksi)-2-[(3,4-dimetoksipiridin-2-yl)metilsülfinil]-1,2-dihidrobenzimidazol-3-ide Sodyum tuzu 3/2 H₂O

4.4.3. Moleküler formül



4.4.4. Moleküler ağırlığı

432,37 g/mol

4.4.5. Görünüş

Beyaz veya beyazımsı toz

4.4.6. Çözünürlük

Suda, etanol (%96) ve metanolde serbestçe çözünür, pratik olarak heksanda çözünmez. Aşağıda Tablo 4.1.' de çözünürlük çalışması sonuçları paylaşılmıştır.

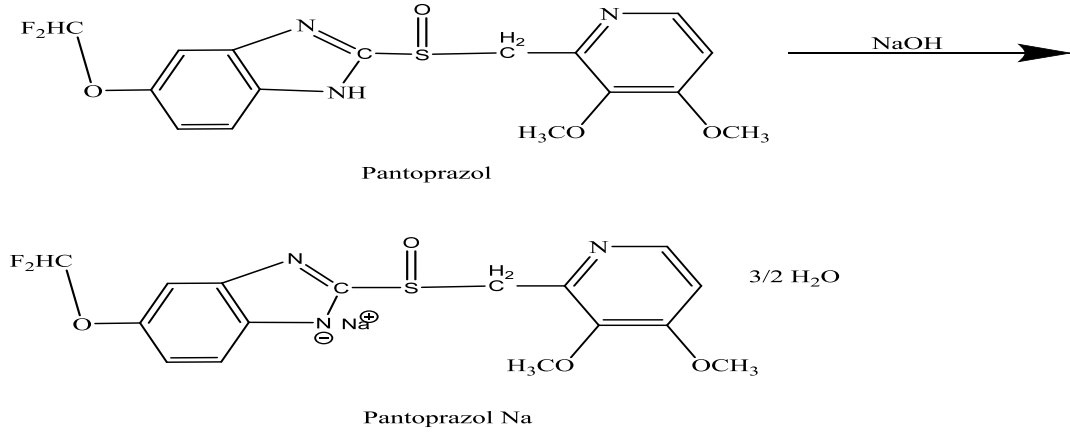
Tablo 4. 1. Pantoprazol Na çözünürlük verileri

Çözücü	25°C Sıcaklıkta Çözünen Miktar (mg/mL)
Su	>1000
Metanol	>2000
Etanol	>1000
Aseton	270
Kloroform	0,022
Diklormetan	0,018
Dietil Eter	0,001
n-Hekzan	0,001

4.4.7. Çözelti görünüşü

Çözelti berrak ve renk şiddeti referans çözeltisi B6'dan daha yoğun değildir.

4.4.8. Pantoprazol Na sentezi



4.5. Pantoprazol Na Tanımlama Testleri

4.5.1. IR absorpsiyon spektrumu

Numunenin KBr dispersiyonundan elde edilen IR absorpsiyon spektrumu aynı şekilde hazırlanan referans ile aynı dalga boylarında maksimum verir.

4.5.2. İyon ve iyon gruplarının tanımlama reaksiyonu

Sodyum için EP 2.3.1 bölümünde yer alan iyon ve fonksiyonel grup tanımlama reaksiyonlarında pozitif sonuç verir.

4.5.3. UV spektrum

Numunenin metanoldeki %0,001 (a/h)'lik çözeltisinin spektrumu 210-360 nm'de incelenir. Numunenin maksimum 289 nm de cevap vermesi beklenir.

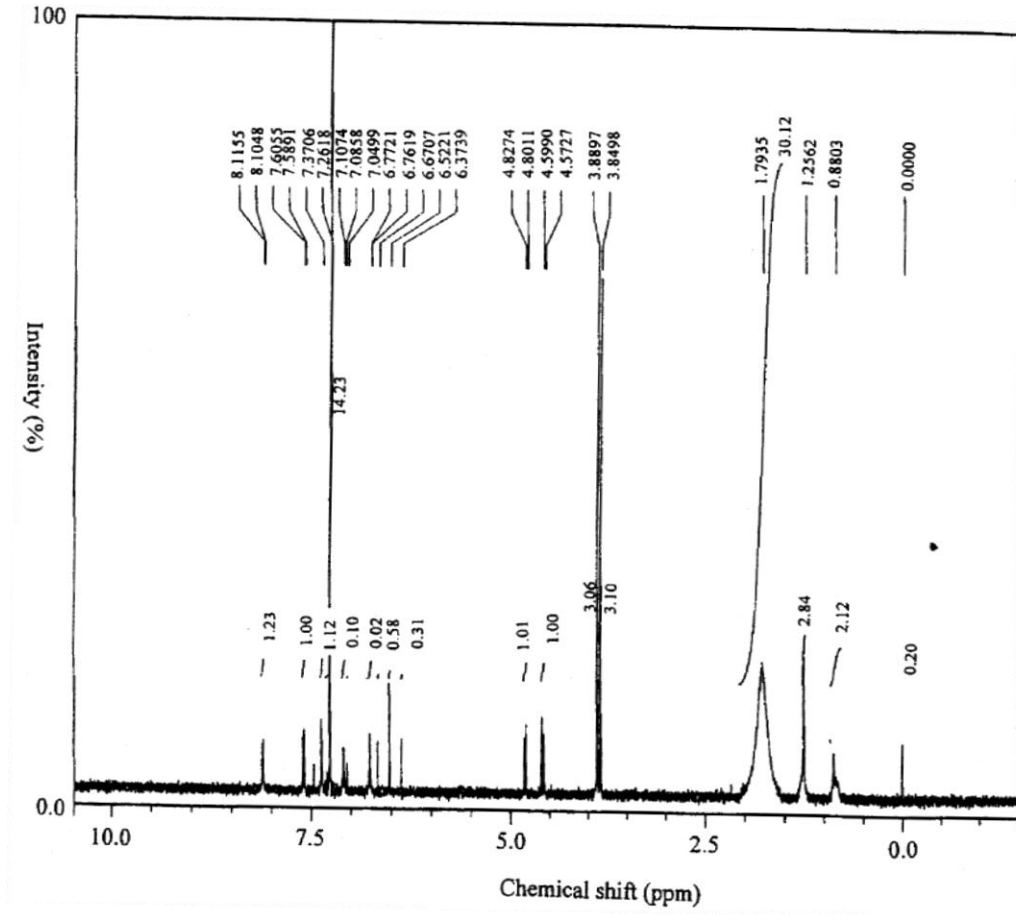
4.5.4. Avrupa Farmakopesi Ek 6.1' de yer alan polimorfizm (kristal yapı)

XR diffraktogram incelenir ve polimorf standardı ile aynı karakteristikleri gösterir.

4.5.5. Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometri

4.5.5.1. ¹H-NMR Spektrum

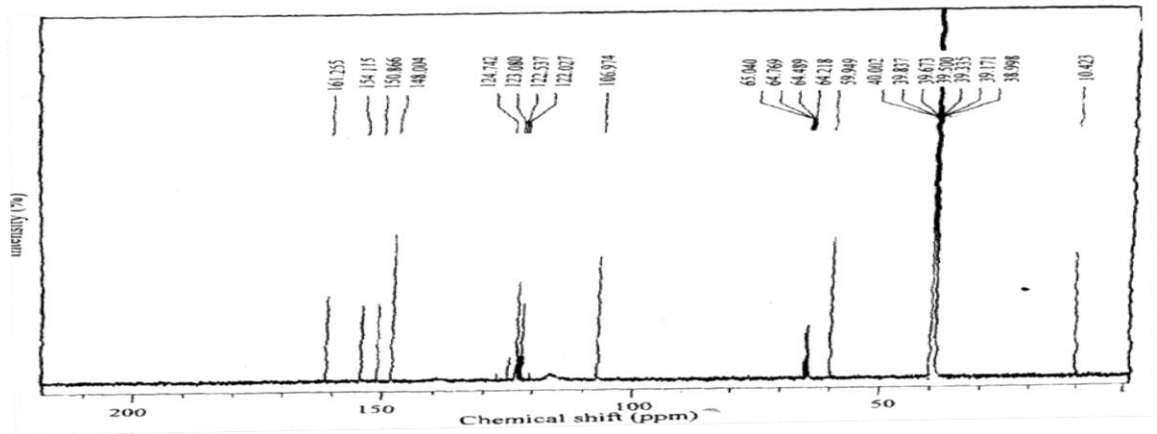
DMSO içinde çözülmüş pantoprazol sodyum tek boyutlu bir ¹H-NMR spektrumu Jeol 500 Lambda NMR spektrometresi kullanılarak elde edildi. Elde edilen spektrum şekil 4.2.'de gösterilmiştir (Badwan ve ark, 2002).



Şekil 4. 2. Pantoprazol Na ¹H-NMR Spektrumu

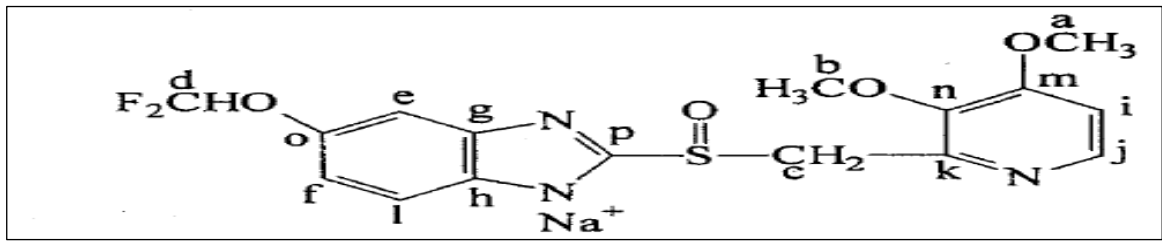
4.5.5.2. ¹³C-NMR Spektrum

DMSO içinde çözülmüş pantoprazol sodyum tek boyutlu ¹³C -NMR spektrumu, Jeol 500 Lambda NMR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. Şekil 4.3.'de gösterilen spektrumu 24°C'de kaydedildi ve dahili olarak tetrametilsilana başvuruldu. Çeşitli rezonans bantları için atamaları Tablo 4.2. 'de bulunur (Badwan ve ark, 2002).



Şekil 4. 3. Pantoprazol Na ^{13}C -NMR Spektrumu

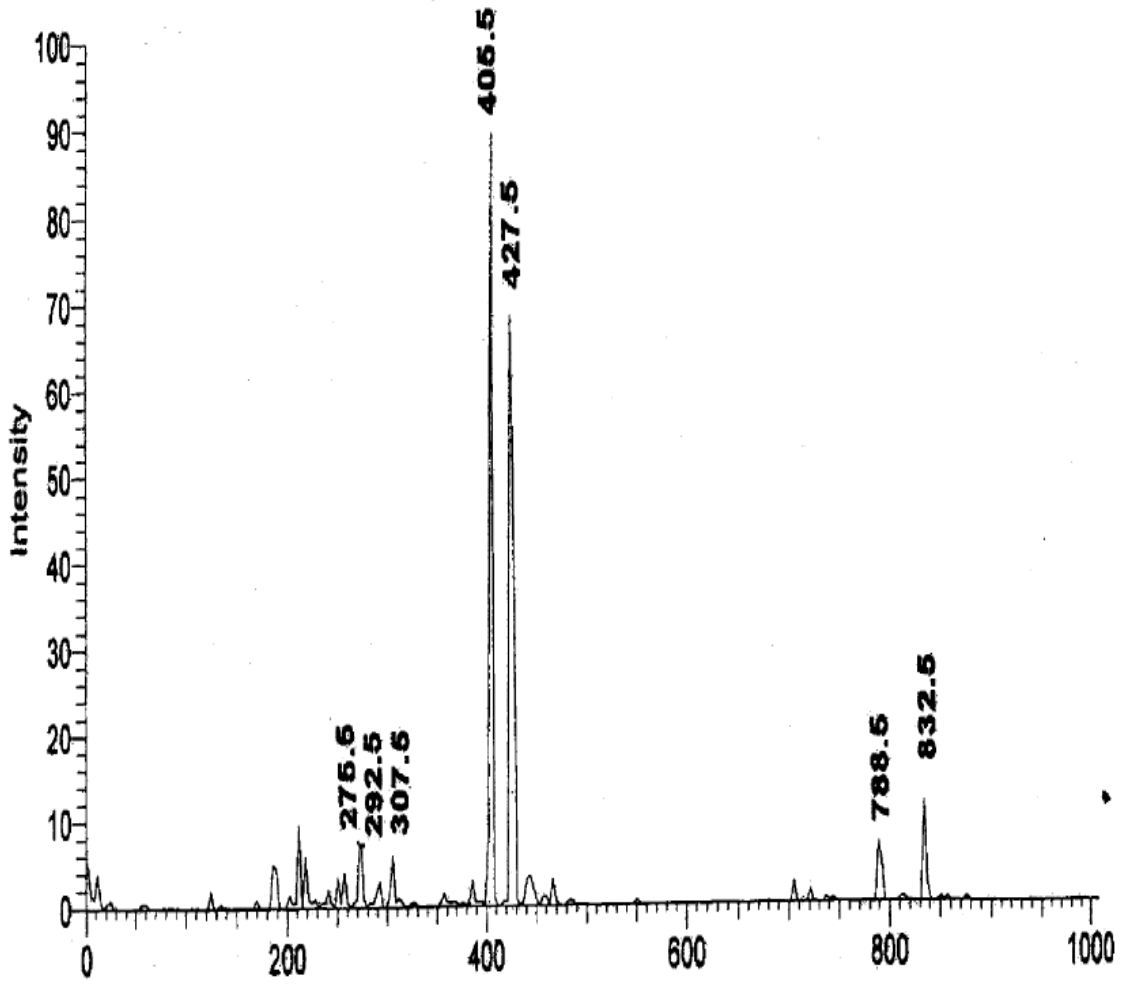
Tablo 4. 2. ^{13}C -NMR spektrum rezonans bantları



Kimyasal Kayma (ppm)	Simge
60,0	a,b
64,5	C
64,8	D
107,0	e,f
122,0	g,h
122,5	I
123,1	j,k
124,8	L
148,0	M
150,9	N
154,1	O
161,3	P

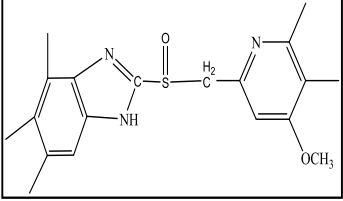
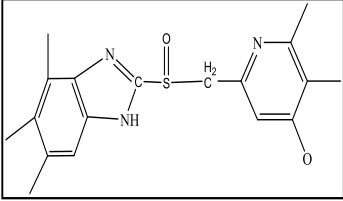
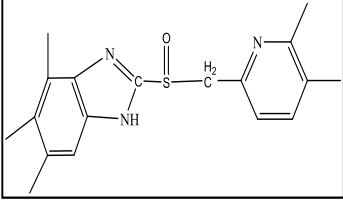
4.5.4 Kütle Spektrometresi

Pantoprazol sodyum kütle spektrumu Şekil 4.4.' de, tanımları ile kütle fraksiyonları Tablo 4.3.' te gösterilmiştir. Pantoprazol sodyum moleküler ağırlığı pozitif iyonizasyon modunda çalışan bir Finnigan AQA LC / MS sistemi (Thermoquest) kullanılarak belirlenmiştir (probe 4.00 kV, Cone 200 V) (Badwan ve ark, 2002).



Şekil 4. 4. Pantoprazol Kütle Spektrumu

Tablo 4. 3. Pantoprazol Na ¹³C-NMR Spektrumu

m/z	Tanım	Bağıl Yoğunluk (%)
832,5	(Pantoprazole) ₂ Na ₃	12%
788,5	[(Pantoprazole) ₂ Na] ⁺¹	8%
427,5	[Pantoprazole Na ₂] ⁺¹	70%
405,5	[Pantoprazole Na ₂] ⁺¹	90%
307,5	C ₁₄ H ₁₀ N ₃ O ₂ SNa/ 	6%
292,5	C ₁₃ H ₇ N ₃ O ₂ SNa/ 	2%
275,5	C ₁₄ H ₁₀ N ₃ O ₂ SNa/ 	10%

4.6. Pantoprazol Na için Yapılmış Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları

Hızlandırılmış bozunma çalışmaları asit, alkali, peroksit, ısı ve fotolitik etki uygulanarak yapılmaktadır. Bunlara ek olarak aynı etkiler çözücü içinde uygulanarak çözücüye ait piklerin ortadan kaldırılması sağlanmaktadır. Asit, alkali, peroksit, ısı ve fotolitik etki uygulanan örnekler daha sonra DAD dedektörde 180-900 nm arasında taramaya tutularak ürünün rafta yaşadığı stres koşulları simüle edilir. Bu uygulama aynı zamanda geliştirilen veya yürürlükte olan HPLC metotlarında bozunma ürünlerinin, tespiti konusunda seçici olup olmadığını göstermektedir. Seçicilik (Selectivity) parametresi altında yapılan bu çalışma pik saflığı bakılarak metodun ayırım gücü konusundada yeterliliğini sorgular. Hızlandırılmış bozunma çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar çeşitli uygunluk kriterlerine tabi tutulur. Kabul kriterleri aşağıdaki gibidir.

1. Stres uygulanmamış numune ve diğer stres uygulanan numunelere ait kromatogramlarda piklerin tepe noktaları üst üste oturtularak eşleştirilir. Bu eşleşme sonunda pikler en az %98 oranında eşleşmelidir.
2. Safsızlıklara ait pik saflığı verisi 990'dan az olamaz. Tablolarda 990'dan az olan pik saflığı sonuçları başarısız, 990'dan fazla olan sonuçlar ise başarılı olarak ifade edilmektedir.

Yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışmaları sonucunda impüritelerde artış olduğu gözlemlendi. Sıcaklık altında yapılan bozundurma çalışmasında bir safsızlığın safsızlık C ile aynı alıkonma zamanına sahip olduğu saptandı. Asidik bozundurma ortamında ise bozunma ürünlerinin safsızlık B ve safsızlık C içine girişim yaptığı saptandı. Bazik bozundurma koşullarında ise bozunma ürünleri safsızlık B, safsızlık C, safsızlık D+F ve Pantoprazol piklerine girerek girişim yapmıştır. Likit UV bozundurmada ise safsızlık C ile aynı alıkonma zamanında bozunma ürününe rastlanmıştır. Pantoprazol'e asidik bozundurma ortamında girişim saptanmamıştır. Bazik ve oksidatif bozundurma koşullarında bozundurulmamış numuneye göre Pantoprazol

yüzdesinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Asidik bozunmada da aynı durum söz konusudur. Bu sonuçlar aşağıdaki tablolarda mevcuttur.

Tablo 4. 4. Avrupa Farmakopesi metodunda stres altında pik saflığı sonuçları*

Bozunma Şartları	Pik Saflığı					
	Saf. A	Saf. B	Saf. C	Saf. D+F	Saf. E	Pantoprazol
Bozundurulmamış Numune	Başarılı	-	-	-	-	Başarılı
Sıcaklık (105°C)	Başarılı	Başarılı	Başarısız	Başarılı	Başarılı	Başarılı
Katı Numune 360 nm UV ışık altında	Başarılı	Başarılı	Başarılı	-	-	Başarılı
Numune çözeltisi 360 nm UV ışık altında	Başarılı	-	Başarısız	-	-	Başarılı
1,0N HCl	-	Başarısız	Başarısız	Başarılı	Başarılı	-
1,0N KOH	-	Başarısız	Başarısız	-	-	Başarısız
% 6' lık H₂O₂	Başarılı	-	Başarılı	-	-	Başarılı

Tablo 4.5. Avrupa Farmakopesi metodunda stres altında safsızlık sonuçları*

Bozunma Şartları	Safsızlıklar						
	Saf. A	Saf. B	Saf. C	Saf. D+F	Saf. E	Tanımlanmış saf.	Toplam
Bozundurulmamış	< 0,15 %	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı	< 0,5 %
Sıcaklık (105°C)	> 0,15 %	> 0,15 %	< 0,10 %	< 0,15 %	> 0,10 %	> 0,10 %	> 0,5 %
Katı UV	< 0,15 %	< 0,15 %	> 0,10 %	Saptanmadı	Saptanmadı	< 0,10 %	< 0,5 %
Likit UV	> 0,15 %	Saptanmadı	> 0,10 %	Saptanmadı	Saptanmadı	< 0,10 %	< 0,5 %
1.0N HCl	Saptanmadı	> 0,15 %	> 0,10 %	> 0,15 %	> 0,10 %	> 0,10 %	> 0,5 %
1.0N KOH	Saptanmadı	> 0,15 %	> 0,10 %	Saptanmadı	Saptanmadı	> 0,10 %	> 0,5 %
% 6' lık H₂O₂	> 0,15 %	Saptanmadı	> 0,10 %	Saptanmadı	Saptanmadı	> 0,10 %	> 0,5 %

*2008 yılında Avrupa Farmakopesi 7.0 bölümünde yer alan analitik metotların Sandoz Syntek Proje&TLCM bölümü Analitik Laboratuvarında yapılan verifikasyon çalışmasından alınan verilerdir.

4.7. Avrupa Farmakopesi 7.0 Pantoprazol Na Safsızlık Tayin Yöntemi Kabul Kriterleri

Halen EP (European Pharmacopoeia) tarafından kullanılan Pantoprazol Na ilgili maddeleri metoduna ait kabul kriterleri ve safsızlık limitleri aşağıdaki gibidir.

4.7.1. Safsızlık metodu için sistem uygunluğu

1. Numune çözeltisinden 1000 defa seyreltilerek hazırlanan Referans çözeltisi (a) ardışık 6 enjeksiyonunda Pantoprazol Sodyum için piklerin alanlarının bağıl standart sapması 20,0'den küçük olmalıdır.
2. Pantoprazol Na sistem uygunluğu çözeltisinde Safsızlık E ve Safsızlık D+F arasındaki ayırım 1,5 olmalıdır.
3. Numune kromatogramı Pantoprazol Na sistem uygunluğu çözeltisi kromatogramı ile benzer olmalıdır.

4.7.2. Safsızlık limitleri

1. Numune kromatogramında elde edilen Safsızlık A'ya ait pikin alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanının 1,5 katından fazla olmamalıdır (maks. %0,15).
2. Numune kromatogramında elde edilen Safsızlık B'ye ait pikin alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanının 1,5 katından fazla olmamalıdır (maks. %0,15).

3. Numune kromatogramında elde edilen safsızlık C'ye ait pikin alanı 0,3 ile çarpılarak düzeltme faktörü uygulanır ve elde edilen değer referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanından fazla olmamalıdır (maks. %0,10).
4. Numune kromatogramında elde edilen Safsızlık D+F'ye ait pikin alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanının 1,5 katından fazla olmamalıdır (maks. %0,15).
5. Numune kromatogramında elde edilen Safsızlık E'ye ait piklerin alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanından fazla olmamalıdır (maks. %0,10).
6. Numune kromatogramında elde edilen herhangi bir (spesifik olmayan) safsızlığa ait piklerin alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanından fazla olmamalıdır (maks. %0,10).
7. Numune kromatogramında elde edilen toplam safsızlık alanı referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanının 5 katından fazla olmamalıdır (maks. %0,5).
8. Referans çözeltisi (a) ile elde edilen kromatogramdaki ana pikin alanın 0,5 katından küçük olan alanlar numune kromatogramında ihmal edilir ve hesaplama yapılmaz (maks. %0,05).

4.8. Safsızlıklar ve Sınıflandırılması

İlaç, insanlık tarihi ile aynı yaşta çok eski bir kavramdır. Canlıların hastalıklardan korunması, teşhis ve tedavi etmek amacıyla başlangıçta doğal kaynaklar en çok yararlanılan kaynaklar olmuştur. Kimya sanayinin son yüzyılda ilerlemesi eskiden doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların günümüzde sentez yoluyla üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bu ilaçların sayıları doğal kaynaklardan elde edilenlere göre çok daha fazladır. Knorr tarafından 1883'de Antipirin'in sentez edilmesi sentetik ilaçlar alanında

çok önemli bir keşiftir. Sentez yoluyla elde edilen ilaçların sayısı arttıkça sentetik ilaçların etkinlik, yan etkiler, kalite yönünden kontrollerinin önemi anlaşılmış ve standartların oluşturulabilmesi amacıyla Amerika’da 1906 yılında FDA kurulmuştur. 1930’ lu yıllarda ABD de bir çocuk şurubu formülasyonunda yapılan yanlışlık, 1960’ larda Avrupa’da birçok sakat doğuma neden olan “thalidomide” trajedisi, ilaçların üretimin her aşamasında kalite ve safsızlık yönünden sıkı kontrol edilmesi gerektiğini göstermiştir. Farmasötik ürünlerde safsızlıklar, sentez, formülasyon veya zamanla oluşan istenmeyen kimyasallardır. Miktarları çok az olsa bile farmasötik ürünün kalitesini bozar ve güvenliğini tehdit edebilirler. Bu nedenle sağlık otoriteleri giderek safsızlık konusuna daha katı önlemler almaktadır. İngiliz Farmakopesi (BP), Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) ve Avrupa Farmakopesinin (EP) son baskılarında farmasötik ürünlerdeki safsızlıkların kontrolü için gerekli analizler konusuna daha fazla yer verilmiştir. Farmakopelerde her ilaç için belirli standartlar belirlenmekle birlikte tüm dünyada geçerli ortak standartlar henüz her ilaç için belirlenmemiştir. Aynı etken madde için farklı safsızlık tanımları gözlenmektedir. Örneğin, ampisilin, amoksisilin, sefuroksim aksetil, raniditin, siprofloksazin safsızlıkları Avrupa Farmakopesi’nde daha geniş olarak ele alınmakta, açık formülleri, limitleri ayrıntılı anlatılmakta ancak, USP’de safsızlıkların tanımları çok kısa verilmektedir. Tüm dünyada farmakopeler arasındaki farklılıkların giderilmesi amacıyla WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından 1989 yılı Paris konferansında planlanan ve ilki FDA (Amerika Gıda ve İlaç İdaresi) Avrupa ve Japon Sağlık otoritelerinin katılımı ve desteği ile 1990 yılında düzenlenen ICH’de (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) safsızlıklar, kaynakları ve limitleri üzerinde tüm taraflarca kabul edilecek standartlar belirlenmesi kararlaştırılmıştır. Harmonizasyon ile ilaç ruhsatlandırmasının tüm ülkelerde benzer standartlar çerçevesinde yapılması çok önem kazanmıştır. ICH rehberlerindeki safsızlık kavramının tanımı ve ilaç etken madde üretiminin önemi konusunu tezimizde detaylandıracağız.

4.8.1. İlaç etken maddelerinde safsızlıklar

İlaç etken maddelerinde proses veya etken maddeden kaynaklanan safsızlıklar ile ilgili standartlar ICH'ın ve FDA'nın rehberlerinde üç bölümde incelenmektedir:

1. Organik safsızlıklar
2. Anorganik safsızlıklar
3. Kalıntı uçucu çözücüler

4.8.1.1. Organik safsızlıklar

İlaç etken maddesinin sentezi, depolanması veya başka bozunmaya zorlayıcı koşullarla oluşabilirler. Kimyasal yapılarının aydınlatılması zor olabilir. Bu safsızlıklar aşağıdaki başlıklar altında incelenebilir:

1. Başlangıç kimyasalları: Çok kademeli sentezlerde pantoprazolde olduğu gibi her kademe gerekliliği gösterilse bile son üründe reaksiyona girmemiş başlangıç maddesi kalabilir. Pantoprazol hammaddesi üretiminde EP farmakopesinde safsızlık C olarak tanımlanan Merkaptosafsızlığı bu tip safsızlık için bir örnektir.
2. Yan ürünler: Organik sentezlerde %100 verimle ürün elde etmek çok zordur. Her bileşik belirli oranlarda yan ürünler içerebilir. Yine Pantoprazol hammaddesi üretiminde Pantoprazol-N-Oksit safsızlığı bu tip safsızlık için bir örnektir.
3. Bozunma ürünleri: Organik bileşikler kimyasal yapıları nedeniyle veya beklemeyle bozunabilirler. Pantoprazol sentezinde aşırı oksidasyondan kaynaklı Pantoprazol Sülfon bu tip safsızlığa örnek gösterilebilir.

4.8.1.2. Anorganik safsızlıklar

Üretim işlemlerinden kaynaklanabilirler. Bu safsızlıklar arasında;

1. Reaktif, ligand ve katalizörler
2. Ağır metaller (ağır metallerin en önemli kaynağı su ve kullanılan reaktör ve cihazlardır. Saf veya demineralize su ile paslanmaz veya emaye reaktör ve cihazlar kullanılarak kolayca bertaraf edilirler)
3. Anorganik tuzlar
4. Diğer materyaller (aktif kömür, filtre artıkları v.b) sayılabilir

4.8.1.3. Kalıntı uçucu çözücüler

Üretim proseslerinde kullanılan organik ve anorganik sıvılardır, uygun yöntemlerle kolayca bertaraf edilebilirler. Pantoprazol üretiminde reaktif olarak kullanılan etanol son üründe sınır değerlerden daha fazla miktarda kalırsa ürünün bozunmasını kolaylaştırır ve belirli limitlerden sonra toksik etki gösterir. Üreticiler etanol içermeyen ürün elde edebilmek amacıyla pantoprazol üretiminde kurutma işleminde dikkatli olarak bertaraf etmişlerdir. İlaç ürünlerinde ayrıca enantiomerik safsızlıklar da bulunabilir. Kiral bileşiklerin enantiomerleri farklı farmakolojik özellik gösterebilirler. Örneğinesomeprazole (s-omeprazole) saf enantiomer halinde kullanılan ilaçtır. Sentez esnasında oluşan r-omeprazol s-omeprazol için safsızlık olarak kabul edilmektedir. Sentezde kullanılan yöntemde her ne kadar sıcaklık, süre, miktar, pH, ortam ve kullanılan malzemeler defalarca valide edilmiş olsa da, süreç kontrolleri her seride tekrarlanır ve

kayıtları tutulur. Kimyasal reaksiyon esnasında oluşan ürün, yan ürünler ile başlangıç madde ve safsızlıkları sık periyotlarda HPLC, GC ve diğer cihazlarda valide edilmiş yöntemlerle takip edilir. Bu kontroller ayrıca atık reaksiyon solventleri ve yıkama solventlerine de uygulanır.

4.8.2. Etken maddelerin safsızlıklardan arındırılması

Saflaştırma işlemleri distilasyon, katkı maddeleri (aktif karbon v.b.) ilavesi, çözme, yıkama, faz ayrımı (dekantasyon), istenmeyen solventin distilasyon/stripping yoluyla uzaklaştırılması, kolon kromatografisi, ultrafiltrasyon ve filtre üzerinde yıkama ve kurutma işlemlerinin bir kısmını veya hepsini kapsar. Saflaştırma işleminin tekrarlanamadığı bazı ürünlerde ara ürün (intermedier) saflaştırılarak istenmeyen safsızlıklar bertaraf edilir. Örneğin, pantoprazol üretiminde ara ürün olarak kullanılan pantoprazol sülfidit gerekirse birkaç defa saflaştırılarak son ürünlerdeki safsızlıkların önüne geçilir. Renk verici safsızlıklar ve bazıları ürün çözeltilerinde uygun aktif karbonla karıştırıp süzülerek veya direkt aktif karbonlu filtre elemanı içinden geçirmek suretiyle yapılır.

4.8.3. Formülasyondan kaynaklanan safsızlıklar

Formülasyon sırasındaki safsızlıklar yöntemden, çevreden ve dozaj şekline kaynaklanabilir.

1. Yöntemden kaynaklananlar:

Diklofenak sodyumun parenteral dozaj formu hazırlanırken son ürünün sterilizasyonu sırasında diklofenak sodyum, indolinon türevine dönüşür ve bozulur.

2. Çevreden kaynaklananlar:

A. Isı: Birçok ilaç ürünü ısıya karşı dayanıksızdır. Örneğin vitaminler özellikle sıvı formülasyonlarda ısı ile kolayca bozunurlar.

B. Işık (Özellikle UV Işık): Birçok ilaç formülasyonu ışık ile hızla bozunur ve etkin dozun çok altına düşerler. Bu durum, formülasyonu ışıktan koruyan ambalaj ile önlenir.

C. Nem: Higroskopik ürünler nem ile gerek hammadde gerekse tabletlerde bozunurlar.

D. Dozaj şeklinden kaynaklananlar: Genellikle sıvı dozaj şekilleri, bozunma ve mikrobiyolojik kontaminasyona daha duyarlıdır. Mikrobiyolojik bozunma ile oral sıvı formülasyonları sağlığa zararlı hale dönüştürür.

E. Bekleme (Yaşlanma) ile oluşan safsızlıklar:

İki grupta incelenebilirler:

- İlaç bileşenlerinin etkileşmesi: Vitaminler genellikle çok labildir ve özellikle sıvı dozaj formlarında bekleme ile bozunur, etkilerini kaybederler. Vitamin B kompleks enjeksiyonluk formülasyonunda tiamin kolaylıkla bozunur.

- Fonksiyonel grup ile ilgili bozunmalar: İlacın kimyasal yapısı bozunması üzerinde önemli rol oynar. Örneğin esterler özellikle sıvı dozaj formlarda kolayca bozunur. Kimyasal yapıya bağlı bozunmalar arasında oksidasyon, fotolitik ayrışma, karboksilasyon sayılabilir.

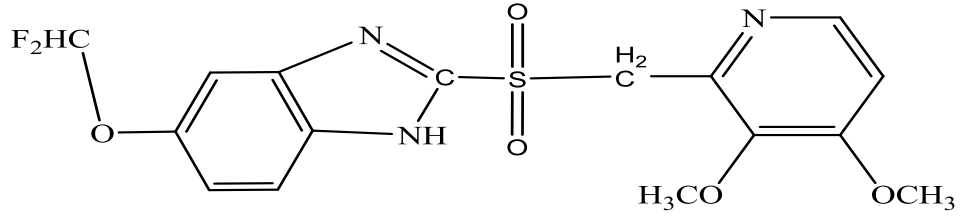
Farmakopelerde verilen safsızlık limitleri gerek kullanıma hazır ilaçlarda ve gerekse ilaç etken maddelerinde ICH'in rehberinin belirttiği gibi stabilite çalışmaları sonucunda ölçülen miktarlar olarak belirlenmiştir. İlaç formülasyonlarında son kullanma tarihleri

ilaç hammaddelerinin stabilite verileri hazırlandıktan sonra belirlenir. Gerek USP’de gerekse Avrupa farmakopesinde farmasötik forma getirilmiş ilaçlardaki toplam safsızlıklar çoğunlukla etken maddelerindeki toplam safsızlık limitlerinden daha yüksektir (Roy, 2002). Elektronik ve bilhassa bilgisayar teknolojilerinin son yirmi yıl içinde olağanüstü gelişmeleri laboratuvar cihazları ve bu cihazlarla yapılan araştırmaları aynı oranda geliştirmiş, ilaçlardaki safsızlıkların nitelik ve nicelik yönünden kontrolünü kolaylaştırmıştır (GC-MS/LC-MS/HPLC yöntemleri). Yeni Ar-Ge teknolojileri, ilaçlardan safsızlıkların uzaklaştırılması ve tanıma imkanlarının artırılması ile, aynı zamanda gen toksisitesi gibi çeşitli alanlardan yeni sorunların artması, daha güvenilir ilaçların gelişmelerini mümkün kılmaktadır. Bu yeniliklerin tümü yeni ilaç hammaddeleri Ar-Ge çalışmalarında denenip ve uygulanmaktadır. Üretimi devam etmekte olan ilaç etken maddelerinin analizleri, yöntemleri, tanımları ve limitlerini farmakopeler belirlemektedir. Firmalar ilaç etken madde ürünleri için farmakopelere uyum sertifikalarını uluslararası bir organizasyondan almak zorundadırlar. Fiyat rekabetinden daha önemli olarak kalite rekabetinin söz konusu olduğu bu ürünlerin akredite/sertifikalı olması gerekmektedir. Ayrıca ilaç etken madde alıcıları “Stabilite Data”ları ile birlikte farmakope ve ICH limitlerinin dışında, kendi firma safsızlık limitlerini üretici firmaya göndererek istedikleri spesifikasyonlara uygun ürün talep etmektedirler (Impurities in New Drug Substances ICH:Q3A(R1), 2006).

4.9. Pantoprazol Na Safsızlıkları ve Safsızlık Oluşturma Şekilleri

4.9.1. Pantoprazol Sülfon (EP/USP: Safsızlık A)

4.9.1.1. Yapısı



Pantoprazol Sülfon

4.9.1.2. Kimyasal adı

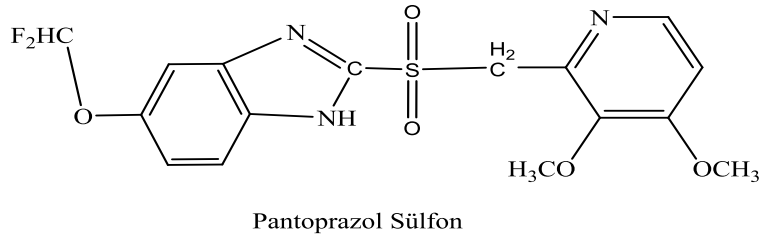
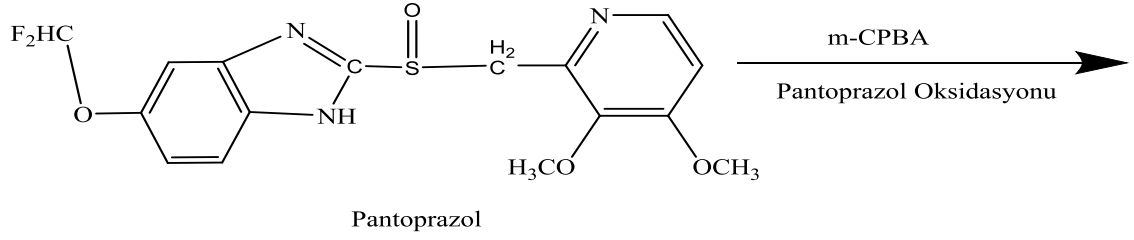
5-(diflorometoksi)-2-[[[(3,4-dimetoksipiridin-2-il)metil]sülfonil]-1H-benzimidazol

4.9.1.3. Tayin metodu

Pantoprazol sülfon yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

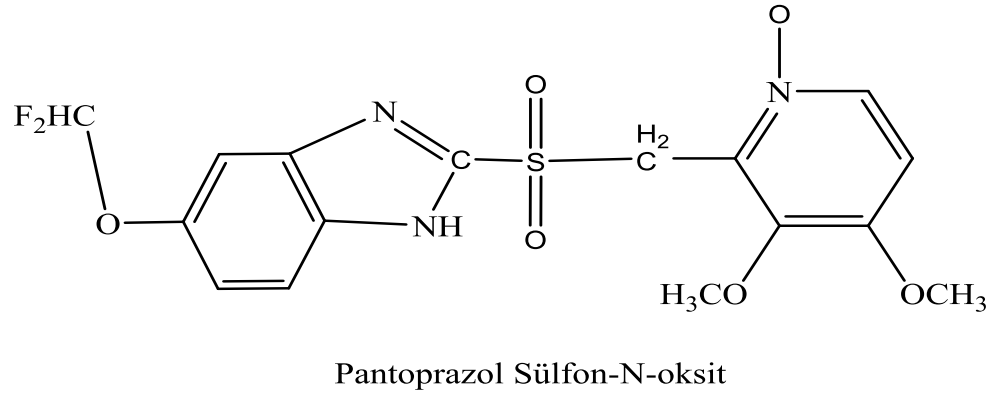
4.9.1.4. Safsızlık oluşturma şekli

Pantoprazol sülfon sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir safsızlık olup, kritik safsızlık olarak nitelendirilebilir. Diğer safsızlıklara nazaran etken maddenin sülfondan temizlenmesi oldukça zordur. Bu sebeple oksidasyon reaksiyonu doğru zamanda bitirilip sülfon artışına izin verilmemelidir. Aşağıda görüleceği üzere oluşan ara ürün aşırı oksidasyona maruz kalarak kükürt atomu üzerinden oksitlenmektedir.



4.9.2. Pantoprazol Sulfon-N-Oksit

4.9.2.1. Yapısı



4.9.2.2. Kimyasal adı

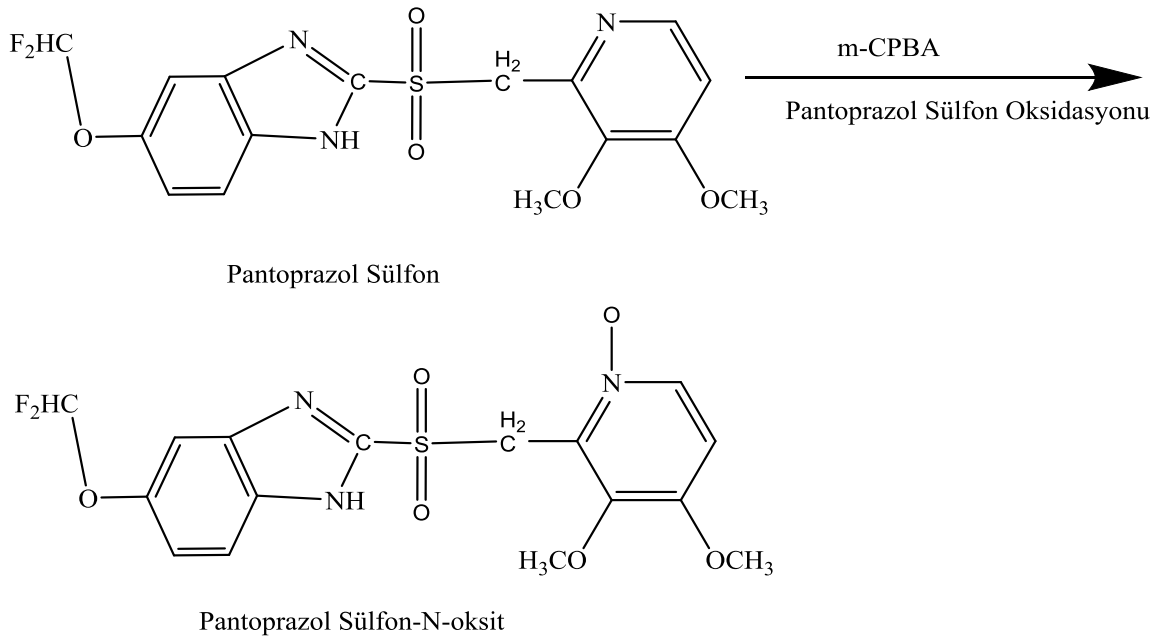
6-(difloroMetoksi)-2-[[3,4-dimetoksi-1-oksido-2-piridinil]metil]sülfonil]-1H-benzimidazol

4.9.2.3. Tayin metodu

Pantoprazol sülfon-N-oksit yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

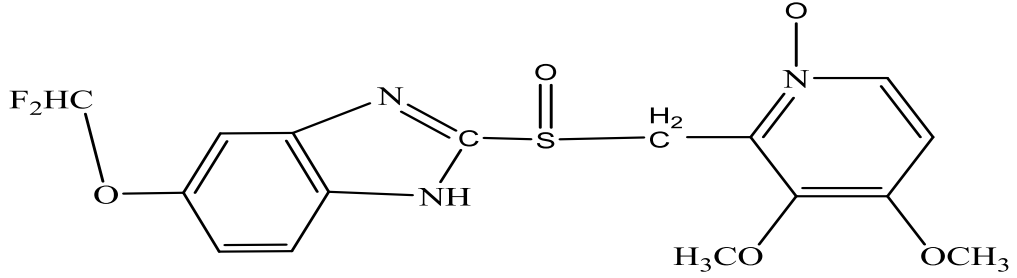
4.9.2.4. Safsızlık oluşturma şekli

Pantoprazol sülfon-N-oksit sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir safsızlıktır. Bu safsızlıkta aşırı oksidasyon ürünüdür. Pantoprazol Sülfon yine m-CPBA ile okside olarak Pantoprazol sülfon-N-oksit safsızlığını oluşturur. Aşağıda Pantoprazol sülfon-N-oksit oluşumu verilmiştir.



4.9.3. Pantoprazol-N-Oksit

4.9.3.1. Yapısı



Pantoprazol-N-Oksit

4.9.3.2. Kimyasal adı

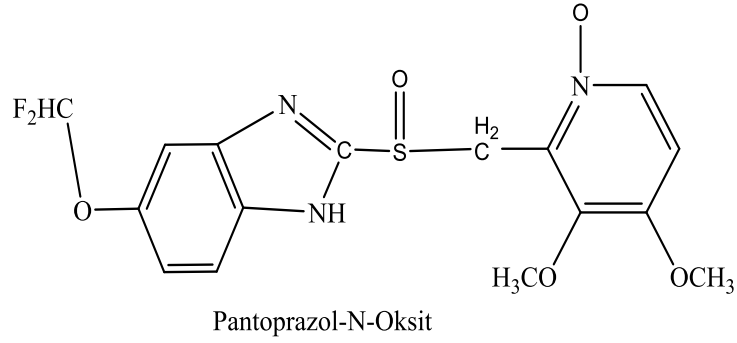
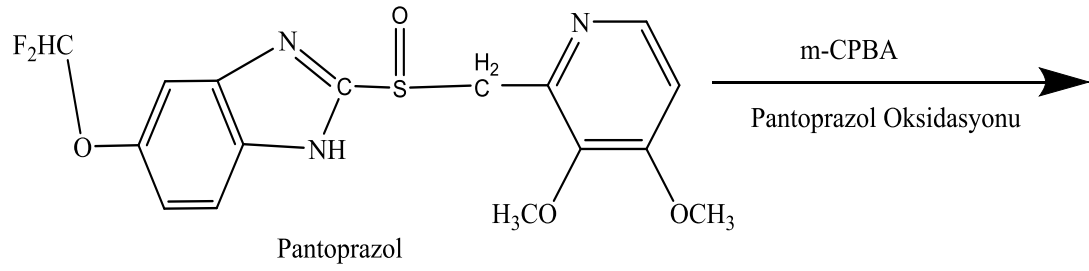
6-(Diflorometoksi)-2-[[[(3,4-dimetoksi-1-oxido-2-piridinil)metil]sülfinil]-1H-benzimidazol

4.9.3.3. Tayin metodu

Pantoprazol-N-oksit yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

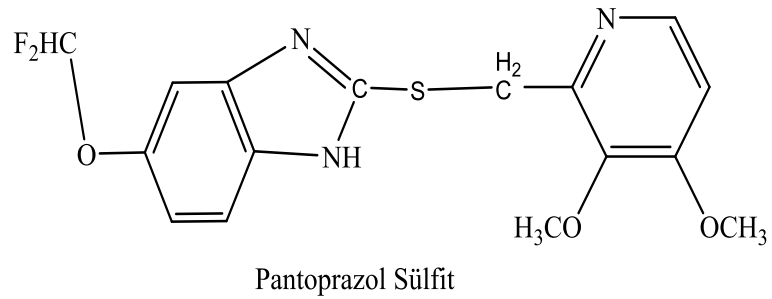
4.9.3.4. Safsızlık oluşturma şekli

Pantoprazol-N-oksit sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir safsızlıktır. Bu safsızlıkta aşırı oksidasyon ürünüdür. Pantoprazol yine m-CPBA ile okside olarak Pantoprazol-N-oksit safsızlığını oluşturur. Aşağıda Pantoprazol-N-oksit oluşumu verilmiştir.



4.9.3.5. Pantoprazol Sülfid (EP/USP: Safsızlık B)

4.9.3.6. Yapısı



4.9.3.7. Kimyasal adı

5-(diflorometoksi)-2-[[[(3,4-dimetoksi-piridin-2-yl)metil]sülfanil]-1*H*-benzimidazol

4.9.3.8. Tayin metodu

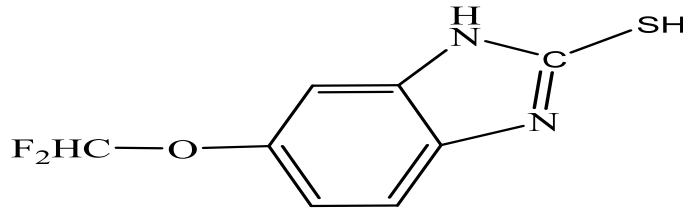
Pantoprazol sülfid yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

4.9.3.9. Safsızlık oluşturma şekli

Pantoprazol sülfid pantoprazol sentezinde bir ara basamak ürünüdür. Sentez esnasında saflaştırma işlemleri iyi yapılamazsa bu safsızlık son ürüne kadar taşınabilir.

4.9.4. Pantoprazol merkaptı (EP/USP: Safsızlık C)

4.9.4.1. Yapısı



Pantoprazol Merkaptı

4.9.4.2. Kimyasal adı

5-(diflorometoksi)-1*H*-benzimidazol-2-tiol

4.9.4.3. Tayin metodu

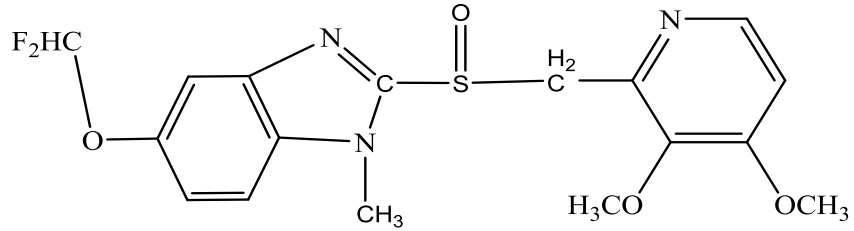
Pantoprazol merkaptto yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

4.9.4.4. Safsızlık oluşturma şekli

Pantoprazol merkaptto pantoprazol sentezinde bir başlangıç ürünüdür. Sentez esnasında saflaştırma işlemleri iyi yapılamazsa bu safsızlık son ürüne kadar taşınabilir.

4.9.5. Safsızlık D+F (EP/USP: Safsızlık D+F enantiyomer karışım)

4.9.5.1. Yapısı



Pantoprazol D+F Enantiyomer

4.9.5.2. Kimyasal adı

Safsızlık D: 5-(diflorometoksi)-2-[(RS)-[(3,4-dimetoksiipridin-2-il)metil]sülfinil]-1-metil-1H benzimidazol

Safsızlık F: 6-(diflorometoksi)-2-[(RS)-[(3,4-dimetoksiipridin-2-il)metil]sülfinil]-1-metil-1H benzimidazol

4.9.5.3. Tayin metodu

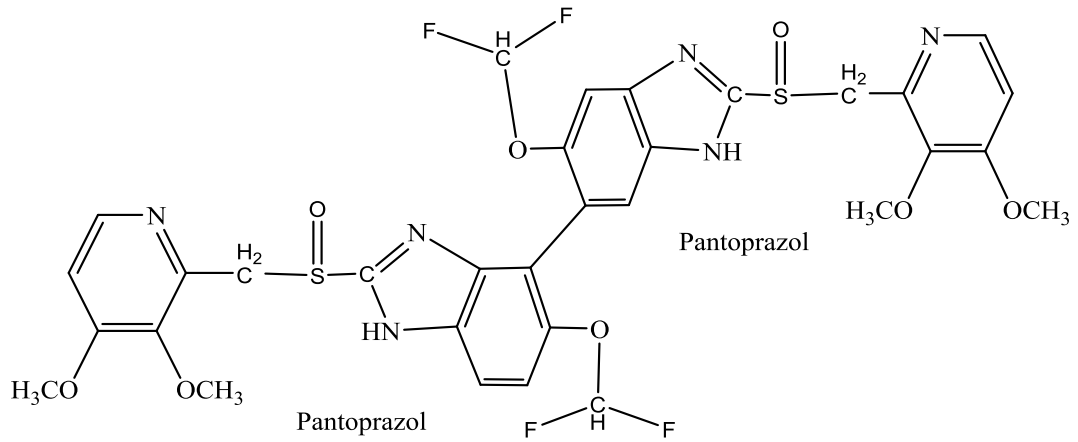
Pantoprazol D+F safsızlıkları yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

4.9.5.4. Safsızlık oluşturma şekli

Safsızlık D+F sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir safsızlıktır. Bu safsızlıkta azotun metillenmesi sonucu oluşur.

4.9.6. Pantoprazol Dimer safsızlık E (EP/USP: Safsızlık E dimer yapısı)

4.9.6.1. Yapısı



4.9.6.2. Kimyasal adı

6,6'-bis(Diflorometoksi)-2,2'-bis[[3,4-dimetoksipiridin-2-il)metil]sülfinil]-1H,1'H-5,5'-bibenzimidazolil

4.9.6.3. Tayin metodu

Pantoprazol safsızlık E yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile tayin edilir.

4.9.6.4. Safsızlık oluşturma şekli

Safsızlık E sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan bir safsızlıktır. Bu safsızlıkta iki pantoprazol molekülü birleşerek dimer denilen yapıyı oluşturur.

4.10. Validasyon Tanımı ve Safsızlık Validasyon Parametreleri

4.10.1. Validasyon

Bir metodun, sürecin, cihazın veya sistemin beklendiği gibi çalıştığını ve istenen sonuçları verdiğinin ispatlanması işlemlerinin tamamına validasyon denir (James ve Gale, 2001). Düşünülen kabul kriterleri yöntemin cinsine göre (miktar tayini analizi, safsızlık analizi) değiştirilebilir. Validasyonda amaç yöntemi iyileştirmek yada yeterli hale getirmek değil, yöntemin yeterlilik ve güvenilirlik anlamında şartları sağladığını tespit etmektir. Bunun için validasyonda önemli iki kriter vardır bunlar doğruluk ve kesinliktir. ICH tarafından farmasötiklerle ilgili olan her yöntemin valide edilmesi çok önemli bir gerekliliktir.

Validasyon için öncelikle laboratuvar koşulları ve ekipmanın yeterli olması gereklidir. Bu koşullar; validasyonun yapılmasına imkan sağlayacak ekipman, üzerinde son kullanma tarihi belirtilmiş etiketleri bulunan reaktifler ve kullanılan aletlerde analizi adı, yöntem adı ve hareketli faz bileşenleri şeklinde sıralanabilir (James ve Gale, 2001).

4.10.2. Valide edilmesi gereken analitik prosedürler

Valide edilmesi gereken analitik prosedürler dört kısım testten oluşur. Bunlar; test numunesinin tutulma zamanını belirleyerek, analiti tanımlamada kullanılan tanınma testleri, safsızlık miktarını hesaplayarak safsızlık seviyesini belirlemek için kullanılan safsızlık içeriğinin kantitatif olarak ölçüldüğü testler, safsızlıkların ya da kalıcı çözücülerin ve ağır metallerin sınırlarını belirlemek için kullanılan testler ve bitmiş üründe etken maddenin miktarını belirlemede kullanılan testlerdir (Roger, 2001; James ve Gale, 2001; ICH Q2A Text, 1995).

4.10.3. Validasyonun tekrarlanmasını gerektiren durumlar

Etken maddenin sentez metodunda, bitmiş ürünün içeriğinde ve analitik yöntemde yapılan değişiklik EP, USP ve yerel ilaç otoritesi tarafından önemli değişiklik kabul edilir ve sonucunda validasyon parametreleri tekrar edilir (ICH Q2A Text, 1995).

4.10.4. Validasyon dökümantasyonu

Dökümantasyon işlemi protokol, rapor ve test dataları içerir. Validasyona öncelikle protokol hazırlanarak başlanılır (Ghulam, 2003). Protokol; test yöntemlerini, valide edilecek parametreleri, test örneklerinin nasıl hazırlanacağını, kromatografik koşulları, validasyon sonuçlarını kabul kriterlerini içermelidir.

Safsızlık yöntemi validasyon raporu ; kullanılan aletlerin listesi, modeli, kullanılan malzemelere ait bilgileri, kullanılan reaktif ve çözücüleri, numune, blank, sistem uygunluğu çözeltilerinin hazırlanışını, kromatografik koşulları içermelidir (James ve Gale, 2001).

4.10.5. Validasyonun temel parametreleri

Validasyonun gerçekleştirilebilmesi için uygulanan parametreler; doğruluk, doğrusallık, kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrar elde edebilirlik, ara kesinlik), seçicilik, tayin alt sınırı, kantitatif alt sınır, konsantrasyon aralığı, sistem uygunluğu ve sağlamlıktır (James ve Gale, 2001).

4.10.5.1. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk gerçekliği kabul edilen referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ve uyumu ifade eder. Analitik prosedürün belirlenen konsantrasyon aralığı üstünden yapılır (Roger, 2001). Doğruluğun tayin edilebilmesi için en az 3 farklı konsantrasyonda 3 enjeksiyon tekrarı ile elde edilen 9 dataya ihtiyaç duyulur (ICH Q2A Text, 1995). Analizin yapılması için tavsiye edilen konsantrasyon değerleri LOQ düzeyi, %100' lük ve %120'lik düzeyler kullanılıp geri kazanım hesaplanır (Roger, 2001).

4.10.5.2.Kesinlik (Precision)

Kesinlik aynı koşullar altında, aynı homojenlikte hazırlanmış olan birden fazla örnekten elde edilen ölçüm değerlerinin birbirine yakınlığını ifade eder. 3 bölümden oluşur(Roger, 2001). Bunlar;

4.10.5.3.Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Tekrarlanabilirlik zamanın çok kısa bir müddetinde aynı işlem şartları (aynı gün, analizci ve cihaz) altındaki kesinliği ifade eder (James ve Gale, 2001). Tekrarlanabilirliğin sağlanabilmesi için analitik prosedürde belirlenen konsantrasyon aralığında en az 3 farklı konsantrasyonda 3 enjeksiyon tekrarı ile elde edilen 9 dataya ya da %100'lük test konsantrasyonundan elde edilen 6 enjeksiyon verisine ihtiyaç duyulur (ICH Q2A Text, 1995). Elde edilen RSD değerleri %5.0'den küçük olmalıdır.

4.10.5.3.1. Ara Kesinlik (Intermediate precision)

Laboratuvar değişiklikleri ile ifade edilir. Farklı laboratuvar, farklı analizci, farklı gün, farklı cihaz ile yapılan kesinlik analizidir. Çevre koşullarında oluşan değişikliklerin analitik prosedürü nasıl etkilediğini tayin eder. Tüm bu değişiklikler ayrı değil, aynı zamanda yapılarak değişimler tayin edilir (Roger, 2001; ICH Q2A Text, 1995).

4.10.5.3.2. Tekrar elde edebilirlik (Reproducibility)

Çalışmalar arasındaki kesinliği belirlemek için yapılır. Aynı anda yapılan işlemler esnasında yöntemi standardize etmek için başvurulan bir yöntemdir (Roger, 2001).

Standart sapma, bağıl standart sapma, güven aralığı her kesinlik parametresi için hesaplanmalıdır (ICH Q2A Text, 1995). Elde edilen RSD değerleri %5.0'den küçük olmalıdır.

4.10.5.4. Seçicilik (Selectivity)

Etken madde ile yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığını tespit etmek için yapılır (ICH Q2A Text, 1995).

4.10.5.5. Tayin alt sınırı

Etken madde ya da safsızlığın dedekte edilebileceği en düşük konsantrasyon değeridir (Ruperez ve ark, 2002; Roger, 2001). Birçok yöntem ile tespit edilebilir (ICH Q2B, 1997, ICH Validation, 1998).

4.10.5.5.1. Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem

Enstrümental olmayan yöntemlerde kullanıldığı gibi enstrümental olan yöntemlerde de kullanılır. Tayin alt sınırı, etken maddenin bilinen konsantrasyonunda hazırlanan numunesinin analizi ile güvenilir olarak tespit edilebileceği en düşük seviyenin bulunması ile belirlenir.

4.10.5.5.2. Sinyal / Gürültü (Signal / Noise) oranına dayanan yöntem

Bu yöntem baseline gürültüsü ile ilgilidir. Etken maddenin bilinen en düşük konsantrasyonunda hazırlanan numunesinin ölçümü ile elde edilir. Sinyal / Gürültü oranınının 3 ya da 2:1 olması kabul edilebilir tayin alt sınırıdır.

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

Tayin alt sınırı bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$TAS = 3.3 \sigma / S$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S: kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

Eğim etken maddenin kalibrasyon eğrisinden elde edilir. Sigmanın bulunabilmesi için iki yol vardır; bunlardan ilki etken maddenin belirli konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerinin dedektör cevapları arasındaki bağıl standart sapma hesabı ile sigmanın bulunmasıdır. İkincisi kalibrasyon eğrisinde regresyon çizgisinin bağıl standart sapması ya da regresyon çizgisinin y eksenini oluşturan noktalarının standart sapmasının sigma olarak kullanılabilirdiği yöntemdir

4.10.5.6. Kantitatif alt sınır

Uygun kesinlik ve doğrulukta etken maddenin kantitatif olarak tayin edilebileceği en düşük sınırdır. Safsızlıkların ya da bozunma ürünlerinin tayininde kullanılır (ICH Q2B, 1997; ICH Validation, 1998). Bir çok şekilde tespit edilebilir (Roger, 2001; ICH Q2B, 1997)

4.10.5.6.1. Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem

Enstrümental olmayan yöntemlerde kullanılır. Kantitatif alt sınır, etken maddenin bilinen konsantrasyonunda hazırlanan numunesinin analizi ile güvenilir olarak tespit edilebileceği en düşük seviye belirlenir.

4.10.5.6.2. Sinyal / Gürültü (Signal / Noise) oranına dayanan yöntem

Bu yöntem baseline gürültüsü ile ilgilidir. Etken maddenin bilinen en düşük konsantrasyonunda hazırlanan numunesinin ölçümü ile elde edilir. Sinyal / Gürültü oranının 10:1 olması kabul edilebilir kantitatif alt sınırdır.

4.10.5.6.3. Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntem

Kantitatif alt sınır bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$KAS = 10 \sigma / S$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

Eğim etken maddenin kalibrasyon eğrisinden elde edilir. Sigmanın bulunabilmesi için iki yol vardır; bunlardan ilki etken maddenin belirli konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerinin dedektör cevapları arasındaki bağıl standart sapma hesabı ile sigmanın bulunmasıdır. İkincisi kalibrasyon eğrisinde regresyon çizgisinin bağıl standart sapması ya da regresyon çizgisinin y eksenini oluşturan noktaların standart sapmasının sigma olarak kullanılabilirdiği yöntemdir.

4.10.5.7.Doğrusallık (Linearity)

Belirlenen konsantrasyon aralığı içinde hazırlanan numunelerin içindeki etken madde miktarının konsantrasyon ile orantılı olarak artması ile elde edilir (Roger, 2001). Doğrusallık parametresinin incelenebilmesi için en az 5 konsantrasyonda çalışmak gerekir (ICH Validation, 1998). Doğrusallık en küçük kareler yöntemine göre

oluşturulan doğrunun regresyon katsayısı ile değerlendirilir (Ruperez ve ark., 2002; Roger, 2001). Regresyon katsayısının karesi $> 0,99$ olmalıdır.

4.10.5.8.Konsantrasyon aralığı (Range)

Uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallık seviyesini sağlayan numune içinde bulunan etken madde veya safsızlığın üst ve alt konsantrasyon sınırındır (Roger, 2001). Etken madde ya da bitmiş üründe yöntem validasyonunda %80 - %120 konsantrasyon aralığı olarak kabul edilir (ICH Validation, 1998). Etken madde ve safsızlık tayini tek bir yöntem ile yalnızca %100 standart kullanılarak yapılıyor ise konsantrasyon aralığı safsızlığın detekte edildiği en küçük değer ile %120 konsantrasyon arası olarak kabul edilir (ICH Q2A Text, 1995).

4.10.5.9.Sistem uygunluğu (System suitability)

Sistem uygunluğu bilinmeyenlerin analizi öncesinde sistemin performansını kontrol etme işlemdir. Teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü, ayırım gücü ve tekrarlanabilirlik (6 kez tekrarlanan enjeksiyonların bağlı standart sapması ile elde edilir) sistemin performansını ölçen kriterlerdir (Ghulam, 2003).

4.10.5.10. Sağlamlık (Robustness)

Yöntem parametrelerinde yapılan küçük ama anlamlı değişikliklerin yöneme olan etkisini incelemek ve yöntemin normal koşullarında güvenilirlik sınırlarını belirlemek amacıyla yapılır (Roger, 2001).

Yöntemde yapılan değişikler arasında örnek çözeltilerini ultrasonik banyoda bekletme süresi ya da karıştırma zamanı, hareketli faz oranı, hareketli faz pH'ı, kolon ısısı, enjeksiyon hacmi, akış hızı, farklı kolon kullanımı sayılabilir (Center for Drug Evaluation and Research, 1994; ICH Validation, 1998).

4.11. Validasyonun Kabul Kriterleri

4.11.1. Doğrusallık parametresi

Regresyon katsayısının karesi (r^2) 0,98'den az olmamalıdır. Tercih edilen r^2 değeri 0,99'dur. Yöntemde gerçek değerler ile bulunan değerler arasında farklar görülmeye başlandığı 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 (James ve Gale, 2001). Doğrusallık parametresinin incelenebilmesi için en az 5 konsantrasyonda çalışmak gerekir (ICH Validation, 1998).

4.11.2. Kesinlik parametresi

Etken madde ile hazırlanan çözeltilerin sonuçları $< \pm \%10$ ise çok iyi, $\pm \%11 - \%20$ yeterli, $\pm \%21 - \%30$ sınıra yakın ama kabul edilebilir, $\pm \%30$ 'dan fazlası kabul edilemez olarak belirlenmiştir. Ayrıca sonuçlar arasındaki bağıl standart sapma $\%2,0$ 'den büyük olmamalıdır (James ve Gale, 2001).

4.11.3. Doğruluk parametresi

Safsızlık tayini analizleri için $\% 90 - \% 110$ sınırları içinde olmalıdır (James ve Gale, 2001).

4.11.4. Seçicilik parametresi

Etken madde ile yardımcı maddeler arasında bir etkileşim olmamalıdır (James ve Gale, 2001).

4.11.5. Tayin alt sınırı

Üst sınır baseline gürültü seviyesinin 3 katı, Sinyal/Gürültü oranı 2 ya da 3:1 olmalıdır (James ve Gale, 2001).

4.11.6. Kantitatif alt sınırı

Tayin alt sınırının 3 katı, Sinyal / Gürültü oranı 10:1 olmalıdır (Ghulam., 2003).

4.11.7. Sistem uygunluğu

Etken maddenin % 100 konsantrasyonda hazırlanan çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılarak bağıl standart sapma hesaplanır bu değer % 5'den küçük olmalıdır. Ayrıca sistem uygunluğu kromatogramında pikin kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerlendirilir (James ve Gale, 2001). Kuyruklanma faktörü 2 ya da daha küçük, teorik plaka sayısı 2 000'den büyük, ayırım gücü ve kapasite faktörü 2'den büyük olmalıdır (Ghulam, 2003).

4.11.8. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları

Stabilite testleri ilacın son kullanma tarihinden önce bozulmaya uğramadığından emin olmak için yapılır (Barbas ve ark., 2000). Analitik yöntem stabilite analizi esnasında, bozunma ürününü aktif üründen ayırabilmelidir (Barbas ve ark., 2000). Bu yüzden seçilen analitik yöntem ile bilinmeyen safsızlıkları tespit etmek ve etken madde ya da bilinen safsızlıkların bozulmasını tespit edebilmek için hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılır. Böylece hızlandırılmış bozundurma çalışmaları ile molekülün gerçek stabilitesi belirlenmiş ve kullanılan analitik yöntemin stabilite analizi performansı valide edilmiş olur (ICH Q1A (R2), 1998).

4.11.9. Literatürlerde yapılmış hızlandırılmış bozundurma çalışmaları uygulamaları

Asidik ortam pH 3,0 ve bazik ortam pH 8,0 gibi farklı pH ortamlarında bekletmek, %0,3 H₂O₂ ile okside etmek, 1 saat kadar 120°C'de bekletmek (Lambropoulos ve Bergholdt, 2000; Mitakos ve Panderi , 2002; Barbas ve ark., 2000) hızlandırılmış stabilite şartları için kullanılan sıcaklıkların $\pm 10^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında bekletmek, UV lamba ışığına 24-48 saat maruz bırakmak, nemli ortamda ve etkili görünür ışık altında bekletmek olarak sıralanabilir (ICH Q1A(R2), 2003).

4.12. Kromatogram Uygunluk Terimleri ve Açıklamaları

4.12.1. Kapasite Faktörü (k')

Alıkonma faktörü'de denir ve k' ile sembolize edilir. Kolonda çözünen örneğin göç hızını açıklamada sıkça kullanılan önemli bir terimdir. Kapasite faktörünün sayısal değeri 1'den çok küçük olursa elüsyon çok hızlı olacağından alıkonma zamanının tayini zorlaşır (Center for Drug Evaluation and Research., 1994). Ters durumda, Kapasite faktörünün 20-30'dan büyük olması durumundaysa elüsyon zamanı aşırı uzun olur. İdealde, kromatografik analizler kapasite faktörünün $2 \leq k' \leq 10$ olduğu durumlarda gerçekleştirilir.(Ergenç ve ark., 1999)

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

k' : Kapasite faktörü

t₀ : Ölü zaman (dk)

t_r : Tutulma zamanı (dk)

4.12.2. Teorik Plaka Sayısı (N)

N ile sembolize edilir. Kolonun doldurma materyalinin özellikleri ve kütle transferinin başarısı ile ilgili bir ölçüdür. N ne kadar büyük olursa, o kadar komplike örnekler, o kolon ile başarıyla ayrıştırılabilir (Center for Drug Evaluation and Research, 1994).

$$N = 16. (t_R/t_W)^2$$

t_R : Etken maddenin tutulma zamanı (dk)

t_W : Pikin baseline üzerindeki iki kenarının arasındaki genişlik

4.12.3. Ayırma Faktörü (a)

Ayırma faktörü birbiri ile ilişkili iki pikin bağıl tutulmalarına denir. Mobil ve sabit fazın özellikleri ile sıcaklıktan etkilenir. İki pikin kapasite faktörleri oranıdır (Ergenç ve ark., 1999).

$$a = k_2/k_1$$

k_2 : Sonraki pikin kapasite faktörü

k_1 : Önceki pikin kapasite faktörü

4.12.4. Kuyruklanma Faktörü (T)

Kuyruklanma faktörü kromatografik yöntemde pikin asimetrisini ölçmek için kullanılan değerdir (James ve Gale, 2001).

$$T = W / 2f$$

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

f : Pikin ön kenarından maksimum dikeyine olan uzaklığı

4.12.5. Pik simetrisi

Pikin simetrisi yüksekliğinin %10'luk kısmından ölçülür (James ve Gale, 2001). İdeal simetrisinin değeri 1 olup, eğer;

<1 ise pik sağa doğru yatık (fronting)

>1 ise pik sola doğru yatık (tailing)

şekilde asimetrik olur.

4.12.6. Ayırma Gücü (R)

R ile sembolize edilir. Birbirini takip eden iki adet bileşene ait piklerin birbirinden ayırımlarının başarısını gösterir. Takip eden piklere ait maksimumlar arası mesafenin iki pik'e ait genişliklerin toplamına bölünmesiyle hesaplanır (James ve Gale, 2001).

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

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

4.12.7. Tutulma zamanı (t_R)

Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terketmesi olayıdır . Bu özellikten yola çıkılarak, belirli sabit analitik koşullar altında, her kimyasal madde için parmakizi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retentiontime- t_R) tanımı türetilmiştir. Bu kavram belirli sabit deneysel koşullarda analizi yapılan maddenin sabit fazı terketmesi ve dedektöre ulaşması için geçen süreyi göstermektedir.

$$t_R= V_r/F$$

V_r : Çözeltiyi elue etmek için kolondan geçen çözücü hacmi

F : Akış hızı

4.13. İstatistiksel Terimlerin Tanımları

4.13.1. Standart Sapma (SD)

Standart sapma analizle ilgili sistematik hatanın ölçüsüdür. Her bir değer in ortalamadan sapmasının karelerinin toplamının serbestlik derecesine bölümünün kare kökü ile ifade edilir. Serbestlik derecesi sayısı, bir standart sapma hesaplamasında kullanılan bağımsız veri sayısını gösterir (Skoog, 1996; Gennaro, 1985).

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

Standart sapma genel olarak niceliksel ölçekli sayılar için en çok kullanılan verilerin ortalamaya göre yayılmasını gösteren bir istatistiksel ölçüdür. Eğer birçok veri ortalamaya yakın ise, standart sapma değeri küçüktür; eğer birçok veri ortalamadan uzakta yayılmışlarsa standart sapma değeri büyük olur. Eğer bütün veri değerleri tıpatıp aynı ise standart sapma değeri sıfırdır.

4.13.2. Bağlı Standart Sapma (RSD)

Bağlı standart sapma, standart sapmanın numunelerin ortalamasına bölümü olarak ifade edilir (James ve Gale, 2001).

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

SD: Standart sapma

\bar{X} : Numune değerlerinin ortalaması

4.13.3. Ortalamanın Güven Aralığı (p)

Örneğin yeterince büyük olmaması veya bir örnekten elde edilen istatistiğin bir başka örnekten sağlanan istatistikle aynı olmayışı yüzünden anakütle parametresini bir noktada tahmin etmek yanlış sonuçlar doğurabilir. Bu yüzden anakütle parametresi belirli bir hata seviyesi göz önüne alınarak belirli bir aralıkta aranır. Hata terimini α ile gösterirsek, $1-\alpha$ güven seviyesinde aralık tahmini yapabiliriz. Hata terimi normal eğrinin her iki ucunda eşit olarak yer alır. Bu $\alpha/2$ ' lik hata terimine karşılık gelen $\pm Z$ değerleri belirlenerek örnek dağılımının standart hatası ile çarpıldığında hata payı elde edilir. Hata payının örnek istatistiğine eklenip çıkarılması ile aralık tahmini yapılır. Bu şekilde, anakütle parametresinin belirli aralıkta yer aldığını, $1-\alpha$ güven seviyesinde söyleyebiliriz. Güven sınırlarından küçük olanına alt güven sınırı, büyüğüne ise üst güven sınırı denir. Hata terimi küçüldükçe güven aralığı genişler. Güven sınırlarının belirleneceği olasılık seviyesine göre Z değeri değişir (Skoog, 1996; Gennaro, 1985).

$$\mu = \bar{x} \mp \frac{z \cdot SD}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} : Numune değerlerinin ortalaması

SD: Standart sapma

n: Değer sayısı

4.13.4. Standart Hata (STH)

Her bir ortalamanın standart sapması ortalamanın standart hatası olarak bilinir. Standart sapma değerinin veri sayısının kareköküne bölünmesi ile elde edilen değerdir (Gennaro, 1985; Kayaalp, 1998).

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

4.13.5. En K Kareler Yöntemi

Bir grafikteki noktaların çizilen doğrudan olan düşey sapması artık olarak adlandırılır. En k kareler yöntemi ile elde edilen doğru, bütün noktalarının karelerinin toplamını en aza indiren bir doğrudur. En k kareler yöntemi, birbirine bağlı olarak değişen iki fiziksel büyüklük arasındaki matematiksel bağlantıyı, mümkün olduğunca gerçeğe uygun bir denklem olarak yazmak için kullanılan, standart bir regresyon yöntemidir. Bir başka deyişle bu yöntem, ölçüm sonucu elde edilmiş veri noktalarına "mümkün olduğu kadar yakın" geçecek bir fonksiyon eğrisi bulmaya yarar. En k kareler yöntemi, bir doğru denkleminin verdiği (teorik) y değerleri ile ölçümlerin verdiği (gerçek) y değerleri arasındaki farkların karelerinin toplamını küçültme fikrine dayanır. Bu yöntem, denklemdaki a ve b sayılarını, bahsedilen kareler toplamını en k yapacak şekilde seçer ve adını da buradan alır. (Skoog, 1996; Ergenç ve ark., 1999)

4.13.6. Doğrunun eğimi

Doğrunun eğimi ya da gradyanı o doğrunun dikliğini, eğimliliğini belirtir. Daha büyük eğim, daha eğimli bir doğru demektir. Eğim, bir doğrunun herhangi iki noktası arasındaki dikey değişimin yatay değişime oranı olarak tanımlanabilir. Bir doğru üzerinde (x_1, y_1) ve (x_2, y_2) koordinatlarında iki nokta verildiğinde doğrunun eğimi

$$m = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)}$$

formülü ile bulunabilir.

4.13.7. Doğrunun kesme noktası

$y = ax + b$ denkleminde hesaplanan a ve b değerleri yerine konularak doğru denklemi bulunur. $y = ax + b$ denkleminde a eğimi ve b de y eksenini kesim noktasını gösterir. Çünkü $x = 0$ olduğunda $y = b$ olur.

4.13.8. Korelasyon katsayısı

Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki birleşimin ölçümünün derecesidir. Korelasyon, olasılık kuramı ve istatistikte iki rassal değişken arasındaki doğrusal ilişkinin yönünü ve gücünü belirtir. Genel istatistiksel kullanımda korelasyon,

bağımsızlık durumundan ne kadar uzaklaştığını gösterir. Farklı durumlar için farklı korelasyon katsayıları geliştirilmiştir. Bunlardan en iyi bilineni Pearson çarpım-moment korelasyon katsayısıdır. İki değişkenin kovaryansının, yine bu değişkenlerin standart sapmalarının çarpımına bölünmesiyle elde edilir. Pearson ismiyle bilinmesine rağmen ilk olarak Francis Galton tarafından bulunmuştur.

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

4.13.9. Tayin alt sınırı

Tayin sınırı; analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur (Zhang ve Haemers, 1991; Vega ve Sola, 2001). Tayin sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yonteme göre değişir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir (Mitakos ve Panderi, 2002; Ergenç ve ark., 1999).

Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapmasına ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntemdir.

Tayin alt sınırı bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$TAS = 3.3 \frac{\sigma}{S}$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

4.13.10. Kantitatif alt sınır

Kantitatif alt sınır; analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. (Zhang ve Haemers A., 1991;). Analitin bilinen miktarlarda azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Kantitatif tayin alt sınırı genelde varyasyon katsayısı ile varyasyon katsayısının %15-20 yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda kantitatif tayin sınırı, tayin sınırının iki, üç katıdır (Cinquina ve ark., 2003). Elde edilen dedektör cevaplarının standart sapmasına ve kalibrasyon eğrisinin eğimine dayanan yöntemdir.

Kantitatif alt sınır bu yöntemde şu şekilde ifade edilir:

$$KAS = 10 \frac{\sigma}{S}$$

σ : elde edilen dedektör cevaplarının standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi (slope)

4.13.11. İki ortalamanın karşılaştırılması

İki ortalamanın karşılaştırılması aynı analizin iki takımının ortalaması arasındaki bir farkın gerçek olup olmadığını ve numunelerin farklı olup olmadığını veya farklılığın rastgele hataların basit bir sonucu olup olmadığını anlaşılması için kullanılan bir yöntemdir (Skoog, 1996).

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

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

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kimyasal Maddeler

Pantoprazol Na Sesquihydrate çalışma standardı, Pantoprazol D+F çalışma standardı, Pantoprazol Sülfon çalışma standardı, Pantoprazol-N-Oksit çalışma standardı, Pantoprazol Merkaptol çalışma standardı ve Pantoprazol Sülfid Çalışma standardı Sandoz Synthek İlaç Hammaddeleri Proje & TLCM bölümü sentez laboratuvarı tarafından sentezlenmiştir.

Potasyum dihidrojen fosfat (JT Baker)

Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck)

Potasyum hidroksit (Merck)

Kromatografik saflıkta Asetonitril (Merck)

HCl (Merck)

Hidrojen peroksit (Merck)

Validasyonda kullanılan kromatografik saflıktaki su Merck Milipore su sistemi tarafından sağlanmaktadır. Kullanılacak Pantoprazol Na bitmiş ürünü Sandoz Synthek İlaç Hammaddeleri tarafından sağlanmıştır.

5.2. Gereçler

HPLC sisteminde Agilent G1311A QuatPump HPLC pompa G1379A Degasser gaz uzaklaştırıcı, G1329A ALS Autosampler , G1315B DAD dedektör, G1316A Colcom kolon fırını, 100 pL'lik loop kullanılmıştır. UPLC sisteminde Dionex Ultimate 3000 model pompa, Ultimate 3000 model Autosampler, Ultimate 3000 model DAD dedektör,

Ultimate 3000 model gaz uzaklaştırıcı ve 100 pL'lik loop kullanılmıştır. Metod geliştirme denemeleri ve validasyonda ise Waters X-Terra RP C₁₈ (4,6 x 150 mm 5µm), Zorbax SB C₁₈ (4,6 x 100mm 3,5µm), Agilent Rapid Resolution C₁₈ (4,6 x 150mm 1,8µm), Hypersil Gold Thermo Separation C₁₈ (4,6 x 150mm 3µm), Agilent Rapid Resolution C₁₈ (4,6 x 250mm 5µm), Thermo Separation Hypersil C₁₈ (4,6 x 250 mm 5µm, Phonemenex C₈ (4,6 x 250mm 5µm), Agilent SB-Phenyl C₁₈ (4,6 x 250 mm 5 µm) özelliklerinde kolonlar kullanılmıştır. UPLC metot geliştirmeleri çalışmasında ise Acquity UPLC Beh Phenyl Column, (2,1 x 100mm 1,7µm 130Å) kolon ile Restek Ultra Biphenyl C₁₈ (2,1 x 100mm 3,0 µm) kullanılmıştır. Örneklerin süzülmesi için 0,45 µm naylon filtreler kullanılmıştır. Tartımlar için Metler Toledo terazi, pH ölçümleri için Metrohm 780 pH metre ve elektrodu kullanılmıştır. pH metre kalibrasyonu için pH=1, pH=7 ve pH=12 çözeltileri kullanılmıştır. Isolab A tipi pipetler, Bandelin Sonorex model ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında Labor magnetik karıştırıcı kullanılmıştır. Tüm analizler Sandoz Synthek İlaç Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret A.Ş Proje & TLCM Bölümü Analitik Laboratuvarında yapılmıştır.

5.3. Safsızlık Tayini Analitik Metod Validasyonunda İncelenecek Parametreler

Aşağıdaki parametreler Pantoprazol Na'un ilgili maddeler yöntemi için analitik metod validasyonunda incelenecektir:

- Spesifiklik (Selectivity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Dedeksiyon Limiti (Limit of detection)
- Kantitasyon Limiti (Limit of quantitation)
- Aralık (Range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
 1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 2. Ara Kesinlik (Intermediate precision)
 3. Tekrar Uygulanabilirlik (Reproducibility)

- Sağlamlık
 1. Çözelti Stabilitesi (Solution stability)
 2. Metot Parametreleri Değişiklikleri (Influence of variation of test parameters)

5.4. Validasyon Kromatografik Koşulları

5.4.1. HPLC Kromatografik koşulları

Kolon : Agilent Zorbax SB Phenyl C₁₈ (4,6 x 250 mm 5,0 µm)
Dalga Boyu (nm) : 290nm ve 305nm (DAD veya MWD veya VWR dedektör)
Sıcaklık : 25,0°C
Tray Sıcaklığı : 4,0°C
Akış Hızı : 1,0 mL/dak
Enjeksiyon Hacmi : 20 µL
Enjeksiyon Süresi : 30 dakika

5.4.2. UPLC Kromatografik koşulları

Kolon : Restek Ultra Biphenyl Column C₁₈ (2,1 x 100 mm 3,0 µm)
Dalga Boyu (nm) : 290nm ve 305nm (DAD veya MWD veya VWR dedektör)
Sıcaklık : 25,0°C
Tray Sıcaklığı : 4,0°C
Akış Hızı : 0,25 mL/dak
Enjeksiyon Hacmi : 3,5 µL
Enjeksiyon Süresi : 15 dakika

5.5. Mobil Fazın Hazırlanması

5.5.1. Tampon çözeltisinin hazırlanması

1,495 g Potasyum dihidrojen fosfat ve 0,2625 g Dipotasyum hidrojen fosfat hassas olarak tartılır, 500,0 mL'lik balon jojeye aktarılır. Destile su ile çözülerek hacmine tamamlanır, karıştırılır. pH 7,4'e 0,1 N Potasyum hidroksit ile ayarlanır.

5.5.2. Mobil fazın hazırlanması

65:35(v/v) tampon çözeltisi/Asetonitril karıştırılır, degaze edilir.

5.6. Validasyonda Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanmaları ve Hesaplamalar

5.6.1. Blank çözeltisinin hazırlanması

Mobil faz HPLC vialine aktarılır.

5.6.2. Standart çözeltisinin hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Na, 5,00 mg Pantoprazol Merkaptu, 7,50 mg Pantoprazol D+F, 5,00 mg Pantoprazol Sulfit 7,50 mg Pantoprazol Sulfon ve 5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 100,0 mL'lik balon jojeye transfer edilir. Ultrasonik banyoda 2 dakika tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır (stok standard çözeltisi). Bu çözeltinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.6.3. Numune çözeltisinin hazırlanması

50,00 mg Pantoprazol Na numunesi hassas tartılarak 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. 10,0 mL mobil faz ilave edilir, ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karıştırılır. HPLC vialine aktarılır.

5.6.4. Hesaplamalar

$$\frac{A_N}{A_{\text{Safsızlık std.}}} \times \frac{C_{\text{Safsızlık std.}}}{C_N} \times P \times 100 \quad \% \text{ Spesifik bilinmeyen/ bilinen safsızlık}$$

$$\frac{A_N}{A_{\text{Pantoprazol Na}}} \times \frac{C_{\text{Pantoprazol Na}}}{C_N} \times P \times 100 \quad \% \text{ Spesifik olmayan herbir bilinmeyen safsızlık}$$

A_N : Numune çözeltisinde safsızlığa ait alan

$A_{\text{Saf.std}}$: Standart çözeltisinde safsızlık standardı/Pantoprazol Na'a ait alan

$C_{\text{Saf.std}}$:Standart çözeltisinde safsızlık standardı/Pantoprazol Na'a ait konsantrasyon

C_N : Numune çözeltisinin konsantrasyonu

P : Potens değeri ondalık sayı olarak as-is üzerinden yuvarlama yapılmadan

alınır. (Örneğin Potens= % 99,8 ise hesaplamalarda 0,998 kullanılır).

5.7. Spesifiklik

Etken maddeye ait bütün mevcut safsızlık/bozunma ürünleri spike yapılarak spesifiklik, impüriteler ve aktif madde arasındaki elde edilebilen ayırım gösterilir. Blank, herhangi bir girişimin olmadığını göstermek için kullanılır. Tüm safsızlıklar ve test edilen madde ayrı ayrı analiz edilip tanımlanmalı ve ayrımları gösterilmelidir. Blank, mobil faz, safsızlık çözeltileri, standart çözeltisi, numune çözeltisi, ilaveli (spike) numune çözeltisi, stres şartlarındaki numune çözeltileri sisteme enjekte edilmelidir.

5.7.1. Safsızlık çözeltilerinin hazırlanması

5.7.1.1. Blank çözeltisinin hazırlanması

Mobil faz HPLC vialine aktarılır.

5.7.1.2. Pantoprazol Sülfon (Safsızlık A) safsızlık standardının hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Sülfon (safsızlık A) standardı hassas olarak tartılarak 200,0 mL'lik balon jojeye transfer edilir. 50,0 mL seyreltme çözeltisi ilave edilir ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme seyreltme çözeltisi ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltisi). Bu çözeltinin 3,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır (C: 0,0015mg/mL).

5.7.1.3. Pantoprazol-N-Oksit safsızlık standardının hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 200,0 mL'lik balon jøjeye transfer edilir. 50,0 mL seyreltme çözeltilisi ilave edilir ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözümlenmesi sağlanır. Hacme seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltilisi). Bu çözeltilinin 2,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır (C: 0,0010 mg/mL).

5.7.1.4. Pantoprazol D+F safsızlık standardının hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol D+F safsızlık standardı hassas olarak tartılarak 200,0 mL'lik balon jøjeye transfer edilir. 50,0 mL seyreltme çözeltilisi ilave edilir ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözümlenmesi sağlanır. Hacme seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltilisi). Bu çözeltilinin 3,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır (C: 0,0015mg/mL).

5.7.1.5. Pantoprazol Sülfid (Safsızlık B) safsızlık standardının hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Sülfid standardı hassas olarak tartılarak 200,0 mL'lik balon jøjeye transfer edilir. 50,0 mL seyreltme çözeltilisi ilave edilir ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözümlenmesi sağlanır. Hacme seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltilisi). Bu çözeltilinin 2,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır (C: 0,0010mg/mL).

5.7.1.6. Pantoprazol Merkпто (Safsızlık C) safsızlık standardının hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Merkпто standardı hassas olarak tartılarak 200,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. 50,0 mL seyreltme çözeltilisi ilave edilir ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünlmesi sağlanır. Hacme seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltilisi). Bu çözeltilinin 2,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltme çözeltilisi ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır (C : 0,0010mg/mL).

5.7.1.7. Standart çözeltilisinin hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Na, 5,00 mg Pantoprazol Merkпто, 7,50 mg Pantoprazol D+F, 5,00 mg Pantoprazol Sulfit 7,50 mg Pantoprazol Sulfon ve 5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 100,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. Ultrasonik banyoda 2 dakika tutularak çözünlmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltilisi). Bu çözeltilinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.7.1.8. Numune çözeltilisinin hazırlanması

50,00 mg Pantoprazol Na numunesi hassas tartılarak 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. 10,0 mL mobil faz ilave edilir, ultrasonik banyoda tutularak çözünlmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karıştırılır. HPLC vialine aktarılır.

5.7.1.9. İlaveli numune çözeltilisinin hazırlanması

50,00 mg Pantoprazol Na numunesi hassas tartılarak 50,0 mL'lik balon jøjeye transfer edilir. 10,0 mL mobil faz ilave edilir, ultrasonik banyoda tutularak çözünməsi sağlanır. Bu numune içerisine daha önce hazırlanan stok standart çözeltilisinden 1,0 mL ilave edilir. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karışırılır. HPLC vialine aktarılır.

5.7.1.10. Hızlandırılmış bozunma çalışmaları

Stok çözeltilisi numune analiz konsantrasyonunun çalışma çözeltilisindeki etken maddenin yaklaşık 10 katı konsantrasyonu olacak şekilde hazırlanır. Çözeltilerin hazırlanışı aşağıdaki gibidir:

5.7.1.10.1. Stok çözeltilisinin hazırlanması

500,00 mg numune 50,0 mL'lik balon jøjeye transfer edilir. Çözücü ilave edilir ve tamamen çözüneneye kadar ultrasonik banyoda tutulur. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karışırılır.

5.7.1.10.2. Bozundurmaya maruz bırakılmayan numunenin hazırlanması

5,0 mL stok çözeltilisi 50,0 mL'lik balon jøjeye aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.3. Bozundurmaya maruz bırakılan numunelerin hazırlanması

5.7.1.10.3.1. UV ışığı altında bozundurma

Yeterli miktarda stok numune çözeltisi ve katı numune 360 nm'de 16-20 saat UV ışığına maruz bırakılır. Daha sonra numune hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlanır.

5.7.1.10.3.2. Termal bozundurma

5,0 mL stok çözelti 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilerek 50,0 mL'lik balon jöjeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.3.3. Asidik bozundurma

5,0 mL stok çözelti ve 5,0 mL 1,0 N HCl çözeltisi 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 1-2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilir ve 5,0 mL 1,0N KOH ile nötrale edilir. Bu çözelti 50,0 mL'lik balon jöjeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.3.4. Bazik bozundurma

5,0 mL stok çözelti ve 5,0 mL 1,0 N KOH çözeltisi 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 1-2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilir ve

5,0 mL 1,0 N HCl ile nötrale edilir. Bu çözelti 50,0 mL'lik balon jøjeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.3.5. Oksidatif bozundurma

5,0 mL stok çözelti ve % 6'lık H₂O₂ (Hidrojen peroksit) 50,0 mL'lik balon jøjeye aktarılır. 4 saat oda sıcaklığında bekletilir ya da 30 dakika 75 °C'de ısıtılır. Çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.4. Bozundurmaya maruz bırakılan numunelerin blank çözeltilerinin hazırlanması

5.7.1.10.4.1. UV ışığı altında bozundurma

Blank (çözücü) çözeltisi 360 nm'de 16-20 saat UV ışığına maruz bırakılır.

5.7.1.10.4.2. Termal bozundurma

5,0 mL blank (çözücü) çözeltisi 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilerek 50,0 mL'lik balon jøjeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.4.3. Asidik bozundurma

5,0 mL blank (özücü) özeltisi ve 5,0 mL 1,0 N HCl özeltisi 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 1-2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilir ve 5,0 mL 1,0 N KOH ile nötralize edilerek 50,0 mL'lik balon jojeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.4.4. Bazik bozundurma

5,0 mL blank (özücü) özeltisi ve 5,0 mL 1,0 N KOH özeltisi 50,0 mL'lik balona aktarılır ve su banyosunda geri soğutuculu sistemde 1-2 saat kaynatılır. Oda sıcaklığına getirilir ve 5,0 mL 1,0 N HCl ile nötralize edilerek 50,0 mL'lik balon jojeye çözücü ile yıkanarak aktarılır ve çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.1.10.4.5. Oksidatif bozundurma

5,0 mL blank (özücü) özeltisi ve % 6'lık H₂O₂ (Hidrojen peroksit) 50,0 mL'lik balon jojeye aktarılır. 4 saat oda sıcaklığında bekletilir ya da 30 dakika 75 °C'de ısıtılır. Çözücü ile hacme tamamlanır.

5.7.2. Enjeksiyon sırası

Standart çözeltileri (sistem uygunluğu)	6 enjeksiyon
Blank	1 enjeksiyon
Mobil faz	1 enjeksiyon
Safsızlık çözeltileri	1'er enjeksiyon
Numune çözeltileri	1 enjeksiyon
Spike numune çözeltileri	1 enjeksiyon
Standart Çözeltisi (sistem uygunluğu)	6 enjeksiyon*
Blank	1 enjeksiyon
Unspiked Numune Çözeltisi	1 enjeksiyon
UV Işığı için blank çözeltisi	1 enjeksiyon
UV Işığı için (sıvı) numune çözeltisi	1 enjeksiyon
UV Işığı için (katı) numune çözeltisi	1 enjeksiyon
Termal bozundurma için blank çözeltisi	1 enjeksiyon
Termal bozundurma için numune çözeltisi	1 enjeksiyon
Oksidatif bozundurma için blank çözeltisi	1 enjeksiyon
Oksidatif bozundurma için numune çözeltisi	1 enjeksiyon
Bazik bozundurma için blank çözeltisi	1 enjeksiyon
Bazik bozundurma için numune çözeltisi	1 enjeksiyon
Asidik bozundurma için blank çözeltisi	1 enjeksiyon
Asidik bozundurma için numune çözeltisi	1 enjeksiyon
Blank	1 enjeksiyon
Standart Çözeltisi	1 enjeksiyon

* İki çalışma birleştirildiği zaman sistem uygunluğu için 6 enjeksiyon yapmaya gerek yoktur.

5.7.3. Kromatografik prosedür

Hazırlanan çözeltiler 1'er kez enjekte edilir. Pik purity testi, DAD (Diode Array Dedector) veya mass spektrofotometresi kullanılarak spektrumları alınır. Mobil faz, blank, numune çözeltisi ve bozundurma çalışması için hazırlanan numuneler karşılaştırılarak bozunma ürünleri tespit edilir.

5.7.4. Data değerlendirme

1. Standart çözeltinin ardışık 6 enjeksiyonunda Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol Sülfid, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol D+F ve Pantoprazol Sülfon'a ait piklerin alanlarının % RSD'si 5,0'den küçük olmalıdır.
2. Tüm piklerin RT ve RRT'leri belirlenir. Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol Sülfid, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol D+F ve Pantoprazol Sülfon çıkış zamanında herhangi bir pik çıkmadığı gösterilmelidir.
3. Bütün mevcut safsızlıkların varlığında aktif maddenin ve bilinen safsızlıkların ilaveli numune içerisinde rezolüsyonu göstermek için datalar değerlendirilmelidir.
4. Bütün mevcut safsızlıkların varlığında aktif maddenin ve bilinen safsızlıkların ilaveli numune içerisinde pik saflığına (peak purity) bakılır. Saflık değerleri 990'dan az olmamalıdır.

5.8. Doğrusallık (Linearity)

5.8.1. Stok standart çözeltisinin hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Na, 5,00 mg Pantoprazol Merkaptı, 7,50 mg Pantoprazol D+F, 5,00 mg Pantoprazol Sülfid 7,50 mg Pantoprazol Sülfon ve 5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 100,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir, mobil faz ilave edilir. Ultrasonik banyoda 2 dakika tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır.

5.8.2. %150'lik Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 3,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.3. %120'lik Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 2,4 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.4. %110'luk Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 2,2 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.5. %100'lük Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.6. %90'lık Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 1,8 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.7. %80'lik Standart çözeltisinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 1,6 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8. LOQ Çözeltilerin hazırlanması

5.8.8.1. %50'lik Çözeltinin hazırlanması

Stok standart çözeltinin 1,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.2. %45,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 9,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.3. %40,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 8,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.4. %35,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 7,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.5. %30,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 6,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.6. %25,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 5,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.7. %20,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 4,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.8. %18,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 3,6 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.9. %15,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 3,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.10.%12,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 2,4 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.11.%10,0'luk Çözeltinin hazırlanması

% 50'lik standart çözeltinin 2,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.12.%8,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 1,6 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.13.%5,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.14.%1,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 1,0 mL'si 50,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.8.15.%0,5'lik Çözeltinin hazırlanması

%50'lik standart çözeltinin 0,5 mL'si 50,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9. LOD Çözeltilerinin hazırlanması

5.8.9.1. %10,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 10,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.2. %9,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 9,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.3. %8,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 8,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.4. %7,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 7,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.5. %6,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 6,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.6. %5,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 5,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.7. %4,0'lük Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 4,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.8. %3,0'lük Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 3,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.9. %2,0'luk Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.10.%1,0'lik Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 1,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.8.9.11.%0,05'lik Çözeltinin hazırlanması

%100'lük standart çözeltinin 1,0 mL'si 200,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.9. Dedeksiyon Limiti (LOD)

LOQ için hazırlanan çözeltilerden dedekte edilebilen en düşük konsantrasyonda standart çözeltileri hazırlanarak enjekte edilir. 3'er enjeksiyon yapılır. LOD seviyesindeki çözeltide pikler dedekte edilebilir olmalıdır. S/N oranı hesaplanır. S/N 3:1 ile 2:1 arasında olmalıdır. Hazırlanan çözeltiler doğrusallık çalışması ile birlikte enjekte edilebilir.

5.10. Kantitasyon Limiti (LOQ)

Doğrusallık için hazırlanan çözeltilerden en düşük konsantrasyona sahip olan seviyedeki çözelti kullanılır ve çözelti konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonda seyreltmeler yapılır. Herbir çözeltiden 3'er enjeksiyon yapılır. S/N oranı hesaplanır. S/N $\geq 10:1$ olmalıdır. Hazırlanan çözeltiler doğrusallık çalışması ile birlikte enjekte edilebilir. Bu seviyede 1 adet standart çözeltisi hazırlanır ve 6 kez enjekte edilir. % RSD'si 10,0'dan küçük olmalıdır.

5.11. Aralık (Range)

LOQ, %100 ve %120 konsantrasyonundaki standart çözeltilerinin % RSD'si 5,0'den küçük olmalıdır. Sonuçlar, doğrusallık, LOD ve LOQ düzeylerini belirlemek için hazırlanan ve enjekte edilen çözeltilerden elde edilebilir.

5.12. Enjeksiyon Sırası

Standart Çözeltisi (sistem uygunluğu)	6 enjeksiyon
Blank	3 enjeksiyon
LOD için Hazırlanan Çözeltiler*	3'er enjeksiyon
LOQ için Hazırlanan Çözeltiler*	3'er enjeksiyon
% 80'lik Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
% 90'luk Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
% 100,0'lük Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
% 110,0'luk Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
% 120,0'lik Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
% 150,0'lik Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon

*LOD ve LOQ için hazırlanan çözeltiler ayrı enjeksiyon olarak verilebilir ya da doğrusallık için hazırlanan çözeltiler ile birlikte enjekte edilebilir.

5.13. Doğrusallık, LOD, LOQ ve Aralık için Kromatografik Prosedür

Hazırlanan çözeltiler 3'er kez enjekte edilir. LOD ve LOQ parametresi incelenirken, analiz sırasında konsantrasyon seviyeleri azaltılabilir veya çoğaltılabilir.

5.14. Doğrusallık, LOD, LOQ ve Aralık için Data Değerlendirme

Standart çözeltinin ardışık 6 enjeksiyonunda Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol Sülfid, Pantoprazol D+F ve Pantoprazol Sülfon'a ait piklerin alanlarının % RSD' si 5,0'den küçük olmalıdır.

Her seviyede Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol Sülfid, Pantoprazol D+F ve Pantoprazol Sülfon'a ait piklerinin alanlarının %RSD'si %5,0'den küçük olmalıdır.

Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol Sülfid ve Pantoprazol Sülfon, Pantoprazol D+F için konsantrasyon ile elde edilen piklerin alanları arasında doğrusallık grafiği çizilir, regresyon ve kesme noktası (Y-intersept) ve korelasyon katsayısı belirlenir.

Tablo 5. 1. Doğrusallık raporlama limitleri

Korelasyon katsayısı	$\geq 0,99$
% Y intersept	$\leq \pm 25$
Regresyon çizgisinin eğimi	Sadece raporlanacak
Artık karelerin toplamı	Sadece raporlanacak

5.15. Doğruluk (Accuracy)

Metodun doğruluğunun kanıtlanması amacı ile geri kazanım çalışması için 9 tayin yapılarak incelenir. Her bir safsızlığın limit konsantrasyonun LOQ, %100'lük ve %150'lik 3 konsantrasyon seviyesinde yapılan 3'er tayinlerinin verileri toplanır. Bilinen konsantrasyonda safsızlıklar numuneye ilave edilir ve aynı prosedür ile analiz edilir. Geri kazanılan safsızlık miktarı hesaplanır ve sonuçlar % geri kazanım olarak raporlanır.

5.15.1. %LOQ Seviyesinde standart çözeltisinin hazırlanması

Bölüm başlığı 5.8.8. LOQ standartlarının hazırlanması kısmında bu bilgilere yer verilmiştir.

5.15.2. %100'lük Standart çözeltisinin hazırlanması

Bölüm başlığı 5.8.5. %100 standart çözeltisinin hazırlanması kısmında bu bilgilere yer verilmiştir.

5.15.3. %150'lik Standart çözeltilisinin hazırlanması

Bölüm başlığı 5.8.2. %150 standart çözeltilisinin hazırlanması kısmında bu bilgilere yer verilmiştir.

5.15.4. %LOQ Seviyesinde safsızlık ilaveli numune çözeltilisinin hazırlanması

50,00 mg numune 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. LOQ seviyesine denk gelecek impürite miktarları ilave edilir, çözülür, karıştırılır ve hacme mobil faz ile tamamlanır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.15.5. %100'lük Safsızlık ilaveli numune çözeltilisinin hazırlanması

50,00 mg numune 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. Stok standart (bkz. 5.8.1.) çözeltilisinin 1,0 mL'si ilave edilir, çözülür, karıştırılır ve hacme mobil faz ile tamamlanır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.15.6. %150'lik Safsızlık ilaveli numune çözeltilisinin hazırlanması

50,00 mg numune 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. Stok standart (bkz. 5.8.1.) çözeltilisinin 1,50 mL'si ilave edilir, karıştırılır, çözülür ve hacme mobil faz ile tamamlanır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.15.7. Enjeksiyon Sırası

LOQ Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
%100'lük Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
%150'lik Standart Çözeltisi	3 enjeksiyon
Blank	1 enjeksiyon
LOQ İlaveli Numune 1	1 enjeksiyon
LOQ İlaveli Numune 2	1 enjeksiyon
LOQ İlaveli Numune 3	1 enjeksiyon
%100'lük İlaveli Numune 1	1 enjeksiyon
%100'lük İlaveli Numune 2	1 enjeksiyon
%100'lük İlaveli Numune 3	1 enjeksiyon
%150'lik İlaveli Numune 1	1 enjeksiyon
%150'lik İlaveli Numune 2	1 enjeksiyon
%150'lik İlaveli Numune 3	1 enjeksiyon

5.15.8. Kromatografik Prosedür

%100'lük ve %150'lik Standart çözeltinin ardışık 3'er enjeksiyonunda Pantoprazol Na, Merkпто, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol Sülfıt ve Pantoprazol Sülfon, Pantoprazol D+F'e ait piklerinin alanlarının % RSD 5,0'den küçük olmalıdır.

LOQ seviyesindeki Standart çözeltinin ardışık 3'er enjeksiyonunda Pantoprazol Na, Merkпто, Pantoprazol Sülfon-N-Oksit, Pantoprazol Sülfıt ve Pantoprazol Sülfon, Pantoprazol D+F'e ait piklerinin alanlarının % RSD 10,0'den küçük olmalıdır.

Bütün mevcut safsızlıkların varlığında aktif maddenin ve bilinen safsızlıkların ilaveli numune içerisinde ayrımını göstermek için datalar değerlendirilmelidir. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilmelidir.

5.15.9. Data Değerlendirme

Her bir seviye için geri kazanım hesaplanır. Safsızlık limitine göre geri kazanım sonuçlarının kabul kriterleri aşağıda verilmiştir:

Tablo 5. 2. Geri kazanım kabul limitleri

Limit < %0,5	%80-120
Limit %0,5-5	%90-110
Limit > %5	%95-115
Her biri için	%80-120

5.16. Kesinlik (Precision)

5.16.1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Metodun tekrarlanabilirliği, hazırlanan kontrol prosedüründe tanımlanan koşullar altında homojen numunenin 6 tayini yapılarak hesaplanır.

5.16.2. Ara kesinlik (Intermediate Precision)

Metodun tekrarlanabilirliği, hazırlanan kontrol prosedüründe tanımlanan koşullar altında homojen numunenin 6 tayini farklı bir analist tarafından farklı bir gün, farklı bir

cihaz, farklı bir kolon kullanılarak tayin edilir. Tekrar uygulanabilirlik yapıyor ise bu parametreyi incelemeye gerek yoktur.

5.16.3. Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility)

Metodun tekrarlanabilirliği, hazırlanan kontrol prosedüründe tanımlanan koşullar altında homojen numunenin 6 tayini farklı bir analist tarafından farklı bir gün, farklı bir cihaz, farklı bir kolon kullanılarak farklı bir laboratuvarında tayin edilir.

5.16.3.1. Blank çözeltisinin hazırlanması

Mobil faz 0,45 µm'lik filtreden süzülür ve HPLC vialine aktarılır.

5.16.3.2. Standart çözeltisinin hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Na, 5,00 mg Pantoprazol Merkaptı, 7,50 mg Pantoprazol D+F, 5,00 mg Pantoprazol Sülfid 7,50 mg Pantoprazol Sülfon ve 5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 100,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. Ultrasonik banyoda 2 dakika tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır (stok standard çözeltisi). Bu çözeltinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.16.3.3. Numune çözeltisinin hazırlanması

50,00 mg Pantoprazol Na numunesi hassas tartılarak 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. 10,0 mL mobil faz ilave edilir, ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karıştırılır. HPLC vialine aktarılır

5.16.3.4.Enjeksiyon sırası

Standart Çözeltisi (sistem uygunluğu)	6 enjeksiyon
Blank	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 1	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 2	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 3	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 4	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 5	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi 6	1 enjeksiyon
Blank	1 enjeksiyon
Standart Çözeltisi	1 enjeksiyon

5.16.3.5.Kromatografik Prosedür

Standart çözeltinin ardışık 6'şar enjeksiyonunda Pantoprazol Na, Merkaptol, Pantoprazol-N-Oksit, Pantoprazol Sülfid ve Pantoprazol Sülfon, Pantoprazol D+F'e ait piklerinin alanlarının % RSD 5,0'den küçük olmalıdır. Sistem uygunluk parametreleri incelenir.

5.16.3.6.Data Değerlendirme

Tekrarlanabilirlik için hazırlanan %100'lük konsantrasyondaki 6 homojen numune analiz edilir. Herbir impürite sonucu için % RSD hesaplanır ve impürite limitlerine göre aşağıdaki tabloya göre değerlendirme yapılır.

Tablo 5. 3. Tekrarlanabilirlik için bağıl standart sapma limitleri

Tekrarlanabilirlik	<%0,2	%RSD ≤ %20 , n≥6
	%0,2-0,5	%RSD ≤ %10 , n≥6
	%0,5- 5	%RSD ≤ %5 , n≥6
	> %5	%RSD ≤ %2,5 , n≥6

Arakesinlik için hazırlanan % 100'lük konsantrasyonda hazırlanan 6 homojen numune analiz edilir. Herbir safsızlık sonucu için %RSD hesaplanır ve arakesinlik parametresi incelenirken herbir safsızlık için % RSD limiti tekrarlanabilirlik ile aynıdır. Tekrarlanabilirlik ile arakesinlik değerleri arasındaki farklar aşağıdaki tabloya göre değerlendirilecektir:

Tablo 5. 4. Arakesinlik parametresi kabul limitleri

Arakesinlik	Gözlenen seviye %0,1'den fazla değil ise	$\Delta \leq \%0,05$
	Gözlenen seviye %0,2-0,3	$\Delta \leq \%0,10$
	Gözlenen seviye %0,4-0,5	$\Delta \leq \%0,15$
	Gözlenen seviye %0,6-0,8	$\Delta \leq \%0,20$
	Gözlenen seviye %0,9-3,0	$\Delta \leq \%0,3$
	Gözlenen seviye > 3,0%	$\Delta \leq \%10$ bağıl

5.17. Sağlamlık

5.17.1. Çözelti stabilitesi

5.17.1.1. Standart çözelti stabilitesi

Hazırlanan standart çözeltisi farklı zaman aralıklarında 1'er kez enjekte edilir. Zaman aralıkları 0-72 saatlerdir. Standart çözeltisinin stabilitesine göre bu süre

değişebilir. (Validasyon testlerinin herhangi birinde hazırlanan %100'lük standart çözeltisi kullanılabilir ya da yeni hazırlanır).

5.17.1.2.Numune çözeltisi stabilitesi

Hazırlanan ilavesiz numune çözeltisi farklı zaman aralıklarında 1'er kez enjekte edilir. Zaman aralıkları 0-24 saatlerdir. Tavsiye edilen zamanlar analiz şartlarına göre değişebilir (Tekrarlanabilirlik testinde hazırlanan numune çözeltilerinden biri kullanılabilir ya da yeni hazırlanır).

5.17.1.3.Standart çözeltisinin hazırlanması

5,00 mg Pantoprazol Na, 5,00 mg Pantoprazol Merkaptu, 7,50 mg Pantoprazol D+F, 5,00 mg Pantoprazol Sulfid 7,50 mg Pantoprazol Sulfon ve 5,00 mg Pantoprazol-N-Oksit standardı hassas olarak tartılarak 100,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. Ultrasonik banyoda 2 dakika tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır (stok standart çözeltisi). Bu çözeltinin 2,0 mL'si 100,0 mL'ye mobil faz ile tamamlanır, karıştırılır. 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine alınır.

5.17.1.4.Numune çözeltisinin hazırlanması

50,00 mg Pantoprazol Na numunesi hassas tartılarak 50,0 mL'lik balon jöjeye transfer edilir. 10,0 mL mobil faz ilave edilir, ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Hacme mobil faz ile tamamlanır ve karıştırılır. HPLC vialine aktarılır.

5.17.1.5.Enjeksiyon sırası

Standart Çözeltisi	1 enjeksiyon
Numune Çözeltisi	1 enjeksiyon

5.17.1.6.Data değerlendirme

Standart çözeltisinden elde edilen pik alanlarının %RSD'si hesaplanır ve aşağıdaki tabloya göre % RSD değerlendirilir.

Tablo 5. 5. Sağlık parametresi standart kabul kriterleri

Gözlenen seviye <%0,2	≤%30 bağıl
Gözlenen seviye %0,2-0,5	≤ %20 bağıl
Gözlenen seviye %0,5-5,0	≤% 10 bağıl
Gözlenen seviye > %5,0	≤ %5 bağıl

Numune çözeltisindeki impürityelerin yüzdeleri hesaplanır ve aşağıdaki tabloya göre %RSD'leri değerlendirilir. Numune çözeltisinde raporlama seviyesi üzerinde ilave bir pik gözlenmemelidir.

Tablo 5. 6. Sağlık parametresi numune kabul kriterleri

Gözlenen seviye < %0,5	± %0,1 mutlak
Gözlenen seviye %0,5-5,0	≤ %10 bağıl
Gözlenen seviye > %5,0	≤ %5 bağıl

5.17.2. Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters)

Analiz parametreleri (akış hızı, dalga boyu ve kolon sıcaklığı,vb) değiştirilir. 1 adet standart çözeltisi hazırlanır. Standart çözeltisi enjekte edilir. Değiştirilen parametreler için yeni değerler aşığıdaki tabloya yazılır.

Tablo 5. 7. Analiz şartlarındaki değişiklik için koşul tablosu

	Akış Hızı	Mobil Faz pH ¹	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	Dalga Boyu
	± % 10	± % 5	± % 5	± 5 °C	± 5	± 5
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	305
A1	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	305
A2	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	305
B1	1,0	7,8	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	305
B2	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	305
C1	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	305
C2	1,0	7,4	25:75 (ACN:Tampon)	25	290	305
D1	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	305
D2	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	305
E1	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	305
E2	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	305
F1	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	310
F2	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	300

6. BULGULAR

6.1. HPLC Metot Geliştirme Denemeleri 1

6.1.1. Kromatografik koşullar

Kolon : Waters X-Terra RP C₁₈, (4,6 x 150 mm x 5 µm)

Dalga Boyu (λ) : 290 nm ve 305 nm

Sıcaklık:

Kolon Sıcaklığı : 25,0°C

Tray Sıcaklığı : 4,0°C

Akış Hızı : 1,5 mL/dak

Enjeksiyon Hacmi : 25.0 µL

Enjeksiyon Süresi : 60 dakika

6.1.2. Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

6.1.2.1. Mobil Faz A'nın Hazırlanması

80 hacim distile su, 15 hacim asetonitril, 5 hacim metanol ve 0,2 hacim trietilamin karıştırılır. Çözeltinin pH'ı fosforik asit ile $6,50 \pm 0.05$ 'e ayarlanır.

6.1.2.2. Mobil Faz B'nin Hazırlanması

80 hacim asetonitril ile 20 hacim su karıştırılır, degaze edilir.

6.1.2.3. Çözücünün hazırlanması

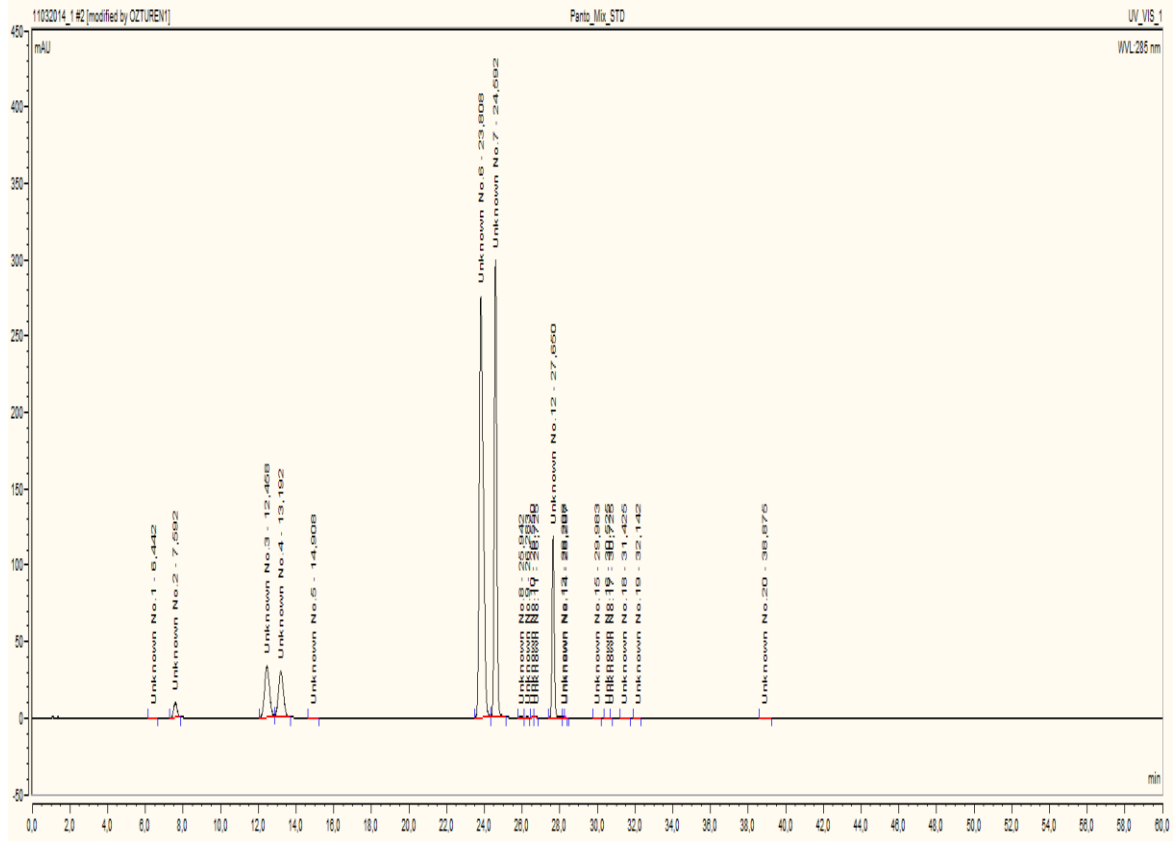
80 hacim su, 15 hacim asetonitril, 5 hacim metanol ve 0,2 hacim trietilamin ile karıştırılır, filtreden süzülür ve degaze edilir. Çözeltinin pH'ı ortofosforik asit ile $10,00 \pm 0,05$ 'e ayarlanır.

6.1.2.4. Sonuçlar

Bu geliştirme denemelerinde pikler arasındaki rezolüsyonun kötü ve analiz süresinin çok uzun olduğu görüldü. Ayrıca bazı piklerin kromatogramda çıkmadığı saptandı. Bu mobil faz ve çözücü varlığında farklı akış denemeleri ile yapılan çalışmalara ait örnek kromatogramlar aşağıdadır.

Tablo 6. 1. Metot denemeleri akış değişim programı 1

Süre (dak.)	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0	100	0
5	100	0
10	95	5
20	95	5
25	60	40
35	60	40
40	100	0

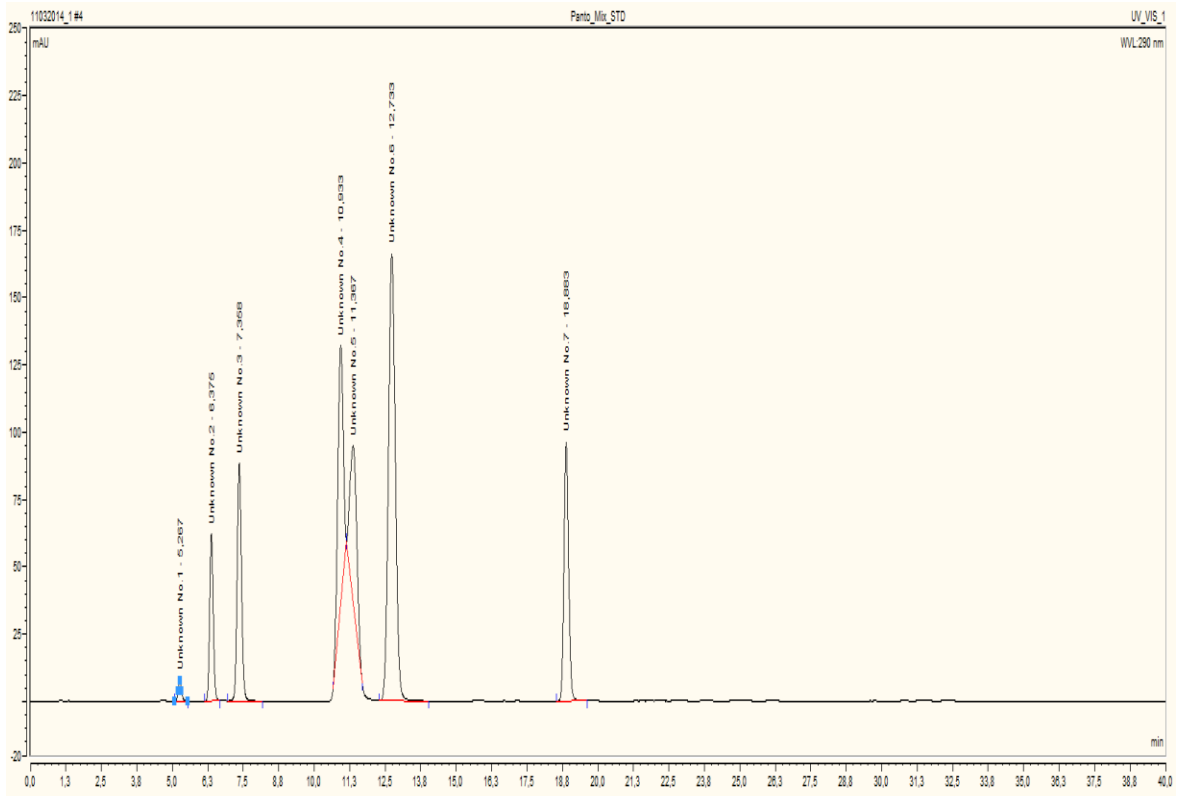


Resim 6. 1. Metot denemesi örnek kromatogram 1

Kromatografik koşullar sabit tutularak sadece gradient programın değiştirilmesi sonucu aşağıdaki kromatogramlar elde edilmiştir.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,500	15,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,500	15,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,500	40,0	0,0	0,0	
6	35,000	1,500	40,0	0,0	0,0	
7	40,000	1,500	5,0	0,0	0,0	

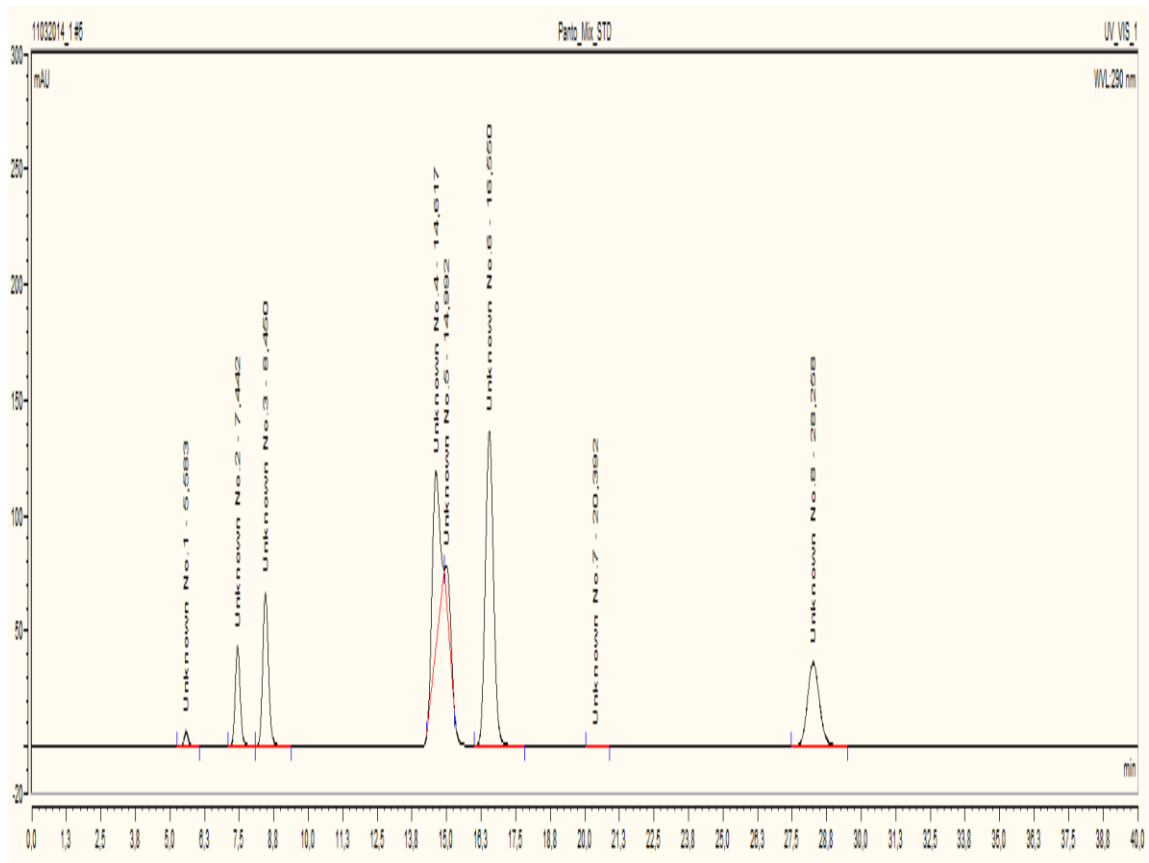
Resim 6. 2. Metot denemeleri akış değişim programı 2



Resim 6. 3. Metot denemesi örnek kromatogram 2

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,500	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,500	0,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,500	10,0	0,0	0,0	
6	35,000	1,500	15,0	0,0	0,0	
7	40,000	1,500	5,0	0,0	0,0	

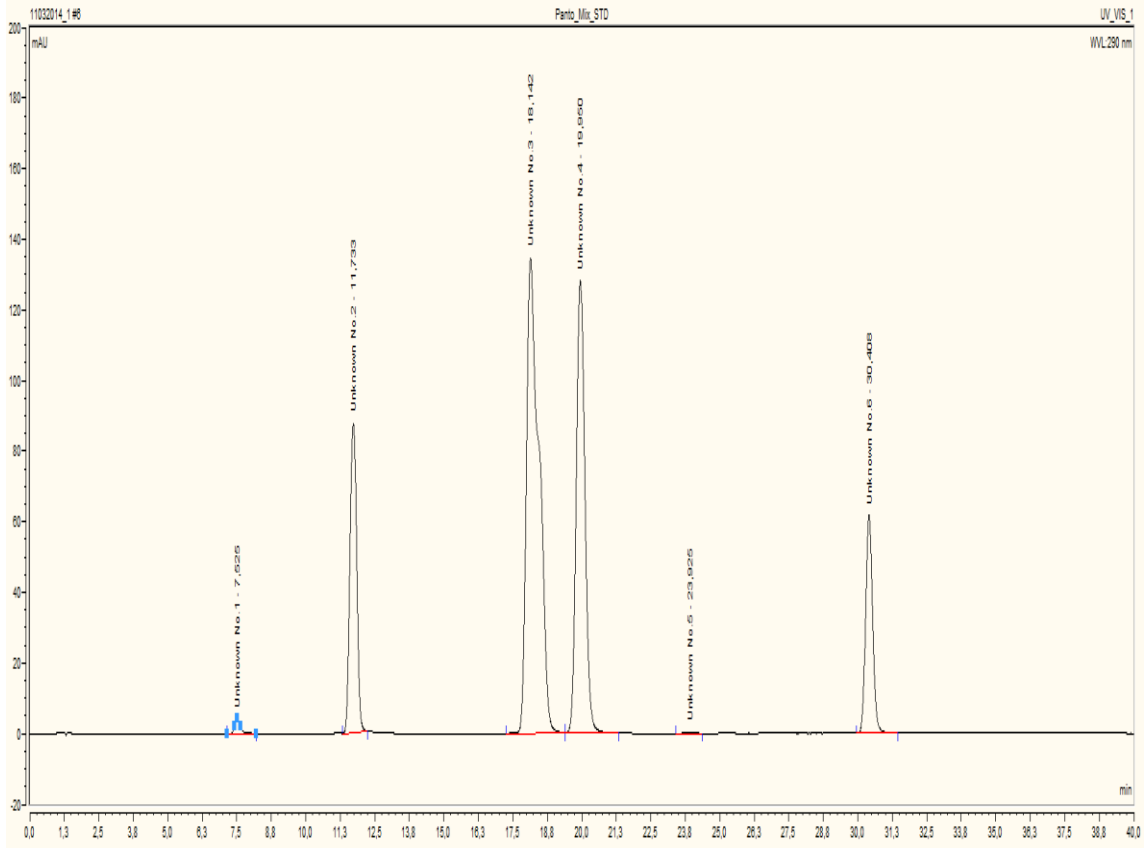
Resim 6. 4. Metot denemeleri akış değişim programı 3



Resim 6. 5. Metot denemesi örnek kromatogram 3

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
3	10,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
4	20,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
5	40,000	1,200	40,0	0,0	0,0	
6	45,000	1,200	0,0	0,0	0,0	

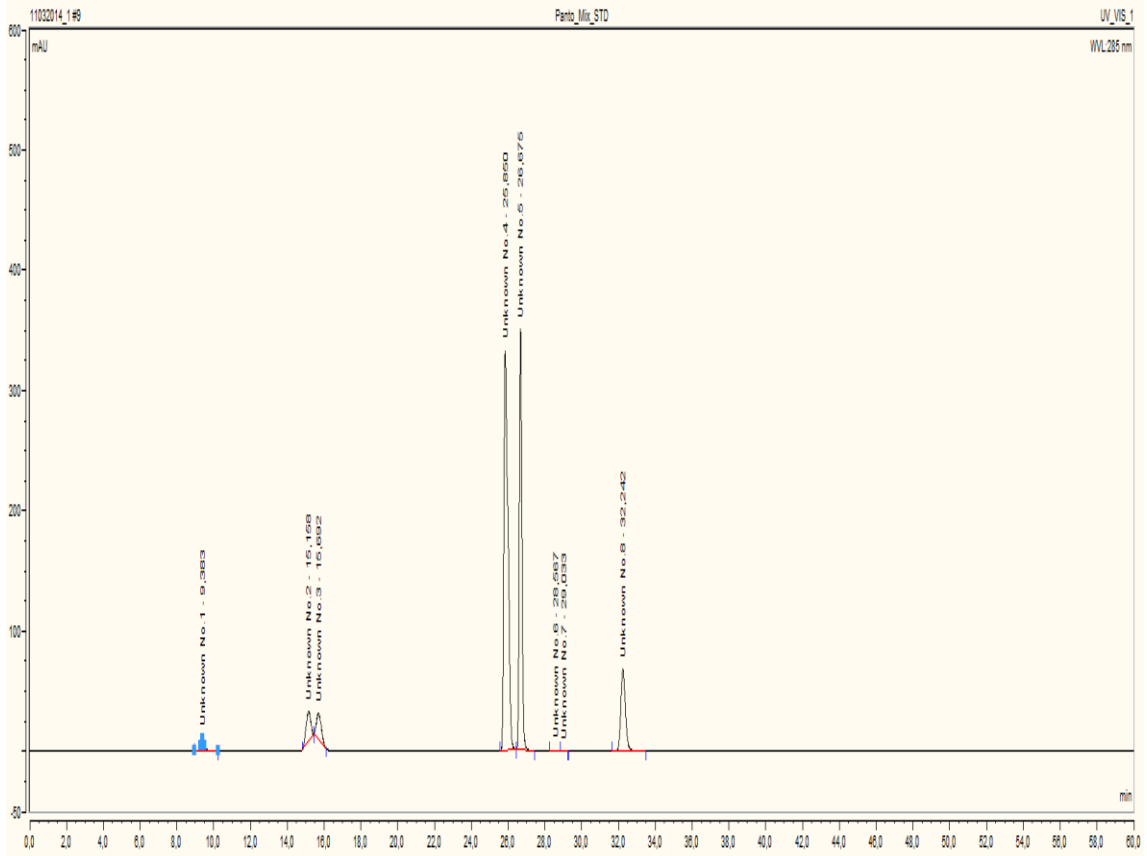
Resim 6. 6. Metot denemeleri akış değişim programı 4



Resim 6. 7. Metot denemesi örnek kromatogram 4

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
6	25,000	1,200	30,0	0,0	0,0	
7	55,000	1,200	30,0	0,0	0,0	
8	60,000	1,200	0,0	0,0	0,0	

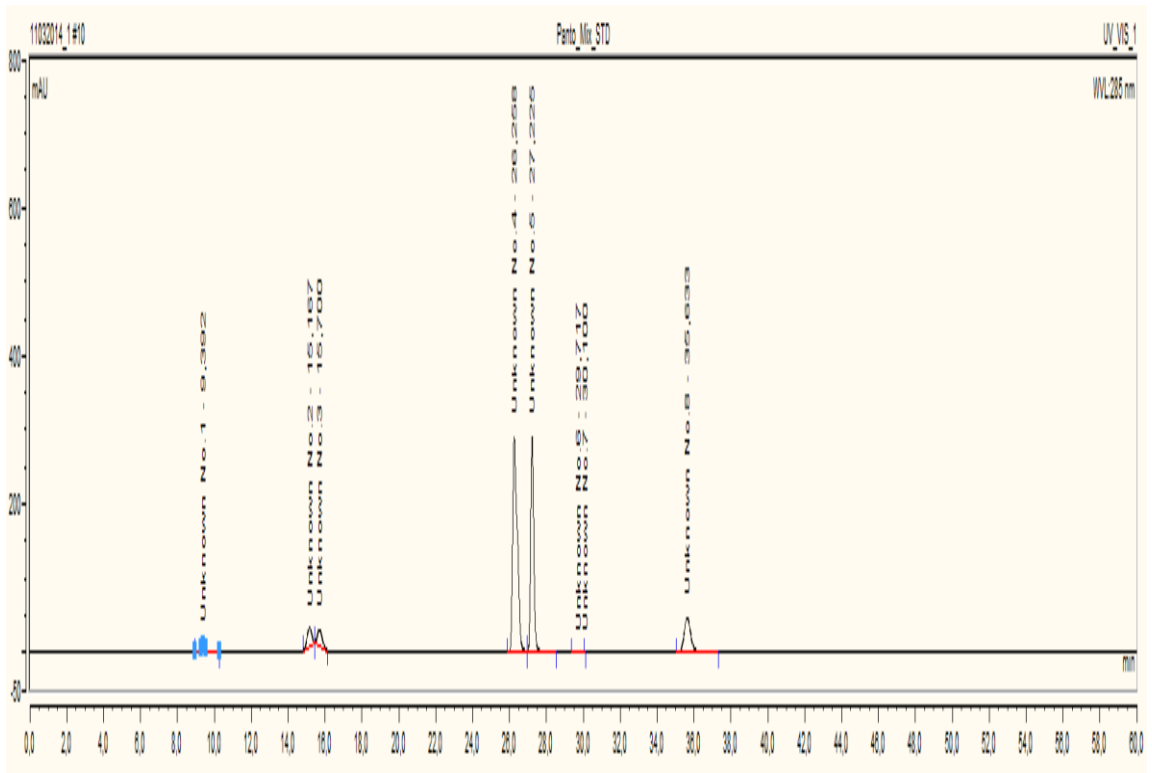
Resim 6. 8. Metot denemeleri akış değişim programı 5



Resim 6. 9. Metot denemesi örnek kromatogram 5

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
6	25,000	1,200	25,0	0,0	0,0	
7	50,000	1,200	25,0	0,0	0,0	
8	60,000	1,200	0,0	0,0	0,0	

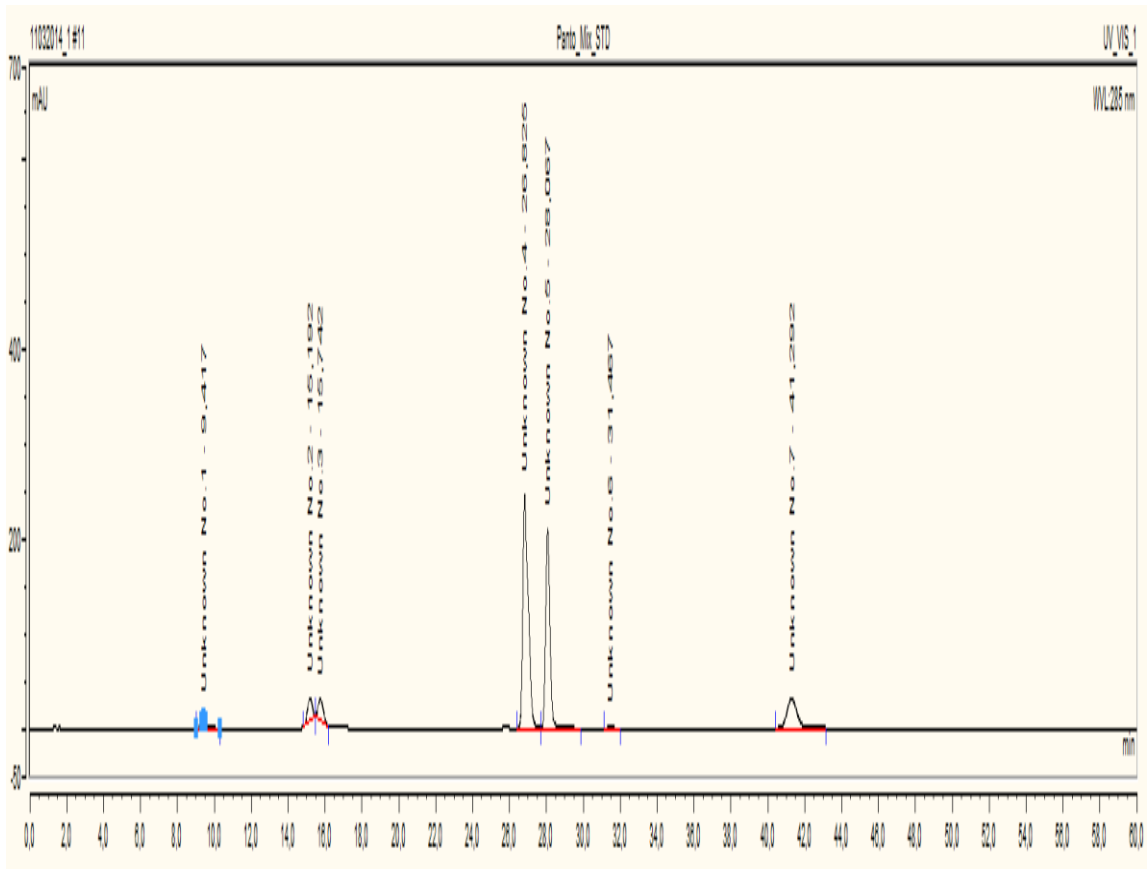
Resim 6. 10. Metot denemeleri akış değişim programı 6



Resim 6. 11. Metot denemesi örnek kromatogram 6

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,200	0,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,200	5,0	0,0	0,0	
6	25,000	1,200	20,0	0,0	0,0	
7	50,000	1,200	20,0	0,0	0,0	
8	60,000	1,200	0,0	0,0	0,0	

Resim 6. 12. Metot denemeleri akış değişim programı 7

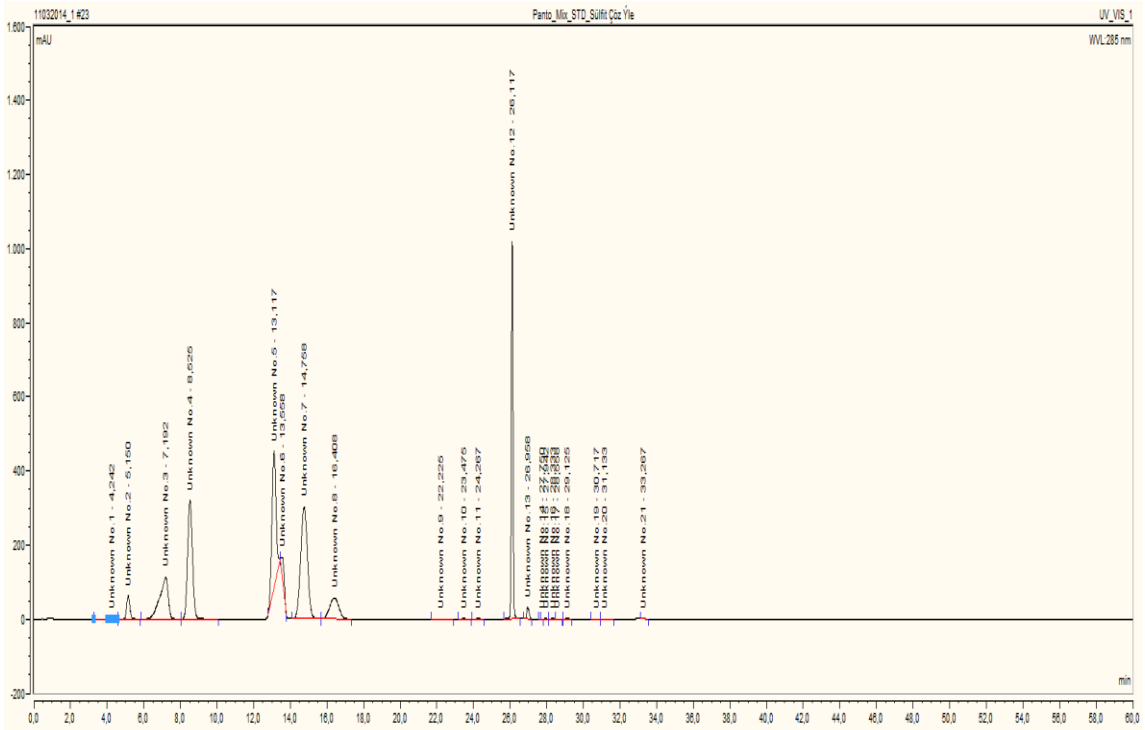


Resim 6. 13. Metot denemesi örnek kromatogram 7

Aynı kromatografik koşullar sabit tutularak yalnızca çözücünün asetonitril:su (50:50) karışımı kullanılmasıyla elde edilen kromatogramlar aşağıdaki gibidir.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	1,500	0,0	0,0	0,0	
2	0,000	1,500	0,0	0,0	0,0	
3	5,000	1,500	0,0	0,0	0,0	
4	10,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
5	20,000	1,500	5,0	0,0	0,0	
6	25,000	1,500	40,0	0,0	0,0	
7	55,000	1,500	40,0	0,0	0,0	
8	60,000	1,500	0,0	0,0	0,0	

Resim 6. 14. Metot denemeleri akış değişim programı 8



Resim 6. 15. Metot denemesi örnek kromatogram 8

6.2. HPLC Metot Geliştirme Denemeleri 2

6.2.1. Kromatografik koşullar

Kolon	:Agilent Rapid Resolution C ₁₈ (4,6 x 150 mm 1,8 µm)
Dalga Boyu (λ)	: 290 nm ve 305 nm
Sıcaklık:	
Kolon Sıcaklığı	: 30°C
Tray Sıcaklığı	: 10°C
Akış Hızı	: 1,5 mL/dak
Enjeksiyon Hacmi	: 30,0 µL
Enjeksiyon Süresi	: 25 dakika

6.2.2. Mobil fazın hazırlanması

6.2.2.1. 0,01 M Na₂HPO₄ Çözeltisinin hazırlanması

2,8 g susuz disodyumhidrojenfosfat hassas olarak tartılır, 2000 mL'lik balon jöjeye aktarılır. Destile su ile çözülerek hacmine destile su ile tamamlanır, karıştırılır. pH 6,5'a ortofosforik asit (H₃PO₄) ile ayarlanır.

6.2.2.2. Mobil faz A hazırlanması

90 hacim 0,01 M Na₂HPO₄ pH 6,5 çözeltisi 10 hacim asetonitril ile karıştırılır. 15 dk ultrasonik banyoda tutulur.

6.2.2.3. Mobil faz B hazırlanması

30 hacim 0,01 M Na_2HPO_4 pH 6,5 çözeltisi 70 hacim asetonitril ile karıştırılır. 15 dk ultrasonik banyoda tutulur.

6.2.3. Çözücülerin hazırlanması

6.2.3.1. 0,01 M Na_2HPO_4 Çözeltisinin hazırlanması

2,8 g susuz disodyumhidrojenfosfat hassas olarak tartılır, 2000 mL'lik balon jöjeye aktarılır. Destile su ile çözülerek hacmine destile su ile tamamlanır, karıştırılır. pH 8,1'e ortofosforik asit (H_3PO_4) ile ayarlanır.

6.2.3.2. Seyreltme çözeltisi 1 hazırlanması

50 hacim 0,01 M Na_2HPO_4 pH 8,1 çözeltisi 50 hacim asetonitril ile karıştırılır. 15 dk ultrasonik banyoda tutulur.

6.2.3.3. Seyreltme çözeltisi 2 hazırlanması

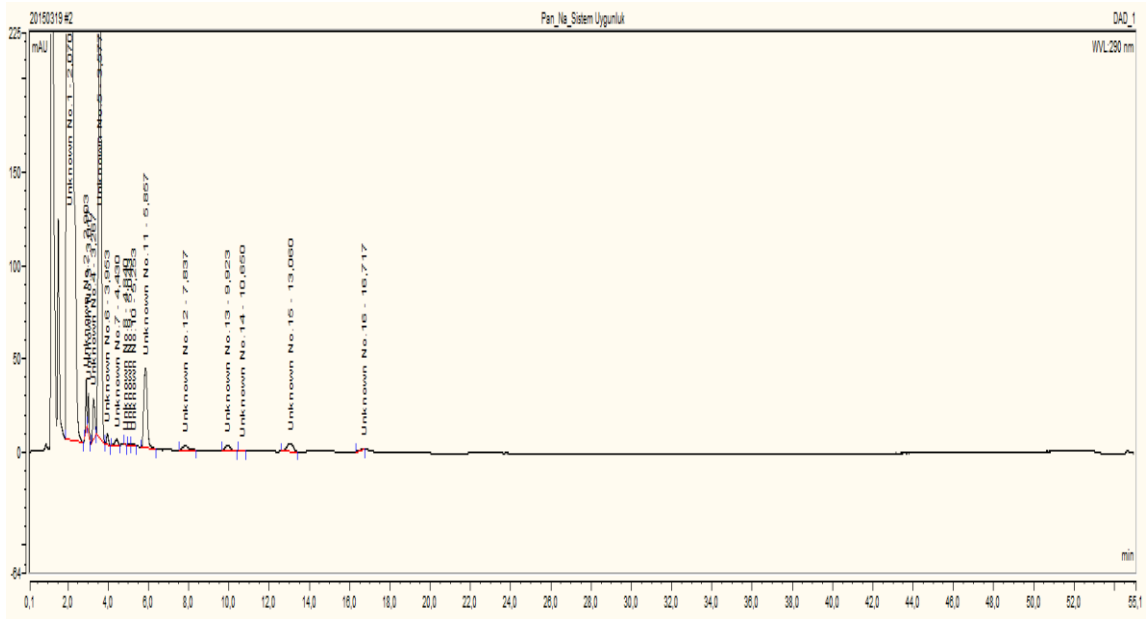
90 hacim 0,01 M Na_2HPO_4 pH 8,1 çözeltisi 10 hacim asetonitril ile karıştırılır. 15 dk ultrasonik banyoda tutulur.

6.2.3.4. Sonuçlar

Bu geliştirme denemelerinde pikler arasındaki ayırımın kötü olduğu görüldü. Ayrıca bazı piklerin kromatogramda çıkmadığı saptandı. Bu mobil faz ve üzücü varlığında farklı akış denemeleri ve kolonlar ile yapılan çalışmalara ait örnek kromatogramlar aşağıdadır.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
3	10,000	1,00	15,0	0,0	0,0
4	50,000	1,00	100,0	0,0	0,0
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

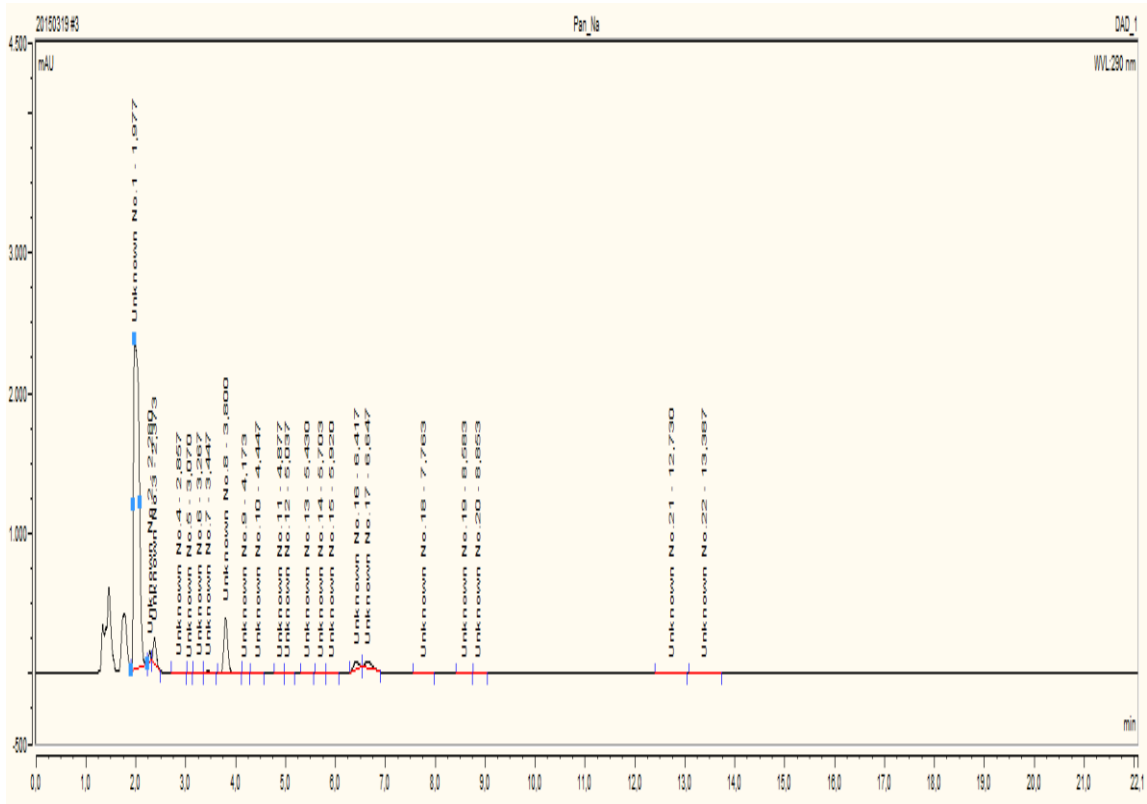
Resim 6.16. 4,6 x 150mm 1,8μ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi akış değişim programı.



Resim 6.17. 4,6 x 150mm 1,8μ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
3	10,000		0,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

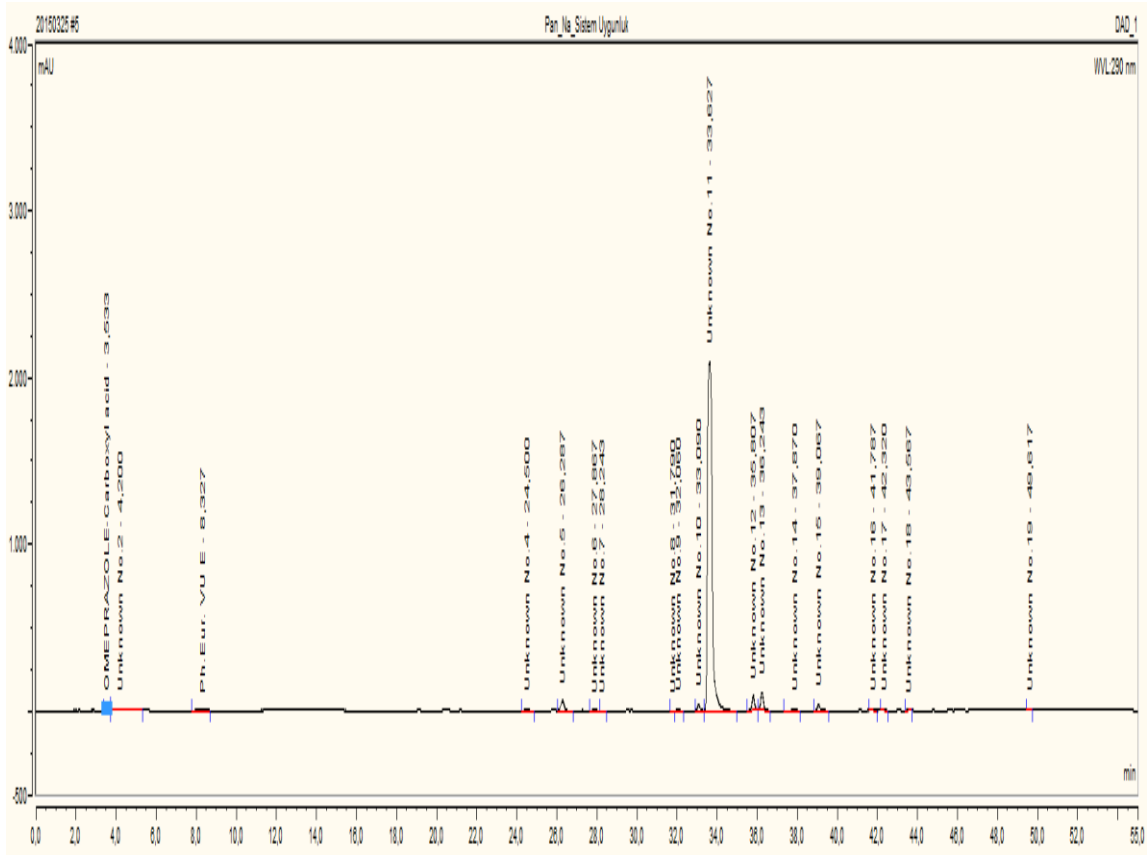
Resim 6.18. 4,6 x 150mm 3,0 μ Hypersil Gold Thermo Separation kolon denemesi akış değişim programı.



Resim 6.19. 4,6 x 150mm 3,0 μ Hypersil Gold Thermo Separation kolon deneme kromatogramı.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
3	10,000		0,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

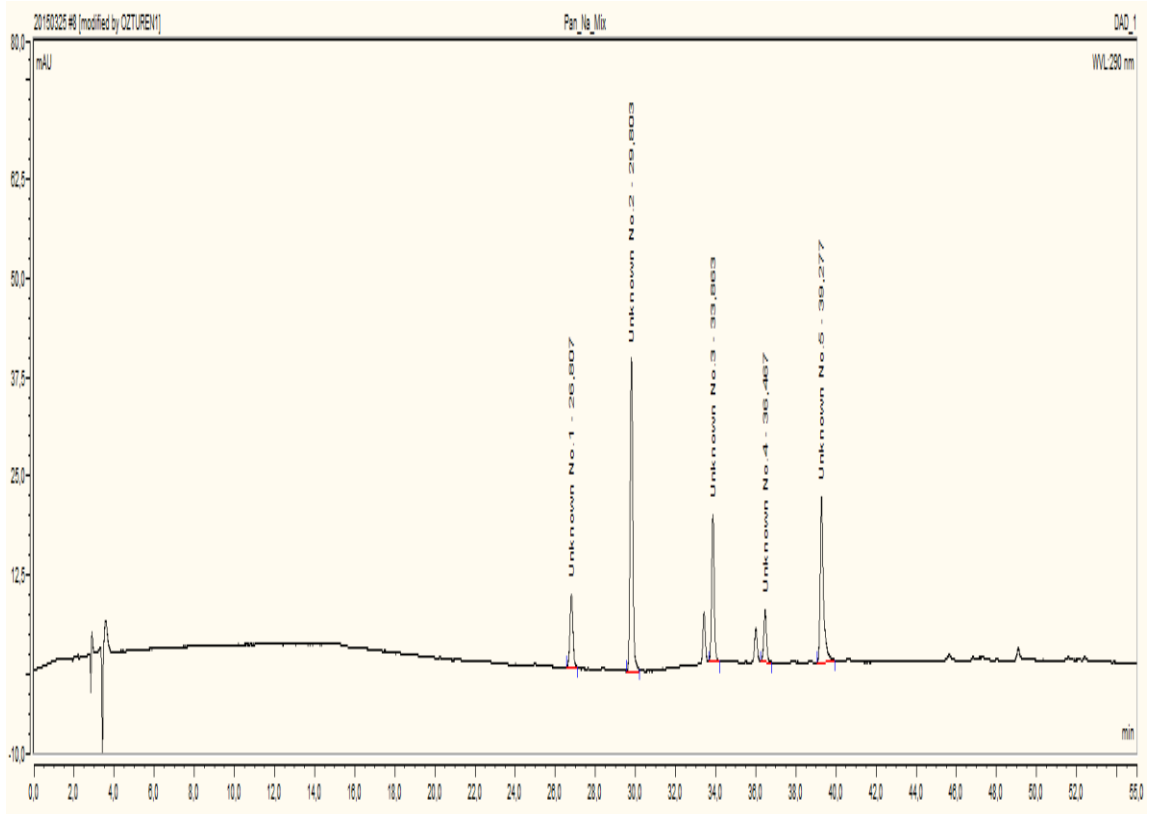
Resim 6.20. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi akış değişim programı.



Resim 6.21. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	0,0	0,0	0,0
3	10,000		0,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

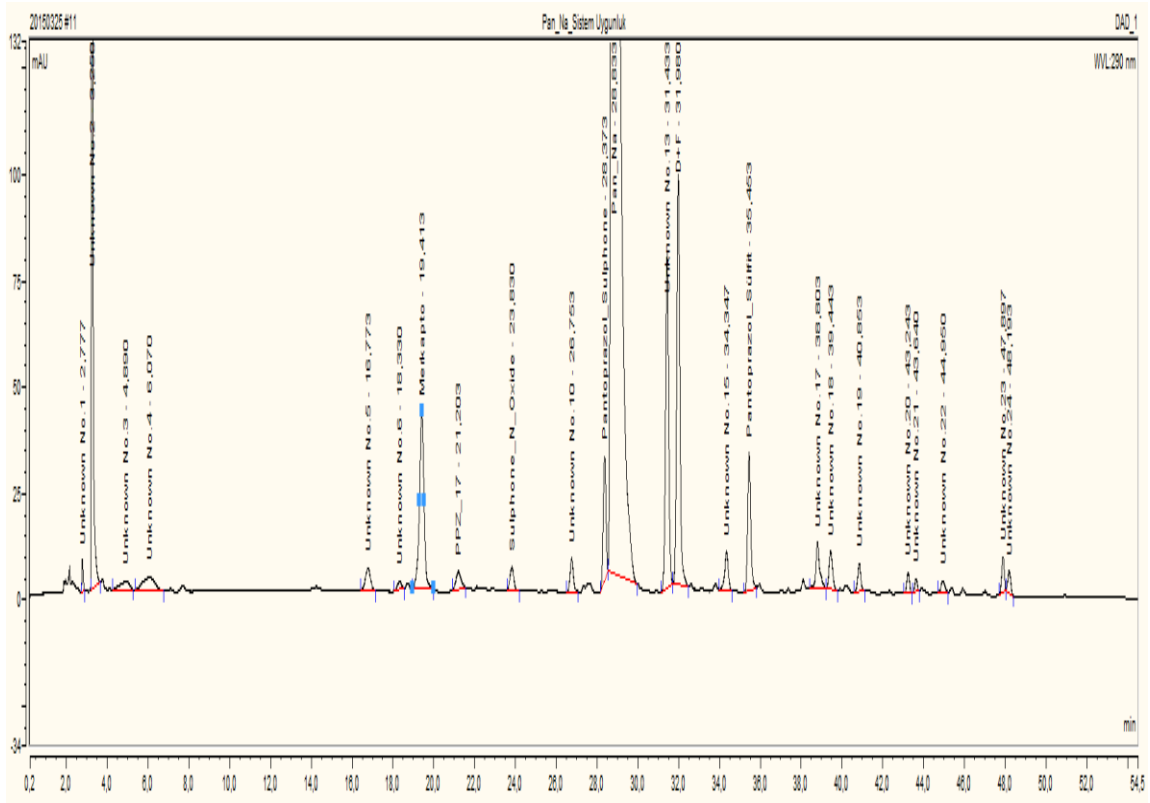
Resim 6. 22. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon denemesi standart enjeksiyonu akış değişim programı



Resim 6. 23. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution kolon deneme kromatogramı standart enjeksiyonu

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
3	10,000		15,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

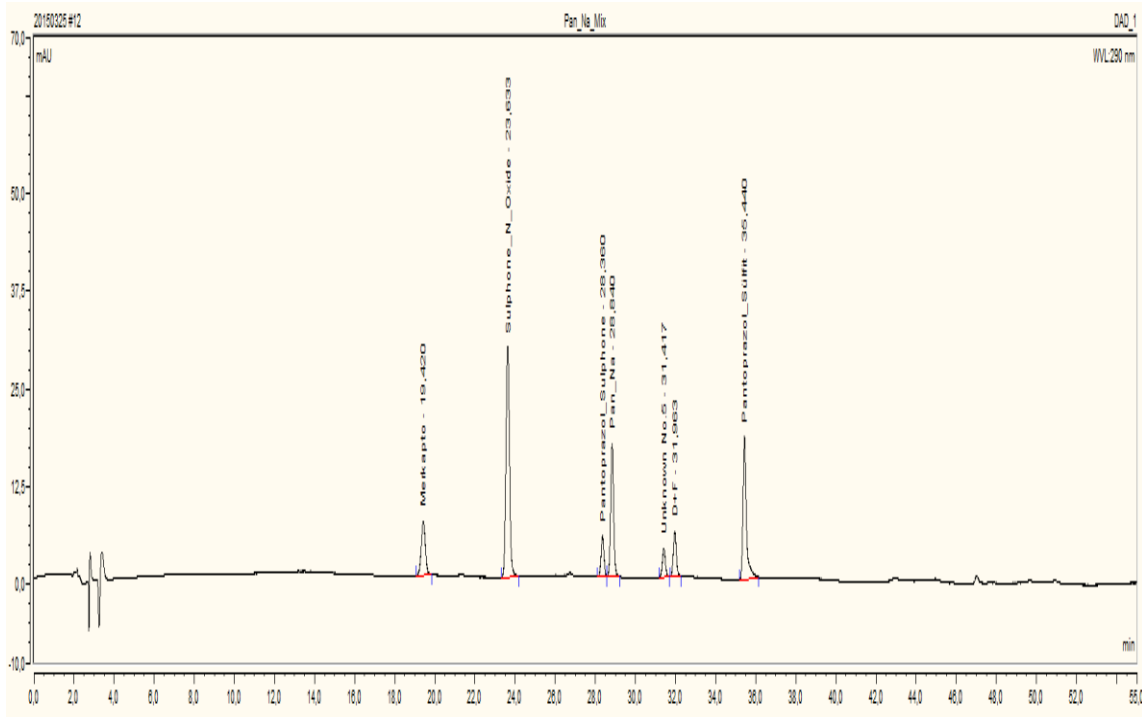
Resim 6.24. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na sistem uygunluğuna ait kolon denemesi akış değişim programı



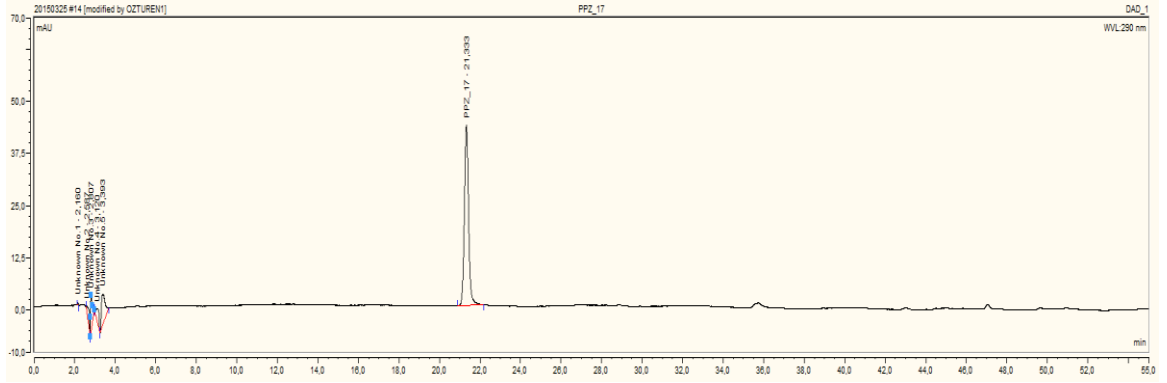
Resim 6. 25. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na sistem uygunluk kromatogramı

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
3	10,000		15,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

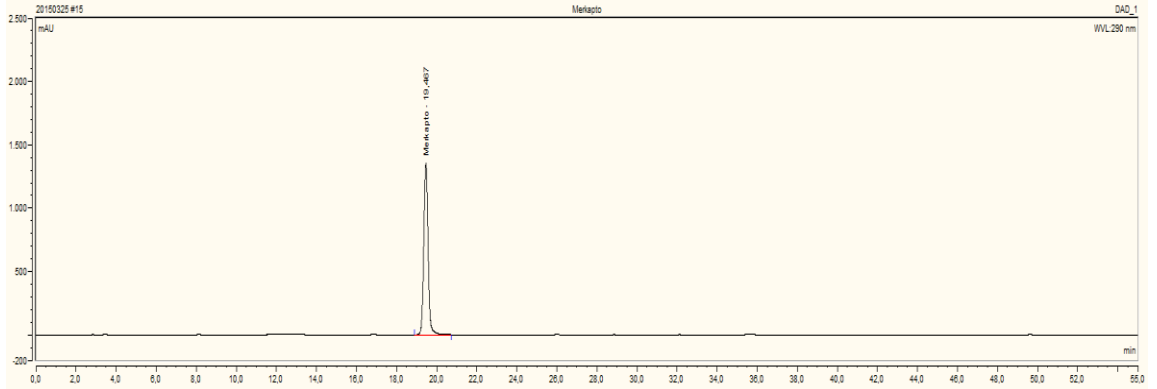
Resim 6. 26. 4,6 x 250mm 5,0µ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na karışım standardına ait kolon denemesi akış değişim programı



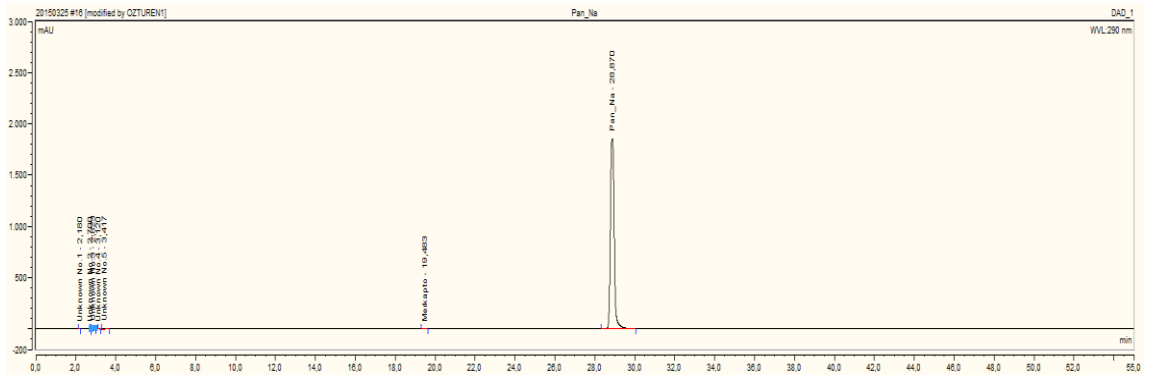
Resim 6. 27. 4,6 x 250mm 5,0µ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na karışım standardına ait kromatogram



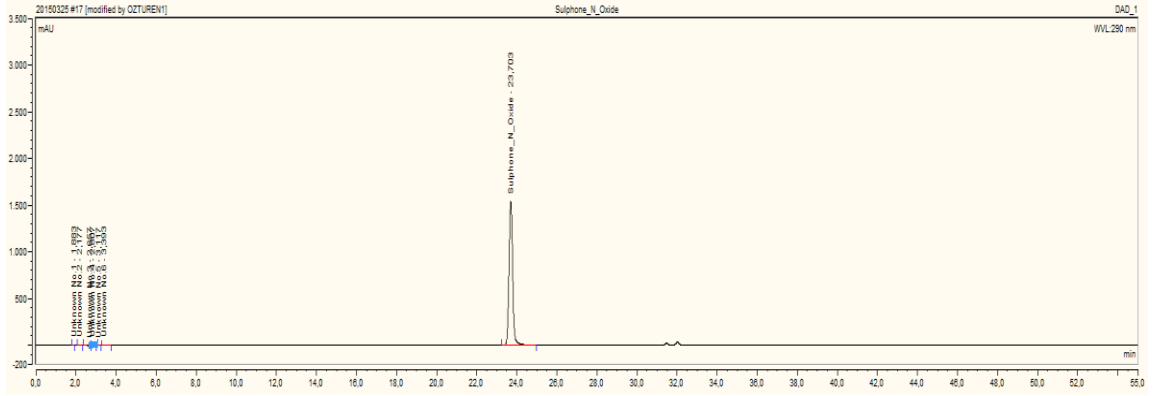
Resim 6. 28. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Piridin HCl kromatogramı



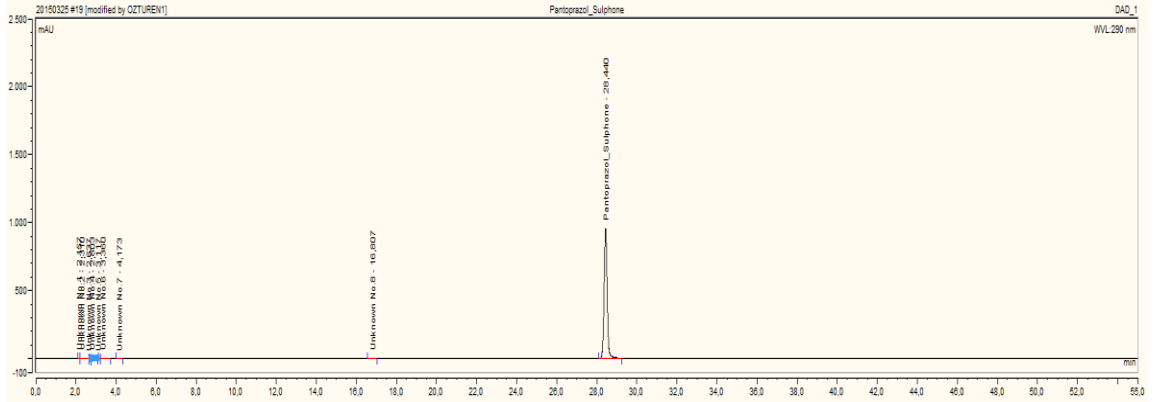
Resim 6. 29. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Merkaptö kromatogramı



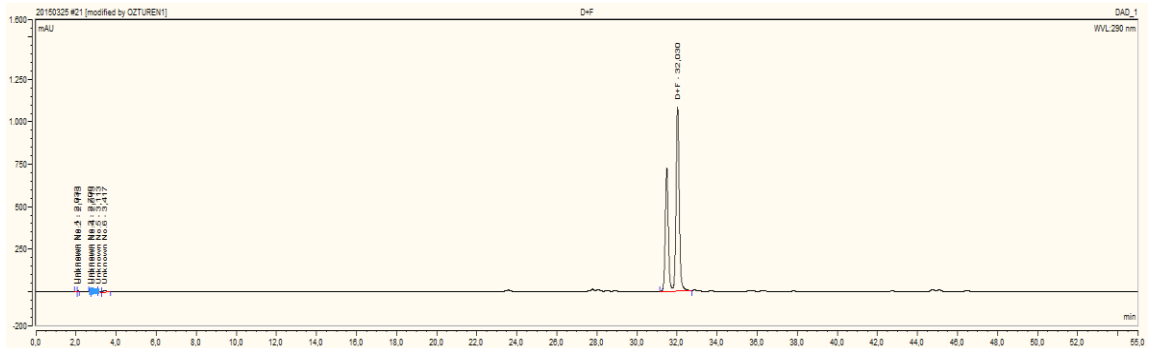
Resim 6. 30. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Na kromatogramı



Resim 6. 31. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Sülfon-N-Oksit kromatogramı



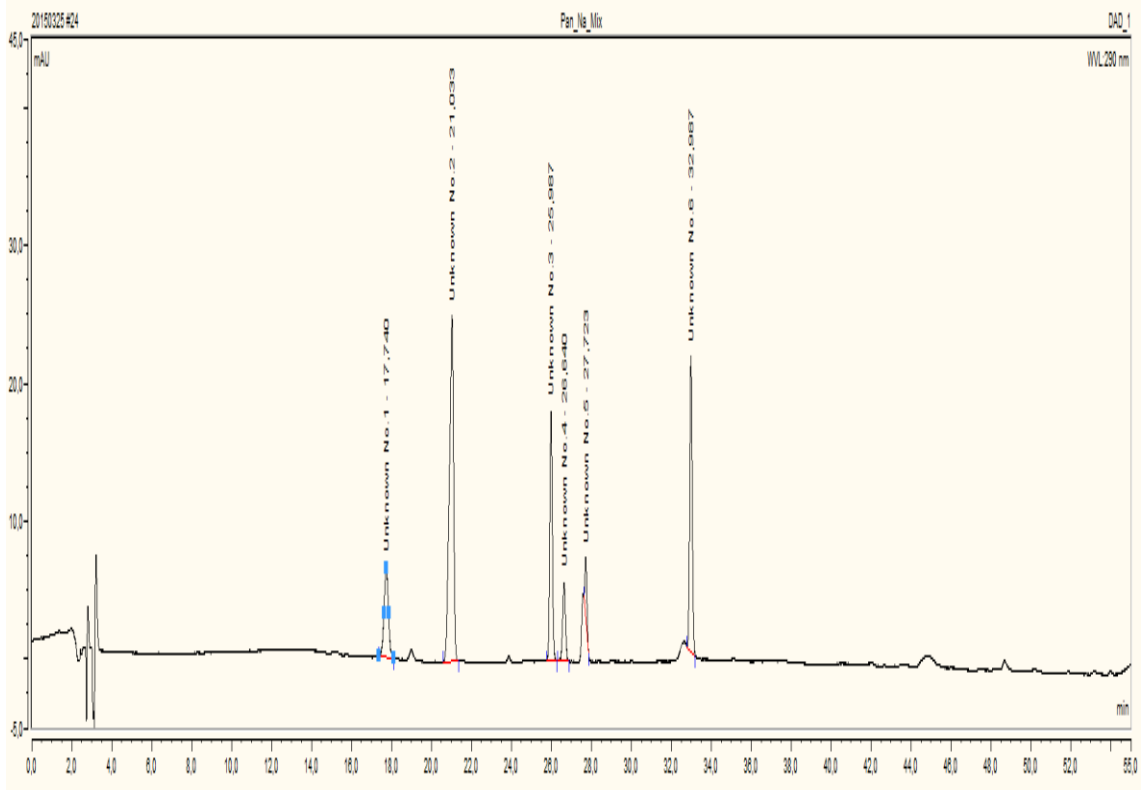
Resim 6. 32. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş Pantoprazol Sülfon kromatogramı



Resim 6. 33. 4,6 x 250mm 5,0 μ Agilent Rapid Resolution seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş D+F kromatogramı

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
3	10,000		15,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

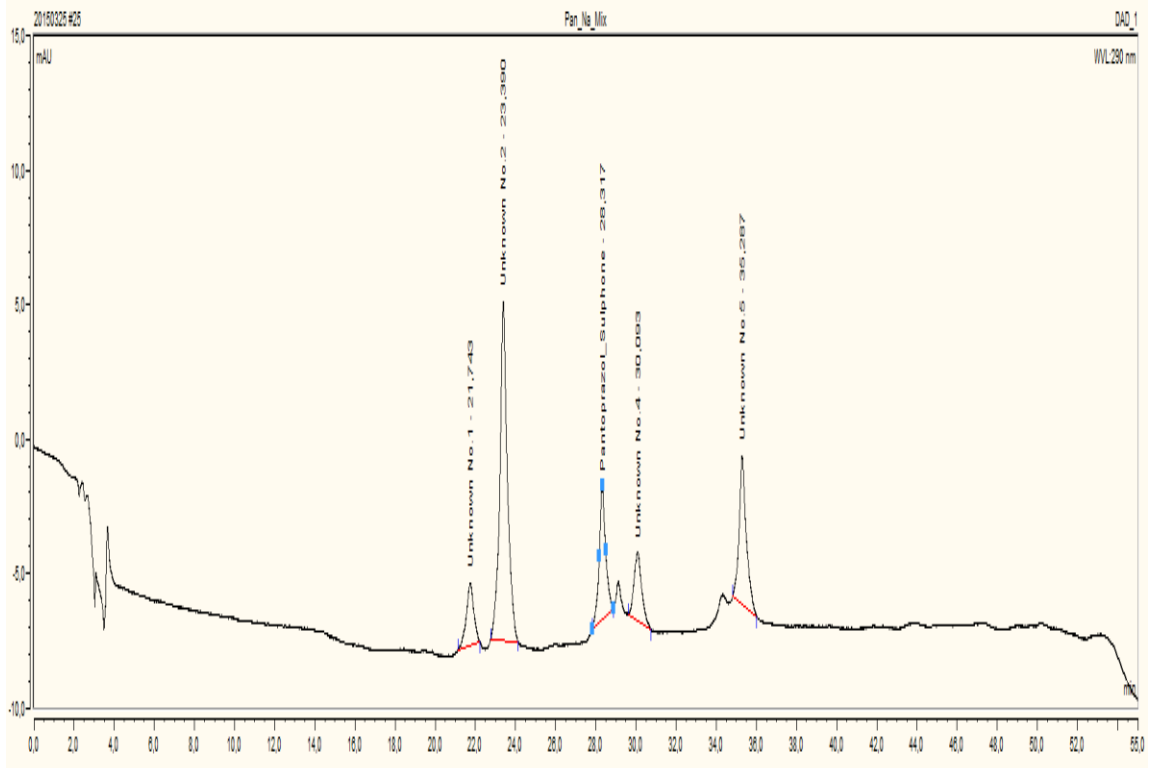
Resim 6. 34. 4,6 x 250mm 5,0 μ Thermo Separation Hypersil akış değişim programı



Resim 6. 35. 4,6 x 250 5,0 μ Thermo Separation Hypersil seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş karışım standardı kromatogramı

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B	%C	%D
1	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
2	0,000	1,00	15,0	0,0	0,0
3	10,000		15,0		
4	50,000		100,0		
5	55,000	1,00	0,0	0,0	0,0

Resim 6. 36. 4,6 x 250mm 5,0µ Phonemenex C₈ akış değişim programı



Resim 6. 37. 4,6 x 250mm 5,0µ Phonemenex C₈ kolonu seyreltme çözeltisi 1 ile çözülmüş karışım standart kromatogramı

6.3. Validasyon

6.3.1. HPLC Validasyon

6.3.1.1. Seçicilik (Selectivity)

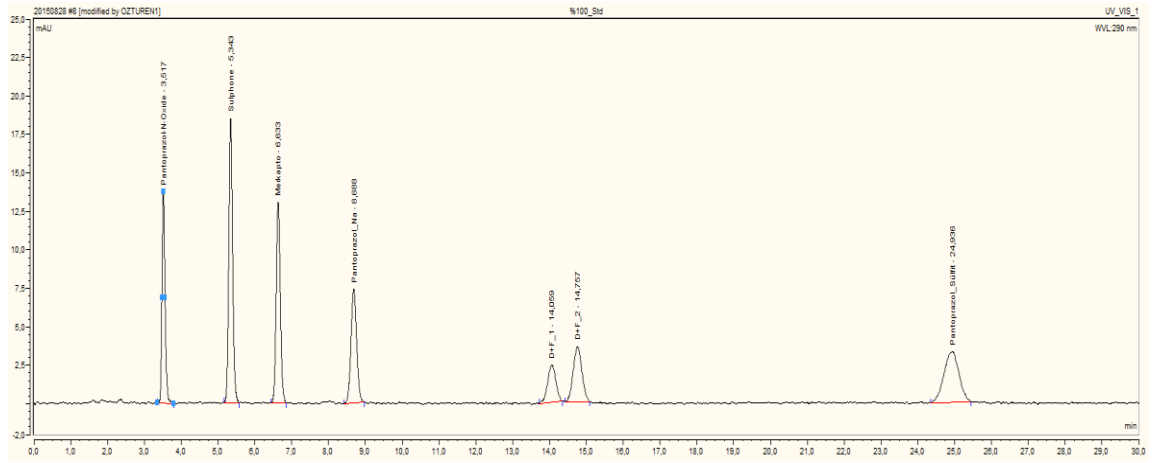
Validasyonun HPLC tarafında yapılan seçicilik parametresine ait sonuçlar uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Etken maddenin varlığında bilinen safsızlıkların rezolüsyonu uygunluk kriterleri sınırları içerisinde bulunmuştur. Etken maddeye herhangi bir girişim olmadığı saptanmıştır. Çalışmaya ait veriler ve kromatogramlar aşağıdaki gibidir.

Tablo 6. 2. Seçicilik parametresi standart tekrarlanabilirliği

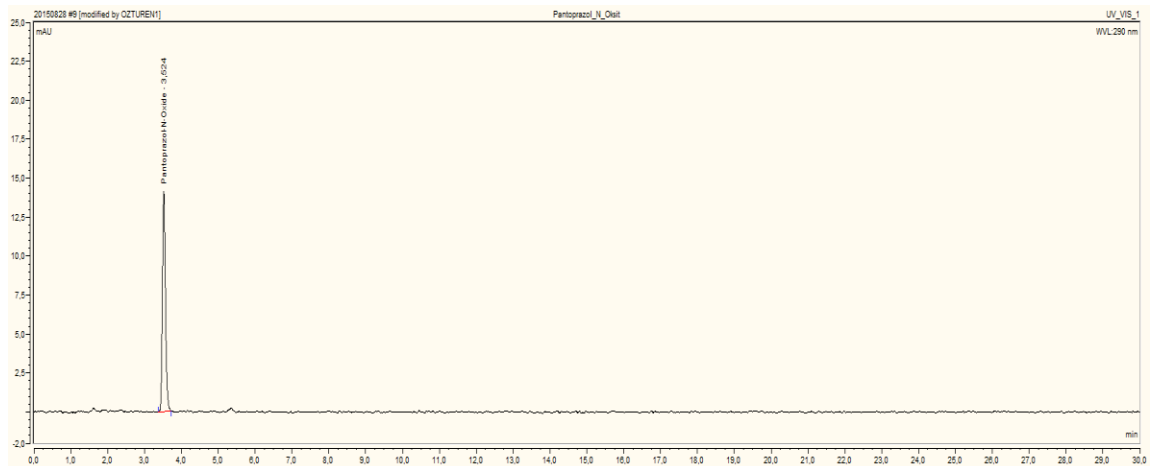
	Standart Çözelti						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00101	0,001516	0,001016	0,001002	0,001512	0,001512	0,001004
RT	3,517	5,343	6,633	8,688	14,059	14,757	24,936
RRT	0,4048	0,6150	0,7635	1,0000	1,6182	1,6985	2,8702
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,33962	2,23378	4,06891	1,34536	0,63019	0,98848	1,53596
2	1,31994	2,26408	4,0415	1,34848	0,62368	0,97831	1,49714
3	1,31486	2,24844	4,04371	1,35454	0,61972	0,95827	1,56295
4	1,33835	2,25925	4,04319	1,35611	0,62909	0,96522	1,58569
5	1,32406	2,23834	4,03371	1,32092	0,61973	0,94264	1,57231
6	1,33087	2,23149	4,04474	1,32502	0,62356	0,97774	1,56374
Ort.	1,32795	2,24590	4,04596	1,34174	0,62433	0,96844	1,55297
SD	0,01004	0,01362	0,01192	0,01511	0,00448	0,01652	0,03183
RSD	0,756	0,606	0,295	1,126	0,718	1,706	2,050
RSD	< % 5,0	< % 5,0	< % 5,0	< % 5,0	< % 5,0	< % 5,0	< % 5,0

Tablo 6. 3. Pantoprazol Na HPLC safsızlık tayini sonuçları

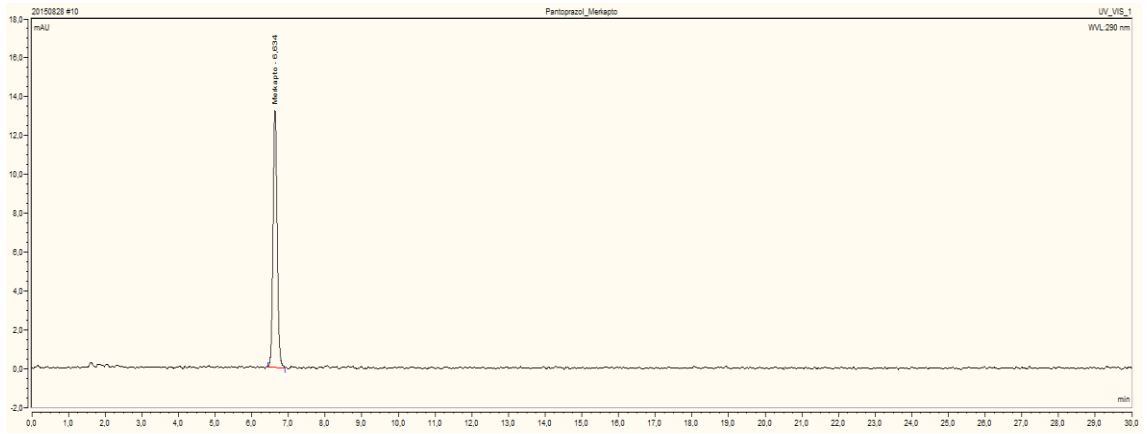
Numune	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfid	Bilinmeyen Maks.	Toplam Safsızlık
B319845	0,002	0,049	0,001	Saptanmadı	Saptanmadı	Saptanmadı	0,015	0.086
Limitler	Maks. %0,1	Maks. % 0,15	Maks. %0,10	Maks. %0,15	Maks. %0,15	Maks. %0,10	Maks. %0,1	Maks. %0,5
Kantitasyon Limitleri	<LOQ= % 0,008	LOQ= % 0,009	<LOQ= % 0,003	LOQ= % 0,036	LOQ= % 0,036	LOQ= % 0,036	LOQ= % 0,015	



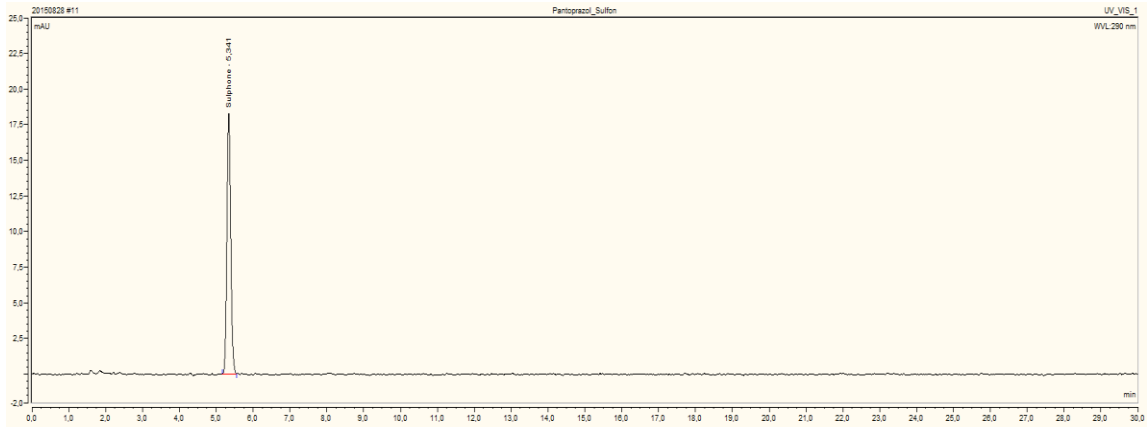
Resim 6. 3. 1. Pantoprazol Na HPLC seçicilik standardı



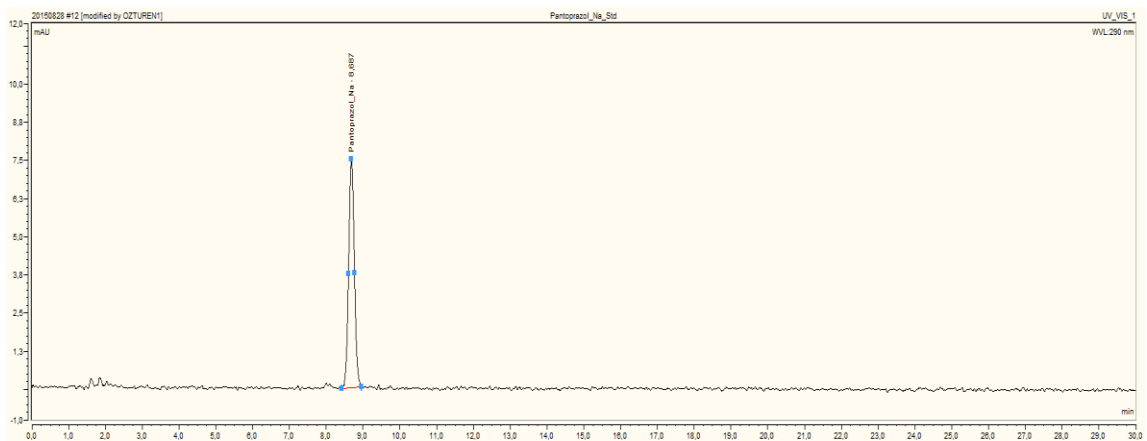
Resim 6. 3. 2. HPLC metodu Pantoprazol-N-Oksit kromatogramı



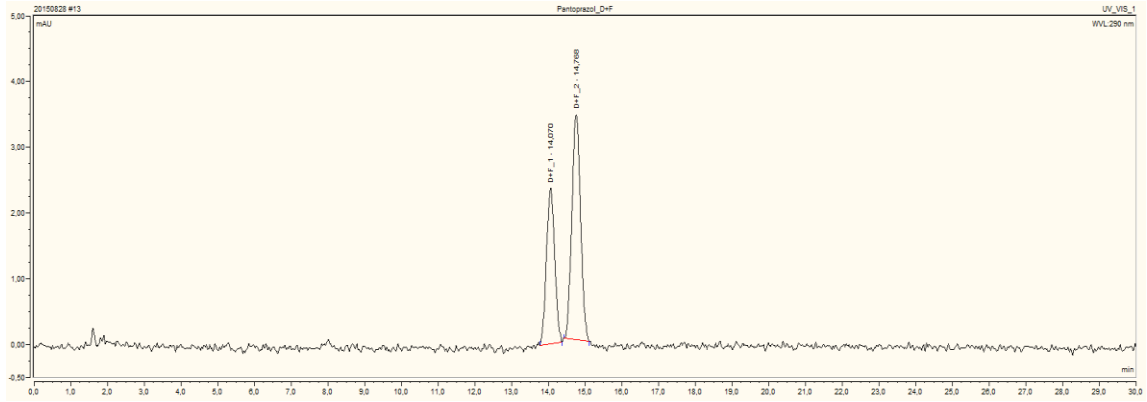
Resim 6. 3. 3. HPLC metodu Pantoprazol Merkaptu kromatogramı



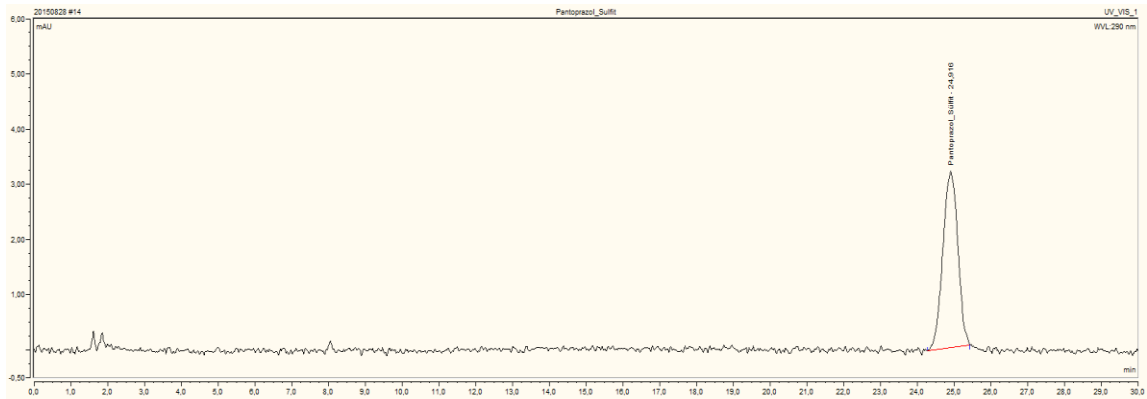
Resim 6. 3. 4. HPLC metodu Pantoprazol Sülfon kromatogramı



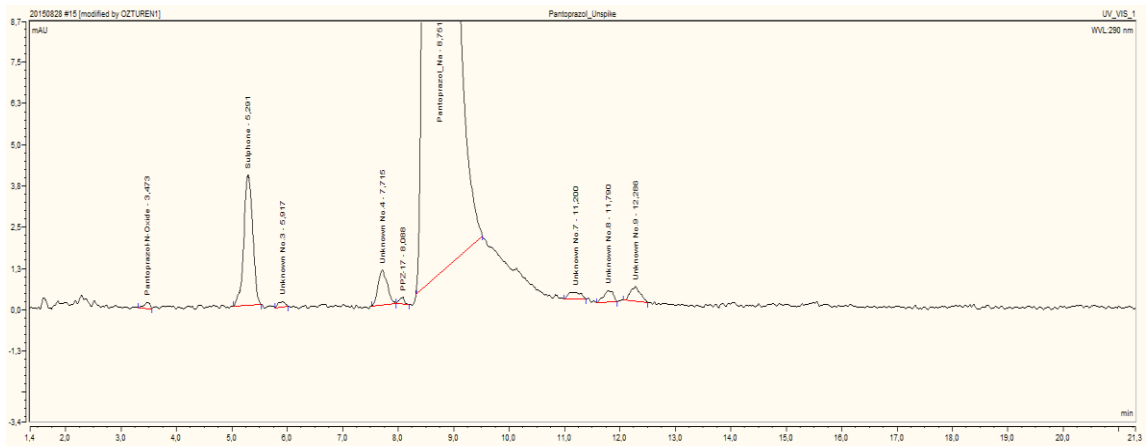
Resim 6. 3. 5. HPLC metodu Pantoprazol Na kromatogramı



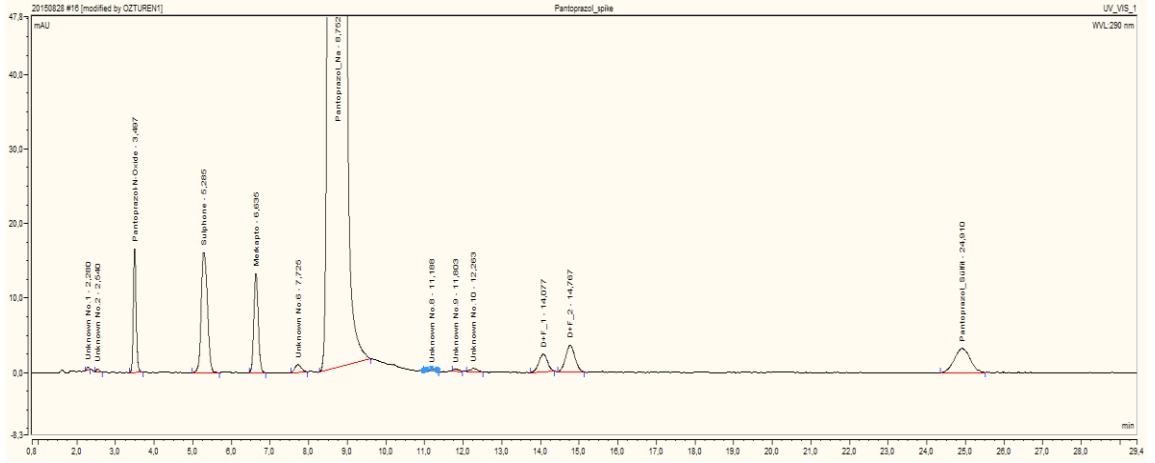
Resim 6. 3. 6. HPLC metodu D+F kromatogramı



Resim 6. 3. 7. HPLC metodu Sülfite kromatogramı



Resim 6. 3. 8. HPLC Pantoprazol unspike numune kromatogramı



Resim 6. 3. 9. HPLC Pantoprazol spike numune kromatogramı

6.3.1.1.1. HPLC Bozundurma çalışmaları

Stres çalışması asit, alkali, peroksit, ısı ve fotolitik etki şartları altında numuneye uygulanmıştır. Numuneler DAD dedektör kullanılarak kromatografik sistem üzerinde analiz edilmiştir. Bozulmuş örneklerin analiz içeriği ve pik saflık dereceleri referans çözeltisi kullanılarak kontrol edildi. Bu çalışmaya ait stres koşulları ve sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır. Sonuçlar uygunluk kriterlerini karşılamış, pik saflığı sonuçları stres koşulları altında 990 değerini sağlamıştır. Yapılan bozundurma çalışmalarında sıcaklık uygulandığında bütün safsızlıklarda artış olduğu tespit edildi. UV ışık altındaki çalışmalarda ise merkaptosafsızlığında ciddi artış olduğu görüldü. Bununla beraber, UV ışığının bütün safsızlıklar ve dolayısı ile toplam safsızlığı arttırdığı gözlemlendi. HCl etkisi ile bozundurmada ise aktif ilaç hammaddesinin başlangıç materyali olan sülfid molekülüne parçalandığı görüldü. KOH etkisi ise HCl ile benzer etkilere sahip olup, yine başlangıç materyallerine parçalamıştır. % 6 H₂O₂ etkisi kuvvetli oksitleyici özelliği dolayısı ile fazla oksidasyon ile ortaya çıkan Sülfon ve N-oksit safsızlıklarını arttırmıştır. Pik saflığı sonuçları ise uygunluk kriterlerini karşılamıştır.

Tablo 6. 3. 1. Bozundurma şartları

Şartlar	Süre
Asidik stres (1,0 N HCl)	1-2 saat
Bazik stres (1,0 N KOH)	1-2 saat
Oksidatif stress (%6 Hidrojen Peroksit)	4 saat
Sıcaklık	1-2 saat
UV ışık altında stress	24 saat

Tablo 6. 3. 2. Stres numuneleri analiz sonuçları

Numune Şartları	Bilinen Safsızlıklar						Bilinmeyen Safsızlıklar	Toplam safsızlık (%)
	N-Oksit (%)	Sülfon (%)	Merkapto (%)	D+F 1 (%)	D+F 2 (%)	Sülfid (%)	Maksimum (%)	
Bozundurulmamış	0,002<LOQ	0,049	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,015	0,086
Sıcaklık (105°C)	0,175	0,191	0,719	0,915	0,611	4,048	1,382	12,012
UV ışığı (Kati)	<LOD	0,056	0,358	<LOD	<LOD	0,065	0,114	0,747
UV ışığı (Sıvı)	0,018	0,038	0,257	<LOD	<LOD	0,005<LOQ	0,134	0,648
1,0N HCl	0,100	1,373	1,861	14,320	<LOD	18,357	4,591	53,586
1,0N KOH	0,670	0,609	4,495	<LOD	<LOD	2,819	7,375	18,121
%6 H ₂ O ₂	29,638	24,504	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,323	62,333

Tablo 6. 3. 3. Stres numuneleri pik saflığı sonuçları

Numune şartları	Pik saflıkları						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
Bozundurulmamış	923	995	<LOD	995	<LOD	<LOD	<LOD
Sıcaklık (105°C)	999	1000	1000	997	999	999	1000
UV ışığı (Kati)	<LOD	997	1000	997	<LOD	<LOD	931
UV ışığı (Sıvı)	972	-	1000	997	<LOD	<LOD	725
1,0N HCl	1000	1000	1000	1000	1000	<LOD	1000
1,0N KOH	1000	1000	1000	1000	<LOD	<LOD	1000
%6 H ₂ O ₂	1000	1000	<LOD	989	<LOD	<LOD	<LOD

6.3.1.2. Kantitasyon limitleri

Yapılan çalışmalar sonunda kantitasyon limitleri belirlenen kriterler ışığında tespit edilmiştir. S/N ≥ 10 koşulunu sağlayacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Bu seviyede hazırlanan karışım standardı tekrarlanabilirliği RSD<%10 koşulunu sağlamıştır. Kantitasyon limitleri çalışmasına ait sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 4. Kantitasyon limiti standardı tekrarlanabilirliği

LOQ Standart Çözeltileri							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfit
C(mg/mL)	0,00008	0,00009	0,00003	0,00015	0,000541	0,000541	0,00036
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,11305	0,14616	0,09617	0,21300	0,22074	0,31365	0,49235
2	0,10780	0,14027	0,09683	0,21201	0,24451	0,35625	0,52369
3	0,10891	0,15606	0,08829	0,20817	0,21649	0,36321	0,55444
4	0,09884	0,13972	0,10232	0,21701	0,23541	0,37256	0,50264
5	0,12117	0,14946	0,10436	0,21495	0,23351	0,36803	0,48333
6	0,11167	0,13362	0,10362	0,21372	0,22018	0,36379	0,48922
ORT	0,11024	0,14422	0,09860	0,21314	0,23013	0,35625	0,50761
SD	0,00277	0,00798	0,00475	0,00255	0,01510	0,02683	0,03105
RSD	2,510	5,533	4,819	1,197	6,562	7,532	6,116
RSD Limit	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10

Tablo 6. 3. 5. Kantitasyon standardı S/N değerleri

LOQ Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00008	0,00009	0,00003	0,00015	0,000541	0,000541	0,00036
	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	10,4	10,4	9,2	10,6	8,6	12,3	9,7
2	10,0	10,7	9,1	10,1	9,2	12,8	10,3
3	9,8	10,7	9,4	10,1	8,4	12,5	10,7
4	9,5	10,4	9,4	11,1	9,0	12,8	9,8
5	10,3	10,4	9,3	10,7	9,0	13,0	9,6
6	10,4	10,1	10,0	10,1	8,6	12,7	10,1
ORT	10,06667	10,45000	9,40000	10,45000	8,80000	12,50000	10,03333
SD	0,30551	0,17321	0,15275	0,28868	0,41633	0,25166	0,50332
RSD	3,035	1,657	1,625	2,762	4,731	2,013	5,017

6.3.1.3. Dedeksiyon limitleri

Yapılan çalışmalar sonunda dedeksiyon limitleri belirlenen kriterler ışığında tespit edilmiştir. $2 < S/N < 3$ koşulunu sağlayacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Dedeksiyon limitleri çalışmasına ait sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 6. Dedeksiyon limiti standartı tekrarlanabilirliği

LOD Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00002	0,00003	0,00001	0,00005	0,00011	0,00011	0,00011
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,02632	0,04440	0,01714	0,06188	0,05983	0,05411	0,07033
2	0,02690	0,04344	0,02942	0,05720	0,05283	0,05271	0,08563
3	0,02687	0,03811	0,02341	0,05239	0,06666	0,06040	0,08622
ORT	0,02670	0,04198	0,02332	0,05716	0,05977	0,05574	0,08073
SD	0,00033	0,00339	0,00614	0,00475	0,00692	0,00410	0,00901
RSD	1,223	8,071	26,328	8,302	11,569	7,348	11,159

Tablo 6. 3. 7. Dedeksiyon standardı S/N değerleri

LOD Standard çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00002	0,00003	0,00001	0,00005	0,00011	0,00011	0,00011
	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	2,9	3,0	2,0	3,1	2,2	2,7	2,9
2	2,7	3,1	2,3	3,1	2,2	2,2	3,5
3	3,2	2,9	1,9	2,7	2,6	2,8	3,1
ORT	2,9	3,0	2,1	3,0	2,3	2,6	3,2
SD	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
RSD	8,6	3,3	10,1	7,8	9,9	12,5	9,6

6.3.1.4. Linearite ve aralık (Linearity and Range)

Metodun doğrusallığı LOQ ve %150 standart konsantrasyonları aralığında hazırlanan çözeltilerin sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Her bir safsızlık ve etken maddeye ait konsantrasyon değerleri x eksenine, dedektör cevapları ise y eksenine girilerek linearite grafikleri elde edilmiştir. Linearite ve aralık çalışmalarında hazırlanan çözeltiler 3'er kez enjekte edilmiştir. Yapılan bu enjeksiyonların RSD değerleri uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Linearite ve aralık parametresine ait değerler aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 8. LOQ Standart tekrarlanabilirliği

LOQ Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00008	0,00009	0,00003	0,00015	0,00054	0,00054	0,00036
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,11305	0,14616	0,09617	0,21300	0,22074	0,31365	0,49235
2	0,10780	0,14027	0,09683	0,21201	0,24451	0,35625	0,52369
3	0,10891	0,15606	0,08829	0,20817	0,21649	0,36321	0,55444
4	0,09884	0,13972	0,10232	0,21701	0,23541	0,37256	0,50264
5	0,12117	0,14946	0,10436	0,21495	0,23351	0,36803	0,48333
6	0,11167	0,13362	0,10362	0,21372	0,22018	0,36379	0,48922
ORT	0,11024	0,14422	0,09860	0,21314	0,23013	0,35625	0,50761
SD	0,00277	0,00798	0,00475	0,00255	0,01510	0,02683	0,03105
RSD	2,510	5,533	4,819	1,197	6,562	7,532	6,116
RSD Limit	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10	<%10

Tablo 6. 3. 9. %50 Standart tekrarlanabilirliği

%50 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00051	0,00076	0,00051	0,00050	0,00076	0,00076	0,00050
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,65941	1,14317	2,00320	0,69192	0,31035	0,50548	0,72749
2	0,66218	1,14013	2,03772	0,66186	0,32265	0,50251	0,72502
3	0,66975	1,14262	2,01078	0,67874	0,30299	0,49125	0,72267
ORT	0,66378	1,14197	2,01723	0,67751	0,31200	0,49975	0,72506
SD	0,00535	0,00162	0,01814	0,01507	0,00993	0,00751	0,00241
RSD	0,806	0,142	0,899	2,224	3,184	1,502	0,332

Tablo 6. 3. 10. %80 Standart tekrarlanabilirliği

%80 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfit
C(mg/mL)	0,00081	0,00121	0,00081	0,00080	0,00121	0,00121	0,00080
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,0694	1,79853	3,23334	1,08155	0,49819	0,81116	1,21341
2	1,09079	1,82981	3,22291	1,09613	0,50151	0,78435	1,20551
3	1,05706	1,80816	3,22481	1,05139	0,51866	0,79998	1,20813
ORT	1,07242	1,81217	3,22702	1,07636	0,50612	0,79850	1,20902
SD	0,01707	0,01602	0,00556	0,02282	0,01099	0,01347	0,00402
RSD	1,591	0,884	0,172	2,120	2,171	1,686	0,333

Tablo 6. 3. 11. %90 Standart tekrarlanabilirliği

%90 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sulfone	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfit
C(mg/mL)	0,00091	0,00136	0,00091	0,00090	0,00136	0,00136	0,00090
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,17861	1,99134	3,58010	1,16240	0,56945	0,87570	1,39268
2	1,19761	1,99933	3,59793	1,17285	0,56388	0,86962	1,35041
3	1,18638	1,98935	3,58328	1,17870	0,56124	0,89237	1,32875
ORT	1,18753	1,99334	3,58710	1,17132	0,56486	0,87923	1,35728
SD	0,00955	0,00528	0,00951	0,00826	0,00419	0,01178	0,03251
RSD	0,804	0,265	0,265	0,705	0,742	1,340	2,396

Tablo 6. 3. 12. %100 Standart tekrarlanabilirliği

%100 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfit
C(mg/mL)	0,00101	0,00152	0,00102	0,00100	0,00151	0,00151	0,00100
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,32011	2,23758	4,03184	1,35521	0,64881	1,00409	1,49945
2	1,31952	2,23295	4,01983	1,30498	0,61335	0,96037	1,48522
3	1,32812	2,2393	4,02507	1,32880	0,62841	0,99567	1,58093
ORT	1,32258	2,23661	4,02558	1,32966	0,63019	0,98671	1,52187
SD	0,00480	0,00328	0,00602	0,02513	0,01780	0,02320	0,05164
RSD	0,363	0,147	0,150	1,890	2,824	2,351	3,393

Tablo 6. 3. 13. %110 Standart tekrarlanabilirliği

%110 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00111	0,00167	0,00112	0,00110	0,00166	0,00166	0,00110
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,46015	2,46717	4,41590	1,45446	0,71928	1,08467	1,67997
2	1,45980	2,46813	4,42176	1,45029	0,69118	1,06180	1,68758
3	1,45542	2,46306	4,41508	1,45093	0,69520	1,06989	1,64630
ORT	1,45846	2,46612	4,41758	1,45189	0,70189	1,07212	1,67128
SD	0,00264	0,00269	0,00364	0,00225	0,01520	0,01160	0,02197
RSD	0,181	0,109	0,082	0,155	2,165	1,082	1,314

Tablo 6. 3. 14. %120 Standart tekrarlanabilirliği

%120 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00121	0,00182	0,00122	0,00120	0,00181	0,00181	0,00120
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,59749	2,702120	4,83094	1,60881	0,73979	1,21153	1,88643
2	1,57872	2,688380	4,82400	1,58286	0,76381	1,21853	1,81736
3	1,57415	2,676200	4,83627	1,59659	0,77038	1,19294	1,79289
ORT	1,58345	2,68890	4,83040	1,59609	0,75799	1,20767	1,83223
SD	0,01237	0,01297	0,00615	0,01298	0,01610	0,01323	0,04851
RSD	0,781	0,482	0,127	0,813	2,124	1,095	2,648

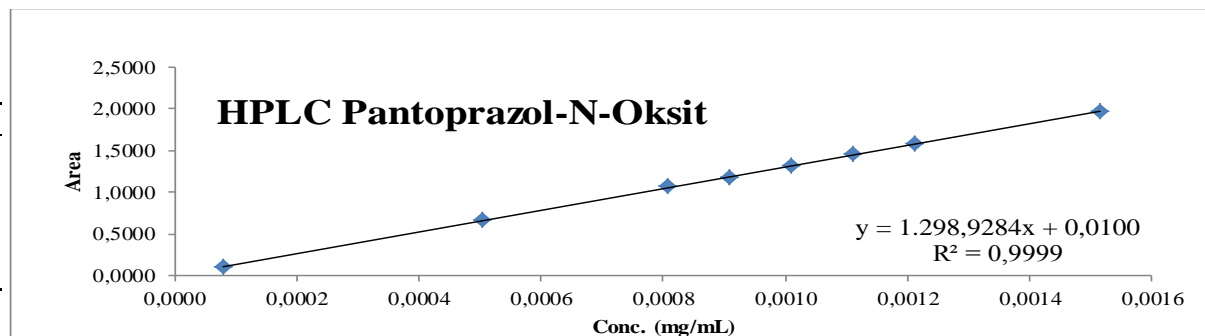
Tablo 6. 3. 15. %150 Standart tekrarlanabilirliği

%150 Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,00152	0,00227	0,00152	0,00150	0,00227	0,00227	0,00151
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,96745	3,355540	6,01565	2,00265	0,94546	1,47058	2,32586
2	1,98013	3,326110	6,02794	1,97175	0,95178	1,47719	2,26403
3	1,96333	3,337990	6,01945	1,99954	0,93441	1,46269	2,27744
ORT	1,97030	3,33988	6,02101	1,99131	0,94388	1,47015	2,28911
SD	0,00876	0,01481	0,00629	0,01701	0,00879	0,00726	0,03253
RSD	0,444	0,443	0,105	0,854	0,931	0,494	1,421

6.3.1.4.1. Pantoprazol-N-Oksit grafiği

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999936555
R Square	0,999873114
Adjusted R Square	0,999851966
Standard Error	0,006984958
Observations	8



ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	2,306795532	2,306795532	47280,44223	6,38432E-13
Residual	6	0,000292738	4,87896E-05		
Total	7	2,30708827			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	0,010016215	0,005883169	1,702520387	0,13955321	-0,004379381	0,02441181	-0,004379381	0,02441181
X Variable 1	1298,928394	5,973714264	217,4406637	6,38432E-13	1284,311242	1313,545547	1284,311242	1313,545547

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,115229415	-0,004989415
2	0,665975054	-0,002195054
3	1,059550357	0,012866309
4	1,190742125	-0,003208792
5	1,321933893	0,00064944
6	1,453125661	0,005331006
7	1,584317429	-0,000864095
8	1,977892732	-0,007589399

%-intercept:

$$y = 1298,9284x + 0,01$$

$$y = (1298,9284 * 0,00101) + 0,01$$

$$y = 1,321917684$$

$$\frac{1,32258}{1,32192} = 100$$

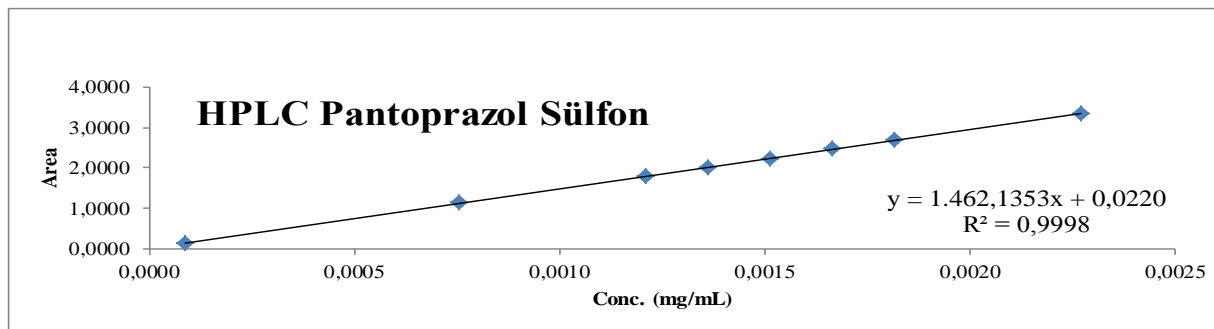
$$x = 99,950$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 99,95 = 0,050$$

6.3.1.4.2. Pantoprazol Sulfon grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,999911593
R Square	0,999823193
Adjusted R Square	0,999793726
Standard Error	0,014108341
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	6,753485884	6,753485884	33929,39472	1,72732E-12
Residual	6	0,001194272	0,000199045		
Total	7	6,754680156			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,021986204	0,011731687	1,87408708	0,110053487	-0,006720201	0,050692608	-0,006720201	0,050692608
X Variable 1	1462,13526	7,937787977	184,1993342	1,72732E-12	1442,712193	1481,558328	1442,712193	1481,558328

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,153122191	-0,008907191
2	1,130284731	0,011688602
3	1,795263847	0,016902819
4	2,016923553	-0,023583553
5	2,238583258	-0,001973258
6	2,460242964	0,005877036
7	2,681902669	0,006997331
8	3,346881786	-0,007001786

%-intercept:

$$y = 1462,1353x + 0,0220$$

$$y = (1462,1353 * 0,001516) + 0,0220$$

$$y = 2,238597115$$

2,23661	100
2,23860	x

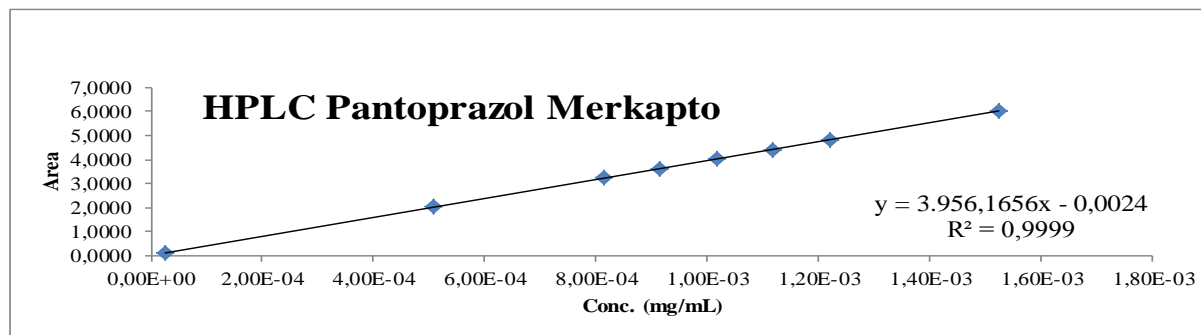
$$x = 100,0888$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 100,0888 = -0,089$$

6.3.1.4.3. Pantoprazol Merkpto grafiği

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999971625
R Square	0,99994325
Adjusted R Square	0,999933791
Standard Error	0,014777381
Observations	8



ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	23,08629197	23,08629197	105720,5101	5,71165E-14
Residual	6	0,001310226	0,000218371		
Total	7	23,0876022			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	-0,00236378	0,012049545	-0,19617208	0,850951035	-0,03184796	0,027120391	-0,031848	0,027120391
X Variable 1	3956,165562	12,16731728	325,1469054	5,71165E-14	3926,393209	3985,937915	3926,39321	3985,937915

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,10482868	-0,006230346
2	2,007368321	0,009865012
3	3,213207584	0,013812416
4	3,615154006	-0,028050672
5	4,017100427	0,008479573
6	4,419046848	-0,001466848
7	4,820993269	0,009410064
8	6,026832532	-0,005819199

%-intercept:

$$y = 3.956,1656x - 0,0024$$

$$y = (3956,1656 * 0,001016) - 0,0024$$

$$y = 4,01706425$$

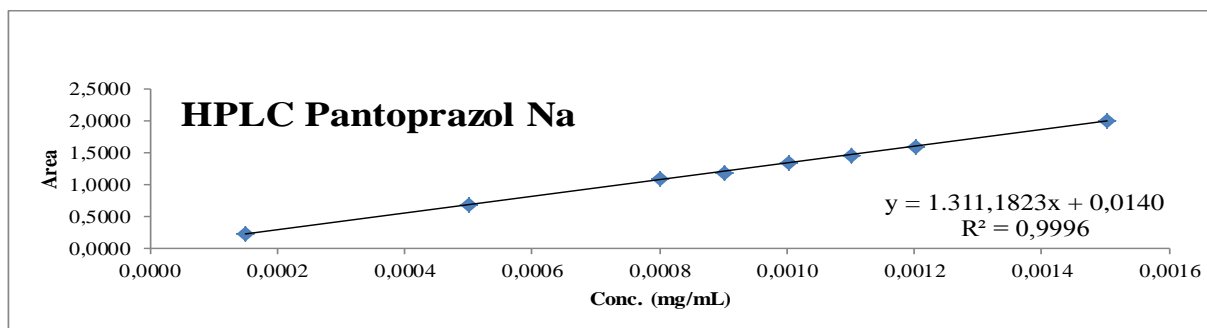
4,02558	100
4,01706	x
$x = 99,7885$	

%-intercept = $100 - 99,7885 = 0,212$

6.3.1.4.4. Pantoprazol Na grafiği

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999780396
R Square	0,999560841
Adjusted R Square	0,999487648
Standard Error	0,01247211
Observations	8



ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	2,124312096	2,124312096	13656,46917	2,64721E-11
Residual	6	0,000933321	0,000155554		
Total	7	2,125245417			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	0,014034129	0,010974224	1,278826547	0,248190744	-0,01281883	0,040887088	-0,01281883	0,040887088
X Variable 1	1311,182342	11,22002637	116,8608966	2,64721E-11	1283,727926	1338,636757	1283,727926	1338,636757

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,21240815	0,000735183
2	0,670936482	0,006570184
3	1,065077894	0,011278772
4	1,196458365	-0,025141698
5	1,327838836	0,001824498
6	1,459219306	-0,007325973
7	1,590599777	0,00548689
8	1,984741189	0,006572144

%-intercept:

$$y = 1.311,1823x + 0,0140$$

$$y = (1.311,1823 * 0,001002) + 0,0140$$

$$y = 1,327804665$$

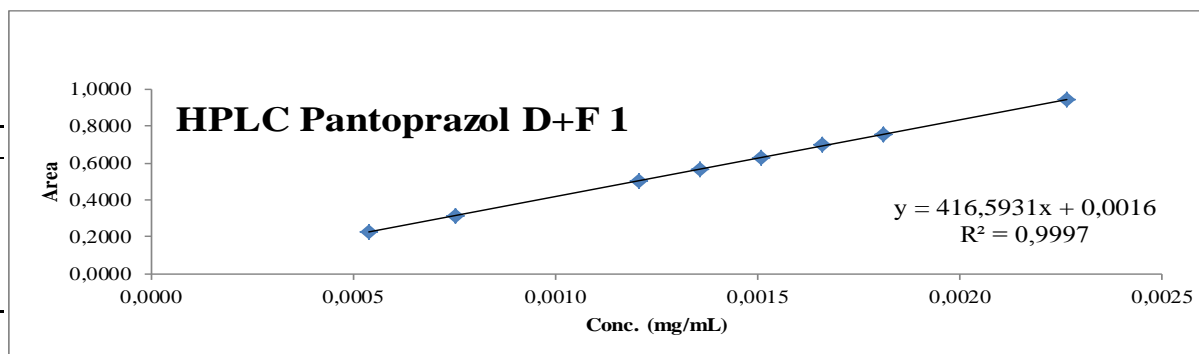
1,329663	100
1,327805	x
	$x = 99,8602$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 99,8602 = 0,140$$

6.3.1.4.5. Pantoprazol D+F 1 grafiği

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,999031136
R Square	0,998063212
Adjusted R Square	0,997740414
Standard Error	0,012030045
Observations	8



ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0,447467682	0,447467682	3091,912094	2,27202E-09
Residual	6	0,000868332	0,000144722		
Total	7	0,448336014			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	-0,008296973	0,011183789	-0,741874939	0,486177627	-0,035662718	0,019068773	-0,035662718	0,019068773
X Variable 1	420,4071774	7,560605064	55,60496466	2,27202E-09	401,9070433	438,9073115	401,9070433	438,9073115

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,143289243	0,001767423
2	0,309530853	0,002465813
3	0,500227549	0,005892451
4	0,563793114	-0,026119781
5	0,62735868	0,00283132
6	0,690924245	0,010962422
7	0,75448981	0,003503523
8	0,945186506	-0,001303172

%-intercept:

$$y = 416,5931x + 0,0016$$

$$y = (416,5931 * 0,001512) + 0,0016$$

$$y = 0,631489$$

$$\frac{0,630190}{0,631489} = \frac{100}{x}$$

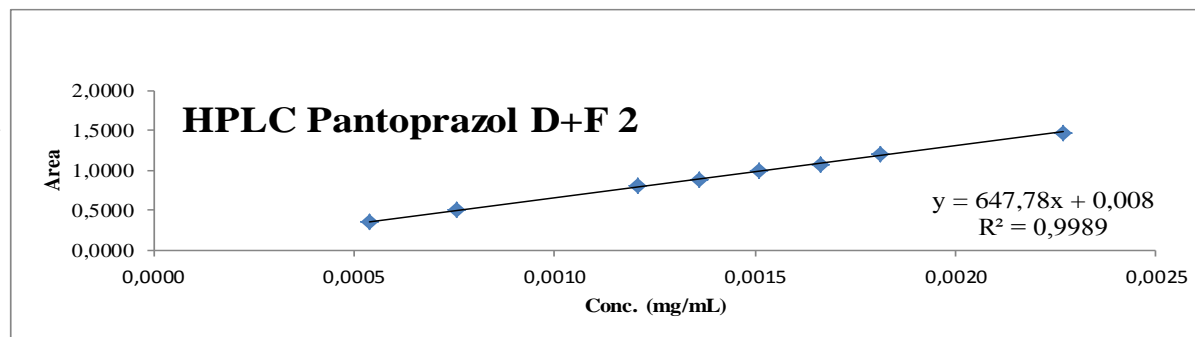
$$x = 100,2061$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 100,2061 = -0,206$$

6.3.1.4.6. Pantoprazol D+F 2 grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,999012173
R Square	0,998025322
Adjusted R Square	0,99769621
Standard Error	0,019266108
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	1,125601343	1,125601343	3032,470835	2,40802E-09
Residual	6	0,002227097	0,000371183		
Total	7	1,12782844			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,023921743	0,017910829	-1,33560224	0,230110073	-0,067747961	0,019904476	-0,067747961	0,019904476
X Variable 1	666,7784976	12,10830271	55,0678748	2,40802E-09	637,1505482	696,406447	637,1505482	696,406447

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,21649858	-0,024391914
2	0,480162801	0,019583865
3	0,782613528	0,015883139
4	0,883430437	-0,004200437
5	0,984247346	0,002462654
6	1,085064255	-0,012944255
7	1,185881163	0,021785503
8	1,48833189	-0,018178557

%-intercept:

$$y = 647,78x + 0,008$$

$$y = (647,78 * 0,001512) + 0,008$$

$$y = 0,98744336$$

$$\frac{0,986710}{0,987443} = 100$$

$$\frac{0,987443}{x} = 100$$

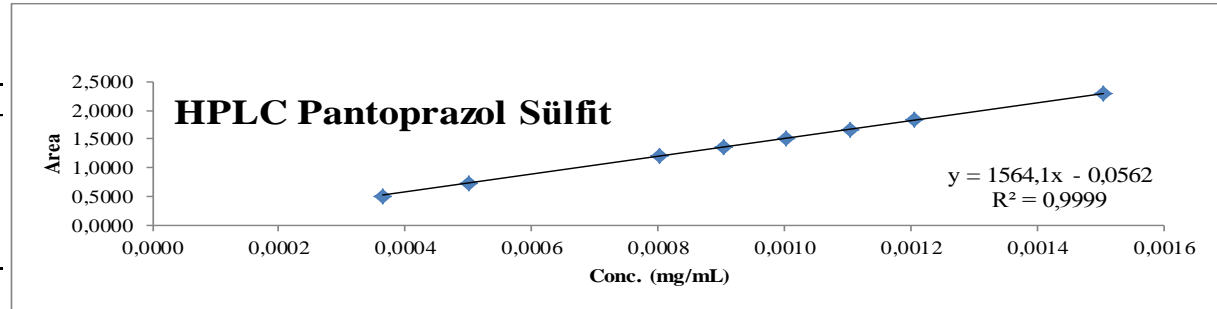
$$x = 100,0743$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 100,0743 = -0,074$$

6.3.1.4.7. Pantoprazol Sülfit grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,99989749
R Square	0,99979499
Adjusted R Square	0,999765703
Standard Error	0,008372121
Observations	9



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	2,392797615	2,392797615	34137,75685	3,59067E-14
Residual	7	0,000490647	7,00924E-05		
Total	8	2,393288262			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,057647192	0,008208052	-7,023249126	0,000207235	-0,07705615	-0,038238234	-0,07705615	-0,038238234
X Variable 1	1566,151329	8,476493494	184,7640573	3,59067E-14	1546,107607	1586,195051	1546,107607	1586,195051

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,513371582	-0,011193249
2	0,728560775	-0,003500775
3	1,200285555	0,008731111
4	1,200285555	0,008731111
5	1,357527149	-0,000247149
6	1,514768742	0,007097924
7	1,672010336	-0,000727002
8	1,829251929	0,002974738
9	2,300976709	-0,011866709

%-intercept:

$$y = 1564,1x - 0,0562$$

$$y = (1564,1 * 0,001004) - 0,0562$$

$$y = 1,5141564$$

$$\frac{1,5218667}{1,5141564} = 100$$

$$\frac{1,5141564}{x} = 100$$

$$x = 99,4934$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 99,4934 = 0,507$$

6.3.1.5. Doğruluk (Accuracy)

Metodun doğruluğu 9 adet numuneye üç farklı konsantrasyonda standart spike yapılarak ispatlanmıştır. Bu üç farklı konsantrasyon LOQ, %100 ve %150 standartlarıdır. Yapılan bu spike işleminden sonra numuneler analiz edilmiştir. Spike yapılmadan önceki numune sonuçları da göz önünde bulundurularak geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda sonuçların uygunluk kriterlerini karşıladığı tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar %80-%120 aralığında bulunmuştur. Sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Resim 6. 3. 10. LOQ Spike geri kazanım tablosu

LOQ Spike çözeltisi % geri kazanım							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	95,62509	97,01936	104,22706		107,48614	93,78009	97,97056
2	100,80538	95,95979	101,06062		99,25173	92,21096	103,56539
3	98,23700	98,01683	95,23474		101,08546	108,24191	99,84601
ORT	98,22249	96,99866	100,17414		102,60778	98,07765	100,46065
SD	2,59018	1,02868	4,56123		4,32313	8,83740	2,84761
RSD	2,637	1,061	4,553		4,213	9,011	2,835

Resim 6. 3. 11. %100 Spike geri kazanım tablosu

%100 Spike çözeltisi % geri kazanım							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	101,02537	103,55282	102,40189		102,44529	104,65385	102,47547
2	101,31744	103,37342	102,52212		106,00930	101,58405	100,69673
3	100,24923	102,31517	101,93090		101,17108	100,10945	104,29429
ORT	100,86402	103,08047	102,28497		103,20856	102,11579	102,48883
SD	0,55208	0,66881	0,31247		2,50779	2,31839	1,79882
RSD	0,547	0,649	0,305		2,430	2,270	1,755

Resim 6. 3. 12. %150 Spike geri kazanım tablosu

%150 Spike çözeltisi % geri kazanım							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfidit
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	101,71629	102,63701	102,82011		106,68691	105,12713	112,07075
2	100,28929	102,45847	101,80961		105,06701	102,51584	104,87486
3	102,06270	102,71510	102,15508		103,03392	104,88770	106,73584
ORT	101,35610	102,60353	102,26160		104,92928	104,17689	107,89382
SD	0,93997	0,13155	0,51360		1,83039	1,44349	3,73509
RSD	0,927	0,128	0,502		1,744	1,386	3,462

6.3.1.6. Kesinlik (Precision)

6.3.1.6.1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Metodun tekrarlanabilirliği homojen numunedan alınan 6 örneğin analiz edilmesi sonucu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler uygunluk kriterlerini karşılamıştır. Saptanan safsızlık değerleri RSD < %20 koşulunu sağlamıştır.

Resim 6. 3. 13. Numune tekrarlanabilirliği

No.	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfidit	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
1	0,005<LOQ	0,051	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,098
2	0,004<LOQ	0,051	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,092
3	0,005<LOQ	0,051	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,099
4	0,004<LOQ	0,051	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,093
5	0,005<LOQ	0,052	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,098
6	0,004<LOQ	0,053	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,099
Ort.	0,00450	0,05150	0,00100				0,01533	0,09650
SD	0,00055	0,00084	0,00000				0,00103	0,00315
%RSD	12,172	1,625	0,000				6,736	3,261
RSD Limit	<%20	<%20	<%20				<%20	<%20

6.3.1.6.2. Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility)

Yapılan çalışmalar sonunda kesinlik parametresi başlığı altında bulunan yeniden üretilebilirlik sonuçları uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Sonuçların kesinlik parametresi ile ortak tablosu aşağıda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 16. Tekrar uygulanabilirlik standart tekrarlanabilirliği

Standart çözeltisi							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,001008	0,0015	0,00101	0,001012	0,0015	0,0015	0,00101
RT	3,509	5,294	6,621	8,683	14,106	14,791	24,755
RRT	0,4041	0,6097	0,7625	1,0000	1,6246	1,7034	2,8510
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	1,33338	2,24279	4,093870	1,3214	0,60708	0,96323	1,47337
2	1,32459	2,22202	4,082160	1,38477	0,64357	1,0094	1,58034
3	1,30834	2,26139	4,076670	1,33149	0,63718	0,99721	1,58117
4	1,29638	2,22302	4,123160	1,32389	0,64585	0,99145	1,45889
5	1,31929	2,25623	4,105280	1,31767	0,64907	1,01072	1,43934
6	1,33301	2,27238	4,100760	1,36488	0,58988	0,98597	1,52867
Ort.	1,31917	2,24631	4,09698	1,34068	0,62877	0,99300	1,51030
SD	0,01456	0,02074	0,01680	0,02756	0,02440	0,01754	0,06214
%RSD	1,104	0,923	0,410	2,055	3,880	1,767	4,115
RSD Limit	< %5	< %5	< %5	< %5	< %5	< %5	< %5

Tablo 6. 3. 17. Tekrar uygulanabilirlik safsızlık sonuçları

No.	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
1	<LOD	0,050	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,015	0,092
2	<LOD	0,052	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,013	0,088
3	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,097
4	<LOD	0,049	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,093
5	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,012	0,098
6	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,095
Ort.		0,051					0,01400	0,09383
SD		0,001					0,00141	0,00366
%RSD		2,038					10,102	3,896
RSD Limit		< %20					< %20	< %20

Tablo 6. 3. 18. Tekrar uygulanabilirlik ve kesinlik karşılaştırma tablosu

Yeniden uygulanabilirlik	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
No.								
1	<LOD	0,050	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,015	0,092
2	<LOD	0,052	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,013	0,088
3	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,097
4	<LOD	0,049	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,093
5	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,012	0,098
6	<LOD	0,051	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,095
Ort.		0,051					0,014	0,094
SD		0,0010					0,0014	0,0037
%RSD		2,038					10,102	3,896
Kesinlik	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
No.								
1	0,005 <LOQ	0,051	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,098
2	0,004 <LOQ	0,051	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,092
3	0,005 <LOQ	0,051	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,099
4	0,004 <LOQ	0,051	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,014	0,093
5	0,005 <LOQ	0,052	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,098
6	0,004 <LOQ	0,053	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,016	0,099
Ort.	0,005 <LOQ	0,052	0,001 <LOQ				0,015	0,097
SD	0,00055	0,001	0,000				0,001	0,003
%RSD	12,172	1,625	0,000				6,736	3,261
Δ Limit	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05				Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05

6.3.1.7. Sağlamlık (Robustness)

6.3.1.7.1. Solüsyon stabilitesi

Çözelti stabilitesi uygun aralıklarla standart çözeltisi ve numune çözeltisinin analizi ile gösterilmiştir. Solüsyon stabilitesi değerlendirilmesi için standart çözeltisi ve numune çözeltisi kontrol edilen prosedüre göre hazırlandı. Bu çözeltiler 2-8°C'de muhafaza edildi ve düzenli aralıklarla belirli bir süre boyunca analiz edildi. İlk sonuçlar ile her zaman noktasındaki sonuçlar arasındaki yüzde değişim hem standart hem de test çözeltisi için hesaplandı. Örnek çözeltisi safsızlık değerinin başlangıç safsızlık değerinden % değişimi \leq %1,0 olmalıdır. RSD limitleri gözlenen safsızlık seviyesi $<$ %0,2 olduğu durumlarda \leq %30 gözlenen safsızlık seviyesi %0,2 ile %0,5 değerleri arasında olduğu durumlarda \leq %20 olmalıdır. Aşağıdaki tablolarda bu çalışmaya ait veriler paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 19. Standart alan değişim tablosu

Stabilite Zamanı	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
28.08.15 13:50	1,33962	2,23378	4,06891	1,34536	0,63019	0,98848	1,53596
29.08.15 02:14 14 Saat	1,31952	2,23295	4,01983	1,30498	0,61335	0,96037	1,48522
30.08.15 15:31 50 Saat	1,31904	2,23310	4,04303	1,34049	0,63567	1,02220	1,52756
31.08.15 12:15 70 Saat	1,31803	2,23673	4,07186	1,36230	0,65570	0,99923	1,53984
31.08.15 15:33 73,5 Saat	1,33459	2,23375	4,09045	1,34548	0,64639	1,02173	1,49266

Tablo 6. 3. 20. Standart stabilite RSD tablosu

%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
1,069	0,026	0,858	2,155	1,915	2,040	2,375
1,095	0,022	0,451	0,256	0,612	2,372	0,388
1,149	0,093	0,051	0,885	2,806	0,765	0,178
0,266	0,001	0,373	0,006	1,795	2,339	2,022

Tablo 6. 3. 21. Standart stabilite alan yüzde değişim tablosu

%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfite
-1,50	-0,04	-1,21	-3,00	-2,67	-2,84	-3,30
-1,54	-0,03	-0,64	-0,36	0,87	3,41	-0,55
-1,61	0,13	0,07	1,26	4,05	1,09	0,25
-0,38	0,00	0,53	0,01	2,57	3,36	-2,82

Tablo 6. 3. 22. Numune stabilite % safsızlık sonuçları

Stabilite Zamani	% N-Oksit	% Sülfon	% Merkapto	% D+F 1	% D+F 2	% Sülfite	% Bilinmeyen Maks.	% Toplam
28.08.2015 20:15	0,002<LOQ	0,049	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,015	0,086
30.08.2015 16:03 44 Saat	0,015	0,051	0,002<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,015	0,127
30.08.2015 23:44 51 Saat	0,016	0,052	0,001<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0,012	0,125

Tablo 6. 3. 23. Numune stabilite RSD sonuçları

%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfite	Bilinmeyen Maks.	Toplam
108,146	2,828	47,140	<LOD	<LOD	<LOD	0,000	27,222
109,994	4,201	0,000	<LOD	<LOD	<LOD	15,713	26,139

Tablo 6. 3. 24. Numune stabilite % değişim tablosu

%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F 1	D+F 2	Sülfite	Bilinmeyen Maks.	Toplam
650,00	4,08	100,00	<LOD	<LOD	<LOD	0,00	47,67
700,00	6,12	0,00	<LOD	<LOD	<LOD	-20,00	45,35

Yapılan solüsyon stabilitesi çalışmalarında standardım stabil kaldığı, fakat numunenin taze hazırlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

6.3.1.7.2. Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters)

Kromatografik metot parametrelerinde, sağlıklı çalışması başlığı altında yapılan çalışmalar sonunda aşığıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, değişiklik yapılan parametrelerin içinde yer alan 70:30 (Tampon:ACN) ve tamponda yapılan pH değişikliklerini metodun tolere edemediğı ve bazı maddelerin kromatografik zamanın dısına çıktığı veya saptanamadığı görülmüştür. Tampon pH değişiklikleri maddelerin çözünürlük ve kolondaki elüsyonlarını değıştirdiğı için yerlerinin değiştii saptanmıştır. D+F 1, D+F 2, sülfıt, sülfon safsızlıkları pH değişikliklerinde kromatogramda saptanamamıştır. Bununla beraber sülfıt, D+F 1 ve D+F 2 safsızlıkları 70:30 (Tampon:ACN) değişikliğinde de kromatogramda saptanamamıştır. Metodun mobil faz akış hızı, dalga boyu ve sıcaklık değişikliklerinden önemli ölçüde etkilenmediğı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar aşığıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 25. N-Oksit parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,511	1,31803	10,84	1,25	9413	6,02	13,949
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,194	1,20639	10,51	1,24	8832	5,39	13,561
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,900	1,46136	9,87	1,25	9993	6,80	14,311
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	4,869	0,79065	13,09	1,04	10409	8,74	6,644
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	7,624	1,3176	6,88	1,17	5343	14,25	5,065
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	4,679	1,33275	13,22	1,14	6925	8,36	9,251
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	2,917	1,33574	7,80	1,22	10879	4,83	18,244
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	3,517	1,31514	10,68	1,22	9447	6,03	13,993
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	3,585	1,33646	11,23	1,23	9196	6,17	13,602
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	3,427	1,30390	10,41	1,24	9333	5,85	14,097
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	3,427	1,33543	10,41	1,26	9406	5,85	14,527

Tablo 6. 3. 26. Sülfon parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	5,302	2,23673	6,84	1,11	12909	9,60	18,620
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	4,823	2,04714	6,63	1,10	12186	8,65	18,226
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	5,890	2,50083	7,01	1,12	13648	10,78	19,151
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	7,899	2,24555	8,81	1,07	13389	14,80	12,875
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	8,042	2,23941	7,90	1,06	12720	15,08	12,239
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	3,938	2,24917	3,36	1,14	10928	6,88	23,211
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	5,249	2,23457	6,68	1,12	13542	9,50	19,281
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	5,539	2,24732	6,49	1,08	12348	10,08	17,501
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	5,110	2,28350	7,32	1,11	12596	9,22	19,199
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	5,110	1,99588	6,97	1,13	12516	9,22	16,747

Tablo 6. 3. 27. Merkapto parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	305	6,625	4,07186	8,55	1,09	17221	12,25	31,517
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	305	6,023	3,72587	6,09	1,09	16511	11,05	31,07
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	305	7,366	4,51365	8,75	1,09	18017	13,73	32,080
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	305	10,503	4,06913	15,00	1,05	17353	20,01	20,122
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	305	10,103	4,20827	12,08	1,05	17388	19,21	21,740
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	305	8,776	4,03375	15,07	1,06	17346	16,55	23,748
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	305	5,312	4,16517	4,21	1,11	16674	9,62	39,429
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	305	6,504	4,09591	6,4	1,11	17414	12,01	32,488
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	305	6,873	4,07464	8,58	1,06	16749	12,75	30,034
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	310	6,508	3,94611	7,91	1,08	16850	12,02	30,659
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	300	6,506	3,54328	5,99	1,08	16842	12,01	27,548

Tablo 6. 3. 28. Pantoprazol Na parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezölüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	8,694	1,3623	15,12	1,08	15195	16,39	7,451
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	7,907	1,21855	15,21	1,09	14543	14,81	7,266
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	9,655	1,47199	15,76	1,08	16029	18,31	7,567
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	16,773	1,27884	-	1,09	16253	32,55	3,825
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	20,407	1,23787	-	0,97	17492	39,81	3,244
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	14,124	1,27242	17,78	1,02	16306	27,25	4,55
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	6,077	1,34482	14,05	1,11	14285	11,15	10,268
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	8,469	1,37299	16,11	1,09	15684	15,94	7,89
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	9,057	1,35802	15,03	1,05	14424	17,11	6,981
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	8,558	1,35287	15,97	1,05	14872	16,12	7,503
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	8,556	1,2428	15,81	1,04	15080	16,11	6,892

Tablo 6. 3. 29. D+F 1 parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	14,11	0,6557	1,56	1,0	16721	27,22	2,419
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	12,843	0,54575	1,57	1,05	17500	24,69	2,307
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	15,684	0,74282	1,57	0,93	18421	30,37	2,497
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	24,229	0,56312	1,71	0,91	19300	47,46	1,379
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	9,402	0,57879	1,39	0,98	19249	17,8	3,41
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	13,753	0,62028	1,48	0,96	20188	26,51	2,51
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	14,578	0,6386	1,70	1,02	17988	28,16	2,326
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	14,039	0,60732	1,58	1,01	18982	27,08	2,395
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	14,040	0,61259	1,54	0,96	18167	27,08	2,376

Tablo 6. 3. 30. D+F 2 parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	14,794	0,99923	16,86	1,05	17983	28,59	3,586
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	13,469	0,90655	16,74	1,03	16905	25,94	3,506
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	16,436	1,10867	17,03	1,01	17276	31,87	3,58
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	25,462	1,01483	n.a.	1,19	18330	49,92	2,128
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	9,796	0,94813	13,64	1,1	17391	18,59	5,126
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	14,345	0,95257	16,98	1,05	18940	27,69	3,66
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	15,354	1,0122	16,55	1,07	16174	29,71	3,353
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	14,705	0,97954	17,07	1,03	18021	28,41	3,527
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	14,702	0,90106	16,75	1,06	17622	28,4	3,263

Tablo 6. 3. 31. Sülfite parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	24,8	1,53984	-	1,12	17547	48,6	3,306
A ₁	1,1	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	22,565	1,349	-	1,07	17853	44,13	3,182
A ₂	0,9	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	27,578	1,71245	-	1,05	18453	54,16	3,416
B ₁	1,0	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
B ₂	1,0	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₁	1,0	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₂	1,0	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	14,785	1,59272	-	1,03	18383	28,57	5,736
D ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	23,629	0,70541	-	1,03	19300	46,26	1,665
D ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	26,162	1,49918	-	1,07	16021	51,32	2,931
E ₁	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	24,677	1,5605	-	1,03	18105	48,35	3,442
E ₂	1,0	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	24,654	1,32103	-	1,06	17341	48,31	2,817

6.3.2. UPLC validasyon

6.3.2.1. Seçicilik (Selectivity)

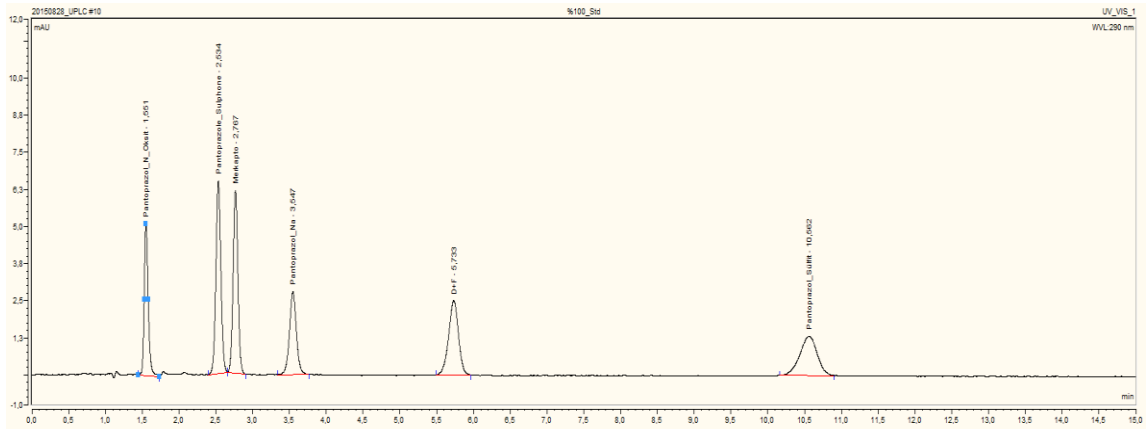
Validasyonun UPLC tarafında yapılan seçicilik parametresine ait sonuçlar uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Etken maddenin varlığında bilinen safsızlıkların rezolüyonu uygunluk kriterleri sınırları içerisinde bulunmuştur. Etken maddeye herhangi bir girişim olmadığı saptanmıştır. Çalışmaya ait veriler ve kromatogramlar aşağıdaki gibidir.

Tablo 6. 3. 32. UPLC Seçicilik standart tekrarlanabilirliği

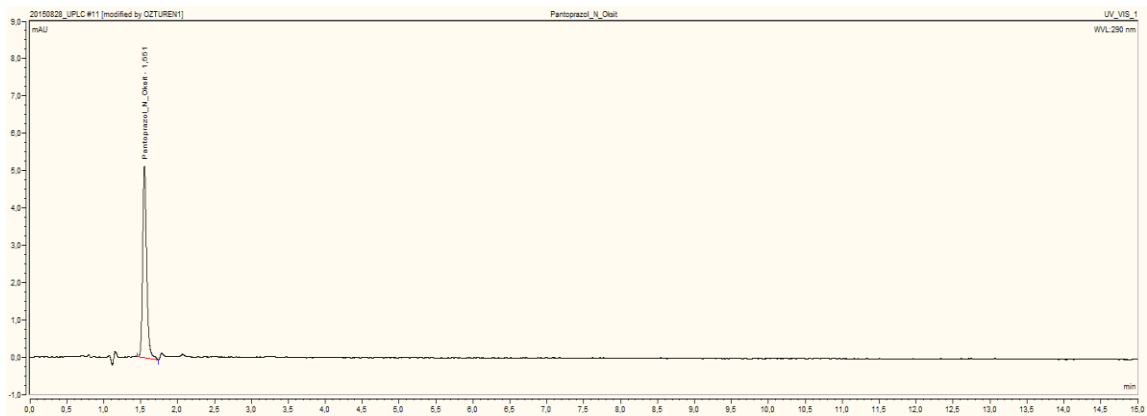
Standart Çözeltileri						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00101	0,001516	0,001016	0,001002	0,001512	0,001004
RT	1,542	2,521	2,766	3,547	5,749	10,58
RRT	0,1775	0,2902	0,3184	0,4083	0,6617	1,2178
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,33497	0,55213	0,93587	0,32839	0,42325	0,38867
2	0,33377	0,55006	0,93323	0,32518	0,42251	0,38296
3	0,33296	0,54849	0,9246	0,32657	0,42057	0,38971
4	0,33287	0,54321	0,92066	0,32566	0,41850	0,38283
5	0,32866	0,54108	0,91509	0,32347	0,41730	0,37875
6	0,32549	0,54099	0,91148	0,31916	0,41238	0,38002
Ort.	0,33442	0,54599	0,92349	0,32474	0,41909	0,38382
SD	0,00362	0,00484	0,00972	0,00318	0,00399	0,00447
RSD	1,081	0,887	1,052	0,978	0,953	1,166
RSD Limit	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5

Tablo 6. 3. 33. UPLC Metodu safsızlık sonuçları

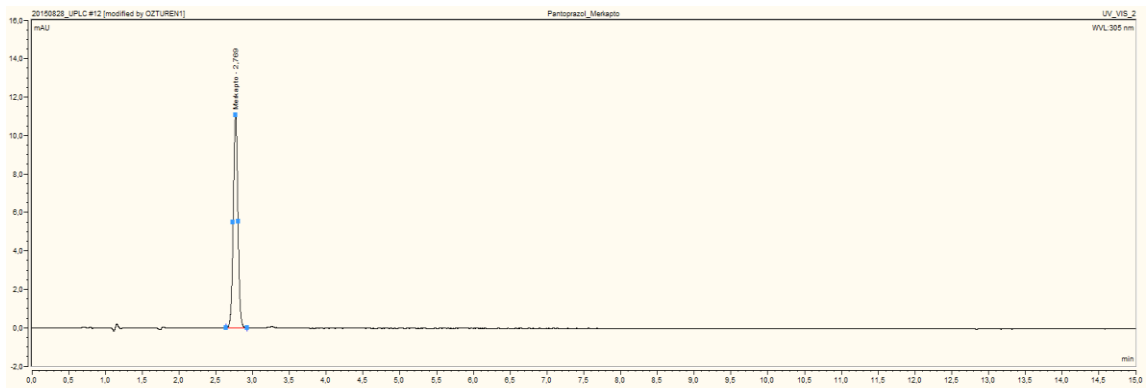
Numune	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfit	Bilinmeyen Maks.	Toplam Safsızlık
B319845	<LOD	0,049	0,001	0,003	0,008	0,011	0,094
Limitler	Maks. % 0,1	Maks. %0,15	Maks. %0,1	Maks. %0,15	Maks. % 0,1	Maks. % 0,1	Maks. % 0,5
Kantitasyon Limitleri	<LOQ= %0,003	LOQ= %0,004	<LOQ= %0,003	<LOQ= %0,007	<LOQ= %0,013	LOQ= %0,006	



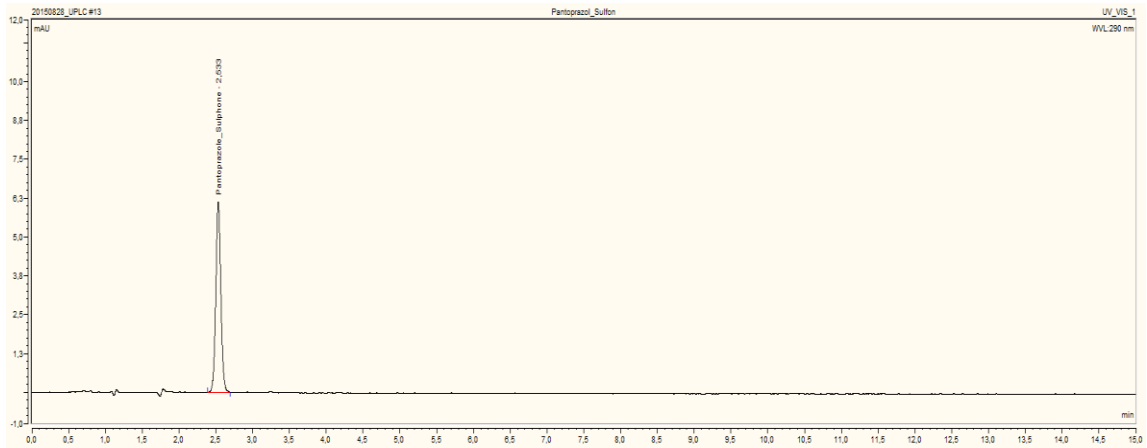
Resim 6. 3. 14. UPLC %100 Standart kromatogramı



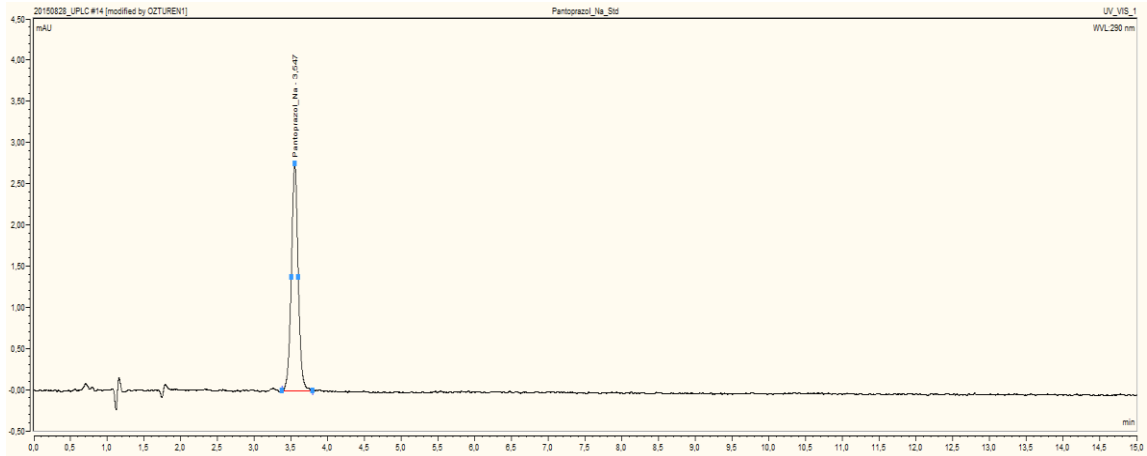
Resim 6. 3. 15. UPLC Pantoprazol-N-Oksit kromatogramı



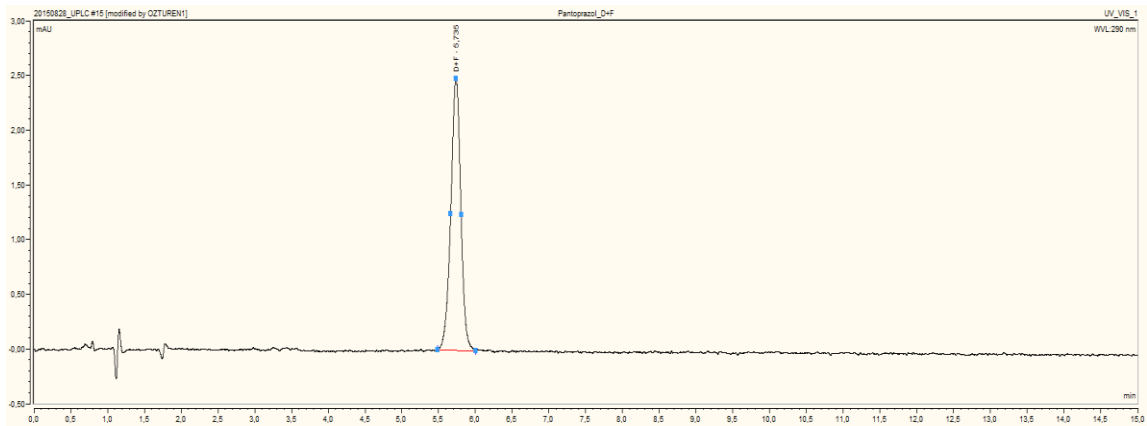
Resim 6. 3. 16. UPLC Merkapt kromatogramı



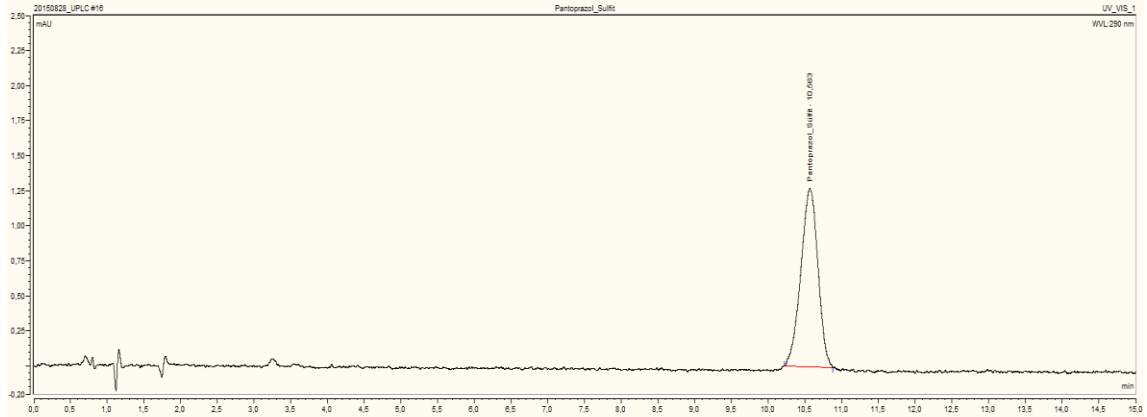
Resim 6. 3. 17. UPLC Pantoprazol Sulfon kromatogramı



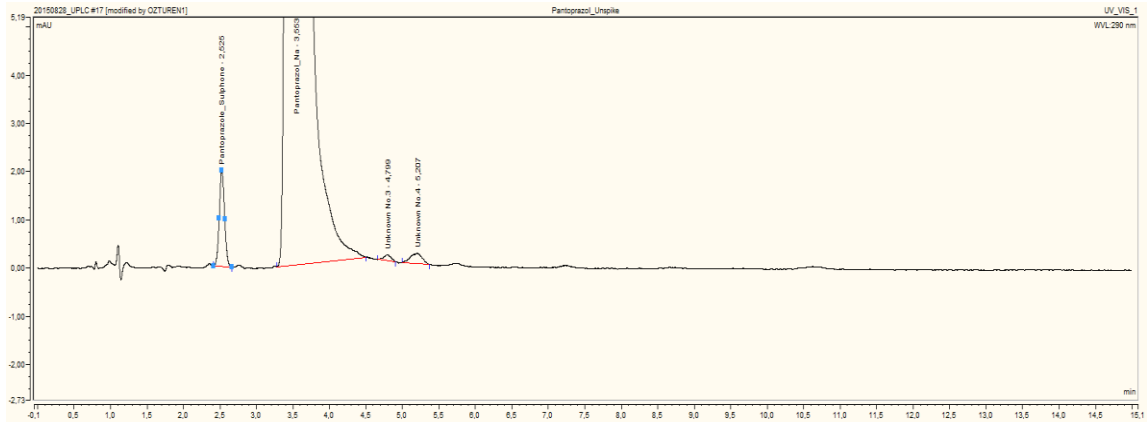
Resim 6. 3. 18. UPLC Pantoprazol Na kromatogramı



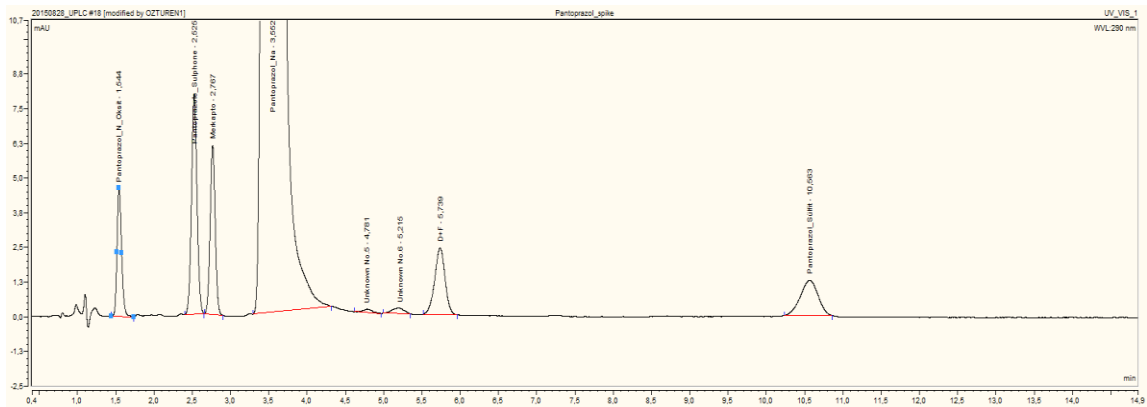
Resim 6. 3. 19. UPLC D+F kromatogramı



Resim 6. 3. 20. UPLC Pantoprazol Sulfid Kromatogramı



Resim 6. 3. 21. UPLC Pantoprazol unspike numune kromatogramı



Resim 6. 3. 22. UPLC Pantoprazol spike numune kromatogramı

6.3.2.1.1. UPLC Bozundurma çalışmaları

Stres çalışması asit, alkali, peroksit, ısı ve fotolitik etki şartları altında numuneye uygulanmıştır. Numuneler DAD dedektör kullanılarak kromatografik sistem üzerinde analiz edilmiştir. Bozulmuş örneklerin analiz içeriği ve pik saflık dereceleri referans çözeltisi kullanılarak kontrol edildi. Bu çalışmaya ait stres koşulları ve sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır. Yapılan bozundurma çalışmalarında sıcaklık uygulandığında bütün safsızlıklarda artış olduğu tespit edildi. UV ışık altındaki çalışmalarda ise merkaptosafsızlığında ciddi artış olduğu görüldü. Bununla beraber, UV ışığının bütün safsızlıklar ve dolayısı ile toplam safsızlığı arttırdığı gözlemlendi. HCl etkisi ile bozundurmada ise aktif ilaç hammaddesinin başlangıç materyali olan sülfid molekülüne parçalandığı görüldü. KOH etkisi ise HCl ile benzer etkilere sahip olup, yine başlangıç materyallerine parçalamıştır. %6 H₂O₂ etkisi kuvvetli oksitleyici özelliği dolayısı ile fazla oksidasyon ile ortaya çıkan Sülfon ve N-oksit safsızlıklarını arttırmıştır. Pik saflığı sonuçları ise uygunluk kriterlerini karşılamıştır.

Tablo 6. 3. 34. UPLC Seçicilik bozundurma şartları

Şartlar	Süre
Asidik stres (1,0 N HCl)	1-2 saat
Bazik stres (1,0 N KOH)	1-2 saat
Oksidatif stres (%6 H ₂ O ₂)	4 saat
Sıcaklık	1-2 saat
UV ışık altında stress	24 saat

Tablo 6. 3. 35. UPLC Seçicilik bozundurma safsızlık sonuçları

Numune Şartları	Bilinen Safsızlıklar					Bilinmeyen	Toplam safsızlık (%)
	N-Oksit (%)	Sülfon (%)	Merkapto (%)	D+F (%)	Sülfid (%)	Maksimum (%)	
Bozundurulmamış	0,002 <LOQ	0,049	0,001 <LOQ	<LOD	<LOD	0,015	0,086
Sıcaklık (105°C)	0,047	0,081	0,772	0,571	3,984	1,615	11,610
UV ışığı (Katı)	0,027	0,053	0,415	0,002	0,060	0,110	0,767
UV ışığı (Sıvı)	0,031	0,070	0,290	0,003 <LOQ	0,012 <LOQ	0,308	0,894
1,0N HCl	0,014	0,267	3,677	8,082	25,573	1,813	46,315
1,0N KOH	0,333	0,086	5,405	<LOD	15,248	1,884	26,988
% 6 H₂O₂	29,069	23,219	0,047	0,024	<LOD	5,901	64,449

Tablo 6. 3. 36. UPLC Seçicilik bozundurma pik saflıkları

Numune şartları	Pik saflıkları					
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
Bozundurulmamış	987	1000	996	1000	974	<LOD
Sıcaklık (105°C)	1000	-	1000	1000	1000	1000
UV ışığı (Katı)	1000	1000	1000	1000	936	999
UV ışığı (Sıvı)	1000	1000	1000	1000	981	-
1,0N HCl	1000	1000	1000	1000	1000	1000
1,0N KOH	1000	1000	1000	1000	-	1000
%6 H₂O₂	1000	1000	1000	-	990	-

6.3.2.2. Kantitasyon limitleri

Yapılan çalışmalar sonunda kantitasyon limitleri belirlenen kriterler ışığında tespit edilmiştir. S/N ≥ 10 koşulunu sağlayacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Bu seviyede hazırlanan karışım standardı tekrarlanabilirliği RSD<%10 koşulunu sağlamıştır. Kantitasyon limitleri çalışmasına ait sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 37. UPLC Kantitasyon standardı tekrarlanabilirliği

% LOQ Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00003	0,000038	0,00003	0,00006	0,00006868	0,00013
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,01100	0,01414	0,01346	0,01877	0,02624	0,04183
2	0,01056	0,01389	0,01225	0,01924	0,02665	0,04049
3	0,00935	0,01397	0,01177	0,01882	0,02859	0,04083
4	0,01024	0,0141	0,01387	0,01828	0,02711	0,04143
5	0,01136	0,01433	0,01053	0,01774	0,02731	0,04314
6	0,01029	0,01436	0,01229	0,01813	0,0273	0,04495
ORT	0,01047	0,01413	0,01236	0,01850	0,02720	0,04211
SD	0,00085	0,00013	0,00087	0,00026	0,00126	0,00070
RSD	8,163	0,903	7,045	1,396	4,615	1,654
RSD	< %10	< %10	< %10	< %10	< %10	< %10

Tablo 6.3. 38. UPLC Kantitasyon standardı S/N tablosu

%LOQ Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00003	0,000038	0,00003	0,00006	0,000069	0,00013
	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	10,0	9,9	11,3	9,6	9,7	10,5
2	10,4	9,7	10,3	10,0	10,4	10,3
3	9,9	10,1	10,4	9,8	10,7	10,1
4	10,6	10,1	11,5	9,9	10,0	10,1
5	10,2	10,3	10,3	9,6	9,7	10,5
6	9,8	10,1	10,8	9,7	9,8	10,7
ORT	10,15000	10,03333	10,76667	9,76667	10,05000	10,36667
SD	0,26458	0,20000	0,55076	0,20000	0,51316	0,20000
RSD	2,607	1,993	5,115	2,048	5,106	1,929

6.3.2.3. Dedeksiyon limitleri

Yapılan çalışmalar sonunda dedeksiyon limitleri belirlenen kriterler ışığında tespit edilmiştir. $2 < S/N < 3$ koşulunu sağlayacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Dedeksiyon limitleri çalışmasına ait sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 39. UPLC Dedeksiyon standardı tekrarlanabilirliği

LOD Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00001	0,000012	0,00001	0,00002	0,000021	0,00004
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,00166	0,00409	0,00460	0,00497	0,00642	0,00947
2	0,00183	0,00377	0,00343	0,00420	0,00477	0,01146
3	0,00312	0,00246	0,00402	0,00417	0,00736	0,01183
ORT	0,00220	0,00344	0,00402	0,00445	0,00618	0,01092
SD	0,00080	0,00086	0,00059	0,00045	0,00131	0,00127
RSD	36,236	25,106	14,564	10,198	21,204	11,624

Tablo 6. 3. 40. UPLC Dedeksiyon standardı S/N tablosu

LOD Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00001	0,000012	0,00001	0,00002	0,00002	0,00004
	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
1	2,1	3,2	2,5	3,0	3,3	2,8
2	2,3	3,2	2,1	2,7	2,8	3,1
3	2,6	2,4	2,0	2,6	3,5	3,0
ORT	2,3	2,9	2,2	2,8	3,2	3,0
SD	0,3	0,5	0,3	0,2	0,4	0,2
RSD	10,8	15,7	12,0	7,5	11,3	5,1

6.3.2.4. Linearite ve aralık (Linearity and Range)

Metodun doğrusallığı LOQ ve %150 standart konsantrasyonları aralığında hazırlanan çözeltilerin sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Her bir safsızlık ve etken maddeye ait konsantrasyon değerleri x eksenine, dedektör cevapları ise y eksenine girilerek linearite grafikleri elde edilmiştir. Linearite ve aralık çalışmalarında hazırlanan çözeltiler 3'er kez enjekte edilmiştir. Yapılan bu enjeksiyonların RSD değerleri uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Linearite ve aralık parametresine ait değerler aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 41. Kantitasyon standardı tekrarlanabilirliği

%LOQ Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00003	0,00004	0,00003	0,00006	0,00007	0,00013
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,01100	0,01414	0,01346	0,01877	0,02624	0,04183
2	0,01056	0,01389	0,01225	0,01924	0,02665	0,04049
3	0,00935	0,01397	0,01177	0,01882	0,02859	0,04083
4	0,01024	0,01410	0,01387	0,01828	0,02711	0,04143
5	0,01136	0,01433	0,01053	0,01774	0,02731	0,04314
6	0,01029	0,01436	0,01229	0,01813	0,02730	0,04495
ORT	0,01047	0,01413	0,01236	0,01850	0,02720	0,04211
SD	0,00085	0,00013	0,00087	0,00026	0,00126	0,00070
RSD	8,163	0,903	7,045	1,396	4,615	1,654
RSD Limit	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Tablo 6. 3. 42. %50 Standart tekrarlanabilirliği

%50 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
C(mg/mL)	0,00051	0,00076	0,00051	0,00050	0,00076	0,00050
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,17148	0,28412	0,42756	0,16565	0,21529	0,19687
2	0,17086	0,28173	0,42903	0,16373	0,21764	0,19718
3	0,17212	0,28318	0,42841	0,16427	0,21332	0,19340
ORT	0,17149	0,28301	0,42833	0,16455	0,21542	0,19582
SD	0,00063	0,00120	0,00074	0,00099	0,00216	0,00210
RSD	0,367	0,425	0,172	0,602	1,004	1,072

Tablo 6. 3. 43. %80 Standart tekrarlanabilirliği

%80 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00081	0,00121	0,00081	0,00080	0,00121	0,00080
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,27288	0,44884	0,73462	0,26685	0,34180	0,31323
2	0,27413	0,44767	0,73311	0,26081	0,33980	0,29154
3	0,27196	0,44809	0,73369	0,26379	0,34411	0,30999
ORT	0,27299	0,44820	0,73381	0,26382	0,34190	0,30492
SD	0,00109	0,00059	0,00076	0,00302	0,00216	0,01170
RSD	0,399	0,132	0,104	1,145	0,631	3,837

Tablo 6. 3. 44. %90 Standart tekrarlanabilirliği

%90 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00091	0,00136	0,00091	0,00090	0,00136	0,00090
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,30976	0,4916	0,80994	0,28749	0,37670	0,34024
2	0,30351	0,49229	0,80647	0,28895	0,37843	0,34248
3	0,30177	0,49386	0,81408	0,29367	0,37477	0,34105
ORT	0,30501	0,49258	0,81016	0,29004	0,37663	0,34126
SD	0,00420	0,00116	0,00381	0,00323	0,00183	0,00113
RSD	1,378	0,235	0,470	1,114	0,486	0,332

Tablo 6.3. 45. %100 Standart tekrarlanabilirliği

%100 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00101	0,00152	0,00102	0,00100	0,00151	0,00100
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,34081	0,56184	0,94566	0,33029	0,42791	0,38791
2	0,34313	0,55755	0,94079	0,32679	0,42136	0,38252
3	0,33735	0,55955	0,94262	0,33430	0,42752	0,38577
ORT	0,34043	0,55965	0,94302	0,33046	0,42560	0,38540
SD	0,00291	0,00215	0,00246	0,00376	0,00367	0,00271
RSD	0,854	0,384	0,261	1,137	0,863	0,704

Tablo 6. 3. 46. %110 Standart tekrarlanabilirliği

%110 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00111	0,00167	0,00112	0,00110	0,00166	0,00110
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,37457	0,6127	1,03658	0,36368	0,47236	0,43265
2	0,36968	0,60955	1,03675	0,36276	0,46549	0,42968
3	0,37252	0,60774	1,03126	0,35925	0,46339	0,42245
ORT	0,37226	0,61000	1,03486	0,36190	0,46708	0,42826
SD	0,00246	0,00251	0,00312	0,00234	0,00469	0,00525
RSD	0,660	0,411	0,302	0,646	1,004	1,225

Tablo 6. 3. 47. %120 Standart tekrarlanabilirliği

%120 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00121	0,00182	0,00122	0,00120	0,00181	0,00120
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,40119	0,656490	1,13202	0,38684	0,50693	0,45408
2	0,39852	0,654750	1,12705	0,39606	0,50301	0,46507
3	0,4015	0,654510	1,12320	0,38810	0,49829	0,46228
ORT	0,40040	0,65525	1,12742	0,39033	0,50274	0,46048
SD	0,00164	0,00108	0,00442	0,00500	0,00433	0,00571
RSD	0,409	0,165	0,392	1,281	0,861	1,241

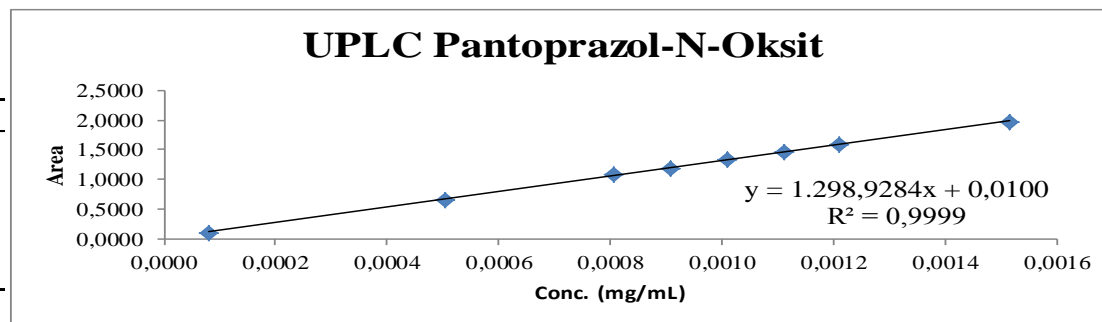
Tablo 6. 3. 48. %150 Standart tekrarlanabilirliği

%150 Standart çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,00152	0,00227	0,00152	0,00150	0,00227	0,00151
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,50342	0,824790	1,46106	0,49446	0,63618	0,58295
2	0,50135	0,823680	1,46043	0,49157	0,63016	0,58728
3	0,50066	0,823900	1,45251	0,48564	0,62904	0,58717
ORT	0,50181	0,82412	1,45800	0,49056	0,63179	0,58580
SD	0,00144	0,00059	0,00476	0,00450	0,00384	0,00247
RSD	0,286	0,071	0,327	0,917	0,608	0,421

6.3.2.4.1. Pantoprazol-N-Oksit grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,9999366
R Square	0,9998731
Adjusted R Square	0,999852
Standard Error	0,006985
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	2,306795532	2,3067955	47280,442	6,38432E-13
Residual	6	0,000292738	4,879E-05		
Total	7	2,30708827			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,0100162	0,005883169	1,7025204	0,1395532	-0,00437938	0,0244118	-0,0043794	0,02441181
X Variable 1	1298,9284	5,973714264	217,44066	6,384E-13	1284,311242	1313,5455	1284,31124	1313,54555

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,1152294	-0,004989415
2	0,6659751	-0,002195054
3	1,0595504	0,012866309
4	1,1907421	-0,003208792
5	1,3219339	0,00064944
6	1,4531257	0,005331006
7	1,5843174	-0,000864095
8	1,9778927	-0,007589399

%-intercept:

$$y = 1.298,9284x + 0,0100$$

$$y = (1.298,9284 * 0,001010) + 0,0100$$

$$y = 1,32191768$$

$$\frac{1,321918}{1,322583} = \frac{100}{x}$$

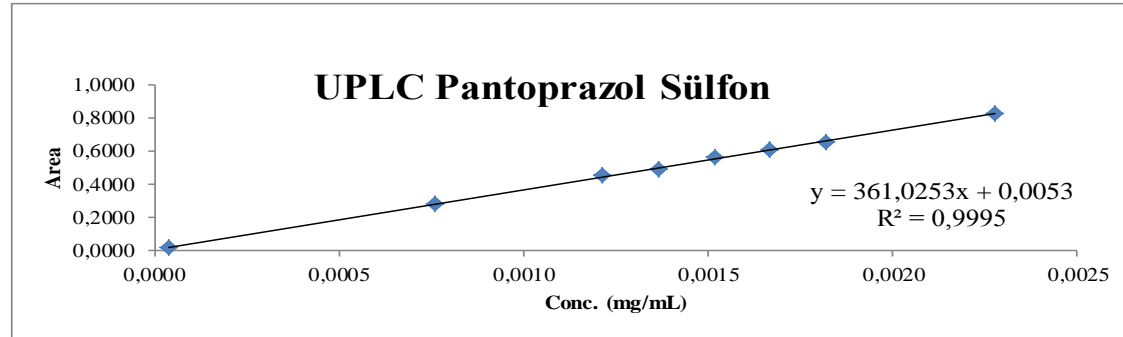
$$x = 100,050355$$

$$\text{\%-intercept} = 100 - 100,05 = -0,050$$

6.3.2.4.2. Pantoprazol Sulfon grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,999765606
R Square	0,999531267
Adjusted R Square	0,999453144
Standard Error	0,005789899
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0,428907523	0,428907523	12794,45282	3,21888E-11
Residual	6	0,000201138	3,35229E-05		
Total	7	0,42910866			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,005258396	0,004716346	1,114930145	0,30753572	-0,006282086	0,016798878	-0,006282086	0,016798878
X Variable 1	361,025317	3,191734804	113,112567	3,21888E-11	353,2154233	368,8352107	353,2154233	368,8352107

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,01893223	-0,004800563
2	0,278915586	0,004094414
3	0,443109901	0,005090099
4	0,497841339	-0,005258005
5	0,552572777	0,00707389
6	0,607304215	0,002692452
7	0,662035653	-0,006785653
8	0,826229967	-0,002106634

%-intercept:

$$y = 361,0253x + 0,0053$$

$$y = (361,0253 * 0,001516) + 0,0053$$

$$y = 0,552614355$$

$$0,552614355 \quad 100$$

$$0,55964667 \quad x$$

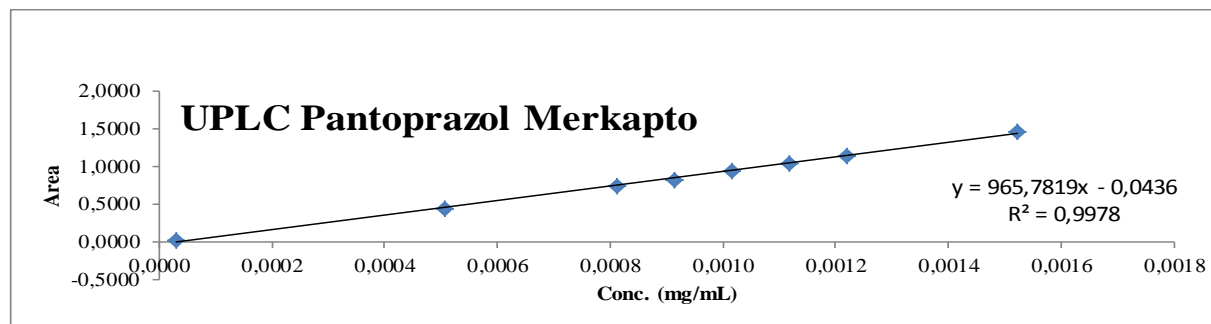
$$x = 101,2725532$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 101,273 = -1,273$$

6.3.2.4.3. Pantoprazol Merkpto grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,99890385
R Square	0,99780891
Adjusted R Square	0,99744373
Standard Error	0,02241666
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	1,373029491	1,37302949	2732,3618	3,28994E-09
Residual	6	0,003015039	0,00050251		
Total	7	1,376044529			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	-0,0435635	0,018297362	-2,380864	0,0547036	-0,08833556	0,0012085	-0,0883356	0,001208501
X Variable 1	965,781905	18,47608533	52,2719985	3,29E-09	920,5725526	1010,9913	920,572553	1010,991257

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	-0,0157212	0,028082863
2	0,44705368	-0,018720344
3	0,741424	-0,007617336
4	0,83954744	-0,02938411
5	0,93767089	0,005352448
6	1,03579433	-0,000930993
7	1,13391777	-0,006494435
8	1,42828809	0,029711907

%-intercept:

$$y = 965,7819x - 0,0436$$

$$y = (965,7819 * 0,001016) - 0,0436$$

$$y = 0,93763441$$

$$\frac{0,93763441}{0,943023} = \frac{100}{x}$$

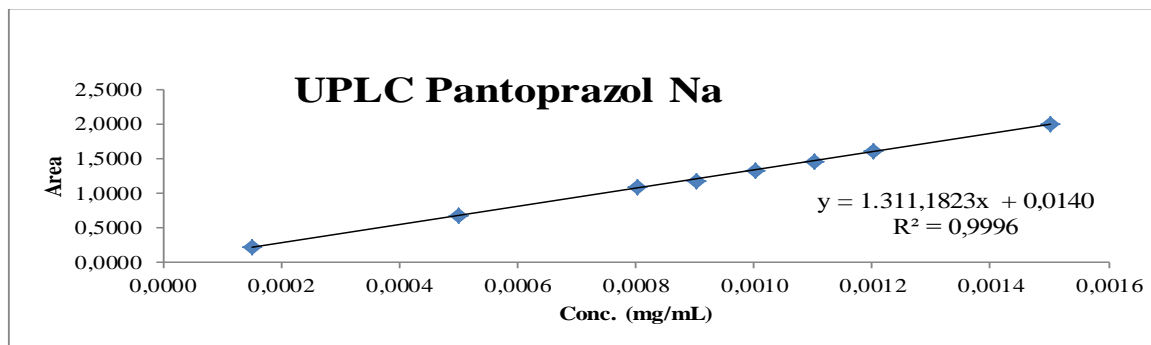
$$x = 100,575$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 100,575 = -0,575$$

6.3.2.4.4. Pantoprazol Na grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,9997804
R Square	0,9995608
Adjusted R Square	0,9994876
Standard Error	0,0124721
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	2,124312096	2,1243121	13656,469	2,64721E-11
Residual	6	0,000933321	0,0001556		
Total	7	2,125245417			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,0140341	0,010974224	1,2788265	0,2481907	-0,01281883	0,0408871	-0,0128188	0,04088709
X Variable 1	1311,1823	11,22002637	116,8609	2,647E-11	1283,727926	1338,6368	1283,72793	1338,63676

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,2124082	0,000735183
2	0,6709365	0,006570184
3	1,0650779	0,011278772
4	1,1964584	-0,025141698
5	1,3278388	0,001824498
6	1,4592193	-0,007325973
7	1,5905998	0,00548689
8	1,9847412	0,006572144

%-intercept:

$$y = 1.311,1823x + 0,0140$$

$$y = (1.311,1823 * 0,001002) + 0,0140$$

$$y = 1,3278047$$

$$\frac{1,3278047}{1,329663} = \frac{100}{x}$$

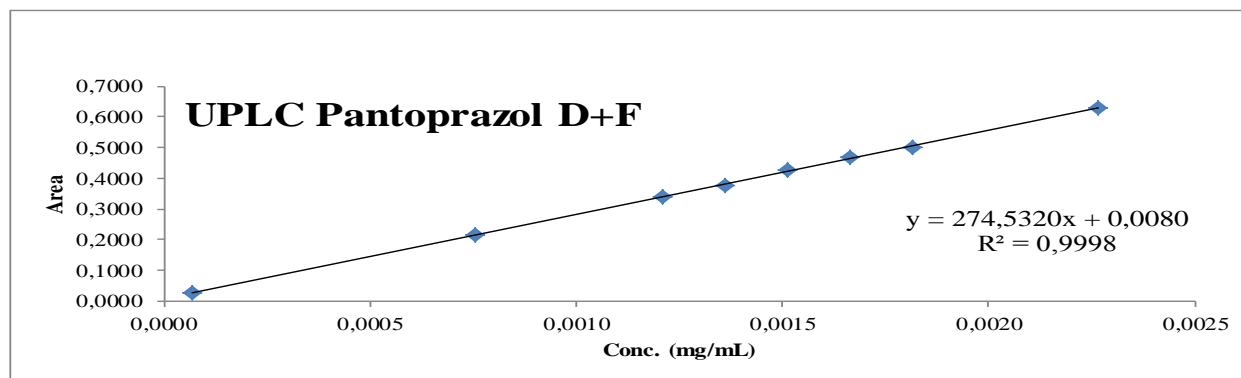
$$x = 100,139981$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 100,139981 = -0,140$$

6.3.2.4.5. Pantoprazol D+F grafiği

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,9998898
R Square	0,9997796
Adjusted R Square	0,9997429
Standard Error	0,002974
Observations	8



ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	0,240759676	0,2407597	27220,6	3,34472E-12
Residual	6	5,30686E-05	8,845E-06		
Total	7	0,240812745			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,0079831	0,002452543	3,2550428	0,0173563	0,001981976	0,0139843	0,00198198	0,01398429
X Variable 1	274,53201	1,663964798	164,98667	3,345E-12	270,4604299	278,60358	270,46043	278,60358

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>
1	0,026838	0,000362009
2	0,2155293	-0,000112663
3	0,340057	0,001846287
4	0,3815663	-0,004932953
5	0,4230755	0,002521142
6	0,4645848	0,002495236
7	0,506094	-0,00335067
8	0,6306217	0,001171612

%-intercept:

$$y = 274,5320x + 0,0080$$

$$y = (274,5320 * 0,0015120) + 0,0080$$

$$y = 0,42309238$$

$$\frac{0,42309238}{0,4255967} = \frac{100}{x}$$

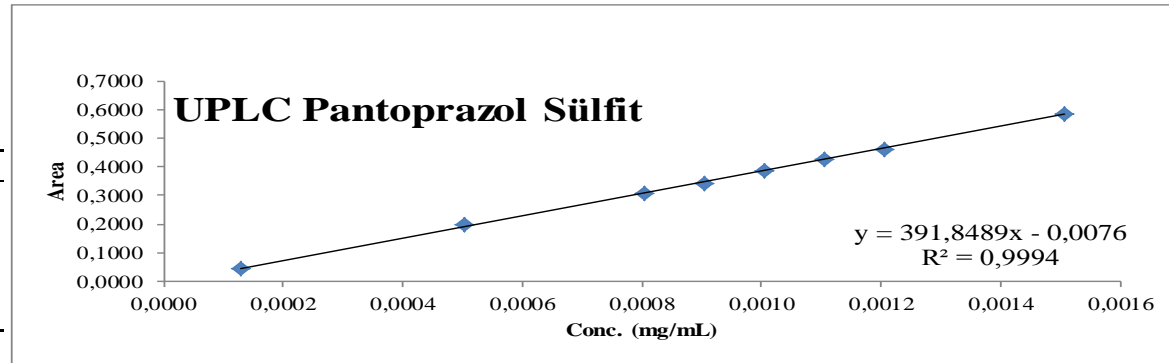
$$x = 100,5919$$

$$\text{\%-intercept} = 100 - 100,592 = -0,592$$

6.3.2.4.6. Pantoprazol Sülfid grafiği

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0,9997033
R Square	0,99940669
Adjusted R Square	0,99930781
Standard Error	0,00439646
Observations	8



ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0,19535351	0,19535351	10106,812	6,52807E-11
Residual	6	0,000115973	1,9329E-05		
Total	7	0,195469483			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	-0,007631	0,003818475	-1,9984359	0,0926269	-0,01697445	0,0017125	-0,0169744	0,00171249
X Variable 1	391,848894	3,897728047	100,532641	6,528E-11	382,3114966	401,38629	382,311497	401,38629

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals
1	0,04354449	-0,001432821
2	0,18907717	0,0067395
3	0,30710205	-0,002182053
4	0,34644368	-0,005187016
5	0,38578531	-0,000385311
6	0,42512694	0,00313306
7	0,46446857	-0,003991902
8	0,58249346	0,003306544

%-intercept:

$$y = 391,8489x - 0,0076$$

$$y = (391,8489 * 0,0010040) - 0,0076$$

$$y = 0,3858163$$

$$0,3858163 \quad 100$$

$$\frac{0,3854000}{x}$$

$$x = 99,892$$

$$\% \text{-intercept} = 100 - 99,892 = 0,108$$

6.3.2.5. Doğruluk (Accuracy)

Metodun doğruluğu 9 adet numuneye üç farklı konsantrasyonda standart spike yapılarak ispatlanmıştır. Bu üç farklı konsantrasyon LOQ, %100 ve %150 standartlarıdır. Yapılan bu spike işleminden sonra numuneler analiz edilmiştir. Spike yapılmadan önceki numune sonuçları da göz önünde bulundurularak geri kazanım hesaplamaları yapılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda sonuçların uygunluk kriterlerini karşıladığı tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar %80-%120 aralığında bulunmuştur. Sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 49. LOQ Spike % geri kazanım tablosu

LOQ Spike çözeltisi % geri kazanım						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	103,28025	95,72630	104,44136		95,99220	101,65796
2	102,99363	95,77143	100,79557		95,59027	105,10077
3	105,85987	96,41083	100,33219		97,90161	103,01357
ORT	104,04459	95,96952	101,85637		96,49469	103,25743
SD	1,57860	0,38285	2,25062		1,23489	1,73431
RSD	1,517	0,399	2,210		1,280	1,680
% Geri kazanım Limit	%80-120	%80-120	%80-120		%80-120	%80-120

Tablo 6.3. 50. %100 Spike geri kazanım tablosu

%100 spike çözeltisi % geri kazanım						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	Sülfid
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	97,40622	100,28323	98,97298		99,14531	95,29471
2	98,91314	101,21043	100,09543		99,18908	93,11151
3	96,99498	99,46734	98,51537		99,68243	93,69892
ORT	97,77145	100,32033	99,19459		99,33894	94,03505
SD	1,00989	0,87213	0,81301		0,29827	1,12975
RSD	1,033	0,869	0,820		0,300	1,201
% Geri kazanım Limit	%80-120	%80-120	%80-120		%80-120	%80-120

Tablo 6. 3. 51. %150 Spike geri kazanım tablosu

%150 Spike çözeltisi % geri kazanım						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	Sülfit
	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım	% Geri kazanım
1	99,35234	101,18727	100,29214		101,18887	93,83588
2	101,12792	101,92050	101,54954		101,20814	94,33203
3	99,56757	100,67240	100,08472		99,15903	93,37687
ORT	100,01594	101,26006	100,64214		100,51868	93,84826
SD	0,96899	0,62723	0,79265		1,17753	0,47770
RSD	0,969	0,619	0,788		1,171	0,509
% Geri kazanım Limit	%80-120	%80-120	%80-120		%80-120	%80-120

6.3.2.6. Kesinlik (Precision)**6.3.2.6.1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)**

Metodun tekrarlanabilirliği homojen numunedan alınan 6 örneğin analiz edilmesi sonucu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler uygunluk kriterlerini karşılamıştır. Saptanan safsızlık değerleri RSD < %20 koşulunu sağlamıştır.

Tablo 6. 3. 52. Numune tekrarlanabilirliği

No.	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfit	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
1	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,006 <LOQ	0,013	0,091
2	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,004 <LOQ	0,004 <LOQ	0,013	0,091
3	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,005 <LOQ	0,013	0,091
4	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,002 <LOQ	0,005 <LOQ	0,011	0,089
5	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,004 <LOQ	0,012	0,092
6	<LOD	0,052	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,003 <LOQ	0,012	0,088
Ort.		0,05117	0,00100	0,00300	0,00450	0,01233	0,0965
SD		0,00041	0,00000	0,00063	0,00105	0,00082	0,00315
%RSD		0,798	0,000	21,082	23,307	6,620	3,261
RSD limit	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20

6.3.2.6.2. Tekrar uygulanabilirlik (Reproducibility)

Yapılan çalışmalar sonunda kesinlik parametresi başlığı altında bulunan tekrar uygulanabilirlik sonuçları uygunluk kriterlerini sağlamıştır. Sonuçların kesinlik parametresi ile ortak tablosu aşağıda paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 53. Tekrar uygulanabilirlik standart tekrarlanabilirliği

Standart Çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F	Sülfid
C(mg/mL)	0,0010	0,0015	0,0010	0,0010	0,0015	0,0010
RT	1,531	2,494	2,765	3,563	5,823	10,643
RRT	0,43	0,70	0,78	1,00	1,64	2,99
	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan	Alan
1	0,34503	0,56406	0,941200	0,33543	0,43070	0,39544
2	0,34094	0,56114	0,935770	0,33403	0,42557	0,38591
3	0,34153	0,56088	0,937460	0,33181	0,43180	0,39232
4	0,34789	0,55953	0,935370	0,32977	0,42634	0,38893
5	0,33977	0,5576	0,928630	0,32556	0,43065	0,3857
6	0,34144	0,55842	0,931740	0,32716	0,42899	0,39053
Ort.	0,34277	0,56027	0,93503	0,33063	0,42901	0,38981
SD	0,00307	0,00231	0,00439	0,00386	0,00254	0,00378
RSD	0,894	0,412	0,470	1,167	0,592	0,969
RSD limit	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5	≤ %5

Tablo 6. 3. 54. Tekrar uygulanabilirlik safsızlık sonuçları

No.	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
1	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,004 <LOQ	<LOD	0,015	0,092
2	<LOD	0,050	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,013	0,088
3	<LOD	0,050	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,014	0,097
4	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,016	0,093
5	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,002 <LOQ	<LOD	0,012	0,098
6	<LOD	0,049	0,0002 <LOQ	0,001 <LOQ	<LOD	0,014	0,095
Ort.		0,049	0,0004	0,0029		0,012	0,081
SD		0,00052	0,00006	0,00088		0,00117	0,00250
%RSD		1,047	16,447	30,301		9,879	3,103
RSD limit	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20	≤ %20

Tablo 6. 3. 55. Tekrar uygulanabilirlik ve kesinlik karşılaştırma tablosu

Tekrar uygulanabilirlik	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
No.							
1	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,004 <LOQ	<LOD	0,015	0,092
2	<LOD	0,050	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,013	0,088
3	<LOD	0,050	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,014	0,097
4	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,003 <LOQ	<LOD	0,016	0,093
5	<LOD	0,049	0,0004 <LOQ	0,002 <LOQ	<LOD	0,012	0,098
6	<LOD	0,049	0,0002 <LOQ	0,001 <LOQ	<LOD	0,014	0,095
Ort.		0,049	0,0004	0,0029		0,014	0,09383
SD		0,00052	0,00006	0,00088		0,00141	0,00366
%RSD		1,047	16,447	30,301		10,102	3,896
Kesinlik	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfid	Bilinmeyen safsızlık Maks. (%)	Toplam safsızlık (%)
No.							
1	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,006 <LOQ	0,013	0,091
2	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,004 <LOQ	0,004 <LOQ	0,013	0,091
3	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,005 <LOQ	0,013	0,091
4	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,002 <LOQ	0,005 <LOQ	0,011	0,089
5	<LOD	0,051	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,004 <LOQ	0,012	0,092
6	<LOD	0,052	0,001 <LOQ	0,003 <LOQ	0,003 <LOQ	0,012	0,088
Ort.		0,051	0,0010	0,00300	0,00450	0,01233	0,0965
SD		0,00041	0,00000	0,00063	0,00105	0,00082	0,00315
%RSD		0,798	0,000	21,082	23,307	6,620	3,261
Δ Limit	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05	Δ ≤ %0,05

6.3.2.7. Sağlamlık (Robustness)

6.3.2.7.1. Solüsyon stabilitesi

Çözelti stabilitesi uygun aralıklarla standart çözeltisi ve numune çözeltisinin analizi ile gösterilmiştir. Solüsyon stabilitesi değerlendirilmesi için standart çözeltisi ve numune çözeltisi kontrol edilen prosedüre göre hazırlandı. Bu çözeltiler 2-8°C'de muhafaza edildi ve düzenli aralıklarla belirli bir süre boyunca analiz edildi. İlk sonuçlar ile her zaman noktasındaki sonuçlar arasındaki yüzde değişim hem standart hem de test çözeltisi için hesaplandı. Örnek çözeltisi safsızlık değerinin başlangıç safsızlık değerinden % değişimi \leq %1,0 olmalıdır. RSD limitleri gözlenen safsızlık seviyesi $<$ %0,2 olduğu durumlarda \leq %30 gözlenen safsızlık seviyesi %0,2 ile %0,5 değerleri arasında olduğu durumlarda \leq % 20 olmalıdır. Aşağıdaki tablolarda bu çalışmalara ait veriler paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 56. Standart alan değişim tablosu

Stabilite Zamani	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F	Sülfite
28.08.15 22:21	0,33497	0,55213	0,93587	0,32839	0,42325	0,38867
29.08.15 05:14_7 Saat	0,33735	0,55955	0,94262	0,3343	0,42752	0,38577
30.08.15 03:12_31 Saat	0,33992	0,55579	0,94061	0,32918	0,42615	0,39133
30.08.15 06:39_34 Saat	0,33406	0,55376	0,93597	0,3273	0,41893	0,38597
31.08.15 11:48_51 Saat	0,34145	0,56253	0,94641	0,33122	0,43125	0,38575

Tablo 6. 3. 57. Standart stabilite RSD tablosu

%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F	Sülfite
0,501	0,944	0,508	1,261	0,710	0,530
1,037	0,467	0,357	0,170	0,483	0,482
0,192	0,208	0,008	0,235	0,725	0,493

1,355	1,319	0,792	0,607	1,324	0,533
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tablo 6. 3. 58. Standart stabilite alan yüzde değişim tablosu

%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol_Na	D+F	Sülfite
0,71	1,34	0,72	1,80	1,01	-0,75
1,48	0,66	0,51	0,24	0,69	0,68
-0,27	0,30	0,01	-0,33	-1,02	-0,69
1,93	1,88	1,13	0,86	1,89	-0,75

Tablo 6. 3. 59. Numune stabilite safsızlık değişim tablosu

Stabilite Zamanı	% N-Oksit	% Sülfon	% Merkapto	% D+F	% Sülfite	% Bilinmeyen Maks.	% Toplam
B319845_29.08.15 01:48	<LOD	0,049	0,001<LOQ	0,003<LOQ	0,008<LOQ	0,011	0,094
B319845_30.08.15 06:56_28 Saat	<LOD	0,050	0,003	0,004<LOQ	0,0014<LOQ	0,014	0,139
B319845_30.08.15 21:20_42 Saat	<LOD	0,054	0,004	0,003<LOQ	<LOD	0,014	0,157

Tablo 6. 3. 60. Numune stabilite % RSD tablosu

%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD	%RSD
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfite	Bilinmeyen Maks.	Toplam
<LOD	1,428	70,711	<LOQ	<LOQ	16,971	27,313
<LOD	6,865	84,853	<LOQ	<LOD	16,971	35,496

Tablo 6. 3. 61. Numune stabilite % değişim tablosu

%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim	%Değişim
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	D+F	Sülfite	Bilinmeyen Maks.	Toplam
<LOD	2,04	200	<LOQ	<LOQ	27,27	47,87
<LOD	10,20	300	<LOQ	<LOD	27,27	67,02

Yapılan solüsyon stabilitesi takibi çalışması sonucunda standart uygunluk kriterlerini karşılamıştır. Numunenin ise sülfon, merkapto, bilinmeyen safsızlık ve toplam safsızlık artışları dolayısıyla taze hazırlanması gerektiği saptanmıştır.

6.3.2.7.2. Metot parametrelerinde yapılan değişiklikler (Influence of variation of test parameters)

Kromatografik metot parametrelerinde, sağlamlık çalışması başlığı altında yapılan çalışmalar sonunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, değişiklik yapılan parametrelerin içinde yer alan 70:30 (Tampon:ACN) ve tamponda yapılan pH değişikliklerini metodun HPLC metoduna nazaran daha iyi tolere ettiği sadece sülfit safsızlığının kromatografik zamanın dışına çıktığı veya saptanamadığı görülmüştür. Metodun mobil faz akış hızı, dalga boyu ve sıcaklık değişikliklerinden önemli ölçüde etkilenmediği sonucuna varılmıştır. Aşağıdaki tablolarda bu veriler paylaşılmıştır.

Tablo 6. 3. 62. Pantoprazol-N-Oksit parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	1,534	0,34145	7,76	1,13	3447	6,67	5,077
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	1,397	0,31381	7,31	1,15	3125	5,99	4,885
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	1,695	0,38166	7,51	1,13	3344	7,48	5,079
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,229	0,34072	8,38	1,04	2836	10,14	3,265
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,366	0,33047	4,47	0,98	4719	15,83	2,653
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	2,091	0,33702	9,69	1,26	3226	9,46	3,504
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	1,221	0,33939	5,34	1,26	3174	5,1	6,104
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	1,476	0,3446	6,91	1,15	3334	6,38	5,253
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	1,597	0,34402	8,44	1,12	3377	6,98	4,872
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	1,531	0,33323	7,35	1,14	3172	6,66	4,803
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	1,531	0,34355	7,38	1,14	3205	6,66	4,984

Tablo 6. 3. 63. Pantoprazol Sülfon parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,501	0,56253	1,84	1,00	4739	11,5	6,117
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,275	0,50941	1,71	1,06	4178	10,37	5,77
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,761	0,62752	1,82	1,03	4367	12,8	5,993
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,983	0,5525	1,38	0,99	3986	18,92	3,561
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	7,205	0,5401	3,32	0,89	6379	35,03	2,37
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	3,847	0,54743	7,55	-	5289	18,23	3,856
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	1,745	0,57404	3,91	1,24	4015	7,73	7,868
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	2,312	0,56979	2,11	1,05	4333	10,56	6,421
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	2,719	0,5368	1,47	0,98	4820	12,59	5,506
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	2,493	0,55293	1,76	1,06	4205	11,47	5,744
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	2,494	0,50241	1,72	1,06	4223	11,47	5,212

Tablo 6. 3. 64. Pantoprazol Merkaptol parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezölüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,769	0,94641	4,59	1,00	5974	12,85	10,57
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	2,516	0,86686	4,32	1,08	5216	11,58	10,024
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,065	1,02895	4,42	1,05	5626	14,32	10,142
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	4,329	0,73254	7,76	1,08	5360	20,64	5,1
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	4,263	0,93573	10,59	0,93	7209	20,31	7,436
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	3,639	0,77415	-	-	7822	17,19	7,133
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	2,187	0,93459	1,87	1,24	5934	9,94	12,368
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	2,612	0,95209	4,57	1,05	5487	12,06	10,845
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	2,948	0,91367	4,25	1,02	5944	13,74	9,671
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	310	2,763	0,85437	4,34	1,08	5358	12,81	9,117
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	300	2,763	0,84388	4,35	1,09	5358	12,81	8,981

Tablo 6. 3. 65. Pantoprazol Na parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,565	0,33122	8,74	1,01	4770	16,83	2,531
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,245	0,30307	8,26	1,09	4213	15,22	2,394
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	3,941	0,36725	8,49	1,05	4485	18,7	2,48
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	6,915	0,18979	13,3	1,08	4100	33,57	0,736
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	8,529	0,3052	9,59	0,94	6085	41,64	1,122
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	5,761	0,32291	11,37	1,31	6027	27,81	1,533
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	2,425	0,3166	7,97	1,31	4747	11,12	3,374
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	3,392	0,33493	8,75	1,05	4464	15,96	2,626
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	3,741	0,3318	8,18	1,03	4540	17,7	2,341
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	3,557	0,31986	8,28	1,1	4300	16,78	2,338
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	3,556	0,30641	8,31	1,08	4309	16,78	2,238

Tablo 6. 3. 66. Pantoprazol D+F parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	5,822	0,43125	11,39	0,98	5587	28,11	2,206
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	5,297	0,38721	10,82	1,05	5047	25,49	2,083
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	6,443	0,46995	11,13	1,05	5256	31,21	2,139
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	14,644	0,27069	-	0,92	6708	72,22	0,638
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	13,808	0,40654	-	0,91	6868	68,04	0,991
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	10,123	0,40037	-	1,27	7337	49,62	1,232
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	3,747	0,43004	10,17	1,21	6108	17,73	3,254
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	5,649	0,42995	10,47	1,01	5166	27,25	2,202
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	5,993	0,43136	11,63	0,99	5286	28,96	2,084
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	5,808	0,42469	11	1,06	5017	28,04	2,057
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	5,807	0,40341	10,98	1,05	5068	28,04	1,976

Tablo 6. 3. 67. Pantoprazol Sülfid parametre değişim etkisi tablosu

Şartlar	Akış	pH	Mobil Faz Oranı	Kolon Sıcaklığı	Dalga Boyu	RT	Alan	Rezolüsyon	Asimetri	Plaka sayısı	K'	Yükseklik
Normal	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	10,644	0,38575	-	0,98	6279	52,22	1,174
A ₁	0,275	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	9,689	0,14776	-	1,04	5721	47,44	0,471
A ₂	0,22	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	11,79	0,43332	-	1,05	6020	57,95	1,151
B ₁	0,25	7,7	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
B ₂	0,25	7,0	35:65 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₁	0,25	7,4	30:70 (ACN:Tampon)	25	290	-	-	-	-	-	-	-
C ₂	0,25	7,4	40:60 (ACN:Tampon)	25	290	6,181	0,39156	-	1,22	7352	29,9	1,968
D ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	30	290	10,047	0,39705	-	1,05	5788	49,24	1,221
D ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	20	290	11,262	0,39016	-	0,99	6049	55,31	1,091
E ₁	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	295	10,621	0,38428	-	1,08	5971	52,1	1,12
E ₂	0,25	7,4	35:65 (ACN:Tampon)	25	285	10,608	0,32988	-	1,08	5945	52,04	0,979

6.4. Metotların Performans Maliyet Kıyaslamaları

Yaptığımız çalışmalar sonunda amaç kısmında sözünü ettiğimiz performans ve maliyet verilerine üretim numunelerine analiz yapan kalite kontrol laboratuvarı perspektifinden cevap vereceğiz.

Yılda 300 adet farklı lot Pantoprazol Na üretilen bir aktif hammadde fabrikasında zaman ve materyal anlamında yeni teknolojilerin ve metotların daha kısa sürede cevap vermesinin büyük avantajları göreceğiz.

Bir adet Pantoprazol Na analizi için EP (European Pharmacopoeia) metodunda:

1 adet blank,

1 adet yer görme standardı (Ref.B),

6 adet standart tekrarlanabilirliği (Ref.A),

1 adet numune

1 adet son standart olmak üzere toplam 10 adet enjeksiyon yapılmaktadır.

Yeni geliştirdiğimiz metotlarda ise:

1 adet blank,

6 adet safsızlık standardı,

1 adet numune

1 adet safsızlık standardı olmak üzere toplam 9 enjeksiyon yapılmaktadır.

Bu enjeksiyon sayıları ve üretim yapılan batch sayısı göz önüne alındığında aşağıda tablodaki veriler elde edilmiştir.

Tablo 6. 4. 1. Metot performans maliyet verileri

Metot	Enjeksiyon sayısı	Toplam analiz süresi	Asetonitril miktarı	Tampon miktarı	Potasyum dihidrojen fosfat	Dipotasyum hidrojen fosfat
EP (European Pharmacopoeia)	3000	135 000 dk, 2250 saat, 93,75 gün	68 100 mL, 68,1 L	66 900 mL, 66,9 L	200,031 g	35,123 g
Yeni HPLC metodu	2700	81 000 dk, 1350 saat, 56, 25gün	28 350 mL, 28,35 L	52 650 mL, 52,65 L	157, 424 g	27,641 g
Yeni UPLC metodu	2700	40 500 dk, 675 saat, 28, 125 gün	3543, 75 mL, 3,544 L	6581,25 mL, 6,581 L	19, 678 g	3,455 g

Bu kıyaslama sonunda UPLC metodunun rekabetçi piyasa koşulları altında firmalara ciddi zaman ve maliyet tasarrufu sağlayacağı saptanmıştır. Çok küçük maliyetlerin dahi şirketlerin varolma, karlılık, sürdürülebilirlik, istihdam, ürün kalitesi gibi parametreleri dramatik şekilde etkilediği düşünüldüğünde HPLC metotlarının ve cihazlarının yerini artık yeni teknoloji UPLC cihazlarına bırakması gerektiği bu çalışmada da güçlü bir şekilde ispatlanmıştır. Ayrıca cihaz maliyetlerini düşünen şirket yöneticilerinin sarf edilen madde miktarlarındaki ciddi düşüş sebebiyle bu cihazların kendisini kısa sürede amorti ederek, maliyetleri pozitif yönde ivmelendireceğini unutmaması gerekir.

7. SONUÇ VE TARTIŞMA

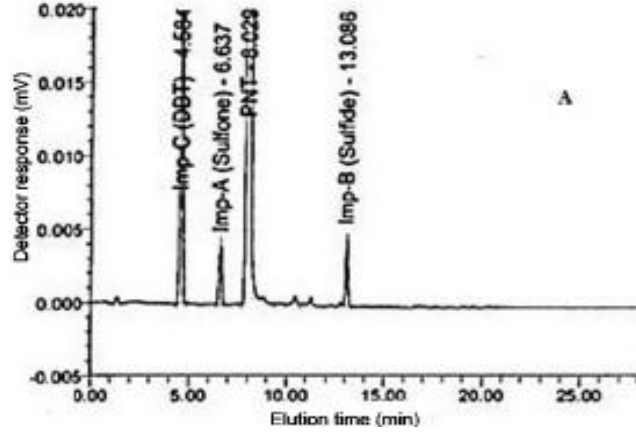
Pantoprazol sodyum günümüzde antibiyotiklerden sonra dünya üzerinde en çok reçete edilen proton pompa inhibitörlerinden biridir. 1980'lerin başı itibariyle proton pompası inhibitörlerinin keşfi ve 1988' de ilk ilaç olan Omeprazol'ün satışa sunulması sonrasında en çok kullanılan ilaç gruplarından biri olma kimliğini günümüzde de sürdürmektedir (IMS Dataview, 2012).

Bu çalışmada pantoprazol sodyum molekülü safsızlık tayini metodu geliştirip, yürürlükte bulunan Avrupa Farmakopesi metoduna göre daha kısa sürelerde sonuç almayı ve geliştirilmiş bu metotları valide etmeyi amaçladık. Bu geliştirme ve validasyon çalışmalarını iki farklı kromatografi teknolojisi olan HPLC ve UPLC cihazlarında yaptık.

Bu çalışmalarda HPLC cihazında Agilent Zorbax SB Phenyl C₁₈ (4,6 x 250 mm 5,0 µm) kolon UPLC cihazında ise Restek Ultra Biphenyl Column C₁₈ (2,1 x 100 mm 3,0 µm) kolon kullanılmıştır. Potasyum dihidrojen fosfat ve dipotasyum hidrojen fosfat ile hazırlanan tampon asetonitril ile 65:35 (Tampon:ACN) oranında karıştırılarak mobil faz hazırlanmıştır. Hazırlanan bu mobil faz aynı zamanda çözücü olarak da kullanılmıştır. Analizlerin ölçümleri 290 nm ve 305 nm dalgaboylarında yapılmıştır.

Bu yöntemlerin validasyonu amacıyla yapılmış olan çalışmalardan seçicilik parametresinde safsızlık yönteminde uygulanan kromatografik şartlarda çözücünün pik vermediği ayrıca etken madde piki ile safsızlık piklerinin birbiri ile girişim yapmadığı ayrımın iyi olduğu saptanmıştır. Bu bulgular kromatografik şartların pantoprazole sodyum için uygun olduğunu göstermektedir.

Pandey ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmalarda Pantoprazol, safsızlık A (pantoprazol sülfon), safsızlık B (pantoprazol sülfid), safsızlık C (pantoprazol merkapt) tayinleri yapmış olup HPLC metotunda sırasıyla 8,028; 6,637; 13,086; 4,684 alıkonma zamanlarında dedekte etmişlerdir. Yine bu çalışmada pantoprazol sodyuma dayalı RRT (Relative retention time) verileri safsızlık A için 0,80 safsızlık B için 1,66 ve safsızlık C için 0,57 olarak bulunmuştur (Pandey ve ark., 2013).



Resim 7. 1. Pandey ve arkadaşlarına ait metot kromatogramı

Bizim geliştirdiğimiz yeni metotlarda ise safsızlık adedi daha fazla olup retensiyon zamanları ve kromatogramlar aşağıdaki tablolar ve resimlerde verilmiştir.

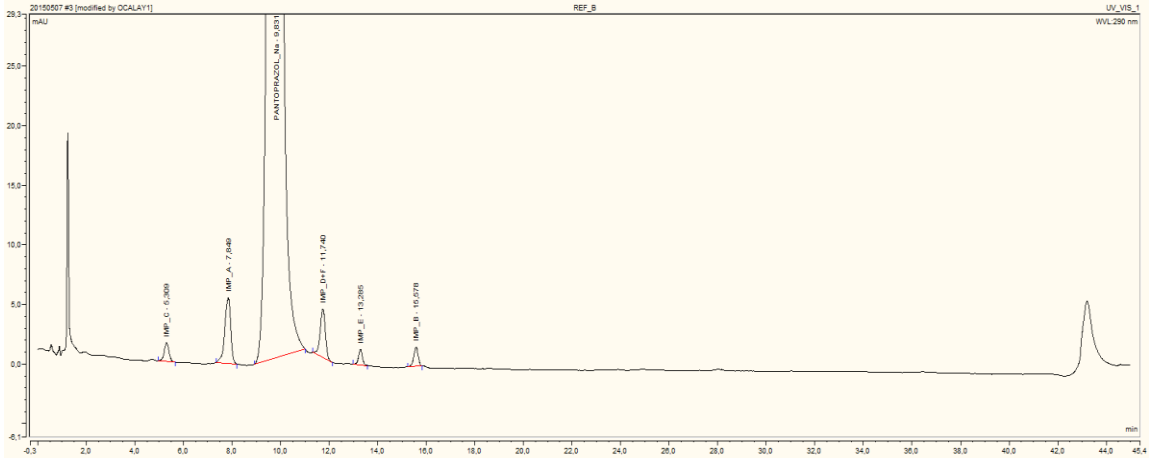
Tablo 7. 1. HPLC Alıkonma zamanları

	Standart Çözeltisi						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfit
RT	3,517	5,343	6,633	8,688	14,059	14,757	24,936
RRT	0,4048	0,6150	0,7635	1,0000	1,6182	1,6985	2,8702

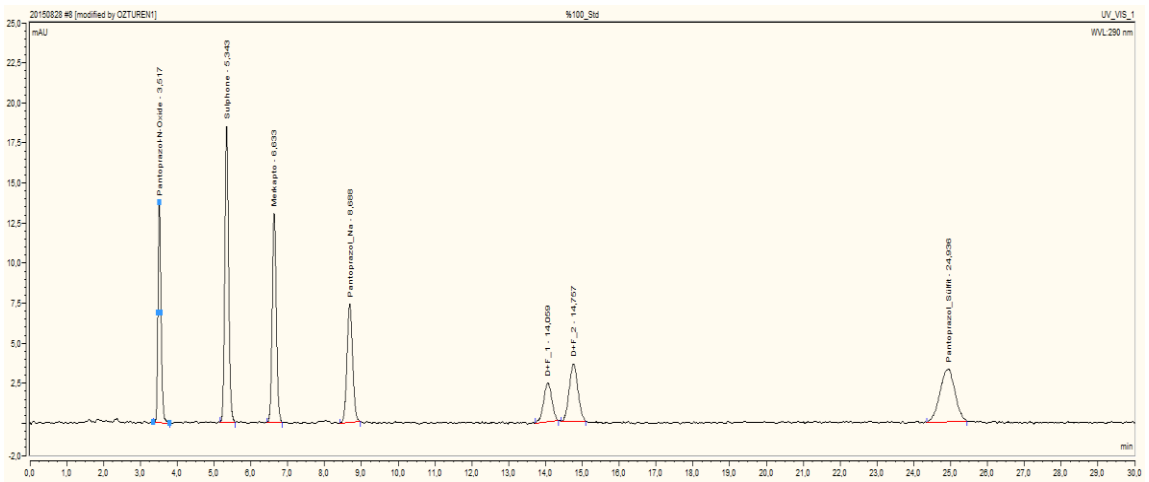
Tablo 7. 2. UPLC Alıkonma zamanları

	Standart Çözeltisi					
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfit
RT	1,542	2,521	2,766	3,547	5,749	10,58
RRT	0,1775	0,2902	0,3184	0,4083	0,6617	1,2178

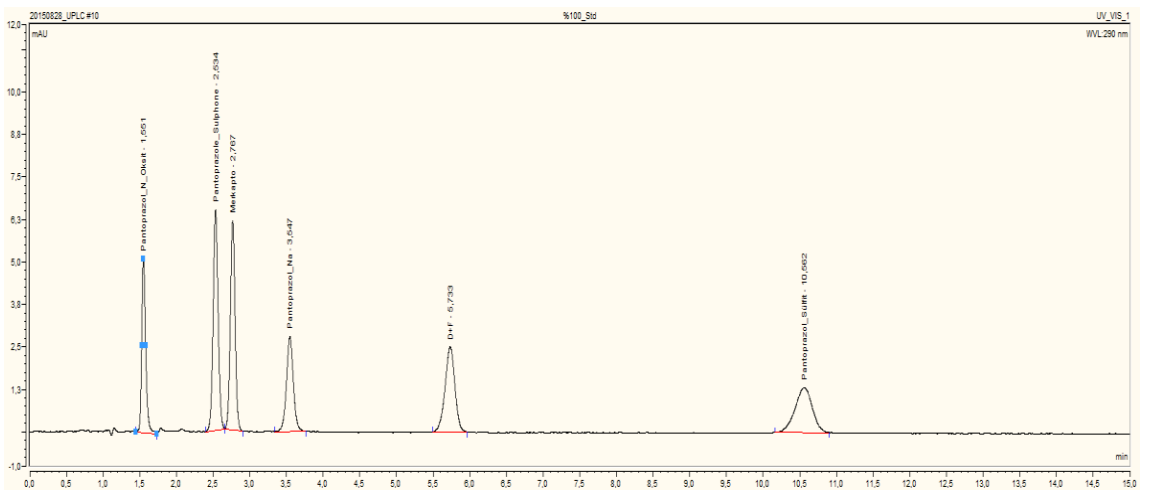
Ayrıca yapılan kromatografik geliştirmeler sonucunda bulunan metotların yürürlükte bulunan Avrupa Farmakope metodundan da HPLC metodunda 15 dakika UPLC metodunda ise 30 dakika daha iyi analiz süreleri olduğu saptanmıştır. Aşağıda her üç metoda ait kromatogramlar paylaşılmıştır.



Resim 7. 2. Avrupa Farmakopesi metodu pik tanımlama standardı



Resim 7. 3. HPLC metodu pik tanımlama standardı



Resim 7. 4. UPLC metodu pik tanımlama standardı

Yapılan çalışmalar sonucunda metotların ayırım kriterlerini sağladığı saptanmıştır. Avrupa Farmakopesi ayırım parametresi için minimum 1,5 şartını aramaktadır.

Tablo 7. 3. HPLC metodu ayırım verileri

Rezolüsyon						
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
10,84	6,84	8,55	15,12	1,56	16,86	

Tablo 7. 4. UPLC metodu ayırım verileri

Rezolüsyon					
N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfid
7,76	1,84	4,59	8,74	11,39	

Pandey ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmalar ve bizim geliştirdiğimiz metotlara ait LOD ve LOQ düzeyleri aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır (Pandey ve ark., 2013).

Tablo 7. 5. Pandey ve arkadaşlarına ait metodun LOD ve LOQ değerleri

LOD				
	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	Sülfid
C(mg/mL)	0,000046	0,000045	0,000043	0,000047
LOQ				
	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	Sülfid
C(mg/mL)	0,000138	0,000134	0,000129	0,000140

Tablo 7. 6. HPLC metodu LOD ve LOQ değerleri

LOD							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,000020	0,000030	0,000010	0,000050	0,000110	0,000110	0,000110
LOQ							
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F 1	D+F 2	Sülfid
C(mg/mL)	0,000080	0,000090	0,000030	0,000150	0,000541	0,000541	0,000360

Tablo 7. 7. UPLC metodu LOD ve LOQ değerleri

LOD						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfite
C(mg/mL)	0,000010	0,000012	0,000010	0,000020	0,000021	0,000040
LOQ						
	N-Oksit	Sülfon	Merkapto	Pantoprazol Na	D+F	Sülfite
C(mg/mL)	0,000030	0,000038	0,000030	0,000060	0,000069	0,000130

Bizim alışmalarımızın Pandey ve arkadaşlarının çalışmalarına nazaran merkapto, pantoprazol sodyum ve pantoprazol sülfon düzeyleri LOD ve LOQ konsantrasyonlarında daha düşük iken pantoprazol sülfite ait konsantrasyonlar daha yüksek olduğu saptanmıştır.

HPLC ve UPLC yöntemlerinin öncelikle safsızlık tayinleri için işlenebilirliği incelenmiş ve yöntemde belirtilen kromatografik şartlar değiştirilmeden uygun sabit fazın tespit edilmesi için pikler arası uygun ayırım gücü, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü tayin edilmiş ve safsızlık tayininde bu yöntemin işlediği saptanmıştır.

Metot validasyonlarında elde edilen ayırımların hepsi 1,5'den büyük, kuyruklanma faktörleri ise 2'den küçük bulunarak bu konuda yapılan çalışmalarda belirtilen sınırlar dahilinde kalmıştır.

Safsızlık tayin yöntemlerinde doğrusallığın sağlanabilmesi için çalışılan 7 konsantrasyonda bütün safsızlıklar HPLC ve UPLC için 0,00003mg/mL-0,00227mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Bütün safsızlıklar ve etken madde için r^2 değerleri 0,99'dan büyük bulunmuştur. Çalışılan yöntemin doğrusallık kriterine uygunluk gösterdiği James ve arkadaşının yapmış olduğu çalışmada doğrusallık için belirtilen sınırlara uyduğu belirlenmiştir (James ve Gale, 2001).

Doğruluk parametresi safsızlık tayin yöntemi için, safsızlıkların % LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltilerinden elde edilen geri kazanım sonuçlarının %95-%108 aralığında bulunduğu ve sınırlar içinde kaldığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar HPLC için:

Pantoprazol-N-oksit'in % LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %98,22, %100,86, %101,36

Pantoprazol sülfon'un %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %97,00, %103,08, %102,60

Pantoprazol merkapto'nun %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %100,17, %102,26, %102,26

Pantoprazol D+F 1'in %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %102,61, %103,21, %104,93

Pantoprazol D+F 2'in %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %98,08, %102,12, %104,93

Pantoprazol sülfid'in %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %100,46 %102,49, %107,90

Elde edilen sonuçlar UPLC için:

Pantoprazol-N-oksit'in %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %104,04, %97,77, %100,02

Pantoprazol sülfon'un %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %95,97, %100,32, %101,26

Pantoprazol merkapto'nun %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %101,86, %99,19, %100,64

Pantoprazol D+F 'in % LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %96,49, %99,34, %100,52

Pantoprazol sülfid'in %LOQ, %100, %150'sini içeren çözeltileri için sırasıyla geri kazanım; %103,26, %94,04, %93,85 olarak bulunmuştur. Safsızlık tayin yönteminin doğruluk kriteri için belirtilen sınırlar dahilinde kaldığı bulunmuştur (James ve Gale, 2001).

Tekrar elde edilebilirlik parametresi için safsızlık tayin yönteminde ise safsızlıkları %100 konsantrasyonda içeren standardın 6 enjeksiyonu sonucu elde edilen RSD değerleri %5,0'den küçük çıkmıştır. Yine aynı zamanda hazırlanan 6 homojen numunenin sonucu $\Delta < 0,05$ kuralını sağlayarak yöntemlerin tekrar elde edilebilirlik kriterini sağladığı ispatlanmıştır (James ve Gale, 2001).

Tekrarlanabilirlik parametresi için safsızlık metodunda tüm safsızlıkların %100 konsantrasyonda hazırlanmış olan standardın 6 kez enjeksiyonu sonucu elde edilen RSD değerleri %5.0'den küçük bulunmuştur. Bununla birlikte 6 homojen numuneye ait analizler RSD<%20 olup, yöntemlerin tekrarlanabilirlik kriterini sağladığı ispatlanmıştır. (James ve Gale, 2001).

Yöntemlerin sağlamlığını tespit etmek için uygulanan değişiklikler sonucu elde edilen piklerin kapasite faktörleri 1,5'tan büyük, kuyruklanma faktörleri 2'den küçük ve teorik plaka sayıları 2000'den büyük olduğu için değişimler sonucu yöntemlerde anlamlı değişiklikler olmamış ve yöntemlerin sağlamlıkları ispat edilmiştir (James ve Gale, 2001).

Yöntem validasyonu esnasında sağlamlık parametresi altında bakılan çözelti stabilitesi çalışması sonucunda standardın 72 saat stabil kaldığı, numunenin ise artan toplam safsızlık dolayısı ile taze hazırlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bozundurma çalışması asit, alkali, peroksit, ısı ve fotolitik etki şartları altında numuneye uygulanmıştır. Numuneler DAD dedektör kullanılarak kromatografik sistem üzerinde analiz edilmiştir. Bozulmuş örneklerin analiz içeriği ve pik saflık dereceleri referans çözeltisi kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu çalışmaya ait stres koşulları ve sonuçlar aşağıdaki tablolarda paylaşılmıştır. Yapılan bozundurma çalışmalarında sıcaklık uygulandığında bütün safsızlıklarda artış olduğu tespit edildi. UV ışık altındaki çalışmalarda ise merkaptosafsızlığında ciddi artış olduğu görüldü. Bununla beraber, UV ışığının bütün safsızlıklar ve dolayısı ile toplam safsızlığı arttırdığı gözlemlendi. HCl etkisi ile bozundurmada ise aktif ilaç hammaddesinin başlangıç materyali olan sülfid molekülüne parçalandığı görüldü. KOH etkisi ise HCl ile benzer etkilere sahip olup, aktif ilaç hammaddesini başlangıç materyallerine parçalamıştır. %6 H₂O₂ etkisi kuvvetli oksitleyici özelliği dolayısı ile fazla oksidasyon ile ortaya çıkan Sülfon ve N-oksit safsızlıklarını arttırmıştır. Pik saflığı sonuçları ise uygunluk kriterlerini karşılamıştır.

Bu çalışmalar sonunda geliştirilen her iki metotta valide edilip uygunluk kriterlerini karşılamıştır. Bu iki metotta pantoprazol sodyumda safsızlık analizi yapacak yetkinliğe sahiptirler. Bu süreçten sonra bu iki metodun maliyet ve performans verilerinin Avrupa Farmakope metodundan 1 yıl boyunca yapılması muhtemel 300 batch analizi üzerinden yarattığı maliyet verilerine bakacağız.

Tablo 7. 8. Yıllık metot sarfiyatları

Metot	Enjeksiyon sayısı	Toplam analiz süresi	Asetonitril miktarı	Tampon miktarı	Potasyum dihidrojen fosfat	Dipotasyum hidrojen fosfat
EP (European Pharmacopoeia)	3000	135 000 dk, 2250 saat, 93,75 gün	68 100 mL, 68,1 L	66 900 mL, 66,9 L	200,031 g	35,123 g
Yeni HPLC metodu	2700	81 000 dk, 1350 saat, 56, 25gün	28 350 mL, 28,35 L	52 650 mL, 52,65 L	157, 424 g	27,641 g
Yeni UPLC metodu	2700	40 500 dk, 675 saat, 28, 125 gün	3543, 75 mL, 3,544 L	6581,25 mL, 6,581 L	19, 678 g	3,455 g

Sonuç olarak çalışmalar sonunda geliştirilen metotlar, validasyonu yapılarak uygunluk kriterlerini karşılamıştır. Bu validasyon süresince uygun kolonların ve mobil fazların bulunması amacıyla denemeler yapılarak metotlar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu metotlar süre olarak Avrupa Farmakope metodundan daha kısa sürede sonuç vermektedir. Sürelerin kısa olması sonucunda çok ciddi bir maliyet düşüşünde sayısal verilerle desteklenerek ispatlanmıştır.

8. KAYNAKLAR

Abraham NS, Hlatky MA, Antham EM, et al. ACCF/ACG/AHA 2010 expert consensus document on the concomitant use of proton pump inhibitors and thienopyridines: a focused update of the ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use. *Am J Gastroenterol* 2010;105:2533-49.

Ament PW, Daniel BD, James ME. Reducing adverse effects of proton pump inhibitors. *Am Fam Physician* 2012;86:66-70.

Anderson T, *Clin. Pharmacokin.* 1996;9:31.

Andres E, Loukili N, Neol E, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004;171:251-9.

Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, et al. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:65-74.

Aseeri M, Schroeder T, Kramer J, Zackula R. Gastric acid suppression by proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium-difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2308-13.

Badwan A., Lina N. Nabulsi, M.M. Al Omari, Nidal H. Daraghme, Mahmoud K. Ashour, Ahmad M. Abdoh 1 and A. M. Y. Jaber, Analytical Profile Of Drug Substances And Excipients. 2002; 29, 215-257.

- Barbas C., Garcia A., Saavedra L., Castro M.: Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography. Stress tests for stability evaluation. *J. Chromatogr. A*, 2000; 870: 97-103.
- Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, et al. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Eng J Med* 2010;363:1909-17.
- Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, et al. Definition and antagonism of Histamin H2 receptors. *Nature* 1972;236:385-90.
- Blanchi LK, Burke CA, Bennett AE, et al. Fundic gland polyp dysplasia is common in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:180-5.
- Broeren MA, Geerdink EA, Vader HL, van den Wall Bake AW. Hyomagnesemia induced by several proton pump inhibitors. *Ann Intern Med* 2009;151:755-6.
- Cappell MS. Colonic toxicity of administered drugs and chemicals. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1175-90.
- Center for Drug Evaluation and Research: Validation of Chromatographic Methods, November 1994.
- Chande N, Driman DK. Microscopic colitis associated with lansorazole: report of two cases and a review of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:530-3.
- Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, et al. COMMIT collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo- controlled trial. *Lancet* 2005;366:1607-21.

- Choudry U, Boyce HW, Coppola D. Proton pump inhibitor-associated gastric polyps: A retrospective analysis of their frequency and endoscopic, histologic and ultrastructural characteristics. *Am J Clin Pathol* 1998;110:6115-21.
- Chubineh S, Birk J. Proton Pump inhibitors: The good, the bad and the unwanted. *South Med J* 2012;105:613-8.
- Cinquina A.L., Roberti P., Giannetti L., Longo F., Draisci R., Fagiolo A., Brizioli N.R.: Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection optimization and validation. *J. Chromatogr. A.* 2003: 221-226-987.
- Creutzfeldt W, Lamberts R. Is hypergastrinaemia dangerous to man? *Scand J Gastroenterol Suppl* 1991;180:179-91.
- Cundy T, Mackay J. Proton pump inhibitors and severe hypomagnesaemia. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:180-5.
- Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect* 2003;54:243-5.
- De Korwin JD, Ducrotte P, Vallot T. New generation proton pump inhibitors: progress in the treatment of peptic acid diseases? *Presse Med* 2004;19:746-54.
- Dial S, Delaney JAC, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*- associated disease. *JAMA* 2005;294:2989-95.

Dublin S, Walker RI, Jackson ML, et al. Use of proton pump inhibitors and histamine 2 receptor blockers and risk of pneumonia in older adults: a population based case control study: *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2010;19:792-802.

Ergenç N., Gürsoy A., Ateş Ö.: İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini, İstanbul Üniversitesi Matbaası, İstanbul, 1999;158-173.

Estborn L, Joelsen S. Occurrence of community acquired respiratory tract infection in patients receiving esomeprazole: retrospective analysis of adverse events in 31 clinical trials. *Drug Saf* 2008;31:627-36.

Fitton A. and Wiseman L., *Drugs*, 1996;51, 460.

Food and Drug Administration. Drug safety communication: low magnesium levels can be associated with long-term use of proton pump inhibitor drugs (PPIs). Published March 2011.

Gennaro A.R.: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17 th edition, Pennsylvania, USA, 1985;104-128.

Ghilain JM, Schapira M, Maissn JM, et al. Lymphocytic colitis associated with lansoprazole treatment. In French. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:960-2.

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. *J. Chromatogr. A*, 2003;987:57-66.

- Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, et al. Influence of omeprazole on the platelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double blind OCLA study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:256-60.
- Goel GA, Deshpande A, Lopez R, et al. Increased rate of spontaneous bacterial peritonitis among cirrhotic patients receiving pharmacologic acid suppression. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:422-7.
- Gray SL, LaCroix AZ, Larson J, et al. Proton pump inhibitor use, hip fracture, and change in bone mineral density in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2010;170:765-71.
- Heidelbaugh JJ, Kim AH, Chang R, Walker PC. Overutilization of proton-pump inhibitors: What the clinician needs to know. *Therap Adv Gastroenterol* 2012;5:219-32.
- Heidelbaugh JJ, Metz DC, Yang YX. Proton Pump Inhibitors: are they overutilised in clinical practice and do they pose significant risk? *Int J Clin Pract* 2012;66:582-91.
- Hilmer SN, Heap TR, Eckstein RP, et al. Microscopic colitis associated with exposure to lansoprazole. *Med J Aust*. 2006;184:185-186.
- Hodgson N, Koniaris LG, Livingstone AS, et al. Gastric carcinoids: a temporal increase with proton pump inhibitor introduction. *Surg Endosc* 2005;19:1610-2.
- Howell MD, Novack V, Grgurich P, et al. Iatrogenic acid suppression and the risk of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 2010;170:784-90.
- Hsu PI, Lai KH, Liu CP. Esomeprazole with clopidogrel reduces peptic ulcer recurrence, compared with clopidogrel alone, in patients with atherosclerosis published correction appears in *Gastroenterology* 2011;141:778.

Huber R., Hartmann M., Bliesath S., Luhnann R., and Zech K., *Int. J Clin. Pharm. Therap.*,1996;7:34.

Hutchinson C, Geissler CA, Powell JJJ, Bomford A. Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemo-chromatosis. *Gut* 2007;56:1291-5.

ICH Q2A Text on Validation of Analytical Methods: Definitions and terminology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, March 1995).

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).

ICH Q1A (R2) Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished products (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, April 1998).

ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, February 2003).

ICH Validation: Methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, December 1998).

Impurities in New Drug Substances ICH:Q3A(R1), 2006.

IMS Dataview MAT/6/2012 verisi

James D.J., Gale E.V.B.: Analytical Method Validation. Analytical Method Validation, Special edition: 2001;5;7-71.

Jayatilaka S, Shakov R, Eddi R, et al. Colstridium difficile infection in an urman medical center: five-year analysis of infection rates amog adult admissions and association with the use of proton pump inhibitors. Ann Clin LabSci 2007;37:241-7.

Jianu CS, Fossmark R, Viset T, et al. Gastric carcinoids after long-term use of a proton pump inhibitor. Aliment Pharmacol Ther 2012;36:644-9.

Jianu CS, Lange OS, Viset T, et al. Gastric neuroendocrine carcinoma after long-term use of proton pump inhibitör. Scand J Gastroenterol 2012;47:64-7.

Johnstone J, Nerenberg K, Loeb M, et al. Meta analysis: proton pump use and the risk for community aquired pneumonia. Aliment Pharmacol Ther 2010;31:1165-77.

Kayaalp S.O.: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji, 8. basım, Feryal Matbaası, Ankara, 1: 1998;287-292.

Kaye JA, Jick H. Proton pump inhibitor use and risk of hip fractures in patients without major risk factors. Pharmacotherapy 2008;28:951-59.

Kuipers EJ, Lundell L, Klinkenberg-Knol EC, et al. Atrophic gastritis and Helicobacter pylori infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or funduplications. N Eng J Med 1996;334:1018-22.

- Kupier EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, et al. Increase of *Helicobacter pylori* associated corpus gastritis during acid suppressive therapy: Implications for long-term safety. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1401-6.
- Kwok CS, Arthur AK, Anibueze CI, et al. Risk of *Clostridium difficile* infection with acid suppressing drugs and antibiotics: meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1011-9.
- Lambropoulos J., Bergholdt B. A.: Method development and validation for the HPLC potency assay of *traglitazone* tablets. *J. Phann. Biomed. Anal.* 2000;24:251-258-24.
- Leonard AD, Ho KM, Flexman J. Proton pump inhibitors and diarrhoea related to *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients: a case-control study. *Intern Med J* 2012:591-4.
- Leonard J, Marshall JK, Moayyedi P. Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2047-56.
- Lindstrom CG. Collagenous colitis with watery diarrhea: a new entity? *Pathol Eur* 1976;11:87-9.
- Linksy A, Gupta K, Lawler EV, et al. Proton pump inhibitors and risk for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 2010;170:772-8.
- Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Eng J Med* 2011;365:1693-703.
- Lundell L, Matinen P, Myrvold HE, et al. Nordic GERD Study Group: Lack of effect of acid suppression therapy on gastric atrophy. *Gastroenterology* 1999;117:319-26.

- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al, European Helicobacter Study Group. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut 2012;61:646-64.
- Metz DC, Yang YX. Safety of proton pump inhibitor exposure. Gastroenterology 2010;139:1115-27.
- Metzi DC. Clostridium difficile colitis: wash your hands before stopping the proton pump inhibitor. Am J Gastroenterol 2008;103:2314-6.
- Mitakos A., Panderi I.: A validated LC method for the determination of clopidogrel in pharmaceutical preparations. J. Phann. Biomed. Anal.2002;28:431-438.
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 50-year analysis of 562 gastric carcinoids: small tumor or larger problem? Am J Gastroenterol 2004;99:23-32.
- Mukherjee S. Diarrhea associated with lansoprazole. J Gastroenterol Hepatol 2003;18:602-3.
- Mullin MJ, Valenzano MC, Whitby M, et al. Esomeprazole induces upper gastrointestinal tract transmucosal permeability increase. Aliment Pharmacol Ther 2008;28:1317-25.
- O'Connell MB, Madden DM, Murray AM, et al. Effects of proton pump inhibitors on calcium carbonate absorption in women: a randomized crossover trial. Am J Med 2005;118:778-81.

- Pandey S, Pandey P, Mishra D, Singh UK: A validated stability indicating HPLC method for the determination of process-related impurities in pantoprazole bulk drug and formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 2013;49-176:182.
- Rammer M, Kirchgatterer A, Hobling W, et al. Lansoprazole-associated collagenous colitis: a case report. *Z Gastroenterol* 2005;43:657-60.
- Ray S, Delaney M, Muller AF. Proton pump inhibitors and acute interstitial nephritis. *BMJ* 2010;341:668-70.
- Recjer RR. Calcium absorption and achlorhydria. *N Eng J Med* 1985;313:70-73.
- Regolisti G, Cabassi A, Parenti E, et al. Severe hypomagnesemia during long term treatment with a proton pump inhibitor. *Am J Kidney Dis* 2010;56:168- 74.
- Roger L.L.: Approach to assay validation for the development of biopharmaceuticals. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2001;34:195-197
- Roy J, Pharmaceutical impurities- A mini review. *AAPS Pharm. Tech.*, 2002;3:1-8.
- Ruperez F.J., Fernandez H., Barbas C.: LC determination of loratadine and related impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002;29:35-41.
- Sabatine MS, Cannon Cp, Gibson CM, et al. Clarity-Timi 28 investigators. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST segment elevation. *N Eng J Med* 2005;352:1179-89.
- Sarkar M, Hennesy S, Yang YX, et al. Proton pump inhibitor use and the risk for community acquired pneumonia. *Ann Intern Med* 2008;149:391-8.

Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology* 2008;134:1842-60.

Sharma BK, Walt RP, Pounder RE, et al. Optimal dose of oral omeprazole for maximal 24 hour decrease of intragastric acidity. *Gut* 1984;25:957- 64.

Skoog D.A.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, USA, 1996;11,70.

Solcia E, Villani L, Fiocca R, et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* on gastritis in duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;201:28-34.

Sultan N, Nazreno J, Gregor J. Association between proton pump inhibitors and respiratory infections: a systematic review and metaanalysis of clinical trials. *Can J Gastroenterol* 2008;22:761-6.

Suter P, Golner B, Goldin B, et al. Reversal of protein-bound vitamin B12 malabsorption with antibiotics in atrophic gastritis. *Gastroenterology* 1991;101: 1039-45.

Targownik LE, Lix Lm, Leung S, et al. Proton pump inhibitor use is not associated with osteoporosis or accelerated bone mineral density loss. *Gastroenterology* 2010;138:896-904.

Thachil, J. Overprescribing PPIs: time for a hospital antacid policy on *Clostridium difficile*. *BMJ* 2008;336:109.

Thjodleifsson B, Rindi G, Fiocca R, et al. A randomized, double-blind trial of the efficacy and safety of 10 and 20 mg rabeprazole compared with 20 mg omeprazole in the maintenance of gastro-oesophageal reflux disease over 5 years. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:343-51.

- Thomson RD, Lestina LS, Bensen SP, et al. Lansoprazole-associated microscopic colitis: a case series. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2908-13.
- Valuck RJ, Ruscin JM. A case control study on adverse effects: H2 blocker or proton pump inhibitor use and risk of vitamin B12 deficiency in older adults. *J Clin Epidemiol* 2004;57:422-8.
- Vega E., Sola N.: Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001;25:523-530.
- Veress B, Lofberg R, Bergman L. Microscopic colitis syndrome. *Gut* 1995;36:880-6.
- Wilcox GM, Mattia A. Collagenous colitis associated with lansoprazole. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:164-6.
- Wilcox GM, Mattia AR. Microscopic colitis associated with omeprazole and esomeprazole exposure. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:551-3.
- Wingate DL. Acid reduction and recurrent enteritis. *Lancet* 1990;335:222.
- Wolfe MM, Sachs G. Acid suppression: Optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease and stress related erosive syndrome. *Gastroenterology* 2000;118:9-31.
- Yang YX, Lewis JD, Epstein S, et al. Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *JAMA* 2006;296:2947-2952.
- Zhang M.Q., Haemers A.: Quinolone antimicrobial agents: Structure-activity relationship. *Pharmazie* 1991;46:687-700.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı	Engin	Soyadı	Öztürk
Doğum Yeri	Aksaray	Doğum Tarihi	17.08.1982
Uyruğu	T.C.	Tel	0544 365 13 02
E-mail	baracudaengin@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2008
Lise	Bağcılar Lisesi	1999

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1	Kasiyer	Sevil Parfümeri	2004-2008
2	Analist	Acıbadem Lab-Med	2008-2011
3	Analitik Analist	Sandoz	2011-

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	67.379	70.615	66.072
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Chromeleon 6.8	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.