

**AGOMELATİNİN SIVI KROMATOĞRAFI
YÖNTEMİ KULLANILARAK TABLETLERDEN
ANALİZİ**

Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

Yüksek Lisans Tezi

**AGOMELATİNİN SIVI KROMATOĞRAFI
YÖNTEMİ KULLANILARAK
TABLETLERDEN ANALİZİ**

Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Haziran 2013

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nafiz Öncü Can

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1301S004).

Jüri ve Enstitü Onayı

Mehmet Emre Özdemirhan'ın "AGOMELATİNİN SIVI KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ KULLANILARAK TABLETLERDEN ANALİZİ" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 27.06.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç Dr. Nafiz Öncü CAN Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Göksel ARLI Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY Anadolu Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Mehmet Emre Özdemirhan
Doğum tarihi ve yeri : 1987, İzmir
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yunus Emre
Kampüsü, Eskişehir
meozdemirhan@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : Çan Atatürk İlköğretim Okulu (1993-2001)
Lise : Çan İ. Bodur Anadolu Lisesi (2001- 2005)
Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(2006-2011),
Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim
Fakültesi, Görsel-İşitsel Teknikler ve Marka
Yapımcılığı Bölümü, Marka İletişimi
Programı (2011-2013)

Yabancı Dil : İngilizce, İspanyolca

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

- 1- EPSA – European Pharmacy Students Association (Avrupa Eczacılık Öğrencileri Birliği)
- 2- IPSF – International Pharmacy Students Federation (Uluslararası Eczacılık Öğrencileri Federasyonu)
- 3- Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

Ozdemirhan, M. E., Usluer, G., 33rd European Pharmaceutical Students Association ANNUAL CONGRESS - 2nd Science Day, kongresi dahilinde, Ideas of Academics and Students in Eskisehir Anadolu University Faculty of Pharmacy about Influenza A (H1N1) Virus, Krakow, Polonya, Nisan (2010).

Ozdemirhan, M. E., Can, N.O., Arlı, G., 34th European Pharmaceutical Students Association ANNUAL CONGRESS - 3rd Science Day, kongresi dahilinde Analysis of Ticlopidine in Pharmaceutical Tablets using C₁₈ Bonded Monolithic Silica Column, Lizbon, Portekiz, Nisan (2011).

Ozdemirhan, M. E., Can, N.O., 35th European Pharmaceutical Students Association ANNUAL CONGRESS - 4th Science Day, kongresi dahilinde Method Development Studies for the Liquid Chromatographic Determination of Agomelatine, İstanbul, Türkiye, Nisan (2012).

Ozdemirhan, M. E., Can, N.O., International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS 10, sempozyumu dahilinde, Proceedings and Abstracts adlı özet kitabında, P-194 HPLC Determination of Agomelatine in Tablets using C₁₈ Bonded Fused-Core and Monolithic Silica Columns, Ankara, Türkiye, Haziran (2012).

Ozdemirhan, M. E., Can, N.O., 1st International Pharmacy Graduation Projects Symposium sempozyumu dahilinde Method Development Studies for HPLC Analysis of Ticlopidine in Tablets Using C₁₈-Bonded Monolithic Silica Column, Lefkoşa, Kıbrıs, Haziran (2012).

Ozdemirhan, M. E., Can, N.O., 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques sempozyumu dahilinde, Final Program adlı özet kitabında, CEFF20_TU HPLC, Determination of Agomelatine in Tablets Using Different Types of Stationary Phases, Amsterdam, Hollanda, Haziran (2013).

Katılan Bilimsel Toplantılar

- 1- 9. Türkiye Eczacılık Kongresi, İstanbul (2008).
- 2- 12th EPSA Summer University, Pharmaceutical Marketing - Time for Change, Burgas, Bulgaristan (2010).
- 3- 2. Ulusal Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğrenci Kongresi, İstanbul (2011).
- 4- Yedi Tepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğrenci Kongresi, İstanbul (2011).
- 5- 1. Ulusal Eczacılık Öğrenci Kongresi, İstanbul (2011).
- 6- 35th EPSA Annual Congress, The Future of Pharmacy, İstanbul (2012).
- 7- 11. Türk Eczacılar Birliği Türkiye Eczacılık Kongresi, Ankara (2012).

Bilimsel Etkinlikler

Organizasyonunda bulunulan toplantılar

- 1- 4. Her Yönüyle Eczacılık Sempozyumu, Eskişehir (2011).
- 2- 1st International Certificate Program on Predictive and Personalized Medicine/Healthcare in Daily Modern Medicine and Pharmacy, Eskişehir (2012).

Katılan Kurslar ve Eğitim programları

- 1- Kalite Denetimi Eğitimi, Eskişehir, BAMER (2009).
- 2- Hedef Yönetimi Eğitimi, Eskişehir, BAMER (2009).
- 3- Müşteri Memnuniyeti Eğitimi, Eskişehir, BAMER (2009).
- 4- EN ISO 19011:2002 Kalite Yönetimi Sistemi Eğitimi, Eskişehir, BAMER (2009).

- 5- Yaşlılarda İlaç Kullanımı ve Eczacının Rolü, Eskişehir, TEB (2010).
- 6- Danışman Eczacı Eğitimi, Ankara, TEB (2011).
- 7- Pazarlama Eğitimi, Eskişehir, Anadolu Üniversitesi (2011).
- 8- Dermatolojik Sorunlarda İlaç Kullanımı, Eskişehir (2012).
- 9- KOSGEP – T.C. Küçük ve Orta Ölçekli İşletmeleri Geliştirme ve Destekleme İdaresi Başkanlığı, Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi, Eskişehir (2013).

Projeler

- 1- Agomelatinin Sıvı Kromatografi Yöntemi Kullanılarak Tabletlerden Analizi, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Nafiz Öncü Can, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 1301S004 (2013).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında derin bilgileriyle beni yönlendiren, anlayışlı tavrıyla bana her zaman katkıda bulunarak yeni bilgiler edinmemi sağlayan ve yakın ilgisiyle yoluma ışık tutan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Çalışmalarım boyunca engin bilgi birikimi ve tecrübelerini her ihtiyaç duyduğumda bana yansıtmaktan çekinmeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya,

Almış olduğum dersler süresince, bilgi birikimi ve anlayışını büyük bir güvenle bana aktaran Sayın Hocam Prof. Dr. Zeki ATKOŞAR'a,

Yüksek lisans tezimde katkısını hiçbir zaman inkar edemeyeceğim, her zaman beni düşünen ve maddi manevi desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Yard. Doç. Dr. Özgür Devrim Can'a,

Tez çalışmalarım esnasında ihtiyaç duyduğum bilgileri bana büyük bir cömertlikle sunan ve yol gösteren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Yusuf Özkay ve Yard. Doç. Dr. Ümide Demir Özkay'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma,

Uzun bir zaman boyunca her şeyimi paylaştığım fikirleri ve verdiği destekle beni ayakta tutan kardeşim gibi sevdiğim Sayın Ecz. Aykut Dede'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her alanda yardımlarını hissettiren değerli arkadaşlarım Yiğit, Sema, Miray, Murat, Buket ve Selin'e,

Yaşamımın her anımda yanımda olamasalar da desteklerini daima içimde hissettiğim çok kıymetli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

AGOMELATİNİN SIVI KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİ KULLANILARAK TABLETLERDEN ANALİZİ

ÖZET

Agomelatin, 2000’li yılların başında geliştirilen, melatonerjik reseptör agonisti ve 5-HT_{2C} reseptör antagonisti olan bir ilaç molekülüdür. Yetişkinlerde major depresif atakların tedavisi için kullanılmakta olan uyku üzerine olumlu etkiler gösterebilen antidepresan bir ilaçtır. Bu çalışmanın amacı tabletlerdeki agomelatinin miktar tayini için ucuz, basit ve duyarlı bir analitik yöntem geliştirmektir. Deneysel çalışmalarda temel olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği kullanılmakla birlikte yöntem geliştirme basamaklarında UV – görünür bölge spektrofotometrisinden de yararlanılmıştır. Analizlerde kullanılan C₁₈ – bağlı monolitik silika ve C₁₈ – bağlı “fused-core” silika kolonların kromatografik performansları ve elde edilen analitik verilerin karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve uluslararası validasyon uygulamalarına göre yöntem geçerliliği sınanmıştır. Bu çalışma sonunda rutin tablet analizlerinde güvenle kullanılacak yeni bir yöntem önerilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Agomelatin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, tablet analizi, farmasötik analiz.

DETERMINATION OF AGOMELATINE IN TABLETS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Agomelatine, a drug molecule, which was developed at the beginning of 2000's, is a melatonergic receptor agonist and 5-HT_{2C} receptor antagonist. It is an antidepressant drug, which is in use for the treatment of major depressive episodes in adults and may possess positive effects on sleep. The aim of this study is to develop a cheap, simple and sensitive analytical method for determination of agomelatine in tablets. Although high performance liquid chromatography is used principally in the experimental studies, UV – visible spectrophotometry was also utilized in the method development steps. Comparison of chromatographic performances and analytical data obtained using C₁₈ – bonded monolithic silica and C₁₈ – bonded “fused core” column was realized. The results were evaluated statistically and the validity of the method was assessed according to the international validation practices. At the end of this study a new method, which can be securely utilizable in the routine tablet analyses was proposed.

Keywords: Agomelatine, high performance liquid chromatography, tablet analyses, pharmaceutical analysis

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Agomelatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
Agomelatin'in Farmakolojik Özellikleri	3
Agomelatin'in Etki Mekanizması	5
İrbesertan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	5
Agomelatin Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	6
GEREÇLER	9
Kullanılan Kimyasallar	9
Kullanılan Cihazlar	9
YÖNTEMLER	10
UV – Görünür Bölge Spektrofotometrisi Yöntemi	10
<i>Standart çözeltilerin hazırlanışı</i>	10
<i>Analiz parametreleri</i>	10
YPSK Yöntemi	11
<i>Standart çözeltilerin hazırlanışı</i>	11
<i>Hareketli fazın hazırlanışı</i>	11

<i>Analiz parametreleri</i>	12
Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı	12
<i>Tablet çözeltisinin hazırlanışı</i>	12
Sonuçların Değerlendirilmesi	13
<i>Yöntem geçerliliğinin tespiti</i>	13
<i>Sistem uygunluk testleri</i>	13
<i>Spesifiklik</i>	13
<i>Doğrusallık</i>	13
<i>Doğruluk</i>	14
<i>Keskinlik</i>	14
<i>Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)</i>	15
<i>Kararlılık</i>	15
BULGULAR ve TARTIŞMA	16
Agomelatin'in UV – Görünür Bölge Spektrofotometrisi Yöntemi ile Analizi	16
Agomelatin'in YPSK Yöntemi ile Analizi	17
<i>Yöntem geliştirme</i>	17
<i>YPSK yönteminin validasyonu</i>	33
Geliştirilen Yöntemlerin Numunelere Uygulanması	38
<i>UV – görünür bölge spektrofotometrik yöntemin tabletlere uygulanması</i>	38
<i>YPSK yönteminin tablet numunelerine uygulanması</i>	38
SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	42
EK 1 Chromolith® RP-18e (100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası	45
EK 2 Supelco Ascentis® Express C₁₈ (100×4.6 mm, 2.7µm) kolon analiz sertifikası	46

EK 3 Agomelatin standart maddesinin analiz sertifikası	47
EK 4 İrbesartan standart maddesinin analiz sertifikası	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI	SAYFA
Çizelge 1 UV – görünür bölge spektrofotometrisi analizlerinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hesapları	10
Çizelge 2 Analiz sırasındaki UV – görünür bölge spektrofotometrisi parametreleri	11
Çizelge 3 YPSK analizlerinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hesaplamaları	11
Çizelge 4 USP'ye göre SUT hesaplama şekilleri	14
Çizelge 5 Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C ₁₈ kolonlarının özellikleri	17
Çizelge 6 ACN değişiminin AGO'nun t _R değerine etkisi	20
Çizelge 7 Kolon fırını sıcaklığı (T) değişiminin AGO'nun t _R değerine etkisi	21
Çizelge 8 Tampon oranı değişiminin ayrı ayrı AGO ve IS t _R değerlerine etkisi	26
Çizelge 9 Tampon oranı değişiminin AGO ve IS t _R değerlerine etkisi (Ascentis® Express C ₁₈)	26
Çizelge 10 YPSK analizlerinde kullanılan diğer kolonların özellikleri	30
Çizelge 11 Geliştirilen yöntemin değişik sabit fazlara uygulanmasıyla elde edilen SUT değerleri	30
Çizelge 12 Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C ₁₈ kolonlarının SUT sonuçları	34
Çizelge 13 AGO ve IS'nin farklı kolonlar ile standart çözeltilerde yapılan analizlerinde elde edilen sinyallerinin t _R kesinliklerinin karşılaştırması (n=30)	34
Çizelge 14 Doğruluk çalışmalarının sonuçları (n=9)	35
Çizelge 15 AGO standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının Chromolith® Performance RP-18e kolon kullanımında istatistiksel değerlendirmesi	35

Çizelge 16	AGO standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının Ascentis® Express C ₁₈ kolon kullanımında istatistiksel değerlendirmesi	36
Çizelge 17	AGO standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin Chromolith® Performance RP-18e kolon ile istatistiksel değerlendirmesi	36
Çizelge 18	AGO standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin Ascentis Express® C ₁₈ kolon ile istatistiksel değerlendirmesi	37
Çizelge 19	Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti analizlerinin sonuçları ($n=30$)	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Agomelatin'in molekül yapısı	3
Şekil 2 İrbesartan'ın molekül yapısı	6
Şekil 3 1.16×10^{-5} M IS ve $2.06 \times 10^{-7} - 1.65 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında AGO içeren kalibrasyon çözeltilerinin spektrumları	16
Şekil 4 AGO'nun hareketli fazın değişen ACN oranları karşısında 230.0 nm dalga boyundaki kromatogramları: (a): %20.0, (b): %25.0, (c): %30.0, (d): %35.0, (e): %40.0, (f): %45.0, (g): %50.0	18
Şekil 5 AGO'nun değişen T değerleri karşısında 230.0 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları: (a): 15.0 °C, (b): 20.0 °C, (c): 25.0 °C, (d): 30.0 °C, (e): 35.0 °C, (f): 40.0 °C, (g): 45.0 °C	21
Şekil 6 AGO'nun hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Chromolith® Performance RP-18e kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0, (c): %30.0, (d): %40.0	24
Şekil 7 IS' nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Chromolith® Performance RP-18e kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0, (c): %30.0, (d): %40.0	25
Şekil 8 AGO ve IS' nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Ascentis® Express C ₁₈ kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %0.0, (b): %10.0, (c): %20.0, (d): %30.0, (e): %40.0, (f): %50.0	27
Şekil 9 AGO ve IS'nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 0.5 mL.dk ⁻¹ akış hızında 230.0 nm dalga boyunda Ascentis® Express C ₁₈ kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0	28

Şekil 10	Geliştirilen yöntem koşullarında 8.23×10^{-6} M AGO (13.05 dk, 13.66 dk) ve 1.16×10^{-5} M IS (10.44 dk, 9.92 dk) standart çözeltisinin kromatogramları: (a): Chromolith® Performance RP-18e, (b): Ascentis® Express C ₁₈	29
Şekil 11	8.23×10^{-6} M AGO ve 1.16×10^{-5} M IS standart çözeltilerinin analiz kolonlarında kromatogramları: (a): Chromolith® HR RP-18e, (b): Nucleosil® 100 C ₁₈ , (c): Fortis® C ₁₈ , (d): Gemini® C ₁₈ , (e): Synergi® Hydro RP, (f): PRP-1, (g): Fluophase® RP	32
Şekil 12	8.23×10^{-6} M AGO standart çözeltisinin 6 aylık kararlılık kontrollerinde elde edilen kromatogramları: (a): Chromolith® Performance RP-18e, (b): Ascentis® Express C ₁₈	37
Şekil 13	IS ile karıştırılan Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tabletinin (2.06×10^{-6} M) 190.0 – 400.0 nm aralığındaki spektrumu	38
Şekil 14	Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti çözeltisinin analiziyle elde edilen kromatogramlar: (a): Chromolith® Performance RP-18e, AGO (2.06×10^{-6} M, 13.01 dk), IS (1.16×10^{-5} M, 10.45 dk), (b): Ascentis® Express C ₁₈ (2.06×10^{-6} M, 13.66 dk), IS (1.16×10^{-5} M, 9.95 dk)	40

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT _{2C}	: 5-hidroksitriptamin
7-DP	: 7-desmetil-agomelatin
A	: Alan
A	: Absorbans
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACN	: Asetonitril
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AGO	: Agomelatin
α	: Seçicilik faktörü
APDC	: Amonyum pirolidin di tiyokarbamat
As	: Asimetri faktörü
BSS	: Bağlı standart sapma
CAS	: Kimyasal özetler servisi
CYP1A2	: Sitokrom 1A2
CYP2C19	: Sitokrom 2C19
CYP2C9	: Sitokrom 2C9
DAD	: Fotodiyot dizisi dedektör
EEG	: Elektroensefalografi
EMEA	: Avrupa İlaç Ajansı
EtOH	: Etanol
FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Birliği
GH	: Büyüme hormonu
GİS	: Gastrointestinal sistem
k'	: Kapasite faktörü
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IR	: Kızıl ötesi
IRB	: İrbesartan
IS	: İç standart
<i>i.p.</i>	: İntraperitonal
<i>i.v.</i>	: İntravenöz
LH	: Lüteinleştirici hormon
LOD	: Saptama sınırı

LOQ	: Tayin alt sınırı
LPGE	: Düşük basınçlı değişken hareketli faz
MeOH	: Metanol
MIBK	: Metil izobutil keton
MS	: Kütle spektroskopisi
MT ₁	: Melatonin a reseptörü
MT ₂	: Melatonin b reseptörü
<i>n</i>	: Deney sayısı
<i>N</i>	: Teorik tabaka sayısı
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PVDF	: Poliviniliden florür
PN	: Pik normalizasyonu
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
<i>r</i>	: Korelasyon katsayısı
<i>R_s</i>	: Ayrım gücü
SCN	: Suprakiazmatik nükleus
SEM	: Ortalamanın standart hatası
SK	: Sıvı kromatografisi
SS	: Standart sapma
SSRI	: Seçici selektif – gerilim inhibitörü
SUT	: Sistem uygunluk testleri
T	: Kolon fırını sıcaklığı
<i>TF</i>	: Kuyruklanma faktörü
<i>t_R</i>	: Alıkonma zamanı
TSH	: Tiroit uyarıcı hormon
USP	: Birleşik Devletler Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
YPSK	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya üzerinde 350 milyondan fazla insan, çalışma performanslarını kaybetmelerine neden olan depresyonun etkisi altındadır. Depresyon normal duygu bozukluklarından farklı olarak iki hafta veya daha uzun süre boyunca üzüntü duygusuna sebep olarak insanların iş, okul ya da evdeki normal fonksiyonlarını yerine getirme yeteneğini kaybettirir (Rahman ve ark., 2008). Klinikte nöropsikiyatrik semptomlar, anksiyete durumu, pişmanlık duygusu, haz kaybı, iştah değişiklikleri ve uyku bozukluklarını içeren bir yelpazeden oluşan, iş yapma kabiliyetini sınırlayan dünya çapında görülen majör depresif bir bozukluktur (Shelton ve ark., 2007). Sosyal, psikolojik ya da biyolojik etkilerin bileşkesi olarak ortaya çıkar. Depresyonun, vücut sağlığıyla yakından ilişkisi vardır ve bireylerin yaşam kalitesiyle verimliliği üzerindeki büyük etkisi, dolaylı yollardan kalp hastalıkları ve diğer rahatsızlıklara da sebebiyet verebilir (Nease ve ark., 2003). Ekonomik yetersizlikler, işsizlik, felaketler ve yaşanan psikolojik çatışmalar bu hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırabilmektedir. Bir araştırmaya göre her yıl depresyonlu hastaların yaklaşık bir milyonu bu sebeplerden intihar etmektedir (Rahman ve ark., 2008). Dünya genelinde ve ülkemizde yaşlı nüfusun hızla artmasına paralel olarak yaşlılığa özgü sağlık sorunları da artmakta ve giderek daha fazla önem kazanmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte kronik hastalıklar ortaya çıkmakta, fiziksel yeteneklerde azalma, bilişsel işlevlerde ve günlük yaşam aktivitelerde gerileme görülmektedir; bunlarla birlikte psikiyatrik sorunlar arasında depresyon da önemli bir yer tutmaktadır (Demet ve ark., 2002).

Majör depresif bozukluğun tedavisinde kullanılan ilaçların hızlı sinaptik etkileri vardır fakat klinik etkinlikleri geç başlar. Tedavide seçici selektif – gerialım inhibitörleri (SSRI), trisiklik antidepressanlar, monoamin oksidaz inhibitörleri, nörepinefrin gerialım inhibitörleri ve bunların dışında kalan diğer antidepressanlar kullanılabilir (Autry ve ark., 2012). Melatonerjik reseptör agonisti olan agomelatin (AGO) de diğer antidepressan ilaçlar arasında yer alır. AGO, büyük depresyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan, serotonin ve nöradrenalin gerialım inhibitörleriyle kıyaslandığında daha az seksüel yan etkilere sahip olan ve farmakolojik profiline bakıldığında uyku kalitesini artıran antidepressan bir ilaç moleküldür. Diğer antidepressanların aniden bırakılmasıyla ortaya çıkan yoksunluk sendromu durumunun AGO için geçerli olmaması, Montgomery (2006), ilacın en avantajlı özelliklerinden biridir.

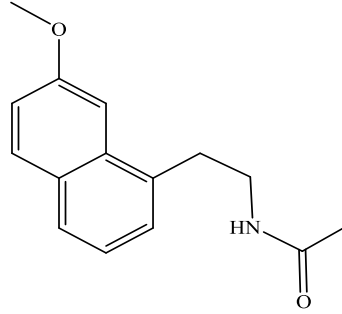
AGO sentezi 2000’li yılların başına dayanmakla birlikte, ilaç geliştirilmiş ve faz 3 çalışmalarının yürütülmesinin ardından 2005 yılı Mart ayında Avrupa İlaç Ajansı’na (EMA) arz edilmiştir. AGO’nun yan etkilerine dair özel bir şüphe duyulmamasına rağmen ilaç etkinliğinin net olarak gösterilememesinden ötürü Haziran 2006’da Beşeri Tıbbi Ürünler Komitesi AGO içeren müstahzarların pazarlama yetkisinin elinden alınmasını yararlı görmüştür ([http-1](http://1)). Eylül 2007’ de ise AGO modifiye edilerek tekrar (EMA) sunulmuş ve Kasım 2008’de bazı kısıtlamalarla birlikte olumlu görüş alarak Şubat 2009 da satış ruhsatı verilmiş, Ekim 2011’de Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Birliği’ne (FDA) sunulularak sonuçlar uygun görülmüş ve geliştirme çalışmaları tamamlanmıştır ([http-2](http://2)).

Farmakolojik alandaki çalışmaları yoğunlukta olan AGO'nun literatürdeki analitik çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu tezin konusu AGO'nun farmasötik tabletlerindeki miktar tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yönteminin geliştirilmesi ve tablet örneklerine uygulanmasıdır. Bu bağlamda tez kapsamında YPSK ile analitik ve aletsel parametrelerin iki farklı analiz kolonu kullanılarak incelenmesi, yöntemin mümkün olabildiğince iyileştirilmesi, geçerliliğinin araştırılması ve örneklere uygulaması basamakları yer almaktadır. alışmalar sonucunda, ülkemizde ve dünyada ilaç endüstrisi alanında üretim yapan kuruluşların kolaylıkla uygulayabileceği, analiz araç ve gereçleri ucuz, doğru ve kesin sonuçlar veren bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Agomelatin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

CAS numarası 138112-76-2 olan AGO'nun CAS adlandırması N-[2-(7-metoksinaftalen-1-il)etil]asetamid olup molekül formülü C₁₅H₁₇NO₂'dir. 243.30 molekül ağırlığına sahiptir. Bileşimini %74.07 karbon, %6.99 hidrojen, %5.77 azot ve %13.17 oksijen elementi oluşturur.



Şekil 1. Agomelatin'in molekül yapısı

AGO oda sıcaklığında kokusuz beyaz renkli katı toz halinde bulunur. Suda ve pH 5.5 değerine sahip tamponlarda çok az çözünme özelliğine sahiptir. Asidik ortamlarda daha iyi çözünen bu madde, MeOH içinde kuvvetli, metilen klorür ve EtOH içerisinde MeOH'a nazaran daha az çözünür (Fornaro ve ark., 2010). Log P değeri 2.46 olarak belirtilmiştir (http-3).

Agomelatinin Farmakolojik Özellikleri

AGO canlılardaki MT₁ ve MT₂ reseptörlerine güçlü afinite gösteren bir melatonin agonistidir. Ayrıca serotonin antagonisti olarak, düşük seviyede olsa da insan ve bazı hayvan türlerindeki 5-HT_{2C} reseptörlerini etkiler (Audinot ve ark., 2003). Sunulan resmi in vitro çalışmalar, insanlar dışındaki diğer türlerde MT reseptörlerine afinite gösterdiğini söylemese de depresyonlu birçok hayvan modelinde imipramin ve fluoksetin gibi antidepresanlarla benzer etkileri yeterince gösterdiği gözlenmiştir. Antidepresan etkisi melatonin reseptörlerini aktive etmesi, 5-HT_{2C} reseptörlerini bloke etmesi ve hücre dışındaki nöradrenalin ve dopamin miktarını artırmasıyla ilişkilidir (Chenu ve ark., 2013). Ayrıca, antipsikotik etki belirtisi görülmezken, AGO anksiyolitik etki ve melatonin aktivitesine bağlı olarak kronobiyotik aktivite gösterir. AGO'nun farmakolojik etkisinin dozaj zamanı ile ilişkili olduğu ve en yüksek etki seviyesinin endojen melatoninin fizyolojik dalgalanmasına uygun olarak ve uygulanan klinik pozolojiyle akşam alındığında oluştuğu düşünülmektedir (Racagni ve ark., 2011).

Sekonder farmakodinamik çalışmalarda AGO'nun fareler üzerinde yapılan hafıza, öğrenme ve dikkat üzerine etkileri araştırılmasının yanı sıra sıçanlarda sabah ve akşam saatlerinde verilen dozlarla uyku ve EEG spektrumları üzerine etkileri incelenmiştir. Bütün çalışmalar sadece erkek gruplar üzerinde yapılmıştır. Farelerin uzaysal öğrenme ve hafıza çalışmalarında ve sıçanların EEG kayıtlarında 10.0 mg.kg⁻¹ (*i.p.*, *i.v.*) doz ve dozun altında AGO'nun herhangi bir yan etkisi

gözlenmemiştir. Özellikle akşam vakitlerinde alınan yüksek dozlardaki AGO (1.0 – 10.0 mg.kg⁻¹, *i.p.*) hafızayı geliştirmiştir. AGO'nun dikkat testlerinde herhangi bir etkisi olmadığı ve EEG güç spektrumunda 3.0 mg.kg⁻¹, (*i.p.*) değerindeki dozun fizyolojik ritimlerin resenkronizasyonunda etkin olduğu belirtilmiştir. 10.00 µg.mL⁻¹ değerinden daha düşük AGO kan değerlerinin (yüksek doz gruplarında) EEG spektral gücünü değiştirebileceği kanısına varılmıştır (Quera-Salva ve ark., 2007).

Güvenlik farmakolojisi çalışmaları AGO ve 7-DP metabolitinin yüksek dozlarda önemli derecede merkezi sinir sistemi depresyonuna sebep olduğunu göstermiştir. AGO için herhangi bir suistimal potansiyeli saptanmamıştır. Böbrek fonksiyonları, solunum sistemi, kalp sistemi ya da gastrointestinal sistem (GİS) üzerinde biyolojik olarak etkisi yoktur. Hafif miktarda GİS motilitesini yükseltir. Sıçanlardaki endokrin çalışmalar AGO'nun erkeklerin bazal ve strese bağlı prolaktin ve lüteinleştirici hormon (LH) seviyelerinde, proöstruslu dişilerde muhtemel prolaktin ve LH dalgalanmalarını ve her iki cinsiyetteki kortikosteron miktarını azalttığını göstermiştir. Östrus döngüsü üzerindeki potansiyel etkileri değerlendirilmezken, ACTH, GH, TSH üzerinde şüpheli etkilere rastlanmıştır (http-4).

AGO oral yoldan hızlı ve iyi emilim gösterir (\geq %80.0). Mutlak biyoyararlanımı düşük (terapötik oral dozda < %5.0), bireyler arasında gösterdiği değişiklik önemlidir. Erkeklere oranla kadınlarda biyoyararlanımı daha yüksektir. Oral kontraseptif kullanımı biyoyararlanımı artırırken, sigara kullanımı azaltır. Bir iki saat içinde plazma doruk konsantrasyonuna ulaşır. Terapötik doz aralığında sistemik AGO maruziyeti doz ile doğru orantılıdır. Doz arttıkça ilk geçiş etkisi saturasyonu oluşur. Gıda (normal ya da yüksek yağlı öğün) alımı biyoyararlanım ve emilim oranına etki etmez (Srinivasan ve ark., 2012). Yüksek yağlı yiyecekler ilacın kararsızlığını artırır.

Yaştan ve konsantrasyondan bağımsız olarak kararlı hal dağılım hacmi 35.0 L, plazma proteinlerine bağlanma oranı %95.0'tir. Bu oranlar ve böbrek yetmezliği olan hastalarda sabitken, karaciğer yetmezliği olan hastalarda iki katına çıkar. Oral yoldan alımı takiben AGO başlıca CYP1A2, düşük oranda CYP2C9 ve CYP2C19 karaciğer izoenzimleri tarafından hızlıca metabolize edilir. Ana metabolit olan hidrosillenmiş ve dimetillenmiş AGO aktif değildir ve hızlıca idrarla atılır (Srinivasan ve ark., 2009).

Eliminasyon hızlıdır, plazma yarı ömrü bir ile iki saat arasındadır. Kandan metabolizmayla hızlı bir şekilde temizlenir (yaklaşık 1.10 mL.dk⁻¹). Atılım esas olarak idrarla (%80.0) ve idrarda değişikliğe uğramayan metabolitlerin geri kazanımı ihmal edilebilir olmasına rağmen bir kısmı da metabolit formları şeklinde gerçekleşir (Zupancic ve Guilleminault, 2006). Ağır böbrek yetmezliği olan hastalarda farmakokinetik parametrelerle ilgili bir değişiklik gözlemlenmemiştir ($n=8$, 25.0 mg'lık tek doz) fakat, bu hastalarda kullanılabilir olmasına dair kısıtlı klinik verilere sahip olduğu için orta ve ağır böbrek rahatsızlıkları olan hastalarda kullanımında dikkatli olunmalıdır. Karaciğer yetmezliği görülen hafif kronik ya da orta sirozlu hastaları kapsayan özel çalışmalarda yaş, ağırlık ve sigara içme alışkanlığı olan eşleştirilmiş hastalarla karşılaştırıldığında AGO maruziyetinde önemli derecede artış olduğu (sırasıyla 70 ve 140 kat) gözlenmiştir. AGO kinetiğinde ırksal bir etki üzerine veri bulunmamaktadır (http-5).

Agomelatin'in Etki Mekanizması

AGO yakın zamanda melatonerjik MT1 (KI = 0.1 nM) ve MT2 (KI = 0.12 nM) seçici agonistlerinden hareketle geliştirilen melatoninin naftalen analogudur (Millan ve ark., 2003). Melatoninle karşılaştırıldığında, daha uzun bir yarı ömür ve nispeten SCN ve beyinin diğer bölgelerinde MT1 ve MT2 melatonin reseptörleri için yüksek benzerlik gösterir (Delagrange ve Boutin, 2006). Hafif kronik stresli sıçanlara akşam verildiğinde AGO ve melatonin antidepresan etki göstermiş, sabah uygulandığında ise yalnızca AGO'nun bu etkiyi gösterdiği gözlenmiştir (Papp ve ark., 2003).

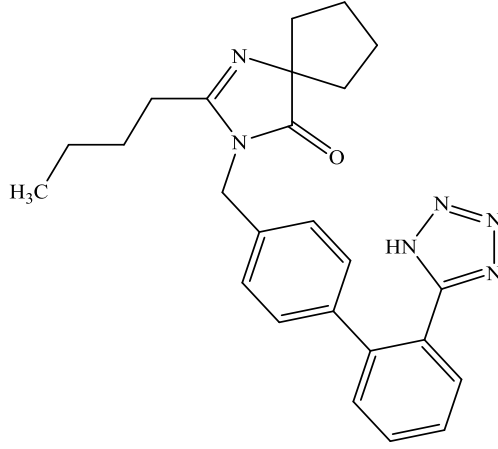
AGO ayrıca serotoninin 5-HT_{2C} (pKi=6.2 µM) reseptör antagonist aktivite de sergiler (Millan ve ark., 2003). Serotonerjik sistem üzerindeki bu etkisi her ne kadar başlangıçta gereksiz ve istenmeyen bir durum olarak görülse de, anksiyolitik ve antidepresan değeri olduğu anlaşılmıştır. Depresyonlu hastalarda 5-HT_{2C} reseptörleri duyarlılığının artması ve antidepresanların terapötik etkileri ile azalan 5-HT_{2C} reseptör miktarı arasındaki korelasyonundan hareketle 5-HT_{2C} reseptör blokajının AGO'nun antidepresan profilini ortaya çıkaran mekanizma olarak düşünülmüştür (Riedel ve ark., 2002). AGO'nun farklı reseptör aktivitelerindeki rolüyle antidepresan etkisi arasındaki ilişki tam anlamıyla aydınlatılamamasına rağmen, bu bileşiğin hem melatonerjik reseptörlerle hem de 5-HT_{2C} reseptörleriyle sinerjik olarak hareket edebildiği görülmektedir (Papp ve ark., 2003). Bu hipotezin mantığı melatonerjik ve 5-HT_{2C} reseptörlerinin hem SCN hem de serebral korteks, hipokampus, amigdala ve talamus gibi depresyon patopiskolojisiyle alakalı beyin bölgelerinde birlikte ifade edilmesinden temel almaktadır (San ve Arranz, 2008).

Amerikan ve Fransız bilim adamlarının depresyon/anksiyete modelinde AGO'nun yararlı davranışsal ve nörolojik etkilerinin incelediği bir çalışmada yetişkin farelere içme suyu yoluyla 8 hafta boyunca kortikosteron (35.0 mg.gün.ml⁻¹) tedavisi uygulandığı bildirilmiştir. Son 4 hafta hayvanlara AGO (10.0/40.0 mg.kg⁻¹ *i.p.*) ya da fluoksetin (18.0 mg.kg⁻¹ *i.p.*) tedavisi uygulanarak çeşitli davranışsal modeller test edilip aynı zamanda da ev – kafes aktivitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar, kortikosteron tedavisinin yol açtığı depresyon/anksiyeteye hem kronik AGO tedavisinin hem de fluoksetin tedavisinin engel olduğunu göstermiştir. Ayrıca AGO ile tedavi edilen fare grubunda, AGO'nun ev – kafes aktivitesinin karanlık/aydınlık oranını artırdığı ve kronik kortikosteron tarafından indüklenen oransal değişiklikleri tersine çevirerek bozulan fizyolojik ritmi normale dönmesini sağladığı gözlenmiştir. AGO'nun bütün hipokampusun kortikosteron tedavisinden dolayı hücre çoğalmasındaki düşüşü de tersine çevirip yeni oluşan nöronların da olgunlaşma oranını artırdığı gözlenmiştir. Genel olarak bu çalışmada, AGO'nun melatonerjik agonist ve 5-HT_{2C} antagonist özellikleri arasındaki sinerjiden temel alarak ayrılan mekanizmasıyla anksiyolitik/antidepresan özelliğinin yanında fizyolojik ritim normalizasyonu ile farklı bir spektrum sağladığı gözlenmiştir (Rainer ve ark., 2012).

İrbesertan'ın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

İrbesertan (IRB) bu çalışmada iç standart (IS) olarak kullanılmıştır. Anjiyotensin II reseptör antagonisti bir madde olan IRB, 2-bütül-3-[[20-(1H-tetrazol-5-il)[1,10-bifenil]-4-il]metil]-1,3diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on şeklinde adlandırılır. Kapalı

formülü $C_{25}H_{28}N_6O$ ve molekül ağırlığı 428.5 g.mol^{-1} 'dür. (Moffat ve ark., 2011). IRB'nin molekül formülü **Şekil 2**'de verilmiştir.



Şekil 2. İrbesartan'ın molekül yapısı

Katı, kristal yapı ve beyaz bir fiziksel görünüme sahip bir madde olan IRB'nin erime noktası $180.0-181.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'dir. Apolar ve asidik karakterli bir maddedir. Suda çok az çözünürlüğe sahipken alkol, metilen klorür gibi apolar çözücülerde yüksek çözünürlük gösterir. 4.50 pKa değerine sahip ve sulu asit çözeltilerinde ($0.2 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HCl}$) mor ötesi (UV) maksimum absorpsiyon (A) verdiği dalga boyları 224 ve 246 nm 'dir (Moffat ve ark., 2011).

Agomelatin Analizleri ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

AGO ile ilgili yapılmış çalışmalar genellikle etki mekanizması sinir sistemi ve depresyon/anksiyete üzerindeki etkilerini konu alan farmakolojik çalışmalardır. Analitik çalışmalar ise oldukça kısıtlıdır. Bu zamana kadar yayınlanan kromatografik çalışmalar ve patentler de dikkate alınarak derlenen analitik yöntemler aşağıda bahsedilmiştir.

AGO'nun ara ve son ürünlerinin ayrılması ve analizinde yöntem olarak yüksek performanslı sıvı faz kromatografisi tercih edilmiş, kromatografik kolon olarak silika bazlı C_{18} kolon ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) kullanılmış, pH aralığı $2.0 - 7.0$ arasında değişen tampon çözeltiler denenmiş, bu tampon çözeltinin yanına belli bir oranda iki çeşit organik çözücü eklenerek üçlü bir bileşenden oluşan hareketli faz karışımının oluşturulmuş ve akış hızı 1.0 mL.dk^{-1} olarak uygulanmıştır. Uygulanan bu yöntem ışığında AGO'nun ara ve nihai ürününün hızlı ve etkin bir şekilde ayırma ve analizi gerçekleştirilmiştir (Ning, 2008).

Bir başka çalışmada Plastil - C_{18} kolon ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) kullanılarak ters faz YPSK kullanılmış, hareketli faz bileşenleri asetronitril (ACN) ve su ($30:70$, h/h), 1.0 mL.dk^{-1} hızla kolona gönderilerek 230.0 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. AGO'nun kalibrasyon eğrisi $5.00-80.00 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında doğrusallık göstermiştir. AGO geri kazanım oranı $\%100.4$ olarak bulunmuştur (He ve ark., 2010).

Wang ve arkadaşları, AGO'nun içeriğinin belirlenmesinde susuz ortam titrasyonu yöntemi kullanılmıştır. Yöntem geliştirme sürecinde, kloroform – asetik asit karışımı çözücü olarak kullanılarak AGO'nun çözünmesi sağlanmış, titrasyonu yürütmek için

ise perklorik asit çözeltisi kullanılmıştır. Titrasyonda dönüm noktasının belirlenmesi için grafik metot yöntemi kullanılarak AGO içeriği hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre, AGO'nun içerik tespitinde kullanılan yöntem YPSK kullanılarak yapılan analizlerle benzerlik göstermiş ve aynı sonuçlar elde edilmiştir (Wang ve ark., 2012).

Zhou ve arkadaşları AGO ve ara ürünlerinde bulunan safsızlıkları belirlemek amacıyla YPSK kullanmışlardır. Çalışmada, etkili bir şekilde AGO ve sentetik ara maddeleri olarak da yabancı maddelerin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bilindiği üzere AGO'nun melatonin uyarıcı, depresif hastalıklara karşı direnç etkisi vardır ve gündüz aktivite durumu değişmeksizin gece uyku esnasındaki koşullar altında artabilir. AGO ve sentetik ara maddeleri olarak da yabancı maddelerin ayrılması için etkili bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kolon tercihi oktadesilsilan bağlı silikadan yana kullanılırken, hareketli faz olarak faz A (organik faz) ve faz B (su fazı) kullanılmış, pH değeri 6.0 – 7.0 arasında değişen tampon çözelti ve bu organik solventlerin değişik oranlardaki karışımlarıyla hareketli faz tertip edilmiş akış hızı da 1.0 mL.dk⁻¹ değişken hareketli faz elüsyonu olarak tayin edilerek yabancı ve sentetik ara maddelerin belirlenmesi ve analizi gerçekleştirilmiştir (Zhou ve ark., 2012).

Patil ve arkadaşları AGO'nun insan plazmasındaki ölçümü ve farmakokinetik uygulamaları için sıvı – sıvı ekstraksiyonunu temel alan bir metot geliştirip validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. IS olarak fluoksetin kullanılmış, analitlerin kromatografik dağılımları Betasil - C₁₈ (4.0x100 mm, 5µm) kolon kullanılarak kütle spektroskopisiyle (MS) tespit edilmiştir. Hareketli faz olarak MeOH ve %0.1 asetik asit içeren 2.0 mM değerinde amonyum asetat çözeltisi (80:20 h/h) kullanılmış, 1.2 mL.dk⁻¹ akış hızında ve analiz süresi 3.0 dk sürmüştür. Sabit hareketli faz kullanılan bu metot, pozitif iyonizasyon modundaki API – 4000 MS sistemiyle desteklenmiştir. Bu yöntem, 0.05 – 8.00 ng.mL⁻¹ AGO doğrusallık aralığında onaylanmıştır. AGO'nun tayin alt sınır, iç çalışma ve ara çalışmalarda kesinlik oranları sırasıyla %12.12 ile %9.01 olmuştur. AGO ve fluoksetin için geri kazanım sırasıyla %67.10 ile %72.96 olarak plazma numunelerinin farmakokinetik çalışmalarında kullanılmak üzere bir metot geliştirilmiştir (Patil ve ark., 2012).

YPSK ile yapılan literatürdeki bir kaç çalışmadan biri olarak AGO'nun tabletlerden analizini yapan Wang ve arkadaşları, Phenomenex Luna - C₁₈ (250x4.6 mm, 5 µm) sabit fazı kullanımında MeOH – 0.05 mol.L⁻¹ sodyum dihidrojen fosfat (40:60) oranında hazırlanan hareketli fazı 1.0 mL.dk⁻¹ akış hızında kolondan geçirerek analiz gerçekleştirmişlerdir. Dedektör dalga boyu olarak 230.0 nm seçilmiş ve kolon fırını sıcaklığı (T) 25.0 °C olarak sabitlenmiştir. Kalibrasyon denklemi $y=1.979 \times 10^5 x - 1.258 \times 10^4$ ($y=0.9999$, $n=5$) bulunmuş ve 1.07 - 10.7 µg.mL⁻¹ aralığında doğrusallık göstermiştir. AGO'nun geri kazanım değeri %1.28 standart sapmayla (SS) %98.73 ($n=9$) olarak kaydedilmiştir (Wang ve ark., 2012).

AGO'nun çeşitli kristal formları şeklinde polimorf moleküller hazırlama çalışmalarında, dedektör olarak IR spektroskopisiyle X ışınları kırınımından yararlanarak AGO'nun diğer altı çeşit formundan farklı olarak yeni bir kristal formu tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2012).

Li ve arkadaşları AGO'dan nikel tayini için yeni bir yöntem geliştirmişler ve AGO içerisindeki nikel içeriğini saptamak için alevli atomik absorpsiyon spektrometresi kullanmışlardır. Analizler 232.0 nm dalga boyunda yapılmış ve çözücü sistem olarak amonyum pirolidin di tiyokarbamat (APDC) – metil izobutil keton (MIBK) kullanılmıştır. Örneklerin konsantrasyon hesabında dış standart katma yöntemi uygulanmış nikel doğrusal aralığı $0.05 - 4.00 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ($r= 0.9990$) ve ortalama geri kazanım %93.30 olarak bulunmuştur (Li ve ark., 2012).

Liu ve arkadaşları AGO'nun ilaç formundan yedi adet yabancı madde tayini için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Olası yabancı maddelerin kimyasal yapıları nükleer manyetik rezonans (NMR) ve IR spektroskopisi analitik yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Hypersil BDS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) kolon ile potasyum dihidrojen fosfat (15.0 mM, pH, 3.0) ve ACN bileşiminden oluşan 1.0 mL.dk⁻¹ akış hızındaki hareketli fazın gradient uygulaması ile ayırım sağlanarak etkin kromatogramlar elde edilmiştir. 230.0 nm dalga boyunda fotodiyot dizisi dedektör (DAD) ile tayin sağlanmıştır. Zorlandırılmış koşullar altındaki kararlılık çalışmaları çerçevesinde AGO'nun asit ve bazik şartlardaki duyarlılığı ile önerilen yöntemin spesifik özellik taşıdığı görülmüştür. Yönteme ICH'nin tavsiyeleri doğrultusunda spesifiklik, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, sağlamlık ve sisten uygunluk testlerini içeren validasyon işlemleri uygulanmıştır. Safsızlıkların saptama sınır aralığı % 0.0008 – 0.0047 olarak bulunmuştur. AGO ve içerdiği safsızlıklar için uygulanan regresyon çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.999 bulunmuştur. Metodun doğruluğu bütün safsızlıklar için geri kazanım yöntemi ile (%94.4 - %106.7) kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2013).

Organik çözücüler kullanarak AGO ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı bir çalışmada kloroform, 1,2 – dikloroetan, hekzan ve kloroform:bütanol (1.0:1.0, h/h) çözücüleri kullanılarak orta pH değerlerinde AGO ekstraksiyonunun verimliliği araştırılmıştır. Sülfirik asit ile konsantr ortamda p – dimetil amino benzaldehitin reaksiyonunu dayalı bu çalışma ile analiz sonuçlarının analitik kimya ile toksikoloji alanlarında da kullanılabilirdiği AGO için kantitatif bir tayin yöntemi geliştirilmiştir (Darmohrai, 2012)

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasallar

Standart madde olarak kullanılan %98.0 saflıktaki AGO Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, IS olarak kullanılan %99.0 saflıktaki IRB Ulkar Kimya Sanayii ve Ticaret A.Ş. (Türkiye) firması tarafından üretilmiş olup Nobel İlaç A.Ş. (Düzce) firmasından sağlanmıştır. YPSK saflıktaki ACN, Merck KGaA (Almanya) firmasından, fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan %99.8 saflıktaki NaH₂PO₄ Sigma-Aldrich (ABD) firmasından, H₃PO₄ Merck KGaA (Almanya) firmasından, YPSK saflıktaki su Merck KGaA (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Valdoxan[®] Tablet (25 mg) ilaç tablet örneği ise Servier İlaç ve Araştırma A.Ş. (İstanbul) firmasından satın alınmıştır.

Kullanılan Cihazlar

YPSK analizlerinin tamamında LC-20AT model LPGE ünitesi takılmış gradient pompa, SIL-20A otomatik örnekleyici, CBM-20A model iletişim ünitesi, CTO-10ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model DAD ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü YPSK cihazının yanında Intel Pentium 4 işlemcili bilgisayar ve Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

UV – görünür bölge spektrofotometrisi ile yapılan incelemelerde Shimadzu (Japonya) marka UV – 2450PC model çift ışık yollu UV – görünür bölge spektrofotometresi cihazı kullanılmıştır. Ölçümlerde 1.0 cm ışık yoluna sahip kuvars kuvetler kullanılmıştır.

Analiz cihazlarının yanı sıra analizler öncesi hazırlık aşamalarında cam malzemeler ile kimyasal maddelerin tartımında Ohaus (İsviçre) marka Explorer E12140 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanmasında 20.0 – 100.0 µL ve 100.0 – 1000.0 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, partiküllerin ayrımı için Eppendorf (Almanya) 5810R model soğutuculu santrifüj aleti, çözeltilerde homojenliği sağlamak için Heidolph (Almanya) - Reax Top model vorteks karıştırıcı, çözeltileri içinde barındırdığı çözünmüş gazlardan arındırmak için Bandelin (Almanya) marka RK-100H Sonorex model ultrasonik banyo, ve çözeltilerin pH'ını ayarlama Seven Multi model Mettler Toledo (İsviçre) marka pH metre kullanılmıştır.

Sabit faz olarak Merck KGaA (Almanya) firmasının ürünü olan Chromolith[®] Performance RP-18e ve Chromolith[®] High Resolution RP-18e, Sigma – Aldrich (ABD) firmasının ürünü olan Ascentis[®] Express C₁₈, Teknokroma (Birleşik Krallık) firmasının ürünü olan Nucleosil[®] 100 C₁₈, Phenomenex (ABD) firmasının ürünü olan Gemini[®] C₁₈ ve Synergi[®] Hydro RP, Hamilton (ABD) firmasının ürünü olan PRP-1, Thermo Scientific (ABD) firmasının ürünü olan Fluophase[®] RP ile Fortis Technologies Ltd (Birleşik Krallık) firmasının ürünü olan Fortis[®] C₁₈ YPSK analiz kolonları kullanılmıştır.

YÖNTEMLER

UV – Görünür Bölge Spektrofotometrisi Yöntemi

Standart çözeltilerin hazırlanışı

UV – görünür bölge spektrofotometrik yöntemde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler için ayrı ayrı 1.0 mg AGO ve 10.0 mg IS tartılarak 100'er mL lik balon jöjelerde yine ayrı ayrı hareketli faz (ACN:Su:Tampon (0.025 M pH:2.0 fosfat tamponu) 25:45:30, h/h/h) çözeltisinde çözülmüş, sırasıyla 4.11×10^{-5} M (0.10 µg/mL) ve 2.33×10^{-4} M (0.10 mg/mL) derişimlerine sahip AGO ve IS stok çözeltileri elde edilmiştir.

Elde edilen AGO ve IS stok çözeltilerinden IS'den sabit miktarda (500 µL), AGO'dan ise 50.0 – 4000.0 µL arası artan oranlarda hacimler deney tüplerine aktarılmış, oluşan karışımı seyreltmek için son hacim 10.0 mL olacak şekilde yine hareketli faz karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Böylece UV – görünür bölge spektrofotometresinde kullanılmak üzere 2.06×10^{-7} M (0.05 µg/mL) ile 1.65×10^{-5} M (4.00 µg/mL) aralığında değişen çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen bu çözeltiler kalibrasyon seti olarak kullanılmıştır. Kullanılan miktarlar ve oluşan AGO derişimleri aşağıdaki **Çizelge 1**'de belirtilmiştir.

Çizelge 1. UV – görünür bölge spektrofotometrisi analizlerinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hesapları

AGO Stok Hacmi (µL)	IS Stok Hacmi (µL)	Hareketli Faz Hacmi (µL)	Son Hacim (µL)	C _{AGO} (M)
50.0	500.0	945.0	1000.0	2.06×10^{-7}
100.0	500.0	940.0	1000.0	4.11×10^{-7}
200.0	500.0	930.0	1000.0	8.23×10^{-7}
300.0	500.0	920.0	1000.0	1.23×10^{-6}
400.0	500.0	910.0	1000.0	1.65×10^{-6}
500.0	500.0	900.0	1000.0	2.06×10^{-6}
1000.0	500.0	850.0	1000.0	4.11×10^{-6}
2000.0	500.0	750.0	1000.0	8.23×10^{-6}
3000.0	500.0	650.0	1000.0	1.23×10^{-5}
4000.0	500.0	550.0	1000.0	1.65×10^{-5}

Analiz parametreleri

UV – görünür bölge spektrofotometrisi ile yapılan ölçümlerde maddenin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunu tespit edebilmek için 190.0 - 400.0 nm aralığında spektrum taraması yapılmıştır. Analiz sırasındaki geçerli aletsel parametreler **Çizelge 2**'de verilmiştir.

Çizelge 2. Analiz sırasındaki UV – görünür bölge spektrofotometrisi parametreleri

Parametre	Değer
Tarama Aralığı	190.0 - 400.0 nm
Ölçüm Modu	Absorbans
Tarama Modu	Tek
Tarama Hızı	Orta
Örnekleme Aralığı	0.2 nm
Işık Yolu Uzunluğu	1.0 cm
Aralık Genişliği	0.5 nm

YPSK Yöntemi

Standart çözeltilerin hazırlanışı

AGO standart stok çözeltisi için 1.0 mg standart madde tartılıp 100.0 mL balon jodede hareketli faz çözeltisi içinde çözülmüştür. Daha sonra bu çözelti 1/100 oranında hareketli faz çözeltisi ile seyreltilerek 4.11×10^{-7} M ($0.10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) derişime sahip bir çözelti elde edilmiştir.

IS stok çözeltisi için 10.0 mg IRB tartılıp 100.0 mL balon jodede hareketli faz içinde çözülmüştür. 2.33×10^{-4} M ($100.00 \mu\text{g/mL}$) derişiminde çözelti elde edilmiştir.

AGO standart çözeltisinden değişen ve IS stok çözeltisinden sabit hacimlerde viallere çekilerek hareketli faz çözeltisi ile 1.0'er mL'ye tamamlanmış, bu yolla değişen derişimlerde çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen bu çözeltiler kalibrasyon seti olarak kullanılmıştır. İlgili hesaplar **Çizelge 3**'te verilmiştir.

Çizelge 3. YPSK analizlerinde kullanılan kalibrasyon çözeltilerinin hesaplamaları

AGO Stok Hacmi (μL)	IS Stok Hacmi (μL)	Hareketli Faz Hacmi (μL)	Son Hacim (μL)	C_{AGO} (M)
10.0	50.0	940.0	1000.0	4.11×10^{-7}
20.0	50.0	930.0	1000.0	8.23×10^{-7}
30.0	50.0	920.0	1000.0	1.23×10^{-6}
40.0	50.0	910.0	1000.0	1.65×10^{-6}
50.0	50.0	900.0	1000.0	2.06×10^{-6}
100.0	50.0	850.0	1000.0	4.11×10^{-6}
200.0	50.0	750.0	1000.0	8.23×10^{-6}
300.0	50.0	650.0	1000.0	1.23×10^{-5}
400.0	50.0	550.0	1000.0	1.65×10^{-5}
500.0	50.0	450.0	1000.0	2.06×10^{-5}

Hareketli fazın hazırlanışı

Analizler boyunca sabit kalan ve ACN:Su:Tampon (0.025 M pH:2.0 fosfat tamponu) 25:45:30, *h/h/h*'dan oluşan hareketli faz sistemi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Fosfat tamponu hazırlamak için 0.018 g katı NaH_2PO_4 (%99.8) tartılarak bir miktar YPSK kalite su ile 250.0 mL'lik balon jojeye aktarılmış, üzerine pipetörle 0.421 mL H_3PO_4 (d: 1.695 g.mL^{-1} , %86.0'lık) eklenmiş ve YPSK kalite su ile son hacme

tamamlanmıştır. Daha sonra çözelti 0.45µm polivinilidenflorür (PVDF) filtreden süzülerek olası çözünmemiş partiküllerden arındırılmıştır. Tüm çözeltiler, yaklaşık 5 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmüş gazların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son aşamada YPSK cihazının pompa ünitesinde bulunan karıştırıcı valf ile çözücülerin istenilen oranda karıştırılarak hareketli fazın oluşturulması ve sisteme gönderilmesi sağlanmıştır.

Analiz parametreleri

Yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda karar verilen hareketli faz olan ACN:Su:Tampon (0.025 M pH:2.0 fosfat tamponu) (25:45:30, h/h/h) bileşimli çözelti bütün analizler süresince 1.0 mL.dk⁻¹ akış hızında kolondan geçirilmiştir.

Analizlerde birinci nesil monolitik silika bazlı kolonların bir örneği olan Chromolith® Performance RP-18e (100×4.6 mm) ile fused core (core-shell) partikül teknoloji kolonların bir örneği olan Ascentis® Express C₁₈ (100×4.6 mm, 2.7 µm) YPSK kolonları kullanılmıştır.

Enjeksiyon hacmi 5.0 µL, kolon fırını sıcaklığı ise 40.0 °C olarak uygulanmıştır. Analitlerin dedektör yanıtları 230.0 nm dalga boyuna ayarlı sinyal toplama frekansı 6.25 Hz ve aralık genişliği 1.2 nm olan DAD ile ölçülmüştür.

Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı

Tablet çözeltisinin hazırlanışı

UV – görünür bölge spektrometrik yöntem için 30 adet Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti tek tek 50.0 mL'lik balon jöjelerde hareketli faz çözeltisi içinde 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldürülmüştür. Tabletlerin çözüldüğü balon jöjeden 0.1 mL pipetör yardımıyla çekilerek 1.5 mL'lik polipropilen viallerde hareketli faz çözeltisi ile 1.0 mL hacmine tamamlanmıştır. 1/10 oranında seyreltilmesi sağlanan çözeltiye 4000 rpm hızda 15 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üstte kalan berrak kısım 0.45 µm PVDF filtreden süzölmüştür. Hazırlanan çözelti içerisindeki teorik AGO derişimi 2.06×10⁻⁴ M olarak hesaplanmıştır. Deney tüplerine bu çözeltiden 0.1 mL çekilerek 0.5 mL IS stok çözeltisi (2.33×10⁻⁴ M) ile karıştırılmış ve oluşan çözelti 10.0 mL'ye tamamlandıktan sonra spektrumları alınmıştır. Spektrumu alınan çözeltideki son AGO derişimi yaklaşık 2.06×10⁻⁶ M ve IS derişimi 1.16×10⁻⁵ M olarak hesaplanmıştır.

YPSK analizleri için 30 adet Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti tek tek 50.0 mL'lik balon jöjelerde hareketli faz çözeltisi içinde 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldürülmüştür. Elde edilen çözeltilerden tüplere 500.0'er µL çekilerek 5.0 mL'ye tamamlanmış ve çözeltiler 4000 rpm hızda 15 dk santrifüjlenmiştir. Üstte kalan berrak çözelti 0.22 µm gözenek çaplı PVDF filtreden süzölmüştür. Elde edilen çözeltiye IS eklenerek 1.5 mL'lik polipropilen viallerde hareketli faz ile 1:100 oranında seyreltilmiştir. Çözelti içerisindeki son AGO derişimi yaklaşık 2.06×10⁻⁶ M (0.50 µg.mL⁻¹) olarak hesaplanmış ve elde edilen tablet çözeltileri ve IS karışımları cihaza gönderilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesi

AGO'nun pik normalizasyonu (PN) yöntemiyle PN değerleri hesaplanmış ve bu değerler IS pikinin PN değerine oranlanarak analizlerdeki hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır. PN değerleri ilgili pikin alanının t_R değerine bölünmesiyle elde edilmiştir. Her bir derişime karşılık olarak AGO'nun ve IS'nin PN değerlerinin birbirine bölünmesiyle elde edilen değerler analitik yanıt olarak kabul edilmiştir. PN değerleri ve çözeltilerin derişimlerinden yola çıkılarak yöntem geçerliliği (validasyon) uygulamalarındaki hesaplamalar ve AGO'nun tabletlerdeki miktarlarının tayini gerçekleştirilmiştir.

Yöntem geçerliliğinin tespiti

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) tavsiye ettiği şekilde yöntem geçerliliği uygulamaları geliştirilen yonteme uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı kontrol edilmiştir. Yöntem geçerliliği için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, LOD, LOQ ve sistem uygunluk testleri (SUT) yapılmıştır (ICH, 2005).

Sistem uygunluk testleri

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazı ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin uygunluğu yöntem geliştirme basamağında oldukça büyük önem taşımaktadır. Ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (TF) ve asimetri faktörü (A_s), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k') ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini oluşturur (USP 30, 2006). Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri AGO ve IS için Birleşik Devletler Farmakopesi (USP) metoduna göre Shimadzu LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan formüller **Çizelge 4**'te verilmiştir.

Spesifiklik

Yöntemin spesifikliği, analizi yapılacak numunede var olan ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme yeteneği olarak değerlendirilmektedir. AGO safsızlıklarının muhtemel etkisini ve tabletlerdeki katkı maddelerinin oluşturabileceği girişimleri incelemek için iki farklı analiz kolonu ile araştırmalar yapılmıştır. Her iki kolon ile elde edilen kromatogramlar birbirleriyle karşılaştırılmış ve analit sinyallerini etkileyecek pozitif ya da negatif girişimler incelenmiştir. Ayrıca analitlerin ve IS piklerinin saflıkları DAD ile kontrol edilmiştir.

Doğrusallık

Derişime karşı analit cevabının doğru orantılı olarak değiştiği ve korelasyon katsayısı (r) ile ifade edilen bir parametredir. Analizlerde AGO (0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 ve 5.00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) için derişime karşı analit cevabının yer aldığı grafikler elde edilmiştir. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olarak incelenmiş ve doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. Hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b (deneme sürümü) programı ile yapılmıştır.

Çizelge 4. USP'ye göre SUT hesaplama eşitlikleri

Parametre	Eşitlik	
Teorik Tabaka Sayısı	$N = 16 \times (t_R/W)^2$	N : teorik tabaka sayısı t_R : alıkonma zamanı W : pik genişliği
Kuyruklanma Faktörü	$TF = W_{0.05} / (2 \times \alpha_{0.05})$	TF : kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Ayırım Gücü	$R = 2 \times (t_R - t_{Rp}) / (W + W_p)$	R : ayırım gücü t_R : alıkonma zamanı t_{Rp} : önceki pikin alıkonma zamanı W : pik genişliği W_p : önceki pikin genişliği
Kapasite Faktörü	$k' = (t/t_0) - 1$	k' : kapasite faktörü t : alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman
Bağıl Alıkonma Zamanı	$\alpha = (k'_2/k'_1) = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0)$	α : bağıl alıkonma zamanı k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman

Doğruluk

Analizler sonucu elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Geri kazanım çalışmalarında gerçek değere ne kadar yaklaşıldığının bir göstergesidir. Önceden analiz edilen tablet çözeltisi içerisinde düşük, orta ve yüksek derişimlerde (4.11×10^{-6} M, 8.23×10^{-6} M ve 1.23×10^{-5} M) AGO standart maddesi ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Kesinlik

Geliştirilen YPSK yöntemiyle analizi yapılan etken maddelerin sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Kesinlik çalışmaları günler içi ve günler arası deneyleri içermektedir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan $0.10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimdeki AGO çözeltileri ($n=10$) aynı gün içerisinde ve ardışık üç gün süre ile belirlenen koşullarda

analiz edilmiştir. Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde ortalama, ortalamanın standart hatası (SEM), SS, bağıl standart sapması (BSS), ortalamanın %95 güven seviyesindeki olası sınırları olarak verilmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b (deneme sürümü) programı ile yapılmıştır.

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

LOD, analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin belirlediği, ancak güvenli miktar tayini sınırları içine girmeyen en alt derişim olarak değerlendirilmektedir. LOQ ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyi olarak bilinmektedir. LOD ve LOQ değerleri için ICH'in tavsiyelerine göre sinyal/gürültü oranının kullanıldığı hesaplamalarda elde edilen oran değeri saptama sınırı için 3.3, tayin sınırı için ise 10.0 olarak kabul edilmiştir.

Kararlılık

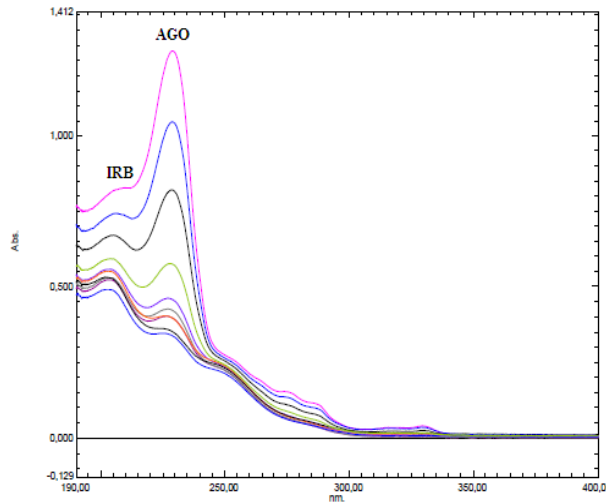
AGO içeren standart çözeltilerin kararlılığı 6 ay süreyle takip edilmiştir. Bu amaçla standart AGO çözeltisi 1 hafta, 1 ay ve 6 aylık sürelerde geliştirilen YPSK yöntemiyle analiz edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Agomelatin'in UV – Görünür Bölge Spektrofotometrisi Yöntemi ile Analizi

Analit ve IS maddelerini çözmek için uygun bir çözücü düşünülmüş ve analizlerin maliyeti de hesaba katılarak ilk etapta su denenmiştir. AGO'nun düşük polar özellikte olmasından dolayı suda tamamen çözünmemesi ve IS'nin de apolar ve asidik karakterli olmasından dolayı suda zayıf çözünürlüğe sahip olması suyun tek başına çözücü olarak kullanılmasını zorlaştırmıştır. Analitlerin ACN ile yüksek çözünürlük gösterdikleri gözlenmiştir. ACN yüksek maliyetli bir çözücü olduğu için AGO ve IS'nin çözünmesinde sadece ACN çözeltisi kullanmaktan kaçınılmıştır. Hareketli faz ile geçimli olan bu maddeler hareketli faz çözeltisi içinde yüksek çözünürlük göstererek kararlılık açısından kısa vadeli bir problem yaratmamıştır. Düşük çözelti derişimlerinin kullanılması UV – görünür bölge spektrofotometrisi için çok düşük A değerleri ile sonuçlanacağından uygun bir derişim aralığı seçilmiş ve bu aralıkta çözeltiler hazırlanmıştır. UV – görünür bölge spektrofotometrik yöntemde kullanılmak üzere hazırlanan standart çözeltiler için ayrı ayrı 1.0 mg AGO ve 10.0 mg IS tartılarak 100'er mL lik balon jodelerde yine ayrı ayrı hareketli faz çözeltisinde çözülmüş, sırasıyla 4.11×10^{-5} M (0.1 $\mu\text{g/mL}$) ve 2.33×10^{-4} M (0.100 $\mu\text{g/mL}$) derişimlerine sahip AGO ve IS stok çözeltileri elde edilmiştir.

Elde edilen AGO ve IS stok çözeltilerinden IS'den sabit miktarda (500 μL), AGO'dan ise 50.0 – 4000.0 μL arası artan oranlarda hacimler deney tüplerine konulmuş, oluşan karışımı seyreltmek için son hacim 10.0 mL olacak şekilde yine hareketli faz karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Böylece UV – görünür bölge spektrofotometresinde kullanılmak üzere 2.06×10^{-7} M (0.05 $\mu\text{g/mL}$) ile 1.65×10^{-5} M (4.0 $\mu\text{g/mL}$) aralığında değişen çözelti grupları elde edilmiştir. Elde edilen bu çözelti grupları kalibrasyon seti olarak kullanılmıştır. Çalışmalar sonunda $y=57991x+0.3236$; $r=0.9996$ ($y: A$, $x: C_{(M)}$) denklemi elde edilmiş ve bu denklem tablet analizlerinde kullanılmıştır. Örneklerin kalibrasyon spektrumu Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. 1.16×10^{-5} M IS ve 2.06×10^{-7} – 1.65×10^{-5} M derişim aralığında AGO içeren kalibrasyon çözeltilerinin spektrumları

Agomelatin'in YPSK Yöntemi ile Analizi

Yöntem Geliştirme

AGO'nun kimyasal yapısı ve nitelikleri göz önünde bulundurularak, geçmişte yapılan çalışmalar incelenmiş ve güncel gelişmelerin de değerlendirilmesiyle hareketli faz ve kolon (sabit faz) seçimi yapılarak YPSK analizleri için yöntem geliştirme çalışmalarına başlanmıştır.

Sağlam, basit, hızlı testler geliştirmek amacıyla, yeni ve gelişmiş analitik cihazların kullanımını günümüz uygulamalarında önemli bir noktadır. Bu durumda verimli ayırımlar gerçekleştirmenin temel yollardan biri, 2.0 µm'nin altında partiküllere sahip polimerik ya da hibrit materyalli veya monolitik yapıya sahip sabit fazlar kullanmaktır. 2.0 µm'nin altında partikülleri ve çok dar boşluklarıyla kolonlar düşük çözücü tüketimi, daha yüksek kolon verimi ve daha düşük analiz süresi gibi avantajlara sahiptir. Bunların yanı sıra, monolitik kolonlar, basınç düşmesi yönünden geleneksel C₁₈ kolonlar ile karşılaştırıldığında, içindeki tek bir monolitik silika çubuğuna sahip yapısıyla basınç problemlerini ortadan kaldırmaktadır. 3.0 mL.dk⁻¹ ve daha fazla akış hızında monolitik kolonlar sıradan YPSK sistemleri ile farmasötiklerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni hibrit ve polimerik materyal ile dolu kolonlar, özellikle geniş pH aralığı ve etkili ayırımlar için diğer bir seçenektir. Monolitik yapıya Chromolith® YPSK kolonları, standart bir parçacıklı kolonun ayırım süresiyle karşılaştırıldığında daha iyi ayırımlar sağlar, çünkü çift durumlu (bimodal) bir yapıya sahip, oldukça porlu, monolitik silika çubuklardan yapılmışlardır. Kolon küçük partiküller halinde doldurulmak yerine, tek bir parça, yüksek saflıkta silika jelden oluşmuştur. Daha uzun ömürlü olması ve biyolojik numuneler ile daha düşük matriks hassasiyeti göstermesi, Chromolith® kolonların ek avantajlarıdır (Can, 2011; Can ve Arlı, 2010).

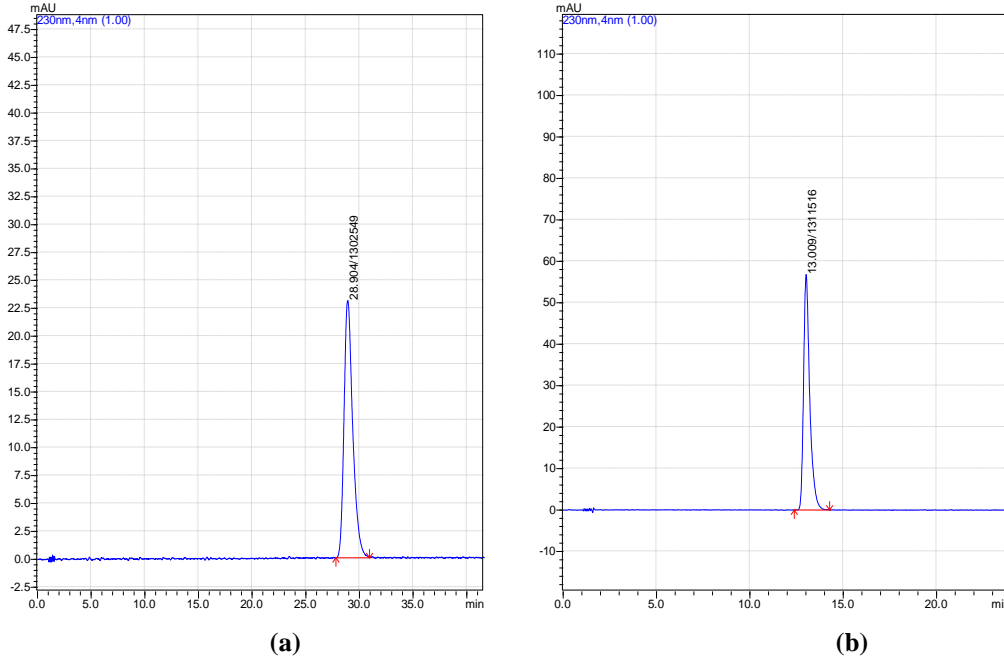
Monolitik silika bazlı kolonların bu avantajları dahilinde analizlere Chromolith® Performance RP-18e ile başlanarak bu kolonun yanı sıra Ascentis® Express C₁₈ kolonun da analizlerde kullanılması planlanmıştır. Burada amaç hem maddelerin yüksek çözünürlüklü analizlerini gerçekleştirebilmek hem de aynı ebatlara sahip (4.6 mm×100 mm) monolitik yapıya sahip bir kolon ile yeni geliştirilmiş "fused – core" tipi bir kolonun kromatografik performanslarını karşılaştırmaktır. Kolonların başlıca teknik özellikleri birbirleri ile karşılaştırmalı olarak **Çizelge 5**'te verilmiştir.

Çizelge 5. Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonlarının özellikleri

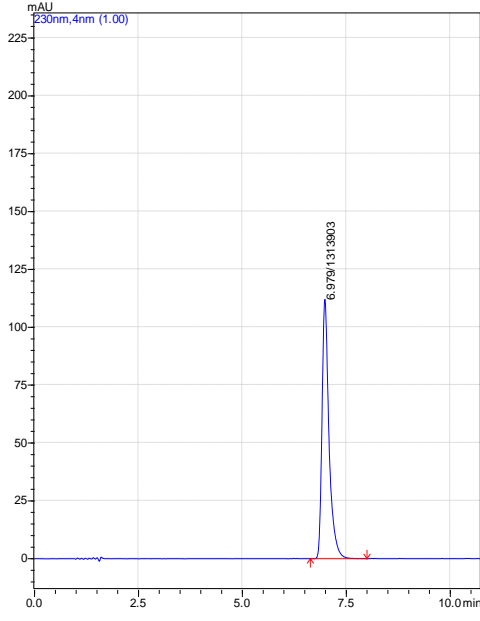
	Chromolith® Performance RP-18e	Ascentis® Express C ₁₈
Partikül Boyutu	-	2.7 µm
Makropor/ Mezopor Büyüklüğü	1.5 µm/13 nm	-
Yüzey Alanı (m².g⁻¹)	300	150
Karbon Yüzdesi (%)	18	17
Toplam Geçirgenlik (%)	80	-
Por Hacmi/Çapı	1.0 mL.g ⁻¹	90 Å
pH Aralığı	2.0-7.5	2.0-9.0
Yüzey Kaplama	3.6 µmol.m ⁻²	3.5 µmol.m ⁻²

Yöntem geliştirme çalışmalarına Chromolith® Performance RP-18e ile başlanmış ve 8.23×10⁻⁵ M derişimdeki AGO çözeltisi kullanılmıştır. Hareketli faz bileşenlerinin seçiminde ACN, su ve çeşitli tampon tiplerini içeren çözeltiler gibi YPSK

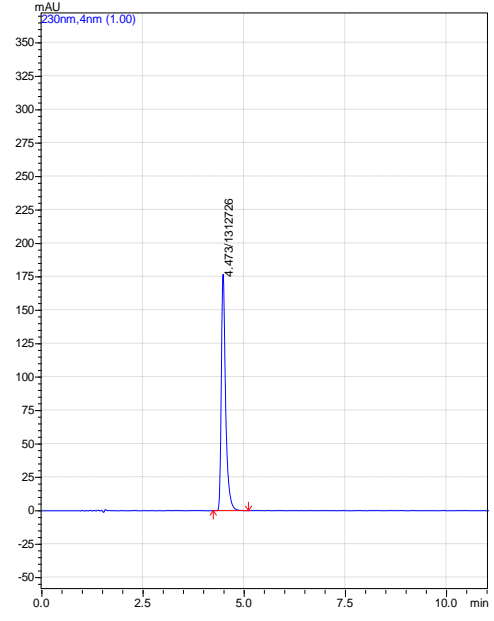
analizlerinde yaygın kullanımı olan kimyasallar hareketli faz olarak denenmiştir. Yöntem geliştirme çalışmaları sırasında hareketli fazın oranları ve T değiştirilerek kromatogramlardaki AGO pikinin alıkonma zamanı ve pik morfolojileri incelenmiştir. AGO düşük polaritede ($\log P=2.46$) bir maddedir. İlk aşamada $40.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ sabit T değerinde hareketli fazdaki tampon oranı %10.0'da sabit tutularak ACN'nin değişen oranlardaki (%20.0, %25.0, %30.0, %35.0, %40.0, %45.0, %50.0) hareketli faz bileşimlerinin AGO'nun alıkonmasına etkisi incelenmiştir. %20.0 ACN içeren hareketli faz kullanıldığında AGO piki 28.90 dk'da gözlenmiştir. Pikin alıkonma zamanı çok geç bir zaman olarak kabul edilmiş ve hareketli faz polaritesinin kademeli olarak artırılması gerektiği ortaya çıkmıştır. %50.0 ACN içeren hareketli faz kullanıldığında ise AGO piki alıkonma zamanı 2.27 dk'da gözlenmiş, bu da erken bir alıkonma zamanı olarak nitelendirilmiştir. Çünkü kromatografik analizlerde analiz edilen maddelerin k' değerinin 2.0-10.0 arası olması istenmektedir. Bu durumda, AGO için k' 2.0'den düşük değerdedir. Deneysel çalışmaların devamında %25.0 ACN içeren hareketli faz kullanıldığında ise AGO piki alıkonma zamanı 13.01 dk'da gözlemlenmiş, analizlerin maliyeti de göz önünde bulundurularak %25.0 ACN içeren hareketli faz ve bu zamanlama analizler için ideal kabul edilmiştir. Hareketli fazdaki ACN değişiminin AGO'nun alıkonma zamanına (t_R) etkisi Şekil 4 a-g'de verilen kromatogramlarda görülmektedir.



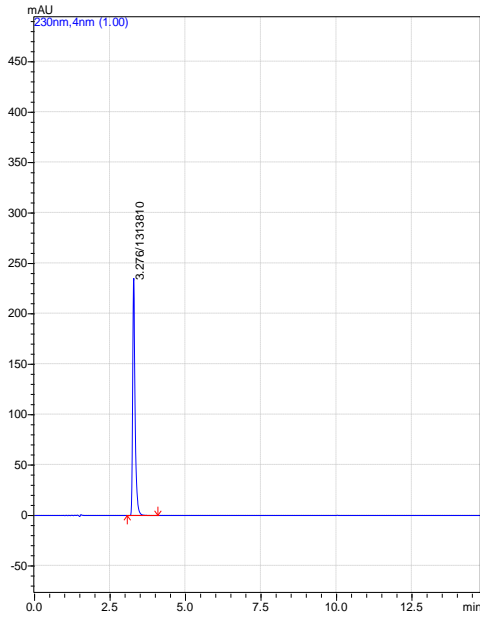
Şekil 4. AGO'nun hareketli fazın değişen ACN oranları karşısında 230.0 nm dalga boyundaki kromatogramları: (a): %20.0, (b): %25.0, (c): %30.0, (d): %35.0, (e): %40.0, (f): %45.0, (g): %50.0



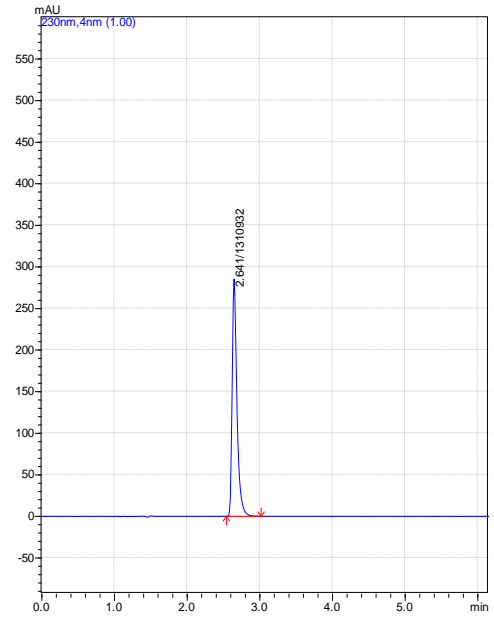
(c)



(d)

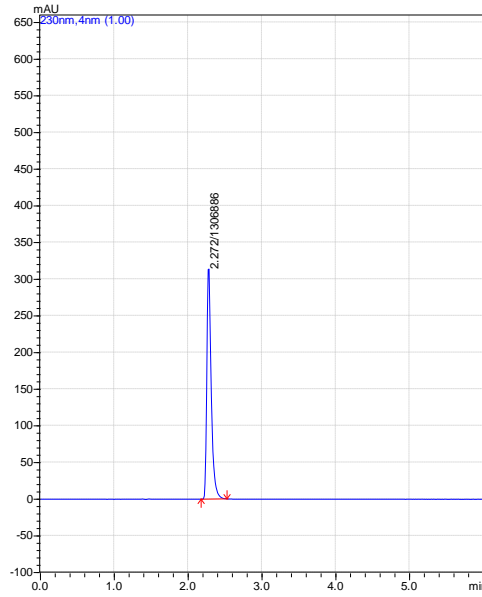


(e)



(f)

Şekil 4. (Devam) AGO'nun hareketli fazın değişen ACN oranları karşısında 230.0 nm dalga boyundaki kromatogramları: (a): %20.0, (b): %25.0, (c): %30.0, (d): %35.0, (e): %40.0, (f): %45.0, (g): %50.0



(g)

Şekil 4. (Devam) AGO'nun hareketli fazın değişen ACN oranları karşısında 230.0 nm dalga boyundaki kromatogramları: (a): %20.0, (b): %25.0, (c): %30.0, (d): %35.0, (e): %40.0, (f): %45.0, (g): %50.0

Bunun yanı sıra ACN oranındaki değişime bağlı olarak AGO'nun alanlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Alan değişimlerindeki bağıl standart sapma düzeyi %0.3 civarındadır. ACN değişiminin AGO'nun t_R değerine etkisine ait sonuçlar **Çizelge 6**'da verilmiştir.

Çizelge 6. ACN değişiminin AGO'nun t_R değerine etkisi

Hareketli Fazın ACN Oranı (%)	t_R (dk)	A
20.0	28.90	1302549
25.0	13.01	1311516
30.0	6.98	1313903
35.0	4.47	1312726
40.0	3.28	1313810
45.0	2.64	1310932
50.0	2.27	1306886

Hareketli fazın fosfat tamponu oranı %10.0 oranında sabit tutulmasının yanı sıra ACN oranı da %25.0'te tutularak T'nin artan değerler karşısında (15.0 °C, 20.0 °C, 25.0 °C, 30.0 °C, 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C) AGO pikinin kolondaki davranışına bağlı olarak kromatogramdaki alıkonma zamanı gözlemlenmiştir. Monolitik bazlı kolonun izin verilen en yüksek çalışma sıcaklığı 45.0 °C olduğu için incelemelerde bu sıcaklık üst sınır olarak alınmıştır. T değerinin 15.0 °C olduğu analizde AGO piki 18.16 dk'da gözlemlenirken, 45.0 °C olduğu analizde de 12.26 dk'da kolonu terk etmiştir. Sistemin kinetik enerjisinin arttığı ve hareketli fazın viskozitesinin düştüğü bir sıcaklık olan 40.0 °C analizlerin kalitesi ve kolon basıncının da uygun seviyelerde seyretmesi üzerine kabul edilebilir bir sıcaklık olarak görülmüştür ve bu sıcaklıkta

AGO pikinin alıkonma zamanı 13.02 dk olarak kaydedilmiştir. T değişiminin AGO'nun sabit fazdaki t_R değerine etkisinin sonuçları **Çizelge 7**'de belirtilmiştir.

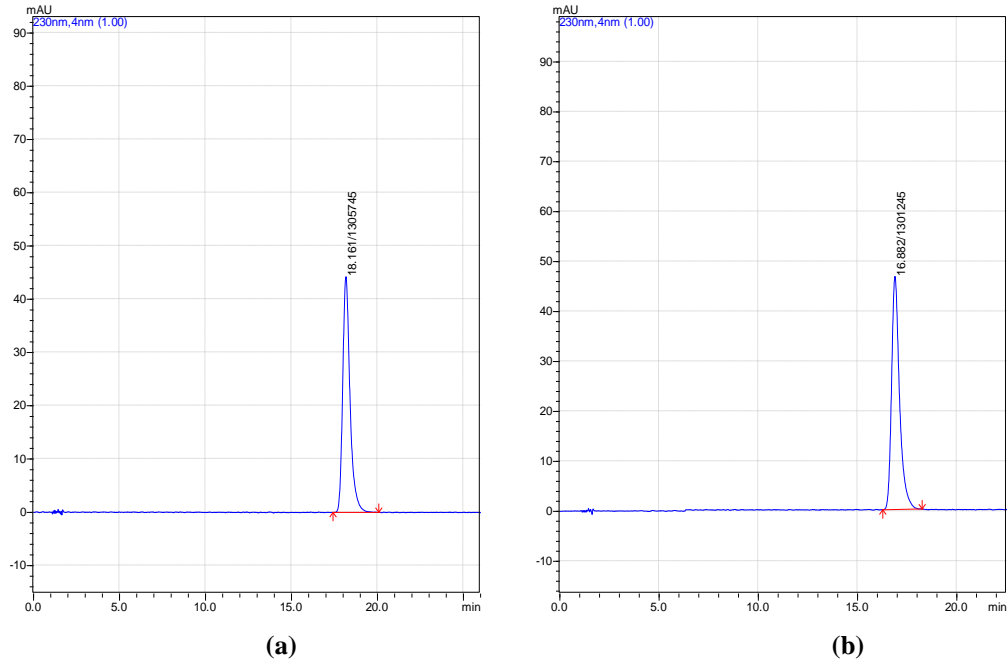
Çizelge 7. Kolon fırını sıcaklığı (T) değişiminin AGO'nun t_R değerine etkisi

T (°C)	t_R (dk)	A
15.0	18.16	1305745
20.0	16.88	1301245
25.0	15.87	1302251
30.0	14.83	1306119
35.0	13.79	1300400
40.0	13.02	1309390
45.0	12.26	1308186

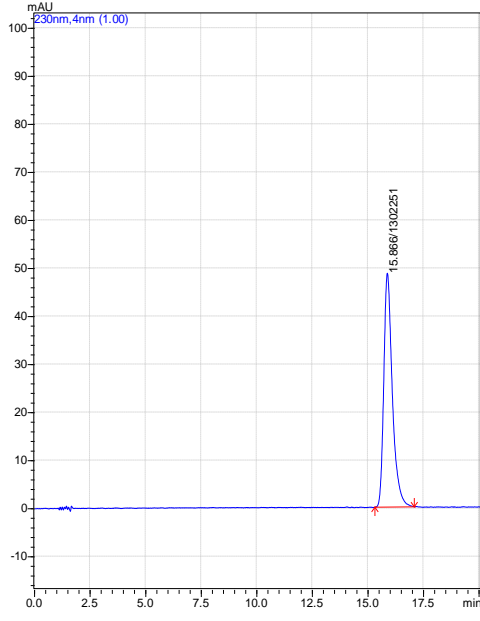
T oranı ile AGO'nun alıkonma zamanı arasındaki ilişkinin aşağıda verilen denkleme uyduğu tespit edilmiştir (**Eşitlik 1**).

$$t_{R(AGO)} = -0.1964 T_{(\%)} + 20.866 \quad (r=-0.9966) \quad (\text{Eşitlik 1})$$

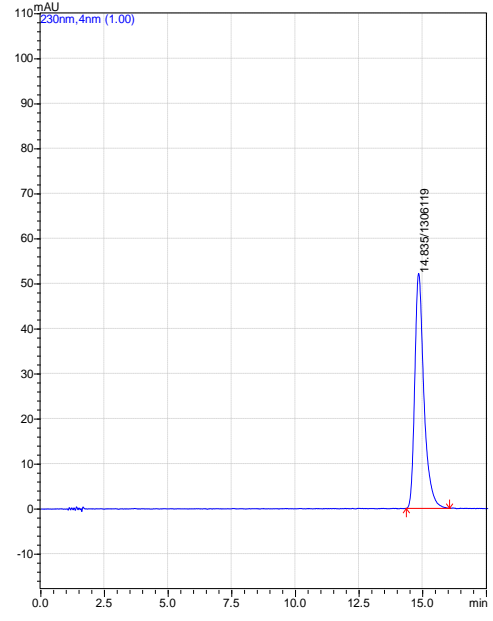
AGO'nun kolondaki t_R değerine T'nin etkisinin incelendiği analizlerde elde edilen kromatogramlar **Şekil 5a-g**'de sunulmuştur.



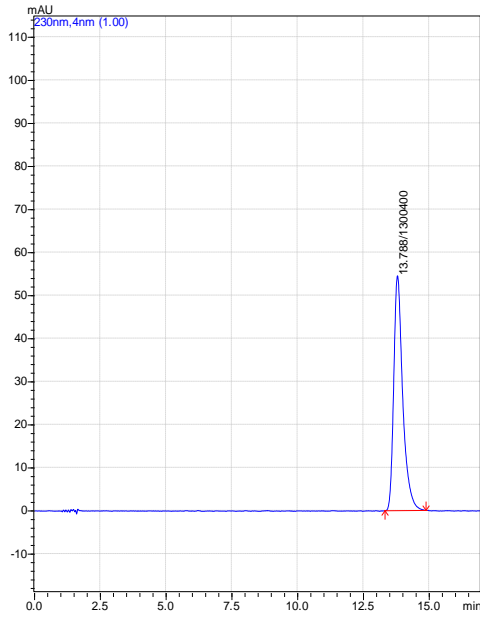
Şekil 5. AGO'nun değişen T değerleri karşısında 230.0 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları: (a): 15.0 °C, (b): 20.0 °C, (c): 25.0 °C, (d): 30.0 °C, (e): 35.0 °C, (f): 40.0 °C, (g): 45.0 °C



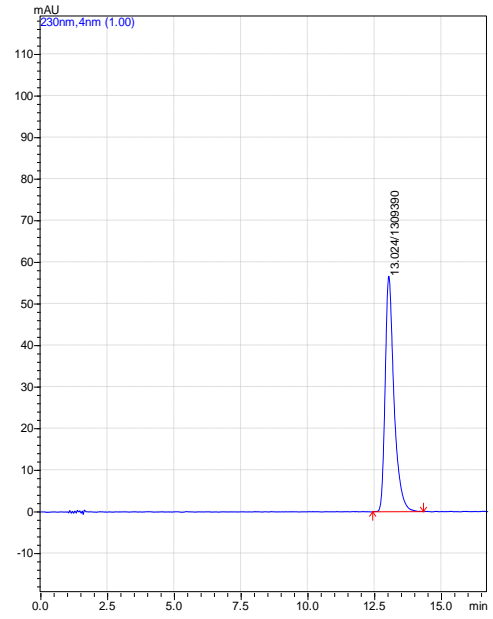
(c)



(d)

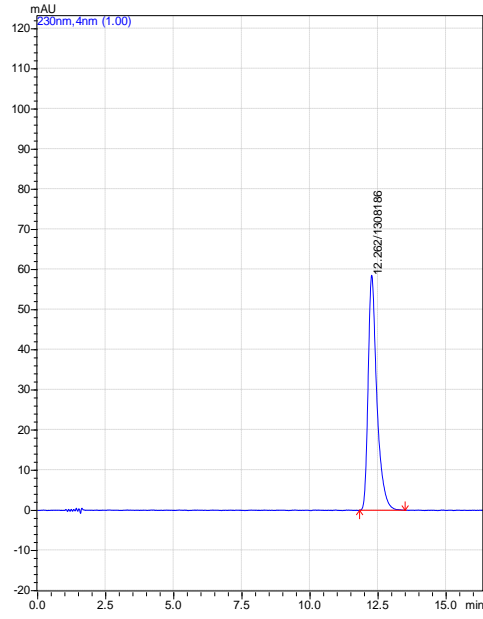


(e)



(f)

Şekil 5. (Devam) AGO'nun değişen T değerleri karşısında 230.0 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları: (a): 15.0 °C, (b): 20.0 °C, (c): 25.0 °C, (d): 30.0 °C, (e): 35.0 °C, (f): 40.0 °C, (g): 45.0 °C

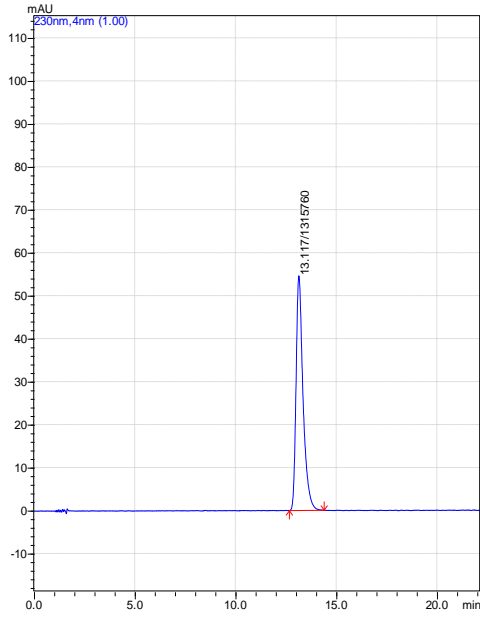


(g)

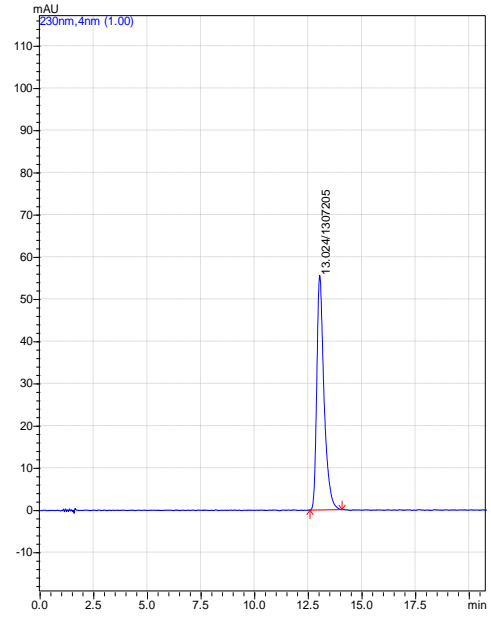
Şekil 5. (Devam) AGO'nun değişen T değerleri karşısında 230.0 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları: (a): 15.0 °C, (b): 20.0 °C, (c): 25.0 °C, (d): 30.0 °C, (e): 35.0 °C, (f): 40.0 °C, (g): 45.0 °C

Numunenin analize hazırlanma işlemlerinden, matriksteki diğer maddelerin varlığından ve analiz şartları altında kontrol edilemeyen iç ve dış etkenlerden kaynaklanan hataları azaltabilmek adına bir iç standart madde kullanılması uygun görülmüştür. IS'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önünde bulundurulduğunda AGO ile karışımlarının geçimsiz bir özellik taşımadığı ve kromatografik sistemde uygun bir IS olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir.

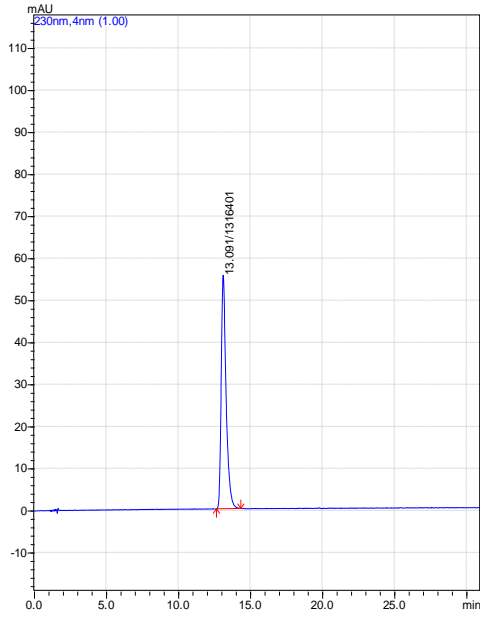
Yöntem geliştirme çalışmalarına hareketli fazdaki fosfat tamponu oranları değiştirilerek (%10.0, %20.0, %30.0, %40.0) devam edilmiştir. Analizler AGO standart çözeltisi ve değişen fosfat tamponu karşısında IS davranışını da gözlemlemek adına iki maddeyi de içeren çözeltiyle yapılmıştır. Enjeksiyonlar AGO ve IS'nin ayrı ayrı bulunduğu viallerde gerçekleştirilmiştir. %10.0 fosfat tamponu içerikli hareketli fazda AGO piki ortalama 13.09 dk'da gözlenirken IS piki 13.40 dk'da alıkonmuştur. Bu durumda birlikte analiz edilen maddelerin piklerinin birbirleri ile çakışacağı öngörülerek bileşimdeki tampon oranının artırılması yoluna gidilmiştir. %40.0 fosfat tamponu içerikli hareketli fazda AGO piki 13.06 dk'da alıkonmuş, IS pikinin 10.17 dakikaya kadar gerilediği gözlemlenmiştir. Elde edilen kromatogram örnekleri AGO ve IS için sırasıyla **Şekil 6a-d** ve **7a-d**'de gösterilmiştir. Hareketli fazdaki fosfat tamponu değişimi AGO'nun t_R değerini yaklaşık 0.03 dk kadar etkilerken, fosfat tamponunun %10.0'dan %40.0'a çıkması hareketli fazda daha iyi bir tamponlama sağlayarak zayıf asit özellikli IS'nin ($pK_a=4.50$) kolonu yaklaşık 3.23 dk daha erken terk etmesini sağlamıştır. %30.0 fosfat tamponu içerikli hareketli fazda AGO piki alıkonma zamanı yaklaşık 13.09 dk'da IS piki ise yaklaşık 10.67 dk'da gözlemlenmiş ve kromatogramda piklerin t_R değerlerinin ideal mesafelerde meydana geldiği düşünülerek hareketli fazdaki geçerli fosfat tamponu oranı olarak kabul edilmiştir.



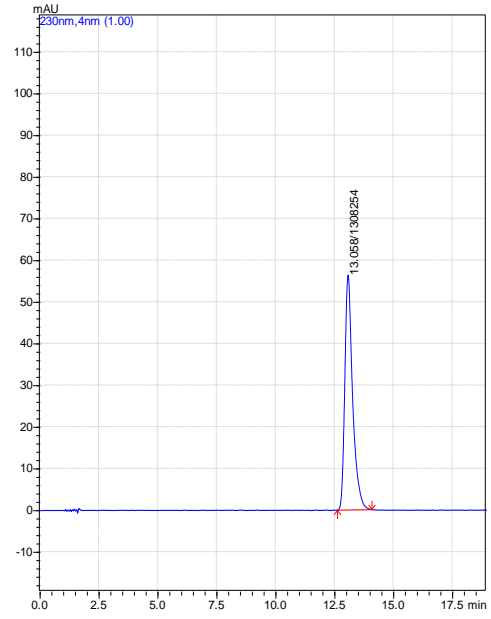
(a)



(b)

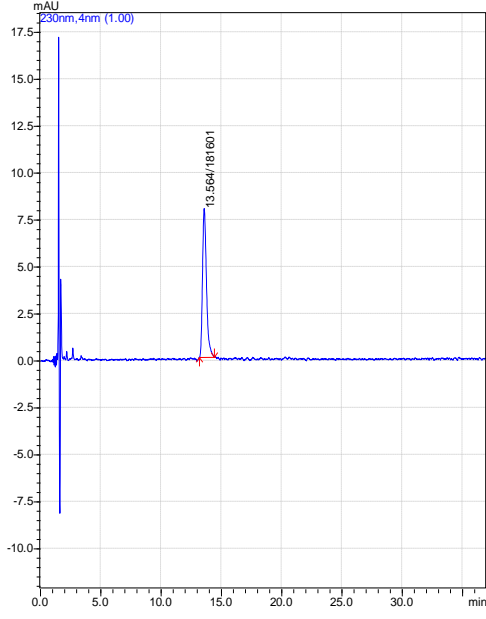


(c)

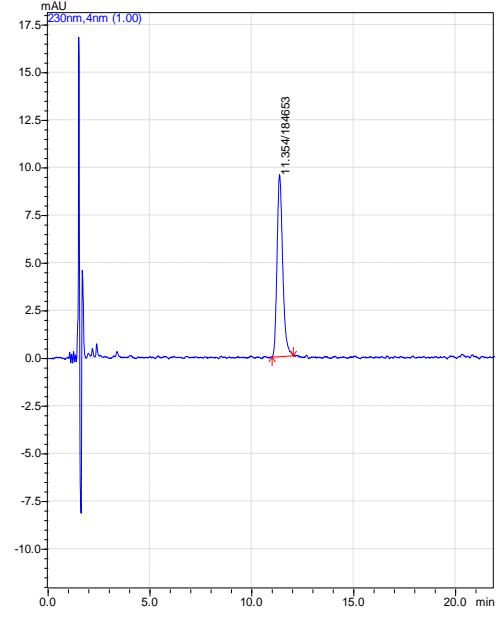


(d)

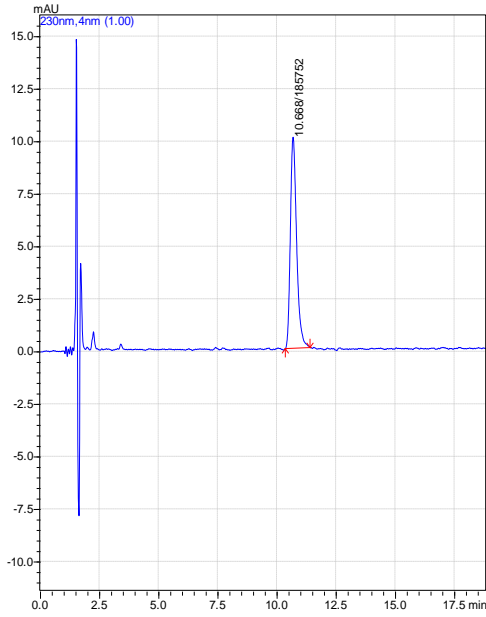
Şekil 6. AGO'nun hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Chromolith® Performance RP-18e kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0, (c): %30.0, (d): %40.0



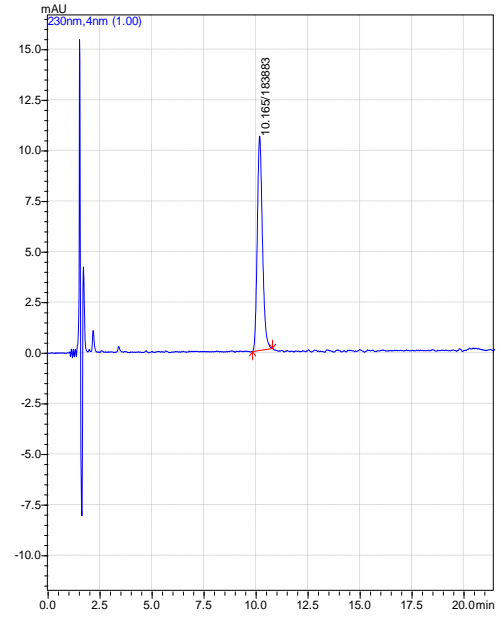
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 7. IS' nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Chromolith® Performance RP-18e kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0, (c): %30.0, (d): %40.0

Hareketli fazdaki tampon oranı değişiminin Chromolith® Performance RP-18e kolonda ayrı ayrı AGO ve IS t_R değerlerine etkisinin sonuçları **Çizelge 8'**de verilmiştir.

Bu aşamaya kadar gerçekleştirilen çalışmalar Chromolith® Performance RP-18e kolonu kullanılarak yürütülmüştür.

Çizelge 8. Tampon oranı değişiminin ayrı ayrı AGO ve IS t_R değerlerine etkisi

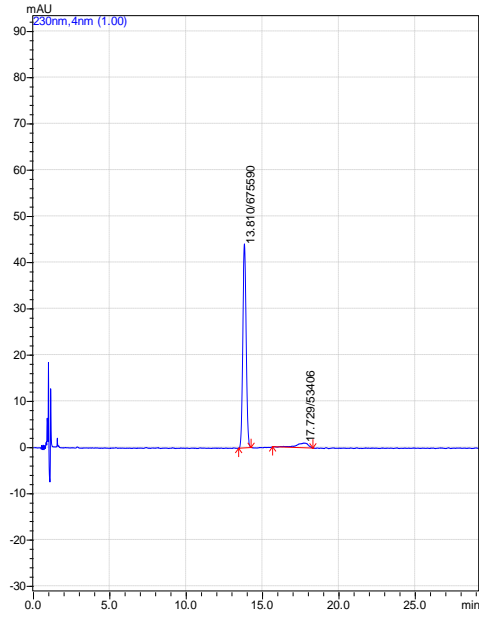
Hareketli Fazın Fosfat Tamponu Oranları (%)	AGO		IS	
	t _R (dk)	A	t _R (dk)	A
10.0	13.09	1315001	13.40	180980
20.0	13.02	1307178	11.36	184029
30.0	13.09	1316401	10.69	185752
40.0	13.06	1309698	10.17	184792

Hareketli faz içinde fosfat tamponunun değişen oranlarının AGO ve IS maddelerin farklı bir kolondaki t_R değerine etkisini görmek üzere Ascentis[®] Express C₁₈ kolon kullanılarak AGO ve IS maddeleri karışımı birlikte analiz edilmek yoluyla hareketli fazdaki fosfat tamponu oranları değiştirilerek (%0.0, %10.0, %20.0, %30.0, %40.0, %50.0) enjeksiyonlara devam edilmiştir. Tampon kullanılmayan (%0.0) hareketli faz denemesinde AGO piki ortalama 13.30 dk'da gözlenmiştir. Hareketli fazdaki tampon oranının %50.0 olduğu analizlerde ise AGO piki ortalama 13.03 dk'da gözlemlenmiştir. Hareketli fazdaki fosfat tamponu oranı değişimi AGO'nun kolondaki t_R değerine çok ciddi bir etki etmediği görülmüştür. Fosfat tamponu kullanılmayan analize oranla %50.0 oranda fosfat tamponu uygulanması standart maddenin alıkonma zamanını 0.27 dk kadar öne çekmiştir. IS maddenin hareketli fazdaki fosfat tamponu değişimine daha duyarlı davrandığı görülmüştür. Tampon içeriği %0.0 olan hareketli fazda IS, AGO'dan sonra kolonu terk etmiştir. Ayrıca bu koşullarda AGO pikinin düzgün bir morfolojiye sahip olmasına rağmen IS pikinin son derece bozuk bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. %10.0 fosfat tamponu içerikli hareketli fazda kolondaki t_R değeri ortalama 12.98 dakikaya denk gelirken, tampon oranı %50.0'ye çıktığında kromatogramdaki yerini ortalama 9.73 dk'da almıştır. Özetle tampon yüzdesindeki artış IS'nin t_R değerini azaltmıştır. Analizlerde elde edilen kromatogramlar **Şekil 8a-f**'de belirtilmiştir. %10.0'dan %50.0'ye çıkan hareketli fazdaki fosfat tampon oranı değişiminin Ascentis[®] Express C₁₈ kolonda eş zamanlı analiz edilen AGO ve IS maddelerine t_R değerine etkisinin sonuçları **Çizelge 9**'da verilmiştir.

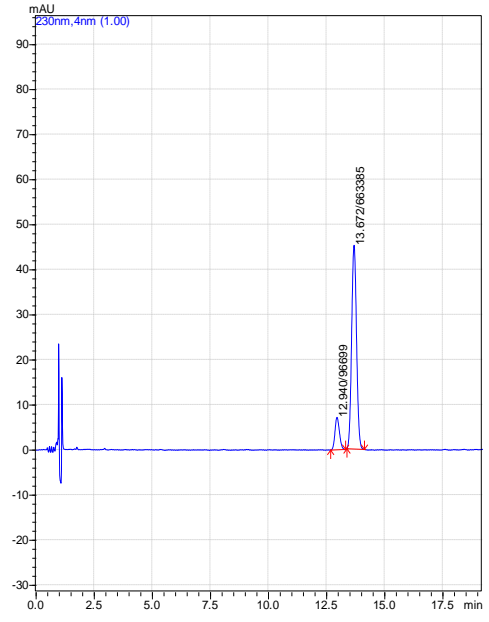
Çizelge 9. Tampon oranı değişiminin AGO ve IS t_R değerlerine etkisi (Ascentis[®] Express C₁₈)

Hareketli Fazın Fosfat Tamponu Oranları (%)	AGO		IS	
	t _R (dk)	A	t _R (dk)	A
0.0	13.30	660250	-	-
10.0	13.69	666372	12.98	96007
20.0	13.40	660763	10.91	95888
30.0	13.70	670196	9.89	97813
40.0	13.09	653021	10.07	91585
50.0	13.03	648172	9.73	94747

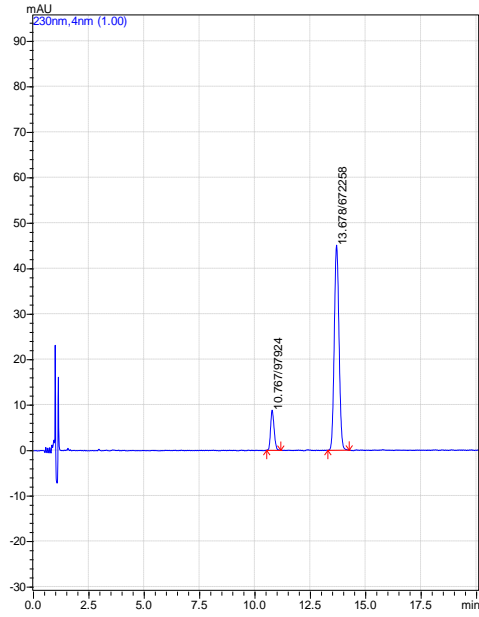
Devam edilen yöntem geliştirme çalışmaları esnasında hareketli fazın fosfat tamponu oranlarının değiştirilmesinin yanında, yine bu kolonun özelliklerinden dolayı daha düşük bir akış hızı olan 0.5 mL.dk⁻¹ AGO ve IS' nin sürüklenme oranlarını nasıl etkileyeceğini görmek için %10.0 ve %20.0 fosfat tamponu içeren hareketli faz üzerinde denenmiştir. %10.0 fosfat tamponu içerikli hareketli fazın 0.5 mL.dk⁻¹ hızla kolondan geçirilmesiyle elde edilen kromatogramda AGO ve IS pikleri ortalama olarak sırasıyla, 27.40 ve 24.32 dk civarında gözlemlenmiştir.



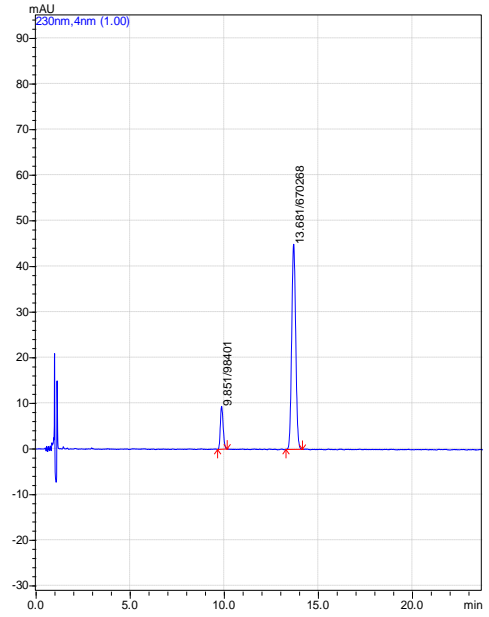
(a)



(b)

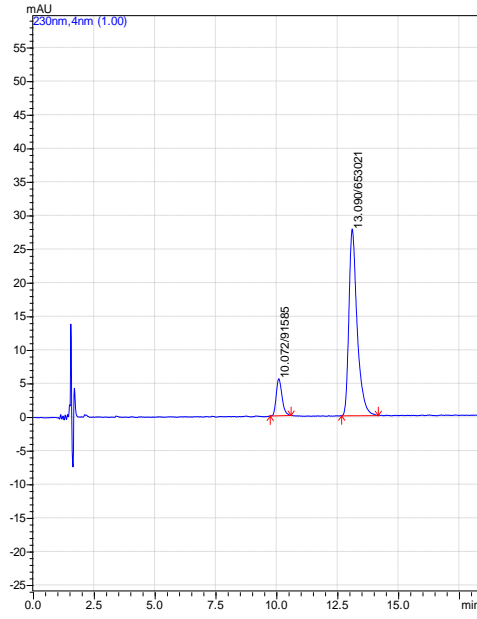


(c)

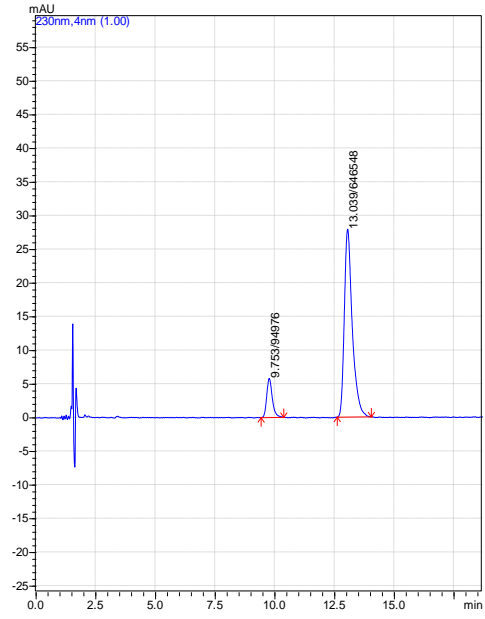


(d)

Şekil 8. AGO ve IS' nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Ascentis® Express C₁₈ kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %0.0, (b): %10.0, (c): %20.0, (d): %30.0, (e): %40.0, (f): %50.0



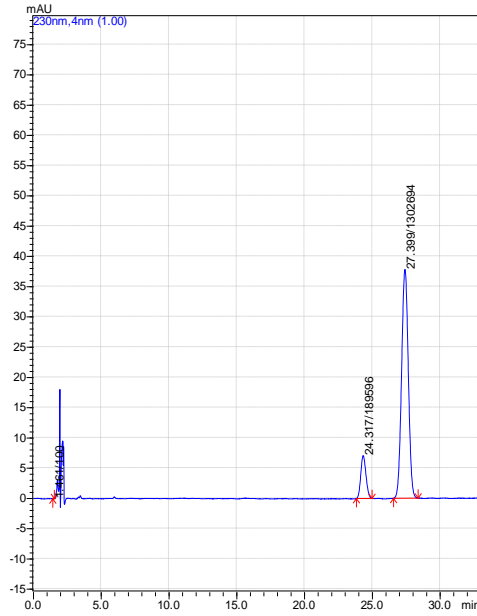
(e)



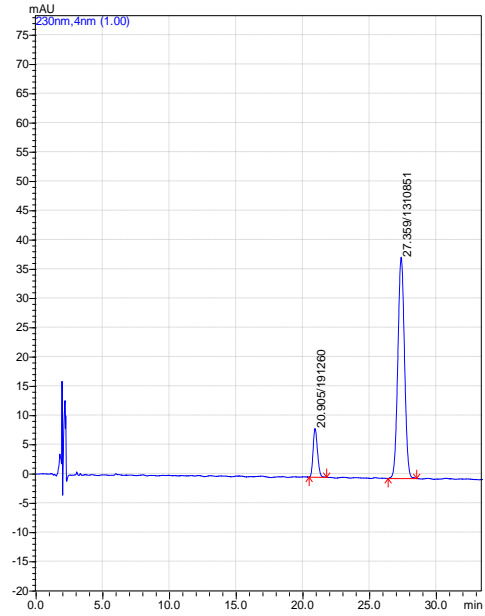
(f)

Şekil 8. (Devam) AGO ve IS' nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 230.0 nm dalga boyunda Ascentis® Express C₁₈ kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %0.0, (b): %10.0, (c): %20.0, (d): %30.0, (e): %40.0, (f): %50.0

0.5 mL.dk⁻¹ akış hızında hareketli fazdaki fosfat tamponu oranı %20.0 olarak değiştirildiğinde AGO ve IS pikleri ortalama olarak sırasıyla, 27.36 ve 20.90 dk'da gözlenmiştir (Şekil 9a-b).



(a)

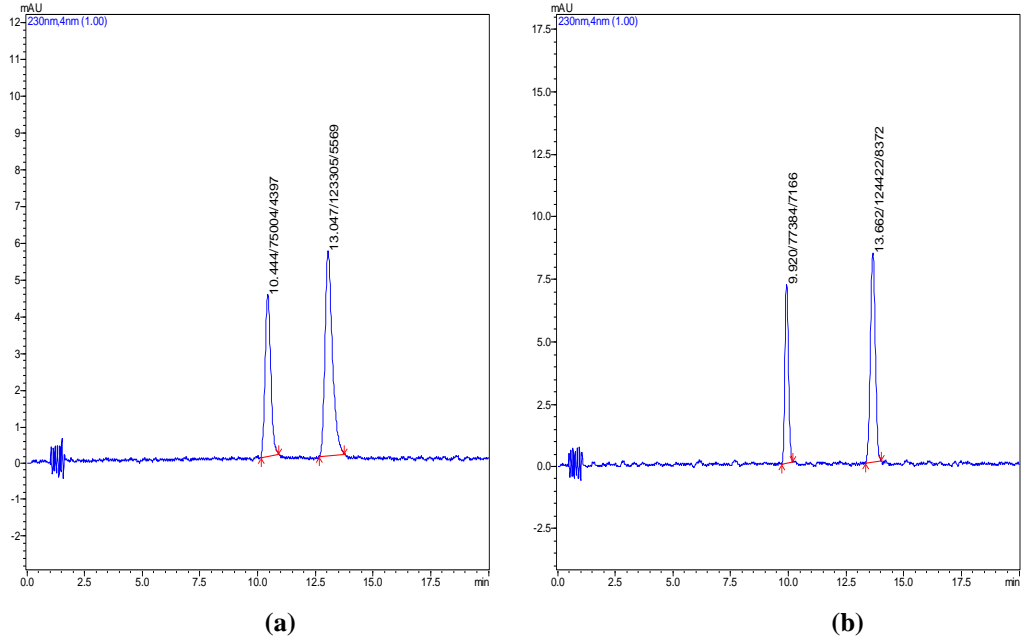


(b)

Şekil 9. AGO ve IS'nin hareketli fazın değişen fosfat tamponu oranları karşısında 0.5 mL.dk⁻¹ akış hızında 230.0 nm dalga boyunda Ascentis® Express C₁₈ kolonda elde edilen kromatogramları: (a): %10.0, (b): %20.0

AGO'nun t_R değerinin değişmesinde bu değişim çok etkin rol oynamazken, IS'nin kolondan çıkma zamanını yaklaşık 3.5 dk öne çekmiştir. Fakat bu düşük akış hızında temel çizgi düzgünlüğü gözlenmemiş ve 30.0'ar dakikalık analiz süresini uzun bir zaman dilimi olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sonucu $0.5 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında daha fazla fosfat tampon oran değişimleri denenmeyerek, analizlere tekrardan $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızı ile devam edilmesi uygun görülmüştür.

Son basamaktaki yöntem geliştirme çalışmaları da değerlendirilerek, sonuçta hareketli faz olan ACN:Su:Tampon (0.025 M pH:2.0 fosfat tamponu) (25:45:30, $h/h/h$) çözeltisinin $1.0 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ akış hızında sisteme pompalanmasına, kolon sıcaklığı olarak $40.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 'nin kullanılmasına, bunların yanı sıra analit çözeltilerinin sisteme 5.0 'er μL 'lik hacimlerde gönderilerek sinyallerin 230.0 nm dalga boyunda izlenmesine ve analizlerin 20.0 dk 'da sonlandırılmasına karar verilmiştir. Belirtilen koşullar altında yürütülen analizlerde gözlenen sistem basıncı, Chromolith® Performance RP-18e kolonunda 29 bar , Ascentis® Express C_{18} kolonda ise 165 bar 'dır. En uygun hale getirilmiş koşullar altında elde edilen AGO ve IS içeren standart çözelti kromatogramları Şekil 10a-b'de gösterilmiştir.



Şekil 10. Geliştirilen yöntem koşullarında $8.23 \times 10^{-6} \text{ M}$ AGO (13.05 dk, 13.66 dk) ve $1.16 \times 10^{-5} \text{ M}$ IS (10.44 dk, 9.92 dk) standart çözeltisinin kromatogramları: (a): Chromolith® Performance RP-18e, (b): Ascentis® Express C_{18}

Akış hızı, T ve hareketli faz bileşenlerinden ACN ile fosfat tamponu oranlarının çeşitli oranlarda değiştirilerek denenmesiyle her basamakta iyileştirilen ve geliştirilen bu analiz yönteminin hareketli faz, T, enjeksiyon hacmi, dalga boyu ve akış hızı değiştirilmeden diğer analiz kolonlarında uygulanabilirliği incelenmiştir. Kromatografik performansları birbirleriyle karşılaştırılan bu kolonların özellikleri Çizelge 10'da verilmiştir.

Çizelge 10.YPSK analizlerinde kullanılan diğer kolonların özellikleri

	Chromolith®HR RP-18e	Gemini® C ₁₈	Fortis® C ₁₈	Nucleosil® 100 C ₁₈
Partikül boyutu	-	5.0 µm	5.0 µm	5.0 µm
Kolon uzunluğu	100 mm	100 mm	100 mm	100 mm
Kolon iç çapı	4.6 mm	4.6 mm	4.6 mm	4.6 mm
Makropor/ Mezopor Büyüklüğü	1.15 µm / 15 µm	-	-	-
Yüzey Alanı (m ² /g)	250	375	380	-
Karbon Yüzdesi (%)	18	14	17	15
Por Hacmi/Çapı	1 mL/g	110 Å	100 Å	100 Å
1.0 mL/dk'de Kolon Basıncı (Bar)	27	36	40	49
pH aralığı	2.0-7.5	1.0-12.0	1.0-11.0	2.0-8.0

Çizelge 10. (Devam) YPSK analizlerinde kullanılan diğer kolonların özellikleri

	Fluophase® RP	Synergi® Hydro RP	PRP-1
Partikül boyutu	5.0 µm	4.0 µm	5.0 µm
Kolon uzunluğu	100 mm	150 mm	100 mm
Kolon iç çapı	4.6 mm	4.6 mm	4.6 mm
Yüzey Alanı (m ² /g)	100	475	415
Karbon Yüzdesi (%)	10	11	-
Por Hacmi/Çapı	100 Å	80 Å	100 Å
1.0 mL/dk'de Kolon Basıncı (Bar)	39	62	102
pH aralığı	2.0-8.0	1.5-7.0	1.0-13.0

Bu çerçevede çalışmaya eklenen yeni kolonlarla kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalardan elde edilen kromatogramlar yardımıyla SUT değerlerini içeren validasyon parametreleri uygulanmıştır (Çizelge 11).

Çizelge 11. Geliştirilen yöntemin değişik sabit fazlara uygulanmasıyla elde edilen SUT değerleri

Parametre	Chromolith HR RP-18e		Gemini® C ₁₈		Fortis® C ₁₈		Synergi® Hydro RP		Tavsiye Edilen Değer
	AGO	IS	AGO	IS	AGO	IS	AGO	IS	
t _R (dk)	12.90	11.64	22.60	11.83	33.30	24.52	44.24	29.23	
N	11717	12212	9824	7203	14671	4418	27867	9970	>2000
TF	1.180	1.139	1.187	1.226	1.077	1.011	1.086	1.034	<2
A _s	1.184	1.118	1.149	1.183	1.082	0.951	1.110	1.031	0.95<A _s <1.2
k'	6.608	5.866	14.804	8.815	20.273	14.665	21.442	13.210	2<k<10
α	1.126		2.014		1.382		1.551		>1
R _s	2.797		14.393		5.581		12.489		>2

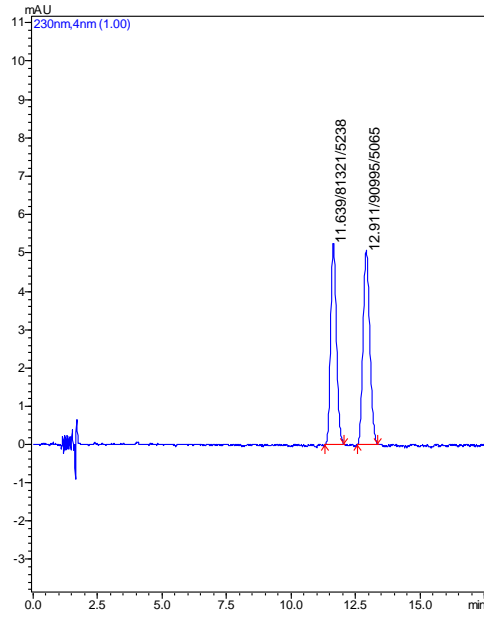
Çizelge 11. (Devam) Geliştirilen yöntemin değişik sabit fazlara uygulanmasıyla elde edilen SUT değerleri

Parametre	Nucleosil® 100 C ₁₈		Fluophase® RP		PRP-1		Tavsiye Edilen Değer
	AGO	IS	AGO	IS	AGO	IS	
t_R(dk)	28.37	24.61	8.53	23.44	36.08	22.10	
N	11812	7490	7898	4096	17464	2345	>2000
TF	1.119	1.207	1.040	1.023	1.127	1.092	<2
A_s	1.126	1.184	1.052	1.011	1.117	1.092	0.95<A _s <1.2
k'	17.789	15.293	5.018	15.536	26.741	15.990	2<k<10
α	1.163		3.096		1.672		>1
R_s	3.325		16.096		8.735		>2

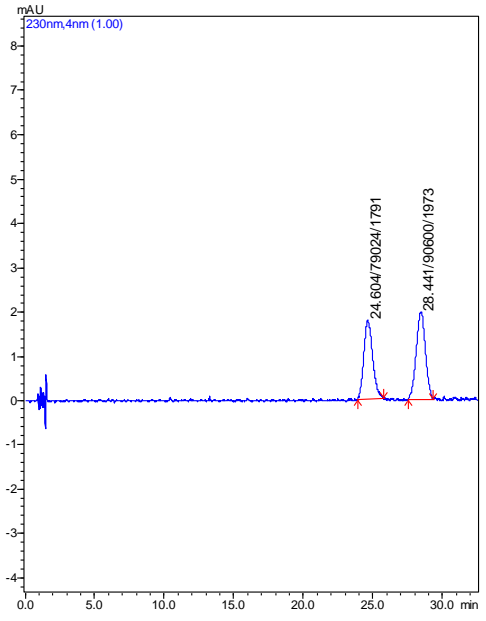
Hazırlanan kalibrasyon serisi ($4.11 \times 10^{-7} - 2.06 \times 10^{-5}$ M) sıra ile C₁₈ bağlı monolitik silika kolonların ikinci nesil bir örneği olan Chromolith® High Resolution RP-18e (Merck), C₁₈ bağlı silika parçacıklı Nucleosil® 100 C₁₈ (Teknokroma), C₁₈ bağlı silika parçacıklı Fortis® C₁₈ (Fortis), silika parçacıklı hibrit Gemini® C₁₈ ve polar kaplanmış uçlu C₁₈ silika Synergi® Hydro RP (Phenomenex), polistiren-divinilbenzen polimer yapısındaki PRP-1 (Hamilton), perflorlu silika uçlu C₁₈ Fluophase® RP (Thermo Scientific), analiz kolonlarına uygulanarak AGO ve IS'nin kolondaki alıkonma zamanları gözlenmiştir (**Şekil 11a-g**). Dedektörden sırasıyla 12.90 dk, 28.37 dk, 33.30 dk, 22.60 dk, 44.24 dk, 36.08 dk ve 8.53 dk civarlarında AGO sinyalleri elde edilmiştir. AGO ve IS sinyalleri için en yüksek N değeri sırasıyla Synergi® Hydro RP (20308) ve Chromolith® High Resolution RP-18e (12212) kolonlarında gözlenmiştir. Analizlerin kalitesi açısından TF değerinin her zaman en düşük seviyelerde olması beklenmektedir. Fluophase® RP, Synergi® Hydro RP ve Fortis® C₁₈ sabit fazları AGO sinyalleri için en düşük TF değerine sahiptir (1.04, 1.08 ve 1.09). Geliştirilen yöntem AGO ve IS'nin kolondaki alıkonma zamanları göz önünde bulundurulduğunda ikinci nesil Chromolith® High Resolution RP-18e sabit fazında daha uygun, güvenilir ve geçerlidir. Ayrım gücünün en yüksek olduğu sabit faz Fluophase® RP (16.10) olmuştur. Alıkonma zamanları incelendiğinde AGO kolonu en erken terk ettiği sabit faz Fluophase® RP (8.53 dk) en geç terk ettiği sabit faz ise Synergi® Hydro RP (44.24 dk) olmuştur.

USP kriterlerine göre bir analitik yöntemin seçiciliği bir analitin varlığını ölçüm esnasında doğru tayin edebilmeye bağlıdır (USP 23, 1995). Bu doğrultuda AGO ve IS analitlerinin kromatogramlardaki sinyallerine göre bağlı alıkonma değeri en yüksek olan kolonlar Fluophase® RP (3.10) ve Gemini® C₁₈ (2.01) olmuştur.

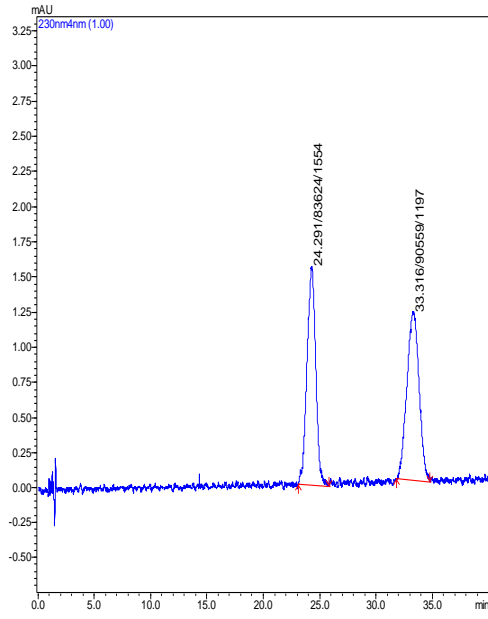
Analizlerde kullanılan kolonlarla değişik analiz gruplarıyla daha fazla deneye ihtiyaç duyulmasına rağmen AGO tayini için Chromolith® HR RP-18e başta olmak üzere, Gemini® C₁₈, Fluophase® RP ve Nucleosil® 100 C₁₈ birbirinin yerine alternatif olarak kullanılabilir birer sabit faz olarak değerlendirilmiştir. Değişik sabit fazlar kullanılarak elde edilen bilgiler ışığında genel olarak yeni nesil kolonlar yüksek etkinlik gösterirken yüksek ayrım gücü (Fluophase® RP), pik simetrisi (Fortis® C₁₈) ve geç elüsyon (Synergi® Hydro RP) gibi analiz özelliklerinin ihtiyacı durumlarında farklı seçimler yapılabileceği düşünülmüştür.



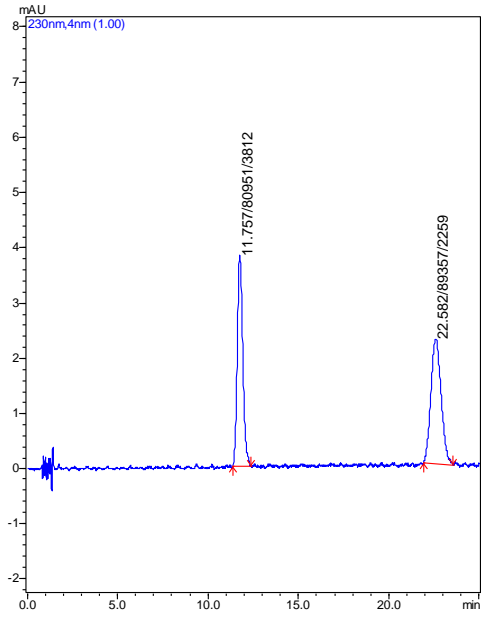
(a)



(b)

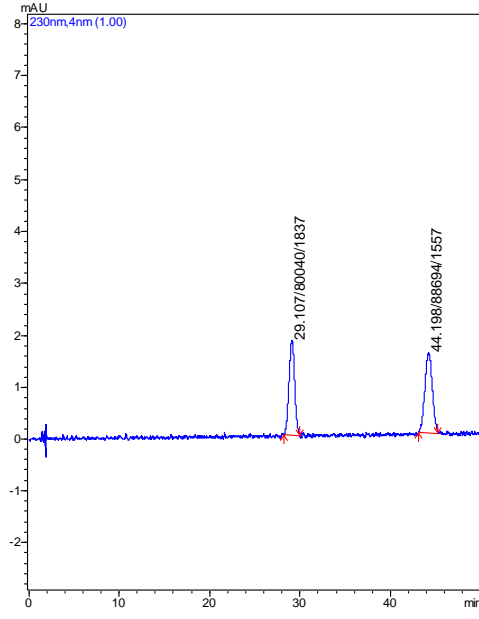


(c)

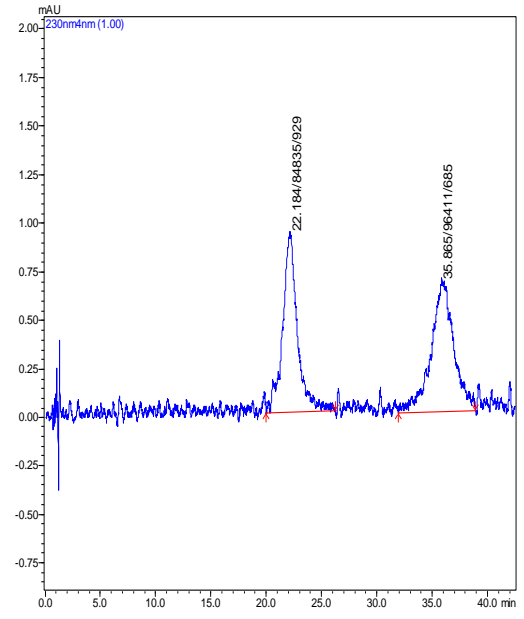


(d)

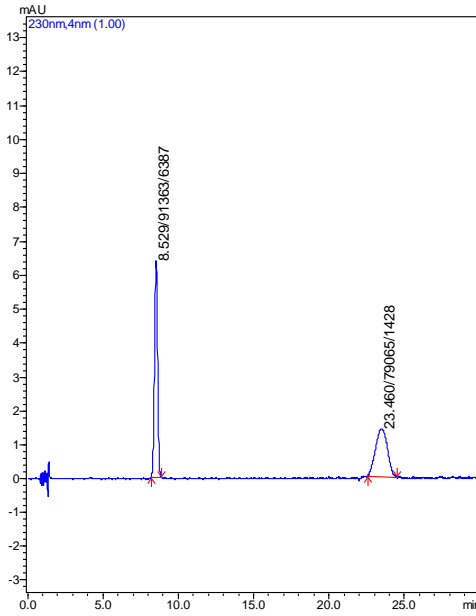
Şekil 11. 8.23×10^{-6} M AGO ve 1.16×10^{-5} M IS standart çözeltilerinin analiz kolonlarında kromatogramları: (a): Chromolith[®] HR RP-18e, (b): Nucleosil[®] 100 C₁₈, (c): Fortis[®] C₁₈, (d): Gemini[®] C₁₈, (e): Synergi[®] Hydro RP, (f): PRP-1, (g): Fluophase[®] RP



(e)



(f)



(g)

Şekil 11.(Devam) 8.23×10^{-6} M AGO ve 1.16×10^{-5} M IS standart çözeltilerinin analiz kolonlarında kromatogramları: (a): Chromolith® HR RP-18e, (b): Nucleosil® 100 C₁₈, (c): Fortis® C₁₈, (d): Gemini® C₁₈, (e): Synergi® Hydro RP, (f): PRP-1, (g): Fluophase® RP

YPSK yönteminin validasyonu

Tabletlerden AGO tayini için geliştirilen YPSK yönteminin ne derece doğrulukta, kesinlikte, güvenilirlikte ve tekrar edilebilir nitelikte olduğunu belirlemek için ICH (ICH, 2005) ve USP (USP 30, 2006) yaklaşımları temelinde bazı değerlendirmeler yapılmıştır.

Öncelikle YPSK cihazının ve yöntemin performansını gösteren SUT uygulanmıştır. Bu testlerde N , R_s , TF , A_s , α ve k' gibi parametreler hesaplanmıştır. Analizler sırasında elde edilen kromatogram hesaplamaları YPSK cihazının bağlı olduğu bilgisayara yüklü olan Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak elde edilmiştir (**Çizelge 12**).

Çizelge 12. Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonlarının SUT sonuçları

Parametre	Chromolith® Performance RP-18e		Ascentis® Express C ₁₈		Tavsiye Edilen Değer
	AGO	IS	AGO	IS	
t_R (dk)	13.04	10.44	13.67	9.81	
N	8752	9192	17577	18233	>2000
T	1.46	1.29	1.04	1.18	<2
A_s	1.43	1.20	1.03	1.17	$0.95 < A_s < 1.2$
k'	3.11	2.29	4.25	2.77	$2 < k < 10$
%BSS(t_R)	0.19	1.00	0.22	1.12	<1
α	1.36		1.53		>1
R_s	5.25		10.98		>2

AGO ve IS'nin dedektör yanıtları pik alanlarının t_R değerine bölünmesiyle hesaplanan bir yöntem olan pik normalizasyon (PN) yöntemiyle yorumlanmıştır. Alet, ortam ve analizciden kaynaklanan hataların en aza indirilmeye hedeflenmesi doğrultusunda validasyon çalışmalarında AGO'nun değişen derişimlerine karşı IS'nin sabit derişimli bir çözeltisi kullanılmış, yani analitlerin PN değerleri IS'nin PN değerlerine oranlanmıştır. Sonuçlar doğrultusunda AGO'nun IS'ye göre bağıl t_R değerleri Chromolith® Performance RP-18e kolonda 1.25, Ascentis® Express C₁₈ kolonda ise 1.39 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 5'te sunulan karşılaştırmaya ek olarak, yapılan çalışmada test edilen analitik kolonların analit piklerinin t_R ve PN değerlerine ilişkin performans istatistikleri ise **Çizelge 13'**te verilmiştir.

ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen tavsiyeler üzerine AGO analizi için geliştirilen analitik yöntem için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kılavuz doğrultusunda doğruluk, kesinlik, doğrusallık, LOD, LOQ ve spesifiklik testleri yönetime uygulanmıştır.

Çizelge 13. AGO ve IS'nin farklı kolonlar ile standart çözeltilerde yapılan analizlerinde elde edilen sinyallerinin t_R kesinliklerinin karşılaştırması ($n=30$)

	Chromolith® Performance RP-18e		Ascentis® Express C ₁₈	
	AGO	IS	AGO	IS
t_R Ort.	13.05	10.44	13.67	9.81
t_R SS	0.02	0.10	0.03	0.11
t_R %BSS	0.22	1.00	0.19	1.12

Analitik bir metodun değerlendirilmesi, bileşimi güvenilir şekilde bilinen bir veya daha fazla standart numunenin analizi ile yapılabilmektedir. Ayrıca, standart numunelerin hem bileşim bakımından hem de analit konsantrasyonu bakımından analizi yapılacak numune ile benzer olması gerekmektedir. Numuneye standart ilave

edilmesi tekniği kullanılarak numuneye bilinen miktarda analit ilave edilerek ilave edilen miktarın geri kazanılma oranı ile metodun etkinliği ölçülebilir (Skoog ve ark., 1991). Bu bağlamda yöntemin doğruluğunu belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemine dayalı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. AGO dışındaki bileşenlerin yöntem ile yaptığı etkileşimi incelemek için bilinen derişimde AGO ve IS karışımı, önceden analiz edilmiş tablet çözeltilerine eklenmiş ve analiz edilmiştir. Geri kazanım verileri her bir örnek tipi için 3 farklı örnek çözeltilisine katılan 3 farklı derişimde analit içeren çözeltilerin 3'er kez analiz edilmesi ile elde edilmiştir. Eklenen çözeltilerdeki analit derişimleri düşük, orta ve yüksek standart katma uygulamalarında AGO için 4.11×10^{-6} M, 8.23×10^{-6} M ve 1.23×10^{-5} M derişimlerde eklenmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler doğrusallık çalışmaları sonucu elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonların kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar, numune bileşenlerinin analitlerin tayinine beklenenden olumsuz etki yapmadığını göstermektedir. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler **Çizelge 14**'te verilmektedir.

Çizelge 14 . Doğruluk çalışmalarının sonuçları (n=9)

	Eklenen (M)	Bulunan (M)	% Geri Kazanım	Ortalama Geri Kazanım
Chromolith® Performance RP-18e	4.11×10^{-6}	4.31×10^{-6}	104.9	101.96
	8.23×10^{-6}	8.22×10^{-6}	99.9	
	1.23×10^{-5}	1.24×10^{-5}	101.1	
Ascentis Express® C₁₈	4.11×10^{-6}	3.97×10^{-6}	96.6	100.26
	8.23×10^{-6}	8.45×10^{-6}	102.7	
	1.23×10^{-5}	1.25×10^{-5}	101.5	

Yöntemin kesinliği, tekrar edilebilirlik çalışmaları yardımıyla tayin edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında 4.11×10^{-7} M ($0.10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) derişime sahip AGO çözeltilisi kullanılmıştır. Bu çözeltili aynı gün içerisinde ve ardışık 3 gün süre ile belirlenen koşullarda Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonları ile art arda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların SS, BSS ve güven aralığı parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle geliştirilen yöntemin kesinlik yönünden analitik açıdan yeterli düzeyde olduğu görülmüştür. Kesinlik sonuçları standart çözeltiler için **Çizelge 15** ve **Çizelge 16**'da verilmiştir.

Çizelge 15. AGO standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının Chromolith® Performance RP-18e kolon kullanımında istatistiksel değerlendirmesi

	Gün İçi			Günler Arası (n=30)
	1. Gün (n=10)	2. Gün (n=10)	3. Gün (n=10)	
Ortalama	0.08396	0.08235	0.08417	0.08349
En Düşük Ortalama GA %95	0.08303	0.08157	0.08300	0.08291
En Yüksek Ortalama GA %95	0.08489	0.08313	0.08535	0.08407
SS	0.001301	0.001097	0.001643	0.001556
SEM	0.0004116	0.0003468	0.0005194	0.0002840
%BSS	1.55	1.33	1.95	1.86

Çizelge 16. AGO standart çözeltileri için kesinlik çalışmalarının Ascentis® Express C₁₈ kolon kullanımında istatistiksel değerlendirmesi

	Gün İçi			Günler Arası (n=30)
	1. Gün (n=10)	2. Gün (n=10)	3. Gün (n=10)	
Ortalama	0.07184	0.07166	0.07217	0.07189
En Düşük Ortalama GA %₉₅	0.07093	0.07086	0.071	0.07139
En Yüksek Ortalama GA %₉₅	0.07275	0.07245	0.07335	0.07239
SS	0.001271	0.001109	0.001639	0.001328
SEM	0.000402	0.0003507	0.0005184	0.0002425
%BSS	1.77	1.55	2.27	1.85

Yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 ve 5.00 µg.mL⁻¹ AGO (4.11x10⁻⁷ M – 2.06x10⁻⁵ M) ve 5.00 µg.mL⁻¹ sabit derişimde IS içeren çözeltiler hazırlanmış ve belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında da analizler gün içi ve günler arası olarak 3 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin en küçük kareler metoduyla değerlendirilmiş, buna göre eğim, kesim ve bu değerlerin SS ve r değerleri hesaplanmıştır. AGO için bu yöntemin belirtilen derişim aralığında doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert – Beer Yasası'na uyduğu görülmüştür. Yöntemin gün içi ve günler arası doğrusallığına ilişkin istatistiksel veriler Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonlarının kullanılmasıyla elde edilmiştir ve bu veriler **Çizelge 17 ve 18**'de verilmiştir.

Geliştirilen YPSK yöntemin LOD ve LOQ değerleri, kromatogramlardaki sinyal ve en yakın gürültü oranları kullanılarak hesaplanmıştır. Sinyal şiddetinin gürültüye oranının kullanıldığı hesaplamalar sonucu elde edilen oran değeri LOD için 3.3, LOQ için ise 10.0 ile çarpılmıştır. Bu şekilde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri AGO standart çözeltisi için doğrusallık tablolarında verilmiştir.

Çizelge 17. AGO standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin Chromolith® Performance RP-18e kolon ile istatistiksel değerlendirmesi

	Gün İçi			Günler Arası (n=30)
	1. Gün (n=10)	2. Gün (n=10)	3. Gün (n=10)	
Eğim	159076 ± 1095	150893 ± 814.1	148464 ± 772.2	152811 ± 1279
Kesim	0.01969 ± 0.01061	0.02555 ± 0.007892	0.02033 ± 0.007486	0.02186 ± 0.0124
r	0.999	0.999	0.999	0.999
Eğim GA %₉₅	156552 - 161601	149016 - 152770	146683 - 150244	150192 - 155430
Kesim GA %₉₅	-0.004782 - 0.04416	0.007351 - 0.04375	0.00307 – 0.0376	-0.003533 – 0.04725
LOQ (M)	3.75x10 ⁻⁷	3.71x10 ⁻⁷	3.76x10 ⁻⁷	3.74x10 ⁻⁷
LOD (M)	1.25x10 ⁻⁷	1.24x10 ⁻⁷	1.25x10 ⁻⁷	1.25x10 ⁻⁷

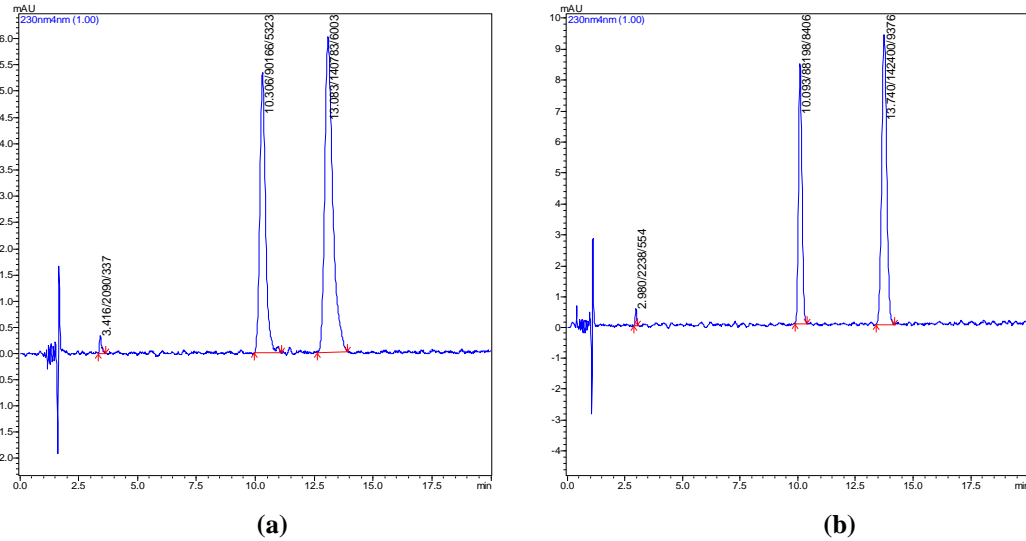
Analizi yapılacak numunenin yapısındaki ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme yeteneği olarak bilinen spesifikliğin belirlenmesi için numune analizleri farklı iki kolonla yapılmıştır.

Çizelge 18. AGO standart çözeltisi için gün içi ve günler arası doğrusallık analizinin Ascentis® Express C₁₈ kolon ile istatistiksel değerlendirilmesi

	Gün İçi			Günler Arası (n=30)
	1. Gün (n=10)	2. Gün (n=10)	3. Gün (n=10)	
Eğim	145887 ± 996.8	137891 ± 971.3	132235 ± 897.3	138671 ± 1424
Kesim	0.009555 ± 0.009663	0.02299 ± 0.009417	0.03034 ± 0.008699	0.02096 ± 0.01380
r	0.999	0.999	0.999	0.999
Eğim GA %95	143588 - 148185	135651 - 140131	130166 - 134305	135755 - 141587
Kesim GA %95	-0.01273 - 0.03184	0.001273 - 0.0447	0.01028 - 0.05040	-0.007305 - 0.04923
LOQ (M)	3.65x10 ⁻⁷	3.61x10 ⁻⁷	3.55x10 ⁻⁷	3.60x10 ⁻⁷
LOD (M)	1.22x10 ⁻⁷	1.20x10 ⁻⁷	1.18x10 ⁻⁷	1.20x10 ⁻⁷

Elde edilen kromatogramlardan hiçbirinde analit piklerine karşı olumsuz etki yaratan herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Bununla birlikte kromatogramlardaki AGO piklerinin saflıkları DAD ile kontrol edilmiş ve girişime sebebiyet veren bir madde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar kapsamında yeterli spesifikliğe sahip olduğu kabul edilmiştir.

Kararlılık çalışmalarında 6 ay boyunca saklanan ve analiz edilen çözeltilerin kromatogramlarında yapılan incelemelerde ilk 1 aylık çözeltilerde alıkonma zamanı ve alanlar yönünden bir farklılık gözlenmemiş olmakla birlikte uzun dönem bekleyen çözeltilerin analizlerinde ortalama 3.41 dk (Chromolith® Performance RP-18e) ve 2.98 dk (Ascentis® Express C₁₈) yakınlarında kromatogramlarda ilave bir pik ve AGO alanlarında artış tespit edilmiştir (**Şekil 12a-b**).

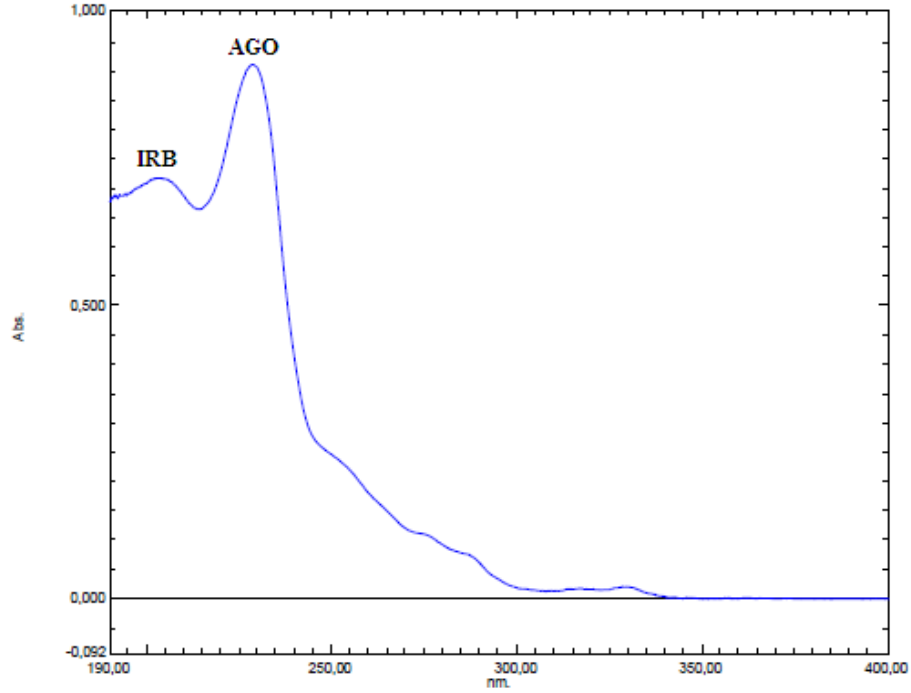


Şekil 12. 8.23×10⁻⁶M AGO standart çözeltisinin 6 aylık kararlılık kontrollerinde elde edilen kromatogramları: (a): Chromolith® Performance RP-18e, (b): Ascentis® Express C₁₈

Geliştirilen Yöntemlerin Numunelere Uygulanması

UV – görünür bölge spektrofotometrik yöntemin tabletlere uygulanması

AGO analizi için geliştirilen UV – görünür bölge spektrofotometrik yöntemi Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti çözeltisine uygulanmıştır. Tablet çözeltisi deneysel kısımda anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve 190.0 – 400.0 nm aralığında spektrumu alınmıştır. Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tabletinin spektrumu **Şekil 13**'te verilmektedir.



Şekil 13. IS ile karıştırılan Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tabletinin (2.06×10^{-6} M) 190.0 – 400.0 nm aralığındaki spektrumu

Elde edilen spektrumdan AGO'nun maximum dalga boyundaki A değerleri her biri için kalibrasyon denklemlerinde yerlerine konularak tabletteki AGO miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 19**'da verilmiştir.

Tablet analiz sonuçları, AGO analizi için geliştirilen UV – görünür bölge spektrofotometrik metodu kullanılarak maddenin tabletlerden yüksek verimle analiz edildiğini göstermektedir.

YPSK yönteminin tablet numunelerine uygulanması

Bu çalışmada geliştirilen YPSK yöntemiyle AGO'nun Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tabletlerinden analizleri yapılmıştır. Yöntemin numuneye uygulanması konusunda karşılaştırmalı sonuçlar elde ederek yöntemin numuneler üzerindeki spesifikliğinin gösterilmesi düşüncesiyle Chromolith® Performance RP-18e ile Ascentis® Express C₁₈ kolonları kullanılmıştır.

İlk çalışmalarda Chromolith® Performance RP-18e kolon kullanılmıştır. Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti çözeltisi daha önce deneysel kısımda bahsedildiği gibi hazırlanmıştır. 50.0 µL 1:10 oranında hareketli faz karışımı

ile seyreltilen tablet çözeltisine 50.0 µL IS eklenip yine hareketli faz çözeltisiyle 1.0 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin iyice karıştırılıp homojenizasyonu sağlandıktan sonra analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan bir örnek **Şekil 14-a**'da verilmiştir.

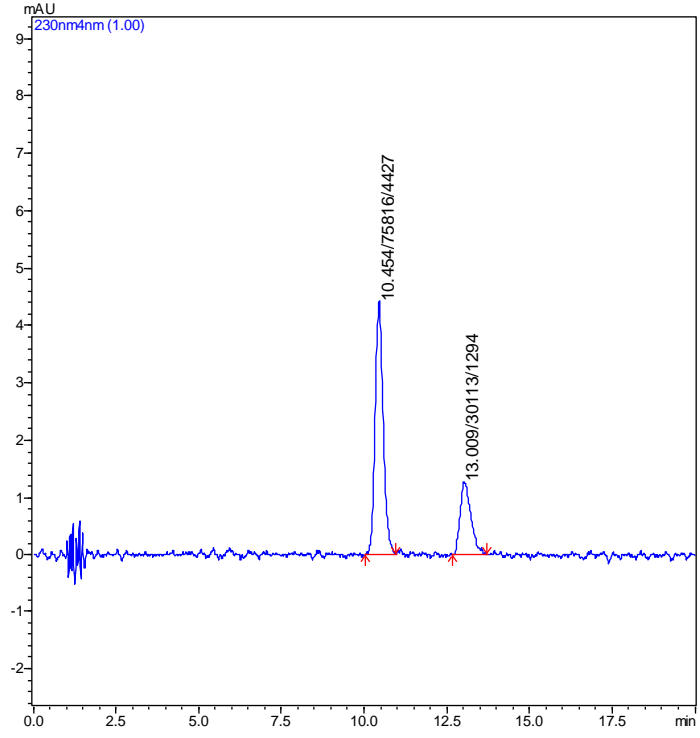
Aynı tablet çözeltileri aynı gün içinde Ascentis® Express C₁₈ kolon kullanılarak analiz edilmiş ve elde edilen kromatogramlardan bir örnek **Şekil 14-b**'de verilmiştir.

Analiz edilen 30 adet tablet çözeltisinden elde edilen kromatogramlardan AGO'nun IS'ye göre PN değerleri hesaplanmış ve bu PN değerleri yardımıyla AGO'nun doğrusalılık çalışmalarından elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak tabletlerdeki AGO miktarı her iki kolon için de hesaplanmıştır (**Çizelge 19**).

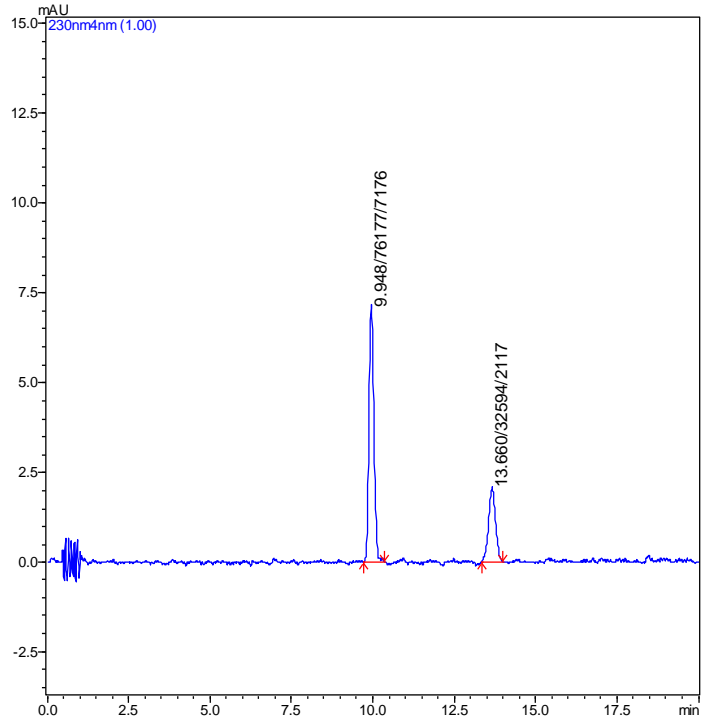
Çizelge 19. Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti analizlerinin sonuçları (n=30)

	Ascentis® Express C ₁₈	Chromolith® Performance RP-18e	UV – Görünür Bölge Spektrofotometrisi
Ortalama	25.07	25.12	25.31
Minimum	23.23	22.75	23.40
Maksimum	26.70	26.60	27.43
Yüzde İçerik	100.30	100.50	101.20
Standart Sapma	1.03	0.93	1.27
SEM	0.19	0.17	0.23
En Düşük Ortalama GA %95	24.69	24.77	24.83
En Yüksek Ortalama GA %95	25.46	25.47	25.78
Varyasyon Katsayısı	4.13	3.70	5.04

Yapılan örnek uygulama çalışmalarıyla deneysel çalışmalar sonlandırılmıştır. Sonuçlar, geliştirilen yöntemin örneklere kabul edilebilir düzeyde bir başarıyla uygulanabildiğini göstermektedir.



(a)



(b)

Şekil 14. Valdoxan® 25 mg (Servier İlaç ve Araştırma A.Ş.) ilaç tableti çözeltisinin analiziyle elde edilen kromatogramlar: (a): Chromolith® Performance RP-18e, AGO (2.06×10^{-6} M, 13.01 dk), IS (1.16×10^{-5} M, 10.45 dk), (b): Ascentis® Express C₁₈ (2.06×10^{-6} M, 13.66 dk), IS (1.16×10^{-5} M, 9.95 dk)

SONUÇ VE ÖNERİLER

AGO'nun literatürdeki kromatografik çalışmaları oldukça kısıtlıdır. YPSK ile tabletlerden AGO tayini için yeni bir yöntem geliştirilmesiyle literatürdeki yetersizliklerin tamamlanması ve diğer araştırmalar için kolay uygulanabilir bilimsel bir örnek teşkil etmesi hedeflenmiştir. Ek olarak yeni geliştirilmiş olan yüksek teknoloji ürünü kolonların analizlerde kullanılmış ve performanslarının karşılaştırılmış olması da bu alanda çalışan bilim insanlarının çalışmalarına destek verici niteliktedir. Chromolith® Performance RP-18e ve Ascentis® Express C₁₈ kolonların kullanımıyla geliştirilen bu yöntemdeki tablet sonuçları, evrensel bir yöntem olan UV – görünür bölge spektrofotometrisi ile yapılan analiz sonuçlarıyla da desteklenmiş ve bu kolonlarla elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu açıardan değerlendirildiğinde hem uygulama hem de kullanılan malzemeler açısından önemli veriler elde edilebilecek bir tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Dünya genelinde ve ülkemizdeki depresyonlu insanların sayısının çokluğu ve depresif ilaç maddelerin kullanımının artması yeni bir antidepresan bir ilaç molekülü olan AGO'nun analizini daha da önemli hale getirmektedir. AGO'nun farmasötik preparatlardan analizi için örnek hazırlama basamakları basit ve güvenilir analiz sonuçlarını içermesinin yanında tayin alt sınırı ve saptama sınırı değerlerinin düşük miktar olması ile kısa analiz süresi sayesinde de avantajlıdır. Kolay erişilebilir bir iç standarda sahip olan bu yöntemde kullanılan alet ve kimyasal maliyetlerinin de MS kullanılan yöntemlerle karşılaştırıldığında daha ucuz olmasından dolayı tercih edilebilir bir YPSK yönteminin geliştirildiğini söylemek mümkündür. Ayrıca gerçekleştirilen bu çalışma ile AGO'nun farmasötik preparatlardan tayini rutin kontrol laboratuvarları ve ilaç endüstrisinde güvenilir, başarılı, doğru ve hassas bir şekilde gerçekleştirilebilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile AGO'nun farmasötik preparatlardan rutin tayini için geliştirilmiş güvenilir, doğruluğu yüksek ve duyalı bir yöntem önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Audiot, V., Mailliet, F., Lahaye-Brasseur, C., Bonnaud, A., Le Gall, A., Amossé, C., New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 367, 553–561 (2003).

Autry, A. E., Monteggia, L. M., Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders, *Pharmacol. Rev.*, 64 (2), 238-258 (2012).

Can, N.O., HPLC determination of cefprozil in tablets using monolithic and C₁₈ silica columns, *J. Sep. Sci.*, 34(16-17), 2223–2231 (2011).

Can, N.O., Arlı G., J. AOAC, International, Reversed Phase HPLC Analysis of Levetiracetam in Tablets using Monolithic and Conventional C₁₈ Silica Columns, 93 (4), 1077-1085 (2010).

Chenu, F., El Mansari, M., Blier, P., Electrophysiological effects of repeated administration of agomelatine on the dopamine, Norepinephrine and serotonin systems in the rat brain, *Neuropsychopharmacology*, 38, 275-284 (2013).

Darmohrai, N. M., Investigation conditions of extraction of agomelatine by organic solvents, *MKEHA7*, 14(3), 40-43 (2012).

Delagrange, P., Boutin, J. A., Therapeutic potential of melatonin ligands, *Chronobiol Int*, 23, 413e8 (2006).

Demet, M., M., Taşkın, E. O., Deniz, F., Karaca, N., İçelli, İ., Manisa huzurevinde kalan yaşlılarda depresyon belirtilerinin yaygınlığı ve ilişkili risk etkenleri, *Türk Psikiyatri Derg.*, 13, 290-299 (2002).

Fornaro, M., Prestia, D., Colicchio, S., Perugi, G., A Systematic, Updated Review on the Antidepressant Agomelatine Focusing on its Melatonergic Modulation, *Curr Neuropharmacol*, 8(3), 287-304 (2010).

He, X., Ren, Z., Wang, J., Liu, J., Du, Y., Qiao, H., Determination of agomelatine by RP-HPLC, *HYZAE2*, 25 (2), 204-205 (2010).

http-1 European Medicines Agency, Questions and Answers on Recommendation for Refusal of Marketing Authorisation, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2009/12/WC500017305.pdf, (26.06.2013).

http-2 Novartis drops future blockbuster agomelatine, <http://www.scripintelligence.com/home/Novartis-drops-future-blockbuster-agomelatine-322880>, (10.06.2013).

http-3 Product Chemical Properties – Agomelatine, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.74141.html?rid=ed71d9ca-c5a4-4865-80fe-ff580506de3b>, (26.06.2013).

http-4 European Medicines Agency, CHMP Assessment Report for Valdoxan, http://www-ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/000915/WC500046226.pdf, (10.06.2013).

http-5 European Medicines Agency, Valdoxan: EPAR - Product Information http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000915/WC500046227.pdf, (26.06.2013).

International Conference on Harmonisation Expert Working Group, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2(R1). In: ICH Harmonised Tripartite Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (2005).

Li, Y., Yu, X., Wang, S., Determination of nickel in agomelatine by flame atomic absorption spectrometry, *ZYWCAH*, 15(10), 1414-1415 (2012).

Liu, Y., Chen, L., Ji, Y., Quantification and structural elucidation of potential impurities in agomelatine active pharmaceutical ingredient, *JPBADA*, 81-82, 193-201, (2013).

Millan, M. J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., et al, The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine 2C receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 306, 954e64 (2003).

Moffat, A.C., Osselton, M. D., Widdop, B., Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material, 4, 1493-1494, (2011).

Montgomery, S. A., Major depressive disorders: clinical efficacy and tolerability of agomelatine, a new melatonergic agonist, *ECNP*, 16, 633-638 (2006).

Nease, D. E. Jr., Malouin, J. M., Depression Screening: a practical strategy, *J Fam Pract*, 52 (2), 118-126 (2003).

Ning, M., HPLC method for separating and analyzing agomelatine intermediate and final product thereof, *Çin*, CN101206200 (2008).

Papp, M., Gruca P., Boyer P. A., Mocaer E., Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat, *Neuropsychopharmacology*, 28, 694e703 (2003).

Patil, S. R., Nerurkar, K. K., Kalamkar, A. M., Pukale, V., Mangaonkar, K. V., Pingale, S. G., Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study, *J. Mass. Spectrom*, 47, 23-28 (2012).

Racagni, G., Riva, M. A., Molteni, R., Musazzi, L., Calabrese, F., Popoli, M., Mode of action of agomelatine: synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptors, *World J. Biol. Psychiatry*, 12, 574-587 (2011).

Rahman, A., Patel, V., Maselko, J., Kirkwood, B., The neglected 'm' in MCH programmes—why mental health of mothers is important for child nutrition, *Trop. Med. Int. Health*, 13, 579-83 (2008).

Rainer, Q., Xia, L., Guilloux, J. P., Gabriel, C., Mocaër, E., Hen, R., Enhamrel, E., Gardier, A. M. and David, D. J., Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety, *IJNP*, 15, 321–335 (2012).

- Riedel, W. J., Klaassen, T., Griez, E., Honig, A., Menheere, P. P. C. A., Van Praag, H. M., Dissociable hormonal, cognitive and mood responses to neuroendocrine challenge: evidence for receptor-specific serotonergic dysregulation in depressed mood, *Neuropsychopharmacology*, 26, 358e67 (2002).
- Quera-Salva, M. A., Vanier, B., Laredo, J., Hartley, S., Major depressive disorder, sleep EEG and agomelatine: an open-label study, *IJNUFB*, 10, 691-696 (2007).
- San, L., Arranz, B., Agomelatine: A novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and serotonergic system, *EURPSY*, 23, 396-402 (2008).
- Shelton, R. C., The molecular neurobiology of depression, *Psychiatr. Clin. North Am.*, 30, 1–11 (2007)
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Analitik Kimya Temelleri, E., Kılıç, F., Köseoğlu, Bilim Yayıncılık, Ankara, 731–732, (1999).
- Srinivasan, V., Zakaria, R., Othman, Z., Lauterbach, E. C., Acuna-Castroviejo, D., Agomelatine in depressive disorders: its novel mechanism of action, *JNCNE7*, 24(3), 290-308 (2012).
- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Pathophysiology of depression: role of sleep and the melatonergic system, *Psychiatry Res.*, 165(3), 201-214 (2009).
- USP, The United States Pharmacopeia 23, National Formulary 18, General Chapter 1225, Validation of compendial methods, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1710–1612 (1995).
- USP, The United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25, System Suitability, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2287-2288 (2006).
- Wang, X., Li, C., Xie, C., Method for determining content of agomelatine by non-water titration, *Çin*, CN 102507705 (2012).
- Wang, Y., Zhang, G., Wang, D., Tao, W., Ge, W., Determination of agomelatine in tablets by HPLC, *ZXYAI*, 29 (7), 652-655 (2012).
- Zhou, G., Deng, C., Qiang, J., High performance liquid chromatography (HPLC) detecting method of agomelatine and intermediates as well as impurities, *Çin*, CN102539567 (2012).
- Zhu, Ji.-Q., Wei, W.-T., Dai, Y., Zhao, J., Zhang, D.-Z., Study on the polymorphs of agomelatine, *ZYHZEJ*, 22(6), 495-498 (2012).
- Zupancic, M., Guilleminault, C., Agomelatine: a preliminary review of a new antidepressant, *CNS Drugs*, 20(12), 98-105 (2006).

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6

Ord. No. 1.02129.0001

Batch No. UM6151

Rod No. UM6151/067

Date 16.05.2007

This batch of monolithic columns has successfully passed all production quality tests regarding our specifications for reproducibility

- a. Capacity Factor k
- b. Efficiency (Plate Number N/m)
- c. USP Tailing Factor (T_{USP})
- d. Selectivity (Separation Factors α)
- e. Chemical Stability

Test result for Anthracene

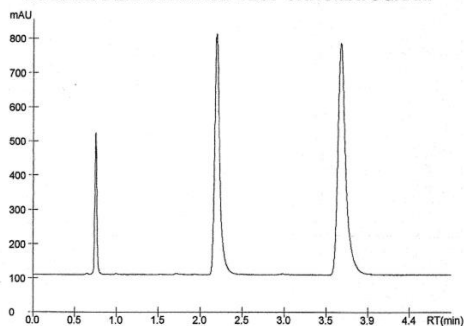
$k = 4.1$
 $N/m = 84854$
 $T_{USP} = 1.57$
 $\Delta p = 21 \text{ bar}$
 $\alpha (\text{Anthracene/Progesterone}) = 2.01$

Sample Components

1. Thiourea (10 µg/ml)
2. Progesterone (100 µg/ml)
3. Anthracene (10 µg/ml)

Dr. Hans D.J. Müller
Quality Assurance Production

COLUMN PERFORMANCE TEST CHROMATOGRAM



Test Conditions

Eluent: Acetonitrile/Water (60/40, v/v)
Flow Rate: 2 ml/min
Inj. Volume: 1 µl
Detection: UV 254 nm
Cell Volume: 13 µl
Temperature: ambient

This document has been produced electronically and bears no signature.

DIVISION Performance & Life Science Chemicals (PLS)
Certified Quality Management System
according to DIN ISO 9001



Merck KGaA · 64271 Darmstadt · Germany
Fax +49 (0)61 51 72 60 80
Website: www.chromatography.merck.de

EK 2 Supelco Ascentis® Express C₁₈ (100×4.6 mm, 2.7µm) kolon analiz sertifikası



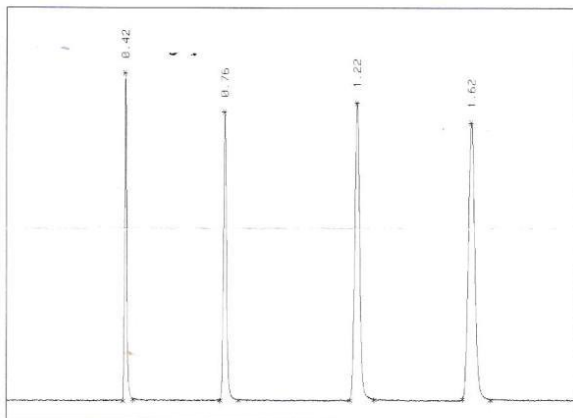
595 North Harrison Road
 Bellefonte, PA 16823-0048 USA
 Telephone 800-247-6628 • 814-359-3441
 Fax 800-447-3044 • 814-359-3044
 email: supelco@sial.com
 sigma-aldrich.com/supelco

SERIAL NO.: USPY003871
 COLUMN: Ascentis Express C18 10cm x 4.6mm
 PART NO.: 53827-U
 PACKING LOT NO.: S10041

TEST CONDITIONS:
 MOBILE PHASE = 60/40 ACETONITRILE/WATER
 PRESSURE = 230 bar
 FLOW = 1.8 mL/min
 LINEAR VELOCITY = 0.400 cm/sec
 TEMPERATURE = AMBIENT

PERFORMANCE RESULTS FOR TOLUENE (K' = 2.90)

PARAMETER	SPECIFICATION	COLUMN USPY003871
THEORETICAL PLATES	MIN: 22000	28853
USP TAILING FACTOR	MAX: 1.25	1.17
SELECTIVITY	RANGE: 1.37 - 1.57	1.50



QC Sample:
 Uracil (20 µg/ml)
 Acetophenone (30 µg/ml)
 4-Cl-Nitrobenzene (80 µg/ml)
 Toluene (2.40 mg/ml)

EK 3 Agomelatin standart maddesinin analiz sertifikası

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

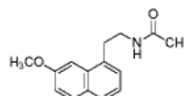
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Agomelatine - ≥98% (HPLC)

Product Number: A1362
Lot Number: 011M4710V
Brand: SIGMA
CAS Number: 138112-76-2
Formula: C₁₅H₁₇NO₂
Formula Weight: 243.30 g/mol
Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date: 28 FEB 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
> 20 mg/mL DMSO		
Elemental Composition	Pass	Pass
C ₁₅ H ₁₇ NO ₂		
Purity (HPLC)	≥ 97.5%	> 99.5%
HPLC Identity	Conforms	Conforms
co-elutes with the reference lot		

Brendan Nye, QC Team Leader
Quality Control
Natick, Massachusetts US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

EK 4 İrbesartan standart maddesinin analiz sertifikası



ULKAR KİMYA SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
59500 Organize Sanayi Bölgesi, Çerkezköy, Tekirdağ

ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000012 İrbesartan E.U.		
Üretici/Satıcı Firma	:-		
Analiz Tarihi	:20.11.2008	Miktar	:28,890 KG
SAP Batch No	:8L0008	Kontrol Parti No	:040000021251
Satıcı Batch No	:-		
		Son Kullanma Tarihi	:16.11.2013
Saklama Şartı	:İYİ KAPATILMIŞ KAPLARDA. 30°C'NİN ALTINDA SAKLANIR.		

ANALİZLER	SPEŞİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
GÖRÜNÜŞ	Beyaz veya beyazımsı, kristal toz.	0001 UYGUN Beyaz kristal toz.	USP Current Edition
POLİMORFİZM	Form A olmalı.	UYGUN Form A	Firma Spesifikasyonu
ÇÖZÜNÜRLÜK	Pratik olarak suda çözünmez. Etil alkolde ve metilen klorürde az çözünür.	0001 UYGUN Suda çözünmedi. Etanol ve metilen klorürde az çözündü.	USP Current Edition
TANIMA A-IR SPEKTRUM	IR spektrumu standarda uymalıdır.	0001 UYGUN Standart ile numune aynı pikleri verdi.	USP Current Edition
TANIMA B-HPLC	HPLC kromatogramı standarda uymalıdır.	UYGUN	USP Current Edition
SU	Max 0,50 %	0,34 %	USP Current Edition
AĞIR METAL	Max 0,002 %	0,002 %	USP Current Edition
KURUTMA KAYBI	Max 0,50 %	0,19 %	Firma Spesifikasyonu
BAĞIMLI MADDELER-İMPURİTE A	Max 0,20 %	0,00 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER-İMPURİTE B (1-[(2 '-C	Max 0,10 %	0,00 %	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.
BAĞIMLI MADDELER-TRİFENİL METANOL	Max 0,10 %	0,00 % Dedekte edilmedi.	USP Cur.Ed.-Firm.Sp.

SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	28.11.2008
AÇIKLAMA	Ka 28.11.2008		
ANALİZİ YAPAN Eda BAŞTARK Olcaş mer Alişahin 27.11.08	KONTROL EDEN Emre KALELİ 25.11.2008	ONAY Dursun Gam 28.11.2008	