



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİYOKOLŞİKOSİD TAYİNİNDE HIZLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (UPLC) YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Handan SEZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2010



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİYOKOLŞİKOSİD TAYİNİNDE HIZLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (UPLC) YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Handan SEZEN

Prof.Dr. Cevdet DEMİR
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2010

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Handan SEZEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 09/11/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Cevdet DEMİR
Danışman

Doç.Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

Prof.Dr. Hulusi MALYER

ÖZET

Bu çalışmada çok yaygın kullanıma sahip bir kas gevşetici olan 8 mg tiyokolşikosid içeren tablette çözünme hızı testi HPLC`den UPLC`ye transfer edilmiş ve metot validasyonu yapılmıştır. Çözünme hızı (dissolusyon) testi ilacın mide veya bağırsak ortamındaki performansının laboratuvar koşullarında incelenmesine imkan sağlayan önemli bir testtir. İlaç aktif maddesinin belli bir süre sonunda çözünen yüzde miktarı olarak sonuç verir. Analitik metot validasyonu, metodun güvenilirliğini kanıtlayan uluslararası bir zorunluluk ve aynı zamanda laboratuvarda kalite güvencenin önemli bir basamağıdır. Bu çalışmada öncelikle analitik metot UPLC`ye uyarlanmış ve validasyon parametreleri test edilmiştir. Çalışmalar sonucunda yeni çözünme hızı metodunun kesin, doğrusal, doğru, seçici ve stabil olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeni metot UPLC tekniğinin avantajları sayesinde zamandan ve çözelti kullanımından oldukça fazla tasarruf sağlamaktadır.

Anahtar sözcükler: Metot validasyonu, UPLC, Çözünme Hızı Testi, Tiyokolşikosid.

ABSTRACT

In this study the dissolution test of the 8 mg thiocolchicoside tablets which is a widely used muscle relaxant transferred from HPLC to UPLC and validated. Dissolution test is a fundamental analysis that gives the opportunity to examine a drug's performance in gastric or intestinal medium at laboratory conditions. This test gives the per cent of the dissolved amount of a drug's active after a certain time. Analytical method validation is an international necessity that proves the reliability of the method and also an important step of the quality assurance of laboratory. In this study first of all analytical method adapted to UPLC and then validation parameters performed. As established from the data, the new method is precise, linear, accurate, selective and robust, hence stands validated. Besides the new method reduces the consumption of solvents considerably and shortens the time of analysis.

Key words: Method validation, UPLC, Dissolution Test, Thiocolchicoside.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SEMBOL LİSTESİ	xi
GİRİŞ	1
1. KURAMSAL TEMELLER	2
1.1. Botanik Bilgi	2
1.2. Tiyokolşikosid Hakkında Bilgi	4
1.3. İlaç Endüstrisinde Çözünme Hızı Testi	5
1.3.1. Tarihçesi	6
1.3.2. Çalışma prensibi	9
1.4. Kromatografinin Tarihçesi	12
1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)	14
1.5.1. Çalışma mekanizması	15
1.5.2. Ayırma teknikleri	19
1.5.2.1. Normal faz HPLC	21
1.5.2.2. Ters faz HPLC	21
1.6. Hızlı Sıvı Kromatografi (UPLC)	22
1.7. Analitik Metot Validasyonu	27
1.7.1. Validasyonda kullanılan hesaplamalar	28
1.7.2. Sistem uygunluk testi	29
1.7.3. Tek tek analitik parametrelerin planı ve kabul kriterleri	29
1.7.4. Kesinlik	30
1.7.4.1. Tekrarlanabilirlik	30
1.7.4.2. Ortam kesinliği	31
1.7.4.3. Tekrar elde edilebilirlik	32

1.7.5. Doğrusallık.....	32
1.7.6. Düzeltme faktörü.....	33
1.7.7. Doğruluk	34
1.7.8. Uygulama aralığı.....	36
1.7.9. Tespit limiti	37
1.7.10. Hesaplanabilirlik limiti.....	38
1.7.11. Seçicilik.....	38
1.7.12. Yöntemin stabilitesi (Robustness)	39
1.7.12.1. Kromatografik ayırımın ve numune çözeltisi hazırlığının stabilitesi	39
1.7.12.2. Standart ve numune çözeltilerinin stabilitesi	40
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	41
2.2. Kimyasal maddeler	41
2.3. Hazırlanan çözeltiler	41
2.4. Yapılan analizler	41
2.4.1. Ön denemeler	41
2.4.2. Validasyon parametreleri	42
2.4.2.1. Seçicilik	42
2.4.2.2. Doğrusallık.....	42
2.4.2.3. Doğruluk	43
2.4.2.4. Kesinlik	43
2.4.2.4.1. Tekrarlanabilirlik.....	43
2.4.2.4.2. Ortam kesinliği.....	44
2.4.2.5. Uygulama aralığı.....	44
2.4.2.6. Yöntemin stabilitesi	44
2.4.2.7. Numune ve standart çözeltilerinin stabilitesi	44
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	45
3.1. Sistem Uygunluk Testi.....	45
3.2. Kesinlik	47
3.3. Doğrusallık.....	49
3.4. Doğruluk	51

3.5. Seçicilik.....	53
3.6. Yöntem Stabilitesi.....	55
3.7. Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitesi.....	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR	60
TEŞEKKÜR	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

KISALTMALAR DİZİNİ

- HPLC – Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPLC – Hızlı Sıvı Kromatografisi
LC-MS-MS – Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi- Kütle Spektrometresi
USP- Amerika Birleşik Devletleri Farmakopisi
FDA - Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
Psi- İnç kareye düşen pound
ppt - trilyonda bir kısım
 μm - Mikrometre
dp- Partikül boyutu
 c_i - ilgili safsızlığın içeriği
DL - ihmal edilebilir limit (disregard limit)
RSD- Relatif standart sapma
LOD- Tespit limiti
LOQ- Hesaplanabilirlik limiti
PDA -Photodiode array dedektör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.1. Colchicum alkaloidleri moleküler yapısı.....	3
Şekil 1.1.2. Güz çiğdemi	3
Şekil 1.2.1. Tiyoikşikosid molekölünün yapısı.....	4
Şekil 1.3.1.1. Benzoik asit ve kurşun kloritin çözüme hızı eğrisi.....	7
Şekil 1.3.2.1. Çözüme hızı test cihazı	10
Şekil 1.3.2.2. Çözüme hızı testi palet aparatı	11
Şekil 1.3.2.3. Çözüme hızı testi sepet aparatı	11
Şekil 1.5.1.1. HPLC çalışma mekanizması	15
Şekil 1.5.1.2. Kromatografik kolonun çalışması.....	16
Şekil 1.5.1.3. Piklerin çıkışı	17
Şekil 1.5.1.4. Tanımlama	18
Şekil 1.5.1.5. Tanımlama ve miktar tayini	18
Şekil 1.5.2.1. Analitin fonksiyonel grubuna göre kromatografik polarite spektrumu .	19
Şekil 1.5.2.2. Hareketli faz polarite spektrumu.....	20
Şekil 1.5.2.3. Sabit faz polarite spektrumu	20
Şekil 1.5.2.1.1. Normal faz kromatografisi.....	21
Şekil 1.5.2.2.1. Ters faz kromatografisi.....	22
Şekil 1.6.1. Van deemter grafiği	24
Şekil 1.6.2. Köprölü etil hibrid yapısı	25
Şekil 1.6.3. eCord teknoloji	27
Şekil 3.5.1. Blank kromatogramı	53
Şekil 3.5.2. Plasebo kromatogramı	53
Şekil 3.5.3. Standart çözelti kromatogramı	54
Şekil 3.5.4. Numune çözeltisi kromatogramı.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.1. Colchicum alkaloidleri	3
Çizelge 1.7.1.1. Çeşitli serbestlik dereceleri ve güvenilirlik düzeylerinde $t_{(1-P, n-1)}$ 'nin aldığı değerler	28
Çizelge 1.7.2.1. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği kabul kriterleri.....	29
Çizelge 1.7.3.1. Metot çeşidine göre değerlendirilecek performans kriterleri.....	29
Çizelge 1.7.4.1.1. Tekrarlanabilirlik kabul kriterleri	31
Çizelge 1.7.4.2.1. Ortam kesinliği kabul kriterleri.....	31
Çizelge 1.7.6.5.1. Doğrusallık kabul kriterleri.....	33
Çizelge 1.7.7.1. Doğruluk kabul kriterleri	36
Çizelge 1.7.8.1. Uygulama aralığı kabul kriterleri.....	37
Çizelge 1.7.12.2.1. Çözelti stabilitesi kabul kriterleri.....	40
Çizelge 3.1.1. Sistem uygunluk testi sonuçları	45
Çizelge 3.1.2. Kesinlik, doğrusallık ve doğruluk parametreleri özet sonuçları	46
Çizelge 3.1.3. Sistem uygunluk testi-enjeksiyon tekrarlanabilirliği tiyokolşikosid pik alanları.....	47
Çizelge 3.2.1. Kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik sonuçları.....	48
Çizelge 3.2.2. Kesinlik parametresi ortam kesinliği sonuçları.....	49
Çizelge 3.3.1. Doğrusallık sonuçları	50
Çizelge 3.3.2. Doğrusallık eğrisi.....	51
Çizelge 3.4.1. Doğruluk parametresi sonuçları	52
Çizelge 3.6.1. Yöntem stabilitesi sonuçları.....	55
Çizelge 3.7.1. Standart ve numune çözeltileri stabilite sonuçları	56

SEMBOL LİSTESİ

- N- Teorik plaka sayısı
R_S – Rezolusyon
 α - Seçimlilik faktörü
k- Kapasite faktörü
w- Pik genişliği
H- Pik yüksekliği
L- Kolon uzunluğu
 σ - Standart sapma
 \bar{x} - Ortalama değer
 Δ - Delta

GİRİŞ

Farmasotik geliştirme; terapötik bir kimyasalın tanımlanmasıyla, ilaç olarak sunulması ve rutin kullanımı arasında yer alan önemli bir aşamadır. Geliştirme çalışmaları laboratuvar ölçekli sentez aşamasından üretim boyutuna geçmek ve dozaj formunun belirlenmesi gibi birçok basamağı içermektedir. Analitik kimya bu aşamalardaki değişimlerin ürün kalite ve tutarlılığına olan etkilerini anlamada çok önemli bir role sahiptir. HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) bu amaçla kullanılan temel analitik tekniktir. Çok güvenilir ve yeterli bir teknik olmasına karşın geliştirilmeye açıktır (Wren ve Tchelitcheff 2006).

Van Deemter eşitliğinden kromatografik prosesin etkinliğinin partikül boyutu küçüldükçe arttığı bilinen bir gerçektir. Küçük partikül çapı teorik plaka yüksekliğini azaltmakta dolayısıyla ayırımın etkinliği artmaktadır. Standart HPLC'lerde partikül boyutu küçük kolonlar kullanmak yüksek basınca sebep olmaktadır. Yüksek basınca dayanıklı şekilde dizayn edilen UPLC (Hızlı sıvı kromatografisi) bu dezavantajları yok eden, analiz süresi ve çözelti kullanımını azaltan yeni bir tekniktir. (Nováková ve ark. 2006)

Tiyokolşikosid ağrı kesici ateş düşürücü etkileri olan bir kas gevşetici ajandır. Romatizmal, ortopedik ve travmatolojik hastalıkların ve kas spazmlarının tedavisinde kullanılmaktadır. İlaçta çözünme hızı testi kalite kontrol ve biyoeşdeğerlik çalışmaları kapsamında yapılmaktadır. Ayrıca ilaç geliştirme sürecinde de faydalı bilgiler sağlamaktadır. (Dokoumetzidis ve Macheras 2006)

Bu çalışmada HPLC ile yapılan tiyokolşikosid çözünme hızı testinin UPLC'ye transfer edilmesi ve metod validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

1.KURAMSAL TEMELLER

1.1. Botanik Bilgi

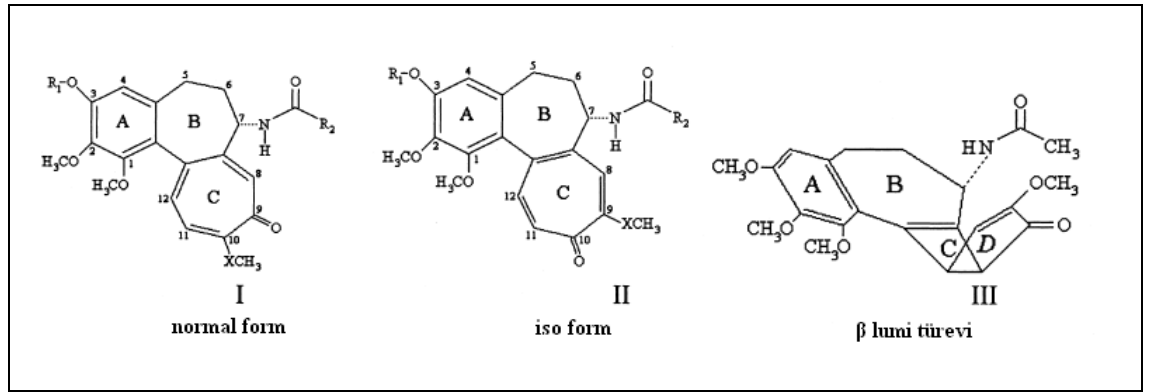
Colchicum autumnale L. (Liliaecae) türü orta ve güney avrupada yetişmektedir. Türkiye`de ise bulunmamaktadır. Bununla beraber *Colchicum* cinsinin Türkiye`de yayılışı saptanan 22 türü bulunmaktadır. (Davis P.H, 1984) Bu tür 10-30 cm yükseklikte otsu ve soğanlı bir bitkidir. Çiçekler sonbaharda yaprak ve meyvalar ise ilkbaharda meydana gelir. Çiçekler altı parçalı morumsu pembe renklidir. Meyva çok tohumlu bir kapsüldür.

Bitki zehirli alkaloid ve glikozidler taşımaları nedeniyle insanlar ve hayvanlar için tehlikelidir. Bitkinin tohumlarında yağ, reçine, tanen, şeker, bir glikozid ve alkaloidler bulunmaktadır. Toplam alkaloidlerin miktarı % 0.3-1.2`dir. Alkaloidlerin en önemlisi kolşisinidir. Bu alkaloid benzosiklo-heptano-tropolon çekirdeği taşır. Azot halkasının dışındadır. Tohumlarda aynı çekirdeği taşıyan diğer alkaloidlerde bulunmaktadır. Bunlar birbirlerinden çok az farklıdırlar. Bu alkaloidler azotu asetil ile bağlı olanlar ve bağlı olmayanlar gibi 2 büyük gruba ayrılabilirler. Bu nedenle çiğdem tohumu alkaloidleri nötral fenolik alkaloidler (kolşisin grubu alkaloidler) ve bazik alkaloidler (demekolsin grubu alkaloidler) sınıflandırılır. *Colchicum* alkaloidleri A, B, C, D, E, F ve U maddeleri olarak isimlendirilirler. Örneğin A maddesi colchicin, F maddesi ise demekolsini göstermektedir. Çiğdem tohumundan kolşikosid adı verilen bir glikozid izole edilmiştir. Hidroliz sonucunda glikoz ve dimetil kolşisini verir (Tanker, 1973; Baytop, 1974).

Kolşisin tarımda poliploidlerin eldesinde ve hücre bölünmesine engel olduğu için bazı tümörlerin tedavisinde kullanılmıştır. Ancak toksik bir madde olduğu için uygulama alanı bulamamıştır. Romatizma, artrit ve gut hastalıklarında etkili olan maddenin kolşikosid olduğu belirlenmiştir (Baytop 1974). *Colchicum* alkaloidleri ve glikozidleri Çizelge 1.1.1. 'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1.1. Colchicum alkaloidleri ve glikozidleri (Rosso ve Zuccaro 1998'den).

Bileşikler	R ₁	R ₂	X
Kolşisin	CH ₃	CH ₃	O
Kolşikosid	glukozil	CH	O
Tiyokolşisin	CH ₃	CH ₃	S
N-formyl-N-deacetyl tiyokolşisin	CH ₃	H	S
3 O-demethyl tiyokolşisin	H	CH ₃	S
Tiyokolşikosid	glukozil	CH ₃	S
N-formyl-N-deacetyl tiyokolşikosid	glukozil	H	S



Şekil 1.1.1. Colchicum alkaloidleri moleküler yapısı (Rosso ve Zuccaro 1998'den)

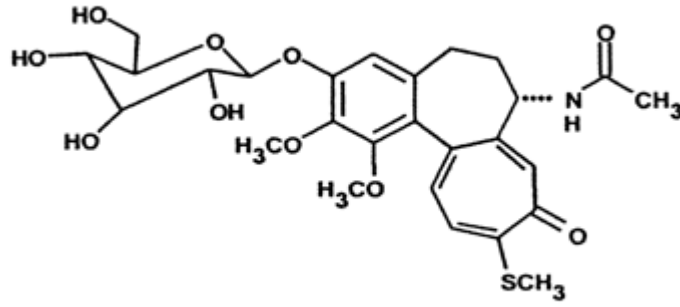
Formüllerdeki R₁, R₂ ve X'ler çizelge 1.1.1.' de verilmiştir.



Şekil 1.1.2. Colchicum autumnale L. (<http://www.cb garden.org/blog/index.php/tag/fall-lecture>, 2010)

1.2. Tiyokolşikosid Hakkında Bilgi

Tiyokolşikosid, güz çiğdemi bitkisinde doğal olarak bulunan bir glukozid olan kolşikosidin sentetik sülfür türevidir. (Sutherland ve ark. 2002) Spesifik bir gama-aminobütirik asit reseptörü inhibitörüdür. Farmakolojik olarak kas gevşetici etkiye sahip bir üründür. Merkezi sinir sisteminden kaynaklanan kasılmaları azaltır veya ortadan kaldırır. 4 ve 8 mg 'lık iki dozda üretilmektedir. Literatürde tiyokolşikosid ile ilgili bulunan kromatografik çalışmalar sınırlıdır. 1998 yılında yayınlanan bir çalışmada kolşisin familyasından olan alkaloidler ters faz HPLC ile belirlenmiştir. Tiyokolşikosid molekülünün yapısı şekil 1.2.1.'te görüldüğü gibidir.



Şekil 1.2.1. Tiyokolşikosid molekülünün yapısı (Sutherland ve ark. 2002'den).

Bu çalışmada gradient bir ters faz HPLC metodu geliştirilerek alkaloid karışımı analiz edilmiştir. (Rosso ve Zuccaro 1998)

Diğer bir çalışmada ise tiyokolşikosid plazma miktarının belirlenmesi için katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanan bir LC-MS-MS (Sıvı kromatografi-Kütle spektrometresi-Kütle spektrometresi) metodu geliştirilmiştir. 8 mg tiyokolşikosid alan gönüllü deneklerin plazma örneklerine metot uygulanmış ve çok düşük konsantrasyonlarda sonuçlar bulunmuştur. (0,3 ng/mL altında) Buradan tiyokolşikosidin vücuda alınmasından sonra çok hızlı bir şekilde metabolize olduğu tesbit edilmiş ve en büyük metaboliti olan 3-desmetiltiyokolşisin molekülünün plazmada miktarı belirlenebilecek bir konsantrasyonda olduğu ortaya çıkmıştır. (Sutherland ve ark. 2002)

2010 yılında yayınlanan bir çalışmada kombine diklofenak sodyum ve tiyokolşikosid içeren farmasotik bir üründe miktar tayini için spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiştir ve valide edilmiştir. Diklofenak sodyum için 5-30 µg/mL tiyokolşikosid için ise 10-60 µg/mL derişim aralığı Beer-Lambert yasasına uyum göstermiştir. (Sengar ve ark. 2010)

Diğer bir çalışmada kapsül formulu tiyokolşikosid içeren farmasotik bir üründe miktar tayini için iki farklı spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İlk metot tiyokolşikosidin 259.8 nm`de maksimum absorbands göstermesine dayanarak geliştirilmiştir. 2. metotda ise 249.8 – 269.8 nm arasında eğri altındaki alan yöntemiyle geliştirme yapılmıştır. Her iki yöntemde 5-50 µg/ml derişim aralığında Beer-Lambert yasasına uyum göstermiştir. (Joshi ve Gupta 2010)

Diğer bir çalışmada tiyokolşikosid ve ketoprofen içeren farmasotik üründe miktar tayini için yine 2 farklı spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İlkinde 1.türev yöntemi kullanılarak tiyokolşikosid için 233.0 nm, ketoprofen için 243.0 nm dalga boyu seçilmiştir. 2. yöntem olarak absorbands düzeltme yöntemi kullanılarak 372.0 nm ve 260.0 nm olmak üzere 2 dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. İlk dalga boyunda sadece tiyokolşikosid absorbands vermektedir. İkinci dalga boyunda ise her iki maddede absorbands vermektedir. İlk yöntemde tiyokolşikosid için doğrusallık aralığı 3-15 µg/ml iken ketoprofen için 12-60 µg/ml`dir. 2. yöntemde ise bu aralıklar sırasıyla 1-5 µg/ml ve 10-50 µg/ml olmaktadır. (Wankhede ve ark. 2010)

2010 yılında yayınlanan diğer bir çalışmada ise yine kombine tiyokolşikosid-lornoxicam içeren tablette miktar tayini için ters faz bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Hareketli faz olarak 45:55 oranında pH 7.3 tampon / metanol karışımı 1.5 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. İnertsil ODS C18 özellikte 250 mm boyunda 4.6 mm iç çaplı ve 5 µm partikül boyutlu kolon ile 290 nm dedektör dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiştir. Metot ilaç otoritesi kurallarına göre valide edilmiştir. (Bhavsar ve ark. 2010)

1.3. İlaç Endüstrisinde Çözünme Hızı Testi

İlaç kullanımında en yaygın dozaj formu tablet formudur. Bunun nedenleri arasında diğer formlara nazaran formülasyon stabilitesine ve kolay üretim prosesine sahip olması

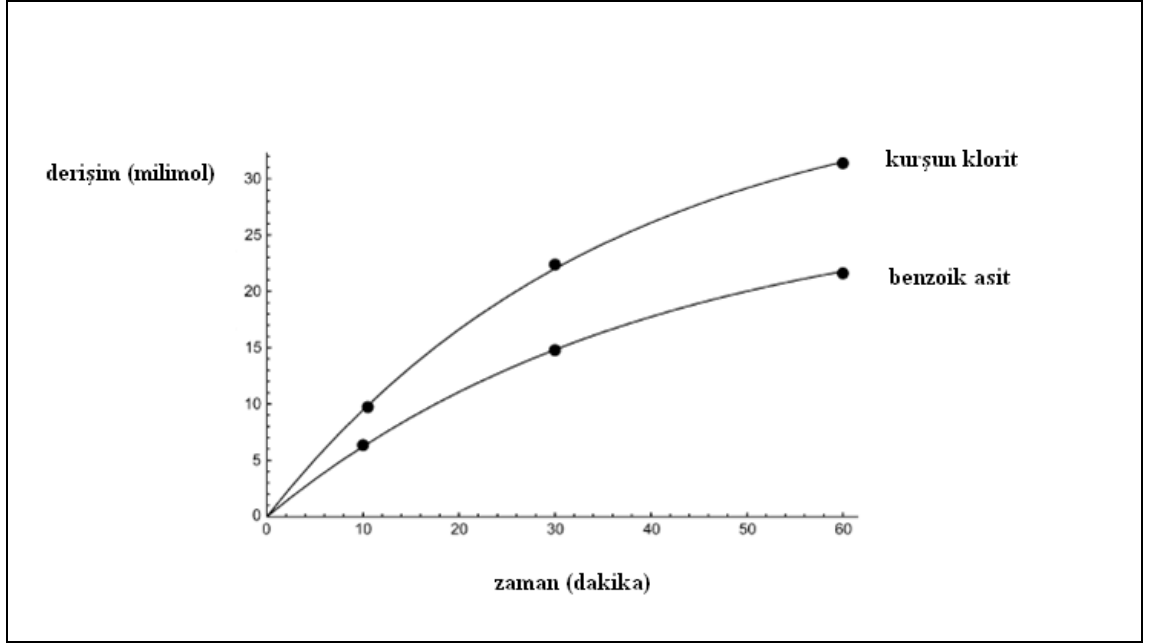
yer almaktadır. İlacın hastaya güvenli bir şekilde ulaşması gerektiğinden ilaçta kalite kontrol testleri çok önemlidir. Her ürün lotunun test edilmesi ve ürünün kalitesinin test sonuçlarına göre değerlendirilmesi gereklidir. Farmasotik endüstride tabletlerin salınımı yani çözünmesi güvenlik ve işlevselliğini kanıtlamak için yapılan en önemli testlerdendir. İlaç salınımı çözünme hızı (dissolusyon) testi ile ölçülmektedir. Çözünme hızı testinde, bir ortamda çözünen toplam ilaç etken maddesi miktarı zamanın fonksiyonu olarak ölçülür. (Paakkuna ve ark. 2009)

1.3.1 Tarihçesi

İlaçta katı formların geliştirilmesinden bu yana bir asır geçmesine rağmen yaklaşık 50 yıl öncesinde çözünme hızı testinin önemi bilim adamları tarafından farkedilmiştir. Bu arada 19.yüzyılın sonlarından itibaren çözünme hızı prosesi çalışmaları fizikokimyacılar tarafından geliştirilmekteydi. Bu konuda yapılan en temel araştırmalar ilaçla ilgili değildi, dolayısıyla ilaçta çözünme hızı gündeme geldiğinde çözünme hızı prosesinin temel yasaları mevcuttu. 1897 yılında profesör Noyes ile Whitney beraber ilk çözünme hızı deneylerini gerçekleştirdiler ve `Katı maddelerin kendi solusyonlarında çözünme hızı`adlı bir makale yayınladılar. (Noyes ve Whitney 1897) İki az çözünen bileşiğin benzoik asit ve kurşun kloritin çözünme hızı testini gerçekleştirdiler. Kullandıkları materyalleri cam silindirler içinde su içeren beherlere daldırdılar ve silindirleri sabit bir sıcaklıkta belli bir dönme hızına ayarladılar. Başlangıçtaki konsantrasyon ile doymuş çözeltinin konsantrasyonu arasındaki farkın çözünme hızı ile orantılı olduğunu gördüler. Bu durum matematiksel olarak gösterimi aşağıdaki gibidir. Eşitlikte dC/dt çözünme hızı, C başlangıç derişimi ve CS doymuş çözelti derişimidir. k değeri bir sabittir.

$$dC/dt = k (CS - C)$$

(1.3.1.1)



Şekil 1.3.1.1. Benzoik asit ve kurşun kloritin çözünme hızı eğrisi
(Dokoumetzidis ve Macheras 2006).

Bileşikler ortamı doyuracak miktardan daha fazla olduğundan çözünme hızı testi boyunca yüzeyleri sabit kalmıştır. Bu çalışma ile çözünme sırasında katı yüzeyinde ince bir difüzyon tabakasının oluştuğu ve moleküllerin bu tabakadan geçerek sulu ortama difüze olduğu gösterilmiştir.

Bir sonraki gelişme 1900 yılında Brunner ve Tolloczko tarafından gerçekleştirilmiştir. Yaptıkları bir dizi deney sonucunda çözünme hızının ayrıca yüzeye, karıştırma hızına, sıcaklığa, yüzeyin yapısına ve aparatın düzenine bağlı olduğunu göstermişlerdir. Eşitlik 1.2.1.1'i geliştirerek aşağıdaki eşitliği ortaya çıkardılar.

$$dC/dt = k_f S (C_S - C) \quad (1.3.1.2)$$

Burada S yüzey alanıdır. Bu çalışma Walther Nernst'in teorik çalışmasıyla beraber yayınlandı. 1904 yılında Nernst ve Brunner'in yaptığı bu yayının en önemli sonucu difüzyon tabakası oluşumuna ve Ficks'in 2. yasasına dayanan Nernst- Brunner eşitliğinin bulunmasıdır.

$$dC/dt = DS/Vh (C_S - C) \quad (1.3.1.3)$$

Eşitlikte D difüzyon katsayısı, h difüzyon tabakasının kalınlığı ve V dissolusyon ortamının hacmidir.

1931 yılında Hixson ve Crowell S değerini ağırlığa (w) göre ifade ederek $w^{2/3}$ değerine orantılı olduğunu gösterdiler. Böylece eşitliğin kompakt materyallere uygulanabilir olduğunu kanıtladılar. Buradan özetle aşağıdaki eşitliği buldular.

$$w_0^{1/3} - w^{1/3} = k_2 t \quad (1.3.1.4)$$

w_0 başlangıç ağırlığı ve k_2 sabittir.

Çözünme prosesinin fiziksel açıklaması için difüzyon tabakası modeli dışında 1950'lerde iki alternatif model daha geliştirilmiştir. Difüzyon yerine yüzeyler arası taşımayı esas alan bariyer modelinde yüksek aktivasyon enerji seviyesi ilk modele göre sınırlayıcı bir özelliktir. Danckwerts'in 1951`de ortaya attığı 3. modele göre devamlı yenilenen makroskopik solvent paketçikleri katı yüzeyine ulaşmakta molekülleri absorblamakta ve çözeltiye taşımaktadır. İn vitro çözünme hızı çalışmalarındaki gelişmelere rağmen farmasotik alanda kullanımı 1950`lerin başlarına kadar olmamıştır. O zamana kadar ilacın in vivo yararlanımını değerlendirmek için tabletin dezentegrasyonunun yeterli olduğu düşünölmekteydi. İlk resmi dezentegrasyon testi İsviçre farmakopisinde 1934 yılında yayınlandı. USP`de (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopisi) ise 1950 yılında 14.baskıda dezentegrasyon testine yer verildi. Ortam olarak 37 °C`de su kullanılmaktaydı. Daha sonraki yıllarda dezentegrasyon ortamı olarak daha gerçekçi koşullar örneğın simule gastrik sıvılar kullanıldı. 1948 yılında yayınlanan Filleborn`un metodu oldukça kapsamlıydı. İn vivo koşulları simule eden mide ortamı kullanmıştır. Çalışmasında belli pH`da besin maddesi varlığında peristaltik hareketleri taklit etmiştir. 1950`lerin başında ilacın fizyolojik yararlanımını değerlendirmek için sadece dezentegrasyon testinin yeterli olmayacağı anlaşılmıştır.

1951 yılında Edward, katı ilaç formlarının gastrointestinal sistemden absorplanması prosesinin hızlı olması durumunda çözünme hızının ilacın vücutta dağılımını kontrol eden bir basamak olduğunu belirtmiştir. Nelson ise 1957 yılında oral yoldan alınan teoflin tuzlarının kandaki seviyelerinin in vitro çözünme hızı testi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. 1960-1970 yılları arasında bu konuyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. 60`ların sonunda ürün formülasyonlarındaki farklılıkların ilacın cevap verme süresi ve şiddetinde büyük farklılıklara neden olacağı anlaşılmıştır. Bu esnada biyoyararlanım terimi bir ilactan farmakolojik olarak ne derece yararlanıldığını yada

başka bir deyişle bir dozun ne kadarının genel sirkülasyona katıldığını belirtmek için kullanılmıştır. 1971 yılında farklı formulasyonların serum digoxin seviyeleri incelenmiş ve birbirinden 7 kat farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu durum FDA` i (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi) harekete geçirmiş ve 1972 Amerika` sında piyasada bulunan 32 üreticinin 44 lot ürünü detaylı dissolusyon çalışmasına tabi tutulmuş ve aralarında büyük farklar olduğu tespit edilmiştir.

1970` lere gelindiğinde farmokopilerde tablet ve kapsül formları için dissolusyon testi gerekliliği yer almaya başlamıştır. 35 yıldır biyoyararlanım ve kalite kontrol amaçlı olarak dissolusyon testi gerçekleştirilmektedir. Bu gelişmelerin sonucu olarak 1970`de sepet yöntemi denilen USP aparat 1 ilk resmi dissolusyon test yöntemi olarak USP de yer almıştır. Daha sonra bunu 1978 yılında palet yöntemi (USP aparat 2) 1991 yılında uzun salınlı ilaçlar için inip çıkabilen silindir yöntemi (USP aparat 3) ve 1995 yılında akış geçiren hücre (USP aparat 4) izlemiştir (Dokoumetzidis ve Macheras 2006).

1.3.2 Çalışma prensibi

Çözünme hızı testi ürünün vücutta emilmeden önce başına gelen olayları vücut dışında taklit etmeye ve öngörmeye olanak verir. İlacın mide veya bağırsak ortamındaki performansının yapay koşullar altında doğrudan gözlemlenmesine olanak veren basit ve anlamlı bir yöntemdir. Çözünme hızı testinin sonucu belirli bir sürede belli zaman noktalarında ilaç aktifinin çözünen yüzde miktarı olarak raporlanır.

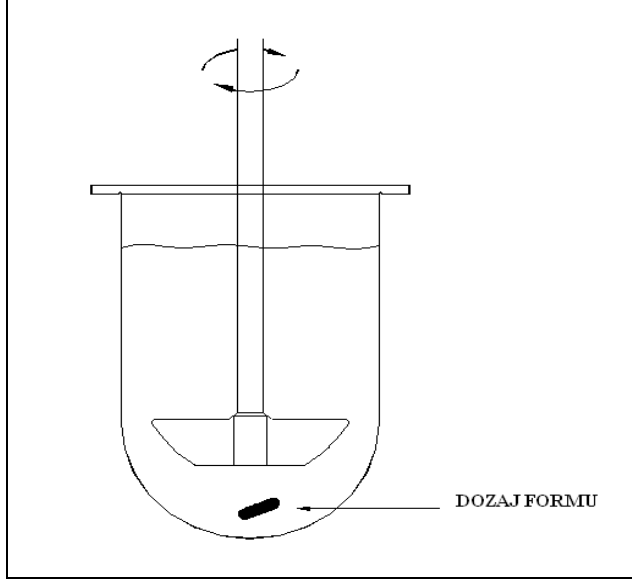
(http://www.tfd.org.tr/TFD_kongre_2007/tfd2007_14_Kayaalp.pdf)

Çözünme hızı test cihazı şekilde görülmektedir.

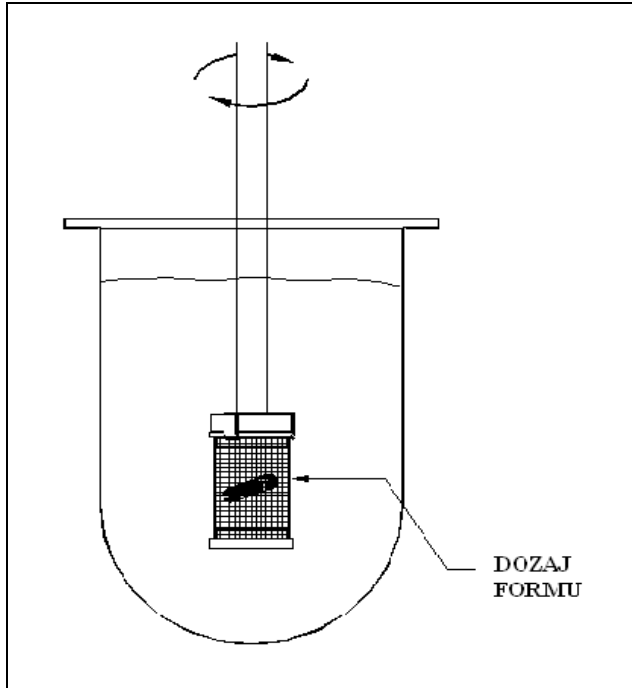


Şekil 1.3.2.1. Çözünme hızı test cihazı

Cam kaplar ürünün çözüneceği sıvıyı içermektedir. Karıştırma aparatı olarak USP de tanımlanmış çeşitlerden en yaygın kullanılanları şekil 1.2.2.2. ve 1.2.2.3. 'de görülmektedir.



Şekil 1.3.2.2. Çözünme hızı testi palet aparatı



Şekil 1.3.2.3. Çözünme hızı testi sepet aparatı

Test sonunda alınan numuneler spektrofotometrik yada kromatografik yollarla analiz edilir.

1.4. Kromatografinin Tarihçesi

21 mart 1903 tarihinde Tswett'in 'Adsorpsiyon olgusunda yeni bir kategori ve biyokimyasal analize uygulamaları' başlıklı konferansı günümüzde en çok kullanılan kromatografik teknik olan sıvı kromatografinin başlangıç noktası sayılmaktadır. (Tswett 1903) Kromatografi ile ilgili yayınladığı en önemli makalede klorofilleri kromatografik yolla ayırmış ve kromatogram terimini tanımlamıştır. Daha sonra 25 yıllık bir durgunluk sürecinin ardından organik kimyacıların doğal ürünlere olan ilgisinin artması ile kromatografi yeniden keşfedilmeye başlanmıştır.

Kromatografinin öneminin artmasıyla bu konuda daha fazla çalışma yapılmaya başlanmış ve kromatografi olayının açıklamada denge teorisini uygulayan ilk teorik yaklaşımları içeren yayınlar basılmıştır.

Tswett'in günümüzde normal faz kromatografi olarak adlandırılan tekniği suda çözünen analitlerin ayrılması söz konusu olduğunda başarılı olamamaktaydı. Bu durum 1941 yılında dağılma kromatografisi yani sıvı-sıvı kolon kromatografisinin Martin ve Synge tarafından keşfine neden oldu. Yayınladıkları çalışmada teorik plaka yüksekliği terimini kullanmışlardır. Ayrıca bu çalışmada hareketli fazın gaz da olabileceğinden bahsedilerek gaz-sıvı kromatografisinin temelleri atılmıştır. Kolon kromatografisi yaygın bir şekilde kullanılmamıştır. Bunun sebebi muhtemelen sabit fazın hareketli faz tarafından fiziksel olarak sürüklenmesi ile metodun stabil olmamasıydı. Martin ve meslektaşları ayrıca ilk mikro analitik teknik olan kağıt kromatografisinde geliştirmişlerdir. İnce tabaka kromatografisinin doğmasıyla yavaş bir teknik olan kağıt kromatografisi gözden düşmüştür. Cam plaka üzerine ince bir tabaka halinde adsorbent uygulanması ile yapılan bu teknik Rusya'da keşfedilmiştir. Daha sonraları ince tabaka kromatografisi organik ve farmasotik laboratuarlarda standart bir analitik teknik olarak yerini almış ve kolaylığı ve hızı nedeniyle tam olarak diğer metotlarla yer değiştirmemiştir. Dezavantajlarına karşın kalitatif ve yarı kantitatif çalışmalar için kullanılmaya devam etmektedir. Gaz kromatografisinin petrokimya ile eş zamanlı

yükselmesiyle birlikte kromatografik prosesin teorik tanımına ve fizikokimyasal özelliklerine kinetik bakış açısıyla yaklaşmıştır. Difüzyon etkisi, denge koşullarında kütle transferine gösterilen direnç ve kolonda moleküllerin rastgele ilerlemesi gibi durumlar tanımlandıkça van Deemter eşitliği ortaya çıkmıştır. Bu eşitlik, kromatografik kolonun etkinliğine moleküller arası difüzyon, hareketli fazın akış hızı, sabit faz kalınlığı gibi özelliklerin nasıl etki ettiğini tartışmamıza olanak sağlamaktadır. Bu dönemde bilim adamları enstrümantal sıvı kromatografi üzerine araştırmalar yapmaya başlamışlardır. İlk önceleri yüksek basınçlı sıvı kromatografi olarak adlandırılan teknik daha sonra yüksek performanslı sıvı kromatografi adını almaya başlamıştır. Çünkü kromatografik prosesin performansını etkileyen daha küçük partiküller ve daha kısa kolonlar kullanılmaya başlanmıştır. HPLC kısaltmasıyla modern enstrümantal sıvı kromatografiler en yaygın kullanılan teknik haline gelmiştir.

Horváth ve arkadaşları 1966 yılında Roma'daki kromatografi sempozyumunda nükleotitlerin ayrılmasında iyon değiştiricilerin kullanılmasından ilk kez bahsetmişlerdir. (Horváth ve ark. 1967)

Kromatografi ve HPLC konularında araştırmalar ve sempozyumlar son hızıyla sürmeye devam ediyordu. 1970'lerin başında HPLC'nin bu derece ilerleyeceği tahmin edilememekteydi . Ancak gaz kromatografi ile organik bileşiklerin % 20'sinden daha azının ayrılabilmesi de biliniyordu. Sıvı kromatografide sabit ve hareketli faz çeşitliliği ve iki fazın da ayırma aktif olması büyük bir seçicilik potansiyeli sağlamaktadır. Bununla birlikte, önceleri daha büyük partiküller mevcut iken daha küçük silika partiküllerin geliştirilmesi ve kimyasal olarak modifiye edilmiş sabit fazların kullanımı HPLC dünyasında önemli bir adım olmuştur. Ters faz sistemler sulu ortamdan direkt enjeksiyon yapılabilmesini sağlamıştır. Kolonlar oldukça stabil ve seçiciydiler fakat kuvvetli bazik analitlerin ayrılmasında sorun oluşturabiliyorlardı. Ters faz kromatografide hareketli faz optimizasyonu oldukça kolaydır çünkü genellikle sulu ya da organik faz oranını değiştirmek işe yaramaktadır. Sabit fazın veya analitin özelliklerini iyileştirmek de pH değerini değiştirmek ya da değişik ajanlar ilave etmek gibi yollarla gerçekleştirilebilmektedir. Günümüzde partikül kimyasındaki gelişmeler sayesinde yüksek etkinlik sağlanabilmektedir.

Farmasotik kimyanın ihtiyaçları HPLC'nin gelişiminde itici güç olmuştur. Farmasotik ürünlerin kalitesi HPLC analizlerinin kalitesi ile belirlenmektedir.

Kolonların seçiciliği ve etkinliği yalnızca aktif madde ve ilgili bileşiklerinin ayrılması ve belirlenmesinde değil aynı zamanda ekipman kalite ve güvenilirliğinde de ön koşuldur. Avrupa farmakopisinde yer alan analiz gereklilikleri ancak HPLC yöntemi ile sağlanabilmektedir.

HPLC, analitik kimyada son 40 yılın en büyük buluşudur. Laboratuvar cihazları arasında terazi ve pH metrelerden sonra HPLC cihazları 3. sırayı almaktadır.

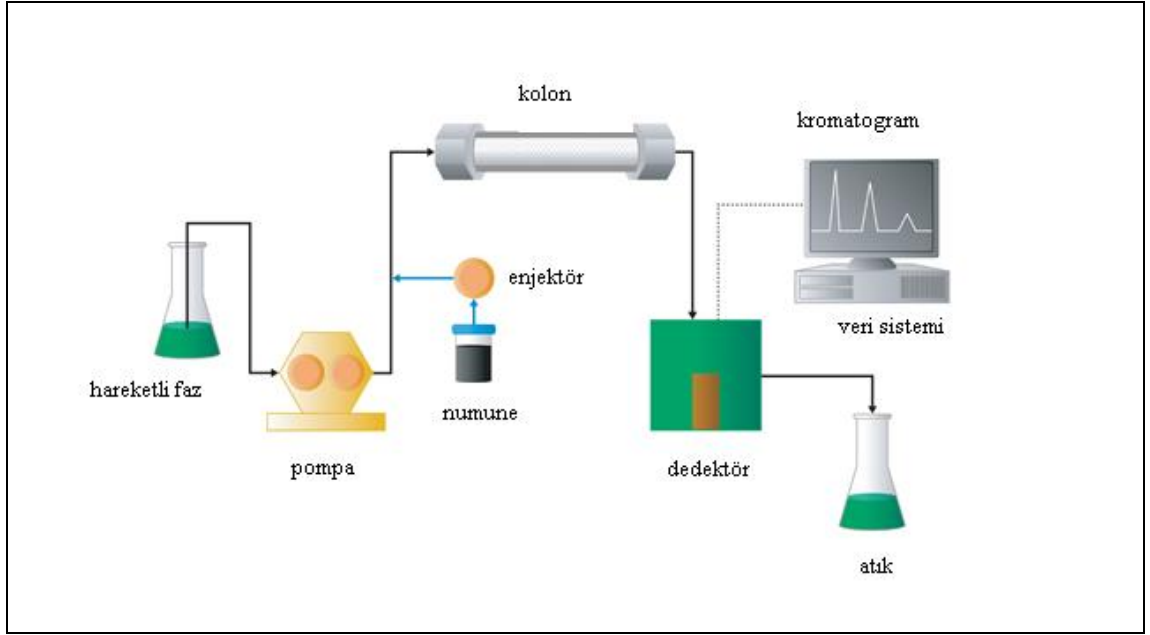
(Engelhardt 2004)

1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

1970'lerde Prof. Csaba Horváth tarafından kullanılan HPLC kısaltması sıvı kromatografide gereken akışı sağlamak için yüksek basıncın kullanıldığını işaret etmekteydi. Başlangıçta pompaların sadece 500 psi (inç kareye düşen pound) [35 bar] basınç kapasitesi vardı. Bunlara yüksek basınçlı sıvı kromatografisi deniliyordu. 1970'lerin başında teknolojiye büyük gelişmeler oldu. Yeni HPLC cihazları 6,000 psi [400 bar] basınca kadar çıkabiliyordu ve gelişmiş enjektör, dedektör ve kolonlarla donatılmıştı. HPLC 1970'lerin orta ve sonlarında önemli bir yer edindi. Bu süreçte performanstaki gelişmelerin (daha küçük partiküller, daha yüksek basınç) devam etmesiyle HPLC kısaltması aynı kaldı fakat ismi yüksek performanslı sıvı kromatografi oldu.

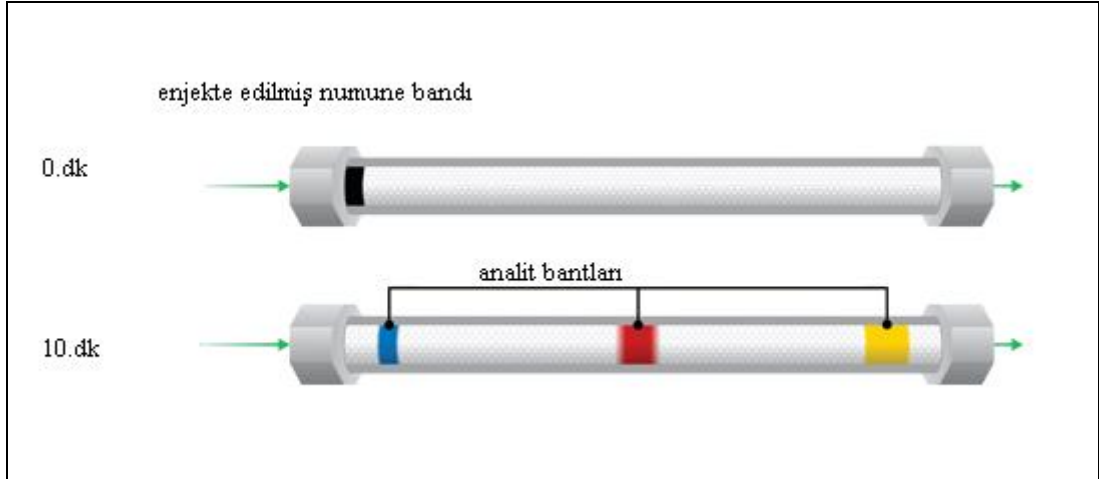
Yüksek performanslı sıvı kromatografi günümüzde analitik kimyanın en önemli araçlarından biridir. Sıvıda çözünebilen herhangi bir numunedeki bileşenleri ayırma, tanıma ve miktarını belirleme kapasitesine sahiptir. Günümüzde ppt (trilyonda bir kısım) seviyesinde eser konsantrasyona sahip bileşikler bile kolayca tanımlanabilmektedir. HPLC farmasötik, gıda, kozmetik, çevre ve endüstriyel gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

1.5.1. Çalışma mekanizması



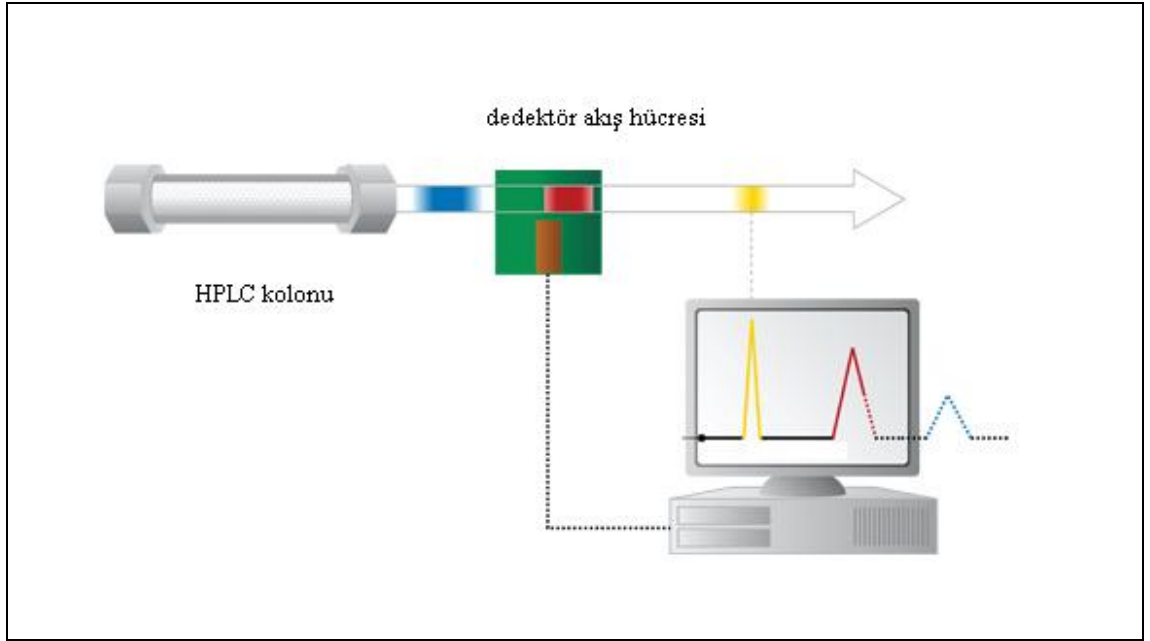
Şekil 1.5.1.1. HPLC çalışma mekanizması

Şekil 1.5.1.1. den bir numunede bulunan bileşiklerin ayrımının nasıl gerçekleştiği kolayca anlaşılabilir. Hareketli faz kolona soldan girer partikül yatağı boyunca geçer ve sağdan kolonu terk eder. Şekil 1.5.1.2. 'te enjeksiyon anındaki kolon görülmektedir. Burada numune sarı, kırmızı ve mavi boya bir karışımıdır ve siyah bir band şeklinde kolon girişinde görülmektedir. Birkaç dakika sonra her bir bileşen farklı hızlarda hareket eden bantlara ayrılmaktadır. Çünkü her bir analiti çekmek için mobil faz ile sabit faz arasında bir yarış söz konusudur. Sarı renkli bandın en hızlı hareket eden olduğu ve kolondan çıkmak üzere olduğu görülmektedir. Bu bileşen hareketli faz ile daha çok etkileşim içine girmiştir. Bu yüzden mobil fazın hızına yakın bir hızda hareket etmiştir. Mavi boya bandı sabit faz ile daha çok etkileşime girmiştir. Dolayısıyla kolonu en son terk etmiştir. Her bir bileşen farklı hızlarda hareket ettiğinden kromatografik olarak ayrılabilirler.



Şekil 1.5.1.2. Kromatografik kolonun çalışması

Ayrılan bileşenler kolondan çıktıktan hemen sonra dedektöre gelirler. Dedektör her bir ayrılmış bileşeni hareketli faz referansına karşı dedekte eden bir akış hücresine sahiptir. Uygun bir dedektör her bir bileşenin varlığını algılayabilecek hassasiyete sahiptir ve bileşene karşılık gelen elektriksel sinyali bilgisayar data sistemine göndermektedir. Dedektör analiz edilmek istenen maddenin karakteristik ve konsantrasyonuna göre seçilir. HPLC sisteminde oluşan kromatografik ayrımı temsil eden grafiğe kromatogram denilmektedir. Data sistemi tarafından zamana karşılık oluşan piklerin grafiği çizilir. Her bir pik farklı bir bileşen için dedektörün cevabını temsil etmektedir.



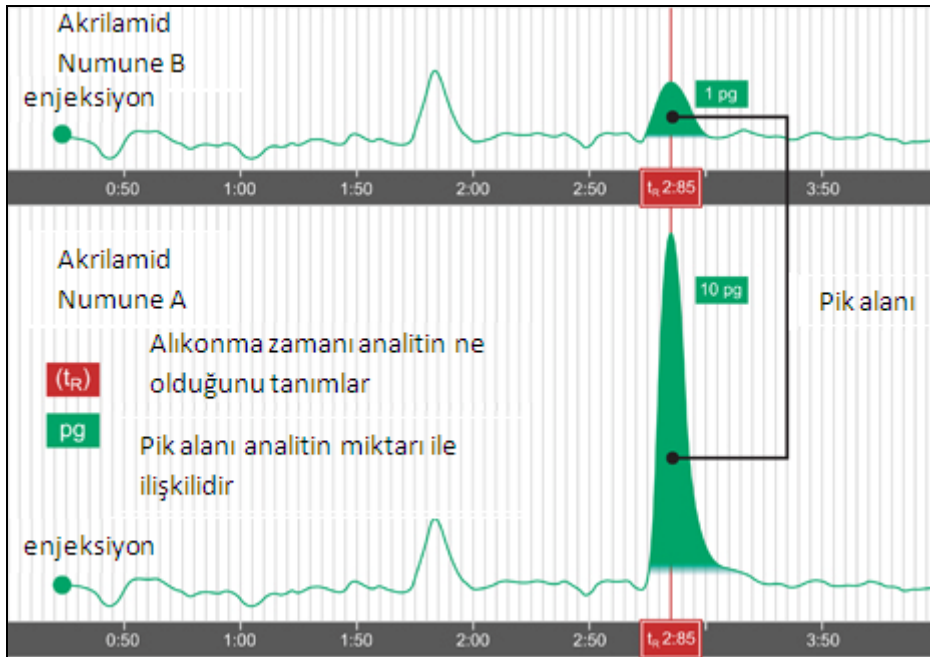
Şekil 1.5.1.3. Piklerin çıkışı

Kolonda ayrılan bir bileşen dedektör akış hücresinden geçmeye başladıktan sonra oluşan elektriksel sinyal data sisteme gönderilir ve ekranda sonuç kromatogram görünmeye başlar. Kromatogram numune enjekte edilir edilmez düz bir çizgi olarak başlar. Bu çizgiye baseline denir ve dedektör akış hücresinden sadece saf hareketli faz geçtiği anları temsil etmektedir. Bileşen akış hücresinden geçtikçe daha güçlü bir sinyal data sisteme gönderilir. Numune karışımındaki analitin konsantrasyonuna bağlı olarak bir pik oluşur. Analit tamamen akış hücresinden geçtikten sonra sinyal tekrar baseline seviyesine döner. Numunedeki analitler sabit faz ve mobil fazla etkileşimlerine göre kolonu önce yada sonra terk ederek dedektöre giderler ve bir kromatogram oluştururlar. Aynı sisteme enjekte edilen referans standart ve numune kromatogramlarından her bir pik alıkonma zamanlarını karşılaştırarak bileşenler kalitatif olarak tanımlanabilmektedir.



Şekil 1.5.1.4. Tanımlama

Tanıma işleminden sonraki önemli adım numunede ne kadar analit olduğudur. Dedektör sinyali analit konsantrasyonuna karşılık gelmektedir. Bir analit ne kadar konsantre ise sinyali o kadar büyüktür .



Şekil 1.5.1.5. Tanımlama ve miktar tayini

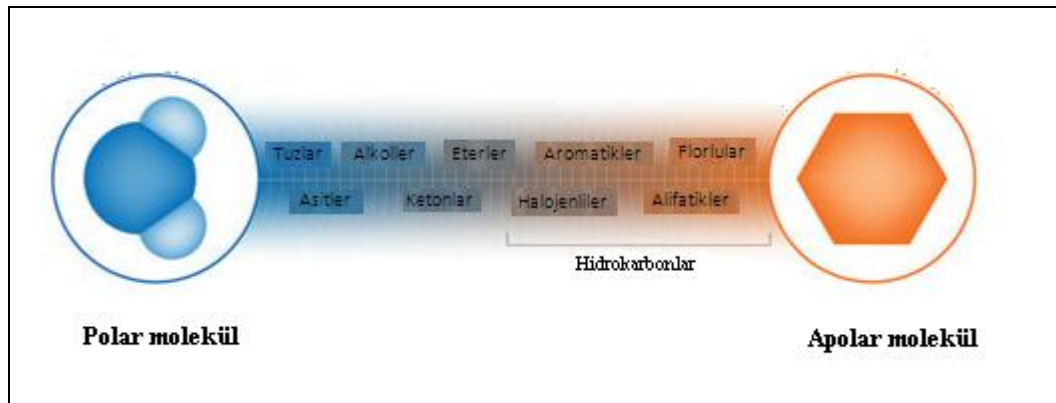
Bir pikin altında kalan alan o bileşenin konsantrasyonunun ölçütüdür. Bu alan değeri data sistemi tarafından otomatik olarak hesaplanır. Referans standart pikinin verdiği alan değerinden numune konsantrasyonu hesaplanır. (Skoog ve ark. 2007)

1.5.2. Ayırma teknikleri

Genelde kimyasal bileşiklerin üç temel karakteristiği kromatografik ayrımı gerçekleştirmektedir. Bunlar

- Polarite
- Elektriksel yük
- Moleküler büyüklük

Bir molekülün yapısı, aktivitesi ve fizikokimyasal karakteristiklerini bileşiği oluşturan atomlar ve arasındaki bağlar belirlemektedir. Bir molekülde bileşiğin özelliklerini belirleyen belli atomların spesifik yerleşimlerine fonksiyonel grup denir. Bu yapı genellikle bileşiğin polar ya da apolar olduğunu göstermektedir. Organik moleküller temel fonksiyonel gruplarına göre sınıflara ayrılmaktadır. Polariteye dayanan bir ayırma farklı moleküllerin relatif alıkonma zamanlarını daha çok bu fonksiyonel gruplar belirlemektedir.

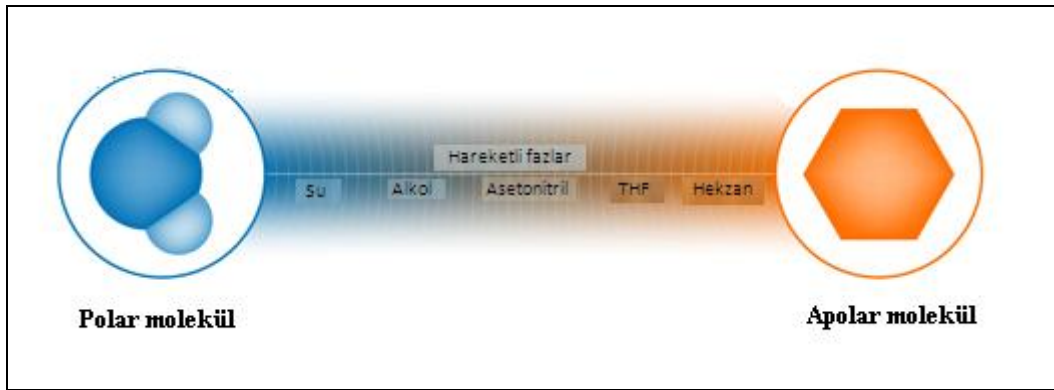


Şekil 1.5.2.1. Analitin fonksiyonel grubuna göre kromatografik polarite spektrumu

Su (yüksek dipol momentli küçük bir molekül) polar bir bileşikken aromatik bir hidrokarbon olan benzen apolar bir moleküldür. Benzer polariteye sahip moleküller

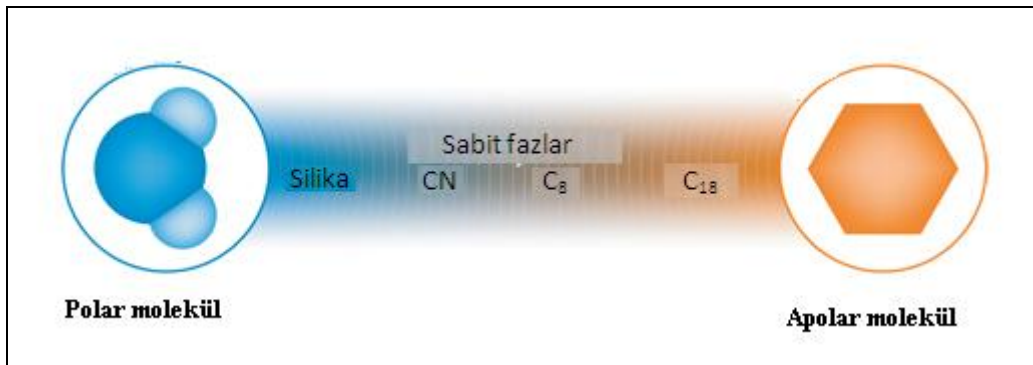
birbirleriyle etkileşime girmeye yatkındırlar. Farklı polariteye sahip olanlar ise çok daha az etkileşim içindedirler. Benzer benzeri çeker ilkesi polariteye dayanan kromatografinin temelini oluşturur.

Farklı polariteye sahip sabit ve mobil faz seçerek numunede var olan bileşikler arasında bir yarış gerçekleştirilmektedir. Sabit faz polaritesine yakın bileşenler partiküllerle daha güçlü etkileşim içinde oldukları için kolonu daha geç terk ederler. Aynı şekilde mobil faz polaritesine yakın polariteye sahip olanlar ise daha hızlı hareket ederler.



Şekil 1.5.2.2. Hareketli faz polarite spektrumu

Şekil 1.5.2.2. `deki skala genellikle kullanılan solventleri relatif kromatografik polaritelerine göre göstermektedir.



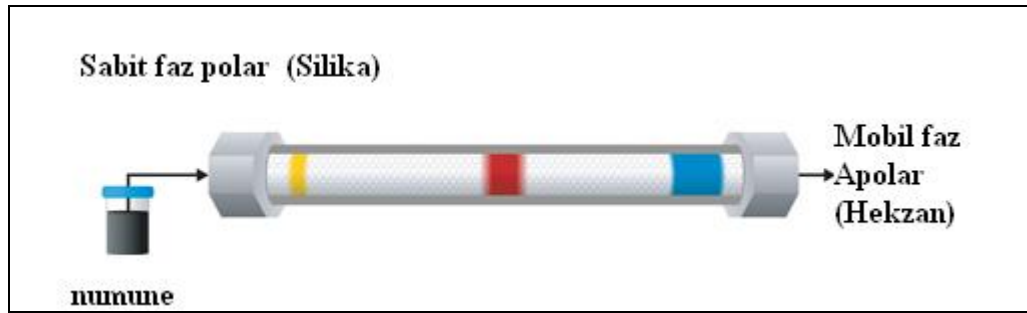
Şekil 1.5.2.3. Sabit faz polarite spektrumu

Silika, asidik silanol grupları içeren aktif, hidrofilik (suyu seven) bir yüzeye sahiptir. Skalının polar ucunda yer almaktadır. Silika yüzeyin polaritesi daha az polar grupların bağlanmasıyla modifiye edilebilmektedir. Şekildedeki görüldüğü gibi polariteyi düşürmek için cyanopropylsilyl- [CN], n-octylsilyl- [C8] ve n-octadecylsilyl- [C18, ODS], gibi fonksiyonel gruplar yüzeye bağlanabilir. C18 hidrofobik (su sevmeyen) apolar bir gruptur.

Analizci numune için en iyi sabit ve mobil faz kombinasyonunu seçmelidir.

1.5.2.1 Normal faz HPLC

Tswett bitki ekstraktlarını ayırırken polar sabit faz ve daha az polar bir mobil faz kullanmıştır. Bu klasik mod normal faz olarak adlandırılmıştır. (Tswett 1906)

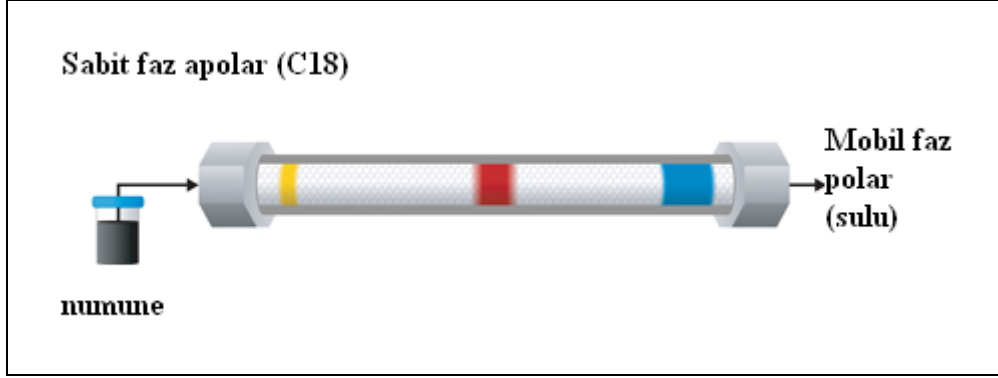


Şekil 1.5.2.1.1. Normal faz kromatografi

Şekil 1.5.2.1.1. bir normal faz kromatografik ayrımı temsil etmektedir. Sabit faz silika iken mobil faz % 100 organik olup su içermemektedir.

1.5.2.2 Ters faz HPLC

Ters faz terimi normal fazdaki durumun tam tersini belirtmektedir. Şekilde görüldüğü üzere polar bir mobil faz ve apolar bir sabit faz kullanılmaktadır.



Şekil 1.5.2.2.1.Ters faz kromatografi

Günümüzde geniş bir kullanım aralığı olduğu için HPLC çalışmalarının %75'i ters faz ayırma dayanmaktadır. Su ve organik (asetonitril yada metanol) karışımı mobil faz ile C18 (ODS) sabit faz en popüler ters faz ikilidir. (Skoog ve ark. 2007)

1.6. Hızlı Sıvı Kromatografi (UPLC)

2004 yılında cihaz ve kolon teknolojisindeki gelişmeler sayesinde sıvı kromatografide rezolusyon, hız ve hassasiyet parametrelerinde önemli ilerlemeler kaydedildi. Bu yeni performans düzeyine çıkmak için daha küçük partiküllü kolonlar [1.7 mikron] ve 15.000 psi (1000 bar) basınçtaki mobil faza dayanabilecek şekilde dizayn edilmiş cihazlar gerekiyordu. Bu yeni teknoloji Hızlı Sıvı Kromatografi olarak adlandırıldı.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yaklaşık 30 yıldır dünya çapında tüm laboratuvarlarda kullanılan kanıtlanmış bir tekniktir. Bu tekniğin ilerlemesinde kromatografik ayrımı etkileyen dolgu maddelerinin geliştirilmesi rol oynamıştır. Plaka yüksekliği ve lineer akış hızı arasındaki ilişkiyi açıklayan van Deemter eşitliği ile bu durum açıklanabilir. Partikül büyüklüğü değişkenlerden biri olduğu için van Deemter eğrisi kromatografik performansı araştırmak için kullanılabilir. Bu eşitliğe göre partikül büyüklüğü 2.5 μm 'nin (mikron) altına indiği zaman etkinlikte önemli bir artış olmaktadır ve artan akış hızı etkinliği azaltmamaktadır. Daha küçük partiküller kullanarak hız ve pik kapasitesi (gradient ayrımlarda birim zamanda ayrılan pik sayısı) yeni limitlere genişlemekte ve bu teknoloji Hızlı Sıvı Kromatografi (UPLC) adını

almaktadır. Bu teknoloji küçük partiküllü kolonlar kullanarak ve yüksek akış hızı sağlayarak üstün rezolasyon ve hassasiyet avantajlarına sahiptir.

Etkinlik UPLC nin temel ayırım parametresidir. Temel rezolasyon eşitliğine bakılacak olursa;

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{1+k} \right] \quad (1.5.1)$$

Rezolasyonun (R_s) , teorik plaka sayısının (N) karekökü ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Teorik plaka sayısı ise partikül büyüklüğü ile ters orantılıdır. Örneğin partikül büyüklüğü 5 μm 'den 1.7 μm 'ye indirilirse N üç kat ve rezolasyon için karekökü kadar artmaktadır. N ayrıca pik genişliğinin karesi ile ters orantılıdır.

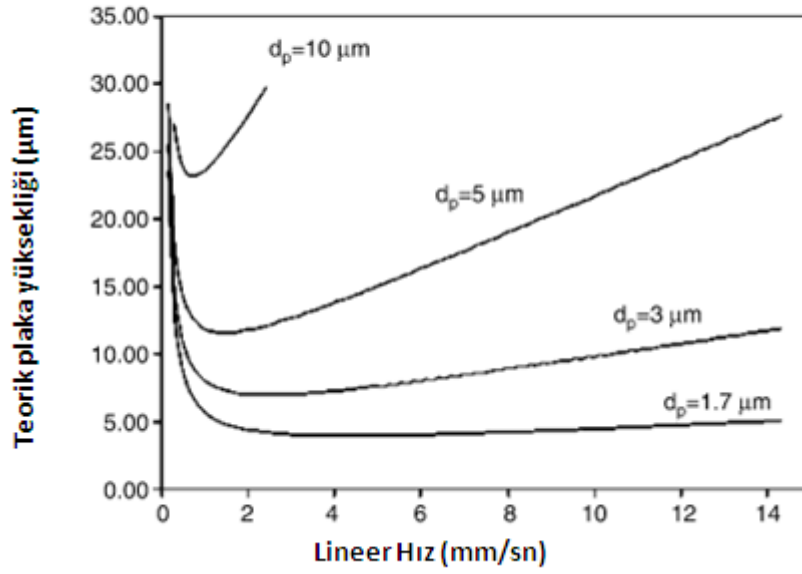
$$N \propto 1/w^2 \quad (1.5.2)$$

Buradan pikler ne kadar dar olursa onları birbirinden ayırmanın daha kolay olduğu görülmektedir. Ayrıca pik yüksekliği (H) , pik genişliği (w) ile ters orantılıdır. Partikül boyutu düştükçe N ve dolayısıyla R_s artmakta böylece hassasiyette yükselme olmakta daha uzun ve dar pikler elde edilmektedir. Daha dar pikler aynı zamanda daha fazla pik kapasitesi anlamına gelmektedir.

$$H \propto 1/w \quad (1.5.3)$$

Van deemter eşitliğinden çıkarılabilecek diğer bir ilişki partikül boyutu düştükçe maksimum N ye ulaşmak için optimum akış hızının artmasıdır. Fakat akış hızı ile basınç orantılı olduğundan küçük partiküller ile çalışmak için yüksek basınca dayanıklı bir sistem gerekmektedir. Analiz hızı temel amaç ise rezolasyon ve etkinlik daha da arttırılabilir. Etkinlik kolon uzunluğu (L) ile doğru, partikül boyutu (d_p) ile ters orantılıdır.

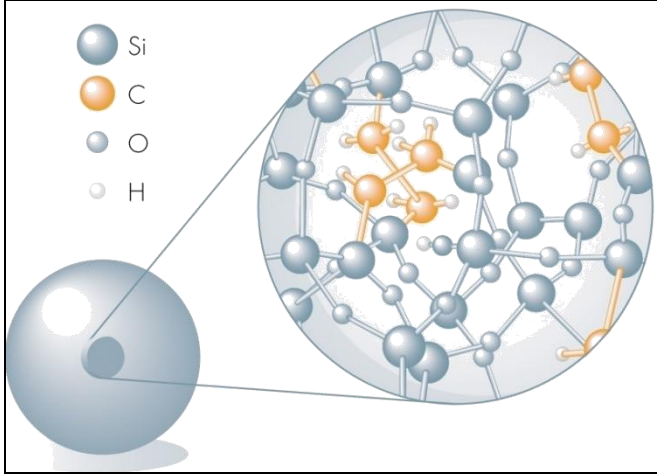
$$N \propto L / d_p \quad (1.5.4)$$



Şekil 1.6.1. Van deemter grafiği
(Nováková ve Ark. 2006` dan)

Dolayısıyla rezolusyon kaybı olmadan kolon partikül boyutu ile aynı şekilde kısaltılabilir. Küçük partiküller sebebiyle üç kat fazla akış hızı ve kolon boyunun üç kat kısalmayla rezolusyon korunurken analiz süresi 1/9 oranında azalmaktadır.

UPLC teknolojisi için 2 µm altında partiküllerin geliştirilmesi önemli bir aşamadır. Silika bazlı partiküller mekanik olarak oldukça dayanıklı iken kullanım pH aralıkları sınırlı kalmaktadır. Bunun yanında polimerik kolonlar pH açısından daha iyi olmakla beraber düşük etkinlik gibi başka dezavantajlara sahiptirler. Kolon üreticileri silica ve polimerik kolonların avantajlarını birleştirerek hibrid kolonlar geliştirdiler. Daha sonra bu kolonlar UPLC ye uyumlu hale getirildi. BEH olarak adlandırılan bu kolonda köprülü etil hibrid yapısı mevcuttur. 1.7 µm partiküller mekanik stabilitelelerini silika matrikse metil gruplarının bağlanmasıyla kazanmaktadırlar.



Şekil 1.6.2. Köprülü etil hibrid yapısı

(http://www.cosmoscience.org/Presentations_2006/HighTemperatureChromatographyHybridStationaryPhases.pdf , 2010)

Partiküllerin geliştirilmesi yanında cihaz ünitelerinin de yeni teknolojiye uygun olması gerekmektedir. Pompa yüksek basınçta düzgün ve tekrarlanabilir akış sağlayabilmelidir.

Dedektörün analit pikini doğru ve tekrarlanabilir şekilde integre etmesi için birim zamanda okuduğu veri hızının yeterince yüksek olması gerekmektedir. Dedektör türüne göre UPLC hassasiyeti HPLC ye göre 2-3 kat fazla olmaktadır.

Numune girişi ayrıca kritik bir konudur. Standart enjeksiyon valfleri manuel yada otomatik yüksek basınca dayanıklı dizayn edilmemişlerdir. Kolonu basınç dalgalanmalarından korumak için enjeksiyon prosesi düzgün olmalıdır. Ayrıca hızlı bir enjeksiyon döngü zamanı ve minimal taşımaya (carry over) sahip düşük enjeksiyon hacmi UPLC hassasiyeti için gereklidir.

UPLC sisteminde ikili seri akış pompası bulunmaktadır. 4 solvent hattı ve solvent degaze etme özelliği vardır. 2 µm altı partiküllerden maksimum avantaj sağlamak için 15000 psi basınç limitine sahiptir. İğne içinde iğne (needle-in-needle) sistemi ile numuneleme yapmaktadır. İkili bir yıkama ile beraber bir enjeksiyon döngü zamanı 60 s dir. 65 °C` a kadar kolon ısıtabilmektedir.

Standart absorbans bazlı optik dedektörler konsantrasyona karşı duyarlıdır dolayısıyla UPLC için akış hücresi hacmi konsantrasyon ve sinyali korumak için azaltılmalıdır. Küçük hacimli standart akış hücreleri de sinyal gücünün bağlı olduğu ışık

yolu uzunluğunu azaltmaktadır fakat iletim azalmakta ve gürültü artmaktadır. UPLC sisteminde bir optik fibere eşdeğer ışık öncülü akış hücresi kullanılmaktadır. 10 mm ışık yoluna ve yalnızca 500 nL hacme sahiptir. (SWARTZ , 2005)

UPLC` nin genel olarak bize sağladığı avantajları şunlardır;

- Azalan analiz süresi
- Rezolusyon ve etkinlikte artış
- Daha az kimyasal kullanımı ve azalan atık
- Geniş pH aralığına dayanıklı stabil kolon
- Hassas dedektör
- Değiştirilebilen loop hacmi
- Kolon tarihçesi saklama (eCord teknolojisi)

Kısa analiz süresi;

- Kalite Kontrol departmanı için bitmiş ürünlerin serbest bırakılmalarını hızlandırmaktadır.
- Stabil olmayan moleküllerin analizi için uygundur.
- Daha hızlı metot geliştirme imkanı sağlamaktadır.

Kolonlar açısından değerlendirme yapacak olursak en çok kullanılan HPLC kolonları pH kullanım aralığı 2-8 iken BEH teknoloji UPLC kolonlarında bu aralık 1-12 olmaktadır. BEH kolonlar yüksek basınç ve sıcaklığa dayanıklıdır. Daha uzun ömürlüdürler. Defalarca kullanımdan dahi sonra aynı etkinliğe sahiptirler. Ayrıca farklı bileşikler HPLC` de farklı tip kolonlarla analiz edilirken tek bir çeşit BEH kolon ile bir çok bileşik analiz edilebilir.

Dedektör hassasiyeti ise UPLC` de daha fazladır. Data hızı (Sampling rate) artınca dedektör hassasiyeti artmaktadır. HPLC` de 2 pts/s olan data hızı UPLC` de 20 pts/s olmaktadır. UPLC` de düşük numune derişimleri dedekte edilebilmektedir.

Diğer bir avantaj değiştirilebilen farklı hacimlerde loop imkanıdır. UPLC için 20ml, 10ml, 5ml ve 2ml gibi farklı hacimlerde looplar mevcuttur. Looplar kolayca değiştirilebilmektedir. Sisteme sadece karakterizasyon yapılarak tanıtılmaktadır. Sistem validasyonuna gerek olmamaktadır. Değişik loop hacmi imkanı metot geliştirme esnasında enjeksiyon hacmini ayarlama fayda sağlamaktadır.

UPLC`lerde bulunan diğer bir avantaj eCord teknolojisidir. Bu teknoloji sayesinde elektronik olarak kolonun sertifika, kurulum tarihi, enjeksiyon sayısı, numune set sayısı (sequence), maksimum basınç ve sıcaklık gibi bilgileri saklanmaktadır.



Şekil 1.6.3. eCord teknoloji

1.7. Analitik Metot Validasyonu

Analitik laboratuvarlarda validasyon uluslararası bir gerekliliktir. Valide metotların kullanımı analitik bir laboratuvarın yeterli ve kalifiye olduğu göstermesi nedeniyle önemlidir. Bir metodu valide etmek metodun analitik amacının yani kabul edilebilir belirsizlik seviyesinde analitik sonuçlar elde etmenin başarılıp başarılmadığının araştırılması anlamına gelmektedir. Analitik metot validasyonu laboratuvarında kalite güvencenin ilk basamağını oluşturmaktadır. Analitik kalite güvence bir laboratuvarın her zaman yüksek kalitede veri elde ettiğini garantilemek için gerçekleştirmesi gereken ölçümler bütünüdür.

Analitik bir yöntemin valide edilmesinin amacı, metodun kullanım amacı için uygun olduğunu göstermektir. Bütün HPLC metotlarının validasyonu, temsili homojen bir numune üzerinden uygulanmalıdır. Metot validasyonu süresince kullanılan tüm referans maddelerin ve kimyasalların kaynakları ve saflıkları biliniyor olmalıdır. Herhangi bir analitik validasyon başlatılmadan önce validasyonun kapsamı, analitik sistem ve gereklilikleri ihtiva edecek şekilde belirlenmelidir.

Pratikte metot validasyonu kesinlik, doğruluk, seçicilik, doğrusallık, kullanım aralığı, dedeksiyon (ölçümleme) limiti, hesaplama limiti, yöntem stabilitesi (robustness) gibi metot performans karakteristiklerinin değerlendirilmesi ile yapılır. Hangi

performans kriterinin değerlendirileceği metodun çeşidine bağlıdır. (TAVERNIERS ve ark. 2004)

1.7.1 Validasyonda kullanılan hesaplamalar

Ortalama değer, \bar{x} , $\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ eşitliği kullanılarak hesaplanır. $x_1, x_2,$

..., x_n tek tek değerlerdir. n değer sayısıdır. Standart sapma, σ , $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$

eşitliği kullanılarak hesaplanır. $x = x_1, x_2, \dots, x_n$ 'dir. Relatif standart sapma, RSD,

$RSD = \frac{\sigma \times 100}{\bar{x}}$ eşitliği kullanılarak hesaplanır. %95 güven aralığı,

$\bar{x} \pm t_{(1-P, n-1)} \times \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right)$ eşitliği kullanılarak hesaplanır. t, gerekli güvenilirlik limitine göre

P değeri ve n-1 serbestlik derecesiyle t dağılımı için kritik değerdir. (%95 güven aralığı için P=0.05'dir.) Çeşitli serbestlik dereceleri ve güvenilirlik düzeylerinde $t_{(1-P, n-1)}$ 'nin aldığı değerler aşağıdadır:

Çizelge 1.7.1.1. Çeşitli serbestlik dereceleri ve güvenilirlik düzeylerinde

$t_{(1-P, n-1)}$ 'nin aldığı değerler

Güvenilirlik Düzeyi	90%	95%	99%	%99.5
$\gamma = n-1$	t_{90}	t_{95}	t_{99}	$t_{99.5}$
1	6,314	12,706	63,657	127,320
2	2,920	4,303	9,925	14,089
3	2,353	3,182	5,841	7,453
4	2,132	2,776	4,604	5,598
5	2,015	2,571	4,032	4,773
6	1,943	2,447	3,707	4,317
7	1,895	2,365	3,500	4,029
8	1,860	2,306	3,355	3,832
9	1,833	2,262	3,250	3,690
10	1,812	2,228	3,169	3,581
15	1,753	2,131	2,947	3,252
20	1,725	2,086	2,845	3,153
25	1,708	2,060	2,787	3,078
P	1,645	1,960	2,576	2,807
$\gamma = n-1$	t_{90}	t_{95}	t_{99}	$t_{99.5}$

1.7.2. Sistem uygunluk testi

Sistem uygunluk testi bir HPLC metodunun bütününü temsil eder ve kromatografik sistemin uygun performansından emin olmak için yapılır. Kantitatif analizler için sistem uygunluk testi en azından iki parametre içermelidir. Birincisi enjeksiyonların tekrarlanabilirliğidir; ikincisi analizlerde genellikle kritik ayrımlar için yöntem stabilitesi verilerinden belirlenebilir. Rezolüsyon, simetri faktörü, teorik plaka sayısı gibi parametreler kullanılabilir

Çizelge 1.7.2.1. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği kabul kriterleri

Analitik Test	5 ardışık enjeksiyonun RSD'si
Miktar Tayini:	
- Aktif Madde	≤ %1.5
- Koruyucular/Antioksidanlar	≤ %5.0
İçerik Tekdüzeliliği	≤ %1.5
Dissolüsyon	≤ %2.0
Kantitatif Safsızlık Testi	≤ %5.0

1.7.3. Tek tek analitik parametrelerin planı ve kabul kriterleri

Her bir parametre için aşağıdaki bölümlerde kabul kriterleri belirtilmiştir. Eğer başka kriterler uygulanıyorsa (katı faz ekstraksiyonuyla olan metotlar, türevlendirme vb.), doğrulama gereklidir.

Çizelge 1.7.3.1. Metot çeşidine göre değerlendirilecek performans kriterleri

Parametre	Tanıma	Miktar Tayini	İçerik Tekdüzeliliği	Dissolüsyon	Safsızlık	
					Kantitatif	Limit
Tekrarlanabilirlik	-	+	+ ¹⁾	+	+	-
Ortam Kesinliği	-	+	-	+	+	-
Doğrusallık	-	+	+	+	+	-
Düzeltilme Faktörü	-	o	o	o	+	o
Doğruluk	-	+	+	+	+	-
Seçicilik	+	+	+	+	+	+
Tespit Limiti	-	-	-	-	o	+
Hesaplanabilirlik Limiti	-	-	-	-	+	-
Yöntem Stabilitesi	+	+	+	+	+	+

Çizelge 1.7.3.1. de + işareti kesinlikle yapılması gereken parametre, - işareti yapılması gerekli olmayan, ° işareti ise gerekli durumlarda yapılır anlamına gelmektedir.

1.7.4. Kesinlik

Bir analitik metodun kesinliği, belirlenen koşullar altında aynı homojen numunenin çoklu hazırlıklarından elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uygunluğu belirtir. Kesinlik, üç aşama olarak düşünülebilir: Tekrarlanabilirlik, ortam kesinliği ve tekrar elde edilebilirlik.

1.7.4.1 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa bir zaman aralığı içinde aynı uygulama koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Valide edilen metotta tarif edilen prosedür uygulanır.

- Miktar Tayininde; en az 6 numune çözeltisi hazırlanır (%100 test konsantrasyonunda) ve analiz edilir.
- İçerik Tekdüzeligi: Doğruluk parametresindeki plan uygulanır.
- Çözünme Hızı : Bir beherden alınan 6 numune analiz edilir. Aynı anda, metotta tarif edilen yöntemle göre dissolüsyon çalışması da yapılır.
- Kantitatif Safsızlık: En az 6 numune çözeltisi hazırlanır (%100 test konsantrasyonunda) ve analizlenir.

Çizelge 1.7.4.1.1. Tekrarlanabilirlik kabul kriterleri

Analitik test	Limitler
Miktar tayini:	
- Etken madde	RSD ≤ % 2.0
- Koruyucular/antioksidantlar	RSD ≤ % 5.0
İçerik Tekdüzeliliği	RSD ≤ % 2.0
Dissolüsyon	RSD ≤ % 2.0
Kantitatif safsızlık (spike edilmemiş numuneler)	%1.0 ≤ c _i için, RSD ≤ %5.0 %0.1 ≤ c _i < %1.0 için, RSD ≤ %7.0 DL ≤ c _i < %0.1 için, RSD ≤ %10.0

Çizelge 1.6.4.1.1. de yer alan c_i , ilgili safsızlığın içeriği DL ise ihmal edilebilir limit anlamına gelmektedir.

1.7.4.2 Ortam kesinliği

Ortam kesinliği, laboratuvar içindeki değişimleri ifade eder: farklı günler, farklı analizciler, farklı cihaz gibi. Valide edilen metotta tarif edilen prosedür uygulanır (ilk seri ilk analizci tarafından, ikinci seri ikinci analizci tarafından yapılır)

Çizelge 1.7.4.2.1. Ortam kesinliği kabul kriterleri

Analitik test	Limitler
Miktar Tayini	
- Aktif Madde	Δ ≤ %3.0
- Koruyucular/ Antioksidanlar	Δ ≤ %5.0
Dissolüsyon	Δ ≤ %6.0 (Δ iki dissolüsyon analizinden elde edilen sonuçlardan hesaplanır.)
Kantitatif safsızlık (spike edilmemiş numuneler)	c _i < %0.15 **) için, Δ ≤ %0.05 abs. %0.15 ≤ c _i ≤ %0.30 **) için, Δ ≤ %33 rel. %0.31 ≤ c _i ≤ %0.50 **) için, Δ ≤ %0.10 abs. %0.51 ≤ c _i ≤ %0.80 **) için, Δ ≤ %20 rel. %0.80 < c _i **) için, Δ ≤ %0.16 abs. **) aktive göre relatif

1.7.4.3 Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik iki laboratuvar arasındaki kesinliği tanımlar. Çalışma planı, kabul kriterleri ortam kesinliği ile aynıdır.

1.7.5. Doğrusallık

Bir analitik prosedürün doğrusallığı, numunedeki analitin konsantrasyonuna (miktarına) direkt olarak orantılı olan test sonuçlarını (verilen bir aralık içinde) elde etme kapasitesini gösterir. İlgili maddelerin stok solüsyonundan seyreltilerek veya tartılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanır. Doğrusallığın sağlanması için, minimum 5 konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmalıdır. Doğrusallık çalışması, enjeksiyon hacmi değiştirilerek gerçekleştirilmemelidir. Minimum konsantrasyon aralıkları (ürünün hem serbest bırakma hem de raf ömrü spesifikasyonları göz önünde bulundurularak) aşağıdaki şekildedir:

- Miktar tayini testi: Çalışma konsantrasyonunun %80'inden %120'sine kadar olan konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir. Koruyucular ve antioksidanlar için konsantrasyon aralığı, gerekirse, spesifikasyon aralığı üzerinden uygun biçimde örneğin $\pm\%20$ olarak genişletilebilir.
- İçerik tekdüzeliği testi: Çalışma konsantrasyonunun %60'undan %140'ına kadar olan konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir.
- Ortak miktar tayini ve içerik tekdüzeliği testi: Çalışma konsantrasyonunun %60'undan %140'ına kadar olan konsantrasyon aralığında (konsantrasyon seviyeleri %60, %80, %90, %100, %110, %120 ve %140) çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir.
- -Anında salınımlı (IR-immediate release) ürünler için çözünme hızı testi: Çalışma konsantrasyonunun %60'undan %120'sine kadar olan konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir. Eğer gerekirse diğer konsantrasyon seviyeleri de çalışmaya eklenebilir.

- Kontrollü salınımlı (CR-controlled release) ürünler için çözünme hızı testi: Spesifikasyon aralığı üzerinden $\pm\%20$ konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir.
- Kantitatif safsızlık testi: Spesifikasyon limitinin (herbir bilinen safsızlık için) ihmal edilebilir limitinden $\%120$ 'sine kadar olan konsantrasyon aralığında çözeltiler hazırlanır ve analiz edilir.
- Ortak miktar tayini ve kantitatif safsızlık testi: Doğrusallık testi, miktar tayini spesifikasyonunun ihmal edilebilir limitinden $\%120$ 'sine kadar olan konsantrasyon aralığını kapsamalıdır.

Çizelge 1.7.5.1. Doğrusallık kabul kriterleri

Analitik Test	Limitler
Miktar Tayini:	
- Aktif Madde	Korelasyon Katsayısı $r \geq 0.999$
- Koruyucular/Antioksidanlar	Korelasyon Katsayısı $r \geq 0.995$
İçerik Tekdüzeliliği	Korelasyon Katsayısı $r \geq 0.999$
Dissolüsyon	Korelasyon Katsayısı $r \geq 0.999$
Kantitatif Safsızlık Testi	Korelasyon Katsayısı $r \geq 0.99$

1.7.6. Düzeltme faktörü

Düzeltme faktörü (CF-correction factor), belirlenen koşullar altında, referans maddenin cevabına karşılık belirlenen analit cevabının sayısal değeridir. Düzeltme faktörü, respons faktörün tersidir. Düzeltme faktörü genellikle, doğrusallık verilerinden belirlenir (regresyon analizinden elde edilen regresyon çizgilerinin eğimi). İmpürite miktarı kısıtlı olduğu zamanlarda, belirleme tek nokta ölçümü olarak uygulanmalıdır (spesifikasyon limitine karşılık gelen konsantrasyon seviyesinde hazırlanan ilgili analitin çözeltileri).

- **Hesaplama:**

$$CF = \frac{slope_{REF}}{slope_{DET}} = \left(\frac{A_{REF}}{c_{REF}} \times \frac{c_{DET}}{A_{DET}} \right) \quad (1.7.6.1)$$

$slope_{REF}$ referans analitin doğrusallık verilerinden elde edilen regresyon çizgilerinin eğimi

$slope_{DET}$ belirlenecek analitin doğrusallık verilerinden elde edilen regresyon çizgilerinin eğimi

A_{REF} referans analitin cevabı

A_{DET} belirlenecek analitin cevabı

C_{REF} referans analitin konsantrasyonu

C_{DET} belirlenecek analitin konsantrasyonu

- **Metot Validasyonunda Kullanımı:** Düzeltme faktörü, geri kazanımın (doğruluk) hesaplanmasında kullanılır.
- **Analitik Metotlarda Kullanımı:** Düzeltme faktörü, 0.80 ile 1.20 aralığında ise safsızlık analizleri için kullanılmaz.

1.7.7. Doğruluk

Bir analitik prosedürün doğruluğu, bulunan değer ve gerçek değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Gerçek değer aşağıdaki şekillerden belirlenir;

- Model numunelerin analizlerinden
- Başka bir bağımsız metot kullanarak

Genellikle ilk yöntem tercih edilir. Doğruluk parametresi, geri kazanım olarak tanımlanır. Geri kazanım, bulunan değer ve gerçek değerlerin % cinsinden oranıdır.

- **Miktar tayini testi için plan:** Belirlenecek olan analitin farklı miktarlarıyla (çalışma konsantrasyonunun %80, %100 ve %120'si), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ünde) en az 9

model numune hazırlanır ve analiz edilir. Gerekirse, diğer konsantrasyon seviyeleri de eklenebilir (genellikle antioksidan ve koruyucular için).

- **İçerik tekdüzeliği testi için tasarım:** Aktif madde(ler)nin farklı miktarlarıyla (çalışma konsantrasyonunun %60, %100 ve %140'ı), %60 ve %140 seviyesinde 3'er, %100 seviyesinde 6 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ünde) en az 12 model numune hazırlanır ve analiz edilir. Çalışma konsantrasyonunun %100 seviyesi, aynı anda kesinlik parametresinin değerlendirilmesi için de kullanılır.
- **Ortak miktar tayini ve içerik tekdüzeliği testi için plan:** Aktif madde(ler)nin farklı miktarlarıyla (çalışma konsantrasyonunun %60, %80, %100, %120 ve %140'ı), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ü) en az 15 model numune hazırlanır ve analiz edilir.
- **Anında salınımlı (IR) ürünler için çözünme hızı testi planı:** Aktif madde(ler)nin farklı miktarlarıyla (çalışma konsantrasyonunun %60, %90 ve %120'si), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ünde) en az 9 model numune hazırlanır ve analiz edilir. Gerekirse, diğer konsantrasyon seviyeleri de eklenebilir.
- **Kontrollü salınımlı (CR) ürünler için çözünme hızı testi planı:** Aktif madde(ler)nin farklı miktarlarıyla (spesifikasyon aralığı üzerinden $\pm\%20$), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ünde) en az 9 model numune hazırlanır ve analiz edilir. Gerekirse, diğer konsantrasyon seviyeleri de eklenebilir.
- **Safsızlık testi için plan:**
Bilinen impüriteler için, impüritelerin farklı miktarlarıyla (safsızlık spesifikasyon limitinin ihmal edilebilir limit seviyesi, %100 ve %120'si), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo ve aktif madde içeren (her ikisi de

çalışma konsantrasyonunun %100'ünde) en az 9 model numune hazırlanır ve analiz edilir. Gerekirse, diğer konsantrasyon seviyeleri de eklenebilir.

Eğer kullanılan aktif hammaddesi içerisinde, az miktarda belirlenecek olan safsızlıklardan varsa, var oldukları göz önünde bulundurularak düzeltmeler yapılmalıdır. Bu durumda, doğrusalılık tüm konsantrasyonları kapsamalıdır.

Bilinmeyen impüriteler için aktif maddenin farklı miktarlarıyla (spesifikasyon limitinin ihmal edilebilir limit seviyesi, %100 ve %120'si), her seviye için 3 tane olmak üzere, plasebo içeren (çalışma konsantrasyonunun %100'ü) en az 9 model numune hazırlanır ve analiz edilir.

Çizelge 1.7.7.1. Doğruluk kabul kriterleri

Analitik test	Limitler
Miktar tayini:	
- Etken madde	Geri Kazanım % 98.0 - 102.0 (her değer) ve RSD ≤ %2.0
- Koruyucular/ antioksidantlar	Geri Kazanım %95.0 - 105.0 (her değer) ve RSD ≤ %5.0
İçerik Tekdüzeliği	Geri Kazanım %98.0 - 102.0 (her değer) ve RSD ≤ %2.0
Dissolüsyon	Geri Kazanım %95.0 - 105.0 (her değer) ve RSD ≤ %3.0
Kantitatif safsızlık testi	Geri Kazanım %90.0 - 110.0 (her değer) ve RSD ≤ %5.0 (%1.0 ≤ c _i için) Geri Kazanım %85.0-115.0 (her değer) ve RSD ≤ %7.0 (%0.1 ≤ c _i < %1.0 için) Geri Kazanım %80.0 - 120.0 (her değer) ve DL ≤ c _i < %0.1 için RSD ≤ %10.0

1.7.8. Uygulama aralığı

Analitik bir prosedürün uygulama aralığı analiz edilecek maddenin numune içindeki en yüksek ve en düşük konsantrasyonları arasındaki aralıktır (bu konsantrasyonları içerir); bu sebeple, bu analitik prosedür kesinlik, doğruluk ve doğrusallığın uygun seviyesi olarak gösterilir.

Çizelge 1.7.8.1. Uygulama aralığı kabul kriterleri

Analitik test	Gereklilikler
Miktar tayini	
-Aktif Madde	Test konsantrasyonunun % 80 - % 120'si
-Koruyucular/Antioksidanlar	Spesifikasyon aralığı üzerinden \pm %20
İçerik Tekdüzeliliği	Test konsantrasyonunun %60 - %140 'ı
Anında salınımlı ürünler için dissolüsyon testi	Test konsantrasyonunun %60 - %120'si
Kontrollü salınımlı ürünler için dissolüsyon testi	Spesifikasyon aralığı üzerinden \pm %20
Kantitatif safsızlık testi	DL - Spesifikasyon limitinin % 120'si

1.7.9. Tespit limiti

Bir analitik prosedürün tespit limiti (LOD); numunedeki analitin, dedekte edilebilen ancak kesin değer olarak hesaplanamayan en düşük miktarıdır. Tespit limiti aşağıda belirtilen yaklaşımların biri kullanılarak belirlenebilir.

- **Baseline gürültüsü ve eğime göre hesaplama**

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

eşitliği kullanılarak LOD hesaplanır.

σ , ilgili analitin çıkış zamanına (ya da yakınına) göre belirlenen zaman aralığında, plasebo ya da çözücünün kromatogramındaki baseline gürültüsüdür.

S, ilgili analitin, doğrusallık verilerinden elde edilen (konsantrasyon üzerinden pik yüksekliklerine dayanan) regresyon çizgisinin eğimidir.

- **Sinyal/gürültü oranına göre hesaplama**

Sinyal/gürültü oranı, analitin güvenilir olarak dedekte edilebildiği minimum konsantrasyonu belirleyerek ve analitin bilinen düşük konsantrasyonundan ölçülen sinyallerle blank'ten elde edilen sinyallerin karşılaştırılmasıyla belirlenir. Yaklaşık 3:1 Sinyal/gürültü oranı, tespit limitini belirlemek için kabul edilebilir oran olarak düşünülebilir.

LOD değeri, spesifikasyon limitine eşit ya da daha düşük olmalıdır.

1.7.10. Hesaplanabilirlik limiti

Bir analitik yöntemin hesaplanabilirlik limiti (LOQ), bir numunedeki analitin, uygun kesinlik ve doğrulukla, hesaplanarak belirlenebilen en düşük miktarıdır. Hesaplanabilirlik limiti aşağıda belirtilen yaklaşımların biri kullanılarak belirlenebilir.

- **Baseline gürültüsü ve eğime göre hesaplama**

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \text{ eşitliği kullanılarak LOQ hesaplanır.}$$

σ , ilgili analitin çıkış zamanına (ya da yakınına) göre belirlenen zaman aralığında, plasebo ya da çözücünün kromatogramındaki baseline gürültüsüdür.

S, ilgili analitin, doğrusallık verilerinden elde edilen (konsantrasyon üzerinden pik yüksekliklerine dayanan) regresyon çizgisinin eğimidir.

- **Sinyal/gürültü oranına göre hesaplama**

Sinyal/gürültü oranı, analitin güvenilir olarak dedekte edilebildiği minimum konsantrasyonu belirleyerek ve analitin bilinen düşük konsantrasyonundan ölçülen sinyallerle blank'ten elde edilen sinyallerin karşılaştırılmasıyla belirlenir. 10:1 sinyal/gürültü oranı, hesaplanabilirlik limitini belirlemek için kabul edilebilir oran olarak düşünülebilir.

LOQ değeri, analitik metotta belirtilen ihmal edilebilir limite eşit ya da daha düşük olmalıdır.

Nadiren, kuvvetli ya da toksik veya istenmeyen farmakolojik etkiler oluşturan bilinen safsızlıklar için, safsızlıkların kontrol edilmesi gereken seviye LOD/LOQ limiti olmalıdır.

1.7.11. Seçicilik

Seçicilik; var olduğu kabul edilen bileşenler içerisinde, analitin net bir biçimde tayin edilebiliyor olmasıdır. Genel olarak bunlar; safsızlıklar (bozunma ürünlerini de içerir)

eksipiyanlar (ilaç üretiminde kullanılan yardımcı maddeler) vb.'dir. Plasebo veya çözücünün kromatogramları, numune ve safsızlık spike edilmiş numune kromatogramlarıyla karşılaştırılır. Gerekirse, ilgili pikin "peak purity" 'si PDA (Photodiode array) dedektör kullanılarak belirlenir. Metot, belirlenen amaç için yeterli derecede seçici olmalıdır. Safsızlık testinde, her bir safsızlığın (bozunma ürünlerini de içerir) diğer bileşenlerden (aktif madde(ler), eksipiyanlar, çözücü, gradient pikleri vb.) ayrımı sağlanmalıdır. Buna karşın, miktar tayini testinde aktif madde piki, diğer tüm piklerden yeterli derecede ayrılmalıdır. Buna rağmen diğer pikler birarada çıkabilir. İçerik tekdüzeliği ve dissolüsyon testleri, eksipiyanlara, çözücüye ve gradient piklerine karşı yeterli derecede seçici olmalıdır.

1.7.12. Yöntemin stabilitesi (Robustness)

Bir analitik prosedürün dayanıklılığı, metot parametrelerindeki minör değişimlere karşı etkilenmeden kalma kabiliyetini gösterir.

1.7.12.1. Kromatografik ayırımın ve numune çözeltisi hazırlığının stabilitesi

Analitik metottaki belirli değişikliklerin etkisi değerlendirilir. Aşağıdaki parametrelerin, metot validasyonu sırasında test edilmesi tavsiye edilir:

- Kolon seçimi: En azından iki benzer kolon test edilir. Analitik metotta belirtilen kolon çeşidi için, dolgu maddesi lotunda (sorbent batch) değişiklik gösteren en az iki kolon test edilir.
- Mobil faz kompozisyonu: Organik bileşen(ler)in konsantrasyonundaki değişimler genellikle $\pm 2\%$ 'den 5% 'e (absolut) kadar; tuzların, asitlerin ya da bazların konsantrasyonundaki değişimler genellikle $\pm 10\%$ (relatif) ve şiral modifiye edicilerin konsantrasyonundaki değişimler genellikle $\pm 10\%$ (relatif) olarak test edilir.
- Mobil fazın veya mobil faz bileşeninin pH' sı: Genellikle 0.2-0.5 birim pH değişimi test edilir.
- Akış oranı: Genellikle $\pm 10\%$ olarak değiştirilir.
- Kolon sıcaklığı: Genellikle $\pm 10^\circ\text{C}$ olarak değiştirilir.

- Bir kademe ekstraksiyonu aşan daha zor numune hazırlıkları durumunda (örneğin, türevlendirme, katı faz ekstraksiyonu vb. gibi), bu özel prosedürün de dayanıklılığı doğrulanmalıdır.

1.7.12.2. Standart ve numune çözeltilerinin stabilitesi

Standart ve numune çözeltilerinin stabilitesi, uygun bir zaman aralığı içerisinde, iyi seçilmiş koşullar altında doğrulanır. Bu zaman aralığı, genellikle, en az 48 saattir (24 saatlik aralıklarla), ancak, eğer bu zaman aralığı içerisinde numune dayanıksız olarak gözlenirse, zaman aralığı kısaltılır.

Analitik metotta belirtilen saklama koşulları, daima test edilmelidir (otosampler/karanlık). Diğer saklama koşulları da doğrulanmalıdır. Bunlar, şu şekilde olabilir: oda sıcaklığı/ışıkta korunmadan (gün ışığı) ve/veya buzdolabı (genellikle 5°C) /karanlık. Kantitatif safsızlık testlerinde, dayanıklılığın doğrulanması genellikle model numuneler (doğruluk testinden) üzerinde gerçekleştirilir. Değerlendirme için daima taze standart çözeltileri kullanılır. Çözeltilerin dayanıklılığı (x), % orjinal değer,

$$x = \frac{C_s \times 100}{C_0} \text{ eşitliği kullanılarak hesaplanır.}$$

C_0 zaman = 0 anında ilgili analitin içeriği

C_s ilgili numuneleme anında ilgili analitin içeriği

Çizelge 1.7.12.2.1. Çözelti stabilitesi kabul kriterleri

Analitik test	Limitler (% orjinal değer)
Miktar tayini:	
- Etken madde	% 98.0 - % 102.0 (her değer)
- Koruyucular/ antioksidantlar	% 95.0 - % 105.0 (her değer)
İçerik Tekdüzeliliği	%98.0 - 102.0 (her değer)
Dissolüsyon	%97.0 - 103.0 (her değer)
Kantitatif safsızlık testi - standart çözeltileri	1.0 % $\leq c_1$ için %90.0 - 110.0 (her değer) %0.1 $\leq c_1 < 1.0$ için %85.0 - 115.0 (her değer) DL $\leq c_1 < 0.1$ için %80.0 - 120.0 (her değer)
Kantitatif safsızlık testi - numune çözeltileri	1.0 % $\leq c_1$ için %90.0 - 110.0 (her değer) %0.1 $\leq c_1 < 1.0$ için %85.0 - 115.0 (her değer) DL $\leq c_1 < 0.1$ için %80.0 - 120.0 (her değer)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Çalışmada Hanson Research SR8 Plus ve DISTEK Premier 5100 marka çözünme hızı test cihazları, WATERS Acquity UPLC (UV ve PDA dedektörlü), Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x100 mm kolon kullanıldı. Tartımlar Mettler Toledo MX5 ve XP205 analitik terazilerde alındı. Çözünmeyi sağlamak için Bandelin Sonorex Digital 10 P ultrasonik banyo kullanılmıştır.

2.2. Kimyasal maddeler

- Metanol (J.T.Baker)
- Asetonitril (J.T.Baker)
- Hidroklorik Asit (J.T.Baker)
- Tiyokolşikosid referans standartı (Alchem)

2.3. Hazırlanan çözeltiler

Hareketli faz olarak 780 ml distile su 220 ml asetonitril karışımı,UPLC cihazı yıkama çözeltileri olarak %80 ve % 20`lik asetonitril karışımları hazırlanmıştır. UPLC`de kullanılacak tüm çözeltiler 0.2 µ filtreden süzülerek kullanılmıştır. Çözünme hızı testi ortamı olarak 0.1 N HCl çözeltisi ve standart çözeltisi hazırlığında kullanmak üzere %80 metanol hazırlanmıştır.

2.4. Yapılan analizler

2.4.1 Ön denemeler

İlk olarak var olan HPLC ile çözünme hızı testi metodu UPLC`ye transfer edildi. HPLC kromatografik şartları UPLC`ye uyarlandı. Yeni metotta 10 µl olan enjeksiyon hacmi 2 µl olarak değiştirildi. 250 mm boy,4,6 mm iç çap ve 5 µ partikül boyutlu Hypersil ODS kolon yerine Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x100 mm kolon kullanıldı.

Deneme enjeksiyonu olarak tiyokolşikosid standart çözeltisi sisteme verildi. Bunun için ~8 mg tiyokolşikosid referans maddesi 50 ml`lik balonjojeye tartıldı. % 80 metanol

ile ultrasonik banyoda 5 dk tutularak çözünmesi sağlandı. %80 metanol ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözülden 5 ml alıp 100 ml'ye 0.1 N HCl ile seyreltildi.

2.4.2 Validasyon parametreleri

2.4.2.1 Seçicilik

Seçicilik parametresi için sisteme blank, standart, numune ve plasebo çözeltilerinden 2'şer adet enjeksiyon yaptırılmıştır. Blank çözeltisi olarak çözünme hızı test ortamı 0.1 N HCl kullanılmıştır. Standart ve numune çözeltileri metoda göre hazırlanmıştır. Standart çözeltisi için ~8.8 mg tiyokolşikosid referans maddesi hassas olarak 50 ml lik balonjojeye tartıldı, bir miktar % 80 metanol ilave edilerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandıktan sonra %80 metanol ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözülden 5 ml alıp 100 ml'ye 0.1 N HCl ile seyreltildi. Numune hazırlığı için belirli bir lot tabletin çözünme hızı testi yapılmıştır. Çözünme hızı ortamı 0.1 N HCl çözeltisidir. USP Aparat 2 palet yöntemi ile 100 rpm hızda 15 dk sonunda numuneleme yapılmıştır.

2.4.2.2 Doğrusallık

Doğrusallık parametresi için % 55, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120 oranında referans tiyokolşikosid içeren çözeltiler stok çözülden seyreltme yöntemi ile hazırlanmış ve sisteme verilmiştir. Stok çözelti için 18.6 mg referans tiyokolşikosid 100 ml 'lik balonjojeye tartıldı ve bir miktar % 80 metanol ile çözünmesi sağlandıktan sonra aynı çözelti ile hacmine tamamlandı. Bu stok çözülden sırasıyla 2.75, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 ve 6 ml çekilerek 100 ml'lik balonjelere aktarıldı ve hacmine 0.1 N HCl ile tamamlandı. Böylece % 55, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120'lik çözeltiler elde edildi. %55, % 100 ve % 120'lik çözeltilerden 5'er enjeksiyon diğer numunelerden 2'şer enjeksiyon yaptırılmıştır.

2.4.2.3 Doğruluk

Doğruluk parametresi için; tiyokolşikosid çalışma derişiminin % 60, % 90 ve % 120`si seviyesinde aktif ve plasebo içeren ve her seviyeden 3 farklı hazırlık olmak üzere toplam 9 model numune çözeltileri hazırlanmıştır. Tiyokolşikosid çalışma derişimi 8 mg/900 ml `dir. Bu derişim % 100 kabul edilmektedir. Buna göre gerekli hesaplamalar yapılarak % 60, % 90 ve % 120`lik model numuneler hazırlanmıştır. Çalışma kolaylığı açısından numuneler 900 yerine 500 ml`ye gerekli hesaplamalar yapılarak hazırlanmıştır. % 60 seviyesi için sırasıyla 2.66, 2.67 ve 2.66 mg, % 90 için 3.99, 4.00, 3.99 mg ve % 120 seviyesi için 5.34, 5.32 ve 5.34 mg referans tiyokolşikosid hassas şekilde tartılarak 500 ml`lik balonjölere aktarıldı. Uygun miktarda plasebo ilave edildikten sonra 0.1 N HCl ile çözümlenerek hacmine tamamlandı. Standart çözeltilerden 2 hazırlık (biri kontrol standartı olmak üzere) metoda uygun şekilde yapıldı. Numune dizisi kalibrasyon standartı, kontrol standartı ve sırasıyla 9 model numune şeklinde sisteme verilmiştir.

2.4.2.4 Kesinlik

Kesinlik parametresi için valide edilen metottaki prosedür uygulanmıştır. Belli bir lot numunenin çözünme hızı testi yapıldı. Bunun için çözünme hızı test cihazı beherlerine ölçülü olarak 900 ml 0.1 N HCl koyulduktan sonra sıcaklığının 37 ± 0.5 ° C`ye gelmesi beklendi. Cihaz hazır olunca paletlerin dönüş hızı 100 rpm`e ayarlanıp her behere bir tablet atılarak test başlatıldı ve 15 dk sonunda filtreli enjektör yardımıyla her beherden viallere numuneleme yapıldı. Tekrarlanabilirlik kriteri için ayrıca tek beherden 6 numune alındı. Standart çözeltileri metoda göre hazırlandı. Sisteme verilen numune dizisi kalibrasyon standartı, kontrol standartı ve numuneler şeklindedir.

2.4.2.4.1 Tekrarlanabilirlik

Kesinlik parametresinin bir parçası olan tekrarlanabilirlik için çözünme hızı testi sonunda tek beherden 6 adet numuneleme yapılarak sisteme verilmiştir.

2.4.2.4.2 Ortam kesinliği

Metotdaki prosedür farklı günde, farklı cihazda başka bir analizi tarafından uygulanmıştır. Yapılan işlemler kesinlik parametresindeki gibidir.

2.4.2.5 Uygulama aralığı

Bu parametre doğrusallık çalışmasının bir parçasıdır. Numune derişiminin % 55 ve % 120'si sisteme verilerek tespit edilmiştir.

2.4.2.6 Yöntemin stabilitesi

Bu parametre için metottaki prosedür belirli değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Yapılan değişimler şunlardır;

- Farklı kolon
- Hareketli faz asetonitril oranında $\pm\%10$ değişim
- Akış hızında $\pm\%10$ değişim
- Kolon sıcaklığında $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ artış

Değişimler yapılarak sisteme standart çözelti verilmiştir. Kromatogramın sistem uygunluk kriterlerini karşılayıp karşılamadığına bakılmıştır.

2.4.2.7 Numune ve standart çözeltilerinin stabilitesi

Numune ve standart çözeltileri 4°C ve 25°C sıcaklıkta bekletilerek başlangıçta, 24 saat sonunda ve 48 saat sonunda her zaman taze hazırlanmış standart çözelti kullanarak test edilmiştir.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

3.1 Sistem Uygunluk Testi

Doğrusallık parametresi testinin uygulanması sırasında sisteme verilen 5 ardışık standart çözelti enjeksiyonundan elde edilen % RSD, simetri faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri çizelge 3.1.1. 'de verilmektedir. Çizelge 3.1.2. 'de ise kesinlik, doğrusallık ve doğruluk parametreleri özet sonuçları görülmektedir.

Çizelge 3.1.1. Sistem uygunluk testi sonuçları

Sistem Uygunluk Testi	Kabul kriteri	Sonuçlar
a) Enjeksiyon tekrarlanabilirliği	$RSD \leq \% 2.0$	% 0.6
b) Simetri faktörü	$0.8 \leq T \leq 1.5$	1.23
c) Teorik plaka sayısı	≥ 6000	21477
Sonuç	–	Uygun

Çizelge 3.1.2. Kesinlik, doğrusallık ve doğruluk parametreleri özet sonuçları

Validasyon parametreleri	Kabul kriteri	Sonuçlar
a) Kesinlik - Tekrarlanabilirlik - Ortam kesinliği	RSD \leq 2.0 % RSD \leq 2.0 %	RSD = 0.9 % RSD = 0.4 %
- Çözünme hızı testi	$\Delta \leq$ 6.0 %	$\Delta =$ 1.0 %
b) Doğrusallık	$r \geq$ 0.999	$r =$ 0.9995
c) Doğruluk	Geri kazanım 95.0 – 105.0 % ve RSD \leq 3.0 %	<u>% 60 Seviyesi</u> Geri kazanım = 98.3 % RSD = 0.6 % <u>% 90 Seviyesi</u> Geri kazanım = 97.6 % RSD = 0.2 % <u>% 120 Seviyesi</u> Geri kazanım = 99.2 % RSD = 0.3%

Çizelge 3.1.3. Sistem uygunluk testi-enjeksiyon tekrarlanabilirliği tiyokolşikosid pik alanları

Enjeksiyon no.	Tiyokolşikosid pik alanı [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]
1	184282
2	182356
3	184580
4	184594
5	184826
Ortalama	184128
RSD [%]	0.6

Çizelge 3.1.3. `de sistem uygunluk testi 6 standart enjeksiyonu pik alanları, ortalama alan ve % RSD görülmektedir.

3.2 Kesinlik

Kesinlik parametresi testinden elde edilen tekrarlanabilirlik ve ortam kesinliği sonuçları çizelge 3.2.1 ve 3.2.2`de görülmektedir. Çizelge 3.2.1`de 2 farklı analist tarafından yapılan çözünme hızı testi sonunda tek beherden çekilen 6 numunenin sonuçları görülmektedir. Çizelge 3.2.2`de ise 2 analistin test sonuçları arasındaki mutlak fark görülmektedir.

Çizelge 3.2.1. Kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik sonuçları

Tiyokolşikosid						
	1.analist			2.analist		
Numune no.	Tartım [mg]	Cevap [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Çözünen [%]	Tartım [mg]	Cevap [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Çözünen [%]
1	–	185604	97.0	–	182601	96.3
2	–	185959	97.1	–	181821	95.9
3	–	185627	97.0	–	182029	96.0
4	–	185783	97.0	–	181835	95.9
5	–	185031	96.6	–	181298	95.6
6	–	181552	94.8	–	180729	95.3
Ortalama	–	–	96.6	–	–	95.8
RSD [%]	–	–	0.9	–	–	0.4
% 95 güven aralığı			<95.7; 97.5.>		–	<95.4; 96.2>
Referans çözelti	8.7	186149	–	9.0	190721	–

Çizelge 3.2.2. Kesinlik parametresi ortam kesinliği sonuçları

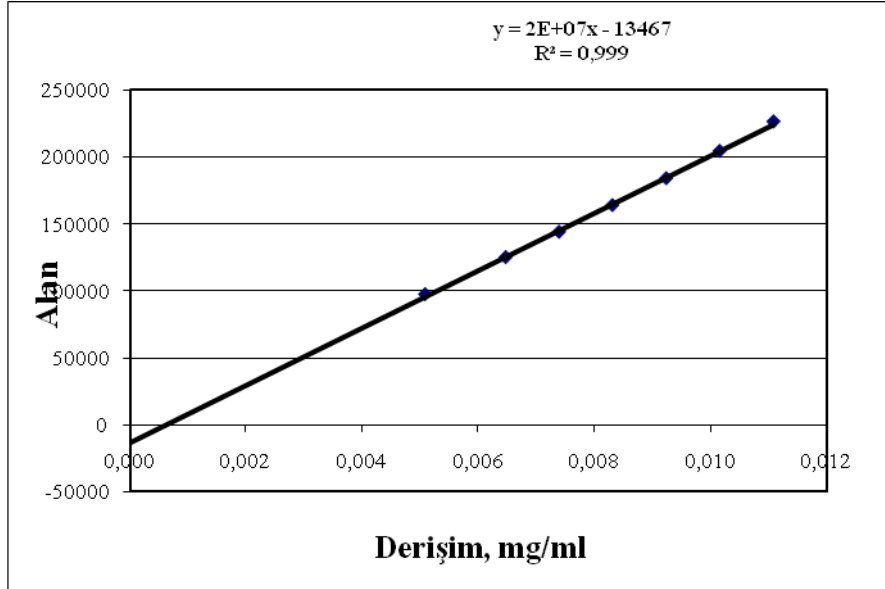
Çözünme hızı testi tek tek sonuçları [%]								
- 1.analizci								
Zaman [dk]	1.beher	2.beher	3.beher	4.beher	5.beher	6.beher	Ortalama	RSD
15	92.6	91,5	96,4	95,5	92,1	89,7	93,0	2.70
- 2.analizci								
Zaman [dk]	1.beher	2.beher	3.beher	4.beher	5.beher	6.beher	Ortalama	RSD
15	95.2	94,9	93,5	94,9	93,0	92,3	93,9	1.28
Δ [%]	1.0							

3.3 Doğrusallık

Doğrusallık parametresi çalışmasında teorik olarak test derişiminin % 55, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120 oranında referans tiyokolşikosid içeren çözeltilerin gerçek derişimleri, verdikleri pik alanları, regresyon eğrisi ve korelasyon katsayısı değerleri çizelge 3.3.1. de görülmektedir.

Çizelge 3.3.1. Doğrusallık sonuçları

Tiyokolşikosid			
Gerçek derişim [%]	Gerçek derişim [mg/ml]	Cevap [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Cevap oranı [$\mu\text{V}\cdot\text{s}/\text{Test derşimi \%`si}$]
57.7	0.00508	97464	1689.2
73.5	0.00647	125155	1702.8
84.0	0.00739	144131	1715.8
94.4	0.00831	164070	1738.0
105.0	0.00924	184211	1754.4
115.5	0.01016	204608	1771.5
126.0	0.01109	226661	1798.9
Korelasyon katsayısı	r = 0.9995		–
Regresyon eğrisi	$y = 2.10^7x - 13467$		–
Ortalama	–		1738.7
RSD [%]	–		2.3

Çizelge 3.3.2. Doğrusallık eğrisi

3.4. Doğruluk

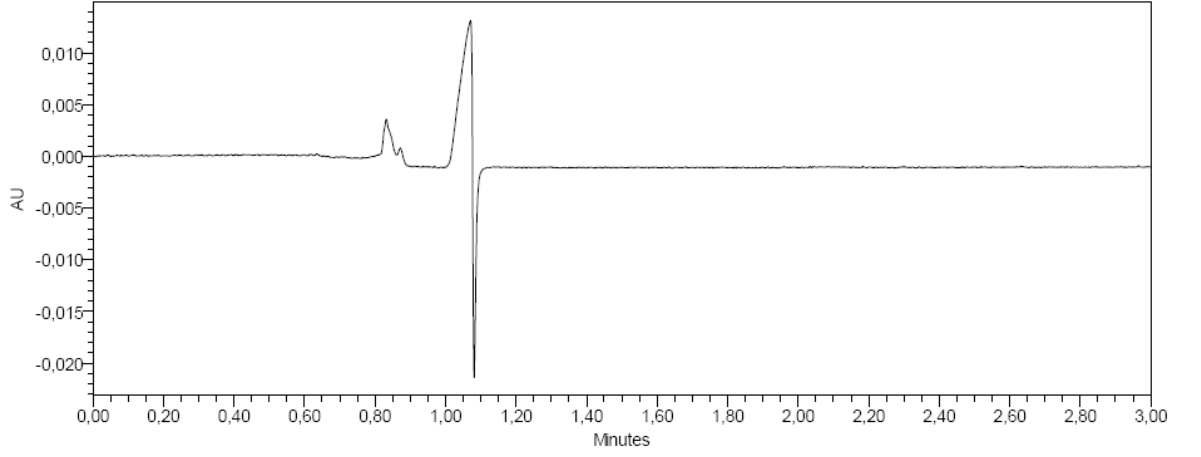
Çizelge 3.4.1`de test derişiminin teorik olarak % 60, 90 ve 120 sine denk gelecek şekilde hazırlanan aktif madde ve plasebo içeren çözeltilerin hesaplanan ve bulunan gerçek derişimleri ve geri kazanımları görülmektedir.

Çizelge 3.4.1. Doğruluk parametresi sonuçları

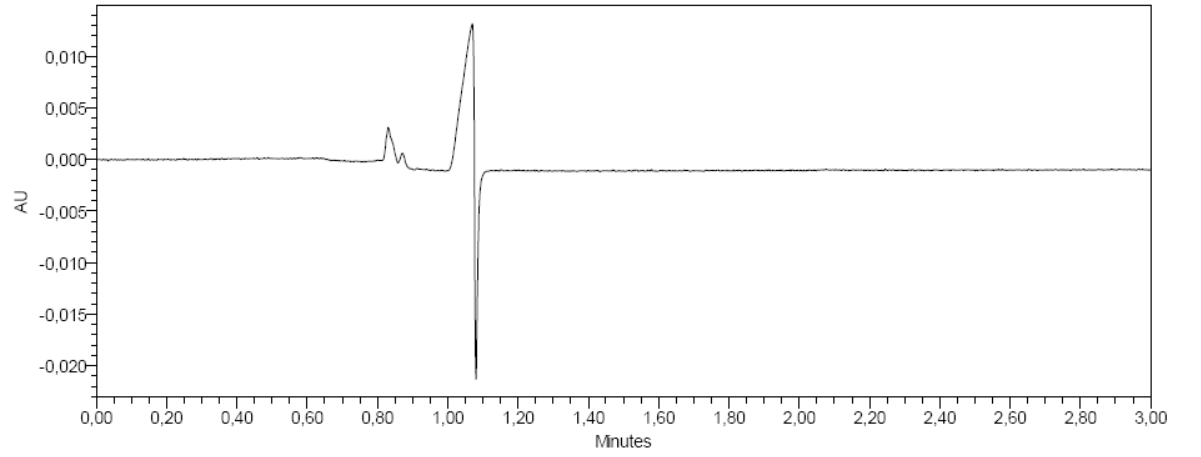
Tiyokolşikosid					
Numune no.	Derişim [%]	Eklenen referans madde [mg/500 ml]	Cevap [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Bulunan [mg/500 ml]	Geri kazanım [%]
1	59.5	2.66	113396	2.61	98.1
2	59.7	2.67	113144	2.61	97.8
3	59.5	2.66	114380	2.63	98.9
Ortalama	–	–	–	–	98.3
RSD [%]	–	–	–	–	0.6
% 95 güven aralığı		–	–	–	<96.9; 99.7>
4	89.2	3.99	168929	3.89	97.5
5	89.4	4.00	169729	3.91	97.8
6	89.2	3.99	168852	3.89	97.5
Ortalama	–	–	–	–	97.6
RSD [%]	–	–	–	–	0.2
% 95 güven aralığı		–	–	–	<97.2; 98.0>
7	119.4	5.34	230502	5.30	99.3
8	118.9	5.32	228672	5.26	98.9
9	119.4	5.34	230468	5.31	99.4
Ortalama	–	–	–	–	99.2
RSD [%]	–	–	–	–	0.3
% 95 güven aralığı		–	–	–	<98.5; 99.9>
Referans	–	8.7	189033	–	–

3.5. Seçicilik

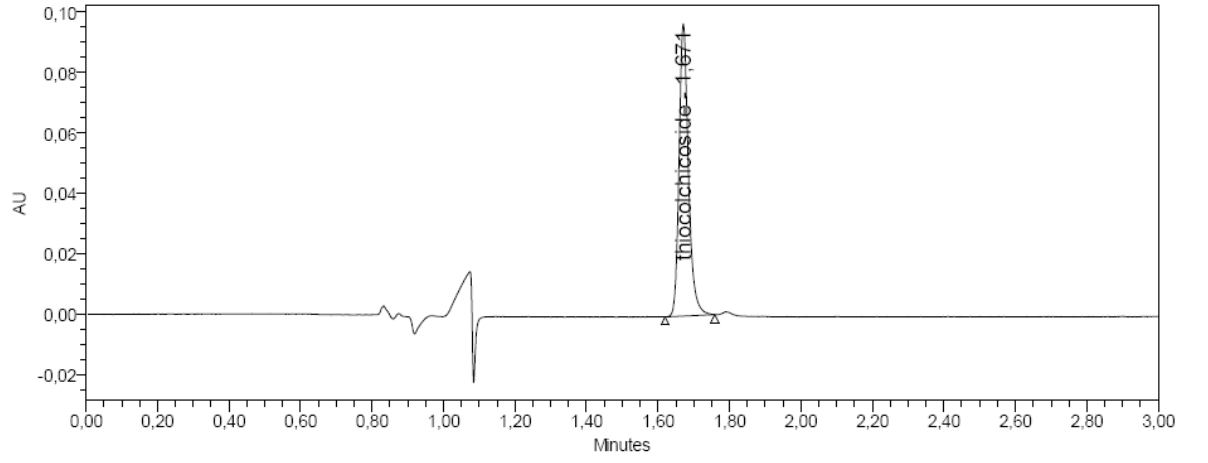
Sisteme verilen blank,plasebo, numune ve standart çözelti kromatogramları şekil 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3. ve 3.5.4.`de görülmektedir.



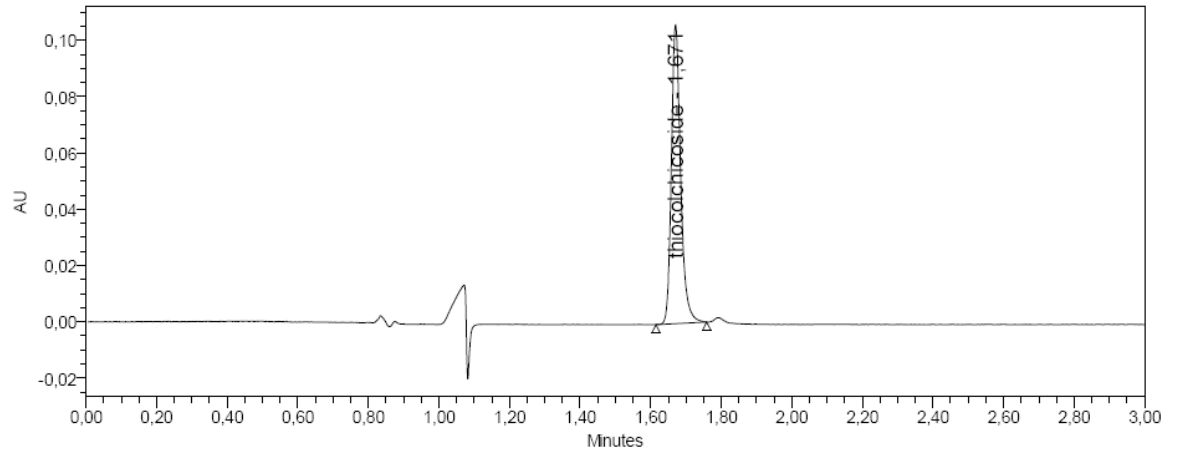
Şekil 3.5.1. Blank kromatogramı



Şekil 3.5.2. Plasebo kromatogramı



Şekil 3.5.3. Standart çözelti kromatogramı



Şekil 3.5.4. Numune çözeltisi kromatogramı

3.6. Yöntem Stabilitesi

Yöntem stabilitesi (robustness) parametresi sonuçları çizelge 3.6.1. 'de görülmektedir.

Çizelge 3.6.1. Yöntem stabilitesi sonuçları

Farklı kolonlar	Tiyokolşikosid		
	Alıkonma zamanı (dk)	Simetri faktörü	Teorik plaka sayısı
Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x100 mm seri no: 017039208156-96	1.79	1.20	20691
Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x100 mm seri no: 015337276155-56	1.86	1.31	18561
Hareketli faz kompozisyonu (Distile su : asetonitril, v/v)	Tiyokolşikosid		
	Alıkonma zamanı (dk)	Simetri faktörü	Teorik plaka sayısı
78 : 23.1	1.67	1.18	20368
78 : 22.0	1.79	1.20	20691
78 : 20.9	1.98	1.46	7530
Akış hızı [ml/dk]	Tiyokolşikosid		
	Alıkonma zamanı (dk)	Simetri faktörü	Teorik plaka sayısı
0.225	1.97	1.19	21511
0.250	1.79	1.20	20691
0.275	1.64	1.20	19947
Kolon sıcaklığı [°C]	Tiyokolşikosid		
	Alıkonma zamanı (dk)	Simetri faktörü	Teorik plaka sayısı
40	1.74	1.13	20959
30	1.79	1.20	20691

3.7. Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitesi

Standart ve numune çözeltilerinin stabilite sonuçları çizelge 3.7.1. 'görölmektedir.

Çizelge 3.7.1. Standart ve numune çözeltileri stabilite sonuçları

Tiyokolşikosid standart çözeltisi		
Zaman [saat]	Autosampler 25 ° C [Orijinal değerin %`desi]	Autosampler 4 ° C [Orijinal değerin %`desi]
0	100.0	100.0
24	99.0	97.9
48	97.0	99.9
Tiyokolşikosid numune çözeltisi		
Zaman [saat]	Autosampler 25 ° C [Orijinal değerin %`desi]	Autosampler 4 ° C [Orijinal değerin %`desi]
0	100.0	100.0
24	98.9	98.2
48	97.5	100.2

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analitik kimya endüstrinin bir çok alanında olduğu gibi farmasotik alanda da çok önemli bir yere sahiptir. Analitik kimyanın güçlü araçlarından olan HPLC, bir ilaç aktif maddesinin geliştirilmesinden başlayarak pek çok basamakta kullanılan güvenilir bir tekniktir.

İlacın hastaya güvenli bir şekilde ulaşması gerektiğinden ilaçta kalite kontrol testleri çok önemlidir. Her ürün lotunun test edilmesi ve ürünün kalitesinin test sonuçlarına göre değerlendirilmesi gereklidir. Farmasotik endüstride tabletlerin salınımı yani çözünmesi güvenlik ve işlevselliğini kanıtlamak için yapılan en önemli testlerdendir. İlaç salınımı çözünme hızı (dissolusyon) testi ile ölçülmektedir. Çözünme hızı testinde, bir ortamda çözünen toplam ilaç etken maddesi miktarı zamanın fonksiyonu olarak ölçülür. (Paakkuna ve ark. 2009) Çözünme hızı testi sonunda alınan numuneler analitik metoduna göre kromatografik yani HPLC yoluyla yada spektrofotometrik yolla analiz edilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yaklaşık 30 yıldır dünya çapında tüm laboratuarlarda kullanılan kanıtlanmış bir tekniktir. Ancak 2004 yılında cihaz ve kolon teknolojisindeki gelişmeler sayesinde sıvı kromatografide rezolusyon, hız ve hassasiyet parametrelerinde önemli ilerlemeler kaydedildi. Bu yeni performans düzeyine çıkmak için daha küçük partiküllü kolonlar [1.7 mikron] ve 15.000 psi (1000 bar) basınçtaki mobil faza dayanabilecek şekilde dizayn edilmiş cihazlar gerekiyordu. Bu yeni teknoloji Ultra Performanslı Sıvı Kromatografi olarak adlandırıldı.

Bu çalışmada ağrı kesici ateş düşürücü etkiye sahip kas gevşetici bir ajan olan tiyokolşikosid içeren tabletin çözünme hızı testi HPLC`den UPLC`ye transfer edilmiş ve analitik metot validasyonu yapılmıştır.

Çalışmada öncelikle HPLC metodu UPLC şartlarına uyarlanarak ön denemeler yapılmıştır. Daha sonra çözünme hızı metot validasyonunda istenen zorunlu olan validasyon parametreleri sırasıyla yapılmıştır.

İlk yapılan parametre olan seçicilik için numune, standart, blank ve placebo çözeltileri sisteme verilmiş ve analit pikinin herhangi başka piklerle çakışmadığı tespit edilmiştir.

Doğrusallık parametresi çalışmasında çalışma derişiminin % 55, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120 oranında referans tiyokolşikosid içeren çözeltiler stok çözeltilerden seyreltme yöntemi ile hazırlanmış ve sisteme verilmiştir. %55, % 100 ve % 120'lik çözeltilerden 5'er enjeksiyon diğer numunelerden 2'ser enjeksiyon yaptırılmıştır. Analiz sonunda elde edilen sonuçlardan regresyon eğrisi çizdirilmiştir. Bu eğrinin korelasyon katsayısı yani r değeri 0.9996 bulunmuştur. Kabul kriterini karşılamaktadır.

Doğruluk parametresi için test derişiminin % 60, % 90 ve % 120'si oranında referans madde ve plasebo içeren her seviyeden 3'er numune analiz edilmiştir. Hesaplanan derişimler ve bulunan derişimlerden geri kazanım hesaplanmıştır. Geri kazanım ortalamaları sırasıyla % 60, % 90 ve % 120 için 98.2, 97.5 ve 99.2 olarak bulunmuştur. Bulunan değerler kabul kriteri olan % 95.0 – 105.0 aralığındadır.

Kesinlik parametresi için analitik metottaki prosedür farklı günlerde farklı analistler tarafından farklı cihazlarda gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik kriteri için tek beherden alınan 6 numune sonucunun % RSD'si 1. analist ve 2. analist için sırasıyla 0.9 ve 0.4 bulunmuştur. 2 analist arası ortalama sonuçlar arası mutlak fark ise % 1'dir.

Yöntem stabilitesi için analitik metot belli değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Yapılan değişimler şunlardır; farklı kolon, hareketli faz asetonitril oranında \pm %10 değişim, akış hızında \pm %10 değişim, kolon sıcaklığında +10 ° C artış. Yapılan değişimlerde sistem uygunluk parametreleri yani simetri faktörü ve teorik plaka sayısı kabul kriterlerini karşılamaktadır.

Çözelti stabilitesi çalışmasında 4 ° C ve 25 ° C autosampler koşullarında bekletilen standart ve numune çözeltileri 24 saat aralıkla her seferinde taze standart çözelti hazırlanarak analiz edilmiş ve % değişime bakılmıştır. Analiz sonucunda çözeltilerin her iki sıcaklık koşulunda da 48 saat stabil olduğu gözlenmiştir. Bu bilgi analitik metoda ilave edilmiştir.

Yapılan validasyon çalışmaları yeni analitik metodun seçici, doğrusal, doğru, kesin ve stabil olduğunu göstermiştir.

Özetle bu çalışmada öncelikle HPLC metodu UPLC şartlarına uyarlanarak ön denemeler yapılmıştır. Daha sonra validasyon parametreleri çalışılmıştır. Yapılan validasyon çalışmaları yeni analitik metodun seçici, doğrusal, doğru, kesin ve stabil olduğunu göstermiştir. Valide olan UPLC metodu sayesinde analiz zamanı % 66

civarında kısılmakta ve hareketli faz sarfiyatında % 90'lara varan tasarruf sağlanmaktadır. Maliyetlerin çok önemli olduğu günümüzde ilaç endüstrisi laboratuvarları için bu tür çalışmalar oldukça önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

BAYTOP T. Farmakognozi. Cilt II. İstanbul, 1974

BHAVSAR, S. M. , M. P. DASHARATH, A.P. KHANDAR, C. N. PATEL. 2010. Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Lornoxicam and Thiocolchicoside in Solid Dosage Form. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2(2). 563-572.

DAVIS P.H., Flora of Turkey and East Eagean Islands, Vol 8, 1984, Edinbugh

DOKOUMETZİDİS , A. , P. MACHERAS. 2006. A Century of Dissolution Research: From Noyes to Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. International Journal of Pharmaceutics. 321: 1-11

ENGELHARRDT, H. 2004. One Century of Liquid Chromatography From Tswett`s Columns to Modern High Speed and High Performance Separations. Journal of Chromatography B. 800. 3-6

HORVÁTH, C. B. A. PREISS, S. R. LIPSKY. 1967. Use of Pellicular Ion Exchangers for the Separations of Nucleotides. ANAL.CHEM. 39: 1422

<http://www.cbgarden.org/blog/index.php/tag/fall-lecture>, Erişim Tarihi: 21.01.2010. Konu: Güz çiğdemi.

http://www.cosmoscience.org/Presentations_2006/HighTemperatureChromatographyHybridStationaryPhases.pdf , Erişim Tarihi: 21.01.2010. Konu: UPLC Kolon Kimyası.

http://www.tfd.org.tr/TFD_kongre_2007/tfd2007_14_Kayaalp.pdf , Erişim Tarihi: 21.01.2010. Konu: Çözünme Hızı Testi.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2 (R1)

NOVÁKOVÁ, L. , L. MATYSOVÁ, P. SOLÍCH. 2006. Advantages of Application of UPLC in Pharmaceutical Analysis. Talanta, 68: 908-918.

NOYES, A.A., W.R. WHITNEY. 1897. The Rate of Solution of Solid Substances in Their Own Solutions. J.Am. Chem.Soc. 19: 930-934

PAKKUNA, M. , S. MATERO , J. KETOLAINEN , M. LAHTELA-KAKKONEN , A. POSO , P. REINIKAINEN. 2009. Uncertainty in Dissolution Test of Drug Release. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 97: 82-90

RACHANA, R. J. , K. GUPTA. 2010. UV-Spectrophometric Determination of Thiocolchicoside in Capsule. Der Pharma Chemica. 2 (2) . 384-391

ROSSO , A. , S. ZUCCARO. 1998. Determination of Alkaloids from the Colchicine Family by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 825: 96-101

SENGAR, MR. , SV. GANDHI, UP. PATIL, VS. RAJMANE. 2010. Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and Thiocolchicoside in Fixed Dose Combination by Spectrophometry. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol.3 Issue 2. 89-91

SKOOG, D. A. , F. J. HOLLER, T. A. NIEMAN. Çev.Ed.: Esmâ KILIÇ. 2007. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık.

SUTHERLAND , F.C.W. , M.J. SMİT , L. HERBST , J. ELS , H.K.L. HUNDT , K.J. SWART, A. F. HUNDT. 2002. Highly Specific and Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of 3-desmethylthiocolchicine in Human Plasma as Analyte for the Assessment of Bioequivalence After Oral Administration of Thiocolchicoside. *Journal of Chromatography A*, 949: 71-77

SWARTZ , M.E. 2005. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) : An Introduction. *Separation Science Redefined*. 8-14.

TANKER M.N. Farmakognozi I, İstanbul 1973

TAVERNIERS , I. , M. DE LOOSE , E. VAN BOCKSTAELE. 2004. Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance. *Trends in Analytical Chemistry*. 23:8, 535-552

TSWETT, M. 1903. On a New Category of Adsorption Phenomena and Their Application to Biochemical Analysis. *The Lecture of Warsaw Society of Natural Sciences, Biological Section*. XIV (6)

TSWETT, M. 1906. On a New Category of Adsorption Phenomena and Their Application to Biochemical Analysis. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 24: 384-393

WANKHEDE, S. B. , S. S. ZAMBARE, S. S. CHITLANGE. 2010. Estimation of Thiocolchicoside and Ketoprofen in Pharmaceutical Dosage Form by Spectrophotometric methods. *Journal of Pharmacy Research*. 3.(4). 707-710

WREN , S.A.C. , P. TCHELİTCHEFF. 2006. Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development. *Journal of Chromatography A*, 1119: 140-146.

TEŞEKKÜR

Öncelikle destek, yardım ve anlayışı için değerli danışman hocam sayın Prof.Dr.Cevdet DEMİR` e çok teşekkür ederim. Yüksek lisans öğrenimim sırasında üzerimde emeği olan tüm hocalarımda teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı işyerimde yürütebilmem için bana destek veren ve çalışmam boyunca ilgisini esirgemeyen değerli müdürlerim sayın Dr.Y.Lütfü ŞEN` e, ve sayın Kemalettin GELİŞLİ` ye, süpervizörüm sayın Mehmet BAYRAM`a çok teşekkür ederim. Zentiva Sağlık Ürünleri Kalite Denetim Müdürlüğü Ürün-Stabilite Şefliği Dissolusyon Bölümündeki çalışma arkadaşlarıma verdikleri motivasyon ve destek için ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Metot geliştirme ve validasyon ile bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini her zaman hissettiren Ar-Ge bölümündeki arkadaşlarım Tuğba ÖZTÜRK KARYAĞDI, Muzaffere YAĞIZ ve Esin ERSOY YILDIZ` a çok teşekkür ederim. Ayrıca Office Word bilgisiyle yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Nil BORA ESKİKURT`a teşekkür ederim.

Yüksek lisansımı bitirmem için beni motive eden ve sürekli destek olan çok sevgili eşim İbrahim SEZEN`e ve her sarılışıyla yorgunluğumu alarak bana enerji veren canım oğlum Ömer Yiğit`e de çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

ÖZGEÇMİŞ

11.10.1979 yılında Bursa'da doğdu. İlk öğrenimini Hürriyet İlkokulunda, orta öğrenimini Hürriyet Lisesinde, lise öğrenimini Bursa Erkek Lisesinde tamamladı. 2002 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak kimya anabilim dalı analitik kimya bölümünde yüksek lisansa başladı. 01.06.2004 tarihinde Zentiva Sağlık Ürünleri A.Ş.'de işe başladı. Halen Kalite Kontrol Uzmanı olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.