

**SELEKSİPAG'IN FARMASÖTİK
TABLETLERDE HPLC İLE
MİKTAR TAYİNİ
Yüksek Lisans Tezi**

Ebru YILDIZ

Eskişehir 2024

**SELEKSİPAG'IN FARMASÖTİK TABLETLERDE
HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ**

Ebru YILDIZ

YÜSEK LİSANS TEZİ

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Ocak 2024**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ebru YILDIZ'ın "Seleksipag'ın Farmasötik Tabletlerde HPLC ile miktar Tayini" başlıklı tezi 19.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

.....

Üye : Prof. Dr. Hayati ÇELİK

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN

.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Enstitü Müdürü

ÖZET

SELEKSİPAG'IN FARMASÖTİK TABLETLERDE HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ

Ebru YILDIZ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Seleksipag, Dünya Sağlık Örgütü'nün fonksiyonel sınıflamasına göre Sınıf II ve III'de yer alan hastalarda pulmoner arteriyel hipertansiyon ilerlemesini geciktiren ve hastaların hastaneye yatışlarını azaltan bir ilaçtır. Seleksipag, prostasiklinden yapısal olarak farklı olan ve oral yolla kullanılan bir prostasiklin IP reseptör agonistidir.

Bu tez çalışmasında Seleksipagin ticari farmasötik üründen analizi için yeni bir HPLC metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen metodun hareketli fazı asetonitril: KH_2PO_4 tamponu (28 mM, pH 3) (40:60, *h/h*) olup akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0,5 mL/dk ve 1,0 μL 'dir. Metod validasyonu ICH Q2(R1) kılavuzuna göre yürütülmüştür ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Seleksipag, Uptravi[®], Miktar tayini, HPLC.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SELEXIPAG IN PHARMACEUTICAL TABLETS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ebru YILDIZ

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institute of Graduate Schools, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Selexipag is an oral prostacyclin IP receptor agonist that delays the progression of pulmonary arterial hypertension (PAH) and reduces hospitalization in patients in Class II and III according to the World Health Organization (WHO) functional classification. Selexipag is an oral prostacyclin IP receptor agonist that is structurally different from prostacyclin.

In this thesis study, a new HPLC method was developed for the analysis of Selexipag from commercial pharmaceutical products. The mobile phase of the developed method is acetonitril: KH_2PO_4 buffer (28 mM, pH 3) (40:60, v/v), the flow rate and injection volume are 0.5 mL/min and 1.0 μL , respectively. Method validation was carried out according to the ICH Q2(R1) guideline and the results were evaluated statistically.

Keywords: Selexipag, Uptravi[®], Quantitation, HPLC.

TEŞEKKÜR

Ocak, 2024

Yüksek lisans tezimin hazırlanma aşamasında sahip olduğu bilgi ve birikimleriyle bana destek olan, mesleki ve bilimsel birikimiyle bana yol gösteren, mesleğimde ve hayatta çok şey öğrendiğim ve her zaman örnek alacağım, danışman hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Yüksek lisans tezimin her anında bana yardımcı olan, yeni bilgiler edinmemi sağlayan ve bana sonsuz destek olan Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında katkılarını esirgemeyen Abeer ELRİŐ ve Egemen Güvenç ÖĞÜT'e,

Ve hayatımda her an yanımda olduğu gibi yüksek lisans tezimde de ilgisini, bilgisini ve sevgisini eksik etmeyen sevgili eşim ve aileme,

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	2
2.1. Seleksipag Nedir?	2
2.2. Seleksipagın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
2.3. Seleksipagın Etki Mekanizması	3
2.4. Seleksipagın Farmakokinetik Özellikleri	3
2.4.1. Genel özellikler.....	3
2.4.2. Emilim	4
2.4.3. Dağılım.....	4
2.4.4. Biyotransformasyon.....	4
2.4.5. Eliminasyon.....	5
2.5. Seleksipagın Farmakolojik Özellikleri	5
2.6. Seleksipag Analizleri ile İlgili Çalışmalar	6
2.7. Kromatografi.....	7
2.7.1. Temel kromatografik parametreler.....	8
2.7.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	9

2.7.3. HPLC donanımı	10
3. GEREÇLER	13
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler	13
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	13
4. YÖNTEMLER.....	14
4.1. Deneysel Parametreler	14
4.1.1. Enstrümental parametreler	14
4.1.2. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı.....	14
4.1.3. Standart çözeltilerinin hazırlanışı.....	14
4.1.4. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı.....	15
4.1.5. Sonuçların değerlendirilmesi	15
4.1.6. Yöntem geçerliliğinin tespiti	15
4.1.7. Sistem uygunluk testleri	16
4.1.8. Seçicilik ve spesifiklik.....	17
4.1.9. Kararlılık.....	18
4.1.10. Doğrusallık.....	18
4.1.11. Doğruluk.....	18
4.1.12. Kesinlik	19
4.1.13. Teşhis ve tayin alt sınırı.....	19
4.1.14. Sağlamlık	19
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
5.1. SLP'nin UV-Görünür Alandaki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi	21
5.2. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme.....	22
5.3. Yöntem Geçerliliğinin Tayini	23
5.4. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması.....	26
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	28
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>SLP ile ilgili yapılan miktar tayini adaklı çalışmalar</i>	6
Tablo 4.1. <i>SUT parametrelerinin sınırları</i>	16
Tablo 4.2. <i>USP'ye SUT parametrelerinin formülleri</i>	17
Tablo 5.1. <i>SLP analizi için elde edilen SUT verileri</i>	22
Tablo 5.2. <i>SLP için doğrusallık ve kesinlik verileri</i>	23
Tablo 5.3. <i>Geri kazanım verileri (n=4)</i>	24
Tablo 5.4. <i>Ara kesinlik verileri</i>	25
Tablo 5.5. <i>Metot sağlamlık çalışmaları (n=3)</i>	25
Tablo 5.5. (Devam) <i>Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)</i>	26
Tablo 5.6. <i>SLP standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)</i>	26
Tablo 5.7. <i>Elde hazırlanmış Uptravi® formülasyonu sonuçları (n=6)</i>	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>SLP'nin molekül yapısı</i>	2
Şekil 5.1. <i>Seleksipag'ın UV-Görünür bölgede spektrumu (C=7,84 µg/mL)</i>	21
Şekil 5.2. <i>Optimize koşullar altında SLP (7,84 µg/mL) ve IS (efavirenz, 40,0 µg/mL) kromatogramı</i>	22
Şekil 5.3. <i>Uptravi®'nin analiz kromatogramı</i>	27

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik Katsayısı
A_s	: Asimetri Faktörü
ANOVA	: Varyans Analizi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Konsantrasyon
C_8	: Oktilsilan
C_{18}	: Oktadesilsilan
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
HETP	: Teorik Tabaka Yüksekliği
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Beşeri İlaçların Ruhsatına İlişkin Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılmasına İlişkin Uluslararası Konferans)
ID	: İç Çap
IP	: Prostatiklin
IT	: İyon Tuzağı
k	: Kapasite Faktörü
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
MS	: Kütle Spektrometresi
N	: Teorik Plaka Sayısı
RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
R_s	: Ayrım Gücü
S_1	: Ara Kesinlik Varyansı
S_r	: Tekrarlanabilirlik Varyansı
SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
T	: Kuyruklanma Faktörü
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Alan

USP : United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kromatografik yöntemlerin kullanım alanının çok geniş olması, etkili ve hızlı ilaç analizlerinin yapılmasına da olanak sağlamaktadır. HPLC kullanımı, ilaçta araştırma ve geliştirme veya klinik ve tedavi izleme çalışmalarının yanı sıra kalite kontrol analizleri, biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik değerlendirmesi, kriminoloji, toksikoloji, çevre, gıda gibi alanları da kapsamaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından da kabul edilen Seleksipag (SLP), Sınıf II ve III pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) hastalığının ilerlemesini geciktirerek, bu durumda olan fonksiyonel hastaların hastaneye yatış durumlarını azaltan ve pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisi için, prostasiklin IP reseptör agonisti ve endike olarak isimlendirilen ağız yolu ile alınan ilaçtır. SLP, prostasiklin IP reseptör agonisti olduğundan prostasiklinden yapısal olarak farklı oral bir ilaçtır [1].

Bu tezde, SLP'nin farmasötik preparattan HPLC ile miktar tayini için geliştirilmiş yeni bir analitik yöntem üzerinde çalışılmıştır. Bu tezin amacı, SLP'nin farmasötik preparattan tayini için ucuz, hızlı ve güvenilir bir HPLC yöntemi geliştirmek, geliştirilen yöntemin geçerliliğinin sağlanması, yönteminin geliştirilmesi ve gerçek örneklerle uygulanabilir olmasının gösterilmesidir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen yöntem ICH Q2(R1) kılavuzuna göre valide edilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Seleksipag Nedir?

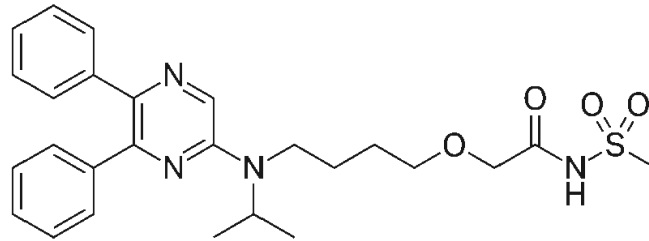
Prostasiklin üzerinde etkili olan diğer ilaçların aksine SLP, seçici bir prostanoid olmayan prostasiklin IP reseptör agonisti olarak görev yapar. Randomize kontrollü çalışmalar, kombinasyon tedavisindeki SLP'nin PAH mortalitesini önemli ölçüde azaltmadığını, ancak hastaneye yatış sıklığı ve hastalığın alevlenmesi üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ülkemizde 200 µg ve 800 µg tabletler halinde mevcuttur. Ana yan etkiler baş ağrısı, mide bulantısı, kusma ve baş dönmesini içerir. Ülkemizde ERA ve PDE-5i ile monoterapiye veya kombinasyon tedavisine yanıt vermeyen FS II-III grup 1 PAH hastalarında kullanılması endikedir.

Karaciğerde ilacın ana molekülden 37 kat daha güçlü olan aktif formuna dönüştürülür ve doğrudan IP reseptörlerine bağlanır. SLP ve metabolitleri IP reseptörlerine bağlanır ancak diğer prostasiklin reseptörlerine bağlanmaz [2].

SLP ağızdan alınan oral bir tablettir, piyasada UPTRAVİ® olarak bulunmakta olup üretici firması Johnson & Johnson firmasıdır SLP'nin başlangıç dozu günde iki kez 200 mikrogramdır. Doz daha sonra haftada iki kez 200 µg artışlarla hastanın tolere edebileceği en yüksek doza, günde iki kez maksimum 1600 µg kadar artırılır. Uzun süreli doz (idame dozu), hastanın yan etkileri ne kadar iyi tolere edebildiğine göre belirlenir. Yani doz yükseltme aşamasında hasta dayanılmaz yan etkilerle karşılaşmıyca kadar doz artırılır. İlacın yiyeceklerle birlikte alınması tolere edilebilirliğini artırabilir [2].

2.2. Seleksipagin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

475086-01-2 CAS numarası olan SLP'nin CAS isimlendirilmesi 2-[4-[(5,6-difenil-2-pirazinil) (1-metiletil) amino] bütoksi]-N-(metilsülfonyl) asetamid olup molekül formülü C₂₆H₃₂N₄O₄S, molekül ağırlığı ise 496,62 g/mol'dür.



Şekil 2.1. SLP'nin molekül yapısı

SLP kokusuz, katı toz halinde, beyaz renkli olarak bulunur. Dimetil sülfoksitte kolaylıkla çözünür, suda çözünmez. Serin ve kuru, iyi kapatılmış bir kaptaki saklanmalı ve

nemden ve güçlü ışıktan/ışıdan uzak tutulmalıdır. Erime noktası 134-138 °C'dir. Yoğunluğu 1,2 g/cm³ olarak belirtilmiştir [3].

2.3. Seleksipagin Etki Mekanizması

SLP, prostasiklin ve analoglarından ayrı olarak seçici IP reseptör agonisti olarak değerlendirilir. SLP, yaklaşık olarak 37 kat daha güçlü olan aktif metabolitini elde etmek için karboksilesterazlar tarafından hidrolize edilir. SLP ve aktif metabolitleri, diğer prostaglandin reseptörlerine (EP1-EP4, DP, TP ve FP) kıyasla IP reseptörleri için yüksek seğiciliğe sahip, yüksek afiniteli IP reseptörü agonistleridir. EP1, EP3, FP ve TP'nin seğiciliği önemlidir çünkü bunlar kan damarlarında ve gastrointestinal sistemde iyi kurulmuş kontraktıl reseptörlerdir. Bu reseptörler immünsüpresif etkilere aracılık ettiğinden, EP4, EP2 ve DP1'e yönelik seçicilik önem arz etmektedir. IP reseptörlerinin SLP ve etkin metabolitleri tarafından uyarılması, vazodilatasyonun yanı sıra antifibrotik ve antiproliferatif etkiler de üretir.

SLP, PAH sığanlarında pulmoner ve kardiyak yeniden yapılanmayı inhibe eder ve periferik ve pulmoner basınçlarda orantılı bir azalmaya neden olarak periferik vazodilatasyonun pulmoner farmakodinamik etkinliği yansıttığı öne sürölmektedir. SLP, in vitro sığan modelinde IP reseptörü duyarsızlaştırmasını veya taşıflaksiyi tetiklemez [1].

2.4. Seleksipagin Farmakokinetik Özellikleri

2.4.1. Genel özellikler

SLP'nin ve aktif metabolitlerinin farmakokinetiği esas olarak sağlıklı gönüllü kişiler üzerinde ęalıřma yapılmıştır. SLP ve aktif metabolitinin farmakokinetiği, 800 µg tek doz ve günde (2) iki kez 1800 µg çoklu dozlarla orantılı olduğu anlaşılmaktadır. Çoklu dozlardan sonra SLP ve aktif metabolitler 3 gün içerisinde kararlı duruma ulaşmıştır. Çoklu dozlardan sonra bile ne ana bileşik ne de aktif metabolit plazmada birikmez. Sağlıklı gönüllülerde, kararlı durum maruziyetindeki denekler arası değişkenlik (doz aralığı boyunca eğrinin altındaki kalan), SLP ve etkin metabolit için sırayla %43 ve %39 olduğu görölmektedir. Deneklerin uygulamaya maruz kalma farklılıklarının SLP ve etkin metabolitler için sırayla %24 ve %19 olduğu görölmektedir.

SLP ve aktif metabolitlerine duyarlı durum maruziyeti PAH hastalarında ve sağlıklı kişilerde benzerdir. PAH hastalarında SLP'nin ve aktif metabolitlerin farmakokinetik özellikleri hastalığın şiddetinden etkilenmez ve zamanla değişmez.

Sağlıklı gönüllülerde veya PAH hastalarında cinsiyet, ırk, yaş veya vücut ağırlığının SLP'nin ve aktif metabolitlerinin farmakokinetik özellikleri üzerinde klinik olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

2.4.2. Emilim

SLP hızla emilir ve yabancı bileşiklerin vücuttan atılmasında rol oynayan enzimler tarafından etkin bir metabolite hidrolize edilir. Ağız yoluyla uygulanan SLP ve etkin metabolitinin maximum plazma yoğunlaşmalarına sırayla 1-3 saat ve 3-4 saat sonra ulaşılır. SLP'nin insanlarda mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %49'dur. Sebebi büyük ihtimalle SLP'nin ilk geçiş etkisinden kaynaklanmaktadır ve aktif metabolitlerin plazma konsantrasyonları, oral ve intravenöz uygulamadan sonra benzerdir. Gıda varlığında, tek bir 400 µg dozundan sonra SLP 'ye maruz kalma, Japon deneklerde %15 azalırken, beyaz ırk deneklerinde %10 artmıştır. Bu sırada aktif metaboliteye maruz kalan Japon deneklerde %12 azalırken, beyaz ırkta %27 azalma göstermiştir. Tokken yapılan uygulamaya göre açken yapılan uygulamadan sonra daha fazla gönüllü advers olay bildirmiştir.

2.4.3. Dağılım

SLP ve aktif metabolitleri plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır (toplamda yaklaşık %99, ayrıca albümin ve alfa-1 asit glikoproteine de bir miktar bağlanır).

2.4.4. Biyotransformasyon

SLP, karaciğerde ve bağırsakta karboksilesterazlar tarafından aktif bir metabolite hidrolize edilir. Oksidatif metabolizma öncelikle CYP2C8 ve daha az oranda CYP3A4 tarafından katalize edilir ve hidrosillenmiş ve dealkile edilmiş ürünlerin oluşumuna yol açar. UGT1A3 ve UGT2B7, etkin metabolitin glukuronidasyonunda rol oynar. Etkin metabolit dışında insan plazmasında dolaşan metabolitlerin hiçbiri ilacın toplam miktarının %3'ünü aşmaz. Sağlıklı kişilerde ve PAH hastalarında, aktif metabolitin ağızdan alınarak uygulanmasından sonra duyarlı durum konsantrasyonunun ana bileşikten yaklaşık olarak 3-4 kat daha yüksek olduğu görülmüştür.

2.4.5. Eliminasyon

SLP'nin eliminasyonu temel olarak metabolizma yoluyla ve 0,8-2,5 saatlik ortalama terminal yarı ömrü vardır. Etkin metabolitin yarı ömrü 6,2-13,5 saattir. SLP'nin toplam vücut klirensi 17,9 L/saattir. Sağlıklı gönüllülerde atılım uygulamadan 5 gün sonra tamamlanmış ve çoğunlukla dışkıyla (uygulanmış dozun %93'üne karşılık gelen) ve %12' si idrarla atılmıştır.

Şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda (eGFR <30 mL/dk/1,73 m²) SLP ve aktif metabolitlerine maruz kalma oranında 1,4-1,7 kat artış (maksimum plazma konsantrasyonu ve plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki alan) görülmüştür.

Hafif (Child-Pugh sınıf A) veya orta derecede (Child-Pugh sınıf B) karaciğer yetmezliği olan hastalarda, SLP' ye maruz kalma sağlıklı deneklerle karşılaştırıldığında sırayla 2 ve 4 kat yüksek olduğu görülmüştür. Aktif metabolite maruz kalma, hafif karaciğer yetmezliği olan hastalarda hemen hemen değişmeden kalmış ve orta derecede karaciğer yetmezliği olan hastalarda iki (2) katına çıktığı fark edilmiştir. Şiddetli karaciğer yetmezliği olan (Child-Pugh sınıf C) iki deneğe SLP verilmiştir. Bu iki denekte SLP'ye ve etkin metabolitine maruz kalma, orta derecede karaciğer yetmezliği (Child-Pugh sınıf B) olan deneklerle benzer olduğu görülmüştür.

Karaciğer yetmezliği olan hastalarla yapılan bir çalışmanın simülasyon verileri ve modellemesine göre, orta derecede karaciğer yetmezliği olan hastalarda (Child-Pugh B Sınıfı) günde tek doz uygulamasından sonra SLP'ye maruz kalma, günde iki doz uygulaması sırasında sağlıklı gönüllülerde görülene göre yaklaşık 2 kat yüksek olacağı tahmin edilmiştir. Günde tek doz uygulanan bu hastalardaki kararlı durum maruziyetinin, günde iki kez doz uygulanan sağlıklı gönüllülerde gözlenene benzer olması beklenmektedir. Şiddetli karaciğer yetmezliği (Child-Pugh Sınıf C) olan kişiler, günde tez doz uygulaması sırasında orta derecede karaciğer yetmezliği olan kişiler gibi öngörülen kararlı durum maruziyeti göstermiştir [4].

2.5. Seleksipagin Farmakolojik Özellikleri

SLP, ağız yoluyla kullanılan yüksek selektif IP agonistidir. Yüksek selektif özelliği nedeniyle diğer prostanoid reseptörlerine (DP, EP, IP, FP, TP gibi aktif lipid aracılara) etkisi yoktur ve bu sebeple yan etkileri oldukça azdır. Faz 2 çalışmasında PAH'da aktifliği gösterilmiş ve ardından Faz 3'de GRIPHON çalışması yapılmıştır. Çalışmada birincil

sonlanım noktası ilk morbidite/mortalite olayının oluşmasına kadar geçen zamandır. Tüm nedenlerden ölüm veya kötüleşen PAH nedeniyle hospitalizasyon veya atriyal septestomi/akciğer nakli gerektirecek PAH kötüleşmesi, parenteral prostonoid kullanımı/kronik oksijen tedavisi gereksinimi veya hastalığın progresyonu mortalite/morbidite olayı olarak kabul görmüştür. Son 3 ayda ERA ve/veya PDE-5 inhibitörü kullanmış (%80) ve hiç tedavi görmemiş (%20) WHO Grup 1 toplam 1156 stabil hasta, 4,3 yıl boyunca takip edilmiştir. Yaş, cins, etyoloji, başlangıç fizik kapasite ve daha önce aldığı tedaviden bağımsız olarak SLP plaseboya göre morbidite/mortalitede %40 (HR 0,60; %99 CI 0,46-0,78; p<0,0001) azalma sağladığı izlenmiştir [5, 6].

2.6. Seleksipag Analizleri ile İlgili Çalışmalar

SLP birçok farmasötik preparatta yer alması ve farmasötik birçok alanda kullanılan bir madde olması nedeniyle üzerinde fazlaca analitik çalışma yapılmıştır. Tablo 2.1’de SLP ile ilgili yapılan miktar tayini odaklı çalışmalar verilmiştir.

Tablo 2.1 SLP ile ilgili yapılan miktar tayini odaklı çalışmalar

Teknik	Kolon	Hareketli Faz,		Dedektör	Enjeksiyon Hacmi	LOD,	Ref.
		Akış Hızı	t _R (dk)			LOQ,	
						Aralık	
HPLC	Insertil ODS (250×4,6 mm)	ACN %0,1 OPA tamponu (pH: 3) (70:30, h/h) 1,0 mL/dk	2,16	270 nm	10 µL	2,165 ng/mL 100 µg/mL	[7]
HPLC	C ₁₈ (100×4,6 mm, 5 µm)	Metanol: 20 mM fosfat tamponu (pH: 3) 1,0 mL/dk	Kaynakta verilmemiş	270 nm	20 µL	100-600 µg/mL	[8]
HPLC	C ₁₈ (150×4,6 mm, 5 µm)	ACN: %0,5 formik asit (65:35, h/h) 1,2 mL/dk	8,2	270 nm	20 µL	3,3 ng/mL 10-25 µg/mL	[9]

Tablo 2.1. (Devam) SLP ile ilgili yapılan miktar tayini adaklı çalışmalar

Teknik	Kolon	Hareketli Faz,		Dedektör	Enjeksiyon Hacmi	LOD,	Ref.
		Akış Hızı	t _R (dk)			LOQ,	
							Aralık
LC-MS/MS	X-Bridge fenil (150×4,6 mm, 3,5 µm)	ACN, Formik asit 1 ml/dk	3	Kaynakta verilmemiş	10 µL	1,22 ng/mL 100-200 µg/mL	[10]
LC-MS/MS	Cortecs C ₁₈ (100×4,6 mm, 2,7µm)	ACN: 10 mM Amonyum format (pH: 4) (80:20 h/h) 0,5 mL/dk)	10	Kaynakta verilmemiş	10 µl	10 pg/mL 10,0-25600 pg/mL	[11]
LC-ESI/MS	Zorbax C ₁₈ XDB (100×4,6 mm, 3,5 µm)	Metanol : 5 mM amonyum asetat (75:25, h/h) 0,7 mL/dk)	10	Kaynakta verilmemiş	10 µl	0,104 ng/mL 0,100-50,869 ng/mL	[12]

Tablo 2.1’de görüldüğü üzere; SLP analizleri için ağırlıklı yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde, farmasötik kalite kontrol uygulamalarında yaygın olarak tercih edilen C₁₈ kolon kullanılmış ve genellikle UV dedektörler tercih edilmiştir. Söz konusu geliştirilen metotlarda baskın teknik HPLC ve en çok kullanılan sabit faz silika bazlı tanecikli yapıda C₁₈ fonksiyonel gruba sahip kolonlardır. Kullanılan kolonların hepsi günümüz teknoloji ile üretilmiş kısa, dar iç çapı olan ve küçük tanecikli yapıda kolonlardır. Bu çalışmalarda analiz yönteminin tüm parametreleri verilmiş olup yönteme etki eden faktörler açıklanmıştır.

2.7. Kromatografi

Kromatografi, karışımların bileşenlerinin ayrılması, tanımlanması ve belirlenmesi için çeşitli önemli yöntemleri içerir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune mobil fazda çözülür. Mobil faz gaz, sıvı veya süperkritik akışkan olabilir. Bu hareketli faz daha sonra bir kolon veya katı yüzey üzerinde hareketsiz hale getirilen, karışmayan sabit bir fazdan

geçirilir. Sabit fazda güçlü bir şekilde tutulan numune bileşenleri, mobil faz akışıyla birlikte çok yavaş şekilde hareket ederken, zayıf şekilde tutulan bileşenler hızlı bir şekilde hareket eder. Geçiş oranlarındaki bu farklılıklar, numune bileşenlerini niteliksel ve/veya niceliksel olarak analiz edilebilecek farklı bantlara veya bölgelere ayırır. Kromatografi, bilimin her alanına uygulanabilecek güçlü bir ayırma yöntemi olup, 20. yüzyılın başlarında Rus botanikçi Mikhail Tswet tarafından keşfedilip isimlendirilmiştir. Tswet, bu tekniği, klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini, ince öğütülmüş toz kalsiyum karbonatla doldurulan bir cam kolon aracılığıyla bir bitki pigment çözeltisinden çıkarmak için kullandı. Bu yöntem kromatografi denir. Çünkü ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde görünür. Yunanca “renk” anlamına gelen “chroma ” ve “harf” anlamına gelen “graphein ” kelimelerinden gelir.[13].

2.7.1. Temel kromatografik parametreler

Alıkonma zamanı: Numune uygulamasından, analitin dedektöre ulaşmasına kadar geçen zamana alıkonma zamanı denir. Alıkonmayan türün dedektöre ulaşması için gereken zamana ölü hacim alıkonma zamanı (t_0) denir.

Kapasite faktörü: Kromatografik sistemde moleküller, işlem sırasında mobil fazdaki, akım seviyesindeki veya diğer parametrelerdeki değişikliklere bağlı olarak etkili bir şekilde ayrılmış moleküllerin tutulma sürelerindeki değişiklik nedeniyle analizler arasında farklı tutulma sürelerine sahip olabilir. Saklama süreleri bu değişkenlerin etkisini ortadan kaldırmak için normalleştirilebilir. Bu nedenle kapasite faktörü veya alıkonma faktörü (k') ile belirlenen bir ifade kullanılır ve ölü hacimden ilgili molekülün alıkonma süresi hesaplanır.

Bir maddenin kapasite katsayısı 1'den çok küçükse bu, maddenin kolondan ölü zamanına çok yakın bir zamanda ayrıldığı anlamına gelir. Güç faktörü 20-30'dan büyük olduğunda elüsyon zamanı çok uzun olur. İdeal olarak kromatografik ayırma, karışımdaki maddelerin kapasite katsayısının 1 ile 10 arasında olduğu koşullar altında gerçekleştirilir.

Seçicilik: Karışımda, seçicilik (α) daha fazla alıkonulan maddenin kapasite faktörünün daha az alıkonulan maddenin kapasite faktörüne oranı olarak tanımlanmaktadır. Analitin, sabit ve hareketli fazın, kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olan seçicilik, bu faktörlere göre değişiklik gösterebilir. Seçicilik, $\alpha > 1$ olmalıdır. Seçicilik değeri $\alpha > 1$ olmadığı durumlarda iyileştirilme yapılmazsa karışımdaki maddelerin pikleri tamamen ayrılma göstermez.

Kolon etkinliği: Bir kromatografi kolonunun performansı, ayrılan madde kolon içerisinde hareket ettikçe meydana gelen bant genişlemesinden etkilenir. Kolon performansının niceliksel bir ölçüsü olarak iki terim yaygın olarak kullanılır: teorik katman numarası (N) ve teorik katman yüksekliği (H). Kromatografik ayırma sırasında $N > 2000$ gereklidir. L'nin kolon uzunluğunu temsil ettiği durumda teorik katman sayısı ile teorik yükseklik arasında aşağıdaki gibi bir ilişki vardır. Bazı araştırmacıların daha güvenli sonuçlar verdiğine inandığı farklı bir N değerini hesaplanırken pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliğinin ($W_{1/2}$) tayini gerekmektedir.

Ayırım faktörü: Rezolüsyon (R), iki bant arasında bulunan uzaklığın bant genişliği cinsinden değerini olarak ifade edilmektedir. Bu durum bir kolonun iki analiti ayırma yetisinin nicel bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir ve $R \geq 1,5$ kabul edilebilir bir ayırımı işaret etmektedir.

Asimetri faktörü: Analitin sabit fazda olan denge derişimi ile hareketli fazda olan denge derişimi arasındaki ilişkide doğrusallıktan sapma, nicel analizi güçleştirdiğinden dolayı ve alıkonma sürelerinin nitel analizlerde kullanımını engellediğinden kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenmektedir. İyi ayırma işleminde pik asimetri oranının (PAO) 1,5'tan küçük olması istenir [13].

2.7.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Farmasötik endüstri ve biyoteknoloji alanında araştırma ve geliştirme, rutin analiz ve kalite güvence süreçlerinin her aşamasında moleküllerin tanınması, saflaştırılması ve karakterizasyonu için kullanılan en önemli yöntemlerden birisi HPLC'dir. Çözelti halinde, çözünür durumdaki moleküllerin saflaştırılması ve ayrılması için uygun bir yöntemdir. HPLC, ilaçlardan proteinlere kadar uzanan geniş bir aralıkta çözünür moleküllerin saflaştırılması ve analizi için ideal olan çok yönlü bir ayırma tekniğidir. řu anda HPLC; amino asitler, proteinler, peptitler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitler dahil olmak üzere birçok biyomolekül sınıfının analiz etmek için temel bir tekniktir. HPLC'nin diğer tekniklere göre avantajları ayırma gücü, hız, hassasiyet, doğruluk, tekrarlanabilirlik, geri kazanabilirlik, uçucu olmayan ve sıcaklıkla bozulabilen türlerin ayrılması için uygunluğunun ve otomasyonunun olmasıdır [13].

2.7.3. HPLC donanımı

Test edilecek biyomolekülün uygun bir çözücü içerisinde çözünmesi: Test edilecek, Peptit, protein veya diğer moleküller organik ya da uygun bir çözücü kullanılarak çözülmesi gerçekleştirilir. Numunedeki bileşenlerin ayrılması: Bileşenlerin ayrılması sabit faz olarak nitelendirilen kolonda gerçekleştirilir. Çözünmüş karışım kolona enjekte edilir. Bu karışım ve mobil fazdan oluşan sıvının kolon boyunca hareketi için bir basınç uygulanır. Bu basınç altında farklı bileşenler, kolon içerisinde farklı hızlarda hareket ederler. Bu, bileşenlerin çıkışta farklı zamanlarda ulaştığını gösterir. Ayrılan bileşenlerin ve miktarlarının tayini ise bileşenler ayrıldıktan sonra detektör kullanılarak yapılır. Bu amaçla numunelerin özelliklerine bağlı olarak UV, iletkenlik, floresans, kütle gibi farklı detektörler seçilebilir. Kromatogramların değerlendirilmesi: Detektörden elde edilen kromatogramlar çeşitli değişik bilgisayar programları kullanılarak kolaylıkla yorumlanmaktadır [14].

Normal akış hızlarına ulaşmak için modern cihazlarda 3-10 µm'lik dolgu maddeleriyle doldurulmuş kolonlarda yüzlerce atmosferlik basınç uygulanmaktadır. HPLC cihazları yüksek basınç kullanıldığından, diğer kromatografi cihazlarına göre daha karmaşık ve pahalıdır.

Mobil faz şişeleri: HPLC cihazında tipik bir veya daha fazla çok cam veya paslanmaz çelik kap bulunur. Araştırmalarda sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar çeşitli polaritede çözücüler kullanılabilirdiğinden bu kapların kalitesi oldukça önemlidir. Ayrıca kullanılan çözeltinin saf olması gerekir. Bu numuneyi ve kolonu etkiler, dolayısıyla hatalar meydana gelebilir.

Gaz giderici: Mobil faz içerisinde yer alan erimiş gazların giderilmesi için kullanılan bir sistemdir. Tüm çözücülerin gazları giderilmelidir. Mobil fazda hava kabarcıklarını kolonlarda ve pompalarda sorunlara neden olabilir. Örneğin; kolonda kabarcık oluşması alıkonma süresinin değişmesine ve pik genişlemesine neden olabilir. Gaz giderme işlemi farklı şekillerde yapılabilir; karıştırma ile vakuma maruz kalma, çözücülerin ısıtılması, ultrasonifikasyon veya çözücü şişesine helyum gazı verilmesi ile yapılabilir. Ancak teknoloji ilerledikçe gaz gidericiler cihazda standart modül halinde yer alıyorlar.

Pompa: Pompa, HPLC sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistem içerisinde HPLC pompası, numunenin ve fazın enjektör, dedektör ve kolondan sabit akışını sağlayan bileşendir. HPLC pompasının görevi sıvıyı sistem içerisinde sirküle

etmektedir. Akış hızı genellikle dakikada akan mobil faz hacminin mililitre cinsinden ifade edilir. Bir pompa sisteminin sahip olması gereken temel özellikler; yüksek basınç altında çalışabilme, akışın doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, basınç dalgalanmalarının düşük olması ve kendi kendini düzenleyebilme yeteneğidir.

HPLC sisteminde yer alan pompalama sistemleri, pompanın yapımında kullanılan malzemeye (metalik, ametalik), pompanın akış hızına (mikrobore, standart bore ve preparatif pompa sistemleri), pompanın tipine (izokratik/tek kanallı, binary/ikili, quaternary/gradyen 4 kanallı pompa sistemleri) ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına (şırınga tipi, piston pompalar) göre sınıflandırılır.

Yapılan çalışmalarda metot geliştirme ve moleküllerin ayrımı önemlidir. Pompa deney sırasında değişmeden sabit bir akış hızı sergiliyorsa buna izokratik sistem denir ve basit ayırmalara uygundur. Gradient sistemde hareketli fazın bileşimi zamanla değişir. Kompleks karışımların ayrılması ve bilinmeyen karışımlar için yöntem geliştirilmesi amacıyla kullanılır.

Enjeksiyon portu: Enjeksiyon portu HPLC sisteminin bileşenlerinden biridir. Numunenin sabit fazdan (kolon) önce hareketli faza enjekte edilmesi için kullanılır. İki çeşit olmak üzere elle kumanda edilen manuel ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler vardır. Günümüzde oto-enjektör ünitelerinin soğutma, seyreltme, ısıtma ve karıştırma gibi fonksiyonları da vardır.

Kolon fırını: Çalışma kalitesi için kolonun tutulduğu ortamın sabit bir ısıda olması gerekir. Bu nedenle HPLC cihazlarında kolon fırını önem arz etmektedir. İki tür kolon fırını vardı. Bunlar Hava sirkülasyonlu ve blok ısıtıcılıdır.

Kolon: Kolon, HPLC donanımının temel bileşenlerinden biridir. Karmaşık örneklerde bileşenleri iyi çözünürlükle ayıran sabit fazdır. Kolonun iç yüzeyi için kullanılan malzemelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri büyük farklılıklar gösterir ve numunenin bilinen fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, kullanılan HPLC yöntemine ve mobil fazın özelliklerine göre seçilmelidir. Çoğu analitik kolonun iç çapı 2 ila 5 mm arasında değişir. Kolon iç çapı arttıkça iç doldurma hacmi ve akış hızı artar ancak oluşan piklerin çözünürlüğü nedeniyle hassasiyet azalır. Kolon uzunlukları büyük ölçüde değişir, ancak genellikle 30 ila 300 mm'dir. Kolon uzunluğunun arttırılması numune bileşenlerinin ayrılmasını iyileştirir, ancak analiz süresi ne kadar uzun olursa, o kadar fazla mobil faz tüketilir. Analiz için doğru kolonları seçmek çok önemlidir.

Dedektör: Kolondan çıkan bileşenleri görmemizi, miktarlarını ve ayrımlarını belirlemenizi sağlar. Dedektörden geçen maddeler bir kayıt cihazı kullanılarak kaydedilir ve dedektörün zaman içindeki tepkisine göre oluşturulan grafiğe kromatogram adı verilir. UV/VIS Dedektör, Fotodiyot Dizisi Dedektörü (DAD), Kütle Dedektörü (MS), Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD), Refraktif İndeks Dedektörü (RID), Toplam İletkenlik Dedektörü (TCD) ve Elektrokimyasal Dedektör (ECD) gibi dedektörler geliştirilmiştir. Dedektörler analizi yapılacak numune ve analitin fizikokimyasal özelliklerine uygun olarak seçilmektedir [14].

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler

Analitik saflıktaki kimyasal maddeler monobazik potasyum fosfat (%99,8, *a/a*), fosforik asit (%86, *a/a*), efavirenzdir. HPLC sınıfı çözücüler Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınan asetonytrildir. Su, laboratuvarlarımızdaki Millipore ultra saf su sistemleri kullanılarak üretilmiştir. %99,9 (*a/a*) saflıkta SLP referans standardı TRC Company'den (Kanada) satın alınmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

HPLC analizleri için Shimadzu (Japonya) firmasına ait Nexera-i LC-2040C 3D cihazı kullanılmıştır. Sistemin yazılımı Shimadzu (Japonya) firmasına ait LabSolutions 5.81 yazılımıdır. Sistem Windows 10 ile donatılmıştır.

Analizlerde Sunshell firmasının ürünü olan core-shell (çekirdek-kabuk) partiküle sahip C18 kolon (2,6 μm , 4,6 x 100 mm) kullanılmıştır.

Kullanılan diğer cihazlar Mettler Toledo (İsviçre) firmasına ait SevenMulti model pH metre ve XSE 105 Dual Range model analitik terazi, RK 100 H model ultrasonik banyo (Bandelin, Almanya), Reax Top model karıştırıcı (Heidolph, Almanya) ve Rotina 380 R santrifüj cihazı (Hettich, Almanya) ve çözelti hazırlanmasında 20-100 μL ve 100-1000 μL aralıklarında çalışılan Research model Eppendorf (Almanya) pipetörlerdir.

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneysel Parametreler

4.1.1. Enstrümental parametreler

HPLC analizlerinde kolon fırın sıcaklığı $35,0 \pm 0,1$ °C'dir. Sisteme hareketli faz 0,5 mL/dk akış hızında gönderilmiştir. Numune ve standart çözeltilerin stabilitesinin korunması amacıyla otomatik örnekleyicinin termostat sıcaklığı $15 \pm 0,1$ °C'ye sabitlenmiş olup 1,0 µL enjeksiyon hacmi olarak belirlenmiştir. Hazırlanan hareketli faz çözeltileri 0,22 µm selüloz asetat filtre ile süzülmüştür.

SLP'nin maksimum absorbanansı 204 nm'de tespit edildiği için HPLC sisteminde foto diyot dizisi dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayrıca dedektörde spektrumlar 190 ve 380 nm arasında 1,5625 Hz veri örnekleme frekansında ve 0,640 sn zaman sabitinde izlenmiştir.

4.1.2. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

HPLC çalışmalarında kromatografik ayırım izokratik elüsyon modunda yapılmıştır. Hareketli faz karışımı asetonitril: KH_2PO_4 tamponu (28 mM, pH 3) olup (40:60, *h/h*) oranında kullanılmıştır. Tampon çözelti, 3,856 g monobazik potasyum hidrojen fosfatın 1,0 L su içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda çözünmesi için 15 dakika bekletilmiş ve süzülmüştür.

4.1.3. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Referans standardının çalışma çözeltileri ve stok çözeltileri, asetonitril ile hazırlanmıştır. SLP'nin stok çözeltileri 100 µg/mL elde ederek hazırlanmıştır. İlerleyen basamaklarda yapılan yöntem validasyon çalışmalarında ise kullanılan kalite kontrol çözeltileri stok çözeltinin hareketli faz çözeltisiyle seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Hareketli faz ve kolon seçimi sırasında iç standardın seçimi içinde çalışmalar yapılmıştır. Bilindiği gibi kromatografinin içinde olduğu yöntemlerde kromatografik parametrelerin ayarlanmasının yapılması ve günden güne sabit şekilde tutulması önem teşkil etmektedir. Çünkü maddelerin sinyal büyüklükleri ve alıkonulma zamanı analiz koşulluyla tamamen ilişkilidir. Hareketli faz bileşimini, kolon sıcaklığını, dedektör verimliliğini ve kolon fizikokimyasal koşullarını en üst düzeyde veya aynı değerde tutmak her zaman mümkün

değildir. Karışık yapılı örnek analizleri ve özellikle biyolojik sıvılarda, kolonun kimyasal yapısıyla birlikte birçok aletsel bileşen etkilenmektedir.

Bu doğrultuda, analizde iç standart olarak değerlendirilecek maddeler incelenmiştir. Çözünürlük, dedekte edilebilirlik, yapısal benzerliği ve polaritesi gibi önemli parametreler göz önüne alınarak yapılan araştırmalarda Efavirenzin iç standart olarak kullanılabilen en uygun madde olduğuna kanısına varılmıştır.

4.1.4. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

SLP'nin geri kazanım çalışmaları farmasötik preparatı olan Uptravi® (200 µg/tablet SLP içerir) içerisinde yapılması hedeflenmiştir. 10 tane Uptravi® ilaç tableti (200 µg/tb) tek tek hassas terazide tartılarak ortalama tablet ağırlığının hesaplanması yapılmıştır. 10 tablet havanda iyice öğütülerek toz haline getirilmiştir. Ezilen tabletlerden ortalama tablet ağırlığına (138,94 mg) karşılık gelen bir miktar çıkarılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Ortalama bir tablet ağırlığı kadar tartılan miktar içinde asetonitril olan 10 mL jöjeye alınarak üzeri hacmine eşitlenecek şekilde asetonitril ile tamamlanarak çözelti hazırlanmıştır. Çözelti ardından vortekste 5 dakika karıştırılmış, karıştırıldıktan sonra 10 dk sonikatöre alınmış daha sonra tekrar vortekste 2 dk karıştırıldıktan sonra üst tarafta kalan saydam çözelti 0,22 µm gözenek çapı olan PVDF filtresinden süzölmüş ve elde edilen tablet çözeltisi %25 ACN ile seyreltilip sisteme verilmiştir.

Bu homojen çözelti 1/10 oranında ara stok olarak seyreltilip geri kazanım çözeltileri bu ara stoğun gerekli oranlarda seyreltilmesi ile kalibrasyon çözeltileri serisinde dedektör için %20, %50, %80, %100, %120, %150 ve %170 oranlarına gelecek şekilde hazırlanmıştır.

4.1.5. Sonuçların değerlendirilmesi

HPLC dedektör sisteminin analitik tepkisi, elde edilen kromatogramdaki etken maddenin sinyal alanı olarak belirlendi. Erişilen verilerin grup arası uyumu, varyansının analizi (ANOVA) incelenmiş ve istatistik hesapları GraphPad Prism v8.0 programı ile yapılmıştır.

4.1.6. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Geliştirilen yöntem için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) Q2(R1) kılavuzun önerdiği şekilde metod geçerliliğinin incelenmesi yapılmış ve analitik için

gerekli kriterleri sağladığı belirlenmiştir [15]. Yöntem geçerlilik için kesinlik, spesifiklik, doğruluk, doğrusallık, tayin alt sınırı, sistem uygunluk testleri ve saptama sınırı yapılmıştır [15-17].

4.1.7. Sistem uygunluk testleri

Analizler esnasında mevcut sistemin metot geçerliliği sağlanmış sisteme aktarılabilirliğini ve sistemin düzgün çalışmasını sağlayacak ayrıca lüzumlu olmayan kromatografik verimlilik gerekliliğini önleyecek sistem uygunluk kriterleri oluşturulmuştur. Bu kriterler genel olarak; ayırım gücü (R_s), Teorik Tabaka Sayısı (N), seçicilik faktörü (α), Kuyruklanma (T) ve Asimetri Faktörü (A_s) ve Kapasite (k) gibi parametreler sistem uygunluk parametreleridir. Bu parametrelerin hesaplanması ve kabul edilebilirlik sınırları içerisinde olması gereklidir. Kabul edilebilirlik sınırları Tablo 4.1.'te dir.

Tablo 4.1. SUT parametrelerinin sınırları

Parametre	Kabul edilebilirlik sınırı (USP)
Teorik tabaka sayısı	$N > 2000$
Bağıl Alıkonulma	-
Kapasite faktörü	$1 \leq k \leq 10$
Ayırım gücü	$R_s > 1,5$
Kuyruklanma faktörü	$2 \leq T$
Seçicilik	$\alpha > 1$
Pik asimetrisi	$0,95 \leq A_s \leq 2$
Pik Alanının Tekrar edilebilirliği	$\%BSS < 1,5$

Metot geliştirme sürecinde bu parametrelerin her biri Tablo 4.2'de verildiği gibi Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) [18] metoduna göre hesap yapılmıştır.

Tablo 4.2. USP 'ye SUT parametrelerinin formülleri

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	N : Teorik Tabaka Sayısı t_R : Alıkonulma Zamanı W : Pik Genişliği T : Kuyruklanma faktörü
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0,05}}{2 \times \alpha_{0,05}}$	$W_{0,05}$: Pikin %5 Yüksekliğindeki Pik Genişliği $\alpha_{0,05}$: Pikin %5 Yüksekliğindeki ilk Yarısının Genişliği
Asimetri faktörü	$A_S = \frac{\beta_{0,10}}{\alpha_{0,10}}$	A_S : Asimetri Faktörü $\beta_{0,10}$: Pikin %10 Yüksekliğindeki İkinci Yarısının Genişliği $\alpha_{0,10}$: Pikin %10 Yüksekliğindeki İlk Yarısının Genişliği
Ayırım gücü	$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}}$	t_1 : önceki pikin alıkonulma zamanı t_2 : pikin alıkonulma zamanı $W_{0,5}$: pik genişliği $W_{P0,5}$: önceki pikin genişliği
Kapasite faktörü	$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	k : kapasite faktörü t_R : alıkonulma zamanı t_M : ölü zaman

4.1.8. Seçicilik ve spesifiklik

Seçicilik; bir yöntemde hedeflenen bileşiğin sinyalinin, matrislerdeki girişim yapabilecek maddelerin varlığında tayin edilebilme yeteneğidir. Bir analit veya analit grubu için mükemmel seçici olan bir yöntem spesifiktir. Spesifiklik ise validasyon prosedürüdür ve yöntemin mevcut olabilecek diğer bileşenler (örneğin safsızlıklar, bozunma ürünleri ve matris bileşenleri) varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneğini teyit etmektir [19]. Bu amaçla etken madde SLP derişimi bilinen miktarda zorlu bozma koşullarına tabi tutularak bozunma ürünleri elde edilmiş, kromatografik ayırım bu bileşenlerin varlığında yapılmış ve elde edilen sonuçlar standart SLP çözültisi ile karşılaştırılmıştır.

4.1.9. Kararlılık

SLP'nin stok çözeltisi, asetonitrilde uygun şekilde seyreltilmiş olup periyodik şekilde (6, 12, 18, 24, 48 saat) olmak üzere çözelti kararlılığını incelemek için analizleri yapılmıştır.

4.1.10. Doğrusallık

Bir yöntemin doğrusallığı, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan veya bir tür matematiksel dönüşümden sonra doğrudan orantılı olan ölçüm sonuçları sağlama yeteneği olarak tanımlanır. Doğrusallık genellikle, artan analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülen enstrümental tepkilerin (pik alan veya yükseklik) normal en küçük kareler eğrisi veya sadece doğrusal regresyon eğrisi olarak ifade edilir. Kalibrasyon eğrisinin yapılması için pik yüksekliklerin kullanımına kıyasla pik alanların kullanılması tercih edilir [20].

Geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için SLP standart çözeltileri %20-50-80-100-120-150-170'ine karşılık gelen (1,568; 3,92; 6,272; 7,84; 9,40; 11,76; 13,328 µg/mL) 7 farklı derişim seviyesinde asetonitril hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Dedektör sisteminde analizler en az üç tekrarlı olmak üzere yapılmış ve hesaplama elde edilen alanların ortalaması ile yapılmıştır. Doğrusallık gün içinde ve günler arasında olacak şekilde 3 (üç) kez yapılarak çalışılmış ve ortaya çıkan lineer regresyon analizi incelenmiştir.

4.1.11. Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, elde edilen değerin gerçek değerden sapma derecesi ile verilir. Bir yöntemin doğruluğuna ilişkin bir tahmin yöntemlerinden birisi de bilinen bir konsantrasyonda bir numunenin analiz edilmesini ve daha sonra sonuçların ölçülen ve gerçek değer arasında karşılaştırılmasını içerir [20]. Bu amaçla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Metot için elde hazırlanmış SLP tablet çözeltilerinden düşük seviyede (6,272 µg/mL), orta seviyede (7,84 µg/mL) ve yüksek seviyede (9,40 µg/mL) olmak üzere üç farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanmış ve analizler yapılmıştır. Her seviyeye üç paralel set hazırlanmış, ortaya çıkan sonuçların bağıl standart sapma (%BSS), standart sapma (S) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanımları hesaplanmıştır.

4.1.12. Kesinlik

Kesinliğin belirlenmesi tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik olmak üzere üç kategoriye ayrılır. Tekrarlanabilirlik veya gün içi kesinlik çalışması; belirli bir ekipman kullanılarak analizin, bir laboratuvarında bir analist tarafından ve bir iş günü içinde gerçekleştirildiğinde belirlenir. Ara kesinlik çalışması ise, analiz farklı analistler tarafından birkaç gün veya hafta boyunca tek bir laboratuvarında farklı ekipman, reaktifler ve kolonlar kullanılarak gerçekleştirildiğinde elde edilir [20].

HPLC için standart ve farmasötik formülasyon çözeltilerin %100 noktasına denk gelen (7,84 µg/mL) konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak üç gün sırası ile 5, 3 ve 3 tekrarlı olmak üzere analiz edilmiştir. Ayrıca metodu için ara kesinlik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar varyans analizi ile yorumlanarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama standart hata, ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve %95 güven seviyesi dahil edilerek istatistiksel şekilde hesaplanmıştır.

4.1.13. Teşhis Alt Sınırı ve Tayin Alt Sınırı

Teşhis alt sınırı (LOD), kullanılacak analitik koşullar altında saptanabilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Analitlerin varlığı LOD seviyesinde görülebilir, fakat bunların kantitatif olarak ölçülemez. Analitik koşullarda Doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilen en düşük konsantrasyon tayin alt sınırı (LOQ)'dur. Genellikle LOQ, teşhis alt sınırının (LOD) üç katı olarak tahmin edilebilir [20].

4.1.14. Sağlamlık

Analitik bir yöntemin sağlamlığı, yöntemin, metod parametrelerindeki değişikliklerden etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Metodun sağlamlığı yapılan kontrollü değişikliklerden anlamlı olarak etkilenmemesiyle gösterilmiş olur. Bu nedenle parametre, normal kullanım sırasında yöntem güvenilirliğinin bir göstergesini sağlar. Bir yöntemin sağlamlığı, farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı aletler, farklı reaktifler, farklı günler, vb. gibi çeşitli koşullar altında aynı numunelerin analizi ile elde edilen test sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesidir [20]. Bu amaçla %100 konsantrasyon seviyesine karşılık gelen standart SLP çözeltileri hazırlanmış ve kolon sıcaklığı ($\pm\%10$), akış hızı ($\pm\%10$), hareketli fazın apolar bileşen yüzdesi ($\pm\%10$) ve çalışılan dalga boyunda değişiklik yapılarak çeşitli sistem uygunluk parametrelerindeki sapmalar hesaplanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Söz konusu çalışmanın amacı SLP farmasötik preparatlarda analizi için otoritelerin önerdiği gereklilikleri sağlayan metot geliştirmektir. Günümüzde sıvı kromatografisi iyi bir ayırım gücü sağlayarak hedef bileşiğin analizinin yüksek doğruluk, tekrarlanabilirlik ve uygulanabilirlik sunması avantajıyla en tercih edilen tekniklerden birisidir. Gelişen teknolojik değişimler, yatırımlar ve detektörlerle sağlanmaya çalışılan yüksek hassasiyet ile bu yaygın kullanımın daha da süreceği aşikardır.

Çalışmada SLP'nin HPLC ile ayırımı sağlanarak analizi için uluslararası geçerliliğe sahip metot geliştirilmiştir. HPLC ile her türlü laboratuvarların var olan imkanlarına hitap edilmeye çalışılmıştır.

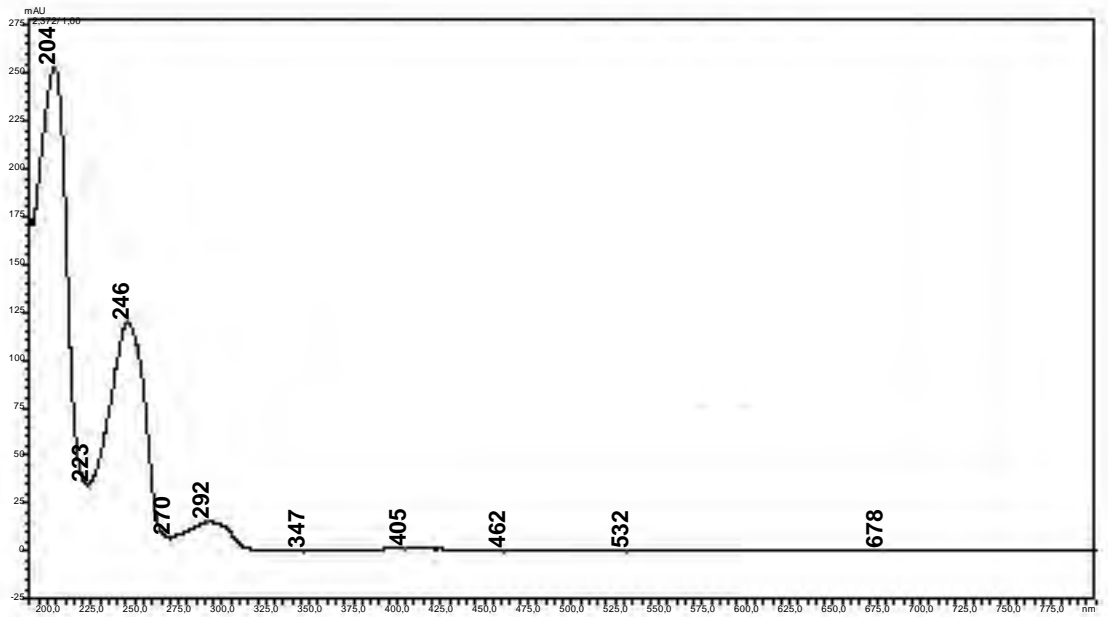
Bilindiği gibi kromatografi yöntemlerinde de kromatografik parametrelerin günden güne sabit tutulur ve iyi ayarlanması tutulması son derece önem teşkil etmektedir. Maddelerin sinyal büyüklükleri ve alıkonulma zamanları analiz koşulluyla birbirleriyle bağlantılıdır. Mobil faz bileşimini, dedektör verimliliğini, kolon sıcaklığını ve kolon fizikokimyasal koşullarını en üst düzeyde veya aynı değerde tutmak her zaman mümkün değildir. Bunun nedeni, karışık yapılu örnek analizleri ve biyolojik sıvıların analizinde, başta kolon olmak üzere birçok alet bileşeninin kimyasal yapısının bu numunelerden etkilenmesidir. Kolon ve hareketli faz seçimi sırasında iç standartların seçimi konusunda da çalışmalar yapılmıştır. Kromatografi çalışmaları, aletsel parametrelerde meydana gelebilecek değişimleri ve analizcinin neden olabileceği değişiklikleri izlemek için de iç standart kullanımı gereklidir.

İç standart maddeler, davranış benzerlikleri ve kimyasal yapıları nedeniyle analiz edilen numuneye değişmez derişimde katılan ve ortam değişkenlerinden analiz edilen maddeler gibi etkilenen maddelerdir. Tayin işlemlerini yaparken maddenin sinyalinin referans olarak kullanılması, analitik koşullardaki değişikliklerden kaynaklanan hataları önler ve daha kesin ve doğru sonuçlar sağlar. Bu doğrultuda, analizlerde iç standart olarak kullanılan maddeler dikkate alınmış ve yapılan çalışmalarda yapısal benzerlik, çözünürlük, dedekte edilebilirliği ve polarite gibi parametreler değerlendirilerek yapılan çalışmalarda Efavirenzin iç standart olarak kullanılabilir en uygun iç standart olduğu kararı verilmiştir.

Bu yöntemde tam olarak metot geçerliliği sağlanmıştır. Ayrıca geliştirilen metot ile farmasötik preparat olan Upravi®'nin analizi yapılmak istenmiştir.

5.1. SLP'nin UV-Görünür Alandaki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

HPLC çalışmalarının ilk adımı analitin UV-Vis spektroskopisi davranışlarının incelenmesidir. Bu amaçla SLP'nin UV-Vis spektrometresinde maksimum absorbansta yaptığı dalga boyu tespit edilmiştir. Şekil 5.1, 190-800 nm aralığında okunan, 7,84 µg/mL derişimde asetonitril içinde hazırlanan bir SLP çözeltisinin elde edilen spektrumunu gösterir.



Şekil 5.1. Seleksipag'ın UV-Görünür bölgede spektrumu (C=7,84 µg/mL)

Moleküllerin UV absorbanları yapılarındaki elektronik geçişlerin enerjisinden kaynaklanır. İzole bir C=C çift bağı için, bir elektronu pi'den pi* orbitaline yükseltmek için gereken enerji, UV bölgesindeki ışığa (yaklaşık 170 nm) karşılık gelir, ancak konjuge olan çift bağların sayısı (tekli bağlarla ayrılmış) arttıkça, en yüksek dolu moleküler orbital ve en düşük boş moleküler orbital arasındaki enerji farkı azalır. Yapıda yüksek dalga boylarında geçiş yapmaya yatkın göze çarpan fonksiyonel gruplar difenil pirazin grubu, pirazin halkasına bağlı amin grubu ve sulfonomidir. Bu grupların kendi içlerinde yaptıkları konjugasyonlarından kaynaklı absorbanlar görülmektedir. Ancak halkalar arasındaki rijiteden dolayı spektrum visible bölgeye geçememiştir.

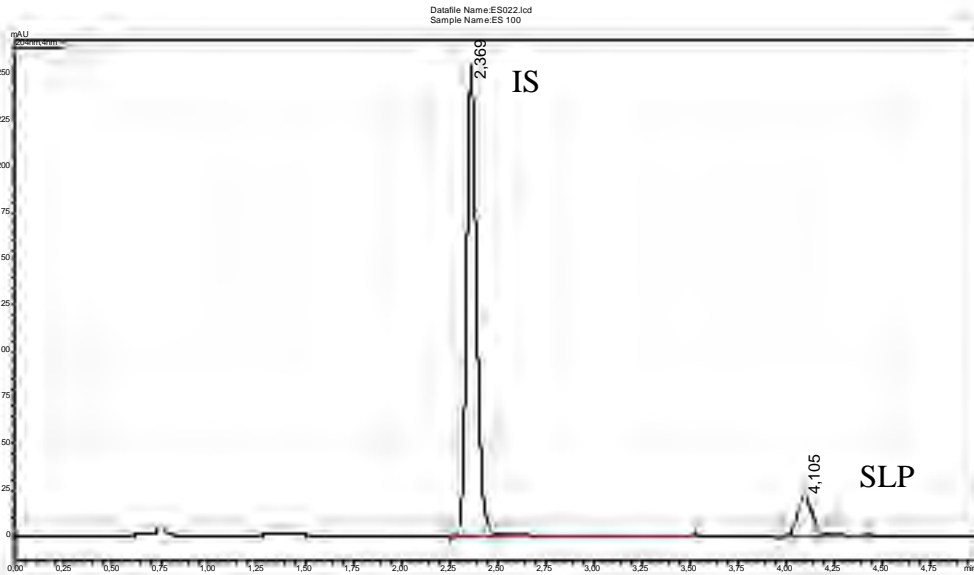
5.2. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

İlaç endüstrisinde ilaç analizlerinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte analizi için önerilen yöntemlerin başında sıvı kromatografisi gelmektedir.

Tablo 5.1. SLP analizi için elde edilen sut verileri

Parametre	Hesaplanan Değer		Tavsiye Edilen Değer
	SLP	IS	
Alıkonulma Zamanı (dk) \pm GA*	4,105 \pm 0,01	2,37 \pm 0,02	-
Alıkonulma Zamanı için %BSS	0,0001	0,0001	BSS \leq % 1
Pik Alanı Kesinliği için %BSS (n=6)	0,36	0,19	BSS \leq % 1
Alıkonulma Zamanı için Enjeksiyon Kesinliği %BSS (n=6)	0,03	0,05	BSS \leq % 1
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,10	1,19	T \leq 2
Kapasite Faktörü (K)	5,36	2,67	2 < k < 10
Teorik Tabaka Sayısı (N)	11335	7528	N > 2000
USP Genişlik	0,11	0,15	\leq 1
HETP (USP)	20,6	13,3	-

*%95 güven seviyesinde



Şekil 5.2. Optimize koşullar altında SLP (7,84 μ g/mL) ve IS (efavirenz, 40,0 μ g/mL) kromatogramı

5.3. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Geliştirilen yöntemde analit derişimine karşı dedektörden elde edilen sinyaller hesaba katılmıştır. Kalibrasyon grafiğı her bir standart çözelti derişimine karşılık gelen pik alanına göre oluşturulmuştur. HPLC yönteminin tüm metot geçerliliğı parametreleri tam olarak analiz edilmiştir.

Metodun hesaplanan doğrusallık ve kesinlik verileri Tablo 5.2’de verilmiştir. Metotların çalışma aralığı için inilebilecek en düşük SLP derişimleri hedeflenmiştir. HPLC yönteminde analitin sinyaline etki edebilecek muhtemel bozucu etkiler zorlu bozma koşullarında kromatografik ayrımın yapılması ve yöntemin optimizasyonu ile elimine edilmiştir. Ayrıca dedektörde pikin saflığı da 0,999887 olarak hesaplanıp mevcut piklerin sadece SLP’e ait olduğu tekrar kanıtlanmıştır. Böylece yöntemin spesifikliğı ve seçiciliğı sağlanmıştır.

Tablo 5.2. SLP için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	Değer
Doğrusal Aralık (µg/mL)	1,57-13,33
Eğim±SS ^a (Gün İçi, n=7)	2,605±0,07
Kesim±SS ^a (Gün İçi, n=7)	0,031±0,02
Tanımlayıcılık Katsayısı (Intraday, n=7)	0,9964
Teşhis sınırı	59,0 ng/mL
Tayin sınırı	178,9 ng/mL
Eğim±SH ^b (Günler Arası, k=3, n=21)	2,627±0,037
Kesim±SH ^b (Günler Arası, k=3, n=21)	0,028±0,008
Tanımlayıcılık Katsayısı (Günler Arası, k=3, n=21)	0,9961
ANOVA	F (2,18)=0,0002 P =0,9998 (P>0,05)
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, Ortalama, n=6)	0,556
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, SS ^a , n=6)	0,002
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, BSS ^c %, n=6)	%0,42

Tablo 5.2. (Devam) SLP için doğrusalılık ve kesinlik verileri

Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, OSH ^d , n=6)	0,001
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, GA ^e , n=6)	0,001845
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası , Ortalama, n=9)	0,555
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, SS ^a , n=9)	0,002
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, BSS ^c %, n=9)	0,282
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, OSH ^d , n=9)	0,001
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, GA ^e , n=9)	0,001
ANOVA	F (2,6)=0,324 P = 0,7354 (P>0,05)

^a Standart Sapma, ^b Standart Hata, ^c Bağıl Standart Sapma, ^d Ortalamanın Standart Hatası, ^e %95 Güven seviyesinde Güven Aralığı.

SLP analizi için optimize edilen HPLC yönteminin doğrusalılık ve kesinlik verilerinin hesaplanmasından sonra doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım deneyleri için elde hazırlanan Uptravi[®] tablet formülasyonu çözeltisine standart ekleme metodu ile SLP ilavesi yapılmıştır. Çalışma 3 farklı konsantrasyonda 7 bağımsız analiz ile gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım deneylerinden elde edilmiş veriler Tablo 5.3’de sunulmuştur. Sonuçlara dikkatle göz gezdirildiğinde seyreltme, süzme gibi işlemlerin yöntem doğruluğuna etkisinin kabul edilebilir sınırlar dahilinde olduğu görülmektedir.

Tablo 5.3. Geri kazanım verileri (n=4)

Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	Kesinlik		Doğruluk	
		SS	BSS (%)	Geri Kazanım (%)	Hata (%)
6,27	6,38±0,12	0,13	1,99	101,8	1,81
7,84	7,27±0,03	0,03	0,45	92,70	-7,29
9,41	9,31±0,13	0,13	1,40	98,98	-1,02

*%95 Güven seviyesinde

Tablo 5.4. Ara kesinlik verileri

Parametre	
Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/ml}$)	1,57-13,33
Eğim \pm SH (Güniçi, n=7)	2,619 \pm 0,048
Kesim \pm SH (Güniçi, n=7)	0,029 \pm 0,01
Tanımlayıcılık Katsayısı (Günlerarası, n=6)	0,99961
ANOVA	F (1,12)= 2×10^{-4} P=0,9883 (P>0,05)

Yöntemin geçerliliğinin sağlanmasında diğer bir önemli basamak ise metot sağlamlığının ifade edilmesidir. Metot sağlamlığı çalışmalarının önemli iki noktası vardır. Bunlardan ilki söz konusu metodun bileşenlerinde meydana gelen ufak değişikliklere direnç gösterebilmesi diğeri de metodun sınırlarının bilinmesidir. Gelişen kolon teknolojisi daha iyi ayırım ve seçicilik sağlarken metotta meydana gelen değişimlerden daha fazla etkilenir hale gelmiştir. Bu nedenle günümüzde sağlamlık çalışmaları metodun dayanıklılık kabiliyetini kanıtlamaktan çok sınırlarını ifade etme ve buna göre analizcinin gereken hassasiyeti göstermesini zorunlu kılma anlamı taşımaktadır. Çalışmada geliştirilen her iki metot için sağlamlık çalışmaları yapılmış ve alıkonulma süresi, teorik plakaların sayısı ve kuyruklanma faktörü parametrelerindeki fark olarak hesaplanmıştır. Tablo 5.5’de elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

SLP’nin asetonitril içinde hazırlanmış standart çözeltisinin stabilitesi farklı koşullar altında saklandıktan sonra HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Kısa süreli kararlılık için oda sıcaklığında 24 saat ve 48 saat boyunca, uzun süreli kararlılık için $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de üç gün süreyle döngüsü yapılarak depolanmış ve ardından her bir çözeltinin analizleri yapılmıştır. Bu analizler üç kez tekrar edilip sonuçlar %95 güven düzeyinde geri kazanımları ve bağıl standart sapma sonuçları olarak değerlendirildi. Tablo 5.6, SLP çözeltilerinin bu koşullar altında stabil olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.5. Metot sağlamlık çalışmaları (n=3)

Değiştirilen Parametre	Alıkonulma Zaman (dk)	%Fark (Ortalama \pm GA*)	N	%Fark (ortalama \pm GA*)
Tampon pH	2,9	4,05	10671	-5,86 \pm 1,4
	3,1	5,78	14215	25,4 \pm 1,7

Tablo 5.5. (Devam) *Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)*

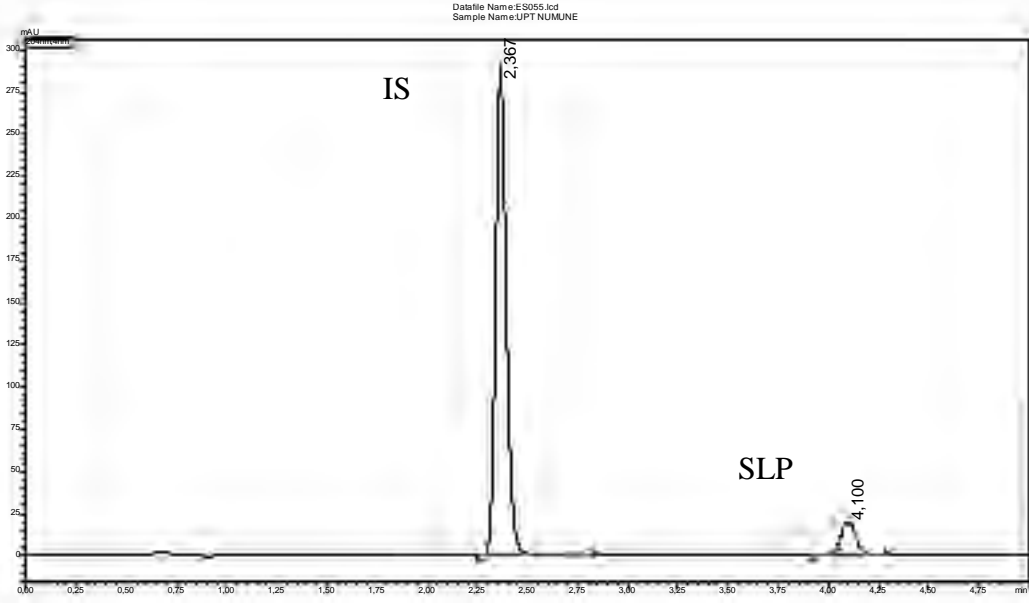
Kolon sıcaklığı (°C)	32,0	4,29	4,58±0,08	10857	-4,21±0,73
	38,0	3,91	-4,84±0,05	10401	-8,24±1,6
Akış hızı (mL/dk)	0,45	4,52	10,1±0,09	12051	6,32±1,01
	0,55	3,75	-8,60±0,11	10799	-4,73±0,7
Hareketli faz	66	6,86	-67,1±1,48	21447	89,2±1,7
Tampon çözelti oranı %	54	2,68	-34,67±0,15	7831	-30,9±0,5
Dalga boyu (nm)	206	2,37	-42,3±0,04	7511	-33,7±0,96
	202	2,37	-42,3±0,04	7491	-33,9±1,05

Tablo 5.6. *SLP standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)*

Eklenen Derişim (µg/mL)	Kısa Dönem Kararlılık (48 s, Oda Sıcaklığı)		Uzun Dönem Kararlılık (2 h, -20 °C)	
	Bulunan (Ortalama ±SS)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±SS)	GK (%)
	7,84	7,28±0,16	92,8	7,25±0,01

5.4 Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

Yöntem geliştirme sürecinin her aşaması analizciler için oldukça önemlidir ve sonraki süreçte soru işaretlerinin daha az olmasını sağlar. Yöntem optimizasyonu, yöntemin geçerliliğini kolaylaştırmak için temel oluşturur, ancak aynı zamanda yöntemin zayıf yönlerinin ortaya çıkarılmasını da mümkün kılar. Yöntemin tam geçerliliğinin sağlanması, yöntemin uygulanabilirliğinin ve yönetimin tekrarlanabilirliğinin kolaylaştırılması anlamına gelir. Bu süreçlerin ardından yöntem geliştiricinin elindeki kaynakları kullanarak numune uygulama çalışmaları yapması sunulan yöntemin kendini bir kez daha ispat etmesi demektir. Bu çalışmada da bu anlayışla SLP'nin ticari farmasötik tablet formülasyonu olan Uptravi® geri kazanım çalışmaları ve numune uygulamaları için kullanılmıştır.



Şekil 5.3. Upravi®'nin analiz kromatogramı

Tablo 5.7. Elde hazırlanmış Upravi® formülasyonu sonuçları (n=6)

Parametre	Değer
Ortalama (µg)	200,1
Minimum (µg)	199,8
Maksimum (µg)	200,4
Standart sapma (µg)	0,26
%BSS	0,13
OSH (µg)	0,11
%Bias	+0,01
Güven aralığı*	±0,21

*%95 Güven seviyesinde

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İlaç endüstrisinde Sıvı kromatografisi en baskın tekniktir. İlaç endüstrisi ile sınırlı kalmayıp tıp, tarım, çevre, beslenme vb. birçok alanda niteliksel ve niceliksel amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıvı Kromatografi tekniğinde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte analiz yapılabilmesi için kullanılan sarf malzemelerin yüksek saflıkta olması gerekmekte ve ayrıca sabit faz seçimi de büyük önem taşımaktadır. Tekniği günümüzde bu kadar başarılı ve vazgeçilmez yapan en önemli unsurlarından birisi sürekli gelişen kolon teknolojisidir. Diğer bir teknolojik değişim ve yeniliğin noktası dedeksiyonun gerçekleştiği dedektör sistemidir. Dedektör sistemini belirleyen önemli unsur ise hedef bileşiğin kimyasal özellikleridir. Özellikle ilaç moleküllerinin kromofor gruplara sahip olması sebebiyle HPLC tekniğine başvuru çok fazladır. Ancak bu yarışa yakından bakıldığında görülür ki ikisi birbirini tamamlayan ve ihtiyaç ile imkanlar dahilinde başvuru enstrümantasyon sistemleridir. Ayrıca her ikisinin kullanımı sınırlayan diğer bir önemli faktör ise hedef bileşiğin sahip olduğu kromofor grup ya da iyonlaşma kabiliyetidir.

Çalışmanın hedef bileşiği olan SLP dikkate alındığında, kromofor grubunun absorpsiyonu güçlü olmadığından HPLC ile ulaşılan tayin sınırları nispeten düşüktür. Söz konusu çalışma, günümüz ilaç ürünlerinin analizi için farmasötik analitik yöntemlerin sahip olması gereken gereksinimlere ve özelliklere bir örnektir.

Bahsi geçen çalışma kapsamında yapılan analizlerde kolon olarak marka C₁₈ model kullanılmıştır. Önceki bölümde tartışıldığı gibi C₁₈ model kolon, piyasada bulunabilen en küçük çekirdek ve kabuk parçacıklarına sahip kolondur. Bu özellik analizi oldukça verimli hale getirmiş ve 5 dakikada tamamlanmıştır. Bu süre literatürdeki çalışmalarda kullanılan yöntemlere göre daha kısadır. Bu çalışmada diğer çalışmalara oranla az maliyetli ve güvenilir sonuçlar verme yetisine sahiptir. Analiz ve zaman giderlerinde kısa süreli yöntemler ciddi bir tasarruf sağlar. Analizlerde kullanılan zaman kısa olacağından dolayı çözücünün az kullanımı, enerjinin tasarrufu ve atığın az ortaya çıkışı sağlanır. Böylelikle daha çevreci yaklaşım ortaya koyulacaktır. Analiz az yapıldığında bu durum önemli gibi görünmese de çok sayıda örnek kullanımı söz konusu olduğu zaman bu durum önem teşkil etmektedir. Az sürede çok analiz yapılabilmesi içinde yukarıda sayılan nedenler önemlidir. Özellikle de ilaç sektöründeki yoğun tempo düşünüldüğünde bu durum çok kullanışlıdır.

Bu çalışma için hazırlanan çözeltilerde analizler esnasında IS olarak EFA kullanılmıştır. Kullanılmış olan EFA çözeltilere eklenmiştir. Değişken olan hareketli fazlar hazırlanırken EFA'nın alıkonma süresinin göz önünde olması piklerinin iç standart pikine göre ayarlanması gerektiğini düşündürmüştür. İç standart için yapılan ilk çalışmada EFA'nın, izokratik hareketli faz kullanımıyla yapılan eş zamanlı analizde asidik ve bazik pH'ın etkileri incelenmiştir. Hareketli faz sisteminde hareketli faz asetonitril-su karışımı olup pH 3'e tamponlanmış ve alıkonma zamanları üzerine etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda ortaya çıkan kromatogramlar değerlendirilirken İç standartın pik normalizasyonu ile birlikte kullanılması yöntemi dış faktörlerin etkisine karşı daha dirençli hale getirmiştir. Bu analizciden, yöntemden ve cihazdan kaynaklanan hataları en aza indirmiştir.

Hedeflenen analizler için analizcinin aklında sürekli bulundurması düşünülen önemli iki nokta vardır: Analizin yapılacağı matris ortamı ve analitin kimyasal özellikleri. Bu iki nokta uygulanacak prosedürlerin yol haritasını ve analiz yönteminin türünü belirleyecektir. Aynı zamanda analizcinin sınırlarını ve özgürlüğünü belirleyecektir. Bu sebeple analizci analizine başlamadan, hedef olan bileşiğe ve matrisine yakından bakmakta ve gerçekleşmiş kimyasal olayları öngörebilmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Bruderer, S., Hurst, N., Remenova, T., Dingemanse, J. (2017). Clinical pharmacology, efficacy, and safety of selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opinion on Drug Safety*, 16 (6), 743-751.
- [2] Sitbon, O., Channick, R., Chin, K.M., Frey, A., Gaine, S., Galiè, N., Ghofrani, H.-A., Hoeper, M.M., Lang, I.M., Preiss, R. (2015). Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 373 (26), 2522-2533.
- [3] Online, D. (2023): Selexipag.
- [4] Duggan, S.T., Keam, S.J., Burness, C.B. (2017). Selexipag: a review in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 17, 73-80.
- [5] Basson, R., Driscoll, M., Correia, S. (2015). Flibanserin for low sexual desire in women: A molecule from bench to bed? *EBioMedicine*, 2 (8), 772-773.
- [6] D'Aquila, P., Monleon, S., Borsini, F., Brain, P., Willner, P. (1997). Anti-anhedonic actions of the novel serotonergic agent flibanserin, a potential rapidly-acting antidepressant. *European Journal of Pharmacology*, 340 (2-3), 121-132.
- [7] Damireddy, S., Pravalika, K., Praveen, M., Sathish, G., Anusha, M. (2017). Method development and validation of selexipag in its bulk and dosage form by rp-HPLC. *Int J Pharm Biol Sci*, 7, 84.
- [8] Youssef, Y.M., Mahrouse, M.A., Mostafa, E.A. (2023). Assessment of environmental impact of a novel stability-indicating RP-HPLC method and reported methods for the determination of selexipag in bulk and dosage form: A comparative study using different greenness assessment tools. *Microchemical Journal*, 185, 108256.
- [9] Ceylan, B., Tırıs, G., Tekkeli, S.E.K., Önal, C., Önal, A. (2022). A novel HPLC method for selexipag in human plasma and application to a pharmacokinetic study.

- [10] Rao, K.P., babu, N.L., Koganti, K., Palakeeti, B., Srinivas, K.S. (2021). Related substances method development and validation of an LCMS/MS method for quantification of selexipag and its related impurities in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *SN Applied Sciences*, 3, 1-12.
- [11] Bhadru, B., Rao, V.V., Vidhyadhara, S. (2019). Development and validation of bioanalytical method for the quantitative estimation of selexipag in biological matrices using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11 (7), 2722-2727.
- [12] Satheshkumar, S., Muruganatham, V. (2021). A Rapid Method for Quantification of Selexipag in Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Electron Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 5689-5707.
- [13] Ülgen, M. (2022): Prokainamidin farmasötik preparattan ve plazmadan yeşil hplc ile analizi. Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi.
- [14] Burcu, E., Dinçel, A.S. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2 (2), 51-57.
- [15] Guideline, I.H.T. (2005): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. pp. 11-12.
- [16] [16] Swartz, M.E., Krull, I.S. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC Press.
- [17] Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165 (2-3), 216-224.
- [18] Russo, K.A.J.P.S.T.t.S.G.M. (2010). The role of USP monographs in stability testing. 51-60.
- [19] Aboul-Enein, H.Y. (2000). Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. *Accreditation and Quality Assurance*, 5 (5), 180-181.

- [20] Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32, 243-259.