

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ULTRA PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİNDE
(UPLC), DEKSMEDETOMİDİNİN MİKTAR VE
SAFSIZLIK TAYİNİ**

DUYGU SARAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZEYNEP AYDOĞMUŞ**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sıdika Toker'e,

Araştırma ve çalışmalarım sırasında beni gerek bilgi gerek laboratuvar imkanları açısından her zaman destekleyen Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Direktörü rahmetli Sayın Dr. Ali Türkyılmaz'a,

Ayrıca Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Proje Grup Yöneticisi Sayın Gülay Yelken Demirel'e,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş'a,

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili aileme, Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deksmetomidin Hidroklorür	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	4
2.1.3. Yan Etkileri	6
2.1.4. Analiz Yöntemleri.....	7
2.2. Sıvı Kromatografisi.....	10
2.2.1. Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC)	10
2.3. Yöntem Validasyonu	12
2.3.1. Spesifiklik	12
2.3.2. Doğrusallık.....	13
2.3.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	13
2.3.4. Doğruluk	15
2.3.5. Kesinlik	15
2.3.5.1. Sistem Kesinliği	15
2.3.5.2. Yöntem Kesinliği	15
2.3.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	16
2.3.6. Uygulama Aralığı.....	16
2.3.7. Sağlamlık	16

2.3.7.1. Yöntemin Stabilitesi.....	16
2.3.7.2. Çözelti Stabilitesi	16
2.3.7.3. Hareketli Faz Stabilitesi	17
2.3.8. Sistem Uygunluk.....	17
2.3.9. Stres Testi Çalışması.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	18
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	18
3.1.2. Çözeltiler.....	19
3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi	19
3.1.2.2. Deksmetomidin Çözeltileri.....	19
3.1.2.3. Stres Testi Çözeltileri	20
3.2. Aletler ve Gereçler	24
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi	24
3.4. Deksmetomidinin UPLC ile Analizi	26
3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi	26
3.4.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	26
3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	27
3.5.1. Spesifiklik	27
3.5.2. Doğrusallık.....	27
3.5.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	27
3.5.4. Doğruluk	27
3.5.5. Kesinlik	28
3.5.5.1. Sistem Kesinliği	28
3.5.5.2. Yöntem Kesinliği	28
3.5.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik	28
3.5.6. Uygulama Aralığı.....	28
3.5.7. Sağlamlık	28
3.5.7.1. Yöntemin Stabilitesi.....	28
3.5.7.2. Çözelti Stabilitesi	29
3.5.7.3. Hareketli Faz Stabilitesi	29
3.5.8. Sistem Uygunluk.....	29
3.5.9. Stres Testi.....	29

3.6. Enjeksiyonluk Çözeltilerde Deksmetomidin'in Analizi	29
3.6.1. Enjeksiyonluk Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.6.2. Geliştirilen UPLC Yöntemi ile Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Deksmetomidinin UPLC ile Analiz Sonuçları	31
4.2. Yöntem Validasyonu Sonuçları	31
4.2.1. Spesifiklik	31
4.2.2. Doğrusallık.....	35
4.2.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	36
4.2.4. Doğruluk	38
4.2.5. Kesinlik	39
4.2.5.1. Sistem Kesinliği	39
4.2.5.2. Yöntem Kesinliği	40
4.2.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	41
4.2.6. Uygulama Aralığı.....	43
4.2.7. Sağlamlık	44
4.2.7.1. Yöntemin Stabilesi.....	44
4.2.7.2. Çözelti Stabilesi	46
4.2.7.3. Hareketli Faz Stabilesi	47
4.2.8. Sistem Uygunluk.....	47
4.2.9. Stres Testi.....	47
4.3. Enjeksiyonluk Çözeltilerde Deksmetomidin'in Analizi	52
4.3.1. Geliştirilen UPLC Yönteminin Enjeksiyonluk Çözelti Formülasyonuna Uygulanması	52
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	57
HAM VERİLER	61
FORMLAR	62
ETİK KURUL KARARI	63
PATENT HAKKI İZNİ	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	65
ÖZGEÇMİŞ	66

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Referans standart.....	18
Tablo 3-2: Kimyasallar	18
Tablo 3-3: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	23
Tablo 3-4: Kromatografik koşullar	25
Tablo 3-5: Stres testi çalışma koşulları.....	25
Tablo 4-1: Spesifiklik testi sonuçları	34
Tablo 4-2: Deksmetomidin maddesi doğrusallık sonuçları	35
Tablo 4-3: Kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denklemi ve sonuçları	35
Tablo 4-4: Teşhis ve tayin limiti sonuçları	37
Tablo 4-5: Tayin limiti çözeltisi enjeksiyonlarının sonuçları	37
Tablo 4-6: Enjeksiyonluk preparat içindeki Deksmetomidin için geri kazanım sonuçları.....	39
Tablo 4-7: Sistem kesinliği sonuçları	40
Tablo 4-8: Yöntem kesinliği deksetomidin miktar tayini ve safsızlık sonuçları	41
Tablo 4-9: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için miktar tayini ve safsızlık sonuçları	42
Tablo 4-10: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için karşılaştırmalı sonuçlar.....	43
Tablo 4-11: Uygulama aralığı sonuçları	44
Tablo 4-12: Kolon sıcaklığı değişikliği ile elde edilen test sonuçları.....	45
Tablo 4-13: Akış hızı değişimi sonuçları.....	45
Tablo 4-14: Tampon çözeltisi pH değişimi sonuçları.....	46
Tablo 4-15: Hareketli faz stabilitesi sonuçları	47
Tablo 4-16: Stres testi çalışması sonuçları	48
Tablo 4-17: Saflık açısı ve saflık eşiği değerleri ile verim sonuçları	50
Tablo 4-18: Deksmetomidin hidroklorür içeren formülasyonun geliştirilen yöntemle elde edilen miktar tayini ve safsızlık analizi sonuçları	52
Tablo 4-19: Deksmetomidin içeren enjeksiyonluk çözeltilerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Deksmetomidin hidroklorür molekül yapısı.....	3
Şekil 2-2: Deksmetomidin hidroklorürün FTIR spektrumu.....	4
Şekil 2-3: Bir UPLC cihazının şematik gösterimi (25).....	11
Şekil 2-4: Laboratuvarda kullanılan bir UPLC sistemi (26).....	12
Şekil 3-1: Deksmetomidin UV spektrometrede alınmış spektrumu	26
Şekil 4-1: Blank (hareketli faz) enjeksiyonu kromatogramı.....	31
Şekil 4-2: Etken madde içermeyen ilaç preparatı (plasebo) çözeltisi kromatogramı	32
Şekil 4-3: Standart çözeltisi kromatogramı	32
Şekil 4-4: Standart çözeltisi için pik saflığı kromatogramı	33
Şekil 4-5: Numune çözeltisi kromatogramı	33
Şekil 4-6: Numune çözeltisi için pik saflığı kromatogramı	34
Şekil 4-7: Deksmetomidin kalibrasyon eğrisi	36
Şekil 4-8: Teşhis limiti çözeltisi kromatogramı.....	38
Şekil 4-9: Tayin limiti çözeltisi kromatogramı.....	38
Şekil 4-10: Çözelti stabilitesi sonuçları	46
Şekil 4-11: Stres edilmemiş numune kromatogramı.....	50
Şekil 4-12: Stres edilmemiş plasebo kromatogramı	50
Şekil 4-13: Asit degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı.....	51
Şekil 4-14: Baz degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı	51
Şekil 4-15: Peroksit degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı	51
Şekil 4-16: Isı degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı	51
Şekil 4-17: Fotostabilite degradasyonu numune çözeltisi kromatogramı.....	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UPLC: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

MS: Kütle Spektrometrisi

FTIR: Fourier Dönüşümlü İnfrared

FDA: Amerikan İlaç ve Gıda Komitesi

PDA: Photo Diode Array Dedektör

UPLC-MS/MS: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi

UHPLC-MS/MS (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi)

HPLC-ESI-MS/MS: Yüksek Performans Sıvı Kromatografi-Elektrosprey İyonizasyon-Tandem Kütle Spektrometri

SRM: Seçilen Reaksiyon İzleme Modu

ESI-MS/MS: Elektrosprey İyonizasyon-Tandem Kütle Spektrometrisi

LOD: Teşhis (Dedeksiyon) Limiti

LOQ: Tayin Limiti

BF₃-MeOH: Boron triforid-Metanol

PFB-Cl: Pentaflorobenzoik asit-Klorür

BEH: Ethylene Bridged Hybrid (Etilen Köprülü Hibrit)

SPE: Katı Faz Ekstraksiyonu

GGT: Gama Glutamil Transferaz

AST: Aspartat aminotransferaz

ALT: Alanin Aminotransferaz

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Na₂HPO₄•2H₂O: Sodyum Fosfat Dibazik Dihidrat

NaHPO₄•2H₂O: Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat

NaCl: Sodyum Klorür

HCl: Hidroklorik Asit

NaOH: Sodyum Hidroksit

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

UV: Ultraviyole

mM: miliMolar

v: Hacim

g: gram

mg: miligram

μ g: mikrogram

ng: nanogram

pg: pikogram

mL: mililitre

μ L: mikrolitre

nm: nanometre

α : alfa

C: Konsantrasyon

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

USP: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi

WFI: Enjeksiyonluk Su

ÖZET

Saray, D. (2019). Ultra Performans Sıvı Kromatografisinde (UPLC), Deksmetomidinin Miktar ve Safsızlık Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada deksmedetomidinin enjeksiyonluk çözeltilerde miktar tayini ve safsızlık tayini için ultra performans sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, ters fazlı kolonda; metanol-5mM fosfat tamponu (pH:7, 60:40, h/h) hareketli fazı ile 0,2 mL/dk akış hızında ultraviyole dedektör ile geliştirilmiştir. Deksmetomidin için dedeksiyon dalga boyu; 220 nm olarak tespit edilmiştir. Maddenin doğrusal aralığı 0,021-27,47 µg/mL olarak bulunmuştur. Teşhis ve tayin limitleri ise sırasıyla 6,3 ve 21,0 ng/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem valide edilerek maddenin enjeksiyonluk çözeltideki miktar ve safsızlık tayini analizlerine başarıyla uygulanmıştır. Yöntem aynı zamanda asit, baz, peroksit, ısı ve fotostabilite çalışmaları gibi farklı stres koşullarına maruz bırakılarak seçiciliği ve kararlılığı açısından da kontrol edilmiştir. Bu yöntem hızlı, kolay ve tekrarlanabilir olup maddenin enjeksiyonluk çözeltilerinin miktar tayini ve safsızlık tayini analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Deksmetomidin, Ultra Performans Sıvı Kromatografisi, analitik metot validasyonu, enjeksiyonluk çözelti, parenteral preperat.

Bu çalışma Sanovel İlaç A.Ş. tarafından desteklenmiş olup, üniversite ve sanayi işbirliği ile yürütülmüştür.

ABSTRACT

Saray, D. (2019). Analytical Method Validation with UPLC for Assay and Related Substances of Dexmedetomidine in Dexmedetomidine Hydrochloride Injection. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry, Master Thesis. Istanbul.

In this study, an ultra performance liquid chromatography method was developed for determination of the dexmedetomidine and it's related substances in injectable solutions. Dexmedetomidine was separated on the reverse phase column with the mobile phase of methanol-5 mM phosphate buffer (pH: 7, 60:40, v/v) at 0.2 mL/min flow rate. Detection wavelength for dexmedetomidine was determined to be 220 nm. The linear range of the material was found to be 0.021-27.47 µg/mL. Detection and quantitation limits were found to be 6.3 and 21.0 ng/mL, respectively. The method has been validated and successfully applied to the analysis of the assay and related substances of the material in the solution for injection. The method was also tested for specificity, degradation and stability by exposure to different stress conditions such as acid, base, peroxide, heat and photostability studies. This method is fast, easy and reproducible and can be safely used in the analysis of assay and related substances of the injectable solutions of the material.

Keywords: Dexmedetomidine, Ultra Performance Liquid Chromatography, analytical method validation, injection solution, parenteral prepare.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde dünya nüfusunun artışı ile birlikte, tüketimin artması ve sanayileşmede hızlanma görülmektedir. Son yıllarda ilaç endüstrileri, ilaçların geliştirilmesinde maliyeti düşürmek ve daha az zaman harcanması için yeni bir yola odaklanmakta ve bununla birlikte ürünlerinin kalitesinin korunmasını istemektedir. Hız, daha fazla sayıda analizin daha kısa sürede yapılmasına izin verir, böylelikle numune verimi ve laboratuvar verimliliğini artırır. Bunlar daha hızlı analizin ve dolayısıyla ultra performanslı sıvı kromatografisinin (UPLC) faydalarıdır. Çalışma maliyeti ve örnek iş hacmi analizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) göre avantajlıdır.

UPLC, sıvı kromatografisine yeni bir yön veren modern bir tekniktir. UPLC, esas olarak üç alanda geliştirilmiştir: “hız, çözünürlük ve duyarlılık”. HPLC ile karşılaştırıldığında daha iyi çözünürlük, hız ve duyarlılık elde etmek için çap olarak 2 µm'den küçük parçacıklarda UPLC yöntemleri uygulanabilir. Yüksek basınç altında, analitik kolon üzerinde herhangi bir olumsuz etkinin olmadığı, zaman ve çözücü tüketimi gibi diğer bileşenlerin UPLC'de daha az olduğu gözlemlenmiştir. UPLC analizlerinde elde edilen kromatogramlar ile, daha hassas analiz gerçekleştirme, çözücü tüketimini azaltma ve yüksek analiz hızına sahip olmakla birlikte, HPLC'ye kıyasla daha iyi çözünürlük ve ayrışmanın bulunduğu tespit edilmiştir.

Özellikle 20 yılı aşkın bir süredir, α_2 adrenoseptör agonistlerinin, anksiyolitik, analjezik, sedatif etkileriyle, anestezi ilaç dozlarını azaltma, perioperatif hemodinamik stabiliteyi sağlama ve bunun gibi istenen pek çok sayıda etkilerine rağmen, anestezi alanında rutin olarak kullanıma girememesinin sebebi, spesifik bir α_2 adrenoseptör agonistinin olmamasıyla açıklanabilir (4,21,22,23).

Deksmedetomidin hidroklorür; imidazolinler subgrubu içinde yer alan, bir diğer α_2 agonisti, klonidine oranla daha selektif olduğu ispatlanmış, sürekli intravenöz sedasyon amacıyla yoğun bakım ortamında kullanılmak üzere piyasaya sürülmüş, geniş bir farmakolojik özellik spektrumuna sahip, güçlü ve ileri derecede selektif, bir α_2 adrenoseptör agonistidir (3,4,6,23).

Yoğun bakım ünitelerinde tedavi esnasında başlangıçtan itibaren entübe edilmiş ve mekanik olarak ventile edilen hastaların sedasyonunda endikedir. 24 saati aşmayan

sürelerde sürekli infüzyon şeklinde uygulanır (4). Anestezi ve cerrahi girişimler sırasında kan basıncını düşürür, kalp hızının azalmasını sağlar, hemodinamik stabilizeye yol açar. Anestezi sonrası titremeyi ortadan kaldırır ve lokal anestezide blokaj süresini uzatır (5). Solunum depresyonuna yol açmaksızın, hastaların uyandırılabilir ve iletişim kurabileceği bir sedasyon ve analjezi sağlar. İlave sempatolitik özellikleri daha az anksiyete, stres hormonu yanıtının küntleşmesi ve intraoküler basınçta azalmadır (6).

Deksmedetomidin hidroklorür uygulanan yoğun bakım hastalarında istenen sedasyon düzeylerine erişilmiş, daha az anksiyete görülmüş ve analjezi gereksiniminde anlamlı bir azalma olmuştur; hastalar kolayca uyandırılabilmiş, koopere ve oryante durumda kalmış ve sonuç olarak hastaların tedavi kolaylığında artış sağlanmıştır (20).

Deksmedetomidinin farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde literatürde HPLC-UV, UPLC-tandem kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS), HPLC-MS/MS, HPLC-elektrosprey iyonizasyon-MS/MS yöntemi (HPLC-ESI-MS/MS), sıvı kromatografisi-MS/MS (LC-MS/MS), ESI-MS/MS yöntemlerine rastlanmıştır. Bu yöntemler farmasötik preparatlardaki deksmedetomidinin miktar tayinine yöneliktir.

Farmakope analizi için ise bir HPLC-UV tayini bildirilmiştir (23).

Literatür araştırması sırasında, Deksmedetomidin miktar tayini ve safsızlık tayini için kullanılan HPLC-UV, HPLC-MS gibi yöntemlerde, eş zamanlı analiz edilebilecek bir analitik metoda rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında; mevcut olan çalışmalara alternatif olacak şekilde enjeksiyonluk çözeltilerdeki deksmedetomidinin miktar tayini ve safsızlık tayini yöntemlerini tek bir analitik yöntemde birleştirip eş zamanlı analiz edebilmek, HPLC yöntemine göre analiz süresini kısaltmak, çok daha hızlı, hassas, az maliyetli ve rutin tayinlerde kullanılabilecek UPLC yöntemi geliştirmek ve bu yöntemi Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, *International Conference Harmonization Q2(R1)*) kılavuzuna göre validasyon parametreleri doğrultusunda valide etmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

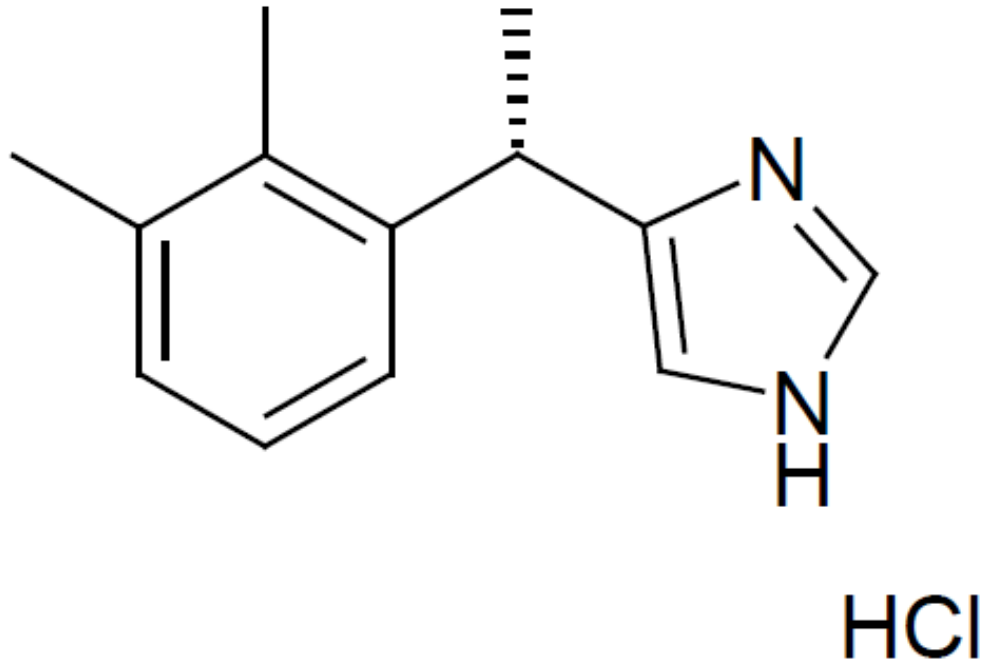
2.1. Deksmetomidin Hidroklorür

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

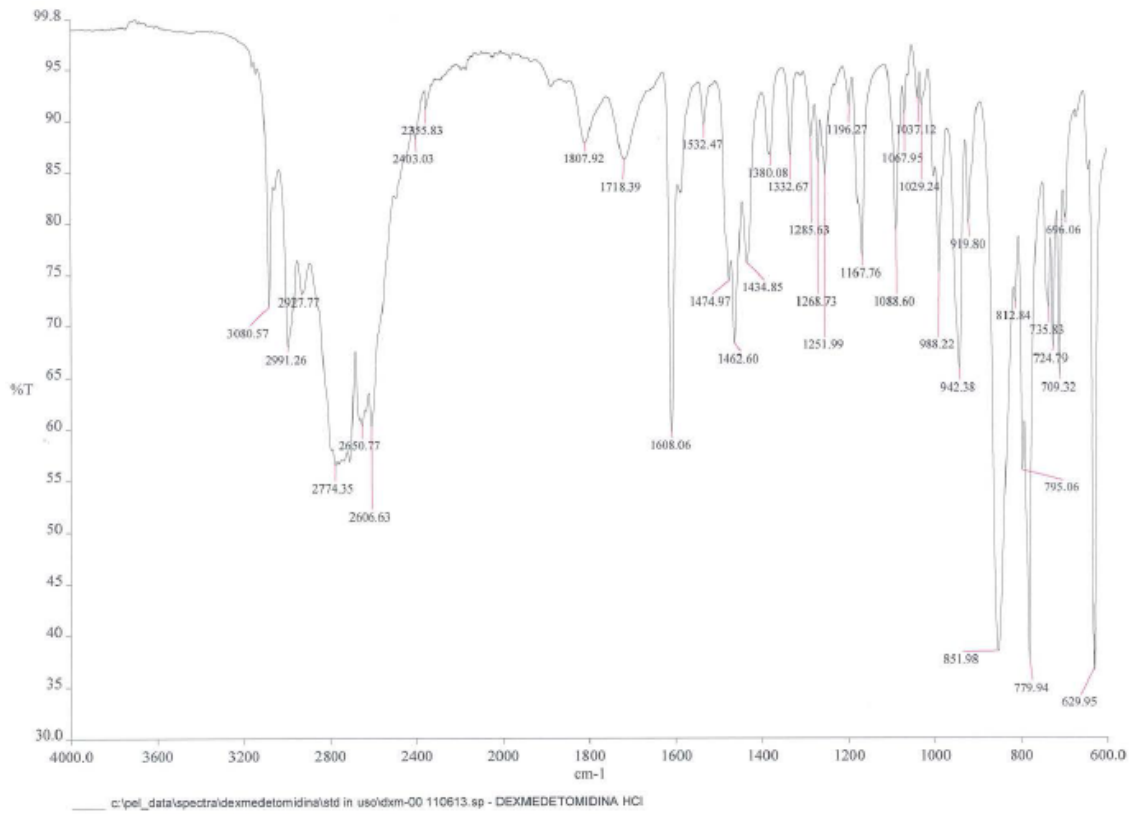
Deksmetomidin hidroklorürün kimyasal adı 4-[(S)-1-(2,3-dimetilfenil) etil]-3H-imidazol hidroklorür'dür (Şekil 2-1). Kapalı formülü $C_{13}H_{17}ClN_2$. Baz haldeki deksmedetomidinin kapalı formülü $C_{13}H_{16}N_2$, molekül ağırlığı 200,28 g/mol'dür (1) olan deksmedetomidin hidroklorürün molekül ağırlığı 236,74 g/mol'dür.

Deksmetomidin hidroklorür suda ve alkolde kolay, metilen klorür ve asetonda az çözünen, katı, beyaz ya da beyaza yakın toz halinde bir bileşiktir. Kaynama noktası 156,5-157,5 °C'dir ve pKa'sı 7,1'dir (2).

Deksmetomidin hidroklorürün Fourier Dönüştümlü İnfrared (FTIR) spektrumu Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2-1: Deksmetomidin hidroklorür molekül yapısı



Şekil 2-2: Deksmedetomidin hidroklorürün FTIR spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

Deksmedetomidin geniş bir farmakolojik özellik spektrumuna sahip, güçlü ve ileri derecede selektif, bir α_2 adrenoseptör agonistidir (3,6). Sempatik sinir uçlarından noradrenalin salınmasını azaltarak sempatolitik etki gösterir (18). α_2 selektivitesi hayvanlarda düşük ve orta dozların (10-300 μ /kg) yavaş intravenöz infüzyonu sonrasında gözlemlenirken; hem α_1 hem de α_2 aktivitesi, yüksek dozların (>1000 μ /kg) yavaş intravenöz infüzyonu sonrasında veya hızlı intravenöz uygulama ile gözlenmiştir (18).

Deksmedetomidinin analjezik ve anestetik/analjezik koruyucu etkileri vardır, kardiyovasküler etkiler doza bağlıdır; daha düşük infüzyon oranlarında santral etkiler baskın olarak kalp atım hızı ve kan basıncında azalmaya neden olur (18). Daha yüksek dozlarda sistemik vasküler direnç ve kan basıncında artışa neden olur, ayrıca bradikardik etki de belirginleşir, Deksmedetomidin sağlıklı gönüllülere monoterapi şeklinde verildiğinde solunum depresyonuna neden olmaz (18).

Erişkin hastalar için uygulamaya 10 dakika içinde 1 µg/kg'lık bir yükleme dozu ile başlanması ve 0,2-0,7 µg/kg/saat sınırları arasında kalan bir idame infüzyonu ile devam edilmesi önerilir. İdame infüzyonunun hızı, arzulanan klinik etkiye erişilecek biçimde ayarlanabilir. Klinik çalışmalarda 0,05 µg/kg/saat gibi düşük dozlar kullanılmıştır. Klinik çalışmalarda 24 saate kadar devam eden infüzyonlar üzerinde çalışılmıştır. Mekanik ventilasyon gereken hastaların yanı sıra ekstübasyondan sonra düzenli solunumu olan hastalara da uygulanmıştır. Primer olarak karaciğerde metabolize edildiğinden hepatik yetersizliğin derecesine bağlı olarak dozun azaltılması gerekebilir. Uygulanmasında kontrollü bir infüzyon cihazı kullanılmalıdır.

Halihazırda entübe edilmiş ve sedasyon altındaki hastalar, 0,7 µg/kg/saat şeklindeki başlangıç infüzyon oranı ile deksmedetomidine geçiş yapabilirler; bu doz daha sonra hastanın yanıtına bağlı olarak, istenilen sedasyon düzeyine ulaşılabilecek şekilde 0,2-1,4 µg/kg/saat doz aralığında basamaklar halinde ayarlanabilir (18). Daha düşük bir başlangıç infüzyon oranı, fiziksel olarak güçsüz hastalarda göz önünde bulundurulmalıdır, Deksmetomidin çok kuvvetlidir ve infüzyon oranı saatte bir şeklinde verilir (18). Doz ayarlaması sonrasında bir saate kadar yeni bir kararlı durum sedasyon düzeyine ulaşılamayabilir (18).

Bitmiş ürünlerdeki geçimlilik çalışmaları, flakon tıplarında kullanılan bazı doğal kauçuk tipleriyle adsorbsiyon potansiyeli olduğunu göstermiştir. Sentetik veya üzeri kaplanmış doğal kauçuk araçlar ile uygulanmalıdır. Kan, serum veya plazma ile birlikte verildiğindeki geçimliliği bilinmemektedir (4). Amfoterisin B (mantar tedavisinde kullanılan bir ilaç) ve diazepam (kaygı giderilmesinde kullanılan bir ilaç) ile uygulandığında geçimsiz olduğu belirlenmiştir (18). Deksmetomidin ile birlikte uygulandığında anestetikler, sedatifler, hipnotikler ve opioidlerin etkilerinde artışa yol açabilmektedir (18). Deksmetomidin ile izofluran, propofol, alfentanil ve midazolam arasında gösterilmiş bir farmakokinetik etkileşim yoktur, ancak farmakodinamik etkiler nedeniyle deksmedetomidin hidroklorür ile birlikte uygulandığında bu ajanların dozajının azaltılması gerekebilir (4). Deksmetomidin hidroklorür ve rokuronyum uygulamasında nöromusküler blokajın miktarında klinik olarak anlamlı artışlar ve farmakokinetik etkileşimler gözlenmemiştir (4).

Deksmedetomidin dağılım yarı ömrü ($t_{1/2}$) yaklaşık olarak 6 dakikadır ve 2 saatlik bir eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$) vardır. Deksmetomidin hidroklorürün radyoaktif işaretli dozunun %95'i idrarda ve %4'ü dışkıda metabolize edilmiş olarak elimine edilir (19).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1999 yılında yoğun bakım, entübe ve mekanik ventilasyon altında olan hastalar için deksmedetomidin kullanımını onaylamıştır (7).

2.1.3. Yan Etkileri

Deksmedetomidin hidroklorür infüzyonu uygulaması ile en sık rastlanan advers etkiler; hipotansiyon, hipertansiyon, bradikardi, bulantı, ağız kuruluğu ve hipoksidir. En sık görülen yan etkileri ise (8);

Bir bütün olarak vücutta: Ateş, hiperpireksi, hipotermi, hipovolemi, hafif anestezi, ödem, ağrı,

Kardiyovasküler sistemde: Kan basıncı dalgalanması, kalp yetersizliği, spesifik anormal elektrokardiyogram, şiddetlenen hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, ritim bozuklukları (atriyel aritmi, ventriküler aritmi, kardiyak arrest, ekstrasistoller, atriyel fibrilasyon, ventriküler fibrilasyon, kalp bloku, sinüs arresti, T dalgası inversiyonu, taşikardi, supraventriküler taşikardi, ventriküler taşikardi),

Merkezi ve periferik sinir sisteminde: Demans, baş dönmesi, baş ağrısı, hipertoni, istemsiz kas kontraksiyonları, nevralji, nörit, konuşma bozukluğu,

Endokrin ve gastrointestinal sistemde: Erkeklerde laktasyon, abdominal ağrı, diyare, kusma,

Karaciğer ve biliyer sistemde: artmış GGT, artmış AST ve ALT,

Metabolik ve nutrisyonel bozukluklar: Asidoz, respiratuar asidoz, artmış kreatinin, fosfokinaz, hiperglisemi, hiperkalemi, artmış alkali fosfataz, susama,

Trombosit, kanama, pıhtılaşma bozuklukları (başka bir nedeni belirlenemeyen hemoraji)

Psikiyatrik bozukluklar: Ajitasyon, anksiyete, konfüzyon, deliryum, halüsinasyon, illüzyon, insomnia, sinirlilik, paranoya,

Eritrosit bozuklukları: Anemi,

Solunum sistemi: Apne, ateletazi, solunum seslerinde azalma, bronkospazm, hiperkapni, hipoventilasyon, pulmoner konjesyon, solunum depresyonu, solunum yetersizliği, rinit,

Dermatolojik bozukluklar ve görme bozuklukları: Pruritus, döküntü, lokalize deri reaksiyonu, terlemede artış, fotopsi, anormal görmenin yanı sıra, üriner ve vasküler sistemde; hematüri, oligüri, üriner retansiyon, geçici iskemik atak gözlenebilir.

2.1.4. Analiz Yöntemleri

Krishna M. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Deksmetomidin enjeksiyonluk çözeltilerinde miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirmiş ve metodu valide etmişlerdir. Bu yöntemde photo diode array (PDA) dedektör kullanılmıştır. 1,0 mL/dk akış hızında, LiChrosper 100 RP-18 kolon kullanılmıştır. Konsantrasyon aralığı 2-6 µg/mL arasında gözlenen korelasyon 0,999 olarak elde edilmiştir. Deksmetomidin geri kazanımı %101,1 olarak bulunmuştur (9).

Liu H. ve arkadaşları, UPLC-MS/MS kullanarak, çocuk plazmasında deksmedetomidini belirlemek için yöntem geliştirmişlerdir. Plazma örneğinde, asetonitril ile protein çöktürme yöntemi kullanarak numuneler hazırlamışlardır ve UPLC’de gradient elüsyon ile Acquity UPLC BEH C18 kolonu kullanmışlardır. Dedeksiyon, çoklu reaksiyon izleme modunda üçlü bir dört kutuplu tandem kütle spektrometresi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 0.05-10 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Plazmadaki deksmedetomidinin geri kazanım oranı %86,7-89,1 aralığında hesaplanmıştır (10).

Cui Z. ve arkadaşları, deksmedetomidinin farmakokinetik karakterizasyonu için plazma, idrar ve/veya amniyotik sıvıdan tayinleri için uygun bir HPLC-MS/MS çalışması yapmışlardır. Maddenin ekstraksiyonu için etil asetat kullanmışlardır. Ayırma yöntemi 0,5 mL/dk akış hızında bir gradyen elüsyonu ile bir Agilent Zorbax SB-CN kolonu üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Dedeksiyon, pozitif elektrosprey iyonizasyonu ile

üçlü bir dört kutuplu tandem kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Yöntem hem preparat hem de fetal plazma için 25-5000 pg/mL konsantrasyon aralığında, idrar ve/veya amniyotik sıvı için 50-5000 pg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Geri kazanım, preparat, idrar, fetal plazma ve/veya amniyotik sıvı için sırasıyla %82,9–87,2, %85,7–88,4, %86,2–89,7 ve %83,7–88,1 olarak elde edilmiştir (11).

Li W. ve arkadaşları, insan plazmasında deksmedetomidin tayini ve farmakokinetik araştırması için HPLC-ESI-MS/MS geliştirmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril ve %0,5 formik asit çözeltisi (30:70, h/h) karışımı kullanılmıştır. 0,2 mL/dk akış hızında ve seçilen reaksiyon izleme (SRM) modunda bir üçlü dört kutuplu tandem kütle spektrometresi üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 5-5000 pg/mL konsantrasyon aralığında korelasyon katsayısı 0,9995'in üzerinde bulunmuştur (12).

Hui Y. ve arkadaşları, plazmadaki deksmedetomidin ve metabolitlerin katı faz ekstraksiyonunu ve ardından iki adımlı bir türevlemeyi içeren yöntem geliştirmişlerdir. Birinci adımda, metabolitlerde bulunan primer alkol ve karboksilik asidi aynı anda maskelemek için Boron triforid-Metanol ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$) kullanmışlardır. İkinci adımda ise, metabolitlerde bulunan imidazol halkasını türevlendirmek için Pentafluorobenzoic acid chloride (PFB-Cl) kullanmışlardır. Ekstraksiyon ve türevlendirme işlemleri yapılarak, konsantrasyon aralıkları 0,1–40, 0,5–100, 0,5–100 ve 1,0–500 ng/mL olarak tespit edilmiştir (13).

Lee J. ve arkadaşları, HPLC-MS/MS kullanarak pediatrik plazmada deksmedetomidin için HPLC analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Deksmetomidin katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile 200 μL plazmadan ekstrakte edilmiştir. HPLC cihazında 0,3 mL/dk akış hızında, metanol:asetonitril:su çözücü karışımında (20:20:60, h:h:h) 5 mM amonyum asetat tamponu/formik asitten (%0,03) oluşan bir hareketli faz kullanarak çalışma yapmışlardır. Plazmadaki toplam deksmedetomidin geri kazanımı %76,6–78,3 olarak bulunmuştur (14).

Inoue K. ve arkadaşları, küçük bir miktar plazmada (10 μL) deksmedetomidinin belirlenmesi için bir UPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Seçilen reaksiyon izleme modunda ESI-MS/MS için orijinal ve kararlı bir izotop kullanılarak deksmedetomidin ölçümü yapmışlardır. ESI-MS/MS kullanılarak, 3 dakikalık bir UPLC yöntemi ile

çalışmışlardır. Tayin limiti, plazmada (100 µL) 5 pg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri ise %98,8 ile %100,3 arasında değişmiştir (15).

Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) analizinde, deksmedetomidinin HPLC-UV tayini bildirilmiştir. Hareketli faz olarak metanol ve fosfat tamponu (pH:7,8) (60:40, h/h) karışımı kullanılmıştır. 1,0 mL/dk akış hızında ve 50 µL enjeksiyon hacminde miktar tayini analizi gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini analizi ile aynı hareketli faz kullanılarak deksmedetomidin için bir safsızlık tayini analizi de bildirilmiştir. 1,0 mL/dk akış hızında ve 25 µL enjeksiyon hacminde safsızlık tayini analizi gerçekleştirilmiştir (23).

Zheng Z. ve arkadaşları, insan plazmasında deksmedetomidinin UHPLC-MS/MS (Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-MS/MS) ile tayini ve deksmedetomidin konsantrasyonunun propofolün hedef kontrollü infüzyon konsantrasyonuna etkisinin değerlendirilmesi için bir çalışma yapmışlardır. Hareketli faz olarak %0,1 formik asit ve 5 mM amonyum asetat içeren asetonyitril, metanol ve su (30:70, h/h) karışımı kullanılmıştır (70:10:20, h/h/h). 0,3 mL/dk akış hızında ve seçilen reaksiyon izleme (SRM) modunda kütle spektrometresi üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon aralığı 0,1-10 ng/mL olarak bulunmuştur. Kalite kontrol örneklerinin kesinlik sonuçları %10,05'den daha düşük bulunmuştur. Doğruluk oranı ise %6,25'ten düşük olarak bulunmuştur (27).

Szerkus O. ve arkadaşları, HPLC-MS/MS kullanarak insan plazmasında deksmedetomidini belirlemek için yöntem geliştirmişlerdir. Deksmetomidin katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile plazmadan ekstrakte edilmiştir. 5-2500 pg/mL konsantrasyon aralığında korelasyon katsayısı 0,98'in üzerinde tespit edilmiştir (28).

Nakanishi R. ve arkadaşları, anne sütünde deksmedetomidinin tayini için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Deksmetomidin sıvı faz ekstraksiyonu kullanılarak 200 µL insan sütünden dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. HPLC cihazında 0,3 mL/dk akış hızında, 5 mM amonyum format tamponu ve formik asit (%0,1) içeren asetonyitril karışımından (60:40, h:h) oluşan bir hareketli faz kullanarak çalışma yapmışlardır. Dedeksiyon pozitif elektrosprey iyonizasyonuna sahip bir kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anne sütünden deksmedetomidin geri kazanımı %82,4–87,9 olarak bulunmuştur (29).

2.2. Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

Sıvı kromatografisi, düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. HPLC, bir karışımdaki bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve ölçmek için analitik bir tekniktir. Dünya çapında çoğu laboratuvar için gerekli olan en yaygın kromatografi tekniğidir.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.

Genel olarak, yöntem sıvı bir çözücü akışı kullanılarak bir kolona doldurulmuş bir katı adsorban madde üzerinden geçirilen bir sıvı numuneyi içerir. Numunedeki her analit, adsorban malzeme ile biraz farklı şekilde etkileşir, böylece analitlerin akışını geciktirir. Eğer etkileşim zayıfsa, analitler kolondan kısa bir süre akarlar ve eğer etkileşim güçlü ise, elüsyon süresi uzundur.

2.2.1. Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC)

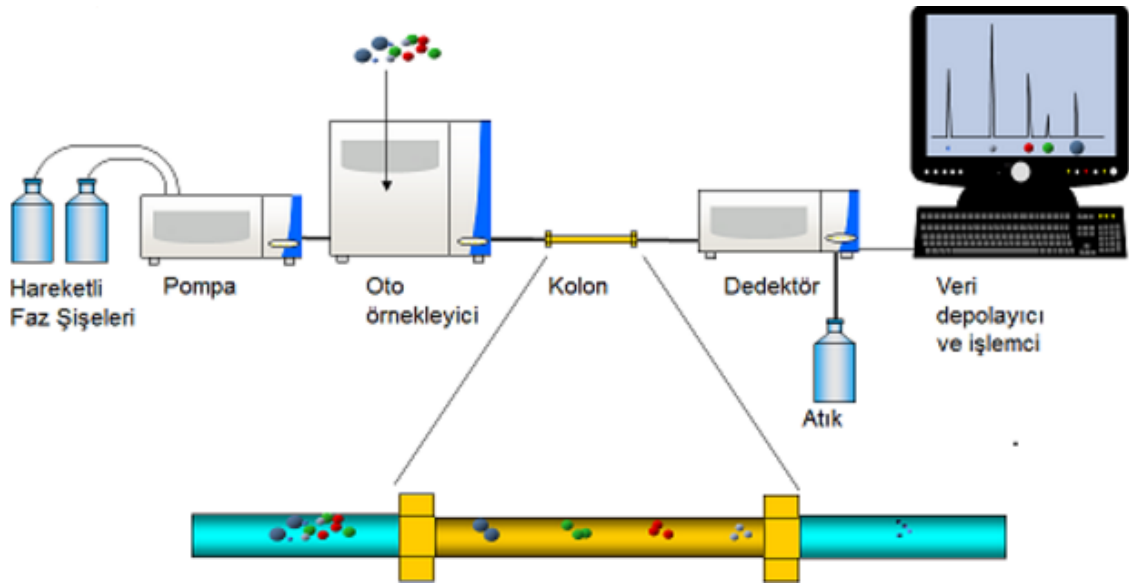
Son kolon teknolojisindeki gelişmeler farmasötik preparatların kalite kontrol ve rutin analiz işlemlerinde, daha az analiz süresine ihtiyaç duyan ve yüksek ayırma gücüne sahip kromatografik tekniklerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu nedenle, UPLC geliştirilmiştir (16).

UPLC sistemleri ilk kez 2004 yılında piyasaya sürülmüştür. Daha hızlı akış hızları elde etmek için genel çalışma basıncını neredeyse ikiye katlayarak, UPLC geliştiricileri çok daha kısa sürede eşit veya daha iyi çözünürlükte LC ayırma elde edebilmiştir.

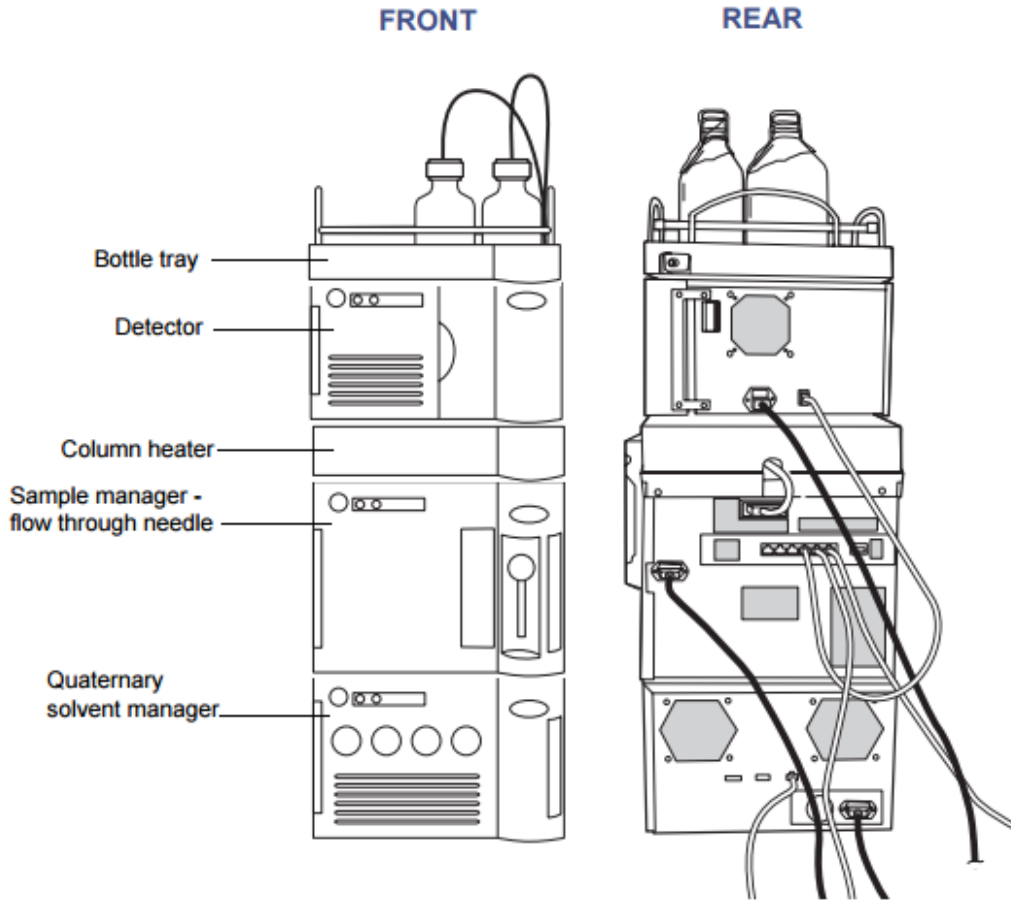
UPLC teknolojisinde 1000 Bar'ın üzerinde basınç üretebilen pompa sistemleri, amaca göre en küçük 5 cm uzunluğunda, normal kolonlara göre daha küçük çaplı ve

daha küçük tanecik boyutuna sahip kolonlar kullanılmaktadır. Analiz işlemlerinde düşük analiz maliyeti ile birlikte hızlı, kolay, duyarlı, seçici, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve uygulanması analitik kimyanın temel problemidir. Bu kapsamda klasik HPLC analiz işlemlerindeki dezavantajlarını elimine etmek için son derece uygun yöntemlerden birisinin UPLC yönteminin olduğu son uygulamalar ile açıkça ortaya konmaktadır (16).

Burada UPLC genel yapısı verilecektir. Bir UPLC cihazına ait başlıca bileşenler Şekil 2-3'te verilmiştir. Şekil 2-4'te ise laboratuvarında kullanılan bir UPLC sistemi örneği verilmiştir.



Şekil 2-3: Bir UPLC cihazının şematik gösterimi (25)



Şekil 2-4: Laboratuvarda kullanılan bir UPLC sistemi (26)

2.3. Yöntem Validasyonu

Validasyon, bir testte gerçekleştirilen prosedür, süreç veya aktivitenin daha sonra üretimin her aşamasında istenen uyum seviyesini koruduğunu gösteren belgesel bir kanıt oluşturma sürecidir. Yöntem validasyonu ise, bir veya birden fazla analitin, belirli bir matriks içerisindeki miktarının tayin edilmesinde kullanılan yöntemin güvenilirliğini göstermesi için yapılan işlemlerin bütünüdür.

İlaç uygulamaları için ICH Q2(R1) kılavuzunda yer alan validasyon parametreleri çalışılacaktır (17).

2.3.1. Spesifiklik

Spesifiklik, analiz edilecek analitin matris etkisi ve katkı maddelerinin varlığında, matriks içinde tartışmaya yer vermeksizin kesin olarak tayin edilebilirliğidir.

Etken pike ait pik saflığı testi yapılarak, etken pikinin tamamen analite ait olduğunun gösterilmesidir.

2.3.2. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik yöntem için belirlenen aralıkta elde edilen test sonuçlarının numune içindeki ilgili madde ve/veya etken madde konsantrasyonu ile doğru orantıya sahip olmasıdır. Analitin farklı konsantrasyonları ile elde edilen verilerden yola çıkarak oluşmuş olan eğrinin regresyon analizi yapılır. Eğrinin eğimi, korelasyon katsayısı, ve y (ordinat) kesim noktası hesaplanarak eğri denklemi elde edilir.

2.3.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Teşhis limiti, örnekteki bileşenin doğru ve güvenilir şekilde tespit edildiği en düşük konsantrasyonudur. Farklı yöntemlerle belirlenebilir.

- a) Görsel değerlendirmeye dayanarak: enstrümental olmayan yöntemler için kullanılabilir, aynı zamanda enstrümental yöntemlerde de kullanılabilir.

Teşhis limiti, bilinen analit konsantrasyonlarına sahip numunelerin analizi ve analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebildiği minimum seviyenin belirlenmesi ile belirlenir.

- b) Sinyal/Gürültü oranı: teşhis limiti için sinyal/gürültü oranı 3'ten büyük olmalıdır.

Bu yaklaşım sadece temel bir gürültü (baseline) oluşturan analitik prosedürlere uygulanabilir. Sinyal/gürültü oranının belirlenmesi, bilinen düşük konsantrasyonlu analit ile numunelerden ölçülen sinyallerin, boş numunelerinkine karşılaştırılması ve analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebildiği minimum konsantrasyonun oluşturulmasıyla gerçekleştirilir.

- c) Cevap ve eğrinin standart sapmasına bağlı olarak hesaplanabilir.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Eğim (S) analitin kalibrasyon eğrisinden elde edilebilir. “ σ ” tahmini ise çeşitli şekilde gerçekleştirilebilir. Örneğin;

- Blank standart sapmasına bağlı olarak: Analitik blank cevabının büyüklüğünün ölçülmesi, uygun sayıda boş numunenin (blank) analiz edilmesi ve bu tepkilerin standart sapmasının hesaplanmasıyla gerçekleştirilir.
- Kalibrasyon eğrisine dayalı olarak: Teşhis limiti aralığında bir analit içeren numuneler kullanılarak spesifik bir kalibrasyon eğrisi çalışılmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisinin RSD'si veya regresyon çizgilerinin y-interceptlerinin standart sapması, standart sapma olarak kullanılabilir.

Tayin limiti, örnekteki bileşenin doğru ve güvenilir şekilde hesaplanabilen en düşük konsantrasyonudur. Farklı yöntemlerle belirlenebilir.

- a)** Görsel değerlendirmeye dayanarak: enstrümental olmayan yöntemler için kullanılabilir, aynı zamanda enstrümental yöntemlerde de kullanılabilir.

Kantitasyon limiti genel olarak, bilinen analit konsantrasyonlarına sahip numunelerin analizi ve analitin kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle nicelleştirilebildiği minimum seviyenin tespit edilmesi ile belirlenir.

- b)** Sinyal/Gürültü oranı: tayin limiti için sinyal/gürültü oranı 10'dan büyük olmalıdır.

Sinyal/gürültü oranının belirlenmesi, bilinen düşük konsantrasyonlu analit ile numunelerden ölçülen sinyallerin, boş numunelerinkilerle (blank) karşılaştırılması ve analitin güvenilir bir şekilde ölçülebildiği minimum konsantrasyonun oluşturulmasıyla gerçekleştirilir.

- c)** Cevap ve eğrinin standart sapmasına bağlı olarak hesaplanabilir.

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

σ : Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Eğim (S) analitin kalibrasyon eğrisinden elde edilebilir. “ σ ” tahmini ise çeşitli şekilde gerçekleştirilebilir. Örneğin;

- Blank standart sapmasına bağılı olarak: Analitik arkaplan cevabının büyüklüğünün ölçülmesi, uygun sayıda boş numunenin (blank) analiz edilmesi ve bu tepkilerin standart sapmasının hesaplanmasıyla gerçekleştirilir.
- Kalibrasyon eğrisine dayalı olarak: Belirli bir kalibrasyon eğrisi, tayin seviyesi aralığında bir analit içeren numuneler kullanılarak çalışılmalıdır. Bir kalibrasyon eğrisinin RSD'si veya regresyon çizgilerinin y-interceptlerinin standart sapması, standart sapma olarak kullanılabilir.

2.3.4. Doğruluk

Doğruluk, gerçek değer ile analiz edilen değer birbirine olan yakınlığını gösterir. Etken madde içermeyen ilaç preparatına (plasebo) bilinen miktarlarda etken madde eklenir. Analitin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarındaki üçer numune analiz edilerek tayin yapılır ve geri kazanım yüzdesi hesaplanır.

2.3.5. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten yapılan ardışık örneklemelerden elde edilen ölçüm serileri arasındaki uyum yakınlığı (saçınım derecesi) olarak tarif edilir. Belirlenen koşullar altında aynı örneklerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir.

2.3.5.1. Sistem Kesinliği

Sistem kesinliği, aynı çalışma şartlarında ve kısa zaman aralığında test edilir. Örnek hazırlama safhasında gelecek hatalardan bağımsız olarak sistem performansının bir ölçütüdür.

2.3.5.2. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliği, aynı çalışma şartlarında kısa zaman aralığında tespit edilir. Sistem performansının numune hazırlama safhasından gelecek hatalar dahilinde değerlendirilmesidir.

2.3.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, laboratuvarda gün içindeki ve farklı günlerdeki rastgele değişimlerin analitik yöntemin kesinliği üzerine etkisini görmek amacıyla aynı homojen numunenin aynı/farklı günde ve farklı bir cihazda test edilmesidir.

2.3.6. Uygulama Aralığı

Bir analitik yöntemin uygulama aralığı doğrusallık çalışmalarından oluşturulur. Uygun doğrusallık, doğruluk ve kesinliğe sahip bir yöntem ile tayin edilen bileşenin alt ve üst konsantrasyonları arasındaki aralık olarak tarif edilir. Doğrusallık çalışmasının alt ve üst sınır çözeltilerinin 6'şar enjeksiyonunun RSD'si hesaplanır.

2.3.7. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinin bilinerek yapılan küçük değişimlerden (akış hızı, kolon sıcaklığı, tampon pH değişimi gibi) etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve analitik yöntemin normal kullanıldığı sürede güvenilirliğinin göstergesidir.

2.3.7.1. Yöntemin Stabilitesi

Yöntem parametrelerinde aşağıda belirtilen değişiklikler yapılarak, yapılan bu değişikliklerin sistem uygunluk parametresi ve numune sonucu üzerindeki etkisi incelenir.

- a) Kolon sıcaklığı değişimi (25°C-30°C)
- b) Akış hızı değişimi ($\pm 0,02$ mL/dk)
- c) Tampon pH değişimi ($\pm 0,02$)

2.3.7.2. Çözelti Stabilitesi

Analizi yapılacak maddenin stabil olarak analiz şartlarında bekletilme süresi saptanır. Seçilecek bekletilme süresi analize özgüdür. Eğer etken madde bu süre ve saklama şartlarında bozulacak olursa bu şartlar limitlendirilir ve yöntemde belirtilir.

2.3.7.3. Hareketli Faz Stabilitesi

Analizde kullanılacak hareketli fazın stabil olarak analiz şartlarında bekletilme süresi saptanır. Seçilecek bekletilme süresi analize özgüdür. Eğer hareketli faz bu süre ve saklama şartlarında bozulacak olursa bu şartlar limitlendirilir ve yöntemde belirtilir.

2.3.8. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluğu testleri, analitik yöntemlerin doğru ve kesin sonuçlar vermesine katkıda bulunan spesifik testlerdir. Sistem uygunluk testi, bir çok analitik metodun ana testlerinden birisidir. Bu testlerin prosedürleri, ekipmana, uygulanan test prosedürlerine ve analiz edilecek maddeye bağlı olarak hazırlanır ve değerlendirilir. Sistem uygunluk test parametreleri, analiz edilecek maddenin yapısına, valide edilen analitik yönteme bağlı olarak ayarlanır.

2.3.9. Stres Testi Çalışması

İlgili farmasötik ürünün ve plasebosunun hidroliz, oksidasyon, fotoliz ve termoliz işlemleri ile potansiyel bozunma ürünlerinin oluşumunun tespit edilmesinde incelenecek parametreler ve kriterler belirlenir. Kütle denkliği hesabı sonucu elde edilen verim (%) rapor edilir. Aynı zamanda, Saflık açısı < Saflık eşiği olmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2017-2018 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında ve Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş. Ar-Ge Merkezi enstrümental analiz laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında referans standart kullanılmıştır. Referans standart bilgileri Tablo 3-1’de, analiz sertifikası Ek-1’de verilmiştir.

Tablo 3-1: Referans standart

Standart	Üretici-Lot No	Kullanım Amacı
Deksmedetomidin Hidroklorür	USP – R01590	Analit

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-2’de verilmiştir.

Tablo 3-2: Kimyasallar

Kimyasallar	Tedarikçi Bilgisi
Ultra saf su	Elga Purelab Option
Metanol (HPLC saflığında)	J.T.Baker
Sodyum fosfat dibazik dihidrat	Merck
Sodyum fosfat monobazik dihidrat	Merck
Sodyum Klorür	J.T.Baker
Filtre	Sartorius
pH metre	Mettler Toledo

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi

Hareketli faz olarak metanol ve değişik fosfat tamponu çözeltileri farklı oranlarda denenmiştir. En uygun hareketli faz çözeltisi metanol:5 mM fosfat tamponu (pH:7) (60:40, h/h) karışımı olarak belirlenmiştir. Hareketli faz, süzme sisteminden süzülerek (Millipor, 0,45 µm filtre) analize hazır hale getirilmiştir. Hareketli faz çözeltisi aynı zamanda blank çözeltisi olarak da kullanılmıştır.

5 mM Fosfat tamponunun hazırlanması

0,89 g sodyum fosfat dibazik dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1000 mL'lik balona aktarılıp, 900 mL saf suda (*Elga Purelab Option cihazı*) çözüldü. pH $7,0 \pm 0,05$ 'e pH ayarlama çözeltisi ile istenilen pH'a ayarlandıktan sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

0,1 M pH ayarlama çözeltisi hazırlanması

16,0 g sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1000 mL'lik balon jojeye aktarılıp saf suda çözülerek, hacmine saf su ile tamamlandı

Etken madde içermeyen ilaç preparatı (plasebo) çözeltisi hazırlanması

9,0 g sodyum klorür (NaCl) 1000 mL saf suda mL'lik balon jojeye aktarılıp saf suda çözülerek, hacmine saf su ile tamamlandı.

3.1.2.2. Deksmetomidin Çözeltileri

Stok Standart Çözeltisi:

2,00 mg Deksmetomidin'e eşdeğer 2,36 mg Deksmetomidin Hidroklorür referans standart tartılarak, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Hareketli faz çözeltisiyle çözüldü ve hacmine tamamlandı (Stok standart çözelti 1). Bu çözeltinin 8,0 mL'si 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz çözeltisiyle tamamlanarak karıştırıldı (Stok standart çözelti 2) (0,04 mg/mL, Deksmetomidin).

Stok standart 2 çözeltisinden hareketli faz çözeltisi ile 0,02 mg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 0,02-26,0 µg/mL aralığında standart çözeltiler hareketli faz çözeltisi ile hazırlandı. Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı Tablo 3-3'te verilmiştir.

Stok Numune Çözeltisi:

2,36 mg Deksmetomidin Hidroklorür maddesi 100 mL'lik balon jojeye alınarak, hacmine plasebo çözeltisi ile tamamlandı (0,02 mg/mL, Deksmetomidin).

Tayin Limiti Çözeltisi:

Stok numune çözeltisinin 0,1 mL'si 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz ile tamamlanarak karıştırıldı (20,0 ng/mL, Deksmetomidin).

Teşhis Limiti Çözeltisi:

Tayin limiti çözeltisi'nin 3,0 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz ile tamamlanarak karıştırıldı (6,0 ng/mL, Deksmetomidin).

Numune Çözeltisi-1:

Stok numune çözeltisinin 0,5 mL'si 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine plasebo ile tamamlanarak karıştırıldı (0,1 µg/mL, Deksmetomidin).

Numune Çözeltisi-2:

3,07 mg Deksmetomidin Hidroklorür maddesi 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine plasebo ile tamamlanarak karıştırıldı (26,0 µg/mL, Deksmetomidin).

Numune Çözeltisi-3:

Deksmetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınarak 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı (0,02 mg/mL, Deksmetomidin).

3.1.2.3. Stres Testi Çözeltileri

Standart Çözeltisi:

2,36 mg Deksmetomidin Hidroklorür referans standart 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı (0,02 mg/mL, Deksmetomidin) ve UPLC'ye enjekte edildi.

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hareketli faz çözeltisiyle tamamlandı (0,02 mg/mL, Deksmetomidin) ve UPLC'ye enjekte edildi.

a) Asit ile Bozunma

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 1,0 mL 1N HCl ilave edildi ve 80°C'lik su banyosuna alındı. Analizden önce her bir numune çözeltisi 1,0 mL 1N NaOH ile nötralize edildi. Oda sıcaklığına gelen numune hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı.

Bu çalışma, numune çözeltileri ile eş zamanlı olarak, aynı koşulda ve aynı şekilde hazırlanan plasebo çözeltileri ile de yapılmıştır.

b) Baz ile Bozunma

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 1,0 mL 1N NaOH ilave edildi ve 80°C'lik su banyosuna alındı. Her bir numuneleme noktasında çözeltiyi nötrlemek için 1,0 mL 1N HCl ile nötralize edildi. Oda sıcaklığına gelen numune hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı.

Bu çalışma, numune çözeltileri ile eş zamanlı olarak, aynı koşulda ve aynı şekilde hazırlanan plasebo çözeltileri ile de yapılmıştır.

c) Peroksit ile Bozunma (Ortam Sıcaklığı)

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 1,0 mL hidrojen peroksit (%3) ilave edildi. Her bir numuneleme noktasında oda sıcaklığına gelen numune, hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı.

Bu çalışma, numune çözeltileri ile eş zamanlı olarak, aynı koşulda ve aynı şekilde hazırlanan plasebo çözeltileri ile de yapılmıştır.

d) Isı ile Bozunma

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 80°C'lik su banyosuna alındı. Her bir numunleme noktasında oda sıcaklığına gelen numune, hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlandı.

Bu çalışma, numune çözeltileri ile eş zamanlı olarak, aynı koşulda ve aynı şekilde hazırlanan plasebo çözeltileri ile de yapılmıştır.

e) Fotostabilite

Numune Çözeltisi:

Deksmedetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınıp 5 mL'lik balon jojeye aktarılaraq fotostabilite kabinine alındı. Kimyasal aktinometrik sistem ile çözeltinin aldığı radyasyon takip edilerek yeterli radyasyona maruz kaldıktan sonra HPLC vialine yeterli miktarda numuneleme yapıldı.

Bu çalışma, numune çözeltileri ile eş zamanlı olarak, aynı koşulda ve aynı şekilde hazırlanan plasebo çözeltileri ile de yapılmıştır.

Tablo 3-3: Kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	DXM Seviyesi (%)	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Standart Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim (Hareketli faz çözeltisi)
ST1	0,1	0,02	50,0 µL DXM (0,04 mg/mL)	100 mL
ST2	0,5	0,1	50,0 µL DXM (0,04 mg/mL)	20 mL
ST3	1,0	0,2	0,1 mL DXM (0,04 mg/mL)	20 mL
ST4	5,0	1,0	0,25 mL DXM (0,04 mg/mL)	10 mL
ST5	10	2,0	0,25 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST6	20	4,0	0,5 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST7	40	8,0	1,0 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST8	60	12,0	1,5 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST9	80	16,0	2,0 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST10	100	20,0	2,5 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST11	110	22,0	2,75 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL
ST12	130	26,0	3,25 mL DXM (0,04 mg/mL)	5 mL

DXM: StokStandart Çözeltisi (Deksmedetomidin)

3.2. Aletler ve Gereçler

1. UPLC aleti (Waters, HClass)
Quaternary Solvent Manager, QSM Pompa Ünitesi
SN-M10HLP326N Kolon Fırını
Sample Manager SDI, FTN, Otomatik Numune Ünitesi
C18 Analitik Kolon (Acquity UPLC BEH, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm)
2. Spektrofotometre (PDA Detector UPD, TUV Detector UPT)
3. Hassas Terazı (Mettler Toledo, XP56, AX205 ve AX504)
4. Manyetik Karıştırıcı (Ika / RCT Standart Heidolph / MR Hei-end)
5. Ultra saf su cihazı (Elga Purelab Option)
6. pH metre (Mettler Toledo, Seven Excellence Multiparameter)
7. Otomatik pipetler (Eppendorf 10-100 µL ve 100-1000 µL)
8. Pipet uçları (Eppendorf 100 µL ve 1000 µL)
9. Hareketli faz filtresi (Millipor, 0,45 µm)
10. HPLC vialleri (Isolab)
11. Vial kapakları (Isolab)
12. Enjektör (Hamilton, düz uçlu, 50 µL)
13. FTIR (Perkin Elmer)

3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

Enstrümental Koşullar:

UPLC sisteminin bilgisayarı güç düğmesinden açılır. Cihazın üniteleri sırasıyla açılır. Ardından masaüstünden Empower ikonuna basılarak yazılım açılır. 3.1.2.1'e uygun olarak hazırlanan hareketli faz çözeltisi sistemin kanallarına yerleştirilir. Kullanılan hatlar için purge işlemi yapılır. Purge işlemi bittikten sonra, akış 0,2 mL/dk olarak ayarlanır ve kolon bağlantısına kadar hareketli faz geçmesi sağlanır. Sonrasında kolon takılarak, cihaz ve kolonun şartlanması için sistemden hareketli faz geçirilir. Kromatografik koşullar Tablo 3-4'te verilmiştir.

Tablo 3-4: Kromatografik koşullar

Kolon	Acquity UPLC BEH, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm parçacık büyüklüğü
Akış hızı (mL/dk)	0,2
Dalga Boyu (nm)	220
Enjeksiyon hacmi (µL)	5
Kolon sıcaklığı (°C)	25
Otomatik numuneleme ünitesi sıcaklığı (°C)	25
Enjeksiyon süresi (dk)	6 (Standart çözeltisi enjeksiyonları) 30 (Blank, plasebo ve numune çözeltileri enjeksiyonları)

Stres testi çalışma koşulları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3-5).

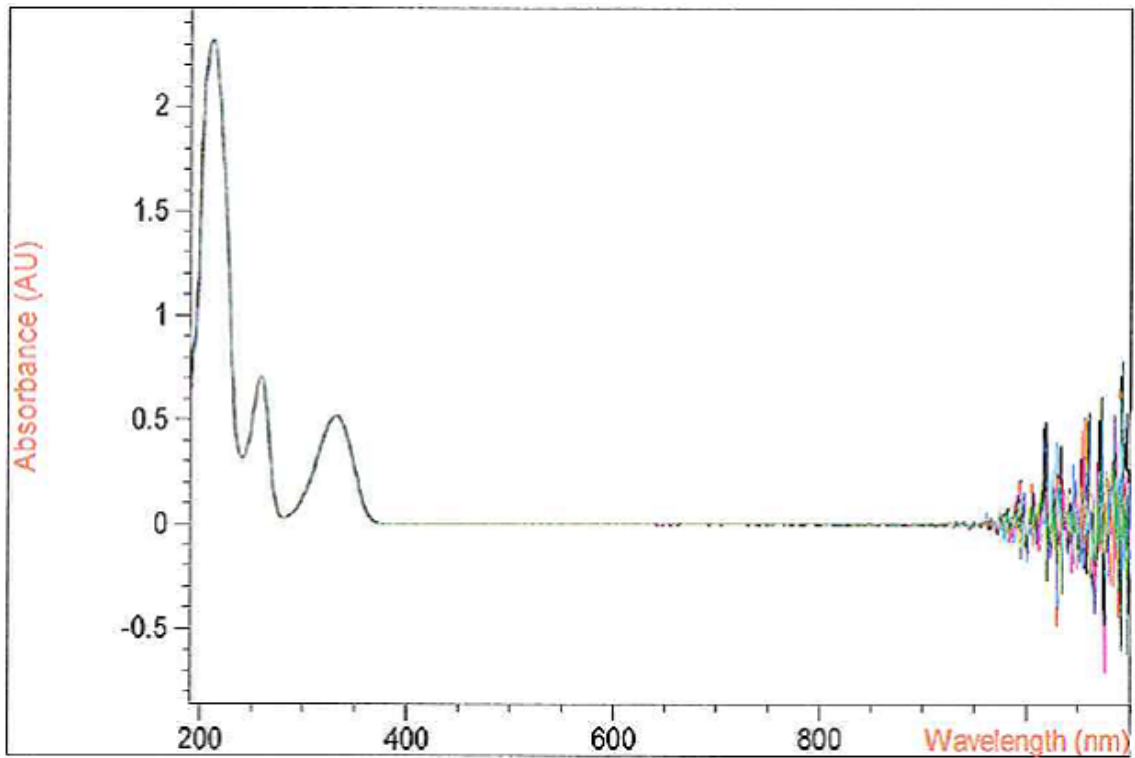
Tablo 3-5: Stres testi çalışma koşulları

Sıra No	Bozunma Türü	Bozunma Ajanı	Sıcaklık
1	Asit ile bozunma	1N HCl	80°C
2	Baz ile bozunma	1N NaOH	80°C
3	Peroksit ile bozunma	H ₂ O ₂ (%3)	Ortam sıcaklığı
4	Isıyla bozunma	Isı	80°C
5	Fotostabilite	UV ışını	Ortam sıcaklığı

3.4. Deksmetomidinin UPLC ile Analizi

3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Deksmetomidinin göstermiş olduğu maksimum absorbanstaki dalga boyu spektrofotometri yöntemi ile belirlenmiştir. UPLC cihazında PDA dedektör ile yapılan dalga boyu taramasında maksimum absorbands verdiği dalgaboyu 220 nm olarak bulunmuştur. Yine UV spektrofotometrisinde de yapılan çalışma ile dalga boyu 220 nm olarak tespit edilmiştir. UV spektrometresinden elde edilen spektrum Şekil 3-1’de verilmiştir.



Şekil 3-1: Deksmetomidinin UV spektrometrede alınmış spektrumu

3.4.2. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Stok standart 2 çözeltisinden seyreltilerek Tablo 3-3’te yer alan konsantrasyonlarda hazırlanan deksmedetomidin çözeltileri enjekte edilerek, standart pik alanları hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için ICH Q2(R1) kılavuzuna göre validasyon parametreleri çalışıldı (17).

3.5.1. Spesifiklik

Blank çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözeltisi ve numune çözeltisi Bölüm 3.1.2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanarak yöntemde belirtilen koşullarda analiz edildi. Blank ve plasebo kromatogramlarında, etken madde alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik gözlenmemelidir. Standart ve numune enjeksiyonlarından elde edilen etken madde piki saf olmalıdır (saflık açısı < saflık eşik değeri). Sonuçlar Bölüm 4.2.1’de verilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Tablo 3-3’te belirtilen 12 farklı konsantrasyondaki standart çözeltisi analiz edildi ve dedektör yanıtına göre derişim/pik alanı grafiğı çizilerek, sonuçların pik alanlarının ortalaması, standart sapma ve eğim hesaplanarak grafiksel değeriendirilmesi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

3.5.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Düşük konsantrasyonlarda Deksmidetomidin içeren çözeltiler hazırlanıp enjekte edildi. Sinyal/gürültü oranı ≥ 3 olan çözelti konsantrasyonu teşhis limiti olarak belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.3’te verilmiştir.

Düşük konsantrasyonlarda Deksmidetomidin içeren çözeltiler hazırlanıp enjekte edildi. Sinyal/gürültü oranı ≥ 10 olan çözelti konsantrasyonu tayin limiti olarak belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.3’te verilmiştir.

3.5.4. Doğruluk

Etken madde içermeyen ilaç preparatına (plasebo) etken madde eklenerek, %0,1, %0,5, %100 ve %130 seviyelerinde etkin maddeden eklendi ve her bir seviye için 3’er paralel numune hazırlandı. Hazırlanan örnekler (Bakınız bölüm 3.1.2.2) aynı standarda karşı analizlendi. Her bir seviye için elde edilen geri kazanım sonuçlarının ortalaması, SD ve RSD değeri hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.4’te verilmiştir.

3.5.5. Kesinlik

3.5.5.1. Sistem Kesinliği

Tablo 3-3'te belirtilen Deksmetomidin standart çözeltisi (0,02 mg/mL, Deksmetomidin) hazırlandı ve sisteme ardışık 6 kez enjekte edildi. Standart çözeltinin 6 enjeksiyonunun pik alanları ortalaması, SD ve RSD değerleri hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.5.1'de verilmiştir.

3.5.5.2. Yöntem Kesinliği

Bölüm 2.1.2.2'de belirtilen numune çözeltisi-3 için 6 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.5.2'de verilmiştir.

3.5.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Aynı laboratuvarında aynı ve farklı bir günde Bölüm 2.1.2.2'de belirtilen numune çözeltisi-3 için 6 farklı numune çözeltisi hazırlandı ve farklı bir cihaz ile analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.5.3'te verilmiştir.

3.5.6. Uygulama Aralığı

Doğrusallık çalışmasının alt ve üst derişiminlerinde (tayin limiti ile standart çözelti konsantrasyonunun %130 seviyesi) Deksmetomidin çözeltileri hazırlandı ve her bir çözeltiden altı ardışık enjeksiyon yapılarak analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.6'te verilmiştir.

3.5.7. Sağlamlık

3.5.7.1. Yöntemin Stabilesi

Yöntem parametrelerinde aşağıda belirtilen değişiklikler yapılarak, yapılan bu değişikliklerin sistem uygunluk parametresi ve numune sonucu üzerindeki etkisi incelendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.7.1'de verilmiştir.

- a) Kolon sıcaklığı değişimi (25°C-30°C)
- b) Akış hızı değişimi ($\pm 0,02$ mL/dk)
- c) Tampon pH değişimi ($\pm 0,02$)

3.5.7.2. Çözelti Stabilitesi

Bölüm 3.1.2.1’de belirtilen standart çözeltisi (0,02 mg/mL, Deksmidetomidin) ve Bölüm 3.1.2.2’de belirtilen numune çözeltisi-3 (0,02 mg/mL, Deksmidetomidin) hazırlandı. 64 saat boyunca 25°C sıcaklıkta bekletilip belli sürelerde analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.7.2’de verilmiştir.

3.5.7.3. Hareketli Faz Stabilitesi

Bölüm 3.1.2.1’de belirtilen standart çözeltisi (0,02 mg/mL, Deksmidetomidin) hazırlandı ve farklı günlerde hazırlanmış olan hareketli faz çözeltileri ile analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.7.3’te verilmiştir.

3.5.8. Sistem Uygunluk

Bölüm 3.1.2.1’de belirtilen standart çözeltisi (0,02 mg/mL, Deksmidetomidin) hazırlandı ve analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.8’te verilmiştir.

3.5.9. Stres Testi

Bölüm 3.1.2.3’te belirtilen çözeltiler hazırlandı ve Bölüm 3.3’te yer alan stres testi koşullarına göre analiz edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.9’da verilmiştir.

3.6. Enjeksiyonluk Çözeltilerde Deksmidetomidin’in Analizi

3.6.1. Enjeksiyonluk Çözeltilerin Hazırlanması

Sanovel İlaç A.Ş. laboratuvarlarında hazırlanan enjeksiyonluk çözeltiler kullanılmıştır. Hazırlanan enjeksiyonluk çözeltilerin doluları 2 mL’lik flakonlara yapılmıştır. Her bir flakon 200 µg Deksmidetomidin’e eşdeğer 236 µg Deksmidetomidin Hidroklorür içermektedir. Enjeksiyonluk çözelti formülasyonunda 18 mg NaCl ve enjeksiyonluk su (WFI) bulunmaktadır. Etkin ve yardımcı maddeler üretim yönteminde verilen sıra ile eklenerek, yöntemde belirtilen koşullarda karıştırılmıştır. Deksmidetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltisi içeriğinden 1,0 mL alınarak 5 mL’lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine hareketli faz çözeltisi ile tamamlanmıştır. 6 farklı numune çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.

3.6.2. Geliştirilen UPLC Yöntemi ile Analiz

Geliştirilen yönteme ait hareketli faz, analitik cihaz ve kolon hazır hale getirilerek 6 farklı enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.10'da verilmiştir.

Sonuçlar farmakope (USP 41) yöntemiyle elde edilen sonuçlarla da t- ve F-testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Kıyas yöntemi sonuçları Bölüm 4.2.10'da verilmiştir.

4. BULGULAR

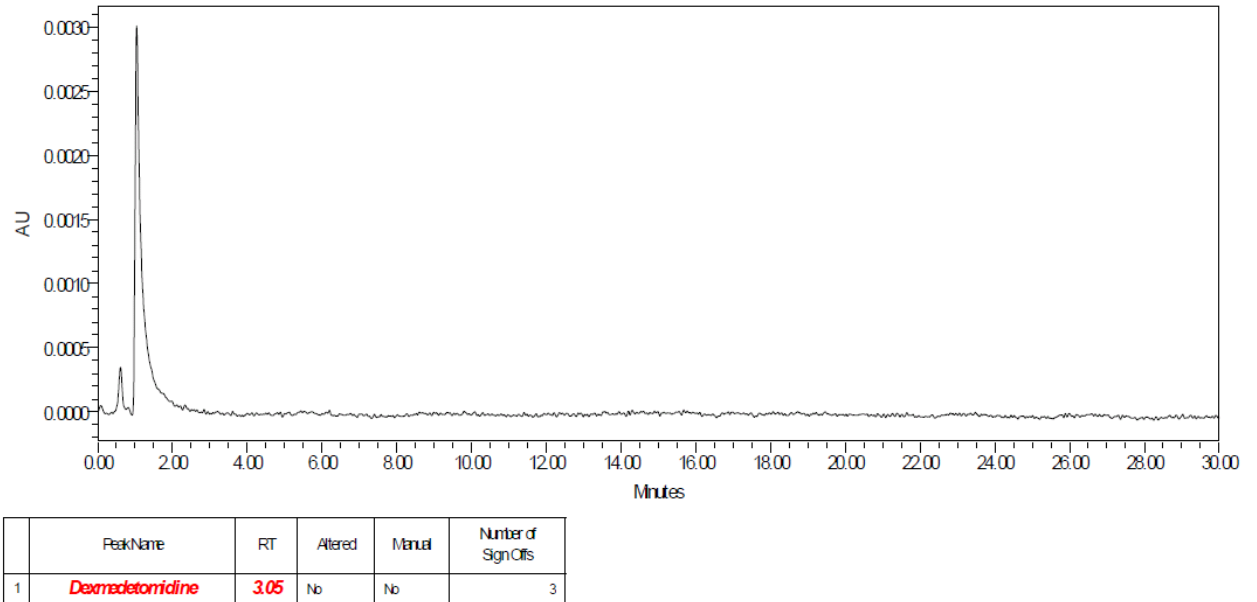
4.1. Deksmetomidinin UPLC ile Analiz Sonuçları

Deksmetomidinin enjeksiyonluk çözeltilerde miktar ve safsızlık tayini için UPLC ile analizinde için yöntem, ters fazlı kolonda; metanol-5mM fosfat tamponu (pH:7, 60:40, h/h) hareketli fazı ile 0,2 mL/dk akış hızında analiz edildi. Dedeksiyon UV dedektör ile 220 nm olarak tespit edilmiştir.

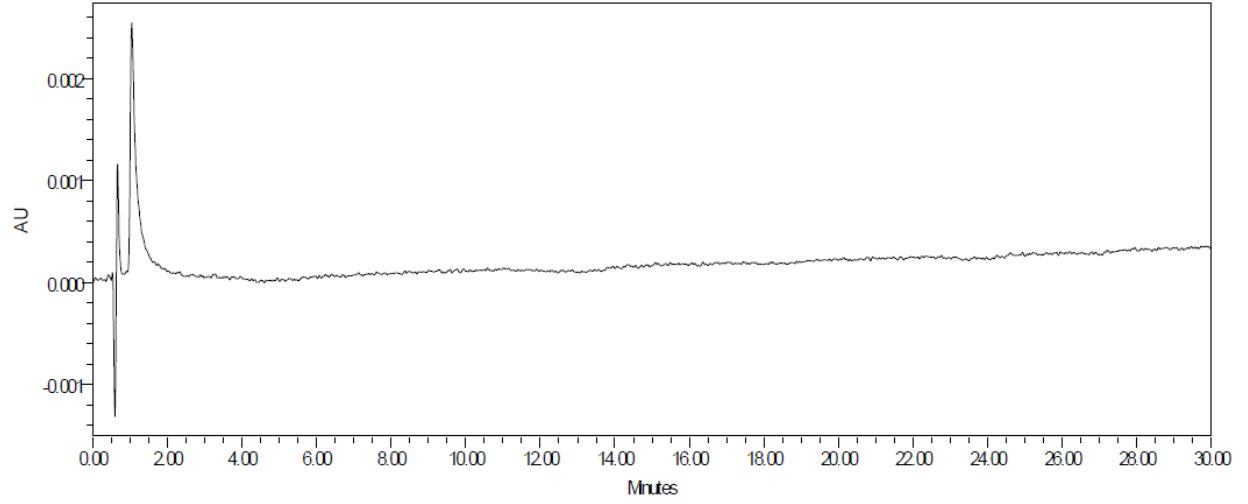
4.2. Yöntem Validasyonu Sonuçları

4.2.1. Spesifiklik

Yöntem seçiciliğinin sınanması için hareketli faz çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart (0,02 mg/mL, Deksmetomidin) ve enjeksiyonluk preparat (0,02 mg/mL, Deksmetomidin) çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4-1 ve Şekil 4-6 arasında verilmiştir. Spesifiklik testi sonuçları ise Tablo 4-1’de verilmiştir.

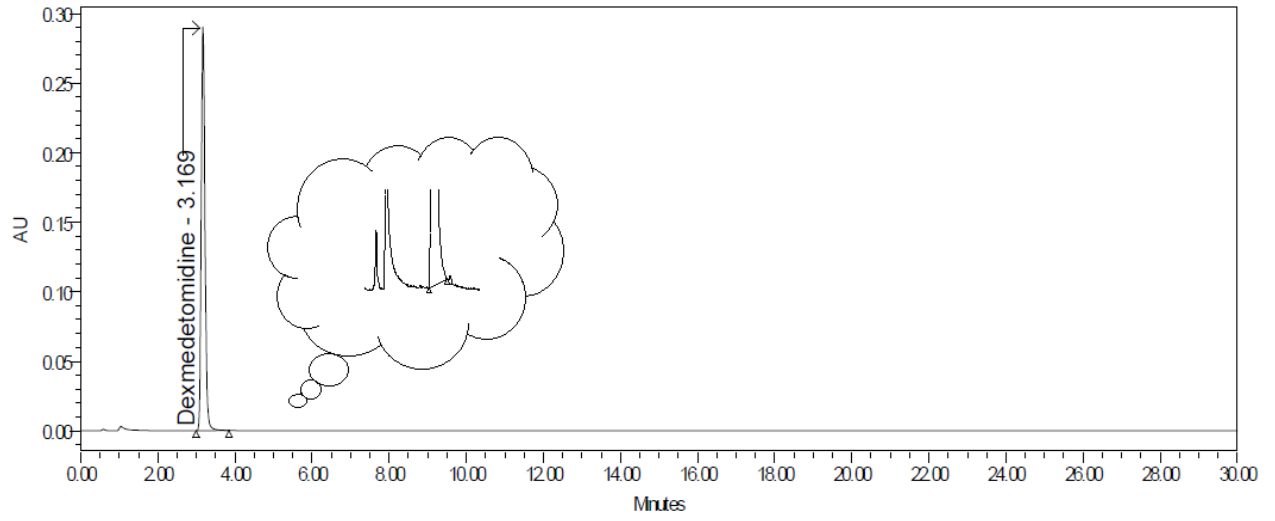


Şekil 4-1: Blank (hareketli faz) enjeksiyonu kromatogramı



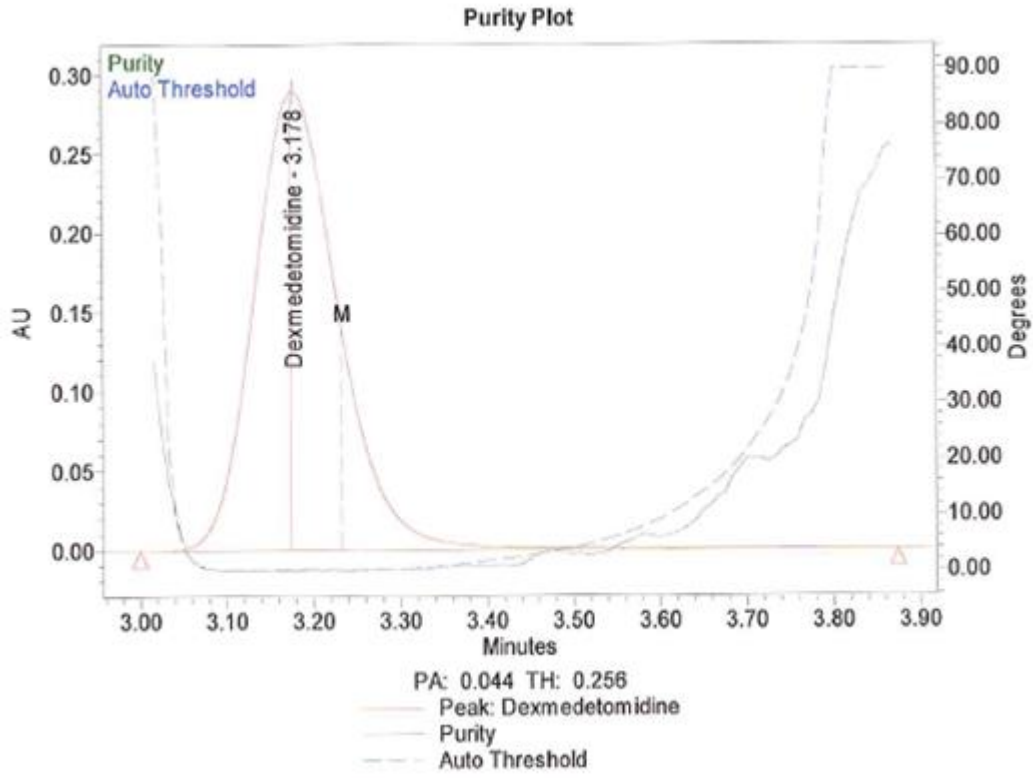
	PeakName	RT	Altered	Manual	Number of Sign Offs
1	Dexmedetomidine	3.05	No	No	3

Şekil 4-2: Etken madde içermeyen ilaç preparatı (plasebo) çözeltisi kromatogramı

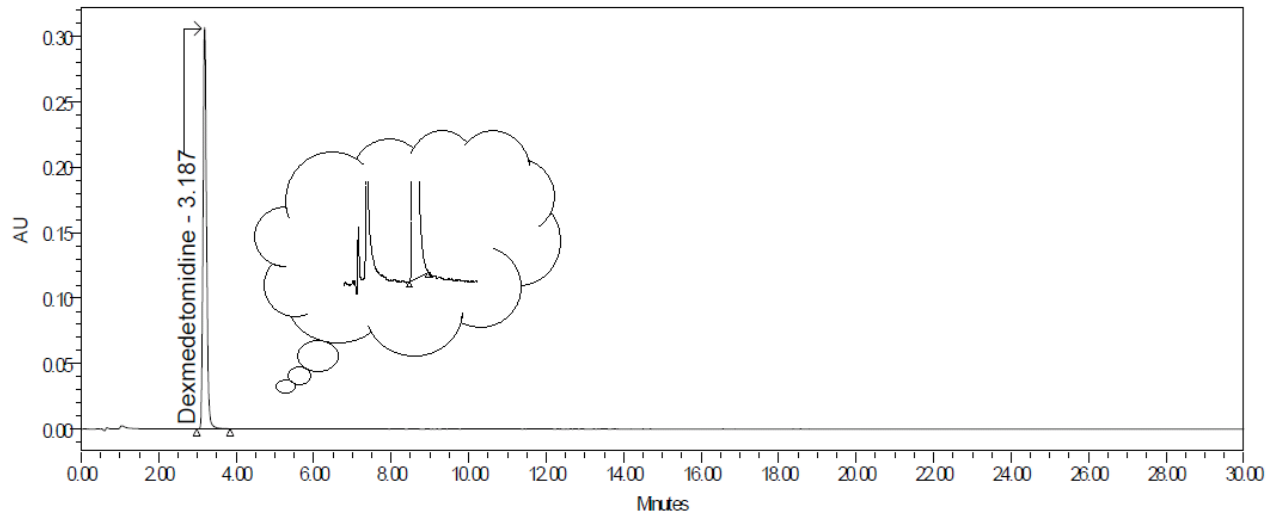


	PeakName	RT	Area	Height (µV)	%Area	Altered	Manual	Number of Sign Offs	USP Tailing	USP Plate Count
1	Dexmedetomidine	3.17	1960491	290794	100.0	No	No	3	1.2	5231

Şekil 4-3: Standart çözeltisi kromatogramı

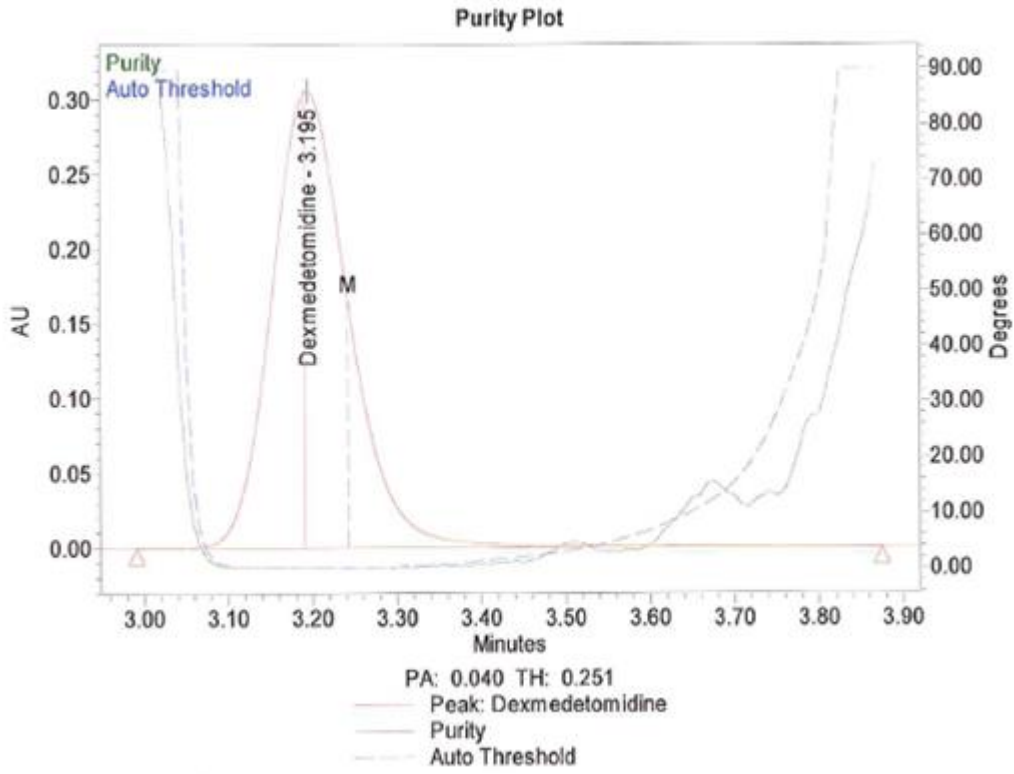


Şekil 4-4: Standart çözeltisi için pik saflığı kromatogramı



	PeakName	RT	Area	Height (µV)	%Area	Altered	Manual	Number of Sign Offs	USP Tailing	USP Plate Count
1	Dexmedetomidine	3.19	1936657	307272	100.0	No	No	3	12	6085

Şekil 4-5: Numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-6: Numune çözeltisi için pik saflığı kromatogramı

Tablo 4-1: Spesifiklik testi sonuçları

Numune Adı	Alıkonma Zamanı (RT) (dk)	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
Blank	-	-	-
Plasebo	-	-	-
Standart çözeltisi	3,2	0,04	0,26
Numune çözeltisi	3,2	0,04	0,25

Hareketli faz (blank) ve etken madde içermeyen ilaç preparatı (plasebo) çözeltilerine ait kromatogramlarda, etken madde pikinin alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik gözlenmemiştir. Etken madde piki, standart ve numune çözeltisi enjeksiyonlarında saf bulunmuştur (Şekil 4-4 ve Şekil 4-6).

4.2.2. Doğrusallık

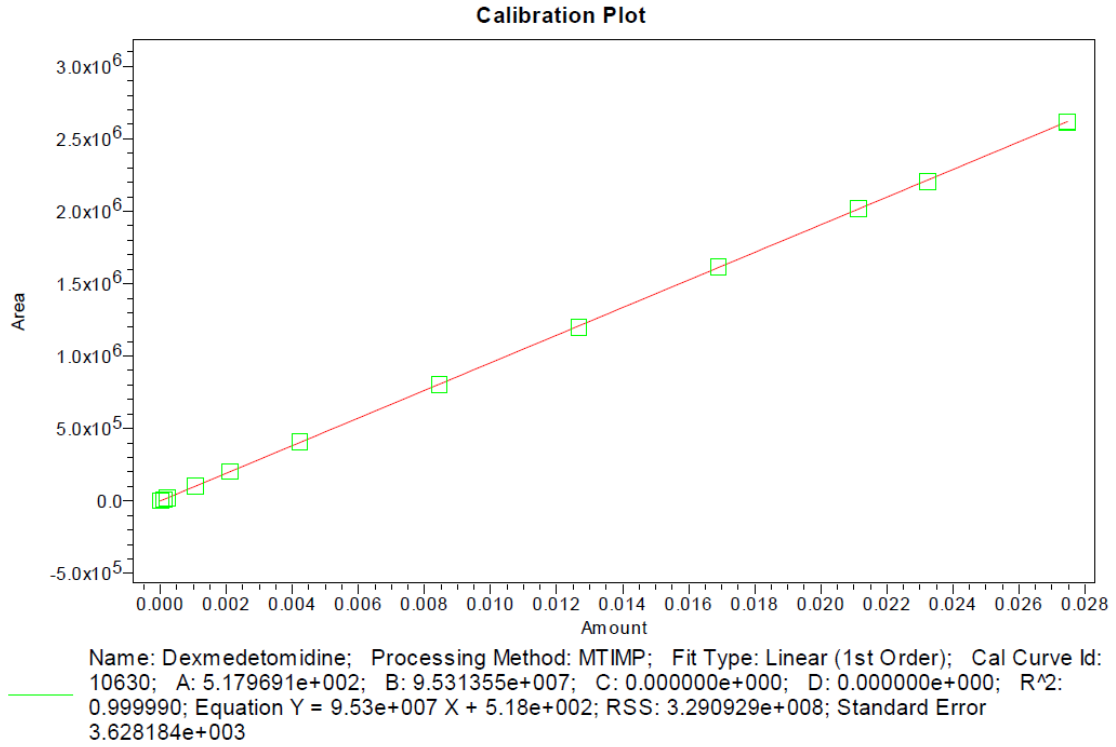
Tablo 3-3'te belirtilen 12 farklı konsantrasyondaki standart çözeltisi analiz edildikten sonra, dedektör yanıtına göre derişim/pik alanı grafiğı çizildi. Sonuçlar Tablo 4-2 ve Tablo 4-3'te, kalibrasyon eğrisi Şekil 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Deksmetomidin maddesi doğrusallık sonuçları

Deksmetomidin Seviyesi (%)	Ortalama Pik Alanı [N=3]	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	DeneySEL Konsantrasyon (µg/mL)
0,1	1934	0,02	0,021
0,5	9815	0,1	0,11
1,0	19589	0,2	0,21
5,0	102424	1,0	1,06
10	204855	2,0	2,11
20	407361	4,0	4,23
40	802610	8,0	8,45
60	1200104	12,0	12,68
80	1614872	16,0	16,90
100	2018239	20,0	21,13
110	2206262	22,0	23,24
130	2617347	26,0	27,47

Tablo 4-3: Kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denklemi ve sonuçları

Doğru Denklemi	Kalibrasyon Katsayısı (R ²)	Eğim	y-kesim noktası
$y = 9,53 \cdot 10^7 x + 518$	0,999990	$9,53 \cdot 10^7$	518



Şekil 4-7: Deksmedetomidin kalibrasyon eğrisi

4.2.3. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

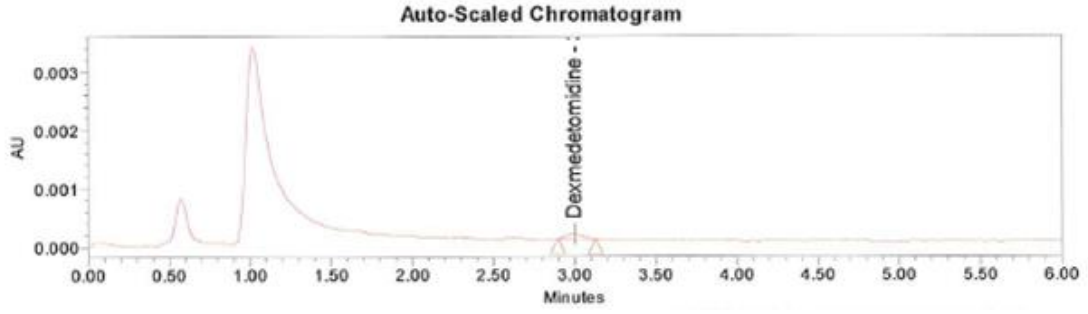
Teşhis limiti ve tayin limiti sonuçları Tablo 4-4'te, ilgili kromatogramlar Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da verilmiştir. Tayin limiti çalışması için 6 tekrar yapılmıştır. Elde edilen pik alanları, ortalama pik alanı, SD ve RSD Tablo 4-5'de verilmiştir. Tayin limiti çalışması için elde edilen RSD değeri %8,7 olarak bulunmuştur.

Tablo 4-4: Teşhis ve tayin limiti sonuçları

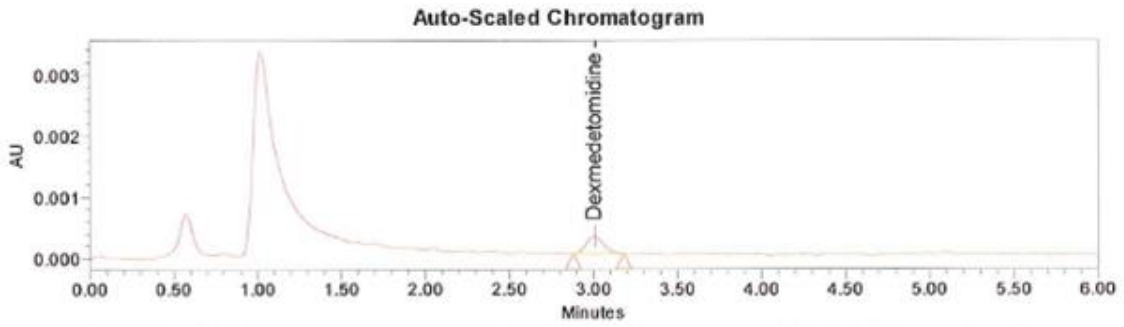
Çözeltili Adı	Konsantrasyon (ng/mL)	Numune Çözeltilisi Konsantrasyonuna Göre (%)	Sinyal/Gürültü
Teşhis Limiti (LOD)	6,3	0,03	5
Tayin Limiti (LOQ)	21,0 [N=6]	0,1	18

Tablo 4-5: Tayin limiti çözeltisi enjeksiyonlarının sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Deksmedetomidin Piki Alanları
1	1815
2	1802
3	2071
4	1792
5	1921
6	2202
Ortalama	1934
SD	168,8
RSD (%)	8,7



Şekil 4-8: Teşhis limiti çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-9: Tayin limiti çözeltisi kromatogramı

4.2.4. Doğruluk

Bölüm 3.5.4'te yer alan hazırlıklar doğrultusunda enjeksiyonluk preparat numuneleri analiz edildi. Her bir seviye için elde edilen geri kazanım sonuçları, ortalamaları, standart sapma ve RSD değerleri Tablo 4-6'da verilmiştir. Standart çözeltisi için hazırlanan ölçü eğrisinden elde edilmiş olan regresyon denkleminde yerine konularak sonuçlar hesaplanmıştır.

Tablo 4-6: Enjeksiyonluk preparat içindeki Deksmetomidin için geri kazanım sonuçları

Deksmetomidin Seviyesi (%)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%) [N=3]	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
0,1 (Tayin limiti)	0,02	99,9	99,6	4,4	4,4
		95,1			
		103,9			
0,5	0,1	96,9	96,4	0,7	0,7
		96,6			
		95,6			
100	20,0	99,0	99,1	0,4	0,4
		98,8			
		99,6			
130	26,0	99,0	99,0	0,2	0,2
		99,1			
		98,8			

4.2.5. Kesinlik

4.2.5.1. Sistem Kesinliği

Standart çözeltinin 6 farklı enjeksiyonunun pik alanları, pik alanları ortalaması, SD ve RSD değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-7’de verilmiştir. RSD değeri %0,1 olarak bulunmuştur.

Tablo 4-7: Sistem kesinliği sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Standart Çözeltisi (20 µg/mL) Deksmedetomidin Piki Alanları [N=6]
1	2051038
2	2051796
3	2050517
4	2049087
5	2045737
6	2048753
Ortalama	2049488
SD	2170,7
RSD (%)	0,1

4.2.5.2. Yöntem Kesinliği

Altı farklı numune çözeltisi hazırlanarak analiz edildi. Numune sonuçları, ortalaması, SD ve RSD değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-8’de verilmiştir. RSD değeri %0,1 olarak bulunmuştur.

Tablo 4-8: Yöntem kesinliği deksmedetomidin miktar tayini ve safsızlık sonuçları

Enjeksiyon No	Standart Çözeltisi (20 µg/mL) Deksmedetomidin Piki Alanları	Sonuçlar (%)	Bilinmeyen Safsızlık (%)
1	2051038	99,3	T.E.*
2	2051796	100,1	T.E.
3	2050517	99,8	T.E.
4	2049087	99,3	T.E.
5	2045737	99,1	T.E.
6	2048753	99,7	T.E.
Ortalama	2049488	99,6	T.E.
SD	2170,7	0,4	T.E.
RSD (%)	0,1	0,4	T.E.

*T.E: Bu çalışma koşullarında safsızlık tespit edilmemiştir.

4.2.5.3. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Aynı laboratuvarında aynı ve farklı bir günde hazırlanan 6 farklı numune çözeltisi farklı bir cihaz ile analiz edildi. Sonuçlar Tablo 4-9 ve Tablo 4-10'da verilmiştir. RSD değeri %0,1 olarak bulunmuştur. İki analist arasındaki ortalama miktar tayini sonuçları arası fark ise %1,9 olarak bulunmuştur.

Tablo 4-9: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için miktar tayini ve safsızlık sonuçları

Çalışmanın Adı	Enjeksiyon No	Standart Çözeltisi (20 µg/mL) Deksmetomidin Piki Alanları	Sonuçlar (%)	Bilinmeyen Safsızlık (%)
Gün İçi Tekrarlanabilirlik	1	1889171	101,3	T.E.*
	2	1887214	101,2	T.E.
	3	1889485	101,7	T.E.
	4	1886969	101,7	T.E.
	5	1887005	101,2	T.E.
	6	1888220	102,0	T.E.
	Ortalama	1888011	101,5	T.E.
	SD	1122,0	0,3	T.E.
	RSD (%)	0,1	0,3	T.E.
Günler Arası Tekrarlanabilirlik	1	1856151	101,4	T.E.
	2	1861136	101,6	T.E.
	3	1855284	101,5	T.E.
	4	1853536	101,2	T.E.
	5	1863920	101,3	T.E.
	6	1857185	101,2	T.E.
	Ortalama	1857869	101,4	T.E.
	SD	3903,0	0,2	T.E.
	RSD (%)	0,2	0,2	T.E.

*T.E: Bu çalışma koşullarında safsızlık tespit edilmemiştir.

Tablo 4-10: Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için karşılaştırmalı sonuçlar

Gün İçi Tekrarlanabilirlik	Ortalama Miktar Tayini Sonuçları (%)	Ortalama Safsızlık Sonuçları (%)
1	99,6	T.E.*
2	101,5	T.E.
Ortalama Sonuçlar Arası Fark (%)	1,9	T.E.
Günler Arası Tekrarlanabilirlik	Ortalama Miktar Tayini Sonuçları (%)	Ortalama Safsızlık Sonuçları (%)
1	99,6	T.E.
2	101,4	T.E.
Ortalama Sonuçlar Arası Fark (%)	1,8	T.E.

*T.E: Bu çalışma koşullarında safsızlık tespit edilmemiştir.

4.2.6. Uygulama Aralığı

Uygulama aralığı sonuçları Tablo 4-11’de verilmiştir. RSD değeri %0,05 olarak bulunmuştur. Kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4-11: Uygulama aralığı sonuçları

Enjeksiyon No	Tayin Limiti (0,02 µg/mL) Deksmedetomidin Piki Alanları	Standart Çözeltisi (26 µg/mL) Deksmedetomidin Piki Alanları
1	1815	2618135
2	1802	2616283
3	2071	2615763
4	1792	2617110
5	1921	2618974
6	2202	2617816
Ortalama	1934	2617347
SD	168,8	1198,8
RSD (%)	8,7	0,05

4.2.7. Sağlamlık

4.2.7.1. Yöntemin Stabilitesi

Geliştirilen yöntem stabilitesi çalışması sonuçları aşağıda verilmiştir. FDA kılavuzunda yer alan sistem uygunluk parametrelerinden teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü değerlerinin kabul kriterlerine uygunluğu da incelenmiştir (Teorik plaka sayısı > 2000, Kuyruklanma faktörü ≤ 2).

Kolon sıcaklığı değişimi Tablo 4-12’de, akış hızı değişimi Tablo 4-13’te ve tampon pH değişimi Tablo 4-14’te belirtilmektedir. Testlerde yapılan değişiklikler doğrultusunda, belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir ve analiz sonuçlarında RSD değerleri; kolon sıcaklığı değişiminde %0,1-%0,2 arasında, akış hızı değişiminde %0,1, tampon çözeltisi pH değişiminde ise %0,04-%0,1 arasında bulunmuştur. Böylece yöntemin sağlam olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4-12: Kolon sıcaklığı değişikliği ile elde edilen test sonuçları

Kolon Sıcaklığı (°C)	Çözelti Adı	RT	Pik Alanı	RSD (%)	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
25°C	Standart (0,02 mg/mL)	2,89	1936983	0,1 [N=6]	3698 [N=6]	1,3 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,91	1902866	-	4390	1,2
30°C	Standart (0,02 mg/mL)	2,86	1936821	0,2 [N=6]	3715 [N=6]	1,3[N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,87	1907366	-	4484	1,2

Tablo 4-13: Akış hızı değişimi sonuçları

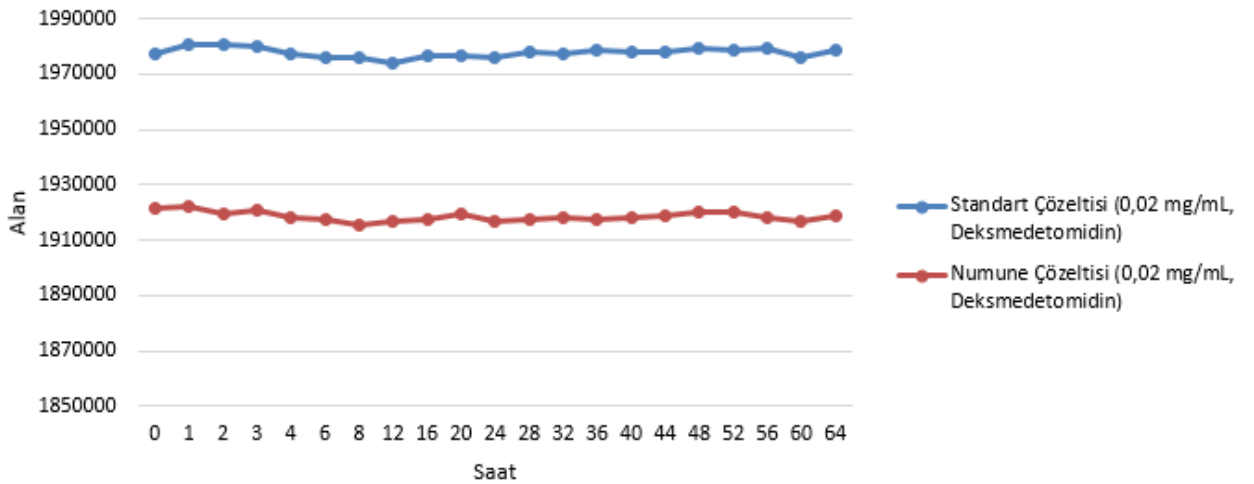
Akış Hızı (mL/dk)	Çözelti Adı	RT	Pik Alanı	RSD (%)	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0,18	Standart (0,02 mg/mL)	3,23	2152114	0,1 [N=6]	4011[N=6]	1,3 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	3,25	2119002	-	4861	1,3
0,20	Standart (0,02 mg/mL)	2,89	1936983	0,1 [N=6]	3698 [N=6]	1,3 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,91	1902866	-	4390	1,2
0,22	Standart (0,02 mg/mL)	2,62	1762115	0,1 [N=6]	3442 [N=6]	1,2 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,63	1730020	-	4077	1,2

Tablo 4-14: Tampon çözeltisi pH değişimi sonuçları

Tampon pH değeri	Çözelti Adı	RT	Pik Alanı	RSD (%)	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
6,8	Standart (0,02 mg/mL)	2,88	1939778	0,04 [N=6]	3612 [N=6]	1,3 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,88	1903001	-	4294	1,3
7,0	Standart (0,02 mg/mL)	2,89	1936983	0,1 [N=6]	3698 [N=6]	1,3 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,91	1902866	-	4390	1,2
7,2	Standart (0,02 mg/mL)	2,89	1938998	0,1 [N=6]	3633[N=6]	1,2 [N=6]
	Numune (0,02 mg/mL)	2,89	1904807	-	4312	1,2

4.2.7.2. Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesi sonuçları Şekil 4-10'da yer alan grafikte verilmiştir. Oda sıcaklığında ve gün ışığında 64 saat boyunca yapılan analizde, pik alanları arası anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.



Şekil 4-10: Çözelti stabilitesi sonuçları

4.2.7.3. Hareketli Faz Stabilitesi

Toplam 8 günde hazırlanmış olan hareketli faz çözeltileri ile 25°C sıcaklıkta analiz yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-15'te verilmiştir. RSD değerleri %0,1-%0,3 arasında bulunmuştur.

Tablo 4-15: Hareketli faz stabilitesi sonuçları

Süre (gün)	RT	Standart Çözeltisi (20 µg/mL) Deksmedetomidin Piki Alanları Ortalaması [N=6]	RSD (%)
0	2,88	1934349	0,3
2	2,96	1934771	0,1
6	2,90	1936588	0,1
8	2,94	1935926	0,1

4.2.8. Sistem Uygunluk

Sistem kesinliği standart çözeltisinin 6 farklı enjeksiyonundan elde edilen Deksmetomidin etken pikine ait alanların ortalaması, SD ve RSD değerleri Tablo 4-7'de verilmiştir. Aynı zamanda, sağlamlık parametreleri için hazırlanmış olan standart çözelti, yöntem koşullarına göre de analiz edilmiştir. İlgili yöntem koşullarına ait sistem uygunluk parametreleri Tablo 4-12, Tablo 4-13 ve Tablo 4-14'te verilmiştir.

4.2.9. Stres Testi

Tablo 3-4'te verilen stres testi çalışma koşulları doğrultusunda ilgili stres analizleri (miktar tayini ve safsızlık) yapılmıştır. Geri kazanım, aşağıda belirtilen kütle denkliği ve verim hesabı denkliğinden hesaplandı. Geri kazanım değerleri Tablo 4-16'da ve bu çalışmaya ait pik saflık değerleri Tablo 4-17'de verilmiştir. İlgili kromatogramlar ise Şekil 4-11 ve Şekil 4-17 arasında verilmiştir. Bu verilere göre pikler saf olarak elde edilmiştir.

Kütle Denkliği Hesabı:

Toplam kütle miktarı (%) = Etken madde miktarı (%) + Toplam safsızlık miktarı (%)

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Toplam kütle miktarı (\%)}_{\text{Stres Edilmiş Numune}}}{\text{Toplam kütle miktarı (\%)}_{\text{Stres Edilmemiş Numune}}} \times 100$$

Tablo 4-16: Stres testi çalışması sonuçları

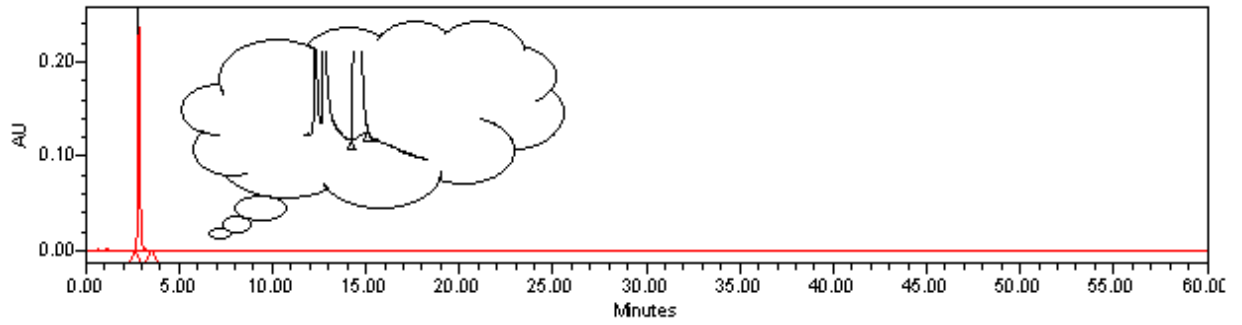
Uygulanan Stres Koşulu	Numune Tipi	Numuneleme Periyodu (saat)	RT	Miktar Tayini Sonucu (%)	Safsızlık Sonucu (%)
Asit Degredasyonu	İşlem görmemiş numune	-	2,84	101,8	T.E.*
		1	2,84	101,8	T.E.
		3	2,85	102,0	T.E.
	Asit (1N HCl, 80°C)	6	2,85	103,9	T.E.
		9	2,83	103,9	T.E.
		15	2,82	102,3	T.E.
		24	2,82	102,3	T.E.
Baz Degredasyonu	İşlem görmemiş numune	-	2,83	101,1	T.E.
		1	2,82	101,0	T.E.
		3	2,82	101,2	T.E.
	Baz (1N NaOH, 80°C)	6	2,80	101,1	T.E.
		9	2,81	101,2	T.E.
		15	2,77	101,5	T.E.
		24	2,77	102,5	T.E.

Uygulanan Stres Koşulu	Numune Tipi	Numuneleme Periyodu (saat)	RT	Miktar Tayini Sonucu (%)	Safsızlık Sonucu (%)
Peroksit Degredasyonu	İşlem görmemiş numune	-	2,79	103,7	T.E.
	Peroksit H ₂ O ₂ (%3)	1	2,81	102,6	T.E.
		3	2,79	103,4	T.E.
		6	2,77	102,3	T.E.
		9	2,77	102,8	T.E.
		15	2,79	102,8	T.E.
		24	2,80	103,7	T.E.
Isı (80°C) Degredasyonu	İşlem görmemiş numune	-	2,87	98,5	T.E.
	Isı, 80 °C	1	2,89	98,8	T.E.
		3	2,87	98,4	T.E.
		6	2,84	98,6	T.E.
		9	2,83	98,1	T.E.
		15	2,86	98,3	T.E.
		24	2,87	98,5	T.E.
Fotostabilite	İşlem görmemiş numune	-	2,80	104,6	T.E.
	Fotostabilite	Kimyasal aktinometrik sistem	2,79	104,4 (Paketsiz numune)	T.E.
			2,79	103,6 (Paketli numune)	T.E.

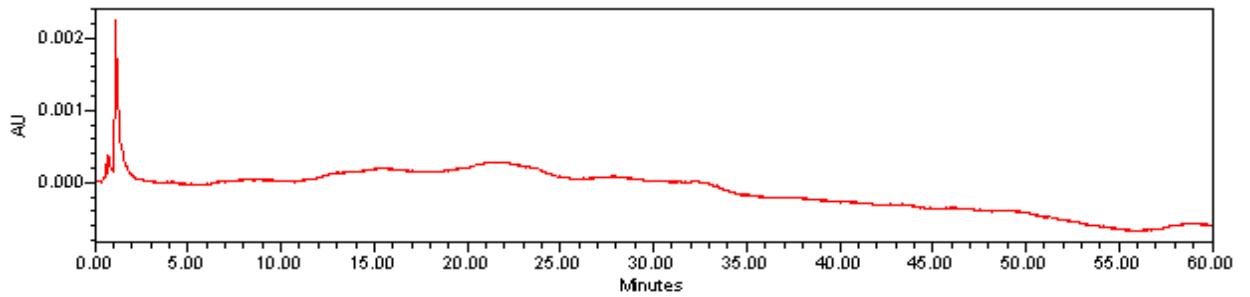
*T.E: Bu çalışma koşullarında safsızlık tespit edilmemiştir.

Tablo 4-17: Sahlık açısı ve sahlık eşiği değerleri ile verim sonuçları

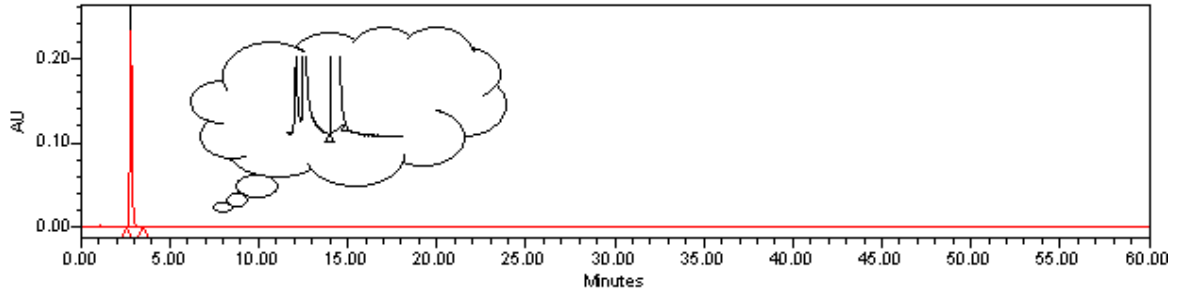
Uygulanan Stres Koşulu ve Numune tipi	Numuneleme Periyodu (saat)	Verim (%)	Sahlık Açısı	Sahlık Eşiği
Asit Degradasyonu (1N HCl, 80°C)	24	100,5	0,030	0,237
Baz Degradasyonu (1N NaOH, 80°C)	24	101,4	0,027	0,236
Isı Degradasyonu (80°C)	24	100,0	0,030	0,237
Peroksit Degradasyonu H ₂ O ₂ (%3)	24	100,8	0,052	0,264
Fotostabilite Degradasyonu	Paketli numune	99,8	0,033	0,241
	Paketsiz numune	99,0	0,032	0,238



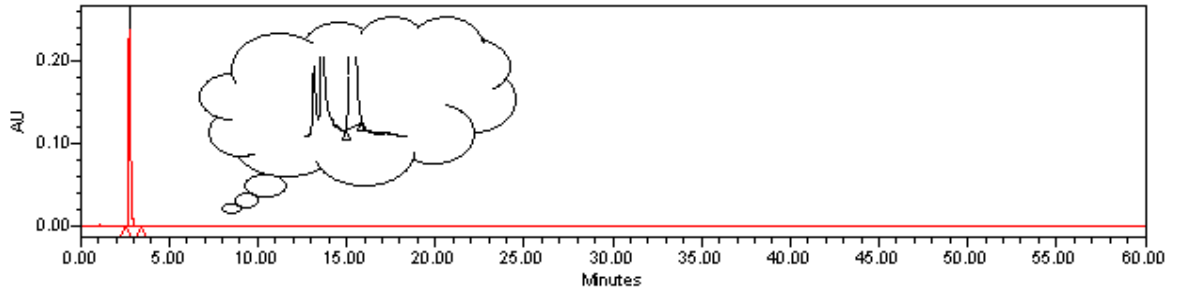
şekil 4-11: Stres edilmemiş numune kromatogramı



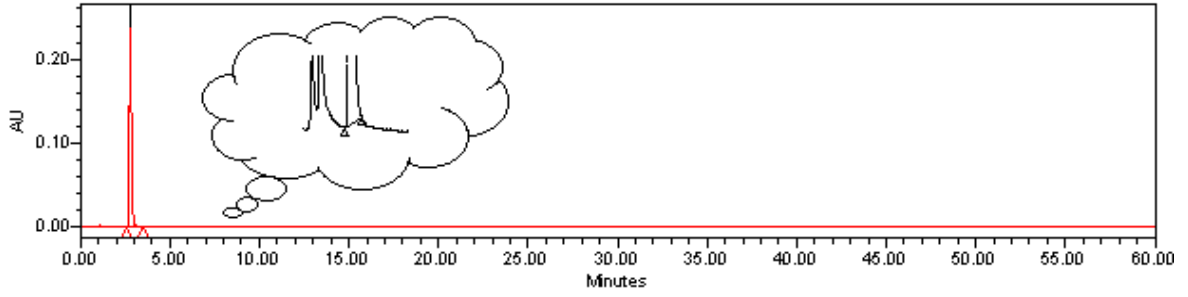
şekil 4-12: Stres edilmemiş plasebo kromatogramı



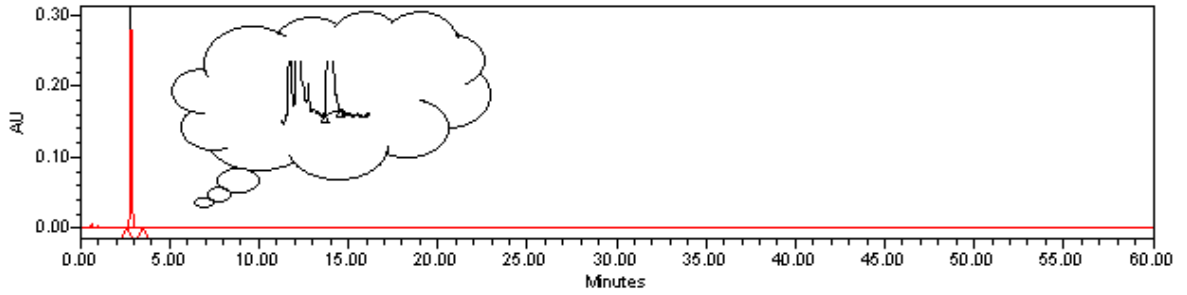
Şekil 4-13: Asit degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı



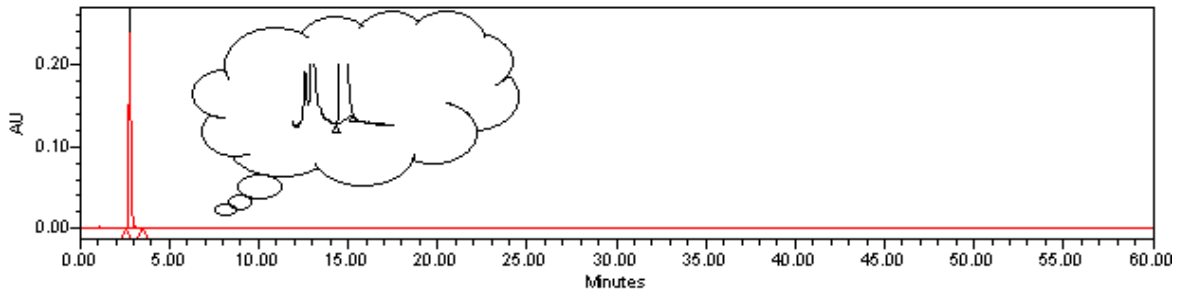
Şekil 4-14: Baz degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-15: Peroksit degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-16: Isı degradasyonu 24.saat numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4-17: Fotostabilite degradasyonu numune çözeltisi kromatogramı

4.3. Enjeksiyonluk Çözeltilerde Deksmetomidin'in Analizi

4.3.1. Geliştirilen UPLC Yönteminin Enjeksiyonluk Çözelti Formülasyonuna Uygulanması

Geliştirilen UPLC-UV yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 4-18'de verilmiştir. Bölüm 3.6.1'de anlatıldığı gibi hazırlanarak analizlenen enjeksiyonluk çözeltilerin sonuçları, ölçü eğrisinden elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır ve yüzde (%) sonuç olarak verilmiştir.

Tablo 4-18: Deksmetomidin hidroklorür içeren formülasyonun geliştirilen yöntemle elde edilen miktar tayini ve safsızlık analizi sonuçları

Enjeksiyon No	Numune Çözeltisi (100 µg/mL) Deksmetomidin Piki Alanları	Sonuçlar (%)	Bilinmeyen Safsızlık (%)
1	1863530	100,7	T.E.*
2	1856128	100,3	T.E.
3	1857978	100,4	T.E.
4	1852427	100,1	T.E.
5	1859829	100,5	T.E.
6	1848725	99,9	T.E.
Ortalama	1856436	100,3	T.E.
SD	5288,5	0,3	T.E.
RSD (%)	0,3	0,3	T.E.

*T.E: Bu çalışma koşullarında safsızlık tespit edilmemiştir.

Deksmedetomidin'in tayini için geliştirilen UPLC yönteminin sonuçlarını kıyaslamak için farmakopede (USP 41) kayıtlı olan HPLC-UV yöntemi kullanıldı. Çalışma Bölüm 3.6'da belirtilen şekilde yapılmıştır. Sonuçlar, t- ve F- testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslanmıştır ve %95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Kıyas yöntemi sonuçları Tablo 4-19'da verilmiştir.

Tablo 4-19: Deksmetomidin içeren enjeksiyonluk çözeltilerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi

Numune No (n=6)	Geliştirilen Yöntemin Sonuçları (%)	Kıyas Yöntemi Sonuçları (%)
1	100,7	100,7
2	100,3	99,8
3	100,4	100,6
4	100,1	100,3
5	100,5	100,8
6	99,9	100,5
Ortalama	100,3	100,5
SD	0,3	0,4
RSD (%)	0,3	0,4
Güven Aralığı	100,3 ± 0,315	100,5 ± 0,420
Güven Sınırları	99,99 - 100,62	100,08 - 100,92
	t= 1,06	
	F= 1,78	
Güven aralığı (%95)= $t_{\text{tablo}} \times \text{SD} / \sqrt{n}$ ($t_{\text{tablo}}=2,57$)		
$t_{\text{tablo}}= 2,23$ $F_{\text{tablo}}= 5,05$		

5. TARTIŞMA

Deksmedetomidin, geniş farmakolojik özelliklere sahip selektif bir α_2 reseptör agonistidir. Sempatik sinir uçlarından noradrenalin salınmasını azaltarak sempatolitik etki göstermektedir.

Bu çalışmada deksmedetomidinin enjeksiyonluk çözeltilerde miktar ve safsızlık tayini için UPLC yöntemi geliştirilmiştir.

Deksmedetomidinin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 220 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3-1).

Spesifiklik parametresi için hareketli faz (blank) ve plasebo kromatogramlarında, etken madde pikinin alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik gözlenmemiştir. Standart ve numune enjeksiyonlarından elde edilen etken madde piki saf olarak elde edilmiştir (saflik açısı < saflik eşik değeri).

Bu yöntemle, Deksmetomidin için doğrusallık aralığının 0,021-27,47 $\mu\text{g/mL}$ olduğu tespit edilmiştir. Hesaplanan teşhis ve tayin limitleri ise sırasıyla 6,3 ve 21,0 ng/mL olarak bulunmuştur.

Geliştirilen UPLC yöntemi, Deksmetomidinin enjeksiyonluk preparatına uygulandı. Enjeksiyonluk preparattaki miktar tayini çalışması geri kazanım miktarları; tayin limiti için %80-%120, %0,5 seviyesi için %90-%110 ve diğer seviyeler için %98-%102 aralığında hesaplanmıştır. Bulunan geri kazanım değerlerinin hepsi kabul limitleri içerisindedir.

Keskinlik için yapılan çalışmalarda, standart çözeltisinden elde edilen altı ardışık enjeksiyon için Deksmetomidin etken pikine ait alanların RSD değeri %0,1 olarak bulunmuştur. Numune çözeltilerinde safsızlık tespit edilmemiştir. Numunelere ait miktar tayini sonuçlarının RSD değeri %0,4 olarak hesaplanmıştır. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında, yapılan iki çalışmanın arasındaki fark %1,9 olarak bulunurken; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında, yapılan iki çalışmanın arasındaki fark %1,8 bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında yöntemin kesinliği uygun görülmektedir.

Yöntem sağlamlığı çalışmalarından elde edilen veriler, kolon sıcaklığı değişikliği ile tampon pH değişikliği miktar tayini ve safsızlık tayini validasyonu amaçlı

kullanılan metodun değişiklikten etkilenmediğini göstermektedir. Akış hızının azalmasıyla hem standart hem de numune çözeltilerinde Deksmetomidin pik alanlarında artış olup, bu artış normal koşullarda elde edilen pik alanları oranını değiştirmemektedir. Aynı şekilde, akış hızının arttırılmasıyla hem standart hem de numune çözeltilerinde Deksmetomidin pik alanlarında azalma olup, bu azalma normal koşullarda elde edilen pik alanları oranını değiştirmemektedir. Akış hızı değişikliğiyle alıkonma zamanlarında fark edilir değişiklikler gözlenmemiştir.

25°C sıcaklıkta standart ve numune çözeltilerinin 64 saat, hareketli faz çözeltilisinin ise 8 gün süre ile stabil olduğu tespit edilmiştir.

Sistem uygunluğu testi yapıldığında tüm parametrelerin uygun olduğu görülmüştür.

Stres testi çalışmalarında, Deksmetomidin Hidroklorür enjeksiyonluk çözeltilisinin ve plasebosunun çalışmada uygulanan termoliz, asidik degradasyon, bazik degradasyon, oksidatif degradasyon ve fotoliz stres koşullarına maruz bırakıldığında herhangi bir bozunmanın gözlenmediği ve maddenin bu koşullarda sağlam olduğu görülmüştür. Miktar tayini ve safsızlık testlerinden elde edilen kromatogramlarda yer alan Deksmetomidin pikinin saflıkları incelenmiş olup pikler saf olarak bulunmuştur.

Elde edilen tüm bu verilere dayanarak, UPLC ile deksmetomidinin enjeksiyonluk çözeltilerde miktar ve safsızlık tayini için geliştirilen yöntemin stabilite göstergeli olduğu sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen yöntem enjeksiyonluk çözelti formülasyonuna uygulandı. Sonuçlar farmakope (USP 41) yöntemiyle elde edilen sonuçlarla t- ve F- testleri kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslanarak %95 olasılık düzeyinde anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Sonuç olarak geliştirilen yöntem ile, miktar tayini ve safsızlık tayini yöntemleri tek bir analitik yöntemde birleştirilerek, eş zamanlı analiz edilebilmektedir. Bu yöntemle, bildirilen diğer HPLC-UV yöntemlerine nazaran daha kısa sürede ve daha az solvent harcanarak, daha küçük hacimlerde çalışılmış; daha hassas ve daha az maliyetli bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Literatürde yer alan LC-MS/MS gibi yöntemler için gerekli olan cihazların yüksek maliyeti, çalışma zorluğu ve her laboratuvarında bulunamaması; UPLC cihazına ulaşım kolaylığı ve diğer cihazlara istinaden daha düşük maliyeti, geliştirilen yöntemin

uygulanabilirliğini arttıracaktır. Bu yöntem rutin farmasötik analizlerde kullanım için rahatlıkla önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. PubChem, Open Chemistry Database
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexmedetomidine_hydrochloride
2. The Merck Index. 13th ed. USA
3. Wikipedia
<https://en.wikipedia.org/wiki/Dexmedetomidine>
4. Precedex product label, Abbott Laboratories Inc
<http://www.1ilac.com/ilaclar/Abbott/PRECEDEX.iv.flakon.htm>
5. Ayşe (İncesu) Gürel, Özenç Timlioğlu, Alpha-2 Adrenergic Agonists in Pain Management, Türkiye Klinikleri J Med Sci 1996; **16 (5)**:360-3
6. RxMediaPharma 2018; İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
7. Tobias JD. Dexmedetomidine: are there going to be issues with prolonged administration, *Journal of Pediatric Pharmacology & Therapeutics*. 2010; **15 (3)**: 4–9.
8. Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia*; 1999, **54**: 146-165
9. Krishna M, Nadre M, Sherikar A, Reddy R. Stability indicating HPLC method validation for the assay of dexmedetomidine in dexmedetomidine hydrochloride injection. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis*. Vol 3, No **1** (2015): 796
10. Liua H, Sunb W, Wangc C, Yinga W, Zhenga L, Zenga R, Wang Z, Ge R. Determination of dexmedetomidine in children's plasma by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **1023-1024** (2016): 30–35
11. Z.Cuia, D.S.-L.Chow, L.Wu, D.A.Lazar, R.Rodrigo, O.O.Olutoye, O.A.Olutoye. High performance liquid chromatography–tandem mass

- spectrometric assay of dexmedetomidine in plasma, urine and amniotic fluid samples for pregnant ewe model. *Journal of Chromatography B*. **961**, 15 June 2014, 13-19
12. Li W., Zhang Z., Wu L., Tian Y., Feng S., Chen Y. Determination of dexmedetomidine in human plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **50**, Issue 5, December 2009, 897-904
 13. Y.-H.Hui, K.C.Marsh, S.Menacherry. Analytical method development for the simultaneous quantitation of dexmedetomidine and three potential metabolites in plasma. *Journal of Chromatography A*. **762**, Issues 1–2, 21 February 1997, 281-291
 14. Ji Lee, F Su, H Shi, AF Zuppa. Sensitive and specific liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantitation of dexmedetomidine in pediatric plasma. *Journal of Chromatography B*, **852**, (1–2), 2007, 195-201
 15. Inoue K., Sakamoto T., Fujita Y., Yoshizawa S., Tomita M., Min J.Z., Todoroki K., Sobue K., Toyo'oka T. Development of a stable isotope dilution UPLC-MS/MS method for quantification of dexmedetomidine in a small amount of human plasma. *Biomedical Chromatography*, **27** (7), July 2013, 853-858
 16. Selimoğlu F., Parasetamol içeren kombine farmasötik preparatların UPLC yöntemi ile kantitatif analizi. *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı*, 2013
http://earsiv.atauni.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/123456789/1251/faysal_selimo%C4%9Flu_tez.pdf?sequence=1
 17. ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures
 18. Türk İlaç Rehberi
<https://www.ilacrehberi.com/v/precedex-200-jig2-ml-iv-konsantre-infuzyon-cozelt-c838/kub>

19. Deksmetomidin, Acil Tıp

<http://xn--aciltp-t9a.com/deksmedetomidin>

20. Riker R.R., Shehabi Y., Bokesch P.M., Ceraso D., Wisemandle W., Koura F., Whitten P., Margolis B.D., Byrne D.W., Ely E.W., Rocha M.G.; for the SEDCOM (Safety and Efficacy of Dexmedetomidine Compared With Midazolam) Study Group. Dexmedetomidine vs Midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial. *JAMA*; February 4, 2009, Vol **301**, No. 5

21. <http://www.dexmedetomidine.com>

22. Khan Z.P., Ferguson C.N., & Jones R.M. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists, their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia*, **54** (2) 1999, 146–165

23. The United States Pharmacopeia 41th ed., Official monographs, Dexmedetomidine Injection

24. Söner A. Entübasyona karşı gelişen hemodinamik yanıtın baskılanmasında deksmedetomidin, esmolol ve fentanilin etkinliğinin karşılaştırılması. *Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Kliniği*, 2009

http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/anestezi_reanimasyon/dr_aygul_soner.pdf

25. <http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yuksek-performans-sivi.html>

26. ACQUITY UPLC H-Class System Guide, Waters Corporation 2010, System components, 1-7

27. Zheng Z., Zhang S., Ma W., Zhang L., Huang L., Huang W., Huang M., Wang Z., Li J. Determination of dexmedetomidine by UHPLC–MS/MS and its application to evaluate the effect of dexmedetomidine concentration on the target-controlled infusion concentration of propofol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **154**, 438–443.

28. Szerkus O., Struck-Lewicka W., Kordalewska M., Bartosińska E., Bujak R., Borsuk A., Bienert A., Bartkowska-Śniatkowska A., Warzybok J., Wiczling

- P., Nasal A., Kaliszan R., Markuszewski M.J., Siluk D. HPLC–MS/MS Method For Dexmedetomidine Quantification With Design of Experiments Approach: Application To Pediatric Pharmacokinetic Study. *Bioanalysis*, **9** (4), 395-406.
29. Nakanishi R., Yoshimura, M., Suno M., Yamamoto K., Ito H., Uchimine Y., Toriumi T., Kurosawac A., Sugawarac A., Kunisawa T. Detection of dexmedetomidine in human breast milk using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to a study of drug safety in breastfeeding after Cesarean section. *Journal of Chromatography B*, **1040** (2017) 208–213.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI