

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

**MAKROLİT GRUBU BAZI ANTİBAKTERİYEL İLAÇLARIN
KROMATOĞRAFİK DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ,
GELİŞTİRİLEN ANALİZ YÖNTEMLERİNİN VALİDE EDİLMESİ
VE UYGULAMALARI**

Uzm. Ecz. Şeyda DEMİRCAN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2010**

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

**MAKROLİT GRUBU BAZI ANTİBAKTERİYEL İLAÇLARIN
KROMATOĞRAFİK DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ,
GELİŞTİRİLEN ANALİZ YÖNTEMLERİNİN VALİDE EDİLMESİ
VE UYGULAMALARI**

Uzm. Ecz. Şeyda DEMİRCAN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

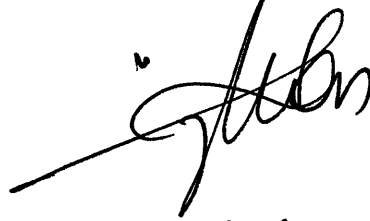
**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sedef KIR**

**ANKARA
2010**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

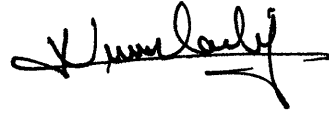
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sibel Özkan
Ankara Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Sedef Kır
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof.Dr. Nursabah Elif Başçı
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sacide Altınöz
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Nuran Özaltın
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, tüm lisansüstü eğitimim süresince yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sedef Kır'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Nursabah E. Başçı, Sayın Prof. Dr. Nuran Özaltın ve Sayın Prof. Dr. Sacide Altınöz'e, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi arkadaşlarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında sağladıkları teknik imkanlardan dolayı Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri Ar-Ge yöneticilerime,

Tüm eğitim hayatım boyunca özveriyle desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, ilgi ve desteği için sevgili nişanlım Tolga İlter'e teşekkür ederim.

ÖZET

Demircan Ş., Makrolit Grubu Bazı Antibakteriyel İlaçların Kromatografik Davranışlarının İncelenmesi ve Geliştirilen Analiz Yöntemlerinin Valide Edilmesi ve Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2010. Bu çalışmada, yüksek bakteriostatik etkinliğe ve olumlu yan etki profiline sahip makrolit grubu antibakteriyellerden Klaritromisin, Azitromisin veya Spiramisin içeren farmasötik preparatlardan etken madde ve safsızlık analizleri için HPLC ve UPLC yöntemleri geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İlacın stres koşullarına maruziyeti ile oluşan bozunma ürünleri ve miktarları geliştirilen kromatografik yöntemlerle tespit edilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminde en iyi koşullar; Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için ACE C18, 250 x 4.6 mm i.ç., 5 µm kolon, pH = 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70 : 30, h/h) hareketli faz, 1.2 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (219 nm); Azitromisin ve safsızlıklarının analizi için ACE C18, 150 x 4.6 mm i.ç., 5 µm kolon, pH = 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65 : 35, h/h) hareketli faz, 1.0 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (240 nm); Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için Inertsil ODS 250 x 4.6 mm i.ç., 5 µm kolon, pH = 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitrilin (70 : 30, h/h) hareketli faz, 1.2 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (240 nm) elde edilmiştir. Geliştirilen UPLC yönteminde Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için HPLC yönteminde kullanılan hareketli fazlar ve UV dedektör kullanılmış olup analizler 1.7 µm partikül çapına sahip Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm kolon ile gerçekleştirilmiştir. UPLC sisteminde akış hızı Klaritromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için 0.3 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıkları için 0.4 mL/dak'dır. Validasyon çalışmaları ile seçici, doğru, kesin, hassas, sağlam ve tutarlı olduğu ispatlanan yöntemler karşılaştırılarak, yüksek ayırıcılık, kısa analiz süresi ve düşük analiz maliyetinin sağlandığı UPLC yöntemleri kalite kontrol numunelerinin safsızlık analizleri için önerilmiştir.

Anahtar kelimeler: Makrolitler, HPLC, UPLC, safsızlık, stres testi

ABSTRACT

Demircan, Ş., Investigation of the Chromatographic Behavior of Some Macrolide Group Antibacterial Drugs and Validation and Application of the Developed Analytical Methods. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Ph. D. Thesis, Ankara, 2010. In this study, HPLC and UPLC methods were developed and validated to analyse the active ingredient and impurities from the pharmaceutical preparations containing the macrolide group antibacterials with a high bacteriostatic activity and a favorable side effect profile, Clarithromycin, Azithromycin and Spiramycin. The amounts of degradation products formed by the exposure of drug to the stress conditions analysed by the developed chromatographic methods. The optimized conditions for Clarithromycin and its impurities are; ACE C18, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm column, pH = 3.0, 5 mM phosphate buffer / methanol (70 : 30, v/v) mobile phase with 1.2 mL/min flow rate and performed with UV detector (219 nm) for HPLC. The HPLC analysis of Azithromycin and its impurities has performed by ACE C18, 150 x 4.6 mm i.d., 5 µm column, pH = 6.0, 5 mM phosphate buffer / acetonitrile (65 : 35, v/v) mobile phase with 1.0 mL/min flow rate and performed with UV detector (240 nm). The HPLC analysis of Spiramycin and its impurities has been performed by Inertsil ODS 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm column, pH = 2.5, 10 mM acetate buffer / acetonitrile (70 : 30, v/v) mobile phase with 1.2 mL/min flow rate and performed with UV detector (240 nm). The same mobile phase mixture and UV detector were used for UPLC method to analyse the amount of Clarithromycin, Azithromycin, Spiramycin and their impurities and the analysis has been performed by Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm column with 1.7 µm particle size. The flow rate was 0.3 mL/min for Clarithromycin and Spiramycin, 0.4 mL/min for Azithromycin at UPLC system. The validated methods that are selective, precise, accurate, sensitive, robust and rugged have been compared and the UPLC methods with high resolution, short retention time and low analysis cost have been proposed for the analysis of impurities in quality control samples.

Keywords: Macrolides, HPLC, UPLC, impurity, stress test

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Makrolid grubu antibakteriyel ilaçlar	2
2.1.1. Klaritromisin	4
2.1.2. Azitromisin	6
2.1.3. Spiramisin	8
2.2. Farmasötik Safsızlıklar	9
2.2.1. Safsızlık kaynakları	11
2.2.2. Bozunma ürünleri	15
2.3. Farmasötik preparatlardan analiz yöntemleri	18
2.3.1. Klaritromisin için analiz yöntemleri	18
2.3.2. Azitromisin için analiz yöntemleri	20
2.3.3. Spiramisin için analiz yöntemleri	20
2.4. Kromatografi	21
2.4.1. Kromatografide temel parametreler	24
2.4.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	31
2.4.3. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)	36
2.5. Analitik Yöntem Validasyonu	41

2.5.1. Validasyon Parametreleri ve Kabul Kriterleri	42
2.5.2. Tekrar Validasyon Kriterleri	51
2.5.3. Kontrol Kartları	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	55
3.2. Kullanılan Farmasötik Preparatlar	56
3.3. Kullanılan Enstrümental Analiz Cihazları	56
3.4. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	57
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması	57
3.6. Klaritromisin için Analiz Yöntemleri	58
3.6.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	58
3.6.2. Kromatografik Koşullar	60
3.7. Azitromisin için Analiz Yöntemleri	60
3.7.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	60
3.7.2. Kromatografik Koşullar	63
3.8. Spiramisin için Analiz Yöntemleri	63
3.8.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	63
3.8.2. Kromatografik Koşullar	65
3.9. Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları	66
3.9.1. Seçicilik	66
3.9.2. Sistem Tekrarlanabilirliği	66
3.9.3. Doğrusallık – Uygulama Aralığı	66
3.9.4. Doğruluk	66
3.9.5. Kesinlik	67
3.9.6. Gözlenebilirlik Sınırı	67
3.9.7. Raporlama Seviyesi	67
3.9.8. Alt Tayin Sınırı	68
3.9.9. Sağlamlık	68

3.9.10. Çözeltilerin Kararlılığı	68
3.9.11. Kalite Kontrol Kartları	68
3.10. Stres Testi Çalışmaları	69
3.11. İstatistiksel Hesaplamalar	70
4. BULGULAR	71
4.1. Klaritromisin için Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları	71
4.1.1. Yöntemlerin Optimizasyonu	71
4.1.2. Yöntemlerin Validasyonu	80
4.2. Azitromisin için Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları	97
4.2.1. Yöntemlerin Optimizasyonu	97
4.2.2. Yöntemlerin Validasyonu	105
4.3. Spiramisin için Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları	122
4.3.1. Yöntemlerin Optimizasyonu	122
4.3.2. Yöntemlerin Validasyonu	132
4.4. Stres testleri	149
4.4.1. Klaritromisin için Stres Testi	149
4.4.2. Azitromisin için Stres Testi	152
4.4.3. Spiramisin için Stres Testi	155
4.5. Farmasötik Preparat Analizleri	158
5. TARTIŞMA	160
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	171
KAYNAKLAR	173
EKLER	183
ÖZGEÇMİŞ	189

SİMGELER ve KISALTMALAR

K	: Klaritromisin
Ksaf1	: Klaritromisin safsızlık 1 (6,11-di-O-metileritromisin)
Ksaf2	: Klaritromisin safsızlık 2 (6-O-metil-15-noreritromisin)
A	: Azitromisin
Asaf1	: Azitromisin safsızlık 1 (6-demetil azitromisin)
Asaf2	: Azitromisin safsızlık 2 (3-deoksi azitromisin)
S	: Spiramisin
Ssaf1	: Spiramisin safsızlık 1 (NeospiramisinI)
Ssaf2	: Spiramisin safsızlık 2 (NeospiramisinII)
Ssaf3	: Spiramisin safsızlık 3 (NeospiramisinIII)
$\bar{X}$	: Aritmetik ortalama
α	: Seçicilik
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
ACN	: Asetonitril
BSS	: Bağlı standart sapma
Cm	: Santimetre
Dak	: Dakika
DAD	: Dizi diyot dedektör
EtOH	: Etanol
G	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
NaOH	: Sodyum hidroksit

H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UPLC	: Ultra performanslı sıvı kromatografisi
i.ç.	: İç çap
k'	: Kapasite faktörü
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Litre
LOD	: Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	: Alt tayin sınırı
MeOH	: Metanol
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mm	: Milimetre
N	: Etkinlik (teorik tabaka sayısı)
Ng	: Nanogram
Pas	: Pik asimetri oranı
Ppm	: Milyonda bir kısım
R	: Korrelasyon katsayısı
R _s	: Ayırıcılık
R ²	: Tanımlayıcılık katsayısı
S/G	: Sinyal/gürültü
SS	: Standart sapma
t _R	: Alıkonma zamanı
UV	: Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Klaritromisinin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2. Azitromisinin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Spiramisinin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.4. p-aminofenol'den parasetamol sentezi sırasında yan ürün oluşumu	12
Şekil 2.5. Diklofenak sodyumun otoklavlanması ile oluşan safsızlık	14
Şekil 2.6. Klaritromisin safsızlıkları	17
Şekil 2.7. Azitromisin safsızlıkları	18
Şekil 2.8. Spiramisin safsızlıkları	18
Şekil 2.9. Kapasite faktörünün hesaplanması	25
Şekil 2.10. Van Deemter Eğrisi	28
Şekil 2.11. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri	29
Şekil 2.12. Pik asimetri oranının hesaplanması	30
Şekil 2.13. HPLC cihazının şematik gösterimi	31
Şekil 2.14. Silika bağlı faz dolgu maddelerinin elde edilmesi. a) Yüzey silanolünün klorodimetilsilanla reaksiyonu, b) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel klorosilanla reaksiyonu, c) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel alkoksisisilanla reaksiyonu.	33
Şekil 2.15. Değişik partikül boyutları (10, 5, 3 ve 1.7 µm) için Van Deemter eğrisi	37
Şekil 2.16. Klasik silika ve hibrit silika sentezi	40
Şekil 2.17. a) 60 µm çapında insan saçı, b) 5 µm partikül çapında analitik partiküller, c) 1.7 µm UPLC kolon partikülleri	41
Şekil 4.1. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 3.5 fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1,2 mL dak-1, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	79
Şekil 4.2. Klaritromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 3.5 fosfat tamponu / metanol	79

	(70:0, h/h), akış hızı: 0,3 mL dak-1, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	
Şekil 4.3.	Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 3.5 fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1,2 mL dak-1, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	82
Şekil 4.4.	Klaritromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 3.5 fosfat tamponu / metanol (70:0, h/h), akış hızı: 0,3 mL dak-1, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	82
Şekil 4.5.	Klaritromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusalılık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için	84
Şekil 4.6.	Klaritromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri	85
Şekil 4.7.	Klaritromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	96
Şekil 4.8.	Klaritromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	96
Şekil 4.9.	Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 1,0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	104
Şekil 4.10.	Azitromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	104
Şekil 4.11.	Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 1,0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	107
Şekil 4.12.	Azitromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	107
Şekil 4.13.	Azitromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusalılık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için	109
Şekil 4.14.	Azitromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri	109

Şekil 4.15.	Azitromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	121
Şekil 4.16.	Azitromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	121
Şekil 4.17.	Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC / 1,2 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	131
Şekil 4.18.	Spiramisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: UPLC / 0,3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	131
Şekil 4.19.	Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC / 1,2 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]	134
Şekil 4.20.	Spiramisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: UPLC / 0,3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]	134
Şekil 4.21.	Spiramisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusalılık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için	137
Şekil 4.22.	Spiramisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri	137
Şekil 4.23.	Spiramisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	148
Şekil 4.24.	Spiramisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)	148
Şekil 4.25.	Asit hidrolizine maruz bırakılan klaritromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	150
Şekil 4.26.	Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan klaritromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	151
Şekil 4.27.	Asit hidrolizine maruz bırakılan Azitromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	153
Şekil 4.28.	Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan Azitromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	154

Şekil 4.29.	Asit hidrolizine maruz bırakılan Spiramisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	156
Şekil 4.30.	Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan Spiramisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram	157

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Ürün formül değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri	51
Tablo 2.2. Analitik yöntemin değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri	52
Tablo 2.3. Aktif veya hammadde tedarikçisi değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri	53
Tablo 4.1. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi	73
Tablo 4.2. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	74
Tablo 4.3. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi	75
Tablo 4.4. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi	76
Tablo 4.5. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi	77
Tablo 4.6. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizi için belirlenen kromatografik koşullar	78
Tablo 4.7. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	80
Tablo 4.8. Klaritromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	81
Tablo 4.9. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik verileri	83
Tablo 4.10. Klaritromisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)	84

Tablo 4.11.	Klaritromisinin plasebodan geri kazanım sonuçları	86
Tablo 4.12.	Klaritromisin ve safsızlıklarının günüçi kesinlik verileri	87
Tablo 4.13.	Klaritromisin ve safsızlıklarının günler arası kesinlik verileri	87
Tablo 4.14.	Klaritromisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen kesinlik verileri	88
Tablo 4.15.	Klaritromisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları	89
Tablo 4.16.	% 0.1'lik raporlama seviyesinde klaritromisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri	89
Tablo 4.17.	Klaritromisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı	90
Tablo 4.18.	Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi	89
Tablo 4.19.	Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi	92
Tablo 4.20.	Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi	93
Tablo 4.21.	Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi	94
Tablo 4.22.	Klaritromisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları	95
Tablo 4.23.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi	98
Tablo 4.24.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	99

Tablo 4.25.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi	100
Tablo 4.26.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi	101
Tablo 4.27.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi	102
Tablo 4.28.	Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizi için belirlenen kromatografik koşullar	103
Tablo 4.29.	Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	105
Tablo 4.30.	Azitromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	106
Tablo 4.31.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik verileri	108
Tablo 4.32.	Azitromisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)	109
Tablo 4.33.	Azitromisinin plasebodan geri kazanım sonuçları	111
Tablo 4.34.	Azitromisin ve safsızlıklarının günüçi kesinlik verileri	112
Tablo 4.35.	Azitromisin ve safsızlıklarının günler arası kesinlik verileri	112
Tablo 4.36.	Azitromisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen kesinlik verileri	113
Tablo 4.37.	Azitromisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları	114
Tablo 4.38.	% 0.1'lik raporlama seviyesinde Azitromisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri	114

Tablo 4.39.	Azitromisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı	115
Tablo 4.40.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi	116
Tablo 4.41.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi	117
Tablo 4.42.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi	118
Tablo 4.43.	Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi	119
Tablo 4.44.	Azitromisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları	120
Tablo 4.45.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi	124
Tablo 4.46.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	125
Tablo 4.47.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi	126
Tablo 4.48.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi	128
Tablo 4.49.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi	129
Tablo 4.50.	Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizi için belirlenen kromatografik koşullar	130
Tablo 4.51.	Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	132
Tablo 4.52.	Spiramisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri	133

Tablo 4.53.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik verileri	135
Tablo 4.54.	Spiramisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)	136
Tablo 4.55.	Spiramisinin plasebodan geri kazanım sonuçları	138
Tablo 4.56.	Spiramisin ve safsızlıklarının günüçi kesinlik verileri	139
Tablo 4.57.	Spiramisin ve safsızlıklarının günler arası kesinlik verileri	139
Tablo 4.58.	Spiramisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen kesinlik verileri	140
Tablo 4.59.	Spiramisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları	141
Tablo 4.60.	% 0.1'lik raporlama seviyesinde Spiramisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri	141
Tablo 4.61.	Spiramisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı	142
Tablo 4.62.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi	143
Tablo 4.63.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi	144
Tablo 4.64.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi	145
Tablo 4.65.	Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi	146
Tablo 4.66.	Spiramisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları	147

Tablo 4.67.	Klaritromisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları	149
Tablo 4.68.	Azitromisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları	152
Tablo 4.69.	Spiramisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları	155
Tablo 4.70.	Klaritromisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları	158
Tablo 4.71.	Azitromisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları	158
Tablo 4.72.	Spiramisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları	159

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Makrolitler, düşük yan etki profili, yüksek doku ve serum düzeyleri ile geniş bakteriostatik etkinlik gösteren antibiyotiklerdir (1). Günümüzde, özellikle, gastrointestinal yan etkisi diğer makrolitlerden daha az olan yeni makrolitler Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin kullanılmaktadır (2).

Farmasötik preparatların kalitesini ve dayanıklılığını gösteren en önemli parametrelerden biri içeriğindeki safsızlık miktarı olup, farmasötik preparat içeriğindeki safsızlıkların tayin edilmesi büyük önem taşımaktadır. İlaç analizlerinde sıklıkla kromatografik yöntemler kullanılmakta olup daha kısa analiz sürelerinde yüksek ayırıcılığın sağlandığı yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kromatografik sistemlerde kullanılmak üzere küçük partikül çapına sahip kolon dolgu maddelerinin geliştirilmesi, yüksek ayırıcılığın sağlandığı yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Morgan ve arkadaşlarının, Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için geliştirdiği HPLC yönteminde 40 dakika analiz süresinde % 0.1 alt tayin sınırlarında analizler yapılmıştır (68). Miguel ve Barbas'ın, Azitromisin ve safsızlıklarının tabletlerden analizi için geliştirdikleri sıvı kromatografisi yöntemi ile 35 dakika analiz süresinde ayırım sağlanmış ancak uzun alıkonma nedeni ile piklerde kuyruklanma gözlenmiştir. Chepkwony ve arkadaşlarının Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için geliştirdikleri yöntemde analiz süresi 75 dakika olup piklerde kuyruklanmalar ve girişimler mevcuttur (77). Bu çalışmada, safsızlık analizleri için 1.7 µm partikül çapına sahip kolonların kullanımına olanak sağlayan ultra performanslı sıvı kromatografisi sistemleri ile kaynaklarda mevcut yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemlerinden daha kısa analiz süresi, düşük analiz maliyeti, yüksek ayırıcılık ve yüksek hassasiyette analiz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, makrolit grubu antibakteriyel ilaçlardan Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlarda tayinleri amaçlanmıştır. Bu amaçla, söz konusu maddelerin kromatografik davranışlarının belirlenmesi, yüksek performanslı ve ultra performanslı sıvı kromatografisi ile analiz yöntemlerinin optimizasyonu amaçlanmıştır. Optimize edilen analiz yöntemlerinin,

ICH kılavuzları esas alınarak, seçicilik, sistem tekrarlanabilirliği, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, hassasiyet ve sağlamlık çalışmaları yapılarak validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Geçerliliği kanıtlanan yöntemlerin stabilite çalışmalarına uygulanabilirliğinin gösterilmesi için, stres koşullarına maruz bırakılan farmasötik preparatta oluşan safsızlık miktarlarının tayini planlanmıştır. Geliştirilen kromatografik yöntemlerle, piyasada mevcut preparatlardaki etken madde ve safsızlık miktarlarının belirlenmesi planlanmıştır. Kalite kontrol laboratuvarlarında safsızlık tayinleri için geçerli yöntemlerin önerilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Makrolit grubu antibakteriyel ilaçlar

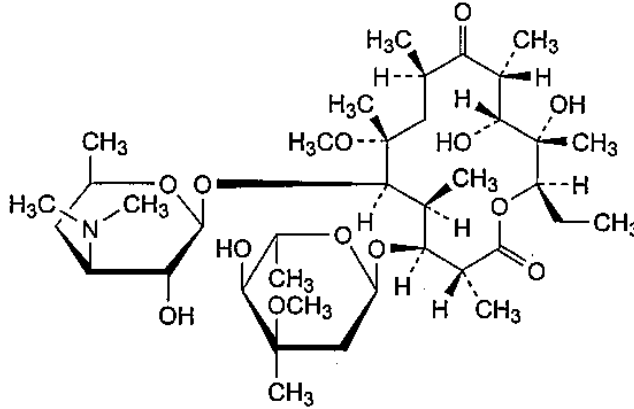
Makrolit antibiyotiklerin ilk üyesi olan eritromisin, 1950'lerden beri başta penisilin alerjisi olan hastalar olmak üzere, üst solunum yolu infeksiyonları ile deri ve yumuşak doku infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Gastrointestinal yan etkiler, kısa serum yarılanma ömrü ve artan direnç gibi dezavantajları ise, eritromisinin klinik kullanımını kısıtlamıştır. Eritromisinin yapısında yapılan değişikliklerle, daha geniş spektrumlu ve daha iyi tolere edilebilen, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri daha uygun makrolidler elde edilmiştir. 1990'ların sonlarında Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin klinik olarak tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Böylece, makrolitler solunum yolu infeksiyonları, cinsel yolla bulaşan infeksiyonlar, *Helicobacter pylori* ve *Mycobacterium avium* kompleks gibi farklı etkenlere bağlı infeksiyonlar olmak üzere daha geniş kullanım alanı bulmuştur (1).

Homojen bir antibiyotik grubu olan makrolitlerin temel yapısı makrosiklik lakton halkasıdır. Makrolitler, lakton halkasının büyüklüğüne göre sınıflandırıldığında, 14 üyeli (eritromisin, roksitromisin, klaritromisin, diritromisin, fluritromisin), 15 üyeli (azitromisin) ve 16 üyeli (spiramisin, josamisin, midekamisin, rokitamisin, miokamisin) gruplara ayrılmaktadır (2-4). Tüm makrolitler bakterilerde RNA bağımlı protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki ederler. Bu etkinliklerini 70S ribozomun 50S subünitine bağlanarak aynı yere t-RNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını önleyerek sağlarlar (5). Sonuçta bakteriyel üreme engellenir. Genel olarak makrolitler bakteriyostatik antibiyotiklerdir, yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal etki gösterebilirler. Makrolitler belirgin postantibiyotik etkiye sahiptir (6).

Makrolitlerin mikroorganizmalara karşı etkisi genel olarak birbirine benzerdir. Gram pozitif mikroorganizmalara ve hücre içi atipik mikroorganizmalara (klamidya, mikoplazma, lejyonella) etkilidirler. *S. Pyogenes*, *S. Pnemoniae*, *S. Viridans* ve grup B streptokokların çoğu makrolitlere duyarlıdır (7). Günümüzde,

özellikle, gastrointestinal yan etkisi diğer makrolitlerden daha az olan yeni makrolitler Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin kullanılmaktadır (1, 8).

2.1.1. Klaritromisin



Şekil 2.1. Klaritromisinin kimyasal yapısı

On dört üyeli halka yapısına sahip bir makrolittir. Eritromisinin lakton halkasının C6 hidroksi grubu bir metoksi grubu içerecek şekilde değiştirilmiştir. Bu değişiklik ile mide asidine dayanıklılık ve oral biyoyararlanım artırılmış, gastrointestinal intolerans azaltılmıştır (9). Klaritromisin, azitromisin gibi akciğer dokusuna ve makrofajlara eritromisinden daha fazla girer. Bu üstünlüğü *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC)’a karşı neden daha etkili olduğunu kısmen açıklayabilir. Klaritromisin tek başına kullanıldığında MAC’a karşı etkili olmasına rağmen etkisini dirençli organizmalar da bulunmaktadır. Klaritromisin *H. Pylori* ile ilişkili duodenal ülserinin tedavisi için de kullanılır. Ayrıca çocuklarda bulaşma ile ortaya çıkan pnömoninin tedavisinde de kullanılmaktadır (10).

Etki mekanizması

Diğer makrolit grubu antibiyotikler gibi klaritromisin de 70S ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanarak RNA’nın aracılık ettiği bakteri protein sentezini engeller. Belirli organizmalar üzerinde konsantrasyona bağlı bakterisid ya da bakterostatik etki gösterir. Alkali ortamda noniyonize halde olduğundan pH’nın alkalileştirilmesi bakteri hücrelerine girmesini kolaylaştırır. Klaritromisin, fagositler ve

makrofajlar içine de etkin bir şekilde girebildiğinden, solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan organizmaların geniş bir bölümüne karşı etkilidir (11).

Klaritromisin genelde eritromisine karşı duyarlı mikroorganizmlara karşı etkilidir. Etkili olduğu organizmalara pek çok stafilokok ve streptokok türleri dahildir (12). Ayrıca *Mycobacterium catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* türleri ve *Chlamydia pneumoniae*'ya karşı da etkilidir. Akciğer dokusunda ulaştığı konsantrasyonlarda *Mycobacterium avium*'u inhibe eder. Lyme hastalığına neden olan *Borrelia burgdorferi*'ye karşı etkilidir. Klaritromisin vücutta önemli ölçüde antibakteriyel etki gösteren metaboliti 14-OH klaritromisin'e dönüşür. Bu metabolit *Haemophilus influenzae*'ya karşı ana bileşiğe göre iki kat daha güçlü etki gösterir, fakat benzer konsantrasyonlardaki etkinliği eritromisin'den fazla değildir. Klaritromisin günümüzde en fazla solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun dışında cinsel temasla bulaşan enfeksiyonların, otitis media ve AIDS'li hastalardaki enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır (13).

Farmakokinetik

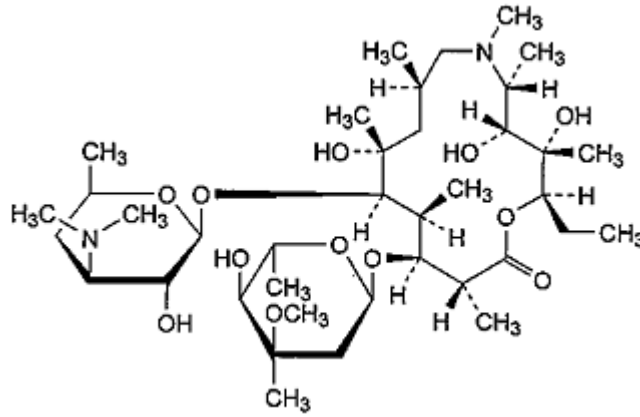
Klaritromisin oral yolla kullanılır. Gastrointestinal sistemden absorpsiyonu hızlıdır. Biyoyararlanımı kabaca % 50 civarındadır ve gastrointestinal kanalda besinlerin varlığı biyoyararlanımı etkilemez. Absorpsiyon hızı ve aktif metaboliti 14-OH klaritromisine dönüşümü biraz azalsa da, ilacın besinlerle birlikte alınması antimikrobiyal aktivitesini değiştirmez (14).

Klaritromisin proteinlere düşük oranda bağlanır ve bu özelliği ilacın eritromisine kıyasla neden vücutta daha fazla dağılıma uğradığını açıklar. Yüksek doku penetrasyonu genellikle serum konsantrasyonlarından daha yüksek doku konsantrasyonları oluşturur. Doruk serum konsantrasyonlarına yaklaşık 2 saat içinde, kararlı konsantrasyonlarına ise 2-3 gün içinde ulaşılır. Ağızdan her 12 saatte bir alınan 250 mg'lık dozlar yaklaşık 1µg/mL'lik denge konsantrasyonları oluşturur. Eliminasyon yarı ömrü 5-7 saat arasında değişmektedir.

Klaritromisin vücutta 14-OH klaritromisine metabolize olur ve verilen bir dozunun kabaca % 20 kadarı ilk geçiş metabolizması sırasında bu metabolite

dönüştürülür. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda bu metabolitin konsantrasyonları daha düşüktür. Klaritromisin idrarla atılır. İdrarda % 20-30 oranında ana bileşik şeklinde, % 10-15 oranında da 14-OH metaboliti olarak bulunur (15).

2.1.2. Azitromisin



Şekil 2.2. Azitromisinin kimyasal yapısı

Azitromisin azalidlerin makrolit alt grubuna giren yarı sentetik bir antibiyotiktir. Yapıca eritromisine benzer. Oral yoldan kullanılır. Günde bir kez alınarak kullanılabilmesi ve hastaların bu ilaca eritromisine göre daha iyi gastrointestinal tolerans göstermeleri başlıca avantajlarını oluşturur (16). Eritromisine göre belirgin üstünlüğü azitromisinin intraselüler konsantrasyonlarının daha yüksek olması ve böylece etkinlik ve etki süresinin daha uzun olmasıdır. Azitromisinin tablet ve oral süspansiyon şeklinde preparatları bulunmaktadır. Gonore, servisit, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonları, otitis media, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile klamidy enfeksiyonu profilaksisi için kullanılır. HIV taşıyan ileri derecede AIDS hastalarında, Mycobacterium avium kompleks (MAC) profilaksisi için de kullanılmaktadır (17).

Etki mekanizması

Azitromisin bakteriyel ribozomların 50S alt ünitesine bağlanarak bakteri hücresinde protein sentezini inhibe eder. Etkisi genellikle bakteriyostatiktir, fakat yüksek konsantrasyonlarda ya da duyarlı organizmalara karşı bakterisit etki de

gösterebilir. Azitromisin gram-negatif organizmalara karşı daha aktiftir. Fakat streptokok ve stafilokoklara karşı aktivitesi eritromisine göre daha zayıftır. Klamidyal enfeksiyonlara ek olarak hafif ve orta şiddetteki üst solunum yolu enfeksiyonlarında ve toplu yaşama bağlı bulaşma ile aktarılan orta şiddetteki pnömonide yararlıdır. Azitromisinin, eritromisin gibi diyabetik gastropareizde etkili olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir (18).

Azitromisinin genellikle eritromisine duyarlı mikroorganizmalara karşı etkilidir. Bunlar arasında *Staphlococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes* ve *S. pneumoniae* gibi gram-pozitif ve *Haemophilus influenza* ve *Moraxella catarrhalis* gibi gram-negatif organizmalar yer alır. *Chlamydia trachomatis* de azitromisine duyarlıdır. İn vitro ortamda duyarlı olduğu gösterilen diğer organizmalar arasında streptokoklar, *Streptococcus viridans* grubu, *Bordetella pertussis*, *Camphylobacter jejuni*, *Haemophilus ducreyi*, *Legionella pneumophila*, *Bacteroides bivius*, *Clostridium perfringens* ve *Mycoplasma pneumoniae* vardır. Azitromisin Lyme hastalığının tedavisinde klinik olarak kullanılmadığı halde mükemmel doku penetrasyonu ve Lyme hastalığının etkeni olan *Borrelia burgdorferi*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonun (MIK) çok düşük oluşu bu ciddi hastalıkta yararlı olabileceğini göstermektedir (19).

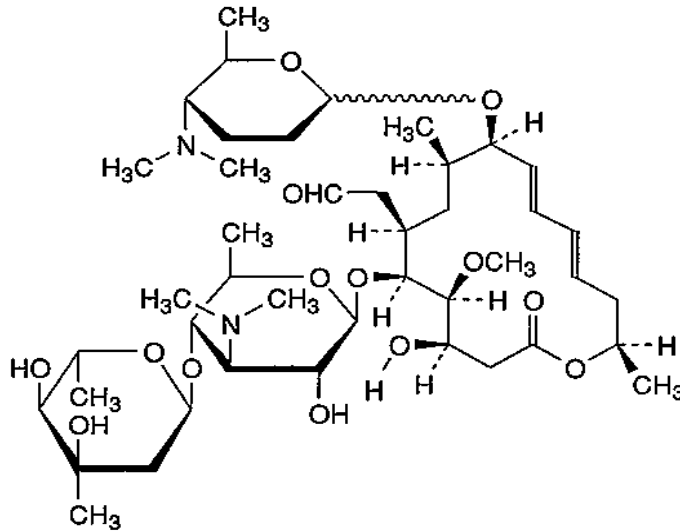
Farmakokinetik

Azitromisin oral ve intravenöz yoldan uygulanır. Oral uygulamadan sonra absorpsiyonu hızlıdır. Azitromisin kapsüllerin oral biyoyararlanımları % 37'dir. Yiyecekler eğrinin altında kalan alan (AUC) üzerinden değerlendirilen absorpsiyon derecesini yaklaşık % 43 oranında azaltırlar. Bu yüzden azitromisin kapsülleri yemeklerden 1 saat önce ya da 2 saat sonra alınmalıdır. Bunun tersine yüksek oranda yağ içeren bir yemekle alındığında AUC değişmeden kalır. Bu nedenle azitromisin tabletleri aç ya da tok karnına alınabilir. Yemekler azitromisin süspansiyonunun absorpsiyon oranını yaklaşık % 56 oranında artırır. Yemeklerle birlikte alındığında süspansiyonun doruk serum konsantrasyonu önemli ölçüde arttığı için süspansiyonlar aç karnına alınmalıdır. Azitromisin vücutta yaygın dağılım gösterir; intraselüler penetrasyonu güçlüdür ve fibroblastlar ile fagositlerde konsantre olur. Sonuç olarak,

doku düzeyleri plazma konsantrasyonlarından önemli ölçüde fazladır. Bunun yanında santral sinir sistemine penetrasyonu zayıftır. İlacın proteinlere bağlanması plazma konsantrasyonu ile değişir; düşük konsantrasyonlarda (0.02 µg/ml) % 52'si bağlı formda bulunur ve bağlanma konsantrasyon arttıkça (2 µg/ml) % 7'ye kadar düşer (20).

Azitromisinin uzun bir yarılanma ömrü vardır (68 saat). Bu özelliği kısmen dokular tarafından yaygın olarak geri alınması ve yavaş salıverilmesi ile açıklanabilir. İlaç metabolize olmaz ve eliminasyonun büyük kısmı ilacın safra içine atılmasından sonra feçes ile olur; % 10'dan daha az bir kısmı da idrar ile atılır (21).

2.1.3. Spiramisin



Şekil 2.3. Spiramisinin kimyasal yapısı

Spiramisin makrolit grubu bir antibiyotiktir. Eritromisinin etkili olduğu bakterilere karşı etkili, fakat etkinliği ona göre daha düşüktür. Kriptosporidoz ve toksoplazmoz gibi protozoa enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılır (22). Oral yoldan baz formunda, rektal veya intravenöz yoldan adipat tuzu halinde kullanılır. Antibakteriyel etki spektrumunun uygunluğu ve özellikle tonsil ve bronkopulmoner dokulara yüksek oranda difüze olabilmesi nedeniyle duyarlı mikroorganizmaların yol açtığı tonsilit, nazofarenjit, sinüzit, otit, bronşit ve akut akciğer hastalıkları; grip ve döküntülü hastalıklardan sonra görülen solunum yolu komplikasyonlarının korunma

ve tedavisi; hamilelik sırasında toksoplazmoz, yeni doğanların toksoplazmozunu ve toksoplazmozun selim şekillerinin tedavisi ve iltihaplı diş çekimleri, diş ve çene ameliyatları, periodontit gibi ağız boşluğu enfeksiyonların korunma ve tedavisinde kullanılır (23-25).

Etki mekanizması

Spiramisin, eritromisin gibi ribozomlardaki 50S alt ünitesine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe eder ve protein sentezini inhibe eden diğer antibiyotikler gibi esas olarak bakteriyostatik etki gösterir. Antibakteriyel etkinliği eritromisine göre daha azdır (26).

Farmakokinetik

Spiramisin oral yoldan kullanılır. Gastrointestinal kanaldan yaklaşık 20 dakikada absorbe olur. Absorpsiyonu besinlerden etkilenmez. Oral yoldan 2 g dozunda verildikten 1.5-3 saat sonra plazmada doruk konsantrasyonuna ulaşır (3 µg/mL); yarı ömrü yaklaşık 8 saattir. Plazma proteinlerine % 10 oranında bağlanır. İç organlarda (özellikle tonsillerin lenfoid dokusu ve akciğer parankimasında) yüksek konsantrasyonda bulunur. Enfeksiyon bölgesinde ulaştığı konsantrasyonlar, bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MIK) birkaç katı üzerindedir. Vücut sıvılarına geniş ölçüde dağılır. Bronş salgısında, tükürük ve anne sütünde yüksek oranda bulunur. Plazmadaki konsantrasyonları düşük düzeylere indikten sonra dokularda yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli olarak kalır, fakat serebrospinal sıvıya önemli ölçüde giremez. Spiramisin karaciğerde aktif metabolitlerine metabolize edilir; önemli bir bölümü safra yoluyla elimine edilir. İdrarla yaklaşık % 10 oranında elimine edilir (27).

2.2. Farmasötik Safsızlıklar

Bir jenerik ürün geliştirilirken, orijinal ürünün spesifikasyonlarını taşıması esas alınır. Farmasötik preparatların formül geliştirme çalışmalarında ilk formülasyonlar laboratuvar boyutunda (1-3 kg) geliştirilir ve üretilir. Dozaj şekli ve oranı, yardımcı maddeler ile geçimlilik, safsızlıklar, üretim biçimi ve ambalaj seçimi formülasyonun

gelişiminde önemli faktörlerdir. Laboratuvar boyutunda hazırlanan formülasyonun stabilitesi test edilir ve en dayanıklı formül deneme ölçeğinde (pilot) üretilir (5-10 kg). Stres koşullarına maruz bırakılan preparatın dayanıklılığı etken madde miktarı ve oluşan safsızlıkların miktarının tespit edilmesi ile ileri derecede stabilite testleri yapılır. Formülasyon geliştirme aşamasında pilot üretime geçmeden önce etken madde ve safsızlık analizleri için analitik yöntem geliştirilir ve valide edilir. Stres testleri valide edilmiş analitik metod ile gerçekleştirilir.

Farmasötik preparatlardaki safsızlıklar (impürte), etken madde (active pharmaceutical ingredient, API) içeriğinde bulunan veya formülasyon geliştirme aşamasında meydana gelen istenmeyen kimyasal maddelerdir. Bu istenmeyen kimyasal maddelerin çok az bir kısmı bile bazen ilacın etkinliğini ve/veya güvenilirliğini etkileyebilir. Safsızlık profillerinin nitel ve nicel olarak belirlenmesi, son yıllarda resmi otoriteler tarafından üzerinde dikkatle durulan, ilaç geliştirme çalışmalarında kritik noktaların başında gelmektedir. İngiliz farmakopesi (BP) ve Amerikan farmakopesi (USP) gibi farmakopelerde, ilaç formülasyonlarında veya etken madde bileşimindeki kabul edilebilir safsızlık limitleri belirtilmiştir.

Uluslararası harmonizasyon konferansı (ICH), yeni ilaç molekülleri, ürünler ve çözücü safsızlıkları ile ilgili kılavuzlar yayınlamıştır (28-30). Ayrıca, Ahuja ve Gorog yayınladıkları kitaplarında ilaçlarda bulunan safsızlıkların belirlenmesinde resmi yönetmelikler ve kılavuzlarda belirtilen değişik durumları ele almıştır (31, 32). Safsızlık standartlarının temin edilmesi ile ilgili, resmi otoriteler ve ilaç firmalarının anlamlı bir talebi vardır. Ancak ilaçlarda bulunan safsızlık referans standartlarını üretmek veya izole ederek elde etmek oldukça zordur.

Üretim sırasında meydana gelen safsızlıklar ve bozunma ürünlerinin izolasyonunda ve yapısının aydınlatılmasında kütle spektrometrisi, nükleer manyetik rezonans (NMR), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), fourier transform iyon siklotron rezonans kütle spektrometrisi (FTICR-MS) ve tandem kütle spektrometrisi yöntemlerinin kullanıldığı bazı makaleler mevcuttur (33-36).

Genel olarak, yeni ilaçlardaki safsızlıklar ile ilgili ICH kılavuzlarına göre; nadiren görülen bir yan etkiye veya zehirli bir etkiye sahip olduğu bilinen veya

tahmin edilen ürünler dışında % 0.1 seviyesinin altındaki safsızlıkların belirlenmesine gerek yoktur (28).

2.2.1. Safsızlık kaynakları

İlaçlar, etken maddelerin formülize edilmiş halleridir. İlaçlarda iki tip safsızlık bulunmaktadır; 1. etken madde ile ilgili safsızlıklar, 2. formülasyon geliştirme çalışmaları, üretim aşaması veya zamanla formülasyonda oluşan safsızlıklar (37-41).

Etken madde ile ilgili safsızlıklar

ICH kılavuzlarına göre, etken madde ile ilgili safsızlıklar aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

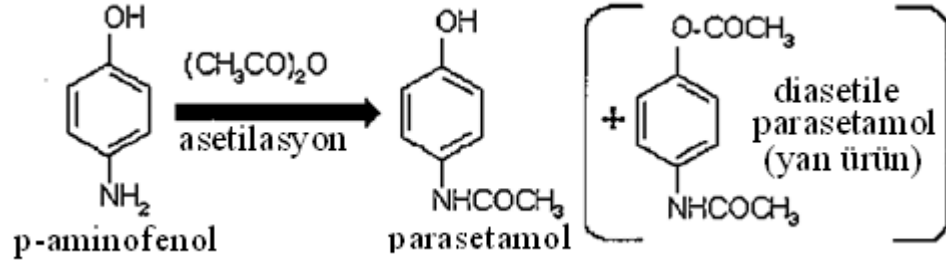
- a) Organik safsızlıklar
- b) İnorganik safsızlıklar
- c) Çözücü safsızlıkları (rezidual solvent)

a) Organik safsızlıklar; Etken maddede meydana gelen organik safsızlıklar, üretim süreçlerinde ve/veya saklama koşullarında meydana gelebilir. Tanımlanabilen veya tanımlanamayan, uçucu olan veya olmayan çeşitli safsızlıklar meydana gelebilir.

Başlangıç maddeleri veya ara ürünler: Bunlar etken maddelerde en çok bulunan safsızlıklardır. Etken maddenin her bir sentez basamağında meydana gelebilirler. Her ne kadar bitmiş ürün çözücülerle yıkansa da başlangıç maddelerin artıkları kalabilir ve üreticiler safsızlıklar konusunda çok dikkatli olmalıdır. Örneğin p-aminofenolden parasetamol sentezlenirken elde edilen parasetamol yığınının numune alınarak p-aminofenol limit testi yapılır. p-aminofenol bazı üreticiler için başlangıç maddesi bazıları içinse ara ürün olabilir (42).

Yan ürünler: Organik kimyada etken madde sentezi sonunda % 100 tek bir bitmiş ürün elde etmek çok nadir görülür. Her zaman yan ürünlerin oluşma olasılığı

vardır. Örneğin parasetamol sentezi sırasında yan ürün olarak diasetil parasetamol meydana gelebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. p-aminofenol'den parasetamol sentezi sırasında yan ürün oluşumu

Bozunma (degradation) ürünleri: Üretim aşamasında bitmiş ürünün bozunması sonucu da safsızlıklar oluşabilir. Farklı dozlardaki ilaç formülasyonunda saklama koşullarında ve zamanla meydana gelen safsızlıklar genellikle ortaktır. Bozunma ürünlerine iyi bir örnek; penisilin ve sefalosporinlerin bozunmasıdır. Beta laktam halkasının C6 / C7 yan zincirindeki amino grubu bozunmada kritik rol oynar (43).

Reaktifler, ligandlar ve katalizörler: Bu kimyasallar zaman zaman safsızlık olarak problem yaratsa da daha seyrek görülür.

Genel olarak etken maddeler yukarıda bahsi geçen organik safsızlık türlerini, önemsiz veya önemli seviyede içerebilir.

Her ne kadar organik safsızlıklar sentez ve üretim sırasında sıklıkla oluşsa da etken madde üreticilerinin ve ilaç üreticilerinin bu safsızlıkların miktarları ve tayin edilmeleri konusunda ICH kılavuzları ve yönetmeliklere uygun çalışmalıdır.

Enantiyomerik safsızlıklar: Şiral bir molekülün, enantiyomerlerinden sadece biri daha iyi farmakolojik aktivite gösterip, terapötik indeks ve yan etki profili açısından olumlu değerlendirilip ilaç molekülü olarak değerlendirilebilir (44). Bazı enantiyomerlerin ise farklı aktivitelere sahip ve farklı terapötik etki için ilaç molekülü olarak formülasyonları geliştirilebilir. Bu durumda da enantiyomerik

safsızlığının da belirlenmesi gerekir. Örneğin levofloksazin, ofloksazinin S-izomerik formudur. Levofloksazin içeren farmasötik preparatta mutlaka enantiyomerik safsızlık analizi yapılarak ofloksazin varlığı tespit edilmelidir (45).

b) İnorganik Safsızlıklar; Etken maddenin üretimi sırasında inorganik safsızlıklar da meydana gelebilir. Genellikle yapısı tayin edilebilir moleküllerdir.

Reaktifler, ligandlar ve katalizörler: Her ne kadar üretim sırasında bazı problemlere neden olsada bu safsızlıkların bulunma olasılığı düşüktür.

Ağır metaller: Ağır metaller, özellikle üretim sürecinde asidifikasyonun veya asit hidrolizinin gerçekleştiği paslanmaz çelik reaktörler ve kullanılan su nedeni ile oluşurlar. Demineralize su ve cam üretim hatları kullanılarak, bu ağır metal safsızlıklarının oluşumunun önüne geçilebilir.

Diğer materyaller (filtreler, yardımcı malzemeler): Filtreler, santrifüj aletleri gibi yardımcı aletler ilaç üretim tesislerinde rutin olarak kullanılır ve birçok durumda, aktif karbon da kullanılır. Üretilen hammadde içeriğindeki liflerin ve siyah parçacıkların düzenli olarak izlenmesi, bu maddeleri önlemek için şarttır.

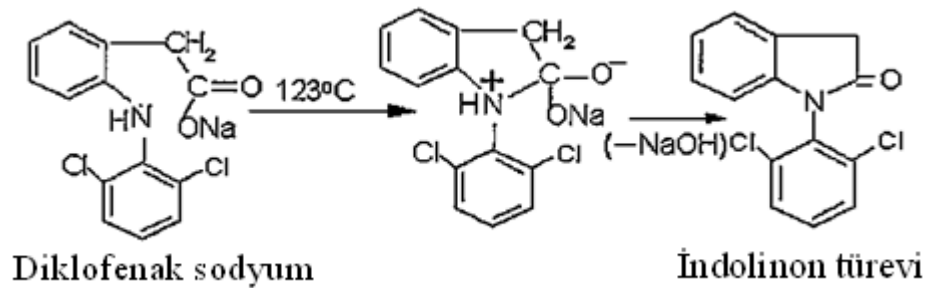
c) Çözücü safsızlıkları; Üretim sırasında kullanılan uçucu organik çözücülerdir. Bu çözücüleri uzaklaştırmak çok zordur ancak güvenlik yönünden bu çözücülerin uzaklaştırılması çok önemlidir. Toksik olduğu bilinen bazı çözücülerden üretim sırasında özellikle kaçınılmalıdır. Çözücü safsızlıkları, insan sağlığına olası zararlı etkilerine göre üç sınıfa ayrılır (46). Kaçınılması gereken çözücüler arasında benzen (Sınıf I, limit; 2 ppm) ve karbon tetraklorür (Sınıf I, limit 4 ppm) vardır. Diğer taraftan, en sık kullanılan çözücüler; metilen klorid (600 ppm), metanol (3000 ppm), piridin (200 ppm) ve toluen (890 ppm)'dir. N.N-dimetilformamid (880 ppm) ve asetonitril (410 ppm) Sınıf II'dedir. Sınıf III çözücüler (asetik asit, aseton, izopropil alkol, butanol, etanol ve etil asetat) için günlük en fazla 50 mg maruziyete izin verilmiştir. Bu nedenle ICH limitlerine kesinlikle uyulmalıdır (30).

Formülasyon ile ilgili safsızlıklar

Etken maddenin formülasyonu sırasında çeşitli nedenlerle safsızlıklar meydana gelebilir.

Formülasyon geliştirme aşamasında meydana gelen safsızlıklar;

a) Yönteme bağlı: Örneğin diklofenak sodyum içeren parenteral bir preparatın otoklavda sterilizasyonu sırasında 1-(2,6-diklorofenil) indolin safsızlık olarak meydana gelir (48).



Şekil 2.5. Diklofenak sodyumun otoklavlanması ile oluşan safsızlık

Otoklav yöntemi ($123 \pm 2^\circ\text{C}$), diklofenak sodyumun molekül içi siklik reaksiyonu ile indolinon türevi ve sodyum hidroksit oluşmasına neden olabilir. Bu safsızlığın oluşması formülasyonun başlangıç pH değerine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Safsızlığın ampul formunda bitmiş ürünlerdeki konsantrasyonu, BP’de geçen ham maddedeki derişim limitlerini aşmaktadır.

b) Çevreye bağlı: Stabilitayı etkileyen primer çevresel faktörler;

Sıcaklık: Isıya karşı oldukça hassas olan çok sayıda ilaç etken maddesi mevcuttur. Örneğin ilaç etken maddesi olan vitaminlerin özellikle sıvı formundaki formülasyonları ısıya karşı oldukça hassas olup ısıyla bozunma potansiyeli oldukça yüksektir (49).

Işık, özellikle UV ışık: Bazı ilaç molekülleri ışığa karşı dayanıklı iken bazı moleküller tamamen bozunma ürünlerine dönüşmektedir. Formülasyon geliştirme

çalışmalarında molekülün ışığa dayanıklılığını tespit etmek için stres testi ve fotostabilite deneyleri yapılarak molekülün bozunma ürünleri tayin edilir. Kabul limitlerinin dışında bozunma ürünlerinin oluşması halinde preparatın ambalaj ve saklama koşulları belirlenir. Örneğin ergometrin içeren parenteral preparatlarda gün ışığına maruziyetle yüksek oranda bozunma ürünleri oluşmakta bu nedenle koyu renkli ambalajda muhafaza edilmektedir (50, 51).

Nem: Nem, özellikle hidroskopik moleküller içeren katı dozaj formundaki formülasyonlara zararlıdır. Aspirin ve ranitidin nemden etkilenen klasik örneklerdir.

c) Dozaj formuna bağlı: İlaç firmaları bir ürünü piyasaya vermeden önce her ne kadar ön formülasyon çalışmalarında ürünün stabilitesini inceleseler de bazen ürünün dozaj formuna bağlı sorunlar nedeni ile ürün piyasadan geri çekilmek zorunda kalabiliyor. Genellikle sıvı dozaj formları bozunma ve mikrobiyolojik kontaminasyon için daha yatkın formlardır. Bu nedenle, su içeriği, çözeltinin veya süspansiyonun pH değeri, anyon-kasyon uyumu, bileşimindeki maddelerin birbiri ile etkileşimi ve birincil ambalaj materyali önemli faktörlerdir (52).

Sıcak ve nemli ortamlarda muhafaza edilen oral sıvı dozaj formlarında gelişen bakteri, mantar ve maya gibi mikrobiyolojik üremenin olduğu preparatlar insan tüketimi için kullanışsız ürünlerdir. Mikrobiyal kontaminasyon, raf ömrü süresine, çoklu doz kullanımına, bazı uygunsuz koruyucu maddelerin kullanımına, birincil ambalaj materyalinin yarı geçirgen yapısına bağlı olarak oluşabilir (53).

2.2.2. Bozunma ürünleri

a. Farmasötik preparatın içeriğindeki maddelerin birbiri ile etkileşimi; Birçok vitamin, özellikle sıvı formlar olmak üzere değişik dozaj formlarında zamanla bozulmaktadır. Folik asit, pantotenik asit, siyanokobalamin ve tiamin gibi bazı vitaminlerin bozunma ürünleri toksik olmasa da preparat içeriğindeki etken madde miktarının olması gerekenden daha az olması nedeni ile önemlidir (54).

Özellikle kombine preparatlarda bileşimindeki maddelerin zamanla birbirleri ile etkileşimi ile bozunma ürünleri oluşabilir. Her molekül kararlı kaldığı ortam

koşullarında muhafaza edilmelidir. Örneğin B vitamini kompleksi içeren parenteral preparatların zamanla birbirleriyle etkileşimi sonucu bozunma ürünleri oluşur (53, 55).

b. Fonksiyonel gruplara bağlı bozunma ürünleri

Ester hidrolizi: Özellikle sıvı formdaki ve ester tipi ve ilaçlar hidroliz ile bozunma ürünlerine dönüşebilir. Örneğin; aspirin, benzokain, seftoksim, kokain ekotiyofat, etil paraben, seftoksim proksetil (56). Ester bağı kolay açılır, bu nedenle, ester grubu taşıyan ilaçların ana metabolitleri, hidroliz ürünleri veya bunların konjugatlarıdır. Ester hidrolizi ile bozunma ürünlerinin oluştuğu istenmeyen durumlar olduğu gibi ön-ilaçların büyük kısmı da ester yapısındadır. Hidroliz özellikle ester tipi ilaçların başlıca bozunma reaksiyonudur ve bu bozunma özellikle sıvı dozaj formlarında görülür (57).

Oksidatif bozunma: Aromatik halkaya doğrudan bağlı hidroksil grubu, konjuge dien, heterosiklik aromatik halka, nitrozo ve nitrit türevleri, aldehit grubu taşıyan ilaç molekülleri oksidatif bozunma ürünleri verebilirler (58).

Fotolitik parçalanma: Farmasötik preparatlar, üretim sırasında, ambalajlama sırasında, eczane veya hastanede raf ömrü süresince ışığa maruz kalır. Florokinolon antibiyotikleri fotolitik parçalanmaya yatkın moleküllerdir. Siprofloksazin içeren göz damlası gün ışığına maruz kaldığında fotolitik parçalanma ile etilendiamin analoguna dönüşür (59-61).

Dekarboksilasyon: Bazı çözülmüş karboksilik asitler ısıyla karboksil grubundan karbondioksit kaybeder (62).

Farmasötik preparatın kalitesi açısından önemli faktörler:

Kristalizasyon, kristallerin büyüklüğü, farmasötik preparatın kalitesini ve özellikle stabilitesini etkiler. Büyük kristaller ilacın bozunmasına neden olabilir. Bu nedenle ilaç üreticileri özellikle daha iyi kristaller üretmeye çalışmaktadır.

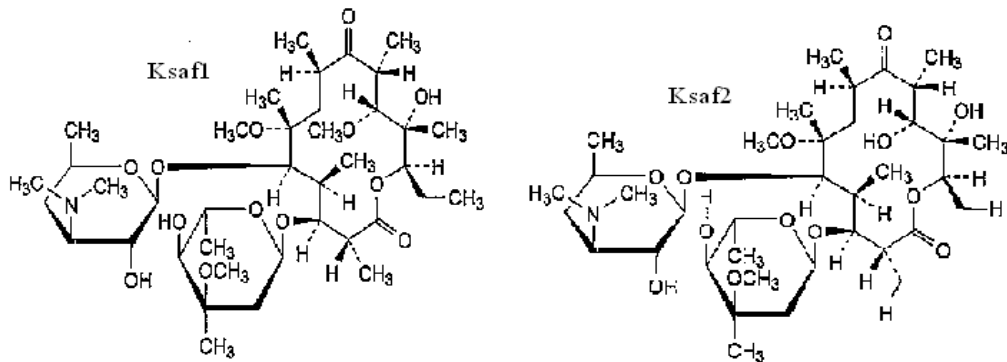
Islak kekin yıkanması, istenmeyen kimyasalların ve çözücü safsızlıkların uzaklaştırılması için tam olarak yapılmalıdır.

Kurutma, vakum kurutma makinesi ya da bir akışkan yataklı kurutucular her zaman ilaç endüstrisinde kurutma tepsisinde yapılan kurutmaya tercih edilir. Yüksek termal verimlilik, kuruma süresinin azaltılması ve daha uniform kurumanın sağlanması ısıya hassas ilaç molekülleri açısından önemlidir.

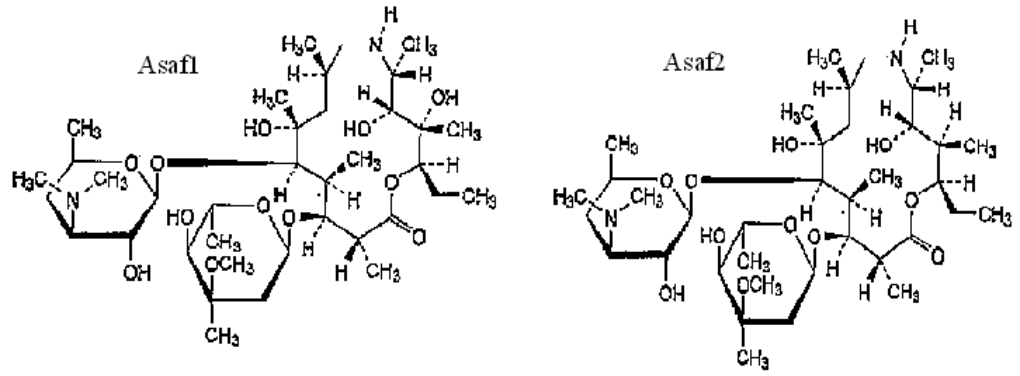
Uygun ambalaj; ışığa duyarlı ilaç molekülleri için ışıktan koruyucu ambalajlarda muhafaza edilmelidir.

Üretim yönteminin stabilite çalışmalarına dayalı olması: üretim yönteminin belirlenmesinden önce detaylı bir stabilite çalışması yapılması gerekir. Özellikle parenteral preparatlarda sterilizasyon için aseptik filtrasyon ile terminal otoklav yöntemi stabilite açısından karşılaştırılmalıdır. Örneğin, diklofenak sodyum enjeksiyonluk preparatlarında safsızlıkların oluşumundan kaçınmak için aseptik filtrasyon, alternatif yöntem olan terminal otoklava tercih edilmelidir (63, 64).

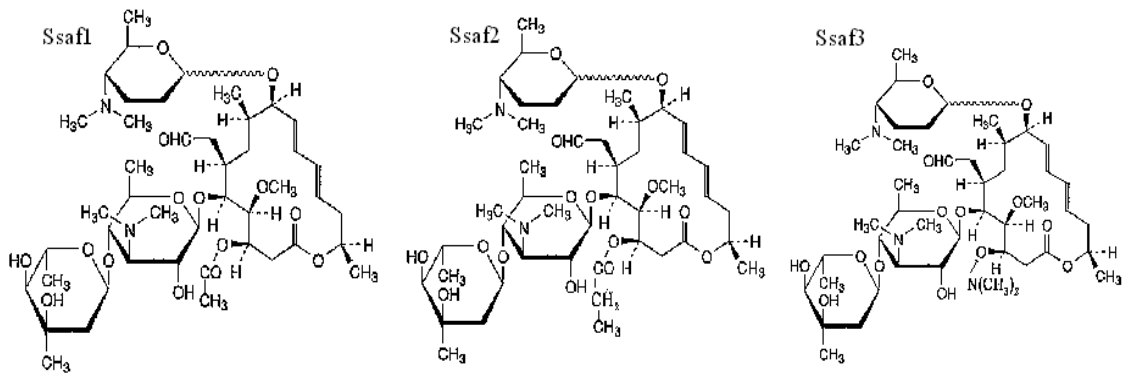
Tez çalışmasında farmasötik preparatlardan analizi yapılacak safsızlıklar 6,11-di-O-metileritromisin (Ksaf1), 6-O-metil-15-noreritromisin (Ksaf2), 6-demetil azitromisin (Asaf1), 3-deoksi azitromisin (Asaf2), neospiramisinI (Ssaf1), neospiramisinII (Ssaf2) ve neospiramisinIII (Ssaf3) kimyasal yapıları Şekil 2.6-2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.6. Klaritromisin safsızlıkları



Şekil 2.7. Azitromisin safsızlıkları



Şekil 2.8. Spiramisin safsızlıkları

2.3. Farmasötik preparatlardan analiz yöntemleri

2.3.1. Klaritromisin için analiz yöntemleri

Klaritromisin'in farmasötik preparatlardan analizine ilişkin çalışmalarda kromatografik yöntemler önemli yer tutar. Esas olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kapiler elektroforez ve kütle dedektörlü sıvı kromatografisi yöntemleri bildirilmiştir.

Pappa-Louisi ve arkadaşları, Klaritromisin'in farmasötik preparatlardan analizi için ters faz sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak ODS kolon, hareketli faz olarak pH 7.0 fosfat tamponu ile organik çözücü olarak asetonyitril, isopropanol karışımı kullanarak, Klaritromisin'in analizine kolon

sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Oda sıcaklığında simetrik pikler elde edilmiştir (65).

Morgan ve arkadaşları, Klaritromisin'in farmasötik preparatlardan analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde hareketli faz olarak asetonyitril-potasyum fosfat tamponu (pH 5.4), 5 µm partikül çapında C18 kolon ve 50 derece kolon sıcaklığında ve 205 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır (66).

Hirsch ve arkadaşları, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi yöntemi ile Klaritromisin'in analizini gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde Nucleosil C18 kolon kullanılmış, asetonyitril, monobazik potasyum fosfat (pH 4.1) hareketli faz sistemi ile 205 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır (67).

Morgan ve arkadaşları Klaritromisin'in safsızlık analizi için UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmiştir. YMC C 18 kolon, asetonyitril - 0.033 M potasyum dihidrojen fosfat (48:52) hareketli faz sistemi, 205 nm dalga boyunda UV dedektör ile analizler gerçekleştirilmiştir. Dedektör cevabındaki farklılıklar nedeniyle Klaritromisin safsızlıkları tek tek analiz edilmiştir (68).

Nakagava ve arkadaşları, Klaritromisin'in tablet formülasyonundan analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve Zorbox SB C₁₈ kolonda, metanol – potasyum fosfat (pH 3.5) hareketli faz ve 205 nm dalga boyunda UV dedektör ile analizler gerçekleştirilmiştir (69).

Steinmetz ve arkadaşları, tabletlerden Klaritromisin analizi için ters-faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz asetonyitril-fosforik asit hareketli faz sistemi kullanılarak 230 nm'de gerçekleştirilmiştir (70).

Kazusaki ve arkadaşları, Klaritromisin için Inertsil ODS kolon ve hareketli faz olarak asetonyitril-su karışımının kullanıldığı HPLC yöntemi geliştirmiştir. Optimum koşullarda analiz süresi 17 dakika olarak bulunmuştur (71).

2.3.2. Azitromisin için analiz yöntemleri

Zubata ve arkadaşları, farmasötik preparatlardan Azitromisin analizi için sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiştir. C18 kolon kullanılmış ve 215 nm dalga boyunda analizler gerçekleştirilmiştir. Kesin, doğru ve seçici bir yöntem olduğu gösterilmiş olup, stabilite ve çözünme testi analizlerinde kullanılmak üzere önerilmiştir (72).

Miguel ve Barbos, Azitromisinin safsızlıklarının tabletlerden analizi için sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiştir. Rutin analiz ve stabilite analizlerinde kullanılmak üzere önerilmiştir. Doğrusal gradient elüsyon ve 210 nm'de UV dedeksiyon ile analizler gerçekleştirilmiştir. Phenomenex Synergi® MAX-RP 4 µm 250×460 mm kolon 50 °C kolon sıcaklığında kullanılmıştır (73).

Yanga ve arkadaşları, Klaritromisin analizi için UV dedektörlü ters faz HPLC yöntemi geliştirmiştir. İyon çifti ajanı olarak sodyum heptansülfonat tuzu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak amonyum dihidrojen fosfat : asetonytril (67:33, h/h) karışımı kullanılmış ve dedeksiyon 210 nm'de gerçekleştirilmiştir. C18, 5 µm 150 mm × 4.6 mm, kolon ve 25 °C kolon sıcaklığında çalışılmıştır (74).

2.3.3. Spiramisin için analiz yöntemleri

Liu ve arkadaşları, Spiramisinin analizi için izokratik bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak, poli(stiren-divinilbenzen) PLRP-S (8 µm 1000 Å), hareketli faz olarak, asetonytril-0.2 M potasyum fosfat tamponu pH 9.0- su (37:5:58, v/v/v), akış hızı 1.0 mL/dak'dır. UV dedeksiyon 232 nm'de gerçekleştirilmiştir (75).

Vial ve arkadaşlarının, farmasötik preparatlardan Spiramisin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde ODS kolon, hareketli faz olarak metanol-tetrahidrofuran-su (17:3:80, h/h/h) karışımı ve 230 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır (76).

Chepkwony ve arkadaşları, Spiramisin analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analizler için C₁₈ kolon ve dizi diyot dedektör kullanılmıştır.

Ayırım gradient elüsyon sistemi ile A ve B elüentleri kullanılarak [A=Fosfat tamponu: Asetonitril (95:5) ve B=Su:Asetonitril (20:80)] gerçekleştirilmiştir (77).

Frenich ve arkadaşları, Spiramisin analizi için sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiştir. Zorbax SB C18 kolon ve % 0.01 fosforik asit-asetonitril içeren gradient elüsyon kullanılmıştır. Dedeksiyon 230 nm’de yapılmıştır (78).

Kaynaklarda Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin için geliştirilmiş UPLC yöntemi bulunmamaktadır.

2.4. Kromatografi

Kromatografi, kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Bütün kromatografik yöntemlerde ortak olarak bir sabit faz ve bir de hareketli faz vardır. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, sabit faz üzerinden geçirilir; bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırım gerçekleşir.

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alındığında, kolon kromatografisi ve düzlemsel kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder.

Ayrıca kromatografi hareketli fazın tipine göre, sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süperkritik akışkanlı kromatografi şeklinde sınıflandırılır. Bu üç teknikte hareketli faz sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır (79).

Kromatografik yöntemlerde sabit ve hareketli faz ile numune arasındaki etkileşimlere bağlı olarak çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti, iyon değiştirme, moleküler eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (80).

Dağılma kromatografisi, birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması temeline dayanmaktadır. Sabit faz olarak, inert bir destek katının üzeri kaplanmış veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı sabit fazlar kullanılır. Ayrılacak maddeler, sabit faz ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına bağlı olarak dağılırlar, bu dağılım farklı oranda göçe neden olur ve ayırım gerçekleşir.

Sabit faz ve hareketli faz polaritelerinin farklılığına göre dağılma kromatografisi ters faz sıvı kromatografisi ve normal faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki alt başlıkta incelenebilir (81).

Ters faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda daha fazla kalmayı tercih eden, yani daha fazla alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır.

Ters faz sıvı kromatografisi, günümüzde en çok kullanılan ayırım tekniğidir. İlaç analizlerinde de genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni; ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

İyon çifti kromatografisi, iyonik veya iyonize olabilen türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. İyon çifti kromatografisinin ayırım mekanizması için kaynaklarda önerilen üç temel model aşağıda açıklanmıştır (82).

- i. İyon çifti oluşumu: Bu modelde, iyon çifti oluşumu sulu hareketli fazda meydana gelir ve daha sonra oluşan yüksüz iyon çifti ters faz kolona tutunur. Alıkonma iyon çiftinin polaritesine bağlıdır.
- ii. Dinamik iyon değiştirici: Dinamik iyon değiştirici modelinde, iyon çifti oluşturucunun hidrofobik kısmı hidrofobik sabit faza adsorblanır ve kolonun bir iyon değiştirici olarak davranmasına neden olur.

iii. İyon etkileşimi: Bu modelde iyon çiftinin iki fazda birden oluşmasının gerekmediği savunulur ve sabit faz yüzeyinde lipofilik iyon çifti oluşturunların neden olduğu iki katmanlı bir elektrik tabakasından kaynaklanan dinamik bir dengenin meydana geldiği düşünülür. Bu yüzeyin yük yoğunluğunun neden olduğu elektrostatik güç maddenin alıkonmasını sağlar.

İyon değiştirme kromatografisi; sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. İyon değiştirme kromatografisinde iyonik yapılar (K^+ , Na^+ , SO_4^{2-}) ya da belirli pH değerlerinde iyonlaşabilen moleküller (organik asit veya organik bazlar) ayrılır. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli iyonik bağ oluşursa alıkonma o kadar güçlüdür.

Moleküler eleme kromatografisi yönteminde, maddeler molekül büyüklüğüne ve biçimine göre ayrılırlar. Jel geçirgenlik ya da jel filtrasyon adını da alan bu yöntemde belli büyüklüğe sahip ve karışımdaki bileşenlerle etkileşmeyen bir madde, katı faz olarak kullanılır. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve numunede bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Büyük moleküller gözeneklere sığmayarak hareketli fazla birlikte hızla sürüklenerek kolondan ilk önce çıkarlar. Küçük moleküller gözenekleri dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları gözeneklerde geçirdikleri zaman miktarına bağlıdır.

Afinite kromatografisi, bir protein molekülü ile uygun bir ligand arasında spesifik etkileşim kurulması esasına dayanır. Proteine spesifik bağlanma eğilimi gösteren ligand, sabit faz oluşturmak üzere bir jel matrikse bağlanır. Sabit faz, özel bir proteine karşı gelen antikor ise, protein karışımı kolondan geçirildiği zaman, sadece antikor ile etkileşen protein kolona bağlanır. Daha sonra bu protein hareketli fazın bileşiminin veya pH'sının değiştirilmesi ile antikordan ayrılarak elüe edilir (83).

2.4.1. Kromatografide Temel Parametreler

Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı (t_R) denir. Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de (V_R) kullanılmaktadır. Bir maddenin alıkonma hacmi, bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir (Formül 2.1.).

$$V_R = t_R F \quad (2.1)$$

Alıkonma hacmi, temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı K ile aşağıdaki formül gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_M + K V_S \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte V_M kolondaki hareketli faz hacmi, V_S kolondaki sabit faz hacmidir.

Dağılım katsayısı (K) ise, çözünenin sabit fazdaki molar derişiminin (C_S), hareketli fazdaki molar derişimine (C_M) oranlanması ile hesaplanır (Formül 2.3).

$$K = C_S / C_M \quad (2.3)$$

Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü (k') olarak bilinen bu kavram Formül 2.4'de verilmiştir.

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.4)$$

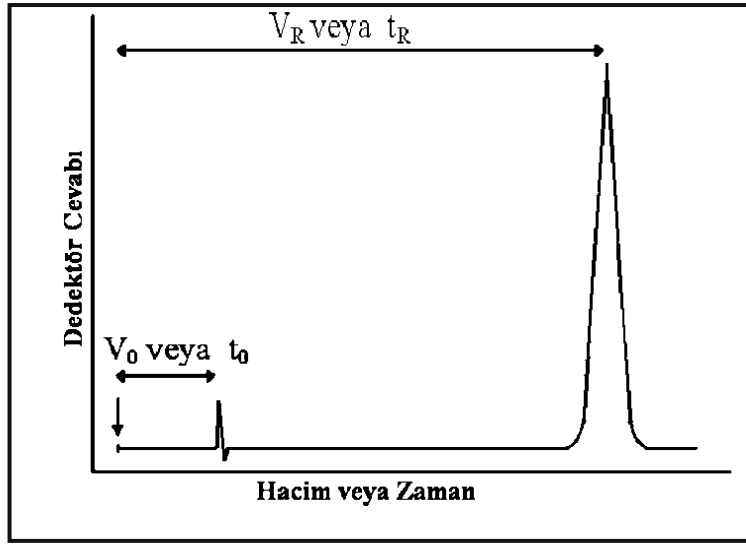
Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse formül; aşağıdaki biçimde yazılabilir.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü zamanda (t_0) elüe edilirler. Formül 2.4 ve 2.5’de V_0 ve t_0 sırasıyla ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.9).

Kapasite faktörü, maddenin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım katsayısına bağlıdır.

$$k' = K \times V_s/V_m \quad (2.6)$$



Şekil 2.9. Kapasite faktörünün hesaplanması

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Bir kromatografik ayırmada hesaplanan kapasite faktörü değerinden faydalananarak ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir.

Seçicilik Faktörü

Bir karışımdaki iki maddenin ayırımını değerlendirmek için kullanılır. A ve B bileşenli bir karışımda seçicilik faktörü (α), her iki bileşenin kapasite faktörü oranına eşittir.

$$\alpha = k'_B / k'_A \quad (2.7)$$

k'_B : Alıkonma zamanı uzun olan maddenin kapasite faktörü

k'_A : Alıkonma zamanı kısa olan maddenin kapasite faktörü

Bu tanıma göre, α daima 1'den büyüktür.

Seçiciliği etkileyen ana faktör sabit fazdır. Hareketli fazın bileşimi ve az da olsa sıcaklık da seçiciliği etkiler.

Kolon Etkinliği

Kromatografik kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak, birbiriyle ilgili iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, tabaka yüksekliği H ve tabaka sayısı N 'dir. Bu iki terim arasında Formül 2.8'deki bağıntı vardır.

$$N = L / H \quad (2.8)$$

L : Kolon uzunluğu

Kromatografik kolonun etkinliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağlı olarak kolon etkinliği değişmektedir.

Tabaka sayısını elde edebilmek için aşağıdaki formül kullanılabilir:

$$N = 16 (t_R / W)^2 \quad (2.9)$$

t_R : Alıkonma zamanı

W : Zemin pik genişliği

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılabilecek hatalardan kaçınmak için N değeri hesaplamada başka bir seçenek, $W_{1/2}$, yani yarı yükseklikteki pik genişliği değeri kullanılmasıdır. Böylece tabaka sayısı aşağıdaki formülle ifade edilir.

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel yaklaşım, 1950’li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter’in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile başlamıştır (Formül 2.11).

$$H = A + B/u + C u \quad (2.11)$$

H: Tabaka Yüksekliği (cm)

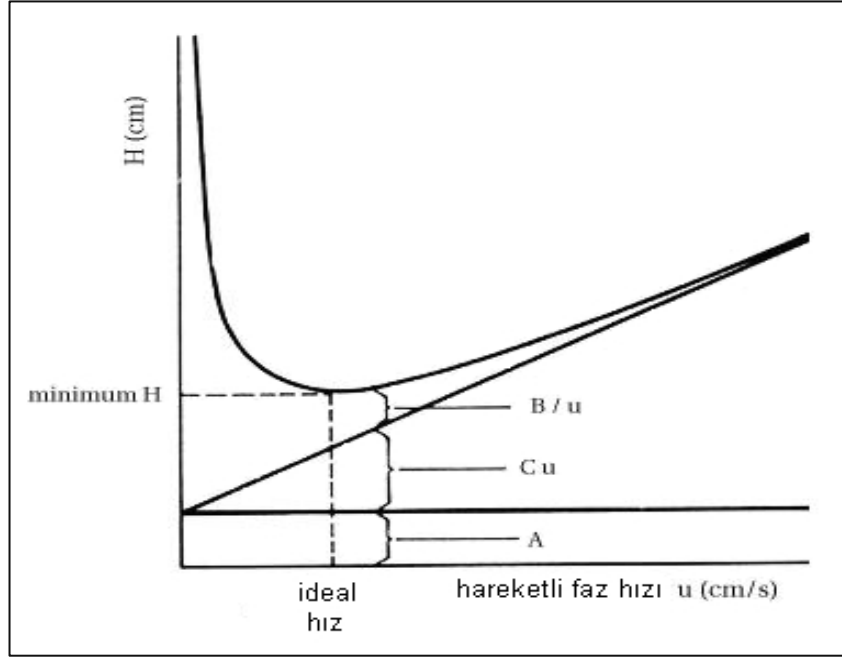
A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği artırılabilir. Formül 2.11’deki akış hızından bağımsız olan A değeri, bileşenlerin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen bileşenlerin kolonda kalış süreleri de farklı olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşmasında bantta genişleme gözlenir. Bu olaya eddy difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A’nın değeri küçültülebilir. Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup özellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. B’nin değeri kolon sıcaklığının azaltılması ile küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B’nin değerinin küçültülmesi mümkündür. Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak erişilemez. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının artırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Van Deemter Eğrisi

Ayırıcılık

Kromatografide amaç karışım içindeki maddeleri ayırmaktır. Ayırıcılık terimi (R_s) bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçütüdür. Ayırıcılık teorik tanım olarak, alıkonma zamanları arasındaki farkın ortalama pik genişliğine oranıdır (Formül 2.12).

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2) \quad (2.12)$$

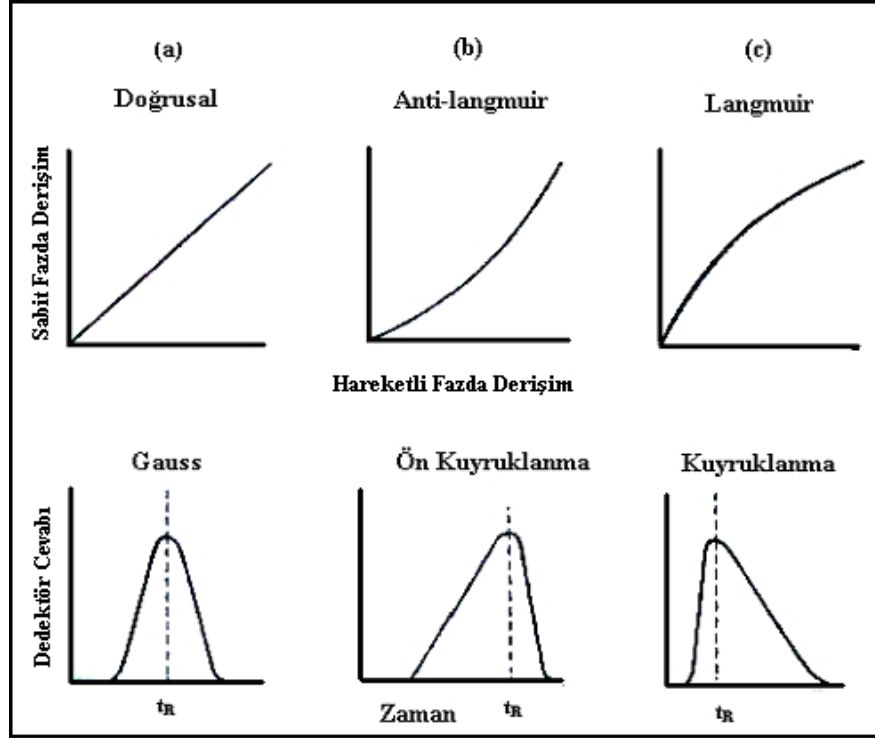
$R_s = 1.5$ olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1.5'den büyük ($R_s \geq 1.5$) olması önerilir.

Formül 2.13'e göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k')'dür.

$$R_s = (1/4) [(\alpha - 1) / \alpha] [k' / (k' + 1)] N^{1/2} \quad (2.13)$$

Pik asimetri oranı

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (C_m) sabit fazdaki denge derişimine (C_s) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. Şekil 2.11'deki izoterm doğrusal olup eğimi dağılım katsayısını (K) verir. Bütün C_m değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.



Şekil 2.11. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri

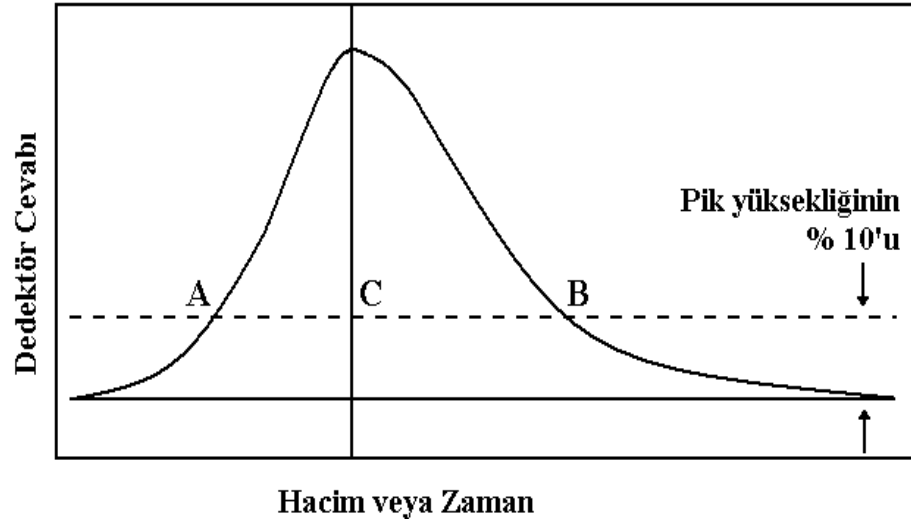
Dışbükey izoterm (Şekil 2.11 b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma denir.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa izoterm içbükey olur (Şekil 2.11 c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür. Pik simetrisinin belirlenmesi için pik asimetri oranının hesaplanması, madde elüsyon pikinin Gauss (çan) eğrisi olup olmadığının denetlenmesi açısından önemlidir.

Pik asimetri oranı (PAs) aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$PAs = (CB / AC) \times 100 \quad (2.14)$$

CB ve AC uzunlukları Şekil 2.12’de tanımlanmıştır. Tam simetrik bir pik için $PAs = 1$ ’dir. Pratikte 0.9-1.4 arasında PAs değerleri kabul edilmektedir.



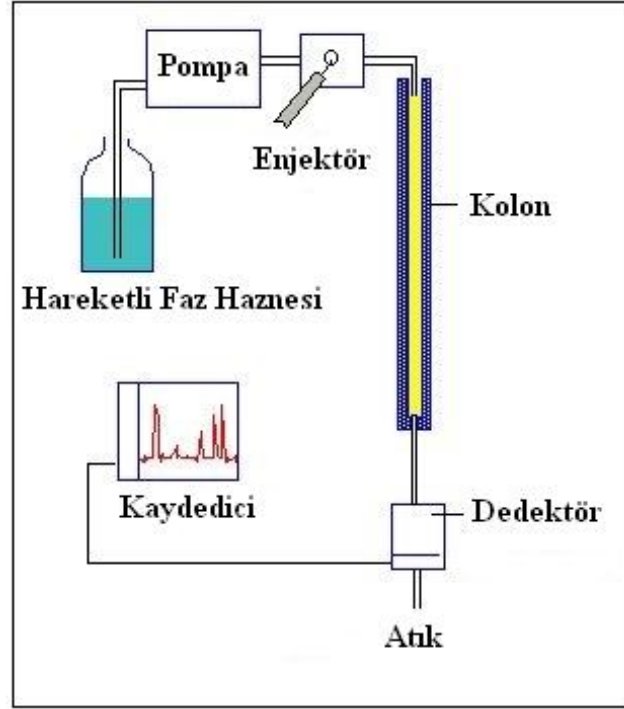
Şekil 2.12. Pik asimetri oranının hesaplanması

2.4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik ayırımın etkinliği, sabit fazdaki tanecik çapının ve kolon çapının küçültülmesi ile artmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle ayırma işleminde tanecik çapı 3-10 μm olan dolgu maddelerinin yaklaşık 5 mm çapındaki kolonlarda kullanılması mümkün olmuştur. Bu şartlar altında, kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gerekmektedir. Bu tür kolonlarda yüksek basınç altında (100-400 atm) gerçekleştirilen kromatografi türüne yüksek performanslı (basınçlı) sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilir. Yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri; duyarlılığı, doğruluğu, nicel analizlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir (81-84).

HPLC Sistemi

Şekil 2.13’de şematik olarak gösterilen bir HPLC cihazı temel olarak, hareketli faz haznesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur.



Şekil 2.13. HPLC cihazının şematik gösterimi

Hareketli Faz Haznesi

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz hazneleri içerir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözünmüş gazların giderilmesi gerekir. Süzme işlemi için 0.45-0.6 µm çapında membran veya teflon filtreler kullanılır.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Sisteme gönderilen hareketli faz bileşiminin veya akış hızının zamanla sürekli veya kesikli olarak değiştirilmesi ile yapılan ayırma işlemine gradient elüsyon denir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen

sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli fazlar kullanılır (85).

Pompa

Bir HPLC sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

400 atm'e kadar basınç üretimi,

Puls içermeyen basınç çıkışı,

0.1-10 mL/dak aralığında akış hızları,

% 0.5 veya daha iyi bir tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,

Korozyona dayanıklı parçalar.

Enjektör

HPLC analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan numune hacminin çok küçük olması ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

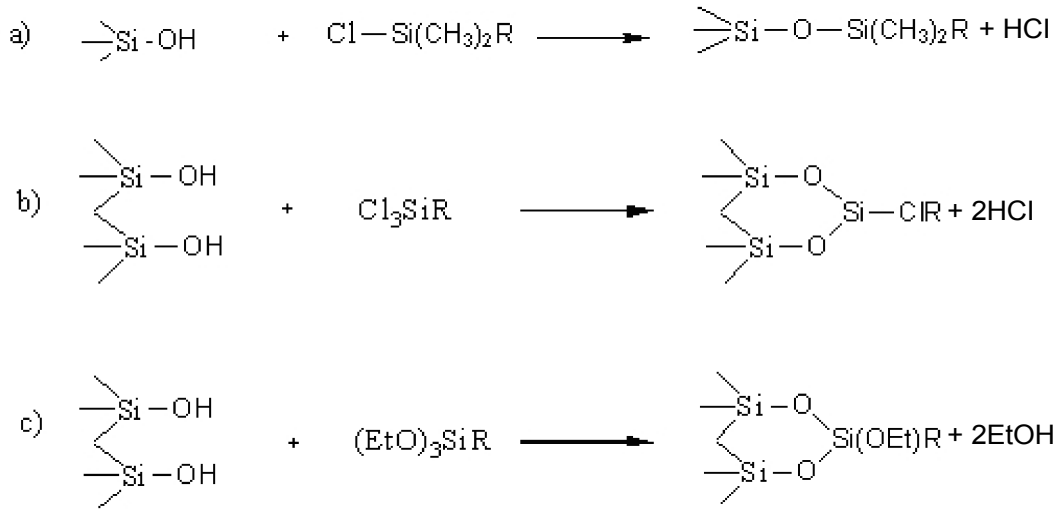
Kolon

HPLC kolonlarının çoğu paslanmaz çelikten yapılır. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2-5 mm iç çaplı, 5-30 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 3-10 µm arasında değişmektedir.

Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Yüzeylerine gözenekli yapıda silika, alümina veya iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli dolgular, silika, alümina ve iyon

değiştirici reçineden yapılır. En çok kullanılan dolgu maddesi silikadır. Silika yüzeyine kimyasal veya fiziksel olarak ince organik bir film kaplanır.

Dağılma kromatografisinde en sık olarak silika temelli bağlı fazlar kullanılır. Silika temelli bağlı fazlar, yüzeyde bulunan silanol gruplarının organosilanlarla Şekil 2.14'de gösterilen reaksiyonları sonucu elde edilir. En çok kullanılan, klorodimetilsilanların yüzey silanol grupları ile reaksiyonudur. Ters faz sıvı kromatografisi için kullanılan çeşitli alkil ve substitüe alkil silikalarda bu yolla elde edilir.



Şekil 2.14. Silika bağlı faz dolgu maddelerinin elde edilmesi. a) Yüzey silanolünün klorodimetilsilanla reaksiyonu, b) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel klorosilanla reaksiyonu, c) Yüzey silanollerinin trifonksiyonel alkoksisilanla reaksiyonu.

Bağlı faz dolguları, bağlanan katman apolar karakterde olduğu zaman ters faz olarak, bu katman polar fonksiyonlu gruplar içerdiği zaman ise normal faz olarak sınıflandırılırlar.

Silika yüzeyinde kalan reaksiyona girmemiş artık silanoller, yüzeye istenmeyen bir polarlık verirler. Bu durum, özellikle bazik maddeler çalışılırken kromatografi piklerinde kuyruklanmaya sebep olmaktadır. Bu etkiyi azaltmak için

klorometilsilanla ek bir reaksiyon yapılarak artık silanoller kapatılır. Bu işleme “end-capped” denir.

Analitik kolonun kullanım ömrünü arttırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Ek olarak, bu ön kolonlar, hareketli fazı sabit fazla doyurarak analitik kolonda sabit faz kaybını en aza indirir.

Sıvı kromatografisinde kolon sıcaklığının kontrolü önemlidir. Özellikle ters faz ve iyon değiştirme kromatografisinde sıcaklığın alıkonma zamanına ve tekrarlanabilirliğe etkisi anlamlıdır. Birçok HPLC cihazı, kolon sıcaklığını oda sıcaklığından 100-150 °C’ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ile donatılmıştır (86).

Dedektör

HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir ve iki grup altında toplanırlar:

a) Maddeye Yönelik Dedektörler

Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar;

Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared)

Elektrokimyasal dedektörler

Ayırım sonrası tepkime dedektörleri

Radyoaktivite dedektörleri

Kütle spektrometreleri

b) Çözeltiye Yönelik Dedektörler

Örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılırlar;

Refraktif indeks dedektörleri

Dielektrik sabiti dedektörleri

İletkenlik dedektörleri

Yoğunluk dedektörleri

Dedektör seçimi numunenin kimyasal yapısına ve yöntemin gereksinimlerine bağlıdır. Numune bileşenleri kromofor gruplar içeriyorsa, UV/GB dedektör bu çalışmada olduğu gibi ilk tercih olacaktır.

Yüksek duyarlılığı, geniş bir doğrusal aralığa sahip olması, sıcaklık dalgalanmalarından nispeten etkilenmemesi ve gradient elüsyon için uygun olması nedeniyle UV-GB dedektörleri en sık kullanılan dedektör tipidir. Bu dedektörler, maddenin ultraviyole veya görünür bölge ışığı absorpsiyonu temeline dayanır. Ayrıca, UV-GB dedektörleri bir ya da daha fazla dalga boyunda ölçüm yapabilme olanağı da sağlar. Değişken dalga boyunda ışın yayabilen dedektörlerde 190-400 nm aralığında döteryum lambası, 350-700 nm aralığında kuartz-iyot/tungsten lambası kullanılmaktadır.

Dizi diyot dedektör (DAD) ise bir tür gelişmiş UV/GB dedektörüdür. Optik sistemi, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir. Kromatografik piklerin saflık kontrolünde veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayininde oldukça sık kullanılır. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga

boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir (87).

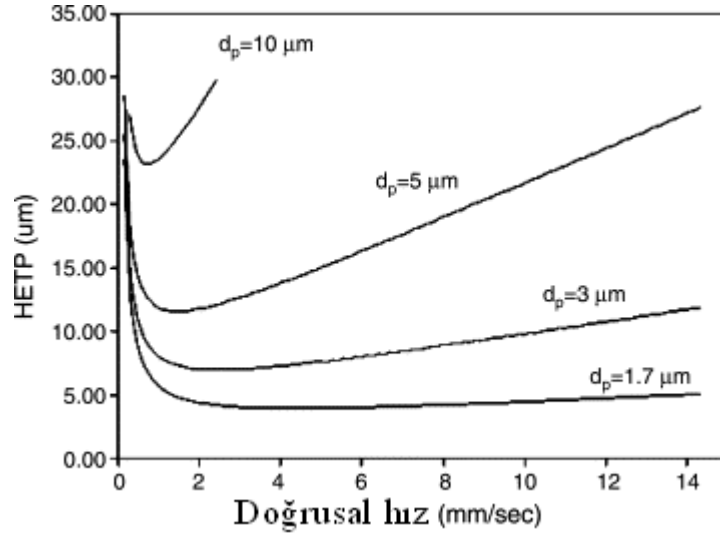
Kaydedici

Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akış hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroişlemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde tekrarlanabilirliği arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha doğru değerler elde edilmesine olanak sağlamaktadır (88).

2.4.3. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)

Ultra performanslı sıvı kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC), sıvı kromatografisinin yeni bir uygulamasıdır (89). UPLC, ilk üreticisi olan Waters firması tarafından “hız, ayırıcılık ve seçicilik” olarak tanımlanmaktadır.

Van Deemter eşitliğinden de iyi bilindiği üzere kromatografik şartların etkinliği partikül boyutunun azalması ile orantılıdır. Buna göre, bant genişlemesi, teorik plaka sayısı (HETP) ve doğrusal akış hızı (linear velocity) analitik kolonun partikül çapına bağlıdır. Daha küçük partikül çapları Van Deemter eğrisinden de görüleceği gibi HETP’nin anlamlı derecede azalmasına ve yüksek etkinliğe neden olur. 5 ve 10 μm partikül boyutları için hareketli faz akış hızının artırılmasının, verimliliğe olumsuz etkisi yoktur. Ancak HPLC sistemlerinde kullanılan küçük partikül boyutunun dezavantajı, sistemde çok yüksek geri basınca neden olmasıdır.



Şekil 2.15. Değişik partikül boyutları (10, 5, 3 ve 1.7 μm) için Van Deemter eğrisi

Mevcut HPLC sistemlerinde partikül boyutu sisteme uyumlu olmak zorundadır. HPLC sisteminde, partikül boyutunun küçülmesi, yüksek geri basınca neden olmaktadır. Bu nedenle küçük partikül çaplı kolonların kullanımında bir kısıtlama vardır. Buna rağmen HPLC sistemlerinde daha küçük partikül çapına sahip dolgu maddelerine eğilim vardır. Bir çok bilim adamı daha küçük partikül çaplı kolonlar geliştirerek kromatografik sistemlerde denemiş ancak yüksek geri basınç nedeni ile mevcut sistemlerde başarılı olunamamıştır. Acquity UPLC ilk geliştirilen UPLC sistemi olup, HPLC sistemleri 35-40 MPa basınçta çalışılırken, UPLC ile 103.5 MPa (15.000 psi) geri basınca ulaşılabilmiştir. 15.000 psi basınçta çalışabilecek özel pompalarla bu sağlanabilmektedir. Kısa sürede ve düşük hacimde numune enjeksiyonuna olanak sağlayan, sıcaklığı belli aralıklarda (4–40 °C) kontrol edilebilen otoörnekleyiciler geliştirilmiş olup UPLC sisteminin hız ve hassasiyetinde artış sağlamıştır. Dedektörün fiber optik akış hücresi 10 mm uzunlukta ve 500 nL hacme sahip olup, yüksek numuneleme oranı sağlamaktadır. Dedektör saniyede 20-40 nokta okuma yapabilmektedir. Sistem içindeki tüm hacimler en aza indirilerek analizin hızı, ayırcılığı ve hassasiyeti sabit tutulmuştur.

UPLC sisteminde ikinci nesil X-Terra'ya ait dolgu maddeleri içeren kolonlar ile çalışılmaktadır. Hibrit partiküller, etilensiloksan/ silika hibrit köprüsü (bridged

ethylsiloxane/silica hybrid, BEH) taşımakta olup, 1.7 µm partikül çapına sahiptir. Diğer X-Terra dolgu materyalleri ve mevcut kolon dolgu maddelerinden, sadece BEH yapısı yüksek basınçta ve geniş pH aralığında (1–12) kolon stabilitesini sağlamaktadır. UPLC kolonları C18, Shield RP18, C8 ve fenil kolonlardır.

UPLC'nin pratikte uygulamaları, HPLC sistemlerine göre pik ayırıcılığı, hız ve hassasiyet açısından önemli üstünlüklerinin olduğunu göstermiştir.

Farmasötik, toksikolojik ve klinik analizlerde, analizin etkinliği ve hızı sıvı kromatografisinde oldukça önemli parametreler durumuna geldi. Yüksek etkinlik ve düşük analiz süresi, düşük analiz maliyetine olanak sağlamaktadır. UPLC, sıvı kromatografisinin geleceğinde önemli rol alacaktır.

UPLC sistemi, analitik çalışmalarda sonuçların kalitesini arttıran ve bunun yanı sıra numune başına düşen zaman ve maliyeti önemli ölçüde azaltan bir sıvı kromatografi sistemidir. Sistem, geleneksel olarak kullanılan veya optimize edilmiş HPLC çalışmaları ile kıyaslandığında kromatografi çalışanlarının daha geniş doğrusal ivme, akış hızı ve basınç aralığında daha kısa sürede hassas ve yüksek ayırıcılığa sahip sonuçlar elde edilmesine imkan tanımaktadır.

UPLC teknolojisi, özellikle zaman alan ve ayırımı zor olan maddelerin analizi için dünya genelinde yer alan birçok laboratuvarı başarıyla adapte edilmiş olup sağlam, güvenilir ve tekrarlanabilir bir sistemdir. UPLC sistemi, optik veya kütle dedektörleri ile birlikte kullanılabilir.

Kolon teknolojisi:

2004 yılında UPLC sistemlerinin geliştirilmesi ile daha iyi ayırıcılık ve hassasiyetin sağlandığı hızlı kromatografik yöntemler geliştirilebilmiştir. Bu çok küçük partikül çapına sahip kolon dolgu maddeleri ile sağlanmıştır. Bir kromatografik analizin verimliliği için yüksek ayırıcılıkta analiz yapılmalıdır. Ayırıcılık iki pikin alıkonma zamanları arasındaki farkın bant genişliklerinin

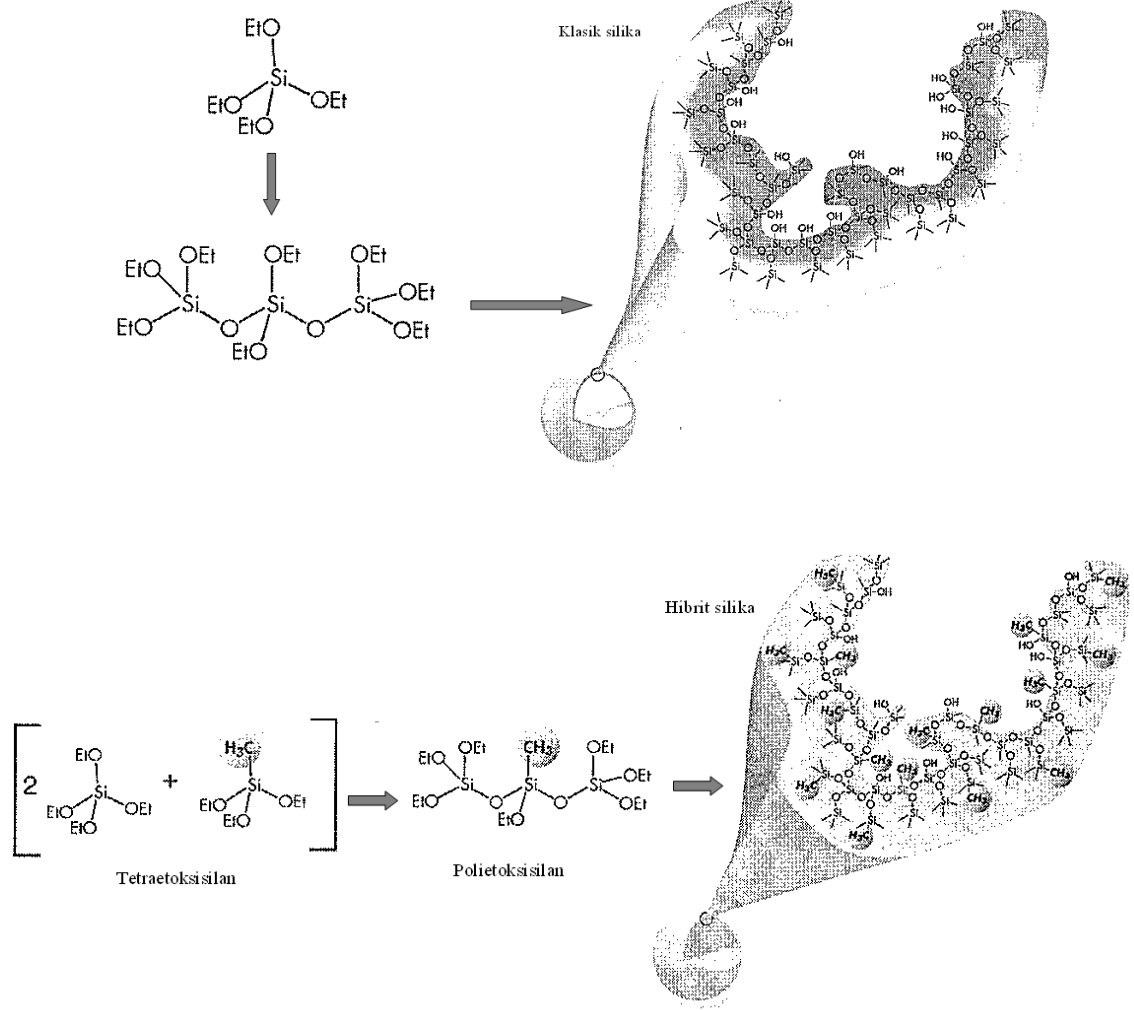
toplamına oranı ile hesaplanır. Ayırıcılığı arttırmak için kısa alıkonma zamanına sahip dar pikler elde edilmelidir. Pikin alıkonma zamanı uzadıkça bant genişliğinde de artma olur. Alıkonma zamanını azaltmak için hareketli fazdaki organik çözücü oranı, pH veya kolon değiştirilerek analizler yapılabilir.

HPLC analizlerinde daha sıklıkla 5 µm partikül çapına sahip dolgu maddeleri kullanılır. Analizi yapılacak molekülün polaritesine göre normal veya ters faz kolonlar kullanılır. Normal faz kolonlarda dolgu maddesi silikajele siyano, amino gibi gruplar bağlıdır. Normal faz kolonla analizi yapılacak molekül arasında hidrofilik etkileşim olur. İlaç analizlerinde daha sıklıkla kullanılan ters faz kolonlar ise C18, C8, C4, fenil kaplı kolonlardır ve analizi yapılacak olan molekülle hidrofobik etkileşime girer. Yüksek su oranlı hareketli faz sistemlerinde C18 ters faz kolonların ömrü daha kısadır. Ayrıca belirli pH aralığındaki çözeltilere dayanıklıdır. pH 2.0-8.0 dışındaki pH'larda çalışılmamalıdır.

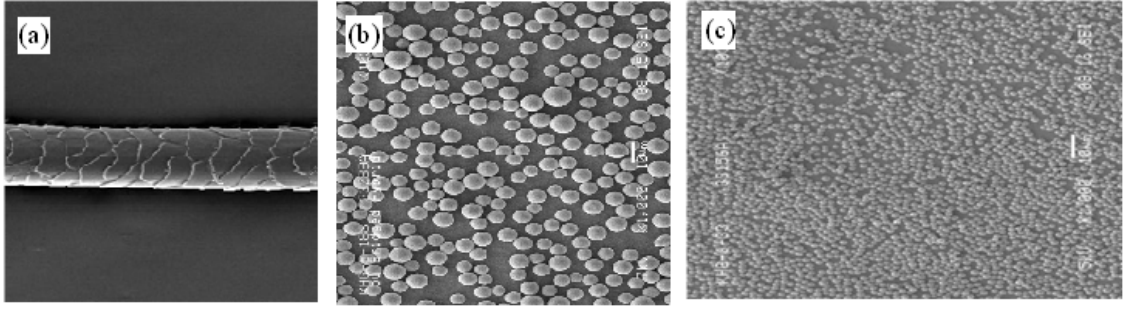
Küresel partiküller düşük geri basıncı ve uzun kolon ömrü sağlar. Büyük yüzey alanı, kompleks ve çok bileşenli numuneler için daha büyük alıkonma, kapasite ve ayırım sağlar. Büyük gözenekler daha büyük çözünmüş moleküllere izin verir. Partikülün yüzeyine daha uzun süre etki ederek daha uzun alıkonma sağlar. Daha küçük gözenek boyutu, yüksek yüzey alanı oluşturduğundan yüksek karbon bağlanma yüzdesine sahip olduğundan yüksek etkinlik sağlar. Partikül boyutu küçük kolonlarla daha yüksek etkinlik sağlanırken basınç da ciddi oranda artar.

UPLC sistemlerinde kullanılan 1.7 µm partikül çapına sahip dolgu maddeleri hibrit silika sentezi ile sağlanmıştır. Daha küçük kolon dolgu maddeleri akışa karşı bir direnç oluşturduğundan dolayı yüksek geri basınca sebep olurlar. En iyi ayırım etkinliği için optimum doğrusal akış 1.7 µm partikül çapında etilen hibrit partikülleri ile sağlanmış olup 15.000 psi basınç sağlayan pompa sistemleri geliştirilmiştir. Klasik silika bazlı kolonlar UPLC sisteminde çalışmaya elverişli değildir. UPLC sisteminde kullanılmak üzere sentezlenen ve geliştirilen bu yeni kolon dolgu materyallerinin fiziksel stabilitesi yüksek, geniş yüzey alanına sahip, poroz dolgu

materyaller olması gerekmektedir. Yeni bir etilensiloksan/silika bağı (bridged ethylsiloxane/silica, BEH) hibrit partiküllerinin sentezlenmiştir (Şekil 2.16). Kimyasal olarak dayanıklı bu materyal pH 1-12 aralığında çalışma imkanı da sağlamıştır (90, 91).



Şekil 2.16. Klasik silika ve hibrit silika sentezi



Şekil 2.17. a) 60 µm çapında insan saçı, b) 5 µm partikül çapında analitik partiküller, c) 1.7 µm UPLC kolon partikülleri

Yüksek dayanıklılığı nedeniyle, bu kolonlarla 2000’den daha çok enjeksiyon yapmak mümkün olmuştur.

2.5. Analitik Yöntem Validasyonu

USP XXIV/NF’de verilen tanıma göre bir analitik yöntemin geçerlilik testi (validasyonu), bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Bir analitik yöntemin uygulanabilirliğinin ve geçerliliğinin, laboratuvar çalışmaları ile çeşitli parametrelerin ölçülmesine analitik yöntem validasyonu denir. Analitik yöntemlerden güvenilir sonuçların elde edebilmesi için yöntemin iyi bir şekilde tanımlanmış ve geçerlilik testlerinin tam olarak yapılmış olması gerekmektedir.

Green’in tanımına göre validasyon, analitik yöntemin istenen amaca uygun olmasını sağlayan işlemlerdir (92).

EN 45000 Standart Serilerinin Yorumlama Rehberi validasyon üzerine 20 bölüm ve dokuz validasyon parametresini içerir. Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlarda kullanılan ilaçların kaydındaki teknik ihtiyaçları karşılamak için, analitik işlemlerin geçerliliği üzerine ortak bir döküman geliştirmiştir. Bu döküman sekiz validasyon parametresinin tanımını içerir (93-96).

Analitik işlemlerin validasyonunun amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilirlikte ve tekrarlanabilir sonuçların

alınmasıdır (97). Validasyon çalışmaları belirlenmiş yöntemlere göre yürütülmelidir. Bir yöntemin validasyon çalışmasına başlanırken bir protokol oluşturularak hangi parametrelerin nasıl inceleneceği ve kabul kriterlerinin ne olduğu mutlaka belirtilerek bu protokole uygun analizler yapılmalıdır. Yeni bir imalat formülü veya yeni bir çalışma yöntemi kullanıldığı zaman, bunun rutin işlemlerdeki uygunluğunun gösterilmesi zorunludur (98-100). Tanımlanmış işleyiş, belirlenmiş materyal ve araç ve gereç kullanılarak istenilen kalitede ürünün sürekli olarak üretilebileceği gösterilmelidir. Araç ve gereçlerin ve materyallerin değiştirilmesi de dahil olmak üzere, ürünün kalitesini veya üretiminin tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek tüm üretim değişikliklerinin ürünün kalitesinde değişikliğe neden olma ihtimaline karşı analizinde kullanılan yöntemin tekrar valide edilmesi gerekir (101, 102). İşleyiş ve yöntemlerin, hedeflenen sonuçlara ulaşmada yeterlilikleri kanıtlanıncaya kadar düzenli aralıklarla tekrar validasyona tabi tutulmalıdır. Tekrar validasyon, özellikle yöntem değiştirildiğinde, matriks değişikliklerinde, cihaz model ve marka değişikliklerinde yapılmalıdır (103).

2.5.1. Validasyon Parametreleri ve Kabul Kriterleri

Yöntem validasyonunda kullanılmak üzere istatistiki bilgilerden yararlanılarak metodun güvenilirlik ve geçerlilik derecesinin saptanmasında kullanılan parametrelerdir (104, 105). Test parametreleri aşağıda verilmektedir.

1. Seçicilik (Selectivity)
2. Sistem Analizi (Sistem Tekrarlanabilirliği)
3. Doğrusallık (Linearity)
4. Uygulama Aralığı (Range)
5. Doğruluk (Accuracy)
6. Kesinlik (Precision)

6.1. Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

6.2. Ortam Uygunluğu (Intermediate Precision)

6.3. Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

7. Gözlenebilirlik Sınırı (Limit of Detection, LOD)

8. Raporlama Seviyesi (Reporting Threshold)

9. Alt Tayin Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)

10. Yöntemin Sağlamlığı (Robustness)

11. Çözeltilerin Kararlılığı (Stability in Solution)

Yöntem validasyon çalışmalarında referans standart kullanılır. Bir referans standart, iyi niteliklere sahip, yüksek derecede saf bir bileşik olmalıdır. Belli bir yöntem ile belli bir güven aralığında belirsizliği tam olarak verilerek sertifikalandırılmış referans maddelere ise sertifikalı referans madde (CRM) denir.

Seçicilik

Ortamda olması beklenen komponentlerin varlığında uygulanan analitik yöntemin, etkin maddenin ve/veya ilgili bileşiklerinin spesifik olarak miktarını ölçmede gösterdiği hassasiyet derecesidir. Farmasötik preparatlar için geliştirilen analitik yöntemin seçiciliğini göstermek için aşağıdaki çözeltilerin enjeksiyonu yapılır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak herhangi bir girişimin olmadığı gösterilmelidir.

a) Sistem Uygunluk Çözeltisi: Analitik yöntemin sistem uygunluk parametreleri mutlaka tanımlanmalıdır. Pikler arası girişimin olmadığı ayırıcılık ile tanımlanmalıdır.

b) Çözücü (blank): Numune çözeltisinin hazırlandığı çözücü enjekte edilir.

c) Plasebo çözeltisi (bitmiş üründe): Bitmiş ürün içeriğinde bulunan etken madde dışındaki tüm bileşenleri içeren plasebo, numune çözeltisi hazırlanır gibi hazırlanır ve enjekte edilir.

d) Safsızlıkların etkisi: Bilinen safsızlıklar tek tek enjekte edilerek alıkonma zamanları tespit edilir. Bilinen safsızlıklar numune çözeltisine %100 derişiminde ilave edilir; safsızlıkların birbirinden, placebodan, çözücü ve aktiften olan ayırımına bakılır.

e) Numune çözeltisi

Kabul kriteri: Etken madde alıkonma zamanında placebodan gelen herhangi bir pik görülmemelidir. İlgili bileşik pikleri; etken madde, placebo ve çözücü piklerinden ayrılmalıdır.

Sistem analizi (Sistem tekrarlanabilirliği):

Standart çözeltinin uygulanan yöntemde belirtildiği sayıda enjeksiyonunun yapılması prensibine dayanır. Yöntemde herhangi birşey belirtilmediği durumlarda her bir bileşen için en az 5 enjeksiyon yapılır. Ortalama ve BSS (%) değeri hesaplanır.

Kabul kriteri: Etken madde analizi sonucunda hesaplanan BSS $\leq$ %2.0 olmalı, safsızlık analizi sonucunda hesaplanan BSS $\leq$ %5.0-15.0 olmalıdır.

Doğrusallık

Bir analitik tekniğin “doğrusallığı” alınan test sonuçlarının numune derişimine bağlı olarak gösterdiği doğrusallık derecesidir. Aşağıda belirtilen aralıklarda, uygulanan analitik yönteme göre standart çözeltiler hazırlanarak tayin edilir. En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri standart çözeltiler hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltilerin derişimine karşı ölçüm yapılan cihazın verdiği cevap grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilir. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru

denklemleri elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

Etken madde için, stok standart çözeltiden seyreltilerek veya ayrı ayrı tartım alınarak hazırlanır ve standart çözelti derişimleri %50 ve %150 arasında olacak şekilde hazırlanan en az 7 çözelti test edilir. %80 ve %120 arasında en az 5 nokta içermelidir. Derişim ve dedektör okuma değerlerine göre elde edilen regresyon katsayısı (r^2) kabul kriterine göre değerlendirilir.

$$\text{Kabul kriteri: } r^2 > 0.998$$

Bilinmeyen safsızlıklar için, etken maddeden bir stok standart çözeltisi hazırlanır. Bu stok standart çözeltisinden çözelti derişimleri LOQ ile bilinmeyen safsızlık limitinin %120'si arasında olacak şekilde en az 6 çözelti seyreltilerek test yapılır.

Bilinen safsızlıklar için herbir safsızlığı içerecek şekilde bir stok standart çözeltisi hazırlanır. Bu stok standart çözeltisinden safsızlık derişimleri LOQ ile bilinen safsızlık limitinin %120'si arasında olacak şekilde en az 6 çözelti seyreltilerek test yapılır.

Hazırlanan bu çözeltilere ait test sonuçları kayıtlandırılır. Herbir bilinen safsızlık ve bilinmeyen safsızlıklar için derişim - dedektör okuma değeri için birer doğrusallık grafiğı çizilir ve regresyon katsayısı hesaplanır.

$$\text{Kabul kriteri: } r^2 \geq 0.990$$

Uygulama aralığı

Kabul edilebilir “doğruluk”, “doğrusallık” ve “kesinlik”te hazırlanan bir yöntem ile analizi yapılan maddenin üst ve alt derişim seviyelerinin belirlenmesidir.

Aşağıda tanımlanan uygulama aralığındaki alt ve üst değerlerinden yöntemdeki standart enjeksiyon sayısı kadar enjeksiyon yapılır. Etken madde için

test derişiminin % 50 ile % 150 arası, safsızlıklar için LOQ ile limitin % 120'si aralığındadır.

Kabul kriteri: Etken madde analizi sonucunda hesaplanan BSS $\leq$ %2.0 olmalı, safsızlık analizi sonucunda hesaplanan BSS $\leq$ %5.0-15.0 olmalıdır.

Doğruluk

Doğruluk bulunan değerin gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl ve mutlak hata ile verilir.

Etken madde:

Test derişiminin %80, %100 ve %120 oranlarında üçer numune, plasebo ve etken maddenin tartılması ile hazırlanır. Hazırlanan çözeltiler analitik yöntem ile analiz edilir. Aynı aktif madde hem standart hem de numune hazırlığında kullanılır. Elde edilen sonucun % cinsinden teorik değere oranı olarak da ifade edilir.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{\text{Bulunan Miktar}}{\text{İlave Edilen Miktar}} \times 100$$

Kabul kriteri: Her bir derişim için geri kazanım, % 98.0 - % 102.0 arasında olmalıdır.

Safsızlık:

Analizi yapılan maddenin ilgili bileşik limitinin %LOQ, %100 ve %120'si derişimlerinde 3'er numune hazırlığı, herbir safsızlığın numuneye ilave edilmesi yöntemi ile hazırlanır. Safsızlık ilave edilmemiş en az bir adet numune hazırlanır ve analizi yapılır. Test sonuçları uygulanan metodun ilgili bileşiği açığa çıkarmadaki kapasitesi hakkında fikir verir.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{\text{Bulunan Miktar}}{\text{İlave Edilen Miktar}} \times 100$$

Kabul kriteri: Safsızlık sınırı $\geq \% 0.5$ ise; $\% 100$ ve $\%120$ seviyesi için geri kazanım; $\% 90.0 - \% 110.0$, LOQ seviyesi için geri kazanım; $\% 80.0 - \% 120.0$ olmalıdır. Safsızlık sınırı $< \%0.5$ ise; her bir safsızlığın her seviyesi için geri kazanım; $\% 80.0 - \%120.0$ olmalıdır.

Kesinlik

Kesinlik, deney sonucu elde edilen değerlerin birbirine olan yakınlığı ile ve bağıl standart sapma ($\% BSS$) ile verilir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların uyumunu ifade eder.

Etken madde:

Analitik tekniğin, aynı laboratuvarında, aynı analizci ve aynı cihaz ile arka arkaya altı (6) farklı numunede ($\%100$ derişiminde) çalışılması ile alınan test sonuçlarının birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Kabul kriteri: Etken madde analizi için $BSS \leq \% 2.0$

Safsızlık:

Analitik yöntem, aynı laboratuvarında, aynı analist tarafından ve aynı cihaz kullanarak uygulanır. Altı (6) farklı numune, safsızlık ilave edilmesi yöntemi ile hazırlanır. (Eklenen safsızlık miktarı $\% 100$ teorik limit derişimi kadardır) Safsızlık ilave edilmemiş numune hazırlığı da metoda göre yapılır.

Kabul kriteri: $BSS \leq \% 10.0$ ($n=6$) (LOQ değeri altındaki ilgili bileşikler değerlendirme dışında bırakılır.)

Ortam Kesinliği

Etken madde

Analitik yöntemin aynı laboratuvarıda, farklı analizci, farklı gün, farklı cihaz ve aynı tip farklı bir kolon kullanılarak kesinlik parametresinde kullanılan aynı numuneden arka arkaya altı farklı %100 derişimdeki numunenin metoda göre çalışılması ile alınan birden fazla test sonucunun birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Kabul kriteri: Etken madde için $BSS \leq \% 2.0$ ($n=6$) ve iki farklı analist arasındaki ortalama değeri arasındaki fark $\% 3.0$ 'dan fazla olmamalı.

Safsızlık:

Altı farklı numunenin aynı laboratuvarıda, farklı analizci, farklı gün, farklı cihaz ve aynı tip farklı kolon kullanılarak metoda göre enjekte edilir. Safsızlık ilave edilmemiş (unspike) numune hazırlığı da; kesinlik parametresindeki gibi yapılarak enjekte edilir.

Kabul kriteri: Safsızlık limiti $\geq \% 0.5$ ise, iki analizcinin ortalama $\%$ geri kazanım sonucu arasındaki mutlak fark $\pm \%10.0$ olmalı. Safsızlık limiti $< \% 0.5$ ise, iki analizcinin ortalama $\%$ geri kazanım sonucu arasındaki mutlak fark $\pm \% 20.0$ olmalı.

Tekrar elde edilebilirlik

Etken madde

Analitik yöntemin farklı laboratuvarıda, farklı analizci, farklı gün, farklı cihaz ve aynı tip farklı bir kolon kullanılarak kesinlik parametresinde kullanılan aynı numuneden arka arkaya altı farklı $\% 100$ derişimdeki numunenin metoda göre çalışılması ile alınan birden fazla test sonucunun birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Kabul kriteri: Etken madde için $BSS \leq \% 2.0$ (n=6) İki farklı analizci arasındaki ortalama değer arasındaki fark $\% 3.0$ 'den fazla olmayacak.

Safsızlık

Altı farklı numunenin farklı laboratuvarında, farklı analist, farklı gün, farklı cihaz ve aynı tip farklı kolon kullanılarak metoda göre enjekte edilir. Safsızlık ilave edilmemiş (unspike) numune hazırlığı (kesinlik parametresindeki gibi) ve LOQ seviyesindeki standart hazırlığı da yapılarak analiz edilir.

Kabul kriteri: Safsızlık limiti $\geq \% 0.5$ ise, iki analizcinin ortalama $\%$ geri kazanım sonucu arasındaki mutlak fark $\pm \% 10.0$ olmalı. Safsızlık limiti $< \% 0.5$ ise, iki analizcinin ortalama $\%$ geri kazanım sonucu arasındaki mutlak fark $\pm \% 20.0$ olmalı.

Gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Dedektörün numune içinde tespit edebildiği en düşük miktardır. Sinyal / Gürültü oranının 2:1 veya 3:1'e denk geldiği derişimdir.

Raporlama seviyesi

Günlük alım dozu ve ICH Guideline baz alınarak her bir safsızlık için reporting threshold belirlenir. Bu derişimdeki hazırlıktan altı enjeksiyon yapılır. Standart çözelti, ICH'te yer alan aşağıdaki limitler baz alınarak hazırlanır;

Aktif madde'ye ait maksimum günlük doz seviyesi	Raporlama
$\leq 1 \text{ g}$	$\% 0.1$
$> 1 \text{ g}$	$\% 0.05$

Kabul kriteri: $BSS \leq \% 10.0$

Alt tayin sınırı (LOQ)

Numune içinde, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte tespit edilen en düşük aktif derişimidir. Sinyal / Gürültü oranının yaklaşık 10:1'e denk geldiği derişimdir.

Kabul kriteri: $BSS \leq \%10.0$

Sağlamlık

Uygulanan analitik yöntemin çalışma ortamındaki stabilitesinin test edilmesidir. Yöntemin sağlamlığı, aşağıdaki parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak sistem uygunluk parametrelerinin geçerliliğinin kontrol edilmesi ile gösterilir.

Test edilen parametreler:

- Kolon sıcaklığı
- Dalga Boyu (± 2 nm)
- Taşıyıcı gaz akışı / mobil faz akış hızı
- Mobil faz pH'sı
- Mobil faz içindeki organik faz oranı
- Farklı kolon kullanımı (farklı lot, farklı firma)

Her parametre değişikliği için analiz metodu, sistem uygunluk çözeltisi veya standart çözeltisi (safsızlık analizlerinde ise tüm bilinen safsızlıkları içeren standart çözelti) enjeksiyonu yapılarak çalışılır.

Çözeltilerin stabilitesi

Çözelti stabilitesi oda sıcaklığı (25°C) için aynı cihazda 48 saat için uygulanır. İlgili çözeltilerinin bozunması durumunda buzdolabı sıcaklığında (4°C) da bir çalışma yapılır.

Etkin madde

Stok standardı, çalışma standardı ve numune çözeltileri için yapılır. İlk enjeksiyon en kısa zamanda yapılır. Stok standart çözeltisi saklanır. Enjeksiyon yapılacağı vakit seyreltme işlemi yapılarak analiz edilir. Aynı cihazda minimum 6 farklı zamanda enjeksiyon yapılarak tespit edilen alanlar arasındaki % fark hesaplanır. Zamana karşı alan değişim grafiği oluşturulur.

$$\% \text{ Fark} = \frac{\text{X.zaman alanı-ilk zaman alanı} \times 100}{\text{ilk zaman alanı}}$$

Kabul kriteri: % Fark $\leq$ %5.0

2.5.2. Tekrar validasyon kriterleri

Bir metot validasyonun tekrar valide edilmesini zorunlu kılan değişiklikler Tablo 2.1 – 2.3’de listelenmiştir;

Tablo 2.1. Ürün formül değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri

Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri	Ürün Değişimi		
	Doz Değişimi	Yeni Yardımcı Madde	Yardımcı Madde Miktarı
Seçicilik	-	+	-
Sistem Analizi	+	+	+
Doğrusallık	+	-	-
Uygulama Aralığı	+	-	-
Doğruluk	+	+	+
Tekrarlanabilirlik	+	+	+
Ortam Uygunluğu	-	-	-

Alt Tayin Sınırı	-	-	-
Ölçülebilirlik Sınırı	-	-	-
Raporlama Seviyesi	-	-	-
Sağlamlık	-	-	-
Çözelti Stabilesi	+	+	+

Tablo 2.2. Analitik yöntemin değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri

Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri	Yöntem Değişikliği		
	Numune Hazırlığı	Sistem Parça Değişikliği*	Kromatografik Şart Değişikliği
Seçicilik	-	+	+
Sistem Analizi	+	+	+
Doğrusallık	-	+	+
Uygulama Aralığı	-	+	+
Doğruluk	+	+	+
Tekrarlanabilirlik	+	+	+
Ortam Uygunluğu	+	+	+
Alt Tayin Sınırı	-	+	+
Ölçülebilirlik Sınırı	-	+	+
Raporlama seviyesi	-	+	+
Sağlamlık	-	+	+
Çözelti Stabilesi	+	-	-

*: Dedektör değişimi vb.

Tablo 2.3. Aktif veya hammadde tedarikçisi değişikliği halinde tekrar validasyon parametreleri

Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri	Yeni Hammadde Kaynağı veya Sentezi	
	Etken madde	Safsızlıklar
Seçicilik	+	+
Sistem Analizi	+	+
Doğrusallık	-	+
Uygulama Aralığı	-	+
Doğruluk	-	+
Tekrarlanabilirlik	-	+
Ortam Uygunluğu	-	+
Alt Tayin Sınırı	-	+
Ölçülebilirlik Sınırı	-	+
Raporlama seviyesi	-	+
Sağlamlık	-	+
Çözelti Stabilitesi	+	+

Valide bir yöntemin doğrulanması: Valide edilmiş bir yöntemin geçerliliğinin başka bir laboratuvar da kanıtlanmasıdır. Yöntem doğrulanması çalışmasında, yöntemi ilk geliştiren ve valide eden laboratuvar tarafından hangi validasyon parametrelerinin çalışılması gerektiği bildirilmediği durumlarda uygulanması gereken validasyon parametreleri: seçicilik, doğrusallık, LOQ (sadece safsızlık yöntemleri için gereklidir), doğruluk ve kesinlik.

2.5.3. Kontrol Kartları

Kontrol kartları sistemin kalitesini izlemek için rutin olarak kullanılır. İzlenecek işlem karakteristiklerine göre iki temel tipte kontrol kartı vardır. İlki, tek düze kontrol kartı olarak da adlandırılan tek bir karakteristiği gösteren grafikler,

ikincisi ise çoklu değişken kontrol kartı olarak da adlandırılan birden fazla karakteristiği özetleyen veya gösteren istatistiksel grafiklerdir (106).

Kontrol kartları, analiz edilen kalite kontrol (QC) numunelerinin ortalama miktarları ve SS değerleri hesaplanması ile oluşturulur. SS değerlerinin ± 2 ve ± 3 katı kullanılarak uyarı (ortalama $\pm 2SS$) ve kontrol sınırları (ortalama $\pm 3SS$) saptanır (107, 108). Kontrol kartlarında sistem cevapları her bir QC için noktalar halinde gösterilir. Kontrol kartında tüm QC cevaplarının ortalama değerleri çizgi ile belirginleştirilir, bu çizginin üzerinde ve altında $\pm 2SS$ ve $\pm 3SS$ çizgileri yer alır. QC analizi ile elde edilen değerlerden herhangi birinin kontrol kartları sınırı dışına çıkması analizin durdurulmasını gerektirir. Bu değerlerin uyarı sınırı ve kontrol sınırı arasında kalması analiz işleminin durdurulmasına gerek olmadığını ancak sonuçların kritik bölgede olduğunu ifade eder. Bu durumda sistemdeki analiz şartları kontrol edilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	J. T. Baker
Asetonitril	J. T. Baker
Potasyum dihidrojen fosfat	J. T. Baker
Etilasetat	J. T. Baker
Metanol	J. T. Baker
Glasiyel asetik asit	J. T. Baker
Sodyum asetat	J. T. Baker
Sodyum bisülfid	J. T. Baker
Ortofosforik asit	J.T. Baker
Hidroklorik asit	J. T. Baker
Klaritromisin standartı	Teva
Klaritromisin safsızlık 1 standartı (6,11-di-O-metileritromisin)	USP reference standards
Klaritromisin safsızlık 2 standartı (6-O-metil-15-noreritromisin)	USP reference standards
Azitromisin standartı	Dr. Reddy's laboratories
Azitromisin safsızlık 1 standartı (6-demetil azitromisin)	USP reference standards
Azitromisin safsızlık 2 standartı (3-deoksi azitromisin)	USP reference standards
Spiramisin standartı	Dr. Reddy's laboratories
Spiramisin safsızlık 1 standartı (Neospiramisin I)	Sigma-Aldrich
Spiramisin safsızlık 2 standartı (Neospiramisin II)	Sigma-Aldrich
Spiramisin safsızlık 3 standartı (Neospiramisin III)	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Klacid® 500 mg Film Tablet	Abbott
Klaromin® 500 mg Film Tablet	Zentiva Sağlık Ürünleri
Zitromax® Film Kaplı Tablet	Pfizer
Azro® Film Tablet	Zentiva Sağlık Ürünleri
Rovamycine® Film Tablet	Eczacıbaşı İlaç San.
Rovagyl® Film Tablet	Medifarma

3.3. Kullanılan Cihazlar

UPLC	: Waters KGaA (Acquity UPLC)
HPLC	: Shimadzu Scientific Instruments
Vakum pompası (VSK için)	: Millipore
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph
Etüv	: Elektro-mag
HPLC Sistemi	: Shimadzu SCL-10 AVP
Dizi diyot dedektör	: Shimadzu SPD-M 10 AVP
Peristaltik pompa	: Büchi B-688 ve Lewa M5
Saf su sistemi	: Barnstead NanoPure Diamond ve Bandelin, Sonorex, RK514 BH
Vorteks karıştırıcı	: IDL RS2
Hassas terazi	: Mettler Toledo AG 285
Ultrasonik banyo	: Transsonic 570
pH metre	: Mettler Toledo MA 235
Santrifüj	: Hettich, EBA 20
Terazi	: Shimadzu Libror EB-330H
Otomatik mikropipetler	: Microlit 10-100 µl ve 100-1000 µl
Derin donduruculu buzdolabı	: Bosch

3.4. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

HPLC kolonu	: Phenomex, Inertsil C18, 250 ve 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m
HPLC kolonu	: Agilent, Zorbax Rx C18 250 ve 150 mm x 4.6 mm i.ç., 5 μ m
HPLC kolonu	: Varian, ACE C18 250 ve 150 mm x 4.6 mm i.ç., 5 μ m
UPLC kolonu	: Waters, Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1.7 μ m
Filtre	: 0.20 μ m Machery Nagel Polyester filtre
Vial	: Agilent, cam, 1 mL
Balon joje	: İldam
Balon	: İldam
Cam santrifüj tüpü	: İldam
Beher	: İldam
Spatül	: Metal
Tartım kabı	: Cam
Otomatik pipet ucu	: 100, 500 ve 1000 μ L

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması;

5 mM Potasyum dihidrojenfosfat çözeltisi: 0.68 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ($M_A=136.09$ g/mol) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra 1 L'ye su ile tamamlanmıştır.

5 mM Disodyum hidrojenfosfat çözeltisi: 0.89 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ($M_A=177.99$ g/mol) tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra 1 L'ye su ile tamamlanmıştır.

10 mM Asetat tamponu: 0.680 g sodyum asetat.3H₂O bir miktar saf su içerisinde çözülür ve su eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlanır. Asetat tamponunun pH değeri 1 M glasiyel asetik asit ile ayarlanır.

1 M Glasiyel asetik asit çözeltisi: Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 5.7 mL derişik (% 99.5'lik) glasiyel asetik asit çözeltisi eklenmiş ve su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M Hidroklorik asit çözeltisi: Balon joje içerisine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8.5 mL derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenmiş ve su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M Sodyum hidroksit çözeltisi: 4 g sodyum hidroksit, bir miktar suda çözündükten sonra 100 mL'ye su ile tamamlanır.

% 10'luk sodyum bisülfıt çözeltisi: Derişik (% 40) sodyum bisülfıt çözeltisinden 25 ml alınır 100 mL'ye su ile tamamlanır.

3.6. Klaritromisin için Analiz Yöntemleri

3.6.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Numune çözeltisi: 10 tablet havanda toz haline getirilir, bir tablet ağırlığı olan 1055 mg toz tartılır (500 mg Klaritromisin'e eşdeğer) 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jojede hacmine hareketli fazla tamamlanır ve 50 ppm derişimde Klaritromisin içeren numune çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek viale alınır.

Stok Ksaf1 çözeltisi: 5 mg Ksaf1 standartı tartılır ve 100 mL'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (kabul limiti % 0.5'dir).

Stok Ksaf2 çözeltisi: 5 mg Ksaf2 standartı tartılır ve 100 mL'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (kabul limiti % 0.25'dir).

% 120'lik standart çözelti: 6 mg Klaritromisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 600 µL stok Ksaf1 çözeltisinden, 300 µL stok Ksaf2 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 100'lük standart çözelti: 5 mg Klaritromisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 500 µL stok Ksaf1 çözeltisinden, 250 µL stok Ksaf2 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 80'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 8 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 50'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 30'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 3 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 20'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 2 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 10'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 5'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 100 mL'lik balon jojede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

% 1'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 100 mL'lik balon jojede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

Plasebo ve plasebo çözeltisinin hazırlanması: 368 mg laktoz granül, 63 mg prejelatinize nişasta, 100 mg Avicel PH 102, 1 mg magnezyum stearat, 5 mg kinolin sarısı, 8 mg sorbik asit, 5 mg titanyum dioksit ve 5 mg vanilin içeren plasebo, 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir, 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jojede hacmine hareketli fazla tamamlanarak plasebo çözeltisi hazırlanır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek vialle alınır.

3.6.2. Kromatografik Koşullar

Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizinde hareketli faz olarak 5 mM fosfat tamponu (pH = 3.0) ve metanolün 70 : 30 oranında karıştırılması ile elde edilen hareketli faz 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden geçirildikten ve ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır. HPLC sisteminde 1.2 mL/dak, UPLC sisteminde 0.3 mL/dak akış hızında kullanılmıştır. HPLC sisteminde 20 µL, UPLC sisteminde ise 5 µL enjeksiyon hacminde analizler gerçekleştirilmiştir.

3.7. Azitromisin için Analiz Yöntemleri

3.7.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Numune çözeltisi: 10 tablet havanda toz haline getirilir, bir tablet ağırlığı olan 1127 mg toz tartılır (500 mg Azitromisine eşdeğer) 100 mL'lik balon jojeye alınır ve

70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jodede hacmine hareketli fazla tamamlanır ve 50 ppm derişimde Azitromisin içeren numune çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

Stok Asaf1 çözeltisi: 5 mg Asaf1 standartı tartılır ve 100 ml'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (Kabul limiti % 0.5'dir.)

Stok Asaf2 çözeltisi: 5 mg Asaf2 standartı tartılır ve 100 ml'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (Kabul limiti % 0.5'dir.)

% 120'lik standart çözelti: 6 mg Azitromisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 600 µL stok Asaf1 çözeltisinden, 600 µL stok Asaf2 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 100'lük standart çözelti: 5 mg Azitromisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 500 µL stok Asaf1 çözeltisinden, 500 µL stok Asaf2 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 80'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 8 mL alınır ve 10 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 50'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 10 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 30'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 3 mL alınır ve 10 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 20'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 2 mL alınır ve 10 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 10'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 10 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 5'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 100 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 1'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 100 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

Plasebo ve plasebo çözeltisinin hazırlanması: 320 mg laktoz monohidrat, 85 mg mikrokristalin selüloz PH101, 80 mg kollidon, 35 mg povidon K30, 10 mg magnezyum stearat, 60 mg prejelatinize edilmiş mısır nişastası, 30 mg talk, 10 mg metil paraben, 15 mg Opadry II, 5 mg titanyum dioksit ve içeren plasebo, 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir, 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jodede hacmine hareketli fazla tamamlanarak plasebo çözeltisi hazırlanır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

3.7.2. Kromatografik Koşullar

Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizinde hareketli faz olarak 5 mM fosfat tamponu (pH = 6.0) ve asetonitrilin 65 : 35 oranında karıştırılması ile elde edilen hareketli faz 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden geçirildikten ve ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır. HPLC sisteminde 1.0 mL/dak, UPLC sisteminde 0.4 mL/dak akış hızında, kullanılmıştır. HPLC sisteminde 20 µL, UPLC sisteminde ise 5 µL enjeksiyon hacminde analizler gerçekleştirilmiştir.

3.8. Spiramisin için Analiz Yöntemleri

3.8.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

Numune çözeltisi: 10 tablet havanda toz haline getirilir, bir tablet ağırlığı olan 1240 mg toz tartılır (690 mg Spiramisin'e eşdeğer) 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jodede hacmine hareketli fazla tamamlanmış ve 69 ppm derişimde Spiramisin içeren numune çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden süzülerek viale alınır.

Stok Ssaf1 çözeltisi: 6.9 mg Ssaf1 standartı tartılır ve 100 mL'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (kabul limiti % 0.5'dir).

Stok Ssaf2 çözeltisi: 6.9 mg Ssaf2 standartı tartılır ve 100 mL'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (kabul limiti % 0.5'dir).

Stok Ssaf3 çözeltisi: 6.9 mg Asaf3 standartı tartılır ve 100 mL'lik balonjojede, hareketli faz ile çözündürülür ve hacmine hareketli faz ile tamamlanır (kabul limiti % 0.25'dir).

% 120'lik standart çözelti: 8.3 mg Spiramisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 600 µL stok Ssaf1, 600 µL stok Ssaf2 ve 300 µL stok Ssaf3 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 100'lük standart çözelti: 6,9 mg Spiramisin standartı tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek etken maddenin çözünmesi sağlanır. 500 µL stok Ssaf1, 500 µL stok Ssaf2 ve 250 µL stok Ssaf3 çözeltisinden eklenerek 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır. Elde edilen berrak çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 80'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 8 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 50'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 30'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 3 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 20'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 2 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 10'luk standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 10 mL'lik balon jöjede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 5'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 5 mL alınır ve 100 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

% 1'lik standart çözelti: Hazırlanan % 100'lük çözeltiden 1 mL alınır ve 100 mL'lik balon jodede hareketli fazla tamamlanır, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

Plasebo ve plasebo çözeltisinin hazırlanması: 368 mg laktoz granül, 10 mg povidon K30, 65 mg mikrokristalin selüloz, 10 mg poloksamer 188, 50 mg krospovidon, 30 mg hidroksipropil selüloz, 3 mg kalsiyum stearat, 3 mg talk ve 5 mg titanyum dioksit içeren plasebo, 100 mL'lik balon jojeye alınır ve 70 mL hareketli faz ile ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir, 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanır ve çalkalanır. Bir süre bekletilir ve çözünmeyen maddelerin çökmesi beklenir. Çözeltinin üst kısmından 1 mL çözelti alınarak 100 mL'lik balon jodede hacmine hareketli fazla tamamlanarak plasebo çözeltisi hazırlanır. Elde edilen bulanık çözelti, 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtrede süzülerek viale alınır.

3.8.2. Kromatografik Koşullar

Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizinde hareketli faz olarak 10 mM asetat tamponu (pH = 2.5) ve asetonitrilin 70 : 30 oranında karıştırılması ile elde edilen hareketli faz 0.20 µm Machery Nagel Polyester filtreden geçirildikten ve ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kullanılmıştır. HPLC sisteminde 1.2 mL/dak, UPLC sisteminde 0.3 mL/dak akış hızında kullanılmıştır. HPLC sisteminde 20 µL, UPLC sisteminde ise 5 µL enjeksiyon hacminde analizler gerçekleştirilmiştir.

3.9. Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen HPLC ve UPLC yöntemlerinin validasyonu ICH (Text on Validation of Analytical Procedures) ve USP XXIV (2nd supplement: Validation of Compendial Methods) esas alınarak yapılmıştır.

Sistem uygunluk parametrelerini belirlemek amacı ile Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin % 100'lük standart çözeltileri ile bu etken maddelere ait safsızlık standart çözeltileri ve farmasötik preparata ait numune çözeltisi HPLC ve UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Pikler arası en ideal ayırıcılık tespit edilerek sistem uygunluk parametresi olarak belirlenmiştir. Ayrıca etken madde standartları 5 kez enjekte edilerek pik alanlarının bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

3.9.1. Seçicilik

Etken maddeler standart çözeltileri, etken maddelere ait safsızlık standart çözeltileri, farmasötik preparat numune çözeltileri, plasebo çözeltisi ve çözücü HPLC ve UPLC sistemlerine enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve herhangi bir girişim olup olmadığı ve pikler arası ayırıcılık belirlenmiştir.

3.9.2. Sistem Tekrarlanabilirliği

Etken madde ve safsızlıklarına ait standart çözeltiler, HPLC ve UPLC sistemlerine 10 kez enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanlarının bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

3.9.3. Doğrusallık ve Uygulama Aralığı

Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin % 1 - % 120'lik standart çözeltilerin, HPLC ve UPLC ile analizi yapılarak, elde edilen pik alanları derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Regresyon analizi yapılmıştır. Yöntemlerin doğrusallığı kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle kontrol edilmiştir. Ayrıca yöntem doğrusallığının kontrolü için; olması gereken derişimlere karşı kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimler grafiğe geçirilmiştir.

3.9.4. Doğruluk

Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve safsızlıkları için geri kazanım testi yapılmıştır. Etken maddenin teorik miktarına göre % 80, % 100, % 120 oranında

etken madde ve safsızlıkları plasebo çözeltisine eklenmiştir. Her bir derişim için 3'er numune hazırlanmıştır.

3.9.5. Kesinlik

% 80, % 100, % 120 oranında etken madde ve safsızlıkları ayrı ayrı içeren 6 çözelti aynı günde ve 3 farklı günde yenilenerek analiz edilmiş ve BSS değerleri hesaplanmıştır.

Ayrıca kesinlik çalışmaları, farklı bir günde, farklı cihazda, farklı analizciyle, aynı derişimlerde etken madde ve safsızlıklarını içeren 6 ayrı çözeltinin HPLC ve UPLC sistemlerine enjeksiyonu ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.9.6. Gözlenebilirlik Sınırı

Sinyal / gürültü oranının 3:1 olduğu derişim olarak belirlenmiştir.

3.9.7. Raporlama Seviyesi

Günlük alım dozu ve ICH kılavuzları baz alınarak raporlama seviyesi belirlenir.

Aktif madde'ye ait maksimum günlük doz seviyesi	Raporlama %
$\leq 1 \text{ g}$	0.1
$> 1 \text{ g}$	% 0.05

Klaritromisin için günlük alım dozu 2 kez 500 mg olup ICH kılavuzuna göre 1000 mg ve daha az olduğundan raporlama seviyesi olarak % 0.1'lik standart çözeltisi hazırlanmış ve 6 kez enjekte edilmiş, BSS değeri hesaplanmıştır.

Azitromisin için günlük alım dozu 500 mg olup ICH kılavuzuna göre 1000 mg ve daha az olduğundan raporlama seviyesi olarak % 0.1'lik standart çözeltisi hazırlanmış ve 6 kez enjekte edilmiş, BSS değeri hesaplanmıştır.

Spiramisin için günlük alım dozu 1 kez 690 mg olup ICH kılavuzuna göre 1000 mg'dan az olduğundan raporlama seviyesi olarak % 0.1'lik standart çözeltisi hazırlanmış ve 6 kez enjekte edilmiş, BSS değeri hesaplanmıştır.

3.9.8. Alt Tayin Sınırı

Sinyal / gürültü oranının 10:1 olduğu derişim olarak belirlenmiştir.

3.9.9. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için etken madde ve ilgili safsızlıkları içeren % 100'lük standart çözeltiler hazırlanmış olup değişen HPLC ve UPLC koşullarında analiz edilmiştir. Yöntemde kullanılan hareketli fazdaki tampon oranı, hareketli faz pH'sı, hareketli faz akış hızı ve dedektör dalga boyu değiştirilerek elde edilen piklerin alıkonma zamanları, asimetri oranı, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılığı karşılaştırılmıştır.

3.9.10. Çözeltilerin Kararlılığı

Plasebo çözeltisi üzerine her etken madde ve ilgili safsızlıkları ilave edilerek hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında (+ 25°C) 48 saat boyunca tutulmuştur. Her çözelti, 0., 6., 12., 18., 24., 36., 42. ve 48. saatler sonunda analiz edilerek elde edilen sonuçlar, taze hazırlanmış çözelti sonuçları ile karşılaştırılmış, zamanla nasıl değiştiği belirlenmiştir. 48 saat sonunda oda sıcaklığında kararlı olmayan çözeltiler için +4 °C'de kararlılık çalışması tekrarlanmıştır.

3.9.11. Kalite Kontrol Kartları

Kalite kontrol kartları, % 100'lük derişimde etken madde ve safsızlık içeren plasebo çözeltilerinin analiz edilmesi ile elde edilen ortalama etken madde miktarı ve SS değerleri hesaplanarak oluşturulmuştur. Ortalama $\pm 2SS$ uyarı, ortalama $\pm 3SS$ kontrol sınırı olarak saptanmıştır.

3.10. Stres Testi Çalışmaları

Ayrı ayrı % 100 derişimde klaritromisin, azitromisin ve spiramisin içeren plasebo havanda ince toz haline getirilerek belirli stres koşullarına, yüksek sıcaklık, ultraviyole radyasyonu, oksidasyon koşulları, yüksek sıcaklıkta güçlü asidik ve alkali koşullara, maruz bırakılmıştır. Plasebo da aynı koşullara maruz bırakılarak yardımcı maddelere ait bozunma ürünleri ayrı ayrı tespit edilmiştir.

Bu çalışma, 8 ayrı stres koşulu altında yapılmıştır.

1. Ortam Koşullarında Bozundurma

1 g numune 24 saat boyunca açık havada atmosfere maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda 0.5 gram numune 100 mL hareketli fazda çözündürülmüştür.

2. Güneş Işığında Bozundurma

1 g numune 24 saat boyunca güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda 0.5 gram numune 100 mL hareketli fazda çözündürülmüştür.

3. Fotolizle Bozundurma Çalışması

1 g numune 24 saat boyunca UV ışığına maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda 0.5 gram numune 100 mL hareketli fazda çözündürülmüştür.

4. Sıcaklık Etkisiyle Bozundurma Çalışması

1 g numune 24 saat boyunca otoklavda 105°C’de sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda 0.5 gram numune 100 mL hareketli fazda çözündürülmüştür.

5. Asit Hidrolizi

Bir cam beherin içinde 0.5 gram numuneye 10 mL 1 M HCl ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 30 dak boyunca ısıtılıp soğutulmuş ve hacim 100 mL’ye hareketli fazla tamamlanmıştır.

6. Baz Hidroliz

Bir cam beherin içinde 0.5 gram numuneye 10 mL 1M NaOH ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 30 dak boyunca ısıtılıp soğutulmuş ve hacim 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanmıştır.

7. Oksidasyon

Bir cam beherin içinde 0.5 gram numuneye 10 mL % 30 H₂O₂ ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 30 dakika boyunca ısıtılıp soğutulmuş ve hacim 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanmıştır.

8. İndirgenme

Bir cam beherin içinde 0.5 gram numuneye 10 mL % 10 sodyum bisülfid ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 30 dakika boyunca ısıtılıp soğutulmuş ve hacim 100 mL'ye hareketli fazla tamamlanmıştır.

3.11. İstatistiksel Hesaplamalar

Validasyon çalışmalarında elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve hesaplanması Microsoft Excel 2007 ve SPSS 11.5 paket programları ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klaritromisin için Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları

4.1.1. Yöntemlerin Optimizasyonu

Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizleri için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH'sı ve akış hızının, Klaritromisin ve safsızlıklarının kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kromatografik sistemin test edilen kromatografik koşullardaki t_0 değerinin saptanması için metanol sisteme enjekte edilmiş ve metanolün alıkonma zamanı t_0 değeri olarak alınmıştır.

Dedektör seçimi

Klaritromisin, yüksek absorpsiyon gösteren bir molekül olduğundan dizi diyot dedektör ile çalışılmıştır. Maksimum absorpsiyon verdiği 219 nm dedeksiyon dalga boyu olarak seçilmiştir.

Sabit fazın belirlenmesi

Klaritromisin ve safsızlıkları apolar yapıda moleküller olduğundan ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan C8 ve C18 HPLC kolonları kullanılmış ve en iyi kromatografik parametreler C18 kolon ile elde edilmiştir. 150 ve 250 mm'lik kolonlar denenmiş ve 250 mm'lik kolonla daha iyi bir ayırıcılık elde edilmiştir. Aynı özellikte farklı marka kolonlar (Zorbax, ACE, Phenomenex) ile çalışmalar yapılmış ve en iyi ayırımın sağlandığı 5µm partikül çapında dolgu maddesi içeren ACE C18, 250 x 4.6 mm kolon seçilmiştir. UPLC sisteminde yapılan analizler için 1.7 µm partikül çapında dolgu maddesi içeren Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm kolon kullanılmıştır.

Hareketli Fazın Belirlenmesi

Kullanılacak hareketli fazın bileşimindeki tampon çözelti, pH'sı, derişimi, organik çözücü ve oranı değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Tampon türü - organik çözücünün belirlenmesi

pH'sı 3,5 olan fosfat, sitrat ve asetat tamponlarına ayrı ayrı değişik oranlarda asetonitril veya metanol eklenerek hareketli fazlar hazırlanmıştır. Sitrat ve asetat tamponlarının asetonitril (60:40) ve metanol (60:40) ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma ve girişim gözlenmiştir. Sodyum ve potasyum dihidrojen fosfat tamponlarının metanol ile 60:40 oranında hazırlandığı hareketli fazın kullanıldığı sistemlerde HPLC sisteminde benzer kromatografik parametreler elde edilse de UPLC sisteminde potasyum dihidrojen fosfat tamponu ile en iyi ayırım, simetrik pikler ve yüksek pik alanları elde edilmiştir. Farklı oranlarda metanol ile hazırlanan hareketli faz ile elde edilen piklere ait kromatografik parametreler Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi

% MeOH		20	25	30	35	40
K	t_R (dak)	11.78	6.02	4.14	4.07	3.81
	k'	10.43	8.31	6.69	6.11	5.09
	R_(K-Ksaf1)	2.07	1.88	1.73	1.34	0.92
	N	6065	5644	4901	2888	2760
	PAs	1.47	1.21	1.10	0.87	0.77
Ksaf1	t_R (dak)	13.02	8.32	5.80	4.41	3.94
	k'	11.64	9.50	7.15	6.81	4.36
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	3.66	2.95	2.43	2.06	1.74
	N	8231	7098	6112	4408	3841
	PAs	1.41	1.33	0.96	0.95	0.90
Ksaf2	t_R (dak)	15.57	10.05	7.80	6.02	5.42
	k'	14.11	11.52	7.98	7.01	6.58
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	3.66	2.95	2.43	2.06	1.74
	N	8011	7852	5998	5032	3002
	PAs	1.32	1.28	0.98	0.92	0.86

MeOH: Metanol, t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: 5 mM pH 3.0 fosfat tamponu / Metanol, akış hızı: 1 mL dak⁻¹, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Tampon derişiminin belirlenmesi

Fosfat tamponu derişiminin analize etkisinin araştırılması için pH'sı 3.0 olan 5 mM, 10 mM ve 15 mM fosfat tamponu ve metanol (70:30, h/h) içeren çözeltiler hareketli faz olarak denenmiştir. Bu koşullarda elde edilen kromatografik bulgular Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

Tampon derişimi		5 mM	10 mM	15 mM
K	t_R (dak)	4.17	4.21	4.47
	k'	6.02	6.32	6.81
	R_(K-Ksaf1)	1.71	1.65	1.59
	N	4961	5006	5118
	PAs	1.08	1.21	1.37
Ksaf1	t_R (dak)	5.83	5.90	5.93
	k'	6.15	6.54	6.78
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	2.43	2.48	2.51
	N	6112	6189	6209
	PAs	0.96	1.18	1.31
Ksaf2	t_R (dak)	7.60	7.72	7.86
	k'	7.88	7.98	8.11
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	2.43	2.48	2.51
	N	5998	6088	6162
	PAs	0.98	1.21	1.35

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: pH 3.0 fosfat tamponu / Metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Tampon pH'sının belirlenmesi

Hareketli faz pH'sının en uygun olduğu değerin saptanması amacıyla fosfat tamponunun pH değeri 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 olarak değiştirilmiştir. pH değerinin kromatografik parametrelere etkisi Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi

pH		2.5	3.0	3.5	4.0
K	t_R (dak)	4.01	4.24	5.33	5.67
	k'	6.17	6.81	7.20	7.89
	R_s(K-Ksaf1)	1.33	1.70	1.89	1.92
	N	5112	5901	6338	6582
	PAs	0.74	1.03	1.20	1.36
Ksaf1	t_R (dak)	5.12	5.80	6.26	7.81
	k'	6.99	7.15	8.02	9.34
	R_s(Ksaf1-Ksaf2)	1.98	2.43	2.67	2.88
	N	5802	6112	6585	6744
	PAs	0.76	0.96	1.29	1.31
Ksaf2	t_R (dak)	7.01	7.80	8.68	9.11
	k'	7.22	7.98	8.45	8.71
	R_s(Ksaf2-Ksaf1)	1.98	2.43	2.67	2.88
	N	6307	6998	7269	7854
	PAs	0.71	0.98	1.13	1.28

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: 5 mM fosfat tamponu / Metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Buna göre en iyi ayırımın sağlandığı hareketli faz pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol, (70 : 30, h/h) olarak belirlenmiştir.

HPLC ve UPLC sisteminde aynı hareketli faz kullanılmıştır.

Akış hızının belirlenmesi

HPLC sisteminde 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 mL/dak akış hızlarında, UPLC sisteminde ise 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mL/dak akış hızlarında analizler yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

		HPLC sistemi				UPLC sistemi			
Akış Hızı (mL/dak)		0.8	1.0	1.2	1.4	0.2	0.3	0.4	0.5
K	t_R (dak)	2.90	3.58	4.17	4.67	1.88	2.07	2.56	2.79
	k'	3.65	5.71	6.02	7.13	6.56	8.32	11.32	14.28
	R_s(K-Ksaf1)	1.04	1.56	1.71	1.73	9.84	11.63	12.33	13.02
	N	4208	4318	4961	5103	9022	8932	8709	8677
	PAs	0.89	0.91	1.08	1.21	1.08	1.01	1.11	1.06
Ksaf1	t_R (dak)	4.55	5.01	5.83	6.32	0.41	0.55	0.59	0.64
	k'	6.05	7.81	6.95	8.44	4.32	6.67	8.54	9.02
	R_s(Ksaf1-Ksaf2)	1.21	1.79	2.43	2.61	3.22	4.30	4.65	4.89
	N	5844	6008	6112	6238	9563	9430	9382	9271
	PAs	0.82	0.91	0.96	1.08	1.08	1.01	1.06	1.06
Ksaf2	t_R (dak)	6.61	7.04	7.80	8.32	0.71	0.84	0.92	1.13
	k'	6.89	7.45	7.98	8.61	5.34	7.41	9.01	12.19
	R_s(Ksaf2-Ksaf1)	1.67	2.01	2.43	2.56	3.22	4.30	4.65	4.89
	N	4963	5356	5798	6201	9830	9761	9308	9116
	PAs	0.86	0.91	0.98	1.06	1.10	1.00	0.98	0.98

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / Metanol (70:30, h/h), Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Enjeksiyon hacmi değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl değiştiği incelenmiş ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi

		HPLC					UPLC		
Enjeksiyon hacmi (μ L)		5	10	20	40	3	5	7	9
K	t_R (dak)	4.11	4.15	4.17	4.21	2.06	2.07	2.09	2.13
	k'	6.21	6.14	6.02	5.97	8.26	8.32	8.09	7.84
	$R_{(K-Ksaf1)}$	1.66	1.67	1.71	1.74	11.08	11.63	12.08	12.23
	N	4851	4904	4961	5228	8733	8932	9103	9388
	PAs	0.97	1.01	1.03	1.06	0.98	1.01	1.01	1.04
Ksaf1	t_R (dak)	5.77	5.81	5.83	5.85	0.54	0.55	0.57	0.57
	k'	7.18	7.03	6.95	6.88	6.73	6.67	6.48	6.31
	$R_{(Ksaf1-Ksaf2)}$	2.19	2.30	2.43	2.55	4.17	4.30	4.44	4.61
	N	5929	6012	6112	6310	9371	9430	9501	9592
	PAs	0.95	0.96	0.97	1.05	0.97	1.01	1.04	1.05
Ksaf2	t_R (dak)	7.57	7.57	7.60	7.61	0.83	0.84	0.84	0.86
	k'	7.95	7.91	7.88	7.83	7.50	7.41	7.38	7.33
	$R_{(Ksaf2-Ksaf1)}$	2.37	2.40	2.43	2.45	4.36	4.30	4.22	4.17
	N	5701	5729	5798	5810	9703	9761	9811	9847
	PAs	0.97	0.97	0.98	1.01	0.97	1.00	1.03	1.03

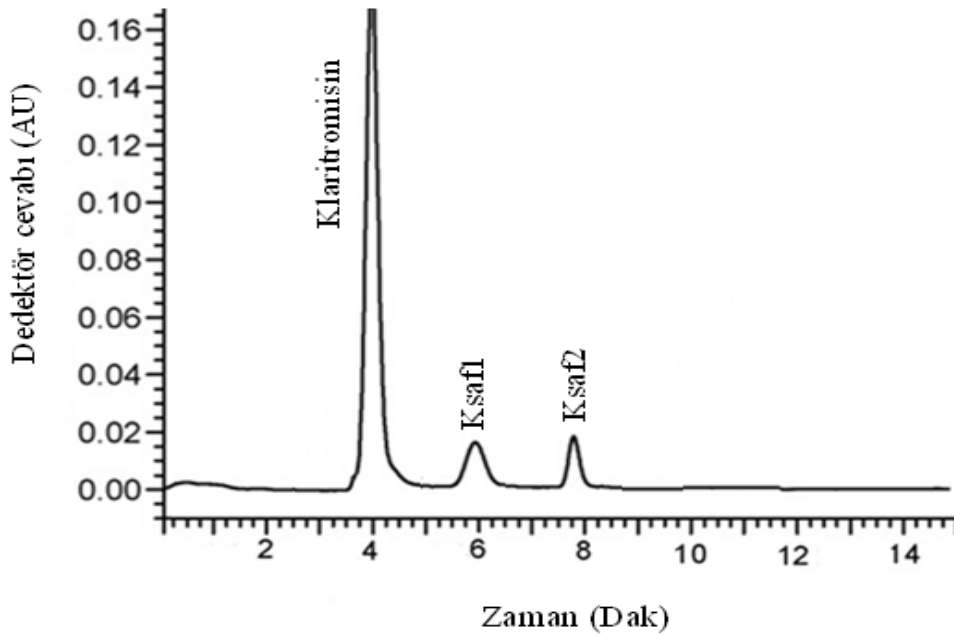
t_R : Alıkonma zamanı, k' : Kapasite faktörü, R_s : Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / Metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC / 1.2 mL/dak, UPLC / 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Optimizasyon çalışmaları sonunda HPLC ve UPLC için belirlenen kromatografik koşullar Tablo 4.6’da verilmiştir.

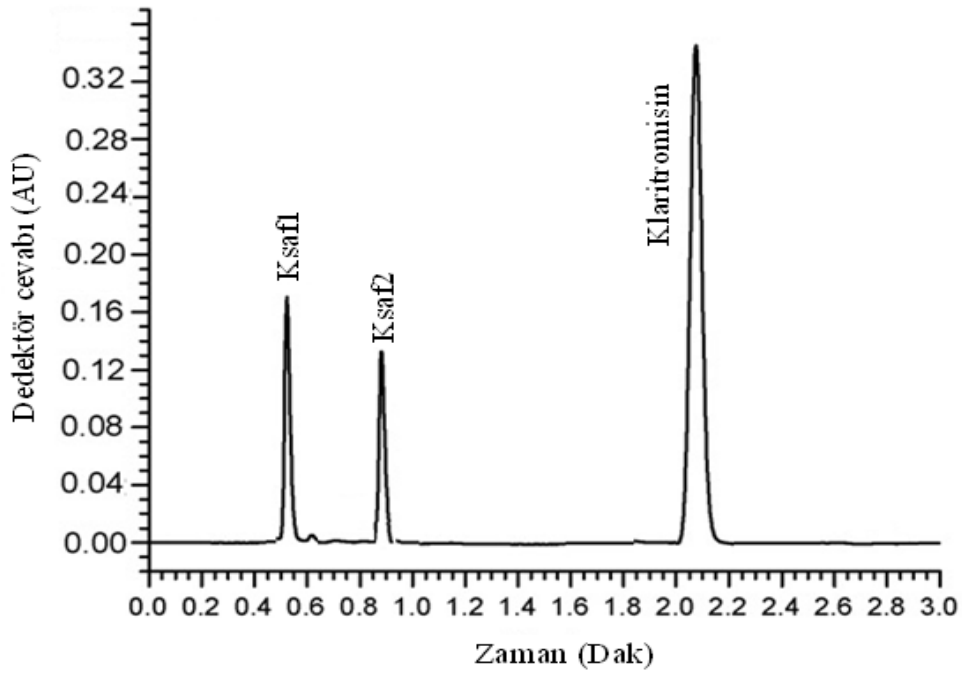
Tablo 4.6. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizi için belirlenen kromatografik koşullar

	HPLC	UPLC
Kolon	ACE C18, 250 x 4.6mm, 5 μ m	Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1.7 μ m
Dedektör	219 nm, DAD	219 nm, DAD
Hareketli faz	pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu/ metanol, (70 : 30, h/h)	pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol, (70 : 30, h/h)
Akış hızı	1.2 mL/dak	0.3 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	20 μ L	5 μ L

Saptanan optimum koşullarda Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi HPLC sisteminde 8.5 dak, UPLC sisteminde 2.5 dak’da gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1.2 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 μ L]



Şekil 4.2. Klaritromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 μ L]

4.1.2. Yöntemlerin Validasyonu

Sistem uygunluk çalışması

HPLC ve UPLC sistemlerinin uygunluğunu test etmek amacıyla standart etken madde ve safsızlık çözeltileri 5 kez enjekte edilmiştir. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizlerinde elde edilen alıkonma zamanı, pik alanı ve ayırıcılık değerleri Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.7. Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	K			Ksaf1			Ksaf2		
	t _R	Alan	R*	t _R	Alan	R**	t _R	Alan	R**
STD 1	4.15	737.51	1.72	5.80	213.2	2.41	7.81	163.45	2.41
STD 2	4.17	732.27	1.72	5.81	218.8	2.43	7.80	162.37	2.43
STD 3	4.14	723.93	1.73	5.81	216.3	2.44	7.78	157.67	2.44
STD 4	4.11	731.20	1.73	5.80	215.0	2.44	7.79	162.66	2.44
STD 5	4.12	719.70	1.74	5.78	212.2	2.41	7.81	163.41	2.41
X	4.14	728.92	1.73	5.80	215.1	2.43	7.80	161.91	2.43
SS	0.02	7.07	0.01	0.01	2.61	0.02	0.02	2.42	0.02
BSS(%)	0.48	0.97	0.58	0.17	1.21	0.82	0.26	1.49	0.82

t_R: Alıkonma zamanı, R*: K ve Ksaf1 arasındaki ayırıcılık, R**: Ksaf1 ile Ksaf2 arasındaki ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1.2 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]

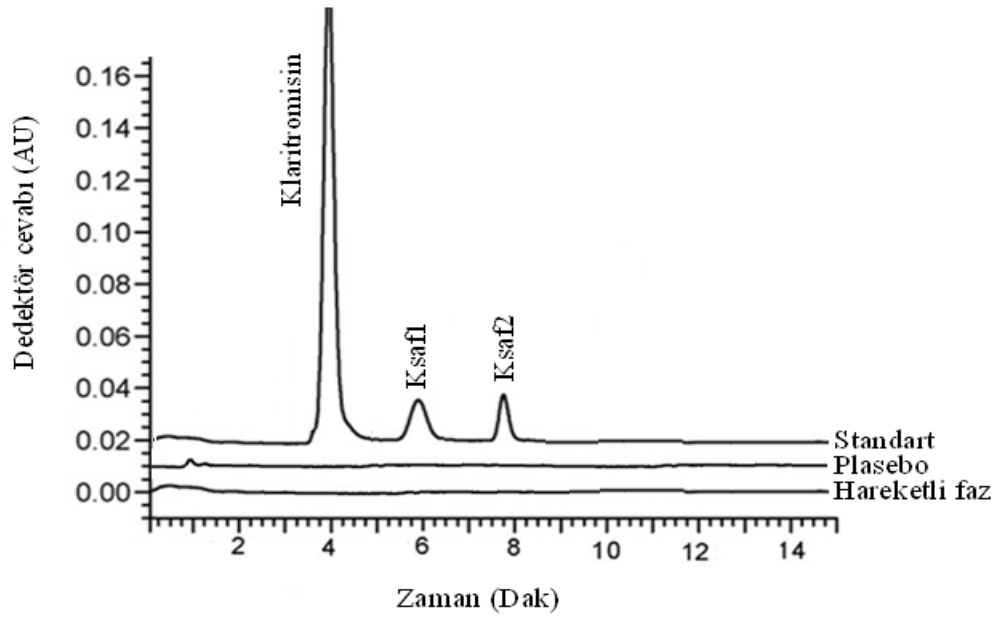
Tablo 4.8. Klaritromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	K			Ksaf1			Ksaf2		
	t_R	Alan	R*	t_R	Alan	R**	t_R	Alan	R**
STD 1	2.07	1100.21	11.60	0.55	231.44	4.29	0.84	295.89	4.29
STD 2	2.08	1097.13	11.65	0.55	234.06	4.30	0.85	297.71	4.30
STD 3	2.08	1104.22	11.63	0.55	232.17	4.32	0.85	294.12	4.32
STD 4	2.07	1095.02	11.62	0.54	228.86	4.28	0.84	300.46	4.28
STD 5	2.06	1107.66	11.65	0.54	230.03	4.30	0.86	298.55	4.30
X	2.07	1100.85	11.63	0.55	231.31	4.30	0.85	297.35	4.30
SS	0.01	5.15	0.02	0.00	2.00	0.01	0.01	2.44	0.01
BSS(%)	0.48	0.47	0.17	0.00	0.86	0.23	1.18	0.82	0.23

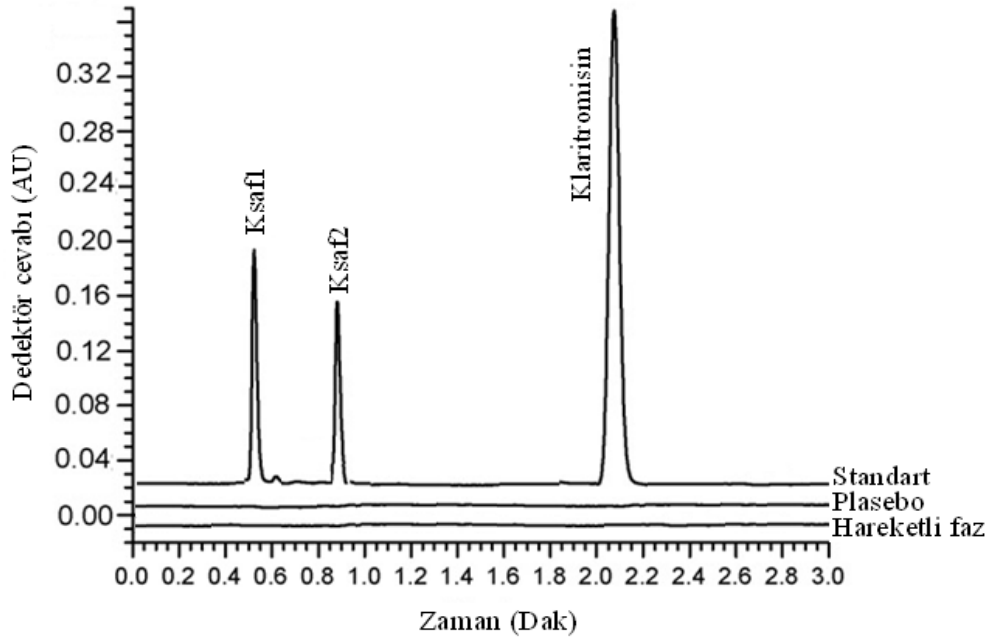
t_R: Alıkonma zamanı, R*: K ve Ksaf2 arasındaki ayırıcılık, R**: Ksaf1 ile Ksaf2 arasındaki ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 3.0 fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]

Seçicilik (Selectivity)

Hareketli faz, plasebo çözeltisi, standart etken madde ve safsızlıklarını içeren çözeltiler, HPLC ve UPLC sistemlerine enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak pikler arası herhangi bir girişim olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Klaritromisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltilerin HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 1.2 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 μ L]



Şekil 4.4. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Klaritromisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltilerin UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 μ L]

Sistem tekrarlanabilirliği

% 100'lük Klaritromisin ve safsızlık çözeltilerinin 10 kez enjekte edilmesi ile elde edilen pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen pik alanları

	HPLC			UPLC		
	K	Ksaf1	Ksaf2	K	Ksaf1	Ksaf2
STD 1	735.33	215.92	165.11	1106.27	228.72	296.77
STD 2	733.71	216.43	163.07	1099.03	230.09	299.42
STD 3	731.42	214.39	161.41	1103.41	231.34	297.89
STD 4	722.25	213.11	157.03	1096.33	227.86	300.06
STD 5	725.76	216.03	164.41	1103.46	232.03	300.55
STD 6	731.35	213.02	163.32	1106.21	231.47	297.89
STD 7	722.90	219.83	162.57	1095.09	233.06	294.31
STD 8	721.03	217.39	159.82	1094.22	234.17	296.12
STD 9	731.57	213.41	162.66	1096.42	229.96	302.68
STD 10	713.71	211.23	163.41	1105.66	232.03	298.55
X	726.90	215.08	162.28	1100.61	231.07	298.42
SS	6.89	2.53	2.36	4.88	1.93	2.40
BSS (%)	0.95	1.18	1.45	0.44	0.84	0.80

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma; [Hareketli faz: pH 3.0, 5 m M fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

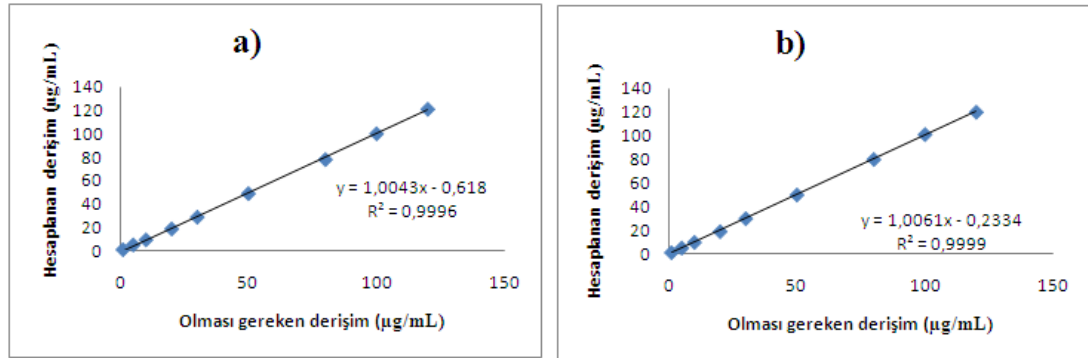
Doğrusallık

Klaritromisin ve safsızlık çözeltileri için oluşturulan kalibrasyon eğrilerine ait veriler Tablo 4.10'da, yöntemin doğrusallık kontrol grafikleri Şekil 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Klaritromisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)

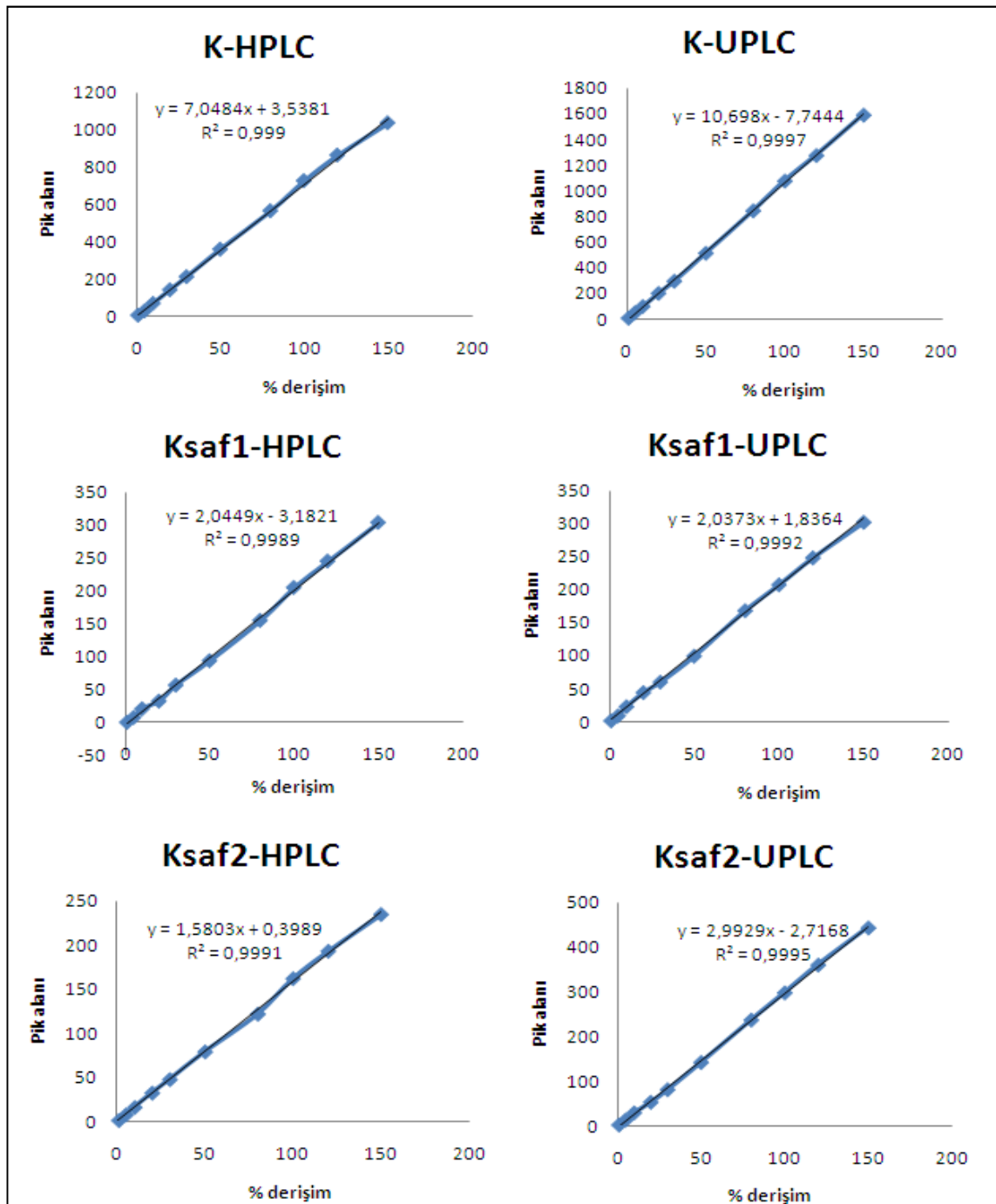
	K	Ksaf1	Ksaf2
HPLC			
$y=ax+b$	$7.0484x+3.5381$	$2.0449x-3.1821$	$1.5803x+0.3989$
r	0.9995	0.9994	0.9995
r^2	0.9990	0.9989	0.9991
Uygulama aralığı	0.5 – 60 $\mu\text{g/mL}$	2.5 – 300 ng/mL	1.25 – 150 ng/mL
UPLC			
$y=ax+b$	$10.698x-7.7444$	$2.0373x+1.8364$	$2.9929x-2.7168$
r	0.9996	0.9996	0.9997
r^2	0.9993	0.9992	0.9995
Uygulama aralığı	0.5 – 60 $\mu\text{g/mL}$	2.5 – 300 ng/mL	1.25 – 150 ng/mL

[Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 μL , UPLC; 5 μL]



Şekil 4.5. Klaritromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusallık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu $p < 0.05$ olup derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal ve r tesadüfen bulunmuş bir değer değildir. (İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 2).



Şekil 4.6. Klaritromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri

Doğruluk

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Klaritromisin standartının geri kazanım sonuçları Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Klaritromisinin plasebodan geri kazanım sonuçları

Klaritromisin Yüzdesi	HPLC		UPLC	
	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)
% 80	79.69	99.61	79.88	99.85
	79.03	98.79	80.06	100.08
	81.04	101.30	80.89	101.11
% 100	101.09	101.09	100.77	100.77
	98.67	98.67	99.23	99.23
	98.38	98.38	99.09	99.09
% 120	119.28	99.40	119.86	99.88
	118.39	98.66	119.13	99.28
	120.76	100.63	120.14	100.12
	X	99.61	X	99.93
	SS	1.12	SS	0.69
	BSS (%)	1.12	BSS	0.69

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma
[Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Kesinlik

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Klaritromisin standartının gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları Tablo 4.12 ve 4.13’de verilmiştir. Ayrıca farklı analizciler tarafından elde edilen kesinlik verileri Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4.12. Klaritromisinin gün içi kesinlik verileri (n=6)

Klaritromisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	79.92	80.28
SS	1.02	0.54
BSS	1.28	0.67
% 100		
X	99.38	99.70
SS	1.49	0.93
BSS	1.50	0.94
% 120		
X	119.48	119.71
SS	1.20	0.52
BSS	1.00	0.43

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.13. Klaritromisinin günler arası kesinlik verileri (n=6)

Klaritromisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	79.62	80.21
SS	1.23	0.40
BSS	1.54	0.50
% 100		
X	99.51	99.93
SS	1.51	0.84
BSS	1.52	0.84
% 120		
X	120.14	120.04
SS	1.54	0.87
BSS	1.28	0.72

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.14. Klaritromisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen pik alanları

Analizci		HPLC			UPLC	
A	K	Ksaf1	Ksaf2	K	Ksaf1	Ksaf2
STD 1	735.33	215.92	165.11	1106.27	228.72	296.77
STD 2	733.71	216.43	163.07	1099.03	230.09	299.42
STD 3	731.42	214.39	161.41	1103.41	231.34	297.89
STD 4	722.25	213.11	157.03	1096.33	227.86	300.06
STD 5	725.76	216.03	164.41	1103.46	232.03	300.55
STD 6	731.35	213.02	163.32	1106.21	231.47	297.89
X	729.97	214.82	162.39	1102.45	230.25	298.76
SS	4.98	1.52	2.92	4.00	1.67	1.47
BSS	0.68	0.71	1.80	0.36	0.73	0.49
Analizci		HPLC			UPLC	
B	K	Ksaf1	Ksaf2	K	Ksaf1	Ksaf2
STD 1	722.90	219.83	162.57	1095.09	233.06	294.31
STD 2	721.03	217.39	159.82	1094.22	234.17	296.12
STD 3	731.57	213.41	162.66	1096.42	229.96	302.68
STD 4	713.71	211.23	163.41	1105.66	232.03	298.55
STD 5	721.48	215.57	163.01	1104.25	231.98	299.48
STD 6	719.70	212.23	163.41	1107.66	230.03	298.55
X	721.73	214.94	162.48	1100.55	231.87	298.28
SS	5.78	3.28	1.35	5.95	1.66	2.88
BSS	0.80	1.53	0.83	0.54	0.72	0.97

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Farklı analizciler tarafından elde edilen veriler istatistiksel olarak (Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi) karşılaştırılmış olup bulgular arasında fark yoktur ($T_{hesap} = 5.11$, $T_{tablo} = 0$, $T_{hesap} > T_{tablo}$, $p > 0.05$).

Gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim LOD olarak belirlenmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Klaritromisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları

	Gözlenebilirlik sınırı (ng/mL)	
	HPLC	UPLC
K	166.50	125.00
Ksaf1	1.80	1.00
Ksaf2	1.00	0.85

Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Raporlama seviyesi

% 0.1’lik tablet çözeltisinden yapılan 6 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alan değerleri Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.16. % 0.1’lik raporlama seviyesinde klaritromisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri

	HPLC		UPLC	
	Pik alanı (Ksaf1)	Pik alanı (Ksaf2)	Pik alanı (Ksaf1)	Pik alanı (Ksaf2)
1	42.22	66.02	47.08	118.78
2	45.38	65.61	47.45	116.42
3	43.46	63.28	49.66	118.09
4	42.22	66.41	48.69	117.45
5	44.66	63.88	49.68	119.01
6	43.25	64.69	47.47	117.01
X	43.53	64.98	48.34	117.79
SS	1.28	1.24	1.17	1.02
BSS (%)	2.94	1.91	2.42	0.87

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Alt tayin sınırı (LOQ)

Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 10 olduğu derişim LOQ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Klaritromisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı

	Alt tayin sınırı (ng/mL)	
	HPLC	UPLC
K	500.00	375.00
Ksaf1	2.50	1.87
Ksaf2	1.25	1.00

Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Sağlamlık

% 100 derişimde standart Klaritromisin ve safsızlık çözeltilerinin analizlerinde organik çözücü oranı (% 28 – 32), tampon pH'sı (2.8-3.2), akış hızı (HPLC için 1.1-1.3 mL/dak. UPLC için 0.25-0.35 mL/dak) ve dalga boyu (217-221 nm) değiştirilerek sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır (Tablo 4.18-4.21).

Tablo 4.18. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Tampon /organik çözücü oranı (h/h)			Tampon /organik çözücü oranı (h/h)		
		72/28	70/30*	68/32	72/28	70/30*	68/32
K	t_R (dak)	4.15	4.14	4.13	2.07	2.08	2.08
	R_(K-Ksaf1)	1.75	1.73	1.72	11.62	11.63	11.65
	N	4913	4901	4896	9965	9961	9958
	PAs	1.11	1.10	1.07	1.01	1.01	1.02
Ksaf1	t_R (dak)	5.82	5.80	5.80	0.54	0.55	0.55
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	2.45	2.43	2.46	4.29	4.30	4.32
	N	6108	6112	6118	9218	9226	9224
	PAs	1.01	0.99	0.98	1.01	1.02	1.02
Ksaf2	t_R (dak)	7.82	7.80	7.81	0.84	0.85	0.85
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	2.45	2.43	2.42	4.29	4.30	4.32
	N	5992	5998	5972	9198	9181	9176
	PAs	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00	1.01

t_R: Alıkonma zamanı. PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık. N: Teorik tabaka sayısı. *Optimum kromatografik koşuldur. Hareketli faz: 5 mM fosfat tamponu / metanol, akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Organik çözücü oranında yapılan % 2'lik değişikliğin Klaritromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.19. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		2.8	pH 3.0*	3.2	2.8	pH 3.0*	3.2
K	t_R (dak)	4.14	4.14	4.13	2.07	2.08	2.09
	R_(K-Ksaf1)	1.75	1.74	1.75	11.63	11.64	11.64
	N	4907	4911	4913	9960	9961	9961
	PAs	1.09	1.10	1.10	1.01	1.01	1.01
Ksaf1	t_R (dak)	5.81	5.81	5.80	0.55	0.56	0.56
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	2.44	2.43	2.43	4.31	4.31	4.32
	N	6118	6115	6113	9223	9226	9227
	PAs	1.01	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01
Ksaf2	t_R (dak)	7.80	7.80	7.81	0.85	0.86	0.86
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	2.44	2.44	2.43	4.30	4.30	4.32
	N	5995	5998	5997	9196	9192	9190
	PAs	1.01	1.00	1.01	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı. PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık. N: Teorik tabaka sayısı. *Optimum kromatografik koşuldur. Hareketli faz: fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Tampon pH değerinde yapılan 0.2 birimlik değişikliğin Klaritromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.20. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Akış hızı (mL/dak)			Akış hızı (mL/dak)		
		1.1	1.2*	1.3	0.25	0.30*	0.35
K	t_R (dak)	4.15	4.14	4.13	2.09	2.08	2.07
	R_(K-Ksaf1)	1.75	1.73	1.72	11.63	11.63	11.64
	N	4923	4918	4916	9965	9961	9958
	PAs	1.10	1.18	1.07	1.01	1.01	1.02
Ksaf1	t_R (dak)	5.80	5.81	5.82	0.54	0.55	0.56
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	2.43	2.43	2.44	4.29	4.30	4.31
	N	6108	6112	6118	9225	9227	9228
	PAs	1.01	0.99	0.98	1.00	1.00	1.01
Ksaf2	t_R (dak)	7.82	7.80	7.81	0.84	0.85	0.86
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	2.45	2.43	2.42	4.29	4.30	4.31
	N	5992	5998	5972	9185	9182	9177
	PAs	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00	1.01

t_R: Alıkonma zamanı. PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık. N: Teorik tabaka sayısı. *Optimum kromatografik koşuldur. Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Hareketli faz akış hızında yapılan değişikliğin Klaritromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.21. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Dalga boyu (nm)			Dalga boyu (nm)		
		217	219*	221	217	219*	221
K	t_R (dak)	4.15	4.14	4.13	2.07	2.08	2.08
	R_(K-Ksaf1)	1.76	1.73	1.70	11.62	11.63	11.65
	N	4913	4901	4896	9955	9961	9963
	PAs	1.11	1.10	1.07	1.01	1.00	1.02
Ksaf1	t_R (dak)	5.82	5.80	5.80	0.54	0.55	0.55
	R_(Ksaf1-Ksaf2)	2.45	2.43	2.46	4.29	4.30	4.32
	N	6108	6112	6118	9218	9226	9224
	PAs	1.01	0.99	0.98	1.01	1.02	1.02
Ksaf2	t_R (dak)	7.82	7.80	7.81	0.84	0.85	0.86
	R_(Ksaf2-Ksaf1)	2.45	2.43	2.42	4.29	4.30	4.31
	N	5992	5998	5972	9194	9187	9185
	PAs	1.02	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı. PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık. N: Teorik tabaka sayısı. *Optimum kromatografik koşuldur. Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Dedektör dalga boyunda yapılan 2 birimlik değişikliğin Klaritromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Çözeltilerin kararlılığı

% 100'lük derişimde klaritromisin ve safsızlıklar eklenmiş plasebo çözeltisinin oda sıcaklığında (+25°C) 48 saat boyunca 6 saat aralıklarla yapılan analizlerinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.22'de verilmiştir.

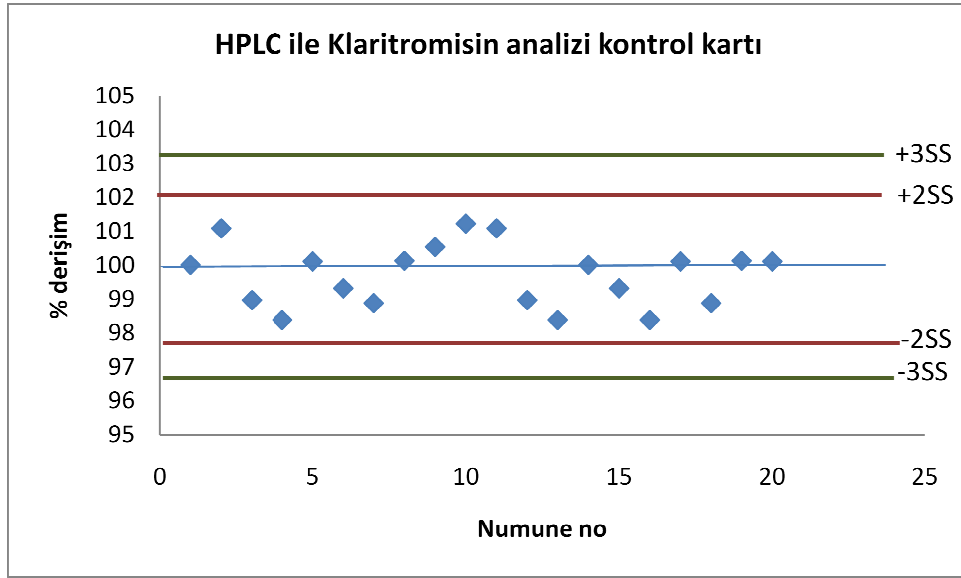
Tablo 4.22. Klaritromisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları

Saat	HPLC			UPLC		
	% Derişim			% Derişim		
	K	Ksaf1	Ksaf2	K	Ksaf1	Ksaf2
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
6	100.67	100.61	100.03	100.52	100.01	100.03
12	100.91	100.57	99.84	100.88	100.35	99.88
18	100.40	100.36	99.79	100.42	99.84	99.81
24	101.07	99.76	99.67	101.03	99.81	99.69
36	101.02	99.83	99.32	101.02	99.80	99.35
42	101.01	98.52	98.73	101.01	98.56	98.77
48	100.33	98.19	98.52	100.27	98.22	98.54

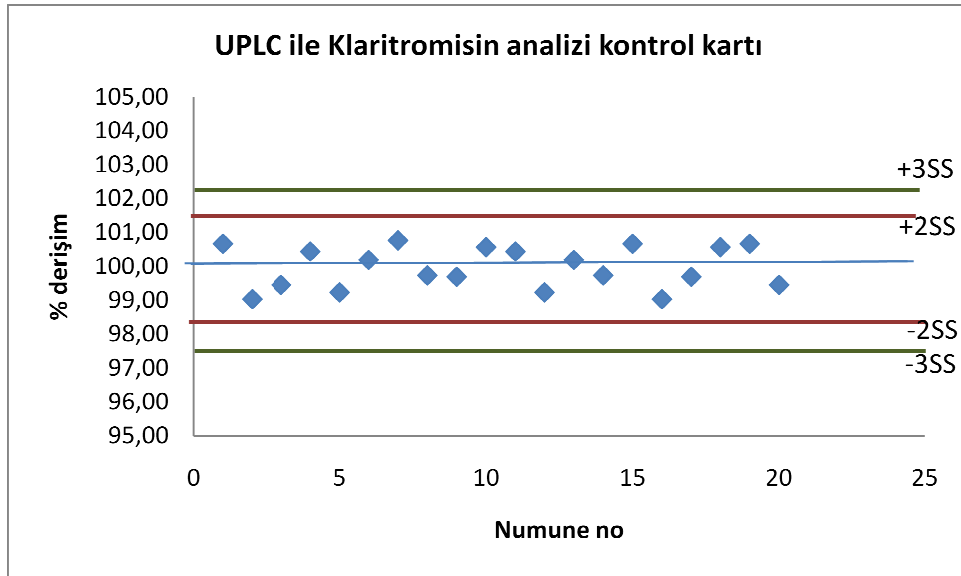
Hareketli faz: pH 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Klaritromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Kalite Kontrol Kartları

20 adet plasebo (% 100 derişimde klaritromisin ve safsızlıklarını içeren) çözeltisinin analizleri sonucu elde edilen klaritromisin miktarları ile kalite kontrol kartları oluşturulmuştur (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.7. Klaritromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)



Şekil 4.8. Klaritromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)

4.2. Azitromisin için Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları

4.2.1. Yöntemlerin Optimizasyonu

Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizleri için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH'sı ve akış hızının, azitromisin ve safsızlıklarının kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kromatografik sistemin test edilen kromatografik koşullardaki t_0 değerinin saptanması için metanol sisteme enjekte edilmiş ve metanolün alıkonma zamanı t_0 değeri olarak alınmıştır.

Dedektör seçimi

Azitromisin, yüksek absorpsiyon gösteren bir molekül olduğundan dizi diyot dedektör ile çalışılmıştır. Maksimum absorpsiyon verdiği 240 nm dedeksiyon dalga boyu olarak seçilmiştir.

Sabit fazın belirlenmesi

Azitromisin ve safsızlıkları apolar yapıda moleküller olduğundan ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan C8 ve C18 HPLC kolonları kullanılmış ve en iyi kromatografik parametreler C18 kolon ile elde edilmiştir. 150 ve 250 mm'lik kolonlar denenmiş ve 150 mm'lik kolonla daha iyi bir ayırıcılık elde edilmiştir. HPLC sistemi için ACE C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m kolon, UPLC sistemi için Acquity BEHC18, 50x2.1 mm, 1.7 μ m kolon sabit faz olarak seçilmiştir.

Hareketli Fazın Belirlenmesi

Kullanılacak hareketli fazın bileşimindeki tampon çözelti, pH'sı, derişimi, organik çözücü ve oranı değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Tampon türü - organik çözücünün belirlenmesi

Fosfat, sitrat ve asetat tamponlarına ayrı ayrı değişik oranlarda asetonyitril veya metanol eklenerek hareketli fazlar hazırlanmıştır. Sitrat ve asetat tamponlarının asetonyitril ve metanol ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma ve girişim gözlenmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat tamponu ile en iyi ayırım, simetrik pikler ve yüksek pik alanları elde edilmiştir. Farklı oranlarda asetonyitril ile hazırlanan hareketli faz ile elde edilen piklere ait kromatografik parametreler Tablo 4.23’de verilmiştir.

Tablo 4.23. Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde asetonyitril yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi.

ACN (%)		30	35	40	45
A	t_R (dak)	5.68	4.80	4.14	4.07
	k'	8.93	6.83	6.13	5.90
	R_(A-Asaf1)	3.88	3.12	2.73	2.34
	N	7642	6054	5321	4988
	PAs	1.33	1.09	1.07	0.84
Asaf1	t_R (dak)	5.05	2.78	2.02	1.81
	k'	11.64	9.50	7.15	6.81
	R_(Asaf1-A)	3.66	3.12	2.43	2.06
	N	8031	7432	6812	5419
	PAs	1.12	1.04	0.91	0.89
Asaf2	t_R (dak)	8.57	7.65	6.80	5.02
	k'	10.12	9.74	7.92	7.15
	R_(Asaf2-A)	5.76	5.64	4.93	4.06
	N	8130	7800	6577	6044
	PAs	1.32	0.98	0.96	0.92

ACN: Asetonyitril, t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: Hareketli faz: pH 6.0, 10 mM fosfat tamponu / asetonyitril, akış hızı: 1 mL dak⁻¹, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Tampon derişiminin belirlenmesi

Fosfat tamponu derişiminin analize etkisinin araştırılması için 5 mM, 10 mM ve 15 mM fosfat tamponu ve asetonitril (65:35, h/h) içeren çözeltiler hareketli faz olarak denenmiştir. Bu koşullarda elde edilen kromatografik bulgular Tablo 4.24’de verilmiştir.

Tablo 4.24. Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

Tampon derişimi		5 mM	10 mM	15 mM
A	t_R (dak)	4.80	4.87	4.91
	k'	6.83	6.91	6.95
	R_(A-Asaf1)	3.12	3.01	2.59
	N	6054	6010	5918
	Pas	1.09	1.15	1.21
Asaf1	t_R (dak)	2.78	2.90	2.94
	k'	9.50	9.55	9.61
	R_(Asaf1-A)	3.12	3.44	3.50
	N	7432	7589	7609
	Pas	1.04	1.08	1.11
Asaf2	t_R (dak)	7.65	7.82	7.93
	k'	9.74	9.78	9.81
	R_(Asaf2-A)	5.64	5.78	5.91
	N	7800	7184	7262
	Pas	0.98	1.09	1.15

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL]

Tampon pH'sının belirlenmesi

Hareketli faz pH'sının en uygun olduğu değerin saptanması amacıyla fosfat tamponunun pH değeri 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5 olarak değiştirilmiştir. pH değerinin kromatografik parametrelere etkisi Tablo 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.25. Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi.

pH		5.0	5.5	6.0	6.5
A	t_R (dak)	4.47	4.64	4.78	4.93
	k'	6.21	6.47	6.83	6.91
	R_s(A-Asaf1)	2.33	2.70	3.12	3.24
	N	5912	5978	6054	6170
	PAs	0.84	1.03	1.09	1.23
Asaf1	t_R (dak)	1.94	2.21	2.78	2.81
	k'	8.99	9.15	9.50	9.74
	R_s(Asaf1-A)	2.34	2.83	3.12	3.88
	N	5802	6112	7432	6504
	PAs	0.86	0.96	1.04	1.12
Asaf2	t_R (dak)	7.21	7.44	7.65	8.01
	k'	8.27	8.98	9.74	9.91
	R_s(Asaf2-A)	5.02	5.43	5.64	5.88
	N	6307	6598	7800	7954
	PAs	0.81	0.98	0.98	1.19

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Hareketli faz: 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL]

Buna göre en iyi ayırımın sağlandığı hareketli faz pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril, (65:35, h/h) olarak belirlenmiştir.

HPLC ve UPLC sisteminde aynı hareketli faz kullanılmıştır.

Akış hızının belirlenmesi

HPLC sisteminde 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 mL/dak akış hızlarında, UPLC sisteminde ise 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mL/dak akış hızlarında analizler yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.26’da verilmiştir.

Tablo 4.26. Hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

		HPLC sistemi				UPLC sistemi			
Akış Hızı (mL/dak)		0.8	1.0	1.2	1.4	0.2	0.3	0.4	0.5
A	t_R (dak)	2.90	3.58	4.17	4.67	1.88	2.07	2.56	2.79
	k'	3.65	5.71	6.02	7.13	6.56	8.32	11.32	14.28
	R_(A-Asaf1)	1.04	1.56	1.71	1.73	9.84	11.63	12.33	13.02
	N	4208	4318	4961	5103	9022	8932	8709	8677
	PAs	0.89	0.91	1.08	1.21	1.08	1.01	1.11	1.06
Asaf1	t_R (dak)	4.55	5.01	5.83	6.32	0.41	0.55	0.59	0.64
	k'	6.05	7.81	6.95	8.44	4.32	6.67	8.54	9.02
	R_(Asaf1-A)	1.21	1.79	2.43	2.61	3.22	4.30	4.65	4.89
	N	5844	6008	6112	6238	9563	9430	9382	9271
	PAs	0.82	0.91	0.96	1.08	1.08	1.01	1.06	1.06
Asaf2	t_R (dak)	6.61	7.04	7.80	8.32	0.71	0.84	0.92	1.13
	k'	6.89	7.45	7.98	8.61	5.34	7.41	9.01	12.19
	R_(Asaf2-A)	1.67	2.01	2.43	2.56	3.22	4.30	4.65	4.89
	N	4963	5356	5798	6201	9830	9761	9308	9116
	PAs	0.86	0.91	0.98	1.06	1.10	1.00	0.98	0.98

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Enjeksiyon hacmi değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl değiştiği incelenmiş ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.27’de verilmiştir.

Tablo 4.27. Enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi

		HPLC				UPLC			
Enjeksiyon hacmi (µL)		5	10	20	40	3	5	7	9
A	t_R (dak)	4.11	4.15	4.17	4.21	2.06	2.07	2.09	2.13
	k'	6.21	6.14	6.02	5.97	8.26	8.32	8.09	7.84
	R_{s(A-Asaf1)}	1.66	1.67	1.71	1.74	11.08	11.63	12.08	12.23
	N	4851	4904	4961	5228	8733	8932	9103	9388
	Pas	0.97	1.01	1.03	1.06	0.98	1.01	1.01	1.04
Asaf1	t_R (dak)	5.77	5.81	5.83	5.85	0.54	0.55	0.57	0.57
	k'	7.18	7.03	6.95	6.88	6.73	6.67	6.48	6.31
	R_{s(Asaf1-A)}	2.19	2.30	2.43	2.55	4.17	4.30	4.44	4.61
	N	5929	6012	6112	6310	9371	9430	9501	9592
	Pas	0.95	0.96	0.97	1.05	0.97	1.01	1.04	1.05
Asaf2	t_R (dak)	7.57	7.57	7.60	7.61	0.83	0.84	0.84	0.86
	k'	7.95	7.91	7.88	7.83	7.50	7.41	7.38	7.33
	R_{s(Asaf2-A)}	2.37	2.40	2.43	2.45	4.36	4.30	4.22	4.17
	N	5701	5729	5798	5810	9703	9761	9811	9847
	Pas	0.97	0.97	0.98	1.01	0.97	1.00	1.03	1.03

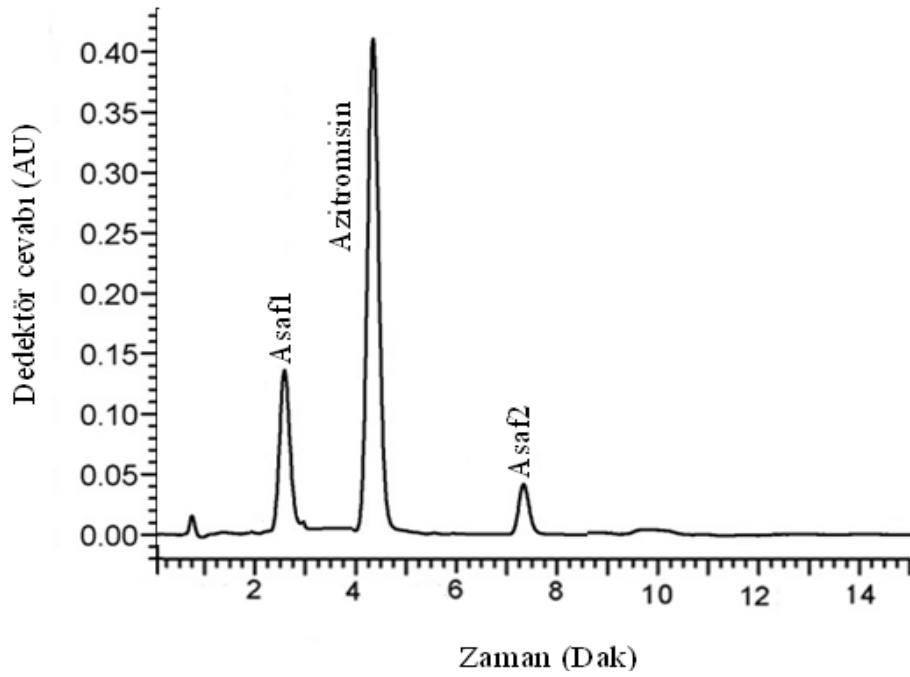
t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Optimizasyon çalışmaları sonunda HPLC ve UPLC için belirlenen kromatografik koşullar Tablo 4.28’de verilmiştir.

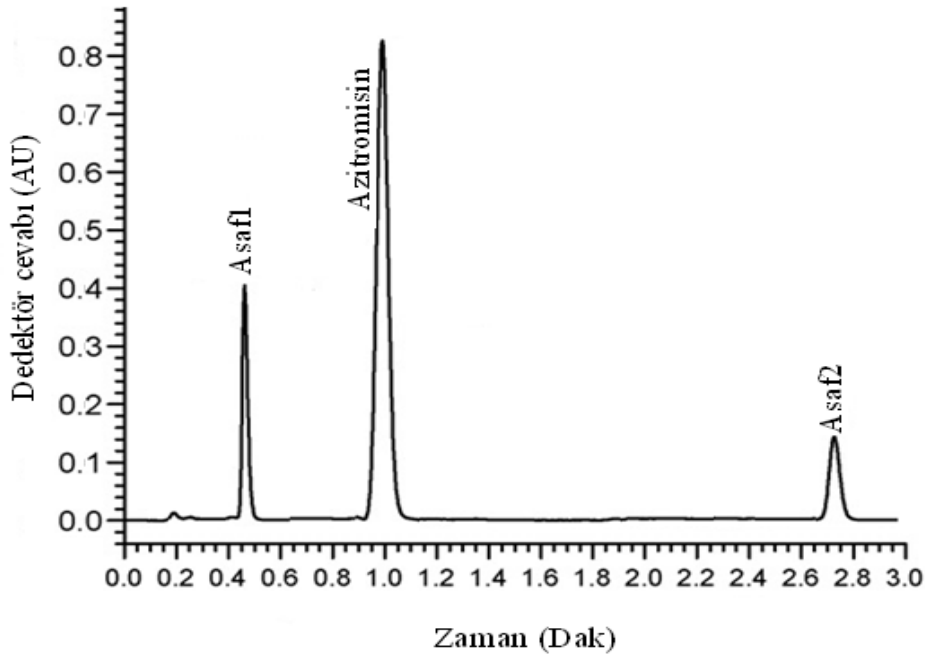
Tablo 4.28. HPLC ve UPLC sistemleri için belirlenen kromatografik koşullar

	HPLC	UPLC
Kolon	ACE C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm	Acquity BEHC18, 50x2.1 mm, 1.7µm
Dedektör	240 nm, DAD	240 nm, DAD
Hareketli faz	pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu/ asetonitril, (65 : 35, h/h)	pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril, (65 : 35, h/h)
Akış hızı	1.0 mL/dak	0.4 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	20 µL	5 µL

Saptanan optimum koşullarda Azitromisin ve safsızlıklarının analizi HPLC sisteminde 8.0 dak, UPLC sisteminde 3.0 dak’da gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8-4.9).



Şekil 4.9. Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 1,0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]



Şekil 4.10. Azitromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]

4.1.2. Yöntemlerin Validasyonu

Sistem uygunluk çalışması

HPLC ve UPLC sistemlerinin uygunluğunu test etmek amacıyla standart etken madde ve safsızlık çözeltileri 5 kez enjekte edilmiştir. Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizlerinde elde edilen alıkonma zamanı, pik alanı ve ayırıcılık değerleri Tablo 4.29 ve Tablo 4.30’da verilmiştir.

Tablo 4.29. Azitromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	A			Asaf1			Asaf2		
	t _R	Alan	R*	t _R	Alan	R*	t _R	Alan	R**
STD 1	4.81	2555.57	3.12	2.78	1554.19	3.12	7.61	1731.15	5.21
STD 2	4.85	2501.33	3.14	2.78	1568.06	3.14	7.62	1712.73	5.24
STD 3	4.77	2578.17	3.12	2.78	1575.50	3.12	7.66	1756.31	5.22
STD 4	4.82	2564.01	3.13	2.78	1536.59	3.13	7.63	1723.91	5.23
STD 5	4.77	2527.29	3.12	2.78	1549.62	3.12	7.62	1716.53	5.23
X	4.80	2545.27	3.13	2.78	1556.79	3.13	7.63	1728.13	5.23
SS	0.03	30.80	0.01	0.00	15.36	0.01	0.02	17.27	0.01
BSS(%)	0.63	1.21	0.32	0.00	0.99	0.32	0.26	1.00	0.19

t_R: Alıkonma zamanı, R*: A ile Asaf1 arasındaki ayırıcılık, R**: A ile Asaf2 arasındaki ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

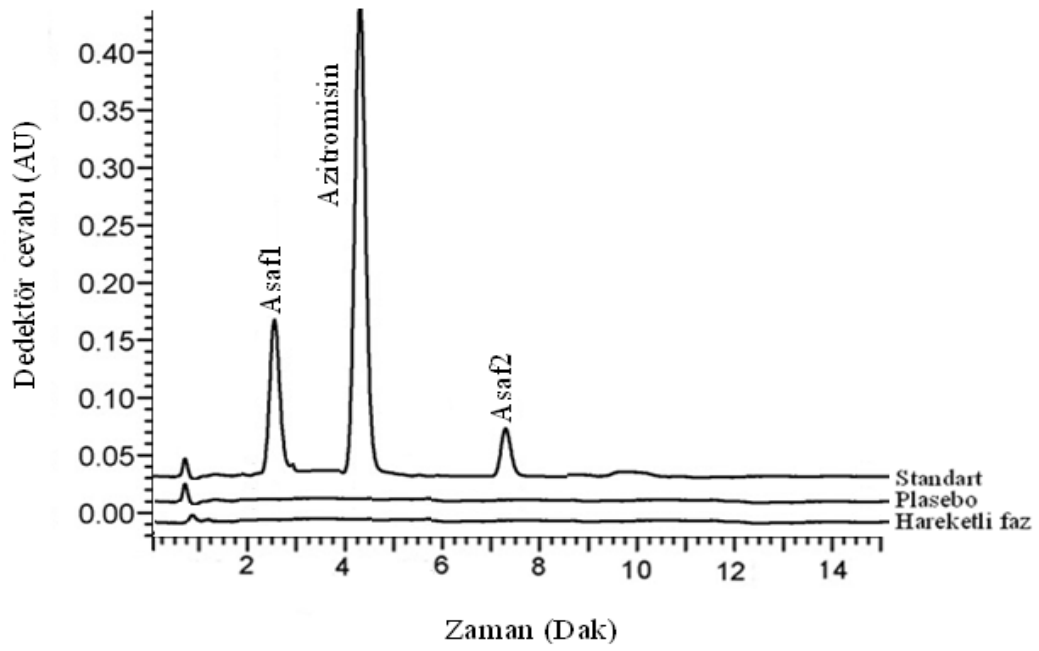
Tablo 4.30. Azitromisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	A			Asaf1			Asaf2		
	t_R	Alan	R*	t_R	Alan	R*	t_R	Alan	R**
STD 1	1.03	7597.12	4.22	0.57	4612.09	4.22	2.65	5129.47	5.62
STD 2	1.04	7578.66	4.20	0.57	4663.11	4.20	2.61	5089.33	5.64
STD 3	1.03	7557.15	4.17	0.57	4589.92	4.17	2.66	5076.27	5.62
STD 4	1.02	7486.19	4.22	0.57	4603.88	4.22	2.60	5131.79	5.63
STD 5	1.03	7473.02	4.20	0.57	4612.09	4.20	2.62	5101.08	5.67
X	1.03	7538.43	4.20	0.57	4616.22	4.20	2.63	5105.59	5.64
SS	0.01	55.72	0.02	0.00	27.73	0.02	0.03	24.50	0.02
BSS(%)	0.97	0.74	0.48	0.00	0.60	0.48	1.14	0.48	0.35

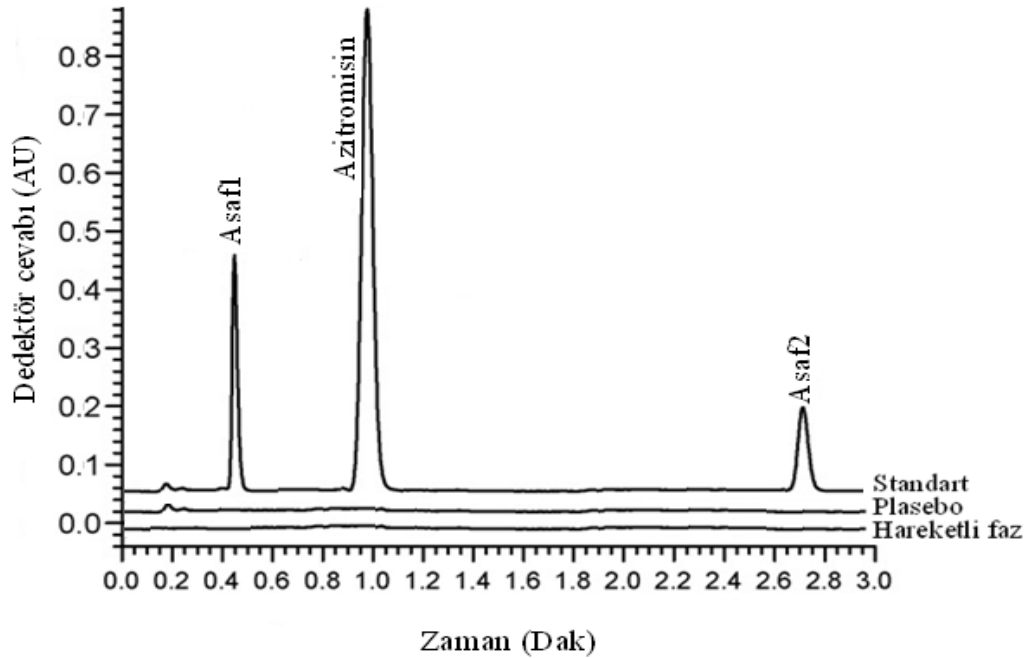
t_R: Alıkonma zamanı, R*: A ve Asaf1 arasındaki ayırıcılık, R**: A ile Asaf2 arasındaki ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 6.0 fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]

Seçicilik (Selectivity)

Çözücü, plasebo çözeltisi, etken madde ve safsızlıklarını içeren standart çözelti HPLC ve UPLC sistemlerine enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak pikler arası herhangi bir girişim olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Azitromisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltinin HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 1,0 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]



Şekil 4.12. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Azitromisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltinin UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: 0.4 mL/dak,

Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 μ L]

Sistem tekrarlanabilirliği

% 100'lük Azitromisin ve safsızlık çözeltilerinin 10 kez enjekte edilmesi ile elde edilen pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 4.31'de verilmiştir.

Tablo 4.31. Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen pik alanları

	HPLC			UPLC		
	A	Asaf1	Asaf2	A	Asaf1	Asaf2
STD 1	2555.57	1554.19	1731.15	7597.12	4612.09	5129.47
STD 2	2501.33	1558.06	1712.73	7578.66	4663.11	5089.33
STD 3	2578.17	1550.50	1756.31	7557.15	4589.92	5076.27
STD 4	2564.01	1536.59	1723.91	7486.19	4603.88	5131.79
STD 5	2527.29	1522.19	1716.53	7543.02	4652.17	5101.08
STD 6	2517.21	1549.62	1729.37	7498.18	4612.09	5156.19
STD 7	2508.44	1521.56	1711.55	7473.02	4571.29	5084.73
STD 8	2566.72	1549.62	1726.47	7494.54	4587.82	5127.39
STD 9	2552.95	1551.07	1744.38	7487.97	4604.56	5111.90
STD 10	2522.18	1522.41	1722.91	7573.11	4646.09	5093.16
X	2539.39	1541.58	1727.53	7528.90	4614.30	5110.13
SS	27.17	14.52	13.98	45.74	30.16	25.52
BSS	1.07	0.94	0.81	0.61	0.65	0.50

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma; [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 μ L, UPLC; 5 μ L]

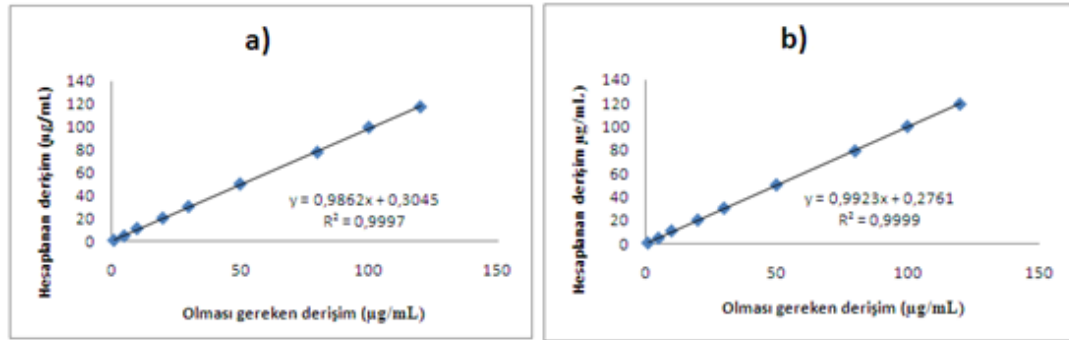
Doğrusallık

Azitromisin ve safsızlık çözeltileri için oluşturulan kalibrasyon eğrilerine ait veriler Tablo 4.32’de, yöntemin doğrusallık kontrol grafikleri Şekil 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.32. Azitromisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)

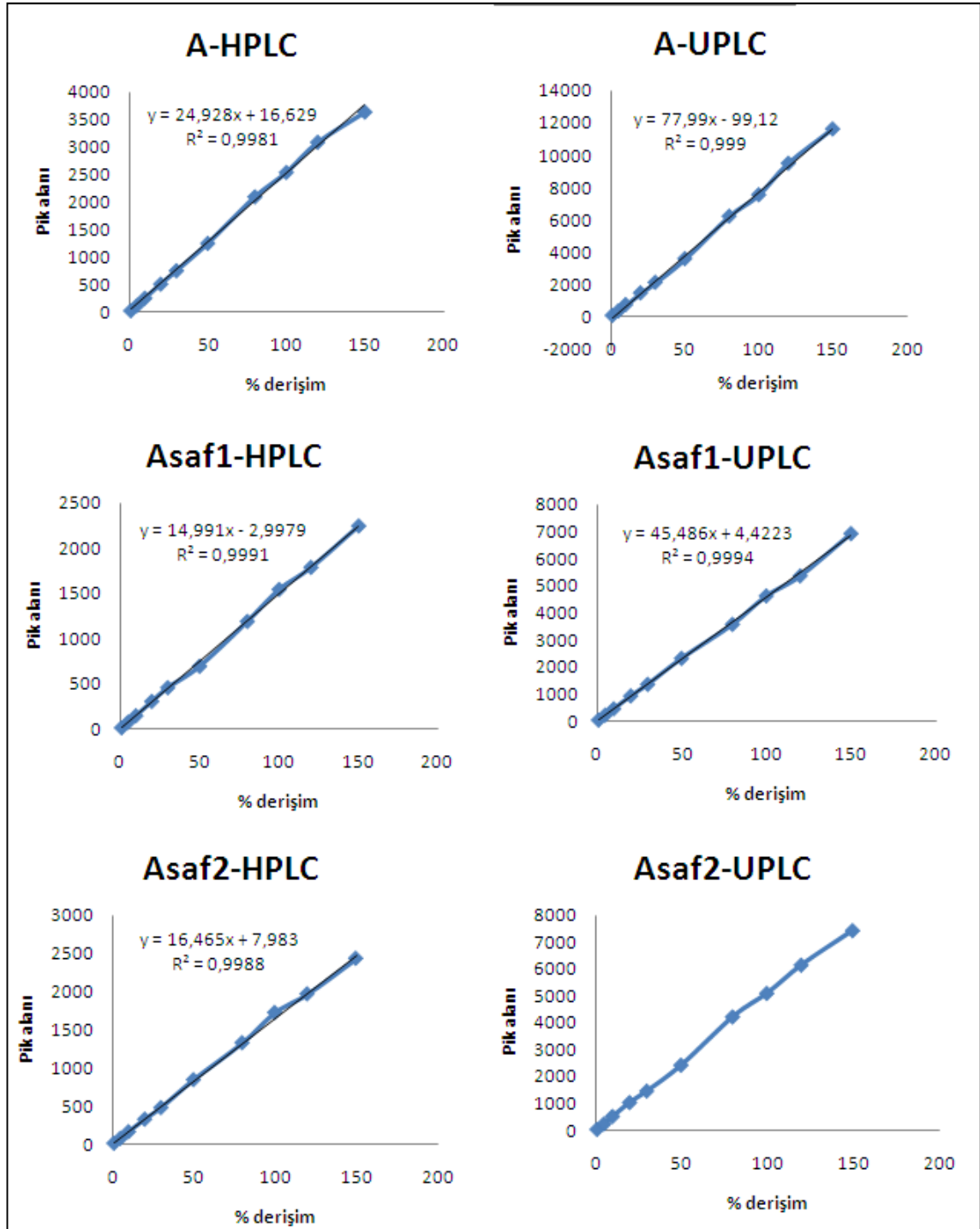
	A	Asaf1	Asaf2
HPLC			
$y=ax+b$	$24.928x+16.629$	$14.991x-2.9979$	$16.465x+7.983$
R	0.9990	0.9995	0.9994
r²	0.9981	0.9991	0.9988
Uygulama aralığı	0.5 – 60 µg/mL	2.5 – 300 ng/mL	2.5 – 300 ng/mL
UPLC			
$y=ax+b$	$77.99x-99.12$	$45.486x+4.4223$	$50.481x+20.157$
R	0.9995	0.9997	0.9994
r²	0.9990	0.9994	0.9988
Uygulama aralığı	0.5 – 60 µg/mL	2.5 – 300 ng/mL	2.5 – 300 ng/mL

Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL



Şekil 4.13. Azitromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusallık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu $p < 0.05$ olup derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal ve r tesadüfen bulunmuş bir değer değildir. (İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 2).



Şekil 4.14. Azitromisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri

Doğruluk

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Azitromisin standartının geri kazanım sonuçları Tablo 4.33’de verilmiştir.

Tablo 4.33. Azitromisinin plasebodan geri kazanım sonuçları

Azitromisin Yüzdesi	HPLC		UPLC	
	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)
% 80	80.11	100.14	79.78	99.73
	79.21	99.01	80.12	100.15
	79.01	98.76	81.10	101.38
% 100	101.14	101.14	100.09	100.09
	99.33	99.33	98.13	98.13
	98.07	98.07	100.25	100.25
% 120	120.81	100.68	121.55	101.29
	119.72	99.77	119.43	99.53
	121.06	100.88	120.67	100.56
	X	99.75	X	100.12
	SS	1.05	SS	0.98
	BSS (%)	1.05	BSS	0.98

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Keskinlik

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Azitromisin standartının gün içi ve günler arası keskinlik sonuçları Tablo 4.34 ve 4.35’de verilmiştir. Ayrıca farklı analizciler tarafından elde edilen keskinlik verileri Tablo 4.36’de verilmiştir.

Tablo 4.34. Azitromisin ve safsızlıklarının gün içi kesinlik verileri (n=6)

Azitromisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	79.44	80.67
SS	0.59	0.50
BSS	0.74	0.62
% 100		
X	99.51	99.49
SS	1.54	1.18
BSS	1.55	1.19
% 120		
X	120.53	120.22
SS	0.71	0.68
BSS	0.59	0.57

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma; [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.35. Azitromisin ve safsızlıklarının günler arası kesinlik verileri (n=6)

Azitromisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	79.11	80.33
SS	0.95	0.39
BSS	1.21	0.48
% 100		
X	99.85	99.82
SS	1.59	0.61
BSS	1.59	0.61
% 120		
X	120.86	120.55
SS	0.97	0.12
BSS	0.80	0.10

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma; [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.36. Azitromisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen pik alanları

Analizci 1	A	HPLC Asaf1	Asaf2	A	UPLC Asaf1	Asaf2
STD 1	2564.01	1536.59	1723.91	7486.19	4603.88	5131.79
STD 2	2527.29	1522.19	1716.53	7543.02	4652.17	5101.08
STD 3	2517.21	1549.62	1729.37	7498.18	4612.09	5156.19
STD 4	2508.44	1521.56	1711.55	7473.02	4571.29	5084.73
STD 5	2566.72	1549.62	1726.47	7494.54	4587.82	5127.39
STD 6	2552.95	1551.07	1744.38	7487.97	4604.56	5111.90
X	2539.44	1538.44	1725.37	7497.15	4605.30	5118.85
SS	25.03	13.87	11.40	24.08	27.23	25.15
BSS	0.99	0.90	0.66	0.32	0.59	0.49
Analizci 2	A	HPLC Asaf1	Asaf2	A	UPLC Asaf1	Asaf2
STD 1	2501.33	1558.06	1712.73	7578.66	4663.11	5089.33
STD 2	2578.17	1550.5	1756.31	7557.15	4589.92	5076.27
STD 3	2566.72	1549.62	1726.47	7494.54	4587.82	5127.39
STD 4	2552.95	1551.07	1744.38	7487.97	4604.56	5111.90
STD 5	2522.18	1522.41	1722.91	7573.11	4646.09	5093.16
STD 6	2555.57	1554.19	1731.15	7498.18	4612.09	5156.19
X	2546.15	1547.64	1732.33	7531.60	4617.27	5109.04
SS	28.87	12.74	15.68	42.39	30.78	29.27
BSS	1.13	0.82	0.90	0.56	0.67	0.57

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Farklı analizciler tarafından elde edilen veriler istatistiksel olarak (Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi) karşılaştırılmış olup bulgular arasında fark yoktur ($T_{hesap} = 4.71$, $T_{tablo} = 0$, $T_{hesap} > T_{tablo}$, $p > 0.05$).

Gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim LOD olarak belirlenmiştir (Tablo 4.37).

Tablo 4.37. Azitromisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları

	Gözlenebilirlik sınırı (ng/mL)	
	HPLC	UPLC
A	185.50	125.00
Asaf1	2.40	1.50
Asaf2	1.00	0.85

Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Raporlama seviyesi

% 0.1'lik tablet çözeltisinden yapılan 6 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alan değerleri Tablo 4.38'de verilmiştir.

Tablo 4.38. % 0.1'lik raporlama seviyesinde Azitromisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri

	HPLC		UPLC	
	Pik alanı (Asaf1)	Pik alanı (Asaf2)	Pik alanı (Asaf1)	Pik alanı (Asaf2)
1	58.06	71.27	86.63	93.08
2	50.5	77.63	85.89	91.07
3	49.62	72.64	82.87	95.12
4	51.07	74.43	88.6	94.11
5	47.41	72.29	86.46	95.09
6	54.19	73.11	84.12	94.15
X	51.81	73.56	85.76	93.77
SS	3.77	2.25	2.02	1.52
BSS (%)	7.28	3.06	2.36	1.62

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Alt tayin sınırı (LOQ)

Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 10 olduğu derişim LOQ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.39).

Tablo 4.39. Azitromisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı

	Alt tayin sınırı (ng/mL)	
	HPLC	UPLC
A	500.00	375.00
Asaf1	2.50	1.87
Asaf2	1.25	1.00

Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Sağlamlık

% 100 derişimde standart Azitromisin ve safsızlık çözeltilerinin analizlerinde organik çözücü oranı (% 33 – 37), tampon pH'sı (5.8-6.2), akış hızı (HPLC için 0.9-1.1 mL/dak, UPLC için 0.35-0.45 mL/dak) ve dalga boyu (217-221 nm) değiştirilerek sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır (Tablo 4.40-4.43).

Tablo 4.40. Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Tampon /organik çözücü oranı (h/h)			Tampon /organik çözücü oranı (h/h)		
		67/33	65/35*	63/37	67/33	65/35*	63/37
A	t_R (dak)	4.80	4.80	4.81	1.02	1.03	1.03
	R_(A-Asaf1)	3.12	3.12	3.14	4.22	4.22	4.23
	N	6051	6054	6054	9303	9307	9309
	Pas	1.09	1.09	1.08	1.01	1.02	1.02
Asaf1	t_R (dak)	2.79	2.78	2.78	0.54	0.57	0.55
	R_(Asaf1-A)	3.14	3.12	3.13	4.21	4.22	4.23
	N	7415	7432	7428	9677	9672	9674
	Pas	1.03	1.04	1.04	1.01	1.01	1.02
Asaf2	t_R (dak)	7.65	7.65	7.64	2.62	2.63	2.65
	R_(Asaf2-A)	5.63	5.64	5.65	5.20	5.23	5.22
	N	7803	7800	7798	9298	9291	9276
	Pas	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril, akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Organik çözücü oranında yapılan % 2'lik değişikliğin Azitromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.41. Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		5.8	pH 6.0*	6.2	5.8	pH 6.0*	6.2
A	t_R (dak)	4.80	4.80	4.81	1.02	1.03	1.03
	R_(A-Asaf1)	3.12	3.12	3.14	4.22	4.22	4.23
	N	6051	6054	6054	9303	9307	9309
	PAs	1.09	1.09	1.08	1.01	1.02	1.02
Asaf1	t_R (dak)	2.79	2.78	2.78	0.54	0.57	0.55
	R_(Asaf1-A)	3.14	3.12	3.13	4.21	4.22	4.23
	N	7415	7432	7428	9677	9672	9674
	PAs	1.03	1.04	1.04	1.01	1.01	1.02
Asaf2	t_R (dak)	7.65	7.65	7.64	2.62	2.63	2.65
	R_(Asaf2-A)	5.63	5.64	5.65	5.20	5.23	5.22
	N	7803	7800	7798	9298	9291	9276
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tampon pH değerinde yapılan 0.2 birimlik değişikliğin Azitromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.42. Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Akış hızı (mL/dak)			Akış hızı (mL/dak)		
		0.9	1.0*	1.1	0.35	0.40*	0.45
A	t_R (dak)	4.80	4.80	4.81	1.02	1.03	1.03
	R_(A-Asaf1)	3.12	3.12	3.14	4.22	4.22	4.23
	N	6051	6054	6054	9303	9307	9309
	PAs	1.09	1.09	1.08	1.01	1.02	1.02
Asaf1	t_R (dak)	2.79	2.78	2.78	0.54	0.57	0.55
	R_(Asaf1-A)	3.14	3.12	3.13	4.21	4.22	4.23
	N	7415	7432	7428	9677	9672	9674
	PAs	1.03	1.04	1.04	1.01	1.01	1.02
Asaf2	t_R (dak)	7.65	7.65	7.64	2.62	2.63	2.65
	R_(Asaf2-A)	5.63	5.64	5.65	5.20	5.23	5.22
	N	7803	7800	7798	9298	9291	9276
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Hareketli faz akış hızında yapılan değişikliğin Azitromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.43. Azitromisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Dalga boyu (nm)			Dalga boyu (nm)		
		238	240*	242	238	240*	242
A	t_R (dak)	4.80	4.80	4.81	1.02	1.03	1.03
	R_(A-Asaf1)	3.12	3.12	3.14	4.22	4.22	4.23
	N	6051	6054	6054	9303	9307	9309
	PAs	1.09	1.09	1.08	1.01	1.02	1.02
Asaf1	t_R (dak)	2.79	2.78	2.78	0.54	0.57	0.55
	R_(Asaf1-A)	3.14	3.12	3.13	4.21	4.22	4.23
	N	7415	7432	7428	9677	9672	9674
	PAs	1.03	1.04	1.04	1.01	1.01	1.02
Asaf2	t_R (dak)	7.65	7.65	7.64	2.62	2.63	2.65
	R_(Asaf2-A)	5.63	5.64	5.65	5.20	5.23	5.22
	N	7803	7800	7798	9298	9291	9276
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Dedektör dalga boyunda yapılan 2 birimlik değişikliğin Azitromisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Çözeltilerin kararlılığı

% 100'lük derişimde Azitromisin ve safsızlıklar eklenmiş plasebo çözeltisinin oda sıcaklığında (+25°C) 48 saat boyunca 6 saat aralıklarla yapılan analizlerinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.44'de verilmiştir.

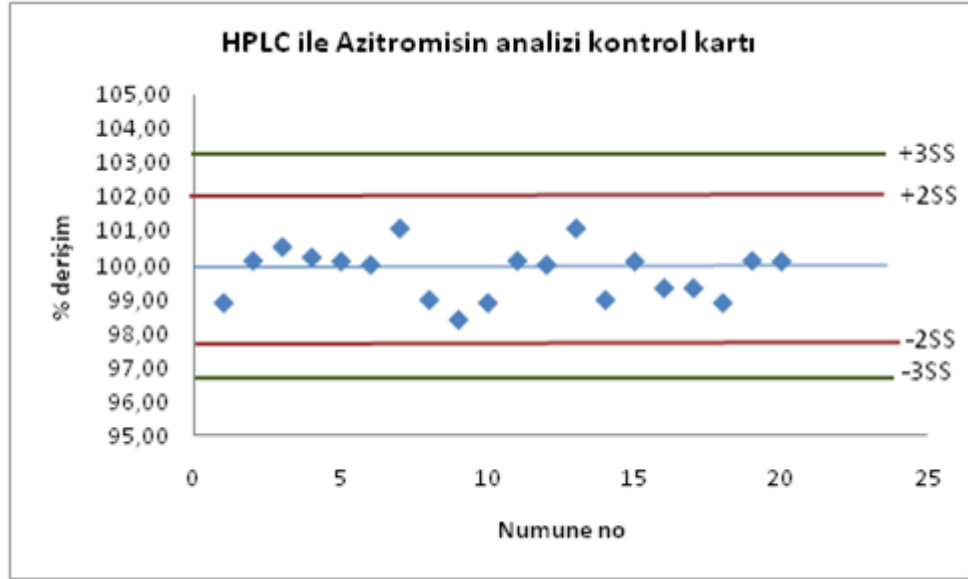
Tablo 4.44. Azitromisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları

Saat	HPLC % Derişim			UPLC % Derişim		
	A	Asaf1	Asaf2	A	Asaf1	Asaf2
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
6	100.67	100.61	100.83	100.59	100.55	100.94
12	99.71	100.17	100.78	99.70	100.13	100.71
18	100.45	101.13	99.93	100.55	101.29	99.88
24	99.87	100.36	101.01	99.63	100.42	101.12
36	100.12	101.21	101.72	100.56	101.47	101.66
42	101.61	100.58	101.32	100.51	100.61	101.35
48	100.31	101.03	101.61	100.33	101.15	101.58

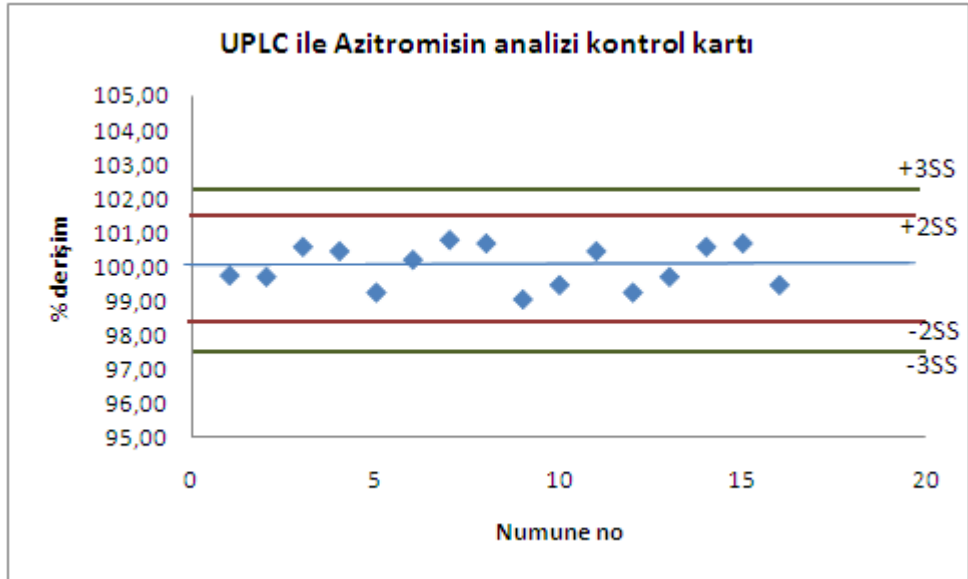
Hareketli faz: pH 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65:35, h/h), akış hızı: HPLC; 1.0 mL/dak, UPLC; 0.4 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Kalite Kontrol Kartları

20 adet plasebo (% 100 derişimde Azitromisin ve safsızlıklarını içeren) çözeltisinin analizleri sonucu elde edilen Azitromisin miktarları ile kalite kontrol kartları oluşturulmuştur (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.15. Azitromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)



Şekil 4.16. Azitromisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)

4.3. Spiramisin İçin Kromatografik Yöntemlerin Analiz Bulguları

4.3.1. Yöntemlerin Optimizasyonu

Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC sistemleri ile analizleri için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, sabit faz seçimi, hareketli fazın bileşimi, pH'sı ve akış hızının, Spiramisin ve safsızlıklarının kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kromatografik sistemin test edilen kromatografik koşullardaki t_0 değerinin saptanması için metanol sisteme enjekte edilmiş ve metanolün alıkonma zamanı t_0 değeri olarak alınmıştır.

Dedektör seçimi

Spiramisin, yüksek absorpsiyon gösteren bir molekül olduğundan dizi diyot dedektör ile çalışılmıştır. Maksimum absorpsiyon verdiği 240 nm dedeksiyon dalga boyu olarak seçilmiştir.

Sabit fazın belirlenmesi

Spiramisin ve safsızlıkları apolar yapıda moleküller olduğundan ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan C8 ve C18 HPLC kolonları kullanılmış ve en iyi kromatografik parametreler C18 kolon ile elde edilmiştir. 150 ve 250 mm'lik kolonlar denenmiş ve 250 mm'lik kolonla daha iyi bir ayırıcılık elde edilmiştir. HPLC sisteminde, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5 μ m kolon, UPLC sisteminde Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1.7 μ m kolon sabit faz olarak seçilmiştir.

Hareketli Fazın Belirlenmesi

Kullanılacak hareketli fazın bileşimindeki tampon çözelti, pH'sı, derişimi, organik çözücü ve oranı değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Tampon türü - organik çözücünün belirlenmesi;

Fosfat, sitrat ve asetat tamponlarına ayrı ayrı değişik oranlarda asetonitril veya metanol eklenerek hareketli fazlar hazırlanmıştır. Fosfat ve sitrat tamponlarının asetonitril ve metanol ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma gözlenmiştir. Asetat tamponunun kullanıldığı hareketli faz ile simetrik ve birbiri ile girişim yapmayan pikler elde edilmiştir. Farklı oranlarda asetonitril ile hazırlanan hareketli faz sistemleri ile elde edilen piklere ait kromatografik parametreler Tablo 4.45’de verilmiştir.

Tablo 4.45. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde asetonytril yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi.

% ACN		20	25	30	35
S	t_R (dak)	10.07	9.13	8.81	6.55
	k'	6.63	6.33	6.18	5.98
	R_(S-Ssaf3)	2.57	2.45	2.04	1.91
	N	6647	6609	6530	6458
	PAs	1.30	1.11	1.05	0.91
Ssaf1	t_R (dak)	3.05	2.78	2.21	2.10
	k'	4.63	4.51	4.02	3.95
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.64	2.13	1.82	1.45
	N	6033	5834	5813	5760
	Pas	1.34	1.09	0.97	0.88
Ssaf2	t_R (dak)	5.57	4.65	3.63	2.82
	k'	6.32	6.14	5.92	5.85
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.64	2.13	1.82	1.45
	N	5131	4809	4578	3394
	PAs	1.29	0.98	0.96	0.89
Ssaf3	t_R (dak)	8.57	7.65	6.81	5.12
	k'	3.32	3.24	3.12	3.10
	R_(S-Ssaf3)	2.57	2.45	2.04	1.91
	N	8130	7800	6577	6044
	PAs	1.32	0.98	0.96	0.92

ACN: Asetonytril, t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: HPLC sistemi, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5µm kolon hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonytril, akış hızı: 1mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Tampon derişiminin belirlenmesi

Asetat tamponu derişiminin analize etkisinin araştırılması için 5 mM, 10 mM ve 15 mM asetat tamponu ve asetonytril (70:30, h/h) içeren çözeltiler hareketli faz

olarak denenmiştir. Bu koşullarda elde edilen kromatografik bulgular Tablo 4.46’da verilmiştir.

Tablo 4.46. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

Tampon derişimi		5 mM	10 mM	15 mM
S	t_R (dak)	8.83	8.80	8.76
	k'	6.23	6.16	6.08
	R_(S-Ssaf3)	2.32	2.07	1.91
	N	6589	6564	6528
	PAs	1.21	1.03	0.94
Ssaf1	t_R (dak)	2.28	2.21	2.13
	k'	4.11	4.02	3.97
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.93	1.84	1.75
	N	5734	5713	5709
	Pas	1.09	0.98	0.86
Ssaf2	t_R (dak)	3.65	3.63	3.02
	k'	5.94	5.90	5.77
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.93	1.84	1.75
	N	4649	4588	4398
	PAs	1.05	0.96	0.91
Ssaf3	t_R (dak)	6.90	6.83	6.72
	k'	3.20	3.12	3.11
	R_(S-Ssaf3)	2.32	2.07	1.91
	N	6813	6570	6141
	PAs	1.08	0.96	0.90

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: HPLC sistemi, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5µm kolon hareketli faz: pH: 2.5, asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: 1mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Tampon pH'sının belirlenmesi

Hareketli faz pH'sının en uygun olduğu değerin saptanması amacıyla asetat tamponunun pH değeri 2.0, 2.5, 3.0 ve 3.5 olarak değiştirilmiştir. pH değerinin kromatografik parametrelere etkisi Tablo 4.47'de verilmiştir.

Tablo 4.47. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde tampon pH'sının kromatografik parametrelere etkisi.

pH		2.0	2.5	3.0	3.5
S	t_R (dak)	8.93	8.81	8.50	8.41
	k'	6.23	6.18	5.91	5.88
	R_(S-Ssaf3)	2.18	2.02	1.88	1.49
	N	6577	6538	6497	6444
	PAs	1.14	1.02	0.81	0.78
Ssaf1	t_R (dak)	2.38	2.21	2.15	2.13
	k'	4.22	4.02	3.90	3.78
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.03	1.82	1.77	1.67
	N	5734	5719	5680	5599
	Pas	1.15	0.98	0.91	0.90
Ssaf2	t_R (dak)	3.66	3.61	3.58	3.42
	k'	6.04	5.95	5.86	5.80
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.91	1.83	1.75	1.71
	N	4601	4584	4399	4381
	PAs	1.08	0.98	0.92	0.88
Ssaf3	t_R (dak)	6.85	6.81	6.72	6.55
	k'	3.17	3.13	3.08	3.01
	R_(S-Ssaf3)	2.18	2.02	1.88	1.49
	N	6809	6577	6116	6004
	PAs	1.08	0.97	0.90	0.87

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: HPLC sistemi, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5µm kolon hareketli faz: pH: 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: 1mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Buna göre en iyi ayırımın sağlandığı hareketli faz pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril, (70:30, h/h) olarak belirlenmiştir.

HPLC ve UPLC sisteminde aynı hareketli faz kullanılmıştır.

Akış hızının belirlenmesi

HPLC sisteminde 0.8, 1.0, 1.2 ve 1.4 mL/dak akış hızlarında, UPLC sisteminde ise 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 mL/dak akış hızlarında analizler yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.48’de verilmiştir.

Tablo 4.48. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

		HPLC sistemi				UPLC sistemi			
Akış Hızı (mL/dak)		0.8	1.0	1.2	1.4	0.2	0.3	0.4	0.5
S	t_R (dak)	10.11	9.16	8.82	7.51	1.91	1.67	1.22	1.09
	k'	6.67	6.36	6.19	5.91	8.36	8.32	8.30	8.21
	R_(S-Ssaf3)	2.59	2.21	2.04	1.87	4.84	3.93	3.63	3.02
	N	6651	6609	6532	6463	9022	8932	8709	8677
	PAs	1.33	1.12	1.04	0.90	1.08	1.01	0.92	0.86
Ssaf1	t_R (dak)	3.07	2.76	2.23	2.10	0.41	0.47	0.59	0.64
	k'	4.63	4.51	4.02	3.95	4.32	6.67	8.54	9.02
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.64	2.13	1.82	1.45	3.22	2.65	2.05	1.89
	N	6033	5834	5813	5760	9563	9430	9382	9271
	Pas	1.37	1.09	0.96	0.91	1.08	1.01	1.06	1.06
Ssaf2	t_R (dak)	5.51	4.69	3.64	2.80	0.71	0.66	0.62	0.60
	k'	6.37	6.11	5.90	5.81	5.84	5.41	5.04	4.91
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.66	2.17	1.84	1.40	2.82	2.65	2.19	2.09
	N	5137	4811	4583	3744	9830	9761	9308	9116
	PAs	1.29	0.98	0.96	0.89	1.10	1.00	0.98	0.98
Ssaf3	t_R (dak)	8.57	7.65	6.81	5.12	1.71	1.36	0.92	0.73
	k'	3.37	3.21	3.16	3.11	5.34	5.31	5.01	4.98
	R_(S-Ssaf3)	2.59	2.41	2.01	1.87	4.21	3.93	3.65	3.29
	N	8234	7813	6545	6167	9803	9444	9301	9121
	PAs	1.35	1.17	0.96	0.90	1.13	1.01	0.97	0.95

t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: HPLC sistemi, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5µm kolon hareketli faz: 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Enjeksiyon hacmi değiştirilerek kromatografik parametrelerin nasıl değiştiği incelenmiş ve elde edilen kromatografik parametreler Tablo 4.49’da verilmiştir.

Tablo 4.49. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi

Enjeksiyon hacmi (μ L)		HPLC				UPLC			
		5	10	20	40	3	5	7	9
S	t_R (dak)	8.89	8.86	8.82	8.51	1.71	1.67	1.62	1.58
	k'	6.69	6.31	6.22	5.97	8.41	8.36	8.28	8.22
	R_(S-Ssaf3)	2.44	2.26	2.14	1.99	4.87	4.33	4.02	3.95
	N	6658	6600	6570	6441	9082	8938	8723	8622
	PAs	1.22	1.09	1.02	0.95	1.07	1.01	0.95	0.91
Ssaf1	t_R (dak)	2.88	2.86	2.80	2.74	0.49	0.48	0.45	0.41
	k'	4.66	4.50	4.11	3.98	4.52	5.66	6.59	7.01
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.43	2.02	1.82	1.64	3.89	2.84	2.65	2.61
	N	6039	5841	5819	5765	9576	9435	9371	9255
	Pas	1.23	1.12	0.96	0.91	1.08	1.01	1.06	1.06
Ssaf2	t_R (dak)	3.75	3.71	3.65	3.60	0.68	0.66	0.63	0.60
	k'	6.39	6.17	5.94	5.87	5.88	5.46	5.14	4.98
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	2.06	1.97	1.84	1.66	3.28	2.66	2.25	2.16
	N	5141	4832	4589	3778	9830	9761	9308	9116
	PAs	1.21	1.09	0.99	0.88	1.11	1.02	0.97	0.97
Ssaf3	t_R (dak)	6.97	6.92	6.81	6.62	1.41	1.36	1.22	1.14
	k'	3.57	3.41	3.18	3.10	5.40	5.33	5.07	4.98
	R_(S-Ssaf3)	2.51	2.46	2.10	2.08	4.26	3.95	3.44	3.31
	N	8132	7781	6476	6228	9711	9649	9318	9129
	PAs	1.39	1.12	0.98	0.92	1.11	1.00	0.95	0.93

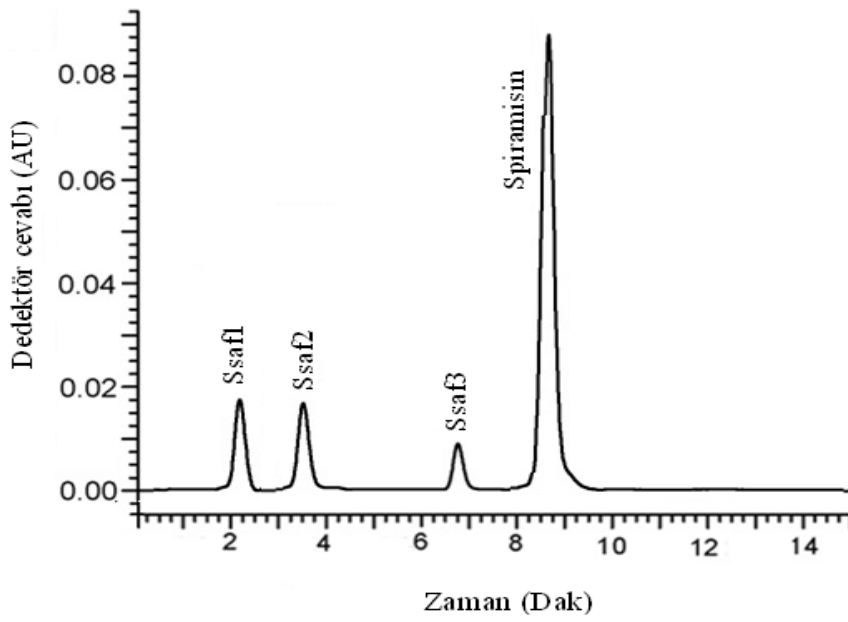
t_R: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, PAs: Pik asimetri oranı. [Kromatografik koşullar: HPLC sistemi, Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5 μ m kolon hareketli faz: 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti]

Optimizasyon çalışmaları sonunda HPLC ve UPLC için belirlenen kromatografik koşullar Tablo 4.50’de verilmiştir.

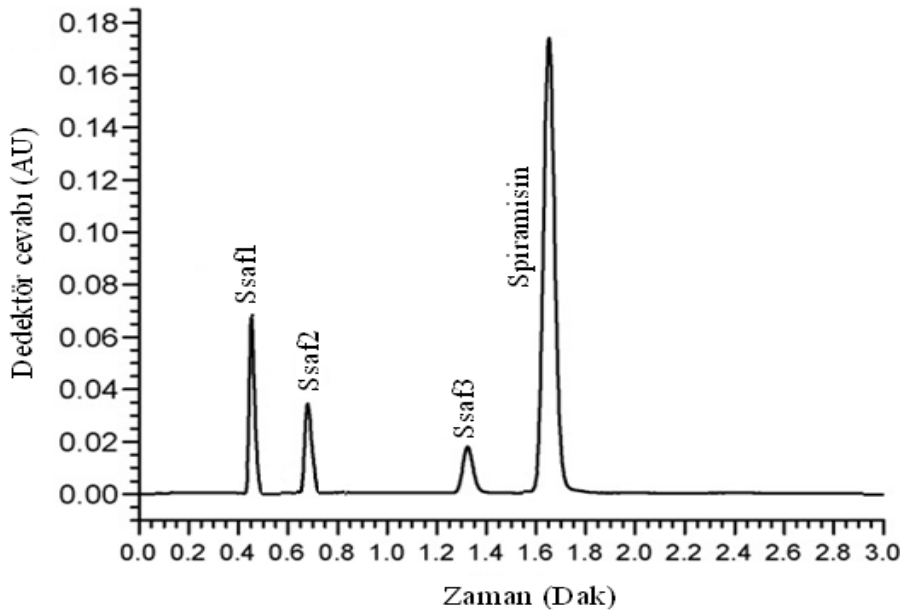
Tablo 4.50. HPLC ve UPLC sistemleri için belirlenen kromatografik koşullar

	HPLC	UPLC
Kolon	Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5µm	Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1.7 µm
Dedektör	240 nm, DAD	240 nm, DAD
Hareketli faz	pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril, (70 : 30, h/h)	pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril, (70 : 30, h/h)
Akış hızı	1.2 mL/dak	0.3 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	20 µL	5 µL

Saptanan optimum koşullarda Spiramisin ve safsızlıklarının analizi HPLC sisteminde 10.0 dak, UPLC sisteminde 2.0 dak’da gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15, 4.16).



Şekil 4.17. Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 μ L]



Şekil 4.18. Spiramisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 μ L]

4.1.2. Yöntemlerin Validasyonu

Sistem uygunluk çalışması

HPLC ve UPLC sistemlerinin uygunluğunu test etmek amacıyla standart etken madde ve safsızlık çözeltileri 5 kez enjekte edilmiştir. Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizlerinde elde edilen alıkonma zamanı, pik alanı ve ayırıcılık değerleri Tablo 4.51 ve Tablo 4.52’de verilmiştir.

Tablo 4.51. Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	S			Ssaf1			Ssaf2			Ssaf3		
	t _R	Alan	R*	t _R	Alan	R**	t _R	Alan	R**	t _R	Alan	R*
STD 1	8.84	5456.31	2.02	2.21	1053.03	1.86	3.63	1051.15	1.86	6.81	739.05	2.02
STD 2	8.81	5434.01	2.04	2.20	1036.89	1.78	3.62	1057.12	1.78	6.82	731.11	2.04
STD 3	8.80	5417.25	2.02	2.18	1075.01	1.82	3.66	1055.75	1.82	6.86	756.91	2.02
STD 4	8.81	5464.01	2.03	2.21	1053.65	1.80	3.63	1059.72	1.80	6.83	723.01	2.03
STD 5	8.78	5427.29	1.98	2.22	1059.52	1.84	3.62	1051.71	1.84	6.82	726.44	1.98
X	8.81	5439.77	2.02	2.20	1055.62	1.82	3.63	1055.09	1.82	6.83	735.30	2.02
SS	0.02	19.73	0.02	0.02	13.72	0.03	0.02	3.64	0.03	0.02	13.49	0.02
BSS(%)	0.25	0.36	1.13	0.69	1.30	1.74	0.45	0.34	1.74	0.28	1.83	1.13

t_R: Alıkonma zamanı, R*: S ile Ssaf3 arası ayırıcılık, R**: Ssaf1 ile Ssaf2 arası ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]

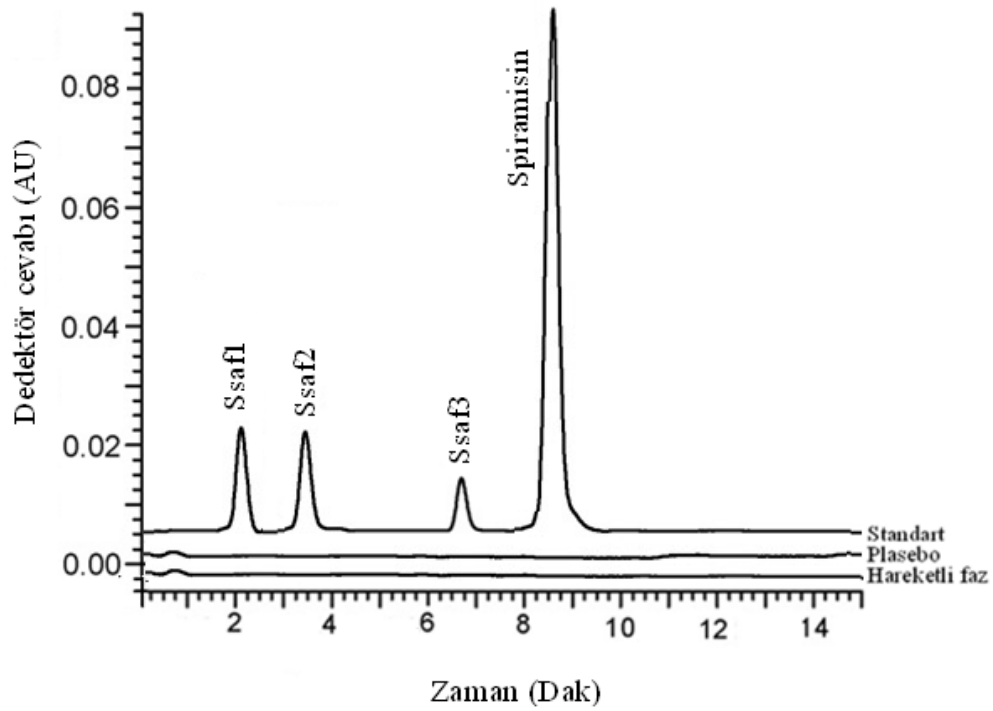
Tablo 4.52. Spiramisin ve safsızlıklarının UPLC ile analizinde elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	S			Ssaf1			Ssaf2			Ssaf3		
	t _R	Alan	R*	t _R	Alan	R**	t _R	Alan	R**	t _R	Alan	R*
STD 1	1.67	10175.45	3.92	0.47	4105.30	2.65	0.66	3951.15	2.65	1.36	1331.81	3.92
STD 2	1.68	10162.54	3.94	0.45	4113.68	2.67	0.63	3972.12	2.67	1.34	1328.73	3.94
STD 3	1.66	10125.17	3.92	0.46	4107.51	2.64	0.65	3955.75	2.64	1.36	1329.75	3.92
STD 4	1.66	10164.01	3.93	0.45	4105.36	2.63	0.63	3959.72	2.63	1.34	1330.23	3.93
STD 5	1.65	10154.27	3.94	0.46	4106.52	2.68	0.64	3951.71	2.68	1.33	1332.72	3.94
X	1.66	10156.29	3.93	0.46	4107.67	2.65	0.64	3958.09	2.65	1.35	1330.65	3.93
SS	0.01	18.96	0.01	0.01	3.48	0.02	0.01	8.57	0.02	0.01	1.60	0.01
BSS(%)	0.69	0.19	0.25	1.83	0.08	0.78	2.03	0.22	0.78	1.00	0.12	0.25

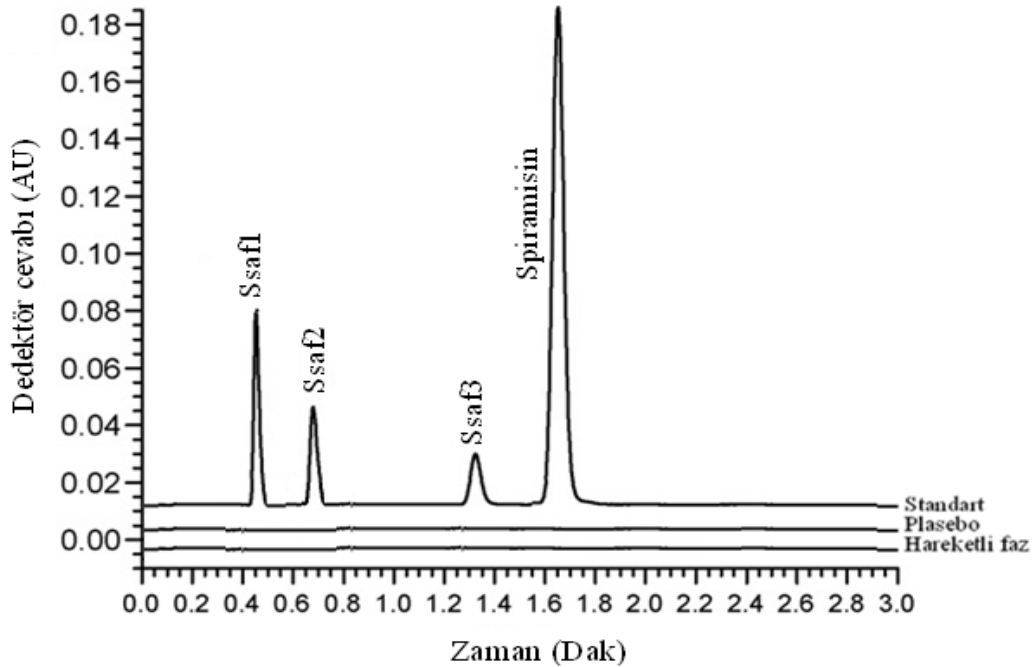
t_R: Alıkonma zamanı, R*: S ile Ssaf3 arası ayırıcılık, R**: Ssaf1 ile Ssaf2 arası ayırıcılık, X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]

Seçicilik (Selectivity)

Hareketli faz, plasebo çözeltisi, standart etken madde ve safsızlıklarını içeren çözeltiler, HPLC ve UPLC sistemlerine enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak pikler arası herhangi bir girişim olup olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.19. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Spiramisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltilerin HPLC ile analizine ait kromatogramlar [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 20 µL]



Şekil 4.20. Hareketli faz, plasebo çözeltisi ve Spiramisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltilerin UPLC ile analizine ait kromatogram [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: 5 µL]

Sistem tekrarlanabilirliği

% 100'lük Spiramisin ve safsızlık çözeltilerinin 10 kez enjekte edilmesi ile elde edilen pik alanları ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 4.53'de verilmiştir.

Tablo 4.53. Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde sistem tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen pik alanları

	HPLC				UPLC			
	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
STD 1	5439.77	1055.62	1055.09	735.30	10156.29	4107.67	3958.09	1330.65
STD 2	5450.13	1058.34	1053.03	732.35	10157.86	4104.66	3950.89	1331.87
STD 3	5478.55	1050.21	1036.89	731.01	10175.57	4105.89	3976.27	1330.34
STD 4	5524.31	1036.95	1075.01	738.42	10174.86	4110.60	3931.79	1331.62
STD 5	5427.17	1052.21	1053.65	735.31	10154.30	4116.52	3941.08	1331.01
STD 6	5517.46	1054.69	1059.52	730.22	10149.88	4112.69	3919.56	1330.91
STD 7	5508.01	1052.15	1071.15	733.73	10174.73	4111.81	3984.73	1330.56
STD 8	5466.92	1054.96	1052.64	732.92	10167.49	4108.87	3927.39	1331.72
STD 9	5502.18	1055.10	1064.43	738.53	10168.79	4109.44	3911.90	1330.67
STD 10	5492.31	1052.24	1062.29	735.02	10175.73	4106.46	3993.16	1330.55
X	5480.68	1052.25	1058.37	734.28	10165.55	4109.46	3949.49	1330.99
SS	33.77	5.85	10.80	2.81	10.03	3.58	28.13	0.55
BSS	0.62	0.56	1.02	0.38	0.10	0.09	0.71	0.04

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma; [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

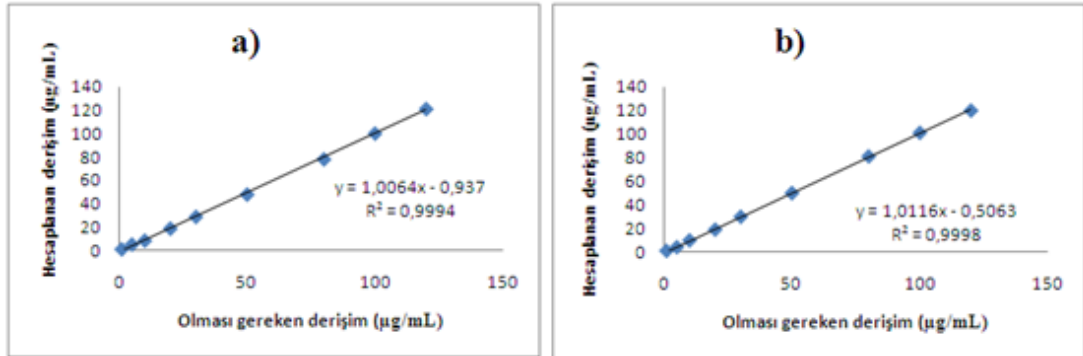
Doğrusallık

Spiramisin ve safsızlık çözeltileri için oluşturulan kalibrasyon eğrilerine ait veriler Tablo 4.54’de, yöntemin doğrusallık kontrol grafikleri Şekil 4.19’da verilmiştir.

Tablo 4.54. Spiramisin ve safsızlık çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerine ait veriler (n=6)

	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
HPLC				
y=ax+b	53.62x-66.84	10.49x+10.09	10.53x+9.59	7.59x-4.62
R	0.9994	0.9994	0.9995	0.9995
r²	0.9988	0.9989	0.9990	0.9991
Uygulama aralığı	0.69 – 83 $\mu\text{g/mL}$	3.45-414 ng/mL	3.45-414 ng/mL	1.73-207 ng/mL
UPLC				
y=ax+b	105.22x-65.60	41.75x+2.93	39.36x+33.17	12.53x+1.37
R	0.9995	0.9995	0.9998	0.9996
r²	0.9991	0.9991	0.9996	0.9993
Uygulama aralığı	0.69 – 83 $\mu\text{g/mL}$	3.45-414 ng/mL	3.45-414 ng/mL	1.73-207 ng/mL

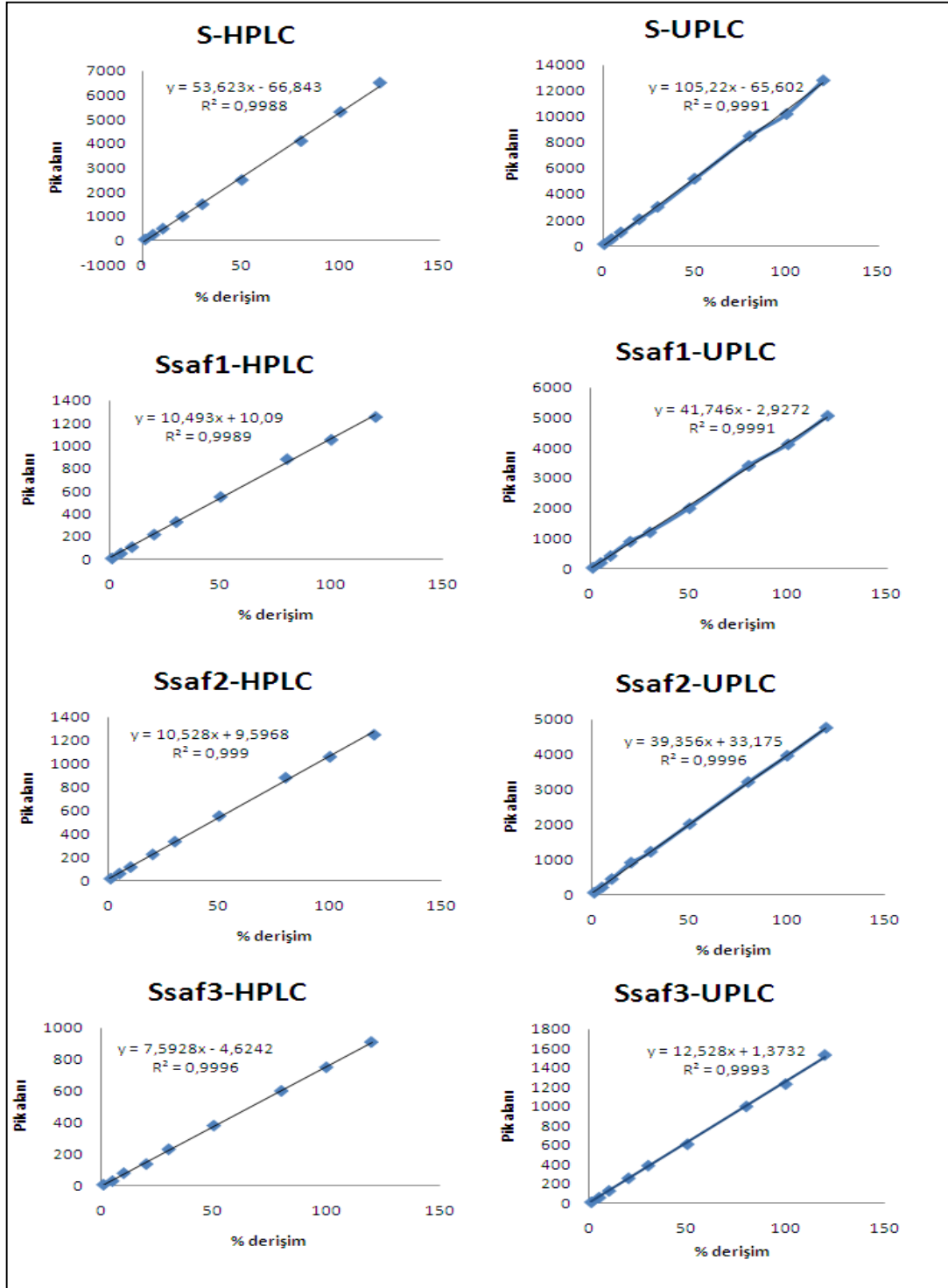
[Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 μL , UPLC; 5 μL]



Şekil 4.21. Spiramisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerin doğrusallık kontrol grafikleri a) HPLC sistemi için, b) UPLC sistemi için

Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu $p < 0.05$ olup derişim

ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal ve r tesadüfen bulunmuş bir değer değildir. (İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 2).



Şekil 4.22. Spiramisin ve safsızlık analizleri için geliştirilen yöntemlerle elde edilen kalibrasyon eğrileri

Doğruluk

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Spiramisin standartının geri kazanım sonuçları Tablo 4.55’de verilmiştir.

Tablo 4.55. Spiramisinin plasebodan geri kazanım sonuçları

Spiramisin Yüzdesi	HPLC		UPLC	
	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)	Elde edilen Miktar (%)	Geri kazanım (%)
% 80	81.13	101.41	79.81	99.76
	80.09	100.11	80.06	100.08
	79.14	98.93	80.34	100.43
% 100	100.43	100.43	100.81	100.81
	99.17	99.17	99.88	99.88
	98.68	98.68	99.62	99.62
% 120	119.51	99.59	119.80	99.83
	118.55	98.79	119.73	99.78
	120.91	100.76	120.08	100.07
	X	99.76	X	100.03
	SS	0.97	SS	0.38
	BSS (%)	0.97	BSS	0.38

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma; [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetronitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Keskinlik

Plasebo çözeltisine, % 80, 100 ve 120 oranında eklenen Spiramisin standartının gün içi ve günler arası keskinlik sonuçları Tablo 4.56 ve 4.57’de verilmiştir. Ayrıca farklı analizciler tarafından elde edilen keskinlik verileri Tablo 4.58’de verilmiştir.

Tablo 4.56. Spiramisin ve safsızlıklarının günüçi kesinlik verileri (n=6)

Spiramisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	79.36	80.61
SS	1.55	0.48
BSS	1.95	0.59
% 100		
X	99.65	100.03
SS	1.95	0.86
BSS	1.96	0.86
% 120		
X	119.58	120.04
SS	1.36	0.87
BSS	1.14	0.72

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma; [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonyril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.57. Spiramisin ve safsızlıklarının günler arası kesinlik verileri (n=6)

Spiramisin Yüzdesi	HPLC	UPLC
% 80		
X	78.69	79.94
SS	1.17	0.10
BSS	1.49	0.13
% 100		
X	99.38	100.13
SS	1.74	0.99
BSS	1.75	0.99
% 120		
X	120.24	119.71
SS	1.37	0.52
BSS	1.14	0.44

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma; [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonyril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tablo 4.58. Spiramisin ve safsızlıklarının farklı analizci ile elde edilen kesinlik verileri

Analizci	HPLC				UPLC			
	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
STD 1	5478.55	1050.21	1036.89	731.01	10175.62	4105.89	3976.27	1330.34
STD 2	5524.31	1036.95	1075.01	738.42	10174.91	4110.6	3931.79	1331.62
STD 3	5427.17	1052.21	1053.65	735.31	10154.39	4116.52	3941.08	1331.01
STD 4	5517.46	1054.69	1059.52	730.22	10149.92	4112.69	3919.56	1330.91
STD 5	5508.01	1052.15	1071.15	733.73	10174.73	4111.81	3984.73	1330.56
STD 6	5466.92	1054.96	1052.64	732.92	10167.5	4108.87	3927.39	1331.72
X	5487.07	1050.20	1058.14	733.60	10166.18	4111.06	3946.80	1331.03
SS	36.92	6.73	13.84	2.99	11.35	3.60	27.14	0.55
BSS	0.67	0.64	1.31	0.41	0.11	0.09	0.69	0.04
Analizci	HPLC				UPLC			
	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
STD 1	5439.77	1055.62	1055.09	735.3	10156.32	4107.67	3958.09	1330.65
STD 2	5450.13	1058.34	1053.03	732.35	10157.97	4104.66	3950.89	1331.87
STD 3	5478.55	1050.21	1036.89	731.01	10175.66	4105.89	3976.27	1330.34
STD 4	5466.92	1054.96	1052.64	732.92	10167.51	4108.87	3927.39	1331.72
STD 5	5502.18	1055.1	1064.43	738.53	10168.83	4109.44	3911.9	1330.67
STD 6	5492.31	1052.24	1062.29	735.02	10175.75	4106.46	3993.16	1330.55
X	5471.64	1054.41	1054.06	734.19	10167.01	4107.17	3952.95	1330.97
SS	24.12	2.83	9.74	2.68	8.38	1.83	30.10	0.65
BSS	0.44	0.27	0.92	0.36	0.08	0.04	0.76	0.05

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma; [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Farklı analizciler tarafından elde edilen veriler istatistiksel olarak (Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi) karşılaştırılmış olup bulgular arasında fark yoktur ($T_{hesap} = 5.53$, $T_{tablo} = 0$, $T_{hesap} > T_{tablo}$, $p > 0.05$).

Gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim LOD olarak belirlenmiştir (Tablo 4.59).

Tablo 4.59. Spiramisin ve safsızlıkları için gözlenebilirlik sınırları

Gözlenebilirlik sınırı (ng/mL)		
	HPLC	UPLC
S	172.50	130.00
Ssaf1	1.15	0.86
Ssaf2	1.15	0.86
Ssaf3	1.15	1.00

Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC ; 1.2 mL/dak, UPLC; 0,3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Raporlama seviyesi

% 0.1'lik tablet çözeltisinden yapılan 6 enjeksiyon sonucu elde edilen pik alan değerleri Tablo 4.60'da verilmiştir.

Tablo 4.60. % 0.1'lik raporlama seviyesinde Spiramisin safsızlıklarına ait pik alan değerleri

	HPLC			UPLC		
	Pik alanı (Ssaf1)	Pik alanı (Ssaf2)	Pik alanı (Ssaf3)	Pik alanı (Ssaf1)	Pik alanı (Ssaf2)	Pik alanı (Ssaf3)
1	55.09	51.71	35.3	107.67	95.89	60.65
2	58.34	53.03	32.35	104.66	95.09	61.87
3	50.32	56.89	31.01	105.89	97.67	60.34
4	52.82	52.64	32.92	108.87	92.79	61.72
5	55.11	54.43	38.53	109.44	91.19	62.67
6	52.93	50.29	35.02	106.46	99.36	62.55
X	54.10	53.17	34.19	107.17	95.33	61.63
SS	2.73	2.29	2.68	1.83	3.02	0.96
BSS (%)	5.05	4.30	7.83	1.71	3.17	1.56

X: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0,3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Alt tayin sınırı (LOQ)

Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde sinyal/gürültü oranının 10 olduğu derişim LOQ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.61).

Tablo 4.61. Spiramisin ve safsızlıkları için alt tayin sınırı

	Alt tayin sınırı (ng/mL)	
	HPLC	UPLC
S	690.00	517.50
Ssaf1	3.45	2.58
Ssaf2	3.45	2.58
Ssaf3	1.73	1.30

Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC ; 1.2 mL/dak, UPLC; 0,3 mL/dak, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL

Sağlamlık

% 100 derişimde standart Spiramisin ve safsızlık çözeltilerinin analizlerinde organik çözücü oranı (% 28 – 32), tampon pH'sı (2.3 – 2.7), akış hızı (HPLC için 1.1-1.3 mL/dak, UPLC için 0.25-0.35 mL/dak) ve dalga boyu (238-242 nm) değiştirilerek sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır (Tablo 4.62-4.65).

Tablo 4.62. Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde organik çözücü oranı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Tampon /organik çözücü oranı (h/h)			Tampon /organik çözücü oranı (h/h)		
		72/28	70/30*	68/32	72/28	70/30*	68/32
S	t_R (dak)	8.81	8.80	8.81	1.67	1.68	1.66
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	5141	5167	5155	7321	7317	7329
	PAs	1.06	1.06	1.07	1.02	1.01	1.02
Ssaf1	t_R (dak)	2.21	2.20	2.20	0.47	0.45	0.46
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6341	6434	6421	8670	7678	7667
	PAs	1.05	1.04	1.04	1.00	1.00	1.01
Ssaf2	t_R (dak)	3.63	3.62	3.63	0.66	0.65	0.64
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6780	6789	6779	8929	8910	8927
	PAs	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01	1.01
Ssaf3	t_R (dak)	6.81	6.82	6.82	1.36	1.34	1.33
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	6786	6780	6779	8918	8909	8921
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur.

[Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril, akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Organik çözücü oranında yapılan % 2'lik değişikliğin Spiramisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.63. Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde tampon pH değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC pH			UPLC pH		
		2.3	2.5*	2.7	2.3	2.5*	2.7
S	t_R (dak)	8.81	8.80	8.81	1.67	1.68	1.66
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	5141	5167	5155	7321	7317	7329
	PAs	1.06	1.06	1.07	1.02	1.01	1.02
Ssaf1	t_R (dak)	2.21	2.20	2.20	0.47	0.45	0.46
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6341	6434	6421	8670	7678	7667
	PAs	1.05	1.04	1.04	1.00	1.00	1.01
Ssaf2	t_R (dak)	3.63	3.62	3.63	0.66	0.65	0.64
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6780	6789	6779	8929	8910	8927
	PAs	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01	1.01
Ssaf3	t_R (dak)	6.81	6.82	6.82	1.36	1.34	1.33
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	6786	6780	6779	8918	8909	8921
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC; 1.2 mL/dak, UPLC; 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren % 100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Tampon pH değerinde yapılan 0.2 birimlik değişikliğin Spiramisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.64. Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde akış hızı değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Akış hızı (mL/dak)			Akış hızı (mL/dak)		
		1.1	1.2*	1.3	0.25	0.30*	0.35
S	t_R (dak)	8.81	8.80	8.81	1.67	1.68	1.66
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	5141	5167	5155	7321	7317	7329
	PAs	1.06	1.06	1.07	1.02	1.01	1.02
Ssaf1	t_R (dak)	2.21	2.20	2.20	0.47	0.45	0.46
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6341	6434	6421	8670	7678	7667
	PAs	1.05	1.04	1.04	1.00	1.00	1.01
Ssaf2	t_R (dak)	3.63	3.62	3.63	0.66	0.65	0.64
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6780	6789	6779	8929	8910	8927
	PAs	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01	1.01
Ssaf3	t_R (dak)	6.81	6.82	6.82	1.36	1.34	1.33
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	6786	6780	6779	8918	8909	8921
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: pH 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC; 20 µL, UPLC; 5 µL]

Hareketli faz akış hızında yapılan değişikliğin Spiramisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Tablo 4.65. Spiramisin ve safsızlıklarının analizlerinde dedektör dalga boyu değişiminin sağlamlığa etkisi

		HPLC			UPLC		
		Dalga boyu (nm)			Dalga boyu (nm)		
		238	240*	242	238	240*	242
S	t_R (dak)	8.81	8.80	8.81	1.67	1.68	1.66
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	5141	5167	5155	7321	7317	7329
	PAs	1.06	1.06	1.07	1.02	1.01	1.02
Ssaf1	t_R (dak)	2.21	2.20	2.20	0.47	0.45	0.46
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6341	6434	6421	8670	7678	7667
	PAs	1.05	1.04	1.04	1.00	1.00	1.01
Ssaf2	t_R (dak)	3.63	3.62	3.63	0.66	0.65	0.64
	R_(Ssaf1-Ssaf2)	1.83	1.82	1.80	2.65	2.67	2.68
	N	6780	6789	6779	8929	8910	8927
	PAs	0.99	0.99	1.01	1.00	1.01	1.01
Ssaf3	t_R (dak)	6.81	6.82	6.82	1.36	1.34	1.33
	R_(S-Ssaf3)	2.02	2.04	2.03	3.92	3.93	3.94
	N	6786	6780	6779	8918	8909	8921
	PAs	0.99	0.98	0.98	1.00	1.01	1.01

t_R: Alıkonma zamanı, PAs: Pik simetri oranı. R: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, *Optimum kromatografik koşuldur. [Hareketli faz: pH 2.5 asetat tamponu / asetonitril (70:30, h/h), akış hızı: HPLC / 1.2 mL/dak, UPLC / 0.3 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarını içeren %100'lük standart çözelti, enjeksiyon hacmi: HPLC / 20 µL, UPLC / 5 µL]

Dedektör dalga boyunda yapılan 2 birimlik değişikliğin Spiramisin ve safsızlık piklerine ait kromatografik parametreler üzerine etkisi istatistiksel olarak, Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış olup, sonuçlar arasında fark yoktur (p> 0.05).

Çözeltilerin kararlılığı

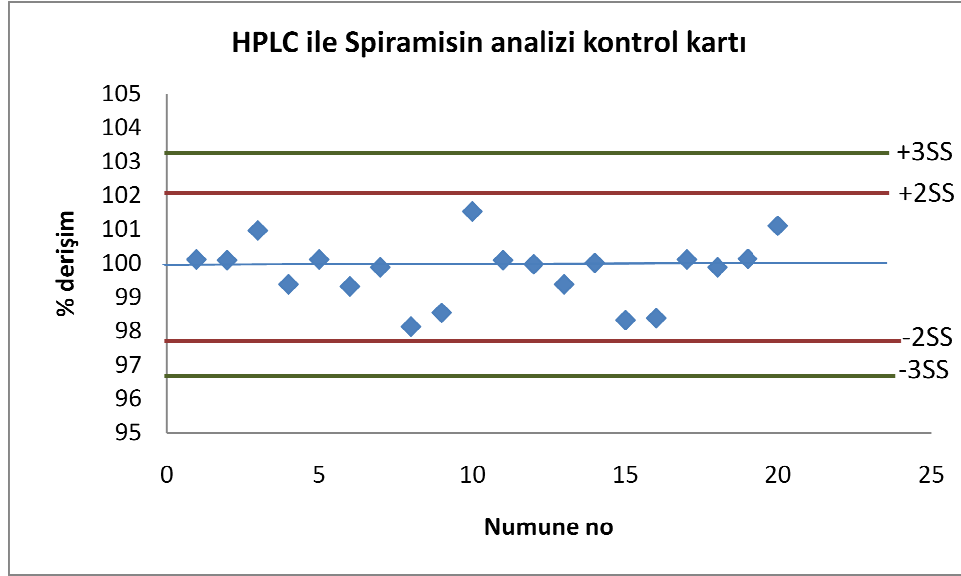
% 100'lük derişimde Spiramisin ve safsızlıklar eklenmiş plasebo çözeltisinin oda sıcaklığında (+25°C) 48 saat boyunca 6 saat aralıklarla yapılan analizlerinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.66'da verilmiştir.

Tablo 4.66. Spiramisin ve safsızlıklarının kararlılık çalışmaları

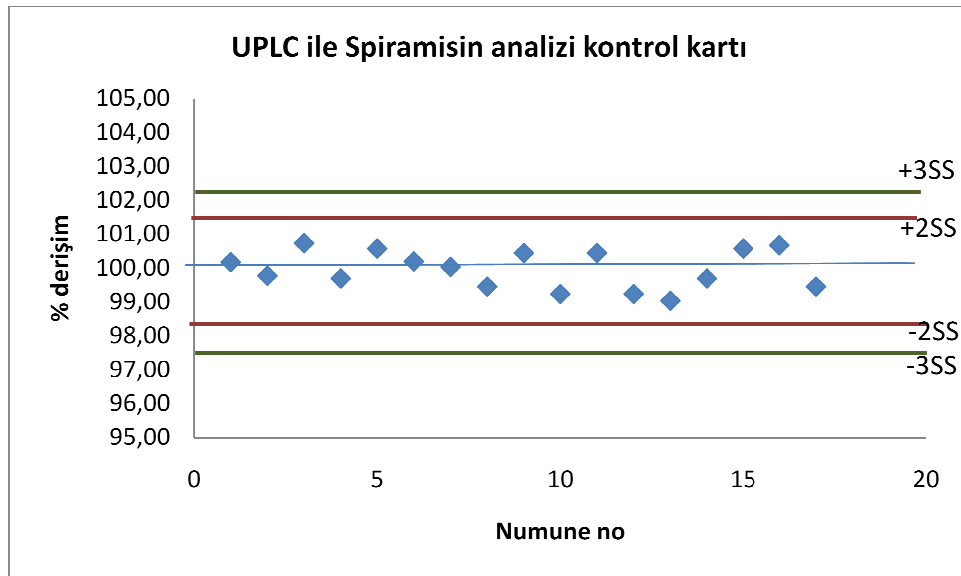
Saat	HPLC				UPLC			
	S	% Derişim			S	% Derişim		
		Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3		Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
6	100.34	100.61	100.83	100.32	100.19	100.55	100.11	100.13
12	99.98	100.92	100.78	100.21	100.21	100.13	100.51	100.52
18	100.17	101.02	99.93	100.23	100.55	100.29	99.89	100.09
24	100.21	100.56	101.01	100.15	100.90	100.45	100.12	100.34
36	100.19	100.78	101.72	100.17	100.54	100.48	100.66	100.89
42	101.01	100.55	101.32	100.22	100.51	100.60	100.35	100.91
48	100.71	100.92	101.61	100.28	100.78	100.19	100.58	100.93

Kalite Kontrol Kartları

20 adet plasebo (% 100 derişimde Spiramisin ve safsızlıklarını içeren) çözeltisinin analizleri sonucu elde edilen Spiramisin miktarları ile kalite kontrol kartları oluşturulmuştur (Şekil 4.20 ve 4.21).



Şekil 4.23. Spiramisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin HPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)



Şekil 4.24. Spiramisin eklenmiş plasebo çözeltilerinin UPLC analizleri sonucu oluşturulan kalite kontrol kartı (n=20)

4.4. Stres çalışmaları

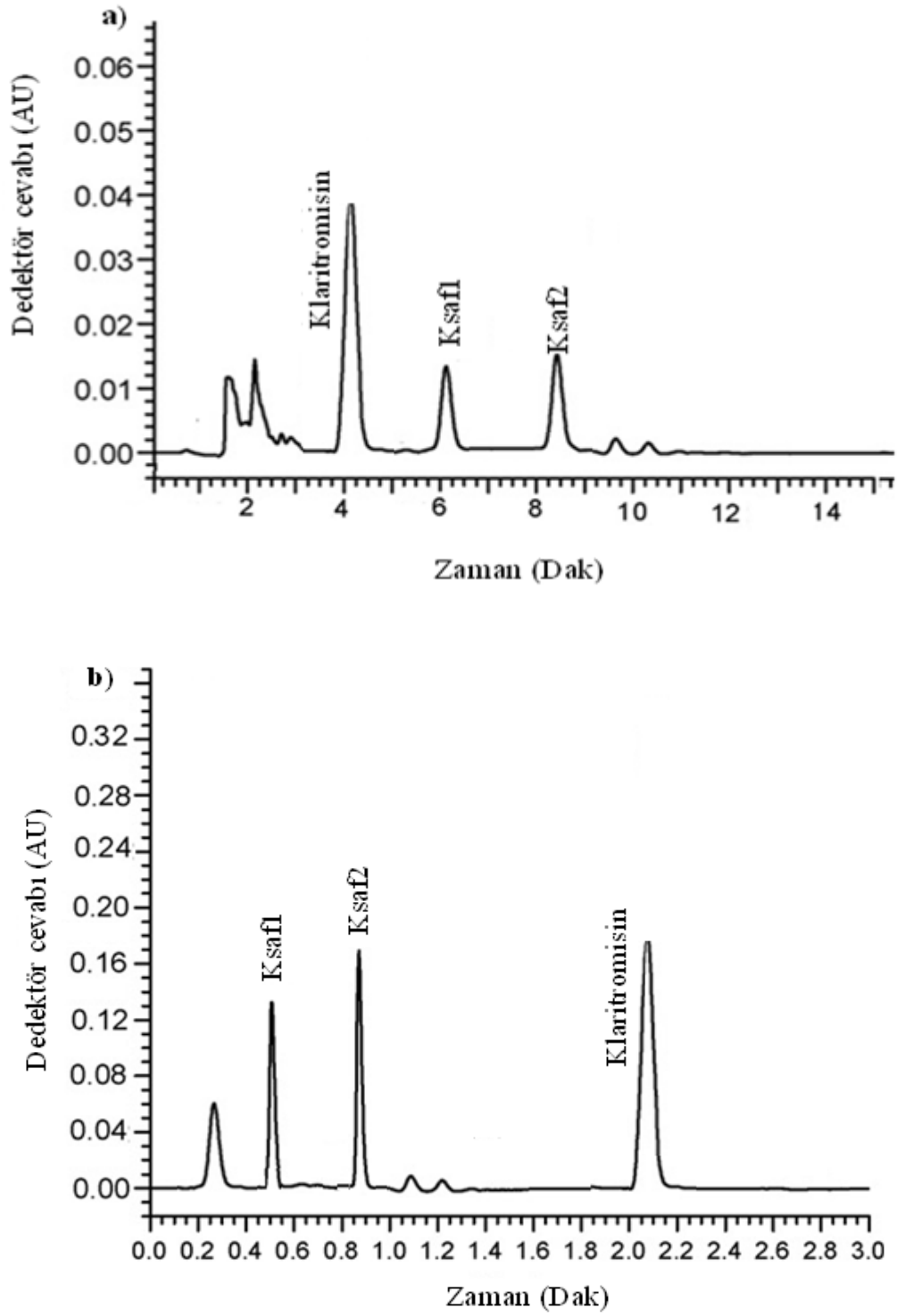
4.4.1. Klaritromisin için stres testi

% 100 derişimde Klaritromisin eklenen plaseboya uygulanan stres testi sonuçları Tablo 4.67’de verilmiştir.

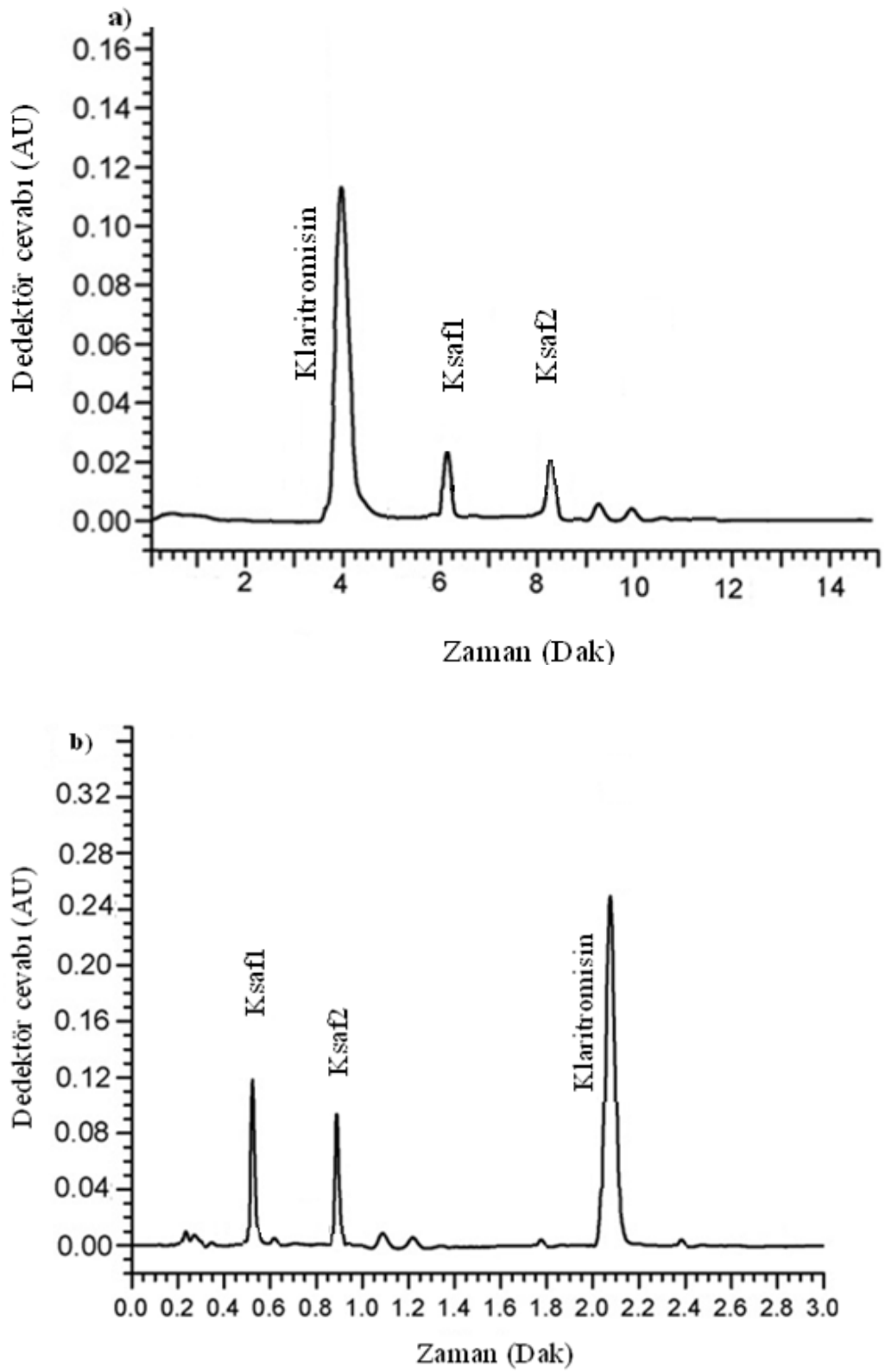
Tablo 4.67. Klaritromisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları

	HPLC			UPLC		
		% derişim			% derişim	
	K	Ksaf1	Ksaf2	K	Ksaf1	Ksaf2
Ortam koşulları	98.79	0.07	0.09	99.58	0.07	0.09
Güneş ışığı	98.22	0.06	0.08	99.22	0.06	0.08
Fotoliz	98.15	0.09	0.13	99.13	0.10	0.12
Sıcaklık	98.27	0.12	0.21	99.25	0.11	0.21
Asit hidrolizi	67.81	11.34	12.23	67.83	11.97	12.33
Baz hidrolizi	99.12	0.07	0.12	99.34	0.09	0.12
Oksidasyon	95.88	2.05	1.71	96.01	2.08	1.68
İndirgenme	98.33	0.09	0.07	99.23	0.10	0.08

Klaritromisin eklenmiş plaseboda asit hidrolizi ve hidrojen peroksitle oksidasyon sonucu görülen bozunma Şekil 4.25 ve 4.26’da gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Asit hidrolizine maruz bırakılan klaritromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram



Şekil 4.26. Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan klaritromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram

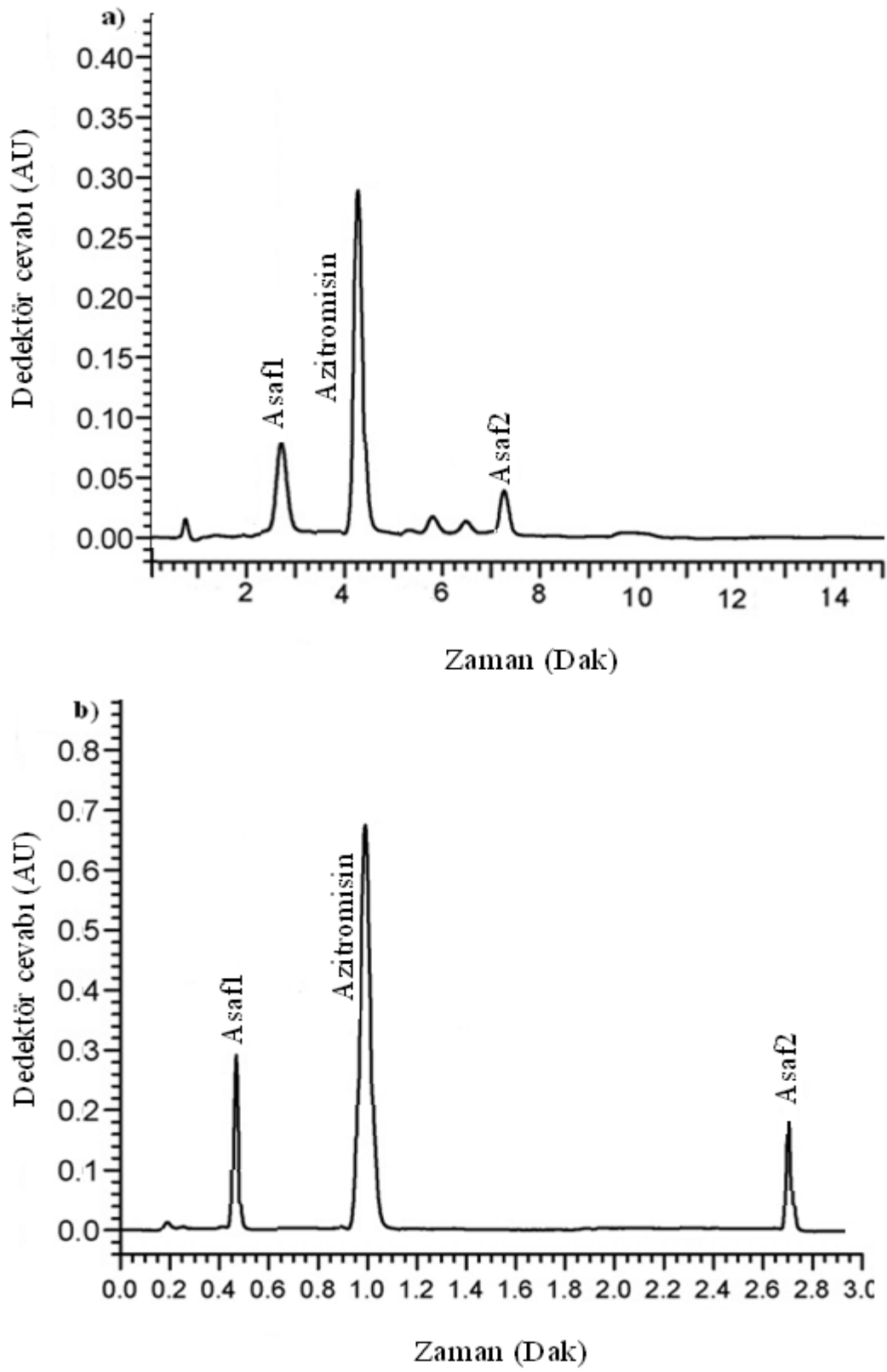
4.4.2. Azitromisin için stres testi

% 100 derişimde Azitromisin eklenen plaseboya uygulanan stres testi sonuçları Tablo 4.68’de verilmiştir.

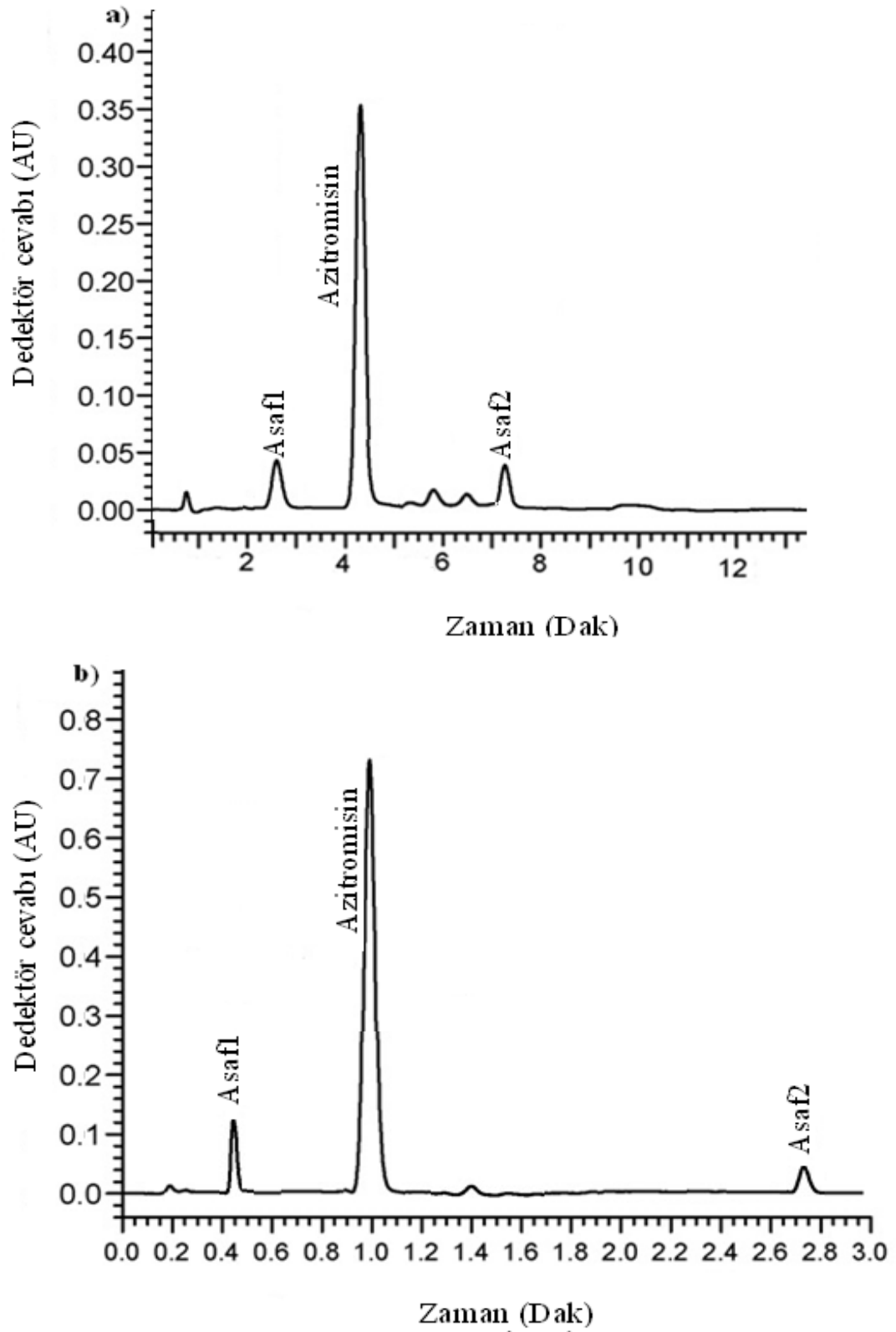
Tablo 4.68. Azitromisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları

	HPLC % derişim			UPLC % derişim		
	A	Asaf1	Asaf2	A	Asaf1	Asaf2
Ortam koşulları	100.02	<LOD	<LOD	100.01	<LOD	<LOD
Güneş ışığı	99.92	0.01	0.01	98.22	0.06	0.08
Fotoliz	98.95	0.05	0.09	98.91	0.05	0.10
Sıcaklık	98.27	0.12	0.21	98.25	0.11	0.21
Asit hidrolizi	88.42	9.54	4.23	88.81	9.16	4.03
Baz hidrolizi	98.93	0.07	0.05	99.06	0.07	0.06
Oksidasyon	93.61	3.45	2.84	93.41	3.48	2.93
İndirgenme	99.05	0.08	0.05	99.13	0.08	0.05

Azitromisin eklenmiş plaseboda asit hidrolizi ve hidrojen peroksitle oksidasyon sonucu görülen bozunma Şekil 4.27 ve 4.28’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Asit hidrolizine maruz bırakılan Azitromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram



Şekil 4.28. Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan Azitromisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram

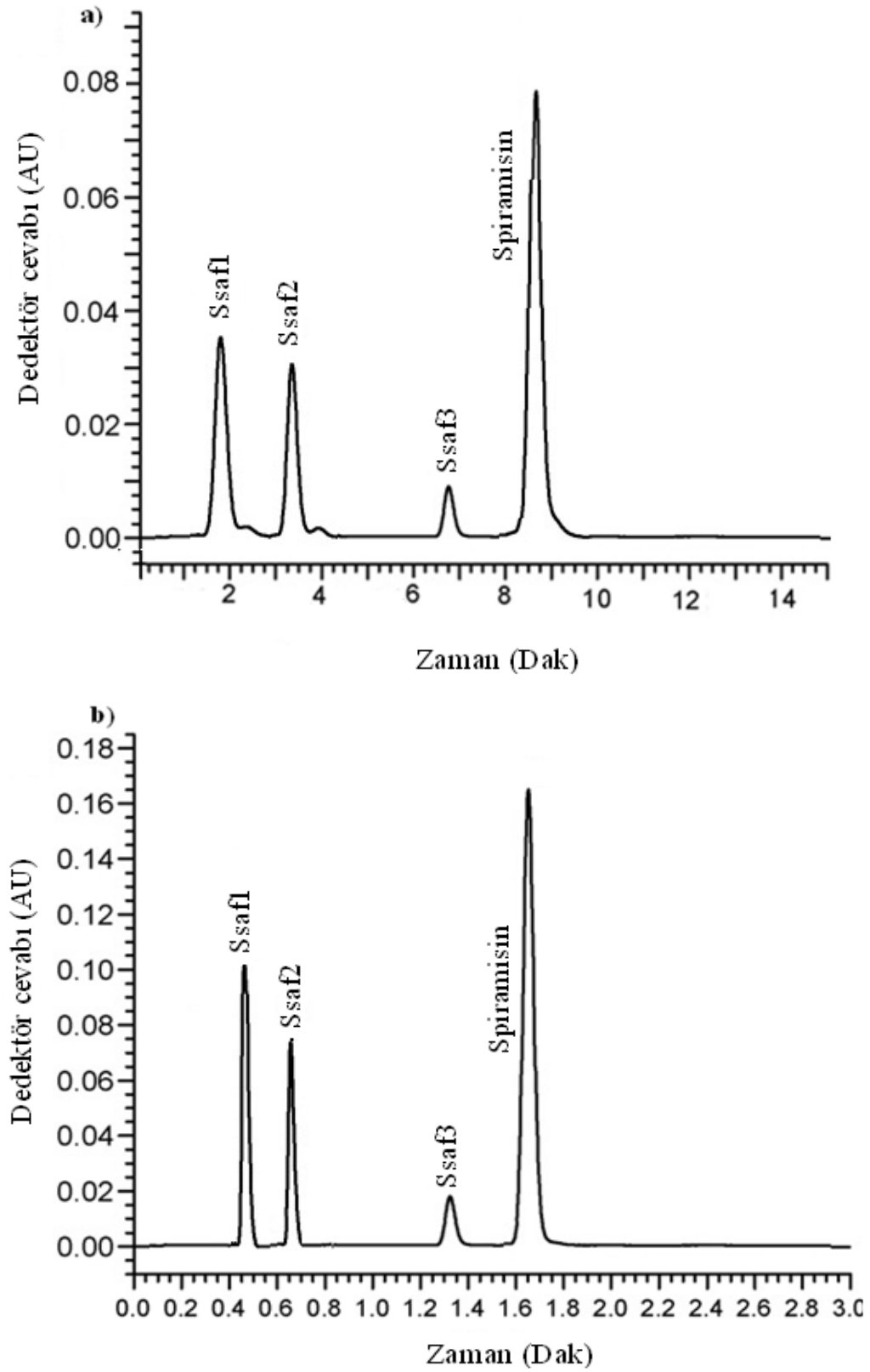
4.4.3. Spiramisin için stres testi

% 100 derişimde Spiramisin eklenen plaseboya uygulanan stres testi sonuçları Tablo 4.69’da verilmiştir.

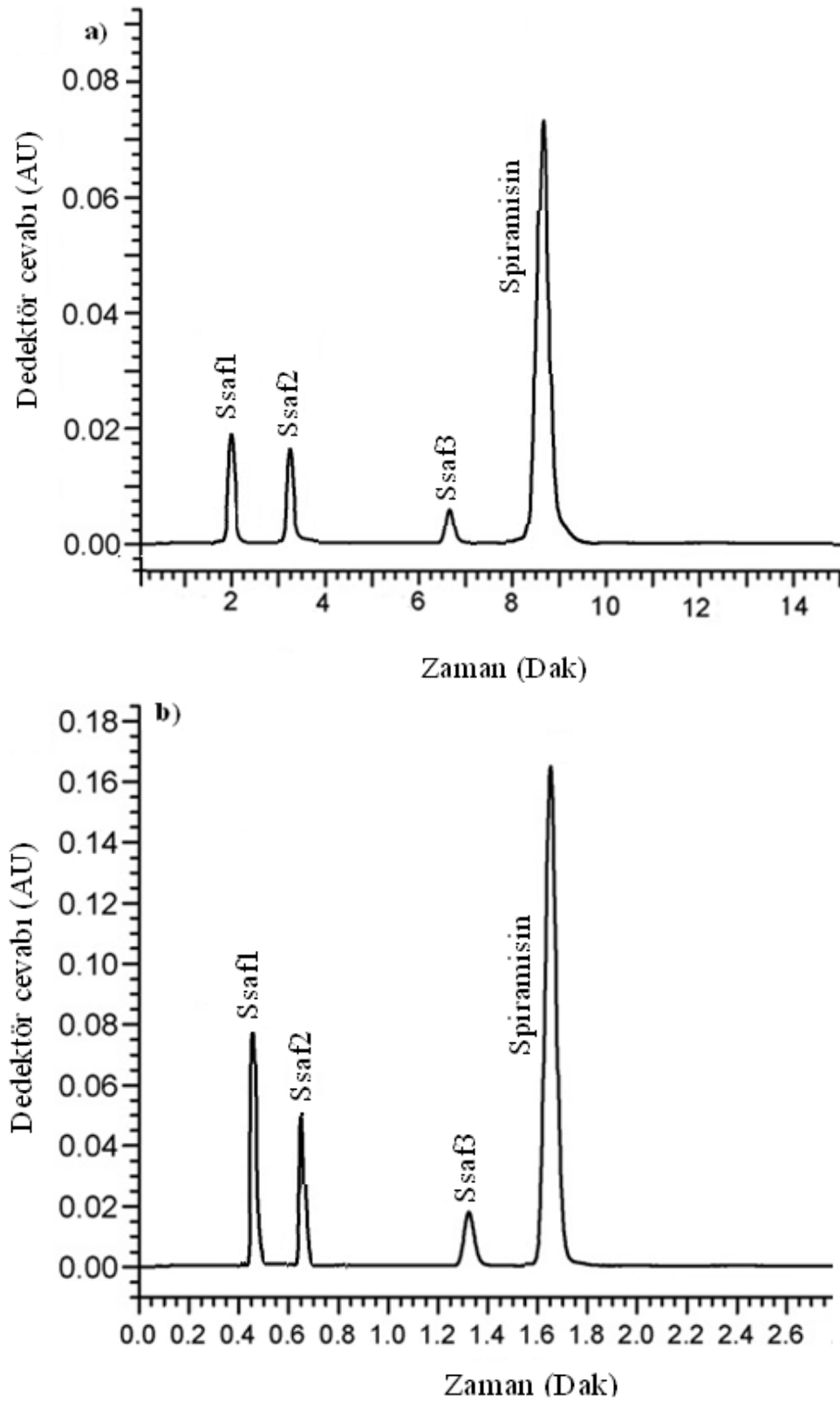
Tablo 4.69. Spiramisin ve safsızlıkları için stres testi sonuçları

	HPLC				UPLC			
	% derişim				% derişim			
	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3	S	Ssaf1	Ssaf2	Ssaf3
Ortam koşulları	100.01	<LOQ	<LOQ	<LOQ	100.01	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Güneş ışığı	99.94	0.01	0.01	<LOQ	99.96	0.01	0.01	<LOQ
Fotoliz	98.67	0.03	0.05	0.04	99.71	0.04	0.05	0.04
Sıcaklık	98.55	0.10	0.18	0.09	99.51	0.12	0.18	0.09
Asit hidrolizi	85.12	8.88	5.01	1.02	85.79	8.52	5.03	1.04
Baz hidrolizi	98.77	0.08	0.04	0.03	99.66	0.08	0.04	0.03
Oksidasyon	91.50	4.01	3.73	1.44	91.13	4.08	3.76	1.46
İndirgenme	99.27	0.09	0.11	0.04	99.53	0.08	0.12	0.05

Spiramisin eklenmiş plaseboda asit hidrolizi ve hidrojen peroksitle oksidasyon sonucu görülen bozunma Şekil 4.29 ve 4.30’da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Asit hidrolizine maruz bırakılan Spiramisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram



Şekil 4.30. Hidrojen peroksitle oksidasyona maruz bırakılan Spiramisin içeren plasebonun a) HPLC sistemi ile b) UPLC sistemi ile analizine ait kromatogram

4.5. Farmasötik preparat analizleri

Etken madde ve safsızlıklarının analizi için geliştirilen ve valide edilen analiz yöntemleri ile piyasadaki Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin içeren tablet formundaki preparatlardan elde edilen etken madde ve safsızlıklarının miktarları Tablo 4.70 – 72’de verilmiştir

Tablo 4.70. Klaritromisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları

Farmasötik preparat	K	HPLC % derişim		K	UPLC % derişim	
		Ksaf1 (<% 0.5*)	Ksaf2 (<% 0.25*)		Ksaf1 (<% 0.5*)	Ksaf2 (<% 0.25*)
Klacid® 500 mg Film Tablet	99.89	0.07	< LOQ	99.90	0.07	< LOQ
Klaromin® 500 mg Film Tablet	99.90	0.08	< LOQ	99.90	0.07	< LOQ

*Ürün spesifikasyonlarında belirtilen değerlerdir.

Tablo 4.71. Azitromisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları

Farmasötik preparat	A	HPLC % derişim		A	UPLC % derişim	
		Asaf1 (<% 0.5*)	Asaf2 (<% 0.5*)		Asaf1 (<% 0.5*)	Asaf2 (<% 0.5*)
Zitromax® Film Kaplı Tablet	99.85	0.09	0.11	99.83	0.10	0.11
Azro® Film Tablet	99.87	0.09	0.12	99.85	0.10	0.12

*Ürün spesifikasyonlarında belirtilen değerlerdir.

Tablo 4.72. Spiramisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analiz sonuçları

Farmasötik preparat	S	HPLC % derişim			S	UPLC % derişim		
		Ssaf1 (<% 0.5*)	Ssaf2 (<% 0.5*)	Ssaf3 (<% 0.25*)		Ssaf1 (<% 0.5*)	Ssaf2 (<% 0.5*)	Ssaf3 (<% 0.25*)
Rovamycine[®] Film Tablet	99.81	0.08	0.12	0.10	99.81	0.08	0.11	0.11
Rovagyl[®] Film Tablet	99.82	0.09	0.12	0.09	99.82	0.09	0.11	0.09

*Ürün spesifikasyonlarında belirtilen değerlerdir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, farmasötik preparatlarda etken madde analizi ve üretim aşamasında veya raf ömrü süresince etken maddenin bozunması ile oluşan safsızlıklarının analiz edilmesi için kromatografik yöntemler geliştirilmiş, geçerlilikleri kanıtlanmıştır. Ayrıca farmasötik preparatlar stres koşullarına maruz bırakıldığında oluşan bozunma ürünleri geliştirilen yöntemlerle tespit edilmiştir.

Kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi

Bu çalışmada, HPLC ve daha küçük partikül çapına sahip, yüksek basınca dayanıklı kolonların kullanıldığı UPLC sistemleri ile Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve bu moleküllerin safsızlıklarının kromatografik davranışları incelenmiştir.

Analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında, Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının molekül özellikleri dikkate alınarak sabit fazın hareketli fazdan daha apolar olduğu ve geniş bir uygulama alanına sahip olan ters faz sıvı kromatografisi geliştirilmiştir. HPLC ve UPLC sisteminde en iyi seçiciliğin, ayırıcılığın ve duyarlılığın elde edildiği kromatografik koşullar belirlenmiştir.

Farklı boyutlarda ve farklı markalarda ait C8 ve C18 kolonlar denenmiş ve Klaritromisin ve safsızlıklarının HPLC ile analizinde 5 µm partikül çapına sahip ACE C18, 250 x 4.6 mm, Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde ACE C18, 150 x 4.6 mm, Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde ise Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, UPLC ile analizlerde ise 1.7 µm partikül çapına sahip Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm kolon seçilmiştir.

Analizi yapılacak moleküller, UV bölgede yüksek absorpsiyon gösterdiğinden dizi diyot dedektörlü HPLC ve UPLC sistemlerinde çalışılmıştır. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizleri 219 nm, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının analizleri ise 240 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

En uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde dikkate alınan kromatografik parametreler alıkonma zamanı, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranıdır. Uygun hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde sistem

uygunluk parametreleri olarak da adlandırılan bu kromatografik parametreler incelenmiştir. Yüksek kapasite faktörü değerleri ayırıcılığı artırır, ancak kapasite faktöründeki fazla artış analiz süresinin uzamasına ve geniş piklere neden olur (80). En uygun performans için kapasite faktörü 1-10 arasında olmalıdır, ancak bazı durumlarda bu aralık 0.5-20 aralığına kadar genişleyebilir (81). Bir kromatografik sistemde piklerin birbirinden tam olarak ayrılabilmesi, kesin ve tutarlı bir nicel analiz yapılabilmesi için ayırıcılığın 1.5'dan ($R \geq 1.5$) büyük olması gerekmektedir. Teorik tabaka sayısı bir kolon için önemli özellik olup kolonun keskin ve dar pikler oluşturma gücünü tanımlar. İyi bir ayırım için kromatografik kolonda teorik tabaka sayısı 2000'in üzerinde olmalıdır. Yöntem geliştirilmesinde pik şekilleri de önemli bir ölçüdür. Belirlenen kromatografik koşullarda simetrik piklerin elde edilmesi (PAs değerinin bir veya bire yakın olması) her zaman tercih edilir (82-85).

Kromatografik parametrelerin hesaplamalarda kullanılan ölü hacim, kolondaki toplam hareketli faz hacmidir. Bu çalışmada ölü hacim zamanının belirlenmesi için metanol kullanılmış ve t_0 değeri, Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde HPLC sistemi için 1.8 dak, UPLC sistemi için 0.04 dak, Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde HPLC sistemi için 1.5 dak, UPLC sistemi için 0.03 dak, Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde HPLC sistemi için 2.5 dak, UPLC sistemi için 0.03 dak olarak belirlenmiştir.

Denenen hareketli fazlar bir tampon çözelti ile organik çözücünün farklı oranlarda karıştırılması ile elde edilmiştir. Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde fosfat, sitrat ve asetat tamponlarına ayrı ayrı değişik oranlarda asetonitril veya metanol eklenerek hareketli fazlar oluşturulmuştur. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için sitrat ve asetat tamponlarının asetonitril ve metanol ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma ve girişim gözlenmiştir. Sodyum ve potasyum dihidrojen fosfat tamponlarının metanol ile karıştırılması ile hazırlanan hareketli fazın kullanıldığı, HPLC sisteminde benzer kromatografik parametreler elde edilse de UPLC sisteminde potasyum dihidrojen fosfat tamponu ile en iyi ayırım, simetrik pikler ve yüksek pik alanları elde edilmiştir. Azitromisin ve safsızlıklarının analizi için sitrat ve asetat tamponlarının asetonitril ve metanol ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma ve girişim gözlenmiştir.

Potasyum dihidrojen fosfat tamponu ile en iyi ayırım, simetrik pikler ve yüksek pik alanları elde edilmiştir. Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde fosfat ve sitrat tamponlarının asetonitril ve metanol ile kullanıldığı kromatografik sistemlerde piklerde kuyruklanma gözlenmiştir. Asetat tamponunun kullanıldığı hareketli faz ile simetrik ve birbiri ile girişim yapmayan pikler elde edilmiştir.

Teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranının (PAs) en uygun olduğu ve en iyi ayırımın gerçekleştiği hareketli faz Klaritromisin ve safsızlıkları için fosfat tamponu / metanol, (70 : 30, h/h); Azitromisin ve safsızlıkları için fosfat tamponu / metanol, (65 : 35, h/h); Spiramisin ve safsızlıkları için asetat tamponu / asetonitril (70 : 30, h/h) olarak seçilmiştir.

Hareketli fazın pH değeri ayırımı yapılacak maddelerin asidik ya da bazik karakterine bağlı olarak kromatografik davranışlarını etkiler. Ters faz sıvı kromatografisinde asidik bileşenler için pH'nın arttırılması ile alıkonma zamanı azalırken, bazik bileşenlerde ise tam tersidir (87). Hareketli fazın pH'sının belirlenmesi için tampon çözeltinin pH değeri 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 ve 6.5'e ayarlanarak yapılan analizlerde pik asimetri oranlarının ve teorik tabaka sayısının yüksek olması nedeni ile en iyi ayırımın olduğu Klaritromisin ve safsızlıkları için pH 3.0 fosfat tamponu, Azitromisin ve safsızlıkları için pH 6.0 fosfat tamponu, Spiramisin ve safsızlıkları için pH 2.5 asetat tamponu olarak seçilmiştir.

Hareketli fazın tampon derişimini 5 mM, 10 mM ve 15 mM olarak değıştirilmiş ve her bir etken madde ve safsızlıklarının analizinde en yüksek ayırıcılığın elde edildiği tampon derişimi saptanmıştır. Klaritromisin ve safsızlıklarının analizinde 5 mM fosfat tamponu, Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde 5 mM fosfat tamponu ve Spiramisin ve safsızlıklarının analizinde 10 mM asetat tamponu yüksek ayırıcılığa sahip olması nedeniyle uygun bulunmuştur.

Hareketli faz akış hızı HPLC sisteminde 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 ve 1.2 mL/dak olarak değıştirilerek kromatografik parametreler değerdendirildiğinde Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için 1.2 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarının analizi için 1.0 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için 1.2 mL/dak seçilmiştir.

Hareketli faz akış hızı UPLC sisteminde 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 mL/dak olarak değiştirilerek kromatografik parametreler değerlendirildiğinde Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için 0.3 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıklarının analizi için 0.4 mL/dak, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için 0.3 mL/dak seçilmiştir.

Enjeksiyon hacmi HPLC sisteminde 5, 10, 20 ve 40 µL, UPLC sisteminde ise 3, 5, 7 ve 9 µL olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametreler değerlendirildiğinde en iyi ayrımın sağlandığı Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının analizinde enjeksiyon hacmi, HPLC sisteminde 20 µL, UPLC sisteminde ise 5 µL olarak belirlenmiştir.

HPLC ve UPLC kromatografik koşulların optimizasyon çalışmalarında iç standart kullanılmamış her analiz öncesinde belirlenen sistem uygunluk parametreleri kontrol edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda HPLC ve UPLC sistemleri için hareketli faz olarak Klaritromisin ve safsızlıkları için pH = 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70 : 30, h/h) HPLC sisteminde 1.2 mL/dak, UPLC sisteminde 0.3 mL/dak akış hızında kullanılmıştır (Tablo 4.6). Belirlenen kromatografik koşullarda, Klaritromisin, safsızlık 1 ve safsızlık 2, HPLC sistemi ile analizde sırası ile 4.14, 5.80 ve 7.80 dak alıkonma zamanında; UPLC sistemi ile analizde 2.07, 0.55 ve 0.85 dak alıkonma zamanında ayrılmıştır (Şekil 4.1-4.2)

Azitromisin ve safsızlıklarının analizinde hareketli faz olarak pH = 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65 : 35, h/h) HPLC sisteminde 1.0 mL/dak, UPLC sisteminde 0.4 mL/dak akış hızında kullanılmıştır (Tablo 4.28). Belirlenen kromatografik koşullarda, Azitromisin, safsızlık 1 ve safsızlık 2; HPLC sisteminde sırası ile 4.80, 2.78 ve 7.61 dak, UPLC sisteminde 1.03, 0.57 ve 2.65 dak alıkonma zamanlarında ayrılmıştır (Şekil 4.9-4.10).

Spiramisin ve safsızlıklarının HPLC ve UPLC ile analizinde hareketli faz olarak pH = 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitrilin (70 : 30, h/h) HPLC sisteminde 1.2 mL/dak, UPLC sisteminde 0.3 mL/dak akış hızında kullanılmıştır (Tablo 4.50). Belirlenen kromatografik koşullarda, Spiramisin, safsızlık 1, safsızlık 2 ve safsızlık 3;

HPLC sisteminde sırası ile 8.81, 2.20, 3.63 ve 6.83 dak, UPLC sisteminde 1.67, 0.47, 0.64 ve 1.36 dak alıkonma zamanlarında ayrılmıştır (Şekil 4.17-4.18).

Kromatografik yöntemlerin validasyonu

Geliştirilen HPLC ve UPLC yöntemlerinin validasyonu ICH (Text on Validation of Analytical Procedures) ve USP XXIV (2nd supplement: Validation of Compendial Methods) esas alınarak yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemlerin sistem uygunluk parametrelerinin belirlenmesinde elde edilen pik alanlarının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapma değerleri ile her pikin en yakınındaki pike göre ayırıcılığı incelenmiştir.

HPLC sistemi ile analizde Klaritromisin ile safsızlık 1 pikleri arasındaki ayırıcılık 1.73, safsızlık 1 ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık 2.43 (Tablo 4.7), Azitromisin piki ile safsızlık 1 piki arasındaki ayırıcılık 3.13, Azitromisin ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık ise 5.23 (Tablo 4.29), Spiramisin piki ile safsızlık 3 piki arasındaki ayırıcılık 2.02, safsızlık 1 ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık ise 1.82 (Tablo 4.51) olarak elde edilmiştir.

UPLC sistemi ile analizde Klaritromisin ile safsızlık 2 pikleri arasındaki ayırıcılık 11.63, safsızlık 1 ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık 4.30 (Tablo 4.8), Azitromisin ile safsızlık 1 piki arasındaki ayırıcılık 4.20, Azitromisin ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık ise 5.64 (Tablo 4.30), Spiramisin piki ile safsızlık 3 piki arasındaki ayırıcılık 3.93, safsızlık 1 ile safsızlık 2 arasındaki ayırıcılık ise 2.65 (Tablo 4.52) olarak elde edilmiştir.

HPLC ve UPLC ile analizlerde pik alanları ve alıkonma zamanlarının BSS değerleri Klaritromisin ve safsızlıkları için % 1.18'den, Azitromisin ve safsızlıkları için % 1.14'den, Spiramisin ve safsızlıkları için % 1.83'den küçük ve tüm analizlerde ayırıcılık değerinin 1.5'den büyük olması geliştirilen yöntemlerde sistemlerin uygunluğunu gösteren bir parametredir.

Sonuçlar HPLC ve UPLC sistemi için kabul edilebilir ayırıcılığı sağlamakta olup, UPLC sistemi ile daha yüksek ayırıcılık elde edilmiş ve UPLC ile analiz süresi

yaklaşık 3 kat azalmıştır. Analiz süresinin kısalması harcanan hareketli faz miktarını ve dolayısıyla analiz maliyetini de önemli ölçüde azaltmaktadır.

Optimize kromatografik koşullarda HPLC ve UPLC sistemleri ile elde edilen kromatogramlarda standartların birbiri ile plasebo ve çözücü ile arasında herhangi bir girişimin olmaması, geliştirilen yöntemlerin Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının analizi için seçici olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.11, 4.12, 4.19 ve 4.20).

HPLC sisteminin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla standart çözeltilerin 10 kez enjeksiyonu yapılmış Klaritromisin, Ksaf1 ve Ksaf2 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile % 0.95, 1.18 ve 1.45, Azitromisin, Asaf1 ve Asaf2 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile % 1.07, 0.94 ve 0.81, Spiramisin, Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile 0.62, 0.56, 1.02 ve 0.38 olarak bulunmuştur (Tablo 4.9, 4.31 ve 4.53).

UPLC sisteminin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla standart çözeltilerin 10 kez enjeksiyonu yapılmış ve Klaritromisin, Ksaf1 ve Ksaf2 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile % 0.44, 0.84 ve 0.80, Azitromisin, Asaf1 ve Asaf2 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile % 0.61, 0.65 ve 0.50, Spiramisin, Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 pik alanlarının BSS değerleri sırası ile 0.10, 0.09, 0.71 ve 0.04 olarak bulunmuştur (Tablo 4.9, 4.31 ve 4.53).

BSS değerlerinin kabul kriterinin % 2'den küçük olması geliştirilen yöntemlerin HPLC ve UPLC sistemlerinde tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

% 1 – 120 derişim aralığında Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlık standartlarını içeren çözeltilerin optimize edilen deneysel koşullarda analizleri yapılarak elde edilen pik alanlarına karşı derişim eğrileri çizilerek kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon doğru denklemi, korelasyon analizi sonucunda r ve R^2 katsayıları elde edilmiştir. Korrelasyon katsayıları Klaritromisin, Ksaf1 ve Ksaf2 için HPLC sisteminde sırası ile 0.9990, 0.9989 ve 0.9991, UPLC sisteminde 0.9993, 0.9992 ve 0.9995 (Tablo 4.10); Azitromisin, Asaf1 ve Asaf2 için HPLC sisteminde sırası ile 0.9981, 0.9991 ve 0.9988, UPLC sisteminde

0.9990, 0.9994 ve 0.9988 (Tablo 4.32); Spiramisin, Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 için HPLC sisteminde sırası ile 0.9994, 0.9994, 0.9995 ve 0.9995, UPLC sisteminde 0.9995, 0.9995, 0.9998 ve 0.9996 (Tablo 4.54) olarak bulunmuştur. Kalibrasyon doğrularının doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak, doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır (107).

Ayrıca Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin için doğrusallığın kontrol grafikleri çizilmiş (Şekil 4.5, 4.13 ve 4.21) ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin 1, tanımlayıcılık katsayılarının 0.9994'den büyük olması geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir.

Yöntemlerin doğruluk çalışması için plasebo çözeltisine % 80, % 100 ve % 120 derişimlerde standart çözelti eklenerek 3'er çözelti HPLC ve UPLC sisteminde analiz edilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Buna göre Klaritromisin için HPLC sisteminde % 99.61, UPLC sisteminde % 99.93 geri kazanım sağlanmıştır (Tablo 4.11). Azitromisin için HPLC sisteminde % 99.75, UPLC sisteminde % 100.12 geri kazanım sağlanmıştır (Tablo 4.33). Spiramisin için ise HPLC sisteminde % 99.76, UPLC sisteminde ortalama % 100.03 geri kazanım sağlanmıştır (Tablo 4.55). Geri kazanım değerlerinin % 98-102 aralığında olması yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Yöntemlerin kesinlik çalışmaları için plasebo çözeltisine, gün içinde ve günler arasında, % 80, % 100 ve % 120 derişimlerde standart çözelti eklenerek hazırlanan çözelti HPLC ve UPLC sisteminde analiz edilmiş BSS değerleri hesaplanmıştır. Gün içi kesinlik çalışmalarında BSS değerleri; Klaritromisin için HPLC sisteminde % 1.00 – 1.50, UPLC sisteminde % 0.43 – 0.94 (Tablo 4.12), Azitromisin için HPLC sisteminde % 0.59 – 1.55, UPLC sisteminde % 0.57 – 1.19 (Tablo 4.34), Spiramisin için HPLC sisteminde % 1.14-1.96, UPLC sisteminde % 0.59-0.86 (Tablo 4.56) aralığında bulunmuştur.

Günler arası kesinlik çalışmalarında BSS değerleri; Klaritromisin için HPLC sisteminde % 1.28 – 1.54, UPLC sisteminde % 0.50 – 0.84 (Tablo 4.13), Azitromisin için HPLC sisteminde % 0.80 – 1.59, UPLC sisteminde % 0.10 – 0.61 (Tablo 4.35), Spiramisin için HPLC sisteminde % 1.14-1.75, UPLC sisteminde % 0.13-0.99 (Tablo

4.57), aralığında bulunmuştur. BSS değerlerinin 2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin yüksek olduğunun göstergesidir (92, 93).

Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının (% 100 derişimde) HPLC ve UPLC ile analizleri farklı iki analizci tarafından gerçekleştirilmiş (Tablo 4.14, 4.36 ve 4.58) ve elde edilen verilerin istatistiksel değerdendirilmeleri sonucu ortalamalar arasında anlamlı bir fark bulunmaması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır ($p > 0.05$) (108).

Geliştirilen kromatografik yöntemler için, LOD değerdeleri S/G oranının 3 olduğđ değere göre Klaritromisin, Ksaf1 ve Ksaf2 için HPLC sisteminde sırası ile 166.50 ng/mL, 1.80 ng/mL ve 1.00 ng/mL, UPLC sisteminde sırası ile 125.00 ng/mL, 1.00 ng/mL ve 0.85 ng/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.15). Azitromisin, Asaf1 ve Asaf2 için HPLC sisteminde sırası ile 185.50 ng/mL, 2.40 ng/mL ve 1.00 ng/mL, UPLC sisteminde sırası ile 125.00 ng/mL, 1.50 ng/mL ve 0.85 ng/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.37). Spiramisin için HPLC sisteminde 172.50, Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 için 1.15 ng/mL, UPLC sisteminde sırası ile 130.00 ng/mL, 0.86 ng/mL, 0.86 ve 1.00 ng/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.59).

Günlük alım dozunun 1000 mg ve altı olan farmasötik preparatlar için belirtilen raporlama seviyesi % 0.1'dir (29). Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin'in safsızlıklarının % 0.1'lik çözeltilerinden 6 tane hazırlanmış; HPLC ve UPLC yöntemleri ile analizleri sonucunda elde edilen pik alanlarının BSS değerdeleri hesaplanmıştır. Bu değerdeler; Ksaf1 ve Ksaf2 için HPLC sisteminde % 2.94 ve % 1.91, UPLC sisteminde % 2.42 ve % 0.87 (Tablo 4.16); Asaf1 ve Asaf2 için HPLC sisteminde % 7.28 ve % 3.06, UPLC sisteminde % 2.36 ve % 1.62 (Tablo 4.38); Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 için HPLC sisteminde % 5.05, % 4.30 ve % 7.83, UPLC sisteminde % 1.71, % 3.17 ve % 1.56 (Tablo 4.60) olarak bulunmuştur.

Geliştirilen kromatografik yöntemler için, LOQ değerdeleri S/G oranının 10 olduğđ değere göre Klaritromisin, Ksaf1 ve Ksaf2 için HPLC sisteminde 500.00 ng/mL, 2.50 ng/mL ve 1.25 ng/mL, UPLC sisteminde 375.00 ng/mL, 1.87 ng/mL ve 1.00 ng/mL (Tablo 4.17); Azitromisin, Asaf1 ve Asaf2 için HPLC sisteminde sırası ile 500.00 ng/mL, 2.50 ng/mL ve 1.25 ng/mL, UPLC sisteminde sırası ile 375.00 ng/mL,

1.87 ng/mL ve 1.00 ng/mL (Tablo 4.39); Spiramisin, Ssaf1, Ssaf2 ve Ssaf3 için HPLC sisteminde sırası ile 690.00 ng/mL, 3.45 ng/mL, 3.45 ng/mL ve 1.73 ng/mL UPLC sisteminde sırası ile 517.50 ng/mL, 2.58 ng/mL, 2.58 ng/mL ve 1.30 ng/mL (Tablo 4.61) olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen düşük LOD ve LOQ değerleri ile raporlama seviyesinde kabul kriterlerine ($< \% 10$) uygun BSS değerlerinin elde edilmesi geliştirilen yöntemlerin yüksek duyarlılıkta olduğunu göstermektedir.

Yöntemlerin sağlamlık çalışmalarında, hareketli faz organik çözücü oranı, tampon pH'sı, akış hızı ve dedektör dalga boyunda, yapılan küçük değişiklikler sonucunda Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının analizlerinde elde edilen sistem uygunluk parametrelerinin etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Her bir değişiklik sonucu yapılan analiz bulguları optimum koşullarda elde edilen analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.18-4.21, Tablo 4.40-4.43 ve Tablo 4.62-4.65) Yapılan t testi sonuçları, geliştirilen yöntemin optimum koşullarında yapılan küçük değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri üzerinde etkili olmadığını ve HPLC ile UPLC analiz sonuçlarının sağlamlığını göstermektedir ($p>0.05$) (108).

Çözeltilerin kararlılık çalışmaları için Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıklarının $\% 100$ 'lük çözeltilerinin oda sıcaklığında 48 saat boyunca 6 saat ara ile analizleri yapılmış ve $\%$ derişim miktarları hesaplanmıştır (Tablo 4.22, 4.44 ve 4.66). Bu süre sonunda derişimlerde $\% 2$ 'den daha az derişim gözlenmiş olması standart çözeltilerin 48 saat kararlı olduğunu göstermiştir.

Plasebo çözeltilisine $\% 100$ derişimde Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin veya safsızlıklarının eklenmesi ile elde edilen kalite kontrol numunelerinin miktar tayini ile oluşturulan kalite kontrol kartları sistemin kalitesini izlemek için kullanılmıştır. Kalite kontrol numunelerinin analiz sonuçları değerlendirildiğinde tüm değerlerin uyarı sınırları içinde kalması HPLC ve UPLC sistemlerinin kalitesinin güvence altında olduğunu göstermiştir (Şekil 4.7-4.8, Şekil 4.15-4.16 ve Şekil 4.23-4.24).

Stres Testi Çalışmaları

% 100 derişimde Klaritromisin, Azitromisin veya Spiramisin içeren plasebolar 8 ayrı stres koşuluna maruz bırakılmıştır. Ortam koşulları, güneş ışığı, fotoliz, sıcaklık, baz hidrolizi ve indirgenme testlerinde üç madde de meydana gelen bozunmalarının kabul sınırlarının altında olduğu; asit hidrolizi ve hidrojen peroksitle oksidasyon sonucu her üç madde de bozunma olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.67-4.69).

Klaritromisin içeren plasebo, asit hidrolizine maruz bırakılıp HPLC ve UPLC yöntemleri ile analiz edildiğinde bozunma ürünü olarak ortalama % 11.34 Ksaf1 ve % 12.23 Ksaf2'nin oluştuğu; hidrojen peroksit ile oksidasyona maruz bırakıldığında % 2.07 Ksaf1 ve % 1.70 Ksaf2'nin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.25-4.26)

Azitromisin içeren plasebo, asit hidrolizine maruz bırakılıp HPLC ve UPLC yöntemleri ile analiz edildiğinde bozunma ürünü olarak ortalama % 9.35 Asaf1 ve % 4.13 Asaf2'nin oluştuğu; hidrojen peroksit ile oksidasyona maruz bırakıldığında % 3.47 Ksaf1 ve % 2.89 Ksaf2'nin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.27-4.28)

Spiramisin içeren plasebo, asit hidrolizine maruz bırakılıp HPLC ve UPLC yöntemleri ile analiz edildiğinde bozunma ürünü olarak ortalama % 8.70 Ssaf1, % 5.02 Ssaf2 ve % 1.03 Ssaf3'ün oluştuğu; hidrojen peroksit ile oksidasyona maruz bırakıldığında % 4.05 Ssaf1, % 3.75 Ssaf2 ve % 1.45 Ssaf3'ün oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.29-4.30)

Farmasötik Preparat Analizleri

Piyasada bulunan Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin içeren farmasötik preparatlardan etken madde ve safsızlıklarının analizleri optimize edilen ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilen HPLC ve UPLC yöntemleri yapılmıştır.

Klacid[®] ve Klaromin[®] 500 mg Film Tablet içeriğinde % 99.90 Klaritromisin, % 0.07 Ksaf1 bulunmuş olup, Ksaf2 tespit edilmemiştir (Tablo 4.70).

Zitromax[®] Film Tablet içeriğinde % 99.85 Azitromisin, % 0.10 Asaf1 ve % 0.11 Asaf2; Azro[®] Film Tablet içeriğinde % 99.86 Azitromisin, % 0.10 Asaf1 ve % 0.12 Asaf2 bulunmuştur (Tablo 4.71).

Rovamycin[®] Film Tablet % 99.80 Spiramisin, % 0.08 Ssaf1, % 0.12 Ssaf2 ve % 0.11 Ssaf3; Rovagyl[®] Film Tablet içeriğinde % 99.82 Spiramisin, % 0.09 Ssaf1, % 0.12 Ssaf2 ve % 0.09 Ssaf3 bulunmuştur (Tablo 4.72).

Yapılan analiz çalışmaları sonucunda piyasada mevcut farmasötik preparatlarda etken madde miktarları % 98 – 102 arasında, safsızlık miktarları ise ürün spesifikasyonlarında belirtilen kabul sınırlarının altında bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, makrolit grubu antibakteriyel ilaçlardan Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının farmasötik preparatlardan analizi için HPLC ve UPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminde en iyi koşullar Klaritromisin ve safsızlıklarının analizi için ACE C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm i.ç. kolon, pH = 3.0, 5 mM fosfat tamponu / metanol (70 : 30, h/h) hareketli faz, 1.2 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (219 nm); Azitromisin ve safsızlıklarının analizi için ACE C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm i.ç. kolon, pH = 6.0, 5 mM fosfat tamponu / asetonitril (65 : 35, h/h) hareketli faz, 1.0 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (240 nm); Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için Inertsil ODS 250 x 4.6 mm, 5 µm i.ç. kolon, pH = 2.5, 10 mM asetat tamponu / asetonitril (70 : 30, h/h) hareketli faz, 1.2 mL/dak akış hızı ve UV dedektör ile (240 nm) elde edilmiştir. Bu koşullarda analiz süresi Klaritromisin ve safsızlıkları için 8.5 dak, Azitromisin ve safsızlıkları için 8 dak, Spiramisin ve safsızlıkları için 10 dak olarak bulunmuştur.

Geliştirilen UPLC yönteminde Klaritromisin, Azitromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için HPLC yönteminde kullanılan hareketli fazlar ve UV dedektör kullanılmış olup analizler 1.7 µm partikül çapına sahip Acquity BEH C18, 50 x 2.1 mm kolon ile gerçekleştirilmiştir. UPLC sisteminde akış hızı Klaritromisin, Spiramisin ve safsızlıklarının analizi için 0.3 mL/dak, Azitromisin ve safsızlıkları için 0.4 mL/dak'dır. Optimize edilen UPLC koşullarında analiz süresi Klaritromisin ve safsızlıkları için 2.2 dak, Azitromisin ve safsızlıkları için 2.9 dak, Spiramisin ve safsızlıkları için 1.8 dak olarak bulunmuştur.

Geliştirilen HPLC ve UPLC yöntemlerinin validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve geçerlilikleri kanıtlanmıştır.

Valide edilen yöntemler farmasötik preparat analizlerine uygulanmış, preparatlardaki etken madde ve safsızlık tayinleri ile kalite kontrolleri gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca geliştirilen ve valide edilen HPLC ve UPLC yöntemleri farklı stres koşullarına maruz bırakılmış Klaritromisin, Azitromisin veya Spiramisin içeren plasebonun analizine uygulanmış, asit hidrolizi ve hidrojen peroksitle oksidasyon sonucunda her üç maddenin bozunduğu belirlenmiş ve bozunma ürünlerinin miktarları saptanmıştır.

Geliştirilen yöntemler, Klaritromisin, Azitromisin ve Spiramisin ile safsızlıkları için mevcut analiz yöntemleri (68, 73, 77) ile karşılaştırıldığında daha kısa analiz süresi, düşük analiz maliyeti, simetrik ve keskin piklerin elde edildiği yüksek ayırıcılık ve yüksek hassasiyetle analizler gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin bozunma ürünlerinin izlenmesinde geçerli bir yöntem olduğu saptanmış olup yöntemler stabilite çalışmaları için önerilmektedir.

Geliştirilen HPLC ve UPLC yöntemleri karşılaştırıldığında, düşük analiz süresi, etkin ayırıcılık, düşük analiz maliyetinden dolayı UPLC yöntemi HPLC çalışmalarına üstünlük sağlamakta olup kalite kontrol laboratuvarlarında ve araştırma-geliştirme laboratuvarlarında, ürün geliştirme çalışmalarında ve stabilite çalışmalarında, kalite kontrol analizlerinde kullanılmak üzere önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pechere, J.C. (2001). New perspectives on macrolide antibiotics, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(1), 93-97.
2. Retsema, J., Fu, W. (2001). Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 (1), 3-10.
3. Douthwaite, S. (2001). Structure-activity relationships of ketolides vs macrolides, *Clinical Microbiology Infection*, 7 (3), 11-17.
4. Kayaalp, S.O. (1998) Tıbbi farmakoloji (8. bs.). Ankara: Baskı Hacettepe-Taş kitapçılık Ltd. Şti.
5. Giamarellos-Bourboulis, E.J. (2008). Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 (1), 12-20.
6. Abu-Gharbieh, E., Vasina, V., Poluzzi, E., De Ponti, F. (2004). Antibacterial macrolides: a drug class with a complex pharmacological profile. *Pharmacological Research*, 50 (3), 211-222.
7. Harvey, R.J., Wallwork, B.D., Lund, V. J. (2009). Anti-Inflammatory Effects of Macrolides: Applications in Chronic Rhinosinusitis, Immunology and *Allergy Clinics of North America*, 29 (4), 689-703.
8. Rubinstein, E. (2001). Comparative safety of the different macrolides. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 (1), 71-76.
9. Weiss, K., Vanjaka, A. (2002). An open-label, randomized, multicenter, comparative study of the efficacy and safety of 7 days of treatment with clarithromycin extended-release tablets versus clarithromycin immediate-release tablets for the treatment of patients with acute bacterial exacerbation of chronic bronchitis. *Clinical Therapeutics*, 24 (12), 2105-2122.
10. Gotfried, M. (2000). Comparison of bacteriologic eradication of *Streptococcus pneumoniae* by clarithromycin and reports of increased antimicrobial resistance. *Clinical Therapeutics*, 22 (1), 2-14.
11. Gotfried, M., Jung, R., Messick, C.R., Rubinstein, I. (2004). Effects of six-week clarithromycin therapy in corticosteroid-dependent asthma: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Current Therapeutic Research*, 65 (1), 1-12.

12. Freund, R.Y., Dousman, L., Mohaghehpour, N. (2002). Prophylactic clarithromycin to treat *Mycobacterium avium* in HIV patients receiving zidovudine may significantly increase mortality by suppressing lymphopoiesis and hematopoiesis. *International Immunopharmacology*, 2 (10), 1465-1475.
13. Maglioa, D., Capitanoa, B., Baneviciusa, M.A., Tessiera, P.R., Nightingalea, C.H., Nicolau, D.P. (2004). Efficacy of clarithromycin against *Streptococcus pneumoniae* expressing *mef(A)*-mediated resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23 (5), 498-501.
14. Garey, K.W., Vo, P.Q., Lewis R.E., Saengcharoen, W., LaRocco, M.T., Tam, V.H. (2009). Increased bacterial adherence and biomass in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria exposed to clarithromycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63 (1), 81-86.
15. Guay D.R.P., Gustavson, L.E., Devcich, K.J., Zhang J., Cao G., Olson, C.O. (2001). Pharmacokinetics and tolerability of extended-release clarithromycin. *Clinical Therapeutics*, 23 (4), 566-577.
16. Blumer, J.L. (2005). Evolution of a new drug formulation: the rationale for high-dose, short-course therapy with azithromycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (3), 143-147.
17. Petropoulos, A.D., Kouvela, E.C., Starosta, A.L., Wilson, D.N., Dinos, G.P., Kalpaxis, D.L. (2009). Time-Resolved Binding of Azithromycin to *Escherichia coli* Ribosomes. *Journal of Molecular Biology*, 385 (4), 1179-1192.
18. Pacifico, L., Chiesa, C. (2002). Azithromycin in children: A critical review of the evidence. *Current Therapeutic Research*, 63 (1), 54-76
19. Lee Hand, W., Hand, D.L. (2001). Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 (5), 419-425.
20. Escudero, E., Fernandez-Varona, E., Marina, P., Espunya, A. (2006). Pharmacokinetics and tissue tolerance of azithromycin after intramuscular administration to rabbits. *Research in Veterinary Science*, 81 (3), 366-372.
21. Ehnhagea, A., Rautiainenb, M., Fangc, A.F., Sanchez, S.P. (2008). Pharmacokinetics of azithromycin in serum and sinus fluid after administration of extended-release and immediate-release formulations in

- patients with acute bacterial sinusitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 (6), 561-566.
22. Moutard, I., Gressier, B., Brunet, C., DINE, T., Luyckx, M., Templier, F., Cazin, M. (1998). In vitro interaction between spiramycin and polymorphonuclear neutrophils oxidative metabolism. *Pharmacological Research*, 37 (3), 197-201.
 23. Meroni, V., Genco, F., Tinelli, C., Lanzarini, P., Bollani, L., Stronati, M., Petersen, E. (2009). Spiramycin treatment of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women impairs the production and the avidity maturation of T. *gondii*-specific immunoglobulin G antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16 (10), 1517-1520.
 24. Valentini, P., Annunziata, M.L., Angelone, D.F., Masini, L., De Santis, M., Testa, A., Grillo, R.L., Speziale, D., Ranno, O. (2009). Role of spiramycin/cotrimoxazole association in the mother-to-child transmission of toxoplasmosis infection in pregnancy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28 (3), 297-300.
 25. Grujic, J., Djurkovic-Djakovic O., Nikolic, A., Klun, I., Bobic, B. (2005). Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 (3), 226-230.
 26. Karray, F., Darbon, E., Oestreicher, N., Dominguez, H., Tuphile, K., Gagnat, J., Blondelet-Rouault, M.H., Gerbaud, C., Pernodet, J.L. (2007). Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology*, 153 (12), 4111-4122.
 27. Choi, S.U., Kim, M.K., Ha, H.S., Hwang, Y.I. (2007). In vivo functions of the gamma-butyrolactone autoregulator receptor in *Streptomyces ambofaciens* producing spiramycin. *Biotechnology Letters*, 30 (5), 891-897.
 28. International Conferences on Harmonization, Guidance on Impurities in New Drug Substances. Q3A(R). Federal Register. (2000). 65 (140).
 29. International Conferences on Harmonization, Guidance on Impurities in New Drug Products. Q3B(R). Federal Register. (2000). 65 (139).
 30. International Conferences on Harmonization, Guidelines for Residual Solvents. Q3C. Federal Register. (1997). 62 (247), 67377.

31. Ahuja, S. (1998). *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*. USA: Marcel Dekker Inc.
32. Gorog, S. (2000). *Identification and Determination of Impurities in Drugs*. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company.
33. Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R. (2001). Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. *American Pharmaceutical Review*, 4 (1), 70-78.
34. Nageswara, R.R., Narasa, R.A., Narsimha, R. (2008). Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (3), 505-519.
35. Gadamasetti, K., Braish, T. (2008). *Process chemistry in pharmaceutical industry*. USA: Taylor & Francis Group.
36. Basak, A.K., Rawa, A.S., Al Hakim, A.H., Furnessa, S., Samaana, N.I., Gilla, D.S., Patel, H.B., Powersa, R.F., Yua, L. (2007). Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (1), 64-72.
37. Ahuja, S. (2007). Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (1), 3-11.
38. Görög, S. (2006). The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (8), 755-757.
39. Roy, J. (2002). Pharmaceutical Impurities - A Mini-Review. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 3 (2), 1-8.
40. McGoverna, T., Jacobson-Kram, D. (2006). Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(8), 790-795.
41. Jacobson-Kram, D., McGovern, T. (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (1), 38-42.
42. Panderi, I., Archontaki, H., Gikasa, E., Parissi-Poulou, M. (1998). Acidic hydrolysis of bromazepam studied by high performance liquid

- chromatography. Isolation and identification of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 (2), 327-335.
43. Oberholtzer, E.A., Florey, K. (1988). Analytical profiles of drug substances. *Academic Press*, 17, 73-114.
 44. Roy, J., Mohammad, G., Banu, A. (1993). Pharmaceutical analysis and stability of locally manufactured ampicillin trihydrate. *Indian Drugs*, 5 (30), 211-218.
 45. Smith, A., Pennefather, P.M., Kaye, S.B., Hart, C.A. (2001). Fluoroquinolones - place in ocular therapy. *Drugs*, 61 (6), 747- 761.
 46. The British Pharmacopoeia Commission. (2001). British Pharmacopoeia. Vol 1, 123-128. UK; The Stationary Office.
 47. Riley, T.N. (1998). Steric aspects of drug action. *US Pharmacist*, 23 (3), 40-51.
 48. Roy, J., Islam, M., Khan, A.H., Das, S.C., Akhteruzzaman, M., Deb, A.K., Alam, A.H. (2001). Diclofenac sodium injection sterilized by autoclave and the occurrence of cyclic reaction producing a small amount of impurity. *Journal of Pharmaceutical Science*, 90, 541-544.
 49. Lipari, F., Swarin, S.J., (1982). Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *Journal of Chromatography*, 247, 297-306.
 50. Ried, C.S., Siegrist, A., Ternes, H., Gunten, T.A. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal waste water effluents: a pilot study. *Environmental Science and Technology*, 39, 4290–4299.
 51. Roy, J., Bhuiyan, K., Faruque, A., Sobahan, M., Al-Farooque M. (1997). Injectable ergometrine: stability and packaging for developing countries. *Indian Drugs*, 34 (11), 634-636.
 52. Hoq, M.M., Morsheda, S.B., Gomes, D.J. (1991). Development of appropriate preservative system for liquid antacid: bacterial contaminants in antacid samples. *Bang Journal of Microbiology*, 8 (1), 5-9.
 53. Roy, J., Mahmud, M., Sobhan, A., Akhteruzzaman, M., Al-Farooque, M., Ali, E. (1994). Marketed vitamin B-complex injectables: stability and mutual interaction. *Journal of Medical Chemistry*, 20 (13), 2157-2163.

54. Connor, K.A., Amidon, G.L., Stella, V.J. (1986). Chemical Stability of Pharmaceuticals-A Handbook for Pharmacists. New York: John Wiley & Sons.
55. Hoerle, S.L., Evans, K.D., Snider, B.G. (1992). HPLC Determination of Impurities in a 3rd Generation Cephalosporin. *Antimicrobial Agents*, 19 (2), 163-165.
56. Kumar, V., Sunder, N., Potdar, A. (1992). Critical factors in developing pharmaceutical formulations- An overview. *Pharmaceutical Technology*, 16, 86-88.
57. Yazawa, I., Katsuyama, N., Katsuyama, A. (2001). Properties of high resolution ODS columns. *Chromatography*, 21, 396-397.
58. Sunderland, J., Tobin, C.M., White, L.O., MacGowan, A.P., Hedges, A.J. (1999). Ofloxacin photodegradation products possess antimicrobial activity. *Drugs*, 58 (2), 171-172.
59. Condorelli, G., De Guidi, G., Giulfido, S., Sortino, S., Chilleni, R., Sciuto, S. (1999). Molecular mechanisms of photosensitization induced by drugs XII. Photochemistry and photosensitization of rifloxacin: An unusual photodegradation path for the antibacterials containing a fluoroquinolone-like chromophore. *Photochemistry and Photobiology*, 70 (3), 280-286.
60. Baertschi, S.W. (2005). Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation, Drugs and the Pharmaceutical Sciences. 153, Boca Raton: Taylor & Francis Group.
61. Anderson, N.H., Johnston, D., McLelland, M.A., Munden, P. (1991). Photostability testing of drug substances and drug products in UK pharmaceutical laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9 (6), 443-449.
62. Alsante, K.M., Friedmann, R.C., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R., Snyder, K.D., Szczesny, E.J. (2001). Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. *Separation Science and Technology*, 3, 85-172.
63. Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Santafianos, D., Sharp, T.R. (2004). Solving impurity/degradation problems: Case studies. *Separation Science and Technology*, 5, 361-400.

64. Ahuja, S. (2004). Overview: Isolation and characterization of impurities. *Separation Science and Technology*, 5, 1-25
65. Pappa-Louisi, A., Agraftiotou, P. (2002). Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the macrolide antibiotics clarithromycin and roxithromycin, *Chromatographia*, 55, 541–547.
66. Morgan, D.K., Brown, D.M., Rotsch, T.D., Plaszc, A.C. (1998). A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination and identification of clarithromycin as the drug substance and in various dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9 (3), 261-269.
67. Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K., Mehlich, A., Ballwanz, F., Kratz, K.L. (1998). Determination of antibiotics in different pharmaceuticals via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 815, 213–223.
68. Morgan, D., Cugier, P., Mareello, B., Sarocka, C., Stroz, D., Plaszc, A. (1999). Impurity profiling of clarithromycin using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 502, 351-358.
69. Nakagawa, Y., Itai, S., Yoshida, T., Nagai, T. (1999). Physicochemical properties and stability in acid solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin. *Chem Pharm Bull*, 40, 725–728.
70. Steinmetz, W.E., Bersch, R., Towson J., Pesiri, D. (1998). The conformation of 6-methoxyerythromycin A in tablets determined by LC-MS. *Journal of Medical Chemistry*, 35, 4842–4845.
71. Kazusaki, M., Shoda, T., Kawabata, H., Katsukura, H. (2001), Influence of mobile phase composition on thermodynamic properties in high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 24, 141-151.
72. Zubata, P., Ceresole, R., Rosasco, M., Pizzorno, M. (2002). A new HPLC method for azithromycin quantitation *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1, 833-836.
73. Miguel, L., Barbas, C. (2003). LC determination of azithromycin tablets *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2), 211-217.

74. Yanga, Z., Wanga, L., Tang, X. (2009). Determination of azithromycin by ion-pair HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (3), 811-815.
75. Liu, L., Roets, E., Hoogmartens, T. (2003). J. Liquid chromatography of spiramycin on poly(styrene-divinylbenzene). *Journal of Chromatography A*, 764 (1), 43-53.
76. Vial, J., Menier, I., Jardy, A., Amger, P., Brun, A., Burbaud, L. (1998). How to better define the characteristics of dispersion of results in liquid chromatographic analyses through an interlaboratory study: Example of collaborative studies on ketoprofen and spiramycin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1), 131-143.
77. Chepkwony, H.K., Vermaelen, A., Roets, E., Hoogmartens, J. (2001). Development and validation of reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of spiramycin and related compounds. *Chromatographia*, 54, 51-56.
78. Frenich, G., Galera, A.M., Garcia, M.G. (2001). Resolution of HPLC-DAD highly overlapping analytical signals for quantitation of spiramycin in pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography Related Technology*, 24, 651-668.
79. Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara.
80. Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D. (1987). Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, Great Britain.
81. Hamilton, R.J., Sewell, P.A. (1982). Introduction to High Performance liquid chromatography, Second Edition, Chapman and Hall, USA,
82. Bidlingmeyer, B.A. (1992). Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, USA,
83. Adamovics, J.A. (1997). Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2nd Edition, Mercel Dekker Inc., New Jersey.
84. Meyer, V.R. (1988). Practical high performance liquid chromatography, John Wiley & Sons, USA,
85. Snyder, L.R., Glajch, J.L., Kirkland J.J. (1988). Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, USA.

86. Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., Molnar, P. (1977). Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Analytical Chemistry*, 49 (14), 2295-2305.
87. Krstulovic, A.M., Brown, P.R. (1982). *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, USA.
88. Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S. (1997). *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
89. Novakova, L., Matysova, L., Solich, Petr. (2006) Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, 908-918.
90. Grumbach, E.S., Wheat, T.E., Kele, M., Mazzeo, J.R. (2005) Developing Columns for UPLC: Design Considerations and Recent Developments. *Separation science redefined*, 40-44.
91. Yang, Q., Kapoor, M.P., Inagaki, S. (2005) Ethane-bridged hybrid mesoporous functionalized organosilicas with terminal sulfonic groups and their catalytic applications. *Journal of Material Chemistry*, 15, 666-673.
92. Green, J.M. (1996). A practical guide to analytical method validation, *Analytical Chemistry*, 68, 305A-309A.
93. Shabir, G.A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66.
94. The United States Pharmacopeia, USP XXIV, United Pharmacopoeial Convention. (2002). Rockville
95. Shah, V.P., Midha, K., Dighe, S. (1992) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Science*, 81(3), 309-312.
96. Thompson, M., Wood, R. (1995) Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure and Applied Chemistry*, 67 (4), 649-666.
97. Rose, U. (1998) In situ degradation: a new concept for system suitability tests in monographs of the European Pharmacopoeia. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18 (1), 1-14

98. Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart D.L., McDowall, R.D. (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 (2) 193-218.
99. Abarca, A., Canfranc, E., Sierra, I., Marina, M.L. (2001) A validated flame AAS method for determining magnesium in a multivitamin pharmaceutical preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25 (5-6), 941-945.
100. Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R. (2003) Conventional and micellar liquid chromatography method development for danazol and validation in capsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (3) 433-439.
101. Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R. (2003) Optimization and validation of conventional and micellar LC methods for the analysis of methyltestosterone in sugar-coated pills. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (1), 201-208.
102. Hokanson, G.C. (1994) A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part I: The initial validation process. *Pharmaceutical Technology*, 118-130.
103. Hokanson, G.C. (1994) A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part II: Changes and the need for additional validation, *Pharmaceutical Technology*, 92-100.
104. Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M. (1996) A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (4), 375-388.
105. Bressolle, F., Bromet-Petit, M., Audran, M. (1996) Validation of liquid chromatographic methods, applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 686 (1), 3-10.
106. Woodall, W. (1985) The statistical design of quality control charts, *The Statistician*, 34, 155-160.
107. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V. (1997). Biyoistatistik, 7. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, s. 191-197.
108. Miller, J.C., Miller, J.N.(1993). Statistics for Analytical Chemistry, Third Edition, Ellis Horwood Limited.

EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

$$\text{Bağıl standart sapma} = \frac{SS}{X} \times 100$$

SS: Standart sapma

X: Aritmetik ortalama

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

$S_{\bar{X}}$: Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler

Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bu test ile bulunan korrelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu anlaşılmaktadır.

1. H₀: Korrelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir (r=0).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r} \qquad S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

T: Test istatistiği,

r: Korrelasyon katsayısı,

S_r : Korrelasyon katsayısının standart hatası.

3. Yanılma olasılığı $\alpha=0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi= n-2 (n: Ölçüm sayısı)
5. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve n-2 serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H₀ reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: a) Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t=hesaplanan değer, p<0.05).
b) Korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t=hesaplanan değer, p>0.05)

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT) hesaplanır:

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi (YOASD) = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi (RASD) = YOASD - YSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması (RAKO) = RAKT / RASD

4. H_0 = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha=0.05$ seçilmiştir.

6. $F=RKO / RAKO$

7. $p=0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: a) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır

(F =Hesaplanan değer, $p<0.05$).

b) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir

(F =Hesaplanan değer, $p>0.05$).

t Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

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

n_1 : 1.yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2.yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2.yöntemin standart sapması

$\bar{x}_1$: 1. yöntemin ortalaması

$\bar{x}_2$: 2.yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi= $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.

2. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: a) Ortalamalar arasında fark yoktur ($t = \text{Hesaplanan değer}, p > 0.05$).

b) Ortalamalar arasında fark vardır ($t = \text{Hesaplanan değer}, p < 0.05$).

Tek Yönlü Varyans Analizi

1. Kareler toplamları bulunur.

Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

d) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2. Serbestlik derecelerinin bulunması

a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \times k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1) \times (k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4. H_0 = Yöntemler arasında fark yoktur.

H_1 = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = GAKO / HKO$

7. $\alpha = 0.05$ düzeyinde GAsD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.
8. Karşılaştırma: Hesaplanan değer F (FH) değeri tablo F (FT) değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur (F = Hesaplanan değer, $p > 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır (F = Hesaplanan değer, $p < 0.05$).

ÖZGEÇMİŞ

11Mart1978’de Malatya’da doğdum. Malatya Anadolu Lisesini bitirdikten sonra Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2001 yılında mezun oldum. Aynı yıl başladığım Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya yüksek lisans programını 2004 yılında tamamladım. Lisansüstü eğitimim süresince farmasötik preparatlardan ve çeşitli biyolojik materyallerden ilaç analizi için özellikle kromatografik yöntemler olmak üzere çeşitli analitik yöntem geliştirme çalışmaları yaptım. 2002-2007 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalıştım. 2007-2008 yılları arasında Eczacıbaşı Sağlık Ürünlerinde Ar-Ge Uzmanı olarak çalıştım. Abdi İbrahim İlaç Sanayi’nde, 2008 yılında başladığım Medikal Destek Yöneticiliği görevime halen devam etmekteyim.