



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**STABİLİTE GÖSTERGELİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
MONTELUKAST İÇEREN İKİLİ ETKEN MADDELERİN
FARMASÖTİK DOZAJ ŞEKİLLERİNDEN
AYNI ANDA ANALİZİ**

Selda ZENGİN KURNALI

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STABİLİTE GÖSTERGELİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
MONTELUKAST İÇEREN İKİLİ ETKEN MADDELERİN
FARMASÖTİK DOZAJ ŞEKİLLERİNDEN
AYNI ANDA ANALİZİ**

Selda ZENGİN KURNALI

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2022**

Etik Beyan

Etik Beyan
Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Stabilite göstergeli sıvı kromatografisi ile montelukast içeren ikili etken maddelerin farmasötik dozaj şekillerinden aynı anda analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: SELDA ZENGİN KURNALI

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında
SELDA ZENGİN KURNALI tarafından hazırlanan
“Stabilite göstergeli sıvı kromatografisi ile montelukast içeren ikili etken maddelerin
farmasötik dozaj şekillerinden aynı anda analizi” adlı tez çalışması
Aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA Tezi olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.05.2022

Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. İ. Murat PALABIYIK
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Antihistaminler	4
1.2. Lökotrienler Antagonistleri	5
1.3. Çalışmalarda Kullanılan Etken Maddelere Ait Bilgiler	6
1.3.1. Montelukast Sodyum	6
1.3.2. Desloratadin	8
1.3.3. Levosetirizin	9
1.4. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in Aynı Anda Analizinin Yapıldığı Çalışmalar	11
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Tez Çalışması Analizlerinde Kullanılan Cihazlar ve Maddeler	17
2.1.1. Hammaddeler ve Safsızlıklar	17
2.1.2. Piyasa Preparatları	17
2.1.3. Cihazlar ve Araçlar	18
2.1.4. Analiz Kolonları	18
2.1.5. Kimyasal Maddeler	19
2.1.6. Çalışma Çözeltileri	19
2.2. Yöntem	22
2.2.1. Kromatografik Yöntemler	22
2.2.2. Kromatografik Yöntem Türleri	23
2.2.3. Sıvı Kromatografi (SK)	24
2.2.4. Kütle Spektrometrisi (KS)	38
2.2.5. Kromatografik Ayırım Teknikleri	41
2.2.6. Analitik Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri	44
3. BULGULAR	48
3.1. Dalga Boyu Taraması	48
3.2. Montelukast, Desloratadin, Levosetirizin ve Safsızlıkları (Imp1, Imp2, Imp3) için Geliştirilen UPSK Yönteminin Analiz Bulguları	52
3.2.1. UPSK Sistemi ile Analitik Yöntem Çalışmaları	52
3.2.1.5. Akış Hızı	61
3.2.2. Sistem Uygunluk Parametreleri	63
3.2.3. Bozundurma Çalışmaları	64
3.2.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)	73
3.2.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar	74

3.2.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	76
3.2.7. Sağlamlık Çalışmalarına Ait Sonuçlar	79
3.3. Montelukast, Desloratadin, Levosetirizin ve safsızlıkları (Imp1, Imp2, Imp3) için Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları	81
3.3.1. YPSK Sistemi ile Analitik Yöntem Çalışmaları	81
3.3.2. Sistem Uygunluk Parametreleri	85
3.3.3. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)	86
3.3.4. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar	88
3.3.5. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	90
3.3.6. Sağlamlık Çalışmalarına Ait Sonuçlar	93
3.4. Montelukast, Levosetirizin için Ters Faz Yöntemi Kullanılarak Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları	95
3.4.1. Ters Faz Yöntemi Kullanılarak Geliştirilen YPSK Yöntemi Analitik Yöntem Çalışmaları	95
3.4.2. Sistem Uygunluk Parametreleri	100
3.4.3. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)	101
3.5. Kütle Spektrometrisi Yöntemi ile Molekül Ağırlığı Belirlenmesi	104
4. TARTIŞMA	114
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	123
ÖZET	125
SUMMARY	126
KAYNAKLAR	127
ÖZGEÇMİŞ	132

ÖNSÖZ

Tez çalışmaları kapsamında alerjik rinit (astım ile ya da tek başına) tedavisinde kullanılan montelukast sodyum, desloratadin ve levosetirizin etken maddelerinin ve safsızlıklarının UPSK ve YPSK cihazlarında analizi ve analitik yöntem optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntem, kütle spektrometresinde kullanıma uygun olarak tasarlanmıştır. Bu sayede bozundurma çalışmaları sırasında ortaya çıkan bozunma ürünlerinin molekül ağırlıkları tayin edilerek, bozunma ürünlerinin hangi molekül olabilecekleri araştırılmıştır. Geliştirilen yöntemler için yöntem geçerlilik testleri ve validasyon çalışmaları da yapılarak, bu maddelerin farmasötik dozaj şekillerinden eş zamanlı analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Doktora eğitimime başladığımdan beri bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, hoşgörü ve anlayışla her konuda yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Değerli bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, beni destekleyen hocalarım Prof. Dr. Sibel A. Özkan ve Prof. Dr. Nilgün Günden GÖĞER'e çok teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Doktora çalışmaları süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana hep yardımcı olan, sabırla destekleyen Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a ve Analitik Kimya Anabilim Dalı doktora öğrencisi Cem ERKMEN'e ve sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmaları süresince göstermiş oldukları destek ve anlayış için Dr.Ecz. Abdullah USLU, Rıdvan SERT ve Nobel İlaç Ailesine, tecrübe ve değerli zamanını benimle paylaşarak destek olan sevgili mesai arkadaşım Cihat ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sevgilerini hep hissettiğim, bana her zaman inanan ve güvenen sevgili annem Medine ZENGİN ve babam Mustafa ZENGİN'e, beni destekleyen ve sabreden sevgili eşim Dr. Sertan KURNALI'ya, bana enerji veren, sürekli öğreten çocuklarım Kaan ve Kerem'e hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik Faktörü
ACN	Asetonitril
ARIA	Alerjik Rinit ve Astım Üzerine Etkisi
BSS	Bağıl Standart Sapma
DES	Desloratadin
EMA	European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FDD	Fotodiyot Dizi Dedektörü
IMP1	N-Formil Desloratadin
IMP2	Montelukast Sülfoksit
IMP3	Montelukast Cis İzomer
IS	Parasetamol
SK	Sıvı Kromatografisi
m	Eğim
k	Kapasite Faktörü
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Fotodiyot Dizi Dedektörü)
KS	Kütle Spektrometre
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometre)
LEV	Levosetirizin
MEOH	Metanol
MON	Montelukast Sodyum
N	Etkin Tabaka Sayısı
PTFE	Politetrafloroetilen
Rs	Ayrırma Gücü
SK	Sıvı Kromatografisi

SSS	Santral Sinir Sistemi
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T	Kuyruklanma Faktörü
TAS	Tayin Alt Sınırı
THF	Tetrahidrofuran
TS	Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı
t_R	Alıkonma Zamanı
UPLC-DAD	Ultra Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Fotodiyot Dizi Dedektörü)
UPSK	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultra Viyole
USP	United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Montelukast'ın kimyasal yapısı	8
Şekil 1.2. Desloratadin'in kimyasal yapısı	9
Şekil 1.3. Levosetirizin'in kimyasal yapısı	10
Şekil 2.1. Kromatografik ayrılma şeması	23
Şekil 2.2. Sıvı kromatografide izokratik ve gradient elüsyon uygulamaları	27
Şekil 2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi	28
Şekil 2.4. FDD dedektörünün şematik gösterimi (Swartz, 2010)	35
Şekil 2.5. Van Deemter Eğrisi (Shammout, 2013)	37
Şekil 2.6. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri	39
Şekil 2.7. Elektrosprey iyonizasyon şematik gösterimi	41
Şekil 2.8. YPSK sisteminde elde edilen kromatogram örneği (Gumustas, 2009)	42
Şekil 3.1. UV spektrofotometrede, Montelukast'ın seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	48
Şekil 3.2. UV spektrofotometrede, Desloratadin'in seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	49
Şekil 3.3. UV spektrofotometrede, Levosetirizin Dihidroklörür'ün seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	49
Şekil 3.4. UV spektrofotometrede, IMP1'in seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	50
Şekil 3.5. UV spektrofotometrede, IMP2'nin seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	51
Şekil 3.6. UV spektrofotometrede, IMP3'ün seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması	51
Şekil 3.7. Zorbax SB-Phenyl, $50 \times 4,6$ mm, $1,8 \mu\text{m}$ kolon, $0,6 \text{ mL dk}^{-1}$ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz 1 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	53
Şekil 3.8. Zorbax SB-Phenyl, $50 \times 4,6$ mm, $1,8 \mu\text{m}$ kolon, $0,6 \text{ mL dk}^{-1}$ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz 2 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	54
Şekil 3.9. Zorbax SB-Phenyl, $50 \times 4,6$ mm, $1,8 \mu\text{m}$ kolon, $0,6 \text{ mL dk}^{-1}$ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro	

asetik asit içeren, akış programı 1 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	54
Şekil 3.10. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, Hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren, akış programı 2 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	55
Şekil 3.11. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren, akış programı 3 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	56
Şekil 3.12. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	57
Şekil 3.13. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 3 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	58
Şekil 3.14. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:10 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	58
Şekil 3.15. Acquity UPLC BEH –C18, 50×2,1 mm, 130Å, 1,7µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	59
Şekil 3.16. Acquity UPLC BEH –Phenyl, 100×2,1 mm, 1,7µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), Akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	59
Şekil 3.17. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 30°C, 0,6 mL dk ⁻¹ , akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	60
Şekil 3.18. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,5 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	61
Şekil 3.19. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,7 mL dk ⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram	61

Şekil 3.20. UPSK SUT kromatogramı: Optimize edilen koşullarla; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram

63

Şekil 3.21. İşlem görmemiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

64

Şekil 3.22. İşlem görmemiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

65

Şekil 3.23. 0,1N HCl ile asit hidrolizi yapılmış LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

65

Şekil 3.24. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

66

Şekil 3.25. %0,3 H₂O₂ ile oksidasyona uğratılmış LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

66

Şekil 3.26. 70°C'de etüvde 6 saat bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

67

Şekil 3.27. 3,6 milyon luks saat gün ışığında 1 hafta bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

67

Şekil 3.28. 600 W-h/m² UV ışıktta 1 hafta bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

68

Şekil 3.29. 0,1 N HCl ile asit hidrolizi yapılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 68

Şekil 3.30. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 69

Şekil 3.31. %0,3 H₂O₂ ile oksidasyona uğratılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 69

Şekil 3.32. 70°C'de etüvde 6 saat bekletilmiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 70

Şekil 3.33. 3,6 milyon luks saat gün ışığında 1 hafta bekletilmiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 70

Şekil 3.34. 600 W-h/m² UV ışıktı 1 hafta bekletilmiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 71

Şekil 3.35. UPSK-FDD terarlanabilirlik çalışması; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan arka arkaya 5 enjeksiyona ait kromatogram (Derişimler piklerin geliş sırasına göre µg mL⁻¹ olarak; IS: 30, DES: 50, IMP1: 2, LEV: 50, IMP2: 2, IMP3: 2, MON: 100) 74

Şekil 3.36. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet UPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 77

- Şekil 3.37.** 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet UPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 79
- Şekil 3.38.** Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 5 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram 82
- Şekil 3.39.** Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 6 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram 83
- Şekil 3.40.** Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 7 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram 84
- Şekil 3.41.** YPSK-FDD SUT kromatogramı: Optimize edilen koşullarla; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram 86
- Şekil 3.42.** YPSK-FDD tekrarlanabilirlik çalışması; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM Amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan arka arkaya 5 enjeksiyona ait kromatogram 87
- Şekil 3.43.** 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet YPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), Akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram 91
- Şekil 3.44.** 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet YPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram 93
- Şekil 3.45. a.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 90:10; (h/h) gösteren kromatogram 95
- Şekil 3.45. b.** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 85:15; (h/h) gösteren kromatogram 96

Şekil 3.45. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 1 mL dk ⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 80:20; (h/h) gösteren kromatogram	96
Şekil 3.46. a. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,00 mL dk ⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram	97
Şekil 3.46. b. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,25 mL dk ⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram	97
Şekil 3.46. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,50 mL dk ⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram	98
Şekil 3.47. a. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, akış hızı: 1 mL dk ⁻¹ , 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 20 °C analiz şartlarına ait kromatogram	98
Şekil 3.47. b. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, akış hızı: 1 mL dk ⁻¹ , 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 25 °C analiz şartlarına ait kromatogram	99
Şekil 3.47. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, akış hızı: 1 mL dk ⁻¹ , 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 30 °C analiz şartlarına ait kromatogram	99
Şekil 3.47. d. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, akış hızı: 1 mL dk ⁻¹ , 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 40 °C analiz şartlarına ait kromatogram	100
Şekil 3.48. Piklerin geliş sırasıyla LEV ve MON için kalibrasyon sonuçları	102
Şekil 3.49. Piklerin geliş sırasıyla LEV ve MON için optimize koşullarda a; kapsül numunesi, b; % 25 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi, c; % 50 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi, d; % 100 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar; Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon,akış hızı: 1 ml dk ⁻¹ , 240 nm, MeOH:Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 40 °C analiz şartları	103
Şekil 3.50. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış test çözeltisine ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları	105
Şekil 3.51. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış test çözeltisine ait SK-KS kromatogramları	106
Şekil 3.52. Oksidasyon bozundurma yapılmış test çözeltisine ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları	107
Şekil 3.53. Oksidasyon bozundurma yapılmış test çözeltisine ait SK-KS kromatogramları	108
Şekil 3.54. MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözeltiye ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları	109

Şekil 3.55. MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözeltiye ait SK-KS kromatogramları

110



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. ARIA klavuzuna göre alerjik rinit sınıflaması	2
Çizelge 1.2. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar	11
Çizelge 2.1. Analizlerde kullanılan piyasa preparatlarının listesi	17
Çizelge 2.2. Bazı yaygın kromatografik fazların bileşimi	31
Çizelge 2.3. Başlıca sabit faz sınıflandırması ve uygulamaları	31
Çizelge 2.4. Dedektör özellikleri	33
Çizelge 2.5. Sistem uygunluk testleri (SUT) parametreleri	43
Çizelge 3.1. UPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemi parametreleri	62
Çizelge 3.2. UPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları	63
Çizelge 3.3. LORCLAST® Tablet bozundurma sonuçları	72
Çizelge 3.4. LEVMONT® Tablet bozundurma sonuçları	72
Çizelge 3.5. UPSK-FDD yönteminin doğrusalılık çalışması sonuçları	73
Çizelge 3.6. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST®) Tablet için UPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları	75
Çizelge 3.7. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin (LEVMONT®) Tablet için UPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları	75
Çizelge 3.8. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet etken maddelerine ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.8. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet için safsızlıklara ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	77
Çizelge 3.9. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet etken maddelerine ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.9. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet safsızlıklara ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.10. a. UPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları	79
Çizelge 3.10. b. UPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları	80

Çizelge 3.11. a. UPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları	80
Çizelge 3.11. b. UPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları	80
Çizelge 3.12. YPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemi parametreleri	85
Çizelge 3.13. YPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları	85
Çizelge 3.14. YPSK-FDD yönteminin doğrusallık çalışması sonuçları	87
Çizelge 3.15. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST®) Tablete ait YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları	88
Çizelge 3.16. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin Dihidroklörür (LEVOMONT®) Tablete ait YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları	89
Çizelge 3.17. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST®) Tablete ait UPSK-FDD ve YPSK-FDD Yöntemi ile test sonuçları, F ve t değerleri	89
Çizelge 3.18. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin Dihidroklörür (LEVOMONT®) Tablete ait UPSK-FDD ve YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları, F ve t değerleri	89
Çizelge 3.19. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet etken maddelerine ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	90
Çizelge 3.19. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet safsızlıklara ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	91
Çizelge 3.20. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablete ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları	92
Çizelge 3.20. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet için safsızlıklara ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları	92
Çizelge 3.21. a. YPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları	93
Çizelge 3.21. b. YPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları	94
Çizelge 3.22. a. YPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları	94
Çizelge 3.22. b. YPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları	94
Çizelge 3.23. Ters faz yöntemi ile geliştirilmiş YPSK analiz yöntemi parametreleri	100
Çizelge 3.24. Ters faz yöntemi ile geliştirilmiş YPSK analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları	101

Çizelge 3.25. Ters faz yöntemi kullanılarak geliştirilmiş yöntemin doğrusallık çalışması sonuçları	101
Çizelge 3.26. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin tablet etken maddelerine ait ters faz yöntemi kullanılarak geliştirilmiş yöntemin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar	103
Çizelge 3.27. SK-KS cihaz parametreleri	104
Çizelge 3.28. SK-KS ile belirlenen moleköl ağırlıkları	112



1. GİRİŞ

Rinit, burun boşluğunu kaplayan zarların iltihabı olarak tanımlanır. Hapşırma, kaşıntı, burun tıkanıklığı, burun akıntısı, post burun drenajı, gözlerde laktasyon ve buna bağlı koku ve tat kaybı gibi belirtilerin hepsinin veya bazılarının kombinasyonu ile karakterize edilir. Rinit insanlık kadar eski bir hastalıktır (Karabıçak, 2011; Mandhane ve ark., 2011). Rinit, bir dizi faktörle tetiklenen heterojen bir hastalıktır. Genellikle atopik, idiyopatik, alerjik olmayan veya bulaşıcıdır. Diğer çeşitleri mesleki, hormonal ve ilaca bağlı riniti içerir (Lemanske, 1998).

Alerjik rinit dünya nüfusunun %10-25 kadarını etkileyen global bir sağlık problemidir (Bousquet ve ark., 2001). Alerjik rinit mevsimsel ve perennial (yıl boyu) alerjik rinit olarak iki ana kategoride tanımlanmıştır (Lemanske, 1998). Mevsimsel alerjik rinit belirtileri ağaç, çimen, yabancı ot poleni veya mantar gibi mevsimsel alerjene maruz kalma ile doğrudan ilişkilidir ve kolayca tanımlanabilir. ‘Mevsim’ uzunluğu iklim ve bölge koşullarına göre çeşitlilik gösterebildiği gibi, ayrıca hastanın duyarlı olduğu alerjen aralığına bağlı olarak değişebilir. İntermittan belirtileri bir hafta içinde 4 günlük süreden daha az veya toplam süresi 4 haftalık süreden daha az olur. Perennial alerjik rinit belirtileri bir hafta içinde 4 günlük süreden daha fazla veya toplam süresi 4 haftalık süreden daha fazla olarak yılın %75’ine kadar meydana gelir. Belirtiler sinüzit, solunum yolu enfeksiyonu ve rinitin diğer türleri ile benzerlik gösterdiği için perennial alerjik rinitin tanımlanması kolay değildir. Perennial alerjik rinite genellikle, toz akarları, hayvan kepeği, küf gibi mevsimsel olmayan alerjenler sebep olur (May ve Dolen, 2017).

Alerjik rinitin duyarlı olunan alerjen türüne göre sınıflandırılması, her durumda klinik görünümü göstermeyebilir. Bunun sebebi; alerjik rinit belirtisi görülenlerde enfeksiyonlar, sigara dumanı, çeşitli kokular gibi belirgin olmayan uyarıcıların alerjen ile karşılaşmasa bile belirtilerin görülmesine sebep olabilir. Duyarlılığı sebebi ile perennial rinit grubunda olan bir kişiyi şikayetleri bütün yıl boyunca aynı oranda olmayabilir veya polen ve mantara duyarlı olan kişide semptomatik dönemin

belirlenmesi zor olabilir. Bunların yanı sıra, kişi tek bir alerjene değil de birçok alerjene karşı hassasiyet gösterebilir ve bütün yıl boyunca süregelen şikayetleri bahar döneminde artabilir. Diğer taraftan enflamasyonun az olduğu durumlarda polen döneminde belirtiler mevsimsel özellik gösterecek kadar olmayabilir. Bu neden ile kişileri persistan ve intermittan belirtileri olanlar diye belirtilerin süresine göre sınıflandırma önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile iş birliği ile yapılan “alerjik rinit ve astım üzerine etkisi (ARIA)” konulu çalışmada alerjik rinit için yeni sınıflandırma tanımlanmıştır. Bu sınıflandırma; belirtilerin sürekliliğini ve seviyesini dikkate almaktadır. (Çizelge 1.1) (Bousquet ve ark., 2001).

Çizelge 1.1. ARIA klavuzuna göre alerjik rinit sınıflaması.

İntermittan alerjik rinit
• Haftada 4 günden kısa süren semptomlar veya • Ard arda 4 günden kısa süren semptomlar
Persistan alerjik rinit
• Haftada 4 günden uzun süren semptomlar ve • Ard arda 4 günden uzun süren semptomlar
Hafif alerjik rinit: Aşağıdakilerden <u>hiçbiri</u> olmamalı
• Uykunun bozulması • Günlük aktivitede, eğlencede ve/veya sporda rahat olamama • Evde veya işte rahatsızlık • Rahatsızlık vermese de semptomların varlığı
Orta/ciddi alerjik rinit: Aşağıdakilerin <u>en az biri</u> olmamalı
• Uykunun bozulması • Günlük aktivitede, eğlencede ve/veya sporda rahat olamama • Evde veya işte rahatsızlık • Rahatsızlık vermese de semptomların varlığı

Alerjik rinit; uyku, okul, iş üretkenliği ve sosyal yaşamı etkileyerek yaşam kalitesini azaltır. Yüksek prevalansı ve yaşam kalitesi üzerine olan etkisi ile alerjik rinit başlıca kronik solunum yolu hastalığı olarak sınıflandırılmaktadır. Alerjik rinit sistemik inflamatuvar sürecin bir parçasıdır ve astım, rinosinüzit, alerjik konjonktivit gibi diğer alerjik hastalıklar ile ilişkilidir (May ve Dolen, 2017).

Birçok epidemiyolojik rapor alerjik rinit ve astım arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Alerjik rinitli hastaların önemli bir kısmında havayolu aşırı duyarlılığı saptanmıştır. Bu nedenle alerjik rinitin astım gelişimi için bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. Alerjik rinitli hastalarda astım şikayetleri (yaklaşık %40'ında), astımlı hastalarda da rinit şikayetleri görülebilmektedir. Bu durum üst ve alt solunum yollarının ortak inflamatuvar süreç ile etkilendiğini düşündürmektedir. Alerjik inflamasyonun tek bir hedef organı değil de tüm solunum sistemini içerecek şekilde seyretmesi, “birleşik hava yolları” kavramı ortaya çıkarmıştır. Her iki durumda da erken ve geç faz inflamatuvar yanıtlar görülmekte, aynı efektör hücreler görev almakta ve aynı mediyatörler salgılanmaktadırlar. Açıklanmaya çalışılan bu patofizyolojik bağlantı sonucu ortak mekanizmaya yönelik yeni tedavi yaklaşımları üzerinde durulmaya başlanmıştır (Borish, 2003). Alerjik rinitin uygun tedavisi astım belirtilerini azaltabilir, havayolu kapasitesini artırabilir ve bronşiyal hipertansiyonu azaltabilir (Crystal-Peters ve ark., 2001).

Alerjik rinit tedavisinde 3 yaklaşım vardır;

- Alerjenden Korunma
- İlaç Tedavisi
- İmmunoterapi

Alerjenden korunma gibi farmakolojik olmayan yöntemler alerjik rinit belirtilerini ve tedavi için gerekli ilaç miktarını azaltabilir veya ortadan kaldıracaktır. Hasta tarafından veya alerji testi ile alerjen tanımlandığında, alerjenden kaçınma pratik bir yöntem olabilir. Alerjenden kaçınma farmakoterapi dahil bütün tedavi stratejisinin bir parçası olmalıdır (May ve Dolen, 2017). İlaç tedavisi, tolerans, hasta

tercihi maliyet hesaba katılarak seçilmelidir. Alerjik rinit tedavisinde ilaçlar genellikle oral veya burun içinden uygulanır. Farmakoterapi için mevcut ilaç sınıfları antihistaminikler, kortikosteroidler, dekonjestanlar, antilökotrienler (LTRA'lar), antikolinergikler olarak belirtilebilir. İmmunoterapi de farmakoterapiye cevap vermeyen hastalar için bir seçenektir. En yaygın kullanılan farmakoterapi seçenekleri; intranasal kortikosteroidler, H₁ reseptör antagonistleri (antihistaminler) ve antilökotrienler (LTRA'lar)dir (May ve Dolen, 2017).

1.1. Antihistaminler

Histamin, alerjik semptomlara sebep olan mediyatörlerden majör olanıdır. Nazal mukozada H₁ histamin reseptörleri hakimdir. Klasik antihistaminikler, reseptör düzeyinde histamin ile kompetitif inhibisyona girerek onun etkisini hızla inhibe ederek etki gösterirler. Bu inhibisyon sonucu alerjik rinit semptomları olan hapşıırma, burun akıntısı ve göz, burun ve boğazda kaşıntı hissi hafifler. Alerjik yanıtın geç fazında oluşan konjesyon ve burun tıkanıklığı üzerine etkileri yoktur. Alerjik rinite yönelik medikal tedavide ilk başvurulanan ajanlardır. Tedaviye alerjenle karşılaşmadan 1–2 hafta önce başlanılırsa daha etkili olurlar. Son zamanlarda antihistaminiklerin H₁ reseptör antagonisti olmalarının yanı sıra antialerjik etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir. Bu etkiler ilacın molekül yapısına göre farklılık gösterir.

Antihistaminikler, ilacın kan-beyin bariyerini geçiş hızına bağlı olarak sedatif ya da sedatif olmayan olarak üzere iki gruba ayrılır. Sedasyon yapan antihistaminikler, lipofiliktir ve kan-beyin bariyerini hızla geçer. Sedatif olmayanlar ise lipofilik özellikleri azaltılmıştır ve kan-beyin bariyerini yavaş geçerler. Yeni kuşak antihistaminikler (terfanadin, akrivastin, astemizol, azelastin, setrizin, ebastin, feksofenadin, loratadin, terfenadin, desloratadin, levosetirizin, rupatidin) H₁ reseptörleriyle kompetisyonun yanında, mediyatörlerin intrasellüler yapımını azaltmakta, hücre degranülasyonunu önleyerek de etki göstermektedirler. Bu ajanlar büyük ölçüde lipofobik olduğu için kan beyin bariyerini minimal düzeyde geçerler ve çok daha az sedasyona neden olurlar. Antikolinergik etkileri yok ya da çok az olduğu

için glokom ve prostat hipertrofisinde güvenle kullanılabilir. İlaç etkileşimleri de daha azdır. Ayrıca hem etkileri 24 saat sürer, hem de H₁ reseptörlere daha büyük bir selektivite gösterirler. Bu nedenlerle alerjik rinit tedavisinde, ikinci kuşak antihistaminikler daha çok tercih edilmektedir (Karabıçak, 2011).

Antihistaminikler kaşıntı, hapşıрма ve burun akıntısı gibi histamin bağlantılı semptomları baskılar, ancak bunlar burun tıkanıklığının rahatlaması için oral veya topikal dekonjestanlarla birlikte kullanılmalıdır. Desloratadin, levosetirizin gibi yeni sedatif olmayan antihistaminikler, hava yolu geçişinin iyileştirerek ve yaşam kalitesini artırarak ilave dekonjestan ve anti-inflamatuvar özellik gösterir (Ciebiada ve ark., 2011).

1.2. Lökotrienler Antagonistleri

Montelukast, pranlukast, zafirlukast gibi lökotrien antagonisti ajanlar alerjik rinit patofizyolojisinde önemli rol oynayan proinflamatuvar biyoaktif mediyatörler olan sistenil lökotrien (CysLT)'lerin sentezini ya da etkilerini bloke ederler. Sistenil lökotrienler bronkokonstriksiyona, mukus sekresyonuna, vasküler permeabilitenin artmasına, havayoluna eozinofil göçüne ve de düz kas proliferasyonunun artmasına neden olurlar. Montelukast ve zafirlukast lipooksijenaz ürünü eikozanoid yapılı otakoid olan LTD₄ ve LTE₄'ün reseptörlerini (bronş düz kasları ve kapiller endotelinde) bloke ederler. Bu maddeler CysLT'ler grubuna girer ve etkiledikleri reseptörler CysLT₁ reseptörleri diye adlandırılırlar (Karabıçak, 2011).

Montelukast lökotrien reseptör antagonistidir ve intermitan ve persistan alerjik rinit tedavisinde uygulanır. Günde bir kez uygulandığında etkili bir şekilde burun tıkanıklığı azaltır, belirgin bir şekilde semptomlarda iyileşme gözlenir. Montelukastın veya antihistaminlerin tek başına kullanılmasına göre Montelukastın antihistaminikler ile birlikte kullanılması tedavide ilave avantajlar sağlamaktadır (Ciebiada ve ark., 2011).

Farmakokinetik verilere göre, desloratadin, levosetirizin ve montelukast oral uygulamadan sonra hızla emilir, kanda maksimum konsantrasyona hızla ulaşır ve yetişkinlerde uzun plazma yarılanma süresine sahiptir. Klinik veriler montelukast ve desloratadin veya levosetirizin günde bir kere birlikte alınması ile 24 saat için intermitan veya persistan alerjik rinitli hastalarda semptomların giderildiğini göstermektedir (Ciebiada ve ark., 2011).

1.3. Çalışmalarda Kullanılan Etken Maddelere Ait Bilgiler

Tez çalışmalarında antihistaminik etkili ilaç etken maddelerinden Desloratadin (DES) ve Levosetirizin (LEV) ile lökotrien reseptör antagonisti olan Montelukast Sodyum (MON) kullanılmıştır.

1.3.1. Montelukast Sodyum (Rx Media, 2018)

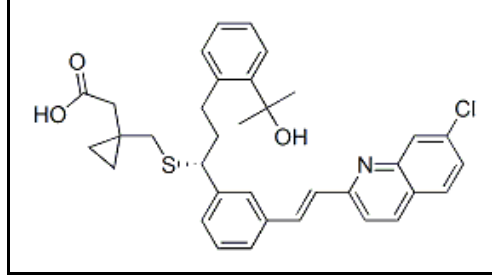
Montelukast, astım ve alerjik rinitin profilaksisinde ve kronik tedavisinde oral yoldan kullanılan bir ilaçtır. ABD’de zafirlukastın ardından tedaviye giren ikinci lökotrien reseptör antagonistidir. Zafirlukast’tan farklı olarak, montelukast CYP2C9 veya CYP3A4 enzimlerini inhibe etmez ve bu enzimlerle metabolize olan ilaçların hepatik klirensini etkilemez. Lökotrien antagonistleri, ABD Ulusal Astım Eğitim ve Önleme Programı Uzman Paneli’ne göre hafif persistan astımda inhale kortikosteroidlere bir alternatif oluşturmalarına rağmen tercih edilmezler. Buna ek olarak, Panel bir alternatif olarak, yetişkinler ve en az 12 yaşındaki çocuklardaki yeterli kontrol edilemeyen orta persistan astımda, düşük doz inhale kortikosteroid tedavisine yardımcı tedavi olarak lökotrien antagonistlerini önermektedir. Montelukastın astım profilaksisindeki etkinliği 12 yaşına kadar çocuklarda ve alerjik rinit profilaksisindeki etkinliği 6 aya kadar bebeklerde gösterilmiştir. Buna ek olarak, montelukast, FDA tarafından egzersiz kaynaklı bronkokonstriksiyonun profilaksisi için onaylanmıştır; semptomları tek başına bir inhale kısa etkili beta-2 agonist ile kontrol edilemeyen hastalarda, egzersiz kaynaklı bronkokonstriksiyon belirtilerinin

kontrol altına alınabilmesi için inhale kısa etkili beta-2 agonist tedavisine eklenebilecek birinci basamak kontrol edici ilaç olabilir. Montelukast tablet, çiğnenebilir bir tablet, oral granül gibi farklı farmasötik şekillerde mevcuttur. Tablet formu astım için FDA tarafından Şubat 1998’de onaylanmıştır. Çiğnenebilir tabletleri ve oral granülleri çocuklarda astım için, sırasıyla 2000 ve 2001 yıllarında onaylanmıştır. İlaç mevsimsel alerjik rinit için Ocak 2003’te FDA onayı almıştır. FDA montelukastı Nisan 2007’de egzersize bağlı bronkokonstriksiyonun önlenmesi için onaylamıştır. Montelukastın bir intravenöz formülasyonu acil serviste ya da hastanede bakım gerektiren akut astım ataklarının ek tedavi için klinik geliştirme aşamasındadır.

Montelukast solunum yolunda bulunan sisteinil lökotrien reseptörü (CysLT1) üzerinde etkili olan lökotrien D4 (LTD4)’ün güçlü ve selektif antagonistidir. Sisteinil lökotrienlerin CysLT’ye bağlanmaları astma patofizyolojisi ile ilgili bulunmuştur.

Bu araşidonik asit metabolizma ürünleri alerjenlere yanıt olarak çeşitli hücrelerden (mast hücreleri ve eozinofiller dahil) salıverilirler. Sisteinil lökotrienlerin CysLT’ye bağlanması kemoatraktan eozinofiller, inflamatuvar mediyatörlerin stimülasyonu, solunum yolunda ödeme yol açan endotelial membran geçirgenliğinde artma, düz kas kasılması ve kalın, yoğun mukus salgısında artma dahil astım fizyopatolojisi ile ilişkili bulunmuştur. Buna ek olarak, sisteinil lökotrienler, dendritik hücre olgunlaşması ve migrasyon ile gelecekteki alerjik tepkiler için bağışıklık sistemini hazırlarlar. Sisteinil lökotrienler alerjik rinitte erken ve geç faz reaksiyonlar sırasında alerjene yanıt olarak burun mukozasına salıverilirler ve aksırma, nazal kaşıntı ve geç konjesyona yol açarlar. Gerçekten de bunların CysLT’ye bağlanmaları solunum yolunda ödeme, bronş düz kasının kasılmasına ve kalın yoğun mukus salgılanmasına yol açar. Montelukast, LTD4’ün fizyolojik etkilerini CysLT1 reseptörü düzeyinde inhibe ederek astmanın işaret ve belirtilerini olumlu yönde etkiler. Klinik olarak, ilacın antijene bağlı bronkokonstriksiyonun erken fazını %75 ve geç fazını ise %57 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Montelukast lökotrien reseptörleri üzerinde agonist etki göstermez ve LTC4,

asetilkolin, histamin, prostaglandin veya serotonin'e bağılı düz kas kasılmalarını inhibe etmez. Montelukast'ın kimyasal yapısı Şekil1.1'de görülmektedir.



Şekil 1.1. Montelukast'ın kimyasal yapısı.

(Montelukast formülü: $C_{35}H_{36}ClNO_3S$, Montelukast molekül ağırlığı: 586.187 g/mol)

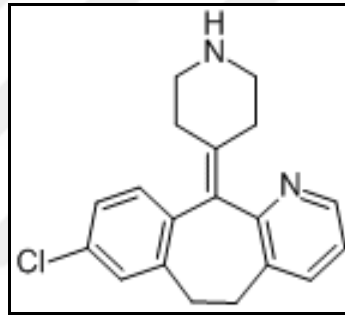
1.3.2. Desloratadin (Rx Media, 2018)

Sedatif olmayan desloratadin, uzun etkili bir antihistaminiktir. Etkisini periferik histamin H_1 -reseptörlerini etkileyerek gösterir. Santral sinir sistemine (SSS) çok az geçer ve buradaki H_1 -reseptörlerine afinitesi düşüktür. Bu yüzden desloratadinin SSS'deki etkileri difenhidramin gibi geleneksel H_1 -antagonistleri ile kıyaslandığında daha azdır. Desloratadin, Loratadin'in aktif bir metabolitidir. In vitro bağılı potentliği Loratadin'e kıyasla 10-20 kat daha fazladır. Mevsimsel alerjik rinite ilişkin belirtilere karşı kullanılır. İlaç FDA tarafından ilk kez Aralık 2001'de onaylanmış ve Şubat 2002'de perennial alerjik rinit ve kronik idiyopatik ürtiker ek endikasyonları için onay almıştır. Avrupa ilaç ajansı EMEA da değişik desloratadin preparatlarını onaylamıştır.

Diğer H_1 -blokörleri gibi desloratadin de H_1 -reseptörleri için histaminle yarışmaya girer. Kromolin ve Nedokromil'in yaptığı gibi histaminin salıverilmesini engellemez. Bu kompetitif antagonizma histaminin gastrointestinal kanal, uterus, geniş kan damarları ve bronş düz kasındaki etkilerini bloke eder. H_1 -reseptörlerinin blokajı ödem, sıcaklık ve kaşıntı gibi histaminerjik etkinlikten kaynaklanan histaminik aktiviteyi de baskılar. Yüksek konsantrasyonlarda ilacın bu H_1 -antagonisti etkisi göreceli olarak irreversibl hale gelir. In vitro araştırmalar Desloratadin'in H_1 -

reseptörlerine ana ilaç olan Loratadin'e göre 15 kat daha yüksek afinite gösterdiğini ortaya koymuştur.

Desloratadin kan-beyin engelini hızla geçmez ve beyindeki reseptörlere kıyasla öncelikli olarak periferdeki H₁-reseptörlerine bağlanır. Bu özelliği sedasyon yapmama özelliğinin bir bölümünü açıklayabilir. H₁-reseptör blokörlerinin kimyasal yapıları antikolinerjik ilaçlar, lokal anestezikler, antispazmodikler, gangliyon ve adrenerjik reseptör blokörü ilaçlara benzer. H₁-reseptörleri değişen derecede antikolinerjik etki gösterirler; bununla birlikte, desloratadin terapötik konsantrasyonlarda önemli antikolinerjik etkinlik göstermez. Desloratadin'in kimyasal yapısı Şekil 1.2'de görülmektedir.



Şekil 1.2. Desloratadin'in kimyasal yapısı.

(Desloratadin formülü: C₁₉H₁₉ClN₂, Desloratadin molekül ağırlığı: 310.825 g/mol)

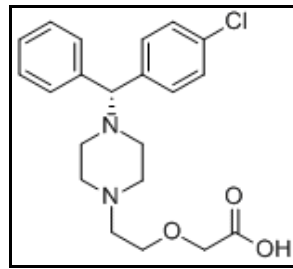
1.3.3. Levosetirizin (Rx Media, 2018)

Levosetirizin, Setirizinin (R) enantiyomeridir ve güçlü bir periferik H₁-reseptör antagonistidir. Santral sinir sistemine girmediğinden sedasyon oluşturmeyan antihistaminikler grubuna dahildir. Alerjik rinit (oküler semptomları da içeren mevsimsel alerjik rinit dahil) ve kronik idiyopatik ürtiker tedavisinde kullanılır.

Levosetirizin histamin H₁-reseptörlerine yüksek afinite gösterir. Histamin vücudun savunma mekanizmalarının bir bölümü tarafından üretilen endojen bir kimyasaldır. Hemen hemen tüm dokularda bulunan mast hücrelerinde depolanır.

Vücut alerjen olarak bilinen yabancı bir maddeye (örn. polen tozu) karşı reaksiyon verdiği zaman, mast hücreleri alerjen tarafından depoladıkları histamini salıvermek üzere uyarılırlar. Salıverilen histamin H₁-reseptörlerine bağlanarak alerjik semptomlar olarak bilinen reaksiyon zincirine yol açar. Histaminin salıverilmesi alerjik bölgeye kan akımını artırır ve alerjik yanıtta katkıda bulunan diğer kimyasal mediyatörlerin salıverilmesine neden olur. Tüm bunlar alerjik reaksiyonun semptomlarına yol açar. Histamin, saman nezlesinde, burun, göz, deri ve solunum yollarında inflamasyona neden olur; gözde yaşarma ve kaşıntı, burunda akıntı, aksırık ve nazal konjestiyon ortaya çıkar.

Levosetirizin histamin reseptörlerini bloke eder. Histaminin mast hücrelerinden salıverilmesini önlemez, fakat onun H₁-reseptörlerine bağlanmasını engeller. Böylece saman nezlesine yol açan yukarıdaki tipik olayları önler. Levosetirizin eozinofillerin cilt ve akciğer hücrelerine migrasyonunu inhibe eder. Levosetirizin kronik idiyopatik ürtiker olarak adlandırılan durumun semptomlarını da önler. Bu hastalıkta belirli bir nedene bağlanamayan kronik kaşıntılı döküntü görülür. Histamin etkisinin bloke edilmesi kaşıntıyı iyileştirir ve buna bağlı kaşıntıyı azaltır. Levosetirizin sedasyon oluşturmayan bir antihistaminiktir. Beyine giremediğinden normal dozlarda sersemlik hali oluşturmaz. Buna rağmen bazı hastalarda hafif bir uyku hali veya fatig görülebilir. Levosetirizin'in kimyasal yapısı Şekil1.3.'de görülmektedir.



Şekil 1.3. Levosetirizin'in kimyasal yapısı.

(Levosetirizin formülü: C₂₁H₂₅ClN₂O₃, Levosetirizin molekül ağırlığı: 388.892 g/mol)

1.4. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in Aynı Anda Analizinin Yapıldığı Çalışmalar

Çizelge 1.2. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar.

Madde Adı	Yöntem	Sabit Faz	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Kromatografik Uygunluk Parametreleri			Validasyon Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk (%)	
Montelukast	Sıvı Kromatografisi	BDS Hypersil C18(250 mm x 4,6 mm x 5 μ m)	Disodyum Hidrojen Fosfat Tamponu (0,02 M): Metanol (25: 75 h/h), Ortofosforik asit ile pH 7'ye ayarlanmış.	3,558	UV	-	-	-	2 – 20 μ g mL ⁻¹	0,2 μ g mL ⁻¹	0,6 μ g mL ⁻¹	0,20	101,20	(Rathore ve ark., 2010)
Levosetirizin				7,450		-	-	-	1 – 10 μ g mL ⁻¹	0,5 μ g mL ⁻¹	0,8 μ g mL ⁻¹	1,81	101,16	
Montelukast	İnce Tabaka Sıvı Kromatografisi	-	Toluen:Etil Acetat:Metanol:Amonyak (2.5: 7: 2.5: 1, h/h/h/h)	-	Densitometrik Scanning	-	-	-	1000-5000 ng spot ⁻¹	50 ng spot ⁻¹	110 ng spot ⁻¹	0,06	100,55	
Levosetirizin				-		-	-	-	500-2500 ng spot ⁻¹	90 ng spot ⁻¹	200 ng spot ⁻¹	0,34	99,75	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Hypersil Gold L7 Kolon (250mm x 4,6 mm, 5 μ m)	0.05 (M) Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu, pH 7.5 ve Metanol (20:80 h/h)	4,2	UV	5,95	-	8000	10-350 μ g mL ⁻¹	2,41 μ g mL ⁻¹	7,3 μ g mL ⁻¹	<1	99,38	(Basu ve ark., 2011)
Levosetirizin				3,2		-	-	7500	10-260 μ g mL ⁻¹	2,26 μ g mL ⁻¹	6,85 μ g mL ⁻¹	<1	100,41	
Montelukast	İnce Tabaka Sıvı Kromatografisi	-	Etil Asetat: Metanol:Trietilamin (5:5:0.02 h/h/h)	-	Densitometrik Scanning	-	-	-	400–1200 ng spot ⁻¹	20,63 ng spot ⁻¹	62,5 ng spot ⁻¹	0,33	101,46	(Rote & Niphade, 2011)
Levosetirizin				-		-	-	-	200–600 ng spot ⁻¹	21,12 ng spot ⁻¹	64 ng spot ⁻¹	0,8530	97,98	
Montelukast	Birinci-Türev Spektrofotometri	-	-	-	-	-	-	-	10–60 μ g mL ⁻¹	3,69 μ g mL ⁻¹	11,17 μ g mL ⁻¹	0,93	101,77	
Levosetirizin				-		-	-	-	5–30 μ g mL ⁻¹	1,05 μ g mL ⁻¹	3,21 μ g mL ⁻¹	0,32	99,45	

Çizelge 1.2. Devam. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar.

Madde Adı	Yöntem	Sabit Faz	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Kromatografik Uygunluk Parametreleri			Validasyon Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk (%)	
Montelukast	Kemometri Destekli Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Phenomenex® C18 Analitik Kolon (150mm×4.6mm, 5µm); Phenomenex® C18 Guard Cadridge (4mm×3mm, 5µm) ile Bağlantılı	MeCN, MeOH, 11.39 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)Çözelti (40:30:30 h/h/h)	4,56	UV	-	-	-	0,5-5,0 µg mL ⁻¹	0,34 ng mL ⁻¹	1,12 ng mL ⁻¹	-	99,68	(Suresh ve ark., 2012a)
Levosetirizin				4,11		-	-	-	0,25-2,5 µg mL ⁻¹	0,23 ng mL ⁻¹	0,58 ng mL ⁻¹	-	99,54	
Ambroksol				3,44		-	-	-	3,75-37,5 µg mL ⁻¹	0,16 ng mL ⁻¹	0,47 ng mL ⁻¹	-	99,25	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Atlantis C-18 Analitik Kolon (4.6×150 mm; 5µm)	Asetonitril:Amonyum Asetat (65:35 h/h) pH 4.2'ye Ortofosforik asit ile ayarlanmış.	6,28	UV	-	-	10284	50-150 µg mL ⁻¹	0,10 µg mL ⁻¹	0,33 µg mL ⁻¹	0,52	99,84	(Raja & Rao, 2012)
Levosetirizin				3,03		-	-	7451	25-75 µg mL ⁻¹	0,05 µg mL ⁻¹	0,17 µg mL ⁻¹	1,26	98,38	
Montelukast	Yüzey Metodolojisi Yanıtı Kullanarak Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Phenomenex® C18 Analitik Kolon (150mm×4.6mm, 5µm); Phenomenex® C18 Guard Cadridge (4mm×3mm, 5µm) ile Bağlantılı	MeCN, MeOH, 20.00 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7.0) Çözelti (32,7:30:37,3 h/h/h)	-	UV	-	-	-	-	-	9,45 ng mL ⁻¹	-	-	(Suresh ve ark., 2012b)
Levosetirizin				-		-	-	-	-	-	8,7 ng mL ⁻¹	-	-	
Ambroksol				-		-	-	-	-	-	6,45 ng mL ⁻¹	-	-	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Phenomex-Luna 5µ C8(100Å, 250 x 4.6 mm)	Asetonitril: %0,5 Trietilamin Suda (90:10 h/h), pH 5,5'e Ortofosforik Asit ile Ayarlanmış	5,2	UV	-	-	-	3-30 µg mL ⁻¹	0,0032 µg mL ⁻¹	0,0094 µg mL ⁻¹	1,145	101,30	(Babu ve ark., 2012)
Levosetirizin				3,8		-	-	-	2-32 µg mL ⁻¹	0,00028 µg mL ⁻¹	0,00086 µg mL ⁻¹	1,764	100,63	

Çizelge 1.2. Devam. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar.

Madde Adı	Yöntem	Sabit Faz	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Kromatografik Uygunluk Parametreleri			Validasyon Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk (%)	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Phenomenex C-18 Kolon (250 mm × 4.8 mm, 5 µm)	Metanol: Su: Asetik Asit (90:10:0.05 h/h/h)	7,61	UV	11,5	-	4153	40-140 µg mL ⁻¹	0,69 µg mL ⁻¹	2,09 µg mL ⁻¹	<2	98,54	(Chhatrala & Patel, 2012)
Desloratadine				2,23		-	-	3902	20-70 µg mL ⁻¹	0,87 µg mL ⁻¹	2,54 µg mL ⁻¹	<2	101,4	
Levosetirizin	Birinci-Türev Spektro fotometri	-	-	-	-	-	-	-	3-30 µg mL ⁻¹	0,3177621 µg mL ⁻¹	2,4459207 µg mL ⁻¹	0,099	98,752	
				-		-	-	-	2-32 µg mL ⁻¹	0,2979182 µg mL ⁻¹	1,8263959 µg mL ⁻¹	0,885	99,79	
Montelukast	Türev ve Spektrum Oranı Türev Kullanarak Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi ile Spektrofotometri	-	-	-	-	-	-	-	2,4 –20,0 µg mL ⁻¹	-	2,4 µg mL ⁻¹	0,35	100,13	(Palabiyik ve ark., 2012)
Desloratadine				-		-	-	-	2,0 –12,0 µg mL ⁻¹	-	2,0 µg mL ⁻¹	1,01	100,89	
Levosetirizin				-		-	-	-	3,2 –12,8 µg mL ⁻¹	-	3,2 µg mL ⁻¹	0,06	100,42	
Montelukast	Spektrum Oranı Türev Spektrofotometri	-	-	-	-	-	-	-	5-40 µg mL ⁻¹	0,17 µg mL ⁻¹	0,52 µg mL ⁻¹	0,41-0,59	100,5	(Bankar & Patel, 2013a)
Desloratadin				-		-	-	-	5-40 µg mL ⁻¹	0,72 µg mL ⁻¹	1,2 µg mL ⁻¹	0,12-0,81	99,58	
Montelukast	Q-Absorbans Oran Spektrofotometri	-	-	-	-	-	-	-	5-40 µg mL ⁻¹	0,07 µg mL ⁻¹	0,20 µg mL ⁻¹	0,12-0,17	99,33	(Bankar & Patel, 2013b)
Desloratadin				-		-	-	-	5-40 µg mL ⁻¹	0,13 µg mL ⁻¹	0,39 µg mL ⁻¹	0,11-0,33	98,85	
Montelukast	Çift Dalga Boyu Spektrofotometri	-	-	-	-	-	-	-	2.5-40 µg mL ⁻¹	0,15 µg mL ⁻¹	-	0,13-0,86	98,97	
Desloratadin				-		-	-	-	2.5-25 µg mL ⁻¹	0,23 µg mL ⁻¹	-	0,25-0,33	99,23	

Çizelge 1.2. Devam. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin'in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar.

Madde Adı	Yöntem	Sabit Faz	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Kromatografik Uygunluk Parametreleri			Validasyon Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk (%)	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	C18 ters faz kolon; (Phenomenox-RP Aqueous) (250mm×4.6mm, 5µm)	15mm Amonyum Asetat:Asetonitril (40:60, h/h)	13,15	PDA		7,480	7288,18	8–40 µg mL ⁻¹	0,005 µg mL ⁻¹	0,015 µg mL ⁻¹	0,340	97,5	(Srividya ve ark., 2013)
Levosetirizin				2,18			0,390	3497,58	4–20 µg mL ⁻¹	0,125 µg mL ⁻¹	0,380 µg mL ⁻¹	0,106	98,10	
Ambroksol				4,42			1,840	6427071	30–150 µg mL ⁻¹	0,03 µg mL ⁻¹	0,09 µg mL ⁻¹	0,031	99,36	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	XTerra C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm)	Fosfat Tamponu (pH 4): Asetonitril (60:40 h/h)	6,218	UV	-	-	3935,2	30-70 µg mL ⁻¹	3,20 µg mL ⁻¹	9,86 µg mL ⁻¹	<1	98,0	(Rao ve ark., 2014)
Levosetirizin				2,432		-	-	2123,4	30-70 µg mL ⁻¹	3,36 µg mL ⁻¹	9,90 µg mL ⁻¹	<1	99,1	
Montelukast	İkinci-Türev Senkron Floresan Spektrofotometri (Florimetrik Yöntem)	-	-	-	-	-	-	-	0,20–2,00 µg mL ⁻¹	0,03 µg mL ⁻¹	0,10 µg mL ⁻¹	0,71	-	(İbrahim ve ark., 2015)
Desloratadin				-		-	-	-	0,10–2,00 µg mL ⁻¹	0,02 µg mL ⁻¹	0,05 µg mL ⁻¹	0,43	-	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	YMC C18 Column (250, 4.6 mm, 5µm)	Ortofosforik Asit (pH-2.1): Metanol (40:60 h/h)	4,724	PDA	7,62	-	12924	10-30 µg mL ⁻¹	0,6593 µg mL ⁻¹	2,1978 µg mL ⁻¹	0,11	99,73	(Mastanam ma ve ark., 2015)
Desloratadin				3,504		-	-	9618	5-15 µg mL ⁻¹	0,429 µg mL ⁻¹	1,429 µg mL ⁻¹	0,24	99,06	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	Hypersil C8, 250 x 4.6 mm, 5 µm	1000 mL Suda 2.8 g Disodyum Hidrojen Ortofosfat, pH 7.00'ye Ortofosforik Asit ile Ayarlanmış: Metanol (250: 750 (h/h))	6,89	UV	-	-	7255	12,42-74,52 µg mL ⁻¹	-	-	0,1	99,4	(Jayasimha ve ark., 2015)
Levosetirizin				4,05		-	-	7455	6,22-37,34 µg mL ⁻¹	-	-	0,1	99,5	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	BDS C8 Kolon (150 × 4.6mm, 5 µm)	Potasyum Hidrojen Ortofosfat Tamponu:Asetonitril (40:60 h/h)	2,04	PDA	-	-	2031	5-30 ppm	0,01 ppm	0,03 ppm	0,4	98,47	(Mamatha & Devanna, 2018)
Desloratadin				3,77		-	-	2831	2,5-15 ppm	0,01 ppm	0,04 ppm	1	100,11	
Asebrofilin				2,68		-	-	2521	100-600 ppm	0,32 ppm	0,98 ppm	0,1	98,71	

Çizelge 1.2. Devam. Montelukast ile Desloratadin ve/veya Levosetirizin’in aynı anda analizinin yapıldığı çalışmalar.

Madde Adı	Yöntem	Sabit Faz	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Kromatografik Uygunluk Parametreleri			Validasyon Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk (%)	
Montelukast	Ters Faz Sıvı Kromatografisi	C18 (4.6 mm X 250 mm, 5 µm), Agilent Column	(Amonyum Asetat Tamponu: Asetonitril) pH 3,5	7,409	PDA	-	-	-	10 – 50 µg mL ⁻¹	6,01 µg mL ⁻¹	17,62 µg mL ⁻¹	0,087	-	(Kumar ve ark., 2018)
Levosetirizin				8,558		-	-	-	10 – 50 µg mL ⁻¹	7,2 µg mL ⁻¹	22,7 µg mL ⁻¹	0,071	-	
Doksofilin				4,425		-	-	-	10 – 50 µg mL ⁻¹	3 µg mL ⁻¹	11,9 µg mL ⁻¹	0,055	-	
Montelukast	Birinci Derece Türev Spektrofotometri	-	-	-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	0,63 µg mL ⁻¹	1,93 µg mL ⁻¹	0,54	-	
Levosetirizin				-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	0,87 µg mL ⁻¹	2,64 µg mL ⁻¹	0,52	-	
Doksofilin				-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	0,36 µg mL ⁻¹	1,11 µg mL ⁻¹	0,52	-	
Montelukast	Vierordt’s Metot Spektrofotometri	-	-	-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	1,12 µg mL ⁻¹	3,39 µg mL ⁻¹	0,54	-	
Levosetirizin				-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	0,97 µg mL ⁻¹	2,94 µg mL ⁻¹	0,51	-	
Doksofilin				-		-	-	-	4-24 µg mL ⁻¹	1,18 µg mL ⁻¹	3,59 µg mL ⁻¹	0,57	-	
Montelukast	Sıvı Kromatografi	Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 50 cm, 5 µm)	Asetonitril ve 10 mM Amonyum Format, pH 8’e 50 µL Amonyum Hidroksit ile Ayarlanmış (73:27, h/h)	2,327	MS-MS	-	-	-	1–500 ng mL ⁻¹	-	1 ng mL ⁻¹	1,83	98,22	(Rashed & Nasr, 2019)
Levosetirizin				0,908		-	-	-	1–500 ng mL ⁻¹	-	1 ng mL ⁻¹	1,92	98,84	
Montelukast	Sıvı Kromatografi	Kinetex® C 18 (150 mm x 4.6 mm, 5µm)	Metanol:10 mM Amonyum asetat (85:15, h/h) pH 4.0	1,35	UV	-	-	3986	0,5-100 µg mL ⁻¹	0,05 µg mL ⁻¹	0,16 µg mL ⁻¹	0,26	100,66	(Erkmen ve ark., 2019)
Levosetirizin				3,09		16,07	6,77	8992	0,5-100 µg mL ⁻¹	0,16 µg mL ⁻¹	0,47 µg mL ⁻¹	0,33	100,58	
Montelukast	İnce Tabaka Kromatografisi	-	Etil Asetat: Metanol: Trietilamin (5:5:0.04, % h/h)	-	-	-	-	-	200–1000 ng spot ⁻¹	21.46 ng	65.03 ng	1,61	99.95–100.31	(Desai ve Ark. 2020)
Levosetirizin				-		-	-	-	100–500 ng spot ⁻¹	9.15 ng	27.74 ng	1,51	99.31–100.13	

Bu tez çalışmaları içerisinde, montelukast, desloratadin; montelukast, levosetirizin içeren farmasötik preparatların tek bir kromatografik sistemde analizi için güvenilir, hassas, hızlı ve kolay bir sıvı kromatografisi (SK) yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin de validasyonu amaçlanmıştır. Aynı zamanda valide edilen bu yöntemin montelukast, desloratadin ve levosetirizin safsızlık analizlerine uygulanması planlanmıştır. Böylece sıvı kromatografisi (SK), ultra performans sıvı kromatografisi (UPSK), foto diyot dizisi (FDD) dedektörü, kütle spektrometresi ile analiz yöntemi geliştirilecek ve geliştirilen yöntem ile montelukast, desloratadin, levosetirizin etken maddelerini içeren, alerjik rinit (astım ile ya da tek başına) tedavisinde kullanılan ilaçların hızlı bir şekilde analizlerinin yapılabilmesi mümkün olabilecektir.

Bu çalışmalar ile montelukast, desloratadin, levosetirizin etken maddelerini içeren, alerjik rinit (astım ile ya da tek başına) tedavisinde kullanılan ilaçlar için uygulaması çabuk, kolay miktar tayini ve safsızlık analizleri için yöntem geliştirilecek, geliştirilen yöntemin geçerli olduğunu göstermek amacı ile validasyonu uygulanacak, analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Yöntemlerin doğruluk, kesinlik, doğrusallık ve aralık, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, piyasada bulunan ürün analizlerine uygulanabilmesi gibi kriterleri ölçülmüştür.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Çalışması Analizlerinde Kullanılan Cihazlar ve Maddeler

2.1.1. Hammaddeler ve Safsızlıklar

- Montelukast sodyum Unimark Remedies Ltd.
- Desloratadin Glenmark Pharmaceuticals Ltd.
- Levosetirizin Dihidroklörür Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd.
- Parasetamol Covidien Mallinckrodt
- N-formil Desloratadin (IMP1) Glenmark Pharmaceuticals Ltd.
- Montelukast Sülfoksit (IMP2) Toronto Research Chemicals
- Montelukast Cis-izomer (IMP3) Toronto Research Chemicals

2.1.2. Piyasa Preparatları

Çizelge 2.1. Analizlerde kullanılan piyasa preparatlarının listesi.

Etken Madde	Ruhsat Sahibi	Piyasa Preparatı	Dozaj Formu	İçeriği
Montelukast + Desloratadin	NOBEL İLAÇ SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.	LORCLAST®	Film Kaplı Tablet	10/5 mg Montelukast/Desloratadin
Montelukast + Levosetirizin	NUVOMED İLAÇ SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.	LEVOMONT®	Film Kaplı Tablet	10/5 mg Montelukast/Levosetirizin Dihidroklörür

2.1.3. Cihazlar ve Araçlar

- YPSK sistemi: Waters (ABD)
- UPSK sistemi: Waters (ABD)
- Fotodiyot dizi dedektörü (FDD): Waters (ABD)
- Kütle spektrometresi: Waters (ABD)
- Fotostabilite cihazı: Vötsch VP 500L (Almanya)
- Manyetik karıştırıcı: Heidolph (Almanya)
- Su banyosu: Polyscience (ABD)
- Terazî (Hassas): Mettler Toledo (ABD)
- Saf su cihazı: Sartorius Aarium 611 (Almanya)
- pH metre: WTW pH 7310 (Almanya)
- Ultrasonik su banyosu: Bransonîc (ABD)
- Çeşitli sarf malzemeler
- Filtre (0,45µm PTFE): Sartorius (Almanya)

2.1.4. Analiz Kolonları

Acquity UPLC BEH –C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.7µm), WATERS®, ABD

Acquity UPLC BEH –Phenyl (100 mm × 2.1 mm, 1.7µm) WATERS®, ABD

Zorbax SB-Phenyl (50 mm × 4.6 mm, 1.8µm), Agilent, ABD

Inertsil Ph-3, (100 mm × 4.6 mm, 3µm), GL Sciences Inc., Japonya

Kinetex C18, (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm), Phenomenex, ABD

2.1.5. Kimyasal Maddeler

• Amonyum asetat	MERCK MILLIPORE
• Trifloroasetik asit	SIGMA-ALDRICH
• Asetonitril	ISO-LAB
• Metanol	MERCK MILLIPORE

2.1.6. Çalışma Çözeltileri

Tez kapsamında kullanılan çözeltiler YPSK-FDD, UPSK-FDD, SK-KS için aynı şekilde hazırlandı.

2.1.6.1. Stok ve Çalışma Standardı Çözeltileri

IS (İç Standart: Parasetamol), MON(Montelukast), DES(Desloratadin), LEV(Levosetirizin), IMP1(N-formil desloratadin), IMP2(Montelukast sülfoksit safsızlığı), IMP3(Montelukast cis-izomer safsızlığı) maddeleri hassas bir şekilde tartıldıktan sonra, seyreltme çözeltisi olan 5 mM Amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3.2 ye ayarlandı): Metanol: Asetonitril (25:25:50, h/h) ile çözülerek stok standart çözeltileri oluşturuldu. Sonrasında tüm seyreltmeler yine seyreltme çözeltisi ile yapıldı. Standart çözeltideki maddelerin mg mL⁻¹ olarak konsantrasyonu IS, MON, DES, LEV, IMP1, IMP2, IMP3 için sırası ile 0,6; 2; 1; 1; 0,05; 0,05; 0,05 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra seyreltilen bu çözeltiler, sisteme enjeksiyon (10 µL) yapıldı. Hazırlanan bütün çözeltiler 0,45 µm PTFE(Politetrafloroetilen) filtreden süzülerek analiz sistemine verildi.

2.1.6.2. Piyasa Preparatlarından Numune Çözeltilerinin Hazırlanışı

Lorclast®; Montelukast 10 mg+Desloratadin 5 mg Film Kaplı Tablet:

10 mg Montelukast ve 5 mg Desloratadin içeren ilaç ürünü çözeltisi hazırlığında; 3 adet Lorclast® ilaç ürününden hassas tartım alınarak havanda ezildi ve homojen tablet tozu elde edildi. Bu tablet tozundan 10 mg Montelukast'a eş değer miktarda (≈ 312 mg) 100 mL hacimde balon joje içine tartılarak alındı. Bu balon jojeye 50 mL seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve karıştırıldı. Bu çözeltinin bir kısmı süzüldü (0,45 μ m PTFE filtre ile) ve analiz sistemine verildi.

Levmont®; Montelukast 10 mg+ Levosetirizin Dihidroklörür 5 mg Film Kaplı Tablet:

10 mg Montelukast ve 5 mg Levosetirizin Dihidroklörür içeren ilaç ürünü çözeltisi hazırlığında; 3 adet Levmont® ilaç ürününden hassas tartım alınarak havanda ezildi ve homojen tablet tozu elde edildi. Bu tablet tozundan 10 mg Montelukast'a eş değer miktarda (≈ 282 mg) 100 mL hacimde balon joje içine tartılarak alındı. Bu balon jojeye 50 mL seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve karıştırıldı. Bu çözeltinin bir kısmı süzüldü (0,45 μ m PTFE filtre ile) ve analiz sistemine verildi.

2.1.6.3. Doğruluk Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

İlaç bitmiş ürününde etken maddelerin yanında bulunan yardımcı maddelerin etken maddelerin analizi uygulanırken analizi etkileyip etkilemediğini kontrol etmek için ilaç bitmiş ürünleri ile geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaç ile bitmiş ürüne ait bilinen içerikte stok çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye her birinden saf etken madde ve etken maddelere ait safsızlık ilavesi yapıldı. Elde edilen sonuçlardan

bitmiş ürüne ilave edilen etken madde ve safsızlık miktarlarının hangi oranda bulunduğu tespit edildi.

Lorclast® Film Tablet; Montelukast 10 mg+Desloratadin 5 mg

Montelukast ve Desloratadin (10 ve 5 mg) içeren tablet çözeltisi hazırlığında, 3 adet Lorclast® ilaç ürününden hassas tartım alınarak havanda ezildi ve homojen tablet tozu elde edildi. Bu tablet tozundan 10 mg Montelukast'a eş değer miktarda (≈ 312 mg) 100 mL hacimde balon joje içine tartılarak alındı. Bu balon jojeye 50 mL seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Üzerine gerekli hacimlerde IS, MON, DES, IMP1, IMP2, IMP3 standart çözeltilerinden eklendi. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltinin son bilinen konantrasyonu $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak sırası ile IS, MON, DES, IMP1, IMP2, IMP3; 30, 200, 100, 2, 2, 2 olacak şekilde standart eklendi. Bu çözeltinin bir kısmı 0,45 μm PTFE filtreden süzülerek analiz sistemine verildi

Levmont® Film Tablet; Montelukast 10 mg+ Levosetirizin Dihidroklörür 5 mg

Montelukast ve Levosetirizin Dihidroklörür (10 ve 5 mg) içeren tablet çözeltisi hazırlığında, 3 adet Levmont® ilaç ürününden hassas tartım alınarak havanda ezildi ve homojen tablet tozu elde edildi. Bu tablet tozundan 10 mg Montelukast'a eş değer miktarda (≈ 282 mg) 100 mL hacimde balon joje içine tartılarak alındı. Bu balon jojeye 50 mL seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Üzerine gerekli hacimlerde IS, MON, LEV, IMP2, IMP3 standart çözeltilerinden eklendi. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Çözeltinin son bilinen konantrasyonu $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak sırası ile IS, MON, LEV, IMP2, IMP3; 30, 200, 100, 2, 2 olacak şekilde standart eklenmiştir. Bu çözeltinin bir kısmı süzüldü (0,45 μm PTFE filtre ile) ve analiz sistemine verildi.

2.1.6.4. YPSK Sisteminde Kullanılan Çözelti İçerikleri

Analizler için tampon çözelti olarak farklı derişimlerde (3mM-10mM) amonyum asetat çözeltileri ile %0,15 trifloro asetik asit içeren asetonitril hazırlandı. %0,15 trifloro asetik asit içeren asetonitril ve tampon çözelti, farklı oranlarda (60:40; h/h, 40:60; h/h) ve akış programı ile sisteme verildi.

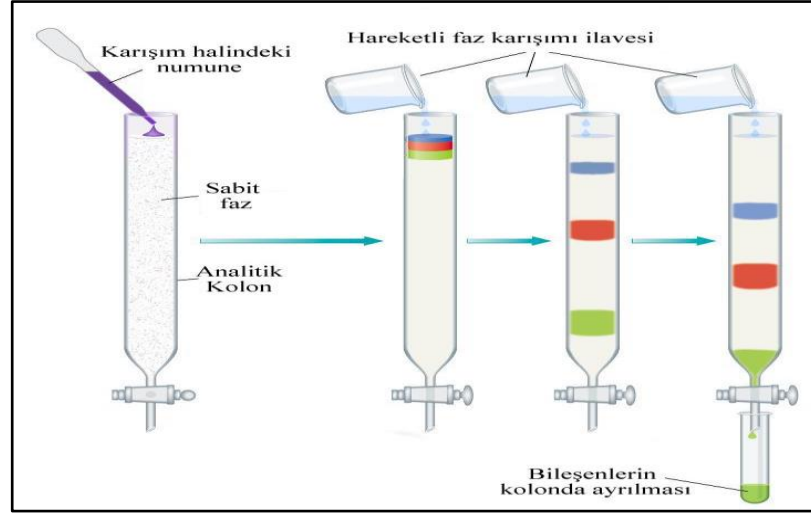
Optimize edilen yöntemde 5mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH'sı 3.2 ye ayarlandı) ile %0,15 trifloro asetik asit içeren asetonitril hareketli faz olarak akış programı ile sisteme verildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler; karışımlardaki bileşenlerin (iki ya da daha fazla), hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımı ile, sabit (durgun) bir faz arasından farklı hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Başka hiçbir ayırma yöntemi, tüm bilim dallarına uygulama bulan kromatografide olduğu kadar güçlü ve genel olarak uygulanabilir değildir.

Kromatografi, 1906'da Rus botanikçi Mikhail Tsvet tarafından bulunup ve isimlendirilmiştir. Bu tekniği, bileşiklerin çözeltilerini ince bölünmüş kalsiyum karbonat içeren bir cam kolon paketinden geçirerek çeşitli bitki pigmentlerini ayırmak için kullanmıştır. Ayrılan türler kolonda renkli bantlar oluşturarak belirlendiği için, yunancadan gelen renk anlamındaki 'chromatos' ve yazma anlamındaki 'graphos' kelimelerinden oluşmaktadır. (Nemlioğlu, 2019; Shammout, 2013; Sharma, 2007; Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.1. Kromatografik ayrılma şeması (Nemlioğlu, 2019).

Bir kromatografik sistemde numune, bir kolonun girişine veya sabit fazın başka bir taşıyıcısına küçük bir hacimde verilir. Mobil faz, numune bileşenlerini kolon boyunca sabit faz ile uyumlu olarak taşır. Numune bileşenleri ve sabit faz arasındaki farklı etkileşimler nedeniyle, numune bileşenleri sisteme farklı hızlarda göç etmiş ve farklı alıkonma süreleri ile kolondan ayrıştırılmıştır. Alıkonma süresi, numune girişi ile kolondan ayrılma arasındaki süre olarak tanımlanır. Kolonun sonunda, ayrılan bileşenler dedektörden geçerler ve dedektör sinyali görülür. Birden fazla bileşene sahip bir numunede bazı bileşikler, numunenin karmaşıklığına ve kolonun kapasitesine bağlı olarak kısmen veya tamamen birleşirler. Kromatografik ayrılma şeması Şekil 2.1 de görülmektedir (Lundanes ve ark., 2013).

2.2.2. Kromatografik Yöntem Türleri

Kromatografik yöntemlerin sayısı sürekli olarak yeni katılımlarla artabilmektedir. Bu sebeple kromatografik yöntemleri sınıflandırmak için birden fazla yöntem bulunmaktadır. Sınıflandırmada genel olarak numunenin ortama verilmiş şekli, ayrılma mekanizması, fazların polarlığı ve fiziksel durumu gibi kriterler esas alınmaktadır. Bütün kromatografik yöntemler hareketli faz ve sabit faz kullanılarak yürütülmektedir. Buna bağlı olarak başlıca sınıflandırma mobil fazın fiziksel şekline dayanmaktadır. Kromatografik fazların türüne göre kromatografik yöntemler Gaz,

Sıvı, Süperkritik Akışkan Kromatografi olarak sınıflandırılmaktadır (Demirci ve Özçimder, 2009; Robards ve ark., 2012; Scott, 1995; Sharma, 2007).

2.2.3. Sıvı Kromatografi (SK)

Kromatografi türlerinden biri olan sıvı kromatografi (SK), çözelti halindeki karışımı bileşenlerine ayırmak için kullanılan analitik bir tekniktir. Sıvı kromatografi, hareketli fazın sıvı olduğu kromatografik prosedürleri tarif etmek için kullanılan genel bir isimdir. Ayrılma, optimum koşullar altında bir karışımdaki her bir bileşenin karışımdaki diğer bileşenlere göre farklı olarak iki fazla etkileşime girmesi nedeniyle oluşur.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), sıvı hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan mekanik olarak pompalandığı sıvı kromatografisini tarif etmek için kullanılan terimdir. Bir YPSK cihazı; enjektör, pompa, kolon ve dedektörden oluşur. (Robards ve ark., 2012; Shammout, 2013).

Ters ve Normal Faz Sistemleri

Sabit fazın polar olduğu, polar olmayan bir mobil faz içeren sıvı kromatografi sistemleri, normal faz sistemleri olarak adlandırılır. Tersine, mobil fazın daha polar olduğu sistem ters faz olarak tanımlanır. Polar moleküller sabit faz için daha düşük bir afiniteye sahiptir, daha hızlı elute edilir. Bu terimlerin seçimi tamamen tarihseldir ve 'normal' teriminin kullanımının (belirtilenlerin ötesinde) özel bir önemi yoktur. Ters fazlı sistemler sıvı kromatografisinde normal fazdan çok daha yaygındır. (Robards ve ark., 2012)

Normal Faz kromatografide mobil faz olarak hekzan, kloroform gibi apolar çözücüler ile sabit faz olarak genellikle silika ve alümina kullanılmaktadır. Normal faz kromatografi kullanımının seçilmesi, genellikle belirli mobil fazlardaki örnek çözünürlüğü ile ilgilidir. Normal fazda esas olarak polar olmayan çözücüler

kullandığından, polar veya sulu çözücülerde çözünmeyen yüksek hidrofobik bileşikler için tercih edilen yöntemdir.

Ters faz sıvı kromatografi, çok tercih edilen kromatografi çeşididir. Düşük molekül ağırlıklı numunelerin tüm analizlerinin neredeyse % 90'ı ters faz sıvı kromatografi kullanılarak gerçekleştirilir. İlaçların yapısı çoğunlukla apolardır. İlaç analizlerinde yaygın olarak ters faz sıvı kromatografisi uygulanmaktadır. Bu kromatografi türü genellikle apolar madde analizlerinde kullanılmaktadır. Apolar maddeleri ayırırken uzun alkil zincirli sabit fazlar (C18) kullanılmakta olup, polar maddelerin ayrılmasında kısa alkil zincirli sabit fazlar (C8, C2) kullanılmaktadır. (Nemlioğlu, 2019; Robards ve ark., 2012; Shammout, 2013)

Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi (HILIC)

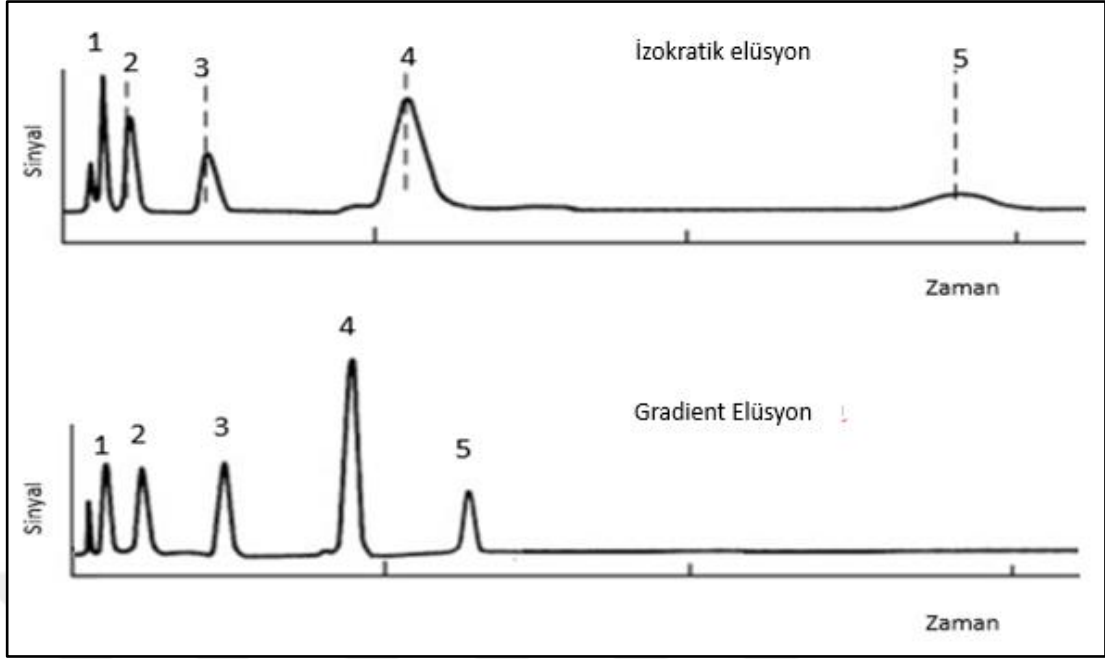
1990 yılında Alpert HILIC terimini polar bileşiklerin orta derecede polar bir sabit faz ile hidrofobik hareketli fazın kullanıldığı ayırım tekniği olarak tanımlamıştır. Bu teknik, polar maddelerin analizi için yeni ve alternatif tekniktir. Genellikle normal faz kromatografi sabit fazları ile ters faz kromatografi hareketli fazlarının hibritleşmesinden oluştuğu söylenebilir. Bu yüzden, HILIC tekniğinin uygulanışında oldukça hidrofilik sabit fazlar kullanılır. Birçok durumda hareketli fazlar (sıklıkla asetonitrilin bazende metanol, etanol veya izopropanolün kullanıldığı) polar organik çözücülerdir. HILIC tekniği günümüzde biyolojik numunelerin analizinde, insan ve bitki metabolitlerinin tayininde (metabolomik çalışmalar), ilaç ve protein analizlerinde uygulanabilmektedir. HILIC ayırımında polar maddelerin analiz sonundaki alıkonma sıraları ters fazda gözlemlenenin tam tersidir. Bu durum da bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak analizlerine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar HILIC mekanizmasının polar maddelerin kolonda tutunmasını sağlayıp ve pik asimetresi problemlerini azalttığını göstermiştir. Bu teknikte çoğunlukla düşük viskoziteli organik çözücülerin kullanıldığı hareketli fazlar diğer tekniklere kıyasla cihazda daha düşük basınçlar oluşturmaktadır. Bu sayede elde edilen daha yüksek akış oranları ile analiz süreleri kısaltılırken cihaza verilen zarar da azaltılmış olmaktadır. Ayrıca HILIC çalışmalarında kullanılan kromatografik sistem ile diğer

(ters ve/veya normal faz) tekniklerin kullanıldığı ekipman aynı olduğu için işletme maliyetleri normal faz ve ters faz sistemlerin maliyetiyle benzer olup ek bir cihaza veya cihaz parçasına gerek duyulmamaktadır (Erkmen ve ark., 2021; Nemlioğlu, 2019).

Sıvı Kromatografide İzokratik ve Gradient (Akış Programı) Elüsyon

İzokratik elüsyon, kromatografik analizde çalışma süresi boyunca sabit çözücü bileşimi kullanma tekniğini belirtir. Gradient elüsyonda, polariteleri önemli ölçüde farklı olan iki (ve bazen daha fazla) çözücü sistemi kullanılır. Çözücülerin oranları, programlanarak, sürekli olarak ve bazen bir dizi adım şeklinde ayarlanabilmektedir. Gradient elüsyon genellikle ayırma verimliliğini artırır. Modern yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazları, gradient çalışmaya uygun olarak, değişen oranlarda iki veya daha fazla kaynaktan sıvıları getiren valflerle donatılmıştır (Shammout, 2013; Skoog ve ark., 1998).

Analizi yapılacak numune kolon için geniş ölçüde farklı afiniteye sahip bileşenler içeriyorsa, gradient elüsyon analiz süresini kısaltmak ve piklerin şeklini geliştirmek için yararlıdır. Gradient elüsyonda, mobil fazın eluent kuvvetini arttırmak için mobil fazın bileşim, pH, akış hızının sürekli değişimi gibi değişimler uygulanır. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, ilk birkaç pik, kolonun ölü hacmine çok yakın olarak elüt edilir, bu da hareketli fazın bu bileşikler için çok güçlü olduğunu gösterir. Ayrıca, son pikler çok uzun tutma süreleri ile kısa ve geniştir, bu da hareketli fazın bu bileşikler için çok zayıf olduğunu gösterir. Bu problemlerin çözümü daha zayıf bir solvent ile başlamak ve analiz süresince solvent kuvvetini kademeli olarak arttırmaktır. Gradient ayrılma izokratik ayrılmaya göre daha uygun pik genişlikleri, gelişmiş hassasiyet ve daha kısa analiz süreleri sağlar (Shammout, 2013).

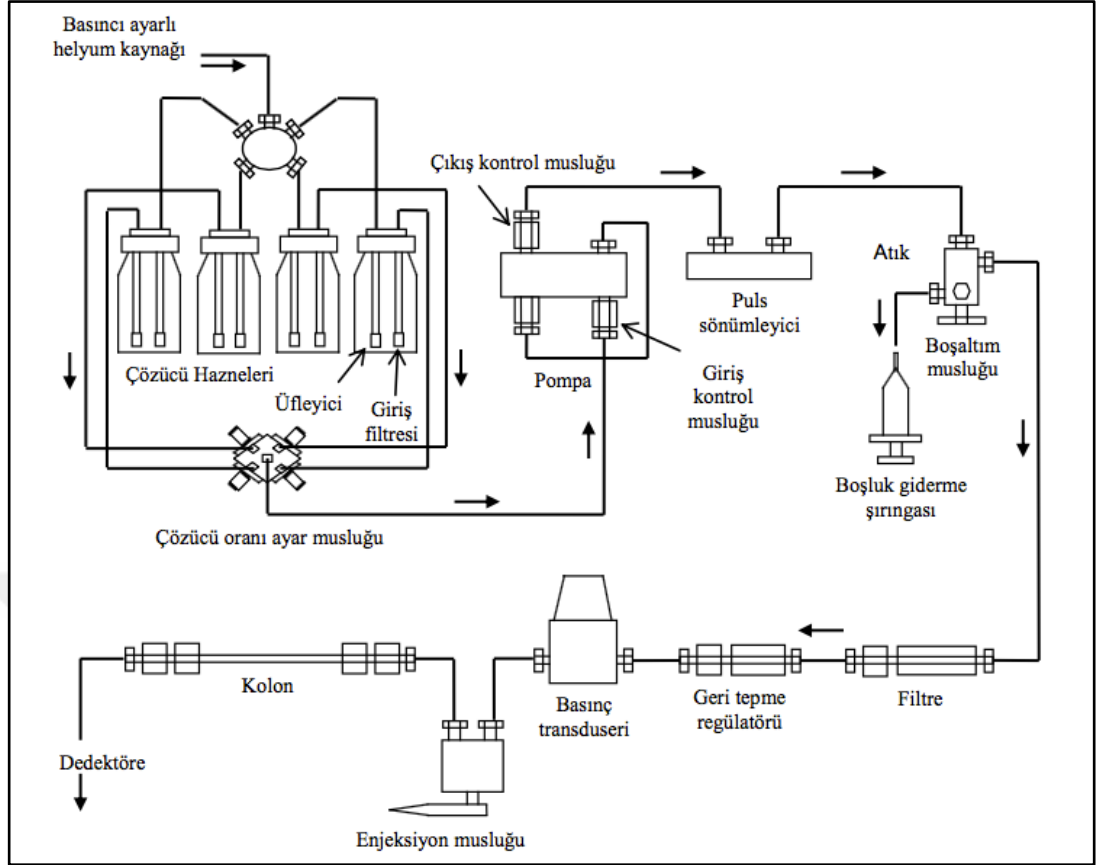


Şekil 2.2. Sıvı kromatografide izokratik ve gradient elüsyon uygulamaları.

Hareketli faz için gradientin bileşenleri ikili, üçlü veya dörtlü olabilir. Başlangıç bileşimi zayıf olmalıdır, yani polaritede sabit fazdan çok farklı olmalıdır. Ters fazlı sıvı kromatografide, katı faz polar değildir veya hidrofobiktir, bu nedenle gradient çalışması sırasında mobil faz, daha az polar bileşenin genellikle asetonitril, metanol veya tetrahidrofur (THF) oranının artırılmasıyla "daha güçlü" yapılır. Normal faz gradient için bunun tam tersi gereklidir; yani, polar çözücünün oranı çalışma sırasında artırılır (Shammout, 2013).

2.2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Modern sıvı kromatografisinde yaygın olan 2 ile 10 μm boyut aralığında dolgu maddeleri ile makul akış hızları elde etmek için birkaç yüz atmosferden oluşan pompalama basınçları gerekir. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak, yüksek performanslı sıvı kromatografisi için ekipman, diğer kromatografi tipleri ile karşılaştırıldığında çok daha ayrıntılı ve pahalı olma eğilimindedir. Yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi için tipik bir diyagram (Şekil 2.3)'de verilmiştir (Shammout, 2013; Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk).

2.2.3.1.1. Sistem Çözeltileri

Modern bir yüksek performans sıvı kromatografi sistemlerinde cam veya paslanmaz çelik hazneler bulunur. Bu hazneler her biri 500 ml veya daha fazla çözücü içerecek şekildedir. Genellikle çözünmüş gazları ve sıvılardaki tozu gidermek için aygıtlar dahil edilmiştir. Gaz kabarcıklarının oluşması bant yayılmasına neden olur. Bunlara ek olarak, hem kabarcıklar hem de toz, dedektör performansının azalmasına sebep olur. Gaz gidericiler, vakumlu bir pompalama sistemi, bir damıtma sistemi, ısıtma ve karıştırma için bir cihaz veya düşük çözünürlükte bir inert gazın ince kabarcıkları ile çözünmüş gazların çözeltilerden süpürüldüğü bir sistemden oluşabilir. Çözücü içerisinde bulunması muhtemel toz ve partiküller pompa ya da enjeksiyon sistemine zarar verebilir. Bu durumdan korunmak veya kolonun

tıkanmaması için sistemlerde, bu maddeleri süzen bir düzenek bulunmaktadır (Nemlioğlu, 2019; Shammout, 2013; Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.1.2. Pompa Sistemleri

Sıvı kromatografisi pompa sistemleri hareketli fazı kontrollü bir akış hızında vermek zorundadır. Örneğin basınçlı çözücünün bir darbe azaltıcı cihazdan geçirilmesi gibi bir işlem ile basınç dalgalanmaları en aza indirilmelidir. Borular ve bağlantılar pompa sisteminin oluşturduğu basınçlara dayanabilmelidir. Bu pompalar hapsolmuş hava kabarcıklarını uzaklaştırabilecek bir sisteme sahip olabilir.

Sıvı kromatografi pompaları tarafından üretilen yüksek basınçların patlama tehlikesi oluşturmadığı, çünkü sıvının çok sıkıştırılmadığı bilinmektedir. Bu nedenle, bir bileşenin yırtılması, yalnızca çözücü sızıntısına neden olur. Ancak, böyle bir sızıntı yangın tehlikesi oluşturabilir. Yıllar boyunca çok çeşitli pompa tasarımları geliştirilmiş olmasına rağmen, 1980'lerden bu yana neredeyse tüm sıvı kromatografi pompaları pistonlu pompanın bir varyasyonuna dayanmaktadır (Shammout, 2013).

2.2.3.1.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Numune enjeksiyonunun basıncını düşürmeden sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Sisteme tanıtmak için genellikle örnek hacmi 1µL ile 100µL enjekte edilebilir. Enjeksiyon hacmi 2 mL hacme kadar enjektör çevrimi ile artırılabilir. Kromatografik sistemlerde otomatik enjektörler ve manuel enjektörler olarak iki ana enjektör tipi vardır. Otomatik enjektörler daha rahattır, kullanıcı dostudur ve manuel enjektörlere göre doğru ve hassastır (Nemlioğlu, 2019; Pratima, 2018; Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.1.4. Sabit Fazlar

Analit karışımlarının modern YPSK’da ayrılması, ‘kolon’ adı verilen cihazda gerçekleştirilir. Kolon kromatografik sistemin kalbidir. Mevcut YPSK kolonları çoğu durumda çok küçük sert gözenekli malzeme parçacıkları ile dolu paslanmaz çelik borudur. Çoğu kolon 10-30 cm uzunluğunda ve 4 ila 10 mm iç çaplara sahiptir. 5-10 µm arasında tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddelerinin kullanıldığı kolonlar sık kullanılmaktadır. Bu tür kolonlar genellikle 40000 - 60000 plaka / metre sağlar. Bu kolonların yanı sıra daha yüksek performansa sahip kolonlar (1-4,6 mm iç çap; 3-7,5cm uzunluk) vardır. tanecik büyüklüğü 1,7-5 µm olan partiküllerle dolu bu kolonlar, 100000 plaka /m içerirler, hız ve solvent tüketimi tasarruf sağlarlar.

Ters fazlı YPSK’da tutma tipik olarak analit, mobil faz ve bağlı sabit faz (örneğin, C18) ile ligandın bağlandığı silika yüzeyinin yapısı ve erişilebilirliği arasındaki bir dengeye dayanır. Sıvı kromatografi için en yaygın dolgu maddeleri silika parçacıklarından hazırlanır. Bu parçacıklar sıklıkla yüzeye kimyasal veya fiziksel olarak bağlanmış ince organik film ile kaplanmıştır. Diğer dolgu malzemeleri arasında alümina partikülleri, gözenekli polimer partikülleri ve iyon değişim reçineleri bulunur. Silika jel ve ODS (oktadesilsilil) silika jel, sırasıyla normal ve ters faz kromatografi uygulaması için en sık kullanılan dolgu malzemelerinden ikisidir. Ancak ters faz sıvı kromatografisinde fenil tipi işlevselliği içeren sabit fazların ticari kullanılabilirliği ve popülerliğinin arttığı bilinmektedir. 2003 yılında yapılan bir çalışmada, bütün ters faz sıvı kromatografi analizlerinin %39’unda C18 faz kullanıldığı, %12’sinde fenil faz kullanıldığı bulunmuştur. Yaygın kullanılan kromatografik fazların bileşimi Çizelge 2.2 de; başlıca sabit faz sınıflandırması ve uygulamaları Çizelge 2.3’de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Bazı yaygın kromatografik fazların bileşimi (Swadesh, 1996).

Malzeme	Homojen(H) ya da Bağlı (B)	Kromatografi Türü
Silica	H	Normal Faz, Jel Permetasyon
Alumina	H	Normal Faz
Grafit	H	Ters Faz
Poly (Sitren-divinil Benzen)	H	Ters Faz, Jel Permetasyon
Alkil Silan	B	Ters Faz
Fenil	B	Ters Faz
Siyano	B	Ters Faz
Amino	B	Normal Faz, İyon Değişimi
Alkilat Amino	B	İyon Değişimi
Sülfonat	B	İyon Değişimi
Alkil Sülfonat	B	İyon Değişimi
Diol	B	Normal Faz
Poly (Metilmetakrilat)	H	Jel Permetasyon

Çizelge 2.3. Başlıca sabit faz sınıflandırması ve uygulamaları (Taylor, 2015).

Faz	Ligand	Uygulama
C18 (Alkil)	-C ₁₈ H ₃₇	Farmasötikler, steroidler, yağ asitleri, flatlar, çevre kirleticiler için en kalıcı alkil fazı
C18 Polar Gömülü	-C ₁₆ H ₃₃ NO	Liganddaki karbamat veya benzeri aralayıcı, polar analitlerin tutulmasını teşvik eder ve fonksiyonel grup farklılıklarına dayanarak ayrılmaya yardımcı olur
Siyano (Siyanopropil)	-(CH ₂) ₃ CN	Kutupsal analitler için benzersiz seçicilik ve geniş ölçüde farklı kimya ile çözünen
Fenil (Difenil)	-C ₆ H ₅ (-C ₁₂ H ₉)	Aromatik ve orta polar bileşikler
Pentaflorofenil (PFP)	-C ₆ F ₅	Halojenli, polar ve izomerik analitler için gelişmiş seçicilik
Amino (Aminopropil)	-(CH ₂) ₃ NH ₂	Elektrostatik tutmayı arttırmak için pH kontrolü ile kullanılabilen zayıf anyon değiştirici

Fenil bağlı fazlar başarılı bir şekilde konumsal izomerler, tokoferoller, flavonoidler, taksoller, polinükleer aromatikler ve nitroaromatik bileşikler, aktif farmasötik bileşen ve ilgili bileşikler ayrılmasında kullanılırlar.

Amerikan Farmakopesi (USP) ticari olarak temin edilebilir fenil fonksiyonelliğine sahip ters faz malzemeleri L11 olarak (tanım -gözenekli silika parçacıklarına kimyasal olarak bağlanmış fenil grupları) sınıflandırır (Euerby ve ark., 2007; Kazakevich ve LoBrutto, 2007; Nemlioğlu, 2019; Pratima, 2018; Shammout, 2013; Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.1.5. Dedektör Türleri

Bir YPSK sisteminde dedektör, fiziksel veya kimyasal özelliklerin konsantrasyon veya tanınmasına karşılık gelen ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesinden sorumlu olan bileşendir.

YPSK için dedektörler, kromatografik işlemdeki çözünen veya hareketli fazın herhangi birinin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinden yararlanarak aşağıdaki 4 yoldan biri ile tasarlanmaktadır:

- Yığın özellik veya fark ölçümü
- Analit özelliği
- Hareketli faz modifikasyon
- Birleşmiş teknikler

Yığın özellik dedektörleri, numune olan veya olmayan hareketli fazdaki farklılıkları ölçerek tüm analitlerde ortak olan özellikleri ölçtüğü için YPSK için en evrensel detektörlerdir. En yaygın yığın özellik detektörlerinden biri kırılma indeksi detektörüdür.

Analit özelliği dedektörleri, analite özgü bir özelliğe yanıt verir. Belirli bir dalga boyunda UV ışığını absorblayan analitlere yanıt veren UV detektörü, analit özelliği detektörünün en yaygın örneğidir. Diğer yaygın kullanılan analit özelliği detektörleri arasında floresans, dizi diyot, kütle spektrometreleri, elektrokimyasal ve radyoaktivite dedektörleri bulunur.

Mobil faz modifikasyon dedektörleri, analitin özelliklerinde bir değişiklik meydana getirmek için kolon sonrası hareketli fazı, gaz fazında asılı partiküller oluşturmak gibi değişikliğe uğratırlar. Evaporatif ışık saçılımı ve korona deşarj dedektörleri bu kategoriye girer.

Birleştirilmiş teknikler ayrı bağımsız analitik teknolojinin bir YPSK sistemine bağlanmasını ifade eder. En yaygın kullanımı kütle spektrometresi (SK-KS) ve kızılötesi spektrometresi ve nükleer manyetik rezonans gibi teknolojilerdir. Kütle spektrometresi rutin bir YPSK detektörü olarak giderek daha fazla kullanım görmektedir (Swartz, 2010).

Dedektör seçilirken dikkate alınması gereken birçok özellik vardır ve Çizelge 2.4’de bunlardan bazılarını listelenmiştir. Hiçbir dedektör bu özelliklerin hepsine sahip olmadığından, zamanla birçok dedektör tasarlanmış ve üretilmiştir.

Çizelge 2.4. Dedektör özellikleri (Swartz, 2010)

• Yüksek hassasiyet, tekrarlanabilir, öngörülebilir cevap
• Tüm çözünenlere cevap veren ya da tahmin edilebilir bir özgüllüğü olan
• Geniş doğrusal dinamik aralık; çözünen miktarı ile doğrusal olarak artan tepki
• Sıcaklık ve hareketli faz akışındaki değişikliklerden etkilenmeyen tepki
• Mobil fazdan bağımsız olarak cevap verme
• Ekstra kolon bant genişlemesine sebep olmayan
• Güvenilir ve kullanımı rahat
• Çözünen tahribatsız
• Tespit edilen pik hakkında niteliksel ve niceliksel bilgi sağlama
• Hızlı cevap verme

UV-görünür absorbands dedektörü, günümüzde kullanılan en yaygın YPSK detektörüdür, çünkü birçok bileşik UV (veya görünür) bölgesinde (190-600 nm'den) absorblar. Absorbans olarak elde edilen numune konsantrasyonu, dedektör hücresinden iletilen ışığın oranı ile Beer Yasası’na göre belirlenir:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon bc$$

A: Absorbans

I_0 =gelen ışının şiddeti

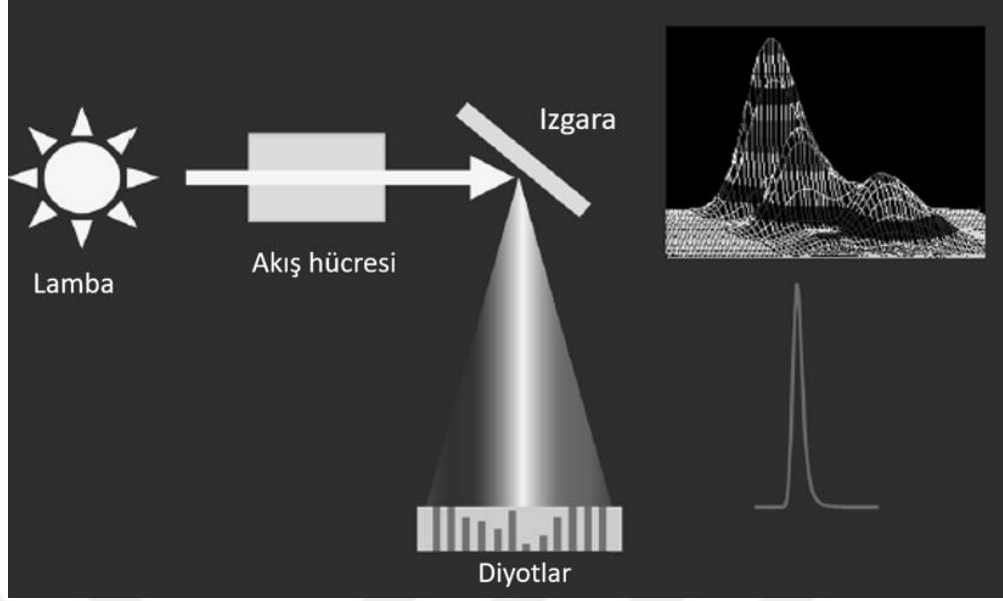
I: geçen ışının şiddeti

b: hücrenin yol uzunluğu

ϵ : çözünenin molar sönüm katsayısı

c: molar konsantrasyon

Üç farklı UV dedektörü türü vardır. Bunlar farklı dalga boylarına dayanan sabit dalga boyu dedektörleri, geniş spektrumlu bir lambadan üretilen bir veya daha fazla dalga boyuna dayanan değişken ve fotodiyot dizisi dedektörleridir. İlk YPSK sistemlerinin bel kemiği olan sabit dalga boyu dedektörleri ucuz ve basittir, ancak bugün sınırlı bir şekilde kullanılmaktadır. Değişken dalga boyu dedektörleri, bir analitin maksimum absorbansında veya daha fazla seçicilik sağlayan bir dalga boyunda çalışacak şekilde ayarlanabilir. Farklı analitlerin tepkisini telafi etmek için kromatografik çalışma sırasında dalga boylarını değiştirmek üzere programlanabilirler. Fotodiyot dizi dedektörleri (FDD), ışığın ızgaraya çarpmadan önce akış hücresinden geçmesi dışında, spektrumun bir fotodiyot dizisine yayılmasını sağlayan, değişken dalga boyu dedektörlerine benzer bir optik yola sahiptir. FDD şekil 2.4 de görülmektedir. UV belirleme işlevinin yanında FDD dedektörleri piklerin spektrumlarını sağlayarak pik tanınması ve saflık analizinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca, çok dalga boylu bir UV/ görünür bölge dedektörü olarak da işlev görebilir.



Şekil 2.4. FDD dedektörünün şematik gösterimi (Swartz, 2010)

2.2.3.2. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPSK)

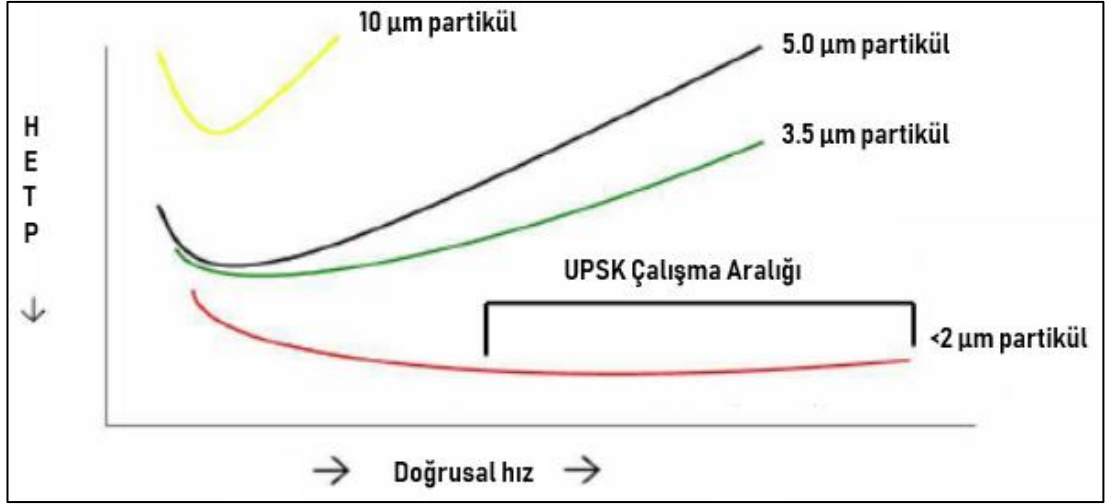
UPSK, sıvı kromatografiye yeni bir yön veren modern bir tekniktir. UPSK, temel olarak üç alanda gelişen ultra performanslı sıvı kromatografisini ifade eder: “hız, çözünürlük ve hassasiyet. UPSK ilkeleri, temel YPSK ile aynı prensiptir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisine (YPSK) kıyasla daha iyi çözünürlük, hız ve hassasiyet elde etmek için ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPSK)’de çapı 2 μm ’den küçük partikül uygulanmaktadır. YPSK, sabit faz parçacık büyüklüğündeki bir azalmanın herhangi bir kromatografik işlem için en büyük faydaya sahip olacağı kabul edilerek geliştirilmiştir. Küçük partikül kromatografisinin veriminin artması uzun zamandır bilinmesine rağmen, bu bilimi kullanan tekniklerin geliştirilmesi, mobil fazı 2 μm ’den küçük partiküllerden pompalarken karşılaşılan sistem geri basınçlarındaki büyük artışlarla karmaşıklaşmaktadır. Geleneksel YPSK sistemleri, tipik olarak küçük partikül kromatografisi ile sağlanan geri basınçlarda çalışamaz. YPSK ve UPSK arasında ayırım yapan tek bir ayırma parametresi bulunmamakla birlikte, UPSK, yüksek mekanik mukavemetli 2 μm ’den küçük sabit faz parçacıkları kullanan kromatografik ayırmalar anlamına gelir. UPSK, partikül kimyası performansı, sistem

optimizasyonu, dedektör tasarımı, veri işleme ve kontrolünde kullanılan teknolojik adımların avantajına sahip olan YPSK'nin özel bir sürümüdür (Chawla ve Ranjan, 2016; Swartz, 2007; Taleuzzaman ve ark., 2015; Zotou, 2012).

UPSK'da ana avantaj, hızlı analizle daha iyi verimlilik ve bu daha küçük partikül boyutuyla elde edilir. Parçacık boyutu değişkenlerden biri olduğu için kromatografik performansı araştırmak için Van Deemter eğrisi kullanılabilir. Van Deemter denklemi, daha küçük boyutlu parçacıkların kullanılmasıyla verimliliğin arttığını gösterir. Van Deemter denklemi, doğrusal hız (akış hızı) ve plaka yüksekliği (HETP) arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir formüldür. Van Demeeter denklemine göre, partikül büyüklüğü 2µm altına düştüğü için, verimde sadece önemli bir kazanç olmaz, aynı zamanda verim artmış debilerde veya lineer hızlar da azalmaz (Taleuzzaman ve ark., 2015).

$$H = A + B/v + C_v$$

A, B ve C sabitleridir ve v, taşıyıcı gazın akış hızıdır (doğrusal hız). Amaç, kolon verimliliğini artırmak için HETP'yi en aza indirmektir. A terimi hıza bağlı değildir ve eddy karışımını belirtir. Sütunların küçük ve üniform büyüklükteki parçacıklarla doldurulmuş olması daha küçüktür. B terimi, parçacıkların doğal difüzyon eğilimini belirtir. Yüksek akış hızlarında bu etki daha küçüktür, bu nedenle bu terim v'ye bölünür. C terimi, ayırma işlemi sırasında dengeye kinetik direnci temsil eder. Kinetik direnç, mobil fazdan sabit faza geçme ve tekrar geri dönme ile ilgili zaman gecikmesidir. Sonuç olarak, verimi arttırması muhtemeldir ve kromatografik performansı etkilemeden ayırma hızlandırılabilir. UPSK'nin ortaya çıkışı, ayırma performansından (ölü hacimleri azaltarak) ve tutarlı basınçlardan (YPSK'deki 170 ila 350 bar ile karşılaştırıldığında yaklaşık 500 ila 1000 bar) faydalanan SK için mevcut enstrümantasyon tesisinin iyileştirilmesini gerekli kılmıştır. Verimlilik, kolonun uzunluğu ile orantılıdır ve parçacıkların yarıçapı ile ters orantılıdır (Chawla ve Ranjan, 2016).



Şekil 2.5. Van Deemter Eğrisi (Shammout, 2013)

Van Deemter eğrisi (Şekil 2.5) çiziminden görülebileceği gibi, partikül boyutu küçüldükçe karşılık gelen HETP de azalmakta ve bu da daha yüksek verim sağlamaktadır. Ayrıca Van Deemter grafiğine göre en yüksek verimlerin daha büyük partiküllere kıyasla daha küçük partiküllerle çok daha geniş bir akış aralığında elde edilebildiği açıktır.

UPSK kullanımı, ilaç metabolitlerinin saptanmasında ve ayırma spektrumlarının kalitesinin artırılmasında yardımcı olmuştur. İlaç endüstrisinde, UPSK analizinin talebi, yüksek, UPSK'nin kromatogramdaki yüksek çözünürlük gibi benzersiz özelliklerinden, değerli, güvenilir ve özgün verilerle daha kısa sürede daha fazla analitik çalışma yapan kısa süreli analizler nedeniyle çok yüksektir. Bilim insanı UPSK tarafından daha hızlı bir şekilde daha doğru veriler üretebilir. UPSK tekniği bitkisel ürün analizinde kullanılır. Analitik laboratuarda, UPSK'nin talebi çok yüksektir çünkü geliştirilen yöntem doğru ve hazırdır ve bu aynı zamanda nano düzeydeki analitin araştırma bilgisini genişletmektedir. Bu yöntemle, numunenin nitel, nicel ve karmaşıklığı gibi her açıdan analiz standardı çok yüksek standartlarda ayırt edilebilir. UPSK / KS sistemi, bileşiğin karmaşıklığını çözen bir veri üretmek için kullanılır. KS'ni UPSK'li bir detektör olarak kullanmak, analizin yorumlanmasına derinlik katmaktadır. İlaç geliştirme ve formülasyon süreci için, ilaç maddelerinin ve bunların safsızlıklarının profillenmesi, tespit edilmesi ve ölçülmesi çok doğru bir şekilde gerçekleştirilebilir (Swartz, 2007; Taleuzzaman ve ark., 2015).

2.2.4. Kütle Spektrometrisi (KS)

Kütle Spektrometresi, incelenen analitle ilgili iyonik türlerin kütle / yük oranının ölçümüne dayanan analitik bir tekniktir. Kütle spektrometrisi (KS); elektron iyonlaşması, moleküllerin parçalanması ve kütle / yük oranının (m / z) belirlenmesi ile ilgilidir. Bir numuneden bir gaz iyon demeti üretir, elde edilen iyon karışımını kütle-şarj oranlarına göre ayırır ve mevcut her iyonik türün nispi bolluğunun ölçüsü olan çıkış sinyalleri sağlar. KS kavramı, bir numuneden iyon oluşturmak, iyonları m / z oranına göre ayırmaktır. Bu, kütle ile aynı olarak kabul edilebilir çünkü iyon çoğu durumda sadece tek bir yüke sahiptir. Gaz halindeki moleküller, bazılarının parçalayacağı moleküler iyonları oluşturmak üzere iyon kaynağında iyonlaştırılır. Çeşitli işlemlerle, farklı m / z değerlerinin iyonları dedektöre ulaşmak için kütle analiz cihazından birer birer geçer. İyonlar dedektöre çarptıklarında, sırayla bilgisayar tarafından depolanabilecek dijital bir cevaba dönüşen elektrik sinyaline dönüştürülürler. Bir kütle spektrometresi doğrudan kütleyi belirlemez, ancak iyonunun m / z değerini ölçerek bir molekülün kütlesini belirler. İyonların m / z bilgisi neyin mevcut olduğunu belirlemeye izin verirken, ölçülen iyon yoğunluğu ne kadar var olduğu sorusuna cevap verir. Ek olarak, kütle spektrumlarının sistematik yorumu, moleküler yapıların aydınlatılmasında kullanılabilecek iyonizasyon işleminin ayrıntılı bir görüntüsünü sağlar. İyonların m / z değerlerine göre ayrılmadan ve tespit edilmeden önce iyonların gaz halinde olması temel bir KS gereksinimidir. Geçtiğimiz on yıl boyunca, KS, proteinlere, peptidlere, karbonhidratlara, DNA'ya, ilaçlara ve biyolojik olarak ilgili diğer birçok moleküle uygulanmasına izin veren muazzam teknolojik gelişmelerden geçmiştir (Nataraj ve ark., 2011; Niessen, 2006; Shammout, 2013).

2.2.4.1. Kütle Spektrometre Cihazı

Bir katı, sıvı veya buhar olabilen bir numune kütle spektrometre cihazına yüklenir ve buharlaştırılır. Numune molekülleri bir iyon kaynağında iyonlara dönüştürülür veya elektrosprey iyonizasyon (ESI) durumunda, çözelti içinde mevcut

olan iyonları gaz fazına hareket ettirebilir. İyonlar kütle analizöründe kütle yük oranlarına göre ayrılır. Analizör bölümü sürekli olarak çok düşük bir vakuma pompalanır, böylece iyonlar gaz molekülleriyle çarpışmadan geçebilir. Kaynaktan üretilen iyonlar, içinden geçtikleri bir dizi metal yarığa giderek artan negatif potansiyeller uygulanarak analizör odasına hızlandırılır. İyonları tespit etmek ve çözülen iyonik türlerin her birinin göreceli bolluğunu kaydetmek için detektör sistemi kullanılır ve iyon / elektrik sinyallerinin büyüklüğü bir kütle spektrumuna dönüştürülür. Kütle spektrometre cihazlarının temel bileşenleri Şekil 2.6 (Çal, 2014) da görülmektedir.

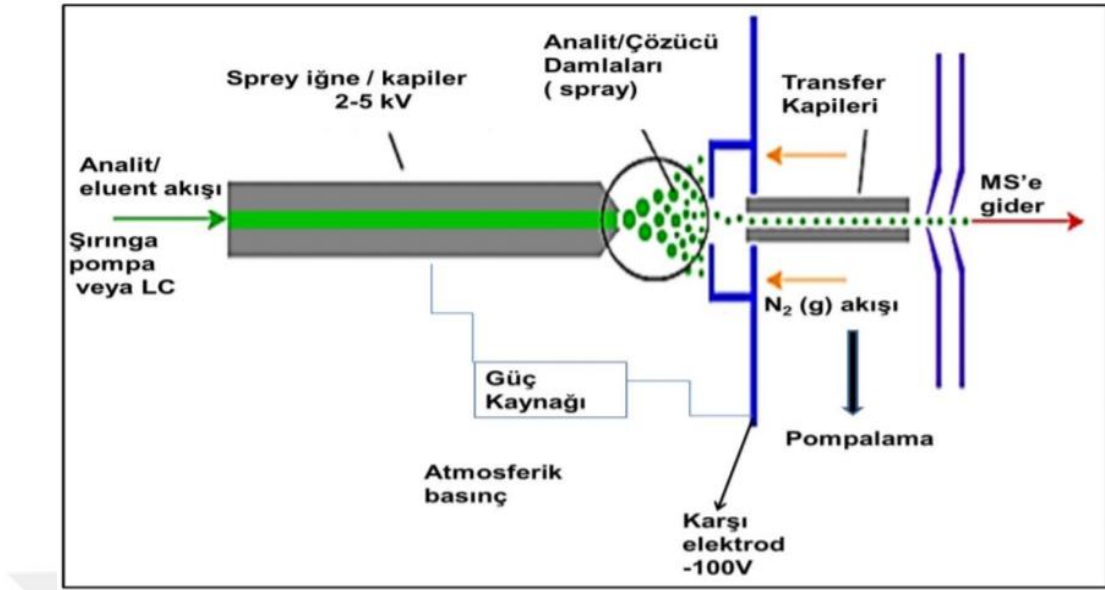


Şekil 2.6. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri (Çal, 2014)

Tekniğin hem nitel hem de nicel kullanımı vardır. Bunlar arasında bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması, bir moleküldeki elementlerin izotopik kompozisyonunun belirlenmesi ve bunun bir fragmentasyonunu gözlemleyerek bir bileşiğin yapısının saptanması bulunur. Diğer kullanımlar, bir numunedeki bir bileşiğin miktarının ölçülmesini veya gaz fazı iyon kimyasının temellerinin çalışılmasını içerir. KS şimdi çok çeşitli bileşiklerin fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklerini inceleyen analitik laboratuvarlarda sık kullanılır. (Nataraj ve ark., 2011).

2.2.4.2. Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

Kütle spektrometre analizlerinde uygulanan elektrosprey iyonizasyon bir iyonizasyon tekniğidir. Çözelti halinde bulunan örnek, ucuna yüksek pozitif veya negatif elektrik potansiyeli uygulanan kısa bir paslanmaz çelik kılcal boru boyunca geçirilir. Çözelti tüpün ucuna ulaştığında, güçlü elektrik alanı tüpün neredeyse buhar olmasına neden olur. Kütle spektrometresinin uygun şekilde püskürtülmesi, bu damlacıkların buğusu, yoğunlaşmayı önlemek için hafifçe ısıtılabilen bir evaporasyon odasından akar. Bu bölgeden damlacıklar olarak, çözücü yüzeylerden hızla buharlaşır ve damlacıklar küçüldükçe küçülür. Damlacıkların önemli bir kısmının yüzeyleri üzerinde aşırı pozitif veya negatif elektrik yükü vardır. Böylece damlacıklar küçüldükçe, benzer yükler arasındaki doğal itme iyonların ve nötr moleküllerin salınmasına neden olana kadar elektriksel yüzey yük yoğunluğu artar. Kapiler tüpün ucu, bu buharlaşma bölgesinin karşı ucunda küçük bir deliğe yöneliktir. Numune moleküler iyonları ve küme iyonları, çözücününkinden çok daha fazla moleküler kütleyle (ve dolayısıyla momentuma) sahiptir ve giriş bölgesinin sonundaki hedef üzerinde düz bir şekilde hareket etme eğilimindedir. Hedef delikte, daha ağır iyonlar geçer, ancak daha hafif çözücü moleküllerin çoğu bu zamana kadar dağılır ve bu nedenle geçmez. Gerçekte, cihaz, çözücü ve çözünen (numune) moleküller arasında bir momentum ayırıcıdır. Bu delikten geçtikten sonra iyonlar, bir nozul ve bir sıyırıcı vasıtasıyla iki havalandırılmış bölgeden geçer. Bu konik şekilli delikler örnek iyonlarının çözücü iyonlarından ayrılmasını sağlar. Son olarak, numune iyonları kütle spektrometresinin analizörüne geçer, burada kütle/yük (m/z) oranları normal şekilde ölçülür. Şekil 2.7'de elektrosprey iyonizasyonun şematik gösterimi verilmiştir. (De Hoffmann ve ark., 1996; Fenn ve ark., 1990; Fenn ve ark., 1989; Herbert ve Johnstone, 2003; Simpson, 2003)



Şekil 2.7. Elektrosprey iyonizasyon şematik göstermi (Çal, 2014)

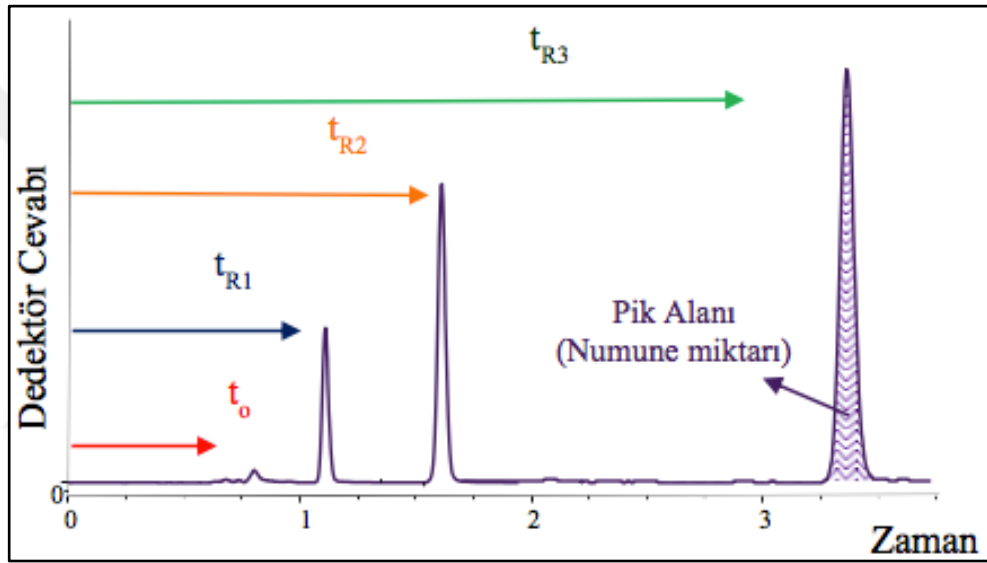
ESI'da iyonlaşan türler kütle ayırıcısında kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar. Elektrosprey iyonizasyonlu (ESI) SK-KS, peptitlerin, proteinlerin, biyolojik numunelerin, polimerlerin, nükleotitlerin, şekerlerin ve organometaliklerin moleküler ağırlığını ölçmek için kullanılır. Ayrıca biyolojik araştırmalarda ve tıbbi araştırmalarda sıkça kullanılır (Çal, 2014; Pratima, 2018).

2.2.5. Kromatografik Ayırım Teknikleri

Kromatografik ayırımlar, çözünen maddelerin mobil ve sabit fazlar arasında ne ölçüde ayrıldığına bağlı farklılıklara dayanır. YPSK cihazında analiz sonucu elde edilen kromatogram örneği Şekil 2.8'de görülmektedir. Kromatogram; akış derişimi veya akış derişimini ölçmek için kullanılan diğer niceliklere dedektörün verdiği cevaptır. Zamana veya hacime karşı grafik veya başka biçimde gösterimi olabilir. İdeal kromatogramlar Gauss eğrisi şeklindeki piklerin temel çizgi üzerinde sıralanması ile oluşurlar. Pik, analiz kolunundan bir bileşen ayrıştırıldığında dedektör tarafından kaydedilen kromatograma ait kısımdır. Analit pikinin dedektöre ulaşması için numune enjeksiyonundan sonra geçen süreye tutma süresi(t_R) denir. Aynı çözelti içinde bulunan, analiz edilecek her bir bileşen için kolon içinde tutunma zamanları

farklıdır. Tutulmamış türlerin kolondan geçmesi için geçen süre ölü zaman (t_0) olarak ifade edilir. (Titck, 2017; Fanali ve ark., 2013 ve Kromidas, 2005).

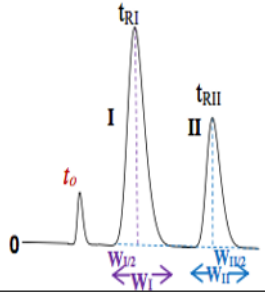
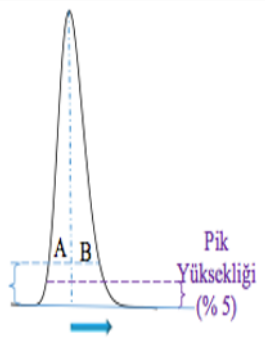
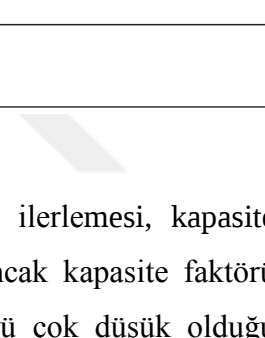
Kullanılan cihazın çeşitli bileşenleri, nitelikli olmalı ve test veya analizi yürütmek için gereken başarıyı elde etme yeteneğine sahip olmalıdır. Sistem uygunluk testleri, yöntemin ayrılmaz bir parçasını temsil eder ve kromatografik sistemin başarımının yeterli olduğunu kesinleştirmek için kullanılır. (Titck, 2017; Gumustas, 2016; Nemlioğlu, 2019)



Şekil 2.8. YPSK sisteminde elde edilen kromatogram örneği (Gumustas, 2009)

Sistem uygunluk parametrelerinin sembolleri, formülleri, limitleri ve açıklamaları Çizelge 2.5'te görülmektedir.

Çizelge 2.5. Sistem uygunluk testleri (SUT) parametreleri (Nemlioğlu, 2019)

SUT Parametresi	Sembolü	Formülü	Limit	Açıklama
Kapasite Faktörü	k	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$1 \leq k \leq 10$	
Seçicilik	α	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{r0}}{t_{R1} - t_{r0}}$	$\alpha > 1$	
Ayrım Gücü	R_S	$R_S = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{10.5} + W_{20.5}}$	$R_S > 1.5$	
Kuyruklanma Faktörü	T	$T = \frac{A + B}{A}$	$2 \leq$	
Pik Asimetresi	A_s	$A_s = \frac{B}{A}$	$0.95 \leq A_s \leq 2$	
Teorik Tabaka Sayısı	N	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	$N > 2000$	
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği	% BSS	$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$	$\% BSS < 1.5$	

Analiz edilen madde kolonda iyi tutunması ve yavaş ilerlemesi, kapasite faktörünün yüksek olduğu durumlarda gerçekleşmektedir. Ancak kapasite faktörü çok büyük olursa analiz süresi uzamaktadır. Kapasite faktörü çok düşük olduğu zaman, madde çözücü pikinden ayıramamaktadır. İdeal kapasite faktörü 1 ile 10 arasında olması uygun görülmüştür. Seçiciliği, hareketli ve sabit fazın özellikleri etkilemektedir. Seçicilik (α) değerinin 1'den büyük olması uygundur.

En önemli SUT parametresi teorik tabaka sayısı olarak değerlendirilebilir. Çünkü teorik tabaka sayısı, analiz verimi ile doğrudan ilgilidir. Teorik tabaka sayısını etkileyen parametreler; analiz edilen maddenin türü, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı, tampon çözeltinin türü ve kolon ömrüdür.

Ayırma gücü (rezolüsyon), art arda elüte edilen iki analiti ayırma yeteneğinin kantitatif bir ölçümünü sağlar. Ayırmanın tam olarak sağlanması için ayırma gücü (R_s) en az 1,5 olmalıdır.

Pik asimetrisindeki artış, rezolüsyonun ve analiz hassasiyetinin azalmasına sebep olmaktadır. Kolon ömrü azaldıkça pik asimetrisi artar. Pik asimetri faktörü pikin yüksekliğinin yirmide-birindeki pik genişliği ile hesaplanmaktadır. 1.0 değerindeki A_s simetriyi belirtir. $A_s > 1.0$ olduğunda, pik kuyruklanmıştır. $A_s < 1.0$ olduğunda, pik ön kuyruklanmıştır.

Standart bir çözelti birkaç kez (5-6 defa) enjekte edildikten sonra pik tepkilerinin (pik yüksekliği veya pik alanı) bağlı standart sapması ölçülür. Bu ölçümlerin belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğini ifade eder (Rao ve Goyal, 2016).

2.2.6. Analitik Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri

Validasyon, bir yöntemin uygulama kriterlerine uygunluğunun değerlendirilmesi için yöntem parametrelerinin belirlendiği geçerlilik çalışmasıdır. İlaç üretimi sürecinin bütün aşamalarında gerçekleştirilen işlemlerin doğru, güvenilir, hassas, seçici olması ve analitik yöntemlerin geçerliklerinin belirlenmesi çok önemlidir. Kapsamlı validasyon, rutin kullanım öncesi yöntem uygulama parametrelerinin belirli bir bölümünde inceleme yapılması, dökümante edilmesi; tam validasyon yöntemin tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir (Nemlioğlu, 2019; Yılmaz, 2012).

Dikkate alınması gereken tipik validasyon parametreleri; Doğruluk, Kesinlik, Seçicilik, Tayin alt sınırı; Teşhis alt sınırı, Doğrusallık ve Aralık olarak belirtilmektedir (Chewg, 2005).

2.2.6.1. Seçicilik

Seçicilik, numune eksipyanlar ve ilgili bileşikler içermesine rağmen bir yöntemin yalnızca ölçmek istediği şeyi ölçme kabiliyeti ile ilgilidir. Daha spesifik olarak seçicilik; genellikle ilgilenilen analitin, numunede olması beklenen bileşiklerin varlığında (farmasötik numuneler için etkin olmayan eksipyanlar, bozunma ürünleri, sentez safsızlıkları, kap ekstrakte edilebilirleri) doğru ve kesin bir şekilde ayırt edilebilme yeteneğine denir. Bir yöntem seçici değil ise, diğer parametrelerin önemi yoktur. (Chewg, 2005; FDA, 2013; Jenke, 2006; Nemlioğlu, 2019).

2.2.6.2. Tespit Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

TS (Tespit Sınırı), tespit edilebilen, fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen ve analit sinyalinin, gürültüden ayrılabilirdiği en düşük seviyedir. TAS (Tayin Alt Sınırı) ise kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. (Gumustas ve Ozkan, 2011; Ozkan, 2012; Gumustas, 2016).

TS ve TAS değerleri hesaplanırken farklı yöntemler kullanılabilir. Yaygın kullanılan yöntemlerden birisi;

$$TS = 3,3 \times \text{Standart Sapma (SD)} / m \text{ (Kalibrasyon doğrusunun eğimi)}$$

TAS = 10 x Standart Sapma (SD) /m (Kalibrasyon doğrusunun eğimi) şeklinde yapılan hesaplamadır.

2.2.6.3. Doğrusallık ve Aralık

Bir doğrusallık değerlendirmesi, analit piki ile standart analit konsantrasyonunun ilişkilerinin doğasını belirler. Doğrusallık değerlendirmesi,

prosedürün doğrudan veya iyi tanımlanmış bir matematiksel dönüşüm yoluyla belirli bir aralıktaki numunedeki analit konsantrasyonu ile orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğini belirler.

Bir prosedürün aralığı doğrusallığına bağlıdır. Aralık, analitik prosedürün uygun bir doğruluk, hassasiyet ve doğrusallık seviyesine sahip olduğu kanıtlanmış olan alt ve üst analit konsantrasyonu arasındaki aralıktır. Aralık, prosedürün, aralığın en uç noktalarında ve aralık içinde kabul edilebilir doğruluk, hassasiyet ve doğrusallık sağladığını doğrulayarak doğrulanır (Gumustas, 2016; Gumustas ve Ozkan, 2011; Ozkan, 2012; Ozkan ve ark., 2015; Jenke, 2006).

2.2.6.4. Doğruluk (Geri kazanım)

Doğruluk, bir sonuç ile doğru veya bilinen bir değer arasındaki fark olarak tanımlanabilir. Literatürde yöntem doğruluğunun belirlenmesi için çeşitli prosedürler bulunmaktadır. Yaygın olarak başvuru bir prosedür, bilinen bir miktarda analit ile bir test çözeltisinin takviye edilmesini içerir. Doğruluk, analitik yöntemin, bilinen miktarlarda analitin numunelerde beklenen normal seviyelerin üstünde ve altında eklendiği ilaç ürününe uygulanmasıyla değerlendirilir. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım olarak gösterilmektedir.(Chewg, 2005; Jenke, 2006; Nemlioğlu, 2019).

2.2.6.5. Kesinlik

Analitik bir prosedürün kesinliği, belirli koşullar altında aynı homojen çözeltinin çoklu örnekleme sonucunu elde edilen verilerin arasındaki yakınlığı ifade eder. Bu tanım, yöntemin gerçek çalışma şartlarındaki tekrar edilebilirliğinin göstergesidir. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği, çalışmalar arası veya gün içi kesinlik, tekrar elde edilebilirlik olarak uygulanabilir.

Kesinlik çalışmasının ilk tipi cihaz kesinliği veya enjeksiyon tekrarlanabilirliğidir. İkinci tip tekrarlanabilirlik veya test içi hassasiyettir. Test içi kesinlik verileri bir günde elde edilir ya da farklı analizcilerin hazırladığı çözeltiler analiz edilir. Tekrar elde edilebilirlik; laboratuvarlar arasındaki hassasiyeti ifade eder. Ürün için yapılan miktar tayini test yöntemi için kesinlik kriterlerinin bir örneği, cihaz kesinliği için (BSS)% 2 ve test içi kesinlik için % 3 olacaktır. Ancak çalışma safsızlık tayini gibi düşük seviyelerde sonuçlar vermekte ise; tekrarlanabilirlik için %5'e, tekrar elde edilebilirlik için %10-15'e kadar kabul edilebilir. (Gumustas, 2016; Jenke, 2006; Rao ve Goyal, 2016; Titck, 2017).

2.2.6.6. Sağlamlık

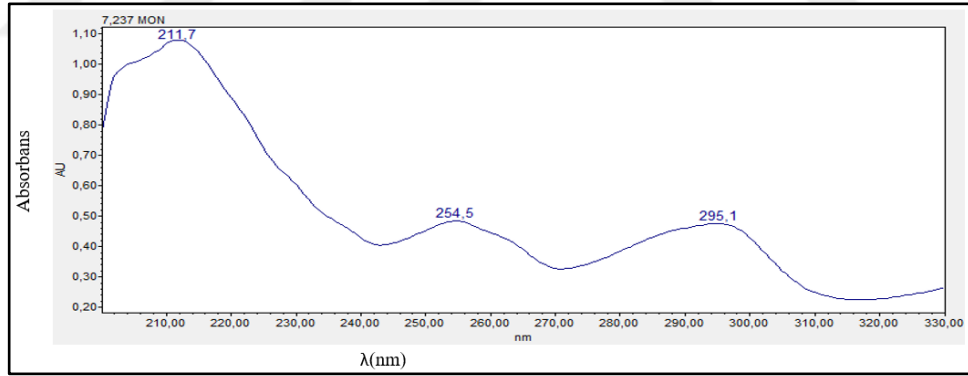
Sağlamlık, bir analitik yöntemin, yöntem parametrelerindeki (örneğin; pH, mobil faz bileşimi, sıcaklık ve enstrümantal ayarlar) küçük ancak kasıtlı değişikliklerden etkilenmeden kalma yeteneğinin ölçüsü olarak tanımlanır ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesini sağlar. Sağlamlığın belirlenmesi, bir parametrenin değiştirilmesi ve sistem uygunluğunun ve / veya numunelerin analizinin izlenmesi yoluyla yöntem üzerindeki etkinin ölçüldüğü sistematik bir süreçtir (Kumar Bhardwa Santosh ve ark., 2015).

3. BULGULAR

3.1. Dalga Boyu Taraması

Seyreltme Çözeltisi: pH 3,2 sulu çözelti: Metanol: Asetonitril (25:25:50 h/h/h)

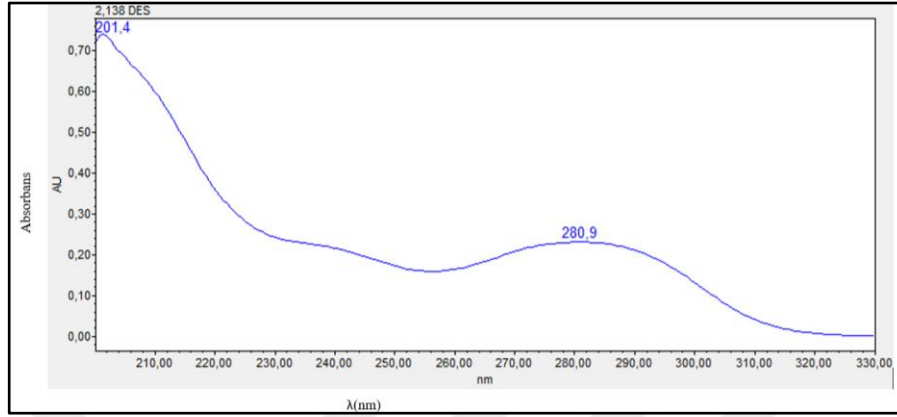
Montelukast sodyum çözeltisi: 100,0 mg Montelukast'a eş değer yaklaşık 104 mg Montelukast sodyum tartıldı. 50 mL balon joje içerisine konuldu. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen çözünmesi için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 50 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile çözülmesi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınıp 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı (Montelukast derişimi: $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu çözelti UPSK/ foto diyet dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbens verdiği belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. UV spektrofotometrede, Montelukast'ın seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması.

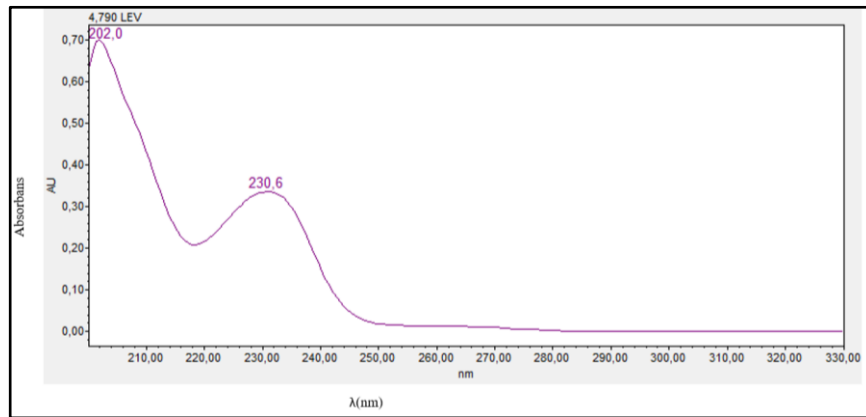
Desloratadin çözeltisi: 50,0 mg Desloratadin tartıldı, 50 mL balon joje içerisine konuldu. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen çözünmesi için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 50 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile çözülmesi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınıp, 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı (Desloratadin derişimi: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu

      UPSK/ foto diyot dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbans verdiği belirlendi (  kil 3.2).



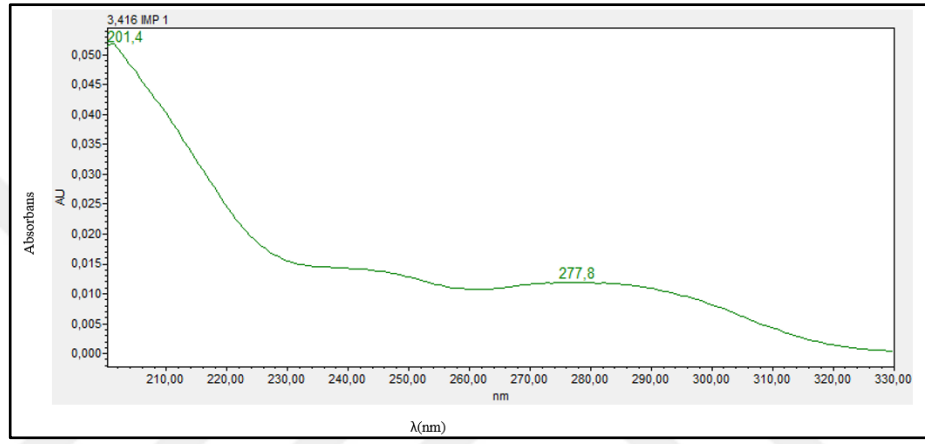
  kil 3.2. UV spektrofotometrede, Desloratadine'in seyreltme         ile hazırlanmış, derişimi 50 µg mL⁻¹ olan        nin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması.

Levosetirizin dihidroklorür        : 50,0 mg Levosetirizin dihidroklorür tartıldı. 50 ml balon joje içerisine konuldu.  zerine bir miktar seyreltme         ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen           için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 50 mL hacmine seyreltme         ile           ile tamamlandı. Bu        den 5 mL alınıp, 100 mL hacmine seyreltme         ile tamamlandı(Levosetirizin dihidroklorür derişimi: 50 µg mL⁻¹). Bu       UPSK/ foto diyot dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbans verdiği belirlendi (  kil 3.3).



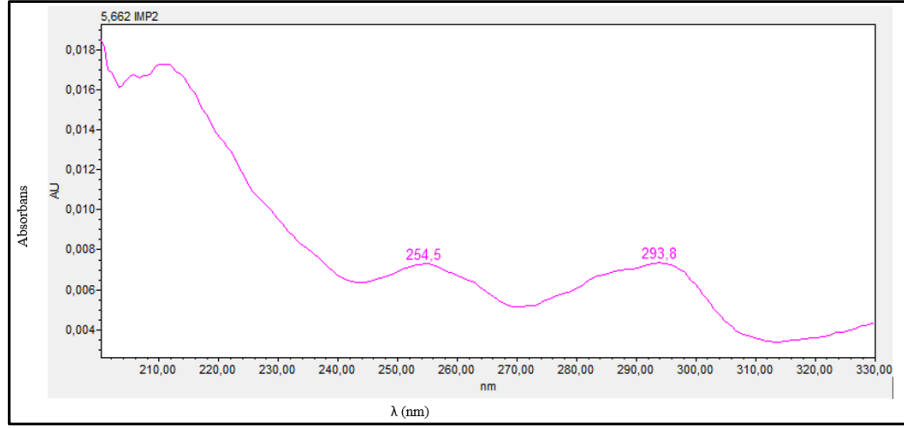
  kil 3.3. UV spektrofotometrede, Levosetirizin Dihidroklorür' n seyreltme         ile hazırlanmış, derişimi 50 µg mL⁻¹ olan        nin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması.

IMP1 çözeltisi: 5,0 mg IMP1 tartıldı, 100 mL balon joje içerisine konuldu. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen çözünmesi için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile çözülmesi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınıp 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı (IMP1 derişimi: $2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu çözelti UPSK-foto diyot dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbans verdiği belirlendi (Şekil 3.4).



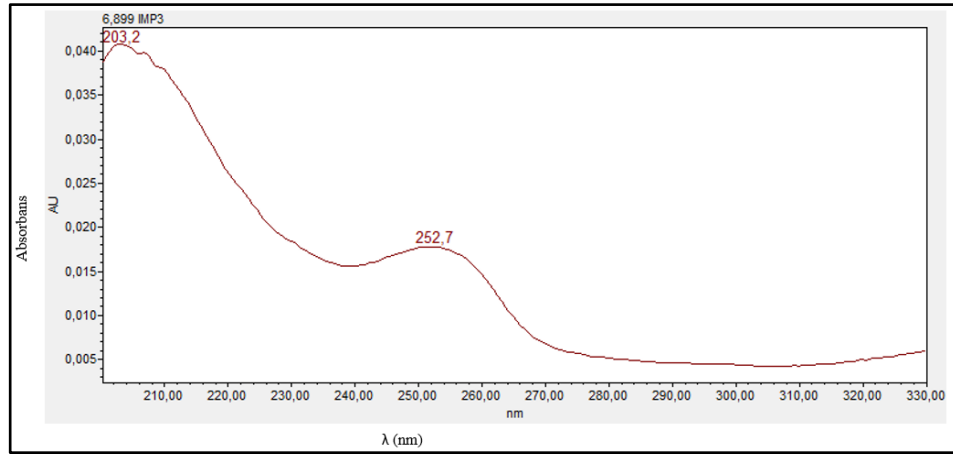
Şekil 3.4. UV spektrofotometrede, IMP1'in seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması.

IMP2 çözeltisi: 5,0 mg IMP2 tartıldı, 25 mL balon joje içerisine konuldu. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen çözünmesi için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 25 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile çözülmesi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınıp 20 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınıp 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı (IMP2 derişimi: $2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu çözelti UPSK-foto diyot dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbans verdiği belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. UV spektrofotometrede, IMP2'nin seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması.

IMP3 çözeltisi: 5,0 mg IMP3 tartıldı, 100 mL balon jöje içerisine konuldu. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyoya tamamen çözünmesi için 5 dakika bekletildi. Daha sonra 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile çözülmesi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınıp 100 mL hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı (IMP3 derişimi: $2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu çözelti UPSK-foto diyot dizisi dedektör sistemine enjekte edildi, hangi dalga boyunda en yüksek absorbans verdiği belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. UV spektrofotometrede, IMP3'ün seyreltme çözeltisi ile hazırlanmış, derişimi $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan çözeltinin 200-400 nm aralığında dalga boyu taraması

MON, DES, LEV, IMP1, IMP2, IMP3 moleküllerini içeren çözeltilerinin UV spektrumları incelendiğinde 6 molekülün 238 nm'de absorbans verdiği ve bu

absorbansların tekrarlanabilir olduğu tespit edildi. Çalışma kapsamında bu 6 molekülün ortak koşullar altında aynı anda analiz edilebilmesi ve miktar tayinlerinin yapılabilmesi için 238 nm çalışma yapılacak dalga boyu olarak seçildi.

3.2. Montelukast, Desloratadin, Levosetirizin ve Safsızlıkları (Imp1, Imp2, Imp3) için Geliştirilen UPSK Yönteminin Analiz Bulguları

3.2.1. UPSK Sistemi ile Analitik Yöntem Çalışmaları

MON, DES ve LEV maddelerinin ve safsızlıklarının aynı anda UPSK yöntemiyle analizinde uygun kromatografik koşulların belirlenmesi için aşağıdaki parametrelerin etkisi incelendi:

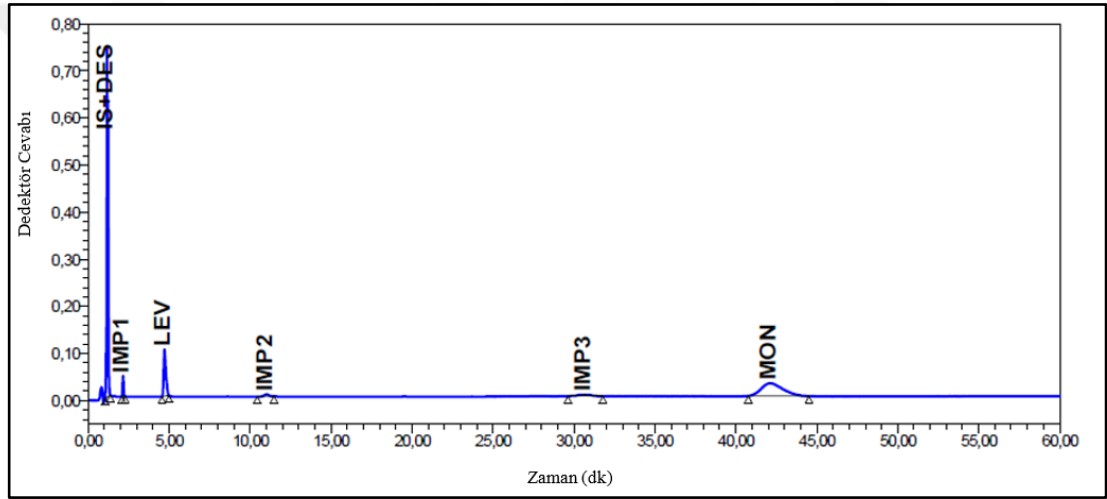
- Hareketli faz içeriği
- Tampon çözeltilerin molaritesi
- Farklı sabit fazlar
- Kolon sıcaklığı
- Akış hızı

3.2.1.1. Hareketli Faz İçeriği

UPSK-FDD yöntemi optimize edilirken bozundurma çalışmalarında karşılaşılabilecek bilinmeyen bir safsızlığın SK-KS ile molekül ağırlığını da tayin edebilmek için SK-KS yöntemlerinde kullanılabilen bir tampon çözelti olması özellikle tercih edildi. Bu amaçla çalışmalara trifloroasetik asit ve/veya amonyum asetat içeren tampon çözeltiler ile başlandı. MON, DES, LEV moleküllerinin ve safsızlıklarını aynı anda ayırmak sabit bir akış programı ile mümkün olmayacağı öngörüldüğünden 2 farklı tampon çözelti hazırlandı. UPSK cihazının bir hareketli faz kanalına 5mM amonyum asetat içeren tampon (Hareketli FazA), diğeri bir kanalına

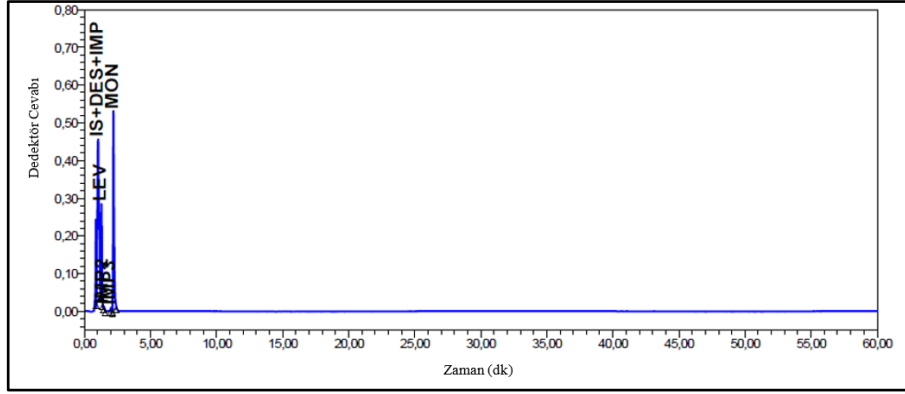
ise %0,15 trifloro asetik asit içeren tampon (Hareketli FazB), konularak çalışmalara başlandı. Bu çalışmalarda Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8 µm kolon kullanıldı. Diğer koşullar sıcaklık, dalga boyu, akış hızı, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm, 0,6 mL dk⁻¹, 10 µL uygulandı. Çeşitli rasgele ve sistematik hataları dengelemek için iç standart olarak Parasetamol (IS) kullanıldı.

Farklı hareketli faz oranları ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12’de görülmektedir. İlk çalışma, hareketli faz 1 deneme akışı ile yapılmıştır. Hareketli faz 1; Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60: 40, h/h).



Şekil 3.7. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz 1 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

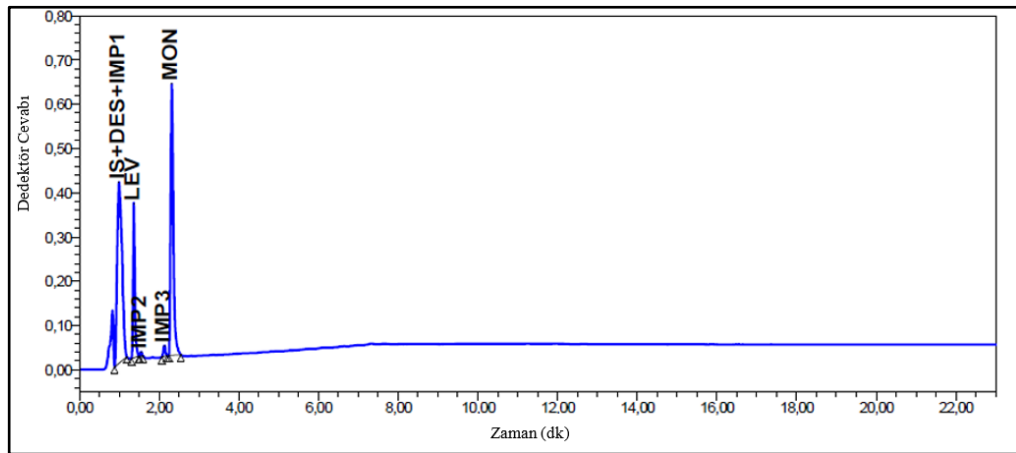
Hareketli Faz 1 deneme akışı ile yapılan çalışmalarda DES ve IS için ayrışma sağlanamadı, kapasite faktörü düşük bulundu, IMP3 ve MON pikleri geç çıktı. Çalışmaya Hareketli faz 2 deneme akışı ile devam edildi. Hareketli faz 2; Hareketli Faz B: Hareketli Faz A (60:40, h/h).



Şekil 3.8. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz 2 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram

Hareketli Faz 2 deneme akışı ile yapılan çalışmalarda pikler erken çıktı ancak ayrışma sağlanamadı ve kapasite faktörü düşük bulundu. Bu çalışmalar sonucu sabit oranda hareketli faz karışımı ile uygun analiz şartlarının sağlamayacağı öngörüldüğünden akış programı oluşturuldu.

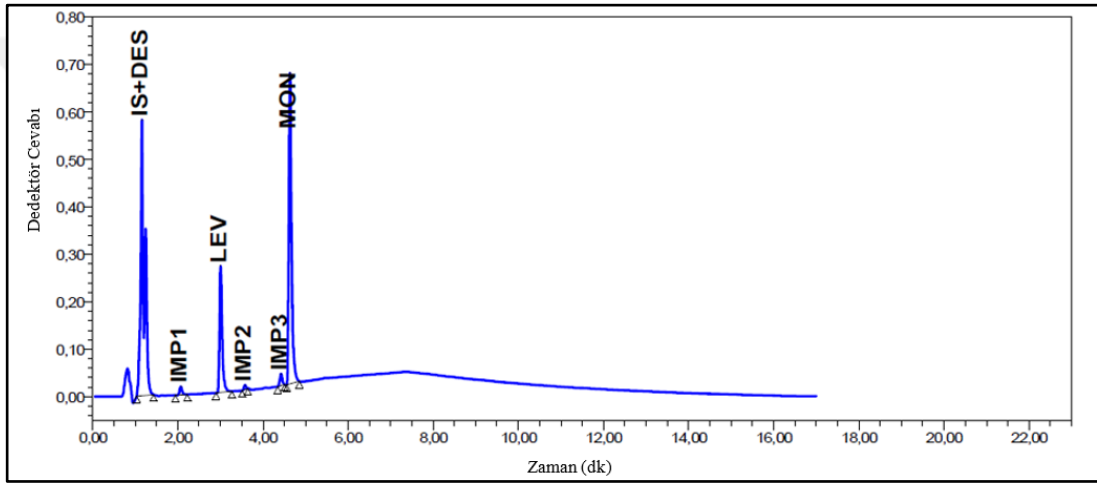
Akış Programı 1			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	0,6	40	60
4	0,6	30	70
6	0,6	25	75
22	0,6	25	75
23	0,6	40	60



Şekil 3.9. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren, akış programı 1 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 1 ile yapılan çalışmalarda maddeler arasında ayrışma sağlanamadı ve kapasite faktörü düşük bulundu.

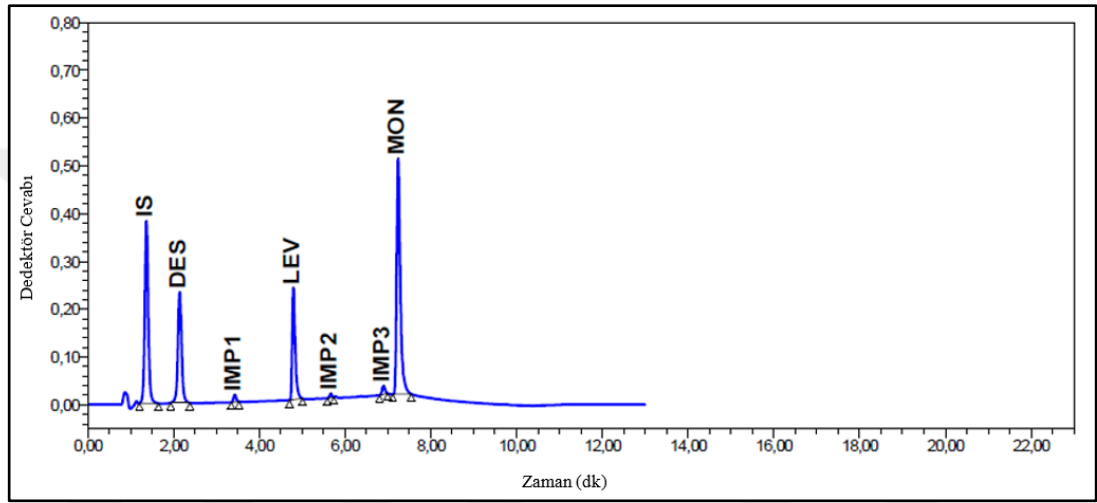
Akış Programı 2			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	0,6	65	35
4	0,6	30	70
6	0,6	25	75
16	0,6	65	35
17	0,6	65	35



Şekil 3.10. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, Hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren, akış programı 2 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 2 ile yapılan çalışmalarda IMP1, LEV, IMP2, IMP3 ve MON arasında ayrışma sağlandı ancak IS ve DES arasında yeterli ayrışma sağlanamadı ve kapasite faktörü düşük bulundu.

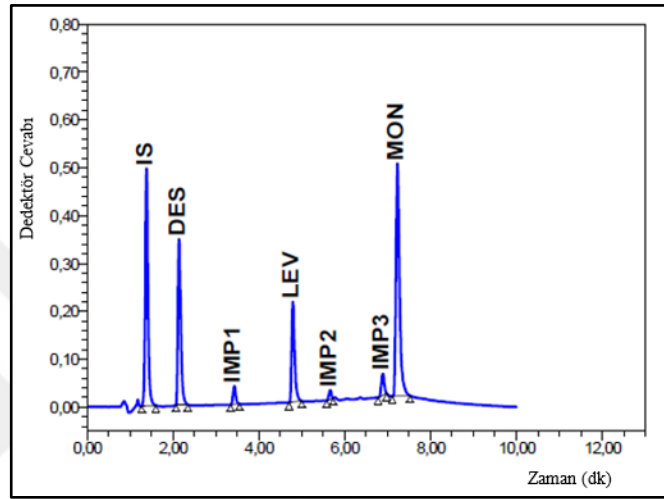
Akış Programı 3			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	0,6	75	25
4	0,6	50	50
6	0,6	40	60
9	0,6	80	20
10	0,6	75	25
12	0,6	75	25



Şekil 3.11. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren, akış programı 3 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 3 ile yapılan çalışmalarda IMP1, LEV, IMP2, IMP3 ve MON arasında ayırışma sağlandı ve kapasite faktörü yeterli bulundu($1 \leq k \leq 10$). SUT parametrelerine uygun daha kısa bir akış programı oluşturmak amacı Akış Programı 4 oluşturuldu.

Akış Programı 4			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	0,6	75	25
4	0,6	50	50
6	0,6	40	60
9	0,6	75	25
10	0,6	75	25



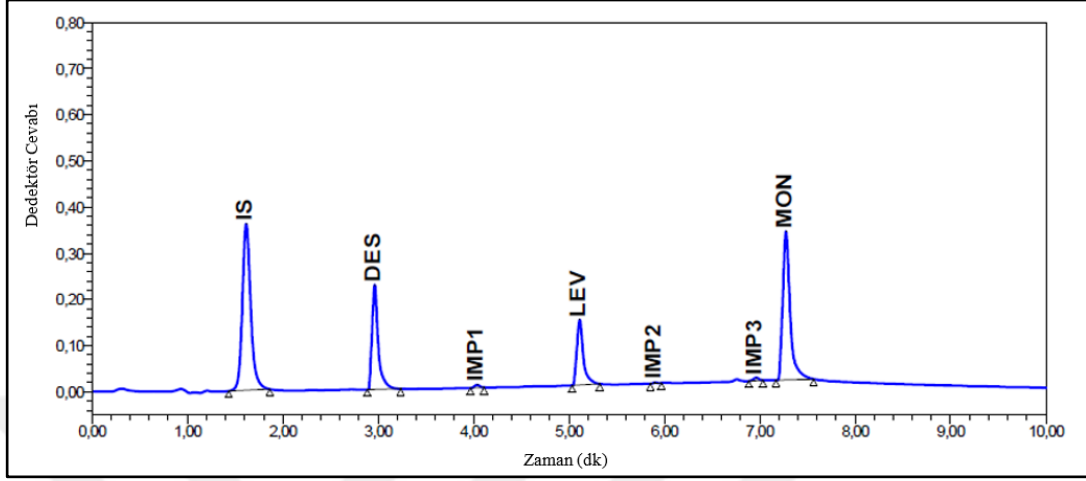
Şekil 3.12. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 4 ile SUT parametreleri sağlanarak süre 10 dk olarak kısaltıldı. Bundan sonraki çalışmalara bu program ile devam edildi ve kromatogram süresi 10 dk olarak alındı.

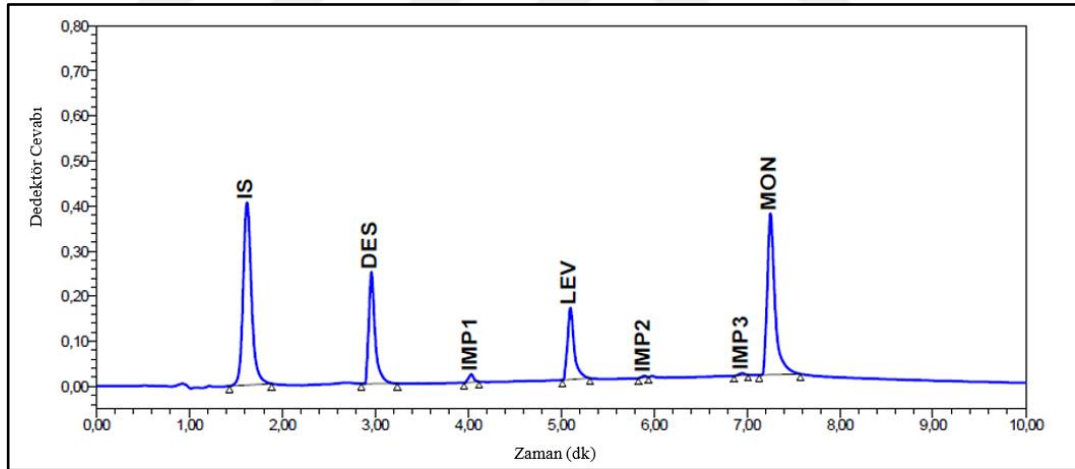
3.2.1.2. Tampon Çözeltilerin Molaritesi

Hareketli Faz A olan 5mM amonyum asetat içeren tampon çözelti yerine 3mM ve 10mM amonyum asetat içeren tampon çözelti hazırlanarak çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalar ile tampon çözelti molaritesinin etkisi incelenmiştir. Hareketli faz B ve çalışmanın diğer koşullar kolon, sıcaklık, dalga boyu, akış hızı, enjeksiyon hacmi sırası ile; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8 µm, 25°C, 238 nm, 0,6 mL dk⁻¹, 10 µL sabit tutuldu.

Tampon çözeltinin molaritesinin değişimi ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 3.13, 3.14’de görülmektedir.



Şekil 3.13. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 3 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

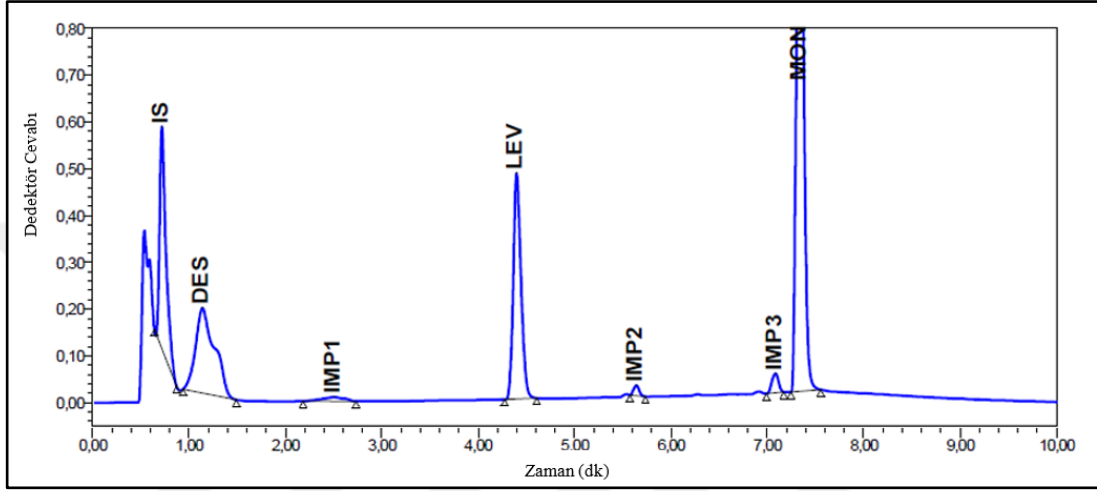


Şekil 3.14. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:10 mM amonyum asetat: ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

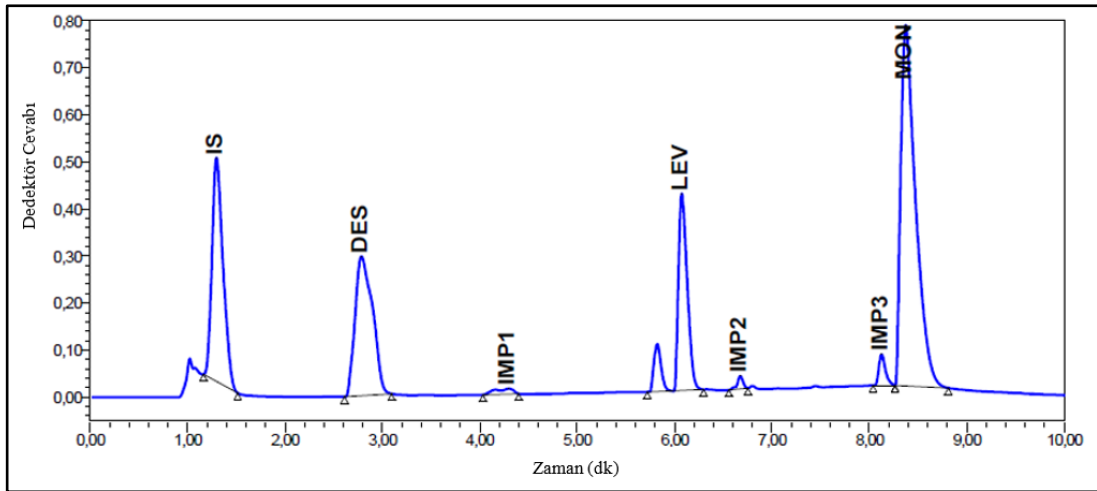
3 mM, 5 mM ve 10 mM amonyum asetat tamponlarının Hareketli faz A olarak kullanıldığı enjeksiyonlarda anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak tekrarlanan enjeksiyonlarda pik simetrilerinde yükselme ve ayrışmanın kötü olması sebebi ile 5mM amonyum asetat tamponunun pH sı 3,2 ye ayarlanarak çalışmalara devam edildi.

3.2.1.3. Farklı Sabit Fazlar

Kromatografik koşulların araştırılmasına kolon denemeleri ile devam edildi. Sıcaklık, dalga boyu, akış hızı, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm, 0,6 mL dk⁻¹, 10 µL sabit tutuldu.



Şekil 3.15. Acquity UPLC BEH –C18, 50×2,1 mm, 130Å, 1,7µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

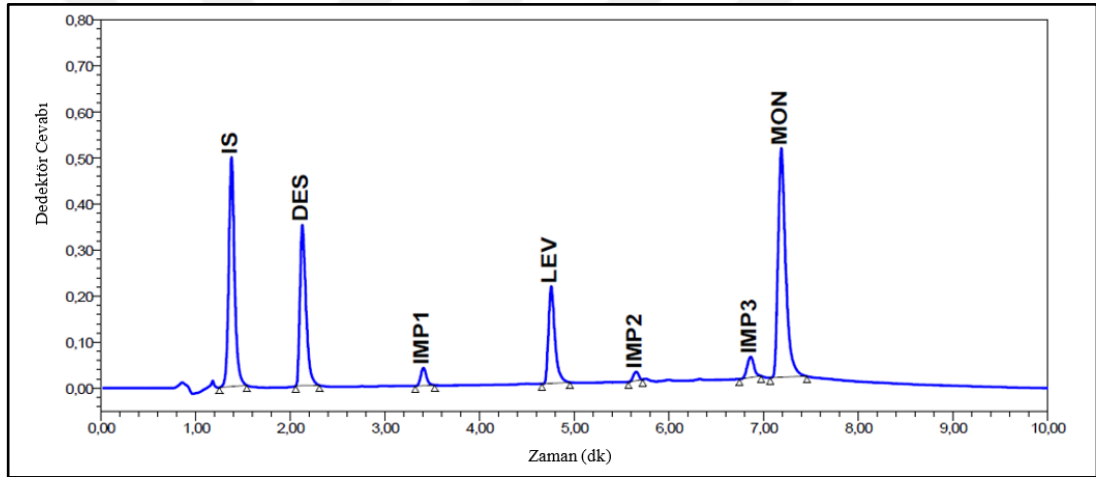


Şekil 3.16. Acquity UPLC BEH –Phenyl, 100×2,1 mm, 1,7µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), Akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Sabit faz seçimi çalışmalarından elde edilen kromatogramlar (Şekil 3.15, Şekil 3.16) değerlendirildiğinde; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon ve 0,6 mL dk⁻¹ akış hızında daha iyi ayrışma ve pik simetrisi sağlamakla birlikte basınç değerinin daha düşük olduğu görüldü.

3.2.1.4. Kolon Sıcaklığı

UPSK-FDD yönteminde sıcaklığın etkisini kontrol etmek amacı ile sıcaklık 25 °C'den 30 °C'ye değiştirilerek enjeksiyon yapıldı. Çalışmanın diğer şartları sabit tutuldu.

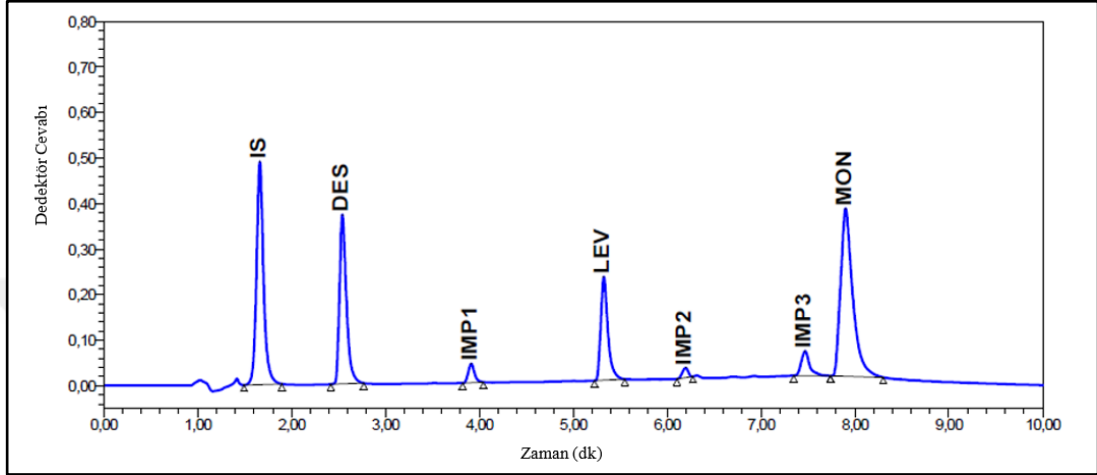


Şekil 3.17. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 30°C, 0,6 mL dk⁻¹, akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

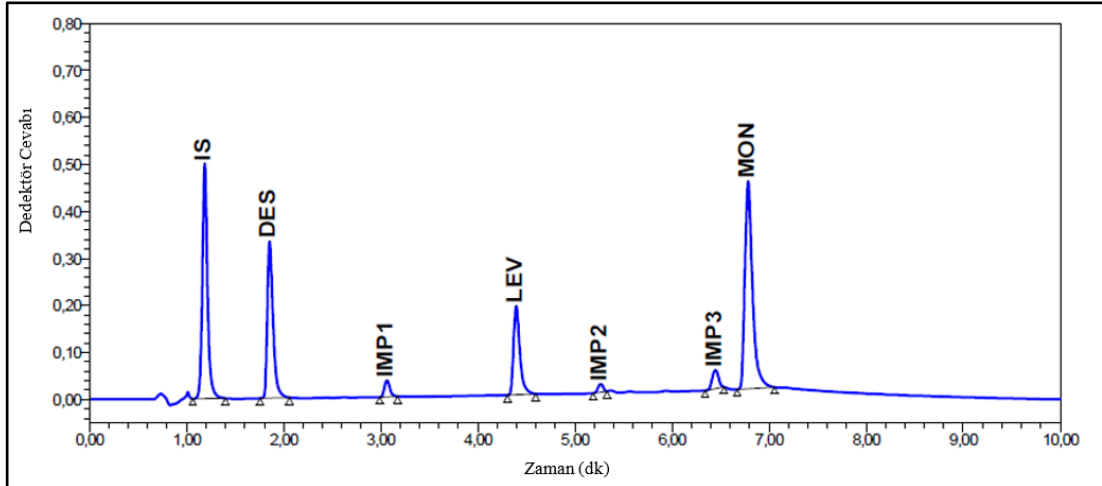
30 °C kolon sıcaklığı ile yapılan çalışma sonucu elde edilen kromatogramda (Şekil 3.17) anlamlı bir fark görülmedi. Sıcaklık parametresinin kolon fırını ihtiyacı ortaya çıkaracağı düşünülerek çalışmalara 25 °C kolon sıcaklığı ile devam edildi.

3.2.1.5. Akış Hızı

UPSK-FDD yönteminde akış hızını optimize etmek için 0,5 mL dk⁻¹ ve 0,7 mL dk⁻¹ akış hızlarında enjeksiyon yapıldı. Çalışmanın diğer şartları sabit tutuldu.



Şekil 3.18. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,5 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.



Şekil 3.19. Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,7 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış hızı çalışmaları değerlendirildiğinde 0,5 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılan çalışma sonucu elde edilen kromatograma göre IMP3 ve MON piklerinin simetrisi yükseldiği gözlemlendi. 0,7 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılan enjeksiyona ait kromatogramda; 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılan enjeksiyona ait kromatograma göre anlamlı bir fark olmadı. Basıncın az olması ve pik simetrisi değerlendirilerek çalışmalara 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile devam edildi.

Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntemin parametreleri Çizelge 3.1’de görülmektedir.

Çizelge 3.1. UPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemi parametreleri.

UPSK-FDD Yöntem Parametreleri				
Kolon	Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm			
Hareketli faz bileşimi	ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren): Tampon- 5 mM amonyum asetat(trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı)			
Sıcaklık (°C)	25			
Akış Programı	Akış hızı (mL dk ⁻¹)	Süre (dk)	Tampon-5 mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) (%)	ACN- (%0,15 trifloro asetik asit içeren) (%)
	0,6	0	75	25
	0,6	4	50	50
	0,6	6	40	60
	0,6	9	75	25
	0,6	10	75	25
Enjeksiyon hacmi (µL)	10			
Dalga boyu (nm)	238			

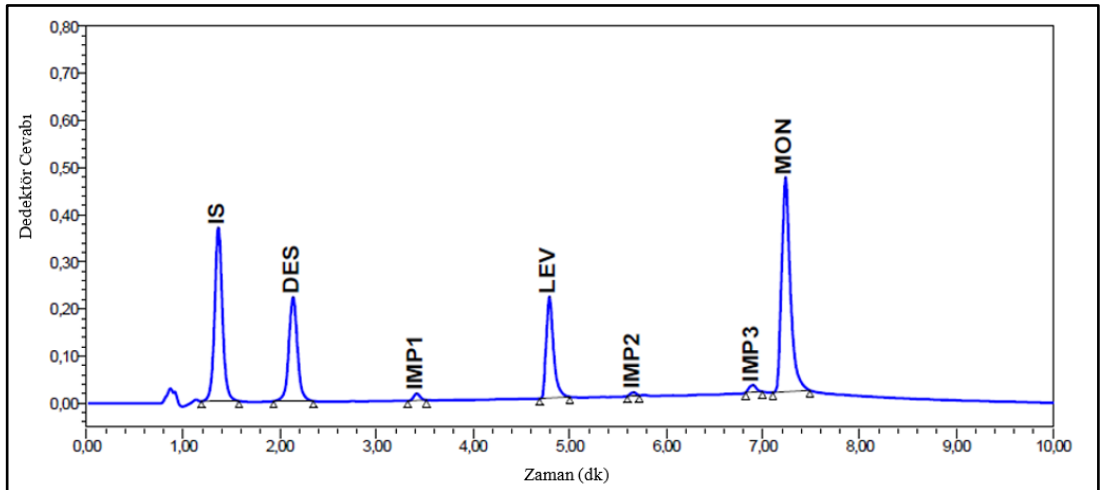
3.2.2. Sistem Uygunluk Parametreleri

Optimize edilen UPSK/FDD analiz yöntemi ile elde edilen kromatogram Şekil 3.20’de ve hesaplanan SUT parametreleri Çizelge 3.2’de görülmektedir.

Çizelge 3.2. UPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları.

	DES	IMP1	LEV	IMP2	IMP3	MON
Alıkonma zamanı (t_R)	2,14	3,42	4,79	5,66	6,90	7,24
Kapasite faktörü (k)	1,38	2,80	4,32	5,29	6,66	7,04
Ayrım gücü (R_s)	-	9,02	10,21	6,86	10,30	2,19
Kolon etkinliği (N)	2918	12446	18124	42507	41462	28104
Seçicilik (α)	-	2,03	1,55	1,22	1,26	1,06
Kuyruklanma faktörü (T)	1,04	1,09	1,42	0,95	1,06	1,38

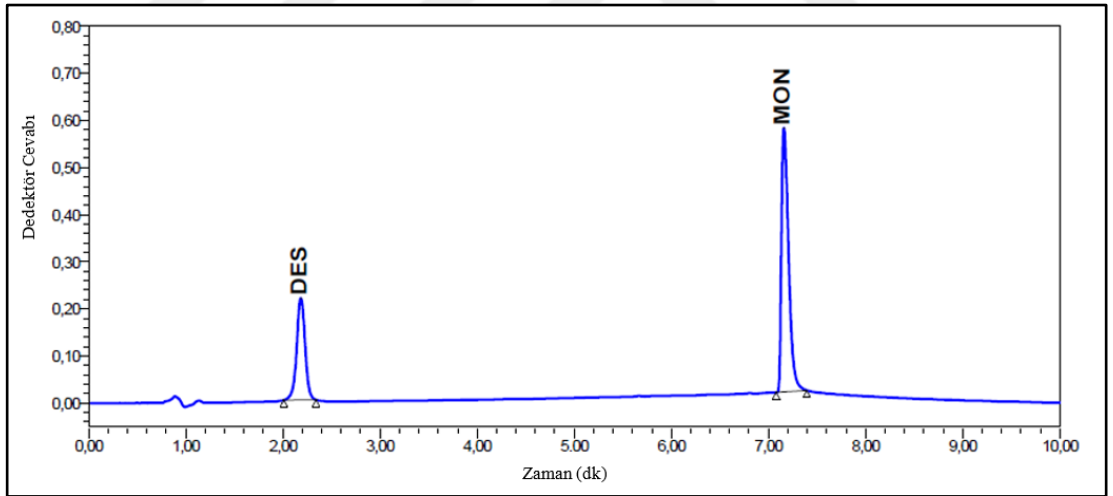
Sistem uygunluk sonuçlarına bakıldığında bütün maddeler için; kapasite faktörü 1-10 arasında, ayırım gücü 1,5’den büyük, kolon etkinliği 2000’den büyük, seçicilik 1’den büyük, kuyruklanma faktörünün 2’den küçük olduğu ve optimize edilen yöntemin sistem uygunluk şartlarını sağladığı görüldü.



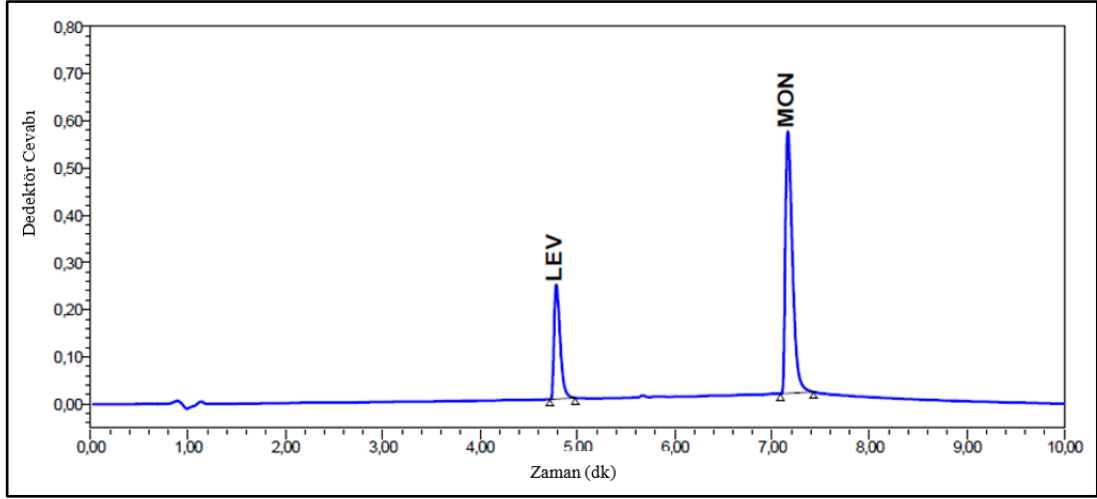
Şekil 3.20. UPSK SUT kromatogramı: Optimize edilen koşullarla; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.

3.2.3. Bozundurma Çalışmaları

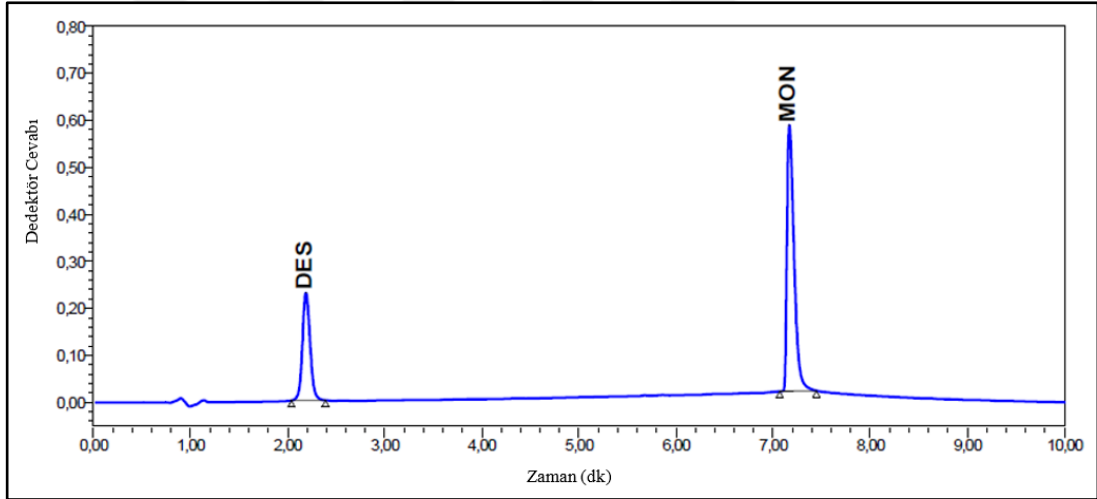
Yöntem parametreleri belirlendikten sonra, yöntemin seçiciliğini ve stabilite göstergeli olup olmadığını kontrol etmek için LORCLAST® ve LEVMONT® tablet formları üzerinden hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapıldı. Bozundurma çalışmaları kapsamında tablet çözeltisi hidroliz (Asit, Baz); oksidasyon (H_2O_2 ile); ışıktaki bozunma (tabletlerin fotostabilite cihazında 600 Wh/m^2 UV ışığı ve 1,2 milyon lüks saat gün ışığında beklemesi); sıcaklık (tabletlerin 70°C 'de etüv içerisinde beklemesi) işlemlerine maruz bırakılarak bozundurma çalışmaları yapıldı. Sonuçlar bozundurma işlemlerine maruz bırakılmamış $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ MON'a eşdeğer tablet çözeltisileri ile karşılaştırıldı ve bozunma oranları hesaplandı. Ürünü kontrollü ortamda bozunmaya uğratacak bozundurma koşullarına tabi tutarak ve bozunma ürünlerinin ve etken maddelerinin hiçbir etki olmadan sayısal olarak ölçüldüğü görüldü.



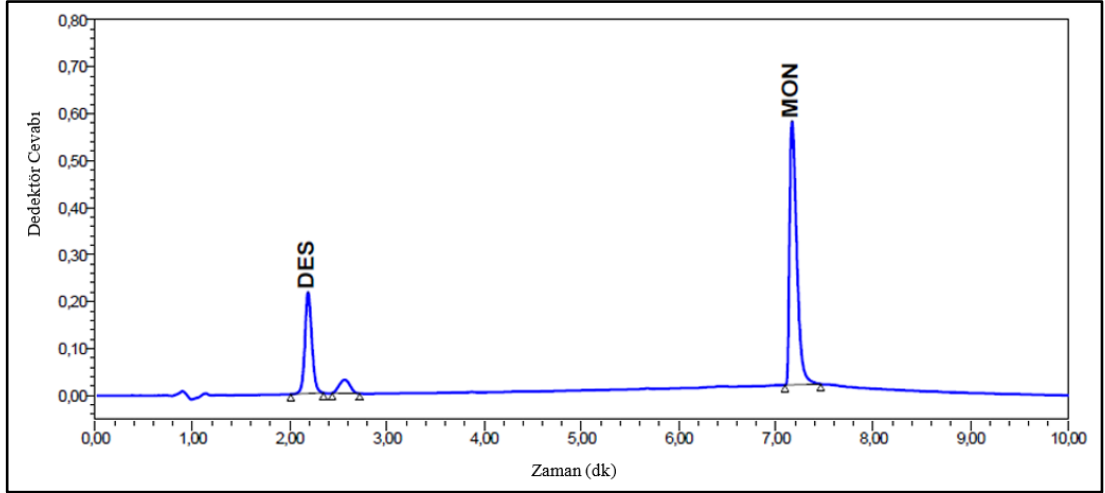
Şekil 3.21. İşlem görmemiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, $50\times 4,6\text{ mm}$, $1,8\text{ }\mu\text{m}$ kolon, 25°C , $0,6\text{ mL dk}^{-1}$ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı $3,2$ ye ayarlandı): ACN ($\%0,15$ trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



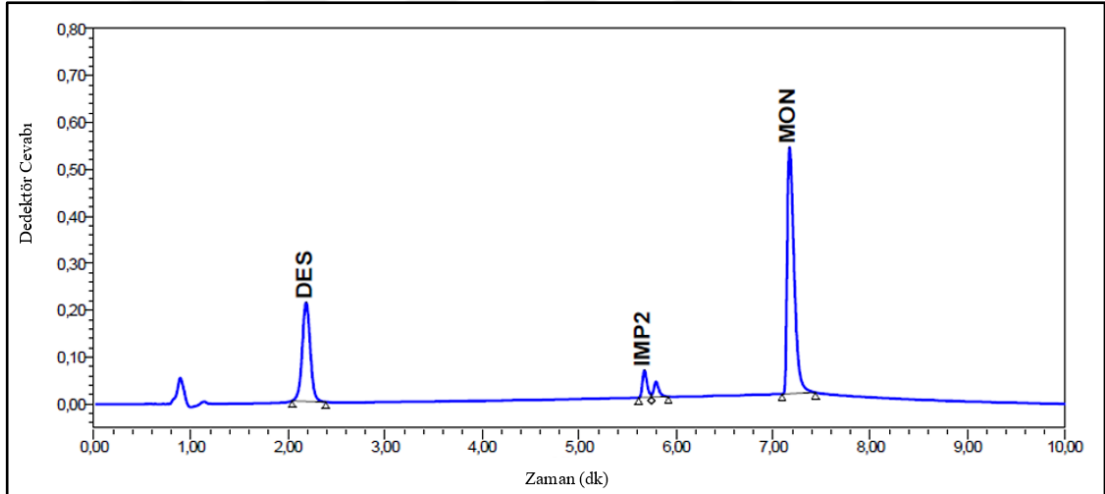
Şekil 3.22. İşlem görmemiş LEVMONT[®] tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



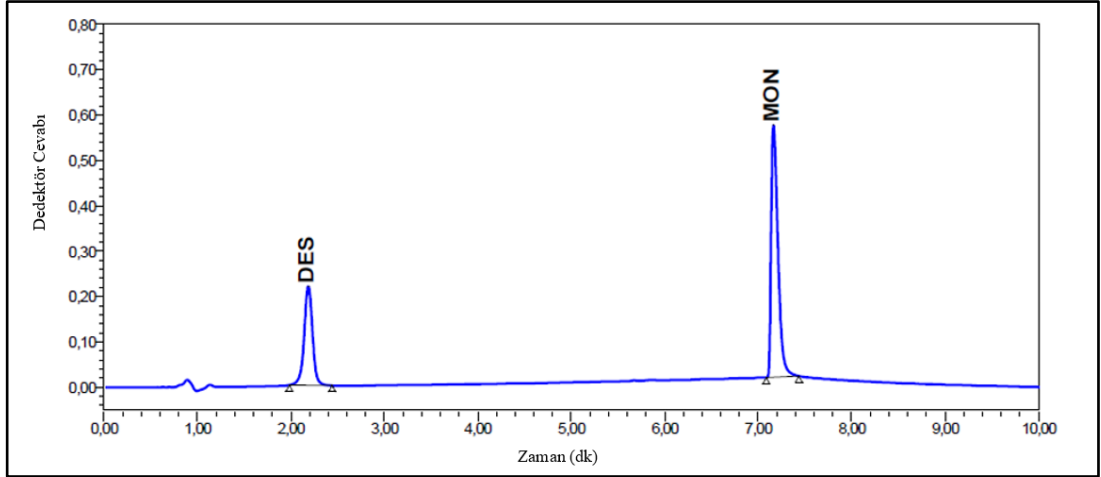
Şekil 3.23. 0,1N HCl ile asit hidrolizi yapılmış LORCLAST[®] tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



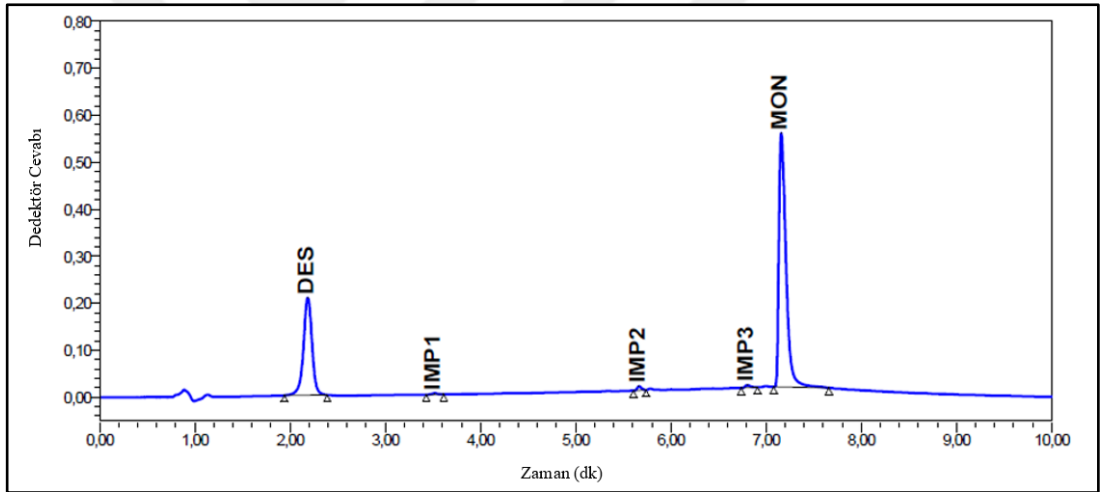
Şekil 3.24. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış LORCLAST[®] tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı); ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



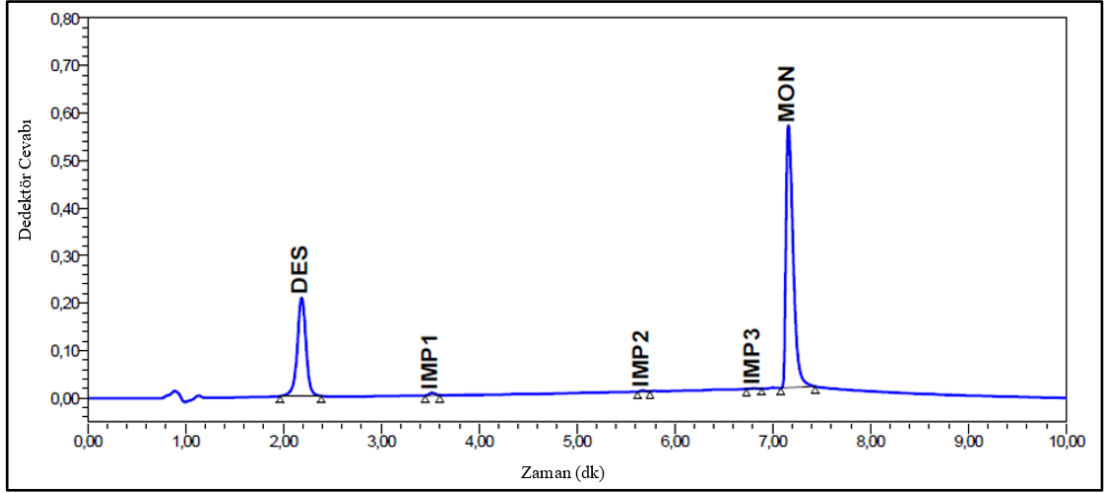
Şekil 3.25. %0,3 H₂O₂ ile oksidasyona uğratılmış LORCLAST[®] tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı); ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



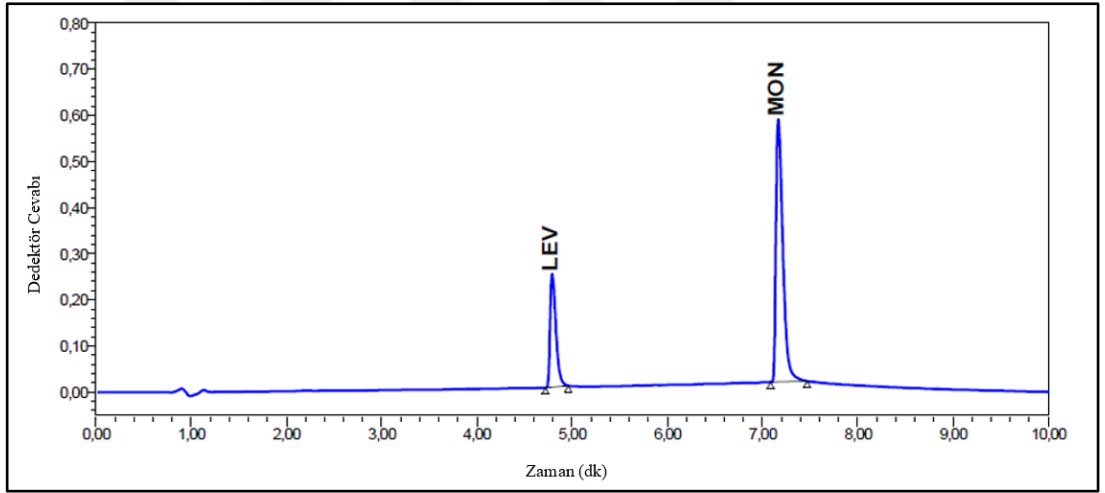
Şekil 3.26. 70°C’de etüvde 6 saat bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



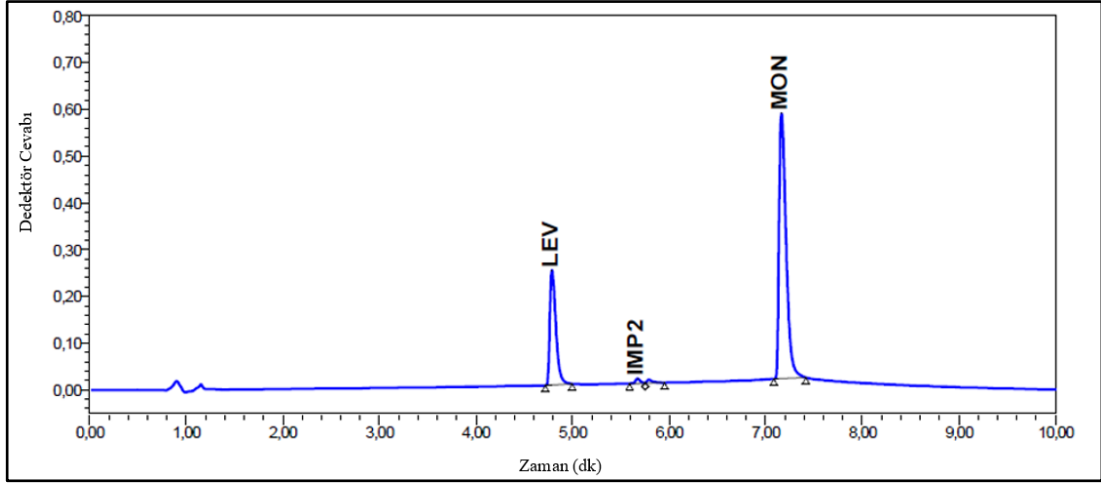
Şekil 3.27. 3,6 milyon luks saat gün ışığında 1 hafta bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



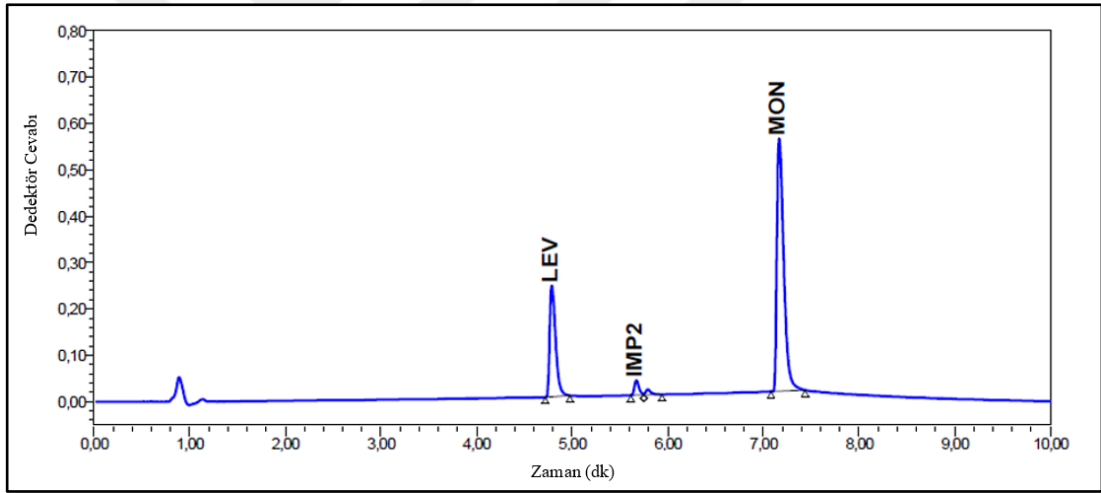
Şekil 3.28. 600 W-h/m² UV ışıktta 1 hafta bekletilmiş LORCLAST® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



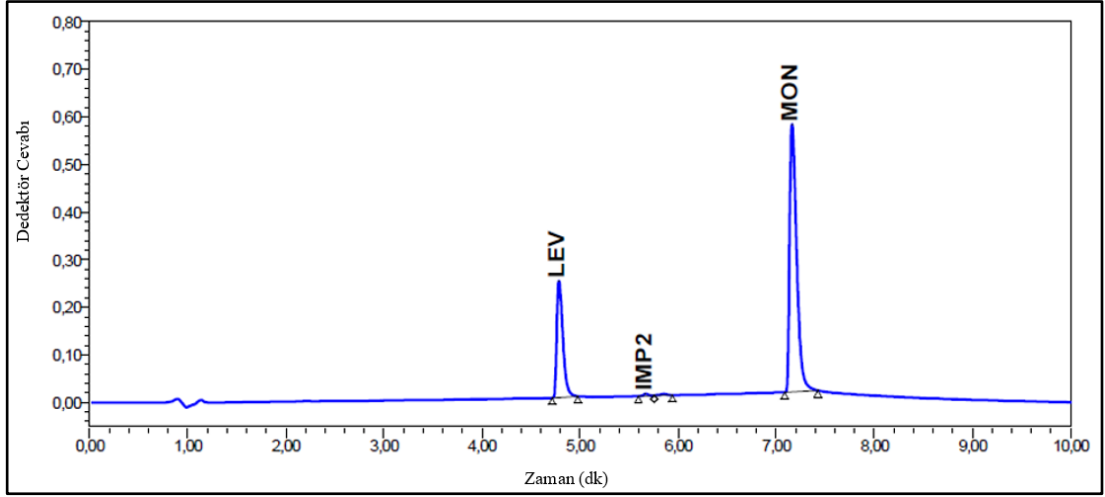
Şekil 3.29. 0,1 N HCl ile asit hidrolizi yapılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



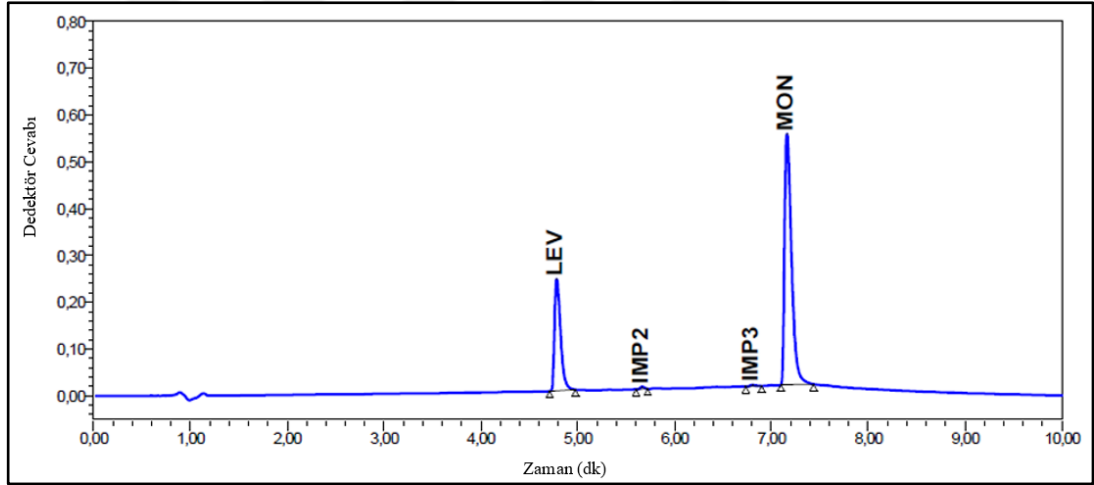
Şekil 3.30. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı); ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



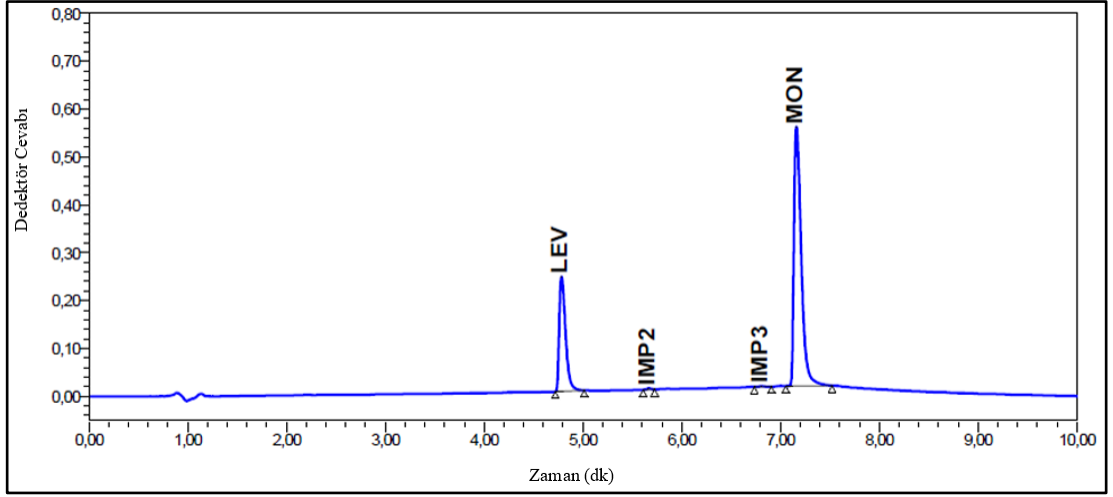
Şekil 3.31. %0,3 H₂O₂ ile oksidasyona uğratılmış LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı); ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



Şekil 3.32. 70°C'de etüvde 6 saat bekletilmiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4



Şekil 3.33. 3,6 milyon luks saat gün ışığında 1 hafta bekletilmiş LEVMONT® tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.



Şekil 3.34. 600 W-h/m² UV ışıktaki 1 hafta bekletilmiş LEVMONT[®] tablet test çözeltisine ait kromatogram; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.

Çizelge 3.3. LORCLAST® Tablet bozundurma sonuçları.

İşlen Görmemiş Tablet		Asit (0,1 N HCl) Bozundurma		Baz (0,1 N NaOH) Bozundurma		Peroksit (%0,3 H ₂ O ₂) Bozundurma Oksidasyon		Sıcaklık (70°C) Bozundurma		Gün Işığı Bozundurma		UV Işığı Bozundurma	
	Başlangıç	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	70°C Etüvde 6.Saat	Bozunma	3,6 milyon luks saat gün ıgında 1 hafta	Bozunma	600 W-h/m ² UV ışıktı 1 hafta	Bozunma
MON	%100,0	%100,0	-	%99,7	-	%91,4	%9,0	%99,9	-	%98,6	%1,7	%98,9	%1,7
DES	%99,7	%99,9	-	%82,9	%16,9	%99,1	-	%100,3	-	%99,4	%0,8	%98,1	%0,5

Çizelge 3.4. LEVMONT® Tablet bozundurma sonuçları.

İşlen Görmemiş Tablet		Asit (0,1 N HCl) Bozundurma		Baz (0,1 N NaOH) Bozundurma		Peroksit (%0,3 H ₂ O ₂) Bozundurma Oksidasyon		Sıcaklık (70°C) Bozundurma		Gün Işığı Bozundurma		UV Işığı Bozundurma	
	Başlangıç	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	80°C Su banyosunda 1.Saat	Bozunma	70°C Etüvde 6.Saat	Bozunma	3,6 milyon luks saat gün ıgında 1 hafta	Bozunma	600 W-h/m ² UV ışıktı 1 hafta	Bozunma
MON	%99,6	%99,6	-	%98,1	%2,0	%95,6	4,3	%99,4	%1,1	%97,9	%1,0	%99,1	%0,4
LEV	%99,7	%99,8	-	%99,9	-	%99,6	-	%99,3	-	%100,2	-	%100,2	-

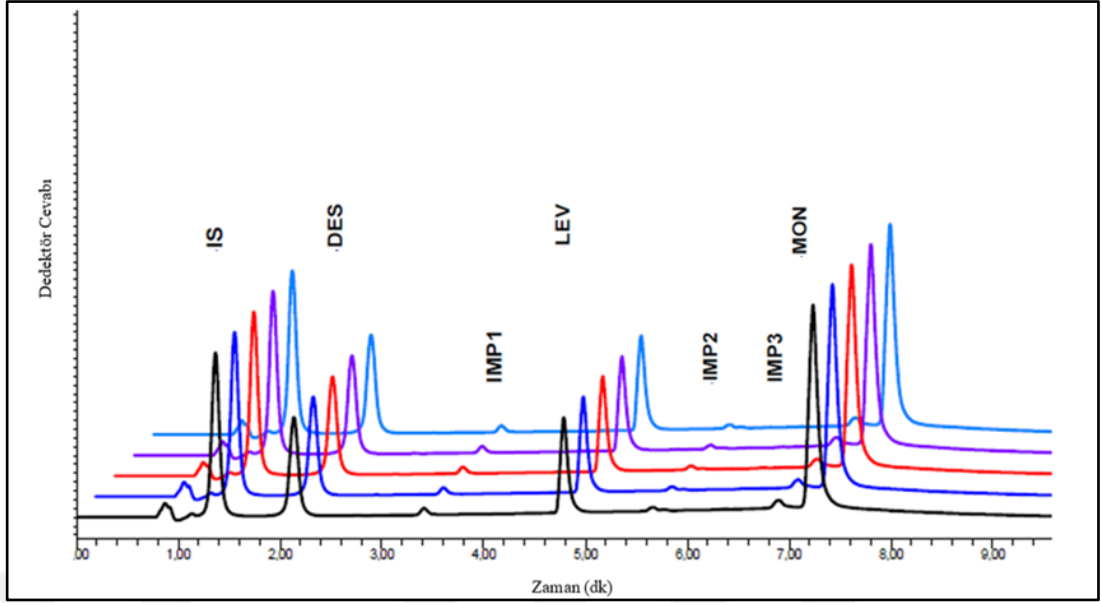
3.2.4. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)

Doğrusallık çalışması için üç etken madde ve safsızlıkları içeren, artan derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler UPSK-FDD sisteminde analiz edildi. Çözelti derişimlerine karşı elde edilen alan oranları ile grafik çizildi, her bir madde için doğrusallık çalışması yapıldı. Doğrusallık grafiğinin eğim ve kesişimi kullanılarak TS ve TAS hesaplandı. Doğrusallık çalışması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.5'te görölmektedir.

Çizelge 3.5. UPSK-FDD yönteminin doğrusallık çalışması sonuçları.

	DES	IMP1	LEV	IMP2	IMP3	MON
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,50-100	0,10-4	0,5-100	0,20-4	0,20-4	1,0-200
Eğim	0,4012	0,4797	0,3278	0,2101	0,5433	0,4153
Kesişim	0,0017	-0,00001	-0,0003	0,00004	0,00002	-0,0003
Korelasyon katsayısı	0,9996	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Eğimin standart hatası	0,004	0,001	0,0009	0,0008	0,0005	0,002
Kesişimin standart hatası	0,003	0,00008	0,001	0,00005	0,00003	0,0005
TS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,149	0,021	0,122	0,047	0,037	0,240
TAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,452	0,063	0,369	0,144	0,111	0,727
Tekrar edilebilirlik(Gün içi) % BSS*	0,17	0,31	0,14	0,32	0,79	0,10
Tekrar edilebilirlik(Günler arası) % BSS*	0,09	0,63	0,19	0,28	0,36	0,35

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.



Şekil 3.35. UPSK-FDD terarlanabilirlik çalışması; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan arka arkaya 5 enjeksiyona ait kromatogram (Değişimler piklerin geliş sırasına göre µg mL⁻¹ olarak; IS: 30, DES: 50, IMP1: 2, LEV: 50, IMP2: 2, IMP3: 2, MON: 100).

3.2.5. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar

MON, DES, LEV içeren tabletlerin analizini yapabilmek amacı ile ikili etken madde içeren şekilde bulunan tabletler kullanılarak test çözeltileri hazırlandı ve optimize edilen yöntem ile analizi yapıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler ile kalibrasyon denkleminde yararlanılarak tabletlerin içerdiği MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 miktarları hesaplandı. Tablet çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ve 3.7’de görülmektedir.

Çizelge 3.6. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST®) Tablet için UPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları.

	MON	DES
Etiket miktarı (mg)	10	5
Test 1	9,96	5,10
Test 2	9,97	4,94
Test 3	9,97	5,08
Test 4	10,00	4,94
Test 5	9,97	5,07
Bulunan miktar sonucu (Ortalama) (mg)	9,97	5,03
BSS (%)*	0,20	1,59
BH (%)	0,30	-0,60

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.

Çizelge 3.7. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin (LEV MONT®) Tablet için UPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları.

	MON	LEV
Etiket miktarı (mg)	10	5
Test 1	10,12	4,98
Test 2	10,05	4,95
Test 3	10,15	4,96
Test 4	10,19	4,85
Test 5	10,02	4,86
Bulunan miktar sonucu (Ortalama) (mg)	10,11	4,92
BSS (%)*	0,69	1,22
BH (%)	-1,10	1,60

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.

3.2.6. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 moleküllerinin miktarlarının belirlenebilmesi için geliştirilen UPSK-FDD yöntemi piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Piyasa preparatları MON ve DES içeren ile MON ve LEV içeren olarak iki adettir. İlaç formu oluşturulurken kullanılan yardımcı maddelerin maddelerinin analiz yönteminde, tayin edilecek maddeler ile aynı yerde girişim yapıp yapmadığını anlamak amacı ile geri kazanım çalışması yapıldı.

MON-DES ve MON-LEV içeren tabletlerin analizi için tablet çözeltileri hazırlandı ve saf MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 moleküllerini içeren çözeltiler ile aynı anda analizi yapıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler ile kalibrasyon denkleminde yararlanılarak tabletlerin içerdiği MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 miktarları hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8.a, 3.8.b, 3.9.a, 3.9.b görülmektedir.

Çizelge 3.8. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet etken maddelerine ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

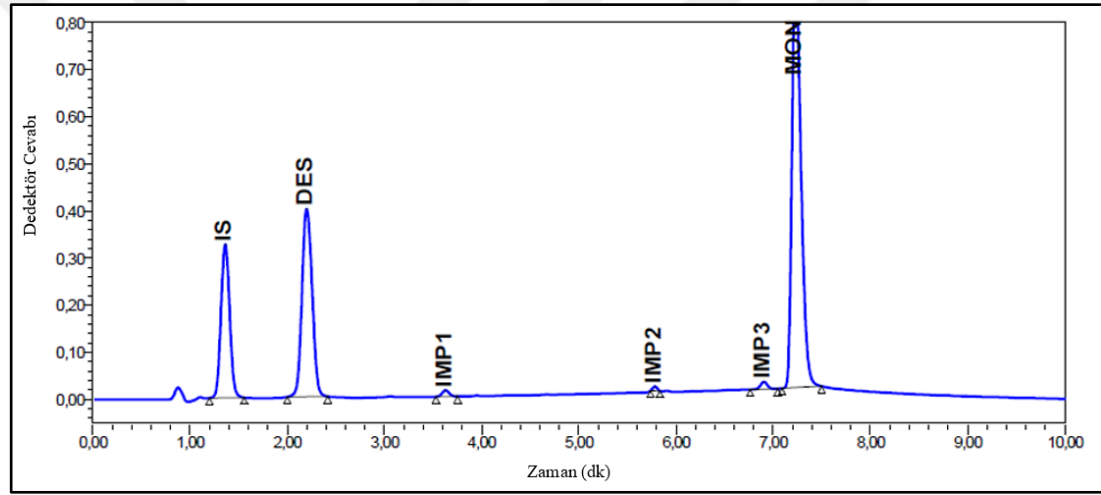
	MON	DES
Etiket miktarı (mg)	10	5
Tablet analizi sonucu miktar (mg)	9,97	5,03
BSS (%) [*]	0,20	1,59
BH (%)	0,30	-0,60
Eklenen miktar (mg)	9,92	5,15
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	9,77	5,22
Geri kazanım (%)	98,5	101,3
BSS (%) [*]	0,70	0,96
BH (%)	1,49	-1,33

^{*}Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.

Çizelge 3.8. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet için safsızlıklara ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

	IMP1	IMP2	IMP3
Eklenen miktar (mg)	0,189	0,186	0,186
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	0,186	0,183	0,185
Geri kazanım (%)	98,2	98,4	99,5
BSS (%)*	1,77	1,40	1,78
BH (%)	1,76	1,61	0,51

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.



Şekil 3.36. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet UPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4.

Çizelge 3.9. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet etken maddelerine ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

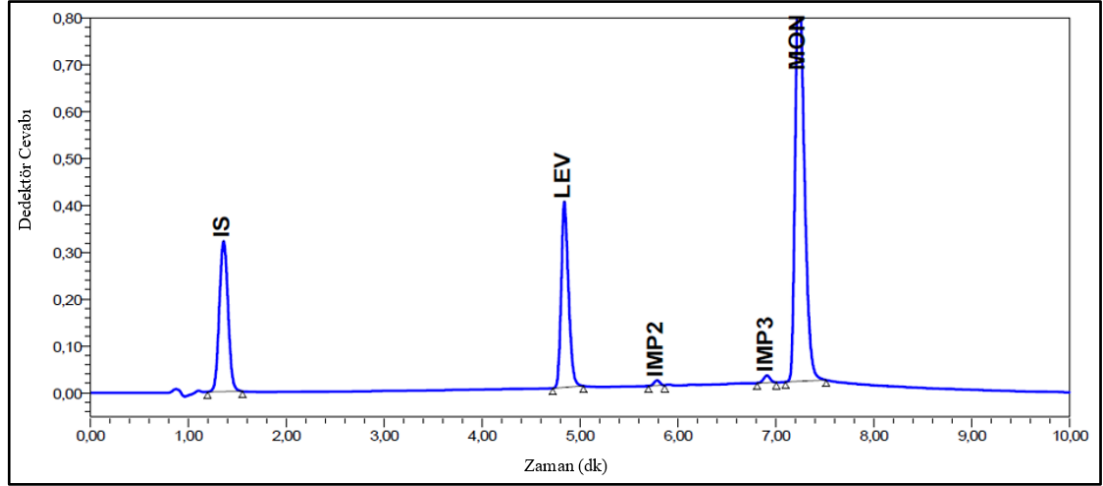
	MON	LEV
Etiket miktarı (mg)	10	5
Tablet analizi sonucu miktar (mg)	10,11	4,92
BSS (%)*	0,69	1,22
BH (%)	-1,10	1,60
Eklenen miktar (mg)	9,92	5,02
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	9,85	5,00
Geri kazanım (%)	99,3	99,5
BSS (%)*	0,87	2,14
BH (%)	0,68	0,48

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır

Çizelge 3.9. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet safsızlıklara ait UPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

	IMP2	IMP3
Eklenen miktar (mg)	0,202	0,199
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	0,201	0,196
Geri kazanım (%)	99,6	98,2
BSS (%)*	1,87	1,70
BH (%)	0,40	1,81

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır.



Şekil 3.37. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet UPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon, 25°C, 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4

3.2.7. Sağlamlık Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Sağlamlık çalışması için üç etken madde ve safsızlıkları içeren çözelti hazırlandı. Bu çözelti dalga boyu ve tampon çözelti pH parametrelerinde küçük değişiklik yapılmış UPSK-FDD sisteminde analiz edildi. Yöntemin sağlamlığının belirlenmesi için yapılan küçük değişiklikler sonrası sistem uygunluk testleri yapıldı. Sağlamlık çalışması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.10.a-b ve 3.11.a-b’de görülmektedir.

Çizelge 3.10. a. UPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Dalga boyunda -2’lik değişim (Dalga boyu: 236 nm)			Dalga boyunda +2’lik değişim (Dalga boyu: 240 nm)			Dalga boyu: 238 nm		
	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON
Alıkonma zamanı (tR)	2,14	4,79	7,23	2,14	4,79	7,23	2,14	4,79	7,24
Kolon etkinliği (N)	2986	20426	31357	3041	20857	31799	2918	18124	28104
Kuyruklanma faktörü (T)	1,04	1,44	1,47	1,04	1,34	1,39	1,04	1,42	1,38

Çizelge 3.10. b. UPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Dalga boyunda -2'lik değişim (Dalga boyu: 236 nm)			Dalga boyunda +2'lik değişim (Dalga boyu: 240 nm)			Dalga boyu: 238 nm		
	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3
Alıkonma zamanı (tR)	3,41	5,65	6,89	3,41	5,66	6,89	3,42	5,66	6,90
Kolon etkinliği (N)	13119	42355	4650	13696	42869	45676	12446	42507	41462
Kuyruklanma faktörü (T)	1,08	0,89	0,94	1,04	0,82	0,96	1,09	0,95	1,06

Çizelge 3.11. a. UPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Tampon pH'sında - 0,05'lik değişim(pH:3,15)			Tampon pH'sında +0,05'lik değişim(pH:3,25)			Tampon pH:3,2		
	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON
Alıkonma zamanı (tR)	2,13	4,78	7,23	2,14	4,79	7,23	2,14	4,79	7,24
Kolon etkinliği (N)	2991	20534	31631	2922	17728	27262	2918	18124	28104
Kuyruklanma faktörü (T)	1,05	1,45	1,43	1,04	1,42	1,42	1,04	1,42	1,38

Çizelge 3.11. b. UPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Tampon pH'sında - 0,05'lik değişim(pH:3,15)			Tampon pH'sında +0,05'lik değişim(pH:3,25)			Tampon pH:3,2		
	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3
Alıkonma zamanı (tR)	3,41	5,65	6,89	3,41	5,66	6,90	3,42	5,66	6,90
Kolon etkinliği (N)	13126	46795	45909	11927	38880	38143	12446	42507	41462
Kuyruklanma faktörü (T)	1,12	0,95	0,96	1,09	0,83	0,95	1,09	0,95	1,06

3.3. Montelukast, Desloratadin, Levosetirizin ve safsızlıkları (Imp1, Imp2, Imp3) için Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları

Geliştirilmiş ve valide edilmiş olan analiz yöntemi UPSK'dan YPSK ya transfer edilmek sureti ile YPSK yöntemi optimizasyonu amaçlandı. MON, DES ve LEV maddelerinin ve safsızlıklarının aynı anda analizi için uygun; akış süresi en kısa olacak şekilde YPSK yönteminin optimizasyonu yapıldı.

3.3.1. YPSK Sistemi ile Analitik Yöntem Çalışmaları

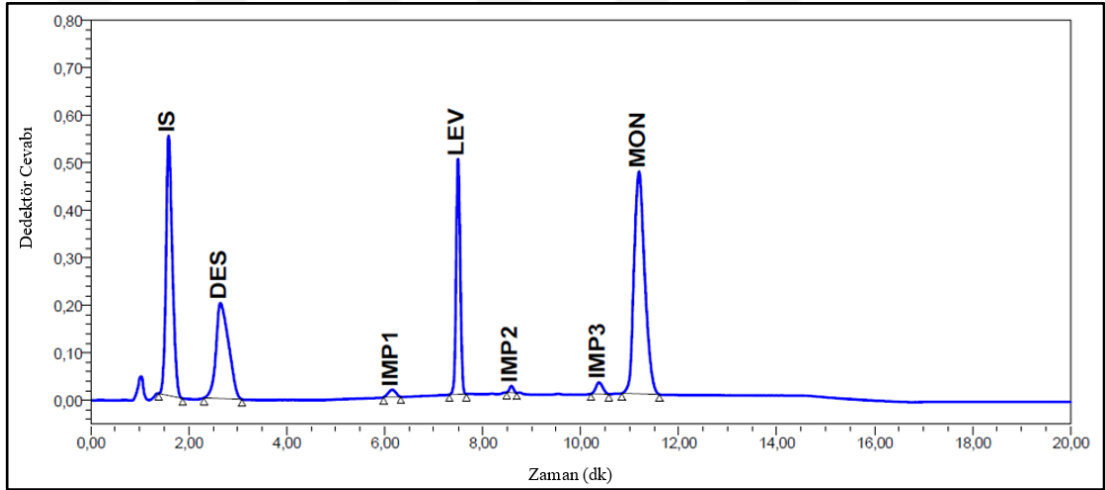
MON, DES ve LEV maddelerinin ve safsızlıklarının aynı anda YPSK yöntemiyle analizinde uygun; akış süresi en kısa olacak şekilde kromatografik koşulların belirlenmesi için hareketli faz içeriğinin etkisi incelendi. Diğer parametreler (Tampon çözelti molaritesi, sabit faz, vb.) UPSK yönteminden YPSK ya uyarlandı; benzer özellikteki çözelti ve sabit faz kullanılarak uygulandı.

3.3.1.1. Hareketli Faz İçeriği

UPSK-FDD yönteminde optimize edildiği gibi; SK-KS ile molekül ağırlığını da tayin edebilmek için SK-KS yöntemlerinde kullanılabilen bir tampon çözelti olan Triflouroasetik asit ve Amonyum asetat içeren tampon çözeltiler çalışmalar yapıldı. MON, DES, LEV moleküllerinin ve safsızlıklarını aynı anda YPSK ile analizi için akış programları ile enjeksiyonlar yapıldı. YPSK cihazının bir hareketli faz kanalına 5 mM Amonyum asetat(Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): (Hareketli FazA), diğer bir kanalına ise ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) (Hareketli FazB), konularak çalışmalara başlandı. Bu çalışmalarda Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon kullanıldı. Diğer koşullar sıcaklık, dalga boyu, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm ve 20 µL uygulandı. Kolon boyu 2 katına çıktığı için, analiz süresinin uzamaması amacı ile akış hızı 1,2 mL dk⁻¹ olarak ayarlandı.

UPSK yöntemine benzer oranlarda akış programı hazırlanarak çalışmaya başlandı. Farklı hareketli faz oranları ile yapılan enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 3.38, 3.39, 3.40 de görülmektedir.

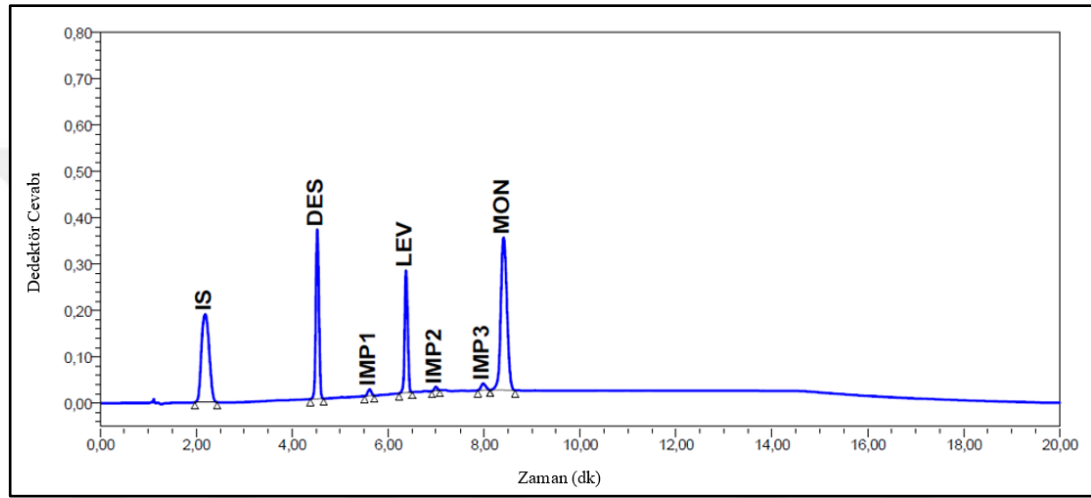
Akış Programı 5			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	1,2	75	25
3	1,2	75	25
6	1,2	50	50
13	1,2	50	50
15	1,2	75	25
20	1,2	75	25



Şekil 3.38. Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 5 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 5 ile yapılan çalışmalarda kapasite faktörü düşük bulundu ve DES simetri faktörü uygun değildir. Optimizasyon çalışmalarına Akış programı 6 ile devam edildi.

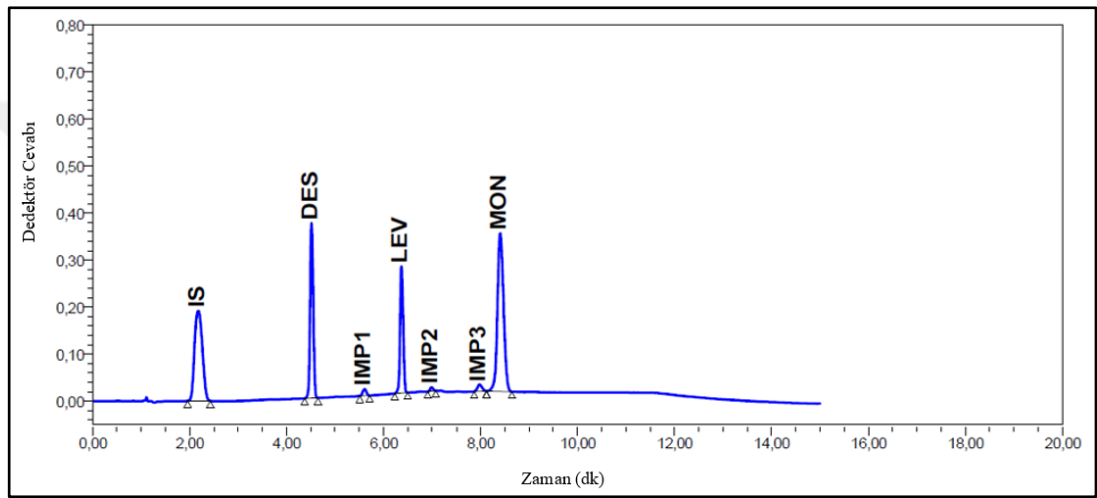
Akış Programı 6			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
Başlangıç	1,2	85	15
1	1,2	85	15
5	1,2	45	55
13	1,2	45	55
18	1,2	85	15
20	1,2	85	15



Şekil 3.39. Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 6 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 6 ile yapılan çalışmalarda IMP1, LEV, IMP2, IMP3 ve MON arasında ayrışma sağlandı ve kapasite faktörü yeterli bulundu ($1 \leq k \leq 10$). SUT parametrelerine uygun daha kısa bir akış programı oluşturmak amacı Akış Programı 7 oluşturuldu.

Akış Programı 7			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
Başlangıç	1,2	85	15
1	1,2	85	15
5	1,2	45	55
10	1,2	45	55
13	1,2	85	15
15	1,2	85	15



Şekil 3.40. Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, 20 µL enjeksiyon hacmi, akış programı 7 ile yapılan çalışmalarda elde edilen kromatogram.

Akış programı 7 ile SUT parametreleri sağlanarak süre 15 dk olarak kısaltıldı. Bundan sonraki çalışmalara bu program ile devam edildi ve kromatogram süresi 15 dk olarak alındı.

Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntemin parametreleri Çizelge 3.12’de görülmektedir.

Çizelge 3.12. YPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemi parametreleri

YPSK-FDD Yöntem Parametreleri				
Kolon	Inertsil, Ph3 100×4,6 mm, 3µm			
Hareketli faz bileşimi	ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren): Tampon- 5 mM Amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı)			
Sıcaklık (°C)	25			
Akış programı	Akış hızı (mL dk ⁻¹)	Süre (dk)	Tampon-5 mM Amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) (%)	ACN- (%0,15 trifloro asetik asit içeren) (%)
	1,2	0	85	15
	1,2	1	85	15
	1,2	5	45	55
	1,2	10	45	55
	1,2	13	85	15
	1,2	15	85	15
Enjeksiyon hacmi (µL)	20			
Dalga boyu (nm)	238			

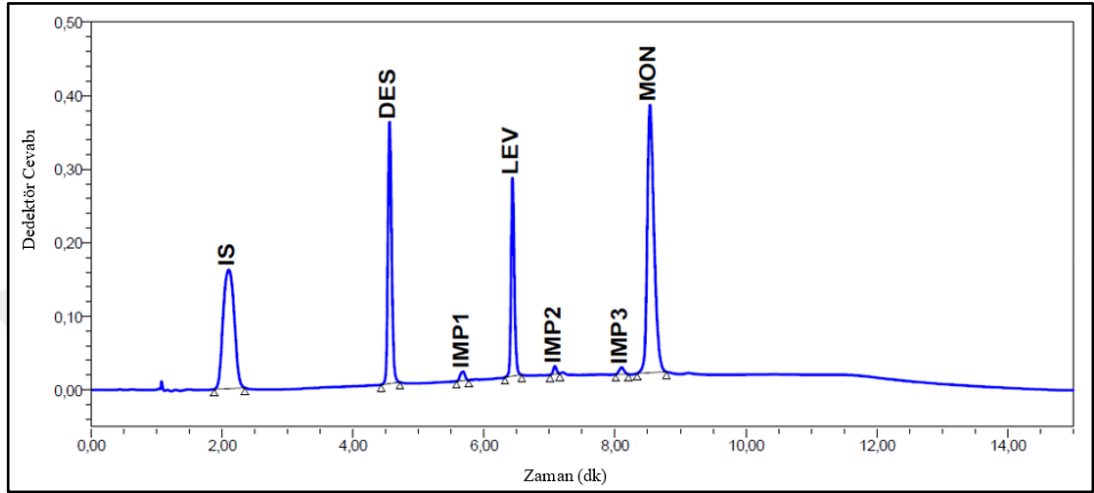
3.3.2. Sistem Uygunluk Parametreleri

Optimize edilen YPSK/FDD analiz yöntemi ile elde edilen kromatogram Şekil 3.41 ve hesaplanan SUT parametreleri Çizelge 3.13 de görülmektedir.

Çizelge 3.13. YPSK-FDD cihazı ile geliştirilmiş analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları.

	DES	IMP-1	LEV	IMP-2	IMP-3	MON
Alıkonma zamanı (t _R)	4,56	5,68	6,44	7,08	8,10	8,54
Kapasite faktörü (k)	3,56	4,68	5,44	6,08	7,10	7,54
Ayrım gücü (R _S)	-	9,65	6,98	6,90	8,52	2,59
Kolon etkinliği (N)	29587	31844	83117	87922	53001	32727
Seçicilik (α)	-	1,32	1,16	1,12	1,17	1,06
Kuyruklanma faktörü (T)	1,17	0,88	1,22	1,0	1,08	1,34

Sistem uygunluk sonuçlarına bakıldığında bütün maddeler için; kapasite faktörü 1-10 arasında, ayırım gücü 1,5'dan büyük, kolon etkinliği 2000'den büyük, seçicilik 1'den büyük, kuyruklanma faktörünün 2'den küçük olduğu ve optimize edilen yöntemin sistem uygunluk şartlarını sağladığı görüldü.



Şekil 3.41. YPSK-FDD SUT kromatogramı: Optimize edilen koşullarla; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram

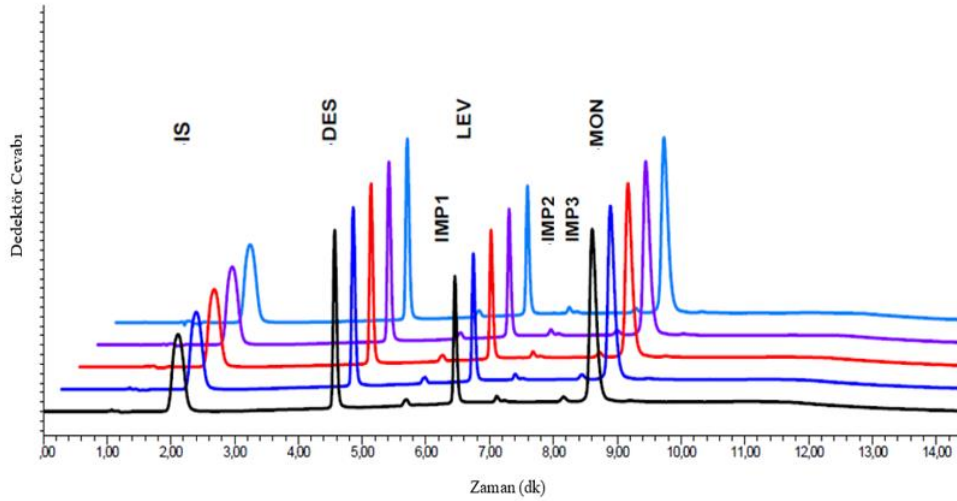
3.3.3. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)

Doğrusallık çalışması için üç etken madde ve safsızlıkları içeren, artan derişimlerde çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler YPSK-FDD sisteminde analiz edildi. Çözelti derişimlerine karşı elde edilen alan oranları ile grafik çizildi ve her bir madde için doğrusallık çalışması yapıldı. Doğrusallık grafiğinin eğim ve kesişimi kullanılarak TS ve TAS hesaplandı. Doğrusallık çalışması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.14'de görülmektedir.

Çizelge 3.14. YPSK-FDD yönteminin doğrusallık çalışması sonuçları

	DES	IMP-1	LEV	IMP-2	IMP-3	MON
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,50-100	0,10-4	0,50-100	0,10-4	0,10-4	1,0-200
Eğim	0,4463	0,4658	0,3026	0,3128	0,5098	0,4200
Kesişim	0,0009	-0,00003	0,0001	-0,00002	-0,000004	0,0010
Korelasyon katsayısı	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Eğimin standart hatası	0,0007	0,001	0,00021	0,0009	0,00006	0,0005
Kesişimin standart hatası	0,0011	0,00007	0,00035	0,00006	0,0010	0,0016
TS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,112	0,021	0,165	0,032	0,020	0,237
TAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,338	0,065	0,499	0,097	0,059	0,719
Tekrar edilebilirlik (Gün içi) % BSS*	0,26	0,63	0,20	0,62	0,82	0,19
Tekrar edilebilirlik (Günler arası) % BSS*	0,13	0,32	0,79	0,47	0,29	0,07

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır



Şekil 3.42. YPSK-FDD tekrarlanabilirlik çalışması; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3 μm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz: 5 mM Amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 4 ile yapılan arka arkaya 5 enjeksiyona ait kromatogram (Derişimler piklerin geliş sırasına göre $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak; IS: 30, DES: 50, IMP1: 2, LEV: 50, IMP2: 2, IMP3: 2, MON: 100)

3.3.4. Tablet Çalışmalarına Ait Sonuçlar

MON, DES, LEV içeren tabletlerin analizini yapabilmek amacı ile ikili etken madde içeren şekilde bulunan tabletler kullanılarak test çözeltileri hazırlandı ve optimize edilen yöntem ile analizi yapıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler ile kalibrasyon denkleminde yararlanılarak tabletlerin içerdiği MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 miktarları hesaplandı. Tablet çalışmalarından elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15 ve 3.16’de görülmektedir.

Yapılan çalışmalar ile UPSK-FDD ve YPSK-FDD olmak üzere iki adet analiz yöntemi geliştirildi. Her bir yöntem ile yapılan analiz sonuçlarının eşdeğerliğini göstermek için F-t testi uygulandı. (Çizelge 3.17,3.18). F değeri F_{teorik} değerinden, t değeri de t_{teorik} değerinden küçük bulundu. F-t testine göre her iki yöntemin birbirine eşdeğer olduğu görüldü.

Çizelge 3.15. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST®) Tablete ait YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları.

	MON	DES
Etiket miktarı (mg)	10	5
Test 1	10,02	4,96
Test 2	9,98	5,01
Test 3	9,97	5,00
Test 4	10,02	5,03
Test 5	10,01	4,97
Bulunan ortalama miktar (mg)	10,00	4,99
BSS (%)*	0,20	0,60
BH (%)	0	0,20

Çizelge 3.16. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin Dihidroklörür (LEV MONT[®]) Tablete ait YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları.

	MON	LEV
Etiket miktarı (mg)	10	5
Test 1	10,17	4,89
Test 2	10,12	4,90
Test 3	10,14	4,89
Test 4	10,11	4,95
Test 5	10,10	4,92
Bulunan ortalama miktar (mg)	10,13	4,91
BSS (%) [*]	0,30	0,61
BH (%)	-1,30	1,80

Çizelge 3.17. 10 mg Montelukast + 5 mg Desloratadin (LORCLAST[®]) Tablete ait UPSK-FDD ve YPSK-FDD Yöntemi ile test sonuçları, F ve t değerleri.

	MON		DES	
	UPSK-FDD	YPSK-FDD	UPSK-FDD	YPSK-FDD
Numune 1	9,96	10,02	5,10	4,96
Numune 2	9,97	9,98	4,94	5,01
Numune 3	9,97	9,97	5,08	5,00
Numune 4	10,00	10,02	4,94	5,03
Numune 5	9,97	10,01	5,07	4,97
Ortalama miktar (mg)	9,97	10,00	5,03	4,99
F değeri (F _{teorik:6,39})	1,69		0,30	
t değeri (t _{teorik: 2,31})	2,08		0,85	

Çizelge 3.18. 10 mg Montelukast + 5 mg Levosetirizin Dihidroklörür (LEV MONT[®]) Tablete ait UPSK-FDD ve YPSK-FDD yöntemi ile test sonuçları, F ve t değerleri.

	MON		LEV	
	UPSK-FDD	YPSK-FDD	UPSK-FDD	YPSK-FDD
Numune 1	10,12	10,17	4,98	4,89
Numune 2	10,05	10,12	4,95	4,90
Numune 3	10,15	10,14	4,96	4,89
Numune 4	10,19	10,11	4,85	4,95
Numune 5	10,02	10,10	4,86	4,92
Ortalama miktar (mg)	10,11	10,13	4,92	4,91
F değeri (F _{teorik:6,39})	1,55		0,20	
t değeri (t _{teorik: 2,31})	0,65		0,34	

3.3.5. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 moleküllerinin miktarlarının belirlenebilmesi için geliştirilen YPSK-FDD yöntemi piyasa preparatlarına uygunlandı. Piyasa preparatları MON ve DES içeren ile MON ve LEV içeren olarak iki adettir. İlaç formu oluşturulurken kullanılan yardımcı maddelerin maddelerinin analiz yönteminde, tayin edilecek maddeler ile aynı yerde girişim yapıp yapmadığını anlamak amacı ile geri kazanım çalışması yapıldı.

MON-DES ve MON-LEV içeren tabletlerin analizi için tablet çözeltileri hazırlandı ve saf MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 moleküllerini içeren çözeltiler ile aynı anda analizi yapıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen veriler ile kalibrasyon denkleminde yararlanılarak tabletlerin içerdiği MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 miktarları hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.19.a, 3.19.b, 3.20.a, 3.20.b’de görülmektedir.

Çizelge 3.19. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet etken maddelerine ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

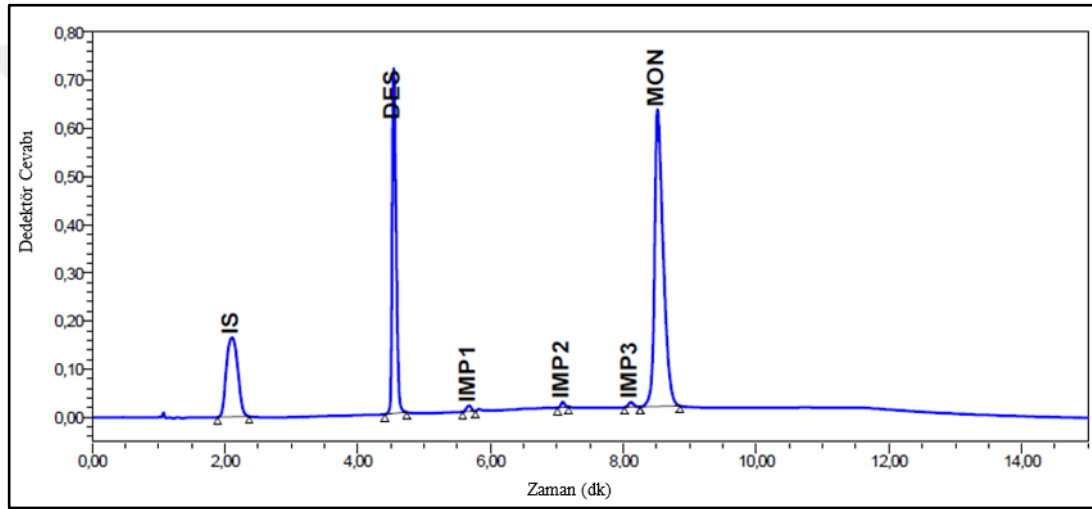
	MON	DES
Etiket miktarı (mg)	10	5
Tablet analizi sonucu miktar (mg)	10,00	4,99
BSS (%)*	0,20	0,60
BH (%)	0	0,20
Eklenen miktar (mg)	9,92	4,98
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	9,84	4,91
Geri kazanım (%)	99,2	98,7
BSS (%)*	0,76	0,74
BH (%)	0,80	1,28

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır

Çizelge 3.19. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet safsızlıklara ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

	IMP1	IMP2	IMP3
Eklenen miktar (mg)	0,200	0,191	0,199
Geri Kazanım Analiz Sonucu Miktar (mg)	0,201	0,193	0,199
Geri kazanım (%)	100,5	101,1	99,8
BSS (%)*	1,93	1,33	1,88
BH (%)	-0,52	-1,14	0,17

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır



Şekil 3.43. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Desloratadin Tablet YPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), Akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram.

Çizelge 3.20. a. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablete ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

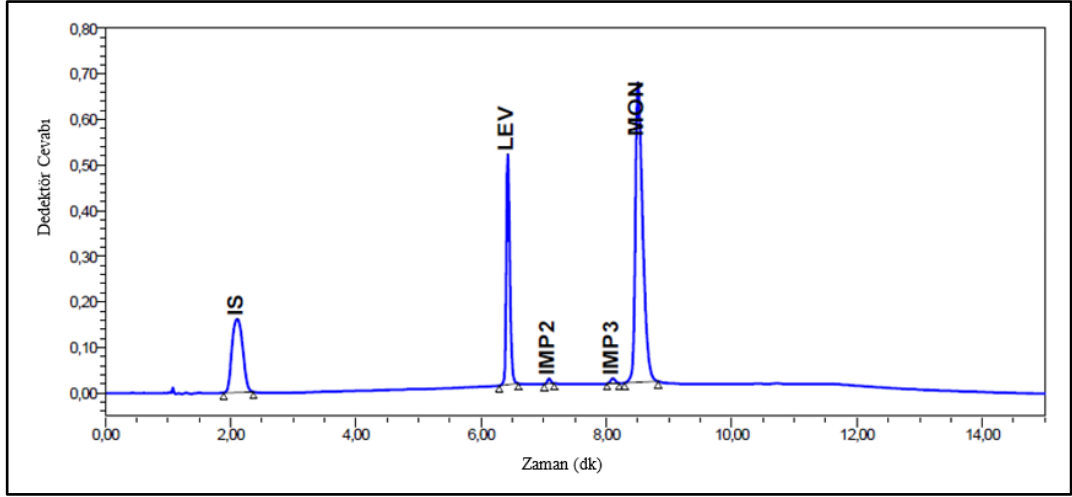
	MON	LEV
Etiket miktarı (mg)	10	5
Tablet analizi sonucu miktar (mg)	10,13	4,91
BSS (%) *	0,30	0,61
BH (%)	-1,30	-1,8
Eklenen miktar (mg)	9,92	4,95
Geri kazanım analiz sonucu miktar (mg)	9,86	4,90
Geri kazanım (%)	99,4	98,9
BSS (%) *	0,95	1,66
BH (%)	0,62	1,10

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır

Çizelge 3.20. b. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet için safsızlıklara ait YPSK-FDD yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları.

	IMP2	IMP3
Eklenen miktar (mg)	0,193	0,199
Geri Kazanım Analiz Sonucu Miktar (mg)	0,191	0,199
Geri kazanım (%)	99,3	99,7
BSS (%) *	1,89	1,68
BH (%)	0,73	0,28

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır



Şekil 3.44. 10 mg Montelukast Sodyum + 5 mg Levosetirizin Tablet YPSK-FDD yöntemi ile geri kazanım kromatogramı; Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon, 25°C, 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı, 238 nm dalga boyu, hareketli faz:5 mM amonyum asetat (Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı); ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren), akış programı 7 ile yapılan enjeksiyona ait kromatogram.

3.3.6. Sağlamlık Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Sağlamlık çalışması için üç etken madde ve safsızlıkları içeren çözelti hazırlandı. Bu çözelti dalga boyu ve tampon çözelti pH parametrelerinde küçük değişiklik yapılmış YPSK-FDD sisteminde analiz edildi. Yöntemin sağlamlığının belirlenmesi için yapılan küçük değişiklikler sonrası sistem uygunluk testleri yapıldı. Sağlamlık çalışması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.21.a-b ve 3.22.a-b’de görülmektedir.

Çizelge 3.21. a. YPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Dalga boyunda -2’lik değişim (Dalga boyu: 236 nm)			Dalga boyunda +2’lik değişim (Dalga boyu: 240 nm)			Dalga boyu: 238 nm		
	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON
Alıkonma zamanı (tR)	4,50	6,35	8,37	4,50	6,35	8,38	4,56	6,44	8,54
Kolon etkinliği (N)	12884	19953	13485	12912	19912	13576	29587	83117	32727
Kuyruklanma faktörü (T)	1,31	1,27	1,31	1,31	1,28	1,31	1,17	1,22	1,34

Çizelge 3.21. b. YPSK-FDD yönteminde dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Dalga boyunda -2'lik değişim (Dalga boyu: 236 nm)			Dalga boyunda +2'lik değişim (Dalga boyu: 240 nm)			Dalga boyu: 238 nm		
	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3
Alıkonma zamanı (tR)	5,60	6,97	7,95	5,60	6,97	7,96	5,68	7,08	8,10
Kolon etkinliği (N)	16142	69969	26254	17497	51469	24542	31884	87922	53001
Kuyruklanma faktörü (T)	1,01	0,94	1,26	1,07	1,28	1,27	0,88	1,0	1,08

Çizelge 3.22. a. YPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası etken maddeler ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Tampon pH'sında - 0,05'lik değişim(pH:3,15)			Tampon pH'sında +0,05'lik değişim(pH:3,25)			Tampon pH:3,2		
	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON	DES	LEV	MON
Alıkonma zamanı (tR)	4,49	6,35	8,37	4,49	6,36	8,40	4,56	6,44	8,54
Kolon etkinliği (N)	14929	20557	13768	18139	36299	16464	29587	83117	32727
Kuyruklanma faktörü (T)	1,37	1,48	1,32	1,25	1,27	1,21	1,17	1,22	1,34

Çizelge 3.22. b. YPSK-FDD yönteminde tampon pH'sında yapılan küçük değişiklikler sonrası safsızlıklar ile sağlamlık çalışması sonuçları.

	Tampon pH'sında - 0,05'lik değişim(pH:3,15)			Tampon pH'sında +0,05'lik değişim(pH:3,25)			Tampon pH:3,2		
	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3	IMP1	IMP2	IMP3
Alıkonma zamanı (tR)	5,59	6,97	7,95	5,60	6,98	7,97	5,68	7,08	8,10
Kolon etkinliği (N)	19564	50683	35071	22972	43416	36184	31884	87922	53001
Kuyruklanma faktörü (T)	1,15	1,12	1,36	0,98	1,36	0,99	0,88	1,0	1,08

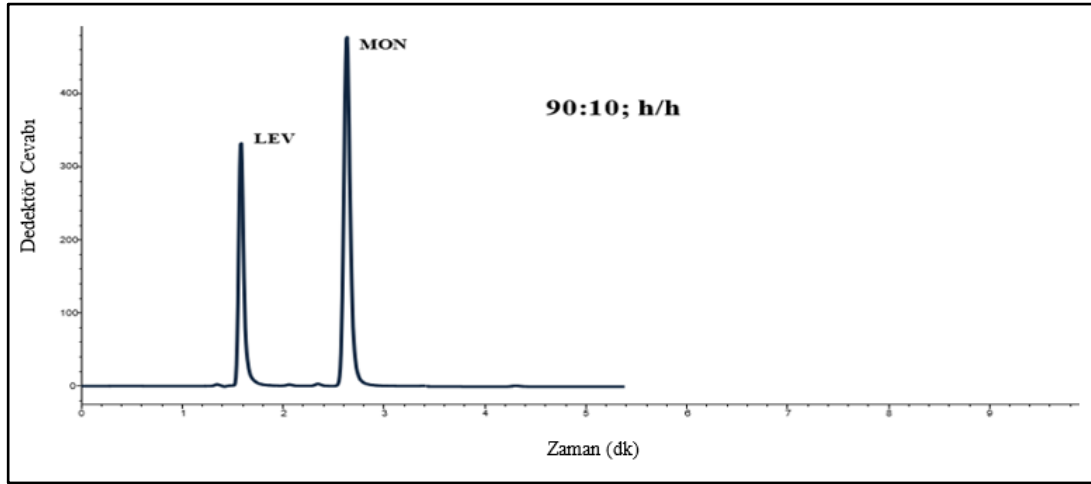
3.4. Montelukast, Levosetirizin için Ters Faz Yöntemi Kullanılarak Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları

Montelukast ve Levosetirizin etken maddelerinin aynı anda analizleri için ters faz yöntemi kullanılarak uygulanabilecek alternatif bir yöntem de tez çalışmaları süresinde geliştirilmiştir.

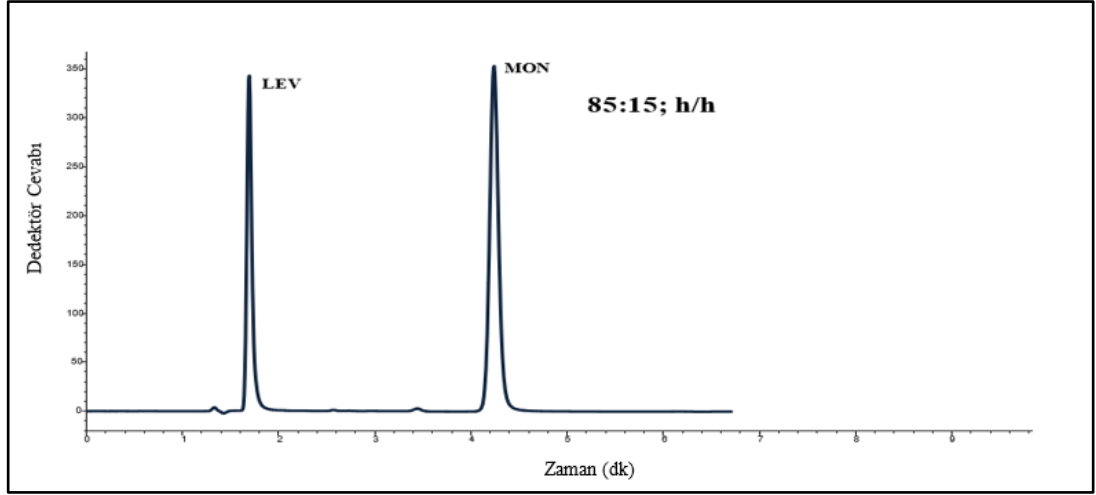
3.4.1. Ters Faz Yöntemi Kullanılarak Geliştirilen YPSK Yöntemi Analitik Yöntem Çalışmaları

Hareketli Faz Kompozisyonu Seçimi

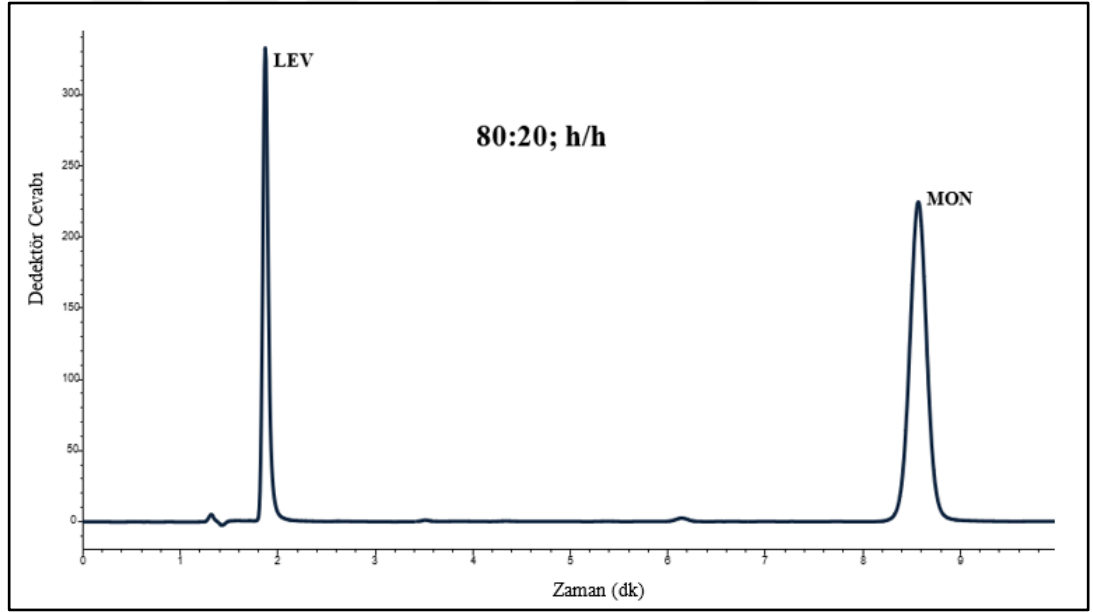
En uygun metanol oranının belirlenmesi için hacimce %90, %85 ve %80 metanol içeren hareketli fazlar ile, akış hızı 1 mL dk⁻¹, kolon sıcaklığı 25°C olarak oda koşullarında çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 3.45. a. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 90:10; (h/h) gösteren kromatogram.



Şekil 3.45. b. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m) kolon, 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 85:15; (h/h) gösteren kromatogram.

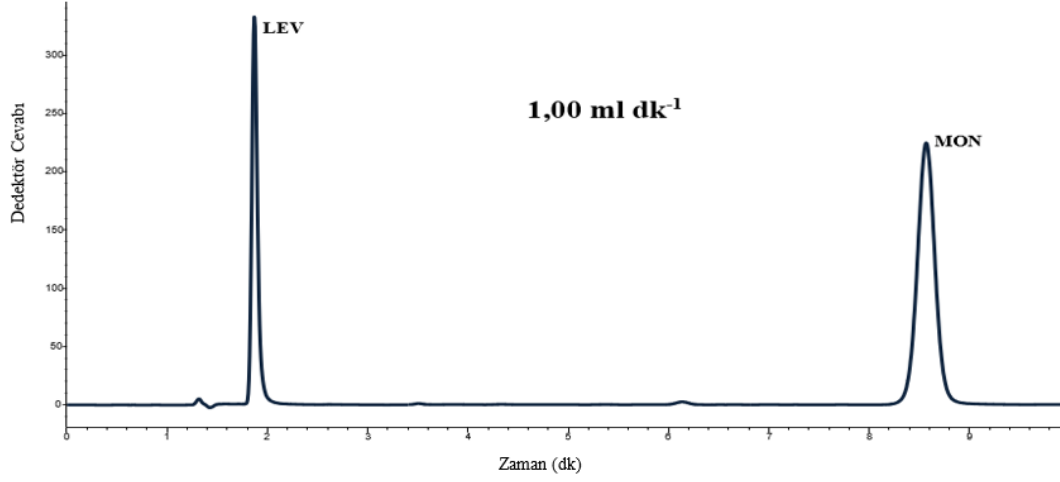


Şekil 3.45. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m) kolon, 25°C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, 240 nm, pH:4,0 olan 10 mM amonyum asetat tampon çözeltisi analiz şartlarında hareketli faz bileşimini 80:20; (h/h) gösteren kromatogram.

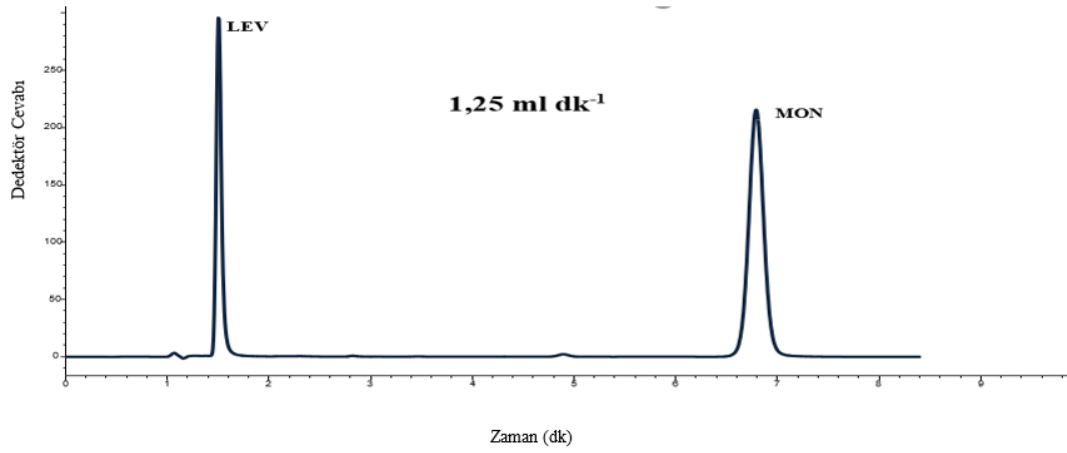
Akış Hızı Etkisi

Levosetirizin ve montelukast maddelerinin eş zamanlı analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında akış hızını optimize etmek için 1-1,5 mL dk⁻¹ arasında değişen hızlarda enjeksiyon yapıldı. Diğer koşullar; metanol ve tampon-10 mM

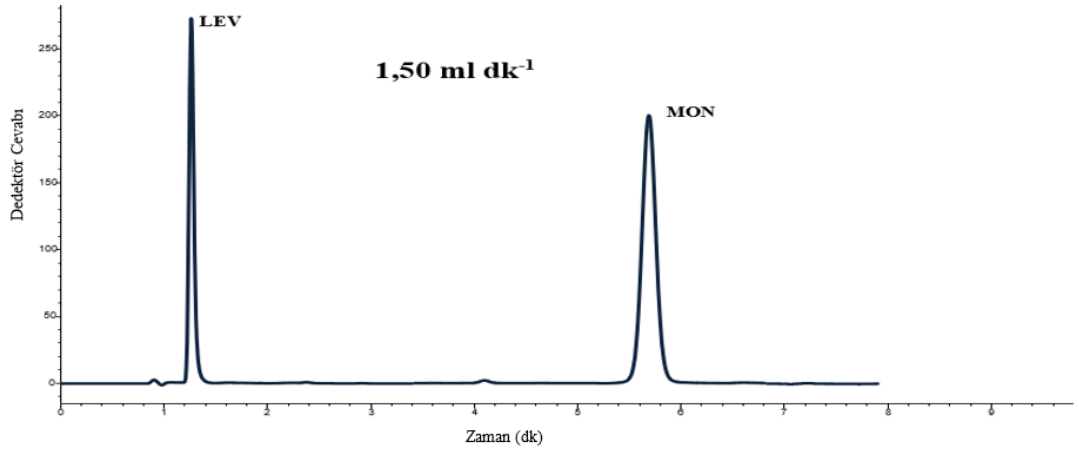
(pH:4,0) (80:20 h/h) içeren hareketli faz, 25°C kolon sıcaklığı olarak uygulandı. Yapılan deneyler sonucunda optimum akış hızı belirlenmiştir.



Şekil 3.46. a. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,00 mL dk⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram.



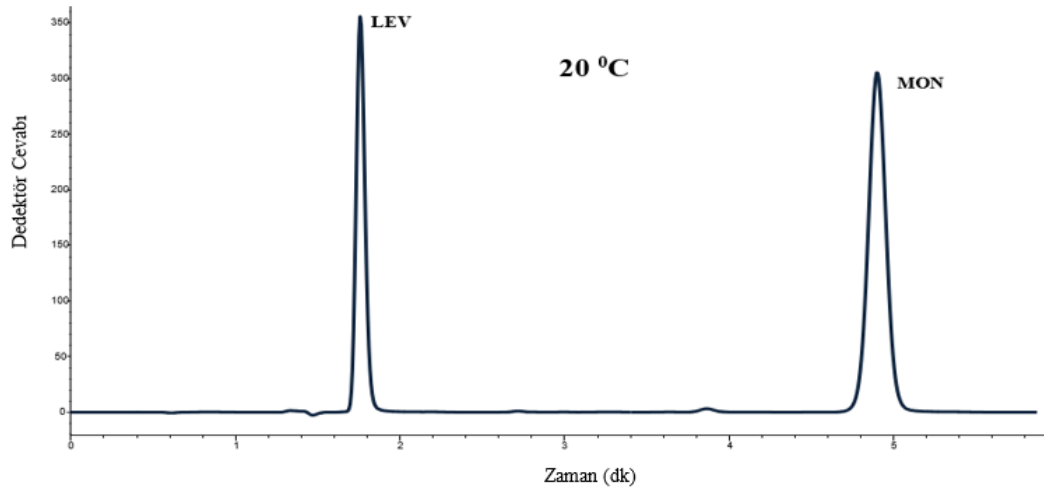
Şekil 3.46. b. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,25 mL dk⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram.



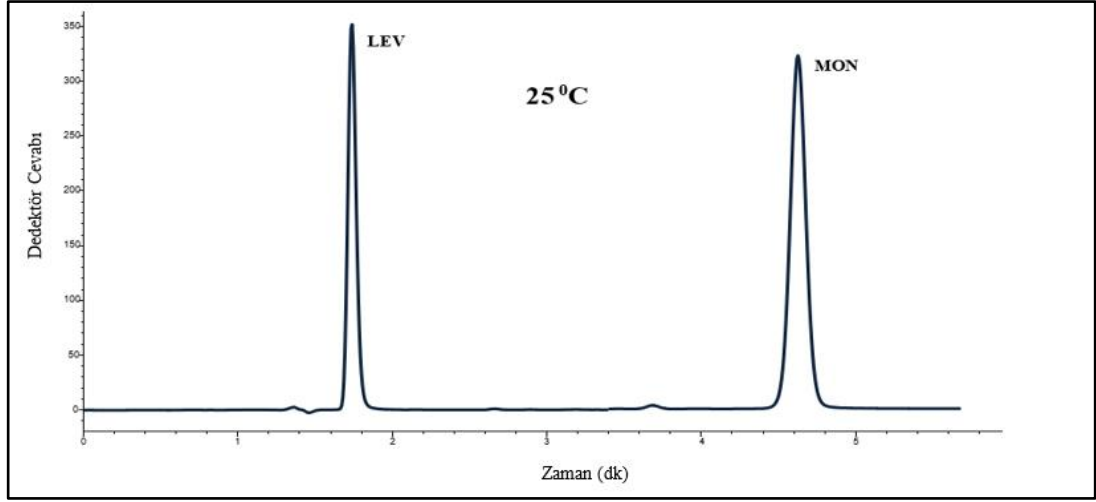
Şekil 3.46. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, 25°C, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (80:20; h/h) analiz şartlarında 1,50 mL dk⁻¹ akış hızı şartlarına ait kromatogram.

Sıcaklık Etkisi

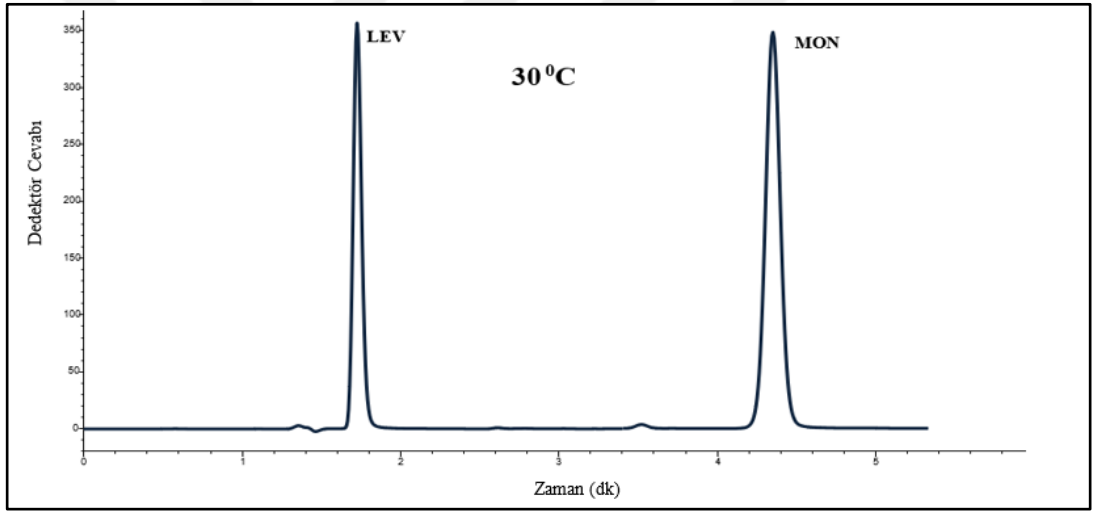
Optimizasyon çalışmalarında kullanılan en etkili parametrelerden bir diğeri ise sıcaklıktır. Optimizasyon çalışmalarında seçtiğimiz ters faz sıvı kromatografisi yönteminde sıcaklık artışı ile düzgün pik şekilleri elde edilirlen ve daha kısa sürede analizler gerçekleştirilmektedir. En uygun sıcaklığın belirlenmesi için kolon sıcaklığı değiştirilerek analizler yapılmıştır.



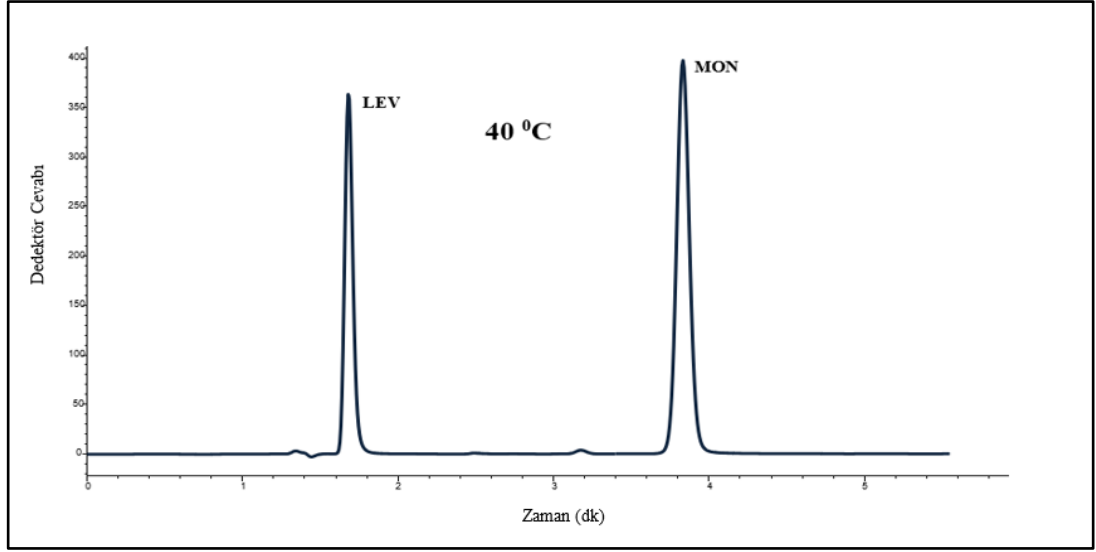
Şekil 3.47. a. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, akış hızı: 1 mL dk⁻¹, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 20 °C analiz şartlarına ait kromatogram.



Şekil 3.47. b. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μm) kolon, akış hızı: 1 mL dk⁻¹, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 25 °C analiz şartlarına ait kromatogram.



Şekil 3.47. c. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μm) kolon, akış hızı: 1 mL dk⁻¹, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 30 °C analiz şartlarına ait kromatogram.



Şekil 3.47. d. Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m) kolon, akış hızı: 1 mL dk⁻¹, 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm (pH:4,0) (85:15; h/h), 40 °C analiz şartlarına ait kromatogram.

Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Geliştirilen yöntemin parametreleri Çizelge 3.23’de görülmektedir.

Çizelge 3.23. Ters faz yöntemi ile geliştirilmiş YPSK analiz yöntemi parametreleri.

Ters Faz Yöntemi Kullanılarak Geliştirilen Yöntem Parametreleri	
Kolon	Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm; 5,0 μ m)
Hareketli faz bileşimi	Metanol: Amonyum asetat(pH: 4)- 10 mM, 85:15 (h/h)
Sıcaklık (°C)	40
Akış hızı (mL dk ⁻¹)	1,5
Enjeksiyon hacmi (μ L)	10
Dalga boyu (nm)	240

3.4.2. Sistem Uygunluk Parametreleri

Optimize edilen ters faz yöntemi ile YPSK analiz yöntemi ile elde edilen SUT parametreleri Çizelge 3.24’de görülmektedir.

Çizelge 3.24. Ters faz yöntemi ile geliştirilmiş YPSK analiz yöntemine ait sistem uygunluk (SUT) parametreleri ve sonuçları.

	LEV	MON
Alıkonma zamanı (t_R)	1,35	3,09
Kapasite faktörü (k)	0,29	1,94
Ayırım Gücü (R_S)		16,07
Kolon etkinliği (N)	3986	8992
Seçicilik (α)		6,77
Kuyruklanma faktörü (T)	0,86	0,91

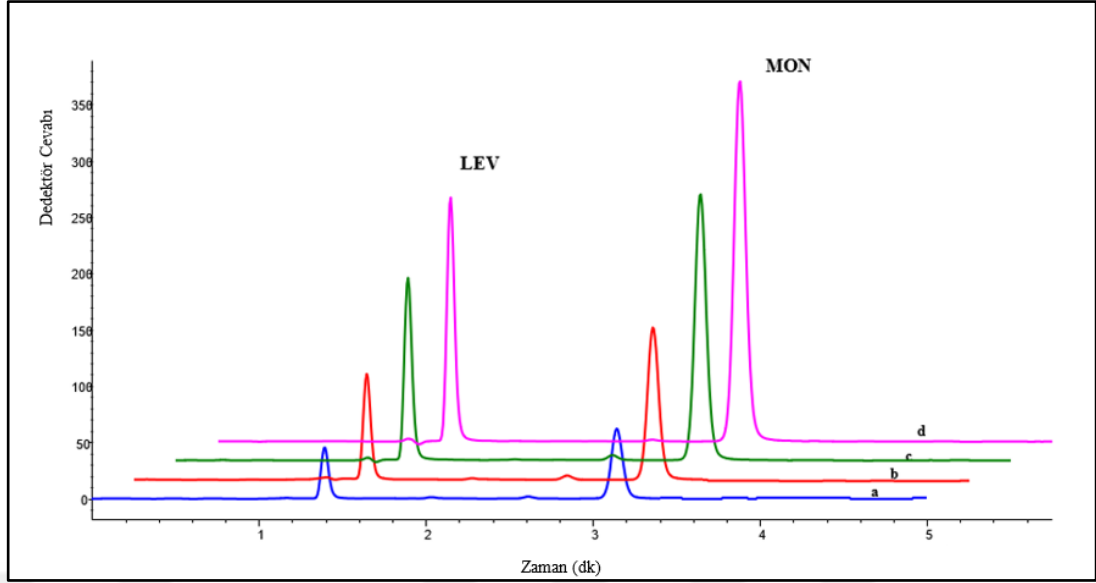
3.4.3. Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık)

Doğrusallık çalışması için üç etken madde ve safsızlıkları içeren, artan derişimlerde çözelti hazırlandı. Bu çözelti YPSK-FDD sisteminde analiz edildi. Çözelti derişimlerine karşı elde edilen alanlar ile grafik çizildi, her bir madde için doğrusallık çalışması yapıldı. Doğrusallık çalışması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.25’te görülmektedir.

Çizelge 3.25. Ters faz yöntemi kullanılarak geliştirilmiş yöntemin doğrusallık çalışması sonuçları.

	LEV	MON
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5-100	0,5-100
Eğim	7,08	16,22
Kesişim	3,35	-5,09
Korelasyon katsayısı	0,999	0,999
Eğimin standart hatası	0,06	0,18
Kesişimin standart hatası	2,99	7,92
TS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,16	0,05
TAS($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,47	0,16
Tekrar edilebilirlik (Gün içi) % BSS*	0,33	0,26
Tekrar edilebilirlik (Günler arası) % BSS*	1,02	0,39

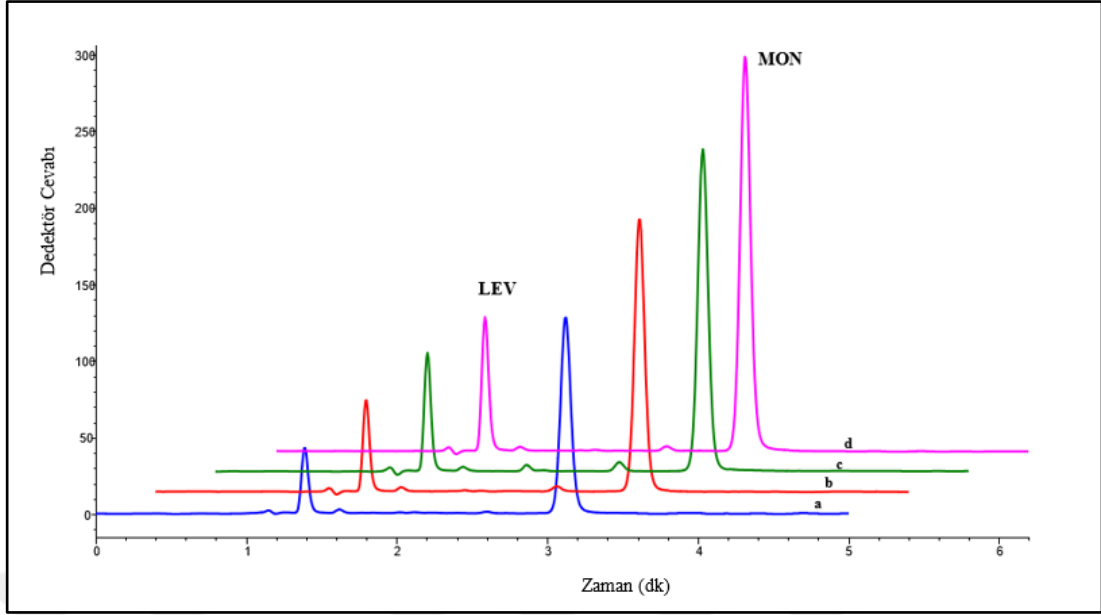
*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır



Şekil 3.48. Piklerin geliş sırasıyla LEV ve MON için kalibrasyon sonuçları a; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, b; 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, c; 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, d; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μm) kolon, akış hızı: 1 ml dk^{-1} , 240 nm, MeOH: Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 40 $^{\circ}\text{C}$ analiz şartları.

Farmasötik Dozaj Şekline Uygulama İle Yapılan Geri Kazanım Çalışması

Optimizasyonu ve validasyonu tamamlanan yöntem BRONCHOREST[®] 10 mg/ 5 mg kapsül formülasyonunun analizi için de kullanılmıştır. Kapsül numunesi üzerine belirli oranlarda standart maddeler eklenmiştir ve bu standart maddelere ait geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıda Çizelge 3.26'da ve Şekil 3.49'da verilmiştir.



Şekil 3.49. Piklerin geliş sırasıyla LEV ve MON için optimize koşullarda a; kapsül numunesi, b; % 25 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi, c; % 50 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi, d; % 100 oranında etken madde ilave edilmiş kapsül numunesi ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar; Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μ m) kolon, akış hızı: 1 ml dk⁻¹, 240 nm, MeOH:Tampon-10 Mm(pH:4,0) (85:15; h/h), 40 °C analiz şartları.

Çizelge 3.26. 40 mg Montelukast Sodyum + 20 mg Levosetirizin etken maddelerine ait, ters faz yöntemi kullanılarak geliştirilmiş yöntemin, geri kazanım çalışmasından elde edilen sonuçlar.

	MON	LEV
Bilinen Miktar (μ g mL ⁻¹)	20	40
Bulunan Miktar (μ g mL ⁻¹)	19,72	39,62
BSS (%)*	0,46	0,38
BH (%)	4,02	0,84
Eklenen miktar (μ g mL ⁻¹)	20	40
Geri Kazanım Analiz Sonucu Miktar (μ g mL ⁻¹)	20,23	40,43
Geri kazanım (%)	100,58	100,66
Geri Kazanım için BSS (%)*	0,58	0,31
Geri Kazanım için BH (%)	-0,58	-0,54

*Ard arda yapılan 5 enjeksiyon sonuçlarıdır

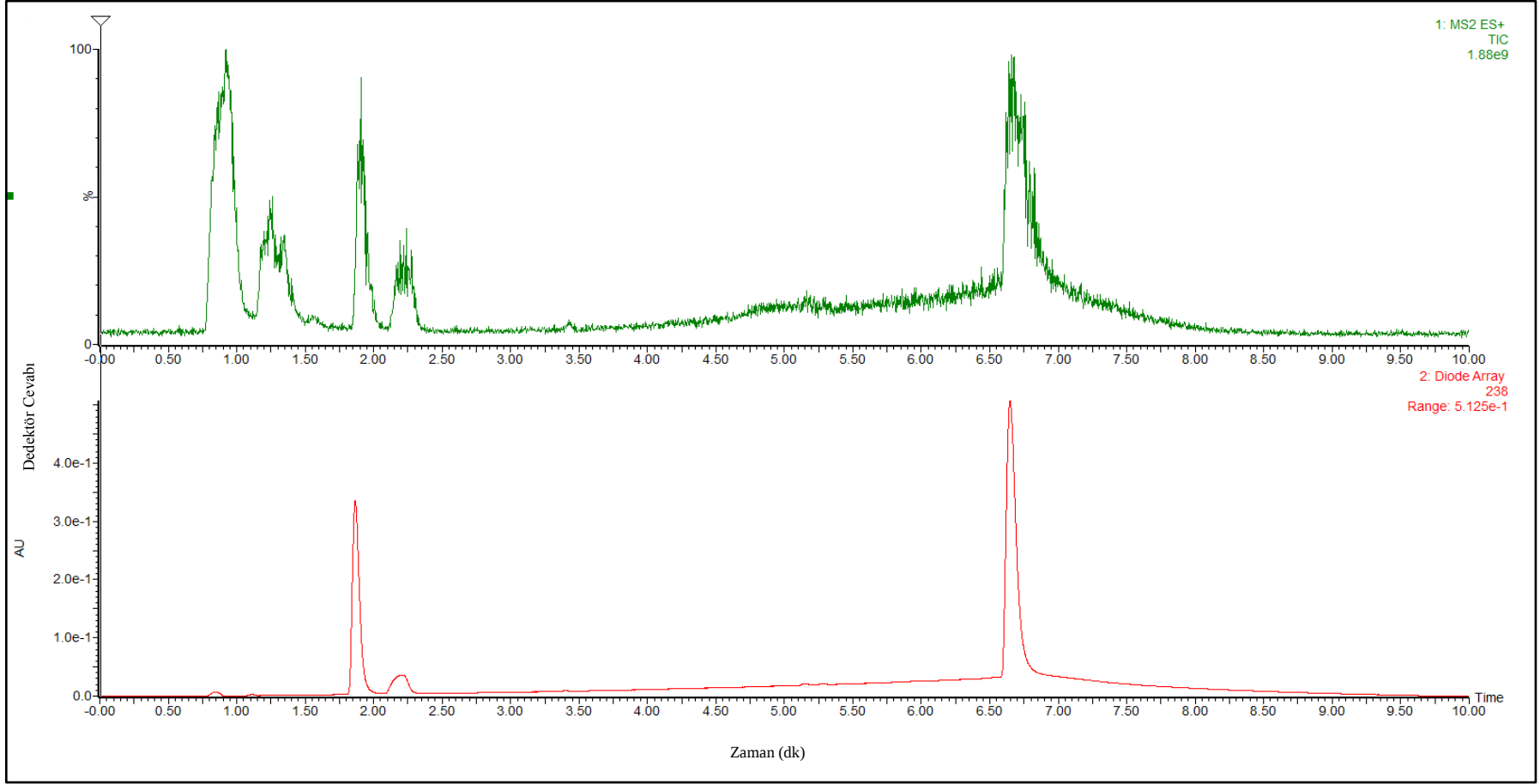
3.5. Kütle Spektrometrisi Yöntemi ile Molekül Ağırlığı Belirlenmesi

UPSK/YPSK-FDD yöntemi optimize edilirken bozundurma çalışmalarında karşılaşılabilecek bilinmeyen bir safsızlığın SK-KS ile molekül ağırlığını da tayin edebilmek için SK-KS yöntemlerinde kullanılabilen bir tampon çözelti olması özellikle tercih edildi. Optimizasyonu ve sonrasında validasyonu yapılmış analitik koşullar hem FDD hem de K/KD bağlı SK cihazında uygulandı. Bu sayede LORCLAST® tablette bazik bozundurma ve oksidasyon çalışmaları sırasında olduğu gözlemlenen bilinmeyen safsızlıkların molekül ağırlığı belirlenebildi. Çalışma sırasında MON, DES, LEV moleküllerinin ve safsızlıklarının da molekül ağırlıklarına bakıldı.

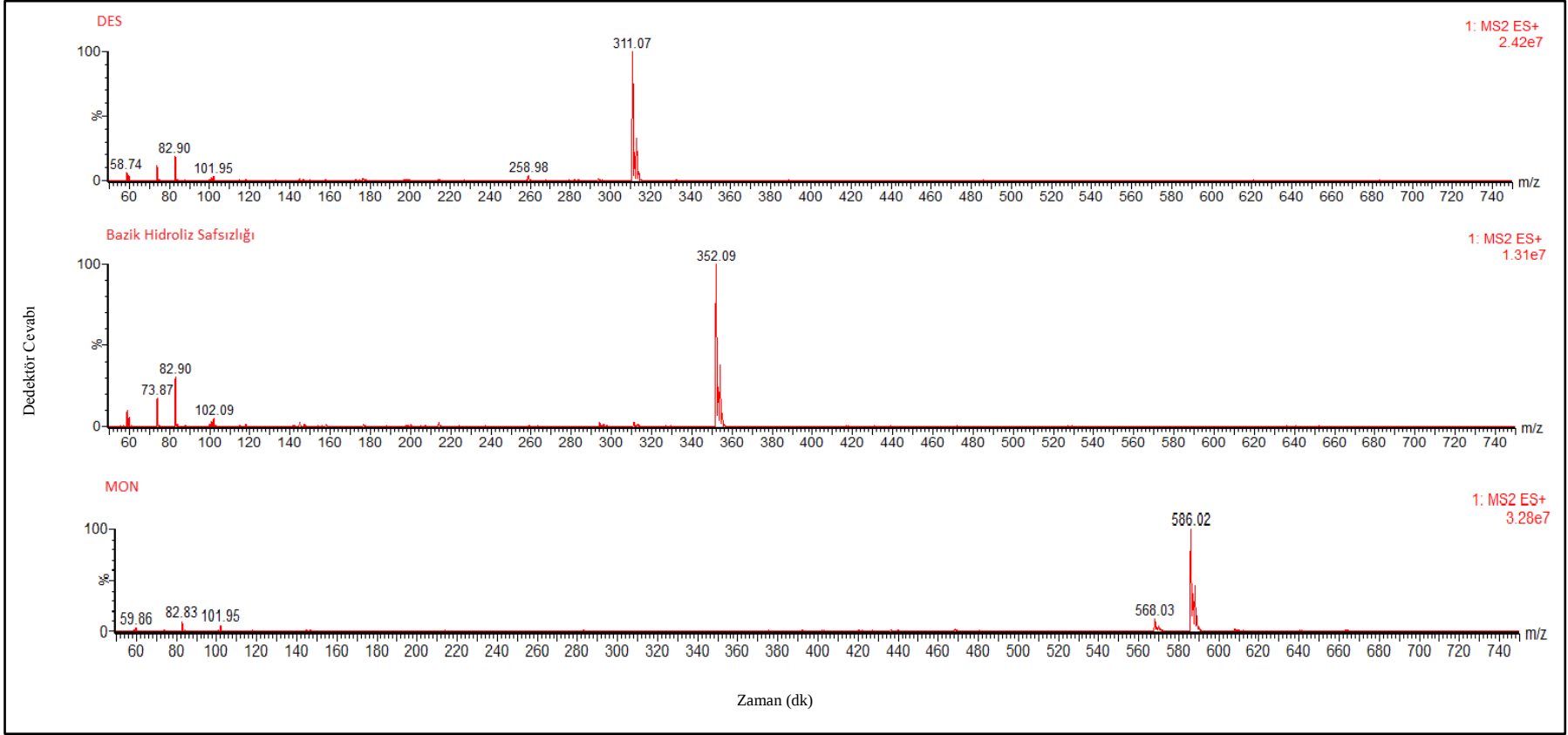
Çizelge 3.27. SK-KS cihaz parametreleri.

SK-KS cihaz parametreleri	
Ion Mode	Electrospray+
Capillary voltage	1,77kv
Cone voltage:	25v
Desolvation Temperature	500 °C
Detection mode	MS Scan, Time 0 to 10, Mass 50.00 to 750.00 ES+

0,1N NaOH ile bazik bozundurma yapılmış test çözeltisi SK-KS cihazına enjekte edildi. Hem FDD hem KD olmak üzere iki detektöre bağlı bu cihazdan elde edilen kromatogramlar Şekil 3.50-3.51’de görülmektedir.

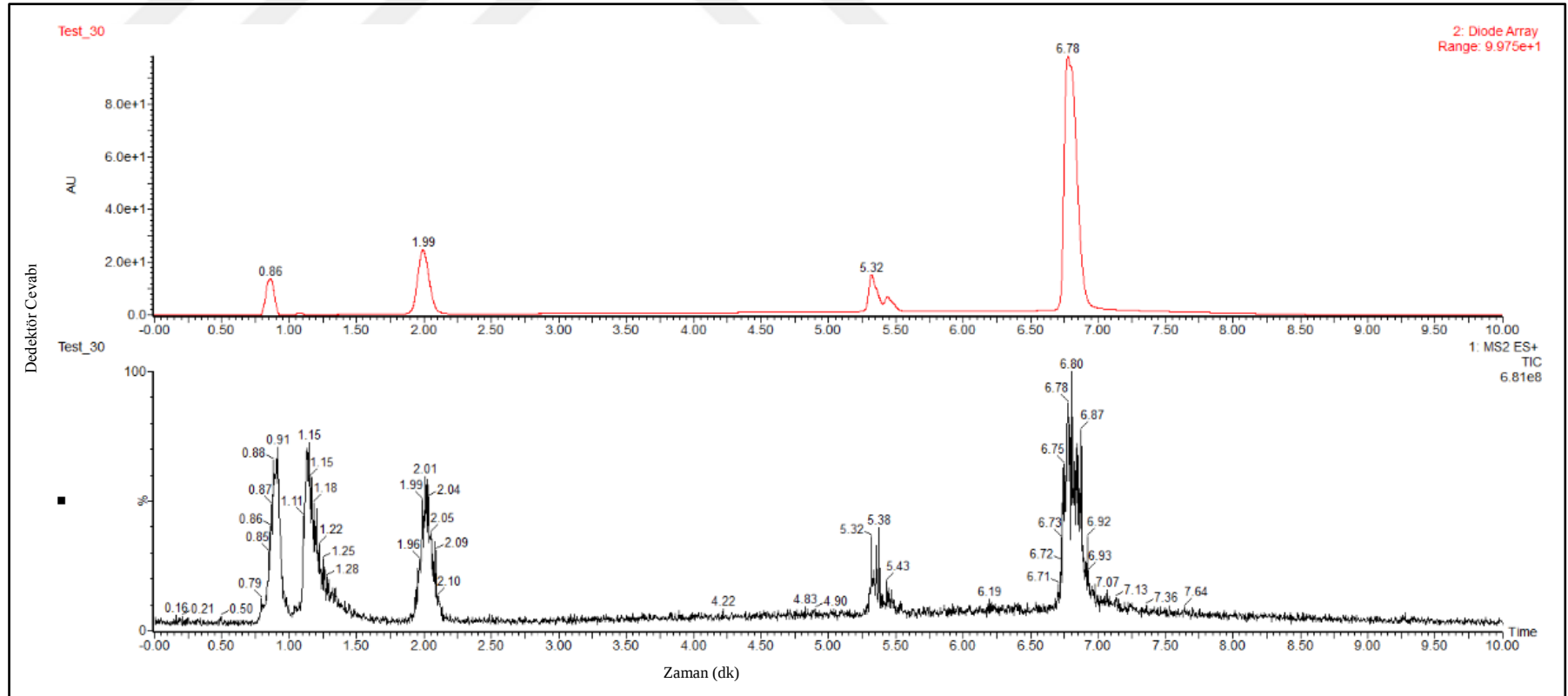


Şekil 3.50. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış test çözeltisine ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları.

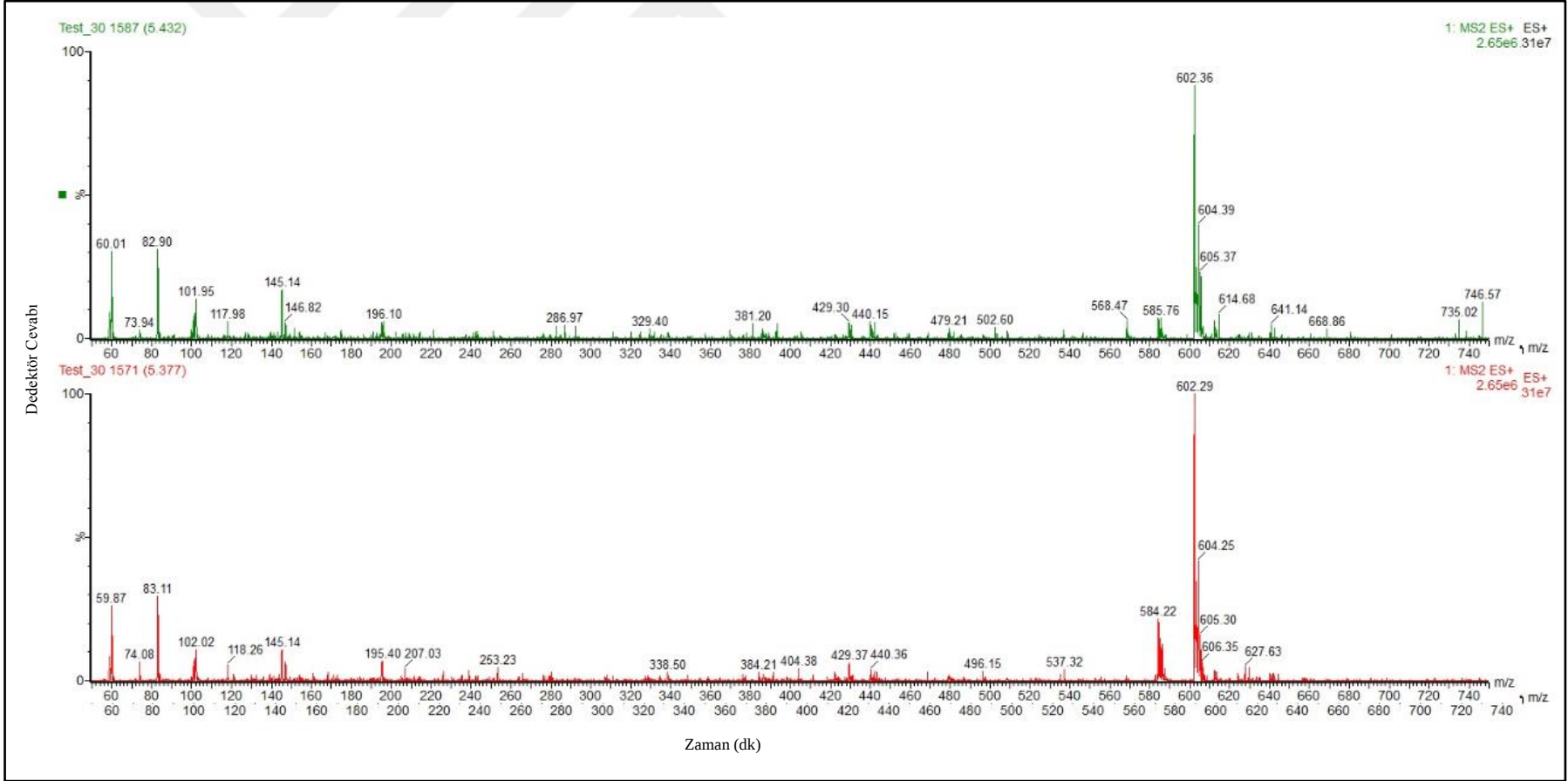


Şekil 3.51. 0,1N NaOH ile baz hidrolizi yapılmış test çözeltisine ait SK-KS kromatogramları.

Oksidasyon bozundurma yapılmış test çözeltisi SK-KS cihazına enjekte edildi. Hem FDD hem KD olmak üzere iki detektöre bağlı bu cihazdan elde edilen kromatogramlar Şekil 3.52- 3.53’de görülmektedir.

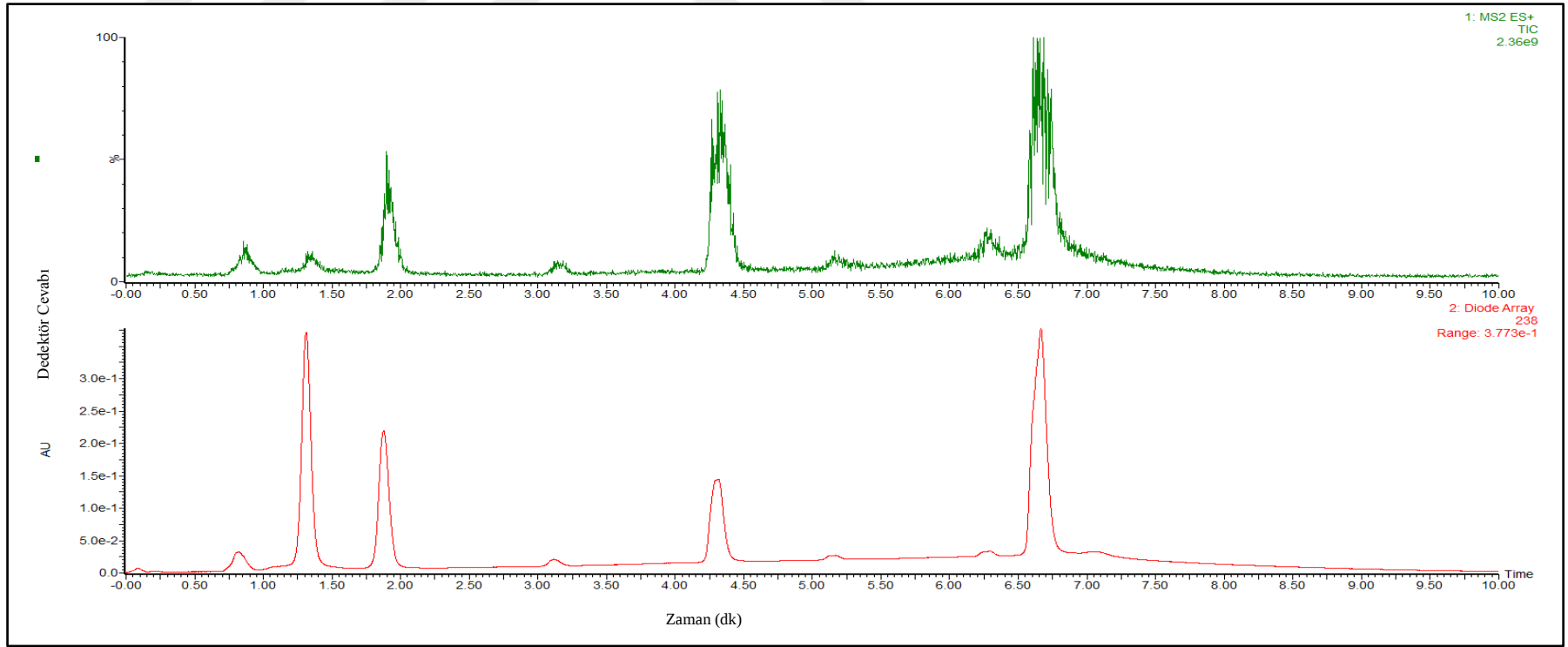


Şekil 3.52. Oksidasyon bozundurma yapılmış test çözeltisine ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları.

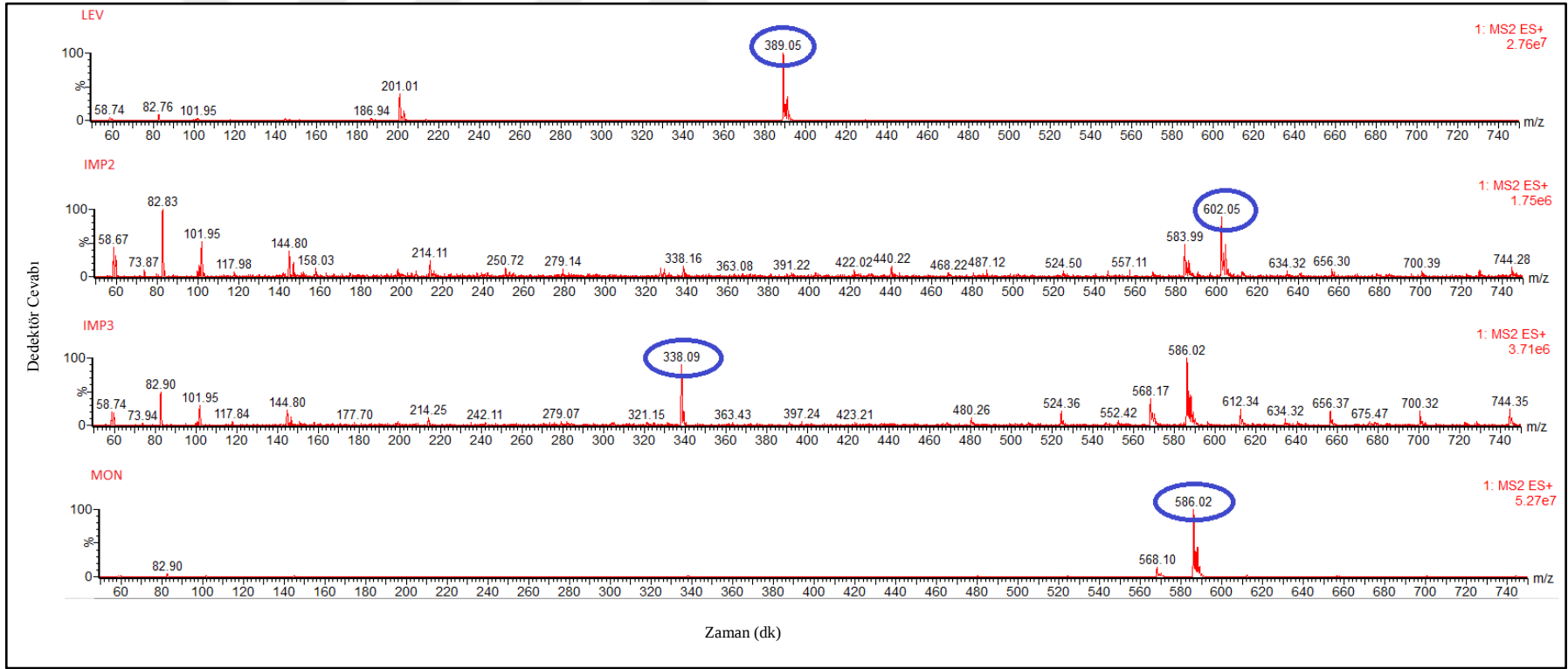


Şekil 3.53. Oksidasyon bozundurma yapılmış test çözeltisine ait SK-KS kromatogramları.

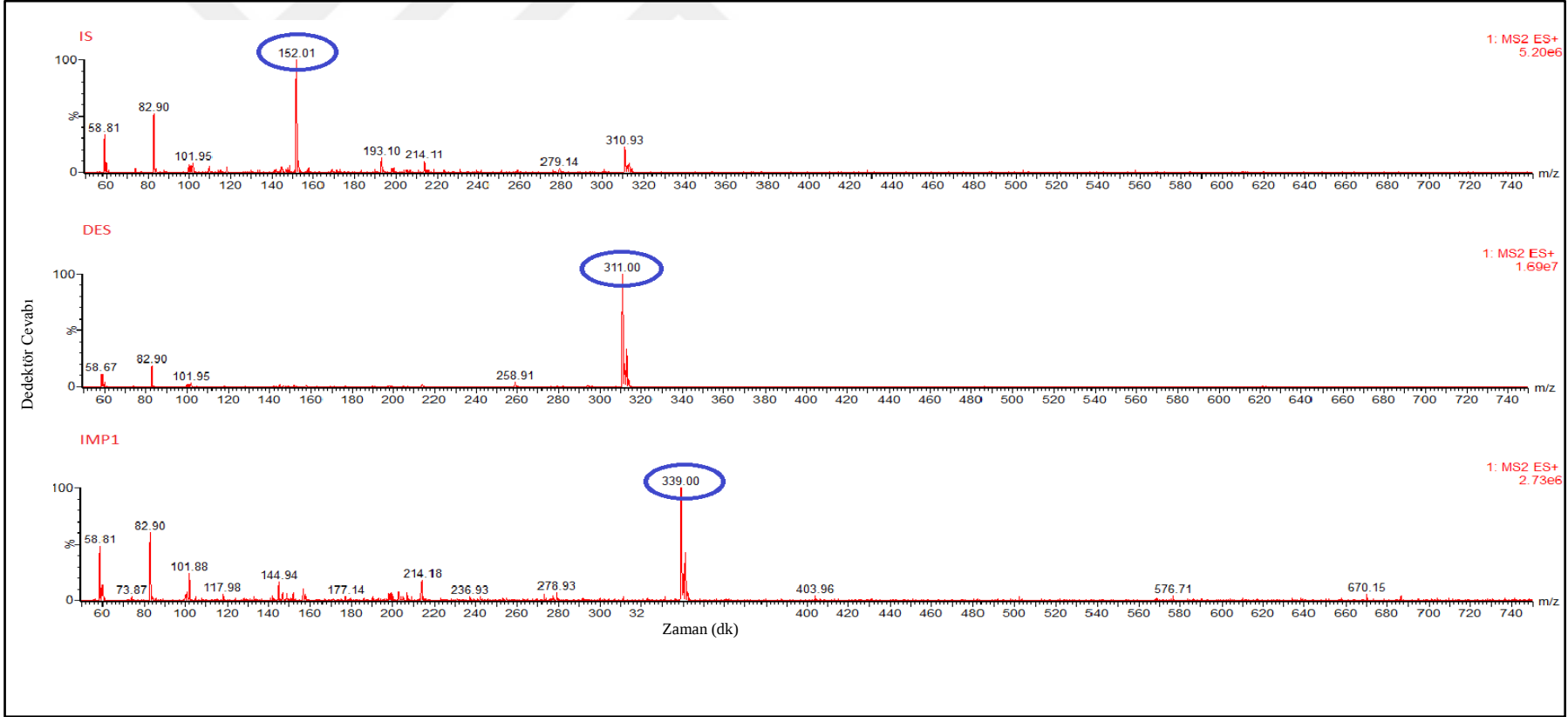
SK-KS çalışması kapsamında MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözelti de sisteme enjekte edildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 3.54-3.55’de görülmektedir.



Şekil 3.54. MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözeltiye ait SK-FDD ve iyonlaşma kromatogramları.



Şekil 3.55. MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözeltiyi ait SK-KS kromatogramları

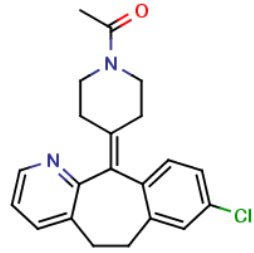


Şekil 3.55. Devam. MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarını içeren çözeltiye ait SK-KS kromatogramları

Çizelge 3.28. SK-KS ile belirlenen molekül ağırlıkları.

Madde Adı	Molekül Ağırlığı
IS	152
DES	311
Bazik Hidroliz Safsızlığı	352
IMP1	339
LEV	389
IMP2	602
IMP3	338
MON	586

Bu çalışmada bilinen MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarının molekül ağırlıkları belirlenmesinin yanında bazik hidroliz ve oksidasyon bozundurmaları ile oluşan safsızlıkların molekül ağırlığının belirlenerek ve spektrumundan yola çıkarak bu safsızlığın ne olduğunun bulunması amaçlandı. Bazik hidroliz safsızlığının FDD spektrumuna bakıldığında DES ile benzer olduğu görüldü. DES safsızlığı olduğu tahmin edilen bu maddenin molekül ağırlığı da N-Asetil Desloratadin ile aynıdır. Bu verilerden yola çıkarak bu safsızlığın N-asetil Desloratadin olduğu tezine varıldı.

N-asetil Desloratadin	
Yapısı	
Formülü	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ O
Molekül Ağırlığı	352,86

Oksidasyon bozundurma sonrası Montelukast safsızlığı olan IMP2'nin hemen yanında oluşan safsızlığının FDD spektrumuna bakıldığında IMP2 ile benzer olduğu görüldü. Bu maddenin moleköl ağırlığı da IMP2 ile aynıdır. Bu safsızlık ve IMP2 nin Montelukast Sulfoksitin diastereoizomerleri olabileceği tezine varıldı.



4. TARTIŞMA

Alerjik Rinit tedavisinde en yaygın kullanılan farmakoterapi seçenekleri; intranasal kortikosteroidler, H1 reseptör antagonistleri (antihistaminler) ve antilökotrienler (LTRA'lar)dir. Desloratadin (DES) ve Levosetirizin (LEV); antihistaminik etkili ilaç etken maddeleri, Montelukast Sodyum (MON); lökotrien reseptör antagonistidir. Montelukastın veya antihistaminlerin tek başına kullanılmasına göre Montelukastın antihistaminikler ile kullanılması tedavide avantajlar sağlamaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), sıvı hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan mekanik olarak pompalandığı sıvı kromatografisini tarif etmek için kullanılan terimdir. Mobil fazın daha polar olduğu ters faz sıvı kromatografi, çok tercih edilen kromatografi çeşididir. Düşük molekül ağırlıklı numunelerin tüm analizlerinin neredeyse %90'ı ters faz sıvı kromatografi kullanılarak gerçekleştirilir. İlaçların yapısı çoğunlukla apolardır. İlaç analizlerinde yaygın olarak ters faz sıvı kromatografisi uygulanmaktadır. Analizi yapılacak numune kolon için geniş ölçüde farklı afiniteye sahip bileşenler içeriyorsa, gradyan elüsyon analiz süresini kısaltmak ve piklerin şeklini geliştirmek için yararlıdır.

Bir YPSK cihazı; enjektör, pompa, kolon ve dedektörden oluşur. Analizlerde kullanılan kolonların çeşitli türleri vardır. Silika jel ve ODS kaplı silika jel, sırasıyla normal ve ters faz kromatografi uygulaması için en sık kullanılan kolon dolgu malzemelerinden ikisidir. Ancak ters faz sıvı kromatografisinde fenil tipi işlevselliği içeren sabit fazların ticari kullanılabilirliği ve popülerliğinin arttığı bilinmektedir.

YPSK, sıvı kromatografiye yeni bir yön veren modern bir tekniktir. YPSK, temel olarak üç alanda gelişen ultra performanslı sıvı kromatografisini ifade eder: “hız, çözünürlük ve hassasiyet. YPSK ilkeleri, temel YPSK ile aynıdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisine kıyasla daha iyi çözünürlük, hız ve hassasiyet

elde etmek için ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPSK)'de çapı 2 µm'den küçük partikül uygulanmaktadır.

Kütle Spektrometresi, incelenen analitle ilgili iyonik türlerin kütle / yük oranının ölçümüne dayanan analitik bir tekniktir. Kütle spektrometrisi (KS); elektron iyonlaşması, moleküllerin parçalanması ve kütle / yük oranının (m/z) belirlenmesi ile ilgilidir. Bir katı, sıvı veya buhar olabilen bir numune kütle spektrometre cihazına yüklenir ve buharlaştırılır. Numune molekülleri bir iyon kaynağında iyonlara dönüştürülür veya elektrosprey iyonizasyon (ESI) durumunda, çözelti içinde mevcut olan iyonları gaz fazına hareket ettirebilir. İyonlar kütle analizöründe kütle yük oranlarına göre ayrılır. Kütle spektrometre analizlerinde uygulanan elektrosprey iyonizasyon bir iyonizasyon tekniğidir. ESI'da iyonlaşan türler kütle ayırıcısında kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar. Elektrosprey iyonizasyonlu (ESI) SK-KS, peptitlerin, proteinlerin, biyolojik numunelerin, polimerlerin, nükleotitlerin, şekerlerin ve organometaliklerin moleküler ağırlığını ölçmek için kullanılır.

Bu çalışma kapsamında, montelukast ve desloratadin; montelukast ve levosetirizin içeren farmasötik preparatların tek bir kromatografik sistemde analizi için güvenilir, hassas, hızlı ve kolay bir UPSK ve YPSK yöntemleri geliştirilmesi ve bu yöntemlerin validasyonu amaçlandı. Aynı zamanda valide edilen bu yöntemin montelukast, desloratadin ve levosetirizin safsızlık analizlerine uygulanması planlandı. Bozunma çalışmaları sırasında karşılaşılabilecek bilinmeyen bir safsızlığın SK-KS ile molekül ağırlığını da tayin edebilmek için SK-KS yöntemlerinde kullanılabilen bir tampon çözelti olması özellikle tercih edildi.

Bu amaçla çalışmalara trifloroasetik asit ve/veya amonyum asetat içeren tampon çözeltiler ile başlandı. MON, DES, LEV moleküllerinin ve safsızlıklarını aynı anda ayırmak sabit bir akış programı ile mümkün olmayacağı öngörüldüğünden iki farklı tampon çözelti hazırlandı. UPSK cihazının bir hareketli faz kanalına 5mM amonyum asetat içeren tampon (Hareketli FazA), diğer bir kanalına ise %0,15 trifloro asetik asit içeren tampon (Hareketli FazB), konularak çalışmalara başlandı.

Bu çalışmalarda Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8 µm kolon kullanıldı. Değişken oranlar aşağıdaki gibidir.

Hareketli faz 1; Hareketli Faz A: Hareketli Faz B (60: 40, h/h)

Hareketli faz 2; Hareketli Faz B: Hareketli Faz A (60: 40, h/h)

Hareketli Faz A oranının fazla olduğu koşulda IMP3 ve MON pikleri alıkonma sürelerinin uzadığı görüldü. Hareketli Faz B oranının fazla olduğu koşulda ise pikler erken çıktı ancak ayrışma sağlanamadı ve kapasite faktörü düşük bulundu. Bu çalışmalar sonucu sabit oranda hareketli faz karışımı ile uygun analiz şartlarını sağlamayacağı öngörüldüğünden akış programı oluşturuldu. Akış programları optimizasyonu çalışmalarında Akış programı 4 (Aşağıda verilmiştir) ile SUT parametreleri sağlanarak süre 10 dk olarak kısaltıldı. Bundan sonraki çalışmalara bu program ile devam edildi ve kromatogram süresi 10 dk olarak alındı. Diğer koşullar sıcaklık, dalga boyu, akış hızı, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm, 0,6 mL dk⁻¹, 10 µL uygulandı. İç standart olarak Parasetamol (IS) kullanıldı.

Akış Programı 4			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	0,6	75	25
4	0,6	50	50
6	0,6	40	60
9	0,6	75	25
10	0,6	75	25

Tampon çözelti molaritesi optimizasyonunda; 3 mM, 5 mM ve 10 mM amonyum asetat tamponlarının Hareketli faz A olarak kullanıldığı enjeksiyonlarda anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak tekrarlanan enjeksiyonlarda pik simetrilerinde yükselme ve ayrışmanın kötü olması sebebi ile 5mM amonyum asetat tamponunun pH sı 3,2 ye ayarlanarak çalışmalara devam edildi.

Sabit faz denemelerinde Acquity UPLC BEH –C18, 50×2,1 mm, 130Å, 1,7µm kolon ve Acquity UPLC BEH –Phenyl, 100×2,1 mm, 1,7µm kolon ile enjeksiyonlar

yapıldı. Sabit faz seçimi çalışmaları değerlendirildiğinde; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolon ve 0,6 mL dk⁻¹ akış hızında daha iyi ayrışma ve pik simetrisi sağlamakla birlikte basınç değerinin daha düşük olduğu görüldü.

Akış hızı çalışmaları değerlendirildiğinde 0,5 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılan çalışma sonucu elde edilen kromatograma göre IMP3 ve MON piklerinin simetrisi yükseldiği gözlemlendi. 0,7 mL dk⁻¹ ve 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılan çalışma sonucu elde edilen kromatogramda anlamlı bir fark olmadı. Basıncın az olması ve pik simetrisi değerlendirilerek çalışmalara 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile devam edildi.

Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Geliştirilen UPSK-FDD yönteminin parametreleri (Çizelge 3.1) ve sistem uygunluk parametreleri (Çizelge 3.2) belirlendi. Sistem uygunluk testi sonuçlarına ile yöntemin uygulanabilir olduğu görüldü. Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra yöntem validasyonu aşamasına geçildi.

Yöntem parametreleri belirlendikten sonra, yöntemin seçiciliğini ve stabilite göstergeli olup olmadığını kontrol etmek için LORCLAST® ve LEVMONT® tablet formları üzerinden hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapıldı. Bozundurma çalışmaları kapsamında tablet çözeltisi hidroliz (Asit, Baz); oksidasyon (H₂O₂ ile); ışıktaki bozunma (tabletlerin fotostabilite cihazında 600 Wh/m² UV ışığı ve 3,6 milyon lüks saat gün ışığında beklemesi); sıcaklık (tabletlerin 70°C’de etüv içerisinde beklemesi) işlemlerine maruz bırakılarak bozundurma çalışmaları yapıldı. Sonuçlar bozundurma işlemleri uygulanmamış 100 µg mL⁻¹ MON’a eşdeğer tablet çözeltileri ile karşılaştırıldı ve bozunma oranları hesaplandı. Bozundurma çalışmaları incelendiğinde MON ve DES içeren tablet çözeltilerinde 0,1 N HCl asit hidrolizi ve 70°C’de etüv içerisinde beklemesi sonucu herhangi bir bozunma safsızlığı gözlemlenmedi. Yine MON ve DES içeren tablet çözeltilerinde MON için hidrojen peroksit, gün ve UV ışığı ile yapılan çalışmalarda bozunma safsızlıkları oluşmuştur. DES için ise 0,1 N NaOH baz hidrolizi, gün ve UV ışığı ile yapılan çalışmalarda bozunma safsızlıkları oluşmuştur. Gün ve UV ışığı bozundurma çalışmalarında oluşan safsızlıklar IMP1, IMP2 ve IMP3’ten biri veya bazıları ile aynıdır. DES ve

MON içeren tabletin 0,1 N NaOH baz hidrolizinde görülen pikin alıkonma zamanı yaklaşık 2,6 dakika; oksidasyon bozundurması sonucu görülen pikin alıkonma zamanı yaklaşık 5,8 dakikadır. Oksidasyon bozundurma sonrası 5,8 dakikada gelen safsızlık olan IMP2'nin hemen yanında oluşan safsızlığının FDD spektrumuna bakıldığında IMP2 ile benzer olduğu görüldü. 2,6 dakikada gelen safsızlığın FDD spektrumuna bakıldığında DES ile benzer olduğu görüldü. Alıkonma zamanları IMP1, IMP2 ve IMP3'ten farklı olan bu bozunma ürünleri SK-KS sisteminde analiz yapıp molekül ağırlıkları belirlendi.

MON ve LEV içeren tablet çözeltilerinde Montelukast için 70°C, 0,1 N NaOH baz hidrolizi, hidrojen peroksit, gün ve UV ışığı ile yapılan çalışmalarda bozunma safsızlıkları olduğu gözlemlendi. LEV için ise herhangi bir bozunma safsızlığı gözlemlenmedi. 70°C, 0,1 N NaOH baz hidrolizi, gün ve UV ışığı bozundurma çalışmalarında oluşan safsızlıklar IMP2 ve/veya IMP3'tür. IMP2 ve IMP3'ten farklı olarak yaklaşık 5,8 dakikada MON oksidasyon bozundurması sonucu oluşan pik görüldü.

Oluşan tüm safsızlıklar LORCLAST® ve LEVMONT® tabletleri ile hazırlanan çözeltilerdeki MON, DES, LEV etken maddeleri ile aynı alıkonma zamanında gelmediği için bozunma ürünlerinin ve etken maddelerinin hiçbir etki olmadan sayısal olarak ölçüldüğü görüldü.

Geliştirilen UPSK-FDD yöntemine yöntem geçerlilik testleri uygulandı ve geçerlilik kriterlerine göre değerlendirildi. Bu amaçla, validasyon çalışmaları kapsamında yöntemin; doğrusalılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, sağlamlık gibi parametrelere uygunluğu kontrol edilip sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri yapıldı.

Geliştirilen ikinci yöntem YPSK-FDD ile analiz yöntemidir.

YPSK cihazının bir hareketli faz kanalına 5 mM Amonyum asetat(Trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı): (Hareketli FazA), diğer bir kanalına ise ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) (Hareketli FazB), konularak çalışmalara başlandı. Bu çalışmalarda Inertsil Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon kullanıldı. Diğer koşullar sıcaklık, dalga boyu, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm ve 20 µL uygulandı. Kolon boyu 2 katına çıktığı için, analiz süresinin uzamaması amacı ile akış hızı 1,2 mL dk⁻¹ olarak ayarlandı. UPSK yöntemine benzer oranlarda akış programı hazırlanarak çalışmaya başlandı.

Akış programları optimizasyonu çalışmalarında Akış programı 7 (Aşağıda verilmiştir) ile yeterli ayırışma sağlanmış ve kapasite faktörü uygun bulundu. SUT parametreleri sağlanarak süre 15 dk olarak optimize edildi. Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Diğer koşullar sıcaklık, dalga boyu, akış hızı, enjeksiyon hacmi sırası ile; 25°C, 238 nm, 1,2 mL dk⁻¹, 20 µL uygulandı. İç standart olarak Parasetamol (IS) kullanıldı.

Akış Programı 7			
Zaman (dk)	Akış Hızı (mL dk ⁻¹)	Hareketli Faz A(%)	Hareketli Faz B(%)
Başlangıç	1,2	85	15
1	1,2	85	15
5	1,2	45	55
10	1,2	45	55
13	1,2	85	15
15	1,2	85	15

Geliştirilen YPSK-FDD yönteminin parametreleri (Çizelge 3.12) ve sistem uygunluk parametreleri (Çizelge 3.13) belirlendi. Sistem uygunluk testi sonuçlarına ile yöntemin uygulanabilir olduğu görüldü. Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra yöntem validasyonu aşamasına geçildi.

MON ve LEV etken maddelerinin aynı anda analizleri için ters faz yöntemi kullanılarak uygulanabilecek alternatif bir yöntem de tez çalışmaları süresinde geliştirildi.

En uygun metanol oranının belirlenmesi için hacimce %90, %85 ve %80 metanol içeren hareketli fazlar ile, akış hızı 1 mL dk⁻¹, kolon sıcaklığı 25°C olarak oda koşullarında çalışmalar yapıldı.

LEV ve MON maddelerinin eş zamanlı analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında akış hızını optimize etmek için 1-1,5 mL dk⁻¹ arasında değişen hızlarda enjeksiyon yapıldı.

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan en etkili parametrelerden bir diğeri ise sıcaklıktır. Optimizasyon çalışmalarında seçtiğimiz ters faz sıvı kromatografisi yönteminde sıcaklık artışı ile düzgün pik şekilleri elde edilirken ve daha kısa sürede analizler gerçekleştirildi. En uygun sıcaklığın belirlenmesi için kolon sıcaklığı değiştirilerek (20°C, 25°C, 30°C ve 40°C) analizler yapıldı.

Bu çalışmalar ile koşullar optimize edilerek ve yöntem geliştirildi. Geliştirilen YPSK-FDD yönteminin parametreleri (Çizelge 3.23) ve sistem uygunluk parametreleri (Çizelge 3.24) belirlendi. Sistem uygunluk testi sonuçlarına ile yöntemin uygulanabilir olduğu görüldü. Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra yöntem validasyonu aşamasına geçildi.

Yapılan literatür araştırmaları sonucu (Çizelge 1.2) ikili etken maddenin eş zamanlı olarak analizinin yapıldığı çalışmalar görüldü ancak 3 etken maddenin ve 3 safsızlığın eş zamanlı olarak analizinin yapıldığı bir çalışma görülmedi. Bu tez çalışması ile geliştirilen UPSK-FDD ve YPSK-FDD yönteminin sonucu literatürde bulunan yöntemlerle kıyaslandığında 3 etken maddenin ve 3 safsızlığın eş zamanlı olarak analizinin gerçekleştirilebildiği, hızlı, hassas ve sağlam bir yöntem olduğu görüldü.

MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 tayini için geliştirilen UPSK-FDD ve YPSK-FDD yöntemleri farmasötik dozaj formlarında da uygulandı. Bu çalışma ile yardımcı maddelerin ve bozunma ürünlerinin analiz yöntemini etkileyip etkilemediği kontrol edildi ve bu maddelerin analizi etkilemediği görüldü.

Sonuç olarak MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 maddelerinin aynı anda UPSK-FDD yöntemi ile; Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolonda kullanılarak, sıcaklık 25°C ve 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile uygulanmıştır. Hareketli faz içeriğinde; ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) ve 5 mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) akış programı ile uygulanmıştır. Yöntemin dalga boyu 238 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda; MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 maddelerine ait piklerin alıkonma zamanları sırasıyla 7,24; 2,14; 4,79; 3,42; 5,66 ve 6,90 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 için doğrusal aralık sırasıyla 1,0-200µg mL⁻¹; 0,5-100 µg mL⁻¹; 0,5-100 µg mL⁻¹; 0,10-4 µg mL⁻¹; 0,20-4 ve 0,20-4 µg mL⁻¹, teşhis sınırı sırasıyla 0,240; 0,149; 0,122; 0,021; 0,047 ve 0,037 µg mL⁻¹, tayin alt sınırı ise sırasıyla 0,727; 0,452; 0,369; 0,063; 0,144 ve 0,111 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

YPSK-FDD yöntemi ile çalışmalar Inertsil, Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolon ve sıcaklık 25°C ve 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı ile uygulanmıştır. Hareketli faz içeriğinde; ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) ve 5 mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) akış programı ile uygulanmıştır. Yöntemin dalga boyu 238 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda; MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 maddelerine ait piklerin alıkonma zamanları sırasıyla 8,54; 4,56; 6,44; 5,68; 7,08 ve 8,10 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde MON, DES, LEV, IMP1, IMP2 ve IMP3 için doğrusal aralık sırasıyla 1,0-200µg mL⁻¹; 0,5-100 µg mL⁻¹; 0,5-100 µg mL⁻¹; 0,10-4 µg mL⁻¹; 0,10-4 ve 0,10-4 µg mL⁻¹, teşhis sınırı sırasıyla 0,237; 0,112; 0,165; 0,021; 0,032 ve 0,020 µg mL⁻¹, tayin alt sınırı ise sırasıyla 0,719; 0,338; 0,499; 0,065; 0,097 ve 0,059 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

MON ve LEV etken maddelerinin aynı anda analizleri için ters faz yöntemi kullanılarak uygulanabilecek alternatif bir yöntem de Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolon, sıcaklık 40°C ve 1,5 mL dk⁻¹ akış hızı ile uygulanmıştır. Hareketli faz içeriğinde; Metanol: Amonyum asetat (pH: 4)- 10 mM, 85:15 (h/h) ile uygulanmıştır. Yöntemin dalga boyu 240 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak

belirlenmiştir. Bu koşullarda; MON, LEV maddelerine ait piklerin alıkonma zamanları sırasıyla 3,09 ve 1,35 dakikadır. Geliştirilen yöntemde MON, LEV içinde doğrusal olarak sırasıyla 0,5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, teşhis sınırı sırasıyla 0,05; 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tayin alt sınırı ise sırasıyla 0,16; 0,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

UPSK-FDD yöntemi ile Optimizasyonu ve sonrasında validasyonu yapılmış analitik koşullar hem FDD hem de K/KD bağlı SK cihazında uygulandı. SK-KS ile bilinen MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarının molekül ağırlıkları belirlenmesinin yanında bazik hidroliz ve oksidasyon bozundurmaları ile oluşan safsızlıkların molekül ağırlığı belirlenmiştir. Bazik hidroliz safsızlığının FDD spektrumuna bakıldığında DES ile benzer olduğu görüldü. DES safsızlığı olduğu tahmin edilen bu maddenin molekül ağırlığı; 352 olarak bulundu. Bu molekül ağırlığı N-Asetil Desloratadin ile aynıdır. Bu verilerden yola çıkarak bu safsızlığın N-asetil Desloratadin olduğu tezine varıldı. Oksidasyon bozundurma sonrası Montelukast safsızlığı olan IMP2'nin hemen yanında oluşan safsızlığının FDD spektrumuna bakıldığında IMP2 ile benzer olduğu görüldü. Bu maddenin molekül ağırlığı da 352 olarak bulundu. Bu molekül ağırlığı IMP2 ile aynıdır. Bu safsızlık ve IMP2'nin Montelukast Sülfoksitin diastereoizomerleri olabileceği tezine varıldı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında alerjik rinit tedavisi için yaygın kullanılan Desloratadin, Levosetirizin ve Montelukast etken maddelerinin ve safsızlıklarının iki farklı sistem kullanılarak eş zamanlı analiz yapılabilmesi için gerekli parametreler belirlendi ve bu parametreler uygulanarak analizleri yapıldı. Analiz yöntemi oluşturmak için tampon çözelti molaritesi ve hareketli faz bileşimi, kolon, akış hızı ve sıcaklık koşullarının optimizasyonu ile analizler için en iyi koşullar belirlendi. İki farklı analiz sistemi olan UPSK-FDD ve YPSK-FDD birbirleri ile karşılaştırıldı. SK-KS yöntemi ile de bilinen MON, DES, LEV moleküllerini ve safsızlıklarının molekül ağırlıkları belirlenmesinin yanında; çalışmalar sırasında tespit edilen bazik hidroliz ve oksidasyon bozundurmaları ile oluşan safsızlıkların molekül ağırlığı belirlendi.

Montelukast, Levosetirizin ve Desloratadin'in tek başına veya diğer ilaçlarla ikili kombinasyon halinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi, UV spektrofotometri, ince tabaka kromatografisi ve sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi gibi çeşitli teknikler kullanılarak belirlenmesi için analitik yöntemlerin sayısı bildirildi. Bununla birlikte, Montelukast, Levosetirizin, Desloratadin ve safsızlıklarının eşzamanlı analizi için şimdiye kadar yayınlanan herhangi bir valide edilmiş YPSK ve UPSK yöntemi bulunamadı. Bu çalışma ile, Montelukast, Levosetirizin, Desloratadin ve IMP1, IMP2, IMP3 safsızlıklarının eşzamanlı analizi için hızlı ve hassas YPSK ve UPSK yöntemlerini önerildi ve doğrulandı.

Sonuç olarak uygulanan validasyon parametreleri değerlendirildiğinde; geliştirilen yöntemlerin seçici, tekrarlanabilir, hassas, kesin ve kararlı yöntemler olduğu görülmektedir. İki farklı sistem olan UPSK-FDD ve YPSK-FDD cihazlarında ters faz sıvı kromatografisi ile geliştirilen yöntemler karşılaştırıldığında YPSK-FDD sistemi ile UPSK-FDD sistemi kadar hızlı ve hassas analiz yöntemi geliştirildiği görüldü. Bu analiz yöntemleri farmasötik dozaj formlarında da başarı ile uygulanmış

ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirilmeler student-t ve Fisher (F) testleri ile yapılmıştır. Student-t ve Fisher (F) testleri tutarlı olup, yöntemlerin birbirine eşdeğer oldukları gösterilmiştir.



ÖZET

Stabilite göstergeli sıvı kromatografisi ile montelukast içeren ikili etken maddelerin farmasötik dozaj şekillerinden aynı anda analizi

Bu tezin amacı alerjik rinit tedavisinde yaygın kullanılan Desloratadin, Levosetirizin ve Montelukast etken maddelerinin ve safsızlıklarının iki farklı sistem kullanılarak aynı anda analizleri için yöntemi belirlemektir. Yöntem geliştirme aşamasında farklı hareketli faz bileşimi, farklı sıcaklık, akış hızının yöntem üzerindeki etkileri gibi deney şartları optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sırasında tespit edilen bazik hidroliz ve oksidasyon bozundurmaları ile oluşan safsızlıkların molekül ağırlığı SK-KS yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntemlerin biri olan UPSK-FDD yöntemi ile analiz çalışmaları Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm kolonda, sıcaklık 25°C ve 0,6 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılmıştır. Hareketli faz içeriğinde; ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) ve 5 mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) akış programı ile uygulanmıştır. UPSK-FDD yöntemi dalga boyu 238 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen bir diğer yöntem olan YPSK-FDD yöntemi ile çalışmalar Inertsil, Ph3 100×4,6 mm, 3µm kolonda, sıcaklık 25°C ve 1,2 mL dk⁻¹ akış hızı ile yapılmıştır. Hareketli faz içeriğinde; ACN (%0,15 trifloro asetik asit içeren) ve 5 mM amonyum asetat (trifloro asetik asit ile pH sı 3,2 ye ayarlandı) akış programı ile uygulanmıştır. YPSK-FDD yöntemi dalga boyu 238 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlenmiştir. Montelukast ve Levosetirizini aynı anda analiz için alternatif bir YPSK-FDD yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntem ile çalışmalar Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) kolonda, sıcaklık 40°C, akış hızı 1,5 mL dk⁻¹, dalga boyu 240 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir. Hareketli faz içeriğinde; Metanol: Amonyum asetat (pH: 4)- 10 mM, 85:15 (h/h) ile uygulanmıştır.

Geliştirilen yöntemler valide edilmiş; hızlı, seçici, hassas, güvenilir, çevreci yöntemlerdir. Önerilen UPSK-FDD ve YPSK-FDD yöntemleri farmasötik dozaj formlarında da başarı ile uygulanmıştır. Böylece analiz sonuçlarının yardımcı maddelerden etkilenmediği ve ilaç numunelerine uygulanabilirliği de gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen her iki yöntemin istatistiksel değerlendirmesi Student-t ve F testi ile yapılmış ve yöntemlerin birbirine eşdeğer oldukları gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Desloratadin, İlaç analizi, Levosetirizin, Montelukast, Safsızlık, SK-KS, UPSK-FDD, Validasyon, YPSK-FDD.

SUMMARY

A Stabbility Indicating Liguid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Montelukast Binary Mixtures in Pharmaceutical Dosage Forms

The aim of this thesis is to develop a method for simultaneous analysis of the active ingredients and impurities of Desloratadine, Levocetirizine and Montelukast, which are widely used in the treatment of allergic rhinitis, using two different systems. For this reason, experimental conditions such as different mobile phase composition, different temperature, flow rate effects were optimized. The molecular weight of the impurities formed by the basic hydrolysis and oxidation decompositions detected during the optimization studies was determined by the LC-MS method. Analysis studies with UPLC-DAD method, which is one of the methods, were performed on Zorbax SB-Phenyl, 50×4,6 mm, 1,8µm column, temperature 25°C and flow rate of 0.6 mL min⁻¹. In the mobile phase content; ACN (containing 0.15% trifluoroacetic acid) and 5 mM ammonium acetate (pH adjusted to 3.2 with trifluoroacetic acid) were applied by flow program. The wavelength was chosen as 238 nm and the injection volume was 10 µL. With the HPLC-DAD method, another developed method, studies were carried out in Inertsil, Ph3 100×4,6 mm, 3µm column, temperature 25°C and 1.2 mL min⁻¹ flow rate. In the mobile phase content; ACN (containing 0.15% trifluoroacetic acid) and 5 mM ammonium acetate (pH adjusted to 3.2 with trifluoroacetic acid) were applied by flow program. The wavelength was chosen as 238 nm and the injection volume was 20 µL. An alternative HPLC-DAD method has also been developed for simultaneous analysis of Montelukast and Levocetirizine. With this method, studies were carried out on a Kinetex C18 (150 mm x 4.6 mm, 5.0 µm) column, temperature 40°C and flow rate of 1.5 mL min⁻¹. In the mobile phase content; Methanol was applied with ammonium acetate (pH: 4)-10 mM, 85:15 (v/v). The wavelength was chosen as 240 nm and the injection volume was 10 µL.

The developed methods have been validated; These are fast, selective, sensitive, reliable and environmentally friendly methods. The proposed UPLC-DAD and HPLC-DAD methods have also been successfully applied in pharmaceutical dosage forms. Thus, it has been shown that the analysis results are not affected by the excipients and its applicability to drug samples. In addition, the statistical evaluation of both developed methods was made with Student-t and F tests and it was shown that the methods were equivalent to each other.

Keywords: Desloratadine, Drug analysis, Impurity, Levocetirizine, Montelukast, LC-MS, UPLC-DAD, Validation, HPLC-DAD.

KAYNAKLAR

- BABU, R. S., BHARADWAJ, K. A., ARJUN, N. C., PRASAD, N. & PRASAD, V. (2012). A Validated Comparitative LC and Ratio First Derivative Spectrophotometric Method for the Simultaneous Determination of Levocetirizine dihydrochloride and Montelukast sodium in Bulk and Pharmaceutical dosage forms. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **02**(08): 243-249.
- BANKAR, R. M. & PATEL, D. B. (2013a). Simultaneous estimation of montelukast sodium and desloratadine by ratio spectra derivative spectrophotometry method in combined dosage forms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **5**(1): 193-199.
- BANKAR, R. M. & PATEL, D. B. (2013b). Spectrophotometric Determination Of Montelukast Sodium And Desloratadine In Combined Dosage Form. *International Journal of ChemTech Research*. **5**(1): 136-141.
- BASU, A., BASAK, K., CHAKRABORTY, M. & RAWAT, I. S. (2011). Simultaneous RP-HPLC Estimation of Levocetirizine Hydrochloride and Montelukast Sodium in Tablet Dosage Form. *International Journal of ChemTech Research*. **3**(1): 405-410.
- BORISH, L. (2003). Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. **112**(6): 1021-1031.
- BOUSQUET, J., VAN CAUWENBERGE, P. & KHALTAEV, N. (2001). Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **108**(5): S147-S334.
- CHAWLA, G. & RANJAN, C. (2016). Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*. **3**(1): 1-16.
- CHEWG. (2005). ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation Of Analytical Procedures:Text And Methodology Q2(R1). In International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use.
- CHHATRALA, V. R. & PATEL, J. (2012). Simultaneous Estimation Of Montelukast Sodium And Desloratadine By RP-HPLC In Their Marketed Formulation. *International Journal of ChemTech Research*. **4**(4): 1402-1407.
- CIEBIADA, M., GORSKA-CIEBIADA, M., BARYLSKI, M., KMIECIK, T. & GORSKI, P. (2011). Use of Montelukast Alone or in Combination with Desloratadine or Levocetirizine in Patients with Persistent Allergic Rhinitis. *American Journal of Rhinology & Allergy*. **25**(1): e1-e6.
- CRYSTAL-PETERS, J., NESLUSAN, C. & WHITE, A. (2001). An Investigation of Allergic Rhinitis, Asthma, and Medication Use in a Privately Insured Population. *J Managed Care Pharm*. **7**(4): 287-291.
- ÇAL, A. (2014). Yeni Nesil Platin Komplekslerinin kütle Spektrometrik Yöntemlerle İncelenmesi ve Antikanser Aktivitelerinin İn Vitro Olarak Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi.
- DE HOFFMANN, E., CHARETTE, J., STROOBANT, V. (1996). Mass Spectrometry Principles and Applications. Chichester: John Wiley & Sons.

- DEMIRCI, A. & ÖZCİMDER, M. (2009). Kromatografik Yöntemler. Ankara: Kurban Matbaacılık.
- DESAI, J. A., DEDHIYA, P.P., PATEL, H.B., MISHRA, A.D., SHAH, S.A. (2020). Application of analytical quality by design approach in method development for the simultaneous estimation of levocetirizine hydrochloride and montelukast sodium in their combined dosage form. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 33: 119-129.
- ERKMEN, C., ZENGİN KURNALI, S., USLU, B. (2019). Development of Reverse Phase Liquid Chromatographic method by using core shell particles column for determination of montelukast and levocetirizine from pharmaceutical capsule dosage forms. *Revue Roumaine de Chimie*. 64 (10): 859-866
- ERKMEN, C., GEBREHIWOT W.H., USLU, B. (2021). Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest Applications in the Pharmaceutical Researches. *Current Pharmaceutical Analysis*. 17 (3): 316-345
- EUERBY, M. R., PETERSSON, P., CAMPBELL, W. & ROE, W. (2007). Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis. *Journal of Chromatography A*. **1154**(1-2): 138-151.
- FANALI S, HADFD PR., POOLE C, SCHOENMAKERS P and LLOYD DK (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.
- FDA. (2013). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (ed. F. a. D. A. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug and C. f. V. M. C. Evaluation and Research (CDER)).
- FENN, J. B., MANN, M., MENG C.K., WONG, F.S., WHITEHOUSE, C.M.,. (1990). Electrospray ionization principles and practice. *Mass Spectrometry*. **9** 37.
- FENN JB, M. M., MENG CK, WONG SF, WHITEHOUSE CM. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.. *Science*. **246**(4926): 64–71.
- GÜMÜŞTAŞ, M (2009). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile aynı anda analizi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- GUMUSTAS, M. (2016). Beta agonist ilaç etken maddelerin kiral davranışlarının incelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- GUMUSTAS, M. & ÖZKAN, S. A. (2011). The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*. 5(1-21).
- HERBERT, G. & JOHNSTONE, R. A. W. (2003). Mass Spectrometry Basics by Christopher. Florida, ABD: CRC Press.
- İBRAHİM, F. A., EL-ENANY, N., EL-SHAHENY, R. N. & MIKHAIL, I. E. (2015). Simultaneous determination of desloratadine and montelukast sodium using second-derivative synchronous fluorescence spectrometry enhanced by an organized medium with applications to tablets and human plasma. *Luminescence*. **30**(4): 485-494.

- JAYASIMHA, N., REDDY, V. K. & GOUD, E. S. K. (2015). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of montelukast sodium and levocetirizine dihydrochloride tablets. *Der Pharmacia Sinica*. **6**(9): 8-14.
- JENKE, D. R. (2006). Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **19**(5): 737-757.
- KARABİÇAK, H. (2011). Alerjik rinitli hastalarda flutikazon propiyonatın tek başına, levosetirizin veya montelukast ile birlikte kullanımlarının tedavi üzerine etkinliklerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi thesis, Kırıkkale Univ.
- KAZAKEVICH, Y. V. & LOBRUTTO, R. (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists: Wiley.
- KROMIDAS, S. (Ed.) (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*. Weinheim: Wiley- VCH Verlag GmbH & CoK GaA Publishers.
- KUMAR BHARDWA SANTOSH, DWIVEDIA K. & D., A. D. (2015). A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **5**(4): 76-81.
- KUMAR, N., ANGHORE, D., RAWAL, R. K. & PANDEY, A. (2018). RP-HPLC and UV Method Development for Simultaneous Estimation of Doxofylline, Montelukast and Levocetirizine Dihydrochloride in Pharmaceutical Dosages Form. *Analytical Chemistry Letters*. **8**(2): 195-204.
- LEMANSKE, R. F. (1998). A review of the current guidelines for allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **101**(2): 392-396.
- LUNDANES, E., REUBSAET, L. & GREIBROKK, T. (2013). Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods: Wiley.
- MAMATHA, J. & DEVANNA, N. (2018). RP-HPLC-PDA Method for Simultaneous Quantification of Montelukast, Acebrophylline and Desloratadine Tablets. *Asian Journal of Chemistry*. **30**(6): 1383-1386.
- MANDHANE, S. N., SHAH, J. H. & THENNATI, R. (2011). Allergic rhinitis: An update on disease, present treatments and future prospects. *International Immunopharmacology*. **11**(11): 1646-1662.
- MASTANAMMA, S., RAMBABU, G., SAIDULU, P. & TEJASWINI, I. S. (2015). Designing of forced degradation studies and development of validated stability indicating method for simultaneous estimation of desloratadine and montelukast sodium in their formulation. *Der Pharmacia Lettre*. **7**(3): 39-47.
- MAY, J. R. & DOLEN, W. K. (2017). Management of Allergic Rhinitis: A Review for the Community Pharmacist. *Clinical Therapeutics*. **39**(12): 2410-2419.
- NATARAJ, K. S., BABU, T. V. & DUZA, M. B. (2011). Method Development And Validation Of Montelukast Sodium In Bulk And Pharmaceutical Dosage Forms By RP-HPLC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* . **4**(11): 739-749.

- NEMLIOĞLU, T. (2019). Bazı Anjiotensin II Antagonisti İlaç Karışımlarının Fotodiyot Dizi Dedektör Ve Kütle Spektrometresi İle Sıvı Kromatografisinde Aynı Anda Analizleri Ve Validasyonları. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- NIESSEN, W. M. A. (2006). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: CRC Press.
- OZKAN, S. A. (2012). Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation: HNB publishing.
- OZKAN, S. A., KAUFFMANN, J.-M. & ZUMAN, P. (2015). Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- PALABIYIK, I. M., CAGLAYAN, M. G. & ONUR, F. (2012). Using derivative and ratio spectra derivative: spectrophotometries as new data preprocessing method in partial least squares technique for resolving overlapped spectra of montelukast sodium, desloratadine, and levocetirizine dihydrochloride. *Reviews in Analytical Chemistry*. **31**(2).
- PRATIMA, N. A. (2018). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*. **1**(1).
- RAJA, T. & RAO, A. L. (2012). Development And Validation Of A Reversed Phase Hplc Method For Simultaneous Determination Of Levocetirizine And Montelukast Sodium In Tablet Dosage Form. *International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry*. **2**(4): 1057-1063.
- RAO, G. & GOYAL, A. (2016). Development of stability indicating studies for pharmaceutical products: an innovative step. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*. **3**(3): 110.
- RAO, M. P., SRILAKSHMI, M., TEJA, B. R. & RAO, D. N. (2014). Analytical Method Development and Validation of Levocetirizine Hydrochloride and Montelukast Sodium in Combined Tablet Dosage Form by RP-HPLC. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. **5**(6): 1010.
- RASHED, N. S. & NASR, Z. A. (2019). Simultaneous determination of levocetirizine dihydrochloride and montelukast sodium in human plasma by LC-MS/MS: development, validation, and application to a human pharmacokinetic study. *Acta Chromatographica*. **31**(3): 194-200.
- RATHORE, A. S., SATHIYANARAYANAN, L. & MAHADIK, K. R. (2010). Development of Validated HPLC and HPTLC Methods for Simultaneous Determination of Levocetirizine Dihydrochloride and Montelukast Sodium in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Form. *Pharmaceutica Analytica Acta*. **01**(01).
- ROBARDS, K., JACKSON, P. E. & HADDAD, P. A. (2012). Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods: Elsevier Science.
- ROTE, A. R. & NIPHADE, V. S. (2011). Determination of Montelukast Sodium and Levocetirizine Dihydrochloride in Combined Tablet Dosage Form by Hptlc and First-Derivative Spectrophotometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **34**(3): 155-167.
- RXMEDIAPHARMA (2018), İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Prof.Dr. Levent Üstünes, (Ed.), 2008, Gemaş Yayıncılık.

- SCOTT, R. P. W. (1995). *Techniques and Practice of Chromatography*: Taylor & Francis.
- SHAMMOUT, A. M. J. (2013). Development And Validation Of An Ultra-Performance Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometry (Uplc-Ms/Ms) Method For Determination Of Betamethasone Or Dexamethasone In Pharmaceutical Preparations, Hacettepe.
- SHARMA, B. K. (2007). *Chromatography*. Meerut, India: Krishna Prakashan.
- SIMPSON, R. J. (2003). *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J. & NIEMAN, T. A. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*: Saunders College Pub.
- SRIVIDYA, P., TEJASWINI, M., SRAVANTHI, D. & NALLURI, B. N. (2013). Simultaneous Analysis of Levocetirizine Dihydrochloride, Ambroxol Hydrochloride, and Montelukast Sodium by Rp-Hplc - Pda Method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **36**(20): 2871-2881.
- SURESH, R., MANAVALAN, R. & VALLIAPPAN, K. (2012a). Chemometrics Assisted RP- HPLC Method for the Simultaneous Determination of Levocetirizine, Ambroxol and Montelukast in Pharmaceutical Formulation. *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*. **1**(3): 1205-1220.
- SURESH, R., MANAVALAN, R. & VALLIAPPAN, K. (2012b). HPLC method for the simultaneous determination of Levocetirizine, Ambroxol and Montelukast in human Plasma employing response Surface Methodology. *International Journal of Drug Development & Research*. **4**(3): 173-185.
- SWADESH, J. K. (1996). *HPLC: Practical and Industrial Applications*: Taylor & Francis.
- SWARTZ, M. (2010). Hplc Detectors: A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **33**(9-12): 1130-1150.
- SWARTZ, M. E. (2007). UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **28**(7-8): 1253-1263.
- TALEUZZAMAN, M., ALI, S., GILANI, S. J., IMAM, S. S. & HAFEEZ, A. (2015). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. **2**(6).
- TAYLOR, T. (2015). Choosing the Right HPLC Stationary Phase. *LCGC North America*. **33**(3): 218.
- TİTCK. (2017). Türk Farmakopesi (ed. T. İ. v. T. C. Kurumu). T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, Türkiye.
- YILMAZ, A. (2012). Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu.. TURKLAB Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği, İstanbul.
- ZOTOU, A. (2012). An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Open Chemistry*. **10**(3).

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Selda
Soyadı Zengin Kurnalı

II- Eğitimi

2005–2008 Yüksek Lisans/ Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı
2000–2004 Lisans/ Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü
1996–2000 Lise/ Mehmet Çelikel Lisesi (Zonguldak)

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Kimya Mühendisi

IV- Mesleki Deneyimi

Nobel İlaç A.Ş. Analitik Ar-ge Uzmanı (Mayıs 2014-)
Nobel İlaç A.Ş. Analitik Ar-ge Uzmanı (Ocak 2011-Mayıs 2014)
Nobel İlaç A.Ş. Analitik Ar-ge Sorumlusu (Şubat 2005-Ocak 2011)

V- Bilimsel İlgi Alanları

Stabilite göstergeli analitik yöntem geliştirme ve validasyonu, İlaç analizleri,
İlaç stabilite analizleri

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Poster sunumu

Zengin Kurnalı S., Öztürk C., Uslu A., Uslu B., Stability Indicating UPLC Method for the Determination of Montelukast Sodium, Desloratadine and Their Impurities from Fixed Dose Combination Tablets, Poster Sunumu, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 2018, Ankara

Zengin Kurnalı S., Öztürk C., Sert R., Uslu, RP-HPLC and RP-UPLC Method Development for Simultaneous Estimation of Montelukast, Levocetirizine Dihydrochloride and Desloratadine in Pharmaceutical Dosage Forms, Poster Sunumu, Euroanalysis 2019, iSTANBUL

Yayın

Erkmen, C., Zengin Kurnalı, S., Uslu, B., Development of reverse phase liquid chromatographic method by using core shell particles column for determination of Montelukast and levocetirizine from pharmaceutical capsule dosage forms, *Revue Roumaine de Chimie*, 2019,64(10), 859-866(DOI: 10.33224/rch.2019.64.10.04).

Verdiği Seminerler

“İlaç Endüstrisindeki Üretim Cihazlarında Madde Kalıntılarının HPLC İle Analizleri” konu başlıklı 2011-12/Güz döneminde Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda seminer verilmiştir.

“Stabilite Göstergeli Analitik Metod Validasyonu” konu başlıklı 2011-12/Güz döneminde Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda seminer verilmiştir.