



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**VORTİOKSETİN İÇEREN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA
SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK
YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNLERİ**

Cansu ALVER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2016- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VORTİOKSETİN İÇEREN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA
SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK
YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNLERİ**

Cansu ALVER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2016- ANKARA

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Vortioksetin İçeren Farmasötik Preparatlarda Spektrofotometrik ve Kromatografik Yöntemlerle Miktar Tayinleri" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi 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: Cansu ALVER

Tarih: 13.11.2016

İmza: C. Alver

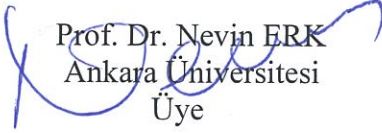
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında Cansu ALVER tarafından hazırlanan “Vortioksetin İçeren Farmasötik Preparatlarda Spektrofotometrik ve Kromatografik Yöntemlerle Miktar Tayinleri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/11/2016



Prof. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN
Gazi Üniversitesi
Üye

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

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Vortiooksetin Hidrobromürün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	4
1.2.1. Kimyasal Yapı	4
1.2.2. Farmakolojik Özellikleri	6
1.2.2.1. Farmakodinamik Özellikleri	6
1.2.2.2. Farmakokinetik Özellikler	8
1.2.2.3. Kullanımı	10
1.2.2.4. Yan Etkiler	11
1.2.2.5. Kontrendikasyonları	11
1.3. Vortiooksetin Miktar Tayini İçin Günümüme Kadar Uygulanmış Olan Analiz Yöntemleri	12
1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler	15
1.4.1. Kromatografi	15
1.4.1.1. Kromatografinin Temel İlkeleri	18
1.4.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi	24
1.4.1.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografinin Avantajları	27
1.4.1.2.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografinin Dezavantajları	28
1.4.2. Spektrofotometri	29
1.4.2.1. Spektroskopinin Temeli ve Lambert-Beer Yasası	29
1.4.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi	31
1.4.2.3. UV-GB Spektrofotometre	32
1.4.2.4. Türev Spektrofotometri	34
1.4.2.4.1. Türev Spektrofotometrinin Avantajları ve Dezavantajları	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan Farmasötik Preparatlar	37
2.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	37
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
2.4. Kullanılan Standart	38
2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi ile vortiooksetin.HBr Miktar Tayini	38
2.5.1. Ortam Şartları ve Hesaplamalar	38
2.5.2. Deneyin Yapılışı	39

2.5.2.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması	39
2.5.2.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası Deneyler)	39
2.5.2.2.1. Gün İçi Deneyler	39
2.5.2.2.2. Günler Arası Deneyler	40
2.5.2.2.3. Yüzde Geri Kazanım Çalışmaları	40
2.5.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	40
2.5.2.3.1. Miktar Tayini Analizi	40
2.5.2.3.2. İçerik Tekdüzeliliği Analizi	41
2.5.2.4. Hızlandırılmış Degradasyon Çalışmaları	41
2.5.2.4.1. Termal Degradasyon	41
2.5.2.4.2. Asit Degradasyon	41
2.5.2.4.3. Alkali Degradasyon	42
2.5.2.4.4. Oksidatif Degradasyon	42
2.5.2.4.5. Fotokimyasal Degradasyon	43
2.6. Spektrofotometrik Yöntem ile vortiooksetin.HBr Miktar Tayini	43
2.6.1. Doğrudan UV-GB Spektrofotometri	43
2.6.1.1. Ortam Şartları ve Hesaplamalar	43
2.6.1.2. Deneyin Yapılışı	44
2.6.1.2.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması	44
2.6.1.2.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması	44
2.6.1.2.2.1. Gün İçi Deneyler	44
2.6.1.2.2.2. Günler Arası Deneyler	44
2.6.1.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	45
2.6.1.2.3.1. Miktar Tayini Analizi	45
2.6.2. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometri	45
2.6.2.1. Deneyin Yapılışı	45
2.6.2.1.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması	45
2.6.2.1.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası Deneyler)	46
2.6.2.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	46
2.6.2.1.3.1. Miktar Tayini Analizi	46
3.BULGULAR	47
3.1. Vortiooksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin YBSK Analiz Bulguları	47
3.1.1. Etken Madde ve İnternal Standart Spektrumları	47
3.1.2. Hareketli Faz Tampon Türlerinin Denenmesi	48
3.1.3. Hareketli Faz pH Değişikliklerinin Etkisi	49
3.1.4. Yöntem İçin Uygun Dalgaboyu Tarama Sonuçları	51
3.1.5. Kolon Seçiminin Yapılması	52
3.1.6. Çalışma Eğrisi Denklemi Verileri Eldesi	52
3.1.7. Tekrarlanabilirlik çalışmaları	53
3.1.7.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler	53
3.1.8. Doğruluk	56
3.1.8.1. Geri Kazanım Çalışma Verileri	56
3.1.9. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	57
3.1.9.1. Miktar Tayini Analiz Bulguları	57
3.1.9.2. İçerik Tekdüzeliliği Verileri	57

3.1.10. Hızlandırılmış Degradasyon Çalışmaları Verileri	59
3.2. Vortioksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Doğrudan UV-GB Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları	60
3.2.1. Çözücü için Tampon Türlerinin Denenmesi	60
3.2.2. Çalışma Eğrisi Denklem Verileri Eldesi	64
3.2.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	66
3.2.3.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler	66
3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	67
3.3. Vortioksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Birinci Türev UV-GB Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları	68
3.3.1. Çalışma Denklemi Verileri Eldesi	68
3.3.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	70
3.3.2.1. Gün İçi Deneyler	70
3.3.2.2. Günler Arası Deneyler	71
3.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	71
4. TARTIŞMA	73
4.1. YBSK Analizleri	73
4.2. Spektrofotometrik Analizler	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
ÖZET	79
SUMMARY	80
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi kapsamında, bir antidepresan etkili etken madde olan vortiksetinin ilaç piyasasında şu an tek örneğinin bulunduğu tablet formundaki preparatlarından miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografik ve UV-GB spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin Türkiye ilaç piyasasına giren preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında değerli katkılarıyla çalışmalarına yön veren sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e; yüksek lisans eğitimim için destek olan Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Analiz ve Kontrol Laboratuvarları Daire Başkanı Kim. Yücel DENER'e; İlaç ve Kozmetik Ürünler Laboratuvarları Birim Sorumlusu Kim. Lale DEMİREL'e; yaptığım çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen Bil. Uzm. Kim. Soner BAY'a, Uzm. Kim. Engin ER'e, Ecz. Ali Kemal ATEŞ'e ve Ecz. Gizem TIRIS'a, derin teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince tavsiyeleri, öngörülleri ve destekleri için Ecz. Nihal KOCA'ya, Bio. Ezgi HEREK'e, Bil. Uzm. Ecz. Munise VURUCU'ya ve Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu İlaç ve Kozmetik Ürünler Laboratuvarları Birimi mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa, seçicilik (Kromatografik yöntem)
a	Absorbtivite ($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
A	Absorbans değeri
b	Işığın örnek içinde adıgı yol (cm)
c	Işık hızı ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)
cd	Kandela
cm	Santimetre
C	Konsantrasyon (g.L^{-1})
$^{\circ}\text{C}$	Derece Celsius
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Asetik Asit
D_2	Döteryum
DAD	Diode-array dedektör
dk	Dakika
ϵ	Epsilon, molar absorptivite değeri ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
E	Bir molekülün iç enerjisi (J)
E_d	Bir molekülün dönme enerjisi (J)
E_e	Bir molekülün elektronik enerjisi (J)
$E_{\bar{o}}$	Bir molekülün ötelenme enerjisi (J)
EPR	Elektron paramagnetik rezonans
ESR	Elektron spin rezonansı
E_t	Bir molekülün titreşme enerjisi (J)
$^{\circ}\text{F}$	Derece Fahrenheit
g	gram
h	Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34} \text{ J.s}$)
H	Teorik tabaka yüksekliği (Kromatografik yöntem)
H_2	Hidrojen
H_3BO_3	Borik Asit

HBr	Hidrobromür
HCl	Hidroklorik asit
HILIC-MS	Kütle spektrofotometreli hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi
I	Örnekten çıkan ışımının şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
I ₀	Örneğe gelen ışımının şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
IR	İnfrared (Kızılötesi)
J	Joule
İTK	İnce tabaka kromatografi
K	Dağılma katsayısı (Kromatografik yöntem)
k'	Kapasite faktörü (Kromatografik yöntem)
KD	Kabul değeri
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
λ	Lamda, Işımanın dalga boyu (nm)
L	(i) Kolon uzunluğu (Kromatografik yöntem); (ii) Litre
LC-FTIR	Likit Kromatografi - Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopi
LC-MS	Kütle spektrometre likit kromatografi
μ	Mikron
m	Metre
M	Molar
Ma	Molekül ağırlığı (g)
MADRS	Montgomery-Csberg Depression Rating Scale
MAOI	Monoamin oksidaz inhibitörü
MDB	Majör depresif bozukluk
MeOH	Metanol
μg	Mikrogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
√	Nü, Işımanın frekansı (s ⁻¹)
N	Teorik plaka sayısı (Kromatografik yöntem)
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Trisodyum sitrat

NaOH	Sodyum Hidroksit
NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	Amonyum Asetat
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezolüsyon spektrofotometre
ppm	Milyonda bir birim
r	Korelasyon katsayısı
R	Rezolüsyon (Kromatografik yöntem)
R _f	Alıkonma faktörü (Kromatografik yöntem)
RSD	Bağıl standart sapma
s	Saniye
SS	Standart sapma
SSRI	Seçici serotonin geri alım inhibitörü
T	Transmittans (Geçirgenlik)
t ₀	Ölü zaman (Kromatografik yöntem)
TAS	Tayin alt sınırı (µg.mL ⁻¹)
TCA	Trisiklik antidepresan
t _R	Alıkonma zamanı (Kromatografik yöntem)
t _w	Pik taban genişliği (Kromatografik yöntem)
UPLC	Ultra performans likit kromatografi
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-GB	Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi
V _H	Ölü Hacim (Kromatografik yöntem)
V _R	Alıkonma hacmi (Kromatografik yöntem)
V _{ss}	Ortalama dağılım hacmi (Kromatografik yöntem)
W	Tungsten
Xe	Ksenon
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
YS	Yakalama sınırı (µg.mL ⁻¹)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Alıkonma zamanı ve ölü zamanın kromatogramda gösterimi	19
Şekil 1.2. Van Deemter grafiği ve teorik plaka yüksekliği ile A,B ve C ilişkisi	22
Şekil 1.3. Rezolüsyonun alıkonma zamanı ve pik genişliği ile ilgisi	24
Şekil 1.4. Lambert-Beer yasasından sapmalar	31
Şekil 1.5. Çift ışın yollu spektrofotometre cihazı	32
Şekil 1.6. Basit bir orijinal spektrum	34
Şekil 1.7. (a); Basit bir orijinal spektrum (b); Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi (c); Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi (d); Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi (e); Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi	35
Şekil 3.1. Vortioksetin.HBr'ün ultraviyole-görünür bölgedeki spektrumu	47
Şekil 3.2. Kafeinin ultraviyole-görünür bölgedeki spektrumu	47
Şekil 3.3. 80 µg/mL vortioksetin.HBr ve 40 µg/mL kafein çözeltisinin amonyum asetat tampon içeren hareketli fazdaki kromatogramı	48
Şekil 3.4. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin potasyum dihidrojen fosfat tampon içeren hareketli fazdaki Kromatogramı	48
Şekil 3.5. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0,05 M KH ₂ PO ₄ tampon (pH 6,00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı	49
Şekil 3.6. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0,05 M KH ₂ PO ₄ tampon (pH 5,00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı	49
Şekil 3.7. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0,05 M KH ₂ PO ₄ çözelti (pH 4,00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı	50
Şekil 3.8. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0,05 M KH ₂ PO ₄ tampon (pH 3,00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı	50
Şekil 3.9. Hareketli faz içerisindeki değişen konsantrasyonlarda vortioksetin.HBr ve sabit olarak 20 µg/mL kafein içeren a) 20 µg/mL; b) 30 µg/mL ; c) 40 µg/mL ; d) 50 µg/mL; e) 60 µg/mL; ve f) 70 µg/mL çözeltilerinin 225.0 nm'deki kromatogramları	52
Şekil 3.10. YBSK yöntemi ile elde edilen çalışma grafiği	53

Şekil 3.11. Oksidatif degradasyon sonucunda vortioksetin.HBr etken maddesinin tamamen bozunduğunu gösteren kromatogram (225,0 nm)	59
Şekil 3.12. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M sitrat tampon (pH:2,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	60
Şekil 3.13. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M sitrat tampon (pH:3,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	60
Şekil 3.14. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	61
Şekil 3.15. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M asetat tampon (pH:5,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	61
Şekil 3.16. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:6,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	62
Şekil 3.17. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:7,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	62
Şekil 3.18. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:8,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	63
Şekil 3.19. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M borat tampon (pH:9,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	63
Şekil 3.20. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M borat tampon (pH:10,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu	64
Şekil 3.21. 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) içerisinde hazırlanan vortioksetin.HBr'ün a) 6 µg/mL; b) 8 µg/mL; c) 10 µg/mL; d) 14 µg/mL; e) 18 µg/mL; f) 24 µg/mL; ve g) 30 µg/mL konsantrasyonlarına ait, doğrudan UV spektrumları	64
Şekil 3.22. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 228,0 nm 'deki çalışma Grafiği	65
Şekil 3.23. 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) içerisinde hazırlanan vortioksetin.HBr'ün a) 6 µg/mL; b) 8 µg/mL; c) 10 µg/mL; d) 14 µg/mL; e) 18 µg/mL; f) 24 µg/mL; ve g) 30 µg/mL konsantrasyonlarına ait, birinci Türev UV spektrumları (λ_1 : 237,7 nm; λ_2 : 257,2 nm)	68
Şekil 3.24. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 237,7 nm'de elde edilen çalışma grafiği	69
Şekil 3.25. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 257,2 nm'de elde edilen çalışma grafiği	69

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. 0,05 M KH_2PO_4 tampon :MeOH (60:40; h/h) hareketli fazının pH değişimlerinin alıkonma zamanlarına etkisi (Dalga boyu:225 nm)	51
Çizelge 3.2. 220,0-235,0 nm dalgaboyu aralığında etken madde alanları	51
Çizelge 3.3. Kullanılan kolonlar sonucu elde edilen asimetri faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri (225,0 nm)	52
Çizelge 3.4. YBSK yöntemi ile çalışma eğrisi denklem verileri (225 nm, n=7)	53
Çizelge 3.5. YBSK yöntemi ile, her birinde 20 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde kafein iç standardı bulunan çözeltilerle vortioksetin.HBr etken maddesinden elde edilen gün içi deneysel veriler	54
Çizelge 3.6. YBSK yöntemi ile, her birinde 20 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde kafein iç standardı bulunan çözeltilerle vortioksetin.HBr etken maddesinden elde edilen günler arası deneysel veriler	55
Çizelge 3.7. YBSK yöntemi ile vortioksetin.HBr etken maddesinden elde edilen geri kazanım verileri	56
Çizelge 3.8. YBSK yöntemi ile Brintellix® 10 mg tabletteki vortioksetin miktar tayini analiz verileri	57
Çizelge 3.9. YBSK yöntemi ile Brintellix 10 mg tabletteki vortioksetin.HBr İçerik tekdüzeliği analiz verileri	58
Çizelge 3.10. YBSK yöntemi ile, her birinde 40 $\mu\text{g/mL}$ vortioksetin.HBr ve 20 $\mu\text{g/mL}$ kafein iç standardı bulunan çözeltilerle elde edilen vortioksetin.HBr hızlandırılmış degradasyon çalışma verileri	59
Çizelge 3.11. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemle elde edilen çalışma eğrisi verileri (228,0 nm, n=7)	65
Çizelge 3.12. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen gün içi deneysel veriler	66
Çizelge 3.13. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen günler arası deneysel veriler	66
Çizelge 3.14. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile Brintellix® 10 mg tabletteki analiz sonuçları	67
Çizelge 3.15. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde elde edilen çalışma eğrisi verileri (n=7)	70
Çizelge 3.16. Birinci türev UV-GB spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen gün içi deneysel veriler (237,7 nm)	70
Çizelge 3.17. Birinci türev UV-GB spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen günler arası deneysel veriler (237,7 nm)	71

Çizelge 3.18. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemi farmasötik preparata uygulandığında elde edilen analiz sonuçları (Brintellix® 10 mg /tablet)	72
Çizelge 5.1. Yöntemler arasında istatistiksel değerlendirme verileri (<i>F</i> testi, <i>student'in t</i> testi ve <i>cochran</i> testi)	78



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Majör depresif bozukluk (MDB), kişilerin gündelik hayatlarını sorunsuz sürdürmelerini etkileyecek bir melankoli, keder ve üzüntü durumudur. Bu rahatsızlık klinik depresyon olarak da anılır. Klinik depresyon ile normal depresyonun farkı, klinik depresyonda tıbbi bir teşhisin konmasıdır. Ayrıca normal depresif kişilere kıyasla majör depresifler günlük işlerini yerine getiremeyecek bir çökmürlük halindedir. Majör depresyon, çoğu kişinin dönem dönem yaşadığı kısa veya uzun süreli depresyonların patolojik bir boyuta ulaşmış hali olarak yorumlanabilir. (Wikipedia.org, erişim tarihi:10.10.2015)

MDB belirtileri olarak hayattan keyif alamama, konsantre olamama, ilgi ve dikkat eksikliği ve buna bağlı unutkanlık, değersiz hissetme, kararsızlık, suçluluk hissi, karamsarlık, intihar düşüncesi gibi bilişsel belirtilerin yanı sıra uykuda artış ya da azalış, iştahta artış ya da azalış, enerji azlığı, psikomotor retardasyon veya ajitasyon, cinsel istekte azalma, özsaygı yitimi gibi durumlar gözlenir. Huzursuzluk, endişe, çabuk rahatsız olma ve çabuk sinirlenme gibi duygusal durumlar da ortaya çıkabilir. Fiziksel etkileri, ruhsal semptomlara bağlı olarak aşırı kilo kaybı veya alımı, mide bozuklukları, kusma, terleme şeklinde kendini gösterebilir. Çevresel etkenler, bu rahatsızlıkta oldukça etkilidir, tetikleyicidir ve nöbetlerin artmasına sebep olur. (Wikipedia.org, erişim tarihi:10.10.2015)

İlaç tedavisi uygulanmadan, kendiliğinden geçebilme olasılığı düşük olan bu rahatsızlığın tanısının konulabilmesi için belirtilerin en az 2 hafta bulunması koşulu aranır. Tanı için; belirtiler içerisinde depresif duygulanım, hayattan zevk ve ilgi kaybı gözlenmesinin zorunlu olmasına ek olarak; bahsedilen diğer belirtilerden en az beş tanesinin kişide bulunması gerekir. İlaç tedavisi esnasında, dozajdan bağımsız olarak ara sıra nöbet ve/veya ataklar yaşanabilir. (Noropsikiyatri.blogspot.com.tr, erişim tarihi: 07.10.2015)

MDB ile nörotransmitter denen beyin kimyasalları arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Depresyon esnasında serotonin gibi bazı kimyasalların düzeyi normale göre düşüktür. Fakat bu biyokimyasal bozukluğun depresyonun nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu anlaşılamamıştır. Bazen genetik faktörlerden dolayı da depresyona eğilimli olduğu bir gerçektir. Uyuşturucu, alkol bağımlılığı ve bazı ilaçların kullanımı da depresyona sebep olabilmektedir. (Türkiye Psikiyatri Derneği resmi web sitesi, erişim tarihi: 05.11.2015)

MDB'nin tedavisinde çeşitli antidepresanlar kullanılır. Bu ilaçlar, genel olarak beyindeki kimyasalların seviyesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Monoamin oksidaz inhibitörü (MAOI), trisiklik antidepresan (TCA) ve seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) türü ilaç grupları antidepresan gruplarına aittir. (Psikofarma.info, erişim tarihi: 07.10.2015)

MAOI'lerden bahsetmek gerekirse, örnek olarak fenalzin ve tranilsipromin verilebilir. Monoaminler sadece aminoasitlerden oluşan nörotransmitterlerdir; en iyi bilinen örnekleri serotonin, dopamin ve noradrenalin'dir. Monoamin oksidaz enzimleri(MAO), monoaminlerin oksidasyonlarını katalizler. MAOI'lar ise bu enzimleri inhibe ederek monoaminlerin yıkımını durdurur, böylece Serotonin, Noradrenalin gibi nörotransmitterlerin seviyesinin artmasına sebep olur. MAOI grubu ilaçlar depresyonun yanı sıra birden çok rahatsızlığın giderilmesinde kullanılır. İlacın etkisini göstermesi birkaç hafta sürmektedir. Bu ilaçların kullanımı esnasında tiramin içeren maddeleri tüketmekten kaçınmak gerekir (NHS Choices, erişim tarihi: 03.01.2016). Ayrıca fluoksetin içeren antidepresanlarla birlikte kullanılırlarsa ölüme sebep olabilirler. (Suzer ve ark., erişim tarihi 05.09.2015)

TCA'lar da tıpkı MAOI'lar gibi birden çok rahatsızlığın giderilmesinde etkili olup tedavi etkisi için birkaç hafta beklenmesi gerekir. MAOI'ların alternatifi olarak kullanılabilen TCA'lar noradrenalin ve serotoninin sinaptik aralıktan geri emilimini bloke ederler. TCA türü antidepresanlara örnek olarak amitriptilin, klomipramin, dosulepin, imipramin, lofepramin, nortriptilin, trimipramin verilebilir. (NHS Choices, erişim tarihi: 03.01.2016; Psikofarma.info, erişim tarihi: 07.10.2015)

SSRI mekanizmasında ise temel etki, serotonin hormonunun seçici geri alımına bağlıdır. Salgılanan serotoninin vücutta geri alımını engelleyerek serbestçe dolaşmasına imkan veren ilaçlardır. Trisiklik antidepresanlarına göre sedatif etkisi daha azdır. Noradrenalin ve dopamin düzeyinde önemli değişikliklere sebep olmadıkları düşünülür. Bu gruba dahil etken maddelere örnek olarak Sertralin, Sitalopram, Fluoksetin, Paroksetin, Fluvoksamin, vb. verilebilir. SSRI antidepresanları, MDB tedavisinin yanı sıra anksiyete, yeme bozuklukları, panik bozukluklar, obsesif-kompulsif bozukluklar, travma sonrası stres bozukluğu ve sosyal fobi gibi rahatsızlıkların tedavisinde de kullanılır. MAOI'lar ve triptofan içeren ilaçlarla kullanımı kontrendikedir. SSRI kullanan kişilerin çoğu, bu antidepresanlardan fayda sağlar. İlacın etkisinin göstermesi, tıpkı diğer antidepresan ilaç grupları gibi, birkaç hafta sürmektedir. (NHS Choices, erişim tarihi: 03.01.2016; Wikipedia.org, erişim tarihi:10.02.2016)

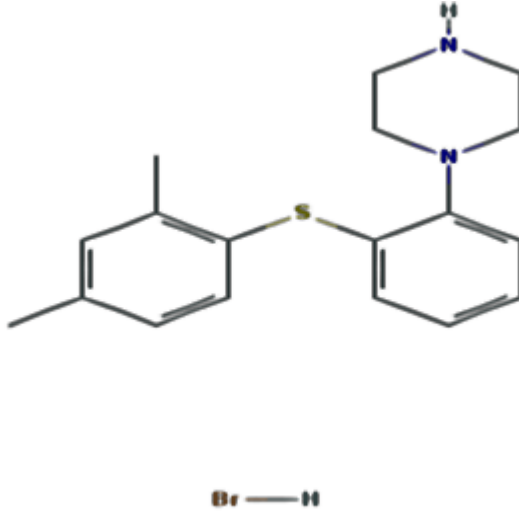
Vortioksetin ise serotonin modülatör ve stimülatörü olarak ifade edilmektedir. Çeşitli serotonin reseptörleri üzerindeki etkisi ve serotoninin iletimindeki rolü ile, yukarıdaki sınıflandırmadan farklı olarak, multimodal bir antidepresan olarak öne çıkmaktadır (Katona ve ark., 2014).

Oldukça yeni bir antidepresan etkili etken madde olan vortioksetin için alternatif miktar tayini analiz yöntemleri geliştirilmesine katkıda bulunmak, bu çalışmanın yegane amacıdır. Tez kapsamında, vortioksetinin şu anda tek bir örneğinin bulunduğu tablet formundaki miktar tayini için spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem önerilmesi hedeflenmiştir. Önerilen yöntemlerin Türkiye ilaç piyasasına girmiş preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

1.2. Vortiksetin Hidrobromür'ün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

1.2.1. Kimyasal Yapı

Maddenin Molekül Yapısı:



Kapalı formülü: $C_{18}H_{23}BrN_2SBr$

Yarı açık formülü:

CC1=CC(=C(C=C1)SC2=CC=CC=C2N3CCNCC3)C.Br

Molekül ağırlığı: 379,35762 g/mol

IUPAC isimlendirmesi:

1-[2-(2,4-dimetilfenil)sülfanilfenil]piperazin.hidrobromür

Görünüş: Beyazdan hafif bej-krem tonlarına kadar değişebilen tozdur.

Saklama koşulları: 25 °C (77 °F)'de saklanmalıdır. Kısa süre ile 15-30 °C (59-86 °F)'de bulundurulabilir. İyi kapatılmış ambalajlarda saklanmalıdır.

Çözünürlük: Suda az çözünür, ortam sıcaklığında, pH'ı 5,5 olan doymuş çözeltisinde çözünürlüğü yaklaşık olarak 1,3 mg baz/mL'dir.

LogP (o/w): 4,2

Ayrışma Sabiti: $pK_a = 9,1 (\pm 0,1)$ ve $3,0 (\pm 0,2)$

(Pubchem Open Chemistry Database, erişim tarihi: 10.10.2015)

1.2.2. Farmakolojik Özellikleri

1.2.2.1.Farmakodinamik Özellikleri

Vortioksetinin ATC kodu N06AX26'dır. Bu koda göre etken maddenin farmakoterapötik grubu; sinir sistemi - psikoanaleptikler – antidepresanlar - diğer antidepresanlar şeklinde belirtilebilir. (ilacabak.com, erişim tarihi: 12.10.2015)

Vortioksetinin etki mekanizmasının, serotonerjik reseptör aktivitesinin direkt modülasyonu ve serotonin (5-HT) taşıyıcısının inhibisyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Klinik dışı veriler vortioksetinin bir 5-HT₃, 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} reseptör antagonisti, 5-HT_{1B} reseptörünün parsiyal agonisti, 5-HT_{1A} reseptörünün agonisti ve 5-HT taşıyıcısının inhibitörü olduğunu göstermektedir. Temel olarak serotonin modülasyonu yapsa da, muhtemelen, noradrenalin, dopamin, histamin, asetilkolin, GABA ve glutamat sistemlerini de içeren çeşitli sistemlerde nörotransmisyonun modülasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Bahsedilen multimodel aktivitenin etkileri şöyle sıralanabilir: Antidepresan etkiler, anksiyolitik vb. etkiler ve bilişsel fonksiyonlardaki, öğrenme ve hafızadaki iyileşme etkileri (hayvan deneylerinde). Bununla birlikte, hayvan verileri ile insanlar üzerinden tahmin yürütülürken dikkatli olunması gerektiğinden, farmakolojik rolünde birtakım belirsizlikler varlığını korumaya devam etmektedir.

Vortioksetinin etkililiği ve güvenliliği, altı bin yedi yüzden fazla hastayı kapsayan ve üç bin yedi yüzden fazlasının da MDB yaşadığı, on iki haftayı aşmayan süreli bir klinik program ile ölçülmeye çalışılmıştır. On iki adet, çift-kör, plasebo kontrollü, 6/8 haftalık ve sabit dozda yürütülen, erişkin ve yaşlı hastalardan oluşan çalışmalar yapılmıştır. Bu on iki çalışmanın dokuzunda vortioksetinin etkililiği gösterilmiştir. Vortioksetinin etkililiği artan dozla artmıştır.

Bireysel çalışmalardaki etkiler ise, erişkinlerde yürütülen kısa dönemli, plasebo kontrollü deneylerde ölçülmeye çalışılmıştır. İlacın 5, 10 ve 20 mg/gün dozları ile plasebo arasındaki ortalama farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. 15 mg/gün dozu ise plasebodan ayrılmamıştır. Ancak, toplam çalışmada, plasebo ile ortalama farklılık gözlenmiştir. Vortioksetinin etkililiği havuzlanmış yanıt verenler analizi ile de desteklenmiştir. Bu analizde yanıt verenlerin oranı vortioksetin için %46 ile %49 aralığındadır. Buna karşılık plasebo için bu oran %34'tür.

Ayrıca, vortioksetinin 5-20 mg/gün aralığındaki dozlarının, depresif semptomların geniş bir aralığında etkili olduğu gösterilmiştir.

Daha sonra MDB'li hastalar için 10 mg ve 20 mg/gün dozdaki vortioksetinin etkililiği ile 25 mg/gün ve 50 mg/gün dozlarında agomelatin etkililiği karşılaştırılmıştır. 12 hafta süreli, çift kör, esnek-dozlu karşılaştırmalı çalışma yapılmıştır. MADRS (Montgomery-Csberg Depression Rating Scale) toplam skoruna göre etki, vortioksetinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha iyi bulunmuştur.

Antidepresan etkililiğinin idamesi, bir relaps nleme çalışmasında gösterilmiştir. Vortioksetin ile başlangıçta bahsedilmiş olan 12 hafta süreli çalışma döneminin sonunda, hastalık belirtileri azalan/biten hastalar, vortioksetin 5 veya 10 mg/gün veya plasebo gruplarına rastgele dağıtılmıştır. Hastalar, en az 24 hafta süreli (24 - 64 hafta) ift-kör dönemde relaps açısından gözlemlenmiştir. Sonuç olarak vortioksetin, plaseboya karşı üstün bulunmuştur. Plasebo grubunda hastalığın tekrarlama riskinin vortioksetin grubuna göre 2 kat fazla olduğu bulunmuştur.

Yaşlı (>65 yaş) depresif hastalarda yürütülen çalışmalarda da vortioksetin plaseboya göre üstün bulunmuştur. Antidepresan etkisinin idamesi de bu hasta popülasyonunda uzun dönemli relaps nleme çalışmasında gösterilmiştir.

Vortioksetin, uykusuzluk veya uyuklama durumu sıklığını, plaseboya göre, arttırmamıştır.

Kısa ve uzun dönemli, plasebo kontrollü klinik çalışmalarda, vortioksetin tedavisinin aniden kesilmesinden sonraki durum da sistematik olarak incelenmiştir. Hem kısa dönemli (6-12 hafta), hem uzun dönemli (24-64 hafta) vortioksetin tedavisi kesildiğinde, kesilme semptomlarının sıklığı ve yapısı açısından plaseboyla karşılaştırıldığında, klinik olarak önemli bir fark görülmemiştir.

Vortioksetin ile yapılan kısa ve uzun dönemli çalışmalarda, hastanın bildirdiği seksüel advers etkilerin indidansı düşüktür ve plaseboya benzer düzeydedir. Ayrıca vücut ağırlığında, kalp hızında, kan basıncında, hepatik ve renal değerlendirmelerde plaseboya göre klinik olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

1.2.2.2. Farmakokinetik Özellikler

Emilim: Vortioksetin oral kullanımdan sonra yavaş olsa da iyi absorbe edilir. Pik plazma konsantrasyonuna 7-11 saatte ulaşır. 5, 10 veya 20 mg/gün çoklu dozlarda, ortalama maksimum konsantrasyon değerleri 9-33 ng/ml şeklinde gözlenmiştir. Mutlak biyoyararlanım %75'dir. Farmakokinetik üzerinde yiyeceklerin bir etkisi görülmemiştir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Dağılım: Ortalama dağılım hacmi (V_{ss}), 2,600 L'dir ve yoğun ekstrasvasküler dağılım gösterir. Plazma proteinlerine %98-99 gibi yüksek oranda bağlanır ve bu bağlanma, vortioksetinin plazma konsantrasyonlarından bağımsızdır. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Biyotransformasyon: Depresyon tedavisinde kullanılan ilaçların neredeyse tümü karaciğerde bulunan CYP2D6 ve CYP2C9 ile metabolize edilirler (Genetiks

Sağlık Hizmetleri Tic. Ltd. Şti., Erişim tarihi: 04.01.2016). Vortioksetin de, ilk aşamada primer olarak CYP2D6 ve az oranda CYP3A4/5 ve CYP2C9 ile katalizlenen oksidasyonla; daha sonra da glukuronik asit konjugasyonu yoluyla karaciğerde metabolize edilir. Vortioksetinin majör metaboliti farmakolojik olarak inaktiftir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Eliminasyon: Ortalama eliminasyon yarılanma ömrü 66 saat ve oral klerensi 33 L/saat'tir. İnaktif vortioksetin metabolitlerinin yaklaşık 2/3'ü idrarla ve yaklaşık 1/3'ü feçesle atılır. Vortioksetinin ancak ihmal edilebilir miktarları feçesle atılır. Kararlı durum plazma konsantrasyonlarına yaklaşık 2 haftada ulaşılır. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Hastalardaki karakteristik özellikler:

Yaşlılar

Atmış beş yaşından büyük sağlıklı kişilerde, 10 mg/gün çoklu doz uygulamalarından sonra, sağlıklı genç kişilerden (<45 yaş) oluşan kontrole karşılaştırıldığında, vortioksetine maruziyeti (vücuttaki konsantrasyon ve birikme indeksi) %27'ye kadar artmıştır. Atmış beş yaşından büyük hastalarda başlangıç dozu, her zaman, etkili en düşük doz olan günde bir kez 5 mg vortioksetin olmalı ve bu hastalara 10 mg/gün dozunu aşmadan önce dikkatli olunmalıdır. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Böbrek yetmezliği

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda, tek doz 10 mg vortioksetin uygulamasından sonra, diyaliz sırasında vortioksetinin sadece küçük bir kısmı kaybedilmiştir. Doz ayarlaması gerekli değildir. Şiddetli renal yetmezliği olan kişilerde deneyim sınırlıdır ve dikkatli kullanım gerekir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

Hepatik yetmezlik

10 mg tek doz vortioksetin uygulanmasından sonra, hafif veya orta derecede karaciğer yetmezliğinin vortioksetinin farmakokinetiği üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Doz ayarlaması gerekli değildir. Vortioksetin, ağır karaciğer yetmezliği olan hastalarda çalışılmamıştır. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

CYP2D6 gen tipleri

Dozaj ayarlaması için önemli bir faktördür. CYP2D6 enziminin metabolize işlemini yavaş gerçekleştirdiği kişilerde, hızlı metabolize edenlere göre vortioksetinin plazma konsantrasyonu yaklaşık iki kat fazladır. Güçlü CYP3A4/2C9 inhibitörlerinin CYP2D6 zayıf metabolize edicilere eşzamanlı uygulanması, ilaca daha fazla maruz kalınmasına sebep olur.

Bütün hastalar için olduğu gibi, hastanın bireysel yanıtına bağlı olarak, bir doz ayarlaması gereklidir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

1.2.2.3. Kullanımı

Erişkinlerde majör depresif epizotların tedavisinde kullanılır. İlaç oral yoldan alınır. Yiyeceklerle birlikte veya ayrı olarak alınabilir. Bireysel hasta yanıtına bağlı olarak minimum dozaj 5 mg/gün, maksimum dozaj ise 20 mg/gün şeklindedir. Depresif semptomların düzelmesinden sonra antidepresif cevabın yerleşmesi için en az altı ay kullanılması tavsiye edilir. Tedavi bitiminde hastalar, dozu aşamalı olarak azaltmak yerine ani olarak kesebilirler. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

1.2.2.4. Yan Etkiler

En sık görülen istenmeyen etki bulantıdır ve kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülmüştür. Yan etkiler genelde hafif ve orta şiddette ve tedavinin ilk iki haftasında ortaya çıkar niteliktedir. Geçici olduklarından tedavinin kesilmesine yol açmazlar.

Diğer yaygın advers etkiler; iştah azalması, anormal rüyalar, baş dönmesi, diyare, konstipasyon, kusma, jeneralize prürittir. Yaygın olmayan advers etkiler ise dış gıcırdatma, kızarma, gece terlemeleri şeklinde ifade edilebilir.

Klinik çalışmalarda, 5-15 mg arasındaki dozlarda seksüel disfonksiyon açısından plasebo ile herhangi bir fark gözlenmemiştir. Fakat 20 mg dozda vortioksetin, tedaviye bağlı seksüel disfonksiyon ile bağlantılı bulunmuştur.

Yan etkiler, atmış beş yaşından büyük hastalarda daha yüksek oranda görülmüştür.

Özellikle elli yaş üstü kişilerde SSRI ve TCA kullanan hastalarda kemik kırığı riskinin arttığı bilinmektedir. Bu riskin vortioksetin için de geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. (RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

1.2.2.5. Kontrendikasyonları

-Vortioksetin veya formülasyondaki diğer maddelere karşı hipersensitivite

-Nonselektif MAOI veya selektif MAO-A ile birlikte kullanımı.

(RX Media Pharma®, 2015; RxList, erişim tarihi: 03.01.2016)

1.3. Vortioksetin Miktar Tayini İçin Günümüze Kadar Uygulanmış Olan Analiz Yöntemleri

Gu ve ark.(2015), fare plazmasındaki vortioksetin miktarının tayini için bir tandem kütle spektrofotometreli ultra performans likit kromatografik (UPLC-MS/MS) metod geliştirmişlerdir. Plazma numuneleri protein çöktürücü ile işlem görmüştür. Ayırmada kullanılan UPLC kolonu, Acquity BEH C₁₈ (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm); gradyan hareketli faz ise % 0,1 formik asit içeren su ve asetronitril olarak belirtilmiştir. Dedeksiyon, çoklu reaksiyon görüntüleme (MRM) şeklinde, pozitif iyon elektrosprey tandem kütle spektrometre ile gerçekleştirilmiştir. Valide edilmiş metot, 0,05-20,0 ng/mL ($R^2 > 0,997$) aralığında iyi bir doğrusallığa sahip olmuştur. Ekstraksiyon geri kazanımı, vortioksetin için % 78,3-88,4 aralığında, internal standart olarak kullanılan karbamazepin için ise % 80,3 oranındadır. Gün içi ve günler arası kesinlik % 8,5'un altında, doğruluk ise -%1,2 ile % 9,5 aralığındadır. Vortioksetin için dikkate değer bir matris etkisi ve astatik veriye rastlanmamıştır. Metot, farelerdeki vortioksetinin farmakokinetik çalışmalarına başarıyla ilk kez uygulanabilmiştir ve vortioksetin uygulamaları ile gelişim çalışmaları için temel oluşturmaktadır.

Dousa ve ark. (2015), vortioksetin üretilen proseslerde oluşan 2-klor-N-(2-kloroetil) etanamin bileşiğinin kütle spektrofotometre hidrofilik etkileşim sıvı kromatografik (HILIC-MS) yöntem ile belirlenmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Son on yılda, farmasötik düzenleme kurulları, ilaç etken maddelerinin genotoksik impüritelerinin izleme düzeyinin takip edilmesi ve değerlendirilmesine odaklanmıştır. Bu durum, imalatçı firmaların analiz ve kontrolleri için yenilikçi yaklaşımlar sağlamaktadır. İlaç üretimi prosesi esnasında artan düşük derişimlerdeki (ppm düzeyinde) genotoksik impüritelerin seviyesi, pozitif olarak tanımlanmalı ve miktarları tayin edilebilmelidir. Bu sebeple genotoksik impüritelerin analizleri için hassas ve seçici analitik metotlara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada da, 2-klor-N-(2-kloroetil) etanamin genotoksik impüritesinin analitik kontrolü için pratik bir örnek sunulmuştur. Bu analiz için seçici iyon bandında elektrosprey iyonizasyon ile kuadropol (QDa) kütle dedeksiyonundan

faaydalanılmıştır. HILIC-MS metodu, valide edilmiş ve 75 ppm derişiminde, vortiooksetin genotoksik impüritelerinin kantitatif analizini ortaya koymuştur. Kullanılan kolon, Primesep B kolon (150 x 4,6 mm, 5,0 µm); kullanılan hareketli faz, pH'sı 3,0 olan 10 mM amonyum format tampounu ve asetonnitril (5:95, h/h); akış hızı ise 0,8 mL/dk. şeklinde ifade edilmiştir. QDa kütle dedektörü pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Kuadropol kütle cihazı, seçici iyon görüntüleme modunda çalışılmıştır.

Liu ve ark. (2016), kütle spektrometre likit kromatografi (LC-MS), infrared spektrofotometre (IR) ve nükleer manyetik rezolüsyon spektrofotometresinden (NMR) yararlanarak, stabilitenin ortaya konduğu bir ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografi metodu geliştirmiş ve vortiooksetin impüritelerinin karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu alışma ile yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) yöntemi ile potansiyel vortiooksetin impüritelerinin ayırım ve tanısı raporlanmıştır. Bir yeni bileşik ve dört proses kaynaklı impürite yapıları karakterize edilmiş ve bunlar NMR, MS ve IR spektroskopik analizleri ile de doğrulanmıştır. Tanımlı impüritelerin muhtemel oluşum mekanizmaları da sunulmuştur. Karakterizasyon datalarına dayanılarak, yeni bileşiğin 1-[4-[(2,4-dimetilfenil)tiyo]fenil]-piperazin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 0,05-0,75 µg/mL aralığında elde edilen impüritelerin ayırım ve miktar tayinleri için etkili bir kromatografik metot optimize edilmiştir. Geliştirilen metot, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, dayanıklılık, dedeksiyon limiti ve ölçüm limiti parametreleri açısından valide edilmiştir. YBSK metodunda kullanılan kolon, Inertsil ODS-3 C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) olarak ifade edilmiştir. Kullanılan hareketli faz ise; hareketli faz A olarak trifloroasetik asitin sudaki % 0,05'lik çözeltisi ve hareketli faz B olarak asetonnitrildir. Gradyan program uygulanmıştır (Zaman(dk) /A:B(h/h); 0.dk 80/20, 30. dk 60/40, 50. dk 20/80, 60. dk 20/80, 65. dk 80/20, 70. dk 80/20). 230 nm'de gerçekleştirilen çalışmada akış hızı 1,0 mL/dk; kolon sıcaklığı 35°C'dir. Çözücü olarak ise su (%80) ve asetonnitril (%20) karışımı kullanılmıştır.

Bunlar dışında, aşağıda yer alan farmakolojik ve klinik araştırmalara da göz atılmıştır.

Uldam ve ark. (2011), vortioksetin metabolitlerinin (N-oksit/N-glukuronid ve N-O-glukuronid) teşhislerini LC-MS dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle gerçekleştirmişlerdir. Metabolitleri, vortioksetin kullanan insan ve hayvan idrar ve plazmalarından elde edilmiştir.

Chen ve ark.(2013); vortioksetinin, flukonazol (sitokrom P450 [CYP] 2C9, CYP2C19 ve CYP3A inhibitörü), ketokonazol (CYP3A ve P-glikoprotein inhibitörü), rifampisin (CYP inhibitörü), bupropiyon (CYP2D6 inhibitörü ve CYP2B6 substratı), etinil estradiol/levonorgestrel (CYP3A substratları) ve omeprazol (CYP2C19 substrat ve inhibitörü) gibi çeşitli ilaçlar ile etkileşimlerini incelemişler ve farmakokinetik özelliklerini araştırmışlardır.

Areberg ve ark. (2012) tarafından sağlıklı bireylerin antidepresan etkili vortioksetin alımından sonra plazma seviyelerindeki seratonin düzeylerinin ölçülmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Mork ve ark. (2012) majör depresyon tedavisinde kullanılan vortioksetinin farmakolojik etkileri üzerinde çalışmışlardır. Vortioksetinin seratononin inhibisyon ve seratonin reseptör modülasyonları üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *In-vivo* şartlarda yaptıkları çalışmalarda etken maddenin antidepresan ve anksiyolitik etkilerinin varlığını tespit etmişlerdir.

Hvenegaard ve ark. (2012) tarafından, vortioksetinin *in-vitro* şartlarda; insan karaciğer mikrozom, S9 fraksiyon ve rekombinat enzimleri kullanılarak oluşturduğu metabolitler araştırılmıştır.

1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımı oluşturan tüm bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan yöntemlerin genel adıdır. Kromatografik yöntemlerde biri sabit, diğeri hareketli olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Ayrılacak bileşenler, hareketli fazın etkisi ile sabit faz üzerinde belirli bir yöne doğru hareket ederler. Bileşenlerin fiziksel ve kimyasal açıdan bu iki faz ile etkileşimleri farklı olduğundan kromatografik sistemde alıkonma süreleri de farklı olur ve bileşenler bu şekilde birbirlerinden ayrılır. Sabit faz ile etkileşimleri hareketli faza göre baskın olan bileşenler sistemi geç terk ederken tam tersi özelliğe sahip bileşenler kısa alıkonma süreleri ile sistemden ayrılır.

Hareketli faz olarak sıvı ya da gaz formlar bulunur. Sabit faz ise katı ya da sıvı olabilir. Katı olan sabit fazlar adsorbe edici özelliğe sahip olan aktiveştirilmiş alümina, silika jel gibi maddelerden oluşur (adsorbsiyon kromatografi). Sıvı sabit fazlar ise, katı bir destek maddesinin üzerine kaplanmış sıvıdan oluşur (partisyon kromatografi).

Kromatografi, ilk olarak Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilmiştir. Tsvett, bitki bileşenlerinin renkli pigmentlerini ayırırken kullandığı bu yöntemde kullandığı kolonda renkli bantlar oluştuğu için bu ayırma tekniğine “kromatografi” demiştir. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Hareketli faz tiplerine göre kromatografi genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılıp örneklendirilebilir:

- Sıvı Kromatografi (Hareketli fazı sıvı formdaki kromatografik yöntemler):
 1. Sıvı-katı kromatografi; ince tabaka kromatografi, jel kromatografi.
 2. Sıvı-sıvı kromatografi; kağıt kromatografi, yüksek basınçlı sıvı kromatografi, ultra performans sıvı kromatografi.

- Gaz Kromatografi (Hareketli fazı gaz formdaki kromatografik yöntemler):
 1. Gaz-katı kromatografi; klasik gaz-katı kromatografi.
 2. Gaz-sıvı kromatografi; gaz-sıvı kromatografi ve kapiler kolon kromatografi. (Gündüz, 1990, Bölüm 25; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Ayrılma mekanizmalarına göre ise, kromatografi şöyle sınıflandırılabilir:

- Adsorbsiyon kromatografi
- Partisyon kromatografi
- İyon değiştirme kromatografi
- İyon çifti kromatografi
- Jel filtrasyon kromatografisi (moleküler eleme kromatografi)
- Afinite kromatografi (Gündüz, 1990, Bölüm 24; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Kullanım amacına göre kromatografik yöntemler; analitik ve/veya preparatif uygulamalar şeklinde sınıflandırılıp kullanılır. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Son olarak da, **uygulama biçimlerine göre** kromatografik sistemler ikiye ayrılır:

- Düzlemsel kromatografi; ince tabaka kromatografi (İTK), kağıt kromatografi
- Kolon kromatografi; kolon kromatografi, sıvı kromatografi, gaz kromatografi. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Düzlemsel kromatografi türleri olan kağıt kromatografi ve ince tabaka kromatografi arasındaki fark, sabit faz türlerinin farklı olmasıdır. İTK’de sabit faz olarak, cam plakalar üzerine ince bir tabaka halinde sürülen aktifleştirilmiş silika jel, alümina, kalsiyum karbonat gibi katı bir adsorban kullanılabilir. Kağıt kromatografide ise sabit faz; kağıtta bulunan su içeriği ve/veya kağıdın liflerine tutunan hareketli faz moleküllerinden oluşur. Bu sebeple, kağıt kromatografi, sıvı-sıvı kromatografi türüne dahil olurken İTK sıvı-katı kromatografi tipine örnektir. Her

iki kromatografi uygulamasında da sabit faz materyali, hareketli faz olarak kullanılacak uygun bir çözücüye daldırılmakta; çözücü ile sabit faz materyalinin temas ettikleri noktadan 1-2 cm ileriye numune enjeksiyonları yapılmakta ve hareketli fazın sabit faz üzerinde ilerlerken numune bileşenlerini sürükleyerek ayırması gerçekleşmektedir. İTK’de hareketli faz yönü aşağıdan yukarıya iken, kağıt kromatografide aşağıdan yukarıya veya yukarıdan aşağıya olabilir. Yeterli yürütme işlemi sağlandığında kağıt veya plaka üzerinde bileşenlere ait lekelerin gözlenmesi aşamasına geçilir. Eğer lekeler kendiliğinden görülmüyor ise, kağıt veya plakaya uygun bir reaktif püskürtülmesi, iyot tankında bekletilmesi ve/veya bunların UV ışığının altında incelenmesi gibi işlemler gerçekleştirilir. Bileşenlere ait lekelerin bunların standartlarına ait lekeleri ile yerlerinin kıyaslanması ile kalitatif analizler yapılabilir. Bu işlem, alıkonma faktörü deneni R_f değerinden yararlanılarak gerçekleştirilir. R_f değeri, aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$R_f = d_{(\text{bileşen})} / d_{\text{HF}}$$

Burada $d_{(\text{bileşen})}$, numunenin uygulandığı ilk noktanın merkezinden, bileşene ait lekenin merkezine kadar olan mesafenin uzunluğunu ifade eder. d_{HF} ise, numunenin uygulandığı ilk noktanın merkezini başlangıç almak koşulu ile hareketli fazın ilerlediği yolun uzunluğunu gösterir. R_f değeri 0 ile 1 arasında bulunur. Standart ve numunenin R_f değerleri kıyaslanarak bileşenlerin tanısı yapılabilir. Lekelerin büyüklüğü ve yoğunluğu kıyaslanarak yarı kantitatif analizler de yapılabilir. Lekelerin olduğu bölüm alınarak ve uygun bir çözücüde ekstraksiyonları yapılarak kantitatif analizler de gerçekleştirilebilir. (Çöl, 2011, erişim tarihi: 04.01.2016)

Kolon kromatografi sistemi ise, cam bir silindirik boru içine dolgu maddelerinin, sıvı hareketli faz ile hazırlanmış süspansiyonlarının yerleştirilmesi ile hazırlanır. Analiz edilecek madde çözeltisi kolonun üst kısmına halka oluşturacak şekilde uygulanır ve üzerine hareketli faz eklenir. Numune bileşenleri halkalar şeklinde ayrılır ve kolonun alt kısmından toplanırlar. Numune bileşenleri renkli ise, renkli halkaların gözlenmesi sayesinde ayırım kolay olacaktır. Fakat renksiz bileşenler var ise, bunların reaktiflerle renklendirilmeleri veya absorbans değerlerinin ölçülmesi gibi yöntemlerle ayrılmaları gerekebilir. Kolon kromatografi, biyomoleküllerin

ayrılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Taneciklerin büyüklüklerine bakılarak jel filtrasyonu kromatografi, yüklerine bakarak iyon değişimi kromatografi ve bağlanmalarına bakarak afinite kromatografi mekanizmaları ile kolon kromatografi yöntemleri uygulanmaktadır. (Çöl, 2011, erişim tarihi: 04.01.2016)

1.4.1.1. Kromatografinin Temel İlkeleri

Dağılma Katsayısı:

Bir X bileşeninin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dağılımı

$$X_s = X_h$$

denmesine göre oluşmaktadır. Burada X_s , sabit fazdaki X bileşenini, X_h ise hareketli fazdaki X bileşenini ifade eder. Bu bileşenin iki fazdaki konsantrasyonlarının oranına dağılma katsayısı denir ve aşağıdaki gibi formülize edilir.

$$K = C_{X_s} / C_{X_h}$$

K: Dağılma katsayısı

C_{X_s} : Sabit fazdaki bileşen derişimi

C_{X_h} : Hareketli fazdaki bileşen derişimi (Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Dağılma katsayısı, hangi bileşenin kromatografik sistemden erken veya geç çıkacağı hakkında bilgi vermektedir. Matematiksel olarak düşünüldüğünde, K değerinin büyük olması bileşenin sabit fazdaki derişiminin daha fazla olduğunu, dolayısıyla sistemde yavaş ilerleyeceğini gösterir. Tam tersi olarak K değerinin küçük olması ise, bileşenin hareketli fazdaki konsantrasyonunun büyük olduğunu ve sistemi erken terk edeceğini ortaya koymaktadır. Bileşen, kolonu ne kadar erken terk ederse, oluşturacağı pik o kadar keskin olur. Tam tersi durumda ise pik yayılır. Bir karışımdaki bileşenler, K değerlerinin farklı olmasından dolayı kromatografik sistemi farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde ayrımları sağlanmış olur.

Kromatogram, kromatografik sistemle elde edilen bileşen konsantrasyonlarının zamana veya hareketli fazın hacmine karşı grafiğe alınmasına verilen isimdir. Kromatogramlarda gözlenen pikler ile nitel tayin ve nicel hesaplamalar yapılmaktadır. (Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

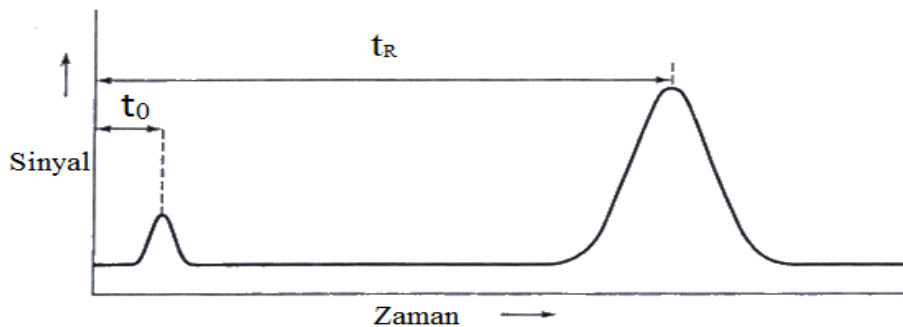
Alıkonma Zamanı, Alıkonma Hacmi ve Ölü Hacim:

Bileşen konsantrasyonlarının zamana karşı grafiğe geçirildiği kromatogramlarda, herhangi bir bileşene ait olan pikin maksimum noktasına karşılık gelen zamana **alıkonma zamanı (t_R)** denir. Zaman yerine hareketli fazın hacminin kullanıldığı kromatogramlarda ise pikin maksimumuna karşılık gelen hacme **alıkonma hacmi (V_R)** denir. Bu iki ifade arasında, “v” simgesi sisteme uygulanan akış hızını (mL/dk cinsinden) ifade etmek koşulu ile, aşağıdaki formülle açıklanacak bağlantı mevcuttur.

$$V_R = t_R \times v$$

Hareketli fazın, sabit faz üzerinden geçerek sistemden çıkmak için harcadığı hacim **ölü hacim (V_H)** veya **kolondaki boşluk hacmi** olarak isimlendirilir. Hareketli fazın kolondan çıkması için geçen süre (t_0) ile ölü hacim arasında aşağıdaki ilişki mevcuttur:

$$V_H: t_0 \times v$$



Şekil 1.1. Alıkonma zamanı ve ölü zamanın kromatogramda gösterimi

Kromatogramlarda gözlenen piklerin alıkonma zamanları kullanılarak nitel analizler gerçekleştirilmektedir. (Erdik ve ark., 2001, s:98; Hacettepe Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016, Yıldız ve ark., 1993, bölüm 21)

Kapasite Faktörü:

Kapasite faktörü (k'), bir bileşenin sabit faz ve hareketli fazdaki mol sayılarının oranı olarak tanımlanır ve matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$k' = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_H} = \frac{K \cdot V_S}{V_H}$$

V_S : Kolonda kullanılan sabit fazın hacmi

V_H : Hareketli faz hacmi

Kapasite faktörü, alıkonma zamanları cinsinden ise aşağıdaki formülle ifade edilir:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Alıkonma zamanı, ölü hacim ve dağılma katsayısı arasındaki ilişki;

$$V_R = V_H (1 + k') = V_H + K V_S$$

eşitliği ile ifade edilir. (Erdik ve ark.,2001, s:99; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Teorik Plaka Sayısı:

Piklerin kolonu terk etme süreleri uzadıkça keskinliklerinin azaldığı ve genişlediği ifade edilmişti. Analizde piklerin mümkün olduğunca keskin ve simetrik olmaları istenir. Piklerin keskinliği, kromatografik kolonun verimli oluşu ile ilgilidir ve bu verimlilik, teorik plaka sayısı (N) ile ifade edilir.

$$N = 16 \cdot \left[\frac{t_R}{t_w} \right]^2$$

t_w : Pik taban genişliği

Alıkonma zamanı ile pik genişliği aynı birimde ölçüldüğü için (Bu ölçüm hacim, zaman veya başlangıç noktasına uzunluk olabilir.) teorik tabaka sayısının birimi yoktur. Teorik tabaka sayısı ne kadar büyükse pikler de o kadar keskin ve simetrik olur.

Teorik tabaka sayısı, kolon uzunluğu (L) ile doğru orantılıdır. Fakat kolon uzunluğu, analiz süresini uzatacağından aynı zamanda bir dezavantajdır.

Teorik plaka sayısı ile teorik tabaka yüksekliği (H), ters orantılıdır ve ölçülen kolon uzunluğunun hesaplanan N değerine oranı ile elde edilir. Kolonun verimi ve piklerin kalitesi açısından H değerinin düşük olması istenir.

$$H = \frac{L}{N} = \frac{1}{16} \left[\frac{t_w}{t_R} \right]^2$$

Yukarıdaki formülden, bir kolonun boyunun elde edilecek pik genişliğinin karekökü ile orantılı olduğu da anlaşılmaktadır.

Kromatografik sistemde H değerinin büyümesine sebep olan her etki, kolon verimini düşürerek piklerin genişlemesine sebep olmaktadır. Numunenin tümü, kolonun giriş kısmına birden verilemezse, kolon içinde bileşenler yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere difüzlenirse, kolon içindeki bileşenlere ait iyon veya moleküller farklı yollara yönelirse, bileşenler iki faz arasında dengeye ulaşamazsa ve benzer geciktirici tüm etkilerde elde edilen pikler genişler. (Beşergil, 2013, erişim tarihi: 07.01.2016; Erdik ve ark., 2001, s:94-95; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Van Deemter Eşitliği:

$$H = A + B / v + C \cdot v$$

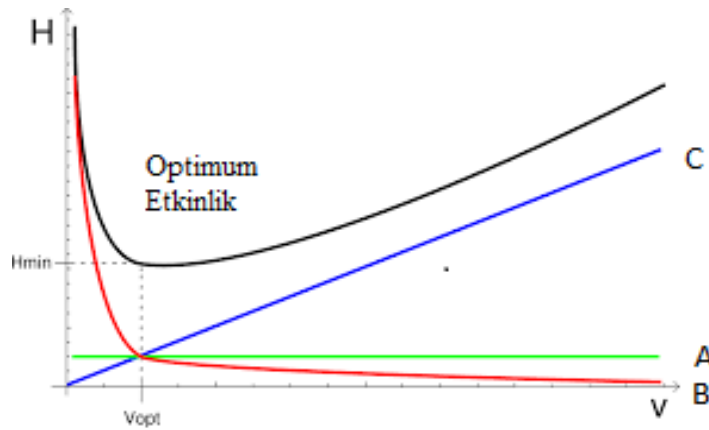
Bir kolondaki verim eldesi için kolonun optimum etkinlik koşulları bulunmalıdır. Bunun için öncelikle kullanılacak optimum akış hızı saptanır. Hareketli faz gaz ise, Şekil 1.2.'deki optimum etkinlik eğrisinde görülen minimum noktasına karşılık gelen akış hızı seçilmelidir. Hareketli faz sıvı ise, bu minimum değer çok küçük akış hızlarında elde edileceğinden ve bu akış hızı da alıkonma süresini çok arttıracığından dolayı daha yüksek hızlarda çalışılır.

H değerini düşürmek için, Van Deemter eşitliği dikkate alınarak bazı önlemlere başvurulur.

Formüldeki A değeri, akış hızından bağımsız bir değerdir. Bileşenler kolonda ilerlerken farklı yollar izlerlerse A değeri büyür. Bu değeri küçültmek için, kolon dolgu maddesi küresel ve çok küçük tanecikli olmalıdır ve kolonun içine mümkün olduğunca sıkı ve boşluksuz doldurulmalıdır. (Erdik ve ark., 2001, s:96-97)

Formüldeki B terimi, difüzyon terimidir ve düşük akış hızlarında önemlidir. Hareketli fazın gaz olduğu durumda, gazların difüzyon katsayısı sıvılardan yaklaşık 10^5 kat büyük olduğundan, B değeri önem kazanır. B değerini düşürmek için hareketli fazda molekül ağırlığı büyük bir gaz seçilebilir, kolon sıcaklığı azaltılabilir veya kolona daha fazla basınç uygulanabilir. (Erdik ve ark., 2001, s:96-97)

C değeri ise, kütle aktarımı terimidir ve yüksek akış hızlarında önem kazanmaktadır. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılıma dengelerine ulaşamaz. C değerini düşürmek amacıyla hareketli faz için az viskoz bir sıvı kullanılabilir, kolon sıcaklığı artırılabilir ve sıvı kromatografilerdeki sabit fazdaki katı destek üzerinde yer alan sıvı filminin kalınlığı mümkün olduğunca azaltılabilir. Gaz kromatografilerde ise içinde dolgu maddesi olmayan ince bir kapiler boru kolon tercih edilebilir. (Erdik ve ark. 2001, s:96-97; Gündüz, 1990, Bölüm 25; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)



Şekil 1.2. Van Deemter grafiği ve teorik plaka yüksekliği ile A,B ve C ilişkisi

Seçicilik:

İki bileşene ait kapasite faktörlerinin birbirlerine oranı seçicilik olarak ifade edilir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$$

Seçicilik, esasen sabit fazla ilgili olsa da hareketli fazdan da etkilenen bir parametredir. α değeri 1'e ne kadar yakın olursa iki bileşenin pikleri birbirinden o kadar zor ayrılır. Seçicilik faktörü, **bağıl alıkonma** olarak da bilinir. (Beşergil, 2013, erişim tarihi: 07.01.2016; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

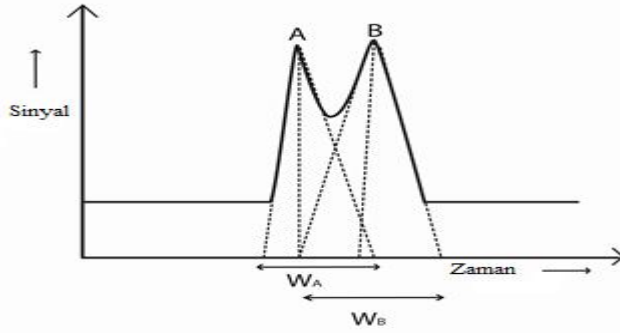
Rezolüsyon:

Rezolüsyon (R), seçicilik, etkinlik ve retansiyon zamanı ile ilişkilidir. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

$$R = \underbrace{\left[\frac{k'}{1 + k'} \right]}_{\text{Alıkonma zamanı}} \cdot \underbrace{\left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right]}_{\text{Seçicilik}} \cdot \underbrace{\frac{\sqrt{N}}{4}}_{\text{Etkinlik}}$$

Aşağıdaki formülde ise, tahmin edileceği gibi, pik genişlikleri ile rezolüsyonun ters orantısı görülmektedir. Ayrıca bileşenlerin arasındaki alıkonma zamanı farkı arttıkça da rezolüsyonun arttığı görülmektedir. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

$$R = 2 (t_{RB} - t_{RA}) / (W_A + W_B)$$



Şekil 1.3. Rezolüsyonun alıkonma zamanı ve pik genişliği ile ilgisi

Bileşenler arasında iyi bir ayırım gerçekleştirmek için R değerini arttıracak çalışmalar yapılmalıdır. % 96.0 'lık bir ayırımda rezolüsyon değeri 1 iken, %100'e yakın bir ayırımda rezolüsyon 1,5 değerindedir. (Beşergil, 2013, erişim tarihi: 07.01.2016)

Yukarıda bahsedilen kromatografi temel parametreleri incelendiğinde; iyi bir ayırım sağlamak için kolon boyu ve sabit faz arttırılmalı, gerekirse hem sabit hem hareketli fazın bileşenleri değiştirilmeli, sıcaklık azaltılmalıdır. Daha keskin pikler elde etmek için ise kolonun doldurulduğu tanecikler küçük ve aralıksız olmalı, hareketli faz ve sabit faz arasındaki temas yüzeyi mümkün olduğunca arttırılmalı, kolon çapı azaltılmalı, akış hızı iyi ayarlanmalı ve mümkün olduğunca düşük miktarda örneklerle çalışılmalıdır.

İstenen ayırım gerçekleştirildiğinde pik alanı ve/veya yüksekliği kullanılarak nicel analizler yapılır. Piklerin alıkonma zamanlarına bakılarak bileşenlerin tanısı yapılabilir. Farklı zamanlarda sistemi terk eden bileşenlerin saf halde elde edilmesi sağlanabilir. (Beşergil, 2013, erişim tarihi: 07.01.2016; Yıldız ve ark.,1993, Bölüm 21)

1.4.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi

İlaç etken maddelerinin analizinde sıkça kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK), uçucu olmayan biyolojik ve kimyasal bileşenlerin ayırımı için tercih edilmektedir.

Bu gelişmiş cihazlardaki bölümler şöyle sıralanabilir:

- Hareketli faz rezervuarı
- Hareketli fazların cihaza girişini sağlayan pompalar
- Oto örnekleyici sistemi ve enjektör
- 3-5 veya 10 μm çapında tanecikler içeren, 2-5 mm kalınlığında ve çeşitli uzunluklarda kolonlar
- Yüksek hassasiyette dedektörler
- Dedektörden alınan sinyallerin değerlendirilerek kaydedileceği bir yazılım içeren bilgisayar. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Pompalar, hareketli fazın istenen akış hızında (mL/dk) kolondan geçebilmesi için gerekli basıncı sağlarlar. Dayanıklılıkları genelde 300-600 bar arasında değişmektedir. YBSK için normal bir akış 0,5-2,0 mL/dk aralığındadır. Tüm deney boyunca pompa değişmeyen oranda ve hızda hareketli faz akışı sağlıyorsa bu sistem **izokratik sistem**, fakat pompa, hareketli faz oran ve hızında değişimler meydana gelen bir akış sağlıyorsa bu sistem **gradyan sistem** olarak isimlendirilir. (Erdik ve ark., 2001, s:136)

Numunenin, enjeksiyon için viallerde bekletildiği ve enjeksiyonların yapıldığı bölüm olan oto örnekleyici sistem, günümüzde sıcaklık ayarlama ve ışıktan korunma gibi özellikler de sağlamakta; böylece numune, enjeksiyon için beklerken ısı ve sıcaklık gibi dış etkilere etkilenmemektedir. Numuneyi sisteme verecek enjektör bölmesinin, istenen mikrolitredeki hacmi doğru enjekte edecek hassasiyette olması (doğruluk), aynı vialden art arda yapılan enjeksiyonlarda ise enjeksiyon hacimlerini tekrarlayabilir olması (kesinlik) gerekir. Otoörnekleyici sistem içinde yer alan enjektörler, şırınga ve valf olarak ikiye ayrılır. İlaç analizlerinde genelde enjeksiyon hacimleri 0,1-100,0 μL arasında değişmektedir. Enjektörler, sistemdeki yüksek basınçlara dayanıklı olmalıdır.

Kolon içindeki dolgu maddelerinin küçüklüğü ve kolonun ince oluşu sayesinde hareketli faz ile sabit faz arasındaki denge daha hızlı kurulmaktadır. Yapılarına ve

ayırma yöntemlerine göre farklı tiplerde kromatografi kolonları bulunmaktadır. Bazıları aşağıda sıralanmıştır:

- Normal faz kolonlar
- Ters faz kolonlar
- Boyut dışlama kromatografi kolonları
- İyon değişimi kromatografi kolonları (Choudhary, erişim tarihi:10.08.2016)

Kolonlar genelde poröz silika partiküller ile doldurulur ve bu partiküller, bileşenlerin alıkonma zamanlarını doğrudan etkilerler. Partikül boyutları genelde 1,7; 3,5; 5 ve 10 μ olur. İlaç analizleri için, kolon bağlantı materyali olarak genelde paslanmaz çelik kullanılır.

Kolon bölmelerinin sıcaklıkları genelde 5-100°C aralığında ayarlanabilmektedir. Kolon, kolon fırını denen ısıtıcı/soğutucu bloklar arasına yerleştirilir.

Az miktarda numunelerle (ppm seviyesinde) çalışıldığından, dedektörlerin de bu miktarları algılayacak ve anlamlı bir cevaba dönüştürebilecek hassasiyette olmaları gerekir. Dedektörler, numune miktarlarının, nicel ya da nitel analiz işlemlerin yapılacağı kromatogramlara dönüştüğü bölümlerdir. En çok kullanılan dedektör çeşitleri; spektroskopik, elektrokimyasal, floresans ve kırılma indisi dedektörleridir. UV absorpsiyonuna dayanan dedektörler; UV dedektör ve Diode-array dedektörlerdir (DAD). Gaz kromatografideki gibi, YBSK kolonunun çıkışına dedektör olarak bir kütle spektrometre (LC-MS) veya FT- infrared spektrometre (LC-FTIR) de ilave edilebilmektedir. (Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

YBSK kolonlarında kullanılan sabit faz sıvıdır ve içindeki dolgu maddelerinin üzerine bu sıvının ince bir film tabakası olarak bağlanması ile oluşmaktadır. Burada sıvı film, katı destek üzerine kimyasal bağlarla tutunduğundan bu yönteme **bağlı faz sıvı-sıvı kromatografi** de denir. Sıvılar, katı destek olarak silika jele, silika jel yüzeyinin silanize edilmesi ile bağlanır. Silanize edilmiş yüzeye -OH, -NH₂, -CN grupları içeren organik sıvılar bağlandığında polar bir sabit faz elde edilmiş olur. Silanize edilmiş yüzeye apolar uzun karbon zinciri içeren sıvılar da bağlanabilir. YBSK faz türlerinin polarlıklarına göre ikiye ayrılmaktadır:

- Polar yapıda bir sabit faz (siyanopropil-, aminopropil-, vb.) ve apolar ya da düşük polarlıkta bir hareketli faza sahip olan **normal faz sıvı kromatografi**

- Apolar bir sabit faz (oktadesil-, oktil-, dimetil-, vb.) ve polar bir hareketli faza sahip olan **ters faz sıvı kromatografi** (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Normal faz sıvı kromatografide apolar maddeler kolondan erken ayrılırken ters faz sıvı kromatografide polar maddeler kolonu daha çabuk terk etmektedirler.

Ters faz kromatografinin normal faz kromatografiye göre birtakım avantajları mevcuttur. Normal faz kromatografilerde hareketli fazın kontrolü güçleşir ve hareketli fazdaki küçük bir değişiklik dahi kromatogramda belirgin farklılıklara sebep olur. Ayrıca normal faz kromatografide dengeye ulaşma hızı yavaştır. Polar maddeler geç ve yaygın pikler oluşturarak normal faz kromatografi sistemini terk ederler. Ayrıca normal faz kromatografide kullanılacak hareketli faz apolar olduğundan ve apolar çözücüler pahalı olduklarından ve nemden uzak tutulmaları gerektiğinden dolayı dezavantaj oluştururlar. (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016)

Normal faz kromatografi, suya karşı hasas bileşikler, izomerler ve kiral bileşiklerin analizlerinde tercih edilmektedir. (Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Ultra performanslı sıvı kromatografi (UPLC) ise; teorisi ve çalışma dinamiği, cihaz bölümleri YBSK ile benzer özellik gösteren bir kromatografi türüdür. Buna karşılık, daha kısa ve dar kolonları, kolonlar içerisinde daha küçük boyuttaki tanecikler ve cihazın daha yüksek basınçlara dayanıklı olması sebebi ile YBSK'nın bir üst modeli olarak düşünülebilir.

1.4.1.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografinin Avantajları

- Duyarlılık yüksektir. Yüksek kesinlik ve doğruluk ile analizler gerçekleştirilir.
- Analiz süresi kısadır.

- Kullanıcı hatasına daha az bağımlı bir yöntemdir.
- YBSK kolonları, uygun şartlarda yıkanıp saklandıkları takdirde, yenilenmeye gerek duymadan defalarca farklı analizler için kullanılabilir.
- Gaz kromatografiye göre, hareketli fazının sıvı olması ve daha düşük sıcaklıklarda çalışabilme imkanı (özellikle yüksek sıcaklıklarda bozulan maddeler için), daha geniş numune aralığında çalışma imkanı sunar.

(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi resmi web sitesi, erişim tarihi: 03.01.2016; Yıldız ve ark., 1993, bölüm 21)

1.4.1.2.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografinin Dezavantajları

- Her analizde, tek başına tanı için yeterli olmayabilir.
- Karışımların tüm bileşenlerin tamamen ayrılamadığı durumlar oluşabilir.
- Uçucu bileşenlerle çalışamaz.
- Cihazların hassas olması sebebiyle analizler olumsuz yönde etkilenebilir.
- Ultra performanslı sıvı kromatografilerine göre analiz süresi ve harcanan hareketli faz hacmi daha fazladır, buna karşılık dayanabildiği basınç daha düşüktür. Ultra performanslı likit kromatografide elde edilen pikler YBSK'ya göre daha keskin ve ayırımlar daha iyidir. (biyokure.org, erişim tarihi: 04.01.2016)

1.4.2. Spektrofotometri

Başlıca spektroskopik yöntemler şunlardır:

- Atomik Absorpsiyon Spektroskopi
- Ultraviyole (UV) ve Görünür Bölge (GB) Spektroskopi
- İnfrared (IR) Spektroskopi
- Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) Spektroskopi
- Elektron Spin Rezonansı (ESR) / Elektron Paramagnetik Rezonans (EPR) spektroskopi
- Kütle Spektrometrisi (MS) (Erdik ve ark., 2001, D Bölümü)

MS, NMR, IR ve UV-GB spektroskopik yöntemlerinin uygulanması sonucunda bir bileşiğin kimyasal yapısı bulunabilmektedir.

1.4.2.1. Spektroskopinin Temeli ve Lambert-Beer Yasası

Bir molekülün iç enerjisi (E); elektronik (E_e), titreşme (E_t), ötelenme (E_o) ve dönme (E_d) hareketlerine ait kuantlaşmış enerjilerin toplamıdır. (Erdik ve ark., 2001, s: 729)

$$E = E_e + E_t + E_d + E_o$$

Bir moleküle ışıma enerjisi gönderildiğinde ve molekül bu enerjiyi absorpladığında molekülde aşağıdaki formülde görüldüğü üzere bir enerji artışı olur:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

h : Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s)

ν : Işımanın frekansı

λ : Işımanın dalga boyu

c : Işık hızı (3×10^8 ms⁻¹) (Erdik ve ark., 2001, s:729)

Moleküle aktarılan bu enerji, molekülde elektronik, titreşme, ötelenme ve dönme uyarmalarına neden olur. Yani molekülde, kuantlaşmış bir enerjiyi alma ve o enerjiyi elektronik, titreşme, ötelenme ve dönme hareketleri ile verme durumu söz konusu olur. Bir molekülün spektrumunda, bileşenlerin absorpsiyon çizgileri, bantları ve pikleri, bu alınıp verilen enerjiden dolayı oluşmaktadır. İnfrared ışımanın enerjisi titreşme ve dönme seviyelerini uyarırken ultraviyole ışımanın enerjisi elektronik (ve dolayısıyla titreşme, ötelenme ve dönme) seviyelerini uyarır. (Erdik ve ark., 2001, s:729)

Spektrofotometri, Lambert-Beer yasasına dayanmaktadır. Lambert-Beer yasası, aşağıdaki formülle ifade edilir:

$$A = \log I_0/I = a.b.C$$

A: Absorbans değeri

I_0 : Örneğe gelen ışımanın şiddeti

I: Örnekten çıkan ışımanın şiddeti

a: Absorptivite

b: Işığın örnek içinde aldığı yol

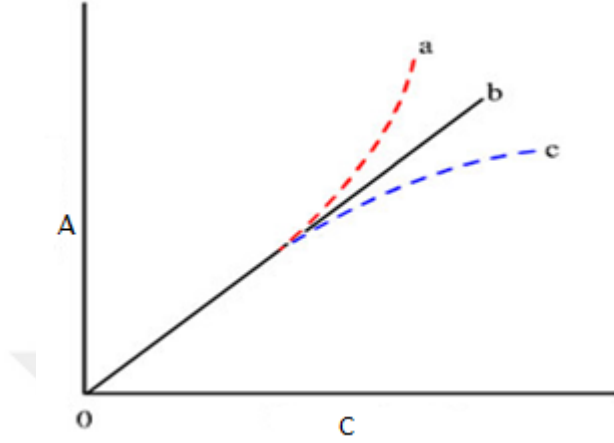
C: Konsantrasyon (g/L) (Erdik ve ark., 2001, s:730; Gündüz, 1990, Bölüm 2)

Transmittans (T) ise geçirgenliktir ve “ $T= I/I_0$ ” formülü ile gösterilir. (Erdik ve ark., 2001, s: 730)

Absorptivite, belirli bir dalga boyunda bir atom, iyon veya molekül için sabit bir değerdir. Molar absorptivite değeri (ϵ) ise, “Ma” molekül ağırlığını belirtmek üzere; “ $\epsilon= a .Ma$ ” formülü ile ifade edilir ve tıpkı absorptivite gibi sabit bir değerdir. (Erdik ve ark., 2001, s:730)

Lambert-Beer yasasına göre, A değeri C değerine karşı grafiğe alındığında Şekil 1.4’teki “b” doğrusu elde edilir. Yasadan sapmalar, şekilde görüldüğü gibi pozitif (a) veya negatif (c) olabilir. Bu sapmalar; çözücüyle etkileşim, polimerleşme gibi

kimyasal sebeplerden, cihazdan kaynaklanan sebeplerden veya analist hatasından doğan sebeplerden kaynaklanabilir. Burada önemli olan, doğrusal aralığı bularak bu aralığı kalibrasyon eğrisi olarak kullanmak ve bu şekilde kantitatif analizler yapabilmektir. (Erdik ve ark., 2001, s:730-731; Gündüz, 1990, Bölüm 2)



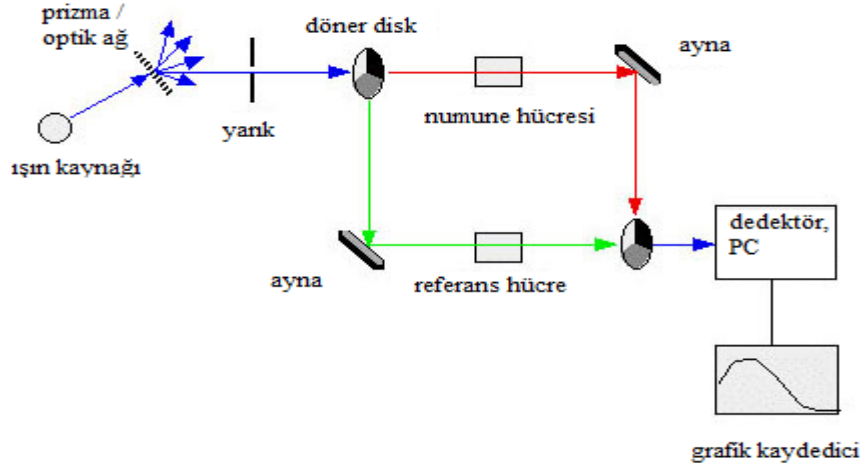
Şekil 1.4. Lambert-Beer yasasından sapmalar.

1.4.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopisi

UV-GB spektroskopisi, elektronik spektroskopisi adıyla da anılır ve burada elektronik geçiş spektrumları gözlenir. 200-400 nm aralığı UV ve 400-700 nm aralığı görünür bölgeyi kapsar. Görünür bölgede absorpsiyon yapan bileşik renklidir ve absorpladığı rengin tamamlayıcı rengindedir. (Erdik ve ark., 2001, s:732)

Bu yöntemde, uyarılan elektronlar bir elektronik seviyeden diğerine geçerken pikler meydana getirirler. Moleküllerde elektronik hareketin yanında dönme ve titreşme hareketlerinin olması, piklerin keskinliğini azaltır. Absorpsiyon piki, bir elektronun bir yörüngeden daha yüksek bir yörüngeye çıkması ile meydana gelir. Burada, molekülün belirli bir fonksiyonel grubu hep aynı bölgede absorpsiyon yapar ve molekülün geri kalanı bu absorpsiyona katılmaz. Absorpsiyon yapan bu fonksiyonel gruplara **kromofor** denir. Aynı molekülde iki veya daha fazla kromofor bulunduğu ve bu gruplar en az ikili bağ içerdiklerinde, absorpsiyon değeri bu grupların absorpsiyonlarının toplamına eşittir ve buna **toplanabilirlik kuralı** denir. Toplanabilirlik kuralı, karışımlara ait bileşenler için de geçerlidir. (Erdik ve ark., 2001, s:735-736)

1.4.2.3. UV-GB Spektrofotometre



Şekil 1.5. Çift ışın yollu spektrofotometre cihazı (Clark, 2006, erişim tarihi: 04.01.2016)

Spektrofotometre cihazı, şu bölümlerden oluşmaktadır:

Işın kaynağı: UV-GB bölge için sürekli ışın kaynakları kullanılır. Döteryum (D_2) ve Hidrojen (H_2) elektriksel boşalım lambaları UV bölge için en çok kullanılan ışın kaynakları olup 180-380 nm arasında ışık yayar. Ksenon (Xe) ve civa buhar lambası UV-GB bölgenin tümünde (150-700 nm) kullanılabilen sürekli ışın kaynaklarıdır. Tungsten (W) flaman lambası ise görünür ve yakın IR bölgede (320-3000 nm) ışık yayar.(biyokure.org, erişim tarihi: 04.01.2016)

Monokromatör: Polikromatik ışıktan monokromatik ışın eldesinde kullanılır. Genel olarak prizmalar ve optik ağılar monokromatör olarak kullanılır. Numune üzerine gönderilen ışının daha monokromatik olmasını sağlamak için çift monokromatörlü spektrofotometreler kullanılabilir. (biyokure.org, erişim tarihi: 04.01.2016)

Yarıklık: Monokromatörlerin konumu ayarlanarak istenen dalga boyunda elde edilen ışığın geçtiği yarıktır. Elde edilecek spektrumun şeklini, pik yapısını,

keskinliğini, dolayısıyla ölçüm duyarlılığı, sinyal/gürültü gibi parametreleri etkiler. (Clark, 2006, erişim tarihi: 04.01.2016)

Ayna: Çift ışın yollu spektrofotometre cihazlarında, gelen ışığı ikiye bölerek numune ve referans hücreye eşit ışık gönderilmesini sağlayan düzeneklerdir. (İnce, 2012)

Numune hücresi: Çalışılan bölgeye göre farklı maddelerden yapılmış numune hücreleri kullanılır. Örneğin, cam hücreler görünür bölge ışınlarını geçirdiğinden sadece görünür bölge çalışmaları için uygundur. Kuartz hücreler ise UV, görünür ve yakın IR çalışmaları için uygundur. (İnce, 2012)

Referans hücresi: Kör olarak kullanılan çözücülerin bulunduğu bölümdür. Hücre yapıları numune hücresi ile aynıdır. (İnce, 2012)

Dedektör: Işın kaynağından gelen ışığın şiddeti ölçülerek maddenin ne kadar ışığı absorpladığını veya geçirdiğini ölçen bölümlerdir. Başlıca dedektör türleri şunlardır:

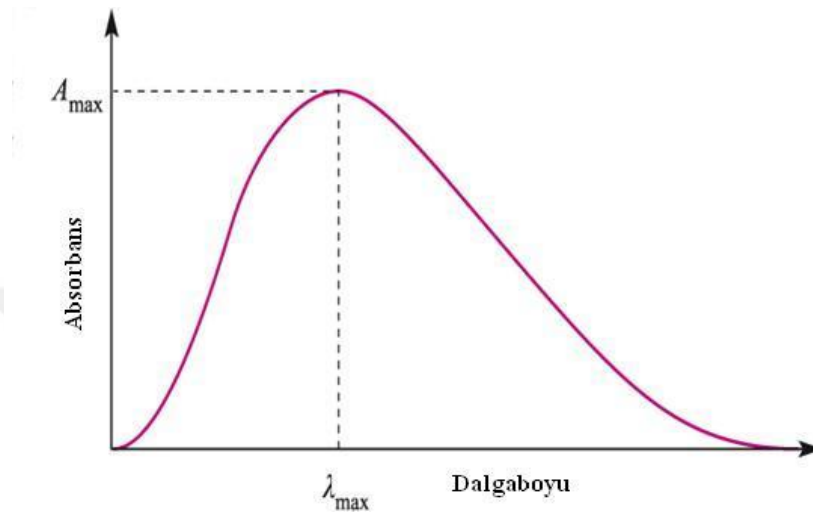
- Fototüpler
- Fotoçoğaltıcı tüpler
- Silisyumlu fotodiodlar
- Fotovoltaik hücreler
- Fotoiletken hücreler
- Yük aktarım düzenekleri (Gündüz, 1990; Bölüm 5; İnce, 2012)

Dedektörler ışına karşı duyarlı olmalı, ışın şiddeti ile doğru orantılı bir sinyal üretmeli, kararlı olmalı ve mümkün olduğunca kısa yanıt sürelerine sahip olmalıdır. (Gönüllü, 2001; Gündüz, 1990; Bölüm 5; İnce, 2012)

Grafik kaydedici: Dedektörden gelen sinyalleri bilgisayar ekranı ve kağıt üzerine aktaran sistemdir. (Gönüllü, 2001; Gündüz, 1990; Bölüm 5; İnce, 2012)

1.4.2.4. Türev Spektrofotometri

Bir spektrofotometrik ölçüm sonucunda aşağıda gözlenen absorbans(A)-dalga boyu(λ) grafiği elde edilir.



Şekil 1.6. Basit bir orijinal spektrum

Yukarıdaki grafiğe göre, matematiksel olarak “ $A = f(\lambda)$ ” fonksiyonu (orijinal spektruma ait fonksiyon) yazılabilir. Bu fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetin eğimi, fonksiyonun bu noktadaki türevini ifade eder. Fonksiyonun her noktasındaki türevi hesaplanabilir. Bu şekilde elde edilen türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilir. (İnce, 2012)

A değerinin λ değerine göre türevi alındığında aşağıdaki eşitlikler elde edilir:

$$A = a.b.C \text{ (Lambert-Beer Yasası)}$$

$$dA / d\lambda = -C.b.da/d\lambda \text{ (1. dereceden türev eğrisi)}$$

$$d^2A / d^2\lambda = -C^2.b^2.(da/d\lambda)^2 - C.b.(d^2a/d\lambda^2) \text{ (2. dereceden türev eğrisi)}$$

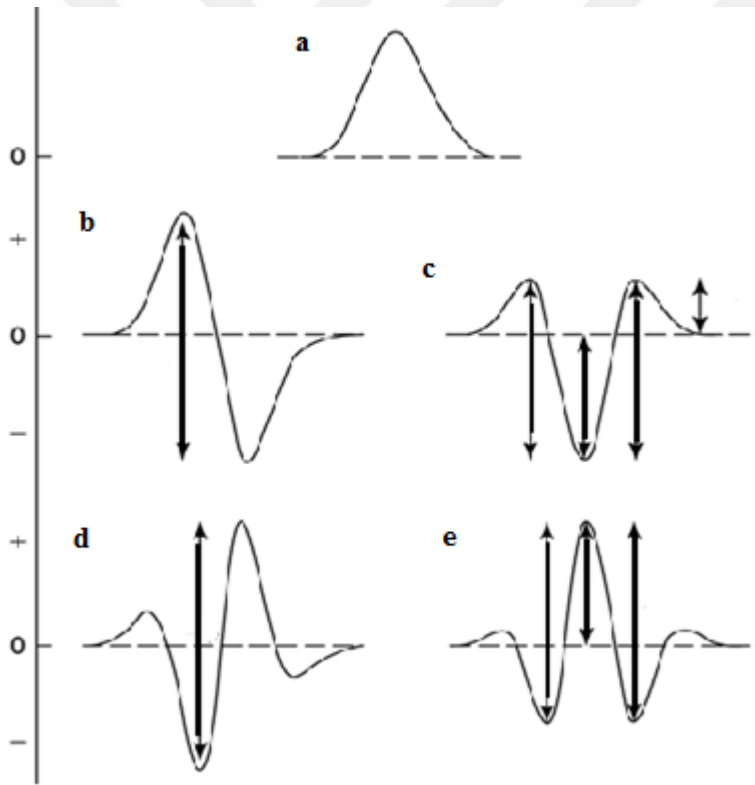
$$d^3A / d^3\lambda = -C.b.(d^3a/d\lambda^3) + 3.C^2.b^2.(da/d\lambda).(d^2a/d\lambda^2) - C^3.b^3.(da/d\lambda)^3$$

(3. dereceden türev eğrisi) (Onur ve Yücesoy, 1983)

Bu hesaplarla elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilir ve böylece türev spektrumları elde edilir. Bunları hazırlamak için bilgisayar programlarından yararlanılır. Elde edilen türev spektrumlarının kullanılması ile yapılan analiz yöntemlerine **türev spektrofotometri** adı verilir. (Onur ve Yücesoy, 1983)

Şekil 1.7.'ye göre;

- Orijinal spektrumun 1. türevi alındığında; bandın yükselen bölgesinde pozitif, alçalan bölgesinde negatif pikler oluştuğu,
- Türev derecesi ilerledikçe piklerin daraldığı,
- Daralan pikler sayesinde üst üste binen bantların birbirinden ayrıldığı görülmektedir.



Şekil 1.7. (a); Basit bir orijinal spektrum
(b); Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi
(c); Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi
(d); Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi
(e); Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi
(Medicinescomplete.com, erişim tarihi:03.01.2016)

1.4.2.4.1. Türev Spektrofotometrinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajlar:

- Yöntem, spektrum eğimleri hakkında bilgi vermekte ve dönüm noktalarının tespitini sağlamaktadır.
- Pikler, orijinal spektrumlara göre birbirinden daha iyi ayrılmaktadır.
- Karışım içindeki bileşenlerin miktar tayinlerine olanak sağlamaktadır.
- Etken maddelerin miktar tayinleri preparat içindeki tüm matriks bileşenlerinin varlığında da yapılabilmektedir.
- Etken maddelerin, bozunma ürünlerinin varlığında da tayinleri yapılabilmektedir.
- Bulanık çözeltilerde orijinal spektrumlar hata verirken türev spektrometri yöntemi ile oluşan hatalar ortadan kalkmaktadır.(İnce, 2012; Uyguner, 2010)

Dezavantajlar:

- Yöntemde türev derecesi arttıkça sinyal/gürültü oranı bozulmaktadır.
- Bozulan sinyal/gürültü oranı, pik sayısının artmasına sebep olmaktadır.
- Yöntem için pahalı spektrofotometrelere ihtiyaç vardır. (İnce, 2012; Uyguner, 2010)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Türkiye İlaç Piyasasında Bulunan Farmasötik Preparatlar

1. Brintellix® 5 mg 28 Film Kaplı Tablet (Lundbeck İlaç Ticaret Ltd.Şti.)
Vortioksetin 5 mg / tablet

2. Brintellix® 10 mg 28 Film Kaplı Tablet (Lundbeck İlaç Ticaret Ltd.Şti.)
Vortioksetin 10 mg / tablet

3. Brintellix® 20 mg 28 Film Kaplı Tablet (Lundbeck İlaç Ticaret Ltd.Şti.)
Vortioksetin 20 mg / tablet

2.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

-YBSK yöntemi için:

YBSK: Dionex Ultimate Focused 3000-9 (Dedektör türü: Diode Array Dedektör)

YBSK Kolonu: Waters Symmetry C₁₈, 3,5 µm, 4,6 x 100 mm Kolon

Hassas Terazî: Ohaus Discovery 5 Haneli Hassas Terazî

pH metre: Mettler Toledo pH/İon meter 5220

Ultrasonik Banyo: Ultrasonic LC60H

Magnetik Karıştırıcı: Wisestir Multi Hotplate Çoklu Magnetik Karıştırıcı

-Spektrofotometrik yöntemler için:

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601

Hassas Terazî: Shimadzu, Libror AEG-220

Magnetik Karıştırıcı: Electro Mag: Type MS, Rührman, Heidolph

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

-YBSK yöntemi için:

Metanol (MeOH) (Merck)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (Merck)

Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)

Amonyum Asetat (NH₄C₂H₃O₂) (Merck)

Amonyum Hidroksit (NH₄OH) (Merck)

-Spektrofotometrik yöntemler için:

Metanol (MeOH) (Merck)

Trisodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇) (Merck)

Hidroklorik asit (HCl) (Merck)

Asetik Asit (C₂H₄O₂) (Merck)

Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (Merck)

Borik Asit (H₃BO₃) (Merck)

2.4. Kullanılan Standart

Vortioksetin Hidrobromür (Lundbeck İlaç Ticaret Ltd.Şti.)

2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi ile Vortioksetin.HBr Miktar Tayini

2.5.1. Ortam Şartları ve Hesaplamalar

YBSK yöntemi ile yapılan analizlerde, çeşitli denemeler sonucunda, hareketli faz olarak pH değeri $3,00 \pm 0,05$ olan potasyum fosfat tamponu (% 30) ve metanol (% 70) kullanılmış olup izokratik yöntemle çalışılmıştır. Dedektör dalga boyu olarak 225,0 nm tercih edilmiş, akış hızı ise 1,3 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılan kolon; Waters Symmetry C₁₈, 100 x 4,6 mm, 3,5 µm olarak seçilmiştir.

Kolon sıcaklığı, basınç kontrolü de göz önüne alınarak 50 °C'ye ayarlanmıştır. Saflığı bilinen vortiksetin hidrobromür standardının hareketli fazda çözülerek hazırlanan stok çözeltisinden analitik olarak doğrusallık gösterecek derişim aralıkları tespit edilmiş ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak miktar tayinlerinde kullanılacak çalışma denklemine ulaşılmıştır. İnternal standart olarak kafein seçilmiş ve saflığı bilinen kafein de hareketli fazda çözülerek tüm etken madde çözeltilerinin içine eşit derişimde eklenmiştir. Seyreltme çözeltisi olarak da hareketli faz kullanılmıştır. Çözeltilerin tümü cihaza verilmeden önce 0,22 mikron naylon filtreden süzülerek viallere konulmuştur. Çözeltiler, analiz süresi boyunca karanlıkta ve buzdolabı sıcaklığında (yaklaşık 4 °C) muhafaza edilmiştir.

2.5.2. Deneyin Yapılışı

2.5.2.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması

Vortiksetin hidrobromür etken maddesinin ve kafein iç standardının hareketli fazda çözülerek hazırlanan stok çözeltilerinden hareketle, vortiksetin derişiminin 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 µg/mL olduğu yedi adet standart çözeltisi hazırlanmış ve her çözeltinin içinde 20 µg/mL derişiminde kafein iç standardının bulunması sağlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler YBSK cihazında belirtilen kromatografik şartlarda sisteme verilmiştir. Pik alanları derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve bu grafikten yararlanılarak miktar tayinleri için çalışma denklemi elde edilmiştir. (Şekil 3.10.)

2.5.2.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası Deneyler)

2.5.2.2.1. Gün İçi Deneyler

40 µg/mL vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein içeren üç adet paralel çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 2., 4., 6. ve 8. saatlerdeki

pik alanları incelenmiştir. Okunan alanlar çalışma eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.5.'de görülen veriler elde edilmiştir.

2.5.2.2.2. Günler Arası Deneyler

40 µg/mL derişiminde vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein içeren üç adet paralel çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 0.(hazırlandığı gün), 1., 2., 3., 4. ve 5. günlerdeki pik alanları incelenmiştir. Okunan alanlar kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.6.'da görülen veriler elde edilmiştir.

2.5.2.2.3. Yüzde Geri Kazanım Çalışmaları

40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 µg/mL vortioksetin.HBr ve her birinde 20 µg/mL kafein içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Çalışma eğrisinden elde edilen çalışma denklemini kullanılarak belirtilen çözeltilerin geri kazanımları hesaplanmış ve Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir.

2.5.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

2.5.2.3.1. Miktar Tayini Analizi

Ankara'daki lokal bir eczaneden temin edilen ve içeriğinde 10 mg vortioksetin / tablet bulunan 10 adet tablet, hassas terazide tartılmış ve tabletlerin ortalama ağırlığı bulunmuştur. Tartılan tabletler havan içerisinde toz edilerek içerisinde bir tablet ağırlığına eşdeğer numune tozu tartılmış ve 50 mL'lik balon jöjeye aktararak hareketli faz ile ultrasonik banyoda ve magnetik karıştırıcıda çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltiden 2 mL; 200 µg/mL olarak hazırlanmış kafein stok çözeltisinden ise 1 mL alınarak hareketli faz ile 10 mL'ye tamamlanmıştır (40 µg/mL vortioksetin, 20 µg/mL kafein). Birbirine paralel, eşit derişimde, beş adet numune çözeltisi hazırlanmıştır. YBSK sistemine verilen numunelere ait pik alanları çalışma eğrisi

denkleminde yerine konulmuştur. Bu denklemden, numune içerisindeki vortioksetin etken maddesinin miktarı hesaplanarak Çizelge 3.8.'de belirtilmiştir.

2.5.2.3.2. İçerik Tekdüzeliliği Analizi

İçerik tek düzeliliği analizi için 10 adet tablet ayrı ayrı 50 mL'lik balon jodelerde hareketli faz ile ultrasonik banyo ve magnetik karıştırıcıda çözülmüştür. Daha sonra bu numunelerden 2'şer mL; 200 µg/mL olarak hazırlanmış kafein stok çözeltisinden ise 1'er mL alınıp 10'ar mL'ye hareketli faz ile tamamlanmıştır (40 µg/mL vortioksetin, 20 µg/mL kafein). YBSK sistemine verilen numunelere ait pik alanları çalışma eğrisi denkleminde yerine konulmuştur. Bu denklemden, numuneler içerisindeki vortioksetin etken maddesinin miktarı hesaplanarak Çizelge 3.9.'da sunulmuştur. Gerekli veriler kullanılarak kabul değeri (KD) hesaplanmıştır.

2.5.2.4. Hızlandırılmış Degradasyon Çalışmaları

Bu çalışmalar için üç noktalı (20, 40 ve 60 µg/mL vortioksetin.HBr ve her birinde 20'şer µg/mL kafein) yeni bir çalışma grafiği elde edilerek çalışmalar bu yeni grafikteki denkleme göre (Çizelge 3.10.) sayısal neticeye ulaştırılmıştır.

2.5.2.4.1. Termal Degradasyon

Vortioksetin.HBr etken maddesi 48 saat boyunca 80 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Ardından, 40 µg/mL derişiminde vortioksetin ve 20 µg/mL kafein içeren çözelti hazırlanmıştır. Okunan pik alanları çalışma eğrisinden elde edilen denkleme yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.10.'da sunulan veriler elde edilmiştir.

2.5.2.4.2. Asit Degradasyon

20 mg vortioksetin.HBr üzerine 10 mL 1,0 M hidroklorik asit çözeltisi eklenmiştir. Karışım, 100 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına

getirilen karışımın pH değeri 1,0 M sodyum hidroksit ile 7'ye nötralize edilmiştir. Bu karışım 50 mL'ye hareketli faz ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 40 µg/mL derişiminde vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL derişiminde kafein içeren yeni bir çözelti, hareketli faz ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır (Kafein için, hareketli fazda 200 µg/mL derişiminde hazırlanan stok kafein çözeltisi kullanılmıştır.). Çalışmalar sonucunda okunan pik alanları çalışma eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.10.'da sunulan veriler elde edilmiştir.

2.5.2.4.3. Alkali Degradasyon

20 mg vortiksetin.HBr üzerine 10 mL 1,0 M sodyum hidroksit çözeltisi eklenmiştir. Karışım, 100 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına getirilen karışımın pH değeri 1,0 M hidroklorik asit ile 7'ye nötralize edilmiştir. Bu karışım 50 mL'ye hareketli faz ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 40 µg/mL derişiminde vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL derişiminde kafein içeren yeni bir çözelti, hareketli faz ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır (Kafein için, hareketli fazda 200 µg/mL derişiminde hazırlanan stok kafein çözeltisi kullanılmıştır.). Çalışmalar sonucunda okunan pik alanları çalışma eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.10.'da gösterilen veriler elde edilmiştir.

2.5.2.4.4. Oksidatif Degradasyon

20 mg vortiksetin.HBr üzerine 10 mL % 3'lük hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiştir. Karışım, 100 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Ardından oda sıcaklığına getirilen karışım 50 mL'ye hareketli faz ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 40 µg/mL derişiminde vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL derişiminde kafein içeren yeni bir çözelti, hareketli faz ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır (Kafein için, hareketli fazda 200 µg/mL derişiminde hazırlanan stok kafein çözeltisi kullanılmıştır.). (Şekil 3.11.)

2.5.2.4.5. Fotokimyasal Degradasyon

Vortioksetin.HBr etken maddesi 48 saat boyunca güneş ışığında bekletilmiştir. Ardından, 40 µg/mL derişiminde vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein içeren çözelti hazırlanmıştır. Okunan pik alanları kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.10.'da görülen veriler elde edilmiştir.

2.6. Spektrofotometrik Yöntem ile Vortioksetin.HBr Miktar Tayini

2.6.1. Doğrudan UV-GB Spektrofotometri

2.6.1.1. Ortam Şartları ve Hesaplamalar

Spektrofotometrik yöntem ile yapılan analizlerde, çeşitli denemeler sonucunda, çözücü olarak metanol ve pH değeri $4,00 \pm 0,05$ olan 0,02 M asetat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir. Shimadzu marka UV 1601 model çift ışık yollu spektrofotometre kullanılarak UV bölgede (200-400 nm) yapılan taramalar sonucunda 228,0 nm'de etken maddenin maksimum absorbans değeri verdiği gözlenmiştir. Saflığı bilinen vortioksetin.HBr standardının metanolde çözülerek ve pH $4,00 \pm 0,05$ 0,02 M asetat tamponu ile seyreltilerek hazırlanan çözeltilerinden analitik olarak doğrusallık gösterecek konsantrasyon aralıkları tespit edilmiş ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak miktar tayinlerinde kullanılacak çalışma denklemine ulaşılmıştır. Çözeltiler 0,22 mikron naylon filtreden süzülerek analiz edilmiş ve analiz süresi boyunca karanlıkta ve buzdolabı sıcaklığında (yaklaşık 4 °C) muhafaza edilmiştir.

2.6.1.2. Deneyin Yapılışı

2.6.1.2.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması

Vortioksetin.HBr etken maddesinin metanolde çözülerek hazırlanan stok çözeltilerinden hareketle, vortioksetin.HBr konsantrasyonunun 6, 8, 10, 14, 18, 24 ve 30 µg/mL olduğu yedi adet standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler gerekli hacme pH 4,00±0,05 0,02 M asetat tamponu ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin 228,0 nm'deki absorbands değerleri elde edilmiş ve bu değerler, konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafikten yararlanılarak çalışma denklem verileri elde edilmiştir. (Şekil 3.22.)

2.6.1.2.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması

2.6.1.2.2.1. Gün İçi Deneyler

Vortioksetin.HBr etken maddesinin metanolde çözülmesi ile 200 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti ve bu stok çözeltiden alınan miktarların pH 4,00±0,05 0,02 M asetat tamponu ile seyreltilmesi ile 20 µg/mL standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. saatlerde absorbands değerleri ölçülmüştür. Okunan değerler, çalışma eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.12.'de sunulan veriler elde edilmiştir.

2.6.1.2.2.2. Günler Arası Deneyler

Vortioksetin.HBr etken maddesinin metanolde çözülmesi ile 200 µg/mL derişiminde stok çözelti ve bu stok çözeltiden alınan miktarların pH 4,00±0,05 0,02 M asetat tamponu ile seyreltilmesi ile 20 µg/mL derişiminde standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 0., 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki absorbands değerleri

ölçülmüştür. Okunan değerler, çalışma eğrisinden elde edilen denklemde yerlerine konulmuş ve Çizelge 3.13.'de sunulan veriler elde edilmiştir.

2.6.1.2.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

2.6.1.2.3.1. Miktar Tayini Analizi

Ankara'da lokal bir eczaneden temin edilen ve içeriğinde 10 mg vortioksetin / tablet bulunan 10 adet tablet, hassas terazide tartılmış ve tabletlerin ortalama ağırlığı bulunmuştur. Tartılan tabletler havan içerisinde toz edilerek içerisinde bir tablet ağırlığına eşdeğer numune tozu tartılmış ve 50 mL'lik balon jøjeye aktararak metanol ile ultrasonik banyoda ve magnetik karıştırıcıda çözülmüştür. Daha sonra bu çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye pH $4,00 \pm 0,05$ 0,02 M asetat tamponu ile tamamlanmıştır (20 µg/mL vortioksetin.HBr). Birbirine paralel, eşit derişimde, beş adet numune çözeltisi hazırlanmıştır. Maksimum absorpsiyonun bulunduğu 228,0 nm deki absorbans değerleri çalışma eğrisi denkleminde yerine konulmuştur. Bu denklemden, numune içerisindeki vortioksetin.HBr etken maddesinin miktarı hesaplanarak Çizelge 3.14.'de belirtilmiştir.

2.6.2. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometri

2.6.2.1. Deneyin Yapılışı

2.6.2.1.1. Çalışma Grafiğinin Hazırlanması

Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 6, 8, 10, 14, 18, 24 ve 30 µg/mL konsantrasyon aralığında çizdirilen vortioksetin.HBr 'ın orijinal spektrumlarının cihaz hafızasından çağırılarak teğetlerin eğimi anlamına gelen birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Birinci türev spektrumları incelenerek 237,7 nm ve 257,2 nm'deki türev absorbans değerleri okunmuştur. Okunan bu türev absorbans

değerleri konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve bu grafikten yararlanılarak çalışma denklemleri elde edilmiştir. (Çizelge 3.15)

2.6.2.1.2. Tekrarlanabilirliğin Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası Deneyler)

Doğrudan UV-GB Spektrofotometri yöntemi ile gün içi ve günler arası deneyler için hazırlanan spektrumlar alınıp kaydedilmiş ve bu kayıtlı spektrumlar cihaz hafızasından çağırılarak teğetlerin eğimi anlamına gelen birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Birinci türev spektrumları incelenerek 237,7 nm'deki türev absorbans değerleri okunmuştur. Okunan türev absorbans değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiş ve bu grafikten yararlanılarak gün içi ve günler arası (Çizelge 3.16. ve 3.17.) deney verileri elde edilmiştir.

2.6.2.1.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

2.6.2.1.3.1. Miktar Tayini Analizi

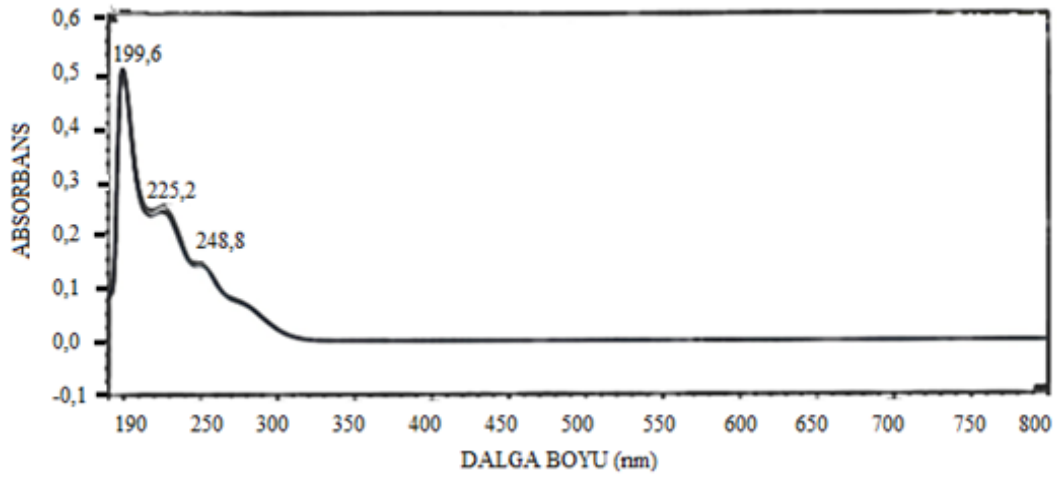
Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntem ile “yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması” çalışmalarında önceden spektrumları alınıp kaydedilen numune çözeltilerinin bu kayıtlı spektrumları cihaz hafızasından çağırılarak birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Birinci türev spektrumları incelenerek 237,7 nm ve 257,2 nm'deki türev sinyalleri okunmuştur. 237,7 nm ve 257,2 nm için bulunan çalışma grafikleri kullanılarak preparatlardaki etken madde miktarları hesaplanmıştır.(Çizelge 3.18.)

3. BULGULAR

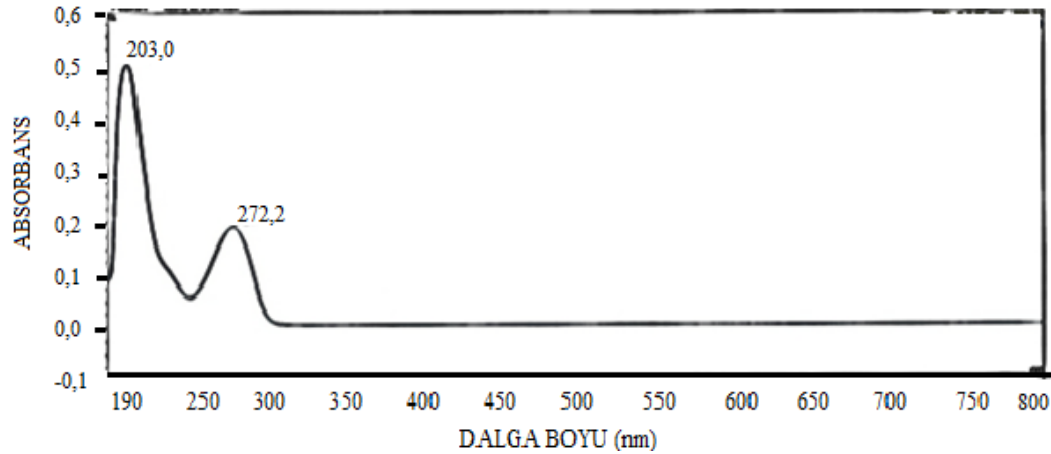
3.1. Vortioksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin YBSK Analiz Bulguları

3.1.1. Etken Madde ve İnternal Standart Spektrumları

Yüksek performanslı sıvı kromatografik çalışmalara başlamadan önce vortioksetin.HBr ve kafeinin (internal standart) UV-GB spektrumları alınmış ve Şekil 3.1. ve 3.2. 'de sunulmuştur.



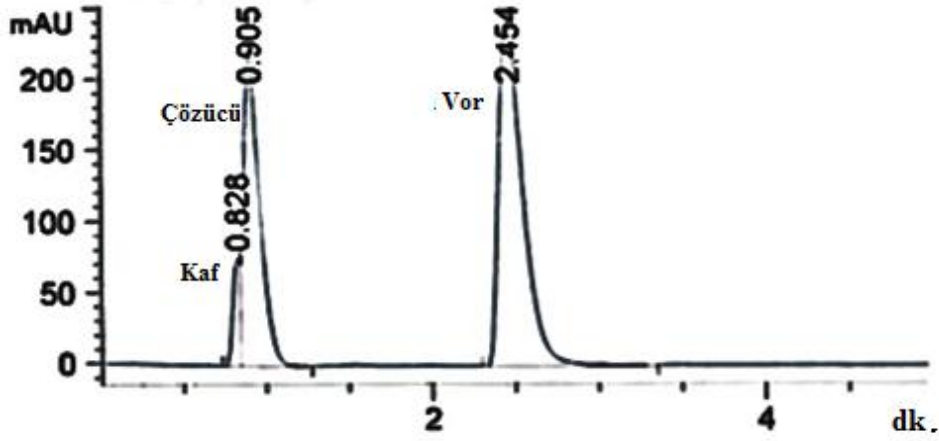
Şekil 3.1. Vortioksetin.HBr'ün ultraviyole-görünür bölgedeki spektrumu



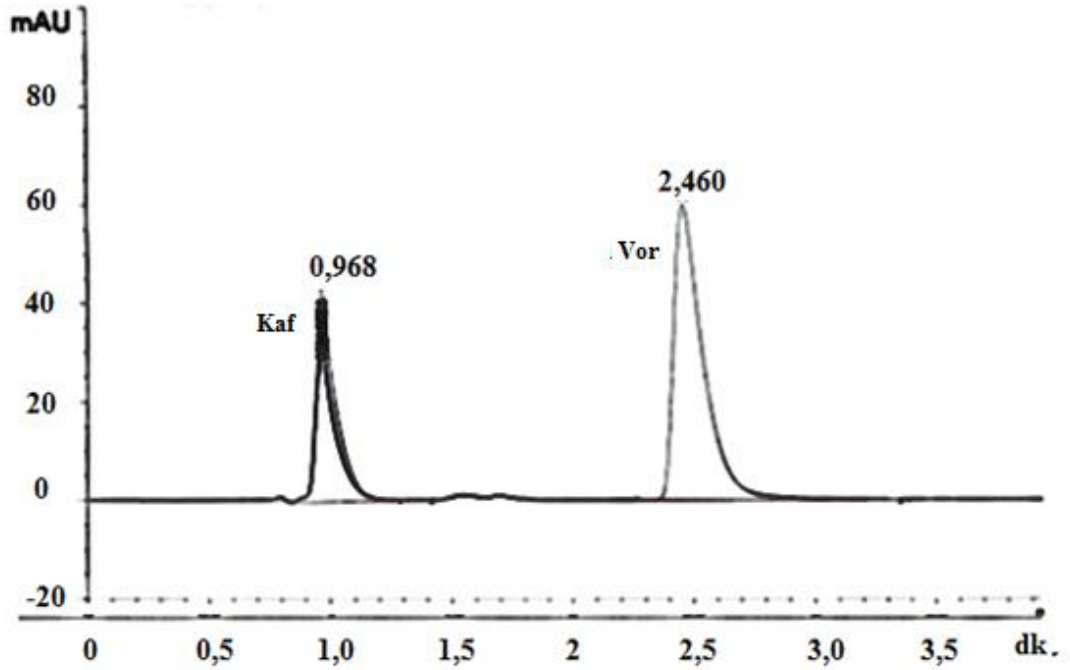
Şekil 3.2. Kafeinin ultraviyole-görünür bölgedeki spektrumu

3.1.2. Hareketli Faz Tampon Türlerinin Denenmesi

Yöntem için hareketli faz seçimi için en uygun tampon türleri araştırılmış ve Şekil 3.3. ve 3.4. de sunulan kromatogram elde edilmiştir.



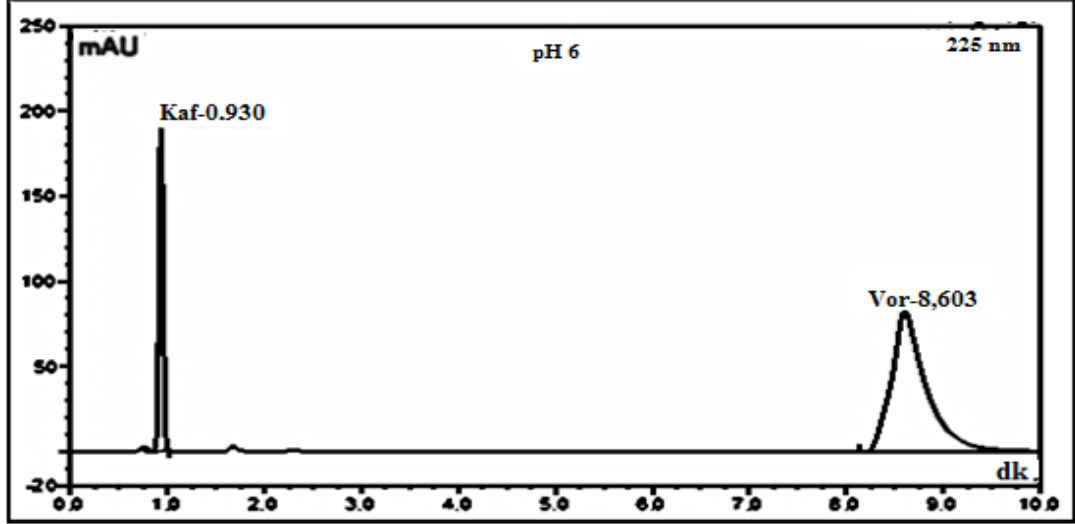
Şekil 3.3. 80 µg/mL vortiksetin.HBr ve 40 µg/mL kafein çözeltisinin amonyum asetat tampon içeren hareketli fazdaki kromatogramı



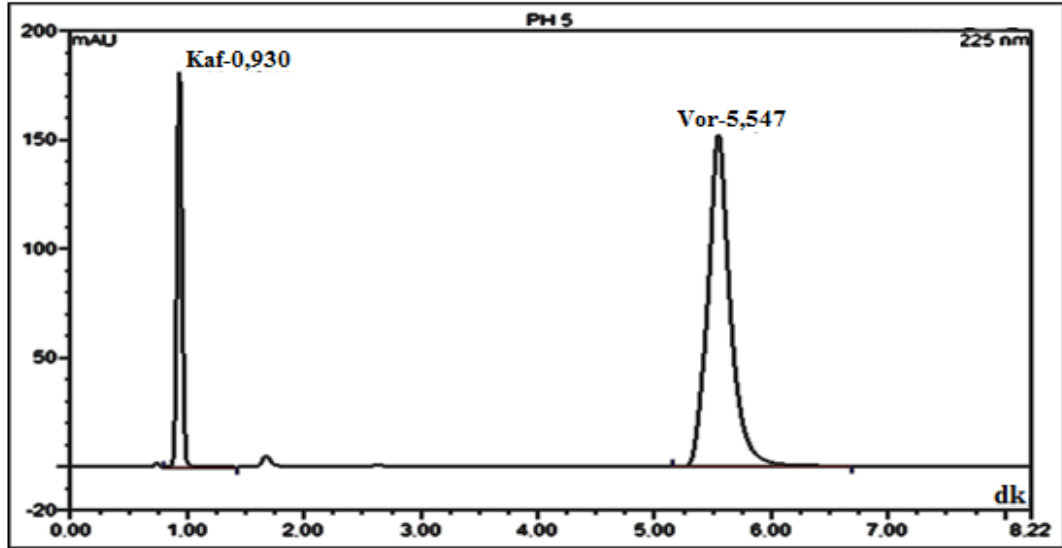
Şekil 3.4. 40 µg/mL vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin potasyum dihidrojen fosfat tampon içeren hareketli fazdaki kromatogramı

3.1.3. Hareketli Faz pH Değişikliklerinin Etkisi

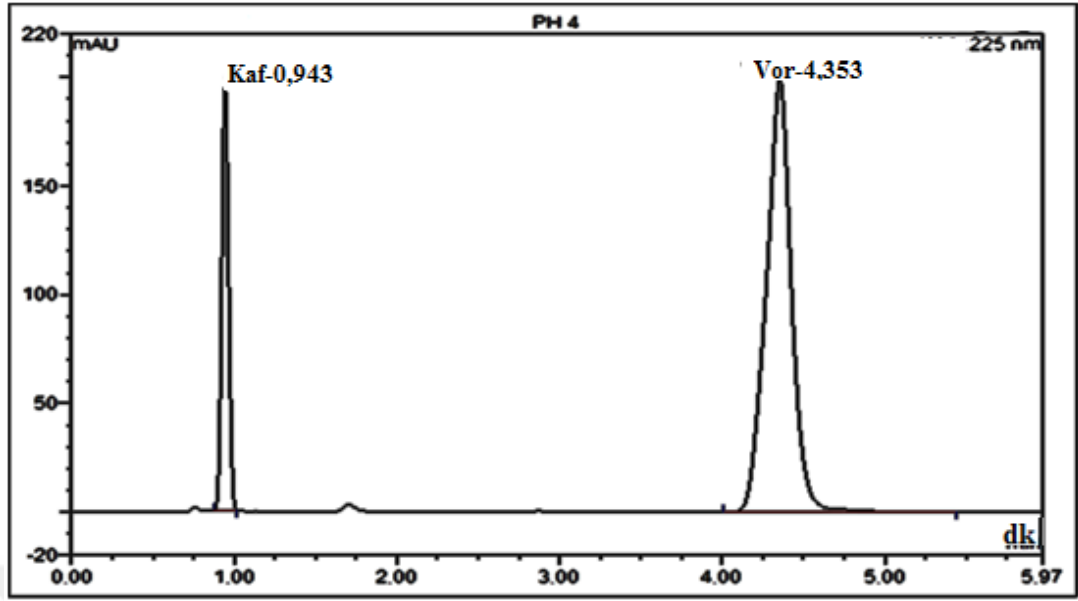
Yöntem için uygun tampon ortamı seçildikten sonra pH'nın 3.0 – 6.0 aralığında uygun pH seçilmiş ve ele edilen kromatogramlar Şekil 3.5- 3.8.'de sunulmuştur.



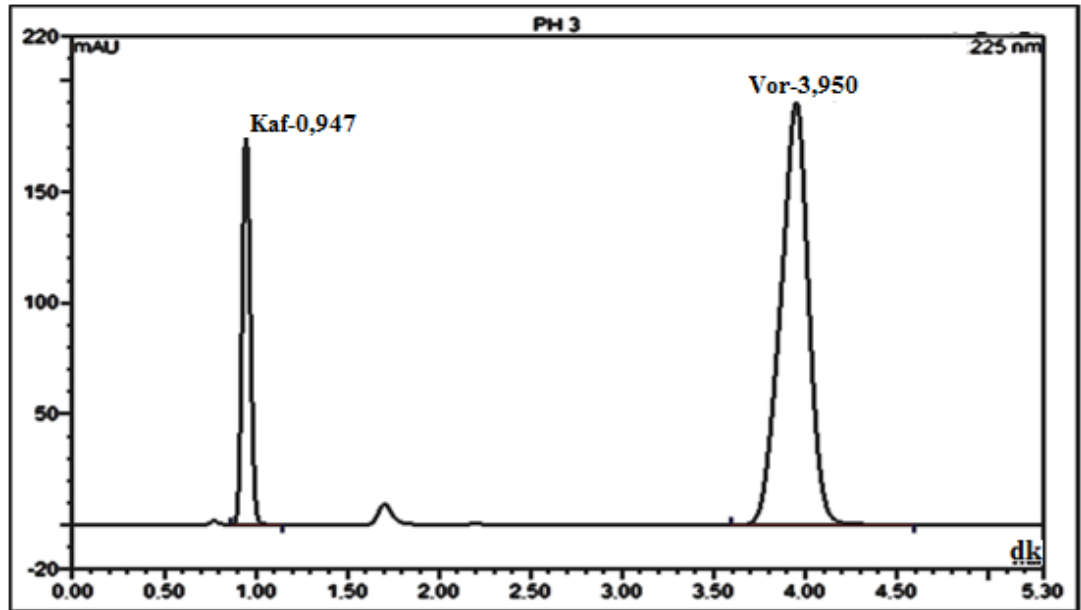
Şekil 3.5. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0.05 M KH₂PO₄ tampon (pH 6.00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı



Şekil 3.6. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0.05 M KH₂PO₄ tampon (pH 5.00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı



Şekil 3.7. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0.05 M KH_2PO_4 çözelti (pH 4.00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı



Şekil 3.8. 40 µg/mL vortioksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein çözeltisinin 0.05 M KH_2PO_4 tampon (pH 3.00):MeOH (60:40; h/h) hareketli fazı ile elde edilen kromatogramı

Farklı pH aralığında hazırlanan fosfat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen kromatogramlar incelenerek etken madde ve internal standart çözeltilerinin alıkonma süreleri Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. 0,05 M KH_2PO_4 tampon :MeOH (60:40; h/h) hareketli fazının pH değişimlerinin alıkonma zamanlarına etkisi (Dalga boyu:225 nm)

pH Değerleri	Kafein Alıkonma Zamanı (dk.)	Vortioksetin.HBr Alıkonma Zamanı (dk.)
pH 6,00	0,930	8,603
pH 5,00	0,930	5,547
pH 4,00	0,943	4,353
pH 3,00	0,947	3,950

3.1.4. Yöntem İçin Uygun Dalgaboyu Tarama Sonuçları

Fotometrik dedektör kullanılarak yapılan uygun Dalgaboyu (220,0 -235,0 nm) çalışmaları sonucunda etken madde için elde edilen alan değerleri Çizelge 3.2.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. 220,0-235,0 nm dalgaboyu aralığında etken madde alanları

Dalga Boyu (nm)	Vortioksetin.HBr Alanı
220,0	34,430
223,0	35,032
224,0	35,281
225,0	35,668
226,0	35,290
230,0	33,906
235,0	28,781

3.1.5. Kolon Seçiminin Yapılması

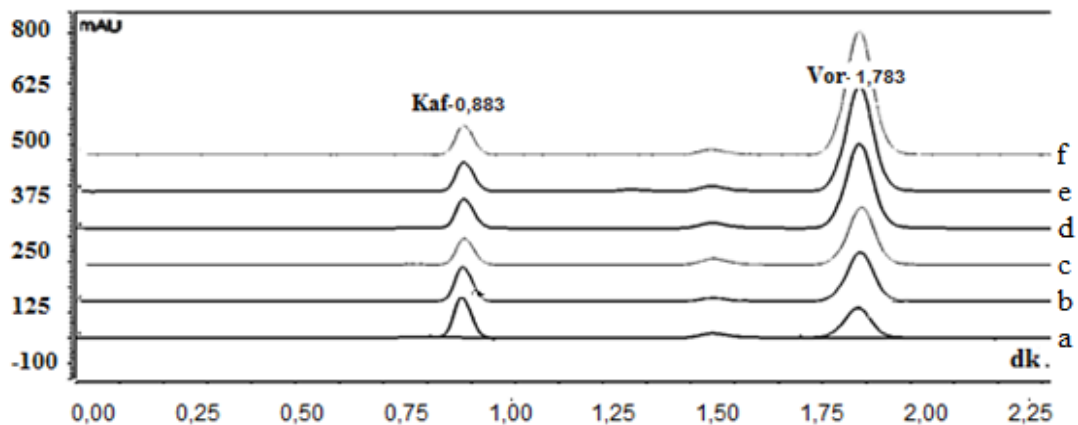
Önerilen yöntem için sabit faz olarak kullanılacak olan Luna C₁₈, Kromasil C₁₈ ve Waters Symmetry C₁₈ kolonları denenmiş ve asimetri ve teorik plaka sayıları Çizelge 3.3.'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan kolonlar sonucu elde edilen asimetri faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri (225,0 nm)

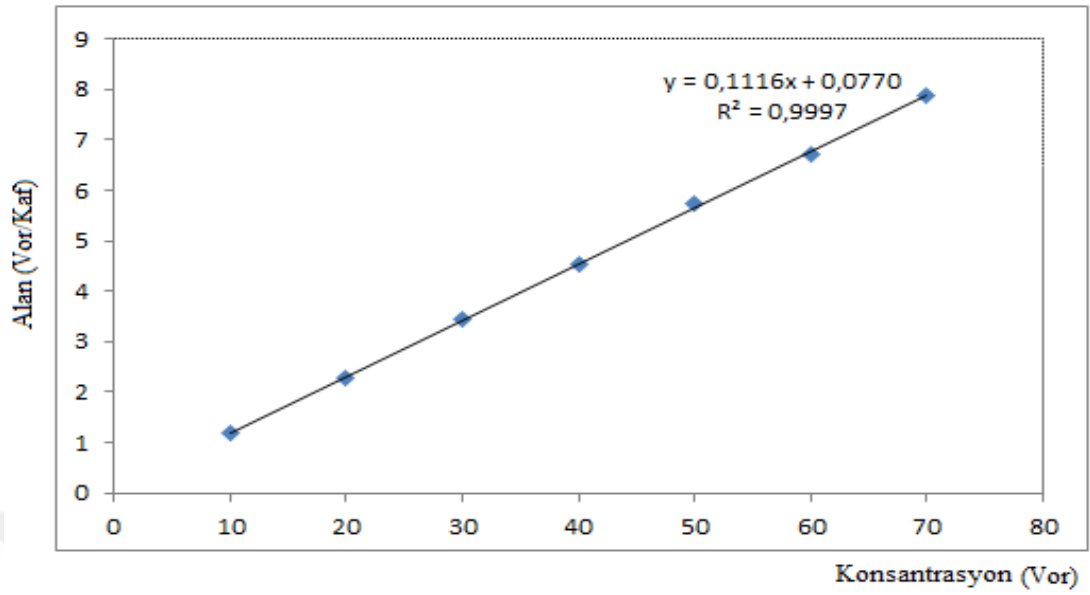
Kolon	Asimetri (Vortioksetin.HBr)	Teorik Plaka (Vortioksetin.HBr)	Sayısı
Luna C ₁₈ , 3,0 µm, 4,6 x 50 mm	0,45	1092	
Kromasil C ₁₈ , 3,5 µm, 4,6 x 100 mm	0,42	2285	
Waters Symmetry C ₁₈ , 3,5 µm, 4,6 x 100 mm	0,99	2402	

3.1.6. Çalışma Eğrisi Denklemi Verileri Eldesi

Standart vortioksetin ve standart kafein çözeltisi kullanılarak elde edilen 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 µg/mL konsantrasyonlardaki vortioksetin.HBr ve her birinde 20 µg/mL kafein içeren çözeltilerin 225,0 nm'de okunan alanları konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş; Şekil 3.10.'da görülen çalışma eğrisi ve Çizelge 3.4.'te görülen çalışma eğrisi denklem verileri elde edilmiştir.



Şekil 3.9. Hareketli faz içerisindeki değişen konsantrasyonlarda vortioksetin.HBr ve sabit olarak 20 µg/mL kafein içeren a) 20 µg/mL ; b) 30 µg/mL ; c) 40 µg/mL ; d) 50 µg/mL ; e) 60 µg/mL ; ve f) 70 µg/mL çözeltilerinin 225,0 nm'deki kromatogramları



Şekil 3.10. YBSK yöntemi ile elde edilen çalışma grafiği

Çizelge 3.4. YBSK yöntemi ile çalışma eğrisi denklem verileri (225 nm, n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
10 – 70 µg/mL	0,1116	0,0770	0,9998	0,2434	0,8115

a: Çalışma grafiğinin eğimi

b: Çalışma grafiğinin y- eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı (3SS/a)

TAS: Tayin alt sınırı (10 SS/a)

SS: Kesimin standart sapması

3.1.7. Tekrarlanabilirlik çalışmaları

3.1.7.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler

Deney kesinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan gün içi deney sonuçları Çizelge 3.5.'te, günler arası deney sonuçları ise Çizelge 3.6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. YBSK yöntemi ile, her birinde 20 µg/mL derişiminde kafein iç standardı bulunan çözeltilerle vortiooksetin.HBr etken maddesinden elde edilen gün içi deneysel veriler

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (%)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)	Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (%)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
30 µg/mL Vortiooksetin 1	0. saat	101,0	0,88	0,87	40 µg/mL Vortiooksetin 2	6. saat	100,8	0,01	0,01
	2. saat	100,7	0,28	0,28		8. saat	101,1	0,30	0,30
	4. saat	100,5	0,03	0,03	40 µg/mL Vortiooksetin 3	0. saat	101,5	0,26	0,26
	6. saat	100,6	0,05	0,05		2. saat	101,2	0,14	0,13
	8. saat	100,9	0,14	0,14		4. saat	101,5	0,05	0,05
30 µg/mL Vortiooksetin 2	0. saat	100,6	0,13	0,13		6. saat	101,5	0,11	0,11
	2. saat	100,4	0,25	0,24		8. saat	101,7	0,07	0,07
	4. saat	100,9	0,08	0,08	50 µg/mL Vortiooksetin 1	0. saat	101,3	0,11	0,10
	6. saat	100,6	0,23	0,23		2. saat	101,5	0,08	0,08
	8. saat	100,7	0,32	0,32		4. saat	101,5	0,09	0,09
30 µg/mL Vortiooksetin 3	0. saat	100,0	0,06	0,06		6. saat	101,6	0,06	0,06
	2. saat	99,9	0,03	0,03	50 µg/mL Vortiooksetin 2	8. saat	101,3	0,05	0,05
	4. saat	100,2	0,40	0,40		0. saat	101,4	0,55	0,55
	6. saat	100,2	0,02	0,02		2. saat	101,2	0,38	0,37
	8. saat	100,4	0,02	0,02		4. saat	101,4	0,17	0,18
40 µg/mL Vortiooksetin 1	0. saat	100,2	0,14	0,14	50 µg/mL Vortiooksetin 3	6. saat	101,6	0,11	0,11
	2. saat	100,5	0,01	0,01		8. saat	101,7	0,23	0,23
	4. saat	100,3	0,00	0,00		0. saat	101,7	0,11	0,11
	6. saat	100,6	0,05	0,05		2. saat	101,8	0,16	0,16
	8. saat	100,6	0,27	0,27	50 µg/mL Vortiooksetin 3	4. saat	101,7	0,33	0,33
40 µg/mL Vortiooksetin 2	0. saat	101,3	0,07	0,07		6. saat	101,7	0,23	0,23
	2. saat	100,8	0,32	0,32		8. saat	101,7	0,00	0,00
	4. saat	100,9	0,12	0,12					

Çizelge 3.6. YBSK yöntemi ile, her birinde 20 µg/mL derişiminde kafein iç standardı bulunan çözeltilerle vortiooksetin.HBr etken maddesinden elde edilen günler arası deneyssel veriler

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (%)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)	Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (%)	Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
30 µg/mL Vortiooksetin 1	0. gün	101,0	0,88	0,87	40 µg/mL Vortiooksetin 2	3. gün	103,0	1,32	1,28
	1. gün	100,5	0,01	0,01		4. gün	101,2	0,11	0,11
	2. gün	100,8	0,70	0,69		5. gün	100,8	0,11	0,10
	3. gün	100,2	1,73	1,73	40 µg/mL Vortiooksetin 3	0. gün	101,4	0,26	0,26
	4. gün	100,1	0,58	0,58		1. gün	100,0	0,09	0,09
30 µg/mL Vortiooksetin 2	5. gün	100,9	0,03	0,03		2. gün	94,3	0,50	0,53
	0. gün	100,6	0,13	0,13		3. gün	87,8	1,25	1,42
	1. gün	98,2	0,38	0,39		4. gün	85,9	0,05	0,06
	2. gün	94,2	0,10	0,11		5. gün	86,6	0,02	0,02
	3. gün	98,4	0,58	0,59	50 µg/mL Vortiooksetin 1	0. gün	101,3	0,11	0,10
30 µg/mL Vortiooksetin 3	4. gün	91,1	0,15	0,16		1. gün	101,1	0,18	0,18
	5. gün	91,0	0,22	0,24		2. gün	100,4	0,06	0,01
	0. gün	100,0	0,06	0,06		3. gün	99,7	0,93	0,94
	1. gün	100,1	0,11	0,11		4. gün	99,7	0,23	0,23
	2. gün	99,4	0,21	0,21		5. gün	99,5	0,43	0,44
40 µg/mL Vortiooksetin 1	3. gün	110,3	1,59	1,44	50 µg/mL Vortiooksetin 2	0. gün	101,4	0,55	0,55
	4. gün	98,5	1,13	1,15		1. gün	101,4	0,20	0,19
	5. gün	98,7	0,57	0,58		2. gün	101,8	0,60	0,59
	0. gün	100,2	0,14	0,14		3. gün	102,1	1,55	1,52
	1. gün	100,7	0,03	0,03		4. gün	101,3	0,06	0,06
40 µg/mL Vortiooksetin 2	2. gün	100,2	0,16	0,16	50 µg/mL Vortiooksetin 3	5. gün	100,9	0,19	0,18
	3. gün	99,7	3,15	3,16		0. gün	101,7	0,11	0,11
	4. gün	100,1	0,45	0,45		1. gün	100,2	0,07	0,07
	5. gün	100,5	0,68	0,67		2. gün	97,8	0,01	0,01
	0. gün	101,3	0,07	0,07		3. gün	98,7	1,63	1,65
40 µg/mL Vortiooksetin 2	1. gün	101,2	0,18	0,17		4. gün	98,1	0,38	0,39
	2. gün	101,3	0,40	0,40		5. gün	98,9	0,66	0,67

3.1.8. Doğruluk

3.1.8.1. Geri Kazanım Çalışma Verileri

Yöntemin doğruluğunun tespiti için yapılan % geri kazanım çalışmalarının sonuçları Çizelge 3.7.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.7. YBSK yöntemi ile vortiksetin.HBr etken maddesinden elde edilen geri kazanım verileri

Numune No	Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
1	40,00 + 5,00	46,30	102,9
2	40,00 + 10,00	50,76	101,5
3	40,00 + 15,00	55,42	100,8
4	40,00 + 20,00	60,49	100,8
5	40,00 + 25,00	65,55	100,8
6	40,00 + 30,00	70,44	100,6
7	40,00 + 35000	75,54	100,7
8	40,00 + 40,00	78,20	97,7
X_{ort} :			100,7
Standart Sapma:			1,42
Bağıl Standart Sapma:			1,41

3.1.9. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

3.1.9.1. Miktar Tayini Analiz Bulguları

Yöntem etken maddeyi içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. YBSK yöntemi ile Brintellix® 10 mg tabletteki vortioksetin miktar tayini analiz verileri

Numune No	Miktar Tayini (mg/tb)
1	10,07
2	10,00
3	10,23
4	9,87
5	10,11
$\bar{X}_{ort}$: 10,06 Standart Sapma: 0,13 Bağıl Standart Sapma: 1,33 $p : 0,05$ için G.A. : $10,06 \pm 0,16$	

P değeri: 0,05

G.A. : Güven Aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

$t = 2,78$ (Serbestlik derecesi ; $n - 1 = 4$ için)

3.1.9.2. İçerik Tekdüzeliliği Verileri

Farmasötik preparat içerisinde bulunan etken madde için yapılan içerik tekdüzeliliği çalışma verileri Çizelge 3.9.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. YBSK yöntemi ile Brintellix 10 mg tabletteki vortiksetin.HBr
İçerik tekdüzeliği analiz verileri

Numune No	Miktar Tayini (%)
1	98,5
2	99,3
3	99,9
4	96,9
5	102,1
6	98,1
7	101,1
8	99,6
9	95,5
10	96,0
X_{ort} : 98,5	
Standart Sapma: 2,60	
Bağıl Standart Sapma: 2,64	

Avrupa Farmakopesi 8.0'a göre; 25 mg'dan daha düşük veya toplam tablet ağırlığının %25'inden daha düşük dozajlarda, preparata içerik tekdüzeliği testi uygulanır. Kabul değerinin hesaplanması için farmakopede belirtilen formül uygulanır. Farmakopeye göre,

$$\%98,5 \leq X_{ort} \leq 101,5 \text{ ise;}$$

$$M = X_{ort}$$

$$KD = k \cdot s \text{ olur.}$$

Burada, 10 adet numune ile çalışıldığından, “k” değeri, 2,4 alınacaktır. İçerik tekdüzeliği testinin sonucunun uygun olması için, kabul değeri (KD), maksimum 15 (L1) olmalıdır. “s” ile belirtilen ifade ise, 10 adet numunenin miktar tayini sonuçlarının standart sapmasıdır. Veriler yerine konulduğunda,

$$KD = 2,4 \times 2,60 = 6,24 < 15 \text{ (L1)}$$

sonucu elde edilir.

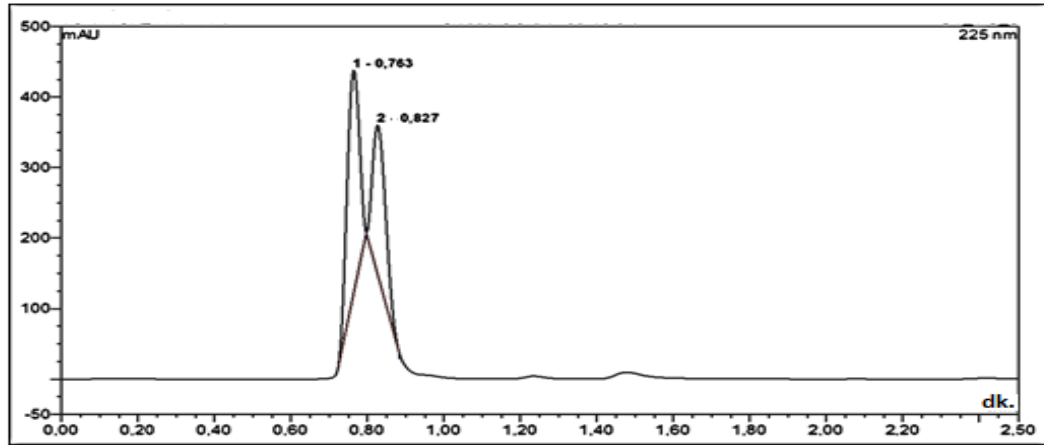
(Avrupa Farmakopesi 8.0, 2014, Bölüm 2.9.40)

3.1.10. Hızlandırılmış Degradasyon Çalışmaları Verileri

Önerilen yöntem kullanılarak yapılan degradasyon çalışma sonuçları Çizelge 3.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.10. YBSK yöntemi ile, her birinde 40 µg/mL vortiksetin.HBr ve 20 µg/mL kafein iç standardı bulunan çözeltilerle elde edilen vortiksetin.HBr hızlandırılmış degradasyon çalışma verileri

Degradasyon Şartları	Sıcaklık (°C)	Süre (Saat)	Degradasyon(%)
Termal Degradasyon	80	48	-2,25
Asit Degradasyon	100	1	+1,53
Alkali Degradasyon	100	1	+0,70
Oksidatif Degradasyon	100	1	-100,00
Fotokimyasal Degradasyon	100	1	-1,51

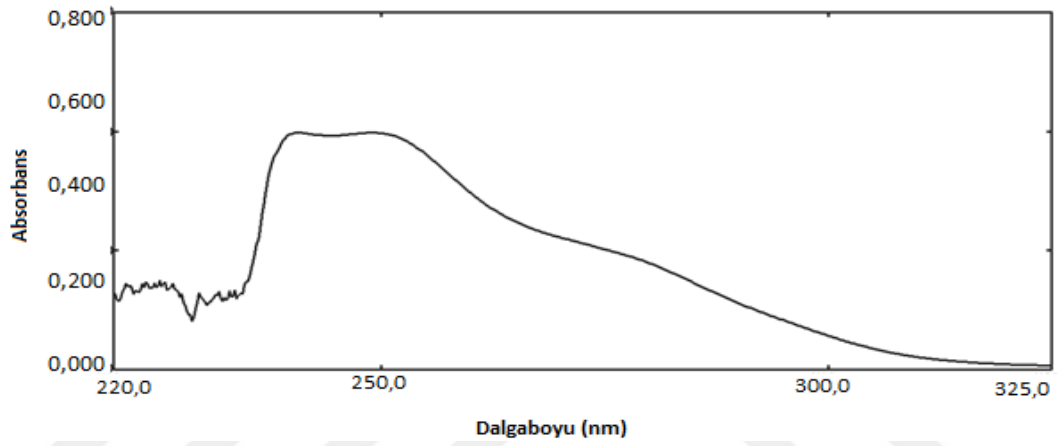


Şekil 3.11. Oksidatif degradasyon sonucunda vortiksetin.HBr etken maddesinin tamamen bozunduğunu gösteren kromatogram (225,0 nm)

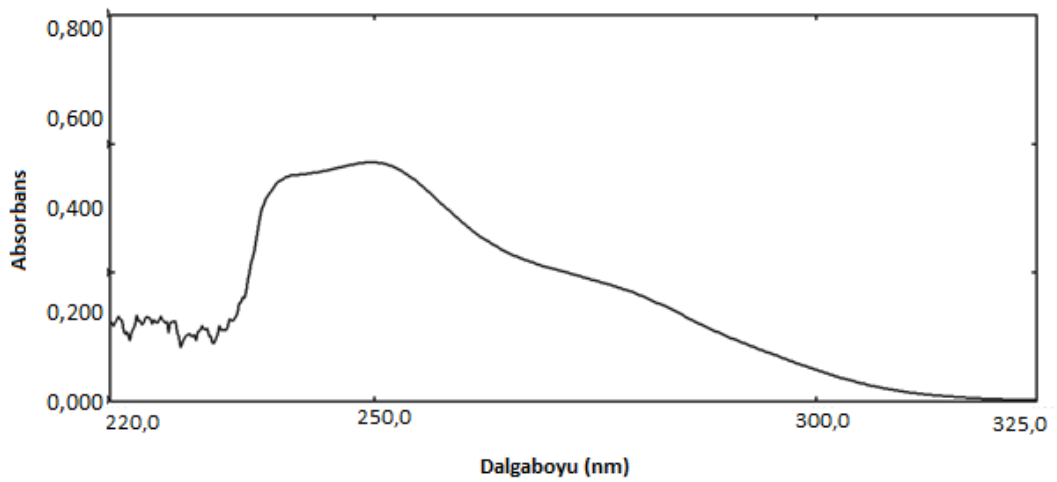
3.2. Vortioksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Doğrudan UV-GB Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları

3.2.1. Çözücü için Tampon Türlerinin Denenmesi

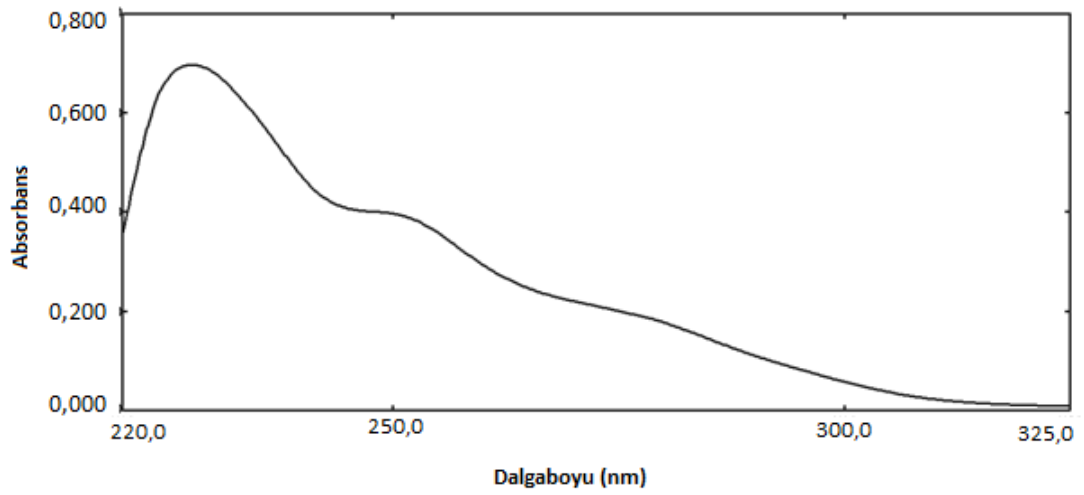
Spektrofotometrik yöntem için Etken maddenin çeşitli tampon ortamlarındaki orijinal spektrumları Şekil 3.12. - 3.20.'de gösterilmiştir.



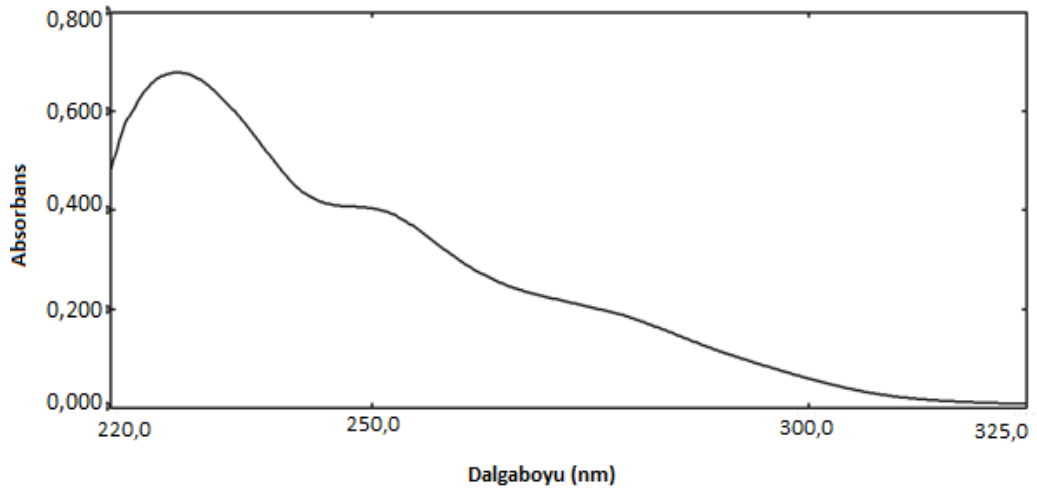
Şekil 3.12. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M sitrat tampon (pH:2,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu



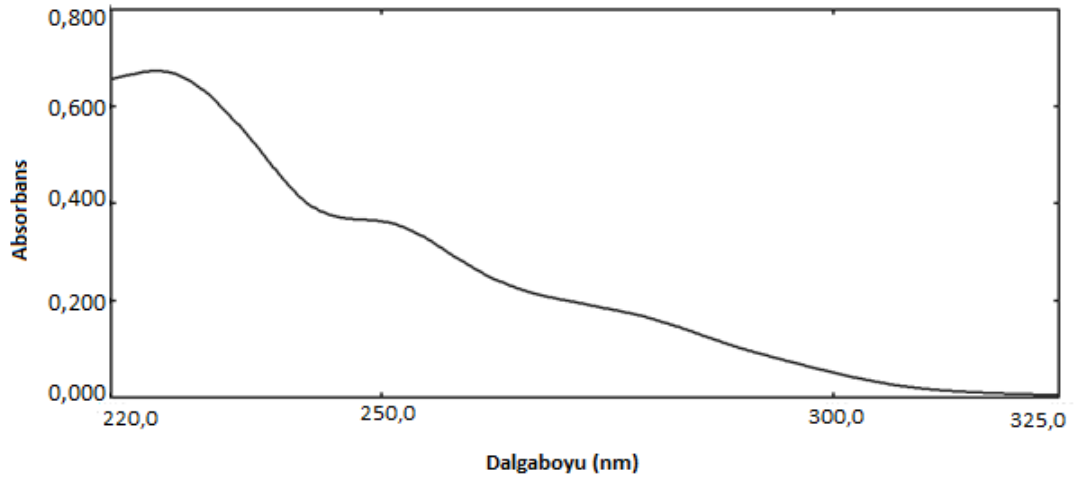
Şekil 3.13. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M sitrat tampon (pH:3,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu



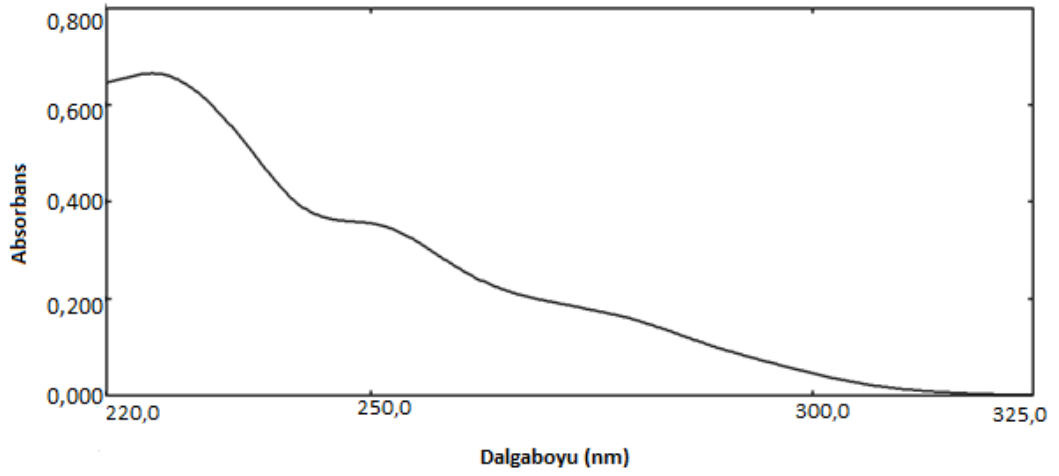
Şekil 3.14. 12 µg/mL vortioxetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) kullanılarak hazırlanan vortioxetin.HBr UV spektrumu



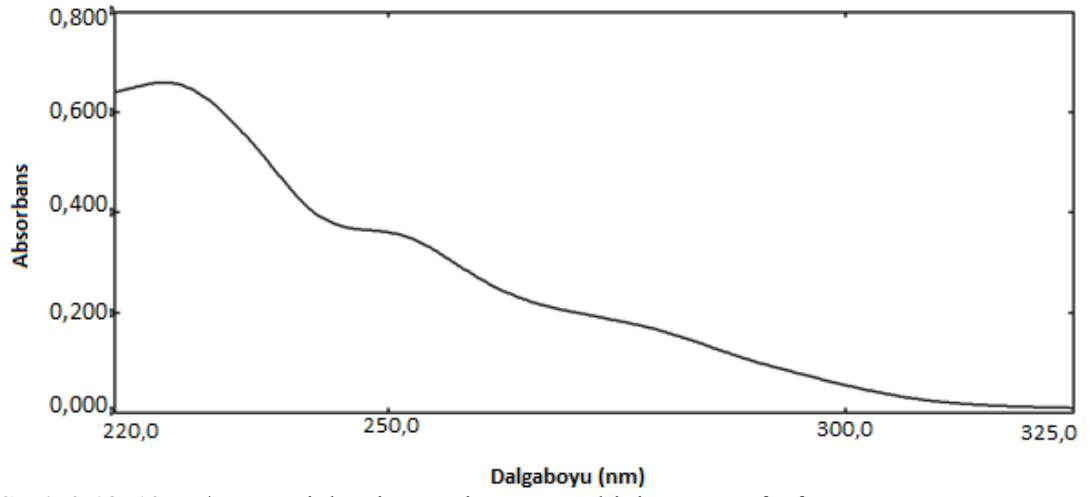
Şekil 3.15. 12 µg/mL vortioxetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M asetat tampon (pH:5,0) kullanılarak hazırlanan vortioxetin.HBr UV spektrumu



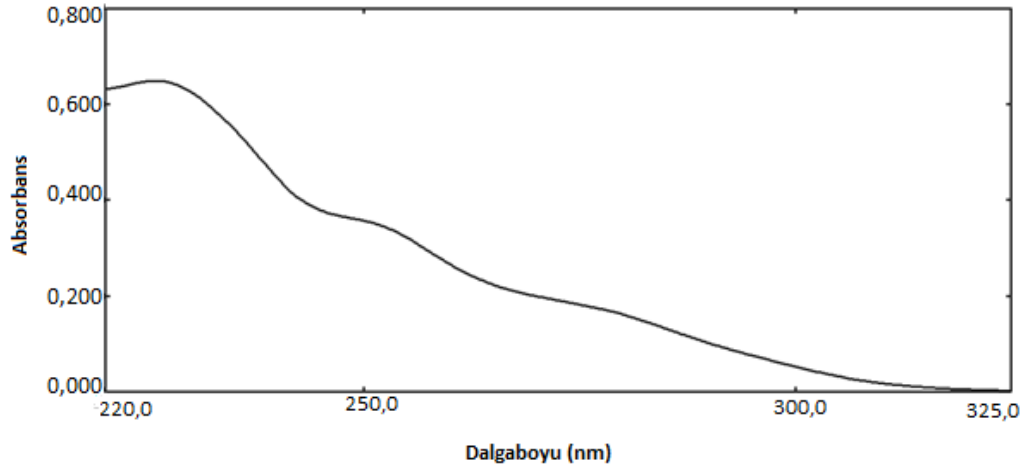
Şekil 3.16. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:6,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu



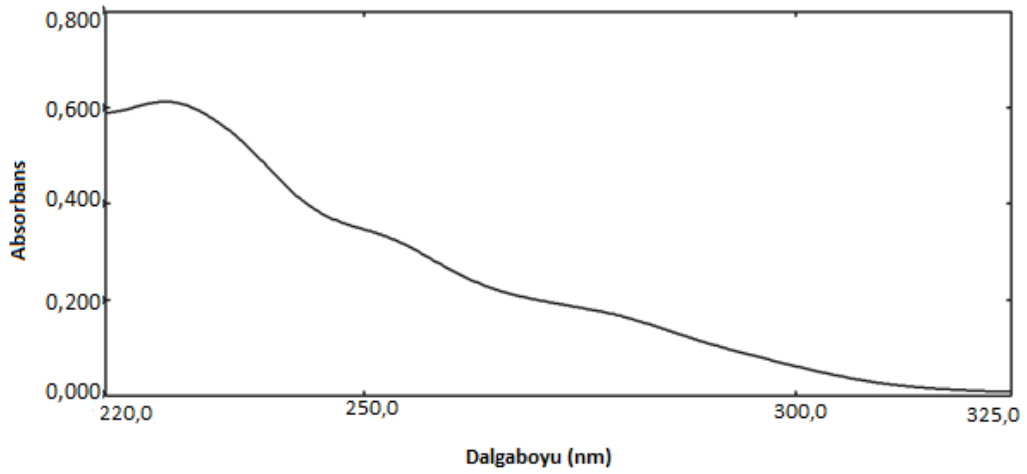
Şekil 3.17. 12 µg/mL vortioksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:7,0) kullanılarak hazırlanan vortioksetin.HBr UV spektrumu



Şekil 3.18. 12 µg/mL vortioxetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M fosfat tampon (pH:8,0) kullanılarak hazırlanan vortioxetin.HBr UV spektrumu



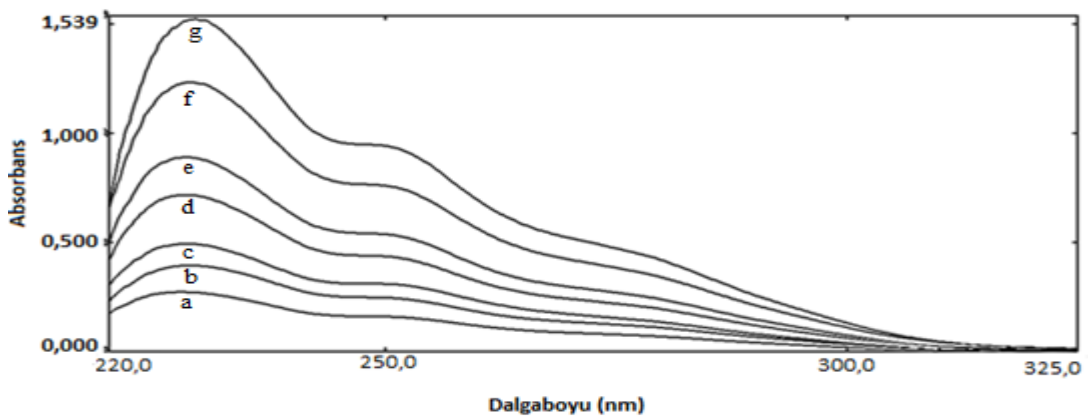
Şekil 3.19. 12 µg/mL vortioxetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M borat tampon (pH:9,0) kullanılarak hazırlanan vortioxetin.HBr UV spektrumu



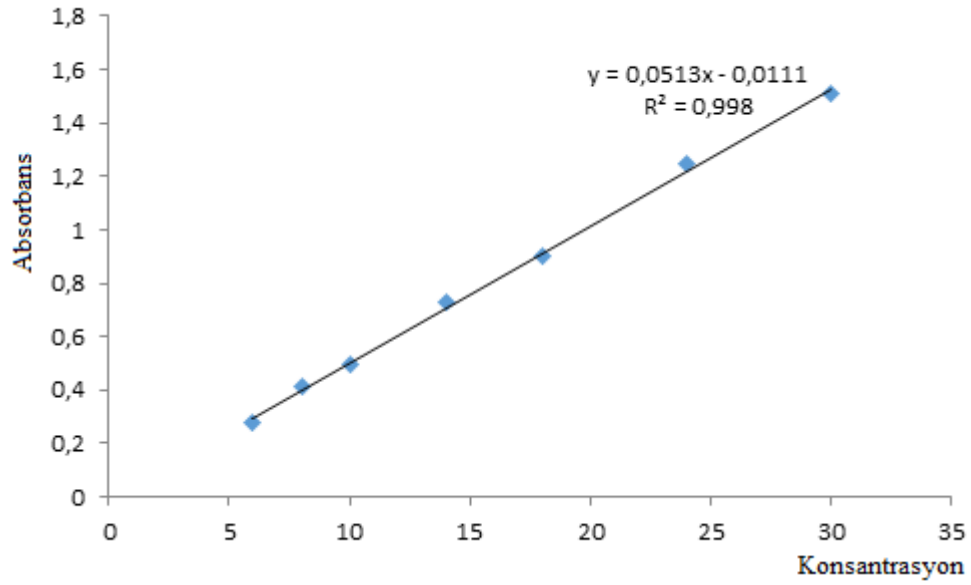
Şekil 3.20. 12 µg/mL vortiooksetin.HBr içeren çözeltinin 0,02 M borat tampon (pH:10,0) kullanılarak hazırlanan vortiooksetin.HBr UV spektrumu

3.2.2. Çalışma Eğrisi Denklem Verileri Eldesi

Standart vortiooksetin.HBr çözeltisi kullanılarak elde edilen 6, 8, 10, 14, 18, 24 ve 30 µg/mL konsantrasyonlardaki vortiooksetin.HBr çözeltilerin 228,0 nm’de okunan absorbans değerleri konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş; Şekil 3.21.’de görülen UV orijinal spektrumları ve Çizelge 3.11.’de görülen çalışma eğrisi denklem verileri elde edilmiştir.



Şekil 3.21. 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) içerisinde hazırlanan vortiooksetin.HBr’ün a) 6 µg/mL; b) 8 µg/mL; c) 10 µg/mL; d) 14 µg/mL; e) 18 µg/mL; f) 24 µg/mL; ve g) 30 µg/mL konsantrasyonlarına ait, doğrudan UV spektrumları



Şekil 3.22. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 228,0 nm ‘deki çalışma Grafiği

Çalışma grafik verileri Çizelge 3.11.’de sunulmuştur.

Çizelge 3.11. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemle elde edilen çalışma eğrisi verileri (228,0 nm, n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
6 – 30	0,0513	-0,0111	0,999	0,6616	2,2054

a: Çalışma grafiğinin eğimi

b: Çalışma grafiğinin y- eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı (3SS/a)

TAS: Tayin alt sınırı (10SS/a)

SS: Kesimin standart sapması

3.2.3. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

3.2.3.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler

Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntem ile deney kesinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan gün içi deney sonuçları Çizelge 3.12.'de, günler arası deney sonuçları ise Çizelge 3.13.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.12. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen gün içi deneysel veriler

Kullanılan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar(%)
20	0. Saat	100,4
20	1. saat	99,8
20	2. saat	100,9
20	3. saat	100,9
20	4. saat	100,9
20	5. saat	100,9
20	6. saat	100,9
20	7. saat	101,5
Ortalama Miktar(%)		100,8
Standart Sapma		0,48
Bağıl Standart Sapma (%)		0,48

Çizelge 3.13. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen günler arası deneysel veriler

Kullanılan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar(%)
20	0. gün	104,7
20	1. gün	109,0
20	2. gün	104,7
20	3. gün	107,3
20	4. gün	105,8
Ortalama Miktar(%)		106,3
Standart Sapma		1,85
Bağıl Standart Sapma (%)		1,74

3.2.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem etken madde içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Doğrudan UV-GB Spektrofotometrik yöntemi ile Brintellix® 10 mg tabletteki analiz sonuçları

Numune No	Miktar Tayini (mg/tb.)
1	9,82
2	9,82
3	9,75
4	10,13
5	9,82
$\bar{X}_{ort}$:	9,87
Standart Sapma:	0,15
Bağıl Standart Sapma:	1,52
p : 0,05 için G.A. :	9,87 ± 0,19

P değeri: 0,05

G.A. : Güven Aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

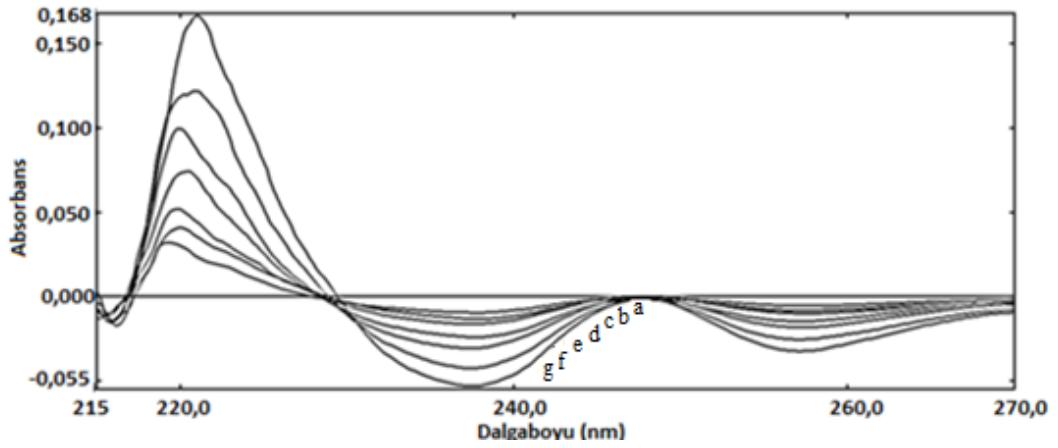
n : Deney sayısı

t = 2,78 (Serbestlik derecesi ; n – 1 = 4 için)

3.3. Vortiksetin Hidrobromür İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Birinci Türev UV-GB Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları

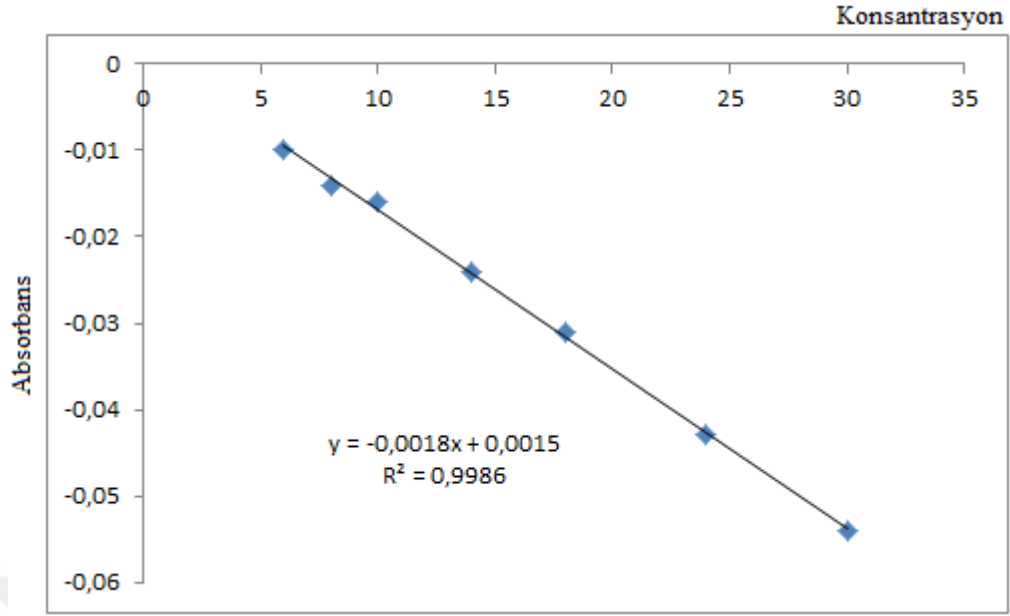
3.3.1. Çalışma Denklemleri Verileri Elde

Standart vortiksetin.HBr çözeltisi kullanılarak elde edilen 6, 8, 10, 14, 18, 24 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki vortiksetin.HBr çözeltilerin UV orijinal spektrumları kullanılarak bilgisayarlar yardımıyla birinci türev UV spektrumları elde edilmiş Şekil 3.23.'de gösterilmiştir.

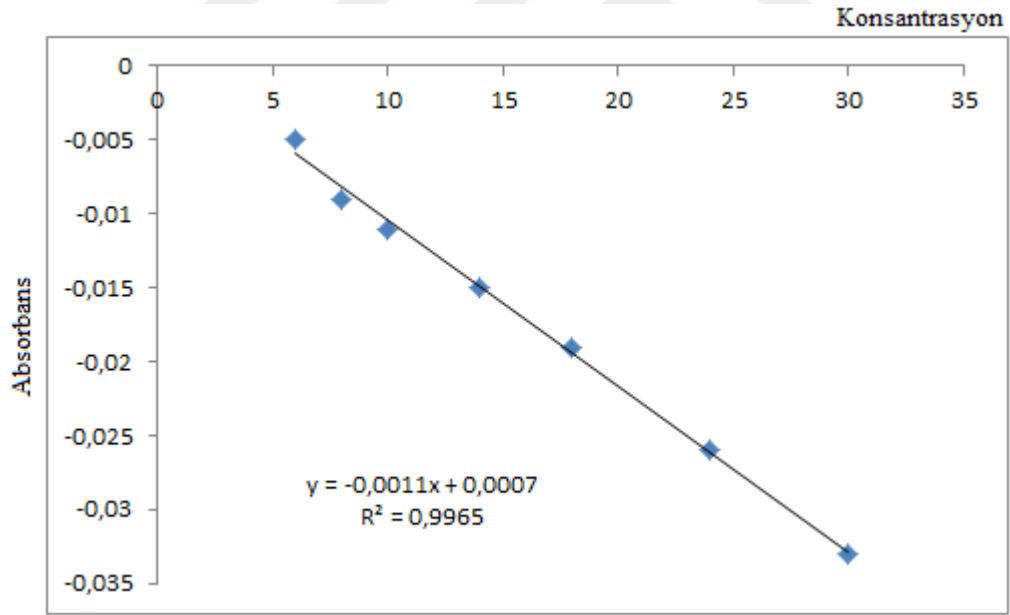


Şekil 3.23. 0,02 M asetat tampon (pH:4,0) içerisinde hazırlanan vortiksetin.HBr'ün a) 6 $\mu\text{g/mL}$; b) 8 $\mu\text{g/mL}$; c) 10 $\mu\text{g/mL}$; d) 14 $\mu\text{g/mL}$; e) 18 $\mu\text{g/mL}$; f) 24 $\mu\text{g/mL}$; ve g) 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarına ait, birinci Türev UV spektrumları (λ_1 : 237,7 nm; λ_2 : 257,2 nm)

Etken maddenin Birinci türev spektrumları alınarak 237,7 ve 257,2 nm'de türev absorbans değerleri okunarak çalışma grafikleri Şekil 3.24. ve 3.25.'te gösterilmiştir. Elde edilen çalışma grafik verileri Çizelge 3.15.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.24. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 237,7 nm’de elde edilen çalışma grafiği



Şekil 3.25. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde 257,2 nm’de elde edilen çalışma grafiği

Çizelge 3.15. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemde elde edilen çalışma eğrisi verileri (n=7)

Çalışılan Dalgaboyu (nm)	Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
237,7	6 – 30	-0,0018	0,0015	0,999	0,9623	3,2075
257,2	6 – 30	-0,0011	0,0007	0,997	0,5746	1,5486

a: Çalışma grafiğinin eğimi

b: Çalışma grafiğinin y- eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

YS: Yakalama sınırı ((3SS/a)

TAS: Tayin alt sınırı (10SS/a)

SS: Kesimin standart sapması

3.3.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

3.3.2.1. Gün İçi Deneyler

Birinci türev UV-GB spektrofotometri yöntemi ile deney kesinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan gün içi deney sonuçları Çizelge 3.16.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.16. Birinci türev UV-GB spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen gün içi deneysel veriler (237,7 nm)

Kullanılan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar(%)
20	0. Saat	98,6
20	1. saat	95,8
20	2. saat	98,6
20	3. saat	98,6
20	4. saat	101,4
20	5. saat	101,4
20	6. saat	98,6
20	7. saat	98,6
	$X_{ort}(\%)$	99,0
	SS	1,78
	BSS (%)	1,80

3.3.2.2. Günler Arası Deneyler

Günlerarası deney sonuçları Çizelge 3.17.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. Birinci türev UV-GB spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen günler arası deneysel veriler (237,7 nm)

Kullanılan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar(%)
20	0. gün	104,2
20	1. gün	101,4
20	2. gün	104,2
20	3. gün	104,2
20	4. gün	106,9
	$X_{ort}(\%)$	104,2
	Standart Sapma	1,96
	Bağıl Standart Sapma (%)	1,89

3.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem etken madde içeren farmasötik preparata uygulandığında elde edilen sonuçlar Çizelge 3.18.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.18. Birinci Türev UV-GB Spektrofotometrik yöntemi farmasötik preparata uygulandığında elde edilen analiz sonuçları
(Brintellix® 10 mg /tablet)

Numune No	Miktar Tayini (mg/tb.)	
	237,7 nm	257,2 nm
1	9,51	10,26
2	9,51	10,26
3	9,51	9,91
4	9,73	10,26
5	9,51	10,62
$\bar{X}_{ort}$:	9,55	10,26
Standart Sapma:	0,15	0,25
Bağıl Standart Sapma:	1,52	2,45
p : 0,05 için G.A. :	$9,55 \pm 0,18$	$10,26 \pm 0,32$

P Değeri: 0,05

G.A. : Güven Aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

t = 2,78 (Serbestlik derecesi ; n – 1 = 4 için)

4. TARTIŞMA

Yüksek lisans tez konusu kapsamında, “Brintellix® 10 mg tablet” isimli preparatta bulunan antidepresan etkili vortioksetin.HBr adlı etken maddenin miktar tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmalara başlamadan önce bu konuda kaynaklar incelenmiş, fakat etken maddenin yeni olmasından dolayı, fazla sayıda çalışmaya ulaşılamamıştır.

Vortioksetin etken maddesi, Lundbeck İlaç Ticaret Ltd.Şti.’den tedarik edilmiştir. Analizlere başlarken, kolay bir çözücü olarak metanol denenmiş ve metanol içerisinde hazırlanan etken madde çözeltisinin spektrumu alınarak maksimum absorbands verdiği değerler tespit edilmiştir (Şekil 3.1.). Bu absorbands değerleri, çalışmaların gerçekleştirileceği dalga boyları açısından fikir vermiştir.

4.1. YBSK Analizleri

Deneylerin birinci bölümü yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem ile gerçekleştirilmiş ve bu kapsamda, tampon ve metanol karışımı bir hareketli fazın kullanılmasına karar verilmiştir. Deneyin pratik olması açısından çözücünün de hareketli faz ile aynı olması istenmiştir. Tampon için potasyum dihidrojen fosfat ve amonyum asetat tuzları denenmiş, fakat çalışılan dalga boylarında ve analiz şartlarında, amonyum asetat tamponundan kaynaklı pik, Şekil 3.3.’de görüldüğü gibi, internal standart olarak kullanılan kafein ile iç içe geçmiştir. Bu sebeple, tampon olarak, belirtilen çalışma koşullarında pik vermeyen potasyum dihidrojen fosfat tamponu seçilmiştir.

Kolon seçiminde, en yaygın kolon türü olan C₁₈ kolonlar tercih edilmiş ve Çizelge 3.3.’de görüldüğü gibi, vortioksetin pikine ait en uygun asimetri faktörü ve teorik plaka sayısı, Waters Symmetry C₁₈, 3,5 µm, 4,6 x 100 mm kolonda elde edilmiştir.

Tampon türüne ve kolona karar verildikten sonra, 6,00; 5,00; 4,00 ve 3,00 pH değerlerinde 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat tamponları hazırlanmış ve metanol ile karıştırılarak elde edilen çözeltiler, hareketli faz ve çözücü olarak kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar, Şekil 3.5.-3.8.'de görülmektedir. Kromatogramlar değerlendirildiğinde, pH değeri düştükçe vortioksetin.HBr pikinin alıkonma süresi azalmış, pik keskinleşmiş ve analitik olarak değerlendirilebilir bir pik şeklini almıştır. Çizelge 3.1.'de, düşen pH değerlerinin vortioksetin.HBr'nin pik alıkonma zamanına etkisi görülmektedir. Amaç analiz süresinin kısaltılması ve analitik açıdan değerlendirilebilir pik eldesi olduğu için bütün bu çalışmalar sonucu pH değeri 3,00 olan tamponla çalışılmasına karar verilmiştir. Tamponda, kolonun zarar görmemesi için daha düşük pH değerleri tercih edilmemiştir.

Kolon ve tampon seçimi netleştikten sonra, ilk aşamada alınan UV-GB spektrumu ile vortioksetinin çalışılacak dalgaboyunun tespit edilmesi için DAD kullanılmış ve Çizelge 3.2.'de gözlenen, çeşitli dalga boylarındaki alanları incelenmiştir. Bu çalışma sonucu çalışılacak dalgaboyu olarak 225,0 nm olarak belirlenmiştir.

Kolon, dalgaboyu ve tampon seçimi yapıldıktan sonra, analiz süresinin kısılması ve sistem basıncının çok yüksek olmaması amacıyla cihaz ayarlamaları yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 50 °C olarak seçilmiştir. Hareketli faz seçiminde çözücü ve tampon oranları değiştirilerek kromatogramlar alınmış ve oran olarak %30, pH 3,00 potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve %70 metanol olarak belirlenmiş, akış hızı 1,3 mL/dk seçilmiştir.

Deney şartları optimize edildikten sonra, çalışma eğrisinin ve çalışma denkleminin oluşturulması için 10,0 – 70,0 µg/mL çalışma aralığında 7 adet standart çözelti kullanılmıştır. Çalışma grafiği verileri Çizelge 3.4.'te sunulmuştur. Yöntem için hesaplanan yakalama sınırının 0,2434 µg/mL, tayin alt sınırının 0,8115 µg/mL ve korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, geliştirilen yöntemin duyarlılığını ispatlamaktadır. vortioksetin için hesaplanan yüzde geri kazanım oranı Çizelge 3.7.'de görüldüğü gibi, %100,7 olarak bulunmuştur.

Avrupa Farmakopesi 8.0'daki "2.9.40 Dozaj Birimlerinin Tekdüzeliliği" bölümüne göre, farmasötik preparatta bulunan etken madde miktar tayini analizlerine ek olarak içerik tekdüzeliği testi de gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.1.10.'da görüleceği gibi, yapılan test sonucunda kabul değeri (KD) 6,24 bulunmuş ve bu değerin L1 değerinden (L1=15) küçük olması, içerik tekdüzeliği testinin sorunsuz gerçekleştirildiğini ispatlamıştır.

Yapılan hızlandırılmış degradasyon çalışmalarında etken madde termal, asit, alkali, oksidatif ve fotokimyasal stres şartlarına maruz bırakılmıştır. Çizelge 3.10. ve Şekil 3.11.'de görüldüğü gibi, oksidatif degradasyon çalışmaları etken maddenin tamamen bozunmasına sebep olmuş, diğer faktörlerin önemli ölçüde bozunmaya sebep olmadığı saptanmıştır.

4.2. Spektrofotometrik Analizler

Tez çalışmamızın ikinci bölümünde doğrudan UV-GB spektrofotometrik ve birinci türev spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Stok vortiooksetin.HBr çözeltileri metanolde hazırlanmış ve pH 2,00 ve 3,00 sitrat tamponu, pH 4,00 ve 5,00 asetat tamponu, pH 6,00, 7,00 ve 8,00 fosfat tamponu ile pH 9,00 ve 10,00 borik asit tamponu kullanılarak seyreltmeler yapılmış ve UV spektrumları alınmıştır. (Bölüm 3.2.1. Çözücü İçin Tampon Türlerinin Denenmesi) Tüm tamponlar 0,02 M olarak hazırlanmıştır. Alınan orijinal UV spektrumları incelenerek tampon çözelti olarak pH 4,00 asetat tamponu ve çalışma dalga boyu olarak 228,0 nm seçilmiştir.

Çalışma şartları optimize edildikten sonra, doğrudan UV-GB spektrofotometrik yöntem için çalışma eğrisinin ve çalışma denkleminin oluşturulması için 6,0 – 30,0 µg/mL çalışma aralığında 7 adet standart çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma grafiği verileri Çizelge 3.11.'de sunulmuştur. Yöntem için hesaplanan yakalama sınırının 0.6616 µg/mL, tayin alt sınırının 2.2054 µg/mL ve korelasyon katsayısının 1'e yakın olması, geliştirilen yöntemin duyarlılığını göstermektedir.

Son olarak doğrudan UV-GB spektrofotometrik yöntemle elde edilen tüm spektrumların birinci dereceden türev spektrumları elde edilmiş ve 237,7 ile 257,2 nm'deki değerler incelenmiştir. Çalışma grafikleri ise sırasıyla Şekil 3.24. ve Şekil 3.25.'de görülmektedir. Bu grafiklerde de hesaplanan veriler ve korelasyon katsayısının 1'e yakın olması nedeniyle yöntemin duyarlı olduğu fikri ortaya çıkmaktadır.

Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğin araştırılması amacıyla yapılan gerek gün içi ve gerekse günler arası çalışmalar sonuçları incelendiğinde geliştirilen yöntemlerin tekrar edilebilir olduğu kanıtlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ankara’da lokal bir eczaneden temin edilen vortioksetin içeren Brintellix® 10 adlı farmasötik preparatlardan etken madde miktar tayini ve içerik tekdüzeliği kontrolü için spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler geliştirilmiştir.

Etken madde miktar tayinine yönelik tarafımızca geliştirilen birinci yöntem kromatografik yöntem olup; “Gereç ve Yöntem” bölümünde (Bölüm 2.) bahsedilen kromatografik koşullar etken maddeyi içeren farmasötik preparatlara uygulandığında, hesaplamalar sonucunda preparatlarda bulunan vortioksetin miktar tayini p:0,05 için güven aralığı $10,06 \pm 0,16$ mg / tablet olarak bulunmuştur.

Ayrıca yine tarafımızca geliştirilen diğer bir yöntem olan doğrudan UV-GB spektrofotometrik yöntem ile farmasötik preparatlar içerisinde bulunan etken madde miktar tayini sonuçları ortalama olarak $9,87 \pm 0,19$ mg / tablet olarak hesaplanmıştır. Birinci türev UV-GB spektrofotometrik yöntem ile elde edilen farmasötik preparatlar içindeki etken madde miktar tayin sonuçları ise; 237,7 nm için p:0,05 güven aralığı $9,55 \pm 0,18$ mg / tablet olarak ve 257,2 nm için p:0,05 güven aralığı $10,26 \pm 0,32$ mg / tablet olarak hesaplanmıştır.

YBSK çalışmalarının diğer kısmında, Avrupa Farmakopesi 8.0, Bölüm 2.9.40.’a göre, 10 adet tablete içerik tekdüzeliği testi uygulanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda kabul değeri, $L1=15$ değerinden daha küçük bir değer olan 6,24 olarak hesaplandığından test sonucu uygun çıkmıştır.

Vortioksetin.HBr içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için tarafımızca geliştirilen tüm yöntemler sonucu elde edilen sonuçların uygunluğu, tablet içerisinde bulunan yardımcı maddelerin ve çekirdek film kaplama materyalinin analiz yöntemlerini etkilemediğini ispatlamıştır.

Geliştirilen yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel değerlendirmeler yapılması amacıyla analiz sonuç gruplarına F testi, *student'in t* testi ve *cochran* testi (ikiden fazla veri gruplarında kesinlikler yönünden varyans uyumu) uygulanmış ve veriler çizelge 5.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Yöntemler arasında istatistiksel değerlendirme verileri (F testi, *student'in t* testi ve *cochran* testi)

Hesaplanan Değerler	Doğrudan UV-GB Spektrofotometri	Birinci Türev UV-GB Spektrofotometri (257,2 nm)
F_{hesap} (Referans yöntem:YBSK)	0,79	0,28
t istatistik değeri (Referans yöntem:YBSK)	2,10	-1,62
C_{hesap}	0,61	

F_{tablo} : 6,39 (P değeri: 0,05; $n_2=5$; $n_3=5$)

t kritik iki uçlu değer: 2,31 (P değeri: 0,05; $n_2=5$; $n_3=5$)

C_{tablo} : 0,63 (P değeri: 0,05; $n_1=5$; $n_2=5$; $n_3=5$)

n_1 : YBSK metodu ile yapılan analiz tekrar sayısı

n_2 : Doğrudan UV-GB metodu ile yapılan analiz tekrar sayısı

n_3 : Birinci türev UV-GB metodu ile yapılan analiz tekrar sayısı

Çizelge 5.1.'e göre;

- $F_{hesap} < F_{tablo}$ olduğundan; YBSK yöntemi verileri ile kıyaslanan doğrudan UV-GB ve birinci türev UV-GB yöntemleri analiz sonuçları arasında standart sapmalar yönünden %95 olasılıkla anlamlı bir fark yoktur.

- t istatistik değeri $< t$ kritik iki uçlu değer olduğundan; YBSK yöntemi verileri ile kıyaslanan doğrudan UV-GB ve birinci türev UV-GB yöntemleri analiz sonuçları arasında aritmetik ortalamalar yönünden %95 olasılıkla anlamlı bir fark yoktur.

- $C_{hesap} < C_{tablo}$ olduğundan; üç yöntem verileri arasında standart sapmaları yönünden %95 olasılıkla anlamlı bir fark yoktur.

Tüm çalışmalar ve değerlendirmeler sonucunda, geliştirilen yöntemlerin tüm kalite kontrol ve araştırma geliştirme laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Vortioksetin İçeren Farmasötik Preparatlarda Spektrofotometrik ve Kromatografik Yöntemlerle Miktar Tayinleri

Vortioksetin.HBr, serotonin modölatör ve stimölatörü olan multimodel bir antidepresan etkili etken maddedir. Bu tez çalışması ile, yeni bir etken madde olan vortioksetin.HBr içeren preparatlarda miktar tayini için geliştirilmiş pratik bir Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YSBK) metodu ve spektrofotometrik metotlar önerilmiştir.

YBSK ile yapılan deneylerde Waters Symmetry C₁₈, 100 x 4,6 mm, 3,5 µm kolon kullanılmıştır. Aynı zamanda çözücü olarak kullanılan hareketli faz; pH'sı 3,00±0,5 olan 0,05 M potasyum fosfat tamponu : Metanol (30:70 (h/h)) karışımıdır. Dedektör dalga boyu 225,0 nm, kolon akış hızı 1,3 mL/dk ve kolon fırın sıcaklığı 50 °C'dir. İç standart olarak kafeinin hareketli fazda hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. Belirtilen kromatografik şartlarda, 10,0 – 70,0 µg/mL çalışma aralığında korelasyon katsayısı 0,999 olarak hesaplanmıştır. Yöntemden elde edilen geri kazanım değeri ise %100,74'tür. Etken maddeye uygulanan hızlandırılmış degradasyon çalışmaları ile vortioksetin çeşitli stres test koşullarına maruz bırakılmış ve oksidatif degradasyon şartları dışında etken maddenin stabil kaldığı görölmüştür.

Doğrudan UV-GB spektrofotometrik deneylerde çözücü olarak metanol, seyreltme çözeltilisi olarak ise pH 4,00 asetat tamponu kullanılmıştır. 220,0-325,0 nm aralığında çalışmalar yapılmıştır. Belirtilen spektrofotometrik şartlarda 6,0 – 30,0 µg/mL çalışma aralığında korelasyon katsayısı 0,999 olarak hesaplanmıştır.

Birinci türev UV-GB spektrofotometri yöntemi ile yapılan hesaplarda, maksimum absorbans veren dalga boylarından 237,7 nm ve 257,2 nm seçilmiştir. Doğrudan UV-GB spektrofotometri yönteminde bahsedilmiş spektrofotometrik şartlarda 6,0 - 30,0 µg/mL çalışma aralığında korelasyon katsayıları 237,7 nm için 0,999 ve 257,2 nm için 0,998 olarak hesaplanmıştır.

Uygulanan üç yöntemle elde edilen gün içi ve günler arası çalışmaların başarı ile sonuçlanmaları ile deneylerin kesinliği ispat edilmiştir. Preparatlardaki vortioksetin miktar tayinleri, yüksek güvenilirlikli sonuçlar ile üç yöntemle de başarıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına uygulanan *F* testi, *student'in t* testi ve *cochran* testi sonucunda üç yöntem arasında %95 olasılıkla anlamlı farkların olmadığı görölmüştür. Yöntemler, kısa analiz süreleri içermektedir. Ayrıca dayanıklı, kolay ve pratik yöntemler olarak tüm kalite kontrol ve araştırma geliştirme çalışmaları için önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Birinci türev UV-GB spektrofotometri; doğrudan UV-GB spektrofotometri; farmasötik preparatlar; miktar tayini; Vortioksetin; yüksek basınçlı sıvı kromatografi.

SUMMARY

Quantitations in Pharmaceutical Preparations Containing Vortioxetine by Spectrophotometric and Chromatographic Methods

Vortioxetine is a multimodal antidepressant-effective active ingredient, which is serotonin modulator and stimulator. Within this study, a workable HPLC method and spectrophotometric methods are proposed for quantitation of the new active ingredient, vortioxetine, in preparations.

In the study of HPLC, a Waters Symmetry C18, 100 x 4.6 mm, 3.5 μ m column was used. The mobile phase was pH:3.00 $\pm$ 0.5, 0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer and methanol (30:70 (v/v)) mixture, also used as the solvent. The detector wavelength was 225.0 nm, the flow rate was 1.3 mL/min. and the column oven temperature was 50 °C. Solutions of caffeine in the mobile phase were used as the internal standard. Under prescribed chromatographic conditions, with operating range 10.0 – 70.0 μ g/mL, the correlation coefficient was calculated as 0.999. The recovery value obtained from the method was 100.74%. Vortioxetine was exposed to different stress test conditions with forced degradation conditions applied to the active ingredient, and it was observed that the active ingredient was stable except under oxidative degradation conditions. The method has a short analysis period. Also, the method is durable, easy and practical and proposed for all quality control and research and development studies.

In the direct UV-VIS spectrophotometric studies, methanol was used as the solvent and pH:4.00 acetate buffer was used as the diluent. The studies were performed between 220.0-325.0 nm. Under the following spectrophotometric conditions, with operating range 6.0 – 30.0 μ g/mL, the correlation coefficient was calculated as 0.999.

During the calculations with the first derivative UV-VIS spectrophotometric method, 237.7 nm and 257.2 nm were chosen as the wavelengths give the maximum absorbance values. Under the spectrophotometric conditions mentioned in the direct UV-VIS spectrophotometric method, with operating range 6.0 – 30.0 μ g/mL, the correlation coefficient was calculated as 0.999 for 237.7 nm and 0.998 for 257.2 nm.

The precision of the studies was proved with good results of intra-day and inter-day studies with all the methods applied in this thesis. The quantitation of vortioxetine in preparations was executed successfully with highly reliable results with these three methods. In the wake of *F* test, *student's t* test and *cochran* test applied to the analyse results; it was seen that three methods have no significant discrepancies with 95% possibility. The methods have short analysis periods. In addition, they are proposed for all quality control and research&development studies as durable, easy and practical methods.

Keywords: Direct UV-VIS spectrophotometry; first derivative UV-VIS spectrophotometry; High Pressure Liquid Chromatography; pharmaceutical preparations; quantitation; Vortioxetine.

KAYNAKLAR

- ALI TA, MOHAMED GG, AGLAN AA, HEAKAL FE (2016). RP-HPLC stability-indicating method for estimation of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **44**: 1601-1608.
- AREBERG J, LUNTANG-JENSEN M, SOGAARD B, NILAUSEN D (2012). Occupancy of the Serotonin Transporter after Administration of Lu AA21004 and its Relation to Plasma Concentration in Healthy Subjects. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **110**: 401–404.
- AREBERG J, PETERSEN KB, CHEN G, NAIK H (2014). Population Pharmacokinetic Meta-Analysis of Vortioxetine in Healthy Individuals. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **115**: 552–559
- ARTIGAS F (2015). Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *European Neuropsychopharmacology*, **25**: 657–670.
- BALDWIN DS (2012). On assessing potential efficacy for vortioxetine in generalized anxiety disorder. *European Neuropsychopharmacology*, **22**: 841–843.
- BAUNE BT, RENGIER L (2014). Pharmacological and non-pharmacological interventions to improve cognitive dysfunction and functional ability in clinical depression – A systematic review. *Psychiatry Research*, **219**: 25–50
- BEŞERGİL B (2013). Kromatografiye Giriş.
Erişim: [http://www.bayar.edu.tr/besergil/24_BOLUM_7.pdf]
Erişim Tarihi: 07.01.2016
- BETRY C, ETIEVANT A, PEHRSON A, SANCHEZ C, HADDJERI N (2014). Effect of the multimodal acting antidepressant vortioxetine on rat hippocampal plasticity and recognition memory. *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **58** (2015): 38–46
- BIDZAN L, MAHABLESHWARKAR AR, JACOKSEN P, YAN M, SHEEDAN DV (2012). Vortioxetine(LuAA21004)in generalized anxiety disorder: Results of an 8-week, multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *European Neuropsychopharmacology*, **22**: 847–857
- BİYÖKURE.ORG (2011). HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
Erişim: [<http://biyokure.org/hplc/5384/>]
Erişim Tarihi: 04.01.2016

- CHEN G, LEE R, HOJER AM, BUCHBJERG J K, SERENKO M, ZHAO Z (2013). Pharmacokinetic Drug Interactions Involving Vortioxetine (Lu AA21004), A Multimodal Antidepressant. *Clin Drug Investig*, **33**: 727–736
- CHOUDHARY A (2016), Different Types of HPLC Columns Used in Analysis.
Erişim: [<http://www.pharmaguideline.com/2016/01/different-types-of-columns-used-in-hplc.html>]
Erişim Tarihi: 10.08.2016
- CLARK J (2006). A Double Beam UV-Visible Absorption Spectrometer
Erişim: [<http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/spectrometer.html>]
Erişim Tarihi: 04.01.2016
- CLARK (MedicinesComplete) (2010). Ultraviolet Visible and Fluorescence Spectrophotometry.
Erişim: [https://www.google.com.tr/search?q=derivative+spectroscopy+medicinescomplete&espv=2&biw=1486&bih=623&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwirpoyv4tXPAhVBBMAKHYY07BrYQ_AUIBigB&dpr=0.9#imgsrc=VsuooLGtMQV_wM%3A]
Erişim Tarihi: 03.01.2016
- ÇÖL B (2011). Kromatografi Metodu - Fotosentetik Pigmentlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile Ayrıştırılması
Erişim: [www.bekircol.com/biyokimyalab/kromatografi.pdf]
Erişim Tarihi: 04.01.2016
- DING HX, LEVERETT CA, KYNE JR RE, LIU KKC, FINK SJ, FLICK AC, O'DONNELL CJ (2015). Synthetic approaches to the 2013 new drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **23**: 1895–1922
- DRUGS.COM (2016). Vortioxetine
Erişim: [<https://www.drugs.com/search.php?searchterm=vortioxetine&a=1>]
Erişim Tarihi: 05.09.2015
- DOUSA M, KLVANA R, DOUBSKY J, SRBEK J, RICHTER J, EXNER M, GIBALA P (2015). HILIC–MS Determination of Genotoxic Impurity of 2-Chloro-N-(2-Chloroethyl)Ethanamine in the Vortioxetine Manufacturing Process. *J. Chromatogr. Sci.*, **54**: 119-124
- EDQM (2016). AVRUPA FARMAKOPESİ 8.0 (2014), Bölüm 2.9.40: Uniformity of Dosage Units
- ERDİK E, OBALI M, YÜKSEKİŞİK N, ÖKTEMER A, PEKEL T (2001). Denel Organik Kimya; 4. Baskı: D Bölümü.
- FRANCOIS C, NIELSEN R.Z, DANCHENKO N, WILLIAMS V, LANCON C (2015). PMH52 – The effect of Vortioxetine on family functioning in Adults with Major depressive Disorder. *Value in Health*, **18**: A124

GENEL MÜHENDİSLİK MEKANİK SAN. VE TİC. A.Ş. (2015). RX Media Pharma ®
2015, İzmir

GENETİKS SAĞLIK HİZMETLERİ TİC. LTD. ŞTİ. (2010). Depresyon Tedavisi
Erişim: [<http://www.farmakogenetik.com/tr/depresyon>]
Erişim Tarihi: 04.01.2016

GÖNÜLLÜ UG (2001). Fenazopiridin hidroklorür içeren ikili farmasötik preparatlarda etken maddelerin aynı anda miktar tayinleri için spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi ve farmasötik preparatlara uygulanması, Ankara Üniversitesi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Giriş Bölümü.

GU EM, HUANG C, LIANG B, YUAN L, LAN T, HU G, ZHOU H (2015). An UPLC–MS/MS method for the quantitation of vortioxetine in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **997**: 70–74

GUILLOUX JP, DAVID IM, PEHRSON A, GUIARD BP, REPERANT C, ORVOEN S, GARDIER AM, HEN R, EBERT B, MILLER S, SANCHEZ C, DAVID DJ (2013). Antidepressant and anxiolytic potential of the multimodal antidepressant vortioxetine (Lu AA21004) assessed by behavioural and neurogenesis outcomes in mice. *Neuropharmacology*; **73** (2013): 147-159.

GÜNDÜZ T (1990). Enstrümental Analiz. 2. Baskı.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ (2009). Kromatografi.
Erişim: [www.analitik.hacettepe.edu.tr/Demolar/kromatografi.pdf]
Erişim Tarihi: 03.01.2016

HVENEGAARD MG, BANG-ANDERSEN B, PEDERSEN H, JORGENSEN M, PUSCHL A, DALGAARD L (2012). Identification of the cytochrome P450 and other enzymes involved in the in vitro oxidative metabolism of a novel antidepressant, Lu AA21004. *Drug Metab Dispos.*, **40(7)**:1357-1365.

İLACABAK.COM (2011). Brintellix 20 mg 28 Film Kaplı Tablet.
Erişim:[<http://www.ilacabak.com/ilacgoster.php?ilac=BRINTELLIX.20.MG.28.FILM.KAPLI.TABLET&Id=17482>]
Erişim Tarihi: 12.10.2015

İNCE T (2012). Farmasötik Preparatlarda Metformin'in Spektrofotometrik Yöntemlerle Miktar Tayini; Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Giriş Bölümü.

KATONA CL, KATONA CP (2014). New generation multi-modal antidepressants: focus on vortioxetine for major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **2014;10**: 349-354.

- LEISER SC, PEHRSON AL, ROBICHAUD PJ, SANCHEZ C (2014). Multimodal antidepressant vortioxetine increases frontal cortical oscillations unlike escitalopram and duloxetine – a quantitative EEG study in rats. *British Journal of Pharmacology*, **171**: 4255–4272
- LEVILLAIN P, FOMPEYDIE D (1986). Spectrophotometric derivate. *Analysis*, **114**:1.
- LIU L, CAO N, MA X, XIONG K, SUN L, ZOU Q, YAO L (2016). Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC–MS, IR and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **117**: 325-332
- LUNDBECK (2013). Products.
Erişim:[<http://www.lundbeck.com/global/brain-disorders/products>]
Erişim Tarihi: 07.07.2015
- MORK A, PEHRSON A, BRENNUM LT, NIELSEN SM, ZHONG H, LASSEN AB, MILLER S, WESTRICH L, BOYLE NJ, SANCHEZ C, FISCHER CW, LIEBENBERG N, WEGENER G, BUNDGAARD C, HOGG S, BANG-ANDERSEN B, STENSNOE TB (2012). Pharmacological effects of Lu AA21004: a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, **340**(3):666-675
- MORK A, MONTEZINHO LP, MILLER S, MURPHY CT, PLATH N, LI Y, GULINELLO M, SANCHEZ C (2013). Vortioxetine (Lu AA21004), a novel multimodal antidepressant, enhances memory in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **105**: 41–50.
- NHS CHOICES (2015). Antidepressants.
Erişim:[<http://www.nhs.uk/conditions/Antidepressant-drugs/Pages/Introduction.aspx>]
Erişim Tarihi: 03.01.2016
- NÖROPSİKİYATRİ.BLOGSPOT.COM.TR (2014). Majör depresif bozukluk.
Erişim:[http://noropsikiyatri.blogspot.com.tr/p/blog-page_9.html]
Erişim Tarihi: 07.10.2015
- ONUR F, YÜCESOY C (1983). Türev Spektrofotometrisi. *Fabad J. Pharm . Sci.*, **13**:462.
- PAE CU, WANG SM, HAN C, LEE SJ, PATKAR AA, MASAND PS, SERRETTI A (2015). Vortioxetine, a multimodal antidepressant for generalized anxiety disorder: A systematic review and meta-analysis; *Journal of Psychiatric Research*, **64** (2015): 88-98
- PSİKOFARMA.INFO (2007). Antidepresan ve Antimanik İlaçlar
Erişim: [<http://www.psikofarma.info/ilaclarla-ilgili-genel-konular-psikofarmakolojik-yazilar-etken-maddeler/antidepresan-ve-antimanik-ilacilar-2/>]
Erişim Tarihi: 07.10.2015

PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE (2012). Vortioxetine Hydrobromide

Erişim: [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/56843850>]

Erişim Tarihi: 10.10.2015

RX LIST- THE INTERNET DRUG INDEX (2015) Brintellix, Drug Description.

Erişim: [<http://www.rxlist.com/brintellix-drug.htm>]

Erişim Tarihi: 03.01.2016

SANCHEZ C, ASIN KE, ARTIGAS F (2014). Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data. *Pharmacology & Therapeutics*, **145**: 43–57

SKOOG DA, WEST DM, ED II (1981). Principles of Instrumental Analysis; 2nd Ed. Chapter 13-28.

SÜZER Ö, NEŞETOGLU R, BARUKSAL G, DEDEOGLU BD (2008). İlaç Grupları ve İlaçlar İçin İlaç Etkileşimi Örnekleri. *Klinik Gelişim*; **21**:2

Erişim: [<http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/cilt21sayi2/bolum6.pdf>]

Erişim Tarihi: 05.09.2015

TÜRK İLAÇ REHBERİ (2016). Brintellix 20 mg 28 Film Kaplı Tablet Klinik Özellikler.

Erişim: [<http://www.ilacrehberi.com/v/brintellix-20-mg-film-kapli-tablet-e870/kub/klinik-ozellikler/>]

Erişim Tarihi: 03.01.2016

TÜRKİYE PSİKİYATRİ DERNEĞİ (2012) Depresyon Konusunda Bilmek İstedikleriniz.

Erişim: [<http://www.psikiyatri.org.tr/pagepublic.aspx?menu=17>]

Erişim Tarihi: 05.11.2015

ULDAM HK, JUHL M, PEDERSEN H, DALGAARD L (2011). Biosynthesis and identification of an N-oxide/N-glucuronide metabolite and first synthesis of an N-O-glucuronide metabolite of Lu AA21004. *Drug Metab Dispos.*, **39**(12):2264-2274

U.S. FOOD&DRUG ADMINISTRATION (2015). Draft Guidance on Vortioxetine Hydrobromide

Erişim: [<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm452870.pdf>]

Erişim Tarihi: 09.10.2015

UYGUNER N (2010). Eprosartan ve hidroklorotiazit'in tabletlerde türev spektrofotometri ile miktar tayini, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans dönem projesi, Giriş Bölümü.

VIETA E, LOFT H, MAHABLESHWARKAR AR, FLOREA I (2014). P.2.f.023 The efficacy of vortioxetine in the treatment of patients with major depressive disorder (MDD) in short-term placebo-controlled studies: a meta-analysis of 11 studies. *European Neuropsychopharmacology*, **24**(2): S465–S466

WIKIPEDIA.ORG (2008). Majör Depresif Bozukluk

Erişim: [https://tr.wikipedia.org/wiki/Maj%C3%B6r_depresif_bozukluk]

Erişim Tarihi: 10.10.2015

WIKIPEDIA.ORG (2016). Selective Serotonin Reuptake Inhibitor

Erişim: [https://en.wikipedia.org/wiki/Selective_serotonin_reuptake_inhibitor]

Erişim Tarihi: 10.02.2016

WILSON S, BUCHBJERG J, HOJER AM, AREBERG J, NUTT DJ (2013). P.1.g.013

Effects of vortioxetine versus paroxetine on polysomnography in man: a pharmacokinetic/pharmacodynamic study. *European Neuropsychopharmacology*, **23**(2): S195–S196

YILDIZ A, GENÇ Ö, BEKTAŞ S (1993). Enstrümental Analiz Yöntemleri; 1. Baskı:

Bölüm 21



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Cansu ALVER

Doğum Yeri ve Tarihi: Bafra - 10.07.1988

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim: cansu.alver@titck.gov.tr

II- Eğitimi

Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2006-2010)

Ortaöğretim: Osmangazi Malcılar Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (2002-2006)

İlköğretim: Dr. Necla Yazıcıoğlu İlköğretim Okulu (1994-2002)

Yabancı Dil: İngilizce (YDS – 62,5)

III- Mesleki Deneyimi

- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İlaç ve Kozmetik Ürünler Kontrol Laboratuvarları Birimi – Analist/Kimyager (2013- devam ediyor)
- Toprak İlaç ve Kimyevi Maddeler San. Tic. A.Ş. – Analist/Kimyager (2011)
- Türk Standartları Enstitüsü, Petrokimya Laboratuvarları - Stajyer (2009)

IV- Sertifikalar ve Katılım Belgeleri

- IR TRACER-100 Cihazı Kullanıcı Eğitimi Sertifikası
- ISO 17025/ Temel Dökümantasyon Eğitimi Sertifikası
- ISO 17025/ Ölçüm Belirsizliği/Metod Validasyonu Eğitimi Sertifikası
- ISO 17025/ Laboratuvar İstatistiği Eğitimi Sertifikası
- ISO 17025/ İç/Dış Kalite Kontrol Çalışmaları Eğitimi Sertifikası
- ISO 17025/ Resmi Yazışmalar Eğitimi Sertifikası Eğitimi Sertifikası
- Brookfield DV3TCP Viskozimetre Cihazı Kullanıcı Eğitimi Sertifikası
- Thermo Scientific HPLC Ultimate 3000 Cihazı Teorik ve Aplikasyon Eğitimi Sertifikası
- Takım Çalışması ve Liderlik Eğitim Programı Katılım Belgesi