



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**RASAJİLİN VE PRAMİPEKSOL İÇEREN
FARMASÖTİK DOZAJ FORMLARINDA ETKEN
MADDELERİN SPEKTROFOTOMETRİK VE YPSK
METODLARI İLE MİKTAR TAYİNİ**

Serpil SEVİM

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RASAJİLİN VE PRAMİPEKSOL İÇEREN
FARMASÖTİK DOZAJ FORMLARINDA ETKEN
MADDELERİN SPEKTROFOTOMETRİK VE YPSK
METODLARI İLE MİKTAR TAYİNİ**

Serpil SEVİM

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

**ANKARA
2019**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Rasajilin ve Pramipeksol İçeren Farmasötik Dozaj Formlarında Etken Maddelerin Spektrofotometrik ve YPSK Metodları ile Miktar Tayini” 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: Serpil Sevim

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalında
Serpil SEVİM tarafından hazırlanan
“Rasajilin ve Pramipeksol İçeren Farmasötik Dozaj Formlarında Etken Maddelerin
Spektrofotometrik ve YPSK Metodları ile Miktar Tayini” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/05/2019

Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN
Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ
Hacettepe Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Doç. Dr. İ. Murat PALABIYIK
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

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

.....
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Parkinson Hastalığı	1
1.2. Üzerinde Çalışma Yapılan Etken Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
1.2.1. Rasajilin Mesilat	3
1.2.1.1. Kimyasal Yapısı	3
1.2.1.2. Farmakodinamik Özellikleri	3
1.2.1.3. Farmakokinetik Özellikleri	5
1.2.1.4. Endikasyonları	7
1.2.1.5. Kontrendikasyonları	7
1.2.1.6. Yan Etkiler / Advers Etkiler	7
1.2.2. Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat	8
1.2.2.1. Kimyasal Yapısı	8
1.2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	8
1.2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri	9
1.2.2.4. Endikasyonları	10
1.2.2.5. Kontrendikasyonları	11
1.2.2.6. Yan Etkiler / Advers Etkiler	11
1.3. Etken Maddelerin Tayinleri Konusunda Günümüze Kadar Yapılmış Çalışmalar	11
1.3.1. Spektrofotometrik Çalışmalar	11
1.3.2. Sıvı Kromatografik Çalışmalar	15
1.3.3. Gaz Kromatografik Çalışmaları	23
1.3.4. İyon Kromatografik Çalışmaları	24
1.3.5. Kapiler Elektroforez Yöntemleri	24
1.4. Kullanılan Yöntemler	25
1.4.1. Spektrofotometri	25
1.4.1.1. Spektrofotometre	27
1.4.2. Türev Spektrofotometri	29
1.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	32
2. GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	36
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36

2.3.	Kullanılan Standart Maddeler	37
2.4.	Kullanılan Farmasötik Preparatlar	37
2.5.	Rasajilin Mesilat için Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	37
2.5.1.	Rasajilin Mesilat Saflık Kontrolü	38
2.5.2.	Spektrofotometri	38
2.5.2.1.	Analitik Şartlar	38
2.5.2.2.	Standart Çözeltilerin Hazırlanması	39
2.5.2.3.	Seçicilik ve Spesifiklik	39
2.5.2.4.	Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık	39
2.5.2.5.	Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti	40
2.5.2.6.	Kesinlik	40
2.5.2.7.	Doğruluk	40
2.5.2.8.	Farmasötik Preparata Uygulama	41
2.5.3.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	41
2.5.3.1.	Analitik Metot Geliştirme	41
2.5.3.2.	Kromatografik Koşullar	41
2.5.3.3.	Hareketli Faz Hazırlanması	42
2.5.3.4.	İç Standart, Standart Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	42
2.5.3.5.	Sağlamlık	42
2.5.3.6.	Seçicilik ve Spesifiklik	43
2.5.3.7.	Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık	43
2.5.3.8.	Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti	44
2.5.3.9.	Kesinlik	44
2.5.3.10.	Doğruluk	44
2.5.3.11.	Farmasötik Preparata Uygulama	45
2.6.	Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat için Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	45
2.6.1.	Pramipeksol Saflık Kontrolü	46
2.6.2.	Spektrofotometri	46
2.6.2.1.	Analitik Şartlar	46
2.6.2.2.	Standart Çözeltilerin Hazırlanması	46
2.6.2.3.	Seçicilik ve Spesifiklik	47
2.6.2.4.	Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık	47
2.6.2.5.	Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti	47
2.6.2.6.	Kesinlik	48
2.6.2.7.	Doğruluk	48
2.6.2.8.	Farmasötik Preparata Uygulama	48
2.6.3.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	49
2.6.3.1.	Analitik Metot Geliştirme	49
2.6.3.2.	Kromatografik Koşullar	49
2.6.3.3.	Hareketli Faz Hazırlanması	50
2.6.3.4.	İç Standart, Standart Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	50
2.6.3.5.	Sağlamlık	50
2.6.3.6.	Seçicilik ve Spesifiklik	51
2.6.3.7.	Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık	51
2.6.3.8.	Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti	51
2.6.3.9.	Kesinlik	52
2.6.3.10.	Doğruluk	52

2.6.3.11. Farmasötik Preparata	52
3. BULGULAR	53
3.1. Etken Maddelerin Kontrolleri	53
3.1.1. Erime Noktası Tayini	53
3.1.2. FT-IR Spektrumları	54
3.2. Rasajilin Mesilat için Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları	56
3.2.1. Spektrofotometrik Yöntem	56
3.2.1.1. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi	56
3.2.1.2. Türev Spektrofotometri	57
3.2.1.3. Türev Spektrofotometrik Tekniklerin Doğruluğu	60
3.2.1.4. Türev Spektrofotometrik Tekniklerin Farmasötik Preparata Uygulanması	61
3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK)	63
3.2.2.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu	63
3.2.2.2. YPSK Metodunun Sağlamlığı - Farklı pH ve Farklı Hareketli Faz Akış Hızı	66
3.2.2.3. YPSK Metodunun Sağlamlığı- Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitesi	67
3.2.2.4. YPSK Metodunun Seçiciliği	69
3.2.2.5. YPSK Metodunun Kesinliği- Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik	70
3.2.2.6. YPSK Metodu Rasajilin Mesilat Analizi İçin Analitik Veriler	70
3.2.2.7. YPSK Metodunun Doğruluğu	71
3.2.2.8. YPSK Metodunun Farmasötik Preparata Uygulanması	72
3.3. Pramipeksol Dihidroklörür Monohidrat için Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları	74
3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem	74
3.3.1.1. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi	74
3.3.1.2. Türev Spektrofotometri	75
3.3.1.3. Türev Spektrofotometri Tekniğinin Doğruluğu	77
3.3.1.4. Türev Spektrofotometri Tekniğinin Farmasötik Preparata Uygulanması	78
3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK)	79
3.3.2.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu	79
3.3.2.2. YPSK Metodunun Sağlamlığı - Farklı pH, Farklı Hareketli Faz Akış Hızı	82
3.3.2.3. YPSK Metodunun Sağlamlığı- Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitesi	84
3.3.2.4. YPSK Metodunun Seçiciliği	86
3.3.2.5. YPSK Metodunun Kesinliği - Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik	87
3.3.2.6. YPSK Metodu Pramipeksol Dihidroklörür Monohidrat Analizi için Analitik Veriler	88
3.3.2.7. YPSK Metodunun Doğruluğu	89
3.3.2.8. YPSK Metodunun Farmasötik Preparata Uygulanması	90
4. TARTIŞMA	92
4.1. Rasajilin Mesilat Tayini için YPSK ve Spektrofotometrik Çalışmalar	92
4.2. Pramipeksol Dihidroklörür Monohidrat Tayini İçin YPSK ve Spektrofotometrik Çalışmalar	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	104

ÖZET	107
SUMMARY	108
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	114



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, ilaçların minumum zaman ve maliyetle kalite ve güvenilirliğinin sağlanması konusuna analitik alanda katkı sağlamaya çalıştım. Çalışmada Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerini içeren farmasötik preparatlardaki etken maddelerin miktar tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemler ve spektrofotometrik analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Ön işlem gerektirmeyen bu yöntemler ticari farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır.

Tezin hazırlanması ve tamamlanmasında bana her konuda yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında hiçbir yardımı esirgemeyen ve gerekli koşulların sağlanmasında emeği geçen Analitik Kimya A.B.D. Öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Akademik çalışmalar konusunda beni sürekli destekleyen sayın Prof. Dr. Necati DİKMEN'e, doktora eğitimine beni teşvik eden ve hiçbir yardımı esirgemeyen Dinçsa İlaç San. ve Tic. A.Ş. Yönetim Kurulu Başkanı Sayın Aytaç DİNÇER'e, teşekkürlerimi sunmak isterim.

Bana her türlü konuda destek olan aileme ve özellikle her zaman yanımda olup her türlü yardımı sağlayan sevgili eşim Ümit SEVİM'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

IR	Infrared
IS	İç standart
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-tandem kütle dedektörü
LC-TSQ	Sıvı kromatografi- kuantum kütle spektrometre
LOD	Tespit limiti
LOQ	Ölçüm limiti
Pramipeksol	Pramipeksol dihidroklorür monohidrat
Psödoefedrin	Psödoefedrin HCl
Rasajilin	Rasajilin Mesilat
$\bar{X}$	Ortalama
SS	Standart Sapma
BSS	Bağıl Standart Sapma
Tamsulosin	Tamsulosin HCl
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
SRM	Seçici reaksiyon görüntüleme

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Rasajilin	3
Şekil 1.2.	Pramipeksol	8
Şekil 1.3.	Dalga boylarına göre frekanslar ve ışık tayfı	26
Şekil 1.4.	Absorbans-konsantrasyon grafiği	27
Şekil 1.5.	Transmittans-konsantrasyon grafiği	27
Şekil 1.6.	Spektrofotometre düzeneği	28
Şekil 1.7.	Çift ışık yollu spektrofotometre	29
Şekil 1.8.	A. Basit bir orijinal spektrum $dA/d\lambda$ Orijinal spektrumun Birinci Dereceden Türevi $d^2A/d\lambda^2$ Orijinal spektrumun İkinci Dereceden Türevi $d^3A/d\lambda^3$ Orijinal spektrumun Üçüncü Dereceden Türevi $d^4A/d\lambda^4$ Orijinal spektrumun Dördüncü Dereceden Türevi	31
Şekil 1.9.	YPSK cihazının şematik olarak görünüşü	34
Şekil 1.10.	Agilent 1260 Infinity YPSK	35
Şekil 3.1.	Rasajilin erime noktası kamera görüntüsü	53
Şekil 3.2.	Pramipeksol erime noktası kamera görüntüsü	54
Şekil 3.3.	Rasajilinin IR Spektrumu	55
Şekil 3.4.	Pramipeksolün IR Spektrumu	55
Şekil 3.5.	0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için sıfır derece UV spektrumu	56
Şekil 3.6.	0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için Birinci Türev spektrum	57
Şekil 3.7.	0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için İkinci Türev spektrum	57
Şekil 3.8.	İç Standart Olarak Psödoefedrin HCl İçeren Rasajilin Kromatogramı	65
Şekil 3.9.	Rasajilinin Pik Performans Değerlendirmesi	66
Şekil 3.10.	Rasajilin ve İç Standart Çözeltilerini İçeren Karışımın Kromatogramı	69
Şekil 3.11.	0,1 N HCl içerisindeki Pramipeksol (20,0 µg/mL) Sıfır Derece UV spektrumu	74

Şekil 3.12.	0,1 N HCl içerisindeki Pramipeksol (20,0 µg/mL) için Birinci Türev Spektrumu	75
Şekil 3.13.	İç Standart Olarak Tamsulosin HCl İçeren Pramipeksol Kromatogramı	81
Şekil 3.14.	Pramipeksol Pik Performans Değerlendirme	82
Şekil 3.15.	Pramipeksol ve İç Standart Çözeltilerini İçeren Karışımın Kromatogramı	86
Şekil 3.16.	Plasebo Kromatogramı	87
Şekil 3.17.	Farmasötik Ürün Kromatogramı	87



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Kolon Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	33
Çizelge 3.1.	Rasajilin Türev Spektrofotometri Teknikleri İçin Kalibrasyon Eğrilerinin Regresyon Değerleri	59
Çizelge 3.2.	Rasajilin Tayini İçin Optimize Edilmiş Spektrofotometrik Koşullar	60
Çizelge 3.3.	Rasajilin Farmasötik Dozaj Formlarındaki Türev Spektrofotometri sonuçları (% içerik)	62
Çizelge 3.4.	Rasajilin YPSK ile Analizinde Yöntem Geliştirme	64
Çizelge 3.5.	Rasajilin Tayini için Optimize Edilmiş Kromatografik Koşullar	65
Çizelge 3.6.	Rasajilin YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları (Farklı pH ve Farklı Hareketli Faz Akış Hızı)	67
Çizelge 3.7.	Rasajilin YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları	68
Çizelge 3.8.	Rasajilin YPSK Seçicilik Testi Sonuçları	69
Çizelge 3.9.	Rasajilin YPSK Kesinlik Testi Sonuçları	70
Çizelge 3.10.	YPSK Rasajilin Analitik Veriler ($y=n+mc$ denklemi için)	71
Çizelge 3.11.	Rasajilin YPSK Doğruluk Testi Sonuçları	72
Çizelge 3.12.	Rasajilin Farmasötik Dozaj Formlarındaki YPSK Sonuçları (% içerik)	73
Çizelge 3.13.	Pramipeksol Spektrofotometrik Metodun Spesifite Testi Sonuçları	75
Çizelge 3.14.	Pramipeksol Birinci Türev Kesinlik Testi Sonuçları	76
Çizelge 3.15.	Pramipeksol Spektrofotometri Tekniği İçin Kalibrasyon Eğrisi Regresyon Değerleri	77
Çizelge 3.16.	Pramipeksol Tayini İçin Optimize Edilmiş Spektroskopik Koşullar	78
Çizelge 3.17.	Pramipeksolün Farmasötik Dozaj Formlarındaki Birinci Türev Spektrofotometri sonuçları (% içerik)	79
Çizelge 3.18.	Pramipeksol YPSK Analitik Metod Geliştirme	80
Çizelge 3.19.	Pramipeksol Tayini için Optimize Edilmiş Kromatografik Koşullar	81

Çizelge 3.20.	Pramipeksol YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları (Farklı pH, Farklı Hareketli Faz Akış Hızı)	83
Çizelge 3.21.	Pramipeksol YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları	85
Çizelge 3.22.	Pramipeksol YPSK Seçicilik Testi Sonuçları	86
Çizelge 3.23.	Pramipeksol YPSK Kesinlik Testi Sonuçları	88
Çizelge 3.24.	Pramipeksol YPSK Analitik Veriler ($y=n+mc$ denklemi için)	89
Çizelge 3.25.	Pramipeksol YPSK Doğruluk Testi Sonuçları	90
Çizelge 3.26.	Pramipeksolün Farmasötik Dozaj Formlarındaki YPSK Sonuçları (% içerik)	91
Çizelge 4.1.	Rasajilin Tayini için Optimize edilmiş Kromatografik ve Spektrofotometrik Koşullar	96
Çizelge 4.2.	Pramipeksol Tayini için Optimize edilmiş Kromatografik ve Spektrofotometrik Koşullar	101
Çizelge 4.3.	Rasajilin t-testi sonuçları	102
Çizelge 4.4.	Pramipeksol t-testi sonuçları	102
Çizelge 4.5.	Rasajilin ve Pramipeksol İçin Literatürdeki LOD, LOQ ve Çalışma Aralığı	103

1. GİRİŞ

1.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, 1817 yılında, An Essay on the Shaking Palsy adlı makalede ilk detaylı tanımı yayınlayan İngiliz doktor James Parkinson'dan adını almaktadır (Shulman ve ark., 2011).

Parkinson Hastalığı bir tür hareket rahatsızlığıdır. Beyindeki sinir hücreleri, bir beyin kimyasalı olan dopamini yeterli üretmediklerinde ortaya çıkar. Bazı durumlarda genetik, ancak çoğu zaman ailevi bir bağı bulunmayan bir hastalıktır. Çevresel kimyasallara maruz kalmak bu hastalıkta bir rol oynayabilir.

Semptomlar yavaş yavaş ve çoğu zaman bedenin bir tarafında belirir. Daha sonra her iki tarafı da etkiler. Bunların arasında; eller, kollar, bacaklar, çene ve yüzde titremeler; kol, bacak ve gövdede sertlik; hareket etmede yavaşlama; dengede ve koordinasyonda bozukluk yer almaktadır.

Semptomlar kötüleştikçe, bu hastalığı taşıyan insanlar yürümekte, konuşmakta ya da basit işleri yapmakta zorluk çekebilirler. Depresyon, uyku sorunları ya da çiğnemede, yutkunmada, konuşmada güçlük gibi sorunlar yaşayabilirler.

Parkinson hastalığını teşhis etmek için bir laboratuvar tahlili mevcut olmadığından, bu hastalığı teşhis etmede zorlanılabilir. Doktorlar hastalığın tanısını koymak için tıbbi geçmiş ve nörolojik muayene sonuçlarını kullanırlar.

Parkinson hastalığı genellikle 60'lı yaşlarda başlar, ancak daha erken yaşta da görülebilir. Erkeklerde görülme sıklığı, kadınlarda görülme sıklığından fazladır. Bu hastalığı tümünden ortadan kaldırmak için bir tedavi mevcut değildir. Cerrahi müdahale ve derin beyin stimülasyonu (DBS) ciddi durumlarda yardımcı olabilir. DBS ile beyin

içerisine ameliyat ile elektrotlar yerleştirilir. Bunlar beynin hareketi kontrol eden merkezlerini stimüle etmek için elektrik akımları gönderir. Birtakım ilaçlar semptomların ciddi şekilde azaltılmasında yardımcı olur.

Parkinson hastalığı semptomlarını tedavi etmek için altı tip ilaç sınıfı mevcuttur: levodopa, dopamin agonistleri, dopamini inaktive eden enzim inhibitörleri (MAO B inhibitörleri ve COMT inhibitörleri), antikolinerjikler ve amantadin (Shulman ve ark., 2011).

Rasajilin mesilat, Parkinson hastalığının tedavisinde levodopa ile birlikte veya levodopa tedavisi olmaksızın kullanılabilir (RX MediaPharma 2017).

Pramipeksol dihidroklorür monohidrat, dopamin agonistleri olarak adlandırılan ilaç grubuna dahildir. Bu gruptaki ilaçlar, vücutta doğal olarak bulunan dopamin isimli maddeye karşı duyarlı olan ve beyinde yer alan “dopamin resptörleri” isimli algılayıcı yapıları uyarırlar. Bu reseptörler, huzursuz bacak sendromu ve parkinson sendromu adı verilen hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Pramipeksol, huzursuz bacak sendromu ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde endikedir (RX MediaPharma 2017/PDR 2009).

Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerinin miktar tayinleri için hızlı, basit, ekonomik, duyarlı ve seçici spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemler, analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve bu yöntemlerin ticari farmasötik dozaj formlarındaki etken maddelerin tayini için kullanılması amaçlanmıştır.

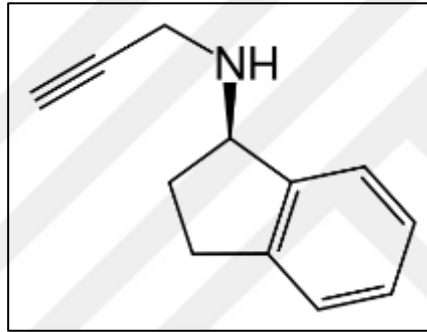
Yapılan kaynak araştırmalarında piyasaya yeni sürülen Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerini içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayinleri için sınırlı sayıda yöntem bulunmaktadır. İncelenen bu analiz yöntemlerinin hemen hemen hepsinde bu etken maddelerin farmasötik preparatlardan miktar tayini için uzun zaman alıcı ön işleme gerek duyulmaktadır. Ön işleme gerek duyulmaksızın hızlı, duyarlı ve

rutin kullanıma uygun yöntemlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi literatürlere yeni yöntemlerin önerilmesi açısından önem taşımaktadır.

1.2. Üzerinde Çalışma Yapılan Etken Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

1.2.1. Rasajilin Mesilat

1.2.1.1. Kimyasal Yapısı



Şekil 1.1. Rasajilin

Kapalı Formülü: C₁₂H₁₃N

Açık Formülü: (R)-N-(prop-2-ynil)-2,3-dihidro-1H-inden-1-amin

Molekül Ağırlığı: 171,24 g/mol (The Merck Index, 14. Baskı)

Erime Noktası: 155-158°C

Görünüş: Beyazdan kirli beyaza kristal toz

Çözünürlük: İzopropil alkol ve asetonda az çözünür. Suda, etanol ve metanolde serbestçe çözünür.

1.2.1.2. Farmakodinamik Özellikleri

Etki mekanizması

Rasajilin, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılır. Parkinson hastalığında, beyinde dopamin üretimi yapan hücrelerin kaybı gerçekleşir. Dopamin, beyinde

hareket kontrolünde rol alır. Rasajilin, beyinde dopamin seviyelerinin artmasına ve devam etmesine yardımcı olur (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

Klinik araştırmalar

Rasajilinin etkinliği 3 araştırmayla gösterilmiştir;

- Klinik araştırma I- monoterapi tedavisi
- Klinik araştırma II ve III- levodopayla adjuvan tedavi (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Monoterapi

Araştırma I 'de, 404 hasta rasgele seçilmek suretiyle; 26 hafta boyunca, 138 hastaya plasebo, 134 hastaya günde 1 mg Rasajilin veya 132 hastaya günde 2 mg Rasajilin verilmiştir. Aktif karşılaştırma ajanı bulunmamaktadır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Bu araştırma için etkinliğin Birincil ls Birleşik Parkinson Hastalığı Değerlendirme lği'ne göre (UPDRS, bölüm I-III) başlangıtan itibaren toplam skordaki değişikliklerdir. Başlangıtan bitişe (LOCF-Son Gözlemin İleri Taşınması) kadar olan ortalama değişiklik arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Hastalığı hafif olan popülasyonda etki belirgindir. Yaşam kalitesinde belirgin ve faydalı bir etki grlmştir. (Değerlendirmede PD-QUALIF-Parkinson Hastalığı Yaşam Kalitesi lği kullanılmıştır) (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Adjuvan Tedavi

Araştırma II 'de rasgele seçilen hastalardan 229 hastaya plasebo veya 231 hastaya günde 1 mg Rasajilin veya levadopa / dekarboksilaz inhibitörünün programlanmış dozlarıyla alınan 200 mg COMT inhibitörü olan entekapon 18 hafta süresince verilmiştir. Araştırma III'de rasgele seçilen hastalaradan, 159 hastaya plasebo, 164 hastaya günde 0,5 mg Rasajilin veya günde 1 mg Rasajilin 26 hafta boyunca verilmiştir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Her iki araştırmada da başlangıştan tedavi süresine kadar, gün boyunca "OFF" durumunda geçirilen ortalama süredeki değişiklik, etkinliğin primer ölçüsüdür. (her değerlendirme muayenesinden önce, 3 günde tamamlanan 24 saatlik ev günlüklerine göre tayin edilmiştir) (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Araştırma II 'de "OFF" durumunda geçirilen süredeki ortalama değişiklik plaseboyla kıyaslandığında - 0,78 saattir. Entakapon grubunda, "OFF" süresindeki ortalama toplam günlük azalma, 1 mg Rasajilin grubunda gözlemlenene benzerlik göstermekte olup - 0,80 saattir. Araştırma III 'te ortalama değişiklik plaseboyla kıyaslandığında 0,94 saat olarak bulunmuştur (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Etkinliğin sekonder ölçütleri, muayene eden tarafından, düzelmenin küresel değerlendirmelerini (“OFF” döneminde Günlük Yaşam Aktiviteleri (ADL) alt ölçėi, “ON” döneminde UPDRS motor skorları) içermektedir. Rasajilin, plaseboyla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bir fayda sağlamıştır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

1.2.1.3. Farmakokinetik Özellikleri

Emilim

Rasajilin hızlı bir şekilde absorbe edilerek, yaklaşık 0,5 saatte doruk plazma derişimine (C_{max} : 5.9-8.5 ng/mL) ulaşır. Bir Rasajilin dozunun mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %36’ dır. Besinler Rasajilinin T_{max} değerini etkilemezken, Rasajilin çok yağlı bir yemekle birlikte alındığında, C_{max} ve eğri altı alan (EAA) değerlerinde sırasıyla yaklaşık %60 ve %20 oranında azalma gözlemlenir. EAA değerinin anlamlı olarak değişmemesi sebebiyle Rasajilin tek başına veya yemeklerle birlikte kullanılabilir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Dağılım

Ortalama dağılım hacmi, bir doz Rasajilin (i.v.) sonrasında 243 litredir. Plazma protein bağlanması, ¹⁴C işaretli bir oral Rasajilin dozu sonrasında yaklaşık %60 ve %70 olarak hesaplanmıştır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Metabolizma

Atılmadan önce karaciğerde tama yakın bir Rasajilin biyotransformasyonu gerçekleşmektedir. Rasajilin metabolizması 1-aminoindan, 3-hidroksi-N-proparjil-l aminoindan ve 3-hidroksi-l-aminoindan sağlamak için N-dealkilasyon ve/veya hidroksialkilasyon olmak üzere iki şekilde ilerlemektedir. Rasajilin metabolizmasının her iki şekli de *in vitro* deneylere göre sitokrom P450 sistemine bağımlıdır ve Rasajilin metabolizmasında yer alan ana izoenzim CYP1A2'dir. Glükuronatları oluşturmak üzere ana eliminasyon yolunun, Rasajilin ve metabolitlerinin konjugasyonu olduğu görülmektedir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Atılım

¹⁴C ile işaretlenmiş Rasajilinin oral yolla alımından sonra, Birincil olarak idrar yoluyla (%62,6) ve ikincil olarak da feçesle (%21,8) eliminasyon meydana gelmiştir ve 38 günlük bir sürede dozun toplam %84,4'ü elimine edilmiştir2.r. Rasajilinin %1'inden az bir miktarı, değişikliğe uğramadan idrar yoluyla atılmaktadır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Doğrusallık/doğrusal olmayan durum

Rasajilin farmakokinetiği, 0,5 - 2 mg doz aralığında doğrusaldır. Sonlanma yarı ömrü ise 0,6 - 2 saattir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

1.2.1.4. Endikasyonları

Rasajilin doz sonu dalgalanmaları olan hastalarda adjuvan tedavi olarak (levodopa tedavisi ile birlikte) veya idiyopatik parkinson hastalığının tedavisinde monoterapi olarak (levodopa tedavisi olmaksızın) endikedir (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

1.2.1.5. Kontrendikasyonları

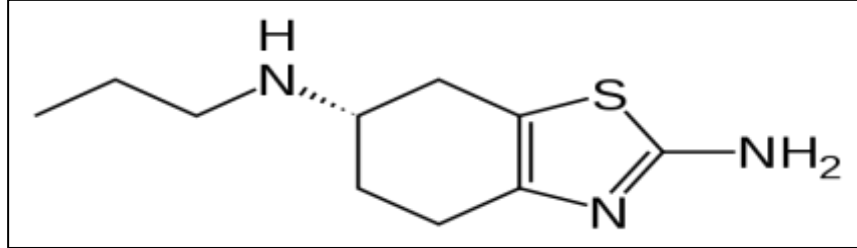
Etkin madde veya yardımcı maddelerden (mannitol, mısır nişastası, koloidal anhidrit silika, prejelatinize mısır nişastası, talk ve stearik asit) herhangi birine karşı aşırı duyarlılık gerçekleşmesi durumunda kontrendikedir. Diğer monoaminoksidaz (MAO) inhibitörleri (reçetesiz satılan doğal ve tıbbi ürünler dahil) veya petidin ile eş zamanlı tedavide kontrendikedir. Petidin veya MAO inhibitörleri ile tedaviye başlanması ve Rasajilinin kesilmesi arasında en az 14 gün vardır. Şiddetli karaciğer bozukluğu olan hastalarda kontrendikedir (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

1.2.1.6. Yan Etkiler/Advers Etkiler

Toplam 1361 hasta, Rasajilin klinik programında Rasajilin ile 3076,4 hasta yılı süresince tedavi edilmiştir. Çift kör plasebo kontrollü çalışmalarda, 213 hasta yılı süresince 539 hasta plasebo ile 212 hasta yılı süresince 529 hasta günde 1 mg Rasajilin ile tedavi edilmiştir. Bu tedaviler sırasında monoterapi sonucu raporlanan yan etkiler; influenza, deri karsinomu, baş ağrısı, lökopeni, alerji, halüsilasyon, depresyon, keyifsizlik, vertigo, konjunktivit, flatulans, dermatit, boyun ağrısı, kas-iskelet ağrıları, artrit, rinit, ani idrar sıkışması ve ateştir. Adjuvan tedavi sırasında görülen yan etkiler ise iştah azalması, anormal rüyalar, halüsilasyonlar, diskinezi, denge bozuklukları, distoni, ortostatik hipotansiyon, karpal tünel sendromu, karın ağrısı, konstipasyon, bulantı, kusma, ağız kuruluğu, artralji, ağız kuruluğu, kilo kaybı, döküntü ve düşmedir (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

1.2.2. Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat

1.2.2.1. Kimyasal Yapısı



Şekil 1.2. Pramipeksol

Kapalı Formülü: $C_{10}H_{17}N_3S$

Açık Formülü: (S)-N-propil-4,5,6,7-tetrahidro-1,3-benzotiazol-2,6-diamin

Molekül Ağırlığı: 211,33 g/mol

Erime Noktası: 296°C - 301°C

Görünüş: Beyazdan kırık beyaza toz

Çözünürlük: Suda %20'den fazla, metanolde %8 civarında, etanolde % 0,5 civarında çözünür ve diklorometanda çözünmez (The Merck Index, 14. Baskı).

1.2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri

Etki Mekanizması

Pramipeksol, dopamin agonistleri denilen bir ilaç grubuna dahildir. Dopamin agonistleri beyinde dopamin reseptörlerini (algılayıcılarını) uyarır. Dopamin reseptörlerinin uyarılması, beyindeki sinir iletilerini tetiklemek suretiyle vücut hareketlerinin kontrol edilmesine destek olur (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

Klinik çalışmalar

Parkinson hastalığının erken ve ileri dönemlerinde yürütülen kontrollü klinik araştırmalarda, araştırmalar süresince Pramipeksolun etkinliği yaklaşık 6 ay boyunca

kalıcı olmuştur. Üç yıldan uzun süren açık tasarımlı idame çalışmalarında, etkinliğin azalmasına dair veri yoktur (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Pramipeksol etkinliği huzursuz bacak sendromunda, orta dereceli ile çok şiddetli huzursuz bacak sendromuna sahip yaklaşık 1000 hasta üzerinde, plasebo kontrollü dört araştırma kapsamında değerlendirilmiştir. Kontrollü araştırmalarda, 12 haftaya kadar tedavi edilen hastalarda etkinlik ortaya konulmuş ve kalıcı etkinlik 9 aylık bir dönem süresince gösterilmiştir. Pramipeksolün etkinliği bir yıla kadar uygulanan açık etiketli uzatma çalışmalarında kalıcı olmuştur (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

1.2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri

Emilim

Pramipeksol oral uygulama sonrasında tamamen emilir. Mutlak biyoyararlanım %90'dan büyüktür. Bir Faz I çalışmasında, pramipeksol çabuk salımlı ve uzatılmış salımlı tabletler açlık durumunda değerlendirilmiştir. Aynı günlük dozlarda günde bir kez kullanılan Pramipeksol uzatılmış salımlı tablet ve günde üç kez kullanılan Pramipeksol çabuk salımlı tablet ile ulaşılan minimum ve doruk plazma konsantrasyonları (C_{min} , C_{maks}) ve maruziyet düzeyleri (EAA) eşdeğer bulunmuştur. Günde bir kez kullanılan Pramipeksol uzatılmış salımlı tablet uygulaması, günde üç kez pramipeksol çabuk salımlı tablet uygulaması ile karşılaştırıldığında, pramipeksol plazma konsantrasyonlarında 24 saat boyunca daha az sıklıkta dalgalanmaya yol açmaktadır. Günde bir kez Pramipeksol uzatılmış salımlı tablet ile maksimum plazma konsantrasyonlarına 6 saat civarında ulaşılır. Maruziyet açısından kararlı duruma en geç 5 günlük bir sürekli uygulamadan sonra ulaşılmaktadır. Genel olarak, besinler pramipeksolün biyoyararlanımını etkilemez. Yağdan zengin bir öğün, sağlıklı gönüllülerde, doruk konsantrasyonda (C_{maks}) tek doz uygulamasından sonra %24, çoklu doz uygulamasından sonra %20 civarında bir yükselmeye ve doruk plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanında yaklaşık 2 saatlik bir gecikmeye neden olmuştur. Total maruziyet (EAA) eşzamanlı yiyecek alımından etkilenmemiştir. C_{maks} 'daki artış klinik açıdan önemli kabul edilmez. Pramipeksol

uzatılmış salımlı tabletin etkililik ve güvenliliğinin belirlendiği Faz III çalışmalarında, hastalara ilaçlarını alırken yemek durumunu dikkate almalarına gerek olmadığı söylenmiştir. (TİTCK, 2019).

Dağılım

İnsanlarda, Pramipeksolün proteinlere bağlanması çok düşük ve dağılım hacmi ise yüksektir. Sıçanlarda, beyin dokusunda yüksek konsantrasyonlar görülmüştür (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Biyotransformasyon

İnsanlarda Pramipeksol küçük oranda metabolize olmaktadır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Eliminasyon

Pramipeksolün böbrek vasıtasıyla değişmemiş halde atılımı, major eliminasyon yoludur ve alınan dozun yaklaşık %80 'ini oluşturur. ¹⁴C ile işaretlenmiş bir dozun yaklaşık %90'ı böbrekler aracılığıyla atılır iken, feçeste %2 'den az bir miktarı bulunmaktadır. Pramipeksolün renal klerensi yaklaşık 400 mL/dk iken total klerensi ise 500 mL/dk civarındadır. Eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2}$), yaşlılarda 12, gençlerde ise 8 saate kadar değişmektedir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Doğrusallık/doğrusal olmayan durum

Pramipeksolün farmakokinetik profili doğrusaldır (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

1.2.2.4. Endikasyonları

Pramipeksol, idiyopatik Parkinson hastalığındaki semptomların tedavisinde endikedir. Monoterapi olarak veya levodopa ile kombine edilerek kullanılabilir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

Pramipeksol, idiyopatik huzursuz bacak sendromunun tedavisinde endikedir (RX MediaPharma, 2012 / TİTCK, 2019).

1.2.2.5. Kontrendikasyonları

Pramipeksol veya ürünün yardımcı maddelerinden herhangi birine karşı aşırı duyarlılık durumunda kontrendikedir (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

1.2.2.6. Yan Etkiler/Advers Etkiler

Yaygın yan etkilerden bazıları şunlardır: Anormal rüyalar, halusinasyonlar, konfüzyon, bulantı, konstipasyon, kusma, diskinezi, baş dönmesi, delüzyon, baş ağrısı (RX MediaPharma, 2012 / PDR, 2009).

1.3. Etken Maddelerin Tayinleri Konusunda Günümüze Kadar Yapılmış Çalışmalar

1.3.1. Spektrofotometrik Çalışmalar

Devala Rao, G. ve arkadaşları (2011) tarafından, bulk ve farmasötik dozaj formlarda Rasajilin tayini için görünür bölgede iki tane basit ve hassas spektrofotometrik yöntem (A&B) geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Yöntem A, Folin-Ciocalteau fenol ayırıcının % 20 sodyum karbonat çözeltisi varlığında, 750 nm’de maksimum absorpsiyon gösteren bir mavi kromojen verilerek Rasajilin tarafından indirgenmesine dayanmaktadır. Yöntem B, 515 nm’de maksimum absorpsiyon gösteren kırmızımsı bir kompleks üretmek için sonradan 1,10-fenantrolin ile reaksiyona giren ferrik iyonlarının (ferrik klorür) ferrüs iyonlarına indirgenmesine dayanmaktadır. Yöntem A ve B için sırasıyla 4-40 µg/mL ve 1-10 ng/mL

konsantrasyon aralıklarında doğrusaldır. Genel farmasötik katkı maddelerinden hiçbir girişim gözlenmemiştir.

Bukka, Rama ve arkadaşları (2010), Rasajilinin bulk ve farmasötik formülasyonlarda tayini için basit ve ucuz bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. İlacın sulu çözeltisi 271,6 nm’de maksimum absorpsiyon göstermiş ve 5-150 µg/mL ($r^2= 0,9999$) konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Regresyon doğrusunun eşitliğindeki eğim ve kesişim noktası sırasıyla 0,0054 ve 0,0005’dir. Tespit limiti (LOD) 0,5 µg/mL ve ölçüm limiti (LOQ) 5 µg/mL olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem ortak eksipiyanlardan gelen hiçbir girişim olmadan farmasötik formülasyonlarda Rasajilinin tayinine başarıyla uygulanmıştır.

Meloun ve arkadaşları (2010) tarafından, Rasajilin-serbest baz [N-propargyl-l-(R)aminoindan] ve Rasajilin {[N-propargyl-l-(R)aminoindan] metansulfonat}’in asitlik sabitleri, 0,01 ve 0,4 mol/L⁻¹ aralığında, farklı iyonik kuvvetlerinde I ve (25 ve 37)°C ‘deki sıcaklıklarda; iki farklı çoklu dalga boyunu ve spektral verilerin çok değişkenli davranışlarını, SPECFIT 32 ve SQUAD(84), doğrusal olmayan regresyon analizlerini ve Indexes faktör analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Aynı zamanda, termodinamik ayrışma sabitlerinin deneysel tayini, ilacın kimyasal yapısının bilgisine dayalı olan PALLAS programının, deneysel değeri ile uyumlu sayısal tahmini ile birleştirilmiştir. Indexes programındaki faktör analizi, veri kalitesi yüksek olduğunda ve cihazsal hata belli olduğunda, ışık soğuran bileşenlerin doğru sayısını tahmin etmektedir. Çoğu indeksler sinyal-hata oranı 10’dan yüksek olduğunda her zaman doğru sayıda bileşen tahmini yapmaktadır. Termodinamik asitlik katsayısı pKaT, pKa ve I verisinin doğrusal olmayan regresyonuna göre belirlenmiştir: Rasajilin baz için 25°C ‘de pKaT = 7,12(1) ve 37°C ‘de 7,01(1); Rasajilin için 25 °C’de pKaT =7,07(1) ve 37°C ‘de 7,16(1)’dir, burada parantez içindeki değer son belirgin basamaktaki standart sapmadır. Her iki ilacın da asitlik sabitlerinin güvenilebilirliği, çoklu dalga boyu spektrofotometrik pH titrasyon verisinin test uygunluğu ile kanıtlanmıştır.

Onal, Armağan (2011), Pramipeksol, Nebivolol, Carvedilol ve Eletripan gibi genellikle ikincil amino grubu içeren bazı ilaçların tayininde hassas ve seçici spektrofotometrik ve spektroflorometrik yöntemler geliştirmiştir. Söz konusu yöntemler, sarı renkli reaksiyon ürününün oluştuğu ve spektrofotometrik, spektroflorometrik ölçümlerinin alındığı borat tamponunda 7-kloro-4-nitrobenzofurazon ile ikincil amino gruplarının Türevlendirilmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrik ve spektroflorometrik çalışmalar için sırasıyla konsantrasyon aralıkları 2,0 -250 ng/mL ve 0,1- 3,0 µg/mL olarak bulunmuştur. Tanımlanan yöntemler, bu etken maddenin farmasötik preparatlardan rutin analizlerinde kolaylıkla uygulanabilmektedir.

Babu ve arkadaşları (2007), Pramipeksolün bulk ve tablet dozaj formunda tayini için basit ve hassas bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Pramipeksol, molar absorptivite katsayısı $5,37208 \times 10^3$ L/mol cm ile 261 nm’de maksimum absorbans veren yeni antipsikotik bir ilaçtır. 4-60 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Analizin sonuçları istatistiksel olarak ve geri kazanım çalışmaları aracılığıyla valide edilmiştir.

El-Bayoumi (2009), oksidatif bozunma ürününün varlığında Pramipeksolün tayini için üç yöntem geliştirmiştir. İlk yöntemde, spektrumların Birinci Türevi alınmıştır. Bu yöntem, tüm ilacı %60’a kadar oksidatif ürün varlığında saptamaktadır. İkinci yöntem, Pramipeksolün hareketli faz olarak etil asetat; metanol (7:3, h/h) kullanıldığı ince tabaka kromatografinin kantitatif değerlendirmesine bağlıdır. Kromatogramlar 264,5 nm’de taranmıştır ve Pramipeksol 2,0-5,0 µg/mL/spot konsantrasyon aralığında saptanmıştır. Bu yöntem kesinliğini %60 oksidatif ürün varlığına kadar korumuştur. Üçüncü yöntem, hareketli faz olarak metanol ve 0,05 M sodyum dihidrojen fosfat (30:70, h/h) kullanan basit bir yüksek performans sıvı kromatografidir (YPSK). Sistemin pH’sı fosforik asit ile 3’e ayarlanmıştır. Yöntem, Pramipeksolü 10,0-40,0 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Bu yöntem, tüm ilacı %75’e kadar oksidatif ürün varlığında saptamıştır. Önerilen yöntemler, Pramipeksolün farmasötik formülasyonlarına başarıyla uygulanmıştır. Önerilen

yöntemlerin geçerliliği standart ekleme tekniği ile de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak referans yöntem ile elde edilenlerle uygun bulunmuştur.

Gurupadayya ve arkadaşları (2009) tarafından, Pramipeksol ilacının ve tabletlerinin miktarının belirlemesi için iki basit, hassas, kesin ve ekonomik yöntem (A ve B) tanımlanmıştır. Yöntem A, 616 nm'de bir karakteristik absorpsiyon maksimumuna sahip renkli bir kromojen oluşturmak için, Pramipeksolün Birincil amin grubunun sodyum nitrat ve hidroklorik asit ile diazolasına ve ardından N-(1-naphthyl) etilen diamin hidroklorür (BM belirteci) ile birleşmesine dayalıdır. Yöntem B, ilacın asidik koşullar içinde, maksimum dalga boyu olan 475,5 nm'de bir Schiff's bazı vererek paradimetilaminobenzaldehit (PDAB) ile metanolik bir çözelti içinde reaksiyon oluşturmaya dayalıdır. Yöntem A için 4-20 µg/mL konsantrasyon aralığında, yöntem B için 50-150 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Ticari farmasötik formülasyonlar analiz edildiğinde, önerilen yöntemlerle elde edilen sonuçların etiketteki miktarları ile uyduğu görülmüştür.

Rani B. Sudha ve arkadaşları (2007), Pramipeksolün farmasötik formda tayini için basit ve yeniden üretilebilir spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. Yöntem A, ilacın Folin-Ciocalteu ayırıcı ile sodyum karbonat varlığında 795 nm'de bir absorpsiyon maksimumu veren mavi renkli bir kompleks oluşumu reaksiyonuna dayalıdır. Yöntem B, Pramipeksolün suda 262 nm'deki UV absorpsiyonuna dayalıdır.

Rani B. Sudha ve arkadaşları (2006), Pamipeksolün saf halinin tayini için iki basit ve hassas spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Yöntem A, Pramipeksolün demir klorür varlığında 1,10-fenantrolin ayırıcı ile reaksiyon verdiğinde kırmızı renkli kromojen (λ_{max} : 519 nm) oluşumuna dayalıdır. Yöntem B, Pramipeksolün bazik koşullarda 1,2-naftakinon 4-sulfonat ile verdiği reaksiyona dayalıdır ve absorban 460 nm'de ölçülmüştür.

Thangabalan ve arkadaşları (2011) tarafından, Pramipeksolün saf ve farmasötik formülasyonlarının miktar tayini için iki basit, hızlı ve hassas spektrofotometrik

yöntem (A ve B) tanımlanmıştır. A yönteminde, çözücü olarak saf su kullanılmış ve 262 nm’de bir absorbsiyon maksimumu göstermiştir. B yönteminde, çözücü olarak metanol kullanılmış ve 263 nm’de absorbsiyon maksimumu göstermiştir. A yönteminde, doğrusallık 10-50 µg/mL aralığında ve B yönteminde doğrusallık 5-40 µg/mL aralığında bulunmuştur. A yöntemi için ($y=0,02 x-0,003$; $r^2=0,9996$) ve B yöntemi için ($y=0,0291 x-0,0073$; $r^2=0,9987$)’dir. Önerilen yöntemler, farmasötik formülasyonlarda Pramipeksolün tayini için başarıyla uygulanmıştır.

1.3.2. Sıvı Kromatografik Çalışmalar

Ma, Zhongying ve arkadaşları (2011), LC-MS/MS ile insan plazmasında Rasajilinin konsantrasyonunu belirlemişler ve farmokinetiğini araştırmışlardır. Kromatografik ayırım, Inertsil ODS-3 C18 kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kullanılarak, metanol-% 0,2 amonyum asetat çözeltisi ve % 0,25 amonyaktan (85:15, h/h) oluşan hareketli faz ile yapılmıştır. Analiz LC-MS/MS ile şu koşullar altında yapılmıştır. Rasajilin için m/z 172’den (öncü iyon) 117,15’e (ürün iyonu) ve iç standart (papaverin) için m/z 340,1’den (öncü iyon) 324,1’e (ürün iyonu). Yöntem, 0,010-40 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır ($r= 0,9995$). Rasajilin için LOQ 0,010 ng/mL olmuştur. Farmokinetik çalışmaları sağlıklı gönüllülerde 0,5, 1,0 ve 2,0 mg’lık tek oral dozun plazma konsantrasyonunda yapılmıştır. Rasajilin tayini için hızlı, hassas ve basit bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve miktar tayini klinik farmokinetik çalışmaya başarıyla uygulanmıştır.

Tong, Liping ve arkadaşları (2010), insan plazmasında Rasajilinin tayini için bir LC-MS/MS metodu geliştirmiş ve sağlıklı kişilerde farmokinetiğini araştırmışlardır. Plazma numuneleri, iç standart olarak kullanılan kardoverin ile sıvı-sıvı ekstraksiyon yoluyla ekstrakte edilmiş ve Intersil ODS-3 kolonu ile ayrılmıştır. İnsan plazmasında Rasajilin içeriği üçlü kuadropol ikili kütle spektrometresi ile seçici reaksiyon görüntüleme (SRM) aracılığıyla belirlenmiştir. 90,55%-101,57%’lik bir geri kazanım elde edilmiş ve doğrusallık aralığı 0,010-40 ng/mL’dir ($r = 0,9998$). Gün içi, günler

arası bağıl standart sapmaların tümü % 15'den daha düşüktür. Rasajilinin farmokinetik çalışması için metot hızlı, doğru ve hassas olarak bulunmuştur.

Song, Min ve arkadaşları (2008), Rasajilin, enzim (MAO-B)'in tip B için seçiciliği ile birlikte, oldukça etkili, seçici ve tersinmez ikinci nesil bir monoamin oksidaz inhibitörüdür. İnsan plazması ve idrarında Rasajilin tayini için hızlı ve hassas bir LC-MS/MS metodu geliştirmeyi ve valide etmeyi amaçlamıştır. LC-MS/MS analizleri, Finnigan LC-TSQ quantum kütle spektrometresi üzerinden pozitif iyon elektrospray iyonlaşma ve seçici reaksiyon görüntüleme (SRM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Rasajilinin plazmadaki miktar tayini 0,01-40 ng/mL ve idrardaki miktar tayini 0,025-40 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Analiz süresi 5,5 dk.'dır. Plazma ve idrardaki ortalama geri kazanımların ikisi de %85'den büyük olmuştur. Gün içi ve günler arası kesinliğin bağıl standart sapması ve doğruluğu sapması, sırasıyla %15'den ve %10'dan düşük olmuştur. Geliştirilmiş yöntemin, tek doz 0,5, 1 ve 2 mg'lık Rasajilin tabletlerinin sağlıklı Çinli gönüllerde oral yoldan alınmasından sonra yapılan klinik farmokinetik çalışmalar için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Ma ve arkadaşları (2008) tarafından, insan plazmasında Rasajilin belirlemesi için oldukça hassas bir sıvı kromatografi-ikili kütle spektrometresi (LCMS/MS) yöntemi geliştirilmiştir. Analizde, plazmanın n-hekzan-diklorometan-izopropanol (20:10:1, h/h/h) ile sıvı-sıvı ekstraksiyonundan yararlanmıştır. Analit ve iç standartın (Psödoefedrin) ayırımı Zorbax Extend C18 kolon (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) üzerinden, 0,5 mL/dk akış hızına sahip asetonitril-5 mM amonyum asetat- asetik asitten oluşan (40:60:0,05, h/h/h) hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. API 4000 üçlü kuadropol kütle spektrometresi elektrospray iyonlaştırma arayüzeyi aracılığıyla çoklu reaksiyon görüntüleme modunda, Rasajilin için m/z 172,1 $\rightarrow$ m/z (1 17,1 + 115,1), iç faz için m/z 166,0 $\rightarrow$ m/z 148,1 geçişlerini kullanarak çalıştırılmıştır. Yöntem, 0,020-50 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Bağıl standart sapma cinsinden gün içi ve günler arası kesinlikler %11,2'den daha düşük ve bağıl hata cinsinden doğruluk $\pm 6,4$ aralığındadır. Ölçüm limiti, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile birlikte 0,020 ng/mL'de tanımlanabilir ve tekrarlanabilir. Üç konsantrasyonda ortalama verimlilik

95,6 $\pm$ %7,0, 97,9 $\pm$ %3,0 ve 95,3 $\pm$ %8,3 olmuştur. Valide edilmiş yöntem, artan duyarlılık (rapor edilenlerden 10 kat daha yüksek) ve geniş doğrusal konsantrasyon aralığı sunmuştur. Bu yöntem, Rasajilinin farmokinetiğinin değerlendirilmesi için 1,2 ve 5 mg'lık Rasajilinin tek oral dozda alınmasından sonra, 12 Çinli sağlıklı gönüllüye başarıyla uygulanmıştır.

Lakshmi, M. Vijaya ve arkadaşları (2010) tarafından, Rasajilinin tayini için doğru ve kesin bir YPSK metodu geliştirilmiştir. İlacın ayırımı ters faz C₁₈ kolonunda fosfat tamponu ve asetonitril (50:50, h/h) oluşan hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,5 mL/dk.'dır. Tayin dalga boyu 210 nm'dir. Doğrusallık; 1,000 değerinde bir korelasyon katsayısı ile birlikte 10-125 ng/mL aralığında gözlenmiştir. Önerilen yöntem doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından valide edilmiştir. Bu yöntem, tablet dozaj formlarında Rasajilinin rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabilir.

Fernandez, Marcos ve arkadaşları (2009), biyobozunabilen mikrokürelerdeki Rasajilin tayini için bir ters faz YPSK metodu geliştirmiş ve valide etmiştir. Kromatografik ayırım, RP-18 kolon üzerinden, pH 3,1'e ayarlanmış asetonitril:su (5:95, h/h) hareketli fazı ile gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/ dk.'dır ve UV tayini 290 nm'dedir. İç standart olarak acyclovir kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0,5-20 µg/mL aralığında doğrusaldır. Kesinlik için bağıl standart sapma %1,8'den küçüktür. Doğruluk, %1,3'den küçük bağıl standart sapma ile birlikte 99,01 ve %102,55 aralığındadır. LOD değeri 0,07 µg/mL ve LOQ 0,23 µg/mL'dir. Yöntem, biyobozunabilen PLGA mikrokürelerde Rasajilin rutin analizleri için çok elverişli hale getirilmiş, basit, hızlı ve uygulanması kolaydır. Yöntem, başka farmasötik dozaj formlarında da ilacın tayini için güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

El-Sherif ve arkadaşları (2008) tarafından, Pramipeksol saf hali ve tablet halinin tespiti için hassas ve yeniden yapılabilir dört yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntem, hareketli faz olarak metanol, 0,025 M fosfat tamponu çözeltisi (pH=3,5, 95:5 h/h) ve ortam sıcaklığında 1,5 mL/dk akış hızı kullanan ters faz YPSK'ye dayalıdır. Miktar

tayini, UV ile 254 nm’de, 25-80 µg/mL konsantrasyon aralığında, ortalama yüzde geri kazanım $99,98 \pm 0,69$ olarak elde edilmiştir. İkinci yöntem, bozulmamış ilacın 265 nm’de densitometrik ölçümlerinden sonra ilacın bozunma ürünlerinden ince tabaka kromatografi yöntemi kullanılarak ayırımına dayalıdır. Ayırım, silika jel (60F254) alüminyum plaka üzerinde nokta başına 1-10 µg konsantrasyon aralığında ve $100,13 \pm 0,64$ ortalama yüzde geri kazanım ile diklorometan:metanol:amonyak (18:2,8:0,4, h/h/h) hareketli fazı ile uygulanmıştır. Üçüncü yöntem, ilacın 287,8 nm’de (D2), 7,5-40 µg/mL konsantrasyon aralığında ve $99,62 \pm 1,22$ ortalama yüzde geri kazanımı ile İkinci Türev ölçümüne dayalıdır. Dördüncü yöntem, ilacın P-dimetilaminobenzaldehit ile 100 °C’de 17 dk. boyunca ısıtıldıktan sonra kararlı ve renkli bir ürün oluşturmaya dayalıdır. Absorpsiyon ölçümü 414 nm’de gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık aralığı, $99,54 \pm 0,954$ ortalama yüzde geri kazanım ile birlikte 6-15 µg/mL bulunmuştur. Önerilen yöntemler ve ince tabaka kromatografi için %90’a kadar, D2 yöntem için %50 ‘ye kadar bozunma ürün varlığında ilacın tayini için kullanılmıştır. Önerilen yöntemler bulk(yığın) ve tablet formunda ilacın tespiti için uygulanmıştır. İki bozunma ürünün yapısı için kütle spektrumu ile fikir vermiştir.

Li Hua ve arkadaşları (2011) tarafından, Pramipeksolün tayininde, insan plazmasında hassas ve uygun bir sıvı kromatografi-ikili kütle spektrometresi geliştirilmiş, valide edilmiş ve Pramipeksolün farmakokinetiği çalışılmıştır. Plazma örneği etileterdiklorometan (3:2, h/h) ile ekstrakte edilmiş ve sonra Venusil ASB-C18(150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolondan hareketli faz olarak asetonitril-10 mmol-L-ammonyum asetat -formik asit kullanılarak analiz edilmiştir. Elektrosprey iyonlaştırma kaynağıyla donatılmış ikili kütle spektrometresi dedektör olarak kullanılmış ve pozitif iyon modunda çalışılmıştır. Pramipeksol ve iç standart huperzin için sırasıyla (m/z 212→ m/z (111+126+153) ve m/z 24→ m/z 210) seçici reaktif izleme (SRM) kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Doğrusal kalibrasyon eğrileri 5,92-740 pg/mL konsantrasyon aralığında elde edilmiştir. Miktar tayininde ölçüm limiti 5,92 pg/mL’dir. Gün içi, günler arası bağıl standart sapma %9,7 den azdır. Bağıl hata açısından doğruluk %2,5 - %0,6 aralığındadır. Bu yöntem, 0,125 mg ya da 0,25 mg Pramipeksol tabletlerinin sağlıklı gönüllülerde farmokinetik çalışmasına, başarıyla uygulanmıştır. Pramipeksol miktar tayininde, yöntemin hassasiyetini önemli ölçüde

arttıran üç SRM geçişi seçilmiş ve yöntemin insan plazmasında Pramipeksol tayinine uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Jancic B. ve arkadaşlarının (2007) araştırmadaki ana hedefi, Pramipeksol ve safsızlıklarının, (BI-II 546 CL, BI-II 751 xx ve 2-aminobenzotiazol) çözünürlük sabitlerinin monokratik YPSK ile tayinidir. Kromatografik metodun avantajı, küçük miktarda maddenin gerekli olması ve maddenin saflık derecesinin daha az önemli olmasıdır. Analiz, geniş bir pH aralığında sabit fazı kararlı bir şekilde kullanarak gerçekleştirilmiştir. Uygun pH çözeltisi olarak trietilamonyum fosforik asit tamponu seçilmiştir; çünkü geniş bir pH aralığını kapsamaktadır. Tayin, Pramipeksol, BI-II 751 xx ve 2-aminobenzotiazol için 262 nm ve BI-II 546 CL için 326 nm gibi iki farklı dalga boyu üzerinden yapılmıştır. Sabitler, analitin alıkonma zamanına karşı hareketli fazın pH'ı şeklinde elde edilen tipik sigmoidal eğrilerden hesaplanmıştır.

Jancic B. ve arkadaşları (2007), Pramipeksol ve bulk ilaç ve farmasötik formundaki ilgili maddelerinin analiz verilerinin eksikliğinden dolayı, deneysel tasarımı yapılarak Pramipeksolün ve ilgili maddelerinin kromatografik davranışlarının optimizasyonunu ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Pramipeksol, BI-II 546 CL, BI-II 751 xx ve 2-aminobenzotiazolün genelde safsızlık olarak bulunduğu bir dopaminagonist D2-agonist/antiparkinson ajanıdır. Analiz, değişik oranlarda asetonitril ve su fazı (sulu trietilamin/ortofosforik asit) içeren hareketli fazla birlikte C₁₈ kolonu kullanılarak yapılmıştır. Tayin, Pramipeksol, BI-II 751 xx ve 2-aminobenzotiazol için 262 nm'de ve BI-II 546 CL için 326 nm'de yapılmıştır. Ayırmada kromatografik parametrelerin etkisini belirlemek için, merkezi kompozit tasarımı seçilmiştir. Asetonitril, TEA içeriği ve su fazının pH'ı, alıkonma üzerinde önemli etkilere sahip faktörler olarak tanımlanmıştır. Uygun bir matematiksel model kullanarak, yazarların değişik koşullar altında alıkonmayı tahmin etmeleri mümkün olmuştur.

Kamienska-Duda, Agata ve arkadaşları (2008) tarafından, ticari ilaç ürünlerinde Pramipeksolün ve onun iki ana safsızlığı; S(-)-4,5,6,7-tetra hidrobenzotiazol-2,6-

diamin ve S(-)-4, 5, 6, 7-tetrahidro-N6, N6 dipropilbenzotiazol-2,6-diamindiklorür monohidrat'ın tayini için iki YPSK metodu geliştirilmiş ve kısmen valide edilmiştir. Yöntemin seçiciliği, doğrusallığı, tespit limiti, LOQ ve kesinliği belirlenmiştir.

Malenovic, Andjelija ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bu makalede, Pramipeksolün YPSK analizleri için önceden optimize edilmiş bir yöntem ve onun safsızlıkları yöntem validasyonuna maruz bırakılmıştır. Optimize edilen kromatografik koşullar şöyledir: Hareketli faz asetonitril-su fazı (15:85, h/h, %1 trietilamin (TEA) içeren su fazı, ortofosforik asit ile 7'ye ayarlanan pH); Pramipeksol, BI-II 751 xx, BI-II 786 BS ve 2-aminobenzotilazol için 262 nm'de ve BI-II 546 CL için 326 nm'de saptama, kolon sıcaklığı 25°C ve akış hızı, 1 mL/ dk. asetonitril ve TEA içeriği, su fazının pH'sı, akış hızı, kolon sıcaklığı ve kolon tipi sağlamlık testinde çalışılan faktörlerdir. Plackett-Burman deneysel plana göre, 12 faktöre sahip olmak için 5 sahte değer eklenmiştir. Verim olarak, çözünme faktörü seçilmiştir. Sağlamlık, grafiksel (yarı-normal olasılık ve Pareto grafikleri) ve istatistiksel (t-test) metotlarına göre değerlendirilmiştir. Ayrıca, önemli faktörler için önemli olmayan aralıklar tahmin edilmiş ve sistem uygunluk testi için limitler belirlenmiştir. Son olarak, önerilen YPSK metodu için doğrusallık, doğruluk ve kesinlik tanımlanmıştır. Safsızlıklar için LOD ve LOQ değerleri tespit edilmiştir. Yöntem tamamıyla bu deneylerle belirlenmiştir.

Yadav Manish ve arkadaşları (2010), Pramipeksolün, insan plazmasındaki tayini için hassas ve yüksek verimli ultra-performans sıvı kromatografi ikili kütle spektrometresi (UPSK-MS-MS) yöntemi geliştirmiştir. Numune hazırlama, Pramipeksolün ve ranitidinin (iç standart) etil asetatla 100 µL insan plazmasından sıvı - sıvı ekstraksiyonunu kapsamıştır. Kromatografik ayırım, 0,5 mL/dk. akış hızına sahip, 10 mM amonyum format(pH 7,5)-asetonitril (15:85, h/h) içeren izokratik hareketli faz kullanılarak bir Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7µm) kolonunda gerçekleştirilmektedir. Pramipeksol (m/z 212,1→153,0) ve iç standart (m/z 315,0→176,1) için öncü - ürün iyon geçişi, çoklu reaksiyon görüntüleyici (MRM) çalıştırılarak, pozitif iyon modunda üçlü quadropol kütle spektrometresi üzerinde görüntülenmiştir. Yöntem, 20-4020 pg/mL gibi geniş bir doğrusal konsantrasyon aralığında valide edilmiştir.

Nirogi, Ramakrishna ve arkadaşları (2007) tarafından, Pramipeksolün insan plazmasında miktar tayini için YPSK/elektrosprey iyonlaştırma ikili kütle spektrometresi metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından, analitler ters-faz kolon üzerinden izokratik hareketli faz kullanarak ayrılmış ve ilgili (M+H) + iyonları, m/z 212/152 (Pramipeksol için), m/z 409/228 (iç standart için) kullanılarak çoklu reaksiyon görüntüleme modunda MS/MS ile analiz edilmiştir. Yöntem, 200-8000 pg/mL’de doğrusaldır. LOQ, %8’den küçük bir bağıl standart sapma ile 200 pg/mL’dir. Her bir numune için 3,5 dk. çalışma süresi olması günde 200’den fazla insan plazmasının analiz edilebilmesini mümkün kılmıştır. Valide edilmiş yöntem, insan plazma örneklerini analiz etmek için farmokinetik, biyoygunluk veya biyoeşdeğerlilik çalışmalarındaki uygulamalarda başarıyla kullanılmıştır.

Rao ve arkadaşları (2009), Pramipeksolü saf formunda ve aynı zamanda farmasötik doz formunda belirlemek için hızlı ve tekrarlanabilir bir ters faz YPSK metodu geliştirmiştir. Ayırım, bir Hypersil ODS kolon ve 90:10 h/h oranında, 1,5mL/dk. akış hızında bir asetonitril ve asetat tamponundan oluşan (pH=6,5) bir hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz 260 nm’de yapılmıştır. İlacın alıkonma süresi 4,4 dk.’dır. Yöntem, 1-80 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Yöntem aynı zamanda ilacın tablet doz formunda analizinde de tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

Mou, Shuhui (2010) tarafından çalışılan yöntem, Pramipeksolün ve optik izomerinin analizi ve ayrılması için kullanılan YPSK metodunu açıklamaktadır. Yöntem, 0,1-0,5 mg/mL numune çözeltisi elde etmek için Pramipeksol örneğini susuz etanol ile çözmeyi ve selüloz kiral kolon AD-H (Daicel, 250 mm x 4.6 mm, 5µm) ve hareketli faz olarak 0,1-%0,5 kadar amin(diethylamin) içeren normal faz karışık çözücü n-hegzan ve susuz etanol (70:30 h/h - 90:10 h/h) kullanan, akış hızı 0,4-1,3mL/dk, analiz dalga boyu 262 nm, kolon sıcaklığı 20-25°C ve numune enjeksiyon hacmi 2-50µL olan normal faz kromatografiyi içermektedir. Bu önerilen yöntem, kalite kontrolü gerçekleştirmek için Pramipeksol optik izomer safsızlıklarının ve Pramipeksol içeren ticari ilaçların analizini hızlıca ve kesin olarak yapabilmektedir.

Srinubabu G. ve arkadaşları (2006) tarafından, Pramipeksolün tabletlerdeki rutin kontrolü için UV ile birlikte hızlı ve hassas bir ters faz YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Ayırım, hareketli faz olarak akış hızı 0,8 mL/dk olan bir asetonitril/fosfat tamponu (60/40, h/h) karışımı kullanılarak yapılmıştır. Miktar tayini, iç standart metodu ile yapılmış ve yöntem doğrusalılık (korelasyon katsayısı=0,99892), doğruluk, sağlamlık ve ara kesinlik ile valide edilmiştir. Yöntemin oldukça hassas olduğunu gösteren LOQ ve LOD sırasıyla 4,5 µg ve 1,4 µg olarak bulunmuştur. Deneysel tasarım validasyon sırasında yöntem sağlamlığı ve ara kesinliği hesaplamak için kullanılmıştır, sağlamlık testi için üç faktör ele alınmıştır: Asetonitrilin hacimce yüzdesi, akış hızı ve pH. Orijinal tamamlayıcı ve sıcaklığın cevap üzerinde hiçbir önemi yokken, akış hızındaki artış, ilaç konsantrasyonunda azalmaya sebep olmuştur. Ara kesinlik ölçüsü için, ele alınan değişkenler: Analizci, ekipman, günler ve analiz yönteminin kesin olduğunu gösteren bağıl standart sapma (BSS) değeri (0,56%, n=24)'dir. İlacın tablet formundaki tayini için, yöntem uygulanabilir bulunmuştur ve geliştirilen yöntemin sonuçları UV spektrofotometrik yöntemin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Humaria, Syeda ve arkadaşları (2010), saf ilaçlar ve tabletlerde Pramipeksol tayini için ultra performans sıvı kromatografi (UPLC) kullanan hızlı, hassas ve seçici bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem, Reversed Phase Waters Symmetry kolonunda ve UV 260 nm'de ayırma dayanmaktadır. 0,04 mg/mL LOD ve 0,16 mg/mL LOQ ile birlikte 50-300 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır (R=0,999). Yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği güncel ICH kılavuzuna göre belirlenmiştir. 3 Kalite Kontrol seviyesinde (100, 150 ve 200 mg/mL) BSS değerleri gün içi ve günler arası pik alanına bağlı olarak %0,02 – %0,05'dir. Gün içi bağıl hata 0,01 ve %0,2 arasındadır. Geliştirilen yöntem, tabletlerde Pramipeksol tayininde başarıyla uygulanmış ve alınan sonuçlar istatistiksel olarak, kaynaklarda bulunan referans yöntem ile elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Doğruluk, yüzde geri kazanımı 97,7-103,2 ile; kesinlik %1,6- %2,2 aralığında spike geri kazanım yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ticari formlarda hiçbir girişim gözlenmemiştir. Bu yöntem, geçen zaman ve kullanılan çözücü miktarı açısından ekonomiktir.

Bharathi D Vijaya ve arkadaşları (2009), 500 µL insan plazmasında, iç standart olarak memantin kullanıldığı Pramipeksol tayini için oldukça hassas ve spesifik bir LC-MS-MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. API-4000, elektrosprey iyonlaştırma tekniği kullanılarak, çoklu reaksiyon görüntüleme modunda (MRM) çalıştırılmıştır. İnsan plazmasından Pramipeksol ve iç standardın ekstraksiyonu için katı-faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. 0,01 M amonyum asetat tamponu (pH 4,4): asetonitril (30:70, h/h) kullanılarak bir Discovery CN kolon üzerinde ayırma piklerine ulaşılmıştır. Toplam kromatografik çalışma süresi 3,0 dk.'dır ve Pramipeksol ve iç standardın elüsyonu sırasıyla yaklaşık 2,32 ve 2,52'de gerçekleşmiştir. Pramipeksol ve iç standart için görüntülenen MS/MS iyon geçişleri sırasıyla 212,10→153,10 ve 180,20→107,30'dur. Yöntemin, 0,999'a eşit veya büyük bir korelasyon katsayısı ile birlikte 20-3540 pg/mL doğrusallık aralığında doğru ve kesin olduğu kanıtlanmıştır. Gün içi, günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri, FDA kılavuzuna uygun bulunmuştur. Geliştirilmiş miktar tayini yöntemi, 0,25 mg Pramipeksol tabletinin gönüllüler tarafından oral yolla alınmasını takiben farmakokinetik çalışmaya uygulanmıştır.

1.3.3. Gaz Kromatografik Çalışmaları

Panchal Jayesh ve arkadaşları (2011), Pramipeksolün fare plazmasında miktar tayini için gaz kromatografi-kütle spektrometresi kullanılarak, basit, hızlı ve hassas bir yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. Alt seviye ölçüm limiti (LOQ), referans edilen diğer yöntemlere (LCMS/MS) göre daha üstündür. NaOH ile bazik yapıldıktan sonra, plazma numuneleri (0,1 mL), metil-t-bütil eter kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyona maruz bırakılmıştır. Analitler, tek kuadropol kütle spektrometrede elektron darbe iyonlaştırma kullanılarak tespit edilmiştir. Seçilmiş iyon gözlem modunda; 211,212, 152 m/z (Pramipeksol)'daki hedef iyonlar ve m/z 194-165 (kafein, iç standart olarak)'daki hedef iyonlar kullanılmıştır. Pramipeksol için 20-1000 pg/mL aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ($r^2 > 0,996$). Biyoanalitik araştırma için yeterli hassasiyet ve seçicilik sunan LOQ 20 pg/mL'dir. Günler arası ve gün-içi kesinlik, sırasıyla %0,3-%8,8 ve %0,9-%11,33 aralığındadır. Pramipeksolün

plazmadan geri kazanımı $82,4 \pm 7,1$ ile $87,8 \pm 5,7\%$ aralığındadır. Yöntem, biyoanalitik yöntemler için gerekli tüm çalışmaları karşılamakta ve farelerde Pramipeksolün farmakokinetik çalışmasına da başarıyla uygulanmaktadır.

1.3.4. İyon Kromatografik Çalışmaları

Suguna, T. ve arkadaşları (2011), Rasajilin ilaç maddesindeki metansulfonik asit içeriğinin belirlenmesi için baskılanmış koşullar ile birlikte iyon kromatografi kullanılarak basit bir yöntem sunmuşlardır. Yıkama solüsyonu olarak 1,3 mM sodyum karbonat ve 2,0 mM sodyum bikarbonat karışımı kullanılmıştır. Yöntem, 7-13 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal cevaplar vermiştir. Korelasyon katsayısı 0,9993 olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluğu, numune konsantrasyonu %50, %100 ve %120 aralıklarında üçer kez hazırlanarak belirlenmiş ve % geri kazanımı 98,0-102,0 arasında bulunmuştur. Yöntem kesinliği ve ara kesinlik, tüm analizciler için BSS değerleri <%2 olarak bulunmuştur. Tutarlılık (ruggedness), değişik günlerde cihaz veya analist gibi değişkenleri değiştirerek belirlenmiştir. Rasajilin ilacının içindeki metansulfonik asit içeriğini belirlemek için yöntem bütünüyle valide edilmiştir. Ayrıca geliştirilmiş yöntem de valide edilmiştir. Yöntem, doğruluk, yeniden yapılabirlik, tekrarlanabilirlik, doğrusallık, hassaslık yönlerinden valide edilmiştir.

1.3.5. Kapiler Elektforez Yöntemleri

Musenga Alessandro ve arkadaşları (2008), tarafından insan idrarında Pramipeksolün analizi için, lazer-indüklenmiş floresans ile birlikte kapiler elektforeze dayalı hassas bir yöntem geliştirilmiştir. Ayırma, borat tamponu (50 mM, pH=10,3), tetrabutylamonyum bromür (30 mM) ve aseton (%15 h/h)'dan oluşan bir elektrolit çözeltisi ile birlikte kaplanmamış erimiş silika kapileri (75 µ iç çap ve sırasıyla 75,0 ve 60,0 cm toplam ve efektif uzunluk) içerisinde gerçekleştirilmiştir. 20 kV voltaj uygulanarak, elektroforetik çalışma 12 dk. içerisinde tamamlanmıştır. Pramipeksolün pH=9'da floresan izotiyosiyanat ile türevlendirilmesini takiben, etil

asetatla sıvı-sıvı ekstraksiyonuna dayalı bir numune ön-işleme prosedürü, geri kazanım verimleri her zaman %94,5'ten yüksek olan tüm biyolojik etkileşimlerin ortadan kaldırılmasına izin verir. Yöntem validasyonu 25,0-1000 ng/mL aralığında doğrusaldır ($r^2=0,9992$); LOD ve LOQ sırasıyla 10,0 ve 25,0 ng/mL; kesinlik $< 6,8$ %BSS, geri kazanım olarak ifade edilen doğruluk $> \%90,0$ 'dır. Yöntem, Pramipeksol ile tedavi gören hastaların idrar numuneleri analizlerine de uygulanmıştır.

Liu, Chang-hai ve arkadaşları (2009), saflık testi ve L-Pramipeksolün enantiyomerik ayrımı için bir kapiler elektroforez sistemi geliştirmişlerdir. Kiral seçim ajanları olarak β -CD, HP- β -CD, SBE- β -CD ve DM- β -CD kullanarak konsantrasyon etkisini, kiral seçim ajanının pH'sını, kolon boyunu ve kiral ayırımında iç çapı incelemişlerdir. Enantiyomerler aşağıdaki koşullar altında ayrılmıştır: 40 cm kadar etkili bir boyda kaplanmamış erimiş silika kapiler (50 μ m x 47 cm), 40 mmol/L trisodyumsitrat tampon çözeltisi, %0,5 SBE-P-CD, fosforik asitle ayarlanmış pH=4,0, %5 metanol, 25 mmol/L SDS ve devamlı tampon olarak 40 mM sodyumtetraborat çözeltisi içeren elektrolit çözeltisi ve 16 kV ayırım voltajı. Tayin dalga boyu 254 nm'ye ve kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Sonuç olarak L-Pramipeksolün ayrımı bu koşullar altında sağlanmıştır. Optik izomerler tatmin edici şekilde ayrılmıştır ($R_s>2,5$) ve R-Pramipeksol içeriği %0,5'den az bulunmuştur. Önerilen yöntem basit, güvenilir ve rutin saflık testi ve kiral ayırım için kullanılabilir bulunmuştur.

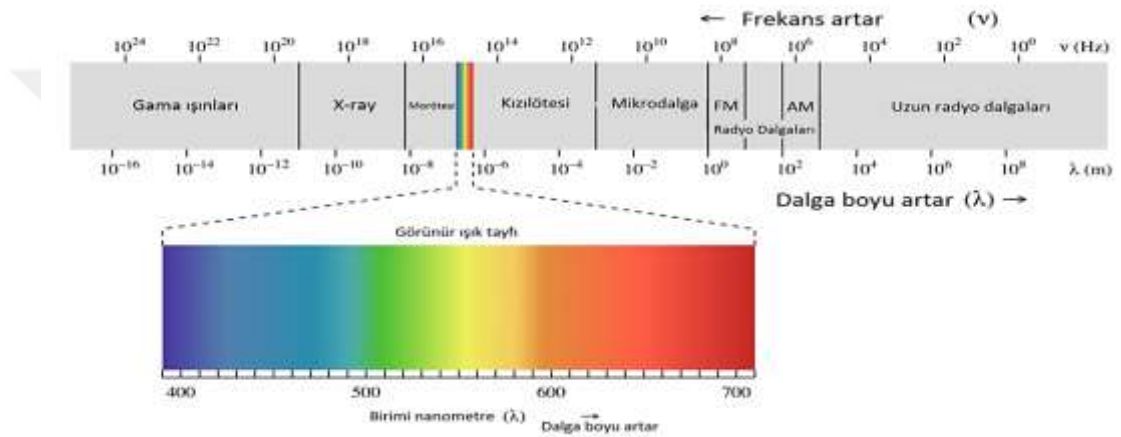
1.4. Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Spektrofotometri

Spektroskopi, bir numunede bir enerji seviyesinden diğerine atomların, moleküllerin veya iyonların geçişi sırasında emilen veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçümü ve yorumudur. Uzayda çok hızlı hareket eden bu elektromanyetik ışımaya, bir tür enerjidir. En yaygın elektromanyetik ışım türleri, göz ile algılanabilen görünür ışık ve ısı olarak algıladığımız kızılötesi (infrared) ışınları, x-ışınları,

ultraviyole, mikrodalga ve radyo ışımları ise diğer elektromanyetik ışıma türleridir. (Yıldız ve Genç, 1993).

Tungsten filaman ya da güneş ışığından yayımlanan ışın beyaz olarak algılanan ve farklı dalga boylarının bir karışımı olan enerjidir. Bu görünür bölgede ışının emilen ve yansıtılan renkleri ayrıldığında, aşağıdaki dalga boylarına göre bir dizilim meydana gelir (Şekil 1.3.). (Gümüştaş, <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notları/mustafa-koray-gumustas>)



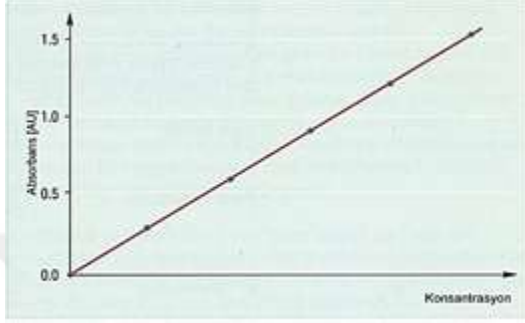
Şekil 1.3. Dalga boylarına göre frekanslar ve ışık tayfı

Buna göre, tanımlanan ışık 430-480 nm mavi bölgede emilim yapan bir çözeltiden geçirilirse diğer renkleri geçirir ve sarı renkte görünür. Bu sebeple sarının, mavi rengin tamamlayıcı rengi olduğu kabul edilir.

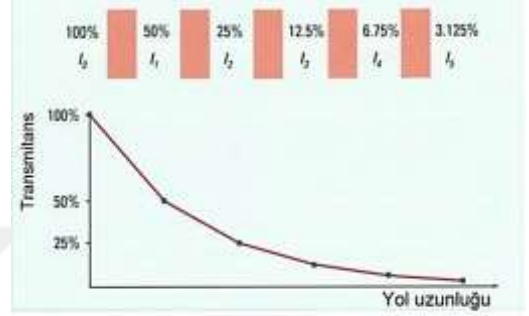
İnsan gözü, 390-780 nm dalga boyu aralığındaki ışıkları algılayabilirken, laboratuvar aletleri daha düşük dalga boylarından UV bölgede ve büyük dalga boylarında (örnek olarak kızıl ötesi (IR) bölgede) ölçüm yapabilmektedir.

Belli dalga boyunda elektromanyetik ışık bir çözeltiden geçirildiğinde çıkan ışığın şiddetinde bir azalma meydana gelir. Giren ışık şiddetine I_0 , çıkan ışık şiddetine I dersek, I/I_0 oranı Transmittansı verir. Genel olarak % transmittans kullanıldığı için, Transmittans (T) = $I / I_0 \rightarrow$ Transmittans (%T) = $100 \times T$ şeklinde gösterilir.

Absorbans, Lambert-Beer kanunu ile matematiksel olarak gösterilmiştir. Buna göre, absorbans çözeltinin özellikleri, çözeltinin derişimi ve ışık yolu ile doğrusal olarak ilişkilidir (Şekil 1.4.). Transmittans grafiğı ise hiperbolik (logaritmik) bir grafiğdir (Şekil 1.5.). (Gümüştas, <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notları/mustafa-koray-gumustas>).



Şekil 1.4. Absorbans-konsantrasyon grafiğı



Şekil 1.5. Transmittans-konsantrasyon grafiğı

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A; Absorbans (optik dansite)

ϵ ; Molar absorptivite (cm / mol)

l; Işık yolu (cm)

c; Konsantrasyon (mol / L)

Bu ifade ile, analitlerin çözeltideki nicel analizi, absorbans ölçümü ile mümkündür. Aşağıdaki kurallara uyulmalıdır.

- Uygun konsantrasyon 10^{-2} M'dan düşüktür.
- Tanecik, çözücü ile etkileşime girmemelidir.
- Gelen ışın monokromatik (tek dalga boyunda) olmalıdır.
- Tanecik büyüklüğü önem taşır (Saçılmalar en aza indirilmelidir).

1.4.1.1. Spektrofotometre

Maddenin ışığı soğurmasını incelemek üzere kullanılan alet, spektrometre ya da spektrofotometre olarak adlandırılır. Şekil 1.6'da basit bir spektrofotometrenin

bölümleri görülmektedir; ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi, örnek kabı ve dedektör bileşenlerinden oluşmaktadır. Optik sinyal, dedektörde elektrik sinyaline dönüştürülür. Bu elektrik sinyali bir kaydedici ya da galvanometre ile ölçülür.

Bu bölümlere ilaveten spektrofotometrelerde ışığı belli bir şiddette numuneye göndermek için aynalar, mercekler, ışık bölücülerini bulunmaktadır. Numune çözeltisi ise ışık geçiren bir malzemeden yapılan numune kaplarına konulmak suretiyle ışık yoluna yerleştirilir (Yıldız ve Genç, 1993).



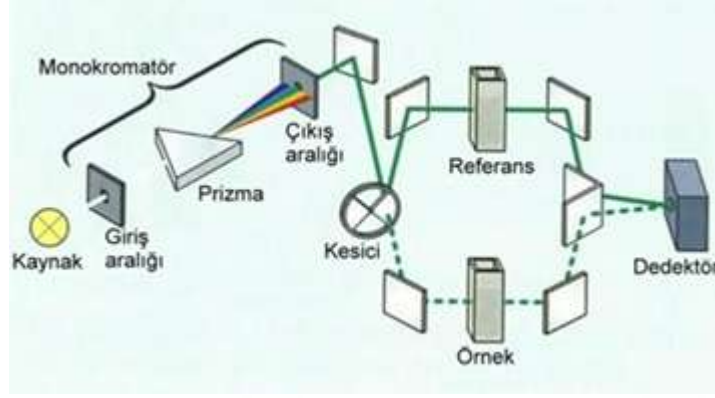
Şekil 1.6. Spektrofotometre Düzenegi

Çift Işık Yollu Spektrofotometre

Her dalga boyunda “sıfır” ve “yüz” ayarlarının yapılması oldukça zaman alır. Spektrofotometrede monokromatörden çıkan ışığın eşit şiddette iki demete ayrılarak birinin numuneye, diğerinin ise çözücüye gönderilmesi ile bu işleme lüzum kalmaz. Bu sayede numunedeki geçirgenlik değeri çözücününki ile sürekli olarak kıyaslanmış olur. İkiye ayrılan ışık iki ayrı dedektör tarafından tespit edilir ve dedektörlerde üretilen sinyallerin oranı ölçülür. Bu gibi cihazlar, çift ışık yollu spektrofotometreler olarak adlandırılır (Şekil 1.7.). Burada iki dedektör tamamen uyumlu olmalıdır, yani eşit şiddete sahip ışık ile aynı sinyali üretmelidirler.

Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, tek bir dedektörden faydalanarak da ölçüm yapma olanağı vardır. Bu amaçla, numune ve çözücünden geçen ışık ışınları, dedektörün önüne yerleştirilen döner bir ışık ayırıcısı aracılığıyla ve ardı ardına dedektöre gönderilir. Bu ard arda gelen ışık demetlerinin oluşturduğu sinyal ise, alternatif yani periyodik türdendir. Bu alternatif sinyal, ışık bölücünün frekansına ayarlanmış bir elektronik çoğaltıcı kullanılarak kaydedilir. Çift ışık yollu cihazlar, ışık

kaynağının şiddetindeki değişimlerden kaynaklanan hataları yok eder (Yıldız ve Genç, 1993).



Şekil 1.7. Çift ışık yollu spektrofotometre

1.4.2. Türev Spektrofotometri

Maddeye gönderilen ışığın dalga boyu-absorbans grafiği çizilerek UV-görünür bölgedeki bir spektrum elde edilir. Yani $A = f(\lambda)$ fonksiyonudur. Bu fonksiyonun, her bir noktasındaki Türevi hesaplanabilir ($dA/d\lambda$). Türev değerlerinin dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmesi sonucu Türev spektrumu ortaya çıkar ve derecesi 1'den n'e kadar olabilir.

$$\left[\frac{dA}{d\lambda} \quad \frac{d^2 A}{d\lambda^2} \quad \frac{d^n A}{d\lambda^n} \right]$$

Türev spektrofotometri, Türev spektrumlarının kullanımına dayanan bir analiz yöntemidir. Türev eğrileri hazırlanırken matematik işlemleri kullanılır. Orijinal bir spektrumun her noktasındaki Türevinin hesaplanıp grafiğinin çizilerek, yeni Türev eğrilerinin hazırlanması işlemi fazlasıyla zordur. Bu yüzden hesapların yapılması amacıyla bilgisayar kullanılır.

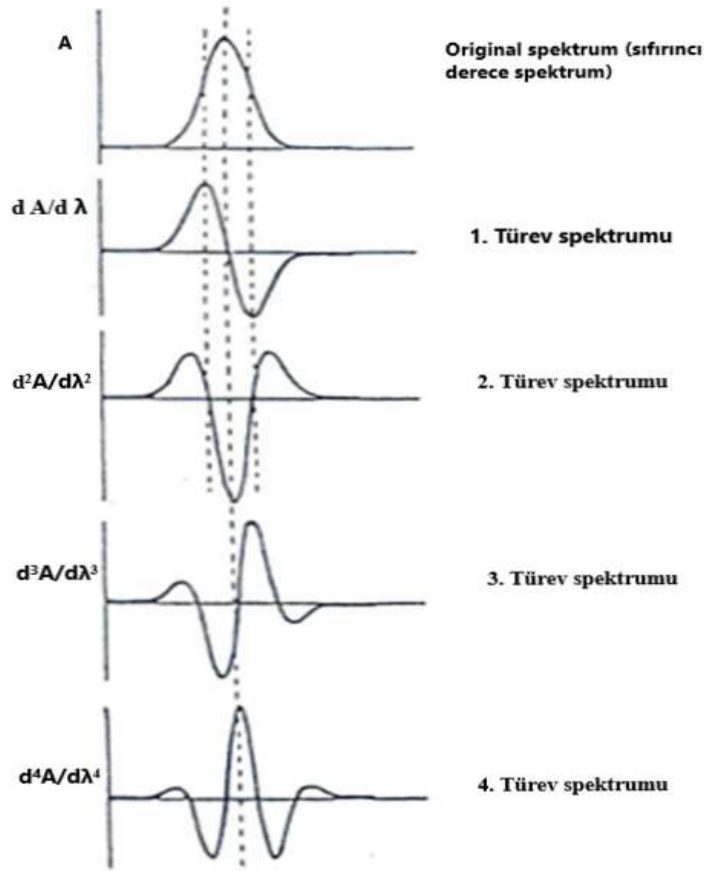
Deneyisel eğrilerin ölçüm aletleriyle Türevlerinin alınması işlemi eskiye dayanır ve ilk kez 1920'lerde kütle spektrumlarının yorumlanmasında Rutherford tarafından

kullanılmıştır. Genel kullanımı ise 1950'leri bulmuştur. Günümüzde, mikroışlemcilerin yaygın kullanımı, bu yöntemin analize kolayca uygulanmasına izin vermektedir ve geliştirilen spektrofotometreler de buna göre tasarlanmıştır (Analitik Kimya Laboratuvar Föyü, 1999).

Yöntemin özellikleri

- Türev yöntemi orjinal spektrumun eğimleri ile ilgili bilgilendirir ve dönüm noktaları ile omuz noktalarının belirginleşmesini sağlar. Bu sayede bir bileşik daha kesin ve kolay bir şekilde tanınabilir.
- Çoğunlukla orjinal spektrumda görülen eğriler birçok pikin çakışması sonucu oluşmuştur. Türev alınması sonucu bu absorpsiyon eğrileri daha detaylı görünür ve bu sayede bir arada bulunan pikler tek tek görülebilir.
- Spektrofotometride, bulanık çözeltilerle çalışıldığında tanecik büyüklüğü, çökme hızı gibi etmenlere dayalı olarak büyük oranda hata yapılması olasıdır. Bulanıklıktan kaynaklanan bu olumsuz etki Türev eğrilerinin çizilmesiyle yok edilebilir.
- Birden fazla madde karışım şeklinde olduğunda kromatografi ve ekstraksiyon gibi herhangi bir ayırma işlemini gerçekleştirmeksizin miktarları tek tek belirlenebilir.
- Reaksiyon ortamı sebebiyle meydana gelen gürültü pikleri ortadan kaldırılır.
- Türev spektrumlarında uydu pikler de çok sayıda görülür. Bir karışım ile çalışıldığında bu pikler bize başka bileşenlerin de olduğunu işaret eder. Türev derecesi arttıkça bu piklerin sayısı da fazlalaşacağı için karışıklık artacaktır.

Türev eğrilerinin şekilleri:



Şekil 1.8.

A. Basit bir orijinal spektrum

$dA/d\lambda$ Orijinal spektrumun Birinci Dereceden Türevi

$d^2A/d\lambda^2$ Orijinal spektrumun İkinci Dereceden Türevi

$d^3A/d\lambda^3$ Orijinal spektrumun Üçüncü Dereceden Türevi

$d^4A/d\lambda^4$ Orijinal spektrumun Dördüncü Dereceden Türevi

Şekilde 1.8.'de görüldüğü üzere Birinci Türev eğrisi, orijinal spektrumda bulunan teğetlerin eğimini gösterir. Türev eğrilerinin aynı dalga boyu aralığında alınması sebebiyle piklerin genişliğinin azalması önem teşkil eden bir durumdur. Bu azalma yaklaşık olarak Birinci Türevde yarisına, İkinci Türevde %53'üne ve Dördüncü Türevde % 41'ine düşmektedir.

Türev spektrumlarında, kesim noktası oldukça önemlidir. Zira, bu noktada ait olduğu maddenin diğer madde ya da maddelerin spektrumuna bir katkısı olmaz. Bu sebeple karışımda bir ayırma işlemi olmaksızın bazı maddelerin diğerleri ile birlikte miktarlarının belirlenmesi mümkündür. Bu durum, bilhassa karışım şeklinde

maddeleri etken maddeler olarak ihtiva eden farmasötik müstahzarların analizi için yöntemin oldukça kolay ve etkili bir miktar tayin yöntemi olmasına sebep olur. Uygun kesim noktaları bulunduğu, ikili karışımlarda uygulandığı gibi daha çok sayıda bileşen içeren karışımlarda da bu yöntem uygulanabilir. (Analitik Kimya Laboratuvar Föyü, 1999)

1.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, kompleks karışımlardaki birbirine yakın özelliklere sahip maddeleri ayırmak için uygulanan pek çok farklı yöntemi içinde barındırır; bu ayırma işlemlerinin çoğu diğer yöntemlerle yapılamamaktadır (Skoog ve ark., 1997). Kromatografik ayırma işlemlerinin hepsinde numunenin taşınması, sıvı, gaz veya süperkritik akışkan olan *hareketli faz* ile gerçekleşir. Bu hareketli faz bir katı yüzeyde ya da bir kolonda sabitlenmiş, kendisiyle karışmayan bir *sabit faz* içinden geçirilir. Bu iki faz numune içerisindeki bileşenlerin farklı oranlarda dağılmasına olanak sağlayacak biçimde seçilir. Sabit faz tarafından kuvvetli bir şekilde tutulan maddeler, hareketli faz ile oldukça yavaş hareket ederler. Öte yandan, sabit faz ile zayıf bir biçimde tutulan maddeler hızlı hareket ederler. Numunedeki maddeler, hareket hızlarının farklı olması neticesinde, birbirlerinden kantitatif ve / veya kalitatif olarak analiz edilebilen, farklı *bölgeler* ya da *bantlar* biçiminde ayrılırlar.

Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler temel olarak ikiye ayrılır. Birinci yöntemde, hareketli ve sabit fazın fiziksel olarak temas etme şekli baz alınır. *Kolon kromatografide*, sabit faz ince bir kolonda yer alır ve hareketli fazın, bu sabit fazın içinden basınç yardımıyla geçmesi sağlanır. *Düzlemsel kromatografide*, sabit faz, bir kağıdın gözenekleri arasına ya da düz bir plaka üzerine sabitlenir ve hareketli faz, sabit fazın içinde yer çekimi ya da kapiler etki sayesinde ilerler. İki kromatografinin de dayandığı temeller aynıdır ve kolon kromatografisi için geliştirilen kuramlar düzlemsel kromatografiye de uyarlanabilir.

Sadece sıvı kromatografi hem düz yüzeylerde hem de kolonlar ile gerçekleştirilebilir; süperkritik sıvı kromatografi ve gaz kromatografi sadece kolonlarda gerçekleştirilir ve hareketli faz kolonun iç yüzeyinde bulunur. (Skoog ve ark., 1997)

Çizelge 1.1. Kolon Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

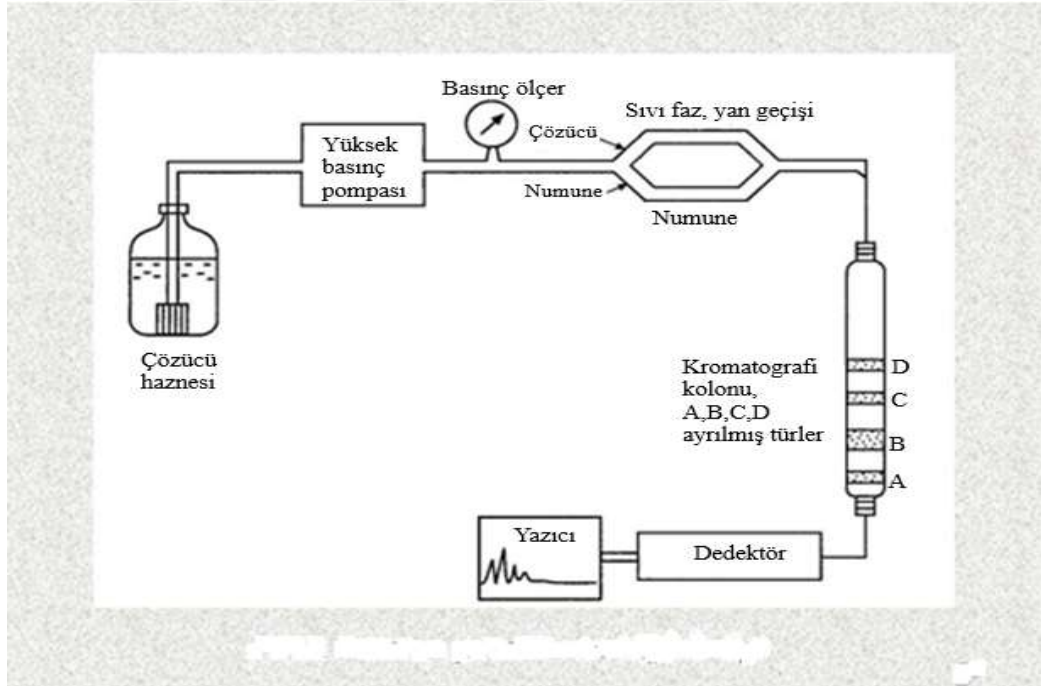
Genel Sınıf	Özel Yöntem	Sabit Faz	Denge Tipi
Sıvı kromatografi (LC) (hareketli faz: sıvı)	Sıvı – sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı – bağlı faz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı – katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz kromatografi (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz – sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz – bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz – katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik – akışkanlı kromatografi (SFC) (hareketli faz: süperkritik sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kapsamı

Sıvı kromatografide hareketli fazın kolon içinde ilerlemesi genel olarak çok yavaş olur. Kromatografik ayrılmanın süresi, kolon boyunun uzatılması ve dolgu maddesinin tanecik çaplarının küçültülmesi ile iyice uzar. Bu tür bir normal kromatografi deneyinde dolgu maddesi taneciklerinin çapı 100-250 µm, kolon boyu 50-200 cm ve kolon çapı 20-50 µm arasındadır ve elde edilen tipik akış hızları 0,1 mL/dk'dır. Daha küçük tanecikli (40-70 µm), daha küçük çaplı (1-3 µm) kolonlarda kullanılması durumunda hareketli fazı 30-50 atm basınç uygulayarak kolon içinde ilerletmek gerekir. Sabit fazdaki kolon çapı ve tanecik çapının azaltılması ile kromatografik ayırimda verimlilik artar. Yüksek basınçta (100-200 atm), bu çeşit kolonlarda gerçekleştirilen sıvı-sıvı kromatografi çeşidi, yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) olarak adlandırılır. Şekil 1.9'da YPSK cihazının temel

bileşenleri görülmektedir. YPSK yöntemine kolon çapının küçültülmesi, kolona giren madde miktarının aynı tutulması durumunda yöntemin duyarlılığını arttırmakta ve ayrıca çözücü miktarını azaltmaktadır (Yıldız ve Genç, 1993).

Analitik ayırma teknikleri içinde, YPSK, en yaygın kullanılan (yıllık satışı yaklaşık bir milyar dolar) ayırma tekniğidir. Bu yöntem, duyarlılığı, uçucu olmayan türlerin ayrılmasına uygunluğu, doğru kantitatif tayinlere kolay bir şekilde uyarlanabilirliği ve hepsinden de önemlisi birçok bilim dalı, sanayi ve halk için Birinci derecede önem arz eden maddelere geniş bir biçimde uygulanabilir olmasıdır. Amino asitler, hidrokarbonlar, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, ilaçlar, pestisitler, antibiyotikler, terpenoidler steroidler, çeşitli inorganik bileşikler ve metal-organik türler bu maddelere örnek gösterilebilir (Skoog ve ark., 1997).



Şekil 1.9. YPSK cihazının şematik olarak görünüşü



Şekil 1.10. Agilent 1260 Infinity YPSK

Yapılan kaynak araştırmalarında Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerini içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayinleri için sınırlı sayıda yöntem bulunmaktadır. İncelenen bu analiz yöntemlerinin hemen hemen hepsinde bu etken maddelerin farmasötik preparatlardan miktar tayini için uzun zaman alıcı ön işleme gerek duyulmaktadır. Ön işleme gerek duyulmaksızın hızlı, duyarlı, ekonomik ve rutin kullanıma uygun yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemler ve spektrofotometrik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi literatürlere yeni yöntemlerin önerilmesi açısından önem taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Hassas Terazi / Sartorius CPA 224S

Ultrasonik Su Banyosu / Bandelin Sonorex

Manyetik karıştırıcı / Daihan Wise Stir

pH Metre / İmolab

Erime Noktası Tayin Cihazı / Stuart SMP 40

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı / Agilent 1200 serisi

UV/Visible Double Beam (Çift Işık Yollu) Spektrofotometre/ Shimadzu UV-1601

FT-IR / Varian 640-IR

Kolon: ACE-5 C18 100 x 4,6 mm, 5µm / Hichrom

Katalog No: ACE-121–1046, Lot No: DV14 – 8244

Lichrospher 60 RP Select B 125x4,0 mm, 5 µm / Merck

Katalog No: 1.50829.0001, Lot No:HX115140

YPSK analizleri, dörtlü gradient pompası, 100 µL halkalı enjeksiyon valfi ve 190-600 nm dalga boylarına ayarlanabilir UV dedektörle donanmış, 100 viallik otosampler'a sahip Agilent 1200 YPSK sistemi ile yapılmıştır.

Spektrofotometrik analizler, 10 mm quartz hücreli, çift ışın yollu Shimadzu marka UV-1601 model UV visible spektrofotometre ile yürütülmüştür.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetonitril / Merck / Ürün Kodu: 100030
- %25'lik Amonyak / Merck / Ürün Kodu: 105422
- %37'lik Hidroklorik Asit / Merck / Ürün Kodu: 100317

- %70'lik Perklorik Asit / Merck / Ürün Kodu: 100519
- Metanol / Merck / Ürün Kodu: 106007
- Glasiyel Asetik Asit (%100) / Merck / Ürün Kodu: 100063
- Amonyum Asetat / Merck / Ürün Kodu: 101116
- YPSK saflıkta su / J.T. Baker / Ürün Kodu: 4218

2.3. Kullanılan Standart Maddeler

Rasajilin, Orchid Chemicals'dan temin edilmiştir. İç standart (IS) olarak kullanılan Psödoefedrin HCl Malladi Drugs and Pharmaceuticals'dan temin edilmiştir.

Pramipeksol standardı Orchid Chemicals and Pharmaceuticals Ltd (Maharashtra, Hindistan)'dan temin edilmiştir. IS, HCl Tamsulosin Titan Laboratories Pvt. Ltd. (Maharashtra, India)'dan temin edilmiştir.

2.4. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Pexola® Tablet 1 mg/ Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Almanya
Parti numarası: 206377

Azilect® Tablet 1 mg / Lundbeck İlaç Tic. Ltd. Şti.
Parti numarası: R87087

2.5. Rasajilin Mesilat için Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

Farmasötik dozaj formlarında Rasajilin analizi için uygulaması basit ve ekonomik olan YPSK metodu ve Birinci Türev-İkinci Türev spektrofotometrik teknikler kullanılarak iki farklı metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Rasajilinin en iyi çözündüğü ortamda (0,1 N HCl) UV spektrofotometrede 220-300 nm dalga boyları arasında tarama yapılarak maksimum absorbansları; 263,933 nm ve 270,373 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Birinci Türev değerleri; 262,005 nm, 265,928 nm, 269,227 nm, 271,853 nm ve İkinci Türev değerleri; 264,270 nm, 267,913 nm, 270,469 nm, 273,044 nm dalga boylarında tespit edilmiştir.

YPSK analizi 210 nm dalga boyu, 1 mL/dk akış hızı, hareketli faz içeriği % 25'lik amonyak ile pH 3'e ayarlanmış ACN:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h) çözelti karışımının C₁₈ kolon (100x4.6 mm x 5 µm) üzerinden pompalanması ile gerçekleştirilmiştir.

YPSK yönteminde, Rasajilin 39-117 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Doğrusal regrasyon eşitliği $y = 1,46545 x + 7,55322 \cdot 10^{-3}$, LOD 0.31 µg/mL ve LOQ 1.01 µg/mL olarak bulunmuştur.

UV Spektrofotometrik yöntemde, (Birinci Türev ve İkinci Türev) Rasajilin 39-273 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır.

2.5.1. Rasajilin Mesilat Saflık Kontrolü

Deneylere başlamadan önce Rasajilinin saflık testleri gerçekleştirilmiştir. Saflık kontrolleri için IR spektrumu alınarak ve erime noktası ölçülerek referanslarla mukayese edilmiştir.

2.5.2. Spektrofotometri

2.5.2.1. Analitik Şartlar

Spektrofotometrik analizler Shimadzu UV-1601 UV/Visible çift ışın yollu kullanılarak uygulanmıştır. Absorbans ölçümleri için kullanılan hücreler 10 mm kuartz

hücrelerdir. Türev koşulları şunlardır: Tarama hızı, 60 nm / dk; spektral yarı genişliği, 2 nm; $\Delta\lambda$, 6 nm.

2.5.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Spektrofotometrik analizler için 195 mg Rasajilin 25 mL 0,1 N HCl içinde çözülerek 7,8 mg/mL Rasajilin içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 39–273 µg/mL arasında 7 farklı konsantrasyonda çözeltiler olacak şekilde 100 mL’lik balon jojelere seri halinde aktarılmıştır. 0,1 N HCl ile hacme tamamlanmıştır. UV spektrofotometre cihazında 220-300 nm dalga boyu aralığında tarama yapılarak maksimum absorbanları ölçülmüştür, Birinci ve İkinci Türevleri alınmıştır.

2.5.2.3. Seçicilik ve Spesifiklik

UV spektrofotometrik metodun spesifikliği ilacın tablet formunda bulunan 1,56 mg Rasajilin ve plasebo için 35’er mg mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, prejelatinize mısır nişastası, talk ve stearik asitin sentetik bir karışımı hazırlanarak uygulanmıştır. UV için 156 µg/mL Rasajilin konsantrasyonunda standart çözelti, 1,56 mg Rasajilin ve ~ 210 mg plasebo içeren numune çözeltisi ve plasebo çözeltisi 0,1 N HCl ile hazırlanarak, 0,20 µm’lik RC’den süzölmüştür. UV spektrofotometrede 220-300 nm dalga boyu aralığında absorban değerleri ölçülmüştür. Birinci ve İkinci Türevleri alınmıştır.

2.5.2.4. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık

UV metodunun doğrusallığı için 195 mg Rasajilin 25 mL 0,1 N HCl ile çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltiden (39-273) µg/mL konsantrasyon aralığında 0,1 N HCl ile 7 farklı konsantrasyonda Rasajilin çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir. Çözeltiler 3 tekrarlı hazırlanmış ve doğrusallık regresyon eşitliği ile değerlendirilmiştir.

2.5.2.5. Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti

UV spektrofotometrik metot ile tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) belirlenirken doğrusallık parametresi altında analiz edilen minimum konsantrasyondaki çözeltilerin UV’de okunan absorbans değerlerinin standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğim değeri aşağıda yer alan tespit limiti ve ölçüm limiti formülünde yerine konularak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \times SS / m$$

$$LOQ = 10 \times SS / m$$

SS : En düşük konsantrasyon için ölçülen değerlerin standart sapması

m : Kalibrasyon eğrisinin eğim değeri

Bu hesaplamalar Birinci Türev ve İkinci Türev için de yapılmıştır.

2.5.2.6. Kesinlik

Spektrofotometrik yöntemin kesinliği için Rasajilin standart çözeltileri (156 µg/mL) aynı gün içinde (gün içi kesinlik) tekrarlanabilirliği elde edebilmek için 5 kere (başlangıç, 1. saat, 2. saat, 3. saat ve 4.saat) analiz edilmiştir ve değişik günlerde (günler arası kesinlik) yeniden üretilebilirliği elde edebilmek için 4 gün 3 kez analiz edilmiştir.

2.5.2.7. Doğruluk

Mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, prejelatinize mısır nişastası, talk ve stearik asit gibi çeşitli ekşiyanların varlığında Rasajilin tayini için, kullanılan spektrofotometrik yöntemin doğruluğu araştırılmıştır. Bunun için 195 mg Rasajilin 0,1 N HCl ile çözülüp 50 mL’ye seyreltilmesiyle standart stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 100 mL’lik balon jojelerde bulunan sabit miktarda (2,1 g) plasebo

karışımının üzerine 78 µg/mL, 156 µg/mL ve 273 µg/mL Rasajilin içerecek şekilde 3 farklı miktarda eklenmiş ve 0,1 N HCl ile seyreltilmiştir. Bu işlemler 3 defa tekrarlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,20 µm'lik RC filtreden süzülerek UV Spektrofotometrede 220-300 nm dalga boyu aralığında 263,933 nm ve 270,373 nm'de maksimum absorbans değerleri ölçülerek, Birinci ve İkinci Türevleri alınmıştır. Geri kazanımları hesaplanmıştır.

2.5.2.8. Farmasötik Preparata Uygulama

Rasajilin tabletler iyice toz haline getirilerek, ortalama 1 tablet ağırlığında 5 ayrı tartım alınarak 156 µg/mL konsantrasyonunda numuneler hazırlanmış ve geliştirilen UV spektrofotometrik metotla etken madde miktar tayini yapılmıştır.

2.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2.5.3.1. Analitik Metot Geliştirme

Farmasötik dozaj formülasyonlarında 78 µg/mL Rasajilin konsantrasyonunda uygun bir YPSK yöntemi geliştirmek için 210 nm dalga boyunda çeşitli hareketli faz karışımları kullanılarak uygun hareketli fazın seçimi, çeşitli kolonlar kullanılarak uygun kolonun seçimi yapılmıştır.

2.5.3.2. Kromatografik Koşullar

YPSK sistemi, bir dörtlü gradyan pompası, bir 100 µL'lik siklik enjeksiyon vanası, bir otomatik numune alma cihazı (100 vialli) ve UV / Vis dedektörü (1200 Serisi, Agilent Technologies, ABD)'nden oluşmaktadır.

YPSK analizi 210 nm dalga boyu, 1 mL/dk akış hızı, hareketli faz içeriği %25'lik amonyak ile pH 3'e ayarlanmış ACN:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h) çözelti

karışımının C₁₈ kolon (100 x 4,6 mm x 5 µm) üzerinden pompalanması ile gerçekleştirilmiştir. Çözelti kullanımdan önce, sonikasyon ile 0,20 µm membran filtre ve gaz giderme vasıtasıyla filtrelenmiştir.

Akış hızı 1,0 mL / dk, kolon sıcaklığı 25°C, dedektör dalga boyu 210 nm ve enjeksiyon hacmi 20,0 µL olarak ayarlanmıştır. Pik alanları, Windows NT tabanlı LC ChemStation Yazılımı ile otomatik olarak entegre edilmiştir.

2.5.3.3. Hareketli Faz Hazırlanması

Asetonitril:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h) karıştırılmıştır. pH 3,0'e 25%'lik amonyak ile ayarlanmış, 0,20 µm membran filtreden süzülerek ultrasonik su banyosunda 15 dk. muamele edilmiştir.

2.5.3.4. İç Standart, Standart Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

50 µg/mL konsantrasyonda çözücü olarak su kullanılarak Psödoefedrin HCl IS çözeltisi hazırlanmıştır. 390 µg/mL konsantrasyonda Rasajilin standart stok çözeltisi IS çözeltisiyle hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için, 39-117 µg/mL konsantrasyon aralığındaki Rasajilin standartları seri halinde seyreltici olarak IS çözeltisi kullanılarak stok çözeltiden hazırlanmıştır.

2.5.3.5. Sağlamlık

Çeşitli koşullarda metodun analitik sonuçlarının kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğunu tayin etme kabiliyetidir. YPSK metodunun sağlamlığı çeşitli parametreler ile tayin edilmiştir. Yöntemin dayanıklılığı hareketli fazın pH değişimi (pH 2,95, pH 3,05) ve hareketli fazın akış hızı değişimi (0,8 ve 1,2 mL/dk) ile tespit edilmiştir. Buna ek olarak 78 µg/mL Rasajilin konsantrasyonunda analitik çözeltilerin

(standart çözelti, Rasajilin ve plasebo içeren numune çözeltisi) stabiliteleri de 3, 6, 12, 24 ve 48 saat sonra analiz edilerek incelenmiştir.

2.5.3.6. Seçicilik ve Spesifiklik

YPSK metodunun spesifikliği ilacın tablet formunda bulunan 1,56 mg Rasajilin ve plasebo için 35'er mg mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, prejelatinize mısır nişastası, talk ve stearik asitin sentetik bir karışımı hazırlanarak uygulanmıştır. 78 µg/mL Rasajilin konsantrasyonlarında standart çözelti, 1,56 mg Rasajilin ve ~ 210 mg plasebo içeren numune çözeltisi ve plasebo çözeltisi IS (Psödoefedrin HCl) çözelti ile hazırlanmıştır. Hareketli faz, IS ve hazırlanan çözeltiler 0,20 mikron membran filtreden süzülerek belirlenen kromatografik koşullarda sisteme verilmiştir.

2.5.3.7. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık

19,5 mg Rasajilin (12,5 mg Rasajiline eşdeğer) 50 mL IS çözelti ile çözülerek Rasajilin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltisinden kalibrasyon eğrisi hazırlamak için değişik konsantrasyonlarda (39-117 µg/mL) Rasajilin çözeltileri IS çözeltisi ile seyreltilmiştir. Hareketli faz 0,20 µm membran filtreden geçirildikten sonra kolon standardizasyonu 30 °C sıcaklıkta 1 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 210 nm seçilmiştir. Hazırlanan seyreltik çözeltiler seri halinde sisteme enjekte edilmiş ve pik alanları ölçülmüştür. Cihazdan alınan istatistik raporda Rasajilin / IS konsantrasyonları oranının, Rasajilin / IS alanlarının oranına karşı çizilen kalibrasyon grafiğinin korelasyon katsayısı ve eğim değerini cihaz otomatik hesaplamıştır. Bu işlemler 3 tekrarlı yapılmıştır.

2.5.3.8. Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti

Önerilen metot ile LOD ve LOQ cihazdan Sinyal / Gürültü (S/N) oranı kullanılarak hesaplanmıştır. S/N oranı 2-3 arasındaki konsantrasyon tespit limiti olarak, S/N oranı 10-20 arasındaki konsantrasyonu ölçüm limiti olarak ölçülmüştür.

2.5.3.9. Kesinlik

Rasajilin standart çözeltileri (78 µg/mL) aynı gün içinde (gün içi kesinlik) tekrarlanabilirliği elde edebilmek için 6 kere (başlangıç, 30. dk., 1. Saat, 2. Saat, 5. Saat ve 10.saat) analiz edilmiştir. Değişik günlerde (günler arası kesinlik) yeniden üretilebilirliği elde edebilmek için 3 gün 3 kez analiz edilmiştir. Ayrıca kullanılan yöntemle çalışılan cihazın kesinliğini test etmek için Rasajilin standart çözeltisi YPSK'ye 10 defa enjekte edilmiştir.

2.5.3.10. Doğruluk

Mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, prejelatinize mısır nişastası, talk ve stearik asit gibi çeşitli eksipiyenlerin varlığında ilacın(etkin maddenin) tayini için, kullanılan YPSK metodunun doğruluğu araştırılmıştır. Bunun için sabit miktarda (~1050 mg) plasebo karışımının üzerine %50-150 arasında 5 farklı miktarda etkin madde ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan karışımlar 100 mL'lik balon jojelere aktarıldıktan sonra 50 µg/mL konsantrasyonundaki IS (PsödoefedrinHCl) çözeltisi ile çözülerek hacme tamamlanmıştır. Son derişimleri (39-117) µg/mL arasında 5 farklı konsantrasyonda olan Rasajilin çözeltileri 0,20 µm'lik RC filtreden süzülüp YPSK'ye enjekte edilmiştir. İşlem 3'er kez tekrarlanmıştır.

2.5.3.11. Farmasötik Preparata Uygulama

Rasajilin tabletler toz haline getirilerek ortalama 1 tablet ağırlığında 5 ayrı tartım alınarak 78 µg/mL Rasajilin konsantrasyonunda numuneler hazırlanmıştır. Önerilen YPSK metodu ile etkin madde miktar tayini yapılmıştır.

2.6. Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

Antiparkinson ajanı Pramipeksol, YPKS ve Türev spektrofotometri ile farmasötik ürünlerde tayini konusunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

İlk yöntem, IS olarak Tamsulosin HCl kullanılarak YPSK'ye dayanmaktadır. Bu yöntemde, kromatografik ayırma 263 nm'de 1 mL/dk. akış hızıyla, 25°C'de, bir Lichrospher 60 RP kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eluent 0,01 mol/L amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h)'den oluşmuştur. Doğrusallık 10,0-30,0 µg / mL aralığında $100,5 \pm 1,10$ ortalama geri kazanım ile bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 8 ng/mL ve 50 ng/mL olarak bulunmuştur.

İkinci yöntemde Pramipeksol tayini için Birinci Türev spektrofotometri tekniği ile 249 ve 280 nm 'de genlik ölçülerek yapılmıştır. Birinci Türev tekniğinde absorbans ve konsantrasyon grafiği, LOD değeri (1,5 ng/mL) ve LOQ değeri 4,5 ng/mL ile 5,0 - 35,0 mg / mL aralığında doğrusaldır.

Farmasötik üründe tipik yardımcı maddeler her iki yöntemin seçiciliğini de engellemez. Geliştirilmiş yöntemler, sağlamlılık, seçicilik, özgüllük, doğrusallık, kesinlik ve hassasiyet için ICH (Q2B, 1996) ve FDA (2000) guidelines (ICH Q2B,1996; FDA,2000)'a göre valide edilmiştir. Sonuç olarak, geliştirilmiş yöntemlerin farmasötik ürünlerde antiparkinson maddesi Pramipeksolün miktarının belirlenmesinde başarılı olmuştur. Farmasötik ürün için bu çalışmada kullanılan BSS

değerleri YPSK yöntemi için %0,97 ve Birinci Türev spektrofotometrik yöntem için %0,00 olarak tespit edilmiştir.

2.6.1. Pramipeksol Saflık Kontrolü

Deneylere başlamadan önce Pramipeksolün saflık kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için IR spektrumu alınarak ve erime noktası bulunarak referanslar ile karşılaştırılmıştır.

2.6.2. Spektrofotometri

2.6.2.1. Analitik Şartlar

Spektrofotometrik analizler Shimadzu UV-1601 UV/Visible çift ışın yollu spektrofotometre kullanılarak uygulanmıştır. Absorbans ölçümleri için kullanılan hücreler 10 mm kuartz hücrelerdir. Analiz koşulları şunlardır: Tarama hızı, 60,0 nm/dk; spektral yarı genişliği, 2,0 nm; $\Delta\lambda$, 6,0 nm.

2.6.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

50 mg Pramipeksol 50 mL 0,1 N HCl içinde çözülerek 1000 µg/mL standart stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çözücü olarak 0,1 N HCl kullanılarak stok çözeltiden 100 mL'lik balon jojelere 5,0–35,0 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi bu 7 çözelti kullanılarak hazırlanmıştır. Kör örneğe karşı (0,1 N HCl) standart çözeltilerin absorbansları kaydedilmiştir. Sıfır noktası spektrumları kaydedildikten sonra, yukarıdaki absorbans spektrasının Birinci Türevleri belirlenerek kaydedilmiştir.

2.6.2.3. Seçicilik ve Spesifiklik

UV spektrofotometrik yöntemin spesifikliğini belirlemek için, 1,0 mg Pramipeksol tablet formunda bulunan her bir yardımcı maddeden 42,0 mg içeren plasebo eklenmiştir. Bu ekşiyanlar mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, povidon K25 ve magnezyum stearattır. Kesin olarak tartılan bütün bileşenler balon jojeler içine aktarılarak 0,1 N HCl ile çözülmüştür. Çözeltiler seyreltici ile hacim işaretine kadar tamamlanmıştır. Seyreltikten sonra, çözeltiler 0,20 µm 'lik membran filtresinden süzölmüştür ve belirtilen şartlar altında analiz edilmiştir.

2.6.2.4. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak ve UV metodunun doğrusallığı için yedi farklı konsantrasyonda ki (5,0-35,0 µg/mL) standart çözeltileri kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır. Çözeltiler üç örnek halinde hazırlanmıştır. Spektrofotometrik yöntemde spektrumların Birinci Türevi için Pramipeksol konsantrasyonuna karşı Türev absorbans değerlerinin işaretlenmesiyle en küçük kareler yöntemi kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

2.6.2.5. Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti

Tespit limiti (LOD) numunedeki tespit edilebilir en düşük analit miktarı olarak tanımlanır. Bu saptanabilir ama ister istemez kesin miktarı ölçülemez. Ölçüm limiti kesin ve doğru olarak ölçülebilir maddenin en düşük miktarıdır. Geliştirilen yöntemde cevaba ve regresyon denkleminin eğimine dayanarak tespit limiti ve ölçüm limiti hesaplanmıştır.

Spektrofotometrik yöntemde, spektranın Birinci Türevi için, en küçük kareler metodu ile absorbansa karşı Pramipeksolün kalibrasyon eğrisi grafiğı oluşturulmuştur. LOD değeri tespit edilmiştir.

2.6.2.6. Kesinlik

Spektrofotometrik yöntemin kesinliği, Pramipeksol standart çözeltilerinin aynı gün içinde tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) elde etmek için belirtilen 5 aralıkta (zaman = 0, 1, 2, 3 ve 4 saat) test edilmesiyle belirlenmiştir. Günler arası kesinlik elde etmek için çözeltiler her gün 3 kez olmak üzere 4 farklı gün test edilmiştir.

2.6.2.7. Doğruluk

Spektrofotometrik yöntemin doğruluğu, manitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, povidon K25 ve magnezyum stearat gibi çeşitli yardımcı maddelerin varlığında, etken maddenin (aktif madde) saptanmasıyla incelenmiştir. Spektrofotometrik yöntemde, doğruluk, etken maddenin 3 farklı miktarı (%50-150 arasında) ile plasebonun aynı miktarının (~ 420 mg) karışımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır.

2.6.2.8. Farmasötik Preparata Uygulama

Pramipeksol içeren 20 tablet tam olarak tartılmış ve ince bir toz halinde öğütülmüştür. Spektrofotometrik yöntemde, bir tablete eşdeğer toz miktarı 0,1 N HCl içeren 50 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,20 µm membran filtreden geçirilerek filtre edilmiş sıvı kullanılmıştır. Kalibrasyon sonuçları kullanılarak belirlenmiş kalibrasyon eğrisi yöntemi ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2.6.3.1. Analitik Metot Geliştirme

YPSK yönteminin geliştirilmesi sırasında, öncelikle uygun bir seyreltici ve IS seçilmiştir. Pramipeksol en iyi su içinde çözünür ve suyun, iç standart Tamsulosin HCl için uygun olduğu da görsel olarak belirlenmiştir.

Farklı kolonlar değerlendirdikten sonra en uygun olanı seçilmiştir. Bu işlem sırasında, RP8, C8, ve C18 kolonları ile Pramipeksol ve IS piklerinde ayırıcılık sağlanamamıştır. En iyi ayırıcılık RP-select B kolonu kullanılarak elde edilmiştir.

Farklı hareketli fazlar denenmiş ve en iyi en yüksek pik performansını gösteren hareketli faz seçilmiştir. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (25:75, h/h) hareketli faz kullanıldığında, elde edilen ayırıcılık düşük ve IS ve Pramipeksol pikleri birbirine yakındır. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (50:50, h/h) hareketli faz kullanıldığı zaman, plaka sayısı düşüktür. En iyi kuyruklanma faktörü, ayırıcılık ve plaka sayısını gösteren hareketli faz, 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h)'de elde edilmiştir.

Pramipeksol için maksimum absorbans gösteren dalga boyu 263 nm (UV spektrofotometrisi)'dir, YPSK yöntemi ile test edilmiştir. Bu yöntemin sağlamlığını görmek için önce hareketli faz akış hızı ($1 \pm 0,2$ mL/dk.) değiştirilmiş, daha sonra fazın pH'ı ($\text{pH } 4,4 \pm 0,05$) değiştirilmiştir.

2.6.3.2. Kromatografik Koşullar

YPSK sistemi, bir dörtlü gradyan pompası, bir 100 µL'lik siklik enjeksiyon vanası, bir otomatik numune alma cihazı (100 vialli) ve UV Vis dedektörü (1200 Serisi, Agilent Technologies, ABD)'nden oluşmaktadır. Bir ters fazlı Merck marka

LiChrospher 60 RP-Select B (125 x 4,0 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Hareketli faz, 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h)'den oluşmuştur. Çözelti kullanımdan önce, sonikasyon ile 0,20 µm membran filtre ve gaz giderme vasıtasıyla filtrelenmiştir.

Akış hızı 1,0 mL / dk, kolon sıcaklığı 25°C, dedektör dalga boyu 263 nm ve enjeksiyon hacmi 20,0 µL olarak ayarlanmıştır. Pik alanları, Windows NT tabanlı LC ChemStation Yazılımı ile otomatik olarak entegre edilmiştir.

2.6.3.3. Hareketli Faz Hazırlanması

0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h) karıştırılmıştır. 0,20 µm'lik membran filtreden süzülerek ultrasonik su banyosunda 15 dk. muamele edilmiştir.

2.6.3.4. İç Standart, Standart Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Çözücü olarak su kullanarak, IS Tamsulosin HCl'in 100,0 µg/mL konsantrasyonunda çözeltisi hazırlanmıştır. Standart stok çözeltisi (250,0 µg/mL) IS çözeltisinden hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için Pramipeksol standartları, IS çözeltisini çözücü olarak kullanarak 10-30 µg/mL konsantrasyon aralığında standart stok çözeltisinden hazırlanmıştır.

2.6.3.5. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığı pH'ı 4,35 – 4,45 arasında ve akış hızı 0,8 ila 1,2 mL/dk. değiştirilerek belirlenmiştir. Ayrıca 20,0 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan plasebo ve Pramipeksol içeren standart ve numune çözeltilerinin stabilitesi 3, 6, 12, 24 ve 48 saat sonra analiz ile değerlendirilmiştir.

2.6.3.6. Seçicilik ve Spesifiklik

YPSK metodunun spesifikliğini belirlemek için, 1,0 mg Pramipeksol plaseboya eklenmiştir. Plasebo, tablet formunda bulunan her bir yardımcı maddeden 42,0 mg içermektedir. Bu ekşiyanlar mannitol, koloidal silikon dioksit, mısır nişastası, povidon K25 ve magnezyum stearattır. Kesin olarak tartılan bütün bileşenler balon jöjeler içine aktararak ve IS ile çözülmüştür. Çözeltiler hacim işareline kadar doldurulmuştur. Seyreltikten sonra, çözeltiler 0,20 µm 'lık membran filtresinden süzülerek, belirtilen şartlar altında analiz edilmiştir.

2.6.3.7. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması ve Doğrusallık

Doğrusallığı test etmek için, YPSK yöntemi NDA (10,0 – 30,0) µg/mL arasında 5 farklı konsantrasyonda standart çözeltileri kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır. Çözeltiler 3 örnek halinde hazırlanmıştır. Pramipeksol konsantrasyonuna karşı pik alanı oranlarının işaretlenmesiyle en küçük kareler metodu kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve lineer regresyon denklemi doğrusallığı belirlemek için kullanılmıştır. Belirlenen kromatografik koşullar altında, Pramipeksol-Tamsulosin HCl (IS) pik alanı oranı için dedektörün cevabı YPSK çalışmalarında gözlenmiştir ve hesaplanan oranın Pramipeksol konsantrasyonu ile orantılı olduğu gösterilmiştir.

2.6.3.8. Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti

Tespit Limiti (LOD) numunedeki tespit edilebilir en düşük analit miktarı olarak tanımlanır ve miktarın kesin bir değer olması şart değildir. Ölçüm limiti kesin ve doğru olarak ölçülebilir maddenin en düşük miktarıdır. YPSK metodu için LOD ve LOQ regresyon denkleminin eğimi ve cevaba göre hesaplanmıştır.

2.6.3.9. Kesinlik

YPSK yönteminin kesinliği için, Pramipeksol standart çözeltileri, aynı gün içinde tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) elde etmek için belirtilen aralıklarda 6 zaman için (zaman = 0,30 dk, 1, 2, 5 ve 10 saat) değerlendirilmiştir. Günler arası kesinlik elde etmek için çözeltiler 3 farklı günde, her gün 3 kez test edilmiştir.

2.6.3.10. Doğruluk

YPSK yönteminde, numuneler etkin maddenin 5 farklı miktarı (%50-150 arası) ile plasebonun aynı miktarının (~ 840 mg) karıştırılması suretiyle hazırlanmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

2.6.3.11. Farmasötik Preparata Uygulama

Pramipeksol içeren 20 tablet tam olarak tartılmış ve ince bir toz halinde öğütülmüştür. YPSK yöntemi için, bir tablet ağırlığına eşdeğer toz miktarı, iç standart çözelti içeren 50 mL'lik balon jojeye aktararak, manyetik karıştırıcıda 20 dk. karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,20 µm membran filtreden süzölmüştür. Filtre edilmiş sıvıda, kalibrasyon sonuçları kullanılarak belirlenmiş kalibrasyon eğrisi yöntemi ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

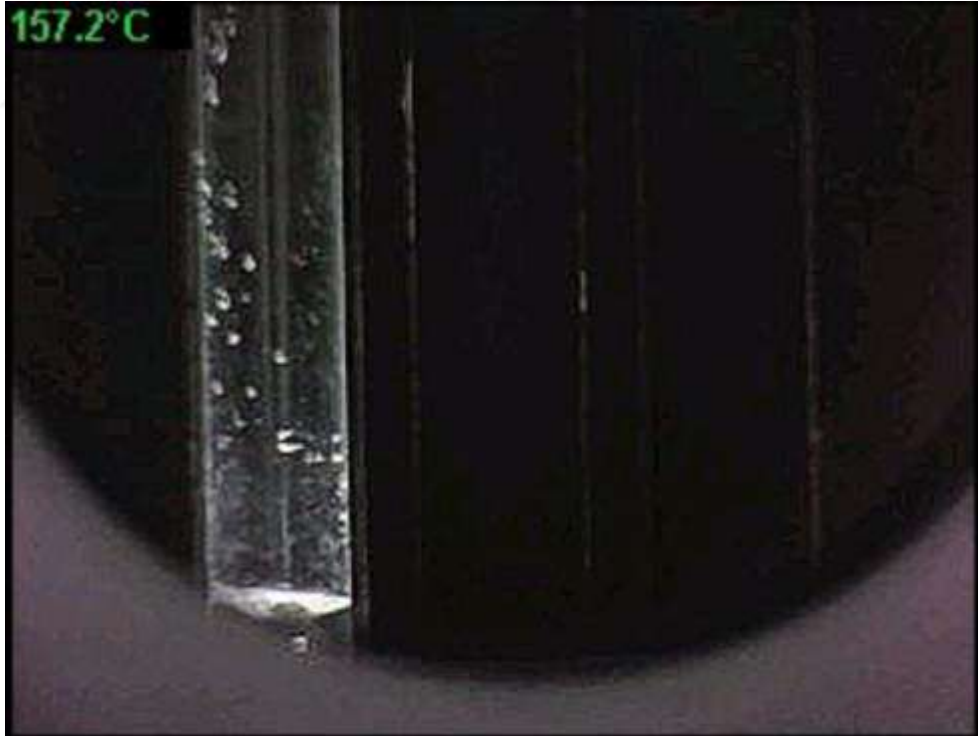
3.1. Etken Maddelerin Kontrolleri

3.1.1. Erime Noktası Tayini

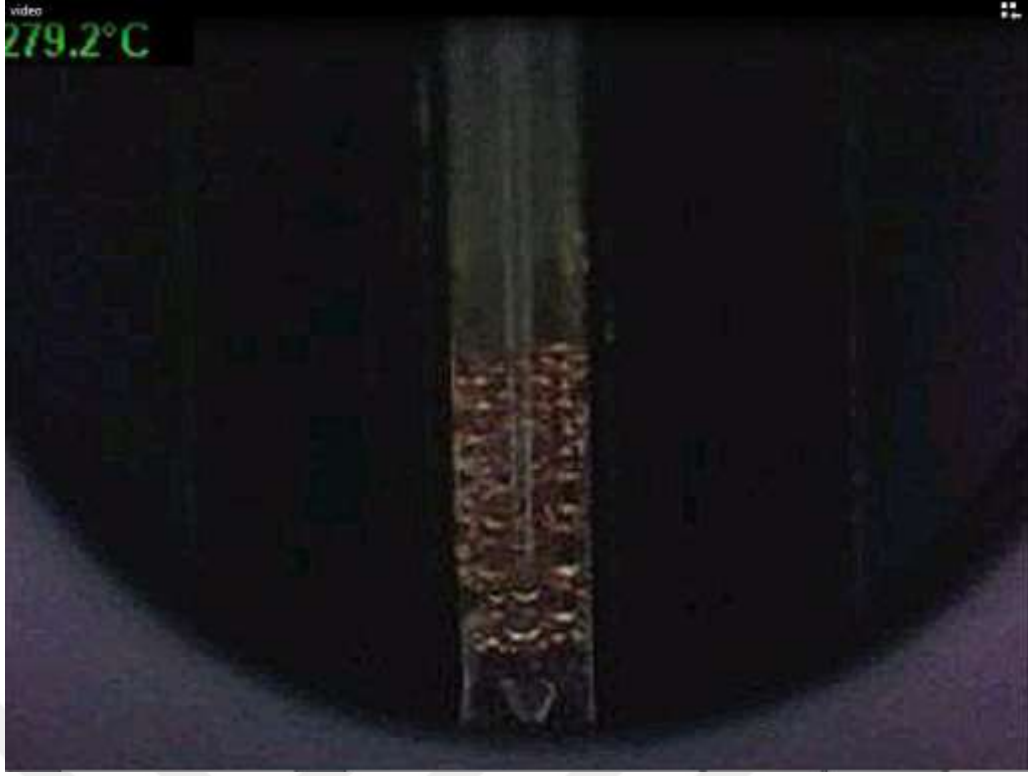
Rasajilin ve Pramipeksol için erime noktaları ölçülmüştür. Rasajilin için 150°C – 164°C sıcaklıkları arasında dakikada 1°C artışlarla erime noktası tayin edilmiştir. Rasajilin, 156,3°C’de erimeye başlamakta 157,2°C’de (Şekil 3.1) berraklaşarak erime son bulmuştur.

Pramipeksol için 275°C – 301°C sıcaklıkları arasında dakikada 1°C artışlarla erime noktası tayin edilmiştir. Pramipeksol 276,4°C’de erimeye başlamakta 279,2°C’de (Şekil 3.2) erime son bulmuştur.

Bu değerler referanslarla uyumludur (Merck Index, 2006).



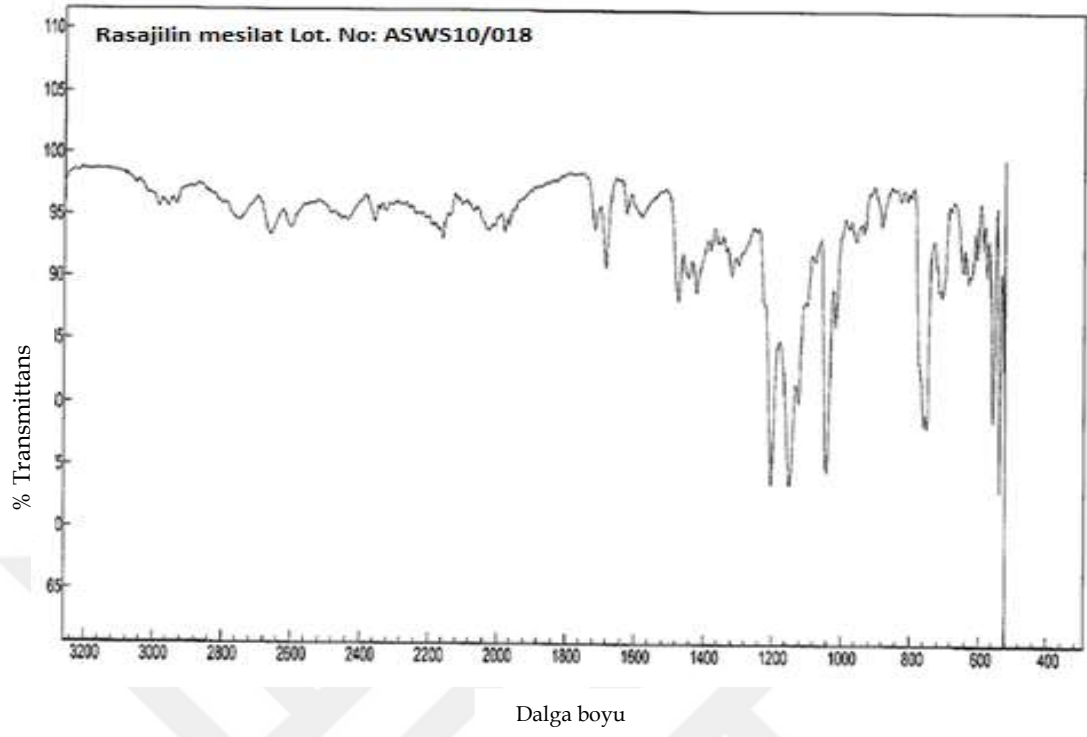
Şekil 3.1. Rasajilin erime noktası kamera görüntüsü



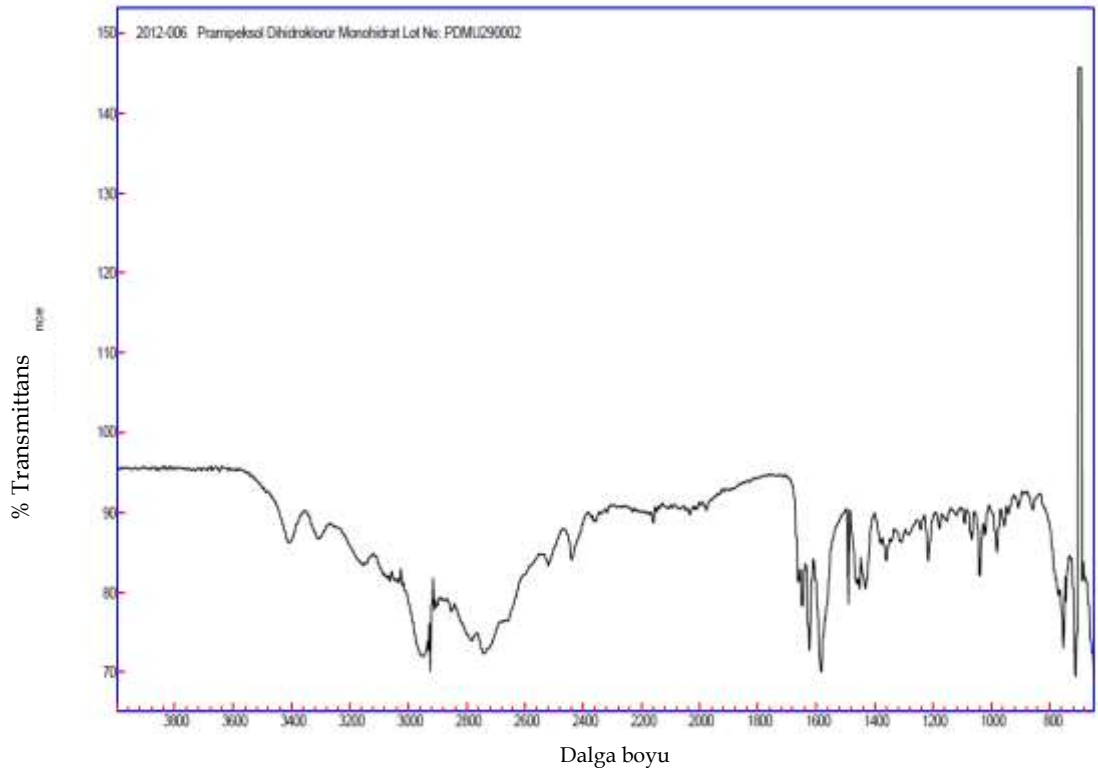
Şekil 3.2. Pramipeksol erime noktası kamera görüntüsü

3.1.2. FT-IR Spektrumları

Rasajilin IR spektrumu (Şekil 3.3) ve Pramipeksol IR spektrumu (Şekil 3.4) Japon Ulusal İleri Endüstriyel Bilim ve Teknoloji Enstitüsü'nün (AIST, 2014) veritabanındaki IR spektrumları ile mukayese edilmiş ve uyumlu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.3. Rasajilinin IR Spektrumu



Şekil 3.4. Pramipeksolün IR Spektrumu

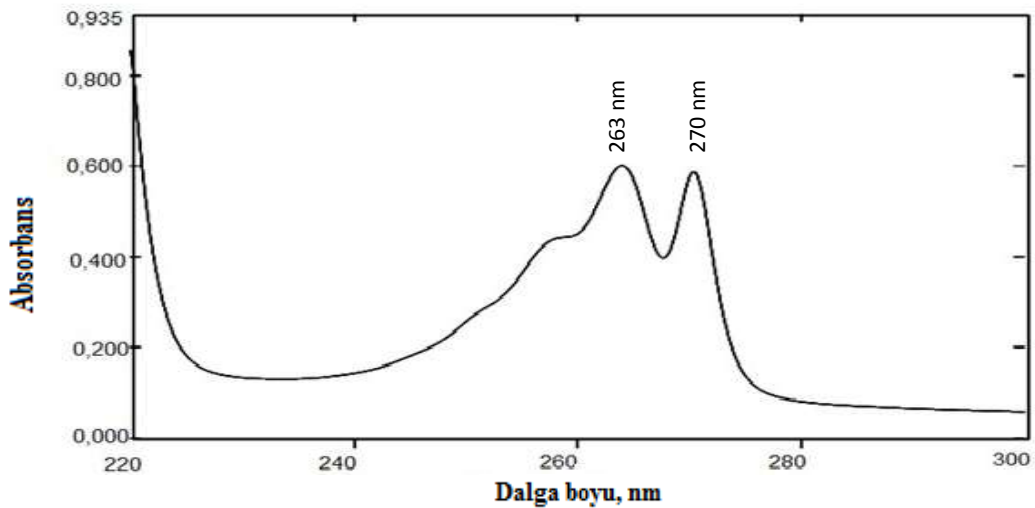
3.2. Rasajilin Mesilat İçin Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları

3.2.1. Spektrofotometrik Yöntem

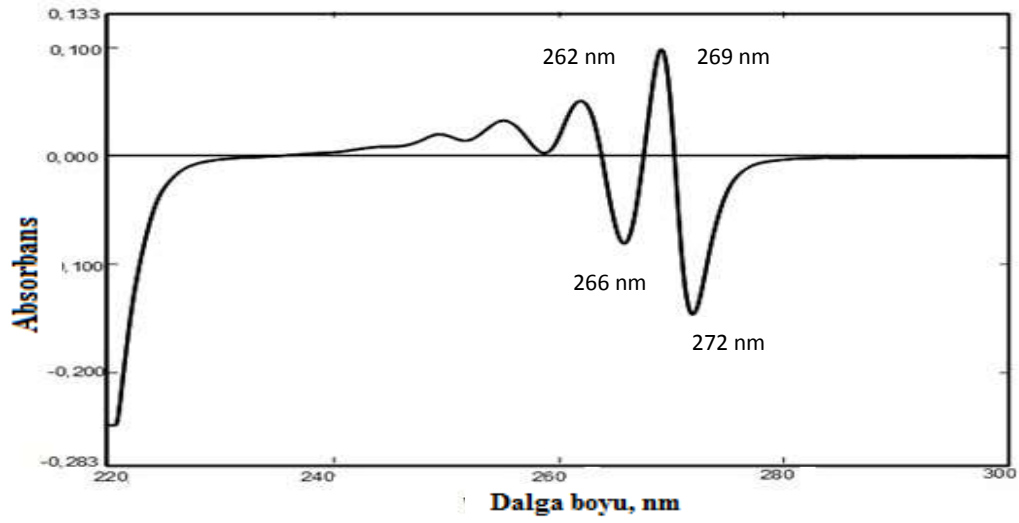
3.2.1.1. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi

Hassas bir Türevlendirme spektrofotometrik yöntem geliştirmek amacıyla, hassasiyeti, girişim olmaması, hazırlama kolaylığı, ilaçların içerik tayini için uygunluğu ve maliyeti açısından iyi bir çözücü olarak 0,1 N HCl seçilmiştir. 0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin 220-300 nm ultraviyole dalga boyu aralığında tarandığında karakteristik bir spektrum oluşturmaktadır (Şekil 3.5.). Rasajiline ait Birinci ve İkinci Türev spektrumları Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.' de gösterilmiştir. Spektrumların Birinci, İkinci, Üçüncü ve Dördüncü Türevleri kullanılarak birçok test gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada en iyi sonuçlar, uygun kesinlik ile Birinci Türev spektrofotometrik teknik için 262, 266, 269 ve 272 nm'deki ve uygun kesinlik ile İkinci Türev spektrofotometrik teknik için 264, 268, 271 ve 273 nm'deki pikler kullanıldığında elde edilmiştir.

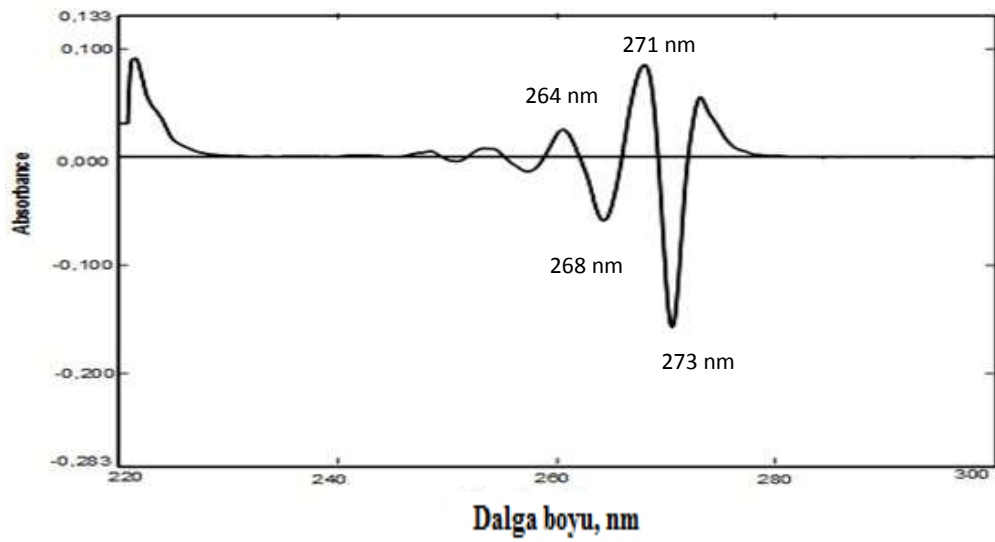
Değerlendirilmiş Türev spektrofotometrik teknikler için kesinlik verisi incelenmiştir. BSS değerleri, yöntemin gün içi ve günler arası için iyi bir tekrarlanabilirlik ($BSS < 1.78$) sergilediğini göstermektedir.



Şekil 3.5. 0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için sıfır derece UV spektrumu



Şekil 3.6. 0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için Birinci Türev spektrumu



Şekil 3.7. 0,1 N HCl içerisindeki Rasajilin için İkinci Türev spektrumu

3.2.1.2. Türev Spektrofotometri

Türev spektrofotometrik hesaplamalar için, regresyon denklemleri Birinci Türev için 262, 266, 269 ve 272 nm’de ve İkinci Türev için 264, 268, 271 and 273 nm’de en küçük kareler metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Doğrusal regresyon analizi sonuçları, bütün kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayılarının 0,9944’den büyük olduğunu göstermiştir. Önerilen yöntem için hesaplanan kalibrasyon eğrisinin

korelasyon katsayısı bu yöntemlerin tamamı için iyi doğrusallık göstermiştir. Kalibrasyon eğrilerinin karakteristiği Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir. Regresyon ve korelasyon katsayıları 1'e yakındır ve Rasajilin Birinci ve İkinci Türev dalgalaboylarında doğrusal olduğunu doğrulamıştır. LOD Birinci Türev yöntemi kullanıldığında 269 nm'de 9 µg/mL olarak bulunmuş, İkinci Türev yöntemi kullanıldığında 271 nm'de 7 µg/mL olarak bulunmuştur.

LOQ Birinci Türev yöntemi kullanıldığında 269 nm'de 27 µg/mL olarak bulunmuş, İkinci Türev yöntemi kullanıldığında 271 nm'de 21 µg/mL olarak bulunmuştur.



Çizelge 3.1. Rasajilin Türev spektrofotometri teknikleri için kalibrasyon eğrilerinin regresyon değerleri

	Birinci Türev				İkinci Türev			
	Dalga boyu, nm				Dalga boyu, nm			
	262	266	269	272	264	268	271	273
Konsantrasyon aralığı, µg/mL	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)	(39 - 273)
Ölçüm Sayısı	21	21	21	21	21	21	21	21
Eğim (m)	0,32	0,52	0,63	0,91	0,39	0,52	1,08	0,91
Eğim (m) standart hata	0,007881	0,006949	0,008638	0,013315	0,006484	0,007495	0,017494	0,006023
Kesim noktası (n)	0,48x10 ⁻³	-0,57x10 ⁻³	1,14x10 ⁻³	1,62x10 ⁻³	-2,29x10 ⁻³	5,05x10 ⁻³	-8,29x10 ⁻³	1,62x10 ⁻³
Kesim noktası (n) standart hata	0,001374	0,001212	0,001507	0,002322	0,001131	0,001307	0,003051	0,001050
Regresyon (R²)	0,9889	0,9966	0,9965	0,9960	0,9947	0,9961	0,9951	0,9936
Korelasyon katsayısı (r)	0,9944	0,9983	0,9982	0,9980	0,9974	0,9981	0,9975	0,9968
Tespit limiti, µg/ mL	11,8	11,0	9,0	9,6	14,7	10,9	7,0	11,7
Tayin limiti, µg/ mL	35,7	33,2	27,3	29,0	44,7	33,1	21,3	35,4

3.2.1.3. Türev Spektrofotometrik Tekniklerin Doğruluğu

Türev spektrofotometrik tekniklerin doğruluk değerleri tayin edilmiştir. Ortalama geri kazanım ve BSS sonuçları <%104,5, <%2.77 Birinci Türev için, <%105,3, <%2,81 İkinci Türev spektrofotometri teknik için tespit edilmiştir. Tayin koşulları Çizelge 3.2. de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Rasajilin tayini için optimize edilmiş spektroskopik koşullar

Metod	UV spektrofotometri
Cihaz	Shimadzu UV-1601
Dedektör	UV
Dalga Boyu Aralığı	220-300 nm
Birinci Türev	262, 266, 269, 272 nm
İkinci Türev	264, 268, 271, 273 nm
Çözücü	0,1 N HCl
Standart	156 µg/mL Rasajilin çözeltisi
Numune	1 Tablet / 10 mL çözücünde

3.2.1.4. Türev Spektrofotometrik Tekniklerin Farmasötik Preparata Uygulanması

Türev spektrofotometrik teknikler Rasajilinin farmasötik dozaj formlarının tayinine uygulanmıştır. İlacın (Azilect® Tablet 1 mg) geri kazanımı için tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.



Çizelge 3.3. Rasajilin farmasötik dozaj formlarındaki Türev spektrofotometri sonuçları (% İçerik)

Birinci Türev		İkinci Türev
Numune No	269 nm	271 nm
1	99,0	97,1
2	101,0	98,9
3	98,0	98,3
4	101,0	99,4
5	101,0	100,0
$\bar{X}$	100,0	98,7
SS	1,43	1,14
BSS , %	1,43	1,15

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK)

3.2.2.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

Kromatografik koşulları optimize etmek amacıyla, önerilen YPSK metot geliştirme çalışmalarında çeşitli değişkenlerin pik şekli, alıkonma zamanı, ayrılcılık ve aynı zamanda uygun IS üzerinde etkisi incelenmiştir. Sabit fazlar: ODS (oktadesilsilil), C₈ ve C₁₈ ; hareketli faz (değişik oranlarda asetronitril: su: perklorik asit) ile birlikte kullanılmıştır. En iyi kromatografik performans Hichrom ACE-5 C₁₈ 100 x 4,6 mm, 5 µm ve (250:750:5, h/h/h) oranında asetronitril: su: perklorik asit karışımından oluşan hareketli faz kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.8.). Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Rasajilin pik performans değerlendirmesi Şekil 3.9' de verilmiştir.

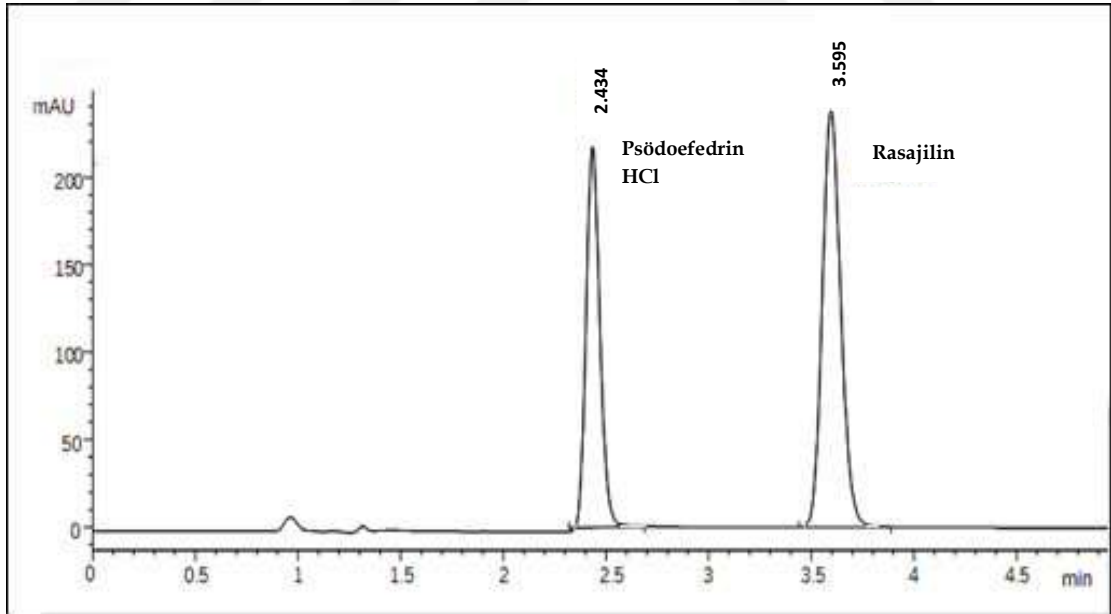
Araştırmalara göre, girişim etkisinin olmaması ve çalışma koşullarındaki iyi cevabı sebebiyle Psödoefedrin HCl iç standart olarak seçilmiştir. En iyi seçicilik ve hassasiyeti belirlemek ve Rasajilin ve Psödoefedrin HCl'i tayin etmek amacıyla elüsyon işlemi tüm UV bölgesinde kontrol edilmiştir. En büyük cevabı veren 210 nm dalga boyu, ilerdeki çalışmalar için tercih edilmiştir.

Çizelge 3.4. Rasajilin YPSK ile analizinde yöntem geliştirme

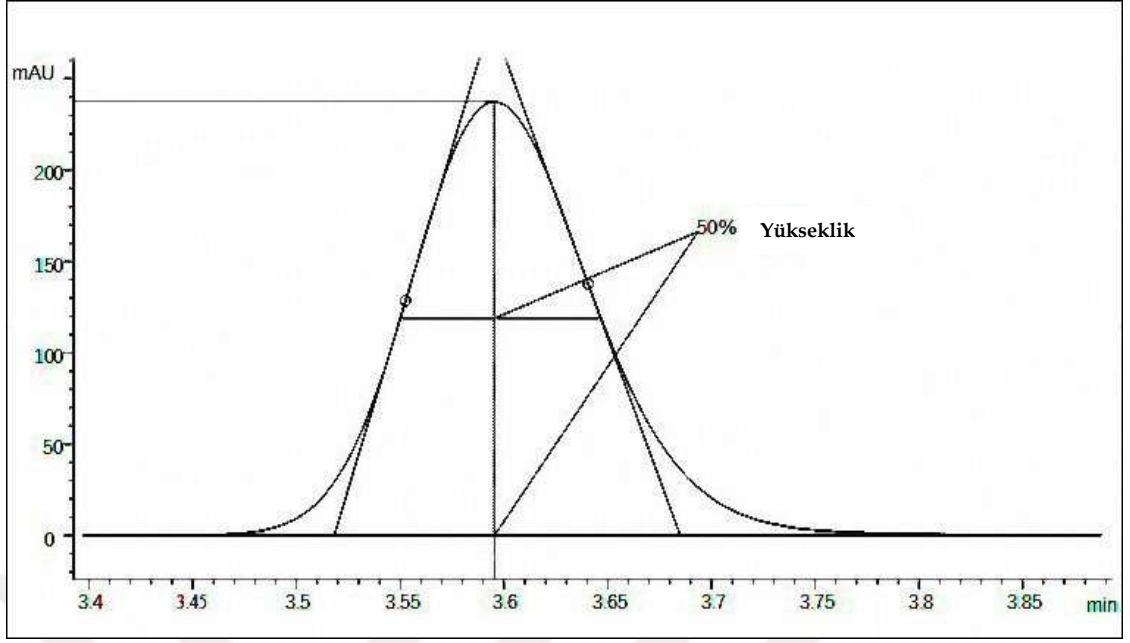
Parametre	Rasajilin/IS alıkonma zamanı, dk	Rasajilin/IS alan	Kapasite faktörü	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Ayırıcılık
Hareketli Faz (150:850:5, h/h/h)	3,60 / 2,44	1,45	6,19	1,15	7802	8,13
(250:750:5, h/h/h) (Orijinal)	3,60 / 2,43	1,45	6,19	1,14	7794	8,17
(350:650:5, h/h/h)	3,62 / 2,44	1,45	6,23	1,15	7499	8,12
Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ 4,6 x 150 mm 5 µm	3,18 / 2,51	1,42	5,35	1,56	2045	2,47
Inertsil ODS-3 250 x 4,6 mm 5 µm	12,45 / 7,65	1,38	23,90	1,15	15149	14,39
Merck Lichrospher 60 RP Select B 4,0 x 125 mm 5 µm	4,42 / 2,85	1,36	7,84	1,11	4044	6,71
Waters Symmetry C ₈ 150 x 3,9 mm 5 µm	4,21 / 2,86	1,37	7,42	1,20	8796	8,66
Hichrom ACE 5 C ₁₈ 100 x 4,6 mm 5 µm (Orijinal)	3,65 / 2,48	1,41	6,31	1,13	7832	8,14

Çizelge 3.5. Rasajilin tayini için optimize edilmiş kromatografik koşullar

Metod	YPSK
Cihaz	Agilent YPSK 1200
Dedektör	UV
Kolon	ACE-5 C18 100 x 4,6 mm, 5µm / Hichrom
Dalga Boyu	210 nm
Akış Hızı	1 mL / dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Hareketli Faz	ACN:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h), pH 3,0
Çözücü	IS çözeltisi (50,0 µg/mL Psödoefedrin HCl suda)
Standart	78.0 µg/mL
Numune	1 Tablet / 20 mL



Şekil 3.8. IS olarak Psödoefedrin HCl içeren Rasajilin Kromatogramı



Şekil 3.9. Rasajilinin pik performans değerlendirmesi

3.2.2.2. YPSK Yönteminin Sağlamlığı - Farklı pH ve Farklı Hareketli Faz Akış Hızı

YPSK yönteminin sağlamlığı, kromatografik koşullardan hareketli faz akış hızı ve pH değerinde kasıtlı varyasyon etkisini gözlemleyerek değerlendirilmiştir. 3,00 pH civarında $\pm 0,05$ birim değişiminin olmasının kromatografik ayırım üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Rasajilinin 7,4 olan pK_a değerinden daha küçük pK_a değerine sahip $3,00 \pm 0,05$ pH değerindeki hareketli faz, tuz oluşumunu bozmaz. Akış hızı 0,8 – 1,2 mL/dk aralığında değiştirilmiştir; akış hızı 0,8 mL'ye indirildiğinde alıkonma süresi 4,56 dk.'ya çıkarken, akış hızının 1,2 mL'ye çıkarılması alıkonma süresini 3,04 dk.'ya düşürmüştür. Her bir parametre, 3'er numune ile çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Rasajilin YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları (farklı pH, farklı hareketli faz akış hızı)

Parametre	Rasajilin alıkonma zamanı	Rasajilin /IS alan	Kapasite Faktörü	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Ayırıcılık	Rasajilin alan % BSS
pH 2,95	3,65	1,48	6,29	1,15	7628	7,96	0,65
pH 3,00 (orijinal)	3,65	1,48	6,30	1,14	7639	7,95	0,38
pH 3,05	3,64	1,48	6,29	1,14	7614	7,96	0,57
Akış Hızı: 0,8 mL/dk	4,56	1,48	8,13	1,16	8329	8,30	0,82
1,0 mL/dk (orijinal)	3,65	1,48	6,29	1,14	7630	7,97	0,36
1,2 mL/dk	3,04	1,48	5,07	1,12	6997	7,51	0,74

3.2.2.3. YPSK Yönteminin Sağlamlığı - Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitesi

Analitik çözeltilerin (standart ve numune) stabilitesi test edilmiştir. Oda sıcaklığında (30°C), 48 saatlik bir periyot içinde, standart çözeltideki Rasajilin miktarının değişimin %0,31, Rasajilin ve plasebo içeren numune çözeltisindeki Rasajilin miktarı değişiminin %0,24 olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. % değişim için, 48 sonundaki YPSK cihazında rasajilin için elde edilen pik alanları ile başlangıçta elde edilen pik alanları arasındaki sapma değeri mutlak olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Değişim (\%)} = \frac{[D_t - D_i]}{D_i} \times 100$$

Dt: Herhangi bir t zamanında bulunan pik alanı

Di: Başlangıçta bulunan pik alanı

Çizelge 3.7. Rasajilin YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları

Zaman	Standart Rasajilin alanı, mAU	% Değişim	Standart İS alanı, mAU	% Değişim	Numune Rasajilin alanı, mAU	% Değişim	Numune İS alanı, mAU	% Değişim
Başlangıç	989,1	-	1463,1	-	988,4	-	1454,1	-
3 saat	986,9	0,22	1461,1	0,13	989,2	0,07	1457,3	0,22
6 saat	987,9	0,12	1460,7	0,16	989,8	0,14	1456,2	0,14
12 saat	989,3	0,02	1460,4	0,18	990,4	0,20	1456,0	0,13
24 saat	988,7	0,04	1461,9	0,08	988,0	0,05	1455,1	0,07
48 saat	985,9	0,31	1463,3	0,01	990,8	0,24	1454,8	0,05
$\bar{X}$	988,0		1461,8		989,4		1455,6	
SS	1,31		1,22		1,12		1,15	
BSS %	0,13		0,08		0,11		0,08	

$\bar{X}$: Ortalama

SS : Standart sapma

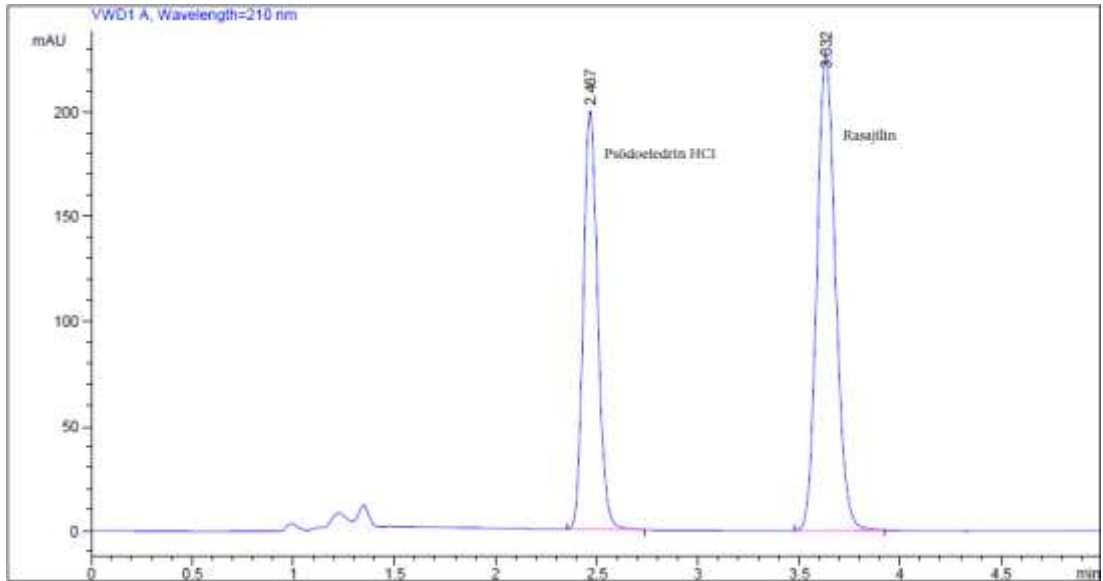
BSS : Bağlı standart sapma

3.2.2.4. YPSK Yönteminin Seçiciliği

Metodun seçiciliği, etkin madde ve en sık kullanılan ekşiپیانların karışımından elde edilen kromatogramlar kıyaslanarak incelenmiştir. Çizelge 3.8.'de gösterildiği gibi, elde edilen sonuçlarda, ekşiپیانlarla hiçbir girişim olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.8. Rasajilin YPSK Seçicilik Testi Sonuçları

Numune	Rasajilin konsantrasyon, µg/mL	İS (Psödoefedrin HCl) konsantrasyon, µg/mL	YPSK alıkonma zamanı (R _t), dk	YPSK alan değerleri, mAU
Hareketli Faz	-	-	-	-
İç Standart	-	50,0	2,47	975,3
Plasebo	-	50,0	2,47	983,5
Rasajilin çalışma standardı	78 (50)	50,0	2,47 3,62	985,5 1460,6
Numune	78 (50)	50,0	2,47 3,63	986,8 1454,4



Şekil 3.10. Rasajilin ve iç standart çözeltilerini içeren karışımın kromatogramı

3.2.2.5. YPSK Yönteminin Kesinliği / Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik

YPSK metodunun kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) için Rasajilin standart çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, YPSK cihazının kesinliğini tespit etmek amacıyla, enjeksiyon tekrarlanabilirliği gerçekleştirilmiştir. Bağlı standart sapma (BSS) değerleri, ($BSS < 0,47$) gün içi ve günler arası kesinlik için metodun iyi tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermiştir.

Çizelge 3.9. Rasajilin YPSK Kesinlik Testi Sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
Zaman	Rasajilin, %	Zaman	Rasajilin, %
Başlangıç	100,2	1.Gün	100,6
30.Dakika	101,0		100,6
1.Saat	100,2		100,6
2.Saat	100,3	2.Gün	99,5
5.Saat	100,5		99,6
10.Saat	100,4		99,5
		3.Gün	100,2
			100,3
			100,3
$\bar{X}$	100,4	$\bar{X}$	100,1
SS	0,284	SS	0,475
% BSS	0,282	% BSS	0,474

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.2.2.6. YPSK Yöntemi Rasajilin Analizi İçin Analitik Veriler ($y=n+mc$ denklemi için)

Kalibrasyon eğrisi elde etmek amacıyla değişik Rasajilin konsantrasyonlarında kromatogramlar kaydedilmiştir. Her konsantrasyon için, ölçümler en az 3 kez gerçekleştirilmiştir. YPSK yöntemi için doğrusallık, Rasajilin ve Psödoefedrin HCl

pik alanlarının oranı ile iyi bir korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi Çizelge 3.10.'da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Rasajilin YPSK analitik veriler ($y=n+mc$ denklemi için)

Konsantrasyon aralığı, µg/mL	39 - 117
Ölçüm sayısı	15
Eğim (m)	1.46
Eğim (m) standart hata	0,005549
Kesişim (n)	$7,55 \times 10^{-3}$
Kesişim (n) standart hata	0,005886
Regresyon (R^2)	0,9999
Korelasyon Katsayısı (r)	0,9999
Tespit Limiti, µg/ mL	0,3
Ölçüm Limiti, µg/ mL	1,0

3.2.2.7. YPSK Yönteminin Doğruluğu

YPSK Yöntemi için doğruluk değerleri tayin edilmiştir. Ortalama geri kazanım ve BSS sonuçları % 99,9 ve % 0,49 olarak tespit edilmiştir. Tayin koşulları Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Rasajilin YPSK Doğruluk Testi Sonuçları

	Numune	Rasajilin Konsantrasyonu (µg /ml)	Geri Kazanım, %
1	% 50	39	100,7
2	% 50	39	100,6
3	% 50	39	100,3
4	% 75	59	100,0
5	% 75	59	100,1
6	% 75	59	100,1
7	% 100	78	100,0
8	% 100	78	99,8
9	% 100	78	99,9
10	% 125	98	99,5
11	% 125	98	99,9
12	% 125	98	99,4
13	% 150	117	99,3
14	% 150	117	99,2
15	% 150	117	99,1
$\bar{X}$			99,9
SS			0,49
BSS %			0,49

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.2.2.8. YPSK Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması

YPSK yöntemi Rasajilinin farmasötik dozaj formlarının tayinine uygulanmıştır. İlacın (Azilect® Tablet 1 mg) geri kazanımı için tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Rasajilinin farmasötik dozaj formlarındaki YPSK sonuçları
(% İçerik)

Numune no	İçerik, %
1	99,6
2	99,7
3	98,8
4	99,5
5	99,9
$\bar{x}$, %	99,5
SS	0,42
BSS%	0,43

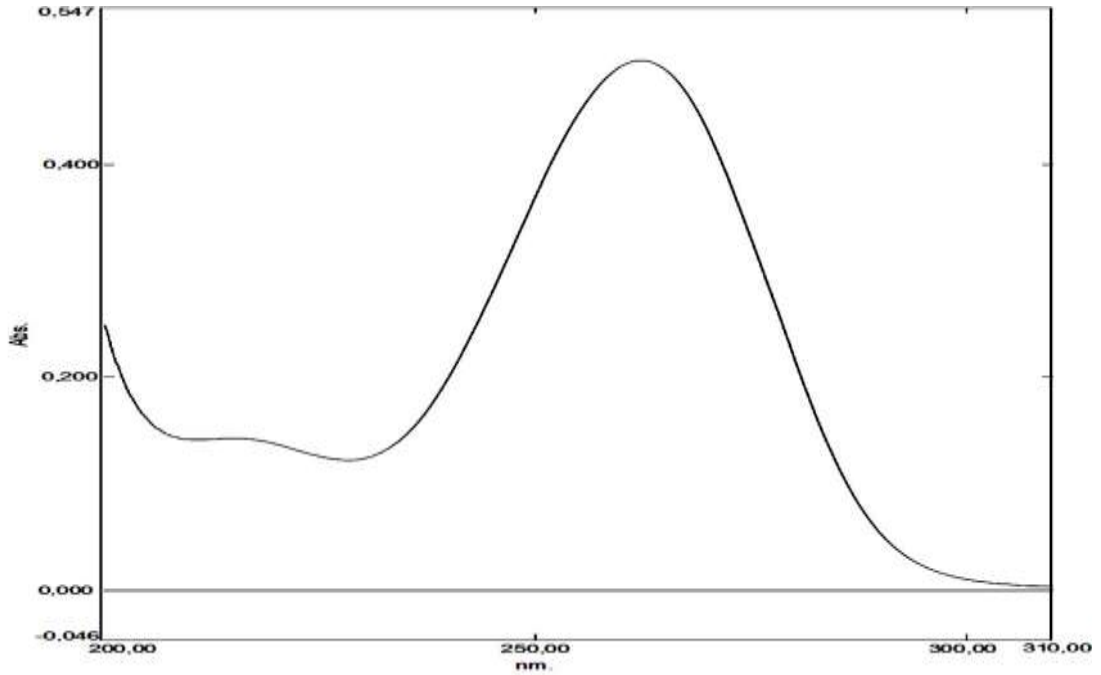
$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.3. Pramipeksol Dihidroklörür Monohidrat için Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları

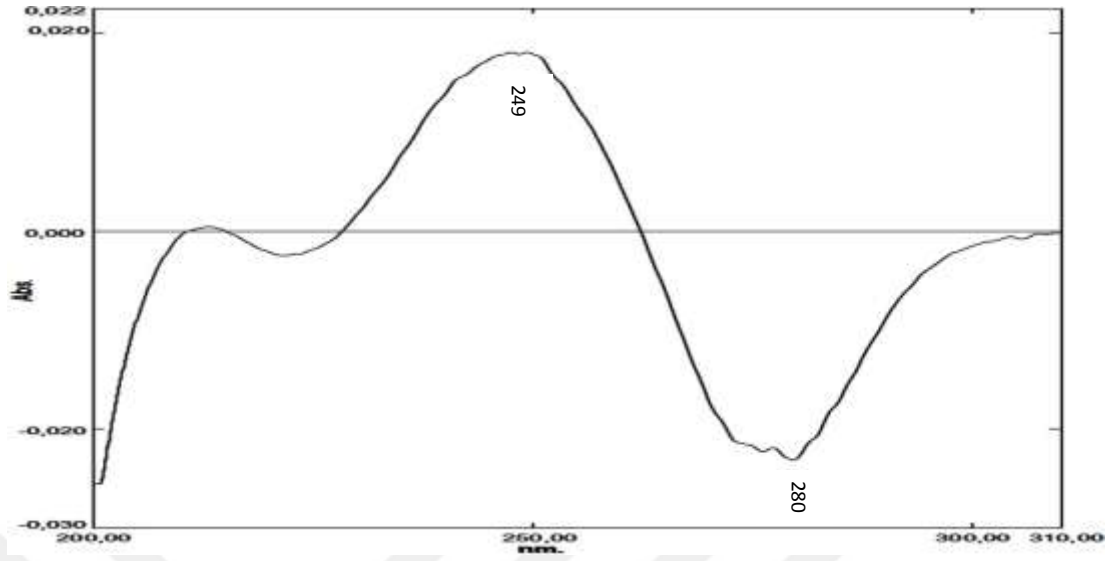
3.3.1. Spektrofotometrik Yöntem

3.3.1.1. Spektrofotometrik Yöntemin Geliştirilmesi

Hassas bir spektrofotometrik Türev yönteminin geliştirilmesi için, hassasiyet, girişim olmaması, hazırlık kolaylığı, ilaç içeriğinin tayini ve maliyet uygunluğundan dolayı çözücü olarak 0,1 N HCl seçilmiştir. 0,1 N HCl çözeltisi içinde, doğrudan UV spektrumu ve Pramipeksolün Birinci Türev spektrumu sırasıyla Şekil 3.11 ve 3.12’de gösterilmiştir. Yardımcı maddelerden gelen geniş bant katılımlarını çıkarmak ve pik çakışmalarına neden olan girişimden dolayı Pramipeksol tayini için Türev spektrofotometri tekniği seçilmiştir. Pramipeksol için farklı dizilerin Türev spektrumları çalışılmış ve deneysel sonuçlar uygun hassasiyetle Birinci Türev spektrumları, iyi tanımlanmış pikleri 249 ve 280 nm civarında verdiğini göstermiştir.



Şekil 3.11. 0,1 N HCl içerisindeki Pramipeksol (20,0 µg/mL) için sıfır derece UV spektrumu



Şekil 3.12. 0,1 N HCl içerisindeki Pramipeksol (20,0 µg/mL) için Birinci Türev spektrumu

3.3.1.2. Türev Spektrofotometri

Birinci Türev spektrofotometrik yöntemin spesifisite parametresi, ilaç maddesinin ve en yaygın olarak kullanılan katkı maddesi karışımının, Türev spektrumu karşılaştırarak eksipiyenlerin girişimini belirlemek için hesaplanmıştır. Elde edilen Türev spektrumları, standart çözelti dışında herhangi bir pik göstermemiştir, bu metodun özgünlüğünü kanıtlamıştır. Çizelge 3.13.'de gösterildiği gibi, elde edilen sonuçlar yardımcı maddelerle hiçbir girişimin olmadığını göstermiştir.

Çizelge 3.13. Pramipeksol spektrofotometrik metodun spesifite testi sonuçları

	Pramipeksol Konsantrasyonu (µg/mL)	Birinci Türev	
		249 nm	280 nm
Plasebo	-	0,000	0,000
Pramipeksol Çalışma Standart	20	0,020	0,026
Numune	20	0,020	0,026

Birinci Türev yöntem çalışmaları değerlendirilmiş ve kesinlik parametresi belirlenmiştir. BSS değerleri hesaplanmış ve sonuçlar yöntemin gün içi ve günler arası iyi tekrarlanabilirlik (<2,72) gösterdiğini kanıtlamıştır.

Çizelge 3.14. Pramipeksol Birinci Türev Kesinlik Testi Sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik			Günler Arası Tekrarlanabilirlik		
	Birinci Türev			Birinci Türev	
Zaman	249 nm	280 nm	Zaman	249 nm	280 nm
	Pramipeksol, %	Pramipeksol, %		Pramipeksol, %	Pramipeksol, %
Başlangıç	102,1	101,9	1.Gün	102,07	101,89
1.Saat	102,1	98,0		102,07	101,89
2.Saat	102,1	98,0		102,07	101,89
3.Saat	102,1	101,9	2.Gün	96,76	105,78
4.Saat	96,8	98,0		102,07	98,00
				96,76	98,00
			3.Gün	102,07	105,78
				102,07	105,78
				102,07	105,78
			4.Gün	96,76	101,89
				102,07	101,89
				96,76	101,89
$\bar{X}$	101,01	99,56	$\bar{X}$	100,30	102,54
SS	2,38	2,13	SS	2,62	2,79
% BSS	2,35	2,14	% BSS	2,61	2,72

$\bar{X}$: Ortalama
 SS : Standart sapma
 BSS : Bağlı standart sapma

Birinci Türev spektrumları ile yaklaşık 249 ve 280 nm 'de kaydedilen sinyallerin Pramipeksol konsantrasyonu ile orantılı olduğu bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, Pramipeksolün değişen konsantrasyonlarındaki spektrumları kaydedilmiştir. Her bir konsantrasyon için, ölçümler, en az üç kez gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Çizelge 3.15.'de özetlenmiştir. Deneysel koşullar altında, önerilen yöntemin duyarlılığını değerlendirmek için LOD ve LOQ, LOD = 3s/m ve LOQ = 10s/m kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.15. Pramipeksol Türev spektrofotometri tekniği için kalibrasyon eğrisi regresyon değerleri

Metod	Birinci Türev Spektrofotometri	
Dalga boyu, nm	249	280
Doğrusallık aralığı (µg/mL)	5 – 35	5 – 35
Ölçüm Sayısı	21	21
Eğim	0,94	1,29
Eğim standart hata	0,028981	0,022282
Kesim noktası	$2,0 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
Kesim noktası standart hata	0,000648	0,000498
Regrasyon R^2	0,9823	0,9943
Korelasyon katsayısı, r	0,9911	0,9971
Tespit limiti (µg/mL)	2,0	1,5
Ölçüm limiti (µg/mL)	6,1	4,5

3.3.1.3. Türev Spektrofotometri Tekniğinin Doğruluğu

Yöntemin doğruluğu, numune çözeltilerine Pramipeksolün bilinen konsantrasyonlarının eklenmesiyle ve daha sonra, ölçülen ve hesaplanan

konsantrasyonların sonuçlarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Birinci Türev spektrofotometri tekniğinin doğruluğu belirlenmiş ve yüzde geri kazanım ile ifade edilmiştir. Elde edilen ortalama geri kazanım ve BSS değerleri Birinci Türev spektrofotometri tekniğinde $<107,6$ ve $<4,36$ olarak bulunmuştur. Tayin koşulları Çizelge 3.16.'da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Pramipeksol tayini optimize edilmiş spektroskopik koşullar

Metod	: UV Spektrofotometrik
Cihaz	: Shimadzu UV-1601
Dedektör	: UV Dedektör
Dalga boyu Aralığı	: 220-300 nm
Zero Order	: 263 nm
Birinci Türev	: (249, 280) nm
Çözücü	: 0,1 N HCl
Standart	: 20,0 µg/mL Pramipeksol çözeltisi
Numune	: 1 Tablet / 50 mL çözücüde

3.3.1.4. Türev Spektrofotometri Tekniğinin Farmasötik Preparata Uygulanması

Birinci Türev spektrofotometri tekniği Pexola® Tablet 1 mg (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Almanya) içindeki Pramipeksol belirlenmesi için uygulanmıştır.

Birinci Türev spektrofotometri yönteminin Pexola® Tablet 1 mg içindeki Pramipeksol dihidroklorür monohidratın kantitatif analiz için uygulama sonuçları Çizelge 3.13'de verilmiştir. Sonuçlar, yöntemin farmasötik ürünlerde Pramipeksol dihidroklorür monohidratın miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.17. Pramipeksolün farmasötik dozaj formlarındaki Birinci Türev spektrofotometri sonuçları
(% İçerik)

Pexola® Tabletlerde Etkin Madde Miktar Tayini			
	Absorbans	1. Türev	
	263,4 nm	249,4 nm	279,8 nm
	%	%	%
Numune 1	99,5	107,4	101,9
Numune 2	99,9	107,4	101,9
Numune 3	99,9	107,4	101,9
Numune 4	98,4	107,4	101,9
Numune 5	99,0	107,4	101,9
$\bar{X}$ %	99,3	107,4	101,9
SS	0,66	0,00	0,00
BSS %	0,67	0,00	0,00

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

3.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (YPSK)

3.3.2.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

YPSK yönteminin geliştirilmesi sırasında, öncelikle uygun bir çözücü ve iç standart seçilmiştir. Pramipeksolün en iyi su içinde çözündüğü ve suyun iç standart Tamsulosin HCl için uygun olduğu da görsel olarak tespit edilmiştir.

Farklı kolonlar değerlendirdikten sonra en uygun olanı seçilmiştir. Bu işlem sırasında, RP₈, C₈, ve C₁₈ kolonlarının Pramipeksol ve IS piklerin ayırıcılığını göstermediği gözlemlenmiştir. En iyi ayırıcılık RP-select B kolonu kullanılarak elde edilmiştir. Önerilen YPSK yöntemini optimize etmek için bütün deney koşulları araştırılmıştır.

Farklı hareketli fazlar denenmiş ve en iyi yüksek performans gösteren hareketli faz seçilmiştir. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (25:75, h/h), hareketli faz olarak kullanıldığında, elde edilen ayırıcılık düşük ve IS ile Pramipeksol pikleri birbirine yakındır. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (50:50, h/h), hareketli faz olarak kullanıldığı zaman, teorik plaka sayısı düşüktür. En iyi kuyruklanma faktörü, ayırıcılık ve teorik plaka sayısını gösteren hareketli faz, 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h) oranındadır.

Hareketli faz oranlarında yapılan değişiklik ile elde edilen veriler aşağıda Çizelge 3.18.'de gösterilmiştir. Sabit fazlar, RP-select B, RP-8, C₈, ve C₁₈ kullanılmıştır. Optimum kromatografik performans Merck LiChrospher 60 RP-Select B (125 x 4,0 mm, 5 µm) kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 3.13.). Diğer sabit fazlarda, sistem uygunluk parametrelerinin tayini simetrik ve düzgün olmayan pikler halinde başarısız bulunmuştur.

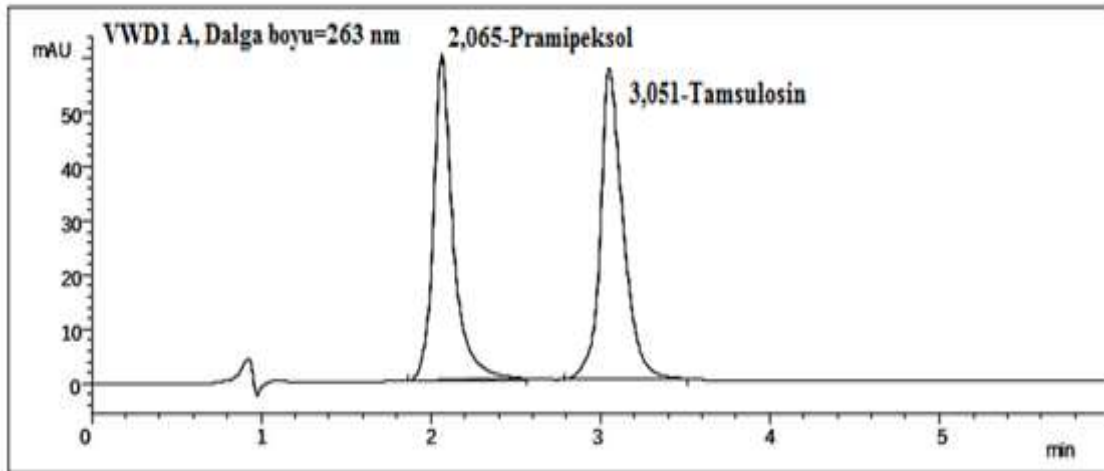
Pramipeksol pik performans değerlendirmesi Şekil 3.14' de verilmiştir.

Çizelge 3.18. Pramipeksol YPSK Analitik Metod Geliştirme

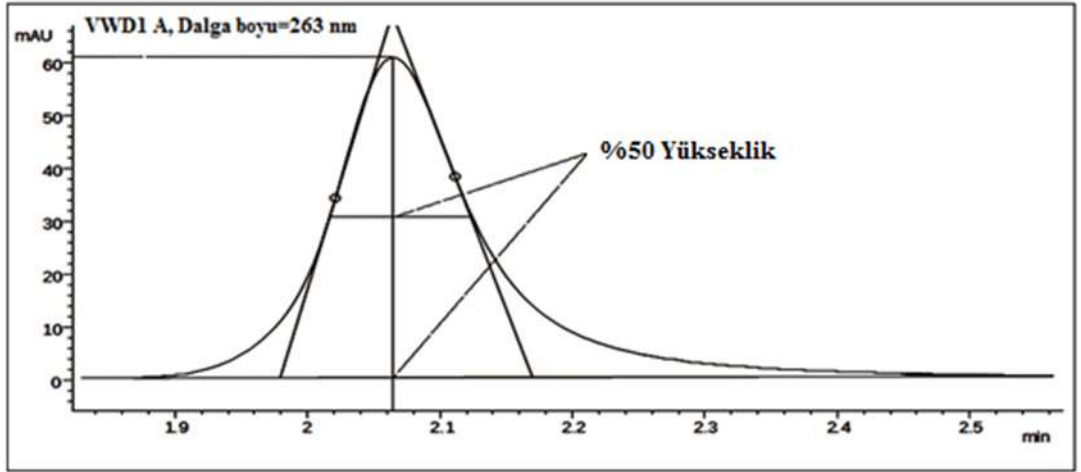
Varyasyonlar	Pramipeksol/ İS Alıkonma zamanı	Pramipeksol/İ S Alan/Oran	Kapasite faktörü	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Ayırıcılık
Hareketli faz (0,01 M AA:ACN 25:75, h/h)	2,63 / 3,07	0,87	4,26	1,46	2497	2,03
Hareketli faz (0,01 M AA:ACN 35:65, h/h) (Orijinal)	2,07 / 3,05	0,90	3,13	1,40	2071	4,87
Hareketli faz (0,01 M AA:ACN 50:50, h/h)	1,77 / 3,86	0,83	2,54	1,36	1145	7,87

Çizelge 3.19. Pramipeksol tayini için optimize edilmiş kromatografik koşullar

Metod	YPSK
Cihaz	Agilent YPSK 1200
Dedektör	UV
Kolon	: Lichrospher 60 RP Select B 125x4.0mm, 5µm
Dalga boyu	: 263 nm
Akış Hızı	: 1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Kolon Sıcaklığı	: 25 °C
Hareketli Faz	: 0,01 M Amonyum asetat (pH:4.4): Asetonitril (35:65, h/h)
Çözücü	: ISTD çözelti (100.0 µg/mL tamsulosin HCl suda)
Kalibrasyon Eğrisi	: (10,0 – 30,0) µg/mL /çözücü (beş çözelti)
Standart	: 20,0 µg/mL / çözücü
Numune	: 1 Tablet / 50 mL çözücü
Analiz süresi	: 6 dk.



Şekil 3.13. IS olarak Tamsulosin HCl içeren Pramipeksol Kromatogramı



Şekil 3.14. Pramipeksol Pik Performans Değerlendirme

3.3.2.2. YPSK Yönteminin Sağlamlığı - Farklı pH, Farklı Hareketli Faz Akış Hızı

Önerilen yöntemin sağlamlığı, pH'ın 4,35 ila 4,45 arasında değiştirilmesiyle kromatografik koşullar üzerinde hiçbir etkisi olmaması sonucu ile değerlendirilmiştir. Hareketli fazın akış hızı 0,8 ve 1,2 mL/dk arasında değiştirilmiştir. Akış hızı 0,8 mL'ye düşürüldüğü zaman alıkonma süresi 2,58 dk.'ya çıkmış, akış hızı 1,2 mL/dk.'ya çıkarıldığı zaman alıkonma süresi 1,72 dk.'ya düşmüştür. Her bir parametre, 3'er numune ile çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. Pramipeksol YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları (farklı pH, farklı hareketli faz akış hızı)

Parametre	Pramipeksol alıkonma zamanı	Pramipeksol/IS alan	Kapasite Faktörü	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Ayırıcılık	Pramipeksol Alan % BSS
Hareketli faz 0,01 M AA pH; 4,35	1,96	0,94	2,91	1,30	2041	4,92	0,76
Hareketli faz 0.01 M AA pH; 4,40 (Orijinal)	1,96	0,93	2,92	1,31	2047	4,95	0,30
Hareketli faz 0,01 M AA pH; 4.45	1,96	0,92	2,92	1,31	2052	4,87	0,63
Hareketli faz Akış hızı: 0,8 mL/dk	2,58	0,94	4,15	1,39	2142	5,43	0,81
Hareketli faz Akış hızı: 1,0 mL/min (Orijinal)	2,06	0,94	3,12	1,36	2043	5,25	0,24
Hareketli faz Akış hızı: 1,2 mL/dk	1,72	0,94	2,43	1,33	1674	4,99	1,12

3.3.2.3. YPSK Metodunun Sağlamlığı - Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilesi

Analitik Çözeltilerin (standart ve numune çözeltileri) stabilesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar, oda sıcaklığında (30°C) 48 saatlik bir süre boyunca, standart çözeltideki Pramipeksolün miktarındaki değişimin %0,36 ve plasebo içeren numune çözeltisindeki Pramipeksolün miktarındaki değişimin %0,17 olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki Çizelge 3.21’de gösterilmiştir.



Çizelge 3.21. Pramipeksol YPSK Sağlamlık Testi Sonuçları

	STANDART Pramipeksol Alanı, (mAU)	% Değişim	STANDART İç standart Alanı (mAU)	% Değişim	NUMUNE Pramipeksol Alanı (mAU)	% Değişim	NUMUNE İç standart alanı (mAU)	% Değişim
Başlangıç	499,3	-	529,6	-	515,3	-	544,6	-
3. saat	498,2	0,22	530,5	0,17	514,7	0,12	544,4	0,04
6. saat	497,8	0,30	532,7	0,58	516,9	0,31	546,2	0,29
12. saat	497,4	0,38	529,9	0,06	514,9	0,08	544,2	0,07
24. saat	498,6	0,14	530,5	0,17	514,6	0,14	544,6	0,00
48. saat	497,5	0,36	530,8	0,23	514,4	0,17	544,7	0,02
$\bar{X}$	498,1		530,6		515,1		544,8	
SS	0,70		1,09		0,92		0,71	
BSS (%)	0,14		0,20		0,18		0,13	

$\bar{X}$: Ortalama

SS : Standart sapma

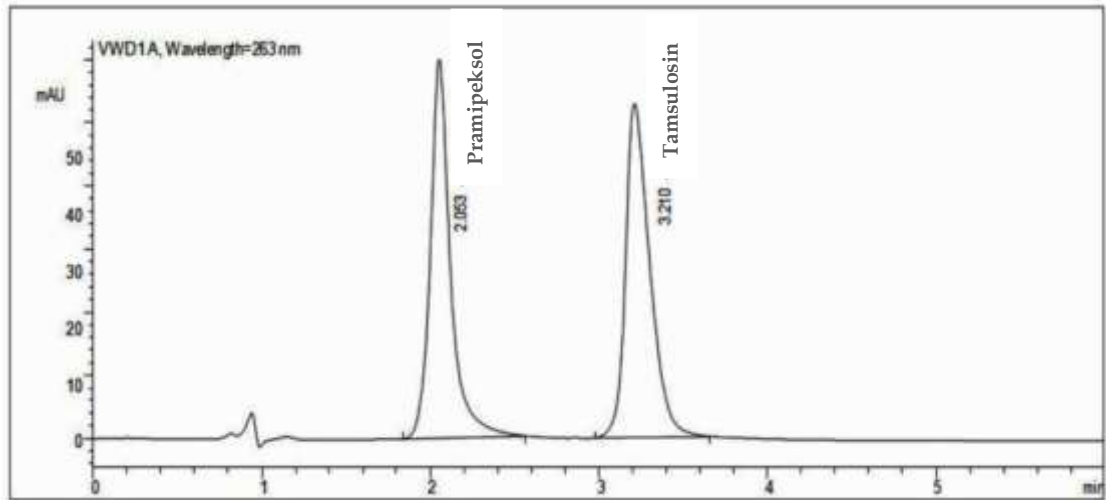
BSS : Bağıl standart sapma

3.3.2.4. YPSK Yönteminin Seçiciliği

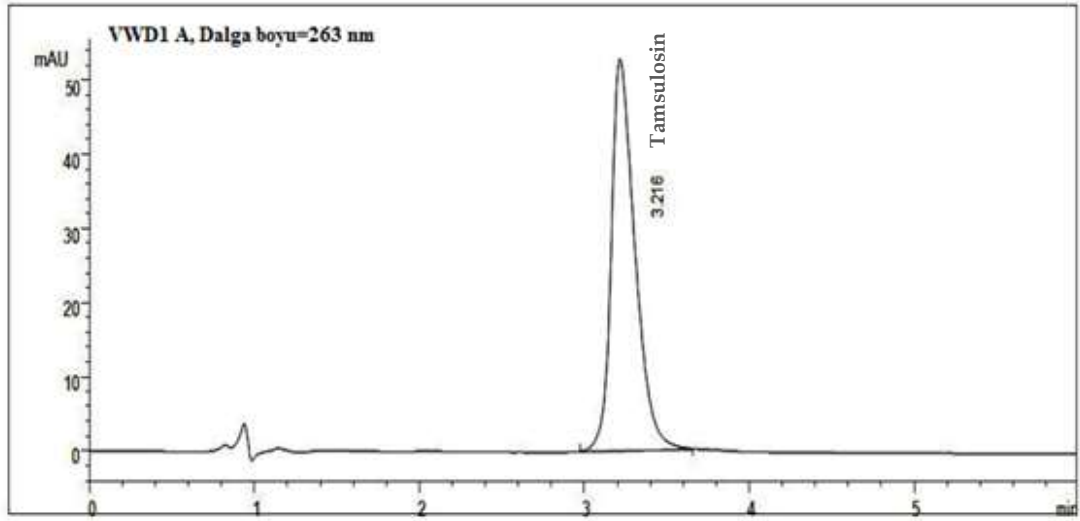
YPSK yönteminde seçicilik parametresi, ilaç maddesinin ve en yaygın olarak kullanılan ekşiyanların karışımının kromatogramları karşılaştırarak, ekşiyanların girişiminin tespit edilmesi için analiz edilmiştir. Çizelge 3.22’de gösterildiği gibi, elde edilen sonuçlar, ekşiyanlardan hiçbir girişim olmadığını ortaya koymuştur. IS içeren standart çözelti, plasebo karışımı ve farmasötik üründen elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 3.15., 3.16. ve 3.17.’ de verilmiştir.

Çizelge 3.22. Pramipeksol YPSK Seçicilik Testi Sonuçları

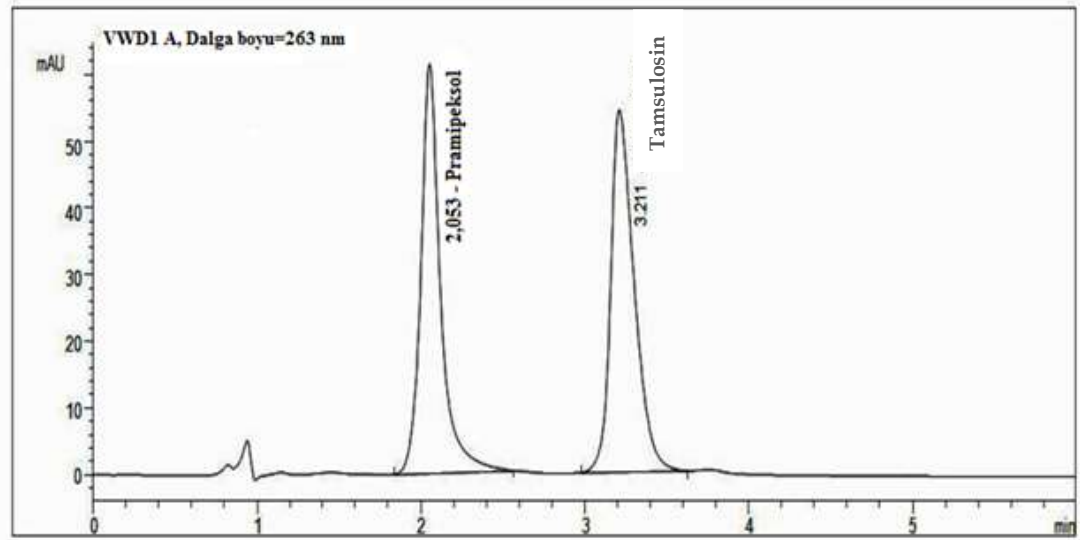
	Pramipeksol konsantrasyon, µg/mL	İS (Tamsulosin HCl) konsantrasyon, µg/mL	YPSK alıkonma zamanı (R _t), dk	YPSK alan değerleri, mAU
Hareketli Faz	-	-	-	-
İç standart	-	100	3,22	531,5
Plasebo	-	100	3,22	529,2
Pramipeksol çalışma standardı	20	100	2,05 3,21	500,5 530,4
Numune	20	100	2,05 3,21	513,4 542,1



Şekil 3.15. Pramipeksol ve iç standart çözeltilerini içeren karışımın kromatogramı



Şekil 3.16. Plasebo kromatogramı



Şekil 3.17. Farmasötik ürün kromatogramı

3.3.2.5. YPSK Yönteminin Kesinliği - Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik

YPSK metodunun kesinliği, Pramipeksol standart çözeltilerinin tekrarlanabilirlik (gün içi) ve yeniden üretilebilirlik (günler arası) parametresi ile belirlenmiştir. Ayrıca, YPSK metodunun performansını doğrulamak için enjeksiyon tekrarlanabilirliği gerçekleştirilmiştir. Hesaplanan BSS değerleri, yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik için iyi tekrarlanabilirlik ($< 0,77$) gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlar YPSK yönteminin yüksek kesinliğini doğrulamıştır.

Çizelge 3.23. Pramipeksol YPSK Kesinlik Testi Sonuçları

Gün İçi Tekrarlanabilirlik		Günler Arası Tekrarlanabilirlik	
Zaman	Pramipeksol, %	Zaman	Pramipeksol, %
Başlangıç	99,3	1.Gün	99,0
30.Dakika	99,3		98,9
1.Saat	99,1		98,8
2.Saat	99,1	2.Gün	98,6
5.Saat	99,1		98,5
10.Saat	99,1		98,6
		3.Gün	97,4
			97,1
			97,2
$\bar{X}$	99,2	$\bar{X}$	98,2
SS	0,09	SS	0,76
% BSS	0,09	% BSS	0,77

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma

3.3.2.6. YPSK Yöntemi ile Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat Analizi İçin Analitik Veriler ($y=n+mc$ denklemi için)

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, Pramipeksolün değişen konsantrasyonlarındaki kromatogramları kaydedilmiştir. Her bir konsantrasyon için, ölçümler, en az 3 kez gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Çizelge 3.24.'de verilmiştir. Deneysel koşullar altında, önerilen yöntemin duyarlılığını değerlendirmek için LOD ve LOQ, $LOD = 3s/m$ ve $LOQ = 10 s/m$ kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.24. Pramipeksol YPSK analitik veriler ($y=n+mc$ denklemi için)

Dalga boyu, nm	263
Doğrusallık aralığı (µg/mL)	10 – 30
Ölçüm sayısı	15
Eğim(m)	4,74
Eğim(m) standart hata	0,034388
Kesişim(n)	$5,6 \times 10^{-4}$
Kesişim(n) standart hata	0,007295
Regresyon, R²	0,9997
Tespit Limiti (ng/mL)	8
Ölçüm Limiti (ng/mL)	50

3.3.2.7. YPSK Yönteminin Doğruluğu

YPSK metodunun doğruluğu, numune çözeltilerine Pramipeksolün bilinen konsantrasyonlarının eklenmesiyle ve daha sonra, ölçülen ve hesaplanan konsantrasyonların sonuçlarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. YPSK metodunun doğruluğu yüzde geri kazanım ile ifade edilmiştir. YPSK tekniğinde elde edilen ortalama geri kazanım %100,5 ve BSS %1,10 olarak bulunmuştur. Tayin koşulları Çizelge 3.19’da verilmiştir.

Çizelge 3.25. Pramipeksol YPSK Doğruluk Testi Sonuçları

	Numune	Pramipeksol Dihidroklörür Monohidrat Konsantrasyon (µg /ml)	% Geri Kazanım
1	% 50	10	100,7
2	% 50	10	98,1
3	% 50	10	100,1
4	% 75	15	100,2
5	% 75	15	98,9
6	% 75	15	100,7
7	% 100	20	102,2
8	% 100	20	99,6
9	% 100	20	99,8
10	% 125	25	101,0
11	% 125	25	100,8
12	% 125	25	101,2
13	% 150	30	101,5
14	% 150	30	102,0
15	% 150	30	100,7
$\bar{X}$			100,5
SS			1,1
BSS %			1,1

3.3.2.8. YPSK Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması

YPSK metodu, Pexola® Tablet 1 mg (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Almanya) içindeki Pramipeksolün belirlenmesi için uygulanmıştır.

YPSK metodunun Pexola® Tablet 1 mg içindeki Pramipeksolün kantitatif analizi için uygulama sonuçları Çizelge 3.26.'da verilmiştir. Sonuçlar yöntemin farmasötik ürünlerde Pramipeksolün miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.26. Pramipeksol farmasötik dozaj formlarındaki YPSK sonuçları

Pexola [®] Tabletlerde Etkin Madde Miktar Tayini (% İçerik)	
Numune 1	99,4
Numune 2	99,3
Numune 3	99,3
Numune 4	97,6
Numune 5	100,2
$\bar{X}$ %	99,2
SS	0,97
BSS %	0,97

$\bar{X}$: Ortalama
SS : Standart sapma
BSS : Bağlı standart sapma

4. TARTIŞMA

4.1. Rasajilin Mesilat Tayini için YPSK ve Spektrofotometrik Çalışmalar

Farmasötik dozaj formlarında Rasajilin analizi için uygulaması basit ve ekonomik olan kantitatif analiz yöntemleri geliştirmek amaçlanmıştır.

Çalışmalara başlamadan önce Rasajilin saflık kontrolleri yapılmıştır. Orchid Chemicals'tan temin edilen etken madde için IR spektrumu alınmış ve erime noktası tayin edilmiştir. Elde edilen spektrum ve bulunan erime noktası, etken maddenin yeterli saflıkta olduğunu göstermiştir. Etken maddenin en iyi çözündüğü ortamı belirlemek amacıyla çeşitli çözücü ortamları (metanol, su, 0,1 N HCl) denenmiş ve en iyi çözücü ortamı 0,1 N HCl olarak belirlenmiştir. Rasajilin en iyi çözündüğü ortamda (0,1 N HCl) UV spektrofotometrede 220-300 nm dalga boyu aralığında tarama yapılarak maksimum absorbansları; 264,0 nm ve 270,4 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 3.5.). Birinci Türev değerleri; 262,0 nm, 266,0 nm, 269,2 nm, 271,9 nm (Şekil 3.6.) ve İkinci Türev değerleri; 264,3 nm, 267,9 nm, 270,5 nm, 273,0 nm (Şekil 3.7.) dalga boylarında tespit edilmiştir. Türev spektrofotometrik hesaplamalar için, regresyon denklemleri Birinci Türev için 262, 266, 269 ve 272 nm'de ve İkinci Türev için 264, 268, 271 ve 273 nm'de en küçük kareler metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Doğrusal regresyon analizi sonuçları, bütün kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayılarının 0,9944'ten büyük olduğunu göstermiştir. Önerilen yöntem için hesaplanan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı bu yöntemlerin tamamı için iyi doğrusallık göstermiştir. Kalibrasyon eğrilerinin karakteristiği Çizelge 3.1.'de verilmiştir. LOD değeri Birinci Türev yöntemi kullanıldığında 269 nm'de 9 µg/mL olarak bulunmuş, İkinci Türev yöntemi kullanıldığında 271 nm'de 7 µg/mL olarak bulunmuştur. LOQ değeri Birinci Türev yöntemi kullanıldığında 269 nm'de 27 µg/mL olarak bulunmuş, İkinci Türev yöntemi kullanıldığında 271 nm'de 21 µg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1.).

Regresyon ve korelasyon katsayıları 1'e yakındır. Rasajilinin Birinci ve İkinci Türev dalga boylarında doğrusal olduğu ve önerilen yöntemin duyarlı olduğu ispatlanmıştır.

Türev spektrofotometrik tekniklerin doğruluk değerleri tayin edilmiştir. Ortalama geri kazanım ve BSS sonuçları <%104,5, <%2,77 Birinci Türev için, <%105,3, <%2,81 İkinci Türev spektrofotometri teknik için tespit edilmiştir.

Türev spektrofotometrik teknikler Rasajilinin farmasötik dozaj formlarının tayinine uygulanmıştır. İlacın geri kazanımı için tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Tez kapsamında Rasajilin için önerilen ikinci kantitatif analiz yöntemi YPSK'dır.

YPSK yöntem geliştirme çalışmalarında çeşitli değişkenlerin pik şekli, alıkonma zamanı, ayrıcılık ve aynı zamanda uygun IS üzerinde etkisi incelenmiştir. Sabit fazlar: ODS (oktadesilsilil), C₈ ve C₁₈ hareketli faz (değişik oranlarda asetonitril: su: perklorik asit) ile birlikte kullanılmıştır. En iyi kromatografik performans Hichrom ACE-5 C₁₈ 100 x 4,6 mm, 5 µm ve (250:750:5, h/h/h) oranında asetonitril: su: perklorik asit karışımından oluşan hareketli faz kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 3.8.). Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'de verilmiştir. Kullanılan yöntemin kararlılığının değerlendirilmesi açısından, “uygun sabit faz ve hareketli faz oranı”, sistem uygunluk parametrelerdeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesi açısından önemlidir. Sabit faz Hichrom ACE-5 C₁₈ 100 x 4,6 mm, 5 µm ile, elde edilen kromatogramlarda gerekli ayrışma ve sistem uygunluk parametrelerinin sağlandığı görülmüştür. Aynı şekilde (250:750:5, h/h/h) oranında asetonitril: su: perklorik asit karışımından oluşan hareketli faz kompozisyonunun, sistem uygunluk parametresinin sağlandığının göstergesi, analitik yöntemin sağlamlığını göstermiştir.

Girişim etkisinin olmaması ve çalışma koşullarındaki iyi cevabı sebebiyle Psödoefedrin HCl IS olarak seçilmiştir. En iyi seçicilik ve hassasiyeti belirlemek ve Rasajilin ve Psödoefedrin HCl'i tayin etmek amacıyla elüsyon işlemi tüm UV bölgesinde kontrol edilmiştir. En büyük cevabı veren 210 nm dalga boyu tespit edilmiştir.

Kromatografik koşullardan hareketli faz akış hızı ve pH değerinde kasıtlı varyasyon yapılmıştır. 3,00 pH civarında $\pm 0,05$ birim değişiminin olması ve bunun da kromatografik ayırım üzerinde bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Rasajilin 7,4 olan pK_a değerinden daha küçük pK_a değerine sahip 3,00 $\pm 0,05$ pH değerindeki hareketli faz, tuz oluşumunu bozmamıştır. Akış hızı 0,8 – 1,2 mL/dk aralığında değiştirilmiştir; akış hızı 0,8 mL'ye indirildiğinde alıkonma süresi 4,56 dk.'ya çıkarken, akış hızının 1,2 mL'ye çıkarılması alıkonma süresini 3,04 dk.'ya düşürmüştür. Akış hızındaki bu büyük değişiklik alıkonma süresinde dikkate değer bir değişim yaratmamıştır. Sonuçlar Çizelge 3.6.'da sunulmuştur.

Analitik çözeltilerin (standart ve numune) stabilitesi test edilmiştir. Oda sıcaklığında (30°C), 48 saatlik bir periyot içinde, standart çözeltideki Rasajilin miktarının değişiminin %0,31, Rasajilin ve plasebo içeren numune çözeltisindeki Rasajilin miktarı değişiminin %0,24 olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

Yöntemin seçiciliği, etkin madde ve en sık kullanılan ekşiپیانların karışımından elde edilen kromatogramlar kıyaslanarak incelenmiştir. Tablet içerisinde bulunan yardımcı maddelerin yöntemi etkilemediği ve hiçbir girişimin olmadığı Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

YPSK yönteminin kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) için Rasajilin standart çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, YPSK cihazının kesinliğini tespit etmek amacıyla, enjeksiyon tekrarlanabilirliği

gerçekleştirilmiştir. Bağlı standart sapma (BSS) değerleri, ($BSS < 0,47$) gün içi ve günler arası kesinlik için yöntemin iyi tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermiştir.

Kalibrasyon eğrisi için değişik Rasajilin konsantrasyonlarında kromatogramlar ve spektrumlar kaydedilmiştir. YPSK yöntemi için doğrusallık, Rasajilin ve Psödoefedin HCl pik alanlarının oranı ile iyi bir korelasyon katsayısı ile elde edilmiştir. YPSK metodu Rasajilin analizi için analitik veriler ($y=n+mc$ denklemi için) Çizelge 3.10.'da verilmiştir.

YPSK yöntemi için doğruluk değerleri tayin edilmiştir. Ortalama geri kazanım ve BSS sonuçları %99,9 ve %0,49 olarak tespit edilmiştir. Tayin koşulları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Önerilen Türev spektrofotometrik teknikler ve YPSK yöntemi Azilect® 1 mg Tablet (Lundbeck İlaç Tic. Ltd. Şti.) adlı Rasajilin içeren farmasötik preparata başarıyla uygulanmıştır. Rasajilin için optimize edilmiş kromatografik ve spektroskopik koşullar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Rasajilin tayini için optimize edilmiş kromatografik ve spektroskopik koşullar

Metod	YPSK	Metod	UV Spektrofotometri
Cihaz	Agilent YPSK 1200	Cihaz	Shimadzu UV-1601
Dedektör	UV	Dedektör	UV
Kolon	ACE-5 C ₁₈ 100 x 4,6 mm, 5 µm / Hichrom	Dalga Boyu Aralığı	220-300 nm
Dalga Boyu	210 nm	Birinci Türev	262, 266, 269, 272 nm
Akış Hızı	1 mL/dk	İkinci Türev	264, 268, 271, 273 nm
Enjeksiyon Hacmi	10 µL	-	-
Kolon Sıcaklığı	30 °C	-	-
Hareketli Faz	ACN:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h), pH 3,0	-	-
Çözücü	İS çözeltisi (50,0 µg/mL Psödoefedrin HCl suda)	Çözücü	0,1 N HCl
Standart	78,0 µg/mL Rasajilin çözeltisi	Standart	156 µg/mL Rasajilin çözeltisi
Numune	1 Tablet / 20 mL çözücünde	Numune	1 Tablet / 10 mL çözücünde
Analiz süresi	5 dakika	Analiz Süresi	1 dakika

4.2. Pramipeksol Dihidroklorür Monohidrat Tayini için YPSK ve Spektrofotometrik Çalışmalar

Farmasötik ürünlerde Pramipeksol miktarını belirlemekte hızlı, kesin, basit ve ekonomik olan analiz yöntemleri geliştirmek amaçlanmıştır. YPSK ve Türev spektrofotometri ile Pramipeksolün farmasötik ürünlerde tayini konusunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalara başlamadan önce Pramipeksolün saflık testleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için IR spektrumu alınarak ve erime noktası test edilerek referanslar ile mukayese yapılmıştır. Elde edilen spektrum ve bulunan erime noktası, etken maddenin yeterli saflıkta olduğunu göstermiştir.

Hassas bir spektrofotometrik Türev yönteminin geliştirilmesi için, hassasiyet, girişim olmaması, hazırlık kolaylığı, ilaç içeriğinin tayini ve maliyet uygunluğundan dolayı çözücü olarak 0,1 N HCl seçilmiştir. 0,1 N HCl çözeltisi içinde, doğrudan UV spektrumu ve Pramipeksolün Birinci Türev spektrumu sırasıyla Şekil 3.11. ve 3.12.'de gösterilmiştir. Yardımcı maddelerden gelen geniş bant katılımlarını çıkarmak ve pik çakışmalarına neden olan girişimden dolayı Pramipeksol tayini için Türev spektrofotometri tekniği seçilmiştir. Pramipeksol için farklı dizilerin Türev spektrumları çalışılmıştır. Deneysel sonuçlar Birinci Türev spektrumları, iyi tanımlanmış pikleri 249 ve 280 nm civarında verdiğini göstermiştir.

Birinci Türev spektrofotometrik yöntemin spesifisite parametresi incelenirken, ilaç maddesinin ve en yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinin karışımının Türev spektrumları karşılaştırılarak eksipyanların girişim verip vermediği incelenmiştir. Elde edilen Türev spektrumları standart çözelti dışında herhangi bir pik göstermemiştir, bu da yöntemin özgünlüğünü kanıtlamıştır. Çizelge 3.13'de görüldüğü gibi, elde edilen sonuçlar yardımcı maddelerle hiçbir girişimin olmadığını göstermiştir.

Birinci Türev yöntem çalışmaları değerlendirilmiş ve kesinlik parametresi belirlenmiştir. BSS değerleri hesaplanmış ve sonuçlar metodun gün içi ve günler arası iyi tekrarlanabilirlik ($<2,72$) gösterdiğini kanıtlamıştır.

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, Pramipeksolün değişen konsantrasyonlarındaki spektrumları 249 ve 280 nm’de kaydedilmiştir. Her bir konsantrasyon için, ölçümler, en az 3 kez gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Çizelge 3.15.’de verilmiştir.

Yöntemin doğruluğu, numune çözeltilerine Pramipeksolün bilinen konsantrasyonlarının eklenmesiyle ve daha sonra, ölçülen ve hesaplanan konsantrasyonların sonuçlarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Birinci Türev spektrofotometri tekniğinin doğruluğu belirlenmiş ve yüzde geri kazanım ile ifade edilmiştir. Elde edilen ortalama geri kazanım ve BSS değerleri Birinci Türev spektrofotometri tekniğinde $<107,6$ ve $<4,36$ olarak bulunmuştur. Tayin koşulları Çizelge 3.16.’da verilmiştir.

Birinci Türev spektrofotometri tekniği Pexola® Tablet 1 mg (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Almanya) içindeki Pramipeksolün belirlenmesi için uygulanmıştır.

Uygulama sonuçları Çizelge 3.17.’de verilmiştir. Sonuçlar yöntemin farmasötik ürünlerde Pramipeksolün miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

YPSK yönteminin geliştirilmesi sırasında, öncelikle uygun bir çözücü ve IS seçilmiştir. Pramipeksolün en iyi su içinde çözüldüğü ve suyun IS Tamsulosin HCl için uygun olduğu tespit edilmiştir. Farklı kolonlar değerlendirdikten sonra en uygun olanı seçilmiştir. Bu işlem sırasında, RP₈, C₈, ve C₁₈ kolonlarının Pramipeksolün ve iç standart piklerin ayırtıcılığını göstermediği gözlemlenmiştir. En iyi ayırtıcılık RP-select B kolonu kullanılarak elde edilmiştir. Farklı hareketli fazlar denenmiş ve en iyi yüksek

performans gösteren hareketli faz seçilmiştir. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (25:75, h/h) hareketli faz olarak kullanıldığında, elde edilen ayırıcılık düşük ve IS ile Pramipeksol pik noktaları birbirine yakın bulunmuştur. 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (50:50, h/h) hareketli faz olarak kullanıldığı zaman, teorik plaka sayısı düşük bulunmuştur. En iyi kuyruklanma faktörü, ayırıcılık ve teorik plaka sayısını gösteren hareketli faz, 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h) oranındadır.

Hareketli faz oranlarında değişiklik ile ilgili elde edilen sonuçlar Çizelge 3.18.'de gösterilmiştir. Sabit fazlar, RP-select B, RP-8, C₈, ve C₁₈ kullanılmıştır. Optimum kromatografik performans Merck LiChrospher 60 RP-Select B (125 x 4,0 mm, 5 µm) kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 3.13.). Diğer sabit fazlarda, sistem uygunluk parametrelerinin tayini simetrik ve düzgün olmayan pikler halinde başarısız bulunmuştur.

Pramipeksol pik performans değerlendirmesi Şekil 3.14' de verilmiştir.

Önerilen yöntemin sağlamlığı, pH'ın 4,35 ila 4,45 arasında değiştirilmesiyle kromatografik koşullar üzerinde hiçbir etkisi olmaması sonucu ile değerlendirilmiştir. Hareketli fazın akış hızı 0,8 ve 1,2 mL/dk arasında değiştirilmiştir. Akış hızı 0,8 mL'ye düşürüldüğü zaman alıkonma süresi 2,58 dk.'ya çıkmış, akış hızı 1,2 mL/dk.'ya çıkarıldığı zaman alıkonma süresi 1,72 dk.'ya düşmüştür. Sonuçlar Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

YPSK yönteminin sağlamlığı, analitik çözeltilerin (standart ve numune çözeltileri) stabilitesi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, oda sıcaklığında (30°C) 48 saatlik bir süre boyunca, standart çözeltideki Pramipeksolün miktarındaki değişimin % 0,36 ve plasebo içeren numune çözeltisindeki Pramipeksolün miktarındaki değişimin % 0,17 olduğu görülmüştür. Sonuçlar Çizelge 3.21.'de verilmiştir.

YPSK yönteminde seçicilik parametresi, ilaç maddesinin ve en yaygın olarak kullanılan eksipiyenlerin karışımının kromatogramları karşılaştırılarak, eksipiyenlerin girişiminin tespit edilmesi için analiz edildi. Çizelge 3.22.'de gösterildiği gibi, elde edilen sonuçlar eksipiyenlerden hiçbir girişim olmadığını ortaya koymuştur.

YPSK yönteminin kesinliği, Pramipeksolün standart çözeltilerinin tekrarlanabilirlik (gün içi) ve yeniden üretilebilirlik (günler arası) parametresi ile belirlenmiştir. Ayrıca, YPSK metodunun performansını doğrulamak için enjeksiyon tekrarlanabilirliği gerçekleştirilmiştir.

Hesaplanan BSS (bağıl standart sapma) değerleri, yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik için iyi tekrarlanabilirlik ($< 0,77$) gösterdiğini ortaya koymuştur.

YPSK yöntemi ile Pramipeksol analizindeki analitik veriler ($y=n+mc$ denklemi) için, Pramipeksolün değişen konsantrasyonlarındaki kromatogramları ve spektrumları kaydedilmiştir. Her bir konsantrasyon için, ölçümler, en az 3 kez gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Çizelge 3.24.'de verilmiştir.

YPSK yönteminin doğruluğu, numune çözeltilerine Pramipeksolün bilinen konsantrasyonlarının eklenmesiyle ve daha sonra, ölçülen ve hesaplanan konsantrasyonların sonuçlarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. YPSK yönteminin doğruluğu yüzde geri kazanım ile ifade edilmiştir. Elde edilen ortalama geri kazanım ve BSS değerleri sırasıyla, YPSK tekniğinde %100,5 ve %1,10 olarak bulunmuştur. Tayin koşulları Çizelge 3.19.'da verilmiştir.

YPSK yöntemi, Pexola® Tablet 1 mg (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Almanya) içindeki Pramipeksolün belirlenmesi için uygulanmıştır. Kantitatif analiz için uygulama sonuçları Çizelge 3.26.'da verilmiştir. Sonuçlar yöntemin farmasötik ürünlerde Pramipeksolün miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Pramipeksol tayini için geliştirilmiş ve optimize edilmiş kromatografik ve spektroskopik parametreler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Pramipeksol tayini için optimize edilmiş kromatografik ve spektroskopik koşullar

Metod	YPSK	Metod	UV Spektrofotometri
Cihaz	Agilent YPSK 1200	Cihaz	Shimadzu UV-1601
Dedektör	UV	Dedektör	UV
Kolon	Lichrospher 60 RP Select B 125x4,0 mm, 5µm	-	-
Dalga boyu	263 nm	Dalga boyu	263 nm
Akış hızı	1 mL/dk	Birinci Türev	249 nm, 280 nm
Enjeksiyon hacmi	20 µL	-	-
Kolon sıcaklığı	25 °C	-	-
Hareketli faz	0,01 M Amonyum asetat (pH:4,4):asetonitril (35:65,h/h)	-	-
Çözücü	IS çözelti (100.0 µg/mL tamsulosin HCl suda)	Çözücü	0,1 N HCl
Kalibrasyon eğrisi	(10,0 – 30,0) µg/mL/çözücü (5 çözelti)	Kalibrasyon eğrisi	(5,0 – 35,0) µg/mL/çözücü (7 çözelti)
Standart	20,0 µg/mL /çözücü	Standart	20,0 µg/mL/çözücü
Numune	1 Tablet / 50 mL çözücü	Numune	1 Tablet/50 mL çözücü
Analiz süresi	6 dk	Analiz süresi	1 dk

Geliştirilen yöntemler ilaçlara uygulandığında elde edilen sonuçlar, referans yöntem olarak kabul edilen YPSK yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Yapılan t-testi sonucunda yöntemlerin sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.3. ve 4.4.' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Rasajilin t-testi sonuçları

	Birinci Türev		YPSK
	269 nm	271 nm	
Ortalama	100,0	98,7	99,5
Standart Sapma	1,43	1,14	0,42
Numune Sayısı	5	5	5
Student's (t-test) (2,015)	0,184782	0,08771	-

Çizelge 4.4. Pramipeksol t-testi sonuçları

	Doğrudan UV	Birinci Türev		YPSK
	263,4 nm	269,4 nm	279,8 nm	
Ortalama	99,3	107,4	101,9	99,2
Standart Sapma	0,66	0	0	0,97
Numune Sayısı	5	5	5	5
Student's (t-test) (2,015)	0,323381	2,08x10 ⁻⁵	0,001489	-

Geliştirilen spektrofotometrik ve YPSK yöntemleri, daha önce geliştirilmiş yöntemlerle LOD, LOQ ve doğrusal çalışma aralıkları açısından karşılaştırılmıştır. Rasajilin ve Pramipeksol için literatürdeki LOD, LOQ ve çalışma aralıkları Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Elde edilen veriler geliştirilen yöntemlerin duyarlı sonuçlar verdiklerini göstermektedir.

Çizelge 4.5. Rasajilin ve Pramipeksol için literatürdeki LOD, LOQ ve çalışma aralığı

KAYNAK	LOD		LOQ		Çalışma Aralığı	
DEVALA. R.G. ve arkadaşları (2011).	Spektrofotometrik		Spektrofotometrik		Spektrofotometrik	
	Yöntem A	Yöntem B	Yöntem A	Yöntem B	Yöntem A	Yöntem B
	0,07 µg/mL	0,2 µg/mL	0,05 µg/mL	0,165 µg/mL	4-40µg/ml	1-10 µg/ml
FERNANDEZ, M. ve arkadaşları (2009).	YPSK		YPSK		YPSK	
	0.07 µg/mL		0.23 µg/mL		0.5-20.0 µg/mL	
LAKSHMÎ, M.V. ve arkadaşları (2010).	YPSK		YPSK		YPSK	
	0.010 µg/mL		0.028 µg/mL		10-125 µg/ml	
ARMAĞAN, Ö. (2011).	Spektrofotometrik	Spektroflorimetrik	Spektrofotometrik	Spektroflorimetrik	Spektrofotometrik	Spektroflorimetrik
	2,08 ng/mL	0,074 ng/mL	6,95 ng/mL	0,274 ng/mL	(2.0 – 250) µg mL ⁻¹	(0.1- 3.0) µg mL ⁻¹
BABU, G.S. ve arkadaşları (2007).	Birinci Türev Spektrofotometri		Birinci Türev Spektrofotometri		Birinci Türev Spektrofotometri	
	2,0 ng/mL / 249 nm		6,1 ng/mL / 249nm		5-35 µg/mL	
	1,5 ng/mL / 280 nm		4,5 ng/mL / 280nm			
THANGABALAN ve arkadaşları (2011a).	Spektrofotometre		Spektrofotometre		Spektrofotometre	
	Brom krezol yeşili (BCG)	Bromtimol mavisi (BTB)	Brom krezol yeşili (BCG)	Bromtimol mavisi (BTB)	5-25 µg/mL	
	0.401µg/ mL	0.418 µg/ mL	1.215 µg/mL	1.267 µg/mL		
THANGABALAN ve arkadaşları (2011b).	Spektrofotometre		Spektrofotometre		Spektrofotometre	
	Yöntem A ; 1.395 µg/ mL		Yöntem A ; 4.227 µg/ mL		Yöntem A ; 10 - 50 µg/ml	
	Yöntem B ; 2.034 µg/ mL		Yöntem A ; 6.164 µg/ mL		Yöntem B ; 5 – 40 µg/ml;	
MANISH, Y. ve arkadaşları (2010).	YPSK		YPSK		YPSK	
	10 ng/mL		25 ng/mL		10–10000 ng/mL	
MUSENGA, A. ve arkadaşları (2008).	YPSK		YPSK		YPSK	
	10 ng/mL		25 ng/mL		5.0-1000 ngmL(-1)	
SRINUBABU, G. ve arkadaşları (2006).	YPSK		YPSK		YPSK	
	1.3577 µg		4.5 µg		5–40 µg mL ⁻¹	

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında Rasajilin ve Pramipeksol içeren farmasötik dozaj formlarında etken madde miktar tayini için uygulaması basit ve ekonomik olan YPSK ve Türev spektrofotometrik teknikler kullanılarak farklı yöntemler geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Önerdiğimiz yöntemler farmasötik preparatlara başarı ile uygulanmıştır.

Geliştirilmiş yöntemler, sağlamlılık, seçicilik, doğrusallık, kesinlik ve doğruluk için ICH (Q2B, 1996) ve FDA (2000) guidelines (ICH Q2B,1996; FDA,2000)'a göre valide edilmiştir.

Rasajilin içeren Azilect® 1 mg Tablet adlı ürüne Birinci Türev UV spektrofotometri uygulandığında;

262 nm'de standart sapma değeri 1,66 ve bağıl standart sapma 1,62;
266 nm'de standart sapma değeri 0,00 ve bağıl standart sapma 0;00;
269 nm'de standart sapma değeri 1,43 ve bağıl standart sapma 1,43;
272 nm'de standart sapma değeri 0,70 ve bağıl standart sapma 0,69 olarak saptanmıştır.

Azilect® 1 mg Tablet adlı ürüne İkinci Türev UV spektrofotometri uygulandığında;

264 nm'de standart sapma değeri 0,74 ve bağıl standart sapma 0,73;
268 nm'de standart sapma değeri 0,87 ve bağıl standart sapma 0,86
271 nm'de standart sapma değeri 1,14 ve bağıl standart sapma 1,15;
273 nm'de standart sapma değeri 1,07 ve bağıl standart sapma 1,05 olarak saptanmıştır.

Azilect® 1 mg Tablet adlı ürüne YPSK yöntemi uygulandığında, ilacın geri kazanımı %99,5, standart sapma 0,42 ve bağıl standart sapma 0,43 olarak hesaplanmıştır.

Pramipeksol içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için, doğrudan UV spektrofotometri, Birinci Türev UV spektrofotometri ve YPSK yöntemleri uygulanmıştır.

Pramipeksol içeren Pexola® Tablet 1 mg adlı ürüne doğrudan UV spektrofotometri uygulandığında;

263,4 nm’de ilacın geri kazanımı %99,3, standart sapma 0,66 ve bağıl standart sapma 0,67;

Pexola® Tablet 1 mg adlı ürüne Birinci Türev UV spektrofotometri uygulandığında;

249,4 nm’de ilacın geri kazanımı %107,4, standart sapma 0,00 ve bağıl standart sapma 0,00,

279,8 nm’de ilacın geri kazanımı %101,9, standart sapma 0,00 ve bağıl standart sapma 0,00 olarak saptanmıştır.

Pexola® Tablet 1 mg adlı ürüne YPSK metodu uygulandığında, ilacın geri kazanımı %99,2, standart sapma 0,97 ve bağıl standart sapma 0,97 olarak hesaplanmıştır.

Tezimiz kapsamında yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurularak önerilen tüm yöntemlerin hızlı, basit, doğru ve hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmadan uygulanabilen yöntemler olduğunu düşünmekteyiz. Önerilen tüm yöntemlerin farmasötik preparatlara başarı ile uygulanmasıyla amacımıza ulaşmış bulunmaktayız.

Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerinin miktar tayinleri için geliştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemler ve spektrofotometrik analiz yöntemlerini içeren iki ayrı makale uluslararası dergilerde yayınlanmıştır.

- Applications of High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Techniques for Determination of Rasagiline Mesylate in Dosage Forms.

ISSN 1061-9348, Journal of Analytical Chemistry, 2015, Vol. 70, No. 5, pp. 600-607. Pleiades Publishing, Ltd., 2015.

- Validation of High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Determination of the Antiparkinson Agent Pramipexole Dihydrochloride Monohydrate in Pharmaceutical Products.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences Vol. 51, No. 4, 2015
<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-825020150004000??>

ÖZET

Rasajilin ve Pramipeksol içeren Farmasötik Dozaj Formlarında Etken Maddelerin Spektrofotometrik ve YPSK Metodları İle Miktar Tayini

Bu tez çalışması kapsamında, Rasajilin ve Pramipeksol etken maddelerinin miktar tayinleri için hızlı, basit, ekonomik, duyarlı ve seçici spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemler analiz yöntemleri geliştirilmiş ve bu yöntemler ticari farmasötik dozaj formlarına da uygulanmıştır.

Rasajilin en iyi çözündüğü ortamda (0,1 N HCl) UV spektrofotometrede 220-300 nm dalga boyları arasında tarama yapılarak maksimum absorpsiyonları; 263,9 nm ve 270,4 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Birinci Türev değerleri; 262,0 nm, 265,9 nm, 269,2 nm, 271,9 nm ve İkinci Türev değerleri; 264,3 nm, 267,9 nm, 270,5 nm, 273,0 nm dalga boylarında tespit edilmiştir. Birinci Türev ve İkinci Türev Lineer regresyon kalibrasyon eğrisi 39-273 µg/mL Rasajilin konsantrasyon aralığında doğrusaldır.

Rasajilin YPSK analizi 210 nm dalga boyu, 1 mL/dk akış hızı, hareketli faz içeriği % 25'lik amonyak ile pH 3,0'e ayarlanmış ACN:Su:Perklorik Asit (250:750:5, h/h/h) çözelti karışımının C₁₈ kolon (100 x 4.6 mm x 5 µm) üzerinden pompalanması ile gerçekleştirilmiştir. YPSK metodunda lineer regresyon kalibrasyon eğrisi 39-117 µg/mL Rasajilin konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Lineer regresyon eşitliği $y = 1,46545x + 7,55322 \cdot 10^{-3}$, tespit limiti (LOD) 0,31 µg/mL ve ölçüm limiti (LOQ) 1,01 µg/mL olarak bulunmuştur.

Birinci yöntemde Pramipeksol tayini için spektrofotometrik teknik Birinci Türevde 249 ve 280 nm'de Türev absorpsiyon değeri ölçülerek yapılmıştır. Birinci Türev tekniğinde absorpsiyon ve konsantrasyon grafiği, tespit limiti 1,5 ng/mL ve ölçüm limiti 4,5 ng/mL ile 5,0 - 35,0 µg/mL aralığında doğrusaldır.

Pramipeksol için ikinci yöntem, iç standart olarak tamsulosin HCl kullanılan YPSK yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde, kromatografik ayırma 263 nm'de 1,0 mL/dk akış hızıyla, 25°C'de, bir Lichrospher 60 RP kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eluent 0,01 M amonyum asetat (pH 4,4) ve asetonitril (35:65, h/h)'den oluşmuştur. Doğrusallık 10,0-30,0 µg/mL aralığında $100,5 \pm 1,10$ ortalama geri kazanım ile bulunmuştur. Tespit limiti (8 ng/mL) ve ölçüm limiti (50 ng/mL) değerleri hesaplanmıştır.

Geliştirilen ve ICH (Q2B, 1996) ve FDA (2000) guidelines'a göre valide edilen yöntemler farmasötik ürünlerde Rasajilin ve Pramipeksol miktarının belirlenmesinde başarılı olmuştur.

Anahtar sözcükler: Anti-Parkinson ajan, Rasajilin Mesilat, Pramipeksol dihidroklorür monohidrat, Türev spektrofotometri, Yüksek performanslı sıvı kromatografi.

SUMMARY

Quantitative Determination of Rasagiline and Pramipexole Active Drug Substances into Pharmaceutical Dosage Forms with Spectrophotometric Method and HPLC

With the scope of this thesis; quick, simple, economical, sensitive and selective high-performance liquid chromatography and spectrophotometric analysis methods have been developed for quantitative determination of Rasagiline and Pramipexole active drug substances and been applied to commercial dosage forms.

Maximum absorbances were measured at 263,9 nm and 270,4 nm wavelengths in the medium where rasagiline best resolved (0,1 N HCl) by UV spectrophotometry scanning at 220-300 nm. First derivative values are determined at 262 nm, 265,9 nm, 269,2 nm, 271,9 nm wavelengths and Second derivation values are determined at 264,3 nm, 267,9 nm, 270,5 nm, 273 nm wavelengths. First and second derivative linear regression calibration curve is linear at 39-273 µg/mL Rasagiline concentration range.

Rasagiline HPLC analysis is realized by using a C18 column (100 x 4.6mm x 5µm) at 210 nm and 25% ammonium, pH 3.0 ACN-Water-Perchloric acid (250:750:5 h/h/h) mixture at a flow rate of 1 mL/min is used as mobile phase. At HPLC method, linear regression calibration curve is linear at 39-117 µg/mL Rasagiline concentration range. Linear regression equation is found as $y = 1,46545x + 7,55322 \cdot 10^{-3}$, LOD (Limit of detection) 0,31 µg/mL and LOQ (Limit of Quantification) 1,01 µg/mL.

In the first method, the first derivative spectrophotometric technique the determination of pramipexole dihydrochloride monohydrate was acquired by measuring the amplitude at 249 and 280 nm. The concentration and absorbance plot were rectilinear over the range of 5,0-35,0 µg/mL with a lower detection limit of 1,5 ng/mL and quantification limit of 4,5 ng/mL in the first derivative technique.

The second method for pramipexol was based on the high-performance liquid chromatography using an internal standard which is tamsulosin HCl. Chromatographic separation was obtained by using a Lichrosper 60 RP column at 25°C and 0,01 mol/L ammonium acetate (pH:4.4): acetonitrile (35:65 by volume) as the eluent, at a flow rate of 1,0 mL/min at 263 nm in this method. The linearity range was determined as 10,0-30,0 µg/mL with mean recovery $100,5 \pm 1,10$. Limit of quantification (50 ng/mL) and limit of detection (8 ng/mL) were calculated.

The developed and validated (according to ICH (Q2B,1996) and FDA (2000) guidelines) methods were successful in finding the quantity of rasagiline and pramipexole in pharmaceutical products.

Keywords: Anti-Parkinson agent, Rasagiline, Pramipexol dihydrochloride monohydrate, Mesylate, Derivative spectrophotometry, High-performance liquid chromatography.

KAYNAKLAR

- AIST (2014) Integrated Spectral Database System of Organic Compound. (Data were obtained from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology-Japan)
- ANALİTİK KİMYA LABORATUVAR FÖYÜ (1999). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın No: 80, s. 176-180
- ARMAĞAN, Ö. (2011). Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of some drugs containing secondary amino group in bulk drug and dosage forms via derivatization with 7-chloro-4-nitrobenzofurazon. *Quim Nova*, **34(4)**: 677-682.
- AZILECT® 1 mg Tablet Kısa Ürün Bilgisi, 2019. Available at: <https://titck.gov.tr/storage/kubKtAttachments/D3BkI53y3TTCC.pdf>. Accessed on: 2019.
- BABU, G.S., RAJU, C.A.I. (2007). Spectrophotometric determination of pramipexole dihydrochloride monohydrate, *Asian J Chem*, **19(1)**: 816-818.
- BUKKA, R. AND KARWA, P. (2010). UV spectrophotometric method for the determination of Rasagiline Mesylate in bulk and pharmaceutical formulations, *Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **5(1)**: 5-7.
- CHANG-HAI, L., QING-YAN, S., CHUN-QUAN, S., HAI, Z., JUN, C., LIANG, Z., YI-FENG, C. (2009). Capillary electrophoresis for analysis of optical impurity of L-pramipexole. *AJSMMU*, **30(9)**: 1058-1061.
- DEVALA, R.G., KATHIRVEL, S., SATYANARAYANA, S.V. (2011). Simple spectrophotometric methods for the determination of rasagiline mesylate in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Res.*, **4(1)**: 61-62.
- EL-BAYOUMI, A.E., BADAWY, A.M., KAFOU, A., EL-GHASEM, H. (2009). Stability-indicating spectrophotometric, densitometric and YPSK methods for determination of pramipexole in dosage forms. *B-FOPCU*, **47(3)**: 1-11.
- EL-SHERIF, Z.A., ABDEL-FATTAH, L.S., EL-HOUSSINI, O. M. (2008). Micro determination of pramipexole dihydrochloride in bulk powder and in tablets. *B-FOPCU*, **46(3)**: 1-13
- FERNANDEZ, M., BARCIA, E., AND NEGRO, S. (2009). Rasagiline mesylate biodegradable PLGA microspheres, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49(5)**: 1185-1191.

Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070489.pdf>. Accessed on: June 2013.

GÜMÜŞTAŞ, K. Biyokimyada Spektroskopik Teknikler. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Fatih-İstanbul
Erişim:<http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notları/mustafa-koray-gumustas/Spektra%20Teknikler%20Ders.doc> Erişim tarihi:29.05.2017

GURUPADAYYA, B. M., VISHWAJITH, V., SRUJANA, N. (2009). Spectrophotometric methods for the estimation of pramipexole dihydrochloride in pharmaceutical formulations. *World J Chem*, **4(2)**: 157-160.

HUA, L., XIAOYAN, C., XIAOJIN, S., YAN, Z., MINGKANG Z., ZHONGDONG, L., DAFANG, Z. (2011). LC-MS/MS determination of pramipexole in human plasma. *Yaowu, Fenxi, Zazhi*, **31(2)**: 330-335.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH. Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Step 4. ICH, 1996. Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, Accessed on: July 2012.

JANCIC, B., MEDENICA, M., IVANOVIC, D., MALENOVIC, A. (2007a). Chromatographic determination of dissociation constants of pramipexole and its impurities. *Chromatographia*, **65(9/10)**: 633-635.

JANCIC, B., MEDENICA, M., IVANOVIC, D., MALENOVIC, A. (2007b). Experimental design in chromatographic analysis of pramipexole and its impurities, *Acta Chim Slov*, **54(1)** :49-54

KAMIENSKA-DUDA, A., KOSMACINSKA, B. (2008). Determination of chromatographic purity of pramipexole dichydrochloride monohydrate - methods comparison, *Przem Chem*, **87(7)**: 796-799

LAKSHMI, M.V., RAO, S. and RAO, A. L. (2010). Development and validation of RP-YPSK method for the estimation of rasagiline tablet dosage forms, *Rasayan. J. Chem.*, **3(4)**: 621-624.

LIPING, T., JING, Y., MIAOMIAO, X., ZHONGYING, M., ZHIRUI, W., AND AIDONG, W. (2010). Determination of rasagiline mesilate in human plasma by LC-MS/MS and study on its pharmacokinetics, *Zhongguo Yaofang*, **21(38)**: 3598-3600.

MA, J., CHEN, X., DUAN, X., DENG, P., WANG, H., ZHONG, D. (2008). Validated LC-MS/MS method for quantitative determination of rasagiline in human plasma and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, **873(2)**: 203-208.

- MALENOVIC, A., JANCIC B., VEMIC, A., DARKO, I., MEDENICA, M. (2010). Validation of a column liquid chromatographic method for the analysis of pramipexole and its 5 impurities, *J AOAC Int*, **93(4)**: 1102-1112.
- MANISH, Y., RAJASEKHAR, R., HERMAL, K., JAYSUKH, R., RAKESH, P., PURAN S., SHRIVASTAV P.S. (2010). Validated ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of pramipexole in human plasma. *J Chromatogr Sci*, **48(10)**: 811-818.
- MELOUN, M., FERENCIKOVA, Z., VRANA, A. (2010). Thermodynamic dissociation constants of rasagiline by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH titration data. *J. Chem. Eng. Data.*, **55(8)**: 2707-2713.
- MUSENGA, A., ERNST, K., EMANUELE, M., RASI, F., RAGGI, M.A. (2008). Analysis of the anti-Parkinson drug pramipexole in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chim Acta*, **626(1)**: 89-96.
- O'NEIL, M.J., HECKELMAN, P.E., KOCH, C.B., KRISTIN, J.R. (2006). *The Merck Index*. 14.ed. White House Station, NJ: Merck and Co Inc, . p.7705.
- PANCHAL, J.G., PATEL, R.V., MENON, S.K. (2011). Development and validation of GC/MS method for determination of pramipexole in rat plasma. *Biomed Chromatogr*, **25(4)**: 524-530.
- PEXA XR 3.75 Mg Uzatılmış Salımlı Tablet Kısa Ürün Bilgisi, 2019. Available at: https://titck.gov.tr/storage/Archive/2019/kubKtAttachments/ONAYLIKÜB3,75.pdf_de0bf545-82af-44c3-9b4e-99b210f24377.pdf. Accessed on: 2019.
- PHYSICIANS' DESK REFERENCE® (2009). Rasagiline Mesylate Tablet Full Prescribing Information. <http://www.pdr.net/full-prescribinginformation/azilect?druglabelid=567>. Accessed February 20, 2000.
- PHYSICIANS' DESK REFERENCE®. (2009). Pramipexole dihydrochloride full prescribing information. Available at: <http://www.pdr.net/drug-information/mirapex?druglabelid=1745>. Accessed on: Apr. 2013.
- RAMAKRISHNA, N.V.S., VISHWOTTAM, K., WISHU, S., KOTESHWARA, M., SANTOSH, M., DEVENDER, A. (2007). Quantification of pramipexole in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry using tamsulosin as internal standard. *Biomed Chromatogr*, **21(11)**: 1151-1158.
- RANI, B.S., REDDY, P.V. (2007). New spectrophotometric methods for the determination of Pramipexole in bulk and pharmaceutical dosage forms, *Acta Cienc. Indica Chem*, **33(1)**: 9-11.

- RANI, B. S., REDDY, P.V. (2006). New spectrophotometric methods for the determination of pramipexole in pharmaceutical dosage forms, *Acta Cienc Indica Chem*, **32(4)**: 317-320.
- RAO, S., KUMAR, D.A., MASTANAMMA, S., SRILAKSHMI, K. (2009). Estimation of pramipexole by an RP-YPSK method, *J Chem Sci*, **7(4)**: 2789-2794.
- RX MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı 2012.
- RX MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı 2017.
- SHUHUI, M. (2010). High performance liquid chromatography (YPSK) method for analyzing and separating pramipexole dihydrochloride and optical isomer thereof. CN Pat.101769902.
- SHULMAN, JM., De JAGER, PL., FEANY, MB. (February 2011) [25 October 2010]. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual review of pathology* 6:193-222.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (1997). *Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition*. Ed: Kılıç, E., Köseoglu, F., Yılmaz, H. Bilim Yayıncılık, Ankara.
- SONG, M., WANG, L., ZHAO, H., HANG, T., AIDONG W., YANG, L., JIA, L. (2008). Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Assay development, validation and application to a human pharmacokinetic study. *J. Chromatogr., B: Biomed.* **875(2)**: 515-521.
- SRINUBABU, G., JAGANBABU, K., SUDHARANI, B., VENUGOPAL, K., GIRIZASANKAR, G., RAO, J.V.L.N.S. (2006). Development and validation of a LC method for the determination of pramipexole using an experimental design, *Chromatographia*, **64(1-2)**: 95-100.
- SUGUNA, T., SARAVAN, C., RAJ, S.V., GAYATHRI, S., TAMIZH, M.M. (2011). Method development and validation for determination of methane sulphonic acid in Rasagiline Mesylate drug substance by ion chromatography with suppressed conductivity detector, *Pharmacia Sinica*, **2(2)**: 68-73.
- SYEDA, H., AKALANKA, D. APPALA, R.S., SYED, S. (2010). Gradient Ultra Fast Liquid Chromatographic analysis of and its application to drug quality control, *Der Pharm Lettre*, **2(4)**: 315-325.
- TARSY, Daniel. Parkinson disease treatment options — medications (Beyond the Basics), <http://www.uptodate.com/contents/parkinson-disease-treatment-options-medications-beyond-the-basics?view=print>. Erişim tarihi: 03.08.2015.

- THANGABALAN, B., KUMAR, P., LAVANYA, G., INTIAZ, S., DEEPTI, C., MANOHAR, B.S., KUMAR, P.V. (2011a). Extractive spectrophotometric determination of pramipexole dihydrochloride in pure and pharmaceutical formulations, *JPR*, **4(3)**: 813-814.
- THANGABALAN, B., VAMSI, K.M., RAVITEJA, N.V.R., HAJERA, B.S.K., MANOHAR B.S., KUMAR, V.P. (2011b). Spectrophotometric methods for the determination of pramipexole dihydrochloride in pure and in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **3**: 84-85.
- VARMA, M.V.S., KAUSHAL, A.M., GARG, S. (2004) Rapid and selective UV spectrophotometric and RP-YPSK methods for dissolution studies of Oxybutynin immediate release and controlled release formulations. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **36(3)**: 669-674.
- VIJAYA, B.D., KUMAR, H.K., VIDYA, S.P.V., KUMAR, S.S., NAIDU, A., RAMESH, M. (2009). Development and validation of a sensitive LC-MS/MS method with electrospray ionization for quantitation of pramipexole in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study, *Biomed chromatogr*, **23(2)**: 212-218.
- YILDIZ, A., GENÇ, O. (1993). Ultraviyole ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi. Enstrümantal Analiz Yöntemleri, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64.
- ZHONGYING, M., YI, Q., LIN, L., AIDONG, W. (2011) Study on determination of rasagiline mesylate in human plasma and its pharmacokinetics by LC-MS/MS, *Zhongguo Yaoshi Wuhan*, **14(3)**: 353-355.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı :Serpil
Soyadı :Sevim
Doğum Yeri ve Tarihi :İğdır - 10.08.1972
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi : Bağlar Cad. Üzümcü Sok. No:1/10 Seyranbağları
Çankaya– ANKARA
Telefon : 0312 257 08 94 (ev)
0555 971 78 30 (GSM)

II- Eğitimi

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik
Kimya Anabilim Dalı- Tezsiz yüksek lisans
2001-2004
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü- 1990-1996
Yabancı Dil : İngilizce

III- Ünvanları

Bilim Uzmanı- 2004
Kimyager -1996

IV- Mesleki Deneyimi

12 / 2003 - Dinçsa İlaç San. ve Tic. A.Ş. / ANKARA
Mesul Müdür
08 / 2003 – 12 / 2003 Novagenix Biyoanalitik İlaç AR-GE A.Ş. / ANKARA
Laboratuvar Uzmanı
08/ 2002 – 08 / 2003 Dinçsa İlaç San. ve Tic. A.Ş. / ANKARA
Mesul Müdür ve Üretim Müdürlüğü

- 11 / 1998 – 08 / 2002** Dinçsa İlaç San. ve Tic. A.Ş. / ANKARA
Kalite Kontrol Sorumlusu
- 12 / 1997 – 10 / 1998** Yenişehir Laboratuvarı / ANKARA
Kalite Kontrol Sorumlusu
- 06 / 1997 – 10 / 1997** Aytemizler Tekstil Ltd. Şti. / ANKARA
Boyahane Sorumlusu

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Klinik Araştırmalar Derneği - Bükreş Sok. No:3/18 Kavaklıdere/Ankara-
Türkiye
Telefon: 0(312) 426 4747

Kimyagerler Derneği - Atatürk bulvarı İzmir-2 Cad. Turtes İşhanı No :34/626
Kat:6
Çankaya/Ankara Telefon: 0542 476 3227

Kontrollü Salım Sistemleri Derneği – Tomurcuk Sok., İzmen Sitesi, B1 Blok,
D :76 Mecidiyeköy/İstanbul Telefon: (0212) 4400272

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

1. Serpil Sevim, Nevin Erk (2015) Applications of High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Techniques for Determination of Rasagiline Mesylate in Dosage Forms. Journol of Analytical Chemistry, 70(5), 600-607, ISSN 1061-9348,
2. Serpil Sevim, Nevin Erk (2015) Validation of High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Determination of the Antiparkinson Agent Pramipexole Dihydrochloride Monohydrate in Pharmaceutical Products. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 51(4), <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-825020150004000>
3. Serpil Sevim, Cem Yücesoy (2004) Etken Maddeden Ticari Ürüne İlaç Üretiminde Kimyasal Analizin Önemi.

Poster Sunumları:

Serpil Sevim, Nevin Erk, ‘‘ Farmasötik preparatlar içerisindeki Pramipeksolün miktar tayini için geliştirilen spektrometrik ve kromatografik iki yöntemin karşılaştırılması’’ XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 29-31 Mayıs 2015, Elazığ, Türkiye

VII- Bilimsel Etkinlikleri**Seminerler:**

1. UPSK (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) Validasyonu (2010).
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı
2. Gaz Kromatografi ve Uygulamaları (2010)
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı

VIII- Diğer Bilgiler**Mesleki Eğitim ve Sertifikalar:**

- 16th International Pharmaceutical Technology Symposium (Smart Technologies For Drug Delivery) SEMPOZYUM 2012
- Bilgisayar Sistem Validasyonu, 06-08.11.2012, Poq
- URS ve Kalifikasyon, 27.09.2012, The Swiss Consulting
- İlaç Endüstrisinde Komünikasyon Ve İletişim Teknikleri, 25.09.2012. The Swiss Consulting
- CPHI Frankfurt, Almanya / Frankfurt 2011
- Toksik Maddelerden Korunma Yöntemi, 29.09.2011, Sem Ltd. Şti
- Analitik Metotların Fda/Usp/Ich ‘a Göre Validasyonu, 26-07.01.2011, Academia Yaşam Bilimleri Merkezi
- Ölçüm Belirsizliği Hesaplama, 24-25.05.2011, Türk Standartları Endüstrisi
- Gmp Ve Temizlik Validasyon Eğitimi; Academia 23.08.2010-24.08.2010
- ISO 9001 : 2008 İç Tetkikçi Eğitimi, TÜV (11-12/03/2010)
- ISO 9001 : 2000 Dokümantasyon, TÜV (10/03/2010)
- ISO 9001 : 2000 Dokümantasyon Temel Eğitimi, TÜV (04-05/03/2010)
- Drug Research and Development, Hacettepe Üniversitesi (04-07/05/2009)

- International Symposium On Drug Research And Development "From Chemistry To Medicine" & Educational Fair On "Glp And Laboratory Safety: New Approaches"; Magum 04.05.2009-07.05.2009
- HACCP Gıda Güvenliği Yönetim Sistemleri, HACCP Gıda Güvenlik Sistemi Uzmanı Kim. Müh. A.Şükrü Genç (25-27/11/2004)
- USP Dissolüsyon Temelleri ve Referans Standartlar, USP / Barbara B. Hubert (06/07/09/2004)
- ISO 9001 : 2000 İç Tetkikçi Eğitimi, KOSGEB + Unicon Danışmanlık (03-05/03/2004)
- ISO 9001 : 2000 Versiyonu Temel Eğitimi, KOSGEB + Unicon Danışmanlık (08-09/01/2004)
- ISO 9001 : 2000 Versiyonu Dokümantasyon, KOSGEB/Fikret OKANT (12-13/01/2004)
- ISO – 9000 : 2000 Seri Standartları, KOSGEB + Unicon Danışmanlık (24-25/06/2002)
- Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği (11/05/2001)
- Toplam Kalite Yönetimi Vaka Çalışması, KOSGEB +KALDER (01/04/2001)
- ISO-9000:2000 Revizyonu, KOSGEB + Unicon Danışmanlık (17/11/2000)
- İşletmelerde Üretim Yönetimi, KOSGEB (13-14/11/2000)
- Toplam Kalite Yönetimi Ve Mükemmellik Modeli, KOSGEB +KALDER (09/10/1999)
- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Uluslararası Farmasötik Bilimler Sempozyumu, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (27/09/2000)
- ISO-9000 Kalite Güvence Sistemi, KOSGEB+İpek Danışmanlık (17-28/06/1999)
- Sorumlu Müdürlük Eğitim, Kimya Müh.Odası (05-12/06/1999)
- İlacın Üretim Prosesleri, Kalite Kontrol Analizleri ve Bu Proseslerde Kullanılan Her Türlü Ekipman, Carlo Erba İlaç San. ve Tic. A.Ş. (11-12/1998)