



T.C

LOKMAN HEKİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATORVASTATİN KALSİYUM VE EZETİMİB'İN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ VE KEMOMETRİK YÖNTEMLER
KULLANILARAK EŞZAMANLI MİKTAR TAYİNLERİ

Nilüfer Burcu ER

AĞUSTOS 2024

T.C
LOKMAN HEKİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATORVASTATİN KALSİYUM VE EZETİMİB'İN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ VE KEMOMETRİK YÖNTEMLER
KULLANILARAK EŞZAMANLI MİKTAR TAYİNLERİ

Nilüfer Burcu ER

DANIŞMAN

Prof. Dr. Feyyaz ONUR

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Aysun DİNÇEL

AĞUSTOS 2024

ONAY

Atorvastatin Kalsiyum ve Ezetimib'in Farmasötik Preparatlarda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ve Kemometrik Yöntemler Kullanılarak Eşzamanlı Miktar Tayinleri

Tezi Hazırlayan: Nilüfer Burcu ER

Tez Savunma Tarihi: 15 Ağustos 2024

Üye (Jüri Başkanı): Prof. Dr. Arzu KARAKURT

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Lokman Hekim Üniversitesi

Bu tez, tarafımdan incelenmiş ve yüksek lisans tezi olarak uygun bulunmuştur.

Üye: Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN

Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

Bu tez, tarafımdan incelenmiş ve yüksek lisans tezi olarak uygun bulunmuştur.

Üye (Danışman): Prof.Dr. Feyyaz ONUR

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Lokman Hekim Üniversitesi

Bu tez, tarafımdan incelenmiş ve yüksek lisans tezi olarak uygun bulunmuştur.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Belgin AKIN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Lokman Hekim Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm.

Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

(X) Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

() Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

() Tezimin/Raporumun..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

() Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

13.09.2024

Nilüfer Burcu ER

ETİK BEYAN

LOKMAN HEKİM ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu belge ile tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik davranış ilkelerine uygun olarak toplanıp sunulduğunu beyan ederim. Bu kural ve ilkelerin gereği olarak, tez çalışmamda bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları bilimsel etik kurallar gözeterek ifade ettiğimi ve kaynağını gösterdiğimi ayrıca beyan ederim.

(13.09.2024)

Nilüfer Burcu ER

ÖZET

ATORVASTATİN KALSİYUM VE EZETİMİB'İN FARMASÖTİK PREPARATLARDA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ VE KEMOMETRİK YÖNTEMLER KULLANILARAK EŞZAMANLI MİKTAR TAYİNLERİ

Nilüfer Burcu ER

Yüksek Lisans Tez

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı Prof. Dr. Feyyaz ONUR,

Dr. Öğr. Üyesi Aysun DİNÇEL

Ankara, AĞUSTOS 2024

Statin grubu, kolesterol ve trigliserid düşürücü olan Atorvastatin kalsiyum (ATVC) ve kolesterol ve trigliserid düşürücü ezetimib (EZE) kan yüksek kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürmek için tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ATVC ve EZE'in spektrofotometrik yöntemlerden birinci türev sıfır-kesim ve oran 1. türev, kemometrik yaklaşım PLS tekniği kullanılarak ve kromatografik olarakta HPLC-DAD kullanılarak eş zamanlı analizi için yeni yöntemler geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemlerin bu iki etken maddeyi içeren farmasötik preparatlarda uygulaması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda birinci türev sıfır-kesim, oran 1. türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi çalışmalarında ATVC ve EZE'in etanoldeki çözeltilerinin 210-320 nm aralığında absorbans spektrumları kullanılmıştır. Birinci türev sıfır-kesim yönteminde ATVC miktar tayini $\lambda=245,2$ nm ve EZE miktar tayini için $\lambda=224,8$ nm dalga boylarındaki türev absorbans değerleri kullanılmıştır. Oran 1. türev spektrum çalışmaları için ise; türev spektrum çalışmalarında ise aynı çözeltilerin, ATVC için 232,6 nm, EZE için ise 213,8 nm dalga boyundaki oran türev absorbans değerleri kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kemometrik yaklaşım tekniklerinden PLS yönteminde kalibrasyon çalışmaları 223-280 nm dalga boyu aralığında sıfıncı derece spektrumda absorbans değerlerinin $\Delta\lambda = 4$ nm'lik aralıklarda ölçümleri kullanılarak yapılmıştır. PLS analizlerinde Brereton paket programı kullanılmıştır. HPLC-DAD ile analiz çalışmaları izokratik, hareketli faz bileşimi; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5,17, h/h, $\lambda=240$ nm 24 °C) karışımı ile 1 mL/dk akış hızında XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap 5 μ m) analitik kolon kullanılarak yapılmıştır. İç standart olarak kuersetin kullanılmıştır. Doğrusal aralık birinci türev sıfır-kesim yönteminde 1-20 μ g/mL, oran birinci türev yönteminde 2-10 μ g/mL ve HPLC-DAD yönteminde 0,05-1,0 μ g/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler ICH gerekliliklerine göre valide edilmiştir. Yöntemlerde bağıl standard sapma değerleri %0,06-1,43 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar arasınada istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (ANOVA, $p>0,05$). Geliştirilen yöntemler, Türkiye ticari olarak bulunan ATVC ve EZE'in ikili karışımını içeren tablet

formülasyonlarına başarıyla uygulanmıştır. Tabletler üzerinde belirtilen miktarlarına göre geri kazanım değerleri %95,43-%102,82 aralığında bulunmuştur. Sonuç olarak tablette ATVC ve EZE analizi için basit, seçici, hassas, doğru ve tekrarlanabilir birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev, PLS ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Atorvastatin, Ezetimib, Kemometri, Spektrofotometri, Türev, Oran, HPLC.



ABSTRACT

SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF ATORVASTATIN CALCIUM AND EZETIMIBE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CHEMETRIC METHODS

Nilüfer Burcu ER

Master Thesis

Health Sciences Institute

Department of Analytical Chemistry

Thesis Advisor Prof. Dr. Feyyaz ONUR

Dr. Aysun DİNÇEL

Ankara, AUGUST 2024

Atorvastatin calcium (ATVC), cholesterol and triglyceride-lowering statin group, and ezetimibe (EZE), cholesterol and triglyceride-lowering drugs, are frequently used in the treatment of high blood cholesterol and triglyceride levels. The aim of this study was to develop new methods for the simultaneous analysis of ATVC and EZE using spectrophotometric methods such as first derivative zero-crossing and ratio 1st derivative, chemometric approach using PLS technique and chromatographic HPLC-DAD and to apply the developed methods in pharmaceutical preparations containing these two active substances. In studies, absorbance spectra of ATVC and EZE solutions in ethanol in the range of 210-320 nm were used in the development of first derivative zero-crossing, ratio 1st derivative spectrophotometric method. In the 1st derivative zero-crossing method, the derivative absorbance values at wavelengths $\lambda=245.2$ nm for ATVC and $\lambda=224.8$ nm for EZE quantification were used. For the ratio 1st derivative studies, the quantification of the same solutions was carried out at wavelengths of 232.6 nm for ATVC and 213.8 nm for EZE. In the PLS method, one of the chemometric approach techniques, calibration studies were carried out using measurements of absorbance values at $\Delta\lambda = 4$ nm intervals in the zero-order spectrum in the wavelength range 223-280 nm. Brereton package program was used in PLS analysis. HPLC-DAD analyses were performed using an isocratic, mobile phase composition; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5.17, v/v, $\lambda=240$ nm 24 °C) mixture and XBridge, C₁₈ (250x4.1 mm, inner diameter 5 μ m) analytical column at a flow rate of 1 mL/min. Quercetin was used as internal standard. The linear range was 1-20 μ g/mL for the first derivative zero-pass method, 2-10 μ g/mL for the ratio first derivative method and 0.05-1.0 μ g/mL for the HPLC-DAD method. The developed methods were validated according to ICH requirements. The relative standard deviation values of the methods were in the range of 0.06-1.43%. There was no statistical difference between the results obtained (ANOVA, $p>0.05$). The developed methods were successfully applied to tablet formulations containing a binary mixture of ATVC and EZE commercially available in Türkiye. According to the amounts indicated on the tablets, the recovery values were in the range of 95,43-102,82%. As a

result, simple, selective, sensitive, accurate and reproducible first derivative zero-pass, ratio first derivative, PLS and HPLC-DAD methods were developed for the analysis of ATVC and EZE in tablets.

Keywords: Atorvastatin, Ezetimibe, Chemometry, Spectrophotometry, Derivative, Ratio, HPLC.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel katkılarını esirgemeyen ve çalışmalarına yön veren çok değerli hocam Prof. Dr. Feyyaz ONUR’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, deneyimleri ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren ve beni motive eden, deneylerimde bana her türlü desteği veren değerli hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi Aysun DİNÇEL’e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan ve destek olan sevgili eşim Ecz. Hikmet ER’e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	x
İÇİNDEKİLER	xi
TABLO DİZİNİ	xiii
ŞEKİL DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Trigliseridler.....	3
2.2. Kolesterol	4
2.3.Atorvastatin	4
Atorvastatin etki mekanizması ve farmakodinamik özellikleri	5
2.4.Ezetimib	6
Ezetimibin etki mekanizması ve farmakodinamik özellikleri.....	7
2.5.ATV ve EZE için analiz yöntemleri	7
2.5.1.Spektrofotometrik yöntemler	7
2.5.1.1.UV/Görünür Bölge spektrofotometrik analiz yöntemi	7
2.5.1.2. Türev Spektrofotometrisi analiz yöntemi	9
2.5.1.3. Spektrofotometrik yöntemlerle yapılmış çalışmalar	10
2.5.2. Kromatografik yöntemler.....	10
2.5.2.1. HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) analiz yöntemi	10
2.5.2.2. Normal faz sıvı kromatografisi	11
2.5.2.3. Ters faz sıvı kromatografisi.....	11
2.5.2.4. HPLC sistemi	11
2.5.2.5. Temel kromatografi parametreleri.....	12
2.5.2.6. Kromatografik yöntemlerle yapılmış çalışmalar.....	16
2.5.3. Kemometrik Yöntemler	18
2.5.3.1.Klasik en küçük kareler yöntemi (Classical least squares-CLS)	19
2.5.3.2. Ters en küçük kareler yöntemi (Inverse least squares-ILS)	20

2.5.3.3.Kısmi en küçük kareler yöntemi (Particjal least squares regression-ILS)	21
2.5.3.4. Temel bileşen regresyon yöntemi (Principal compopnent regression-PCR)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Kimyasal Maddeler	22
3.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.3. Cam ve Diğer Malzemeler	22
3.4. Kullanılan Yazılım Programları	23
3.5. Çözeltilerin hazırlanması	23
3.6.Yöntemler.....	24
3.6.1. Birinci Türev sıfır-kesim yöntemi ile analizin yapılışı	24
3.6.2. Oran türev yöntemi ile analizin yapılışı	24
3.6.3. PLS ile analizin yapılışı	25
3.6.4. HPLC-DAD yöntemi ile analizin yapılışı	26
3.6.4.1. HPLC yönteminin optimizasyonu.....	27
3.7. Analitik Yöntem Validasyonu	27
3.8. ATVC ve EZE'nin tablette analizi	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Sıfır-kesim yöntemi analiz sonuçları	31
4.2. Oran 1. türev yöntemi analiz sonuçları	33
4.3. PLS yöntemi analiz sonuçları	35
4.4. HPLC yöntemi analiz sonuçları	35
4.5. Analiz yöntemlerinin validasyonu.....	37
4.6. Tablette ATVC ve EZE analizi	39
5. TARTIŞMA.....	42
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKÇA	47
EKLER.....	52
EK 1. HAMMADDE ANALİZ SERİFİKALARI	52
EK 2. KOLON ANALİZ SERİFİKASI	54
EK 3. ÖZGÜNLÜK RAPORU	57
EK 4. ÖZGEÇMİŞ	59

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Trigliserit düzeyleri ve sınıflandırma	4
Tablo 2.2. Kan kolesterol değerleri ve sınıflandırması.....	4
Tablo 2.3. EZE ve ATV için tablette ve biyolojik materyalde yapılmış kromatografik analiz yöntemleri ve doğrusal aralık parametre değerleri	17
Table 3.1. ATVC ve EZE için PLS yöntemi Kalibrasyon çözeltileri	26
Tablo 4.1. Kalibrasyon eğri parametreleri (n=6)	33
Tablo 4.2. Sistem uygunluk parametreleri	37
Tablo 4.3. Geliştirilen yöntemler için saptanan LOD ve LOQ değerleri	38
Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri.....	39
Tablo 4.5. Ezetec Plus 10/10, Ezetec Plus 10/20 ve Ezetec Plus 10/40 preparatları için elde edilen geri kazanım değerleri (% Geri kazanım, n=6 için ortalama değerler) ...	40

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Trigliseridin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.2. Atorvastatinin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3. Ezetimibin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.4. Tipik bir HPLC sistemi (Hamilton).....	12
Şekil 2.5. Örnek bir kromatogramda alıkonma zamanı	13
Şekil 2.6.Örnek bir kromatogram için önemli parametreler için ayırıcılık, pik genişliği, alıkonma zamanı etkileri (<i>Fundamentals of Analytical Chemistry</i> 9. baskı, s. 878).	15
Şekil 4.1. ATVC ve EZE standart çözeltilerine ait absorpsiyon spektrumları.....	31
Şekil 4.2. (a) ATVC ve (b) EZE için 1. türev spektrumları	32
Şekil 4.3. (a)ATVC ve (b) EZE için oran birinci türev absorbans spektrumları.....	34
Şekil 4.4. İlaç içermeyen hareketli faza ait kromatogram	36
Şekil 4.5.1µg/mL ATVC, EZE ve Q (IS) içeren standart çözelti için elde edilen kromatogram	37
Şekil 4.6. Ezetec Plus 10/10 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram ..	40
Şekil 4.7. Ezetec Plus 10/20 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram ..	41
Şekil 4.8. Ezetec Plus 10/40 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram ..	41

KISALTMALAR LİSTESİ

ATV	Atorvastatin
ATVC	Atorvastatin kalsiyum
EZE	Ezetimib
IS	İç standart
UV-Gör	Ultraviyole (Morötesi)/görünür bölge
HPLC	Yüksek basıçlı sıvı kromatografisi
PCR	Temel Bileşen Regresyonu (Principal Component Regression)
PLS	Kısmi En Küçük Kareler (Partial Least Squares)
ILS	Ters En Küçük Kareler Yöntemi (Inverse Least Squares)
CLS	Klasik En Küçük Kareler Yöntemi (Classical Least Squares)
BSS	Bağıl standart sapma
LOD	Tespit edilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
t	Alıkonma zamanı
α	Seçicilik
k'	Kapasite faktörü
R	Ayırıcılık
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mg	Miligram

ng	Nanogram
nm	Nanometre
mL	Mililitre
dk	Dakika
MeOH	Metanol
ACN	Asetonitril
ICH	International Council for Harmonisation



1.GİRİŞ

Kolesterol ve trigliseritler, vücut hücrelerinde bulunan ve kan yoluyla taşınan yağ benzeri maddelerdir. Trigliseritler, vücudun enerjiye olan ihtiyacını karşılamakdrlar. Vücutta proteinlerden ve karbonhidratlardan daha çok enerji veren trigliseritler karaciğerde üretilmekle birlikte dışardan çeşitli besinler yoluyla vücumuza alınırlar. Vücutta alınan trigliserit fazlası karaciğer ve yağ dokusunda depolamaktadır. Kolesterol, vücutta hormonların vitaminlerin ve hücrelerin inşasında kullanılan ve kan yoluyla taşınan mumsu maddelerdir. Trigliseritler gibi kolesterol de karaciğerde üretildiği gibi dışardan da besinlerle vücuta alırlar. Her iki madde de vücutta kan yolu ile taşınır ve genel olarak kan yağları olarak isimlendirilirler. Yağ yapısında maddeler oldukları için kanda çözünemezler ve kan yolu ile taşınabilmeleri için proteinlerle kaplı halleri olan lipoproteinler oluştururlar (Endo, 1992). Lipoproteinler genel olarak toplumda iyi huylu ve kötü huylu olarak sınıflandırılmış haliyle bilinirler. İyi huylu lipoprotein olarak adlandırılan HDL (high density lipoprotein) vücuttaki fazla kolesterolü tekrar karaciğere taşınmasını sağlar. Kanda uygun bir seviyedeki HDL kolesterol kalp damar hastalıkları ve ivmelere karşı koruyucu olarak kabul edilir (American Heart Association, 2024).

Kötü huylu kolesterol olarak adlandırılan LDL, HDL tersine kolesterolü karaciğerden diğer dokulara taşınmasını sağlar. Bu nedenle vücutta yüksek seviyede olan LDL arterlerin daralmasına ve sonuç olarak kalp krizi, inme ve periferik arteriyel hastalıklara yol açabilmektedir. Eşlik eden sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet bu süreci daha da hızlandırmaktadır (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2021).

Türk Kardiyoloji Derneği, Türk toplumunda genel olarak iyi huylu kolesterol seviyesinin düşük olduğunu belirtmektedir (Onat ve diğerleri, 2003).

Ülkemizde kardiyovasküler hastalıklarının yüksek oranda görülme sebeplerinden birinin de toplumdaki bu HDL düşüklüğü olduğu kabul edilmektedir.

Sonuç olarak kolesterol ve trigliseritler hücre fonksiyonları için önemli ve gerekli yapılar olup her iki maddenin de kanda belirli sınırlar içerisinde bulunmalıdır. Kanda yüksekliği tespit edilen trigliserit ve kolesterol değerlerinin normale yaklaştırılması amacıyla kolestiramin, kolestipol gibi safra asidi bağlayıcı reçineler, nikotinik asit, ezetimib, fenofibrat, gemfibrozil gibi fibratlar ile çeşitli statin grubu farmasötik

preparatlar kullanılmaktadır (Baigent ve diğerleri, 2005). Başlıca statinler; Atorvastatin, Simvastatin, Lovastatin, Fluvastatin, Pravastatin ve Pitavastatin'dir (Endo, 2010). Atorvastatin 1996 yılında ilk defa FDA tarafından onaylanarak piyasaya çıkmış ve dünyada en çok reçete edilen ilaç grubu olmuştur (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016).

Ezetimib (EZE) ile statinlerin kombine kullanımının üzerine yapılan birçok çalışma kombine preparat kullanımının kanda kolesterol ve trigliserid düzeyini düşürme üzerine etkisinin her iki maddenin ayrı ayrı kullanımından daha etkin olduğunu göstermiştir (Ballantyne ve diğerleri, 2003; Hamilton-Craig ve diğerleri, 2010; Nodari ve diğerleri, 2007; Wan ve diğerleri, 2021). Bu durum EZE ve statin içeren kombine preparatların üretimini başlatmış dolayısı ile hastalarda kullanımını sağlamıştır.

Ülkemizde ruhsatlı EZE + Statin içeren kombine preparatlar;

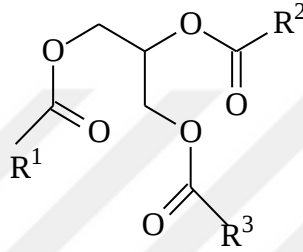
- EZETEC PLUS (EZE+ATVC) /Neutec İlaç San.
- EZEROS (EZE+ Rosuvastatin) / Nuvomed İlaç San.
- EZESIM (EZE+ Simvastatin)/ Neutec İlaç San.
- FIXLIP (EZE+ ATVC) / Celtis İlaç San.
- İNEGY (EZE+ Simvastatin) / Merck İlaçları,
- NOVIROS (EZE+Rosuvastatin) / Celtis İlaç San.
- ROSALIN (EZE+ Rosuvastatin/ / Vitalis İlaç San.
- TRATEZ (EZE+ATVC)/ Drogsan İlaç San.

Bu çalışmada birinci türev sıfır-kesim, oran 1. türev, HPLC ve PLS yöntemleriyle kolesterol ve trigliserid düşürücü olan ATVC ile bir diğer kolesterol ve trigliserid düşürücü etkin madde olan EZE'nin yeni yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin tablette ATVC ve EZE analizine uygulamasının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla EZETEC Plus (Neutec) isimli farmasötik preparatta, geliştirilen analiz yöntemlerinin uygulaması çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

ATV ve EZE kanda yüksek kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürmek için farmasötik preparatların fomülasyonunda yer alan etkin maddelerdir. Aynı ayrı formülasyonlarda bulunduğu gibi son zamanlarda iki etkin maddeyi farklı oranlarda bir arada içeren kombine preparatlar da üretilmiştir. Üretilen bu farmasötik preparatlar biyoyayarlanımın sulu formlara göre daha üstün olmasından ötürü genelde tablet formundadır.

2.1.Trigliseridler



Şekil 2.1. Trigliseridin kimyasal yapısı

Trigliseridler (Şekil 2.1), gliserol (gliserin) ve üç yağ asidinden oluşan esterlerdir. Trigliseridler, lipaz enzimi ve safranin etkisiyle ince bağırsakta ayrışarak kana geçer ve kanda yeni baştan oluşarak lipoprotein olurlar. Bir başka deyişle trigliseridler, kanda bulunan ve vücuda enerji veren lipid türüdür. Uzun süreli açlık, çok enerji sarf ettiren spor programı, hormon üretimi gibi durumlarda vücutta depo edilen trigliseridler kullanılır.

Proteinler ve karbonhidratlara göre vücutta yaklaşık iki kat daha fazla enerji taşıyan trigliseritlerin, yetişkinler için kandaki seviyesi 150 mg/dL'nin altında olması beklenir. Yetişkin bir insanda 151- 199 mg/dL arası sınırdan yüksek, 200-499 mg/dL arası yüksek, 500 mg/dL üzeri ise çok yüksek olarak kabul edilir. Türk Kardiyoloji Derneği tarafından kanda ölçülen trigliserit düzeyleri ve sınıflandırmaları Tablo 2.1'de verilmiştir .

Tablo 2.1. Trigliserit düzeyleri ve sınıflandırma

Sınıflandırma	Trigliserit düzeyi
Çok yüksek	500 mg/dL ve üstü
Yüksek	200-499 mg/dL
Sınırdan yüksek	151-199 mg/dL
Normal	150 mg/dL ve altı

2.2. Kolesterol

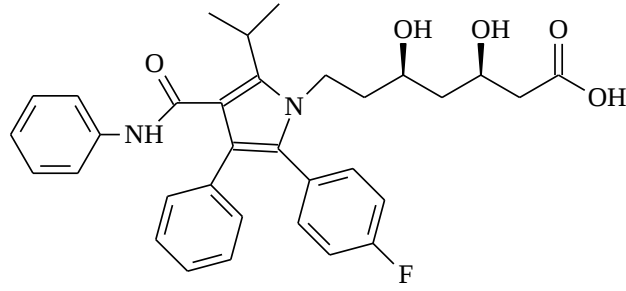
Kolesterol, hücreler tarafından üretilen ve kanda bulunan lipid türüdür. Kolesterol hormon üretimi, sindirim ve hücre zarı oluşumundan sorumludur. Vücutta D vitamini sentezlenmesine yardımcı olur. Hücre dayanıklılığından sorumludur. Üreme sistemi için gerekli olan östrojen ve testosteronun üretiminde, vücutta su seviyesinin korunmasında, sinir dokularının güçlenmesinde önemli rol oynar. Kanda Kolesterol düzeyinin belirli bir seviyede bulunması vücut fonksiyonlarının düzgün işlemesi için önemlidir. Et, yumurta sarısı, peynir gibi besinlerle vücuda dışardan alınmakla birlikte günde yaklaşık 1 gr kolesterol karaciğer ve diğer vücut hücrelerinde yapılmaktadır (Şenel, 2012).

Kolesterol, kanda lipoproteinler şeklinde taşınmaktadır. Lipoproteinler genel olarak iyi huylu ve kötü huylu lipoproteinler olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadırlar (bkz. Bölüm 1). Türk kardiyoloji derneği tarafından kanda ölçülen kolesterol değerleri ve sınıflandırması Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Kan kolesterol değerleri ve sınıflandırması

	HDL Kolesterol (mg/dL)	LDL Kolesterol (mg/dL)	Toplam Kolesterol (mg/dL)
Normal	>40	<130	<200
Sınırdan yüksek		130-159	200-240
Yüksek	>60	>160	>240

2.3. Atorvastatin



Şekil 2.2. Atorvastatinin kimyasal yapısı

Atorvastatin (ATV), redüktaz enzim inhibitörü bir etkin maddedir. Yüksek risk (Tablo 2.2) grubundaki kişilerde kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılır. ATV farmasötik preparatlarda genellikle kalsiyum tuzu halinde Atorvastatin kalsiyum (ATVC) olarak kullanılır. 3-hidroksi-3 metil glutarilkoenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzim inhibitörüdür. Bu enzim HMG-CoA'nın dönüştürülmesini katalize eder. ATV; kimyasal formülü $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, olup (Şekil 2.2), (3R,5R)-7-[2-(4-florofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-propan-2-ilpirrol-1-il]-3,5 dihidroksiheptanoik asit olarak adlandırılır.

ATVC tipik dozu günde 10-80 mg'dır ve %40-60 oranında LDL'i azaltmaktadır (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu [TİTCK], 2016). Atosrvastatin tablet formları çözelti formları ile biyoyararlanım yönünden karşılaştırıldığında tablet formunun çözelti formuna göre %95 - %99 daha etkili olduğu gösterilmiştir. ATVC mutlak biyoyararlanımı değeri yaklaşık %14'dür.

Atorvastatin Etki Mekanizması ve Farmakodinamik Özellikleri

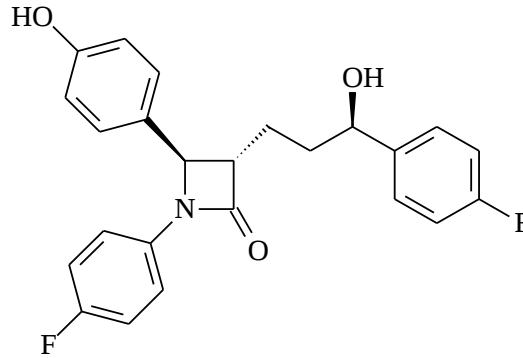
ATV, HMG-KoA (3 hidroksi-3 metil-glutaril-koenzim A) redüktaz enziminin selektif, kompetitif inhibitörüdür (Endo, 1992). Etkisini HMG-KoA enzimini inhibe ederek göstermektedir. ATV, apoB'yi (LDL bileşeni), LDL kolesterolü, çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (VLDL-kolesterol), total kolesterolü ve TG seviyesini düşürmekte, bununla beraber kandaki HDL kolesterol seviyesinde değişik oranlarda artış sağlamaktadır. HMG-KoA redüktaz enzimini inhibisyonu sonucu karaciğerde kolesterol sentezi azalır, LDL yıkımı artar. Kandaki LDL parçacıklarının sayısı ve LDL üretiminde azalma sağlar. ATV'nin bazı metabolitleri de vücutta farmakolojik olarak aktif özellik göstermektedir. ATV'nin en önemli etki merkezi

karaciğerdir. Ailesel homozigot/heterozigot kolesterol yüksekliği hikayesi olan hasta gruplarında, ailesel olmayan hasta gruplarında ve karma dislipidemili hastalarda etkilidir.

ATV ile ezetimibin kombine kullanımının hiperlipidemili hastalarda etkinlik ve güvenilirliği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. EZE ile ATV'nin beraber kullanımın farmakolojik etkisinin bu iki maddelerin tek başına kullanımından daha çok etkili olduğu yapılan klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (Ballantyne ve diğerleri, 2003). ATV'nin etkisinin doza bağlı olarak değiştiği de çalışmalarda görülmüştür. Bu sebeple piyasada ATV'nin çeşitli dozlardaki farmasötik preparatları mevcuttur.

İki etkin maddenin bir arada kullanımının yüksek kolesterol düzeyi seviyesinde etkili bir düşüşe sebep olduğunun kanıtlanması ile her iki maddeyi bir arada içeren kombine preparatlar üretilmeye başlanmıştır. ATV+EZT kombine şekilde içeren dünyada farklı firmalara ait tablet formunda farmasötik preparat örnekleri (*Liptruzet (Organon)*, *Atoreza (Marcyrl)*, *Atozet (MSD)*, *Zatistad (Torrent)*, *TG-Tor EZ (Unichem Laboratories)* gibi) olmakla birlikte şu an Türkiye'de 2011 ruhsat tarihli *Ezetec Plus (Neutec)*, 2023 ruhsat tarihli *Fixlip (Celtis)* ve 2024 ruhsat tarihli *Tratez (Drogsan)* isimli tablet formunda preparatlar bulunmaktadır.

2.4.Ezetimib



Şekil 2.3. Ezetimibin kimyasal yapısı

Ezetimib (EZE) kandaki yüksek kolesterol seviyesinin ayarlanmasında kullanılan bir etkin maddedir. Piyasada farklı firmalara ait çeşitli jenerik preparatları bulunmaktadır. EZE (Şekil 2.3);kimyasal formülü $C_{24}H_{12}F_2NO_3$ olup 1-(4-florofenil)-

3R-[3(S)-(4-florofenil)-3-hidroksi propil]-4(S)(4 hidroksifenil) azetidin – 2-on) olarak adlandırılır.

Ezetimibin Etki Mekanizması ve Farmakodinamik Özellikleri

EZE, seçici olarak kolesterolün bağırsak duvarından taşınmasını önler. NPC1L1L (Niemann-Pick C1-Like 1) proteini üzerinden etki gösterir (Jia L. ve diğerleri, 2011). Statinlerin etki mekanizması ile birlikte tamamlayıcı etki gösterdiği için tedavide statin grupları ile kombine kullanımı tercih edilir (Brar, 2004). Kolesterol absorpsiyonunu azaltır. EZE, oral olarak kullanıldığında etki gösterir, enjeksiyona uygun sulu ortamda çözünmediği için mutlak biyoyararlanımı belirlenememektedir.

Yapılan bir klinik çalışmada 18 hiperkolesterolemik hastada ezetimib, 2 haftada bağırsak kolesterol absorpsiyonunu plaseboyla karşılaştırıldığında %54 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. EZE'in absorpsiyonundaki seçiciliğini belirlemek amacıyla bir seri prelinik çalışma yürütülmüştür. EZE'nin yağ asitlerinin, progesteron, etinil östradiol, A vitamini, D vitamini, trigliserit absorpsiyonunu etkilemediği, kolesterol [¹⁴C] emiliminde seçici davrandığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Ballantyne ve diğerleri, 2003; TİTCK, 2016).

2.5.ATV ve EZE İçin Analiz Yöntemleri

2.5.1.Spektrofotometrik Yöntemler

2.5.1.1.UV/Görünür Bölge Spektrofotometrik Analiz Yöntemi

Spektrofotometrik analiz yöntemlerinin temeli ışığın (elektromagnetik radyasyon) madde (molekül veya iyon) tarafından absorpsiyondan yararlanarak nitel ve nicel analizlerinin gerçekleştirilmesidir. Atomların enerjisi absorblanması atomik spektroskopi, moleküllerin enerjisi absorblanması ise moleküler spektroskopi alanına girmektedir.

Her molekül ancak kendine uygun enerjiyi absorplar. Bu durum maddenin tanınmasındaki ana unsurdur. UV/Vis (mor ötesi ve görünür alan) spektrofotometrisi de bir moleküler spektroskopik yöntemdir. Bu yöntemde moleküldeki elektronların UV ve görünür alandaki (UV-Gör) ışık ile uyarılması söz konusudur. Bu alan genelde 200-800 nm arası kapsamaktadır. 200-400 nm arası UV bölge, 400-800nm arası görünür bölge olarak sınıflandırılmaktadır.

UV-Gör. spektrofotometrik yöntemlerle çeşitli analitik uygulamalar yapılabilir, bunlar;

2. Nitel analizler ile her maddenin belli bir çözücü içindeki spesifik spektrumu kullanılarak analiz işlemleri yapılabilir.
3. Nicel analizler ile Beer-Lambert yasasına göre, ışığın absorpsiyonu ile çözeltideki madde miktarının doğrusal ilişkisi incelenir.
4. Denge sabiti tayininde; zayıf asitlerin denge sabiti K_a (asitlik sabiti) ve zayıf bazların denge sabiti K_b (bazlık sabiti) hesaplanabilir.
5. Molekül ağırlığı hesaplanabilir,
6. Kinetik çalışmalar ve fotometrik titrasyonlarda da spektrofotometrik yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Lambert-Beer yasasında seyreltik çözeltiler için madde absorpsiyonu ile çözelti konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki vardır. Aşağıda verilen eşitlikde; $b(l)$ santimetre cinsinden ışın yolu uzunluğu, T ; geçirgenlik, A ; absorbans, k absorpsiyon katsayısı olarak tanımlanmaktadır. Absorpsiyon katsayısı çözelti konsantrasyonu mol/L cinsinden verilirse “ ϵ ” olarak gösterilir ve molar absorbtivite veya molar ekstinksiyon katsayısı olarak adlandırılır (Skoog ve diğerleri, 2016b). I_0 ; numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti, I ; numune çözeltisinden çıkan ışığın şiddeti olarak tanımlanır.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = k \times l \times C$$

Bu kurala göre, ortamda monokromatik ışığın aldığı yol ve ortamın konsantrasyonu ile ışığın absorpsiyonu doğru orantılıdır. Lambert-Beer kuralının geçerli olabilmesi için seyreltik çözeltiler ile çalışılması gerekmektedir. Numunenin floresans ve fosforesans özellik göstermemesi, numune içerisindeki partüküller nedeniyle saçılma olmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir (Onur, 2019; Skoog ve diğerleri 2013).

UV ve görünür bölge spektrofotometrik yöntemle analizlerde ortamda yalnızca tek bir madde varsa 2 farklı yöntemle analiz gerçekleştirilebilir ancak ortamda birden fazla madde varlığı söz konusu ise türev spektrofotometri yönteminden faydalanılarak analizler gerçekleştirilebilir.

Ortamda tek bir madde varsa veya diğerlerinin etkisinin hiç olmadığı durumlarda uygulanan analitik teknikler şunlardır:

1-Bilinen ve değişen miktarlardaki analit içeren standart çözeltileri hazırlanır ve absorpsiyon (A) değerleri konsantrasyona (C) değerlerine karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. $y = mx+n$ şeklindeki doğru denklemi ile bilinmeyen konsantrasyondaki analit absorpsiyonu okunarak konsantrasyonu hesaplanır.

2-Bilinen konsantrasyonda (C_1) standart madde absorpsiyonu (A_1) okunur. Sonrasında bilinmeyen konsantrasyondaki (C_x) çözeltinin absorpsiyonu (A_x) okunur ve - Lambert-Beer yasasına göre yukardaki eşitlikte yerlerine konularak 2 eşitliğin birbirine oranlanması ile $A_1/A_x = C_1/C_x$ eşitliği elde edilir ve buradan bilinmeyen analit konsantrasyonu hesaplanabilir.

Ortamda tek bir madde olmayıp karışım halindeki çözeltiler için ise türev spektrofotometrisi yönteminden faydalanılabilir.

2.5.1.2. Türev Spektrofotometrisi Analiz Yöntemi

UV-Gör. bölgede madde üzerine gönderilen ışığın dalga boylarına karşı absorpsiyon değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile spektrum elde edilir. Dalga boyu ile absorpsiyon değeri arasındaki ilişki bir fonksiyon olarak $A = f(\lambda)$ gösterilebilir. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanarak ($dA/d\lambda$), hesaplanan değerler dalga boyuna karşı grafiğe geçirilerek “türev spektrumu” meydana getirilir. Türev eşitlikleri 1’den n’e kadar yazılarak aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\frac{dA}{d\lambda} = \left(\frac{dA^2}{d\lambda^2} \dots \frac{dA^n}{d\lambda^n} \right)$$

Bu yöntem ile orijinal spektrumda ayrılmayan piklerin daha ayrıntılı görülmesi ve karışımdaki bileşenlerin miktar tayinlerinin yapılması sağlanabilir, kimyasal veya fiziksel herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmadan ayırım gerçekleştirilebilir. Bu durum özellikle karışım halindeki etkin maddeleri bir arada içeren ilaçların analizinde kolay ve etkili bir yöntem olarak analizciler tarafından tercih edilmektedir.

Oran birinci türev spektrofotometrik yöntemi ile kaydedilen spektrumlara ek olarak çeşitli konsantrasyon değerlerinde bilinmeyen madde içeren standart çözeltilerin birinci derece spektrum türevleri alınarak seçilen konsantrasyon

değerindeki etkin madde çözeltilerinin birinci derece türev spektrumlarına oranlanarak elde edilen spektrum grafiklerinden bilinmeyen çözeltideki madde miktarının konsantrasyonunun hesaplanması yapılmaktadır.

2.5.1.3. Spektrofotometrik Yöntemlerle Yapılmış Çalışmalar

Literatürde spektrofotometrik yöntemlerle yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Narasimharaju ve ark. tarafından tablette EZE analizi UV/Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada EZE için doğrusal aralık 5-20 µg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım oranı %99,11 bulunmuştur (Narasimharaju ve diğerleri, 2008). R.P. Kabra ve arkadaşları yine tablette EZE analizi için bir UV-Gör. spektrofotometrik yöntem geliştirmişler EZE için doğrusal aralığı 2-20 µg/mL olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmada LOD ve LOQ değerleri EZE için sırasıyla; 0,10 µg/mL ve 0,30 µg/mL olarak bulunmuştur (Kabra ve diğerleri, 2014). Yılmaz ve Kaban tarafından tablette ATV analizi UV ve 1. türev spektrofotometri yöntemi ile gerçekleştirilmiş doğrusal aralığı 5-20 µg/mL ile LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 3,0 µg/mL ve 1,0 µg/mL bulunmuştur (Yılmaz & Kaban, 2018). Sonawane ve ark. tarafından tablette ATV ve EZE'nin UV spektrofotometri ile eşzamanlı analizi yapılmış ATV ve EZE için doğrusal aralık 5-25 µg/mL geri kazanım değerleri ATV ve EZE için sırasıyla %99-101 olarak bulunmuştur (Sonawane ve diğerleri, 2007). Belal ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise; tablette ikili karışımların spektrofotometrik yöntemle analizi yapılmıştır. Spektrum oranları yöntemi kullanılarak bu ikili karışımlarda aynı anda miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada her iki tablet için doğrusal aralık 2,5-40 µg/mL olarak bulunmuş, LOD değerleri karışım için sırasıyla 0,59 µg/mL ve 0,32 µg/mL olarak bulunmuştur. Tablette geri kazanım değeri sırasıyla % 100,11 ve %99,38 olarak bulunmuştur (Belal ve diğerleri, 2013).

2.5.2. Kromatografik Yöntemler

2.5.2.1. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) Analiz Yöntemi

HPLC uçucu olmayan kimyasal ve biyolojik bileşenlerin ayrılması için kullanılan bir ayırma yöntemidir. Yöntemde analitlerin, sabit faz doldurulmuş kolonlardan basınç altında hareketli faz ile geçirilerek kolon içerisine bileşenlerin polaritelerine, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılmaları sağlanarak karışımı meydana getiren maddelerin ayrılmaları sağlanır. Ayırımı gerçekleştirilen maddeler

bir dedektörden geçirilerek zamana karşı dedektör cevabı kaydedilir ve kromatogram adı verilen bir grafik elde edilir. Kromatogram; detektör cevabına karşılık zamana veya çözücü hacmine karşı çizilen grafiktir. Kromatogramda her bir maddeye ait piklerin eğri altında kalan alan değerleri veya pik yükseklik değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri her bir maddeye özgü olarak hesaplanarak hem nitel hem nicel analizler yapılmaktadır. Daha hassas çalışma ve deneysel hataların ihmal edilmesi amacıyla iç standart kullanılarak tekrarlı analizlerde standart sapma değerleri birin altına düşürülebilmektedir.

HPLC’de hareketli faz uygulama sistemleri izokratik ve gradient elüsyon olmak üzere iki farklı biçimde kullanılmaktadır. Hareketli faz bileşiminin ve akış hızının sabit tutulduğu ayırma işlemi *izokratik elüsyon* olarak adlandırılmaktadır (Skoog ve diğerleri, 2016a; Skoog ve diğerleri, 2013a). Sisteme gönderilen hareketli faz bileşimin ve/veya akış hızının zamanla sürekli veya kesikli olarak değiştirilmesi suretiyle yapılan ayırma işlemi ise *gradient elüsyon* olarak adlandırılmaktadır (Skoog ve diğerleri, 2013b) izokratik elüsyon tekniği ile ayrılamayan bileşikler gradient elüsyonla ayrılabilen ya da uzun alıkonma zamanlı bileşiklerin alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

2.5.2.2. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit fazın polar, hareketli fazın apolar olduğu sistemlerdir. Bu sistemler genellikle alkol ve amin gibi polar maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Ayrılma işleminde polaritesi düşük olan önce ayrılır. Dolayısıyla çözücü polaritesindeki artış ayrılma zamanını azaltmaktadır. Hareketli faz bileşiminde genellikle hekzan, isopropil ve eter gibi çözücüler kullanılmaktadır (Hamilton-Craig ve diğerleri, 2010).

2.5.2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

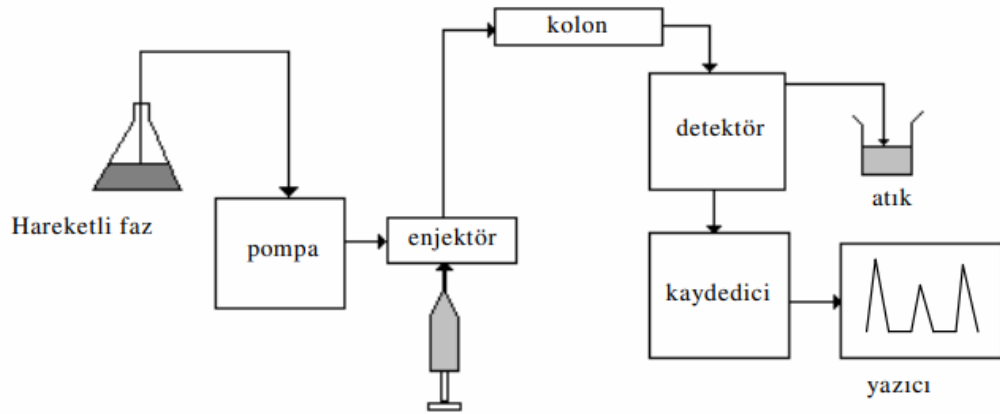
Sabit faz apolar, hareketli fazın polar olduğu sistemlerdir. Hareketli faz bileşiminde genellikle metanol, asetonitril, su ve tampon çözeltiler gibi polar bileşenler kullanılmaktadır.

2.5.2.4. HPLC Sistemi

Bir HPLC sisteminde bulunan kısımları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 2.4);

1. Pompa sistemi

2. Enjektör sistemi
3. Kromatografik kolon
4. Dedektör
5. Yükseltici
6. Kaydedici bölümlerinden oluşur



Sekil 2.4. Tipik bir HPLC sistemi (Hamilton).

HPLC pompa sistemleri 400 atm basınca kadar ve akış hızı 0,1-10 mL/dk aralığında çalışabilen sistemlerdir. Günümüzde HPLC sistemleri otomatik örnekleyici sistemleri ile birlikte kullanılmaktadır. Ayırma işlemi analitik kolon ile sağlanmakta ayırımı hedeflenen maddelerin özelliklerine göre kolon seçimi yapılmaktadır. Genellikle ayırmada kullanılan kolon dolgu maddeleri 3,5-10 μm çapında değişmekte ve oktil (C_8 zinciri), oktadesil (C_{18} zinciri), fenil, alkilamin, alkilnitritler gibi materyallardan oluşturulmaktadır. Kullanılan hassas dedektörler ile pg seviyesinde hassasiyette analiz sağlanabilmektedir. HPLC’de sıklıkla tercih edilen dedektörler kullanım amacına göre değişmekle birlikte şunlardır; Kütle spektroskopi dedektörü (MS), Floresans dedektörü (FLD)i elektrokimyasal dedektör (ECD), reaktif indeks dedektörü (RID), ultraviyole-görünür bölge dedektörü (UV-Gör)i fotodiyot array dedektörü (DAD) (Eser ve Dinçel Sepici, 2018; Skoog ve diğerleri, 2016c).

2.5.2.5. Temel Kromatografi Parametreleri

Kromatografik analizlerde elde edilen bir kromatogram başlıca aşağıdaki parametrelerle yorumlanır;

- i. Kolon etkinliği, N

- ii. Alıkonma zamanı, t_R
- iii. Kapasite faktörü, k'
- iv. Seçicilik, α
- v. Ayırıcılık, R , R_s
- vi. Kuyruklanma faktörü

i. Kolon etkinliği (N): Teorik tabaka (plaka) sayısı bir kolonun etkinliğini belirtir. N değerinin en az 2000 olması beklenir. Düşük teorik plaka sayısına sahip kolonlar yayvan ve geniş pikler verir. Bir kolon ne kadar etkin ve verimli ise pikler de o derece dar ve keskin olur. Bileşiğin cinsine göre akış hızı, sıcaklık, kolon hazırlanışı ve materyalinin kolondaki dağılım düzenliliğine bağlıdır (Onur, 2019).

N değeri aşağıdaki iki farklı formülle hesaplanabilir.

$$N = 16 / (t_R / W_t)^2$$

t_R : Pikin alıkonma zamanı

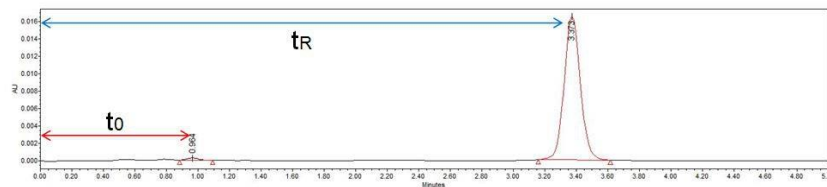
W_t : Pik genişliği

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

$W_{1/2}$: Pikin yarı yükseklikte pik genişliği (Şekil 2.6)

ii. Alıkonma Zamanı, t_R

Alıkonma zamanı, örneğin enjeksiyonundan sonra analitin pike ulaşması için geçen zamandır.



Şekil 2.5. Örnek bir kromatogramda alıkonma zamanı

iii. Kapasite faktörü, k'

Kapasite faktörü, kolonda çözünen maddenin göç hızını açıklamada kullanılan bir parametredir ve k' ile gösterilir. Kapasite faktörünün büyük olması bileşenin kolonda iyi tutunduğunu gösterir ve bu durumda kolonda yavaş hareket ederek kolonu geç terk eder. k' değeri küçük olduğunda bileşen sabit fazda tutunamadığı için kolonda hızlı hareket eder. İyi bir ayırım için k' değerinin 1-10 arasında olması beklenir. k' değeri aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\text{Kapasite Faktörü } (k') = (t_R - t_0) / t_0$$

t_0 : Hareketli faz piki alıkonma zamanı

t_R : Analit piki alıkonma zamanı

iv. Seçicilik, α

Seçicilik bağıl alıkonma olarak da bilinir. İki pikin maksimumu arasındaki zamanın veya mesafenin bir ölçüsüdür. İki pikin birbirinden ayrılma derecesi seçicilik faktörü ile ilişkilidir. Seçicilik faktörü (α) daha çok bileşiklerin tanınmasında kullanılmaktadır. Eğer $\alpha=1$ ise iki pikin tutunma süreleri aynıdır ve aynı elüsyona sahiptirler. $\alpha > 1$ olduğunda iki pikin ayırımından bahsedilebilir. Seçicilik aşağıdaki formül ile ifade edilir (Şekil 2.6.):

$$\alpha = k_2 / k_1$$

k_1 : 1. Pikin kapasite faktörü k_2 : 2. pikin kapasite faktörü

v. Ayırıcılık, R , R_s

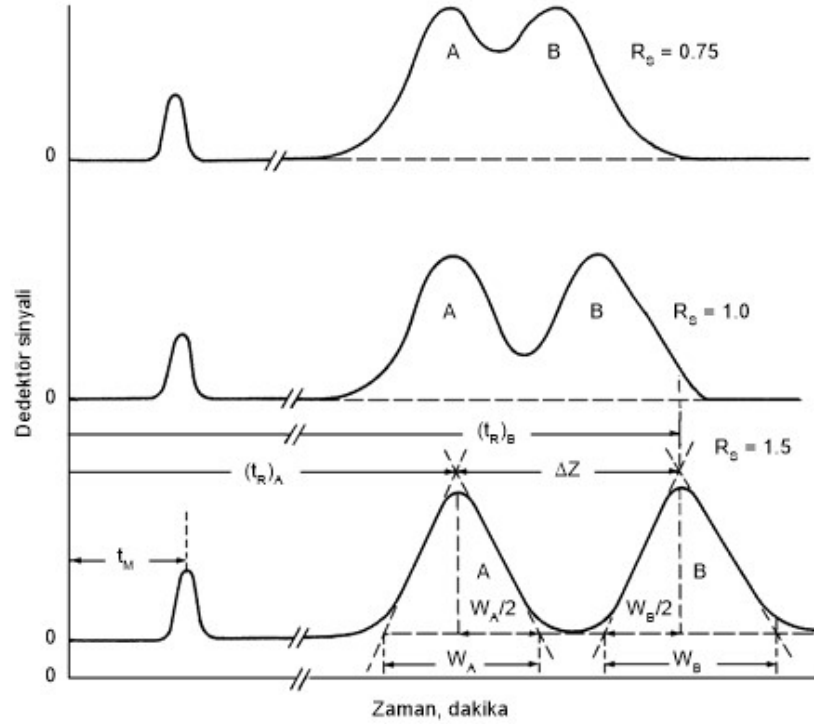
Kolon ayırma gücü (resolution) olarak da tanımlanabilir. Bir kolonun iki analiti ayırma gücünün kantitatif ölçüsüdür. İki pikin birbirinden ayrılma derecesini gösterir. Aşağıdaki şekilde farklı kromatogramlarda hesaplanan ayırıcılık değerlerinde gösterilmiştir.

Ayırıcılık aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / w_1 + w_2$$

t_{R1}, t_{R2} : iki bileşenin alıkonma zamanları

w_1, w_2 : piklerin baz genişlikleri



Şekil 2.6. Örnek bir kromatogram için önemli parametreler için ayırıcılık, pik genişliği, alıkonma zamanı etkileri (*Fundamentals of Analytical Chemistry* 9. baskı, s. 878).

Ayırma gücü (R) = 1.5 olduğunda iki bileşenin ayrılması yaklaşık olarak tam kabul edilir. $R=1$ olduğunda %95 olasılıkla, $R_s=1,5$ olduğunda %99 olasılıkla karışımdaki maddeler birbirinden ayrılmış demektir. Bu sebeple iyi bir ayırmada R değerinin 1,5’den büyük olması gerekmektedir.

vi. Kuyruklanma faktörü

Kuyruklanma faktörü, kromatogramda elde edilen pike ait bir parametre olarak pikin şekli ile ilgilidir. Pik şeklinin asimetri faktörü olarak da tanımlanabilir. “T” ile de gösterilmektedir. Bu faktör pikin simetrisi ile ilgili olup çalışmalarda simetrik piklerin seçilmesi gerekmektedir. Çünkü simetrik olmayan piklerde bazı sorunlarla karşılaşılır. Bu sorunlar:

- Kararlı olmayan miktar tayinleri
- Gözlenemeyen pik kuyruklanmaları,
- Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları
- Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlardır.

Uygun değer olarak kuyruklanma faktörü değerinin “ ≤ 2 ” olması gerekir.

2.5.2.6. Kromatografik Yöntemlerle Yapılmış Çalışmalar

ATO ve EZE etkin maddelerinin analizine yönelik literatürde tek tek veya başka ilaçlarla birlikte eşzamanlı çeşitli analiz yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemlerde çeşitli hareketli fazlar, ve sabit fazlarla birlikte uygulanan yöntemlerde genellikle HPLC sistemi kullanılmaktadır. Yapılmış olan çeşitli çalışmalar bazıları aşağıda açıklanmış ve Tablo 4’de verilmiştir. Kumar ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmada; insan plazmasında ATV ve EZE’nin RP- HPLC ile analizi yapılmıştır. Analizler C₈ 4,6 x 150 mm, 3,5 µm kolon ile 25°C’da potasyum dihidrojen fosfat:asetonitril (40:60 h/h) içeren hareketli faz ile yapılmıştır. Akış hızı 1.2 mL/dk. ATV için ve EZE için doğrusal aralık 5,0-25,0 µg/mL olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise; ATV ve EZE için sırasıyla; 1,294 µg/mL ve 1,384 µg/mL olarak bulunmuştur. Plazmada etkin maddeler için geri kazanım değeri % 100,08-%101,00 olarak bulunmuştur (Ashutosh Kumar ve diğerleri, 2015). Muhammad Ashfaq ve ark. ise tablette EZE ve simvastatin analizini, C₁₈ kolon kullanarak (250x4,6, 5 µm), 0.1M amonyum asetat:asetonitril (30:70, h/h) içeren hareketli faz ile, 1,5 mL/dk akış hızında, gerçekleştirmiştir. Çalışma doğrusal aralık değeri 20-60 µg/mL, LOD değeri EZE için 0,19 µg/mL ve simvastatin için 0,17 µg/mL ve geri kazanım değeri ise %100,25 ve %101,50 olarak bulunmuştur (Ashfaq ve diğerleri, 2007). Ertürk ve ark. tarafından tablette yapılan analiz çalışmasında ATV ve safsızlıklar HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz 5 µm C₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm) kolon ile oda sıcaklığında, asetoni:amonyum asetat:THF içeren 25:70:5 (h/h/h) hareketli faz ile 1,0 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Bu çalışmada ATV için doğrusal aralık 0.5-35.0 µg/mL olarak bulunmuştur. LOD değeri AT 0,013µg/mL, olarak bulunmuştur (Ertürk ve diğerleri, 2003). Seshachalam ve ark.’nın yapmış olduğu çalışmada ise; tablette EZE ve ATV HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. 0,01 M amonyum asetat (pH=3,0):Asetonitril (50:50 h/h) içeren hareketli faz ile 1,0 mL/dk akış hızında C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile çalışılmıştır. ATV ve EZE için için doğrusal aralık değerleri sırasıyla 4-400 µg/mL ve 5-500 µg/mL olarak bulunmuştur. LOD değeri ise EZE ve ATV için sırasıyla 1,25 µg/mL and 1,48 µg/mL olarak bulunmuştur (Seshachalam ve Kothapally, 2008). V. Patel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise; tablette atorvastatin kalsiyum (ATVC) ve ezetimib’in (EZE) türev spektrofotometri ve RP-HPLC ile analizi

yapılmıştır. HPLC analizleri ODS RP-18, 250 mm × 4,6 mm kolon kullanılarak, metanol:su (70: 30 h/h) içeren hareketli faz ile 1 mL/dk alış hızında yapılmıştır.

Tablo 2.3. EZE ve ATV için tablette ve biyolojik materyalde yapılmış kromatografik analiz yöntemleri ve doğrusal aralık parametre değerleri

Etkin madde	Sabit Faz	Hareketli Faz	Doğrusal Aralık	LOD	Yöntem
Ezetimibe Simvastatin Tablet	C ₁₈ 250x4,6, 5 µm	0,1M Amonyum asetat:asetonitrile (30:70, h/h)	20-60 µg/mL	0,19 µg/mL 0,17 µg/mL	HPLC
Atorvastatin	C ₁₈ 250x4,6 mm 5 µm	Asetonitril - amonyum asetat- THF 25:70:5 (h/h/h)	0,5-35,0 µm/mL,	0,013 µm/mL 0,010 µm/mL	HPLC
Atorvastatin Ezetimibe Tablet	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	0,01 M Amonyum asetat(pH:3.0): Asetonitril (50:50 h/h)	4-400 mg/mL 5-500 mg/mL		HPLC
Rosuvastatin Atorvastatin Serum	C ₁₈ (150× 4.6 mm,5µm	Metanol:su (68:32 h/h)	2,0-256 ng/mL,	0,6 ng/mL, 1,0 ng/mL	HPLC
Atorvastatin Ezetimibe Serum	C ₁₈ 100 x4.6 mm, 3,5 µm	% 0,2 Formik asit: asetonitril (30:70, h/h)	0,2–30,0 ng/mL	0,06 ng/mL	LC–MS– MS
Atorvastatin Plazma Ezetimibe	C ₈ 4,6 x 150 mm, 3.5 µm	Fosfat tamponu: asetonitril (40:60 h/h)	5,0-25,0 µg/mL	0,11 µg/mL	HPLC
Atorvastatin Tablet	C ₁₈ , 4,6x250 mm, 5µ	Asetonitril:diklorometan:asetik asit (68,6:30,6:0,8 h/h/h)	15-300 µg/mL	3,57 µg/mL	HPLC
Atorvastatin Ezetimibe Fenofibrat Tablet	C ₁₈ , 250x4,6 mm, 5µ	Asetonitril:fosfat tamponu (90:10 h/h)	10-100 µg/mL,	2,186 µg/mL, 0,877 µg/mL	HPLC

Bu çalışmada ATV ve EZE için doğrusal aralık 3-15 µg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım değerleri türev spektrofotometrisi ile ATV ve EZT için sırasıyla 98,67% ve 99,75%, ters faz HPLC ile 98,92% ve 99,21% olarak bulunmuştur (Patel ve diğerleri, 2010). Shah ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada serumda rosuvastatin ve ATV analizi RP-HPLC/UV yöntemi C₁₈ (150×4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak metanol:su (68:32 h/h) içeren hareketli faz ile 1,5 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Bu çalışmada ATV için doğrusal aralık değeri 2,0-256 ng/mL olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri ATV için sırasıyla 1,0 ve 3,0 ng/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanım değeri ATV için % 98,0 olarak bulunmuştur (Shah ve diğerleri, 2011). El-Bagary ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise; serumda ATV ve EZE, LC–MS/MS ile analizleri yapılmıştır. Ayırma işleminde C₁₈ (100 x4.6 mm, 3,5 µm) kolon kullanılarak ve (40 °C) %0,2 formik asit:asetonitril (30:70, h/h) içeren hareketli faz ile 0,6 mL/dk akış hızında yapılmıştır. Bu çalışmada ATV ve EZE için doğrusal aralık 0,2-30,0 ng/mL olarak bulunmuştur. LOQ değeri ATV ve EZE için 0,2 ng/mL olarak bulunmuştur (El-Bagary ve diğerleri, 2014).

2.5.3. Kemometrik Yöntemler

Kemometri, kısaca analizlerde elde edilen verilerin bilgisayar ortamında istatistiksel ve matematiksel yöntemlerle analitik hesaplamalarının yapılması olarak tanımlanabilir. Deneysel verilerle oluşturulan bir veri seti kullanılarak hazırlanan veri matrisi bilinmeyen madde miktarının tahmin edilmesinde kullanılır. Bunun değişik yolları bulunmaktadır. Kemometrinin analizlerde kullanım amacı ise; en iyi ölçüm prosedürlerinin ve deneysel koşulların matematiksel olarak hızlı ve doğru bir şekilde tasarlanması ve bulunmasıdır. Özellikle analitik kimyada birden fazla değişkenin etkili olduğu analiz prosedürlerinde değişken parametrelerin belirlenip yapılan bir dizi deneysel sonuçla bilinmeyen tahminine olanak sağlayan oldukça pratik ve hızlı bir yöntem olarak kullanımda tercih edilmektedir (Skoog ve diğerleri, 2013).

Kemometri geniş kullanım alanlarına sahip bir tekniktir. İlaç analizlerinde, klinik ve biyolojik örnek analizlerinde, biyoloji, gıda, su, maddelerin çözünme hızı ve stabilite testlerine yönelik analizleride kullanılabilir.

Kemometrik yöntemle birden fazla madde içeren karışımlar, herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmadan analiz edilebilmektedir. Kemometrik yöntemde çeşitli kalibrasyon teknikleri çalışılmaktadır. Bunlar; temel bileşen regresyonu (PCR),

klasik en küçük kareler (CLS), ters en küçük kareler (ILS) ile kısmi en küçük kareler (PLS) teknikleridir (Brereton, 2003).

Kemometride hesaplama işlemlerinin karmaşıklığı sebebiyle bilgisayar programlarından faydalanılarak hesaplama işlemleri kısa sürede sonuçlandırılabilir. Kemometrik (CLS, ILS, PCR, PLS) yöntemlerde çalışmadan önce bir kalibrasyon seti tasarımı oluşturulur ve analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin farklı konsantrasyonlarını içerecek şekilde bir çalışma seti hazırlanır (Dinç & Baleanu, 2002).

Kemometrik kalibrasyonlar (PLS, ILS, CLS, PR) kalibrasyon seti tasarımı rastgele olarak veya analiz edilecek örnekteki maddelerin konsantrasyonlarını içerecek şekilde oluşturulur. Simetrik kalibrasyon setinin planlamasında analiz edilecek maddelerin konsantrasyonları, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde oluşturulur (Brereton, 2003).

2.5.3.1. Klasik En Küçük Kareler Yöntemi (Classical least squares-CLS)

Kullanılan en küçük kareler yöntemi çoklu lineer regresyonun spektroskopide Lambert-Beer eşitliğine uygulamasıdır. Lambert -Beer eşitliği aşağıda verilmiştir;

$$A = K \times C$$

Bu eşitlik çok sayıdaki dalga boyunda okunan absorbans değerleri için şöyle yazılabilir:

$$A_1 = K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1C} C_C$$

$$A_2 = K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots + K_{2C} C_C$$

$$A_3 = K_{31}C_1 + K_{32}C_2 + \dots + K_{3C} C_C$$

$$\dots = \dots$$

$$A_w = K_{w1}C_1 + K_{w2}C_2 + \dots + K_{wC} C_C$$

A_w : w. dalga boyundaki absorbans

K_{wc} : w. Dalga boyundaki c. Bileşenin kalibrasyon katsayısı

C_C : c. bileşenin konsantrasyonu.

Bunun çözümü matrisler kullanılarak yapılabilir. Kalibrasyon n sayıda bilinen konsantrasyondaki numunenin spektrumundaki ölçümlerine dayanır. Kalibrasyon,

numune seti yardımıyla K matrisinin yani katsayılar matrisinin çözümü için katsayılar en küçük kareler çözümü kullanılarak hesaplanır.

$$K = (C^T C)^{-1} C^T A$$

Daha sonra hesaplanan katsayılar kullanılarak bilinmeyen numunenin spektrumundaki absorbans ölçümleri ile hazırlanan matris eşitliğinde yerine konularak miktar tayini yapılır.

2.5.3.2. Ters En Küçük Kareler Yöntemi (Inverse least squares-ILS)

Kullanılan en küçük kareler yöntemi çoklu lineer regresyonun spektroskopisinde Lambert -Beer eşitliğinin tersine uygulamasıdır.

$$C = P \times A$$

Bu eşitlik çok sayıdaki dalga boyunda okunan absorbans değerleri için şöyle yazılabilir:

$$C_1 = P_{11}A_1 + P_{12}A_2 + \dots + P_{1w}A_w$$

$$C_2 = P_{21}A_1 + P_{22}A_2 + \dots + P_{2w}A_w$$

$$\dots = \dots$$

$$\dots = \dots$$

$$C_c = P_{c1}A_1 + P_{c2}A_2 + \dots + P_{cw}A_w$$

Burada:

A_w : w. dalga boyundaki absorbans

P_{cw} : w. dalga boyundaki c. kalibrasyon katsayısı

C_c : c. Bileşenin konsantrasyonu.

Aşağıdaki şekilde en küçük kareler yöntemine göre çözüm için P matrisinin elemanlarının kalibrasyon katsayıları bilinen karışım numunelerinden hareketle hesaplanır. Bu hesaplama:

$$P = (A^T A)^{-1} A^T C \text{ şeklinde yapılır.}$$

Daha sonra hesaplanan katsayılar yardımıyla bilinmeyen numune içerisindeki bileşenlerin konsantrasyonları P matrisi yardımıyla hesaplanır.

2.5.3.3.Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial least squares regression-PLS)

Kemometrik kalibrasyon yöntemler içerisinde en yaygın olarak tercih edilen yöntemdir. PLS yönteminde de hesaplamalar ILS ve CLS yöntemlerindeki gibi yapılmaktadır. PLS1 ve PLS2 olmak üzere 2 şekildedir. PLS1 1 bileşeni model olarak alırken PLS2 bütün bileşikleri modele katmaktadır. En genel PLS algoritması Wold ile Matren tarafından verilen PLS algoritmasıdır. Bu yöntem sayı vektörleri aracılığı ile X ile Y blokları arasındaki ilişkiye dayanmaktadır.

Birçok analitik uygulamada PLS metodlarının PCR'a göre daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Dermiş ve diğerleri, 2017).

2.5.3.4. Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (Principal compopnent regression-PCR)

Çalışma seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik doğrular elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem uygulanırken elde edilen konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğruların oluşturulması temeline dayanır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

Atorvastatin kalsiyum trihidrat	$C_{66}H_{74}CaF_2N_4O_{13}$ (Neutec, USP standardı)
Ezetimib	$C_{24}H_{21}F_2NO_3$ (Neutec, USP standardı)
Kuarsetin	$C_{15}H_{10}O_7$ (Merck)
İmitinib	$C_{29}H_{31}N_7O$ (Cipla)
Parasetamol	$C_8H_9NO_2$ (Sigma)
Kafein	$C_8H_{10}N_4O_2$ (Sigma)
Azitromisin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (Centruon)
Asetonitril	C_2H_3N (Merck, HPLC grade)
Etanol	C_2H_5OH (Carlo Erba)
Metanol	CH_3OH (Carlo Erba)
Monosodyum Fosfat	NaH_2PO_4 (Merck)
Sodyum Hidroksit	$NaOH$ (Merck)

3.2. Kullanılan Cihazlar

HPLC	(Shimadzu, HPLC LC-2030C)
Oto örnekleyici	(SIL-10AD VP),
Dedektör	(DAD, SPD-10A VP)
Spektrofotometre	(Jasco, V-730)
pH metre,	(Ohaus, ST3100F)
Buzdolabı	(Beko)
Vakum Filtirasyon Süzme Seti,	(BF-S2500)
Millipore ultrasaf su cihazı,	(Millipore)
Hassas terazi,	(Ohaus)
Ultrasonik banyo,	(Dizge)
Vorteks (Velp Scientifica)	(Velp)

3.3. Cam ve Diğer Malzemeler

XBridge, C18 (250 x 4,1mm iç çap, 5µm) (Waters Lot no:0151362711, Made in Ireland)

Standard quartz küvet (10 mm)

Vial vida kapaklı (Pyrex)
Mikro pipet (100-1000 µL) (Eppendorf)
Mikro pipet (20-200 µL) (Eppendorf)
Eppendorf tüp (Polipropilen)
Balon joje (Pyrex)
Mezür (Pyrex)
Eppendorf tüpü (Polipropilen)
Cam santrifüj tüpü (Pyrex)

3.4. Kullanılan Yazılım Programları

Kemometrik hesaplamalar için Multi değişkenli Kemometrik analiz programı R.G. Brereton'a ait program (multivariate calibration techniques) kullanılarak yapılmıştır. Mevcut program doğrudan yazılımcısı olan; R.G. Brereton'dan temin edilmiştir. Bilgisayara bağlı LabSolutions yazılımı (Class-VP 5.03), Excel.

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

Ezetimib stok çözeltisi: Analiz işlemlerinde kullanılacak EZE stok çözelti konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde etanolde hazırlanmıştır (Cayman Chemical, 2023). Ara stok çözeltiler ise, istenilen konsantrasyon değerine etanol:su (1:1, h/h) karışımı ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti bekletilmemiş, çalışmalar için taze olarak hazırlanmıştır.

Kuersetin Stok Çözeltisi: Analiz işlemlerinde kullanılacak Q stok çözelti konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde etanolde hazırlanmıştır (Cayman Chemical, 2022). Ara stok çözeltiler ise, istenilen konsantrasyon değerine etanol:su (1:1, h/h) karışımı ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti bekletilmemiş, çalışmalar için taze olarak hazırlanmıştır.

NaH₂PO₄ (20 mM) Çözeltisi: NaH₂PO₄.2H₂O'dan (M_A=156,01 g/gmol) 1,5602 g tartılır. Milli Q su ile 500 mL'lik balon jodede çözülür. pH'sı 1 M NaOH ile 4,16'e pH metrede ayarlanır.

NaOH (1M) Çözelti: NaOH'dan ($M_A=40,00$ g/gmol) 4,00 g tartılır, Milli Q su ile 100 mL'lik balon jode çözülür.

Hareketli Faz Bileşimi: Kromatografik analizlerde kullanılan hareketli faz; 20 mM NaH_2PO_4 :ACN 50:50 (h/h) karışımından oluşmaktadır. Tampon çözeltinin pH değeri (5.17) 1 M NaOH ile ayarlanmıştır. Hareketli faz 0,45 μm filtreden süzöldükten sonra 20 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur. Hareketli faz bileşiminin optimizasyonu için hareketli faz asetonitril ve tampon çözelti oranlarında değişiklikler yapılmış en iyi ayırımın elde edildiği çözelti oranlarında analizler yapılmıştır.

3.6.Yöntemler

3.6.1. Birinci Türev Sıfır-Kesim Yöntemi ile Analizin Yapılışı

Spektrofotometrik analizlerin yapılmasında öncelikle cihazdan gelebilecek olan etkileşimleri en aza indirebilmek amacıyla spektrofotometre cihazında sıfırlama işlemi yapılmıştır. İlk olarak iki küvet hücresi boş bırakılarak havaya karşı okuma yapılmış sonrasında aynı işlem kör çözelti için (çözücü olarak kullanılan çözelti) ile sıfırlama işlemi tekrarlanmıştır. Absorbans değerlerinin ölçümü için standart kuvars küvet (10 mm) kullanılmıştır. Öncelikle ATVC ve EZE standart çözeltileri etanolde hazırlandıktan sonra 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerlerinde hazırlanan standart çözeltilerinin 200-600 nm aralığında spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrum grafiklerinin 1. türevleri alınarak 220-320 nm aralığında sıfır-kesim yöntemi ile miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu yöntem pik tepesinin x eksenine olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir. x eksenine göre simetrik sinyaller içeren türev spektrumlarının değerlendirilmesinde ve birbiri üzerine çizdirilen eğrilerden birinin sıfırdan geçtiği noktadaki diğer maddeye ait spektrumdaki absorbans değerinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Birinci türev sıfır-kesim yöntemi çalışmalarında cihaz parametreleri: tepki süresi: 0,015 sn, tarama hızı: 1000 nm/dak., spektral yarı genişliği: 1 nm, veri aralığı: 0,2 nm ve $\Delta\lambda = 4$ nm olarak ayarlanmıştır.

3.6.2. Oran Türev Yöntemi ile Analizin Yapılışı

ATVC ve EZE'nin 200-600 nm aralığında kaydedilen spektrumlarına ek olarak çeşitli konsantrasyon değerlerinde ATVC ve EZE içeren standart çözeltileri

hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin birinci derece türevleri alınarak yine çeşitli konsantrasyon değerindeki ATVC ve EZE çözeltilerinin birinci derece türev spektrumlarına oranlanarak elde edilen spektrum grafiklerinden bilinmeyen çözeltideki madde miktarının konsantrasyonunun hesaplanması sağlanmıştır. Bu amaçla bölücü olarak ATVC analizi için 5 µg/mL EZE ve EZE analizi için 5 µg/mL ATVC çözeltisi kullanılmıştır.

3.6.3. PLS ile Analizin Yapılışı

Kemometrik yöntem olarak kullanılan PLS tekniğinde, ikili karışımları ve farmasötik formülasyonlarındaki ATV ve EZE'nin bilinmeyen absorbansların tahmini için absorbans matrisi ve konsantrasyon matrisi kullanılarak kalibrasyon veya regresyon elde edildi. Tahmin adımıdaki standart tahmin hatası (SEP), bu tekniğin tahmin yeteneğini tanımlamak için kullanıldı. SEP denklemi aşağıdaki eşitlik ile tanımlanmıştır. Burada C_i^{eklenen} eklenen ilacın konsantrasyonudur ve n ise toplam numune sayısıdır.

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^{\text{added}} - C_i^{\text{found}})^2}{n}}$$

ATVC ve EZE'nin farklı konsantrasyon değerlerindeki karışımları hazırlanarak bu karışımların spektrumları kaydedilmiş ve PLS kalibrasyon matrisi $\Delta\lambda=4$ nm aralıklarla 223-280 nm spektral dalga boyu aralığında hazırlanmıştır. ATVC ve EZE 2-15 µg/mL konsantrasyon değerlerinde çözeltiler hazırlanmıştır (Tablo 3.1.). Geri kazanım değerleri ve SEP değerleri hesaplanmış, sonuçların diğer yöntemlerle elde edilen verilerle karşılaştırılması yapılmıştır. PLS yönteminde Multi-variate analyze Adding for Excel v1.3 yazılımı (Brereton, 2002) kullanıldı.

HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar kemometri tekniğiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca analiz yöntemlerinin birbiri ile karşılaştırılması da ANOVA ile yapılmıştır.

Table 3.1. ATVC ve EZE için PLS yöntemi Kalibrasyon çözeltileri

Karışım no	ATVC (µg/mL)	EZE (µg/mL)
1	5	2
2	8	2
3	10	2
4	13	2
5	2	2
6	15	2
7	2	5
8	5	5
9	8	5
10	10	5
11	13	5
12	15	5
13	2	8
14	5	8
15	8	8
16	13	8
17	10	8
18	15	8
19	2	10
20	5	10

3.6.4. HPLC-DAD Yöntemi İle Analizin Yapılışı

Yöntemin geliştirilmesi ve analizler Lokman Hekim Üniversitesi bünyesindeki Enstrümental Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. HPLC kromatografik sistemi, bir pompa (LC-10AT VP), bir yazılım (Class-VP 5.03) kullanılarak bir bilgisayara bağlanan bir kontrolör (SCL-10A VP), bir otomatik numune alıcı (SIL-10AD VP) ile donatılmış Shimadzu marka cihazdan oluşmaktadır. Dedektör olarak Diyot Dizisi Dedektörü (DAD, SPD-10A VP) kullanıldı.

Sistem, üzerine kurulu bir veri işleme sistemi (Shimadzu, Kyoto, Japonya) bulunan CLASS-VP 5.0 iş istasyonunu kullanan bir kişisel bilgisayar olan bir sistem denetleyicisi (SCL-10A) aracılığıyla kontrol edilmiştir. Ayırma işlemi için XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap, 5 µm) analitik kolon (Waters, Milford, MA, ABD) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 24°C'ye ayarlanmıştır. Her kullanım sonrasında kolon MeOH-Su 50:50 (h/h) karışımı ile kolon hacminin yaklaşık 20 katı olacak şekilde yıkanmıştır.

3.6.4.1. HPLC Yönteminin Optimizasyonu

HPLC sisteminde kullanılacak iç standardın belirlenmesi amacıyla çeşitli ilaçlar denenmiştir. İç standart seçiminde imitinib, parasetamol, kafein, azitromisin ve kuersetinin piklerinin ATVC ve EZE pikleri ile çakışmaması, alıkonma zamanı, ayırıcılık ve kapasite faktörü gibi parametreler açısından en iyi ayırımı sağlayacak herhangi bir piklerle örtüşmeyecek iç standart piki özelliklerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca en uygun olarak kuersetin seçilmiştir.

Geliştirilecek HPLC yöntem için en iyi ayırımın elde edilmesi amacıyla en uygun kromatografik koşulların saptanması için sabit faz, hareketli faz organik çözücü (asetonitril, metanol), tampon çözelti konsantrasyonu, hareketli faz organik çözücü oranı (asetonitril 25, 30, 35, 40, 45, 50 (h/h)), hareketli faz pH değeri (pH=3, 3.5, 4.17, 4.5, 4.6, 5, 5.17, 6) ve hareketli faz akış hızının (0.8, 1, 1.2 mL/dk) ayırıcılığa etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında kullanılan numune, ATVC konsantrasyonu 1,0 µg/mL ve iç standart Q konsantrasyonu 1,0 µg/mL olarak hazırlanmıştır.

HPLC sisteminde kullanılacak sabit faz seçiminde XTerra, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap, 3,5 µm) analitik kolon (Waters, Milford, MA, ABD) ve XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm iç çap, 5 µm) analitik kolon (Waters, Milford, MA, ABD) ile deneyler yapılmıştır. ATVC, EZE ve Q pikleri için alıkonma zamanı, ayırıcılık, kapasite faktörü, pik kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı gibi parametreler göz önünde bulundurulduğunda en iyi ayırım XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap, 5 µm) analitik kolon ile sağlanmıştır.

Çalışmalar HPLC sisteminde izokratik, hareketli faz bileşimi; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5,17, h/h, 24 °C) karışımı ile 1 mL/dk akış hızında, 240 nm dalga boyunda yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL dir.

Yöntemler valide edildikten sonra gerçek numunelere ticari olarak ülkemizde satılan EZETEC 10/10, EZETEC 10/20 ve EZETEC 10/40 tablet formundaki preparatlarına da uygulanmıştır.

3.7. Analitik Yöntem Validasyonu

Geliştirilen yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması için International Conference on Harmonization (ICH) gereklilikleri kapsamında validasyon parametrelerine göre test edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; analitik çözeltilerin doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, özgünlük,

geri kazanım parametreleri ve tablette matriks etkisi incelenmiş istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (ICH Q2(R1), 1994; ICH Q2(R2), 2014; Jenke, 1996a, 1996b; Raul ve diğerleri, 2015). Geliştirilen HPLC-DAD analiz yöntemi için sistem uygunluğu 1 µg/mL için test edilmiştir.

Seçicilik

Numunede bulunan analizi yapılacak maddenin numunedeki diğer etkin madde veya yardımcı maddelerden ayrı olarak analiz edilebilme kalibiyeti sistemin seçiciliği göstermektedir. Seçicilik, karışımların analizine girişim yapma olasılığı olan maddelerin girişim dereceleri hakkında bilgi verir. Diğer maddeler varlığında analize esas maddenin miktarının doğru olarak tayin edilebilme göstergesidir. Validasyon yapılırken teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır.

Duyarlılık

Doğrusallığın geçerli olduğu aralıkta doğrunun eğimidir. Eğim arttıkça yöntem duyarlılığı artmaktadır. Duyarlılık; analit miktarında sürekli olarak azaltmaya gidildiğinde yöntemin verdiği cevabın hassasiyetinin bir ölçüsüdür. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) duyarlılık analizleri için kullanılan parametrelerdir.

Analitin tayininin yapılabileceği seviye ulaşamayan en düşük konsantrasyona gözlenebilme sınırı denilmektedir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden Sinyal/Gürültü oranı 3 (n=6) olduğu konsantrasyon değeri olarak alınır.

LOQ ise; Bir numunedeki analitin kesin ve doğru olarak miktarının tespit edilebildiği en düşük konsantrasyon düzeyidir.

Doğrudan yapılan deneylerden Sinyal/Gürültü oranı 10 (n=6) olduğu konsantrasyon değeri olarak alınır.

Doğrusallık

Konsantrasyona karşı cihaz cevabının doğrusal düz bir çizgi üzerinde olması, doğru orantılı olarak artmasıdır. Eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısı (R) doğrusallığı veren parametrelerdir. $R \geq 0.99$ olmalıdır.

Çalışma aralığı

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük konsantrasyondan, doğrusallıktan sapma gösterdiği konsantrasyona kadar olan değer aralığı çalışma aralığı olarak kabul edilir. Çalışma aralığı yöntemin doğrusallığı bulunduğundan sonra tespit edilir.

Doğruluk

Doğruluk, genellikle ölçülen sonuçların beklenen değerlerle karşılaştırılması yoluyla gösterilir. Doğruluk genellikle bias olarak ifade edilir. Gerçek değer ile yapılan analizler sonucunda elde edilen değerlerin ortalaması arasındaki fark “bias” olarak adlandırılır. Analitik yöntemin doğruluğu, elde edilen değerlerin gerçek değere yakınlığının ölçüsüdür. Bilinen miktardaki analit miktarının çok kez analiz edilmesi ile yapılır. Bir yöntem için doğruluk, geri kazanım çalışmaları ile belirlenir. Sonuçlar “% ortalama geri kazanım” olarak verilir. Doğruluğun kabul edilebilirliği için geliştirilen yöntem ile elde edilen sonuçlarla gerçek ya da bilinen analit konsantrasyonu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması gerekir.

Keskinlik

Keskinlik, yöntemin tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. % BSS (bağıl standart sapma), olarak verilir. Aynı yöntemin tekrarlı uygulaması sonrasında elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Gelistirilen yöntemlerin doğruluk ve keskinlik testi için gün içi ve günler arası ATVC ve EZE için çeşitli konsantrasyon değerlerinde n=6 tekrar ile deneyler yapılmıştır. Bulunan sonuçların ortalaması, standart hatası, standart sapması, bağıl standart sapması hesaplanarak doğruluk testi için eklenen ATVC ve EZE miktarı ile bulunan ATVC ve EZE miktarı arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Geri kazanım

Ortamdaki analitin hangi oranda ortamdan geri alınabildiğinin ölçüsüdür.

$$\% \text{Geri kazanım} = (\text{Cu}/\text{Cs}) \cdot 100$$

Cu = Çalışma sonucunda bulunan konsantrasyon

Cs = Bilinen ya da standart çalışma sonucunda elde edilen konsantrasyon

3.8. ATVC ve EZE'nin Tablette Analizi

Ülkemizde Tablet formunda ATVC ve EZE içeren çeşitli ticari preparatlar mevcut olup farklı doslardaki 3 ayrı preparatta deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bunlar;

Ezetec Plus 10 mg/10 mg Film Kaplı Tablet (10 mg EZE+10 mg ATVC)

Ezetec Plus 10 mg/20 mg Film Kaplı Tablet (10 mg EZE+20 mg ATVC)

Ezetec Plus 10 mg/40 mg Film Kaplı Tablet (10 mg EZE+40 mg ATVC).

Hassas terazi ile ölçülen 1 adet ortalama (n=6) tablet ağırlığı aşağıda verilmiştir:

10/10 mg Ezetec tablet: 0.2552 g

10/20 mg Ezetec tablet: 0.4148 g

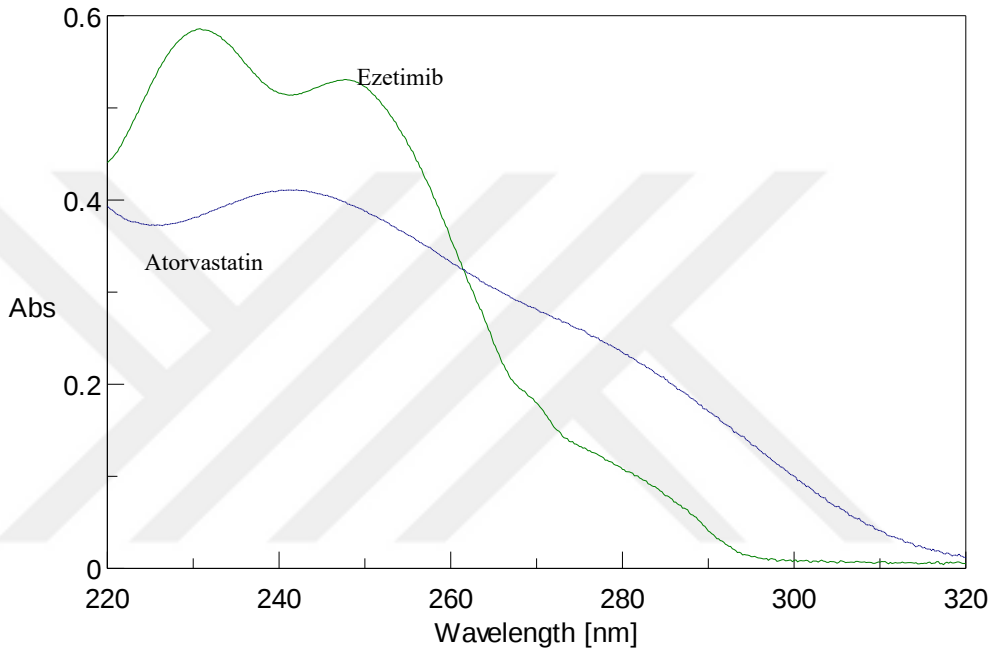
10/40 mg Ezetec tablet: 0.7044 g

Deneysel çalışmalarda tabletlerin analize hazır hale getirilmesi amacıyla öncelikle her biri 10 mg EZE ve sırasıyla 10, 20 ve 40 mg ATVC içeren Ezetec Plus 10/10, 10/20 ve 10/40 preparatlarından 20 adet tablet alınarak porselen havanda iyice ezilmiştir. Ortalama bir tablet ağırlığında numuneler tartılarak 300 mL'lik balonjojeye aktarılmıştır. Etanol ile toz haline getirilmiş tablet çözülerek ve etanol ile 300 mL hacme tamamlanarak tabletlerin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra karıştırma süresinin etkisini ölçmek amacıyla manyetik karıştırıcıda tablet içeren balon jöjeler 20 dk., 30 dk. ve 40 dk. olacak şekilde karıştırılmıştır. Karıştırma süresi sonunda sonunda çözeltiler 0,45 µm gözenek çapına sahip membran filtreden süzülerek analize hazır hale getirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerde 40 dk. karıştırma süresi sonrası elde edilen çözeltiler analiz için kullanılmıştır. Tabletler film kaplı olduğu için üstteki film kabı kazınarak iç kısımlarının alınmasına dikkat edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Birinci Türev Sıfır-Kesim Yöntemi Analiz Sonuçları

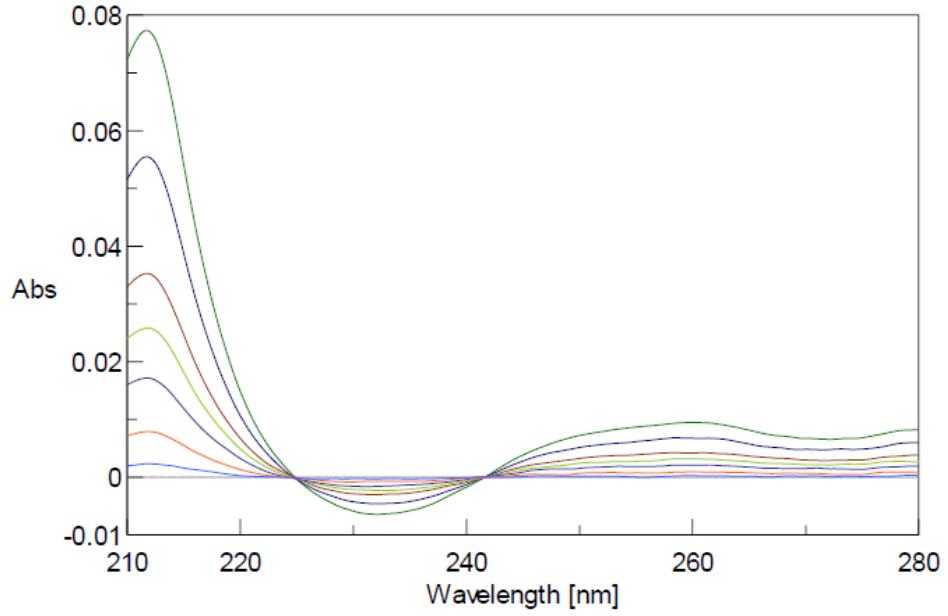
ATVC ve EZE standart çözeltileri etanolde hazırlandıktan sonra 10 µg/mL konsantrasyon değerlerinde hazırlanan standart çözeltilerinin 200-600 nm aralığında spektrumları kaydedilmiştir. Alınan spektrumların 220-320 nm aralığında elde edilen absorpsiyon spektrumları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



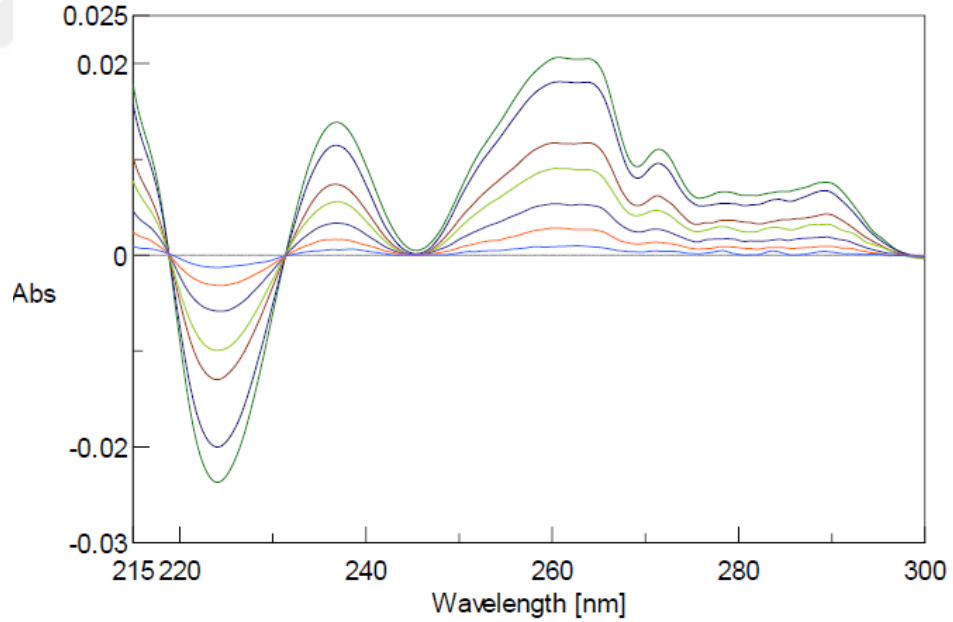
Şekil 4.1. ATVC ve EZE standart çözeltilerine ait absorpsiyon spektrumları

ATVC ve EZE'in türev spektrofotometrisi ile eş zamanlı analizinin yapılabilmesi için stok çözeltiden istenilen konsantrasyon değerine etanol:su (1:1, h/h) karışımı ile seyreltilerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyon (1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 ve 20 µg/mL) değerlerinde hazırlanan standart çözeltilerinin kaydedilen spektrumlarının birinci derece türevleri alınarak 220-320 nm aralığında sıfır-kesim yöntemi ile miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır. Bu yöntem ile ATVC miktar tayini için $\lambda=245,2$ nm ve EZE miktar tayini için $\lambda=224,8$ nm dalga boyu değerlerinde miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen verilerden oluşturulan kalibrasyon eğri parametreleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tekrarlı analiz sonuçlarına göre elde edilen verilerden hesaplanan standart hata sonuçları çok düşük değerlerde olup yine elde edilen r^2 değerleri 1'e çok yakın olarak bulunmuştur.

Şekil 4.2. (a) ve (b)'de ATVC (210-280 nm aralığında) ve EZE (215-300 nm aralığında) için 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 ve 20 µg/mL konsantrasyon değerlerinde sırasıyla elde edilen birinci türev spektrumları verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.2. (a) ATVC ve (b) EZE için 1. türev spektrumları

Tablo 4.1. Kalibrasyon eğri parametreleri (n=6)

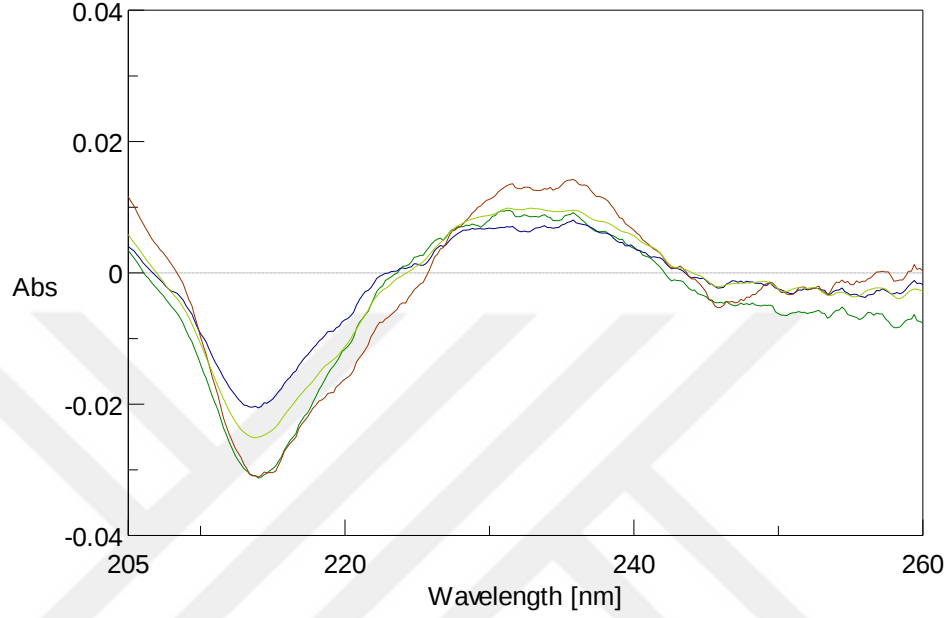
Parametre	Birinci türev S ıfır-kesim		Oran 1. Türev		HPLC	
	ATVC	EZE	ATVC	EZE	ATVC	EZE
λ (nm)	245,2	224,8	232,6	213,8	240	240
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	1,0-20,0	1,0-20,0	2,0-10,0	2,0-10,0	0,05-1,0	0,05-1,0
($y=mx+n$) Eğim (m) $\pm$ SH ^a	0.0002 $\pm$ 1,2.10 ⁻⁶	0.0012 $\pm$ 8,6.10 ⁻⁷	-0.0008 $\pm$ 1,0.10 ⁻⁶	-0,0034 $\pm$ 1,0.10 ⁻⁵	0,831 $\pm$ 0.0004	0,925 $\pm$ 0.0005
($y= mx+n$) Kesim(n) $\pm$ SH ^a	0.0001 $\pm$ 4,7.10 ⁻⁶	0.0005 $\pm$ 7,9.10 ⁻⁶	0,0104 $\pm$ 2,5.10 ⁻⁵	0,0027 $\pm$ 1,0.10 ⁻⁵	-0,0137 $\pm$ 0.0004	0,0014 $\pm$ 0.0001
r^2	0.9991	0.9961	0.9987	0.9969	0.9985	0.9996

SH^a : Standart hata**4.2. Oran Birinci Türev Yöntemi Analiz Sonuçları**

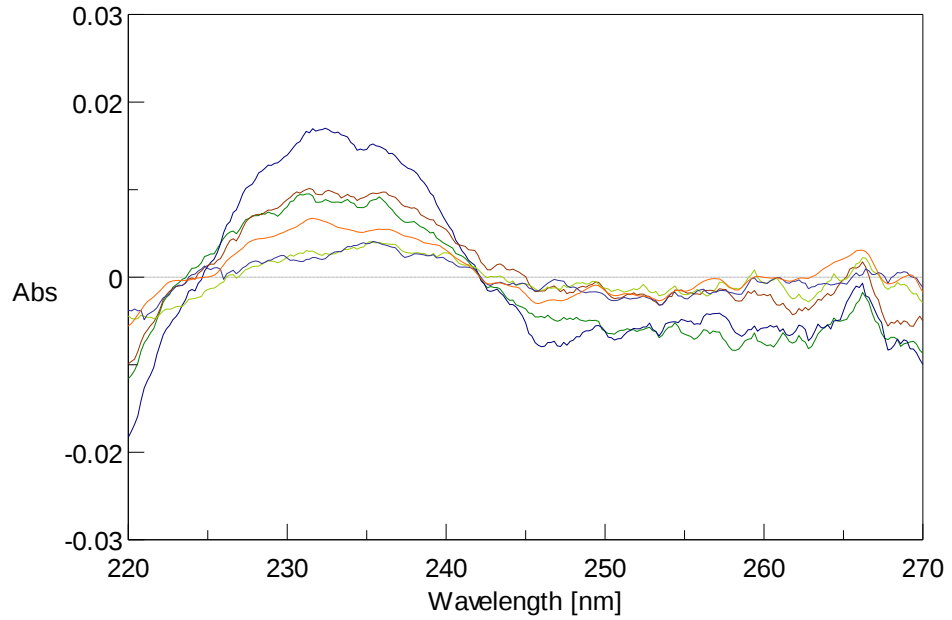
Oran 1. türev spektrum çalışmaları için hem ATVC hem de EZE'nin artan konsantrasyonlarında standart karışım halinde çözeltiler hazırlanmıştır. Karışım halindeki çözeltilerin hazırlanmasında ATVC miktar tayini için EZE (2 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonu sabit tutularak ATVC konsantrasyonu artırılmış (2, 5, 8, 10, 13 ve 15 $\mu\text{g/mL}$) ve sabit bir ATVC (5 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyon değerine bölünmüş ve elde edilen absorbans spektrumlarının birinci derece türevi alınmış, spektrum grafikleri kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. ATVC miktar tayini $\lambda=232,6$ nm dalga boyunda yapılmıştır.

EZE miktar tayini için benzer şekilde ATVC (2 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonu sabit tutularak EZE konsantrasyonu artırılmış (2, 5, 8, 10, 13 ve 15 $\mu\text{g/mL}$) ve sabit bir EZE (5 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyon değerine bölünmüş ve elde edilen absorbans spektrumlarının birinci derece türevi alınmış, spektrum grafikleri kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. EZE miktar tayini $\lambda=213,8$ nm dalga boyunda yapılmıştır. Elde edilen verilerden oluşturulan kalibrasyon eğri parametreleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tekrarlı analiz sonuçlarına göre elde edilen verilerden hesaplanan standart hata sonuçları çok

düşük değerlerde olup yine elde edilen r^2 değerleri 1'e çok yakın olarak bulunmuştur. Şekil 4.3. (a) ve (b)'de EZE (205-260 nm aralığında) ve ATVC (220-270 nm aralığında) değişen konsantrasyon değerlerinde elde edilmiş oran birinci türev absorptans spektrumları gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.3. (a)ATVC ve (b) EZE için oran birinci türev absorptans spektrumları

4.3. PLS Yöntemi Analiz Sonuçları

ATVC ve EZE miktar tayinlerinin yapılmasında PLS yöntemi kullanılmıştır. Saptanan spektral koşullarda kalibrasyon veri setinin ve bilinmeyen numunelerin absorbans değerleri 220-270 nm dalga boyu aralığında alınmıştır ve kemometrik kalibrasyonlar 223-280 nm dalga boyu bölgesindeki absorbans değerlerinin vektörel ölçümleri kullanılarak bilinmeyen çözeltinin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Kalibrasyon veri setinin oluşturulması için okunacak absorbans değerleri Tablo 3.1’de verilen çözeltilerin hazırlanmasıyla elde edilmiştir. Tablo 3.1’de belirtilen 20 farklı çözelti için 20 farklı dalga boyunda absorbans değerleri okunarak 20x20 boyunda matris elde edilmiş bu matris kullanılarak konsantrasyon tahminleri Brereton-Excel programı kullanılarak hesaplatılmıştır. Bilinmeyen numune çözeltileri de bu kalibrasyon veri seti aralığında olacak şekilde seyreltilerek konsantrasyon tahminleri matematiksel modellemede tahmin edilmiştir. En iyi tahmin değeri elde edilen en küçük SEP değerine göre belirlenmiştir.

Yöntemin tekrarlanabilirliği aynı gün ve farklı günlerde tekrarlanan analizlerin sonuçlarının karşılaştırılması ve bağıl standart sapma değerlerinin hesaplanmasıyla yapılmıştır.

4.4. HPLC Yöntemi Analiz Sonuçları

HPLC ile ATVC ve EZE miktar tayinlerinin yapılması amacıyla hareketli fazda organik çözücü etkisi, ATVC ve EZE’nin kromatografik davranışlarının incelenmesi amacıyla farklı sabit fazların ayırıcılığın etkisi değerlendirilmiştir. Sabit faz seçiminde XTerra, C₁₈ (250 x 4,1 mm iç çap, 3,5 µm) analitik kolon ve XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm iç çap, 5 µm) analitik kolonun ATVC ve EZE piklerinde kromatografik parametreler üzerindeki etkileri incelenmiş ve en iyi ayırım (kapasite faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık açısından) XBridge, C₁₈ analitik kolonda gözlemlenmiştir.

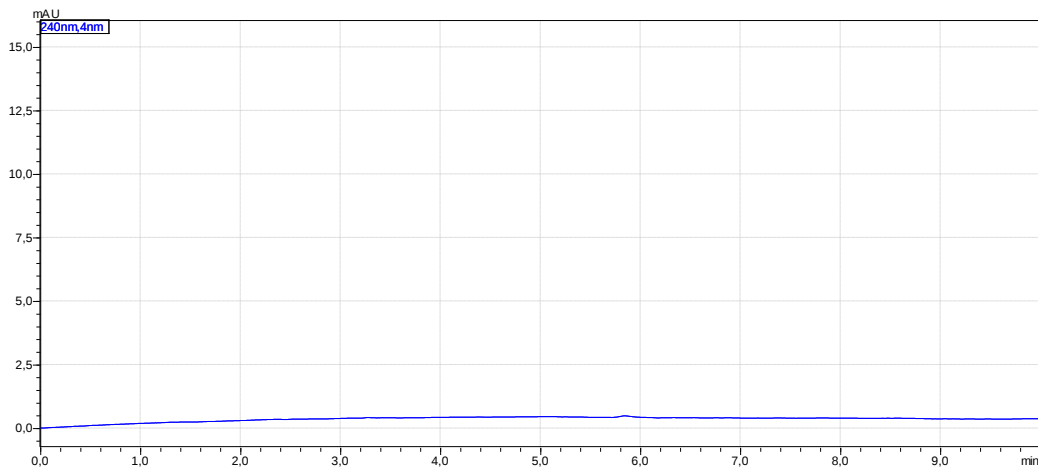
Hareketli faz seçiminde hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin etkisi, hareketli faz pH ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Öncelikle organik düzenleyici seçimi incelenmiştir. Bu amaçla metanol ve asetonnitrilin değişik konsantrasyonları hareketli faz bileşiminde incelenmiştir. Asetonitril ile oluşturulan hareketli faz bileşiminde

ATVC ve EZE pikleri iyi bir ayırım ile gözlemlenirken, metanol içeren hareketli faz ile iyi bir ayırım gözlemlenmemiştir. Hareketli faza hacimce değişik oranlarda asetonitril eklenerek en iyi ayırımın gözlemlendiği hareketli faz bileşimine ulaşılmaya çalışılmıştır. Daha sonra hareketli faz pH değerinin ayırıcılığa etkileri incelenmiş ve en iyi kromatografik koşulların belirlenmesinde; organik çözücü oranı (asetonitril 25, 30, 35, 40, 45 (h/h)), hareketli faz pH değeri (pH=3, 3,5, 4,17, 4,5, 4,5, 4,6, 5, 5,17, 6) ve hareketli faz akış hızının (0,8, 1, 1,2 mL/dk) etkileri incelenmiştir. Geliştirilen kromatografik analiz yönteminde oluşturulan en iyi koşullar izokratik, hareketli faz bileşimi; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5,17, h/h, λ =240 nm 24 °C) karışımı ile 1 mL/dk akış hızı olarak belirlenmiştir.

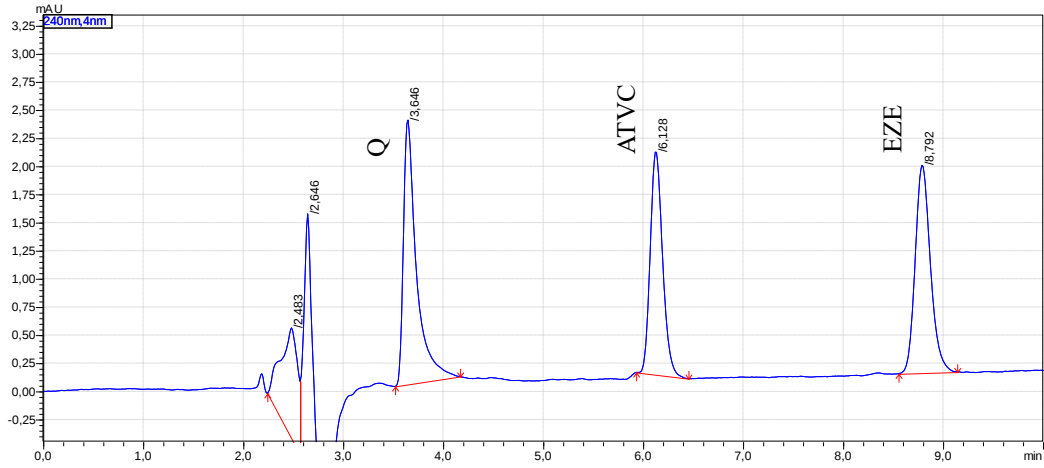
4.4.1. İç Standart Seçimi

ATVC ve EZE analizi işlemlerinde iç standart seçimi için imitinib, parasetamol, kafein, azitromisin ve kuersetin incelenmiştir. İmitinib, parasetamol, kafein, azitromisin pikleri ATVC ve EZE pikleri ile örtüşmüş ve bir ayırım gerçekleştirilememiştir. Kuersetin (Q) piki, ATVC ve EZE pikinden farklı bir alıkonma zamanında elde edilmiş ve bu üç madde için iyi bir ayırım elde edilmiştir. Q (1 µg/mL) iç standart olarak seçilmiştir.

Seçilen analiz koşullarında Şekil 4.4.'de hareketli faza ait kromatogram ve Şekil 4.5.'de 1 µg/mL ATVC, EZE ve Q (IS) içeren standart çözelti için elde edilen kromatogram gösterilmektedir. Q, ATVC ve EZE için alıkonma zamanları sırasıyla 3,6, 6,1 ve 8,8 dk olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. İlaç içermeyen hareketli faza ait kromatogram



Şekil 4.5. 1µg/mL ATVC, EZE ve Q (IS) içeren standart çözelti için elde edilen kromatogram

Geliştirilen HPLC-DAD yönteminde 1µg/mL ATVC, EZE ve Q (IS) içeren standart çözelti için system uygunluğuna bakılmış ve alıkonma süreleri, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı açısından parametreler değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). Kuyruklanma faktörü <2, kapasite faktörü değerleri $1 < k' < 10$ aralık değerinde ve teorik tabaka sayısı >2000 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. Sistem uygunluk parametreleri

Aktif madde	Alıkonma zamanı* (min)	Kapasite faktörü (k')	Kuyruklanma faktörü	Teorik tabaka sayısı
IS	3,644 ± 0,005	2,65	1,93 ± 0,016	10438,08
ATVC	6,128 ± 0,008	5,11	1,17 ± 0,006	8620,80
EZE	8,796 ± 0,013	7,82	1,17 ± 0,008	11938,96

*n=6, sonuçlar ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir

4.5. Analiz Yöntemlerinin Validasyonu

Geliştirilen yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması, Bölüm 3.7.'de verilen validasyon parametrelerine göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla validasyon çalışmalarında; seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Tablo 4.3'de ATVC ve EZE analizi için geliştirilen birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev, HPLC-DAD ve PLS yöntemleri için saptanan LOD ve LOQ değerleri verilmiştir.

Tablo 4.3. Geliştirilen yöntemler için saptanan LOD ve LOQ değerleri

	EZE		ATVC	
	LOD($\mu\text{g/mL}$)	LOQ($\mu\text{g/mL}$)	LOD($\mu\text{g/mL}$)	LOQ($\mu\text{g/mL}$)
1. Türev sıfır kesim	0,05	0,15	0,05	0,15
Oran spektrum 1. Türev	0,05	0,15	0,05	0,15
HPLC-DAD	0,01	0,03	0,01	0,03
PLS	0,05	0,15	0,05	0,15

Geliştirilen yöntemler içerisinde en hassas çalışma değerlerine HPLC-DAD ile ulaşılmıştır. LOD değeri HPLC sisteminde 0,01 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Çalışma aralığı ve doğrusal aralık değerleri aynı konsantrasyon değerlerinde saptanmıştır. Tablo 4.1’de doğrusal aralık birinci türev-sıfır kesim yönteminde 1-20 $\mu\text{g/mL}$, oran birinci türev yönteminde 2-10 $\mu\text{g/mL}$ ve HPLC-DAD yönteminde 0,05-1,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında bulunmuştur. Belirtilen doğrusal aralık değerlerinde r^2 değerleri 1’e oldukça yakın bulunmuştur.

ATVC ve EZE’nin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları geliştirilen farklı yöntemler için farklı konsantrasyon değerlerinde çalışılmıştır. Birinci türev-sıfır kesim yönteminde 2,5, 7,5 ve 10,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerlerinde, oran birinci türev yöntemi için 2,0, 5,0 ve 10,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerlerinde, HPLC-DAD yöntemi için 0,1, 0,4 ve 0,8 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerlerinde ve PLS yöntemi için 2,5, 7,5 ve 10,0 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası (n=6) değerlendirme sonuçları Tablo 4.4’da verilmiştir.

Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklenen (µg/mL)	Gün içi			Günler arası		
	Bulunan ^a (µg/mL)	Kesinlik ^b RSD (%)	Doğruluk ^c Bias (%)	Bulunan ^a (µg/mL)	Kesinlik ^b RSD (%)	Doğruluk ^c Bias (%)
1. Türev-sıfır kesim (EZE)						
2,5	2,48± 0,030	1,19	-0,58	2,49± 0,036	1,43	-0,41
7,5	7,52± 0,057	0,76	0,29	7,60± 0,042	0,55	1,38
10,0	9,99± 0,82	2,82	-0,09	9,95± 0,014	0,13	-0,44
1. Türev-sıfır kesim (ATVC)						
2,5	2,54± 0,007	0,276	1,97	2,54± 0,028	1,10	1,59
7,5	7,44± 0,014	0,18	-0,74	7,45± 0,066	0,88	-0,67
10,0	10,00±0,007	0,07	0,07	10,16± 0,092	0,90	1,61
Oran 1. Türev (EZE)						
2,0	1,99± 0,021	1,07	-0,11	1,99± 0,007	0,36	-0,49
5,0	5,08± 0,004	0,07	1,68	5,06± 0,019	0,38	1,23
10,0	9,99± 0,134	1,34	-0,02	10,02±0,043	0,43	0,29
Oran 1. Türev (ATVC)						
2,0	1,99 ± 0,046	2,31	-0,08	1,99 ± 0,046	2,31	-0,08
5,0	5,07 ± 0,118	2,32	1,43	5,03 ± 0,041	0,82	0,63
10,0	9,97 ± 0,090	0,90	-0,29	10,01± 0,076	0,76	0,17
HPLC (EZE)						
0,1	0,100± 0,022	1,22	-0,12	0,097± 0,063	0,75	-2,50
0,4	0,405± 0,056	1,10	1,14	4,201± 0,019	0,88	5,08
0,8	0,799± 0,072	0,84	-0,06	0,816± 0,030	1,03	2,00
HPLC (ATVC)						
0,1	0,097± 0,010	0,71	-3,27	0,10 ± 0,011	0,76	0,92
0,4	0,383± 0,043	0,46	-4,17	0,388± 0,029	0,94	-3,09
0,8	0,807± 0,085	2,73	0,89	0,796± 0,026	0,95	-0,54
PLS (EZE)						
2,5	2,53 ± 0,012	1,19	1,02	2,55 ± 0,001	0,05	1,80
7,5	7,58 ± 0,005	0,16	1,00	7,60 ± 0,005	0,17	1,32
10,0	10,15± 0,015	0,37	0,51	10,06± 0,006	1,46	0,58
PLS (ATVC)						
2,5	2,54 ± 0,002	0,19	1,71	2,54± 0,007	0,68	1,65
7,5	7,58 ± 0,003	0,09	1,08	7,60 ± 0,002	0,06	1,25
10,0	10,09± 0,041	1,00	0,98	10,10± 0,025	0,60	1,01

^a: ortalama ± standart hata, ^b: Bağlı standard sapma, ^c: (bulunan miktar – eklenen miktar)/ bulunan miktar x100

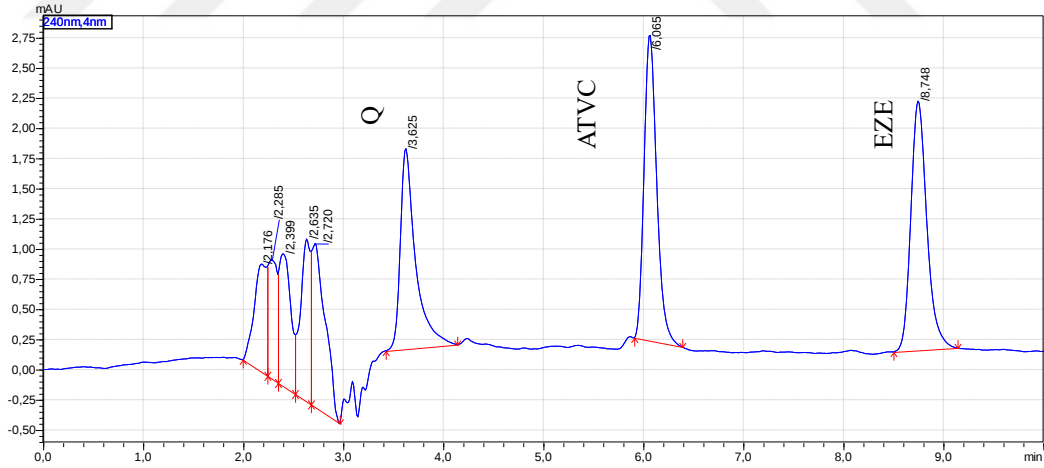
4.6. Tablette ATVC ve EZE Analizi

Birinci türev-sıfır kesim yönteminde, oran birinci türev spektrofotometrik yöntemi, HPLC-DAD yöntemi ve PLS yöntemi için validasyon parametrelerinin değerlendirilmesinden sonra geliştirilen yöntemler ile ülkemizde satılan ticari preparatlarda ATVC ve EZE miktar tayinlerinin yapılması çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla ticari olarak satılan preparatlardan Ezetec Plus 10/10, 10/20 ve 10/40 preparatları satın alınmış ve Bölüm 3.8’de bahsedildiği gibi preparatlar analize hazır hale getirilmiştir. Geliştirilen yöntemler ile yapılan analiz sonuçlarına göre elde edilen geri kazanım değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir.

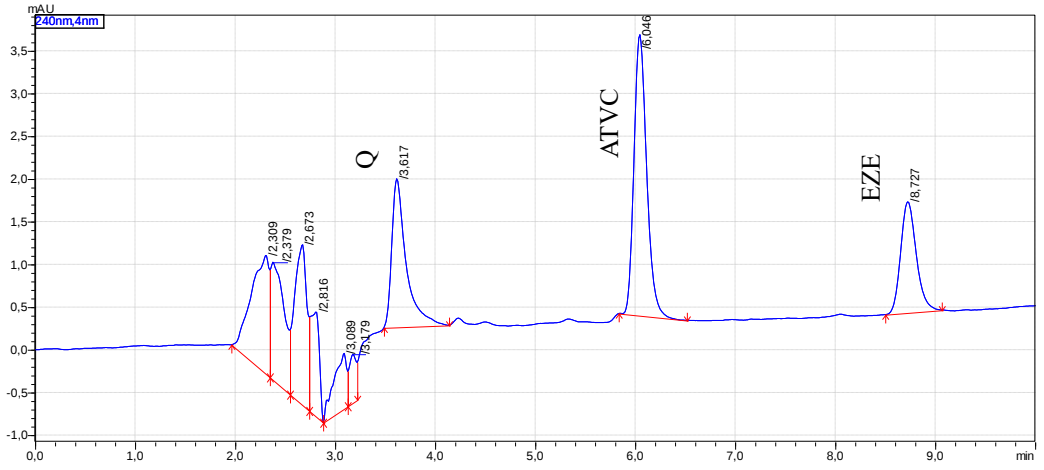
Tablo 4.5. Ezetec Plus 10/10, Ezetec Plus 10/20 ve Ezetec Plus 10/40 preparatları için elde edilen geri kazanım değerleri (% Geri kazanım, n=6 için ortalama değerler)

	1.Türev Sıfır-kesim		Oran 1. Türev		HPLC		PLS	
	EZE	ATVC	EZE	ATVC	EZE	ATVC	EZE	ATVC
10/10	97,89	100,23	101,96	98,49	98,99	98,64	102,70	101,60
10/20	101,11	96,82	99,09	101,92	98,65	100,84	98,78	101,86
10/40	98,10	102,82	95,43	99,35	99,13	102,28	97,65	97,24

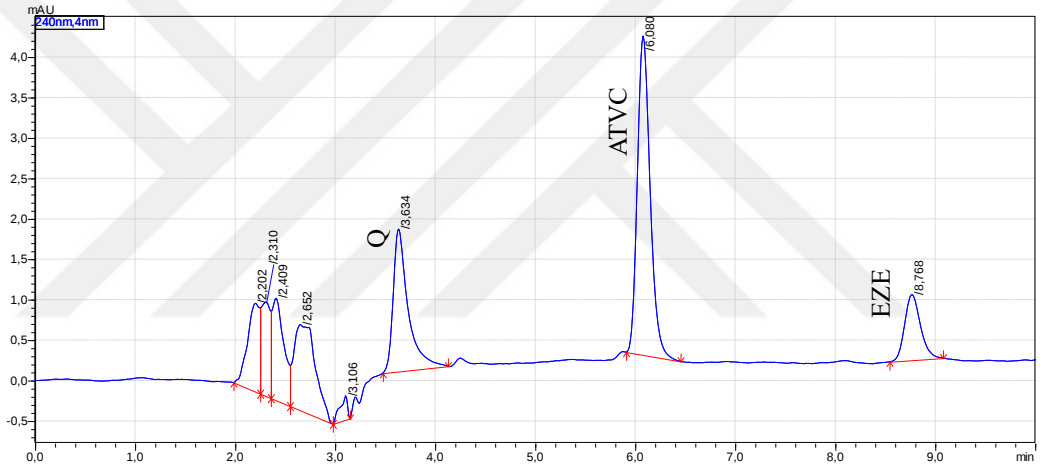
HPLC-DAD sisteminde geliştirilen yöntem yapılan tablette ATVC ve EZE analizlerinde oldukça iyi bir ayırım elde edilmiştir. Ezetec Plus 10/10, Ezetec Plus 10/20 ve Ezetec Plus 10/40 tablet analizleri için yapılan HPLC-DAD sistemine yapılan enjeksiyonlar sonrası elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. Kromatogramlardan da görüleceği gibi ATVC ve EZE pikleri ve iç satndart piki tabletten gelen herhangi bir kirletici veya başka piklerle örtüşmemiş iyi bir ayırım gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. Ezetec Plus 10/10 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram



Şekil 4.7. Ezetec Plus 10/20 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram



Şekil 4.8. Ezetec Plus 10/40 ve Q (IS) içeren tablet için elde edilen kromatogram

Geliştirilen yöntemler ile tablet analizleri sonrasında elde edilen sonuçların birbiri ile istatistiksel olarak bir fark olup olmadığı ANOVA ile test edilmiş ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev, PLS (Partial least squares regression) ve HPLC-DAD yöntemleriyle atorvastatin kalsiyum (ATVC) ve ezetimib (EZE)'nin eş zamanlı analizi için yeni yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemlerin tablette ATVC ve EZE analizine uygulaması amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemler ICH gerekliliklerine göre valide edilmiş ve tablette ATVC ve EZE analizine uygulanması amacıyla Ezetec Plus 10/10, Ezetec Plus 10/20 ve Ezetec Plus 10/40 tabletlerde miktar tayini yapılmıştır.

Spektrofotometrik analiz yöntemlerinden birinci türev sıfır-kesim spektrofotometrik yöntemi; karışım halindeki maddelerin kimyasal bir ön işlem yapılmaksızın ayrılmasına ve nitel olarak karışımı meydana getiren maddelerin analizine olanak sağlayan pratik ve tercih edilen bir analiz yöntemidir. Bu tez çalışmasında ATVC ve EZE miktar tayinleri için bir birinci türev sıfır-kesim spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntem ile tablette etkin madde analizi uygulamaları yapılmıştır. Birinci türev sıfır-kesim yönteminde ATVC miktar tayini $\lambda=245,2$ nm ve EZE miktar tayini için $\lambda=224,8$ nm dalga boyu değerlerinde yapılmıştır. Spektrum taraması yapılan etkin maddelerin türev spektrumlarının alınmasında özellikle karışım halindeki maddelerin analizi için uygun dalga boyu seçimi miktar hesaplamalarında büyük öneme sahiptir. Dalga boyunun belirlenmesi ve belirlenen dalga boyunda ölçülecek absorbans değerleri nicel analiz için en önemli dikkat edilmesi gereken hususdur. Yine spektrum taraması sonrası dalga boyu çalışma aralığının belirlenmesinde spektrumda gözlenen maksimum ve minimum noktaları dikkate alınarak aralık değerinin seçilmesi gerekmektedir. Birinci türev sıfır-kesim yönteminde dalga boyu aralığı 210-320 nm olarak seçilmiştir. Oran birinci türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi çalışmalarında da absorbans spektrumları 210-320 nm aralığında çalışılmıştır. Kaydedilen spektrumların oranlanması için 5 µg/mL konsantrasyon değerinde ATVC ve EZE seçilmiştir. ATVC miktar tayini $\lambda=232,6$ nm dalga boyunda, EZE miktar tayini $\lambda=213,8$ nm dalga boyunda yapılmıştır.

Kemometrik bir yaklaşım olarak PLS tekniği birçok analitik yönetime göre numunelerin hazırlanması için aşırı zaman gerektirmemesi, karmaşık sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemlerine gerek duymaması, ön arıtma işlemi veya herhangi bir tüketme işlemi gerektirmemesi bakımından daha pratik ve çevre dostu olarak avantajlıdır.

Literatürde ATVC ve EZE analizine yönelik çeşitli spektrofotometrik yöntemler bulunmaktadır. Ancak spektrofotometrik veriler kullanılarak kemometrik teknikler kullanılarak ikili karışımlarında ATVC ve EZE eş zamanlı analizine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle geliştirilen spektrofotometrik yöntemler sonrası kemometrik çok bileşenli bir teknik olan PLS ile de miktar tayini çalışması yapılmıştır. PLS tekniği ile yapılan çalışmada kalibrasyonlar 223-280 nm dalga boyu bölgesindeki absorbans değerlerinin dalgaboyu aralığında $\Delta\lambda = 4$ nm'lik farklarla vektörel ölçümleri kullanılarak yapılmıştır.

HPLC-DAD ile analiz çalışmaları kapsamında en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde; kromatografik parametreler olarak alıkonma zamanı, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü, ayırıcılık ve teorik tabaka sayısı dikkate alınmıştır. ATVC ve EZE'nin HPLC-DAD ile eş zamanlı analizinde sabit faz (analitik kolon) özellikleri; hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşimi oranının etkisi, hareketli faz pH değeri ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Organik çözücü seçimi için metanol ve asetonitril denenmiş, en iyi ayırım asetonitril içeren hareketli faz ile elde edilmiştir. Sabit faz seçiminde XTerra, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap, 3,5 µm) ve XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm iç çap, 5 µm) analitik kolonlar denenmiştir. ATVC ve EZE piklerinde kromatografik parametreler üzerindeki etkileri incelenmiş ve en iyi ayırım (kapasite faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık açısından) XBridge, C₁₈ analitik kolonda gözlemlenmiştir. Analiz çalışmaları izokratik, hareketli faz bileşimi; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5,17, h/h, λ =240 nm 24 °C) karışımı ile 1 mL/dk akış hızında XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm, iç çap, 5 µm) analitik kolon kullanılarak yapılmıştır. İç standart olarak kuersetin (1 µg/mL) kullanılmıştır. İç standard seçimi için değişik etkin maddeler denenmiştir. İmitinib, parasetamol, kafein, azitromisin ve kuersetinin analize uygunluğu incelenmiştir. İmitinib, parasetamol, kafein, azitromisin pikleri ATVC ve EZE pikleri ile örtüşmüş ve iyi bir ayırım gerçekleştirilememiştir. Kuersetin (Q) (1 µg/mL) piki, ATVC ve EZE pikinden farklı bir alıkonma zamanında elde edilmiş ve bu üç madde için iyi bir ayırım elde edilmiştir ve iç standart olarak seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.5.). Geliştirilen HPLC-DAD yönteminde 1 µg/mL ATVC, EZE ve Q (IS) içeren standart çözelti için system uygunluğuna incelenmiş ve alıkonma süreleri IS için; 3,6, ATVC için 6,1 ve EZE için 8,8 dk olarak bulunmuştur. Sistem uygunluğu için kuyruklanma faktörü <2, kapasite

faktörü değerleri $1 < k' < 10$ aralık değerinde ve teorik tabaka sayısı > 2000 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2.).

Geliştirilen yöntemlerin validasyon çalışmaları ICH gerekliliklerine göre yapılmış; seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.4.).

Geliştirilen yöntemler ile ülkemizde satılan ticari preparatlarda ATVC ve EZE miktar tayinlerinin yapılması çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla ticari olarak satılan preparatlardan Ezetec Plus 10/10, 10/20 ve 10/40 preparatlarının geliştirilen yöntemlerde miktar tayinleri yapılmış ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.5.). Geliştirilen yöntemler ile tablet analizleri sonrasında elde edilen sonuçların birbiri ile karşılaştırılması ANOVA ile yapılmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Statin grubu, kolesterol ve trigliserid düşürücü olan Atorvastatin kalsiyum (ATVC) ve kolesterol ve trigliserid yüksekliği tedavisinde kullanılan ezetimib (EZE) kan yüksek kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürmek için tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. ATVC ve EZE miktar tayinlerinin hızlı ve kolay bir şekilde yapılması klinik kullanımda akılcı ve güvenli doz belirlenmesi amacıyla yapılacak ilaç analizi çalışmalarında çok önemlidir. Bu çalışmada birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev spektrofotometrik, PLS ve HPLC-DAD yöntemleriyle ATVC ve EZE'nin eş zamanlı analizi için yeni yöntemler geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemlerin tablette ATVC ve EZE analizine uygulaması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi çalışmalarında ek olarak ICH gerekliliklerine göre validasyon çalışmaları yapılmış; seçicilik, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiştir. Doğrusal aralık birinci türev-sıfır kesim yönteminde 1-20, oran birinci türev spektrofotometrik yönteminde 2-10 µg/mL ve HPLC-DAD yönteminde 0,05-1,0 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri incelendiğinde LOD değeri HPLC sisteminde 0,01 µg/mL olarak bulunmuştur. Birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev spektrofotometrik yöntem ve PLS yöntemlerinde 0,01 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler içerisinde en hassas çalışma değerlerine HPLC-DAD ile ulaşılmıştır. Spektrofotometrik yöntemlerin geliştirilmesinde absorbans spektrumları 210-320 nm aralığında çalışılmıştır. Birinci türev sıfır-kesim yönteminde ATVC miktar tayini $\lambda=245,2$ nm ve EZE miktar tayini için $\lambda=224,8$ nm dalga boyu değerlerinde miktar tayini yapılmıştır. Oran birinci türev spektrum çalışmaları için ise; ATVC miktar tayini $\lambda=232,6$ nm dalga boyunda, EZE miktar tayini $\lambda=213,8$ nm dalga boyunda yapılmıştır. PLS tekniği ile yapılan çalışmada ATVC ve EZE kalibrasyonları 223-280 nm dalga boyu bölgesindeki absorbans değerlerinin $\Delta\lambda = 4$ nm'lik farklarla absorbans ölçümleri kullanılarak yapılmıştır. HPLC-DAD ile analiz çalışmaları izokratik, hareketli faz bileşimi; 20 mM NaH₂PO₄:ACN 50:50 (pH=5,17, h/h, $\lambda=240$ nm 24 °C) karışımı ile 1 mL/dk akış hızında XBridge, C₁₈ (250 x 4,1 mm iç çap, 5 µm) analitik kolon kullanılarak yapılmıştır. İç standart olarak kuersetin (1 µg/mL) seçilmiştir. Yöntemler birbiriyle istatistiksel olarak karşılaştırılması ANOVA testiyle yapılmış ve, $p>0,05$ için anlamlı bir fark olmadığı

gözlennemiştir. Geliştirilen yöntemler, tablette ATVC ve EZE analizine uygulanması amacıyla Ezetec Plus 10/10, Ezetec Plus 10/20 ve Ezetec Plus 10/40 tabletlerde miktar tayini yapılmış ve geri kazanım değerleri %90,99-%111,11 aralığında bulunmuştur. Sonuç olarak tablette ATVC ve EZE analizi için basit, seçici, hassas, doğru ve tekrarlanabilir birinci türev sıfır-kesim, oran birinci türev spektrofotometrik, PLS ve HPLC-DAD yöntemleri geliştirilmiştir.



KAYNAKÇA

- American Heart Association (2022). *What is Cholesterol*. Erişim adresi <https://www.heart.org/-/media/Files/Health-Topics/Cholesterol/What-is-Cholesterol.pdf>
- American Heart Association (2024). *HDL(Good), LDL(Bad) Cholesterol and Triglycerides*. Erişim adresi <https://www.heart.org/en/healthtopics/cholesterol/hdl-good-ldl-bad-cholesterol-and-triglycerides>
- Ashfaq, M., Ullahkhan, I., Qutab, S. S., & Naeemrazzaq, S. (2007). HPLC determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulations. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 52(3), 1220-1223. *Soc.*, 52(3), 1220-1223.
- Ashutosh K, S., Debnath, M., Rao, J. S., & Sankar, D. G. (2015). New validated stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of atorvastatin and ezetimibe in human plasma by using PDA detector. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 385-391.
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., Simes, J., Downs, J. R., Gotto, A., Clearfield, M., Holdaas, H., Gordon, D., Davis, B., Dahlof, B., Poulter, N., ... Newman, C. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366(9493), 1267-1278. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1
- Ballantyne, C. M., Houri, J., Notarbartolo, A., Melani, L., Lipka, L. J., Suresh, R., & Veltri, E. P. (2003). Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation*, 107(19), 2409-2415. doi:10.1161/01.CIR.0000068312.21969.C8
- Belal, T. S., Daabees, H. G., Abdel-Khalek, M. M., Mahrous, M. S., ve Khamis, M. M. (2013). New simple spectrophotometric method for determination of the binary mixtures (atorvastatin calcium and ezetimibe; Candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide) in tablets. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(2), 118-126. doi:10.1016/j.jpha.2012.10.004
- Brar, K. (2004). Ezetimibe (Zetia). *Medical Journal Armed Forces India*, 60(4), 388-389. Erişim adresi

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377123704800194?via=ihub>

Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant* (1. baskı, ss. 297–338). John Wiley - Sons.

Cayman Chemical (2023). *Product information Ezetimibe*. Erişim adresi <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/16331.pdf>

Cayman Chemical (2022). *Product information Quercetin (Hydrate)*. Erişim adresi <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/10005169.pdf>

Dermiş, S., Dinç, E., Kuşçu, M. E., ve Biliktü, M. (2017). Farmasötik formülasyonlarda allopurinol’ün sıfırıncı dereceden ve birinci dereceden türev spektrofotometrisi yöntemleriyle kantitatif analizi. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37(2), 73–80.

Dinç, E., & Baleanu, D. (2002). Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(3), 715–723. doi:10.1016/S0731-7085(02)00359-X

El-Bagary, R. I., Elkady, E. F., El-Sherif, Z. A., & Kadry, A. M. (2014). LC-MS-MS simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 52(8), 773–780. doi:10.1093/chromsci/bmt109

Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, 33(11), 1569–1582. doi:10.1016/s0022-2275(20)41379-3

Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 86(5), 484–493. doi:10.2183/pjab.86.484

Ertürk, S., Aktaş, E. S., Ersoy, L., & Fıçıcıoğlu, S. (2003). An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(5), 1017–1023. doi: 10.1016/S0731-7085(03)00408-4

Eser, B., ve Dinçel Sepici, A. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51–57. doi:10.26567/johse.2018250150

- Hamilton-Craig, I., Kostner, K., Colquhoun, D., ve Woodhouse, S. (2010). Combination therapy of statin and ezetimibe for the treatment of familial hypercholesterolemia. *Vascular Health and Risk Management*, 6(1), 1023–1037. doi:10.2147/VHRM.S13496
- International Conference on Harmonization ICH (1994). *Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.
- International Conference on Harmonization ICH (2023). Guideline on *Validation Of Analytical Procedures Q2(R2)*.
- Jenke, D. . (1996a). Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(5), 737–757.
- Jenke, D. R. (1996b). Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. III. Ruggedness, re-validation and system suitability. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19(12), 1873–1891.
- Jia L., Betters J., L., Yu L. (2011). Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport. *NIH Public Access*, 73, 239–259. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142233.
- Kabra, R.P., Kadam, S. C., Mane, V. B., Kadam, S. S., & Mamde, C. G. (2014). Simple novel UV-spectroscopic method for estimation of Ezetimibe in tablet dosage form. *Am. J Pharm Health Res*, 2(9), 66-70.
- Lipitor Prescribing Information (2009). *Pfizer*. doi:10.5040/9781350363595.art-2812
- Mermer, M., ve Acar TEK, N. (2017). Adipoz doku ve enerji metabolizması üzerine etkileri. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(3), 40–46. doi:10.22312/sdusbed.292229
- Narasimharaju, B. C., Devalarao, G., & Ramanjaneyulu, S. (2015). Spectrophotometric Method for the Determination of Ezetimibe in *Pharmaceutical Formulations*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 1(2), 413-416. doi:10.1155/2010/238140
- Nodari, S., Rocca, P., Saporetti, A., Bettari, L., Foresti, A. L., Tanghetti, E., Metra, M., & Dei Cas, L. (2007). The combination of Ezetimibe and Statin: a new treatment for hypercholesterolemia. *Heart International*, 3(1), 12–17. doi: 10.4081/hi.2007.12

- Onat A, Hergenç G., Uzunlar B., Ceyhan K, Uyarel H, Yazıcı M., Doğan Y., Özmay M., Toprak S., Sansoy V. (2003). Türk Toplumunda Koroner Risk Faktörü Olarak HDL-kolesterol: Öngördürücülüğü, Belirleyicileri ve İlişkileri, *Türk Kardioloji Derneği Arşivi*, 31(1), 9-16
- Onur, F. (2019). *Analitik Kimya II*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayın No:101.
- Patel, V., Baldha, R., & Patel, D. (2010). Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ezetimibe by ratio spectra derivative spectrophotometry and reverse phase-high performance liquid chromatography. *Asian Journal of Chemistry*, 22(4), 2511–2517.
- Raul, S. K., Aravelli, A. B., & Jhansi, D. (2015). RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of atorvastatin and ezetimibe in pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(2), 178–181.
- Seshachalam, U., & Kothapally, C. B. (2008). HPLC analysis for simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe in pharmaceutical formulations. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31(5), 714–721. doi:10.1080/10826070701854402
- Shah, Y., Iqbal, Z., Ahmad, L., Khan, A., Khan, M. I., Nazir, S., ve Nasir, F. (2011). Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(9–10), 557–563. doi:10.1016/j.jchromb.2011.01.004
- Skoog, D. A., Holler, J. F., ve Crouch, S. R. (2016a). *Principals of Enstrumental Analysis 7th Edition* (s. 749–750). Cengage Learning.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., ve Crouch, S. R. (2016b). *Principals of Instrumental Analysis 7th Edition* (s. 304). Cengage Learning.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., ve Crouch, S. R. (2016c). *Principles of Instrumental Analysis 7th Edition* (s. 747–778). Cengage Learning.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, James, F., ve Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9. baskı, s. 181). Mary Finch.
- Skoog, D. A., West, D. M., ve Holler, J. F. (2013a). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9. baskı, s. 883). Mary Finch.

- Skoog, D. A., West, D. M., ve Holler, J. F. (2013b). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9. baskı, s. 915). Mary Finch.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, J. F. (2013c). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9. baskı, s. 878). Mary Finch.
- Sonawane, S., Shirkhedkar, A., Fursule, R., ve Surana, S. (2007). Simultaneous spectrophotometric estimation of atorvastatin calcium and ezetimibe in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(5), 683–684. doi:10.4103/0250-474x.38477
- Şenel F. (2012). Kolesterol. *Bilim ve Teknik*, 84-86. Erişim adresi:
<https://services.tubitak.gov.tr/edergi/yazi.pdf?jsessionid=TMhmMOA+tcDtD7TmXb51W2YH?dergiKodu=4&cilt=45&sayi=758&sayfa=84&yaziid=32696>
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2016). *Türkiye İlaç Pazarındaki Değer Bazında Yüksek Satışa Sahip İlaçların Farmakoekonomik Açısından Değerlendirilmesi: 2006-2015 Dönemi*.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2021 *TEMD Dislipidemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu* (9. Baskı). Ankara
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (2016). *Kısa Ürün Bilgisi Ezetect Plus*. Erişim adresi:
https://titck.gov.tr/storage/Archive/2021/kubKtAttachments/EZETECPLUS10mg10mgfilmkapltabletKB_a47506fc-8992-4cc2-ae43-8b3d31611094.pdf
- Wan, S., Ding, Y., Ji, X., ve Meng, R. (2021). The safety and efficacy of Ezetimibe Plus Statins on ASVD and Related Diseases. *Aging and Disease*, 12(8), 1857–1871. doi:10.14336/AD.2021.0412
- Yilmaz, B., ve Kaban, S. (2018). UV and First Derivative Spectrophotometric Methods for the Estimation of Atorvastatin in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Advanced Pharmacy Research*, 2(2), 89–94. doi:10.21608/aprh.2018.5824

EKLER

EK 1. HAMMADDE ANALİZ SERİFİKALARI



EK 2. KOLON ANALİZ SERİFİKASI



EK 3. ÖZGÜNLÜK RAPORU

ATORVASTATİN KALSİYUM VE EZETİMİB'İN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ VE KEMOMETRİK YÖNTEMLER
KULLANILARAK EŞZAMANLI MİKTAR TAYİNLERİ

ÖRNEK RAPORU

% 15	% 12	% 8	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	labakademi.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	vs1.doczz.fr İnternet Kaynağı	<% 1

elektrokimyasal nanobiyosensor ve mikroçip tasarımı", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

54 Halisçelik, Ozan. "Moeksipril Hidroklorür - Hidroklorotiazid İçeren Ticari Farmasotik Preparatın Kemometrik Yöntemlerle Kantitatif Analizi", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

55 Karaca, Sakine Atila. "Asenapin'in Stabilite Gostergeli Ypsk Yontemi Ile Farmasotik Dozaj Formlarından Tayini ve Validasyonu", Anadolu University (Turkey), 2021

Yayın

56 Özden, Tuğba. "Enalapril Maleat ve Hidroklorotizidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi", Ankara Üniversitesi (Turkey), 2024

Yayın

Alıntılanı çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

EK 4. ÖZGEÇMİŞ

NİLÜFER BURCU ER

Öğrenim Bilgileri

Yüksek Lisans: Lokman Hekim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Yüksek Lisans Programı (2022-2024)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beşeri Tıbbi Ürünlerde Ruhsatlandırma Esasları Programı (2018-2020)

Lisans: İstanbul Üniversite Eczacılık Fakültesi (1997-2001)

İş Deneyimi

Eczane eczacılığı (2001-2005)

Ruhsatlandırma işlemleri, Kalite - Özel Sektör (2006-2016)

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu - Kamu (2016-...)

Sertifika ve Eğitim Programları

- 17. Ulusal Spektroskopi Kongresi 30 Mayıs - 01 Haziran 2024, Zonguldak
- Klinik Değerlendirme Süreçleri ile Eş Zamanlı Yürütülen Kalite Değerlendirme Süreçlerine Genel Bakış Eğitimi (07.2024)
- ICH Q3C (Impurities: Guideline For Residual Solvents) ve ICH Q3D (Guideline For Elemental Impurities) Kılavuzları Eğitimi (04.2024)
- İleri Tedavi Tıbbi Ürünleri Eğitimi /Roche Müstahzarları A.Ş (07.2023)
- Biyolojik ve Biyoteknolojik Ürünlerin Kalite Değerlendirmesinde Kullanılan Analitik Metodlar ve Dosya Üzerinden Örnek Çalışmalar (03.2023)
- Yeni Yaklaşımlarla Proses Validasyonu (03.2024)
- Biyolojik ve Biyoteknolojik Ürünlerin Kalite Değerlendirmesinde Kullanılan Analitik Metodlar ve Dosya Üzerinden Örnek Çalışmalar (03.2023)
- Stabilizatörler Ve Yeni Yaklaşımlarla Proses Validasyonu (02.2023)
- Biyolojik Biyoteknolojik Ürünler için Kritik Endüstriyel Üretim Basamakları (05.2023)
- TS-EN ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi /TSE (01-02.2023)
- Extractables & Leachables Workshop/Timothy W. Robison (FDA), Mike Saleh (Pfizer), Andrew Teasdale (AstraZeneca) (11.2018)
- ICH Kılavuzlarına göre Ürün ve Etkin Maddedeki Safsızlıklar/ BTS Bilişim Eğitim ve Danışmanlık, (07.2018)
- Biyolojik ve Biyoteknolojik Ürünlerde Proses Validasyonu (07.2018)
- Aşıların Üretim Teknolojileri Eğitimi (05.2018)
- Beşeri Tıbbi Ürünlerde Yapılan Biyolojik/Mikrobiyolojik Testler Eğitimi (05.2018)
- Beşeri Tıbbi Ürünlerde Yapılan Biyolojik/Mikrobiyolojik Testler Eğitimi (03.2018)