



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TİMOLOL MİKTAR TAYİNİ İÇİN HIZLI, SPESİFİK VE HASSAS UPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

ULAŞ ÇİFÇİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TİMOLOL MİKTAR TAYİNİ İÇİN HIZLI, SPESİFİK VE HASSAS UPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

ULAŞ ÇİFÇİOĞLU

520419004

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU

İSTANBUL, 2023

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimi ve tez çalışmalarım boyunca bana yol gösteren, destekleyici tutumu ve deneyimleri her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU'na,

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvarlarını ve analitik cihazlarını kullanmama olanak sağlayan Deva Holding A.Ş. Ar-Ge Merkezi'ne,

Profesyonel iş hayatımda ve akademik hayatımda desteklerini esirgemeyen değerli yöneticilerim Sayın Ümmüş ÇİÇEK, Sayın Hüsamettin ÖZDEMİR ve Sayın Dr. Rıfat Emre BURMAOĞLU'na

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisansım sırasında da hem maddi hem manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili ablalarım Öncü USLUER ve Burcu Eylem GÖZTEPE'ye ve sevgili annem Nebahat ÇİFÇİOĞLU'na tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET	v
SUMMARY	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1.Timolol Maleat İlaç Aktif Maddesi	2
1.2.Timolol Tayini İçin Analitik Çalışmalar	3
1.3.Sıvı Kromatografisi.....	9
1.3.1.UPLC Sistemi Bileşenleri	10
1.4.Metot Optimizasyonu ve Validasyonu	15
1.4.1.Seçicilik	15
1.4.2.Doğrusallık.....	15
1.4.3.Ölçme ve Gözlenebilirlik Sınırı	16
1.4.3.1.Ölçme Sınırı	16
1.4.3.2.Gözlenebilirlik Sınırı	16
1.4.4.Doğruluk	16
1.4.5.Çalışma Aralığı	17
1.4.6.Kesinlik	17
1.4.6.1.Sistem Kesinliği	17
1.4.6.2.Tekrarlanabilirlik	17
1.4.6.3.Ara Kesinlik	17
1.4.7.Çözelti Stabilitesi.....	18
1.4.8.Sağlamlık	18
1.4.9.Sistem Uygunluk.....	19
2.MATERYAL ve YÖNTEM	20
2.1.Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler	20
2.2.Kullanılan Cihazlar	20
2.3.Deneysel Yöntemler.....	20
2.3.1.Kromatografik Koşullar	20
2.3.2.Çözelti Hazırlıkları.....	21
2.3.2.1.Mobil Faz Hazırlığı.....	21

2.3.2.2.Standart Çözeltisi Hazırlığı.....	21
2.3.2.3.Bitmiş Ürün Numune Çözeltisi Hazırlığı.....	22
2.3.2.4.Hammadde Numune Çözeltisi Hazırlığı.....	22
2.3.2.5.Yöntem.....	22
2.3.2.6.Sistem Uygunluk Parametreleri	23
2.3.2.7.Hesaplama.....	23
3.METOT OPTİMİZASYONU.....	25
3.1.Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi	25
3.1.1.Çözelti Hazırlıkları.....	25
3.1.2.Belirlenen Enjeksiyon Hacimleri	26
3.2.Dalga Boyu Optimizasyonu	27
3.2.1.Çözelti Hazırlanışı	27
3.3.Mobil Faz A pH optimizasyonu.....	29
3.3.1.Çözelti Hazırlığı.....	30
3.4.Akış Hızı Optimizasyonu.....	31
3.5.Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyonu	33
4.METOT VALİDASYONU	34
4.1.Seçicilik	34
4.2.Keskinlik Çalışması	35
4.2.1.Sistem Keskinliği Çalışması	35
4.2.2.Tekrarlanabilirlik Çalışması.....	35
4.2.3.Ara Keskinlik Çalışması	35
4.3.Doğrusallık Çalışması	36
4.3.1Çözelti Hazırlıkları.....	36
4.4.Doğruluk Çalışması	37
4.4.1.Doğruluk Çözelti Hazırlıkları	37
4.5.Çalışma Aralığı	38
4.5.1.Çözeltilerin Stabilitesi.....	38
4.5.1.1.Standart ve Numune Çözeltisi Stabilitesi.....	38
4.5.1.2.Mobil Faz Stabilitesi	39
5.SONUÇ.....	41
5.1.Metot Optimizasyonu Sonuçları	41
5.1.1.Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi.....	41
5.1.2.Dalga Boyu Optimizasyonu Sonuçları.....	49
5.1.3.Mobil Faz pH Optimizasyon Sonuçları.....	50
5.1.4.Akış Hızı Optimizasyon Sonuçları	51

5.1.5.Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyon Sonuçları	51
5.2.Metot Validasyonu Sonuçları	52
5.2.1.Seçicilik Validasyon Parametresi Sonuçları	52
5.2.2.Kesinlik Validasyon Parametresi Sonuçları	57
5.2.2.1Sistem Kesinliği Sonuçları.....	57
5.2.2.2.Tekrarlanabilirlik Sonuçları	57
5.2.2.3.Ara Kesinlik Sonuçları.....	59
5.2.3.Doğrusallık Parametresi Sonuçları.....	63
5.2.4.Doğruluk Parametresi Sonuçları	64
5.2.5.Çalışma Aralığı	64
5.2.6.Çözeltilerin Stabilesi Sonuçları	65
5.3.Sonuçların Yorumlanması	66



ÖZET

TİMOLOL MİKTAR TAYİNİ İÇİN HIZLI, SPESİFİK VE HASSAS UPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Timolol Maleate bir beta-adrenerjik antagonisttir ve levo izomeri daha aktif izomerdir. Antihipertansif, antiaritmik, antianginal ve antiglokom ajanı olarak kullanılabilir. Timolol Maleat, gözlerdeki basıncı veya göz içi basıncını azaltmak için göz damlası solüsyonlarında kullanılan seçici olmayan bir beta-adrenerjik antagonisttir. Ayrıca hipertansiyon tedavisinde ilaç olarak tablet formunda da kullanılır. Açık açılı glokom ve hipertansiyon gibi durumların yönetimi için etkili bir ajandır.

Timolol ilaç aktif maddesinin, kantitatif tayini için kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda geliştirilen metot, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu çalışmada, bu metotlara alternatif olarak Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazına uygun bir analitik metot geliştirilmiş ve bu metodun validasyonu yapılmıştır. HPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlar UPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlara oranla daha fazla organik çözücü kullanılmasına ihtiyaç duydukları için çevreye bırakılan organik atık miktarının artmasına yol açarak, çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkiyi de arttırmaktadır.

Mevcut olumsuzlukların azaltılması için UPLC cihazında geliştirilen yöntem, HPLC cihazında geliştirilen yöntemlere kıyasla daha hassas, daha seçici, daha hızlı, daha güvenilir, daha ekonomik ve çevreye daha duyarlı olmasının yanı sıra daha az örnek numune ile çalışmayı da mümkün kılmıştır. Çalışmamızda Timolol Maleat ilaç aktif maddesinin miktarının tayin edilmesi için UPLC cihazlarında kullanılmak üzere, Timolol molekülünün kromatografik olarak yeterli bir ayırım gösterdiği, kesin ve tekrarlanabilir analitik bir metot geliştirilmiştir. Geliştirilen bu metodun doğruluğunun ispatlanması için, “ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures” rehberi incelendi ve bu rehber doğrultusunda; Kesinlik, Ara-Kesinlik, Sağlamlık, Çözelti Stabilitesi, Çalışma Aralığı, Seçicilik, Doğruluk ve Doğrusallık parametrelerinin çalışmaları yapıldı. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda geliştirilen ve validasyonu tamamlanan bu metot ile Timolol ilaç aktif maddesini içeren ve eczanelerden temin edilen ilaçların Timolol miktar tayini analizleri yapıldı. Yapılan analizler doğrultusunda elde edilen sonuçların, analizi yapılan ilaçların prospektüsünde yazan etiket değerleri ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: UPLC, Kromatografi, Timolol, İlaç, Optimizasyon, Validasyon

02.2023

Ulaş ÇİFÇİOĞLU

SUMMARY

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RAPID, SPECIFIC AND SENSITIVE UPLC METHOD FOR TIMOLOL QUANTIFICATION

Timolol Maleate is a beta-adrenergic antagonist and the levo isomer is the more active isomer. It can be used as an antihypertensive, antiarrhythmic, antianginal and antiglaucoma agent. Timolol Maleate is a non-selective beta-adrenergic antagonist used in eye drop solutions to reduce pressure in the eyes or intraocular pressure. It is also used in tablet form as a medicine in the treatment of hypertension. It is an effective agent for the management of conditions such as open-angle glaucoma and hypertension.

Chromatographic methods are used for the quantitative determination of the active ingredient of timolol. The method developed in most of these methods is designed for use in a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) instrument. In this study, an analytical method suitable for Ultra Pressure Liquid Chromatography (UPLC) device was developed as an alternative to these methods and this method was validated. Since the methods developed for use in the HPLC device require the use of more organic solvents than the methods developed for use in the UPLC device, they increase the negative impact on the environment by causing an increase in the amount of organic waste released to the environment, environment and human health.

The method developed in the UPLC device in order to reduce the existing problems is more sensitive, more selective, faster, more reliable, more economical and more environmentally friendly compared to the methods developed in the HPLC device, as well as making it possible to work with less sample samples. A precise and reproducible analytical method has been developed for the quantification of maleate API, for use in UPLC devices, in which the Timolol molecule shows sufficient chromatographic separation. In order to prove the accuracy of this developed method, the “ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures” guide was reviewed and in line with this guide; Precision, Intermediate Precision, Robustness, Solution Stability, Working Range, Selectivity, Accuracy and Linearity parameters were studied. With this method, which was developed and validated in line with these studies, Timolol quantification analyzes of drugs containing Timolol active drug substance and obtained from pharmacies were performed. It has been determined that the results obtained in the direction of the analyzes are the same as the label values written in the package insert of the analyzed drugs.

Key Words: UPLC, Chromatography, Timolol, Pharmaceutical, Optimization, Validation

SEMBOL LİSTESİ

<u>Semboller</u>	<u>Açıklamalar</u>
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
M	: Mol
mM	: Milimol
R²	: Determinasyon Katsayısı
t	: Zaman (s)
T	: Sıcaklık (°C)
°C	: Santigrat Derece
dk	: dakika

KISALTMALAR LİSTESİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
UPLC	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TIM	: Timolol
DS	: diklofenak sodyum
NS	: Naproksen Sodyum
TEA	: Trietilamin
ACN	: Asetonitiril
LOQ	: Ölçme Sınırı
LOD	: Gözlenebilirlik Sınırı
HSA	: İnsan serum albümin
TFA	: triflotosasetik asit
IS	: İç standart
DOR	: Dorzolamid
LAT	: Latanoprost
BRZ	: Brinzolamid
BRM	: Brimonidin Tartarat
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi – Kütle spektroskopisi/ Kütle spektroskopisi
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
ICH	: Uluslararası Uyum Konseyi
SS	: Standart Sapma
RSD	: Bağlı Standart Sapma
CWT	: Sürekli dalgacık dönüşümü
UV	: Ultraviyole
NP	: Normal Faz
RP	: Ters Faz
IP	: İyon çifti
IC	: İyon Değişim
SEC	: Boyut Eleme
RT	: Alıkonma Zamanı
RRT	: Bağlı Alıkonma Zamanı

h / h : Hacim / Hacim
h / h / h : Hacim / Hacim / Hacim



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Timolol Maleat ilaç aktif maddesinin 2 boyutlu molekül yapısı.....	3
Şekil 1.2: Timolol Maleat aktif maddesinin 3 boyutlu molekül yapısı	3
Şekil 1.3: Sıvı Kromatografisi Sistemi İçin Akım Şeması	10
Şekil 1.4: Kolon Tanımlama Örneği.....	12
Şekil 5.1: 2.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	41
Şekil 5.2: 2.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	42
Şekil 5.3: 3.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	43
Şekil 5.4: 3.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	44
Şekil 5.5: 4.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	45
Şekil 5.6: 4.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	46
Şekil 5.7: 5.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği	47
Şekil 5.8: Mobil Faz A (Çözücü) Kromatogramı	53
Şekil 5.9: Mobil Faz B Kromatogramı	53
Şekil 5.10: Standard Çözeltisi Kromatogramı	54
Şekil 5.11: Timolol İmpürite B Çözeltisi Kromatogramı	54
Şekil 5.12: Timolol İmpürite C Çözeltisi Kromatogramı	54
Şekil 5.13: Timolol İmpürite Karışım Çözeltisi Çözeltisi Kromatogramı	55
Şekil 5.14: Combigan Numune Çözeltisi Kromatogramı	55
Şekil 5.15: Azarga Numune Çözeltisi Kromatogramı	56
Şekil 5.16: Xolatim Numune Çözeltisi Kromatogramı	56
Şekil 5.17: Doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği.....	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1: Kullanılan Reaktif Tablosu	20
Tablo 2-2: Kullanılan Standart ve İlaç Numuneleri Tablosu.....	20
Tablo 2-3: Kullanılan Cihazlar Tablosu	20
Tablo 2-4: Gradient Çalışma Programı	21
Tablo 2-5: Enjeksiyon Şeması Tablosu	23
Tablo 3-1: Enjeksiyon Hacmi Optimizasyonu Enjeksiyon Şeması	26
Tablo 3-2: Dalga Boyu Optimizasyonu için Enjeksiyon Şeması Tablosu	28
Tablo 3-3: Mobil Faz A pH Değerleri Tablosu	29
Tablo 3-4: Mobil Faz A pH Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedür Tablosu.....	30
Tablo 3-5: Akış Hızı Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedürü	32
Tablo 3-6: Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedürü	33
Tablo 4-1: Seçicilik Enjeksiyon Prosedürü	34
Tablo 4-2: Sistem Kesinliği için Enjeksiyon Prosedürü.....	35
Tablo 4-3: Tekrarlanabilirlik Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü	35
Tablo 4-4: Ara Kesinlik Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü	36
Tablo 4-5: Doğrusallık Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü.....	37
Tablo 4-6: Doğruluk Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü	37
Tablo 4-7: Çalışma Aralığı için Enjeksiyon Prosedürü.....	38
Tablo 4-8: Mobil Faz Stabilitesi Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü	40
Tablo 5-1: 2,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	41
Tablo 5-2: 2,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	41
Tablo 5-3: 2,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	42
Tablo 5-4: 2,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	42
Tablo 5-5: 3,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	43
Tablo 5-6: 3,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	43
Tablo 5-7: 3,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	44
Tablo 5-8: 3,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	44
Tablo 5-9: 4,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	45
Tablo 5-10: 4,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	45
Tablo 5-11: 4,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	46
Tablo 5-12: 4,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	46
Tablo 5-13: 5,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları.....	47
Tablo 5-14: 5,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı	47
Tablo 5-15: Enjeksiyon Hacmi Belirlenmesi Analiz Sonuçları	48
Tablo 5-16: Dalga Boyu Optimizasyonu için Sistem Uygunluk ve Numune Sonuçları	50
Tablo 5-17: Mobil Faz pH Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları	50
Tablo 5-18: Akış Hızı Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları	51
Tablo 5-19: Kolon Fırın Sıcaklık Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları.....	52
Tablo 5-20: Seçicilik Validasyon Parametresi için Sistem Uygunluk Sonuçları.....	52
Tablo 5-21: Sistem Kesinliği Sonuçları.....	57
Tablo 5-22: Combigan Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları.....	58
Tablo 5-23: Xolatin Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	58
Tablo 5-24: Azarga Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları	59
Tablo 5-25: Combigan Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları	60
Tablo 5-26: Xolatin Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları	60

Tablo 5-27: Azarga Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları.....	61
Tablo 5-28: Combigan Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu	61
Tablo 5-29: Xolatifim Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu.....	62
Tablo 5-30: Azarga Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu	62
Tablo 5-31: Doğrusallık Parametresi Sonuçları	63
Tablo 5-32: Doğruluk Çalışması Sonuçları	64
Tablo 5-33: Çalışma Aralığı Sonuçları.....	65
Tablo 5-34: Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilitate Sonuç Tablosu	66
Tablo 5-35: Mobil Fazın Stabilitate Sonuç Tablosu.....	66
Tablo 5-36: Timolol Miktar Tayini Metotlarının Karşılaştırılması.....	67



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Timolol, gözlerdeki basıncı veya göz içi basıncını azaltmak için bir göz damlası solüsyonunda verilen seçici olmayan bir beta-adrenerjik antagonisttir. Ayrıca hipertansiyon tedavisinde ilaç olarak tablet formunda da kullanılır. Beyaz ve kristal yapılı toz halinde bulunan Timolol, FDA tarafından 1979 yılında onaylanmıştır. Bu ilaç aktif maddesine sahip ilaçlar birçok üretici tarafından pazarda sunulmaktadır. Açık açılı glokom ve hipertansiyon gibi durumların yönetimi için etkili bir ajandır.

Günümüzde Timolol ilaç aktif maddesinin kullanıldığı ilaçların artması bu ilaçların kantitatif analizlerinin önemini de arttırmaktadır. Bu analizlerin en az numuneyle, en hızlı ve en doğru bir şekilde yapılması önem arz etmektedir. Sıvı kromatografisi yöntemi, Timolol ilaç aktif maddesinin kantitatif analizinin doğru şekilde yapılmasında kullanılan etkili yöntemlerden birisidir. Sıvı kromatografisi cihazları kullanılarak geliştirilecek bir metot; iş yükünü ve maliyetini azaltırken, elde edilen sonuçların güvenilirliğini arttırmaktadır.

Timolol ilaç aktif maddesinin kantitatif tayini için geliştirilmiş metotlar genellikle Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazıyla uygun olarak çalışan metotlardır. HPLC yöntemleri her ne kadar doğru ve tekrarlanabilir sonuç verse de, Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazıyla uygun yöntemler daha hızlı, daha hassas, daha az numuneyle çalışılabilmesi gibi imkânlar sunmaktadır.

UPLC, sıvı kromatografisi için gelişmiş ve modern bir yöntemdir. UPLC, üç alanda gelişen ultra performanslı sıvı kromatografisini ifade eder; hız, çözünürlük ve hassasiyet. UPLC, HPLC'ye kıyasla daha iyi çözünürlük, hız ve hassasiyet elde etmek için çapı 2µm'den küçük parçacıkların analizinin yapılmasını mümkün kılar. 21. yüzyılda ilaç endüstrileri ekonomide yeni yollar bulmaya ve ilaç geliştirme süresini kısaltmaya odaklanmıştır. Bu çalışma kapsamında UPLC cihazıyla uygun şekilde çalışan bir metot geliştirmek, geliştirilen bu metodun optimizasyonunu ve validasyonunu yapmak hedeflenmektedir. Validasyon işleminin ardından, ilaç endüstrisinde kullanılmaya hazır bir metot olup olmadığını sorgulamak amacıyla, piyasada ruhsatlandırılmış ve ticari olarak elde edilebilen, içerisinde Timolol ilaç aktif maddesini barındıran ürünler temin edilecek ve bu metot üzerinden içerdikleri Timolol aktif maddeleri analizlenecektir. Piyasada satışta olan ilaçların Timolol miktarları doğru bir şekilde analizlenebilirse, ilaç endüstrisinde kullanılmak üzere ekonomik, güvenli, hassas ve çevreci bir metot geliştirilmiş olacaktır.

Timolol, oftalmik ilaç ürünlerinin içerisinde bulunan aktif ilaç maddelerinden birisidir. Piyasada bulunan ve ruhsat almış nihai ilaçlar, Timolol ile birlikte farklı ilaç aktif maddeleri de içermektedir. Dorzolamid Hidroklorik Asit, Brimonidin Tartarat ve Brinzolamid gibi ilaç aktif

maddeleri, piyasada Timolol Maleat ile birlikte bitmiş ürün içerisindeki formülasyonda sıklıkla kullanılan aktif maddelerdendir.

Bir analitik metot geliştirilirken tayin edilmesi gereken etken madde dışında yukarıda bahsedilen ve ilaç formülasyonunda ikili kombinasyon olarak Timolol aktif maddesinin yanında yer alan ikinci bir aktif madde de girişim yapabilir. Bahsedilen ilaç aktif maddelerin, kantitatif tayinleri için bazı kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda geliştirilen metot, HPLC cihazında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu çalışmada, bu metotlara alternatif olarak UPLC cihazına uygun bir analitik metot geliştirilmiş ve bu metodun validasyonu yapılmıştır.

HPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlar UPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlara oranla daha fazla organik çözücü kullanılmasına ihtiyaç duyarlar. Bu durum çevreye bırakılan organik atık miktarının artmasına yol açarak, çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkiyi de arttırmaktadır. Mevcut olumsuzlukların azaltılması için UPLC cihazında geliştirilen yöntem, HPLC cihazında geliştirilen yöntemlere kıyasla daha hassas, daha seçici, daha hızlı, daha güvenilir, daha ekonomik ve çevreye daha duyarlı olmasının yanı sıra daha az örnek numune ile çalışmayı da mümkün kılmıştır.

Çalışma kapsamında geliştirilmiş yöntemde, ultra yüksek basınçlı bir analitik ekipman kullanımına uygun olacak şekilde hareketli fazın, çözücünün, analitik kolonun ve ideal konsantrasyonun belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Timolol molekülünün kesin ve tekrarlanabilir, kromatografik olarak yeterli bir ayırım gösterecek şekilde analizlenebilmesine imkan sağlayan analitik metot, UPLC cihazına uygun olarak geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile piyasada ticari olarak satışı yapılan ve içeriğinde Timolol ilaç aktif maddesi bulunduran ürünlerin nicel olarak analizi yapılmıştır.

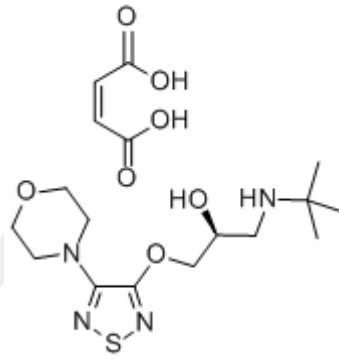
1.1. Timolol Maleat İlaç Aktif Maddesi

Timolol maleat, (S)-1-[(1,1-dimetil)amino]-3-[[4-(4-morfolinil)-1,2,5-tiadiazol-3-il]oksi]-2-propanol, nonspesifik bir adrenerjik blokerdir. Timolol ait 2 boyutlu molekül yapısı Şekil 1.1’de ve 3 boyutlu molekül yapısı Şekil 1.2’de verilmiştir. Timolol maleat, bir antiglok om ajanı olarak kullanılan ilk blokerdir. Glokom tedavisinde kullanılan β -adrenerjik blokör ilaç grubundadır. Glukom hastalığı başlıca sebebi göz iç basıncının artmasına bağlı olarak sinirlerin yıpranmasıdır. Bu hastalığa sahip kişilerin zamanla görme yetisini azalır (Yılmaz, 2010).

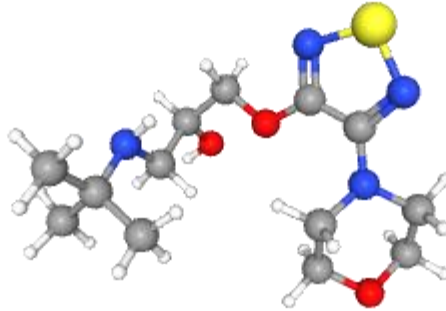
Kristal yapıda ve beyaz renkte olan Timolol; oda koşullarında su içerisinde, metil alkol içerisinde ve metil alkol içerisinde çözünürken kloroform içerisinde ve propilen glikol içerisinde çözünmesi zordur, Sikloheksan içerisinde ve eter içerisinde çözünme gözlemlenmez. Timolol, su içerisindeki pH değeri yaklaşık olarak 4 gelmektedir. Saklama koşulları uygun olduğunda

herhangi bir degradasyona uğramadan 60 ay süreyle stabil kalırken, sıcaklık ve UV ışık altında yapısında bozunma gözlemlenebilir (Yılmaz, 2010).

Timolol aktif maddesi ilaçların içerisinde Timolol Maleat formunda bulunur. İhtiyaç duyulan Timolol miktarı, Timolol maleatın molekül ağırlığına oranlanarak hesaplanır. Bu tez çalışmasında kullanılan ve içerisinde Timolol bulunan ilaçların içerdikleri timolol miktarının mL başına 5 mg olduğu belirtilmiştir. Bu ilaçların içerisinde Timolol miktarı tayin edilirken kullanılan Timolol Maleat standardı, Timolol molekül ağırlığının (316,42 g / mol) Timolol Maleat molekül ağırlığına (432,49 g / mol) bölünmesiyle hesaplanır.



Şekil 1.1: Timolol Maleat ilaç aktif maddesinin 2 boyutlu molekül yapısı



Şekil 1.2: Timolol Maleat aktif maddesinin 3 boyutlu molekül yapısı

1.2. Timolol Tayini İçin Analitik Çalışmalar

Erk, dorzolamid hidroklorür ve timolol etkenlerini aynı anda tek bir kromatografik koşulda hızlı ve hassas bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. İlaçlar, iki sabit dalga boyunda (dorzolamid için dalga boyu 250 nm ve timolol için 300 nm) bir diyot dizisi detektörü ile izlenmiştir. HPLC'daki

metodu, 5 micron C₁₈ kolonda 150 mm'ye 6 mm uzunlukta kolon kullanarak, dakikada 1,2 mL akış hızıyla yapmıştır. Metotlarında sabit faz olarak pH:2,5 tampon: metil alkol :asetonitril reaktiflerinin sırasıyla (85:10:5) oranlarında karıştırılmasıyla elde edilen çözelti kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda dorzolamid hidroklorür etkeninin doğrusal olduğu aralık 4 µg/mL ile 45 µg/mL iken timolol etkeninin doğrusal olduğu aralık 2 µg/mL ile 20,6 µg/mL olduğu gözlemlenmiştir. Geliştirilen metodun ilaç ürünlerine başarıyla uygulanabileceği kanıtlanmıştır. (Erk, 2003).

Nasir ve arkadaşları, timolol (TIM), rosuvastatinin (RST) ve diklofenak sodyumun (DS) farmasötiklerde, insan plazmasında ve dâhili standart olarak naproksen sodyum (NS) içeren göz sıvısında eş zamanlı tayini için yeni bir HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir. Hedef bileşikler, Hypersil 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm çapında ve 5µ çapa sahip C18 kolonda, hareketli faz olarak izokratik modda %0,2 trietilamin (TEA) ve asetonitril (ACN) (40:60, h/h) uygulanması, 1 mL/dk'lık bir akış hızında %85 fosforik asit ile pH'nın 2,75'e ayarlanması ile analiz edilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 45°C'de tutulmuş ve 50 µl numunenin HPLC sistemine enjekte edilmesinin ardından pik 284 nm'de gözlenmiştir. Metanol ile deproteinasyon sonrası, mobil fazı ekstraksiyon sıvısı olarak kullanan sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürü insan plazma ve sığır göz sıvısı örneklerine uygulanmıştır. Önerilen yöntemin insan plazmasındaki geri kazanımları TIM, RST ve DS için %98,72, 96,04 ve %95,14 iken göz sıvısında TIM ve DS için %94,99 ve %98,23 olarak belirtilmiştir. LOD değerleri TIM, RST ve DS için 0,8, 0,5 ve 0,25 ng/mL olarak hesaplanırken, LOQ konsantrasyonu sırasıyla 2, 1,5 ve 1 ng/mL hesaplanmıştır (Nasir vd., 2011).

Boiero ve arkadaşları, timolol ve insan serum albüminin (HSA) albümin nanopartiküllerinde tek kromatografik sistemde aynı anda tayini için izokratik bir metot geliştirmiştir. Yöntem, 25°C de termostat ile kontrol edilen bir ters faz C18 kolonu, 276 nm'de UV detektörü, dakikada 1 mL akış hızında ve hareketli faz içerisinde %0,5 (h/h) suda TFA asetonitril (40:60) (h/h) içinde TFA solüsyonu içermektedir. Albümin ve timolol için alıkonma süreleri sırasıyla 1,84 ± 0,05 dakika ve 2,67 ± 0,04 dakika olarak belirtilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin HSA için 0,2 ile 100 mg / mL ve timolol için 0,01 ile 1 mg / mL arasında doğrusal olduğu belirtilmiştir. Miktar tayini sınırının HSA için 0,2 mg / mL ve timolol için 0,01 mg / mL olduğu belirtilmiştir (Boiero vd., 2015).

Hassib S. T. ve arkadaşları bir anti-glokom β-blokeri, timolol maleat ile farklı sınıflardaki diğer anti-glokom ilaçları olan dorzolamid hidroklorür (DOR), brinzolamid (BRZ) ve bir iç standart (IS) olarak eslikarbazepin içeren tavşan göz suyundaki brimonidin tartratın (BRM) eş zamanlı tayini için duyarlı, seçici, doğru ve kesin bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. Tavşan göz suyundan elde edilen analitlerin saflaştırılması ve ön konsantresi için sıvı-sıvı ekstraksiyonu

kullanılmıştır. Kromatografik ayırma, izokratik modda pH:7 tampon çözeltisi: metanol: asetonitril çözeltileri hacimce (5:50:45) oranlarını içeren hareketli fazla INERTSIL C18 ODS-3 kolonunda (150mm × 4.6mm, 3,5µm), 0,8 mL/min akış hızında gerçekleştirilmiştir. Yöntem, aşağıdaki geçişlerde çoklu reaksiyon izleme (MRM) ile tespitten önce pozitif iyonizasyon modunda elektrosprey iyonizasyon kaynağı kullanılarak çalıştırılmış: TIM için m/z 317,2 → 261,0, DOR için m/z 325,1 → 199,0, BRZ için m/z 384,2 → 281,0 BRM için m/z 292,1 → 212,0 ve IS için m/z 255,0 → 237,0. Ayırma sadece 3 dakikada yapılmış ve belirtilen tüm ilaçlar için miktar tayini alt sınırı (LOQ) (50 ng/mL) olarak belirtilmiş (Hassib vd., 2016).

Lotfy ve arkadaşlar, iki akıllı ve yeni spektrofotometrik yöntem; absorbans çıkarma ve amplitüd modülasyonu, birleştirilmiş regresyon denklemi kullanılarak, benzalkonyum klorür varlığında ön ayırım işlemi gerçekleştirilmeden timolol maleat (TIM) ve dorzolamid hidroklorür (DOR) karışımının belirlenmesi için geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Ek olarak, oran spektrumlarını manipüle eden basit, spesifik, doğru ve kesin spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiş ve ikili karışımın eşzamanlı belirlenmesi için doğrulanmıştır. Metoda doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve seçicilik parametreleri uygulanmıştır. Önerilen yöntemler ilaçların farmasötik formülasyonlarına uygulanmış ve elde edilen sonuçlar, rapor edilen bir spektrofotometrik yöntemle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel karşılaştırma, önerilen yöntemler ile bildirilen yöntemler arasında hem doğruluk hem de kesinlik açısından önemli bir fark olmadığını göstermiştir (Lotfy vd., 2014).

Elshanawane ve arkadaşları brimonidin tartrat ve timolol maleat için doğrulanmış bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. Yöntem HYPERSIL Siyano kolonu (250x4.6 mm, 5 µ) üzerinde ve amonyum asetat (pH 5,0, 0.01 M)- metanol (40:60), (h/h) olan hareketli ortam sıcaklığında 1.5 mL/dk'ya eşit bir akış hızında pompalanması ile gerçekleştirilmiş. 20 µl ilaç numunesi çözeltiler, çift dalga boyunda (Brimonidin Tartrate için 254 nm ve timolol maleat için 300 nm) izlenmiş. Önerilen yöntem, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve miktar tayini algılama sınırları açısından ICH'ye göre doğrulanmıştır (Elshanawane vd., 2014).

Dinç ve arkadaşları, bir göz damlası formülasyonunda brimonidin tartrat (BRI) ve timolol maleatın (TIM) eş zamanlı ölçümü için numunelerin UV spektral veri vektörlerinin iki farklı sürekli dalgacık dönüşümü (CWT) yaklaşımıyla işlendiği bir çalışma yapmıştır. CWT yöntemlerinin brimonidin tartrat - timolol maleat karışımının analizine uygulanması, bir ön kimyasal ayırmanın kullanılmasını gerektirmemiştir. Ön deneylerden sonra, Symlet5 sürekli dalgacık dönüşümleri ve Mexican Hat sürekli dalgacık dönüşümü, analiz edilen ilaçları aynı anda ölçmek için çok uygun bulunmuştur. 5,0-25,0 µg/mL ve 8,0-72,0 µg/mL konsantrasyon aralığında brimonidin tartrat ve timolol maleat için kalibrasyon eğrileri, dalgacık alanındaki

CWT genliklerinin ölçülmesiyle elde edilmiştir. Önerilen yöntemler doğrulanmış ve brimonidin tartrat (BRI) ve timolol maleat (TIM) içeren ticari göz damlası numunelerinin kantitatif analizine uygulanmıştır (Dinç vd., 2017).

Agarwal ve arkadaşları, bulk ilaç olarak ve dozaj formlarında ilacın koranilik asit ile kompleksleştirilmesi yoluyla atenolol ve timololün belirlenmesi için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Yöntem ilaç ve koranilik asit arasındaki kompleksleşmenin 1:1'i olduğunu göstermiştir. Nicel geri kazanımlar ticari olarak temin edilebilen dozaj formlarından elde edilmiştir (Agarwal vd., 1998).

Mohamed ve arkadaşları, timololü dozaj formunda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemini benimseyerek bununla birlikte, gaz sıvı kromatografik (GLC) ve kütle fragmanografik yöntemlerini kullanarak tayin etmiştir (Mohamed vd., 1982).

Maguregui ve arkadaşları, timolol tayini için amperometrik algılama ile yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma, bir C18 kolonu ve 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ içeren 1,3 mL/dk akış hızı ile pH 6.5 te pompalanan asetronitril: su (30:70) mobil fazı kullanılarak yapılmıştır. Metotta ilaç formülasyon Blocadren 10 mg (timolol 10 mg) ile tıbbi tedavi altında olan hipertansif bir hastadan elde edilen timolol tayinininde denenmiştir. Basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile idrar matrisinden iyi bir kazanım ($93,25 \pm 2,5$) elde edilmiştir. İyi bir tekrarlanabilirlik, doğrusalılık ve doğruluk elde edilmiş ve 10 ng/mL'lik tayin limiti, yöntemin insan idrarında doping analizine ve farmakokinetik çalışmalara uygulanmasına izin vermiştir (Maguregui vd., 2006).

Ankit ve arkadaşları, oftalmik solüsyonda Latanoprost, Timolol ve Benzalkonyum klorürün eş zamanlı kantitatif tayini için basit, hızlı ve doğru bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. Kromatografik ayırma, Inertsil C18, 300 x 3.9mm, 5 μ ters fazlı analitik kolon kullanılarak PDA dedektörü ile sağlanmıştır. Hareketli faz asetronitril (40:60 h/h) tamponundan oluşmuş, 1,0 mL/dk akış hızında kolondan geçirilmiştir. Yöntem dalga boyu gradyanında gerçekleştirilmiştir. Çalışma 30°C'de gerçekleştirilmiştir (Ankit vd., 2013).

Hendawy ve arkadaşları modifiye çok duvarlı karbon nanotüp elektrod kullanarak göz damlalarında dorzolamid ve timololün elektrokimyasal ve kemometrik tayinini gerçekleştirmiştir. Çalışma, dorzolamid (DOR) ve timolol maleatın (TIM) kantitatif tayini için basit ve hassas elektrokimyasal sensörün yapımına odaklanmıştır. Bu yöntem, elektrotun özelliklerini iyileştiren çok duvarlı karbon nanotüplerin karbon pasta elektroduna dahil edilmesine dayanmaktadır (Hendawy vd., 2017).

Maguregui ve arkadaşları, oksprenolol ve timolol ilaç aktif maddelerinin idrarda miktar tayinlerine olanak sağlayan, kapiler elektroforez ile çalışmışlardır. Ayırma işlemi 7,5 micron'a

78 cm boyutuna sahip silika kapiler ile yapılmıştır. Elektrolit olarak pH:9'a sahip 50 milimol Boraks-Borik asit kullanılmıştır. UV dedektör kullanılarak yapılmış bu çalışmada dalga boyları timolol ve oksprenolol için sırayla 280 nm ile 299 nm seçilmiştir. Bu koşullarda elde edilen oksprenolol zamanını 4,76 dk iken timolol 4,97 dk olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan doğruluk parametresi altında % geri kazanım değerleri oksprenolol için %94 iken bu değer timolol'de %73 olarak hesaplanmıştır. Metodun en düşük çalışılabildiği konstrasyon olarak oksprenolol için mL'de 0,20 µg iken bu değer timolol'de mL'de 0,19 µg olduğu belirlenmiştir. Bu metotla tayin edilen numuneler aynı analistler tarafından HPLC yöntemi ile tekrarlanmıştır. HPLC metodundan elde edilen verilerin elektroforetik ayırım ile elde edilen veriler ile benzer olduğu belirlenmiştir (Maguregui vd., 2002).

Laddha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; timolol için basit, ekonomik, doğru ve kesin bir stabilite gösteren yöntem, ICH yönergeleri Q1A'ya göre geliştirildi ve daha sonra ICH yönergeleri Q2R'ye göre valide edilmiştir. Bu çalışma Kromasil'in C18 kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm parçacık boyutu) kullanılarak, fosfat tamponu: metanolden (60:40) oluşan bir hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Tamponun pH'ı, O-fosforik asit kullanılarak 3,5'e ayarlanmış ve akış hızı dakikada 1 mL olarak ayarlanmıştır. Metot, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, geri kazanım çalışması gibi farklı parametreler için doğrulanmıştır. Optimize edilmiş ve doğrulanmış yöntemin, Timolol etkeninin miktar tayininin bitmiş üründe belirlenmesinde kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (Umesh vd., 2014).

Hafsa ve arkadaşlarının yaptığı fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarında, TIM'nin 197⁰C'lik bir erime noktası gösterdiği görülmüştür. Timolol ilacının çözünürlüğü yüksekten aza doğru, pH 4 > damıtılmış su > pH 7,4 > pH 8 > metanol sırasını takip etmiştir. Toplu sıvılarda timolol maleatın tahmini için geliştirilen analitik yöntem, 200 nm ile 400 nm arasında damıtılmış suda 295 nm'lik maksimum absorbans λ_{max} göstermiştir. Doğrusallık çalışmaları, 2,00 µg/mL ila 10,00 µg/mL arasındaki timolol maleat tahmininin, $y = 0.0258X - 0,00076$ regresyon denklemi ile doğrusal olduğunu göstermiştir; ($R^2 = 0,9999$). Geliştirilen yöntem, günler arası ve gün içi varyasyon, kantitasyon limiti çalışmaları için valide edilmiştir. Günler arası ve Gün içi varyasyon çalışmalarının SS değerleri, varyasyonun minimum olduğunu göstermiştir. Timololün LOQ limitinin 1,00 µg/mL olduğu bulunmuştur. Yukarıdaki analitik parametreler, timololün geliştirilmiş UV Spektrofotometrik yönteminin basit, doğru ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir (Hafsa vd.,2011).

Mazzo'nun yaptığı bir miktar tayini çalışmasını, maleik asit ve timolol etkenlerinin aynı kromatografik sistem ile analizinde ters faz sistem ve gradient akış ile tamamlamıştır. Geliştirilen metodun çalışma aralığında; özgül, kesin ve doğrusal olduğu aralıktaki numunelerin

analizlenmesiyle belirlenmiştir. Geliştirilen bu metodun maleik asit ve timolol içeren ilaçların miktar tayinlerinde uygun sonuç alınabileceği ispatlanmıştır (.Mazzo vd.,1984)

Lee ve arkadaşlarının atık sular ile yaptıkları bir çalışmada, timolol etkeninin miktar tayininin belirlenmesi için katı faz ekstraksiyon ile hibrit sistem LC-MS/MS uygun bir metot geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada katyon reçine ilaç aktif maddelerinin ekstraksiyon işlemi adsorban olarak kullanılmıştır. Plaseboda kaynaklanabilecek negatif etkilerin sonuca yansımaması için elde edilen ekstraktan bileşikler LC-MS/MS ile tayin edilmiştir. Fakat ekstraksiyon sebebiyle yüzde geri kazanım değerleri düşük bulunmuştur. Timolol etkeninin LC-MS/MS sisteminde tutunma süresi 17 dakika olduğu tespit edilmiştir (Lee vd.,2007)

Rele ve arkadaşları, latanoprost ve timolol ilaç aktif maddelerinin miktar tayininin belirlenmesi için bir HPLC metodu geliştirmeyi başarmışlardır. Geliştirdikleri analitik yöntemde C18 karbonlu, 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm çığında ve 5µ çaplı kolon kullanılmıştır. Hareketli fazı %0,05 su içerisinde TFA ve %0,05 asetonitril içerisinde TFA çözeltisi kullanılmıştır. Analitik yöntem dalga boyu 210 nm ve akış hızı 1,0 mL/dakika seçilerek uygulanmıştır. Geliştirdikleri yöntemin çalışma aralığı Timolol için mL’de 250 µg ile 750 µg aralığındayken, latanoprost için mL’de 2,5 µg ile 7,5 µg olduğunu belirlemişlerdir (Rele vd., 2011)

Olah ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada, plazma içerisindeki timolol’ün miktar tayini analizini LC-MS/MS ile tamamlamışlardır. Timolol’ün lazmadan ön ayrımı için ekstraksiyon kullanılmıştır. Bu ayırmadan sonra C18 karbonlu, 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm çığında ve 5µ çaplı kolon kullanılarak LC-MS/MS hibrit sisteminde analiz edilmiştir. Geliştirilen analitik metodun LOQ değeri 0,5 ng/mL olarak belirlenmiştir (Olah vd., 1993)

Tracqui ve arkadaşları tarafından HPLC cihazı ile, insan plazması ve idrarında bulunan β-adrenejik reseptör antagonistlerin miktar tayinlerinin yapılabildiği bir metot geliştirilmiştir. Geliştirilen metotta 10 µm RSIL kolon kullanılmış olup betaxolol, carteolol, metil pranolol, timolol etkenleri için LOQ değeri 4 ng/mL ile 27 ng/mL aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen metodun kolay, hızlı ve duyarlı olmasının yanı sıra diğer 8 blokerin miktar tayini analizlerinin de başarıyla gerçekleştirilebildiği belirtilmiştir. (Tracqui vd., 1988).

Boiero ve arkadaşları tarafından geliştirilen izokrotik HPLC metoduyla insan serum albümininin ve timolol etken maddelerinin aynı anda miktar tayinleri belirlenmiştir. Geliştirilen metodun kromatografik şartlarının; 25 °C kolon sıcaklığı, ters faz C18 kolon, 1,0 mL/dakika akış hızı, 276 nm dalga boyu ve sırasıyla (40:60) (h/h) oranında %0,05 su içerisinde TFA ve %0,05 asetonitril içerisinde TFA çözeltisilerinin karıştırılmasıyla elde edilen hareketli faz olduğu belirtilmiştir. Albüminin alıkonma zamanının 1,84 dakika olduğu, çalışma aralığının LOQ değeri olan 0,2 mg / mL ile 100 mg / mL arasında olduğu belirtilmiştir. Timolol için ise alıkonma zamanının 2,67

dakika olduğu, çalışma aralığının LOQ değeri olan 0,01 mg / mL ile 1 mg / mL arasında olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen bu metodun albüminin ve timolol için kesin ve doğru olduğu kanıtlanmıştır (Boiero vd., 2015).

1.3. Sıvı Kromatografisi

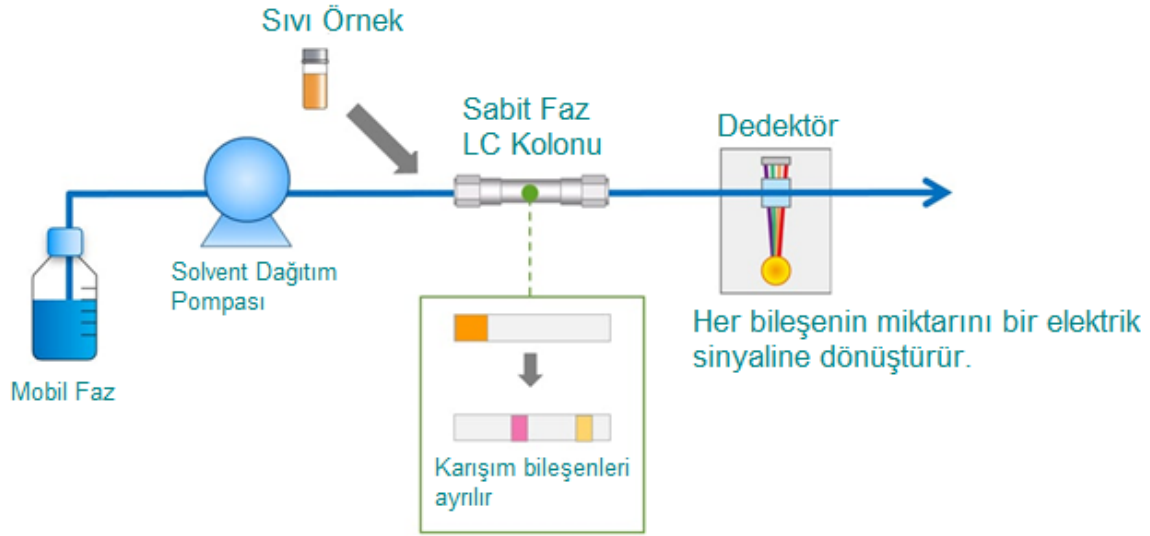
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC), sıvı kromatografide zaman ve çözücü tüketiminin azaltılması ile ilgili yeni olanaklar sağlayan bir tekniktir. UPLC kromatografik sistemi, yüksek geri basınçlara dayanacak şekilde özel olarak tasarlanmıştır (Novakova vd., 2006).

UPLC sistemi, 5 mikron partikül dolgulu analitik kolon kullanan HPLC sisteme kıyasla analiz süresinin dokuz kata kadar kısaltılmasına olanak tanır. 3 mikron partikül dolgulu analitik kolonlarla karşılaştırıldığında, analiz yaklaşık üç kat kısalmaktadır. Parçacık azalmasının olumsuz etkisi geri basınç artışıdır. UPLC'de ayırma çok yüksek basınçlar altında yapılır (UPLC sisteminde 15000 psi kadar mümkündür), ancak analitik kolon veya kromatografik sistemin diğer bileşenleri üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur. Ayırma verimliliği korunur ve hatta iyileştirilir (Novakova vd., 2006).

Parçacık boyutu ne kadar küçükse, HPLC sisteminde o kadar yüksek kolon geri basıncı oluşur. Bu, HPLC sistemlerinde bu tür kolon çapı küçük olan kolonların kullanımında bir sınırlama oluşturur. HPLC'nin tarihi boyunca, daha küçük parçacıklı dolgu malzemesi kullanma eğilimi olmuştur (Novakova vd., 2006).

Sıvı karışımı içeren numune, enjekte edilerek hareketli faza aktarılır. Numune daha sonra hareketli faz tarafından bir yüksek basınçlı pompa ile kromatografik kolonun başına taşınır. Hareketli faz ve enjekte edilen numune karışımı kolona girer, partikül yatağından geçer ve ayrılan karışımı bir detektöre aktararak çıkar.

Klasik bir sıvı kromatografisine ait akım şeması Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.3: Sıvı Kromatografisi Sistemi İçin Akım Şeması

1.3.1. UPLC Sistemi Bileşenleri

UPLC sistemi; hareketli faz, degazör, pompa, örnekleyici, kolon fırını, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur.

Hareketli Faz

Tayin edilecek numuneyi kolon içerisinde yürüten bileşen hareketli fazdır. Hareketli faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler ve/veya bunların organik çözücüler ile belirli oranlarda karışımlarından oluşur. Hareketli fazın bileşimi ve pH değeri ayrımı doğrudan etkiler. Hareketli faz, analizi yapılacak bileşenlerinin kimyasal özellikleri, tercih edilen sabit fazın özellikler ve kullanılacak dedektörün özellikleri gibi parametrelere göre seçilir. Hareketli faz seçiminde sulu tampon çözeltilerinden hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılabilir. Kullanılan bu çözeltilerin saf olması analiz kalitesini olumlu yönde etkileyecektir (Özcan vd., 2010; Skoog vd., 1998).

Degazör

Hareketli fazın kromatografik sisteme girmeden önce hava kabarcıklarının giderilmesini sağlayan cihaz bileşenidir. UPLC sistemi içerisinde sıvı dışındaki her bileşen sabit faza ve detektöre zarar vermektedir. Kolon içerisinde hava kabarcığının girmesi detektöre ulaşan pikin şeklinin bozulmasına veya alıkonma zamanının normalden farklı olmasına sebep olabilir (Özcan vd., 2010; Skoog vd., 1998).

Pompa

Pompanın görevi, hareketli fazın UPLC sistemi içinde yürümesini sağlamaktır. Degazör ünitesinden hareketli fazı alıp belirli bir akış hızıyla sabit faza yollar. Pompalar destekledikleri

akış hızlarına göre sınıflandırılabilirler. UPLC pompaları 0,1 mL/dk akış hızından 2,0 mL/dk akış hız aralığını desteklerler. Pompalar aynı anda birden fazla hareketli faz kullanımına da olanak sağlarlar. Tek kanallı olarak tasarlanan pompalar izokratik ve dört kanallı olarak tasarlanan pompalar gradient olarak adlandırılırlar. İzokratik metotlarda hareketli faz içeriği önceden karıştırılarak hazırlanırken, gradient metotlar anlık değişim yaparak hareketli fazı sabit faza aktarırlar. Gradient pompa kullanımı analiz sürelerin kısılmasını sağlar ve analiz kalitesini artırır. Pompanın nihai görevi hareketli fazın sistem içerisinde dolaşırken yüksek basınçlara karşı dayanıklı olması, akış hızını analiz süresince doğru ayarlaması, sabit fazda oluşan geri basınçtan doğabilecek negatif etkileri azaltması olarak belirtilebilir (Özcan vd., 2010; Skoog vd., 1998).

Örnekleyici

Örnekleyici, tayin edilecek analiti sabit faza doğru hacimde enjekte edilmesinde görev alır. İki tip örnekleyici vardır; manuel ve otomatik-örnekleyici. Manuel sistemlerde analit sabit faza vana yardımıyla aktarılırken, auto-sampler sistemlerde kromatografik sistem bu işlem otomatiktir. Otomatik-örnekleyici sistemler, soğutma ve ısıtma işlemlerini de desteklerken vial'ler yardımıyla 100'lerce numune sabit faza sırayla analizlenmek üzere enjekte edilebilir. (Özcan vd., 2010; Skoog vd., 1998).

Kolon Fırını

Analiz esnasında sabit faza örnekleyici yardımıyla enjekte edilen numunenin sabit bir sıcaklıkta hareket etmesi, analizin kalitesini doğrudan etkiler. Kolon fırını, sabit fazın istenilen sıcakta tutulmasını sağlayan bir UPLC bileşenidir. Kolon fırınları ortam sıcaklığına bağlı kalmadan 15°C'den 80°C'e kadar seçilen bir sıcaklıkta stabil durabilirler. (Skoog vd., 1998).

Kolon

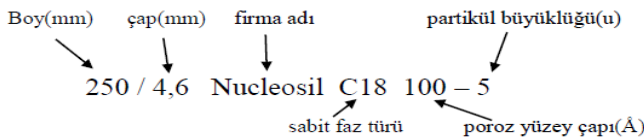
Kolonlar, içeriği bilinmeyen karmaşık numunelerin içerisindeki bileşenlerin birbirinden uygun rezolüsyon ile ayrılmasını olanak sağlayan cihaz bileşenidir. Kolonların içerisinde kullanılan dolgu malzemelerin özellikleri birbirlerinden farklılık gösterip, analiz edilecek moleküle, hareketli faza göre en uygun kolon seçilmesi analiz kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır (Skoog vd., 1998).

Kolonların uzunlukları birbirinden farklılık göstermektedir. Klasik bir UPLC kolonu 100 mm uzunluğundadır. Kolon uzunluğunun arttırılması, tayin edilecek molekülün kolonda daha fazla tutunmasını sağlar. Bu durum ilgili molekülün daha iyi ayrılmasına olanak sağlar fakat kolonda daha fazla tutunma gerçekleştiğinden analiz süresini de arttırır. Kolon uzunluğunun doğru seçimi, analiz süresinin belirlenmesinde ve bileşenlerin birbirinden ayrılmasında doğrudan etkili olduğundan doğru seçim yapılması önem arz etmektedir (Skoog vd., 1998).

Bu bilgiler doğrultusunda kolonun; dolgu maddesi, partikül büyüklüğü, por çapı, fonksiyonel gruplarının özellikleri, sahip olduğu karbon miktarı ve içerisindeki silika malzemesinin saflığı gibi parametreler tayin edilmek istenilen bileşenin ayırımında doğrudan etkili olduğu görülmektedir

Kolonların isimlendirilmesi uluslararası standartlar ile belirlenmiştir. Bu standartlara göre öncelikle mm biriminden kolon uzunluğu ile kolon çapı yazılır ve ardından üretici üretici firma adı ile kolonun sahip olduğu karbon miktarı yazılır. Bunlara ek olarak Ångström biriminden kolon yüzey çapı ve μ biriminden partikül büyüklüğü izlenmektedir

Klasik bir kolon isimlendirme Şekil 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1.4: Kolon Tanımlama Örneği

Dedektör

UPLC sistemlerinde tercih edilecek dedektörün; yüksek duyarlılığa, geniş konsantrasyon aralığına, düşük gürültüye sahip olmalıdır. Ayrıca seçilen dedektörün kolondan çıkan moleküle

duyarlı ve hassas olması gerekmektedir. Dedektörler sıcaklıktaki ve basınçtaki anlık değişimlerden etkilenmeyip, ayırım kalitesini düşürmemelidir. UPLC’de en çok kullanılan dedektörler; ultraviyole, diyot dizisi, floresans, refraktif indeks ve elektrokimyasal (amperometrik ve kulometrik) dedektörlerdir (Özcan vd., 2010)

Kromatografide en çok kullanılan dedektör UV dedektördür. UV dedektör, 190 ile 440 nm dalga boyu aralığında absorbans yapan bileşenlerin ayrılmasında tercih edilirler. UV dedektörlerin çalışma aralığı geniştir ve gradient pompa ile kullanılma imkanı da bulunmaktadır (Özcan vd., 2010).

Kaydedici

Alıkonma zamanlarına bağlı olarak belli bir sırayla dedektöre ulaşan sinyaller kaydedici yardımıyla bir bilgisayara aktarılır. Aktarılan bu bilgi kromatogram olarak bizim anlayacağımız şekilde görüntülenir.

1.3.2. LC ile İlgili Terimler

Pik

Enjekte edilen çözelti içerisindeki bileşenlerin kolondan ayrıştırıldığında kaydedilen dedektör yanıtını gösteren kromatogramın bir bölümüdür. Pik şiddeti, pik alanı veya pik yüksekliği ile temsil edilebilir (Dong, vd., 2005).

Alıkonma Zamanı

Alıkonma zamanı (RT), bileşenin kolona girdikten sonra kaç dakika süre kolonda tutunduğunun dakika biriminden tanımlanmasıdır. Aynı kromatografik sistemde bileşenlerin RT dakikaları birbirlerinden ayrıdır. RT, kromatografik pik tanımlaması için birincil araçtır. Enjeksiyondan tespite kadar geçen süre olarak hesaplanır. RT kaymaları, sızıntıların, kolon performansının, pompa arızalarının ve kolon sıcaklığındaki veya hareketli fazlardaki değişikliklerin göstergesidir (Burtis vd., 2007).

Bağıl Alıkonma Zamanı

Bileşiğin kolondan geçmesi için geçen süre alıkonma zamanıdır. Bağıl alıkonma zamanı (RRT), bir analitin RT'sinin bir başka analitin RT'sine oranlanmasıdır. RRT, içerisinde birden fazla bileşenin bulunduğu numunelerin analizi yapılırken dedektörde işlem gören bileşenlerin tanımlanmasında rol oynar. İlgili bileşenler RRT bilgilerine göre birbirinden ayrılır.

Kuyruklanma Faktörü

Kuyruklanma faktörü basitçe tüm pik genişliğinin, ön yarı genişliğin iki katına bölünmesidir. Kusursuz bir Gauss zirvesi için; ön yarı genişlik tam olarak tüm pik genişliğinin yarısı olacaktır,

dolayısıyla kuyruk faktörü 1,0 olacaktır. Uygun bir pikin kuyruklanma faktörü en az 0,8 ve en çok 1,8 olmalıdır (Dong, vd., 2005).

Teorik Plaka Sayısı

Kolon performansını gösteren bir sayı (kolon verimliliği), tekniğe bağlı olarak yalnızca izotermal, izokratik veya izodens koşullar altında elde edilen verilerden hesaplanabilir. Plaka sayısı kolona, kolon sıcaklığına, hareketli faza ve alıkonma süresine göre değişir. Uygun bir pikin teorik plaka sayısı en az 2000 olmalıdır (Dong, vd., 2005).

Sinyal ve Gürültü

Kısa süreli gürültü, analizin kesinliğini ve doğruluğunu etkiler. Gürültü, dedektörde beliren kirlilik olarak tanımlanır. Sinyal ise bir pikin dedektöre ulaştığındaki yükseliği olarak tanımlanır. Uygun bir pikin sahip olduğu sinyalin gürültüsüne oranı en az 10 olmalıdır (Dong, vd., 2005)

Vial ve Tray

Tayin edilmesi gereken karışımın, UPLC sisteminin örnekleyicisiyle uyumlu olan şişelerin içerisine aktarılması gerekir. Bu şişeler vial olarak adlandırılır. Birden fazla vialin birlikte bulunduğu aparatın adına tray denir. Bir trayin içerisine 10'larca vial koyularak UPLC sisteminin örnekleyicisinin belirtilen sırayla bu vialleri kolona enjeksiyon yapması sağlanır.

Enjeksiyon Hacmi

Örnekleyici tarafından enjektör yardımıyla vial içerisindeki numunenin kolona taşındığı miktarı μL biriminden temsil eder. Önerilen enjeksiyon hacmi, UPLC kolonunun toplam kolon hacminin %1'i ile %10'u aralığındadır.

Akış hızı

Kolon içerisine enjekte edilen sıvı karışım, hareketli faz yardımıyla kolon içerisinde etkileşime başlar. Hareketli fazın dakikada kaç mL kolona gireceği bilgisi metodun akış hızı parametresini tanımlar. Akış hızının değeri, piklerin alıkonma zamanı ile ters orantılıdır.

Dalga Boyu

Numune içerisindeki bileşenler UPLC sisteminde kolon ile etkileşime girerek kolonu belli bir sırayla terkeder ve dedektöre ulaşırlar. Dedektöre ulaşan bu bileşenlerin sinyal'e dönüşebilmeleri için uygun dalga boyunda UV ışığını absorplamaları gerekir. Bütün bileşenlerin absorbans yaptığı ortak dalga boyunun seçilmesi, karışım içerisindeki bileşenlerin uygun bir şekilde tayin edilmesine olanak sağlar.

Pik Alanı

Dedektöre ulaşan bileşenler kaydedici yardımıyla belirli bir şiddette pik verir. Piklerin bu şiddeti alan olarak adlandırılır. Bir karışımın içerisindeki bileşen miktarıyla, o bileşenin dedektörde

verdiği şiddet doğru orantılıdır. Karışımın içerisindeki bileşenlerin miktarları alanlar üzerinden hesap yapılarak belirlenir.

Kromatogram

Dedektörden gelen sinyal, Gauss eğrisi şeklinde bir konsantrasyon/ zaman grafiğine dönüştürülür. Bu grafiğe kromatogram denir. Kromatogram, ayrılan bileşenler dedektörden geçerken oluşan piklerin gerçek zamanlı olarak grafiksel bir gösterimidir. Kromatogram, UPLC sisteminde kimyasal olarak meydana gelen ayrımın bir temsildir. Bir taban çizgisinden yükselen bir dizi tepe, bir zaman ekseninde çizilir. Her zirve, farklı bir bileşik için dedektör yanıtını temsil eder.

1.4. Metot Optimizasyonu ve Validasyonu

1.4.1. Seçicilik

Seçicilik parametresinin validasyonu sırasında, safsızlıkların belirlenmesi ve tahlil sırasında özgüllük araştırması yapılmalıdır. Bir analitik metodun belirli bir analite özgü olduğunu göstermek her zaman mümkün değildir. Bu durumda, gerekli ayırım düzeyine ulaşmak için iki veya daha fazla analitik prosedürün bir kombinasyonu önerilir. Uygun tanımlama testleri, mevcut olması muhtemel yakın ilişkili yapılara sahip bileşikler arasında ayırım yapabilmelidir. Bir metodun ayırımı, analiti içeren numunelerden pozitif sonuçlar ve analiti içermeyen numunelerden negatif sonuçlar elde edilerek doğrulanabilir. Ek olarak, pozitif bir yanıtın elde edilmediğini doğrulamak için analite yapısal olarak benzer veya analite yakından ilişkili malzemelere tanımlama testi uygulanabilir. Potansiyel olarak girişime neden olabilecek bu tür malzemelerin seçimi, meydana gelebilecek etkileşimler göz önünde bulundurularak sağlam bilimsel muhakemelere dayanmalıdır. Seçicilik parametresinin nihai amacı, nihai ürün kompozisyonu (birim formülü) içerisindeki bileşenlerden ve çözücünden analizi yapmaya çalıştığımız komponentin (etken madde) iyi bir rezolüsyon ve saflık ile ayrılmasıdır. Bu parametre dahilinde kromatografik sisteme çözücü, mobil faz, standart, hammadde, içerisinde analit olan ilaçlara ait belirli konsantrasyonda hazırlanmış çözeltiler ve temin edilebilen analite ait safsızlık çözeltileri enjekte edilerek herhangi bir girişim olup olmadığı belirlenir (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.2. Doğrusallık

Analitin konsantrasyonu ile absorbansı arasında, analitik metodun çalışma aralığı boyunca doğrusal bir ilişki olup olmadığı değerlendirilmelidir. İlgili aktif madde ile stok standart çözeltisi hazırlanır ve bu stok standart çözeltisi seyreltilerek doğrusallık parametresinin doğru bir şekilde uygulanabilmesi için en az 5 farklı seviyede çözeltiler hazırlanır. LOQ seviyesinden standart seviyesinin 2 katına çıkacak konsantrasyona kadar ve bunların arasında orta seviye çözeltiler

hazırlanarak kromatografik sisteme enjekte edilirler. Enjekte edilen bu çözeltilerden elde edilen etken pikinin alanlarının konstrasyonlarıyla orantılı olup olmadığı kontrol edilir. İyi bir analitik metodun en alt seviyeden en üst seviyeye kadar doğrusal bir cevap vermesi beklenir. Bir analitik metodun doğrusallığını kontrol etmek amacıyla hazırlanan çözeltilerin konstrasyonuna karşı ilgili çözeltilerden elde edilen kromatografik pik alan grafiği çizilir. Çizilen grafik üzerinden korelasyon katsayısı, y-kesme noktası, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı sunulmalıdır (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.3. Ölçme ve Gözlenebilirlik Sınırı

1.4.3.1. Ölçme Sınırı

Sinyal değerinin gürültü değerine oranını, bilinen düşük analit konsantrasyonlarına sahip örneklerden ölçülen sinyallerin boş örneklerinkilerle karşılaştırılmasıyla ve analizin minimum çalışma konsantrasyonuyla belirlenir. Analitik bir metodun doğru ve kesin bir sonuç verdiği en düşük konstrasyon değeri ölçme sınırı yani LOQ sınırı olarak adlandırılır. LOQ seviyesindeki bir çözeltideki etken pikinin sahip olduğu sinyalilin kromatografik sistemin gürültüsüne oranı yani S/N oranı en az 10 olmalıdır. S/N oranın 10'un altındaki piklerden elde edilen sonuçların güvenilirliği analitik metot tarafından sağlanmamaktadır.

1.4.3.2. Gözlenebilirlik Sınırı

Analitik bir metodun kromatografik sistemde sinyal verdiği fakat ilgili etkene ait hesaplamanın yapılamadığı ya da yapılan hesaplamanın güvenilirliğinin olmadığı en düşük konstrasyon değeri, gözlenebilirlik sınırı yani LOD sınırı olarak adlandırılır. LOD seviyesindeki bir çözeltideki etken pikinin sahip olduğu sinyalin kromatografik sistemin gürültüsüne oranı yani S/N oranı en az 3 olmalıdır.

1.4.4. Doğruluk

Analitik metodun doğruluğu, teorik değerin analitik yöntemle elde edilen deneysel sonuca yakınlığı olarak ifade edilir. Etken maddenin miktar tayininde doğruluk, doğrusallık çalışmasından elde edilen veriler kullanılarak metodun doğrusal olduğu en düşük seviyede, orta seviyede (standart seviyesi) ve en yüksek seviyede çözeltiler hazırlanarak belirlenir. Doğruluk parametresi dâhilinde, içerisine belirlenen seviyede stok standart çözeltisi eklenerek numune çözeltileri hazırlanır ve kromatografik sisteme enjekte edilir. Enjekte edilen bu çözeltilerden elde edilen deneysel miktar tayini sonucu teorik miktar tayini sonucuna oranlanarak metodun % geri kazanımı hesaplanır. Doğruluk çalışmasının başarılı sayılabilmesi için her bir seviyeden 3 paralel test çözeltisi hazırlanır ve her çözeltinin % geri kazanımlarının belirlenen limit aralıklarında olması gerekir (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.5. Çalışma Aralığı

Belirtilen aralık normalde doğrusallık çalışmalarından elde edilir ve prosedürün amaçlanan uygulamasına bağlıdır. Analitik prosedürün belirtilen aralığı içinde veya bu aralığın uç noktalarında analit miktarları içeren numunelere uygulandığında, analitik prosedürün kabul edilebilir bir doğrusallık, doğruluk ve kesinlik derecesi sağladığı teyit edilerek belirlenir. Çalışma aralığı, doğrusallık ve doğruluk parametrelerinin başarılı bir şekilde uygulandığı en düşük ve en yüksek konstrasyon aralığı olarak tanımlanabilir (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.6. Kesinlik

Geliştirilen UPLC metodunun kromatografik koşullar altında tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesidir. Aynı yöntem ile tekrar edilen analizlere ait sonuçlarının aynı geldiğinin bir kanıtıdır. Kesinlik parametresi 3 ana başlık altında incelenir. Bu başlıklar;

- Sistem kesinliği
- Tekrarlanabilirlik
- Ara Kesinlik

1.4.6.1. Sistem Kesinliği

Bir analitik metodun sistem kesinliği, analitik metotta belirtildiği gibi hazırlanan standart çözeltisinin ardışık enjeksiyonlarından elde edilen veriler kullanılarak belirlenir. Etken madde miktar tayini için belirlenen standart seviyesinde hazırlanan standart çözeltisi kromatografik sisteme 6 kez enjekte edilir. Bu enjeksiyonlardan elde edilen etken maddenin pik alanlarının %RSD değeri, ortalama kuyruklanma faktörü, ortalama teorik plaka sayısı ve ortalama rezolüsyon gibi sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.6.2. Tekrarlanabilirlik

Bir analitik metodun tekrarlanabilirliği, analitik metotta belirtildiği gibi hazırlanan standart ve numune çözeltilerinden elde edilen veriler kullanılarak belirlenir. Metotta belirtilen numune hazırlığı ile 6 farklı test çözeltisi hazırlanarak kromatografik sisteme enjekte edilir. Her bir çözeltinin miktar tayini standart çözeltisi enjeksiyonları kullanılarak hesaplanır. Elde edilen 6 farklı test numunesinin sonucu kullanılarak %RSD değeri hesaplanır. Güvenilir bir miktar tayini metodu için elde edilen %RSD değerinin %2,0'dan az olmalıdır (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.6.3. Ara Kesinlik

Bir analitik metodun ara kesinliği, tekrarlanabilirlik parametresinde hazırlanan ve kromatografik sisteme enjekte edilen çözeltilere eş değer çözeltiler analiz günü ve analist değiştirilerek aynı özelliklere sahip farklı kolon ve sisteme enjekte edilerek belirlenir. Güvenilir bir miktar tayini metodu için, enjekte edilen 6 test numunenin ortalama sonucu ile tekrarlanabilirlik çalışmasından

elde edilen 6 test numunesinin ortalama sonucu arasında ki fark %2,0'dan fazla olmamalıdır (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.7. Çözelti Stabilitesi

Bir çözeltinin stabilitesi, matriks içerisindeki bir bileşenin, metotta belirtilen tray sıcaklığında ne kadar süre ile bozunmadan kaldığının göstergesidir. Bir çözeltinin içerisindeki bileşenlerin kararlılığı, saklama koşulları, maddenin kimyasal özellikleri, matriks ve kap sistemine bağlıdır. Bir çözeltinin stabilitesi, cihaz tepkisinin taze hazırlanmış çözeltilere tepkisi ile karşılaştırılarak hesaplanmalıdır.

Bu parametre dâhilinde analitik metotta belirtildiği gibi standart ve numune çözeltileri hazırlanır. Taze hazırlanan bu çözeltiler kromatografik sisteme enjekte edilerek başlangıçtaki pik alanları kaydedilir. Daha sonra belirli periyotlarla aynı çözeltiler kromatografik sisteme enjekte edilerek çözeltilerdeki pik alan değişim %'leri hesaplanır. Elde edilen değişim %2 değerini aştığı zaman periyodu, çözeltinin stabilitesinin bittiği zaman olarak belirlenir ve çözelti stabilitesi %2 değerini geçmediği en son aralık kadar belirlenir. Stabilitesi takip edilen bir diğer çözelti ise hareketli fazdır. Taze hazırlanan hareketli faz ile sisteme standart ve numune çözeltileri enjekte edilerek sonuçlar kaydedilir. Daha sonra oda sıcaklığında beklemiş bu mobil faz kullanılarak kromatografik sisteme çözeltiler enjekte edilerek, elde edilen veriler kullanılarak sistem uygunluk parametreleri değerlendirilir ve mobil fazın stabil kaldığı süre belirlenir.

1.4.8. Sağlamlık

Sağlamlık, analitik yöntemin belli parametreleri değiştirilerek ilgili analitin tayinine cevap verebilme yeteneğidir. Analitik yöntemin esneklik sağlayabileceği sınırlar aşağıdaki bazı değişkenlerin etkisi ile belirlenir;

- Hareketli fazın akış hızının değiştirilmesi
- Hareketli fazın pH değerinin değiştirilmesi
- Aynı özelliklere sahip farklı kolon kullanılması
- Hareketli fazın bileşenlerinin oranlarının değiştirilmesi
- Dedektöre girilen dalga boyunun değiştirilmesi
- Kolon fırın sıcaklığının değiştirilmesi

Yukarıda belirtilen değişikliklerin sonucunda analitik yöntem ile tayini yapılan analit için elde edilen analiz sonuçlarının, kesinlik parametresinde elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda sağlamlık için metot sınırları belirlenir. Analitik metodun yukarıda belirtilen her değişikliği tolere etme zorunluluğu bulunmamaktadır. Tolere etmediği durumlarda, yapılan değişiklik daraltılarak tolere edildiği değerler belirlenir ve ilgili analitik metodun sistem uygunluk parametrelerinde belirtilir (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

1.4.9. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk testi, birçok analitik prosedürün ayrılmaz bir parçasıdır. Testler, analiz edilecek ekipman, elektronik, analitik işlemler ve numunelerin bu şekilde değerlendirilebilecek entegre bir sistem oluşturduğu kavramına dayanmaktadır. Belirli bir prosedür için oluşturulacak sistem uygunluk testi parametreleri, doğrulanan prosedürün türüne bağlıdır. Metot ile yapılacak olan her çalışma öncesinde sistemin analizi doğru şekilde yapabildiğinin gösterilmesi için metoda özgü sistem uygunluk parametrelerinin kontrol edilmesi gereklidir. Bu parametreler genellikle; standart veya metoda özgü sistem uygunluk çözeltilerinden elde edilen verilerden oluşur. Bu çözeltilerden elde edilen ortalama rezolüsyon, %RSD, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı gibi parametrelerin miktar tayini analizi için yeterli olup olmadığı kontrol edilerek analize başlanır (ICH-Q2, 2005; USP-1225, 2015).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Tablo 2-1: Kullanılan Reaktif Tablosu

Adı	Markası
Asetonitril	Panreac Applichem
Sodyum Asetat Trihidrat	Merck
Fosforik Asit	Merck

Tablo 2-2: Kullanılan Standart ve İlaç Numuneleri Tablosu

Adı	Markası
Timolol Maleat Referans Standart	USP
Timolol Maleat Hammadde	FDC Limited
Xolatilim	Deva İlaç
Combigan	Allergan
Azarga	Alcon

2.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 2-3: Kullanılan Cihazlar Tablosu

Adı	Markası	Model
Hassas Terazi	Mettler Toledo	XPR6UD5
Vorteks Karıştırıcı	Thermo Scientific	88882010
pH metre	Mettler Toledo	B531240120
UPLC	Waters Corporation	CHA-H16CHA8G
Saf Su	Elga Pure Lab	PF2XXXXM1

2.3. DeneySEL Yöntemler

2.3.1. Kromatografik Koşullar

Kolon	: ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 100 mm, 2,1 mm, 1,7 µ
Kolon Sıcaklığı	: 35 °C
Akış Hızı	: dakikada 0,4 mL
Dalga Boyu	: 295 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 2,0 µL
Analiz Süresi	: 4,5 dakika
Sampling Rate	: 10
Cihaz	: UPLC Sistemi

Sistem : Gradient Pompa
Soğutuculu Otomatik Örnekleyici
Empower Yazılımı
UV Dedektör

Tablo 2-4: Gradient Çalışma Programı

Zaman (dk)	% Mobil Faz A	% Mobil Faz B
0.00	97	3
2.50	97	3
2.51	5	95
3.00	5	95
3.01	97	3
4.50	97	3

2.3.2. Çözelti Hazırlıkları

2.3.2.1. Mobil Faz Hazırlığı

Tampon Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 1,0 g Sodyum Asetat Trihidrat tartıldı ve 1000 mL’lik balonjoje içerisine alındı ve 500 mL saf su eklenerek çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

Mobil Faz A Hazırlığı

Tampon Çözelti: Asetonitril (850: 150) (h/ h) çözeltiler belirtilen oranda karıştırıldı ve fosforik asit ile pH: 3,0’a ayarlanarak, 0.45 microndan süzüldü ve 3 dakika süreyle degaze yapıldı.

Mobil Faz B Hazırlığı

Asetonitril reaktifi 3 dakika süreyle degaze edildikten sonra Mobil Faz B olarak kullanıldı.

Çözücü Hazırlığı

Mobil Faz A çözeltisi çözücü olarak kullanılmıştır.

2.3.2.2. Standart Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartılarak, 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra mobil faz A ile seyreltildi. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

2.3.2.3. Bitmiş Ürün Numune Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren numune 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

2.3.2.4. Hammadde Numune Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartılarak, 25 mL'lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi

Not-1: Hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin doğruluğunu teyit etmek amacı ile iki paralel çözelti hazırlığı yapılır.

Not-2: Timolol Maleat, Timolol ve Maleik Asitten oluşmaktadır. Standart ve numune çözeltilerini UPLC sistemine enjekte ettiğimizde bu iki pik tespit edilir. Yalnızca Timolol'ün miktar tayini hesaplandığından dolayı çözeltilerin konsantrasyonu hesaplanırken çevirme faktörü hesaba katılır.

Timolol Maleat'tan Timolol'e Çevirme Faktörü:

$$\frac{\text{Timolol Molekül Ağırlığı}}{\text{Timolol Maleat Molekül Ağırlığı}} = \frac{316.42 \text{ g mol}^{-1}}{432.49 \text{ g mol}^{-1}} = 0,73$$

2.3.2.5. Yöntem

- İlk hazırlanan standart çözeltisi 6 kez, ikinci hazırlanan standart çözeltisi 2 kez enjekte edilir.
- Numune çözeltisinden 2'şer enjeksiyon yapılır.
- Hazırlanan çözeltiler Tablo-2-5'te belirtilen enjeksiyon sırası ile sisteme enjekte edilir.

Tablo 2-5: Enjeksiyon Şeması Tablosu

Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
1.Standart çözeltisi	6
2.standart çözelti	2
Numune çözeltisi-1	2
Numune çözeltisi-2	2

2.3.2.6. Sistem Uygunluk Parametreleri

ICH Q14 Analitik Metot Geliştirme kılavuzunda yönlendirildiği şekilde aşağıdaki sistem uygunluk parametreleri belirlenmiş ve metodumuzun uygunluğu analize başlamadan önce bu parametrelerin ölçülmesi ile kanıtlanmıştır.

- İlk hazırlanan standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen Timolol pik alanlarının % rölatif standart sapması (% RSD) $\leq$ % 2,0 olmalıdır.
- İlk hazırlanan standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen Timolol pikinin ortalama alanı ile ikinci hazırlanan standart çözeltisinden elde edilen Timolol pikinin ortalama alanı arasındaki uyum % 98,0 - % 102,0 olmalıdır.
- Enjekte edilen çözeltilerden elde edilen Timolol pikine ait ortalama kuyruklanma faktörü 2,0'den küçük olmalıdır.
- Enjekte edilen çözeltilerden elde edilen Timolol pikinin teorik plaka sayısı 2000'den küçük olmamalıdır.

2.3.2.7. Hesaplama

Bitmiş Ürün İçin Hesaplama

Timolol Miktarı (mg/ mL)

$$\frac{A_N}{A_{STD}} \times \frac{T_{STD}}{25} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{50}{H_N} \times \frac{10}{2,5} \times \text{Ç. F.}$$

A_N = Numune enjeksiyonundaki Timolol etkenine ait alan

A_{Std} = İlk hazırlanan Standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen ortalama Timolol pik alanı

T_{Std} = Timolol Maleat referans standart tartımı (mg)

H_N = Kullanılan numune hacmi

P = Timolol Maleat referans standardının as is aktivitesi (100)

ÇF = Çevirme Faktörü (0,73)

Hammadde İçin Hesaplama

Timolol Maleat Miktarı (%)

$$\frac{A_N}{A_{STD}} \times \frac{T_{STD}}{25} \times \frac{1}{10} \times \frac{P}{100} \times \frac{25}{T_N} \times \frac{10}{1} \times 100 \times \text{Ç. F.}$$

A_N = Numune enjeksiyonundaki Timolol etkenine ait alan

A_{Std} = İlk hazırlanan Standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen ortalama

Timolol pik alanı

T_{Std} = Timolol Maleat referans standart tartımı (mg)

T_N = Kullanılan Timolol Maleat hammadde tartımı (mg)

P = Timolol Maleat referans standardının as is aktivitesi (100)

ÇF = Çevirme Faktörü (0,73)

3. METOT OPTİMİZASYONU

Timolol ilaç aktif maddesinin kantitaitf tayini için geliştirilen metodun optimizasyon çalışmaları için enjeksiyon hacminin optimizasyonu, dalga boyu optimizasyonu, mobil faz A pH değerinin optimizasyonu, akış hızı optimizasyonu ve kolon fırını sıcaklığı optimizasyonu çalışmaları yapılmış ve metot için en uygun kromatografik şartlar belirlenmiştir. Tüm bu çalışmaların detaylarını alt başlıklarda bulabilirsiniz.

3.1. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmes

Metoda en uygun enjeksiyon hacminin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltiler farklı enjeksiyon hacimlerinde UPLC sistemine enjekte edilerek konsantrasyona karşı elde edilen pik alanına ait kalibrasyon grafikleri çizildi.

3.1.1. Çözelti Hazırlıkları

Stok Timolol Maleat Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 683,4 mg (500 mg Timolol'e eşdeğer) Timolol Maleat hammaddesi tartıldı ve 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı.

3,0 mg / mL Çözelti Hazırlığı

3,0 mL Stok Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

2,5 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,5 mL Stok Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

2,0 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,0 mL Stok Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

1,5 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,5 mL Stok Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

1,0 mg / mL Çözelti Hazırlığı

10,0 mL Stok Timolol Maleat çözeltisi 100 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

0,5 mg / mL Çözelti Hazırlığı

5,0 mL 1 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

0,25 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,5 mL 1 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltildi.

0,15 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,5 mL 1 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

0,10 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,0 mL 1 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

0,05 mg / mL Çözelti Hazırlığı

5,0 mL 0,10 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

0,025 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,5 mL 0,10 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

0.015 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,5 mL 0,10 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

0.010 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,0 mL 0,10 mg / mL Timolol Maleat çözeltisi 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

3.1.2. Belirlenen Enjeksiyon Hacimleri

3.1.1.'de hazırlığı gösterilen çözeltiler farklı enjeksiyon hacimlerinde UPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Tablo 3-1: Enjeksiyon Hacmi Optimizasyonu Enjeksiyon Şeması

Çözelti		Enjeksiyon Hacmi (µL)							Enjeksiyon Sayısı
Konsantrasyonu	(mg / mL)								
3,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
2,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
2,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,25	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,15	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,10	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,050	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,025	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,015	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	
0,010	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6	

3.2. Dalga Boyu Optimizasyonu

Enjeksiyon hacmi belirlendikten sonra, değişik dalga boylarında denemeler planlanarak, ideal dalga boyu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında Tablo-3.2’de verilen dalga boylarında bölüm 2.4.2.1’de hazırlanışı verilen çözeltiler, bölüm 2.3’te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.1. Çözelti Hazırlanışı

Standart-1 Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

Standart-2 Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

Combigan Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Combigan ilaç numunesi 50 mL’lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 2,5 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

Azarga Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Azarga ilaç numunesi 50 mL’lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 2,5 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

Xolatim Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Xolatim ilaç numunesi 50 mL’lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı. Bu çözeltinin 2,5 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi ve UPLC sistemine enjekte edildi.

Tablo 3-2: Dalga Boyu Optimizasyonu için Enjeksiyon Şeması Tablosu

Dalga Boyu (nm)	Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
292	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2
295*	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2
298	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2

*: Bu dalga boyundaki ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

3.3. Mobil Faz A pH optimizasyonu

UPLC sisteminde kullanılan Mobil Faz A çözeltisi için uygun pH değerini belirlemek amacı ile Tablo 3.3'te verilen değişik pH aralıklarındaki Mobil Faz A'lar hazırlanmış ve bölüm 3.2.1' de hazırlığı verilen çözeltilerin seyreltilmesinde kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşullar ile Tablo 3-4'teki enjeksiyon prosedürüne uygun olarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 3-3: Mobil Faz A pH Değerleri Tablosu

Mobil Faz Adı (Çözücü)	Mobil Faz A pH Hazırlanışı	Mobil Faz A pH Değeri
Mobil Faz-A 1	Tampon Çözelti: Asetonitril (850:150) (h / h) çözeltiler belirtilen	pH 2,5
Mobil Faz-A 2*	oranda karıştırıldı ve fosforik asit ile pH ayarlandı. 0.45 µm filtreden	pH 3,0*
Mobil Faz-A 3	süzüldü ve 3 dakika süreyle degaze edildi	pH 3,5

*: Bu Mobil Faza ait ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

Tablo 3-4: Mobil Faz A pH Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedür Tablosu

Çözücü Adı (Mobil Faz A Adı)	Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
Mobil Faz-1	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatum	2
Mobil Faz-2	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatum	2
Mobil Faz-3	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatum	2

3.3.1.Çözelti Hazırlığı**Standart-1 Çözelti Hazırlığı**

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL Tablo 3.3’de belirtilen mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 3 farklı 10 mL’lik balon jojelere alındı ve Tablo 3.3’de belirtilen mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

Standart-2 Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL Tablo 3.3’de belirtilen mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 3 farklı 10 mL’lik balon jojelere alındı ve Tablo 3.3’de belirtilen mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

.

Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

Combigan Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Combigan ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 3 farklı 10 mL'lik balon jojelere alındı ve Tablo 3.3'de belirtilen mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

Azarga Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Azarga ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 3 farklı 10 mL'lik balon jojelere alındı ve Tablo 3.3'de belirtilen mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

Xolatim Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Xolatim ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 3 farklı 10 mL'lik balon jojelere alındı ve Tablo 3.3'de belirtilen mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

3.4. Akış Hızı Optimizasyonu

UPLC sisteminde kullanılan en uygun akış hızını belirlemek amacı ile Tablo 3.5'te verilen akış hızlarındaki denemeler planlanmıştır. Bölüm 2.4.2'de hazırlanışı verilen çözeltiler, bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 3-5: Akış Hızı Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedürü

Akış Hızı (ml/dakika)	Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
0.37	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.38	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.39	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.40	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.41	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.42	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2
0.43	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatilim	2

3.5. Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyonu

UPLC sisteminde kullanılan en uygun kolon fırın sıcaklığı belirlemek amacı ile, Tablo 3.3’de verilen değişik kolon sıcaklıklarında denemeler planlanmıştır. Bölüm 2.4.2’de hazırlanışı verilen çözeltiler, bölüm 2.3’te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 3-6: Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyonu için Enjeksiyon Prosedürü

Kolon Fırın Sıcaklığı (°C)	Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
30	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2
35	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2
40	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan	2
	Azarga	2
	Xolatim	2

4. METOT VALİDASYONU

Timolol ilaç aktif maddesinin kantitaitf tayini için geliştirilen metodun validasyon çalışmaları için seçicilik, kesinlik, doğrusallık, doğruluk, çalışma aralığı ve çözeltilerin stabilitesi parametreleri ICH Q2R analitik metotların validasyonu kılavuzuna uygun şekilde yapılmıştır. Tüm bu çalışmaların detaylarını alt başlıklarda bulabilirsiniz.

4.1. Seçicilik

Seçicilik parametresi dahilinde mobil faz A (çözücü), mobil faz B, standart çözeltisi, Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi, Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi ve Xolatim bitmiş ürün numune çözeltisi bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşullar ve Tablo 4.1'de gösterilen enjeksiyon prosedürü kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve tayin edilmek istenen ana pik altında herhangi bir girişim olmadığı kanıtlanmıştır

Seçicilik parametresinde, timolol etkenine ait olan impürite-B ve impürite-C temin edilmiş ve kromatografik sisteme enjekte edilerek alıkonma zamanı timolol etkeniyle aynı olup olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4-1: Seçicilik Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
Mobil Faz A (Çözücü)	1
Mobil Faz B	1
Standart-1	6
Standart-2	2
Timolol İmpürite B Çözeltisi	1
Timolol İmpürite C Çözeltisi	1
Timolol İmpürite Karışım Çözeltisi	1
Combigan Bitmiş Ürün Numune Çözeltisi	2
Azarga Bitmiş Ürün Çumune Çözeltisi	2
Xolatim bitmiş ürün numune çözeltisi	2

4.2. Kesinlik Çalışması

4.2.1. Sistem Kesinliği Çalışması

Sistem Kesinliği çalışmasının amacı kromatografik sistemin uygun çalıştığının ve tekrarlanabilir ölçümler elde edildiğinin ispatlanmasıdır. Bu çalışma kapsamında Tablo 4.2'deki enjeksiyon prosedürü uygulanmış, bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 4-2: Sistem Kesinliği için Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
Standart-1	6
Standart-2	2

4.2.2. Tekrarlanabilirlik Çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışmasının amacı geliştirilen metodun 6 ayrı bitmiş ürün numunesi ölçüldüğünde tayin edilmek istenen madde için tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiğinin ispatlanmasıdır. Bu çalışma kapsamında Tablo 4.3'deki enjeksiyon prosedürü uygulanmış, bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 4-3: Tekrarlanabilirlik Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
Standart-1	6
Standart-2	2
Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi	6
Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi	6
Xolatin bitmiş ürün numune çözeltisi	6

4.2.3. Ara Kesinlik Çalışması

Ara Kesinlik çalışmasının amacı geliştirilen metodun 6 ayrı bitmiş ürün numunesi ölçüldüğünde tayin edilmek istenen madde için farklı kolon, farklı UPLC sistemi ve farklı gün analizlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiğinin ispatlanmasıdır. Bu çalışma kapsamında Tablo 4.4'deki enjeksiyon prosedürü uygulanmış, bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tablo 4-4: Ara Kesinlik Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Adı	Enjeksiyon Sayısı
Standart-1	6
Standart-2	2
Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi	6
Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi	6
Xolatilim bitmiş ürün numune çözeltisi	6

4.3. Doğrusallık Çalışması

Doğrusallık çalışması kapsamında 0,0002 mg / mL ile 0,05 mg / mL konsantrasyonu aralığında çözeltiler hazırlanmış ve bölüm 2.3'te yer alan deneysel yöntem içerisinde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak, UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile kalibrasyon grafikleri çizilmiş, R^2 ve % bağıl standart sapma (%RSD) hesaplanmıştır.

4.3.1. Çözelti Hazırlıkları

Stok Standart Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL'lik balon jöje içerisine alındı. 15 mL mobil faz A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile tamamlandı.

0,0002 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,0 mL stok standart çözeltisi 100 mL'ye mobil faz A ile seyreltili. Bu çözeltinin 0,8 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltili.

0,010 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1, mL stok Standart çözeltisi 25 mL'ye mobil faz A ile seyreltili.

0,0150 mg / mL Çözelti Hazırlığı

1,5 mL stok standart çözeltisi 25 mL'ye mobil faz A ile seyreltili

0.025 mg / mL Çözelti Hazırlığı

2,5 mL stok standart çözeltisi 25 mL'ye mobil faz A ile seyreltili

0,050 mg / mL Çözelti Hazırlığı

5,0 mL stok standart çözeltisi 25 mL'ye mobil faz A ile seyreltili

Tablo 4-5: Doğrusallık Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Konstrasyonu (ml/mL)	Enjeksiyon Sayısı
0,0002	6
0,010	2
0,015	2
0,025	6
0,050	6

4.4. Doğruluk Çalışması

Geliştirilen analitik metodun çalışma aralığı sınırlarında yöntemin doğruluğunu sınamak için; en düşük, orta ve en yüksek konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp standart çözeltisine karşı analizlenir. Analiz sonucunda elde edilen deneysel veriler teorik veriler ile kıyaslanarak % geri kazanım hesaplanır.

4.4.1. Doğruluk Çözelti Hazırlıkları

0,0002 mg / mL Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 1,5 mg Timolol Maleat USP refererans standardı tartıldı ve 100 mL’lik balon joje içerisine alınarak mobil faz A seyreltilti. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 100 mL’ye mobil faz A ile seyreltilti

0,025 mg / mL Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat USP refererans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alınarak mobil faz A seyreltilti. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 25 mL’ye mobil faz A ile seyreltilti

0,050 mg / mL Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat USP refererans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alınarak mobil faz A seyreltilti. Bu çözeltiden 5,0 mL alınarak mL’ye mobil faz A ile seyreltilti.

Tablo 4-6: Doğruluk Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü

Çözelti Adı ve Konstrasyonu (ml/mL)	Enjeksiyon Sayısı
Standart-1(0,025 mg / mL)	6
Standart-2 (0,025 mg / mL)	2
En Düşük Seviye (0,0002 mg / mL)	2
Standart Seviye (0,025 mg / mL)	2
En Düşük Seviye (0,050 mg / mL)	2

4.5. Çalışma Aralığı

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı doğruluk ve doğrusallık çalışmalarından belirlenir. Çalışma aralığının, uygun bir yöntem ile tayin edilen bileşenin alt ve üst konsantrasyonları arasındaki aralık olarak adlandırılır. Doğrusallık çalışmasında minimum (0,0002 mg / mL) ve maksimum (0,050 mg / mL) derişimde hazırlanan standart çözeltiler kullanılır. Çözeltilerin hazırlanışı “Doğrusallık” başlığı altında verilmiştir. Bu çalışma kapsamında uygulanan enjeksiyon prosedürü Tablo 4.7’deki gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Çalışma Aralığı için Enjeksiyon Prosedürü

Standart Çözelti Konsantrasyonu (mg / mL)	Enjeksiyon Sayısı
0,0002	6
0,050	6

4.5.1. Çözeltilerin Stabilitesi

4.5.1.1. Standart ve Numune Çözeltisi Stabilitesi

Standart çözelti stabilitesi çalışmasının amacı, hazırlanan çözeltinin uygulanan kromatografik sistem içerisinde ne kadar süre ile tekrarlanabilir ve ölçümlerde kullanılabilir olduğunun ispatlanmasıdır. Bu çalışmacının diğer bir amacı da hazırlanan çözeltinin kromatografik sisteme enjekte edilmeden vial (hazırlanan çözeltilerin UPLC sistemine enjekte edilmesini sağlayan malzeme) ya da balon joje içerisinde 25°C oda sıcaklığında ne kadar süre ile bekletilebildiğinin ölçülmesidir. Bu çalışma kapsamında hazırlanan çözeltiler 48 saat süre ile bölüm 2.3’te yer alan deneysel yöntemde belirtilen kromatografik koşul, çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.5.1.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL’lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlanarak mobil faz A ile seyreltildi. Bu çözeltinin 1,0 mL’si 10 mL’ye mobil faz A ile seyreltildi.

Standart-2 Çözelti Hazırlığı

Yaklaşık 8,5 mg Timolol Maleat referans standardı tartıldı ve 25 mL'lik balon joje içerisine alındı. 15 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlanarak mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 1,0 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilti.

Numune Çözelti Hazırlığı

Azarga Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Azarga ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

Combigan Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Combigan ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

Xolatim Bitmiş Ürün Numune Çözelti Hazırlığı

1,0 mL Timolol ilaç aktif maddesini içeren Xolatim ilaç numunesi 50 mL'lik balon joje içerisine alındı. 25 mL mobil faz-A eklendi ve ultrasonik banyoda 3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünme işleminden sonra hacmine mobil faz A ile seyreltilti. Bu çözeltinin 2,5 mL'si 10 mL'ye mobil faz A ile seyreltilerek UPLC sistemine enjekte edildi.

4.5.1.2. Mobil Faz Stabilitesi

Standart ve numune çözeltileri UPLC sisteminde taze hazırlanmış ve 12 gün bekletilmiş mobil faz A çözeltileri kullanılarak enjekte edilir ve bu enjeksiyonlardan elde edilen veriler kullanılarak sistem uygunluk parametrelerinde herhangi bir değişiklik olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında Tablo 4.8'deki enjeksiyon prosedürü uygulanmış ve Mobil faz A çözeltisi bölüm 2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 4-8: Mobil Faz Stabilitesi Çalışması için Enjeksiyon Prosedürü

Mobil Faz	Çözeltili Adı	Enjeksiyon Sayısı
Taze Hazırlanmış Mobil Faz	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi	6
	Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi	6
	Xolatim bitmiş ürün numune çözeltisi	6
12 Gün Oda Sıcaklığında Bekletilmiş Mobil Faz	Standart-1	6
	Standart-2	2
	Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi	6
	Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi	6
	Xolatim bitmiş ürün numune çözeltisi	6

5. SONUÇ

5.1. Metot Optimizasyonu Sonuçları

5.1.1. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

Tablo 3.1’de belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler farklı enjeksiyon hacimlerinde UPLC sistemine enjekte edildi ve konsantrasyona karşı elde edilen pik alanına ait kalibrasyon grafikleri çizildi.

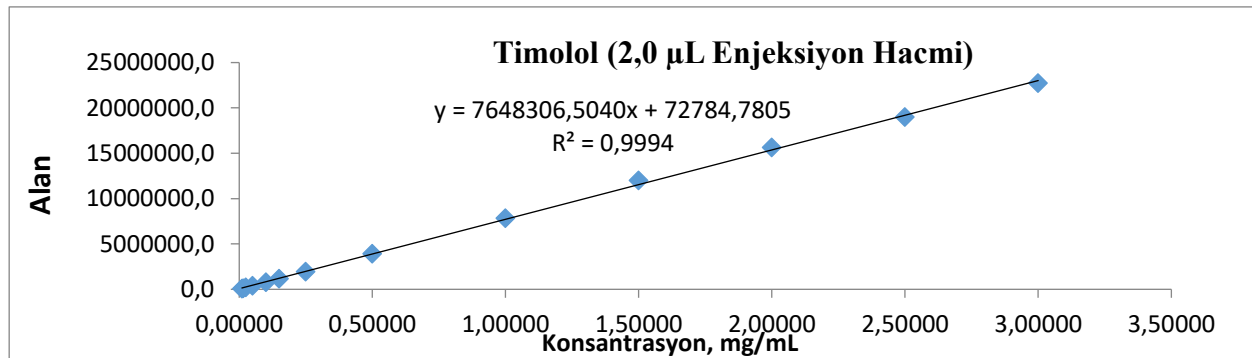
Note: Tablo 5.1 ile Tablo 5.14 aralığındaki tablolardaki çözeltilerin konsantrasyonu mg/mL biriminde verilmiştir.

Tablo 5-1: 2,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	22737776	18989030	15642283	12000423	7847020	3938116
SD	117995,70	139978,00	79227,40	104347,50	69932,80	18753,00
RSD	0,52	0,74	0,51	0,87	0,89	0,48
Kuyruklanma	6,7	6,1	5,7	5,1	4,4	3,4
Plaka Sayısı	250	300	400	500	700	1200

Tablo 5-2: 2,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015	0,01
Ortalama Alan	1953412	1177068	782833	383443	197188	113850	78560
SD	4466,60	5281,40	2976,60	1042,70	335,50	289,00	178,70
RSD	0,23	0,45	0,38	0,27	0,17	0,25	0,23
Kuyruklanma	2,8	2,4	2,2	1,9	1,7	1,6	1,5
Plaka Sayısı	2100	3000	4050	6600	9000	10500	11500



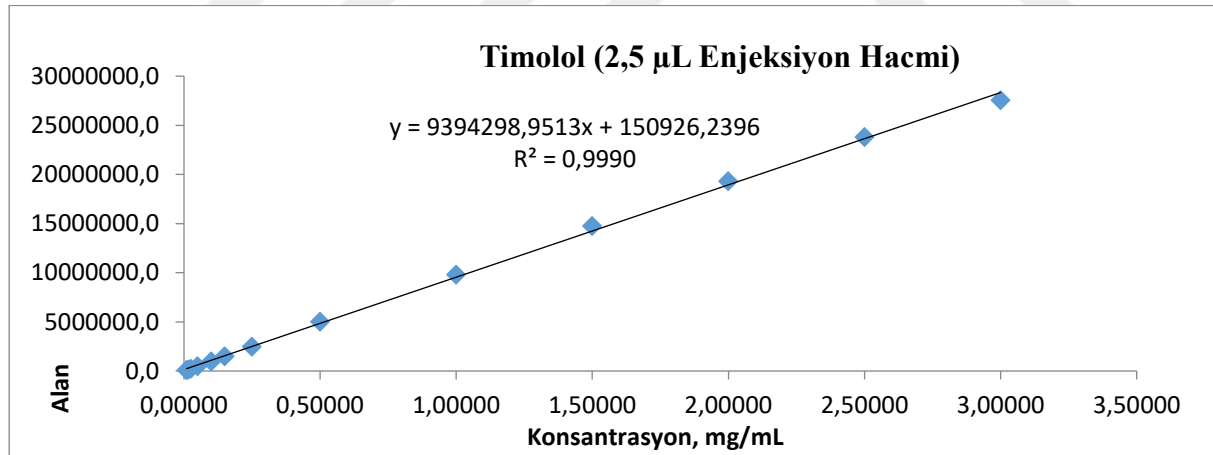
Şekil 5.1: 2.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-3: 2,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	27574140	23811794	19307177	14761991	9825516	5008746
SD	229572,20	145429,40	93016,00	102590,50	27721,40	5047,70
RSD	0,83	0,61	0,48	0,69	0,28	0,10
Kuyruklanma	7,3	6,8	6,3	5,6	4,8	3,8
Plaka Sayısı	190	240	300	400	600	1000

Tablo 5-4: 2,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015	0,01
Ortalama Alan	2478279	1506186	986905	484064	249284	143612	99343
SD	1565	1198,9	1178,3	380,3	430,3	284,1	289,6
RSD	0,06	0,08	0,12	0,08	0,17	0,2	0,29
Kuyruklanma	3	2,6	2,3	2	1,8	1,7	1,6
Plaka Sayısı	1800	2500	3500	5700	8000	10000	11000



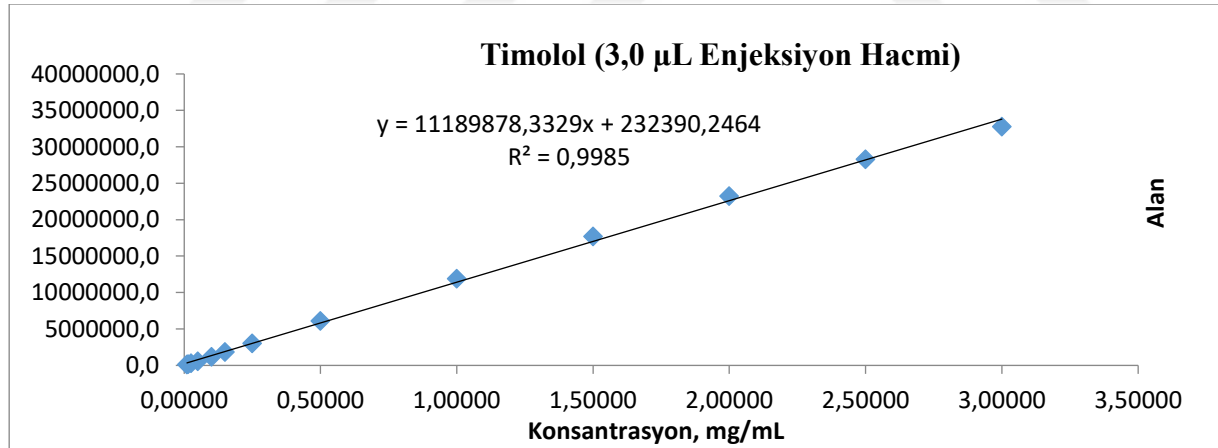
Şekil 5.2: 2.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-5: 3,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	32775428	28307760	23240772	17688859	11895505	6109028
SD	276447,8	222760,3	26977,4	93194,4	31052,1	13136
RSD	0,84	0,79	0,12	0,53	0,26	0,22
Kuyruklanma	7,9	7,4	6,8	6,1	5,2	4,1
Plaka Sayısı	150	190	240	325	490	850

Tablo 5-6: 3,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015
Ortalama Alan	3009304	1831583	1184921	583197	303520	175447
SD	6281,8	4407	1503,5	501,2	565,8	330,6
RSD	0,21	0,24	0,13	0,09	0,19	0,19
Kuyruklanma	3,2	2,8	2,5	2,1	1,9	1,7
Plaka Sayısı	1500	2200	3000	5000	7500	9500

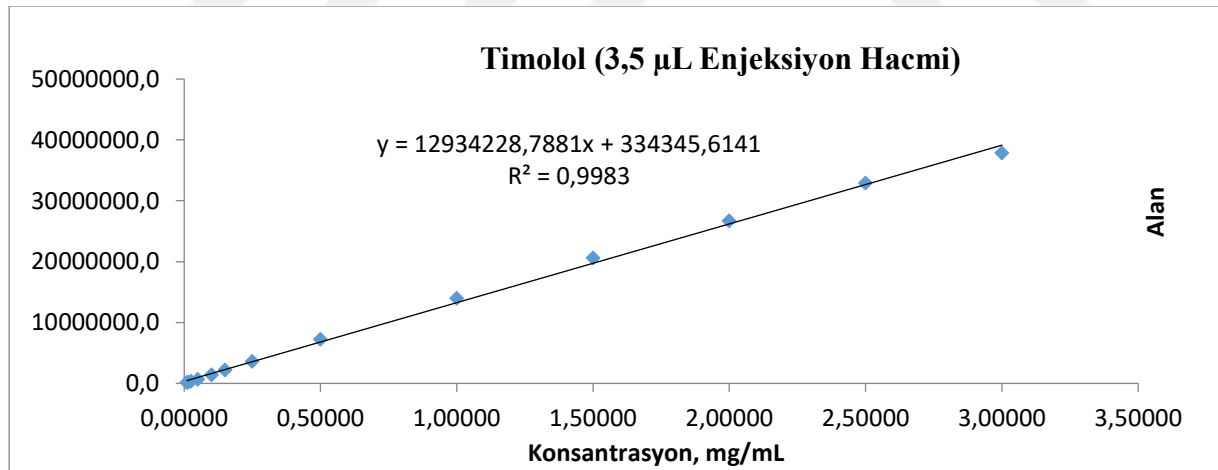
**Şekil 5.3:** 3.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-7: 3,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	37862095	32929053	26689329	20616946	13972212	7265604
SD	151119,7	25174,3	140450,8	55225,7	13760,3	18649,8
RSD	0,4	0,08	0,53	0,27	0,1	0,26
Kuyruklanma	8,7	8,1	7,2	6,5	5,5	4,3
Plaka Sayısı	130	150	200	270	410	740

Tablo 5-8: 3,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015
Ortalama Alan	3602189	2183219	1395380	685878	360282	207635
SD	2520,2	1250,3	1785,5	409,5	480,4	371,2
RSD	0,07	0,06	0,13	0,06	0,13	0,18
Kuyruklanma	3,4	2,9	2,6	2,2	2	1,8
Plaka Sayısı	1300	2000	2700	4400	7000	9000

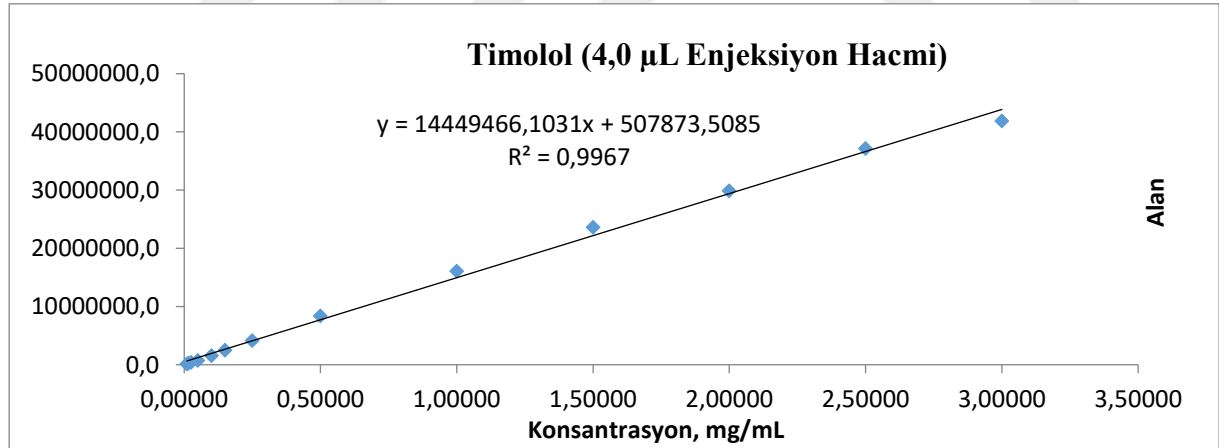
**Şekil 5.4:** 3.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-9: 4,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	41892794	37151207	29906381	23631063	16123420	8420378
SD	162932,9	43123,3	178893,7	36330,1	9660,4	8792,1
RSD	0,39	0,12	0,6	0,15	0,06	0,1
Kuyruklanma	9,2	8,7	7,7	6,9	5,9	4,6
Plaka Sayısı	110	130	170	230	350	650

Tablo 5-10: 4,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015
Ortalama Alan	4162199	2514543	1580742	778677	417155	242182
SD	5991,1	2542,4	830	1214,6	510,7	214,6
RSD	0,14	0,1	0,05	0,16	0,12	0,09
Kuyruklanma	3,6	3,1	2,7	2,3	2	1,9
Plaka Sayısı	1200	1800	2500	4000	6350	8700

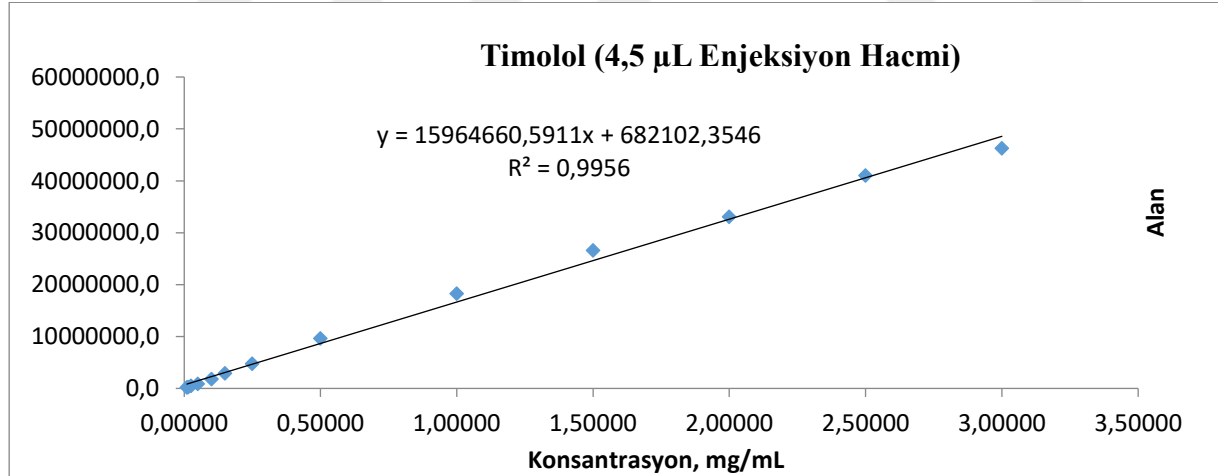
**Şekil 5.5:** 4.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-11: 4,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	46272462	41020756	33076925	26586362	18264164	9610237
SD	52575,5	23303,9	71633,1	7943	11344,9	4688,7
RSD	0,11	0,06	0,22	0,03	0,06	0,05
Kuyruklanma	10	9,7	8,1	7,3	6,3	4,9
Plaka Sayısı	93	111	152	200	300	575

Tablo 5-12: 4,5 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015
Ortalama Alan	4752830	2883312	1787139	875397	474095	276716
SD	1533,8	1291,3	31838,7	654,7	504,7	381,1
RSD	0,03	0,04	0,18	0,07	0,11	0,14
Kuyruklanma	3,8	3,2	2,8	2,4	2,1	1,9
Plaka Sayısı	1050	1600	2200	3500	6000	8000

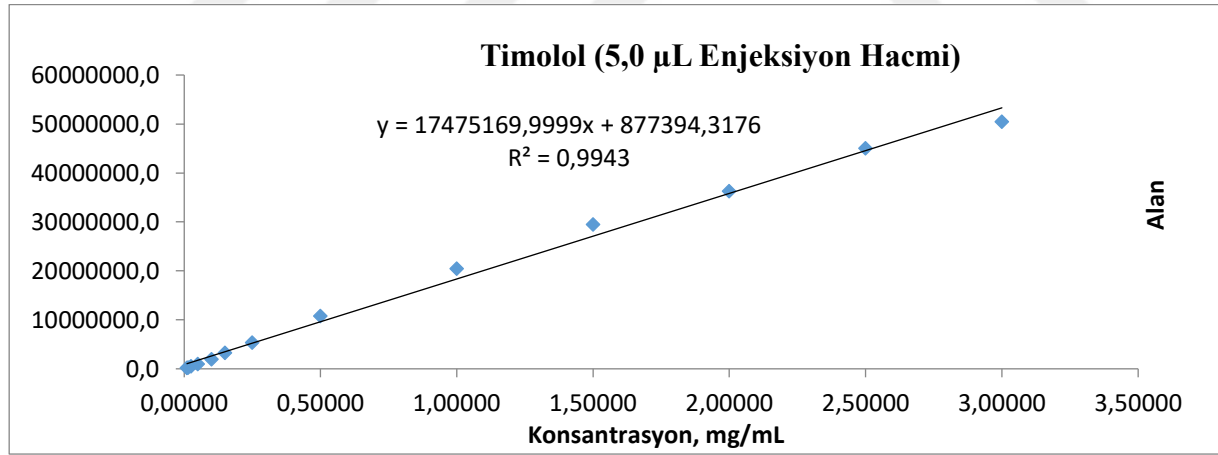
**Şekil 5.6:** 4.5 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-13: 5,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları

	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Ortalama Alan	50473631	45089793	36278659	29533614	20490409	10838430
SD	49338,09	17468,46	94280,86	36717,612	19935,69	5870,48
RSD	0,09775	0,038741	0,25988	0,1243248	0,097293	0,054164
Kuyruklanma	11	10,5	8,5	7,7	6,6	5,1
Plaka Sayısı	80	98	133	175	275	525

Tablo 5-14: 5,0 µL Enjeksiyon Hacmi Sistem Uygunluk Sonuçları Devamı

	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025	0,015
Ortalama Alan	5369406	3263312	1991653,2	978749,2	538073,2	314864,7
SD	4268,506	2741,268	870,88493	539,2897	247,8576	196,5112
RSD	0,079497	0,084003	0,0437267	0,0551	0,046064	0,062411
Kuyruklanma	4	3,4	3	2,5	2,1	2
Plaka Sayısı	950	1411	2050	3500	5500	7700

**Şekil 5.7:** 5.0 µL Enjeksiyon Hacmi için Kalibrasyon Grafiği

Tablo 5-15: Enjeksiyon Hacmi Belirlenmesi Analiz Sonuçları

Konsantrasyon (mg / mL)	Enjeksiyon Hacmi / Alan						
	2,0 µL	2,5 µL	3,0 µL	3,5 µL	4,0 µL	4,5 µL	5,0 µL
3	22737776	27574140	32775428	37862095	41892794	46272462	50473631
2,5	18989030	23811794	28307760	32929053	37151207	41020756	45089793
2	15642283	19307177	23240772	26689329	29906381	33076925	36278659
1,5	12000423	14761991	17688859	20616946	23631063	26586362	29533614
1	7847020	9825516	11895505	13972212	16123420	18264164	20490409
0,5	3938116	5008746	6109028	7265604	8420378	9610237	10838430
0,25	1953412	2478279	3009304	3602189	4162199	4752830	5369406
0,15	1177068	1506186	1831583	2183219	2514543	2883312	3263312
0,1	782833	986905	1184921	1395380	1580742	1787139	1991653
0,05	383443	484064	583197	685878	778677	875397	978749
0,025	197188	249284	303520	360282	417155	474095	538073
0,015	113850	143612	175447	207635	242182	276716	314865
0,01	78560	99343	121347	144239	168039	191741	216716
R ²	0,999	0,999	0,999	0,998	0,997	0,996	0,994
Eğim	7648306,5	9394299,0	11189878,3	12934228,8	14449466,1	15964660,6	17475170,0
Kesim	72784,8	150926,2	232390,2	334345,6	507873,5	682102,4	877394,3

Kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı, % bağıl standart sapma ve doğrusallık çalışmasından elde edilen R² gibi sistem uygunluk parametreleri Timolol ilaç aktif maddesinin miktar tayini için geliştirilen analitik metodun ideal olup olmadığının değerlendirilmesinde rol oynar. Bu değerlendirme için oluşturulan kromatogramlardan Timolol pikine ait tüm sonuçlar Tablo 5.1 ve Tablo 5.15 arasında verilmiştir.

Sisteme 6 kez ardışık olarak enjekte edilen standart çözeltilerinden elde edilen Timolol pikine ait sonuçlara göre çizilen kalibrasyon grafikleri ve sistem uygunluk değerleri incelendiğinde;

- kuyruklanma faktörünün 2,0'ın altında,
- teorik plaka sayısının mümkün olan en yüksek değerde,
- % bağıl standart sapmanın mümkün olan en küçük değerde ve
- R²'nin mümkün olan en yüksek değerde

olduğu enjeksiyon hacminin 2 µL ve konsantrasyonun da 0,015mg / mL olduğu tespit edilmiştir. Analitik metot optimizasyonu ve validasyonunda belirlenen bu enjeksiyon hacmi ve konsantrasyonu kullanılmıştır.

5.1.2. Dalga Boyu Optimizasyonu Sonuçları

Enjeksiyon hacmi belirlendikten sonra, değişik dalga boylarında denemeler planlanmış, ideal dalga boyu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında Tablo 3.2'de verilen dalga boylarında ve metotta belirtilen çözücü ve mobil fazlar kullanılarak UPLC sistemine enjekte edildi ve elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

Literatür araştırmalarında Timolol pikinin maksimum absorbands verdiği dalga boyunun 295nm olduğu görülmüştür (Hafsa vd.,2011). UPLC sistemlerinde kullanılan UV veya PDA dedektörlerinde sapma oluşması muhtemeldir. Bu sebep ile ideal dalga boyu olarak literatürde yayınlanmış olan 295nm'den ± 3 nm alt ve üst değerlerde ölçümler alınmış ve sistem uygunluk parametreleri kontrol edilerek Tablo 5.16'da verilmiştir.

Tablo 5-16: Dalga Boyu Optimizasyonu için Sistem Uygunluk ve Numune Sonuçları

Dalga Boyu (nm)	% RSD	Teorik Plaka Sayısı	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü	İki Standart Çözeltilerin % Uyumu	Combigan mg / mL	Xolatim mg / mL	Azarga mg / mL
292	0,4	9618	1,9	1,6	%98,6	5,1	4,9	5,2
295*	0,1	9578	1,9	1,6	%99,9	5,0	5,0	5,2
298	0,1	9782	1,9	1,7	%97,8	5,1	4,9	5,2

*: Ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

Tablo 5.16’da verilen sonuçlar incelendiğinde, bilinçli bir şekilde dalga boyunda yapılan değişikliklerin, % RSD, teorik plaka sayısı, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü ve iki standart çözeltisi arasındaki uyumun ve numune çözeltilerinin sonuçları üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı ispatlanmıştır. Bu sonuçlara göre, geliştirilen analitik metodun uygulandığı UPLC sisteminin dedektöründe oluşabilecek sapmaları tolere edebildiği görülmüştür. Analitik metot optimizasyonunda ve validasyonunda belirlenen 295nm dalga boyu kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

5.1.3. Mobil Faz pH Optimizasyon Sonuçları

Tablo 5.17’deki veriler incelendiğinde, mobil faz A’nın pH değeri ayarlanırken oluşabilecek analitik hataları ± 0.5 birim kadar başarılı bir şekilde tolere ettiği gözlemlenmiştir. ± 0.5 birim değişiklik düşünüldüğünde hedef seviye olan pH 3.0 değeri mobil faz A için tüm metot optimizasyonunda ve validasyonunda kullanılan pH olarak seçilmiştir.

Tablo 5-17: Mobil Faz pH Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları

pH Değeri	%RSD	Teorik Plaka Sayısı	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü	İki Standart Çözeltilerin % Uyumu	Combigan mg / mL	Xolatim mg / mL	Azarga mg / mL
2,5	0,2	10977	2,1	1,6	%99,3	5,0	4,8	5,0
3,0*	0,1	9578	1,9	1,6	%99,9	5,0	5,0	5,2
3,5	0,3	10170	2,1	1,6	%98,8	4,9	5,0	4,8

*: Ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

5.1.4. Akış Hızı Optimizasyon Sonuçları

Tablo 5.18'teki veriler incelendiğinde, 0,37 mL/dk ve 0,42mL/dk aralığında ki akış hızlarında yapılan çalışmada sistem uygunluk kriterlerinde ve numune sonuçlarında sonucu doğrudan olumsuz etkileyen bir durum tespit edilmemiştir. 0,43 mL/dk akış hızında iki standart arasındaki uyumun hedef değerden düşük kalması sebebi ile bu akış hızı uygun bulunmamıştır. Tüm bu veriler ışığında orta değer olan 0.40 mL/dk değeri tüm metot optimizasyonunda ve validasyonunda kullanılan akış hızı olarak seçilmiştir.

Tablo 5-18: Akış Hızı Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları

Akış Hızı (mL/dk)	%RSD	Teorik Plaka Sayısı	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü	İki Standart Çözeltinin % Uyumu	Combigan mg / mL	Xolatim mg / mL	Azarga mg / mL
0,37	0,1	9754	2,0	1,6	%98,6	5,0	5,0	5,2
0,38	0,3	9845	2,0	1,6	%99,2	5,1	5,0	5,2
0,39	0,1	9704	2,0	1,6	%98,3	5,0	5,0	5,2
0,40*	0,1	9578	1,9	1,6	%99,9	5,0	5,0	5,2
0,41	0,2	9566	1,9	1,6	%98,6	5,1	4,9	5,2
0,42	0,4	9434	1,9	1,6	%98,2	5,1	5,0	5,2
0,43	0,1	9307	1,9	1,6	%97,6	5,1	4,9	5,2

*: Ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

5.1.5. Kolon Fırın Sıcaklığı Optimizasyon Sonuçları

Tablo 5.19'daki veriler incelendiğinde, sistem uygunluk parametreleri açısından kolon fırın sıcaklığında ± 5 birim kadar değişikliğin sistemde başarılı bir şekilde tolere edildiği gözlemlenmiş olsa da bitmiş ürün numunelerindeki sonuçların hedeflenen değerde olduğu 35°C ideal kolon fırın sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Tablo 5-19: Kolon Fırın Sıcaklık Optimizasyonu için Sistem Uygunluk Sonuçları

Kolon Fırın Sıcaklığı °C	%RSD	Teorik Plaka Sayısı	Alıkonma Zamanı	Kuyruklanma Faktörü	İki Standart Çözeltilerin % Uyumu	Combigan mg / mL	Xolatilim mg / mL	Azarga mg / mL
30°C	0,2	9576	2,0	1,6	%99,4	5,3	5,1	5,4
35°C*	0,1	9578	1,9	1,6	%99,9	5,0	5,0	5,2
40°C	0,1	9883	1,9	1,7	%98,7	5,3	5,1	5,4

*: Ölçümler tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışmasından alınmıştır

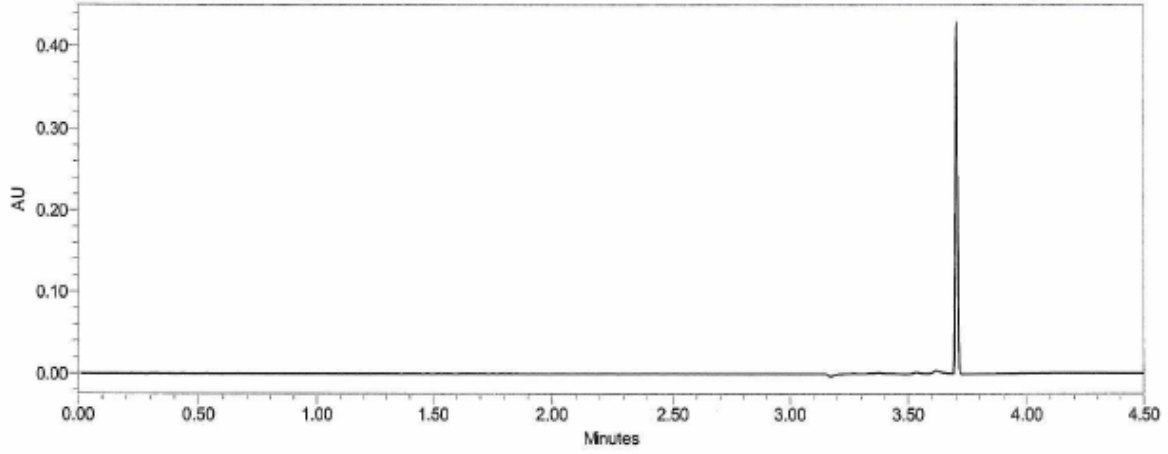
5.2. Metot Validasyonu Sonuçları

5.2.1. Seçicilik Validasyon Parametresi Sonuçları

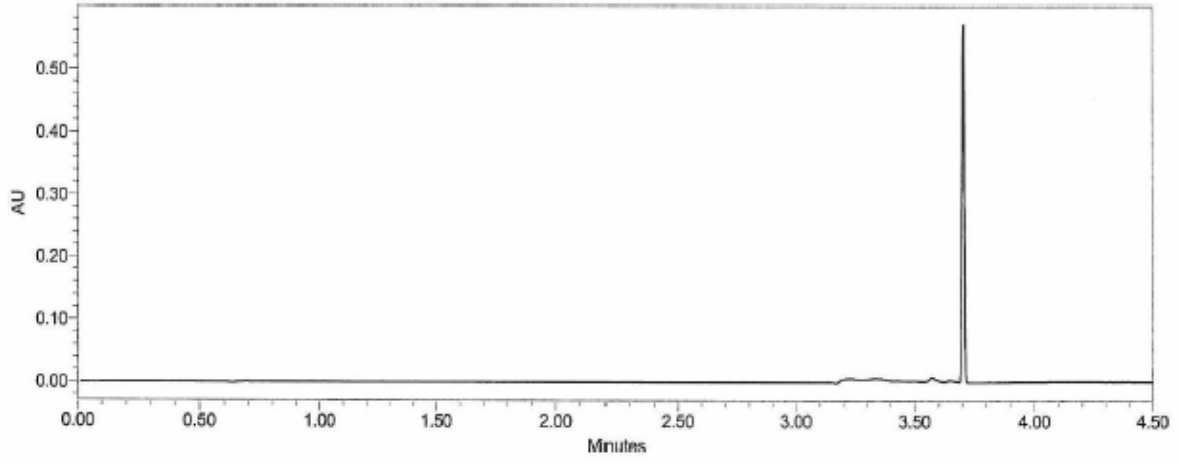
Seçicilik çalışması verileri incelendiğinde enjekte edilen hiçbir solüsyondan Timolol etken madde pikinin alıkonma zamanında denk gelen bir girişim olmadığı gözlemlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda seçicilik parametresi metoda başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Tablo 5-20: Seçicilik Validasyon Parametresi için Sistem Uygunluk Sonuçları

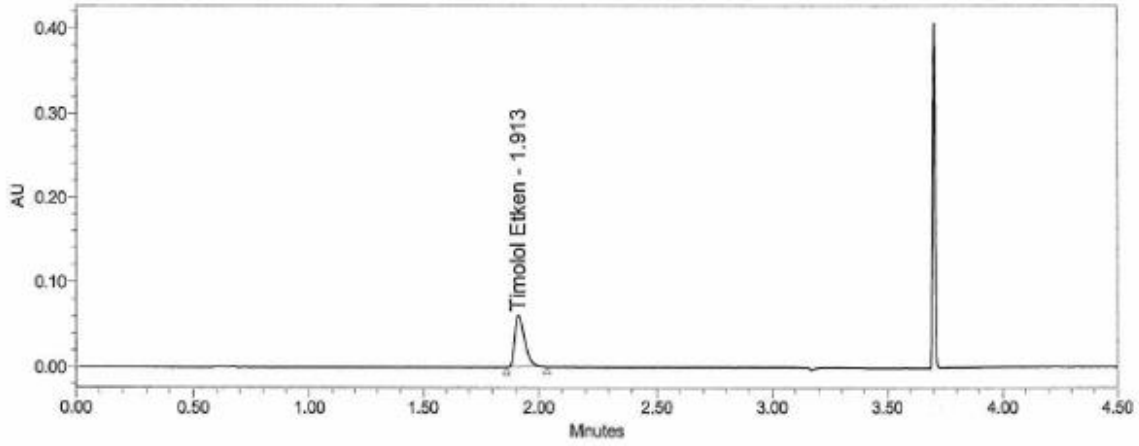
Çözelti Adı	Timolol Piki Alıkonma Zamanı
Mobil Faz A (Çözücü)	Herhangi bir pik tespit edilmemiştir.
Mobil Faz B	Herhangi bir pik tespit edilmemiştir.
Timolol İmpürite B	Herhangi bir pik tespit edilmemiştir.
Timolol İmpürite C	Herhangi bir pik tespit edilmemiştir.
Standart-1	1,9
Standart-2	1,9
Combigan bitmiş ürün numune çözeltisi	1,9
Xolatilim bitmiş ürün numune çözeltisi	1,9
Azarga bitmiş ürün numune çözeltisi	1,9



Şekil 5.8: Mobil Faz A (Çözücü) Kromatogramı

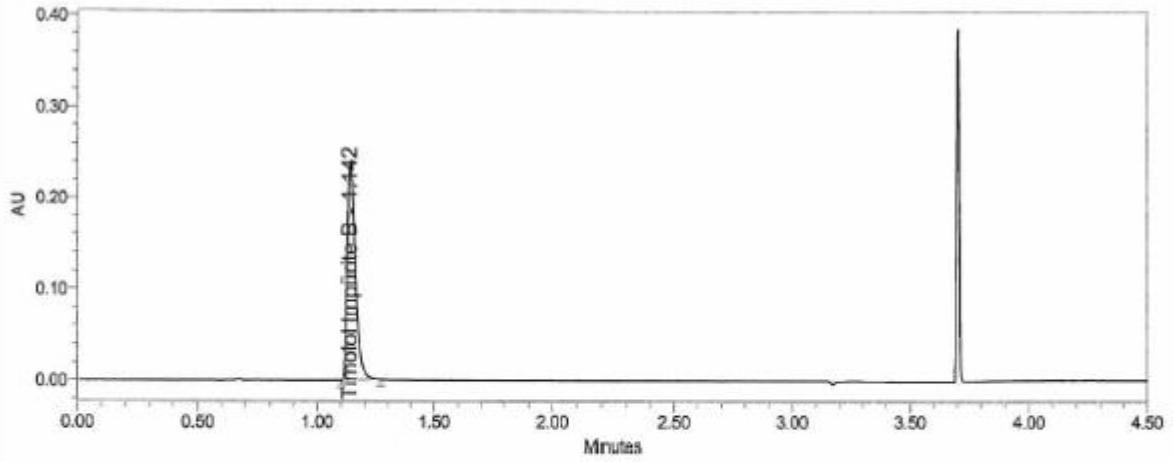


Şekil 5.9: Mobil Faz B Kromatogramı



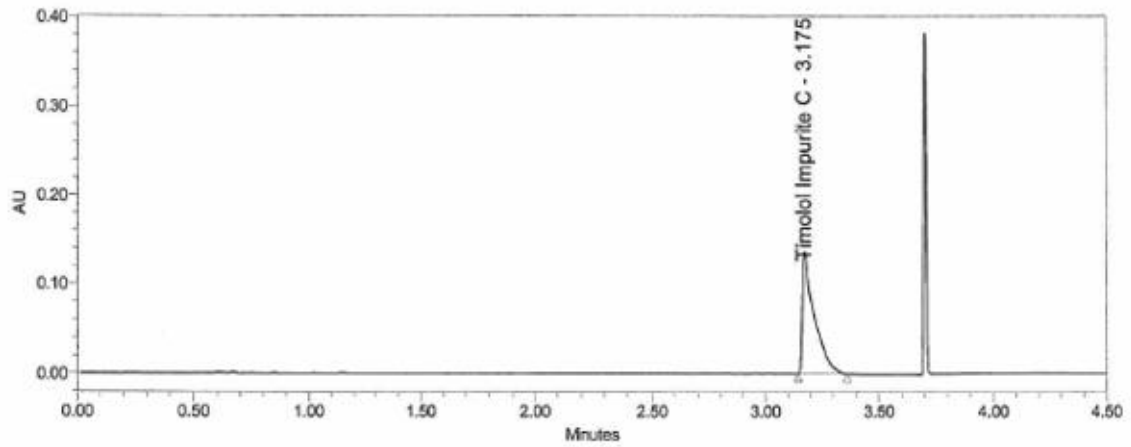
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol Impürte B	1.149					
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.913	183951	100.00	60682	0.375	4.853
4	Timolol Impurite C	3.175					
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.10: Standard Çözeltili Kromatogramı



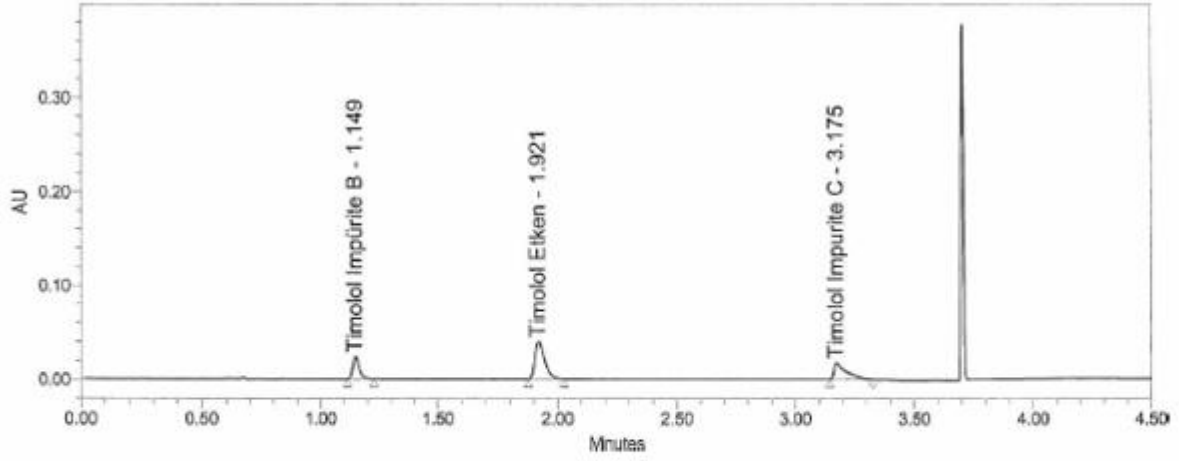
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol İmpürite B	1.142	568135	100.00	240782	0.100	3.570
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.921					
4	Timolol Impurite C	3.175					
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.11: Timolol İmpürite B Çözeltili Kromatogramı



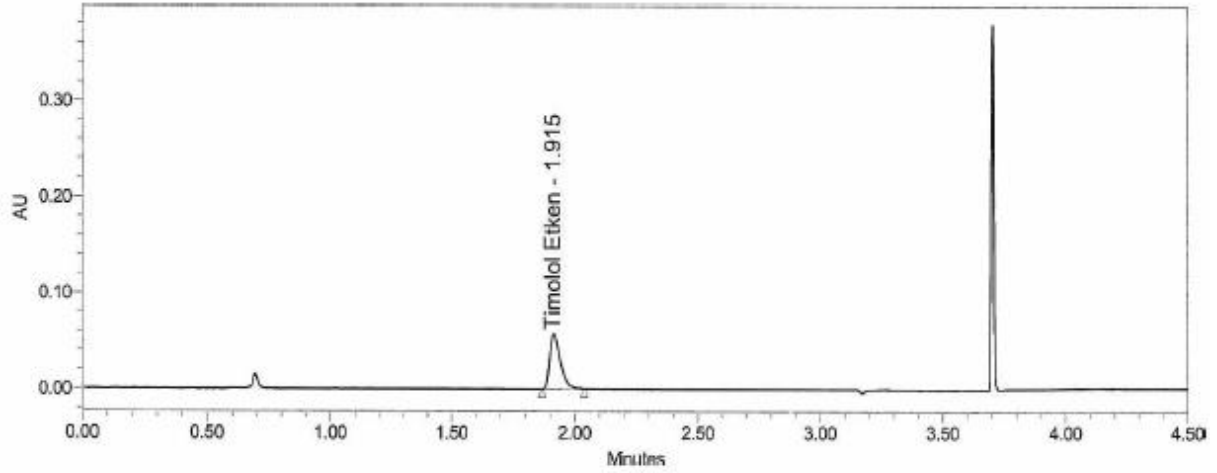
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol İmpürite B	1.149					
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.921					
4	Timolol Impurite C	3.175	501808	100.00	136433	0.936	4.111
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.12: Timolol İmpürite C Çözeltili Kromatogramı



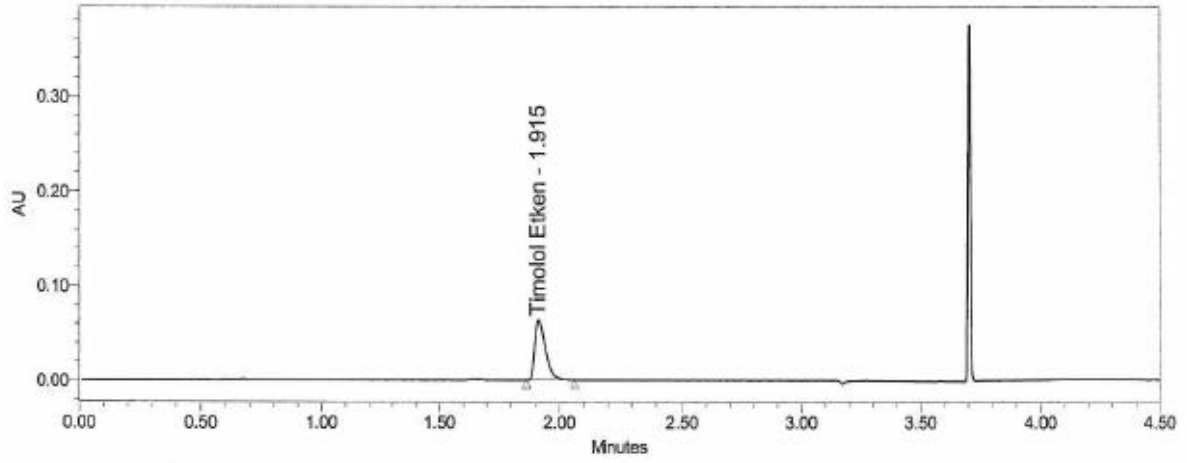
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol İmpürite B	1.149	45249	20.12	23897	0.928	8.188
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.921	113140	50.31	39791	0.547	5.827
4	Timolol Impurite C	3.175	66511	29.57	17802	8.277	9.121
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.13: Timolol İmpürite Karışım Çözeltilisi Çözeltilisi Kromatogramı



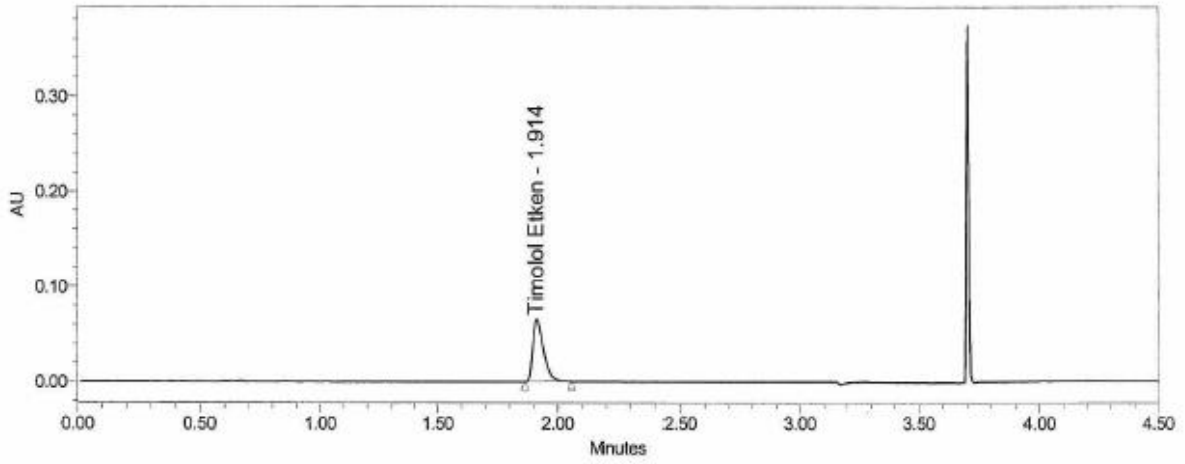
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol İmpürite B	1.149					
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.915	170984	100.00	56911	2.990	22.216
4	Timolol Impurite C	3.175					
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.14: Combigan Numune Çözeltilisi Kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol Impürite B	1.149					
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.915	197507	100.00	63522	0.400	4.879
4	Timolol Impurite C	3.175					
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.15: Azarga Numune Çözeltisi Kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Timolol Impürite B	1.149					
2	Timolol Impurite_F	1.522					
3	Timolol Etken	1.914	204136	100.00	65683	0.393	4.819
4	Timolol Impurite C	3.175					
5	Timolol Impurite F	3.399					

Şekil 5.16: Xolatilim Numune Çözeltisi Kromatogramı

5.2.2. Kesinlik Validasyon Parametresi Sonuçları

5.2.2.1. Sistem Kesinliği Sonuçları

Hedef standart konsantrasyonda yapılan sistem kesinliği çalışma sonuçları incelendiğinde, % rölatif standart sapma, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı ve standart çözeltileri arasında ki uyumun kabul kriterleri içerisinde olduğu kanıtlanmıştır.

Tablo 5-21: Sistem Kesinliği Sonuçları

Enjeksiyon Numarası	Alan
1.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	194697
2.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	194663
3.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	194553
4.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	194297
5.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	194610
6.Enjeksiyon Timolol Piki Alanı	195048
Timolol Piki Ortalama Alanı	194645
Standart Sapma	243,4
% RSD	0,1
Ortalama Kuyruklanma Faktörü	1,6
Ortalama Teorik Plaka Sayısı	9578
Standart-1 ve Standart-2 Uyumu	99,99

5.2.2.2. Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Hedef konsantrasyonda hazırlanan numune çözeltileri referans standart çözeltisi enjeksiyonları kullanılarak, içerdikleri Timolol miktarları mg / mL biriminde hesaplanmıştır. Hesaplanan Timolol miktar tayini sonuçları arasındaki % rölatif standart sapma değerinin üst limit olan %2,0'dan az olduğu görülmüştür. ICH Q1E *stabilite sonuçlarının değerlendirilmesi* kılavuzu incelendiğinde son kullanma tarihi dolmamış ürünlerin içerdikleri etken madde miktarları etiket değerinden %5'den fazla sapmaması gerektiği belirtilmiştir. Timolol ilaç aktif maddesini içeren Combigan, Xolatin ve Azarga ilaçlarının prospektüsleri incelendiğinde içerdikleri Timolol miktarlarının mL başına 5mg olduğu gözlemlenmiştir. ICH kılavuzunun izin verdiği limit değerler 5mg üzerinden hesaplandığında; ilaçların içerdikleri Timolol miktarlarının 475 mg / mL'den az ve 525 mg / mL'den fazla olmaması gerektiği belirlenmiştir. Tablo 5.22 ve Tablo 524 arasındaki sonuçlar incelendiğinde, numune miktar tayini ortalama sonuçlarının 4,75 mg / mL ile 5,25 mg / mL arasında olduğu kanıtlanmıştır.

Tablo 5-22: Combigan Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Numune Çözeltisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,06
2.Numune	5,03
3.Numune	5,02
4.Numune	5,04
5.Numune	5,04
6.Numune	5,06
Ortalama Numune	5,04
Standart Sapma	0,016
% RSD	0,3

Tablo 5-23: Xolatin Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Numune Çözeltisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	4,98
2.Numune	4,98
3.Numune	4,97
4.Numune	4,97
5.Numune	4,97
6.Numune	4,96
Ortalama Numune	4,97
Standart Sapma	0,01
% RSD	0,2

Tablo 5-24: Azarga Numusune Ait Tekrarlanabilirlik Sonuçları

Numune Çözeltisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,16
2.Numune	5,16
3.Numune	5,16
4.Numune	5,19
5.Numune	5,20
6.Numune	5,20
Ortalama Numune	5,18
Standart Sapma	0,02
% RSD	0,4

5.2.2.3. Ara Kesinlik Sonuçları

Farklı günde, farklı kolon ve farklı UPLC sistemi kullanılarak, hedef konsantrasyonda hazırlanan numune çözeltileri referans standart çözeltisi enjeksiyonları kullanılarak, içerdikleri Timolol miktarları mg / mL biriminde hesaplanmıştır. Hesaplanan Timolol miktar tayini sonuçları arasındaki % rölatif standart sapma değerinin üst limit olan %2,0'dan az olduğu görülmüştür. ICH kılavuzunun izin verdiği limit değerler 5mg üzerinden hesaplandığında; ilaçların içerdikleri Timolol miktarlarının 4,75 mg / mL'den az ve 5,25 mg / mL'den fazla olmaması gerektiği belirlenmiştir. Tablo 5,25 ve Tablo 5,27 arasındaki sonuçlar incelendiğinde, numune miktar tayini ortalama sonuçlarının 4,75 mg / mL ile 5,25 mg / mL arasında olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca tekrarlanabilirlik sonuçlarından elde edilen ortalama Timolol miktar tayini sonuçları ile ara kesinlik sonuçlarından elde edilen ortalama Timolol miktar tayini sonuçları arasında ki farkın üst limit olan üst limit olan %2,0'dan az olduğu kanıtlanmıştır.

Tablo 5-25: Combigan Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları

Numune Çözeltisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,05
2.Numune	5,09
3.Numune	5,07
4.Numune	5,08
5.Numune	5,06
6.Numune	5,05
Ortalama Numune	5,07
Standart Sapma	0,02
% RSD	0,3

Tablo 5-26: Xolatin Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları

Numune Çözeltisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	4,91
2.Numune	4,89
3.Numune	4,91
4.Numune	4,88
5.Numune	4,87
6.Numune	4,83
Ortalama Numune	4,88
Standart Sapma	0,03
% RSD	0,6

Tablo 5-27: Azarga Numusune Ait Ara Kesinlik Sonuçları

Numune Çözeltilisi	Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,17
2.Numune	5,17
3.Numune	5,05
4.Numune	5,25
5.Numune	5,21
6.Numune	5,19
Ortalama Numune	5,17
Standart Sapma	0,07
% RSD	1,3

Kesinlik parametresi dâhilinde elde edilen verilerin tamamının kabul edilebilir değerlerde olduğu kanıtlanmıştır. Bu bilgiler dâhilinde kesinlik parametresi metoda başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Tablo 5-28: Combigan Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu

Numune Çözeltilisi	Tekrarlanabilirlik Çalışmasına Ait Timolol Miktarı (mg / mL)	Ara-Kesinlik Çalışmasına Ait Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,06	5,05
2.Numune	5,03	5,09
3.Numune	5,02	5,07
4.Numune	5,04	5,08
5.Numune	5,04	5,06
6.Numune	5,06	5,05
Ortalama Numune	5,04	5,07
Standart Sapma	0,016	0,02
% RSD	0,3	0,3
% Mutlak Fark		0,6

Tablo 5-29: Xolatim Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu

Numune Çözeltilisi	Tekrarlanabilirlik	Ara-Kesinlik Çalışmasına
	Çalışmasına Ait Timolol Miktarı (mg / mL)	Ait Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	4,98	4,91
2.Numune	4,98	4,89
3.Numune	4,97	4,91
4.Numune	4,97	4,88
5.Numune	4,97	4,87
6.Numune	4,96	4,83
Ortalama Numune	4,97	4,88
Standart Sapma	0,01	0,03
% RSD	0,2	0,6
% Mutlak Fark		1,8

Tablo 5-30: Azarga Numunesine ait Karşılaştırma Tablosu

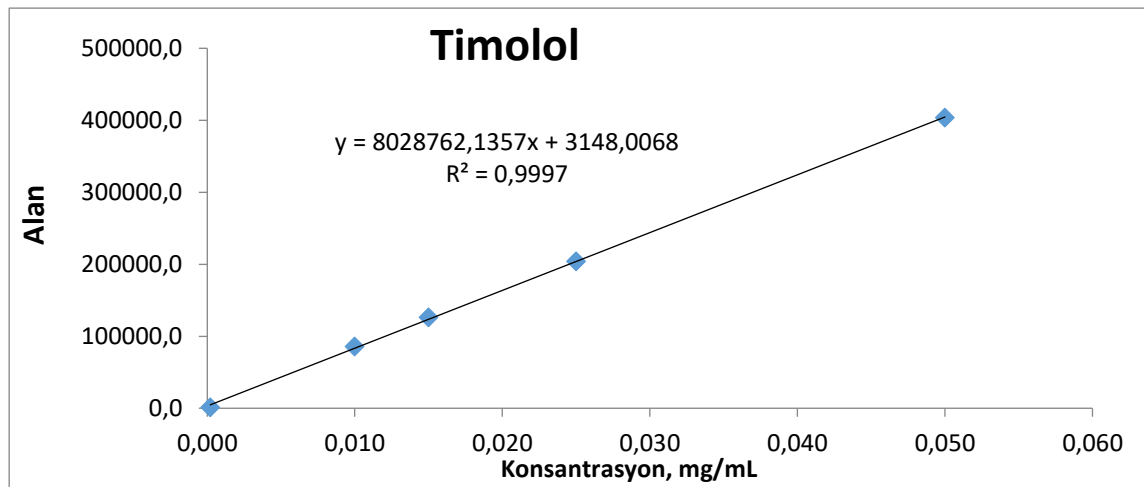
Numune Çözeltilisi	Tekrarlanabilirlik	Ara-Kesinlik Çalışmasına
	Çalışmasına Ait Timolol Miktarı (mg / mL)	Ait Timolol Miktarı (mg / mL)
1.Numune	5,16	5,17
2.Numune	5,16	5,17
3.Numune	5,16	5,05
4.Numune	5,19	5,25
5.Numune	5,20	5,21
6.Numune	5,20	5,19
Ortalama Numune	5,18	5,17
Standart Sapma	0,02	0,07
% RSD	0,4	1,3
% Mutlak Fark		0,2

5.2.3. Doğrusallık Parametresi Sonuçları

Doğrusallık parametresi dâhilinde, 0,0002 mg / mL ile 0,050 mg / mL konstrasyon aralığında standart çözeltileri hazırlandı ve bölüm 2.5. başlığı altında belirtilen prosedüre uygun şekilde sisteme enjekte edilmiştir. İyi bir analitik metodun; en düşük seviye olan 0,0002 mg / mL elde edilen alanların % rölatif standart sapma değerinin %10'dan az, orta değer olan 0,025 mg / mL ve en yüksek değer olan 0,050 mg / mL elde edilen alanların % rölatif standart sapma değerlerinin %2.0 dan az olması gerekmektedir. Sisteme enjekte edilen çözeltilerin verileri kullanılarak konstrasyona karşılık alan grafiği çizilmiştir. İyi bir analitik metodun, çizilen bu grafikten elde edilen R^2 değerinin 0.997'den düşük olmaması gerekmektedir. Elde edilen veriler ile bahsedilen bu kabul kriterlerinin karşılandığı kanıtlanmıştır.

Tablo 5-31: Doğrusallık Parametresi Sonuçları

Enjeksiyon Numarası	Timolol Konsantrasyonu mg / mL				
	0,0002	0,010	0,0150	0,0250	0,050
1	1144	85167	125617	204900	401379
2	1385	86097	126488	203867	403048
3	1115	-	-	204147	403420
4	1117	-	-	203478	403577
5	1222	-	-	203193	404840
6	1241	-	-	204183	403967
Ortalama	1204	85632	126053	203961	403372
Standart Sapma	103,48	657,61	615,89	599,59	1151,56
%RSD	8,59	0,77	0,49	0,29	0,29



Şekil 5.17: Doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği

5.2.4. Doğruluk Parametresi Sonuçları

Doğruluk parametresi dâhilinde her bir seviyeden 3 paralel olacak şekilde; en düşük seviyede (0,0002 mg / mL), standart seviyede (0,025 mg / mL) ve en yüksek seviyede (0,05 mg / mL) numune çözeltileri hazırlanmış ve UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak numunelerin deneysel konsantrasyonu hesaplanmış ve teorik konsantrasyonuna karşı % geri kazanım aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. İyi bir analitik metodun geri kazanımı miktar tayini analizi için en düşük seviyede %100±10 ve diğer seviyelerde %100±2 aralığında olması gerekmektedir. Doğruluk çalışması sonuçları incelendiğinde, metodumuz için % geri kazanım sonuçlarının kabul kriterleri dâhilinde olduğu kanıtlanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneysel Konsantrasyon}}{\text{Teorik Konsantrasyon}} \times 100$$

Tablo 5-32: Doğruluk Çalışması Sonuçları

Çözelti Seviyesi	Hazırlanan mg / mL	Bulunan mg / mL	Geri Kazanım %	Ortalama Geri Kazanım %
En Düşük Seviye	0,000245826	0,00024483	99,6	99,3
	0,000197538	0,00019514	98,8	
	0,000182906	0,000182235	99,6	
Standart Seviyesi	0,025021536	0,024941399	99,7	99,5
	0,024611826	0,024567642	99,8	
	0,025314185	0,025046929	98,9	
En Yüksek Seviye	0,048989533	0,048679273	99,4	99,6
	0,050043072	0,049942377	99,8	
	0,049516302	0,049370826	99,7	

5.2.5. Çalışma Aralığı

Analitik yöntemin çalışma aralığı doğruluk ve doğrusallık çalışmalarından oluşturulur. Çalışma aralığı geliştirilen metot ile uygun sonuçların tayin edilebildiği en düşük ve en yüksek konsantrasyon aralığı olarak belirlenir. Doğrusallık çalışmasında minimum ve maksimum derişimde hazırlanan standart çözeltiler kullanılır. İyi bir analitik metodun, en düşük seviyede elde edilen alanların % rölatif standart sapmanın %10'dan az ve en yüksek seviyede elde edilen alanların % rölatif standart sapmanın %2.0'dan az olması gerekmektedir. Bu bilgi doğrultusunda sonuçlar incelendiğinde, metodumuz için çalışma aralığını 0,0002 mg / mL ile 0,050 mg / mL olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5-33: Çalışma Aralığı Sonuçları

Enjeksiyon Numarası	Timolol Pik Alan Ölçümleri	
	0,0002 (mg / mL Timolol)	0,050 (mg / mL Timolol)
1	1144	401379
2	1385	403048
3	1115	403420
4	1117	403577
5	1222	404840
6	1241	403967
Ortalama	1204	403372
Standart Sapma	103,48	1151,56
%RSD	8,59	0,29

5.2.6. Çözeltilerin Stabilitesi Sonuçları

Çözelti stabilitesi parametresi dahilinde bölüm 2.8.'de belirtildiği gibi çözeltiler hazırlanmış ve belirli zaman diliminde UPLC sistemine enjekte edilmiştir. UPLC sistemine enjekte edilen çözeltilerden elde edilen alanlar başlangıç alanına karşı oranlanarak % değişim aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Miktar tayini analizlerinde, çözeltilerin alanlarındaki değişimlerden hesaplanan değişimin mutlak değerinin % 2.0'ın altında kaldığı süre boyunca çözeltiler stabil kabul edilir. Bu çalışmaya ait sonuçlar incelendiğinde; standart çözeltisi en az 48 saat, Combigan numune çözeltisi en az 47 saat, Xolatim numune çözeltisi en az 46 saat, Azarga numune çözeltisi en az 46 saat ve mobil fazın en az 12 gün süreyle stabil kaldığı gözükmemektedir.

$$\% \text{ Değişim} = \frac{A_T - A_0}{A_T} \times 100$$

Bu denklemde;

A_t : T zamanda ölçülen alan ve A_0 : Başlangıçta ölçülen alan değerini göstermektedir.

Tablo 5-34: Standart ve Numune Çözeltilerinin Stabilité Sonuç Tablosu

Çözelti Adı	Süre	Alan	%Değişim
Standart Çözeltisi	Başlangıç	194645	0,50
	48.saat	195613	
Combigan Çözeltisi	Başlangıç	198465	0,88
	47.saat	200208	
Xolatifim Çözeltisi	Başlangıç	195700	1,23
	46.saat	198114	
Azarga Çözeltisi	Başlangıç	203951	0,88
	46.saat	205755	

Tablo 5-35: Mobil Fazın Stabilité Sonuç Tablosu

Çözelti Adı	Taze Mobil Faz Sonuç (mg / mL)	12 Günlük Mobil Faz Sonuç (mg / mL)	% Değişim
Combigan Çözeltisi	5,0	5,1	2,0
Xolatifim Çözeltisi	5,0	4,9	2,0
Azarga Çözeltisi	5,2	5,1	1,9

5.3. Sonuçların Yorumlanması

Çalışmamızda Timolol ilaç aktif maddesinin miktarının tayin edilmesi için UPLC sistemiyle uyumlu analitik bir metot geliştirilmiştir. Geliştirilen bu metodun doğruluğunun ispatlanması için, “ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures” rehberi incelenmiş ve bu rehber doğrultusunda; Kesinlik, Ara-Kesinlik, Sağlamlık, Çözelti Stabilitesi, Çalışma Aralığı, Seçicilik, Doğruluk ve Doğrusallık parametrelerinin çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen metot ile Timolol ilaç aktif maddesini içeren ve eczanelerden temin edilen ilaçların Timolol miktar tayini analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler doğrultusunda elde edilen sonuçların, analizi yapılan ilaçların prospektüsünde yazan etiket değerleri ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen bütün veriler doğrultusunda, geliştirilen UPLC metodunun ilaç hammaddesinin ve ilaç nihai ürünlerinin içerisindeki Timolol miktarlarını doğru olarak tayin edilebildiği

gözlemlenmiştir. Yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmalarıyla geliştirilmiş olan metodun ilaç sanayilerinde hammadde ve bitmiş üründe kullanıma hazır olduğu kanıtlanmıştır.

Geliştirilen analitik metodun çalışma aralığının 0,0002 mg / mL ile 0,050 mg / mL olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen en düşük çalışma konsantrasyon değeri mevcut HPLC metodlarına kıyasla çok daha düşük seviyededir, bu da UPLC’de geliştirilen metodun daha duyarlı olduğunu ortaya göstermiştir. Litaretürdeki çalışmalarda belirtilen timolol miktar tayini metotlarıyla bu çalışmada geliştirilen UPLC metodunun karşılaştırılması Tablo 5-36’ da verilmiştir. Geliştirilen metodun bir diğer avantajı ise metodun analiz süresidir. 4.5 dakika gibi kısa bir süre içerisinde analizin tamamlanması, hem ilaç nihai ürünün hem de ilaç hammaddesinin daha hızlı tayin edilebilmesi olanak sağlamaktadır. Bu durum, analiz yapılırken kullanılan kimyasalların israfını azaltırken zamanda tasarruf etmemizde olanak sağlıyor. Tüm bunlara ek olarak UPLC sisteminde geliştirilen metodun enjeksiyon hacmi 2 µL olarak belirlenmiş, bu durum kolona giren madde miktarının düşük seviyede imkan sağlayarak HPLC metotlarına kıyasla kullanılan kolonların (sabit fazın) daha uzun ömürlü olmasını mümkün kılmıştır.

Tablo 5-36: Timolol Miktar Tayini Metotlarının Karşılaştırılması

Kaynakça	Kullanılan Ekipman	LOQ Konsantrasyonu mg/mL	Alıkonma Zamanı
USP Farmakope	UPLC	0,0001	3.0
Boiero vd., 2015	HPLC	0,01	2,7
Rele vd., 2011	HPLC	0,0025	2,0
Mazzo vd.,1984	HPLC	0,0009	12,7
Bu Çalışma	UPLC	0,0002	1,9

Yukarıda bahsedilen bütün veriler doğrultusunda, UPLC cihazında geliştirilen, optimizasyonu ve validasyonu yapılan yöntemimiz, diğer kromatografik yöntemlere kıyasla daha hassas, daha seçici, daha hızlı, daha güvenilir, daha ekonomik ve çevreye daha duyarlı olmasının yanı sıra daha az örnek numune ile çalışmayı da mümkün kılmıştır.

KAYNAKLAR

- Agarwal, S. P., Singhal V. ve Prakash A. (1998). Spectrophotometric Determination of Atenolol and Timolol Dosage Forms via Charge-Transfer Complexation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53-55.
- Alamein, A., Hendawy, H. ve Nourhan O. (2019). Chemometrics-assisted voltammetric determination of timolol maleate and brimonidine tartrate utilizing a carbon paste electrode modified with iron (III) oxide nanoparticles. *Microchemical Journal*, 145, 313-329.
- Ankit, A., Sunil T. ve Kashyap, N. (2013). Method Development and its Validation for Quantitative Simultaneous Determination of Latanoprost, Timolol and Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solution by RP-HPLC. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(2), 26-30.
- Boiero, C., Allemandi, D., Longhi, M. and Llabot, J. M. (2015). RP-HPLC Method Development for the Simultaneous Determination of Timolol Maleate and Human Serum Albumin in Albumin Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (111) 186–189.
- Boiero, C., Allemandi, D., Longhi, M. ve Llabot, J. M. (2015). RP-HPLC Method Development for The Simultaneous Determination of Timolol Maleate and Human Serum Albumin in Albumin Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 186-189.
- Burtis, C. A. and Ashwood, E. R. (2007). Tietz -Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı, *Palme Yayıncılık*, Ankara, Türkiye.
- Dinç, E., ve B ker, E. (2017). Continuous Wavelet Transform Methods for the Simultaneous Quantification of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in an Eye Drop Formulation. *Bioequivalence & Bioavailability International Journal*, , 1(1).
- Dong, M. W. (2005). How to be more Successful with HPLC Analysis: Practical Aspects in HPLC Operation, 255-271, *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, New York, USA.

Elshanawane, A. A., Abdelaziz, L. M., M. S. ve Hafez, H. M. (2014). Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Estimation of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, 5(3).

Erk, N. (2003). Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol maleate in eye drops with diodearray and UV detection. *Pharmazie*, 58(7) 491-493.

Hafsa, M., Somashekar, S. and Shanta, K. S. M. (2011). Physico-Chemical Characterization, Uv Spectrophotometric Method Development and Validation Studies of Timolol Maleate. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, (6,2) 030.

Hassib, S. T., Elkady, E. F. ve Sayed, R. M. (2016). Simultaneous Determination of Timolol Maleate in Combination with some other Anti-Glaucoma Drugs in Rabbit Aqueous Humor by High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectroscopy. *Journal of Chromatography B*, 1022, 109-117.

Hendawy, H. A. M., , Elwy, H. M. ve Fekry, A. M. (2017). Electrochemical and Chemometric Determination of Dorzolamide And Timolol in Eye Drops Using Modified Multiwall Carbon Nanotube Electrode. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(9), 43-50.

ICH Q2-R1 (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, International Conference on Harmonisation. Uluslar Arası Uyum Konseyi.

Lee, H. B., Kurtis, S. and Thomas, E. P. (2007). Determination of β -blockers and β_2 -agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, (1148) 158-167.

Lotfy, H. M., Hegazy, M. A., Rezk, M. R. ve Omran, Y. R. (2014). Novel Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Timolol and Dorzolamide in Their Binary Mixture. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 197–207.

Maguregui, M. I., Alonso, R. M., Jiménez, R. M. ve Akesolo, U. (2002). Quantitative Determination of Oxiprenolol and Timolol in Urine by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 949, 91–97.

- Maguregui, M. I., Alonso, R. M. ve Jiménez, R. M. (2006). A Rapid Quantitative Analysis of the β -Blocker Timolol in Human Urine by HPLC Electrochemical Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 19:10, 1643-1652.
- Mazzo, D. J. (2011). Simultaneous Determination of maleic acid and Timolol by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, (299) 503-507.
- Mohamed, M. E., Tawakkol, M. S. ve Aboulenein, H. Y. (1982). Spectrophotometric Determination of Timolol and Other β -adrenergic Blocking Drugs and in Pharmaceutical Preparations. *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 15(8), 609-621.
- Nasir, F., Iqbal, Z., Khan, A., Ahmad, L., Shah, Y., Khan, A., Z., Khan, J. A. ve Khan S. (2011). Simultaneous Determination of Timolol Maleate, Rosuvastatin Calcium and Diclofenac Sodium in Pharmaceuticals and Physiological Fluids Using HPLC-UV. *Journal of Chromatography B*, 3434– 3443.
- Novakova, L., Matysova, L. ve Solich P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, 908-918.
- Olah, T. V., Gilbert, J. D. and Barrish, A. (1993). Determination of the β -adrenergic blocker timolol in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 11,2 157-163.
- Özcan, A. A. and Ersöz, A. (2010). Aletli Analiz Kromatografik Yöntemler ve Uygulamaları, 262-293, *Anadolu Üniversitesi Yayınları*, Eskişehir, Türkiye.
- Rele, R.V., Mhatre, V.V., Parab, J. M. and Warkar, C. B. (2011). Simultaneous RP HPLC determination of Latanoprost and Timolol Maleate in combined pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(1) 138-144.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. and Crouch, S. R. (1998). Enstrümantal Analiz ilkeleri, 6.baskı, *Bilim Yayıncılık*, Ankara, Türkiye.
- Tracqup, A., Kintz, P., Himbew, J., Lugnielw, A. A. J. and Mangin, P. (1988). A Specific HPLC Method for Determination Of β -Blockers Topically Used in Ophthalmological Diseases. *Forensic Science International*, (88) 41-87.

Umesh, D. L., Rohan, K. B., Rasika, V. Z. and Amol, A. T. (2014). Development and validation of stability indicating reverse phase high performance liquid chromatography method for Timolol Maleate. *International Journal of PharmTech Research*, (6,5) 1429-1435.

USP-1225 (2015). VALIDATION OF COMPENDIAL METHODS. *Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi*.

Yılmaz, B. (2010). Timolol Maleat ve Dorzolamid HCl İçeren Oftalmik Çözeltilerin Nitel ve Nicel Tayin Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara, Türkiye.



34. Ulusal Kimya Kongresi – Poster Sunumu Özeti



TÜRKİYE
KİMYA DERNEĞİ



YALOVA
ÜNİVERSİTESİ



HAYAT

Posterler

PS-022

Timolol Miktar Tayini için Hızlı, Spesifik ve Hassas UPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Ulaş Çifçioğlu¹, Ece Kök Yetimoğlu¹

¹Marmara Üniversitesi

Özet: Türkiye Timolol Maleate bir beta-adrenerjik antagonisttir ve levo izomeri daha aktif izomerdir. Antihipertansif, antiaritmik, antianginal ve antiglokom ajanı olarak kullanılabilir [1]. Timolol Maleat, gözlerdeki basıncı veya göz içi basıncını azaltmak için göz damlası solüsyonlarında kullanılan seçici olmayan bir beta-adrenerjik antagonisttir. Ayrıca hipertansiyon tedavisinde ilaç olarak tablet formunda da kullanılır. Açık açılı glokom ve hipertansiyon gibi durumların yönetimi için etkili bir ajandır [2]. Timolol ilaç aktif maddesinin, kantitatif tayini için kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğunda geliştirilen metot, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bu çalışmada, bu metotlara alternatif olarak Ultra Basıncılı Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazına uygun bir analitik metot geliştirilmiş ve bu metodun validasyonu yapılmıştır [3,4]. HPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlar UPLC cihazında kullanılmak üzere geliştirilen metotlara oranla daha fazla organik çözücü kullanılmasına ihtiyaç duydukları için çevreye bırakılan organik atık miktarının artmasına yol açarak, çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkiyi de arttırmaktadır. Mevcut olumsuzlukların azaltılması için UPLC cihazında geliştirilmesi planlanan yöntem, HPLC cihazında geliştirilen yöntemlere kıyasla daha hassas, daha seçici, daha hızlı, daha güvenilir, daha ekonomik ve çevreye daha duyarlı olmasının yanı sıra daha az örnek numune ile çalışmayı da mümkün kılmıştır [5]. Çalışmamızda Timolol Maleat ilaç aktif maddesinin miktarının tayin edilmesi için UPLC cihazlarında kullanılmak üzere, Timolol molekülünün kromatografik olarak yeterli bir ayırım gösterdiği, kesin ve tekrarlanabilir analitik bir metot geliştirilmiştir. Geliştirilen bu metodun doğruluğunun ispatlanması için, "ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures" rehberi incelendi ve bu rehber doğrultusunda; Kesinlik, Ara-Kesinlik, Sağlamlık, Çözelti Stabilitesi, Çalışma Aralığı, Seçicilik, Doğruluk ve Doğrusallık parametrelerinin çalışmaları yapıldı. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda geliştirilen ve validasyonu tamamlanan bu metot ile, Timolol ilaç aktif maddesini içeren ve eczanelerden temin edilen ilaçların Timolol miktar tayini analizleri yapıldı. Yapılan analizler doğrultusunda elde edilen sonuçların, analizi yapılan ilaçların prospektüsünde yazan etiket değerleri ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Teşekkürler: Lisansüstü Öğretim Programı'na başladığımdan bu yana her konuda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli Sayın Prof. Dr. Ece Kök Yetimoğlu'na, laboratuvarlarında çalışma imkanı sunan Deva Holding A.Ş.'ye ve değerli müdürüm Sayın Dr. Rifat Emre Burmaoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Anahtar Kelimeler: UPLC, Timolol, İlaç, Validasyon

Kaynakça

- [1.] Alamein, A., Hendawy, H. ve Nourhan O. (2019). Chemometrics-assisted voltammetric determination of timolol maleate and brimonidine tartrate utilizing a carbon paste electrode modified with iron (III) oxide nanoparticles. *Microchemical Journal*, 145, 313-329.
- [2.] Yılmaz, B. (2010). Timolol Maleat ve Dorzolamid HCl İçeren Oftalmik Çözeltilerin Nitel ve Nicel Tayin Çalışmaları. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- [3.] Erk, N. (2003). Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of dorzolamide hydrochloride and timolol Maleate in eye drops with diodearray and UV detection. *Pharmazie*, 58(7) 491-493
- [4.] Nasir, F., Iqbal, Z., Khan, A., Ahmad, L., Shah, Y., Khan, A., Z., Khan, J. A. ve Khan S. (2011). Simultaneous Determination of Timolol Maleate, Rosuvastatin Calcium and Diclofenac Sodium in Pharmaceuticals and Physiological Fluids Using HPLC-UV. *Journal of Chromatography*, 3434- 3443.
- [5.] Novakova, L., Matyssova, L. ve Solich P. (2006). Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, 908-918.

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM HAYATI

- Lise (2005-2010) : Ataköy Lisesi, İstanbul
- Lisans (2011-2017) : Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi-Kimya Bölümü,
Eskişehir
- Yüksek Lisans (2019-2023) : Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Analitik
Kimya, İstanbul

İŞ HAYATI

- Deva Holding (2018-Devam Ediyor) : Ar-Ge Analitik Geliştirme Uzmanı, Tekirdağ