



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE APREPİTANT VE
KARBAMAZAPİNİN BİR ARADA TAYİNLERİ VE METOT
VALİDASYONU**

HATİCE ŞEBNEM KOCA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. FİLİZ ARIÖZ ÖZDEMİR

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : Hatice Şebnem KOCA
Tez Başlığı : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Aprepitant ve Karbamazapinin Bir Arada Tayinleri ve Metot Validasyonu
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 12.08.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Yrd. Doç. Dr. Filiz ARIÖZ ÖZDEMİR

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Güler YALÇIN

Prof. Dr. Serap SAĞLIK ASLAN

Kurumu

Marmara Üniversitesi Ecz. Fak.

Marmara Üniversitesi Ecz. Fak.

İstanbul Üniversitesi Ecz. Fak.

İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12.08.2016 tarih ve 40 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gökser ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hatice Şebnem KOCA

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında emeği geçen, tez boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, beni bilimsel anlamda yetiştiren, sevgili danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Filiz ARIÖZ ÖZDEMİR'e,

Tezin laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Nuray Yüктаş ve Prof. Dr. Türkan Yurdun' a,

Lisans ve lisans üstü eğitimim süresince bana emeği geçen değerli hocalarıma,

İhtiyaç duyduğum her anda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Desteklerinden dolayı arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Hatice Şebnem KOCA

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
1.1. Giriş.....	3
1.2. Amaç.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Aprepitant.....	4
2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	4
2.1.2. Farmakolojik özellikleri.....	5
2.1.3. Aprepitantın analiz çalışmaları.....	5
2.2. Karbamazapin	6
2.2.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
2.2.2. Farmakolojik özellikleri.....	7
2.3. Karbamazapin 10,11-epoksit.....	8
2.3.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	8
2.3.2. Farmakolojik özellikleri.....	8
2.3.3. Karbamazapin ve karbamazapin 10,11-epoksitin analiz çalışmaları.....	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	18
3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	18
3.3. Çözeltiler.....	18
3.3.1. Aprepitant stok çözeltisi.....	18
3.3.2. Karbamazapin stok çözeltisi.....	19

3.3.3. Karbamazapin 10,11 – epoksit stok çözeltisi.....	19
3.3.4. Aseklufenak (IS) stok çözeltisi.....	19
3.4. Analitik Metot Geliştirme Çalışmaları.....	19
3.4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	19
3.4.1.1. Kromatografik çalışma için karışım çözeltisi.....	19
3.4.1.2. Dalgaboyunun Belirlenmesi.....	20
3.4.1.3. Hareketli Faz Bileşenlerinin, Bileşen Oranlarının ve Hareketli Fazın pH' sinin Belirlenmesi.....	20
3.4.1.4. Sabit Fazın (Kolonun) Belirlenmesi.....	20
3.4.1.5. İç Standardın Belirlenmesi.....	21
3.4.1.6. Akış Hızının Belirlenmesi.....	21
3.4.1.7. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	21
3.5. Metot Validasyonu.....	21
3.5.1. Seçicilik.....	21
3.5.2. Doğrusallık.....	21
3.5.3. Tayin Edilebilme Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	22
3.5.4. Kesinlik (Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik).....	22
3.5.5.İlaç Etkin Madde Çözeltilerinin Farklı Saklama Koşullarındaki Kararlılıkları.....	22
3.5.6. Doğruluk (Geri Kazanım)	22
3.5.7. Yöntemin Sağlamlığı.....	23
3.5.8. Sistem Uygunluk Testi.....	23
3.6. İlaç Formülasyonlarının Karışımından Aprepitant ve Karbamazapin Analizi.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	24
4.1.1. Dalgaboyunun Belirlenmesi.....	24
4.1.2. Hareketli Faz Bileşenlerinin, Bileşen Oranlarının ve Hareketli Fazın pH' sinin Belirlenmesi	25
4.1.3. Sabit Fazın (Kolonun) Belirlenmesi	28
4.2. Yöntem Validasyonu.....	29
4.2.1. Seçicilik.....	29

4.2.2. Doğrusallık.....	30
4.2.3. Tayin Edilebilme Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	35
4.2.4. Kesinlik (Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik).....	35
4.2.5. İlaç Etkin Madde Çözeltilerinin Farklı Saklama Koşullarındaki Kararlılıkları.....	36
4.2.6. Doğruluk (Geri kazanım).....	41
4.2.7. Yöntemin Sağlamlığı.....	42
4.2.8. Sistem Uygunluk Testi.....	43
4.3. İlaç Formülasyonlarının Karışımından Aprepitant ve Karbamazapin Analizi.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	55

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
RP-HPLC	: Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV-Vis	: Ultra Viyole – Görünür Bölge
CBZ	: Karbamazapin
CBZ-E	: Karbamazapin 10,11-epoksit
APT	: Aprepitant
IS	: İç standart
MeOH	: Metanol
CH ₃ CN	: Asetonitril
C	: Konsantrasyon
µg/mL	: Mikrogram / mililitre
ppm	: milyonda bir birim (mg çözünen / kg veya litre çözelti)
A	: Pik Alanı
t _R	: Alıkonma zamanı
HF	: Hareketli faz
LOQ	: Tayin sınırı
LOD	: Gözlenebilme sınırı
SD	: Standart sapma
RSD	: Bağlı standart sapma
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
FDA	: The Food and Drug Administration

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1. Aprepitantın açık kimyasal formülü.....	4
Şekil-2. Karbamazapinin açık kimyasal formülü.....	7
Şekil-3. Karbamazapin 10,11- epoksitin açık kimyasal formülü.....	8
Şekil-4. APT, CBZ ve CBZ-E' nin ayrı ayrı ve karışım halindeki çözeltilerinin spektrumları.....	24
Şekil-5. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının pH= 2,0' deki kromatogramı.....	26
Şekil-6. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının pH= 3,0' deki kromatogramı	26
Şekil-7. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının pH= 4,0' deki kromatogramı.....	27
Şekil-8. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının pH= 5,0' deki kromatogramı	27
Şekil-9. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı.....	29
Şekil-10. Hareketli faz çözeltisine ait kromatogram.....	29
Şekil-11.CBZ-E'nin 0,18-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	30
Şekil-12. CBZ'nin 0,28-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi	32
Şekil-13. APT'nin 0,52-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	33
Şekil-14. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı.....	36
Şekil-15. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	36
Şekil-16. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin +4°C'de, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	37

Şekil-17. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı.....	37
Şekil-18. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	37
Şekil-19. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin +4°C’de, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	38
Şekil-20. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı.....	38
Şekil-21. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	38
Şekil-22. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin -20°C’de, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	39
Şekil-23. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı.....	39
Şekil-24. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	39
Şekil-25. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının -20°C’de, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	40
Şekil-26. APT, CBZ ve CBZ-E ve IS içeren çözelti karışımının otomatik numune örneleyicisinde 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı.....	40

TABLO LİSTESİ

Tablo-1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre CBZ-E, CBZ, APT' nin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi.....	25
Tablo-2. APT, CBZ, CBZ-E'nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları.....	28
Tablo-3.CBZ-E'nin 0,18-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{CBZ-E} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler.....	31
Tablo-4. CBZ-E'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları.....	31
Tablo-5.CBZ'nin 0,28-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{CBZ} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler.....	32
Tablo-6. CBZ'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları.....	33
Tablo-7. APT' nin 0,52-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{APT} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler.....	34
Tablo-8. APT' nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları.....	34
Tablo-9. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	35
Tablo-10. Farklı saklama koşullarında bekletilen CBZ-E, CBZ, APT çözeltilerine ait stabilite sonuçları.....	40
Tablo-11. CBZ-E, CBZ, APT' nin doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları...	41
Tablo-12. Yöntemin sağlamlık parametreleri.....	42
Tablo-13. Sistem uygunluk testi parametreleri.....	43
Tablo-14. 200,0 mg CBZ, 80,0 mg APT içeren ilaç formülasyonları karışımının geliştirilen HPLC yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları.....	44
Tablo-15. Geliştirilen HPLC metodunun optimize koşulları.....	46

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Aprepitant ve Karbamazapinin Bir Arada Tayinleri ve Metot Validasyonu

Öğrencinin Adı : Hatice Şebnem Koca

Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Filiz Arıöz Özdemir

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

ÖZET

Amaç: Bu tezin amacı ‘‘TUBİTAK 1003, SB0104 - Yeni İlaç Geliştirme’’ çağrısı kapsamında ‘‘Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE) Hastalarında Aprepitantın Güvenlilik ve Etkililiğini İnceleyen Faz II Randomize, Plasebo-Kontrollü, Klinik Çalışma’’ başlıklı projeye dahil olan hastaların rutinde kullandıkları karbamazapin ve proje sürecinde kullanacakları aprepitantın plazma içindeki eş zamanlı tayinlerine de uyulanabilecek yeni, hızlı, seçici, duyarlı ekonomik bir metot geliştirmek ve geliştirilen metodu valide etmektir.

Gereç ve Yöntem: Geliştirilen metotta C₁₈ (20 mm x 4,0 mm, 5µm) ön kolon ve C₈ (100 mm x 4,6 mm, 3µm) analitik kolon sabit fazı, asetronitril/su (pH=4 ortofosforik asit çözeltisi), (55/45, h/h) hareketli faz karışımı ile 0,8 mL/dak akış hızı kullanılarak UV-Vis dedektör ile 210 nm dalgaboyunda çalışıldı. İç standart olarak aseklofenak kullanıldı.

Bulgular: Karbamazapin 10, 11-epoksit (CBZ-E), karbamazapin (CBZ), iç standart (IS) ve aprepitant (APT) için alıkonma zamanları sırasıyla 2,18, 2,66, 5,81 ve 6,53 dak. olarak bulunurken, aynı sırayla LOD değerleri 0,050 µg/mL, 0,033 µg/mL, 0,110 µg/mL ve LOQ değerleri 0,165 µg/mL, 0,109 µg/mL 0,370 µg/mL, doğrusal konsantrasyon aralıkları ise CBZ-E için 0,18-5,00 µg/mL, CBZ için 0,28-5,00 µg/mL ve APT için 0,52-5,00 µg/mL, doğruluk çalışması sonuçları ise (düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar için % geri kazanım aralıkları) APT, CBZ, CBZ-E için sırasıyla 96,5- 100,7, 96,2-101,8, 96,1-103,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen metot aprepitant ve karbamazapinin ilaç formülasyonlarının karışımının analizine de uygulanmış, geri kazanımın yüksek doğruluk ve kesinliğin iyi olduğu görülmüştür.

Tartışma: Geliştirilen ve valide edilen bu metot seçici, hassas, kolay, hızlı ve tekrarlanabilir bir metottur. Her iki etkin maddenin rutin ilaç formülasyonu analizlerinde ve bir arada biyolojik materyalde analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Karbamazapin, karbamazapin 10,11-epoksit, aprepitant, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, eş zamanlı tayin.

An High Performance Liquid Chromatography Technique for Simultaneous Determination of Aprepitant and Carbamazepine and Method Validation

Student' s Name : Hatice Şebnem Koca

Supervisor : Assistant Prof. Filiz Arıöz Özdemir

Department : Analytical Chemistry

SUMMARY

Purpose: The aim of this study is to develop and validate a new, rapid and sensitive method which can be used for simultaneous determination of two drugs in plasma. One of them is aprepitant which will be used by the patients during the project which is called “Phase II Randomised, Placebo-Controlled, Clinical Trial Researching: The Reliability and Effectiveness of Aprepitant in Subacute Sclerosing Panencephalitis (SSPE) Patients” based on “TUBITAK 1003, SB0104 – New Drug Development” and carbamazepine which is commonly used by the patients.

Material and Method: This method was carried out using guard column C₁₈ (20 mm x 4,0 mm x 5µm) and analytical column C₈ (100 mm x 4,6 mm, 3µm) as stationary phase and a mobile phase composing of acetonitrile and water containing ortho-phosphoric acid (pH=4), (55:45, v/v). The flow rate was 0,8 mL/min and the chromatograms were monitored at 210 nm wavelength. Aceclofenac was used as internal standard.

Results: The retention times of CBZ-E, CBZ, IS and APT were 2,18 min, 2,66 min, 5,81 min 6,53 min, LOD values were 0,050 µg/mL, 0,033 µg/mL, 0,110 µg/mL and LOQ values were 0,165 µg/mL, 0,109 µg/mL 0,370 µg/mL, the linear ranges were 0,18-5,00 µg/mL, 0,28-5,00 µg/mL and 0,52-5,00 µg/mL, respectively. The recovery results (% values) for low, medium and high concentrations of APT, CBZ, CBZ-E were 96,5-100,7, 96,2-101,8, 96,1-103,0. The validated method was used for the analysis of APT and CBZ in pharmaceutical forms and recovery, accuracy and precision values were acceptable.

Discussion: This method has been a simple, sensitive, rapid and can be used for the analysis of carbamazepine and aprepitant in pharmaceutical forms and biological materials.

Key words: Carbamazepine, carbamazepine 10,11- epoxide, aprepitant, high performance liquid chromatography, simultaneous determination.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Giriş

Aprepitant özellikle kanser hastalarında kemoterapiye bağlı bulantı-kusma şikayetlerinin giderilmesi için kullanılan nörokinin inhibitörü antiemetik bir ilaç etkin maddesidir (Gralla ve Ark, 2005). Karbamazapin ise yaygın olarak epilepsi nöbetleri ve manik depresif bozukluk tedavilerinde kullanılan bir antikonvülsan ilaç etkin maddesi (Onur ve Ark, 2008), karbamazapin 10,11-epoksit ise karbamazapinin farmakolojik olarak aktif olan başlıca metabolit ürünüdür (Dzodic ve Ark, 2012).

Literatürde bu iki etkin maddenin ayrı ayrı biyolojik materyal ve ilaç formülasyonlarından analizi için geliştirilen analitik metotlar mevcuttur ancak bir arada (eş zamanlı) analizleri için herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.2. Amaç

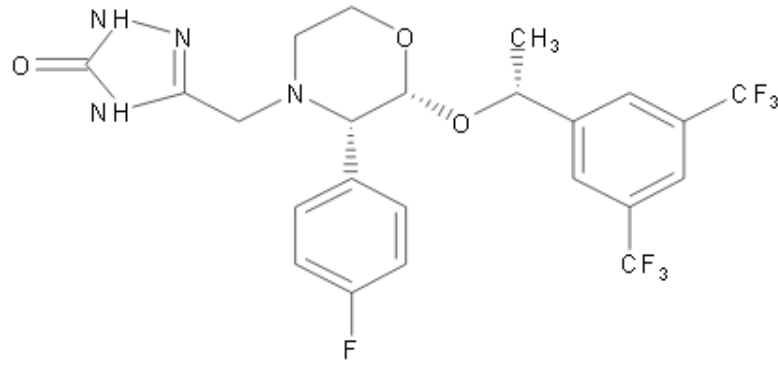
Bu tezin konusunun ana kaynağı “Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı” kapsamında açılmış olan “SB0104 - Yeni İlaç Geliştirme” çağrısı kapsamında “Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE) Hastalarında Aprepitantın Güvenlilik ve Etkililiğini İnceleyen Faz II Randomize, Plasebo-Kontrollü, Klinik Çalışma” başlıklı projedir. Bu projenin ana İş Paketi 2 : “İlaç Düzeyi İzlemi, Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu” başlıklı çalışmalardır. Bu teze konu olmasının nedenlerinden biri de proje kapsamındaki konulardan tez ve yayın üretilmesi TÜBİTAK projelerinden beklenen yaygın etki gereğidir. Bu amaçla bu tezde, ilgili projeye dahil olan hastaların rutinde kullandıkları karbamazapin ve proje sürecinde kullanacakları aprepitantın plazma içindeki eş zamanlı tayininlerinde de kullanılabilecek yeni, hızlı, ekonomik bir metot geliştirilmesi ve geliştirilen bu metodun valide edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aprepitant

Bulantı ve kusma, kanser hastaları arasında yaygın ve korkulan semptomlardır. Nörokinin 1 (NK₁) reseptör antagonistleri sınıfına üye olan aprepitant, kemoterapiye bağlı bulantı ve kusmayı önlemekte etkili olan, 2003 yılında FDA tarafından onaylanan antiemetik bir ilaçtır (Hesketh, 2008).

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil-1. Aprepitantın açık kimyasal formülü

Kimyasal adı 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis (triflorometil) fenil] etoksi]-3-(4-florofenil)-4-mor-folinil] metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on olan aprepitantın kapalı formülü C₂₃H₂₁F₇N₄O₃ olup molekül ağırlığı 534,43 g/mol, rengi kirli beyazdır. Aprepitant suda çözünmezken, etanol, izopropil asetat ve asetonitrilde az çözünür (https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/e/emend/emend_pi.pdf. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Aprepitant, insanda P maddesi nörokinin 1 (NK1) reseptörlerinin seçici, yüksek afiniteli bir antagonistidir. Aprepitant doğrusal olmayan farmakokinetik özellik göstermektedir. Dozun artırılması ile hem klerens hem de mutlak biyoyararlanım azalır. Aprepitantın ortalama oral biyoyararlanımı 80 mg kapsül için % 67 ve 125 mg kapsül için % 59'dur. Aprepitantın ortalama maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) yaklaşık 4 saatte (t_{max}) ulaşılır. Aprepitant plazma proteinlerine yüksek oranda (ortalama % 97) bağlanır. Aprepitant geniş ölçüde metabolize olur. İnsan plazmasında aprepitantın sadece zayıf olarak aktif olan 12 metaboliti saptanmıştır. Metabolitleri idrarla ve safra yoluyla feçesle atılır. Değişmemiş ilaç böbrekler yoluyla atılmaz. Aprepitant'ın plazma klerensi yaklaşık 60-72 ml/dak arasındadır. Terminal yarılanma ömrü yaklaşık 9-13 saat arasında değişir (https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/e/emend/emend_pi.pdf. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.1.3. Aprepitantın Analiz Çalışmaları

Benjamin ve arkadaşları ilaç formülasyonunda aprepitant tayini için geliştirdikleri türev spektrometri yönteminde 210 ve 269 nm dalgalı boylarında çalışmışlar ve aprepitant için doğrusal konsantrasyon aralığını 6-14 µg/mL olarak bulmuşlardır (Benjamin ve Ark, 2013).

Chavez-Eng ve arkadaşları LC-MS/MS, (50 mm x 2,0 mm, 3µm) kolon, asetonitril/%0,1 trifloroasetik asit çözeltisi (pH=3), (40:60, h/h) hareketli faz karışımı ile, 0,5 mL/dak akış hızında, aprepitantın ve iki metabolitinin insan kanında eş zamanlı tayinini yapmışlar, doğrusal konsantrasyon aralıklarını 1. ve 2. metabolit için sırasıyla 10–5000 ng/mL, 25–5000 ng/mL, LOQ değerlerini ise sırasıyla 10 ng/mL, and 25 ng/mL olarak bulmuşlardır (Chavez-Eng ve Ark, 2004).

Kumar ve arkadaşları RP-HPLC, C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, amonyum asetat ve metanol den oluşan (35:65) hareketli faz, 1,5 mL/dak akış hızı ve 210 nm dalgalı boyunda aprepitantın kapsül formülasyonundan ters faz HPLC ile

tainini yapmışlar, LOD ve LOQ değerlerini 0,28 µg/mL ve 0,84 µg/mL olarak bulmuşlardır (Kumar ve Ark, 2009).

Nama ve arkadaşları RP-HPLC, C₁₈ (250 mm x 2,5 mm, 5µm) kolon, metanol ve sudan oluşan (90:10) hareketli faz, 1,0 mL/dak akış hızı ve 220 nm dalgaboyunda aprepitantın kapsülde tayini üzerine çalışmışlar, LOD ve LOQ değerlerini 0,028 µg/mL ve 0,094 µg/mL olarak bulmuşlardır (Nama ve Ark, 2011).

Krishna Chaitanya ve arkadaşları RP-HPLC, C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, asetonitril ve fosfat tampon çözeltiden oluşan (50:50, h/h) hareketli faz, 1,0 mL/dak akış hızında, 210 nm dalgaboyunda aprepitantın ilaç formülasyonunda tayinini yapmışlar ve 4,86 dak. alıkonma zamanında. LOD ve LOQ değerlerini 0,28 µg/mL ve 0,84 µg/mL olarak bulunmuşlardır (Krishna Chaitanya ve Ark, 2013).

Ravi Prakash ve arkadaşları LC-MS/MS, C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, amonyum asetat ve asetonitril (10:90, h/h) karışımından oluşan hareketli faz ile, 0,9 mL/dak akış hızında, aprepitantın insan kanında tayinini yapmışlar ve alıkonma zamanı 1,55 dak. ve konsantrasyon aralığını 10,004-5001,952 ng/mL olarak bulmuşlardır (Ravi Prakash ve Ark,2013).

Sinha ve arkadaşları RP-HPLC, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, n-hekzan, izopropilalkol, metanol, trifloroasetik asit (970:40:4:0,5, h/h/h/h) karışımından oluşan hareketli faz karışımı ile, 0,5 mL/dak akış hızında, 210 nm dalga boyunda aprepitant ve sekiz izomerinin ters ve normal faz HPLC ile tayinini yapmışlar ve LOD ve LOQ değerlerini 0,14 µg/mL ve 0,41 µg/mL olarak bulmuşlardır (Sinha ve Ark, 2013).

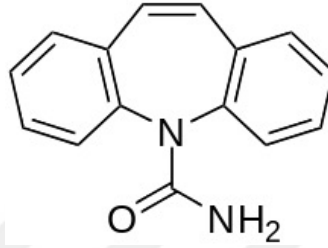
2.2. Karbamazapin

Psikoterapötik bir ajan olarak karbamazapinin, akut mani tedavisinde ve ayrıca bipolar bozuklukların (manik-depresif) tedavisinde ve birçok nörolojik bozuklukta klinik olarak etkili olduğu bilinen bir ilaç etkin maddesidir. Ayrıca alkolü bırakma sendromunda, alkolü bırakma semptomlarını (hipereksitabilite,

tremor, yürüme bozukluğu) azaltır, santral diabetes insipidusta idrar miktarını azaltarak susuzluk duygusunu hafifletir.

(https://www.novartis.com.tr/sites/www.novartis.com.tr/files/Tegretol_200mg_Tablet_KUB_18032014.pdf. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil-2. Karbamazapinin açık kimyasal formülü

Kimyasal adı 5H-dibenz [b,f] azepin-5-karboksamit olan karbamazapinin kapalı formülü $C_{15}H_{12}N_2O$ olup molekül ağırlığı 236,3 g/mol, rengi kirli beyazdır. Suda çözünmezken, alkol ve asetonda çözünür (Xu ve Madden, 2011).

2.2.2. Farmakolojik Özellikleri

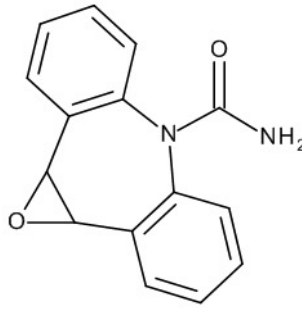
Karbamazapin, oral yolla alındığında hızla emilir ve %75-85 oranında kana geçer. Tek oral doz halinde alındığında, aktif madde plazmada doruk konsantrasyona 6-12 saat içinde ulaşır. Yemek yeme hangi dozaj şeklinde olursa olsun karbamazapin, emilim hızı ve oranını önemli derecede etkilemez. Proteine bağlanma oranı % 75' tir. Karbamazapin başlıca, karaciğerde metabolize olur. Karbamazapinin tamamen emildiği varsayıldığında sanal dağılım hacmi 0,8-1,9 L/kg arasında değişmektedir. Tek oral dozdan sonra, eliminasyon yarılanma ömrü yetişkinlerde 18-55 ve çocuklarda 3-32 saattir. Karbamazapin, monoterapi gören hastaların kanında 17-51 $\mu\text{mol/L}$ seviyesindedir. Pik plazma düzeyine 4-5 saat içinde ulaşır. Oral olarak tek doz halinde 400 mg karbamazapin verildikten sonra, % 72' si idrarla ve % 28'i feçesle atılır. İdrarda, dozun yaklaşık % 2' si değişmemiş ilaç şeklinde ve yaklaşık

%1'i farmakolojik olarak aktif 10,11-epoksit metaboliti şeklinde bulunur (https://www.novartis.com.tr/sites/www.novartis.com.tr/files/Tegretol_200mg_Tablet_KUB_18032014.pdf. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.3. Karbamazapin 10,11-epoksit

Karbamazapinin 33 metaboliti arasında en önemli metaboliti farmakolojik olarak aktif olan, karbamazapin gibi antikonvülsan özelliği ile karbamazapin-10,11-epoksittir. Stabil durumda karbamazapin 10,11-epoksitin plazma konsantrasyonu karbamazapinin %20-25 ine eşdeğerdir (Tonic-Ribarska ve Ark, 2011).

2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil-3. Karbamazapin 10,11-epoksitin açık kimyasal formülü

Kimyasal adı 1a,10b-Dihidro-6H-dibenzo(b,f)oksireno[d]azepine-6-karboksamittir. 10,11-Epoksi karbamazapin veya karbamazapin epoksit olarak da bilinir. Kapalı formülü $C_{15}H_{12}N_2O_2$ olup molekül ağırlığı 252,27 g/mol dür (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c4206?lang=en®ion=TR>, Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Karbamazapin-10, 11-epoksitin plazmadaki konsantrasyonları, karbamazapin düzeylerinin yaklaşık % 30' udur. Karbamazapin-10,11-epoksitin proteine bağlanma oranı % 50' dir. Sitokrom P450 3A4, karbamazapinden karbamazapin-10, 11 epoksit

oluşumundan sorumlu olan ana izoformu olarak tanımlanmıştır. Oral olarak tek doz karbamazapin verildikten sonra yaklaşık olarak %30'u, epoksit biyotransformasyonunun son ürünleri olarak idrara geçer. Plazmadaki 10, 11-epoksit metabolitinin ortalama eliminasyon yarılanma ömrü epoksidinin tek oral doz halinde verilmesinden sonra yaklaşık olarak 6 saattir. Karbamazapin-10,11-epoksit monoterapi gören hastaların kanında 9 µmol/L seviyesindedir. İdrarda, dozun yaklaşık %1'i karbamazapin 10,11-epoksit metaboliti şeklinde bulunur (https://www.novartis.com.tr/sites/www.novartis.com.tr/files/Tegretol_200mg_Tablet_KUB_18032014.pdf. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2016).

2.3.3. Karbamazapin ve Karbamazapin 10,11-epoksitin Analiz Çalışmaları

Jayanna ve arkadaşları, karbamazapinin tabletlerden tayini için geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemde 417 nm dalgaboyunda çalışmışlar ve doğrusal konsantrasyon aralığını 0,2-10 µg/mL olarak bulmuşlardır (Jayanna ve Ark, 2014).

Tambe ve Mulgund, ilaç formülasyonunda karbamazapin tayini için geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemde 275-295 nm dalgaboyu aralığında çalışmışlar. Bu analizde LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,2984 ve 0,9042 µg/mL olarak bulmuşlardır (Tambe ve Mulgund, 2015).

Mandrioli ve arkadaşları, geliştirdikleri HPLC yöntemi ile C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, 237 nm dalgaboyu, asetonitril, metanol, fosfat tamponu (pH=1,9) (17,5:20,0:62,5, h/h/h) hareketli faz karışımı ve 1,2 mL/dak akış hızı kullanarak, epilepsili hasta kanlarında karbamazapinin ve beş metabolitinin tayinlerini yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda, LOQ değeri karbamazapin ve 2-hidroksikarbamazapin için 6 ng/mL, diğer metabolitler için 12 ng/mL olarak bulunurken, LOD değeri karbamazapin ve 2-hidroksikarbamazapin için 2 ng/mL, diğer metabolitler için 4 ng/mL olarak bulunmuştur (Mandrioli ve Ark, 2001).

Jun ve Peng-Ling, RAM-HPLC yöntemi ile (150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, 280 nm dalgaboyunda plazmada karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu çalışmada 1,5 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril/0,1 mol/L amonyum

asetat (12:88, h/h) karışımı kullanmışlar ve çalışmanın sonucunda karbamazapin için LOD değerini 0,5 mg/L olarak bulmuşlardır (Jun ve Peng-Ling, 2002).

Van Rooyen ve arkadaşları, LC/MS-MS yöntemi ile insan plazmasında karbamazapin ve karbamazapin 10,11-epoksit tayini üzerine çalışmışlar. C₁₈ (150 mm x 2,0 mm, 5µm) kolon ve hareketli faz olarak asetonitril/metanol/%0,1 formik asit (10:70:20, h/h) karışımını kullanmışlar, m/z oranlarının sırasıyla 237,05 ve 253,09 alındığı çalışma sonucunda, LOQ değeri karbamazapin için 0,722 ng/mL, karbamazapin 10,11-epoksit için 5,15 ng/mL olarak bulunmuşlardır (Van Rooyen ve Ark, 2002).

Demirkaya ve Kadioğlu, RP-HPLC yöntemi ile 220 nm dalgaboyunda UV dedektör ile ilaç formülasyonunda karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu çalışmada C₁₈ (150 mm x 3,9 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril/su (30:70, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı 0,25-25 µg/mL olarak bulunmuştur (Demirkaya ve Kadioğlu, 2005).

Patil ve Bodhankar, RP-HPLC ile serumda lamotrigin, fenobarbiton, karbamazapin ve fenitoin tayini için yöntem geliştirmişler. 210 nm dalgaboyu, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5µm) kolon ve hareketli faz olarak aseton/asetonitril/metanol/fosfat tamponu (pH=7) (11:12:22:55, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda LOQ değerini 0,2 µg/mL olarak bulunmuşlardır (Patil ve Bodhankar, 2005).

Ulu, RP-HPLC ve türev spektrofotometrisi yöntemleri ile ilaç formülasyonunda karbamazapin tayini üzerine çalışmış, HPLC metodu için 285 nm dalgaboyu, C₁₈ (150 mm, 4,6 mm x 5µm) kolon, 1,0 mL/dak akış hızı ve hareketli faz olarak asetonitril/su (75:25, h/h) karışımı kullanmış, çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığını HPLC metodu ile 0,2-2,0 µg/mL, türev spektrofotometri metodu ile 4,0-10,0 µg/mL, LOD değerini HPLC metodu ile 0,055 µg/mL ve türev spektrofotometri metodu için ile 1,25 µg/mL olarak bulmuştur (Ulu, 2006).

Gupta ve arkadaşları, HPLC ile 210 nm dalga boyunda, serumda melatonin, karbamazapin ve karbamazapin epoksit tayini üzerine çalışmışlar. Bu çalışmada C₁₈ (250 mm x 4,0 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril/su (pH=3,0), (30:70, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda LOD değerleri melatonin, karbamazapin epoksit ve karbamazapin için sırasıyla 800, 500 ve 1300 pg olarak bulunmuşlardır (Gupta ve Ark, 2006).

Şener ve arkadaşları LC-MS, C₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 3µm) kolon, su-asetonitril-asetik asitten oluşan (74,5:25:0,5, h/h/h) hareketli faz ile, 0,4 mL/dak akış hızında, karbamazapinin ve metaboliti karbamazapin-10,11-epoksitin fare beyinde ve kanında tayinini yapmışlar, alıkonma zamanlarını karbamazapin-10,11-epoksit ve karbamazapin için sırasıyla 5,6 ve 12,8 dak, dorusal konsantrasyon aralıklarını 5,0–500,0 ng/mL olarak bulmuşlardır (Şener ve Ark, 2007).

Sanches ve arkadaşları, HPLC ile plazmada karbamazapin, fenobarbital ve fenitoin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde 210 nm dalga boyu, C₁₈ (150 mm x 3,9 mm, 4µm) kolon, 0,5 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril/su (30:70, h/h) çözelti karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı karbamazapin, fenobarbital ve fenitoin için sırasıyla 0,3-20,0 mg/L, 0,9-60,0 mg/L ve 0,6-40,0 mg/L olarak bulunurken LOQ değerleri sırasıyla 0,3 mg/L, 0,9 mg/mL ve 0,6 mg/L olarak bulunmuştur (Sanches ve Ark, 2008).

Dorđević ve arkadaşları, HPLC ile 285 nm dalgaboyunda, serum ve tükürük örneklerinde karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde C₁₈ (250 mm x 4,0 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak metanol/su/asetik asit (65:34:1, h/h) çözelti karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda serum ve tükürük örnekleri için LOD sırasıyla 0,166 ve 0,178 µg/mL, LOQ değerleri aynı sırayla 0,237 ve 0,226 µg/mL, doğrusal konsantrasyon aralığı ise serum ve tükürük örnekleri için 0,1–5,0 µg/mL olarak bulunmuştur (Dorđević ve Ark, 2009).

Djordjevic ve arkadaşları, HPLC ile 285 nm dalgaboyunda saç örneklerinde karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde C₁₈ (250 mm x 4,0 mm, 5µm)

kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, hareketli faz olarak metanol/su/buzlu asetik asit (65:34:1, h/h) karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 1,2 ve 1,7 ng/mg, doğrusal konsantrasyon aralığı 2,5-37,5 ng/mg olarak bulmuştur (Djordjevic ve Ark, 2009).

McMillin ve arkadaşları, immunoassay ve LC-MS/MS yöntemi ile karbamazapin ve epoksit metabolitinin plazmada tayini üzerine çalışmışlar. Bu çalışmada (50 mm x 2,1 mm, 1,8µm) kolon, 0,65 ml/dak. akış hızı, hareketli faz olarak iki bileşende de % 0,1 formik asit olacak şekilde asetronitril/su (25:75, h/h) karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı karbamazapin ve epoksit metaboliti için sırasıyla 2,2-12,0 µg/mL ve 0,6-2,4 µg/mL olarak bulunmuştur (McMillin ve Ark, 2010).

Rashmin ve arkadaşları, HPTLC yöntemi ile 285 nm dalgaboyunda ilaç formülasyonlarında karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde silika jel 60 F₂₅₄ İTK tabakası, hareketli faz olarak etil asetat/toluen/metanol (5:4:1, h/h/h) karışımını kullanmışlardır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 16,70 ve 50,44 ng/spot olarak bulunmuştur (Rashmin ve Ark, 2011).

Baranowska ve Kowalski HPLC–DAD, C₃₀ (250 mm x 4,0 mm, 7µm) kolon, % 0,05 trifloro asetik asit, metanol ve asetronitrilden oluşan hareketli faz ile gradiyent elüsyon yaptıkları bir metot geliştirmişler ve geliştirdikleri bu metot ile, 1,0 mL/dak. akış hızı, 200 ve 450 nm dalgaboylarında, karbamazapinin de bulunduğu 15 ilaç maddesinin yüzey suları ve atık su örneklerinde eş zamanlı tayinini yapmışlardır. Çalışma sonucunda, karbamazapin için alıkonma zamanını 20,564 dak, LOD ve LOQ değerini ise sırasıyla 0,029 ve 0,086 µg/mL olarak bulmuşlardır (Baranowska ve Kowalski, 2011).

Hu ve arkadaşları HPLC-UV, C₁₈ (50 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, % 1 izopropil alkol ve % 0,01 heptaflorobütirik asit ve asetronitrilden oluşan hareketli faz çözeltisi ve gradiyent elüsyon ile 2,0 mL/dak akış hızı, 280 nm dalgaboyunda çalışmışlar, içinde karbamazapinin de bulunduğu 6 analitin tayinini yapmışlardır.

Çalışma sonucunda karbamazapin için alıkonma zamanı 4,51 dak, LOD ve LOQ değeri 0,03 ve 0,10 µM olarak bulunmuştur (Hu ve Ark, 2011).

Tonic-Ribarska ve arkadaşları RP-HPLC, C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, asetonitril ve sudan oluşan (35:65, h/h) hareketli faz, 1,0 mL/dak akış hızı, 220 nm dalgaboyunda çalışmışlar, karbamazapin ve karbamazapin epoksitin plazmada biyoanalitik katı faz ekstraksiyon metodu ile tayinini yaptıkları bu çalışma sonucunda, karbamazapin ve karbamazapin epoksitin doğrusal konsantrasyon aralığını 0,25–20 µg/mL olarak bulmuşlardır (Tonic-Ribarska ve Ark, 2011).

Kratz ve arkadaşları, HPLC ile 275 nm dalgaboyunda UV dedektör ile propranolol, karbamazapin, asiklovir ve hidroklorotiyazid vinblastin ve verapamil tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde C₁₈ (300 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak, asetonitril ve amonyum asetat çözeltisi (pH=3) karışımı kullanmışlardır ve gradiyent elüsyon yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı her bir etkin madde için 0,5-100 µM olarak bulunmuştur (Kratz ve Ark, 2011).

Sultana ve arkadaşları, 212 nm dalgaboyunda, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 10µm) kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı ile hareketli faz olarak metanol/su (pH=3), (80:20, h/h) çözelti karışımı kullanarak ilaç formülasyonunda ve insan serumunda karbamazapin tayini için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığını 0,4-12 µg/mL olarak bulmuşlardır (Sultana ve Ark, 2012).

Dzodic ve arkadaşları HPLC, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, asetonitril ve fosfat tampon (pH=7), (30:70, h/h) hareketli fazı ile, 1,5 mL/dak. akış hızı, 210 nm dalga boyunda, plazmada karbamazapin, karbamazapin epoksit ve karbamazapin trans-diolün tayinini yapmışlar. Doğrusal konsantrasyon aralıklarını karbamazapin, karbamazapin epoksit ve karbamazapin trans-diol için 0,2–25 µg/mL olarak bulmuşlardır (Dzodic ve Ark, 2012).

Mowafy ve arkadaşları, HPLC ile 285 nm dalga boyunda plazmada karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 10µm) kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, hareketli faz olarak metanol/su (50:50, h/h) çözelti karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığını 0,5-40 µg/mL olarak bulmuşlardır (Mowafy ve Ark, 2012).

Patil ve arkadaşları, HPLC ile karbamazapin ve fenitoin için 205 nm, antipirin ve furosemid için 230 nm dalga boyunda çalışmışlar. Bu çalışmada, C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak akış hızı, hareketli faz olarak su (pH=3, %20 orto-fosforik asit ile) /metanol/asetonitril (58:21:21, h/h/h) çözelti karışımını kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda her madde için doğrusal konsantrasyon aralığını 5-100 µM olarak bulunmuştur (Patil ve Ark, 2012).

Sadu ve arkadaşları, RP-HPLC yöntemi ile 285 nm dalgaboyunda PDA dedektör ile ilaç preparatında karbamazapin tayini üzerine çalışmışlar. Bu analizde C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, hareketli faz olarak su/metanol (40:60, h/h) karışımı kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı 0,001-0,200 mg/mL olarak bulunmuştur (Sadu ve Ark, 2012).

Ezzeldin ve arkadaşları HPLC, C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, asetonitril: izopropilalkol: fosfat tamponu (pH=3), (36:15:49, h/h/h) hareketli faz, 1,2 mL/dak. akış hızı ve 220 nm dalga boyunda karbamazapinin insan kanında tayinini ve yöntem validasyonunu yapmışlar, alıkonma zamanını 11,4 dakika, doğrusal konsantrasyon aralığını 0,1-8,0 µg/mL ve LOQ değerini 0,1 µg/mL olarak bulmuşlardır (Ezzeldin ve Ark, 2013).

Serralheiro ve arkadaşları HPLC-UV, C₁₈ (55 mm x 4,0 mm, 3µm) kolon, su-metanol-asetonitril-trietilaminden oluşan (68,7:25:6:0,3, h/h/h/h) hareketli fazı ile, 1,0 mL/dak. akış hızı, 237 nm dalgaboyunda fenobarbital, primidon, fenitoin, karbamazapin, lamotrigin, okskarbazepin ve bunların ana metabolitlerinden bazıları, karbamazapin 10,11-epoksit, 10,11-trans-dihidroksikarbamazapin (transdiol) ve likarbazepinin insan kanında eş zamanlı tayinlerini yapmışlar, doğrusal

konsantrasyon aralıklarını fenobarbital için 0,25–100 µg/mL, primidon için 0,4–50 µg/mL, fenitoin için 0,5–50 µg/mL, karbamazapin, lamotrigin ve karbamazapin 10,11-epoksit için 0,1–50 µg/mL, okskarbazepinin için 0,1–25 µg/mL, transdiol için 0,25–10 µg/mL ve likarbazepin için 0,15–80 µg/mL olarak bulmuşlardır (Serralheiro ve Ark, 2013).

Fulga ve arkadaşları HPLC-DAD, C₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 3,5µm) kolon, asetonitril ve fosfat tampon (pH=3), (37:63, h/h) hareketli fazı ile, 0,8 mL/dak akış hızı, 280 nm dalga boyunda, otopsi için kan ve bazı organlarda karbamazapinin tayinini yapmışlar. Doğrusal konsantrasyon aralığını 5–40 µg/mL olarak bulmuşlardır (Fulga ve Ark, 2013).

Sultana ve arkadaşları, parasetamol, karbamazapin, losartan ve siprofloksasinin ilaç formülasyonunda ve insan serumunda tayini için sırasıyla 245, 230, 206 ve 272 nm dalgaboyunda UV dedektör ile çalışmışlar, bu analizde C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 10µm) kolon, 1,0 mL/dak. akış hızı, hareketli faz olarak asetonitril/su (pH=3), (50:50, h/h) karışımı kullanmışlar ve çalışma sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığını sırasıyla 0,5–24 µg/mL, 0,25–8,0 µg/mL, 0,4–12 µg/mL ve 0,75–10 µg/mL olarak bulmuşlardır (Sultana ve Ark, 2013).

Ul Haq ve Kumar RP-LC-MS/MS, C₈ (50 mm x 4,6 mm, 3µm) kolon, asetonitril-tampon (70:30, h/h) hareketli faz ve 0,65 mL/dak. akış hızında, okskarbazepin ve metaboliti olan 10-hidroksikarbazepinin plazmada eş zamanlı analizini ve yöntem validasyonunu yapmışlar, doğrusal konsantrasyon aralıklarını sırasıyla 0,032–7,044 mg/mL ve 0,103–15,054 mg/mL olarak bulmuşlardır (Ul Haq ve Kumar, 2014).

Thejaswini ve Gurupadayya RP-HPLC, C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, metanol, asetonitril ve fosfat tampon çözelti (pH=3), (50:40:10, h/h/h) hareketli faz, 0,8 mL/dak akış hızı ve 210 nm dalga boyunda amitriptilin, karbamazapin ve flunarizinin insan kanında eş zamanlı tayinini yapmışlar, alıkonma zamanları amitriptilin, karbamazapin ve flunarizin için sırasıyla $3,6 \pm 0,1$ dak., $4,1 \pm 0,2$ dak.

ve $4,6 \pm 0,2$ dak., LOD değerlerini amitriptilin, karbamazapin ve flunarizin için sırasıyla $0,072 \mu\text{g/mL}$, $0,09 \mu\text{g/mL}$ ve $0,06 \mu\text{g/mL}$, LOQ değerlerini ise amitriptilin, karbamazapin ve flunarizin için sırasıyla $0,21 \mu\text{g/mL}$, $0,027 \mu\text{g/mL}$ ve $0,18 \mu\text{g/mL}$ olarak bulmuşlardır (Thejaswini ve Gurupadayya, 2014).

Vosough ve arkadaşları HPLC–DAD, RP kolon (150 mm x 4,6 mm, 5 μm), asetronitril ve K_2HPO_4 tampon çözeltisi (pH=7,5) karışımından oluşan (45:55, h/h) hareketli fazı ile, 1,0 mL/dak. akış hızı, 210 ve 400 nm dalgaboyunda fenobarbital ve karbamazapinin insan kanında eş zamanlı tayinini yapmışlar. Karbamazapin ve fenobarbital için alıkonma zamanlarını 2,97 ve 2,33 dak., LOD değerini sırasıyla 0,006 ve 0,11 $\mu\text{g/mL}$, LOQ değerlerini ise 0,02 ve 0,37 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulmuşlardır (Vosough ve Ark, 2014).

Zhou ve Jiang HPLC-DAD, C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 2,6 μm) kolon, formik asit, metanol ve asetronitrilden oluşan (2:49:49, h/h/h) hareketli faz, 0,2 mL/dak. akış hızı, sulfametoksazol, diklofenak, karbamazapin, ve bezafibrat için sırasıyla 270, 280, 290 ve 230 nm dalgaboylarında sulfametoksazol, diklofenak, karbamazapin ve bezafibratın eş zamanlı tayinini yapmışlar ve sulfametoksazol, karbamazapin, bezafibrat, diklofenak için alıkonma zamanlarını sırasıyla 5,3 dak., 9,4 dak., 12,4 dak. ve 17,0 dak. olarak bulmuşlardır (Zhou ve Jiang, 2014).

Mohamed ve arkadaşları, LC-MS/MS, RP-18 (100 mm x 4,6 mm) kolon, asetronitril ve amonyum asetat tamponu (pH 3,5) (90:10, h/h) hareketli faz karışımı, 0,5 mL/dak. akış hızı kullanarak propofol, midazolam ve karbamazapinin plazmada tayinini yapmışlar ve konsantrasyon aralığı propofol, midazolam ve karbamazapin için sırasıyla 1–100, 2–100 ve 7–1000 ng/mL olarak bulmuşlardır (Mohammed ve Ark, 2015).

Gineys ve arkadaşları, RP-HPLC, C_{18} (100 mm x 2,1 mm, 3 μm) kolon, asetronitril ve % 0,01 orto-fosforik asit çözeltisinden oluşan hareketli faz ile gradiyent elüsyon ve 0,25 mL/dak. akış hızı kullanarak, içinde karbamazapinin de bulunduğu farklı ilaç ve pestisitlerin tayinini yapmışlar. Çalışma sonucunda, doğrusal

konsantrasyon aralığını $1,0 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-8}$ mol/L, LOD değerini $5,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5}$ mg/mL, LOQ değerini ise $1,8 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-4}$ mg/mL olarak bulmuşlardır (Gineys ve Ark, 2015).

Renkoğlu ve arkadaşları, geliştirdikleri HPLC metodunda ACE 5–CN (250 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon, fosfat tamponu (pH 5,0) : metanol (80:20, h/h–70:20, h/h) hareketli faz karışımı ile gradiyent çalışmışlar, 1,0 mL/dak. Akış hızı ve 254 nm dalgaboyunda olanzapin ve karbamazapinin tablet formülasyonunda tayinini yapmışlar, çalışma sonucunda LOD ve LOQ değerlerini olanzapin ve karbamazapin için sırasıyla 0,05 ve 0,2 mg/mL olarak bulmuşlardır (Renkoğlu ve Ark, 2015).

Gurke ve arkadaşları, geliştirdikleri SPE-HPLC–MS/MS metodunda RP kolon (100 mm x 2,0 mm x 2,5µm), 0,3 mL/dak. akış hızı, amonyum asetat çözeltisi, asetonitril ve formik asitten oluşan hareketli faz ile gradiyent elüsyon yaparak lağım suyunda içinde karbamazapinin de olduğu çeşitli farmasötik maddelerin tayinini yapmışlar ve çalışma sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığını 50-20000 ng/L olarak bulmuşlardır (Gurke ve Ark, 2015).

Ferreira ve arkadaşları, HPLC-DAD, C₁₈ kolon, su/metanol/asetonitril (69:25:6, h/h/h) hareketli faz karışımı, 1,0 mL/da. akış hızı, 215 nm dalgaboyunda karbamazapin, okskarbazepin ve onların aktif metabolitleri karbamazapin-10,11-epoksit ve likarbazepinin hücre kültürü ortamında tayinini yapmışlar. Doğrusal konsantrasyon aralıklarını karbamazapin için 0,1-15 µg/mL, okskarbazepin ve karbamazapin-10,11-epoksit için 0,1–5 µg/mL, likarbazepin için 0,1–40 µg/mL olarak bulmuşlardır (Ferreira ve Ark, 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

- LCMS Cihazı (Shimadzu-2020)
 - Pompa Sistemi (LC-20AD)
 - UV/Vis Dedektör (SPD-20A)
 - Otomatik Örnekleyici (SIL-20ACHT)
 - Kolon fırını (CTO-10ASVP)
 - Gaz Giderme Ünitesi (DGU-20A3R)
 - Yazılım versiyonu (Lab Solutions)
 - Analitik kolon Athena, C8 (100 mm x 4,6 mm x 3µm)
 - Ön Kolon Athena, C18 (20 mm x 4,0 mm x 5µm)
- UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601)
- Quartz kuvetler (Heilma 100 Qs, 10x10x45 mm)
- pH metre (Mettler Toledo, MP 220)
- Terazı (Shimadzu, AEX-200G)
- Ultra Saf Su Cihazı (Millipore, Milli-Q-RG)
- Otomatik pipetler (Nichipet EX II)

3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Aprepitant (Merck), karbamazapin (USP), karbamazapin 10,11-epoksit (Sigma) ve aseklofenak (Sigma) USP standartları, asetonitril, metanol, orto-fosforik asit HPLC Grade (Merck) ve bidistile su kullanılmıştır.

3.3. Çözeltiler

3.3.1. Aprepitant Stok Çözeltisi

1,0 mg/mL ($1,87 \times 10^{-3}$ M) stok aprepitant çözeltisi asetonitril kullanılarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden asetonitril ile 0,10 ve 0,01 mg/mL'lik seyreltmeler yapıldı. Çözeltiler +4°C'de saklandı.

3.3.2. Karbamazapin Stok Çözeltisi

1,0 mg/mL ($4,23 \times 10^{-3}$ M) stok karbamazapin çözeltisi metanol kullanılarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden asetonitril ile 0,10 ve 0,01 mg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çözeltiler +4°C’de saklandı.

3.3.3. Karbamazapin 10, 11–epoksit Stok Çözeltisi

1,0 mg/mL ($3,96 \times 10^{-3}$ M) stok karbamazapin 10,11- epoksit çözeltisi metanol kullanılarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden asetonitril ile 0,10 ve 0,01 mg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çözeltiler –20°C’de saklandı.

3.3.4. Aseklofenak (IS) Stok Çözeltisi

İç standart olarak kullanılan 1,0 mg/mL ($2,82 \times 10^{-3}$ M) konsantrasyondaki aseklofenak stok çözeltisinden asetonitril kullanılarak 0,10 ve 0,01 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Çözeltiler +4°C’de saklandı.

3.4. Analitik Metot Geliştirme Çalışmaları

Aprepitant, karbamazapin ve karbamazapin 10,11-epoksitin HPLC ile bir arada analizi için uygun kolon, kolon sıcaklığı, dalga boyu, hareketli faz, hareketli faz akış hızı gibi kromatografik koşullar ve uygun iç standart maddesi belirlendi. Bu koşullarda geliştirilen ve valide edilen yöntem, karbamazapin ve aprepitantın ilaç formülasyonlarının toz karışımlarının analizine de uygulandı.

3.4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

3.4.1.1. Kromatografik Çalışma İçin Karışım Çözeltisi

5,0 mL çözelti içinde 15,0 µg (3 µg/mL) APT, 5,0 µg CBZ, 4,0 µg CBZ-E ve 7,5 µg aseklofenak içeren karışım çözeltisi hazırlandı. Bu karışımdan 20 µL HPLC sistemine enjekte edildi.

3.4.1.2. Dalgaboyunun Belirlenmesi

Madde karışımlarının HPLC ile analizi için UV/Vis dedektör kullanıldı. Bu amaçla 5,0 mL içinde 25,0 µg APT, 20,0 µg CBZ ve 10,0 µg CBZ-E in ayrı ayrı ve karışım çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerinin spektrumları alınarak maksimum absorpsiyon yaptıkları dalgaboyu spektrofotometrik olarak tespit edildi ve her üç madde için de en uygun dalgaboyu 210 nm olarak belirlendi. İlgili spektrumlar Bölüm 4.1.1’de verilmiştir.

3.4.1.3. Hareketli Faz Bileşenlerinin, Bileşen Oranlarının ve Hareketli Fazın pH’ sinin Belirlenmesi

Çalışılacak uygun dalgaboyu belirlendikten sonra karbamazapin ve aprepitantın analizlerine ilişkin literatür çalışmaları göz önüne alınarak hareketli faz olarak asetonitril/su, asetonitril / % 0,1 formik asit, asetonitril / % 0,2 formik asit, asetonitril / % 0,1 trifloroasetik asit, asetonitril / % 0,2 trifloroasetik asit, asetonitril/izopropil alkol/su, asetonitril/metanol/su, asetonitril/fosfat tamponu (farklı mM derişimlerde), asetonitril/orto-fosforik asit çözeltisi (farklı pH’ lerde) gibi değişik çözücü sistemleri farklı karışım oranlarında C₁₈ (250 mm x 4.6 mm), 5µm başlangıç kolonu kullanılarak denendi ve en uygun hareketli faz çözeltisi olarak asetonitril/su (pH=4, orto-fosforik asit çözeltisi ile), (55/45, h/h) karışımı tespit edildi. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre maddelerin alıkonma zamanlarını gösteren Tablo-1 ve farklı pH’ lerdeki kromatogramlar Bölüm 4.1.2.’de verilmiştir.

3.4.1.4. Sabit Fazın (Kolonun) Belirlenmesi

Hareketli faz bileşenlerinin oranı ve pH belirlendikten sonra farklı uzunluk, iç çap ve farklı partikül büyüklüğüne sahip dolgu materyali içeren kolonlar denenerek ayrılmanın ve analiz süresinin en uygun bulunduğu kolon tespit edildi. Sonuçlar Bölüm 4.1.3’ de verilmiştir.

3.4.1.5. İç Standardın Belirlenmesi

Amlodipin, aliskren, ketokonazol, maprotilin, amsinonit ve diklofenak sodyum iç standart olarak denendi. Seçicilik ve analiz süresi göz önüne alınarak aseklofenak uygun iç standart olarak belirlendi.

3.4.1.6. Akış Hızının Belirlenmesi

Alıkonma zamanında fazla gecikmeye neden olmayacak ama iyi bir ayrılmayı sağlayacak akış hızını bulmak için çalışmalar yapıldı ve en uygun akış hızının 0,8 mL/dak. olduğu görüldü.

3.4.1.7. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Kolon sıcaklığı için 20, 25 ve 30 °C ler denendi. Alıkonma zamanlarında önemli bir değişiklik olmadığı için kolon sıcaklığı 25°C olarak seçildi.

3.5. Metot Validasyonu

Geliştirilen analitik metodun validasyonu ICH kılavuzu Q2'ye göre yapıldı. Bu kılavuza göre aşağıdaki validasyon parametreleri incelendi.

3.5.1. Seçicilik

İlgili ilaç etkin maddelerin ve karışımlarının hazırlandığı hareketli faz çözeltisi sisteme enjekte edildi ve hareketli faz çözeltisinden kaynaklanan bir girişimin olmadığı ve yöntemin seçici olduğu görüldü. Buna ait kromatogram Bölüm 4.2.1.'de verilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığı, her üç etkin maddenin 7 farklı konsantrasyonunda karışım çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden tespit edildi. Bu amaçla her bir maddeden 2 şer tartım alındı, alınan tartımdan 2 şer seyreltme yapıldı. Bu çözeltilerden her bir madde için üçer tekrar ile 4 farklı kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve bu kalibrasyon eğrilerinin ortalaması alındı. Sonuçlar Bölüm 4.2.2.'de verilmiştir.

3.5.3. Tayin Edilebilme Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.3.'de verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD : Kalibrasyon doğrusunun y eksenini kestiği değerin standart sapması

m : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.5.4. Kesinlik (Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik)

APT için 0,90 µg/mL, 2,50 µg/mL, 4,50 µg/mL konsantrasyonlarda, CBZ için 0,35 µg/mL, 1,50 µg/mL, 4,50 µg/mL konsantrasyonlarda ve CBZ-E için 0,25 µg/mL, 1,50 µg/mL, 4,50 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Gün içinde farklı zamanlarda ve farklı günlerde yapılan analizler ile elde edilen sonuçlar Tablo-9 Bölüm 4.2.4.'de verilmiştir.

3.5.5. İlaç Etkin Madde Çözeltilerinin Farklı Saklama Koşullarındaki Kararlılıkları

Çözelti kararlılığını belirlemek amacıyla CBZ ve APT standart çözeltileri oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, +4°C'de 1 ay bekletildi. Karışım çözeltisi ve CBZ-E standart çözeltisi oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, -20°C'de 1 ay bekletildi. Ayrıca karışım çözeltisi otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletildi. Bu çözeltilerin kromatogramları ve istatistiksel sonuçları Tablo-10 Bölüm 4.2.5.'de verilmiştir.

3.5.6. Doğruluk (Geri Kazanım)

Metodun doğruluğu için yapılan çalışmada CBZ-E için 0,25 µg/mL, 0,80 µg/mL, 4,50 µg/mL, CBZ için 0,35 µg/mL, 1,50 µg/mL, 4,50 µg/mL ve APT için 0,70 µg/mL, 2,50 µg/mL, 4,50 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin ilgili kalibrasyon eğrisinden bulunan konsantrasyonları ile geri kazanım hesaplandı, % geri kazanım sonuçları Tablo-11 Bölüm 4.2.6.'da verilmiştir.

3.5.7. Yöntemin Sağlamlığı

Geliştirilen metotta kullanılan hareketli faz pH' si, hareketli faz bileşenlerinin oranları, kolon sıcaklığı ve akış hızı küçük oranlarda değiştirilerek yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Bulunan sonuçları gösteren Tablo-12 Bölüm 4.2.7.'de verilmiştir.

3.5.8. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi, Food Drug Administration (FDA) ve United States Pharmacopeia (USP) tarafından önerilen, sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde kullanılan testdir. Bu test için önemli parametreler olan alıkonma zamanı (t_R), kuyruklanma faktörü (T), ayrılma faktörü (R_s) ve teorik plaka sayısının (N) bu çalışma için bulunan sonuçları Tablo-13 Bölüm 4.2.8.'de verilmiştir.

3.6. İlaç Formülasyonlarının Karışımından Aprepitant ve Karbamazapin Analizi

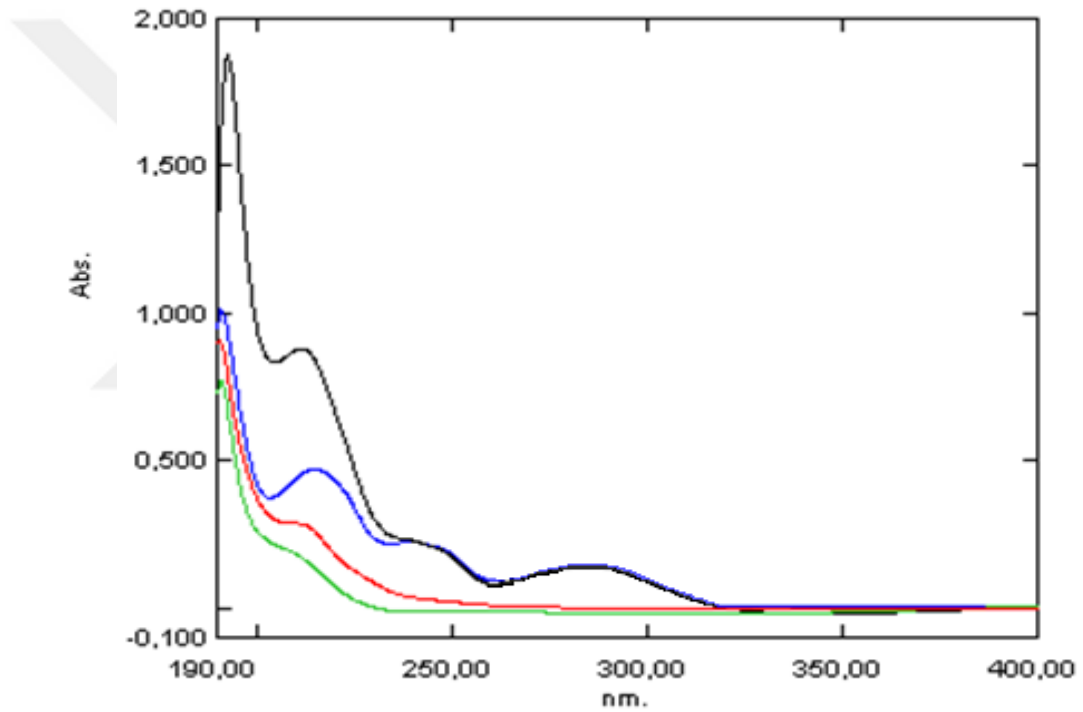
200 mg karbamazapin içeren tabletlerden 15 adet, 80 mg aprepitant içeren kapsüllerden 6 adet teker teker tartıldı. Ortalama ağırlıklar bulundu. Ayrı ayrı havanda toz haline getirilen karbamazapin içeren tabletlerden 1 tablet ve aprepitant içeren kapsüllerden 1 kapsül ağırlığının $\frac{1}{4}$ olacak şekilde tartılan toz karışımı 25 mL' ye metanolle tamamlandı. 1-1,5 saat çalkalandı ve süzüldü. Süzüntüden uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra geliştirilen HPLC yöntemi ile analizi edildi. Bu işlem 3 farklı tartım için tekrarlandı ve sonuçlar ilgili ölçü eğrilerinden hesaplandı. Bulunan sonuçlar Tablo-14 ve Bölüm 4.3.'de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

4.1.1. Dalgaboyunun Belirlenmesi

Şekil-4’ de karışımdaki her bir maddenin maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyları görülmekte ve bu spektrumlar incelendiğinde her üç madde ve karışım çözeltisi için en uygun dalga boyunun 210 nm olduğu görülmektedir.



Şekil-4. APT, CBZ ve CBZ-E’ nin ayrı ayrı ve karışım halindeki çözeltilerinin spektrumları (— 5 µg/mL APT, — 4 µg/mL CBZ, — 2 µg/mL CBZ-E, — 5 µg/mL APT, 4 µg/mL CBZ ve 2 µg/mL CBZ-E içeren karışım çözeltisi).

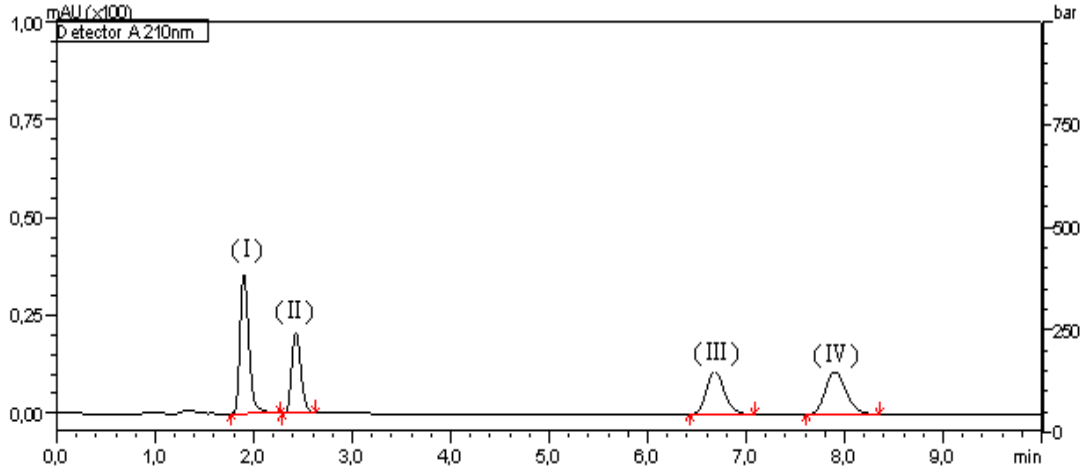
4.1.2. Hareketli Faz Bileşenlerinin, Bileşen Oranlarının ve Hareketli Fazın pH'ının Belirlenmesi

Denemeler sonucunda en uygun hareketli faz çözeltisi olarak asetonitril/su çözücü karışımı ve hareketli faz bileşenlerinin oranları değiştirilerek en uygun hareketli faz çözücü karışımı oranı (55/45, h/h) asetonitril/su olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo-1'de verilmiştir.

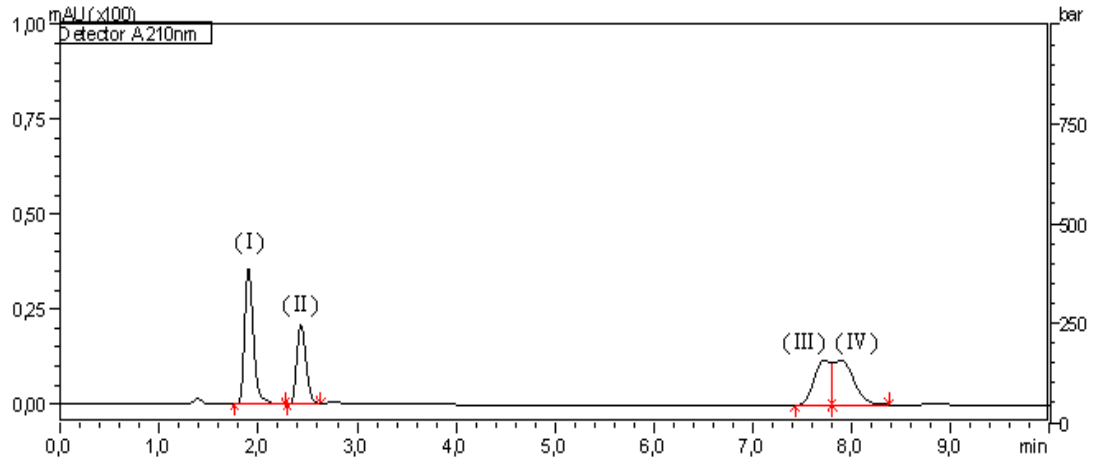
Şekil-5, 6, 7 ve 8' deki kromatogramlar incelendiğinde de görüleceği gibi karışım içindeki ilaç etkin maddelerin ayırımının sağlandığı hareketli faz sulu çözelti pH değeri 4,0 (orto-fosforik asit çözeltisi ile) olarak belirlendi.

Tablo-1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre CBZ-E, CBZ ve APT' nin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi

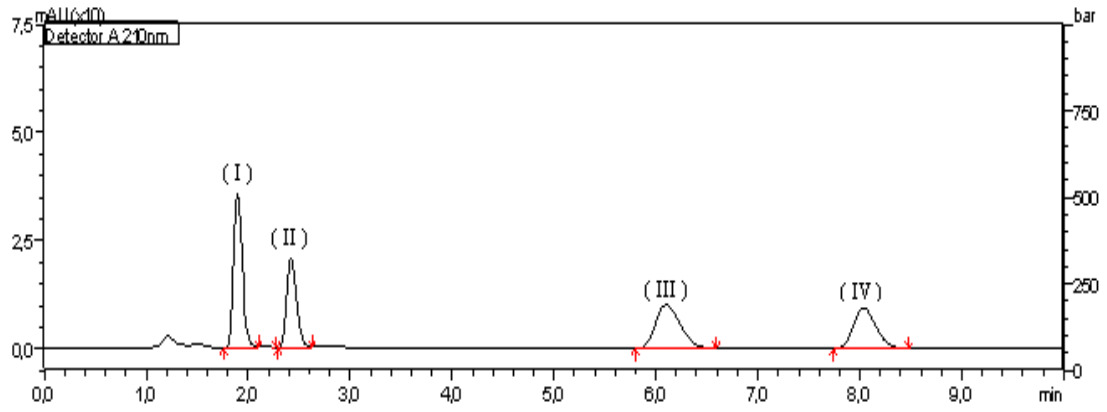
Asetonitril (%)	Su (pH=4) (%)	t _R (CBZ-E) (dak.)	t _R (CBZ) (dak.)	t _R (APT) (dak.)
60	40	2,06	2,42	4,72
55	45	2,18	2,66	6,53
50	50	2,35	3,01	9,98
45	55	2,61	3,54	17,54
40	60	3,00	4,43	37,10



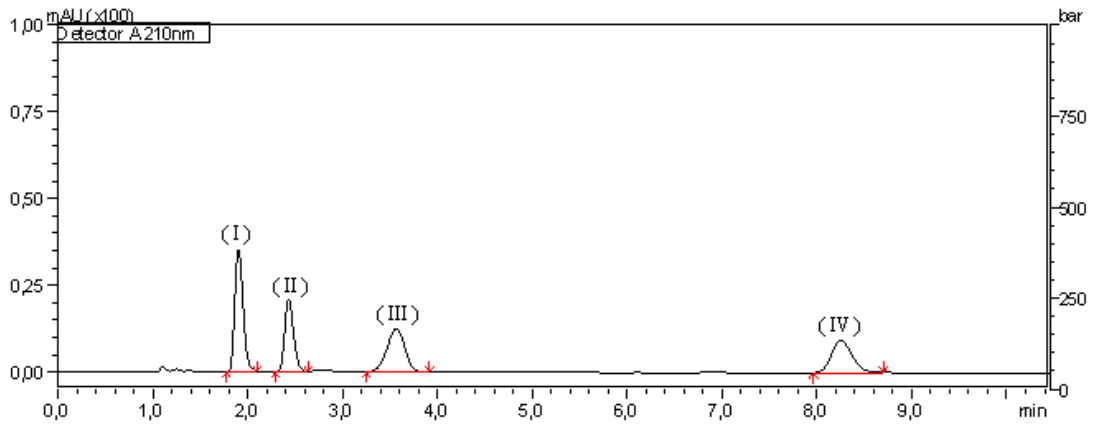
Şekil-5. pH=2,0'de 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 3,0 µg/mL APT (III), 1,5 µg/mL aseklofenak (IV) içeren çözelti karışımının kromatogramı (hf: asetonitril/su (pH=2, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 50/50, h/h, akış hızı =1,0 mL/dak).



Şekil-6. pH=3,0'de 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL aseklofenak (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının kromatogramı (hf: asetonitril/su (pH=3, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 50/50, h/h, akış hızı = 1,0 mL/dak).



Şekil-7. pH=4,0’de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ CBZ-E (I), 1,0 $\mu\text{g/mL}$ CBZ (II), 1,5 $\mu\text{g/mL}$ aseklofenak (III), 3,0 $\mu\text{g/mL}$ APT (IV) içeren çözelti karışımının kromatogramı (hf: asetonitril/su (pH=4, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 50/50, h/h, akış hızı = 1,0 mL/dak).



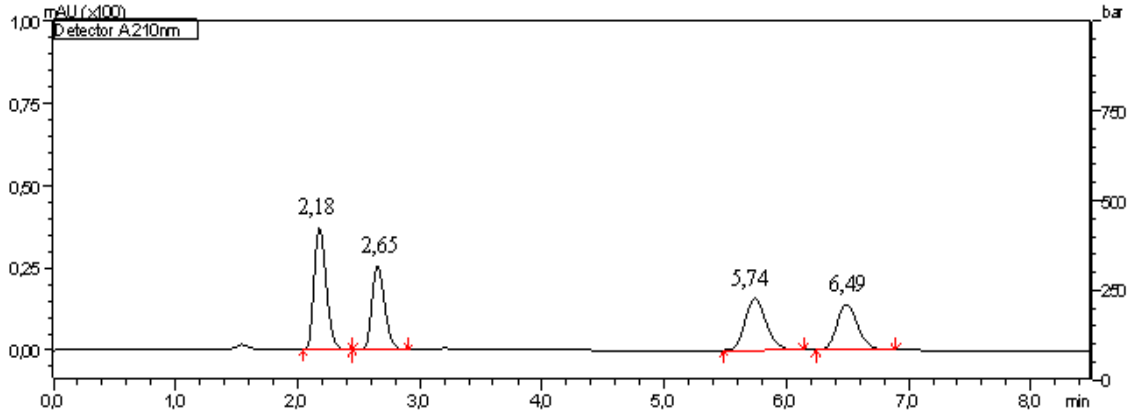
Şekil-8. pH=5,0’ de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ CBZ-E (I), 1,0 $\mu\text{g/mL}$ CBZ (II), 1,5 $\mu\text{g/mL}$ aseklofenak (III), 3,0 $\mu\text{g/mL}$ APT (IV) içeren çözelti karışımının kromatogramı (hf: asetonitril/su (pH=5, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 50/50, h/h, akış hızı = 1,0 mL/dak).

4.1.3. Sabit Fazın (Kolonun) Belirlenmesi

Bölüm 4.1.2’de belirlenen asetonitril/su, (55/45, pH=4 (orto-fosforik asit), h/h) hareketli fazı kullanılarak Tablo-1’ de verilen kolonlar ile çalışıldı ve sabit faz olarak Athena C₈ (100 mm x 4,6 mm, 3µm) HPLC kolonu en uygun kolon olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo-2’ de verilmiştir.

Tablo-2. APT, CBZ ve CBZ-E’ nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları.

Sabit Faz (Kolon)	Alıkonma Zamanı (dak.)		
	CBZ-E	CBZ	APT
Athena C18 (250 mm x 4.6 mm), 5µm	4,82	6,29	16,76
Kromasil C18 (250 mm x 4.6 mm), 5µm	4,21	5,37	15,25
Athena C18 (150 mm x 4.6 mm), 5µm	3,19	4,12	10,30
Symmetry C18 (150 mm x 4.6 mm), 5µm	2,62	3,26	8,36
Inertsil C18 (150 mm x 4.6 mm), 5µm	2,64	3,35	7,78
Inertsil C18 (50 mm x 2.1 mm), 3µm	0,63	0,69	1,36
ACE C8 (150 mm x 4.6 mm), 5µm	3,03	3,57	8,18
Athena C8 (100 mm x 4.6 mm), 3µm	2,18	2,66	6,53

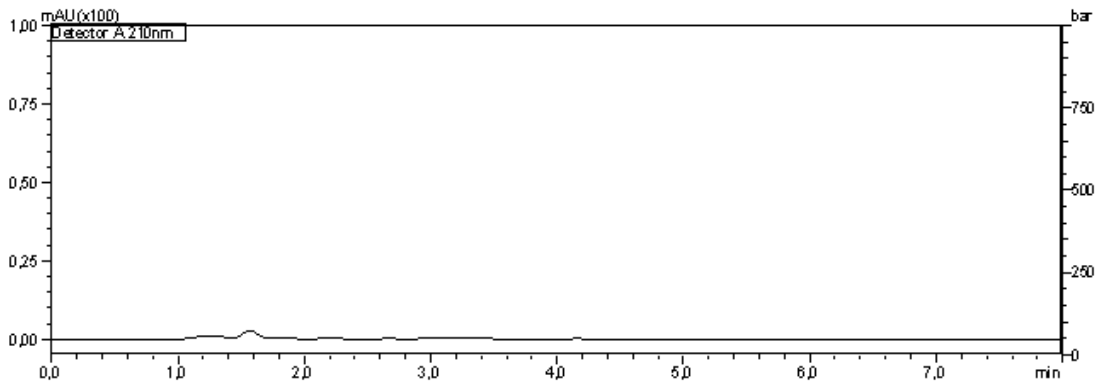


Şekil-9. 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL IS (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: asetonitril/su (pH=4, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 55/45, h/h, akış hızı=0,8 mL/dak.).

4.2. Metot Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

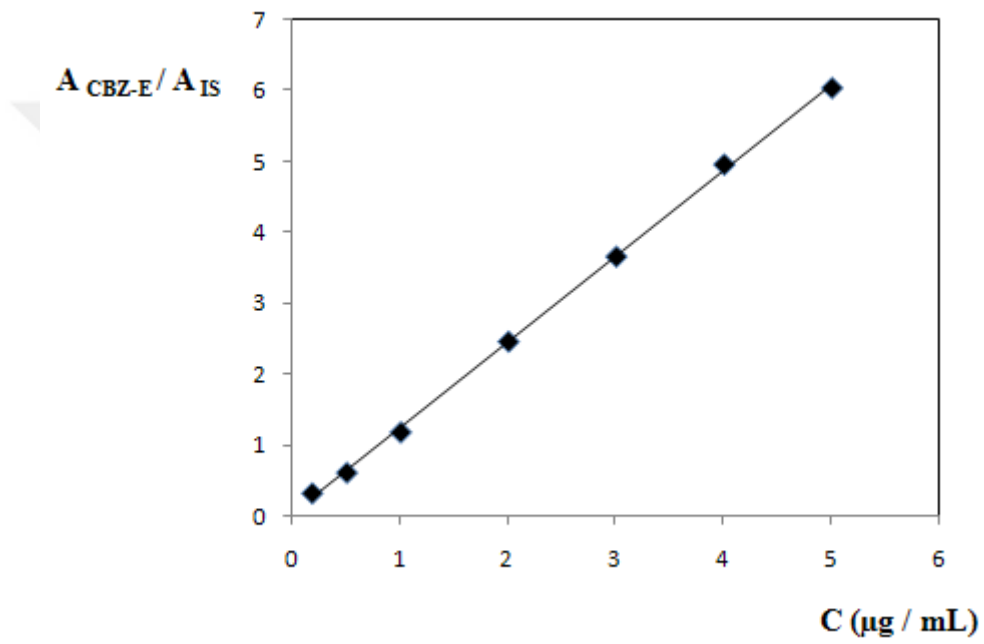
Şekil-10' da görüldüğü gibi geliştirilen sisteme hareketli faz çözeltisi enjekte edildi ve CBZ, CBZ-E, IS ve APT piklerinin görüldüğü dakikalarda hareketli fazdan ileri gelen herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil-10. Hareketli faz çözeltisine ait kromatogram (hf: asetonitril/su (pH=4, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 55/45, h/h, akış hızı = 0,8 mL /dak.).

4.2.2. Doğrusallık

CBZ-E için 0,18-5,00 µg/mL, CBZ için 0,28-5,00 µg/mL ve APT için 0,52-5,00 µg/mL konstrasyon aralığındaki çözeltilerin Bölüm 3.5.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak çizilen ölçü eğrileri Şekil-11, 12 ve 13' de verilmiştir.



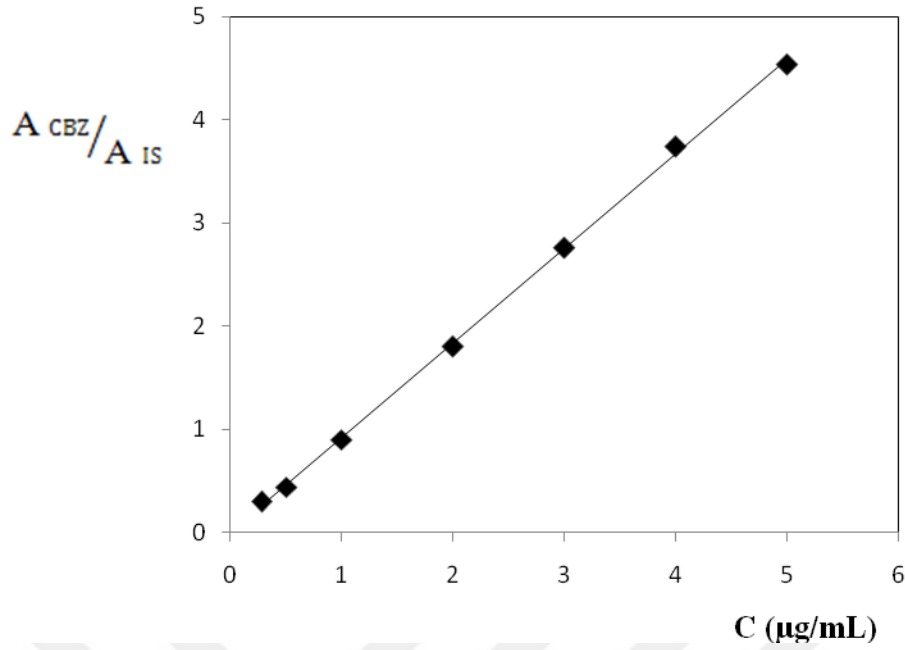
Şekil-11. CBZ-E'nin 0,18 - 5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo-3. CBZ-E'nin 0,18 - 5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{CBZ-E} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler

A_{CBZ-E} / A_{IS} \ C (µg/mL)	0,18	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
1	0,32	0,58	1,13	2,30	3,40	4,75	5,68
2	0,32	0,57	1,13	2,34	3,52	4,73	5,66
3	0,31	0,61	1,18	2,52	3,75	5,01	6,25
4	0,30	0,65	1,25	2,64	3,94	5,32	6,54
Ortalama	0,31	0,60	1,17	2,45	3,65	4,95	6,03
SD	0,01	0,03	0,06	0,16	0,24	0,28	0,44
RSD (%)	3,06	5,97	4,84	6,48	6,58	5,58	7,21
A_{CBZ-E} / A_{IS} oranı değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y=1,21 x + 0,03$ $r= 0,9994$							

Tablo-4. CBZ-E'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları

	1	2	3	4	Ortalama ± SD
m	1,14	1,14	1,25	1,31	$1,21 \pm 0,08$
b	0,04	0,05	0,01	0,01	$0,03 \pm 0,02$
r	0,9990	0,9990	0,9995	0,9995	$0,9993 \pm 0,0003$



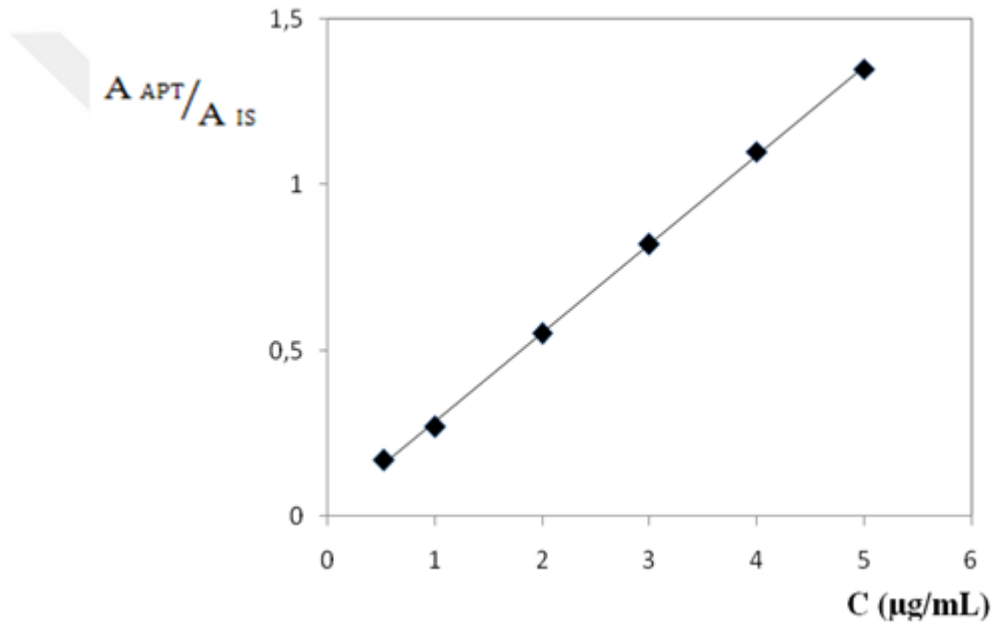
Şekil-12. CBZ'nin 0,28 - 5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo-5. CBZ'nin 0,28 - 5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{CBZ} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler

$\frac{A_{CBZ}}{A_{IS}}$ \ C (µg/mL)	0,28	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
1	0,30	0,47	0,94	1,83	2,79	3,90	4,72
2	0,30	0,46	0,94	1,87	2,90	3,86	4,77
3	0,29	0,44	0,90	1,82	2,85	3,75	4,50
4	0,30	0,39	0,82	1,69	2,51	3,46	4,18
Ortalama	0,30	0,44	0,90	1,80	2,76	3,74	4,54
SD	0,01	0,04	0,06	0,08	0,17	0,20	0,27
RSD (%)	1,68	8,09	6,29	4,33	6,31	5,31	5,91
A_{CBZ} / A_{IS} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y = 0,92x + 0,003$ $r = 0,9995$							

Tablo-6. CBZ' nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları

	1	2	3	4	Ortalama $\pm$ SD
m	0,95	0,96	0,92	0,84	$0,92 \pm 0,05$
b	-0,01	-0,004	0,01	0,01	$0,002 \pm 0,01$
r	0,9990	0,9995	0,9990	0,9995	$0,9993 \pm 0,0003$



Şekil-13. APT' nin 0,52-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo-7. APT'nin 0,52-5,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait A_{APT} / A_{IS} değerleri ve istatistik veriler

A_{APT} / A_{IS} \ C (µg/mL)	0,52	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
1	0,16	0,26	0,52	0,79	1,03	1,31
2	0,17	0,26	0,52	0,77	1,04	1,26
3	0,17	0,27	0,58	0,87	1,15	1,42
4	0,17	0,27	0,57	0,86	1,16	1,41
Ortalama	0,17	0,27	0,55	0,82	1,10	1,35
SD	0,01	0,01	0,03	0,05	0,07	0,08
RSD (%)	2,99	2,18	5,85	6,07	6,35	5,77
A_{APT} / A_{IS} oranı değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y = 0,27 x + 0,02$ $r = 0,9995$						

Tablo-8. APT'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları

	1	2	3	4	Ortalama ± SD
m	0,26	0,25	0,28	0,28	$0,27 \pm 0,02$
b	0,01	0,03	0,01	0,01	$0,02 \pm 0,01$
r	0,9995	0,9995	0,9996	0,9995	$0,9995 \pm 0,0001$

4.2.3. Tayin Edilebilme Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bölüm 3.5.3.'de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri CBZ-E, CBZ ve APT için sırasıyla 50,0 ng/mL, 33,0 ng/mL ve 110,0 ng/mL olarak, LOQ değerleri ise CBZ-E, CBZ ve APT için sırasıyla 165,0 ng/mL, 109,0 ng/mL ve 370,0 ng/mL olarak bulunmuştur.

4.2.4. Kesinlik (Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik)

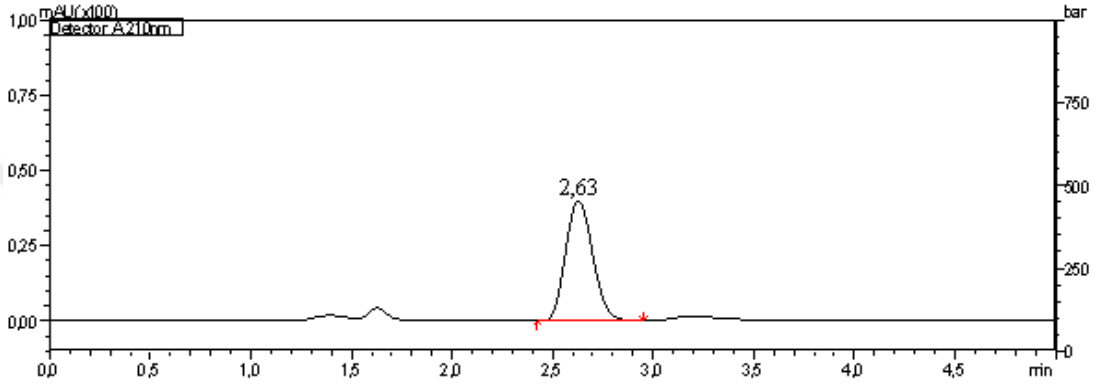
CBZ-E, CBZ ve APT için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler ile Bölüm 3.5.4.'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Bu çözeltilerin gün içi ve farklı günlerde yapılan analizlerinin ölçü eğrilerinden bulunan sonuçları Tablo-9' da verilmiştir.

Tablo-9. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

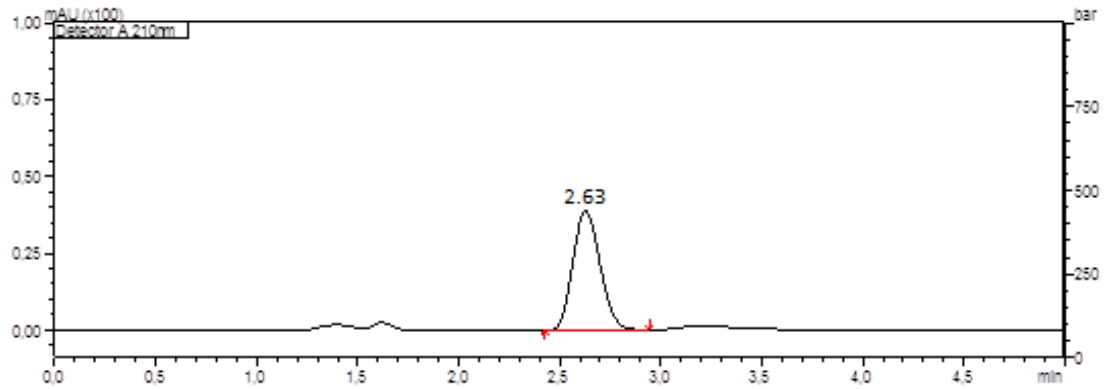
	Gün içi			Günler arası		
	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%) (n=3)	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	RSD (%) (n=3)
CBZ-E	0,25	0,25	2,77	0,25	0,29	5,33
	1,50	1,43	0,50	1,50	1,41	1,07
	4,50	4,34	0,16	4,50	4,34	0,16
CBZ	0,35	0,35	0,62	0,35	0,35	0,68
	1,50	1,56	0,02	1,50	1,58	1,32
	4,50	4,57	0,19	4,50	4,63	0,84
APT	0,90	0,84	0,27	0,90	0,86	2,30
	2,50	2,42	0,10	2,50	2,50	2,38
	4,50	4,53	0,06	4,50	4,61	1,20

4.2.5. İlaç Etkin Madde Çözeltilerinin Farklı Saklama Koşullarındaki Kararlılıkları

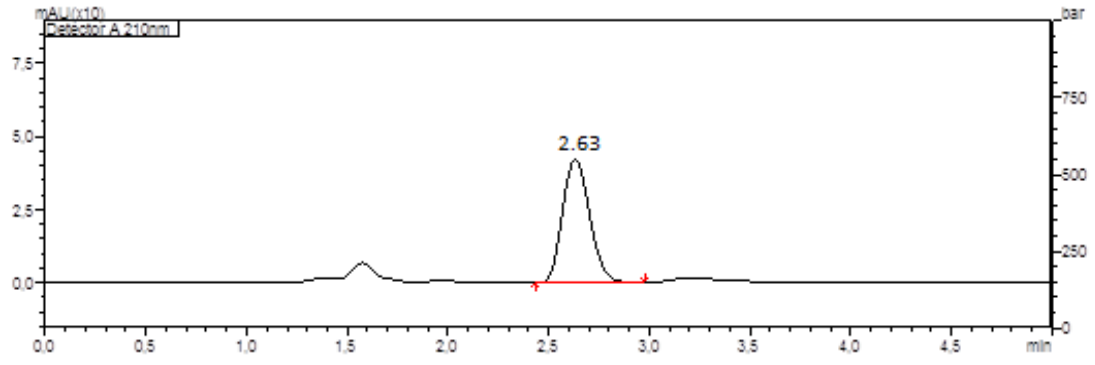
Çözelti kararlılığının saptanması amacıyla, C8 (100 mm x 4,6 mm, 3 μ m) HPLC kolonu, asetonitril/su (pH=4, orto-fosforik asit çözeltisi ile), 55/45, h/h hareketli fazı ve 0,8 mL/dak. akış hızı kullanılarak Bölüm 3.5.5’ de anlatıldığı gibi çalışıldı. İlgili kromatogramlar Şekil- 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ve Tablo-10’da verilmiştir.



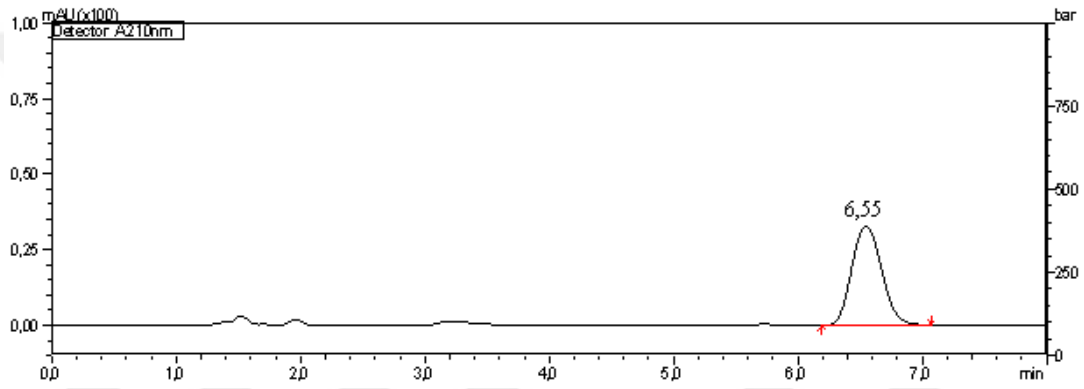
Şekil-14. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı



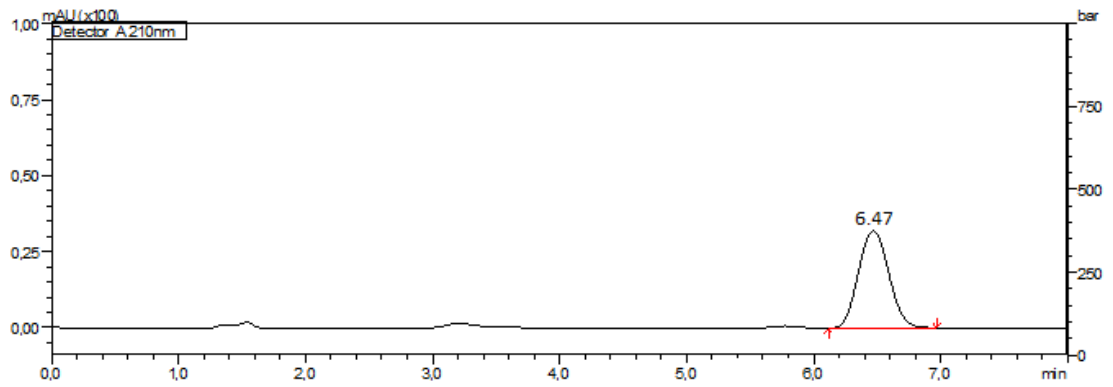
Şekil-15. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı



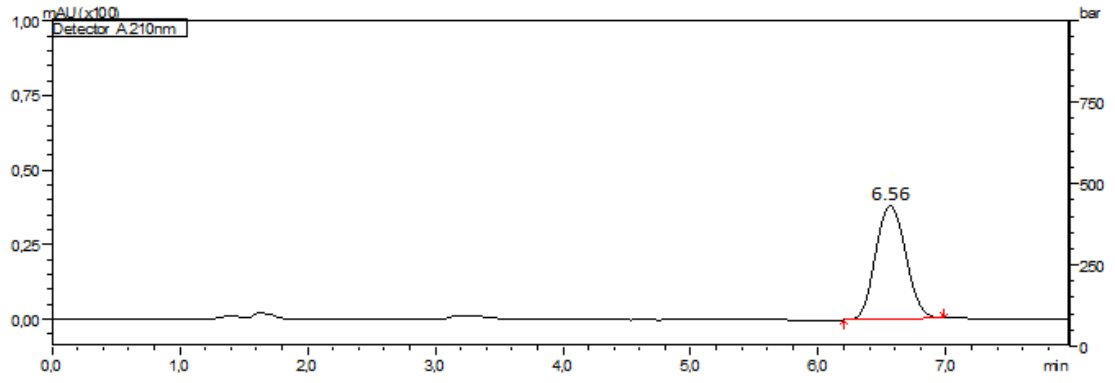
Şekil-16. 2,00 µg/mL CBZ çözeltisinin +4°C’de 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı



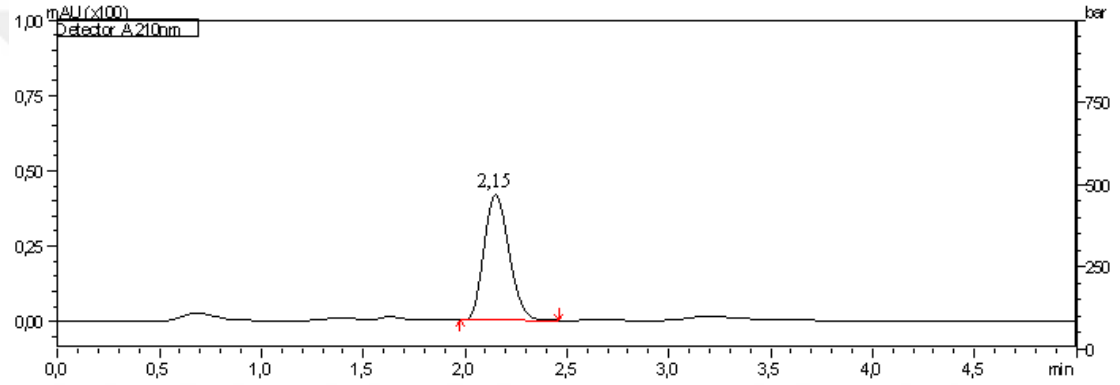
Şekil-17. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı



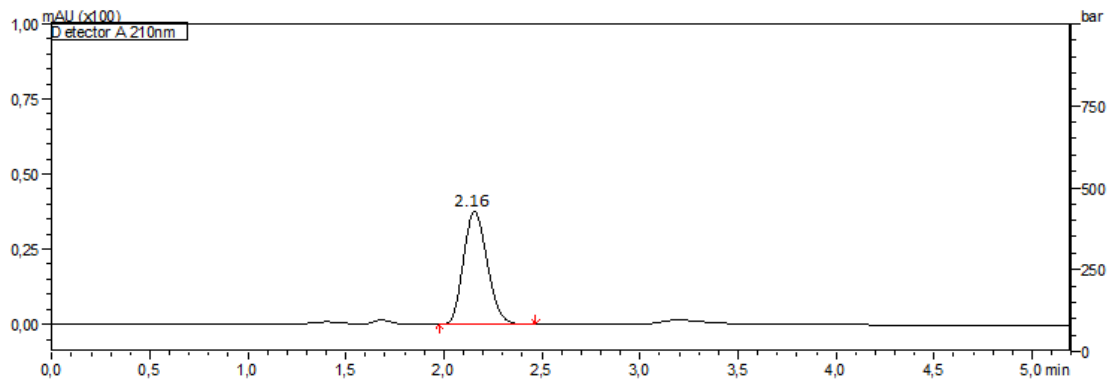
Şekil-18. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı



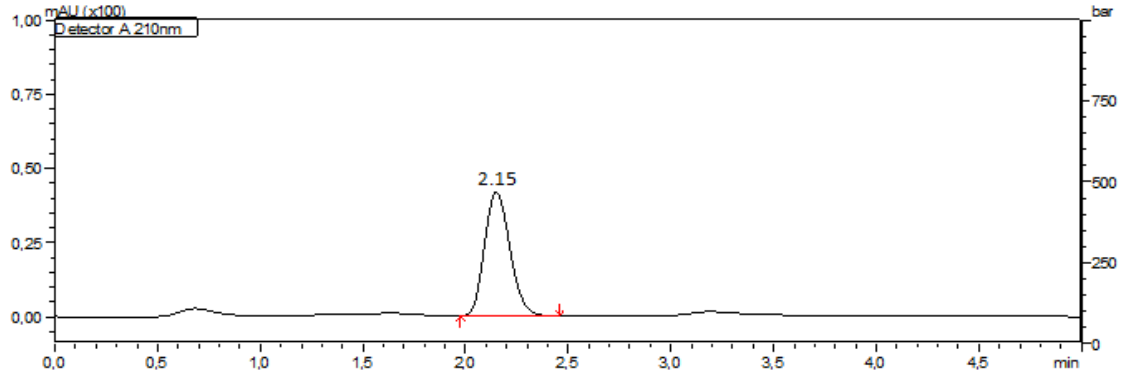
Şekil-19. 10,00 µg/mL APT çözeltisinin +4°C’de, 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı



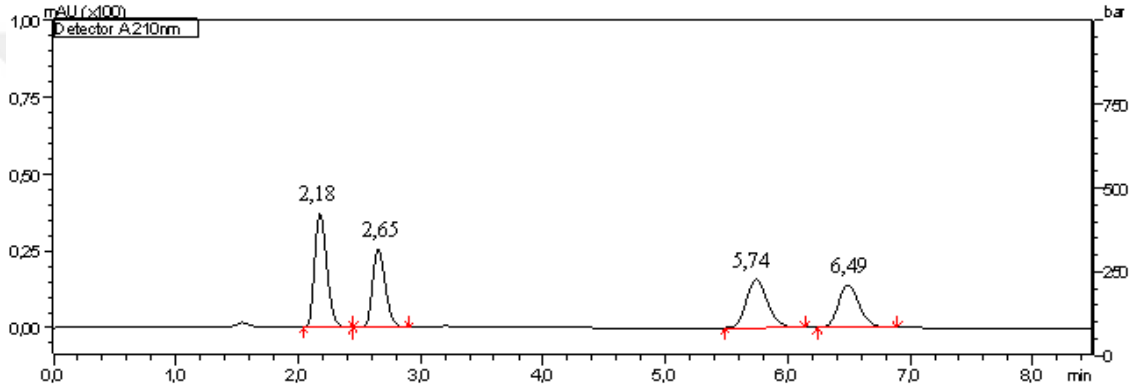
Şekil-20. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı



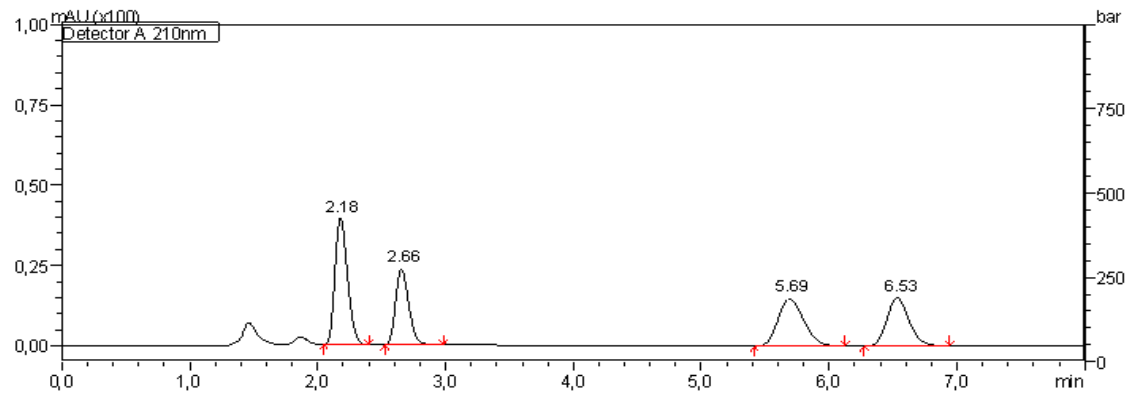
Şekil-21. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin oda sıcaklığında, karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı



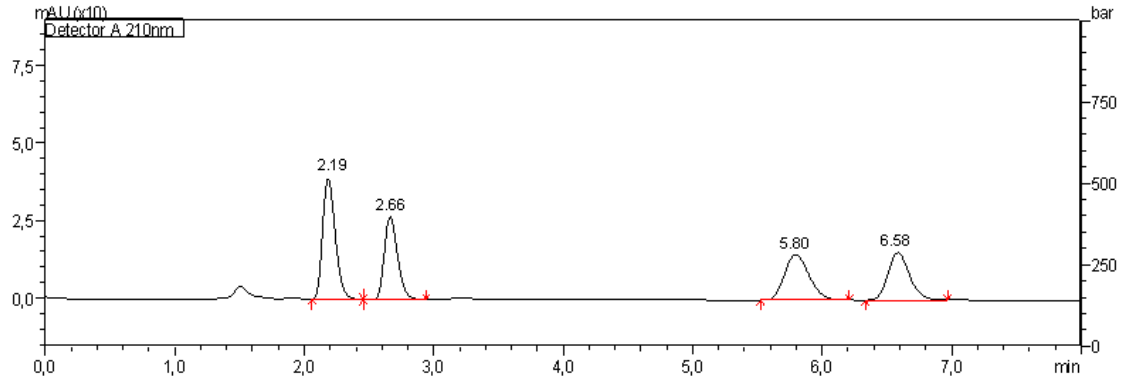
Şekil-22. 1,00 µg/mL CBZ-E çözeltisinin -20°C’de 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı



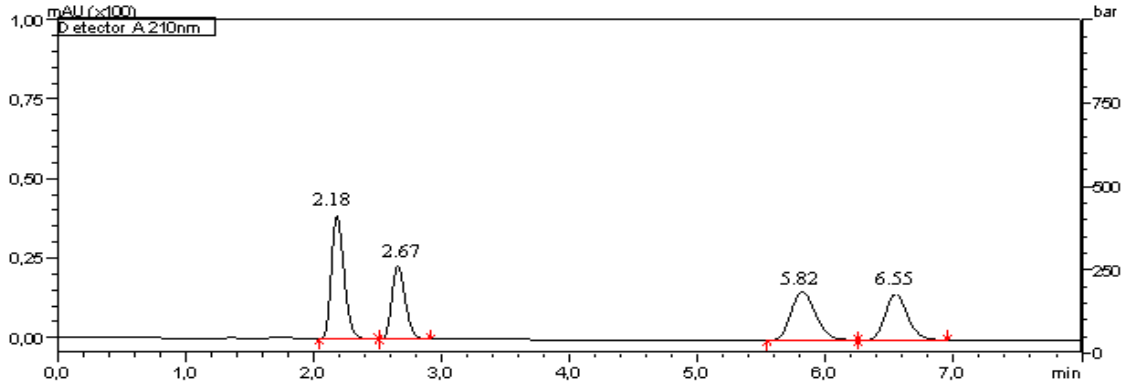
Şekil-23. 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL aseklofenak (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının hazırlandıktan hemen sonra alınan kromatogramı



Şekil-24. 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL aseklofenak (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının oda sıcaklığında karanlıkta, 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı



Şekil-25. 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL aseklofenak (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının -20°C’de 1 ay bekletildikten sonra alınan kromatogramı



Şekil-26. 0,8 µg/mL CBZ-E (I), 1,0 µg/mL CBZ (II), 1,5 µg/mL aseklofenak (III), 3,0 µg/mL APT (IV) içeren çözelti karışımının otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletildikten sonra alınan kromatogramı

Tablo-10. Farklı saklama koşullarında bekletilen CBZ-E, CBZ ve APT çözeltilerine ait kararlılık sonuçları

Uygulama	Geri Kazanım (%) (n= 3, $X_{ort} \pm SD$)			RSD (%)		
	CBZ-E	CBZ	APT	CBZ-E	CBZ	APT
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletme	95,4 ± 0,38	99,7 ± 0,68	97,3 ± 0,20	0,40	0,68	0,21
+4°C de 1 ay bekletme	–	96,6 ± 0,23	99,6 ± 0,87	–	0,24	0,87
-20°C de 1 ay bekletme	103,8 ± 0,61	–	–	0,59	–	–

4.2.6. Doğruluk (Geri kazanım)

Bölüm 3.5.6.'da anlatıldığı gibi çalışılan üç maddeye ait ölçü eğrisinden bulunan değerler ve geri kazanım yüzdeleri Tablo-11' de verilmiştir.

Tablo-11. CBZ-E, CBZ ve APT'nin doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları

	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	SD (n=3)	Geri Kazanım (%) (ortalama ±SD)
CBZ-E	0,25	0,26	0,01	103,0 ± 2,31
	0,80	0,77	0,01	96,3 ± 1,25
	4,50	4,35	0,03	96,1 ± 0,56
CBZ	0,35	0,34	0,01	96,2 ± 1,62
	1,50	1,55	0,02	101,8 ± 1,36
	4,50	4,58	0,04	101,2 ± 0,87
APT	0,70	0,71	0,01	100,0 ± 1,4
	2,50	2,39	0,03	96,5 ± 1,01
	4,50	4,55	0,02	100,7 ± 0,35

4.2.7. Yöntemin Sağlamlığı

Hareketli faz pH' sinde, hareketli faz bileşenlerinin oranlarında, kolon sıcaklığında ve akış hızında yapılan küçük değişiklikler sonucunda elde edilen alıkonma zamanlarındaki değişimler Tablo-12' de verilmiştir.

Tablo-12. Yöntemin sağlamlık parametreleri

pH	t _R (CBZ-E) (dak.)	t _R (CBZ) (dak.)	t _R (APT) (dak.)
3,5	2,17	2,65	6,33
3,8	2,19	2,67	6,46
4,2	2,19	2,66	6,47
4,5	2,17	2,65	6,44
Kolon Sıcaklığı (°C)			
20	2,18	2,66	6,62
30	2,18	2,65	6,61
40	2,16	2,62	6,56
Hareketli Faz			
asetonitril / su (pH=4), (56/44, h/h)	2,15	2,60	6,01
asetonitril / su (pH=4), (54/46, h/h)	2,21	2,72	7,03
Akış hızı (mL/dak)			
0,75	2,32	2,82	6,84
0,85	2,05	2,50	6,10

4.2.8. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi için önemli parametreler olan alıkonma zamanı (t_R), kuyruklanma faktörü (T), ayrılma faktörü (R_S) ve teorik plaka sayısı (N) değerleri Tablo-13’ de verilmiştir.

Tablo-13. Sistem uygunluk testi parametreleri

	Teorik Değerler	CBZ-E	CBZ	IS	APT
Alıkonma Zamanı (t_R) (dak)	-	2,18	2,66	5,81	6,53
Teorik Plaka Sayısı (N)	> 2000	2002	2776	5226	7097
Kuyruklanma Faktörü (T)	≤ 2	1,28	1,26	1,17	1,20
Ayrılma Faktörü (R_S)	$\geq 1,5$	-	2,43	12,31	2,11

4.3. İlaç Formülasyonları Karışımından Aprepitant ve Karbamazapin Analizi

200 mg CBZ ve 80 mg APT içeren ilaç formülasyonlarından elde edilen toz karışım ile Bölüm 3.6.’ da anlatıldığı gibi çalışıldı. Geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek hesaplanan ilaçlar içindeki etkin madde miktarları ve geri kazanım sonuçları Tablo-14’de görülmektedir.

Tablo-14. 200,0 mg CBZ, 80,0 mg APT içeren ilaç formülasyonları karışımının geliştirilen HPLC yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları

	CBZ ^a (mg) (n=3)	APT ^b (mg) (n=3)
1	193,4	77,6
2	194,2	76,0
3	203,0	80,2
X _{ort}	196,9	77,9
Geri Kazanım (%)	98,4	97,4
SD	5,32	2,12
RSD	2,71	2,72

a = Karazepin (Her tablet 200,0 mg karbamazapin içerir)

b = Emend (Her kapsül 80,0 mg aprepitant içerir)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), doğruluğunun ve kesinliğinin yeterli olması ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanları sayesinde bir arada benzer yapıları etkin maddelerin analizlerinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Ters faz sıvı kromatografik bir çalışmada ayırma gücünü etkileyen temel faktörler, hareketli faz bileşenlerinin tipi, oranı, pH değeri ve sabit faz olarak kullanılan kolonun niteliğidir.

İlaç analizi, ilaç takibi ve kalite güvencesi için önemli bir cihaz olan HPLC ilaç sektöründe AR-GE ve kalite kontrol aşamalarında yapılan safsızlık analizleri, ağır metal, etkin madde, organik solvent ve kalıntı solvent miktar tayini, temizlik validasyonu, çözünürlük çalışmaları, stabilite testleri, stereoizomer gibi ilaç analizleri testlerinde önemli bir yer tutar.

Bu çalışmada APT, CBZ ve CBZ-E isimli ilaç etkin maddelerinin eş zamanlı analizleri için seçici, duyarlı, hızlı ve basit bir ters faz HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu amaçla uygun dalga boyu, kolon, hareketli faz, pH, akış hızı ve iç standart araştırılmış ve her üç madde için de en uygun kromatografik koşulun 210 nm dalga boyu, C₈ (100 mm x 4.6 mm x 3µm) kolon, asetronitril / su (pH=4) (orto-fosforik asit çözeltisi ile) (55/45, h/h) hareketli faz karışımı, 0,8 mL/dak akış hızı olduğu bulunmuştur. Bu şartlarda, alıkonma zamanları CBZ-E için 2,18, CBZ için 2,66, IS için 5,81 ve APT için 6,53 dakika olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntem seçicilik, doğrusalılık, tayin sınırı (LOQ), gözlenebilme sınırı (LOD), doğruluk, tekrarlanabilirlik, çözelti kararlılığı, yöntemin sağlamlığı ve uygunluk testi parametreleri incelenerek valide edilmiştir. Çalışma sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı APT için 0,52-5,00 µg/mL, CBZ için 0,28-5,00 µg/mL ve CBZ-E için 0,18-5,00 µg/mL, LOD değerleri CBZ-E, CBZ ve APT için sırasıyla 50,0 ng/mL, 33,0 ng/mL, 110,0 µg/mL ve LOQ değerleri ise sırasıyla 165,0 ng/mL, 109,0 ng/mL, 370,0 ng/mL, doğruluk çalışması sonuçları ise (düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar için % geri kazanım aralıkları) APT, CBZ, CBZ-E için

sırasıyla 96,5- 100,7, 96,2-101,8, 96,1-103,0 olarak bulunmuştur. Etkin madde çözeltilerinin her birinin stabilite çalışması sonucunda, APT ve CBZ stok çözeltilerinin + 4°C’de, CBZ-E çözeltisinin ise - 20 °C’ de en az 1 ay saklanabileceği saptanmıştır. Ayrıca geliştirilen metot karbamazapin ve aprepitantın ilaç formülasyonlarına da uygulanmış ve geri kazanım yüzdeleri APT için % 97,4 ± 2,12 ve CBZ için % 98,4 ± 5,32 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen ve valide edilen, seçici, duyarlı ve oldukça basit olan bu metot, “Subakut Sklerozan Panensefalit (SSPE) Hastalarında Aprepitantın Güvenlilik ve Etkinliğini İnceleyen Faz II Randomize, Plasebo-Kontrollü, Klinik Çalışma” başlıklı projeye dahil olan hastaların rutinde kullandıkları karbamazapin ve proje sürecinde kullanacakları aprepitantın plazma içindeki eş zamanlı tayinlerine de uyarlanabilecek bir metottur ve ayrıca karbamazapin ve aprepitantın ilaç formülasyonlarından analizlerinde de güvenle kullanılabilir. Geliştirilen HPLC metodunun optimize edilmiş koşulları Tablo-15’ de gösterilmektedir.

Tablo-15. Geliştirilen HPLC metodunun optimize koşulları

Parametreler	Optimize Koşullar
HPLC Sistemi	Shimadzu - 2020
Dalga boyu	210 nm
Dedektör	UV/VIS
Kolon	C ₈ (100 mm x 4,6 mm x 3µm)
Hareketli Faz	Asetonitril / su (pH=4), (55/45, h/h)
Akış Hızı	0,8 mL/dak
Kolon sıcaklığı	25°C
Örnekleyici sıcaklığı	20°C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Ortam sıcaklığı	Oda sıcaklığı
Toplam Analiz Süresi	7 dakika

KAYNAKLAR

Baranowska I, Kowalski B. Using HPLC method with DAD detection for the simultaneous determination of 15 drugs in surface water and wastewater. Polish J. Of Environ. Stud. 2011; 20(1) : 21-28.

Benjamin T, Rajyalakshmi Ch, Rambabu C. Derivative spectrophotometric methods for determination of aprepitant in bulk and pharmaceutical formulation. Der Pharma Chemica. 2013; 5(1) : 156-160.

Chavez-Eng C.M, Constanzer M.L, Matuszewski B.K. Simultaneous determination of aprepitant and two metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004; 3: 1213–1229.

Demirkaya F, Kadioğlu Y. Determination of carbamazepine using RP-HPLC method in pharmaceutical preparations. J. Pharm. Sci. 2005; 30: 78-82.

Djordjevic S, Kilibarda V, Stojanovic T. Determination of carbamazepine in hair samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Med Data Rev. 2009; 1(3) : 11-1.

Đorđević S, Kilibarda V, Stojanović T. Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Vojnosanit Pregl. 2009; 66(5) : 347–352.

Dzodic P, Zivanovic L, Protic A, Ivanovic I, Velickovic-Radovanovic R, Spasic M, Lukic S, Zivanovic S. Development and validation of a solid phase extraction-HPLC method for the determination of carbamazepine and its metabolites, carbamazepine epoxide and carbamazepine trans-diol, in plasma. J. Serb. Chem. Soc. 2012; 77 (10) : 1423–1436.

Ezzeldin E, Shahat A.A, Basudan O.A. Development and validation of an HPLC method for the determination of carbamazepine in human plasma. Life Science Journal. 201 ; 10(4) : 2159-2163.

Ferreira A, Rodrigues M, Falcão A, Alves G. HPLC–DAD method for the quantification of carbamazepine, oxcarbazepine and their active metabolites in HepaRG Cell culture samples. Chromatographia. 2016; s:1-10.

Fulga I, Prodan I.C, Perju-Dumbrava D, Chitescu C.L, Tutunaru D, Georgescu C, Debita M, Ardeleanu V, Padure A. Analysis of carbamazepine levels in postmortem blood and tissues by high-performance liquid chromatography. Analele Universitatii “Dunarea de jos” Galati Medicina Fascicula. 2013 ; 17(1) : 17-21.

Gineys M, Kirner T, Cohaut N, Béguin F and Delpoux-Ouldriane S. Simultaneous determination of pharmaceutical and pesticides compounds by reversed phase high pressure liquid chromatography. J Chromatography Sep Tech. 2015 ; 6(7) : 1-6.

Gralla RJ, de Wit R, Herrstedt J, Carides AD, Ianus J. Antiemetic efficacy of the neurokinin-1 antagonist, aprepitant, plus a 5HT₃ antagonist and a corticosteroid in patients receiving anthracyclines or cyclophosphamide in addition to high-dose cisplatin: analysis of combined data from two Phase III randomized clinical trials. Cancer. 2005 ; 104(4) : 865.

Gupta M, Kohli K, Kumar D, Gupta Y.K. A reverse phase high performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of melatonin, carbamazepine epoxide and carbamazepine simultaneously in serum. Indian J Physiol Pharmacol. 2006; 50(4) : 427-430.

Gurke R, Rossmann J, Schubert S, Sandmann T, Rößler M, Oertel R, Fauler J. Development of a SPE-HPLC–MS/MS method for the determination of most

- prescribed pharmaceuticals and related metabolites in urban sewage samples. *Journal of Chromatography B*. 2015; 990: 23-30.
- Hesketh PJ. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med*. 200 ; 358: 2482-2487.
- Hu L, Liu Y, Cheng S. Simultaneous determination of six analytes by hplc-uv for high throughput analysis in permeability assessment. *Journal of Chromatographic Science*. 2011; 49.
- Jayanna B.K, Devaraj T.D, Gowda N. A facile spectrophotometric method for the determination of carbamazepine in tablets. *Indian Journal of Drugs*. 2014; 2(3) : 132-135.
- Jun MA, Peng-Ling ZHU. Restricted-access media high pressure liquid chromatography vs fluorescence polarization immunoassay for analysis of carbamazepine in human plasma. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(1) : 87-91.
- Kratz J.M, Teixeira M.R, Koester L.S, Simões C.M.O. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* . 2011; 44: 531-537.
- Krishna Chaitanya K, Gowri Sankar D, Samson Israel D, Narasimha Kumar Ch. Validated RP-HPLC method for the quantification of aprepitant in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Der Pharma Chemica*. 2013; 5 (1) : 39-46.
- Kumar V.K, Raju N.A, Begum S, Rao JVLN S, Satyanarayana T. The estimation of aprepitant in capsules dosage forms by RP-HPLC. *Research J. Pharm. and Tech*. 2009; 2 (2) : 412-414.
- Mandrioli R, Albani F, Casamenti G, Sabbioni C, Raggi MA. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of

its metabolites in plasma of epileptic patients. *J. Chromatography B*. 2001; 76 : 109.

McMillin G.A, Juenke J.M, Gertie T, Dasgupta A. Estimation of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide concentrations in plasma using mathematical equations generated with two carbamazepine immunoassays. *Am J Clin Pathol* 2010; 133 : 728-736.

Mohamed A.H, Wada M, Ikeda R, Kawakami S, Nakashima K. Validation of an LC-MS/MS method for the determination of propofol, midazolam, and carbamazepine in rat plasma: Application to monitor their concentrations following co-administration. *Biol. Pharm. Bull.* 2015; 38(8) : 1250–1253.

Mowafy H.A, Alanazi F.K, El Maghraby G.M. Development and validation of an HPLC–UV method for the quantification of carbamazepine in rabbit plasma. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012; 20: 29–34.

Nama S, Chandu B. R, Awen B. Z, Khagga M. Development and validation of a new RP-HPLC method for the determination of aprepitant in solid dosage forms. *Trop J Pharm Res*. August 2011; 10 (4) : 491-497.

Onur Ö, Güneysel Ö, Erdede M, Denizbaşı A. *Türk Aile Hek Derg*. 2008; 12(2): 104.

Patil S.R, Kumar L, Kohli G, Bansal A.K. Validated HPLC method for concurrent determination of antipyrine, carbamazepine, furosemide and phenytoin and its application in assessment of drug permeability through caco-2 cell monolayers. *Sci Pharm*. 2012; 80: 89–100.

Patil K.M, Bodhankar S.L. Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 39(1-2) : 181-186.

- Rashmin B, Mrunali R, Kashyap K, Bharat G. Development and validation of HPTLC method for estimation of carbamazepine in formulations and its in vitro release study. *Chromatography Research International*. 2011: 1-8.
- Ravi Prakash PVDLS, Sumadhuri B, Srikanth M. Determination of aprepitant in human plasma by using LC-MS/MS with electrospray ionization. *J Bioequiv Availab*. 2013; 5 : 2.
- Renkoğlu P, Çelebier M, Arica-Yegin B. HPLC determination of olanzapine and carbamazepine in their nicotinamide cocrystals and investigation of the dissolution profiles of cocrystal tablet formulations. *Pharm Development and Technology*. 2015 ; 20(3) : 380-384.
- Sadu M, Yarkala S, Kumar V. Navalgund S.G. Estimation of carbamazepine with different forms of cyclodextrins in pharmaceutical preparation by RP-HPLC. *J. Sci. Res. Pharm*. 2012 ; 1(1) : 10-12.
- Sanches C, Karin V.L, Celia E.O, Maria A.B, Maria D.P. Micromethod for quantification of carbamazepine, phenobarbital and phenytoin in human plasma by HPLC-UV detection for therapeutic drug monitoring application. *Lat. Am. J. Pharm*. 2008 ; 27 (4) : 485-91.
- Sener E, Korkmaz O.T, Yeniceli D, Dogrukol-Ak D, Tuncel M, Tuncel N. Determination of carbamazepine and its main metabolite carbamazepine-10,11-epoxide in rat brain microdialysate and blood using ESI-LC-MS (Ion Trap). *Chromatographia Supplement*. 2007 ; 66.
- Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Falcão A. Fast HPLC-UV method for the simultaneous determination of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and phenytoin in mouse plasma, brain and liver tissues. *Journal Chromatography B*. 2013 ; 925 : 1-9.

Sinha S, Parashar V, Pakhale S, Mungase K, Khan M.A, Swamy Reddy, Haque S.K.M, Mehra V. Determination of eight isomers and related substance of aprepitant using normal-phase and reverse-phase HPLC methods with mass spectrophotometric detection. *Pharmaceutical Methods*. 2013; 4 : 33-42.

Sultana N, Arayne M.S, Ali S.N. Ultra sensitive liquid chromatographic method for the simultaneous determination of carbamazepine with nsaid in API, pharmaceutical formulation and human serum by programming the detector: Application to in vitro drug interaction. *J Chromat Separation Technique* 2012 ; 3 : 8.

Sultana N, Arayne M.S, Ali S.N. An ultra-sensitive LC Method for the simultaneous determination of paracetamol, carbamazepine, losartan and ciprofloxacin in bulk drug, pharmaceutical formulation and human serum by programming the detector. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2013 ; 4 : 24-33.

Tambe H.J, Mulgund S.V. UV Spectrophotometric estimation of carbamazepine in bulk and tablet dosage form using area under curve method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015 ; 4(5) : 1200-1206.

Thejaswini J.C, Gurupadayya B. RP-HPLC method development and validation for simultaneous determination of amitriptyline, carbamazepine and flunarizine in human plasma using mitrazapin as internal standard. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2014 ; 4 (8) : 3597-3602.

Tonic-Ribarska J, Sterjev Z, Cvetkovska E, Kuzmanovski I, Kiteva G, Suturkova L, Trajkovic-Jolevska S. Optimization and validation of bioanalytical SPE-HPLC method for the simultaneous determination of carbamazepine and its main metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in plasma. *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 2011 ; 57(1, 2) : 53 – 61.

- Ul Haq K, Kumar N. Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative analysis of oxcarbazepine and its metabolite 10-hydroxycarbazepine in K₂ edta plasma. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014 ; 6(2) : 422-429.
- Ulu S.T. Determination of carbamazepine in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatography and derivative spectrophotometry. *Turkish J. Pharm. Sct*. 2006 ; 3(3) : 123-139.
- Van Rooyen G.F, Badenhorst D, Swart K.J, Hundt H.K.L, Scanes T, Hundt A.F. Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionisation. *Journal of Chromatography B*. 2002 ; 769(1) : 1–7.
- Vosough M, Ghafghazi S, Sabetkasaei M. Chemometrics enhanced HPLC–DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples. *Talanta*. 2014 ; 119 : 17–23.
- Xu Q. A, Madden T.L. Analytical methods for therapeutic drug monitoring and toxicology. 2011, s: 76.
- Zhou Z, Jiang J.-Q. Simultaneous detection of sulfamethoxazole, diclofenac, carbamazepine and bezafibrate by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2014 ; 81(2) : 278-282.

EKLER

Bilimsel faaliyetler

H.Sebnem Koca, Filiz Arıöz Özdemir. A New Rapid High Performance Liquid Chromatography Method for Seperation of Carbamazepine, Carbamazepine 10,11-Epoxide and Aprepitant. 3rd International BAU Drug Design Congress, 2 October 2015, İstanbul.



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hatice Şebnem	Soyadı	Koca
Doğum Yeri	Beşiktaş	Doğum Tarihi	16.04.1987
Uyruğu	TC	Tel	0530 842 22 90
E-mail	hsebnem.koca@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2011
Lise	Beylerbeyi Hacı Sabancı Lisesi	2004

İş Deneyimi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Arge Analisti	Osel İlaç	2016-
Bursiyer	Tübitak 1003 İlaç Geliştirme Projesi	2014-2016
Laboratuvar Analisti	Mahalo Silikon	2011-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80.478	76.914	62.383

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	İyi

Bilgisayar Bilgisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.