

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**LEVODOPA, KARBİDOPA, ENTAKAPON VE İLGİLİ
BİLEŞİKLERİNİN ANALİZLERİ**

RIFAT EMRE BURMAOĞLU

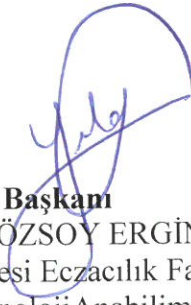
**DANIŞMAN
PROF.DR.SERAP SAĞLIK ASLAN**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

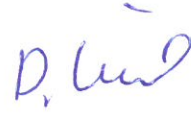
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora öğrencisi Fıfat Emre Burmaoğlu tarafından Prof Dr Serap SAĞLIK ASLAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Levodopa, Karbidopa, Entakapon ve ilgili bileşiklerinin analizleri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 26/07/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı

Prof Dr Yıldız ÖZSOY ERGİNER
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı


Jüri-Danışman

Prof Dr Serap SAĞLIK ASLAN
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı


Jüri

Prof Dr Durişehvar ÖZER ÜNAL
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı


Jüri

Doç Dr Gülcemal YILDIZ
İTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü


Jüri

Doç Dr Fikriye TÜNCCEL ELMALI
YTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

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.

Rıfat Emre Burmaoğlu (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen Tez Danışmanım Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a, bilgisi ve yönlendirmeleriyle çalışmalara ışık tutan Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal'a, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmalar süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığım Deva İlaç Sanayi A.Ş. ye ve yardımını esirgemeyen değerli Ar-Ge personeline sonsuz teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parkinson Hastalığı ve Tedavisi.....	3
2.1.1. Parkinson hastalığı	3
2.1.2. Tedavi.....	3
2.2. Klinik Farmakolojisi	5
2.2.1. Etki mekanizması.....	5
2.2.1.1. Levodopa.....	5
2.2.1.2. Karbidopa.....	6
2.2.1.3. Entakapon.....	6
2.2.2. Farmakokinetiği	7
2.2.3. Metabolizasyon ve eliminasyonu.....	8
2.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler	9
2.3.1. Etkin maddeler	9
2.3.1.1. Levodopa.....	9
2.3.1.2. Karbidopa.....	11
2.3.1.3. Entakapon.....	12
2.3.2. Safsızlıklar	14
2.3.2.1. Levodopa Safsızlıkları	14
2.3.2.2. Karbidopa safsızlıkları	15

2.3.2.3. Entakaponun safsızlıkları	16
2.4. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler	17
2.4.1. HPLC Yöntemleri	17
2.4.2. HPLC-Kütle Spektroskopi Yöntemleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	26
3.2. Çözeltiler	26
3.2.1. Hareketli Fazlar	26
3.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Entakapon Miktar Tayini Analizi İçin Hazırlanan Çözeltiler	27
3.2.3. Safsızlıkların Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler	28
3.3. Aletler ve Diğer Gereçler	29
3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	31
3.4.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları	31
3.4.1.1. Hareketli Faz ve Çözücü Sisteminin Geliştirilmesi	31
3.4.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi	33
3.4.2. HPLC Kolonu Seçimi	34
3.4.3. HPLC Gradyent Programının belirlenmesi	35
3.5. Geliştirme Çalışmaları Sonunda Elde Edilen Analitik Yöntem	37
3.5.1. Levodopa, Karbidopa ve entakapon miktar tayini analizi	38
3.5.2. Levodopa, Karbidopa ve entakapon aktif maddelerine ait safsızlıkların miktar tayini analizi	41
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	43
3.6.1. Seçicilik	43
3.6.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	43
3.6.3. Doğrusallık	45
3.6.3.1. Miktar Tayini için doğrusallık	45
3.6.3.2. Safsızlıklar için doğrusallık	46
3.6.4. Doğruluk	48
3.6.4.1. Miktar tayini için doğruluk	48
3.6.4.2. Safsızlıklar için doğruluk	51
3.6.5. Kesinlik	55
3.7. Kıyas Yöntemi ile Analiz	56

4. BULGULAR.....	58
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular	58
4.1.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları.....	58
4.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi bulguları	60
4.1.3. HPLC Kolonu Seçimi	79
4.1.4. HPLC Gradiyen Programının belirlenmesine ait bulgular.....	80
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	84
4.2.1. Seçicilik.....	84
4.2.2. Nitelik ve Nicelik Sınırı (LOD ve LOQ)	84
4.2.3. Doğrusallık.....	85
4.2.3.1. Miktar Tayini için doğrusallık	85
4.2.3.2. Safsızlıklar için doğrusallık.....	89
4.2.4. Doğruluk	95
4.2.4.1. Miktar tayini için doğruluk çalışması sonuçları.....	95
4.2.4.2. Safsızlıklar için doğruluk çalışması bulguları.....	98
4.2.5. Kesinlik	105
4.2.5.1. Miktar Tayini için Kesinlik çalışması sonuçları	105
4.2.5.2. Safsızlıklar Tayini için Kesinlik çalışması sonuçları	105
4.3. Kıyas Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde edilen Bulgular	106
5. TARTIŞMA	111
KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	121

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Farklı yitiliklerdeki Stalevo'ya ait Levodopanin farmakokinetik değerleri (ortalama $\pm$ SD) (19).....	8
Tablo 3-1: Hareketli faz belirleme çalışmalarında kullanılan hareketli faz bileşenleri..	31
Tablo 3-2: Ana İyon Belirlenmesi İçin Kütle Dedektörü Yazılımına Girilen Parametreler	33
Tablo 3-3: Denemelerde Kullanılan HPLC Kolonlarının Sabit Faz zellikleri.....	34
Tablo 3-4: Deneme 1 de uygulanan gradiyent program	35
Tablo 3-5: Deneme 2 de uygulanan gradiyent program	36
Tablo 3-6: Deneme 3 de uygulanan gradiyent program	36
Tablo 3-7: Aktif Maddelerin Miktar tayini MS/MS parametreleri.....	37
Tablo 3-8: Gradiyent Programı.....	38
Tablo 3-9: Aktif Maddelere Ait Safsızlıkların MS/MS parametreleri.....	41
Tablo 3-10: Aktif maddeler doğruluk numuneleri hazırlama tablosu	50
Tablo 3-11: Safsızlıklar için doğruluk numuneleri hazırlama tablosu	54
Tablo 3-12: Kıyas Yöntemi Gradiyen Programı.....	56
Tablo 4-1: Levodopa standart çözeltisinin farklı zc ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS alışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	58
Tablo 4-2: Karbidopa standart çözeltisinin farklı zc ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS alışması sonucunda elde edilen ürün iyonları.	59
Tablo 4-3: Entakapon standart çözeltisinin farklı zc ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS alışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	59
Tablo 4-4: Entakapon standart çözeltisinin farklı zc ve hareketli fazlar ile yapılmış (-) mod PIS alışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	59
Tablo 4-5: Analiz edilen maddelere ait tespit edilen ana iyonlar	60
Tablo 4-6: İlgilenilen maddeler için belirlenen parçalanma iyonları	66
Tablo 4-7: İlgilenilen piklere ait MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri	79
Tablo 4-8: Farklı HPLC kolonları ile elde edilen sistem uygunluk parametreleri	79
Tablo 4-9: Deneme 1 ile elde edilen ayırım faktörleri.....	81
Tablo 4-10: Deneme 2 ile elde edilen ayırım faktörleri.....	82
Tablo 4-11: Deneme 3 ile elde edilen ayırım faktörleri.....	84

Tablo 4-12: İlgilenilen maddelerin nicelik ve nitelik sınırı konsantrasyonları.....	85
Tablo 4-13: Miktar tayini için doğrusallık çalışması değerleri.....	86
Tablo 4-14: Levodopa safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları.....	89
Tablo 4-15: Karbidopa safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları.....	90
Tablo 4-16: Entakapon safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları.....	91
Tablo 4-17: Levodopa doğruluk sonuçları.....	96
Tablo 4-18: Karbidopa doğruluk sonuçları.....	97
Tablo 4-19: Entakapon doğruluk sonuçları	98
Tablo 4-20: Levodopa Safsızlık B doğruluk çalışması sonuçları	99
Tablo 4-21: Levodopa Safsızlık C doğruluk çalışması sonuçları	100
Tablo 4-22: Metildopa doğruluk çalışması sonuçları	101
Tablo 4-23: Metilkarbidopa doğruluk sonuçları	102
Tablo 4-24: Entakapon Safsızlık C doğruluk sonuçları.....	103
Tablo 4-25: Entakapon Safsızlık A doğruluk sonuçları.....	104
Tablo 4-26: Aktif maddeler için kesinlik çalışması sonuçları	105
Tablo 4-27: Safsızlıkların tayini için kesinlik çalışması sonuçları	106
Tablo 4-28: Levodopa için karşılaştırma tablosu	107
Tablo 4-29: Karbidopa için karşılaştırma tablosu.....	108
Tablo 4-30: Entakapon için karşılaştırma tablosu	108
Tablo 4-31: Levodopa safsızlıklarının karşılaştırma sonuçları.....	109
Tablo 4-32: Karbidopa safsızlıklarının karşılaştırma sonuçları.....	109
Tablo 4-33: Entakapon safsızlıklarının karşılaştırma tabloları.....	110

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Levodopa maddesini metabolize eden enzimler, oluşan metabolitler ve bu metabolitlerin inhibe edilmesi için levodopa ile birlikte formüle edilen inhibitörler (19)5	
Şekil 2-2: İnsan beyinde dopaminin sentezlenmesi ve parçalanması (6)	6
Şekil 2-3: Levodopa'nın kimyasal formülü.....	9
Şekil 2-4: Levodopanin FT-IR spektrumu.....	10
Şekil 2-5: Levodopanin 0,2 mg/mL konsantrasyonda % 0,5 formik asit sudaki çözeltisinin UV spektrumu.	10
Şekil 2-6: Karbidopanin kimyasal formülü	11
Şekil 2-7: Karbidopanin FT-IR spektrumu.....	11
Şekil 2-8: Karbidopanin 0,2 mg/mL konsantrasyonda % 0,5 formik asit sudaki çözeltisinin UV spektrumu.	12
Şekil 2-9: Entakaponun kimyasal formülü	12
Şekil 2-10: Entakaponun FT-IR spektrumu.....	13
Şekil 2-11: Entakaponun 0,2 mg/mL konsantrasyonda metanoldeki çözeltisinin UV spektrumu.....	13
Şekil 2-12: Levodopa Safsızlık B kimyasal formülü.....	14
Şekil 2-13: Levodopa Safsızlık C kimyasal formülü.....	14
Şekil 2-14: Metildopanin kimyasal formülü.....	15
Şekil 2-15: Metil karbidopanin kimyasal formülü.....	15
Şekil 2-16: Entakapon Safsızlık A'nın kimyasal formülü	16
Şekil 2-17: Entakapon Safsızlık C'nin kimyasal formülü	16
Şekil 4-1: Levodopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)	61
Şekil 4-2: Karbidopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1 µg/mL)	61
Şekil 4-3: Entakapon standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)	62
Şekil 4-4: Levodopa Safsızlık B standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL).....	62
Şekil 4-5: Levodopa Safsızlık C standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL).....	63

Şekil 4-6: Metildopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (2,5 µg/mL)	63
Şekil 4-7: Metilkarbidopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (2,5 µg/mL)	64
Şekil 4-8: Entakapon Safsızlık A standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (3 µg/mL)	64
Şekil 4-9: Entakapon Safsızlık C standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (3 µg/mL)	65
Şekil 4-10: Levodopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan ürün iyonları PIS spektrumu (4 µg/mL)	67
Şekil 4-11: Levodopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan ürün iyonları PIS spektrumu (4 µg/mL)	67
Şekil 4-12: Karbidopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1 µg/mL)	68
Şekil 4-13: Entakapon için (+) modda 35 V çarpışma enerjisinde PIS spektrumu (4 µg/mL)	68
Şekil 4-14: Entakapon için (-) modda 35 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)	69
Şekil 4-15: Levodopa Safsızlık B için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)	69
Şekil 4-16: Levodopa Safsızlık C için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)	70
Şekil 4-17: Levodopa Safsızlık C için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)	70
Şekil 4-18: Metildopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)	71
Şekil 4-19: Metildopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)	71
Şekil 4-20: Metilkarbidopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)	72
Şekil 4-21: Metilkarbidopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)	72

Şekil 4-22: Entakapon Safsızlık C için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (3 µg/mL).....	73
Şekil 4-23: Entakapon Safsızlık A için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (3 µg/mL).....	73
Şekil 4-24: Levodopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu	74
Şekil 4-25: Karbidopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu	74
Şekil 4-26: Entakapon standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu (negatif mod).....	75
Şekil 4-27: Entakapon standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu (pozitif mod).....	75
Şekil 4-28: Levodopa Safsızlık B standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu.....	76
Şekil 4-29: Metildopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu.....	76
Şekil 4-30: Levodopa safsızlık C standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu	77
Şekil 4-31: Metilkarbidopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu	77
Şekil 4-32: Entakapon Safsızlık C standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu.....	78
Şekil 4-33: Entakapon Safsızlık A standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu.....	78
Şekil 4-34: Deneme 1 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 µg/mL, $C_{\text{entakapon}}$: 200 µg/mL, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 µg/mL, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 µg/mL).	80
Şekil 4-35: Deneme 2 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 µg/mL, $C_{\text{entakapon}}$: 200 µg/mL, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 µg/mL, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 µg/mL).	81
Şekil 4-36: Deneme 3 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 µg/mL, $C_{\text{entakapon}}$: 200 µg/mL, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 µg/mL, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 µg/mL).	82

Şekil 4-37: Deneme 3 ile elde edilen aktif maddelerin MS piklerini gösteren kromatogram (C_{levodopa} : 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 200 $\mu\text{g/mL}$).....	83
Şekil 4-38: Deneme 3 ile elde edilen ve safsızlıkların MS piklerini gösteren kromatogram ($C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$).....	83
Şekil 4-39: Levodopa doğrusallık grafiği	87
Şekil 4-40: Karbidopa doğrusallık grafiği	87
Şekil 4-41: Entekapon doğrusallık grafiği	88
Şekil 4-42: Levodopa Safsızlık B Doğrusallık grafiği.....	92
Şekil 4-43: Levodopa Safsızlık C Doğrusallık grafiği.....	92
Şekil 4-44: Metildopa Doğrusallık grafiği.....	93
Şekil 4-45: Metilkarbidopa Doğrusallık grafiği.....	93
Şekil 4-46:Entakapon Safsızlık C Doğrusallık grafiği	94
Şekil 4-47: Entakapon Safsızlık A Doğrusallık grafiği	94

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PH: Parkinson Hastalığı

EMA: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

LC-MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografisi

MRM: Çoklu Reaksiyon Monitörleme (Multi Reaction Monitoring)

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

LOD: Teşhis sınırı

LOQ: Tayin Sınırı

Rs: Ayrılma Faktörü

RSD: Bağlı Standart Sapma

Rt: Alıkonma Zamanı

s/n: sinyal / gürültü oranı

SD: Standart Sapma

Tf: Kuyruklanma Faktörü

Df: Serbestlik Derecesi

ÖZET

Burmaoğlu, R.E. (2017). Levodopa, karbidopa, entakapon ve ilgili bileşiklerinin analizleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Levodopa, karbidopa, entakapon ve bu aktif maddelere ait safsızlıklar olan levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlık C ve entakapon safsızlık A'nın film kaplı tabletlerde tayini için tandem kütle spektrometrik yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak bir miktar tayini metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Kromatografik ayırma C18 kolon ile hareketli faz olarak % 0,5 formik asit içeren metanol ve % 0,5 formik asit içeren suyun gradiyent elüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,5 ml/dakikadır. UV dedektör dalgaboyu olarak 280 nm, kütle dedektöründe ise MRM modu kullanılmıştır. Safsızlıklara ait teşhis ve tayin sınırları levodopa safsızlık B için 1,3 ve 3,94 ng/mL, levodopa safsızlık C için 5,26 ve 15,9 ng/mL, metildopa için 0,833 ve 2,53 ng/mL, metilkarbidopa için 3,31 ve 10,0 ng/mL, entakapon safsızlık C için 1,67 ve 5,06 ng/mL ve entakapon safsızlık A için 0,61 ve 1,86 ng/mL olarak belirlenmiştir. Levodopa, karbidopa ve entakapon sırasıyla 100-300 ng/mL, 25-75 ng/mL, 100-300 ng/mL kalibrasyon aralığında doğrusallık ve doğruluk parametreleri çalışılmış ve uygun bulunmuştur. Levodopa, karbidopa ve entakapon safsızlıkları için kalibrasyon aralıkları ise sırasıyla 20- 1600 ng/mL, 10-1000 ng/mL, 7,5 -600 ng/mL arasındadır. Aktif maddelere ait safsızlıkların doğruluk çalışmaları tayin sınırı değeri ve sınır değerinin % 150'si seviyeleri arasında yapılmış ve uygun bulunmuştur. Metot hızlı, doğrusal, güvenilir, kesin ve tekrar edilebilir sonuçlar vermektedir. Geliştirilen bu metot farmasötik preparatta bulunan aktif maddeler olan levodopa, karbidopa, entakapone ve bunlara ait olan safsızlıkların tayini için kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca stabilite numunelerinin tayininde de kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Levodopa, Karbidopa, Entakapon, Safsızlık, HPLC, LC-MS/MS

ABSTRACT

Burmaoğlu, R.B. (2017). Analysis of Levodopa, Carbidopa, Entacapone and their related substances. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Doctorate Thesis. İstanbul.

An LC-MS/MS method has been developed and validated to determine levodopa, carbidopa, entacapone and their corresponding related substances; levodopa impurity B, levodopa impurity C, methyldopa, methylcarbidopa, entacapone impurity C and entacapone impurity A in film coated tablets. Chromatographic separation was achieved with gradient elution by using a C 18 column, mobile phase containing 0,5 % formic acid in water and 0,5 % formic acid in methanol. The mobile phase flow rate was 0,5 ml/min. UV detector was used at 280 nm and mass detector was used in MRM mode. LOD and LOQ results were found as 1,3 and 3,94 ng/mL for levodopa impurity B, 5,26 and 15,9 ng/mL for levodopa impurity C, 0,833 and 2,53 ng/mL for methyldopa, 3,31 ve 10,0 ng/mL for methylcarbidopa, 1,67 ve 5,06 ng/mL for entacapone impurity C and 0,61 ve 1,86 ng/mL for entacapone impurity A. Levodopa, carbidopa and entacapone were found linear and accurate within the range of 100-300 ng/mL, 25-75 ng/mL, 100-300 ng/mL respectively. Linearity was studied for the related substances of levodopa, carbidopa and entacapone within the range of 20- 1600 ng/mL, 10-1000 ng/mL, 7,5 -600 ng/mL respectively. Accuracy was studied for the related substances within the range of LOQ value of corresponding impurity and 150 % of the limit value. The method was rapid, linear, accurate, and reproducible. The developed LC-MS/MS method to determine the related substances and assay of levodopa, carbidopa and entacapone can be used to evaluate the quality of regular samples. It can be also used to test the stability samples.

Key Words: Levodopa, Carbidopa, Entacapone, Related substances, HPLC, LC-MS/MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson hastalığı (PH), elli yaş üzeri dünya nüfusunun yaklaşık % 1-2'sini etkileyen yavaş ilerleyici nörodejeneratif (beyin hücrelerinde kayıp ile seyreden) bir beyin hastalığıdır. Coğrafi bölge, cinsiyet gibi belirli bir ayırıcı özelliği yoktur. Hastalık beyinde substantia nigra adlı bölgede bulunan nigrostriyatal dopaminerjik nöron hücrelerin kaybı sonucu kendini gösterir. Oluşum sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte etiolojisinin genetik ve çevresel faktörler olduğu sanılmaktadır (1). Alzheimer hastalığından sonra yaşlı popülasyonunu en çok etkileyen bu hastalığın oluşum sebepleri üzerine yapılan araştırmalar özellikle monogenetik mutasyonların bulunuşundan sonra artış göstermiş olsa da bu araştırmalar oluşum sebeplerinin çok azını açıklayabilmiştir (2).

PH temel olarak kol ve bacak kaslarında katılık, titreme, bradikinezi (hareketlerde yavaşlık), istirahat esnasında uzuvlarda titreme, gastrointestinal problemler ve uyku bozuklukları gibi belirtilerle kendini gösterir. En önemli belirtilerinden biri vücudun bir tarafında kendini göstermesi, diğer bir ifade ile asimetrik bir hastalık olmasıdır (3-5).

Dopaminerjik nöron hücrelerin kaybı sonucu merkezi sinir sisteminde dopamin seviyesinde azalma olur. Çünkü zarar gören bu beyin dokuları dopamin üretiminden sorumludurlar. Azalan dopamin seviyesi motor sistemlerde dengesizliklere ve yukarıda belirtilen PH sendromlarına yol açar (6).

PH tedavisi önce ilaç tedavisi ile başlar, fizik tedavi ve cerrahi müdahale seçenekleri de mevcuttur. İlaç tedavisinin amacı beyindeki dopamin seviyesini artırmak ve böylece motor kontrol yeteneğini iyileştirmek, hastalığın belirti ve semptomlarını azaltmaktır. Günümüz PH tedavisi ağırlıklı olarak en güvenli ve en yaygın yöntem olan dopamin ikamesi üzerine kuruludur. Bu amaç için en yaygın kullanılan ve en iyi tolere edilen ilaç aktif maddesi levodopadır. Levodopa dopamin maddesi için ön ilaştır (7-9). Ancak oral yolla alımını takiben çevresel sinir sistemindeki iki enzim sebebiyle levodopa çok hızlı metabolize olur ve kan-beyin bariyerinin geçebilen levodopa oranı sadece yaklaşık % 1 seviyelerinde kalır. Bu enzimlerden ilki aromatik aminoasit dekarboksilaz (AADC) enzimidir ve levodopayı dopamine metabolize eder. Ancak bu dopamin kan-beyin bariyerini geçemez. Kanda dopamin seviyesinin yüksekliği bulantı

ve ortostatik hipotansiyon gibi yan etkilere yol açar. Diğer enzim olan kateşol-O-metil transferaz (COMT) enzimi ise levodopayı 3-O-metildopaya çevirir. Her iki enzimin inhibe edilerek kan-beyin bariyerini geçen levodopa miktarının artırılmasını sağlamak ve merkezi sinir sistemi içinde dopamin oluşumunu mümkün kılmak için levodopa, günümüzde iki adet inhibitör ile birlikte tedavi amaçlı olarak pazara sunulmaktadır. AADC enzimini inhibe etmek için karbidopa, COMT enzimini inhibe etmek için ise entakapon yaygın olarak kullanılmaktadır (10-11). Novartis firması Stalevo ticari adı ile yukarıda belirtilen 3 maddeyi kombine olarak içeren ilacı çeşitli yitiliklerde hastaların kullanımına sunmuştur.

Doz titrasyonu sonucu kullanılması gereken miktarlar belirlenir ve PH tedavisi yaşam boyu sürer. Günlük olarak belirtilen dozda kullanılması gereken bu ilaca ait miktar tayini ve safsızlıklarının tayini analizlerinin güvenilir ve hassas olarak yapılabilmesi çok önemlidir. Bu tez çalışmasının amacı levodopa, karbidopa ve entakapon aktif maddeleri ve safsızlıklarına ait yeni ve hassas bir LC-MS/MS tayin yöntemi geliştirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı ve Tedavisi

2.1.1. Parkinson hastalığı

Hastalığı ilk kez İngiliz doktor James Parkinson 1817 de tarif etmiş ve bu sebeple tıp dünyasında hastalık onun adı ile anılmıştır (12). Parkinson hastalığı (PH) tüm dünya nüfusunun yaklaşık % 0,3'ünü, 60 yaş üstü nüfusun yaklaşık % 1'ini etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Erkeklerde görülme sıklığı biraz daha fazladır. Oluşum sebebi tam olarak bilinmemektedir (4). Genetik ve çevresel faktörler sonucu beyinde substantia nigra pars compacta (corpus striatum) adlı bölgede hücre hasarı oluşumu sonucu dopamin üretimi azalır yada durur. Genetik faktörler olarak otozomal baskın ve çekinik genler olan α -synuclein, ubiquitin karboksi terminal hidrolaz L1 (UCHL1) ve ubiquitin protein ligase gibi genler sebep gösterilmektedir (1). Çevresel faktörler olarak ise kurşun, civa, kadmiyum gibi ağır metaller, pestisitler, solventler belirtilmektedir (13,14). Mitokondriyel bozukluk, oksitleyici stress gibi sebeplere bağlı olarak protein yığılması beyinde Lewi cisimciğinin oluşmasına yol açar. Bu yığılma, fibröz yapılı proteinlerin sitoplazmik yığılması olarak da adlandırılır. Dopamin üretiminden sorumlu bölgelerin yıkımına bu protein yığılmasının yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan otopsi çalışmaları bu düşüncüyü desteklemektedir.

PH'nin semptomları motor ve non-motor olmak üzere ikiye ayrılır. Hareket becerileri olarak ifade edilen motor semptomlar, asimmetrik olarak bedenin bir tarafında baş ve kolda titreme, istirahat halinde titreme, uzuvlarda katılık hissi, yavaş hareket etme (bradikinezi), yürüme bozukluğu (gait disturbance) olarak sıralanabilir. Non-motor semptomlar ise REM uyku bozuklukları, huzursuzluk, depresyon, gastrointestinal bozukluklar, mesane kontrolü bozuklukları sayılmaktadır. Yaşam kalitesi üzerine her iki tür semptomların çok ciddi olumsuz etkileri vardır (15, 16).

2.1.2. Tedavi

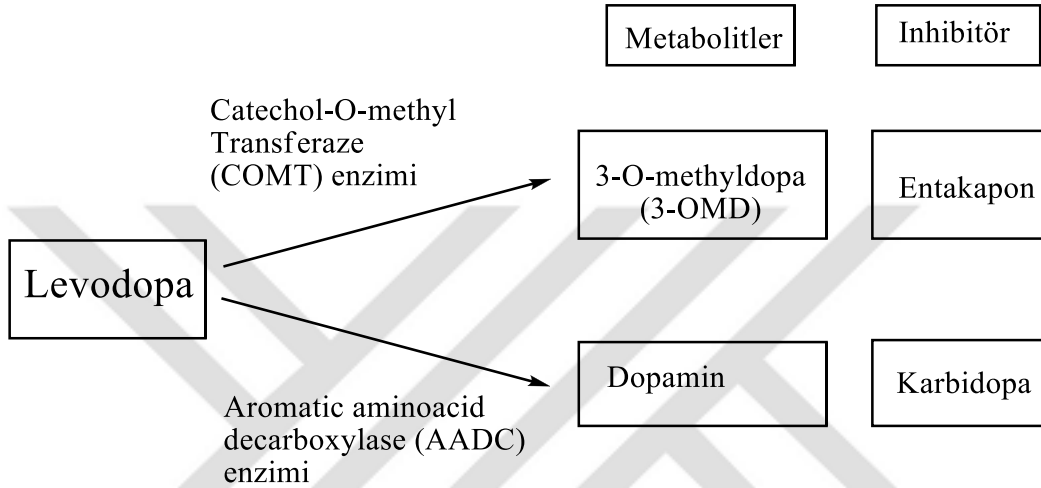
İlk dönemlerde antikolinergikler tedavi amaçlı kullanılmışsa da bu gruba dahil olan atropin ve bir çeşit patates ekstraktı olan belladonna gibi ilaçlar başarılı sonuçlar vermemiştir. Daha sonraları üretilen sentetik antikolinergikler ile titreme ve hareket kısıtlılığı gibi semptomların giderilmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Tedavide dönüm noktası ise levodopanın 1960'larda Parkinson hastalığı (PH) tedavisi için kullanılmaya

başlanmasıdır ve çeşitli klinik çalışmalarla bu tedavinin etkinliği araştırılmaya devam etmiştir. Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından 1970’te tedavi için kullanılmasına izin verilmesinden günümüze levodopa en etkili ve en iyi tolere edilebilen ilaç olarak önemini sürdürmektedir (1, 12, 15).

Yeni PH tanısı konmuş hastalarda eğer hastalık ilk evrelerinde ise levodopa tedavisi ilk seçenek olarak düşünülmez. Önce dopamin agonisti denilen grup tedavi amaçlı kullanılır. Dopamin agonisti ilaçlar levodopanin aksine beyinde dopamine dönüşmezler. Beyin sinir hücrelerindeki reseptörleri uyarak dopaminin yaptığı görevi yerine getirmeye çalışırlar (17). Bu ilaçlar örnek olarak apomorfın, donepezil, ropinirol, bromokriptin, pergolid, pramipeksol ve kabergolin sayılabilir. Bu agonistler levodopa ile kombine olarak kullanılabilirler. Tedavide levodopa kullanımına olabildiğince geç geçilmesi hedeflenir. Bunun sebepleri uzun süreli levodopa tedavisi ile hastalarda “on”-“off” dönemi denilen PH semptomlarının görülmediği ve görüldüğü dönemlerin oluşması ve motor beceri dalgalanmalarının gözlenmesidir (6,15). Ancak dopamin agonisti ilaçlarda psikolojik bozukluklar, bulantı, kusma, ortostatik hipotansiyon, somnolans (uykuya eğilim), uykuda istem dışı hareket ve yorgunluk gibi non-motor yan etkilere yol açabilmektedir (18).

Dopamin kan-beyin bariyerini aşamadığı için dışardan dopamin takviyesinin tedavi edici faydası yoktur. Dopaminin aksine levodopa kan- beyin bariyerini aşabilir. Levodopa dopaminin ön ilacıdır. Ancak levodopa, intravenöz ya da oral yol ile tatbiki sonrasında çevresel sinir sisteminde çok hızlı bir şekilde metabolize olur ve merkezi sinir sistemine sadece % 1 kadarı geçebilir. Bu sebeple levodopa ile PH tedavisinin ilk yıllarında beyine ulaşan levodopa miktarının yeterli olması için 16 grama kadar varan tedaviler uygulanmıştır. Ancak bu doz bile yeterli klinik etkiyi sağlayamamıştır. Bu yüksek doz beraberinde bulantı, kusma ve motor hareketlerde bozukluk, dar açılı glokom gibi yan etkileri getirmiştir. Levodopa çevresel sinir sisteminde kateşol-O-transferaz enzimi (COMT) ve aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi (AADC) sebebiyle hızla, sırası ile 3-O-metildopa (3-OMD) ye ve dopamine metabolize olur. Çevresel sinir sisteminde metabolize olan bu dopamin kan-beyin bariyerini aşamaz ve medulla postrema da bulunan dopamin reseptörlerini harekete geçirerek bulantı, kusma gibi yan etkilere yol açar. Dekarboksilaz inhibitörlerinin kullanılması ile levodopanin metabolize olması kontrol altına alınmıştır. Bu sebeple levodopa-benserazid (Madopar

tablet, Roche) ve levodopa-karbidopa (Sinemet tablet, MSD) gibi kombinasyonların formüle edilmesi ile tedavi iyileştirilmiştir. Günümüzde en etkin tedavi levodopa ve çevresel enzim inhibitörleri olan karbidopa ve entakaponun 3 lü kombinasyonu (Stalevo tablet, Novartis) ile sağlanmaktadır (Şekil 2-1). Tabletlerde karbidopanin levodopaya oranı 1:4 tür. Entakapon tüm yitiliklerde 200 mg olarak bulunmaktadır (19).



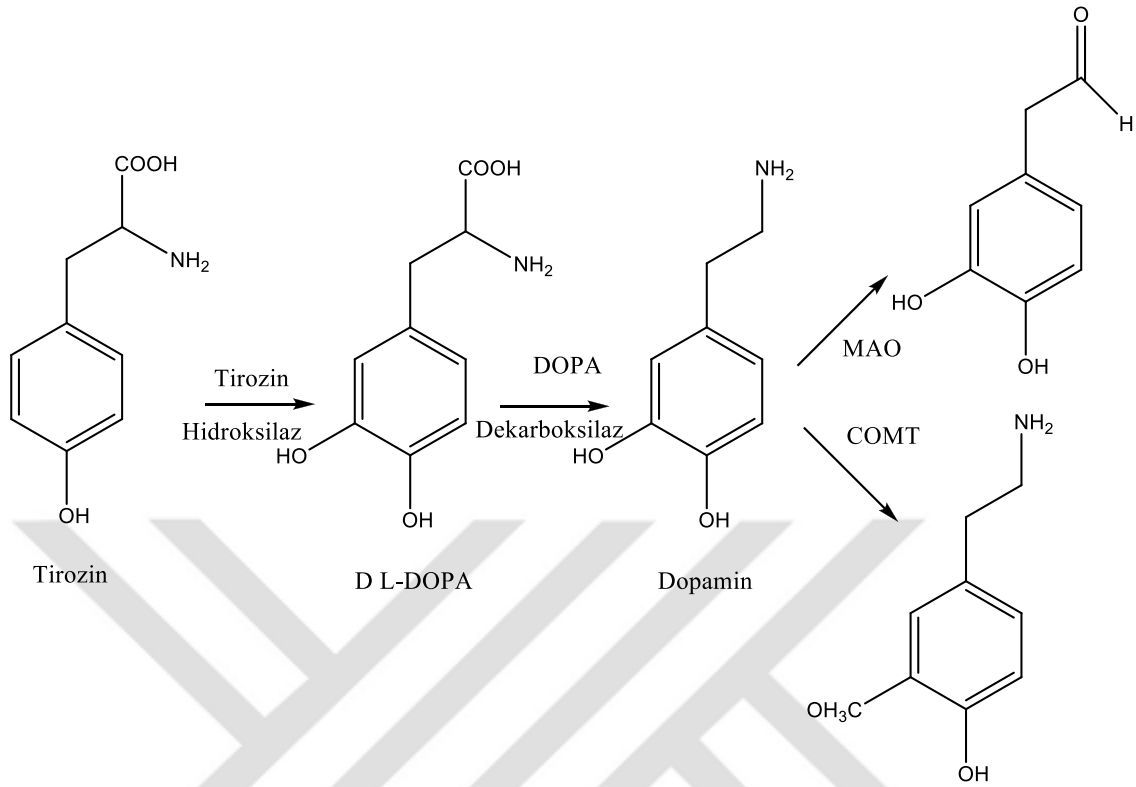
Şekil 2-1: Levodopa maddesini metabolize eden enzimler, oluşan metabolitler ve bu metabolitlerin inhibe edilmesi için levodopa ile birlikte formüle edilen inhibitörler (19)

2.2. Klinik Farmakolojisi

2.2.1. Etki mekanizması

2.2.1.1. Levodopa

Mevcut kanıtlara göre PH semptomları beyinde korpus stratum bölgesinde dopamin eksikliği ile ilişkilidir. Dopamin kan-beyin bariyerini aşamadığı için ilaç olarak alımı faydasızdır. Öte yandan, dopaminin metabolik prekürsoru olan levodopa kan-beyin bariyerini geçer ve beyinde dopamine dönüşür. Bu mekanizmanın levodopanin PH semptomlarını iyileştirdiği düşünülmektedir. Aşağıda beyin dokularında dopaminin ön ilaç olan L-tirozinden levodopanin oluşumu, buradan dopaminin sentezlenmesi ve ardından 2 enzim tarafından degrade olması gösterilmiştir (6) (Şekil 2-2). Levodopanin günlük alım dozu 1500 mg'dır.



Şekil 2-2: İnsan beyinde dopaminin sentezlenmesi ve parçalanması (6)

- a) MAO: Monoamin oksidaz enzimi
- b) COMT: Kateşol-O-metil transferaz enzimi

2.2.1.2. Karbidopa

Levodopa oral yoldan alındığında hızla dekarboksile olarak ekstraserebral dokularda dopamine dönüşür, çok az bir kısmı değişmeden doğrudan merkezi sinir sistemine (MSS) ulaşabilir. Karbidopa, levodopanin çevresel sinir siteminde dekarboksilasyonunu engelleyerek daha çok levodopanin MSS ye ulaşmasını sağlar. Günlük alım dozu 350 mg'dır.

2.2.1.3. Entakapon

Seçici ve tersinir bir kateşol-O-metil transferaz (COMT) inhibitörüdür. COMT, S-adenosil-L-metyonine ait metal gruplarının kateşol yapıları içeren substratların fenolik gruplarına transferini hızlandırır. COMT'un fizyolojik substratlarından biride DOPA'dır. Diğerleri ise kateşolaminler (dopamin, norepinefrin ve epinefrin) ve

bunların hidroksillenmiş metabolitleridir. Levodopanin karbidopa tarafından dekarboksilasyonu engellendiğinde, COMT enzimi levodopayı 3-metoksi-4-hidroksi-L-fenilalanin (3-OMD)'ye metabolize eder. Günlük alım dozu 2000 mg'dır.

2.2.2. Farmakokinetiği

Levodopa, karbidopa ve entakapon (Stalevo) tabletlerin farmakokinetiği 45 ile 75 yaşları arasında sağlıklı kişiler üzerinde incelenmiştir. Değişik dozlarda Stalevo alımı sonrası elde edilen levodopa, karbidopa, entakapon ortalama plazma konsantrasyonları levodopa ve karbidopa içeren tablet ve yanında sadece entakapon içeren tablet (Comtan) alımı sonrası elde edilen değerler ile karşılaştırılabilir bulunmuştur.

Emilim ve dağılım: Levodopa ve entakapon hızlı emilir ve elimine edilir. İkisinin dağılım hacimleri küçüktür. Karbidopa ise, levodopa ve entakapona göre nispeten daha yavaş emilir ve elimine edilir. Levodopa, karbidopa ve entakapon Emilim değerlerinde, özellikle C_{max} değerinde olmak üzere, birey içi ve bireyler arası değerlerde azımsanmayacak ölçüde varyasyonlar vardır. Besin alımının Stalevo üzerine etkileri incelenmemiştir. Çünkü levodopa çeşitli amino asitlerin gut duvarından geçişi ile rekabet eder, levodopanin Emilimi proteince zengin beslenme sonrası bazı hastalarda etkilenmiştir. Proteince zengin beslenme levodopanin Emilimi geciktirebilir ya da azaltabilir. Levodopa plazma proteinlerine yaklaşık % 10- 30 civarında bağlanır.

Tek doz Stalevo alımı sonrası levodopaya ait farmakokinetik özellikler Tablo 2-1 de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Farklı yitiliklerdeki Stalevo'ya ait Levodopanin farmakokinetik değerleri (ortalama $\pm$ SD) (19)

Tablet Yitiliği (L, C, E)* (mg)	AUC_{0-∞} (ng.saatt/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (saat)
50-12,5-200	1,040 $\pm$ 314	470 $\pm$ 154	1,1 $\pm$ 0,5
100-25-200	2,910 $\pm$ 715	975 $\pm$ 247	1,4 $\pm$ 0,6
150-37,5-200	3,770 $\pm$ 1,120	1,270 $\pm$ 329	1,5 $\pm$ 0,9
200-50-200	6,115 $\pm$ 1,536	1,859 $\pm$ 455	1,76 $\pm$ 0,7

* (L,C,E): (Levodopa, Karbidopa, Entakapon)

Sağlıklı kadın ve erkek gönüllülerde tek doz Stalevo alımı sonrası karbidopa pik konsantrasyonuna ulaşım süresi ortalama 2,5 ila 3,4 saattir. Sırası ile 12,5 mg, 25 mg, 37,5 mg ve 50 mg dozlarda karbidopa içeren Stalevo alımı sonrası elde edilen ortalama C_{max} değeri 40 ng/mL ile 225 ng/mL arasında ve ortalama AUC değeri ise 170 ng.saatt ile 1200 ng.saatt değerleri arasındadır. Karbidopanin plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık % 36'dır.

Sağlıklı kadın ve erkek gönüllülerde tek doz Stalevo alımı sonrası entakapon pik konsantrasyonuna ulaşım süresi ortalama 0,8 ila 1,2 saattir. 200 mg entakapon içerek değişik dozlarda Stalevo alımı sonrası elde edilen ortalama C_{max} değeri 1200 ng/mL ile 1500 ng/mL arasında ve ortalama AUC değeri ise 1250 ng.saatt ile 1750 ng.saatt değerleri arasındadır. Entakaponun 400 ng/mL ile 50000 ng/mL konsantrasyonları arasında plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık % 98'dir. Ağırlıklı olarak serum albumine bağlanır.

2.2.3. Metabolizasyon ve eliminasyonu

Levodopanin yarılanma ömrü yaklaşık 1,7 saattir. Değerler 1,1 saat ile 3,2 saat arasında değişebilmektedir. Levodopa farklı metabolitlere dönüşür, en önemli iki metaboliti dekarboksilasyon sonucu oluşan dopamin ve O-metileasyon sonucu oluşan 3-OMD'dir.

Karbidopanin yarılanma ömrü ise ortalama 1,6 saat ile 2 saat arasındadır. Klinik değer olarak 0,7 saat ile 4,0 saat değerleri de mevcuttur. İki önemli metabolite

metabolize olur. Bunlar α -metil-3-metoksi-4-hidroksifenilpropionik asit ve α -metil-3,4-dihidroksifenilpropionik asittir. Bu iki metabolit büyük oranda değişmeden yada bir kısmı glukuronid konjugeleri olarak idrarla elimine olurlar. Toplam üriner atılımın yaklaşık % 30'unu değişmemiş karbidopa oluşturur.

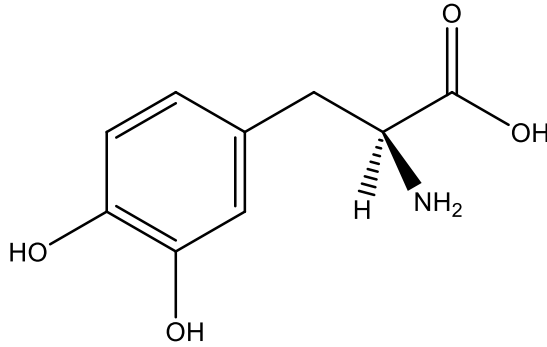
Entakaponun yarılanma ömrü ortalama olarak 0,8 saat ile 1 saat arasındadır. Klinik değer olarak 0,3 saat ile 4,5 saat değerleri de mevcuttur. Entakapon atılım öncesi neredeyse tamamen metabolize olur. Metabolize olmayan kısım yaklaşık % 0,2 dir. Tek aktif metaboliti olan sis-izomeri izomerizasyon sonucu oluşur. Entakapon ve metabolitleri, glukunorid konjugeleri olarak idrarla atılır.

Çok kısa yarılanma ömürleri oldukları için, birbirini takip eden dozlar sonrası sistemde gerçek anlamda bir levodopa ve entakapon akümüasyonu oluşmamaktadır (19,20).

2.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

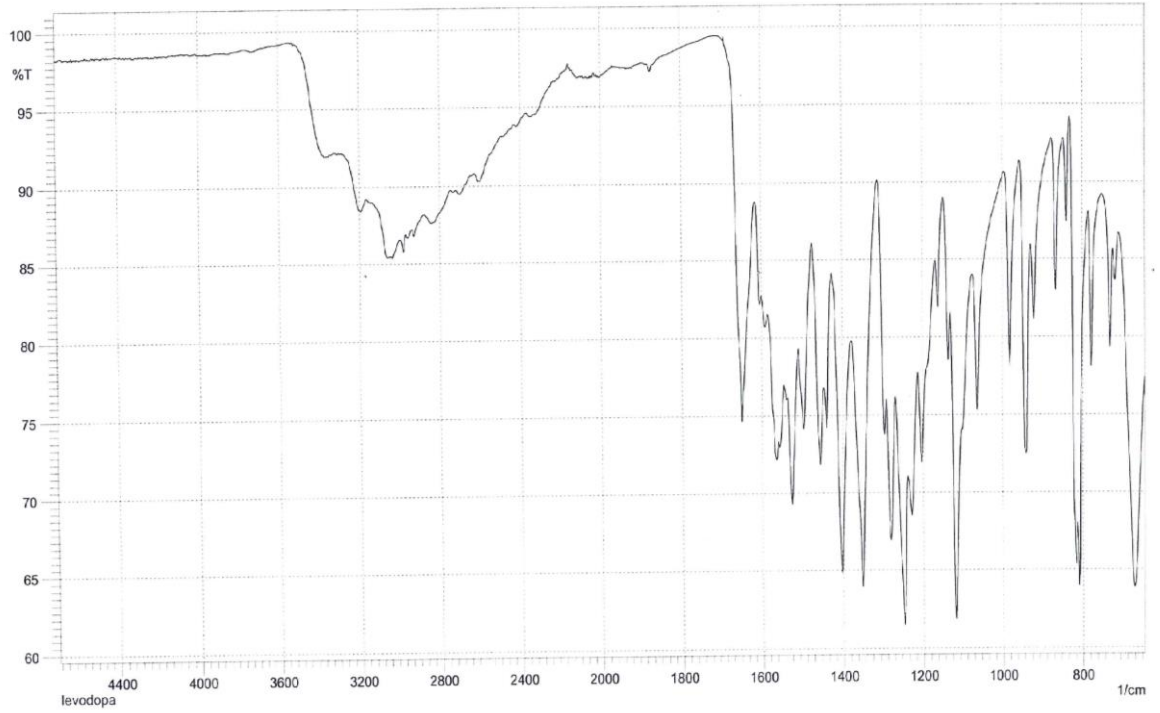
2.3.1. Etken maddeler

2.3.1.1. Levodopa

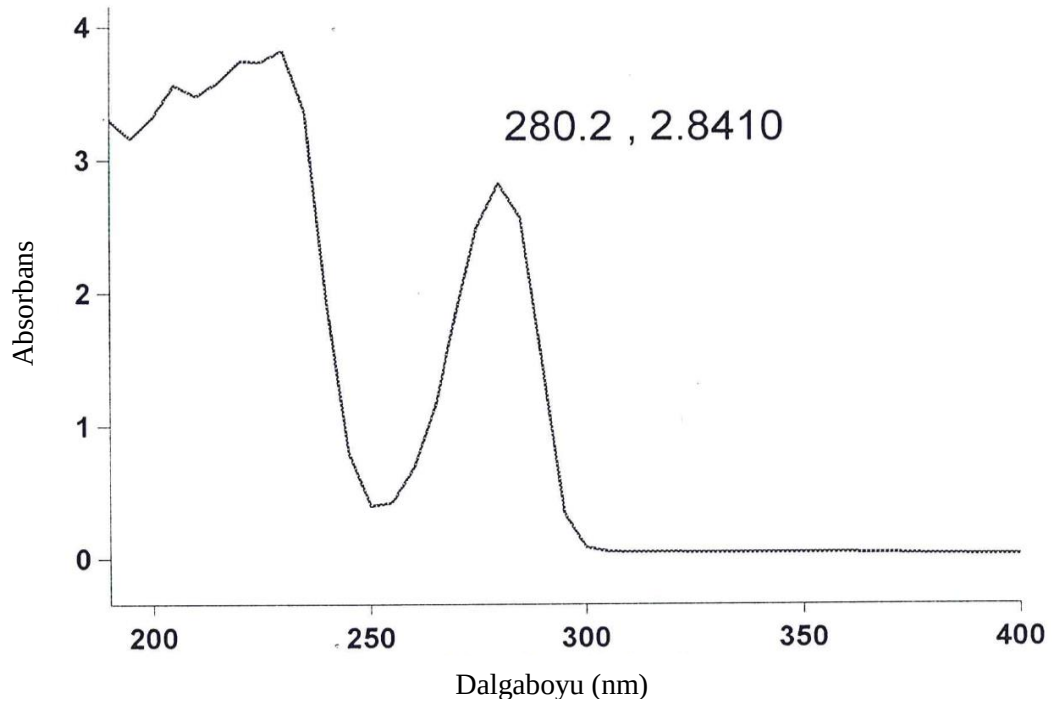


Şekil 2-3: Levodopa'nın kimyasal formülü

Levodopa kimyasal adı (2S)-2-Amino-3-(3,4-dihidroksifenil) propanoik asit ya da (-)-3-(3,4-dihidroksifenil)-L- alanin olan beyaz renkli kristal toz halinde bir aromatik amino asittir (Şekil 2-3). Molekül ağırlığı 197,2 dir. Kapalı formülü $C_9H_{11}NO_4$ 'tür. Elementel analiz değerleri C: % 54,82, H: % 5,62, N: % 7,10, O: % 32,46, asitlik sabiti değeri 25°C de pKa: 2,32 olarak bildirilmiştir. Erime derecesi 284-285 °C dir. Suda az çözünür, pratik olarak % 96'lık etanolde hemen hemen hiç çözünmez. 1 M HCl çözeltisinde kolay çözünür, 0,1 M HCl çözeltisinde zor çözünür (21, 22, 23).

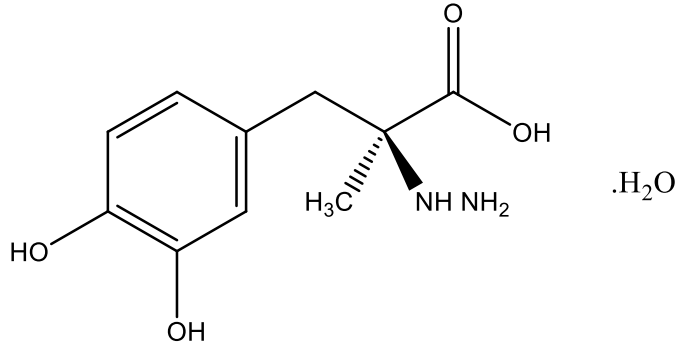


Şekil 2-4: Levodopanin FT-IR spektrumu



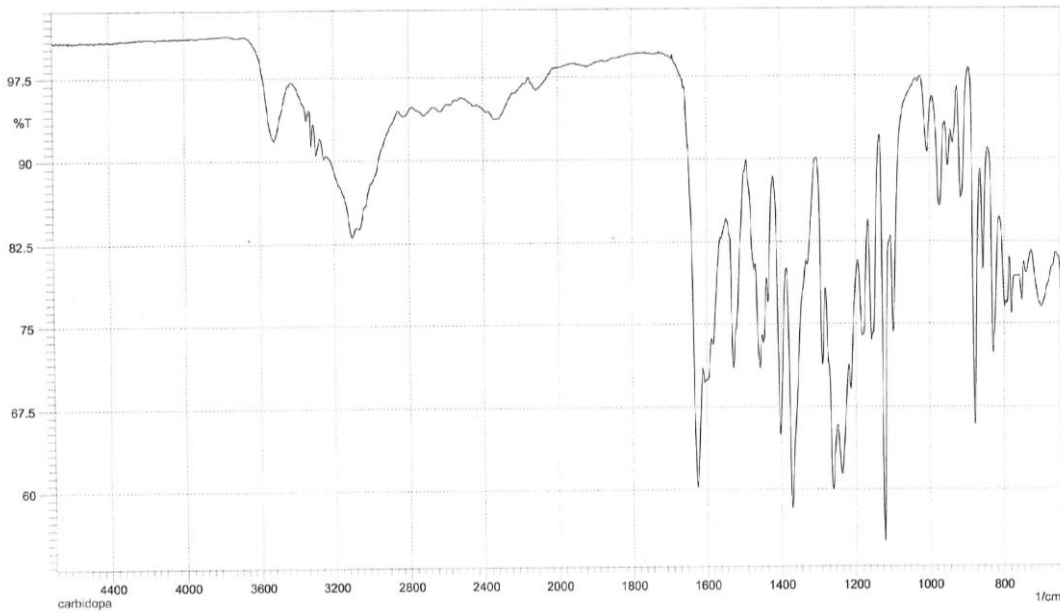
Şekil 2-5: Levodopanin 0,2 mg/mL konsantrasyonda % 0,5 formik asit sudaki çözeltisinin UV spektrumu.

2.3.1.2. Karbidopa

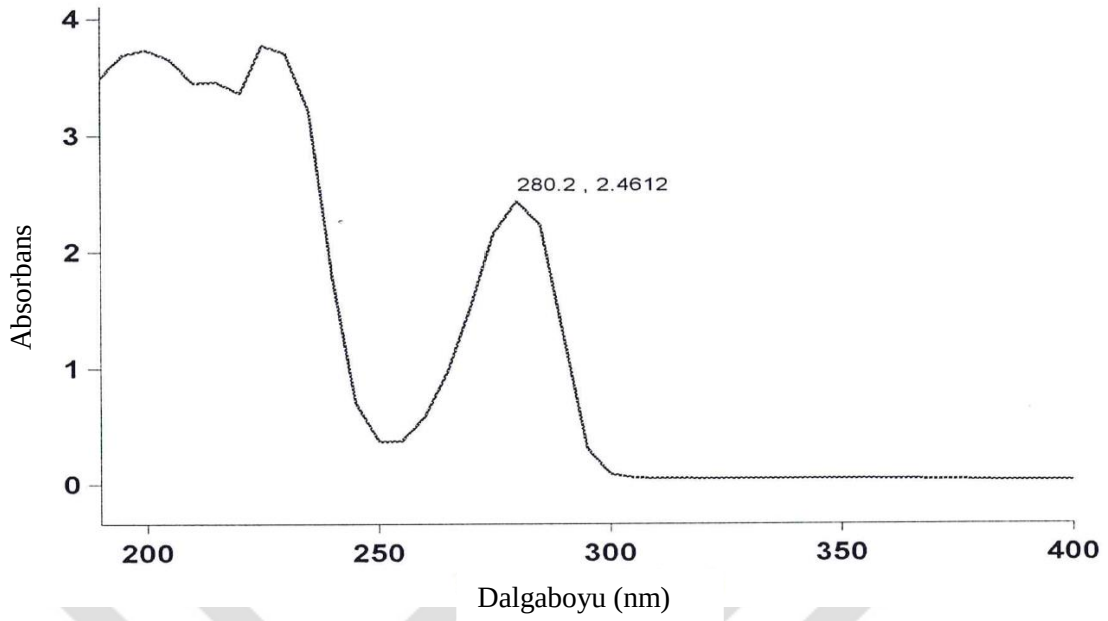


Şekil 2-6: Karbidopanin kimyasal formülü

Karbidopa aromatik aminoasit dekarboksilasyonu inhibitörüdür (AADC). Beyaz yada beyaza yakın kristal tozudur. Kimyasal adı (2S)-3-(3,4-Dihidrofenil)-2-hidrazino-2-metil-propanoik asit monohidrat ya da as (-)-L-(α -hidrazino-(α -metil- β -(3,4-dihidroksibenzen) propanoik asit monohidrattır. Elementel analiz değerleri C: % 49,17, H: % 6,60, N: % 11,47, O: % 32,75 dir. Molekül ağırlığı monohidrat formunda 244,2, susuz formda ise 226,3 tür. Kapalı formülü $C_{10}H_{14}N_2O_4 \cdot H_2O$ olan bu molekül suda az çözünür, % 96'lık etanolde çok az çözünür, metilen klorürde hemen hemen hiç çözünmez. Mineral asitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür. Erime derecesi 208 °C dir. Asitlik sabiti değerleri pKa: 3,59 ve 5,65 olarak bildirilmiştir (24, 25).

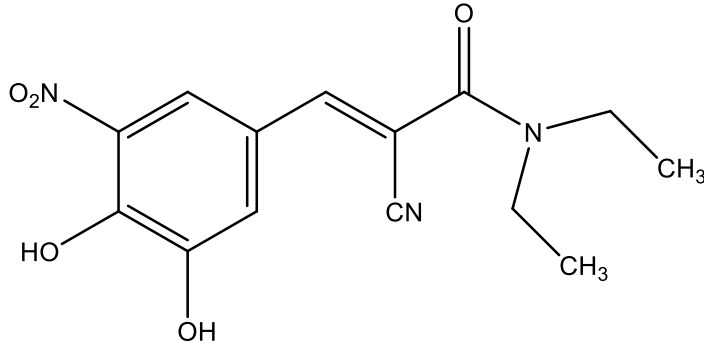


Şekil 2-7: Karbidopanin FT-IR spektrumu



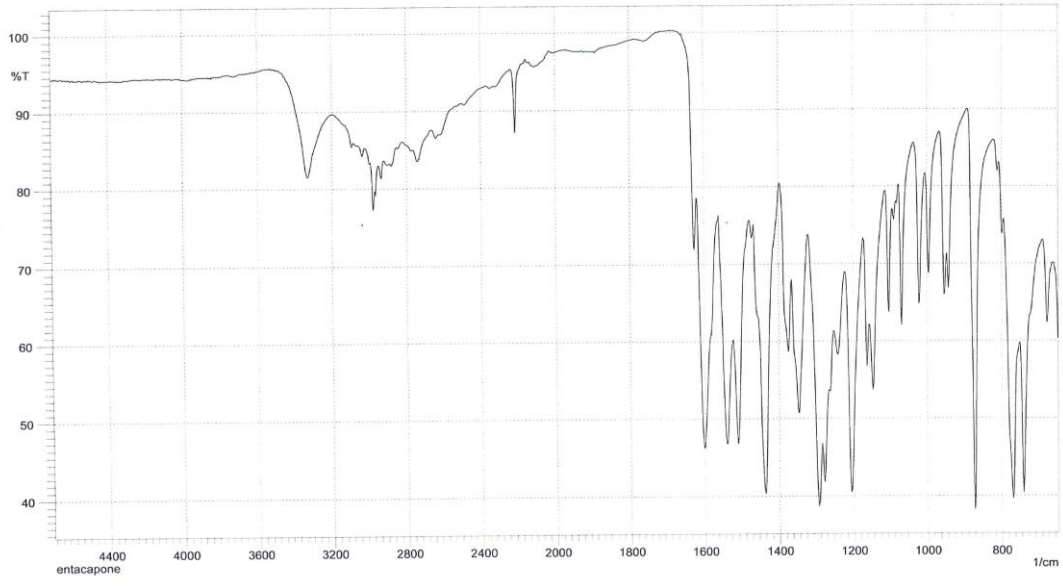
Şekil 2-8: Karbidopan'ın 0,2 mg/mL konsantrasyonda % 0,5 formik asit sudaki çözeltisinin UV spektrumu.

2.3.1.3. Entakapon

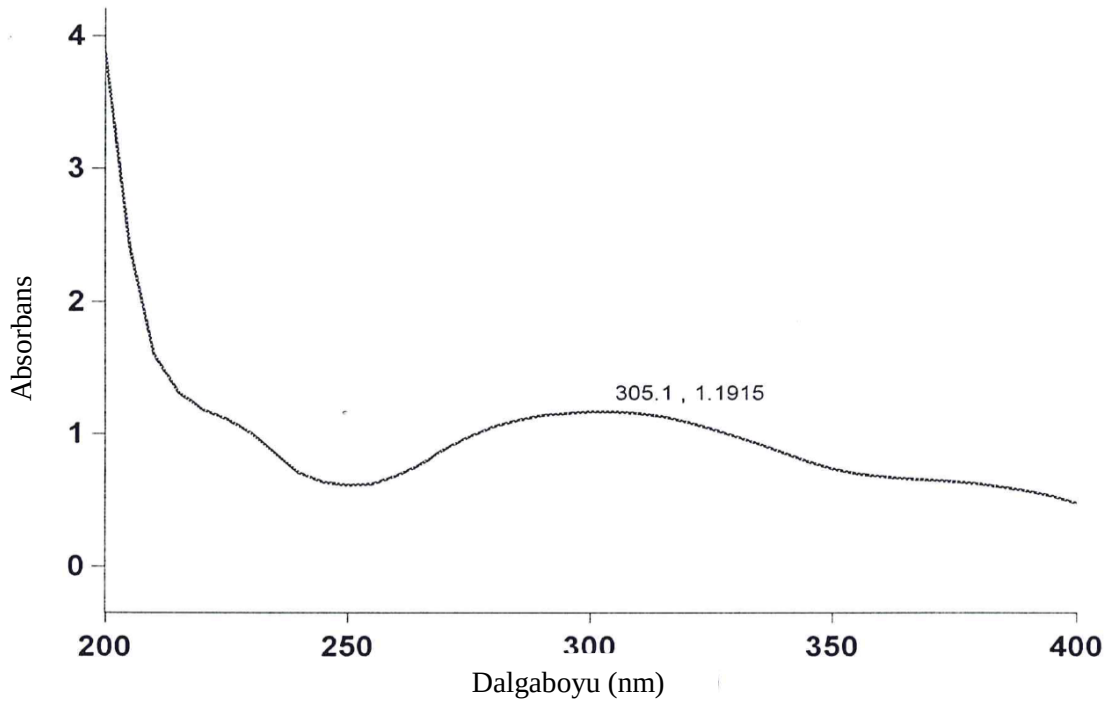


Şekil 2-9: Entakaponun kimyasal formülü

Entakapon molekül ağırlığı 305,3 olan nitro-kateşol yapılı bir kateşol-O-metil transferaz (COMT) inhibitörüdür. Yeşilimsi sarı ya da sarı renkte tozdur. Kimyasal adı (2E)- 2- siyano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-N,N-dietilprop-2-enamid ya da (E)- α -siyano-N,N-dietil-3,4-dihidroksi-5-nitrosinnamamid'dir. Kapalı formülü $C_{14}H_{15}N_3O_5$ olan bu madde suda hemen hemen hiç çözünmez, asetonda zor çözünür, susuz etanolde az çözünür. Elementel analiz değerleri C: % 55,08, H: % 4,95, N: %13,76, O: % 26,20 dir. Polimofizm gösterir. Asitlik sabiti değeri pKa:4,5 olarak bildirilmiştir (26-30).



Şekil 2-10: Entakaponun FT-IR spektrumu

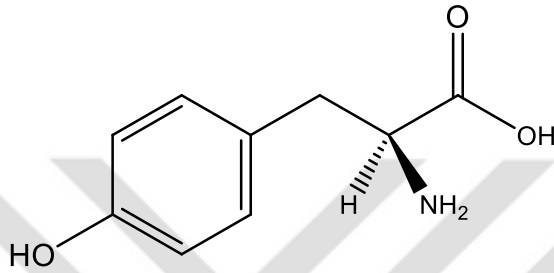


Şekil 2-11: Entakaponun 0,2 mg/mL konsantrasyonda metanoldeki çözeltisinin UV spektrumu.

2.3.2. Safsızlıklar

2.3.2.1. Levodopa Safsızlıkları

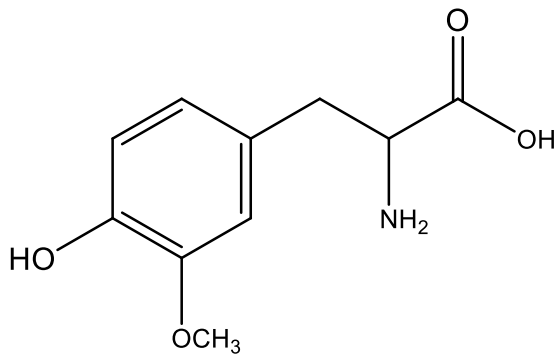
i) Levodopa Safsızlık B: Kimyasal adı (2S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asittir (Şekil 2-12). Kapalı formülü $C_9H_{11}NO_3$ 'tür. Avrupa farmakopesinde safsızlık B olarak adlandırılır. Diğer yaygın bilinen adı L-tirozin'dir. Levodopanin sentezlenmesinde ön sübstrattır. Fenilalaninden elde edilir (12). Molekül ağırlığı 181,2 dir (21,22).



Şekil 2-12: Levodopa Safsızlık B kimyasal formülü

ii) Levodopa Safsızlık C : Kimyasal adı (2RS)- 2-amino-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propaonik asittir (Şekil 2-13). Kapalı formülü $C_{10}H_{13}NO_4$ 'tür. Avrupa farkoesinde safsızlık C olarak adlandırılır. Diğer yaygın bilinen adları 3-O-metildopa (3-OMD) ya da 3-metoksi-DL-tirozindir.

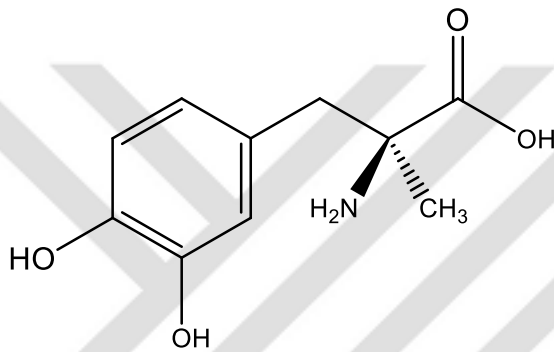
Çevresel sinir siteminde levodopanin kateşol-O-metil transferaz (COMT) enzimi ile metabolize olması sonucu oluşur. Molekül ağırlığı 211,2 dir (21,22).



Şekil 2-13: Levodopa Safsızlık C kimyasal formülü

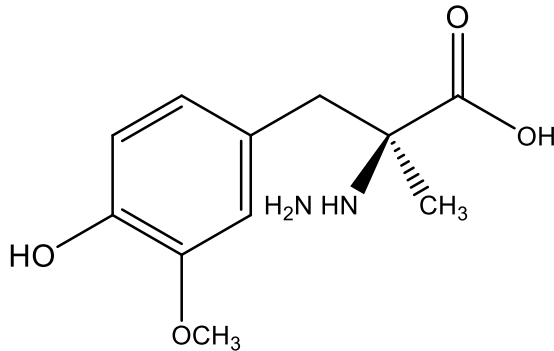
2.3.2.2. Karbidopa safsızlıkları

i) Metildopa: Kimyasal adı (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-metilpropanoik asittir. Avrupa farmakopesinde karbidopanin safsızlığı olarak adlandırılmıştır. Molekül ağırlığı 211,2 dir (Şekil 2-14). Kapalı formülü $C_{10}H_{13}NO_4$ 'tür. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir maddedir. Merkezi sinir sistemi üzerine etkilidir. DOPA dekarboksilaz enzimini inhibe eder. DOPA dekarboksilaz enzimi levodopanin dopamin prekürsörleri olan epinefrin ve norepinefrine dönüşmesine yol açar (24, 25, 31). Levodopa Safsızlık C'nin yapısal izomeridir.



Şekil 2-14: Metildopanin kimyasal formülü

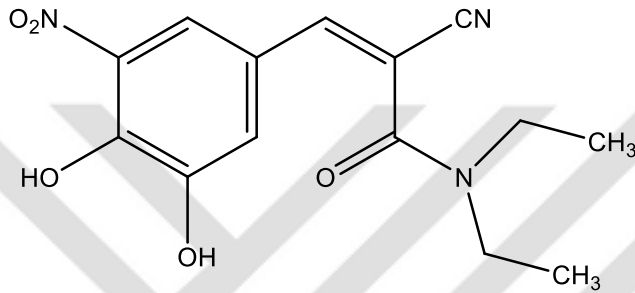
ii) Metilkarbidopa: Kimyasal adı α -Hidrazino-4-hidroksi-3-metoksi- α -metilbenzen propanoik asittir. Diğer adı 3-O-metilkarbidopa'dır. Kapalı formülü $C_{11}H_{16}N_2O_4$ 'tür. 3-OMC kısaltması ile de adlandırılır. Avrupa farmakopesinde karbidopanin safsızlığı olarak tanımlanmıştır. Molekül ağırlığı 240,3 tür (Şekil 2-15) (24, 25).



Şekil 2-15: Metil karbidopanin kimyasal formülü

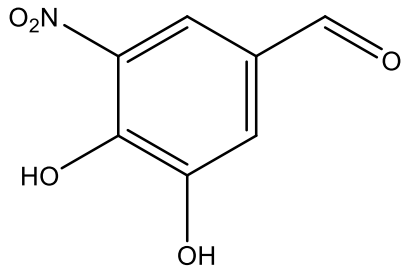
2.3.2.3. Entakaponun safsızlıkları

i) Entakapon Safsızlık A: Kimyasal adı (2Z)-2-siyano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-N,N- dietilprop-2-enamid'dir. Avrupa farmakopesinde Entakaponun A safsızlığı olarak adlandırılır. Entakaponun Z-izomeridir (Şekil 2-16). Kapalı formülü $C_{14}H_{15}N_3O_5$ 'tür. Molekül ağırlığı 305,3 tür. Işığa maruz kalma sonucunda açığa çıkar. Entakapon metabolitlerinin % 75'i glukuronitler ve % 25'i de Z-izomeridir. Z-izomeri entakaponun insan plazmasında bulunan tek faz 1 metabolitidir (26, 27, 32).



Şekil 2-16: Entakapon Safsızlık A'nın kimyasal formülü

ii) Entakapon Safsızlık C: Kimyasal adı 3,4-dihidroksi-5-nitrobenzaldehit'tir. Avrupa farmakopesinde Entakaponun C safsızlığı olarak adlandırılır. (Şekil 2-17). Kapalı formülü $C_7H_5NO_4$ 'tür. Molekül ağırlığı 183,12'dir (26, 27).



Şekil 2-17: Entakapon Safsızlık C'nin kimyasal formülü

2.4. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

2.4.1. HPLC Yöntemleri

Literatürde levodopa, karbidopa ve entakapon için aktif maddeye ait ya da tablet formlarında miktar tayinlerinin veya safsızlıklarının çeşitli analitik yöntemlerle tayinini mümkün kılan farklı analitik yöntemlere ait çalışmalar bulunmaktadır. Bu bölümde bu çalışmalara ait özetler aşağıda sunulmuştur.

Bugamelli ve arkadaşları (10) elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi ile insan plazmasında eş zamanlı olarak levodopa, karbidopa, entakapon ve 3-O-metildopa maddelerinin tayinini yapmışlardır. Bu çalışmada levodopa, karbidopa ve 3-O-metildopa için numuneler protein çöktürme yöntemi ile hazırlanmış ve RP-C18 HPLC kolonu ve hareketli faz olarak (8:92, h/h) oranında metanol ve pH 2,88 fosfat tamponu kullanılarak analiz edilmiştir. Entakapon analizi için ise numune hazırlamada katı faz ekstraksiyonu tercih edilmiş, bu amaçla Oasis HLB marka SPE kartuşları kullanılmış ve % 96 nın üzerinde verim elde edilmiştir. Kromatografik olarak ise C8 kolon ve hareketli faz olarak da sırası ile (17,5: 22,5: 60) oranlarında metanol, asetonitril ve pH 1,9 fosfat tamponu karışımı kullanılmıştır. Her iki analiz içinde + 0,8 Volt potansiyel fark uygulanmıştır. Konsantrasyon aralıkları levodopa için 100-4000 ng/mL, 3-O-metildopa için 200–10.000 ng/mL, karbidopa için 25-4000 ng/mL ve entakapon için ise 20-4000 ng/mL olarak uygulanmış ve doğrusalılık sonuçları uygun bulunmuştur. Kesinlik parametresi sonucu RSD % 5,64 olarak bulunmuş ve geri kazanım çalışmasının sonuçları da % 90'ın üzerinde çıkarak uygun bulunmuştur.

Paim ve arkadaşları (33) kaplı tabletlerde entakapon çözünme hızı tayini testi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde aparat olarak 50 rpm dönüş hızı ayarlı palet, her bir küvette 900 mL hacminde pH 5,3 asetat tamponu kullanılmış ve belirli süreler sonunda bu sistemden alınan numuneler HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Agilent Eclipse XDB RP-18 kolon ve (65: 35, h/h) oranlarında pH'ı % 10 luk fosforik asit ile 3,0'a ayarlanmış su ve asetonitril karışımına sahip hareketli faz kullanılmıştır. Analiz 2,0 mL/dakika hareketli faz akış hızında ve entakaponun en yüksek yanıt verdiği UV 305 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Metot 10-60 µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. Metot kesinliği % 1,58 olarak bulunmuş, geri kazanım çalışmaları çalışma konsantrasyonunun % 80-120 aralığında çalışılmış ve değerler % 95,0-% 105,0 aralığında bulunmuştur.

Kafil ve arkadaşları (34) tabletlerde levodopa, karbidopa miktar tayini ve bunlara bağlı safsızlıklarını tayini yöntemini geliştirmişlerdir. HPLC yönteminde dedektör olarak kulometrik dedektör, C18 kolon, hareketli faz olarak 0,05 M asetat tamponu kullanılmıştır. Metot, numune çözeltileri oda sıcaklığında beklediğinde 6-hidroksidopa'dan oluşan safsızlıkların tayinini yapabilmektedir. Dedektörde uygulanan hücre potansiyel değerleri referans elektrod için +0,3 V, numune elektrodu için +0,6 V' dir. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,1-250 nmol, kesinliği levodopa için % 2,0, karbidopa için % 1,6 olarak bulunmuştur.

Issa ve arkadaşları (35) HPLC ile tabletlerde levodopa, karbidopa ve entakapon tayini yöntemi geliştirmişlerdir. Ölçümler UV 282 nm dalgaboyu, C8 kolon, 1 mL/dakika hareketli faz akış hızı koşullarında yapılmıştır. Hareketli faz olarak 75 hacim tampon (1000 mL sinde 30 mL Tetrahidrofuran ve 0,2 mL trietil amin içeren pH'ı 3,0 a ayarlı) ve 45 hacim asetonitril karışımı kullanılmıştır. Konsantrasyon aralıkları levodopa, karbidopa ve entakapon için sırasıyla 1,25-500 µg/mL, 0,31-125 µg/mL ve 2,5-850 µg/mL'dir. Geri kazanım değerleri levodopa, karbidopa ve entakapon için sırasıyla % 99,2-100,8, % 99,3-100,7 ve % 98,85-101,16 arasında bulunmuştur. Kesinlik değerleri her madde için % 2,0 nin altında bulunmuştur.

Tekale ve arkadaşları (36) tabletlerde entakapona ait safsızlıklar olan stage IV (1-[2-siyano-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil-1-okzo-2-propenil piperidin) ve entakapon safsızlık A (entakapon Z-izomeri) tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde C8 kolonu, (55: 45, h/h, pH 3,0) oranlarında amonyum asetat ve metanolden oluşan hareketli faz ve 283 nm dalgaboyunda UV dedektör kullanmışlardır. Yapılan çalışmada gözlenebilme sınırı (LOD) stage IV safsızlığı için % 0,008, entakapon safsızlık A için % 0,004, tayin sınırı (LOQ) ise stage IV safsızlığı için % 0,02, entakapon safsızlık A için 0,012% olarak bulunmuştur. Kesinlik çalışmasında stege IV ve entakapon safsızlık A için % RSD değerleri sırasıyla % 0,98 ve % 1,52 olarak bulunmuştur.

Rihbani ve arkadaşları (37) geliştirdikleri elektrokimyasal dedektörlü HPLC yönteminde levodopaya ait safsızlıklar olan 3-(3,4,6&hidroksifenil)alanin ve levodopa safsızlık C (3-metoksi-DL-tirozin) ile karbidopaya ait safsızlıklar olan metildopa ve metilkarbidopa (3-O-metilkarbidopa)'nın tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. HPLC sisteminde UV 283 nm dalgaboyu, C8 kolon ve 0.8 mL/dakika akış hızında iyon çifti kimyasalı içeren mobil faz kullanılmıştır. Camsı karbon çalışma elektrodu ve Ag/AgCl

referans elektroduna sahip amperometrik dedektör ile çalışma elektrodu oksidasyon modunda +0,9 V potansiyel fark koşullarında ölçümler alınmıştır. Ölçümlerde UV dedektör ile % RSD %0,96, elektrokimyasal dedektör ile % RSD % 0,28 bulunarak yeterli seviyede kesinlik değerleri elde edilmiştir.

Soukhova ve arkadaşları entakapon etken maddesi ve safsızlıkları için (38) geliştirdikleri HPLC metodunda kloramfenikol maddesini iç standart olarak kullanarak ışık degradasyonu sonucu oluşan entakapon z-izomeri ve diğer oluşan safsızlıkların analizlerini yapmışlardır. Çalışılan yönteme ait doğrusallık çalışması entakapon piki için 0,1-0,3 mg/mL konsantrasyonu aralığında çalışılmış ve doğrusal bulunmuştur. Kesinlik çalışması sonuçları ise % 1,0 bulunmuş, yöntemin doğruluğu ise % 80- % 120 aralığında ortalama % 100,1 olarak bulunmuştur.

Shalini ve arkadaşları (39) HPLC de geliştirdikleri yöntem ile tablet formunda eş zamanlı olarak levodopa ve karbidopa miktar tayini analiz etmişlerdir. Geliştirilen yöntemde C18 kolon kullanılmış ve hareketli faz olarak kullanılan pH 3 fosfat tamponu: asetonitril (90:10, h/h) karışımı 0,5 mL/dakika hızda yürütülmüştür. UV dedektörün dalgaboyu 280 nm'dir. Yöntemin doğrusallık aralığı levodopa için 50 ppm-150 ppm, karbidopa için 12,5 ppm-37,5 ppm olarak uygulanmıştır. Kesinlik değerleri levodopa için % 0,72, karbidopa için % 0,45 olarak bulunmuştur. Yöntem doğruluk çalışması sonuçları ise levodopa ve karbido için sırası ile % 99,8 ve % 99,9 bulunmuştur.

Paim ve arkadaşları (40) tarafından geliştirilen ters faz HPLC yöntemi ile tabletlerde entakapon aktif maddesi miktar tayini 305 nm de stabilite gösterir şekilde analizlenmiştir. C18 kolon ve pH 3 e ayarlı su: asetonitril (65:35, h/h) karışımının hareketli faz olarak kullanıldığı yöntemde UV 254 nm ışığına maruz bırakılmış entakapon çözeltilerinin yanısıra asit, alkali ve peroksit gibi etkilere maruz bırakılan çözeltilere de analizler yapılmış, elde edilen kromatogramların spektral olarak saf bulunması sonucu yöntemin stabilite gösterir bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Shetty ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir başka yöntemde yine tabletlerde entakapon ve 3 adet safsızlıklarının tayini çalışması yapılmıştır (41). Sözü edilen entakapon safsızlıkları asit-alkali, fotoliz, oksidasyon, sıcaklık ve hidroliz gibi bozundurmalar sonrası elde edilen metoksi entakapon, vanillin entakapon ve dihidroksi entakapondur. Gradyent akış programının 1,5 mL/ dakika olarak uygulandığı yöntemde 220 nm ayarlı UV dedektör, C 18 kolon ve % 0,1 fosforik asit tamponu ve asetonitril

kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda entakapon ve safsızlıklarının birbirlerinden ayırım faktörlerinin 2 den büyük olduğu gözlenmiştir. Metodun kesinlik değeri % 2,0 sınırının altında, doğruluk değeri entakapon için % 99,2-101,5, safsızlıklar için % 99,5-102,2 değerleri arasında bulunmuştur.

Gelber ve arkadaşları şiral hareketli faz kullanarak HPLC de levedopa, metildopa, karbidopa ve triptofan maddelerinin enantiyomerik saflıklarını analiz etmişlerdir (42). Bu çalışmada C18 kolon eşliğinde içine fenilalanin ve bakır (II) sülfat eklenmiş hareketli faz kullanılarak maddelerin D ve L izomerlerinin ayrılması hedeflenmiştir. UV dedektör kullanılarak 280 nm de yapılan bu çalışmada doğrusallık için korelasyon katsayısı 0,986, doğruluk çalışmasında yüzdesel fark olarak % 0,5 ve kesinlik çalışmasında % RSD değeri ise % 1,0 altında bulunmuştur.

Saxer ve arkadaşları (43) elektrokimyasal dedektör kullanarak levodopa ve önemli bir metabolit olan 3-O-metildopa (3-OMD)'nın insan plazmasında tayinini yapmışlardır. Klinik çalışmalara özgü tasarlanan bu çalışmada ilgilenilen maddeler iyon çifti ters faz kromatografi yöntemi ile perklorik asit ile protein çöktürmesi işlemine tabi tutulmuş numunelerden analizler yapılmış ve dedektör olarak redoks modunda çalışan çift-elektrod sistemli elektrokimyasal dedektör kullanılmıştır. Metodun günlerarası kesinlik değerleri levodopa ve 3-OMD için sırasıyla % 1,34–6,54 ile % 3.90–5.50 değerlerinde bulunmuştur. Doğruluk değeri ise levodopa için yaklaşık % 90, 3-OMD için ise yaklaşık % 100 olarak bulunmuştur.

Tablet dozaj formunda eş zamanlı olarak levodopa, karbidopa ve entakaponun miktar tayini çalışmasını Krishna ve arkadaşları (44) HPLC'de C18 kolonu ve hareketli faz olarak su (pH 4.5 potasyum dihidrojen fosfat ile ayarlanmış) ve metanol (60: 40, h/h) karışımı kullanarak geliştirmişlerdir. Bu yöntemde dedektör UV 287 nm de kullanılmış ve doğrusallık çalışmalarında korelasyon katsayıları 0,99 olarak metot geri kazanım değerleri ise üç madde içinde % 100 olarak bulunmuştur.

Kumar ve arkadaşları (45) yarı mamül ve tablet dozaj formunda levodopa ve karbidopa miktar tayini için geliştirdikleri yöntemde C18 kolon, 1,0 mL/ dakika akış hızında pH 2,8'e ayarlı fosfat tamponu ve metanol (20:80, h/h) karışımından oluşan hareketli faz, UV dedektör (282 nm) kullanmışlardır. 10 dakikalık enjeksiyonlar ile her iki madde levodopa için 60-140 µg/mL, karbidopa için 6-14 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Elde edilen korelasyon katsayıları 0,999'un

üstündedir. Metodun ortalama geri kazanım değerleri ise levodopa ve karbidopa için sırasıyla % 99,23 ve % 98,97 olarak bulunmuştur. Günlerarası kesinlik değerleri ise sırasıyla % 0,41 ve % 0,42'dir.

Madhavi ve arkadaşları ise geliştirdikleri HPLC yönteminde (46) yarı mamül ve tablet formunda levodopa, karbidopa ve entakapon miktar tayinini 15 dakikalık bir enjeksiyon ile yapmışlardır. Analitik yöntemde C18 kolon, UV dedektör (280 nm) kullanılmıştır. Gradyent akış programında hareketli faz olarak A hattında % 0,05 (h/h) fosforik asit çözeltisi ve B hattında asetonyitril kullanılmıştır. Metodun çalışma konsantrasyon aralığı levodopa, karbidopa ve entakapon için sırasıyla 10-50 µg/mL, 5-25 µg/mL, 20-100 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu aralıklarda doğrusallık için korelasyon katsayıları 0,997 ile 0,999 arasında bulunmuştur. Geri kazanım değerleri ise % 2 kesinlik değerinin altında % 98-% 102 aralığında bulunmuştur.

Zaveri ve arkadaşları (47) geliştirdikleri ters faz HPLC yönteminde tablet dozaj formunda levodopa, karbidopa ve entakapon miktar tayinini belirlemişlerdir. Hibrit C18 kolon (Xterra C18) kullanılan bu yöntemde gradyent akış programı uygulanmıştır. Akış hızının 1,5 mL/ dakika olduğu bu yöntemde hareketli faz olarak A hattında 1-dekan sülfonat sodyum iyon çifti tuzu içeren pH 3 e ayarlı fosfat tamponu, B hattında ise asetonyitril kullanılmıştır. UV dedektör 280 nm'ye ayarlanmıştır. Elde edilen metot validasyon parametreleri doğruluk için % 98,0-102 aralığında, kesinlik için ise RSD değeri % 2,0 altında bulunmuştur.

Mantena ve arkadaşları (48) ultra performans likit kromatografi cihazı (UPLC) ile geliştirdikleri yöntemde levodopa, karbidopa ve entakapon maddelerinin ve bunlara ait bilinen 15 safsızlığın analizini yapmışlardır. Bu safsızlıkların proses kaynaklı ya da degradasyon kaynaklı safsızlıklar olduğu belirtilmiştir. Tanecik boyutu 1,7 µm olan özel bir hibrit C18 kolonun kullanıldığı yöntemde dedektör 225 nm de veri toplamıştır. Gradyent programda 0,5- 0,7 mL/dakika arası değişen akış hızında % 0,1 perklorik asit çözeltisi ve asetonyitril kullanılmış ve tüm piklerin 20 dakikalık kromatogramda elde edilmeleri sağlanmıştır. Hareketli fazda bulunan perklorik asidin iyon çifti oluşturma özelliğinden yararlanılmıştır. Pik şekillerinde kuyruk oluşumunu engellemek için kolon fırın sıcaklığı 45°C ye ayarlanmıştır. Yöntemin stabilite gösterir metot olduğunu ispat etmek için asit, alkali, oksidasyon, ısı, nem, ışık koşullarında bozundurma şartları

uygulanmış numuneler ilgili metot ile analizlenerek sonuçlar incelenmiş ve ardından validasyon işlemi uygulanmıştır.

Vemic ve arkadaşları (49) kaotropik ajan olarak trifloroasetik asit ile hazırlanmış hareketli faz ve C18 kolon kullanarak farklı polaritelere sahip bulunan levodopa, karbidopa, entakapon ve bunların safsızlıklarının HPLC de ayırımlarını sağlamışlardır. Deneysel tasarım yaklaşımıyla belirlenen gradiyent programı 1,0 mL/dakika akış hızında, pH 2,0 a ayarlı 20 mM trifloroasetik asit tamponu ve metanolden oluşmaktadır. Maddelere ait bilinen 6 adet safsızlığın beraberinde analiz edildiği yöntemin dedektörü 280 nm ye ayarlı UV dedektörüdür. Metodun konsantrasyon çalışma aralıkları levodopa, karbidopa, entakapon için sırasıyla 20-200 µg/mL, 10-100 µg/mL, 5-80 µg/mL, levodopa safsızlıkları için 0,1-1 µg/mL, karbidopa safsızlıkları için 0,1-1 µg/mL ve entakapon safsızlıkları için ise 0,02-0,4 olarak uygulanmış ve analiz edilen doğruluk, doğrusallık ve kesinlik gibi validasyon parametrelerinin uygun bulunduğu belirtilmiştir.

Ramakrishna ve arkadaşlarının insan plasmasında entakapon tayini konulu çalışmasında (50) numuneler etil asetat: n-hegzan (70: 30, h/h) çözücü karışımında tek aşamalı sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilmiş ve HPLC de ters faz C18 kolon kullanılarak 305 nm’de analiz edilmiştir. Yöntemde hareketli faz olarak pH 2, 75’e ayarlı olan 30 mM fosfat tamponu ve asetonitril (62:38, h/h) kullanılmıştır. Konsantrasyon aralığı 25-2500 ng/mL olan yöntemde kesinlik seviyesi % RSD 2,2-4,2, doğruluk çalışması sonuçları da % 98,7- 107,5 değerleri arasında bulunmuştur.

Sagar ve arkadaşlarının (51) levodopa ve karbidopa ve bunların metabolitlerinin insan plazmasında ve ürinde tayinini kapsayan çalışmasında matrsten gelen istenmeyen maddeleri eleyebilmek ve numuneyi saflaştırabilmek için kullanılan değiştirilebilir düzenekli kolon bölümüne sahip HPLC ve elektrokimyasal dedektör kullanılmıştır. Böylece plazmada numuneye girişim yapabilecek ve elektrokimyasal dedektörde yanıt verebilecek pek çok madde elenmiş olmaktadır. Yöntemde C18 kolon, karbon fiber mikroeletrik hücre ve referans elektrod olarak gümüş/gümüş fosfat kullanılmış, +0,8 V potansiyel fark uygulanmıştır. Konsantrasyon çalışma aralığı 0,02- 4,0 µg/mL’dir. İnsan plazmasından elde edilen geri kazanım değerleri % 93,83 ile 89,76 değerleri arasında bulunmuştur. Kesinlik değerleri ise RSD % 7,0 değerinin altında bulunmuştur. Analiz edilebilen en küçük konsantrasyonlar levodopa ve karbidopa için sırasıyla 5 ve 8 ng/mL dir.

2.4.2. HPLC-Kütle Spektroskopi Yöntemleri

Genellikle klinik çalışmalarda kullanılmak üzere fizyolojik sıvılarda levodopa, karbidopa ve entakapon ile bu maddelere ait safsızlıkların veya metabolitlerin analizini mümkün kılan pek çok yöntem yayınlanmıştır.

Yadav ve arkadaşları (32) geliştirdikleri yöntemde likit kromatografi- tandem kütle spektrometre (LC-ESI-MS/MS) cihazı kullanarak insan plazmasında eş zamanlı olarak entakaponun E ve Z izomerlerinin miktar tayinini çalışmışlardır. Numune hazırlamada her iki izomer için sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminden yararlanılmış olup 500 µL lik insan plazması üzerinden çalışmalar yürütülmüştür. İç standart olarak karbamazepin kullanılmıştır. HPLC sistem parametreleri C18 kolon, hareketli faz olarak % 1 formik asit ve metanol (50:50, h/h) karışımı, % 90 split oranına sahip 1,0 mL/dakika akış hızı, 35°C ye ayarlı kolon termostatu sıcaklığı olarak sıralanmıştır. Kütle spektroskopide çoklu reaksiyon izleme (multiple reaction monitoring, MRM) yöntemi kullanılmıştır. Hesaplama kütle geçiş değerleri olarak sırasıyla E - Z izomeri çifti için ve iç standart için m/z 306,1→233,0 ile m/z 237,3→194,2 olarak belirlenmiştir. Yöntemin çalışma konsantrasyonu entakapone ve iç standart için sırasıyla 24,3-6076 ng/mL ve 23,8- 5960 ng/mL 'dir. Yapılan validasyon çalışmasında kesinlik değerleri (% RSD) 10'un altında, doğruluk değerleri % 100,4-107,3 arasında bulunmuştur.

Ribeiro ve arkadaşları (52) HPLC-MS/MS ile geliştirdikleri yöntemde insan plazmasında levodopa, karbidopa, entakapon, tolkapon, 3-O-metildopa ve dopaminin eş zamanlı analizini gerçekleştirmişlerdir. 3-O-metildopa ve dopamin metabolit oldukları için incelenmişlerdir. HPLC kısmında C8 kolon kullanılmış, gradiyent program olarak her ikisinde % 1 formik asit içeren su ve asetonitril: metanol (90:10, h/h) karışımı uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem ile analiz edilen en düşük konsantrasyon 7,0 ng/mL'dir. Yöntem doğrusal ($r > 0,99$), kesin ($RSD < \% 11,3$) ve doğru ($RE < \% 11,8$) bulunmuştur. Numuneler solvent çöktürme yöntemiyle asetonitril kullanılarak elde edilmiştir. Kütle dedektöründe hesaplamalar için (+) MRM modu kullanılmıştır.

Cesar ve arkadaşları (53) likit kromatografi, elektrosprey iyonizasyon kaynağı ve kütle spektrometre kullanarak geliştirdikleri yöntemde insan plazmasında levodopa ve karbidopa etken maddelerini analiz etmişlerdir. Yöntemde numune hazırlamada perklorik asit ile protein çöktürme işlemi yapılmış ve iç standart olarak metildopa kullanılmıştır. Likit kromatografide C18 kolon ve % 0,2 formik asit ve asetonitril (90:

10, h/h) karışımı hareketli faz olarak seçilmiştir. Kütle dedektörü + MRM modunda çalıştırılarak hesaplamalar levodopa, karbidopa ve metildopa için sırasıyla m/z 198,1 $\rightarrow$ m/z 107,0, m/z 227,2 $\rightarrow$ m/z 181,0, ve m/z 212,1 $\rightarrow$ m/z 139,2 iyon geçiş değerleri kullanılarak yapılmıştır. Yöntemin konsantrasyon çalışma aralıkları levodopa ve karbidopa için sırasıyla 50-5000 ng/mL ile 3-600 ng/mL'dir. Yöntem sağlıklı gönüllülerde levodopa ve karbidopa içeren tablet formlarında farmakokinetik çalışmalarda başarıyla uygulanmıştır.

Vilhena ve arkadaşları (54) hidrofilik etkileşimli likit kromatografi (HILIC) ve MS/MS kütle spektrometre kullanarak geliştirdikleri yöntemde levodopa, karbidopa ve metabolitlerini (3-O-metildopa ve dopamin) insan plazmasında tayinini gerçekleştirmişlerdir. Klasik ters faz kromatografiye farklı bir alternatif sunan HILIC özellikli kolonlar ile farklı polariteye sahip analitlerin ayrımı sağlanmıştır. Plazma numuneleri % 0,05 formik asit içeren asetonitril ile protein çöktürmesi işlemine tabi tutulmuş ve HPLC de hareketli faz olarak % 0,05 formik asit ve 3mM amonyum format içeren tampon ve asetonitril (21:79, h/h) karışımı eşliğinde analiz edilmiştir. Yöntemin çalışma konsantrasyon aralıkları levodopa için 75–800 ng/mL, karbidopa, 3-O-metildopa için 65–800 ng/mL ve dopamin için 20-400 ng/mL, nicelik sınır değerleri de sırayla 75 ng/mL, 65 ng/mL ve 20 ng/mL'dir. Doğrusallık ($r > 0,99$), doğruluk ($\pm$ % 13,44) ve kesinlik ($\leq$ % 13,99) değerleri uygun bulunmuştur. Kütle dedektöründe elektrosprey iyonizasyon kaynağı ve üçlü kuadropol, hesaplamalar için MRM modu kullanılmıştır.

Martins ve arkadaşları (55) biyoeşdeğerlik numunelerinin çalışılması için geliştirdikleri biyoanalitik yöntemde levodopanin insan plazmasında tayinini sağlayan likit kromatografi-kütle spektrometre (HPLC-MS/MS) yönteminde numuneleri hazırlamada perklorik asit ile protein çöktürme işlemini uygulamışlardır. HPLC de C18 kolon ve % 0,5 formik asit içeren su asetonitril (90:10, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Çalışmada karbidopa iç standart olarak seçilmiştir. Kütle spektrometrede MRM modun hesaplamada kullanıldığı yöntemde levodopa için m/z 198,1 $\rightarrow$ 181,0, karbidopa için m/z 227,1 $\rightarrow$ 181,0 kütle geçiş değerleri kullanılmış ve çarpışma enerjileri sırasıyla 8,5 ve 11,5 V olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot ile 60 sağlıklı gönüllü ile biyoeşdeğerlik çalışması yürütülmüştür.

Entakapon ve ışık altında bozunma sonucu oluşan degradasyon ürünlerinin tayini için Paim ve arkadaşlarının (56) geliştirdiği yöntemde bozunma kinetiğinin ve oluşan en belirgin safsızlığın yapısının aydınlatılması amaçlanmıştır. Belirtilen koşullarda elde edilen en yüksek bozunma ürününün z-izomeri olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla metanol çözücüsü ile hazırlanmış numune 254 nm dalgaboyundaki UV ışığı altında kuartz hücre içinde bekletilmiştir. Kromatografik sistemde asetik asit ile pH 3'e ayarlı su ve asetronitril (65:35, h/h) karışımı, C18 kolon, 305 nm ye ayarlı UV dedektör kullanılmıştır. Kütle dedektörü parametreleri ise çarpışma enerjisi 5 V, ESI (-) konumunda her iki izomer için ise kütle geçiş değerleri m/z 304,1 $\rightarrow$ 66 olarak belirlenmiştir.

Le pan ve arkadaşları (57) insan serumunda levodopa, benserazid ve 3-O-metildopanin eş zamanlı tayini için geliştirdikleri yöntemde likit kromatografi-kütle spektrometre kullanmışlardır. Numune hazırlama yöntemi protein çöktürmedir. Levodopa, benserazid ve 3-OMD için 50-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında yöntem doğrusal bulunmuş, yine sırasıyla bu maddeler için gün içi ve günler arası kesinlik değerleri 120, 360 ve 720 ng/mL konsantrasyonları için % 10,56 ve % 6,22 olarak bulunmuştur. Karbidopa iç standart olarak kullanılmıştır. Çalışmalar C18 kolon, metanol ve formik asit % 0,5 (30:70, h/h) karışımında hazırlanmış hareketli faz kullanılarak yapılmıştır. Kütle spektrometrede levodopa, benserazid, 3-OMD ve karbidopa için geçiş değerleri sırasıyla m/z 198,3 $\rightarrow$ 152,0, 258,2 $\rightarrow$ 85,2, 212,3 $\rightarrow$ 149,0, 227,3 $\rightarrow$ 180,9 olarak belirlenmiş (+) MRM modu kullanılmıştır.

Cesar ve arkadaşları (58) levodopa ve benserazid içeren tabletlerde likit kromatografi ve kütle spektroskopisi cihazı kullanarak insan plazmasında levodopa ve 3-OMD nin karbidopa iç standardı eşliğinde analizi için yöntem geliştirmişlerdir. Plazma numuneleri protein çöktürme işlemi ile muamele edilmiştir. Kromatografide C18 kolon ve % 0,2 lik formik asit asetronitril (94:6, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Kütle dedektöründe hesaplama yapmak için (+) MRM modunda levodopa, 3-OMD ve karbidopa için elde edilen kütle geçiş değerleri sırasıyla m/z 198 $\rightarrow$ 107, 212 $\rightarrow$ 166 ve 227 $\rightarrow$ 181 olarak belirlenmiştir. Yöntemin çalışma konsantrasyon aralıkları levodopa için 50-6000 ng/mL, 3-OMD için 25-4000 olarak belirtilmiş ve doğrusal bulunmuştur. Valide edilen yöntem sağlıklı gönüllülerde farmakokinetik çalışmaların yürütülmesinde başarı ile uygulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında 2012-2017 yılları arasında yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Levodopa CRS (USP Reference Standard, Rockville, MD, ABD)

Levodopa Safsızlık B (USP Reference Standard, Rockville, MD, ABD)

Levodopa Safsızlık C (L-tirozin) (USP Reference Standard, Rockville, MD, ABD)

Karbidopa CRS (USP Reference Standard, Rockville, MD, ABD)

Metildopa (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, France)

Metilkarbidopa (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, Fransa)

Entakapon (USP Reference Standard, Rockville, MD, ABD)

Entakapon Safsızlık A (Z-izomer) (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, Fransa)

Entakapon Safsızlık C (LGC, LGC Standards GmbH, Almanya)

Stalevo ® Film Kaplı Tablet 200/50/200 mg (Novartis, ABD)

Formik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)

Asetonitril (ultra gradiyent grade) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Metanol (ultra gradiyent grade) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Yüksek saflıkta su (HPLC saflıkta)

3.2. Çözeltiler

3.2.1. Hareketli Fazlar

Hareketli faz A (% 0.5 Formik asit içeren metanol): 800 mL metanole 5 mL formik asit eklendi. 1000 mL'ye metanol ile tamamlandı ve karıştırıldı. 0,45 µm membran filtreden süzüldü.

Hareketli faz B (% 0.5 Formik asit içeren su): 800 mL suya 5 mL formik asit eklendi. 1000 mL'ye su ile tamamlandı ve karıştırıldı. 0,45 µm membran filtreden süzüldü.

3.2.2. Levodopa, Karbidopa ve Entakapon Miktar Tayini Analizi İçin Hazırlanan Çözeltiler

Levodopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg levodopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi (C_{levodopa} : 4,0 µg/mL).

Karbidopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg karbidopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 0,5 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{karbidopa}}$: 1,0 µg/mL).

Entakapon Stok Standart Hazırlığı: 10 mg entakapon standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{entakapon}}$: 4,0 µg/mL).

Standart Hazırlığı: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı (C_{levodopa} : 0,2 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,05 µg/mL, $C_{\text{entakapon}}$: 0,2 µg/mL).

Numune Hazırlığı 1 (Levodopa ve Karbidopa için): Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarıldı ve bir miktar mobil faz B ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. (C_{levodopa} : 0,2 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,05 µg/mL).

Numune Hazırlığı 2 (Entakapon için): Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarıldı ve ve bir miktar mobil faz A ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz A ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz A ile hacmine tamamlandı ($C_{\text{Entakapon}}$: 0,2 $\mu\text{g/mL}$).

3.2.3. Safsızlıkların Tayini İçin Hazırlanan Çözeltiler

Levodopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Levodopa Safsızlık B standardı ve 2,5 mg Levodopa Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Levodopa Safsızlık B}}$: 4 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Levodopa Safsızlık C}}$: 4 $\mu\text{g/mL}$).

Karbidopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg metildopa standardı ve 2,5 mg metilkarbidopa standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz B ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hacmine aynı çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{metildopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$).

Entakapon safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Entakapon Safsızlık A standardı ve 2,5 mg Entakapon Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz A ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile hacmine tamamlandı ($C_{\text{Entakapon Safsızlık A}}$: 3 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Entakapon Safsızlık C}}$: 3 $\mu\text{g/mL}$).

Standart çözeltisi: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı ($C_{\text{Levodopa Safsızlık B}}$: 0,4 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Levodopa Safsızlık C}}$: 0,4 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,25 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 0,25 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Entakapon Safsızlık A}}$: 0,3 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Entakapon Safsızlık C}}$: 0,3 $\mu\text{g/mL}$).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarıldı ve bir miktar mobil faz B ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı ($C_{levodopa}$: 200 µg/mL, $C_{karbidopa}$: 50 µg/mL, $C_{entakapon}$: 200 µg/mL).

3.3. Aletler ve Diğer Gereçler

1. Shimadzu UFLC XR HPLC Sistemi (Kyoto, Japonya)

Yüksek basınçlı pompa (LC-20 AD XR)

Soğutuculu Otomatik Örnekleyici (SIL-20 AC HT)

Kolon Fırını (CTO-10 AS VP)

Diode Array Dedektör (Nexera X2 SPD-30A)

Lab Solutions Yazılımı (Version 5.6 SP2)

Entegre Bilgisayar (İntel Pentium Core 2 işlemci, 2048 MB Ram)

MS Windows 7 Professional Edition

2. Shimadzu LCMS-8030 Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS)

3. Shimadzu IRPrestige-21, PIKE Miracle ATR FT-IR Cihazı

4. Yazılımlar:

MS Office XP Excel

MS Office XP Word

Cambridge ChemDraw programı (Cambridge, ABD)

5. HPLC Kolonları:

Agilent Zorbax SB C18 (250 mm x 4,6 mm iç çap, 5 µm) (Kaliforniya, ABD)

Thermo Hypersil BDS C8(250 mm x 4,6 mm iç çap, 5 µm) (Waltham, ABD)

MZ Kromasil 100 C18 (250 mm x 4,6 mm iç çap, 3,5 µm) (Mainz, Almanya)

6. Elga Purelab Flex 2 Su Saflaştırma Sistemi (Saint-Maurice, Fransa)

7. Millipore numune süzme filtresi 0,45 µm (Massachusetts, ABD)
8. Millipore hareketli faz süzme filtresi 0,45 µm (Massachusetts, ABD)
9. Metrohm 780 pH metre (Herisau, İsviçre)
10. Karıştırıcılar:
Heidolph Manyetik Karıştırıcı MR 3001 (Schwabach, Almanya)
Heidolph Tüp Karıştırıcı Reax Top (Schwabach, Almanya)
Heidolph Rotary Buharlaştırıcı (Schwabach, Almanya)
11. Analitik Teraziler
Sartorius LA 200 Terazi (Goettingen, Almanya)
Sartorius Genius Terazi (Goettingen, Almanya)
Mettler Toledo Ultra Micro Terazi XP2U (Greifensee, İsviçre)
12. Eppendorf Otomatik Pipetler (Hamburg, Almanya)
20-200 µl
100-1000 µl
500-5000 µl arasında
13. Bandelin Sonorex Ultrasonik Banyo (Berlin, Almanya)
14. Waters Vida kapaklı HPLC Vialleri 2 ml (Massachusetts, ABD)
15. Cam Malzemeler:
Isolab Balonjoje (5, 10, 100, 250 ml) (Wertheim, Almanya)
Isolab Mezür (500 ml, 1000 ml) (Wertheim, Almanya)
Isolab Beher (500 ml, 1000 ml) (Wertheim, Almanya)

3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

3.4.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları

3.4.1.1. Hareketli Faz ve Çözücü Sisteminin Geliştirilmesi

Kütle dedektöründe analitlere ait en iyi yanıtın elde edilebilmesi için iyi iyonlaşma sağlayan ve uzun süreli çalışmalar sonrasında dedektörün kaynak bölümünde katı tuz birikintisi oluşturmeyen çözücü ve hareketli fazın belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. Kütle dedektörü çalışmalarında çözelti ve hareketli faz hazırlığında yaygın olarak kullanılan amonyum asetat, amonyum format ve formik asit içeren çeşitli çözeltiler denendi. Bu amaçla Tablo 3-1’de belirtilen çözeltiler kullanılarak standart çözeltiler hazırlanarak HPLC vialine kondu. 1 den 4 e kadar sıra numarası verilen her bir çalışma için HPLC pompası 0.3 mL/dakika akış hızına ayarlandı ve tabloda belirtilen hareketli faz A ve hareketli faz B nin eşit oranlarda karışımı ile doğrudan MS /MS dedektörüne 10 µL lik enjeksiyonlar yapıldı.

Tablo 3-1: Hareketli faz belirleme çalışmalarında kullanılan hareketli faz bileşenleri

Çalışma	Hareketli faz A	Hareketli Faz B
1	% 2 lik formik asit metanoldeki çözeltisi	5 mM amonyum format ve % 2 lik formik asit karışımı pH 2,0
2	% 2 lik formik asit metanoldeki çözeltisi	5 mM amonyum asetat ve % 2 lik formik asit karışımı
3	% 2 lik formik asit metanoldeki çözeltisi	% 2 lik formik asit
4	% 0,5 lik formik asit metanoldeki çözeltisi	% 0,5 lik formik asit

Çalışmalar sırasında kullanılan standart çözeltilerinin hazırlanışı:

Levodopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg levodopa standardı tartıldı. 50 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL Hareketli faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 10 mL’ye aynı çözücü ile seyreltildi (C_{levodopa} : 0,04 mg/mL)

Karbidopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg karbidopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL Hareketli faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 0,5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{karbidopa}}$: 0,01 mg/mL).

Entakapon Stok Standart Hazırlığı: 10 mg entakapon standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 10 mL'ye diluent ile seyreltildi ($C_{\text{entakapon}}$: 0,04 mg/mL).

Levodopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Levodopa Safsızlık B standardı ve 2,5 mg Levodopa Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, diluent ile çözülür ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Karbidopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg metildopa standardı ve 2,5 mg metilkarbidopa standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, diluent ile çözülür ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Entakapon Safsızlık A standardı ve 2,5 mg Entakapon Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, metanol ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

Hazırlanan çözelti ile tarama çalışması yaparak ana (precursor) iyonların elde edilmesi amaçlandı. Ana iyonların elde edildiği çözücü ve hareketli faz sistemlerinde PIS (product ion scan) çalışması yapılarak ürün (product) iyonlarının en verimli şekilde dedekte edildiği çözücüler tespit edildi. Bu çalışma ile olabildiğince çok sayıda ürün iyonu elde edilmesi amaçlandı. En uygun çözücü elde edildikten sonra en kararlı ürün iyonlarının elde edilmesi için belirlenen HPLC kolonu ile de 3.4.1.2. de ayrıca ürün iyonları belirleme çalışması yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.1' de verilmiştir.

3.4.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi

Ana iyonun belirlenmesi için bölüm 3.4.1.1’de belirtildiği şekilde çözeltiler ayrı ayrı hazırlanarak HPLC vialine konuldu. HPLC pompası 0,3 mL/dakika akış hızına ayarlandı ve hareketli faz A (% 0,5 formik asit metanoldeki çözeltisi) ve hareketli faz B (% 0,5 formik asit sudaki çözeltisi) nin eşit oranlarda karışımı ile doğrudan MS /MS dedektörüne 10 µL lik enjeksiyonlar yapıldı. Analiz esnasında taranacak bölge olarak Tablo 3-2’de belirtilen m/z değerleri arası bir aralık belirlendi. Başlangıç m/z değerini belirlerken anlamlı seviyede parçalanma ürünlerinin elde edilmesi amaçlandı. Bitiş m/z değerinin belirlerken molekül ağırlığının üstünde bir değer olmasına dikkat edildi. Pozitif ve negatif modda tarama yapılarak en yüksek intensiteye sahip ana iyon belirlendi. Tarama sonucunda elde edilen ana (precursor) iyonlar bölüm 4.1.2 Tablo 4-5’de verilmektedir. Yapılan enjeksiyonlar sonunda elde edilen ve ana iyonları gösteren kütle spektrumları bölüm 4.1.2 Şekil 4-1 ve Şekil 4-9 arasında verilmektedir.

Tablo 3-2: Ana İyon Belirlenmesi İçin Kütle Dedektörü Yazılımına Girilen Parametreler

Madde adı	Molekül ağırlığı	Başlangıç m/z değeri	Bitiş m/z değeri
Levodopa	197	50	250
Karbidopa	226	50	300
Entakapon	305	50	350
Levodopa Safsızlık B	181	50	250
Levodopa Safsızlık C	211	50	300
Metildopa	211	50	300
Metilkarbidopa	240	100	300
Entakapon Safsızlık C	183	50	250
Entakapon Safsızlık A	305	100	350

Bölüm 3.4.1.1’de belirtilen çözeltiler enjekte edilerek bir önceki çalışmada belirlenen ana iyon değerlerinin de kullanılmasıyla parçalanma iyonları belirlendi. Bunun için cihaza ana iyon değeri ve beklenen parçalanma ürünleri m/z aralığı girildi (Tablo 3-2). Üç farklı çarpışma enerjisi voltajında (15, 25 ve 35 volt) taramalar yapılarak olası en

fazla miktarda ürün iyonun elde edilmesi hedeflendi. İlgilenilen maddeler için belirlenen ürün iyonları bölüm 4.1.2 Tablo 4-6 de yer almaktadır.

Elde edilen olası ürün iyonlarına ait m/z değerleri ve kütle dedektörünün bir özelliği olan çoklu reaksiyon izleme özelliği (MRM: Multi reaction monitoring) kullanılarak metot oluşturuldu. Cihazın bu iyonlar için otomatik olarak tarama yapması ve en verimli şekilde iyonlaşabildiği çarpışma enerjisi değerlerini bulması sağlandı. Tüm MRM çiftleri ve bunlara karşılık gelen çarpışma enerjisi değerleri tek bir metot altında toplanarak söz konusu iyon çiftlerinin HPLC kolonu ile çalışırken de kararlı olup olmadığı denendi. Her madde için tek tek elde edilen kütle spektrumları ve kromatogramları incelenerek en yüksek intensiteye sahip ilk iki iyon çifti belirlendi. Bu iyon çiftlerinden ilki miktar tayini hesaplamalarında, ikincisi ise ana iyonu doğrulamak amaçlı kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda elde edilen MRM çiftleri, dwell zamanları, çarpışma enerjileri ile bu değerler ile elde edilmiş olan intensite grafikleri bölüm 4.1.2 Tablo 4-7’de verilmiştir.

3.4.2. HPLC Kolonu Seçimi

Literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak HPLC çalışmalarında Tablo 3-3’de detayları verilen 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm çapında 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip Zorbax SB C18, aynı ebatlarda 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip Hypersil BDS C8 ve 3,5 µm tanecik büyüklüğüne sahip Kromasil C18 kullanılarak bölüm 3.4.3 (deneme gradiyent 1) de belirlenen diğer kromatografik koşullar altında bölüm 3.4.1.1 de belirtilen levodopa, karbidopa ve entakapon içeren standart çözelti hazırlandı ve 10 µl lik enjeksiyonlar yapılarak alan, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı gibi sistem uygunluk parametreler belirlendi. Sonuçlar bölüm 4.1.3’de verilmiştir.

Tablo 3-3: Denemelerde Kullanılan HPLC Kolonlarının Sabit Faz Özellikleri

Kolon	Gözenek çapı (Å)	İç yüzey alanı (m ² /g)	End- capping*	Karbon yükü oranı (%)
Agilent Zorbax SB C18	80	180	Yok	10
Thermo Hypersil BDS C8	130	170	Var	7
MZ Kromasil C18	100	320	Var	20

* Kolonların daha simetrik pik vermesi için üreticinin yapmış olduğu kimyasal işlem.

3.4.3. HPLC Gradyent Programının belirlenmesi

Farklı polaritelere sahip analitlerin kabul edilebilir bir süre içerisinde elde edilebilmesi için izokratik elüsyon yerine literatürde sıkça karşılaşıldığı üzere bir gradiyen programının geliştirilmesi hedeflendi. Kütle dedektörlerinde analiz için piklerin birbirinden başarılı bir şekilde ayrılmaları gerekmediği halde geliştirilen yöntemde bazı ana iyonların ve ürün iyonlarının aynı m/z değerlerine sahip olmaları ve benzer iyonlaşma karakteristikleri sergilemeleri sebebiyle kritik bazı pik çiftlerinin kromatografik olarak ayrılması hedeflendi. Özellikle levodopa safsızlık C ve metildopa ile entakapon safsızlık A ve entakapon çiftlerinin ayrılması için gradiyen sistem geliştirildi. Bu amaç doğrultusunda gradiyent programları Tablo 3-4, 3-5 ve 3-6 da verilen 3 adet deneme yapılmış ve elde edilen son deneme ile ayrımlar sağlanmıştır.

Deneme 1:

Hareketli Faz A: Metanol.

Hareketli Faz B: % 2 formik asit içeren HPLC grade su.

Akış Hızı: 0,8 ml/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 30 °C

Tablo 3-4: Deneme 1 de uygulanan gradiyent program

Zaman (dakika)	% Hareketli Faz A	% Hareketli Faz B
	(h/h)	(h/h)
0.01	5	95
10.0	20	80
32.0	75	25
32.01	5	95
45.0	5	95

Deneme 2:

Organik faz çözücüsü olarak hareketli fazda metanol yerine asetronitril denendi:

Hareketli Faz A: Asetonitril.

Hareketli Faz B: % 2 formik asit içeren HPLC grade su.

Akış Hızı: 0,8 ml/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 30 °C

Tablo 3-5: Deneme 2 de uygulanan gradiyent program

Zaman (dakika)	% Hareketli Faz A	% Hareketli Faz B
	(h/h)	(h/h)
0.01	5	95
10.0	20	80
32.0	75	25
32.01	5	95
45.0	5	95

Deneme 3:

Elüsyon süresinin kısaltılması amacıyla metanol ve tampon çözelti içeren hareketli faz bileşenlerinin farklı bir zaman programı denendi.

Hareketli Faz A: Metanol.

Hareketli Faz B: % 0,5 formik asit içeren HPLC grade su.

Akış Hızı: 0,5 ml/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 30 °C

Tablo 3-6: Deneme 3 de uygulanan gradiyent program

Zaman (dakika)	% Hareketli Faz A	% Hareketli Faz B
	(h/h)	(h/h)
0,01	5	95
10,0	15	85
22,0	95	5
25,0	95	5
25,01	5	95
30,0	5	95

Deneme 1, 2 ve 3 sonucunda elde edilen kromatogramlar ve sistem uygunluk parametreleri Bölüm 4.1.4’de verilmiştir.

3.5. Geliştirme Çalışmaları Sonunda Elde Edilen Analitik Yöntem

Kromatografik Şartlar

Kolon	: MZ Kromasil 100 C18 (250 mm × 4.6 mm), 3.5µm
Kolon sıcaklığı	: 30.0 °C
Numune sıcaklığı	: 15.0 °C
Akış hızı	: 0.5 mL/dak
Dalga boyu	: 280 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 10.0 µL
Analiz süresi	: 30 dak

MS şartları:

Kaynak	: ESI (Electron Spray Ionization)
Interface Sıcaklığı	: 350°C
Nebulizasyon gazı	: Azot
Nebulizasyon gazı akış hızı	: 2.5 L/ dakika
DL sıcaklığı	: 250°C
Heatblock sıcaklığı	: 500°C
Drying Gas Akışı	: 15 L /dakika
Interface Voltajı	: 4.5 kV

HPLC sistemi

Cihaz	: Shimadzu UFLC XR HPLC Sistemi
Sistem	: Yüksek basınçlı pompa (LC-20 AD XR)
	: Soğutuculu Otomatik Örnekleyici (SIL-20 AC HT)
	: Kolon Fırını (CTO-10 AS VP)
	: Diode Array Dedektör (Nexera X2 SPD-30A)
	: Lab Solutions Yazılımı (Version 5.6 SP2)

Kütle Spektroskopi sistemi:

Cihaz	: Shimadzu LCMSMS-8030
--------------	------------------------

MS parametreleri ve gradiyent bilgileri Tablo 3-7, 3-8 ve 3-9’da verilmiştir.

Tablo 3-7: Aktif Maddelerin Miktar tayini MS/MS parametreleri

Madde	Alıkonma Zamanı (dakika)	MRM Mod	Ana iyon (m/z)	Ürün iyonu (m/z)	Dwell zamanı (ms)	CE (+) (V)
Levopoda	9,6	(+)	198.10	152.10*	50	-15
		(+)	198.10	181.10	50	-13
Karbidopa	16,7	(+)	227.10	181.00*	100	-12
		(+)	227.10	71.00	100	-24
Entakapon	25,2	(+)	306.40	232.90*	50	-17
		(+)	306.40	71.90	50	-31

*İlk satırlardaki MRM çiftleri miktar tayini hesaplamalarında kullanılmıştır. İkinci satırdaki MRM çiftleri ise tanıma amaçlı kullanılmıştır.

Mobil Faz A: % 0,5 Formik asit içeren metanol.

Mobil Faz B: % 0,5 formik asit içeren HPLC grade su.

Tablo 3-8: Gradiyent Programı

Zaman (dakika)	% Mobil Faz A (h/h)	% Mobil Faz B (h/h)
0.01	5	95
10.0	15	85
22.0	95	5
25.0	95	5
25.01	5	95
30.0	5	95

3.5.1. Levodopa, Karbidopa ve entakapon miktar tayini analizi

Levodopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg levodopa standardı tartılır. 50 mL'lik balon jojeye aktarılır. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltilir (C_{levodopa} : 0,004 mg/mL)

Karbidopa Stok Standart Hazırlığı: 10 mg karbidopa standardı tartılır. 50 mL'lik balon jojeye aktarılır. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 0.5 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltilir ($C_{\text{karbidopa}}$: 0,001 mg/mL).

Entakapon Stok Standart Hazırlığı: 10 mg entakapon standardı tartılır. 50 mL'lik balon jojeye aktarılır. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL'ye aynı çözücü ile seyreltilir ($C_{\text{entakapon}}$: 0,004 mg/mL).

Standart Hazırlığı: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarılır ve mobil faz B ile hacmine tamamlanır ($C_{\text{levodopa}}: 0,2 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}: 0,05 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}: 0,2 \mu\text{g/mL}$).

Numune Hazırlığı 1 (Levodopa ve Karbidopa için): Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarılır ve bir miktar mobil faz B ile çözünür. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırılır. Hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve aynı çözücü ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltilir ($C_{\text{levodopa}}: 0,2 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}: 0,05 \mu\text{g/mL}$).

Numune Hazırlığı 2 (Entakapon için): Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarılır ve ve bir miktar mobil faz A ile çözünür. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırılır. Hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve mobil faz A ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltilir ($C_{\text{entakapon}}: 0,2 \mu\text{g/mL}$).

Yöntem

- Standart çözelti 1, 6 kez enjekte edilir ve sistem uygunluğu parametreleri kontrol edilir.
- Standart çözelti 2, 2 kez enjekte edilir.
- Numune çözeltileri 1'er kez enjekte edilir

Sistem Uygunluk

- Standart Çözeltisi 1'den altı enjeksiyon yapılır ve ardışık altı enjeksiyondan elde edilen rölatif standart sapma $RSD \leq \% 2.0$ olmalıdır
- Standart çözelti ile kontrol standart çözelti arasındaki uyum $\% 98.0$ ile $\% 102.0$ arasında olmalıdır.

Hesaplama (Levodopa ve Entakapon için)

Aşağıdaki hesaplama formülüne göre numune içindeki levodopa ve entakapon miktarları hesaplanır (Denklem 3-1):

$$\frac{A_u}{A_s} \times \frac{W_s}{50} \times \frac{2}{10} \times \frac{1}{20} \times \frac{200}{W_n} \times \frac{100}{1} \times \frac{10}{1} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100 = \quad (\text{Denklem 3-1})$$

- A_u : Numune çözeltisi kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanı.
 A_s : Standart çözeltisi 1 kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanları ortalaması.
 P : Standardının % as is potensi.
 W_s : Standart tartımı, mg.
 W_{ort} : Ortalama tablet ağırlığı, mg.
 L : İlgilenilen maddenin Etiket değeri (Levodopa: 200 mg, Carbidopa: 50 mg, Entakapon: 200 mg)

Hesaplama (Karbidoa için)

Aşağıdaki hesaplama formülüne göre numune içindeki karbidopa miktarları hesaplanır (Denklem 3-2):

$$\frac{A_u}{A_s} \times \frac{W_s}{50} \times \frac{0.5}{10} \times \frac{1}{20} \times \frac{200}{W_n} \times \frac{100}{1} \times \frac{10}{1} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100 = \quad (\text{Denklem 3-2})$$

- A_u : Numune çözeltisi kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanı.
 A_s : Standart çözeltisi 1 kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanları ortalaması.
 P : Standardının % as is potensi.
 W_s : Standart tartımı, mg.
 W_{ort} : Ortalama tablet ağırlığı, mg.
 L : İlgilenilen maddenin Etiket değeri (Levodopa: 200 mg, Carbidopa: 50 mg, Entakapon: 200 mg)

3.5.2. Levodopa, Karbidopa ve entakapon aktif maddelerine ait safsızlıkların miktar tayini analizi

Tablo 3-9: Aktif Maddelere Ait Safsızlıkların MS/MS parametreleri

Madde	Alınma Zamanı (dakika)	MRM Mod	Ana iyon (m/z)	Ürün iyonu (m/z)	Dwell zamanı (ms)	CE (+) (V)
Levopoda Safsızlık B	12,7	(+)	182,30	136,00*	50	-14
		(+)	182,30	90,90	50	-30
Metildopa	15,0	(+)	212,30	165,90*	50	-12
		(+)	212,30	194,80	50	-15
Levopoda Safsızlık C	16,5	(+)	212,30	194,90*	50	-15
		(+)	212,30	166,10	50	-11
Metilkarbidopa	19,4	(+)	241,40	195,00*	50	-13
		(+)	241,40	70,90	50	-22
Entakapon Safsızlık C	23,1	(-)	182,10	164,90*	50	21
		(-)	182,10	107,00	50	29
Entakapon Safsızlık A	24,5	(-)	304,10	66,00*	50	26
		(-)	304,10	184,00	50	31

*İlk MRM çifti miktar tayini hesaplamalarında kullanılmıştır. İkinci satırdaki MRM çifti ise tanıma amaçlı kullanılmıştır.

Levodopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Levodopa Safsızlık B standardı ve 2,5 mg Levodopa Safsızlık C standardı tartılır ve 25 mL lik balon jojeye aktarılır, mobil faz B ile çözülür ve hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve hacmine aynı çözücü ile tamamlanır.

Karbidopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg metildopa standardı ve 2,5 mg metilkarbidopa standardı tartılır ve 25 mL lik balon jojeye aktarılır, mobil faz B ile çözülür ve hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve hacmine hacmine aynı çözücü ile tamamlanır.

Entakapon safsızlıkları stok çözeltisi: 2,5 mg Entakapon Safsızlık A standardı ve 2,5 mg Entakapon Safsızlık C standardı tartılır ve 25 mL lik balon jojeye aktarılır, mobil faz A ile çözülür ve hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve hacmine aynı çözücü ile hacmine tamamlanır.

Standart çözeltisi: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarılır ve mobil faz B ile hacmine tamamlanır.

Numune Hazırlığı: Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) film kaplı tablete ait 160 mg tablet tozu 200 mL balonjojeye aktarılır ve bir miktar mobil faz B ile çözünür. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırılır. Hacmine aynı çözücü ile tamamlanır.

Hesaplama (Levodopa safsızlıkları)

$$\frac{A_{imp}}{A_s} \times \frac{W_s}{25} \times \frac{4}{100} \times \frac{1}{10} \times \frac{200}{W_n} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100 = \quad (\text{Denklem 3-3})$$

Hesaplama (Karbidopa safsızlıkları)

$$\frac{A_{imp}}{A_s} \times \frac{W_s}{25} \times \frac{2.5}{100} \times \frac{1}{10} \times \frac{200}{W_n} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100 = \quad (\text{Denklem 3-4})$$

Hesaplama (Entakapon safsızlıkları)

$$\frac{A_{imp}}{A_s} \times \frac{W_s}{25} \times \frac{3}{100} \times \frac{1}{10} \times \frac{200}{W_n} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100 = \quad (\text{Denklem 3-5})$$

- A_{imp} : Numune çözeltisi kütle spektrumunda ilgilenilen safsızlık pik alanı.
 A_s : Standart çözeltisi 1 kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanları ortalaması.
 P : Standardının % as is potensi.
 W_s : Safsızlık Standardı tartımı, mg.
 W_{ort} : Ortalama tablet ağırlığı, mg.
 L : İlgilenilen maddenin Etiket değeri (Levodopa: 200 mg, Carbidopa: 50 mg, Entakapon: 200 mg)

3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Yöntem geliştirme çalışmaları tamamlandıktan ve final analitik yönteme ulaşıldıktan sonra yöntem validasyonu güncel ICH Kılavuzu Q2'ye göre yapıldı (59).

3.6.1. Seçicilik

Seçicilik numune matrisi içinde bulunması muhtemel bileşenlerin doğru ve güvenilir bir şekilde tayin edebilme yeteneğidir. Kütle dedektörü MRM modu ile analitler uygun sayıda iyon çiftleri ile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmektedir.

Kabul kriteri: Numune matrisinde bulunan bileşenler (tablet plasebosu) ve ilgilenilen maddeler birbirleri ile girişim yapmamalıdır.

3.6.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Bir metoda ait teşhis sınırı (LOD), metot ile gözlemlenebilen ancak kantitatif olarak tayin edilmesi gerekli olmayan en düşük konsantrasyondur.

Bir metoda ait tayin sınırı (LOQ), uygun hassasiyet ve geri kazanım ile tayin işleminin yapılabildiği en düşük konsantrasyondur.

Bu konsantrasyonların belirlenmesi için yüksekten düşüğe doğru hazırlanan konsantrasyona doğru enjekte edilen çözeltilerin sinyal / gürültü (s/n) oranları hesaplandı ve görsel değerlendirme yoluyla değerlendirme yapıldı.

Levodopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,4629 mg Levodopa Safsızlık B standardı ve 2,8635 mg Levodopa Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz B ile çözülür ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Karbidopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,526 mg metildopa standardı ve 2,5082 mg metilkarbidopa standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz B ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1,25 mL alınarak 50 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon safsızlıkları stok çözeltisi: 1,2463 mg Entakapon Safsızlık C standardı ve 1,2901 mg Entakapon Safsızlık A standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz A ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 50 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

Standart çözeltisi: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{levodopa\ B}$: 0,3941 $\mu\text{g/mL}$, $C_{levodopa\ C}$: 0,3986 $\mu\text{g/mL}$, $C_{metildopa}$: 0,2526 $\mu\text{g/mL}$, $C_{metilcarbido}$: 0,2508 $\mu\text{g/mL}$, $C_{entakapon\ C}$: 0,2979 $\mu\text{g/mL}$, $C_{entakapon\ A}$: 0,3096 $\mu\text{g/mL}$)

Yukarıda hazırlanan standart çözeltisinden çeşitli seyreltmeler yapılarak seri enjeksiyonlar yapıldı, cihazın enjeksiyonlara ait gürültü/sinyal (s/n) değerleri hesaplatıldı. s/n değeri için yaklaşık 3:1 oranına sahip konsantrasyonlar teşhis sınırı (LOD), yaklaşık 10:1 oranına sahip konsantrasyonlar ise tayin sınırı (LOQ) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

Kabul Kriterleri: Teşhis sınırı olarak belirlenmiş konsantrasyonda maddeleri içeren çözeltinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramda pikler kolaylıkla detekte edilebilmeli ve piklere ait sinyal gürültü oranının yaklaşık 2 veya 3 olması gereklidir.

Tayin sınırı olarak belirlenmiş konsantrasyonlarda maddeleri içeren çözeltinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramda pikler gerekli hassasiyet ve geri kazanım kriterleri içinde tayin edilebilmeli ve piklere ait sinyal gürültü oranının yaklaşık 10 olması gereklidir.

Tayin sınırı olarak belirlenmiş konsantrasyonlarda maddeleri içeren çözeltinin ardışık 6 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlarda piklere ait alanlar arasındaki % RSD değeri 20,0 den fazla olmamalıdır.

3.6.3. Doğrusallık

Bir analitik metodun doğrusallığı, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonuna karşı elde edilen test sonucunun belirli bir aralık içinde doğrusal olması olarak açıklanır (59).

3.6.3.1. Miktar Tayini için doğrusallık

Levodopa Stok Standart Hazırlığı: 10,70 mg levodopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Karbidopa Stok Standart Hazırlığı: 11,03 mg karbidopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon Stok Standart Hazırlığı: 10,22 mg entakapon standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Karışım Stok Standart Hazırlığı: Stok standart çözeltielerinden sırası ile 2 mL, 0,5 mL ve 2 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa}}: 4.24148 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}: 1,011451 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}: 4.08391 \mu\text{g/mL}$)

% 50 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

% 80 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 4,0 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

% 90 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 4,5 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

% 100 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 5,0 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

% 120 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 6,0 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

% 150 standart çözeltisi: Karışım stok standart çözeltisinden 7,5 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözelti ile tamamlandı.

İşlem: Hazırlanan her konsantrasyon seviyesinden 3'er enjeksiyon yaparak en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri elde edildi. Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri Bölüm 4.2.3.1 de verilmiştir.

3.6.3.2. Safsızlıklar için doğrusallık

Levodopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,58 mg Levodopa Safsızlık B standardı ve 2,86 mg Levodopa Safsızlık C standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz B ile çözüldü ve hacmine tamamlandı.

Karbidopa safsızlıkları stok çözeltisi: 2,48 mg metildopa standardı ve 2,63 mg metilkarbidopa standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz B ile çözüldü ve hacmine tamamlandı.

Entakapon safsızlıkları stok çözeltisi: 1,27 mg Entakapon Safsızlık C standardı ve 1,61 mg Entakapon Safsızlık A standardı tartıldı ve 25 mL lik balon jojeye aktarıldı, mobil faz A ile çözüldü ve hacmine tamamlandı.

% 400 Standart çözeltisi: Levodopa, karbidopa ve entakapon stok standart çözeltilerinin her birinden sırasıyla 1,6 mL, 1,0 mL ve 1,2 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}: 1,6512 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}: 1,5925 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}: 0,992 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}: 1,052 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}: 0,5256 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}: 0,6072 \mu\text{g/mL}$)

% 5 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 1,25 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,02064 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,01991 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,0124 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,01315 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 0,0076 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,0067 $\mu\text{g/mL}$)

% 10 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,04128 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,03981 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,0248 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,0263 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 0,01518 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,01339 $\mu\text{g/mL}$)

% 25 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 1,25 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,1032 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,09953 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,062 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,06575 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 0,03795 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,0335 $\mu\text{g/mL}$)

% 50 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,2064 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,1991 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,124 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,1315 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon c}}$: 0,07589 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,0669 $\mu\text{g/mL}$)

% 100 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 5,0 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,4128 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,3981 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,248 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,263 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 0,1518 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,1339 $\mu\text{g/mL}$)

% 160 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 4,0 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}$: 0,6605 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 0,6370 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 0,3968 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 0,4208 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 0,2429 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 0,2142 $\mu\text{g/mL}$)

% 200 Standart çözeltisi: % 400 standart çözeltisinden 5,0 mL alınarak 10 mL lik balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}: 0,8256 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}: 0,7962 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}: 0,496 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilcarbidopa}}: 0,526 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}: 0,3036 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}: 0,2678 \mu\text{g/mL}$)

İşlem: Hazırlanan 8 seviye doğrusallık çözeltilerinin her birinden 3 er adet enjeksiyon yapıldı ve en küçük kareler metoduna göre doğrusallık denklemleri ve grafikleri elde edildi. Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri Bölüm 4.2.3 de verilmiştir.

Kabul Kriteri: Tüm pikler için korelasyon katsayısı (r) 0,99 dan az olmamalıdır. Y-kesim değeri aktif maddeler miktar tayini için % 2 den fazla, safsızlıklar için % 10 dan fazla olmamalıdır.

3.6.4. Doğruluk

Analitik metodun doğruluğu, referans kabul edilen bir değerin, bulunan değere yakınlığıdır (59).

3.6.4.1. Miktar tayini için doğruluk

Levodopa Stok Standart Hazırlığı: 10,78 mg levodopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Karbidopa Stok Standart Hazırlığı: 11,08 mg karbidopa standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 0,5 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon Stok Standart Hazırlığı: 10,24 mg entakapon standardı tartıldı. 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Standart Çözelti Hazırlığı: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 20 mL balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. (C_{levodopa} : 0,21366 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,05080 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 0,20459 $\mu\text{g/mL}$)

Numune hazırlığı için kullanılan stok çözeltiler:

Stok standart çözeltisi 1: 10,81 mg levodopa, 11,2 mg karbidopa ve 10,12 mg entakapon standartları ayrı ayrı 50 mL balon jöjelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre standart çözelti hazırlanır. Elde edilen son çözeltide konsantrasyonlar C_{levodopa} : 0,214254 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,051352 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 0,202198 $\mu\text{g/mL}$ dir.

Stok standart çözeltisi 2: 10,6 mg levodopa, 11,11 mg karbidopa ve 10,22 mg entakapon standartları ayrı ayrı 50 mL balon jöjelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre standart çözelti hazırlanır. Elde edilen son çözeltide konsantrasyonlar C_{levodopa} : 0,210092 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,050939 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 0,204196 $\mu\text{g/mL}$ dir.

Stok standart çözeltisi 3: 10,71 mg levodopa, 11,35 mg karbidopa ve 10,49 mg entakapon standartları ayrı ayrı 50 mL balon jöjelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre standart çözelti hazırlanır. Elde edilen son çözeltide konsantrasyonlar C_{levodopa} : 0,212272 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 0,05204 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 0,20959 $\mu\text{g/mL}$ dir.

% 50 seviyesinde numune çözeltisi:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 175 mg tablet plasebo tozu 500 mL balonjojeye aktarıldı ve bir miktar mobil faz B ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1 mL si ile Tablo 3-10'da belirtilen stok standart çözeltisinden 0,25 mL alınarak 10 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine mobil faz B ile tamamlandı.

Tablo 3-10: Aktif maddeler doğruluk numuneleri hazırlama tablosu

Numune çözeltisi	Alınan stok çözelti	Alınan miktar (mL)	Son Hacim (mL)
% 50 seviyesinde numune çözeltisi 1	Stok standart çözeltisi 1	0,25	10 mL
% 50 seviyesinde numune çözeltisi 2	Stok standart çözeltisi 2	0,25	10 mL
% 50 seviyesinde numune çözeltisi 3	Stok standart çözeltisi 3	0,25	10 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 1	Stok standart çözeltisi 1	0,50	10 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 2	Stok standart çözeltisi 2	0,50	10 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 3	Stok standart çözeltisi 3	0,50	10 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 1	Stok standart çözeltisi 1	0,75	10 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 2	Stok standart çözeltisi 2	0,75	10 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 3	Stok standart çözeltisi 3	0,75	10 mL

% 100 seviyesinde numune çözeltisi:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 175 mg tablet plasebo tozu 500 mL balonjojeye aktarıldı ve bir miktar mobil faz B ile çözündü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1 mL si ile Tablo 3-10'da belirtilen stok standart çözeltisinden 0,50 mL alınarak 10 mL balon jojeye aktarılır ve hacmine mobil faz B ile tamamlanır.

% 150 seviyesinde numune çözeltisi:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 175 mg tablet plasebo tozu 500 mL balonjojeye aktarılır ve bir miktar mobil faz B ile çözünür. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırılır. Hacmine aynı çözücü ile tamamlanır. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarılır ve aynı çözücü ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltinin 1 mL si ile Tablo 3-10'da belirtilen stok standart çözeltisinden 0,75 mL alınarak 10 mL balon jojeye aktarılır ve hacmine mobil faz B ile tamamlanır.

İşlem:

Standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve ortalama alanlar elde edildi. % 50, % 100 ve % 150 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3'er numune hazırlandı ve ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplandı. Teorik konsantrasyon ve deneysel konsantrasyon değerleri kullanılarak geri kazanımlar Denklem 3-6'ya göre hesaplandı.

$$\text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneysel Konsantrasyon}}{\text{Teorik Konsantrasyon}} \times 100 \quad (\text{Denklem 3-6})$$

Geri kazanım sonuçları Bölüm 4.2.4.1'de verilmiştir.

3.6.4.2. Safsızlıklar için doğruluk

Levodopa Safsızlık B Stok Standart Hazırlığı: 2,4629 mg levodopa safsızlık B standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Levodopa Safsızlık C Stok Standart Hazırlığı: 2,8635 mg levodopa safsızlık C standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak 100 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Metildopa Stok Standart Hazırlığı: 2,526 mg metildopa standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,25 mL alınarak 50 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Metilkarbidopa Stok Standart Hazırlığı: 2,5082 mg metilkarbidopa standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz B ilave edip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,25 mL alınarak 50 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon Safsızlık C Stok Standart Hazırlığı: 1,2463 mg entakapon safsızlık C standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edilip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 50 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Entakapon Safsızlık A Stok Standart Hazırlığı: 1,2901 mg entakapon safsızlık A standardı tartıldı. 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL mobil faz A ilave edilip çözdükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak 50 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Standart Çözelti Hazırlığı: Stok standart çözeltilerinin her birinden 1 mL alınarak 10 mL balon jojeye aktarıldı ve mobil faz B ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{levodopa B}}: 0,3941 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}: 0,3986 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}: 0,2526 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}: 0,2508 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}: 0,2979 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}: 0,3096 \mu\text{g/mL}$)

Numune hazırlığı için kullanılan stok çözeltiler:

Stok standart çözeltisi 1: 2,5211 mg levodopa safsızlık B standardı, 2,7901 mg levodopa safsızlık C standardı, 2,5121 mg metildopa standardı, 2,5179 mg metilkarbidopa standardı, 1,252 mg entakapon safsızlık C standardı ve 1,2930 mg entakapon safsızlık A standartları ayrı ayrı 25 mL balon jojelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre stok standart çözeltiler hazırlandı.

LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 1: Yukarıda hazırlanan stok standart çözeltilerinden levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlık C ve entakapon safsızlık A için sırasıyla 1 mL, 4 mL, 1 mL, 4 mL, 1,7 mL ve 0,6 mL alınarak 1000 mL ye mobil faz B ile seyreltildi.

Stok standart çözeltisi 2: 2,5309 mg levodopa safsızlık B standardı, 2,8231 mg levodopa safsızlık C standardı, 2,5077 mg metildopa standardı, 2,498 mg metilkarbidopa standardı, 1,2611 mg entakapon safsızlık C standardı ve 1,296 mg entakapon safsızlık A standartları ayrı ayrı 25 mL balon jojelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre stok standart çözeltiler hazırlandı.

LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 2: Yukarıda hazırlanan stok standart çözeltilerinden levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlık C ve entakapon safsızlık A için sırasıyla 1 mL, 4 mL, 1 mL, 4 mL, 1,7 mL ve 0,6 mL alınarak 1000 mL ye mobil faz B ile seyreltilmiştir.

Stok standart çözeltisi 3: 2,5089 mg levodopa safsızlık B standardı, 2,7987 mg levodopa safsızlık C standardı, 2,5031 mg metildopa standardı, 2,515 mg metilkarbidopa standardı, 1,2499 mg entakapon safsızlık C standardı ve 1,2879 mg entakapon safsızlık A standartları ayrı ayrı 25 mL balon jojelere tartılarak yukarıdaki anlatıma göre stok standart çözeltiler hazırlanmıştır.

LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 3: Yukarıda hazırlanan stok standart çözeltilerinden levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlık C ve entakapon safsızlık A için sırasıyla 1 mL, 4 mL, 1 mL, 4 mL, 1,7 mL ve 0,6 mL alınarak 1000 mL ye mobil faz B ile seyreltilmiştir.

Tablo 3-11’de safsızlıklar için doğruluk numunelerini hazırlarken hangi stok çözeltiden kaç mL alınacağı ve son hacim olarak kaç mL’ye tamamlanacağı gösterilmiştir.

Tablo 3-11: Safsızlıklar için doğruluk numuneleri hazırlama tablosu

Numune çözeltisi	Alınan stok çözelti	Alınan miktar (mL)	Son Hacim (mL)
LOQ seviyesinde numune çözeltisi 1	LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 1	100	100 mL
LOQ seviyesinde numune çözeltisi 2	LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 2	100	100 mL
LOQ seviyesinde numune çözeltisi 3	LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 3	100	100 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 1	Stok standart çözeltisi 1	10	100 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 2	Stok standart çözeltisi 2	10	100 mL
% 100 seviyesinde numune çözeltisi 3	Stok standart çözeltisi 3	10	100 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 1	Stok standart çözeltisi 1	15	100 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 2	Stok standart çözeltisi 2	15	100 mL
% 150 seviyesinde numune çözeltisi 3	Stok standart çözeltisi 3	15	100 mL

LOQ seviyesinde numune çözeltileri:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 80 mg tablet tozu 100 mL balonjojeye aktarıldı ve bir miktar LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 1 ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözelti ile tamamlandı. Bu çözeltinin aynısı LOQ seviyesi için stok standart çözeltisi 2 ve 3 kullanılarak hazırlandı. Toplam 3 farklı çözelti elde edilmiş oldu.

% 100 seviyesinde numune çözeltileri:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 80 mg tablet tozu 100 mL balonjojeye aktarıldı ve 10 mL stok standart çözeltisi 1 eklendi ve bir miktar mobil faz B ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Bu çözeltinin aynısı stok standart çözeltisi 2 ve 3 kullanılarak hazırlandı. Toplam 3 farklı çözelti elde edilmiş oldu.

% 150 seviyesinde numune çözeltisi:

Stalevo 200, 50, 200 mg (levodopa, karbidopa, entakapon) tablete ait 80 mg tablet tozu 100 mL balonjojeye aktarıldı ve 15 mL stok standart çözeltisi 1 eklendi ve bir miktar mobil faz B ile çözüldü. 30 dakika mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacmine aynı çözücü ile tamamlandı.

Bu çözeltinin aynısı stok standart çözeltisi 2 ve 3 kullanılarak hazırlandı. Toplam 3 farklı çözelti elde edilmiş oldu.

İşlem:

Standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve ortalama alanlar elde edildi. LOQ, % 100 ve % 150 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3'er numune hazırlandı ve ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar ng/mL cinsinden hesaplandı. Teorik konsantrasyon ve deneysel konsantrasyon değerleri kullanılarak geri kazanımlar Denklem 3-6 'ya göre hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.4.2'de verilmiştir.

Kabul Kriteri: Aktif maddeler için geri kazanım sonuçları % 98,0- % 102,0 arasında olmalıdır. Safsızlık piklerine ait geri kazanım sonuçları için LOQ seviyesi için % 70,0-% 130,0 arasında diğer seviyeler için ise % 80,0 - % 120,0 arasında olmalıdır.

3.6.5. Kesinlik

Metodun kesinliği, aynı numuneden alınan veya hazırlanan çok sayıda numuneden elde edilen aynı gün içindeki sonuçların birbirlerine olan yakınlığı olarak açıklanır (59).

Bölüm 3.5 te anlatıldığı şekilde hazırlanan standart ve numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5’ de verilmiştir.

Kabul Kriteri: Aktif madde miktar tayini sonuçları arasında % RSD değeri % 2,0 den az olmalıdır. Safsızlıkların alanları arasındaki % RSD değeri % 10,0 dan az olmalıdır.

3.7. Kıyas Yöntemi ile Analiz

Tez çalışmasında geliştirilen yöntem, Vemic ve arkadaşları (49) ‘nın geliştirdikleri stabilite gösterir HPLC metodu ile kıyaslandı.

Geliştirilen yöntem ile film kaplı tablete ait levodopa, karbidopa ve entekapon miktar tayinleri analiz edildi ve kıyas yöntemi ile sonuçlar karşılaştırıldı. Kıyas yöntemi kromatografik koşulları ve çözelti konsantrasyonları şu şekildedir:

Kromatografik Şartlar

Kolon	: Zorbax Extend C18 (150 mm × 4.6 mm), 3.5µm
Kolon sıcaklığı	: 30.0 °C
Akış hızı	: 1,0 mL/dak
Dalga boyu	: 280 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 10.0 µL
Analiz süresi	: 40 dak

Mobil Faz A: 20 mM TFA (Trifloroasetik asit) tamponu, pH 2 ye 10 N NaOH ile ayarlandı.

Mobil Faz B: Metanol

Tablo 3-12: Kıyas Yöntemi Gradiyen Programı

Zaman (dakika)	% Mobil Faz A (h/h)	% Mobil Faz B (h/h)
0,01	95	5
7,5	88	12
25,0	23	77
25,01	95	5
40,0	95	5

Aktif maddelerin analizi için levodopa, karbidopa ve entakapon maddeleri için sırasıyla 200 µg/mL, 50 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda standart çözelti hazırlandı. Safsızlıkların analizleri için ise Levodopa safsızlık B, Levodopa Safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, Entakapon safsızlık C ve Entakapon safsızlık A için sırasıyla 0,4 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,075 µg/mL, 0,075 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözelti hazırlandı. Levodopa, Karbidopa ve bu aktif maddelere ait safsızlıkların tayini için hazırlanan numune çözeltisi Stalevo tablet kullanılarak 200 µg/mL, 50 µg/mL konsantrasyonlarda levodopa ve karbidopa içerecek şekilde hazırlandı. Entakapon ve safsızlıklarının tayini için hazırlanan numune çözeltisi 50 µg/mL entakapon içerecek şekilde hazırlandı. Karşılaştırma çalışmalarına ait sonuçlar Bölüm 4.3 de sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

4.1.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları

Bölüm 3.4.1.1 belirtilen çözeltiler ile kütle dedektöründe tarama çalışması yaparak ana (precursor) iyonlar elde edildi. Ana iyonların elde edildiği çözücü ve hareketli faz sistemlerinde PIS (product ion scan) çalışması yapılarak ürün (product) iyonlarının en verimli şekilde dedekte edildiği çözücüler tespit edildi. Bu çalışmada amaç ana iyon ve ürün iyon piklerini en verimli şekilde veren uygun çözücüyü bulmaktır. Gözlenen ürün iyonları bilgi amaçlı olup bir sonraki bölümde HPLC kolonu ile birlikte yapılan çalışma ile ürün iyonları netleştirilmiş ve en kararlı ikisi belirlenerek MRM çiftlerine karar verilmiştir. Aktif maddelere ait ürün iyonlarının değerleri ve hangi hareketli faz sisteminde tespit edilebildiği Tablo 4-1, 4-2, 4-3 ve 4-4' de gösterilmiştir. Tablolarda (+) sembolünün kullanılması sözkonusu iyonun gözlemlendiği anlamına gelir.

Tablo 4-1: Levodopa standart çözeltisinin farklı çözücü ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Çalışma	Levodopa ürün iyonları (m/z)										
	65	79	91	93	107	111	135	139	152	163	181
1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): ürün iyonu gözlemlendi.

(-): ürün iyonu gözlemlenemedi.

Tablo 4-2: Karbidopa standart çözeltisinin farklı çözücü ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları.

Karbidopa ürün iyonları (m/z)								
Çalışma	71	85	111	118	123	139	146	181
1	-	-	+	+	+	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): ürün iyonu gözlemlendi.

(-): ürün iyonu gözlemlenemedi.

Tablo 4-3: Entakapon standart çözeltisinin farklı çözücü ve hareketli fazlar ile yapılmış (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Entakapon ürün iyonları (m/z) (+) mod												
Çalışma	68	72	88	103	115	131	141	159	170	187	215	233
1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
2	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): ürün iyonu gözlemlendi.

(-): ürün iyonu gözlemlenemedi.

Tablo 4-4: Entakapon standart çözeltisinin farklı çözücü ve hareketli fazlar ile yapılmış (-) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Entakapon ürün iyonları (m/z) (-) mod						
Çalışma	66	143	157	184	257	304
1	+	-	-	+	+	+
2	+	+	-	+	-	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+

(+): ürün iyonu gözlemlendi.

(-): ürün iyonu gözlemlenemedi.

Çalışma 1’den çalışma 4’e kadar belirtilen çalışmalarda enjekte edilen analitlerin yeterli iyonlaşma ürünleri verdiği gözlenmiştir. Hareketli fazda tuz kullanımı zamanla iyon kaynağını tıkadığı ve yüksek iyon konsantrasyonlu hareketli fazların analitleri baskılayabildiği bilindiğinden en iyi sonuç veren ve en az iyon içeren % 0,5 formik asit çözeltisinin hareketli faz ve çözücü olarak kullanılmasına karar verildi.

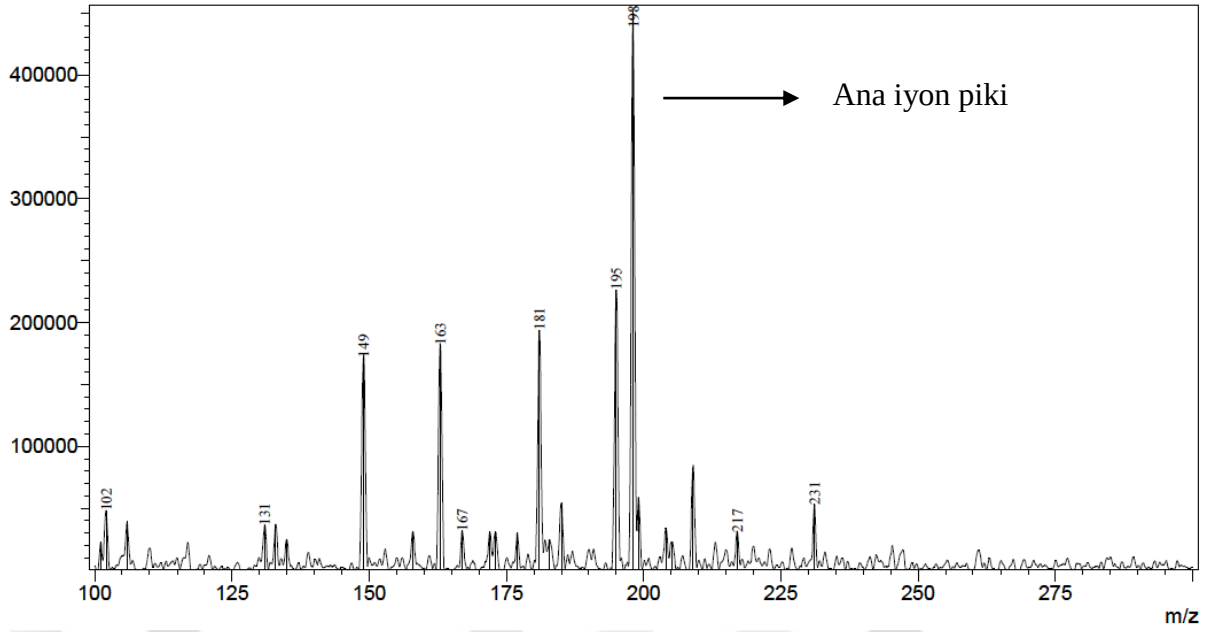
4.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi bulguları

Bölüm 3.4.1.1 belirtilen çözeltiler ile kütle dedektöründe yapılan tarama sonucunda elde edilen ana (precursor) iyonlar Tablo-4-5’de verilmektedir.

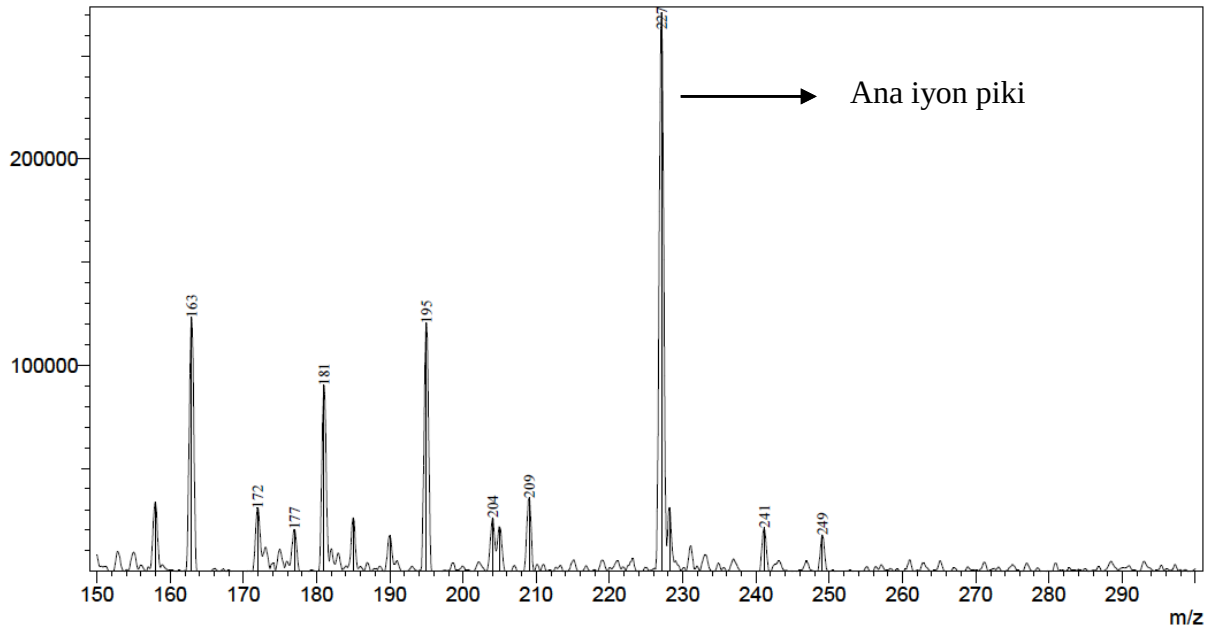
Tablo 4-5: Analiz edilen maddelere ait tespit edilen ana iyonlar

Madde adı	Molekül ağırlığı	Kütle analizör	
		Polaritesi	Ana (precursor) iyon m/z değeri
Levodopa	197	+	198
Karbidopa	226	+	227
Entakapon	305	+	306
Levodopa Safsızlık B	181	+	182
Levodopa Safsızlık C	211	+	212
Metildopa	211	+	212
Metilkarbidopa	240	+	241
Entakapon Safsızlık C	183	-	182
Entakapon Safsızlık A	305	-	304

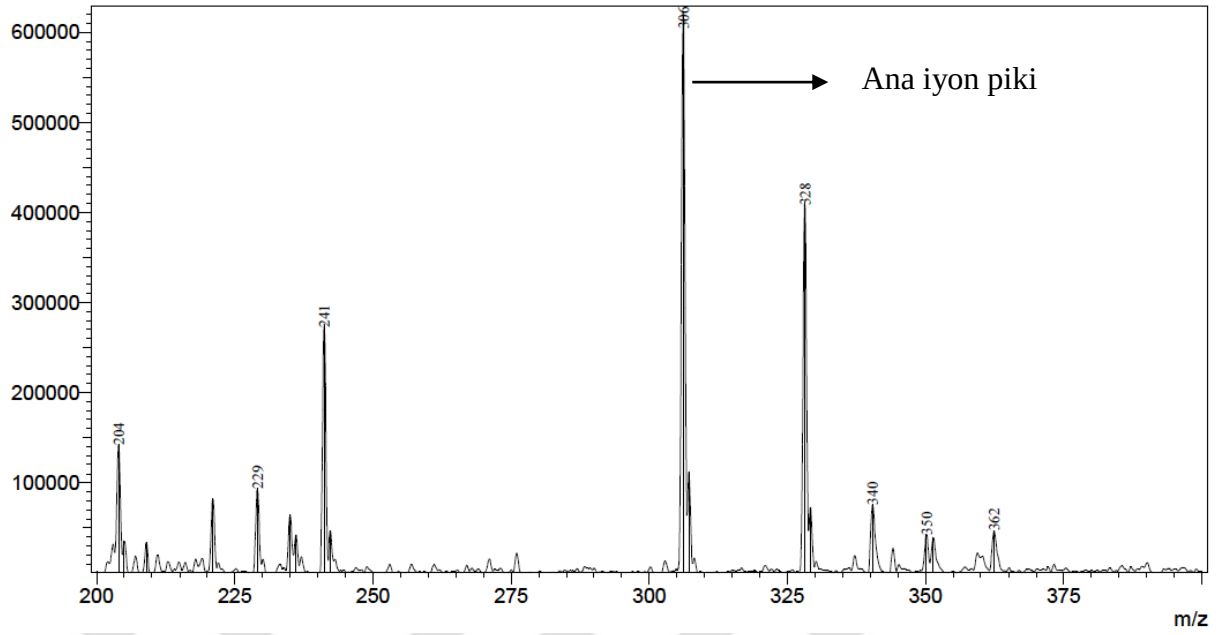
Yapılan enjeksiyonlar sonunda elde edilen ana iyonları gösteren kütle spektrumları Şekil 4-1 ve Şekil 4-9 aralığında verilmektedir.



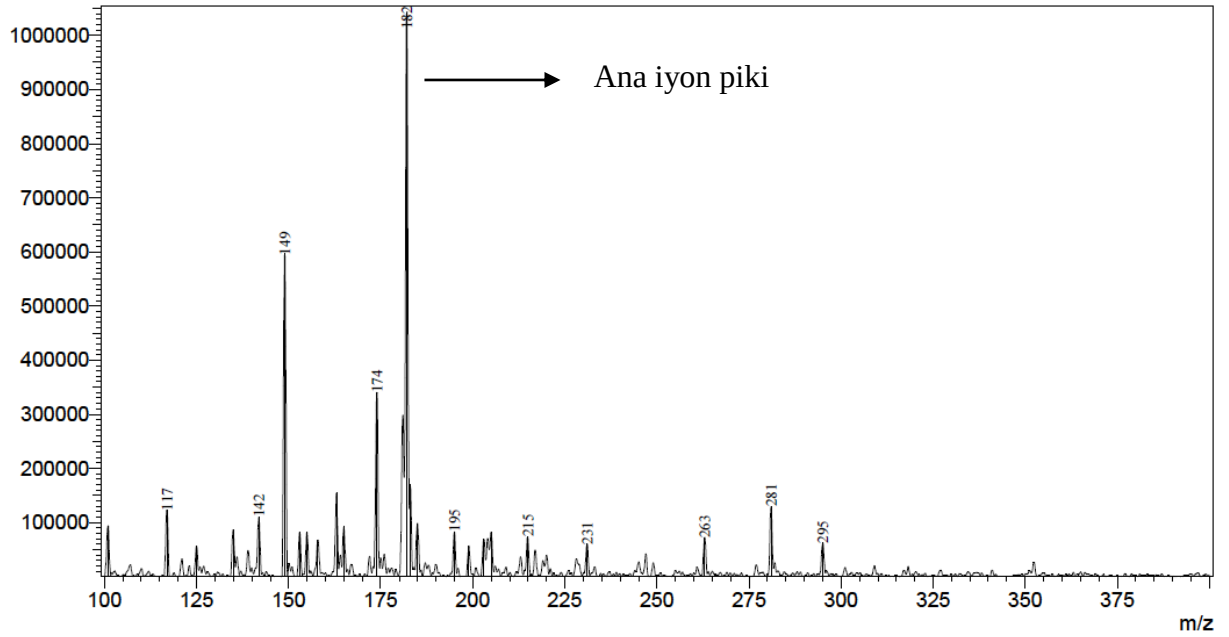
Şekil 4-1: Levodopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)



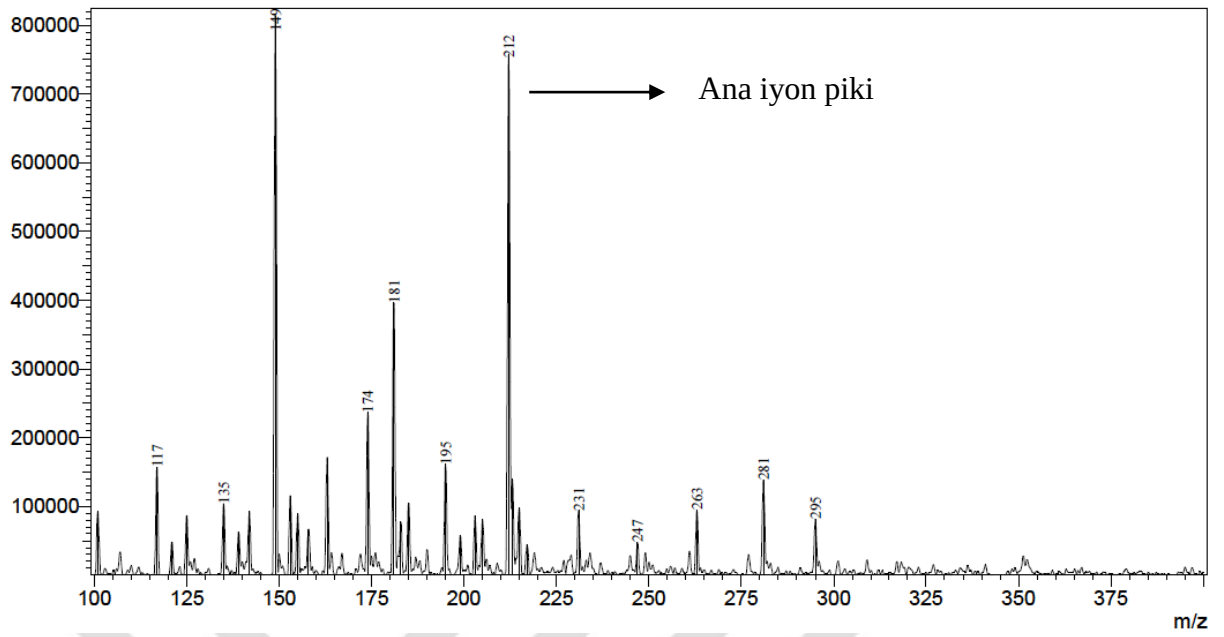
Şekil 4-2: Karbidopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1 µg/mL)



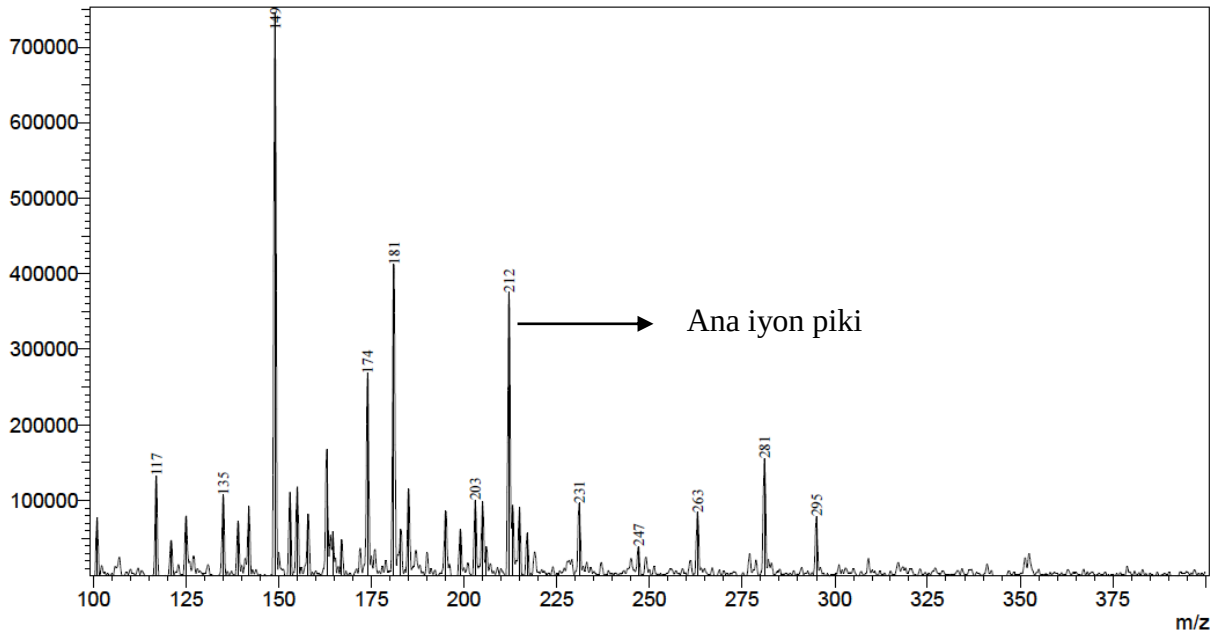
Şekil 4-3: Entakapon standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)



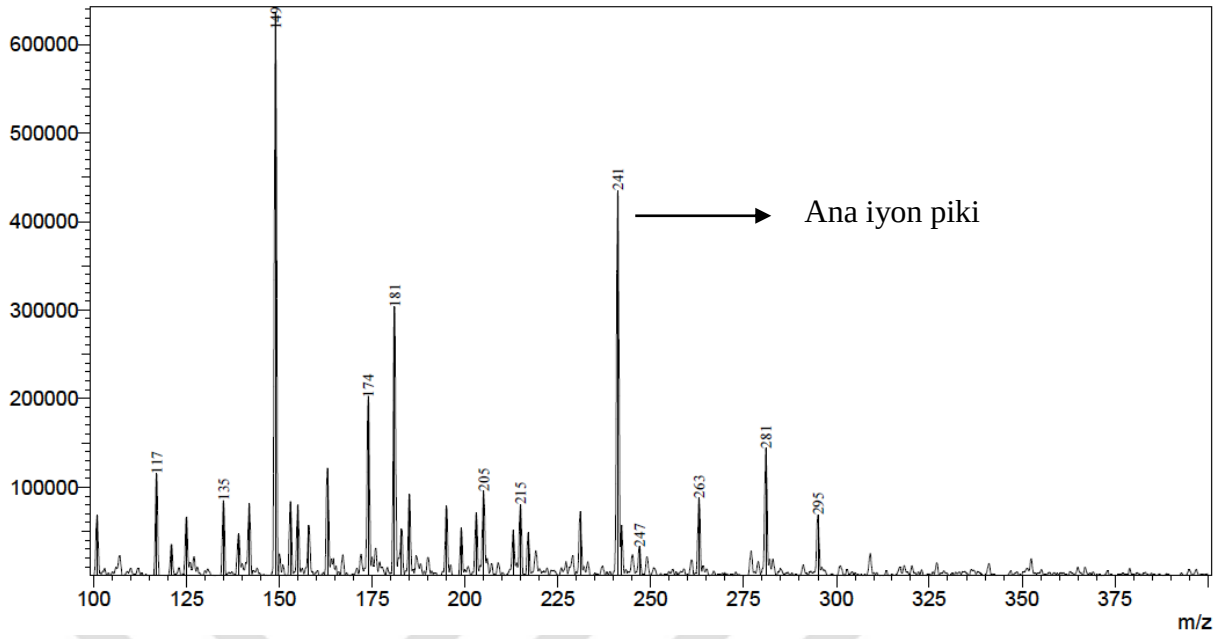
Şekil 4-4: Levodopa Safsızlık B standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)



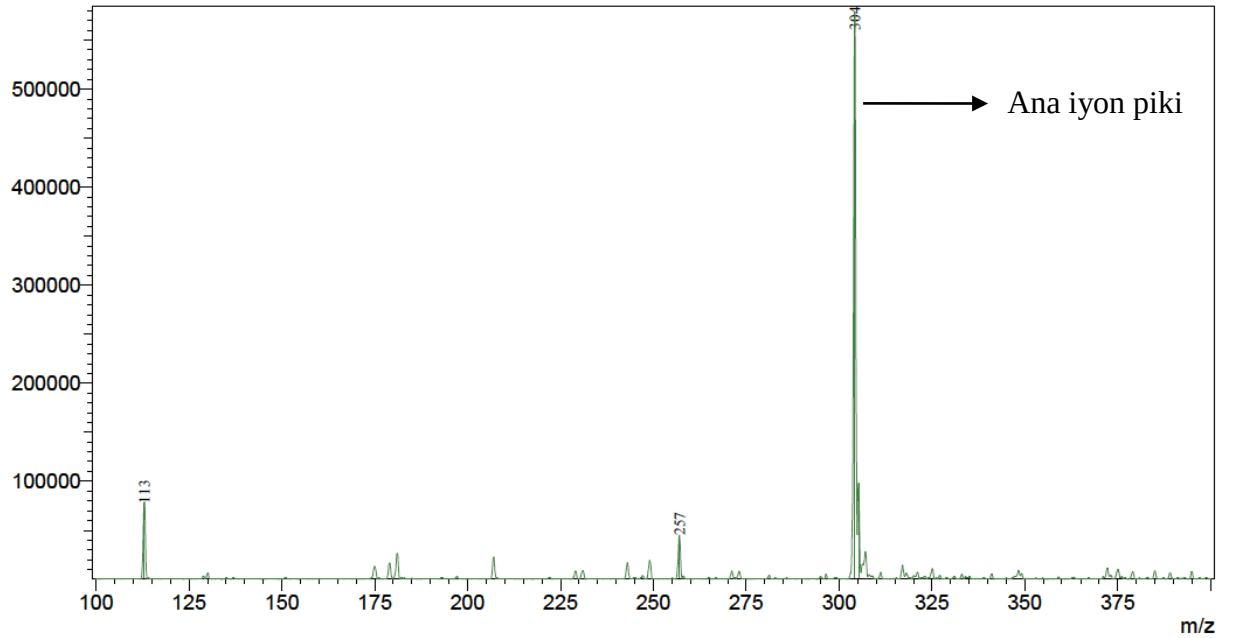
Şekil 4-5: Levodopa Safsızlık C standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (4 µg/mL)



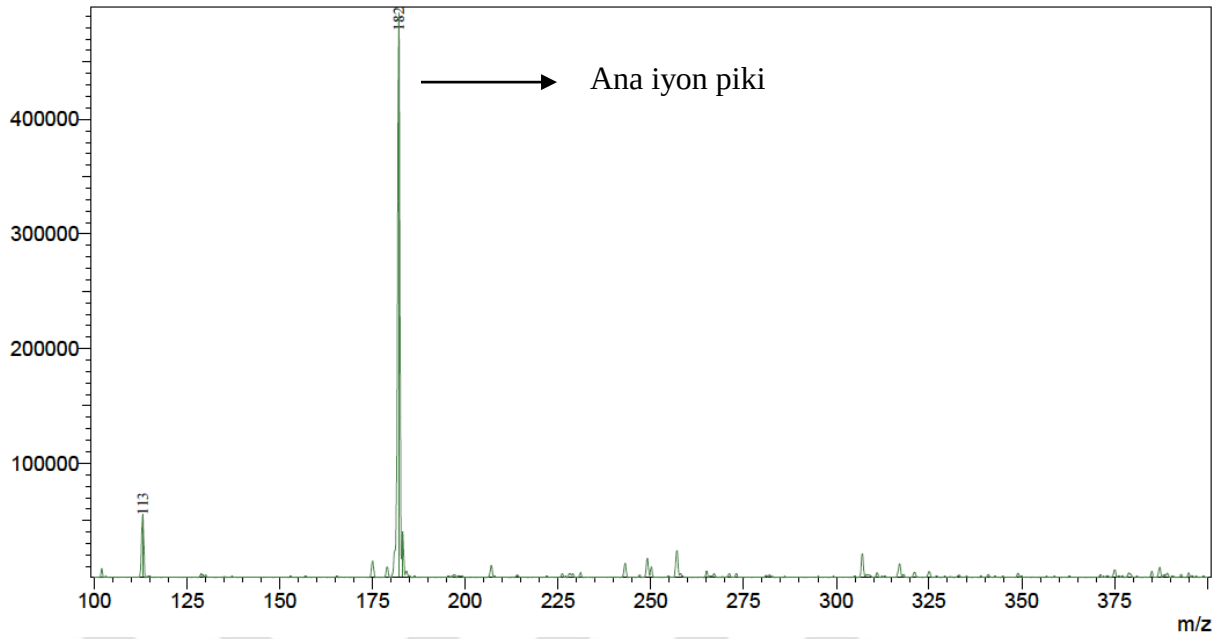
Şekil 4-6: Metildopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (2,5 µg/mL)



Şekil 4-7: Metilkarbidopa standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (2,5 µg/mL)



Şekil 4-8: Entakapon Safsızlık A standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (3 µg/mL)

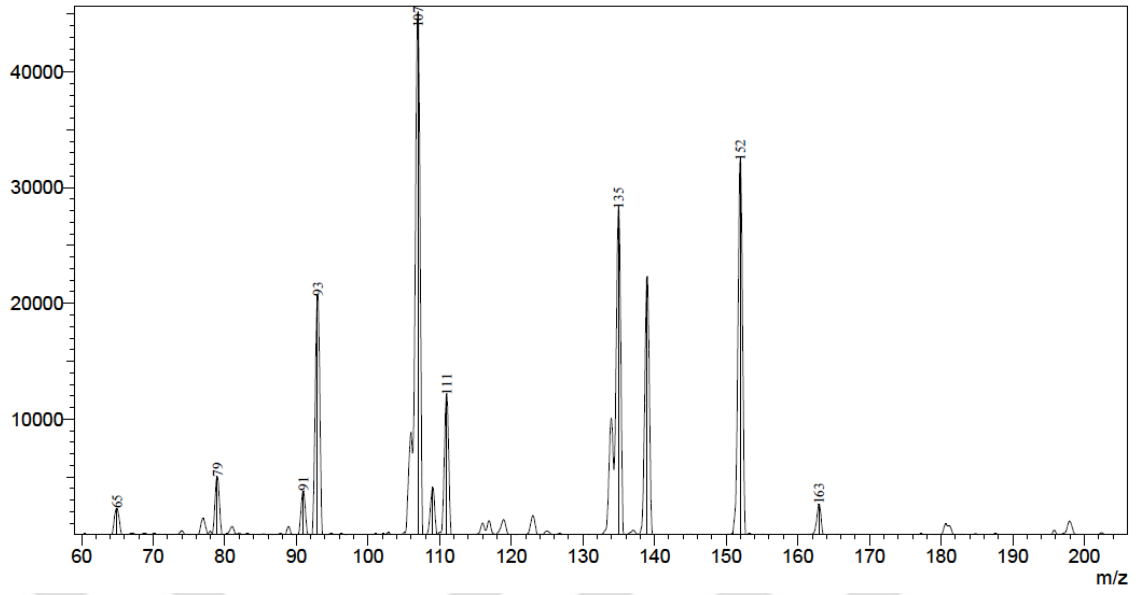


Şekil 4-9: Entakapon Safsızlık C standardı ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (3 µg/mL)

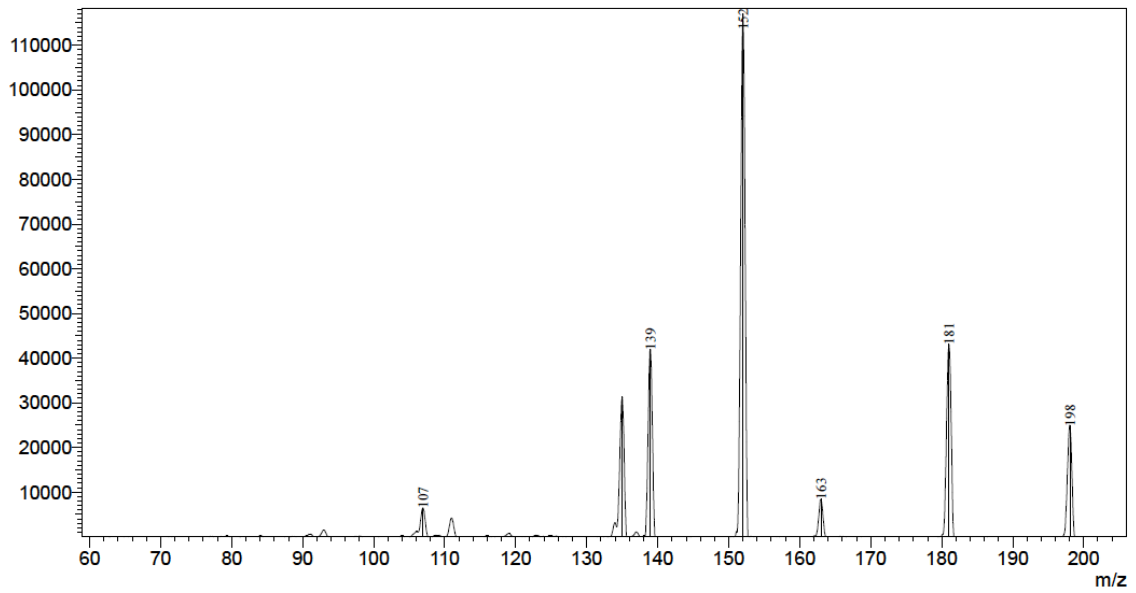
Tablo 4-5’de belirlenen ana iyon değerlerinin de kullanılmasıyla ürün iyonları belirlendi. Ana iyon değeri ve beklenen ürün ürünleri m/z aralığı girilerek üç farklı çarpışma enerjisi voltajında (15, 25 ve 35 volt) taramalar yapılarak ürün iyonları belirlendi. İlgilenilen maddeler için belirlenen ürün iyonları Tablo 4-6’da yer almaktadır. Bu tabloda her madde için muhtemel ürün iyonlarını gösteren ilgili PIS spektrumları Şekil 4-10 – Şekil 4-21 arasındaki şekillerde gösterilmektedir. Bazı maddeler için tüm iyonları gösterebilmek için 2 farklı çarpışma enerjisinde elde edilen spektrumlar sunulmuştur.

Tablo 4-6: İlgilenilen maddeler için belirlenen parçalanma iyonları

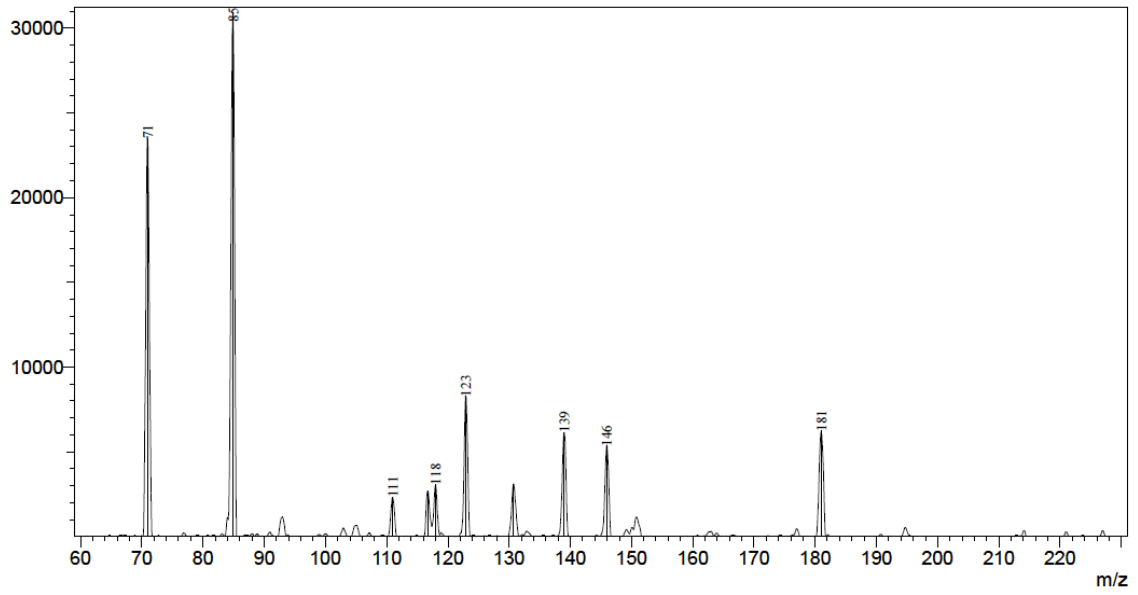
Madde adı	Ana iyon (precursor ion) m/z değeri	Kütle analizör Polaritesi	Parçalanma iyonları (product) m/z değerleri
Levodopa	198	+	65, 79, 91, 93, 107, 111, 135, 139, 152, 163, 181
Karbidopa	227		71, 85, 111, 118, 123, 139, 146, 181
Entakapon	306	+	68, 72, 88, 103, 115, 131, 141, 159, 170, 187, 215, 233
Entakapon	306	-	66, 143, 157, 184, 257, 304
Levodopa Safsızlık B	182	+	65, 77, 91, 95, 107, 119, 123, 136, 147, 165
Levodopa Safsızlık C	212	+	65, 79, 93, 106, 121, 134, 149, 153, 166, 177, 195
Metildopa	212	+	93, 103, 111, 123, 131, 139, 149, 166, 195
Metilkarbidopa	241	+	71, 85, 125, 133, 137, 153, 165, 195, 209
Entakapon Safsızlık C	182	-	79, 92, 107, 124, 135, 152, 165
Entakapon Safsızlık A	304	-	66, 143, 157, 184, 257, 274, 287



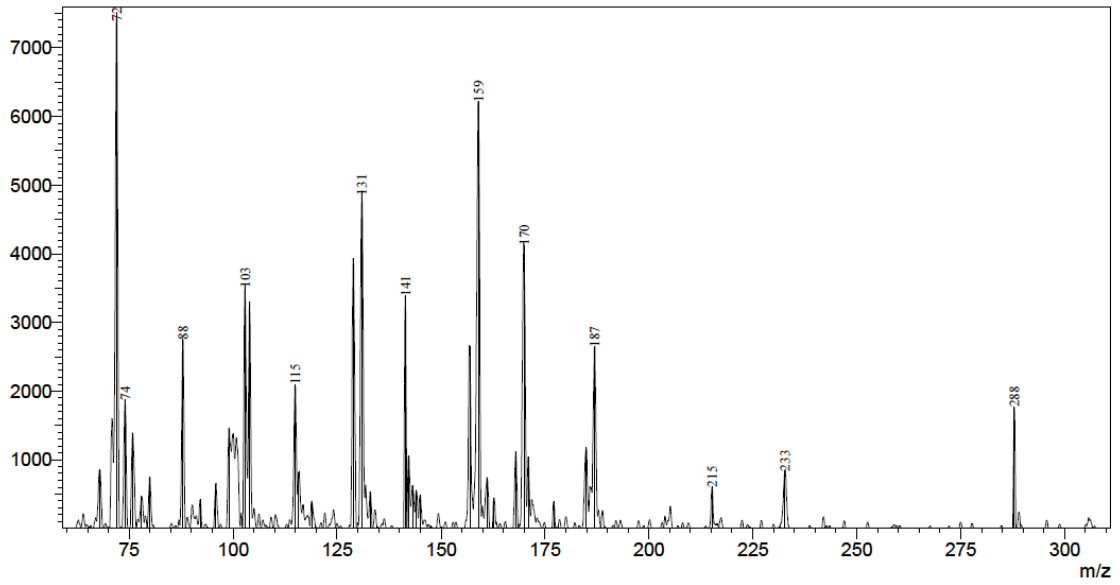
Şekil 4-10: Levodopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan ürün iyonları PIS spektrumu (4 µg/mL)



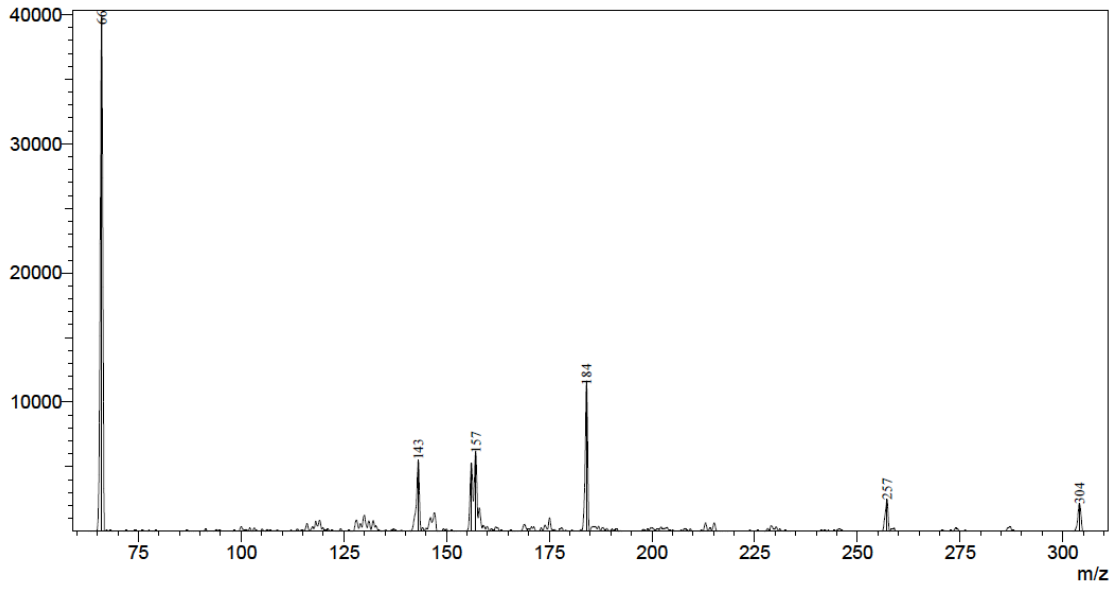
Şekil 4-11: Levodopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan ürün iyonları PIS spektrumu (4 µg/mL)



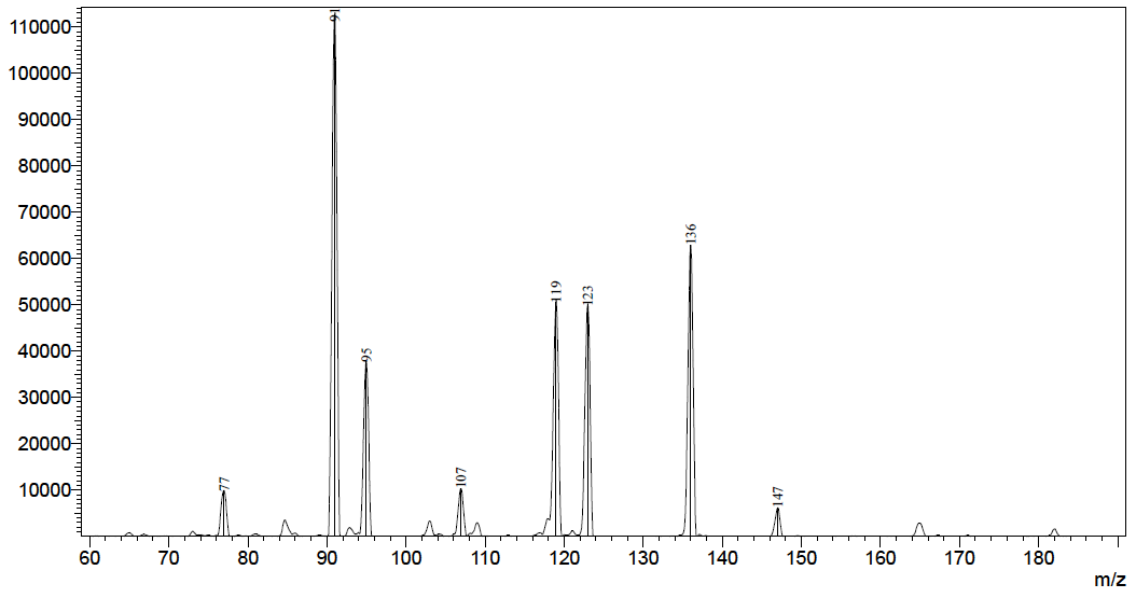
Şekil 4-12: Karbidopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1 µg/mL)



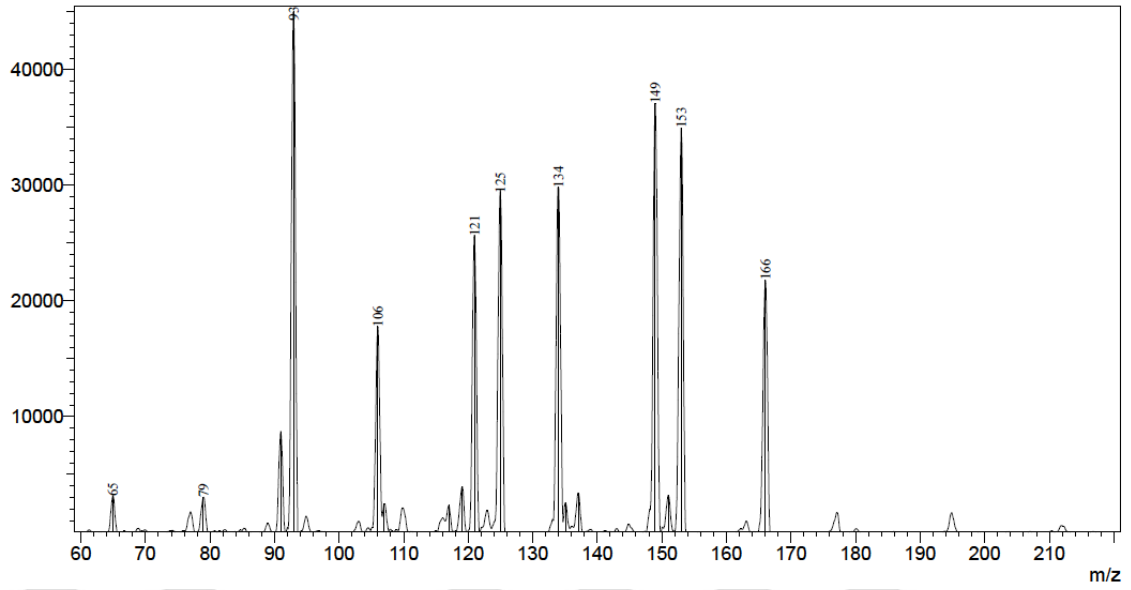
Şekil 4-13: Entakapon için (+) modda 35 V çarpışma enerjisinde PIS spektrumu (4 µg/mL)



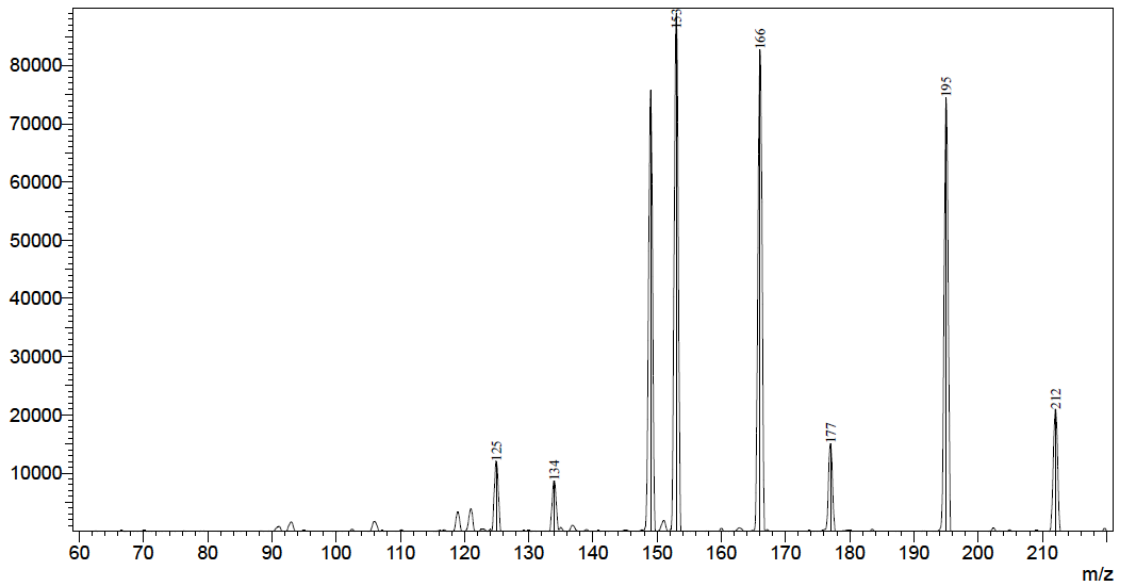
Şekil 4-14: Entakapon için (-) modda 35 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)



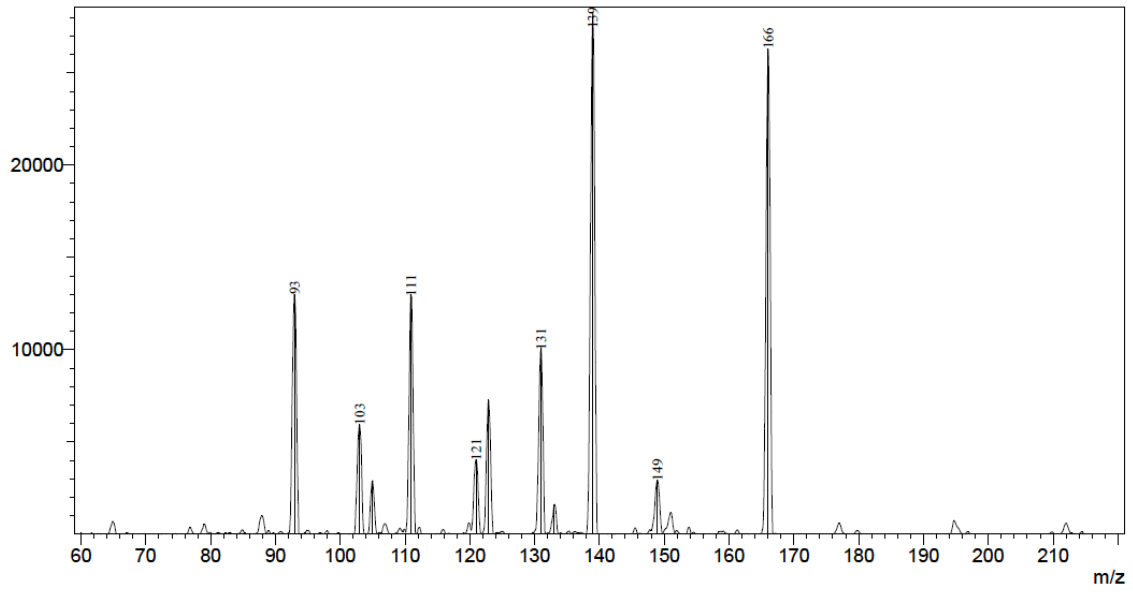
Şekil 4-15: Levodopa Safsızlık B için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)



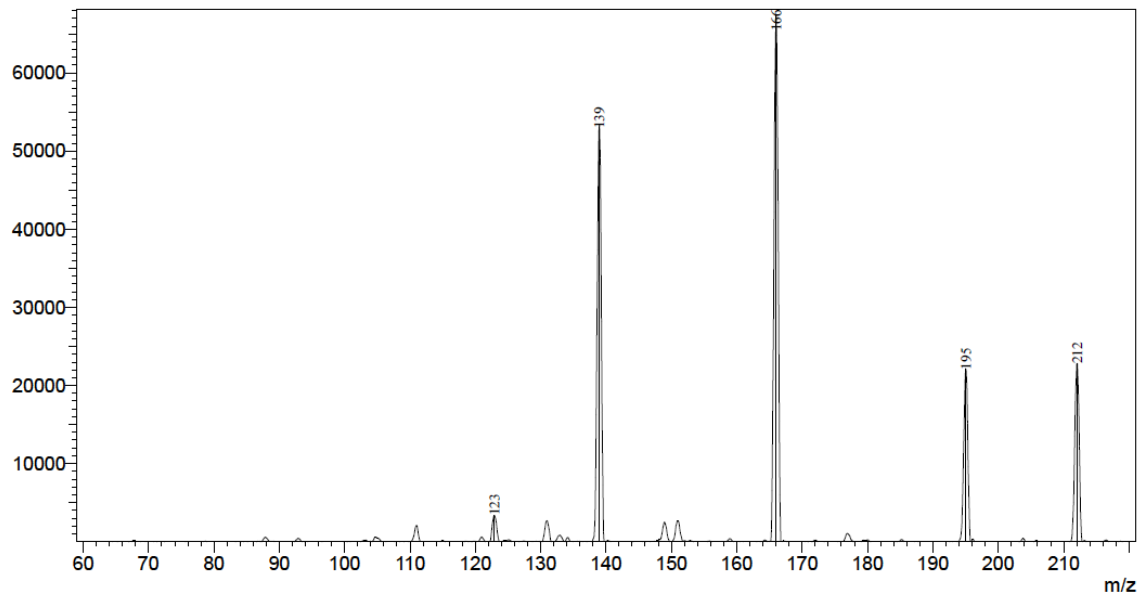
Şekil 4-16: Levodopa Safsızlık C için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)



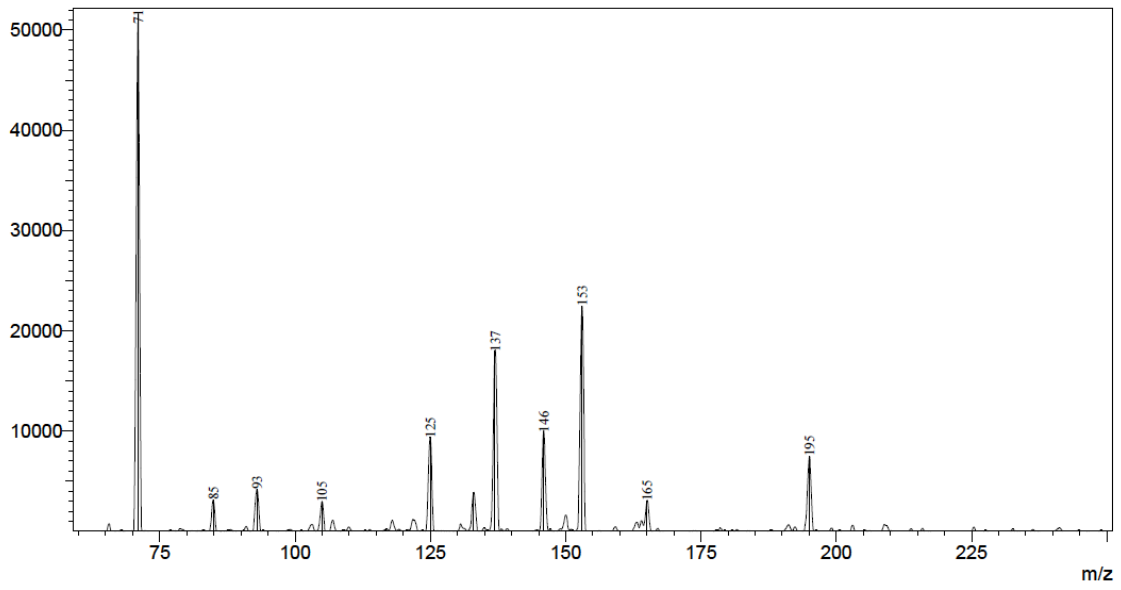
Şekil 4-17: Levodopa Safsızlık C için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (4 µg/mL)



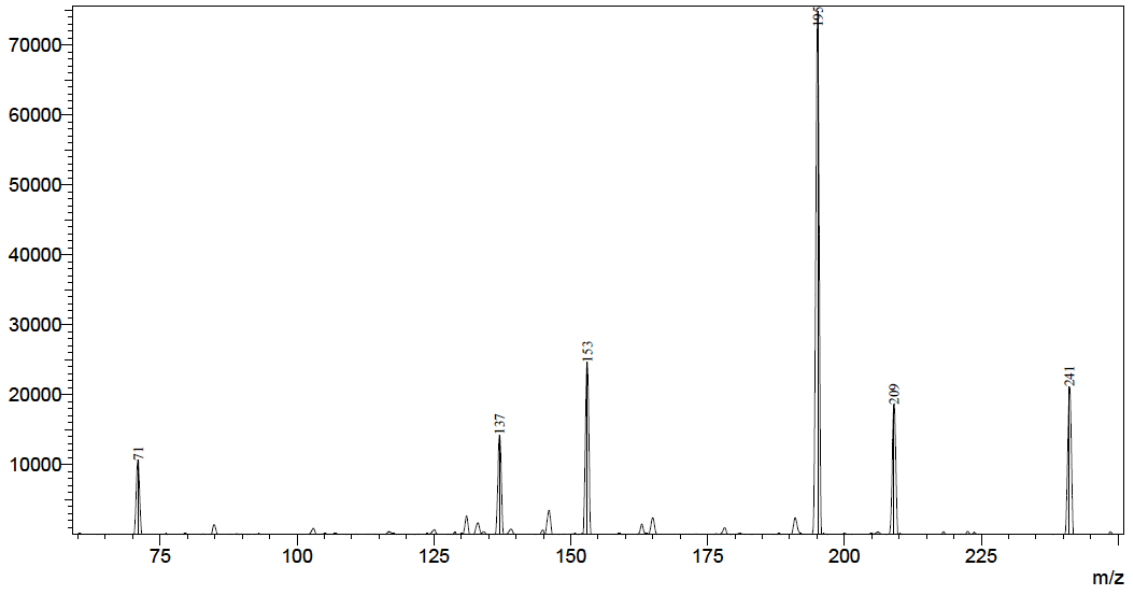
Şekil 4-18: Metildopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)



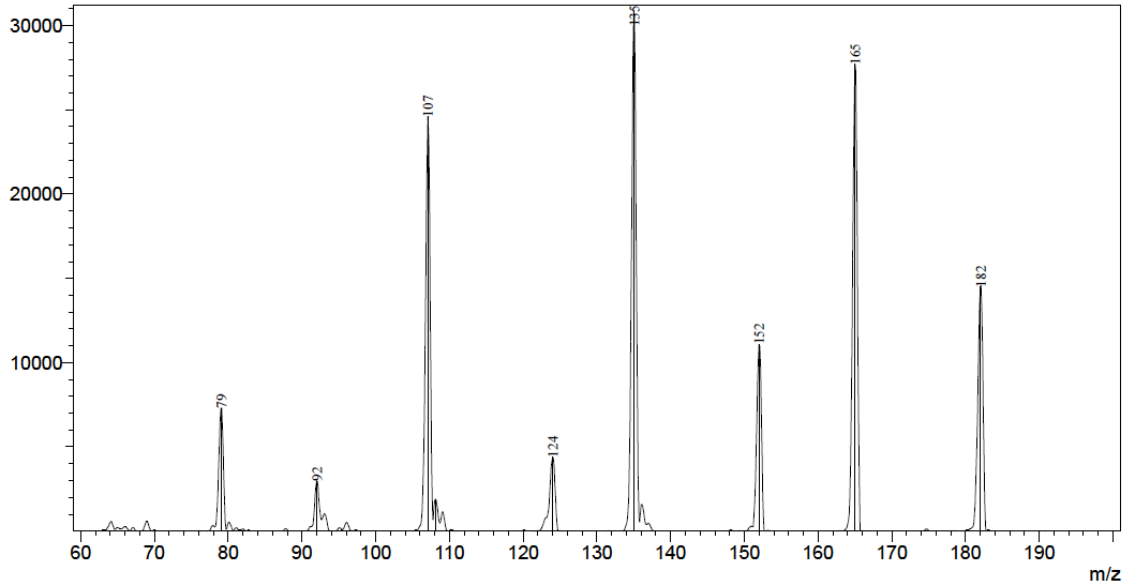
Şekil 4-19: Metildopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)



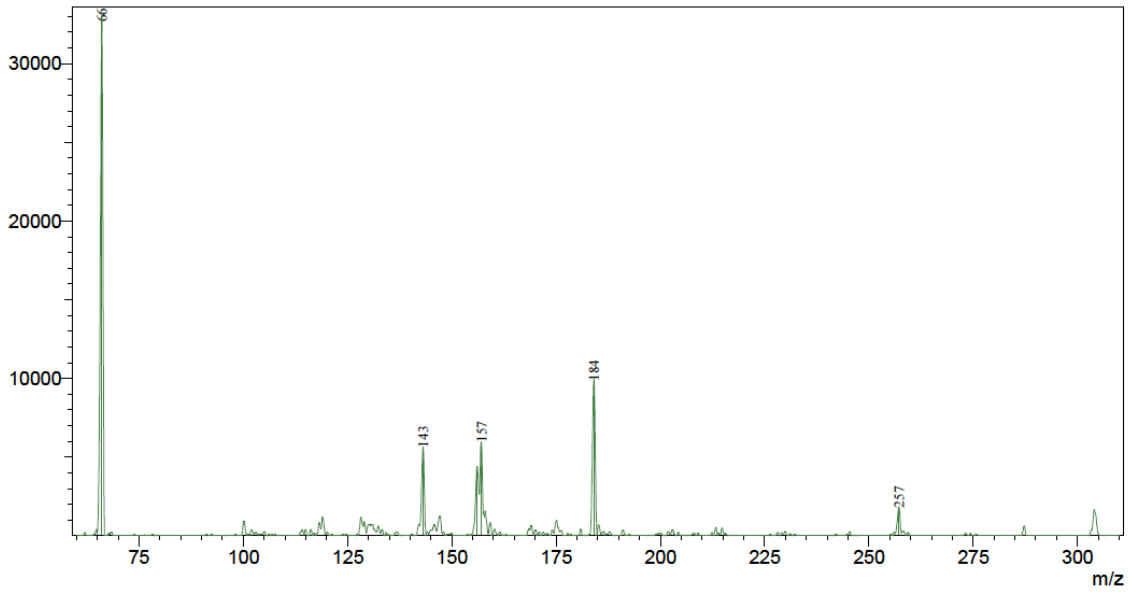
Şekil 4-20: Metilkarbidopa için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)



Şekil 4-21: Metilkarbidopa için 15 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (2,5 µg/mL)



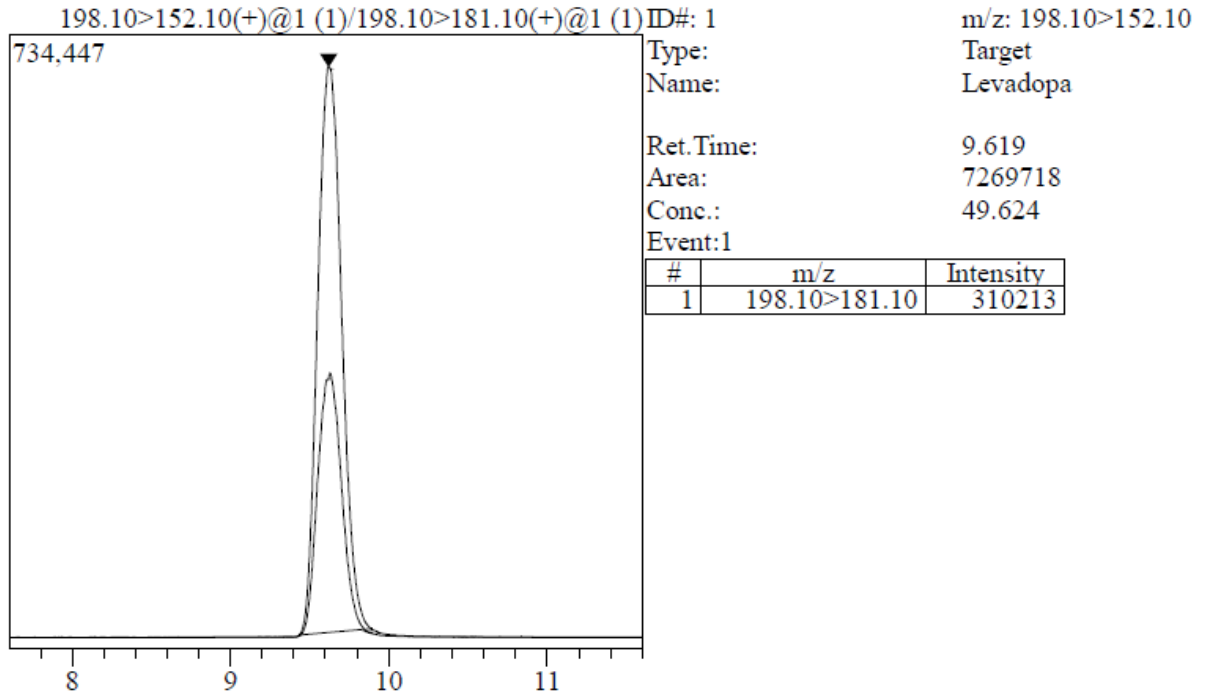
Şekil 4-22: Entakapon Saffsızlık C için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (3 µg/mL)



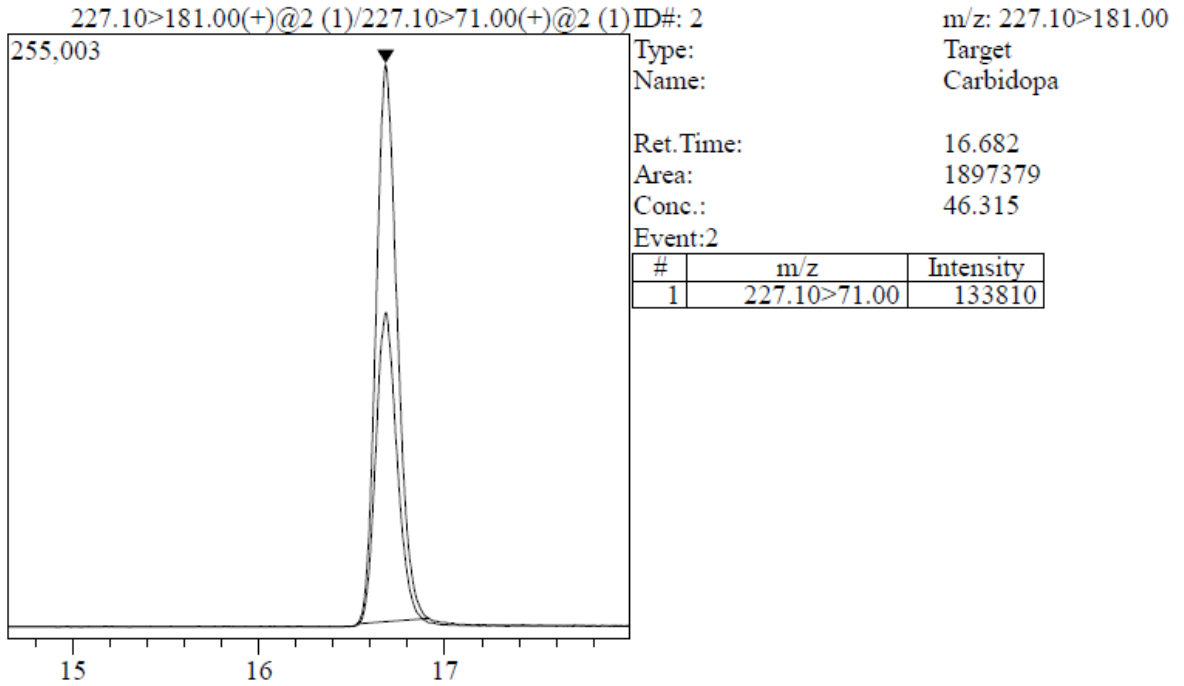
Şekil 4-23: Entakapon Saffsızlık A için 25 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (3 µg/mL)

Yukarıda elde edilen ana iyon ve ürün iyon bilgileri ışığında belirlenen HPLC kolonu ve parametreleri kullanılarak dedektörün optimizasyon özelliği kullanıldı ve ana pikin yanısıra kararlı halde olan ürün iyonlarından en iyi intensiteye sahip olan 2 tane ürün iyonu belirlendi. Elde edilen intensite grafikleri Şekil 4-10 ile Şekil 4-19 arasında

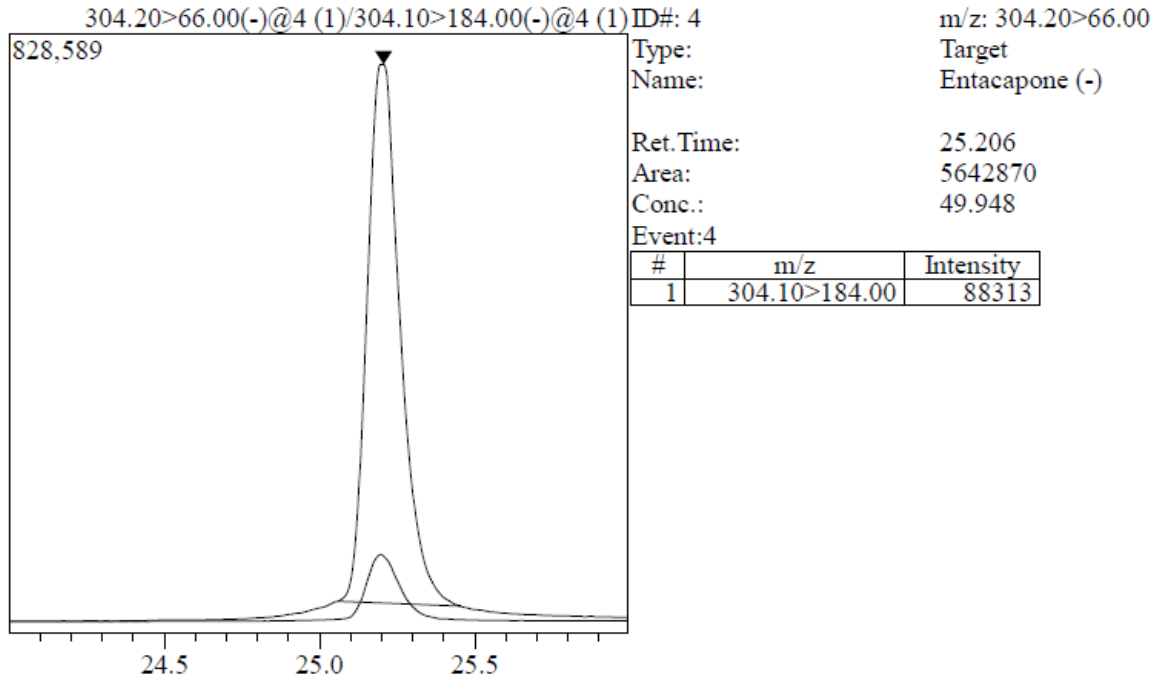
gösterilmiştir. Grafiklerin hemen üstünde belirlenen ana iyon ve bağlı olduğu ürün iyon bilgilerini gösteren MRM çiftleri görülmektedir.



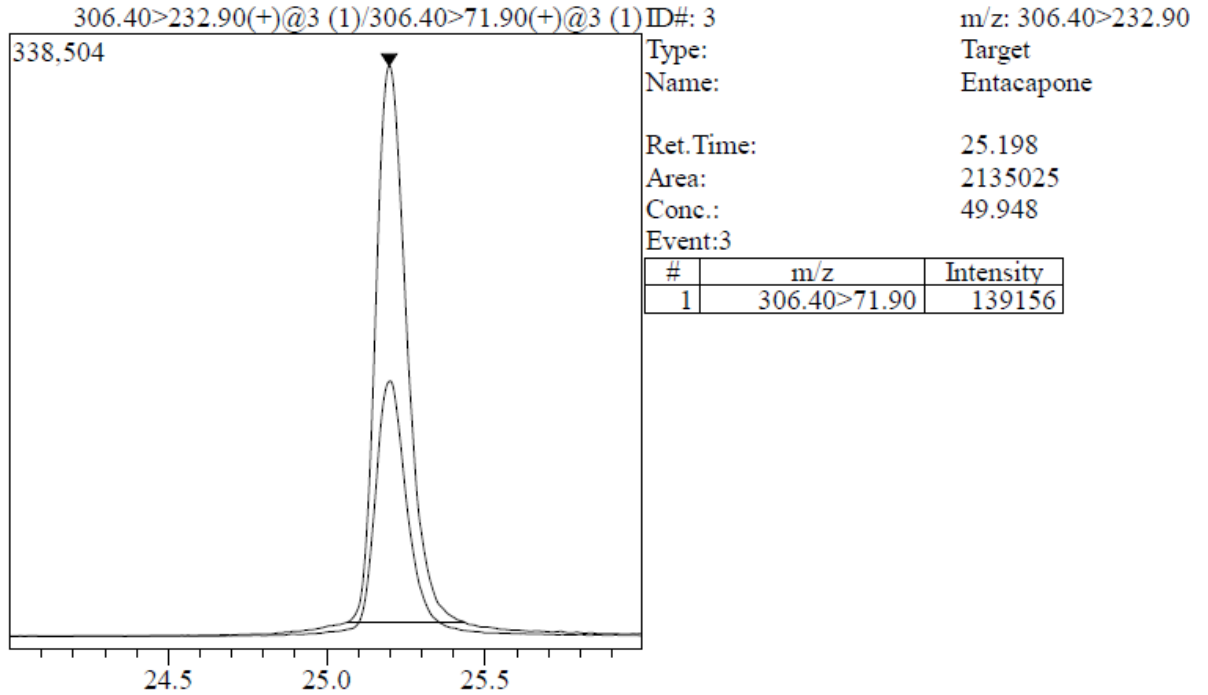
Şekil 4-24: Levodopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



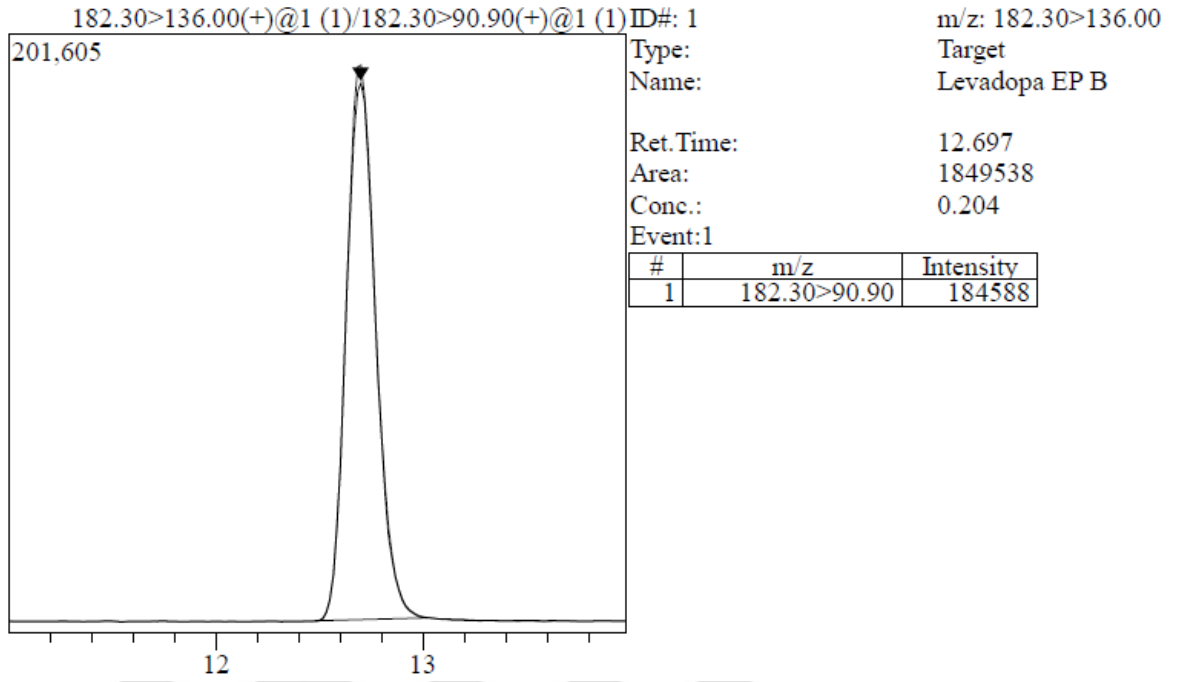
Şekil 4-25: Karbidopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



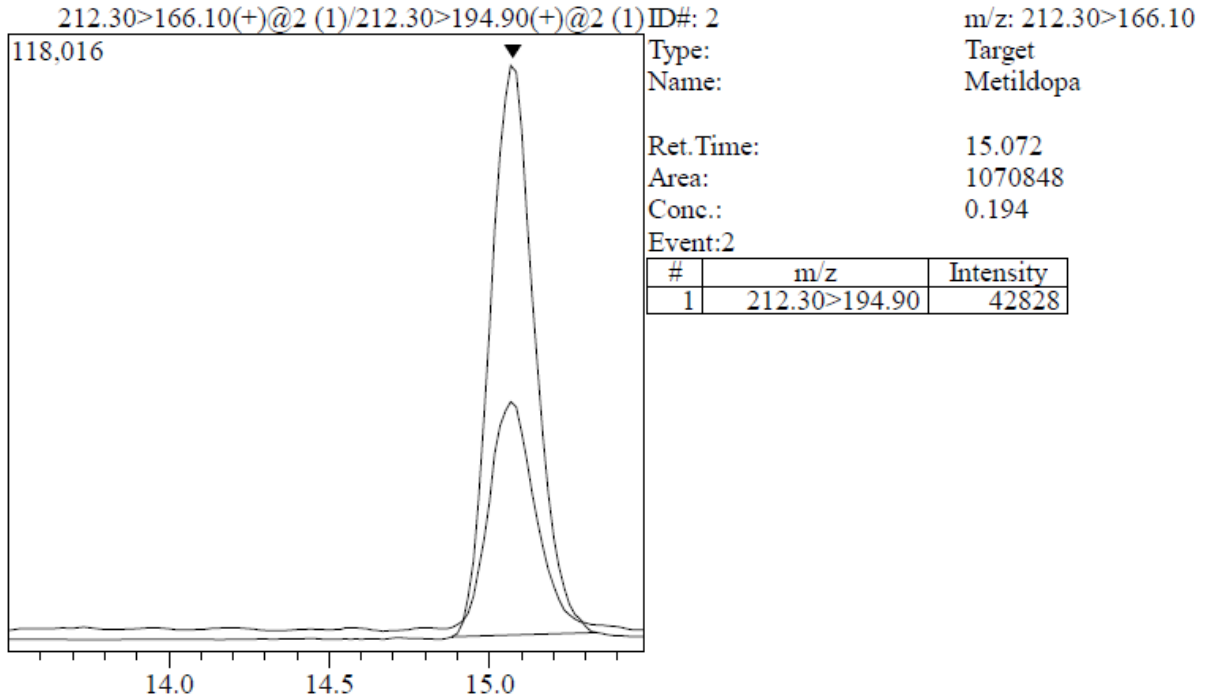
Şekil 4-26: Entakapon standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu (negatif mod)



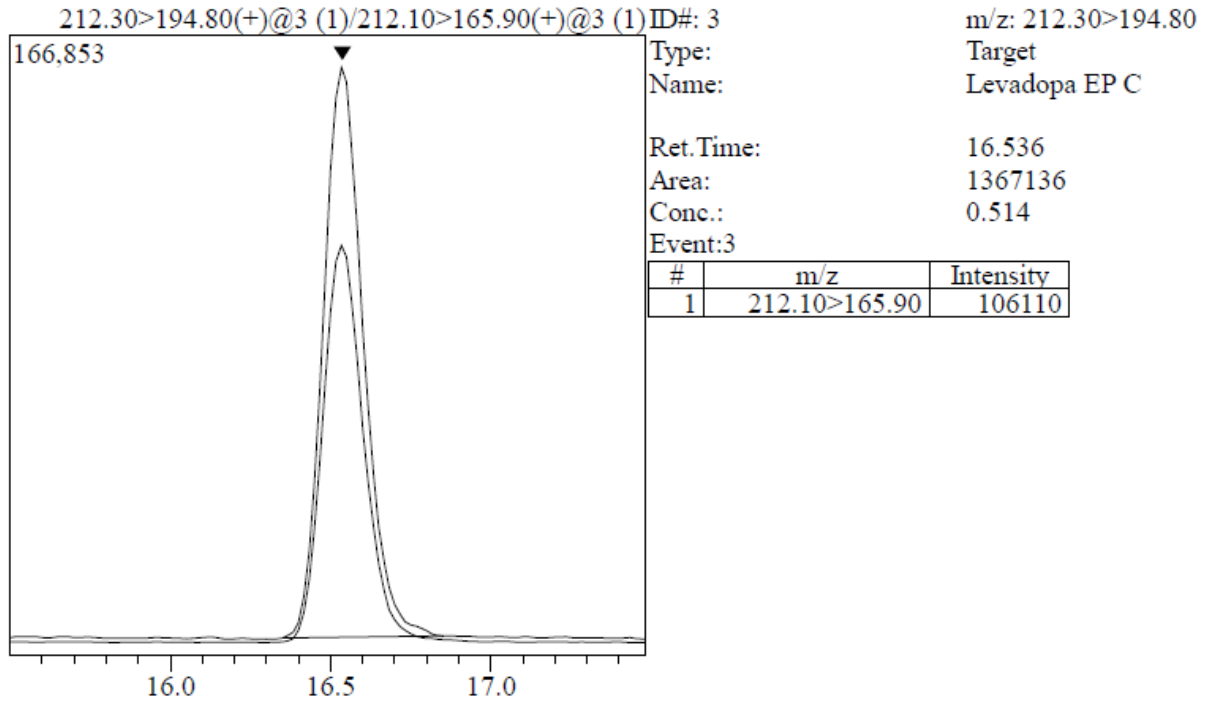
Şekil 4-27: Entakapon standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu (pozitif mod)



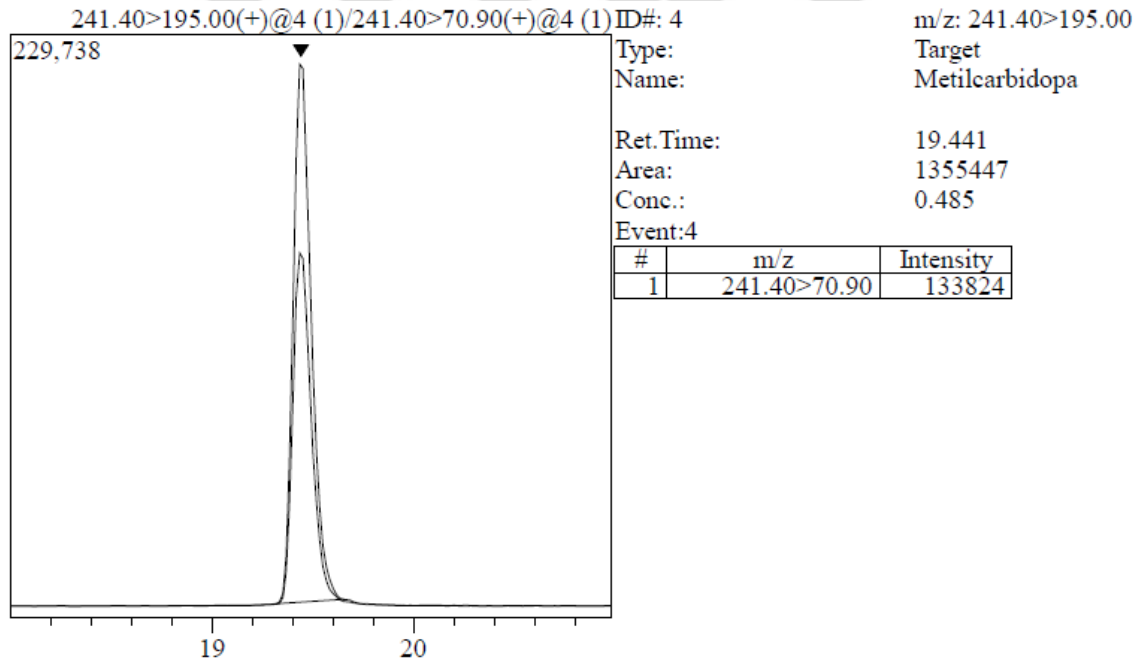
Şekil 4-28: Levodopa Safsızlık B standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



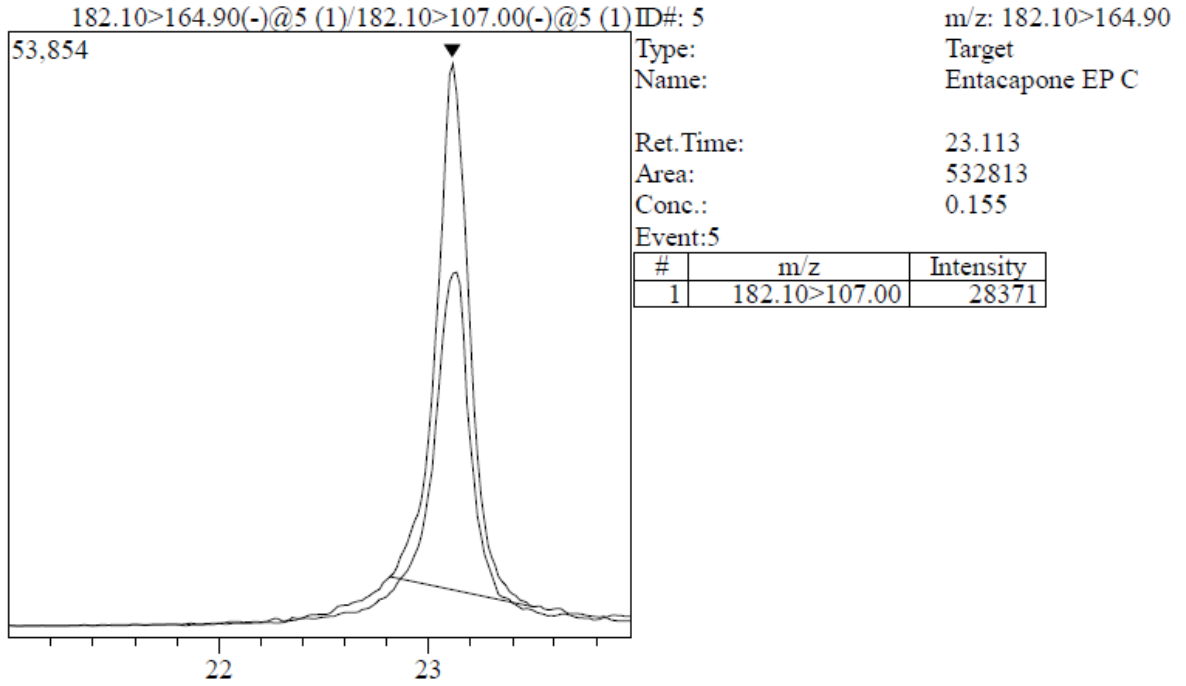
Şekil 4-29: Metildopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



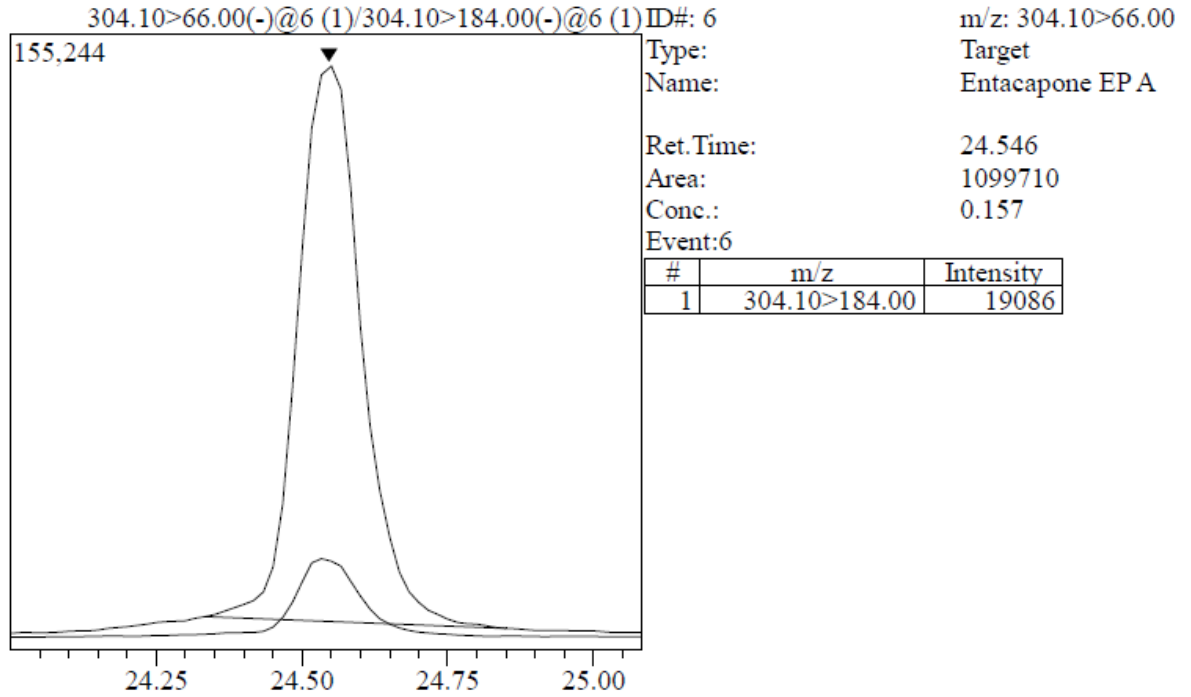
Şekil 4-30: Levodopa safsızlık C standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



Şekil 4-31: Metilkarbidopa standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



Şekil 4-32: Entakapon Safsızlık C standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu



Şekil 4-33: Entakapon Safsızlık A standardı en kararlı 2 MRM çiftine ait kütle spektrumu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda elde edilen MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri Tablo 4-7’de verilmiştir.

Tablo 4-7: İlgilenilen piklere ait MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri

Madde	Alıkönme Zamanı (dakika)	MRM Modu	Ana iyon (m/z)	Ürün iyonu (m/z)	Dwell time (ms)	Çarpışma enerjisi (+/-) (V)
Levodopa	9,6	(+)	198,10	152,10	50	-15
		(+)	198,10	181,10	50	-13
Levopoda	12,7	(+)	182,30	136,00	50	-14
Safsızlık B		(+)	182,30	90,90	50	-30
Metildopa	15,0	(+)	212,30	165,90	50	-12
		(+)	212,10	194,80	50	-15
Levopoda	16,5	(+)	212,30	194,90	50	-15
Safsızlık C		(+)	212,30	166,10	50	-11
Karbidopa	16,7	(+)	227,10	181,00	100	-12
		(+)	227,10	71,00	100	-24
Metilkarbidopa	19,4	(+)	241,40	195,00	50	-13
		(+)	241,40	70,90	50	-22
Entakapon	23,1	(-)	182,10	164,90	50	21
Safsızlık C		(-)	182,10	107,00	50	29
Entakapon	24,5	(-)	304,10	66,00	50	26
Safsızlık A		(-)	304,10	184,00	50	31
Entakapon	25,2	(+)	306,40	232,90	50	-17
		(+)	306,40	71,90	50	-31

4.1.3. HPLC Kolonu Seçimi

3 farklı HPLC kolonu kullanılarak bölüm 3.4.1.1’de belirlenen diğer kromatografik koşullar altında levodopa, karbidopa ve entakapon içeren standart çözelti hazırlandı ve 10 µl lik enjeksiyonlar yapılarak alan, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı gibi sistem uygunluk parametreler belirlendi (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: Farklı HPLC kolonları ile elde edilen sistem uygunluk parametreleri

	Levodopa			Karbidopa			Entakapon		
	Alan	Tf	N	Alan	Tf	N	Alan	Tf	N
Agilent Zorbax SB C18	170701	1,2	5010	299501	1,2	28704	523544	1,3	301548
Thermo Hypersil BDS C8	163211	1,4	4830	293455	1,3	24307	512349	1,5	209218
MZ Kromasil C18	179610	1,1	19811	337775	1,2	73058	688814	1,2	492805

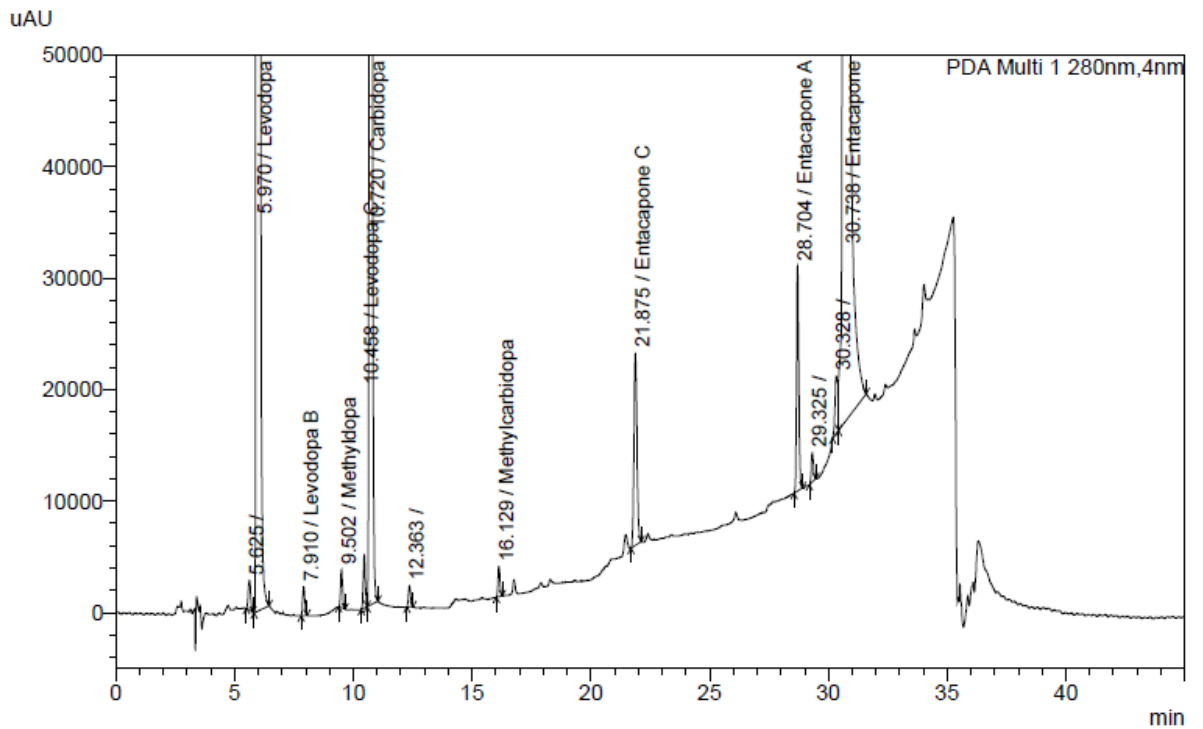
Tf: kuyruklanma faktörü

N: Teorik plaka sayısı

Kromatogamlardan elde edilen ana piklere ait sistem uygunluk parametreleri incelendi. Kuyruklanma faktörü 0,8-ve 1,5 değerleri arasında olup gaussian pik şekline en yakın değer olan 1 değerine en yakın, teorik plaka sayısı olarak da en yüksek değeri veren kolon olan MZ Kromasil C18 kolonu seçilmiştir. Bu kolonun sahip olduğu 3,5 µm tanecik büyüklüğü özelliği ile daha simetrik pik şekli verdiği gözlenmiştir.

4.1.4. HPLC Gradiyen Programının belirlenmesine ait bulgular

Denemeler sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 4-20, 4-21, 4-22 ve ayırım faktörleri Tablo 4-9, 4-10, 4-11’de verilmiştir.

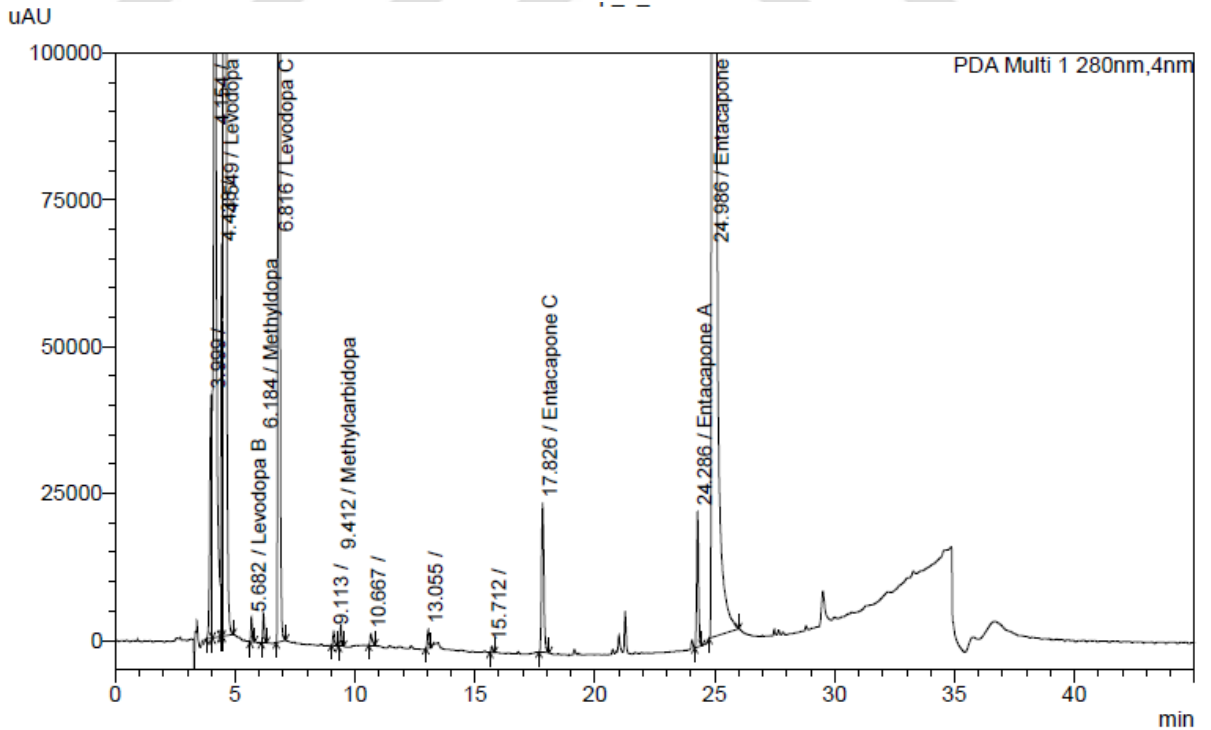


Şekil 4-34: Deneme 1 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 µg/mL, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 µg/mL, $C_{\text{entakapon}}$: 200 µg/mL, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 µg/mL, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{metilcarbidopa}}$: 2,5 µg/mL, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 µg/mL, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 µg/mL).

Tablo 4-9: Deneme 1 ile elde edilen ayırım faktörleri

Pik No	Pik adı	Ayrım Faktörü
1	Levodopa	1,9
2	Levodopa Safsızlık B	11,4
3	Metildopa	9,4
4	Levodopa Safsızlık C	5,9
5	Karbidopa	1,6
6	Metilkarbidopa	22,6
7	Entakapon Safsızlık C	30,0
8	Entakapon Safsızlık A	34,0
9	Entakapon	-

Elde edilen 45 dakikalık kromatogramdan daha kısa enjeksiyon süresi ve daha iyi levodopa EP C ve karidopa ayırımı hedeflendi.

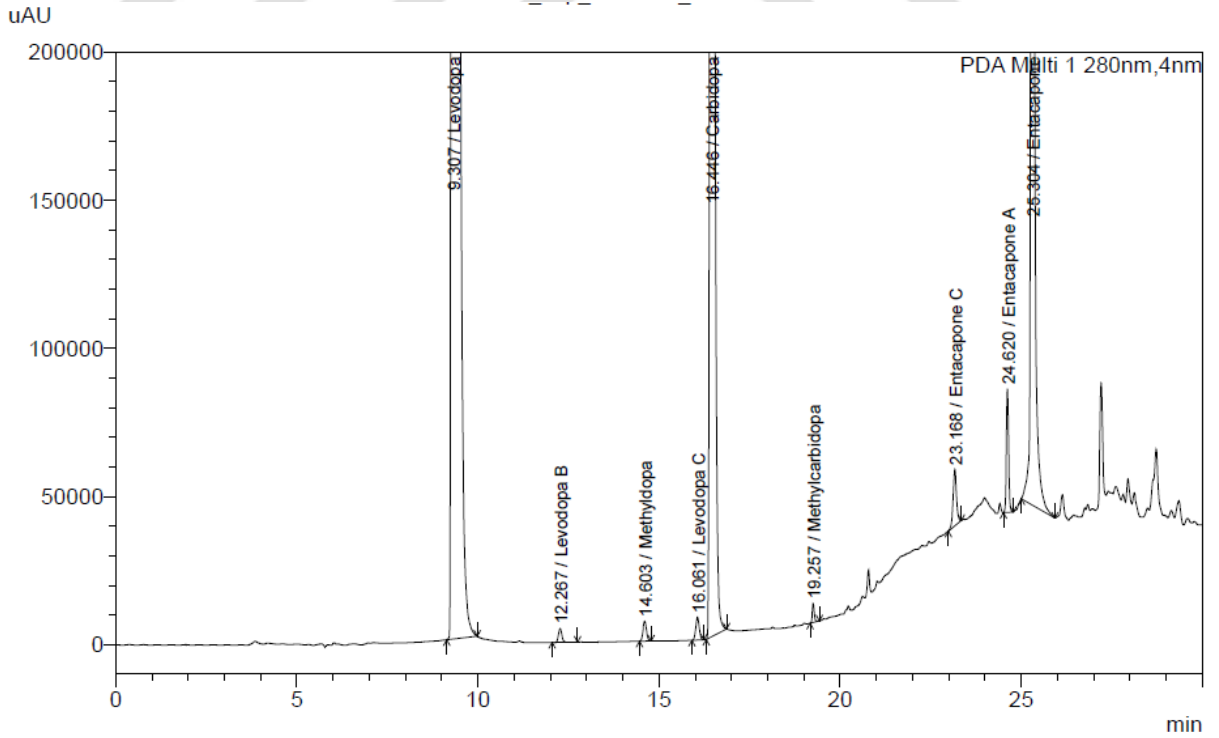


Şekil 4-35: Deneme 2 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$).

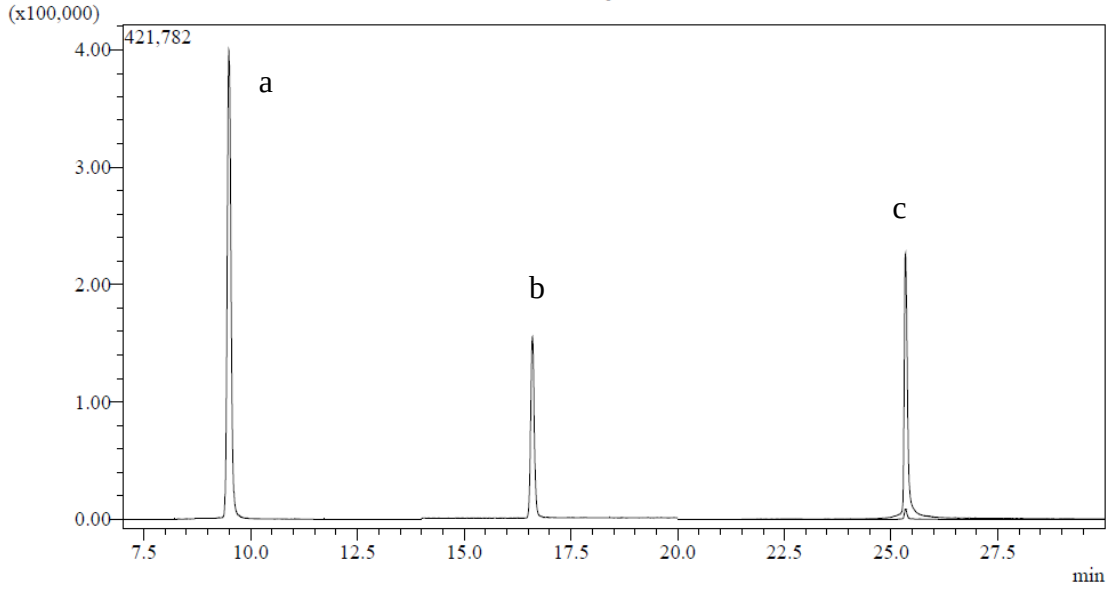
Tablo 4-10: Deneme 2 ile elde edilen ayırım faktörleri

Pik No	Pik adı	Ayrım Faktörü
1	Levodopa	0,7
2	Levodopa Safsızlık B	9,3
3	Metildopa	4,5
4	Levodopa Safsızlık C	5,5
5	Karbidopa	Ayrım sağlanamadı
6	Metilkarbidopa	2,4
7	Entakapon Safsızlık C	14,2
8	Entakapon Safsızlık A	41,2
9	Entakapon	4,8

Bu deneme ile alıkonma zamanları azalmakla beraber levodopa EP C ile karbidopa piklerinin ayrımı sağlanamadı.

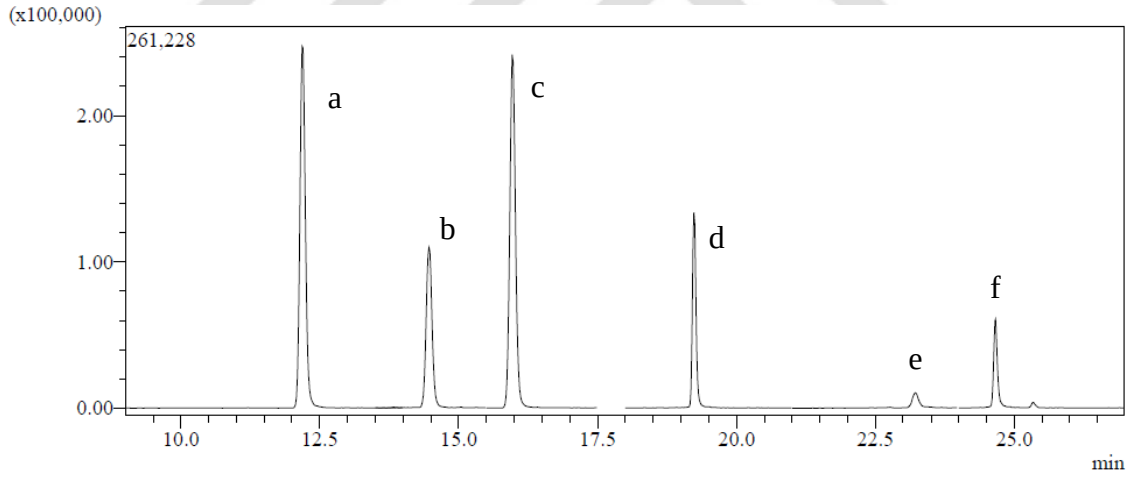


Şekil 4-36: Deneme 3 ile elde edilen HPLC kromatogramı (C_{levodopa} : 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$).



Şekil 4-37: Deneme 3 ile elde edilen aktif maddelerin MS piklerini gösteren kromatogram
(C_{levodopa} : 200 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{karbidopa}}$: 50 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon}}$: 200 $\mu\text{g/mL}$)

a: Levodopa, b: Karbidopa, c: Entakapon



Şekil 4-38: Deneme 3 ile elde edilen ve safsızlıkların MS piklerini gösteren kromatogram
($C_{\text{levodopa B}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{levodopa C}}$: 4,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metildopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{metilkarbidopa}}$: 2,5 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon C}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{entakapon A}}$: 3,0 $\mu\text{g/mL}$).

a: Levodopa Safsızlık B, b: Metildopa, c: Levodopa Safsızlık C, d: Metilkarbidopa, e: Entakapon Safsızlık C, f: Entakapon Safsızlık A

Tablo 4-11: Deneme 3 ile elde edilen ayırım faktörleri

Pik No	Pik adı	Ayırım Faktörü (Rs)
1	Levodopa	-
2	Levodopa Safsızlık B	13,6
3	Metildopa	13,3
4	Levodopa Safsızlık C	8,1
5	Karbidopa	2,0
6	Metilkarbidopa	18,3
7	Entakapon Safsızlık C	28,8
8	Entakapon SAfsızlık A	10,2
9	Entakapon	6,1

Elde edilen son kromatogram ile hem analiz süresi kısaltıldı hem de daha önceki denemelerde Levodopa Safsızlık C ve karbidopa ayırımı iyileştirildi. Geliştirilen metotta bu gradiyen programın kullanılmasına karar verildi.

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla yapılan analizler sonucunda ilgilenilen piklerin alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim olmadığı saptandı. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-36 da verilmiştir.

4.2.2. Nitelik ve Nicelik Sınırı (LOD ve LOQ)

Bölüm 3.6.2’de hazırlanan standart çözeltisinden çeşitli seyreltmeler yapılarak seri enjeksiyonlar yapıldı, cihazın enjeksiyonlara ait gürültü/sinyal (s/n) değerleri hesaplatıldı. s/n değeri için yaklaşık 3:1 oranına sahip konsantrasyonlar nitelik sınırı (LOD), yaklaşık 10:1 oranına sahip konsantrasyonlar ise nicelik sınırı (LOQ) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-12’de verilmiştir.

Tablo 4-12: İlgilenilen maddelerin nicelik ve nitelik sınırı konsantrasyonları

	Nitelik Sınırı (ng/mL)	Alan ortalaması	s/n	Nicelik sınırı (ng/mL)	Alan ortalaması	s/n	%RSD
Levodopa Safsızlık B	1,30	3916	5	3,94	10681	10	11,0
Levodopa Safsızlık C	5,26	1325	4	15,9	6008	17	18,2
Metildopa	0,833	12849	4	2,53	50553	12	5,8
Metilkarbidopa	3,31	568	3	10,0	2506	9	16,0
Entakapon Safsızlık C	1,67	1514	3	5,06	5882	18	15,0
Entakapon SAfsızlık A	0,61	1696	5	1,86	8657	16	10,8

Elde edilen LOQ değerlerine ait enjeksiyonlardan 6 enjeksiyon yapılarak enjeksiyon tekrarlanabilirliği incelendi ve alan % RSD değerleri % 20 nin altında bulunmuştur.

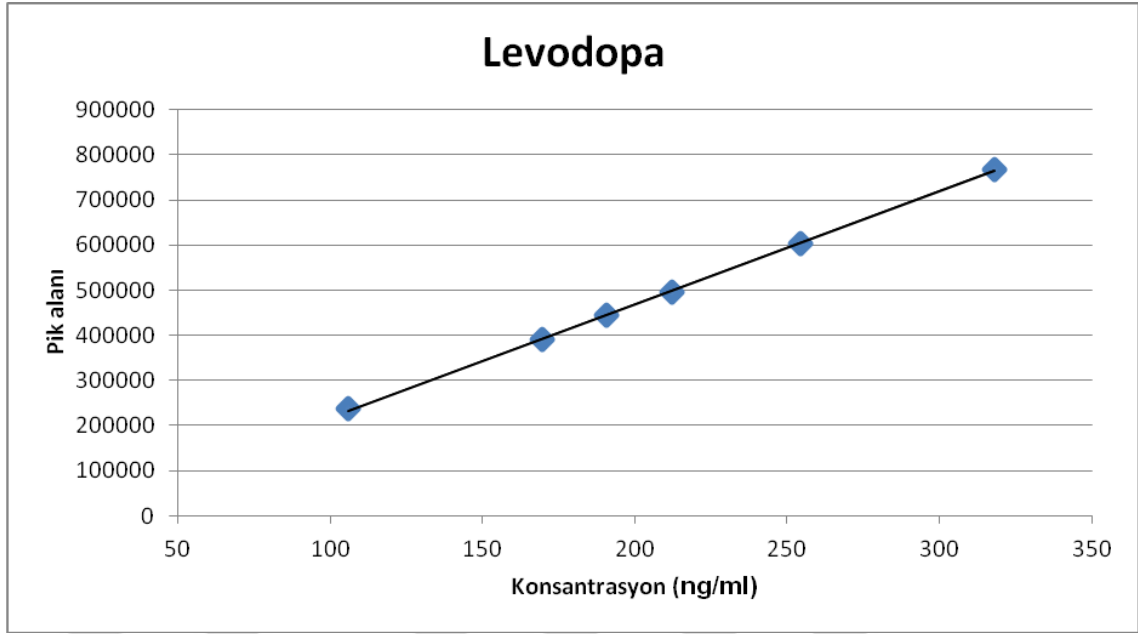
4.2.3. Doğrusallık

4.2.3.1. Miktar Tayini için doğrusallık

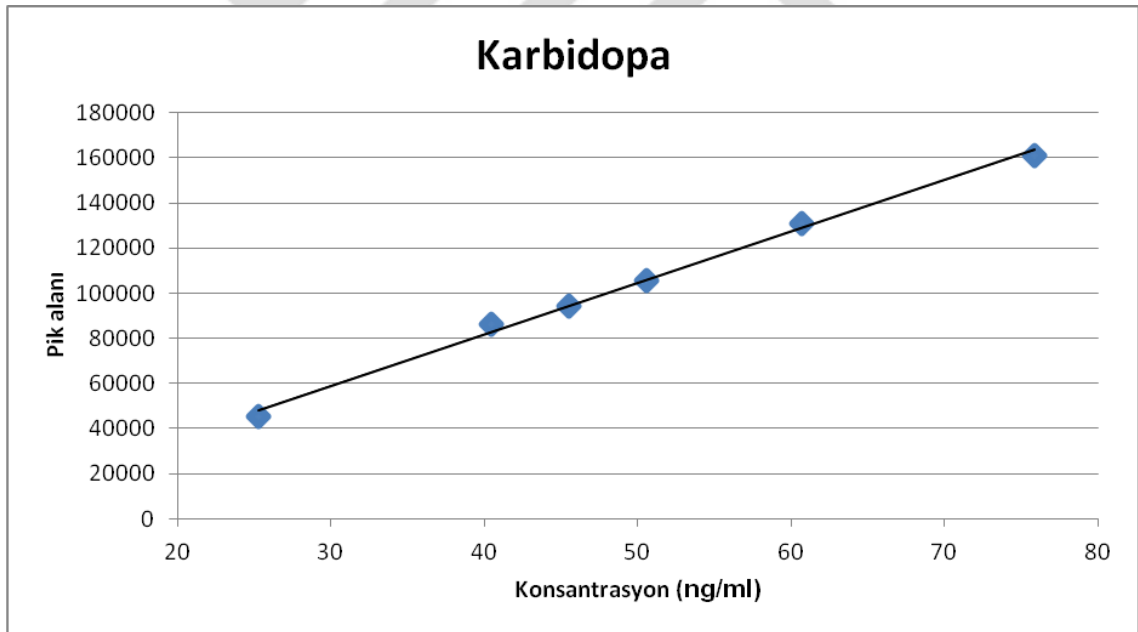
Bölüm 3.6.3.1 de belirtilen çözeltiler hazırlandı ve her konsantrasyon seviyesinden 3 er enjeksiyon yapılarak en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri elde edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-13’de verilmiştir.

Tablo 4-13: Miktar tayini için doğrusallık çalışması değerleri

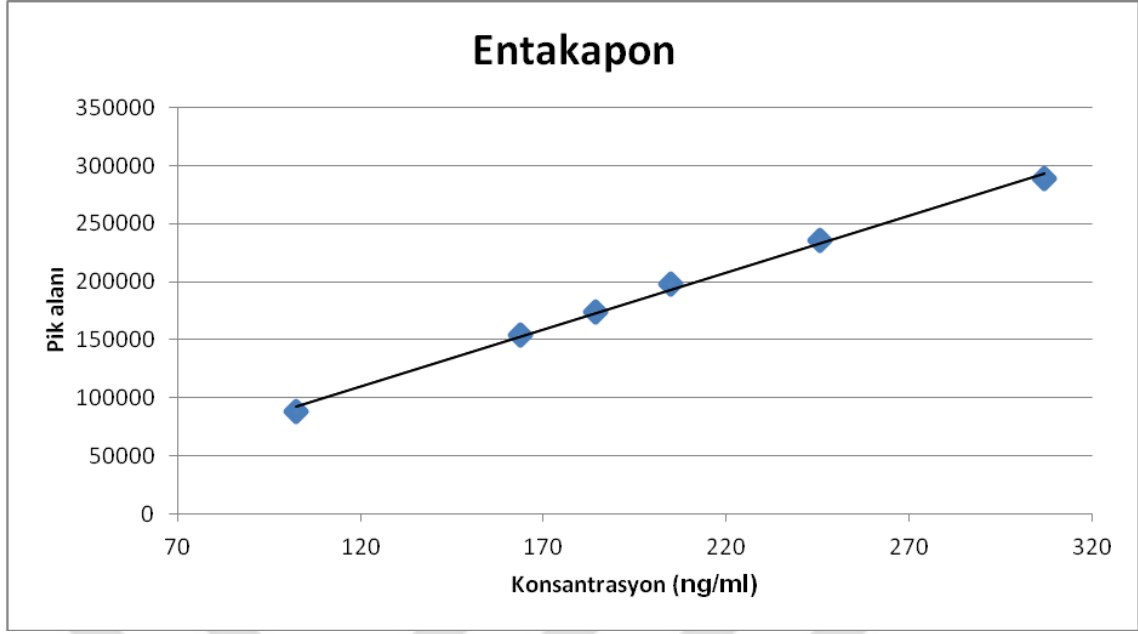
	Levodopa		Karbidopa		Entakapone	
	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan
% 50	106,04	237233	25,29	45274	102,40	88658
% 80	169,66	390650	40,46	85999	163,84	153806
% 90	190,87	444075	45,52	94443	184,32	174005
% 100	212,07	496587	50,57	105472	204,80	197542
% 120	254,49	604540	60,69	130947	245,75	235744
% 150	318,11	768025	75,86	161095	307,20	288516
Eğim	2506,93		2280,27		978,41	
y-kesim noktası	-32611		-9530		-7325	
R	0,999879		0,998156		0,998548	
R ²	0,999758		0,996316		0,997099	
% y- kesim noktası	% 6,6		% 9,0		% 3,7	



Şekil 4-39: Levodopa doğrusallık grafiği



Şekil 4-40: Karbidopa doğrusallık grafiği



Şekil 4-41: Entakapon doğrusallık grafiği

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen verilerden doğrusallık denklemi eğimi, y-kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), korelasyon katsayısının karesi (R^2) ve % y-kesim noktasının değeri hesaplatılmıştır. İlgilenilen tüm maddeler için korelasyon katsayısı 0,998 değerinin üstünde bulunmuştur. % Y-kesim noktası değeri ise % 10 değerinin altında bulunmuştur. Levodopa için 100-300 ng/mL konsantrasyonları aralığında, karbidopa için 25-75 ng/mL konsantrasyonları aralığında, entakapon için 100-300 ng/mL konsantrasyonları aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

$$\% y - kesim noktası = \frac{b}{alan} \times 100$$

(Denklem 4-1)

b: doğrusallık denkleminde y kesim noktası değerinin mutlak değeri.
alan: % 100 konsantrasyona karşılık gelen alan ortalaması.

4.2.3.2. Safsızlıklar için doğrusallık

Bölüm 3.6.3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan 8 seviye doğrusallık çözeltilerinin her birinden 3 er adet enjeksiyon yapıldı ve en küçük kareler metoduna göre doğrusallık denklemleri ve grafikleri elde edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-14, 4-15 ve 4-16’da verilmiştir.

Tablo 4-14: Levodopa safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları

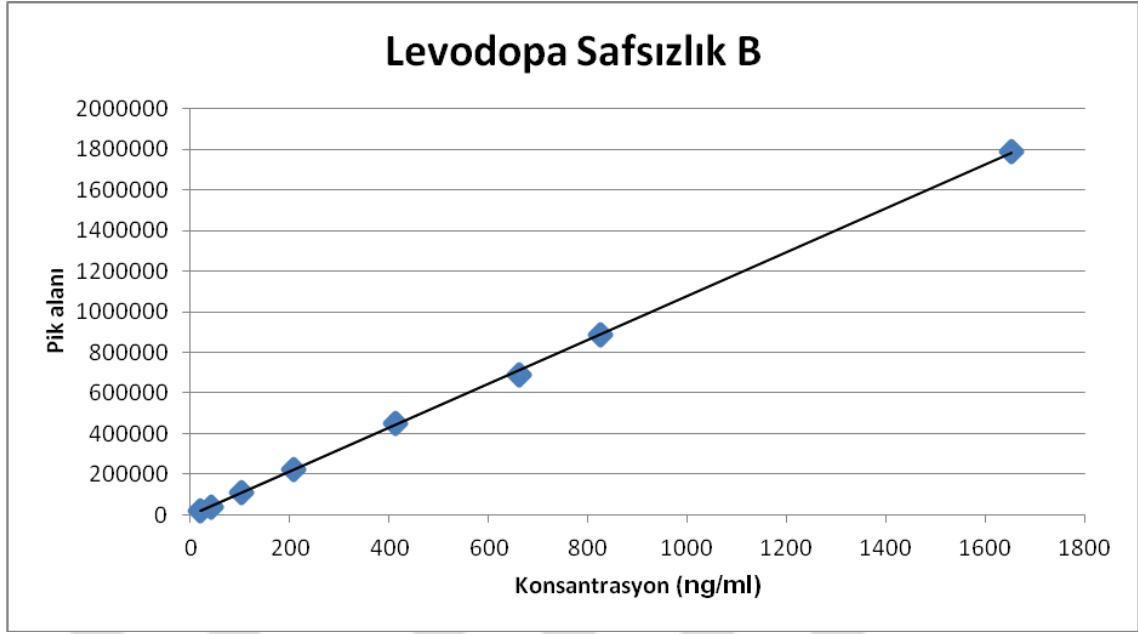
Seviye	Levodopa Safsızlık B		Levodopa Safsızlık C	
	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan
% 5	20,64	19962	19,91	12879
% 10	41,28	40857	39,81	29195
% 25	103,2	110846	99,53	77281
% 50	206,4	225056	199,1	155635
% 100	412,8	449627	398,1	306392
% 160	660,5	690764	637,0	491119
% 200	825,6	884629	796,2	619167
% 400	1651,2	1789816	1592,5	1275168
Eğim	1081,62		798,91	
y-kesim noktası	-3766		-6845	
R	0,999888		0,999841	
R ²	0,999776		0,999683	
% y- kesim noktası	0,84		2,23	

Tablo 4-15: Karbidopa safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları

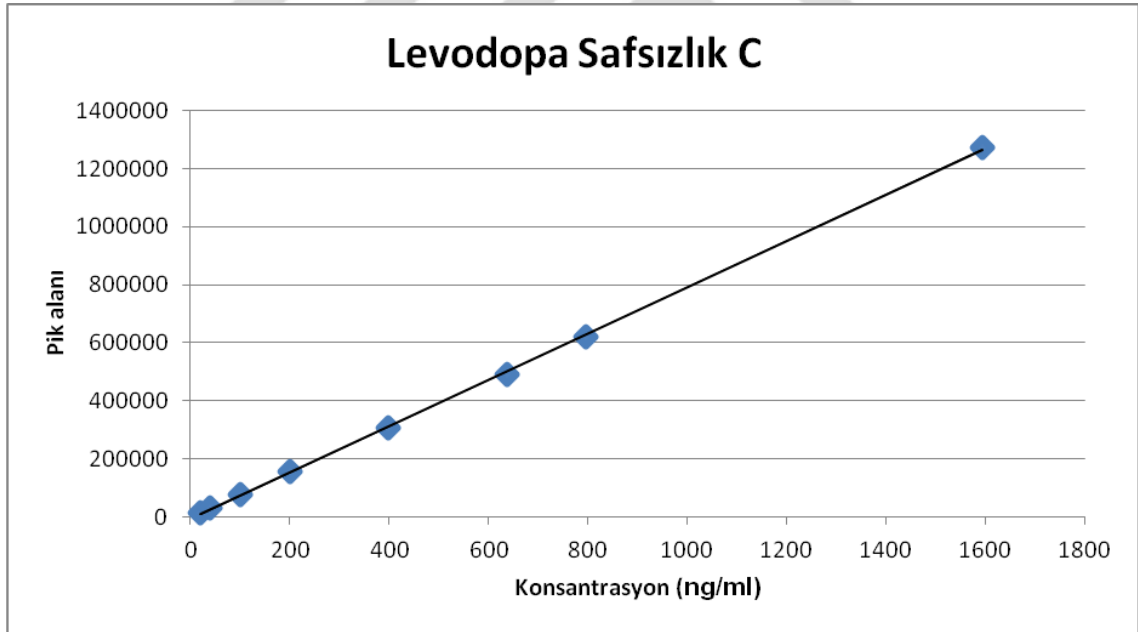
Seviye	Metildopa		Metilkarbidopa	
	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan
% 5	12,4	22759	13,15	9571
% 10	24,8	46598	26,30	19204
% 25	62,0	124676	65,75	45356
% 50	124,0	258354	131,5	88545
% 100	248,0	537473	263,0	161855
% 160	396,8	872609	420,8	278419
% 200	496,0	1103656	526,0	333945
% 400	992,0	2207907	1052,0	744984
Eğim	2237,74		698,67	
y-kesim noktası	-12260		-7967	
R	0,999976		0,998298	
R ²	0,999952		0,996599	
% y- kesim noktası	2,28		4,92	

Tablo 4-16: Entakapon safsızlıklarının doğrusallık çalışmaları sonuçları

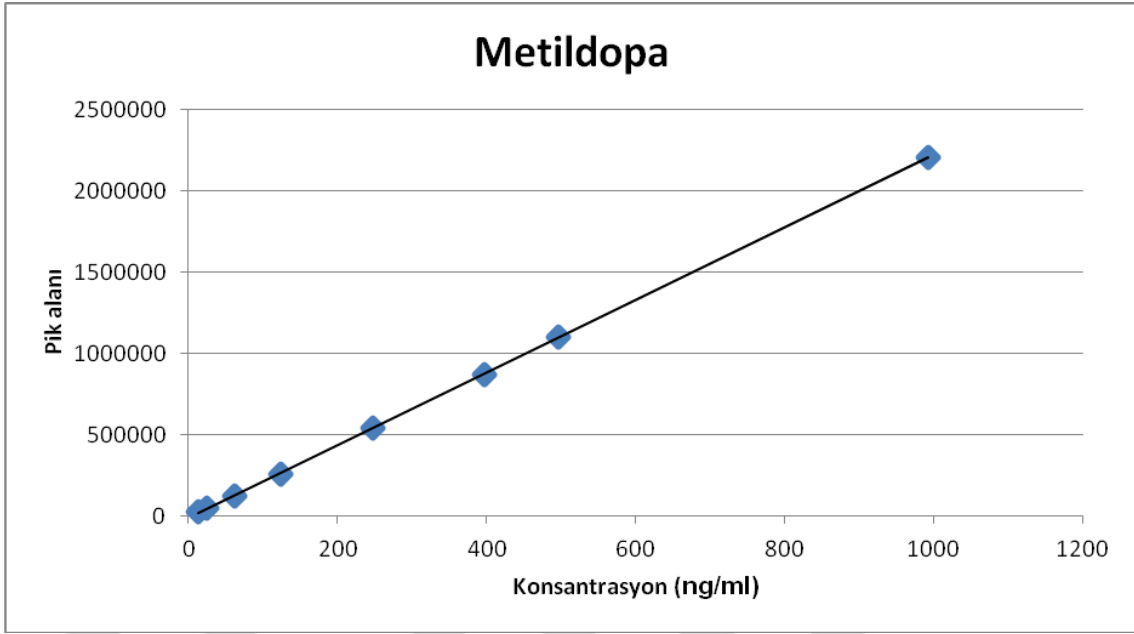
Seviye	Entakapon Safsızlık C		Entakapon Safsızlık A	
	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan	Konsantrasyon (ng/mL)	Alan
% 5	6,7	850	7,6	3997
% 10	13,39	2357	15,18	9988
% 25	33,50	5253	37,95	28611
% 50	66,90	11578	75,89	60027
% 100	133,90	24569	151,80	123077
% 160	214,20	37669	242,90	203898
% 200	267,80	51205	303,60	261354
% 400	535,60	99988	607,20	536869
Eğim	188,04		888,45	
y-kesim	-714		-6678	
noktası				
R	0,999585		0,999779	
R ²	0,999171		0,999557	
% y-kesim	2,91		5,43	
noktası				



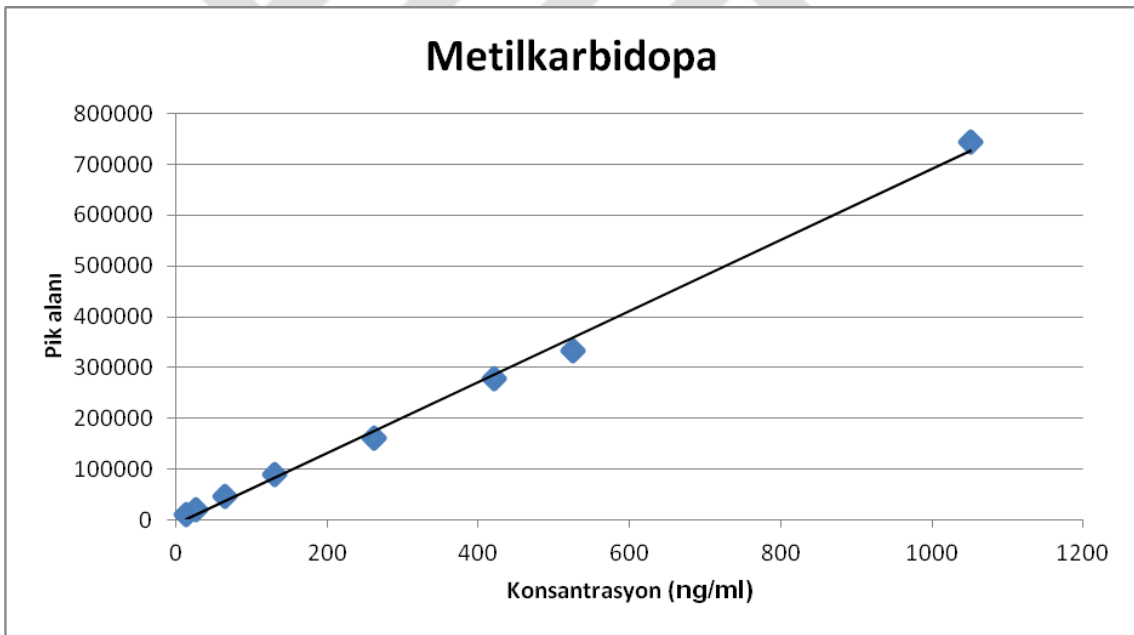
Şekil 4-42: Levodopa Safsızlık B Doğrusallık grafiği



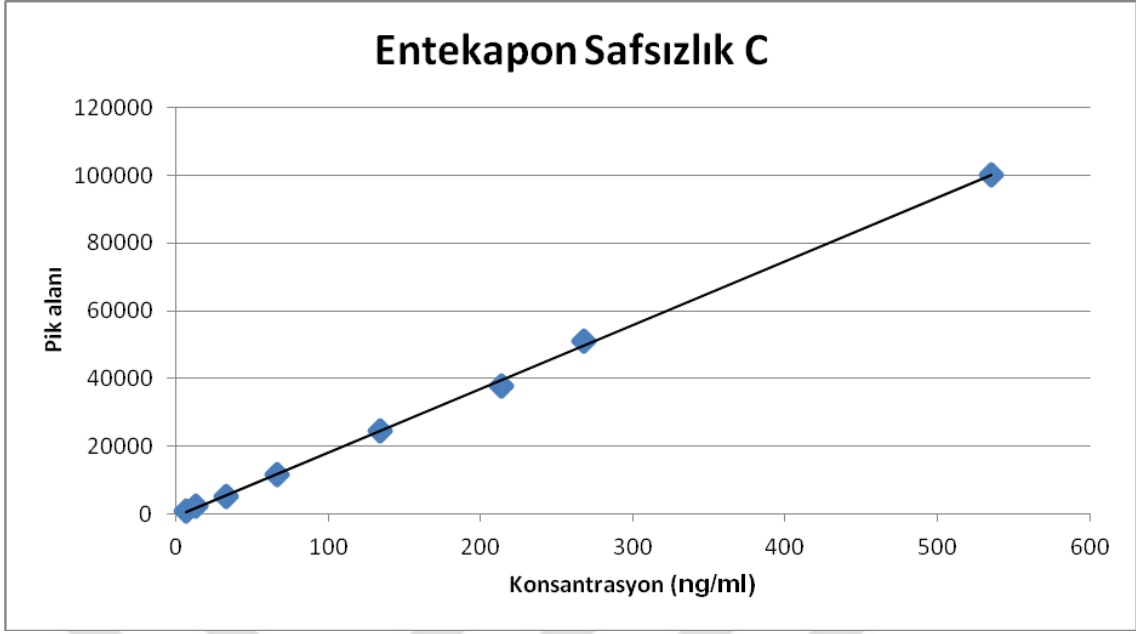
Şekil 4-43: Levodopa Safsızlık C Doğrusallık grafiği



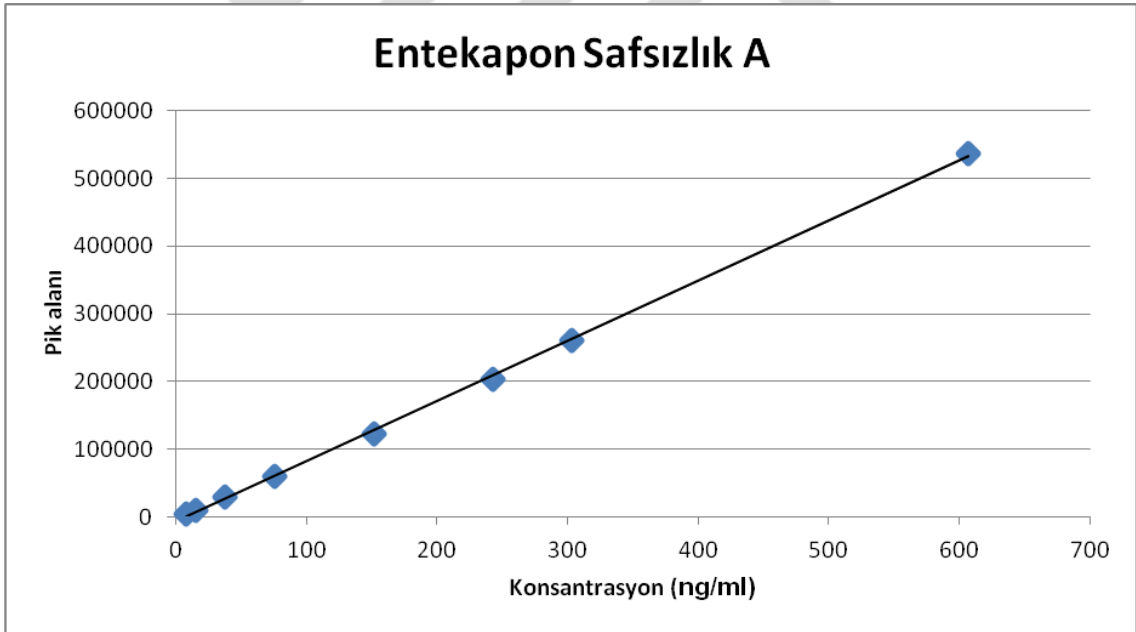
Şekil 4-44: Metildopa Doğrusallık grafiği



Şekil 4-45: Metilkarbidopa Doğrusallık grafiği



Şekil 4-46:Entakapon Safsızlık C Doğrusallık grafiği



Şekil 4-47: Entakapon Safsızlık A Doğrusallık grafiği

Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen verilerden doğrusallık denklemi eğimi, y-kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), korelasyon katsayısının karesi (R^2) ve % y-kesim noktasının değeri hesaplatılmıştır. İlgilenilen tüm maddeler için korelasyon katsayısı 0,998 değerinin üstünde bulunmuştur. % Y-kesim noktası değeri ise % 10 değerinin altında bulunmuştur. Levodopa Safsızlık B ve C için 20- 1600 ng/mL

konsantrasyonları aralığında, metildopa ve metilkarbidopa için 12,5- 1000 ng/mL konsantrasyonları aralığında, entakapon safsızlık C ve A için ise 7,5-600 ng/mL konsantrasyonları aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

4.2.4. Doğruluk

4.2.4.1. Miktar tayini için doğruluk çalışması sonuçları

Bölüm 3.6.4.1’de belirtildiği üzere standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve ortalama alanlar elde edildi. % 50, % 100 ve % 150 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3 er numune hazırlandı ve ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar ng/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-17, 4-18 ve 4-19’da verilmiştir.

Tablo 4-17: Levodopa doğruluk sonuçları

		Teorik	Deneysel	
Seviye		Konsantrasyon	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
		(ng/mL)	(ng/mL)	
% 50	1	107,127	106,270	99,2
	2	107,127	107,341	100,2
	3	105,046	105,256	100,2
	4	105,046	106,202	101,1
	5	106,136	104,650	98,6
	6	106,136	104,862	98,8
% 100	1	214,254	218,111	101,8
	2	214,254	218,325	101,9
	3	210,092	206,310	98,2
	4	210,092	206,100	98,1
	5	212,272	209,300	98,6
	6	212,272	208,027	98,0
% 150	1	321,381	321,703	100,1
	2	321,381	322,345	100,3
	3	315,138	312,302	99,1
	4	315,138	312,617	99,2
	5	318,408	317,135	99,6
	6	318,408	317,453	99,7

Tablo 4-18: Karbidopa doğruluk sonuçları

		Teorik	Deneyisel	
Seviye		Konsantrasyon	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
		(ng/mL)	(ng/mL)	
% 50	1	25,676	25,188	98,1
	2	25,676	25,291	98,5
	3	25,470	25,24	99,1
	4	25,470	25,342	99,5
	5	26,020	26,306	101,1
	6	26,020	26,332	101,2
% 100	1	51,352	50,582	98,5
	2	51,352	50,633	98,6
	3	50,939	50,736	99,6
	4	50,939	50,583	99,3
	5	52,040	52,820	101,5
	6	52,040	53,081	102,0
% 150	1	77,028	76,335	99,1
	2	77,028	75,950	98,6
	3	76,409	77,326	101,2
	4	76,409	77,173	101,0
	5	78,060	76,498	98,0
	6	78,060	76,655	98,2

Tablo 4-19: Entakapon doğruluk sonuçları

		Teorik	Deneysel	
Seviye		Konsantrasyon	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
		(ng/mL)	(ng/mL)	
% 50	1	101,099	100,796	99,7
	2	101,099	101,806	100,7
	3	102,098	103,221	101,1
	4	102,098	103,017	100,9
	5	104,795	104,376	99,6
	6	104,795	104,586	99,8
% 100	1	202,198	200,176	99,0
	2	202,198	199,973	98,9
	3	204,196	204,808	100,3
	4	204,196	206,238	101,0
	5	209,59	210,638	100,5
	6	209,59	210,638	100,5
% 150	1	303,296	307,239	101,3
	2	303,296	308,149	101,6
	3	306,293	302,005	98,6
	4	306,293	303,230	99,0
	5	314,385	318,158	101,2
	6	314,385	317,215	100,9

Doğruluk çalışması sonucunda elde edilen geri kazanım sonuçları levodopa, karbidopa ve entakapon için sırasıyla 100-300 ng/mL, 25-75 ng/mL ve 100-300 ng/mL konsantrasyonları arasında % 98.0 -102.0 arasında bulunmuştur.

4.2.4.2. Safsızlıklar için doğruluk çalışması bulguları

Bölüm 3.6.4.2’de belirtildiği şekilde standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve ortalama alanlar elde edildi. LOQ, % 100 ve % 150 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3 er numune hazırlandı ve ikiye enjeksiyon yapıldı. Standart

konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar ng/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-20-25 de gösterilmiştir.

Tablo 4-20: Levodopa Safsızlık B doğruluk çalışması sonuçları

Seviye		Teorik Konsantrasyon (ng/mL)	Deneysel Konsantrasyon (ng/mL)	% Geri Kazanım
LOQ	1	4,034	3,150	78,1
	2	4,034	3,142	77,9
	3	4,049	3,142	77,6
	4	4,049	3,163	78,1
	5	4,014	3,300	82,2
	6	4,014	3,332	83,0
% 100	1	403,376	363,442	90,1
	2	403,376	363,845	90,2
	3	404,944	377,408	93,2
	4	404,944	381,052	94,1
	5	401,424	369,712	92,1
	6	401,424	374,930	93,4
% 150	1	605,064	618,375	102,2
	2	605,064	610,510	100,9
	3	607,416	638,394	105,1
	4	607,416	633,535	104,3
	5	601,848	584,996	97,2
	6	601,848	581,987	96,7

Tablo 4-21: Levodopa Safsızlık C doğruluk çalışması sonuçları

		Teorik	Deneyisel	
Seviye		Konsantrasyon	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
		(ng/mL)	(ng/mL)	
LOQ	1	15,545	12,607	81,1
	2	15,545	12,576	80,9
	3	15,719	13,691	87,1
	4	15,719	13,848	88,1
	5	15,583	13,682	87,8
	6	15,583	13,713	88
% 100	1	388,632	408,453	105,1
	2	388,632	406,121	104,5
	3	392,976	424,021	107,9
	4	392,976	421,663	107,3
	5	389,579	403,214	103,5
	6	389,579	405,552	104,1
% 150	1	582,949	612,679	105,1
	2	582,949	611,513	104,9
	3	589,463	584,158	99,1
	4	589,463	581,211	98,6
	5	584,369	564,500	96,6
	6	584,369	560,409	95,9

Tablo 4-22: Metildopa doğruluk çalışması sonuçları

Seviye		Teorik Konsantrasyon (ng/mL)	Deneysel Konsantrasyon (ng/mL)	% Geri Kazanım
LOQ	1	2,512	2,125	84,6
	2	2,512	2,120	84,4
	3	2,508	2,149	85,7
	4	2,508	2,159	86,1
	5	2,503	1,980	79,1
	6	2,503	1,977	79
% 100	1	251,210	231,867	92,3
	2	251,210	234,128	93,2
	3	250,770	238,482	95,1
	4	250,770	237,981	94,9
	5	250,310	238,796	95,4
	6	250,310	238,295	95,2
% 150	1	376,815	409,598	108,7
	2	376,815	408,091	108,3
	3	376,155	388,568	103,3
	4	376,155	387,063	102,9
	5	375,465	381,097	101,5
	6	375,465	375,090	99,9

Tablo 4-23: Metilkarbidopa doğruluk sonuçları

Seviye	Teorik		Deneyisel	
		Konsantrasyon (ng/mL)	Konsantrasyon (ng/mL)	% Geri Kazanım
LOQ	1	10,072	8,772	87,1
	2	10,072	8,873	88,1
	3	9,992	9,043	90,5
	4	9,992	9,033	90,4
	5	10,060	8,692	86,4
	6	10,060	8,642	85,9
% 100	1	262,281	279,067	106,4
	2	262,281	280,903	107,1
	3	260,208	274,520	105,5
	4	260,208	276,081	106,1
	5	261,979	271,148	103,5
	6	261,979	271,410	103,6
% 150	1	393,422	397,750	101,1
	2	393,422	401,684	102,1
	3	390,313	407,486	104,4
	4	390,313	399,290	102,3
	5	392,969	388,253	98,8
	6	392,969	390,218	99,3

Tablo 4-24: Entakapon Safsızlık C doğruluk sonuçları

		Teorik	Deneyisel	
Seviye		Konsantrasyon	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
		(ng/mL)	(ng/mL)	
LOQ	1	5,088	4,584	90,1
	2	5,088	4,589	90,2
	3	5,125	4,617	90,1
	4	5,125	4,587	89,5
	5	5,079	4,581	90,2
	6	5,079	4,587	90,3
% 100	1	299,278	273,839	91,5
	2	299,278	269,350	90
	3	301,453	280,050	92,9
	4	301,453	281,256	93,3
	5	298,776	278,459	93,2
	6	298,776	279,057	93,4
% 150	1	448,917	413,902	92,2
	2	448,917	413,453	92,1
	3	452,180	426,858	94,4
	4	452,180	424,597	93,9
	5	448,164	418,585	93,4
	6	448,164	421,722	94,1

Tablo 4-25: Entakapon Safsızlık A doğruluk sonuçları

Seviye		Teorik	Deneyisel	% Geri Kazanım
		Konsantrasyon (ng/mL)	Konsantrasyon (ng/mL)	
LOQ	1	1,803	1,605	89,0
	2	1,803	1,599	88,7
	3	1,866	1,491	79,9
	4	1,866	1,499	80,3
	5	1,855	1,625	87,6
	6	1,855	1,636	88,2
% 100	1	310,32	282,081	90,9
	2	310,32	283,322	91,3
	3	311,04	292,689	94,1
	4	311,04	293,311	94,3
	5	309,096	281,586	91,1
	6	309,096	284,677	92,1
% 150	1	465,480	444,533	95,5
	2	465,480	447,326	96,1
	3	466,560	448,364	96,1
	4	466,560	446,964	95,8
	5	463,644	429,798	92,7
	6	463,644	430,262	92,8

Doğruluk çalışması sonucunda elde edilen geri kazanım sonuçları levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlıkları C ve entakapon safsızlık A için sırasıyla 3,941-591,15 ng/mL, 15,94-597,9 ng/mL, 2,526-378,9 ng/mL, 10,032-376,2 ng/mL, 5,064-446,85 ng/mL ve 1,8576-464,4 ng/mL konsantrasyonları arasında ilk konsantrasyon olan LOQ konsantrasyonları için % 70,0- % 130,0 arasında, diğer seviyelerdeki konsantrasyonlar için ise % 90,0 -110,0 arasında bulunmuştur.

4.2.5. Kesinlik

Bölüm 3.5 te anlatıldığı şekilde hazırlanan standart ve numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçların % RSD değerleri hesaplanarak metodun kesinliği belirlenmiştir.

4.2.5.1. Miktar Tayini için Kesinlik çalışması sonuçları

Levodopa, Karbidopa ve entakapon aktif maddeleri için Stalevo 200/50/200 mg film tablet kullanılarak yapılan miktar tayini çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 4-26' da verilmiştir.

Tablo 4-26: Aktif maddeler için kesinlik çalışması sonuçları

Ölçüm	Levodopa		Karbidopa		Entakapon	
	mg/ tablet	%	mg/ tablet	%	mg/ tablet	%
1	206,8	103,4	49,0	97,9	201,0	100,5
2	209,8	104,9	48,4	96,9	202,0	101,0
3	206,2	103,1	48,6	97,1	200,4	100,2
4	210,6	105,3	49,0	98	199,0	99,5
5	208,2	104,1	49,2	98,4	199,6	99,8
6	207,2	103,6	49,2	98,3	200,2	100,1
Ortalama	208,1	104,1	48,9	97,8	200,4	100,2
Standart Sapma	1,75	0,87	0,31	0,63	1,05	0,53
% RSD	0,84	0,84	0,64	0,64	0,53	0,53

Aktif madde miktar tayini sonuçları arasında % RSD değeri % 2,0 den az bulunmuştur. Safsızlıkların alanları arasındaki % RSD değeri % 10,0 dan az bulunmuştur.

4.2.5.2. Safsızlıklar Tayini için Kesinlik çalışması sonuçları

Levodopa, Karbidopa ve entakapon safsızlıkları için Stalevo 200/50/200 mg film tablet kullanılarak hazırlanan numune çözeltilerinin içine Tablo 3-11 de belirtilen miktarlarda safsızlıkların limit konsantrasyonlarına karşılık gelecek şekilde safsızlıkların stok çözeltilerinden eklemeler yapılmış; yapılan safsızlık tayini çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 4-27' de verilmiştir.

Tablo 4-27: Safsızlıkların tayini için kesinlik çalışması sonuçları

	Levodopa Safsızlık B	Levodopa Safsızlık C	Metildopa	Metilkarbidopa	Entakapone Safsızlık C	Entakapone Safsızlık A
Ölçüm	%	%	%	%	%	%
1	0,219	0,202	0,558	0,499	0,143	0,137
2	0,221	0,198	0,529	0,486	0,145	0,138
3	0,235	0,198	0,508	0,477	0,138	0,136
4	0,222	0,202	0,520	0,492	0,146	0,135
5	0,215	0,199	0,537	0,476	0,143	0,133
6	0,221	0,205	0,511	0,486	0,141	0,135
Ortalama	0,222	0,201	0,527	0,486	0,143	0,136
Standart Sapma	0,007	0,003	0,019	0,009	0,003	0,002
% RSD	3,07	1,37	3,57	1,80	1,98	1,28

Safsızlıkların alanları arasındaki % RSD değeri % 10,0 dan az bulunmuştur.

Validasyon parametreleri sonucunda elde edilen sonuçlar kabul kriterleri içindedir.

4.3. Kıyas Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar Sonucu Elde edilen Bulgular

Bölüm 3.7 de belirtildiği şekilde kıyas yöntemi ile Stalevo tabletlerde aktif madde miktar tayinleri ve safsızlık tayini çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar geliştirilen metot ile elde edilen sonuçlar ile kıyaslanmıştır. Aktif madde miktar tayini sonuçları arasında student t test ile ortalamalar yönünden; f testi ile de standart sapmalar yönünden % 95 güven seviyesinde karşılaştırmalar uygulanmıştır. Hesaplamalarda Microsoft Excel programının “f-test varyanslar için iki örnek” ve “t test: eşit varyanslar varsayarak iki örnek” fonksiyonları kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre deneysel f ve t değerleri f ve t kiritik iki uçlu değerlerinden düşük bulunduğundan her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Her iki yöntem ile elde edilen safsızlık sonuçlarına ise % 95 seviyesinde hipotez testi uygulanmadığı için sonuçlar % fark ile karşılaştırılmış ve anlamlı olarak farklar gözlenmemiştir. Sonuçlar Tablo 4-28, 4-29, 4-30, 4-31, 4-32, 4-33’ de verilmiştir.

Tablo 4-28: Levodopa için karşılaştırma tablosu

Levodopa					
Ölçüm	Geliştirilen Yöntem		Kıyas Yöntemi		
	mg/ tablet	%	mg/ tablet	%	
1	206,8	103,4	204,7	102,4	
2	209,8	104,9	204,8	102,4	
3	206,2	103,1	204,8	102,4	
4	210,6	105,3	211,5	105,7	
5	208,2	104,1	211,3	105,7	
6	207,2	103,6	211,3	105,7	
Ortalama	208,1	104,1	208,1	104,0	
Standart Sapma	1,75	0,87	3,62	1,81	
% RSD	0,84	0,84	1,74	1,74	
f testi	Varyans	3,268	0,763		
	Gözlem	6	6		
	Df	5	5		
	F değeri	4,28			
	F kritik iki uçlu	5,05			
t testi	Df	10			
	t değeri	0,03			
	t kritik iki uçlu	2,23			

Df: Serbestlik derecesi

Tablo 4-29: Karbidopa için karşılaştırma tablosu

Karbidopa					
		Geliştirilen Yöntem		Kıyas Yöntemi	
	Ölçüm	mg/ tablet	%	mg/ tablet	%
	1	48,95	97,9	49,05	98,1
	2	48,45	96,9	49,06	98,1
	3	48,55	97,1	49,02	98,0
	4	49,00	98,0	49,52	99,0
	5	49,20	98,4	49,52	99,0
	6	49,15	98,3	49,48	99,0
	Ortalama	48,9	97,8	49,3	98,5
	Standart Sapma	0,31	0,63	0,25	0,51
	% RSD	0,64	0,64	0,52	0,52
f testi	Varyans	0,524		0,261	
	Gözlem	6		6	
	Df	5		5	
	F değeri			2,00	
	F kritik iki uçlu			5,05	
	Df			10	
t testi	t değeri			1,23	
	t kritik iki uçlu			2,23	

Tablo 4-30: Entakapon için karşılaştırma tablosu

Entakapon					
		Geliştirilen Yöntem		Kıyas Yöntemi	
	Ölçüm	mg/ tablet	%	mg/ tablet	%
	1	201,0	100,5	201,6	100,8
	2	202,0	101,0	201,5	100,7
	3	200,4	100,2	201,8	100,9
	4	199,0	99,5	202,2	101,1
	5	199,6	99,8	201,0	100,5
	6	200,2	100,1	200,6	100,3
	Ortalama	200,4	100,2	201,4	100,7
	Standart Sapma	1,05	0,53	0,57	0,28
	% RSD	0,53	0,53	0,28	0,28
f testi	Varyans	0,278		0,081	
	Gözlem	6		6	
	Df	5		5	
	F değeri			3,42	
	F kritik iki uçlu			5,05	
	Df			10	
t testi	t değeri			2,19	
	t kritik iki uçlu			2,23	

Tablo 4-31: Levodopa safsızlıklarının karşılaştırma sonuçları

Ölçüm	Levodopa Safsızlık B		Levodopa Safsızlık C	
	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi
	%	%	%	%
1	0,219	0,233	0,202	0,204
2	0,221	0,239	0,198	0,207
3	0,235	0,241	0,198	0,203
4	0,222	0,230	0,202	0,202
5	0,215	0,214	0,199	0,204
6	0,221	0,236	0,205	0,198
Ortalama	0,222	0,232	0,201	0,203
Standart Sapma	0,007	0,010	0,003	0,003
% RSD	3,07	4,2	1,37	1,5
Ortalamalar arası % fark	4,3		1,0	

Tablo 4-32: Karbidopa safsızlıklarının karşılaştırma sonuçları

Ölçüm	Metildopa		Metilkarbidopa	
	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi
	%	%	%	%
1	0,558	0,592	0,499	0,532
2	0,529	0,535	0,486	0,524
3	0,508	0,535	0,477	0,530
4	0,520	0,530	0,492	0,502
5	0,537	0,533	0,476	0,510
6	0,511	0,521	0,486	0,506
Ortalama	0,527	0,541	0,486	0,517
Standart Sapma	0,019	0,026	0,009	0,013
% RSD	3,57	4,7	1,80	2,46
Ortalamalar arası % fark	2,6		4,0	

Tablo 4-33: Entakapon safsızlıklarının karşılaştırma tabloları

Ölçüm	Entakapone Safsızlık C		Entakapone Safsızlık A	
	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi	Geliştirilen Yöntem	Kıyas Yöntemi
	%	%	%	%
1	0,143	0,148	0,137	0,131
2	0,145	0,147	0,138	0,136
3	0,138	0,146	0,136	0,137
4	0,146	0,149	0,135	0,136
5	0,143	0,149	0,133	0,134
6	0,141	0,149	0,135	0,130
Ortalama	0,143	0,148	0,136	0,134
Standart Sapma	0,003	0,001	0,002	0,003
% RSD	1,98	1,01	1,28	2,21
Ortalamalar arası % fark	3,4		1,5	

Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında anlamlı ölçüde fark gözlenmemiştir. Safsızlık sonuçlarının arasında elde edilen % farklar % 10 değerinin altındadır.

5. TARTIŞMA

Levodopa PH tedavisinde kullanılan başlıca aktif maddelerden biridir. Enzimler tarafından metabolize olarak etkinliği önemli ölçüde azaldığından yanında bu metabolizasyonu engelleyen başka tabletlerle birlikte kullanılması gerekmektedir. İlaç üretim tekniklerinin gelişmesi ile levodopa ve bu aktif maddenin çevresel sinir sisteminde metabolize olmasını engelleyen aktif maddeleri aynı anda içeren çeşitli dozlarda tabletler hastaların kullanımına sunulmuş ve özellikle yaşlı hasta popülasyonunda kullanım kolaylığı sağlamış ve yanlış dozlama olasılıklarının önüne geçilmiştir. Bu ilerlemeler beraberinde farmasötik preparat olan tabletlerde hem aktif maddelerin hem de safsızlıklarının güvenli, doğru ve hızlı bir şekilde analiz edebilme yeteneğine sahip metotların kullanım zorunluluğunu getirmiştir. Literatürde bu aktif maddeleri ayrı ayrı ya da birlikte analiz edebilen çeşitli enstrümental analitik yöntemler mevcuttur. Çoğunlukla HPLC olan bu yöntemlerde dedeksiyon iletkenlik, elektrokimyasal ve spektrofotometrik dedektörler ile sağlanmıştır (10, 33-51). Bu yöntemlerde aktif maddelerin biri ya da bir kaçı, bazı safsızlıklar ile beraber çeşitli numune hazırlama teknikleri ile analiz edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda dedeksiyonların gerektiği biyoanalitik yöntemlerde ise kütle dedektörlerinin kullanıldığı gözlenmiştir. Bu yöntemlerde aktif maddelerin ve bunlara bağlı bazı metabolitlerinin serum, plazma, idrar gibi fizyolojik sıvılarda düşük seviyelerde çalışıldığı belirlenmiştir (32, 52-58). Bu geliştirme çalışmasının yapıldığı tarihe kadar levodopa, karbidopa ve entakapon ve bunlara bağlı safsızlık maddelerinin kütle dedektör kullanılarak tayin edildiği yöntem yayınlanmamıştır. Kütle dedektörünün kullanılması ile şu ana kadar diğer dedektörler ile elde edilemeyen hassasiyet seviyelerine kadar inilmesi hedeflemiş ve bu yönde geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada tablet aktif maddeleri olan levodopa, karbidopa ve entakaponun aynı anda analiz edilmesinin yanında safsızlıkları olan levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, karbidopa safsızlıkları olan metildopa ve metilkarbidopa ile entakapon safsızlık C ve entakapon safsızlık A'nın hassas ve doğru olarak düşük konsantrasyonlarda tespit edilmesi ve kantitatif olarak analiz edilmesi hedeflenmiştir. Diğer yöntemlerden daha düşük safsızlık tespit edilmesi amacıyla kütle dedektörünün MRM modundan faydalanılmıştır. Bu yöntem ile kromatografik olarak ayırım

olmaksızın tayin mümkündür. Ancak analitlerden levodopa safsızlık C –metildopa ve entakapon – entakapon safsızlık A çiftlerinin moleköl ağırlıklarının aynı olması sebebiyle kromatografik ayırım da hedeflenmiştir. Bu sebeple çalışmalarda eş zamanlı olarak kütle dedektörünün yanı sıra 280 nm dalgaboyunda spektrofotometrik dedektör ile piklerin kromatografik olarak da ayrılması kontrol edilmiştir. Miktar tayini analizi için numune hazırlığı çalışmaları entakapon aktif maddesinin diğer aktif maddeler olan levodopa ve karbidopa gibi sulu çözücülerde iyi çözünmemesi sebebiyle numune hazırlıklarında entakapon miktar tayini için entakaponun iyi çözündüğü çözücü sistemi olan % 0,5 formik asit içeren metanol tercih edilmiş; bu amaçla ikinci bir miktar tayini numunesi hazırlığı geliştirilen analiz yöntemine dahil edilmiştir. Yapılan kromatografi geliştirme çalışmaları hareketli faz olarak % 0,5 formik asit içeren su ve % 0,5 formik asit içeren metanol karışımı gradiyent olarak kullanılmıştır. Hareketli faz ucuz, kolay hazırlanan, kütle dedektöründe kalıntı bırakmadan iyonlaşmayı kolaylaştıran bileşenlerden seçilmiştir. Ayrıca zamanla dedeksiyonu olumsuz etkilemesinin önüne geçilmiştir. Gradiyent uygulanması yoluyla farklı polaritelerdeki maddelerin izokratik elusyon ile elde edilemeyecek kadar kısa enjeksiyon sürelerinde elde edilmesi sağlanmıştır. Entakapon ve safsızlıkları çalışmada ele alınan diğer bileşiklere göre düşük polariteye sahip olduğundan uygulanan gradiyent ile 30 dakika içinde çıkmaları sağlanmıştır.

Kütle dedektöründen en iyi verimi alabilmek için yapılan optimizasyon çalışmaları öncelikle analitlere ait ana pikler belirlenmiştir. Bu amaç için analitlerin çözelti seviyesinde tam çözünmüş ve iyonlaşmaya elverişli koşullarda olması önemli olduğundan çözeltilerin hazırlanmasında hareketli faz olarak % 0,5 formik asit içeren metanol (hareketli faz A) ve % 0,5 formik asit içeren su (hareketli faz B) kullanılmıştır. Böylece çözücü ve hareketli faz uyumsuzluğunu ve farklı çözücü hazırlama gerekliliği ortadan kalkmıştır. Hazırlanan saf çözeltiler ile kütle dedektöründe tarama çalışmaları yapılmış ve elde edilen ana iyonlar literatürde aynı maddeler için belirlenen ana iyonlarla benzerlik göstermiştir. Hassas ve seçici bir şekilde piklerin dedeksiyonu için MRM modu kullanılması kararlaştırılmış ve dedektörün otomatik olarak farklı enerjilerde olabildiğince çok sayıda ürün iyonu belirlenmesi sağlanmış ve kolon ile bereber yapılan enjeksiyonlar ile kararlı MRM çiftleri belirlenmiştir. Elde edilen ilk MRM çiftinin kantitatif amaçlı diğer MRM çiftinin ise tanıma amaçlı kullanılması amaçlanmıştır.

Geliştirme ve optimizasyon çalışmaları sonrasında son hali verilen metoda ICH kılavuzunda belirtilen çerçevede validasyon çalışması yapılmıştır. Kütle dedektörü ile 2 adet MRM çifti kullanıldığından yöntem metotta belirtilen 9 bileşik için seçicidir. Yapılan doğrusallık çalışmalarında levodopa için 100-300 ng/mL konsantrasyonları aralığında, karbidopa için 25-75 ng/mL konsantrasyonları aralığında, entakapon için 100-300 ng/mL konsantrasyonları aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Levodopa Safsızlık B ve C için 20-1600 ng/mL konsantrasyonları aralığında, metildopa ve metilkarbidopa için 12,5- 1000 ng/mL konsantrasyonları aralığında, entakapon safsızlık C ve A için ise 7,5-600 ng/mL konsantrasyonları aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

Doğruluk çalışması sırasında tablet aktif maddeleri olan levodopa, karbidopa, entakapon için % 50, % 100 ve % 150 seviyelerinde sırasıyla 100-300 ng/mL, 25-75 ng/mL ve 100-300 ng/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan doğruluk numunelerinde geri kazanım oranları % 98-102 aralığında elde edilmiştir. Safsızlıklar için LOQ, % 100 ve % 150 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden doğruluk çalışması sonucunda elde edilen geri kazanım sonuçları levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlıkları C ve entakapon safsızlık A için sırasıyla 3,941-591,15 ng/mL, 15,94-597,9 ng/mL, 2,526-378,9 ng/mL, 10,032-376,2 ng/mL, 5,064-446,85 ng/mL ve 1,8576-464,4 ng/mL konsantrasyonları arasında ilk konsantrasyon olan LOQ konsantrasyonları için % 70,0- % 130,0 arasında, diğer seviyelerdeki konsantrasyonlar için ise % 90,0 -110,0 arasında bulunmuştur.

Kesinlik çalışmalarında tabletlerdeki aktif madde miktarları saptanmış ve sonuçlar arasındaki % RSD aktif madde miktar tayini için % 2,0'nin altında elde edilmiştir. Safsızlıkların kesinliği için tabletlerde var olmayan safsızlıklar numune çözeltilisinin içine katılmış ve sonuçların % RSD si hesaplanmıştır. Sonuçlar % 10 değerinin altındadır.

Geliştirilen yöntemin tablet analizlerinde uygulanabilirliği literatürdeki HPLC-UV yöntemi ile kıyaslanmak suretiyle istatistikî olarak incelenmiştir. Aktif maddelere ait hesaplanan f ve t değerleri % 95 olasılık düzeyi için tablo değerlerinden daha küçük olduğundan geliştirilen yöntemin tablet analizlerinde başarıyla uygulanabileceği anlaşılmıştır.

Toplam 6 adet safsızlık üzerine yapılan çalışmalarda geliştirilen yöntem ile daha düşük LOQ değerlerine ulaşılmıştır. Kesinlik çalışmalarında daha yüksek kesinlik seviyelerinde sonuçlar elde edilmiştir. Kesinlik sonuçları arasında kıyaslama yapılmış ve sonuçlar arasında % 10'dan daha az farklar bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen yöntemin enjeksiyon süresi kıyas yöntemine göre daha kısadır.

Kütle dedektörlerinin giderek yaygınlaşması ve ucuzlaması ile safsızlık gibi düşük derişim ve yüksek hassiyet istenen uygulamalarda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilen ve valide edilen LC-MS/MS yöntemi ile tabletlerdeki levodopa, karbidopa ve entakapon ile bu aktif maddelere ait ilgili altı adet safsızlığın (levodopa safsızlık B, levodopa safsızlık C, metildopa, metilkarbidopa, entakapon safsızlık A ve entakapon safsızlık C) miktar tayinleri aynı anda çok düşük konsantrasyonlarda; hassas, doğru ve seçici bir şekilde yapılabilecektir ve bu yöntem ilaç endüstrisindeki rutin analizlerde rahatlıkla kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Shastry B.S., Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neuroscience Research*, 2001; **41**: 5–12.
2. L de Lau L.M., Breteler M.M.B., Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 2006; **5**: 525-535.
3. Campenhausen S., Bornschein B., Wick R., Bötzel K., Sampaio C., Poewe W., Oertel W., Siebert U., Berger K., Dodel R., Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, 2005; **15**: 473-490.
4. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R., Parkinson's disease. *Lancet*, 2004; **363**: 1783-1793.
5. Chen S.Y., Tsai S.T., The Epidemiology of Parkinson's Disease. *Tzu Chi Medical Journal*, 2010; **22**: 73-81.
6. Goole J., Amighi K., Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009; **380**: 1-15.
7. Olanow C.W., Stern M.B., Sethi K., The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology*, 2009; **72** (Suppl 4): 1-136.
8. Müller T., Levodopa/carbidopa and entacapone in the treatment of Parkinson's disease: efficacy, safety and patient preference. *Patient Preference and Adherence*, 2009; **3**: 51–59.
9. Nagayama H., Ueda M., Kumagai T., Tsukamoto K., Nishiyama Y., Nishimura S., Hamamoto M., Katayama Y., Influence of ageing on the pharmacokinetics of levodopa in elderly patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2011; **17**: 150-152.
10. Bugamelli F., Marchesselli C., Barba E., Raggi M.A., Determination of l-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC–ED. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; **54**: 562-567.
11. Gonçalves D., Alves G., Soares-da-Silva P., Falcao A., Bioanalytical chromatographic methods for the determination of catechol-O-methyltransferase inhibitors in rodents and human samples: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2012; **710**: 17-32.

12. Halbig T.D., Koller W.C., Levodopa. *Handbook of Chemical Neurology*, 2007; **84**: 31-72.
13. Chin-Chan M., Navarro-Yepes J., Quintanilla-Vega B., Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015; **9** (124): 1-22.
14. Goldman S.M., Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 2014; **54**: 141-164.
15. Olanow C.W., The Scientific Basis For The Current Treatment Of Parkinson's Disease. *Annual Review of Medicine*, 2004; **55**: 41-60.
16. Munhoz R.P., Moro A., Silveira-Moriyama L., Teive H.A., Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. *Arq Neuropsiquiatr*, 2015: 1-9.
17. Dopamine Agonists for Parkinson's Disease, Parkinson's Disease Health Center. Yayın 12.03.2014, Erişim 20.06.2015, <http://www.webmd.com/parkinsons-disease/dopamine-agonists-for-parkinsons-disease>.
18. Smith Y., Wichmann T., Factor S.A, DeLong M.R., Parkinson's Disease Therapeutics: New Developments and Challenges Since the Introduction of Levodopa. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 2012; **37**: 213-246.
19. Novartis, *Stalevo® (carbidopa, levodopa and entacapone) tablets, for oral use, Summary of Product Characteristics*. Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey 07936 ABD; 2014.
20. EMEA. Stalevo Scientific Discussion, 2004. Erişim 20.07.2015, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000511/WC500057480.pdf
21. European Pharmacopoeia 8th ed., *Levodopa*, **04/2013: 0038**: 2608-2609.
22. United States Pharmacopoeia 38th ed., *Levodopa*, USP 38-NF 33: 4077-4078.
23. Wysong D.V., Recovery of 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-L- Alanine from Velvet Beans. United States Patent Office, **3,253,023**; 1966.
24. European Pharmacopoeia 8th ed., *Carbidopa*, **01/ 2008:0755**: 1764-1765.
25. United States Pharmacopoeia 37th ed., *Carbidopa*, USP 37-NF 32: 2127-2128.
26. European Pharmacopoeia 8th ed., *Entacapone*, **01/ 2011:2574**: 2139-2140.
27. United States Pharmacopoeia 37th ed., *Entacapone*, USP 37-NF 32: 2800-2801.
28. Savolainen J., Leppanen J., Forsberg M., Taipale H., Nevalainen T., Huuskonen J., Gynther J., Mannisto P.T., Jarvinen T., Synthesis and in vitro/in vivo

- evaluation of novel oral N-alkyl- and N,N-dialkyl-carbamate esters of entacapone. *Life Sciences*, 2000; **67**: 2015-216.
29. Najib J., Entacapone: A Catechol-O-Methyltransferase Inhibitor for the Adjunctive Treatment of Parkinson's Disease. *Clinical Therapeutics*, 2001; **23** (6): 802-832.
 30. Bofinatti V., Meco G., New, Selective Catechol-O-Methyltransferase Inhibitors as Therapeutic Agents in Parkinson's Disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999; **81**: 1-36.
 31. Perez-Mella B., Alvarez-Lueje A., Development of a Carbon Nanotube Modified Ionic Liquid Electrode for the Voltammetric Determination of Methyldopa Levels in Urine. *Electroanalysis*, 2013; **25**: 2193-2199.
 32. Yadav M., Dixit P., Trivedi V., Gandhi A., Senger A., Guttikar S., Singhal P., Shrivastav P.S., Chromatographic separation of (E)- and (Z)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 2009; **877**: 533-540.
 33. Paim C.S., Martins M.T., Malesuik M.D., Steppe M., LC Determination of Entacapone in Tablets: In Vitro Dissolution Studies. *Journal of Chromatographic Sciences*, 2010; **48**: 755-759.
 34. Kafil J.B., Dhinga B.S., Stability-indicating method for the determination of Levodopa, levodopa-carbidopa and related impurities. *Journal of Chromatography A*, 1994; **667**: 175-181.
 35. Issa Y.M., Hassoun M.E.M., Zayed A.G., Application of High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Levodopa, Carbidopa, and Entacapone in Tablet Dosage Forms. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2011; **34** (19): 2433-2447.
 36. Tekale P., Tekale S., Mhatre V.S., Determination of Impurities in Formulated Form of Entacapone by using RP-HPLC Method. *Der Pharma Chemica*, 2011; **3**(5): 63-68.
 37. Rihbany L.A., Delaney M.F., Determination of Impurities in Levodopa and Carbidopa by High-Performance Liquid Chromatography with Electro-Chemical Detection. *Journal of Chromatography*, 1982; **248**: 125-133.

38. Soukhova N., Kassymbek Z., Bradby S., Martin-Esker A., White P., Wahab S., Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; **54**: 860-865.
39. Ravindra Reddy Y., Shalini S., Method development and validation of levodopa and carbidopa in a combined dosage form by RP-HPLC method. *International Journal of Pharmacy & Technology*, 2011; **3**: 2943-2960.
40. Paim C.S., Gonçalves H.M.L., Miron D., Sippel J., Steppe M., Stability-Indication LC Determination of Entacapone in Tablets. *Chromatographia*, 2007; **65**: 595-599.
41. Shetty S.K., Surendranath K.V., Radhakrishnanand P., Satish J. Jogul J., Tripathi U.M., Stress Degradation Behavior of Entacapone and Development of LC Stability-Indicating Related Substances and Assay Method. *Chromatographia*, 2009; **69**: 1189-1199.
42. Gelber L.R., Neumeyer J.L., Determination of the Enantiomeric Purity of Levodopa, Methyldopa, Carbidopa, and Tryptophan by Use of Chiral Mobile Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 1983; **257**: 317-326.
43. Saxer C., Niina M., Nakashima A., Nagae Y., Masuda N., Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 2004; **802**: 299-305.
44. Rama Krishna V., Bala Murali Krishna K., Hari Babu B., Development and validation of liquid chromatographic method for the simultaneous estimation of levodopa, carbidopa and entacapone in the combined dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, 2014; **8**(3): 281-288.
45. Suresh Kumar S., Natraj K., Khan A., Kalyan Kumar B., Rao J.V., Development and validation of RP-HPLC Method for simultaneous estimation of levodopa, carbidopa in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmacy Research*, 2011; **4**(11): 4060-4062.
46. Madhavi S., Sultana A., Teja U.C., Nalluri B.N., Development and validation of RP-HPLC-PDA method for the simultaneous estimation of levodopa, carbidopa and entacapone in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2014; **4**(11): 5235-5241.

47. Zaveri M., Dhru B., Khandar A., Simultaneous estimation of levodopa, carbidopa and entacapone in pharmaceutical dosage by validated reverse phase high performance liquid chromatography. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 2012; **2**(1): 10-19.
48. Mantena B.P.V., Rao S.V., Appa Rao K.M., Ramakrishna K., Reddy R.S., Rapid separation technique for the determination of potential impurities present in levodopa, carbidopa, and entacapone in fixed dose combination drug product using trifunctionally bonded phase ethylene bridged sorbent column with smaller ion-pair reagent. *Journal of Liquid chromatography & Related Technologies*, 2015; **38**: 1073-1087.
49. Vemic A., Stojanovic B.J., Stamenkovic I., Malenovic A., Chaotropic agent in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013; **77**: 9-15.
50. Ramakrishna N.V.S., Vishwottam K.N., Wishu S., Koteshwara M., Chidambara J., High-performance liquid chromatography method for the quantification of entacapone in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2005; **823**: 189-194.
51. Sagar K.A., Smyth M.R., Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; **22**: 613-624.
52. Ribeiro R.P., Gasparetto J.C., Vilhena R.O., Guimaraes de Francisco T.M., Martins C.A.F., Cardoso M.A., Pontarolo R., Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC-MS/MS method. *Bioanalysis*, 2015; **7**(2): 207-220.
53. Cesar I.C., Byrro R.M.D., Cardoso F.F.S.S., Mundim I.M., Teixeira L.S., Gomes S.A., Bonfim R.R., Pianetti G.A., Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma. *Journal of Mass Spectrometry*, 2011; **46**: 943-948.
54. Vilhena R.O., Pontes F.L.D., Marson B.M., Ribeiro R.P., Carvalho K.A.T., Cardoso M.A., Pontarolo R., A new HILIC-MS/MS method for the

- simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2014; **967**: 41-49.
55. Martins H.F., Nascimento D.P.P.V.A., Marques M.A., Amendoeira F.C., Determination of levodopa in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS): application to a bioequivalence study. *Quimica Nova*, 2013; **36**: 171-176.
56. Paim C.S., Palma E.C., Malesuik M.D., Steppe M., LC/MS/MS Study for identification of entacapone degradation product obtained by photodegradation kinetics. *Journal of AOAC International*, 2010; **93**: 1856-1861.
57. Pan L., Guo Y., Li Z., Chen J., Jiang T., Yu Y., Simultaneous determination of levodopa, benserazide and 3-O-methyldopa in human serum by LC-MS/MS. *Chromatographia*, 2010; **72**: 627-633.
58. Cesar I.C., Byrro R.M.D., Cardoso F.F.S.S., Mundim I.M., Teixeira L.S., Silva E.P., Gomes S.A., Bonfim R.R., Pianetti G.A., Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC-ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; **56**: 1094-1100.
59. ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 Kasım. Erişim 10.02.2016;
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf