



**FARMASÖTİK FORMÜLASYONLARDAKİ  
TASİMELTEON'UN TASARIM  
BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA  
DAYANARAK HPLC İLE ANALİZİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Elif Özge ERKAN**

**Eskişehir 2024**

## ÖZET

### FARMASÖTİK FORMÜLASYONLARDAKİ TASİMELTEON'UN TASARIM BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA DAYANARAK HPLC İLE ANALİZİ

Elif Özge ERKAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mart 2024

Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Saniye Özcan

Günümüzde Farmasötik düzenleyici kurumlar ve uzmanlarının görüşleri farmasötik kalite kontrol sisteminde sistematik yaklaşımların uygulanmasına giderek daha fazla ihtiyaç duymakta olduğudur. Kalite kontrol yöntemleri, ilaç üretiminin kalitesini güvence altına almak için kontrol stratejisinde önemli bir rol oynar. Özellikle artan kalite kontrol yöntem ihtiyacı, analiz yükü ve bazı etken maddelerin yapısı gereği uzun analiz süresine ihtiyaç sürecin daha verimli olmasını zorunlu kılmaktadır. Burada analizcinin en büyük destekçisinin istatistikî yöntemler olduğu yadsınmaz. Bu tekniklerin daha fazla uygulanabilmesi için sistematik hale gelmesi ve analizci bilgisinin desteklenmesi önemlidir.

Söz konusu çalışmada, Tasimelteon (TSM) farmasötik preparatlarda analizi için basit, hassas, yeşil ve sağlam bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin geliştirilmiştir. Kemometrik faktör tarama çalışması, yöntem performansının daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi için Box-Behnken tasarımı kullanılarak optimize edilen kritik yöntem parametrelerinin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Kromatografik ayırma, mobil faz olarak metanol: fosfat tamponu (0,030 M, pH 2,5):(51:49, *h/h*) kullanılarak Supelco Ascentis® Express C<sub>8</sub> (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) 1,2 mL/dk'da gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusallığı, 10,0 ile 75,0 µg/mL konsantrasyonları için gözlenmiştir. ( $R^2=0,999$ ,  $p<0,05$ ). Yöntemde doğrusallık çalışmaları için pik normalizasyon tekniği uygulanmıştır. Bunun için en uygun iç standart agomelatin olarak seçilmiş olup derişimi ise 33,0 µg/mL olarak uygun bulunmuştur. Doğruluk değerlendirmesi %95,9-100 aralığında elde edilmiştir. Ayrıca, çeşitli analitik yeşillik değerlendirme metrikleri kullanılarak yöntemin yeşilliği ortaya konulmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** HPLC, Box-Bhenken, Tasimelteon, yeşil kimya.

**FARMASÖTİK FORMÜLASYONLARDAKİ TASİMELTEON'UN  
TASARIM BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA DAYANARAK HPLC İLE  
ANALİZİ**

**Elif Özge ERKAN**

**YÜSEK LİSANS TEZİ**  
**Analitik Kimya Anabilim Dalı**  
**Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Saniye Özcan**

**Eskişehir**  
**Anadolu Üniversitesi**  
**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**  
**Mart 2024**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen TYL-2023-2315 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif Özge ERKAN'ın "Tasimeltonun tasarım bazlı kalite yaklaşımına dayanılarak farmasötik formülasyonlarının HPLC ile analizi" başlıklı tezi 14.03.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) : Dr.Öğr.Üy. Saniye ÖZCAN	.....
Üye : Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN	.....
Üye : Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU	.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Enstitü Müdürü

## ABSTRACT

### QUALITY BY DESIGN APPROACH FOR THE ANALYSIS OF TASIMELTEON IN PHARMACEUTIC PRODUCTS WITH HPLC

Elif Özge ERKAN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, March 2024

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Saniye Özcan

Today, the views of pharmaceutical regulatory and experts are that there is an increasing need for the systematic approaches in the pharmaceutical quality control system. Quality control methods play an important role in the control strategy to ensure the quality of pharmaceutical production. In particular, the increasing need for quality control methods, analysis load, and the need for long analysis times due to the nature of some active substances necessitate that the process be more efficient. It is undeniable that statistical methods are the biggest supporters of the analyst here. For the applied more, it is important that they become systematic and support analyst knowledge.

In this study, a simple, sensitive, green, and robust high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the analysis of Tasimelteon (TSM) in pharmaceutical preparations. The chemometric factor screening study helped identify critical method parameters that were optimized using the Box-Behnken design for better understanding and improvement of method performance. Chromatographic separation, Supelco Ascentis® Express C8 (100×4.6 mm, ID, 2.7µm) using methanol:phosphate buffer (0.030 M, pH 2.5):(51:49, v/v) as mobile phase and it was performed at 1.2 mL/min flow rate. Linearity of the method was observed for concentrations of 10.0 to 75.0 µg/mL ( $R^2 = 0.999$ ,  $p < 0.05$ ). The peak normalization technique was applied for linearity studies. For this purpose, the most appropriate internal standard was chosen as agomelatine, and its concentration was found to be 33.0 µg/mL. Accuracy evaluation was achieved in the range of 95.9–100%. Additionally, the greenness of the method was demonstrated using various analytical greenness evaluation metrics.

**Keywords:** HPLC, Box-Behnken, Tasimelteon, green chemistry.

## TEŞEKKÜR

Mart, 2024

Hazırlamıő olduğum bu yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, btn sorularımı cevaplandırarak, kaygılı zor zamanlarımda bana yol gösterip yardımlarını esirgemeyen, aynı laboratuvarında ve birlikte çalıőmıő olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyacağım, sabrına ve kendisine hayran olduğum danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN'a

Laboratuvarında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaőan, yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e

Bu süreçte tanıőmıő olmaktan mutluluk duyduğum, benden tecrübe ve yardımlarını hiç esirgemeyen, zor zamanlarda destek alabildiğim Uzm. Kimyager Abeer ELRİŐ ve Arő. Gör. Hazal AVCI'ya

Yüksek lisans sürecim boyunca, kendi çalışma alanlarına hiç benzememesine rağmen anlattığım her Őeyi sabırla dinleyip, yol göstermeye ve yanımda olmaya çalıőan canım aileme; annem, babam ve ablama

En içten sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

20/03/2024

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	4
2.1. Taimelteonun Gelişimi.....	4
2.2. Tasimelteonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	4
2.3. Tasimelteonun Etki Mekanizması .....	4
2.4. Tasimelteonun Farmakokinetik Özellikleri.....	5
2.5. Tasimelteon Analizleri ile İlgili Çalışmalar .....	5
2.6. Yeşil Analitik Kimya.....	9
2.7. Yeşil Analitik Kimya Yöntemleri .....	9
2.7.1. Analitik yöntem hacim yoğunluğu (AMVI).....	10
2.7.2. Yönetim stratejileri için kimyasal tehlike değerlendirme (CHEMS-1) .....	10
2.7.3. Yüksek performans sıvı kromatografisi- çevresel değerlendirme araçları.....	10
2.7.4. Yaşam döngüsü değerlendirmesi (LCA).....	10
2.7.5. PROMETHEE, Zenginleştirme değerlendirmeleri için tercih sıralaması organizasyon yöntemi .....	10
2.7.6. Yeşil sertifikayla değiştirilmiş eko-ölçek.....	11

2.7.7. HEXAGON.....	11
2.7.8. TOPSIS, İdeal çözüme benzerliğe göre tercih sırası tekniği.....	11
2.7.9. RGB.....	11
2.7.10. NEMI: Ulusal çevre yöntemi endeksi.....	12
2.7.11. Analitik eko- ölçek .....	12
2.7.12. GAPI: Yeşil analitik prosedür endeksi .....	14
2.7.13. Analitik Yeşillik Hesaplayıcı (AGREE) .....	16
2.7.14. Analitik Yöntem Yeşillik Skoru (AMGS) .....	16
2.7.15. Örümcek Diyagramı ile Yeşillik İndeksi.....	16
2.8. Deneysel Tasarımı (DOE).....	16
2.8.1. Deneysel Tasarımın Seçimi .....	17
2.8.2. Tarama tasarımları.....	18
2.8.2.1. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^k$ ).....	18
2.8.2.2. Kesirli faktöriyel tasarımlar ( $2^{k-p}$ ) .....	18
2.8.2.3. Plackett-Burman Tasarımları .....	19
2.8.3. Optimizasyon tasarımları.....	19
2.8.3.1. Üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlar .....	19
2.8.3.2. Merkezi kompozit tasarımlar (CCD).....	20
2.8.3.3. Box-Behnken tasarımları (BBD) .....	20
3. GEREÇLER.....	21
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler .....	21
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
3.3. Kullanılan Sabit Fazlar .....	21
4. YÖNTEMLER .....	22
4.1. Deneysel Parametreler .....	22
4.1.1. Enstrümental parametreler .....	22
4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı .....	22

4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı .....	22
4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı .....	23
4.1.5. Sonuçların değerlendirilmesi .....	23
4.2. İstatiksel Analiz .....	23
4.3. Yöntem geçerliliğinin tespiti .....	24
4.3.1. Sistem uygunluk testleri .....	24
4.3.2. Seçicilik ve spesifiklik .....	26
4.3.3. Kararlılık .....	26
4.3.4. Doğrusallık.....	26
4.3.5. Doğruluk .....	26
4.3.6. Kesinlik .....	26
4.3.7. Teşhis ve tayin alt sınırı.....	27
4.3.8. Sağlamlık.....	27
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
5.1. TSM'nin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi.....	29
5.2. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme .....	30
5.2.1. BBD ile metot optimizasyonu.....	31
5.3. Yöntem Geçerliliğinin Tayini.....	36
5.4. Geliştirilen Yöntemin Yeşillik Değerlendirilmesi .....	40
5.5. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması.....	42
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKÇA.....	46
ÖZGEÇMİŞ .....	50

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> Tasimelton analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> Atık miktarı ve atıkların arıtım durumuna göre puanlandırma .....	13
<b>Tablo 2.3.</b> Deneysel tasarımları (Fukuda vd., 2018) .....	17
<b>Tablo 4.1.</b> Hetlioz <sup>®</sup> formülasyonu (Özcan vd., 2020) .....	22
<b>Tablo 4.2.</b> Bağımsız değişkenler ve faktör seviyeleri.....	24
<b>Tablo 4.3.</b> SUT parametrelerinin sınırları.....	25
<b>Tablo 4.4.</b> USP'ye SUT parametrelerinin formülleri .....	25
<b>Tablo 5.1.</b> Bağımsız değişkenler ve yanıtları .....	31
<b>Tablo 5.2.</b> Oluşturulan modelin denklemleri .....	32
<b>Tablo 5.3.</b> TSM analizi için elde edilen SUT verileri.....	35
<b>Tablo 5.4.</b> TSM için doğrusallık ve kesinlik verileri.....	37
<b>Tablo 5.5.</b> Geri kazanım verileri ( $n = 3$ ) .....	38
<b>Tablo 5.6.</b> Ara kesinlik verileri ( $n = 3$ ) .....	39
<b>Tablo 5.7.</b> Metot sağlamlık çalışmaları ( $n = 3$ ).....	39
<b>Tablo 5.8.</b> TSM standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları ( $n=6$ ).....	40
<b>Tablo 5.7.</b> Yöntemin analitik eko ölçeği .....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Tasimeltheonun molekül yapısı.....	4
Şekil 2.2. GAPI pentagramı (Sajid and Plotka-Wasyłka, 2022) .....	14
Şekil 2.3. Üç İçin Yarı Kesirli İki Düzeyli Faktöriyel Tasarım ( $2^{3-1}$ ) Matrisinin (A), Tamamlayıcı Matrisinin (B) Ve İki Düzeyli Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^3$ ) Matrisinin (C) Gösterimi Girdi Faktörleri. (Fukuda vd., 2018).....	19
Şekil 5.1. TSM'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=100 µg/mL) .....	29
Şekil 5.2. AGO'nun UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=100 µg/mL) .....	30
Şekil 5.3. Oluşturulan modelin standart hatası .....	32
Şekil 5.4. BBD modeli aracılığıyla ikinci dereceden 3 boyutlu yanıt yüzeyi grafikleri: (AB) metanol fraksiyonu (%) ve akış hızı (mL/min), (AC): metanol fraksiyonu (%) ve kolon sıcaklığı ( $C^0$ ), (BC): akış hızı (mL/min) ve kolon sıcaklığı ( $C^0$ ), 100 µg/mL TSM için .....	34
Şekil 5.5. Optimum koşullar altında %100'lük standart çözeltiye ait kromatogram .....	35
Şekil 5.6. Önerilen HPLC yöntemi için AGREE uygulama piktogramı .....	41
Şekil 5.7. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun GAPI piktogramı.....	42
Şekil 5.8. Hetlioz <sup>®</sup> psödo formülasyon (a) ve kör çözeltilerinin (b) kromatogramları ..	43

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	: Seçicilik Katsayısı
$A_S$	: Asimetri faktörü
AGO	: Agomelatin
AGREE	: Analitik Yeşillik Hesaplama Metriği
AMVI	: Analitik Yöntem Hacim Yoğunluğu
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
BBD	: Box-Bhenken Tasarımı
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CHEMS-1	: Yönetim Stratejileri için Kimyasal Tehlike Değerlendirmesi
$C_8$	: Oktildimetilsilan
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GAPI	: Yeşil Analitik Prosedür Endeksi
HETP	: Teorik Tabaka Yüksekliği
HPLC	: Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi
ICH	: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Uluslararası Uyum Komitesi)
$k'$	: Kapasite faktörü
QbD	: Tasarımla kalite
LCA	: Yaşam Döngüsü Değerlendirmesi
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme Modu
MS	: Kütle Spektrometresi
$N$	: Teorik Plaka Sayısı
NEMI	: Ulusal Çevre Yöntemleri Endeksi
PROMETHEE	: Zenginleştirme değerlendirmeleri için tercih sıralaması organizasyon yöntemi
$R_s$	: Ayrım Gücü
$S_1$	: Ara Kesinlik Varyansı
$S_r$	: Tekrarlanabilirlik Varyansı

SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
<i>T</i>	: Kuyruklanma Faktörü
TSM	: Tasimelton
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan
USP	: United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memelilerde hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde düzenlenen sirkadiyen ritim, epifiz bezi tarafından salgılanan melatonin ile uyku-uyanıklık döngüsünün yönetilmesi sonucu oluşur. Sirkadiyen ritim bozukluğu uyku- uyanıklık döngüsünün 24 saat olmadığı durumlar olarak tanımlanır. Sirkadiyen ritim oluşumu ışık etkisi ile yönlendirilir. Melatonin salgısı gün ışığı azaldığında ortaya çıkmaya başlar ve gün ışığı maruziyetinde azalır. Bu sebeple melatoninin kandaki seviyeleri gündüzleri düşükken, geceleri artar. Bu sebeple ışıkla senkronizasyon eksikliğinin beraberinde uyku bozuklukları meydana getirdiği durumlar en fazla tamamen kör olan bireylerde yaygındır. Bununla birlikte, vardiyalı çalışma, jetlag gibi yaşam tarzına bağlı değişkenler sebebi ile sirkadiyen ritim bozulması meydana gelebilmektedir (Dhillon and Clarke, 2014). Uyku düzeni bozukluğunun getirileri olan uykusuzluk, aşırı uykululuk gibi durumların çeşitli mental ve fiziksel fonksiyonel kayıplara sebep olduğu bilinmekle birlikte kronik yorgunluk, duygudurum bozuklukları ve gastrointestinal sorunlar da eşlik edebilir (Lankford, 2011). Bu sorunların Hipertansiyon ve kardiyovasküler gibi hastalıkları tetiklediği görülmüştür (Drake vd., 2004, Richardson vd., 1985). Bu hastalıkların yanı sıra günlük yaşamda sosyal ve fiziksel aktivitelerden uzaklaşma sonucunda psikososyal işlevselliğin bozulduğu kanıtlanmıştır. Aynı şekilde nöbet sistemiyle çalışmanın, düşük yaşam kalitesi açısından olası bir risk oluşturduğu ve psikiyatrik bozuklukları tetiklediği görülmüştür.

FDA tarafından ilk kabul edilen ve melatonin agonisti olarak bilinen Tasimelteonun (TSM) uyku döngüsünün 24 saat olmadığı durumlarda sirkadiyen ritim bozuklukları tedavisinde Hetlizo<sup>®</sup> markası ile satılan bir ilaç olarak kullanılmaktadır. TSM, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Ocak 2014'te onaylanmış, uyku bozukluğu endikasyonuna sahip tek ilaçtır. Günümüzde halen tek ilaç olması literatürde bu etken madde hakkında sınırlı çalışmaların mevcut olduğunu göstermektedir. Tasarım bazlı kalite yaklaşımlarında bile, formülasyon analizlerinde elde edilen sonuç kalitesi daha kolay ve hızlı bir şekilde desteklenmesine rağmen bu etken madde hakkında yeterli veri henüz elde edilmemiştir (Dhillon and Clarke, 2014).

Tasarım bazlı kalite yaklaşımı, kalitenin farmasötik ya da analitik geliştirme sırasında yönteme eklenmesini içermekle birlikte farmasötik sürecin tasarlanma şekliyle de ilgilidir. HPLC Günümüz rutin analizlerde verimlilik bakımından en çok kullanılan bir

cihazdır. Bu cihazla oluşturulacak yöntemin tasarım bazlı kalite yaklaşımı ile ilişkisi, analiz sürecinin başından sonuna kadar kalite odaklı bir şekilde tasarlanmasını ve optimize edilmesini hedeflemektedir. HPLC yöntemi, analiz edilecek bileşiğin belirlenmesi, mobil fazın seçimi, istenilen ayırışmayı sağlamak için sabit fazın optimizasyonu gibi parametreleri içermektedir. Tasarım bazlı kalite yaklaşımıyla bu parametrelerin seçimi ve optimizasyonu belirlenen hedefe ulaşmak için sistemli bir şekilde yapılacaktır. Bu çalışma ile TSM'un formülasyon analizlerinde zaman ve kaynak israfını da önleyen, kalite odaklı formülasyon analizi yöntemini literatüre kazandırmak amaçlanmıştır. HPLC ile yaygın olarak formülasyon analizleri gerçekleştirilmesine rağmen, TSM etken maddesi için tasarım bazlı kalite üzerine formülasyon çalışmaları literatürde bulunmamaktadır. Bu açıdan ele alındığında çalışma başlı başına özgün bir değer arz etmektedir.

Tasarım bazlı kalite; deney tasarımı ve optimizasyon olarak ikiye ayrılmaktadır. HPLC ile TSM'un formülasyon analizi yapılacak ve cihaz koşullarının uygunluğu kontrol edilecektir. Cihaz koşullarının uygun verileri optimizasyon için bilgisayar programına eklenecek ve kontrol deneyleri gerçekleştirilecektir. Elde edilen veriler ve bu bilgilerin literatüre sunulması ile gelecek çalışmalar, projeler ve deneysel basamaklarda kullanılabilir bir kazanım elde edilmesinin yanı sıra, bu süreçlerde gerek kaynak gerek zaman tasarrufu sağlanacaktır.

Bu çalışma kapsamında geliştirecek yöntemlerde The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH (Q2) R2 (Guideline, 2005a) tarafından ön görülen testler geçerli kılınacaktır. Geçerlilik çalışmalarında ise ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde kesinlik, doğruluk, doğrusalık, spesifiklik, seçicilik, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri yapılacak; tasarım bazlı kalite yaklaşımı ile TSM formülasyonlarının HPLC ile analizi gerçekleştirilecektir.

Hedeflenen projede, 24 saat olmayan uyku uyanıklık sirkadiyen uyku ritim bozukluklarında kullanılan, alanında tek olsa dahi sınırlı bilgi sahibi olunan TSM etken maddesi kullanılacaktır. Günümüzde en çok kullanılan HPLC ile formülasyon analizleri gerçekleştirilen TSM maddesi, kalite bazlı tasarım yönteminin gerekliliğini yerine getirecek şekilde deney tasarımı ve optimizasyonu olarak iki ana başlık altında incelenecektir. Burada elde edilen deney tasarımı ve optimizasyon verileri, TSM etken

maddesinin HPLC ile formülasyon analizlerinde gerçekleştirilecek analiz sayısını, haliyle analiz süresini en kaliteli sonuçların elde edileceği haline getirecektir.

Bu projenin gerçekleştirilmesi sonucunda elde edilecek yaygın etki daha çok bilimsel süreçlerde sağlayacağı katkılarla öne çıkmaktadır. Bahsi geçen etken maddenin farklı durumlar için literatür çalışmaları mevcut olsa da formülasyon analizinde tasarım bazlı kalite göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalar literatürde mevcut değildir. Elde edilecek bulgular, benzer bir çalışma bulunmaması sebebiyle yapılacak çalışmalara yön gösterecek niteliktedir. Bu yön gösteriş başta ülkemiz olmak üzere toplumsal refaha ve bilimsel birikime katkı sağlayacaktır.

DeneySEL uygulamalar dâhilinde olan HPLC uygulamaları analitik kimya araştırma laboratuvarlarında yürütülen klasik uygulama basamakları ile gerçekleştirilecek ve TSM etken maddesi analizi yapılacaktır. Bu analiz sürecinde, sıcaklık, akış hızı vb. uygun koşullar belirlenecektir. Uygun koşul ve değerler kalite bazlı tasarım çalışmaları gereği bilgisayar ortamında optimizasyon koşulları belirlenecektir. Bu değerler Box-Behnken tasarımı ile elde edilecek ve HPLC cihazı ile yeniden kontrol analizleri gerçekleştirilecektir. Kontrol analizleri ICH kılavuzlarına göre gerçekleştirilecek ve deneySEL sürecin literatür için uygunluğu test edilecektir.

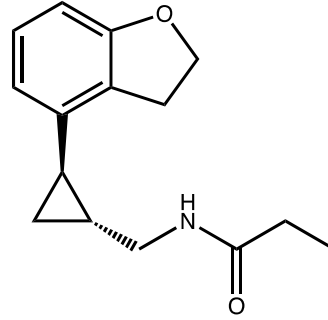
## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Taimelteonun Gelişimi

Mayıs 2013'te FDA'ya sunulan TSM başvurusu Temmuz 2013'te FDA tarafından kabul edilmiş ve incelenme hakkı kazanmıştır. Kasım 2013'te inceleme onaylanmış ve sırası ile Ocak 2010 ve Mart 2011'de 24 saat olmayan sirkadiyen uyku uyanıklık bozukluğu tedavisi için FDA ve Avrupa Komisyonu tarafından yetim ilaç tanımı verilmiştir. 2014 yılında is Hetlioz® markası altında piyasaya sürülmüştür (Dhillon and Clarke, 2014).

### 2.2. Tasimelteonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

TSM (Şekil 2.1), IUPAC adlandırması (1R-trans)-N-[[2-(2,3-Dihidro-4-benzofuranil) siklopropil] metil] propanamid olan melatonin reseptörü agonistidir. CAS numarası 609799-22-6 olup molekül formülü de C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> şeklinde olan tasimelteonun molekül ağırlığı 245,32 g/mol'dür. TSM, oda koşullarında beyaz veya beyazımsı kristal bir toz halde bulunur. Suda çözünürlüğü 1,1 mg/mL ve kaynama noktası 442,553 °C'dir (Reyes vd., 1923).



Şekil 2.1. Tasimelteonun molekül yapısı

### 2.3. Tasimelteonun Etki Mekanizması

TSM MT1 alt tipiyle karşılaştırıldığında MT2'ye daha fazla afinitesi olan bir melatonin reseptör agonistidir. Muhtemelen tasimelteon, bu melatonin reseptör alt tiplerindeki etki yoluyla sirkadiyen sistemi senkronize etmeye ve sonuç olarak gece uykusunu ve gündüz uyanıklığını iyileştirmeye yardımcı olur (Neubauer vd., 2015).

## 2.4. Tasimelteonun Farmakokinetik Özellikleri

TSM, sirkadiyen ritimlerin kontrolünde rol oynadığına inanılan melatoninin MT1 ve MT2 reseptörlerinin bir agonistidir. Karşılaştırıldığında, tasimelteon'un MT2 afinitesi MT1 reseptörüne göre daha fazladır. Melatonin reseptör alt tiplerindeki etki yoluyla sirkadiyen sistemi senkronize ettiği ve gündüz uyanıklık gece uyku döngüsünü iyileştirmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir.(Dhillon and Clarke, 2014)

## 2.5. Tasimelteon Analizleri ile İlgili Çalışmalar

Özellikle sirkadiyen ritm düzensizliklerine bağlı uykusuzluk yakınmalarında olmak üzere genel uykusuzluk BDZ'lerin aksine bilişsel ve psikomotor bozukluğa yol açmadıkları ve daha iyi tolere edilebildiği için kullanım oldukça popülerdir.

Literatüre sunulmuş başlıca metotların genel kapsamları ve numune uygulamaları Tablo2.1'de verilmiştir. Tabloya bakıldığında TSM analizi için geliştirilen metotlar amaçlarına göre; TMS hakkında yapılan çeşitli klinik çalışmaların analizleri (Liu vd., 2018, Torres vd., 2015, Yadlapalli vd., 2019) ve metot geçerliliği sağlanmış analitik metot geliştirilmesi (Naik vd., 2018, Özcan vd., 2020) olarak 2 gruba ayrılabilir.

Klinik çalışmaların analitik metotlarına yakından bakıldığında detaylı bilgi verilmediği ayrıca metot koşullarının detaylı incelenmediği görülmektedir. UV spektroskopisi ile geliştirilmiş yöntemin basit olmakla beraber literatüre bir katma değeri olmadığı görünmektedir. Temeli TSM analizi olan analitik metot geçerliliği sağlanmış yöntemlere bakıldığında ise baskın tekniğin LC-MS/MS olduğu dikkat çekmektedir. Bu çalışmalarda analiz yönteminin genel olarak tüm parametreleri verilmiş olup yöntem etki eden faktörler açıklanmıştır. Geliştirilen metotlarda LC-MS/MS için en çok kullanılan sabit faz silika bazlı tanecikli yapıda C18 fonksiyonel gruba sahip kolonlardır. Kullanılan kolonların büyük bir kısmı yeni teknoloji ile üretilmiş kısa, dar iç çapa sahip ve küçük tanecikli yapıda kolonlardır. Kromatografik ayırmda kullanılan hareketli faz bileşenleri ise genellikle izokratik elüsyon modunda seçilmiştir. Analiz tekniklerinin büyük bir kısmı kütle dedektöründe olduğu için formik asit, amonyum asetat ve amonyum format gibi bir iyonlaştırma ajanı kullanımı gerektirmektedir. Hareketli fazların pH seçiminde bir kriter saptanmamıştır. LC-MS/MS yöntemlerin iki tanesi hariç (Torres vd., 2015,

Yadlapalli vd., 2019) diğerlerinde iç standart kullanılmamıştır. İç standart kullanılan yöntemlerden bir tanesinde (Torres vd., 2015) kullanılan IS hakkında ayrıntılı bilgi verilmemiştir.



**Tablo 2.1.** *Tasimelton analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler*

Analitik yöntem	İç standart	Kolon - Kolon sıcaklığı	Hareketli faz Akış hızı	tR (dk)	Enjeksiyon hacmi Dedektör, Dalga boyu	Mod m/z	Doğrusal aralık	LOD	LOQ	Numune	Kaynak
LC-MS/MS	Tasimelton- d5	Agilent Zorbax, Eclipse, C18 (4.6 × 50 mm, 5 µm) column 40°C	İzokratik elüsyon Asetonitril, %0.02 formik asit içeren su (85:15, v/v) 0.5 mL/dk	0.60	10 µL	MRM m/z 246.3 173.3	0.30– 299.00 ng/mL	VE*	0.300 ng/mL	İnsan Plazması	(Yadlapalli vd., 2019)
ÜÇÜNCÜ TÜREV UV SPEKTROMETRİK YÖNTEM	-	-	-	-	225.0 nm	-	4-20 µg/mL	VE*	4- µg/mL	API	(Naik vd., 2018)
HPLC-UV	-	Agilent, C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm) column	İzokratik elüsyon Asetonitril, Su (55:45, v/v) 1 mL/dk	6	220 nm		VE*		VE*	Sıçan plazması	(Liu vd., 2018)
LC-MS/MS	-	VE*	VE*	VE*	VE*	MRM ESI+	0.30–300 ng/mL	VE*	VE*	İnsan plazması	(Torres vd., 2015)

**Tablo 2.1.** *Tasimelteon analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler (devam)*

Analitik yöntem	İç standart	Kolon sıcaklığı	Hareketli faz Akış hızı	tR (dk)	Enjeksiyon hacmi Dedektör, Dalga boyu	Mod m/z	Doğrusal aralık	LOD	LOQ	Numune	Kaynak
LC MS/MS	-	Chromolith™ High-Resolution RP-18e, (100 × 4.6 mm) 35.5 ± 0.1 °C	% 0.1 (v/v) formik asit içeren su:%0.1(v/v) formik asit içeren asetonitril (60:40 (v/v/)) Ph 2.5) 0.5 mL /dk	6	-	MRM-ESI+ m/z 100-800	11.5 ng/mL 458.0 ng/mL	207 pg/mL	1.15 ng/mL	Market formülasyonu	(Özcan vd., 2020)
LC-DAD	-	Ascentis Express C18 (100 × 4.6 mm, 2.7 µm ) column 40.0 ± 0.1 °C	İzokratik elüsyon Asetonitril:Asetat tamponu (0.025 M, pH4.53):Su(40:10:50, v/v/v) 0.8 mL /dk	3.5	5 µL DAD 281 nm	-	2.04 g/mL 81.6 g/mL	02 ng/mL	153 ng/mL		

## 2.6. Yeşil Analitik Kimya

Yeşil analitik kimya, zehirli kimyasalların azaltılması, süreçlerde enerji tasarrufu gerçekleştirilmesi ve minimum düzeyde atık oluşturmayı hedefler. Bu hedeflere giden süreçte ise yeşil kimyanın 12 ilkesi önemli bir rehber niteliği taşır.(Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022)

Yeşil analitik kimyanın 12 ilkesi;

1. Atık önleme
2. Atom ekonomisi
3. Daha az tehlikeli kimyasal sentez
4. Daha güvenli kimyasal tasarlamak
5. Daha güvenli çözücüler ve yardımcı maddeler
6. Enerji verimliliği için tasarım
7. Yenilenebilir hammaddeler ile daha yeşil sentezler
8. Yan ürünlerin (türevlerin) azaltılması
9. Kataliz
10. Bozulmanın tasarımı
11. Gerçek zamanlı kirlilik önleme
12. Kazaların önlenmesi için daha güvenli bir kimya(Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022, Sogut and Çelebi, 2020)

Zaman içerisinde analitik prosedürlerin yeşilliğinin değerlendirilmesi için çeşitli ölçümler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları belirli türdeki analitik prosedürler için tasarlanmışken, diğerleri geneldir ve analitik prosedürlerin çoğunluğuna uygulanabilir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

## 2.7. Yeşil Analitik Kimya Yöntemleri

Son zamanlarda literatürde yapılan bir araştırma, analitik metodolojileri yeşillendirmeye giden yolun, analitik yaklaşımı tamamen yeniden düşünen kuantum sıçramalarının yanı sıra yerleşik yöntemlerde artan iyileştirmeler içerdiğini göstermektedir. Kullanılan stratejiler arasında reaktiflerin ve solventlerin değiştirilmesi veya değiştirilmesi, otomasyon ve ileri akış teknikleri yoluyla kullanılan kimyasalların azaltılması, minyatürleştirme ve hatta analitlerin yerinde, çevrimiçi veya sahada ölçülmesiyle numune almanın ortadan kaldırılması yer alır.

### **2.7.1. Analitik yöntem hacim yoğunluğu (AMVI)**

Analitik yöntem hacim yoğunluğu, sıvı kromatografik yöntemlerin değerlendirilmesi amacıyla uygulanır. Bu uygulamada kullanılan çözücü ve deneyin sonucunda meydana gelen atıkların toplam hacminin belirli bir prosedürle belirlenmesi bu yöntemin gerçekleştirilmesine olanak tanır (Imam and Abdelrahman, 2023).

### **2.7.2. Yönetim stratejileri için kimyasal tehlike değerlendirmesi (CHEMS-1)**

Uygulanan deney içerisinde prosedür dahilinde kullanılan kimyasalların toksik etkilerini ve bu kimyasallara maruz kalma durumunda oluşabilecek toksisite etkilerini değerlendirmek amacıyla kimyasal salınım verilerinin sistemsal bir düzeneğe oturtulmasını amaçlayan stratejik bir değerlendirme yöntemidir (Swanson vd., 1997).

### **2.7.3. Yüksek performans sıvı kromatografisi- çevresel değerlendirme araçları**

Bu yaklaşım, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerinin, yeşil kimya anlayışına uygunluk profilini çıkarmak adına kullanılan son derece etkili ve bir o kadar da basit bir uygulama yöntemi sunmaktadır. HPLC yöntemlerinde kullanılan organik reaktiflerin güvenlik, sağlık ve çevresel faktörlere yönelik tehlikelerini azaltmayı amaçlar. Çevresel değerlendirme aracı (EAT), kromatografik yöntemler dahilinde bulunan solventlerin tamamı için sağlık, çevre ve güvenlik başlıklarını dikkatle inceler ve kullanılan farklı yöntemlerin yeşil kimya anlayışına uygunluğunu derecelendirerek bir toplam puan hesaplaması yapar. Yapılan hesaplama yöntemlerin yeşil kimya anlayışına uygunluğu açısından karşılaştırılmasına olanak sağlar (Gaber vd., 2011, Shi vd., 2023).

### **2.7.4. Yaşam döngüsü değerlendirmesi (LCA)**

Bu yöntem, yaşam döngüsü değerlendirmesi (LCA), çevresel etki dinamiklerini ölçmek adına ürünlere uygulanan bir yöntemdir (Jacquemin vd., 2012).

### **2.7.5. PROMETHEE, Zenginleştirme değerlendirmeleri için tercih sıralaması organizasyon yöntemi**

Çok ölçülü bir öncelik belirleme yöntemi olarak kullanılan PROMETHEE'nin amacı seçim ve kümeleme gibi sorunlarda karar için destek aracı olarak kullanılmasıdır.

Burada karar için mevcut olan seçeneklerin avantaj/ dezavantaj karşılaştırılması yapılır ve en uygun çözüme ulaşmak hedeflenir (Verme).

#### **2.7.6. Yeşil sertifikayla değiştirilmiş eko-ölçek**

Yeşil parametrelerin nicel yöntemini amaçlayan yeşil sertifika ile değiştirilmiş eko ölçek, süreci tehlikeler, reaktifler, enerji ve atık yönlerinden değerlendirir. Uygulama, numune hazırlama ve analitik ölçüm prosedürlerine uygulanabilirken değerler yarı niceliksel olarak analiz edilir. Bu analiz sonucu reaktiflerin kullanımıyla ilişkili içsel toksisiteyi ve riskleri değerlendirir ve yanlış sınıflandırmaların önlenmesine yardımcı olur. Tehdidin niteliğine ilişkin herhangi bir bilgi verilmeden yalnızca bir sayı verilmesi ve örnekleme için değerlendirme eksikliği bulunması ise dezavantajlarını oluşturur (Shi vd., 2023).

#### **2.7.7. HEXAGON**

Analitik yöntemlerin optimal seçimini ve/veya testini değerlendirmeyi amaçlayan bu metot numune hazırlama ve analitik ölçüm prosedürlerine uygulanabilir ve nitel ve nicel değerlendirilme gerçekleştirilmesine olanak tanır (Shi vd., 2023).

#### **2.7.8. TOPSIS, İdeal çözüme benzerliğe göre tercih sırası tekniği**

Çok kriterli karar analizi çalışılan değerlendirme kriterlerine göre alternatiflerin puanlanması ve sıralanması için kullanılan bir grup araçtır ve TOPSIS, mümkün olan birçok alternatif arasından en iyi alternatifin seçiminde uygulanan çok kriterli karar analizi araçlarından biridir (Al-Hazmi vd., 2016, Nowak vd., 2020).

#### **2.7.9. RGB**

Herhangi bir analitik yöntemi/prosedürü küresel bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan RGB metriğinde test edilen analitik yöntemin 3 önemli özelliğini temsil etmek üzere kırmızı, yeşil ve mavi gibi üç ana renk kullanılmıştır. Kırmızı (R) renk, tipik olarak klasik doğrulama süreçleriyle değerlendirilen analitik yöntemin performansını temsil eder. Yeşil (G) renk, solventler ve atıklarla ilgili tehlikeler, enerji tüketimi ve mesleki riskler gibi güvenlik ve çevre dostu olma anlamına gelir. Mavi (B) renk üretkenliği ve pratik etkinliği temsil eder. Her özelliğin gücü, %0 ile %100 arasında değişen bir renk puanı (CS) ile ortaya çıkarılabilir. Burada metot numune hazırlama ve analitik ölçüm

prosedürlerine uygulanabilir. Analitik performans, çevre için güvenlik, üretkenlik ve pratik etkinlik açılarından değerlendirme sağlarken nitel ve nicel olarak kapsamlı ve şeffaf bir ölçüm sağlama yeteneğine sahiptir. Bu avantajın yanı sıra ek olarak farklı analitik prosedürlerin karşılaştırılmasının kolaylaştırır ve yeni geliştirilen yöntemlerin potansiyel uygulamalarını tahmin edebilir. Buna rağmen Değerlendirme prosedürü zaman alıcı ve karmaşık olabilir. Değerlendirmede kullanılan farklı kriterlerin ağırlıklarını belirlemek için iyi tanımlanmış bir yöntem yoktur (Shi vd., 2023).

#### **2.7.10. NEMI: Ulusal çevre yöntemi endeksi**

Analitik prosedürlerin yeşilliğini ölçmek için kullanılan en eski yöntemlerden biridir ve bu yöntem, dört alana bölünmüş bir daireyi oluşturur. Her bir alan prosedürün farklı bir gereksinimlerini temsil eder ve gereksinimlerin karşılanmasına göre kırmızı veya yeşil renk ile renklendirilir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

İlk alanın yeşil etiketlenmesi için gereksinim, süreçte kullanılacak kimyasalların toksik, biyobirikimli ve kalıcı etkilerinin olmamasıdır. İkinci alan için gereksinim ise kimyasalların hiçbirinin tehlikeli atık D, F, P veya U listelerinde olmamasıdır. Numunenin Ph aralığı 2-12 arasında ise üçüncü alan yeşil olarak işaretlenmektedir. Son olarak dördüncü alan, süreçte oluşacak atık miktarı 50 gramı geçmediğinde yeşil olarak işaretlenir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

NEMI kolay anlaşılabilir olmasının avantajının yanı sıra bilgilerin uzun sürede toplaması ve çok genel olmaları şeklinde iki önemli dezavantaja sahiptir.

#### **2.7.11. Analitik eko-ölçek**

En yaygın yeşil analitik kimya yöntemlerinden biri olan analitik eko-ölçek 100 puandan bazı ceza puanlarının çıkarılması ile ölçülendirilir. Burada 100 puan ideal yeşil analiz olarak tanımlanmıştır. Ceza puanları bu değerden çıkarıldıktan sonra kalan değer 100'e ne kadar yakınsa gerçekleştiren analiz o kadar yeşil olmaktadır. Ceza puanları kullanılacak kimyasal maddelerin miktarlarıyla birlikte niteliklerine, süreçteki enerjinin tüketimine, koşullardaki mesleki tehlikelere, oluşacak atık miktarına ve atıkların işleme yöntemlerine göre değişkenlik gösterir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

Ceza puanlandırılması, çözücüye ve reaktifte ceza puanı ataması ile başlar. Burada kimyasal üzerindeki pitogramlar dikkate alınır. Kimyasal şişeleri üzerindeki her tehlike pitogramı bir ceza puanını oluşturur, pitogram tehlikeli olarak sınıflandırılıyorsa bu sayı

iki ile çarpılırken, pitogram uyarı olarak tanımlanıyorsa sayı bir ile çarpılır. Elde edilen tehlike puanı kimyasal miktarı 10 mL ve ya 10 g'dan az ise bir ile, 10-100 mL(ya da gram) arasında ise iki ile, 100mL (ya da gram)'dan büyük ise üç ile çarpılır (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

Enerji tüketimine ceza puanı ataması yapılırken numune başına enerji tüketimi dikkate alınır (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

- Numune başına enerji tüketimi  $\leq 0,1$  kWh = 0
- Numune başına enerji tüketimi  $\leq 1,5$  kWh = 1
- Numune başına enerji tüketimi  $\leq 1,5$  kWh = 2

Mesleki tehlike ceza puanı ataması yapılırken havaya herhangi bir gaz veya buhar çıkışı durumunda 3 puan atanır. Süreç inzivada ise puan atanmaz.

Atık üretimi ve işlenmesi ceza puanı ataması yapılırken atık miktarı ve atıkların arıtım durumuna göre puanlandırma yapılır (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

**Tablo 2.2.** *Atık miktarı ve atıkların arıtım durumuna göre puanlandırma*

Atık miktarı	Ceza Puanı
<1 mL veya 1 g	1
1–10 mL veya 1–10 g	3
>10 mL veya 10 g	5

Atık Arıtım Yöntemi	Ceza Puanı
Geri Dönüşüm	0
Bozunma	1
Pasivasyon	2
Arıtma Yok	3

Elde edilen tüm puanlar toplanarak 100 değerinden çıkarılarak nihai puan elde edilir. 75 ve üzeri bir puanlandırmaya sahip bir süreç mükemmel yeşil analiz olarak tanımlanır. 50-75 puanlandırma aralığına sahip bir süreç kabul edilebilir yeşil analiz olarak kabul edilirken, 50 puanın altında kalan proses yetersiz yeşil analiz olarak tanımlanır (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

Analitik eko ölçek, 100 üzerinden sayısal değerlendirilmelerle gerçekleştirildiği için nicelik bakımından değerlendirme sağlayarak avantaj elde eder. Lakin

Üçüncü pentagram numune hazırlamanın farklı adımlarını içerirken 6,7 ve 8 olarak numaralandırılan üç alandan oluşur. 6 ile numaralandırılan alan ekstraksiyon ölçeğini içerir. Ekstraksiyon nano ölçekte ise yeşil, ekstraksiyon yapılırsa sarı olarak işaretlenir. Mikro ya da makro ölçekte gerçekleştirilirse altıncı alan kırmızı olarak gösterilir. 7 ile numaralandırılmış alan ise ekstraksiyon aşamasında kullanılan solventler ile ilişkilidir. Yöntem solventsiz ise alan yeşil, yeşil reaktifler kullanıldığında sarı ve yeşil olmayan solventler kullanıldığında kırmızı ile etiketlenir. 8 ile numaralandırılan alan bir yöntemin ekstraksiyona ek olarak gerektirdiği işlemler ile ilgilidir. Ek işlem gerektirmiyorsa alan yeşil olarak işaretlenirken, yöntem solvent temizliği/çıkarılması gibi basit adımlar gerekiyorsa alan sarı olarak işaretlenir. Daha ileri düzey ek işlemler gerektiğinde ise alan kırmızı olarak etiketlenir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

Dördüncü pentagram kullanılan kimyasalların çözücülerin miktarları ve bu miktarların sağlık üzerine etkisini gösterir. Pentagram 9, 10 ve 11 şeklinde numaralandırılan üç alandan oluşur. 9 numaralı alan kullanılan maddelerin hacmi veya miktarı ile ilgilidir. Miktar/ hacim 10mL ya da 10gramdan az ise alan yeşil olarak gösterilir. Bu oran 10-100 mL (g)arasındaysa alan sarı renk ile işaretlenirken, 100 mL'yi aştığında alan kırmızı olarak gösterilir.10 ile numaralandırılmış alan ise kullanılan maddelerin sağlık üzerine etkilerini gösterir. Kimyasallar veya solventlerin sağlık tehlikesi puanı 0 veya 1 ise alan yeşil olarak işaretlenirken bu tehlike derecesi 2 ya da 3 ise alan sarı, 4 ise alan kırmızı etiket ile gösterilir. Alan 11 ise kimyasalların sağlık tehlikesini belirtir. Yanıcılık veya kararsızlık puanına göre alan renklendirilir. Bu puan 0 veya 1 ise alan yeşil, 2 veya 3 ise alan sarı, 4 ise alan kırmızı ile işaretlenir.(Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022)

Beşinci pentagram 12, 13, 14 ve 15 numaralı alanları içerir ve cihazlar tarafından tüketilen enerji miktarı, mesleki tehlikeler, oluşacak atıklar ve bu atıkların işlenme şekilleri hakkında bilgi verir. Alan 12, numune başına tüketilen enerji tüketimini gösterir. Enerji tüketimi numune başına 0,1 kWh'den az ise alan yeşil, 1,5 kWh'ye eşit veya daha az ise sarı, 1,5 kWh'yi aşarsa kırmızı olarak işaretlenir. 13 numaralı alan mesleki tehlikeleri belirtir. Tehlike durumuna göre yeşil veya kırmızı olarak gösterilir. Yöntem gaz veya buhar sızdırmıyorsa alan yeşil, buhar veya gaz salınımı mevcut ise alan kırmızı işaretlenecektir. Alan 14, süreç boyunca oluşacak atık miktarı ile ilişkilendirilir. Atık miktarı 10 mL (g)'den az ise yeşil renk, 1-10 mL (g) arasında ise sarı, 10 mL (g)'den büyük ise kırmızı renk yerleştirilir. Alan 15 ise ortaya çıkacak atıkların artımı hakkında

bilgi verir. Atıklar geri dönüştürülecekse alan yeşil, atıklar bozulma veya pasifleştirme yoluyla işlenecekse alan sarı, atıklar hiç arıtılmayacaksa alan kırmızı ile gösterilir. (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022)

Yeşil analitik prosedür endeksi (GAPI), yöntem ve süreci birçok açıdan ele aldığı için analitik eko ölçeğe kıyasla birçok avantajı bulunur. Buna rağmen sentez ve ön ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan maddelerin dikkate alınmaması ve örneğin atık oluşumunda 10,1 mL ve 400 mL'nin aynı etiket ile gösterilmesi dezavantaj oluşturur. (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022)

### **2.7.13. Analitik Yeşillik Hesaplayıcı (AGREE)**

Analitik yeşillik hesaplayıcı, yeşil analitik kimyanın 12 ilkesinden oluşur. Her ilke 0-1 puan aralığında değerlendirilir, renk çizelgesi 1'den 0'a doğru yeşilden kırmızı renge doğru değişir ve nihai puan 12 ilkenin değerlendirilmesinden oluşur. Sonuçta, yöntemin 12 yeşil parametreye uygun olup olmadığı rahat bir şekilde değerlendirilebilir (Sajid and Płotka-Wasyłka, 2022).

### **2.7.14. Analitik Yöntem Yeşillik Skoru (AMGS)**

Analitik ölçüm prosedürlerine uygulanan analitik yöntem yeşillik skoru; cihaz enerji tüketimi, solventlerin kümülatif enerji talebi, çevre, sağlık ve güvenlikle ilgili atık üretimi kategorilerinde değerlendirme sağlayarak yöntem tasarımının ve cihaz seçiminin etkisini belirleyebilmeyi amaçlar Analitik yöntemlerin yeşilliği AMGS tarafından niceliksel ve kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilmesine rağmen hesaplamaları karmaşıktır ve bazı sınırlamaları vardır. Bu yüzden analitik yöntem yeşillik skorunun puanının hesaplanması için çok daha fazla bilgi edinilmelidir. Bu fazla bilgi sağlanma süreci, yeşillik skorunun hesaplamasının zamanını geciktirir. (Shi vd., 2023)

### **2.7.15. Örümcek Diyagramı ile Yeşillik İndeksi**

Reaktifleri genel özellikleri, koku, yangın güvenliği ve stabilite başlıkları altında inceleyerek yeşilliğin kapsamlı bir ölçüsünü değerlendirmeyi amaçlar. Değerlendirilmeler -5 ve +5 sayı değerleri üzerinden gösterilir; -5 en yeşil olmayan, +5 ise en yeşil olan sonuçtur. (Shi vd., 2023)

## **2.8. Deneysel Tasarımı (DOE)**

En yeterli ve etkili bilgiye ulaşmak için gerçekleştirilecek deneyleri planlama yöntemi deney tasarımı olarak tanımlanır.(Demir vd., 2017) Bu noktada deney tasarımı tasarlama, planlama ve analiz süreçlerini kapsayarak sistematik bir yaklaşım seçeneği sunar. Bu yaklaşım matematiksel modellemeleri içerir ( $y=f(x_i)$ ) ve matematiksel modellemeler her seferinde tek bir değişkenin etkisini incelemek yerine çok sayıda deneysel değişken (x- bağımlı değişken; y- bağımsız değişken) parametreleri verimli olarak inceleyebilen organize bir yöntem şeklindedir (Filiz vd., Fukuda vd., 2018).

Deneysel tasarımı (DOE) yaklaşımında, kontrollü girdi faktörleri, en önemli girdi faktörlerinin belirlenmesine, optimize edilmiş çıktı yanıtlarına yol açan girdi faktörleri ayarının tanımlanmasına ve girdi faktörleri arasındaki etkileşimlerin açıklanmasına olanak tanıyan çıktı yanıtları üzerindeki etkilerini belirlemek için sistematik olarak değiştirilir.(Fukuda vd., 2018)

### 2.8.1. Deneysel Tasarımın Seçimi

Deneysel tasarımın en iyi seçiminde tanımlanmış hedefler, çalışılması planlanan girdi faktörlerinin ve bu faktörlerin etkileşimlerinin sayısı, her bir tasarımın istatistiksel olarak geçerliliği ve etkinliği gibi çeşitli yönler dikkate alınmalıdır. Deney tasarımının ve seçiminin gerçekleştirilmesinde daha iyi anlaşılmalı sağlanmak için deney tasarımları ana hatları ile tarama tasarımları ve optimizasyon tasarımları olarak ikiye ayrılan istatistiksel araçlardır olarak tanımlanabilir (Fukuda vd., 2018). Günümüzde kullanılan deneysel tasarım türleri ve uygulama alanları ayrıntılı olarak Tablo 2.4’de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Deneysel tasarımları (Fukuda vd., 2018)

Uygulamalar	Deneysel tasarım	Deneysel sayı	Seviyeler	Faktörler
Tarama	Plackett-Burman	N	2	<N-1
	Kesirli faktöriyel	$2^{k-p_{Res}}$	2	k>4
	İki seviyeli tam faktöriyel	$2^k$	2	$2 < k < 5$
Optimizasyon	Box-Behnken	$2k(k-1)+C$	3	$3 < k < 5$
	Merkezi kompozit	$2^k+2k+C$	5	$2k < 5$
	3 seviyeli faktöriyel	$3^k$	3	$2 < k < 3$

Bir deneme tasarımının seçiminde öncelik yapılacak olan araştırmanın amacı, incelenecek faktör sayısı ve tipi olmalıdır (Demir vd., 2017).

### **2.8.2. Tarama tasarımları**

Tarama tasarımları elde edilecek çıktı yanıtlarının üzerinde kritik etkilere sahip olan mümkün olduğunca az sayıdaki başlıca faktörlerin seçimini içerir.(Pramod vd., 2016)

Plackett-Burman tasarımları, iki seviyeli tam faktöriyel tasarımlar, kesirli faktöriyel tasarımlar uygun maliyetli olmaları sebebiyle en çok kullanılan tarama tasarımlarıdır. Bu tarama tasarımları, girdi faktörlerinin çıktılar üzerindeki yanıtların daha iyi anlaşılabilmesini sağlamak amacıyla bazı sınırlamalar içerirken azaltılmış deney sayısı ile çok sayıda girdi faktörünün incelenmesine izin verir.(Fukuda vd., 2018)

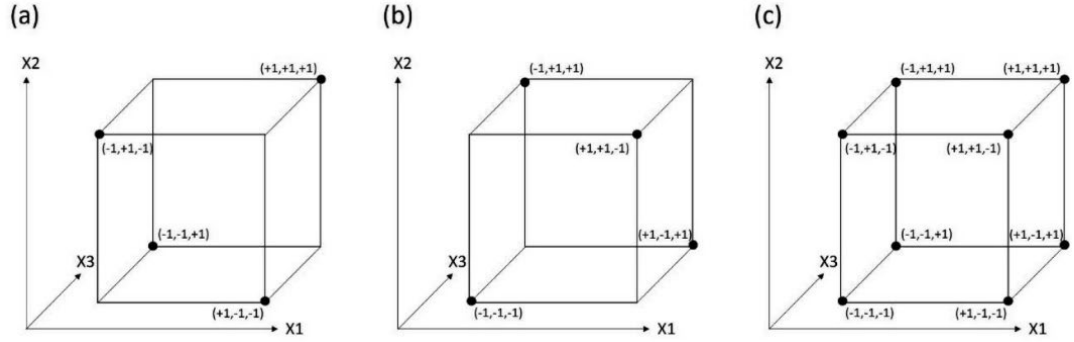
İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlar, girdi faktörlerinin başlıca etkilerini ve bunların çıktı yanıtları üzerindeki etkileşimlerini inceleme konusunda en güçlü kabul edilen tarama tasarımları olarak bilinse de, İki seviyeli tam faktöriyel tasarımların ana sınırlamaları, kesirli faktöriyel tasarımlar ve Plackett-Burman tasarımları ile karşılaştırıldığında daha çok sayıda deney içerir. İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlar için gereken deney sayısı  $2^k$  olarak hesaplanabilir, burada  $k$  çalışılacak girdi faktörlerinin sayısıdır (Fukuda vd., 2018).

#### **2.8.2.1. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^k$ )**

İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlarda düşük (-) ve yüksek (+) olmak üzere iki seviye bulunur.  $K$  burada çalışılacak girdi faktörlerinin sayısıdır ve gerçekleştirilecek deney sayısı  $2^k$  olarak hesaplanır (Demir vd., 2017).

#### **2.8.2.2. Kesirli faktöriyel tasarımlar ( $2^{k-p}$ )**

Fazla miktarda girdi faktörünün çıktı yanıtının değerlendirmesini az sayıda deney ile sağladığından kullanımı en çok tercih edilen tasarımlardan biridir. Kesirli faktöriyel tasarımlar, tam faktöriyel  $2^k$  tasarımının  $2^{k-p}$  tasarımına bölümü ile elde edilir. Buradaki  $p$ , tasarımı parçalamak için seçilen jeneratörlerin sayısıdır. Örneğin, beş girdi faktörü incelendiğinde, yarım fraksiyon faktöriyel tasarım ( $2^{4-1} = 8$  deney) kullanılır. Aynı sayıda deneyle beş girdi faktörünü incelemek için çeyrek-fraksiyon faktöriyel tasarımı ( $2^{5-2} = 8$  deney) kullanılır (Fukuda vd., 2018). Tasarım matrisi ve faktör sayısına göre girdi gösterimleri Şekil 2.3’de verildiği gibidir.



**Şekil 2.3.** Üç İçin Yarı Kesirli İki Düzeyli Faktöriyel Tasarım ( $2^{3-1}$ ) Matrisinin (A), Tamamlayıcı Matrisinin (B) Ve İki Düzeyli Tam Faktöriyel Tasarım ( $2^3$ ) Matrisinin (C) Gösterimi Girdi Faktörleri. (Fukuda vd., 2018)

### 2.8.2.3. Plackett-Burman Tasarımları

Plackett-Burman tasarımları, olabildiğince az sayıda deney ile birlikte çok sayıda faktör incelemesi sağlayabildiği için en yaygın kullanılan tasarımlardan biridir. Aynı zamanda N sayıda deney ile N-1'e sayısına kadar olan giriş faktörlerinin incelenmesini sağlayan iki seviyeli fraksiyonel faktöriyel tasarımların (çözünürlük III) özel bir türü olarak da tanımlanır. Buradaki N deney sayısı 4'ün katı olmalıdır (Fukuda vd., 2018, Rahman vd., 2010).

### 2.8.3. Optimizasyon tasarımları

Bir süreci sağlamlaştırmak, hedefe ulaşmak, çıktı alınan yanıt istenilen seviyeye ulaştırmak, birden çok hedefi aramak ve değişkenliği azaltmak için kullanılan yanıt yüzey metodolojisinde kullanılan en yaygın optimizasyon tasarımları üç seviyeli tam faktöriyel, BBD ve merkezi kompozit tasarımlardır. Tarama tasarımları her bir giriş faktörü için sadece iki seviye içerdiklerinden 1.dereceden yani doğrusal yanıt yüzeylerin modellenmesine izin verirken, optimizasyon tasarımları 3 ya da 5 seviyelerini kullanır bu yüzden de kuadratik ya da 2.dereceden yanıt yüzeylerinin modellenmesine olanak tanır. Bu avantaja rağmen süreç deney sayısının artmasını gerektirdiğinden optimizasyon tasarımlarının en yaygın kullanımı daha az sayıda girdi faktörünü incelenmesini oluşturur.(Fukuda vd., 2018, Pramod vd., 2016)

#### 2.8.3.1. Üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlar

Üç seviyeli tam faktöriyel tasarım, artan deney sayısı gerektirdiği için genellikle iki veya üç girdi faktörü ile kullanılır. Deney sayısı 3k olarak belirtilir ve k sayısı diğer tasarımlarda olduğu gibi girdi faktörü sayısını tanımlar (Fukuda vd., 2018).

#### **2.8.3.2. Merkezi kompozit tasarımlar (CCD)**

Merkezi kompozit tasarımlar, esnek ve sırayla çalışabilmeleri ve verimli olmaları sebebi ile en popüler olarak kullanılan yanıt yüzey metodoloji yöntemidir. Bunun başlıca sebeplerinden biri üç seviyeli tam faktöriyel tasarım ile karşılaştırıldığında daha az deney sayısı gerektirmesidir. Merkezi kompozit tasarımlar her bir girdi faktörü için 5 seviyeye kadar kullanılabilirler (Fukuda vd., 2018, Zhang and Xiaofeng, 2009).

#### **2.8.3.3. Box-Behnken tasarımları (BBD)**

Box- behnken tasarımları daha az sayıda tasarım noktasına sahip olduklarından dolayı aynı miktarda faktörle çalıştığında diğerlerine göre daha uygun fiyat avantajı sunar. Bu avantajın yanı sıra deney sürecindeki değişkenlerin etkisini inceleyebilen ve hatta hatalar hakkında genel bilgi sağlayabilen etkili bir yanıt yüzey tasarımıdır. Merkezi kompozit sistemler 5 seviyeye kadar çalışırken Box–Behnken tasarımları faktör başına 3 seviye içerir. Bu üç seviye -1, 0, +1 olarak tanımlanır ve seviyeler 3 ila 21 arasında farklı sayılarda faktörlere uygulanabilir.(Pehlivanoğlu and Andaç, Yuwono and Indrayanto, 2005)

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler**

Analitik saflıktaki kimyasallar;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (%99,8),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (%86), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl) ve kromatografik saflıkta asetonitril Sigma-Aldrich (ABD) satın alınmıştır. %99,9 saflıkta TSM referans standardı TRC Şirketinden (Kanada) ve iç standart olarak seçilen agomelatin (AGO) (>%99,5 saflıkta) asetonitril Sigma-Aldrich (ABD) satın alınmıştır.

#### **3.2. Kullanılan Cihazlar**

Analizler Shimadzu (Japonya) Prominence serisi HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DGU-20A5 çevrimiçi gaz giderici, düşük basınçlı gradyan ünitesiyle donatılmış LC-20AT tandem ikili pompa, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, CBM-20A iletişim veri modülü ve SPD-M20A diyot dizisi dedektörden oluşmaktadır. Sistemin ölü hacmi 0,50 mL olarak ölçülmüştür. Sistemde veri analizleri LCSolutions 1.11 SP1 yazılımı (Japonya) kullanılarak entegre edilmiştir. Ohaus'tan (Nänikon, İsviçre) Explorer E12140 model analitik terazi, Bandelin'den (Berlin, Almanya) RK 100H model ultrasonik banyo, IKA'dan (Almanya) RO 15 karıştırıcı ve Eppendorf'tan (Almanya) 5810R model santrifüj cihazları numunelerin ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### **3.3. Kullanılan Sabit Fazlar**

Çalışmalarda kromatografik ayırım Sigma Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Supelco Ascentis® Express model fenil heksil ve  $\text{C}_8$  fonksiyonel gruplarına sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) ölçülerinde 2 adet kolon kullanılmıştır.

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Deneysel Parametreler

#### 4.1.1. Enstrümental parametreler

HPLC analizlerinde hareketli faz akış hızı 1,2 mL/dk olup kolon fırın sıcaklığı 25,0±0,1 °C olarak seçilmiştir. Otomatik örnekleme termostat sıcaklığı 15±0,1 °C'ye sabitlenmiş olup enjeksiyon hacmi ise 3 µL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan tüm hareketli faz çözeltileri 0,45 µm CA filtre ile süzülmüştür.

TSM'nin maksimum absorbanansı 220 nm'de tespit edildiği için HPLC sisteminde foto diyot dizisi dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayrıca dedektörde spektrumlar 190 ve 380 nm arasında 1,5625 Hz veri örnekleme frekansında ve 0,640 sn zaman sabitinde izlenmiş olup analiz süresi ise 6 dk'dır.

#### 4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Tüm standart, stok ve çalışma çözeltileri TSM'nin çözünürlüğünün yüksek olduğu asetonitrilde hazırlanmıştır. Bunun için stok TSM ve AGO çözeltileri ayrı ayrı 100 µg/mL olacak şekilde 25 mL'lik balonjojelerde 2,5 mg etken madde çözündürülerek hazırlanmıştır.

#### 4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

Yöntemin doğruluk ve kesinliğini belirlemek amacı ile geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla piyasada TSM'nin farmasötik preparatı olan Hetlioz® psödo olarak hazırlanmıştır. Ürünün ülkeye giriş problemleri olması nedeniyle araştırmacı tarafından bu yöntem tercih edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan formülasyon Tablo 4.1'de verildiği gibidir (Özcan vd., 2020).

**Tablo 4.1.** *Hetlioz® formülasyonu (Özcan vd., 2020)*

Kapsül Formülasyonu	İçeriği (mg)	Tartılan (mg)
Tasimelton	5,00	5,0
Laktoz	41,80	41,8
Mikrokristalin selüloz	41,95	42,0
Kolloidal silikon dioksit	0,69	0,70
Magnezyum stearat	1,36	1,35
Sodyum kroskarmeloz	4,12	4,10
<b>Toplam</b>	<b>94,92</b>	<b>94,95</b>

Bu amaçla Tablo 4.1’de verilen ticari ürünün patentine dahil edilen yardımcı maddeler ultra hassas teraziyile tartılmış ve 100 mL hacme sahip balon jojeye ilave edilerek asetonitrilde çözülmüştür. Ardından vortekste 5 dakika karıştırılmış ve ultrasonik banyoda çözünmesi için 10 dakika bekletilmiştir. Çözünmenin tamamlanmasından sonra heterojen çözelti şırınga ucu filtrelerden süzölmüştür. Süzme işlemi için naylon, PES, PTFE ve PVDF tipte şırınga filtrelerinin hepsi denenmiş ve en yüksek pik alanı PVDF (22/25 mm, 0,22 µm gözenek boyutu, Isolab, Almanya) ile elde edildiği için numune hazırlamada kullanılmıştır. Bu homojen çözelti 1/10 oranında ara stok olarak seyreltilip geri kazanım çözeltileri bu ara stoğun gerekli oranlarda seyreltilerek kullanılmıştır.

#### **4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı**

Çalışma boyunca elüsyon izokratik modda yapılmıştır. Mobil fazın bileşimi metanol: fosfat tamponu (0,030 M, pH 2,5):(51:49, *h/h*) şeklinde seçilmiştir. Tampon çözeltisi 2817 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 670 µL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> maddelerinin 1 L su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 5 dk sonikasyona tabi tutulup ve steril olmayan membran filtrelerden (47 mm iç çap, 0,45 mikron gözenek boyutu, Sartorius, Almanya) ile süzölmüştür.

#### **4.1.5. Sonuçların değerlendirilmesi**

Elde edilen sonuçların analitik açıdan uygunluğunun değerlendirilmesi ve veriler arası uyumluluk çalışmaları olan ANOVA analizleri Microsoft Office Excel aracı ile veri çözömlleme eklentisi kullanılarak yapılmıştır.

#### **4.2. İstatiksel Analiz**

Çalışmada ilk yöntem geliştirme deneylerine dayanarak, metanol oranı, kolon sıcaklığı (°C) ve akış hızı (mL/dak) seçilmiştir. Üç merkez noktası da dahil olmak üzere üç farklı seviyede üç sayısal faktör kullanılarak 14 deney gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tasarımında standart ve örnek çözeltiler 100 µg/mL TSM ve 100 µg/mL AGO içermiştir. Bu üç seçilen bağımsız değişkene karşı ayırım gücü (Y1), teorik tabaka yüksekliği (HETP) (Y2), kapasite faktörü (Y3), teorik tabak sayısı (Y4) ve kuyruklanma faktörü (Y5) olarak seçilerek Design-Expert® yazılımını kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir bağımsız değişken ve seviyeleri Tablo 4.2’de verildiği gibidir.

**Tablo 4.2.** Bağımsız değişkenler ve faktör seviyeleri

Faktör	Birim	Sembol	Seviyeler		
Organik faz yüzdesi	%	A	51	55	59
Akış hızı	mL/dk	B	1,2	1,45	1,7
Kolon sıcaklığı	°C	C	30	35	40

İkinci derece polinom denklemi deneysel yanıtla kullanılmış ve BBD modelinin katsayıları aşağıdaki ifade kullanılarak belirlenmiştir.

$$Y=b_0+b_1X_1+ b_2X_2 +b_3X_3+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{12}X_1X_2 \quad (4.1)$$

Burada Y incelenecek yanıt,  $b_0$  kesişme noktası ve  $b_1$ – $b_{33}$  faktör regresyon katsayılarıdır. BBD modelinin deneysel tepkisini, sabit, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim katsayılarını temsil eder.  $X_1$  ve  $X_2$  kodlanmış değişkenleri temsil eder. BBD modelinin p değerleri aracılığıyla önemi ANOVA kullanılarak değerlendirilmiştir.

Oluşturulan model, korelasyon katsayısı ( $R^2$ ), düzeltilmiş  $R^2$ , tahmin edilen  $R^2$  ve yeterli hassasiyetin farklı sınırları açısından incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Yanıt yüzey analizi, 2 boyutlu kontur grafikleri ve 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri üretilerek gerçekleştirilmiştir. Optimum kromatografik koşullar sayısal ve grafiksel optimizasyondan tahmin edilmiştir. Optimize edilmiş kromatografik koşullar, tasarım alanı bölgesinin grafiksel bir kaplama grafiğinde işaretlenmiştir.

### 4.3. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Geliştirilen yöntemin geçerliliği ICH kılavuzunun önerdiği yönergeler doğrultusunda tam olarak valide edilmiştir (Guideline, 2005b).

#### 4.3.1. Sistem uygunluk testleri

HPLC yöntemi geliştirmenin bilgilendirici bir parçası olarak, HPLC enstrümantasyonunun kromatografik performansını değerlendirmek için sistem uygunluğu kontrol edilmiştir. Hesaplanan sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.3'de verilmiştir.

**Tablo 4.3. SUT parametrelerinin sınırları**

SUT parametresi	Kabul edilebilirlik sınırı (USP)
Bağıl alıkonulma	-
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$
Kapasite faktörü	$1 \leq k \leq 10$
Seçicilik	$\alpha > 1$
Kuyruklanma faktörü	$2 \leq T$
Ayrım gücü	$R_s > 1,5$
Pik asimetrisi	$0,95 \leq A_s \leq 2$
Pik alanının tekrar edilebilirliği	%BSS < 1,5 Genel ayrımlar

Sistem uygunluk parametreleri Shimadzu LCsolution v1.11 SP1 yazılımı aracılığıyla USP'ye göre Tablo 4.4'deki gibi hesaplanmıştır (Hawley, 1917).

**Tablo 4.4. USP'ye SUT parametrelerinin formülleri**

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \left[ \frac{t_R}{W} \right]^2$	$N$ : teorik tabaka sayısı $t_R$ : alıkonulma zamanı $W$ : pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0,05}}{2 \times \alpha_{0,05}}$	$T$ : kuyruklanma faktörü $W_{0,05}$ : pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0,05}$ : pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Asimetri faktörü	$A_S = \frac{\beta_{0,10}}{\alpha_{0,10}}$	$A_S$ : asimetri faktörü $\beta_{0,10}$ : pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0,10}$ : pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Ayrım gücü	$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}}$	$t_1$ : önceki pikin alıkonulma zamanı $t_2$ : pikin alıkonulma zamanı $W_{0,5}$ : pik genişliği $W_{P0,5}$ : önceki pikin genişliği
Kapasite faktörü	$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k$ : kapasite faktörü $t_R$ : alıkonulma zamanı $t_M$ : ölü zaman

#### 4.3.2. Seçicilik ve spesifikklik

Seçicilik çalışmaları için TSM ve AGO iki farklı kolon ile ayrıntılı kromatografik ayrımı yapılmıştır. Bunun dışında ayrıca PDA dedektör ile pik saflıkları hesaplanmıştır.

#### 4.3.3. Kararlılık

TSM ve AGO'nun stok çözeltisi, asetonitrilde uygun şekilde seyreltilmiş (50,0 µg/mL) ve periyodik olarak (6, 12, 18, 24, 48 saat, üç hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü) olmak üzere çözelti ve hareketli faz kararlılığını incelemek için analizleri yapılmıştır.

#### 4.3.4. Doğrusallık

Geliştirilen yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için TSM standart çözeltileri %10-150'sine karşılık gelen (10; 25; 40; 50; 60,0 ve 75,0 µg/mL) 6 konsantrasyon seviyesinde asetonitrilde hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Analizler en az üç tekrarlı olmak üzere ve hesaplama elde edilen alanların ortalaması ile yapılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olmak üzere üç tekrar ile çalışılmış ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir.

#### 4.3.5. Doğruluk

Yöntemin doğruluğunu ortaya koymak amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için Hetlioz®'un elde formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyondan ve standart TSM çözeltisinden yarı derişimlerde alınıp karıştırılarak düşük seviyede (40,0 µg/mL) orta seviyede (50,0 µg/mL) ve yüksek seviyede (60,0 µg/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede çözeltiler (%80, %100 ve %120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanmış, elde edilen sonuçların standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

#### 4.3.6. Kesinlik

Metodun kesinlik çalışmaları tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik olmak üzere üç farklı şekilde ortaya konulmuştur. Bunun için TSM'nin standart ve psödo formülasyon çözeltilerin %100 noktasına denk gelen (50,0 µg/mL) konsantrasyonlarda

çözeltiler hazırlanarak üç gün 3 tekrarlı olmak üzere analiz edilmiştir. Ayrıca ara kesinlik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar varyans analizi ile yorumlanmıştır. Sonuçlar, ortalama, ortalama standart hata, standart sapma, %BSS ve %95 güven seviyesi dahil olmak üzere istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

#### **4.3.7. Teşhis ve tayin alt sınırı**

Teşhis alt sınırı (LOD), için detektörde elde edilen gürültü sinyalinin yaklaşık 3,3 katı sinyal veren derişimde standart TSM çözeltisi hazırlanmış ve 10 tekrarlı analiz edilerek pik alanlarının kesinliği hesaplanmıştır. Tayin alt sınırı (LOQ) için ise LOD derişiminin 5 katı derişik çözelti hazırlanarak gerekli doğruluk ve kesinlikte sonuçlar elde edilen derişim olduğu analiz edilmiştir.

#### **4.3.8. Sağlamlık**

Yöntemin sağlamlığını belirlemek için kalibrasyon doğrusunun %100'ne karşılık gelen derişimde TSM çözeltisi hazırlanmış ve kromatografik parametrelerde ufak değişiklikler yapılarak ( $\pm\%10$ ) üç tekrarlı analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçların metot koşullarındaki sonuçlardan %farkı hesaplanarak ortaya konulmuştur. Bunun için kromatografik çıktı olarak değişikliklerden en fazla etkilenen ve hesaplamalarda kullanılan alıkonma zamanı ile pik alanı kullanılmıştır.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Analitik Kimya, çevremizdeki elementlerin ve moleküllerin doğası, miktarı ve kimliği hakkında kimyasal bilgi edinme aracı olarak tanımlanır. Bu bilgiler toplanır, sınıflandırılır, işlenir, saklanır ve dağıtılır. Amaç, mevcut numune miktarı hakkında gerekli bilginin, bu bilginin son kullanıcılarının ihtiyaç ve taleplerini karşılayacak analitik hassasiyet, seçicilik, doğruluk ve kesinlik düzeyinde, makul maliyet ve istenilen sürede sağlanmasıdır. Analitik Kimya bilimi, problemleri çözmek ve diğer uzmanlara ve halka yüksek kalitede bilgi sağlamak için yeni araçlar geliştirmektedir. Gereksiz bilgileri ve bunun gerektirdiği ek kimyasal, solvent ve enerji maliyetlerini en aza indirmek için gerekli bilgileri elde etmek için kullanılan analiz yöntemleri amaçlarına uygun olmalıdır. Bununla ilgili günümüzdeki en yaygın görüş ve çaba metot optimizasyonu için istatistiksel yöntemlerin denenmesi diğer ise çevre koruması hakkında yayılan endişe ve çabaların karşılığı olan yeşil kimyadır. Aslında uygun metot parametrelerinin belirlenmesinde ve optimizasyonunda istatistiksel yöntemlerin uygulanması da bir nevi iş gücü ve maliyeti azaltma kaygısıdır. Bunun yanında analitiksel açıdan birden fazla parametrenin aynı anda değişikliğinin rahatlıkla gözlenebilmesi ve analizciyi uç noktaları denemeye zorlamamasıdır. Bu çalışmada bu görüşler doğrultusunda BBD ile metot optimizasyonu ve geliştirilen yöntemin çeşitli yeşil metrikler ile değerlendirilmesi yapılmıştır.

Metot optimizasyonunda BBD tercih edilmesinin sebebi yanıt yüzeyi metodolojisi için iyi bir tasarımıdır. Çünkü ikinci dereceden modelin parametrelerinin tahmin edilmesi, sıralı tasarımların oluşturulması, modelin uyum eksikliğinin tespiti ve blokların kullanımı verimli olarak sağlar. Box-Behnken tasarımı ile diğer tepki yüzeyi tasarımları (merkezi kompozit, Doehlert matrisi ve üç seviyeli tam faktöriyel tasarım) arasında yapılan bir karşılaştırmada, Box-Behnken tasarımı ve Doehlert matrisinin merkezi kompozit tasarımdan biraz daha verimli olduğunu ancak üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlardan daha çok daha verimli olduğunu göstermiştir (Ferreira vd., 2007).

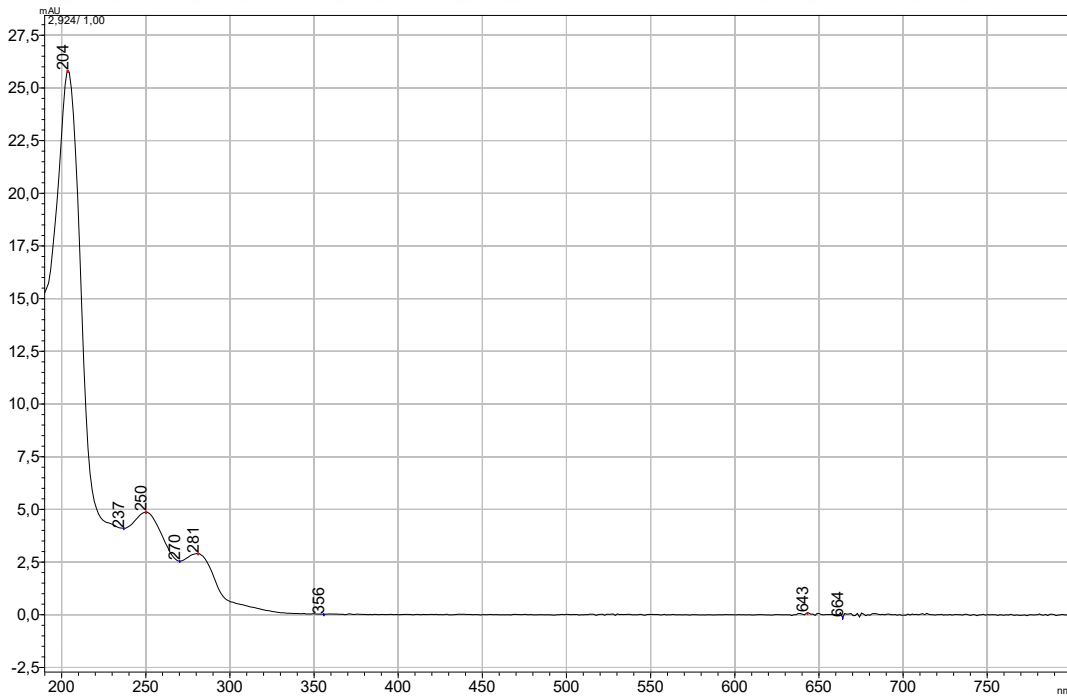
Yeşil analitik kimya kavramı analitik laboratuvarlarda yaygın olarak tanınmaktadır. Farklı analitik yöntemlerin çevre dostu olup olmadığını değerlendirmek için yeşillik ölçütleri geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Şimdiye kadar NEMI, Gelişmiş piktogram, Değiştirilmiş NEMI, HPLC-EAT, AMVI, Analitik Eko-ölçek, Yeşil Sertifika ile değiştirilmiş Eko-ölçek, GAPI, Karmaşık GAPI, RGB, HEXAGON, AMGS, AGREE, AGREEprep ve Spider diyagramı gibi çok sayıda yeşil profil oluşturma metrik aracı önerilmiştir. Analitik prosedürler sırasında tehlikeli çevresel atık oluşumunu

değerlendirmek ve sınırlamak için bu yeşillik analitik kimya ölçümlerinin nasıl kullanılacağını öğrenmek çok önemlidir. Farklı yeşillik metriklerinin farklı kriterleri, avantajları ve dezavantajları vardır. Kullanıcıların farklı analitik analizlerin yeşilliğini değerlendirmek amacıyla bu yeşillik ölçümlerini kullanması açısından yararlı olduğu bir gerçektir. Bu nedenle söz konusu çalışmada geliştirilen metot farklı yeşillik metrikleri ile değerlendirilmiştir.

Çalışmada TSM'nin farmasötik preparatlarda yüksek doğruluk ve kesinlikte analiz için HPCL metodu geliştirilmiştir. Yöntem geliştirilirken metot optimizasyonu için BBD tasarımı kullanılmıştır. Optimize metodun tam metot geçerliliği sağlanmış ve yeşillik değerlendirmesi de çeşitli metrikler ile yapılmıştır.

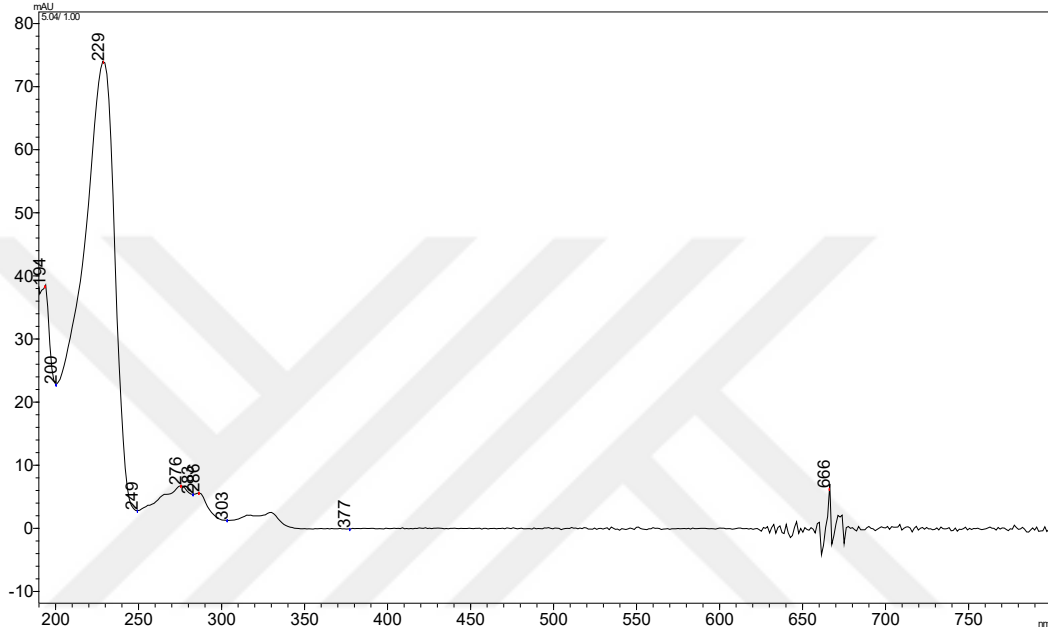
### 5.1. TSM'nin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

HPLC çalışmalarının ilk adımı analitin UV-Vis spektroskopisi davranışlarının incelenmesidir. Bu amaçla TSM'nin UV-Vis spektrometresinde maksimum absorbans yaptığı dalga boyu tespit edilmiştir. Bunun için 100 µg/mL derişimde asetonitrilde hazırlanmış TSM çözeltisinin 190-800 nm aralığında taraması yapılmıştır. Elde edilen spektrum Şekil 5.1'de verildiği gibidir.



Şekil 5.1. TSM'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=100 µg/mL)

Söz konusu çalışmada yüksek doğruluk ve kesinlik sonuç elde edebilmek için IS kullanılmıştır. Bunun için analite en uygun IS maddesinin denemeler sonunda AGO olduğuna karar verilmiştir. Uygun çalışma dalga boyu aralığının belirlenmesi ve analitlerin tanınması amacıyla IS'nin de UV spektrumu 190-800 nm aralığında ölçülmüştür. Elde edilen IS standart çözeltisine ait spektrum Şekil 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.2. AGO'nun UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=100 µg/mL)

## 5.2. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

Metot geliştirme çalışmaları yapılırken etkinliği önemli bağımsız değişkenlerin belirlenmesinde ön denemeler yapılmıştır. Sabit faz seçimin de fenil hegzil ve C8 fonksiyonel grubuna sahip iki farklı kolon türü kullanılmıştır. Ancak gereçler bölümünde de belirtildiği gibi kolonların tek farkı sahip oldukları fonksiyonel gruplardır. Kolon olarak önce Supelco Ascentis® Express model fenil hegzil fonksiyonel grubuna sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) kolon seçilmiştir. Hareketli fazın organik bileşenide asetonitril tercih edilmiştir. Ancak AGO ile TSM piklerinin birbirlerinde ayrımı yetersiz olmuştur. Düşük asetonitril yüzdesi seçildiğinde ise ayrım daha iyi ancak analiz süresi fazla uzun olmuştur. TSM ile IS arasındaki kapasite faktörü iyi olmasına rağmen çözücü pikine göre ise kapasite faktörünün fazla olduğu gözlenmiştir. O nedenle hareketli fazın organik bileşeni asetonitril yerine metanol ve kolonda Supelco Ascentis® Express model C8 fonksiyonel grubuna sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) olan seçilmiştir. Böylelikle kolonda

elektrostatik etki yerine daha çok apolar etkileşimler artırılarak ayırımın çözünürlüğü artırılmaya çalışmıştır. Önemli bağımsız değişkenler ve sınırları belirlendikten sonra ise BBD ile metot optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir.

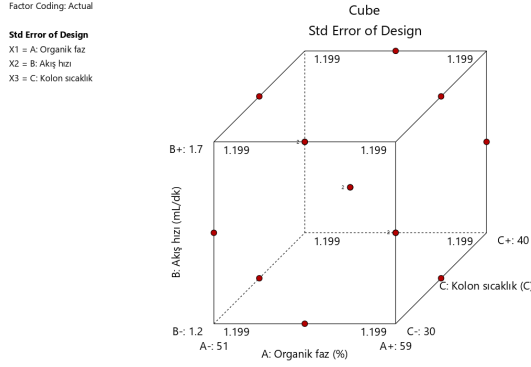
### 5.2.1. BBD ile metot optimizasyonu

HPLC yönteminin geliştirilmesi için 100 µg/mL AGO ve TSM kromatografik değişkenlerin optimizasyonu için BBD aracılığıyla yanıt yüzey metodolojisi ile, metanol fraksiyonu, akış hızı ve kolon sıcaklığı kombinasyonlarını içeren 14 deneysel çalışma ve yanıtlar Tablo 5.1’de özetlenmiştir.

**Tablo 5.1.** Bağımsız değişkenler ve yanıtları

Analiz	Faktör 1 A: Organik faz yüzdesi (%)	Faktör 2 B: Akış hızı (mL/dk)	Faktör 3 C: Kolon sıcaklığı (°C)	Yanıt 1 Ayrırma gücü (Rs)	Yanıt 2 HETP	Yanıt 3 Kapasite faktörü (k')	Yanıt 4 Teorik tabaka sayısı (N)	Yanıt 5 Kuyruklanma faktörü (TF)
1	55	1,45	35	16,976	29,73	2,399	5045,36	1,35
2	55	1,7	40	16,107	36,689	4,993	4088,39	1,4
3	51	1,45	40	16,656	27,145	2,126	4237,6	1,302
4	51	1,45	30	17,051	27,658	2,637	5423,3	1,323
5	59	1,2	35	0,409	34,814	1,939	4308,66	1,424
6	51	1,2	35	16,22	27,738	2,443	5407,73	1,367
7	51	1,7	35	17,129	30,553	4,703	4909,55	1,409
8	55	1,7	30	15,058	42,271	4,03	3548,55	1,289
9	55	1,45	35	16,352	28,552	2,414	5253,58	1,354
10	59	1,45	30	11,091	44,376	1,635	3380,18	1,43
11	55	1,2	30	15,506	29,199	2,411	5137,18	1,37
12	59	1,45	40	10,085	43,376	1,355	3094,29	1,33
13	55	1,2	40	14,534	30,275	2,188	4954,52	1,405
14	59	1,7	35	12,085	53,228	3,244	2818,06	1,413

Oluşturulan modelin bağımsız değişkenleri ve standart hatası ise Şekil 5.3’te verildiği gibi olup oluşturulan model uygundur.



Şekil 5.3. Oluşturulan modelin standart hatası

Seçilen her bir yanıt için bağımsız değişkenler tarafından oluşturulan denklemler ve ANOVA değerleri ise Tablo 5.2’de sunulmuştur. Oluşturulan modelin her bir yanıt için  $R^2$ , P ve F değerleri modelin uygunluğunu göstermektedir. Özellikle  $R^2$  değerleri adedece Y1 ve Y5 için 0,6 civarı bulunmuş olup diğer dört yanıt için ise  $R^2$  değerleri 0,9’dan büyüktür. Bu nedenle ikinci dereceden model seçilmiş ve anlamlı bulunmuştur. Elde edilen verilerin çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Kodlanan faktörler ve denklemleri aşağıdaki gibi elde edilmiştir.

Tablo 5.2. Oluşturulan modelin denklemleri

Yanıt	Denklem	P- değeri	F- değeri	$R^2$	Adeq Precision
Y1	$R_s = 13,95 - 4,17A + 1,71B - 0,1655C$	0,0192	0,1012	0,613	6,8743
Y2	$HETP = 29,14 + 7,84A + 5,09B - 0,7524C$ $+ 3,90AB - 0,1217AC$ $- 1,66BC + 4,24A^2$ $+ 3,21B^2 + 2,26C^2$	0,0002	0,5496	0,996	33,3251
Y3	$k' = 2,41 - 0,4670A + 0,9986B - 0,0064C$ $- 0,2387AB + 0,0577AC$ $+ 0,2965BC - 0,3958A^2$ $+ 1,07B^2 - 0,0725C^2$	0,0072	0,0216	0,975	12,7601
Y4	$N = 5149,47 - 797,12A - 555,44B$ $- 139,30C - 248,11AB$ $+ 224,95AC + 180,62BC$ $- 593,40A^2 - 195,08B^2$ $- 522,24C^2$	0,0223	0,2722	0,955	9,3688
Y5	$TF = 1,35 + 0,0245A - 0,0069B + 0,0031C$ $- 0,0132AB - 0,01907AC$ $+ 0,0190BC + 0,0158A^2$ $+ 0,0355B^2 - 0,0215C^2$	0,7338	0,0339	0,590	3,3148

Faktör katsayıları karşılaştırılarak seçilen A, B ve C faktörlerin göreceli etkisini sağlamak için yukarıdaki kodlanan denklemden yararlanılmıştır. Seçilen BBD modelinde ana etkileşimler ve ikinci dereceden etkiler değerlendirilmiştir. İkinci dereceden model denkleminin en önemli etkileri ve etkileşimleri varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 5.2’de özetlenmiştir; burada p değeri 0,05’ten küçük ve model F değeri (en düşük 0,0216) yüksek olduğundan ikinci dereceden model terimlerinin anlamlılığı sağlanmıştır. Buna ek olarak gerçek pik alanı değerlerinin tahmin edilen pik alanı değerlerine oldukça yakın olduğu görülmüştür.

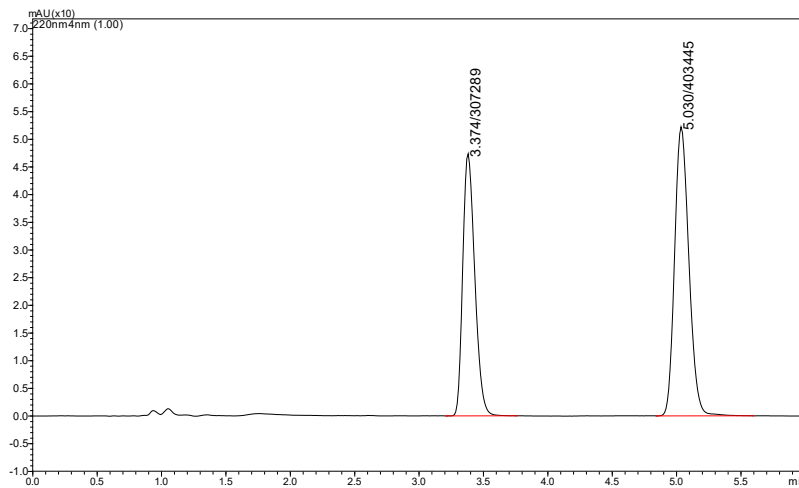
İkinci dereceden model BBD aracılığıyla kabul edilebilir modeldir. Oluşturulan 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri (RSP), seçilen değişkenlerin göreceli etkileşimli etkisini gösteren grafiksel gösterimdir: metanol fraksiyonu (A), akış hızı (B) ve kolon sıcaklığı (C)’nin kuyruklanma faktörü, ayırma gücü, teorik tabaka sayısı, kapasite faktörü ve teorik tabaka yüksekliği üzerine. Şekil 5.4, kromatografik değişkenlerin optimizasyonu için (AB), (AC), (AD), (BC), (BD) ve (CD)’nin bir fonksiyonu olarak 3D RSP’yi göstermektedir. Şekilde, % metanol fraksiyonu (A), akış hızı (B) ve kolon sıcaklığı (C) arttıkça pik alanının arttığı ve 120.63’lük maksimum pik alanına ulaşıldığı açıkça görülmektedir. Şekil 5.4’deki ikinci dereceden model terimlerinin 3D RSP’si, Tablo 5.2 ile kanıtlandığı gibi anlamlıdır. Bağımsız değişkenler için optimum koşullar optimize edilmiş ve şu şekilde bulunmuştur: pH (2,5), metanol fraksiyonu (%51), akış hızı (1,2 mL/dk) ve kolon sıcaklığı (25 °C).

Yukarıda belirtilen ön çalışmalardan sonra metot geçerliliği çalışmalarının ilk adımı olan SUT parametreleri TSM ve AGO için USP metoduna göre hesaplanmıştır. Elde edilen SUT analiz sonuçları Tablo 5.3’de verilmiştir. Optimize koşullar altında %100’lük standart çözeltiye ait kromatogram ise Şekil 5.5’de verildiği gibidir. Bu koşullar altında TSM derişimi 50 µg/mL ve IS olarak seçilen AGO derişimi ise 33 µg/mL olarak hazırlanmıştır.

**Tablo 5.3.** TSM analizi için elde edilen SUT verileri

Parametre	Hesaplanan Değer		Tavsiye Edilen Değer
	TSM	AGO	
Alıkonulma Zamamı (dk)±GA*	3,35±0,01	5,05±0,02	-
Alıkonulma Zamamı İçin %BSS	0,0001	0,63	BSS ≤ %1
Pik Alanı Kesinliğı İçin %BSS (n=6)	0,21	0,23	BSS ≤ %1
Alıkonulma Zamamı İçin Enjeksiyon Kesinliğı %BSS (n=6)	0,03	0,07	BSS ≤ %1
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,37	1,24	T ≤ 2
Kapasite Faktörü (k')	2,62	4,41	2 < k < 10
Teorik Tabaka Sayısı (N)	5111	8389	N > 2000
USP Genişlik	0,19	0,22	≤ 1
HETP (USP)	29,4	17,9	-

\*%95 güven seviyesinde



**Şekil 5.5.** Optimum koşullar altında %100’lük standart çözeltiye ait kromatogram

### 5.3. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Geliştirilen yöntemde yüksek doğruluk ve kesinlik sağlanabilmesi için IS kullanılmıştır. IS, analit sinyalinin IS sinyaline oranının grafiğini çizerek analitik kimyada kalibrasyon için kullanılan kimyasal bir maddedir. Bir IS'nin kimyasal özellikleri çok benzerdir ancak analizler için ilgilenilen kimyasal türlerle aynı değildir. Farmasötik formülasyonlardaki aktif ilaç bileşiklerinin analizi, kalite kontrol laboratuvarlarında rutin bir işlemdir ve analizlerin gerçekleştirilmesi için kesin ve doğru analitik tekniklerin kullanılması önemlidir. Bir ilaç firmasının genellikle çok sayıda kalite kontrol örneğini ölçmesi gerekir. HPLC, ilaç endüstrisinde çok çeşitli numuneler için kullanılır. Nihai ilaç ürünlerinin kalite kontrolü/güvencesi sıklıkla HPLC kullanılarak gerçekleştirilir. Kantitasyon için yeni bir yöntem oluştururken doğru IS'nin seçimi, yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini artırabilir. Bu nedenle yöntem optimizasyon süreci aynı zamanda analiz sonuçlarının kesinliğini ve doğruluğunu önlemek için en uygun IS'nin seçilmesine de odaklanır.

Bu çalışmada birçok madde IS olarak denenmiş ve en uygun IS olarak AGO olduğu görülmüştür. Kantitasyon hesaplamalarında bu nedenle pik normalizasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre etken maddenin alıkonma zamanının pik alanına oranı ile IS'nin alıkonma zamanının pik alanına oranı birbirlerine oranlanmış ve dedektör yanıtı olarak bu değer kabul edilmiştir. X ekseninde ise madde miktarı yerine TSM derişimi alınmıştır. Ancak metot optimizasyonu gibi sistem uygunluk parametreleri incelenirken AGO içinde değerlendirmeler ayrıntılı olarak yapılmıştır.

Pik normalizasyon yöntemi kullanılarak yapılan doğrusallık ve kesinlik verileri Tablo 5.4'de verilmiştir. Geliştirilen yöntem 10,0-75,0 µg/mL için doğrusal olup ilişki lineer ve korelasyon katsayısı ise >0,99 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin kesinliği için pik alanlarının %BSS değeri gün içi için 0,27 ve günler arası ise 1,14 olarak bulunmuştur. Bu durumda yöntemin ilgili derişim aralığında uygulanabilir olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.4.** TSM için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	TSM
Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g/mL}$ )	10,0-75,0
Eğim $\pm$ SS <sup>a</sup> (Gün İçi, n=7)	0,024 $\pm$ 0,001
Kesim $\pm$ SS <sup>a</sup> (Gün İçi, n=7)	-0,009 $\pm$ 0,05
Tanımlayıcılık Katsayısı (Intraday, n=7)	0,9962
Teşhis sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,40
Tayin sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )	2,00
Eğim $\pm$ SH <sup>b</sup> (Günler Arası, k=3, n=21)	0,024 $\pm$ 0,001
Kesim $\pm$ SH <sup>b</sup> (Günler Arası, k=3, n=21)	-0,008 $\pm$ 0,05
Tanımlayıcılık Katsayısı (Günler Arası, k=3, n=21)	0,9929
ANOVA	F (2,15)=1,2 $\times$ 10 <sup>-5</sup> P =0,9999 (P>0,05)
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, Ortalama, n=6)	1,135
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, SS <sup>a</sup> , n=6)	0,003
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, BSS <sup>c</sup> %, n=6)	%0,27
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, OSH <sup>d</sup> , n=6)	0,001
Tekrarlanabilirlik (Gün İçi, GA <sup>e</sup> , n=6)	0,002
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası , Ortalama, n=9)	1,136
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, SS <sup>a</sup> , n=9)	0,003
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, BSS <sup>c</sup> %, n=9)	0,224
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, OSH <sup>d</sup> , n=9)	0,001
Tekrarlanabilirlik (Günler Arası, GA <sup>e</sup> , n=9)	0,001
ANOVA	F (2,15)=0,086 P =0,9181 (P>0,05)

<sup>a</sup> Standart sapma, <sup>b</sup> Standart hata, <sup>c</sup> Bağlı standart sapma, <sup>d</sup> Ortalamanın standart hatası, <sup>e</sup> %95 güven seviyesinde güven aralığı.

Geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinliğinin ortaya konması amacı ile etken maddenin ticari formülasyonu olan Hetlioz®’da geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Ancak ülkedeki ticari formülasyonun giriş izni problemleri nedeniyle ticari ürün preparatı satın alınamamış. Literatürde yer alan formülasyon bilgisinden elde araştırmacı tarafından hazırlanmıştır. Geri kazanım deneyleri için elde hazırlanan Hetlioz® tablet formülasyonu çözeltilisine standart ekleme metodu ile analit TSM’nin ve IS olarak AGO ilavesi yapılmıştır. Çalışma 3 farklı konsantrasyonda 9 bağımsız analiz ile gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım deneylerinden elde edilen veriler Tablo 5.5’de verildiği gibidir. Sonuçlar deneyde araştırmacı tarafından yapılan çözme, süzme ve pipetle gibi manipülasyonlardan bağımsız olarak yüksek doğruluk ve kesinlikte elde edilebilirliğini göstermektedir.

**Tablo 5.5.** Geri kazanım verileri (n = 3)

Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk	
			BSS (%)	Geri Kazanım (%)	Geri Kazanım (%)	Hata (%)
40,0	38,6±0,36	0,31	0,82	96,4	96,4	-3,6
50,0	49,0±0,26	0,23	0,46	97,9	97,9	-2,1
60,0	58,8±0,34	0,30	0,51	98,0	98,0	-2,0

\*%95 Güven seviyesinde

Kalite kontrol analizlerinde diğer bir önemli nokta ise ara kesinlik çalışmasının yapılarak yöntemin cihaz, analizci ve ölçülü malzemelerden bağımsız olarak yüksek doğruluk ve kesinlikte başka bir laboratuvar tarafından da kullanılabileceğinin gösterilmesidir. Bu nedenle başka laboratuvarında bulunan Shimadzu marka Nexera XR Serisi LC-PDA cihazı ile laboratuvarlar arası karşılaştırması yapılarak ara kesinlik çalışmaları sunulmuştur. Bunun için aynı derişim aralığında hazırlanan kalibrasyon çözeltileri cihazda analiz edilerek yine pik normalizasyonu yöntemi ile analiz edilmiş ve Tablo 5.6’daki değerler hesaplanmıştır. Sonuçlar arası farklılıkta tek yönlü varyans analizi ANOVA ile hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra geri kazanım çözeltileri de analiz edilerek analizcinin aynı olması nedeni ile ara varyans olarak sunulmuştur. Üç tekrarlı 3 konsantrasyon seviyesinde ortalama tekrarlanabilirlik varyansı 0,435 olarak hesaplanmış olup limit değer olan %1,5 çok altındadır. Bu nedenle yöntemin ara kesinliğinin mükemmel olduğu söylenebilir.

**Tablo 5.6.** Ara kesinlik verileri (n = 3)

Parametre	
Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g/mL}$ )	10,0-75,0
Eğim $\pm$ SH (Gün İçi, n=7)	0,027 $\pm$ 0,001
Kesim $\pm$ SH (Gün İçi, n=7)	-0,022 $\pm$ 0,06
Tanımlayıcılık Katsayısı (İntraday, n=6)	0,9926
ANOVA	F (1,15)=0,07 P=0,9350 (P>0,05)

Yöntemin geçerliliğinin sağlanması için gerekli bir diğer parametre olan metot sağlamlığının elde edilebilmesi için metodun sınırlarının bilinmesi ve metodun bileşenlerinde meydana gelen ufak değişikliklere direnç gösterebilmesi gerekmektedir. Günümüzde kolon teknolojisinin gelişmiş olması ile birlikte kolonlar ayırım ve seçicilik konusunda daha iyi sonuçlar sunarken, metotta meydana gelen ufak değişikliklerden daha az etkilenir hale gelmişlerdir. Bu sebeple metot sağlamlığı daha çok metot sınırlarını ifade etmek için kullanılmaktadır. Çalışmada geliştirilen metot için sağlamlık çalışmaları gerçekleştirilmiş (n=3) ve kolon sıcaklığı ( $^{\circ}\text{C}$ ), akış hızı (mL/dk), hareketli faz, tampon çözelti oranı (%), dalga boyu (nm) parametrelerindeki fark olarak hesaplanmıştır. Elde edilen metot sağlamlık çalışmaları sonuçları Tablo 5.7’de verilmiştir.

**Tablo 5.7.** Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)

Değiştirilen Parametre	Alkonulma Zaman (dk)	%Fark (Ortalama $\pm$ GA*)	Alan	%Fark (ortalama $\pm$ GA*)
Kolon sıcaklığı ( $^{\circ}\text{C}$ )	32,0	3,46	246449	19,8 $\pm$ 0,7
	38,0	3,24	231877	-24,5 $\pm$ 0,5
Akış hızı (mL/dk)	0,45	3,67	341453	11,2 $\pm$ 0,5
	0,55	3,11	284330	-7,4 $\pm$ 0,1
Metanol %	66	2,15	236238	23,1 $\pm$ 0,8
	54	6,03	167651	45,4 $\pm$ 0,7
Dalga boyu (nm)	206	3,35	282589	-8,7 $\pm$ 0,8
	202	3,35	396683	29,2 $\pm$ 0,7

TSM’un metanol ile hazırlanmış 50,0 mg/mL standart çözeltisinin ve AGO’nun 33,0 mg/mL çözeltisinin yani kalibrasyon grafiğini %100’ne karşılık gelen derişimde çalışma çözeltileri hazırlanarak stabiliteleri farklı koşullar altında saklandıktan sonra

HPLC ile analiz edilmiştir. Farklı koşullar; kısa dönem kararlılık için 24 saat ve 48 saat oda sıcaklığı, uzun dönem kararlılık için 3 hafta  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de ve dondurma çözme kararlılığı için 3 tekrar yapılarak elde edilmiştir. Elde edilen her bir çözeltinin analizleri gerçekleştirilmiştir ve bu analizler %95 güven seviyesinde geri kazanımları ve %BSS sonuçları olarak değerlendirmeye alınmıştır. Tablo 5.8 bahsi geçen koşullar altında TSM çözeltilerinin stabil olduğunu göstermektedir.

**Tablo 5.8.** TSM standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları ( $n=6$ )

Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, oda sıcaklığı)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, $-20^{\circ}\text{C}$ )		Dondurma çözme kararlılığı (3 tekrar)	
Bulunan (Ortalama $\pm$ G A*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama $\pm$ GA*)	GK (%)
49,7 $\pm$ 0,2	99,4	49,8 $\pm$ 0,03	99,7	49,7 $\pm$ 0,01	99,4	49,9 $\pm$ 0,02	99,8

\*%95 Güven seviyesinde

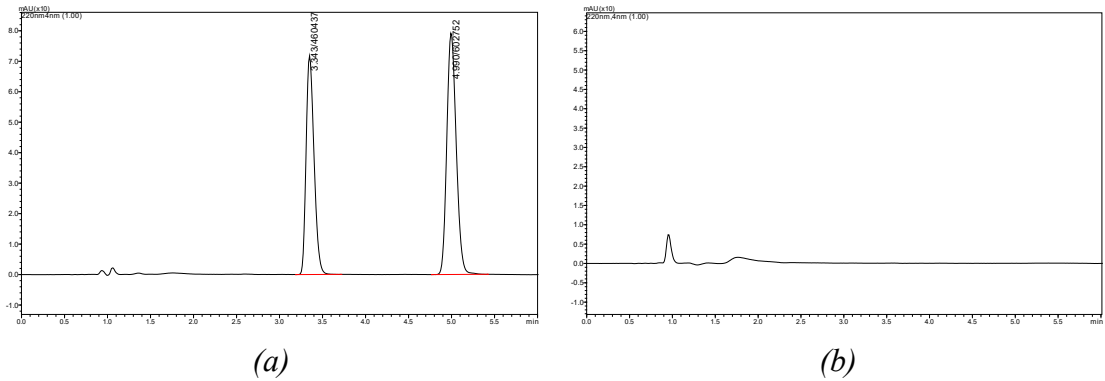
#### 5.4. Geliştirilen Yöntemin Yeşillik Değerlendirilmesi

Analitik eko ölçek yeşillik değerlendirme aracı, ceza puanlarının toplamını 100 değerinden çıkararak ve daha sonra bu matematiksel sürecin sonucuna göre analitik yöntemi değerlendiren bir matematiksel denkleme dayanır, böylece değerler en iyi ifadeyi ifade edecek şekilde 100 olur. İdeal yeşillendirme yöntemini ifade ederken, 75 ve üzeri değerler mükemmel yeşillendirme yöntemini ifade etmektedir. Dolayısıyla, 50 ila 75 arasında bir değere sahip olduğunda yöntem kabul edilebilir yeşil olarak kabul edilirken, 50'den küçük bir değere sahip olduğunda yöntem, dolayısıyla, yeşillik yöntemine katkı sağlamaz. Önerilen ve bildirilen HPLC yöntemlerine ilişkin ceza puanları ve AES hesaplamalarının sonucu Tablo 5.7'de sunulmaktadır. Yöntemin ceza puanı 12 olup yeşillik ölçüğü 88 olarak hesaplanmıştır. Yöntem mükemmel yeşillik kategorisindedir.

maddelerinin kimliği, saflığı, içeriği ve stabilitesi hakkında bilgi sağlamak için bir araya getirilir. Bu nedenle tüm bu emek, çaba ve zaman harcanmasının tek bir amacı vardır: hedefe yönelik gerçek numune analizleri. Bu çalışmada da benimsenen görüş doğrultusunda piyasada bulunan onaylı tek farmasötik formülasyon olan Hetlioz<sup>®</sup>'un analizlerini yapmak istenmiştir. İmkanlar dahilinde TSM'nin ticari farmasötik tablet formülasyonu olan Hetlioz<sup>®</sup> psödo formülasyonu sadece geri kazanım çalışmaları için değil aynı zamanda numune uygulamaları içinde hazırlanmış, analizleri yapılmış ve bu analizler ile geliştirilen metodun uygulanabilirliği gösterilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları ise Tablo 5.9'da verildiği gibidir. Ayrıca Şekil 5.8'de numune ve kör çözeltilerine ait kromatogramlar verilmiştir.

**Tablo 5.9.** Elde hazırlanmış Hetlioz<sup>®</sup> formülasyonu sonuçları (n=6)

Hesaplanan	Miktar
Ortalama (mg)	19,89
Minimum (mg)	19,81
Maksimum (mg)	19,94
Standart sapma (mg)	0,04
%BSS	0,21
OSH (mg)	0,02
%Bias	-0,11
Güven aralığı	95±0,03



**Şekil 5.8.** Hetlioz<sup>®</sup> psödo formülasyon (a) ve kör çözeltilerinin (b) kromatogramları

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

BBD, analitik yöntemler için kromatografik koşulların optimizasyonunda yararlı bir yaklaşımdır. BBD tabanlı optimizasyon bloklar halinde birleştirilmiş üç faktörlü analize dayanmaktadır. Diğer yaklaşımlarla karşılaştırıldığında BBD optimizasyonunda, optimizasyon için gereken toplam deney sayısı daha azdır. BBD, kromatografik parametrelerin optimizasyonu için bir teknik olarak kullanılabilir. Bir deneyde sonucun güvenilirliğini artırmak için QbD çok faydalı bir yöntemdir. HPLC analitik tekniğiyle yöntem geliştirme ve doğrulamada, QbD tarafından optimize edilen kromatografik koşullar hem maliyet hem de zaman tasarrufu sağlar ve bu da rutin analizler için çok faydalıdır. HPLC yönteminin geliştirilmesi için bu çalışmada ön tarama çalışmaları bir kromatografik parametrenin sürekli olarak değiştirilmesiyle pik alanının yeterli bir çözünürlüğü gözlemlenene kadar bir dizi deneyin gerçekleştirildiği deneme yanılma veya her seferinde tek faktör yaklaşımını takip edilmiştir. Ardından etkisi fazla ve önemli olan üç bağımsız değişken tespit edilip BBD ile başarılı bir şekilde optimize edilmiştir. Kurulan model 5 yanıt için oluşturulmuş modelin uygunluğu korelasyon katsayısı ve varyans analizi ANOVA ile gösterilmiştir. Ayrıca modelin sınırları görseli yanıt yüzey grafikleri ile gösterilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada AES, GAPI, AGREE olmak üzere üç değerlendirme metriği aracılığıyla yeşillik profilini değerlendirmesi yapılmıştır. Üç ölçümün karşılaştırılması, incelenen yöntemlerin çevreyi nasıl etkilediğine ilişkin bilgileri analiz ederken AGREE ve AES ölçümlerinin kullanımının basit olduğunu göstermektedir. AES, üretilen atık miktarının yanı sıra tüketilen kimyasal miktarları, zaman ve enerji ile ilgili özelliklerin bazı niceliksel analizini sağlar. Ancak, analitik sürecin hangi aşamasının çevreye zarar verdiği yalnızca skordan anlaşılamaz. GAPI endeksi, analitik eko-ölçeğe kıyasla analitik prosedürün tamamını kapsama avantajına sahiptir. AGREE aracından elde edilen sonuçlar çok açıktır ve ücretsiz yazılım sürümü, AES'ten daha uygulanabilir, dijital olarak renkli bir piktogram sağlar.

Önerilen metot çalışma zamanı, solvent tüketimi, seçicilik, enstrümantal teknikler (HPLC), ilaç ürününün uygulanabilirliği ve ilaç maddesi dikkate alındığında bildirilen diğer yöntemlerden daha iyidir. Geliştirilen yöntemin doğruluk, özgüllük, doğruluk, sağlamlık ve sağlamlık açısından geçerli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ara kesinlik çalışmaları ile tekrarlanabilirlik varyansları hesaplanarak önerilen yöntemin sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bildirilen yöntemler bunları eş zamanlı

olarak geniş bir doğrusallık, doğruluk ve makul tutma süresi aralığıyla belirleyebilirken, yeşil yöntem çevreye daha az zarar verdiği için daha çok tercih edilir. Önerilen kalite kontrol HPLC yöntemi, analitik işlemlerin çevre dostu olması (numune hazırlama ve analiz), onaylanmış sistem uygunluk parametreleriyle yöntemin etkinliği, yeterli çalışma süresi ve maliyetler ile tehlikeli atıkların yönetimi gibi farklı parametreler arasında denge sağlar. Bu kadar büyük avantajlara rağmen, birçok araştırma laboratuvarında UV dedektörlü HPLC'nin bulunmasına yapılan sermaye yatırımı, basit, nispeten hızlı HPLC tahlilimizi, kaynakları sınırlı olan ülkelerin kalite kontrol laboratuvarlarında kabul edilebilir bir alternatif haline getirmektedir.



## KAYNAKÇA

- Al-Hazmi, H., Namiesnik, J., Tobiszewski, M. (2016). Application of TOPSIS for selection and assessment of analytical procedures for ibuprofen determination in wastewater. *Current Analytical Chemistry*, 12 (4), 261-267.
- Demir, Ö., Aksu, B., Özsoy, Y. (2017). İlaç formülasyonu geliştirilmesinde deney tasarımı (doe) seçimi ve kullanımı.
- Dhillon, S., Clarke, M. (2014). Tasimelton: first global approval. *Drugs*, 74, 505-511.
- Drake, R.E., Mueser, K.T., Brunette, M.F., McHugo, G.J. (2004). A review of treatments for people with severe mental illnesses and co-occurring substance use disorders. *Psychiatric rehabilitation journal*, 27 (4), 360.
- Ferreira, S.C., Bruns, R., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J., Brandão, G., da Silva, E.P., Portugal, L., Dos Reis, P., Souza, A. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597 (2), 179-186.
- Filiz, O., Can, K.R., Bilgiç, S., Şenel, S. İlaç Endüstrisinde Proses Validasyonu ve Tasarımla Kalite (QbD) Yaklaşımı. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47 (2), 241-264.
- Fukuda, I.M., Pinto, C.F.F., Moreira, C.d.S., Saviano, A.M., Lourenço, F.R. (2018). Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 54
- Gaber, Y., Törnvall, U., Kumar, M., Amin, M.A., Hatti-Kaul, R. (2011). HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): a tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. *Green chemistry*, 13 (8), 2021-2025.
- Guideline, I.H.T. (2005a). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, 1 (20), 05.
- Guideline, I.H.T. (2005b): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. pp. 11-12.

- Hawley, N.C. (1917). The United States Pharmacopoeia and National Formulary. *The American Journal of Nursing*, 17 (7), 645-646.
- Imam, M.S., Abdelrahman, M.M. (2023). How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, e00202.
- Jacquemin, L., Pontalier, P.-Y., Sablayrolles, C. (2012). Life cycle assessment (LCA) applied to the process industry: a review. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 17, 1028-1041.
- Lankford, D.A. (2011). Tasimelton for insomnia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 20 (7), 987-993.
- Liu, K., Zhou, X., Xu, Z., Bai, H., Zhu, J., Gu, J., Tang, G., Liu, X., Hu, X. (2018). Anhydrates and hemihydrate of tasimelton: Synthesis, structure, and pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 235-243.
- Naik, U.V., Umekar, M.J., Lohiya, R.T. (2018). DEVELOPMENT OF NOVEL UV SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR THE ESTIMATION OF TASIMELTEON.
- Neubauer, D.N., BaHamam, A.S., Pandi-Perumal, S.R. (2015). Tasimelton. *Drug Treatment of Sleep Disorders*, 261-269.
- Nowak, P.M., Kościelniak, P., Tobiszewski, M., Ballester-Caudet, A., Campíns-Falcó, P. (2020). Overview of the three multicriteria approaches applied to a global assessment of analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116065.
- Özcan, S., Levent, S., Geven, A., Özkay, Y., Can, N.Ö. (2020). Stability-indicating LC-MS/MS and LC-DAD methods for robust determination of tasimelton and high resolution mass spectrometric identification of a novel degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 191, 113490.
- Pehlivanoğlu, H., Andaç. 68Ga-PSMA-11 Üretimine ve radyokimyasal saflık analizine tasarımıyla kalite (QBD).

- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENess metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92 (14), 10076-10082.
- Pramod, K., Tahir, M.A., Charoo, N.A., Ansari, S.H., Ali, J. (2016). Pharmaceutical product development: A quality by design approach. *International journal of pharmaceutical investigation*, 6 (3), 129.
- Rahman, Z., Zidan, A.S., Habib, M.J., Khan, M.A. (2010). Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett–Burman design. *International journal of pharmaceuticals*, 389 (1-2), 186-194.
- Reyes, V., Martínez, O., Hernández, G. (1923). National center for biotechnology information. *Plant Breeding. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro*,
- Richardson, G.S., Moore-Ede, M.C., Czeisler, C.A., Dement, W.C. (1985). Circadian rhythms of sleep and wakefulness in mice: analysis using long-term automated recording of sleep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 248 (3), R320-R330.
- Sajid, M., Płotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238, 123046.
- Shi, M., Zheng, X., Zhang, N., Guo, Y., Liu, M., Yin, L. (2023). Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117211.
- Sogut, O., Çelebi, B. (2020). Daha temiz analizler: yeşil kimya. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8 (1), 160-175.
- Swanson, M.B., Davis, G.A., Kincaid, L.E., Schultz, T.W., Bartmess, J.E., Jones, S.L., George, E.L. (1997). A screening method for ranking and scoring chemicals by potential human health and environmental impacts. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16 (2), 372-383.
- Torres, R., Kramer, W.G., Baroldi, P. (2015). Pharmacokinetics of the dual melatonin receptor agonist tasimelteon in subjects with hepatic or renal impairment. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 55 (5), 525-533.

Verme, S.S.Ç.K.K. Sağlık Hizmetlerinde Kuram ve Uygulama Dergisi.

Yadlapalli, S.S.R., Karra, V.K., Kommineni, V., Katari, N.K., Manabolu Surya, S.B. (2019). Bioanalytical technique for determination of tasimelteon in human plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetic study in humans. *Biomedical Chromatography*, 33 (3), e4431.

Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 32, 243-259.

Zhang, Z., Xiaofeng, B. (2009): Comparison about the three central composite designs with simulation. 2009 International Conference on Advanced Computer Control. IEEE, pp. 163-167.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Elif Özge ERKAN

### Eğitim Durumu

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2021)

Lise : Şehit Abdullah Ümit Sercan Anadolu Lisesi (2014)

Yabancı Diller : İngilizce

### Mesleki Deneyim

- Stajyer Kimyager, Santa Farma İlaç San. A.Ş. , Gebze, 2018