

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPIYONAT'IN
BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
İLE AYNI ANDA ANALİZLERİ

Kim. Müh. Pelin GENÇER

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPIYONAT'IN
BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
İLE AYNI ANDA ANALİZLERİ

Kim. Müh. Pelin GENÇER

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ

ANKARA
2023

ONAY SAYFASI

**BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPIYONAT'IN
BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
İLE AYNI ANDA ANALİZLERİ
Kim. Müh. Pelin GENÇER**

Bu tez çalışması 04.01.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Nursabah E. Başçı Akduman (Hacettepe Üniveristesi)
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. İncilay Süslü (Hacettepe Üniveristesi)
Üye:	Prof. Dr. Emirhan Nemutlu (Hacettepe Üniveristesi)
Üye:	Doç. Dr. Mustafa Çelebier (Hacettepe Üniveristesi)
Üye:	Prof. Dr. İ. Murat Palabıyık (Ankara Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

Kim. Müh. Pelin GENÇER

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir
*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde hiçbir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

.....

Kim. Müh. Pelin GENÇER

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum yüksek lisans tezimin her aşamasında sahip olduğu değerli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan, tez çalışmam boyunca, bilgilerini, deneyimlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. İncilay Süslü'ye,

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman, Sayın Prof. Dr. Sedef Kır, Sayın Prof. Dr. Emirhan Nemutlu ve Sayın Doç. Dr. Mustafa Çelebier Hocalarıma,

Lisansüstü eğitimimi destekleyen ve laboratuvar çalışmalarım süresince gerekli olan tüm imkanları sağlayan Genel Müdürü'müz Sayın Dr. Fırat Yerlikaya'ya ve Elixir İlaç Araştırma ve Geliştirme ailesine,

Tüm eğitim hayatım süresince özveriyle desteklerini benden esirgemeyen aileme, yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan eşim Gencay Genç'er'e ve oğlum Vural Ege Genç'er'e teşekkür ederim.

ÖZET

Gençer, P. Betametazon Sodyum Fosfat ve Betametazon Dipropiyonat'ın Bozunma Ürünlerinin Varlığında Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Aynı Anda Analizleri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Steroidler hücrelerde iltihabı arttırmaya aracılık eden proteinleri baskılamaktadır. Kortikosteroidler, adrenal korteksten salgılanan steroid yapıda hormonlardır. Kortikosteroidler anti-inflamatuvar etkilerinden dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Betametazon, esas olarak glukokortikoid görevi gören bir kortikosteroiddir. Bu çalışmada, enjekte edilebilir süspansiyon halindeki farmasötik preparatlarda bulunan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat ve koruyucu maddelerin analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Önerilen yöntem, farklı kolonlar, hareketli faz bileşimleri ve iyon çifti ajanları kullanılarak optimize edilmiştir. Söz konusu etkin madde ve koruyucu maddelerin analizleri, Zorbax XDB C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm kolon, iyon çifti ajanı olarak hekzilamin içeren pH: 4.0 fosfat tamponu : asetonitrilden oluşan hareketli fazı kullanılarak gradient elüsyon ile, 1.0 mL/dk akış hızında ve 254 nm dalga boyunda yapılmıştır. Ayrıca yöntemin seçiciliğini göstermek için stres testi çalışmaları da yapılmıştır. Geliştirilen analitik yöntem seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, tutarlılık ve sağlamlık parametreleri uygulanarak valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen analitik yöntemin betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat etkin maddeleri ile benzil alkol, metil paraben ve propil paraben koruyucu maddelerinin aynı anda analizlerinde kullanılabileceği önerilmiştir. Valide edilen kromatografik yöntem, söz konusu iki etkin madde ve koruyucu maddeleri içeren farmasötik preparatın analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Betametazon sodyum fosfat, Betametazon dipropiyonat, Bozunma ürünleri, Yüksek Basınçlı Sıvı kromatografisi, Validasyon, Farmasötik preparat.

ABSTRACT

Gençer, P. Simultaneous Analysis of Betamethasone Sodium Phosphate and Betamethasone Dipropionate in the Presence of Degradation Products by High Performance Liquid Chromatography, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master's Thesis, Ankara, 2023. Steroids suppress proteins that mediate increased inflammation in cells. Corticosteroids are steroid hormones secreted from the adrenal cortex. Corticosteroids are widely used all over the world due to their anti-inflammatory effects. Betamethasone is a corticosteroid that acts primarily as a glucocorticoid. In this study, high performance liquid chromatography method was developed and validated for the determination of betamethasone sodium phosphate, betamethasone dipropionate and preservatives in pharmaceutical preparations as injectable suspension. The proposed method was optimized by using different columns, mobile phase compositions and ion pair reagents. The analysis of these active substances and preservatives were performed on Zorbax XDB C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m column, using composed of pH: 4.0 phosphate buffer : acetonitrile containing hexylamine as ion pair reagent by gradient elution, flow rate of 1.0 mL/min and wavelengths of 254 nm. In addition, stress test studies were also carried out to show the selectivity of the method. The developed analytical method was validated by applying the parameters of selectivity, linearity, accuracy, precision, ruggedness, and robustness. It has been suggested that the developed and validated analytical method can be used in the simultaneous analysis of betamethasone sodium phosphate, betamethasone dipropionate active substances and benzyl alcohol, methyl paraben and propyl paraben preservatives. This validated method was successfully applied to the pharmaceutical preparation containing these two active substances and preservatives.

Keywords: Betamethasone sodium phosphate, Betamethasone dipropionate, Degradation products, High Performance Liquid Chromatography, Validation, Pharmaceutical preparation.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kortikosteroidler	4
2.2. Tezde Kullanılan Etkin Maddeler	5
2.2.1. Betametazon Sodyum Fosfat	5
2.2.2. Betametazon Dipropiyonat	6
2.3. Betametazon Sodyum Fosfat ve Betametazon Dipropiyonat'ın Analiz Yöntemi	11
2.4. Kromatografi	14
2.4.1. Kromatografi Türleri	16
2.5. Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	18
2.5.1. Hareketli Faz Rezervuarı	19
2.5.2. Pompa	20
2.5.3. Örnekleyici	20
2.5.4. Kolon ve Kolon Fırını	21
2.5.5. Dedektör	22
2.6. Yazılım	23
2.7. Kromatografik Parametreler (48, 49)	23
2.8. Farmasötik Safsızlıklar	29

2.8.1. Safsızlık Kaynakları	30
2.8.2. Bozunma Ürünleri	33
2.8.3. Stres Testleri	34
2.9. Analitik Yöntem Validasyonu	37
2.9.1. Sistem Tekrarlanabilirliği	38
2.9.2. Seçicilik (Özgünlük)	38
2.9.3. Doğrusallık ve Aralık	39
2.9.4. Tespit Sınırı (LOD)	40
2.9.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	40
2.9.6. Doğruluk	41
2.9.7. Kesinlik ve Ara Kesinlik	41
2.9.8. Sağlamlık	42
2.9.9. Kararlılık	42
2.9.10. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Çözeltilerin Hazırlanması	45
3.2. Kromatografik Koşullar	50
3.3. Analiz Yönteminin Validasyon Çalışmaları	50
3.4. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	54
4. BULGULAR	55
4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyonu	55
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi	55
4.1.2. Sabit Fazın Belirlenmesi	57
4.1.3. Hareketli Faz A'nın Belirlenmesi	58
4.1.4. Seyreltme Çözeltisi Seçimi	61
4.1.5. Filtre Seçimi	63
4.2. Validasyon Çalışmaları	65
4.2.1. Sistem Tekrarlanabilirliği	65
4.2.2. Seçicilik	65
4.2.3. Doğrusallık ve Aralık	73

4.2.4. Tespit Sınırı (LOD)	79
4.2.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	80
4.2.6. Doğruluk	81
4.2.7. Kesinlik ve Ara Kesinlik	89
4.2.8. Sağlamlık	91
4.2.9. Kararlılık	95
4.2.10. Sistem Uygunluk Testleri	96
4.3. Farmasötik Preparat Analizlerine İlişkin Bulgular	97
5. TARTIŞMA	98
5.1. Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu	99
5.2. Kromatografik Yöntemin Validasyonu	101
5.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	106
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	107
7. KAYNAKLAR	109
8. EKLER	114
Ek 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
Ek 2. Orjinallik Raporu	
Ek 3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
C8	Oktildimetilsilan
C18	Oktadesilmetilsilan
DAD	Diyot Dizi Dedektörü
dk	Dakika
EP	Avrupa Farmakopesi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
mL	Mililitre
N	Teorik plaka sayısı
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PAO	Pik asimetri oranı
R_s	Ayrıcılık
RRT	Bağıl alıkonma zamanı
S/G	Sinyal/Gürültü
SS	Standart sapma
t_R	Alıkonma zamanı
UV	Mor ötesi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Betametazon sodyum fosfatın kimyasal yapısı (24).	6
2.2. Betametazon dipropiyonatın kimyasal yapısı (27).	7
2.3. Kolon kromatografisinde kromatografik ayırımın şematik gösterimi (40).	14
2.4. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.	15
2.5. HPLC cihazının genel olarak şematik gösterimi (46).	19
2.6. Kromatografik ayırım tekniklere ilişkin görsel.	25
2.7. Simetri faktörüne ilişkin görsel (48).	26
2.8. Pikin vadiye oranının şematize edilmesi (48).	27
2.9. Sinyal/gürültü oranının şematize edilmesi (48).	28
2.10. İlaç etkin maddesi ve formülasyonuna uygulanan stres testleri (75).	35
4.1. Betametazon sodyum fosfata ait spektrum.	56
4.2. Betametazon dipropiyonata ait spektrum.	56
4.3. Benzil alkole ait spektrum.	56
4.4. Metil parabene ait spektrum.	57
4.5. Propil parabene ait spektrum.	57
4.6. C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile yapılan standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Hareketli Faz A: Hekzilamin içeren pH: 4.0 tamponu, Hareketli faz B: Asetonitril).	58
4.7. C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile yapılan standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Hareketli Faz A: Hekzilamin içeren pH: 4.0 tamponu, Hareketli faz B: Asetonitril).	58
4.8. pH: 7.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.	59
4.9. pH: 3.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.	59
4.10. pH: 4.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.	60
4.11. pH: 4.0 olan hareketli faza trietilamin eklendiğinde elde edilen kromatogram.	61
4.12. pH: 4.0 olan hareketli faza hekzilamin eklendiğinde elde edilen kromatogram.	61
4.13. Su : asetonitril (50 : 50, h/h) seyreltme çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.	62

4.14.	Su : asetonitril (70 :30, h/h) seyreltme çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.	62
4.15.	Su : asetonitril (65 : 35, h/h) kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.	63
4.16.	pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.	63
4.17.	Çözücüye ait kromatogram.	66
4.18.	Betametazon dipropiyonat asit bozundurmasına ait kromatogram.	66
4.19.	Betametazon sodyum fosfat asit bozundurmasına ait kromatogram.	67
4.20.	Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.	67
4.21.	Betametazon dipropiyonat baz bozundurmasına ait kromatogram.	68
4.22.	Betametazon sodyum fosfat baz bozundurmasına ait kromatogram.	68
4.23.	Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.	69
4.24.	Betametazon dipropiyonat peroksit bozundurmasına ait bozunma ürünleri miktar tayini kromatogramı.	69
4.25.	Betametazon sodyum fosfat peroksit bozundurmasına ait kromatogram.	70
4.26.	Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.	70
4.27.	Betametazon dipropiyonat ısı bozundurmasına ait kromatogramı.	71
4.28.	Betametazon sodyum fosfat ısı bozundurmasına ait kromatogram.	71
4.29.	Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.	72
4.30.	Betametazon dipropiyonat ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.	72
4.31.	Betametazon sodyum fosfat ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.	73
4.32.	Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.	73
4.33.	Doğrusal regresyon analizi sonucunda betametazon sodyum fosfat için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	74
4.34.	Doğrusal regresyon analizi sonucunda betametazon dipropiyonat için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	75
4.35.	Doğrusal regresyon analizi sonucunda benzil alkol için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	75
4.36.	Doğrusal regresyon analizi sonucunda metil paraben için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	76
4.37.	Doğrusal regresyon analizi sonucunda propil paraben için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	76
4.38.	Betametazon sodyum fosfat için doğrusallık kontrolü grafiği.	77

4.39.	Betametazon dipropiyonat için doğrusallık kontrolü grafiği.	77
4.40.	Benzil alkol için doğrusallık kontrolü grafiği.	78
4.41.	Metil paraben için doğrusallık kontrolü grafiği.	78
4.42.	Propil paraben için doğrusallık kontrolü grafiği.	79
4.43.	Diprosan® adlı farmasötik ürünün analizi sonucu elde edilen kromatogram.	97



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kromatografinin sınıflandırılması.	16
2.2. Bekleme hacminin belirlenmesine ilişkin gradient programı.	25
2.3. Avrupa farmakopesinde yer alan sistem tekrarlanabilirliği kriterleri.	28
2.4. Sistem Uygunluk Testlerine ait kabul kriterleri (48, 80).	43
3.1. Tez çalışmasında kullanılan etkin maddeler ve koruyucu maddeler.	44
3.2. Tez çalışmasında kullanılan farmasötik preparatlar.	44
3.3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.	44
3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.	44
3.5. Tez çalışmasında kullanılan cam malzemeler.	45
3.6. Analizde kullanılan gradient programı.	50
4.1. Farklı pH'larda hareketli faz A kullanıldığında elde edilen ayırıcılık değerleri	60
4.2. Etkin maddeler için filtre seçimi sonuçları.	64
4.3. Koruyucu maddeler için filtre seçimi sonuçları.	64
4.4. Standart çözeltinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri.	65
4.5. Standart çözeltinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alıkonma zamanları.	65
4.6. Etkin madde ve koruyucu maddelere ait µg/mL cinsinden derişim aralıkları.	74
4.7. Etkin madde ve koruyucu maddelerin kalibrasyon eğrilerine ait veriler.	79
4.8. Betametazon sodyum fosfata ait tespit sınırı sonuçları (n = 6).	80
4.9. Betametazon dipropiyonata ait tespit sınırı sonuçları (n = 6).	80
4.10. Betametazon sodyum fosfata ait tayin alt sınırı sonuçları (n = 6).	81
4.11. Betametazon dipropiyonata ait tayin alt sınırı sonuçları (n = 6).	81
4.12. Betametazon sodyum fosfat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6).	82

4.13.	Betametazon dipropiyonat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6).	82
4.14.	Benzil alkol için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	83
4.15.	Metil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	84
4.16.	Propil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	85
4.17.	Betametazon sodyum fosfat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6).	85
4.18.	Betametazon dipropiyonat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n=6).	85
4.19.	Benzil alkol için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	86
4.20.	Metil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	86
4.21.	Propil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	86
4.22.	Betametazon sodyum fosfata ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).	86
4.23.	Betametazon dipropiyonata ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).	87
4.24.	Benzil alkole ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).	87
4.25.	Metil parabene ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).	88
4.26.	Propil parabene ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).	88
4.27.	Etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait standart ekleme yönteminden elde edilen sonuçlar (n = 6).	89
4.28.	Betametazon sodyum fosfata ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	90
4.29.	Betametazon dipropiyonata ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	90
4.30.	Benzil alkole ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	90
4.31.	Metil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	91
4.32.	Propil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	91
4.33.	Betametazon sodyum fosfata ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	92
4.34.	Betametazon dipropiyonata ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	92
4.35.	Benzil alkole ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	93
4.36.	Metil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	94
4.37.	Propil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	94
4.38.	Standart çözeltideki etkin maddelere ait kararlılık verileri.	95

4.39.	Standart çözeltideki koruyucu maddelere ait kararlılık verileri.	95
4.40.	Numune çözeltisindeki etkin maddelere ait çözelti kararlılık verileri.	96
4.41.	Numune çözeltisindeki etkin maddelere ait çözelti kararlılık verileri.	96
4.42.	Standart çözeltilerin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen N sayıları.	96
4.43.	Standart çözeltilerin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen T faktörleri.	97
4.44.	Referans ürüne (Diprosan®) ait analiz sonuçları (n = 6).	97



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kortikosteroidler anti-inflamatuvar etkilerinden dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kortikosteroidler, adrenal korteksten salgılanan steroid yapıda hormonlardır. Steroidlerin insan vücudunda önemli görevleri olup bunlardan en önemlisi, hücrelerde iltihabı arttırmada etkili olan proteinleri baskılamalarıdır ve bu etkilerinden dolayı çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. Kortikosteroid grubu ilaçlar, anti-inflamatuvar, anti-alerjik, immünosupresif ve hemen hemen her organda etkileri olduğu için çok kullanılırlar. Anti-inflamatuvar ve immünosupresif özellikleri nedeniyle romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, astım, artrit, alerjik hastalıklar, anafilaktik şok, nörolojik hastalıklar, çeşitli enfeksiyonlar, crohn hastalığı, ülseratif kolit, hepatik nekroz, kronik aktif hepatit, lenfoma, lösemi, multipl skleroz, psöriyazis ve egzama gibi hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (1-6).

Betametazon, esas olarak glukokortikoid görevi gören bir kortikosteroiddir. Enjekte edilebilir süspansiyon halinde bulunan ticari formülasyonu; betametazonun, iki ester bileşiği olan betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat esterlerinin kombinasyonunu içeren su bazındaki steril bir farmasötik formdur. Betametazondaki hemen etki, hızla çözünen şekli olan betametazon sodyum fosfat tarafından sağlanır. Suda çok az çözünen betametazon dipropiyonat enjeksiyon yerinden çok yavaş emilir ve uzun süre etki göstererek semptomları kontrol eder (7).

Metil paraben ve propil paraben, kozmetik, gıda ürünleri ve farmasötik formülasyonlarda antimikrobiyal koruyucu olarak yaygın olarak kullanılırlar. Tek başına, parabenlerle veya diğer antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilir (8).

İlaç şekillerinin tasarımında ve geliştirilmesinde en önemli noktalardan biri etkin maddenin ve ürünün stabilitesidir. Stabilité en önemli bir göstergesi olup bir ilacın dayanıklı olması, üretimi, depolaması, nakli, hastane veya eczanede saklama ve kullanım süresince üretildiği tarihteki özelliklerinin önceden belirlenmiş sınırlar içinde kalması olarak tanımlanır. Stabilité testlerinde amaç; etkin maddenin veya bitmiş ürünün kalitesinin sıcaklık, ışık ve nem gibi birçok çevresel faktörün etkisinde zamanla nasıl değiştiğine dair kanıt sunmak, etkin

madde için tekrar test süresini, bitmiş ürün için raf ömrünü ve önerilen saklama koşullarını belirlemektir.

Bozunma ürünleri, bir molekülde zamanla oluşan kimyasal değişimden, ısı, ışık, pH ve nem gibi birçok faktörün etkisiyle, yardımcı madde veya birincil ambalaj malzemesiyle reaksiyonu ile oluşan moleküllerdir. İlaç ürünlerinin üretimi, taşınması, depolanması sırasında gelişebilen ve farmasötik ürünlerin etkinliğini etkileyebilecek istenmeyen kimyasallardır. İlaç maddelerinin üretimi ve depolanması sırasında oluşan bozunma maddelerinin belirlenmesi amacıyla stres çalışmaları yapılmaktadır. İlaçtaki olası safsızlık ve bozunmaların belirlenmesi hastanın sağlığı ve ilaç etkinliği için önemlidir. Küçük miktarlarda olsalar bile safsızlıkların bulunması, ilacın hem etkinliğini hem de güvenilirliğini etkileyebilmektedir ve istenmeyen farmakolojik ve toksikolojik etkilere neden olabilmektedirler. Bu nedenle ilaçlarda bulunan safsızlıkların tanımlanması, tayini ve miktarlarının bulunması oldukça önemlidir. Stres testleri, olası bozunma ürünlerini ortaya çıkarmak için yapılan analizlerdir ve ilacın stabilitesinin yani kararlılığının ortaya konulması için önemlidirler. Stres testleri, etkin maddelerin farklı koşullardaki parçalanma ürünleri ve parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi verir. Etkin maddenin, bozunma ürünlerinin, üretimden gelen safsızlıkların, yardımcı maddelerin veya diğer potansiyel safsızlıkların varlığında, girişim olmadan doğru olarak analizi önemlidir (8-10). Etkin madde, bitmiş ürün ve plaseboda oluşabilen olası bozunma ürünlerinin tayininde kullanılacak koşullar kılavuzlarda (ICH Q1A ve ICH Q1B) belirtilmiştir (10-15).

Bir yöntemin validasyonu yani geçerliliği; geliştirilen analitik yöntemin kullanımının uygun olup olmadığını göstermek için yapılır. İlaç üretimi ve kalite kontrolü aşamalarında, uygulanan tüm işlemlerin doğru ve güvenilir olduğunu gösterir. Yöntem validasyonu, geliştirilen bir analiz yönteminin o andaki ve sonraki kullanımlarında geçerli olduğunu göstermektedir. Yöntem validasyonu parametreleri; kararlılık, seçicilik, doğrusalılık, aralık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve tutarlılıktır (16-18). Geliştirilen bir analitik yöntemin uygun olduğunu belirleyen parametreler Uluslararası Uyum Konseyi (ICH)'de tanımlanmıştır (12).

Literatür araştırmasına göre, bozunma ürünlerinin varlığında, betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat ve koruyucuların bir arada analiz edildiği analitik bir

yönteme rastlanmamıştır. Bu amaçla, bozunma ürünlerinin varlığında, betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben'in yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile aynı anda analizi için optimum koşullar belirlenerek miktar tayini çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Bu iki etkin maddenin, plasebo ve farmasötik preparatın, kılavuzlarda verilen koşullarda stres testlerine tabi tutularak (asit, baz, ısı, nem ve oksidasyon işlemi uygulanarak) bozundurma çalışmaları gerçekleştirilecektir.

Geliştirilen analitik yöntemin, kılavuzlar doğrultusunda validasyon çalışmalarının yapılması ve validasyon parametrelerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda yöntemin seçici, doğru, kesin, tutarlı ve sağlam bir yöntem olduğunun gösterilmesi planlanmıştır. Elde edilen bulgular her aşamada uygun istatistiksel testlerle değerlendirilecektir.

Son olarak da geliştirilen ve valide edilen yöntemin, betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddelerini içeren farmasötik preparatlara uygulanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler, adrenal korteksten salgılanan steroid yapıda hormonlardır. Steroidlerin vücudumuzda önemli görevleri olup bunlardan en önemlisi, hücrelerde iltihabı arttırmada etkili olan proteinleri baskırlar ve bundan dolayı çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. Esas olarak karbonhidrat ve protein yıkımını uyarırlar, immün ve inflamatuvar cevaplarda düzenleyici rolleri vardır. Kan basıncını yükseltirler ve bağırsaktan kalsiyum emilimini azaltırlar (1-4). Anti-inflamatuvar, antialerjik, immünsupresif ve hemen hemen her organdaki etkilerinden dolayı kortikosteroidler, sıklıkla kullanılırlar.

Kortikosteroidlerin bilinen birçok etkisi bulunmaktadır (5, 6). Anti-inflamatuvar ve immünosupresif özelliklerinden dolayı romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı, astım, artrit, alerjik hastalıklar (ürtiker, anjioödem, kontakt dermatit, alerjik rinit), sistemik lupus eritromatozus, anafilaktik şok, nörolojik hastalıklar (akut omurilik zedelenmesi, intrakranial basınç artışı, beyin ödemi ve ensefalit), enfeksiyonlar (Hemofilus influenza tip B menenjit, tüberküloz menenjit), crohn hastalığı, ülseratif kolit, kronik aktif hepatit, subakut hepatik nekroz, lenfoma, lösemi, multipl skleroz, psöriyazis ve egzama gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılırlar (1, 2, 5, 6). Sıklıkla kullanılan kortikosteroid ilaçlar; beklometazon, kortizon, fludrokortizon, betametazon, türleri; hidrokortizon, kortizon asetat, prednizon, prednizolon, metilprednizolon, triamsinolon, betametazon, deksametazon, mometazon furoat, fludrokortizon, beklometazon dipropiyonat, flusinolon asetonid, prednikarbat, diflukortolon valerat, deflazakort, flumetazon pivalat, flunisolid, flutikazon propiyonat ve budesoniddir (3).

Kortikosteroidler birkaç şekilde ve genel olarak iki amaca yönelik uygulanırlar. Bir yıldan az olmak üzere kısa süre kullanıldığında, amaç hastalığın başlangıçta alevli semptomlarını kontrol etmek ve steroidle birlikte alınan ilacın etkisinin başlamasına kadar olan sürede hastayı rahatlatmaktır. Ayrıca kullanılan diğer ilaçların beklenen sürelerde etkisiz olması ya da yan etkilerin oluşması durumunda kullanılırlar (19).

Kortikosteroid tedavisinde yaşamı tehdit eden boyutlara ulaşabilen ciddi yan etkiler gözlenebilir. Bu nedenle, kortikosteroid tedavisine başlarken, her bir hasta için ilaçların risk ve yararları değerlendirilmelidir (19).

Kortikosteroidler, hastalık belirtileri kontrol altına alındığında hızla azaltılmalıdır. Doz azaltma işlemi hastalığa bağlı olarak değişir. Uzun dönem, orta dönem veya kısa dönem kortikosteroid kullananlarda, doz kontrolsüz olarak azaltılırsa çekilme sendromu, bitkinlik, halsizlik, iştahsızlık, bulantı ve kilo kaybı oluşabilir. Bu nedenle kortikosteroid dozu uygun zamanda ve kontrollü olarak azaltılmalıdır (20).

Çocuklarda kortikosteroidler kemik büyümesini inhibe eder ve büyüme geriliğine neden olurlar. Kortikosteroidler kısa süre içerisinde yüksek dozlarda iv infüzyonla verilerek de kullanılabilirler. Bu uygulamanın risk-yarar oranı bakımından olumlu olduğu ve yan etkisinin oldukça az olduğu gösterilmiştir (21, 22). Kortikosteroid ilaçlar topikal ya da inhalasyon yolu ile uygulandığında nadiren yan etkiler gözlenir; uzun süre yüksek dozlarda oral kullanıldığında ise hipertansiyon, şeker hastalığı, ödem, osteoporoz, peptik ülser, Cushing sendromu ve özellikle çocuklarda büyümeyi durdurma ve nadiren katarakt ve psikoza neden olur. Yüksek dozda kullanımları immün sistemini de bozar, ciddi enfeksiyon (tüberküloz ve sepsis) riskini artırır. İmmün sistemi baskılayıcı özellikleri de vardır. Uzun dönemli tedavide adrenal bezlerde kortikosteroid üretimini baskılayabilir ve ilacı aniden bırakmak yaşamı olumsuz olarak tehdit eden adrenal yetmezliğe yol açabilir.

2.2. Tezde Kullanılan Etkin Maddeler

Tez kapsamında kortikosteroid grubu ilaçlardan betametazon sodyum fosfat ve betamatazon dipropiyonatın farmasötik preparatlardan aynı anda koruyucu maddeler ve bozunma ürünlerinin varlığında analizleri gerçekleştirilecektir.

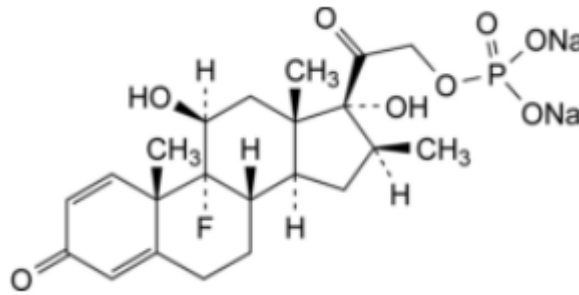
2.2.1. Betametazon Sodyum Fosfat

Betametazon sodyum fosfat, metabolik, immünosupresif ve anti-inflamatuvar etkilere sahip sentetik bir glukokortikoid olan betametazon'un 21-fosfat esterinin disodyum tuzudur. Betametazon sodyum fosfat, spesifik hücre içi glukokortikoid reseptörlerine

bağlanır ve ardından gen ekspresyonunu değiştirmek için DNA'ya bağlanır. Belirli iltihap önleyici proteinlerin sentezi indüklenirken, belirli iltihap araçlarının sentezi engellenir. Sonuç olarak, kronik inflamasyon ve otoimmün reaksiyonlarda genel bir azalma olur (23).

Betametazon sodyum fosfat, disodyum 9-floro-11 β ,17-dihidroksi-16 β -metil-3,20-dioksopregna-1,4-dien-21-il fosfat yapısındadır. $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ molekül formülüne sahiptir. Kimyasal formülü Şekil 2.1'de verilmiştir. Betametazon sodyum fosfat 516.4 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Beyaz veya neredeyse beyaz, çok higroskopik bir tozdur. Suda serbestçe çözünür, % 96'lık etanolde kısmen çözünür, metilen klorürde ise pratik olarak çözünmez (24).

Betametazon sodyum fosfat sulu çözeltide 1.18 ve -3.4 olmak üzere iki pKa değerine sahiptir (25).



Şekil 2.1. Betametazon sodyum fosfatın kimyasal yapısı (24).

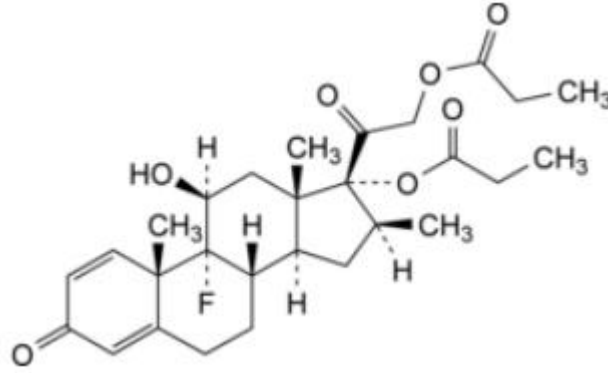
2.2.2. Betametazon Dipropiyonat

Betametazon dipropiyonat, metabolik, immünosupresif ve anti-inflamatuar etkilere sahip sentetik bir glukokortikoid olan betametazon'un 17,21-dipropiyonat esteridir. Betametazon dipropiyonat, spesifik hücre içi glukokortikoid reseptörlerine bağlanır ve ardından gen ekspresyonunu değiştirmek için DNA'ya bağlanır. Belirli iltihap önleyici proteinlerin sentezi indüklenirken, belirli iltihap araçlarının sentezi engellenir. Sonuç olarak, kronik inflamasyon ve otoimmün reaksiyonlarda genel bir azalma vardır (26).

Betametazon dipropiyonat etkin maddesi, 9-floro-11 β -hidroksi-16 β -metil-3,20-dioksopregna-1,4-dien-17,21-diyl dipropanoat yapısındadır. $C_{28}H_{37}FO_7$ molekül formülüne sahiptir. Kimyasal formülü Şekil 2.2'de verilmiştir. 504.6 g/mol molekül ağırlığına sahiptir.

Beyaz veya neredeyse beyaz, kristal tozdur. Suda pratik olarak çözünmez, aseton ve metilen klorürde serbestçe çözünür, % 96'lık etanolde az çözünür (27).

Betametazon dipropiyonat molekülünün pKa değeri 13.64'dür (28).



Şekil 2.2. Betametazon dipropiyonatın kimyasal yapısı (27).

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat'ın farmakolojik, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri aşağıdaki bölümlerde verilmiştir (23, 26, 29).

Betametazon, esas olarak bir glukokortikoid görevi gören bir kortikosteroiddir. Enjekte edilebilir süspansiyon halinde bulunan ticari formülasyonu; betametazonun, iki ester bileşiği olan betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat esterlerinin kombinasyonunu içeren su bazındaki steril bir farmasötik formdur. Betametazondaki hemen etki, hızla çözünen şekli olan betametazon sodyum fosfat tarafından sağlanır. Suda çok az çözünen betametazon dipropiyonat, enjeksiyon yapılan yerden çok yavaş emilir ve uzun süre etki göstererek semptomları kontrol eder (7).

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat; kas veya eklem içine, eklem çevresine, lezyon veya doku içine enjeksiyon ile uygulanır; fakat damar içine veya cilt altına enjekte edilmemelidir. İlacın uygulama dozu; hastalığın türüne ve alınan cevaba göre hastalar arasında farklı olabilir.

Aniden şiddetli semptomlarla başlayıp kısa veya uzun süren aşağıdaki hastalıklarda kullanılırlar:

- Çeşitli eklem hastalıkları (romatoid artrit, osteoartrit) ve romatizmal hastalıklarda,

- İltihap ile gözlenen diğer bazı kas ve iskelet sistemi hastalıkları (bursit, tendinit),
- Bazı alerjik durumlarda (anjiyoödem, astım),
- Alerjik cilt hastalıklarında (ekzema, sedef, ürtiker),
- Bazı hormonal hastalıklarda,
- Bağışıklık sistemi ile ilgili bazı hastalıklarda (kolajen doku hastalıkları).

Aşağıdaki belirtilen durumlarda ise ilaçların dikkatli kullanılması gerekir;

- Ciddi enfeksiyon, yaralanma veya ameliyat gibi durumlarda,
- Siroz, hipotiroidizm, gözde uçuk varsa,
- Duygusal bozukluk varsa,
- Kan pıhtılaşması problemi olan hipoprotrombinemili hastalarda asetil salisilik asit içeren ilaçlar ile birlikte kullanımında,
- Mide-bağırsak hastalıkları (ülseratif kolit, divertikülit), aktif veya aktif olmayan peptik ülser, apse ya da cerrahi enfeksiyon, yeni geçirilmiş bağırsak ameliyatı, yüksek tansiyon, böbrek yetmezliği, kemik erimesi olan hastalarda kortikosteroid kullanımına dikkat edilmelidir.

Kortikosteroidler, enfeksiyonların belirtilerini de maskeleyebilir. Uzun süre kullanıldıklarında, katarakt oluşumu veya göz içi basıncı artışına (glokom) neden olabilirler; ayrıca mantar ve virüslere bağlı göz enfeksiyonlarını kolaylaştırabilirler.

Sentetik kortikosteroidler yüksek dozlarda alındığında; hipertansiyona, vücutta tuz ve sıvı tutulmasına veya potasyum kaybına yol açabilirler.

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropionat içeren ilaçlar, enjeksiyon yerinden absorbe edilerek lokal ve sistemik terapötik etkiler oluştururlar. Oral veya parenteral olarak uygulanan betametazonun plazma yarılanma süresi, 300 dk veya daha fazladır. Karaciğer hastalığı olanlarda betametazon klirensi normal kişilere göre ise daha yavaştır.

Betametazon esas olarak albümin olmak üzere önemli düzeyde plazma proteinlerine bağlanır (konsantrasyon aralığının ortalaması: % 62.5) ve esas olarak albumine bağlanır.

Diğer glukokortikosteroidler gibi betametazon da karaciğerde metabolize olur.

Kortikosteroidlerin farmakodinamik etkileri, ölçülebilir plazma düzeyleri periyodundan da uzun sürdüğünden, total veya bağlanmamış kortikosteroid kan düzeyleri ile terapötik etkileri arasında herhangi bir spesifik ilişki gösterilmemiştir.

Bu etkin maddeleri içeren ilaçların yiyecek ve içeceklerle etkileşimi bulunmamaktadır.

Hamilelerde tıbbi zorunluluk dışında kullanılmamalıdır. Emzirme döneminde güvenilirliği bilinmediğinden; ilacın hasta için önemi, risk/yarar değerlendirilmesi yapılarak kullanılmalı, hamilelik döneminde kortikosteroidlerle tedavi uygulanması halinde doğum sırasında ve sonrasında hem anne hem de çocuk dikkatle izlenmelidir. Gebeliğinde yüksek dozlarda kortikosteroid kullanmış annelerin bebekleri, böbrek üstü bezinin yetersiz çalışması bakımından değerlendirilmelidir. Doğum öncesi döneminde annelere betametazon enjeksiyon uygulandığında, fetüsün adrenal bezlerinde üretilen kortikosteroidi düzenleyen hipofiz hormonları ve fetal büyüme hormonu geçici olarak baskılanır. Kortikosteroidlerin plasentaya geçişi söz konusu olduğu için gebeliğinde kortikosteroid kullanan annelerin yeni doğan bebekleri veya küçük çocukları, ender olarak görülen konjenital (doğumsal) katarakt olasılığı açısından değerlendirilmelidir.

Kortikosteroid türü ilaçlar, bebeklerde ve 3 yaşına kadar olan çocuklarda toksik ve alerjik reaksiyonlara neden olabilecek benzil alkol içerir. Bu nedenle erken doğan bebeklere ve yeni doğanlara uygulanmamalıdır. Kortikosteroidler, bebeklerin ve çocukların büyümesini yavaşlatabilir, uzun süreli tedavide büyüme ve gelişmeleri izlenmelidir.

Rifampin, fenobarbital, efedrin veya fenitoin ile birlikte kullanıldığında kortikosteroidlerin etkileri azalabilir. Kortikosteroid ile birlikte östrojen hormonu alanlarda ise kortikosteroid etkisi artabilir.

Kortikosteroidler, potasyum kaybına neden olan idrar söktürücü ilaçlar ile birlikte kullanıldığında, vücutta potasyum azlığı oluşabilir. Kalp yetersizliğinde, kalp glikozidleri ile

birlikte kullanıldıklarında ise potasyum azlığına bağlı olarak da ritim bozukluğu görülme riski artar.

Amfoterisin B adlı ilacın neden olduğu potasyum kaybını arttırırlar.

Kortikosteroidler, pıhtılaşmayı azaltan kumarin grubu ilaçlarla birlikte kullanıldıklarında, artış veya azalma şeklinde etkilerini değiştirebilirler.

Kortikosteroidler, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar ile birlikte kullanıldığında, sindirim sistemi ülserlerinin oluşma riski artar. Kanda aspirin ve benzeri ilaçların miktarını düşürebilir ve böylece etkisini değiştirebilirler.

Şeker hastalarında, ilaç dozunun yeniden ayarlanması gerekebilir. Kortikosteroidler ile birlikte alındığında, somatotropin adlı ilacın etkisinde azalma görülebilir.

Yumuşak dokuya veya hasta olan bölgeye uygulanan kortikosteroidler, lokal etki ile birlikte sistemik etkilere de neden olabilir. Yan etkiler, doz ve tedavi süresi ile ilgilidir. Yan etkileri azaltmak amacıyla, tedaviyi kesmek yerine, ilaç dozu düşürülmelidir.

İlaç kullanımına bağlı olarak görülen yan etkiler, diğer kortikosteroidler kullanıldığında görülenlere benzerdir. Yüz, dil veya boğazın şişmesi, körlük, tansiyon düşüklüğü, solunum ve yutma zorluğu, baş ağrısı, baş dönmesi ve şok benzeri reaksiyonlar ciddi yan etkiler olup çok seyrek gözlenir. Bu durumlarda acil tıbbi müdahale gerekebilir.

Cilde rengini veren pigmentlerde artma veya azalma, deri ve deri altı dokularda incelme (atrofi), eklem içine uygulamalarda enjeksiyon sonrası ateş ve eklemdede ağrı enjeksiyon bölgesinde ender olarak görülen yan etkilerdir.

Uzun süreli veya yüksek doz kortikosteroid tedavisinden sonra ilaç kesildiğinde hasta en az bir yıl takip edilmelidir. Riski en aza indirebilmek için ilacın dozu yavaş yavaş azaltılmalı ve hastalığı kontrol altına alabilmek için en düşük doz uygulanmalıdır.

Betametazon sodyum fosfat, enjeksiyon yerinden hızlıca emilir ve etkisi hemen görülür, bu nedenle ilacın kullanımında yüksek çözünürlüğe sahip betametazon bileşiğinin bu özelliği dikkate alınmalıdır.

Kortikosteroidlerin komplikasyonları, ilacın dozu ve tedavinin süresi ile ilişkili olduğundan, tüm hastalarda özellikle risk ve yarar açısından değerlendirmesi yapılmalıdır.

2.3. Betametazon Sodyum Fosfat ve Betametazon Dipropiyonat'ın Analiz Yöntemleri

Man-Yun Chen ve arkadaşları, insan plazmasında betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat ve metabolitlerinin belirlenebilmesi için ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde MS/MS dedektör kullanarak yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Yöntem, betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat ve bu iki molekülün metabolitleri betametazon, betametazon 17-monodipropiyonat (B17P) ve betametazon 21-monodipropiyonat (B21P) için valide edilmiştir. Eter ve n-hekzan (4:1, h/h) karışımı kullanılarak ekstraksiyon yapmışlardır. Kromatografik ayırmada betametazon, betametazon dipropiyonat, B21P ve B17P için Hypurity C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm) kolon, betametazon sodyum fosfat için Luna C18 (2) (150 x 2.0 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat içeren ilaç, 23 sağlıklı bireye uygulanmış ve yapılan biyoeşdeğerlik çalışmasında valide etmiş oldukları yöntemi başarılı bir şekilde uygulamışlardır (30).

Kedor Hackmann ve arkadaşları, krem ve topikal çözeltideki salisilik asit ve betametazon dipropiyonatın tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm) kolon, hareketli faz olarak asetronitril : tetrahidrofuran : asetik asit % 1 (25:20:55, h/h/h) pH 3.3 çözeltisi ve UV dedektör ile 254 nm dalga boyunda yöntemi optimize edilmiştir. Doğrusallık aralıkları, betametazon dipropiyonat için 5.0 - 50.0 µg/mL ve salisilik asit için 20.0 - 200.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Bağlı standart hata betametazon dipropiyonat için % 1.38 ve salisilik asit için ise % 3.27'dir. Varyasyon katsayısı ve ortalama geri kazanım değerleri sırasıyla betametazon dipropiyonat için % 0.41-1.15 ve % 100.09, salisilik asit için ise % 0.57-0.95 ve % 99.79 olarak bulunmuştur (31).

Khattak SUR ve arkadaşları pH, ortam, fosfat derişimi ve iyonik şiddetin betametazon valerat ve betametazon dipropiyonatın sıcaklık bozunma kinetiğı üzerine etkisini araştırmışlardır. İlgili etkin maddelerin tayini için valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılmıştır ve sıcaklık etkisiyle bozunma ürünlerini tanımlamışlardır. Çalışmada farklı ortamlarda betametazon-17-valerat, betametazon-21-valerat ve betametazon alkol olarak isimlendirilen iki büyük ürün oluştuğı belirlenmiştir. Betametazon dipropiyonatın, betametazon-17-valerat, betametazon-21-valerat ve betametazon alkol isimlerinde üç ana ürüne bozunduğunu belirlemişlerdir. Betametazon valeratın pH 4-5 aralığında maksimum stabilite, betametazon dipropiyonatın ise pH 3.5-4.5 aralığında maksimum stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir. Betametazon valerat ve betametazon dipropiyonatın bozunması, farklı ortamlardaki sıcaklık ile bozunma için birinci derece kinetikleri ve birinci derece hız sabitleri tespit edilmiştir. Çözücünün polaritesinin, fosfat derişiminin ve iyonik şiddetin artmasıyla hız sabiti değerin düştüğünü belirlemişlerdir (32).

Diğer bir çalışmada, Alice Simon ve arkadaşları, betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat içeren enjeksiyonluk süspansiyonun kas içi uygulamasında, betametazon sodyum fosfat nedeni ile hızlı terapötik etkiye ve betametazon dipropiyonatın yavaş çözünmesi nedeni ile uzun salımlı terapötik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. HPLC yöntemi kullanılarak kas içi uygulanan enjeksiyonluk süspansiyondaki betametazon dipropiyonatın çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Partikül büyüklüğü lazer kırınımı ile ölçülen ve partikül büyüklüğü dağılımı 7.43 - 40.25 μm olan beş ticari preparat kullanmışlardır. Farklı ürünleri pedal aparatı kullanarak, pedalı 300 mL fosfat tamponu içerisinde 25 ve 50 rpm'lik dönüş hızlarında döndürerek analiz etmişlerdir. Biyolojik dissolüsyon ortamı olarak 37 ± 0.5 °C vücut sıvısı, kas sıvısı ve sinoviyal sıvı kullanılmıştır. Ortalama partikül büyüklüğünün sadece çözünme hızını değil aynı zamanda partiküllerin polidispersite indeksini etkilediğı bulunmuştur. % 0.1 sodyum lauril sülfat içeren 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ve 50 rpm dönüş hızı kullanılmıştır. Çözünme hızı profil testindeki betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonatın tayini için doğrusal, kesin, seçici ve doğru bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Çözünme hızı yönteminin bu enjeksiyonluk süspansiyonun kalite kontrol analizlerinde kullanılabileceğı belirtilmiştir (33).

Liljana Bogdanovska ve arkadaşları, diş dolgusu sıvısı içerisindeki betametazon dipropiyonatın tayini için basit bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Diş dolgusu sıvısının periodontal hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların terapötik izlenmesi için kullanılabileceği belirtilmiştir. Önerilen yöntemde numune hazırlama için tek basamaklı tüketme işlemi kullanılmıştır. Betametazon dipropiyonatın 0.10 - 2.00 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirtilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik için sırasıyla % BSS değerleri % 2.2 - 4.5 ve 1.6 - 5.7 arasında değişirken, doğruluk değerleri sırasıyla % 96.6 ve % 97.0'den yüksek bulunmuştur. Önerilen yöntemin, 0.5 mg/g betametazon dipropiyonat krem ile lokal tedaviden sonra kronik periodontitisli hastalardan elde edilen diş dolgusu sıvısındaki betametazon miktarlarının belirlenmesi için başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir (34).

Suryakant Bhosale ve arkadaşları tarafından 1 mL/dk akış hızında, su ve metanolden oluşan hareketli faz gradyanı kullanarak Inertsil C18 (250 x 4.6 mm) kolonda ve 254 nm'de, butenafin hidroklorür ve betametazon dipropiyonatın aynı anda tayini için yöntem geliştirilmiştir. Betametazon dipropiyonat ve butenafin hidroklorürün sırasıyla alıkonma zamanları 4.82 ± 0.80 ve 16.18 ± 0.17 dk bulunmuştur. Yöntem seçicilik, doğrusallık, kesinlik, tutarlılık ve sağlamlık parametreleri ile valide edilmiştir. Yöntemin basit, kesin, hassas ve eş zamanlı olarak krem formülasyonunda butenafin hidroklorür ve betametazon dipropiyonatın tayini için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (35).

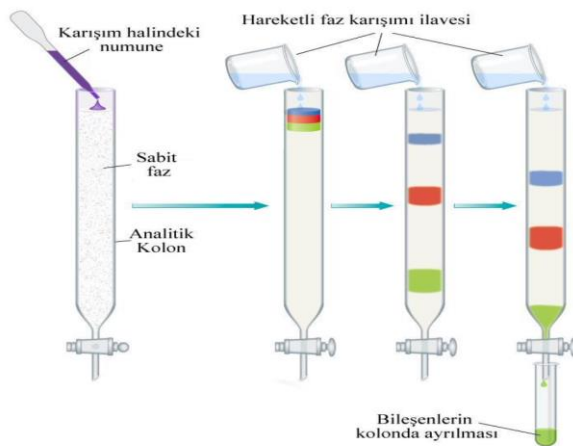
Minshan Shou ve arkadaşları, Diprosalic losyon içerisindeki salisilik asit, betametazon dipropiyonat ve safsızlıklarının aynı anda tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. 35°C'de YMC J'sphere ODS-H80 150 x 4.6 mm kolon kullanılarak 240 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiştir. Gradient ayırım, hareketli faz olarak % 0.05 (h/h) metansülfonik asit çözeltisi ve asetronitril kullanılarak yapılmıştır. Diprosalic losyon numunelerinden 38 dk içerisinde toplamda otuz üç bileşen ayrılmıştır. Yöntemin stabilite göstergeli yöntem olduğu, stabilite süresi dolmuş Diprosalic losyon numunelerindeki tüm safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin yeterli şekilde ayrılmasıyla kanıtlanmıştır (36).

2.4. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin, bir kolonun iç yüzeyine veya düz bir yüzeye kaplanmış olan sabit fazda, bir hareketli faz ile farklı hızlarla sürüklenmeleri ya da hareket etmeleri sonucunda farklı bantlar veya bölgeler oluşturarak birbirlerinden ayrılması işlemidir (37). Kromatografide hareketli faz sıvı, gaz ya da süperkritik bir akışkan olabilirken; sabit faz ise katı veya katı bir destek materyaline emdirilmiş sıvı olabilir. Kromatografi yöntemi, bir numunedeki bileşenlerin nitel/nicel olarak tayin edilmesinde, ayrılmasında ve saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan bir analitik tekniktir (38).

Kromatografide sabit faz olarak kullanılan dolgu maddeleri yüzey alanını artırır. Yüzeyi asidik özellik gösteren silikajel en çok kullanılan sabit fazdır ve ayrıca yüzeyi bazik olan alümina da çok kullanılır (38). Kalsiyum karbonat, kalsiyum oksit, florisil, magnezyum oksit, magnezyum karbonat, diatome toprağı, poliamitler, nişasta ve talk sabit faza örnek olarak verilebilir. Sıvı hareketli faz olarak başlıca su olmak üzere bütün organik çözücüler ve çözücülerin farklı oranlardaki karışımları ile gaz ve süperkritik çözücüler kullanılabilir.

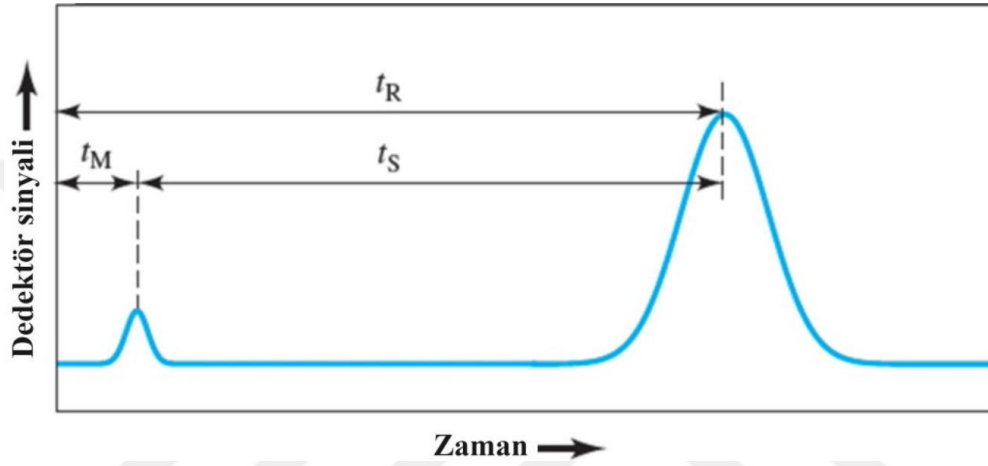
Rus botanikçi bilim adamı olan Mikhail Tswett, kromatografi yöntemini ilk bulan isimdir (Şekil 2.3). Bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmak amacıyla kullanmış ve kalsiyum karbonat içeren cam kolonda renkli bant oluşumlarını görmüştür. Oluşan renkli bantlardan esinlenerek renk anlamında olan “chroma” ve yazma anlamında olan “graphein” kelimelerini kullanarak yönteme kromatografi ismini vermiştir (39).



Şekil 2.3. Kolon kromatografisinde kromatografik ayırmanın şematik gösterimi (40).

Kromatogramlar

Kolon çıkışına, bileşeni tanımaya uygun bir dedektör yerleştirdiğinde dedektör sinyali elde edilir. Bu sinyalin, zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile pikler elde edilir ve oluşan bu grafiğe kromatogram adı verilir (Şekil 2.4). Karışımda bulunan her bir bileşen için farklı bir pik bulunur. Pikin alıkonma zamanı nitel değerlendirmeyi sağlarken, pikin alanı ise nicel değerlendirme yapılabilmesini sağlar.



Şekil 2.4. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.

Sıvı kromatografisi, birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki bileşenlerin dağılımındaki farklılığa dayanan ayırma yöntemidir. Hareketli faz olarak sıvı, sabit faz (kolon) olarak ise katılar kullanılır. Bir karışımda bulunan iki veya daha fazla bileşenin, hareketli faz yardımı ile sabit faz içinden veya üstünden farklı hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır (41).

Sabit faz ve hareketli faz arasındaki fiziksel etkileşim açısından kromatografik yöntemler; uygulama biçimine, ayrılma mekanizmasına ve hareketli faz tipine göre üç farklı şekilde sınıflandırılır (Tablo 2.1) (42).

Tablo 2.1. Kromatografinin sınıflandırılması.

KROMATOĞRAFI TÜRLERİ			
<i>Uygulama Biçimine Göre</i>		<i>Ayrılma Mekanizmasına Göre</i>	<i>Hareketli Faz Tipine Göre</i>
Kolon Kromatografisi	Düzlemsel Kromatografi	Partisyon (Dağılma) Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	İnce Tabaka Kromatografisi	Adsorpsiyon (Tutunma) Kromatografisi	Gaz Kromatografisi
Gaz Kromatografisi	Kâğıt Kromatografisi	İyon Değiştirme Kromatografisi	Süperkritik Akışkan Kromatografisi
Süperkritik Akışkan Kromatografisi		İyon Çifti Kromatografisi	
		Afinite Kromatografisi	
		Moleküler Eleme (Jel Filtrasyon) Kromatografisi	

2.4.1. Kromatografi Türleri**Adsorpsiyon Kromatografisi**

İlk geliştirilen ayırım tekniğidir. Adsorpsiyon, bir karışımdaki sıvı ya da gaz halindeki bileşenlerin katı faz üzerinde tutunmasıdır. Adsorpsiyon kromatografisi ise bir karışımdaki bileşenlerin dolgu maddesinin yüzeyinde farklı olarak tutunmaları sonucu oluşan ayırma işlemidir.

Analitlerin sabit faz üzerinde tersinir olarak adsorblanmaları esasına dayanır. Sıvı hareketli faz katı adsorban üzerinde hareket eder. Denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde

daha uzun süre tutunur. Hiç adsorplanmayan bileşen hareketli faz ile birlikte kolonu terkeder. Yüzeye adsorplanan bileşenler yüzeyle etkileşimlerine bağlı olarak farklı sürelerde kolondan çıkarlar. Bileşenlerin sabit fazla etkileşmesi; dipol-dipol etkileşimleri, Van der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları ile gerçekleşir.

Dağılma Kromatografisi

Sabit faz dolgu maddesi üzerine yayılan bir sıvı film söz konusu ise bu yöntem sıvı-sıvı kromatografisi denir. Bu yöntemde, bileşenler sabit faz ve hareketli faz arasında dağılırlar. Dağılma eğilimlerine göre bileşenlerin ayrımı sağlanır. Dağılma eğilimi polarite farkına dayanır. Sabit faz ile benzer polariteye sahip bileşenler benzer benzeri çözer ilkesine dayanarak kolonda daha fazla tutunurlar. Hareketli fazla benzer polariteye sahip moleküller ise hareketli faz ile birlikte hareket ederek kolonu daha hızlı terk ederler. Dağılma kromatografisi hareketli fazın ve sabit fazın polaritesine göre normal faz ve ters faz olmak üzere iki gruba ayrılır. Normal fazda hareketli faz apolar olup sabit faz polardır. Ters fazda ise hareketli faz polar olup sabit faz apolardır (42, 43).

İyon Çifti Kromatografisi

İyonlaşabilen asidik ya da bazik maddelerin ayrılmasında kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Bu ayırma yönteminde hareketli faza iyon çifti eklenir. Hareketli faz içerisindeki iyon çifti sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olan bileşenler iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır. Alıkonma, iyon çiftinin polaritesine bağlı olup iyon çifti reaktifi uzun zincirli bir alkil ise iyon çifti daha apolar yapıda oluşur ve alıkonma zamanı artar. Hareketli faza ilave edilen iyon çiftleri polaritesi düşük olan sabit faz tarafından alıkonulur. İyonik maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek apolar karakter kazanırlar ve bu şekilde kolonda alıkonma süreleri de artar (44).

İyon Değiştirme Kromatografisi

İyonik yapıdaki bileşikleri ayırmak için kullanılan kromatografi tekniğidir. İnorganik iyonların ve amino asitlerin analizlerinde sıklıkla kullanılır. Sabit faz zayıf veya güçlü katyon ya da anyon değiştiricilerdir. İyon değiştiricinin sabit yükü negatif ise buna katyon değiştirici,

pozitif ise anyon değiştiricidir. Analiz sırasında iyon değiştiricinin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle belli bir pH değerindeki tamponlanmış sulu çözeltidir ve sabit fazın tersi yük içerir. Yükü, hareketli fazın zıt iyonları ile aynı olan örnek bileşenleri sabit faza bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır. Sabit faza kuvvetle bağlanan uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalırken; zayıf bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu daha çabuk terk ederler.

İyon değiştirme mekanizmasında bileşenin alıkonma zamanında, hareketli fazın pH'sı ve iyonik gücü, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir.

Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi

Bir karışımdaki bileşenlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. İnert yapıdaki sabit faz jel veya gözenekli organik bir bileşiktir. Hareketli faz sabit fazın gözeneklerini doldurur. Molekül büyüklüğü küçük olan bileşenler en içteki gözeneklere ulaşarak kolonda daha uzun süre tutunurlar. Büyük moleküller ise kolonu kısa sürede terk ederler.

Afinite Kromatografisi

Hedef biyomolekülün, çözünmeyen bir destek materyali üzerine immobilize edilen ve hedef molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından spesifik ve geri dönüşümlü olarak adsorbe edilmesine dayanan bir tekniktir.

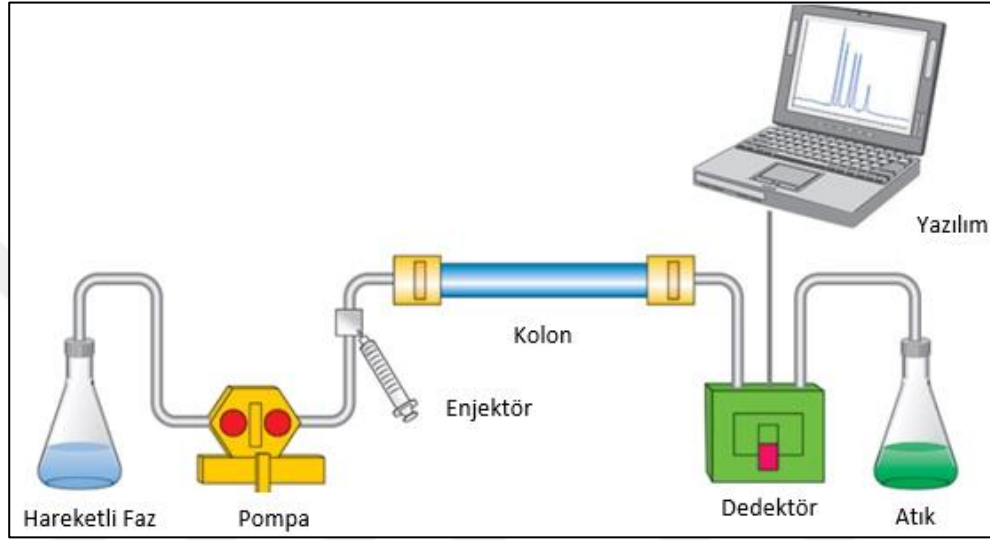
2.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), sıvı haldeki hareketli fazın basınç yardımıyla kolondan geçirildiği sistemlerdir.

HPLC yöntemi, bir karışımdaki bileşenlerin, bir kolon içindeki sabit faz ile birbirinden farklı etkileşimlere girerek, kolonda farklı hızlarda ilerleyerek bileşenlerin birbirinden ayrılması temeline dayanır. HPLC, ayırma amacı ile en çok kullanılan kromatografik tekniktir. Kantitatif, kalitatif tayin yapılabilmesi, kolay uygulanabilir olması, uçucu olmayan ve sıcaklıkla bozunabilen maddelerin analiz edilebilir olması, dedektör seçimine bağlı olarak birçok

molekölün analiz edilebilir olması ve tekrarlanabilirliğin yüksek olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

HPLC cihazı; hareketli faz rezervuarı, pompa, örnekleyici, kolon fırını, dedektör ve analizleri değerlendirebilmek için yazılımdan oluşur. HPLC cihazının genel dizilimi Şekil 2.5’de verilmiştir (45).



Şekil 2.5. HPLC cihazının genel olarak şematik gösterimi (46).

2.5.1. Hareketli Faz Rezervuarı

Hareketli faz olarak kullanılacak olan çözelti şişeleri bu alana yerleştirilir. Genellikle HPLC sistemlerinin en üstünde yer alırlar. Bu tasarımın nedeni, sıvıların yer çekimi altında aşağı yani degazer ve pompa yönünde hareket edecek olmalarıdır (47).

Hareketli faz rezervuarı marka ve modele bağlı olarak sayıca değişkenlik gösterebilmektedir. Genel olarak 2 veya 4 hattan oluşmaktadır. Burada kullanılan şişeler, temizlenmesi kolay inert materyallerden yapılmakta olup genellikle 200 - 5000 mL aralığında hacme sahiptir. Analizlerde çoğunlukla 1000 - 2500 mL hacme sahip hareketli faz şişeleri kullanılmaktadır. Şişeler içerisinde örneğin cihaz içerisinde sürüklenmesini sağlayan ve en önemlisi ayırma etkisi olan hareketli fazlar bulunmaktadır. Hareketli faz içerisine daldırılan cihaza ait hatların ucunda 0.45 µm çapında cam veya teflon filtreler kullanılmaktadır.

Kromatogramlarda bozucu etkiye sahip hareketli fazdaki hava kabarcıklarının sisteme taşınmasını önlemek amacıyla cihazda degaser bulunmaktadır.

Hareketli faz bileşimi, bileşenlerin alıkonmasını ve seçiciliği etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Normal faz sıvı kromatografisinde, hareketli faz olarak apolar organik çözücüler kullanılır. Tekrarlanabilirliğin sağlanabilmesi için kullanılan çözücülerin su içeriği kontrol edilmelidir.

Ters faz sıvı kromatografisinde, hareketli faz polar olup sulu çözeltiler kullanılır.

Analizlerde kullanılan hareketli fazlardaki 0.45 μm 'dan büyük partikülleri uzaklaştırabilmek için hareketli fazlar filtrelenir. Hareketli fazdaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için hareketli fazlar degaze edilebilir, içerisinde helyum geçirilebilir, vakumlu süzme düzeneği kullanılarak süzülebilir.

2.5.2. Pompa

Hareketli fazın kontrollü bir akış hızı ile sistemden geçmesini sağlar. İzokratik (sabit) veya gradyan (değişken bileşimli) akış sağlanabilir. İzokratik ayırmada tek hattan hareketli faz akışı sağlanırken, gradyan ayırımlarda farklı hatlardan değişen oranlarda hareketli faz akışı sağlanır.

Pompalar marka modele bağlı olarak en fazla 400-600 bar basınca dayanabilen sistemlerdir. Analitik yöntemde belirtilen akış hızı bilgileri yazılım yardımıyla pompa modülüne yazılarak akış verilir. Verilen akış sayesinde hareketli fazın ve örneğin cihaz içerisinde sürüklenmesi sağlanır. En az 0.1 mL/dk en fazla 5.0 mL/dk akış hızı verilebilmektedir.

2.5.3. Örnekleyici

Genel olarak 5 - 100 μL aralığındaki hacimlerde enjeksiyon yapılır. Cihazdaki loop hacmi arttırılarak enjeksiyon hacmi arttırılabilmektedir. Hazırlanan çözeltilerden yöntemde

belirtilen hacimlerde enjeksiyon yapılır. Enjeksiyon portları marka/modele bağı olarak soğutma ve ısıtma özelliğine sahip olabilir. Enjeksiyon portunda çoğunlukla iğne yıkama özelliği bulunmaktadır. İğne yıkama vialden veya sürekli akış ile yapılabilir. Analizlerde tekrarlanabilirliği etkileyen modüldür. Aynı çözeltiden ardışık enjeksiyonlar yapılarak cihazın tekrarlanabilirliği kontrol edilebilmektedir.

2.5.4. Kolon ve Kolon Fırını

Kolon fırını ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olabilmektedir. Cihazın marka ve modeline bağı olmakla birlikte genellikle 10 - 85°C aralığında sıcaklık ayarlaması yapılabilir. Analizde kullanılacak olan kolon, üzerinde belirtilen akış yönü doğrultusunda takılmaktadır.

HPLC’de, genellikle 50 - 250 mm uzunlukta, 4.0 - 4.6 mm iç çapa sahip, 3 - 5 µm partikül büyüklüğüne sahip kolonlar kullanılmaktadır. Kolon partikül büyüklüğü azaldıkça örnek ile yüzey etkileşimi artmaktadır. Yüzey etkileşimin artması, daha simetrik pikler elde edilmesini, ayırcılığın artmasını sağlamaktadır. Kolon uzunluğu arttıkça ve partikül büyüklüğü azaldıkça sistemde gözlenen basınç da artmaktadır.

Kolonlar genellikle paslanmaz çelik dış yüzeye sahiptir ve içlerinde fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolgu maddesi bulunmaktadır. Silikalara veya polimerlere eklenmiş fonksiyonel gruplara bağı olarak kolonlar polar-apolar özelliğe sahip olmaktadır. Kolona bağı fonksiyonel grup apolar özellikte olduğunda ters faz sıvı kromatografisi, kolon polar özellikte olduğunda ise normal faz sıvı kromatografisi olarak adlandırılmaktadır.

Normal faz sıvı kromatografisinde genellikle silika veya alümina kullanılır. Burada ayırım, sabit faz üzerindeki adsorpsiyon ve/veya hareketli faz ile sabit faz arasındaki kütle dağılımı farkına dayanır.

Polimerler, silika veya gözenekli grafitlerden hazırlanan kimyasallarla modifiye edilerek normal veya ters faz sıvı kromatografisinde kullanılırlar. Burada ayırım moleküllerin partisionuna dayanır.

Gözenekli silika veya polimerler, boyut dağılımı kromatografisinde kullanılır. Burada ayırım, moleküllerin hacimleri arasındaki farklılığa dayanır.

Asidik veya bazik gruplu reçineler veya polimerler, iyon değişim kromatografisinde kullanılır. Burada ayırım, moleküldeki iyonlar ile hareketli fazdaki iyonların yarışına dayanır.

Özellikle modifiye edilmiş sabit fazlar, örnek olarak selüloz ya da amiloz türevleri, proteinler ya da peptidler ve enantiyomerlerin ayırımı için kullanılır.

Çoğu ayırım, kimyasal olarak yapısı değiştirilmiş silikalar ile doldurulan sabit fazların kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisine dayanır. Silikanın silanol grupları, partiküllerin yüzeyinde değişen sayıda aktif bölgeyi kapsayan kovalent olarak bağlı silil türevlerini elde etmek için çeşitli silan reaktifleri ile reaksiyona sokulur.

Üretici tarafından aksi bir durum belirtilmedikçe, silika bazlı ters fazlı kolonlar, pH'sı 2.0 - 8.0 aralığındaki hareketli fazlarda kararlıdır. Gözenekli grafit veya stiren-divinilbenzen kopolimeri gibi polimerik malzeme parçacıkları içeren kolonlar ise daha geniş bir pH aralıklarında kararlıdır.

Analitik ayırımlarda sıklıkla kullanılan sabit fazların partikül boyutu 2 - 10 µm arasında değişir. Parçacıklar küresel veya düzensiz olabilir ve değişen gözenekliliğe ve spesifik yüzey alanına sahip olabilir. Bu özellikler, belirli bir sabit fazın kromatografik davranışına katkıda bulunur. Artık silanol grupları var ise özellikle bazik maddelerde pik kuyruklanması meydana gelebilir.

2.5.5. Dedektör

Analiz edilecek moleküle bağlı olarak dedektör seçimi yapılmaktadır. Çoğunlukla UV-GB dedektörleri kullanılır. Floresans, diferansiyel refraktometreler, iletkenlik dedektörleri, elektrokimyasal dedektörler, ışık saçılım dedektörleri, kütle spektrometreleri, radyoaktif dedektörler, çok-açılı ışık saçılım dedektörleri de analizlerde kullanılmaktadır.

2.6. Yazılım

Kromatografik şartların yazıldığı, enjeksiyon sırasının belirtildiği ve analiz sonrası kromatogramların değerlendirildiği cihaza ait programlardır (Chemstation, OpenLab CDS).

2.7. Kromatografik Parametreler (48, 49)

Pik

Dedektörün kaydettiği kromatogramda gözlemlenen bir veya birden fazla bileşen için ayrı ayrı görülen tepelerdir.

Alıkonma Zamanı (t_R)

Bileşenlerin ayrılması için gereken süredir. Örneğin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zaman olarak tanımlanır (Şekil 2.6).

Alıkonma Hacmi (V_R)

Bileşenlerin ayrılması için gereken hareketli faz hacmidir. Alıkonma zamanına ve akış hızına (F) bağlı olarak hesaplanabilir (Şekil 2.6).

$$V_R = t_R \times F \quad (2.1)$$

Kapasite Faktörü (k')

Bileşenin alıkonma hacmi ve sistemin ölü hacmi göz önünde bulundurularak hesaplanır.

$$k' = (V_R - V_M)/V_M \quad (2.2)$$

Ayırım sırasında akış hızının sabit olması halinde kapasite faktörü alıkonma zamanlarına göre hesaplanabilir.

$$k' = (t_R - t_M)/t_M \quad (2.3)$$

Seçicilik (α)

İki bileşene ait kapasite faktörü oranı, seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak ifade edilir.

$$\alpha = k'_{2}/k'_{1} \text{ veya } \alpha = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M) \quad (2.4)$$

Alıkonma Süresi (t_M)

Sabit fazda tutunmayan bileşenin ayırımı için gereken süredir.

Alıkonma Hacmi (V_M)

Sabit fazda tutunmayan bileşenin ayırımı için gereken hareketli faz hacmidir. Tutunma süresine ve akış hızına bağlı olarak hesaplanabilir.

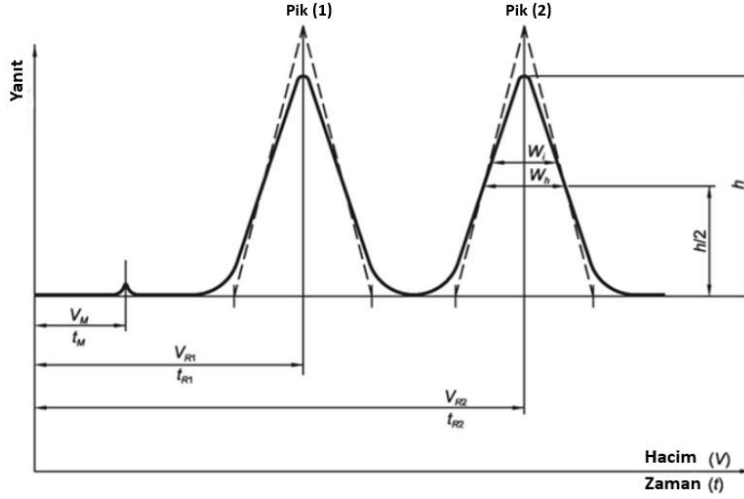
$$V_M = t_M \times F \quad (2.5)$$

Plaka Sayısı (N)

Kolon performansı teorik plaka sayısı olarak ölçülebilir. Alıkonma süresi (t_R) ve pikin yarı yüksekliği (W_h) kullanılarak hesaplanabilir. Teorik plaka sayısı kolon etkinliğinin ölçüsüdür. Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir.

Teorik plaka sayısı analitin yanı sıra akış hızı, hareketli faz, kolon, kolonun uzunluğu ve kolonun iç çapı gibi kromatografik şartlara da bağlıdır (49).

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (2.6)$$



Şekil 2.6. Kromatografik ayırım tekniklerine ilişkin görsel.

Bekleme Hacmi

Kolonun başı ile hareketli fazın birleştiği nokta arasındaki hacme bekleme hacmi (gecikme hacmi) denir. Bekleme hacmi Tablo 2.2.'deki prosedür kullanılarak belirlenebilir.

Akış hızı: 2 mL/dk (Geri basınca bağlı olarak değiştirilebilir)

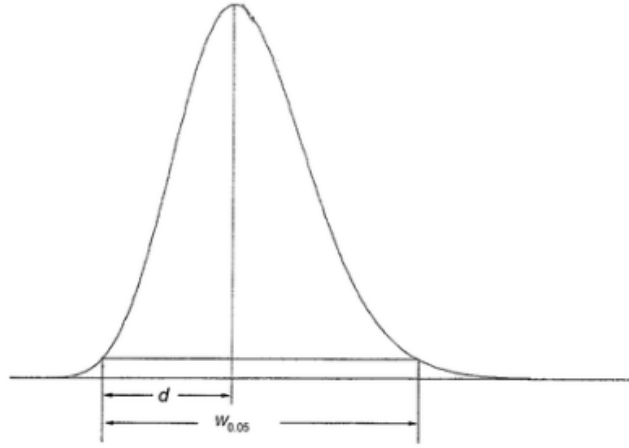
Tayin: 265 nm

Tablo 2.2. Bekleme hacminin belirlenmesine ilişkin gradiyent programı.

Zaman (dk)	Su (%)	% 0.1'lik Aseton Çözeltisi
0-20	100 → 0	0 → 100
20-30	0	100

Simetri Faktörü (A)

Pik yüksekliğinin 20'de birinin pikin başlangıç noktasından pikin tepesine kadar olan mesafenin 2 katına bölünmesi ile hesaplanır. Hesaplama sonucunda elde edilen simetri faktörü (A) değeri 1.0 ise pik simetriktir. A değeri 1.0'den büyük ise pikte kuyruklanma vardır. A değeri 1.0'den küçük ise pikte ön kuyruklanma söz konusudur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Simetri faktörüne ilişkin görsel (48).

$$A = \frac{w_{0.05}}{2d} \quad (2.7)$$

Ayırıcılık (R_s)

Aynı çözelti içerisinde birden fazla bileşenin bulunması halinde, her bir bileşeni doğru ve kesin bir şekilde analiz edebilmek için bileşenlere ait piklerin ayırımının sağlanması gerekmektedir. Ayırıcılık, bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçüsüdür. Bu amaçla, iki bileşene ait pikler arasındaki ayırım aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir. İki bileşeni ait pikin birbirinden ne kadar ayrıldığının ölçüsüdür.

$$R_s = \frac{1.18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (2.8)$$

t_{R2} : İkinci pikin alıkonma süresi

t_{R1} : İlk pikin alıkonma süresi

w_{h1} ve w_{h2} her bir pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği.

Formülde pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği yerine doğrudan pik genişliğinin kullanılması halinde 1.18 yerine 2 ile çarpılır.

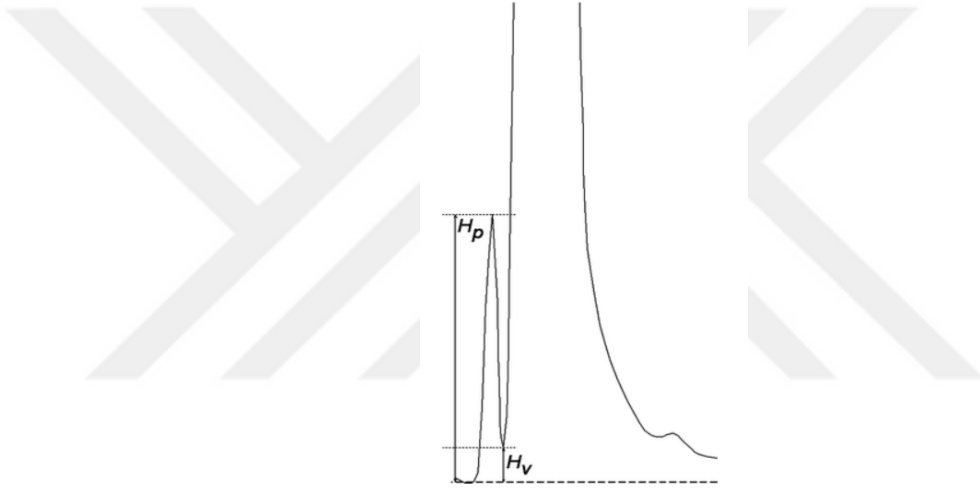
Pikin Vadiye Oranı (p/v)

İki pik arasında rezolüsyon sağlanamadığında, ilgili bileşikler analizinde sistem uygunluk kriteri olarak çalışılır (Şekil 2.8). Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (2.9)$$

H_p : Küçük pikin ekstrapole edilmiş zeminden yüksekliği

H_v : Küçük ve büyük pikleri ayıran eğrinin en alt noktanın ekstrapole edilmiş zeminden yüksekliği.



Şekil 2.8. Pikin vadiye oranının şematize edilmesi (48).

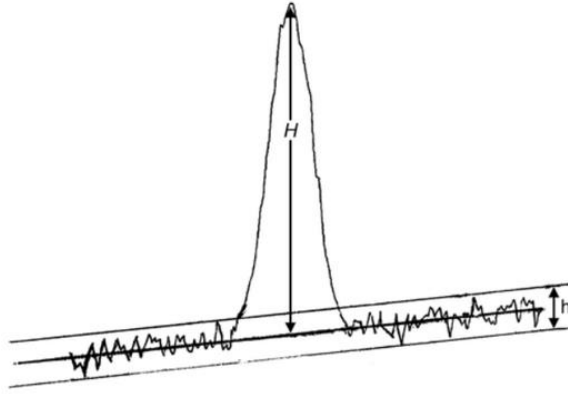
Sinyal/Gürültü Oranı (S/G)

Bir moleküle ait pikin yüksekliğinin baseline gürültüsüne oranıdır (Şekil 2.9). Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$S/G = \frac{2H}{h} \quad (2.10)$$

H: Pik yüksekliği

h: Enjeksiyon sonrası elde edilen kromatogramda kör çözelti enjeksiyonundan elde edilen kromatogramda gürültünün oranı, gürültü oranı sinyal/gürültü (S/G) oranı hesaplanacak olan pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğinin 5 katı mesafede incelenir ve mümkünse bu pikin bulunacağı yerin etrafına eşit olarak yerleştirilir.



Şekil 2.9. Sinyal/gürültü oranının şematize edilmesi (48).

Sistem Tekrarlanabilirliği

Analiz edilen molekülden alınan cevabın tekrarlanabilirliği, % bağıl standart sapma olarak hesaplanır. Tekrarlanabilirliğin hesaplanabilmesi için en az 3 enjeksiyon yapılması gerekir (Tablo 2.3). Sistem tekrarlanabilirliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir.

$$s_r (\%) = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (2.11)$$

y_i : Pik alanı, pik yüksekliği veya iç standardizasyon yöntemi ile alanların oranı olarak her bir değer

$\bar{y}$: Tüm değerlerin ortalaması

n : Ölçüm sayısı (enjeksiyon sayısı)

Tablo 2.3. Avrupa farmakopesinde yer alan sistem tekrarlanabilirliği kriterleri.

	Her bir enjeksiyon sayısı			
	3	4	5	6
*B (%)	İzin verilen en yüksek bağıl standart sapma			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.1	1.27

*B: Test yöntemlerinde verilen üst limit eksi yüzde 100.

2.8. Farmasötik Safsızlıklar

Etkin maddenin, bozunma ürünlerinin, üretimden gelen safsızlıkların, yardımcı maddelerin veya diğer potansiyel safsızlıkların varlığında, herhangi bir girişim olmadan doğru şekilde analizi oldukça önemlidir (8-10). İlaç formülasyonlarının tasarımında ve geliştirilmesinde dikkat edilmesi gerekli en önemli noktalardan biri de etkin maddenin ve bitmiş ürünün stabilitesidir. Stabilitate en önemli kalite göstergesi olup bir ilacın dayanıklı olması ve ayrıca üretimi, depolanması, nakli, hastane veya eczanede saklama ve kullanımı süresince üretildiği tarihteki özelliklerinin önceden belirlenmiş sınırlar içinde kalması olarak tanımlanır. Stabilitate testleri; bir etkin maddenin ya da bitmiş ürünün kalitesinin çevresel faktörlerin (ısı, ışık ve nem gibi) etkisi ile zaman içinde nasıl değiştiğine dair kanıt sunmak, etkin madde için tekrar test süresini veya bitmiş ürünün raf ömrünü ve önerilen saklama koşullarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır.

Farmasötik preparatlardaki safsızlıklar (impürte), etkin madde (active pharmaceutical ingredient, API) içindeki veya formülasyon geliştirme aşamasında oluşabilen istenmeyen kimyasal maddelerdir. Bu olası kimyasal maddelerin çok az bir kısmı bile bazen ilacın etkinliğini ve/veya güvenilirliğini etkileyebilir. Bir ilacın safsızlıkları, ilacın hem farmakolojik hem de toksikolojik yapısını değiştirerek ilacın hasta üzerindeki etkilerini değiştirebilir. Bu nedenle, ilaçlardaki safsızlık ve bozunmaların belirlenmesi hastanın sağlığı ve ilaç etkinliği için oldukça önemlidir.

ICH Q3B(R2) kılavuzunda yer alan günlük maksimum alım dozuna göre bozunma ürünlerinin ya da safsızlıkların ihmal edilme yüzdeleri günlük maksimum alım dozu 1 g'a eşit veya 1 g'dan az olan ilaç ürünleri için % 0.1, günlük maksimum alım dozu 1 g'dan fazla olan ilaç ürünleri için % 0.05'tir. Aynı kılavuzda ilaç ürününün günlük maksimum alım dozuna bağlı olarak tanımlı impüriteler ve tanımlanmamış impüriteler için maksimum yüzde limitler hesaplanmaktadır. İlaç ürünü içerisinde bulunan bozunma ürünleri/safsızlıklar hesaplanan maksimum yüzdelerden fazla olmamalıdır. Herhangi bir safsızlık ya da bozunma ürünü varsa ve bu safsızlıkların belirtilen yüzdelerden daha büyük miktarlarda alınması halinde, ilacın hasta üzerine zararlı veya olumsuz etkisi olacağı düşünülmektedir (50, 51).

Safsızlık profillerinin nitel ve nicel olarak belirlenmesi, son yıllarda resmi otoriteler tarafından üzerinde dikkatle durulmakta ve ilaç geliştirme çalışmalarında kritik noktalar arasında yer almaktadır. Avrupa Farmakopesi (EP)'inde etkin madde bileşimine ait safsızlıkların limitleri, İngiliz Farmakopesi (BP) ve Amerikan Farmakopesi (USP) gibi farmakopelerde ise, ilaç formülasyonlarında ve/veya etkin madde bileşimindeki kabul edilebilir safsızlık limitleri belirtilmektedir. ICH; yeni ilaç molekülleri, ürünler ve çözücü safsızlıkları ile ilgili kılavuzlar yayınlamıştır. Bu kılavuzlar doğrultusunda gerekli hesaplamalar yapılarak limitler belirlenebilmektedir. Genel olarak, yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar ile ilgili olarak ICH kılavuzlarına göre; nadir görülen bir yan etkiye veya zehirli bir etkiye sahip olduğu bilinen ya da tahmin edilen ürünler dışında % 0.1 seviyesinin altındaki safsızlıkların belirlenmesine gerek yoktur (50, 52).

Farmakopelerde her ilaç için belirli standartlar belirlenmesine rağmen tüm dünyada geçerli ortak standartlar henüz her ilaç için belirlenmemiştir. Aynı etkin madde için farklı safsızlık tanımları gözlenmektedir.

Safsızlık standartlarının temin edilmesinde, resmi otoriteler ve ilaç firmalarının talepleri olmasına rağmen; ilaçlarda bulunan safsızlık referans standartlarını üretmek veya izole ederek elde edilmesi oldukça zordur.

Üretim sırasında oluşan safsızlıklar ve bozunma ürünlerinin karakterizasyonunda ve yapılarının aydınlatılmasında; HPLC, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, kütle spektrometrisi, fourier transform iyon siklotron rezonans kütle spektrometrisi (FTICR-MS) ve tandem kütle spektrometrisi yöntemleri kullanılmaktadır (53-56).

2.8.1. Safsızlık Kaynakları

İlaçlarda bulunabilecek olası safsızlıklar ikiye ayrılmaktadır;

1. Etkin madde ile ilgili safsızlıklar

2. Formülasyon geliştirme çalışmaları, üretim aşaması veya zamanla formülasyonda oluşan safsızlıklar (57-61).

Etkin Madde ile İlgili Safsızlıklar

ICH kılavuzlarına göre, etkin madde de bulunabilecek ilgili safsızlıklar;

- a) Organik safsızlıklar
- b) İnorganik safsızlıklar
- c) Kalıntı çözücü safsızlıklarıdır.

a) Organik Safsızlıklar: Etkin maddede organik safsızlıklar, üretim süreçlerinde ve/veya saklama koşullarına bağlı olarak oluşabilir. Etkin maddede tanımlanabilen ve/veya tanımlanamayan, uçucu ve/veya uçucu olmayan çeşitli safsızlıklar bulunabilir.

Başlangıç maddeleri veya ara ürünler; etkin maddelerde en çok gözlenen safsızlıklardır. Etkin maddenin her bir sentez basamağında oluşabilirler.

Yan ürünler; etkin maddenin sentezi sırasında oluşan ürünlerdir. Organik kimyada etkin madde sentezi sonunda % 100 verimle tek bir ürün elde etmek oldukça zordur. Her zaman için yan ürünlerin oluşma olasılığı bulunmaktadır.

Bozunma (degradation) ürünleri; organik bileşiklerin kimyasal yapılarına ve stabilitelerine bağlı olarak bozunmasıyla oluşan ve tayin edilen ürünlerdir. Üretim aşamasında uygulanan proseslere bağlı olarak üründe bozunma söz konusu olabilmekte ve safsızlıklar oluşabilmektedir. Aynı formülasyona ve proses aşamasına sahip ilaç ürünlerinin farklı dozlarında stabilite süresince tayin edilen safsızlıklar genel olarak aynı olmaktadır.

Reaktifler, ligandlar ve katalizörler; organik kimyada etkin maddenin sentezlenmesi aşamalarında kullanılmaktadır. Çok nadiren safsızlık olarak problem teşkil etmektedirler.

Enantiyomerik safsızlıklar; kiral bir molekülün, enantiyomerlerinden sadece biri farmakolojik aktivite gösterip, terapötik indeks ve yan etki bakımından olumlu değerlendirilip ilaç molekülü olarak değerlendirilmektedir. İlaç molekülü olarak değerlendirilen enantiyomerlerin formülasyonları geliştirilmektedir. Enantiyomerlerden diğeri ise safsızlık olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle enantiyomerik safsızlık takibi yapılmaktadır (62).

b) İnorganik Safsızlıklar: Etkin maddenin üretimi sırasında inorganik safsızlıklar da oluşabilmektedir. Bu safsızlıkların genellikle yapısı tayin edilebilir.

İnorganik safsızlıklar; kullanılan reaktifler, ligandlar ve katalizörler kaynaklı olabilir ve bulunma olasılıkları düşüktür. Ağır metaller, etkin maddelerin özellikle üretimleri sırasında, asit hidrolizinin gerçekleştiği paslanmaz çelik reaktörler ve kullanılan sudan oluşabilmektedir. Filtreler, santrifüj cihazları gibi yardımcı ekipmanlardan kaynaklı olarak da safsızlık görülebilmektedir.

c) Kalıntı Çözücü Safsızlıkları; Üretim sırasında kullanılan uçucu organik çözücülerin oluşturduğu safsızlıklardır. Etkin madde sentezleme basamaklarına organik çözücülerini uzaklaştırmak amacıyla ek işlemler eklenmektedir. Ancak organik çözücülerini tamamen uzaklaştırmak çok zordur. Bu nedenle sentezleme sırasında kullanılan organik çözücülerin etkin maddede takibinin yapılması gerekmektedir. Organik çözücüler, zararları göz önünde bulundurularak 3 sınıfa ayrılmıştır. 1.sınıfta yer alan organik çözücüler toksik olduğu bilinen safsızlıklar olup bu organik çözücülerin sentezlerde kullanılmasından kaçınılması gerekmektedir (63). Sınıflandırmalarına göre organik çözücüler şu şekildedir.

1.sınıf çözücüler; benzen kanserojen etkisi bulunmaktadır. Farmakopelere göre etkin maddede en fazla 2 ppm kadar bulunabilir. Karbon tetraklorür toksik ve çevreye zararlı etkisi vardır. Farmakopelere göre bulunma limiti 4 ppm'dir. 1,2-dikloroetan ve 1,1-dikloroetan çözücülerinin toksik etkisi vardır ve limitleri sırasıyla 5 ppm ve 8 ppm'dir.

2.sınıf çözücüler arasında farmakopelere göre 21 adet organik çözücü bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları; asetonitril, kloroform, diklorometan, 1,4-dioksan, formamide, hekzan, metanol, tetrahidrofuran ve toluendir. Limitleri sırasıyla, 410 ppm, 60 ppm, 600 ppm, 380 ppm, 220 ppm, 290 ppm, 3000 ppm, 720 ppm ve 890 ppm'dir.

3.sınıf çözücüler arasında farmakopelere göre 27 adet organik çözücü bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları; asetik asit, aseton, 1-bütanol, 2-bütanol, dimetilsülfoksit, etanol, etil asetat, formik asit, heptan, 1-propanol, 2-propanol ve trietilamindir. 3. sınıf organik çözücülerin farmakopelere göre etkin maddede bulunma limiti 5000 ppm'dir.

Formülasyonla ilgili Safsızlıklar

Farmasötik preparatlarda, etkin madde ve yardımcı maddeler dışındaki bütün istenmeyen maddeler safsızlık olarak değerlendirilebilir. Bunların terapötik etkisi olmadığı gibi belli limitlerin üstünde olması halinde toksik etki gösterebilirler. Bu nedenle ilaç ürününde takip edilmesi gerekmektedir. Safsızlıkların ilaç ürününde bulunmaması/oluşmaması tercih edilmekle birlikte oluşan safsızlıkların kılavuzlarda günlük maksimum alım dozuna bağlı olarak belirlenen limitlerin altında olması gerekmektedir.

Formülasyon geliştirme aşamasında meydana gelen safsızlıklar;

- a) Yönteme bağlı safsızlıklar
- b) Çevresel faktörlere bağlı safsızlıklar (sıcaklık, ışık, nem)
- c) Dozaj formuna bağlı safsızlıklar (sıvı dozaj formları) olarak üçe ayrılır.

2.8.2. Bozunma Ürünleri

Bozunma ürünleri, bir molekülde belli bir süre ile oluşan kimyasal değişimden, çeşitli çevresel faktörlerden (ısı, ışık ve nem), ya da yardımcı madde ve/veya birincil ambalaj malzemesiyle reaksiyonu ile oluşan moleküllerdir. İlaç ürünlerinin üretimi, taşınması, depolanması sırasında gelişebilen ve farmasötik ürünlerin etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilecek istenmeyen kimyasallardır. İlaç ürünlerinin üretimi ve depolanması sırasında oluşabilecek bozunma ürünlerinin önceden belirlenebilmesi amacıyla stres testleri yapılmaktadır.

Bozunma ürünlerinin belirlenmesinde; İnce tabaka kromatografisi, HPLC, Gaz kromatografisi, Süper kritik akışkan kromatografisi, Kapiler elektroforez ve Kütle spektroskopisi yöntemlerinin biri veya bir kaçı kullanılabilmektedir.

Bozunma ürünlerinin oluşumu aşağıda verilen nedenlerden dolayı olabilir:

1. Farmasötik preparatın içindeki maddelerin birbiri ile etkileşimi nedeniyle bozunma ürünleri oluşabilir. Saklama koşuluna bağlı olarak bozunma söz konusu olabilir. Ürün geliştirme aşamasında maddelerin birbiri ile etkileşimi olup olmadığı ve saklama koşulu

kontrol edilmelidir. Koruyucu içermeyen sıvı dozaj formlarında bozunma daha hızlı gözlemlenebilir. Örnek olarak vitaminler, özellikle de sıvı dozaj formlarında zamanla bozunmaktadırlar (64).

2. Fonksiyonel gruplara bağlı bozunma ürünleridir.

Ester Hidrolizi: Hidroliz, özellikle ester tipi ilaçların başlıca bozunma reaksiyonudur ve genelde sıvı dozaj formlarında görülür. Ester bağı kolayca açılır ve bundan dolayı, ester grubu taşıyan ilaçların ana metabolitleri, hidroliz ürünleri veya bunların konjüгатlarıdır. Ön-ilaçların büyük kısmı da ester yapısındadır (65).

Oksidatif Bozunma: Aromatik halkaya doğrudan bağlı olan hidroksil grubu, heterosiklik aromatik halka, konjuge dien, nitrit ve nitrozo türevleri, aldehit grubu içeren ilaçlar oksidatif bozunmaya uğrayabilirler (66).

Fotolitik Parçalanma: Farmasötik preparatlar; üretim ve ambalajlama sırasında, raf ömrü süresince ışığa maruz kalabilmekte ve bozunma ürünleri oluşabilmektedir. Florokinolon grubu antibiyotikler fotolitik parçalanmaya yatkın moleküllerdir (66, 67).

Dekarboksilasyon: Bazı karboksilik asitlerde sıcaklıkla karboksil grubundan karbondioksit çıkar ve bunun sonucunda bozunma ürünleri oluşur (68).

2.8.3. Stres Testleri

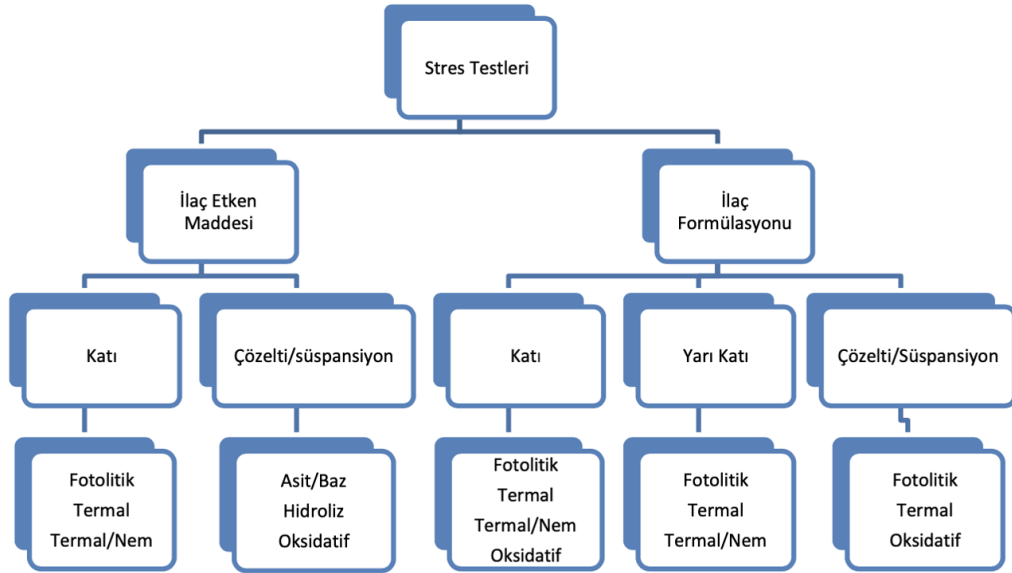
Zorlanmış bozundurma testleri olarak da geçen stres testleri, ilaçların kararlılığının belirlenebilmesi ve ilaçların çeşitli koşullarda bozunma davranışlarını incelemek amacıyla ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan bir yöntemdir. Etkin maddeye uygulanan stres testleri; bozunma ürünlerinin oluşma koşullarının belirlenmesine, molekülün stabilitesi hakkında bilgi sahibi olunmasına ve kullanılan analitik yöntemin uygunluğunun gösterilmesine yardımcı olur.

Stres testleri, zorlu saklama koşulları uygulanarak kimyasal bozunmayı ve fiziksel değişim hızını artırmak için yapılan çalışmalardır. Bu testler ile ilaçlarda oluşabilecek olası bozunma ürünleri tanımlanmakta ve ilaçların kararlılıkları belirlenmektedir. Stres çalışmaları,

pH'sı farklı çözeltiler içinde, oksijen ve ışık varlığında, farklı sıcaklıklarda ve nem seviyelerinde gerçekleştirilmektedir (69).

Stres testleri; etkin maddeyi tamamen bozundurmada, etkin maddedeki kaybı ve buna bağlı olarak oluşan bozunma ürünleri arasındaki kütle dengesini göz önünde bulundurarak gerçekleştirilir. Stres testlerinde etkin maddeyi bozundurma yüzdesinin yaklaşık olarak % 5-20 aralığında olması tercih edilir. Stres testinin niteliği, etkin maddeye ve ilgili bitmiş ürünün yapısına bağlı olabilir. Etkin madde, bitmiş ürün ve plaseboda oluşabilecek bozunma ürünlerinin saptanmasında kullanılan koşullar kılavuzlarda (ICH Q1A ve ICH Q1B) belirtilmiştir (10-15).

Aşağıda farklı ortam koşullarında yapılan bozundurma işlemleri sıralanmıştır (Şekil 2.10) (12-15, 69-75).



Şekil 2.10. İlaç etkin maddesi ve formülasyonuna uygulanan stres testleri (75).

Hidrolitik Bozundurma: Maddelerin asidik, bazik ve nötral ortamdaki bozunmalarının belirlenebilmesi amacıyla maddeler asidik ve bazik koşullara maruz bırakılmaktadır. Hidroliz, geniş pH aralığında gerçekleştirilebilen en yaygın bozundurma koşullarından biridir. Asidik ve bazik koşullarda hidrolitik çalışma, molekülde bulunan iyonlaşabilen fonksiyonel grupların katalizlenmesini içerir. Etkin maddenin ve/veya bitmiş

ürünün hidrolitik bozundurma, 1 N HCl ve 1 N NaOH ile muamele edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu koşullarda elde edilen bozunma miktarına bağlı olarak stres koşulları gözden geçirilir. Bozunma miktarı %5'ten az ise çözeltilerin derişimleri, maruz bırakma süreleri ve maruz bırakma sıcaklığı artırılarak çalışma tekrar edilir. Bozunma miktarı %20'den fazla ise kullanılan asit/baz çözeltilerinin derişimleri, maruziyet süresi ve sıcaklığı azaltılarak çalışma tekrar edilir.

Oksidatif Bozundurma: Oksidasyon, etkin maddenin ve bitmiş ürünün depolama koşullarında ortamda bulunan elementel oksijen ile girdiği reaksiyon türüdür ve önemli bir bozundurma koşuludur. Çalışma genellikle %3-30 derişim aralğındaki hidrojen peroksit çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Etkin madde veya bitmiş ürün, belirli bir süre hidrojen peroksit maruz bırakılarak bekletilmektedir. Çalışmada, bozunmayı hızlandırmak veya bozunma miktarını arttırmak için ısı uygulanabilmektedir.

Isı ile Bozundurma: Etkin madde veya bitmiş ürünler, taşınma ve saklama süreçlerinde ısıya maruz kalabilmektedirler. Bu maruziyet süresince etkin maddede ve bitmiş üründe oluşabilecek olası bozunma ürünlerinin belirlenmesi amacıyla termal bozundurma çalışmaları yapılmaktadır. Termal stres testleri, etkin madde veya bitmiş ürün belirli sıcaklık değerlerinde belirli süre bekletilerek gerçekleştirilmektedir. Termal bozundurma çalışmaları, genellikle 40 - 80 °C aralğında su banyosunda veya katı haldeki maddeler için 90 – 110 °C aralğında etüv içerisinde gerçekleştirilir.

Fotolitik Bozundurma: Fotolitik bozundurma çalışmaları ICH Q1B kılavuzuna gerçekleştirilmektedir. Fotolitik bozundurmada, etkin madde ve bitmiş ürün UV ve görünür ışığa belirli bir süre doğrudan maruz bırakılmakta ve bozunma olup olmadığı değerlendirilmektedir. Etkin madde veya bitmiş ürün, toplam maruziyet 200 W s/m² olacak şekilde UV ışığına, toplam maruziyet 1.2 milyon luks saat olacak şekilde de görünür ışığa maruz bırakılmaktadır (11). Farklı dalga boylarında ışığa maruz bırakılması sonucunda, bozunma ürünlerinin oluşması, ışığa olan duyarlılığa ve maddenin absorpladığı ışık miktarına bağlıdır.

Nem ile Bozundurma: Nem koşullarında bozundurma çalışmalarında ise, numunelerin % 75 ve üzerinde nemli ortamda 7 gün tutulması önerilmektedir. Birden fazla etkin madde içeren ürünler için yapılan bozundurma çalışmalarında ise etkin maddeler ayrı ayrı çalışılmalı ve değerlendirilmelidir. Bitmiş ürüne uygulanan bozundurma çalışmalarında, aynı koşulların plasebo numunelerine de uygulanması önerilmektedir.

2.9. Analitik Yöntem Validasyonu

Geliştirilen analitik yöntemin rutin analizlerde kullanılması için uygunluğunun belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardır. Bir analitik yöntemin uygulanabilirliğinin ve geçerliliğinin, laboratuvar çalışmaları ile çeşitli parametrelerin değerlendirilmesi analitik yöntem validasyonudur.

Bir laboratuvarında kullanılacak yeni geliştirilen veya standart olmayan bir yöntemin analiz öncesinde laboratuvar koşullarında valide edilmesi gerekmektedir.

Geliştirilen yöntemin kullanılacağı analizlerde kesin, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar alınabildiğinin bilimsel olarak kanıtlanması amacıyla analitik yöntem validasyonu yapılmaktadır. Yöntem validasyonu, geliştirilen bir analiz yönteminin o andaki ve daha sonraki kullanımlarına ait geçerliliklerini ve uygunluğunu göstermektedir. Analitik yöntem validasyonu; kılavuzlar, monograflar doğrultusunda yapılmalıdır. Bu amaçla analitik yöntem validasyonu protokolü oluşturularak çalışılacak parametreler ve kabul kriterleri belirlenmelidir.

Bazı durumlarda; geliştirilen bir yöntemde değişiklikler yapıldığında ya da bir parametre çalışma aralığının dışında olduğunda yeniden validasyon yapılması gereklidir. Safsızlıkların miktar tayini yöntemleri söz konusu olduğunda, yöntemin seçiciliği açısından yeni bir safsızlık bulunursa, yöntem yeniden valide edilmelidir. Ekipman veya kimyasal maddelerin kalitelerindeki değişiklikler olduğunda yöntem yeniden valide edilmelidir.

Miktar tayini ve bozunma ürünleri miktar tayini analizlerinde kullanılmak üzere geliştirilen analitik yöntemlerinin validasyon çalışmalarında uygulanması gereken parametreler aşağıda listelenmiştir (11, 12, 17, 18, 76-81).

- Sistem Tekrarlanabilirliği
- Seçicilik (Özgünlük)
- Doğrusallık ve aralık
- Doğruluk (Geri Kazanım)
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara Kesinlik
- Kararlılık
- Sağlamlık
- Alt Tayin Sınırı (LOQ)
- Tespit Sınırı (LOD)

2.9.1. Sistem Tekrarlanabilirliği

Aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında analitik değişkenliği ifade etmektedir. Referans standart kullanılarak standart çözelti hazırlanır. Hazırlanan standart çözeltiden ardışık enjeksiyonlar yapılarak sistem tekrarlanabilirliği değerlendirilir. Yöntemin doğrusal olduğu aralıktaki bir derişimde hazırlanan standart çözeltisinin ardışık 10 enjeksiyonunun yapılmasıyla elde edilen sonuçların % bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanır.

2.9.2. Seçicilik (Özgünlük)

Bir yöntemin seçiciliği; matriks ortamında, analiz edilecek maddeyi diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir ve matriksdeki analitin tam ve doğru olarak tayin edilebilmesidir. Geliştirilen analitik yöntemde, olası fiziksel/kimyasal girişimler varlığında, analiz edilmesi amaçlanan bileşen veya bileşenlerin doğru şekilde tayin edilebilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla, analitik yöneme validasyon parametrelerinden seçicilik parametresi uygulanır. Geliştirilen analitik yöntemde analiz edilecek bileşenlere ait pikler birbiriyle ve matriste bulunan diğer bileşenlere ait piklerle girişim yapmamalıdır. Seçicilik parametresi hem analitin hem de numunenin özellikleri dikkate alınarak, yöntem

geliştirmenin başlangıcından itibaren dikkate alınmalıdır. Herhangi bir yöntemde yeterli bir seçicilik sağlanamazsa diğer parametreler anlamsız kalmaktadır.

Seçicilik parametresi kapsamında, seyreltme çözeltisi, plasebo çözeltisi, referans standart kullanılarak hazırlanan standart çözelti, bozundurma uygulanmış stres çözeltileri analiz edilir. Kromatogramlarda hiçbir pikin birbiri ile girişim yapmadığı kontrol edilir ve pik saflıklarına bakılır.

2.9.3. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, yöntemin numunedeki madde derişimi ile doğru orantılı olan analiz sonuçlarını elde etme yeteneğidir. Uygulamada doğrusallık çalışması, analitik yöntemde uygun olacak şekilde planlanmalıdır. Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir derişim aralığı içerisinde referans standart kullanılarak farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerdeki analitin derişimine bağlı olarak doğru orantılı bir şekilde alınan yanıtların değişmesidir. Doğrusallık parametresinde en az 5 farklı derişimde çözelti hazırlanmalıdır. Referans standart kullanılarak hazırlanan doğrusallık çözeltilerinin her birinden elde edilen yanıtlar derişime grafiğe geçirilir ve kalibrasyon eğrisi çizilir ve regresyon analizi yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilir.

Geliştirilen analitik metodun kullanılacağı analize bağlı olarak çalışma aralığı belirlenir. Analitik metotlar için ICH Q2(R1) kılavuzunda belirtilen çalışma aralıkları aşağıda listelenmiştir (13):

- * Miktar tayini test yöntemi: % 80 - 120
- * Dozaj birimlerinin tekdüzeliği test yöntemi: % 70 - 130
- * Çözünme testlerinde: % 80 - 120
- * Safsızlık tayini test yöntemi: Alt tayin sınırı (LOQ) - spesifikasyonun % 120'si
- * Miktar tayini ve safsızlık tayininin birlikte değerlendirildiği test yöntemi: LOQ - Test çözeltisi derişiminin % 120'si

Doğrusallık çalışmasına ait kalibrasyon eğrisinden elde edilen regresyon katsayısı, eğimin ve kesişimin p değerleri hesaplanır. Regresyon katsayısı (R^2) ≥ 0.999 , eğimin p değeri ≥ 0.05 , kesişimin p değeri ≤ 0.05 olmalıdır.

Aralık ise, temel olarak bileşenin üst ve alt seviyeleri arasındaki uzaklıktır. Aynı yöntem kullanılarak yapılan kesinlik, doğruluk ve doğrusalılık analizleri ile belirlenmektedir. Bir safsızlık testi için minimum aralık, her bir safsızlığın raporlama seviyesinden spesifikasyonun % 120'sine kadardır. İçerik tekdüzellik testi için minimum aralık, testin veya hedef değişimin % 70 - 130'u ve çözünme testi için belirlenen test aralığının % ± 20 'sidir.

2.9.4. Tespit Sınırı (LOD)

Analiz edilecek maddenin sinyalinin gözlenebildiği ancak kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının hesaplanamadığı en küçük değişimdir. İstatistiksel kesinlikte kabul edilebilir ve gözlenebilen en düşük değerdir. Doğrusallık parametresine göre hesaplama yoluyla veya doğrudan analiz edilerek S/G oranına göre belirlenebilir.

Doğrusallık parametresine göre aşağıdaki formül kullanılarak da hesaplanabilir.

$$\text{Tespit Sınırı (LOD)} = \frac{3.3 \times SS}{m} \quad (2.12)$$

m: Eğim

SS: Kesişimin standart sapması

Doğrudan analiz edilerek belirlenmesi halinde bileşenin pik yüksekliğinin baseline'daki gürültüye oranı hesaplanır. Hesaplama sonucunda elde edilen S/G oranı 2 ila 3 aralığında olmalıdır.

2.9.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Analiz edilecek maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebildiği en küçük değişimdir. Doğrusallık parametresine göre hesaplama yoluyla veya doğrudan analiz edilerek sinyal/gürültü oranına göre belirlenebilir.

Gürültünün ölçülemediği durumlarda, doğrusalılık parametresine göre aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanabilir.

$$\text{Alt Tayin Sınırı (LOQ)} = \frac{10 \times SS}{m} \quad (2.13)$$

m: Eğim

SS: Kesişimin standart sapması

Doğrudan analiz edilerek belirlenmesi halinde bileşenin pik yüksekliğinin baseline'daki gürültüye oranı hesaplanır. Hesaplama sonucunda elde edilen S/G oranı 10'dan küçük olmamalı ve 10'a yakın bir değer olmalıdır.

2.9.6. Doğruluk

Doğruluk, analiz işlemi sonunda hesaplanan değerlerin gerçek değere olan yakınlığı olarak ifade edilmektedir. Analizler sonucunda elde edilen ortalama ölçüm sonuçlarının bileşenin gerçek değerine olan yakınlığı olarak tanımlanır. Bilinen derişimde madde eklenerek hazırlanan çözeltilerin tekrarlanan analizleri sonucunda tespit edilir. Doğruluk, LOQ seviyesinde doğruluk % 20'den fazla sapmamalıdır. Pratik olarak hesaplanan ortalama değer teorik yani gerçek değer $\pm$ %15'i olmalıdır.

Doğruluk parametresinde çözeltiler, plasebo üzerine madde eklenerek hazırlanır. En az üç farklı derişimde ve her bir derişimde en az üç çözelti hazırlanarak analiz edilir. Doğruluk parametresinde çalışılan en alt nokta ile en üst nokta, doğrusallık parametresinde çalışılan en alt nokta ve en üst nokta ile aynı olmalıdır.

Doğruluk parametresinde her bir çözelti için aşağıdaki formül kullanılarak geri kazanım hesaplanır. Bağlı hata (BH) ve mutlak hata üzerinden değerlendirilir.

$$\frac{\text{Hesaplanan derişim}}{\text{Teorik (bilinen) derişim}} \times 100 \quad (2.14)$$

2.9.7. Kesinlik ve Ara Kesinlik

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının kontrol edildiği parametredir. Optimum analiz koşulları altında elde edilen sonuçlar arasındaki uyumu gösterir. Kesinlik rastgele hataların dağılımı ile ilişkili olup gerçek değer ile ilişkisi yoktur. Kesinlik sonuçları; analizci, cihaz ve cihazın kalibrasyonu, sıcaklık ve nem gibi çevre koşulları, ölçümler arasındaki zaman gibi parametrelerden etkilenebilir.

Kesinlik kontrol parametreleri olarak SS, BSS ve güven aralığı her kesinlik düzeyi için hesaplanmalıdır.

Gün-içi ve günler arası kesinlikte, doğrusallık aralığından seçilen 3 derişim seviyesinde hazırlanan çözeltilerin aynı gün ve farklı günlerde analizleri yapılır ve % BSS hesaplanır.

Ara kesinlik (tutarlılık), farklı cihaz ve kolon kullanılarak farklı günlerde ve farklı analizciler tarafından % 100'lük derişimde altı ayrı çözeltili hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerden elde edilen sonuçlar ile gün-içi tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen sonuçların SS ve BSS değerleri hesaplanır. Değıştirilen her koşulda elde edilen sonuçlar istatistiksel değeriendirilir.

2.9.8. Sağlamlık

Yöntem sağlamlığının kontrol edildiğı parametredir. Yöntemde kasıtlı olarak küçük ama belirgin değışiklikler yapılarak gerçekleştirilir ve yöntemin bu değışikliklerden etkilenip etkilenmediğini gösteren parametredir. Sağlamlığın değeriendirilmesinde, cihaz ayarları gibi kullanılan analitik ekipmanla doğrudan bağlantılı olan yöntem parametreleri değıştirilmektedir. Örneğın HPLC ile yapılan analizlerde; hareketli fazdaki organik çözücü oranı, hareketli fazın pH'sı, hareketli fazda kullanılan tamponun derişimi, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve akış hızı gibi parametrelerde değışiklik yapılır. Hazırlanan çözeltiler yöntemde kasıtlı olarak değışiklik yapılarak analiz edilir. Elde edilen pikler sistem uygunluk kriterlerine göre değeriendirilir. Alıkonma zamanı, pik simetrisi, teorik plaka sayısı (N) ve yapılan ardışık enjeksiyonların BSS'sı hesaplanır.

ICH Q2A'ya göre; analitik bir prosedürün sağlamlığı, analitik yöntemin güvenilirliğinin bir göstergesidir ve analitik yöntem validasyonlarında mutlaka verilmesi gerekir. FDA ise, sağlamlık çalışmasından elde edilen verilerin, genellikle sunulmasa da yöntem doğrulamasının bir parçası olarak dahil edilmesini tavsiye etmektedir.

2.9.9. Kararlılık

Bir analizde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için standart ve numune çözeltilerinin ne kadar süre kararlı olduğunun bilinmesi gerekir.

Taze hazırlanan çözeltiler ile belli sürelerde bekletilen standart ve numunelerin kararlılıkları, analiz sonuçları ve istatistiksel hesaplamalar kullanılarak karşılaştırılır. Aralarında % 2'den fazla fark bulunmaması istenir. Çözelti stabilitesi parametresinde, çözeltiler hazırlanır hazırlanmaz ve belirli sıcaklıkta bekletilerek aynı cihaz, aynı kolon ve aynı hareketli faz kullanılarak farklı zamanlarda analiz edilir. Yüzde fark hesaplanarak değerlendirilir.

$$\% \text{ Fark} = \frac{A_n - A_0}{A_0} \times 100 \quad (2.15)$$

A_n : n. zamanda yapılan ölçümden elde edilen yanıt

A_0 : Çözelti hazırlanır hazırlanmaz yapılan ölçümden elde edilen yanıt.

2.9.10. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

Sistem uygunluk testleri (SUT), bir analitik yöntemin ayrılmaz bir parçasını temsil eder ve kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için kullanılır. Analize başlamadan önce referans standardı ile analiz sisteminin performansını belirlemek için yapılan çalışmalara sistem uygunluk testleri denir. Bu amaçla kromatografik sistemlerde, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N), ayırıcılık (R_s) ve kuyruklanma faktörü (T) parametreleri incelenir (Tablo 2.4) (81).

Tablo 2.4. Sistem Uygunluk Testlerine ait kabul kriterleri (48, 80).

Parametre	Kabul kriteri
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği	$\% \text{ BSS} \leq 2.0, n = 5$
Kapasite faktörü	$k' > 2.0$
Teorik Plaka sayısı	$N \geq 2000$
Ayırıcılık	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında kullanılan etkin maddeler ve koruyucu maddeler (Tablo 3.1), farmasötik preparatlar (Tablo 3.2), kimyasal maddeler (Tablo 3.3), cihaz ve ekipmanlar (Tablo 3.4) ve kullanılan cam malzemeler (Tablo 3.5) aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan etkin maddeler ve koruyucu maddeler.

Betametazon Dipropiyonat	Symbiotica
Betametazon sodyum fosfat	Symbiotica
Benzil alkol	Merck
Metil paraben	Merck
Propil paraben	Merck

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan farmasötik preparatlar.

Diprospan®	Merck Sharp Dohme İlaçları Ltd. Şti.
------------	--------------------------------------

Tablo 3.3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Hekzilamin	Merck, 804326
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, 104873
Asetonitril	Merck, 100030
Sodyum hidroksit	Merck, 106498
Fosforik asit	Merck, 100573
Hidrojen peroksit	Merck, 107210
Hidroklorik asit	Merck, 100317

Tablo 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

HPLC	Agilent, 1260 Infinity II
C18; 250 x 4.6 mm, 5 µm	Agilent, Zorbax XDB C18
pH metre	Mettler Toledo, SevenExcellence
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Karıştırıcı	IKA
Vorteks	IKA

Tablo 3.4. (Devam) Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

Ultrasonik banyo	Bandelin
Şırınga ucu naylon filtre	Millipore
Şırınga ucu hidrofilik PTFE filtre	Millipore
Puar	Brand
Membran filtre	Millipore, 0.45 µm hidrofilik PTFE

Tablo 3.5. Tez çalışmasında kullanılan cam malzemeler.

Dereceli cam pipet	Isolab
Balon joje	Isolab
Vial	Agilent
Beher	Isolab

3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Hareketli Faz A: 6.8 g potasyum dihidrojen fosfat tartılmıştır, üzerine 3.0 mL hekzilamin eklenmiştir ve 10 dk bekletilmiştir. Karışıma 1000.0 mL su eklenerek çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH'sı fosforik asit ile 4.0 ± 0.05 'e ayarlanmıştır. Çözelti 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülüp degaze edilmiştir.

Hareketli Faz B: Asetonitril hareketli faz B çözeltisi olarak kullanılmıştır.

1.0 N Sodyum Hidroksit Çözeltisi: 42.0 g sodyum hidroksit tartılmıştır, üzerine bir miktar karbondioksit içermeyen su eklenerek çözündürülmüştür ve karbondioksit içermeyen su ile 1000.0 mL'ye seyreltilmiştir.

pH 6.8 Fosfat Tamponu Çözeltisi: 1000.0 mL su üzerine 1.0 mL fosforik asit eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 1.0 N sodyum hidroksit çözeltisi ile 6.8 ± 0.05 'e ayarlanmıştır.

Seyreltme Çözeltisi: pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h).

Kör Çözelti: Kör çözelti olarak seyreltme çözeltisi kullanılmıştır.

Paraben Stok Standart Çözeltisi: 20.0 mg propil paraben ve 130.0 mg metil paraben referans standardı tartılmıştır, üzerine 30.0 mL seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür ve seyreltme çözeltisi ile 100.0 mL'ye seyreltilmiştir (200.0 µg/mL propil paraben, 1300.0 µg/mL metil paraben).

Standart Çözelti: 45.0 mg benzil alkol, 13.2 mg betametazon sodyum fosfat referans standardı ve 32.2 mg betametazon dipropiyonat referans standardı tartılmıştır, 30.0 mL seyreltme çözeltisi ve 5.0 mL metil ve propil paraben stok standart çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile 50.0 mL'ye seyreltilmiştir (20.0 µg/mL propil paraben, 130.0 µg/mL metil paraben, 900.0 µg/mL benzil alkol, 264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat, 644.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Farmasötik Preparat Çözeltisi: 20 adet ampul açılarak karıştırılmıştır. Karışımdan 5.0 g örnek tartılıp üzerine 30.0 mL seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyo yardımıyla çözündürülmüştür. Çözelti seyreltme çözeltisi ile 50.0 mL'ye seyreltilmiştir (263.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat, 643.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Plasebo Çözeltisi: 5.0 g plasebo tartılmıştır, üzerine 30 mL seyreltme çözeltisi eklenerek ultrasonik banyo yardımıyla çözündürülmüştür. Çözelti seyreltme çözeltisi ile 50.0 mL'ye seyreltilmiştir.

Betametazon Sodyum Fosfat Plasebo Çözeltisi: 1.0 mL betametazon sodyum fosfat plasebosu alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye seyreltilmiştir.

Betametazon Dipropiyonat Plasebo Çözeltisi: 1.0 mL betametazon dipropiyonat plasebosu alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye seyreltilmiştir.

Paraben Doğrusallık Stok Çözeltisi: 130.0 mg metil paraben ve 20.0 mg propil paraben standartları 100.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

Doğrusallık Stok Standart Çözeltisi: 90 mg benzil alkol, 26.8 mg betametazon sodyum fosfat ve 64.9 mg betametazon dipropiyonat referans standartları, 50 mL'lik balon jojeye tartılıp üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Çözelti

üzerine 10.0 mL paraben doğrusallık stok çözeltisinden eklenip seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

% 50'lik Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 2.5 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10 .0mL'ye tamamlanmıştır.

% 70'lik Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 3.5 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

% 80'lik Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 4.0 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

% 100'lük Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 5.0 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

% 120'lik Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 6.0 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

% 130'luk Doğrusallık Çözeltisi: Doğrusallık stok standart çözeltisinden 6.5 mL alınmıştır ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

Stres Testleri için Hazırlanan Çözeltiler

Betametazon Sodyum Fosfat Asit Bozundurması: 13.2 mg betametazon sodyum fosfat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL 12.0 N HCl eklenip 20 saat bekletilmiştir. 20 saat süre sonunda üzerine 1.0 mL 12.0 N NaOH eklenerek nötralize edilmiştir ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat).

Betametazon Dipropiyonat Asit Bozundurması: 32.2 mg betametazon dipropiyonat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL 1.0 N HCl eklenip oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. 1 saat süre sonunda üzerine 1.0 mL 1.0 N NaOH eklenerek nötralize edilmiştir ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (644 .0µg/mL betametazon dipropiyonat).

Betametazon Enjeksiyonluk Süspansiyon Plasebo Asit Bozundurması: 5.0 g betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu, 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 12.0 N HCl çözeltisinden 1.0 mL eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, 1.0 mL 12.0 N NaOH çözeltisi eklenerek nötralize edilmiştir ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

Betametazon Sodyum Fosfat Baz Bozundurması: 13.2 mg betametazon sodyum fosfat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL 1.0 N NaOH eklenip oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, üzerine 1.0 mL 1.0 N HCl eklenerek nötralize edilmiştir ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat).

Betametazon Dipropiyonat Baz Bozundurması: 32.2 mg betametazon dipropiyonat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL 2.0 N NaOH eklenip 40 °C'deki su banyosunda 16 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, üzerine 1.0 mL 2.0 N HCl eklenerek nötralize edilmiştir ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (644.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Betametazon Enjeksiyonluk Süspansiyon Plasebo Baz Bozundurması: 5.0 g betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu, 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 N NaOH çözeltisinden 1.0 mL eklenip oda sıcaklığında 16 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, 1.0 mL 1.0 N HCl çözeltisi eklenerek nötralize edilmiş ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

Betametazon Sodyum Fosfat Hidrojen Peroksit Bozundurması: 13.2 mg betametazon sodyum fosfat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL % 10 H₂O₂ eklenerek 40 °C'deki su banyosunda 5 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, üzerine seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat).

Betametazon Dipropiyonat Hidrojen Peroksit Bozundurması: 32.2 mg betametazon dipropiyonat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılır, üzerine 1.0 mL % 30 H₂O₂ eklenerek oda sıcaklığında 20 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, üzerine seyreltme

çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (644.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Betametazon Enjeksiyonluk Süspansiyon Plasebo Hidrojen Peroksit

Bozundurması: 5.0 g betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu, 50.0 mL'lik balon jojeye tartılmış, üzerine 1.0 mL % 10 H₂O₂ eklenerek oda sıcaklığında 5 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, seyreltme çözeltisi ile çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

Betametazon Sodyum Fosfat Isı Bozundurması:

13.2 mg betametazon sodyum fosfat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılarak balon joje 105 °C'deki etüvde 16 saat bekletilmiştir. 16 saatlik süre sonunda, etüvden çıkartılıp oda sıcaklığına gelmesi için beklenmiş, üzerine seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat).

Betametazon Dipropiyonat Isı Bozundurması:

32.2 mg betametazon dipropiyonat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılarak balon joje 170 °C'deki etüvde 24 saat bekletilmiştir. 24 saatlik süre sonunda, etüvden çıkartılıp oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiş, üzerine seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (644.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Betametazon Enjeksiyonluk Süspansiyon Plasebo Isı Bozundurması:

5.0 g betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu 50.0 mL'lik balon jojeye alınarak 105 °C'de 6 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiş, üzerine seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüştür. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

Betametazon Sodyum Fosfat Isı ve Nem Bozundurması:

13.2 mg betametazon sodyum fosfat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılarak 40 °C % 75 RH stabilite kabininde 7 gün bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, kabinden alınarak seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (264.0 µg/mL betametazon sodyum fosfat).

Betametazon Dipropiyonat Isı ve Nem Bozundurması: 32.2 mg betametazon dipropiyonat 50.0 mL'lik balon jojeye tartılarak 40 °C % 75 RH stabilite 7 gün bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, kabinden alınarak seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır (644.0 µg/mL betametazon dipropiyonat).

Betametazon Enjeksiyonluk Süspansiyon Plasebo Isı ve Nem Bozundurması: 5.0 g betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu, 50.0 mL'lik balon jojeye tartılarak 40 °C % 75 RH stabilite 7 gün bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda, kabinden alınarak seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır.

3.2. Kromatografik Koşullar

Geliştirilen HPLC yönteminde; analiz Zorbax Eclipse XDB C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm kolonda, iyon çifti olarak hekzilamin içeren pH: 4.0 fosfat tamponu (hareketli faz A) : asetronitril (hareketli faz B) hareketli fazı kullanılarak gradient program (Tablo 3.6) uygulanarak 1 mL/dk akış hızında ve 254 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. Analizde kullanılan gradient programı.

Zaman (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	80	20
5	80	20
35	50	50
55	50	50
55.1	80	20
65	80	20

3.3. Analiz Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen analitik yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Yöntemin seçici, doğru ve kesin olduğunu göstermek amacıyla ICH Q2(R1) kılavuzu doğrultusunda validasyon parametreleri belirlenmiştir. Bu kapsamda; tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğrusalılık, duyarlılık (LOD ve LOQ), doğruluk ve geri kazanım, sağlamlık ve çözelti kararlılığı parametreleri çalışılmıştır.

Sistem Tekrarlanabilirliği

Sistem tekrarlanabilirliği, sistem uygunluk kriterlerinden biri olup aynı çözeltiden yapılan ardışık enjeksiyonlarda sistemin kesinliği değerlendirilmiştir.

Etkin madde ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100'lük derişimde standart çözelti hazırlanarak ardışık 10 enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyonlardan elde edilen her bir pik için % BSS değeri hesaplanmıştır.

Seçicilik

Seçicilik, analitlerin doğru bir şekilde analiz edilebildiğinin, matrikste bulunan maddelerin analitlerle girişim yapmadığının gösterildiği validasyon parametresidir.

Seçicilik parametresinde, etkin maddelere ve yardımcı maddelere ait standart çözeltiler, stres testi çözeltileri, plasebo çözeltisi ve seyreltme çözeltisi sisteme verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır ve herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Seçicilik parametresi kapsamında yapılan stres testi çalışmasında ise betametazon dipropiyonat, betametazon sodyum fosfat referans standartlarına ve koruyucu maddeleri içeren plaseboya ayrı ayrı stres testleri uygulanmıştır. Betametazon dipropiyonat, betametazon sodyum fosfat referans standartları ve koruyucu maddeleri içeren plasebo asit, baz, peroksit ve ısıya maruz bırakılmıştır.

Doğrusallık ve Aralık

Etkin maddelerin ve koruyucu maddelerin referans standartları kullanılarak % 50 - 130 derişim aralığında 6 farklı artan derişimde doğrusallık çözeltileri hazırlanmıştır ve kromatogramları kaydedilmiştir. Her bir çözeltiden elde edilen alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilmiştir ve kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Regresyon analizi yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ile korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. ANOVA analizleri ile kalibrasyon eğrilerinin eğim değerlerinin sıfırdan farklı ($p < 0.05$), kesişim değerlerinin sıfıra eşit (anlamsız) ($p > 0.05$) ve

korelasyon katsayısının tesadüfi değerler olup olmadığı F değerleri ile istatistiksel olarak belirlenmiştir. Olması gereken derişimlere karşı, kalibrasyon grafiğinden elde edilen verilerle bulunan derişimlerin grafiğe geçirilmesiyle geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığı kontrol edilmiştir.

Tespit Sınırı (LOD)

Etkin maddelere ait referans standartlar kullanılarak S/G oranının 2 - 3 aralığında olduğu % 0.01'lik derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Ardışık altı enjeksiyon yapılmıştır ve alan değerlerinin % BSS değerleri hesaplanmıştır ve S/G oranları kontrol edilmiştir.

Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Etkin maddelere ait referans standartlar kullanılarak S/G oranının yaklaşık olarak 10 olduğu % 0.04'lük derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Ardışık 6 enjeksiyon yapılmıştır. Ardışık enjeksiyonlardan elde edilen alan değerlerinin % BSS değerleri hesaplanmıştır ve S/G oranları kontrol edilmiştir.

Doğruluk

Etkin maddeler ve koruyucu maddeler için gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Aynı gün içinde % 50, % 100 ve % 120 derişimlerde hazırlanan standart çözeltilere (n = 6) ait analiz sonuçları ile elde edilen verilerin % BH değerleri hesaplanarak gün içi doğruluk; aynı derişimlerdeki standart çözeltilerin 6 gün art arda analiz edilmesi ile elde edilen verilerin % BH değerleri hesaplanarak ise günler arası doğruluk değerlendirilmiştir.

Etkin madde ve koruyucu maddelerin % 50, % 100 ve % 120'si olacak şekilde 3 farklı derişimde, betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri plaseboya eklenerek geri kazanım çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir derişim seviyesinde 3 ayrı çözelti hazırlanmıştır ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk parametresi için ayrıca standart ekleme yöntemi çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla, numune çözeltisi üzerine % 20, 70, 80, 90, 100 ve 120 derişim seviyelerinde etkin

madde ve koruyucu madde standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon doğruları çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır.

Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)

Etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 50, % 100 ve % 120'lik olmak üzere 3 farklı derişimde kesinlik çözeltileri hazırlanmıştır. Kesinlik parametresi 6 farklı günde çalışılmıştır. Her bir derişim düzeyi için ilk gün 6 ayrı çözeltili, farklı günlerde ise her bir derişim düzeyi için 3'er çözeltili hazırlanıp analizleri yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarının % BSS değerleri hesaplanarak gün içi ve günler arası kesinlik değerlendirilmiştir.

Ara kesinlik parametresinin değerlendirilmesi için farklı bir analizci tarafından etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100'lük derişimde 6 ayrı çözeltili hazırlanmıştır. Farklı bir cihaz, farklı bir kolon kullanılarak farklı bir günde analiz gerçekleştirilmiştir. Analizde her bir çözeltiliden ardışık 3 enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen sonuçların % BSS değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı ise F ve t-testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sağlamlık

Etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100'lük derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kromatografik şartlarda (akış hızı, dalga boyu ve kolon fırını sıcaklığı) ve hareketli fazın pH'sında değişiklikler yapılarak hazırlanan çözeltiliden ardışık 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her bir değişiklikte elde edilen piklerin alıkonma zamanları, alan değerleri, N sayıları ve T faktörleri değerlendirilmiş ve % BSS değeri hesaplanmıştır.

Kararlılık

Etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100'lük derişimde standart çözeltili hazırlanmıştır. Ticari farmasötik preparat kullanılarak % 100'lük derişimde numune çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltili ve

numune çözeltisinden belirli zamanlarda enjeksiyon yapılmıştır ve elde edilen alan değerleri karşılaştırılarak % uyum değerleri hesaplanmıştır.

Sistem Uygunluk Testleri

Etkin madde ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100' lük derişimde standart çözelti hazırlanmıştır. Ardışık 10 enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyonlardan elde edilen her bir pik için alan değerleri, alıkonma zamanları, N sayıları ve T faktörleri incelenmiştir.

3.4. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi, Türkiye piyasasındaki tek bir muadili bulunan Diprospan® ampul adlı ürüne uygulanmıştır. Numune çözeltileri 6 kez ayrı ayrı hazırlanmış ve analiz sonuçlarına göre etkin madde miktarları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

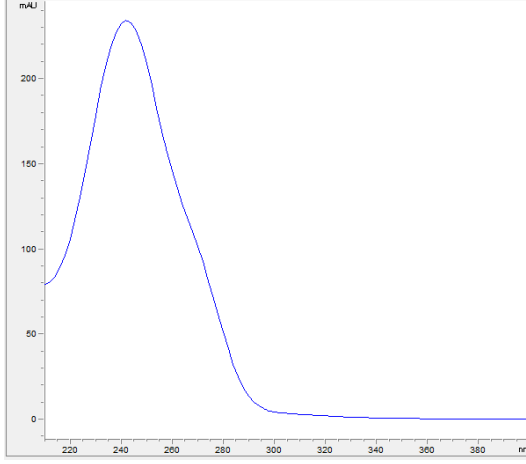
Bu tez çalışması kapsamında, bozunma ürünlerinin varlığında, betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil parabenin HPLC yöntemi ile aynı anda analizi için optimum koşullar belirlenerek miktar tayini çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Bu iki etkin madde ve ticari ürün plasebosu kılavuzlarda verilen koşullarda stres testlerine tabi tutularak (asidik, bazik koşullarda, ısı, nem ve oksidasyon işlemi uygulanarak) bozundurma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemin kılavuzlar doğrultusunda validasyon çalışmaları yapılarak elde edilen bulgular her aşamada uygun istatistiksel testlerle değerlendirilmiştir. Son olarak geliştirilen ve valide edilen yöntem, betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır.

4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyonu

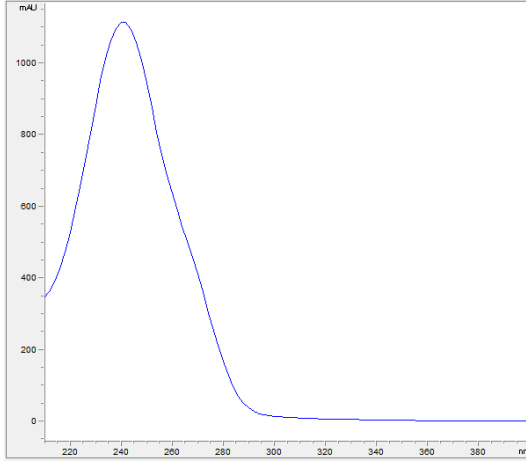
Benzil alkol, metil paraben ve propil paraben koruyucuları ve stres testleri sonucu olası bozunma ürünlerinin varlığında; betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddelerinin miktar tayini için yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır. En uygun kromatografik koşulların belirlenebilmesi amacıyla farklı sabit fazlar kullanılarak, hareketli faz bileşiminde ve hareketli fazın pH'sında değişiklikler yapılarak elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve pikler arasındaki ayırıcılık incelenmiştir.

4.1.1. Dalga Boyu Seçimi

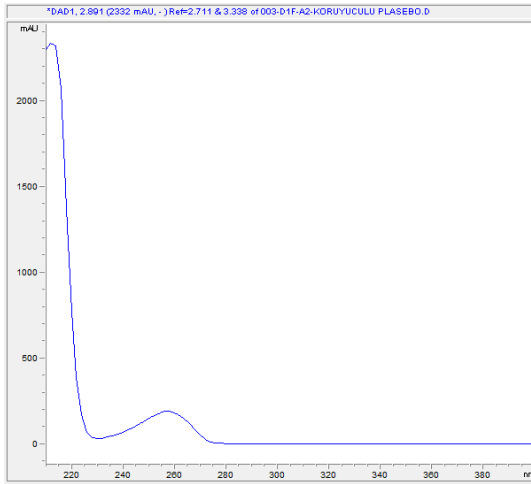
Betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben diyot dizi dedektörü (DAD) kullanılarak sisteme ayrı ayrı enjekte edilmiştir. Her bir molekülün enjeksiyonundan elde edilen spektrumlar incelenmiştir (Şekil 4.1 - 4.5). 254 nm dalga boyunun tüm moleküllerin miktar tayini için uygun olduğu belirlenmiştir.



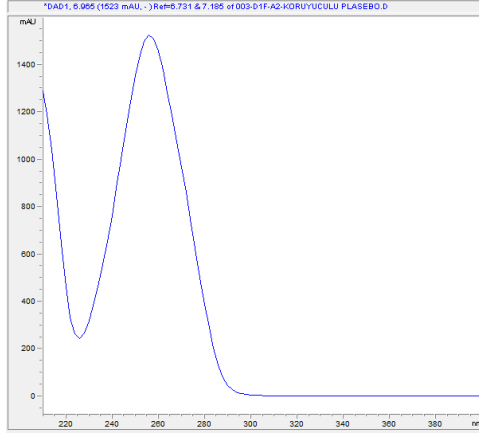
Şekil 4.1. Betametazon sodyum fosfata ait spektrum.



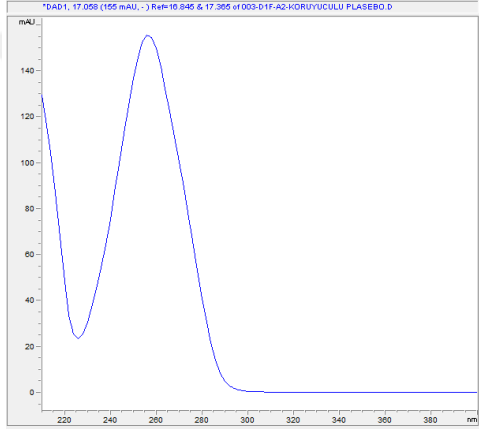
Şekil 4.2. Betametazon dipropiyonata ait spektrum.



Şekil 4.3. Benzil alkole ait spektrum.



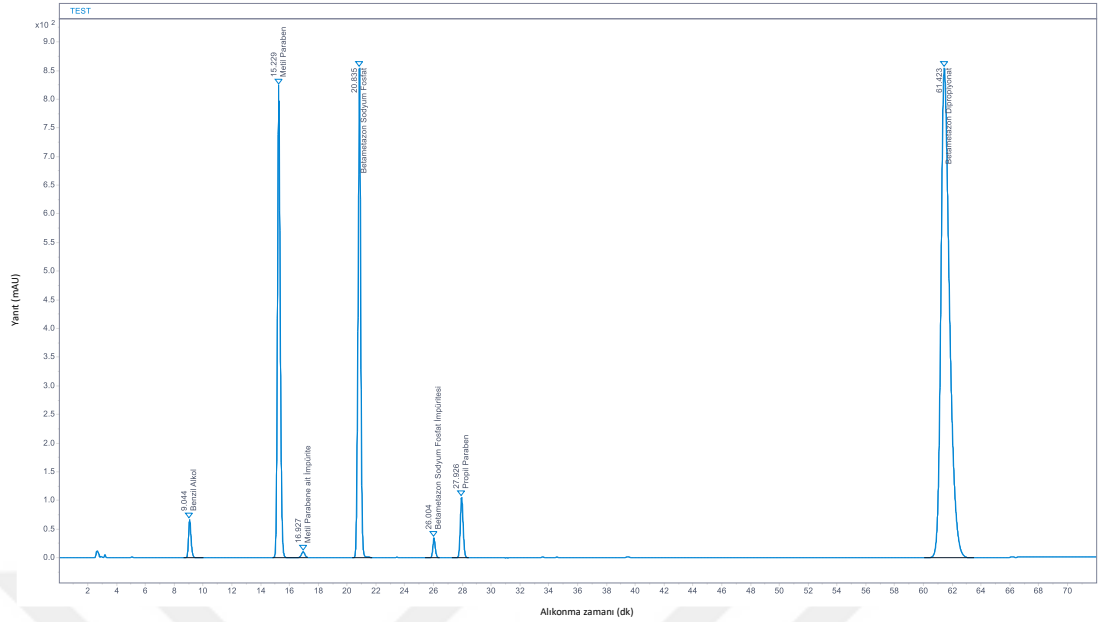
Şekil 4.4. Metil parabene ait spektrum.



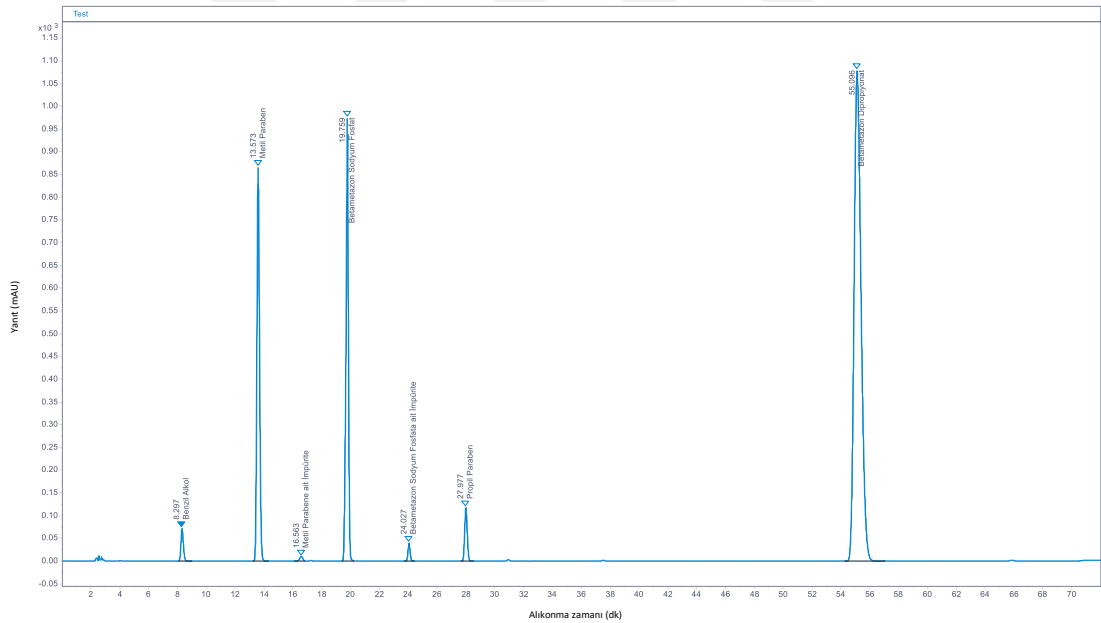
Şekil 4.5. Propil parabene ait spektrum.

4.1.2. Sabit Fazın Belirlenmesi

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddeleri, benzil alkol, metil paraben, propil paraben koruyucularının tayini için C8 ve C18 kolonlar kullanılmıştır. C8 ve C18 kolonlar kullanılarak elde edilen kromatogramlar, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. En iyi ayırımın C18 kolonda olduğu gözlenmiş olup çalışmalar C18 (Zorbax Eclipse XDB C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) kolon ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.6. C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile yapılan standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Hareketli Faz A: Hekzilamin içeren pH: 4.0 tamponu, Hareketli faz B: Asetonitril).

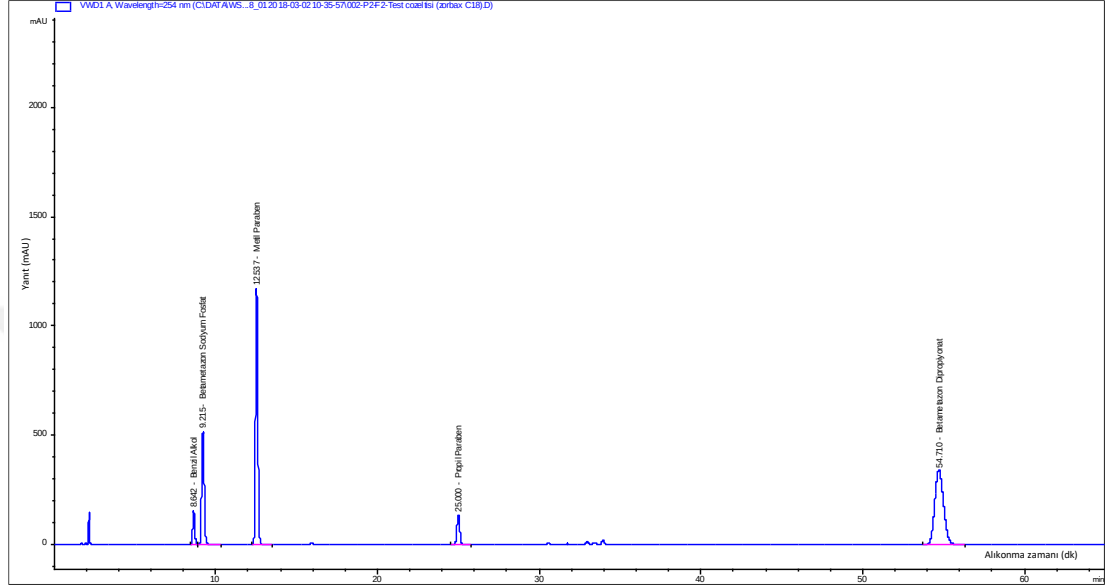


Şekil 4.7. C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon ile yapılan standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Hareketli Faz A: Hekzilamin içeren pH: 4.0 tamponu, Hareketli faz B: Asetonitril).

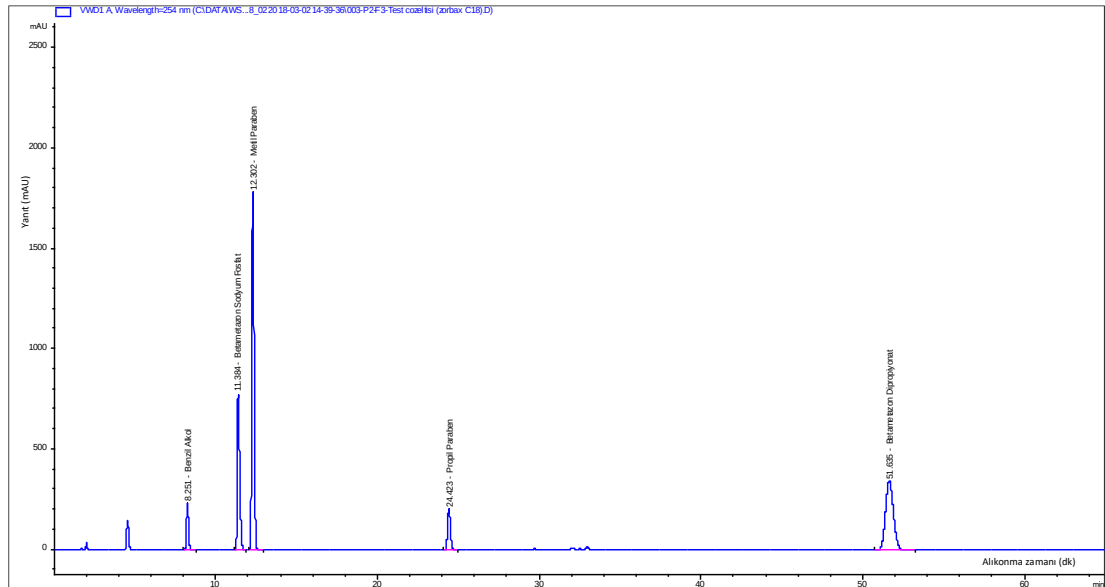
4.1.3. Hareketli Faz A'nın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşimine eklenen iyon çifti ajanının etkisi ve hareketli fazın pH'sının etkisi incelenmiştir. Hareketli faz A'nın (fosfat tamponu) pH'sı 3.0, pH 4.0 ve 7.0'ye

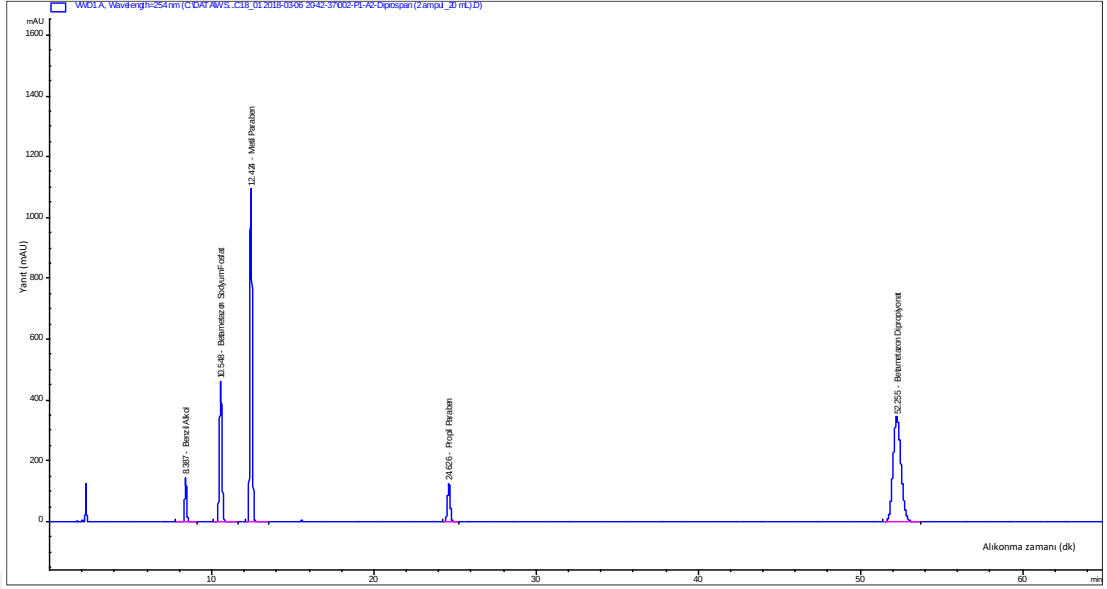
ayarlanmıştır. Hareketli faz A iyon çifti ajanı eklenmeden ve eklenerek hazırlanmıştır. İyon çifti olarak trietilamin ve hekzilamin kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.8 - 4.12’de rezolüsyon değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre iyon çifti ajanı olarak hareketli faza hekzilamin eklenmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.8. pH: 7.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.



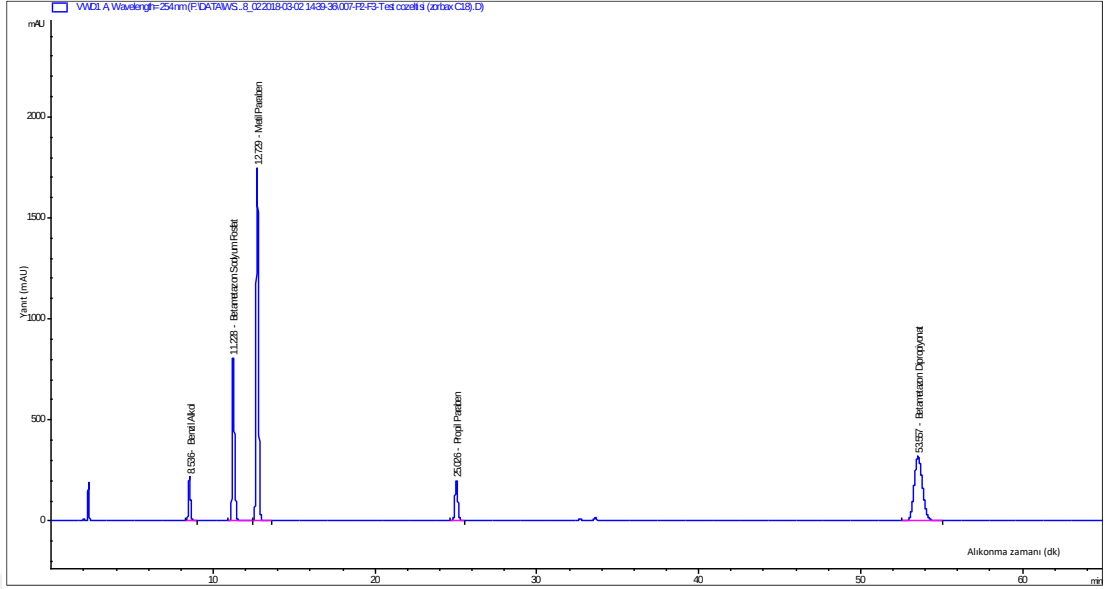
Şekil 4.9. pH: 3.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.



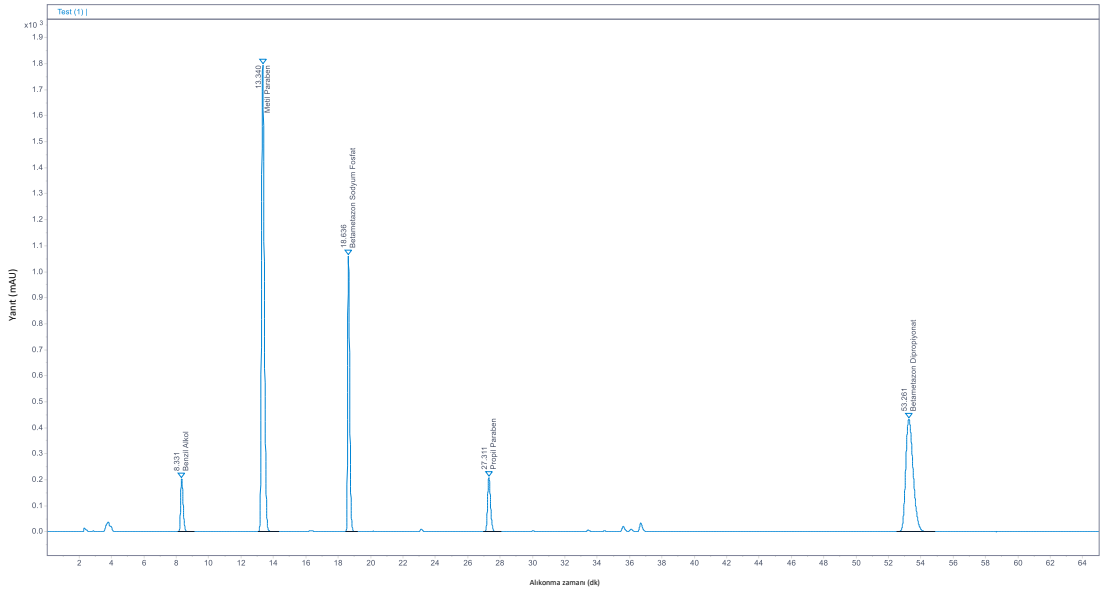
Şekil 4.10. pH: 4.0 olan hareketli faza iyon çifti eklenmediğinde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.

Tablo 4.1. Farklı pH'larda hareketli faz A kullanıldığında elde edilen ayırıcılık değerleri.

	Benzil Alkol ile Betametazon Sodyum Fosfat Arasındaki Rs Değeri	Betametazon Sodyum Fosfat ile Metil Paraben Arasındaki Rs Değeri
pH 3.0 tampon çözelti	12.61	3.37
pH 7.0 tampon çözelti	2.24	11.99
pH 4.0 tampon çözelti	8.50	6.81



Şekil 4.11. pH: 4.0 olan hareketli faza trietilamin eklendiğinde elde edilen kromatogram.

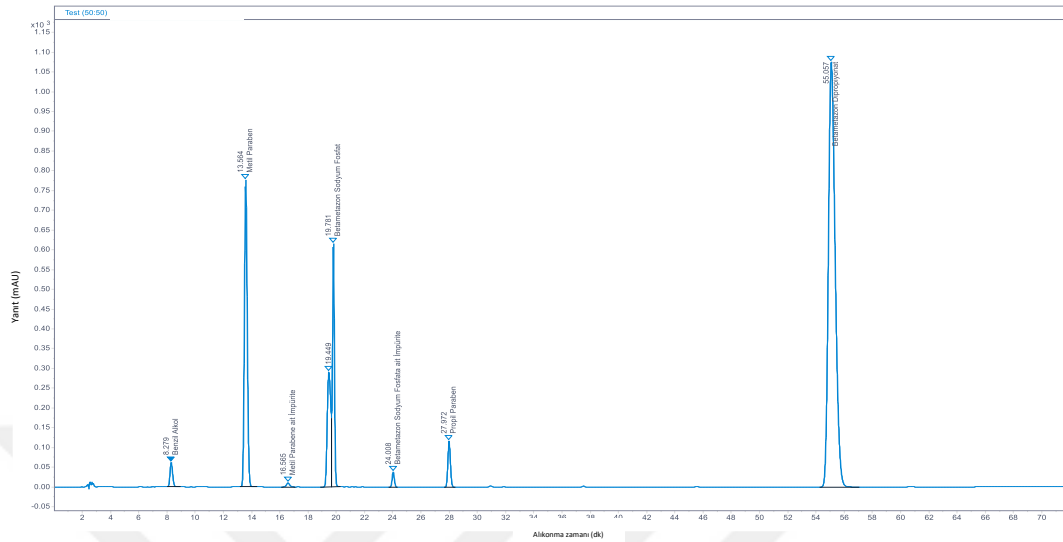


Şekil 4.12. pH: 4.0 olan hareketli faza heksilamin eklendiğinde elde edilen kromatogram.

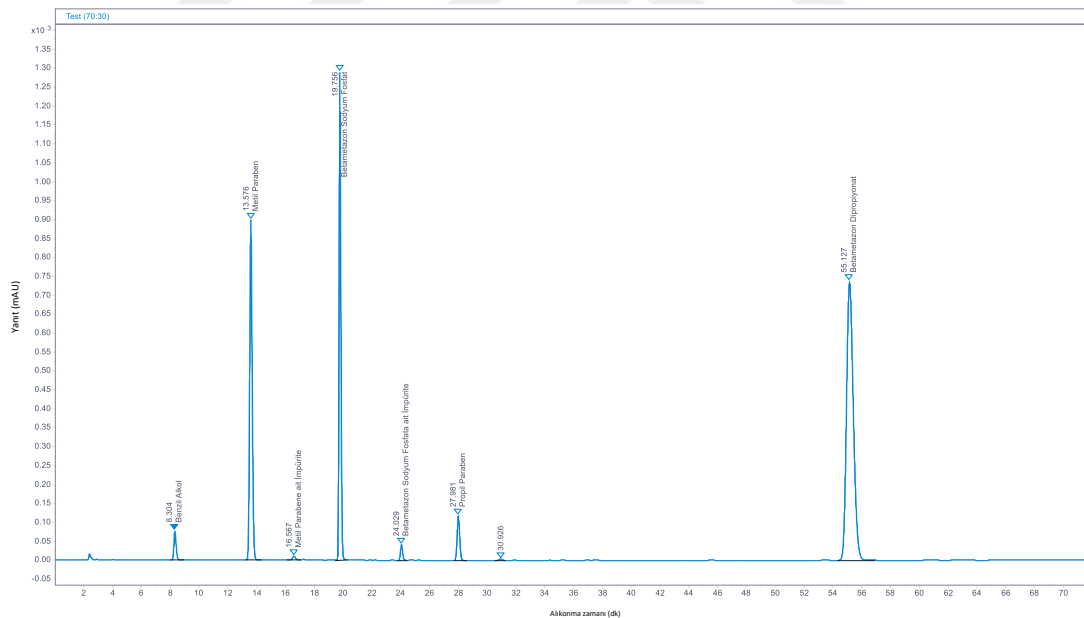
4.1.4. Seyreltme Çözeltisi Seçimi

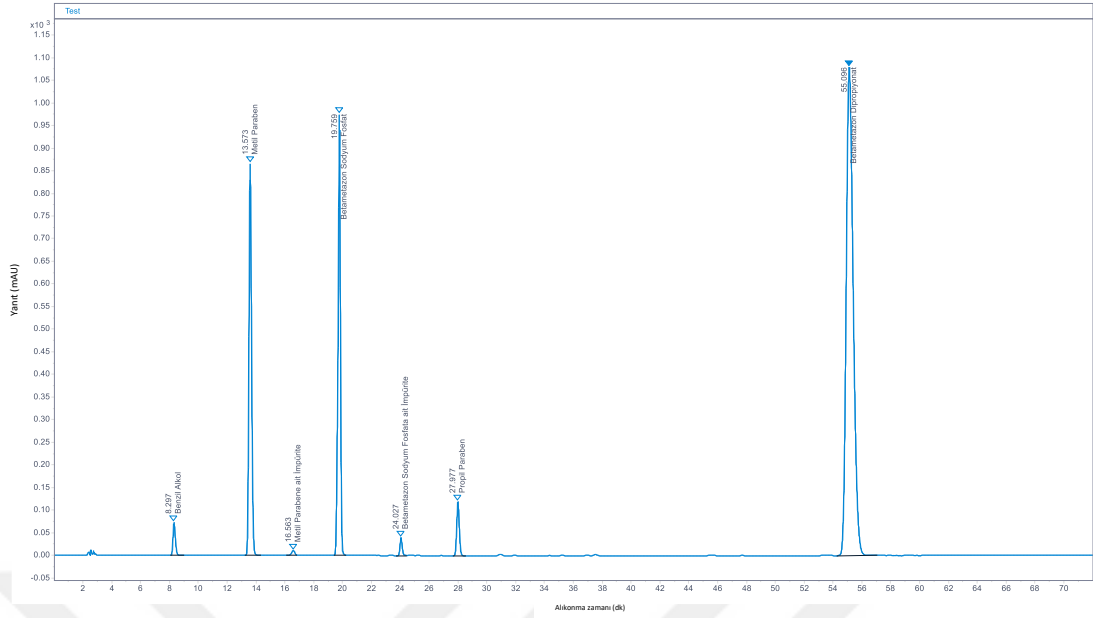
Farklı oranlarda su - asetonitril karışımı ve pH 6.8 fosfat tamponu - asetonitril karışımı kullanılarak seyreltme çözeltisi çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda su : asetonitril (50 : 50, h/h), su : asetonitril (70 : 30, h/h), su : asetonitril (65 : 35, h/h) ve pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) karışımları kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.13 - 4.16'da

verilmiştir. En iyi çözünmenin ve çözelti stabilitesinin pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) çözeltisi ile sağlandığı belirlenmiştir.

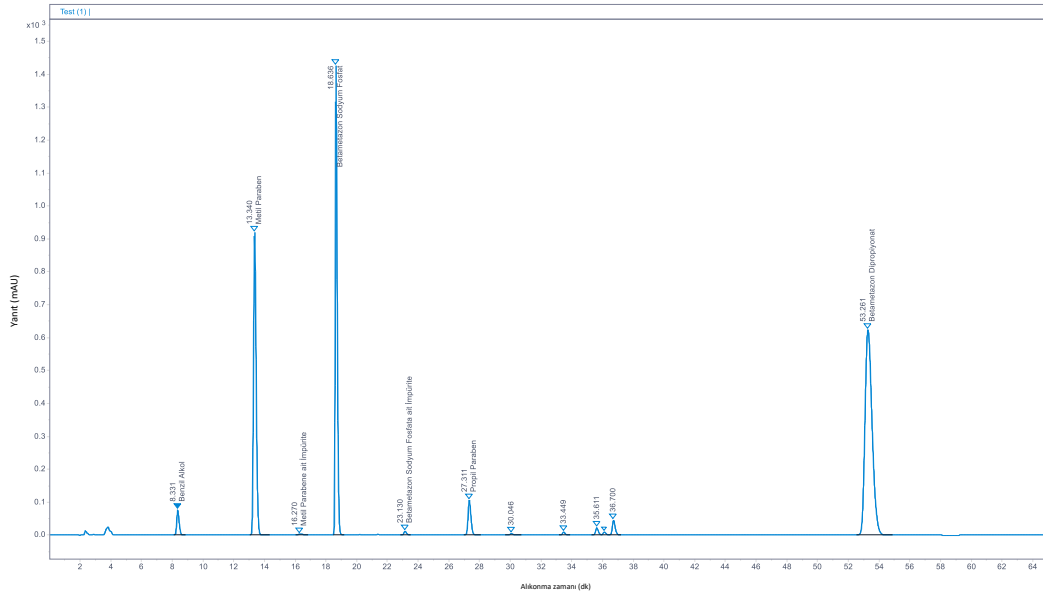


Şekil 4.13. Su : asetonitril (50 : 50, h/h) seyreltme çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.





Şekil 4.15. Su : asetonitril (65 : 35, h/h) kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.



Şekil 4.16. pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) kullanılarak hazırlanan standart çözeltiye ait kromatogram.

4.1.5. Filtre Seçimi

Hazırlanan % 100 derişimde standart çözeltiler süzülmeden, 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden ve 0.45 µm naylon filtreden süzülerek viallere alınmıştır. Süzülmeden sisteme verilen standart çözelti kromatogramından elde edilen ana pik alanları ile süzülerek sisteme verilen standart çözelti kromatogramlarından elde edilen ana piklerin alanları

karşılaştırılmıştır. Alan değerleri arasındaki yüzde % uyum hesaplanmıştır (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Yapılan filtre seçimi çalışmasında benzil alkolün, metil parabenin, betametazon sodyum fosfatın ve betametazon dipropiyonatın naylon filtrede tutunduğu belirlenmiştir. Yapılacak çalışmalarda 0.45 µm hidrofilik PTFE filtre kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.2. Etkin maddeler için filtre seçimi sonuçları.

Çözeltiler	Betametazon Sodyum Fosfat Alanı	Uyum (%)	Betametazon Dipropiyonat Alanı	Uyum (%)
Süzülmeden sisteme verilen standart çözelti	10936.4	-	36150.1	
0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülen standart çözelti	10898.9	99.7	36016.0	99.6
0.45 µm naylon filtreden süzülen standart çözelti	10744.8	98.3	32499.2	89.9

Tablo 4.3. Koruyucu maddeler için filtre seçimi sonuçları.

Çözeltiler	Benzil Alkol Alanı	Uyum (%)	Metil Paraben Alanı	Uyum (%)	Propil Paraben Alanı	Uyum (%)
Süzülmeden sisteme verilen standart çözelti	816.1		10872.1		1449.7	
0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülen standart çözelti	813.3	99.7	10825.7	99.6	1448.4	99.9
0.45 µm naylon filtreden süzülen standart çözelti	795.3	97.5	10064.5	92.6	1265.9	87.3

4.2. Validasyon Çalışmaları

4.2.1. Sistem Tekrarlanabilirliği

Sistem tekrarlanabilirliğinde, % 100 derişimde betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri ve alıkonma zamanları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Standart çözeltinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri.

	Betametazon Sodyum Fosfat	Betametazon Dipropiyonat	Benzil Alkol	Metil Paraben	Propil Paraben
$\bar{x} \pm SH$	10845.2 $\pm$ 9.67	29261.0 $\pm$ 28.79	841.2 $\pm$ 0.21	8693.1 $\pm$ 6.54	1484.8 $\pm$ 1.20
SS	30.57	91.03	0.67	20.68	3.80
% BSS	0.28	0.31	0.08	0.24	0.26

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

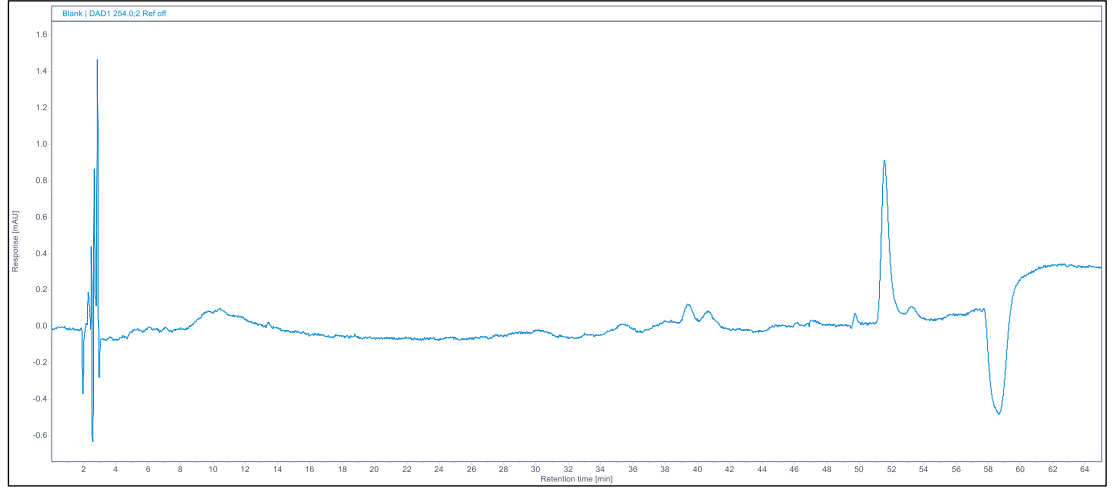
Tablo 4.5. Standart çözeltinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alıkonma zamanları.

	Betametazon Sodyum Fosfat	Betametazon Dipropiyonat	Benzil Alkol	Metil Paraben	Propil Paraben
$\bar{x} \pm SH$	18.70 $\pm$ 0.01	53.12 $\pm$ 0.05	8.33 $\pm$ 0.01	13.35 $\pm$ 0.02	27.36 $\pm$ 0.02
SS	0.04	0.17	0.02	0.05	0.05
BSS	0.21	0.33	0.30	0.37	0.18

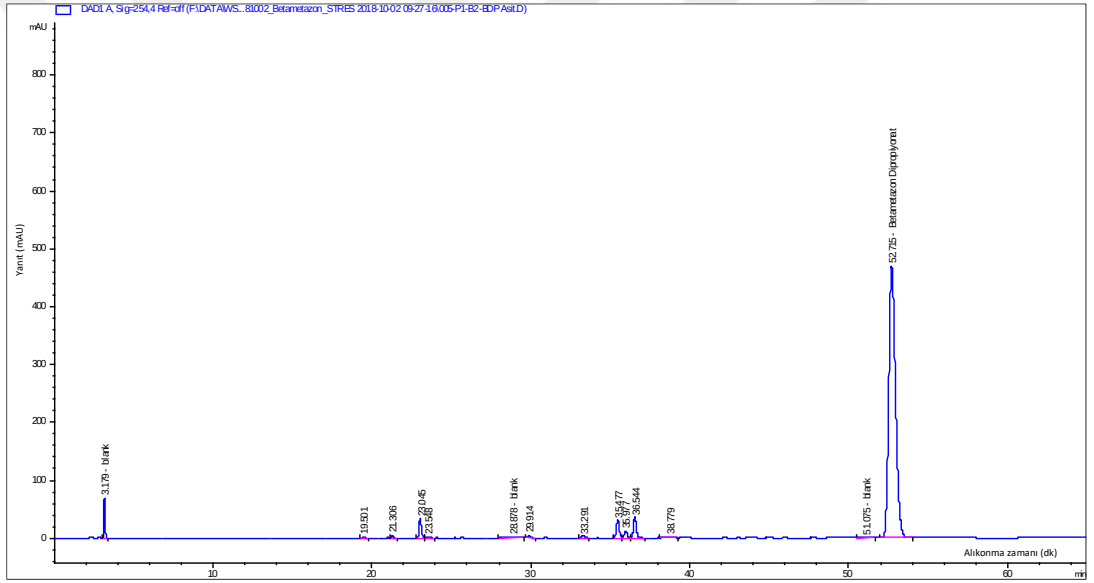
$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

4.2.2. Seçicilik

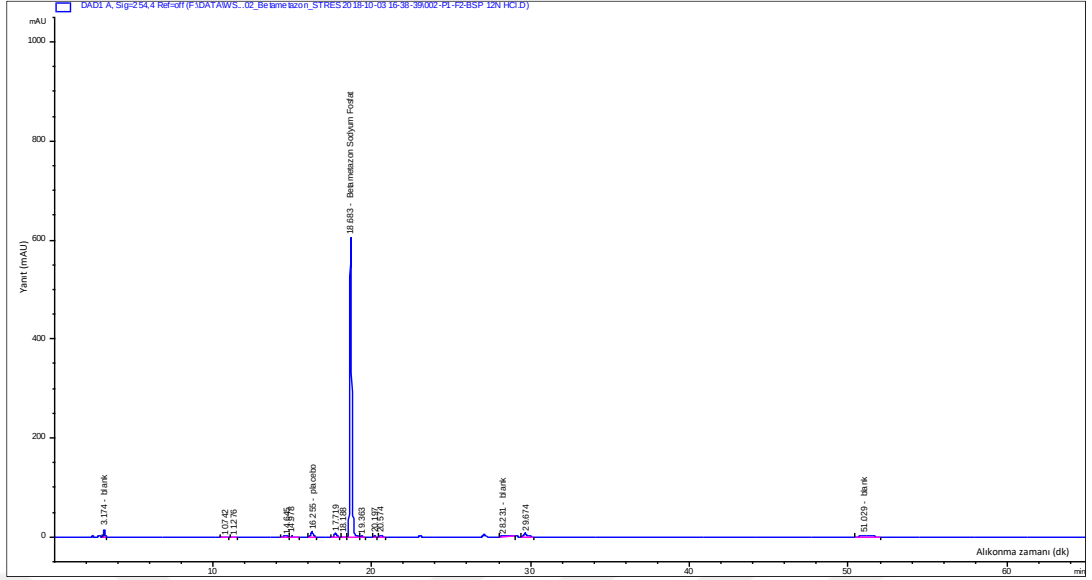
Betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat ve betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosu ile Bölüm 3.1.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan stres çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4.17 - 4.32’de verilmiştir.



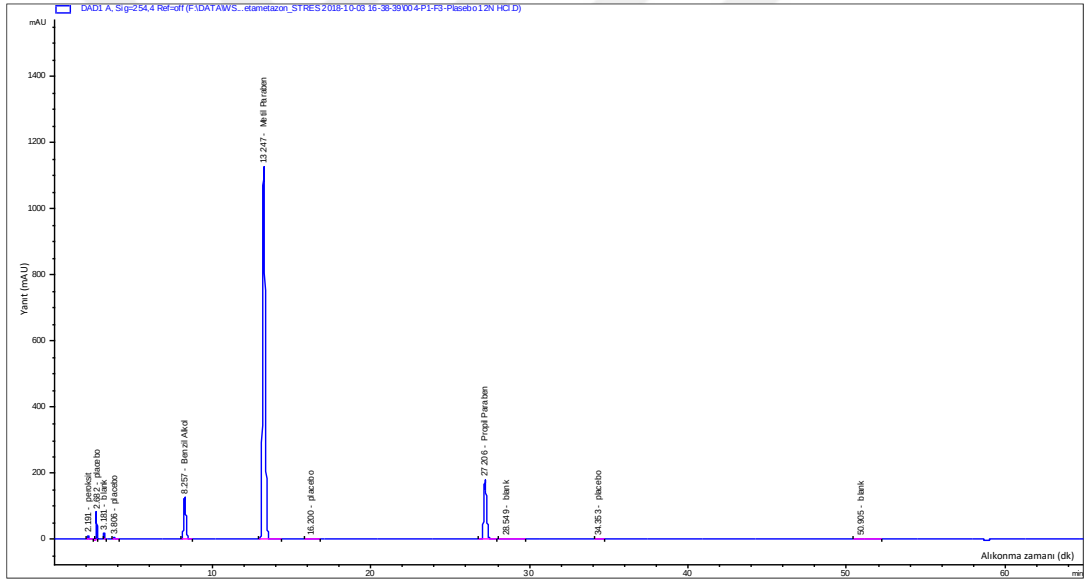
Şekil 4.17. Çözücüye ait kromatogram.



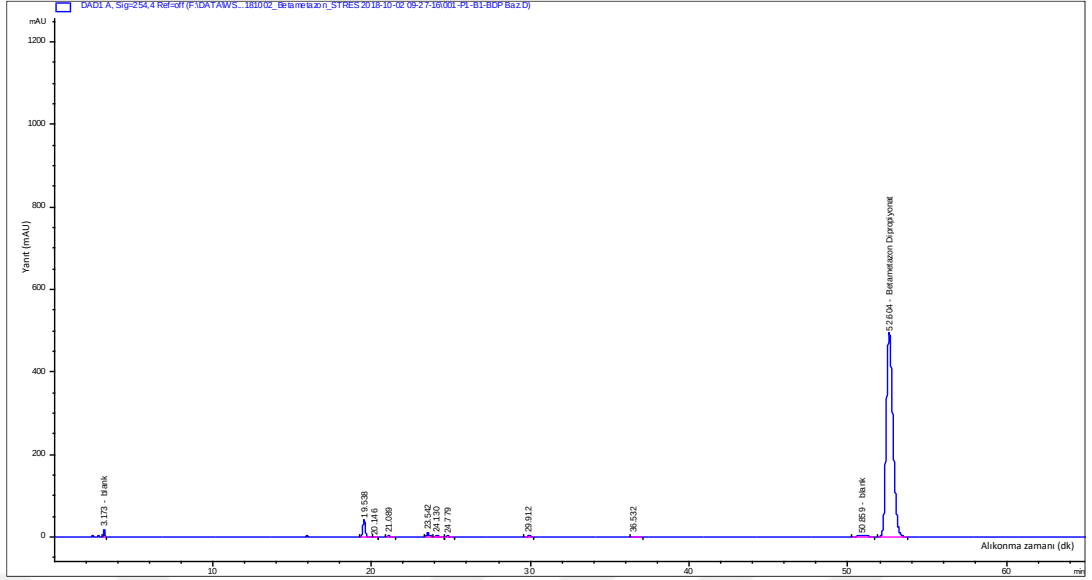
Şekil 4.18. Betametazon dipropiyonat asit bozundurmasına ait kromatogram.



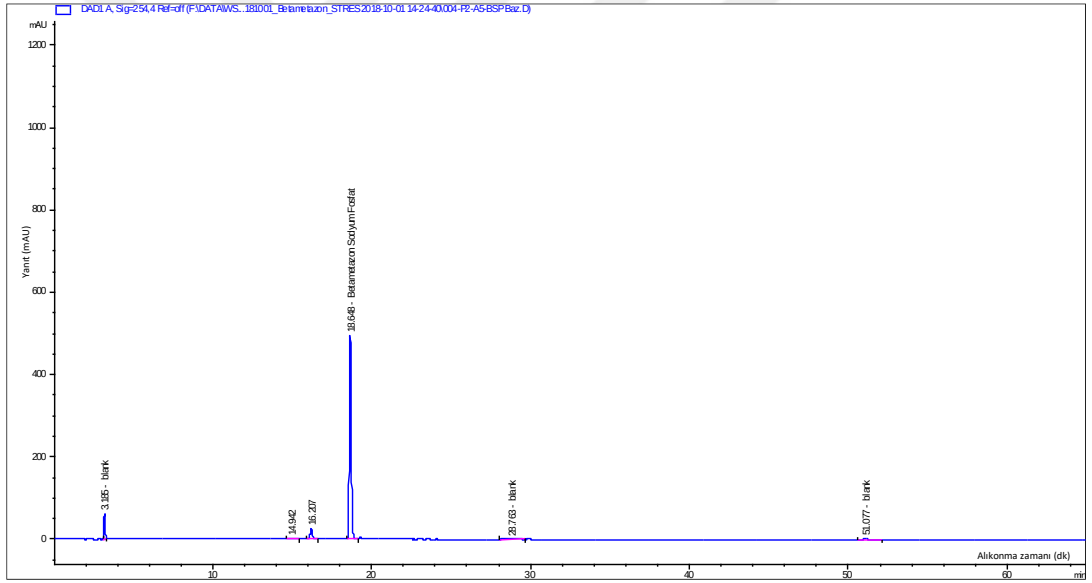
Şekil 4.19. Betametazon sodyum fosfat asit bozundurmasına ait kromatogram.



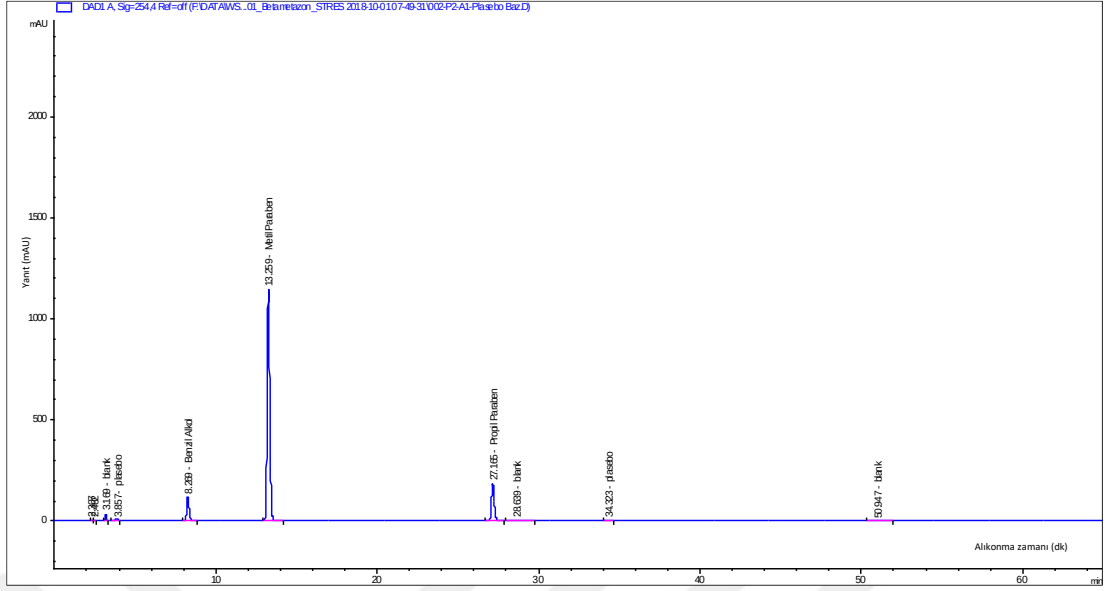
Şekil 4.20. Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.



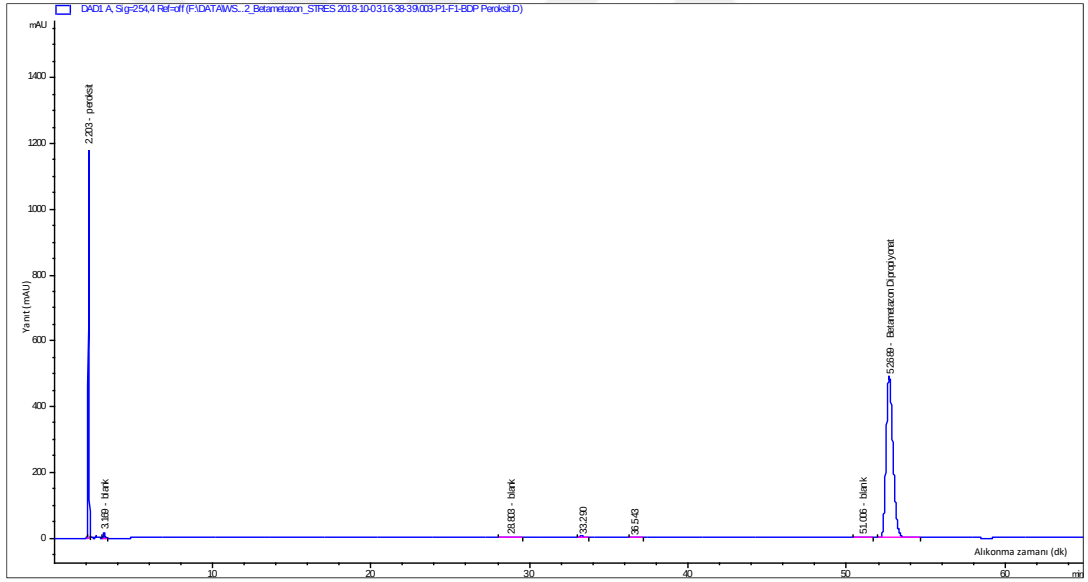
Şekil 4.21. Betametazon dipropiyonat baz bozundurmasına ait kromatogram.



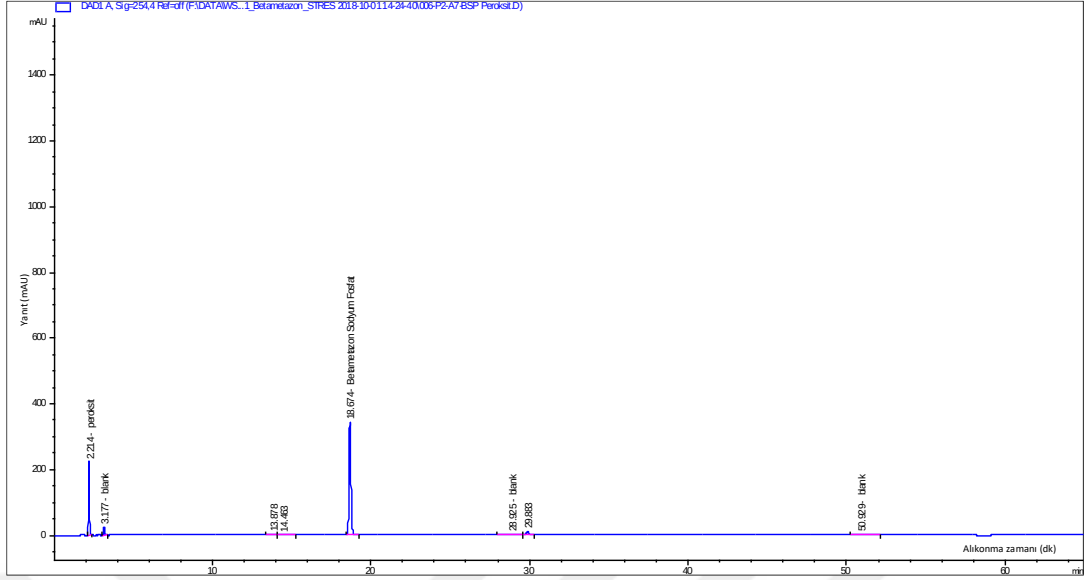
Şekil 4.22. Betametazon sodyum fosfat baz bozundurmasına ait kromatogram.



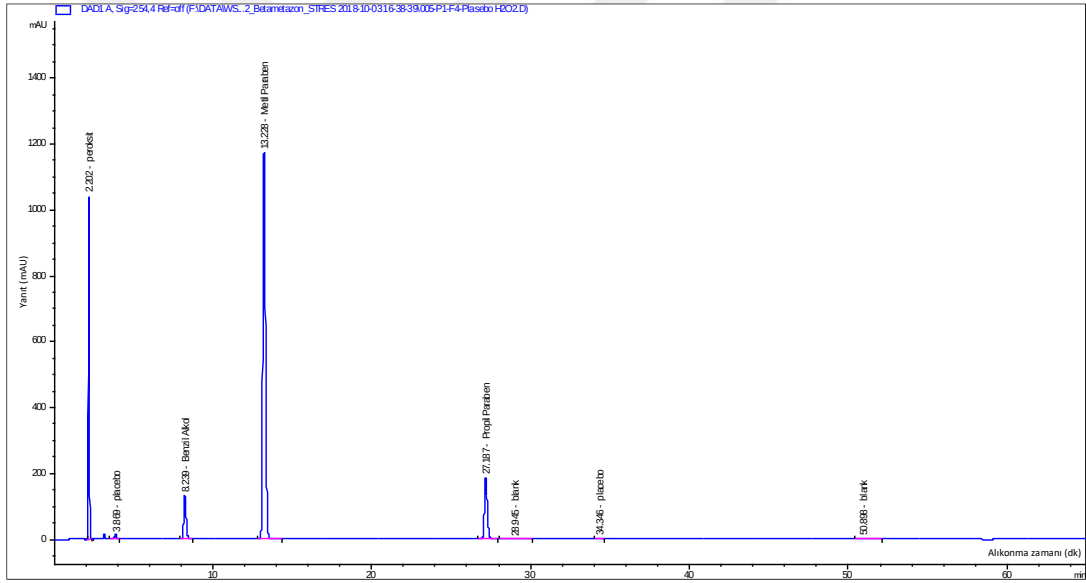
Şekil 4.23. Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.



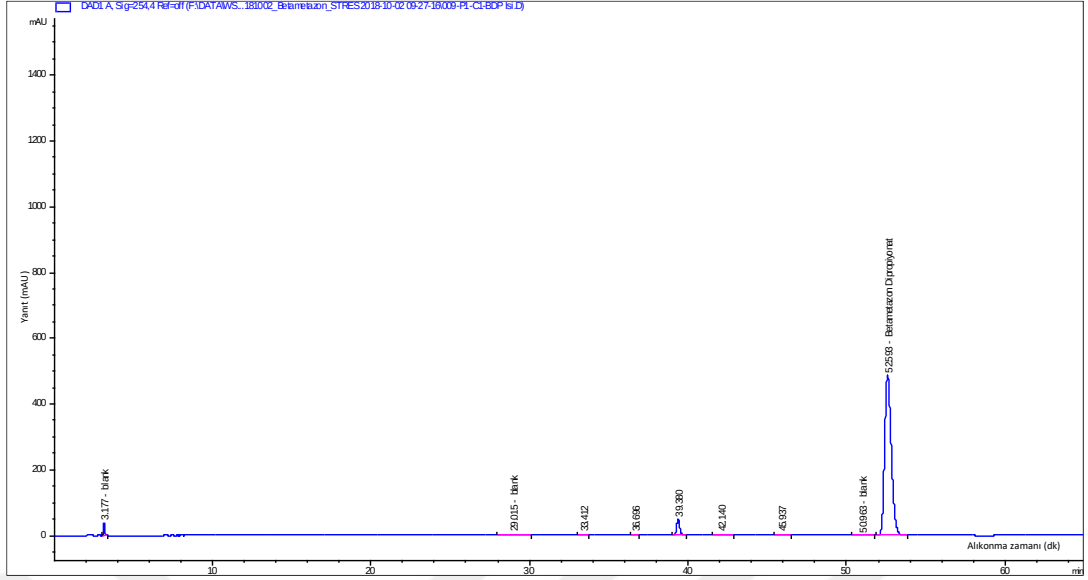
Şekil 4.24. Betametazon dipropiyonat peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



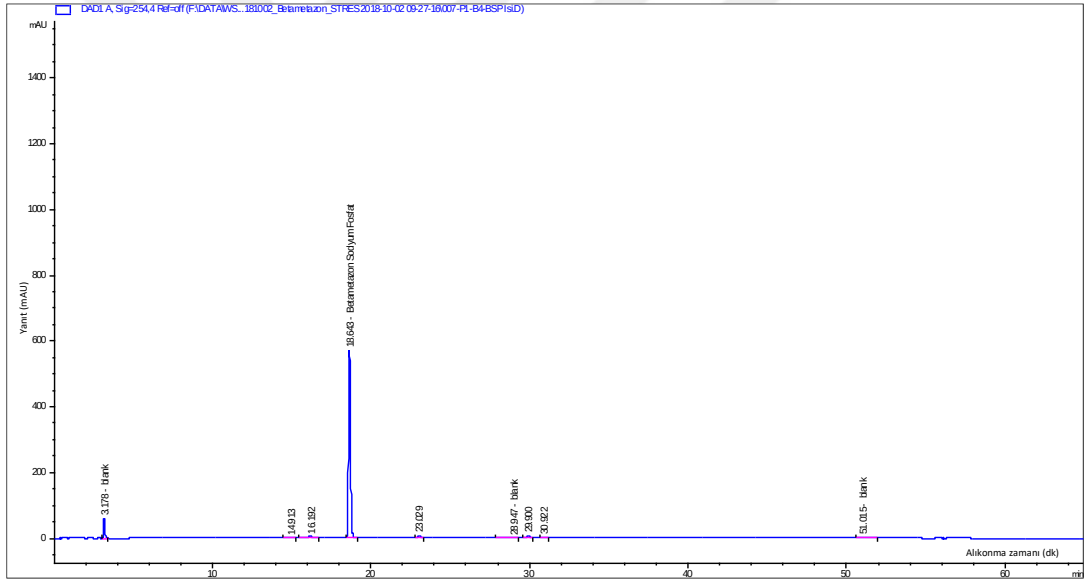
Şekil 4.25. Betametazon sodyum fosfat peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



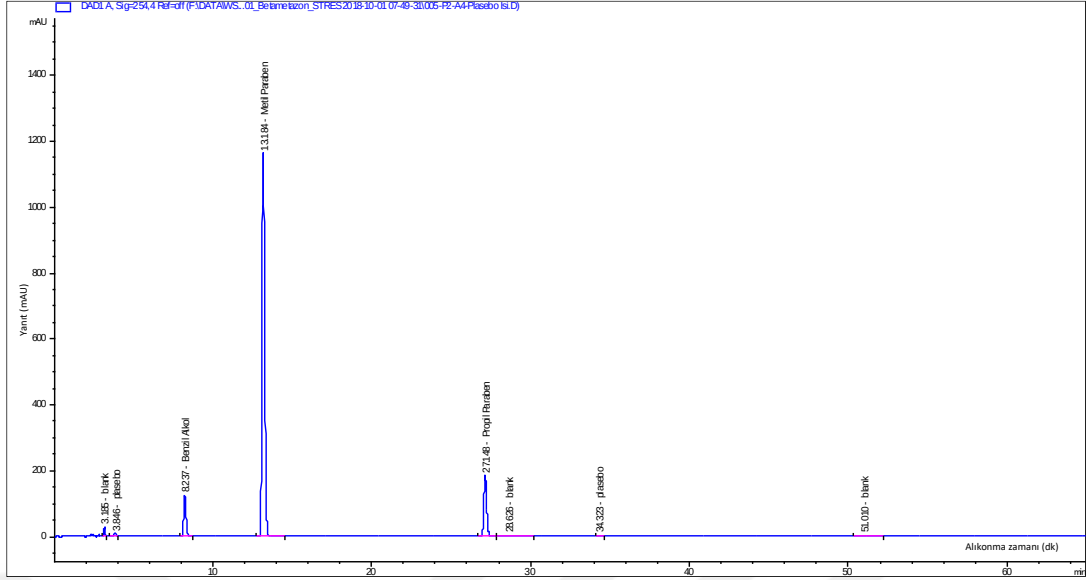
Şekil 4.26. Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



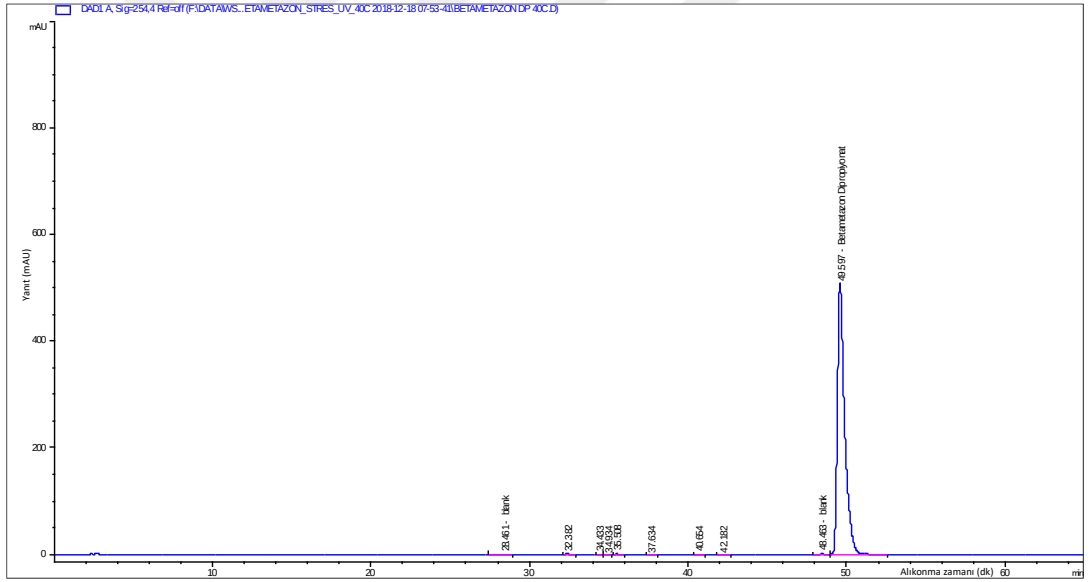
Şekil 4.27. Betametazon dipropiyonat ısı bozundurmasına ait kromatogram.



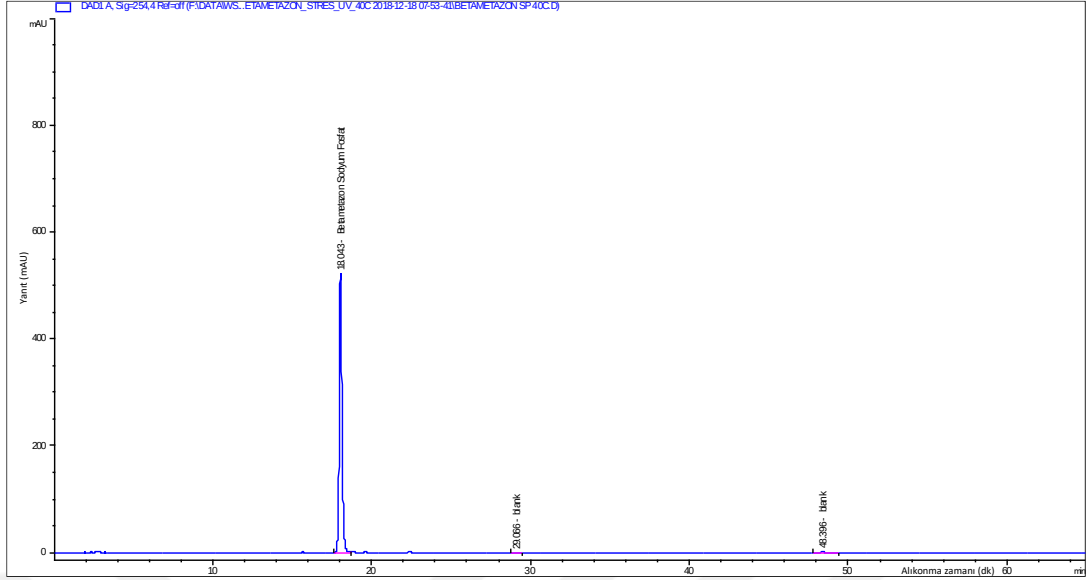
Şekil 4.28. Betametazon sodyum fosfat ısı bozundurmasına ait kromatogram.



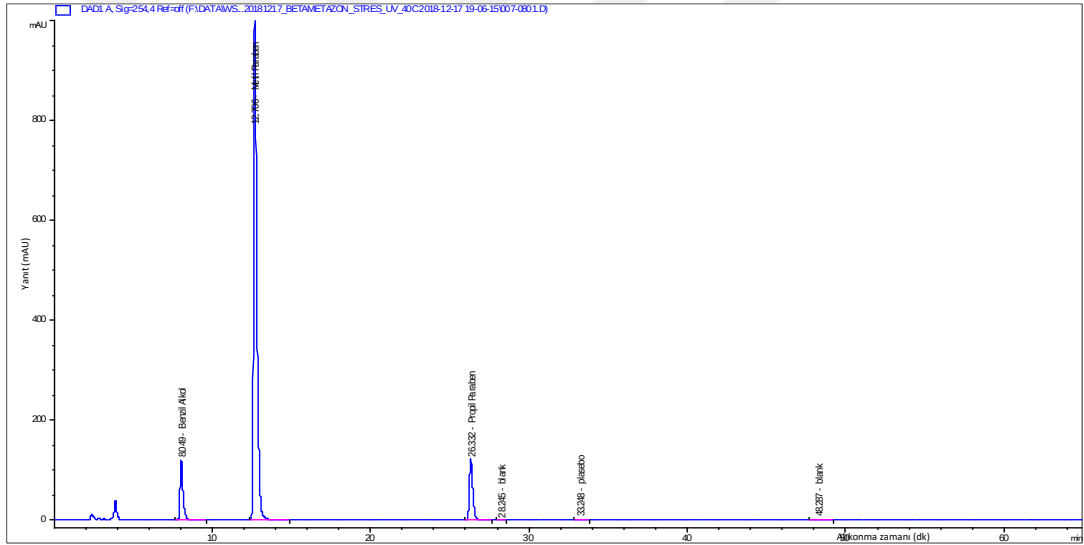
Şekil 4.29. Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.30. Betametazon dipropiyonat ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.31. Betametazon sodyum fosfat ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.32. Betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebo ısı ve nem bozundurmasına ait kromatogram.

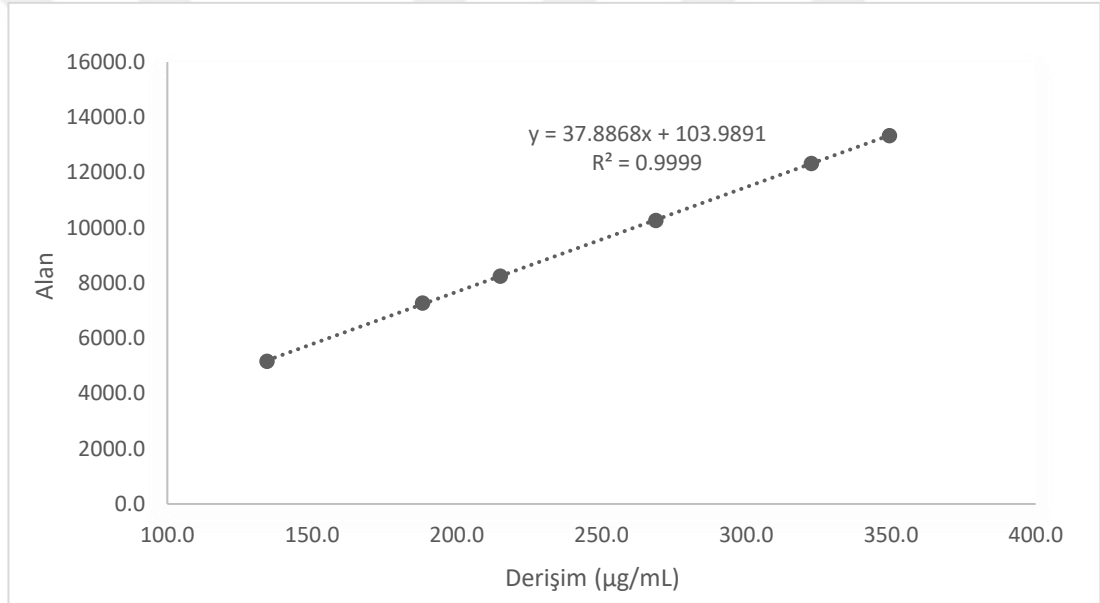
4.2.3. Doğrusallık ve Aralık

% 50-130 (Tablo 4.6) derişim aralığında hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinin analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.33 - 4.37'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ile korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığının kontrolü için oluşturulan grafikler ise Şekil 4.38 -

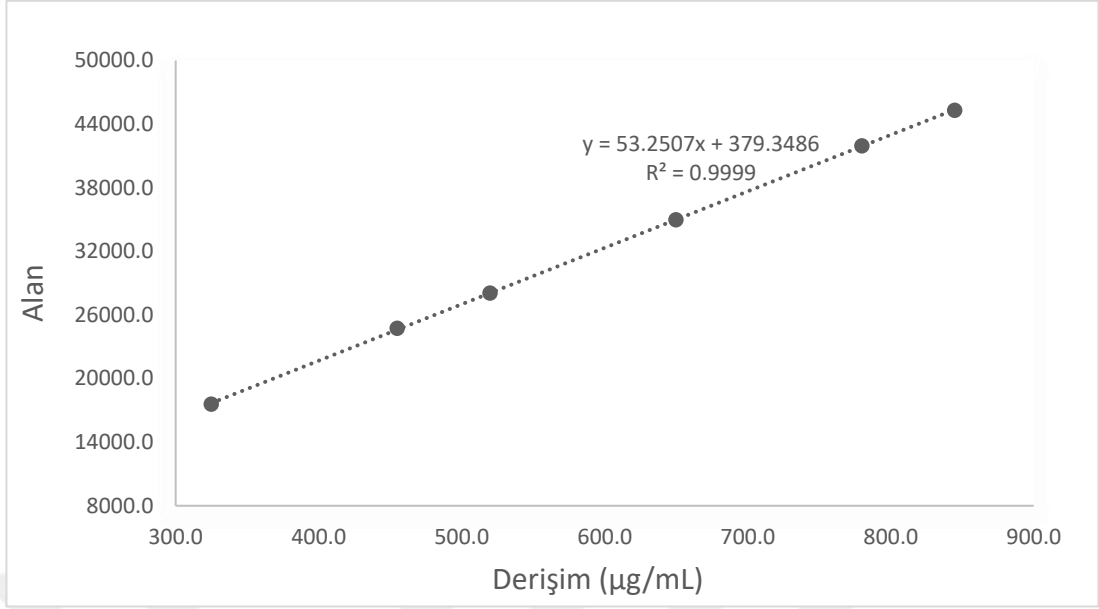
4.42’de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri ve ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.6. Etkin madde ve koruyucu maddelere ait µg/mL cinsinden derişim aralıkları.

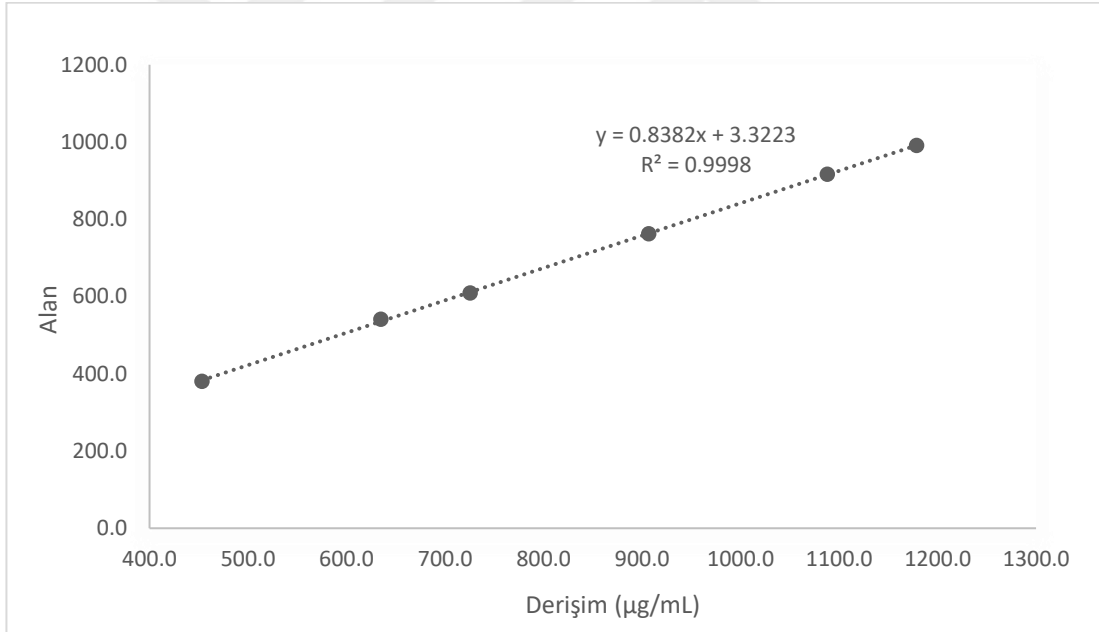
	% 50 - 130 Derişim Aralığı
Betametazon Sodyum Fosfat	134.40 - 349.44
Betametazon Dipropiyonat	324.90 - 844.74
Benzil Alkol	453.40 - 1178.84
Metil Paraben	65.275 - 169.715
Propil Paraben	10.16 - 26.416



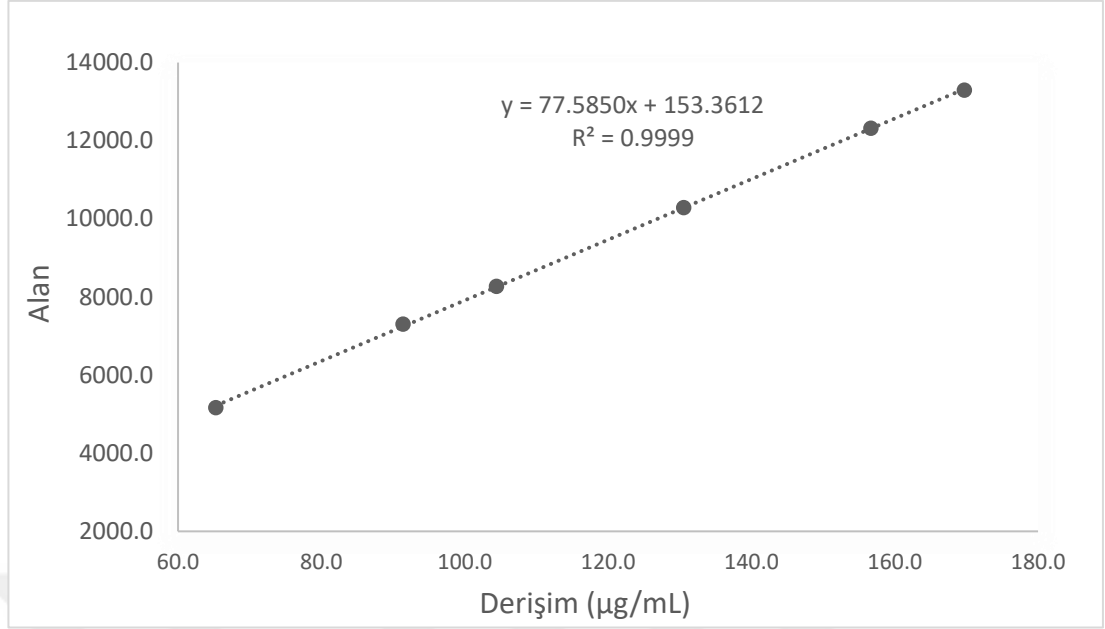
Şekil 4.33. Doğrusal regresyon analizi sonucunda betametazon sodyum fosfat için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



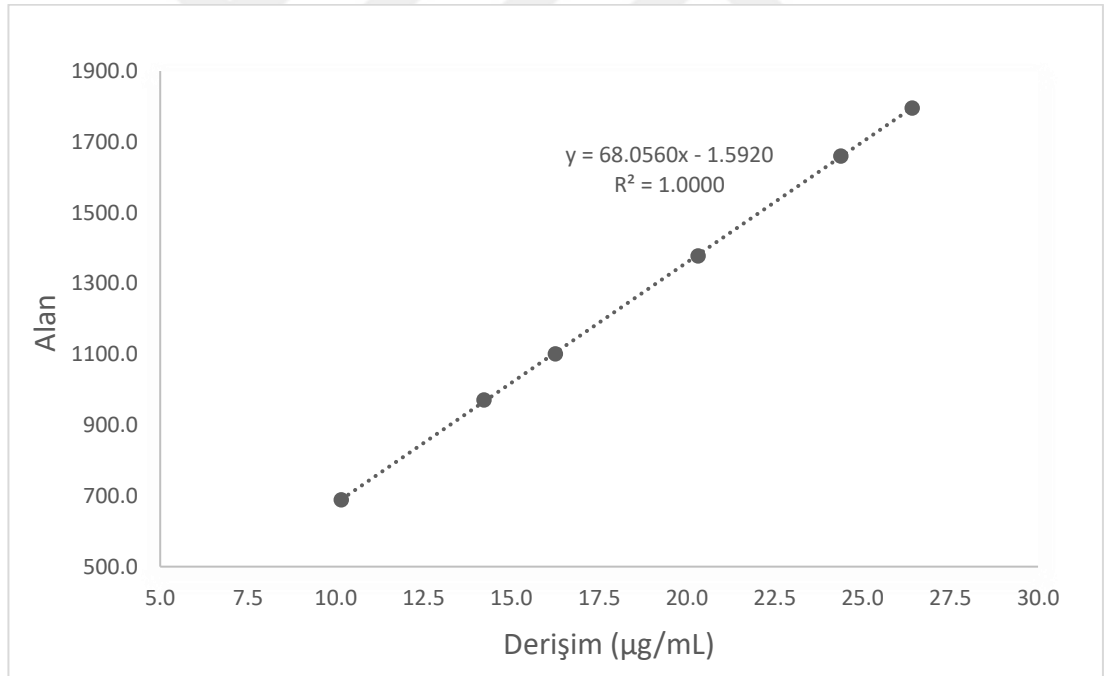
Şekil 4.34. Doğrusal regresyon analizi sonucunda betametazon dipropiyonat için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



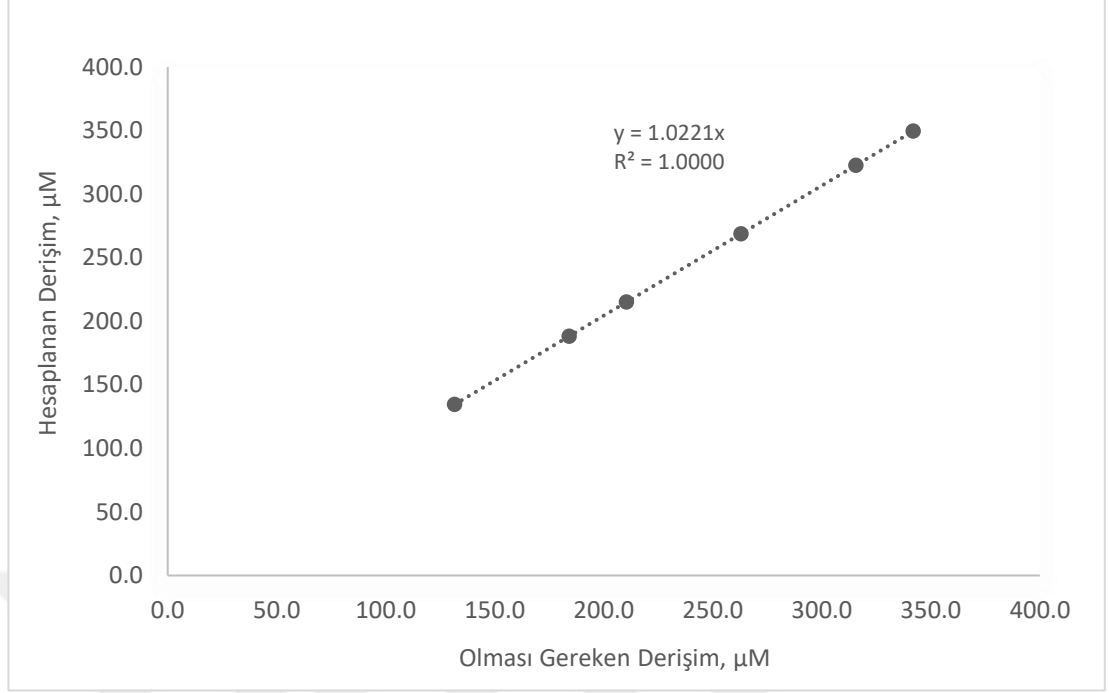
Şekil 4.35. Doğrusal regresyon analizi sonucunda benzil alkol için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



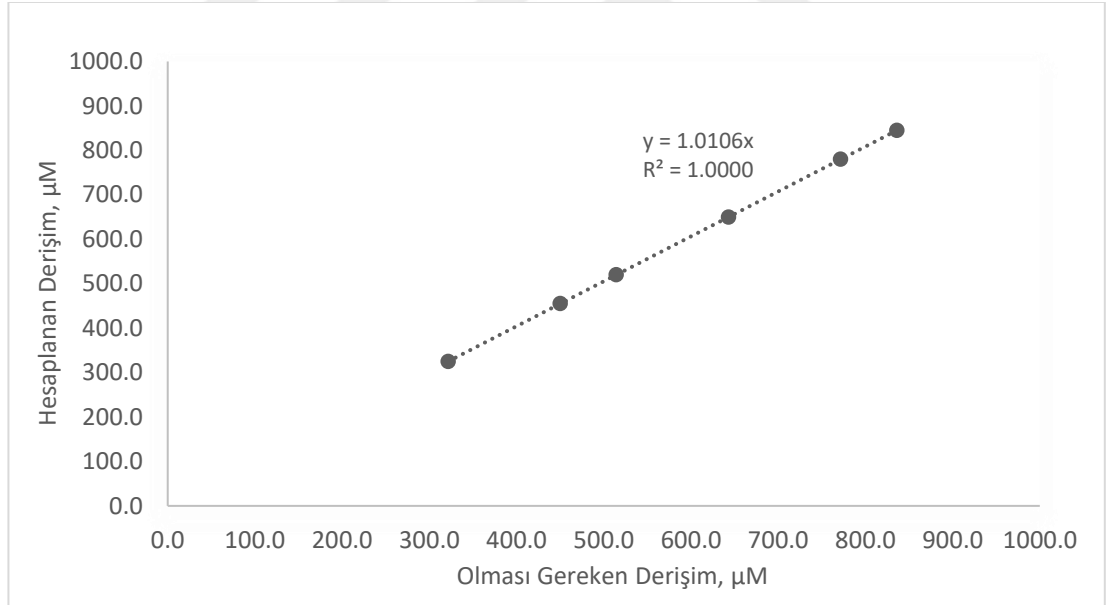
Şekil 4.36. Doğrusal regresyon analizi sonucunda metil paraben için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



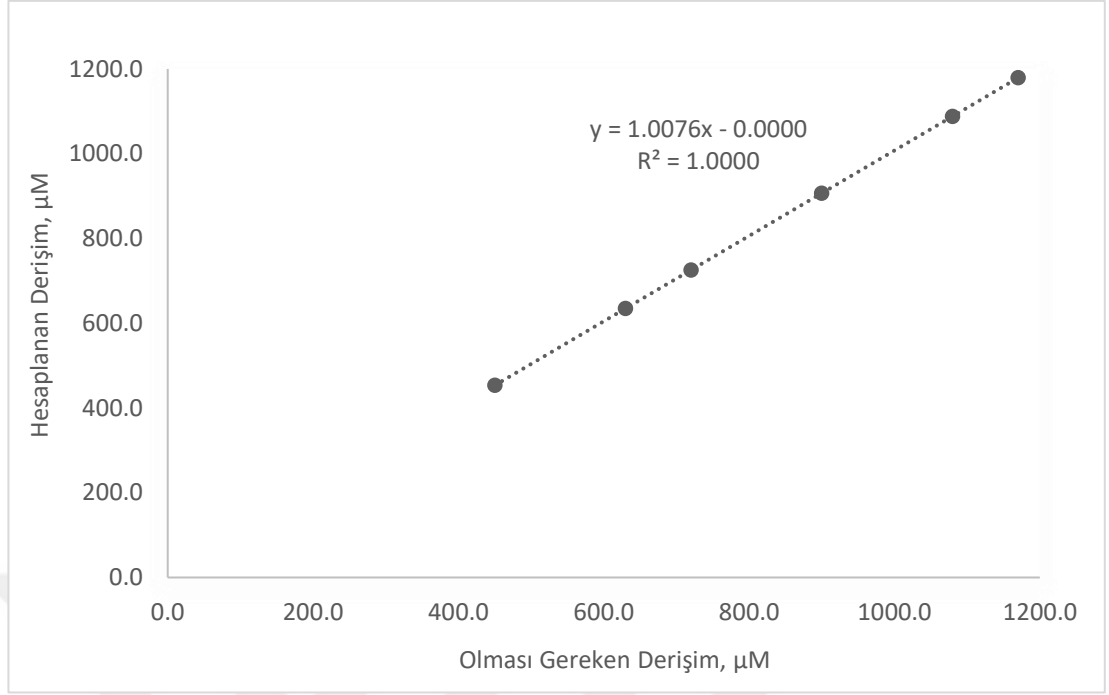
Şekil 4.37. Doğrusal regresyon analizi sonucunda propil paraben için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



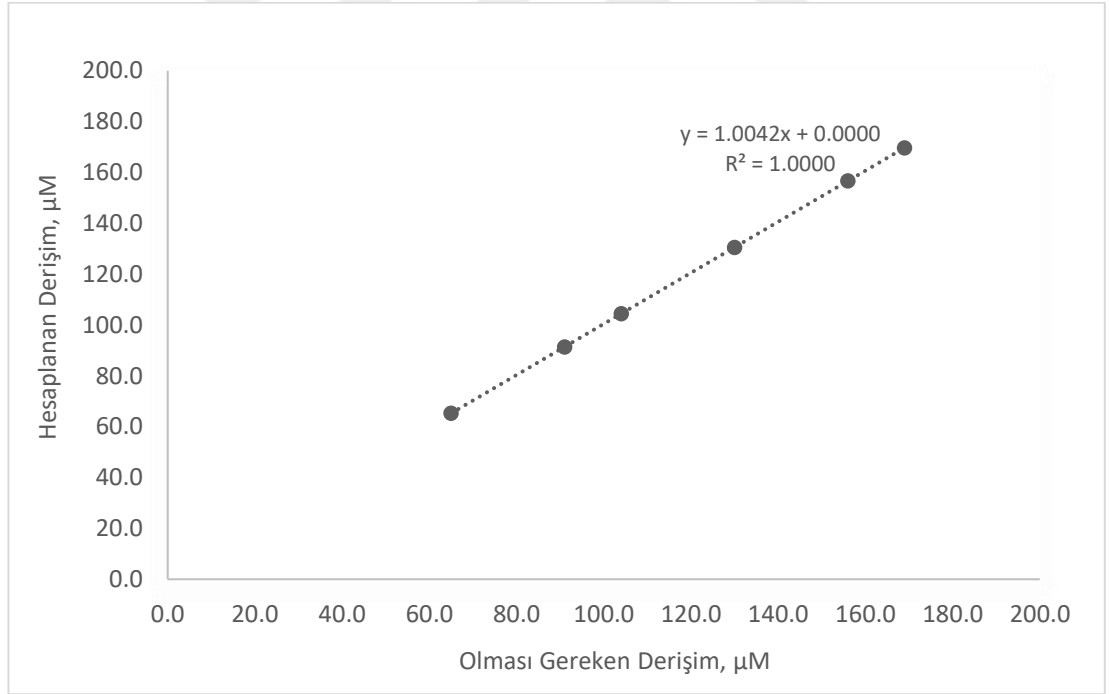
Şekil 4.38. Betametazon sodyum fosfat için doğrusallık kontrolü grafiği.



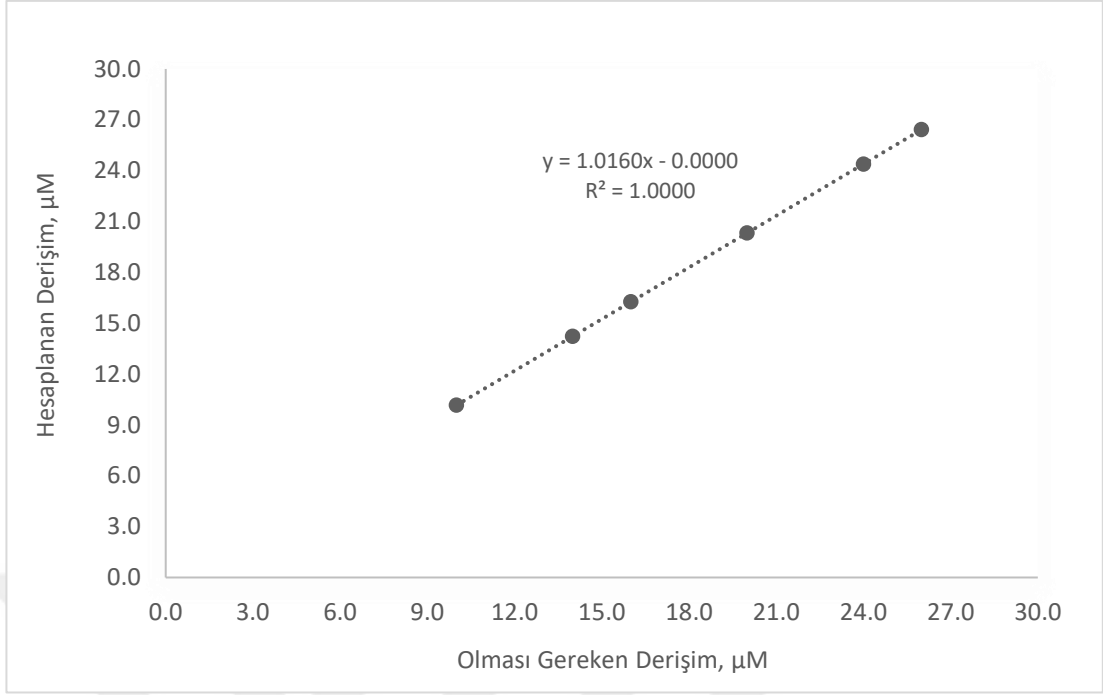
Şekil 4.39. Betametazon dipropiyonat için doğrusallık kontrolü grafiği.



Şekil 4.40. Benzil alkol için doğrusallık kontrolü grafiği.



Şekil 4.41. Metil paraben için doğrusallık kontrolü grafiği.



Şekil 4.42. Propil paraben için doğrusallık kontrolü grafiği.

Tablo 4.7. Etkin madde ve koruyucu maddelerin kalibrasyon eğrilerine ait veriler.

Molekül	b	a	R	*p	**p	F
Betametazon Sodyum Fosfat	37.8868	103.9891	0.9999	0.0653	0.0000	55980.0485
Betametazon Dipropiyonat	53.2507	379.3486	0.9999	0.0522	0.0000	57152.1808
Benzil Alkol	0.8382	3.3223	0.9999	0.2454	0.0000	20822.7815
Metil Paraben	77.5850	153.3612	0.9999	0.0588	0.0000	27495.4836
Propil Paraben	68.0560	-1.5920	1.0000	0.7448	0.0000	84324.3332

b: Eğim, a: Kesişim, R: Korelasyon katsayısı, *p: Eğimin olasılık değeri, **p: Kesişimin olasılık değeri, F: Korelasyon katsayısının F değeri.

4.2.4. Tespit Sınırı (LOD)

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat standartları kullanılarak hazırlanan tespit limiti çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.8. Betametazon sodyum fosfata ait tespit sınırı sonuçları (n = 6).

Enjeksiyon No	S/G Oranı
1	2.02
2	2.07
3	2.05
4	2.10
5	2.01
6	2.06
$\bar{x}$	2.05
SS	0.03
BSS	1.62

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.9. Betametazon dipropiyonata ait tespit sınırı sonuçları (n = 6).

Enjeksiyon No	S/G Oranı
1	2.60
2	2.90
3	2.80
4	2.50
5	2.70
6	2.40
$\bar{x}$	2.64
SS	0.18
BSS	6.82

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

4.2.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat standartları kullanılarak hazırlanan tayin limiti çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.10. Betametazon sodyum fosfata ait alt tayin sınırı sonuçları (n = 6).

Enjeksiyon No	S/G Oranı
1	10.30
2	10.90
3	10.20
4	12.10
5	11.50
6	15.70
$\bar{x}$	11.78
SS	2.05
BSS	17.40

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.11. Betametazon dipropiyonata ait alt tayin sınırı sonuçları (n = 6).

Enjeksiyon No	S/G Oranı
1	14.50
2	15.00
3	13.20
4	15.10
5	15.00
6	19.30
$\bar{x}$	15.35
SS	2.06
BSS	13.43

$\bar{x}$: Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

4.2.6. Doğruluk

Betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben için 3 farklı derişimde (% 50, % 100 ve % 120) hazırlanan 6 farklı standart çözeltinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarından elde edilen veriler kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve % BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12 - 4.21).

Tablo 4.12. Betametazon sodyum fosfat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 50	5068.81	100.73	0.73	99.68 $\pm$ 0.38	0.93	0.93
	5062.07	99.07	0.93			
	5067.14	100.92	0.92			
	5049.59	99.19	0.81			
	5013.216	99.52	0.48			
	5004.18	98.66	1.34			
% 100	10244.45	101.73	1.73	101.56 $\pm$ 0.11	0.26	0.26
	10251.06	101.91	1.91			
	10242.04	101.51	1.51			
	10231.22	101.14	1.14			
	10211.76	101.56	1.56			
	10239.68	101.53	1.53			
% 120	12187.10	101.18	1.18	101.22 $\pm$ 0.04	0.11	0.11
	12200.16	101.16	1.16			
	12195.99	101.35	1.35			
	12228.85	101.24	1.24			
	12195.08	101.06	1.06			
	12195.52	101.32	1.32			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.13. Betametazon dipropiyonat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 50	16973.22	97.99	2.01	99.24 $\pm$ 0.60	1.48	1.49
	16965.78	100.15	0.15			
	16972.06	100.19	0.19			
	16927.05	96.81	3.19			
	17579.26	100.31	0.31			
	16776.91	99.98	0.02			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.13. (Devam) Betametazon dipropiyonat için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 100	34251.47	99.39	0.61	99.36 $\pm$ 0.11	0.27	0.28
	34274.74	98.99	1.01			
	34252.22	99.70	0.30			
	34206.19	99.10	0.90			
	34107.65	99.59	0.41			
	34207.56	99.42	0.58			
% 120	40936.86	98.66	1.34	99.16 $\pm$ 0.22	0.54	0.54
	41052.05	99.45	0.55			
	41003.10	98.69	1.31			
	41137.23	100.05	0.05			
	41023.29	98.87	- 0.01			
	41007.37	99.21	- 0.01			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.14. Benzil alkol için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 50	387.39	101.36	1.36	100.94 $\pm$ 0.59	1.44	1.43
	390.59	102.89	2.89			
	389.69	100.43	0.43			
	388.94	101.33	1.33			
	387.25	98.51	1.49			
	385.75	101.14	1.14			
% 100	774.09	101.83	1.83	101.19 $\pm$ 0.49	1.21	1.19
	774.21	100.42	0.42			
	773.32	99.55	0.45			
	773.21	103.07	3.07			
	772.46	101.28	1.28			
	775.21	100.98	0.98			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.14. (Devam) Benzil alkol için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 120	910.68	100.85	0.85	101.32 $\pm$ 0.26	0.62	0.62
	913.96	100.75	0.75			
	915.97	101.72	1.72			
	919.37	101.63	1.63			
	917.11	102.22	2.22			
	917.23	100.74	0.74			

Tablo 4.15. Metil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 50	5160.04	99.23	0.77	98.65 $\pm$ 0.36	0.87	0.89
	5145.17	99.29	0.71			
	5147.53	98.88	1.12			
	5131.90	99.33	0.67			
	5100.10	97.92	2.08			
	5066.32	97.23	2.77			
% 100	10307.10	98.77	1.23	99.79 $\pm$ 0.24	0.59	0.59
	10315.53	99.61	0.39			
	10301.04	99.77	0.23			
	10292.51	100.14	0.14			
	10276.37	100.52	0.52			
	10308.46	99.92	0.08			
% 120	12254.10	99.98	0.02	100.33 $\pm$ 0.16	0.39	0.39
	12288.49	100.59	0.59			
	12289.64	100.08	0.08			
	12338.39	100.80	0.80			
	12292.40	99.91	0.09			
	12303.55	100.65	0.65			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.16. Propil paraben için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 50	680.40	99.02	0.98	99.95 $\pm$ 0.27	0.65	0.65
	682.52	100.42	0.42			
	685.28	100.13	0.13			
	683.38	100.85	0.85			
	678.11	99.58	0.42			
	676.94	99.70	0.30			
% 100	1380.47	100.78	0.78	101.04 $\pm$ 0.25	0.62	0.61
	1382.32	101.47	1.47			
	1380.74	99.91	0.09			
	1380.01	101.20	1.20			
	1380.27	101.47	1.47			
	1377.56	101.43	1.43			
% 120	1637.90	99.75	0.25	100.52 $\pm$ 0.20	0.49	0.49
	1644.02	100.67	0.67			
	1645.03	100.98	0.98			
	1654.86	101.08	1.08			
	1646.50	100.40	0.40			
	1646.90	100.26	0.26			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.17. Betametazon sodyum fosfat için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	%BH	%BSS
% 50	99.68	100.64	100.11	99.80	100.76	99.38	100.11 $\pm$ 0.41	1.43	1.86
% 100	101.56	99.64	100.04	100.35	99.23	99.77	99.91 $\pm$ 0.28	1.24	1.27
% 120	101.22	99.36	99.72	99.99	99.40	99.81	99.75 $\pm$ 0.25	1.05	1.15

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.18. Betametazon dipropiyonat için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 50	99.23	99.57	99.05	98.68	99.98	99.91	99.43 $\pm$ 0.28	1.16	1.29
% 100	99.36	99.91	99.83	99.31	99.67	99.35	99.60 $\pm$ 0.20	0.74	0.91
% 120	99.16	99.46	99.54	99.81	99.28	99.59	99.51 $\pm$ 0.20	0.92	0.93

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.19. Benzil alkol için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 50	100.94	100.80	98.48	99.93	99.41	99.32	99.67 $\pm$ 0.33	1.37	1.50
% 100	101.19	100.84	100.11	100.12	101.91	98.76	100.40 $\pm$ 0.29	1.15	1.32
% 120	101.32	99.59	98.87	99.43	99.43	99.12	99.41 $\pm$ 0.20	0.99	0.91

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.20. Metil paraben için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 50	98.65	98.52	99.68	99.03	99.15	98.73	99.00 $\pm$ 0.13	1.13	0.62
% 100	99.79	99.78	99.71	99.91	99.76	99.44	99.73 $\pm$ 0.07	0.40	0.33
% 120	100.33	100.00	99.68	99.79	99.85	99.75	99.85 $\pm$ 0.07	0.34	0.34

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.21. Propil paraben için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 50	99.95	99.82	99.64	99.82	99.84	99.83	99.80 $\pm$ 0.08	0.43	0.37
% 100	101.04	99.99	100.04	99.92	99.92	100.00	100.04 $\pm$ 0.07	0.44	0.34
% 120	100.52	99.98	100.09	99.93	99.94	99.94	100.01 $\pm$ 0.05	0.32	0.25

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Doğruluk parametresi için geri kazanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 farklı derişimde (% 50, % 100 ve % 120) betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinden plaseboya eklenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.22 - 4.26'da verilmiştir.

Tablo 4.22. Betametazon sodyum fosfata ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 50	4896.70	98.06	1.94	98.12 $\pm$ 0.53	0.92	0.94
	4892.83	97.23	2.77			
	4908.19	99.07	0.93			
% 100	9659.94	95.90	4.10	96.01 $\pm$ 0.36	0.63	0.65
	9651.10	95.45	4.55			
	9664.78	96.69	3.31			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.22. (Devam) Betametazon sodyum fosfata ait geri kazanım çalışma sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 120	11633.83	97.23	2.77	96.64 $\pm$ 0.31	0.53	0.55
	11620.75	96.50	3.50			
	11621.00	96.20	3.80			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.23. Betametazon dipropiyonata ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 50	16878.35	96.82	3.18	97.58 $\pm$ 0.43	0.75	0.77
	16872.97	98.33	1.67			
	16905.90	97.60	2.40			
% 100	33178.40	95.79	4.21	96.17 $\pm$ 0.19	0.33	0.34
	33132.04	96.41	3.59			
	33201.33	96.31	3.69			
% 120	39937.77	96.48	3.52	96.60 $\pm$ 0.38	0.66	0.68
	39918.85	97.32	2.68			
	39850.23	96.01	3.99			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.24. Benzil alkole ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 3).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 50	379.32	98.56	1.44	98.95 $\pm$ 0.73	1.26	1.28
	379.35	97.93	2.07			
	379.49	100.36	0.36			
% 100	735.11	97.95	2.05	97.60 $\pm$ 0.22	0.38	0.39
	734.27	97.19	2.81			
	734.66	97.67	2.33			
% 120	882.06	98.29	1.71	98.10 $\pm$ 0.10	0.18	0.18
	881.77	98.07	1.93			
	882.10	97.93	2.07			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.25. Metil parabene ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 3).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 50	5018.26	96.32	3.68	96.25 $\pm$ 0.20	0.34	0.35
	5018.20	95.88	4.12			
	5025.93	96.55	3.45			
% 100	9750.00	94.89	5.11	94.85 $\pm$ 0.11	0.20	0.21
	9728.12	94.64	5.36			
	9748.79	95.03	4.97			
% 120	11673.98	95.13	4.87	95.18 $\pm$ 0.04	0.08	0.08
	11658.67	95.15	4.85			
	11657.86	95.27	4.73			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Tablo 4.26. Propil parabene ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 3).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 50	666.73	97.81	2.19	98.02 $\pm$ 0.11	0.18	0.19
	666.61	98.14	1.86			
	667.19	98.12	1.88			
% 100	1310.48	96.28	3.72	96.22 $\pm$ 0.08	0.14	0.15
	1308.49	96.06	3.94			
	1310.42	96.32	3.68			
% 120	1584.11	96.98	3.02	96.99 $\pm$ 0.05	0.09	0.09
	1583.62	96.91	3.09			
	1584.45	97.08	2.92			

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

Doğruluk parametresi için ayrıca standart ekleme yöntemi çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla, numune çözeltisi üzerine % 20, 70, 80, 90, 100 ve 120 derişim seviyelerinde betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon doğruları çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır (Tablo 4.27).

Tablo 4.27. Etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait standart ekleme yönteminden elde edilen sonuçlar (n = 6).

	Kalibrasyon Eğrisinden Elde Edilen Regresyon Denklemini	Standart Ekleme Yönteminden Elde Edilen Regresyon Denklemini
Betametazon sodyum fosfat	$y = 37.8868x + 103.9891$ $R^2 = 0.9999$	$y = 39.4574x - 11.1629$ $R^2 = 0.9997$
Betametazon dipropiyonat	$y = 53.2507x + 379.3486$ $R^2 = 0.9998$	$y = 55.5407x - 373.9589$ $R^2 = 0.9994$
Benzil alkol	$y = 0.8382x + 3.3223$ $R^2 = 0.9998$	$y = 0.8419x - 0.1511$ $R^2 = 0.9997$
Metil paraben	$y = 77.5850x + 153.3612$ $R^2 = 0.9999$	$y = 80.1550x - 23.4724$ $R^2 = 0.9996$
Propil paraben	$y = 68.0560x - 1.5920$ $R^2 = 1.0000$	$y = 69.5439x - 6.6158$ $R^2 = 0.9996$

$y = bx \pm a$; b: Eğim, a: Kesişim, R^2 : Tanımlayıcılık katsayısı.

4.2.7. Kesinlik ve Ara Kesinlik

Betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben için 3 farklı derişimde (% 50, % 100 ve % 120) hazırlanan 6 farklı standart çözeltinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen veriler kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12 - 4.21).

Ara kesinlik parametresinin değerlendirilmesinde; farklı analizci tarafından % 100'lük derişim seviyesinde hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri; farklı günde, farklı kolon ve farklı cihaz kullanılarak ve farklı analizci tarafından optimum deney koşullarında analiz edilmiştir ve farkın anlamlılığı, istatistiksel olarak t- testi ve F-testi ile gösterilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.28 - 4.32'de verilmiştir.

Tablo 4.28. Betametazon sodyum fosfata ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 97.59 \pm 0.04$ $SS = 0.17$ $\% BSS = 0.18$	$\bar{x} \pm SH = 97.71 \pm 0.07$ $SS = 0.28$ $\% BSS = 0.29$
$t_H = 0.90, t_T = 2.23 (p > 0.05)$ $F_H = 2.71, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, t_H : Hesaplanan t, t_t :Tablo t, F_H : Hesaplanan F, F_t :Tablo F değerleri).

Tablo 4.29. Betametazon dipropiyonata ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 99.06 \pm 0.15$ $SS = 0.62$ $\% BSS = 0.63$	$\bar{x} \pm SH = 99.45 \pm 0.13$ $SS = 0.57$ $\% BSS = 0.57$
$t_H = 1.13, t_T = 2.23 (p > 0.05)$ $F_H = 0.85, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, t_H : Hesaplanan t, t_t :Tablo t, F_H : Hesaplanan F, F_t :Tablo F değerleri).

Tablo 4.30. Benzil alkole ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 101.79 \pm 0.10$ $SS = 0.44$ $\% BSS = 0.43$	$\bar{x} \pm SH = 102.04 \pm 0.03$ $SS = 0.15$ $\% BSS = 0.14$
$t_H = 1.32, t_T = 2.23 (p > 0.05)$ $F_H = 0.12, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, t_H : Hesaplanan t, t_t :Tablo t, F_H : Hesaplanan F, F_t :Tablo F değerleri).

Tablo 4.31. Metil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 99.89 \pm 0.11$	$\bar{x} \pm SH = 100.18 \pm 0.06$
SS = 0.45	SS = 0.27
% BSS = 0.45	% BSS = 0.27
$t_H = 1.36, t_T = 2.23 (p > 0.05)$	
$F_H = 0.36, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, t_H : Hesaplanan t, t_t :Tablo t, F_H : Hesaplanan F, F_t :Tablo F değerleri).

Tablo 4.32. Propil parabene ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 98.13 \pm 0.04$	$\bar{x} \pm SH = 98.32 \pm 0.06$
SS = 0.17	SS = 0.27
% BSS = 0.17	% BSS = 0.27
$t_H = 1.43, t_T = 2.23 (p > 0.05)$	
$F_H = 2.52, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, t_H : Hesaplanan t, t_t :Tablo t, F_H : Hesaplanan F, F_t :Tablo F değerleri).

4.2.8. Sağlamlık

Optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak farklı analizci tarafından analiz yönteminin sağlamlığı değerlendirilmiştir. Bunun için % 100 derişim seviyesinde hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler değiştirilen hareketli faz pH'sında, kolon sıcaklığında, akış hızında ve dalga boyunda analiz edilmiştir. Her bir değişiklikte elde edilen piklerin alıkonma zamanları, alan değerleri, N sayıları ve pik simetrisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 4.33 - 4.37'de verilmiştir.

Tablo 4.33. Betametazon sodyum fosfata ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
pH 3.90	18.47 ± 0.00 % BSS = 0.03	9613.62 ± 32.28 % BSS = 0.82	66752 ± 766.36 % BSS = 2.81	0.98 ± 0.01 % BSS = 2.13
pH 4.10	18.68 ± 0.00 % BSS = 0.05	9609 ± 0.56 % BSS = 0.01	69527 ± 713.32 % BSS = 2.51	0.99 ± 0.01 % BSS = 1.49
Akış hızı (0.95 mL/dk)	18.16 ± 0.01 % BSS = 0.10	10124.58 ± 2.08 % BSS = 0.05	79875 ± 1429.2 % BSS = 4.38	1.01 ± 0.01 % BSS = 2.29
Akış hızı (1.05 mL/dk)	17.48 ± 0.00 % BSS = 0.06	9147.38 ± 9.42 % BSS = 0.25	85968 ± 431.99 % BSS = 1.23	1.08 ± 0.00 % BSS = 0.92
Dalga boyu (252 nm)	17.81 ± 0.01 % BSS = 0.07	9437.34 ± 8.10 % BSS = 0.21	92737 ± 573.95 % BSS = 1.51	1.15 ± 0.01 % BSS = 1.86
Dalga boyu (256 nm)	17.81 ± 0.01 % BSS = 0.03	9623.94 ± 9.84 % BSS = 0.25	92948 ± 568.24 % BSS = 1.50	1.17 ± 0.01 % BSS = 2.01
Kolon fırını sıcaklığı (39 °C)	17.85 ± 0.02 % BSS = 0.10	9527.00 ± 9.75 % BSS = 0.10	90230 ± 1007. 32 % BSS = 1.12	1.16 ± 0.02 % BSS = 1.54
Kolon fırını sıcaklığı (41 °C)	17.76 ± 0.01 % BSS = 0.07	9491.46 ± 17.30 % BSS = 0.18	88294 ± 1127.50 % BSS = 1.28	1.17 ± 0.03 % BSS = 2.56

t_R: Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı, $\bar{x}$: Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.34. Betametazon dipropiyonata ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
pH 3.90	53.05 ± 0.01 % BSS = 0.04	33079.75 ± 4.43 % BSS = 0.03	80201 ± 107.84 % BSS = 0.33	1.33 ± 0.00 % BSS = 0.48
pH 4.10	53.44 ± 0.01 % BSS = 0.03	33015.91 ± 6.09 % BSS = 0.05	76181 ± 653.02 % BSS = 2.10	1.33 ± 0.00 % BSS = 0.00
Akış hızı (0.95 mL/dk)	53.01 ± 0.01 % BSS = 0.03	34706.50 ± 10.34 % BSS = 0.07	80980 ± 633.40 % BSS = 1.75	1.34 ± 0.00 % BSS = 0.33
Akış hızı (1.05 mL/dk)	50.76 ± 0.01 % BSS = 0.03	31427.58 ± 8.31 % BSS = 0.06	86766 ± 221.85 % BSS = 0.63	1.33 ± 0.00 % BSS = 0.83

t_R: Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı, $\bar{x}$: Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.34. (Devam) Betametazon dipropiyonata ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
Dalga boyu (252 nm)	51.92 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.04	32630.18 $\pm$ 3.09 % BSS = 0.02	81194 $\pm$ 734.36 % BSS = 2.22	1.35 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.77
Dalga boyu (256 nm)	51.94 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.03	32803.26 $\pm$ 11.65 % BSS = 0.09	78680 $\pm$ 398.11 % BSS = 1.24	1.35 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.56
Kolon fırını sıcaklığı (39 �C)	52.20 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.02	32809.74 $\pm$ 21.73 % BSS = 0.07	73943 $\pm$ 915.05 % BSS = 1.24	1.36 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.38
Kolon fırını sıcaklığı (41 �C)	51.72 $\pm$ 0.02 % BSS = 0.05	32773.05 $\pm$ 34.43 % BSS = 0.11	75428 $\pm$ 1247.43 % BSS = 1.65	1.36 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.90

t_R : Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı, $\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.35. Benzil alkole ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
pH 3.90	7.95 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.02	737.50 $\pm$ 0.19 % BSS = 0.06	13057 $\pm$ 13.94 % BSS = 0.26	1.27 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.56
pH 4.10	7.99 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.04	734.66 $\pm$ 0.91 % BSS = 0.30	12992 $\pm$ 16.16 % BSS = 0.30	1.28 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.78
Akış hızı (0.95 mL/dk)	8.04 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.09	771.15 $\pm$ 0.37 % BSS = 0.12	13191 $\pm$ 41.66 % BSS = 0.77	1.27 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.38
Akış hızı (1.05 mL/dk)	7.27 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.09	698.91 $\pm$ 0.22 % BSS = 0.08	13258 $\pm$ 12.49 % BSS = 0.23	1.24 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.58
Dalga boyu (252 nm)	7.61 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.07	622.60 $\pm$ 0.26 % BSS = 0.10	13106 $\pm$ 32.85 % BSS = 0.61	1.25 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.34
Dalga boyu (256 nm)	7.60 $\pm$ 0.00 % BSS = 0.04	890.78 $\pm$ 0.58 % BSS = 0.16	13085 $\pm$ 26.25 % BSS = 0.49	1.25 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.66
Kolon fırını sıcaklığı (39 �C)	7.62 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.18	730.18 $\pm$ 1.43 % BSS = 0.20	12408 $\pm$ 94.74 % BSS = 0.76	1.25 $\pm$ 0.02 % BSS = 1.78
Kolon fırını sıcaklığı (41 �C)	7.51 $\pm$ 0.01 % BSS = 0.07	729.54 $\pm$ 0.88 % BSS = 0.12	12176 $\pm$ 69.72 % BSS = 0.57	1.24 $\pm$ 0.01 % BSS = 1.10

t_R : Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı, $\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.36. Metil parabene ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
pH 3.90	12.75 ± 0.00 % BSS = 0.04	9752.52 ± 2.73 % BSS = 0.07	29634 ± 66.97 % BSS = 0.55	1.16 ± 0.01 % BSS = 1.48
pH 4.10	12.87 ± 0.00 % BSS = 0.07	9719.19 ± 4.54 % BSS = 0.11	30353 ± 79.78 % BSS = 0.64	1.16 ± 0.01 % BSS = 1.19
Akış hızı (0.95 mL/dk)	12.78 ± 0.01 % BSS = 0.13	10201.35 ± 3.85 % BSS = 0.09	28903 ± 112.17 % BSS = 0.95	1.15 ± 0.00 % BSS = 0.90
Akış hızı (1.05 mL/dk)	11.73 ± 0.01 % BSS = 0.16	9285.04 ± 2.84 % BSS = 0.08	24480 ± 56.71 % BSS = 0.57	1.17 ± 0.01 % BSS = 1.50
Dalga boyu (252 nm)	12.20 ± 0.01 % BSS = 0.13	8434.85 ± 4.34 % BSS = 0.13	25544 ± 201.01 % BSS = 1.93	1.16 ± 0.00 % BSS = 1.05
Dalga boyu (256 nm)	12.17 ± 0.00 % BSS = 0.05	11422.36 ± 9.32 % BSS = 0.20	24505 ± 91.28 % BSS = 0.91	1.16 ± 0.00 % BSS = 0.85
Kolon fırını sıcaklığı (39 �C)	12.26 ± 0.02 % BSS = 0.18	9653.92 ± 11.09 % BSS = 0.11	23605 ± 465.87 % BSS = 1.97	1.16 ± 0.02 % BSS = 1.42
Kolon fırını sıcaklığı (41 �C)	11.99 ± 0.02 % BSS = 0.16	9655.74 ± 8.64 % BSS = 0.09	21842 ± 278.71 % BSS = 1.28	1.16 ± 0.01 % BSS = 0.89

t_R: Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı,  : Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.37. Propil parabene ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
pH 3.90	26.82 ± 0.00 % BSS = 0.01	1322.53 ± 0.51 % BSS = 0.09	132179 ± 353.92 % BSS = 0.66	1.09 ± 0.01 % BSS = 1.19
pH 4.10	26.97 ± 0.00 % BSS = 0.02	1317.53 ± 0.28 % BSS = 0.05	129383 ± 628.23 % BSS = 1.19	1.10 ± 0.00 % BSS = 0.57
Akış hızı (0.95 mL/dk)	26.87 ± 0.00 % BSS = 0.03	1384.00 ± 0.33 % BSS = 0.06	130147 ± 759.43 % BSS = 1.43	1.10 ± 0.01 % BSS = 1.25
Akış hızı (1.05 mL/dk)	25.66 ± 0.00 % BSS = 0.03	1259.09 ± 0.85 % BSS = 0.17	126125 ± 217.80 % BSS = 0.42	1.09 ± 0.01 % BSS = 1.69
Dalga boyu (252 nm)	26.22 ± 0.01 % BSS = 0.05	1139.43 ± 1.04 % BSS = 0.22	126515 ± 755.46 % BSS = 1.46	1.10 ± 0.01 % BSS = 1.15

t_R: Alıkönma zamanı, N: Teorik plaka sayısı,  : Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.37. (Devam) Propil parabene ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T Faktörü
Dalga boyu (256 nm)	26.22 ± 0.00 % BSS = 0.01	1558.90 ± 1.77 % BSS = 0.28	120617 ± 716.66 % BSS = 1.46	1.10 ± 0.01 % BSS = 1.15
Kolon fırını sıcaklığı (39 °C)	26.32 ± 0.01 % BSS = 0.04	1306.99 ± 1.28 % BSS = 0.10	115384 ± 1707.70 % BSS = 1.48	1.09 ± 0.01 % BSS = 1.25
Kolon fırını sıcaklığı (41 °C)	26.04 ± 0.01 % BSS = 0.03	1309.68 ± 1.40 % BSS = 0.11	111003 ± 818.57 % BSS = 0.74	1.10 ± 0.02 % BSS = 1.72

t_R : Alıkonma zamanı, N: Teorik plaka sayısı, $\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

4.2.9. Kararlılık

Standart ve numune çözeltilerinin kararlılık takibi de yapılmıştır. Bu amaçla, başlangıç noktasında elde edilen alan değerleri ile farklı zaman noktalarından elde edilen alan değerleri karşılaştırılmış ve % uyum değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.38 - 4.41'de sunulmuştur.

Tablo 4.38. Standart çözeltideki etkin maddelere ait çözelti kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Betametazon Sodyum Fosfat Alanı	Uyum (%)	Betametazon Dipropiyonat Alanı	Uyum (%)
0	9669.17	-	33116.04	-
34	9680.63	100.12	33260.65	100.44
56	9696.69	100.28	33246.62	100.39

Tablo 4.39. Standart çözeltideki koruyucu maddelere ait çözelti kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Benzil Alkol Alanı	Uyum (%)	Metil Paraben Alanı	Uyum (%)	Propil Paraben Alanı	Uyum (%)
0	735.09	-	9759.74	-	1320.08	-
34	738.10	100.41	9790.46	100.31	1319.53	99.96
56	738.30	100.44	9802.63	100.44	1328.50	100.64

Tablo 4.40. Numune çözeltisindeki etkin maddelere ait çözelti kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Betametazon Sodyum Fosfat Alanı	Uyum (%)	Betametazon Dipropiyonat Alanı	Uyum (%)
0	9682.46	-	33197.90	-
34	9697.30	100.15	33311.17	100.34
56	9713.64	100.32	33325.52	100.38

Tablo 4.41. Numune çözeltisindeki koruyucu maddelere ait kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Benzil Alkol Alanı	Uyum (%)	Metil Paraben Alanı	Uyum (%)	Propil Paraben Alanı	Uyum (%)
0	737.93	-	9775.87	-	1321.78	-
34	740.14	100.30	9816.10	100.41	1321.72	100.00
56	740.40	100.34	9822.61	100.48	1330.24	100.64

4.2.10. Sistem Uygunluk Testleri

% 100 derişim seviyesinde hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltisinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen sistem uygunluğu kriterlerinden olan alan değerleri, alıkonma zamanları, N ve T faktörleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4, 4.5, 4.42 ve 4.43’de verilmiştir.

Tablo 4.42. Standart çözeltilerin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen N sayıları.

	Betametazon Sodyum Fosfat	Betametazon Dipropiyonat	Benzil Alkol	Metil Paraben	Propil Paraben
$\bar{x} \pm SH$	86376.55 $\pm$ 2941.43	67869.74 $\pm$ 179.92	12548.25 $\pm$ 115.17	28201.95 $\pm$ 106.18	109334.64 $\pm$ 188.13
SS	9301.61	568.97	364.21	335.77	594.91
% BSS	10.77	0.84	2.90	1.19	0.54

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

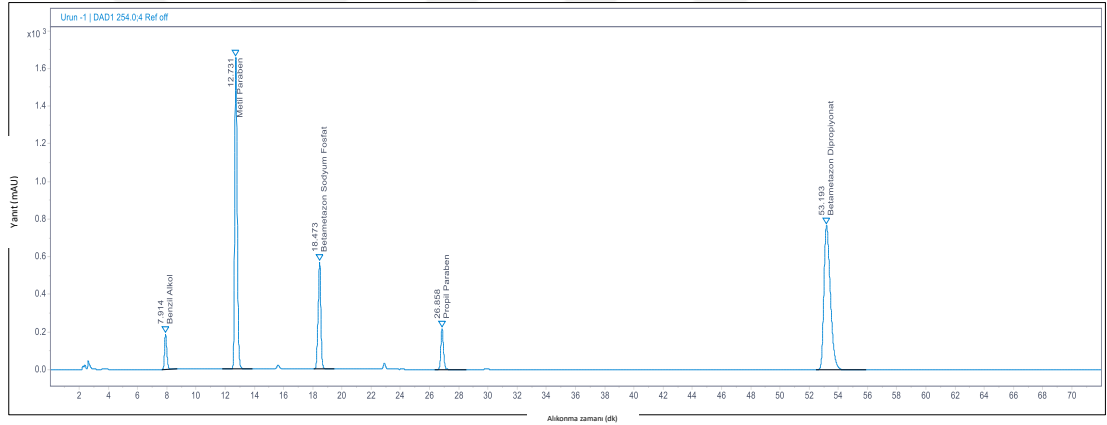
Tablo 4.43. Standart çözeltilerin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen T faktörleri.

	Betametazon Sodyum Fosfat	Betametazon Dipropiyonat	Benzil Alkol	Metil Paraben	Propil Paraben
$\bar{x} \pm SH$	1.19 ± 0.02	1.36 ± 0.00	1.30 ± 0.01	1.24 ± 0.01	1.22 ± 0.00
SS	0.07	0.01	0.03	0.02	0.01
BSS	6.12	0.81	1.98	1.71	1.12

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

4.3. Farmasötik Preparat Analizlerine İlişkin Bulgular

Diprosan® adlı farmasötik üründen 6 ayrı çözelti hazırlanmıştır ve hazırlanan çözeltilerden ardışık 3 enjeksiyon yapılmıştır (Şekil 4.43). Elde edilen sonuçlar Tablo 4.44’de verilmiştir.

**Şekil 4.43.** Diprosan® adlı farmasötik ürünün analizi sonucu elde edilen kromatogram.**Tablo 4.44.** Referans ürüne (Diprosan®) ait analiz sonuçları (n = 6).

	Betametazon Sodyum Fosfat Miktarı (%)	Betametazon Dipropiyonat Miktarı (%)	Benzil Alkol Miktarı (%)	Metil Paraben Miktarı (%)	Propil Paraben Miktarı (%)
$\bar{x} \pm SH$	96.99 ± 0.03	96.20 ± 0.04	99.81 ± 0.04	96.37 ± 0.02	97.61 ± 0.06
SS	0.12	0.16	0.17	0.07	0.26
BSS	0.12	0.17	0.17	0.08	0.26

$\bar{x}$: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma.

5. TARTIŞMA

İlaçların güvenliği ve etkinliği, hastalıkların tedavisinde önemli olan iki temel konudur. Bir ilacın güvenliği, farmakolojik-toksikolojik profilinin yanında, etkin madde ve farklı dozaj formlarındaki bozunma ürünlerinin veya safsızlıkların neden olduğu yan etkilere göre de belirlenir. Bir ilacın kalitesi ve güvenilirliği, hem etkin madde hem de bu etkin maddeleri içeren farmasötik preparatların ve ayrıca bu ürünlerdeki olası safsızlıkların etkin bir şekilde izlenmesi ve kontrol edilmesi ile sağlanır. Aynı şekilde etkin maddeden, ilacın üretilmesine kadar her aşamada oluşan bozunma ürünlerinin veya safsızlıkların saptanması, tanımlanması ve miktarlarının tayin edilmesi, ilaçların kalitesini ve kararlılığını karakterize etmenin en güvenilir yoludur (82).

İlaç etkin maddelerinin kimyasal kararlılığı, farmasötik preparatının güvenliğini ve etkinliğini etkilediği için çok önemlidir. Düzenleyici otoriteler, ilaç etkin maddesi ve ilgili dozaj formunun farklı çevresel faktörlerin etkisiyle zamanla nasıl değiştiğini gözlemleyebilmek için stres testlerini zorunlu tutar. Elde edilen veriler, uygun formülasyon ve ambalajının seçilmesine ve raf ömrünün belirlenmesine yardımcı olur. Stres testlerinde, etkin maddenin kararlılığını belirlemek ve olası bozunma ürünleri oluşturmak için etkin madde ve ilaç ürünleri; hidrolitik, oksidatif, fotolitik ve termal koşullara maruz bırakılır ve bu kısa süre aralığında ilaçlarda depolama koşullarında bozunma ürünlerinin oluşup oluşmadığı araştırılır. Elde edilen bilgiler; etkin madde ve dozaj formunun üretim sürecinin iyileştirilmesine ve uygun depolama koşullarının belirlenmesine yardımcı olur. Genel olarak ilaç maddelerinin % 5 - 20 arasında bozulması yeterli kabul edilmektedir (69, 71-74).

Farmasötik preparatlarda koruyucu maddelerin varlığında etkin madde/maddelerin aynı anda tayini, hem analiz zamanı hem de maliyet açısından avantaj sağlamaktadır. Fakat, farmasötik preparatlarda bulunan koruyucu ve safsızlıkların miktarları genelde az olduğundan; HPLC ile aynı dalga boyunda ve aynı anda etkin madde, koruyucu, safsızlık ve bozunma ürünlerinin tayinleri genelde zordur ve bu analizler ilaç endüstrisinde oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında, enjeksiyonluk süspansiyon dozaj formunda bulunan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat etkin maddelerinin; benzil alkol, metil paraben, propil paraben koruyucu maddelerin varlığında analizleri için kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen HPLC analiz yönteminin, rutin analiz için uygunluk ve güvenilirliğinin kanıtlanması amacıyla valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine göre değerlendirilmiş ve istatistiksel testler uygulanmıştır. Son olarak geliştirilen ve valide edilen analiz yöntemi, farmasötik preparatlara da uygulanmıştır.

5.1. Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu

Tez çalışmasında ilk olarak; benzil alkol, metil paraben ve propil paraben koruyucuları ve stres testleri sonucu olası bozunma ürünlerinin varlığında; betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddelerinin miktar tayini için yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır. En uygun kromatografik koşulların belirlenebilmesi amacıyla sabit faz, hareketli faz içeriği, hareketli fazın pH'sında değişiklikler yapılmış ve elde edilen kromatogramlar ve pikler arasındaki ayırıcılık incelenmiştir.

Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin madde standart çözeltileri ile benzil alkol, metil paraben, propil paraben koruyucu maddelerine ait standart çözeltileri DAD dedektörü kullanılarak sisteme ayrı ayrı verilmiştir ve piklerin spektrumları incelenmiştir. Tüm maddelerin 254 nm'de maksimum absorbanı verdiği gözlenmiş ve bu dalga boyunun tüm moleküllerin miktar tayini için uygun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1 - 4.5).

Yöntem optimizasyonunda uygun sabit fazın belirlenmesi amacıyla C8 ve C18 kolonlar kullanılmıştır ve elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmiştir. En iyi ayırımın C18 kolonda olduğu gözlenmiş olup çalışmalar C18 kolon ile gerçekleştirilmiştir. C8 kolon kullanılarak yapılan enjeksiyonda, metil paraben ile metil paraben safsızlığı arasındaki ayırıcılık 4.4, propil paraben piki ile betametazon sodyum fosfata ait safsızlık piki arasındaki ayırıcılık 6.0 olmuştur. C18 kolon kullanılarak yapılan enjeksiyonda, metil paraben ile metil paraben safsızlığı arasındaki ayırıcılık 8.4, propil paraben piki ile betametazon sodyum fosfata ait safsızlık piki arasındaki ayırıcılık 13.5 olmuştur. Yapılan kolon seçimi çalışmasından elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, C18 kolon ile pikler arası

ayırıcılığın arttığı belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında, C18 (Zorbax Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılmasına karar verilmiştir.

Daha sonra hareketli faz A içeriğindeki iyon çifti ajanının etkisi incelenmiştir. Hareketli faz A içerisine iyon çifti eklenmeden ve iyon çifti ajanı eklenerek enjeksiyonlar yapılmıştır. İyon çifti eklenmeden hazırlanan hareketli faz A ile yapılan standart çözelti enjeksiyonunda, betametazon sodyum fosfatın kolonda tutunma süresinin azaldığı ve metil paraben pikinden önce çıktığı görülmüştür. İyon çifti ajanı kullanılmadığında, betametazon sodyum fosfat ile metil paraben pikleri arasındaki ayırıcılığın azaldığı belirlenmiştir. Hekzilamin eklenerek hazırlanan hareketli faz A ile yapılan standart çözelti enjeksiyonunda ise betametazon sodyum fosfatın alıkonma süresinin arttığı ve metil paraben pikinden sonra çıkarak metil paraben ile arasındaki ayırıcılığın arttığı belirlenmiştir. Ayırımın artması nedeni ile hareketli faz A'da iyon çifti ajanı olarak hekzilamin kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.8 - 4.12).

Seyreltme çözeltisi çalışmasında, farklı oranlarda su - asetonitril karışımı ve pH 6.8 fosfat tamponu - asetonitril karışımı kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda su : asetonitril (50 : 50, h/h), su : asetonitril (70 : 30, h/h), su : asetonitril (65 : 35, h/h) ve pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) karışımları kullanılmıştır. Su : asetonitril (50 : 50, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında, berrak bir standart çözelti elde edilmiştir. Ancak bu seyreltme çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çözelti enjeksiyonunda betametazon sodyum fosfat pikinin yarıldığı görülmüştür (Şekil 4.13). Su : asetonitril (70 : 30, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında ise hazırlanan standart çözeltinin bulanık olduğu görülmüştür. Hazırlanan çözelti 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek sisteme verilmiştir (Şekil 4.14.). Elde edilen kromatogramda pik şekilleri düzgün olmakla birlikte betametazon dipropiyonatın kullanılan seyreltme çözeltisinde çözünmediği görülmüştür. Su : asetonitril (65 : 35, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında, hazırlanan standart çözeltinin berrak olduğu görülmüştür. Elde edilen kromatogramda pik şekillerinin simetrik olduğu (Şekil 4.15) ve betametazon dipropiyonatın kullanılan seyreltme çözeltisinde çözündüğü görülmüştür. Ancak hazırlanan standart çözeltide ikinci günde çökme olduğu gözlenmiştir. Çökme gözlenen çözelti 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek sisteme verildiğinde, çöken maddenin betametazon dipropiyonat olduğu belirlenmiştir. pH 6.8 fosfat tamponu :

asetonitril (65 : 35, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında ise elde edilen kromatogramda pik şekillerinin düzgün olduğu ve betametazon dipropiyonatın kullanılan seyreltme çözeltisinde çözündüğü görülmüştür. Hazırlanan çözelti bekletildiğinde çökme olmamıştır. Uygun koşullar sağlandığı için pH 6.8 fosfat tamponu : asetonitril (65 : 35, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak seçilmiştir (Şekil 4.16).

Geliştirilen HPLC yönteminde; analiz Zorbax Eclipse XDB C18, (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolonda, iyon çifti olarak hekzilamin içeren pH: 4.0 fosfat tamponu (hareketli faz A) : asetonitrilden oluşan hareketli faz kullanılarak gradient program (Tablo 3.6) uygulanarak 1mL/dk akış hızında ve 254 nm’de gerçekleştirilmiştir.

Uygun filtre seçimi için hazırlanan % 100 derişimde standart çözeltiler süzülmeden, 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden ve 0.45 µm naylon filtreden süzülerek viallere alınmıştır. Süzülmeden sisteme verilen standart çözelti kromatogramından elde edilen ana pik alanları ile süzülerek sisteme verilen standart çözelti kromatogramlarından elde edilen ana piklerin alanları karşılaştırılmıştır. Alan değerleri arasındaki yüzde % uyum hesaplanmıştır (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Elde edilen sonuçlara göre; benzil alkolün, metil parabenin, betametazon sodyum fosfatın ve betametazon dipropiyonatın naylon filtrede tutunduğu alan değerlerinin süzülmeden sisteme verilen çözeltilerden düşük olduğu belirlenmiştir. 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülerek sisteme verilen çözeltilerden elde edilen alanlar ile süzülmeden sisteme verilen çözeltilerden elde edilen alanların uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışmalarda 0.45 µm hidrofilik PTFE filtrenin kullanılmasına karar verilmiştir.

Önerilen HPLC yönteminin uygunluğu SUT çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen değerlerin kabul kriterleri içinde olması (Enjeksiyon tekrarlanabilirliği % BSS ≤ 2.0, $k' > 2$, $R_s > 2.0$, $N \geq 2000$ ve $T \leq 2$) geliştirilen HPLC yönteminin söz konusu etkin ve koruyucu maddelerin analizi için uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.4, 4.5, 4.42 ve 4.43).

5.2. Kromatografik Yöntemin Validasyonu

Tez çalışmasında, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben koruyucuları ve stres testleri sonucu olası bozunma ürünlerinin varlığında; betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddelerinin miktar tayini için önerilen HPLC yönteminde

optimum çalışma koşulları belirlendikten sonra geliştirilen yöntemin; kararlılık, özgünlük, doğrusalılık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık parametreleri ile sistem uygunluğu incelenerek validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sistem tekrarlanabilirliğinde, % 100 derişimde hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri ve alıkonma zamanları incelenmiştir (Tablo 4.4 ve 4.5). Betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil parabene ait pik alanları için % BSS değerleri sırasıyla 0.28, 0.31, 0.08, 0.24 ve 0.26 bulunmuştur. % BSS değerlerinin % 2.0'nin altında olması geliştirilen HPLC sisteminin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen analitik yöntemde olası bozunma ürünlerinin varlığı stres çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Asidik, bazik, oksidasyon, ısı ve nem koşullarında etkin madde ve betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosuna stres testleri uygulanarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Betametazon dipropiyonat etkin maddesine yapılan asit bozundurması sonucunda; bağıl alıkonma zamanı (RRT) 0.37, RRT 0.40, RRT 0.44, RRT 0.45, RRT 0.57, RRT 0.63, RRT 0.67, RRT 0.68, RRT 0.69 ve RRT 0.74'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Betametazon sodyum fosfat etkin maddesine yapılan asit bozundurması sonucunda ise betametazon dipropiyonatın alıkonma zamanına göre RRT 0.20, RRT 0.21, RRT 0.28, RRT 0.31, RRT 0.34 ve RRT 0.56'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.18 - 4.19).

Betametazon dipropiyonat etkin maddesine yapılan baz bozundurması sonucunda; RRT 0.37, RRT 0.38, RRT 0.40, RRT 0.45, RRT 0.46, RRT 0.47 ve RRT 0.69'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Betametazon sodyum fosfat etkin maddesine yapılan baz bozundurması sonucunda ise betametazon dipropiyonatın alıkonma zamanına göre RRT 0.28 ve RRT 0.31'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.21 - 4.22).

Betametazon dipropiyonat etkin maddesine yapılan peroksit bozundurması sonucunda RRT 0.63 ve RRT 0.69'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür.

Betametazon sodyum fosfat etkin maddesine yapılan peroksit bozundurması sonucunda betametazon dipropiyonatın alıkonma zamanına göre RRT 0.26, RRT 0.27 ve RRT 0.57'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.24 - 4.25).

Betametazon dipropiyonat etkin maddesine yapılan ısı bozundurması sonucunda RRT 0.64, RRT 0.69, RRT 0.75, RRT 0.80 ve RRT 0.87'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Betametazon sodyum fosfat etkin maddesine yapılan ısı bozundurması sonucunda ise betametazon dipropiyonatın alıkonma zamanına göre RRT 0.28, RRT 0.31, RRT 0.43, RRT 0.57 ve RRT 0.59'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.27 - 4.28).

Betametazon dipropiyonat etkin maddesine yapılan ısı ve nem bozundurması sonucunda; RRT 0.65, RRT 0.69, RRT 0.70, RRT 0.72, RRT 0.76, RRT 0.82 ve RRT 0.85'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Betametazon sodyum fosfat etkin maddesine yapılan ısı ve nem bozundurması sonucunda ise bozunma gözlenmemiştir (Şekil 4.30 - 4.31).

Asidik, bazik, oksidasyon ve sıcaklık koşullarında betametazon enjeksiyonluk süspansiyon plasebosuna da stres testleri uygulanarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir ve herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.20, 4.23, 4.26, 4.29 ve 4.32).

% 50-130 (Tablo 4.6) derişim aralığında hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinin analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.33 - 4.37'de sunulmuştur ve kalibrasyon eğrileri, geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir. Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben korelasyon katsayısı değerleri 0.9999 ve propil paraben için ise 1.000 olarak bulunmuştur. ANOVA analizleri yapılarak kalibrasyon eğrilerinin eğim değerlerinin sıfırdan farklı ($p < 0.05$), kesişim değerlerinin sıfıra eşit (anlamsız) ($p > 0.05$) ve korelasyon katsayısının tesadüfi değerler olmadığı F değerleri ile ($F_{\text{Hesap}} > F_{\text{Tablo}}$) istatistiksel olarak belirlenmiştir (Tablo 4.7). Ayrıca olması gereken derişimlere karşı, kalibrasyon grafiğinden elde edilen verilerle

hesaplanan derişimler grafiğe geçirilerek doğrusallık kontrolü yapılmıştır. Elde edilen doğruların eğimlerinin bir olması ile önerilen HPLC yönteminin doğrusal olduğunu göstermiştir (şekil 4.38 - 4.42).

Yöntemin duyarlılığını göstermek amacıyla betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat için LOD ve LOQ değerleri tespit edilmiştir. Bu amaçla etkin maddelere ait referans standartlar kullanılarak; LOD değerleri için S/G oranının 2-3 aralığında ve LOQ değerleri için ise S/G oranının yaklaşık olarak 10 olduğu değerler seçilmiştir. LOD ve LOQ değerleri, her iki etkin madde için sırasıyla % 0.01 ve % 0.04 olarak bulunmuştur. Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat için LOD değerlerinin saptanmasında S/G oranları sırasıyla 2.05 ve 2.64 ve LOQ değerlerinin saptanmasında S/G oranı yaklaşık olarak 11.78 ve 15.35 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8 - 4.11). Tespit edilen LOD ve LOQ değerlerinin, betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonatın koruyucu maddeler ve bozunma ürünleri varlığında; söz konusu etkin maddelerin farmasötik preparatlardan analizi için geliştirilen HPLC yönteminin yeterli duyarlılıkta olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen HPLC yöntemi ile betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil parabenin kesinlik ve doğruluk çalışmaları için doğrusallık aralığından seçilen 3 farklı derişimde (% 50, % 100 ve % 120) 6 farklı çözelti hazırlanarak aynı günde (gün içi) ve 6 farklı günde (günler arası) analizler yapılmıştır ve gün içi ve günler arası doğruluk için % BH ve kesinlik için % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.12 - 4.21). Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen ortalama % BH ve % BSS değerlerinin % 2'nin altında olması betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonatın koruyucu maddeler ve bozunma ürünleri varlığında; aynı anda analizleri için geliştirilen HPLC yönteminin yüksek doğruluk ve kesinlikte olduğunu göstermektedir.

Doğruluk parametresinin değerlendirilmesi için ayrıca geri kazanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 farklı derişimde (% 50, % 100 ve % 120) betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinden plaseboya eklenmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Tablo

4.22 - 4.26). Betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat etkin maddeleri için % geri kazanım değerleri % 96.01 - 98.12 aralığında bulunmuştur ve bu sonuçlar yöntemin doğruluğunu desteklemektedir.

Doğruluk parametresi için ayrıca standart ekleme yöntemi çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla, numune çözeltisi üzerine % 20, 70, 80, 90, 100 ve 120 derişim seviyelerinde betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon doğruları çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır (Tablo 4.27). Kalibrasyon eğrisinden elde edilen ve standart ekleme yönteminden elde edilen regresyon denklemlerinin eğimlerinin yaklaşık olarak birbirlerine yakın olması nedeniyle yöntemin doğruluğu ve dolayısıyla farmasötik preparattan gelen herhangi bir girişim olmadığı kanıtlanmıştır.

Ara kesinlik parametresinin değerlendirilmesinde; farklı analizci tarafından % 100'lük derişim seviyesinde hazırlanan 6 ayrı betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltileri; farklı günde, farklı kolon ve farklı cihaz kullanılarak farklı analizci tarafından optimum deney koşullarında analiz edilmiştir ve farkın anlamlılığı, istatistiksel olarak t- testi ve F-testi ile gösterilmiştir (Tablo 4.28 - 4.32). Etkin maddeler ve koruyucu maddeler için hesaplanan t ve F değerleri, tablo t ve F değerlerinden küçük olduğundan; farklı günde, farklı kolon ve farklı cihaz kullanılarak farklı analizci tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve geliştirilen yöntemin farklı cihaz, gün, kolon ve analizci değişimine karşı tutarlı ve kesin olduğu belirlenmiştir.

Sağlamlık parametresinin değerlendirilmesi için etkin maddelere ve koruyucu maddelere ait referans standartlar kullanılarak % 100'lük derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Kromatografik şartlarda (hareketli fazın pH'sı, akış hızı, dalga boyu ve kolon fırını sıcaklığı) değişiklikler yapılarak hazırlanan çözeltiden ardışık 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her bir değişiklikte elde edilen piklerin alıkonma zamanları, alan değerleri, N sayıları ve pik simetrileri yani SUT parametreleri değerlendirilmiş ve % BSS değeri hesaplanmıştır (Tablo 4.33 - 4.37). Elde edilen sonuçların kabul kriterleri içinde olması (Enjeksiyon tekrarlanabilirliği $\% BSS \leq 2.0$, $K' > 2$, $R_s > 2.0$, $N \geq 2000$ ve $T \leq 2$) ve her bir koşulda, alıkonma zamanları, alan

değerleri, N sayıları ve pik simetrilerine ait % BSS değerlerinin % 2'den küçük olması geliştirilen HPLC yönteminin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Etkin madde ve koruyucu maddelere ait standart ve numune çözeltilerinin kararlılık çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla, başlangıç noktasında elde edilen alan değerleri ile farklı zaman noktalarından elde edilen alan değerleri karşılaştırılmış ve % uyum değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.38 - 4.41). % uyum değerlerinin 100.0 ± 2.0 aralığında olması nedeniyle etkin madde ve koruyucu maddelerin standart ve numune çözeltilerinin 56 saat kararlı olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminin SUT testleri için % 100 derişim seviyesinde hazırlanan betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben standart çözeltilerinin ardışık 10 enjeksiyonundan elde edilen sistem uygunluğu kriterlerinden olan alan değerleri, alıkonma zamanları, N ve T faktörleri incelenmiştir (Tablo 4.4, 4.5, 4.42 ve 4.43). Elde edilen değerlerin kabul kriterleri içinde olması (Enjeksiyon tekrarlanabilirliği $\% BSS \leq 2.0$, $k' > 2$, $R_s > 2.0$, $N \geq 2000$ ve $T \leq 2$) geliştirilen HPLC yönteminin söz konusu etkin ve koruyucu maddelerin analizi için uygun olduğunu göstermektedir.

5.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi, Türkiye piyasasındaki tek bir muadili bulunan Diprospan® ampul ürününe uygulanmıştır. Numune çözeltileri 6 kez ayrı ayrı hazırlanmış ve analiz sonuçlarına göre etkin madde ve koruyucu madde miktarları hesaplanmıştır ve elde edilen sonuçlar üründe belirtilen miktarlara uygun bulunmuştur. (Tablo 4.44).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Betametazon, glukokortikoid görevi gören bir kortikosteroiddir. Kortikosteroidler anti-inflamatuvar etkilerinden dolayı tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Betametazonun enjekte edilebilir süspansiyon halinde bulunan ticari formülasyonu; betametazonun, iki ester bileşiği olan betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat esterlerinin kombinasyonunu içeren su bazındaki steril bir üründür.

Yapılan kaynak araştırması sonucunda bozunma ürünleri varlığında betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat etkin maddeleri ile benzil alkol, metil paraben ve propil paraben koruyucu maddelerinin eş zamanlı olarak miktar tayini analizlerinin yapıldığına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez kapsamında üründe bulunan betametazonun esterleri ve koruyucu maddelerin, bozunma ürünleri varlığında miktar tayinlerinin yapılabilmesi için gerekli çalışmalar yürütülmüştür.

Çalışma kapsamında, betametazon sodyum fosfat ve betametazon dipropiyonat içeren farmasötik preparatların etkin madde ve koruyucu maddelerin analizleri için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminde bozunma ürünleri varlığında; betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben miktar tayini için en iyi koşullar; Zorbax XDB-C18 (250 x 4.6 mm 5 µm) kolonda, 22.0 mM hekzilamin içeren pH'sı 4.0 olan 50 mM fosfat tamponu ve asetonitrilden oluşan hareketli faz ile 1.0 mL/dk akış hızında, 40°C kolon sıcaklığı ve 254 nm dalga boyu ile elde edilmiştir. Standart ve numune hazırlama aşamasında seyreltme çözeltisi olarak pH 6.8 fosfat tamponu ile asetonitril karışımı kullanıldığında uygun pik şekilleri elde edilmiştir.

Önerilen analitik yöntemle validasyon parametreleri uygulanmıştır. Yöntemin kararlı, seçici, duyarlı, doğru, kesin, sağlam ve tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulanan validasyon parametrelerinden elde edilen sonuçların, kılavuzlarda belirtilen kriterlere uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Valide edilen analitik yöntem, ticari farmasötik preparata da uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda uygun ve tekrarlanabilir sonuçlar alınmıştır.

Geliştirilen analitik yöntemde betametazon sodyum fosfat, betametazon dipropiyonat, benzil alkol, metil paraben ve propil paraben olmak üzere beş molekülün bozunma ürünleri varlığında eş zamanlı olarak miktar tayini analizlerinin yapılabiliyor olması, yöntemin seçici ve tekrarlanabilir olması nedeniyle; geliştirilen bu kromatografik yöntemin, kalite kontrol ve araştırma-geliştirme laboratuvarlarında ve ayrıca stabilite çalışmalarında kullanılabileceği önerilmektedir.



7. KAYNAKLAR

- (1) Gidene S., Arıcı M.A. Glukokortikoidler. Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc-Special Topics. 2012; 5 (1): 25-33.
- (2) Fardet L., Kassas A., Cabane J., Flahault A. Corticosteroid-induced adverse events in adults: Frequency, screening and prevention. Drug Saf. 2007; 10: 861-81.
- (3) Gilman Goodman A, Hardman J.G., Limbird L.E. Adrenocortical steroids. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. 1998; 59: 1465-85.
- (4) Ercan Z.S., Alışır B.M., Kortikosteroidler (Glukokortikoidler ve Mineralokortikoidler). Türkiye Klinikleri J. Int. Med. Sci. 2005; 1 (35): 73-7.
- (5) Samancı N., Balcı N. Kortikosteroidler ve klinikte kullanımı. T Klin. Tıp Bilimleri 2006; 21: 131-40.
- (6) Schimmer B.P., Parker K.L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Hardman JG, Limbird LE, eds. Goodman's & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill. 1996: 1459-85.
- (7) Zou J.J., Dai L., Ding L., Xiao D.W., Bin Z.Y., Fan H.W., Liu L., Wang GJ. Determination of betamethasone and betamethasone 17-monopropionate in human plasma by liquid chromatography-positive/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 2008; 873: 159-64.
- (8) Rowe, R.C., Sheskey, P.J and Quinn, M.E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients (6th Edition). Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 441-5.
- (9) Guideline ICH: Impurities in new drug substances Q3A (R2). Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 2006.
- (10) Harmonised Tripartite Guideline (ICH), Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2), International Conference on Harmonisation, 2003.
- (11) Harmonised Tripartite Guideline (ICH), Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B, International Conference on Harmonisation, 1996.
- (12) Bliesner D.M., Validating chromatographic methods: A practical guide. John Wiley & Sons., 2006.
- (13) ICH (International Council on Harmonisation). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
- (14) Gumustas M., Kurbanoglu S., Uslu B., Ozkan S.A., UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters, Chromatographia, 2013; 76 (21-22): 1365-1427.
- (15) Watson D.G. Pharmaceutical Analysis, 2nd Ed. Elsevier, New York, 2005.

- (16) Taylor R.B., Shivji A.S. A critical appraisal of drug stability testing methods. *Pharm. Res.*, 1987; 4(3): 177-80.
- (17) Hibbert D.B. Method validation of modern analytical techniques. *Accredit. Qual. Assur.*, 1999; 4(8): 352-56.
- (18) Krull I.S., Swartz M. Analytical method development and validation for the academic researcher. *Anal Lett.*, 1999; 32(6): 1067-80.
- (19) Şendur Ömer Faruk, Aydeniz Ali. Artrit ve Kortikosteroidler, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 4(3): 33- 39.
- (20) Samancı N, Balcı N. Kortikosteroidler ve Klinikte Kullanımları. *T Klin. Tıp Bilimleri* 2001; 21: 131-40.
- (21) Weusten BLAM, Jacobs JWG, Bijlsma JWI. Corticosteroid pulse therapy in active rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 23: 183-92.
- (22) Bijlsma JW, Schenk Y, Ramselaar AC et al. Methylprednisolone pulse therapy in conjunction with azathioprine in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1986; 5: 499-504.
- (23) PubChem National Library of Medicine. Betamethasone sodium phosphate. [Internet]. [Erişim Tarihi: 03.12.2022]. Erişim Adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65478>.
- (24) 0810 Betamethasone Sodium Phosphate, EP, EDQM, Strasbourg, France.
- (25) Drugbank. Betamethasone sodium phosphate. [Internet]. [Erişim Tarihi: 03.12.2022]. Erişim Adresi: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000850>.
- (26) PubChem National Library of Medicine. Betamethasone dipropionate. [Internet]. [Erişim Tarihi: 03.12.2022]. Erişim Adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21800>.
- (27) 0809 Betamethasone Dipropionate, EP, EDQM, Strasbourg, France.
- (28) Drugbank. Betamethasone dipropionate. [Internet]. [Erişim Tarihi: 03.12.2022]. Erişim Adresi: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000851>.
- (29) <https://pdf.ilacprospektusu.com/7055-diprospan-suspansiyon-iceren-enjektahl-ampul-kt.pdf>.
- (30) Chen M., Tang Y., Wang Y., Wang C., Yuan C., Chen Y., Tan Z., Huang W., Zhou H, et al. Quantitative determination of betamethasone sodium phosphate and betamethasone dipropionate in human plasma by UPLCMS/MS and a bioequivalence study: *Analytical Methods*. 2016; 8(17): 3550-63.
- (31) Hackmann E R K., Gianotto E A., Santoro M I., et al. Determination of Betamethasone Dipropionate and Salicylic Acid in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography: *Drug Dev Ind Pharm*. 1998; 24(6): 553-5.
- (32) Khattak S U R, Sheikh D, Ahmad I, Usmanghani K, et al. Kinetics of Thermal Degradation of Betamethasone Valerate and Betamethasone Dipropionate in Different Media: *Indian J Pharm Sci*. 2012; 74(2): 133-40.

- (33) Simon A., Borges V. R., Cabral L M., Sousa V P., et al. Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Betamethasone Sodium Phosphate and Betamethasone Dipropionate Intramuscular Injectable Suspension: AAPS PharmSciTech. 2013; 14(1): 425-34.
- (34) Bogdanovska L., Popovska M., Dimitrovska A., Petkovska R., et al. Development and validation of RP HPLC method for determination of betamethasone dipropionate in gingival crevicular fluid: Acta Pharm. 2013; 63(3): 419-26.
- (35) Bhosale S D., Rajput S., et al. RP HPLC Method for Simultaneous Determination of Butenafine Hydrochloride and Betamethasone Dipropionate in a Cream Formulation: J AOAC Int. 2011; 94(1): 106-9.
- (36) Shou M., Galinada W A., Wei Y., Tang Q., Markovich R J., Rustum A M., et al. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion: 2009; 50(3): 356-61.
- (37) Seo C, Hwang YH, Kim Y, Yee ST, Paik MJ, Joo BS, et al. Metabolomic study of aging in mouse plasma by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2016; 1025:1-6.
- (38) Pechlivanis A, Chatziioannou AC, Theodoridis GA, Veskoukis AS, Kouretas D, Mougios V. GC-MS analysis of blood for the metabonomic investigation of the effects of physical exercise and allopurinol administration on rats. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2014; 966: 127-31.
- (39) High P, Thomas EC. High-performance liquid chromatography. Purification Characterization of Secondary Metabolites 2020: 49-58.
- (40) European Pharmacopeia, Liquid Chromatography (2.2.29), EDQM, Strasbourg, France.
- (41) Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Principles of instrumental analysis: Australia: Thomson, c2007. 6th ed.; 2007.
- (42) Smith. R.M. (1988). Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry, UK.
- (43) Bidlingmeyer, B.A. (1992). Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, USA.
- (44) Sadek, P.C. (2000). Troubleshooting HPLC systems: John Wiley & Sons. Inc.
- (45) <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- (46) <https://labakademi.com/hplc-sistemi-solvent-rezervuari/>
- (47) European Pharmacopeia (EP) 10.0, Chromatographic Separation Techniques (2.2.46), EDQM, Strasbourg, France.
- (48) United States Pharmacopeia (USP) Chromatography (621), Rockville, MD.
- (49) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidance on Impurities in New Drug Substances. Q3A(R). Federal Register. (2000). 65 (140).
- (50) International Conferences on Harmonization, Guidance on Impurities in New Drug Products. Q3B(R). Federal Register. (2000). 65 (139).

- (51) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidelines for Residual Solvents. Q3C. Federal Register. (1997). 62 (247), 67377.
- (52) Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R. (2001). Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. *American Pharmaceutical Review*, 4 (1), 70-8.
- (53) Nageswara, R.R., Narasa, R.A., Narsimha, R. (2008). Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46 (3), 505-19.
- (54) Gadamasetti, K., Braish, T. (2008). *Process Chemistry in Pharmaceutical Industry*. USA: Taylor & Francis Group.
- (55) Basak, A.K., Rawa, A.S., Al Hakim, A.H., Furnessa, S., Samaana, N.I., Gilla, D.S., Patel, H.B., Powersa, R.F., Yua, L. *Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59 (1): 64-72.
- (56) Ahuja, S. *Assuring quality of drugs by monitoring impurities*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59 (1): 3-11.
- (57) Görög, S. *The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006; 25 (8): 755-7.
- (58) Roy, J. *Pharmaceutical Impurities-A Mini-Review*. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 2002; 3 (2): 1-8.
- (59) McGovern, T., Jacobson-Kram, D. *Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2006; 25(8): 790-95.
- (60) Jacobson-Kram, D., McGovern, T. *Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59 (1): 38-42.
- (61) Roy, J., Mohammad, G., Banu, A. *Pharmaceutical analysis and stability of locally manufactured ampicillin trihydrate*. *Indian Drugs*, 1993; 5 (30): 211-18.
- (62) The British Pharmacopoeia Commission. (2001). *British Pharmacopoeia*. Vol 1, 123-128.UK; The Stationary Office.
- (63) Connor, K.A., Amidon, G.L., Stella, V.J. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals-A Handbook for Pharmacists*. New York: John Wiley & Sons.
- (64) Yazawa, I., Katsuyama, N., Katsuyama, A. *Properties of high resolution ODS columns*. *Chromatography*. 2001; 21: 396-397.
- (65) Sunderland, J., Tobin, C.M., White, L.O., MacGowan, A.P., Hedges, A.J. *Ofloxacin photodegradation products possess antimicrobial activity*. *Drugs*. 1996; 58 (2): 171-2.
- (66) Condorelli, G., De Guidi, G., Giulfrido, S., Sortino, S., Chilleni, R., Sciuto, S. *Molecular mechanisms of photosensitization induced by drugs XII. Photochemistry and photosensitization of rifloxacin: An unusual photodegradation path for the antibacterials containing a fluoroquinolone-like chromophore*. *Photochemistry and Photobiology*, 1999; 70 (3): 280-86.

- (67) Alsante, K.M., Friedmann, R.C., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R., Snyder, K.D., Szczesny, E.J. (2001). Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. *Separation Science and Technology*, 3, 85- 172.
- (68) Ngwa, G., 2010. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology*, 10(5), 56-59.
- (69) Üstün Z. Doktora Tezi (2018). İmidazol grubu antifungal ilaçların kromatografik davranışlarının ve bozunma ürünlerinin RPLC yöntemiyle belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Isparta.
- (70) Trivikram R., Pandey, I.P. Forced degradation studies for Drug Substances and Drug Products- Scientific and Regulatory Considerations. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2015; 7(5): 238-41.
- (71) Singh, R., Rehman, Z.U. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development, *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2012; 3: 1.
- (72) Baertschi S.W., Alsante, K.M. 2005. Stress testing: The chemistry of the drug degradation. *Pharmaceutical Stress Testing*, Baertschi SW, editors, Taylor & Francis, New York.
- (73) Hotha, K. K., Reddy, S. P. K., Raju, V. K., Ravindanath, L.K. 2013. Forced degradation studies: Practical approach-overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances. *International Research Journal of Pharmacy*. 2013; 4: 78-85.
- (74) Ortak H. Doktora Tezi (2018). Tofasitinib ve Bozunma Ürünlerinin Karakterizasyonu ve Belirlenmesi için LC ve LC-MS/MS Çalışmaları. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Isparta.
- (75) Green, J.M. A practical guide to analytical method validation, *Analytical Chemistry*, 1996; 68: 305A-9A.
- (76) Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5-6): 755–67.
- (77) Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A.* 2003; 987(1-2):57-66. Rockville. 2007.
- (78) Swartz M, Krull IS. Handbook of analytical validation. [electronic resource]: Boca Raton, Fla. : CRC Press, 2012; 2012.
- (79) Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, MD, USA, 2015.
- (80) Research CfDEa, (CDER). Food and Drug Administration Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods. Rockville, MD.1993.
- (81) Dhangar KR., Jagtap RB., Surana SJ., Shirkhedkar AA., Impurity profiling of drugs towards safety and efficacy: Theory and practice, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2017; 62(2): 3543-57.

8. EKLER

Ek 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Hata Değerinin Hesaplanması

$$\text{Bağıl Hata (BH) (\%)} = \frac{|(\text{Teorik Değer} - \text{Hesaplanan Değer})|}{\text{Teorik Değer}} \times 100$$

Standart Hata Değerinin Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\sqrt{\text{Ölçüm Sayısı}}}$$

Bağıl Standart Sapma Değerinin Hesaplanması

$$\text{Bağıl standart sapma (BSS) (\%)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Aritmetik Ortalama}} \times 100$$

Geri Kazanım (%) Hesaplaması

$$\text{Geri Kazanım (\%)} = \frac{\text{Hesaplanan Miktar}}{\text{Teorik Miktar}} \times 100$$

t - Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$$

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2. yöntemin standart sapması

$\bar{x}_1$: 1. yöntemin ortalaması

$\bar{x}_2$: 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.
2. $\alpha = 0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
4. Karar:
 - a) Ortalamalar arasında fark yoktur ($t = \text{Hesaplanan değer}, p > 0.05$).
 - b) Ortalamalar arasında fark vardır ($t = \text{Hesaplanan değer}, p < 0.05$).

F - Testi

İki standart sapma arasında fark olup olmadığını test eder.

$$F_H = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

σ_1 = 1. yöntemin varyansı

σ_2 = 2. yöntemin varyansı

Serbestlik derecesi = $n_1 - 1$ ve $n_2 - 1$

1. H_0 = İki varyans arasında fark yoktur.
2. $\alpha = 0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 - 1$ ve $n_2 - 1$ serbestlik derecesindeki tablo F değerine bakılır.
3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
4. Karar:
 - a) Varyanslar arasında fark yoktur ($F = \text{Hesaplanan değer}, p > 0.05$).
 - b) Varyanslar arasında fark vardır ($F = \text{Hesaplanan değer}, p < 0.05$).

Ek 2. Orjinallik Raporu

BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPIYONAT'IN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE AYNI ANDA ANALİZLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 14	% 2	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
3	www.ilachakkinda.com İnternet Kaynağı	% 2
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.titck.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK 3. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pelin Gençer
Ödev başlığı: BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPI...
Gönderi Başlığı: BETAMETAZON SODYUM FOSFAT VE BETAMETAZON DİPROPI...
Dosya adı: Pelin_Gen_er_31.01.2023_Bas_m_Turnitin.pdf
Dosya boyutu: 4.1M
Sayfa sayısı: 111
Kelime sayısı: 23,301
Karakter sayısı: 139,592
Gönderim Tarihi: 31-Oca-2023 08:02ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2003415114

