

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAPROPTERİN DIHIDROKLORÜR'ÜN PROSES
VE BOZUNMA SAFSIZLIKLARININ
BELİRLENMESİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ
BİR HPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
METOT VALIDASYONU**

Nuriye ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Kimya Mühendisliği Programı

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem ÇORBACIOĞLU

Temmuz, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAPROPTERİN DIHIDROKLORÜR'ÜN PROSES VE
BOZUNMA SAFSIZLIKLARININ BELİRLENMESİ İÇİN
STABİLİTE GÖSTERGELİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE METOT VALIDASYONU**

Nuriye ARSLAN tarafından hazırlanan tez çalışması 11.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Kimya Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem
ÇORBACIOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem ÇORBACIOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Nil ACARALI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Berrin Saygı YALÇIN, Üye
Yalova Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem ÇORBACIOĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Saproterin Dihidroklorür'ün Proses ve Bozunma Safsızlıklarının Belirlenmesi için Stabilité Göstergeli Bir HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nuriye ARSLAN

İmza

*Aileme, özellikle kardeşim Dr. Oktay Arslan'a
ve yakın dostlarıma ithaf ediyorum.*



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tez aşamasında beni yönlendiren, her konuda yardımcı olan, öneri ve desteğini esirgemeyen çok değerli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem ÇORBACIOĞLU'na,**

Tez çalışmam boyunca tüm fedakârlıkları ile bana her konuda destek ve yardımcı olan, onları tanımaktan büyük mutluluk duyduğum **tüm dost ve arkadaşlarıma,** Tezimin için gerekli olan materyali temin etmemde çok yardımcı olan **Tobio İlaç San. ve Tic. A.Ş.'ye,**

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu süreçte de göstermiş oldukları maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni her konuda karşılıksız destekleyen ve bugünlere gelmemde gösterdikleri sabır ve fedakârlık için **canım aileme,**

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nuriye ARSLAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Fenilketonüri (PKU) Tanımı	2
1.2 Fenilalanin ve Yapısı	4
1.3 Hastalığın Tarihçesi	4
1.4 PKU'nun Dünyada Görünme Sıklığı	5
1.5 Tedavi Yöntemleri	7
1.5.1 Diyet Programı	8
1.5.2 Özel Tıbbi Diyet	8
1.5.3 Büyük Nötral Amino Asitler (LNAA)	9
1.5.4 Polietilen Glikol - Fenilalanin Amonyum Liyaz (PEG-PAL) Pegvaliase (PEG-PAL)	9
1.5.5 Glikomakropeptid (GMP)	10
1.5.6 Gen Tedavisi	10
1.5.7 Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL)	11
1.5.8 Sapropterin Tedavisi	11
1.6 Sapropterin Dihidroklorür ve Özellikleri	13
1.6.1 Sapropterin Dihidroklorür Eldesi	14
1.6.2 Sapropterin Dihidroklorür Safsızlıkları	15
1.7 İlaç Etken Maddelerinde ve Ürünlerde Safsızlığın Tanımı	18
1.7.1 Safsızlığın Sınıflandırılması	19
1.7.2 Safsızlık Kaynakları	19

1.8	Zorla Bozundurma Çalışmaları	20
1.9	Analitik Yöntem Validasyonu	20
1.9.1	Validasyon Tanımı ve Amacı	20
1.9.2	Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri	21
1.10	Stabilite Göstergeli Analitik Yöntem Geliştirme	23
1.11	Literatürde Saproterin Dihidroklörür Analiz Yöntemlerinin Yeri . .	24
2	MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1	Materyal	26
2.1.1	Kullanılan Reaktifler Standartlar ve Kimyasal Maddeler . .	26
2.1.2	Kullanılan Gereçler	27
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler	28
2.2	Yöntem	32
2.2.1	Yöntem Geliştirme	32
2.2.2	Validasyon Çalışmasındaki Kromatografik Koşullar	32
2.2.3	Validasyon Parametreleri	34
2.2.4	Miktar Tayini Analitik Yöntem	37
2.2.5	Bozundurma Çalışmaları	39
3	BULGULAR VE TARTIŞMA	42
3.1	Karakterizasyon Çalışmaları	42
3.1.1	UV Tanıma	42
3.1.2	FT-IR Tanıma	44
3.1.3	DSC Termal Analiz	45
3.1.4	Çözünürlük Çalışması	45
3.2	Yöntem Geliştirme	46
3.3	Validasyon Parametreleri	46
3.3.1	Seçicilik	46
3.3.2	Sistem Uygunluk	51
3.3.3	Tespit Limiti	52
3.3.4	Hesaplanabilirlik Limiti	53
3.3.5	Raporlama Seviyesi	53
3.3.6	Doğrusallık	54
3.3.7	Uygulama Aralığı	57
3.3.8	Doğruluk	57
3.3.9	Kesinlik	59
3.3.10	Sağlamlık	62
3.4	Bozundurma Çalışmaları	65
3.4.1	Katı Bozundurma Çalışması	65
3.4.2	Nem ile Bozundurma	66

3.4.3 Sıvı Bozundurma Çalışması	67
4 SONUÇ	72
KAYNAKÇA	74
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	78



SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece



KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACMG	Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji
API	Aktif Farmasötik Bileşen
DF	Düzeltilme Faktörü
dk	Dakika
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FIA	Fluorometrik İmmün Analiz
GA	Güven Aralığı
GMP	Glikomakropeptid
HCL	Hidroklorik Asit
HFA	Yüksek Fenilalanin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı
IND	Araştırma Amaçlı Yeni İlaç Başvurusu
Kg	Kilogram
LNAA	Büyük Nötral Amino Asitler
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Hesaplanabilirlik Limiti
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molarite

MS/MS	Kütle Spektrometri
N	Gürültü
NDA	Yeni İlaç Uygulamaları
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NY	Naylon
PAH	Fenilalanin Hidroksilaz
PDA	Fotodiyot Array Dedektörü
PEG-PAL	Polietilen Glikol Fenilalanin Liyaz Enzimi
Phe	Fenilalanin
PKU	Fenilketonüri
PTFE	Politetrafloroetilen (Hidrofobik)
R	Korelasyon Katsayısı
RC	Hidrofilik Rejenera Selüloz Membran
RFF	Bağıl Yanıt Faktörü
RRT	Bağıl Alıkonma Zamanı
RSD	Rölatif Standart Sapma
RSS	Artık Kareler Toplamı
RT	Alıkonma Zamanı
S	Sinyal
SD	Standart Sapma
UV	Ultraviyole Işık
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	PKU'nun bireylere kalıtsal geçişi	2
Şekil 1.2	Fenilalanin hidroksilasyon sistemi	3
Şekil 1.3	Fenilalaninin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.4	Pegvaliasin'in etki mekanizması	10
Şekil 1.5	Sapropterin Dihidroklörür molekül yapısı	13
Şekil 1.6	Sapropterin Dihidroklörür eldesi (a)	14
Şekil 1.7	Sapropterin Dihidroklörür eldesi (b)	14
Şekil 1.8	Sapropterin Dihidroklörür eldesi (c)	14
Şekil 1.9	Safsızlık B molekül yapısı	15
Şekil 1.10	Safsızlık C molekül yapısı	15
Şekil 1.11	Safsızlık A molekül yapısı	16
Şekil 1.12	Safsızlık D molekül yapısı	17
Şekil 1.13	Safsızlık E molekül yapısı	17
Şekil 1.14	Safsızlık F molekül yapısı	17
Şekil 1.15	Safsızlık G molekül yapısı	18
Şekil 1.16	Safsızlık H molekül yapısı	18
Şekil 1.17	Safsızlık konsantrasyon hesaplama kriterleri	22
Şekil 3.1	Sapropterin Dihidroklörür standart çözeltisi UV spektrumu	42
Şekil 3.2	Test çözeltisi UV spektrumu	43
Şekil 3.3	Çözücü (blank) UV spektrumu	43
Şekil 3.4	Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı FT-IR spektrumu	44
Şekil 3.5	Sapropterin Dihidroklörür hammadde FT-IR spektrumu	44
Şekil 3.6	Sapropterin Dihidroklörür hammadde DSC tarama analizi	45
Şekil 3.7	Plasebo çözeltisi kromatogramı	47
Şekil 3.8	Blank çözeltisi kromatogramı	47
Şekil 3.9	Sapropterin Dihidroklörür standart çözeltisi kromatogramı	47
Şekil 3.10	İlgili bileşikler numune çözeltisi kromatogramı	48
Şekil 3.11	Spike numune çözeltisi kromatogramı	48
Şekil 3.12	Safsızlık B çözeltisi kromatogramı	48
Şekil 3.13	Safsızlık C çözeltisi kromatogramı	49
Şekil 3.14	Sapropterin Dihidroklörür için doğrusallık grafiği	54
Şekil 3.15	Safsızlık B için doğrusallık grafiği	55

Şekil 3.16	Safsızlık C için doğrusallık grafiği	56
Şekil 3.17	Başlangıç sıvı kontrol test kromotogramı	69
Şekil 3.18	Işık ile bozundurma kromotogramı	69
Şekil 3.19	Isı ile bozundurma kromotogramı	70
Şekil 3.20	Oksidasyon bozundurma kromotogramı	70
Şekil 3.21	Baz ile bozundurma kromotogramı	71
Şekil 3.22	Asit ile bozundurma kromotogramı	71



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Dünya çapında bazı genetik metabolik hastalıkların ortalama görülme oranları	6
Tablo 1.2	Türkiye ile diğer ülkelerde PKU hastalığının görülme oranları . .	7
Tablo 2.1	Gradient programı	33
Tablo 3.1	Sapropterin Dihidroklorür için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi	45
Tablo 3.2	Çözünürlük sonuçları	45
Tablo 3.3	Farklı pH değerlerindeki çözünürlük sonuçları	46
Tablo 3.4	Pik tanımlaması	46
Tablo 3.5	Taşınma etkisi	50
Tablo 3.6	Filtre etkisi sonuçları	51
Tablo 3.7	Sistem uygunluk sonuçları	52
Tablo 3.8	Tespit limiti sonuçları	53
Tablo 3.9	Hesaplanabilirlik limiti	53
Tablo 3.10	Raporlama seviyesi sonuçları	53
Tablo 3.11	Sapropterin Dihidroklorür doğrusallık sonuçları	54
Tablo 3.12	Safsızlık B için doğrusallık sonuçları	55
Tablo 3.13	Safsızlık C doğrusallık sonuçları	56
Tablo 3.14	Sapropterin Dihidroklorüre göre Safsızlık B, Safsızlık C için RRT, CF	57
Tablo 3.15	Uygulama aralığı tablosu	57
Tablo 3.16	Sapropterin Dihidroklorür geri kazanım sonuçları	58
Tablo 3.17	Safsızlık B geri kazanım sonuçları	58
Tablo 3.18	Safsızlık C geri kazanım sonuçları	59
Tablo 3.19	Sistem Kesinliği Sonuçları	60
Tablo 3.20	Tekrarlanabilirlik sonuçları	60
Tablo 3.21	Ara kesinlik sonuçları	61
Tablo 3.22	Analist 1 ve 2'nin kesinlik çalışması ortalama sonuçları	61
Tablo 3.23	Ortalamalar arasındaki fark	62
Tablo 3.24	Dalga boyu değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları	62
Tablo 3.25	Kolon Sıcaklığı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları . .	62
Tablo 3.26	Akış hızı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları	63

Tablo 3.27	Standart çözeltisi stabilite sonuçları	63
Tablo 3.28	Numune çözeltisi stabilite sonuçları	64
Tablo 3.29	Katı bozundurma sonuçları	65
Tablo 3.30	Nem numune sonuçları	66
Tablo 3.31	Sıvı bozundurma sonuçları	67
Tablo 3.32	Bozundurma şartları kütle denkliği sonuçları	68



ÖZET

Sapropterin Dihidroklorür'ün Proses ve Bozunma Safsızlıklarının Belirlenmesi için Stabilité Göstergeli Bir HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu

Nuriye ARSLAN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Didem ÇORBACIOĞLU

Bu tez çalışmasında, Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesinin degradasyon bozunma ve proses safsızlıklarının birlikte analizi için stabiliteyi gösteren HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu metotta hareketli faz A olarak potasyum tamponu, hareketli faz B olarak (90:10, h/h) oranlarında asetonitril ile metanol karışımı kullanılmıştır. Gradient elüsyon ile hareketli faz 0,6 ml/dk akış hızında sisteme verilmiştir ve safsızlıkların ayrılması sağlanmıştır. Kolon olarak 150 mm x 4,6 mm, 3,0 μ m ve YMC-Pack ODS-AQ, markası kullanılmıştır. Dedeksiyon ise dalga boyu 220 nm'ye ayarlanmıştır. Askorbik asit, asetonitril içinde çözünerek karışım çözücü olarak kullanılmıştır. Geliştirilen metodun analitik metot validasyonu yapılmıştır. Metodun validasyon parametreleri seçicilik, taşıma etkisi, filtre etkisi, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, sağlamlık, test ve standart çözelti stabilitesi, tespit limiti ile miktarlandırma tayin limiti parametreleri hesaplanmıştır. Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıkları için yapılan linerite doğrusallık çalışmasında sonuçlar 0,997'den büyük korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Metot kesinliği yapılan analizlerde 0,91 ile 1,52, laboratuvar içi kesinlik analizinde 0,72 ile 2,22 arasında değişen %RSD değerleri elde edilmiştir. Metot doğruluğu çalışmasında Sapropterin Dihidroklorür için ortalama %geri kazanım 101,10 ve degradasyon safsızlıkları için sonuçlar 96,38 ile 100,89 arasında bulunmuştur. Miktarlandırma tayin limiti 7,0 – 10,0 ng/ml arasında; tespit limit 2,1 – 3,0 ng/ml değerleri arasında bulunmuştur. Standart çözeltisi 48 saat

15°C’de bozulmadığı ve stabil olduğu görülmüştür. Fakat test çözeltisinin taze hazırlanması gerektiği gözlenmiştir. Metodun sağlamlığı için bazı parametrelerde değişiklikler yapılmıştır. Yapılan değişikliklerin metodun kromatografik şartlarını ve metod performansını etkilemediği gözlemlenmiştir. Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesini tableti ürünü için stress koşullarında zorla bozundurma çalışmaları (ışık, ısı, nem, oksidatif, bazik ve asit) yapılmıştır. Kütle denkliği yapılarak %95,00 - %105,00 arasında değişen değerler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sapropterin Dihidroklorürün, validasyon, safsızlıklar.



ABSTRACT

Development of Stability Indicating an HPLC Method for Sapropterin Dihydrochloride for the Determination and Validation of Process-Related and Degradation Impurities

Nuriye ARSLAN

Department of Chemical Engineering
Master of Science Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Burcu Didem ÇORBACIOĞLU

In this thesis, an HPLC method indicating stability was developed for the combined analysis of the degradation impurities and process impurities of the active substance Sapropterin Dihydrochloride. In this method, potassium buffer was used as mobile phase A, and a mixture of acetonitrile and methanol in a 90:10 (v/v) ratio was used as mobile phase B. The mobile phase was delivered to the system at a flow rate of 0.6 ml/min via gradient elution, ensuring the separation of impurities. A YMC-Pack ODS-AQ column with dimensions of 150 mm x 4.6 mm, 3.0 μ m was used. Detection was set to a wavelength of 220 nm. Ascorbic acid was dissolved in acetonitrile and used as the mixture solvent. Analytical method validation was performed for the developed method. The validation parameters of the method included selectivity, carry-over effect, filter effect, precision, accuracy, linearity, robustness, stability of test and standard solutions, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ). In the linearity study for the active substance Sapropterin Dihydrochloride and its degradation impurities, a correlation coefficient greater than 0.997 was obtained. The method's precision yielded RSD% values ranging from 0.91 to 1.52 in the analyses, and from 0.72 to 2.22 in the intermediate precision analysis. In the accuracy study, the average %recovery for Sapropterin Dihydrochloride was found to be 101.10% and for degradation impurities, the result between 96.38% and 100.89% for degradation impurities. The LOQ was found to be between 7.0 and 10.0 ng/mL; the LOD was found to be between 2.1 and

3.0 ng/mL. The standard solution was observed to be stable for 48 hours at 15°C, whereas the test solution needed to be freshly prepared. For the robustness of the method, some parameters were altered. It was observed that these changes did not affect the chromatographic conditions or method performance. Forced degradation studies under stress conditions (light, heat, humidity, oxidative, basic, and acidic) were carried out for the tablet product containing the active substance Sapropterin Dihydrochloride. Mass balance values between 95.0% and 105.0% were obtained.

Keywords: Sapropterin dihydrochloride, validation, impurities.



1 GİRİŞ

Nadir görülen hastalıkların çoğu genetik metabolik hastalıklardır. Ancak, kalıtsal metabolik hastalıkların sayısı oldukça fazla olduğu için, bu hastalıkların hepsi bir arada incelendiğinde her yıl doğan metabolik hastalıklı çocuk sayısı oldukça yüksektir. Zihinsel engellilikle sonuçlanan metabolik hastalıkların büyük bir çoğunluğu otozomal resesif yolla aktarılır. Eğer anne ve baba taşıyıcı ise, her çocuğuna bu genetik aktarım yoluyla geçen kalıtsal hastalıkların ortaya çıkma olasılığı %25'tir.

Fenilketonüri, genetik bir metabolik bozukluktur. Bu hastalığa sahip çocuklar, protein içeren gıdalarda bulunan fenilalanin adlı amino asidi metabolize edemezler. Bu durum, fenilalanin ve onun yan ürünlerinin kanda ve diğer vücut sıvılarında birikmesine yol açar, bu da çocuğun gelişmekte olan beynine zarar verir. Yüksek fenilalanin seviyeleri, çocuğun beyinde ciddi zihinsel engellere ve merkezi sinir sistemini etkileyen çeşitli semptomların ortaya çıkmasına neden olur.

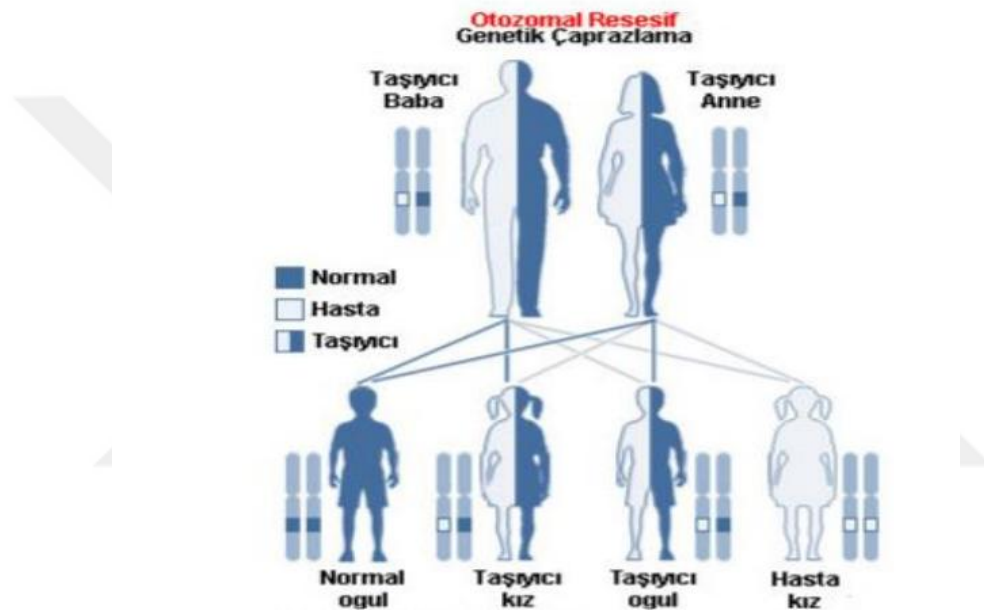
Ülkemizde akraba evliliklerinin yaygın olması, otozomal çekinik genetik metabolik hastalıkların daha yüksek oranlarda görülmesine neden olmaktadır. Yapılan araştırmalara göre, bu hastalıkların ülkemizdeki görülme sıklığı 1/4500 olarak belirlenmiş olup, fenilketonüri oranının dünya ortalamasının üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Kalıtsal bir metabolik hastalık olan fenilketonüri, toplumumuzda hâlâ yeterince bilinmemekte ve birçok çocuğun hayatı boyunca özürlü kalmasına sebep olmaktadır. Bu konuda sağlık kuruluşlarına ve hekimlere ailelerin bilinçlenmesi konusunda büyük görev düşüyor. Topuktan alınan bir damla kan ile bu hastalığın önlenmesi mümkündür [1].

1.1 Fenilketonüri (PKU) Tanımı

Klasik fenilketonüri (PKU) doğuştan gelen, dünyada en yaygın görülen doğumsal bir amino asit metabolizma bozukluğu hastalığıdır [2–4]. Karaciğerde fenilalanin hidroksilaz (PAH) enzimini kodlayan gendeki mutasyon [2, 3] sonucunda, fenilalanin (phe) metabolizmasındaki bozukluklar ile nadir görülen, genetik olarak karakterize, doğuştan gelen otozomal resesif geçişli metabolik bir hastalıktır [5–8].

Şekil 1.1’de PKU’nun genetik geçişi (otozomal resesif gen aktarımı) şematik olarak sunulmaktadır [3].



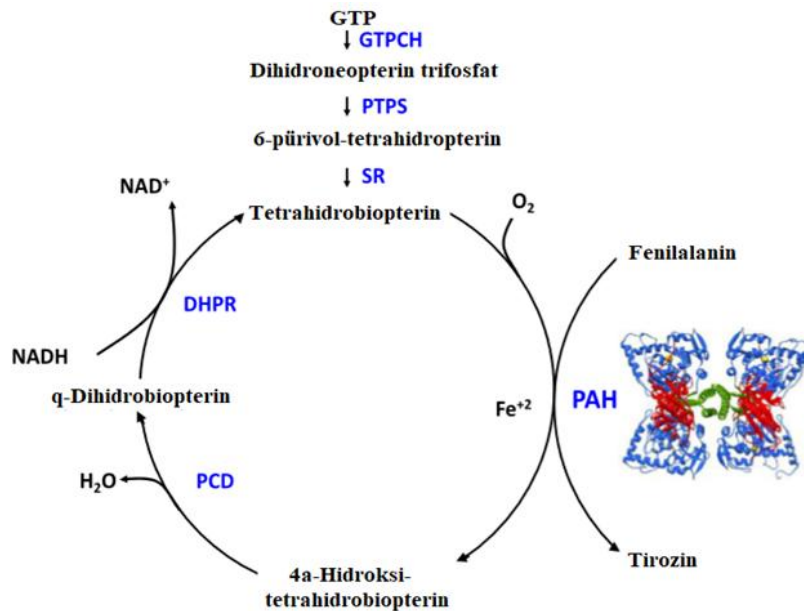
Şekil 1.1 PKU’nun bireylere kalıtsal geçişi

Fenilalanin, proteinlerde ve bazı yapay tatlandırıcılarda bulunan ve gıdalarla vücuda alınan bir amino asittir. PKU hastalığı, PAH enziminin kofaktörü tetrahidrobiopterin (BH₄), yani fenilalanin hidroksilaz (PAH) geninin rejenerasyonu veya biyosentezindeki bozukluklara bağlı da olabilir [9, 10]. Bu gen, fenilalanini tirozine dönüştüren PAH üretiminden sorumludur. Şekil 1.2’de gösterilmektedir [11–13].

Fenilalanin hidroksilaz enziminin normal işlevi azaldığında veya yok olduğunda, plazmada Fenilalanin seviyesi normalin 20-30 katına kadar artar, protein sentezi bastırılır, miyelin üretimi azalır ve nörotransmitterlerde belirgin düşüşler gözlenir [4]. Fenilalanin artışında, kan-beyin bariyerinden geçerek santral sinir sisteminde proteine ve miyeline zarar verir [10]. Ayrıca serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi nörotransmitterlerin sentezini baskılamaktadır [2, 9].

Enzim eksikliği sonucunda, fenilalanin amino asidi idrar, kan ve diğer vücut sıvılarında birikir. Bu durum, alınması gereken diğer önemli amino asitlerin emilimini engelleyerek toksik seviyelere yükselmesine neden olur [3, 14]. PKU'lu çocuklar yaşamın ilk günlerinde normal görünürler [15]. Fakat beyindeki fenilalanine özellikle duyarlı olan sinir hücreleri, aşırı fenilalanin miktarından etkilenebilir ve bunun sonucunda beyin hasarı yavaş yavaş ilerler. Birkaç ay içinde belirgin hale gelir ve geri dönüşü olmayan zihinsel gerilik, gelişimsel sorunlar, anormal davranışlar ve psikiyatrik semptomlar görülmektedir [5, 11, 15]. Ayrıca, başlangıçta iyi metabolik kontrolle tedavi edilen ancak daha sonraki çocukluk veya yetişkinlikte bu kontrolü kaybeden hastalar, geri dönüşümlü ve geri dönüşsüz nöropsikiyatrik sonuçlar yaşayabilirler [10].

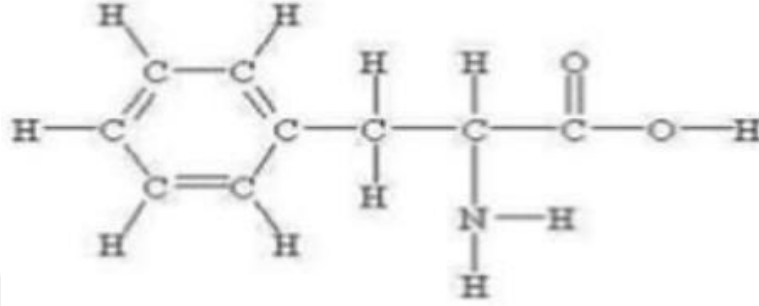
Fenilketonüri, doğum sonrası tarama programlarıyla belirlenir ve tedaviye ilk 3 ay içinde başlanmazsa hastalık belirtilerinin ortaya çıkması ve kalıcı zihinsel engel sorunlarının gelişmesi kaçınılmaz hale gelir [1, 16]. Semptomların önlenmesi veya azaltılması için erken tanı ve tedavi önemlidir. PKU teşhisi koymak neredeyse tüm dünyada, gelişmiş teşhis yöntemleri ve tarama programları sayesinde kolaylaşmıştır. PKU ile ilgili temel sorun, teşhis koymak değil, tedavi etmektir [9]. Ülkemizde fenilketonüri için bebek tarama programı, 1994 yılından beri ülke çapında uygulanmaktadır [17, 18]. Bu sayede hastalığın en ciddi nöropsikiyatrik bulguları önlenabilir [19].



Şekil 1.2 Fenilalanin hidrosilasyon sistemi

1.2 Fenilalanin ve Yapısı

L-fenilalanin, proteinlerin neredeyse tamamında %4 ile %5 oranlarında bulunan ve besinlerle alınan önemli bir amino asittir. Sağlıklı bireylerde, vücudun gelişimi için günlük olarak 9,1 mg/kg fenilalanin alınması yeterlidir [20]. Özellikle tirozinle birlikte birçok proteinin yapıtaşını oluşturur [3]. Şekil 1.3'te Fenilalaninin kimyasal yapısı gösterilmektedir [21, 22].



Şekil 1.3 Fenilalaninin kimyasal yapısı

Fenilalanin, organizmada tirozin şeklinde metabolize edilerek melani norepinefrin, adrenalin, dopamin ve tiroksin gibi çeşitli görevleri olan bileşiklerin yapısında yer alır [3]. Protein sentezi için gerekli olmayan artık fenilalanin (%75 kadarı), karaciğerde bulunan fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından tirozine dönüştürülür. Bu, tersinmez hidroksilasyon reaksiyonudur [22].

L-, D- ve DL- olmak üzere üç ayrı formda Fenilalanin mevcuttur. Vücut proteinlerinde en yaygın bulunanı L- formudur. Bu formun, hafıza ve öğrenme kapasitesine katkıda bulunduğu ve depresyonu engellediği bulunmuştur [21]. D- formunun ağrı kesici özelliklere sahip olduğu bilinir ve DL- formu, bu iki formun bir karışımıdır. DL- formunun mental odaklanmayı artırdığı ve Parkinson hastalığının tedavisinde kullanıldığı ifade edilir. Fenilalanin eksikliğinde zihinsel bozukluklar, depresyon, endişe, kronik yorgunluk ve cinsel istekte azalma görülebilir [3, 22].

1.3 Hastalığın Tarihçesi

PKU ilk defa 1934 yılında Norveçli hekim Dr. Asbjörn Fölling tarafından, zihinsel gerilik gösteren, sarışın ve mavi gözlü iki kardeşte tanımlandı [1, 9, 23]. Kanda artan fenilalanin seviyelerinin, nörofizyolojik sorunların temel nedeni olduğunu tespit etmiştir [4]. Yeni tanımladığı bu rahatsızlığın bilişsel gelişim üzerindeki etkisini vurgulamak için "Imbecilitas phenylpyrouvica" adını vererek

teşhis koymuştur [12, 19, 24]. Sonraki yıllarsa İngiltere’de Penrose ve Quastel, 1946’da bu duruma "fenilketonüri" adını vermiştir [24].

1960’ların başında PKU için ilk tarama testi, Amerikalı bilim insanı Robert Guthrie tarafından geliştirilen ve Guthrie testi olarak adlandırılan yöntemle yapılmıştır. Bu yöntem, fenilketonüri hastalığını teşhis etmek için Guthrie kağıdı adı verilen bir filtre kağıdına az miktarda kan alınmasıyla gerçekleştirilmiştir [4, 9, 18]. Bu test, bakteriyel inhibisyon çalışma prensibine dayanır. Bu prensipte, *Bacillus subtilis* bakterisi beta-tiyenilalanin içeren ortamda fenilalanin olmadan çoğalamaz. Topuktan alınan az miktardaki kan numunesi filtre kağıdına damlatılarak daire şeklinde kesilen örnek, besiyerine yerleştirilir. Eğer ortamda yeterli miktarda fenilalanin varsa, bu bakteri kan numunesinin altında çoğalmaya başlar ve test pozitif sonuçlu olarak değerlendirilir [20].

Bugün, pek çok ülkede PKU ve HFA formları, Guthrie testi veya kütle spektrometresi gibi daha gelişmiş teknolojilerle yenidoğan tarama programları içinde hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde erken teşhis edilebilir [3, 4, 19].

Yenidoğanlar doğumdan sonraki ilk 24-48 saat içinde ilk beslenmelerini aldıktan sonra Guthrie testi ile fenilketonüri açısından taranır; kan fenilalanin düzeyleri 6 mg/dl (360 μ mol/l)’yi geçerse, hastalık düşünülür [20, 25].

PAH geninin 1980’lerde klonlanması, PKU’nun genetik temeli hakkındaki mevcut bilgimizi önemli ölçüde ileri taşıdı [19]. PKU hastalarında BH4 kullanımının fenilalanin seviyelerini düşürebileceği ilk defa 1999’da bildirildi [19].

1.4 PKU’nun Dünyada Görünme Sıklığı

PKU’nun insidansı ülkeden ülkeye değişkenlik göstermektedir [10, 22]. PKU’nun dünya çapında taranan nüfusta görülme insidansı 1/12400 canlı yenidoğan, öngörülen taşıyıcı oranı ise 1/55’tir ve yaklaşık olarak 0,45 milyon insanı etkileyen genetik bir hastalıktır [4, 26]. Avrupa’da, ortalama yaygınlık yaklaşık olarak 1:10.000 doğan bebekte görülür ve en yaygın olarak İrlanda ve Türkiye’de, daha az yaygın olarak ise Finlandiya’da karşılaşılır [27].

Coğrafi açıdan bakıldığında, PKU genellikle Asya ülkelerinde en düşük, ancak Çin hariç en yüksek Avrupa ve Orta Doğu ülkelerinde görülür [26]. Beyaz veya Doğu Asyalı popülasyonlarda en yüksektir (10,000-15,000 canlı doğumda bir) [26]. PKU’nun görülme sıklığının etnik gruplara göre farklılık gösterdiği, beyazlar ve yerli Amerikalılarda daha yaygın olduğu, Asyalılar ve İspanyollarda ise daha nadir

Tablo 1.1 Dünya çapında bazı genetik metabolik hastalıkların ortalama görülme oranları

Hastalık	Sıklık	Hastalık	Sıklık
Fenilketonüri**	1:10000	Hipofosfatazya	1:100000
Histidnemi	1:12000	Glisinri	1:100000
Sistinüri***	1:12000	Hiperglisinri	1:3000
Cori Hastalığı	1:125000	re Siklusu Defektleri	1:30000
Akçaağaç Şurubu Hastalığı	1:175000	Menkes hastalığı	1:35000
Wilson Hastalığı	1:200000	Metakromatiklokodistrofi	1:40000

Bazı hastalıkların Türkiye’de görülme sıklıkları Şu Őekildedir: Fenilketonüri için 1/4500, Sistinüri için ise 1/1000 oranındadır

olduğu tespit edilmiştir [4].

PKU’nun görülme sıklığı, Avrupa ve Kuzey Amerika’daki beyaz ırkta yaklaşık 1/10,000 canlı doğumdur; ancak bazı bölgelerde bu oranın daha yüksek olduğu belirtilmektedir [4].

Finlandiya, Avrupa’da en düşük sıklığa sahip olan ülke iken, ABD’de görülme sıklığı 1/13000’dr. Latin Amerika’da ise sıklık 1/50000 ile 1/25000 arasında deėiŐir ve genellikle güney bölgelerinde daha yüksektir. Tayland’da 1/200000, Tayland’da 1/200000, Çin’de 1/100500, Japonya’da 1/70000 ve Asya’da ise sıklık 1/15000 olarak rapor edilmektedir [10, 22, 28]. PKU, Afrika’da sıklığı son derece düşük seviyelerdedir [4, 10].

Orta Doğu’da, Mısır, İran ve Ürdün gibi bazı ülkelerde PKU’nun görülme sıklığı oldukça yüksektir, yaklaşık olarak 1:5,000 canlı doğumda bir. Diğer yüksek PKU olan ülkeler arasında İsrail, Türkiye, Suudi Arabistan, Irak, Birleşik Arap Emirlikleri ve Bahreyn bulunmaktadır [26, 29]. Fenilketonüri, kalıtsal bir metabolik rahatsızlıktır ve hala toplumumuzda yeterince tanınmamaktadır, bu da birçok çocuğun yaŐamı boyunca engelli kalmasına sebep olmaktadır. Sağlık kuruluŐları ve hekimler, aileleri bilgilendirme konusunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu hastalığın önlenmesi için bir damla kan testi yeterlidir [30].

Türkiye’de sıkça görülen klasik fenilketonüri vakalarının sayısı, akraba evliliklerinin sık olmasından kaynaklanmaktadır, bu da diğer ülkelere kıyasla oldukça yüksek bir seviyededir [22, 27, 29]. Ülkemizde PKU sıklığıyla ilgili yapılan çalışmalar arasında farklılıklar olmasına rağmen [24], PKU’nun Türkiye’deki en yaygın amino asit metabolizma bozukluğu olduğu ve ortalama olarak her 4500 hastadan birinde grldğu tespit edilmiştir [3, 4, 24].

Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre, Türkiye’de her yıl yaklaşık 1.500.000 bebek dünyaya gelirken, fenilketonüri hastalığıyla doğan çocukların sayısı yılda yaklaşık 300-400 arasındadır [1, 7, 22]. Türkiye’de hastalığın bu kadar sık görülmesinin sebebi, akraba evliliklerinin yüksek oranda gerçekleşmesidir (%21 oranında birinci derece kuzen evlilikleri) ve her 20-25 kişiden birinin PKU taşıyıcısı sonucunu oluşturmaktadır. [1, 3, 4, 7]. Türkiye ile diğer ülkelerde PKU hastalığının görülme oranları Tablo 1.2’de gösterilmiştir [22].

Tablo 1.2 Türkiye ile diğer ülkelerde PKU hastalığının görülme oranları

Ülke Adı	Sıklık
Türkiye	1/4500
İrlanda	1/6110
Kuveyt	1/6500
İtalya	1/7000
Almanya	1/9000
İngiltere	1/10000
Amerika Birleşik Devletleri	1/13000
Hollanda	1/18000
Fransa	1/18000
Çin	1/20000
İsveç	1/20000
Japonya	1/60000
Fillandiya	<1/71000

Ulusal Çocuk Sağlığı ve Gelişim Birliği verilerine göre, hastalığın en yüksek sıklığının Türkiye’de olduğu vurgulanmaktadır [22]. Ülkemizde 2001 yılında görülme sıklık, canlı doğum başına 1/4500 olarak rapor edilmiştir [30, 31]. Ülkemizde 2007’de 246, 2008’de 217 ve 2010’da 182 yeni doğanın PKU tanısı aldığı belirtilerek, sıklığın 1/6228 olduğu saptanmıştır [3, 4, 27]. 2016 verilerine göre, Türkiye’de kayıtlı ve kayıtsız olarak yaklaşık 15 bin PKU hastası bulunmaktadır. Halk Sağlığı tarama programlarına göre ise her 6000 bebekten biri PKU’lu olarak doğmaktadır. Avrupa genelindeki toplam PKU hasta sayısının, Türkiye’deki rakama ulaşmadığı ifade edilmektedir [3, 4].

1.5 Tedavi Yöntemleri

Fenilketonüri hastalığına sahip bebekler genellikle doğduklarında sağlıklı bir bebek gibi görünmektedir. Ancak, hastalık belirtileri göz ardı edilerek beslenmeye başlandığında, vücutta biriken fenilalanin, klinik bulguların ortaya çıkmasına ve ilerlemesine neden olabilir [31]. Birçok ülkede yeni doğan taramaları yapılmaktadır. Tarama yöntemleri değişse de, genellikle fenilketonüri teşhisi için doğumdan en az 24 saat sonra bebeğin topuğundan özel bir filtre kağıdına (Guthrie

testi) alınan kan numunesiyle konulmaktadır. [20, 32]. Bugünlerde MS/MS (kütle spektrometrisi) yöntemi, topuktan alınan kan örneğindeki Phe düzeyini FIA (fluorometrik immün analiz) yöntemine kıyasla daha hassas bir şekilde ölçmektedir ve aynı zamanda tirozin seviyesi hakkında da bilgi sağlamaktadır [31].

1.5.1 Diyet Programı

Protein alımı diyetle kısıtlanarak fenilalanin alımı azaltılır [21]. PKU tedavisi için kısıtlı bir diyetin kullanılması ilk kez 1953 yılında belirlenmiştir [19]. Phe kısıtlı diyet, doğal protein kaynaklarının alımını azaltarak, hastaların protein ihtiyaçlarını özel beslenme ürünleri ile karşılar. Et, baklagiller, yumurta, süt ve süt ürünleri gibi yüksek protein içeren besinler, biyokimyasal bulgulara göre diyetten çıkarılır. Karbonhidratlar ve yağlar vücudun temel enerji kaynaklarıdır. İhtiyaç duyulan protein ise fenilalanin içermeyen amino asit takviyeleriyle sağlanır [32]. PKU tedavisinde diyet oldukça etkilidir, ancak uzun süreli uyumda sorunlar yaşanabilir. Bu durum, metabolik kontrolün optimal olmamasına ve nöropsikolojik problemlere yol açabilir [16, 23]. Bu sebeple, PKU'lu bireyler için, doğal protein alımlarını artırma, tıbbi gıdaların kullanımını azaltma veya bırakma, zihinsel sağlıklarını iyileştirme ve kandaki Phe konsantrasyonunu azaltma imkanı sunacak yeni tedavilerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır [33].

1.5.2 Özel Tıbbi Diyet

PKU'nun klasik tedavi yaklaşımı, fenilalanin içeren gıdaları sıkı bir şekilde kısıtlayan, özel ve oldukça kısıtlayıcı bir tıbbi diyeti tıbbi gözetim altında uygulamaktır [8]. PKU hastaları için alternatif besinlerin geliştirilmesi bu noktada önemli hale gelmektedir [32]. Ayrıca, gün içinde birkaç kez tüketilen ve içerisinde fenilalanin içermeyen özel tıbbi formüllerdir [8]. Yaratılan tarifler, bu bireylerin sağlığını korumada önemli rol oynamaktadır. Protein açısından düşük unlar veya sütler kullanılarak yeni tarifler geliştirilmiş ve aynı sofrada farklı malzemelerin kullanılmasıyla PKU'lu çocukların aynı türden yiyecekleri tüketmeleri sağlanmıştır [32]. Bu formüller, esansiyel amino asit tirozin ve diğer amino asitleri sağlar. PKU tedavisi, Tirozin seviyelerinin izlenmesini içerir ve düşükse, tirozin takviyesi yapılır [8]. Fakat bu özel tıbbi diyetle kalorileri sağlamak için özel tasarlanmış düşük proteinli gıdalar oldukça pahalıdır. Bu diyetin maliyeti yılda 20.000 ile 40.000 ABD doları arasındadır [13].

1.5.3 Büyük Nötral Amino Asitler (LNAA)

PKU tedavisinde etkili bir diğer yöntem, büyük nötr amino asitlerle yapılan diyet desteğidir [9]. Phe'nin yanı sıra treonin, triptofan, tirozin metionin, lösin, histidin ile izolösin içeren bir karışımdır. Fenilalanin ve (LNAA) büyük nötr amino asitler kan-beyin zarı geçişte aynı taşıma sistemini kullanır ve bu süreçte rekabet halinde olurlar [9]. Kullanım amacı; beyin ve kandaki fenilalanin seviyelerini düşürmek, nörotransmitterlerin beyindeki üretimini artırmak ve beyinde fenilalanin dışındaki büyük nötral amino asitlerin miktarını yükseltmektir [32]. Büyük nötr amino asit takviyesinin, beyindeki nörotransmitterleri düzelten ve fenilalanin konsantrasyonlarını azaltan etkileri olduğu kanıtlanmıştır [19]. LNAA'nın, PKU hastalarında nörotransmitter sentezini artırarak beyindeki fenilalanin miktarını azalttığı gösterilmiştir [32].

LNAA'lar, PKU tedavisinde potansiyel bir seçenek olabilir, ancak güvenlik ve etkinliklerinin belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. LNAA'lar çeşitli formülasyonlarda bulunur ve genellikle tıbbi gıdalar kategorisine girer [34]. Kısacası, LNAA takviyesinin sağlık sonuçlarını düşük Phe diyeti ile birlikte iyileştirdiği gösterilmiştir [35]. Ancak, bu ürünler genellikle FDA tarafından tıbbi gıdalar olarak sınıflandırılır ve genç hastalara önerilmez, çünkü LNAA takviyesinin etkinliği ve güvenliği konusunda yeterli kanıt bulunmamaktadır [35, 36]. Ayrıca, bu tedavi stratejisinin uzun vadeli etkileri hakkında henüz yeterli klinik veri bulunmamaktadır [37].

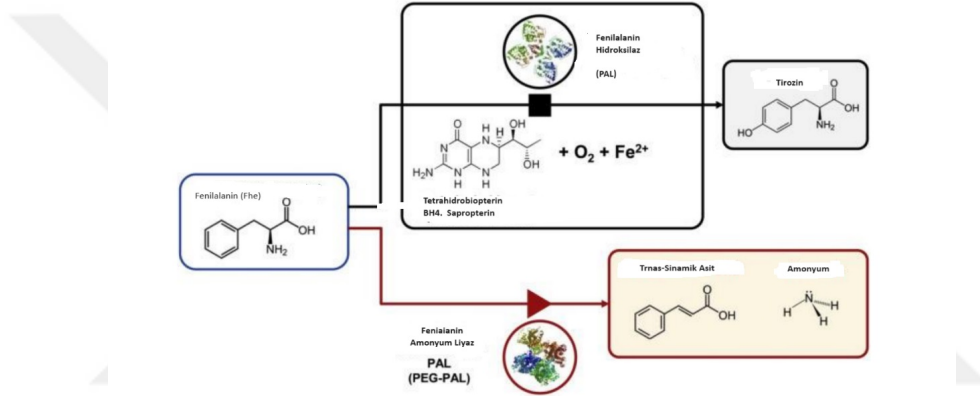
1.5.4 Polietilen Glikol - Fenilalanin Amonyum Liyaz (PEG-PAL) Pegvalias (PEG-PAL)

Fenilalanin, PAH'dan farklı bir enzim olan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) tarafından parçalayan bir enzim tedavisi olarak sunulmaktadır [38]. PAL, kofaktör gerektirmeyen bir bakteri tarafından üretilen enzimdir ve L-fenilalanin ile reaksiyona girerek trans-sinamik asit ve amonyağa dönüştürür. Bu yöntem, PKU'daki fenilalanin düzeyini kontrol etmek için diyet dışı bir ilaç tedavisi seçeneği olmuştur [9, 35]. PKU'daki fenilalanin seviyesini kontrol etmek için diyet dışı bir yol olarak umut vermektedir [35]. PAL'a bağlı immün reaksiyonları azaltmak için PEGilasyon yöntemleri kullanılır [39]. PEG, toksik olmayan uda çözünebilir ve vücuttan kolayca atılabilir bir madde olarak bilinir [32]. PEG ile PAL'ın konjugasyonu, PAL'ın biyofarmasötik özelliklerini artırır ve immünolojik yanıtı azaltmasını sağlar [9]. Doğal PAL'ın enjeksiyondan sonra yarılanma ömrü 6 saatken, PEG-PAL'ın yarılanma ömrü 20 saattir [32].

Fenilalanini zararlı olmayan trans-sinamik asite ve serbest amonyağa dönüştüren bu

enzim, herhangi bir kofaktöre gerek duymaz. u tedavi yöntemi, subkutan enteral, ve intraperitoneal yollarla uygulanmıştır. Pegvaliasie'in etki mekanizması Şekil 1.4'te gösterilmektedir [19].

Phe seviyeleri ($>600 \mu\text{mol/l}$) olan ≥ 16 yaşındaki yetişkin hastaların tedavisinde kullanılan Pegvaliasie (PALYNZIQ) Biomarın tarafından geliştirilen ilaç, yeni bir enzim tedavisi olarak, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından Mayıs 2018'de onaylanmıştır [26, 34, 40]. Günlük 20-60 mg standart dozda deri altına enjeksiyon olarak verilir [34]. Pegvaliaz tedavisi gören bireylerde, yalnızca diyetle veya diyet ve sapropterin kombinasyonu ile tedavi edilen kişilere kıyasla Phe seviyesinde %30-40 oranında azalma görülmektedir [13, 41].



Şekil 1.4 Pegvaliasie'in etki mekanizması

1.5.5 Glikomakropeptid (GMP)

Glikomakropeptid, 64 amino asitten oluşan doğal bir protein kaynağıdır [32]. Fenilketenüri tedavisinde kullanılan Glikomakropeptit, peynir altı suyundan türetilen ve özel amino asitler bakımından zengin olan, ancak fenilalanin, tirozin veya tritofan içermeyen bir proteindir [9, 35]. Fenilalanin düzeyi düşük bir doğal proteindir [19]. Düşük fenilalanin içeren amino asit kaynaklı besinlerin %80'i sentetik amino asitlerden elde edilirken, %20'si doğal amino asitlerden gelir. Glikomakropeptidli besin ve içecekler ise %70 doğal protein, %30 sentetik amino asit içerir. Glikomakropeptid, phe içermediği için PKU'lu hastalarda güvenle kullanılabilir [32].

1.5.6 Gen Tedavisi

Gen terapisi, karaciğer hücrelerine işlevsel bir rekombinant PAH geninin yerleştirildiği bir tedavi yöntemidir. Çünkü PAH aktivitesi karaciğerde

gerçekleşir [37]. Gen terapisi, hücrelerde genleri değiştirerek tedavi etmeyi veya terapotik bir etki sağlamayı amaçlayan bir tekniktir [26]. Klinik gen terapisi çalışmalarındaki ilerlemeler, PKU gibi monogenik bozukluklardaki hastalıklı genlerin düzeltilmesinde umut vaat etmektedir [40]. Temel olarak, bozuk olan enzimin işlevinin geri kazanılması gen terapisi yaklaşımıyla sağlanabilir [9]. Fenilketonüri hastalığının kökeninde, 500'den fazla farklı mutasyon olduğu bildirilen fenilalanin hidroksilaz enzimi geni yer alır. Bu çok sayıda mutasyon, PKU hastalığını gen teknolojisi ile tedavi etmeyi zorlaştırmaktadır [32]. PKU fare modelinde, rekombinant adeno-associated virüs vektörü kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir [19]. Mart 2021 itibarıyla, birkaç ilaç şirketi, PKU için gen terapisi tedavileri üzerinde çalıştıklarını duyurmuştur. Devam eden insan çalışmaları Clinicaltrials.gov'da listelenmiştir. PKU için gen terapisi araştırmalarındaki ilerlemeler, hastalığın temel genetik nedenini hedefleyen daha etkili ve hedeflenmiş tedavilere yönelik umut vadetmektedir [40].

1.5.7 Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL)

Bu tedavi, mantar, bitki ve siyanobakteriler de dahil olmak üzere çeşitli türlerden elde edilen PAL enzimini kullanarak bir hayvan olmayan metabolik yolak üzerine dayanmaktadır [42]. Fenilalanin, önce transsinamik aside dönüşerek, daha sonra benzoik aside dönüşür ve böylece vücuttan uzaklaştırılır. Bu süreci gerçekleştiren PAL adlı dayanıklı bir proteindir, çünkü phe'i tolere edilebilir seviyelere indirir. PAL'ın diyetle eklenmesinin, alternatif bir tedavi yöntemi olabileceği öne sürülmektedir [32, 42].

1.5.8 Sapropterin Tedavisi

Fenilalanin kısıtlı diyetinin sürdürülmesiyle ilgili zorluklar, bu hastalar için çeşitli tedavi seçeneklerinin araştırılmasına neden olmuştur [19]. Kofaktör olan Tetrahidrobiopterin (BH4), kandaki fenilalanin seviyelerini azaltabilir ve PAH'nin aktivitesini artırarak fenilalaninin tirozine dönüşmesini sağlar [26, 32]. Farmasötik tedaviler arasında, PAH enzimi için doğal koenzim olan tetrahidrobiopterin (BH4) sentetik formu olan Sapropterin Dihidroklorürün kullanımı bulunmaktadır [36].

Kandaki phe seviyesinin 400 $\mu\text{mol/l}$ üzerinde olan hastalar BH4 (Sapropterin Dihidroklorit) ile tedavi edilmektedir [5, 11, 32]. PKU belirtilerini azaltmak için en yaygın kullanılan tedavi, fenilalanin içeren yiyecekleri sınırlayarak iyi kontrol edilmiş bir diyeti takip etmektir. Bu kontrol edilmiş diyetin yanı sıra, fenilketonüri risklerini azaltmak için reçeteli ilaç tedavisi ortaya çıkmıştır [40]. Günümüzde fenilketonüri PKU tedavisinde fenilalanin seviyelerini düşürmek için

piyasada bulunan solüsyon dozajda olan yalnızca bir ilaç bulunmaktadır ve bu ilaç KUVAN®'dır [5, 10, 11, 32]. Saproterin, biyolojik olarak aktif olan 6R-diastereomer sentetik bir dihidroklorür tuzudur [13, 32]. FDA, 2007'de ABD'de, EMA ise 2008'de Avrupa'da ve 2010'da Kanada'da PKU tedavisinde kullanılmasını onayladı [5, 14, 32, 40].

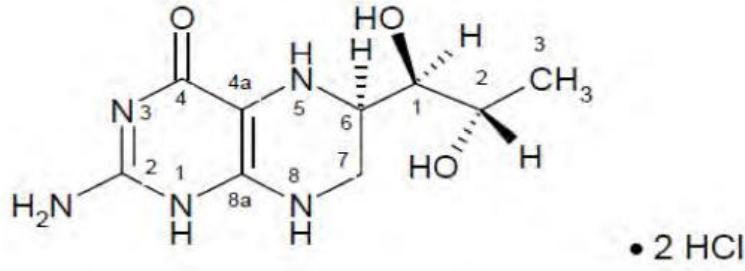
PKU, PAH, GCH1, MAOB, ALB, IGF1, ASCL1 gibi genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır [26]. Sapropterin ile tedavi edilen PKU hastaları, sınırlı Phe diyetlerine devam etmeli, düzenli olarak klinik değerlendirme ve kandaki Phe ve Tyr konsantrasyonlarının izlenmesi gerekmektedir [26]. Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji'nin (ACMG) yeni tedavi kılavuzları, PKU olan bireyler için klinik tedavi hedefinin tüm yaş grupları için kan Phe'yi (120–360 $\mu\text{mol/l}$) aralığında tutmak olduğunu ve tedavinin ömür boyu devam etmesi gerektiğini belirtmektedir [36].

Hafif veya orta derecede PKU'lu çoğu birey, sapropterine duyarlı olabilirken, klasik PKU'lu bireylerin yaklaşık %25-50'si sapropterine (BH4) dozuna yanıt verebilir [34, 36]. Klinik çalışmalarda Sapropterin, kandaki fenilalani seviyesinde %30'luk bir azalma olduğu tanımlanmıştır [34–36]. Sapropterin tedavisi Phe kısıtlı bir diyetin gevşemesine yol açabilir, ancak kan Phe'nin sürekli izlenmesi önerilir [35].

Klinik denemelerde, sapropterin ile tedavi edilen hastalar arasında yaygın olarak görülen yaygın advers etkiler arasında baş ağrısı, rinore, faringolarengeal ağrı, kusma, ishal, burun tıkanıklığı ve öksürük bulunur [26]. PKU'nun semptomları arasında nöbetler, titreme, gelişmede gerilik, aşırı aktivite, egzema gibi cilt problemleri, ağızdan kötü bir koku oluşur. Klasik PKU'lu bebekler, genellikle birkaç aylık olana kadar normal görünürler ve tedavi olmadan bu çocuklar da kalıcı zihinsel hasarlar geliştirir. PKU'lu çocuklar genellikle daha açık renkli cilt ve saçla sahip olabilirler ve egzema gibi cilt bozukluklarına daha yatkındırlar [1, 14].

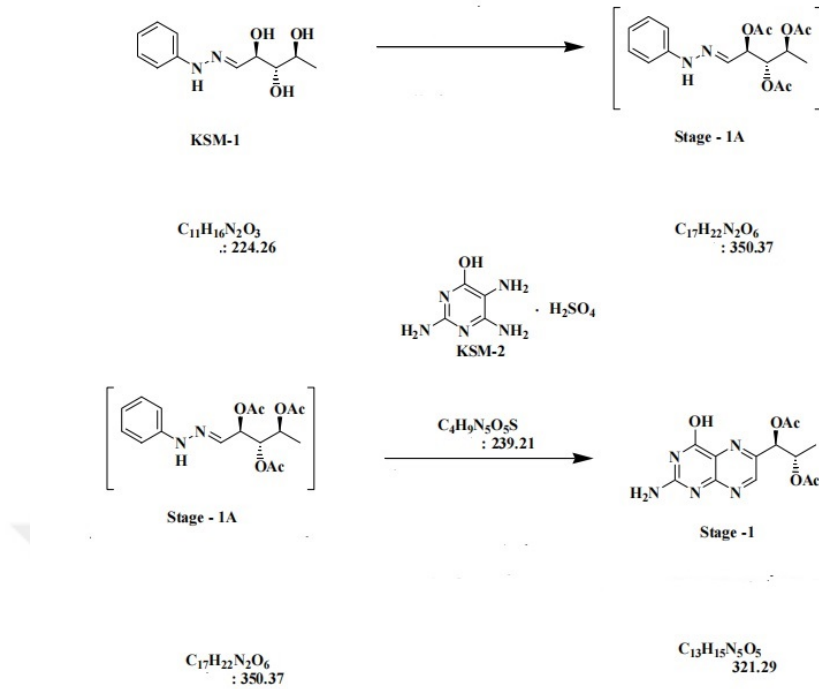
1.6 Sapropterin Dihidroklorür ve Özellikleri

Sapropterin Dihidroklorür kimyasal olarak (R)-2-Amino-6-((1R,2S)-1,2-dihidroksipropil)-5,6,7,8-tetrahydropteridin-(R)-2-Amino-6-((1R,2S)-1,2 dihidroksipropil)-5,6,7,8 tetrahydropteridin-4(3H)-on dihidroklorür, molekül formülü $C_9H_{17}N_5O_3$ olan ve molekül ağırlığı 314,17 g/mol olan beyaz yada soluk sarı toz bir tozdur [43, 44].

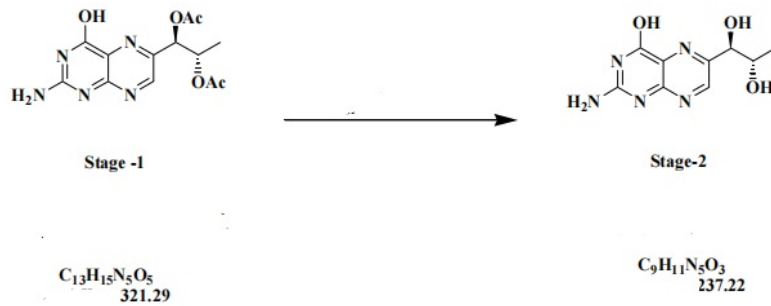


Şekil 1.5 Sapropterin Dihidroklorür molekül yapısı

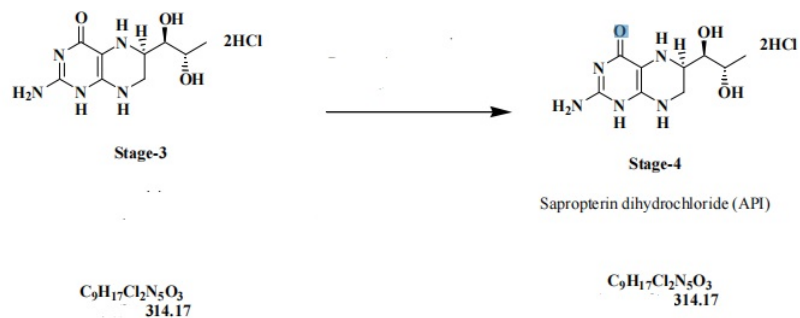
1.6.1 Sapropterin Dihidroklörür Eldesi



Şekil 1.6 Sapropterin Dihidroklörür eldesi (a)



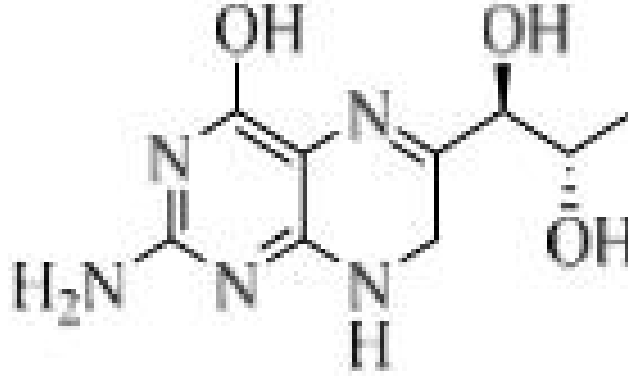
Şekil 1.7 Sapropterin Dihidroklörür eldesi (b)



Şekil 1.8 Sapropterin Dihidroklörür eldesi (c)

1.6.2 Sapropterin Dihidroklorür Safsızlıkları

Safsızlık B (7,8-Dihidro-L-biopterin)

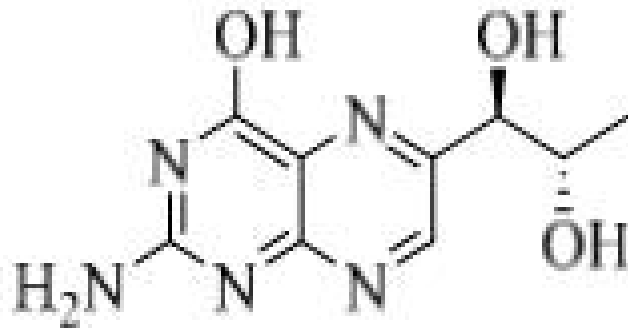


Şekil 1.9 Safsızlık B molekül yapısı

Kimyasal Adı: 1-(2-Amino-4-hidroksi-7,8-dihidro-pteridin-6-yl)propan-1,2-diol

Proses ve degradasyon kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olduğu için bitmiş üründe bilinen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir. Sapropterin Dihidroklorür etkin maddesinin günlük maksimum dozu 20 mg/kg (1400 mg)'dır. "ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products" kılavuzu göz önünde bulundurularak bilinen safsızlık limiti "en fazla %0,20" olarak limitlendirilmiştir.

Safsızlık C (Biopterin)



Şekil 1.10 Safsızlık C molekül yapısı

Kimyasal Adı: 1-(2-Amino-4-hidroksi-pteridin-6-yl)-propan-1,2-diol Proses ve degradasyon kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olduğu için bitmiş üründe bilinen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir. Sapropterin Dihidroklorür etkin maddesinin günlük maksimum dozu 20 mg/kg (1400 mg)'dır. "ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products" kılavuzu göz önünde bulundurularak bilinen safsızlık limiti "en fazla %0,20" olarak limitlendirilmiştir.

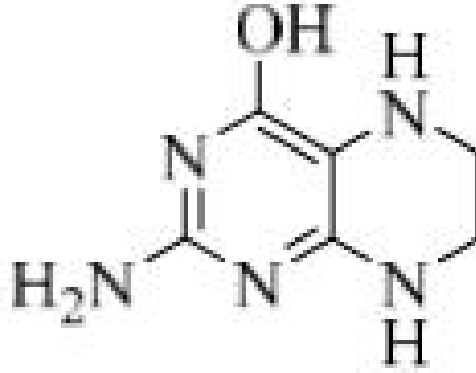
Bilinmeyen en büyük safsızlık

Sapropterin Dihidroklörür etkin maddesinin günlük maksimum dozu 20 mg/kg (1400 mg)'dır. "ICH Q3B (R2) Impurities in New Drug Products" kılavuzu göz önünde bulundurularak bilinmeyen en büyük safsızlık limiti "en fazla %0,14" olarak limitlendirilmiştir.

Toplam safsızlık

Bilinen safsızlık limiti en fazla %0,20 ve bilinmeyen en büyük safsızlık limiti en fazla %0,14'dür. İlerleyen stabilite periyotlarında bilinen safsızlıkların ve artış gösteren birden fazla bilinmeyen safsızlıkların üst limitte olmaları durumunda toplam safsızlık limiti %1,0 olarak belirlenmiştir.

Safsızlık A (İndirgenmiş Pterin)



Şekil 1.11 Safsızlık A molekül yapısı

Kimyasal Adı: 2- Amino-5,6,7,8-tetrahidropteridin-4-ol

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

Safsızlık D (Pterin)

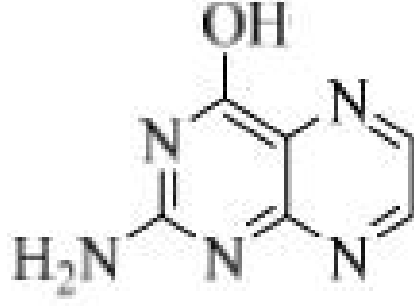
Kimyasal Adı: 2-Amino-pteridin-4-ol

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

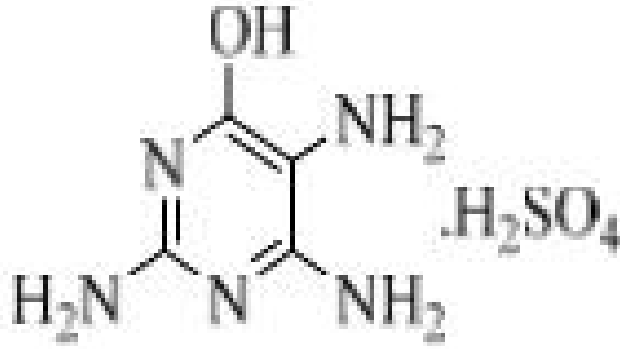
Safsızlık E (TAP Sülfat)

Kimyasal Adı: 2,4,5-Triamino-6-hidroksi pirimidin sülfat

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş



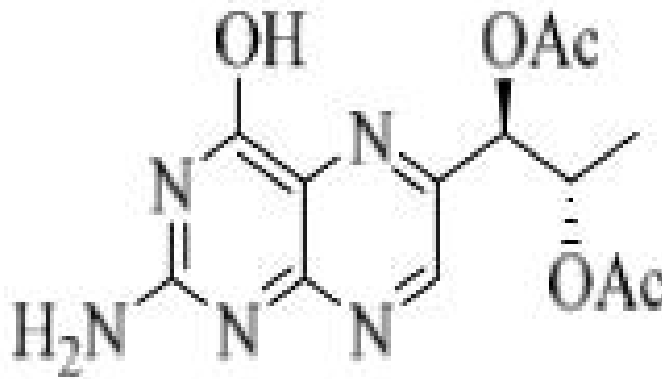
Şekil 1.12 Safsızlık D molekül yapısı



Şekil 1.13 Safsızlık E molekül yapısı

üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

Safsızlık F (Diasetil biopterin)



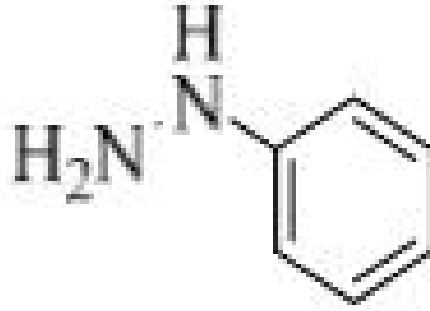
Şekil 1.14 Safsızlık F molekül yapısı

Kimyasal Adı: Asetik asit 2-asetoksi-2-(2-amino-4-hidroksi-pteridin-6yl)-1-metil-etil ester

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş

üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

Safsızlık G

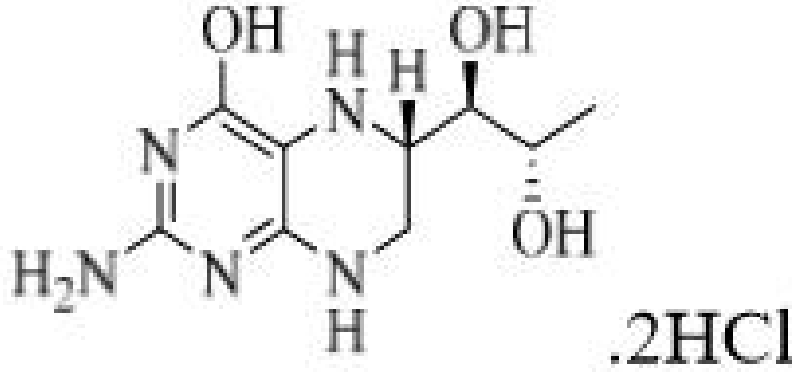


Şekil 1.15 Safsızlık G molekül yapısı

Kimyasal Adı: Fenil hidrazin

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

Safsızlık H



Şekil 1.16 Safsızlık H molekül yapısı

Kimyasal Adı: (6S)-5, 6, 7, 8-tetrahidro-L-eritro-biopterin dihidroklorit

Proses kaynaklı safsızlıktır. Bu safsızlık degradasyon safsızlığı olmadığı için bitmiş üründe bilinmeyen safsızlık kategorisinde değerlendirilecektir.

1.7 İlaç Etken Maddelerinde ve Ürünlerde Safsızlığın Tanımı

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) yönergelerine göre “Safsızlıklar, üründe bulunan ve Aktif Farmasötik Bileşenlerin (API) kendisi veya onu üretmek için kullanılan yardımcı maddedir”. Kısaca safsızlık, başlangıç maddesi veya

ara ürünler gibi orijinal ilaçla bir arada bulunan veya herhangi bir yan reaksiyon nedeniyle oluşan herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Safsızlık profili, ilaç ürünlerinde bulunan tanımlanmış ve tanımlanamayan safsızlıkların bir tanımıdır.

1.7.1 Safsızlığın Sınıflandırılması

ICH safsızlıkları şu şekilde adlandırmıştır:

- Organik safsızlıklar
- İnorganik safsızlıklar
- Artık çözücüler

1.7.2 Safsızlık Kaynakları

- Kristalleşme ile ilgili safsızlıklar
- Stereokimya ile ilgili safsızlıklar
- Kalıntı solventler
- Sentetik ara ürünler ve yan ürünler
- Formülasyonla ilgili safsızlıklar
- Depolama sırasında ortaya çıkan safsızlıklar
- Yöntemle ilgili safsızlık
- Malzemeler arasında karşılıklı etkileşim
- İşlevsel grupla ilgili tipik bozulma

Degredant: Yukarıdaki safsızlık kaynakları arasında, farmasötik aktif kısmın kendisi, bozunma yoluyla ana kaynak olarak hareket eder, ayrışma, degradantlar olarak adlandırılan safsızlıklar üretir. Bir degradant, farmasötik bir maddedeki en basit istenmeyen bileşenlerdir; farmasötik ajanın kendisinin bozunmasıyla veya bir formülasyondaki aktif bileşenin bir dozaj formundaki diğer bileşenlerden biriyle etkileşimi veya reaksiyonu yoluyla oluşturulabilir ve genellikle yapısal olarak ilaç molekülü ile yakından ilişkilidir. Karşılaşılan en yaygın bozunma yolları, ilaç molekülüne yönelik termal stresle veya termal stres olmadan oksidasyon veya hidrolizi içerir. Degradant, ilaç tedavisi gören hastalarda farmakolojik veya toksikolojik herhangi bir olumsuz tepkiye neden olabilir. Bu nedenle, hasta

güvenliğini sağlamak için, toplu ilaçlar ve farmasötik formülasyonlardaki bozunma ürünlerinin saptanması, tanımlanması veya yapısının aydınlatması ve nicel olarak belirlenmesini amaçlayan bir grup analitik faaliyetler olarak tanımlanabilecek bozunma profili oluşturma çok önemlidir.

1.8 Zorla Bozundurma Çalışmaları

Zorla bozunma çalışmalarının, potansiyel bozunmuş ürünlerin tanımlanması, bozunma yolu ve ilaç molekülünün içsel stabilitesi ile bağlantılı olarak büyük miktarda veri üretmesi beklenir [45]. Zorla bozunma çalışmaları etken maddeyi ve ilacı hidrolitik, oksidasyon, fotolitik ve termal koşullara maruz bırakarak gerçekleştirilir [45, 46]. Hidrolitik çalışma asidik ve bazik koşullar altında gerçekleştirilir. Oksidasyon koşullarında, hidrojen peroksitler kapsamlı bir şekilde uygulanır. İlaç maddelerinin oksidatif bozunması, reaktif anyonlar ve katyonlar oluşturmak için bir elektron transfer mekanizmasını içerir [47]. Benzilik karbon, alilik karbon ve tersiyer karbon veya hetero atoma göre α -konumları gibi kararsız hidrojene sahip fonksiyonel grup, oksidasyonlara eğilimlidir. Foto stabilite çalışmaları, UV veya floresan koşullarına maruz bırakılarak ilaç maddelerinin esas olarak birincil degredantlarını oluşturmak için yapılır. İlaç maddeleri minimum 1, 2 milyon lux ve 200 w.s./m² ışığa maruz bırakılır. Fonksiyonel gruplardan bazıları, yani karboniller, nitro aromatik, N-oksit, alkenler, aril klorürler, zayıf C-H ve O-H bağları, sülfürler ve polienler ışığa duyarlıdır. Termal bozulmalar, ilacın kuru ısıya ve ıslak ısıya maruz bırakılmasıyla incelenir. Sıcaklığı daha kısa süre için artırarak termal bozunma gerçekleştirmek mümkün olabilir. Kararlılık gösteren yöntemde yer alan adımlar arasında örnek oluşturma, yöntem geliştirme ve optimizasyon, yöntem doğrulama yer alır [46].

1.9 Analitik Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu, belirli bir test için kullanılan analitik prosedürün amaçlanan kullanıma uygun olduğunu doğrulamak için kullanılan süreçtir.

1.9.1 Validasyon Tanımı ve Amacı

Analitik yöntem geliştirildikten sonra, analitik yöntemin validasyonunun gerçekleştirilmesi önemlidir. ICH Q1B, analitik prosedürlerin doğrulanmasına ilişkin yönergeler sağlar. Yöntem validasyonu, geliştirilen analitik yöntemin amaçlanan amaca uygun olmasını sağlar. Doğrulama birden fazla parametre içerir [43].

1.9.2 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

1.9.2.1 Seçicilik

ICH'e göre, tanımlama testlerin doğrulanması, safsızlıkların belirlenmesi sırasında özgüllük araştırması yapmak gerekir. Özgüllüğü göstermek için kullanılan metotlar, analitik metodun amaçlanan amacına bağlı olmalıdır. Etken piki ve safsızlık pikleri birbirinden ayrılmalıdır. Analit içermeyen numuneler ve analit içeren numunelerin alıkonma süreleri birbiriyle kıyaslanarak tanımlamalar yapılmalıdır. Safsızlık testi için, ayırım, etkin maddeye veya ilaç ürününe uygun safsızlık seviyeleri eklenerek ve bu safsızlıkların ayrı ayrı numune matrisindeki diğer bileşenlerden ayrıldığıının gösterilmesiyle sağlanabilir.

1.9.2.2 Sistem Uygunluk

Analitik metotların kesin ve doğru neticeler vermesine katkıda bulunan spesifik testler sistem uygunluk testleri olarak bilinmektedir. Bu testlere ait olan yöntemler, uygulanan testlerin metotları, kullanılan ekipmanlar ve analizi yapılacak olan maddelere bağlı olarak hazırlanmak ve bu şekilde değerlendirilmek durumundadır.

1.9.2.3 Tespit Limiti

Tespit limit, arka plan gürültüsüne karşı sinyal-gürültü oranına dayanarak belirlenir ve genellikle istatistiksel yöntemlerle hesaplanır. LOD, analitik yöntemin duyarlılığını belirlemek için önemlidir ve genellikle analitin varlığının tespit edilebileceği en düşük düzeyi gösterir. Genellikle sinyal-gürültü oranı 3 olarak, tespit limitini tahmin etmek için genellikle kabul edilir.

1.9.2.4 Hesaplanabilirlik Limiti

Sinyal-gürültü oranının belirlenmesi, bir analitik yöntemin en düşük ölçülebilir konsantrasyonunu ifade eder. LOQ, analitik yöntemle ölçülebilen ve belirli bir güvenilirlik düzeyinde doğru bir şekilde ölçülebilen en düşük konsantrasyon seviyesidir. Sinyal-gürültü oranı 10:1 olmalıdır.

1.9.2.5 Raporlama Seviyesi

ICH el kitabına göre ürünlerdeki her bir safsızlık için ve ürünün günlük alımına ait maksimum doz için bir raporlama seviyesi hesaplanmaktadır. Bu raporlama seviyesi değerinden fazla olan safsızlıklar uygun analitik metoda göre analizlenmelidir.

Attachment 1: Thresholds for Degradation Products in New Drug Products
Reporting Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
≤ 1 g	0.1%
> 1 g	0.05%

Identification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
< 1 mg	1.0% or 5 µg TDI, whichever is lower
1 mg - 10 mg	0.5% or 20 µg TDI, whichever is lower
>10 mg - 2 g	0.2% or 2 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.10%

Qualification Thresholds

<u>Maximum Daily Dose¹</u>	<u>Threshold^{2,3}</u>
< 10 mg	1.0% or 50 µg TDI, whichever is lower
10 mg - 100 mg	0.5% or 200 µg TDI, whichever is lower
>100 mg - 2 g	0.2% or 3 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.15%

Şekil 1.17 Safsızlık konsantrasyon hesaplama kriterleri

1.9.2.6 Doğrusallık

Doğrusallık parametresi, bir analitik yöntemin çeşitli konsantrasyon seviyelerindeki yanıtının bir doğruya ne kadar yakın olduğunu belirten bir ölçüttür. Bu parametre, yöntemin belirli bir aralıktaki konsantrasyonlarda doğru bir şekilde yanıt verip vermediğini değerlendirmeye yardımcı olur. Doğrusallık, genellikle bir grafik üzerinde konsantrasyonun yanıtı karşı dağılımının doğrusallığına bakılarak değerlendirilir.

1.9.2.7 Uygulama Aralığı

Analitik metoda ait belirtilen uygulama aralığı genellikle doğrusallık çalışmalarıyla belirlenir, ancak yöntemin hedeflenen kullanımına göre de değişebilir. Analitik metodun belirtilen aralığı içinde veya bu aralığın uç noktalarında bulunan analit miktarlarını içeren numunelere uygulandığında, analitik prosedürün kabul edilebilir bir doğruluk sağladığı teyit edilerek belirlenir.

1.9.2.8 Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntemin bulunan değer ile kabul edilen bir referans değer arasındaki uyumunu ifade eder. Analitik yöntemin performansının bir ölçüsüdür ve analitik sonuçların gerçek değerlere ne kadar yakın olduğunu gösterir. Doğruluk,

örneğin bilinen miktarlarda safsızlık eklenen ilaç maddesi veya ilaç ürünü gibi örnekler üzerinde incelenmelidir.

1.9.2.9 Kesinlik

Analitik yöntemle ait kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve sonuçların tutarlılığı ile ilgili bir ölçüdür. Bu parametre, aynı numunedeki veya homojen bir numune setindeki ardışık ölçümler arasındaki değişkenliği değerlendirir. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik olara 3 düzeyde değerlendirilebilir.

1.9.2.10 Sağlamlık

Bir analitik yöntemin, bilinen değişikliklere karşı direncinin bir ölçüsü olan sağlamlık, bir metoda ait değişkenlerin bilinen küçük değişikliklere rağmen metodun günlük laboratuvar koşullarında ne kadar tutarlı ve güvenilir olduğunu belirlemeye yardımcı olur.

1.10 Stabilité Göstergeli Analitik Yöntem Geliştirme

İlaçların stabilite testi, bozunma ürünlerinden, proses safsızlıklarından ve diğer potansiyel safsızlıklardan etkilenmeden aktif farmasötik bileşenleri (API) ölçen doğru bir analitik yöntem gerektirir. Stabilité göstergeli HPLC yöntemleri ilaçlar için tasarlanmıştır. Stabilité göstergeli analitik yöntem, API'yi, bozunma ürünlerini ve diğer ilgili bileşenleri müdahale olmadan doğru bir şekilde test edebilen doğrulanmış, spesifik ve kantitatif analitik yöntemdir. Stabilité göstergeli yöntem, ilaç maddesinin ve ilaç ürününün kimyasal, fiziksel veya mikrobiyolojik özelliklerinde zamanla meydana gelen değişiklikleri tespit etmek için kullanılır. Bir ilaç ürününün kalitesi API'nin kalitesine bağlıdır. API'nin kendisindeki değişiklikler ve ilgili safsızlıklar, ilaç ömrü boyunca incelenmelidir. İdeal durum, API'nin ve tüm safsızlıkların tek bir yöntemle doğru bir şekilde ölçülebilmesidir. Bununla birlikte, tüm bileşenleri aynı anda incelemek için tek bir yöntemle ulaşamadığında ikincil doğrulanmış tamamlayıcı yöntem de kullanılabilir. İlaçların stabilite testi, bozunma ürünleri, proses safsızlıkları ve diğer potansiyel safsızlıklardan etkilenmeden aktif farmasötik bileşenleri (API) ölçen doğru bir analitik yöntem gerektirir. Stabilité bilgileri, IND (Araştırma Amaçlı Yeni İlaç Başvurusu) ve NDA (Yeni İlaç Uygulamaları) gibi düzenleyici başvurular için ve API veya ilaç ürünü için son kullanma tarihlerini belirlemek için gereklidir.

1.11 Literatürde Sapropterin Dihidroklorür Analiz Yöntemlerinin Yeri

Literatürde Sapropterin Dihidroklorür için sıvı kromatografi (LC), sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS), vb. cihazların kullanıldığı plazma, biyolojik sıvılar, toplu ve farmasötik dozaj formlarında Sapropterin Dihidroklorür belirlenmesi için mevcut analitik yöntemler bulunmaktadır.

Steven S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, elma püresi, limonlu puding ve üç farklı formülasyona Sapropterin Dihidroklorür içeren tablet tozu eklenerek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca fenilalanin içermeyen formül de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sapropterin Dihidroklorür bozunma ürünleri, HPLC yöntemi ile Whatman Partisil 10 SCX 4,6 × 250 mm kolonu kullanılarak analiz edilmiştir [44].

Prasad, U ve arkadaşları, 10-30 µg/ml konsantrasyon aralığında UV yöntemi ile tarama yaparak maksimum absorpsiyonu 534 nm’de tespit etmişlerdir [48].

Khan, Aslam ve arkadaşları, insan plazmasında BH4 konsantrasyonunun belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi kullanmışlardır. Kolon olarak Hypurity Cyano 5 µm, 4,6 mm x 50 mm kullanılmış; hareketli faz ise izokratik hareketli faz, Asetonitril ve 5 mM Amonyum asetat tampon çözeltisi (65:35 hacim/hacim) karışımı kullanılmıştır [49].

Kim, Hak Rim ve arkadaşları BH4 ve dopaminin analizi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmiştir. 10 mM amonyum formiat içeren asetonitril/su (75:25, hacim/hacim) karışımı kullanılarak Polar Sepax -İmidazol (100 mm × 2,1 mm 3 µm) kolonunda 300 µl/dk akış hızında ayrılmıştır. BH4 için m/z 242,1 ← 166,0, dopamin için m/z 154,1 ← 90,0 ve AACA (IS) için m/z 174,1 ← 114,0. Toplam kromatografik çalışma süresi 5,5 dakikadır. Yöntemde örnek tespit sınırı 10 ng/g’dir. Kalibrasyon eğrisi, BH4 için 10-2000 ng/g ($r^2 = 0,995$) ve dopamin için 10-5000 ng/g ($r^2 = 0,997$) aralığında lineerdir [50].

Winn, Shelley R ve arkadaşları fareler üzerinde yapılan çalışmada biopterin tespiti için floresans dedektörlü HPLC kullanmıştır. Hareketli faz olarak 0,1 M KCl, pH 7,5, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM ditiyotretiol, 0,2 mM fenilmetilsülfonil florür, 1,0 µm lüpeptin ve 1,0 µm pepstatin kullanılmıştır [51].

Scudellaro, Emanuela ve arkadaşları, orijinal ilaç olan Kuvan® ile jenerik ilaç Dipharma (Diterin®) 40°C ve %75 bağıl nemdeki stabilite numunelerindeki sapropterin safsızlıklarının tespiti için HPLC-UV ve LC-MS/MS kullanarak

bir kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. HPLC-UV kromatografik yöntem parametreleri, iyon değişimli Partisil® kolon 10 SCX-250 A, 250 × 4,6 mm çapı, 5 µm tanecik boyutu kullanılarak izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz, pH'sı fosforik asit (H₃PO₄) ile 3,0'a ayarlanmış 0,03 M NaH₂PO₄ çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. 1,2 ml/dak akış hızı olarak ayarlanmış ve çalışma süresi 20 dakikadır. 20 µl enjeksiyon hacmi ve UV dedektörü 265 nm'de ayarlanmıştır.

LC-MS/MS yöntem parametreleri ise TSK-GEL® Amide-80, 3 µm, 150 mm × 2,0 mm ID kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli fazlar (A) su ve (B) %95 asetonitril ve %5 su (h/h) olup, her ikisi de 2,0 mM amonyum formiat ve 3,6 mM formik asit (pH 3,55) içermektedir. Gradyan elüsyonu, akış hızını ve enjeksiyon hacmini sırasıyla 0,2 ml/dak ve 5 µl olarak ayarlamış ve %90 B (t = 0) başlangıcında ve 20 dakika boyunca (t = 20) sabit tutulmuştur. Ardından, %90'dan %20'ye B bir dakikada (t = 21) azaltılmış ve 10 dakika (t = 31) boyunca sabit tutulmuştur. Sonra, bir dakikada %90 B'ye (t = 32) yükseltilmiş ve dengelemesi için 10 dakika (t = 42) sabit tutulmuştur. 6R-(BH₄) standardı, askorbik asit içeren %0,2 w/v'de 10 µg/ml olarak hazırlanmıştır [52].

Heintz, Caroline ve arkadaşları, fenilalanin ve tirozinin ölçümü için LC-ESI-MSMS yöntemi geliştirdiler. Amino asitlerin RP (ters faz)-HPLC ayırımı için 250 × 2 mm C18 kolon (Phenomenex EZ:faast™) kullanılmıştır. Türetilmiş amino asitler için izokratik akış, 6 dakika boyunca %75 çözücü B; %75'ten %95'e (hacim/hacim) lineer gradyan 9 dakika boyunca; %95'ten %100'e (hacim/hacim) lineer gradyan 0,1 dakika boyunca; 3 dakika boyunca %100 çözücü B için izokratik akış; %100'den %75'e (hacim/hacim) lineer gradyan 0,1 dakika boyunca; 2 dakika boyunca %75 çözücü B için izokratik akış kullanılmıştır. Çözücüler A ve B hareketli fazları olarak su içinde 10 mmol/l amonyum formiat ve metanol içinde 10 mmol/l amonyum formiat kullanılmıştır. Akış hızı 150 µl/dk olarak ayarlanmış ve enjeksiyon hacmi 10 µl olarak belirlenmiştir [53].

P. Janaki Pathi ve arkadaşlarının geliştirdikleri kromatografik yöntem gradient sistemdir. Hareketli faz olarak, su içinde 0,02 M amonyum asetat ve asetonitril karışımı kullanılmış, kolon olarak XTerra(R) C18 (5 µm partikül boyutu, 250 x 4,6 mm) kullanılmıştır. 1,0 ml/dakika akış hızı olup, 238 nm'de dalga boyunda analizi yapmıştır. Alıkonma süresi 2,9 dakikadır. Dedektör yanıtı, 20-120 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu saptamıştır [54].

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Reaktifler Standartlar ve Kimyasal Maddeler

- Saproterin dihidroklorür çalışma standardı: Solara Active Pharma Sciences, Lot: NF-WS-053/05 SKT: 03.2024
- Saproterin dihidroklorür etkin hammadde: Solara Active Pharma Sciences, Lot: ASAP200003, SKT: 03.2024
- Saproterin dihidroklorür referans standardı: Solara Active Pharma Sciences, Lot: 1282/IHS/006/20
- Safsızlık B standardı(7,8-Dihidro-L-Biopterin): Sigma Aldrich, Lot: BCCD7332, SKT: 27.04.2022
- Safsızlık C standardı(6-Biopterin):Sigma Aldrich, Lot: BCBZ8817, SKT: 27.04.2022
- Sapropterin Impurity F: Synzeal, Lot: SRL-338-158, SKT:30.09.2023
- Sapropterin Impurity A: Synzeal, Lot: SRL-464-118, SKT:07.05.2025
- Sapropterin Impurity D: Biophore Indian Pharmaceutiacal, Lot: BP/2210/IMP/19/001
- Sapropterin Impurity H: Sigma Aldrich, Lot: BCCF0835, SKT: 01.10.2023
- Su : HPLC kalitede
- Askorbik Asit: DSM, Lot: NF-WS-055/01 SKT: 28.01.2023
- Potasyum Dihidrojen Fosfat: Merck, Lot: AM1206773 017, SKT: 31.08.2022
- Orto Fosforik Asit: Merck, Lot: K50782473 843, SKT: 31.10.2023

- Asetonitril: J.T. Baker, Lot: 2027601862, SKT: 02.10.2022
- Metanol: J.T. Baker, Lot: 2013201870, SKT: 05.2022
- Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet Tobio Novelfarma formülasyon laboratuvarında üretilmiştir.

2.1.2 Kullanılan Gereçler

- Hassas Terazı, Mettler Toledo / MS205DU
- Manyetik Karıştırıcı, Heidolph / Mr Hei Standart
- pH metre, Mettler Toledo / S400-Bio
- Ultrasonik Banyo, Çalışkan / LAB.ULT.4022
- Vortex Cihazı, Heidolph / Reaxtop
- Santrifüj Cihazı,
- Ultra Saf Su Cihazı, Merck/Millipore
- HPLC Sistemi, Waters / e2695
- HPLC UV Dedektör, Waters
- HPLC PDA Dedektör, Waters
- HPLC kolonu, YMC PACK ODS AQ, 3µm, 250 X 4,6 mm
- UV-Visible, Shimadzu
- FTIR, Shimadzu
- DSC-60 Plus, Shimadzu

Analizlerin tümü TOBIO Pharmaceuticals firması analitik laboratuvarında yapılmıştır.

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler

Hareketli Faz A Hazırlığı: 2,72 g potasyum dihidrojen fosfat, 1000 ml suda çözülmüştür. Orto fosforik asit ile pH'ı 3,0'e $\pm 0,05$ ayarlanmıştır. 0,45 μm NY filtreden süzülüp degaz edilmiştir.

Hareketli Faz B Hazırlığı: Metanol ve asetonitril %90:10 (h/h) oranında karıştırılıp degaz edilmiştir.

Çözücü Hazırlığı: 2,72 g potasyum dihidrojen fosfat, 1000 ml suda çözülmüştür. Orto fosforik asit ile pH'sı 3,0 $\pm 0,05$ 'e ayarlanmıştır. 10 mg askorbik asit eklenip karıştırılmıştır.

Plasebo Çözeltisi Hazırlığı: 100 mg plasebo 100 ml'lik balon şişeye içine tartılmıştır. Üstüne çözücü eklenip 5 dakika ultrasonikte bekletilmiştir. Çözücü ile hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir.

Sapropterin Dihidroklörür Stok Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 20,0 mg Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı 200 ml'lik balon şişe içine hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonikte tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Çözücü ile üzeri tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,1 \text{ mg/ml}$)

Sapropterin Dihidroklörür Standart Çözeltisi Hazırlığı: Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltisinden 0,7 ml alınıp 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenip hacmine tamamlanmış ve karıştırılmıştır. 0,45 μm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,0007 \text{ mg/ml}$)

İlgili Bileşikler Numune Çözeltisi Hazırlanması: 10 adet Sapropterin Dihidroklörür 100 mg çözünebilir tablet havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 150,0 mg (50,0 mg Sapropterin Dihidroklörür içerir) alınıp, 100 ml'lik balon şişe içine hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonikte tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Üzerine çözücü eklenip hacmine tamamlanmış ve karıştırılmıştır. 0,45 μm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,5 \text{ mg/ml}$)

Stok Safsızlık B Standart Çözeltisi: 1,0 mg Safsızlık B çalışma standardı 20 ml'lik balon jojeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Çözücü ile hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Safsızlık B}} : 0,05 \text{ mg/ml}$)

Stok Safsızlık C Standart Çözeltisi: 1,0 mg Safsızlık C çalışma standardı 20 ml'lik balon şişeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonikte tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Çözücü ile hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Safsızlık C}} : 0,05 \text{ mg/ml}$)

Limit Konsantrasyonda Safsızlık B Çözeltisi: Stok Safsızlık B çözeltisinden 2 ml 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. $0,45 \mu\text{m}$ RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Safsızlık B}} : 0,001 \text{ mg/ml}$)

Limit Konsantrasyonda Safsızlık C Çözeltisi: Stok Safsızlık C çözeltisinden 2 ml 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. $0,45 \mu\text{m}$ RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Safsızlık C}} : 0,001 \text{ mg/ml}$)

Spike Test Çözeltisi: 10 adet Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet havanda ezilerek toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 150,0 mg (50,0 mg Sapropterin Dihidroklörür içerir) alınıp 100 ml'lik balon şişeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonikte tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Bu çözeltiye Stok Safsızlık B ve Safsızlık C çözeltilerinden 2'şer ml ilave edilmiştir. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. $0,45 \mu\text{m}$ RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,5 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık B}} : 0,001 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık C}} : 0,001 \text{ mg/ml}$)

Tespit Limiti Standart Hazırlığı (LOD, Limit of Detection): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 0,7 ml ve Stok Safsızlık B ve Stok Safsızlık C çözeltilerinden 2'şer ml alınarak 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 1,0 ml alınarak 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 3,0 ml alınarak 10 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,0000021 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık B}} : 0,000003 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık C}} : 0,000003 \text{ mg/ml}$)

Hesaplanabilirlik Limiti Standart Çözelti 1 (LOQ, Limit of Quantitation): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 0,7 ml ve Stok Safsızlık B ve Stok Safsızlık C çözeltilerinden 2'şer ml alınarak 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. Bu çözeltiden 1,0 ml alınarak 100 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}} : 0,000007 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık B}} : 0,00001 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{Safsızlık C}} : 0,00001 \text{ mg/ml}$)

Standart Çözelti 2 (%10): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balon şişeye 0,07 ml ve 0,20 şer ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenip ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00007 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0001 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0001 mg/ml)

Standart Çözelti 3 (%20): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balon şişe 0,14 ml ve 0,40 er ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00014 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0002 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0002 mg/ml)

Raporlama Seviyesi Standart Çözelti 4: Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 1,0 ml alınarak 10 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. Stok Safsızlık B ve Stok Safsızlık C çözeltilerinden 1,0 ml alınarak 10 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden sırayla 0,25 ml ve 0,5'şer ml alınarak 10 ml'lik balon şişeye aktarılmıştır. Üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00025 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,00025 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,00025 mg/ml)

Standart Çözelti 5 (%40): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balon şişeye 0,28 ml ve 0,80'er ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00028 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0004 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0004 mg/ml)

Standart Çözelti 6 (%80): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balon şişeye 0,56 ml ve 1,60'er ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00056 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0008 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0008 mg/ml)

Standart Çözelti 7 (%100): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balonjojeye 0,7 ml ve 2'şer ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp

karıştırılmıştır. 0,45 μ m RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,0007 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,001 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,001 mg/ml)

Standart Çözelti 8 (%120): Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltiden 100 ml'lik balonjojeye 0,84 ml ve 2,40'er ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μ m RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,00084 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0012 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0012 mg/ml)

Sapropterin Dihidroklörür Stok Standart Çözeltisi: Yaklaşık 10,0 mg Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı 100 ml'lik balon jojeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Çözücü ile hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,1 mg/ml)

Doğruluk Test Çözeltisi 1 (%LOQ seviyesi): 100 ml'lik balon jojeye hassas olarak 100,0 mg Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet plasebosu tartılmıştır, bir miktar çözücü eklenerek karıştırılmıştır. Bu balon şişeye 0,007 ml Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltisinden ve 0,002'şer ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μ m RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,000007 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,00001 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,00001 mg/ml)

Doğruluk Test Çözeltisi 2 (%100'lik seviye): 100 ml'lik balon şişeye hassas olarak 100,0 mg Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet plasebosu tartılmıştır, bir miktar çözücü eklenerek karıştırılmıştır. Bu balon şişeye 0,7 ml Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltisinden ve 2'şer ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μ m RC filtre kullanılarak süzölmüş ve viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,0007 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,001 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,001 mg/ml)

Doğruluk Test Çözeltisi 3 (%120'lik seviye): 100 ml'lik balon jojeye hassas olarak 100,0 mg Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet plasebosu tartılmıştır, bir miktar çözücü eklenerek karıştırılmıştır. Bu balon şişeye 0,84 ml Sapropterin Dihidroklörür stok standart çözeltisinden ve 2,4'er ml Safsızlık B ve Safsızlık C stok standart çözeltilerinden eklenip üzerine çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μ m RC filtre kullanılarak süzölmüş ve

viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,0007 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık B}}$: 0,0012 mg/ml, $C_{\text{Safsızlık C}}$: 0,0012 mg/ml)

2.2 Yöntem

2.2.1 Yöntem Geliştirme

Analitik yöntem tanımı ve prensibi

Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet için Sapropterin Dihidroklörür İlgili Bileşikler Tayini Analitik yöntem validasyonunda incelenecek parametreleri ve kabul kriterleri belirlenmiştir.

Limitler

- Safsızlık B: En fazla %0,20
- Safsızlık C: En fazla %0,20
- En Büyük Bilinmeyen Safsızlık: En fazla %0,14
- Toplam Safsızlıklar: En fazla %1,0

2.2.2 Validasyon Çalışmasındaki Kromotografik Koşullar

- Kolon: YMC PACK ODS AQ, 3 μ m, 250 X 4,6 mm
- Akış hızı: 0,6 ml/dakika
- Dedektör: UV/Vis Dedektör, 220 nanometre
- Enjeksiyon hacim: 5 μ l
- Kolon sıcaklık: 30 °C
- Tray sıcaklık: 5 °C
- Toplam analiz süresi: 45 dakika
- Akış türü: Gradient
- Seal wash: Metanol – Su (10:90, h/h) (HPLC kalitede) karıştırılır.
- Needle wash: Metanol – Su (80:20, h/h) (HPLC kalitede) karıştırılır.

Tablo 2.1 Gradient programı

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0,00	98	2
5,00	90	10
10,00	50	50
15,00	20	80
25,00	20	80
30,00	98	2
45,00	98	2

Hesaplamalar

İlgili bileşikler analizi çalışmasında bilinen safsızlıklar % cinsinden aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{Bilinen Safsızlık} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{\frac{W_{\text{std}}}{200} \times \frac{0,7}{100} \times \frac{P}{100}}{\frac{W_{\text{test}}}{100}} \times 100 \times \frac{W_{\text{ort}}}{ED} \times \frac{1}{RRF}$$

A_{test} = Test numune çözeltisinde bilinen safsızlığın pik alanı

A_{std} = Standart numunesi çözeltisinde aktif maddenin pik alanları ortalaması

W_{std} = Referans standart tartımı (mg)

P = Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardının % saflığı

ED = Etiket değeri (100 mg)

W_{ort} = Ortalama Çözünebilir Tablet ağırlığı (300 mg)

RRF = Bağlı Cevap Faktörü

Sapropterin didhidroklörür ilgili bileşikler çalışmasında bilinmeyen her bir safsızlık miktarı % cinsinden aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{Bilinmeyen Safsızlık} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{\frac{W_{\text{std}}}{200} \times \frac{0,7}{100} \times \frac{P}{100}}{\frac{W_{\text{test}}}{100}} \times 100 \times \frac{W_{\text{ort}}}{ED}$$

A_{test} = Test numune çözeltisinde bilinmeyen safsızlığın pik alanı

A_{std} = Standart numune çözeltisinde aktif madde pik alanları ortalaması

W_{std} = Referans standart tartımı (mg)

W_{test} = Test tartımı (mg)

W_{ort} = Ortalama Çözünebilir Tablet ağırlığı (300 mg)

P = Sapropterin Dihidroklorür standardının % saflığı

ED = Etiket Değeri (100 mg)

2.2.3 Validasyon Parametreleri

2.2.3.1 Seçicilik

Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile birlikte analizi için geliştirilen stabiliteyi gösteren analitik yöntemin uygunluğunu incelemek için, Bölüm 2.1.3'de hazırlanan şekilde blank(çözücü), plasebo çözeltisi, Sapropterin Dihidroklorür çözeltisi, ilgili bileşikler numune çözeltisi, limit seviyesinde Safsızlık B, Safsızlık C çözeltileri, spike numune çözeltisi PDA dedektörlü HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Tarama 190 nm-800 nm arasında yapılmıştır. Saflık açısı ve safsızlık eşik değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.3.1'de verilmiştir.

2.2.3.2 Taşınma Etkisi

Seçicilik parametresi için hazırlanan ilgili bileşikler numune çözeltisinden 1 tane vial hazırlanmıştır. Numune çözeltisi enjeksiyonu ve sonrasında blank (çözücü) çözeltisi enjekte edildikten sonra carry-over (taşınma) miktarına bakılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.3.1.1'de verilmiştir.

2.2.3.3 Filtre Etkisi

Seçicilik parametresi için hazırlanan ilgili bileşikler numune çözeltisi santrifüj yapılarak filtesiz bir şekilde ve farklı filtre tipleri ile ilk akıtma, 1 ml akıtma ve 2 mL akıtma yapılarak vial alınmıştır ve cihaza enjekte edilmiştir. Alanları filtresiz çözelti ile karşılaştırılarak filtre uygunluğu değerlendirilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.1.2'de verilmiştir.

2.2.3.4 Sistem Uygunluk

Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile birlikte analizi için geliştirilen stabiliteyi gösteren analitik yöntemin uygunluğunu incelemek için Bölüm 2.1.3'de hazırlandığı gibi Sapropterin

Dihidroklorür maddesi 6 ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.3.2’de verilmiştir.

2.2.3.5 Tespit Limiti (LOD)

Sapropterin Dihidroklorür, Safsızlık B ve Safsızlık C standart çözeltilerinin tespit limiti konsantrasyonu bulunduktan sonra sinyal / gürültü (S/N) bölüm değeri $\geq 3,0$ çözelti derişimi tespit limiti olarak belirlenmiştir. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.3’te verilmiştir.

2.2.3.6 Hesaplanabilirlik Limiti (LOQ)

Farklı düşük konsantrasyonlardaki Sapropterin Dihidroklorür çözeltisi, bozunma safsızlıkları olan Safsızlık B ve Safsızlık C standart çözeltilerini de içerecek şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler cihaza enjekte edilmiştir. S/N oranı $\geq 10,0$ olan çözelti konsantrasyonuna hesaplanabilirlik limiti olarak karar verilmiştir. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.4’te verilmiştir.

2.2.3.7 Raporlama Seviyesi

Sapropterin Dihidroklorür’ün maksimum günlük alım dozu 1 g’ın altındadır. ICH Guideline’de 1 g’ın altındaki günlük alım dozlarında safsızlıklar için Raporlama seviyesi % 0,1, 1 g’ın üstündeki günlük alım dozlarında safsızlıklar için Raporlama seviyesi % 0,05 olarak verilmiştir. Sapropterin Dihidroklorür için günlük alım dozu 1 g’ın üstünde olduğundan ve % 0,05 seviyesinde hazırlanan çözeltiler 3 defa enjekte edilmiştir. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.5’te verilmiştir.

2.2.3.8 Doğrusallık

Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile birlikte analizi için geliştirilen stabiliteyi gösteren analitik yöntemin doğrusallığını incelemek ve bozunma safsızlıklarının miktarını hesaplamada gerekli olan RFF ve DF değerini bulmak için, hesaplanabilirlik limiti seviyesi standart çözeltisi 1 (LOQ), raporlama seviyesi standart çözeltisi 2 (%4), standart çözeltisi 3 (%10), standart çözeltisi 4 (%20), standart çözeltisi 5 (%40), standart çözeltisi 6 (%80), standart çözeltisi 7 (%100) ve standart çözeltisi 8 (%120)’den HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Pik alanlarına karşı konsantrasyonlara göre doğrusallık grafikleri oluşturulmuştur. Regresyon veri çözümüleme analizi yapılmıştır. Safsızlık B ve Safsızlık C için RRF ve DF

değerleri hesaplanmıştır. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.6’da verilmiştir.

Safsızlıkların Rölatif Cevap Faktörleri (RRF) ve Düzeltme Faktörünün (DF) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$RRF = \frac{\text{Safsızlığa ait uyum doğrusu eğimi}}{\text{Etkin madde seyreltik std. ait uyum doğrusu eğimi}}$$
$$DF = \frac{1}{RRF}$$

2.2.3.9 Uygulama Aralığı

Doğrusallık çalışmasının üst ve alt derişimindeki (%120 ile LOQ seviyesi) çözeltilerden 3 defa enjeksiyon yapılmıştır ve kabul koşullarının uygunluğu tespit edilmiştir. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.7’de verilmiştir.

2.2.3.10 Doğruluk

Sapropterin Dihidroklörür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıkları Safsızlık B ve Safsızlık C HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabiliteyi gösteren analitik yöntemin, doğruluğunu tetkik etmek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde hesaplanabilirlik limiti (LOQ), %100 ve %120’si seviyelerinde olacak şekilde üçer paralel numune hazırlanmıştır. Çözelti hazırlıkları Bölüm 2.1.3’de verilmiştir. İlgili standart grafiklerinden yüzde geri kazanımları hesaplanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.3.8’de verilmiştir.

2.2.3.11 Kesinlik

Sapropterin Dihidroklörür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıkları Safsızlık B ve Safsızlık C HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabiliteyi gösteren analitik yöntemin tekrarlanabilirliği için Bölüm 2.1.3’de hazırlandığı gibi Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünür Tablet farmasötik ürünü kullanılarak 6 farklı spike test çözeltisi hazırlanmıştır. Ara kesinlik için, Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünür Tablet farmasötik ürünü kullanılarak 6 farklı spike test çözeltisi hazırlanıp aynı laboratuvarında, farklı bir cihazda, aynı markaya ait olan ve farklı bir seri numaraya sahip kolon kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen değerlere ait ortalama, standart ve relatif standart sapmalar (sırasıyla, SD ve RSD), güven aralığı (%95), yöntem kesinliği

ve laboratuvar içi kesinlik ortalamaları arasındaki fark hesaplanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.3.9’da verilmiştir.

2.2.3.12 Sağlamlık

Sapropterin Dihidroklorür aktif maddesi sağlamlığını incelemek amacı ile kromatografik koşullardaki bazı değişikliklerin yöntem performansını nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Bölüm 2.1.3’de hazırlandığı şekilde standart Sapropterin Dihidroklorür hazırlanmıştır. Dalga Boyu, 220 ± 2 nm olarak değiştirilmiştir. Dalga Boyu, 218 nm ve 222 nm olarak 3’er standart Sapropterin Dihidroklorür çözeltisi enjeksiyonu yapılmıştır. Kolon sıcaklığı, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ olarak değiştirilmiş olup kolon fırını sıcaklığı, 25°C ve 35°C olacak şekilde 3’er enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar normal parametrelere göre, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı ve alıkonma zamanı olarak kıyaslanmıştır ve uygunluğu değerlendirilmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.10.1’de verilmiştir.

2.2.3.13 Stabilité

Sapropterin Dihidroklorür standart çözeltisi ve ilgili bileşikler numune çözeltisi Bölüm 2.1.3’de anlatılan yöntemle göre hazırlanarak 48 saat boyunca belli sürelerde analiz edilmiştir. Belirtilen stabilite süresinde etkin pikinin ve safsızlık piklerinin yüzde değişimi incelenmiştir. Sonuçlar Bölüm 3.3.10.2’de verilmiştir.

2.2.4 Miktar Tayini Analitik Yöntem

Analitik yöntem tanımı ve prensibi Analitik Yöntem Sapropterin Dihidroklorür 100 mg Çözünebilir Tablet farmasötik ürünü Sapropterin Dihidroklorür miktar tayinine yönelik izokratik HPLC yöntemidir.

Limitler $100,0 \text{ mg} \pm \%5,0$ Sapropterin Dihidroklorür / Çözünebilir Tablet ($95,0 \text{ mg} - 105,0 \text{ mg}$ Sapropterin Dihidroklorür / Çözünebilir Tablet)

2.2.4.1 Kromatografik Koşullar

- Kolon: YMC Pack ODS-AQ, $3 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$,
- Akış hızı: $0,5 \text{ ml/dakika}$
- Tayin dalgaboyu: UV, 220 nm

- Enjeksiyon hacmi: 5,0 μ l
- Kolon sıcaklığı: 30°C
- Tray sıcaklığı: 5°C
- Analiz süresi: 15 dakika
- Akış türü: İzokratik

Seal wash: Metanol – Su (10:90, h/h) (HPLC kalitede) karıştırılır.

Needle wash: Metanol – Su (90:10, h/h) (HPLC kalitede) karıştırılır.

2.2.4.2 Kullanılan Çözeltiler

Hareketli Faz Hazırlığı

Tampon Hazırlığı: 2,72 g Potasyum Dihidrojen Fosfat, 1000 ml suda çözülmüştür. Ortofosforik Asit ile pH'sı 2,5'a ayarlanmıştır.

Hareketli Faz Hazırlığı: Tampon ve Metanol (90:10, h/h) oranında karıştırılmıştır. 0,45 μ m NY filtreden süzülüp, degaze edilmiştir.

Çözücü Hazırlığı

0,1 M HCl hazırlığı: 8,3 ml %37'lik Hidroklorik Asit, 1000 ml'lik saf su içerisinde çözülmüştür.

Miktar Tayini Standart Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 50,0 mg Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı, 100 ml'lik balon şişeye hassas tartılmıştır. Üzerine bir miktar çözücü ilave edilmiştir. 5 dakika boyunca ultrasonikte çözülmüştür. Üzerine bir miktar çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır ve 0,45 μ m'lik RC filtre kullanılmış, süzülerek viallanmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,5 mg/ml)

Miktar Tayini Test Çözeltisi Hazırlığı

Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet numunesinden 10 adet tartıldıktan sonra havanda ezilmiştir. Bu tozdan 150,0 mg (50,0 mg Sapropterin Dihidroklörür içerir) alınarak 100 ml'lik balon jojeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Çözücü ile hacmine tamamlanıp karıştırılmıştır. 0,45 μ m'lik RC filtreden süzülerek viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklörür}}$: 0,5 mg/ml)

Hesaplamalar

Miktar tayini çalışmasında Sapropterin Dihidroklörür miktarı mg/çözünebilir tablet

cinsinden aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Sapropterin Dihidroklorür mg/tablet} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{std}}} \times \frac{\frac{W_{\text{std}}}{100} \times \frac{P}{100}}{\frac{W_{\text{num}}}{100}} \times W_{\text{ort}}$$

A_{test} = Test çözeltisindeki aktif madde pik alanı

A_{std} = Standart çözeltisindeki aktif madde toplam pik alanların ortalaması

W_{std} = Tartılan referans standart ağırlığı (mg)

W_{num} = Tartılan numune ağırlığı (mg)

P = Sapropterin Dihidroklorür çalışma standardının % saflığı

W_{ort} = Ortalama çözünebilir tablet ağırlığı (mg/çözünebilir tablet)

2.2.5 Bozundurma Çalışmaları

Bozundurma çalışmalarında belirlenen stres tiplerine göre ilgili bileşikler, miktar tayini, blank çözeltisi ve ürün için yapılan plasebo için bozunma çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC sistemine verilerek bozunma oranlarına ve miktar değişimlerine bakılmıştır. Çıkan sonuçlar blank çözeltileriyle kıyaslanmıştır. Piklerin saflıkları değerlendirilmiştir.

2.2.5.1 Işığa Maruz Bırakma

Yeterli miktarda etken numune ICH kılavuzu Q1B'ye göre 2 döngü boyunca güneş ışığı kabininde bekletilmiş ve 1,2 milyon lüks saat aydınlatmaya maruz bırakılmıştır.

İlgili bileşikler test hazırlığı: Sapropterin Dihidroklorür 100 mg Çözünebilir Tablet numunesinden 10 adet tartıldıktan sonra havanda ezilmiştir. Bu tozdan 150,0 mg (50,0 mg Sapropterin Dihidroklorür içerir) alınmıştır ve 100 ml'lik balon şişeye hassas bir şekilde tartılmıştır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonikte tutularak çözünmesi sağlanmıştır. Üzerine Çözücü eklenmiş ve hacmine tamamlanmış karıştırılmıştır. 0,45 µm'lik RC filtre kullanılmış ve süzülerek viallenmiştir. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklorür}}$: 0,5 mg/ml)

Miktar tayini test hazırlığı: İlgili bileşikler test çözeltisi ile aynı şekilde hazırlanmıştır. ($C_{\text{Sapropterin Dihidroklorür}}$: 0,5 mg/ml) Sonuçlar Bölüm 3.4.1'de verilmiştir.

2.2.5.2 UV Işığı İle Bozundurma

Yeterli miktarda etken numune 200 watt/sm² UV ışığı altında aydınlatmaya maruz bırakılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.1’de verilmiştir.

2.2.5.3 Sıcaklık İle Bozundurma

Belirli miktarda etken madde 72 saat 105°C sıcaklıkta bekletildi. 100 ml’lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üzerine 10 ml çözücü ilave edilip ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanıp çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu özelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.1’de verilmiştir.

Belirli miktarda etken madde 168 saat 105°C sıcaklıkta bekletilmiştir. 100 ml’lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üzerine 10 ml çözücü ilave edilip ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanıp çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu özelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.1’de verilmiştir.

2.2.5.4 Nem İle Bozundurma

Belirli miktarda etken madde 72 saat %90 nem ortamında bekletilmiştir. 100 ml’lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üzerine 10 ml çözücü ilave edilip ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanıp çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu özelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.2’de verilmiştir.

Belirli miktarda etken madde 168 saat %90 nem ortamında bekletilmiştir. 100 ml’lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üzerine 10 ml çözücü ilave edilip ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanıp çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu özelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.2’de verilmiştir.

2.2.5.5 Asit İle Bozundurma

100 ml’lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üstüne 5 ml 5 M HCl eklenip 5 saat boyunca 60°C’de bekletilmiştir. Sonra nötralize etmek için üzerine 5 ml 5 M NaOH eklenerek çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu özelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Blank çözeltili hazırlığında, 100 ml’lik boş balon jojeye 5 mL 5 M HCl eklenerek 5 saat boyunca 60°C’de bekletilmiştir. Aynı şekilde üzerine 5 ml 5 M NaOH eklenerek çözücü ile hacmine

tamamlanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.3'te verilmiştir.

2.2.5.6 Baz İle Bozundurma

100 ml'lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üstüne 5 ml 5 M NaOH eklenip 30 dakika boyunca 60°C'de bekletilmiştir. Sonra nötralize etmek için üzerine 5 ml 5 M HCl eklenerek çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Blank çözeltisi hazırlığında, 100 ml'lik boş balon jojeye 5 ml 5 M NaOH eklenerek 30 dakika boyunca 60°C'de bekletilmiştir. Aynı şekilde üzerine 5 ml 5 M HCl eklenerek çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.3'te verilmiştir.

2.2.5.7 Oksidasyon İle Bozundurma

100 ml'lik balon jojeye, 50,0 mg etken madde tartılmıştır. Üstüne 5 ml %10'luk H₂O₂ eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanılmıştır. Blank çözeltisi hazırlığında, 100 ml'lik boş balon jojeye 5 ml %10'luk H₂O₂ eklendi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Aynı şekilde çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. Sonuçlar Bölüm 3.4.3'te verilmiştir.

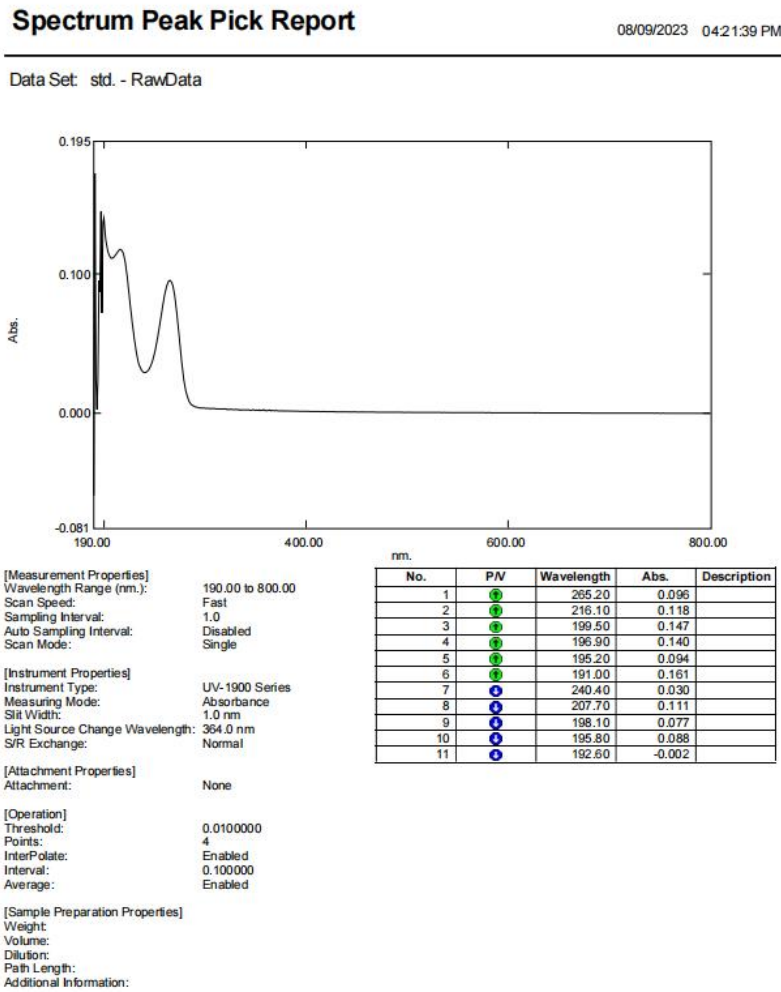
3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Karakterizasyon Çalışmaları

3.1.1 UV Tanıma

Sapropterin Dihidroklorür standart, test ve blank için karakterizasyon çalışması UV spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.1 - Şekil 3.3'te verilmiştir.

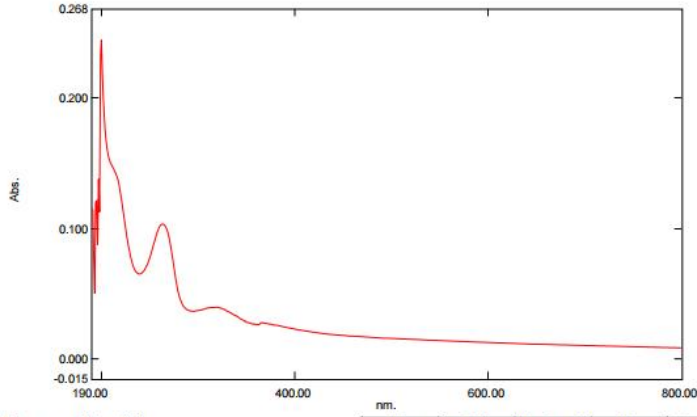


Şekil 3.1 Sapropterin Dihidroklorür standart çözeltisi UV spektrumu

Spectrum Peak Pick Report

08/09/2023 04:23:59 PM

Data Set: test - RawData



[Measurement Properties]

Wavelength Range (nm.): 190.00 to 800.00
Scan Speed: Fast
Sampling Interval: 1.0
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Single

[Instrument Properties]

Instrument Type: UV-1900 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 364.0 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]

Attachment: None

[Operation]

Threshold: 0.0100000
Points: 4
Interpolate: Enabled
Interval: 0.100000
Average: Enabled

[Sample Preparation Properties]

Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

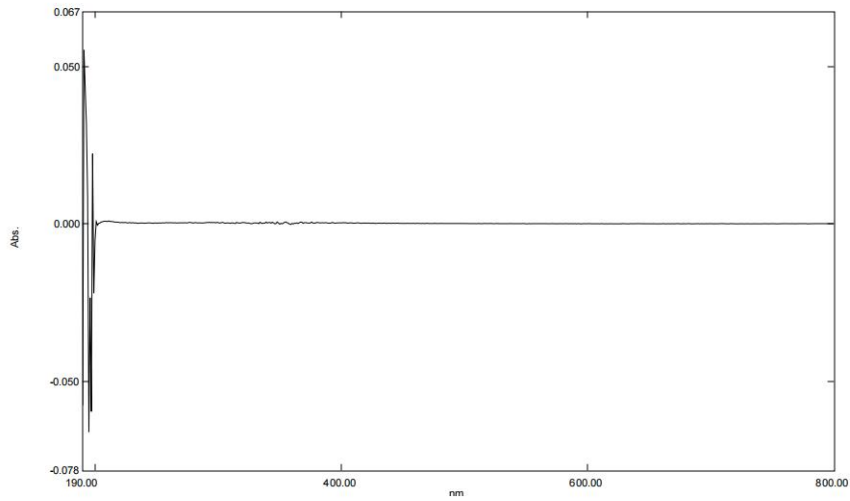
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	263.40	0.104	
2	●	199.60	0.251	
3	●	197.00	0.134	
4	●	194.50	0.131	
5	●	239.10	0.065	
6	●	197.80	0.114	
7	●	195.90	0.089	
8	●	192.80	0.051	

Şekil 3.2 Test çözeltisi UV spektrumu

Active Spectrum Graph Report

08/07/2023 02:33:52 PM

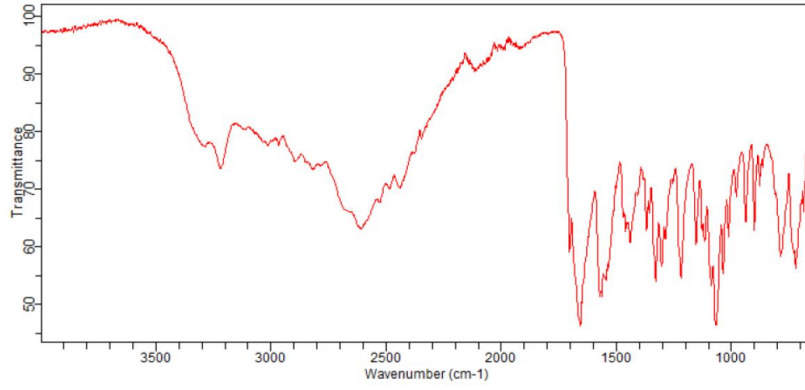
Data Set: blank - RawData



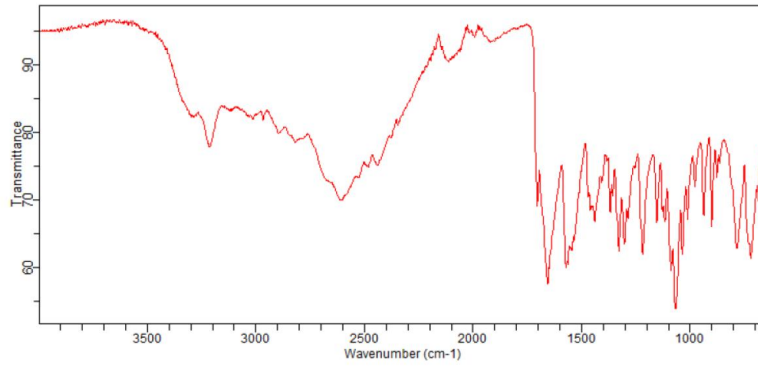
Şekil 3.3 Çözücü (blank) UV spektrumu

3.1.2 FT-IR Tanıma

Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı ve hammadde için karakterizasyon çalışması FT-IR spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.4 - Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.4 Sapropterin Dihidroklörür çalışma standardı FT-IR spektrumu



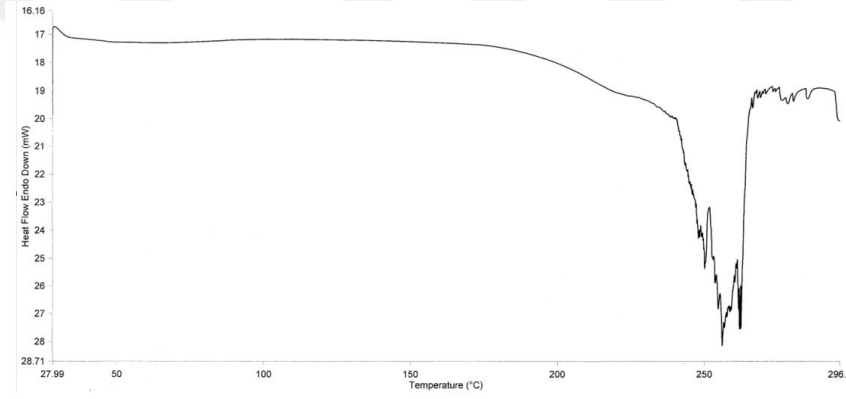
Şekil 3.5 Sapropterin Dihidroklörür hammadde FT-IR spekturumu

Tablo 3.1 Sapropterin Dihidroklorür için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi

Bant/cm ⁻¹	Belirleme
3400 - 3346	-N-H
3200	-O-H
2600	-C-H
1160 - 1666	-C=C & -C=N
1341 - 1330	1°-C=N Amid 1
1230 - 1228	2°-C=N Amid 2
1071	-C=O

3.1.3 DSC Termal Analiz

Sapropterin Dihidroklorür hammaddesinden 3,0 mg alınmıştır ve DSC cihazına 10°C/dk hızla 30°C den 300°C tarama yapılmıştır. 245°C de endoternik pik gözlenmiştir. Elde edilen sonuç Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6 Sapropterin Dihidroklorür hammadde DSC tarama analizi

3.1.4 Çözünürlük Çalışması

Bir miktar hammadde tartılmıştır ve farklı çözücüler ve pH değerlerinde çözünmesi sağlanmıştır. Çözeltilerin çözünürlük verileri Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Çözünürlük sonuçları

Çözücü	Sonuç (mg/ml)
Su	100,43
Matanol	1,038
Etanol	0,5015
Etil Asetat	0,1029
Aseton	0,1007
Hekzan	Çözünmedi
N heptan	Çözünmedi

Tablo 3.3 Farklı pH değerlerindeki çözünürlük sonuçları

pH	Çözünürlük (mg/ml)
1,2	953,20
4,1	973,409
6,0	980,145
8,0	1010,453

3.2 Yöntem Geliştirme

Sapropterin Dihidroklörür 100 mg Çözünebilir Tablet için Sapropterin Dihidroklörür İlgili Bileşikler Tayinine yönelik gradient HPLC yöntemi Bölüm 2.2.2'ye göre sisteme standart, numune, blank ve plasebo çözeltileri sisteme verilerek geliştirilmiştir.

3.3 Validasyon Parametreleri

3.3.1 Seçicilik

Geliştirilen stabilite göstergeli HPLC yönteminin seçiciliğini ve sistem uygunluğunu incelemek amacıyla Bölüm 2.2.3.1 bahsedildiği şekilde yapılan çalışmalara ait sonuçlar Tablo 3.4'te yer almaktadır. Kromotogramlar ise Şekil 3.7 ile Şekil 3.13 arası verilmiştir.

Tablo 3.4 Pik tanımlaması

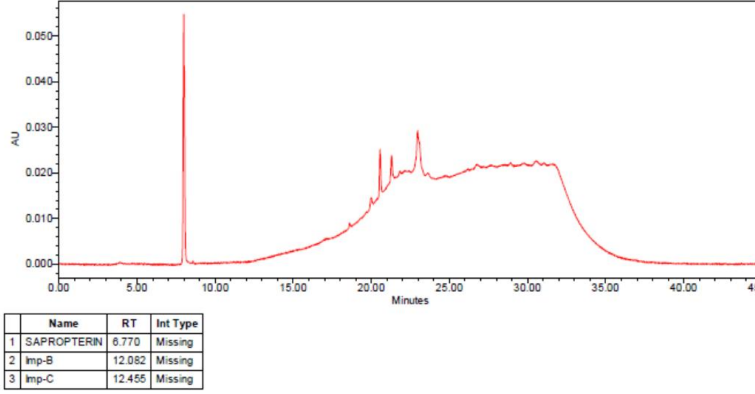
	Numune adı	RT	Safılık Açısı	Safılık Eşik Değeri
Sapropterin Dihidroklörür	Çözücü Çözeltisi	-	-	-
	Plasebo Çözeltisi	-	-	-
	Standart Çözeltisi	6,770	1,645	2,161
	Test çözeltisi	6,473	0,873	1,752
	Spike Test Çözeltisi	6,452	0,822	1,475
Safsızlık B	Limit Çözeltisi	12,082	1,377	1,653
	Spike Test Çözeltisi	12,082	0,798	1,261
Safsızlık C	Limit Çözeltisi	12,437	1,156	1,857
	Spike Test Çözeltisi	12,432	1,119	1,825

Kabul Kriterleri:

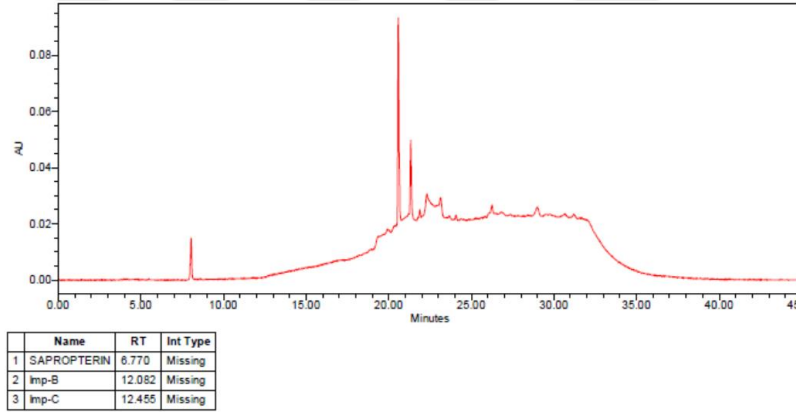
1. Aktif madde ve bilinen safsızlık alıkonma zamanında plasebo ve çözücü kromatogramlarından gelen herhangi bir pik girişimi gözlenmemelidir ve birbirinden ayrılmış olmalıdır..
2. Etkin madde ve bilinen safsızlıklar için saflık açısı saflık eşik değerinden küçük olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

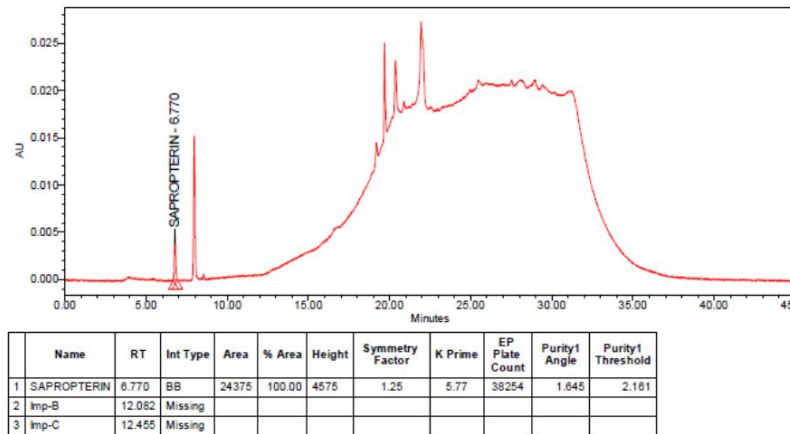
Blank ve plasebo kromatogramı incelendiğinde etkin maddeye ve bilinen safsızlıklara ait alıkonma zamanlarında herhangi bir pik girişi gözlenmemiştir. Etkin madde ve bilinen safsızlıklar için saflık açısı saflık eşik değerinden küçük bulunmuştur. Safsızlık pikleri aktif maddeden ayrılmıştır.



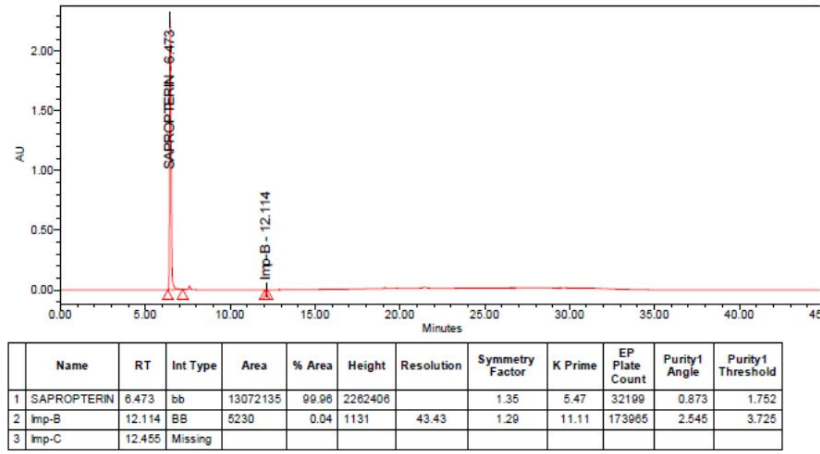
Şekil 3.7 Plasebo çözeltisi kromatogramı



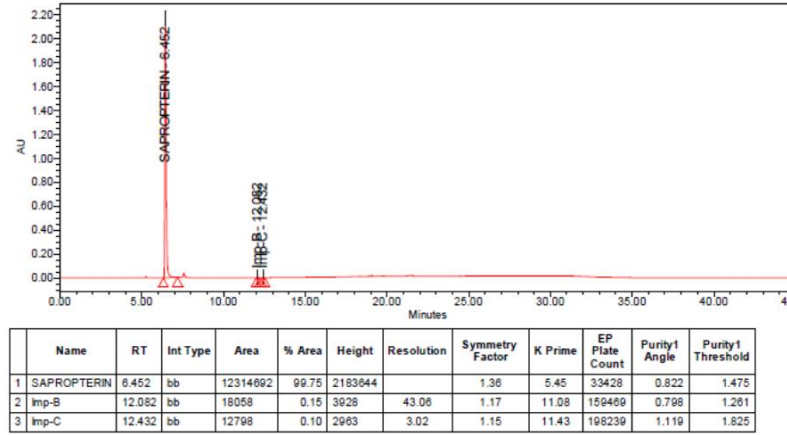
Şekil 3.8 Blank çözeltisi kromatogramı



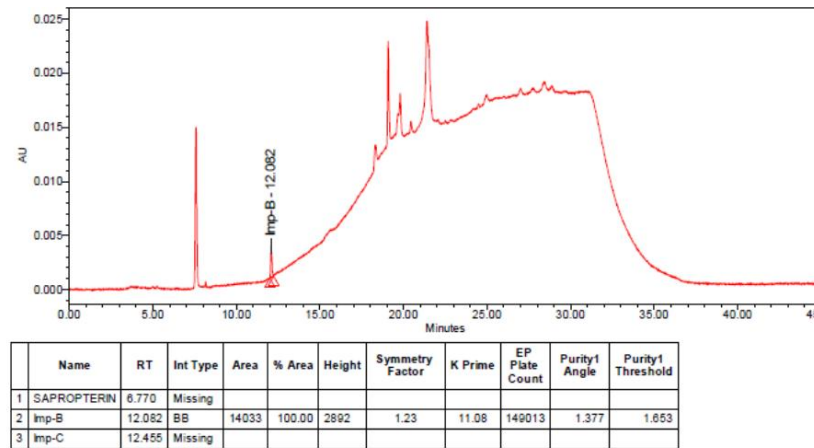
Şekil 3.9 Sapropterin Dihidroklörür standart çözeltisi kromatogramı



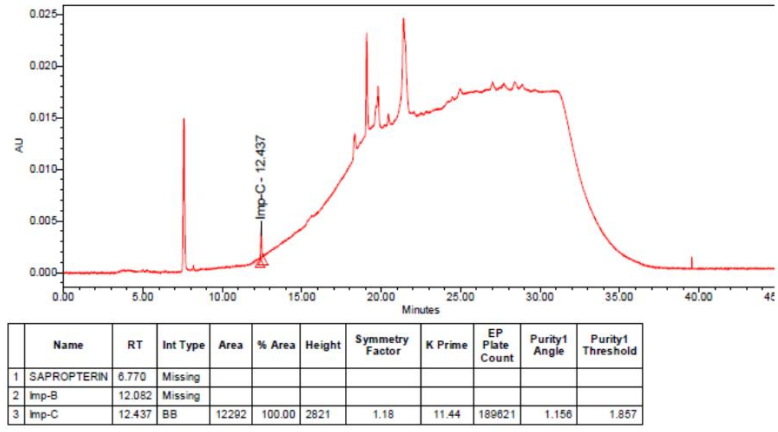
Şekil 3.10 İlgili bileşikler numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.11 Spike numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.12 Safsızlık B çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.13 Safsızlık C çözeltisi kromatogramı

3.3.1.1 Taşıma Etkisi

Seçicilik parametresi için hazırlanan numune çözeltisinden 1 adet vial Bölüm 2.2.3.2’de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Her numune çözeltisi enjeksiyonundan sonra blank çözeltisi cihaza verilmiştir ve taşıma miktarına kontrol edilmiştir. Tablo 3.5’te bulunan sonuçlar sunulmuştur.

Tablo 3.5 Taşınma etkisi

	Alan	Alan	
Etken Madde	Standart Çözeltisi	Blank Çözeltisi	% Fark
Sapropterin Dihidroklorür	37359	0	0,0

3.3.1.2 Filtre Etkisi

Standart çözeltisi ve numune çözeltisi yönteme uygun şekilde hazırlanmıştır. Bölüm 2.2.3.3’te anlatılmıştır. Bu çözeltiler değişik filtre tipleri ile vial alınmıştır ve analiz edilerek % fark hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 3.6’da verilmiştir.

$$\text{Fark/\% Difference} = \left| \frac{AS - AF}{AS} \right| \times 100 \quad (3.1)$$

AS: Filtre edilmemiş çözeltiden elde edilen etkin madde pikinin alanı

AF: Filtre edilmiş çözeltiden elde edilen etkin madde pikinin alanı

Tablo 3.6 Filtre etkisi sonuçları

Filtre Etkisi	Filtre Tipi	Alan	% Fark
Standart	Filtresiz	36613	-
	0,45 μm RC 0 ml	36867	0,69
	0,45 μm RC 1 ml	36630	0,05
	0,45 μm RC 2 ml	36645	0,09
	0,45 μm NY 0 ml	36856	0,66
	0,45 μm NY 1 ml	36945	0,91
	0,45 μm NY 2 ml	36990	1,03
	0,45 μm PTFE 0 ml	36995	1,04
	0,45 μm PTFE 1 ml	36998	1,05
	0,45 μm PTFE 2 ml	36979	1,00
Numune	Filtresiz	18138946	-
	0,45 μm RC 0 ml	17974530	0,91
	0,45 μm RC 1 ml	18174765	0,20
	0,45 μm RC 2 ml	18274765	0,75
	0,45 μm NY 0 ml	18274530	0,75
	0,45 μm NY 1 ml	18674641	2,95
	0,45 μm NY 2 ml	18584331	2,46
	0,45 μm PTFE 0 ml	18284331	0,80
	0,45 μm PTFE 1 ml	18384331	1,35
	0,45 μm PTFE 2 ml	18874331	4,05

Kabul Kriteri:

Filtrelenmiş ve filtrelenmemiş standart ve numune çözeltilerinden elde edilen etkin madde piklerinin alanları arasındaki % fark $\leq 5,0$ olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Filtre etkisi incelendiğinde standart ve numune çözeltilerindeki etkin madde piklerinin alanları filtresiz ve filtreli örneklerin yüzde farkının $\leq 5,0$ olduğu görülmüştür. 0,45 μm RC filtre kullanılmaya karar verilmiştir.

3.3.2 Sistem Uygunluk

Bölüm 2.2.3.4’de bahsedildiği gibi hazırlanan standart çözeltisi analiz edilip kabul kriterlerine uygunluğu test edilmiştir. Bulunan sonuçlar Tablo 3.7’de sunulmuştur.

Tablo 3.7 Sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Standart Çözeltisi Alanı	Alıkonma Zamanı
1	27619	6,317
2	27681	6,312
3	27171	6,312
4	27284	6,310
5	27041	6,313
6	27131	6,317
Ortalama	27321,17	6,314
SD	267,12	0,0029
% RSD	0,98	0,046

Kabul Kriterleri:

1. Altı ardışık standart çözeltisi enjeksiyonu için RSD değeri %5,0'den büyük olmamalıdır.
2. Standart enjeksiyonu için kuyruklanma (tailing) faktörü 2,0'den büyük olmamalıdır.
3. Referans standart enjeksiyonu için teorik plaka sayısı 2000'den küçük olmamalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Altı ardışık enjeksiyon için RSD değeri %0,98'dir.

1. %RSD = %0,98
2. Kuyruklanma faktörü = 1,4
3. Teorik plaka sayısı = 42125

3.3.3 Tespit Limiti

Bölüm 2.2.3.5'de bahsedildiği gibi hazırlanmış, Sapropterin Dihidroklorür standardı, Safsızlık B ve Safsızlık C standardı içeren çözelti karışımı enjekte edilmiştir ve sinyal / gürültü değeri $\geq 3,0$ olan çözelti derişimi tayin limiti belirlenmiştir. Tablo 3.8 ilgili sonuçlar sunulmuştur.

Tablo 3.8 Tespit limiti sonuçları

	Konsantrasyon (mg/ml)	S/N	Test Konsantrasyonuna göre %
Sapropterin Dihidroklorür	0,0000021	5,1	0,00042
Safsızlık B	0,0000030	5,2	0,0006
Safsızlık C	0,0000030	3,7	0,0006

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçların uygunluğu kabul edilmiştir.

3.3.4 Hesaplanabilirlik Limiti

Bölüm 2.2.3.6’da bahsedildiği gibi hazırlanan, Sapropterin Dihidroklorür standardı, Safsızlık B ve Safsızlık C standardı içeren çözelti karışımı enjekte edildikten sonra bulunan sonuçlar Tablo 3.9’da sunulmuştur.

Tablo 3.9 Hesaplanabilirlik limiti

	Konsantrasyon (mg/ml)	S/N	Test Konsantrasyonuna göre %
Sapropterin Dihidroklorür	0,000007	14,5	0,0014
Safsızlık B	0,00001	10,6	0,002
Safsızlık C	0,00001	17,9	0,002

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçların uygunluğu kabul edilmiştir.

3.3.5 Raporlama Seviyesi

Bölüm 2.2.3.7’de bahsedildiği gibi hazırlanan Sapropterin Dihidroklorü standardı, Safsızlık B ve Safsızlık C standardı içeren karışım 3 defa enjekte edilmiştir. Bulunan sonuçlar Tablo 3.10’da sunulmuştur.

Tablo 3.10 Raporlama seviyesi sonuçları

	Konsantrasyon (mg/ml)	S/N	Test Konsantrasyonuna göre %
Sapropterin Dihidroklorür	0,00025	321,9	0,05
Safsızlık B	0,00025	285,4	0,05
Safsızlık C	0,00025	495,9	0,05

Kabul Kriteri:

Raporlama seviyesi konsantrasyonu $\geq$ LOQ konsantrasyonu olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

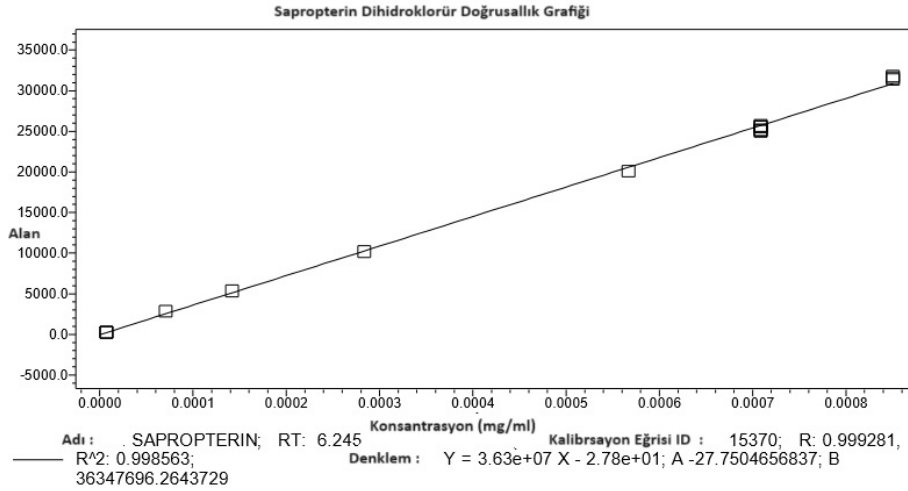
Analiz sonuçların kabul koşullarına uygun olduğu görülmüştür.

3.3.6 Doğrusallık

Bölüm 2.2.3.8’de bahsedildiği gibi hazırlanan belirli seviyelerde Sapropterin Dihidroklorür standart, Safsızlık B ve Safsızlık C standartları hesaplanabilirlik limiti seviyesinde (LOQ) 3 kez, %10 seviyesinde 1 kez, %20 seviyesinde 1 kez, %80 seviyesinde 1 kez, %100 Limit Seviyesinde 6 kez, %120 seviyesinde 3 kez enjeksiyon yapılmıştır. Bulunan sonuçlar Tablo 3.11 ve Tablo 3.13 arasında sunulmuştur.

Tablo 3.11 Sapropterin Dihidroklorür doğrusallık sonuçları

Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Sapropterin Dihidroklorür (mg/ml) (x)	Sapropterin Dihidroklorür Alan Ortalaması (y)
LOQ(%1)	0,00000709	258,322
10%	0,00007092	2871,263
20%	0,00014184	5361,533
40%	0,00028369	10192,633
80%	0,00056738	20102,358
100%	0,00070922	25350,480
120%	0,00085106	31582,975



Şekil 3.14 Sapropterin Dihidroklorür için doğrusallık grafiği

Kabul Kriterleri:

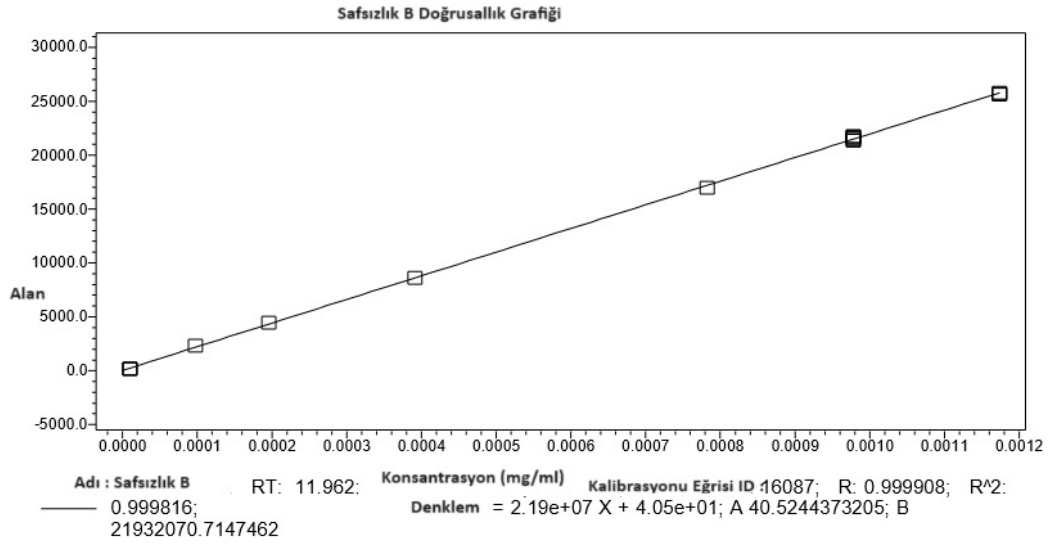
1. $R \geq 0,995$
2. Artık kareler toplamı (RSS) raporlanır.
3. $\frac{Y_{int}}{\%100'lük\ standart\ alanı} \times 100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

1. $R = 0,999281$
2. Artık kareler toplamı (RSS) = $1,012118 \times 10^6$
3. $\frac{27,750}{25350,480} \times 100 = 0,11$

Tablo 3.12 Safsızlık B için doğrusallık sonuçları

Konsantrasyon Seviyesi (%)	Safsızlık B (mg/ml) (x)	Safsızlık B Alan Ortalaması (y)
LOQ(%1)	0,00000994	174,462
10%	0,00009938	2333,152
20%	0,00019877	4468,560
40%	0,00039754	8614,683
80%	0,00079507	16978,383
100%	0,00099384	21582,920
120%	0,00119261	24331,212



Şekil 3.15 Safsızlık B için doğrusallık grafiği

Kabul Kriterleri:

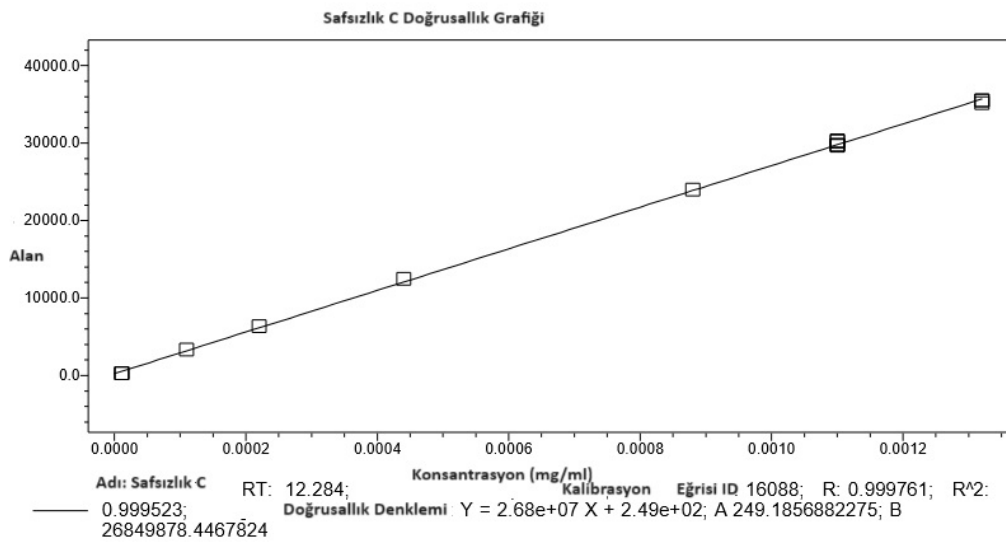
1. $R \geq 0,995$
2. Artık kareler toplamı (RSS) raporlanır.
3. $\frac{Y_{int}}{\%100'lük standart alanı} \times 100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

1. $R = 0,999908$
2. Artık kareler toplamı (RSS) = $9,3762 \times 10^4$
3. $\frac{40,524}{21.582,920} \times 100 = 0,194$

Tablo 3.13 Safsızlık C doğrusallık sonuçları

Konsantrasyon Seviyesi (%)	Safsızlık C (mg/ml) (x)	Safsızlık C Alan Ortalaması (y)
LOQ(%1)	0,00001100	273,545
10%	0,00011000	3371,835
20%	0,00022000	6380,916
40%	0,00044000	8874,450
80%	0,00088000	12503,147
100%	0,00110000	24000,132
120%	0,00132000	28008,876



Şekil 3.16 Safsızlık C için doğrusallık grafiği

Kabul Kriterleri:

1. $R \geq 0,995$
2. Artık kareler toplamı (RSS) raporlanır.
3. $\frac{Y_{int}}{\%100'lük standart alanı} \times 100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

1. $R = 0,999761$

2. Artık kareler toplamı (RSS) = $4,18370 \times 10^5$

3. $\frac{249,186}{24.000,182} \times 100 = 1,04$

Tablo 3.14 Sapropterin Dihidroklorüre göre Safsızlık B, Safsızlık C için RRT, CF

	Bağıl Alıkonma Süresi (RRT)	Bağıl Cevap Faktörü (RRF)
Safsızlık B	1,92	0,60
Safsızlık C	1,97	0,74
Sapropterin	1,00	-

3.3.7 Uygulama Aralığı

Doğrusallık çalışmasında alt ve üst konsantrasyondaki (LOQ ve %120) çözeltilerden 3 defa enjeksiyon yapılarak cihaza verilmiş olup Tablo 3.15'te elde edilen sonuçlar verilmektedir.

Tablo 3.15 Uygulama aralığı tablosu

Enj.	Etken (Alan)		Safsızlık B (Alan)		Safsızlık C (Alan)	
	Min. (LOQ)	Max. (%120)	Min. (LOQ)	Max. (%120)	Min. (LOQ)	Max. (%120)
1	260,615	31799,388	183,827	25790,882	275,707	35491,586
2	251,758	31578,469	176,191	25701,761	276,279	35518,866
3	262,594	31371,069	163,367	25628,543	268,650	35141,802
Ortalama	258	31583	174	25707	274	35384
SD	5,77	214,20	10,34	81,30	4,25	210,26
%RSD	2,23	0,68	5,93	0,32	1,55	0,59

Kabul Kriterleri:

1. En düşük seviyede üç ardışık enjeksiyon için $\% RSD \leq \%15,0$ olmalıdır.
2. En yüksek seviyede üç ardışık enjeksiyon için $\% RSD \leq \%5,0$ olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Sonuçların kabul edilebilir kriterlere uygun olduğu belirlenmiştir. Aktif maddenin çalışma konsantrasyonu, LOQ seviyesinden %120'ye kadar olan aralıkta uygun bulunmuştur.

3.3.8 Doğruluk

Bilinen safsızlıklar; spesifikasyon limit seviyelerinde LOQ, %80, %100 ve %120'si seviyelerinde olacak şekilde test çözeltilisine eklenerek, üç paralel numune

hazırlanmış analiz edilmiştir. Kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilmiştir. Her bir sonuç için LOQ, standart sapma (SD) ve göreceli standart sapma (RSD) hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.16, 3.17, 3.18’de sunulmuştur.

Tablo 3.16 Sapropterin Dihidroklorür geri kazanım sonuçları

Seviye	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	102,00 100,76 100,77	101,18	0,71	0,70
%80	107,51 103,31 101,88	104,23	2,93	2,81
%100	99,78 102,09 100,11	100,66	1,25	1,24
%120	98,45 98,15 98,33	98,31	0,15	0,15
	Ortalama (%)	101,10	-	-
	SD	2,43	-	-
	RSD (%)	2,41	-	-

Tablo 3.17 Safsızlık B geri kazanım sonuçları

Seviye	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	100,00 100,71 100,97	100,56	0,50	0,50
%80	98,61 99,25 97,58	98,48	0,84	0,86
%100	96,71 95,83 96,79	96,44	0,53	0,55
%120	96,65 96,47 96,03	96,38	0,32	0,33
	Ortalama (%)	97,97	-	-
	SD	1,99	-	-
	RSD (%)	2,03	-	-

Tablo 3.18 Safsızlık C geri kazanım sonuçları

Seviye	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	101,91 100,52 100,24	100,89	0,89	0,89
%80	96,97 97,42 96,42	96,94	0,50	0,52
%100	96,53 96,18 97,22	96,64	0,53	0,55
%120	96,91 95,97 96,79	96,56	0,51	0,53
	Ortalama (%)	97,76	-	-
	SD	2,09	-	-
	RSD (%)	2,14	-	-

Kabul Kriterleri:

1. Tüm seviyeler için %90-110, LOQ seviyesi için %80-120, arasında olmalıdır.
2. Her seviye için SD ve RSD değerleri ve elde edilen geri kazanımların ortalaması raporlanır.
3. Her bir seviyede elde edilen SD ve RSD ve geri kazanım ortalamalarının ortalaması raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Elde edilen sonuçlar, hesaplanabilirlik seviyesinde %80-%120 ve diğer seviyeler için %90-%110 arasında olma kriterine sahiptir. Sonuç olarak doğruluk parametresi valide olmuştur.

3.3.9 Kesinlik**3.3.9.1 Sistem Kesinliği (System Precision)**

Analitik metot yönteminde bahsedildiği şekilde referans standart çözeltisi hazırlanmış ve arka arkaya 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her bir enjeksiyona ait alan sonuçlar kaydedilmiştir. Analiz sonuçlarının ortalama değerleri, standart sapma değeri (SD) ve (RSD) rölatif standart sapma değeri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.19’da sunulmuştur.

Tablo 3.19 Sistem Kesinliği Sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Standart özeltisi Alanı	Alınkonma Zamanı
1	27619	6,317
2	27681	6,312
3	27171	6,312
4	27284	6,310
5	27041	6,313
6	27131	6,317
Ortalama	27321	6,314
SD	267,12	0,00
RSD	0,98	0,05

Kabul Kriteri:

Altı peş peşe verilen enjeksiyon için RSD sonucu %5,0'dan büyük olmaması gerekiyor.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Altı ardışık enjeksiyon için RSD değeri %0,98'dir.

3.3.9.2 Tekrarlanabilirlik

Sapropterin Dihidroklorür 100 mg özünebilir Tablet farmasötik ürünü yöntemde belirtildiği şekilde, 6 farklı spike test çözeltisi hazırlanarak cihaza verilmiştir. Tablo 3.20'de ilgili sonuçları içermektedir.

Tablo 3.20 Tekrarlanabilirlik sonuçları

Cihaz	Kolon	Enjeksiyon Sayısı	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)
Waters/e2695/6	YMC PACK ODS AQ 250 X 4,6 mm, 3 μ SN: 110FB00133	1	0,216	0,207
		2	0,218	0,205
		3	0,220	0,210
		4	0,222	0,212
		5	0,219	0,212
		6	0,219	0,213
	Analist 1	Ortalama	0,219	0,210
		SD	0,002	0,003
		%RSD	0,91	1,52
		%95 güven aralđı	0,002	0,003

Kabul Kriterleri:

1. Elde edilen sonuçlar kabul limitleri dışında olmamalıdır.

2. Rölatif standart sapma değeri, $RSD \leq \%5,0$ olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Elde edilen sonuçların kabul limitlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

3.3.9.3 Ara Kesinlik (Laboratuvar İçi Kesinlik, Intermediate Precision)

Aynı laboratuvar da farklı bir günde ve farklı bir analist tarafından Sapropterin Dihidroklorür 100 mg Çözünebilir Tablet (Seri No: NF20_S08_D004) farmasötik ürünü kullanılarak yöntemde belirtildiği şekilde 6 adet spike test çözeltisi hazırlanıp farklı bir cihazda analiz edilmiştir ve kabul kriterine uygunluğu test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.21 ve Tablo 3.22’de sunulmuştur.

Tablo 3.21 Ara kesinlik sonuçları

Cihaz	Kolon	Enjeksiyon Sayısı	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)
Waters/e2695/2	YMC PACK ODS AQ 250 X 4,6 mm, 3 μ SN: 126FA80123	1	0,211	0,196
		2	0,214	0,205
		3	0,210	0,208
		4	0,213	0,207
		5	0,211	0,201
		6	0,211	0,206
	Analist 2	Ortalama	0,212	0,204
		SD	0,002	0,005
		%RSD	0,71	2,22
		95 % güven aralığı	0,002	0,005

Tablo 3.22 Analist 1 ve 2’nin kesinlik çalışması ortalama sonuçları

Analist	Cihaz	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)
1	Waters / e2695/6	0,219	0,210
2	Waters / e2695/2	0,212	0,204
Ortalama Sonuçlar Arası Fark		0,007	0,006

Kabul Kriterleri:

1. % RSD $\leq \%5,0$ olmalıdır.
2. Ortalamalar arasındaki fark

Tablo 3.23 Ortalamalar arasındaki fark

% Tek tek safsızlık ve Toplam safsızlık	Fark
<0,1	Değerlendirilmez
0,10 – 0,20	$\leq \pm 0,05$
>0,20 – 0,50	$\leq \pm 0,10$
>0,50 – 1,0	$\leq \pm 0,20$
>1,0	$\leq \pm 20\%$

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Elde edilen sonuçların kabul limitlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

3.3.10 Sağlamlık**3.3.10.1 Yöntemin Stabilitesi**

Sonuçlar Tablo 3.24, 3.25, 3.26’da verilmiştir.

Dalga Boyu Değişikliği**Tablo 3.24** Dalga boyu değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Dalga Boyu Değişikliği	218 nm	220 nm	222 nm
Kuyruklanma Faktörü	0,91	1,20	1,20
Teorik Plaka Sayısı	26201	25398	24640
Alıkonma Zamanı (dk)	6,238	6,237	6,238

Kolon Sıcaklığı Değişikliği:**Tablo 3.25** Kolon Sıcaklığı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Kolon Sıcaklığı Değişikliği	25 °C	30 °C	35 °C
Kuyruklanma Faktörü	1,20	1,20	1,20
Teorik Plaka Sayısı	24669	25398	20897
Alıkonma Zamanı (dk)	6,421	6,237	6,113
Alan	36422	36464	34499

Akış Hızı Değişikliği:

Tablo 3.26 Akış hızı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Akış Hızı Değişikliği	0,5 ml/dk	0,6 ml/dk	0,7 ml/dk
Kuyruklanma Faktörü	1,18	1,20	1,16
Teorik Plaka Sayısı	26711	25398	22860
Alıkonma Zamanı (dk)	7,112	6,237	5,625
Alan	37580	36464	34587

Kabul Kriterleri:

1. Sistem uygunluk kriterleri sağlanmalıdır.
2. Alıkonma (RT) zamanlarındaki farklılıklar raporlanır ve elde edilen sonuçlar değerlendirilir.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Sonuçlara göre metot dalga boyu değişikliğine, akış hızı değişikliğine ve kolon sıcaklığı değişikliğine dayanıklı olduğu görülmüştür.

3.3.10.2 Çözelti Stabilitesi

Hazırlanmış olan standart ve numune çözeltileri 15°C sıcaklıkta en az 48 saat süresince bekletilip belli aralıkla analizlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.27 ve Tablo 3.28’de sunulmuştur.

Tablo 3.27 Standart çözeltisi stabilite sonuçları

Süre (saat)	Standart Çözeltisi	
	Sapropterin Dihidroklorür	Değişiklik (%)
0	36199	-
4	36613	1,14
8	36914	1,98
12	37122	2,55
16	37300	3,04
20	37181	2,71
24	36728	1,46
30	36551	0,97
36	36689	1,35
42	36493	0,81
48	36288	0,25

Tablo 3.28 Numune çözeltilisi stabilite sonuçları

Süre (saat)	Bilinmeyen En Büyük Safsızlık	Değişiklik (%)	Toplam Safsızlık	Değişiklik (%)
0	10003	-	21018	-
4	10501	4,98	25449	21,08
8	10597	5,94	31809	51,34
12	13251	32,47	41336	96,67
16	19175	91,69	46648	121,94
20	25937	159,29	58844	179,97
24	33998	239,88	69511	230,72
30	48446	384,31	83959	299,46
36	69050	590,29	109319	420,12
42	108117	980,85	157202	647,94
48	196663	1866,04	253737	1107,24

Kabul Kriteri:

Belirtilen stabilite süresinde, standart çözeltilisindeki etkin piki % alan değişimi en fazla 5, numune çözeltilisindeki safsızlık pikleri % alan değişimi en fazla 10 olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Analiz sonuçlarına göre standart çözeltilisi 48 saat ve 15°C’de stabil olduğu gözlemlenmiştir. Test çözeltilisi stabil olmadığı gözlemlenmiştir ve taze hazırlanmalıdır.

3.4 Bozundurma Çalışmaları

3.4.1 Katı Bozundurma Çalışması

Tablo 3.29 Katı bozundurma sonuçları

Bozundurma Koşulları	Kontrol Test	Sıcaklık ile Bozundurma		UV 200 Watt.s/m ²	Fotolik Bozundurma 1200 lux.s
		72 saat 105°C	168 saat 105°C		
Safsızlıklar	% Kütle	% Kütle	% Kütle	% Kütle	% Kütle
Safsızlık E	T.E.	0,005	0,007	0,005	0,006
Safsızlık A	T.E.	0,032	0,045	0,009	0,009
Safsızlık G	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık B	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık C	T.E.	0,580	0,625	T.E.	T.E.
Safsızlık H	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık D	T.E.	0,110	0,171	T.E.	T.E.
Safsızlık F	T.E.	0,428	0,589	T.E.	T.E.
En Yüksek Bilinmeyen Safsızlık	0,04	0,197	0,250	0,03	0,004
Toplam Bilinmeyen Safsızlıklar	0,07	0,541	0,745	0,003	0,004
Toplam Safsızlık	0,10	1,169	2,182	0,017	0,019
Saf Kütle % (Alan)	99,90	99,83	97,82	99,98	99,98
% Bozunma	-	0,07	2,08	0,08	0,08
Etken Saflığı	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

T.E.: Tespit Edilemedi

3.4.2 Nem ile Bozundurma

Tablo 3.30 Nem numune sonuçları

Bozundurma Koşulları	İşlemsiz Kontrol Test	% 90 Nem 72 saat	% 90 Nem 168 saat
Safsızlıklar	% Kütle	% Kütle	% Kütle
Safsızlık E	0,030	0,160	0,140
Safsızlık A	T.E.	0,180	0,200
Safsızlık G	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık H	T.E.	0,200	0,350
Safsızlık B	0,030	0,240	0,550
Safsızlık C	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık D	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık F	T.E.	T.E.	T.E.
En Yüksek Bilinmeyen Safsızlık	0,040	0,440	1,020
Toplam Bilinmeyen Safsızlıklar	0,080	0,650	1,950
Toplam Safsızlık	0,14	1,43	3,19
Saf Kütle % (Alan)	99,91	98,59	96,83
% Bozunma	-	1,02	3,08
Etken Saflığı	1,000000	1,000000	1,000000

T.E.: Tespit Edilemedi

3.4.3 Sıvı Bozundurma Çalışması

Tablo 3.31 Sıvı bozundurma sonuçları

Bozundurma Koşulları	İşlemsiz Kontrol Test	5 M HCl çözeltisi 60°C 5 saat	5 M NaOH çözeltisi 60°C 30 dakika	% 10 H ₂ O ₂ çözeltisi
Safsızlıklar	% Kütle	% Kütle	% Kütle	% Kütle
Safsızlık E	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık A	T.E.	T.E.	0,181	0,02
Safsızlık G	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Safsızlık B	0,02	T.E.	0,729	11,791
Safsızlık C	T.E.	0,189	T.E.	5,322
Safsızlık H	T.E.	T.E.	0,096	0,106
Safsızlık D	T.E.	0,007	0,205	0,116
Safsızlık F	T.E.	0,300	T.E.	T.E.
En Yüksek Bilinmeyen Safsızlık	0,040	0,017	10,484	0,212
Toplam Bilinmeyen Safsızlıklar	0,080	0,022	10,840	0,713
Toplam Safsızlık	0,110	0,518	12,051	18,068
Saf Kütle % (Alan)	99,91	99,48	86,88	81,93
% Bozunma	-	0,43	13,04	17,98
Etken Saflığı	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

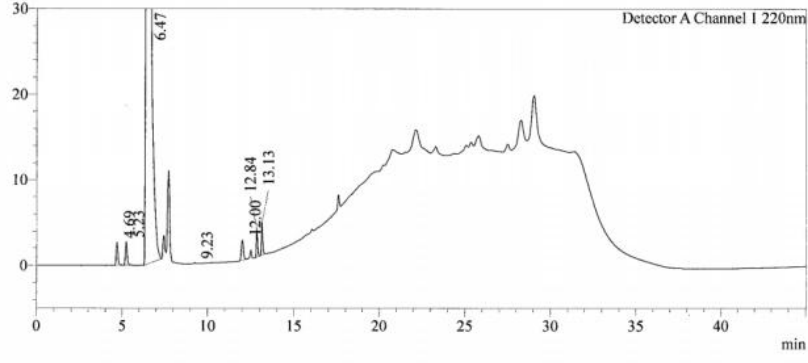
T.E.: Tespit Edilemedi

Tablo 3.32 Bozundurma şartları kütle denkliği sonuçları

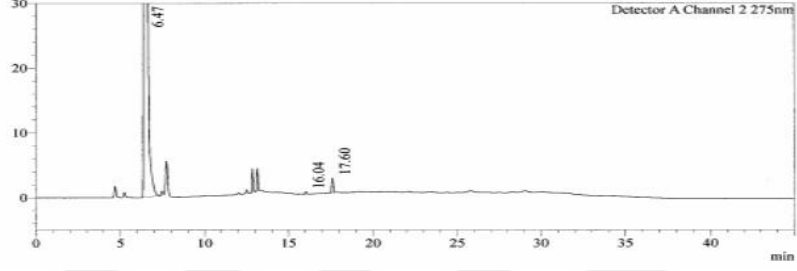
Bozundurma Tipi	Bozundurma Ortamı	Toplam Safsızlık (%)	Miktar Tayini (%)	Kütle Denkliği Verim (%)
Kontrol Test (Sıvı Bozundurma)	-	0,11	100,35	-
Kontrol Test (Katı Bozundurma)	-	0,10	100,86	-
Işıklı Bozundurma	1200 lux.s	0,019	101,00	100,06
	UV 200 Watt.s/m ²	0,017	99,83	98,90
Isı Bozundurma	72 saat 105°C	1,169	98,68	98,90
	168 saat 105°C	2,182	97,68	98,91
Asit Bozundurma 5,0 M HCl	60°C 5 saat	0,518	98,02	98,08
Baz Bozundurma 5,0 M NaOH	60°C 30 dakika	12,051	86,15	97,75
Oksidasyon H₂O₂	%10,0	18,068	81,91	99,52
Nem	%90 Nem 72 saat	1,43	98,45	99,42
	%90 Nem 168 saat	3,19	96,56	99,29

Chromatogram

mV



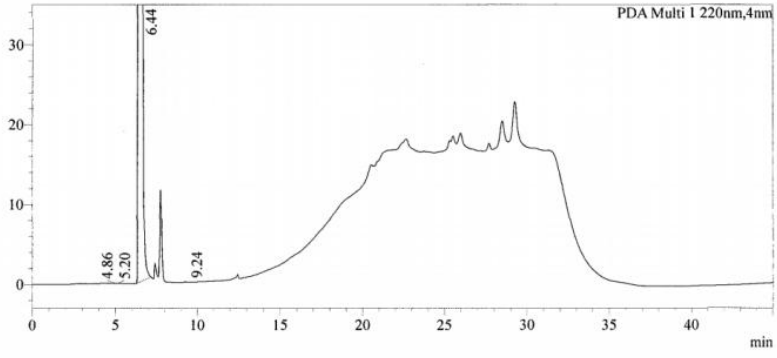
mV



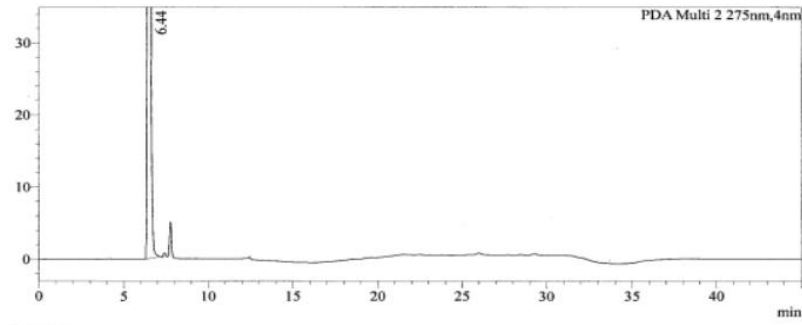
Şekil 3.17 Başlangıç sıvı kontrol test kromotogramı

Chromatogram

mAU



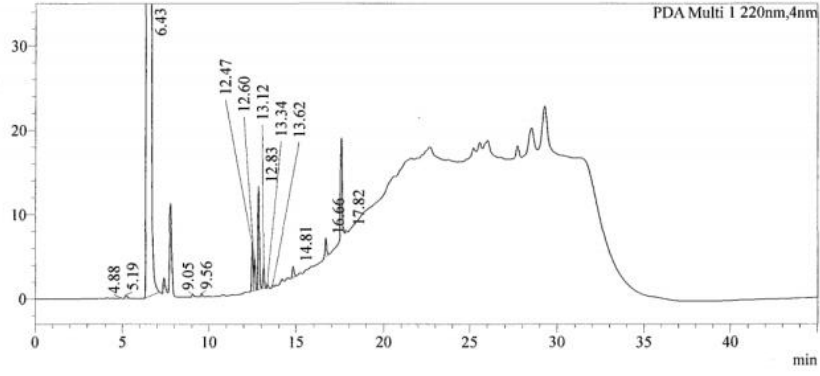
mAU



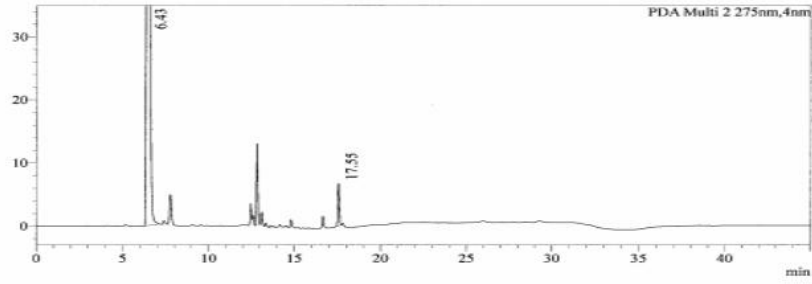
Şekil 3.18 Işık ile bozundurma kromotogramı

Chromatogram

mAU



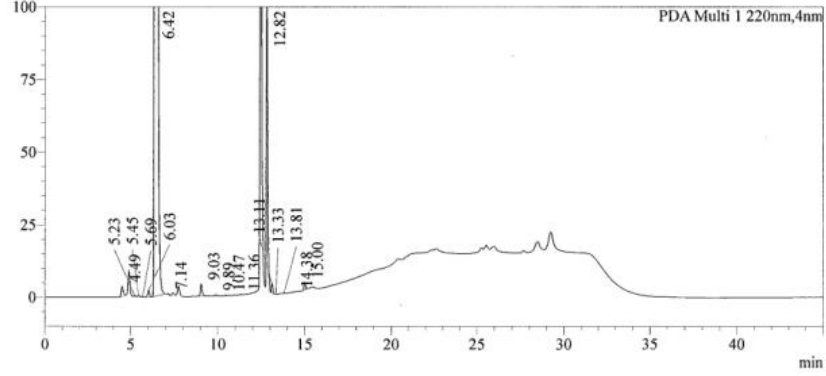
mAU



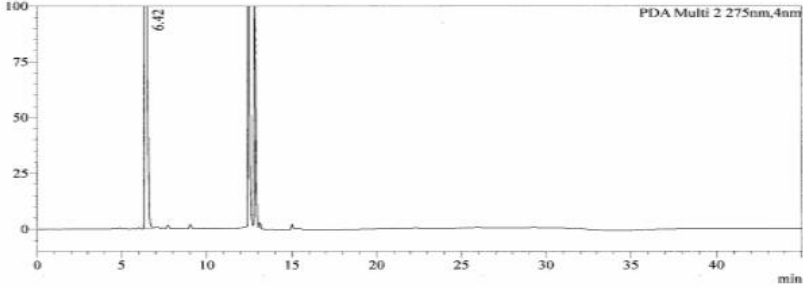
Şekil 3.19 Isı ile bozundurma kromotogramı

Chromatogram

mAU

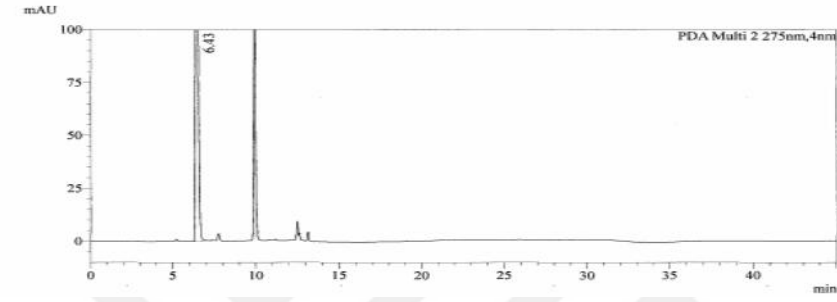
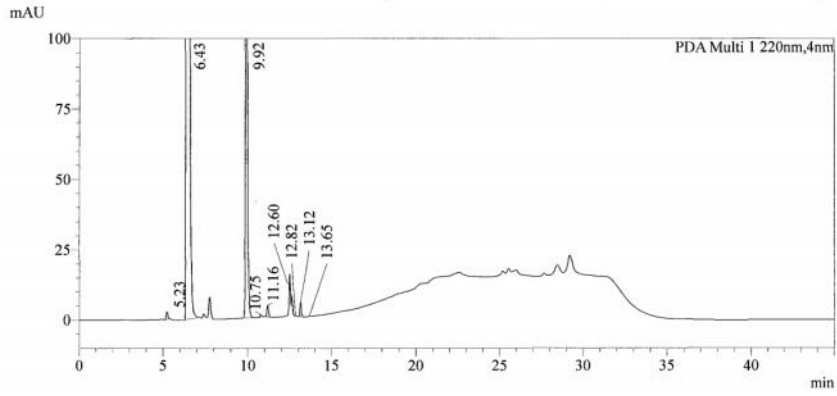


mAU



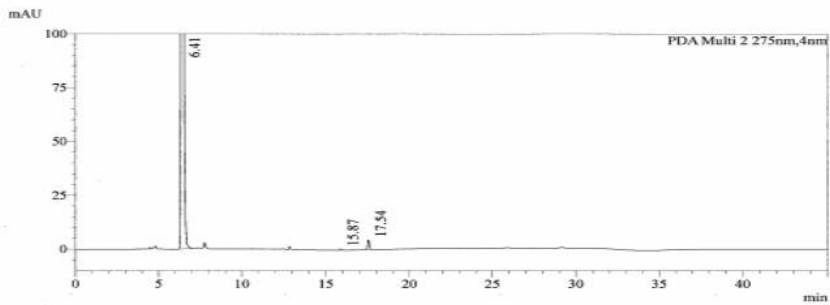
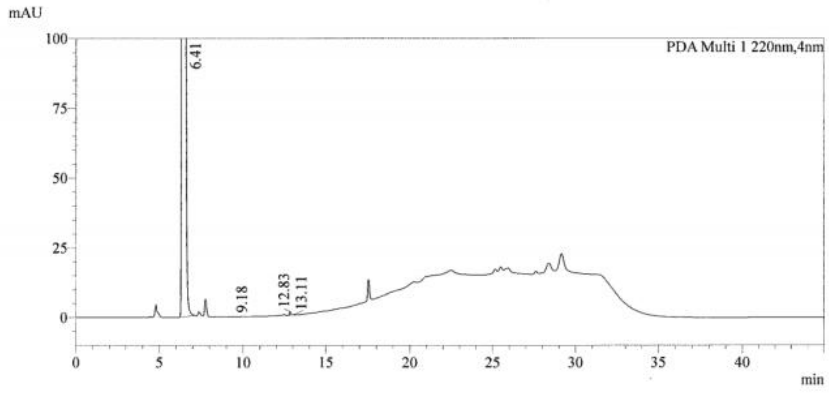
Şekil 3.20 Oksidasyon bozundurma kromotogramı

Chromatogram



Şekil 3.21 Baz ile bozundurma kromotogramı

Chromatogram



Şekil 3.22 Asit ile bozundurma kromotogramı

4 SONUÇ

Bu çalışmada Sapropterin Dihidroklörür, aktif maddesi, proses ve degradasyon bozunma safsızlıklarının birlikte analizi için stabiliteyi gösteren HPLC analitik metodu geliştirilmiştir. Analitik yöntem validasyon çalışmalarında ICH tarafından belirlenen kabul aralıklarında değerler elde edilmiş ve kromatografik analiz performansını gösteren kuyruklanma faktörü, rölatif standart sapma ve teorik plaka sayısı gibi parametreler kabul kriterlerine uygun düzeyde bulunmuştur. Analitik metot validasyon parametreleri olan seçicilik, doğruluk, doğrusallık, , sağlamlık, kesinlik, standart ve test çözeltisi kararlılığı, tayin sınırı ve hesaplanabilirlik sınırı parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Sapropterin Dihidroklörür aktif maddesi ve degradasyon bozunma safsızlıkları için yapılan doğrusallık analizinde korelasyon katsayısı 0,997'den büyük sonuç elde edilmiştir. Yöntem kesinliği validasyon parametresinde aynı günde yapılan analiz sonuçları 0,91 ile 1,52, farklı bir günde yapılan analiz sonuçları ise 0,72 ile 2,22 arasında değişen %RSD sonuçlarına ulaşılmıştır. Analitik metot doğruluğu parametresinde Sapropterin Dihidroklörür için ortalama sonuç 101,10 ve degradasyon bozunma safsızlıkları için ortalama doğruluk verileri ise 96,38 ile 100,89 arasında değişen %geri kazanım verileri elde edilmiştir. LOD Tespit limit seviyesi 2,1 – 3,0 ng/ml arasında; LOQ hesaplanabilirlik seviyesi 7,0 – 10,0 ng/ml arasında elde edilmiştir. Referans standart çözeltisi 48 saatte 15°C'de stabil olduğu sonucu elde edilmiştir. Fakat test çözeltisi taze hazırlanması gerektiği gözlenmiştir. Analitik metot validasyonu çalışmasında sağlamlık parametresi için yapılan kromatografik koşullardaki değişikliklerin metot performansını etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Plasebo çözeltisinin kromatogramında Sapropterin Dihidroklörür, proses ve bozunma safsızlıklarının alıkonma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Örnek çözeltilerinde Sapropterin Dihidroklörür, proses ve bozunma safsızlık pikleri için pik saflığı değerinin, saflık eşik değerinden büyük bulunması piklerin saf olduğunu ve aynı alıkonma zamanında bilinmeyen safsızlık, blank veya plasebo

çözeltilisine ait herhangi bir pikin olmadığını göstermiştir ve bu da yöntemin stabilite göstergeli olduğunu gösteren önemli bir ölçüt olmuştur. Bozundurma çalışmalarında asit, baz ve peroksit ve nem miktarının en önemli faktör olduğu ısı ve ışık faktörlerin bozundurma yüzdesine pek etkisinin olmadığı görülmüştür. Tabletın zorla bozundurma çalışmalarında bilinen safsızlıklardan Biopterin, Pterin, S-İzomer, Pteridin tespit edilebilmiştir. Ancak Neopterin safsızlığı hiçbir bozundurma koşulunda tespit edilememiştir ve bununla beraber bazı bilinmeyen safsızlıklar oluşmuştur.

Bozundurma sonucu, bozunan Sapropterin Dihidroklörür, oluşan bilinen safsızlıklar ve bilinmeyen safsızlıklar için pik saflığı bakılmış ve piklerin saf olduğu tespit edilmiştir. Bozundurulmuş ve bozundurulmamış tablet içeriğindeki Sapropterin Dihidroklörür miktarı karşılaştırılmıştır. Sapropterin Dihidroklörür oksidatif bozundurma çalışmasında %17,98 safsızlık oluşmuş ve %99,52 verim elde edilmiştir. Baz ile bozundurma çalışmasında %13,04 safsızlık oluşmuş ve %97,75 verim elde edilmiştir. Asit ile bozundurmada %0,43 safsızlık oluşmuş ve %98,08 verim elde edilmiştir. Nem ile bozundurmada %1,02 - %3,08 arasında safsızlık oluşmuş ve %99,42 ile %99,28 arasında verim elde edilmiştir. Isı ile bozundurmada %0,07 - %2,08 arasında safsızlık oluşmuş ve %98,90 verim elde edilmiştir. Işık ile bozundurmada safsızlık yüzdesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bununla birlikte kritik değer olan %85'in üzerinde elde edilen verimler geliştirilen yöntemin stabilite göstergeli olduğunun kanıtıdır.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında Sapropterin Dihidroklörür, proses ve bozunma safsızlıklarının bir arada tayini için geliştirilen ve geçerliliği kanıtlanan stabilite göstergeli HPLC yönteminin, kalite kontrol ve Ar-Ge laboratuvarlarında duyarlı, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

- [1] A. Tokatlı, *Bilim Teknik*, vol. 392, pp. 60–61, Jul. 2000.
- [2] R. E. Özçelik, L. Çiftçi, K. Çetin, F. Öztürk, N. Arslan, “Klasik fenilketonüri tanılı olgularda fenilalaninden kısıtlı diyetin antropometrik ölçümler üzerine etkisi,”
- [3] G. Yıldız, “Fenilketonüri (pku) hastaları için üretilen düşük proteinli yoğurt ikamesinin fizikokimyasal mikrobiyolojik ve duyuşal özelliklerinin belirlenmesi,” M.S. thesis, Namık Kemal Üniversitesi, 2019.
- [4] T. Küçükkasap, “Türkiye’de fenilketonüri hastalığında tanı, tedavi, izlem ve uygulamaların saptanması,” 2013.
- [5] B. Erdal, Z. Caferoğlu, “Fenilketonüride yeni bir tedavi: Pegvaliasa,” *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, vol. 5, no. 1-2, pp. 42–53, 2018.
- [6] A. Van Wegberg *et al.*, “The complete european guidelines on phenylketonuria: Diagnosis and treatment,” *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 12, no. 1, pp. 1–56, 2017.
- [7] M. Pehlivan, İ. Kalkan, “Fenilketonüri: Olgu sunumu,” *Aydın Sağlık Dergisi*, vol. 2, no. 2, pp. 57–62, 2016.
- [8] C. PKU, A. Disorders, *Written brief of canadian pku and allied disorders*, Presented to the Standing Committee on Health, Nov. 2020.
- [9] S. Bay, “Bölgemizdeki fenilketonüri hastalığının ve tedavisinin ailelerin ve fenilketonürlü çocukların yaşam kaliteleri üzerine olan etkisinin araştırılması,” 2019.
- [10] R. Cerone, G. Andria, M. Giovannini, V. Leuzzi, E. Riva, A. Burlina, “Testing for tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency,” *Advances in therapy*, vol. 30, pp. 212–228, 2013.
- [11] B. Arabacı, “Determination of sapropterin dihydrochloride in solid dosage forms by visible spectroscopy,” M.S. thesis, Middle East Technical University, 2019.
- [12] G. M. E. Harris, “Identification of pharmacological chaperones for phenylalanine hydroxylase. a virtual screening approach to discover novel drug candidates for treatment of phenylketonuria,” M.S. thesis, The University of Bergen, 2014.
- [13] W. B. Hanley, “Phenylketonuria (pku)—a success story,” *Latest findings in intellectual and developmental disabilities research*, 2012.

- [14] P. Bagchi, S. Visvikis-Sieste, A. Kar, "Establishing a remedy for phenylketonuria disease from indian ayurvedic herbs," *J Biomol Res Ther*, vol. 8, p. 177, 2019.
- [15] H. R. Shoraka, A. A. Haghdoust, M. R. Baneshi, Z. Bagherinezhad, F. Zolala, "Global prevalence of classic phenylketonuria based on neonatal screening program data: Systematic review and meta-analysis," *Clinical and experimental pediatrics*, vol. 63, no. 2, p. 34, 2020.
- [16] O. Hausmann *et al.*, "Pegvaliase: Immunological profile and recommendations for the clinical management of hypersensitivity reactions in patients with phenylketonuria treated with this enzyme substitution therapy," *Molecular genetics and metabolism*, vol. 128, no. 1-2, pp. 84–91, 2019.
- [17] H. Altunhan, Y. FH, "Yenidoğanın değerlendirilmesi ve yenidoğan taramaları," *Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics*, vol. 9, no. 1, pp. 28–32, 2018.
- [18] E. Akpınar, "Aile hekimliğinde güncel yaklaşımlar," 2019.
- [19] P. Kudretoğlu, "Fenilalanin metabolizma bozukluğu olan olguların bh4 yükleme testine cevaplılığı ve moleküler analizlerle ilişkisinin retrospektif incelenmesi," Ph.D. dissertation, Bursa Uludag University (Turkey), 2020.
- [20] Ö. K. Büyükkurt, "Fenilketonüri hastalarına yönelik fenilalanin içeriği azaltılmış bir un geliştirilmesi," 2017.
- [21] C. Akal, "Fenilketonüri hastalarında genotip-fenotip ilişkisi," 2019.
- [22] Ö. Sökmen, "Fenilketonüri hastaları (pku) ve çölyak hastaları için bisküvi üretimi," M.S. thesis, Bursa Teknik Üniversitesi, 2018.
- [23] J. Vockley *et al.*, "Phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis and management guideline," *Genetics in medicine*, vol. 16, no. 2, pp. 188–200, 2014.
- [24] M. H. Müslümanoğlu *et al.*, "Fenilketonüri hastalığında prenatal-postnatal tanıda vntn bağlantısı ve direkt mutasyon analizleri birlikteliğinin avantajları," *Kocatepe Tıp Dergisi*, vol. 5, no. 1, 2004.
- [25] Ö. Yılmaz, "Fenilketonüri bireylerde diyet fenilalanin toleransının değerlendirilmesi," 2017.
- [26] N. A. Elhawary *et al.*, "Genetic etiology and clinical challenges of phenylketonuria," *Human genomics*, vol. 16, no. 1, pp. 1–17, 2022.
- [27] T. Coşkun, M. Çoker, N. Mungan, H. GÖKMEN ÖZEL, S. SİVRİ, "Recommendations on phenylketonuria in turkey," *Turkish Journal of Pediatrics*, vol. 64, no. 3, 2022.
- [28] A. C. Muntau *et al.*, "International best practice for the evaluation of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 127, no. 1, pp. 1–11, 2019.
- [29] H. Bakkali Aissaoui, "Metabolomics in phenylketonuria disease: A systematic review," 2021.

- [30] F. Ovalı, “Yenidoğan taramaları,” *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, vol. 11, no. 4, pp. 193–199, 2019.
- [31] M. Karaca, H. Kazanasmaz, “Fenilalanin ve tirozin düzeyinin plazma ve kuru kan damlası örneklerinde karşılaştırılması,” *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, vol. 16, 2018.
- [32] İ. Ülker, N. Şanlıer, “Fenilketonüride beslenme ve yeni tedavi yaklaşımları,” *Güncel Pediatri*, vol. 16, no. 2, pp. 187–198, 2018.
- [33] N. Longo *et al.*, “Evidence-and consensus-based recommendations for the use of pegvaliase in adults with phenylketonuria,” *Genetics in Medicine*, vol. 21, no. 8, pp. 1851–1867, 2019.
- [34] J. Page, “New drug evaluation: Pegvaliase-pqpz injection, subcutaneous,” 2012.
- [35] P. Strisciuglio, D. Concolino, “New strategies for the treatment of phenylketonuria (pku),” *Metabolites*, vol. 4, no. 4, pp. 1007–1017, 2014.
- [36] C. S. Brown, U. Lichter-Konecki, “Phenylketonuria (pku): A problem solved?” *Molecular genetics and metabolism reports*, vol. 6, pp. 8–12, 2016.
- [37] N. Al Hafid, J. Christodoulou, “Phenylketonuria: A review of current and future treatments,” *Translational pediatrics*, vol. 4, no. 4, p. 304, 2015.
- [38] K. J. Adolfsen *et al.*, “Improvement of a synthetic live bacterial therapeutic for phenylketonuria with biosensor-enabled enzyme engineering,” *Nature communications*, vol. 12, no. 1, p. 6215, 2021.
- [39] J. C. Rocha *et al.*, “Development of a practical dietitian road map for the nutritional management of phenylketonuria (pku) patients on pegvaliase,” *Molecular genetics and metabolism reports*, vol. 28, p. 100771, 2021.
- [40] D. S. Regier, A. Bık, H. Bausell, E. O’Reilly, L. M. Cowser, “Starting the conversation on gene therapy for phenylketonuria: Current perspectives of patients, caregivers, and advocates,” *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, vol. 31, p. 100855, 2022.
- [41] M. Lah *et al.*, “Real-world treatment, dosing, and discontinuation patterns among patients treated with pegvaliase for phenylketonuria: Evidence from dispensing data,” *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, vol. 33, p. 100918, 2022.
- [42] R. Eavri, H. Lorberboum-Galski, “Novel approaches to the therapy of phenylketonuria,” *Annales Nestlé (English ed.)*, vol. 68, no. 2, pp. 70–77, 2010.
- [43] G. González, M. Á. Herrador, “A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 3, pp. 227–238, 2007.
- [44] S. Striepeke, E. R. Jurecki, C. S. Hornfeldt, S. Turbeville, B. Prince, “In vitro stability of sapropterin dihydrochloride from crushed tablets mixed in applesauce, pudding, and infant formula,” *ICAN: Infant, Child, & Adolescent Nutrition*, vol. 1, no. 5, pp. 267–270, 2009.

- [45] I. C. on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), *Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances. q6a*, <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, Geneva, Switzerland: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1999.
- [46] Anonymous, *Ich harmonized tripartite guideline q2 (r1), validation of analytical procedures: Text and methodology*, <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, International Conference on Harmonization (ICH), 1996.
- [47] Anonymous, *Ich harmonized tripartite guideline q1b, stability testing: Photo-stability testing of new drug substances and products*, <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>, International Conference on Harmonization (ICH), 1996.
- [48] U. V. Prasad, B. K. Ramu, "Assay of sapropterin dihydrochloride in tablet dosage form using aromatic aldehyde," *Sumerianz Journal of Scientific Research*, vol. 2, no. 5, pp. 78–82, 2019.
- [49] A. Khan, M. Bhojani, M. Rajput, R. Ponnuri, "Tandem mass spectrometry method for direct determination of tetrahydrobiopterin-an enzyme cofactor in human plasma,"
- [50] H. R. Kim, T.-H. Kim, S.-H. Hong, H.-G. Kim, "Direct detection of tetrahydrobiopterin (bh4) and dopamine in rat brain using liquid chromatography coupled electrospray tandem mass spectrometry," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 419, no. 4, pp. 632–637, 2012.
- [51] S. R. Winn, T. Scherer, B. Thöny, C. O. Harding, "High dose sapropterin dihydrochloride therapy improves monoamine neurotransmitter turnover in murine phenylketonuria (pku)," *Molecular genetics and metabolism*, vol. 117, no. 1, pp. 5–11, 2016.
- [52] E. Scudellaro, L. Tartaglione, F. Varriale, C. Dell'Aversano, O. Taglialatela-Scafati, "Hplc-based analysis of impurities in sapropterin branded and generic tablets," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 4, p. 323, 2020.
- [53] C. Heintz, H. Troxler, A. Martinez, B. Thöny, N. Blau, "Quantification of phenylalanine hydroxylase activity by isotope-dilution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry," *Molecular genetics and metabolism*, vol. 105, no. 4, pp. 559–565, 2012.
- [54] P. J. Pathi, N. A. Raju, G. Parvathalu, "The estimation of sapropterin dihydrochloride in tablet dosage form by rp-hplc.," *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 2, no. 4, pp. 110–113, 2012.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirisi

1. N. Arslan, B. D. Çorbacıoğlu, “Saproterin Dihidroklorür’ün Proses ve Bozunma Safsızlıklarının Belirlenmesi İçin Stabilité Göstergeli Bir HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu,” *International Topkapı Congress 3*, İstanbul, pp. 658-659, 1-2 Mayıs 2024.

