

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SİLDENAFİL VE DAPOKSETİN'İN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
İLE YANYANA ANALİZİ**

CEM SARIOĞLU

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

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Cem Sarioğlu tarafından Prof Dr Serap SAĞLIK ASLAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Sildenafil ve dapoksetin'in yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yanyana analizi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 08/12/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof Dr Zeynep AYDOĞMUŞ
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

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



Jüri

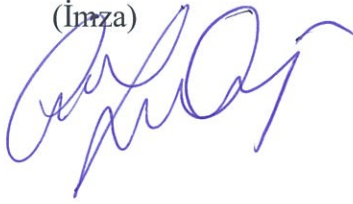
Doç Dr Gülcemal YILDIZ
İTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

BEYAN

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

CEMSARIOĞLU

(İmza)



İTHAF

Eşim Ayla , kızım Defne ve aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a,

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim

Yüksek lisans eğitimim boyunca anlayış ve desteğini esirgemeyen şirketim Deva İlaç ve yöneticilerim Emine Demiryürek ve çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman her koşulda olduğu gibi yine desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan sevgili eşime ve canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sildenafil Sitrat	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Farmakolojisi	4
2.1.2.1. Farmakodinamik Özellikler	4
2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikler	7
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	8
2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri.....	8
2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri.....	9
2.2. Dapoksetin Hidroklorür	10
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	10
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri	11
2.2.2.1. Farmakodinamik Özellikler	11
2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikler	14
2.2.3. Analiz Yöntemleri.....	17
2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri.....	17
2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri.....	18
2.3. Sıvı Kromatografisi Sistemleri	18

2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	18
2.3.2. Autosampler (Otomatik Örnekleyici)	20
2.3.2.1. Hareketli (Mobil) Faz.....	21
2.3.3. Pompa.....	21
2.3.4. Kolon.....	22
2.3.5. Dedektör.....	22
2.4. HPLC Analizlerinin Değerlendirilmesi	22
2.5. Sistem Uygunluk Testi.....	23
2.6. Validasyon Parametreleri	24
2.6.1. Spesifiklik ve Seçicilik.....	24
2.6.2. Doğrusallık.....	24
2.6.3. Doğruluk	24
2.6.4. Kesinlik	25
2.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	25
2.6.6. Sağlamlık	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	27
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	27
3.1.2. Çözeltiler.....	27
3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi	27
3.1.2.2. Sildenafil Çözeltileri:	27
3.1.2.3. Dapoksetin Çözeltileri.....	28
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler	29
3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi	31
3.4. Sildenafil ve Dapoksetin'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme.....	32
3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi	32
3.4.2. Hareketli Faz Seçimi.....	32
3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	32
3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	33

3.5.1. Spesifiklik, Seçicilik	33
3.5.2. Doğrusallık.....	33
3.5.3. Doğruluk	33
3.5.4. Kesinlik	34
3.5.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	34
3.5.6. Sağlamlık	35
3.6. Tabletlerde Sildenafil ve Dapoksetinin Analizi	35
3.6.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması.....	35
3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Tabletlerin Analizi	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Sildenafil ve Dapoksetin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Yanyana Analiz Sonuçları.....	37
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	37
4.2. Yöntem Validasyonu	38
4.2.1. Seçicilik.....	38
4.2.2. Doğrusallık.....	39
4.2.3. Doğruluk	42
4.2.4. Kesinlik	43
4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları	47
4.2.6. Sağlamlık	48
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.....	23
Tablo 3-1: Sildenafil için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	28
Tablo 3-2: Dapoksetin için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı.....	29
Tablo 3-3: Ekipmanlar.....	29
Tablo 3-4: Destek ekipmanlar	30
Tablo 3-5: Cam Malzemeler.....	31
Tablo 4-1: Sildenafil için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	41
Tablo 4-2: Dapoksetin için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları.....	41
Tablo 4-3: Sildenafil için Doğruluk (Geri Kazanım) Hesaplamaları ve Sonuçları.....	42
Tablo 4-4: Dapoksetin için Doğruluk Doğruluk (Geri Kazanım) Hesaplamaları ve Sonuçları.....	43
Tablo 4-5: Sildenafil ve Dapoksetin için Sistem Kesinliği Hesaplamaları ve Sonuçları.....	44
Tablo 4-6: Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Film Tablet'e ait Tekrarlanabilirlik(Kesinlik) Hesaplamaları ve Sonuçları.....	45
Tablo 4-7 Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Film Tablet'e ait Sildenafil için Ara Kesinlik Hesaplamaları ve Sonuçları.....	46
Tablo 4-8 Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Film Tablet'e ait Dapoksetin için Ara Kesinlik Hesaplamaları ve Sonuçları.....	47
Tablo 4-9 Akış Hızı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler.....	48
Tablo 4-10 Hareketli faz tampon/organik oranı değişimindeki sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler.....	49
Tablo 4-11 Kolon marka değişimindeki sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler.....	49

Tablo 4-12 Oda sıcaklığında ve + 4° C’de bekletilen SildenafilveDapoksetin standart ve numune çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçları.....49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Sildenafil Sitrat kimyasal formülü	3
Şekil 2-2 Sildenafil Sitratın 0.5 mg/mL konsantrasyonda asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında 200-800 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	4
Şekil 2-3 Dapoksetin Hidroklorür'ün kimyasal formülü.....	10
Şekil 2-4 Dapoksetin 0.3 mg/mL konsantrasyonda asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında 200-800 nm aralığında alınmış UV spektrumu.....	11
Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram	19
Şekil 2-6: HPLC sistemi	20
Şekil 4-1: 0.5 mg/mL sildenafil ve 0.3 mg/mL dapoksetin karışımına ait örnek kromatogram.....	37
Şekil 4-2: Hareketli faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	38
Şekil 4-3: Plasebo çözeltisine ait kromatogram.....	38
Şekil 4-4: Sildenafil pikine ait saflık spektrumu.....	39
Şekil 4-5: Dapoksetin pikine ait saflık spektrumu.....	39
Şekil 4-6: Sildenafilin 0.25-0.75 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	40
Şekil 4-7: Dapoksetinin 0.15-0.45 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SIL: Sildenafil

DAP: Dapoksetin

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

C_{MAX}: Maksimum plazma konsantrasyonu

T_{MAX}: Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşılan süre

AUC: Biyoyararlanım ölçümlerinde eğri altında kalan alan

SSRI: Selektif Serotonin Gerilim İnhibitörleri

PE: Prematür Ejakülasyon

ED: Erektile Disfonksiyon

PDE-5: Spesifik Fosfodiesteraz tip 5

sGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

EAA: Eğri Altındaki Alan

CV: Standart Sapma

ESI: Elektrospray İyonlaştırıcı

LC: Sıvı Kromatografisi

DLLME: Dispersif Sıvı Sıvı Mikroekstraksiyonu

IL: İyonik Sıvılara Dayalı Geri Ekstraksiyon

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

NMR: Nükleer Manyetik Rezonans

LPGi: Lateral Pragiggantoseleüler Nükleus

PNMRD: Putendal Motor Nöron Refleks Desarj

IELT: Vajinal Penetrasyon İnvajinal Ejakülasyon İçin Geçen Süre

DESS: İlacı Bırakmada Ortaya Çıkan Semptomlar

KD: Dağılım Sabiti

UHPLC: Ultra Hızlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UPLC: Ultra Hızlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV: Ultraviyole

PEEK: Polietereterketon

USP: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi

EP: Avrupa Farmakopesi

FDA: Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

LOD : Teşhis Sınırı

LOQ: Tayin sınırı

MS : Kütle Spektrometrisi

MEC : Miseller Elektrokinetik Kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

DAD: DiyotSerili Dedektörü

MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrisi

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

S/N : Sinyal/ Gürültü Oranı



ÖZET

Sarıoğlu, C. (2017). Sildenafil ve Dapoksetinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Yanyana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Sildenafil ve dapoksetinin tablet dozaj formundaki yanyana tayini için yeni bir izokratik HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Kromatografik ayrılma, ters fazlı C₁₈ kolonda; sodyumfosfat tamponu(0.1 g Sodyum dihidrojen fosfat ve 0.5 g disodyum hidrojen fosfat 400 mL su)(pH 9.5): asetonitril (30:70, h/h) hareketli fazı ile 1.3 mL/dakika akış hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz dalga boyu 228nm' ye ayarlanmıştır. Alıkonma zamanları sildenafil için 2.7 dakika dapoksetin için 6.1 dakika olarak bulunmuştur. Analiz edilen etken maddelerin doğrusal çalışma aralıkları sildenafil için 0.25-0.75 mg/mL ve dapoksetin için 0.15-0.45 mg/mL olarak saptanmıştır. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri ise sırası ile ; sildenafil için 0.318 µg/mL ve 1.060 µg/mL, dapoksetin için 0.316 µg/mL ve 1.053µg/mL' dir. Geri kazanım yüzdeleri sildenafil için %99.07-%100.37, dapoksetin için %99.43-%100.11 olarak bulunmuştur. Yöntem, sildenafil ve dapoksetinin tabletlerde yanyana analizi için uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem basit, hızlı, seçici ve tekrarlanabilir ve ilaç sanayinde sildenafil ve dapoksetinin yanyana analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler : Sildenafil, Dapoksetin, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Tablet Analizi.

ABSTRACT

Sarioğlu, C. (2015 Simultaneous Determination of Sildenafil and Dapoxetine by High-Performance Liquid Chromatographic Method, Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. Istanbul.

In this study, a new isocratic high performance liquid chromatographic method was developed and validated for simultaneous analysis of sildenafil and dapoxetine in tablet dosage form. Chromatographic separation was achieved with a mixture of Acetonitrile: Phosphate buffer pH-9.5 in the ratios 70:30, v/v as the mobile phase and a C18 column. The detection wavelength was adjusted to 228 nm. Retention times were found as 2.7 min for sildenafil and 6.1 min for dapoxetine. The linear concentration ranges were 0.25-0.75 mg / mL for sildenafil and 0.15-0.45 mg / mL for dapoxetine. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) values were 0.318 µg / mL and 1.060 µg / mL for sildenafil, 0.316 µg / mL and 1.053 µg / mL for dapoxetine, respectively. Recovery percentages were found to be 99.07-100.37% for sildenafil and 99.43-100.11% for dapoxetine. The method was applied to simultaneous analysis of sildenafil and dapoxetine in tablet dosage form. The proposed method is simple, rapid, selective and reproducible. It can be recommended to be used for simultaneous analysis of sildenafil and dapoxetine in pharmaceutical industry.

Keywords: Sildenafil,Dapoxetine,High-performance liquid chromatography, Tablet analysis.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erkekler ve partnerlerinde distres oluşturan prematür ejakülasyon (PE), cinsel işlev bozukluklarının en yaygın olarak görülenidir. Dünya üzerindeki erkeklerin yaklaşık olarak %20 ile %40 kadarı yaşamlarının bir döneminde semptomlar ile karşılaşmaktadırlar. Bu disfonksiyon ile hayat boyu veya edinsel olarak karşılaşabilmektedirler. Hayat boyu olan form sıklıkla ilk cinsel karşılaşmadan itibaren her bir partner ile cinsel birleşme girişiminde olan prematür ejakülasyon ile karakterize iken, edinsel olan formu daha önce normal ejakülasyon yaşamış bireylerde yaşamın bir döneminde karşılaşılan bir takım ürolojik veya psikolojik problemlerle ilişkili olarak gelişmektedir [1].

Yapılan çalışmalar ve klinik gözlemler PE'si olan erkeklerin büyük çoğunluğunda erektil disfonksiyon (ED) da olduğunu göstermektedir. Bu konuda 12134 erkeğin katıldığı ABD, Almanya ve İtalya'yı kapsayan geniş bir anket çalışmasında katılımcıların %7.2'sinin hem PE hem de ED kriterlerini kaşıladıkları bulunmuştur. PE'si olan tüm erkeklerin %32'si aynı zamanda ED bildirirken ED'si olan erkeklerin %44'ünde aynı zamanda PE bildirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları PE ve ED cinsel bozukluklarının azımsanmayacak kadar sık bir şekilde birlikte görüldüğünü desteklemektedir [1].

Azımsanmayacak kadar sık görülen PE ve ED birlikteliğinin tedavisinde PDE-5 inhibitörleriyle DAP kombinasyonu güncel araştırma konularındandır. Üzerinde durulan kombinasyon tedavilerinden biri de sildenafil (SIL)– dapoksetin (DAP) kombinasyonudur. Bu kombinasyonun seçilmesinin altında yatan temel nedenlerinden birisi de SIL ve DAP in çalışmalarda klinik olarak anlamlı farmakokinetik ilaç etkileşimine girmemesidir.

SIL ve DAP farmasötik preparatlardaki analizleri incelendiğinde bu iki ilacın yanyana analizi için literatürlerde UV spektrofotometrisi [2], yüksek performanslı sıvı kromatografisi [3] ve sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi [4] yöntemleri olmak üzere 3 adet çalışmaya rastlanmıştır.

Kütle spektroskopisi [4] yönteminin pahalı bir teknik olması ve her laboratuvarında bulunmaması sebebiyle, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile geliştirilen metot kullanılması daha ekonomik ve pratiktir.

UV spektrofotometrisi [2] yönteminin ise stabilite gösterir bir yöntem değildir. Kullanılan tekniğin doğası gereği farmasötik preparat içerisindeki bileşenlerden tam bir ayırım gerçekleştirilmeden analiz edilmektedir.

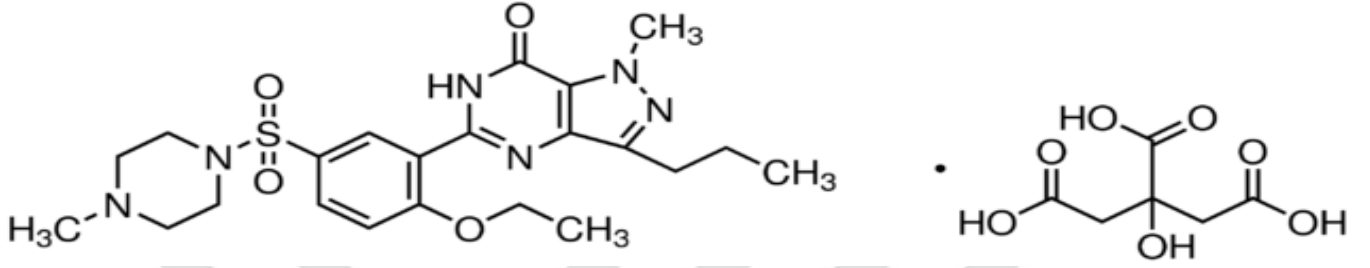
Literatür araştırmasında bulunan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde [3] ise, analiz hazırlığının daha zor olması ve esnek olmaması, metotta kullanılan kolon gibi analiz sarf malzemelerinin daha az ömürlü olması sebebiyle; yeni bir HPLC yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kolay uygulanabilir, her analiz laboratuvarında kolayca bulunabilir, ekonomik, basit malzemeler ile çalışılan, seçici, kesin, doğru ve güvenilir olan, UV dedeksiyona dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi prensibine dayanan metodun geliştirilmesi ve bu geliştirilen metodun ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine uygulanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

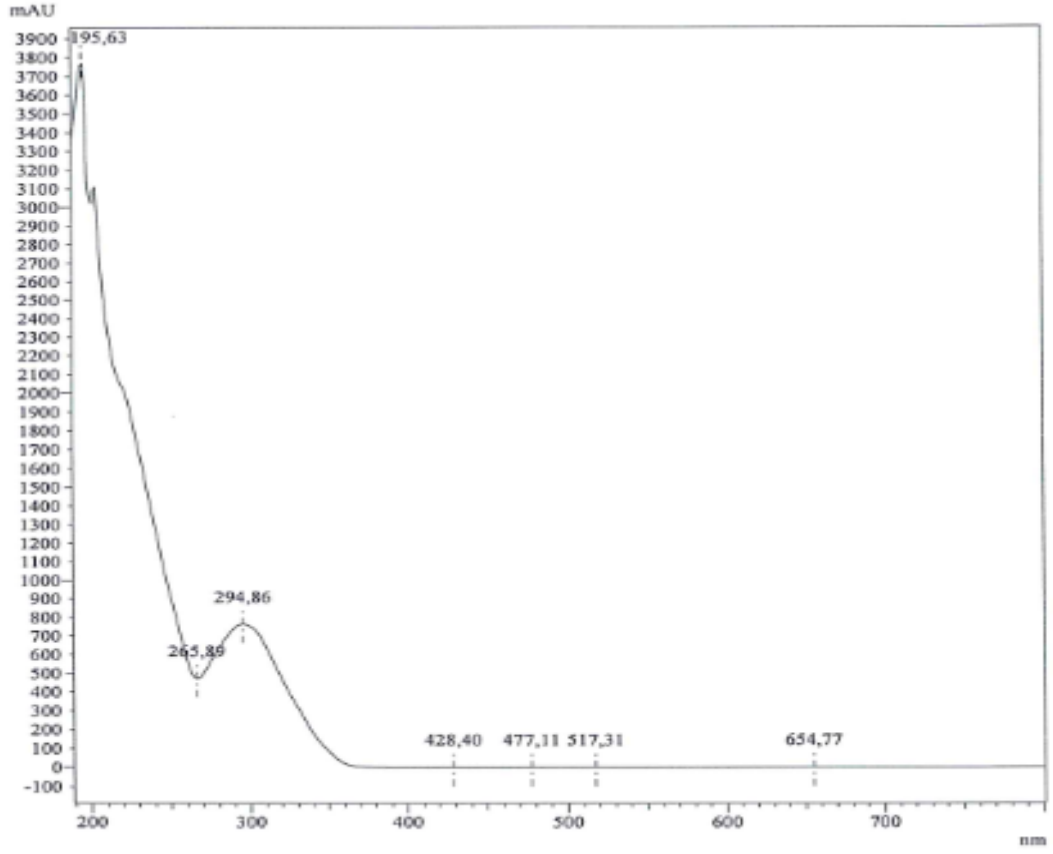
2.1. Sildenafil Sitrat

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1 Sildenafil Sitrat kimyasal formülü

Sildenafil Sitrat'ın kimyasal adı 5-{2-Etoksi-5-[(4-metil-1-piperazin)sulfonil]fenil}-1-metil-3-propil-1,4-dihidro-7H-pirazol [4,3-d]pirimidin-7-on 2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksilat (1:1) olup kapalı formülü C₂₈H₃₈N₆O₁₁S dır. Molekül ağırlığı, 667 g/mol'dür. Beyaz veya beyaza yakın, az higroskopik kristal bir toz olan Sildenafil Sitrat suda ve metanolde az çözünür, hekzanda çözünmez[5]. Erime derecesi 186-188°C arasındadır [6]. Maddenin asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında alınmış UV spektrumu Şekil 2-2'de görülmektedir.



Şekil 2-2 Sildenafil Sitartın 0.5 mg/mL konsantrasyonda asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında 200-800 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

2.1.2.1. Farmakodinamik Özellikler

Viagra film tablet kısa ürün bilgisinde belirtildiği üzere;

“Farmakoterapötik Grup: Erektile disfonksiyonda kullanılan ilaçlar; Fosfodiesteraz İnhibitörleri”

“ATC Kodu: G04B E03”

“SİL, erektil disfonksiyon için oral bir tedavidir. Seksüel stimülasyona doğal bir cevap sonucu penise kan akımını artırarak bozulmuş erektil fonksiyonu düzeltir. Penisin ereksiyonunu sağlayan fizyolojik mekanizma seksüel stimülasyon esnasında corpus kavernosumdan nitrik oksit (NO) serbest bırakılmasını gerektirir. Daha sonra nitrik oksit guanilat siklaz enzimini aktive eder ve bu siklik guanozin monofosfat (sGMP)

düzeyinde artış ile sonuçlanır ki, böylece korpus kavernosumdaki düz kasların gevşemesi ve kanın korpus kavernosum içine dolması sağlanmış olur. SIL, korpus kavernosumdaki sGMP'nin degradasyonundan sorumlu sGMP'ye spesifik fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) enziminin potent ve selektif bir inhibitörüdür. SIL, ereksiyon üzerine periferik bir etki yerine sahiptir. SIL'ın izole insan korpus kavernosumunda direkt bir gevşetici etkisi yoktur ancak bu doku üzerinde bulunan nitrik oksidin gevşetici etkisini artırma potansiyeline sahiptir. Seksüel stimülasyon ile olduğu gibi, NO/sGMP yolu aktive olduğunda, SIL'ın PDE5 enzimini inhibe etmesi korpus kavernosumdaki sGMP seviyelerinde artışa sebep olur. Bu sebeple SIL'ın amaçlanan faydalı farmakolojik etkilerini gösterebilmesi için seksüel stimülasyon gereklidir. Farmakodinamik etkiler In vitro çalışmalar SIL'ın ereksiyon prosesinde rol oynayan PDE5'e seçici olduğunu göstermiştir. Diğer fosfodiesterazlara kıyasla PDE5 üzerine etkisi daha güçlüdür. Retinadaki fototransdüksiyon yolağında rol oynayan PDE6'ya kıyasla 10 kat daha fazla selektiftir. Önerilen maksimum dozlarda PDE1'e kıyasla 80 kat, PDE 2, 3, 4 7, 8, 9, 10 ve 11'e kıyasla 700 kat daha selektiftir. SIL özellikle kardiyak kontraktilite kontrolünde rol alan cAMPspesifik fosfodiesteraz izoformu olan PDE3'e kıyasla PDE5 üzerine 4000-kattan daha büyük bir selektifliğe sahiptir Klinik etkililik ve güvenlilik: SIL'ın seksüel stimülasyona cevap olarak ereksiyon oluşturma zaman aralığının değerlendirilmesi amacı ile iki klinik çalışma düzenlenmiştir. Hastalarda aç karnına yapılan penil pletismograf (RigiScan) çalışmasında, SIL alınması sonucunda, seksüel birleşme için yeterli kabul edilen %60 oranındaki ereksiyon sertliğinin sağlanmasına kadar geçen süre ortalama 25 dakika olmuştur. (12 – 37 dakika). Başka bir RigiScan çalışmasında, SIL'ın, uygulamadan sonraki 4.-5. saatlerde bile seksüel stimülasyona bağlı ereksiyon oluşturma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. SIL, kan basıncında hafif ve geçici düşmelere sebep olur, ancak vakaların çoğunda bu klinik bir etki oluşturmaz. 100 mg oral dozu takiben yatar pozisyonda görülen ortalama maksimum sistolik kan basıncı düşmesi 8.4 mmHg olmuştur. Bu duruma uygun olarak yatar pozisyonda diastolik basınç değişmesi 5.5 mmHg olmuştur. Kan basıncındaki bu azalmalar SIL'ın vasodilatör etkileri ile uyumludur ki bu vasodilatasyonun sebebi büyük olasılıkla vasküler düz kaslardaki artmış sGMP seviyesidir. Sağlıklı gönüllülerde 100 mg'a kadar olan SIL'ın oral yolla tek doz uygulanması sonucunda EKG'de klinik olarak anlamlı hiçbir etki oluşturmamıştır. Tek bir oral doz 100 mg SILin hemodinamik etkileri üzerine, ciddi koroner arter rahatsızlığı olan 14 hastada (en azından bir koroner

arterde \geq %70 stenoz mevcuttu) yapılan bir çalışmada, dinlenme halindeki ortalama sistolik ve diyastolik kan basıncı, taban değerlere kıyasla sırasıyla % 7 ve % 6 azalmıştır. Ortalama pulmoner sistolik kan basıncı % 9 azalmıştır. SIL'in kardiyak output üzerine hiçbir etkisi olmamıştır, stenoz durumundaki koroner arterler içinden kan akışını bozmamıştır. Çift kör plasebo kontrollü bir egzersiz stres çalışmasında, düzenli olarak antianjinal ilaç (nitratlar dışında) kullanan, erektil disfonksiyon ve stabil anjinası olan 144 hasta değerlendirilmiştir. Sonuçlar sınırlayıcı anjinaya kadar olan zamanda SIL ile plasebo arasında klinik olarak anlamlı farklar göstermemiştir. 100 mg dozu takip eden 1 saat içinde Farnsworth - Munsell 100 renk testini kullanan kimi deneklerde renkleri (mavi/yeşil) ayırt edebilmede meydana gelen hafif ve geçici değişiklikler olsa da doz alımından 2 saat sonra hiçbir etki kalmamıştır. Renk ayırd etme mekanizmasında meydana gelen bu değişikliğin retinanın fototransdüksiyon kaskadında yer alan PDE6 enziminin inhibisyonu ile bağlantılı olduğu öngörülmektedir. SIL'in görme keskinliği veya kontrast renkleri seçebilme duyarlılığı üzerine bir etkisi yoktur. Dokümanite edilmiş erken, yaş ile ilgili maküler dejenerasyonu olan (n=9) hastalarda yapılan plasebo kontrollü bir çapraz çalışmada SIL (tek doz 100 mg) iyi tolere edilmiştir ve yapılan görsel testler (görme keskinliği, Amsler grid, renk ayrımı, simüle edilmiş trafik ışığı, Humphrey perimetre ve fotostres) klinik olarak anlamlı hiçbir değişiklik göstermemiştir. Sağlıklı gönüllülerde SILin 100 mg'lık oral tek doz uygulamasından sonra sperm motilitesi veya morfolojisi üzerine bir etki görülmemiştir [7,8].”

“Klinik Çalışmalara Ait Başka Bilgiler: Klinik çalışmalarda, SIL, yaşları 19 ila 87 arasında değişen 8000den fazla hastaya uygulanmıştır. Temsil edilen hasta grupları; yaşlılar (%19.9), hipertansiyonlu hastalar (%30.9), diabetes mellitus (%20.3), iskemik kalp hastalığı (%5.8), hiperlipidemi (%19.8), spinal kord yaralanması (%0.6), depresyon (%5.2), prostatın transüretal reseksiyonu (%3.7), radikal prostatektomi (%3.3). Klinik çalışmalarda tam anlamıyla temsil edilemeyen veya çalışma dışında tutulan gruplar; Pelvik operasyon geçirmiş hastalar, radyoterapi sonrası hastalar, ciddi böbrek veya karaciğer bozukluğu olan hastalar ve aşikar kardiovasküler durumu olan hastalar (Bkz.4.3 Kontrendikasyonlar). Sabit doz çalışmalarında, tedavinin ereksiyonu iyileştirdiğini belirten hasta oranları, plasebo ile %25 olurken, 25 mg ile %62, 50 mg ile %74 ve 100 mg ile %82 olmuştur. Kontrollü klinik çalışmalarda SIL'e bağlı ilacı bırakma oranı plaseboya nazaran aynı veya daha düşük olmuştur. Tüm çalışmalar ele

alındığında, SIL'e bağılı olarak gelişme olduğunu bildiren hastaların oranı; psikojenik erektil disfonksiyon (%84), miks erektil disfonksiyon (%77), organik erektil disfonksiyon (%68), yaşlılar (%67), diyabetli hastalar (%59), iskemik kalp hastalığı (%69), hipertansiyon (%68), prostatın transüretal reseksiyonu (%61), radikal prostatektomi (%43), spinal kord yaralanması (%83), depresyon (%75). Uzun süreli çalışmalarda, SIL'in etkinlik ve emniyeti sürdürülmüştür[7,8].”

2.1.2.2. Farmakokinetik Özellikler

Viagra film tablet kısa ürün bilgisinde belirtildiği üzere;

“Emilim: SIL hızla emilir. Maksimum plazma konsantrasyonuna aç karnına oral alımın 30. ila 120. dakikası arasında ulaşır (ortalama 60 dakika). Mutlak oral biyoyararlanım ortalama olarak %41'dir (%25-%63 arasında değişir). Uygulama sonrası SIL'in EAA ve Cmaks değerleri, tavsiye edilen doz aralığının (25 mg - 100 mg) üzerindeki dozlar ile orantılı olarak artar. SIL yemekle alındığında, absorpsiyon oranı, Tmaks'da ortalama olarak 60 dakikalık bir gecikme ve Cmaks' da ortalama %29'luk bir azalma ile düşer. 45 yaş ve üzeri 36 sağlıklı erkekte yapılan bir çalışmada susuz uygulanan Sildenafil 50 mg ağızda dağılan tablet, Sildenafil 50 mg film kaplı tablet ile biyodeşdeğer bulunmuştur. Aynı çalışmada, Sildenafil 50 mg film kaplı tablet ile karşılaştırıldığında Sildenafil 50 mg ağızda dağılan tablet su ile uygulandığında EAA değişmemiş ancak ortalama Cmaks %14 azalmıştır. Sildenafil ağızda dağılan tabletin yüksek yağ içeren öğünle uygulaması, aç karnına uygulama ile karşılaştırıldığında SIL'in absorpsiyon oranı azalmış, medyan tmaks'ı yaklaşık 3.4 saat gecikmiş ve ortalama Cmax ve EAA sırasıyla yaklaşık %59 ve %12 azalmıştır[7,8].”

“Dağılım: SIL'in dağılıma ait ortalama kararlı durum hacmi 105 L'dir ve bu dokulara dağıldığını gösterir. 100 mg'lık tek bir oral dozu takiben, SIL'in ortalama maksimum toplam plazma konsantrasyonu 440 ng/mL'dir (CV %40). SIL (ve dolaşımdaki majör N-desmetil metaboliti) %96 oranında plazma proteinlerine bağlandığından, bu durum SIL'in 18 ng/mL(38 nM)'lik ortalama maksimum serbest plazma konsantrasyonuna yol açar. Proteinlere bağlanma total ilaç konsantrasyonundan bağımsızdır. 100 mg tek doz SIL alan sağlıklı hastalarda, dozu takip eden 90. dakikada ejakülattaki ilaç dozu uygulanan mevcut dozun %0.0002'sinden azdır. (ortalama 188 ng) [7,8].”

“Biyotransformasyon: SIL özellikle CYP3A4 (majör yol) ve CYP2C9 (minör yol) karaciğer mikrozomal enzimleri ile metabolize edilir. Dolaşımdaki majör metabolit SIL’in N-demetilasyonu ile oluşur. Bu metabolit SIL’e benzer bir fosfodiesteraz seçicilik profiline sahiptir ve PDE5 için in vitro potansi ana ilacın yaklaşık %50’si kadardır. SIL, N-demetilasyon yolu ile dolaşımdaki majör metabolitine dönüşür. Bu metabolitin plazma konsantrasyonları SIL için gözlenenin yaklaşık %40’ıdır. N-desmetil metaboliti de yaklaşık 4 saatlik bir terminal yarı ömür ile metabolize olur[7,8].”

“Eliminasyon: SIL’in 3-5 saatlik terminal faz yarılanma ömrünün bileşkesi olarak vücut klerensi 41L/saattir. Oral veya i.v. uygulanan SIL ağırlıklı olarak metabolitleri halinde feçes ile (uygulanan oral dozun yaklaşık %80’i) ve daha az bir miktarda idrar ile (uygulanan oral dozun yaklaşık % 13’ü) atılır.”

“Doğrusallık/Doğrusal Olmayan Durum: Önerilen doz aralığında SIL’in farmakokinetiği doz ile orantılıdır[7,8].”

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Fejos, ve ark. ilaç ve besin takviyesi örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve UV deteksiyonu ile SIL, Vardenafil ve Tadalafil’in tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon ve 200 mM amonyum asetat ve asetonitril : metanol (1:1) hareketli fazlarını gradient olarak kullanılmış, akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolon fırını sıcaklığı 25 °C’dır. Ölçüm için kullanılan dalga boyu 290 nm, enjeksiyon hacmi 5 µl’dir [9].

Al-Ghazawi ve ark.SIL ve metaboliti N-desmetil SIL’I HPLC ve elektrokimyasal detektör ile insan plazmasında analiz etmişler. C₈150x4.6 mm 5 µm kolonda, asetonitril-metanol-fosfat tamponu (pH:7.68) (18.5:34.5:47.0, v/v/v) çözelti karışımından oluşan hareketli faz ile 27°C’de gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada, SIL için LOQ değeri 7.858 ng/mL ve N-desmetil SIL için 8.675 ng/mL bulunmuştur. [10].

Patterson ve ark. bitkisel toz ve takviye ürünlerinde, SIL ve Vardenafil’in eş zamanlı tanıma analizini, ESI-LC-MS ile gerçekleştirmişlerdir [11].

Xiao, ve ark.insan plazmasında, DLLME-IL-LC-UV tekniklerini kullanarak SIL, Vardenafil ve Aildenafil'in insane plazmada tayinini UV detektör ile yapmışlardır [12].

Sheau. ve ark. insan plazması örneklerinde, SIL analizini sıvı kromatografisi ve UV deteksiyonu kullanarak gerçekleştirmiştir. Bu analiz için C₁₈150x4.6 mm 5 µm kolon ve 30 mM potasyum dihidrojen fosfat pH 6.0 tamponu: asetonitril (45:55) hareketli fazı kullanılmış, akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Ölçüm için kullanılan dalga boyu 230 nm, enjeksiyon hacmi 5 µl'dir Metodun doğrusal aralığı 10-1000 ng/mL olarak tayin edilmiştir [13].

Mikami ve ark., içeceklerde fentolamin ve SIL analizini TLC-LC-MS-PDA ile gerçekleştirmişlerdir [14].

Wang ve ark. .insan plazmasında, LC-MS/MS tekniklerini kullanarak SIL tayini yapmışlardır. Bu analiz için C₁₈50x4.6 mm 5 µm kolon ve 10 mM Amonyum asetat tuzu içeren pH 7.0 tamponu: metanol (15:85) hareketli fazı kullanılmış, akış hızı 0,7 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Metodun doğrusal aralığı 0.25-40 ng/mL olarak tayin edilmiştir [15].

Tripathi ve ark. Plazmada, HPLC ile SIL ve metobiliti olan N-desmetil Sildenafil tayini yapmışlardır. Analizi sıvı kromatografisi ve UV deteksiyonu kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon ve Metanol: Su (85:15) hareketli fazı kullanılmış, akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Ölçüm için kullanılan dalga boyu 230 nm'dir. SIL için alıkonma zamanı 4 dakika olarak bulunmuştur. Metodun doğrusal aralığı 0.1-1.6 µg/mL olarak tayin edilmiştir [16].

2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Bervas Nevado ve ark. , SIL ve metoboliti olan N-Des metil Sildenafil'i insan plazmasında MEC kullanarak analizini yapmışlardır. Çalışmanın lineer aralığı SIL için 0.5-3.5 mg/L, N-Des metil Sildenafil için 0.9-4.6 mg/L olarak bulunmuştur. Her iki madde için teşhis limiti 200 ng/mL olarak tespit edilmiştir. [17].

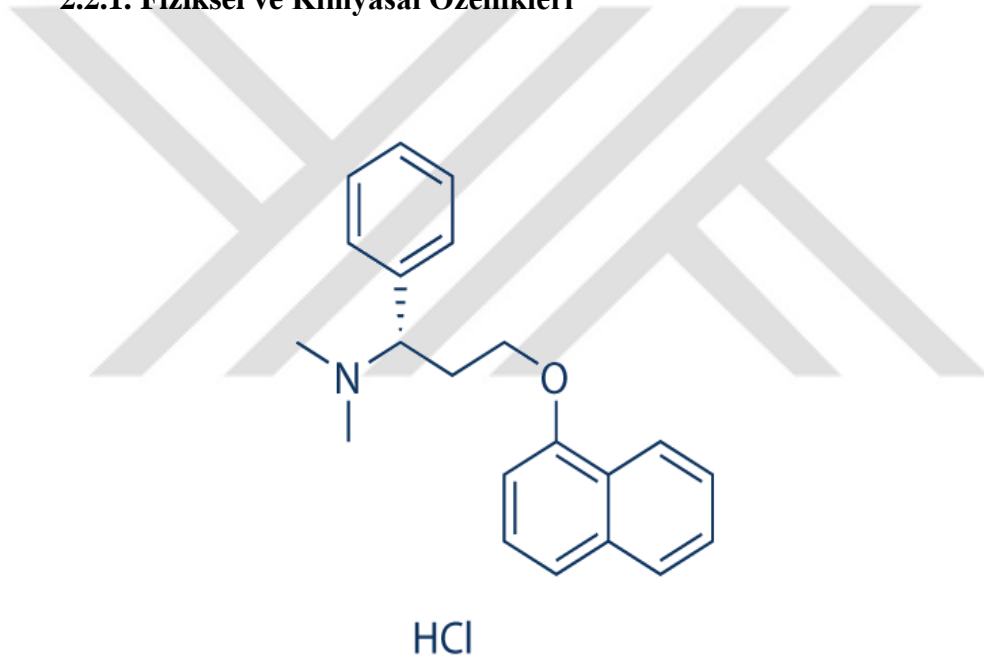
Wang ve ark. , bitkisel ilaç ve gıda takviyesi örneklerinde SIL analizini spektrofotometrik metot kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Analiz 350 nm ve 430 nm'lede gerçekleşmiş olup, SIL için teşhis limiti 0.15 ng/mL'dir. Metodun doğrusal aralığı 0.0003-7.0 µg/mL olarak bulunmuştur [18].

Mokhtar ve ark. .insan plazmasında, GC-MS tekniklerini kullanarak SIL ve metaboliti olan N-desmetil Sildenafil tayini yapmışlardır. Elektron iyonizasyonu ve kimyasal iyonizasyon olmak üzere iki farklı iyonlaştırma tekniği uygulanmıştır. Her iki teknik için alıkonma zamanı 11 dakikadan daha az bulunmuştur [19].

Wawer ve ark. , çözeltilerde, katı preparatlarda ve ilaç dozaj formlarında SIL analizini NMR tekniği ile gerçekleştirmişlerdir [20].

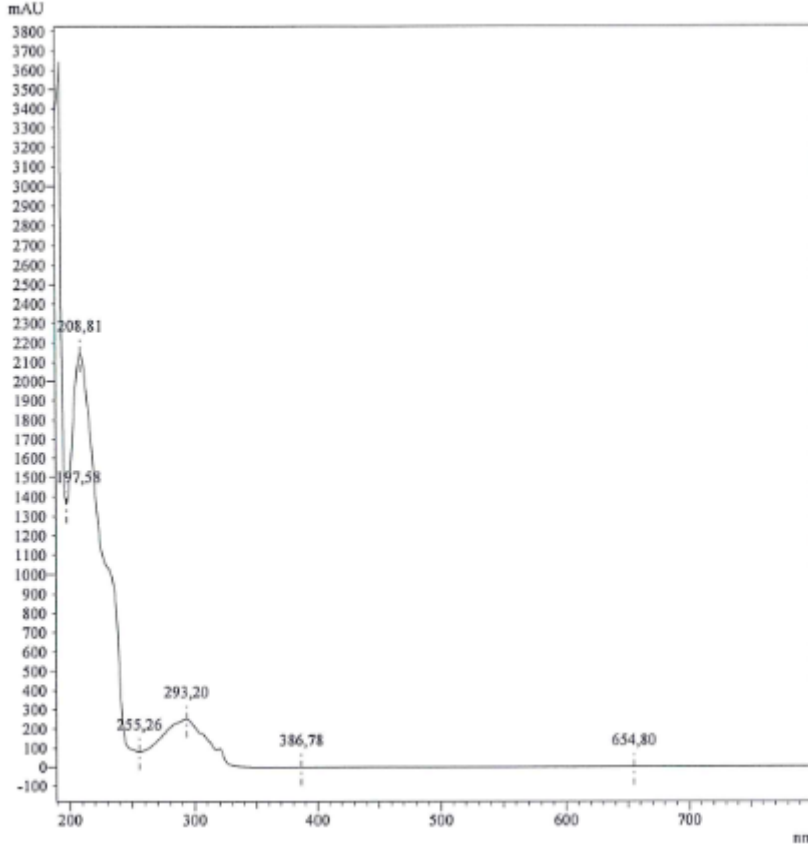
2.2. Dapoksetin Hidroklorür

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-3Dapoksetin Hidroklorür'ün kimyasal formülü

Dapoksetin Hidroklorür kimyasal formülü, (1S)-N,N-dimetil-3-naftalen-1-iloksi-1-fenilpropan-1-amin;hidroklorür,kapalı formülü ise $C_{21}H_{24}ClNO$ dir.Molekül ağırlığı, 342 g/mol'dür. [21].Kristal yapıda tozdur.Erime noktası 180-182°C' dir. pKa değerleri 7,9 ve9,2' dir. Metanol ve suda çözünür[22].Maddenin asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında alınmış UV spektrumu Şekil 2-4' de görülmektedir.



Şekil 2-4Dapoksetin0.3mg/mL konsantrasyonda asetonitril:su (70:30) çözücü karışımında 200-800 nm aralığında alınmış UV spektrumu

2.2.2. Farmakolojik Özellikleri

2.2.2.1. Farmakodinamik Özellikler

Priligy film tablet kısa ürün bilgisinde belirtildiği üzere;

“Farmakoterapötik Grup: Diğer Ürolojikler”

ATC kodu: G04BX14

“DAP”ın prematür ejakülasyondaki etkisinin nöronlardaki serotonin geri alımının inhibisyonu ardından nörotransmitterin presinaptik ve postsinaptik reseptörlerde etkisinin potensiyalize olması yoluyla olduğuna inanılmaktadır. İnsanlarda ejakülasyon esas olarak sempatik sinir sistemince yönetilmektedir. Ejakülasyon yolağı, başlangıç

olarak beyindeki bir dizi nükleusun (medial preoptik ve paraventriküler nükleuslar) etkisi altındaki beyin sapı tarafından yönetilen ve bir spinal refleks merkezinden orijin alır. Sıçanlarda DAP ejakülatuar dışarı fırlatma refleksini, bu etki için gerekli beyin yapısı olan supraspinal seviyedeki lateral paragigantoselüler nükleus (LPGi) üzerinde etki ederek inhibe eder. Seminal vezikülleri, vas deferensi, prostatı, bulboüretal kasları ve mesane boynunu innerve eden postgangliyonik sempatik lifler, bu yapıların koordineli bir şekilde kasılmasını sağlayarak ejakülasyonun oluşmasını sağlar. DAP sıçanlarda bu ejakülatuar refleksi modüle ederek pudental motor nöron refleksi deşarj (PMRD) latensinde uzama ve PMRD süresinde bir azalmaya neden olur [8,23].”

“DAP’ın prematür ejakülasyonun tedavisindeki etkinliği toplam 6081 deneğin randomize edildiği çift kör, plasebo kontrollü beş klinik çalışmayla gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilenler 18 yaş ve üzerideydi, çalışmaya alınmadan önceki 6 aylık dönemdeki cinsel ilişki deneyimlerinin çoğunda bir prematür ejakülasyon hikayesi bulunuyordu. Ek olarak beş çalışmadan dördünde çalışma başlangıcı döneminde cinsel birleşme deneyimlerinin en az % 75’inde intravajinal ejakülasyon gecikme (latens) süresi (IELT; vajinal penetrasyondan intravajinal ejakülasyona kadar geçen süre) 2 dakika veya daha kısaydı. Erektile disfonksiyon dahil diğer cinsel bozuklukların olduğu bireyler ya da prematür ejakülasyon nedeniyle diğer farmakoterapi formlarını kullananlar çalışmalara dahil edilmemiştir. Beş çalışmanın dördünde primer sonlanma noktası olan ortalama IELT, her bir cinsel birleşme epizodunda saat durdurma yöntemiyle ölçülmüştür. Tüm randomize çalışmaların sonuçları birbiriyle uyumlu olarak bulunmuştur. Örnek olarak en uzun tedavi süresinin (24 hafta) olduğu çalışmada, 385’i plasebo, 388’i gerektiğinde 30 mg DAP alacak şekilde ve 389’u gerektiğinde 60 mg DAP alacak şekilde toplam 1162 kişi randomize edilmiştir. Şekil 1’de tüm tedavi gruplarında çalışma başlangıcında ve sonundaki ortalama IELT’leri görülmektedir. Yirmidördüncü haftadaki sonlanma noktasında, ortalama IELT’deki artışlar, her iki DAP grubunda da plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıydı ($p<0.001$) [8,23].”

“IELT’de uzamanın boyutu başlangıçtaki IELT ile ilişkili ve bireyler arasında değişkendi. DAP tedavisinin klinikle ilişkisi aşağıda hastalar tarafından bildirilen yanıt oranlarıyla açıklanmaktadır[8,23].”

“Her iki DAP grubunda yer alanların, plaseboya oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazlasında, 4’üncü haftadan başlayarak 24. haftaya kadar (24. hafta dahil) daha iyi yanıt alınmıştır (Çalışmanın 16. haftasında DAP 30 mg grubuyla plasebo grubu için $p = 0.003$, diğer tüm karşılaştırmalar için $p \leq 0.001$). Bireylerdeki sıkıntıda (streste) anlamlı bir azalma ve hastaların cinsel birleşmeden memnuniyetinde anlamlı bir artış da gözlenmiştir [8,23].”

“Klinik çalışmalarda, aralarında hastaların kendi durumlarını değerlendirmesi için sıklıkla kullanılan durumdaki değişikliğin klinik genel izleniminin de bulunduğu, diğer ikincil hasta tarafından bildirilen sonuçlara ait ikincil sonlanma noktaları da değerlendirilmiştir. Hastalardan çalışmanın başlangıcından itibaren prematür ejakülasyonlarını, “daha fazla iyileşme”den “daha fazla kötüleşme”ye değişen aralıkta karşılaştırmaları istenmiştir. klinik genel izlenim için sonlanma noktalarında plaseboya göre anlamlılık derecesinde nominal anlamlılık 0.05 düzeyinde olacak şekilde (2-yönlü) istatistiksel olarak önemli düzelme görülmüştür[8,23].”

“Prematür ejakülasyonun tedavisi için kronik günlük kullanımda ve gerektiğinde kullanılan DAP 60 mg’ın geri çekilme etkileri, 1238 deneğin randomize edildiği plasebo kontrollü, çift kör ve paralel gruplu bir çalışmayla değerlendirilmiştir. Plasebo ya da 60 mg DAP tedavisini 62 gün boyunca ya günde bir defada ya da gerektiğinde almaya müteakip hastalar, 7 günlük bir dönem daha geri çekilmeyle ilgili değerlendirmeler için izlenmiştir. Tedavinin aniden kesilmesine bağlı geri çekilme etkileri, serotonin geri alım inhibitör tedavisine son verilmesiyle ilişkili semptom ve bulguların klinisyen tarafından puanlandığı bir araç olan “İlacı Bırakmayla Ortaya Çıkan Bulgu ve Semptomlar (Discontinuation Emergent Signs and Symptoms; DESS)” kullanılarak değerlendirilmiştir. Her hasta için, çalışmanın 63. gününden 70. gününe kadar olan haftalık DESS skorunda en az 4 puanlık bir artış olması ilacı bırakmayla ilişkili sendrom olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, DAP tedavisinin aniden kesilmesiyle, ilacın kesilme (geri çekilme) sendromu ile ilişkisine dair kesin bir kanıt bulunamamıştır. DESS skorlarına dayanan ilacı kesme sendromunun oluşmamasıyla uyumlu olacak şekilde, advers olaylarla ilgili veriler de geri çekilmeyle ilgili düşük korelasyon sergilemiştir. İlacın gerektiğinde 30 ve 60 mg dozlarında kullanıldığı 24

haftalık ilaçlı dönemi takiben geri çekilmenin değerlendirildiği 1 haftalık ilaçsız bir dönemden oluşan ikinci bir çift kör klinik çalışmada da benzer sonuçlar görülmüştür[8,23].”

2.2.2.2. Farmakokinetik Özellikler

Priligy film tablet kısa ürün bilgisinde belirtildiği üzere;

Genel Özellikler

“DAP oral uygulama sonrası hızla emilir, hemen tümüyle plazma proteinlerine bağlı olarak hızlı bir dağılıma uğrar, karaciğer ve böbreklerdeki multipl enzim sistemleri tarafından metabolize edildikten sonra idrarla konjuge metabolitler şeklinde elimine edilir. Eliminasyonu hızlıdır ve oral yoldan uygulama sonrası terminal yarılanma ömrü 19.3 saattir[8,23].”

“Emilim: DAP oral uygulama sonrası, tabletin alınmasından sonra yaklaşık 1 saatte maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) ulaşılabilecek şekilde hızla emilir. Mutlak biyoyararlanımı %42’dir (%15 ile %76 arasında; bireyler arası farklılık %38 ve bireyin kendi içindeki farklılık %14 olacak şekilde). Aç karına alınan 30 ve 60 mg’lık tek oral dozlardan sonra, DAP’ın 1.01 saat ve 1.27 saatteki maksimum plazma konsantrasyonları sırasıyla 297 ng/ml ve 498 ng/ml olmuştur. Yağ oranı yüksek yemekle birlikte alınması DAP’ın pik plazma konsantrasyonunu orta derecede (%10) azaltmış, AUC düzeyini orta derecede (%12) arttırmış ve plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanını hafifçe uzatmıştır; buna rağmen, yağ oranı yüksek yemek tüketimiyle emilen miktarda bir değişiklik olmamıştır. Bu değişiklikler klinik olarak anlamlı değildir. DAP yemeklerle birlikte ya da yemek haricinde alınabilir[8,23].”

“Dağılım: In vitro koşullarda DAP’ın % 99’dan fazlası insan serum proteinlerine bağlıdır. DAP 162 litrelik bir ortalama kararlı düzey dağılım hacmiyle hızlı bir dağılıma uğrar. İnsanda intravenöz uygulamayı takiben DAP’ın tahmin edilen ortalama başlangıç, orta ve terminal yarı ömrü sırasıyla 0.10, 2.19 ve 19.3 saattir[8,23].”

“Biyotransformasyon: Yapılan in vitro çalışmalar DAP’ın esas olarak CYP2D6, CYP3A4 ve flavin monooksijenaz (FMO-1) olmak üzere karaciğer ve böbreklerdeki multipl enzim sistemleri ile metabolize olduğu gösterilmiştir. 14C-dapoksetin

metabolizmasını incelemek için dizayn edilmiş bir klinik çalışmada, DAP oral yoldan uygulama sonrasında, N-oksidasyon, Ndemetilasyon, naftil hidrosilasyon, glukuronidasyon ve sülfatlanma şeklinde metabolize olur. Oral uygulama sonrası presistemik ilk geçiş etkisine işaret eden kanıtlar bulunmaktadır. İntakt DAP ve dapoksetin-N-oksit plazmada dolaşan majör maddeler olarak bulunmuştur. Yapılan in vitro çalışmalar, dapoksetin-N-oksit metabolitinin DAP'ın etkisine anlamlı bir katkısının olmadığını gösterecek şekilde bir seri in vitro bağlanma ve taşınma çalışması bu metabolitin aktif olmadığını göstermiştir. Diğer metabolitler arasında dolaşımdaki tıbbi ilaçla ilişkili maddelerin %3'ünden azını oluşturan desmetildapoksetin ile didesmetildapoksetin bulunmaktadır. In vitro bağlanma çalışmalarında desmetildapoksetinin DAP'le eşit potense sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak desmetildapoksetinin plazmadaki toplam ve serbest (Cmax) düzeyleri sırasıyla ana ilacın %3-5 ve %20-25'i olarak tahmin edildiğinden, bu metabolitin toplam etkiye katkısı sınırlı olarak kabul edilir. 60 mg DAP kullanılan bir tek doz klinik farmakoloji çalışmasında CYP2D6 enzimi açısından zayıf metabolize edicilerdeki plazma düzeyleri yoğun metabolize edicilerdekenden daha yüksek olarak bulunmuştur (Cmax düzeyleri yaklaşık % 31, AUCinf düzeyleri ise yaklaşık % 36 daha yüksek). CYP2D6 metabolizma yolağının durumunu belirlemek açısından gerçekleştirilen çoklu dozlu iki Faz 3 çalışmaya toplam 120 zayıf metabolize ediciyle, 1598 yoğun metabolize edici dahil edilmiş ve DAP ile tedavi uygulanmıştır. Zayıf ve yoğun metabolize ediciler arasında etkinlik ve güvenilirlik açısından genel olarak bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca, prematür ejakülasyonu olan hastalarla sağlıklı gönüllüler arasında farmakokinetik açıdan da bir fark gözlenmemiştir[8,23].”

“Eliminasyon: DAP esas olarak idrarla konjuge metabolitler şeklinde elimine edilir; idrarda değişmeden atılan aktif madde tespit edilememiştir. Dozlamadan 24 saat sonra tespit edilen düşük dozların da (pikin % 5'inden daha düşük) gösterdiği gibi DAP'ın eliminasyonu hızlıdır. Günlük dozlamayı takiben DAP minimal düzeyde birikir. Oral uygulanma sonrası terminal yarılanma ömrü 19.3 saattir. Doğrusallık / doğrusal olmayan durum: Konu ile ilgili bir bilgi mevcut değildir. Özel popülasyonlardaki farmakokinetik özellikler: Irk Tek doz 60 mg DAP kullanılarak gerçekleştirilen bir klinik farmakolojik analizde beyaz, siyah, İspanyol asıllı ve Asya kökenli ırklar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Japon ırkıdan ve beyaz ırktan

hastalarda farmakokinetik özelliklerin karşılaştırıldığı bir klinik çalışmada DAP'ın plazma düzeyleri, Japon ırkından olan hastalarda, bu ırktaki hastaların vücut ağırlığının daha az olmasına bağlı olarak % 10 ile % 20 daha yüksek olarak bulunmuştur (AUC ve maksimum konsantrasyonlar). İlaça çok düşük miktarda daha fazla maruz kalmanın anlamlı bir klinik etkisi beklenmemektedir. 19 Yaşlılar (65 yaş ve üzeri) 60 mg DAP kullanılarak gerçekleştirilen tek doz klinik farmakoloji çalışmasının analizi sağlıklı yaşlı erkeklerle sağlıklı genç erişkin erkekler arasında farmakokinetik parametreler (C_{max}, AUC_{inf}, T_{max}) açısından bir farklılık göstermemiştir. Böbrek yetmezliği 60 mg DAP kullanılarak gerçekleştirilen tek doz klinik farmakoloji çalışmasında hafif (kreatinin klerensi 50 ile 80 ml/dakika), orta (kreatinin klerensi 30 ile < %1) DAP elde edilmiştir. Böbrek işlevlerinin hafif veya orta derecede bozulduğu hastalarda doz ayarlamasına gerek yoktur, ancak kullanımda dikkatli olunması önerilir. DAP'ın renal diyalize gerek duyan hastalardaki farmakokinetiği değerlendirilmemiştir. Şiddetli böbrek yetmezliği hastalarındaki veriler sınırlıdır. Ağır böbrek yetmezliği hastalarının ilaca maruziyet halinde düşük tolerabilite ya da çok farklı tepkiler gösterme potansiyelleri olabilir; bu nedenle DAP'ın ağır böbrek yetmezliği hastalarında kullanımı önerilmez. Karaciğer yetmezliği DAP karaciğerde yoğun olarak metabolize edilir. 60 mg DAP kullanılarak gerçekleştirilen bir tek doz klinik farmakoloji çalışmasında, DAP'ın doruk plazma konsantrasyonları (C_{max}), hafif, orta derecede ve ağır karaciğer yetmezliği (Child-Pugh sınıflamasına göre sınıf A, B ve C) olan hastalarda %23 ile %67 kadar azalmıştır. Proteinlere bağlanmaya göre düzeltildiğinde C_{max} düzeylerindeki azalma %4 ile %44 arasında olmuştur. Desmetildapoksetin metabolitinin doruk plazma konsantrasyonları %7 ile %43 arasında azalmıştır. Hafif ve orta dereceli karaciğer yetmezliği durumunda doz ayarlamasına gerek yoktur, ancak tekrarlayan alımlardan sonra DAP ve desmetildapoksetin maruziyet (AUC) belirli ölçülerde arttığından orta derecede karaciğer yetmezliğinde kullanımı sırasında dikkatli olunması önerilir. Ağır karaciğer yetmezliği durumunda DAP maruziyet önemli derecelerde arttığından, ağır karaciğer yetmezliği durumunda (Child-Pugh sınıflamasına göre sınıf C) önerilmez[8,23].”

2.2.3. Analiz Yöntemleri

2.2.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Kim, ve ark. canlı plazması örneklerinde ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve MS deteksiyonu ile DAP'ın tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈(oktadesil silan)50 x 2.0 mm, 1.7 µm kolon ve % 0.5 formik asit : asetonitril (60:40) hareketli fazı kullanılmıştır. Akış hızı 0,3 ml/dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmanın doğrusal aralığı 1-500 ng/mL olarak bulunmuştur. Metodun tekrarlanabilirliği ve farklı günde gerçekleştirilen tekrarlanabilirliği sırasıyla %3.8 ve %8.3 olarak bulunmuştur [24].

Zhang, ve ark. insan plazması örneklerinde ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve MS/MS deteksiyonu ile DAP ve en büyük iki metaboliti olan Dapoksetin-N-oksit, desmetil dapoksetin'in tayinini yanyana gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈(oktadesil silan) 50 x 2.1 mm, 1.7 µm kolon ve % 0.1 formik asit ve asetonitril hareketli fazlarını gradient olarak kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 ml/dakika olarak belirlenmiştir. Analiz süresi 4 dakika olarak bulunmuştur. Metodun doğrusal aralığı DAP için 0-200ng/mL, Dapoksetin-N-Oksit için 0.5-100ng/mL ve desmetil dapoksetin için 0.1-5.0ng/mL olarak bulunmuştur [25].

Bharat ve ark. Tablet dozaj formunda DAP ve tadalafil analizini yanyana olarak HPLC'de gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon ve asetonitril : fosfat tamponu (45:55) hareketli fazını kullanılmış, akış hızı 1.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır[26].

Rajeshwari ve ark. Tablet dozaj formunda DAP ve tadalafil analizini yanyana olarak HPLC'de gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₈ kolon ve asetonitril : pH 6.8 tamponu (55:45) hareketli fazını kullanılmış, akış hızı olarak 1.0 mL/dk kullanılmıştır. Dalga boyu olarak 254 nm seçilmiştir. Çalışmada Tadalafil 4.47, DAP ise 5.84 olarak bulunmuştur. Metodun doğrusal çalışma aralığı, Tadalafil ve DAP için 50-150 µg/mL olarak bulunmuştur [27].

Giri, Abha D. ve ark. ilaç dozaj formlarında DAP ve tadalafil analizini yanyana olarak HPLC'de gerçekleştirmişlerdir. Bu analiz için C₁₈ kolon ve asetonitril : Fosfat tamponu (80:20) hareketli fazı kullanılmış, akış hızı 1.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Dalga boyu olarak 229 nm seçilmiştir. Çalışmanın doğrusal aralığı Tadalafil için 0.25-4 µg/mL, DAP için 0.75-12 µg/mL olarak bulunmuştur. Dedeksiyon ve teşhis limiti

Tadalafil için 0.010 µg/mL ve 0.025 µg/mL , DAP için 0.005 µg/mL ve 0.020 µg/mL olarak bulunmuştur [28].

2.2.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Ravisankar ve ark. ilaç dozaj formlarında DAP analizini UV spektroskopik teknik gerçekleştirmişlerdir. Dalga bouyu olarak 211 nm kullanmışlardır[29].

2.3. Sıvı Kromatografisi Sistemleri

Laboratuvarlarda kullanılan birçok farklı model sıvı kromatografi sistemi mevcuttur. Bu kısımda yüksek performanslı sıvı kromatografisinin genel yapısı verilecektir.

2.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

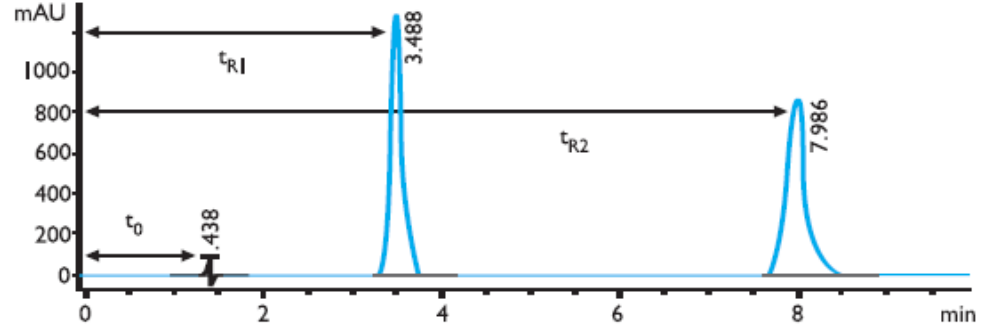
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) kısaca HPLC olarak adlandırılır.

HPLC, yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, ayırma yöntemleri içinde en çok rağbet gören cihazdır. Tercih edilme nedenleri hassasiyet, kantitatif analizlere kolayca uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. İlaç, gıda, kozmetik, çevre gibi birçok sanayiye bilim dalı için geçerli olan maddelere karşı kolayca uygulanabilmesidir. En çok uygulanan bileşiklere örnek olarak ilaç etkin maddeleri, pestisitler, amino asitler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar verilebilir. HPLC cihazı; kabaca dedektör, pompa, kolon, degasser ve örnekleyici olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır. [30].

Yüksek performans; yüksek ayırım faktörünü (resolüsyon) belirtir. Hareketli olan fazın sistem içerisinde ilerlemesi, yüksek seviyede bir basınç ile sağlandığından dolayı “Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografi” diğer isimlendirmesidir [27]. “Yüksek performans” sadece basıncın değil birden fazla etkenin birleşmesiyle oluşturulduğundan “yüksek performanslı sıvı kromatografisi” olarak adlandırılması daha yaygın olarak kullanılmaktadır [31].

Kromatografi tekniğinde türler, kolonda dağılma sabiti (KD) değerlerine bağlı olarak ilerler ve kolonu belli bir sıra ile terk ederler. Kolondan sırası ile ayrılarak çıkan maddelerin konsantrasyonlarının uygun bir yazılımsal hesaplama metodu ile ölçülerek

zaman karşı çizilen grafiğine kromatogram denir [32]. Şekil 2.5' de iki bileşenli bir numuneye ait bir kromatogram görülmektedir [33].



Şekil 2-5: İki bileşenli bir numuneye ait kromatogram [33]

Şekil 2.5'de görülen t_0 değeri, hareketli fazın enjeksiyon kısmından başlayıp detektöre ulaşması için geçen zaman yani kolonda hiç tutulmayan bir türe ait alıkonma zamanıdır. t_{R1} ve t_{R2} ise sırasıyla kolondan ilk çıkan ve ikinci çıkan türlere ait alıkonma zamanlarıdır. Alıkonma zamanı; analitlerin türü, sabit fazın türü, hareketli fazın türü, akış hızı ve kolon uzunluğu faktörlerinebağlı olarak değişebilir. Kolonda ilerleyen bileşenlerin göç hızlarıyla ilgili olarak kromatografide sıkça kullanılan bir parametre alıkonma veya kapasite faktörüdür. Alıkonma faktörü, k' ile gösterilir ve Eşitlik 2.1'de verildiği gibi bulunur [33].

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

(2.1)

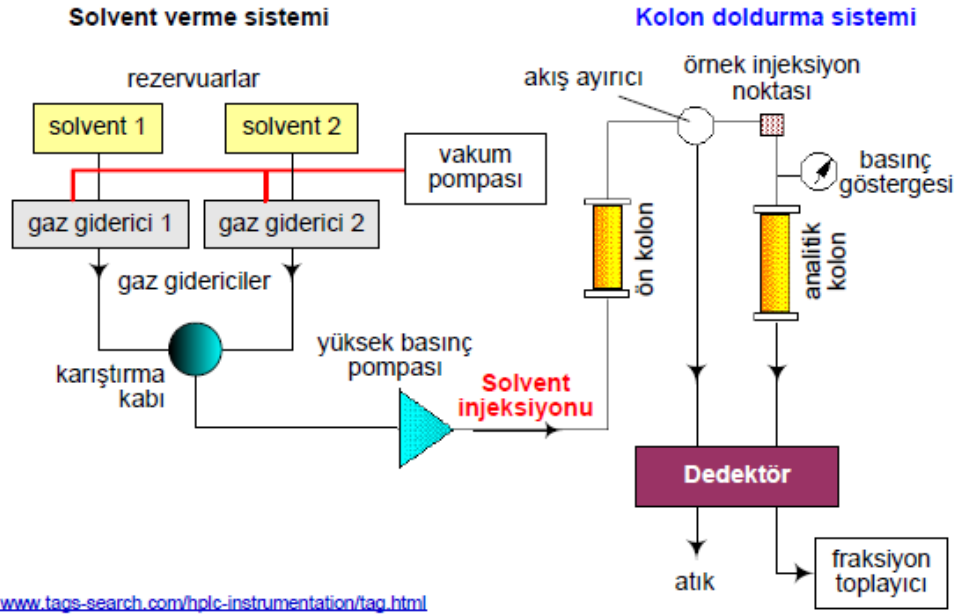
Alıkonma faktörünün 2'den küçük olmaması istenir.

Bir kolonun ayırıcılığı ya da ayırma gücü, kolonun bir numunede bulunan türleri birbirinden ne kadar ayırabildiğinin nicel bir ölçüsüdür. Ayırma gücü (rezolüsyon) R_s ile gösterilir ve aşağıda verilen eşitlik 2.2' den bulunabilir. Bu eşitlikteki 'w' değeri her bir pikin ayrı ayrı taban genişliklerinin ölçüsüdür.

$$R_s = 2x \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)} \quad (2.2)$$

R_s değerinin 1'den büyük olması istenir ve iyi bir ayırıcılık göstergesidir.

Laboratuvarda kullanılan bir HPLC sistemi Şekil 2.6' da verilmiştir.



Şekil 2-6: HPLC sistemi [34]

2.3.2. Autosampler (Otomatik Örnekleyici)

Autosampler (Otomatik Örnekleyici) numunelerin ayrılıp, analizlenmek üzere, kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Genel olarak iki tiptedir; El tipi (Manuel) ve Otomatik modeller. Manuel örnekleyici sistemlerde, numunecek çözelti bir şırıngaya çekilip valfin açılması ile HPLC sistemine gönderilir. Oto örnekleyicilerde, bu işlemleri cihaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Bazı HPLC sistemlerinde ısıtma, soğutma, karıştırma ve seyreltme özellikleri vardır. Vial kapasitesi olarak 10 vialden 1000 vial kadar değişebilir. Numuneleri sisteme verilirken mutlak suretle filtre sisteminden

geçirilerek partikül içermeyen berrak ve temiz bir hale getirmek gerekmektedir. Özellikle otomatik örnekleyiciye numune verirken numune çözeltisi temiz olmalıdır. Bu göz ardı edilirse, sistem çabuk kirlenir veya tıkanır. Numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olması tercih edilir [30].

2.3.2.1. Hareketli (Mobil) Faz

Analiz edilen maddeleri, içerisinde taşıyıp sistem içinde hareket ettiren hareketli fazdır. Hareketli faz, genellikle (ters faz sistemlerde) su ve sulu tampon çözeltiler, ve bunların organik çözücüler ile yaptıkları çözeltileri veya organik solventlerdir. En çok tercih edilen organik çözücüler metanol ve asetonitril'dir. Kullanılacak olan ayırım tekniği, ayrılacak olan maddelerin kimyasal özellikleri, kolon tipine göre hareketli faz seçilmektedir. Hareketli fazın bileşimi ve pH değeri; ayırımı doğrudan etkiler. [30].

2.3.3. Pompa

Esas olarak, hareketli fazın yüksek basınç yardımıyla HPLC sistemi içinde hareket etmesini, degazörden hareketli fazın çekilerek, örnekleyici ve kolona gönderilmesini, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirilmesini pompa gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına ve kullanım özelliklerine göre pompalar Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif olmak üzere 3 grupta değerlendirilir. Analitik pompalar genellikle hareketli fazı 0.1 – 5mL gibi bir akış hızında kullanılırlar. Hareketli faz adedi ve karıştırma kabiliyetlerine göre Tek Kanallı (İzokratik), Çift Kanallı Mikserli (Binary Gradient) ve Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz (Quaternary Gradient) olarak gruplandırılır. İzokratik çalışmalarda hareketli faz sisteme bağlanmadan önce karıştırılıp hazırlanır, gradient çalışmalarda ise karışım HPLC sistemi tarafından değişen zaman ve oranlarda yapılmaktadır. Bu yöntem sayesinde analiz kalitesi artırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Pompa ünitesi genellikle iki pistonlu başlık, basınç dengeleyici (damper), işlemci, inlet ve outlet check valflerden oluşur. Günümüzde Nano ve Ultra Basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Uzun süreli kullanım ve tekrarlanabilir sonuçlar için pompa temizliği ve bakımına dikkat edilmelidir [30].

2.3.4. Kolon

Kolon, HPLC sisteminde sabit faz olarak değerlendirilir ve analitlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerinden ayırım göstermelerini sağlar. Kolonlar genel olarak fonksiyonel gruplar ilave edilmiş silika veya polimer bazlı dolgulu malzemeleridir. HPLC kolonlarında en çok tercih edilen dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Celite (diatom toprağı) ve Alumina da kullanılan maddelerindendir. Kullanılan dolgu maddesi tanecik büyüklüğü 1.5-10 mikrometre aralığında olması istenir. Genellikle çelik olmak üzere, PEEK ve camdan da üretilmektedir. Kolon Fırını ise kolonu analiz için gerekli olan sabit sıcaklıkta tutmak ve saklayıp, korumak için kullanılır [35,36].

2.3.5. Dedektör

En çok tercih edilen sıvı kromatografisi dedektörü Ultraviyole-Görünür bölge bandında absorptans ölçme sistemine dayanan türdür. Ölçüm alınması tek dalga boyunda (Hg lambası 250 nm) veya Döteryum (D₂) ışık kaynağından gelen polikromatik ışınları bir monokromatör yardımıyla λ 'a göre ayırarak kullanılır. Spektrofotometrik dedektörlerden daha hızlı olarak fotodiyot dizisi kullanılır. Her bir dalga boyunda farklı bir fotodiyotun ışık şiddetini saptadığı bu cihazlarda monokromatör örnekle dedektör arasına konur. Bunlarda gözlenebilme sınırı 10^{-10} g/mL'dir [32].

Her bir analit için alınan dedektör cevabı bir kayıt edici yazılım ve bilgisayarda kromatogram olarak görüntülenir. Kromatografik verilerin toplanması, saklanması ve analizi; bilgisayarlar, yazılımlar, integratörler ve diğer veri işlemcileri kullanılarak yapılır [31].

2.4. HPLC Analizlerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçların değerlendirilebilmesi için yöntemle ilgili performans özelliklerini gösteren sayısal ölçütlerin de belirlenmesi gerekir. Bu amaçla ölçümler en az üç defa tekrarlanmalı, standart sapmalar ve bağıl standart sapmalar (RSD) hesaplanarak yöntemin kesinliği bildirilmelidir. Elde edilen kalibrasyon grafiğine bağlı olarak kalibrasyonduyarlığı, analitik duyarlık, teşhis sınırı, tayin sınırı ve çalışma aralığı belirlenmelidir. Ayrıca seçilen yöntemin seçiciliği de bu parametrelerle birlikte tespit edilmelidir.

2.5. Sistem Uygunluk Testi

Amerikan Farmakopesi (USP), bileşik değerlendirmesi üzerine yöntem geçerliliğini içeren özgül rehberler yayınlamıştır. Analitik işlemlerin geçerliliğinin amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır [37].

Sistem uygunluk testi genel olarak tüm analitik sistemin veya HPLC'nin (laboratuvar, analist, kolon, cihaz ve reaktif dahil) analiz metoduna uygun bir şekilde çalışıldığından emin olunması amacıyla için laboratuvarlar tarafından kullanılır. Sistem uygunluk testinin amacı, kromatografik olarak sistemin düzgün (piklerin kolon etkinliği, ayırım faktörü, kuyruklanma katsayısı, kapasite faktörü) ve tekrarlanabilir sistem performansından (standart çözeltilerinin tekrar analizlenmesi ile) emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir.

USP'ye göre sistem uygunluk parametreleri sıvı kromatografisi metodlarının olmazsa olmaz bir kısmıdır. Analize başlanabilmesi ve uygun bir şekilde tamamlanabilmesi için kromatografik sistemin gerekli görülen sistem uygunluk parametrelerinin yeterli olduğunu ispat etmek için kullanılır. Tablo 2.1'de FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri verilmiştir.

Tablo 2-1:FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri [38]

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği (Kesinlik)	$RSD < \%1, n \geq 5$
Ayırım Faktörü	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü	$T \leq 2$
Pik Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)	$N > 2000$

Enjeksiyon kesinliği, RSD (bağlı standart sapma) olarak ifade edilir ve kromatografik sistemin performansını gösterir.

2.6. Validasyon Parametreleri

ICH kılavuzuna göre miktar tayini için validasyon için, seçicilik, tekrarlanabilirlik (kesinlik), doğrusallık, doğruluk, dedeksiyon ve belirleme limiti, sağlamlık ve çözelti stabilitesi parametreleri istenmektedir [39].

2.6.1. Spesifiklik ve Seçicilik

Yöntemin seçiciliği; numune çözeltisi içinde analiz edilecek analiti, numune çözeltisi içinde var olan analit ile girişim yapabilecek diğer bileşenlerden farklı ve spesifik olarak tespit etme yeteneğidir. Numune matrisinde bulunan bileşenlerin (plasebo, çözücü, v.s.) yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçiciliğini belirlemektedir [37].

2.6.2. Doğrusallık

Analitik sistemin (detektör ve elde edilen datalar dahil) belli bir konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu gösterir. Numune çözeltisinin azalan konsantrasyonlarına karşı dedektör cevabının doğrusal bir grafik vermesi gerekmektedir. Numune çözeltisi içerisindeki analitin farklı konsantrasyonları ile elde edilen eğrinin regresyon analizi yapılır. Bu analizden elde edilen veriler üzerinden istatistik hesapları kullanılarak, eğrinin eğimi, y(ordinat)-kesim noktası ve korelasyon katsayısı hesaplanarak eğri denklemi ($y: ax+b$) elde edilir. Analitik çalışmalarda en az 5 noktadan doğrusallık çalışması uygulanmalı ve korelasyon katsayısı 0.99' dan daha büyük olmalıdır [38].

2.6.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluğu belirlemek için çeşitli yöntemler vardır.

a) Analitin bilinen farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin analizi ile belirlenir.

b) Başka bir belirlenmiş metod ile analiz yapılır.

Analitin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlardaki 3 örnek analiz edilerek miktar tayini yapılır ve doğruluk hesaplanır. Etkin madde içermeyen komponentlere (

plasebo) bilinen miktarlarda etkin madde eklenir. Elde edilen çözeltiler aynı anda hazırlanan çözeltilere karşı analizlenir ve geri kazanım hesaplanır.

Kabul edilebilir kriter, doğruluk için nominal değerden \pm % 2' ten fazla sapmanın olmamasıdır [37,40].

2.6.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği(tekrarlanabilirliği); her bir sonucun tekrar elde edilebilme veya test sonuçlarının analiz yöntemi ile saptanan şartlarda aynı numunelerin analiz sonuçlarının birbirine yakınlığının göstergesidir. 3 başlık altında değerlendirilir Sistem Kesinliği, Tekrarlanabilirlik (Kesinlik), Ara Kesinlik.

Analizin en az 3 farklı konsantrasyonunda düşük orta ve yüksek konsantrasyonda 3 örnek analiz edilerek veya en az 6 adet orta konsantrasyonda örnek analiz edilere relatif standart sapma (varyasyon sabiti, cv) hesaplanır [39].

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

Her ikisi de analitik başarımların göstergelerindedir. Tayin sınırı; analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondur. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir [37].

Teşhis sınırı (LOD) için; sinyal/gürültü (S/N) oranı 3:1 olarak kabul edilir.

$$LOD = 3 \sigma/S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

σ regresyon eğrisinin y kesim noktasının standart sapması cevabın standart sapması olarak kullanılabilir.

Tayin sınırı (LOQ), niceleme sınırı; analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondur.

Tayin sınırı(LOQ): Sinyal/ gürültü oranı; en düşük tayin snırı için (S/N) oranı 10' dan büyük olmalıdır.

Kalibrasyon eğrisinin eğiminden de hesaplanabilir.

$$LOQ = 10x\sigma/S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim.

2.6.6. Sağlamlık

Yöntem parametrelerinin yapılan küçük değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanıldığı sürede güvenilirliğinin göstergesidir. Sağlamlık parametresinin değerlendirmesinin birinci sonucu, analitik yöntemin geçerliliğinden emin olmak için sistem uygunluk parametresinin oluşturulmasıdır.

Likit kromatografi yöntemi için yapılabilecek tipik değişiklikler;

-Hareketli fazın pH'sı

-Hareketli fazın tampon/tuz konsantrasyonu

-Hareketli fazın konpozisyonu (organik çözücü konsantrasyonu)

-Kolon tipi

-Kolon sıcaklığı

-Akış Hızı

Çözelti stabilitesi de sağlamlık parametresi içinde değerlendirilebilmektedir. Analiz örnekleri, belirlenen sıcaklıklarında (oda sıcaklığı veya + 4°C gibi) çözelti stabilitesi kontrol edilir. Belirlenen zaman aralıklarında örnekler analizlenerek detektör cevabındaki değişim kontrol edilir. Miktar tayini analizleri için kabul kriteri, en fazla %2 farkdır [39].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda 2013 yılında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıdaki gibidir.

Sildenafil Sitrat,

Dapoksetin Hidroklorür ,

Sodyum dihidrojen fosfat

Disodyum hidrojen fosfat

Dapoksetin 30 mg –Sildenafil 50 mg Film Kaplı Tablet,

Asetonitril (HPLC saflığında) ,

Ultra saf su (HPLC saflığında)

3.1.2. Çözeltiler

3.1.2.1. Hareketli Faz Çözeltisi

0.1 g Sodyum dihidrojen fosfat ve 0.5 g disodyum hidrojen fosfat tartılarak 400 mL su ile çözüldü. Elde edilen çözeltinin pH'ı 9.5 olarak tespit edildi. Elde edilen çözeltinin 300 mL'si alınarak 700 mL asetonitril ile karıştırıldı.(30:70, h/h) Ultrasonik banyoda degaze edildi ve hareketli faz süzücü ile 0.45 µm filtrelerden süzülerek analize hazır hale getirildi.

3.1.2.2. Sildenafil Çözeltileri:

100.0 mg SIL tam olarak tartıldı, 100mL'lik balonjoje'de hareketli faz ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı (1 mg/mL DAP'e eşdeğer).

Stok çözeltiden, 0.25-0.75 mg/mL aralığında standart çözeltiler hareketli faz ile hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Sildenafil için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (mg/mL)	SS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Hareketli Faz
ST1	SIL	0.25	2.5 mL SS (0.25 mg/mL)	10 mL
ST2	SIL	0.40	4.0 mL SS (0.40 mg/mL)	10 mL
ST3	SIL	0.50	5.0 mL SS (0.50 mg/mL)	10 mL
ST4	SIL	0.60	6.0 mL SS (0.60 mg/mL)	10 mL
ST5	SIL	0.75	7.5 mL SS (0.75 mg/mL)	10 mL

3.1.2.3. Dapoksetin Çözeltileri

Stok çözelti:

100.0 mg DAP tam olarak tartıldı, 100mL lik balonjoje’de hareketli faz ile çözüldürüldü ve hacmine tamamlandı (1 mg/mL DAP’e eşdeğer).

Stok çözeltiden, 0.15-0.45 mg/mL aralığında standart çözeltiler hareketli faz ile hazırlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2:Dapoksetin için kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

Standart Adı	Analit	Konsantrasyon (mg/mL)	SS Konsantrasyonu ve Hacmi	Final Hacim Hareketli Faz
ST1	DAP	0.15	1.5 mL DS (1.0 mg/mL)	10 mL
ST2	DAP	0.25	2.5 mL DS (1.0 mg/mL)	10 mL
ST3	DAP	0.30	3.0 mL DS (1.0 mg/mL)	10 mL
ST4	DAP	0.35	3.5 mL DS (1.0 mg/mL)	10 mL
ST5	DAP	0.45	4.5 mL DS (1.0 mg/mL)	10 mL

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

Shimadzu LC-20 AT sistemi analiz için kullanıldı. Kullanılan sistemin kısımları Tablo 3-3’de belirtilmiştir.

Tablo 3-3: Ekipmanlar

HPLC Sistemi	Marka ve Model
Pompa	Shimadzu LC 20 AT
Otoörnekleyici	Shimadzu LC 20 AT
Dedektör	Shimadzu LC 20 AT
Kolon Fırını	Shimadzu LC 20 AT
Analitik Kolon	Waters Xterra 5 µm, 250 x 4,6 mm, C18
Yazılım	Shimadzu Labsolutions

Tablo 3-4'de metot geliştirme ve validasyon sırasında kullanılan destek ekipmanları belirtilmiştir.

Tablo 3-4: Destek ekipmanlar

Destek Ekipmanlar	Marka ve Model
UV Spektrofotometre	Agilent Varian CARY 50
10 cm'lik kuartz küvetler	QS 1000 10 x10 x 45 mm
Saf su sistemi	Elga Purelab Flex 2
Sonik Banyo	Jeitech UCP 20
pH metre	Metrohm
Otomatik pipetler	Eppendorf 10-100 µL ve 100-1000 µL
Oto örnekleyici Vialleri	Agilent
Vial Kapakları	Agilent
Vorteks	Heildolph
Analitik Terazı	Mettler Toledo
Hareketli Faz Filtresi	Millipore, 0.45 µm
RC Filtre 0.45 µm	Sartorius, 0.45 µm

Tablo 3-5’de metot geliştirme ve validasyon sırasında kullanılan destek ekipmanları belirtilmiştir.

Tablo 3-5: Cam Malzemeler

Cam Malzemeler	Marka
Balon 2 Litre	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon 1 Litre	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 5 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 10 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 50 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 100 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Balon joje 200 mL	Isolab laboratuvar malzemeleri
Mezür 500ML	Isolab laboratuvar malzemeleri
Mezür 1000ML	Isolab laboratuvar malzemeleri

3.3. Analizin Gerçekleştirilmesi

- a. Shimadzu 20 ATHPLC sisteminin bilgisayarı üzerinden açma/güç düğmesi ile cihaz açılır.
- b. HPLC kısımlarının her biri teker teker açılır.
- c. UV dedektörünün açma/kapama düğmesine basılarak açılır ve bağlantı sağlanır.
- d. Yazılımda LC Solution ikonu ile LC Solution yazılımı açılır.
- e. LC Solution penceresinden ilgili HPLC seçilir.
- f. 3.1.2.1’euynun olarak hazırlanan hareketli faz çözeltisi sistemin A hattına yerleştirilir. Diğer hatlara ise asetonitril yerleştirilir. İğne yıkama hattına

Asetonitril:Su (70:30) çözeltisi yerşeltirilir. Seal yıkama hattına ise Su/Metanol (95:5) çözeltisi yerleştirilir.

- g. Kullanılan hatlara purge işlemi yapılır.
- h. Purge işlemi bittikten sonra akış 0,1 mL/dak olarak ayarlanır ve kolon bağlantısına kadar hareketli faz geçmesi sağlanır.
- i. Akış kademeli bir şekilde artırılır. Final akış 1.3 mL/dakika olacaktır.
- j. Analiz için geçen süre 8 dakikadır.
- k. Kolon fırını sıcaklığı 25°C' dir.
- l. Enjeksiyon hacmi 10µL'ye ayarlanmıştır.
- m. Dedektör 228 nm' ye ayarlanmıştır.

3.4. Sildenafil ve Dapoksetin'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) ile Yöntem Geliştirme

3.4.1. Dedektör Dalga Boyu Seçimi

SIL ve DAP'ın absorbands yaptığı maksimum dalga boyu Spektrofotometri yöntemiyle SIL için 295 nm (Şekil2-2) ve DAP için 208 nm ve 293 nm (Şekil2-4) olarak bulundu. Her iki etkin maddenin UV spektrumları incelendiğinde 228 nm'nin metot için uygun bir dalga boyu olduğu belirlendi.

3.4.2. Hareketli Faz Seçimi

Hareketli faz seçimi için çeşitli oranlarda ve pH' larda hazırlanan asetonitril-sodyum fosfat denemelerinden sonra, sodyum fosfat tamponu -asetonitril (30:70)(v/v) uygun görüldü.

3.4.3. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 1.0mg/mL konsantrasyonlardaki SIL ve DAP çözeltilerinden; 0.15- 0.25- 0.30- 0.35- 0.45 mg/mL DAP ve 0.25- 0.40- 0.50- 0.60- 0.75mg/mL SIL ihtiva eden konsantrasyonlardaki karışım çözeltileri 10 ml'lik balon jojelerde hazırlandı, 30 saniye vortekslendi.

10 µL enjeksiyon yapılarak alanlar hesaplandı. Elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

3.5. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin metot validasyonu, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization) Q2 kılavuza göre gerçekleştirilmiştir [39].

3.5.1. Spesifiklik, Seçicilik

Yöntemin seçicilik parametresi için, hareketli fazdan, tablet yardımcı maddelerinden gelebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Etkin maddeler olan SIL ve DAP piklerine ait pik saflıkları incelendi. Bunlara ait kromatogram ve spektrumlar Bölüm 4.2.1.' de gösterilmiştir.

3.5.2. Doğrusallık

Analitik yöntemin konsantrasyonunun, değişen konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal bir eğriye sahip olması araştırıldı. Numune çözeltisi içerisindeki analitin farklı konsantrasyonları ile elde edilen eğrinin regresyon analizi yapıldı. Y-(ordinat)-kesim noktası, korelasyon katsayısı, ve eğrinin eğimi hesaplandı ve eğri denklemi elde edildi. Korelasyon katsayısı 0.99' dan büyük olduğu bölüm 4.2.2' de gösterilmiştir.

Ayrıca, elde edilen eğrinin y(ordinat)-kesim noktası, %100 derişimdeki standard çözeltisinden elde edilen alana göre %2'den fazla olmamalıdır. Bölüm 4.2.2' de gösterilmiştir.

3.5.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Analitin farklı konsantrasyonlardaki 3 uygulama serisiyle analiz edilerek miktar tayini yapıldı ve doğruluk hesaplandı. Etkin madde içermeyen ilaç preparatında %80 ,%100 ve %120 derişimlerinde her iki etkin maddeden eklendi ve

hazırlanan örnekler aynı standarda karşı analizlendi. Her seviye için 3'er örnek hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.3' de verilmiştir.

3.5.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği (tekrarlanabilirliği) ; elde edilen bir sonuç ve detektör cevabının tekrar elde edilebilme kabiliyeti veya test sonuçlarının analitik yöntemde belirtilen koşullar altında aynı numunelerin farklı zamanlarda elde edilen sonuçların benzerliğinin göstergesidir.

3 başlık altında değerlendirildi: Sistem Kesinliği, Tekrarlanabilirlik (Kesinlik), Ara Kesinlik.

Sistem kesinliği için;

Standard çözeltisi yöntemde belirtildiği şekilde hazırlandı ve belirtildiği kadar ölçüm yapıldı. Sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.2.4' de verildi.

Kesinlik için;

Aynı analistin birbiri ardına yaptığı analiz tekrarlarının tutarlılığını göstermek amacıyla, aynı seriden 6 adet farklı örnek hazırlanarak ölçüm yapıldı. Sonuçların ortalaması , standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.2.3' de verildi.

Ara Kesinlik;

Aynı seriye ait numuneler kullanılarak farklı ekipman, analist ve farklı bir günde kesinlik parametresindeki gibi altı adet örnek hazırlandı. Sonuçların ortalaması , standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplandı. Ayrıca çıkan sonuçlar kesinlik parametresinden elde edilen ilk 6 sonuç ile kıyaslandı. Sonuçlar bölüm 4.2.3' de verildi.

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

Teşhis sınırı analiz edilen numunenin belirlediği fakat kantitatif sınır üstüne girmeyen en düşük derişimdir. Tayin sınırı ise analiz edilen numunenin kabul kriterleri ile belirlenen kesinlik ve doğruluk miktarının tayin edilebileceği en alt derişimini

oluşturan düzeyidir. Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplandı. Her ikisi de analitik başarının göstergelerindedir. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.5’de verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3 \times \sigma/S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma/S$$

σ : İnterseptin standart sapması

S: Eğim

3.5.6. Sağlamlık

Yöntemde tanımlandığı şekilde standard ve örnek çözeltileri hazırlandı. Metot parametrelerindeki değişikliklere karşı sistem uygunluk parametrelerinin değişimi incelenerek, metodun değişimlere karşı sağlamlığı değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.5' de verildi.

Çözelti stabilitesinin saptanması için standart çözeltiler, oda sıcaklığında karanlıkta 48 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 48 saat ve +4°C de 48saat bekletildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6’ de verilmiştir.

3.6. Tabletlerde Sildenafil ve Dapoksetin’in Analizi

3.6.1. Tabletlerin ve Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

Tabletler, Deva İlaç Sanayi Galenik Laboratuvarlarında basılmıştır. Her bir tablet 50 mg SIL’e eşdeğer sildenafil sitrat, 30 mg DAP’a eşdeğer dapoksetin hidroklorür’e içermektedir. Tablet formülasyonunda, mikrokristalin selüloz Tip 102, mikrokristalin selüloz Tip 105, laktoz monohidrat, kroskarmeloz sodyum, koloidal silikon dioksit, magnezyum stearat ve tablet kaplama malzemesi yer almaktadır. Toplam tablet ağırlığı 475 mg’dır. Etkin maddeler ve yardımcı malzemeler uygun eleklerden elendikten sonra, üretim yönteminde belirlenen sürelerde karıştırılmıştır. Karıştırılan bulk toz karışımı, direk baskı yöntemiyle basılarak tabletler elde edilmiştir. Daha sonra sulu dispersiyon yöntemiyle kaplanmıştır.

30 mg DAP ve 50 mg SIL içeren 20 adet tabletin ortalama tablet ağırlığı hassas olaraktartılarak alındı. Porselen havanda güzelce ezildi ve homojen bir hale getirildi. Ortalama tablet ağırlığı kadar, 6 farklı tartım alınarak tartıldı. Alınan tartımların her biri

100 mL' lik balon jöjelerde hareketli faz ile çözüdüürölerek hacmine tamamlandı. 20 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Bu süre sonunda 0.45 µm RC filtreden süzüldü. Böylece 0.3 mg/mL DAP ve 0.5 mg/mL SIL içeren 6 tablet çözültisi hazırlandı.

3.6.2. Geliştirilen HPLC Yöntemi ile Tabletlerin Analizi

Geliştirilen yönteme ait hareketli faz, kolon ve analitik cihaz hazır hale getirilerek 6 farklı enjeksiyon yapıldı.



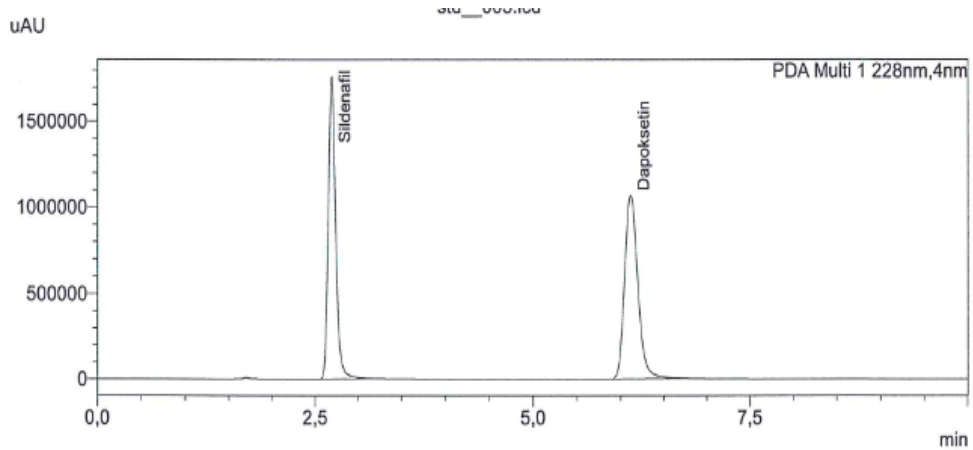
4. BULGULAR

Yöntemin geliştirilmesi amacı ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ilgili bölümlerde verilmiştir.

4.1. Sildenafil ve Dapoksetin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Yanyana Analiz Sonuçları

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuçlar 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapında, 5 µm partikül çaplı C₁₈ kolonda (Waters Xterra), sodyum fosfat tamponu (0.1 g Sodyum dihidrojen fosfat ve 0.5 g disodyum hidrojen fosfat 400 mL su) (pH: 9.5) – asetonitril (30:70)(v/v) çözücü sisteminde, 25°C' de, 1.3mL/dakika akış hızı ile sağlanmıştır. Çalışma UV detektörde, 228 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Yukarıda bahsedilen kromatografik sistemde, etkin maddeler için alıkonma zamanları SIL için 2.7 dakika ve DAP için 6.1 dakikadır (Şekil 4-1).

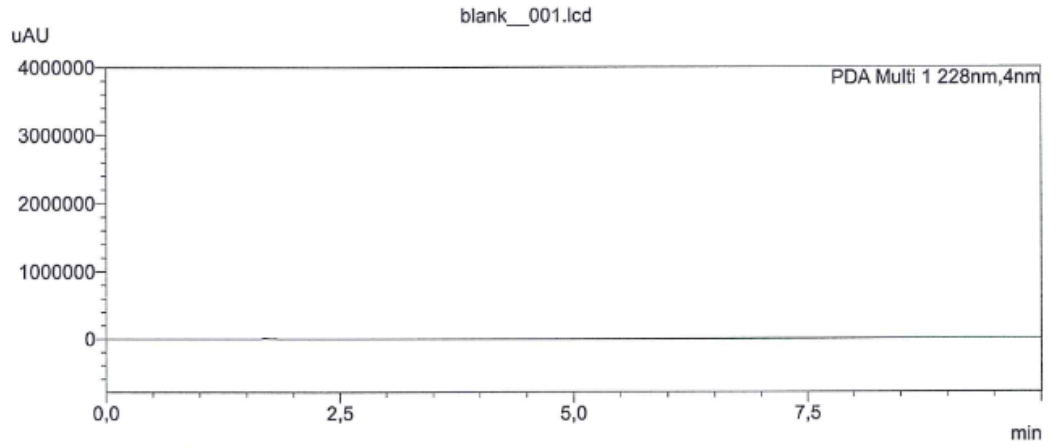


Şekil 4-1: 0.5 mg/mL sildenafil ve 0.3 mg/mL dapoksetin karışımına ait örnek kromatogram

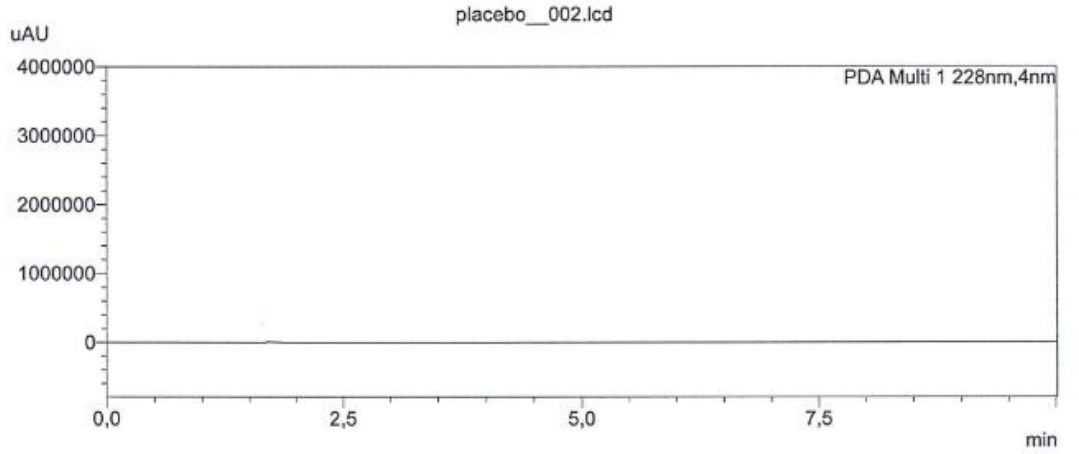
4.2. Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

Metodun seçiciliğinin sınanması için; hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram Şekil 4-2' de, plaseboya ait kromatogram ise Şekil 4-3' de verilmiştir. Hareketli faz ve plasebo kromatogramlarında analitin alıkonma zamanında herhangi bir girişim yoktur.

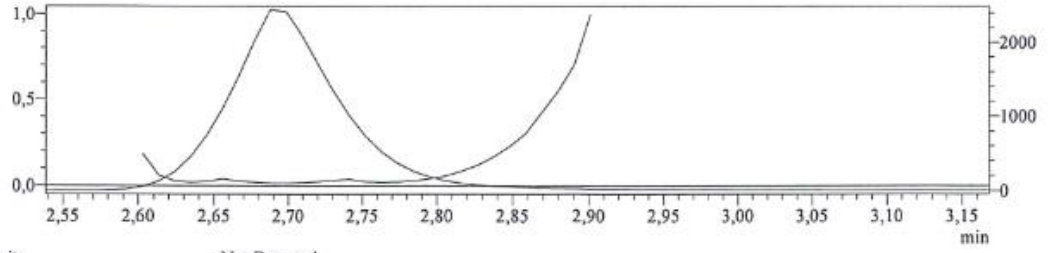


Şekil 4-2: Hareketli faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram



Şekil 4-3: Plasebo çözeltisine ait kromatogram

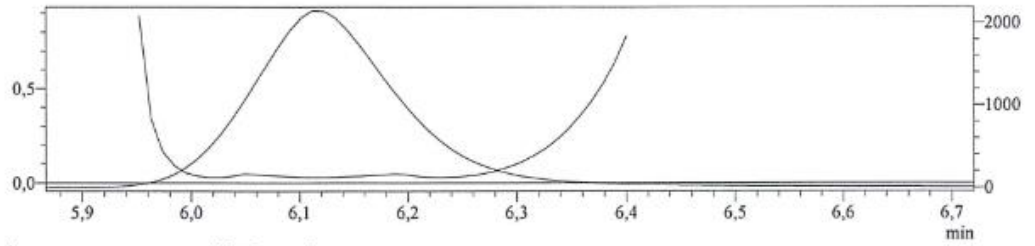
ID# : 1
Retention Time : 2,694 min
Compound Name : Sildenafil



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,985077
Minimum peak purity index : 14922

Şekil 4-4: Sildenafil pikine aitsaflık spektrumu

ID# : 2
Retention Time : 6,118 min
Compound Name : Dapoksetin

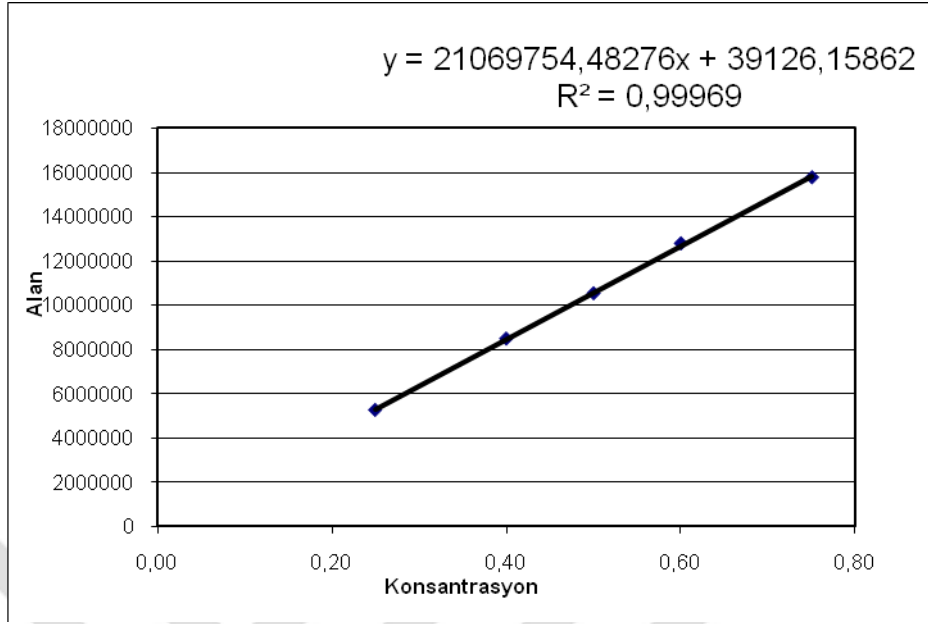


Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,971934
Minimum peak purity index : 28066

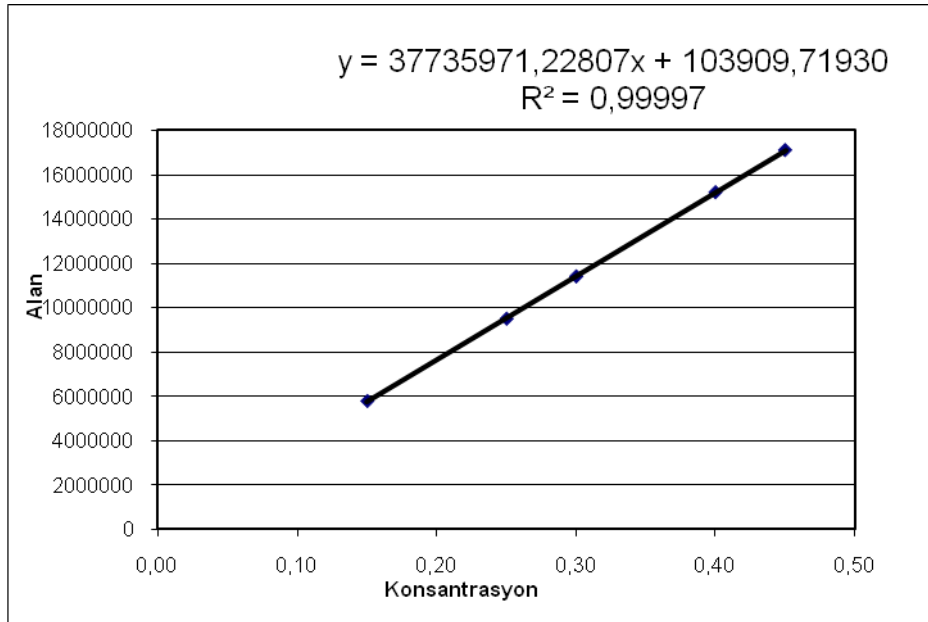
Şekil 4-5: Dapoksetin pikine aitsaflık spektrumu

4.2.2. Doğrusallık

0.15 mg/mL DAP - 0.25 mg/mL SIL, 0.25 mg/mL DAP-0.40 mg/mL SIL, 0.30 mg/mL DAP - 0.5 mg/mL SIL, 0.40 mg/mL DAP - 0.60 mg/mL SIL, 0.45 mg/mL DAP-0.75 mg/mL SIL olan 5 farklı konsantrasyonda 6'şar örnek hazırlandı ve alana karşı grafiğe geçirildi. Validasyon serilerinde 2'şer adet kalibrasyon standartları hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden çizilen kalibrasyon eğrisi SIL için Şekil 4-6'da ve DAP için Şekil 4-7' de verilmiştir. Kalibrasyon eğrileri korelasyon katsayıları 0.999 mertebesinde kabul edilebilir sınırlardadır. Korelasyon katsayıları ve doğru denklemleri SIL için Tablo 4-1' de, DAP için Tablo 4-2' de verilmiştir.



Şekil 4-6: Sildenafil'in 0.25-0.75 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4-7: Dapoksetinin 0.15-0.45 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4-1: Sildenafil için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri Numarası	Korelasyon Katsayıları	Doğru Denklemleri
VAL1-1	0,99976	$y=21156738x-33545$
VAL1-2	0,99987	$y=21076631x+16761$
VAL2-1	0,99990	$y=21076149x+22808$
VAL2-2	0,99992	$y=21077631x+19892$
VAL3-1	0,99968	$y=21076830x+32036$
VAL3-2	0,99987	$y=21069755x+39126$

Tablo 4-2: Dapoksetin için validasyon serilerinden elde edilen doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları

Validasyon Seri Numarası	Korelasyon Katsayıları	Doğru Denklemleri
VAL1-1	0,99991	$y=37945227x+79243$
VAL1-2	0,99991	$y=378497219x+91303$
VAL2-1	0,99995	$y=37817651x+102987$
VAL2-2	0,99994	$y=37814690x+104529$
VAL3-1	0,99994	$y=37795519x+108285$
VAL3-2	0,99997	$y=37735971x+103910$

Bu altı farklı kalibrasyon eğrisinde aynı konsantrasyonları içeren örneklerin ortalaması alınarak tekrar bir doğru denklemi oluşturuldu.

Alan-konsantrasyona karşı çizilen bu grafiğin denklemi SIL için;

$$y=21069754x+39126 \text{ ve korelasyon katsayısı } 0,99969 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Bu denklem DAP için ise;

$$y=37834381x+98376 \text{ ve korelasyon katsayısı } 0,99995 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Y-Intersept/ % 100*100 Standard alan SIL için %0.37.

Y-Intersept/ % 100*100 Standard alan DAP için %0.85.

4.2.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı 3 farklı konsantrasyonda kontrol edildi. Doğruluk hesabı yapıldı. (Tablo 4-3, Tablo 4-4)

Tablo 4-3: Sildenafil için Doğruluk Doğruluk (Geri Kazanım) Hesaplamaları ve Sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneysel Konsantrasyon	%Geri Kazanım	% RSD
% 80	0.40 mg/mL	0.40149 mg/mL	100.37	0.20
	0.40 mg/mL	0.40013 mg/mL	100.03	
	0.40 mg/mL	0.40012 mg/mL	100.03	
% 100	0.50 mg/mL	0.50125 mg/mL	99.43	0.47
	0.50 mg/mL	0.50222 mg/mL	100.25	
	0.50 mg/mL	0.50012 mg/mL	100.24	
% 120	0.6 mg/mL	0.60188 mg/mL	100.31	0.61
	0.6 mg/mL	0.59443 mg/mL	99.07	
	0.6 mg/mL	0.60012 mg/mL	100.02	

Tablo 4-4: Dapoksetin için Doğruluk(Geri Kazanım) Hesaplamaları ve Sonuçları

Seviye	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Deneysel Konsantrasyon	%Geri Kazanım	% RSD
% 80	0.24 mg/mL	0.24012 mg/mL	100.05	0.02
	0.24 mg/mL	0.24003 mg/mL	100.01	
	0.24 mg/mL	0.2400 mg/mL	100.00	
% 100	0.30 mg/mL	0.30009 mg/mL	99.43	0.37
	0.30 mg/mL	0.30052 mg/mL	100.03	
	0.30 mg/mL	0.30032 mg/mL	100.11	
% 120	0.36 mg/mL	0.36011 mg/mL	100.03	0.17
	0.36 mg/mL	0.35903 mg/mL	99.73	
	0.36 mg/mL	0.3600 mg/mL	100.00	

4.2.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği (tekrarlanabilirliği) ; elde edilen bir sonuç ve detektör cevabının tekrar elde edilebilme kabiliyeti veya test sonuçlarının analitik yöntemde belirtilen koşullar altında aynı numunelerin farklı zamanlarda elde edilen sonuçların benzerliği ile kontrol edildi. SIL ve DAP için kesinlik için yapılan hesaplamaları Tablo 4-5, Tablo 4-6, Tablo 4-7 ve Tablo 4-8' de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin kesinliği uygun bulunmuştur. Yöntemin tekrarlanabilir olduğu ispat edilmiştir.

Tablo 4-5: Sildenafil ve Dapoksetin için Sistem Kesinliği Hesaplamaları ve Sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	% 100 Standard Alanına ait Sildenafil Alanı	% 100 Standard Alanına ait Dapoksetin Alanı
1. Enjeksiyon	10537483	11473293
2. Enjeksiyon	10593875	11492043
3. Enjeksiyon	10583752	11492847
4. Enjeksiyon	10583764	11429384
5. Enjeksiyon	10583754	11473957
6. Enjeksiyon	10583754	11483743
Ortalama	10577730	11474211
Standart Sapma	20128,25	23522,36
Bağıl Standart Sapma	0,190289	0,205002

Tablo 4-6: Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Tablet'e ait Tekrarlanabilirlik(Kesinlik) Hesaplamaları ve Sonuçları

Numune	Sildenafil Sonuç (mg/tb)	Dapoksetin Sonuç (mg/tb)
Numune 1	50,32	30,22
Numune 2	50,11	30,21
Numune 3	50,23	30,04
Numune 4	50,35	30,01
Numune 5	50,01	30,33
Numune 6	50,33	30
Ortalama	50,225	30,135
Standart Sapma	0,137949	0,136931
Bağıl Standart Sapma	0,274663	0,454391

Tablo 4-7Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Tablet'e ait Sildenafil için Ara Kesinlik Hesaplamaları ve Sonuçları

Numune	1. Analist- 1.Gün Sildenafil Sonuç (mg/tb)	2. Analist- 2. Gün Sildenafil Sonuç (mg/tb)
Numune 1	50,32	50,21
Numune 2	50,11	50,11
Numune 3	50,23	50,44
Numune 4	50,35	50,51
Numune 5	50,01	50,31
Numune 6	50,33	50,81
Ortalama	50,225	50,39833
Standart Sapma	0,137949	0,249031
Bağıl Standart Sapma	0,274663	0,494126
2 Analist arasındaki % Fark	0,34	

Tablo 4-8Sildenafil/Dapoksetin 50 mg/30 mg Tablet'e ait Dapoksetin için Ara Kesinlik Hesaplamaları ve Sonuçları

Numune	1. Analist- 1.Gün Dapoksetin Sonuç (mg/tb)	2. Analist- 2. Gün Dapoksetin Sonuç (mg/tb)
Numune 1	30,22	30,13
Numune 2	30,21	30,11
Numune 3	30,04	30,00
Numune 4	30,01	30,21
Numune 5	30,33	30,54
Numune 6	30	30,44
Ortalama	30,135	30,23833
Standart Sapma	0,136931	0,208559
Bağıl Standart Sapma	0,454391	0,689716
2 Analist arasındaki % Fark	0,34	

4.2.5. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırları

LOD ve LOQ değerleri: Bölüm 3.5.5' de belirtildiği şekilde her iki etkin madde için de denklemlerinden hesaplandı. Teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise sırası ile SIL için 0.318 µg/mL ve 1.060 µg/mL ve DAP için 0.316 µg/mL ve 1.053 µg/mL' dir.

4.2.6. Sağlamlık

Yöntemde tanımlandığı şekilde standard ve örnek çözeltileri hazırlandı. Metot parametrelerindeki aşağıda belirtilen değişikliklere karşı sistem uygunluk parametrelerinin değişimi incelenerek, metodun değişimlere karşı sağlamlığı değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-9, Tablo 4-10, Tablo 4-11' de verildi.

Sağlamlık parametresi kapsamında yapılan değişiklikler,

- Akış Hızı
- Hareketli faz organik/tampon oranı
- Farklı marka kolon kullanımı

Çözelti stabilitesinin saptanması için standart çözeltiler, otomatik numune örnekleyicisinde 48 saat ve +4°C de 48 saat bekletildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-12' da verilmiştir.

Tablo 4-9 Akış Hızı değişikliğinde sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler

Akış Hızı mL/dakika	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	1.1	1.3	1.5	1.1	1.3	1.5	1.1	1.3	1.5
Sildenafil	1,22	1,22	1,22	7,7	7,5	7,4	3915	3926	3934
Dapoksetin	1,22	1,22	1,22	7,7	7,5	7,4	7392	7312	7301

Tablo 4-10 Hareketli faz tampon/organik oranı değişimindeki sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler

Hareketli Faz Tampon/Organik Oranı	Simetri Faktörü			Ayrım Faktörü			Teorik Plaka Sayısı		
	25/70	30/70	35/70	25/70	30/70	35/70	25/70	30/70	35/70
Sildenafil	1,22	1,24	1,27	8,0	7,5	7,3	3943	3999	3920
Dapoksetin	1,21	1,22	1,21	8,0	7,5	7,3	7543	7333	7222

Tablo 4-11 Kolon marka değişimindeki sistem uygunluk parametrelerindeki değişimler

Kolon Marka	Simetri Faktörü		Ayrım Faktörü		Teorik Plaka Sayısı	
	Waters Xterra C18	ACE C18	Waters Xterra C18	ACE C18	Waters Xterra C18	ACE C18
Sildenafil	1,22	1,22	7,5	7,5	3930	3853
Dapoksetin	1,21	1,22	7,5	7,5	7555	7284

Tablo 4-12 Oda sıcaklığında ve + 4° C’de bekletilen Sildenafil ve Dapoksetin standart ve numune çözeltilerine ait çözelti stabilitesi sonuçları

Uygulama	Standart Çözeltisi		Tablet Numunesine ait çözelti	
	Sildenafil	Dapoksetin	Sildenafil	Dapoksetin
0. Saat Başlangıç alanları	10494834	11498445	10510395	11428475
Oda Sıcaklığı 48 saat alanları	10463414	11490294	10465921	11408294
4°C 48 saat alanları	10483722	114962932	10477593	11418573

5. TARTIŞMA

Erkekler ve eşlerinde sıkıntı meydana getiren prematür ejakülasyon (PE), cinsel işlev bozukluklarının tıp alanında en çok görülenidir. Dünya genelindeki erkeklerin yaklaşık olarak %40 civarında yaşamlarının bir döneminde semptomlarının bildirildiği bu rahatsızlık ile karşılaşmaktadırlar. Bu disfonksiyon hayat boyu veya edinsel olarak gerçekleşebilmektedir. Yapılan çalışmalar ve klinik gözlemler bize, PE sendromu yaşayan bireylerin yüksek yüzde ile erektil disfonksiyon (ED) da olduğunu göstermektedir. PE'si olan tüm erkeklerin %32'si aynı zamanda ED bildirirken ED'si olan erkeklerin %44'ünde aynı zamanda PE bildirmiştir. Bu çalışmanın sonuçları bize, PE ve ED cinsel bozukluklarının büyük oranda birlikte görüldüğünü göstermektedir.

Tıp alanında çok sık rastlanan PE ve ED birlikteliğinin tedavisinde PDE-5 inhibitörleriyle DAP kombinasyonu güncel araştırmalarda çok sık rastlanmaktadır. Bahsi geçen kombinasyon tedavilerinden biri de SIL - DAP kombinasyonudur. Bu kombinasyonun seçilmesinin altında yatan temel nedenlerinden birisi de SIL ve DAP çalışmalarda klinik olarak anlamlı farmakokinetik ilaç etkileşimine girmemesidir.

Bu nedenle kombinasyon olarak tedaviye sunulabilecek olan bu iki maddenin yanyana analizi, bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak tabletlerde analizi için seçici, özgün ve tekrarlanabilir bir yöntem başarıyla geliştirilmiştir.

SILin maksimum absorbans dalga boyu 295 nm(Şekil 2.2),DAP'ın maksimum absorbans dalga boyu 209 nm ve 293 nm (Şekil 2.4) olarak bulunmuştur.

HPLC çalışmalarında öncelikle optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda ayırmalarda en iyi sonuçlar 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm çapında, 5 µm partikül çaplı C18 kolon (Waters XTerra C18) ile hareketli faz olarak sodyum fosfat tamponu(0.1 g Sodyum dihidrojen fosfat ve 0.5 g disodyum hidrojen fosfat 400 mL su) (pH: 9.5): asetonitril (30:70, h/h) 25°C de, 1.3mL/dakika akış hızı kullanılarak elde edilmiştir. Çalışma UV dedektör ile, 228 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Alıkonma zamanları ise DAP için 6,1 SIL için 2,7 dakika olarak bulunmuştur.

HPLC yönteminde göre yapılan seçicilik çalışmalarında etkin madde içermeyen plasebo ve hareketli faz örnekleri HPLC sistemine verilmiş, etkin madde olan SIL ve DAP alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlemlenmemiştir. Her iki etkin maddeye ait PDA detektör'de alınan spektrumlarda ve pik saflıkları incelenmiş ve piklerin saf olduğu gözlemlenmiştir.

Belirlenen çalışma koşullarında doğrusal aralık, SIL için 0,25-0,75 mg/mL ve DAP için 0,15-0,45 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde altı farklı konsantrasyonda analizler yapılmıştır. Aynı gün içinde yapılan analizlere ait RSD değerleri SIL % 0,27 ve DAP için % 0,45, farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen RSD değerleri ise SIL için % 0,49 DAP için % 0,27 olarak saptanmıştır. Farklı günlerde yapılan çalışmaların ortalama sonuçları arasındaki % fark SIL için %0,34, DAP için % 0,34 olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla standart katma metodu uygulanmış ve geri kazanım değerleri SIL için %99,07-%100,37, DAP için %99,43-%100,11 olarak bulunmuştur. Ayrıca etkin maddelere ait piklerin Sinyal/Gürültü değerlerinden çözücünden elde edilen değerlere göre hesaplanan Teşhis (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) ise sırasıyla SIL için 0.318 µg/mL ve 1.060 µg/mL; DAP için 0.316 µg/mL ve 1.053 µg/mL olarak bulunmuştur.

Analitik metodun dayanıklılığını belirlemek amacıyla metod şartlarında değişiklikler yapılmıştır. Akış hızı ± 0.2 mL/dakika, hareketli fazın tampon/organik oranı ± 5 oranında değiştirilmiştir. Ayrıca aynı özelliklere sahip farklı marka bir sıvı kromatografisi kolonu ile çalışma tekrarlanmıştır. Yapılan değişikliklere karşı sistem uygunluk parametreleri incelenmiştir. Tüm değişiklikler dahilinde sistem uygunluk değerlerinde kayda değer bir değişiklik olmamıştır.

Çözelti stabilitesinin saptanması için de standart çözeltiler, oda sıcaklığında ve 4°C'de 48 saat bekletilmiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda çözeltilerin stabil kaldığı belirlenmiştir.

SIL ve DAP farmasötik preparatlardaki analizlerine dair yapılan literatür araştırmasında, bu iki ilacın yanyana analizi için literatürde UV spektrofotometrisi [2], yüksek performanslı sıvı kromatografisi [3] ve sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi [4] yöntemleri olmak üzere 3 adet çalışmaya rastlanmıştır.

Kütle spektroskopisi [4] yöntemi, geliştirilen yöntemle göre daha pahalı bir teknik olması ve her laboratuvarında bulunmaması sebebiyle, UV spektrofotometrisi [2] yönteminin ise stabilite gösterir bir yöntem olmaması ve farmasötik preparat içerisindeki bileşenlerden tam bir ayırım gerçekleştirilmeden analiz edilmesi sebebiyle geliştirilen yöntemle göre dezavantajları bulunmaktadır.

Literatür araştırmasında bulunan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi [3] ile yapılan çalışma, ters fazlı C₁₈ kolonda; trietil amonyum fosfat tamponu pH 3.0 : asetonitril (50:50, h/h) hareketli fazı ile 1.0 mL/dakika akış hızıyla etkin maddelerin birbirinden ayrılmasına dayanmaktadır. Dedektör dalga boyu 232 nm' ye ayarlanmıştır. Analiz edilen analitleri doğrusallık aralıkları SIL için 0.0025-0.02 mg/mL ve DAP için 0.0015-0.12 mg/mL olarak bulunmuştur. Teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırları ise sırası ile ; SIL için 0.534 µg/mL ve 1.62 µg/mL, DAP için 0.105 µg/mL ve 0.318 µg/mL' dir.

Literatür araştırmasında bulunan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde [3] kullanılan hareketli fazın pH'sı analitik kolonlar için çok fazla uygun olmamakla birlikte, bu pH'da kolon ömrü geliştirilen metoda göre daha kısa olacaktır. Hareketli fazda kullanılan trietilamin reaktifi çözelti pH'sını yükseltecektir ve nihai pH olan 3.0'e çekilmesi için çok fazla fosforik asit sarfiyatı gerçekleşecektir. Sarfiyat olarak ve metodun hazırlık aşamasında kolaylık anlamında geliştirilen metoda göre dezavantajları bulunmaktadır. Geliştirilen metotta kullanılan tampon ve mobil faz pH'dan bağımsızdır. Bu sebeple, hem kullanım kolaylığı sağlanacak hem de diğer laboratuvar ekipmanlarından gelebilecek hatalar en aza indirilmiş olacaktır.

Kolay uygulanabilir, her analiz laboratuvarında kolayca bulunabilir, ekonomik, basit malzemeler ile çalışılan, seçici, kesin, doğru ve güvenilir olan, UV dedeksiyona dayanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi prensibine dayanan metod geliştirilmiş ve validasyonu tamamlanmıştır. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntemle SIL ve DAP'ın farmasötik preparatlardan analizi doğru, hassas, seçici ve özgün bir şekilde kolaylıkla yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Deva İlaç Sanayi (2012, Mart) *Sildenafil-Dapoksetin Klinik Uzman Raporu Mart 2012*; Deva İlaç Sanayi Klinik Uzman Raporları, (2012)
- [2] Albin P., Haribabu Y., Eapen S., C., Kutty S., V., Kumar P., Nithyamol P. Validated Spectrophotometric Methods for Simultaneous Estimation of Sildenafil Citrate and Dapoxetine HCl in Tablet Dosage Form. *Pharma Innovation-Journal*. (2013), **2**(4):40-45.
- [3] Tambe V., S., Deodhar M., N., and Prakya V. Stability Indicating UPLC-MS/UV Method for Simultaneous Determination of Sildenafil Citrate and Dapoxetine Hydrochloride from Bulk and Formulation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2016), **78**(5):663-672.
- [4] Chilukuri S., Vengala S., L., Dasari R., Akuthota A., K. Assay Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Dapoxetine HCl and Sildenafil Citrate in Capsules by RP-HPLC. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2016), **6**(3): 1540-1548.
- [5] European Pharmacopoeia 9th ed., *Sildenafil Citrate*, **07/2017: 2270**: 4611-.
- [6] Chemspider Online/ <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5023>
- [7] Viagra Film Tablet Kısa Ürün Bilgisi. *PFIZER İlaçları Ltd. Şti*. İlk yayın tarihi 14.11.2001
- [8] İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı *Rx Media Pharma*
- [9] Fecos I., Neumajer G., Beni S., Jankovics P., Qualitative and Quantitative analysis of PDE-5 Inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements bu HPLC-UV using sildenafil as a sole reference. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014), **98**:327-333.
- [10] Al-Ghazawi M., Tutunji M., Aburuz S., Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma bu high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2007), **43**:613-618.

- [11] Patterson R., Mabe P., Nicole Mitchell E., Cory W., Lifestyle illicit drug seizures: A routine ESI-LC-MS method for the identification of sildenafil and vardenafil. *Forensic Science International*, (2012), **222**:83-88.
- [12] Xiao C., Tang M., Li J., Yin C., Xiang G., Xu L. Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, (2013), 931:111-116.
- [13] Sheu M-T., Wu A-B., Yeh G-C., Hsia A., Ho H-O., Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *Journal of Chromatography*, (2003), **791**:255-262.
- [14] Mikami E., Ohno T., Matsumoto H., Simultaneous identification/determination system for phenolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition. *Forensic Science International*, (2002), **130**: 140-146.
- [15] Wang Y., Wang J., Cui Y., Fawcett J.P., Gu J., Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma. *Journal of Chromatography*, (2005), **828**:118-121.
- [16] A.S. Tripathi, I. Sheikh, A.P. Dewani, P.G. Shelke, R.L. Bakal, A.V. Chandewar, and P.M. Mazumder. Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2013),**21**:317-321.
- [17] Nevado J.J.B., Flores R. j., Penalvo G. C., Farinas N. R., Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography*, (2002), **953**:279-286.
- [18] Wang C.C., Gomez R.A., Fernandez L.P., Determination of sildenafil by preconcentration on surfactant coated polymeric resin followed by spectrofluorimetry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, (2013), **3**:173-179.
- [19] Mokhtar S.U., Chin S.T., Kee C.L., Low M.Y., Drummer O.H., Marriott P.J., Rapid determination of sildenafil and its analogues in dietary supplements using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016), **121**:188-196.

- [20] Wawer I., Pisklak M., Chilmonczyk Z., H, C, N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2005), **38**:865-870.
- [21] Pubchem Online. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45358339>
- [22] Dapoksetin Aktif Madde Dosyası *Emcure Drug Master File*
- [23] Priligy Film Tablet Kısa Ürün Bilgisi. *UFSA İlaç Sanayi ve Tic.A.Ş.* İlk yayın tarihi 26.03.2013
- [24] Kim T.K., Kim I.S., Hong S.H., Choi Y.K., Kim H., Yoo H.H., Determination of dapoxetine in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, (2013), **926**:42-46.
- [25] Zhang W. M., Qiang W., Ying-Fei W., Ming S., Wang R., Development and validation of a sensitive UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of dapoxetine and its two metabolites in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*(2016),**119**:45-9.
- [26] Jhanwar B., Nagori B., P., Jain S., Vyas V. Validation and Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Sildenafil Citrate in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma. *American Journal of Pharmatech Research*. (2013) **3**: 2249-3387.
- [27] Rajeshwari M., Chentilnathan A., Rama K. Validated Rp-Hplc Method for Simultaneous Estimation of Tadalafil and Dapoxetine Hydrochloride in Combined Pharmaceutical Dosage Forms. *Research Article Pharmaceutical Science* (2014) **2**: 72-82.
- [28] Giri, A., D., Bhusari V., K., Dhaneshwar, S., R. Validated Hplc Method for Simultaneous Quantitation of Tadalafil and Dapoxetine Hydrochloride in Bulk Drug and Formulation. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. (2012) **2**,:654.
- [29] Ravisankar P., Pavan N. A., Madhavi G., Shiny Susan, T. Validated UV Spectrophotometric Method for Quantitative Analysis of Dapoxetine in Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Science and Technology*. (2015) **11**:1976-1980.
- [30] Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi (2015). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi. Erişim: 15.06.2015, <http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>

- [31] ARLAB VIII. Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler.(2015) Erişim: 22.06.2015, http://webb.deu.edu.tr/arl原因/images/arl原因_kurs_kitapciki_2012.pdf
- [32] Enstrümental Analiz Ders Notları, Erişim: 21.05.2015, http://www.profdrmehmetyaman.com/ders_notlari/ens.pdf
- [33] Aletli Analiz Laboratuvarı , T.C. Anadolu Üniversitesi yayını no: 2092, Açıköğretim Fakültesi yayını no: 1123
- [34] www.tags-search.com/hplc-instrumentation/tag.html
- [35] Dibek.H.(2014).TurkChem Ocak/ Şubat;61. Erişim: 17.06.2015 http://www.antteknik.com/images/pressroom/2014_Turkchem_AnalitikLablardaHPLC_KolonuSecimi_KromSarf.pdf
- [36] Erişim: 17.06.2015, http://www.bayar.edu.tr/besergil/25_BOLUM_8.pdf
- [37] Söğütertaş Ö. ve Kayalı A. (2005)Ankara Ecz. Fak. Derg. 34 (1) 37 - 57
- [38] United States Pharmacopoeia 40th ed., 621 Chromatography, USP 40-NF 35: 508
- [39] ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 Kasım. Erişim 10.11.2015; http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- [40] Ermer J., Mcb. Miller J., H., (2005) *Method Validation in Pharmaceutical Analysis* Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA