



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİOGLİTAZON HİDROKLORÜRÜN UPLC-UV İLE MİKTAR
TAYİNİ VE VALİDASYONU**

SİNEM BİLGİÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. DİLEK BİLGİÇ ALKAYA

İSTANBUL-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİOGLİTAZON HİDROKLORÜRÜN UPLC-UV İLE MİKTAR
TAYİNİ VE VALİDASYONU**

SİNEM BİLGİÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç.Dr. DİLEK BİLGİÇ ALKAYA

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Sinem BİLGİÇ
Tez Başlığı : Pioglitazon Hidroklorürün UPLC-UV ile Miktar Tayini ve Validasyonu
Sınav Yeri : M.Ü.Eczacılık Fakültesi
Sınav Tarihi : 05.07.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç.Dr. Dilek Bilgiç Alkaya

(Marmara Üniversitesi Eczacılık Fak)

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Dr. Öğr. Üyesi Serap Karaderi

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fak)

Dr. Öğr. Üyesi Ümit Can Erim

Medipol Üniversitesi Eczacılık Fak)

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 2.1.2019.. tarih ve 56 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Ayşen GARGİL KELES

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sinem BİLGİÇ

TEŞEKKÜR

Desteęi, sonsuz anlayışı ve emeği için değerli Dr.Öęretim Üyesi Dilek BİLGİÇ ALKAYA hocama sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tüm zorlu süreçleri beraber aştığım annem Sebahat, babam Muhsin BİLGİÇ'e, yardımlarını esirgemeyen kardeşlerim Sevgi ve Merve'ye verdikleri sonsuz destek için teşekkür ederim.

Desteęini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Umut KARAAĞAÇ' a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-091215-0533 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışmanın yapılması için gerekli imkanı veren Sanofi Sağlık Ürünleri'ne teşekkürü borç bilirim.

Sinem BİLGİÇ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÖZET.....	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pioglitazon.....	6
2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	6
2.1.2. Farmakolojisi.....	7
2.1.3. Pioglitazon HCl ile yapılan etken madde analizleri.....	8
2.1.4. Kromatografi.....	10
2.1.5. Analitik yöntemin geçerli kılınması.....	16
2.1.6. Validasyon parametreleri.....	16
2.1.6.1. Doğruluk ve geri kazanım	17
2.1.6.2. Kesinlik	18
2.1.6.3. Seçicilik	19
2.1.6.4. Teşhis sınırı.....	19
2.1.6.5. Tayin sınırı.....	19
2.1.6.6. Doğrusallık.....	20
2.1.6.7. Duyarlılık	20
2.1.6.8. Çalışma aralığı.....	21
2.1.6.9. Sağlamlık.....	21
2.1.6.10. Tutarlılık.....	21
2.1.6.11. Kararlılık	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler.....	23
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	24
3.3. Yöntem	24
3.3.1. UPLC sisteminde uygulacak kromatografik şartlar.....	24
3.3.2. Validasyonda kullanılacak parametreler.....	25

3.3.2.1. Seçicilik	25
3.3.2.2. Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)	25
3.3.2.3. Doğrusallık.....	25
3.3.2.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik.....	26
3.3.3.5. Doğruluk	26
4. BULGULAR	27
4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	27
4.2. Geliştirilmiş Metodun Validasyonu:	32
4.2.1. Spesifiklik ve seçicilik:	32
4.2.2. Doğrusallık:	36
4.2.3. Doğruluk:	38
4.2.4. Kesinlik:	40
5. TARTIŞMA	44
6. KAYNAKLAR	46
EKLER.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

UPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GDM	Gestasyonel Diyabet
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi
Nm	Nanometre
ml/dk	mililitre/dakika
mg/ml	miligram/mililitre
$\bar{X}$	Ortalama değer
S	Standart sapma
BSS	Bağıl standart sapma
BH	Bağıl hata
LOD	Tayin Limiti
LOQ	Ölçüm Limiti
ICH	International Conference on Harmonization

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. Kromatografik Şartlar	24
Tablo 2. Kolon sıcaklığının Pioglitazon HCl piki üzerindeki etkisi	29
Tablo 3. Sistem Uygunluk Parametreleri	30
Tablo 4. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanları	30
Tablo 5. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanları İstatistiği	31
Tablo 6. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanların RSD.....	31
Tablo 7. Standart Pioglitazon Pikinin Özellikleri.....	32
Tablo 8. Doğrusallık Numunelerinin Alanları	37
Tablo 9. % Geri kazanımlar.....	39
Tablo 10. Doğruluk numunelerinin % sonuçları	39
Tablo 11. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının İstatistiği	40
Tablo 12. Doğruluk numunelerinin % sonuçların RSD	40
Tablo 13. Sistem Kesinliği	41
Tablo 14. Kesinlik numunelerinin % sonuçları.....	41
Tablo 15. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının İstatistiği	42
Tablo 16. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının RSD	42
Tablo 17. Günler Arası Analiz Sonuçları ve RSD	43
Tablo 18. LOD ve LOQ enjeksiyon sonuçları	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. Pioglitazone HCl.....	6
Şekil 2. Kromatogramın prensibi.....	11
Şekil 3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Bölümleri	12
Şekil 4. Piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi	15
Şekil 5. 0,3 ml/dk akış hızındaki deneme enjeksiyonu.....	28
Şekil 6. 0,4 ml/dk akış hızındaki deneme enjeksiyonu.....	29
Şekil 8. Standart Pioglitazon Çözeltisinin 6 enjeksiyonun Alanları Dağılımı.....	31
Şekil 9. Standart Pioglitazon Pikinin Sistem Uygunluk Kromatogramı.....	32
Şekil 10. Blank enjeksiyonu kromatogramı.....	33
Şekil 11. Placebo enjeksiyonu kromatogramı.....	34
Şekil 12. Standart enjeksiyonu kromatogramı	35
Şekil 13. Pioglitazon tablet enjeksiyon kromatogramı	36
Şekil 14. Doğrusallık grafiği.....	37
Şekil 15. Kesinlik Numunelerinin Sonuçları Dağılımı.....	42

ÖZET

Tezin Başlığı: Pioglitazone Hidroklorürün UPLC-UV ile Miktar Tayini ve Validasyonu

Öğrencinin Adı: Sinem BİLGİÇ

Danışman: Doç.Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA

Anabilim Dalı: ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

Amaç: Bu çalışmanın amacı film kaplı tabletlerde bulunan pioglitazon HCl etken maddesinin tayini için valide edilmiş ters faz ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC-UV) yöntemi geliştirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda pioglitazone HCl etken maddesinin literatür çalışmalarında bulunmayan UPLC cihazında metot geliştirilmesi ve validasyonun sağlanmıştır.

Bulgular: Pioglitazon HCl etken maddesinin UPLC cihazında zamandan, kullanılan kimyasallardan tasarruf edilerek seçicilik, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametrelerini karşıladığı ortaya koyulmuştur.

Sonuçlar: Geliştirilen yöntem etken maddenin BEH C18 kolonda fosfat tamponu (pH=6):asetonitril (55:45) hareketli fazı ve UV dedektör ile 225 nm dalga boyunda 0,4 ml/dk akış hızında tespitine dayanır. Bu yöntem ticari ilaç formülasyonu analizinde başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pioglitazon HCl, UPLC, Diyabet, metot validasyonu, kromatografi

SUMMARY

Title: Determination and Validation of Pioglitazone Hydrochloride by UPLC-UV

Student's name: Sinem BİLGİÇ

Consultant: Doç Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA

Department: Analytical Chemistry Department

Objective: The aim of this study is to develop a validated reverse phase ultra performance liquid chromatography (UPLC-UV) method for determination of pioglitazone HCl active substance in film coated tablets.

Materials and methods: In this study, the method development and validation of pioglitazone HCl active substance in UPLC device, which is not found in literature studies, was achieved.

Results: It was demonstrated that the active substance Pioglitazon HCl meets the parameters of selectivity, linearity, accuracy and precision by saving time and chemicals used in UPLC device.

Conclusion: The developed method is based on the detection of the active substance in the BEH C18 column with phosphate buffer (pH = 6): acetonitrile (55:45) mobile phase and UV detector at a flow rate of 0.4 ml / min at 225 nm. This method has been successfully applied in commercial drug formulation analysis.

Keywords: Pioglitazone HCl, UPLC, Diabetes, method validation, chromatography

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde gelişen ve büyüyen ilaç sektörleri arasında çeşitlilik sağlanan etken maddelerini valide olmuş metotlarla hızlı bir şekilde sonuç almak amaçlanmıştır. Çoğunlukla kullanılan HPLC metotlarına karşılık değişen dünyada gelişen teknolojiyle UPLC metotlarının kullanımına başlanmıştır.

- Kısa analiz süresi
- Rezolüsyon ve sensitivitenin artması
- Daha az kimyasal kullanımı ve daha az kimyasal atık
- Geniş pH aralığında doğru sonuç verme
- Hassas dedektör içermesi
- Farklı loop hacimleri
- Stabil olmayan etken maddelerinin hızlı analizi

UPLC cihazının özelliklerindendir.

Dünyada en sık görülen hastalık olan tip II diyabet tedavisinde kandaki şeker düzeyini kontrol altında tutabilmek için kullanılan Pioglitazon tiazolidinedion grubu ilaçlardır. İlaç insülin etkisini arttırarak kasta nonoksidatif glukoz metabolizmasını uyarır karaciğerde de glukoneogenezisi inhibe eder.

Literatür araştırmalarında pioglitazona etken madde ve safsızlık analizleri için yapılmış çalışmalar incelendiğinde genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda UPLC sisteminin hassasiyeti ve hızından dolayı ilaç analizlerinde tercih edilmesiyle etken maddenin UPLC yöntemiyle çalışılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle pioglitazone hidroklorür tayinine ilişkin UPLC cihazında metot geliştirilmesi ve validasyonu yapılması planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Diyabet, 1400'lü yıllarda yazılan tıbbi bir kayıta İngilizcede “diabete” kelimesi ile kullanılmıştır. 1625 senesinde Thomas Willis bal ve tatlı manasında kullanılan Latince mellis sözcüğünü, hasta kişilerin idrarlarının tatlı olacağını bildirmek için “mellitus” olarak belirtmiştir. İdrarın tatlı oluşu, Eski Yunan, Çin, Mısır ve ayrıca Hint ve Persler tarafından da gözlemlenmiştir. Matthew Dobson, 1776 yılında idrarın tatlılığını diyabet hastalığına sahip olan kişilerin kanlarındaki veya idrarlarındaki bir çeşit aşırı şeker sebebiyle oluştuğunu ispatlamıştır. Diabetes mellitus çoğunlukla yalnızca diyabet olarak isimlendirilen, çoğunlukla kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşmesiyle ortaya çıkan ve kandaki glukoz oranının aşırı derecede artmasıyla (hiperglisemi) görülen metabolik bir hastalıktır.

Dünyada en yaygın rastlanan endokrin bir rahatsızlıktır. Vücutta farklı organlara tesir etmesi ve bozulmaya sebep olması sosyal ve ekonomik sıkıntılar nedeni ile toplumun sosyal bir problemi olmuştur. Dünyaki diyabetli hasta sayısının 2025 yılına gelindiğinde 300 milyona kişide görüleceği, bu sayının %90'ını tip 2 diyabetlilerinden oluşacağı düşünülmektedir (Aksoy ve Gürlek, 2004).

Bedendeki kan şekerinin oranının düzenlenmesi birçok kimyasal madde ve hormonun etkileşmesi sonucunda oluşur. Şeker oranının düzenlenmesine katkı sağlayan hormonlardan en önemlisi pankreastan salgılanan insülin hormonudur. Diabetes Mellitus, yeterli insülin salgılanamaması ya da insülin kaynaklı bir bozukluk sonucunda görülen kan şekerinin yükselmesi sebep olduğu birkaç grup rahatsızlığı tanımlamak için kullanılır.

Diyabetin oluşmasının iki sebebi vardır. Birincisi insülin üretiminin azalması sebebiyle ortaya çıkar (Tip 1 diyabet). İkincisi insülinin etkisine karşı vücudun direnç geliştirmesiyle (Tip 2 diyabet ve gestasyonel diyabet) oluşur. Her iki durumun sonucunda da kan şekerinde artış (hiperglisemi) görülür.

Tip 1 Diyabet: “juvenil diyabet”, veya “tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)” olarak isimlendirilir. Pankreas beta hücrelerinin genellikle sinir merkezi sebepli tahribatına

bağlı olarak insülin eksikliği ortaya çıkar. İnsülin yetersizliği sebebiyle hastalara insülin hormonu enjeksiyonla sağlanır. Bu sebeple tip 1 diyabet, “İnsüline Bağımlı Diyabet” olarak da adlandırılır. Diyabet hastalarının %5-10’u, tip 1 diyabete sahiptir (Anonymous, 1985; Gavin vd., 1998). Tanı aşamasında hastanın ağız kuruluğu, fazla su içme, çok idrara çıkma, açlık hissi, kilo verme, bulanık görme, yorgunluk hissetme gibi şikayetleri olur. Bu şikayetler genellikle geçmiş birkaç hafta içinde görülmüştür. Son yıllara kadar bu tip diyabet sadece çocuklarda görülmekte idi. Fakat günümüzde yetişkinlerde de ortaya çıkmaya başlamıştır. Tip 1 diyabet şikayetlerinin yarısı 15 yaşından sonra görülür. Ayrıca genellikle 25 yaşından sonra ortaya çıkan tip 1 diyabet şekli de vardır (Anonim, 2011).

Tip 2 Diyabet: Tip 2 diyabet hastalığında beta hücreleri tarafından insülin üretir; fakat insülin hedeflenen dokularda etkili değildir. Tip 2 diyabet, “Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)”, “İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet” veya “erişkin tipi” diyabet olarak belirtilir ve çoğunlukla 40 yaşından sonra görülür. Dünyada tanısı konulan diyabet vakalarının % 90’dan fazlasını bu diyabet çeşidi oluşturur (Anonymous, 1985; Gavin vd., 1998). Şikayetler tip 1 diyabete benzer fakat daha hafiftir. Bu nedenle hastalık başladıktan ortalama 5 yıl sonra fark edilir. Son zamanlarda obezitenin çocuklarda artması ile çocuklar ve ergenlerde de tip 2 diyabet ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde görülen 15 yaş altı diyabet hastalıklarının yarısına yakınının tip 2 diyabet olduğu belirtilmektedir.

Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet: Bunlar nadir görülen diyabet çeşitleridir (Anonymous, 1985). Diyabet hastalarının %1’den azı bu diyabete sahiptir. Bu tip diyabete sebep olan hastalıklar şunlardır: Beta hücresinin işlevinin bozulmasına bağlı olan genetik defektler, insülin etkilerinde bozulmaya sebep olan ender genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç ve kimyasallara bağlı olarak ortaya çıkan diyabetler, enfeksiyonlar, immun sebepli ender diyabet çeşitleri ve diyabetle görülebilen genetik sendromların bu tip diyabete sebep olduğu belirtilmiştir (Anonim, 2011).

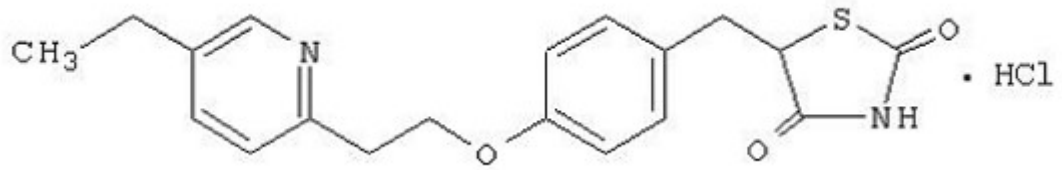
Gestasyonel Diyabet: “Gestasyonel Diabetes Mellitus; GDM” olarak da adlandırılır. İlk defa gebelik sırasında görülen diyabettir. Gebeliklerin % 2-4’ünde GDM ortaya çıkmaktadır (Anonymous, 1985; Gavin vd., 1998). Semptomları genel

olarak tip 2 diyabetle benzerlik gösterir. Fakat gebelik esnasında yapılan taramalar sebebiyle genelde belirtiler ortaya çıkmadan önce tanı yapılır. GDM, doğumdan sonra çoğunlukla iyileşir; ancak daha sonraki gebeliklerde yeniden ortaya çıkma ihtimali fazladır (yaklaşık % 50). Bununla birlikte GDM'si olan kadınların sonraki yaşamlarında tip 2 diyabetli olma ihtimali, % 80'i bulur (Anonymous, 1994). Bu nedenle GDM tanısı yapılmış kadınların doğumdan sonra koruma programına girmeleri gerekir (Anonim, 2011).

2.1. Pioglitazon

Kandaki şekerin seviyesini kontrol altında tutabilmek için kullanılan Pioglitazon . Tiazolidinedion grubu bir antidiyabetik olup tip 2 diyabet hastalığında kullanılır. Tiazolidinedion grubu ilaçlar insülin etkisini artırarak ve kasta nonoksidatif glukoz metabolizmasını uyarar, karaciğerde ise glukoneogenezisi inhibe ederek etkili olurlar. İnsülin sekresyonu üzerinde etkileri yoktur. İlaçlar glukoz konsantrasyonunu düşürürken buna plazma insülin konsantrasyonunda azalma eşlik eder (Fahim vd., 2009).

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 1. Pioglitazone HCl

Pioglitazon HCl;

-Kimyasal ismi (RS)-5-(4-[2-(5-ethylpyridin-2-yl)ethoxy]benzyl)thiazolidine-2,4-dione

-Molekül formülü C₁₉H₂₀N₂O₃S

-Molekül ağırlığı 356.44 g/mol

- Beyaz toz Kristal halinde
- Suda çözünmez, susuz etanolde çözünür.

2.1.2.Farmakolojisi

Hipergliseminin neden olduğu aşırı miktarda idrar üretimi diyabetin akut başında gelir. Su içme isteği ve dolayısıyla sıvı tüketimin artması ise aşırı idrar üretimini dengeleme çabasıdır.. Görmedeki bozulması, açıklanamayan kilo kayıpları, yorgunluk ve enerji metabolizmasındaki değişiklikler ise diyabetin diğer belirtileridir. Çoğunlukla 40 yaşı üstü hastalarda görülen tip 2 diyabette, insülin salgısı normal veya normalden fazla olduğu halde, glukozun organizmaya alınmasından dolayı artan plazma glukoz düzeylerindeki artışına insülindeki azalmaya sebep olmasındandır. Kontrol altına alınmadan yüksek seyreden kan şekeri uzun vadede çeşitli komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.. Şişmanlıkla tip-2 ile kalp-damar hastalıklarına, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropati, sinir sistemi hastalığı nöropati, körlüğe kadar götüren retinopati ve ayak ülserleri gibi uzun vade komplikasyonları sonucu felç, kangren veya koroner hastalıkların riskini artırmaktadır (Sacks, 1994).

Halen tip 2 diabetin patogenezinde primer bozukluk insülin rezistansı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle ile tedavinin ilk basamağında insülin sensitivitesini artıran ilaçların kullanılması en iyi yaklaşımdır. Guanidin türevlerinin böyle bir etki mekanizması olduğunun anlaşılmasının ardından antidiabetik ilaç geliştirme çalışmalarında bu grup moleküllerin önemi artmış ve bu çalışmaların ürünü olarak tiazolidinedionlar geliştirilmeye başlanmıştır. Tiazolidinedionlar; PPAR- γ (Peroksisom Proliferator-Aktive Reseptör- γ) agonistleridir. PPAR aktivasyonu ile insüline cevap veren genlerin transkripsiyonunu düzenlerler. Bu gruptaki ilaçların etki mekanizmaları çoğunlukla iskelet kasında olmak üzere periferik dokulardaki insülin duyarlılığını arttırmaktır. Açlık plazma glukozunu 25-55 mg/dl, A1c'yi %0.5-1.4 düzeyinde düşürürler. Glitazonlar sıvı retansiyonuna ve ödeme sebep olabilirler, bu nedenle kalp yetmezliği hastalarında kullanılmaları, özellikle de insülinle birlikte kullanılmaları tavsiye edilmemektedir. Diğer yan etkiler arasında anemi, kilo alımı,

hepatotoksitedir, rosiglitazonda daha belirgin olmak üzere LDL kolesterolde artış sayılabilir (Aygaz ve Kan, 2010).

2.1.3.Pioglitazon HCl ile yapılan etken madde analizleri

Pioglitazon HCl etken madde miktar tayini ile safsızlık analizleri için literatürlerde genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) UV dedektör sisteminin kullanıldığı metotlar bulunmaktadır.

Adukondalu ve ark. HPLC-UV/VIS dedektör tercih edilerek pioglitazone HCl tabletler için bir yöntem geliştirilmiştir ve validasyonu yapılmıştır. C 18 4,6×250mm. kolon kullanılmıştır. Mobil faz bileşimi ise 10 mM fosfat tamponu (pH 4.5) : Asetonitril: 50:50 ve 245 nm dalga boyunda, 1ml/dk akış hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Pioglitazone HCl (R.t 6.3 dk) (Adukondalu ve Malathy, 2011).

Shaik ve ark. tarafından UV- visible dedektör kullanılarak etken madde analizi ve validasyonu yapılmıştır. Intersil ODS C18 (150mm × 4.6 mm, 5µm), mobil faz olarak amonyum asetat tampon çözeltisi; asetonitril ve asetik asit 50:50:1 (v/v) oranında kullanılmış 269 nm dalga boyunda 0.7 ml/dk akış hızında izokritik bir sistemde analiz gerçekleştirilmiş ve valide edilmiştir (Shaik vd., 2014).

Patil Pavelli M. ve ark glimepirid, metformin HCl ve pioglitazon HCl molekülleri için UV spektrofotometrede metot geliştirmişlerdir. İlk olarak glimepride, metformin HCl ve pioglitazone HCl standartları cihazda okutulduğunda sırasıyla ; 227 nm, 233 nm ve 265.5 nm dalga boyunda pik vermiştir. Daha sonra 3 molekülden oluşan numune çözeltisini 227 nm, 233 nm ve 265.5 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Pavalli vd., 2012).

Deepti Jain ve ark metformin HCl , pioglitazon HCl ve glimepirid tablet formları için UV-PDA dedektör kullanılarak 3 farklı numuneyi tek bir HPLC sisteminde etken madde analizi için metot geliştirmişleridir. Inertsil-ODS-3 (C-18) Kolon (250 × 4.60 mm, 5 µm) ve mobil faz olarak metanol-fosfat tampon çözeltisi (pH 4.3) 75:25 v/v kullanarak 1 mL/dk akış hızında 258 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirip metodu valide etmişlerdir (Jain vd., 2008).

Lakshmi ve ark. metformin ve pioglitazon tablet formları için etken madde analiz metodu geliştirmişleridir. Gemini C18 kolon (150 x 4.6 mm, 5 µ) kullanılmış ve mobil faz olarak asetonitril ve amonyum asetat tampon çözeltisi (pH-3) 42: 58 oranında kullanılmıştır. Akış hızı 0.3 ml/dk ve 255 nm dalga boyunda çalışılan cihazda 5.17 dk da metformin piki ve 8.1dk da pioglitazon piki kromatogramda gelmiştir. Kalibrasyon eğrisi üzerinde, metformin için 0.5-50 ug / ml ve pioglitazon için 0,3-30 ug / ml işaretlenmiştir (Lakshmi vd., 2009).

Najma Sultana ve ark. diltiazem, metformin, pioglitazon ve rosiglitazon tablet formunda ve insan kanı serumunda kullanılacak şekilde metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Hiber, 250-4.6 mm RP-18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril-metanol-su (30:20:50, h/h oranında ve pH 2.59 ± 0.02) kullanılıp oda sıcaklığında akış hızı 1.0 mL/dk ile UV-VIS dedektörde 230 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilmiştir. İyi bir rezolüsyonla tüm antidiyabetikler birbirinden ayrılmıştır (Sultana vd., 2011).

AMR Lotfy Saber ise tablet formundaki pioglitazon HCl etken maddesinin UV dedektör ile HPLC'de Nova-Pak Æ C18 kolonu (3.9 mm x 150 mm, 5 µm) mobil faz olarak ise formik asit ile pH 3'e ayarlanmış amonyum format tamponu ve asetonitril (75:25, h/h) oranında kullanmış olup, 1.0 mL/s akış hızı ile UV dedektörde 225 nm dalga boyunda analizlemiş ve etken madde miktar tayini metodunu valide etmiştir. Doğrusallık $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$, hassasiyet $\geq 99.14\%$, ve kesinlik $\leq 0.6\%$ bulmuştur (Saber, 2008).

Lakshmi ve Rajesh (2011), glipizid, rosiglitazon, pioglitazon, glibenklamid ve glimepiridin eş zamanlı tayini, ilaç formlarından ve insan plazmasından analizi için HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Phenomenex C18 (150 x 4,6 mm, i.d., 5 µm) kolonuyla 1 mL/dakika akış hızında % 0,05 trietilamin, asetonitril ve metanol karışımı (55:15:30; pH 3,5) oranında mobil faz olarak kullanmıştır. İlaçlar 248 nm dalga boyunda 20 dakikadan daha az bir süre içinde ayrılmışlardır. Glipizid, rosiglitazon, pioglitazon, glibenklamid, ve glimepirid için alıkonma zamanları sırasıyla 4,51; 9,56; 11,3; 14,76 ve 17,78 dakikadır. Formülasyonlardan ve insan plazmasından elde edilen geri kazanım değerleri birbirine yakındır. Bu yüzden bu yöntemin farmasötik dozaj formlarının rutin kalite kontrolü için kolay kullanılabilir

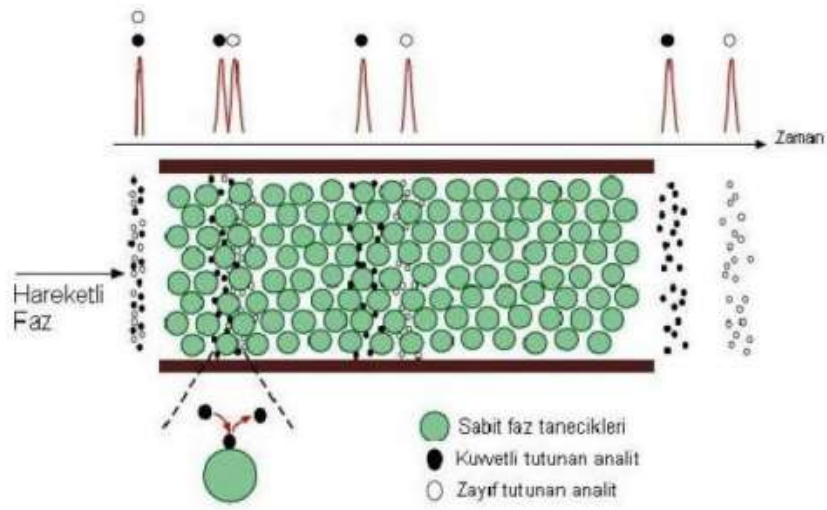
olduğunu ve aynı zamanda klinik çalışmalar için de uygulanabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

2.1.4. Kromatografi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiri ile karışmayan, hareket eden faz ile (gaz veya sıvı) sabit (duran) (katı veya sıvı) faz arasındaki partiyon (dağılım) dengelerine dayanarak ayrılmasını ve aynı zamanda bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizini sağlayarak geniş kullanım alanı bulan bir ayırma yöntemidir (Özden, 2011). Bu metodun temelinde, ayrılacak bileşenlerin bu iki farklı fazda gösterdikleri davranış farklılığı yer almaktadır. Hamilton ve Sewel (1982) ; Bidlingmeyer (1992)'e göre hareket eden faz içerisinde çözünen örnek çözelti sabit fazda farklı etkileşimlere girer. Bu etkileşimler çözünürlük, elektron çifti etkileşimleri iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır. Bu olaylara bağlı örnek çözelti sabit fazda tutunarak hareket eder. (Özden, 2011).

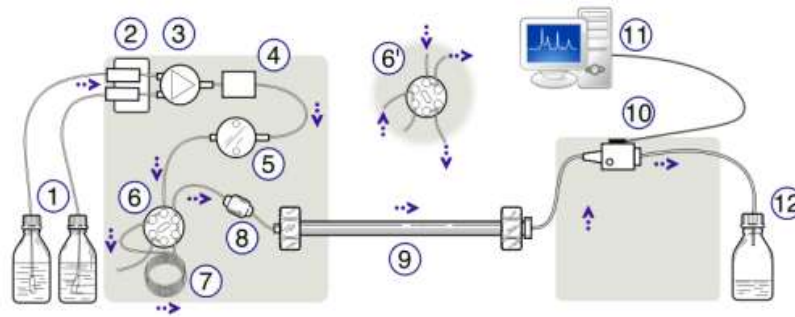
Kolona çözücünün sürekli verilmesi, hareketli ve durgun faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde taneciklerini kolondan sürükler. Numune enjeksiyon sonrasında kolona gelir ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı arasında dağılır. Numune çözeltisi ile birlikte kolona giren hareketli faz, kolon içerisindeki durgun fazda dağılmasına ve ilerlemesine katkı sağlar. Numune çözeltisi içerisinde bulunan farklı bileşenler durgun faz olan kolonda farklı zamanlarda tutunur, farklı zamanlarda kolonda ilerler ve kolonu farklı zamanlarda terkederler. Böylece numune çözeltisi içerisindeki bileşenler ayrılmış olur. Bu ayırma işlemi için hareketli faz HPLC sistemine yüksek bir basınçla pompa yardımıyla verilerek kısa sürede ayırma işlemi tamamlanır. Kolonda ayrılan bileşenler kolon çıkışına bağlanan bir dedektör ile absorbanlarına karşılık bileşenlerin miktarı belirlenir. Dedektörden alınan sonuçlar zamana karşı y- ekseninde işaretlenmesiyle grafikler oluşur. Bu grafiklere “kromatogram” denir. Bu grafikler hem kalitatif hemde kantitatif analiz için kullanılır. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılabilir; pik alanları ise, her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür (Skoog vd., 1998).



Şekil 2. Kromatogramın prensibi

Küçük dolgu maddelerini çelik kolonlara doldurup yüksek basınç altında hareketli faz ile sisteme numuneyi enjekte edilmesiyle oluşan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi denir. Hareketli fazın sıvı olduğu, hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği kromatografik sistemlerdir (Gündüz, 2002). HPLC sisteminde kullanılacak hareketli fazın seçiminde, yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, uygun fiyat gibi özelliklere dikkat edilmelidir. Hamilton (1982), White (1990), Bidlinmeyer (1992)'e göre sabit faz ve hareketli faz farklı polariteye sahip ise örnek molekülleri de farklı çözünürlüklere sahip olabilir. Bu iki fazın polarite değişimlerine göre dağılma kromatografisi iki bölümde gözlenebilir; bu kromatografiler ters-faz sıvı kromatografisi ve normal-faz sıvı kromatografisidir (Özden, 2011). Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polar, sabit faz ise apolardır. Sabit faz olarak genelde organik grupların bağlanması ile kimyasal olarak değiştirilmiş katı partikül yüzeyler kullanılır. Ters-faz sıvı kromatografisinde apolar maddelerin ayrımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit faz olan C18 daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit faz olan C8 ve C2 ise, daha polar maddelerin ayrışmasında tercih edilir. Böylece polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddelerde kısa zincirli sabit fazlarda daha

az tutunurlar (Hamilton, 1982; Sewel vd., 1987; Meyer, 1988; Bidlinmeyer, 1992). Normal-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz apolar, sabit faz ise polardır. Hareketli faz içerisinde genelde hekzan, dietil eter, kloroform veya oktanol gibi polaritesi düşük çözücüler kullanılır.. En yaygın kullanılan sabit fazlar ise; silika ve alüminadır (Özden, 2011). HPLC cihazının Şekil 3.'de ayrıntılı olarak kısımları gösterilmiştir. Kendine has işlevlere sahip olan pompa, örnek giriş sistemi (enjeksiyon bloğu), kolon, dedektör ve kaydedici (data sistemi) olmak üzere beş ana kısımdan oluşan bir düzendir.



Şekil 3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin Bölümleri

- 1) Çözücü hazneleri,
- 2) Çözücü degazör bölgesi,
- 3) Gradient valfleri (kapakları),
- 4) Mobil fazın dağıtımı için karıştırma kabı,
- 5) Yüksek basınçlı pompa,
- 6) Enjeksiyon konumu için kapak değişim kısmı, 6') Numune yükleme için kapak değişim kısmı,
- 7) Numune enjeksiyon döngüsü,
- 8) Ön-kolon (guard kolon),
- 9) Analitik kolon,
- 10) Dedektör,
- 11) Veri toplama, kaydedici,
- 12) Atık bölmesi.

Hareketli fazın sisteme verilmesi bir piston pompası aracılığıyla çözücü haznesinden sağlanır. Çözücü haznesinden seçilen çözücüler sistemin öncelikle degazör bölmesine girmelidir. Çünkü çözücüler içerisinde bulunabilecek muhtemel hava kabarcıkları ile istenmeyen partiküller bu bölümde elimine edilir. Bu sayede hem ayırım prosesinde istenmeyen etkileşimlerden kaçınılmış olup hem de dedektör sinyalindeki analiz kaynaklı gürültü minimuma indirilmiş olmaktadır (Bilber, 2010). Numunenin kolona verilmesi pompa ile kolon arasında yer alan enjeksiyon valfi yardımıyla olur. Numune, yükleme durumunda enjekte edilir. Sonra valf, enjeksiyon pozisyonuna çevrilir. Böylece numune hareketli faz yardımıyla kolona verilmiş olur. Numune bileşenleri kolonun ve hareketli fazın özelliklerine göre kolonda farklı hızlarda ilerler ve farklı zamanlarda kolonu terkederler. Kolondan ayrılan hareketli faz dedektöre gelir ve bir sinyal işlemci tarafından analitik sinyale dönüştürülür. Bu sinyal (pik) kromatogram halinde kaydedilir (Torul, 2009).

Kromatografide Temel Parametreler

Kromatografik yöntemlerde etkili bir ayırım gerçekleştirebilmek için numune bileşenlerinin kolonda tutunabilmesine, numune bileşenlerinin diğerlerinden ayrılabilmesine, numune bileşenlerinin bant genişliklerinin nispeten dar olmasına dikkat etmek gerekir. Bu koşullar sağlanmazsa, uygun bir ayırım gerçekleşmez. Ayrımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise, verilerin yani kromatogramların yorumlanmasıyla kontrol edilir. Kromatogram; kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar aldığı yol veya zamana karşı, uygun bir dedektör tarafından elektronik olarak verilen sinyalle oluşturulan grafikdir. Zaman eksenindeki piklerin yeri, numune bileşenlerini tanımda kullanılır. Pik alanları her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür. Bir kromatogramı yorumlamak için gerekli parametreler; Alıkonma zamanı, t_R Kapasite faktörü, k Seçicilik faktörü, α Kolon ayırma gücü, R_s Kolon verimliliği, N ve L olarak verilmiştir.

Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü

Alıkonma zamanı (t_R), numunenin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma davranışı numune bileşenlerinin hareketli faz

ile sabit faz arasındaki dağılımını gösterir. Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine sıklıkla kapasite faktöründen, k , yararlanılır. Kapasite faktörü, kolonda çözünen numune bileşenlerinin göç hızlarını açıklamak için kullanılan bir ifadedir. Alıkonma faktörü olarak da bilinen kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

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

Burada t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. İyi bir HPLC ayırması için k , 1–10 arasında olmalıdır. k değerlerinin bu aralıkta olması, mobil faz özellikleri ve durgun fazın değiştirilmesi ile sağlanır (Poole ve Poole, 1991).

Seçicilik, α

Kromatografik sistemde iki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneği kolon seçiciliği olarak adlandırılır. Bu durumda bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı; bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağını bir ölçüsüdür. Seçiciliğe etkileyen faktörlerden birincisi sabit faz gibi görünsede hareketli faz bileşimi de azda olsa seçiciliği etkileyen etkenlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi eşitlik aşağıda gösterilmiştir. α , 1,15 ise iki bileşiğin % 98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$$

Teorik tabaka sayısı, N

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğine işaret eder. Kolon verimliliği kolona karakteristik olup kolonda pik dağılım derecesinin ölçümüdür. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ dir. Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2$$

Burada;

N : Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0.5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

Ayırma gücü, R_s

Bir kolonun ayırma gücü, R_s değeri, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Ayırma gücünün belirlenmesinde seçicilik, kapasite faktörü ve tabaka sayısı rol alır. Kromatogramda ard arda gelen iki pik arasında ayırma gücü olan R değeri 1,5 iken tam ayırım olmaktadır. R değeri azaldıkça iki analitin birbiri içerisine girmesi söz konusudur. Örneğin; $R= 1,325$ olduğunda maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiştir, $R=1$ iken, maddelerden biri diğeri içine % 4 oranında girmiştir. $R= 0,75$ 'de ayırım olmamaktadır. (Skoog vd., 1998) (Şekil 4). Ard arda gelen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplama yapılabilir.

$$R_s = (1/4)\sqrt{N} [(\alpha-1)/\alpha] [k/(1+k)]$$

Burada;

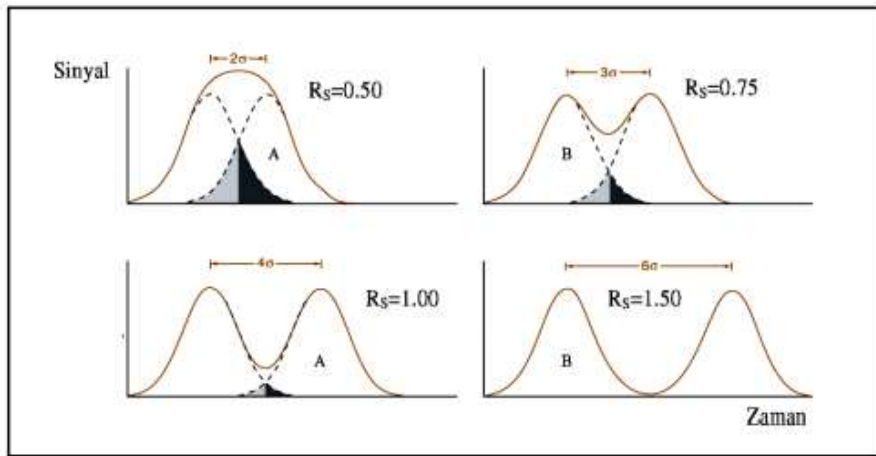
R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

N : Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k : Kapasite faktörüdür.

Bu bağıntı sıvı kromatografik ayırmalarda optimizasyon için esas alınan bağıntıdır. Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün en az 1,5 olması istenir (Skoog vd., 1998).



Şekil 4. Piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

2.1.5. Analitik yöntemin geçerli kılınması

Analitik yöntemler, ilaç etken madde kantitatif - kalitatif analizlerinde ve yardımcı madde analizlerinde, biyoeşdeğerlik analizlerinde, farmakokinetik sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan metotlardır. Bu analizlerin yapılabilmesi için kullanılan analitik metotların güvenilir sonuçların elde edilebileceği validasyonu tamamlanmış geçerliliği olan analitik yöntemler olması gerekmektedir. Geliştirilen her analitik yöntemin validasyonu birbirine bağımlı olmamalıdır. (ICH 1994; Riley ve Rosanske, 1996; Lunte ve Radzik, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001).

Amerikan Farmakopesine (USP XXIII/NF) göre bir yöntemin geçerli kılınması, bir analiz metodunun performansının istenilen analitik uygulamada, belirlenen gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Bir yöntemin gerçekli olması için, geliştirilen metodun aynı zamanda validasyon parametreleri olan uygunluluk, duyarlılık, doğruluk, kesinlik ve tekrar edilebilirlik parametrelerini karşılaması gerekmektedir. Öncelikle cihaz kontrolü ve validasyonu (tüm donanım ve yazılımlar için) yapılmalıdır. Daha sonra seçilen ve geliştirilmesi düşünülen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için validasyon yapılır. Yapılacak analitik analizler için hangi validasyon parametrelerinin kullanılacağı tayin edilmelidir. Geliştirilmesi bitmiş bir yöntemin geçerliliğinin olması için validasyon parametrelerinin ve hesaplarının yapılmış olması gerekmektedir. (ICH 1994; Riley ve Rosanske, 1996; Lunte ve Radzik, 1996; Braggio vd., 1996; Adamovics 1997; Swartz ve Krull, 1997; Mc Dowall 1999; Ahuya ve Scypinski, 2001; Ermer 2001; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004). Cihaz, donanım, yazılım ve geliştirilen yöntemin validasyonları tamamlandıktan sonra Sistem Uygunluk Analizleri yapılır. Bu analizler yöntemin geliştirilmesinde USP tarafından önerilen ve kullanılan testlerdir.

2.1.6. Validasyon parametreleri

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlar üzerinde kullanılmaya başlanan ilaçların analiz metotlarının geçerliliğini sağlamak için ortak doküman oluşturmuştur. Bu dokümanda analiz metotlarının geçerli kılınması için tanımlar yer

alır. Analitik bir yöntemin validasyonu için gerekli parametreler, ulusların farklı kuruluşlarında, uluslararası komitelerde ve literatürlerde belirtilmiştir (Huber, 2007; Riley ve Rosanske,, 1996; Torul, 2009). Analiz metotlarının kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

- Doğruluk (Accuracy; Geri Kazanım (Recovery))
- Kesinlik (Precision)
- Seçicilik (Selectivity)
- Teşhis Sınırı (LOD)
- Tayin Sınırı (LOQ)
- Doğrusallık (Linearity)
- Duyarlılık (Sensitivity)
- Çalışma Aralığı (Range)
- Sağlamlık (Robustness)

2.1.6.1.Doğruluk ve geri kazanım

Geri kazanım parametresi, analiz sonucu değerinin gerçek değere olan oranıdır. Elde edilen sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak gösterilir. Sisteme verilen analizlenecek numunenin analiz yapılan sistemden % kaç oranda geri alınabildiğini belirtir. Geri kazanım çalışmalarında 3 farklı yöntem kullanılır:

Referans Standart ile Karşılaştırma:

Yöntemin sonuçlarını, referans yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır. Elde edilen sonuçlar referans kabul edilen standart sonuçlarına göre istatistiksel olarak kıyaslanır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır. Hesaplanarak bulunan t ve F değerleri tabloda verilen teorik t ve F değerleri ile karşılaştırılır. Bu hesaplarda bulunan değerlerin tabloda bulunan değerlerden küçük olması geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile birlikte gösterilir. (Eşitlik 1.54, Eşitlik 1.55) (ICH 1994; Swartz ve Krull 1997).

$$\%BSS = \frac{SS}{x_{ort}} \times 100$$

$$\%BH = \frac{GD - x_{ort}}{GD} \times 100$$

Burada, GD: Gerçek Değer, SS: Standart Sapma ve Xort: Ortalama Değeri ifade eder.

Matris ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formlarında olduğu gibi matris etkisi olan numunelerle çalışılacağı zaman tercih edilen bir yöntemdir. Analizlecek madde boş matrise farklı derişimlerde ilave edilir ve tayin edilir. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata ile birlikte gösterilir. Bu doğruluk kontrolü numunenin hazırlanışının etkisini ve matriks etkisini ölçer.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:

Bu yöntem ile daha önceden tayin edilmiş referans standardın belirli derişimler ile analiz edilecek maddenin de içerisinde bulunduğu matriks ortamına ilave edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu yöntem Standart Ekleme Yöntemi olarak ifade edilir. Bu çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin oluşturulmasıyla etken madde miktar tayini bu kalibrasyona göre hesaplanır. Sonuçlar eklenen ve bulunan madde miktarları verilerek belirtilir. Bu yöntemle, numunedeki yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda tercih edilir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile birlikte gösterilir.

2.1.6.2.Kesinlik

Analiz metodunun kesinliği, art arda enjeksiyon yapıldığında elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir analitik prosedürün kesinliği genellikle bir dizi ölçümün varyansı, standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilir. Kesinlik için kabul kriteri yapılan analizin türüne bağlıdır. İlaç analizlerinde safsızlık çalışmalarında kabul edilebilirlik sınırı %10'lar da iken, miktar tayinin de %2'ler arasında değişmektedir.

2.1.6.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin, içerisinde bulunan girişim yapma ihtimali bulunan yardımcı maddelerin, çözeltilerden gelebilecek tanımsız safsızlıkların ve sistemde olan safsızlıkların yanında miktarının doğru olarak belirleneceğini gösteren parametredir. Numune çözeltileri ve etken maddenin içerisinde olmadığı diğer tüm maddeleri içeren plasebo sisteme verilerek bu parametre tamamlanmış olur.

2.1.6.4. Teşhis sınırı

Zemin gürültüsünden farklı olarak % 95 ya da % 99 güvenirlilik sınırı içinde tespit edilen belirlenen deney koşulları altında analitik yöntemle uygun doğruluk ve kesinlik ile analiz edilebildiği en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, bu derişimin altındaki derişimlerde istenilen doğrulukta madde analiz edilemez. Teşhis sınırının hesaplanmasında, kör veya tanık çözeltilerinin analizi yapılarak sonuçların standart sapması doğrunun eğimine bölünür. Bu değerin 3,3 katının alınmasıyla gözlenebilme sınırı hesaplanır.

$$LOD = 3,3 \times SD/m$$

Bu eşitlikte ;

SD= Standart çözeltilisinden oluşturulan metot ile sisteme 5 enjeksiyon verildiğinde bulunan sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon eğrisinin kesişim değerinin standart sapması,

m= ilgili kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

2.1.6.5. Tayin sınırı

Bir maddenin % 95 güven sınırı içinde tayin edilebilen en düşük miktarı olarak tanımlanmıştır. Bir başka ifadeyle analitik bir yöntemde, uygun doğruluk ve kesinlikte, analitin miktarı saptanabilen en düşük derişimdir. Tayin sınırı sinyal/gürültü olarak belirlendiğinde bu oran 10 olarak alınır.

$$LOQ = 10 \times SD/ m$$

Bu eşitlikte;

SD= kör çözeltisinden oluşturulan metot ile sisteme 5 enjeksiyon verildiğinde bulunan sonuçlarının veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması;
m= ilgili kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

2.1.6.6. Doğrusallık

Analitik bir işlemin doğrusallığı, örnek içindeki analitin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı test sonuçlarının belli bir aralıkta elde edilebilmesi yeteneğidir. En düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru bir seri standart çözeltiler hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltilerin konsantrasyona karşı ölçüm yapılan cihazın verdiği sonuç grafiğe aktararak kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için bu farklı konsantrasyonlardan oluşan grafiğin düz bir doğru üzerinde yer almalıdır. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı belirten parametrelerdir. Bunlar analit konsantrasyonunun ölçülen sonuçlara karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı $r = 0,9990$ ve üzerinde ise sonuçlar çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'leri veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda gösterilmelidir.

2.1.6.7. Duyarlılık

Analitik bir yöntemde, kullanılan cihazın analit derisimindeki küçük farkları ayırt edebilme yeteneğidir. Duyarlılığı sınırlayan iki faktör vardır. Birincisi; kalibrasyon eğrisinin eğimidir. İkincisi ise; ölçüm aracının kesinliği ve tekrarlanabilirliğidir. Herhangi iki yöntemin kesinliği eşit ise, kalibrasyon eğrisi daha dik olan yöntem daha duyarlıdır. IUPAC tarafından kabul edilen duyarlılığın kantitatif tanımı kalibrasyon duyarlılığı olarak yapılır. Kalibrasyon duyarlılığı aynı zamanda eğimi ifade eder.

2.1.6.8. Çalışma aralığı

Analitik bir yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken, tayin edilebilen en düşük derişimden (LOQ), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime (LOD) kadar olan aralığı kapsar (Torul, 2009). Konsantrasyon aralıkları geliştiren yönteme göre değışiklik gösterir. Bu aralık yöntemin doğrusallığı bulunduğundan sonra tayin edilir.

2.1.6.9. Sağlamlık

Validasyonun sağlamlık parametresi analizdeki herhangi bir parametrenin değışikliğinde oluşacak etkileri gösterir. Farklılaşan şartlardaki yöntemin analiz sonuçlarının doğruluk parametresi ve kesinlik parametresinin kabul edilir olup olmadığını belirler. Eğer yöntemde değıştirilen parametrelerde herhangi bir limit dışında bir durum gözlenir ise bu yöntemin tekrar validasyona başvurulma ihtiyacı durumunu belirler. ICH' e göre geliştirilen yöntemin sağlamlık parametresi önemlidir. Analitik metot parametreleri üzerinde yapılan küçük değışikliklerden (kolon sıcaklığı, akış hızı, mobil faz bileşeni değışikliği, pH değışikliği ve kolon değışikliği) yöntemin etkilenmemesi ve normal kullanım sırasında metodun güvenilirliğini sağlar. (Ertaş ve Kayalı, 2005; Torul, 2009).

2.1.6.10. Tutarlılık

Analitik bir yöntemin tutarlılığı belirlemek için farklı günlerde, farklı laboratuvarlarda veya farklı kişilerin yaptığı iki analizin sonuçlarının yakınlığını belirtir. % bağıl standart sapma ile ifade edilir. ICH, analitik bir yöntemin validasyonunda bu parametreyi zorunlu kılmamıştır (Skoog vd., 1998; Ertaş ve Kayalı, 2005; Torul, 2009).

2.1.6.11. Kararlılık

Bu validasyon parametresi tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde etmek için standart ve numune çözeltilerine yapılır. Standart ve numune çözeltileri oda

sıcaklığında yada numuneleme haznesinin belirlenen sıcaklığında geliştirilen yöntem ile çalışıldığında uygun bir süre stabilitesinin takip edilmesini amaçlayan parametredir. İlk olarak standart ve numune sisteme hazırlandığı gibi enjekte edilir. Daha sonra belirli saat aralıklarıyla (örneğin 6-12-24-48 gibi) enjeksiyonlar yapılarak taze hazırlanan standart çözeltiye karşı değişimleri kontrol edilir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

Kullanılan kimyasallar:

Pioglitazon Hidroklorür Referans Standardı Zheijang Huahai

Asetonitril (J.T.Baker)

Metanol (J.T.Baker)

Sodyum dihidrojen Fosfat (Merck)

Sodyum hidroksit (Merck)

Validasyon çalışmasında kullanılan ultra saf su Merck Milipore su sistemi tarafından sağlanmıştır.

Cihazlar

UPLC Waters Alliance ACQUITY UV dedektör

Hassas Terazi Mettler Toledo

pH metre Mettler Toledo

Manyetik Karıştırıcı

Ultrasonik Banyo Isolab

Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7MicroM 2,1*50mm UPLC kolonu

Waters vial

Filtre PET 0.45 gözenekli

Kullanılan Bilgisayar programları:

Empower 3 software

Biostat stars

Microsoft Excel-Word

Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatları

Piogtan Film Kaplı Tablet 15mg (Zentiva)

3.2 Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Çözelti: 16 mg Pioglitazon HCl referans standardı 50 ml hacimdeki balonjojede çözücü olan asetonitril kullanılarak ultrasonik banyoda 15 dk boyunca bekletilir ve hacmine tamamlanır. PET filtre ile süzülür.

Test Çözeltisi: 10 adet tablet numunesi havanda öğütülerek 16 mg Pioglitazon HCl etken maddesini içerecek şekilde 1 tablet ağırlığı kadar numune tartıldı ve 50 ml hacmindeki balonjojede çözücü ile hacmine tamamlanır. Ultrasonik banyoda 15 dk bekletilerek. PET filtre ile süzülür.

Plasebo çözeltisi: 43 mg aktif içermeyen plasebo çözeltisi 50 ml'lik balojojeye tartıldı ve çözücü ile hacmine tamamlanarak ultrasonik banyoda 15 dk boyunca bekletilerek PET filtre ile süzülür

Blank Çözeltisi : Çözücü olan asetonitril blank çözeltisi olarak sisteme verilir.

Hareketli Faz çözeltisi: : 3,9 g sodyum dihidrojen fosfat 1 litre suda çözülür ve seyreltik NaOH çözeltisi ile pH 6 ya ayarlanır. Hazırlanan bu tampon çözelti ile %45:%55 (h/h) oranında asetonitril ile karışım hazırlanır.

3.3.Yöntem

3.3.1.UPLC sisteminde uygulanacak kromatografik şartlar

UPLC metodunun geliştirilmesinde uygun koşulların belirlenmesi amacıyla mobil faz farklılığı, akış hızı farklılığı, enjeksiyon hacmi farklılığı gibi parametreler sistemde denendi. Tablo 1' deki şartlarla analizler gerçekleştirilecektir.

Tablo 1. Kromatografik Şartlar

Analiz Parametresi	Koşul
Yazılım	Empower 3 Software
Çözelti A	3.9g Sodyum Dihidrojen Fosfat 1 litre saf suda çözülmüş ve pH:6 ya ayarlanmıştır.
Çözelti B	Asetonitril
Mobil Faz	A:B 55:45 (%v/v)
Kolon	Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7µm 2,1mm*50mm

Kolon Sıcaklığı	25°C
Autosampler Sıcaklığı	4°C
Enjeksiyon Hacmi	0,5 µL
Analiz Süresi	3 dakika
Pompa Programı	İzokritik Sistem
Akış hızı	0,4 ml/dk
Dalga Boyu	225 nm
Çözücü	Asetonitril

3.3.2. Validasyonda kullanılacak parametreler

Aşağıdaki parametreler pioglitazone HCl'in miktar tayini yöntemi için analitik metod validasyonunda incelenecektir.

3.3.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinin belirleme amacıyla, mobil fazdan ve tabletin içerisindeki yardımcı maddelerinden kaynaklanan bir girişimin var olup olmadığı belirlendi. Bunlara ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1'de gösterilmiştir.

3.3.2.2. Tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.5' de verildi.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.3.2.3. Doğrusallık

Doğrusal aralık, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlikte sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için pioglitazon 0,000534(LOQ) – 0,384mg/ml farklı konsantrasyonda içeren karışımlar hazırlandı. Kromatogramlardan elde edilen pik

alanları ve konsantrasyona karşılık grafikler çizildi. Elde edilen tüm sonuçlar Bölüm 4.2.2’de bildirildi.

3.3.2.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

0.32 mg/ml konsantrasyonunda n=6 olacak şekilde kesinlik parametresi için örnekler hazırlandı. Belirlenen ölçü eğrisi (0,32 mg/ml standart pioglitazon çözeltisi) denkleminde yerine konularak sonuçlar hesaplandı. Aynı şekilde farklı günde farklı bir analist tarafından n=6 olacak şekilde numuneler hazırlanıp hesaplamalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4’de bildirildi.

3.3.3.5. Doğruluk

Geliştirilen analiz metodunun doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için %80, %100 ve %120 konsantrasyona denk gelecek şekilde pioglitazon çözeltileri hazırlanarak daha önce hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonların geri kazanımı hesaplandı.

Tabletlerde Pioglitazon Analizi

Tablet Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Bunun için, 16 mg pioglitazon HCl içerecek şekilde tablet 50 mL’ lik balon jode asetonitril ile çözülerek ve 50 ml tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Bu zamanın sonunda 0,32 mg/ml konsantrasyonundaki numuneler PET filtreden süzülerek UPLC sistemine enjekte edildi. Bu işlem 6 farklı numune için tekrarlandı. Tabletlerdeki pioglitazon miktarları daha önce hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4’ de belirtildi.

4.BULGULAR

4.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Geliştirilmesi yapılan metot için deneme çalışmalarının kullanılabilir en iyi sonuçları 50 mm uzunluğunda, 2,1 mm iç çapında, 1,7 µm partikül çaplı BEH C18 kolonda, fosfat tamponu (pH:6) – asetonitril dedeksiyonla, 0.5 ul enjeksiyon hacmiyle sisteme verilerek 225 nm dalga boyunda verilerek yapılmıştır. Bu metodun kromatografik sisteminde alıkonma zamanı 1.0 dakikadır.

- **Dalga boyu:**

Pioglitazon HCl etken maddesinin 225 nm de max. Absorbans yaptığı nokta kullanılmıştır.

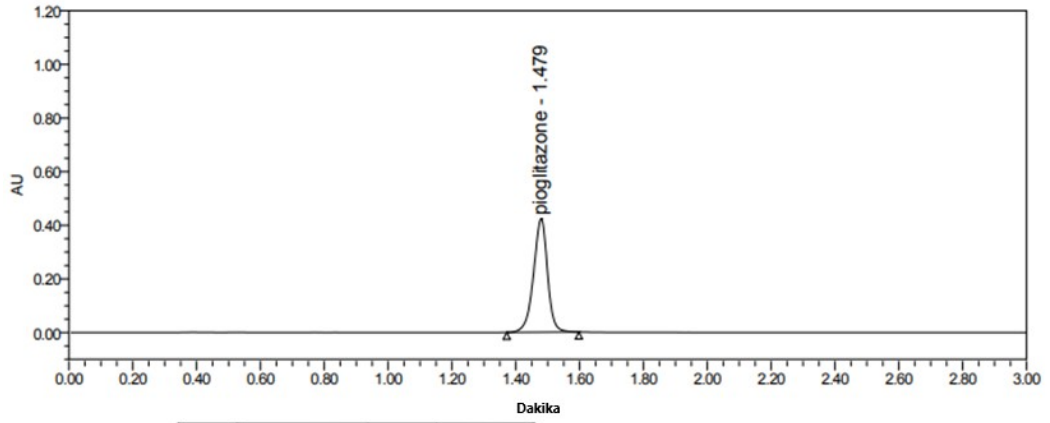
- **Mobil Faz Seçimi:**

Pioglitazon HCl etken maddesinin UPLC sisteminde en iyi retensiyon zamanı ve pik şekli vermesi için ilk olarak gradient sistemde mobil faz oranları belirlenmiştir. Sistemin pH duyarlılığı göz önünde bulundurularak pH ayarı yapılmıştır. UPLC deki amacın analiz süresinin kısaltmak olduğu için en uygun organik: tampon oranı pikin retensiyon zamanına göre ayarlanmıştır. Öncelikle UPLC sisteminin A hattına tampon çözelti, B hattına ise organik çözelti olan asetonitril takıldı ve gradient parametreleri denenerek sisteme Standard çözelti enjekte edildi. En iyi sonuç veren enjeksiyon ile izokritik sistemdeki mobil faz oranları (%h/h) belirlendi.

- **Kolon Seçimi:**

UPLC sisteminde Pioglitazon HCl için BEH C18 1,7µm 2,1mm*50mm kolonlar en iyi sonuç vermiştir.

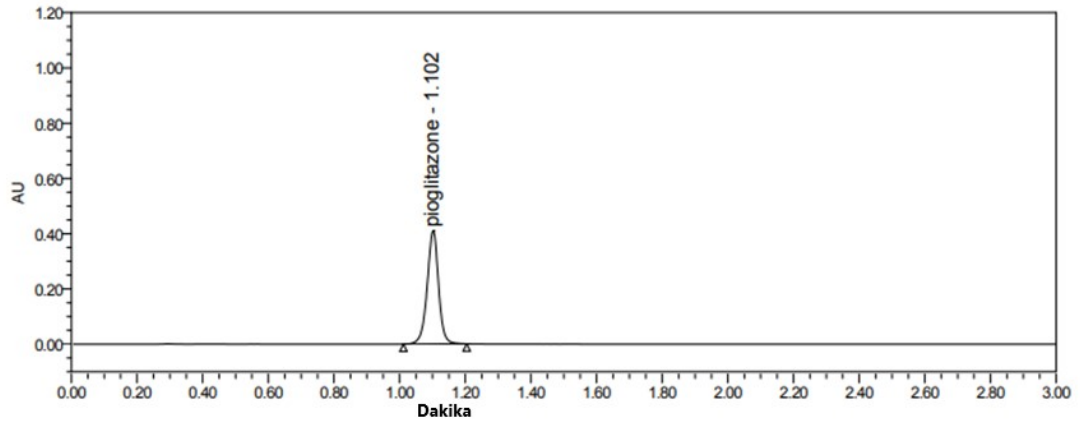
- **Mobil Fazın Akış hızının tayini:** Analizde kullanılan mobil fazın akış hızının ayırma katkısının incelenmesi için tampon : asetonitril (%50:50), tampon:asetonitril (%60:40) ve tampon:asetonitril (%55:45) içeren hareketli faz, 25°C kolon sıcaklığında değişik akış hızlarında UPLC sisteminde analizlenmiştir. Akış hızı 0,3 ve 0,4 ml/dk olarak sisteme verilmiş ve elde edilen kromatogramlar Şekil 5, Şekil 6'de verilmiştir. Bu kromatogramlar incelenerek güvenli akış hızı 0,4ml/dk olarak tayin edilmiştir.



	Pik ismi	Alınma zamanı	Alan
1	IMP A	0.355	
2	IMP B	0.568	
3	pioglitazone	1.479	1292120
Sum			1292120

Standart enjeksiyonu
Dalga boyu: 225nm
Akış hızı: 0,3ml/dk
Enjeksiyon hacmi: 0,5ul
Mobil Faz: 55:45 (%v/v)

Şekil 5. 0,3 ml/dk akış hızındaki deneme enjeksiyonu



	Pik ismi	Alıkonma zamanı	Alan
1	IMP A	0.355	
2	IMP B	0.568	
3	pioglitazone	1.102	986691
Sum			986691

Standart enjeksiyonu
 Dalga boyu: 225nm
 Akış hızı: 0,4 ml/dk
 Enjeksiyon hacmi: 0,5ul
 Mobil Faz: 55:45 (%v/v)

Şekil 6. 0,4 ml/dk akış hızındaki deneme enjeksiyonu

Kolon sıcaklığı değişimi

Kolon sıcaklık değişimin etkisi sistemde gözlenmiştir ve bu sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kolon sıcaklığının Pioglitazon HCl piki üzerindeki etkisi

	Sıcaklık Denemesi		
	Alıkonma zamanı	Teorik plaka sayısı	Simetri faktörü
20°C	1.04	4252	1.43
25°C	1.06	4393	1.42
30°C	1.0	4435	1.39

Sistem Uygunluk Testi:

Bir metodun seçiciliği, analiz edilecek maddenin örnek karışımı(örnek matriks) içerisinde doğru ölçülebildiğinin bir göstergesidir.

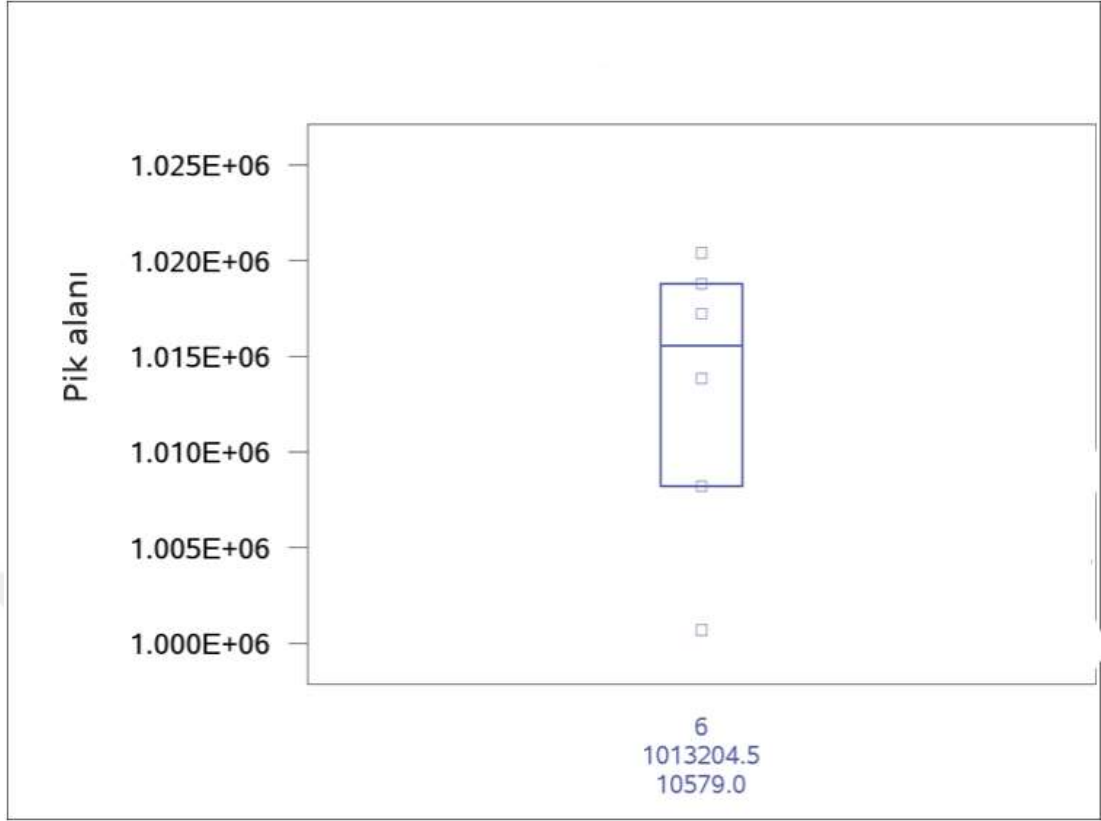
Sistem uygunluk parametresinin doğrulanması için çözücü, plasebo, %100 test çözeltisi konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltisi ve test çözeltisi analiz edildi ve aşağıdaki parametreler incelendi. Çözücü ve plasebo çözeltisi enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlarda pioglitazon pikinin alıkonma zamanında belirgin bir pik gözlenmedi. Enjeksiyon tekrarlanabilirliğini ispatlamak için UPLC cihazına 6 standart enjeksiyonu yaparak %RSD hesaplanmıştır. Kromatografik koşulların uygunluğu kuyruklanma, kapasite faktörü ve teorik plaka sayısına bakılmıştır.

Tablo 3. Sistem Uygunluk Parametreleri

Parametre	Kabul kriteri	Sonuçlar
Standart alanları % RSD	< %2.0	% 0,74
Teorik plaka sayısı	>3000	4925
Simetri Faktörü	0,8-1,5	1,16

Tablo 4. Standart Pioglitazon Çözeltisinin 6 enjeksiyonun Alanları

Sistem Uygunluk Parametresi
Pik Alanı
1008225
1018804
1017231
1013848
1000710
1020409



Şekil 7. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanları Dağılımı

Tablo 5. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanları İstatistiği

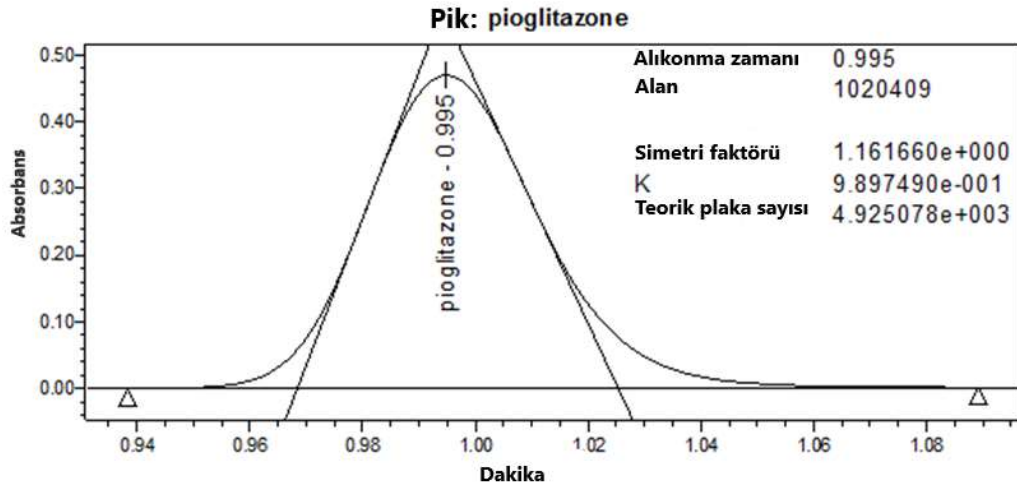
Pioglitazone HCl – Sistem uygunluk parametresi					
N	Min.	Max.	Ortalama	Std Dev	CV (%)
6	1000710	1020409	1013204.5	7493.92	0.740

Tablo 6. Standart Pioglitazon Çözeltilisinin 6 enjeksiyonun Alanların RSD

Pioglitazone HCl – Sistem uygunluk parametresi		
N	Ortalama	Tekrarlanabilirlik CV(%) (95% Güven aralığı)
6	1013204.5	0.74 (1.55)
Kabul Kriteri: 2.00%		

Tablo 7. Standart Pioglitazon Pikinin Özellikleri

Miktar mg/ml	0,3 mg/ml
Dalga Boyu	225 nm
Alıkonma zamanı	0.995
Alan	1020409
Kuyruklanma	1,16
Teorik plaka sayısı	4925
RSD (6 enjeksiyon)	0,74



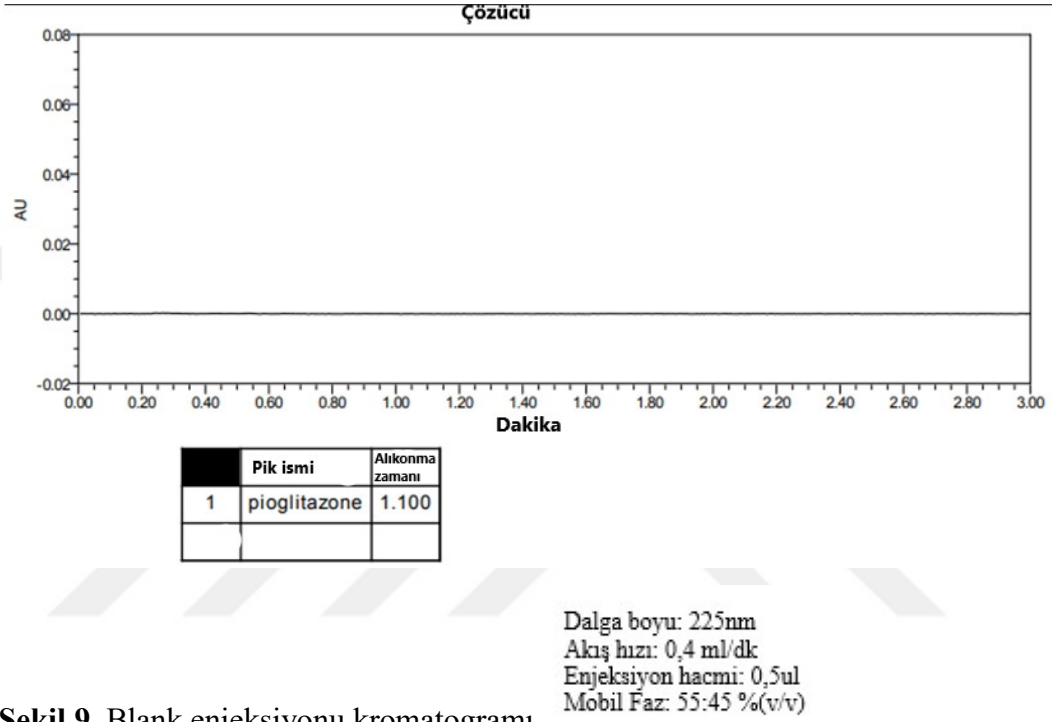
Şekil 8. Standart Pioglitazon Pikinin Sistem Uygunluk Kromatogramı

4.2. Geliştirilmiş Metodun Validasyonu:

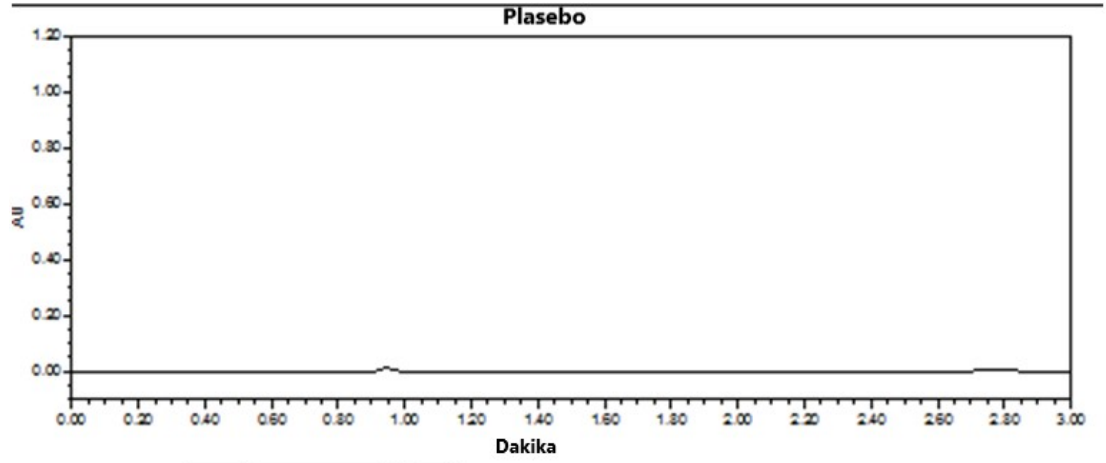
4.2.1. Spesifiklik ve seçicilik:

Spesifiklik parametresi, analizi yapılacak maddenin yardımcı maddeleri ve çözeltileriyle olan etkileşiminin oluşturduğu kromatogramda güvenilir bir şekilde analizlenmesidir. Çözücü ile plasebo çözeltisi kromatogramdaki etken madde ana pikinin alıkonma zamanında bir girişim yapmamalıdır. Çözücü, plasebo çözeltisi, standart çözeltisi ve test çözeltisi geliştirilen yöntemde analizlenerek kromatogramlarından gelen pikler belirlendi. Sonuçlar çözücü kromatogramı,

plasebo çözeltisi kromatogramı, standart Pioglitazon HCl çözeltisi kromatogramı, numune çözeltisi kromatogramı Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13’ de gösterilmiştir.



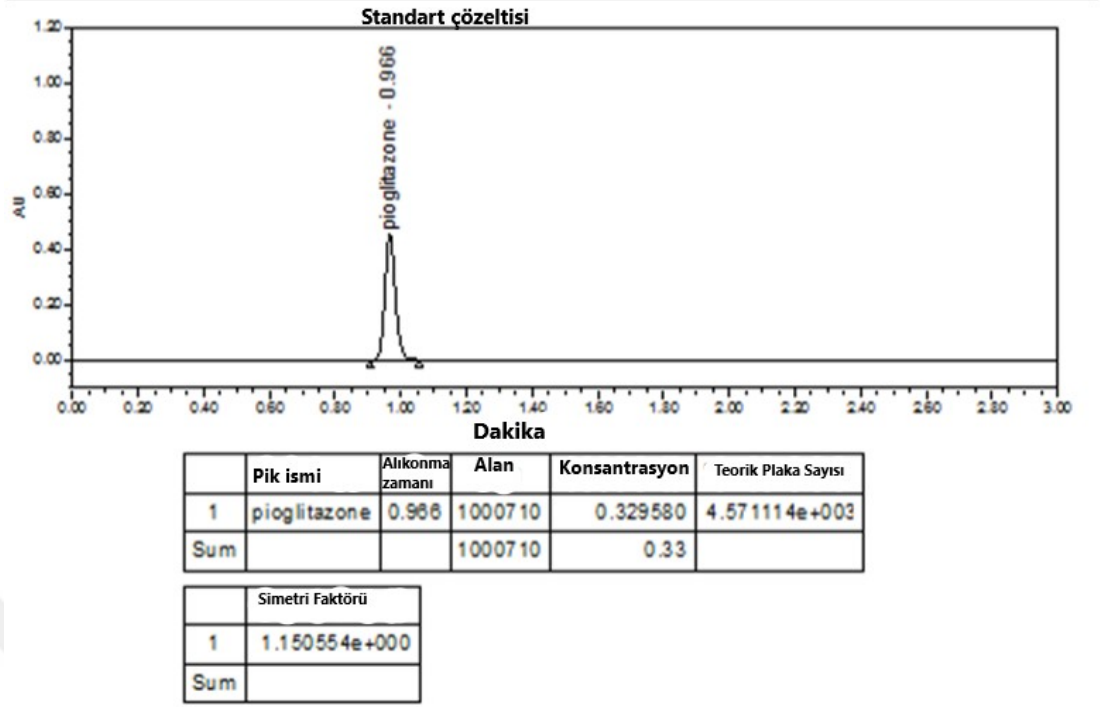
Şekil 9. Blank enjeksiyonu kromatogramı



	Pik ismi	Alınma zamanı
1	IMP A	0.355
2	IMP B	0.568
3	pioglitazone	1.100
Sum		

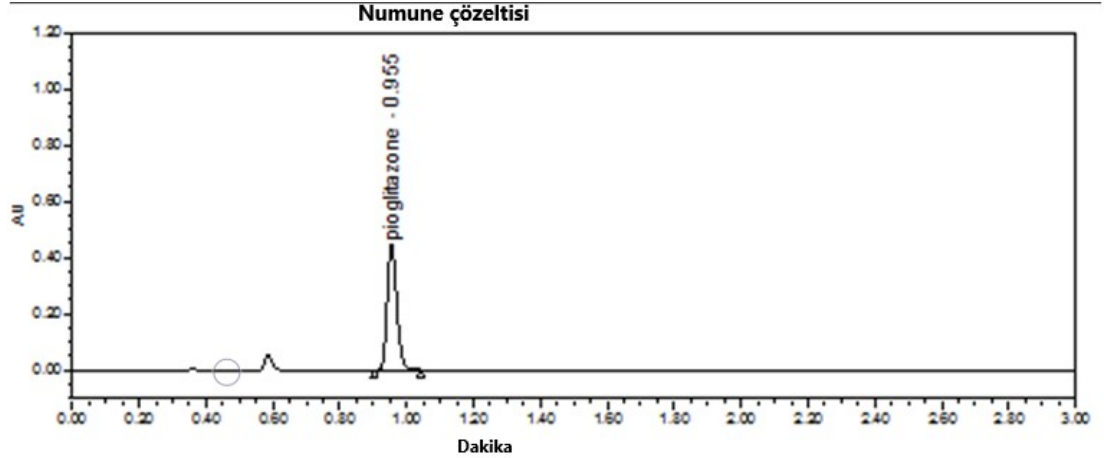
Dalga boyu: 225nm
Akış hızı: 0,4 ml/dk
Enjeksiyon hacmi: 0,5ul
Mobil Faz: 55:45 %(v/v)

Şekil 10. Placebo enjeksiyonu kromatogramı



Dalga boyu: 225nm
Akış hızı: 0,4 ml/dk
Enjeksiyon hacmi: 0,5ul
Mobil Faz: 55:45 %(v/v)

Şekil 11. Standart enjeksiyonu kromatogramı



	Pik ismi	Alınma zamanı	Alan	Konsantrasyon	Teorik Plaka Sayısı
1	IMP A	0.355			
2	IMP B	0.568			
3	pioglitazone	0.955	891788	0.334043	5.412880e+003
			891788	0.33	

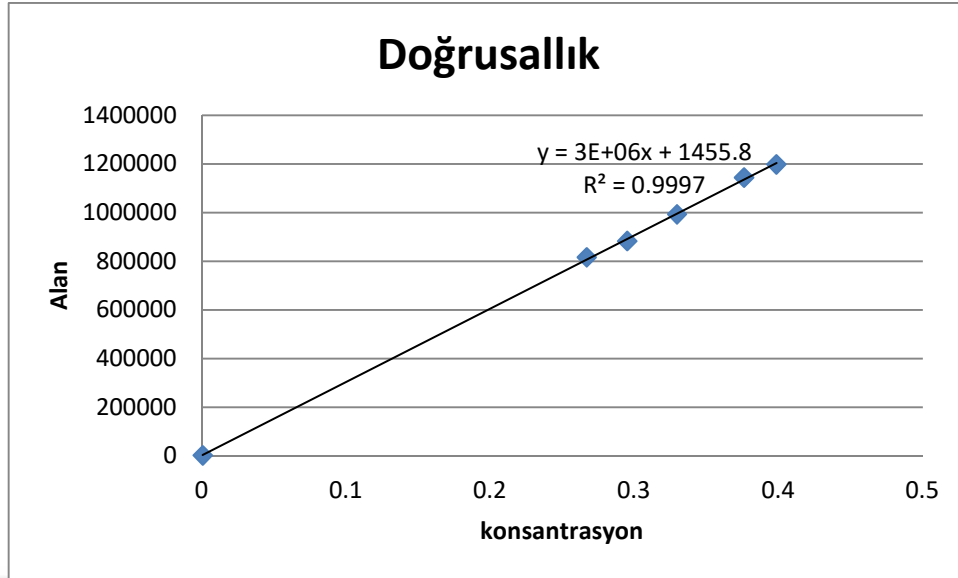
	Simetri Faktörü
1	
2	
3	1.198297e+000

Dalga boyu: 225nm
Akış hızı: 0,4 ml/dk
Enjeksiyon hacmi: 0,5ul
Mobil Faz: 55:45 %(v/v)

Şekil 12. Pioglitazon tablet enjeksiyon kromatogramı

4.2.2.Doğrusallık:

0,000534(LOQ) – 0,384mg/ml konsantrasyon aralığında 5 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.2.2.3.' de belirtildiği gibi çalışılmıştır. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alanı değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi Şekil 14'de verilmiştir. Pioglitazone HCl ile %80 - %90 - %100 - %120 konsantrasyonundaki çözeltilerle sisteme verilerek doğrusallık grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 13. Doğrusallık grafiği

Tablo 8 'de pik alanları ve ortalamaları (A), SD ve RSD değerleri, Şekil 14 'de ise en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denkleminden ($A = mC + b$ [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) verilmiştir.

Tablo 8. Doğrusallık Numunelerinin Alanları

	80%	90%	100%	110%	120%	LOQ
1.enjeksiyon	812331	878429	988581	1134386	1186290	1906
2.enjeksiyon	817743	887524	992467	1152996	1188308	2127
3.enjeksiyon	826563		998718		1195392	2071
4.enjeksiyon	806576		981851		1215237	2015
5.enjeksiyon	819152		998585		1208033	1965
6.enjeksiyon	816238		997037		1196363	2066
ortalama	816434	882977	992873	1143691	1198271	2025
STDEV	6719,4	6431,1	6696,3	13159,3	11294,9	80,1
RSD%	0,8	0,7	0,7	1,2	0,9	4,0

4.2.3.Doğruluk:

Pioglitazon HCl etken maddesinin ve plaseboyu içeren kontrol numunesi olacak şekilde %80, % 100 ve %120 konsantrasyonlarında numuneler hazırlanıp % ortalamalarına bakılarak doğrulukları (geri kazanımları) hesaplanmıştır.

% 80 konsantrasyonda doğruluk çözeltisi : Bunun için, 12,8 mg pioglitazon HCl standardından ve 43 mg plasebodan 50 mL' lik balon joje tartıldı ve asetonytril ile çözülerek ve 50 ml tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Bu zamanın sonunda 0,26 mg/ml konsantrasyonundaki numuneler PET filtreden süzülerek UPLC sistemine enjekte edildi. Bu işlem 3 farklı numune için tekrarlandı.

% 100 konsantrasyonda doğruluk çözeltisi Bunun için, 16 mg pioglitazon HCl standardından ve 43 mg plasebodan 50 mL' lik balon joje tartıldı ve asetonytril ile çözülerek ve 50 ml tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Bu zamanın sonunda 0,32 mg/ml konsantrasyonundaki numuneler PET filtreden süzülerek UPLC sistemine enjekte edildi. Bu işlem 3 farklı numune için tekrarlandı.

% 120 konsantrasyonda doğruluk çözeltisi Bunun için, 19,2 mg pioglitazon HCl standardından ve 43 mg plasebodan 50 mL' lik balon joje tartıldı ve asetonytril ile çözülerek ve 50 ml tamamlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Bu zamanın sonunda 0,38 mg/ml konsantrasyonundaki numuneler PET filtreden süzülerek UPLC sistemine enjekte edildi. Bu işlem 3 farklı numune için tekrarlandı.

Tablo 9. % Geri kazanımlar

Seviye	Teorik Konsantrasyon	Bulunan Konsantrasyon	%Geri kazanım	Ortalama %Geri kazanım
80%	0,26536	0,26721	100,7	100,0
	0,26574	0,26556	99,9	
	0,26654	0,26457	99,3	
100%	0,33508	0,33024	98,6	100,0
	0,33012	0,33176	100,5	
	0,32962	0,33258	100,9	
120%	0,39778	0,39826	100,1	100,5
	0,39608	0,40157	101,4	
	0,39996	0,39936	99,8	
ORT				100,1
SS				0,28
%RSD				0,28

Tablo 10. Doğruluk numunelerinin % sonuçları

Pioglitazon Doğruluk Parametresi	
Konsantrasyon (%)	% Bulunan Sonuç
80	100,70
80	99,93
80	99,26
100	98,55
100	100,50
100	100,90
120	100,12
120	101,39
120	99,85

Tablo 11. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının İstatistiği

Pioglitazon Doğruluk Parametresi						
Konsantrasyon (%)	N	Min.	Max.	Ortalama	Std Dev	CV (%)
80	3	99,26	100,70	99,963	0,7206	0,721
100	3	98,55	100,90	99,983	1,2573	1,258
120	3	99,85	101,39	100,453	0,8223	0,819

Tablo 12. Doğruluk numunelerinin % sonuçların RSD

Pioglitazon Doğruluk Parametresi			
Konsantrasyon Seviyesi	N	Ortalama	Tekrarlanabilirlik CV(%) (95% Güven aralığı)
80	3	99,963	0,96 (1.84)
100	3	99,983	0,96 (1.84)
120	3	100,453	0,96 (1.83)
Kabul Kriteri: 3.00%			

4.2.4.Kesinlik:

Analitik yöntemin kesinliği, hazırlanan homojen bir numuneden ard arda sisteme 6 kez enjeksiyonun yapılması ve bu enjeksiyonların birbiri arasındaki yakınlık olarak ifade edilir. Kesinlik parametresi 3 ayrı başlıkta incelenir. Bunlardan ilki sistemin kesinliği, ikincisi metodun kesinliği, üçüncüsü ise farklı günler aynı laboratuarda çalışılan analizin kesinliğidir.

Sistem Kesinliği: Yöntemin aynı kriterlerinde ard arda belirli enjeksiyon sayısında sisteme verilip kesinliğini kanıtlayan parametredir. Sistemin kesinliği, numuneden bağımsız sistemin güvenilir olmasını tayin eden parametredir. Analiz yöntemine göre hazırlanmış referans çözeltisinden 6 kez sisteme verilmiş ve Tablo 13’ deki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 13. Sistem Kesinliği

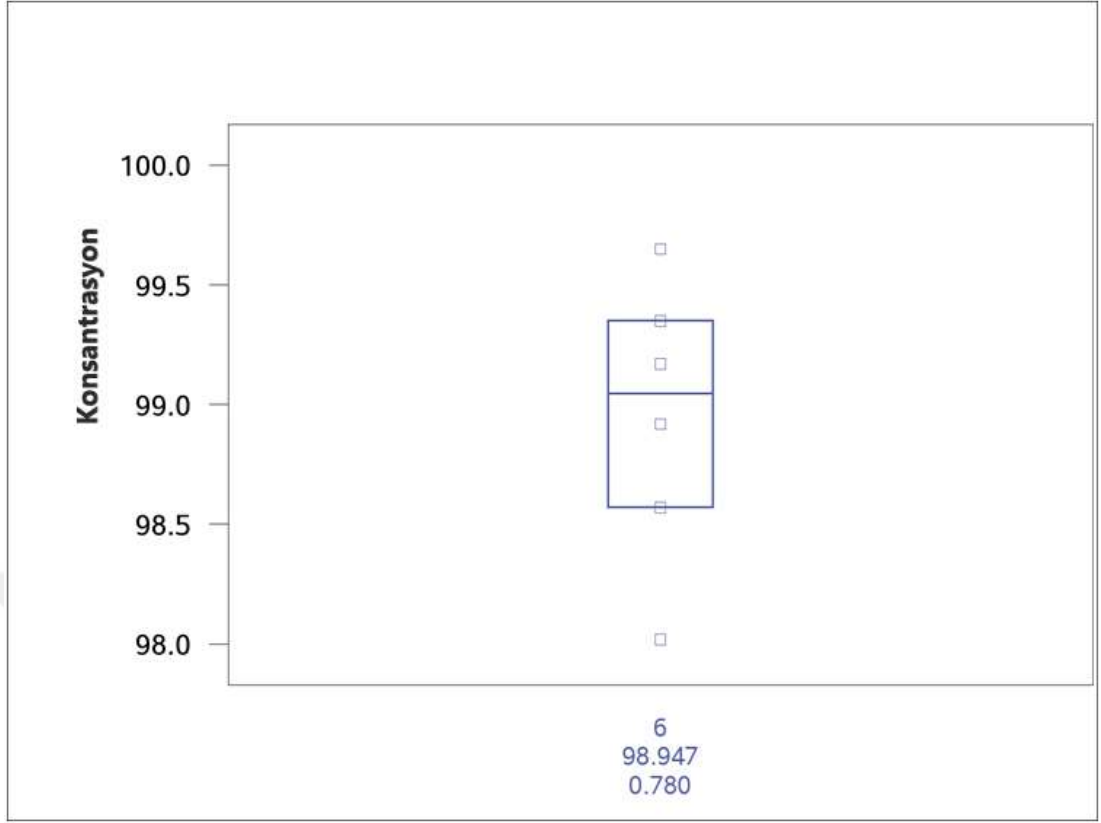
Enjeksiyon sayısı	Standart Çözelti alanı
1	1008225
2	1018804
3	1017231
4	1013848
5	1000710
6	1020409
xort	1013204,5
SS	7493,92
BSS	0,74

Pioglitazon HCl etken maddesi içeren numunelerden Bölüm 3.2.2.4'te anlatıldığı gibi $n=6$ numune olacak şekilde hazırlanıp %CV (varyasyon katsayısı) hesaplanmıştır. Gün içerisinde yapılan analizlerin sonucuna ait bağıl standart sapma değerleri % 0.6 olarak hesaplandı.

Farklı bir günde sisteme verilen numunelerin analiz sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise 0,99 arasında bulundu (Tablo 17).

Tablo 14. Kesinlik numunelerinin % sonuçları

Pioglitazon Kesinlik
% Sonuç
98,92
99,35
98,02
98,57
99,17
99,65



Şekil 14. Kesinlik Numunelerinin Sonuçları Dağılımı

Tablo 15. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının İstatistiği

Pioglitazon Kesinlik					
N	Min.	Max.	Ortalama	Std Dev	CV (%)
6	98,02	99,65	98,947	0,5846	0,591

Tablo 16. Doğruluk numunelerinin % sonuçlarının RSD

Pioglitazon Kesinlik		
N	Ortalama	Tekrarlanabilirlik CV(%) (95% Güven aralığı)
6	98,947	0,59 (1.23)
Kabul Kriteri: 2.00%		

Tablo 17. Günler Arası Analiz Sonuçları ve RSD

Günler Arası	
1.ANALİZ	98,92
	99,35
	98,02
	98,57
	99,17
	99,65
2.ANALİZ	98,95
	100,16
	100,68
	101,06
	101,12
	99,84
Ortalama	99,62
Stdev	0,98
RSD	0,99

Tayin Sınırı ve Teşhis Sınırı

%100 konsantrasyon numunesinden seyreltmeler yapılarak önce LOQ sınırı daha sonra LOD sınırı belirlenmiştir.

Tablo 18. LOD ve LOQ enjeksiyon sonuçları

	LOD	LOQ
	710	1906
	651	2127
	759	2071
	671	2015
	613	1965
	603	2066
ORTALAMA	667,83	2025
STDEV	59,31	80,07
RSD	8,9	3,95

5.TARTIŞMA

Diyabet hastalığının tedavisinde büyük rol alan Tiazolidinedion grubu Pioglitazon HCl etken maddesinin yapılan literatür çalışmalarında UPLC sisteminde çalışmaları olmaması ve bu optimizasyonda daha hızlı sonuçlar elde edilmesi bizi bu çalışmaya teşvik etmiştir.

Günümüzde ilaç firmalarında artan çeşitlilik sebebiyle güvenilir, valide olmuş ve hızlı sonuç verebilen metotlara ihtiyaç vardır. Bu amaçla HPLC analizlerine göre UPLC analizleri daha çok gündeme gelmektedir. Pioglitazon HCl etken maddesinde UPLC de tayin edilebilir bir etken madde olduğunu bu çalışmayla ortaya konulmuştur.

İlk olarak EP metodundan yararlanılarak en uygun çözücü olan asetonitril kullanıldı. Amaç analiz süresini kısaltmak ve yüksek verim elde etmek olduğu için mobil fazdaki organik oranı pikin alıkonma süresini belirlediğinden en uygun oran deneme enjeksiyonları yapılarak bulunmuştur. Bunun için hem çözücü hem de mobil fazdaki ayırma işlemi için en iyi organik asetonitril olarak belirlenmiştir.

UPLC cihazlarının loop hacmi değişiminden yararlanılarak sistemde numunenin konsantrasyonunu düşürmeden küçük enjeksiyon hacmi 0,5µl kullanılarak tekrarlanabilirlik sağlanmıştır.

Geliştirilen analiz yöntemine sistem uygunluk parametreleri uygulandı. Bu testin sonucunda kabul kriterlerine uygun Tablo 2' deki değerler elde edildi. Kalibrasyon eğrisi Pioglitazon HCl için 0,000534(LOQ) – 0,384mg/ml konsantrasyonları aralığında seçilmiştir. Sonuçlarla oluşturulan validasyon serilerinden kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0.9997 olarak bulunmuştur.

Aynı gün çalışma ve farklı günler arası yapılan kesinlik çalışmalarında tabletlerin ± 5 limit aralığında olduğu tespit edildi. Gerikazanım çalışmalarında ise %80- %100- %120 konsantrasyon limitlerinde ortalaması ise %100.1 geçerli sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarına karşılık geliştirilen ve valide edilen bu metotla alıkonma zamanı 1 dk olarak belirlenmiştir. UPLC sisteminde 0,4 ml/dk akış ile

daha az kimyasal kullanımı sağlanmıştır. Çok sayıda örneğin hızlı, tekrarlanabilir ve daha az kimyasal tüketimi ile analiz edilmesi sağlanmıştır.

Literatür araştırmaları ile karşılaştırıldığında Adukondalu ve ark. yaptığı çalışmada alıkonma zamanı pioglitazon HCl etken maddesinin 6.3 dk.dır. Bizim çalışmamızda ise alıkonma zamanı valide edilmiş metodumuzda 1 dk. dır.

Shaik ve ark. ile Najma Sultana ve ark. pioglitazon HCl etken maddesini 0,7 ml/dk ve 1,0 ml/dk akış hızıyla valide etmişleridir. UPLC çalışmalarının özelliği olarak bizim çalışmamızda daha az kimyasal kullanılmış ve akış hızımız 0,4 ml/dk olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen bu yöntemle Zentiva Sağlık Ürünlerinde kullanılan in-house HPLC metodu analiz süresi 15 dk.dan UPLC metoduyla analiz süresi belirlenen limitleri karşılamasıyla 3 dk ya indirilmiştir. Daha kısa sürede daha hassas daha az maliyetli bir çalışma gerçekleştirilmiştir. UPLC cihazına ulaşım kolaylığından bu yöntem rutin farmasötik analizlerde kullanım için rahatlıkla önerilebilir.

6.KAYNAKLAR

Adukondalu D, Malathy PS , Venkateshwar J, Madhusudan Y. Development and Validation of HPLC Method for Dedection of Pioglitazone Hydrochloride in Dosage Forms. IJPBS 2011;4|, 474-478

Ahuya, S., Scypinski, S., 2001. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, 566p, New York.

Aksoy DY, Gürlek A, Tip 2 diyabetin tedavisinde yeni umut: Thiazolidinedionlar, Hacettepe Tıp Dergisi. 2004; 35, 123-126

Altunsoy, S., 2010. Kinapril HCI Ve Hidroklorotiyazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Anonymous. 1985. Diabetes mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Technical Report Series No:727, 113p. Geneva.

Anonim. 2011. Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014). T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 816, 134s. Ankara.

Anonymous. 1985. Diabetes mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Technical Report Series No:727, 113p. Geneva

Anonim. 2011. Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014). T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 816, 134s. Ankara.

Anonymous. 1994. Prevention of diabetes mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Technical Report Series No:844, 100p. Geneva

Ayvaz G, Kan E. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi. Mised 2010; 23-24.

Bidlingmeyer, B.A., 1992. Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons, Inc., 452p, New York.

Bilber, O., 2010. Bazı Gıdalarda Suda ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Eşzamanlı Tayin Metodunun Optimizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 95s, Konya.

Ertaş, Ö.S., Kayalı, A., 2005. An Overview On Analytical Method Validation. Journal Faculty of Pharmacy, 34 (1), 41–57.

Fahim A, Nereida KCL and Gerald MR. Metabolism. 2009; 58, 373-378.

Gavin, J.R., Alberti, K.G.M.M., Davidson, M.B., DeFronzo, R.A., Drash, A., Gabbe, S.G., Genuth, S., Harris, M.I., Kahn, R., Keen, H., Knowler, W.C., Lebovitz, H., Maclaren, N.K., Palmer, J.P., Raskin, P., Rizza, R.A., Stern, M.P., 1998. Report on the Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 21(1), 5-20.

Gündüz, T., 2002. İnrümental Analiz. Gazi Kitabevi, 1357s, Ankara.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. Introduction To High Performance Liquid Chromatography. Chapman and Hall, 248p, New York.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. Introduction To High Performance Liquid Chromatography. Chapman and Hall, 248p, New York.

International Conference on Harmonization (ICH), 1994. Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals; Availability, Fed.Reg. 59, 9750.

Jain D., Jain S, Jain D. and Amin M., Simultaneous Estimation of Metformin Hydrochloride, Pioglitazone Hydrochloride, and Glimepiride by RP-HPLC in Tablet Formulation, Journal of Chromatographic Science, 2008 46(6):501-504.

Lakshmi, K.S., Rajesh, T., 2011. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Glipizide, Rosiglitazone, Pioglitazone, Glibenclamide and Glimepiride in Pharmaceutical Dosage Forms and Human Plasma. Journal of the Iranian Chemical Society, 8(1), 31-37.

Lakshmi, K.S., Rajesh, T., Sharma, S., Simultaneous Determination of Metformin and Pioglitazone by Reversed Phase HPLC in Pharmaceutical Dosage Form, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2009; 1,162-165.

Lunte, S.M., Radzik, D.M., 1996. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis, Elsevier Science Ltd, 511p, New York.

Metformin, Pioglitazone and Rosiglitazone by RP-HPLC and its Applications in Pharmaceuticals and Human Serum, Journal of Chromatographic Science,. 2011; 49, 774-9.

Meyer, R.V., 1988. Practical High Performance Liquid Chromatography. JohnWiley & Sons, 324p, Toronto, Canada.

Özden, T., 2011. Enalapril Maleat Ve Hidroklorotiazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 173s, Ankara.

Pavalli PM, Rathod SD, Chaudhar PD; Development and validation of UV derivative spectrophotometric methods for the determination of glimepride, metformin HCl and pioglitazone HCl in bulk and marketed formulation, Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 2012; 1(3),58-62.

Poole, C.F., Poole, S.K., 1991. Chromatography Today. Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.

Riley, C.M., Rosanske, T.W., 1996. Development and Validation of Methods. Elsevier Science Ltd, 363p, New York.

Saber A. L., Determination of Pioglitazone Hydrochloride in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography, Pak. J. Anal. Environ. Chem. Pak. 2008,9(2) 118 - 121.

Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia. Saunders 1994; 928-1001

Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D., 1987. Chromatographic Separations. John Wiley & Sons, 138p, London.

Shaik SB, P. Joshi K, Usha M, Bindhu T and Ramya T. Analytical method development and validation of pioglitazone hydrochloride by RP-HPLC, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014; 6(6),16-21

Skoog, D.A., Holler, F.J. Nieman T.A., 1998. Enstrümantal Analiz İlkeleri. Çev. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. Bilim Yayıncılık, 849s. Ankara

Sultana N, Saeed AM, Shafi N, Siddiqui FA, and Hussain A, Development and Validation of New Assay Method for the Simultaneous Analysis of Diltiazem,

Swartz, M.E., Krull, I.S., 1997. Analytical Method Development and Validation, Marcel Dekker, 96p, New York.

Torul, H., 2009. Farmasötik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC İle Enantiyomer Tayinleri. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115s, Ankara.

White, R., 1990. Chromatography/ Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications. Marcel Dekker Inc, 328p, New York.



EKLER

PP-52

Determination of Pioglitazone Hydrochloride in Tablets by Ultra-Performance Liquid Chromatography

Sinem Bilgic Karaağac^{1,2*}, Dilek Bilgic Alkaya², Serap Ayaz Seyhan², Çağlar Demirbağ³,

¹ Zentiva Sağlık Ürünleri

² Marmara University Faculty of Pharmacy Department of Analytical Chemistry, Istanbul, Turkey

³ Trakya University Faculty of Pharmacy Department of Analytical Chemistry, Edirne, Turkey

*sinem.bilgic@sanofi.com

Pioglitazone hydrochloride (PG-HCl), ((±)-5-{p- [2-(5-ethyl-2-pyridyl)ethoxy] benzyl}-2,4-thiazolidine- dione hydrochloride) is an oral antidiabetic agent used in the treatment of type 2 diabetes mellitus (also known as non-insulin-dependent diabetes mellitus. Pioglitazone decreases insulin resistance in the periphery and liver, resulting in increased insulin-dependent glucose disposal and decreased hepatic glucose output. UPLC systems achieve savings of labor force and amount of solvent and time during chromatographic analyze. Also, it provide high solubility, high speed and high precision detection. The purpose of this study is to determine a rapid and accurate UPLC method has been developed for the determination of pioglitazone hydrochloride in tablets. Chromatographic analysis was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm x 2.1 mmx1.7 µm) with a mixture of phosphate buffer adjusted with sodium hydroxide to pH 6 and acetonitrile (55:45, v/v) as mobile phase, at flow rate of 0.4 mL min⁻¹, and UV detection at 225 nm.

1.Fahim A, Nereida KCL and Gerald MR, Metabolism., 58, 373 (2009) 378

2.Xue YJ, Turner KC, Meeker JB, Janice P, Mark A, and Stere U, J. Chromatogr. B:, 795 (2003) 215.

International Meeting on Education and Research in Health Sciences (IMER-HS)
Sultanahmet–Istanbul
November 3-5, 2017.

ÖZGEÇMİŞ

ADI	Sinem	SOYADI	BİLGİÇ KARAAĞAÇ
DOĞUM YERİ	LÜLEBURGAZ	DOĞUM TARİHİ	15.03.1990
UYRUĞU	TC	TEL	5317172406
E-mail	Sinem.Bilgic@sanofi.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Analitik Kimya Anabilim Dalı	
Lisans	Ege Üniversitesi-Kimya Bölümü	2013
Lise	Lüleburgaz Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Analitik Geliştirme Uzman Yardımcısı	Zentiva Sağlık Ürünleri	2014-2017
Analitik Geliştirme Uzmanı	Sanofi Sağlık Ürünleri	2017-2019

Yabancı Dil

Bulats: Ortalama 50