

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

**KARGLUMİK ASİT TABLET ÜRÜNÜ İÇİN  
KROMATOĞRAFİK TEKNİKLER KULLANILARAK  
BOZUNMA ÜRÜNLERİ TAYİN METODU GELİŞTİRİLMESİ  
VE VALİDASYONU**

**Uzm. Kim. Burak ARABACI**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA  
2025**



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

**KARGLUMİK ASİT TABLET ÜRÜNÜ İÇİN  
KROMATOĞRAFİK TEKNİKLER KULLANILARAK  
BOZUNMA ÜRÜNLERİ TAYİN METODU GELİŞTİRİLMESİ  
VE VALİDASYONU**

**Uzm. Kim. Burak ARABACI**

**Analitik Kimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN**

**ANKARA  
2025**

**KARGLUMİK ASİT TABLET ÜRÜNÜ İÇİN KROMATOĞRAFİK TEKNİKLER  
KULLANILARAK BOZUNMA ÜRÜNLERİ TAYİN METODU GELİŞTİRİLMESİ VE  
VALİDASYONU**

**Burak Arabacı**

**Danışman: Prof. Dr. Nursabah Elif Başcı AKDUMAN**

Bu tez çalışması 03.07.2025 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. İ. Murat Palabıyık*  
*(Ankara Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. İncilay Süslü*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. Emirhan Nemutlu*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

**Üye:** *Prof. Dr. H. Eda Şatana Kara*  
*(Gazi Üniversitesi)*

**Üye:** *Doç. Dr. Ayşegül Doğan*  
*(Hacettepe Üniversitesi)*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

**17 Temmuz 2025**

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN*

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

03/07/2023

Burak ARABACI

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ile ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir; gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

## ETİK BEYAN

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

***Burak ARABACI***

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimiyle bana rehberlik eden, bilimsel bakış açımı geliştirmemde büyük katkıları olan ve her aşamada desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman'a,

Tez izleme komitesinde yer alarak bilgi ve önerileriyle sürecime katkı sağlayan Prof. Dr. İsmail Murat Palabıyık ve Doç. Dr. Ayşegül Doğan'a,

Doktora eğitimim boyunca teorik ve pratik bilgileriyle gelişimime katkıda bulunan, bilimsel bakış açımı şekillendirmemde önemli rol oynayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve bu süreci benimle paylaşan kıymetli arkadaşlarıma,

Araştırmalarımnda ihtiyaç duyduğum kaynaklara ulaşmamda yardımcı olan, her zaman desteklerini hissettiren Elixir İlaç Araştırma ve Geliştirme AŞ'deki değerli iş arkadaşlarıma,

Ve en önemlisi, hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ve destekleriyle bana güç veren değerli eşim, kızım ve tüm aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

## ÖZET

**Arabacı, B., Karglumik Asit Tablet Ürünü İçin Kromatografik Teknikler Kullanılarak Bozunma Ürünleri Tayin Metodu Geliştirilmesi ve Validasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025.**Karglumik asit (N-karbamoil-L-glutamik asit), üre döngüsü bozuklukları ve organik asidemilere bağlı hiperamonyemi tedavisinde kullanılan önemli bir farmasötik ajandır. Bu çalışmada, karglumik asit içeren tablet formülasyonlarda miktar tayini, dissolüsyon analizi ve safsızlık profillemesi için yüksek doğruluk ve duyarlılığa sahip analitik yöntemler geliştirilmiş, optimize edilmiş ve ICH Q2(R2) kılavuzuna uygun şekilde valide edilmiştir.

Dissolüsyon ve miktar tayini analizleri için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi, ters faz C18 kolon ve fosfat tamponu–asetonitril karışımını içeren hareketli faz ile uygulanmış, 205 nm dedeksiyon dalga boyunda çalışılmıştır. Yöntem, 0.5–60 µg/mL aralığında doğrusal yanıt ( $R^2 > 0.999$ ), %98–102 doğruluk ve %2'nin altında kesinlik (BSS) sağlamıştır.

Safsızlık analizleri için geliştirilen UHPLC-DAD yöntemi, düşük düzeydeki bozunma ürünlerinin ayrımı ve tayini amacıyla optimize edilmiştir. Kritik parametrelerin (pH, sıcaklık, akış hızı) optimizasyonunda Box-Behnken deney tasarımı, sağlamlık değerlendirmesinde ise Plackett-Burman yaklaşımı kullanılmıştır. Stres bozunma çalışmaları, yöntemin stabilite gösteren niteliğini doğrulamıştır.

Dissolüsyon testleri, pH 1.2, 4.5 ve 6.8 ortamlarında gerçekleştirilmiş ve 15 dakika içinde %90'ın üzerinde çözünme sağlanmıştır. Filtrasyon ve çözelti stabilitesi testleri ile analiz koşullarının uygunluğu desteklenmiştir.

Geliştirilen HPLC-DAD ve UHPLC-DAD yöntemleri; yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve duyarlılık özellikleriyle, farmasötik kalite kontrol ve stabilite değerlendirmelerinde güvenilir analitik araçlar olarak önerilmektedir.

Geliştirilen HPLC-DAD ve UHPLC-DAD yöntemleri; yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve duyarlılık özellikleriyle, farmasötik kalite kontrol ve stabilite değerlendirmelerinde güvenilir analitik araçlar olarak önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Karglumik asit, HPLC-DAD, UHPLC-DAD, dissolüsyon, safsızlık.

## ABSTRACT

**Arabacı, B., Development and Validation of a Degradation Product Determination Method Using Chromatographic Techniques for Carglumic Acid Tablet Product, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Doctoral Thesis, Ankara, 2025.** Carglumic acid (N-carbamoyl-L-glutamic acid) is a critical pharmaceutical agent used in the treatment of hyperammonaemia associated with urea cycle disorders and organic acidemias. In this study, highly accurate and sensitive analytical methods were developed, optimized, and validated in accordance with ICH Q2(R2) guidelines for the quantification, dissolution testing, and impurity profiling of carglumic acid in tablet formulations.

For dissolution and assay analyses, an HPLC-DAD method was developed using a reversed-phase C18 column and a mobile phase composed of phosphate buffer and acetonitrile. Detection was performed at 205 nm. The method exhibited linearity over the range of 0.5–60 µg/mL ( $R^2 > 0.999$ ), with accuracy within 98–102% and precision with relative standard deviations (RSD) below 2%.

A UHPLC-DAD method was developed for impurity profiling, enabling the reliable detection and separation of low-level degradation products. The method was optimized using Box-Behnken design for critical parameters such as pH, column temperature, and flow rate. Robustness was evaluated using the Plackett-Burman design. Stress degradation studies confirmed the method's stability-indicating capability.

Dissolution tests were performed under physiologically relevant conditions (pH 1.2, 4.5, and 6.8), and over 90% drug release was observed within 15 minutes. Filtration and solution stability studies supported the suitability of the analytical conditions.

The developed HPLC-DAD and UHPLC-DAD methods demonstrated high selectivity, reproducibility, and sensitivity, making them reliable analytical tools for pharmaceutical quality control and stability evaluation of carglumic acid formulations.

**Keywords:** Carglumic acid, HPLC-DAD, UHPLC-DAD, dissolution, impurity.

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
1.1. Giriş	1
1.2. Amaç	2
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Hiperamonyemi Nedir?	4
2.1.1. Hiperamonyeminin Tanımı ve Fizyopatolojisi	4
2.1.2. Hiperamonyeminin Klinik Belirtileri	5
2.1.3. Hiperamonyeminin Epidemiyolojisi	7
2.2. Hiperamonyemi Tedavisi	8
2.2.1. Farmakolojik Yaklaşımlar	8
2.2.2. Diyet ve Beslenme Yönetimi	10
2.2.3. Yeni Tedavi Yöntemleri ve Araştırmalar	11
2.3. Kargulimik asit	11
2.3.1. Kimyasal Yapı ve Özellikler	11
2.3.2. Karglumik Asit Safsızlıkları	13
2.3.3. Karglumik Asit Tablet Formülasyonu	16
2.4. Hammadde Analizleri	16
2.4.1. Görünüş ve Çözünürlük Analizleri	17
2.4.2. Kimyasal Tanımlama ve Doğrulama	18
2.4.3. Fiziksel Özelliklerin Analizi	19
2.4.4. Saflık ve Kalite Kontrol Analizleri	20
2.4.5. Safsızlık Profili ve Kalıntı Çözücüler	22

2.5.	Karglumik Asit Analizine Yönelik Literatürdeki Yöntemler	23
2.5.1.	Spektroskopik Yöntemler	26
2.6.	Kromatografi	27
2.6.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	30
2.6.2.	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)	34
2.7.	Yöntem Geliştirme Çalışmaları	35
2.7.1.	Deneme Yanılma Yöntemiyle Geliştirilme Çalışmaları	36
2.7.2.	Deney Tasarımının Temelleri ve Yöntem Geliştirme	39
2.7.3.	Validasyon Parametreleri ve Gereklilikleri	46
2.8.	ICH Q3B ve Q14 Gereksinimleri	50
<b>3.</b>	<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>53</b>
3.1.	Malzemeler	53
3.1.1.	Kimyasal Maddeler ve Reaktifler	53
3.1.2.	Standartlar ve Referans Maddeler	53
3.2.	Cihaz ve Ekipmanlar	54
3.3.	Standart, Çözelti ve Numunelerin Hazırlanması	55
3.3.1.	HPLC Miktar Tayini ve Dissolüsyon Analizi için çözelti hazırlanışları	55
3.3.2.	Safsızlık Analizi için çözelti hazırlanışları	56
3.4.	HPLC-UHPLC Cihazında Veri Kayıt ve Değerlendirilmesi	57
3.5.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri	57
3.6.	Yöntemler için Analitik Performans Kriterlerinin Değerlendirilmesi	58
3.7.	Analitik Yöntem Validasyonu	60
3.7.1.	Dissolüsyon Metodu Analitik Yöntem Validasyonu	60
3.7.2.	Bozunma Safsızlıkları Analitik Yöntem Validasyonu	61
3.8.	Stabilite Çalışmaları	62
3.8.1.	Hızlandırılmış Stabilite Testleri	63
3.8.2.	Formülasyon Stabilite Testi	64
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>65</b>
4.1.	Etken Madde ve Dissolüsyon Analizleri için HPLC Yöntemi	65
4.1.1.	Yöntem Geliştirme Çalışmaları	65
4.1.2.	Karglumik Asidin Miktar Tayini ve Dissolüsyon Analizi Bulguları	73

4.1.3.	Sistem Uygunluk Test Sonuçları	75
4.1.4.	Yöntemin Seçicilik ve Spesifiklik Değerlendirmesi	76
4.1.5.	Çözelti Stabilitesi ve Filtre Seçimi Sonuçları	77
4.1.6.	Doğrusallık Parametresi Sonuçları	81
4.1.7.	Doğruluk Parametresi Sonuçları	82
4.1.8.	Kesinlik Parametresi Sonuçları	83
4.1.9.	Sağlamlık Çalışması Sonuçları	85
4.1.10.	Saptama Limiti (DL) ve Tayin Limiti (QL)	87
4.1.11.	Validasyon Parametreleri ve Sonuçları	88
4.1.12.	Dissolüsyon Profili Sonuçları	91
4.2.	Bozunma Ürünleri Analiz Yöntemi	93
4.2.1.	UHPLC ile Karglumik Asit Safsızlıkları için Yöntem Geliştirme	99
4.2.2.	Yöntem Geliştirme Çalışmaları ve Başlangıç Parametreleri	100
4.2.3.	Box-Behnken Deney Tasarımı ile Optimizasyon Sonuçları	102
4.2.4.	Sistem Uygunluk Testleri	104
4.2.5.	Seçicilik	106
4.2.6.	Doğrusallık, Doğruluk ve Kesinlik Sonuçları	107
4.2.7.	DL ve QL Değerlendirmeleri	116
4.2.8.	Sağlamlık Analizi (Plackett-Burman)	117
4.2.9.	Çözelti Stabilitesi ve Filtre Seçimi Sonuçları	121
4.2.10.	Stres Bozundurma Çalışmaları ve Stabilitate Sonuçları	125
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	127
<b>6.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	130
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	133
<b>8.</b>	<b>EKLER</b>	161
	<b>EK 1.</b> HPLC/UHPLC Kromatografi ile İlgili Formüller	
	<b>EK 2.</b> Kullanılan Standartların Analiz Sertifikaları	
	<b>EK 3.</b> Ojinallik Raporu Örneği	
	<b>EK 4.</b> Dijital Makbuz	
<b>9.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	168

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>µg/mL</b>	Mikrogram/mililitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>API</b>	Aktif Farmasötik Bileşen
<b>BBD</b>	Box-Behnken Deney Tasarımı
<b>BP</b>	İngilizce Farmakopesi
<b>BSS</b>	Bağlı Standart Sapma
<b>DAD</b>	Diyot Dizi Dedektör
<b>DGA</b>	Dikarbamoil L-Glutamik Asit
<b>dk</b>	Dakika
<b>DL</b>	Saptama Alt Sınırı
<b>DMF</b>	İlaç Ana Dosyası
<b>EDQM</b>	Avrupa İlaç ve Sağlık Kalitesi Müdürlüğü
<b>EP</b>	Avrupa Farmakopesi
<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>HPA</b>	İlgili Bileşik A
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>ICH</b>	İnsan Kullanımı İçin Farmasötik Ürünlerde Teknik Gerekliklerin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi
<b>IR</b>	Kızılötesi Spektroskopisi
<b><i>k'</i></b>	Kapasite faktörü
<b>mg/mL</b>	Miligram/mililitre
<b>mL/dk</b>	Mililitre/dakika
<b>nm</b>	Nanometre
<b>PCA</b>	Pirokarglumik Asit
<b>PGA</b>	Piroglutamik Asit
<b>QL</b>	Tayin Alt Sınırı

<b>RRF</b>	Bağıl Yanıt Faktörü
<b>S/N</b>	Sinyal/Gürültü Oranı
<b>UHPLC</b>	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
<b>USP</b>	Amerikan Farmakopesi
<b>UV</b>	Ultraviolet (Ultraviyole)

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1 Üre döngüsü.	4
2.2 Karglumik asitin molekül yapısı.	13
2.3 Karglumik ve safsızlıkların molekül şekilleri.	16
2.4 Bir kromatogram örneği (W: pik genişliği, W/2: yarı yükseklikteki pik genişliği, Rs: ayırıcılık, k': kapasite faktör).	29
2.5 HPLC diyagramı.	31
4.1 Hareketli fazdaki asetonitril oranının değişimi ile (A) kapasite faktörü ve (B) pik simetrisindeki değişim.	68
4.2 Hareketli faz tampon derişimi değişimi ile (A) kapasite faktörü ve (B) pik simetrisi değişimi.	70
4.3 Hareketli faz pH değişimi ile (A) kapasite faktörü ve (B) pik simetrisinin değişimi grafiği.	72
4.4 Hareketli faz akış hızının değişimi ile (A) kapasite faktörü ve (B) pik simetrisinin değişimi grafiği.	73
4.5 Karglumik asit, ilgili bileşik A (HPA), piroglutamik asit, pirokarglumik asit ve dikarbamoil L-glutamik asit'in UV spektrumları.	76
4.6 Karglumik asit analiz yönteminin spesifitesi için örnek kromatogram: (a) pH 1.2 dissolüsyon ortamı, (b) pH 4.5 dissolüsyon ortamı, (c) pH 6.8 dissolüsyon ortamı, (d) Karglumik asit standart çözeltisi, (e) Karglumik asit test çözeltisi ve (f) Plasebo.	78
4.7 HPLC analizinde Karglumik asit doğrusallık eğrisi.	84
4.8 Karglumik asit doğrusallık analizi istatistiksel değerlendirme sonuçları.	84
4.9 Karglumik asit tabletinin pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki çözünme profilleri.	93
4.10 Yöntem geliştirme çalışmalarının erken aşamalarında Karglumik asit ve bilinen safsızlıklarının ayrımı.	101

<b>4.11</b>	Ayırıcılık (A), alıkonma zamanı (B) ve kuyruklanma faktörü (C) için Box-Behnken Tasarımı yanıt yüzeyi grafikleri.	103
<b>4.12</b>	Karglumik asit ve safsızlık piklerinin konumlarını gösteren kromatogram.	106
<b>4.13</b>	Kör çözelti (a), plasebo (d), standart çözelti (c) ve test çözeltisi (b) kromatogramlarının üst üste çakıştırılmış görünümü.	107
<b>4.14</b>	Karglumik asit ve safsızlıklarının doğrusallık sonuçları.	109

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>	
2.1	Literatürde bulunan HPLC yöntemlerinin parametreleri.	25
4.1	Hareketli fazdaki asetonitril miktarının değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.	68
4.2	Hareketli faz tampon derişimi değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.	70
4.3	Hareketli faz pH değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.	72
4.4	Hareketli faz akış hızı değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.	74
4.5	Deneme-yanılma yöntemiyle optimize edilen kromatografi koşulları birlikte değerlendirildiğinde sistem uygunluk sonuçları.	74
4.6	Dissolüsyonda Karglumik Asit Miktar Tayini için HPLC yöntemi parametreleri.	75
4.7	Sistem uygunluk çalışması sonuçları.	77
4.8	Çözelti stabilitesi analiz sonuçları.	80
4.9	Filtre çalışması analiz sonuçları.	82
4.10	Doğruluk sonuçlarının detayları.	85
4.11	Kesinlik, ara kesinlik ve günler arası kesinlik sonuçlarının detayları.	86
4.12	Sağlamlık çalışması sonuçlarının detayları.	88
4.13	Plackett-Burman deney tasarımı analizi sonuçları.	88
4.14	Karglumik asit HPLC analizine ait tespit ve tayin limiti sonuçları.	89
4.15	Validasyon parametreleri genel sonuçları.	91
4.16	Kritik yöntem parametreleri için Box-Behnken deneyi çalışmaları ve yanıtları.	95
4.17	UHPLC analizi yöntem parametreleri.	96
4.18	UHPLC metodu gradiyent koşulları.	97
4.19	Yeni ilaç ürünlerinde bozunma ürünleri için eşik değerler.	98

4.20	Box-Behnken kısıtlama ve önem belirleme tablosu.	104
4.21	Validasyon sistem uygunluk sonuçları.	105
4.22	Karglumik asit ve safsızlıkları için regresyon istatistikleri sonuçları.	110
4.23	Karglumik asit safsızlıkları için bağıl yanıt faktörü sonuçları.	114
4.24	Doğruluk analizi sonuçları.	115
4.25	Safsızlık kesinlik sonuçları.	116
4.26	Günler-arası kesinlik sonuçları (ara kesinlik).	117
4.27	Günler arası kesinlik kıyaslama tablosu.	117
4.28	Günler arası farkın F-test ve t-test ile değerlendirilmesine dair sonuçlar.	117
4.29	Tayin ve tespit limiti sonuçları (detay).	119
4.30	Sağlamlık çalışması koşulları.	121
4.31	Sağlamlık çalışması istatistiksel deney tasarımı sonuçları.	122
4.32	Test ve standart çözeltiler için çözeltili stabilitesi sonuçları.	123
4.33	Filtre seçimi sonuçları.	124
4.34	Validasyon sonuçları.	125
4.35	Stres testi çalışmalarının sonuçları.	127

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

### 1.1. Giriş

Günümüzde farmasötik ürünlerin kalite güvencesi ve etkinliğinin sağlanması, ilaç endüstrisinin en temel hedeflerinden biridir. Özellikle nadir hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaç bileşenlerinin stabilite ve saflık analizleri, ürün güvenliği ve hasta sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, karglumik asit (N-karbamoil-L-glutamik asit), üre döngüsü bozuklukları ve organik asidemilere bağlı hiperamonyemi tedavisinde önemli bir ilaç etken maddesi olarak öne çıkmaktadır. Karglumik asit, özellikle karbamoil fosfat sentetaz I (CPS1) enziminin aktivasyonunu sağlayarak üre döngüsünün düzenlenmesine yardımcı olur ve toksik amonyak birikimini önleyerek metabolik dengenin korunmasına katkıda bulunur (1–7).

Karglumik asit içeren farmasötik formülasyonların analizinde, safsızlık profillemesi, stabilite değerlendirmesi ve miktar tayini gibi analitik testlerin hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. İlaç formülasyonlarında safsızlıkların (safsızlıkların) varlığı, ürün stabilitesini ve biyoyararlanımını doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle, farmasötik analizlerde, özellikle yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-DAD) ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi (UHPLC-DAD/UV) gibi ileri analitik teknikler kullanılmaktadır (8–10).

Karglumik asit içeren tablet formülasyonlarının analitik değerlendirmesinde en büyük zorluklardan biri, bozunma ürünlerinin ve ilgili safsızlıkların hassas bir şekilde ayrılması ve nicel olarak belirlenmesidir. Literatürde, karglumik asit ve safsızlıklarının analizi için sınırlı sayıda analitik yöntem bulunmaktadır ve bu yöntemlerin çoğu ya uzun analiz sürelerine sahiptir ya da belirli safsızlıkların ayırımında yetersiz kalmaktadır. Bu durum, özellikle stabilite testleri ve farmasötik kalite kontrol süreçlerinde daha güvenilir, hızlı ve hassas yöntemlere olan ihtiyacı ortaya koymaktadır (11,12).

Bu tez çalışmasında, karglumik asit tablet formülasyonlarının kalite kontrolü için HPLC-DAD ve UHPLC-DAD/UV teknikleri kullanılarak analitik yöntem geliştirilmesi, optimizasyon ve validasyonun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, hem miktar tayini ve dissolüsyon analizleri hem de safsızlık profillemesi

ve bozunma ürünleri analizi için detaylı bir yöntem geliştirme süreci yürütülmüştür. Çalışmada, Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak kritik kromatografik parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve geliştirilen yöntemler, ICH Q2(R2) kılavuzu doğrultusunda valide edilmiştir (13–15).

## 1.2. Amaç

Bu tez çalışmasının temel amacı, karglumik asit içeren tablet formülasyonlarının farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir bir analitik yaklaşım geliştirmek ve bu yöntemin validasyonunu gerçekleştirerek farmasötik analizlerde kullanılabilirliğini kanıtlamaktır. Bu kapsamda, aşağıdaki spesifik hedefler belirlenmiştir:

1. Karglumik asit tabletlerinde miktar tayini ve dissolüsyon analizleri için hassas ve tekrarlanabilir bir HPLC-DAD yöntemi geliştirmek ve valide etmek.
  - Hareketli faz bileşimi, kolon tipi, akış hızı ve dedeksiyon dalga boyu gibi kritik kromatografik parametreleri optimize etmek,
  - Yöntemin sistem uygunluğu, doğrusal çalışma aralığı, kesinlik, doğruluk, tespit ve tayin limitleri (LOD/LOQ) gibi validasyon kriterlerine uygunluğunu değerlendirmek,
  - Tablet formülasyonlarının biyoyararlanımını simüle eden dissolüsyon analizlerini gerçekleştirmek.
2. Karglumik asit ve safsızlıklarının ayrımı için UHPLC-DAD/UV yöntemi geliştirmek ve optimizasyonunu yapmak.
  - İlgili safsızlıklar arasında yüksek çözünürlük sağlamak için kolon sıcaklığı, hareketli fazın pH değeri ve akış hızı gibi kritik parametreleri optimize etmek,
  - Box-Behnken deney tasarımını kullanarak en uygun çalışma koşullarını belirlemek ve yöntemin sağlamlığını değerlendirmek (16),
  - Safsızlıkların profillemesi için yöntemin özgüllüğünü test etmek.

3. Geliştirilen yöntemlerin ICH Q2(R2) ve ICH Q3B(R2) kılavuzlarına uygun olarak validasyonunu sağlamak.
  - o Analitik yöntemin seçicilik, doğrusallık, kesinlik, sağlamlık, çözünürlük ve sistem uygunluğu gibi performans parametrelerini değerlendirmek,
  - o Bozunma ürünlerini ve potansiyel safsızlıkları belirleyerek yöntem güvenilirliğini test etmek,
  - o Stabilitate çalışmalarını gerçekleştirerek yöntemin uzun vadeli kullanım için uygunluğunu ortaya koymak.
4. Farmasötik kalite kontrol süreçlerinde kullanılan geleneksel yöntemlerle karşılaştırmalı analizler yaparak geliştirilen yöntemin üstünlüklerini belirlemek.
  - o Literatürde bulunan mevcut yöntemler ile yeni geliştirilen metodun analiz süresi, hassasiyet ve ayırım gücü açısından kıyaslanmasını yapmak,
  - o Geleneksel HPLC yöntemleri ile UHPLC yöntemlerinin performans farklarını istatistiksel olarak değerlendirmek.

Bu tez çalışması ile hızlı, hassas ve güvenilir bir HPLC/DAD-UV ve UHPLC-DAD/UV yöntemleri geliştirilerek farmasötik analizlerde uygulanabilirliği gösterilecek ve karglumik asit içeren ilaçların kalite kontrol süreçlerine katkı sağlanacaktır.

Bu çalışmanın farmasötik bilimler ve ilaç endüstrisi açısından önemli bir kaynak oluşturması, analitik yöntem geliştirme süreçlerine yenilikçi yaklaşımlar sunması ve yasal düzenleyici gerekliliklere uygun yeni yöntemlerin oluşturulmasına öncülük etmesi hedeflenmektedir.

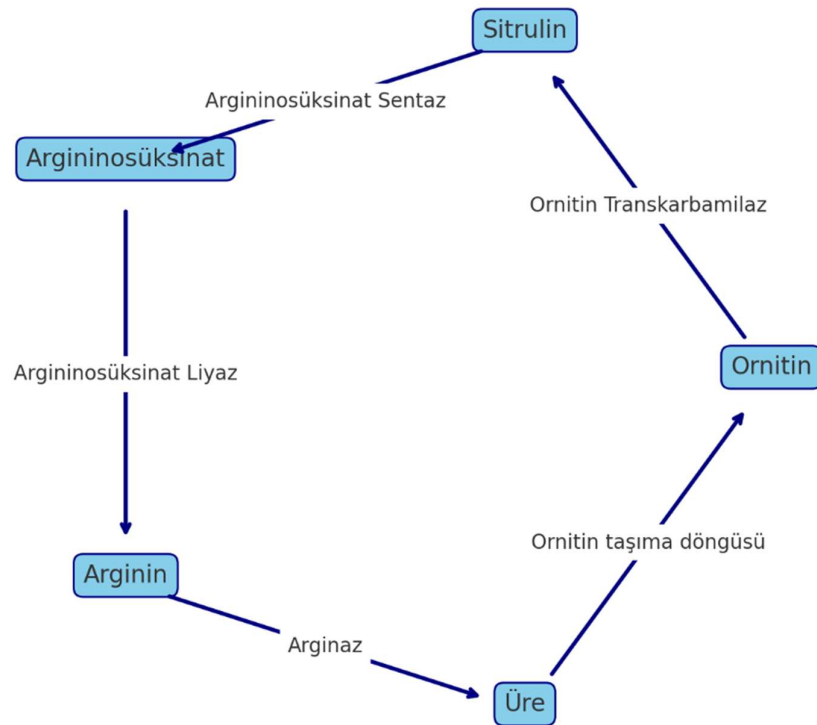
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hiperamonyemi Nedir?

Hiperamonyemi, plazmada amonyak seviyesinin normal fizyolojik sınırların üzerine çıkması durumudur.

#### 2.1.1. Hiperamonyeminin Tanımı ve Fizyopatolojisi

Amonyak, protein metabolizmasının bir yan ürünü olarak karaciğer tarafından üre döngüsü aracılığıyla detoksifiye edilir. Bu süreçte üreye dönüştürülen amonyak, idrar yoluyla vücuttan atılır. Ancak üre döngüsündeki enzim eksiklikleri, karaciğer yetmezliği, genetik bozukluklar veya artmış protein katabolizması gibi nedenlerle amonyak metabolizması bozulabilir. Bu durum hiperamonyemiye yol açarak sinir sistemi üzerinde toksik etkiler oluşturabilir. Üre döngüsü görsel olarak Şekil 2.1’ de verilmiştir (17–26).



Şekil 2.1. Üre döngüsü.

Hiperamonyemide amonyağın beyinde birikmesi, nörotransmitter dengesizliklerine ve hücrel şışmeye neden olur. Özellikle astroglial hücrelerde görülen şışme, beyindeki intrakraniyal basıncın artmasına ve ciddi nörolojik komplikasyonlara yol açabilir. Amonyak toksisitesi, beyin ödemi ve ensefalopati gibi klinik sonuçlarla ilişkilendirilir (27–29).

### 2.1.2. Hiperamonyeminin Klinik Belirtileri

Hiperamonyemi, plazmadaki yüksek amonyak seviyeleri nedeniyle merkezi sinir sistemi (CNS) üzerinde toksik etkiler gösterir ve çok çeşitli klinik belirtilerle kendini gösterebilir. Belirtilerin şiddeti ve çeşitliliği, hastanın yaşı, hiperamonyeminin nedeni (genetik, metabolik veya karaciğer kaynaklı) ve plazma amonyak seviyelerinin yükselme hızına bağlı olarak değişiklik gösterebilir (30–37).

#### Sinir Sistemi Üzerindeki Belirtiler

Merkezi sinir sistemi, hiperamonyemiden en çok etkilenen bölgedir. Amonyak, kan-beyin bariyerini kolayca geçerek beyin dokusunda toksik birikime neden olur ve nörolojik işlevleri bozar. Sinir sistemi üzerindeki etkiler şunları içerebilir (38,39):

- Bilinç Değişiklikleri: Hafif kafa karışıklığından derin komaya kadar değişen bilinç seviyelerinde bozulmalar görülebilir. Özellikle akut hiperamonyemide, bilinç kaybı hızla gelişebilir (40).
- Davranışsal Değişiklikler: Ajitasyon, iritabilite, depresyon ve letarji gibi davranışsal belirtiler sıklıkla görülür. Çocuklarda bu belirtiler, normal gelişim süreçlerini olumsuz etkileyebilir (41,42).
- Kas Koordinasyonu Bozuklukları: Amonyak birikimi, motor kontrolü etkileyerek ataksi (denge kaybı), titreme (tremor) ve istemsiz kas hareketlerine (diskinezi) neden olabilir (43,44).
- Nöbetler: Yüksek amonyak seviyeleri, epileptik nöbetlere yol açabilir. Bu nöbetler genellikle inatçı ve tedaviye dirençlidir (45–47).

#### Gastrointestinal ve Metabolik Belirtiler

Hiperamonyemi, sindirim sistemi ve metabolik süreçler üzerinde de etkiler gösterebilir (48–50):

- İştahsızlık: Hastalar sıklıkla iştah kaybı yaşar ve bu durum malnütrisyona yol açabilir (51).
- Bulantı ve Kusma: Amonyak seviyelerindeki artış, gastrointestinal rahatsızlıklara neden olabilir (52).
- Metabolik Asidoz: Vücutta amonyak birikimi, metabolik dengeyi bozarak asidoza neden olabilir (53–60).

#### Karaciğer Kaynaklı Belirtiler

Hiperamonyemi sıklıkla karaciğer disfonksiyonu ile ilişkilidir. Özellikle karaciğer yetmezliği olan hastalarda spesifik belirtiler görülebilir (61–63):

- Hepatik Ensefalopati: Karaciğerin detoksifikasyon işlevinin bozulması sonucu, amonyak seviyelerindeki artış, hepatik ensefalopati olarak bilinen nörolojik bir tabloya yol açar. Bu durum bilinç kaybı, uyku bozuklukları ve kognitif gerileme ile karakterizedir (64–67).
- Asteriksis (Flapping Tremor): Hastalarda, özellikle ellerde kontrolsüz kas hareketleri görülebilir. Bu bulgu, hiperamonyeminin karaciğer kaynaklı olduğuna işaret eden tipik bir belirtidir (68–75).

#### Yaşa Bağlı Klinik Farklılıklar

Hiperamonyeminin klinik belirtileri, hastanın yaşına bağlı olarak farklılık gösterebilir (76):

- Yenidoğan Dönemi: Yenidoğanlarda hiperamonyemi, genetik nedenlere (üre döngüsü bozuklukları gibi) bağlı olarak gelişir. Belirtiler genellikle doğumdan sonraki ilk günlerde beslenme güçlüğü, letarji, hipotoni ve kusma şeklinde başlar. Tedavi edilmediğinde koma ve ölüm riski yüksektir (77–79).
- Çocukluk ve Ergenlik Dönemi: Davranış bozuklukları, dikkat eksikliği ve hiperaktivite gibi nörolojik belirtiler ön plandadır. Ayrıca baş ağrısı, mide bulantısı ve okul başarısında düşüş görülebilir (80,81).

- Yetişkinler: Karaciğer hastalıklarına bağlı hiperamonyemi vakalarında, yavaş gelişen ensefalopati ve nörolojik gerileme sık görülür (82–84).

#### Diğer Sistemik Belirtiler

Amonyak birikiminin diğer sistemler üzerindeki etkileri daha az yaygın olmakla birlikte önemlidir (85,86).

- Kalp ve Damar Sistemi: Hiperamonyemi, kardiyak ritim bozuklukları ve kan basıncında değişikliklere neden olabilir (87–90).
- Solunum Sistemi: İleri vakalarda, solunum yetmezliği ve hiperventilasyon gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilir (91–100).

### 2.1.3. Hiperamonyeminin Epidemiyolojisi

Hiperamonyemi, genetik veya edinsel nedenlerle ortaya çıkan ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen bir metabolik bozukluktur. Üre döngüsü bozuklukları kaynaklı genetik hiperamonyemi prevalansı dünya genelinde yaklaşık 1:35.000 ile 1:70.000 arasında değişmekte olup, karaciğer hastalıkları veya ilaç toksisitesi gibi edinsel nedenlere bağlı vakalar ise yetişkinlerde daha sık görülmektedir (101,102).

Genetik hiperamonyemi vakaları, genellikle otozomal resesif veya X'e bağlı geçiş gösteren üre döngüsü bozuklukları sonucu ortaya çıkar. Bu durum yenidoğan döneminin ilk günlerinde ciddi metabolik krizlerle kendini gösterebilir. Yenidoğan hiperamonyemisinin sıklığı, uygulanan metabolik tarama programlarının kapsamına göre değişkenlik göstermekte olup, erken tanı ve tedavi edilmediğinde kalıcı nörolojik hasar veya ölüm riski yüksektir (103–105).

Erken çocukluk döneminde hiperamonyemi, sıklıkla hafif genetik mutasyonlara bağlı olarak veya geç başlangıçlı üre döngüsü bozukluklarının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu yaş grubunda hiperamonyemi prevalansı, genetik testlerin ve metabolik taramaların yaygınlaşmasıyla daha iyi anlaşılmıştır. Çocukluk çağında hiperamonyemiye bağlı ölüm oranları, erken tanı ve etkin tedavi yaklaşımları sayesinde önemli ölçüde azalmış olsa da, özellikle gelişmekte olan ülkelerde teşhis ve tedaviye erişim sınırlı olduğundan, hala önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmektedir (106,107).

Yetişkinlerde görülen hiperamonyemi vakaları çoğunlukla karaciğer yetmezliği, siroz, hepatik ensefalopati ve ilaç toksisitesi gibi edinsel nedenlere bağlıdır. Alkolik karaciğer hastalığı ve viral hepatit gibi karaciğer rahatsızlıklarının yaygın olduğu bölgelerde hiperamonyemi insidansı artmaktadır. Özellikle hepatit B ve C enfeksiyonlarının sık görüldüğü Güneydoğu Asya gibi bölgelerde hiperamonyemi daha yaygın olarak gözlemlenmektedir (108–111).

Cinsiyet farklılıkları da hiperamonyemi epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle X'e bağlı geçiş gösteren ornitin transkarbamilaz (OTC) eksikliği gibi genetik bozukluklar, erkeklerde daha şiddetli bir klinik seyir ile ilişkilendirilirken, kadınlarda genetik taşıyıcılık nedeniyle genellikle daha hafif semptomlar görülür. Bununla birlikte, karaciğer hastalıklarına bağlı hiperamonyemide cinsiyet farkı belirgin değildir (112).

Epidemiyolojik veriler, hiperamonyemi vakalarının önemli bir kısmının tanı konulmadığını ve bu durumun yaygınlığının aslında rapor edilenden daha yüksek olabileceğini göstermektedir. Özellikle hafif semptomlarla seyreden geç başlangıçlı genetik hiperamonyemi vakalarının, diğer nörolojik ve metabolik bozukluklarla karıştırılması oldukça yaygındır. Bu durum, doğru tanı konulmasını zorlaştırmakta ve engellemektedir (113,114).

Sonuç olarak, hiperamonyemi epidemiyolojisi, hastalığın genetik ve edinsel nedenleri ile bölgesel sağlık altyapısı, tanı olanakları ve yaşam tarzı gibi faktörlere bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir. Hem genetik hem de edinsel hiperamonyemi vakalarının yönetiminde erken tanı ve etkili tedavi yaklaşımları hem hastalığın prevalansını azaltmada hem de hasta yaşam kalitesini artırmada kritik bir rol oynamaktadır (115,116).

## **2.2. Hiperamonyemi Tedavisi**

### **2.2.1. Farmakolojik Yaklaşımlar**

Farmakolojik tedaviler, hiperamonyemi kontrol altına almayı ve amonyağın vücuttan hızla uzaklaştırılmasını sağlamayı hedefler. Tedavi yöntemleri genellikle amonyak üretimini azaltmaya, bağırsakta amonyak emilimini engellemeye ve amonyağın alternatif yollarla atılmasını desteklemeye odaklanır. Bu yaklaşımlar,

hiperamonyeminin nedeni ve hastanın genel durumu göz önünde bulundurularak bireysel olarak uyarlanır (117).

Karglumik asit, hiperamonyeminin farmakolojik tedavisinde "azot atılımını artıran ilaçlar" grubunda yer alır. Bu ilaç, üre döngüsündeki karbamoil fosfat sentetaz I (CPS1) enziminin doğrudan aktivatörüdür ve amonyağın üreye dönüşümünü hızlandırarak vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Özellikle üre döngüsü bozuklukları veya organik asidemilere bağlı hiperamonyemi vakalarında tercih edilen karglumik asit, amonyak seviyelerini etkin şekilde düşürerek metabolik krizin önlenmesinde önemli rol oynar (118).

Bağırsakta amonyak üretiminin azaltılması için laktuloz gibi osmotik laksatifler kullanılır. Laktuloz, bağırsak florasını değiştirerek amonyak üretimini azaltır ve amonyağın bağırsak lümeninde tutulmasını sağlar. Bunun yanı sıra, rifaksimim gibi bağırsak antibiyotikleri, amonyak üreten bakterilerin inhibisyonunu sağlayarak sistemik amonyak seviyelerini düşürür (119–121).

Plazma amonyak seviyesini hızla düşürmek için sodyum benzoat ve fenilasetat gibi azot bağlayıcı ajanlar kullanılır. Bu ajanlar, amonyağı üre döngüsüne girmeden alternatif yollarla detoksifiye ederek idrarla atılımını sağlar. Karaciğer yetmezliği gibi durumlarda plazmaferez veya karaciğer nakli gibi daha invaziv yöntemler de tedavi planına dahil edilebilir (122,123).

Farmakolojik tedaviler, çoğunlukla diyet yönetimi ve diğer destekleyici tedavilerle kombine bir şekilde uygulanır. Bu bütüncül yaklaşım, amonyak toksisitesinin neden olduğu semptomların hafifletilmesinde etkili bir strateji sunar (124–126).

### **Karaciğer Destek Tedavileri**

Karaciğer yetmezliğine bağlı hiperamonyemilerde, amonyağın detoksifikasyonu için karaciğer destek sistemleri kullanılır. Bu yöntemler arasında plazmaferez ve karaciğer nakli öne çıkar (127,128).

### **Azot Atılımını Artıran İlaçlar**

Üre döngüsü bozukluklarının tedavisinde, azot atılımını artıran ilaçlar yaygın olarak kullanılır. Özellikle sodyum benzoat ve fenilasetat gibi maddeler, alternatif yollarla azot eliminasyonunu sağlar (129,130).

### **2.2.2. Diyet ve Beslenme Yönetimi**

Hiperamonyemi tedavisinde diyet ve beslenme yönetimi, vücuttaki amonyak seviyesini azaltmak ve metabolik dengeyi sağlamak için temel bir yaklaşım olarak kabul edilir. Özellikle üre döngüsü bozuklukları ve karaciğer yetmezliği gibi durumlarda diyet yönetimi, farmakolojik tedaviyi tamamlayıcı bir rol oynar.

Protein Alımının Sınırlandırılması (131–133).

Protein metabolizması, amonyak üretiminin birincil kaynağıdır. Bu nedenle, hiperamonyemili hastalarda protein alımının sınırlanması kritik bir öneme sahiptir (134–136).

Kalori ve Enerji Dengesi

Protein alımı sınırlandırıldığında, yeterli enerji sağlamak için diyetin karbonhidrat ve yağ içeriği artırılır. Bu yaklaşım, protein katabolizmasını önleyerek vücuttaki azot yükünü azaltır (137,138).

Amonyak Üretimini Azaltan Beslenme Modifikasyonları

Hiperamonyemiye katkıda bulunabilecek belirli gıda bileşenlerinin azaltılması veya tamamen diyetten çıkarılması önerilir (139–141).

Besin Takviyeleri ve Esansiyel Besinler

Hastalığın metabolik etkilerini dengelemek için diyetle alınamayan veya yetersiz olan besinlerin takviyesi yapılır (142,143).

Enteral ve Parenteral Beslenme

Ciddi hiperamonyemi vakalarında, oral beslenmenin yeterli olmadığı durumlarda enteral veya parenteral beslenme yöntemleri kullanılır (144–146).

### 2.2.3. Yeni Tedavi Yöntemleri ve Araştırmalar

Hiperamonyeminin tedavisinde geleneksel yöntemlere ek olarak, yenilikçi tedavi yaklaşımları ve ileri teknolojilere dayalı araştırmalar, hastalığın yönetiminde umut verici sonuçlar sunmaktadır. Bu yöntemler, genetik ve moleküler düzeyde hedeflere odaklanarak amonyak metabolizmasını optimize etmeyi amaçlamaktadır (147,148).

#### Gen Terapisi

Hiperamonyemiye neden olan genetik mutasyonların tedavisinde gen terapisi, ileri bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Üre döngüsündeki enzim eksikliklerini düzeltmek amacıyla yapılan araştırmalar, genlerin doğru bir şekilde hedeflenmesi ve replasmanının sağlanması üzerinde yoğunlaşmaktadır (149,150).

#### Hücre Tedavileri

Hiperamonyemide, karaciğerin detoksifikasyon yeteneğini desteklemek veya artırmak için kök hücre tedavileri geliştirilmiştir (151–154).

#### Farmakolojik Yenilikler

Geleneksel farmakolojik yaklaşımlar, hiperamonyeminin yönetiminde etkili olsa da, yeni nesil ilaçlar ve biyoteknolojik ürünler tedavi sonuçlarını iyileştirmeyi hedeflemektedir (155).

## 2.3. Kargulimik asit

### 2.3.1. Kimyasal Yapı ve Özellikler

Karglumik asit, kapalı formülü  $C_6H_{10}N_2O_5$  olan amino asit türevli bir organik bileşiktir. Kimyasal yapısı, bir karbamoil grubu (-CONH<sub>2</sub>) ve glutamik asit türevli bir iskelet içerir. Bu yapı, karglumik asidin biyokimyasal olarak karbamoil fosfat sentetaz I (CPS1) enzimine bağlanmasını ve bu enzimi aktive etmesini sağlar. CPS1'in aktivasyonu, üre döngüsünün hızlanmasına ve plazmadaki amonyak seviyelerinin düşmesine neden olur (156–159).

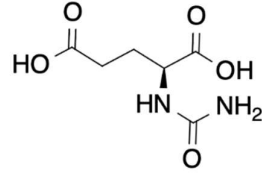
Karglumik asit, genellikle beyaz veya neredeyse beyaz bir toz formunda bulunur. Suda sınırlı bir çözünürlüğe sahiptir ve çözünürlüğü pH'a bağlı olarak değişir.

Nötral veya hafif asidik koşullarda daha kararlı olduğu gözlemlenmiştir. Molekülün logP (karglumik asit için -2.2 ve -2.4 aralığındadır) değeri (hidrofobiklik ve hidrofiliklik dengesi), farmasötik formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin seçiminde önemli bir rol oynar (160–163).

Bu bileşiğin fizikokimyasal özellikleri, farmasötik formülasyon geliştirme sürecinde dikkatle ele alınır. Örneğin (156):

- **Stabilite:** Karglumik asit, yüksek nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere duyarlıdır. Bu nedenle, stabilite çalışmalarında uygun saklama koşulları belirlenir (156).
- **pKa Değerleri:** Karglumik asidin asidik ve bazik gruplarının iyonlaşma davranışlarını ifade eden pKa değerleri, farmasötik formülasyonlarda çözünürlük, stabilite ve biyoyararlanımın optimize edilmesinde kritik bir parametredir. Karglumik asit, karbamoil (-CONH<sub>2</sub>) ve glutamik asit türevli yapısıyla birden fazla iyonizasyon bölgesine sahiptir.
  - Karboksilik Asit Grubu (pKa<sub>1</sub>): 2.3
  - Glutamik Asit Yan Zincir Karboksil Grubu (pKa<sub>2</sub>): 4.1
  - Amino Grubu (pKa<sub>3</sub>): 9.1
  - Bu değerler, karglumik asidin fizyolojik pH koşullarında nasıl iyonize olduğunu ve hangi formda bulunduğunu belirlemede önemlidir. Özellikle pH 2-5 aralığında, molekül kısmen iyonize olurken, pH 7 ve üzeri koşullarda tamamen iyonize halde bulunur. Bu iyonlaşma profili, çözünürlük profili ve farmasötik formülasyon tasarımında dikkate alınmalıdır (164,165).
- **Optik Aktivite:** Molekülün kiral bir merkez içerdiği bilinmektedir ve bu özellik, biyolojik etkinlik ve farmakokinetik davranışları etkileyebilir (166).

Karglumik asidin kimyasal yapısındaki bu özellikler (molekül yapısı görsel olarak Şekil 2.2.'de verilmiştir), farmasötik gelişim süreçlerinde hedeflenen terapötik etkinlik ve biyoyararlanım için optimize edilir. Ayrıca, üretim sırasında kalite kontrol testleriyle yapısal bütünlüğü ve saflığı sürekli izlenir (156,165).



**Şekil 2.2.** Karglumik asitin molekül yapısı

### 2.3.2. Karglumik Asit Safsızlıkları

Karglumik asit üretim, formülasyon ve depolama süreçlerinde, kimyasal yapıdaki hassasiyet nedeniyle çeşitli safsızlıkların oluşumu gözlemlenebilir. Bu safsızlıklar, farmasötik ürünün etkinliğini, güvenilirliğini ve stabilitesini doğrudan etkileyebilir. ICH Q3B (R2) kılavuzunda belirtildiği üzere, farmasötik ürünlerde oluşabilecek bozunma ürünleri ve diğer safsızlıkların belirlenmesi, sınıflandırılması ve kontrolü kritik öneme sahiptir. Karglumik asit ve safsızlıklarının molekül yapıları Şekil 2.3.'de verilmiştir (14,167–172).

ICH Q3B'nin Perspektifi:

Kılavuza göre, safsızlıkların kontrolü şu ana unsurlara dayanır:

- Tanımlı Safsızlıklar: Yapısı belirlenmiş ve toksikolojik olarak değerlendirilmiş bileşenler.
- Tanımlanmamış Safsızlıklar: Yapısı henüz belirlenmemiş, ancak belirli eşik değerlerin üzerinde miktarlarda tespit edilen bileşenler (14,15).
- Eşik Değerleri: Klinik olarak test edilen ürünlerde safsızlıklar için kabul edilebilir limitler genellikle %0,2 ila %0,5 arasında değişmektedir. Bu limitler, ürünün günlük alım dozuna ve toksisite profiline göre belirlenir (14,172,173).

Karglumik asidin farmasötik kalitesinin sağlanması için, üretim sürecinden itibaren bütün aşamalarda safsızlıklar dikkatle izlenmeli ve yönetilmelidir. Üretim sırasında kullanılan hammadde ve proseslerin kontrolü, potansiyel safsızlıkların oluşumunu önlemek veya sınırlandırmak için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, ürünün depolama koşulları ve stabilite çalışmaları sırasında safsızlıkların oluşum eğilimleri detaylı olarak izlenmelidir (37,174–179).

### Bozunma Mekanizmaları ve Safsızlıkların Etkileri

Karglumik asit, kimyasal yapısındaki amid ve karbamoil gruplarının çevresel faktörlere duyarlılığı nedeniyle, bozunma ürünlerine karşı oldukça hassastır. ICH Q3B kılavuzunda belirtilen standartlara göre, bu bozunma ürünlerinin karakterizasyonu ve miktarlarının belirlenmesi gereklidir (14,162,180,181).

Bozunma mekanizmaları arasında şunlar yer alır:

- Hidroliz: Nemli koşullarda amid bağlarının parçalanmasıyla farmakolojik etkisiz yan ürünler oluşabilir (182,183).
- Oksidasyon: Oksijenle temas sonucu reaktif ara ürünler oluşabilir ve bu ürünler toksik etkilere neden olabilir (184–186).
- Termal Bozunma: Yüksek sıcaklık, molekülün yapısında değişikliklere neden olarak bozunma ürünlerinin artmasına yol açabilir (187,188).
- Işık Maruziyeti: UV ışığı, kimyasal bağlarda kırılmaya ve yeni safsızlıkların oluşumuna neden olabilir (189–191).

### Kontrol Stratejileri:

ICH Q3B kılavuzuna uygun olarak, karglumik asit ürünlerinde bozunma ürünlerinin kontrolü için aşağıdaki yaklaşımlar uygulanır (14):

Stabilite Çalışmaları: Ürün, hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite koşullarında test edilerek bozunma ürünlerinin oluşum eğilimleri izlenir (172,192,193).

Analitik Teknikler: HPLC, UHPLC ve LC-MS gibi tekniklerle safsızlıkların tespiti ve miktar tayini yapılır (194–198).

Kabul Limitleri: Klinik güvenlik ve toksikolojik değerlendirmelere göre safsızlıkların kabul limitleri belirlenir (14,172).

Safsızlıklar, ürünün kalite ve güvenliğini etkileyebileceği için dikkatle izlenmeli ve yönetilmelidir. Aşağıda bu safsızlıkların özellikleri detaylı şekilde açıklanmıştır (183):

### **İlgili Bileşik A (HPA)**

Bu bileşik, karglumik asidin üretim sürecindeki ara ürünlerinden biridir (199). Karglumik asit ile benzer bir iskelete sahiptir ancak yan gruplarında farklılıklar gösterir.(200). Suda çözünürlüğü sınırlıdır ve yüksek nemli koşullarda hidrolize olabilir. Yüksek sıcaklıklara duyarlıdır, bu nedenle üretim sırasında sıcaklık kontrolü kritik öneme sahiptir. HPLC yöntemleri ile izlenir ve ana bileşikten ayrılması sağlanır (201).

### **Pirokarglumik Asit**

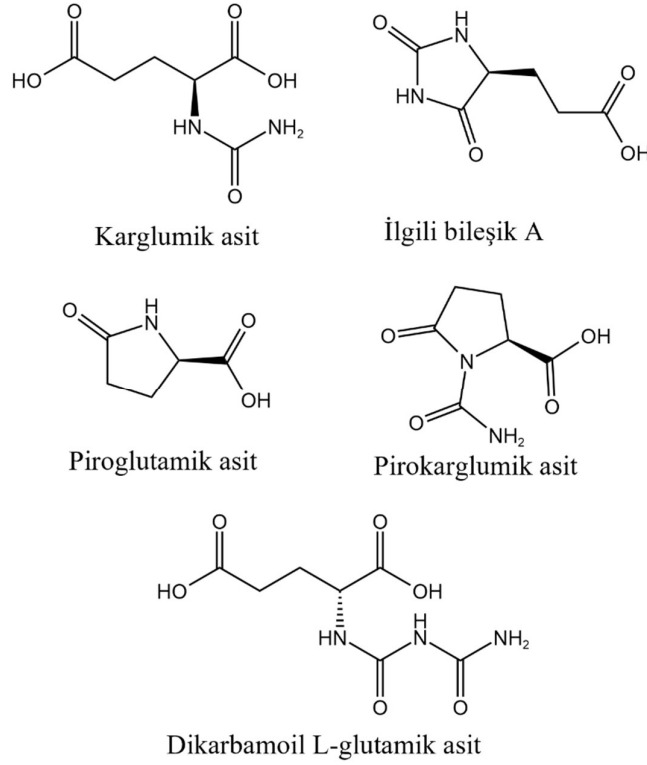
Karglumik asidin termal bozunmasıyla oluşan bir safsızlıktır. Termal işlem sırasında karglumik asidin karbamoil grubunun yeniden düzenlenmesiyle oluşur. Düşük erime noktasına sahiptir ve yüksek sıcaklıkta daha hızlı oluşur. Kütle spektrometrisi (LC/MS) ve HPLC teknikleri ile tespit edilir. Terapötik etkinlik üzerinde minimal bir etkisi olabilir ancak yüksek seviyelerde toksik etkiler gösterebilir (202).

### **Piroglutamik Asit**

Karglumik asidin oksidatif bozunma süreçlerinde oluşan bir bileşiktir. Glutamik asit türevli bir yapıya sahiptir. Yüksek sıcaklık ve pH dalgalanmalarına duyarlıdır. Nemli koşullarda stabilitesi azalır ve ürün içinde birikim gösterebilir. Farmakolojik aktiviteye etkisi sınırlıdır ancak kalite kontrol testleriyle seviyesi izlenmelidir (203).

### **Dikarbamoil L-glutamik Asit**

Bu bileşik, karglumik asidin kimyasal modifikasyonları sırasında oluşur. İki karbamoil grubunun glutamik asit iskeletine bağlı olduğu bir yapı içerir. Düşük suda çözünürlük ve yüksek pH duyarlılığı gösterir. Üretim süreçlerindeki pH değişiklikleri sırasında oluşma eğilimindedir. HPLC ve UV spektrofotometresi ile hassas tespit sağlanabilir (204–206).



**Şekil 2.3.** Karglumik ve safsızlıkların molekül şekilleri.

### 2.3.3. Karglumik Asit Tablet Formülasyonu

Karglumik asidin stabilitesi, biyoyararlanımı ve etkinliği, tablet formülasyonu sırasında dikkatle değerlendirilir (207,208).

#### Formülasyondaki Yardımcı Maddeler

Tablet formülasyonunda, karglumik asidin stabilitesini artırmak ve biyoyararlanımını optimize etmek amacıyla çeşitli yardımcı maddeler kullanılır. Dolgu maddeleri, bağlayıcılar, dağılma ajanları ve kaplama maddeleri bu süreçte önemli bir rol oynar. Yardımcı maddeler, ilacın fiziksel ve kimyasal özelliklerine uygun olarak seçilir (209).

### 2.4. Hammadde Analizleri

Karglumik asit hammaddesi, farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılan temel bileşenlerden biri olup, kalite kontrol süreçlerinde kapsamlı analizlere tabi tutulmaktadır. Hammadde analizleri, ürünün kimyasal ve fiziksel özelliklerini

belirlemek, saflığını doğrulamak ve olası safsızlıkların varlığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilir. Bu süreç, hammaddenin farmasötik kalite standartlarına uygunluğunu sağlamak ve ürün güvenilirliğini garanti altına almak için kritik bir adımdır (210–212). ICH kılavuzları doğrultusunda yapılan bu analizler, karglumik asidin görünüş, çözünürlük, kimyasal tanımlama, fiziksel özellikler, saflık ve safsızlık profili gibi çeşitli parametrelerini detaylı bir şekilde incelemektedir. Bu bölümde, karglumik asit hammaddesine yönelik analizlerin yöntemleri ve kapsamı ele alınacaktır (213,214).

#### **2.4.1. Görünüş ve Çözünürlük Analizleri**

Karglumik asit hammaddesinin görünüş ve çözünürlük özellikleri, farmasötik kalite kontrol süreçlerinde temel parametreler arasında yer almaktadır. Görünüş değerlendirmesi, hammaddenin fiziksel durumu hakkında ilk izlenimi sağlamakta ve kalite standardına uygunluğunu doğrulamak için görsel bir kontrol aracı olarak kullanılmaktadır. Farmakope standartlarına göre, karglumik asidin kristal yapıda, beyaz ile beyazımsı renkte ve homojen bir görünüme sahip olması beklenir. Bu fiziksel özelliklerin herhangi bir sapma göstermesi, hammadde üretim sürecindeki olası hatalara veya kontaminasyona işaret edebilir. Görünüş değerlendirmesi genellikle çıplak gözle yapılır, ancak ışık mikroskobu gibi cihazlar, kristal yapının detaylı analizinde kullanılabilir (215,216).

Çözünürlük özellikleri ise hammaddenin biyoyararlanımını ve formülasyon içerisindeki davranışını belirlemek açısından kritik bir öneme sahiptir. Karglumik asit, farmasötik uygulamalarda genellikle suda çözünür bir bileşik olarak tanımlanır ve bu özelliği, aktif farmasötik bileşenin biyoyararlanımını etkileyen ana faktörlerden biridir. Çözünürlük analizleri sırasında, belirli bir miktar hammadde, farmakope standartlarında belirtilen uygun çözücülerde çözündürülür ve çözünürlüğün nicel ölçümü yapılır. Bu testlerde kullanılan çözücüler genellikle saf su, asidik veya bazik çözeltiler gibi ortamlardır. Çözünürlük testi sırasında elde edilen sonuçlar, karglumik asidin farmasötik formülasyonlarda kullanılabilirliğini doğrudan etkileyebilir (217,218).

Karglumik asidin çözünürlük özellikleri, farklı pH seviyelerinde incelenerek madde davranışının değişen çevresel koşullara karşı nasıl bir tepki verdiği analiz edilir.

Özellikle, mide asiditesine benzer pH seviyelerinde yapılan çözünürlük testleri, karglumik asidin oral farmasötik formülasyonlarda etkinliğini değerlendirmek için kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, çözünürlük değerlerinde sapma olması, formülasyon tasarımı sırasında dikkate alınması gereken stabilite veya performans sorunlarına işaret edebilir. Bu nedenle çözünürlük analizleri, yalnızca mevcut farmasötik standartlarla uyumu doğrulamakla kalmaz, aynı zamanda gelecekteki üretim süreçlerinin iyileştirilmesine yönelik bilgi sağlar (219,220).

Sonuç olarak, karglumik asit hammaddesinin görünüş ve çözünürlük analizleri, farmasötik kalite kontrol süreçlerinin temel unsurlarıdır. Bu analizler, hammaddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değerlendirerek farmasötik kalite standartlarına uygunluğunu doğrulamak için kritik bir araç sağlar. Görünüş değerlendirmesi, hammaddenin homojenliğini ve genel durumunu belirlerken, çözünürlük analizleri, madde biyoyararlanımı ve farmasötik etkinlik açısından önemli bilgiler sunar. Bu süreçler, karglumik asidin farmasötik üretim ve klinik uygulamalar için güvenilir bir bileşen olarak kullanılmasını sağlar (221).

#### **2.4.2. Kimyasal Tanımlama ve Doğrulama**

Karglumik asit hammaddesinin kimyasal tanımlama ve doğrulama süreçleri, farmasötik kalite kontrolün en önemli aşamalarından biridir. Bu analizler, hammaddenin kimlik doğrulamasını yaparak üretim sürecinde olası hataları ve safsızlıkları tespit etmeyi amaçlar. Farmakope standartlarına uygun olarak gerçekleştirilen kimyasal tanımlama testleri, karglumik asidin kimyasal yapısının hedef bileşikle uyumlu olup olmadığını doğrular. Bu doğrulama, genellikle kızılötesi (IR) spektroskopisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve diğer ileri analitik yöntemler kullanılarak yapılır (222–224).

Kızılötesi spektroskopisi (IR), karglumik asidin fonksiyonel gruplarını tanımlamak ve molekülün özgün kimyasal yapısını doğrulamak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. IR spektrumu, hammaddenin karakteristik piklerini göstererek, molekülün kimyasal yapısı hakkında bilgi verir. Karglumik asidin farmakope referans maddesi ile karşılaştırılması, IR spektroskopisi aracılığıyla gerçekleştirilir ve bu süreç, hammadde kimliğinin hızlı ve güvenilir bir şekilde doğrulanmasını sağlar (225).

HPLC analizi ise, karglumik asidin alıkonma zamanını belirlemek ve safsızlıkları tespit etmek için kullanılan bir diğer kritik yöntemdir. Bu yöntem, kromatografik ayırım yoluyla hammaddenin hedef bileşenle uyumluluğunu değerlendirir. Analiz sırasında, karglumik asit standardının alıkonma zamanı ile numunenin alıkonma zamanı karşılaştırılarak kimyasal doğrulama yapılır. Aynı zamanda, HPLC yöntemi, hammaddede bulunan olası safsızlıkların nicel ve nitel değerlendirilmesine de olanak tanır (226,227).

Kimyasal tanımlama ve doğrulama süreçleri, yalnızca hammaddenin kimliğini doğrulamakla kalmaz, aynı zamanda üretim sürecinde kaliteyi artırmak için temel bilgiler sağlar. Özellikle HPLC ve IR gibi ileri analitik yöntemlerin kullanılması, hammadde güvenilirliğini artırır ve farmasötik üretimde hata payını en aza indirir. Bu analizler, karglumik asidin farmasötik kalite standartlarına uygun bir bileşen olarak kullanılmasını sağlar ve ürünün klinik etkinliğini garanti altına alır (228,229).

Sonuç olarak, karglumik asit hammaddesinin kimyasal tanımlama ve doğrulama süreçleri, farmasötik kalite kontrolün vazgeçilmez bir parçasıdır. Bu süreçler, hammaddenin kimyasal bütünlüğünü ve farmasötik kullanım için uygunluğunu doğrulamak için kritik bir araç sağlar. Gelişmiş analitik teknikler, bu aşamada elde edilen sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini artırır, böylece karglumik asidin farmasötik üretimde güvenle kullanılmasını destekler (230,231).

### **2.4.3. Fiziksel Özelliklerin Analizi**

Farmasötik hammaddelerin fiziksel özellikleri, ürün geliştirme ve üretim süreçlerinde kalite ve güvenilirlik sağlamak için önemli bir değerlendirme aşamasıdır. Karglumik asit için gerçekleştirilen fiziksel analizler, hammaddenin stabilitesini, saflığını ve farmasötik formülasyonlara uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılır. Bu testler, hammaddenin üretimden son kullanıma kadar olan süreçlerde kalite standartlarını karşılamasını garanti altına alır ve olası üretim sorunlarını önceden tespit etmeye olanak tanır (232–234).

pH ölçümü, karglumik asidin belirli bir çözelti ortamında nasıl bir davranış sergilediğini ve çözeltinin asidik ya da bazik özelliklerini etkileyen faktörleri değerlendirmek için temel bir parametredir. Bu ölçümler, özellikle oral

formülasyonlarda biyoyararlanımı etkileyen önemli bir faktör olarak kabul edilir. pH değerinin farmakope tarafından belirlenen aralıkta olması, hammaddenin hedeflenen farmasötik ürünle uyumlu olduğunu doğrular. Ayrıca, pH analizi, hammaddenin çevresel koşullara karşı stabilitesini test etme amacıyla da kullanılır (235,236).

Spesifik optik rotasyon testi, karglumik asidin kiral özelliklerini ve moleküler yapısının stereokimyasal doğruluğunu ortaya koyar. Bu analiz, hammaddenin farmakope standartlarına uygunluğunu belirlemenin yanı sıra olası safsızlıkları ve stereokimyasal bozulmaları tespit etmek için önemlidir. Optik rotasyon ölçümleri, karglumik asidin kimyasal yapısının doğruluğunu teyit eden ve farmasötik kalitenin güvence altına alınmasını sağlayan temel bir yöntemdir (236,237).

Kurutma kaybı testi, hammaddenin nem içeriğini ve higroskopik davranışını belirlemek için kullanılan bir diğer kritik analizdir. Farmasötik hammaddelerde nem oranı, kimyasal stabiliteyi doğrudan etkileyen bir faktördür. Yüksek nem içeriği, bozunma ürünlerinin oluşumuna veya fiziksel formun bozulmasına yol açabilir. Karglumik asit için yapılan bu testler, hammaddenin uygun depolama koşullarında stabilitesini garanti etmek ve üretim süreçlerinde karşılaşılabilecek riskleri en aza indirmek için gereklidir (238).

Fiziksel özelliklerin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi, karglumik asidin farmasötik üretimdeki performansını ve güvenilirliğini artırır. Bu analizler, hammaddenin farmasötik kalite standartlarına uygunluğunu sağlayarak, ürünün klinik etkinliğini ve güvenilirliğini garanti eder. Fiziksel özelliklerin analizi, üretim sürecinde olası hataları önceden belirlemenin yanı sıra, farmasötik ürünlerin güvenli bir şekilde geliştirilmesine de katkıda bulunur (239).

Sonuç olarak, karglumik asit hammaddesinin fiziksel analizleri hem ürün geliştirme süreçlerinde hem de üretim aşamalarında kilit bir rol oynar. Bu süreç, hammaddenin stabilite ve kalite gerekliliklerini karşıladığını doğrularak, farmasötik ürünlerin güvenilirliğini ve etkinliğini destekleyen temel bir adımdır (240).

#### **2.4.4. Saflık ve Kalite Kontrol Analizleri**

Farmasötik hammaddelerde saflık ve kalite kontrol analizleri, ürünün güvenilirliğini ve etkinliğini sağlamak adına gerçekleştirilen temel testlerden biridir.

Karglumik asit hammaddesi için yapılan bu analizler, ürünün farmakope standartlarına uygunluğunu doğrulamayı ve olası safsızlıkların tespit edilmesini amaçlar. Hammaddenin saflık düzeyi, farmasötik formülasyonların klinik performansını doğrudan etkilediği için bu testler, üretim ve kalite kontrol süreçlerinde kritik bir yere sahiptir (14,241).

Saflık analizleri, karglumik asidin kimyasal bütünlüğünü değerlendirmek için geliştirilmiş kapsamlı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Özellikle HPLC, saf bileşenin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ve olası safsızlıkların belirlenmesi için tercih edilen bir yöntemdir. Bu analiz, ana bileşenin saflığını yüzdesel olarak ölçerken, aynı zamanda numunede bulunan düşük seviyeli organik ve inorganik safsızlıkları da tespit eder. Bu süreçte elde edilen veriler, hammadde kalitesinin uluslararası düzenlemelere uygunluğunu doğrular (28,176,242).

Sülfat külü tayini gibi testler ise karglumik asitte bulunan inorganik kalıntıların değerlendirilmesi için uygulanır. Bu test, hammaddenin saf olmayan bileşenlerden arındırılmış olduğunun bir göstergesidir. Sülfat külü miktarının belirlenen limitlerin altında olması, hammaddenin yüksek saflıkta olduğunu kanıtlar ve üretim sürecinde istenmeyen kirlilik kaynaklarının kontrol altında tutulduğunu gösterir (243).

Kalite kontrol süreçlerinde miktar tayini de önemli bir parametre olarak yer alır. Bu analiz, hammaddenin hedeflenen kimyasal bileşiğin yeterli miktarını içerip içermediğini doğrular. Karglumik asit için gerçekleştirilen miktar tayini testleri, farmakope standartlarında belirtilen kabul sınırları içinde olup olmadığını belirler. Test sonuçlarının tutarlılığı, hammaddenin farmasötik ürünlerde güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için kritik bir gerekliliktir (13,14,241).

Saflık ve kalite kontrol analizleri, farmasötik hammaddelerin üretimden son kullanıcıya kadar olan süreçlerde kalite güvencesini sağlamak için temel oluşturur. Karglumik asit için yapılan bu testler, ürünün farmasötik standartlara uygunluğunu garanti ederek, güvenilir ve etkin farmasötik formülasyonların geliştirilmesine katkıda bulunur. Bu süreçler, yalnızca üretim aşamasında değil, aynı zamanda uzun vadeli depolama koşullarında da ürünün stabilitesini ve güvenilirliğini korumayı hedefler (173).

Sonuç olarak, saflık ve kalite kontrol analizleri, farmasötik hammaddelerin etkinliğini ve güvenilirliğini garanti altına alan en önemli adımlardan biridir. Karglumik asit gibi farmasötik hammaddelerde bu analizlerin doğru ve eksiksiz bir şekilde gerçekleştirilmesi, ürünün klinik etkinliğini destekleyen ve farmasötik kalite standartlarını güvence altına alan bir süreçtir (14).

#### **2.4.5. Safsızlık Profili ve Kalıntı Çözücüler**

Farmasötik ürünlerde bulunan safsızlıklar ve kalıntı çözücüler, ürün kalitesini ve güvenliğini doğrudan etkileyen faktörler arasında yer alır. Karglumik asit hammaddesinin safsızlık profili ve kalıntı çözücülerinin analizi, bu bileşiğin üretim süreçlerinin kontrol altında tutulduğunu ve uluslararası kalite standartlarına uygun olduğunu doğrulamak için gerçekleştirilir. Bu analizler hem kimyasal hem de toksikolojik açıdan kritik bir değerlendirme sağlar (14,244).

Karglumik asit üretiminde ortaya çıkabilecek organik safsızlıklar, genellikle başlangıç materyalleri, ara ürünler veya yan reaksiyonlar sonucu oluşur. İlgili bileşik A, piroglutamik asit, pirokarglumik asit ve dikarbamoil L-glutamik asit gibi safsızlıklar, bu süreçte en yaygın olarak tespit edilen bileşenler arasındadır. Analitik yöntemler, bu safsızlıkların her birinin miktarını hassas bir şekilde ölçerek farmakope limitleri ile karşılaştırılmasını sağlar. Özellikle düşük seviyelerde bulunan safsızlıkların tespiti, farmasötik ürünlerin güvenilirliğini garanti altına almak için kritik bir adımdır (14).

Karglumik asidin toplam safsızlık profili, HPLC gibi ileri analitik tekniklerle değerlendirilebilir fakat literatürde bunu inceleyen bir çalışma bu tez kapsamında üretilen verilerin bir kısmından oluşan yayınlardan önce bulunmamaktadır (162,242). Bu yöntem, safsızlıkların hem nicel hem de nitel analizi için ideal bir platform sunar. Toplam safsızlıklarının yanı sıra tanımlanamayan bileşenlerin de miktarları belirlenir ve kabul edilebilir sınırlar içinde olup olmadığı kontrol edilir. Bu tür analizler, yalnızca ürünün kimyasal saflığını doğrulamakla kalmaz, aynı zamanda olası toksikolojik risklerin önceden tespit edilmesine de olanak tanır (162,170,242).

Kalıntı çözücüler, hammaddenin üretimi sırasında kullanılan organik çözücülerin iz miktarlarda kalmasıyla oluşur. Karglumik asit için metanol, en yaygın

olarak analiz edilen çözücülerden biridir. Bu tür kalıntı çözücülerin miktarları, ICH Q3C kılavuzunda belirtilen sınırlarla karşılaştırılır. Çözücü kalıntılarının kabul edilebilir düzeylerde olması, ürünün klinik kullanım için güvenli olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca, çözücülerin iz miktarlarının doğru bir şekilde ölçülmesi, üretim sürecinde kullanılan teknolojinin etkinliğini ve kontrol düzeyini de yansıtır (245).

Karglumik asit hammaddesi üzerindeki çözücü kalıntısı veya organik safsızlık analizleri farmasötik ürünlerin kalitesini ve güvenilirliğini artırmaya yönelik kritik adımlardır. Her bir safsızlık ve çözücü kalıntısının değerlendirilmesi, yalnızca ürün güvenliği açısından değil, aynı zamanda düzenleyici standartlara uyum açısından da önem taşır. Bu analizlerin dikkatle yürütülmesi, farmasötik hammaddelerin global standartlara uygun bir şekilde üretilmesini sağlar ve son kullanıcıya güvenle ulaşmasını temin eder (14).

Her aşaması detaylı bir şekilde kontrol edilen bu süreç, yalnızca kaliteyi doğrulamakla kalmaz; aynı zamanda üretim teknolojisinin sağladığı verimliliği ve sürdürülebilirliği de gözler önüne serer. Böylece, karglumik asit hammaddesi hem analitik başarı hem de endüstriyel yeterlilik açısından en üst düzeyde değerlendirilebilir (173).

## **2.5. Karglumik Asit Analizine Yönelik Literatürdeki Yöntemler**

Farmasötik analizlerde, ilaç etkin maddeleri ve ilgili safsızlıkların belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemlerin doğruluğu, hassasiyeti ve güvenilirliği kritik önem taşımaktadır. Literatürde karglumik asidin miktar tayini ve genel farmasötik analizleri üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcut olmakla birlikte, karglumik asit tablet formülasyonlarında yer alan safsızlıkların ayrıntılı analizi ve nicel tayinine yönelik geliştirilmiş bir analitik yöntem literatürde ve farmakopede bulunmamaktadır. Bu nedenle, karglumik aside özgü safsızlıkların hassas ve seçici şekilde belirlenmesini sağlayan analitik yöntem, ilk kez bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Karglumik asit ile ilgili analitik yöntemler literatürde oldukça sınırlıdır ve çoğunlukla yalnızca ana bileşiğin miktar tayinine odaklanılmıştır. Özellikle tanımlı safsızlıkların nicel ve ayrıntılı şekilde incelendiği çalışmaların sayısı son derece azdır.

Bu bağlamda, literatürde yer alan bazı çalışmalarda karglumik asitin belirlenmesi amacıyla HPLC-MS/MS teknikleri kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Bu çalışmalardan birinde, insan plazmasında karglumik asitin tayini için yüksek seçiciliğe sahip bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik koşullar arasında ACE 5 CN kolon (150 mm × 4.6 mm, 5 µm), hareketli faz olarak %80 oranında organik faz (metanol:asetonitril, 50:50, h/h) ve %20 oranında %0.1 asetik asit içeren sulu faz yer almaktadır. Elüsyon izokratik şekilde gerçekleştirilmiş olup akış hızı 1.0 mL/dk olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon üçlü kuadropol kütle spektrometresiyle negatif iyon modunda, çoklu tepkime izleme (MRM) modunda yapılmıştır (m/z 189→146). Numune hazırlama aşamasında 100 µL plazma örneği Oasis MAX anyon değişim SPE ile arıtılmıştır. Yöntem 6–6000 ng/mL aralığında doğrusal yanıt vermekte olup ( $r^2 \geq 0.9987$ ), alt limit tayin düzeyi (LLOQ) 6 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Matris etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiş, yöntem doğruluk ve kesinlik kriterlerini karşılamıştır. Ancak bu yöntemde yalnızca ana bileşik olan karglumik asit analiz edilmiş, safsızlıklar veya bozunma ürünlerine yönelik herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır (181).

Başka bir çalışmada ise karglumik asitin farklı hayvansal ürünlerde (yem, süt, serum) tayini için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde Waters Atlantis T3 C18 kolon (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) tercih edilmiştir. Elüsyon gradiyent modda gerçekleştirilmiş, hareketli fazlar %0.1 formik asit içeren su (faz A) ve metanol (faz B) şeklinde hazırlanmıştır. Elüsyon programı 0–6.0 dakikalar arasında %90 faz A, 6.1–12.0 dakikalar arasında %15 faz A'ya geçiş ve ardından tekrar başlangıç koşullarına dönülerek toplam 20 dakika olarak ayarlanmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dk olarak optimize edilmiştir. Dedeksiyon pozitif iyon modunda MRM modunda yapılmıştır (m/z 191→84). Yem örneklerinde formik asitli su:metanol (80:20, h/h) karışımı ile tüketme uygulanmış, ardından anyon değişimli SPE ile arıtma yapılmıştır. Süt ve serum örneklerinde ise metanol ile protein çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, doğrusal yanıt aralığı ve yüksek geri kazanım (%95–110) ile valide edilmiştir. Katı örneklerde LOD değerleri 0.0035–0.022 mg/kg, sıvı örneklerde ise 0.014–0.023 µg/mL arasında bulunmuştur. Ancak bu analizde de yalnızca ana bileşik olan

karglumik asit ölçülmüş, herhangi bir safsızlık veya bozunma ürünü değerlendirilmemiştir (246).

Bu literatür yöntemlerinin ortak özelliği, yalnızca karglumik asitin tayinine odaklanmaları ve farmasötik formülasyonlarda bilinen safsızlıkların (ilgili bileşik A, pirokarglumik asit, piroglutamik asit, dikarbamoil L-glutamik asit) ayırımına yer vermemeleridir. Ayrıca bu çalışmalar, stabilite göstergeli bir analiz yöntemi sunmamaktadır. Dolayısıyla bu tez kapsamında geliştirilen UHPLC-DAD temelli yöntem hem karglumik asitin hem de tanımlı safsızlıkların aynı anda ve güvenilir şekilde analiz edilmesine olanak tanıyarak literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmayı hedeflemektedir (162).

**Tablo 2.1.** Literatürde bulunan HPLC yöntemlerinin parametreleri.

Parametre	Yöntem 1	Yöntem 2
Kaynak	Sharma ve ark., 2015	Ma ve ark., 2019
Kullanılan Teknik	HPLC-MS/MS (ESI <sup>-</sup> , MRM modu)	HPLC-MS/MS (ESI <sup>+</sup> , MRM modu)
Kolon	ACE 5 CN kolon, 150×4.6 mm, 5 µm	Waters Atlantis T3 C18, 250×4.6 mm, 5 µm
Mobil Faz	%80 MeOH:ACN (50:50) / %20 %0.1 asetik asit içeren su	Faz A: %0.1 formik asitli su, Faz B: metanol
Elüsyon Tipi	İzokratik	Gradyent
Elüsyon Programı	Sabit oranlı, izokratik elüsyon	0–6 dk: %90 A → 6.1–12 dk: %15 A → sonra başlangıca dönüş (toplam 20 dk)
Akış Hızı	1.0 mL/dk	0.8 mL/dk
Dedektör ve Dalga Boyu	Üçlü kuadropol MS, MRM geçişi: m/z 189→146	Üçlü kuadropol MS, MRM geçişi: m/z 191→84
Numune Hazırlama	100 µL plazma, Oasis MAX SPE (anyon değişim) ile tüketme	Yem: formik asitli su:MeOH (80:20) tüketme + SPE Süt/serum: MeOH ile protein çöktürme

Doğrusallık Aralığı	6–6000 ng/mL	Matrise bağlı; geniş aralık (örneğin serumda 0.1–10 µg/mL)
r <sup>2</sup> Değeri	≥ 0.9987	Değerlendirilmiş (değer çalışmada bildiriliyor)
LOD / LOQ	LLOQ: 6 ng/mL	LOD: 0.0035–0.022 mg/kg (katı), 0.014–0.023 µg/mL (sıvı) LOQ: 0.012–0.073 mg/kg
Geri Kazanım / BSS	Geri kazanım: uygun Matris etkisi: ihmal edilebilir (0.95–1.01)	Geri kazanım: %95–110 BSS <%5
Safsızlık Analizi	Sadece ana bileşik analiz edilmiş; safsızlıklar değerlendirilmemiştir	Sadece ana bileşik analiz edilmiş; safsızlıklar nicel olarak incelenmemiştir

### 2.5.1. Spektroskopik Yöntemler

Karglumik asidin kimyasal karakterizasyonu ve safsızlık profili için UV-GB spektrofotometri, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) gibi tekniklerden yararlanılmıştır.

- **UV-GB Spektrofotometri:** Karglumik asidin ve safsızlıklarının absorpsiyon özelliklerini belirlemek için kullanılan temel yöntemlerden biridir. UV-GB spektrofotometreler, 190-400 nm dalga boyu aralığında ölçüm yaparak bileşiklerin maksimum absorpsiyon değerlerini belirlemeye olanak tanır (247).
- **FTIR Spektroskopisi:** Fonksiyonel grupların tanımlanması ve moleküler yapı karakterizasyonunda önemli bir yöntemdir. Özellikle karbamoil ve amid fonksiyonel gruplarının tayininde kullanılmaktadır.
- **NMR Spektroskopisi:** Karglumik asidin proton (<sup>1</sup>H-NMR) ve karbon-13 (<sup>13</sup>C-NMR) spektroskopik analizleri, bileşiğin yapısal doğrulaması açısından kullanılmıştır (248–252).

## 2.6. Kromatografi

Kromatografik teknikler, bir karışım içerisindeki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktar tayini amacıyla kullanılan temel analitik yöntemlerdir. Bu yöntemler, bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasındaki farklı dağılım ve ilgilerine dayanarak çalışır; sabit faz genellikle bir kolon içindeki durağan malzemeyi (örneğin, silika temelli tanecikler) temsil ederken hareketli faz, sıvı veya gaz formunda akışkan bir çözücü karışımından oluşur. Kromatografi teknikleri arasında gaz kromatografisi (GC), ince tabaka kromatografisi (TLC), iyon kromatografisi (IC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi yöntemler yer almaktadır. Ancak bu çalışmada, özellikle yüksek duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı HPLC ve UHPLC teknikleri tercih edilmiştir. Bu teknikler, farmasötik ürünlerde aktif bileşenlerin ve safsızlıkların nicel ve nitel analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (253,254).

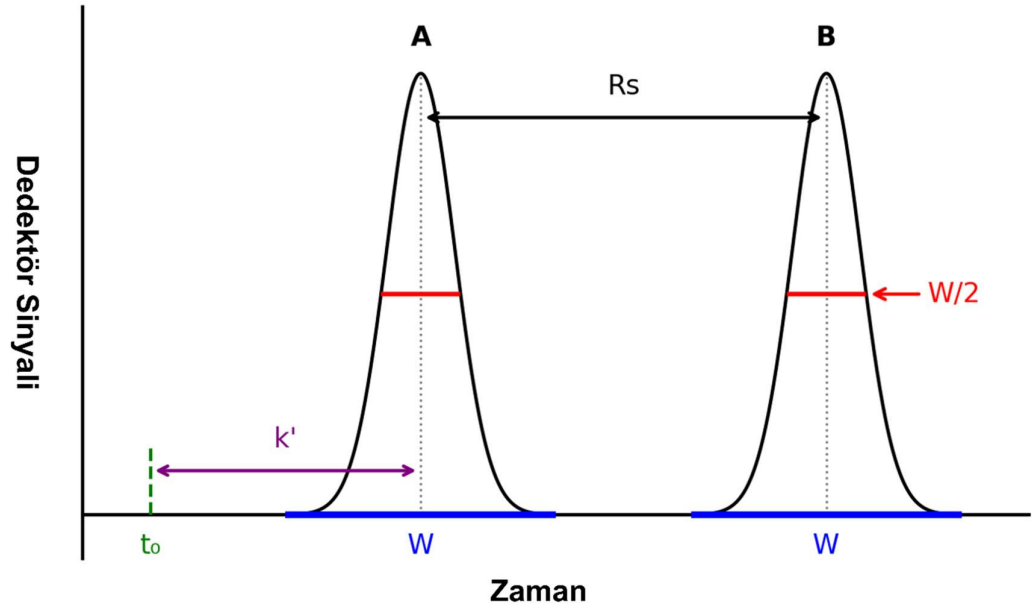
### HPLC ve UHPLC’de Temel Kromatografik Parametreler

HPLC/UHPLC analizlerinde ayırımın kalitesini ve verimini belirleyen çeşitli operasyonel parametreler bulunmaktadır. Temel kromatografik parametrelerden bazıları aşağıda kısaca açıklanmıştır:

- **Akış Hızı:** Hareketli fazın kolondan geçiş hızını (genellikle mL/dakika cinsinden) ifade eder. Akış hızı, analitlerin alıkonma süresini doğrudan etkiler; yüksek akış hızlarında bileşikler kolonu daha kısa sürede terk ederek daha düşük tR değerleri verir. Ancak aşırı yüksek akış hızı, analitlerin sabit faz ile yeterince etkileşmeden elüsyona uğramasına yol açabilir. Optimal akış hızı, analiz süresi ile çözünürlük arasında denge kurularak seçilir.
- **Kolon Sıcaklığı:** Kolon sıcaklığı, kromatografik ayırmada alıkonma sürelerini ve pik şekillerini etkiler. Genellikle sıcaklık artışı, analitlerin sabit faz ile etkileşimini azaltarak daha kısa alıkonma süreleri sağlar. Sabit sıcaklık kullanımı, tekrarlanabilir sonuçlar açısından önemlidir.
- **Kolon Tipi ve Sabit Faz:** Kullanılan kolonun tipi (boyut, iç çap, partikül boyutu) ve sabit fazın kimyasal yapısı (örneğin C18, C8, fenil) ayırımın temelini oluşturur. Ters faz HPLC kolonlarında sabit faz hidrofobik karakterde

olup polar hareketli faz kullanılır. UHPLC sistemlerinde daha küçük partikül boyutları kullanılarak daha yüksek etkinlik sağlanır.

- **Hareketli Faz:** Hareketli fazın bileşimi ve pH değeri, analitlerin kolondaki davranışını etkiler. Genellikle su veya tampon + organik çözücü (metanol, asetonitril) kombinasyonları tercih edilir. Hareketli fazın elüsyon gücü ve pH'sı, bileşiklerin ayrımında kritik rol oynar.
- **Kromatogram ve Pik Alanı:** Kromatogram, dedektör sinyalinin zamana karşı grafiğidir. Her bir pik, kolondan elüe olan bir bileşiği temsil eder. Piklerin yatay eksenindeki konumu alıkonma süresini, altında kalan alan ise analit miktarını gösterir. Pik alanı, nicel analizde kullanılan temel parametrelerden biridir ve analit derişimi ile doğru orantılıdır. Standart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla, bilinmeyen numunedeki analitin miktarı pik alanına göre hesaplanır. Pik alanları ayrıca karışımdaki bileşiklerin göreceli yüzdelereini belirlemek için de kullanılabilir (255,256).



**Şekil 2.4.** Bir kromatogram örneği (W: pik genişliği, W/2: yarı yükseklikteki pik genişliği, Rs: ayırıcılık,  $k'$ : kapasite faktör).

- **Alıkonma Zamanı ( $t_R$ ):** Bileşiğin dedektöre ulaştığı zamandır. Her analit için karakteristik bir değerdir. Analitlerin tanımlanmasında ve tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesinde kullanılır.
- **Kapasite Faktörü ( $k'$ ):** Bir analitin sabit fazla etkileşme süresini tanımlar.  $k' = (t_R - t_0) / t_0$  formülüyle hesaplanır. Genellikle 2'den büyük olması idealdir.  $k'$  çok düşükse bileşik tutulmadan elüe oluyordur; çok yüksekse analiz süresi uzar.
- **Seçicilik ( $\alpha$ ):** İki analitin kolonda farklı tutulma derecesini tanımlar.  $\alpha = k'_2 / k'_1$  şeklinde hesaplanır.  $\alpha > 1$  ise iki analit ayrılabilir demektir. Ayrımın kalitesini belirleyen önemli bir parametredir.
- **Etkinlik (N):** Kolonun ayırma kapasitesinin ölçüsüdür. Yüksek N değeri daha dar ve simetrik pikler ile sonuçlanır. Tanecik boyutu küçüldükçe etkinlik artar, bu nedenle UHPLC kolonları daha yüksek N değerlerine sahiptir.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

- $t_R$ : alıkonma zamanı (dk)
  - $W$ : Pik genişliği (tam genişlik, taban seviyesinde)
- **Ayrırcılık ( $R_s$ ):** İki pik arasındaki ayrımın nicel göstergesidir.  $R_s \geq 1,5$  ise iki pik tamamen ayrılmış kabul edilir. Etkinlik (N), seçicilik ( $\alpha$ ) ve kapasite faktörü ( $k'$ ) çözünürlüğü doğrudan etkiler. Ayrırcılık şematik olarak yukarıdaki Şekil 2.4' de gösterilmiştir.

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

- $t_{R1}, t_{R2}$ : İki farklı bileşenin alıkonma zamanları
  - $W_1, W_2$ : İlgili piklerin genişlikleri
- **Dedeksiyon Dalga Boyu:** UV-GB dedektör kullanıldığında analitin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu seçilir (örneğin 205 nm). Bu, duyarlılığı ve nicel doğruluğu artırır.

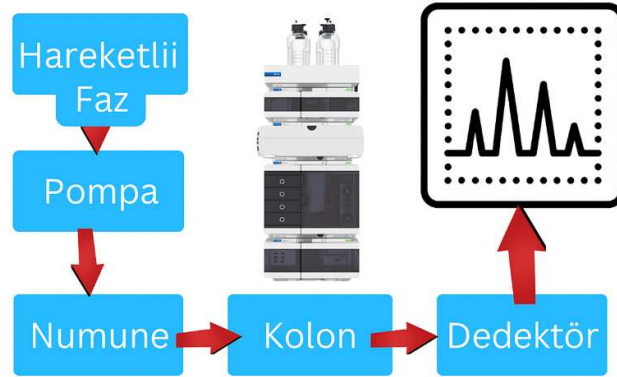
### 2.6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, farmasötik analizlerde kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve miktar tayini için yaygın olarak kullanılan yüksek hassasiyetli bir tekniktir. HPLC'nin temel prensibi, analitin hareketli faz ile sabit faz arasındaki farklı etkileşimlerine dayanır. Yöntem, numunedeki bileşenlerin farklı hızlarla dedektöre ulaşmasını sağlayarak analitik ayırma gerçekleştirir. HPLC cihazının şematik gösterimi Şekil 2.5.'te verilmiştir (257).

HPLC yönteminde kromatografik ayırma için kullanılan başlıca mekanizmalar;

- a. Adsorpsiyon
- b. Dağılma
- c. Hidrofilik etkileşim (HILIC)
- d. İyon çifti oluşumu
- e. İyon değiştirme
- f. Boyut eleme
- g. Afinite

olarak sıralanabilir. Bu çalışmada, dağılma mekanizmasından yararlanılarak kromatografik ayırma gerçekleştirilmiştir. Dağılma kromatografisi normal faz veya ters faz sıvı kromatografisi olarak uygulanabilir.



Şekil 2.5. HPLC diyagramı.

HPLC sisteminde kullanılan sabit faz ve hareketli fazın özelliklerine göre yöntem, ters faz (RP-HPLC) veya normal faz (NP-HPLC) olarak sınıflandırılır (258). Bu çalışmada, ters faz dağılma kromatografisi uygulanmıştır.

#### **Ters Faz Kromatografisi (RP-HPLC):**

- **Tanım:** Sabit fazın hidrofobik, hareketli fazın ise polar olduğu bir kromatografik tekniktir.
- **Sabit Faz:** Genellikle C18 (oktadesilsilan) veya C8 (oktansilan) gibi hidrofobik kolonlar kullanılır.
- **Hareketli Faz:** Su, metanol veya asetonitril gibi polar çözücülerin karışımından oluşur. Genellikle fosfat tamponu veya formik asit gibi tampon sistemleri pH dengesini sağlamak için eklenir.
- **Kullanım Alanları:** Polar veya yarı-polar bileşiklerin analizi için uygundur. Farmasötik ürünlerde bozunma ürünleri, metabolitler ve ilaç etken maddelerinin analizinde yaygın olarak tercih edilir (259,260).
- **Avantajları:**
  1. Daha yüksek çözünürlük.
  2. Geniş bir polarite aralığında bileşiklerin analizi.
  3. Daha düşük organik çözücü tüketimi.

#### **Normal Faz Kromatografisi (NP-HPLC):**

- **Tanım:** Sabit fazın polar, hareketli fazın ise apolar olduğu bir kromatografik tekniktir.
- **Sabit Faz:** Silika veya polar kaplı kolonlar (örneğin, amin veya diol kaplı kolonlar) kullanılır.
- **Hareketli Faz:** Apolar organik çözücüler (hekzan, toluen veya kloroform) kullanılır.
- **Kullanım Alanları:** Apolar veya lipofilik bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur.

- **Avantajları:**

1. Yağlar ve lipitler gibi apolar bileşiklerin analizi için uygundur.
2. Polar sabit fazlar nedeniyle yüksek duyarlılık sağlar (261,262).

### **HPLC Sisteminin Temel Bileşenleri**

HPLC sistemi aşağıdaki temel bileşenlerden oluşur:

- Pompa: Hareketli fazı sabit faz boyunca yüksek basınç altında zorlar. Pompa basıncı genellikle 100-400 bar aralığında çalışır.
- Enjektör: Numuneyi hareketli faza doğru enjekte eder. Otomatik enjektörler yüksek tekrarlanabilirlik sağlar.
- Kolon: Numunedeki bileşenlerin ayrılmasının gerçekleştiği ana bileşendir. Sabit fazın kimyasal özellikleri ayrılma verimliliğini belirler.
- Dedektör: Ayrılan bileşenlerin tespiti ve sinyallerin analizi için kullanılır. UV-Vis dedektörler, florimetrik dedektörler ve kütle spektrometresi (MS) dedektörleri HPLC’de yaygın olarak kullanılır (263).

### **HPLC Uygulamaları**

HPLC, farmasötik analizlerde aşağıdaki alanlarda yaygın olarak kullanılır:

- Bozunma Ürünleri Analizi: İlaç stabilite çalışmaları sırasında oluşan bozunma ürünlerinin tanımlanması.
- Saflık Analizi: İlaç etken maddesinin saflığının belirlenmesi.
- Miktar Tayini: Etken maddelerin ve yardımcı maddelerin miktarlarının analizi.
- Dissolüsyon Analizi için Miktar Tayini: in-vitro analizlerden elde edilen numunelerin tayin edilmesi.

### **HPLC Cihazında Optimize Edilmiş Koşulların Belirlenmesi**

Analizlerde verimliliği artırmak için optimize edilen parametreler:

- Hareketli Fazın Kompozisyonu: pH ve çözücü oranlarının analitin iyonlaşma durumuna uygun şekilde ayarlanması.

- Kolon Sıcaklığı: Ayrılma hızını ve çözünürlüğü optimize etmek için genellikle 25-40°C arasında kontrol edilir.
- Akış Hızı: Genellikle 0.5-1.5 mL/dk arasında seçilir, bu hız kolon performansı ve analitik hassasiyet açısından kritik bir parametredir (264,265).

### **HPLC'de Kullanılan Dedektörler**

HPLC sistemlerinde, ayrılan bileşenlerin tespit edilmesi ve miktar tayini için çeşitli dedektörler kullanılır. Dedektör seçimi, analiz edilen bileşiğin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Yaygın kullanılan dedektörler UV-GB Dedektörü, Dizi Diyot Dedektör (DAD), Floresans Dedektörü, Kütle Spektrometresi (MS), Refraktif İndeks (RI) Dedektörü, Elektrokimyasal Dedektör ve Işık Saçılma Dedektörü (ELSD)'dür. Bu çalışmada UV-GB dedektörünün gelişmiş biçimi olan Dizi Diyot Dedektör kullanılmıştır:

#### **UV-GB Dedektörü:**

UV-GB dedektörleri, bileşiklerin ultraviyole (190-400 nm) ve görünür ışık (400-700 nm) aralığında ışığı soğurma özelliklerini kullanarak tespit yapar.

- Avantajları:
  - Çoğu organik ve inorganik bileşiğin UV aralığında absorpsiyon göstermesi nedeniyle geniş bir uygulama alanına sahiptir.
  - Yüksek duyarlılık ve düşük algılama sınırı sunar.
- Kısıtlamalar:
  - UV-absorpsiyon özelliği göstermeyen bileşiklerde kullanılmaz.
  - Yüksek derişime sahip çözeltiler direk analiz edilemeyebilir.

#### **Dizi Diyot Dedektör (DAD)**

Dizi diyot dedektör (DAD, Diode-Array Detector), UV-GB dedektörünün gelişmiş bir versiyonu olup, farklı dalga boylarında eş zamanlı ölçüm yaparak daha fazla spektral bilgi sağlar. Birden fazla diyottan oluşan bu sistem, her bileşiğin spektrumunu kaydedebilme avantajına sahiptir.

- Avantajları:
  - Eş zamanlı çoklu dalga boyu ölçümü yapabilir, böylece bileşiklerin UV spektral özellikleri hakkında daha fazla bilgi sağlar.
  - Bileşiklerin spektrumlarını karşılaştırarak saflık analizi yapılmasına olanak tanır.
  - Ters faz HPLC ve HILIC gibi farklı kromatografik tekniklerle uyumludur.
- Dezavantajları:
  - Daha büyük veri setleri oluşturduğu için veri işleme süresi artabilir.
  - Geleneksel UV-GB dedektörlerine kıyasla daha yüksek maliyetlidir (266).

### 2.6.2. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

UHPLC, HPLC'nin gelişmiş bir versiyonudur ve daha küçük partikül boyutlarına (genellikle  $<1.8 \mu\text{m}$ ) sahip kolonlar kullanılarak analitik verimliliği artırmayı hedefler. Bu teknoloji, özellikle hız, duyarlılık ve yüksek ayırıcılık gerektiren analizler için geliştirilmiştir.

#### Temel Özellikler:

UHPLC'nin en belirgin özelliği, daha yüksek basınç altında (genellikle 15.000 psi'ye kadar) çalışabilmesidir. Bu, küçük partiküllü kolonların kullanılması sayesinde sağlanır ve bileşenlerin daha hızlı ve etkili ayrılmasına olanak tanır (267).

#### Avantajları:

- Daha Hızlı Analiz: UHPLC, daha kısa kolonlar ve yüksek akış hızları kullanarak analiz sürelerini önemli ölçüde kısaltır.
- Yüksek Ayırıcılık: Küçük partiküller, daha dar pik genişlikleri ve daha iyi ayırma kapasitesi sağlar.
- Düşük Çözücü Tüketimi: Daha kısa analiz süreleri nedeniyle, UHPLC'nin çözücü tüketimi HPLC'ye kıyasla daha düşüktür.

### **Kullanım Alanları:**

UHPLC, farmasötik analizlerde, özellikle bozunma ürünleri, metabolitler ve karmaşık biyolojik matrislerde düşük derişimli bileşenlerin tespiti için uygundur. Ayrıca, validasyon gerektiren yöntemlerde hassas sonuçlar sunar.

### **Sınırlamaları:**

UHPLC'nin yüksek basınç gereksinimi nedeniyle, kullanılan ekipmanların dayanıklılığı ve maliyeti HPLC'ye kıyasla daha yüksektir. Ayrıca, küçük partiküllü kolonların bakım ve stabilite ihtiyaçları dikkate alınmalıdır (268,269).

## **2.7. Yöntem Geliştirme Çalışmaları**

Farmasötik analizlerde safsızlıkların güvenilir biçimde tespiti, ürün kalitesinin ve hasta güvenliğinin sağlanması açısından büyük önem taşır. Bu nedenle, geliştirilecek analitik yöntemlerin bileşikleri doğru, hassas ve tekrarlanabilir şekilde belirleyebilmesi gerekir. Yöntem geliştirme süreci, sistematik bir yaklaşımla yürütülmeli; analiz edilecek bileşiğin kimyasal yapısı, fizikokimyasal özellikleri ve literatürde daha önce uygulanmış yöntemler dikkate alınmalıdır.

Yöntem seçiminde, analiz edilecek maddenin polaritesi, çözünürlük özellikleri ve UV-GB spektrum davranışları gibi faktörler değerlendirilerek uygun kromatografik teknik belirlenmelidir. Ters faz kromatografi (RP-HPLC veya UHPLC) çoğu farmasötik bileşik için ilk tercih olarak değerlendirilir. Sabit faz olarak genellikle C18 tipi kolonlar kullanılırken, hareketli faz bileşimi su, tampon çözeltileri ve organik çözücüler (örneğin metanol veya asetonitril) içerecek şekilde hazırlanır. pH değeri, özellikle iyonik bileşiklerin ayırımında kritik rol oynar ve uygun tampon sistemleriyle kontrol altına alınmalıdır.

Dedektör seçimi de yöntemin hassasiyetini doğrudan etkiler. UV dedektörler, UV absorpsiyon özelliği gösteren bileşikler için yaygın olarak kullanılır. Uygun dalga boyu, hedef bileşiğin maksimum absorpsiyon gösterdiği noktalara göre belirlenmelidir.

İlk yöntem denemelerinde, kromatografik ayırımın başarısı pik şekli, alıkonma süresi ve ayırıcılık gibi kriterler doğrultusunda değerlendirilir. Parametrelerde gerekli ayarlamalar yapılarak yöntem optimize edilir. Optimizasyon süreci sırasında akış hızı,

hareketli faz bileşimi, kolon ve sıcaklığı gibi değişkenler adım adım düzenlenir. Bu aşamada deneysel yaklaşım, gerektiğinde istatistiksel optimizasyon teknikleri (örneğin faktöriyel tasarımlar veya yanıt yüzey metodolojisi) ile desteklenebilir.

Bu genel çerçevedeki sistematik denemeler ile analitik yöntemin doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve seçiciliği sağlanmaya çalışılır.

### **2.7.1. Deneme Yanılma Yöntemiyle Geliştirilme Çalışmaları**

Analitik bir HPLC yönteminin geliştirilmesi ve optimizasyonu, genellikle çeşitli kromatografik parametrelerin sistematik olarak ayarlanmasını gerektirir. Klasik yaklaşımlardan biri olan deneme-yanılma yöntemi, bu parametrelerin teker teker değiştirilerek istenen performans kriterleri sağlanana kadar adım adım optimize edilmesi esasına dayanır. Bu tek değişkenli optimizasyon yaklaşımında, örneğin öncelikle uygun kolon tipi ve boyutu seçilir, ardından hareketli faz bileşimi ve oranları, pH, akış hızı, sıcaklık gibi faktörler birer birer değiştirilerek ayırım üzerinde etkileri gözlemlenir. Her denemede, elde edilen kromatogram incelenerek piklerin alıkonma zamanları, ayırıcılıkları ve şekilleri (asimetri, kuyruklanma faktörü vb.) gibi performans göstergeleri değerlendirilir. İzlenen safsızlıkların ana pikten ayrılma durumu veya kritik iki bileşiğin birbirinden yeterli uzaklıkta elüe olması gibi kriterler sağlanmadığında, bir sonraki denemede ilgili parametrede yeni bir değişiklik yapılır. Bu süreç, optimize edilmiş bir yöntem elde edilene dek devam eder ve analizcinin deneyimi ile literatürdeki bilgiler doğrultusunda yönlendirilir.

Analitik yöntem geliştirme sürecinde, kolon seçimi ve hareketli faz koşulları, ayırım gücünü doğrudan etkileyen kritik parametreler arasında yer almaktadır. İlk aşamada, farklı kolonların performansı değerlendirilerek en uygun ayırım koşullarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Safsızlıkların tam ayırımını sağlayabilmek için kolon boyu ve sabit faz özellikleri, analiz edilen bileşiklerin fizikokimyasal yapısı dikkate alınarak optimize edilir.

Benzer şekilde, hareketli fazın pH değeri, yöntem geliştirme sürecinde önemli değişkenlerden biri olarak ele alınmaktadır. Bileşiğin iyonlaşma davranışını etkileyen bu parametre, en uygun ayırım koşullarının sağlanabilmesi için sistematik olarak değerlendirilir. Bu süreçte, farklı tampon sistemleri denenerek optimum pH aralığı

belirlenir ve bileşiklerin ayrılmasını iyileştiren koşullar tercih edilir. Yapılan testler, belirli kritik bileşiklerin ayrımı açısından yöntem performansının nasıl optimize edilebileceğini göstererek, analitik doğruluğun artırılmasına katkı sağlamaktadır.

Elde edilen veriler sayesinde, hareketli faz pH'sının belirli bileşiklerin ayırımında kritik bir rol oynadığını görülür, yöntemin hassasiyetini artırmak amacıyla gradient elüsyon ve pH optimizasyonu uygulanabilir. Bu süreçte, farklı pH seviyelerinin bileşikler üzerindeki etkisi değerlendirilerek, en uygun ayırım koşulları belirlenebilir.

Ayrıca, dedektör dalga boyu optimizasyonu da yöntem geliştirme sürecinin önemli bir aşaması olarak ele alınmaktadır. Analiz edilen bileşiklerin spektral özellikleri dikkate alındığında, sinyal şiddeti açısından en uygun ölçüm dalga boyu belirlenebilir. Spektrum analizleri sonucunda hem hassasiyeti artıran hem de ölçüm doğruluğunu koruyan ortak bir dalga boyunda ölçüm yapmanın en iyi sonucu verebileceği görülmektedir. Bu yaklaşımlar, yöntemin genel performansını iyileştirmeye yardımcı olurken, analitik doğruluk ve tekrarlanabilirliğin artırılmasına da katkı sağlayabilir.

Bu şekilde her bir parametre tek tek ele alınarak metodun performansına etkisi anlaşılmış ve kademeli iyileştirmelerle optimum koşullar saptanmıştır. Deneme-yenilme yöntemi ile yöntem geliştirme, pratikte yaygın olarak kullanılsa da bazı sınırlamalar içerebilir. Özellikle, birden fazla parametrenin birbirleriyle etkileşim halinde olduğu durumlarda, her bir parametreyi bağımsız olarak optimize etmek, sistemin genel davranışını tam anlamıyla yansıtmayabilir. Parametreler arasındaki olası kombinasyonlar göz ardı edildiğinde, optimum koşulların belirlenmesi güçleşebilir ve metodun performansı beklenen seviyeye ulaşamayabilir. Bu nedenle, sistematik yaklaşımlar ve deney tasarımı teknikleri, daha kapsamlı ve verimli bir optimizasyon süreci sağlamak için tercih edilebilir.

Hareketli fazdaki organik çözücü oranı ile pH değeri arasındaki etkileşim, her bir parametre ayrı ayrı incelendiğinde gözden kaçabilir, ancak birlikte optimize edildiğinde ayırım kalitesinde belirgin bir iyileşme sağlanabilir. Bu durum, deneme-yenilme yönteminin bazı sınırlamalarını ortaya koyarak, süreçte karşılaşılan zorlukları vurgular. Parametrelerin bağımsız olarak değerlendirilmesi, sistemde mevcut olan

etkileşimlerin tam anlamıyla anlaşılmasını engelleyebilir ve optimum ayırım koşullarına ulaşmak için daha fazla deneme yapılmasını gerektirebilir.

Bu nedenle, deneme-yanılma yaklaşımı genellikle daha fazla zaman gerektiren ve çok sayıda deney yapmayı zorunlu kılan bir süreç olarak öne çıkar. Nitekim, bu tez çalışması kapsamındaki yayında da (162) karglumik asit safsızlıklarını ayırmaya yönelik geliştirdikleri yöntemde de başlangıçta klasik optimizasyon yöntemi kullanılmış, ancak kritik pikler arasındaki ayırımın istenen düzeye ulaşmasının zaman aldığı ifade edilmiştir. Bu gibi durumlarda, sistematik deney tasarımı yaklaşımlarının kullanımı, optimizasyon sürecini daha verimli hale getirebilir ve hedeflenen analiz koşullarına daha hızlı ulaşılmasını sağlayabilir.

Bu araştırmacılar, yapılan ön denemeler sonucunda analitik performansı doğrudan etkileyen kritik metod parametrelerini belirleyerek, daha sistematik bir optimizasyon sürecinin gerekliliğine dikkat çekmektedir. Özellikle, iki kritik safsızlık arasındaki ayırıcılık, son pikin alınma süresi ve ana bileşiğin kuyruklanma faktörü gibi parametreler, yöntemin doğruluk, hassasiyet ve tekrarlanabilirliğini sağlamak açısından belirleyici unsurlar olarak öne çıkmaktadır. Bu tür değişkenlerin geleneksel deneme-yanılma yöntemiyle optimize edilmesi, süreçte zaman kaybına ve gereksiz tekrar deneylerine neden olabileceğinden, daha sistematik ve istatistiksel optimizasyon yaklaşımlarının kullanımı önemli hale gelmektedir.

Literatürde de belirtildiği gibi, Design of Experiments (DoE) gibi istatistiksel deney tasarımı yaklaşımları, geleneksel deneme-yanılma yöntemine kıyasla hem zaman hem de maliyet açısından önemli avantajlar sunabilir. Bu yöntemler, birden fazla parametrenin eş zamanlı olarak optimize edilmesine olanak tanırken, değişkenler arasındaki etkileşimleri de detaylı bir şekilde analiz etmeye yardımcı olabilir. Böylece, analitik yöntemin genel performansı artırılabilir ve optimizasyon süreci daha verimli ve sistematik bir hale getirilebilir.

Güncel ICH Q14 kılavuzu, analitik yöntem geliştirmede bilimsel risk değerlendirmesine dayalı ve tasarıma odaklı metodolojilerin benimsenmesini önermektedir. Bu kapsamda, analitik “Quality by Design” (QbD) prensipleri, yöntemlerin sistematik bir şekilde geliştirilmesine ve kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır. Son yıllarda, Plackett–Burman ve Box–Behnken gibi deney

tasarımlarının uygulanması, kromatografik yöntemlerin etkin bir şekilde optimize edilmesine ve sağlamlıklarının değerlendirilmesine yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar, analitik süreçlerde değişkenliğin azaltılmasını ve yöntem güvenilirliğinin artırılmasını sağlarken, aynı zamanda analitik validasyon sürecini de daha sistematik hale getirmektedir.

Bu tür yaklaşımlar, yöntem performansını etkileyen birden fazla değişkenin eşzamanlı olarak değerlendirilmesine ve en uygun çalışma koşullarının belirlenmesine olanak tanır. Ancak, deneme-yanılma yöntemi, özellikle laboratuvar imkanlarının kısıtlı olduğu durumlarda veya optimize edilecek parametrelerin sınırlı olduğu analizlerde hala geçerliliğini koruyan bir yaklaşımdır.

Önemli olan, hangi optimizasyon yöntemi kullanılırsa kullanılsın, analitik metodun güvenilir, tekrarlanabilir ve hedeflenen analize uygun olacak şekilde optimize edilmesidir. Bu tez kapsamında, başlangıç aşamasında deneme-yanılma yaklaşımıyla temel kromatografik koşullar belirlenmiş, daha sonra kademeli iyileştirmelerle metodun performansı artırılmıştır. Nihai yöntemde, kolon, hareketli faz ve dedeksiyon koşulları optimize edilerek, karglumik asit ve safsızlıklarının başarılı bir şekilde ayrımı sağlanmıştır.

Sonuç olarak, optimize edilen metodun sağlam (robust) bir karakter sergilediği ve küçük değişimlere karşı tutarlı sonuçlar verdiği teyit edilmiştir. Bu sayede, literatürle uyumlu, kalite kontrol analizlerinde güvenle uygulanabilecek ve karglumik asidin hassas değerlendirilmesine olanak tanıyan bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

### **2.7.2. Deneysel Tasarımın Temelleri ve Yöntem Geliştirme**

Deneysel tasarım, analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve optimize edilmesi sürecinde bilimsel bir çerçeve sunar. Bu çerçeve, yöntem performansını etkileyen parametrelerin sistematik bir şekilde incelenmesine olanak tanır. Temel olarak, deneysel tasarım, faktörler ve yanıt değişkenleri arasındaki ilişkileri anlamayı ve bu ilişkileri matematiksel modellerle temsil etmeyi hedefler. Farmasötik analizlerde, deneysel tasarım süreçlerinin yapılandırılması genellikle yöntem doğruluğu, kesinlik ve sağlamlık gibi parametrelerin optimize edilmesiyle başlar (270,271).

Deney tasarımının temelleri, geleneksel “tek değişkeni değiştirme” yaklaşımına kıyasla, birden fazla faktörün eşzamanlı olarak değerlendirilmesini mümkün kılar. Bu yaklaşım, özellikle faktörler arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasında kritik rol oynar. Örneğin, HPLC yöntemlerinde kolon sıcaklığı ve pH düzeyleri gibi parametreler tek başına önemli olabilirken, bu iki faktörün birlikte nasıl bir etki yarattığını anlamak, yöntemin genel performansını artırmak için gereklidir. Deney tasarımı, bu tür kompleks etkileşimleri anlamak ve kontrol etmek için etkili bir araçtır (272,273).

Deney tasarımı, çeşitli matematiksel ve istatistiksel modeller üzerine kuruludur. Faktöriyel tasarımlar, Plackett-Burman gibi tarama yöntemleri ve yanıt yüzey metodolojisi (RSM) gibi optimizasyon araçları bu modellerin temelini oluşturur. Deney tasarımının uygulanması sırasında, model doğruluğu ve güvenilirliği, regresyon analizi ve ANOVA gibi istatistiksel yöntemlerle doğrulanır. Böylece, deney tasarımı yalnızca parametrelerin etkilerini değerlendirmekle kalmaz, aynı zamanda bu etkilerin analitik yöntem üzerindeki sonuçlarını öngörmeyi sağlar.

Deney tasarımının temelleri, analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve optimizasyonunda sistematik bir yaklaşım sunar. Bu süreç, analitik doğruluğu artırır, gereksiz denemeleri ortadan kaldırır ve bilimsel verimliliği destekler. Deney tasarımı, farmasötik analizlerde özellikle zaman ve maliyet etkinliği sağlama konusunda vazgeçilmez bir yöntemdir (274–276).

### ***Plackett-Burman Tasarımı Geliştirilmesi***

Plackett-Burman tasarımı, deneysel çalışmalarda çok sayıda faktör arasından en önemli olanları belirlemek için kullanılan etkili bir tarama yöntemidir. Bu tasarım, özellikle farmasötik analizlerde yöntem geliştirme süreçlerinde kritik öneme sahiptir. Analitik yöntemlerinin geliştirilmesinde, bu tasarım faktörlerin önceliklendirilmesi ve daha karmaşık tasarımlara geçiş için temel bilgiler elde edilmesi açısından önemli bir adım oluşturur. Plackett-Burman tasarımı, düşük sayıda deney ile birçok faktörü inceleme fırsatı sunduğu için özellikle başlangıç aşamalarında tercih edilir.(277,278)

Bu tasarımın temel prensibi, her bir faktörün etkisini pozitif ve negatif düzeylerde karşılaştırarak belirlemektir. Deney sayısı, test edilecek faktör sayısından iki fazla olan bir şekilde tasarlanır (örneğin, 8 faktör için 10 deney). Plackett-Burman

tasarımı, faktörler arasındaki ana etkilerin hızlı bir şekilde anlaşılmasını sağlarken, faktörler arasındaki etkileşimleri incelemek için yeterli bilgi sağlamaz. Bu nedenle, tarama aşamasından sonra daha kapsamlı analizler için yanıt yüzey metodolojisi gibi optimizasyon teknikleri uygulanır (279,280).

Farmasötik analizlerde Plackett-Burman tasarımı, hareketli fazın bileşimi, pH, akış hızı, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu gibi birçok parametrenin yöntem performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılmıştır. Özellikle HPLC ve UHPLC yöntemlerinde, bu tasarım kritik parametrelerin belirlenmesinde hızlı ve etkili bir çözüm sunmuştur. Analizlerde, validasyon aşamasında kullanılan bu tasarım, gereksiz parametrelerin elimine edilmesini sağlar ve optimizasyon çalışmalarına temel oluşturur (281,282).

Bu çalışmada Plackett-Burman tasarımı, Minitab 19 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Minitab, istatistiksel analizler ve deney tasarımı için yaygın olarak kullanılan güçlü bir yazılımdır. Yazılım, kullanıcı dostu arayüzü sayesinde tasarımın oluşturulması, verilerin analizi ve sonuçların yorumlanması süreçlerini büyük ölçüde kolaylaştırır. Minitab'ın deney tasarımı modülü, Plackett-Burman gibi çok faktörlü tasarımları otomatik olarak oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Kullanıcı, incelemek istediği faktör sayısını ve her faktör için pozitif-negatif düzeyleri belirterek deney matrisini kolaylıkla oluşturabilir. Ayrıca, yazılım çıktıları sayesinde her bir faktörün ana etkisi ve istatistiksel anlamlılığı grafiksel ve tablo formatında analiz edilebilir (283–285).

Minitab yazılımının en önemli avantajlarından biri, deney tasarımı sonuçlarının hızlı ve görsel olarak yorumlanabilir bir şekilde sunulmasıdır. Örneğin, faktörlerin etkilerini karşılaştırmak için kullanılan Pareto diyagramları ve ana etki grafiklerini otomatik olarak oluşturur. Bu grafikler, hangi faktörlerin kritik olduğunu kolayca belirlemeye yardımcı olur. Ayrıca, Minitab'ın istatistiksel analiz araçları, her faktörün etkisinin güvenilirlik seviyesini ve hata kaynaklarını detaylı bir şekilde ortaya koyar. Bu, deney tasarımının doğruluğunu ve güvenilirliğini artırır (286).

Plackett-Burman tasarımının Minitab ile uygulanması, HPLC yöntemlerinde faktörlerin optimize edilmesine yönelik önemli bulgular sağlar. Örneğin, HPLC analizinde, kolon sıcaklığı ve pH gibi bazı parametrelerin analiz performansı üzerinde

önemli etkileri olacağı kabul edilir. Bu parametreler, Plackett-Burman tasarımı sayesinde önceliklendirildikten sonra optimizasyon aşamasında daha ayrıntılı bir şekilde ele alınabilir. Bununla birlikte, deney tasarımında önemli olmayan faktörlerin elenmesi, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlamıştır (287).

Plackett-Burman tasarımı, farmasötik analizlerde özellikle tarama aşamasında kullanılan etkili bir araç olmasına rağmen, sınırlamaları da dikkate alınmalıdır. Bu tasarım, yalnızca ana etkileri inceler ve faktörler arasındaki etkileşimlere dair bilgi sağlamaz. Bu nedenle, kritik faktörler belirlendikten sonra yanıt yüzey metodolojisi gibi daha karmaşık tasarımlar uygulanarak optimizasyon yapılmalıdır (288).

Sonuç olarak, Plackett-Burman tasarımı, çok sayıda parametrenin hızlı bir şekilde incelenmesi ve kritik olanların belirlenmesi açısından farmasötik yöntem geliştirme süreçlerinde önemli bir yer tutmaktadır. Minitab yazılımı ile birleştirildiğinde, bu tasarım hem kullanıcı dostu bir deney planlama süreci sunmakta hem de güvenilir analiz sonuçları elde edilmesine olanak tanımaktadır. Plackett-Burman tasarımı, optimize edilmesi gereken parametreleri hızlı bir şekilde belirleyerek, daha sonraki aşamalarda detaylı optimizasyon çalışmalarına zemin hazırlamaktadır (289,290).

### ***Box-Behnken Tasarımı Geliştirilmesi***

Box-Behnken tasarımı, yanıt yüzey metodolojisi kapsamında kullanılan ve çok faktörlü optimizasyon çalışmalarında etkili sonuçlar sağlayan bir deney tasarımı yöntemidir. Bu tasarım, özellikle farmasötik analizlerde, parametrelerin doğrusal olmayan etkilerinin ve faktörler arası etkileşimlerin incelenmesinde önemli bir rol oynar. Safsızlıkların analitik yöntemlerinin geliştirilmesinde Box-Behnken tasarımı, metodun hassasiyetini ve doğruluğunu artırmak için kullanılmıştır. Karglumik asit ve bozunma ürünlerinin analizi, bu tasarımın sağladığı avantajlarla optimize edilerek, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir (291).

Box-Behnken tasarımı, üç seviyeli (düşük, orta, yüksek) faktörlerle çalışır ve her faktörün diğer faktörlerle olan etkileşimini incelemek için deneylerin stratejik bir şekilde planlanmasını sağlar. Bu tasarımda, deney noktaları, faktör düzeylerinin köşe noktalarından ziyade, faktör düzeylerinin ortalarında ve eksenel pozisyonlarda yerleştirilir. Bu, deney sayısını azaltırken, yanıt yüzeyinin daha hassas bir şekilde

modellenmesine olanak tanır. Ayrıca, Box-Behnken tasarımı simetrik bir yapıya sahip olduğu için istatistiksel analizlerde daha yüksek güvenilirlik sağlar (292).

Analitik yöntemlerin geliştirilmesinde, deney tasarımı yaklaşımı, bileşiklerin ayrılma verimliliğini artırmak ve analiz yönteminin performansını optimize etmek için önemli bir araçtır. Bu süreçte, kolon sıcaklığı, hareketli fazın pH değeri ve akış hızı gibi kritik parametreler, yöntemin hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini artıracak şekilde değerlendirilir. Farklı değişkenlerin analitik performansa etkisini anlamak için sistematik bir yaklaşım benimsenerek, yöntem doğruluğu, kesinliği ve bileşiklerin ayrılabilirliği detaylı bir şekilde incelenir. Özellikle düşük seviyelerde bulunan bileşiklerin güvenilir bir şekilde tespit edilmesi, analitik yöntemin hassasiyetinin yüksek olması gerektiğini gösterir. Bu nedenle, deney tasarımı kullanılarak optimizasyon sağlanması, analiz sürecinin daha verimli hale getirilmesine ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine katkıda bulunur.

Analitik yöntem geliştirme sürecinde, deney tasarımı yaklaşımı, farklı parametrelerin yöntemin performansına etkisini sistematik bir şekilde incelemek için kullanılmaktadır. Bu süreçte, belirlenen kritik değişkenlerin uygun şekilde optimize edilmesi için istatistiksel analizler ve veri görselleştirme teknikleri uygulanmaktadır. Çalışmada, deneysel matris oluşturularak farklı değişken seviyeleri belirlenmiş ve bu parametreler arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler, grafiksel ve istatistiksel yöntemlerle yorumlanarak, yöntemin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırmaya yönelik iyileştirmeler yapılmıştır. Kritik faktörlerin belirlenmesi ve optimizasyon süreci, deney tasarımı ve veri analizi araçları ile desteklenerek yöntemin güvenilirliğinin artırılmasına katkı sağlamıştır (293).

Deney tasarımı yaklaşımları, analitik yöntemlerin sağlamlığını ve güvenilirliğini değerlendirmek için önemli bir araçtır. Analiz sırasında çevresel ve sistemsel değişkenlerin yöntemin performansına etkisi, sistematik bir şekilde incelenerek değerlendirilir. Küçük ölçekli değişikliklerin sonuçlar üzerindeki etkisini anlamak, yöntemin farklı koşullar altında da tutarlı ve güvenilir sonuçlar vermesini sağlamak açısından kritiktir. Bu kapsamda, belirlenen kritik parametrelerdeki değişimlerin analitik performansa etkisi detaylı olarak incelenmiş ve yöntemin farklı koşullara karşı dayanıklılığı ortaya konmuştur. Bu tür yaklaşımlar, yöntemin geniş

uygulama alanlarında güvenilirliğini artırmak ve analiz süreçlerini daha kontrollü hale getirmek için önemli bir rol oynamaktadır (294).

Box-Behnken tasarımı, hem doğrusal hem de doğrusal olmayan etkilerin analiz edilmesine olanak tanır. Bu, safsızlık yöntem geliştirme çalışmalarında yalnızca bireysel faktörlerin etkilerini değil, aynı zamanda faktörler arası etkileşimlerin de optimize edilmesini sağlamıştır. Örneğin, analizde kullanılan çözücü bileşimi ve ortam pH'sı gibi parametrelerin birlikte değerlendirilmesi, bileşiklerin ayrılma özellikleri üzerinde belirleyici bir rol oynayabilir. Bu tür karşılaştırmalı analizler, yöntemin farklı koşullarda nasıl davrandığını anlamak ve optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından önemlidir. Ayrıca, deney tasarımı ile elde edilen model, yalnızca mevcut analiz yönteminin verimliliğini artırmakla kalmayıp, gelecekte benzer çalışmalar için yol gösterici bir çerçeve oluşturabilir. Bu sayede, yöntemin farklı uygulamalara uyarlanabilirliği artırılır ve daha geniş kullanım alanları için güvenilir bir referans sağlanır (295).

Box-Behnken tasarımı, farmasötik analizlerde özellikle safsızlıkların metodolojik değerlendirmesi için güçlü bir araçtır. Bu tasarım, deneysel parametrelerin hassas bir şekilde optimize edilmesini sağlar ve faktörler arası karmaşık etkileşimleri anlamaya yardımcı olur. Analitik yöntem geliştirme süreçlerinde deney tasarımı yaklaşımları, güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlayarak sürecin verimliliğini artırmada önemli bir rol oynar. Bu tür tasarımlar, analitik koşulların sistematik bir şekilde değerlendirilmesine ve optimize edilmesine yardımcı olur. Aynı zamanda, deney planlama ve veri analizi süreçlerini kolaylaştırarak yöntemin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırır. Farmasötik kalite kontrol süreçlerinde bu yaklaşımlar, analitik yöntemlerin sürekli iyileştirilmesine katkıda bulunarak daha güvenilir ve sürdürülebilir analiz prosedürlerinin oluşturulmasına olanak tanımaktadır (296,297).

### ***Deney Tasarımı ve Yanıt Analizi***

Deney tasarımı, yalnızca parametrelerin seçimi ve deneylerin yürütülmesi ile sınırlı değildir. Deneylerden elde edilen verilerin doğru bir şekilde analiz edilmesi ve bu verilerin anlamlı sonuçlara dönüştürülmesi, sürecin en önemli aşamalarından biridir. Yanıt analizi, faktörler ve yanıt değişkenleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi ve matematiksel modellerle ifade edilmesi sürecini kapsar. Bu aşama, analitik

yöntemlerin performansını iyileştirmek ve optimize etmek için kritik bir rol oynar (298).

Yanıt analizi sürecinde, değişkenlerin bireysel etkileri ve olası karşılıklı etkileşimleri detaylı bir şekilde değerlendirilir. Örneğin, bir analitik yöntemde sıcaklık, akış hızı veya çözücü bileşimi gibi faktörlerin, ölçüm sonuçları üzerindeki etkileri sistematik olarak incelenir. Bu tür analizler, farklı değişkenler arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına ve analiz sonuçları üzerindeki etkilerinin tahmin edilmesine olanak tanır. Ayrıca, yanıt analizi süreci, deney tasarımı ile elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek ve yöntemin güvenilirliğini artırmak için kritik bir aşama olarak görülmektedir (299).

İstatistiksel araçlar, yanıt analizi sürecinde kritik bir rol oynar. ANOVA, Pareto diyagramları ve yanıt yüzey grafikleri gibi araçlar, faktörlerin önem derecesini ve bunların yanıt üzerindeki etkilerini belirlemede kullanılır. Bu araçlar, analitik yöntemlerin optimizasyonunda hangi faktörlerin kritik olduğunu anlamayı ve gereksiz parametreleri eleme kararlarını destekler. Ayrıca, regresyon analizi ile oluşturulan matematiksel modeller, deney tasarımının tahmin edici gücünü artırır ve modelin doğruluğunu test eder (300).

Deney tasarımı ve yanıt analizi, farmasötik analizlerde analitik yöntemlerin geliştirilmesinde ayrılmaz bir süreçtir. Yanıt analizi, deneylerden elde edilen verilerin anlamlandırılmasını sağlar ve bu verilerin yöntem geliştirme sürecine entegrasyonunu kolaylaştırır. Bu süreç, özellikle karglumik asit gibi kompleks bileşiklerin analitik yöntemlerinin optimize edilmesinde kritik bir rol oynamıştır (301).

### ***Deney Tasarımı Sonuçlarının Uygulanması***

Deney tasarımı sonuçlarının uygulanması, optimize edilen koşulların gerçek analizlerde kullanılabilirliğinin test edilmesi sürecini kapsar. Bu aşama, deney tasarımıyla elde edilen teorik bulguların analitik yöntemlere entegrasyonunu ve bu yöntemlerin pratikteki performansını değerlendirir. Özellikle farmasötik analizlerde, deney tasarımı sonuçlarının uygulanması, metodun güvenilirliğini artırmak ve analitik doğruluğu sağlamak için kritik bir adımdır (302).

Deney tasarımı sonuçlarının uygulanması sırasında, belirlenen optimum koşulların gerçek analizlerdeki performansı test edilir. Örneğin, HPLC analizinde kolon sıcaklığı, hareketli fazın pH değeri ve akış hızı gibi parametrelerin etkisi gerçek örnekler üzerinde değerlendirilir. Bu testler, deney tasarımı sırasında elde edilen modelin doğruluğunu ve tahmin edilebilirliğini doğrulamak için kullanılır. Ayrıca, deney tasarımı sonuçlarının farklı laboratuvar koşullarında uygulanabilirliği de bu süreçte test edilir (303).

Pratik uygulama aşamasında, deney tasarımı ile elde edilen sonuçların sağlamlığı ve tekrarlanabilirliği değerlendirilir. Küçük değişikliklerin analiz sonuçları üzerindeki etkileri incelenerek, yöntemin farklı koşullar altında da tutarlı performans gösterip göstermediği belirlenir. Örneğin, analiz sırasında çevresel veya operasyonel faktörlerdeki küçük değişikliklerin sistem üzerindeki etkileri test edilerek, yöntemin dayanıklılığı gözlemlenir. Bu tür değerlendirmeler, analitik yöntemlerin güvenilirliğini artırır ve validasyon sürecine sağlam bir temel oluşturur (304).

Deney tasarımı sonuçlarının uygulanması sürecinde, Minitab gibi yazılımlar kritik bir rol oynar. Bu yazılımlar, deney tasarımıyla elde edilen tahminlerin ve gerçek analiz sonuçlarının karşılaştırılmasını kolaylaştırır. Ayrıca, Pareto diyagramları ve yanıt yüzey grafikleri gibi görselleştirme araçları, sonuçların görsel olarak anlaşılmasını sağlar. Bu araçlar, herhangi bir sapmayı veya model uyumsuzluğunu tespit etmek için etkili bir şekilde kullanılır (305).

Deney tasarımı sonuçlarının uygulanması, analitik yöntemlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu artıran bir süreçtir. Bu aşama, deney tasarımının teorik bulgularını pratik analizlere entegre eder ve farmasötik analizlerde yöntem performansını optimize eder. Karglumik asit ve bozunma ürünleri analizlerinde, bu süreç, analizlerin tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu sağlamak için kritik bir rol oynamıştır.

### **2.7.3. Validasyon Parametreleri ve Gereklilikleri**

#### **Seçicilik**

Seçicilik, analitik yöntemlerin, bir bileşiği matris içindeki diğer bileşenlerden ayırt edebilme yeteneğini ifade eder. Bu test sırasında, ana bileşik ile bozunma

ürünleri, safsızlıklar veya yardımcı maddeler (plasebo), çözücü, hareketli faz arasında herhangi bir girişim olup olmadığı incelenir (306,307).

Bir yöntem seçici olarak kabul edilir, eğer:

- Pik saflık indeksi > %99 bulunması hedeflenir
- Ayırıcılık (Rs): Yakın elüsyona uğrayan iki pik için  $R_s \geq 1,5$  olması beklenir.
- Boş Matris ve Plasebo Testleri: Yardımcı maddeler içeren çözeltiler analize dahil edilir; hedef analit retansiyon süresinde başka pik olmamalıdır.
- İmpürite Eklenmiş Çözelti Denemeleri: Ana bileşiğe, potansiyel bozunma ürünleri veya safsızlıklar eklenir. Her bileşik ayrı pik olarak gözlenmeli ve  $R_s > 1,5$  olmalıdır.
- Stres Bozunma Çalışmaları: Işık, ısı, asit/baz gibi koşullarda bozundurulmuş örnek analiz edilir. Ana bileşik piki, bozunma ürünlerinden ayrılabilir (Rs  $\geq 1,5$ )

### **Sistem Uygunluk**

Sistem uygunluğu testleri, analitik yöntemin tutarlılığı ve güvenilirliğini doğrulamak için gerçekleştirilir. Bu testler, yöntemin kullanım öncesinde belirtilen kriterlere uygun çalıştığını doğrular (308,309).

### **Parametreler:**

- Teorik Tabaka Sayısı: Kolon verimliliğinin bir göstergesidir ve yeterince yüksek olmalıdır (örneğin, >2000).
- Kapasite Faktörü: Analitin sabit fazda ne kadar tutulduğunu gösterir.  $k' > 2$  olması tercih edilir; çok düşük  $k'$  değerleri analitin sabit fazla etkileşmeden çıktığını gösterir.
- Alıkonma Süresi: Bileşiklerin tutarlı bir şekilde aynı zamanda çıkması sağlanmalıdır (n=6, BSS < %1).
- Standart çözeltinin ardışık altı enjeksiyonu için tekrarlanabilir sonuç elde edilmelidir (n=6, BSS < %0.85).

- **Pik Simetrisi:** Pikler simetrik olmalı ve asimetri faktörü genellikle 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- **Pik Kuyruklanma Faktörü (T):** Pik şeklinin simetrisini gösterir. Kabul edilebilir sınır genellikle  $T \leq 2$  şeklindedir. Aşırı kuyruklanma nicel hatalara neden olabilir.

#### **Uygulama:**

Her analiz serisinden önce sistem uygunluğu kriterleri test edilir ve sonuçlar kontrol edilir. Kriterlere uymayan sistem, analiz öncesi sorun giderilerek tekrar hazırlanmalıdır.

#### **Doğrusallık ve Aralık**

Doğrusallık, analitik yöntemin belirli bir derişim aralığında doğrusal yanıt verebilme yeteneğini ifade eder. Yöntemin aralığı, düşük (QL) ve yüksek derişim seviyeleri arasında kalan analitik bölgeleri kapsar (310,311).

#### **Prosedür:**

- Farklı derişim seviyelerinde (genellikle 5-7 farklı derişimde) standart çözeltiler hazırlanır.
- Pik alanları ve derişimler arasında bir doğrusal ilişki olup olmadığı incelenir.
- Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) genellikle  $\geq 0,999$  olmalıdır.

Kalibrasyon eğrisi, doğru bir şekilde oluşturulmuşsa, yöntemin doğrusal bir aralıkta çalıştığını gösterir. Bu, analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu güçlendirir.

#### **Kesinlik ve Doğruluk**

Kesinlik, analitik yöntemin, tekrar edilen ölçümlerde tutarlı sonuçlar verebilme yeteneğidir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik testleriyle değerlendirilir. Kesinlik ve ara kesinlik için altı tekrarlı olarak numune analizi yapılır.

#### **Test Türleri:**

- **Gün İçi Kesinlik:** Aynı gün içinde yapılan çoklu analizlerde varyasyonun ölçülmesi.

- **Günler Arası Kesinlik:** Farklı günlerde yapılan analizlerde sonuçların değişkenliği.

Sonuçlar:

BSS %2'nin altında olmalıdır.

Doğruluk, analitik yöntemin gerçek derişimi ne kadar doğru ölçebildiğini gösterir. Genellikle bilinen miktarların analize eklenmesi ve geri kazanım yüzdelерinin hesaplanmasıyla değerlendirilir.

Test Detayları:

- Bilinen derişimlerdeki analit, numune matrisine eklenir (düşük, orta ve yüksek seviyelerde).
- Her seviyede üç tekrarlı numune hazırlanarak analiz yapılır.
- Geri kazanım yüzdesi hesaplanır:
- Geri Kazanım (Geri Kazanım (%)) = (Tayin Edilen Derişim / Teorik Derişim) × 100
- Doğruluk değerlendirmelerinde, teorik ve ölçülen değerler arasındaki fark ayrıca bağıl hata (%) olarak ifade edilebilir. Bu değer, yöntemin sistematik sapma içerip içermediğini gösterir ve genellikle ±%2 sınırları içinde olmalıdır.
- Ayrıca doğruluk değerlendirmelerinde, teorik ve ölçülen değerler arasındaki fark bağıl hata (%) olarak hesaplanır. Bağıl hata, yöntemin sistematik sapma içerip içermediğini belirlemek için kullanılır ve bu değer ±%2 sınırları içerisinde olması beklenir.

Beklenen Sonuçlar:

Geri kazanım oranı her bir numune için %98-102 arasında bulunmalıdır.(312,313)

### **Sağlamlık**

Sağlamlık, analitik yöntemin, çalışma koşullarında yapılan küçük değişikliklere dayanıklılığını ifade eder.

Test Değişkenleri:

- pH: Hareketli faz pH'ında  $\pm 0,2$  birimlik değişiklikler.
- Sıcaklık: Kolon sıcaklığında  $\pm 5^\circ\text{C}$  değişiklikler.
- Akış Hızı: Akış hızında  $\pm \%10$  değişiklikler.

Sonuçlar:

Bu değişiklikler sonucunda pik alanları, rezolüsyon ve diğer parametrelerdeki değişiklikler kabul edilebilir limitler içinde kalmalıdır (314,315).

### **Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı (LD/QL)**

LD (Saptama Sınırı), bir bileşik sinyalinin algılanabilir en düşük miktarını ifade ederken, QL (Tayin Alt Sınırı), nicel analiz yapılabilir en düşük miktarı temsil eder.

Belirleme Yöntemleri:

- Sinyal/Gürültü Oranı:
  - LD: Sinyal/gürültü oranı  $\geq 3$ .
  - QL: Sinyal/gürültü oranı  $\geq 10$  (316–318).

## **2.8. ICH Q3B ve Q14 Gereksinimleri**

Farmasötik ürünlerin geliştirme ve kalite kontrol süreçlerinde, Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) tarafından belirlenen kılavuzlar, standartlaştırılmış bir çerçeve sunar. ICH Q3B (R2) ve ICH Q14, özellikle bozunma ürünleri analizi ve analitik yöntem geliştirme süreçlerinde kritik öneme sahiptir. Bu kılavuzlar, farmasötik ürünlerin güvenilirliğini, etkinliğini ve kalitesini sağlamak için bilimsel ve risk tabanlı yaklaşımları teşvik eder.

### **ICH Q3B (R2): Bozunma Ürünleri ve Kabul Kriterleri**

ICH Q3B (R2) kılavuzu, bozunma ürünlerinin sınıflandırılması, tanımlanması ve kontrolü için detaylı gereklilikler sunar. Farmasötik ürünlerin stabilite çalışmaları sırasında bozunma ürünlerinin oluşumu dikkatle izlenir ve belirlenen eşik değerlere uygunluğu kontrol edilir.

#### Bozunma Ürünlerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması:

- Tanımlı Bozunma Ürünleri: Yapısı belirlenmiş ve toksikolojik olarak değerlendirilmiş bileşenler.
- Tanımlanmamış Bozunma Ürünleri: Yapısı belirlenememiş ancak miktar açısından raporlanmış bileşenler.

#### Kabul Edilebilir Limitler:

- Klinik olarak test edilen ürünlerde bozunma ürünlerinin eşik değerleri genellikle %0,2 ile %0,5 arasında değişir.
- Bu limitler, toksikolojik değerlendirmelere ve farmakolojik özelliklere göre belirlenir.

#### Analitik Gereksinimler:

- Bozunma ürünlerinin analizi için yöntemler hem özgünlük hem de hassasiyet açısından optimize edilmelidir.
- HPLC ve UHPLC gibi kromatografik teknikler ile kütle spektrometrisi, tanımlama ve miktar tayini için önerilir.

#### **ICH Q14: Analitik Prosedür Geliştirme**

ICH Q14 kılavuzu, analitik yöntemlerin geliştirilmesi, validasyonu ve yaşam döngüsü boyunca kontrol edilmesine yönelik bir yol haritası sunar. Bu kılavuz, özellikle analitik prosedürlerin bilimsel bir temelde geliştirilmesi ve sürekli iyileştirilmesi için kalite risk yönetimini (QRM) teşvik eder.

#### Temel Gereksinimler:

- Bilim ve Risk Temelli Yaklaşım: Analitik yöntem geliştirme süreçlerinde kritik parametrelerin belirlenmesi ve optimize edilmesi gerekir.
- Deney Tasarımı (DoE): Yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ve faktöriyel tasarımlar gibi istatistiksel araçlar kullanılarak, analitik prosedürlerin performansı optimize edilir.

- Yaşam Döngüsü Yönetimi: Analitik yöntemlerin performansı, ürünün yaşam döngüsü boyunca izlenir ve gerekirse yenilenir.

### **Bozunma Ürünleri Analizinde ICH Q3B ve Q14'ün Birlikte Kullanımı**

ICH Q3B ve Q14, bozunma ürünleri analizi için entegre bir yaklaşım sunar. Bu iki kılavuzun bir arada kullanılması, analitik prosedürlerin güvenilirliğini artırır ve ürünün stabilite profili hakkında daha kapsamlı bilgi sağlar.

#### Pratik Uygulama:

- Bozunma Ürünlerinin İzlenmesi: ICH Q3B gerekliliklerine uygun olarak, belirlenen eşik değerlerde bozunma ürünlerinin varlığı düzenli olarak analiz edilir.
- Yöntem Geliştirme: HPLC veya UHPLC gibi kromatografik yöntemler, Q14 çerçevesinde optimize edilir ve sürekli izlenir.
- Risk Yönetimi: Kritik parametreler, deney tasarımı yaklaşımları ile belirlenir ve optimize edilir.

#### ICH Kılavuzlarının Farmasötik Ürünlere Katkıları

- Kabul Edilebilir Güvenlik Seviyeleri: Tüm analizler, klinik güvenlik açısından riskleri minimize edecek şekilde tasarlanır.
- Süreçte Standartlaşma: Kılavuzlar, global uyumlu bir kalite kontrol standardı oluşturur.
- Daha Hızlı ve Güvenilir Geliştirme: Bilimsel ve risk bazlı süreçler, yeni analitik yöntemlerin daha hızlı ve güvenilir şekilde geliştirilmesine olanak tanır.

#### Sonuç

ICH Q3B ve Q14 kılavuzları, farmasötik ürünlerin analitik değerlendirme süreçlerinde bilimsel, güvenilir ve standart bir çerçeve sunar. Bu kılavuzların entegre şekilde kullanılması, bozunma ürünlerinin yönetiminden analitik prosedürlerin geliştirilmesine kadar her aşamada farmasötik ürünlerin kalite güvencesine katkı sağlar (172,241).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Malzemeler

Bu bölümde, gerçekleştirilen analizlerin güvenilirliği, doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla seçilen kimyasal maddeler, reaktifler, standartlar ve referans maddeler ile kullanılan cihaz ve ekipmanlar detaylı şekilde açıklanmıştır. Kullanılan tüm materyaller, yöntem validasyonlarının etkinliğini ve doğruluğunu desteklemek üzere yüksek saflık ve kalite standartlarına uygun olarak seçilmiştir.

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Analizlerin güvenilirliği ve doğruluğu, kullanılan kimyasal maddelerin saflığına ve uygunluğuna doğrudan bağlıdır. Bu nedenle, analizlerde kullanılan kimyasal bileşenler yüksek saflık derecesine sahip ürünlerden seçilmiş ve belirli kriterlere göre kullanılmıştır. Analizlerde asetonitril (HPLC derece, LiChropur, Darmstadt, Almanya), orto-fosforik Asit (%85 saflıkta, LiChropur, Darmstadt, Almanya), potasyum dihidrojen Fosfat (LiChropur, Darmstadt, Almanya) kullanılmış ve ultra saf su saflaştırma sistemi Milli-Q Su, Millipore Milli-Q ile elde edilmiştir. Tüm analizlerde çözeltilerin hazırlanmasında ve hareketli fazın seyreltilmesinde kullanılmıştır. Ek olarak kullanılan kimyasal maddeler aşağıda verilmiştir.

- Sodyum Hidroksit (NaOH): LiChropur, Darmstadt, Almanya
- Metanol (HPLC Dereceli): LiChropur, Darmstadt, Almanya
- Hidroklorik Asit (HCl, %37LiChropur, Darmstadt, Almanya)

Filtrasyon ve Numune Hazırlama İçin Kullanılan Malzemeler:

- PVDF Membran Filtre (0,45 µm, Millex)
- Hidrofobik PTFE Filtre (0,45 µm)

##### 3.1.2. Standartlar ve Referans Maddeler

Kullanılan standart ve referans maddeler analizin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için yüksek saflıkta seçilmiştir:

- Karglumik Asit (N-Karbanil-L-Glutamik asit): Etkin madde olarak %99,6 saflık derecesinde Nuray Chemicals firmasından (Tamilnadu, Hindistan) temin edilmiştir.
- L-Hidantoin-5-propionik Asit (İlgili bileşik A veya HPA): Nuray Chemicals
- Pirokarglumik Asit: Nuray Chemicals'tan sağlanmıştır.
- Piroglutamik Asit: Nuray Chemicals'tan temin edilmiştir.
- Dikarbamoil L-Glutamik Asit: Nuray Chemicals firmasından sağlanmıştır.

Referans maddelerin ve standartların saflık derecelerini, analiz sonuçlarının güvenilirliğini ve yöntem validasyon süreçlerinin doğruluğunu tanımlayan sertifikaları Ekler kısmında sunulmuştur.

### 3.2. Cihaz ve Ekipmanlar

Kullanılan cihaz ve ekipmanların detaylı açıklamaları aşağıda verilmiştir:

#### A. Etkin Madde ve Dissolüsyon Analiz Yöntemi için Kullanılan Cihaz

##### Agilent Infinity II HPLC (1260) Sistemi

- 1260 Quaternary Pump (G7111B) Pompa sistemi,
- 1260 Vial Sampler (G7129A) Otomatik örnekleiyici
- 1260 MCT (G7116B) Kolon sıcaklığı kontrol ünitesi
- 1260 DAD WR (G7115A) Dizi diyot dedektör (DAD)
- Kolon (Waters HSS T3; Xselect Peptide, 100 Å, 250 mm × 4.6 mm, 5.0 µm partikül boyutu)

#### B. Safsızlık Analiz Yöntemi için Kullanılan Cihaz

##### Agilent 1290 Infinity II UHPLC Sistemi:

- 1290 Flexible Pump (G7104A) Pompa sistemi,
- 1290 Multisampler (G7167B) Otomatik örnekleiyici
- 1290 MCT Kolon Fırını (G7116B) Kolon sıcaklığı kontrol ünitesi
- 1290 DAD FS Dedektörü (G7117A Dizi diyot dedektör (DAD)

- Kolon (Waters BEH C18, 150 mm × 2.1 mm, 1.7 µm partikül boyutu)

### C. Ekipmanlar

- Analitik Terazı (Mettler Toledo XPR205)
- pH Metre (Mettler Toledo SevenExcellence S475-K)
- Manyetik Karıştırıcı

### 3.3. Standart, Çözelti ve Numunelerin Hazırlanması

#### 3.3.1. HPLC Miktar Tayini ve Dissolüsyon Analizi için çözelti hazırlanışları

**Standart Çözelti:** 20 mg karglumik asit referans standardı, 50 mL'lik balona alınır.

- pH 6.8 tampon ile çözülüp 50 mL'ye tamamlanır.
- Bu ana stoktan alınan 2.0 mL çözeltinin hacmi 20 mL'ye tamamlanarak 40 µg/mL'lik çalışma çözeltisi elde edilir.

Hazırlanan çözeltinin 5 °C'de en az 60 saat stabil olduğu gözlemlenmiştir.

Dissolüsyon çalışmaları için, USP Tip II aparat kullanılarak pH 1.2, 4.5 ve 6.8 değerlerinde üç farklı tampon ortamı hazırlanmıştır. En yaygın kullanılan pH 6.8 fosfat tamponu, aşağıdaki şekilde hazırlanır:

- 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi: 27.22 g potasyum dihidrojen fosfat, saf suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.
- 0.2 M NaOH çözeltisi: 8.4 g sodyum hidroksit, saf suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.
- pH 6.8 tampon: 250 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi + 112 mL NaOH çözeltisi karıştırılıp 1000 mL'ye tamamlanır.

**Test Çözelti:** Tablet, 750 mL dissolüsyon ortamı içeren behere eklenir. 37 °C sıcaklık ve 100 devir/dk hızda 15 dakika çalıştırılır. Alınan örnekler, pH 6.8 tamponu ile seyreltilerek analiz edilir. Dissolüsyon ortamından 1.5 mL alınır ve 10 mL'ye seyreltilir. 40 µg/mL'lik çalışma çözeltisi elde edilir.

### 3.3.2. Safsızlık Analizi için çözelti hazırlanışları

#### Standart Çözelti:

- 40.0 mg karglumik asit referans standardı, 5.0 mL'lik balona alınır.
- Hareketli faz ile çözülüp 5.0 mL'ye tamamlanır (8000 µg/mL).
- Karıştırma süresi: 30 dakika.
- Stabilite: 48 saat, 5 °C'de saklanmalıdır.

#### Safsızlık Standart Çözeltileri:

- Her bir referans madde (ilgili bileşik A, pirokarglumik asit, piroglutamik asit, dikarbamoil L-glutamik asit) için 1.6 mg alınır.
- 20 mL balona konularak dilüent ile 20.0 mL'ye tamamlanır (80 µg/mL). Safsızlık Limit Konsantrasyonda hazırlanmıştır.
- Karıştırma süresi: 30 dakika.
- Stabilite: 48 sat, 5 °C'de saklanmalıdır

#### Test (Numune) Çözeltisi:

- On tablet tartılır, öğütülür.
- İçinden alınan 100.0 mg toz (40 mg etken madde içerir), 5 mL balona eklenir.
- Hareketli faz ile çözülüp 5.0 mL'ye tamamlanır (8000 µg/mL).
- Karıştırma süresi: 5 dakika.
- Hazırlanan test çözeltisi 5°C'de 48 saat stabildir.

#### Plasebo Toz Karışımı Hazırlanışı:

Etken madde haricinde karglumik asit tablet formülasyonu ile birebir uyumlu bileşenler içermelidir. Bir tablet için sırasıyla silisifiye mikrokristalize selüloz (seyreltici), mannitol (seyreltici), kopovidon K28 (bağlayıcı), krospovidon tip B (dağıtıcı) ve sodyum stearil fumarat (lubrikan) tartılmıştır. Plasebo hazırlanışı için önce silisifiye mikrokristalize selüloz, mannitol, kopovidon ve krospovidon homojen

bir karışım elde edilene kadar karıştırılır, ardından son aşamada sodyum stearil fumarat eklenerek homojenizasyon sağlanır.

**Plasebo Çözeltisi:**

- 60 mg toz plasebo alınır, 5 mL balona eklenir.
- Hareketli faz ile çözülüp 5.0 mL'ye tamamlanır (8000 µg/mL).
- Karıştırma süresi: 5 dakika.

**3.4. HPLC-UHPLC Cihazında Veri Kayıt ve Değerlendirilmesi**

Analitik yöntem geliştirme ve validasyon süreçlerinde HPLC ve UHPLC sistemleri, yüksek hassasiyetli analizlerin gerçekleştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmada, Agilent 1290 Infinity II UHPLC ve Agilent 1260 Infinity II HPLC sistemi kullanılarak, veriler OpenLab yazılımı ile kaydedilmiş ve analiz edilmiştir.

- Veri Toplama Süreci:
  - Numuneler, otomatik enjektör sistemi ile analiz edilerek kromatografik pikler elde edilmiştir.
  - Detektör sinyalleri, HPLC metodu için 205nm ve UHPLC metodu için 214 nm dalga boyunda DAD (Dizi Diyot Dedektör) ile ölçülerek spektral veriler kaydedilmiştir.
  - Piklerin alıkonma süreleri, çözünürlükleri, kuyruklanma faktörleri ve pik alanları sistem yazılımı tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır.
- Veri İşleme ve Değerlendirme:
  - Pik integrasyonu, manuel ve otomatik entegrasyon yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.

**3.5. İstatistiksel Analiz Yöntemleri**

Analitik verilerin güvenilirliği ve yöntemin istatistiksel olarak doğrulanması amacıyla, aşağıdaki analiz yöntemleri uygulanmıştır:

- Doğrusallık ve Regresyon Analizi:
  - Standart eğrinin doğrusal olup olmadığı ANOVA analizi ile test edilmiştir.
- Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik:
  - Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizler için varyans analizi (ANOVA) uygulanmış, limit BSS  $\leq$  %2 olarak belirlenmiştir.
- Sağlıklik Değerlendirmesi:
  - Plackett-Burman Tasarımı ile yöntemin küçük değişikliklere karşı dayanıklılığı test edilmiştir.
  - Değişkenlerin istatistiksel anlamlılığı  $p < 0.05$  olarak belirlenmelidir.
- Pareto Grafiği ve Yanıt Yüzey Analizi:
  - Kritik metodolojik değişkenlerin yöneme etkisi Pareto grafikleri ile görselleştirilmiştir.
  - Yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile optimizasyon yapılmış ve en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

Bu istatistiksel analizler sonucunda, yöntem değişkenlere karşı duyarlı bulunmuş ve validasyon kriterlerini sağladığı gösterilmiştir.

### **3.6. Yöntemler için Analitik Performans Kriterlerinin Değerlendirilmesi**

Analitik yöntemin geliştirilmesi sürecinde Deneme-Yanılma Yöntemi ile aşağıdaki kromatografik parametreler değerlendirilmiştir:

- Hareketli faz bileşimi: Metanol/su ve asetonitril/su karışımları çeşitli oranlarda test edilmiştir. Safsızlık değerlendirilen kısımda organik çözeltili kullanılmaması olarak karar verilmiştir.
- Tampon sistemi: Farklı tampon türleri ve iyonik şiddet aralıkları (5–25 mM) değerlendirilmiş; çalışmalarda 10 mM fosfat tamponu tercih edilmiştir.
- Tampon pH aralığı: pH 2.0–2.4 aralığında test edilmiştir.

- Akış hızı: 0.30–0.40 mL/dk aralığında denenmiştir.
- Kolon sıcaklığı: 20–30 °C aralığında değerlendirme yapılmıştır.

Geliştirilen UHPLC yöntemi, farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir bir analitik araç olarak kullanılabilmesi amacıyla ICH Q2(R2) kılavuzuna uygun şekilde validasyon parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Yöntem optimizasyonu, Box-Behnken Tasarımı (BBD) ve Plackett-Burman Tasarımı (PBD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir; bu süreçte hareketli fazın pH değeri, kolon sıcaklığı ve akış hızı gibi parametreler kritik değişkenler olarak ele alınmıştır. Her bir parametreye ait üç seviyeli tasarım ile yanıt yüzey metodolojisi uygulanmış, çalışmalarda pH 2.0–2.4, sıcaklık 20–30°C ve akış hızı 0.30–0.40 mL/dk aralığında test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum koşullar belirlenmiş ve bu koşullarda yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tanımlanan safsızlıklar:

- İlgili Bileşik A
- Piroglutamik asit
- Pirokarglumik asit
- Dikarbamoil L-glutamik asit

Yöntem, bu safsızlıkları karglumik asitten ve birbirlerinden etkili bir şekilde ayırmaktadır. Bu, yöntemin özgünlüğünü ve ayrımcılığını göstermektedir. Kör çözelti, plasebo, standart ve test çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılmış ve girişim olmadığı doğrulanmalıdır.

Bozunma ürünlerinin belirlenmesine yönelik analitik yöntemler geliştirilirken, ayırım gücü yüksek, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar veren tekniklerin kullanılması gerekmektedir.

Bu süreçte aşağıdaki temel aşamalar dikkate alınmalıdır:

- Dedektör Seçimi: Bozunma ürünlerinin tespit edilebilmesi için uygun dedektörler belirlenir. Görünür ve ultraviyole ışık soğurma özellikleri bulunan bileşikler için uygun spektral aralıklar kullanılır.

- **Stabilite Gösteren Yöntem:** Bozunma ürünlerinin oluşumunu hızlandırmak için stres koşulları (ısı, ışık, oksidasyon ve asit/baz hidrolizi) uygulanmıştır. Bu stres testleri, yöntemlerin stabilite süresi boyunca kullanılabileceğini doğrular.

### 3.7. Analitik Yöntem Validasyonu

HPLC ve UHPLC yönteminin karglumik asit ve safsızlıklarının analizi için ICH Q2(R2) kılavuzlarına uygun olarak doğrulandığını göstermektedir.

#### 3.7.1. Dissolüsyon Metodu Analitik Yöntem Validasyonu

HPLC yöntemi validasyonu, Uluslararası Farmasötik Teknik Gereklilikler için Uyum Konseyi (ICH) Q2(R2) kılavuzları ve Avrupa Farmakopesi (EP) gerekliliklerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğunu, kesinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla çeşitli validasyon parametreleri incelenmiştir.

**Sistem Uygunluk:** Analitik sistemin uygunluğu, altı ardışık enjeksiyonun tekrarlanabilirliği, pik simetrisi ve kolon etkinliği temelinde değerlendirilir.

**Özgünlük:** Analitik yöntemin özgüllüğü, kör çözelti (kör), plasebo ve yardımcı bileşenlerin, karglumik asit ile analitik sinyal açısından herhangi bir girişim oluşturup oluşturmadığının belirlenmesiyle değerlendirilir.

**Doğrusallık ve Aralık:** Analitik yöntemin doğrusal yanıt verdiği derişim aralığını belirlemek amacıyla, çözünme testi sırasında elde edilen örnekler farklı derişim seviyelerinde analiz edilir. Bu kapsamda, en az beş ayrı derişim seviyesi (0.5 µg/mL - 60µg/mL aralığında; %0.1, %1, %10, %50, %100 ve %120) için standart çözeltiler hazırlanarak kromatografik sistemde enjekte edilir. Elde edilen pik alanları ile nominal derişimler arasında kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Doğrusallık değerlendirmesi, en küçük ve en yüksek derişimleri de kapsayacak şekilde seçilen aralıkta yapılır. Kalibrasyon eğrisi doğruluğu ve uygunluğu, regresyon katsayısı ( $R^2$ ) ve kalibrasyon denkleminde göre değerlendirilir. Ayrıca, her bir derişim seviyesi için hesaplanan geri kazanım değerleri ve bağıl standart sapma (%BSS) oranlarıyla yöntemin nicel ölçüm gücü incelenmiştir.

Doğrusallık çalışması ile yöntemin uygun çalışma aralığı belirlenir ve bu aralık içinde yöntemin geçerliliği doğrulanır. Gerekli durumlarda alt ve üst sınır değerleri için saptama sınırı (DL) ve tayin alt sınırı (QL) hesaplamaları da ayrıca yapılabilir.

**Doğruluk ve Kesinlik:** HPLC yöntemi, doğruluk açısından %98–102 geri kazanım aralığında doğrulanmış ve yöntemin kesinliği, %BSS < 2 olacak şekilde belirlenmiştir. Bu sonuçlar, yöntemin tekrarlanabilirliğini ve ölçüm güvenilirliğini desteklemek amacıyla kullanılmıştır.

**Sağlamlık:** Yöntemin değişken test koşulları altında güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla Plackett-Burman deney tasarımı uygulanmıştır. Hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve akış hızında yapılan küçük değişikliklerin analitik performans üzerindeki etkisi incelenmiş ve yöntemin bu değişikliklere karşı dayanıklı (robust) olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular, çözünme yöntemi validasyonunun uluslararası düzenleyici gerekliliklerle uyumlu olduğunu ve farmasötik analizlerde güvenilir bir ölçüm sağladığını ortaya koymaktadır.

### 3.7.2. Bozunma Safsızlıkları Analitik Yöntem Validasyonu

Karglumik asit ve bozunma ürünlerinin analizinde kullanılan UHPLC yönteminin validasyonunu kapsamaktadır. Yöntem, farmasötik kalite kontrolde güvenilirliği sağlamak amacıyla ICH Q2(R2) kılavuzlarına uygun olarak doğrulanmıştır.

**Sistem Uygunluğu:** Altı ardışık enjeksiyonun tekrarlanabilirliği sağlanmalı olup, pik alanları için %BSS  $\leq$  %0.85, kuyruk faktörü 0.8–2, teorik plaka sayısı > 2000 ve safsızlıklar arasında çözünürlük > 2 olarak belirlenmiştir.

**Özgünlük ve Stres Bozunma:** Kör çözelti, plasebo ve numune kromatogramları incelenir, 214 nm'de girişim tespit edilmemelidir. Stres bozunma çalışmaları, yöntemin bozunma ürünlerini ayırma yeteneğini doğrulamalıdır.

**Doğrusallık ve Aralık:** Yöntemin doğrusal çalışma aralığı içinde sinyal şiddeti ile analit derişimi arasında yüksek korelasyon sağlanmalı, regresyon katsayısı ( $R^2 \geq 0.999$ ) olarak bulunmalıdır. 4 – 800  $\mu\text{g/mL}$  aralığında 7 nokta, %0.05, %0.10, %0.50, %1.00, %2.00, %5.00 ve %10.00 olarak, 3 tekrar analiz edilerek alanların ortalaması alınmıştır. Ayrıca karglumik asit için 4 – 9600  $\mu\text{g/mL}$  aralığında doğrusallık çalışılmıştır.

**Saptama ve Tayin Limitleri (DL/QL):** DL, analiz edilen bileşimin sinyal-gürültü oranının ( $S/N \geq 3$ ) olduğu en düşük derişimi ifade ederken, QL,  $S/N \geq 10$  olacak şekilde nicel olarak doğruluk ve kesinlik sağlanan en düşük seviyedir.

**Doğruluk ve Kesinlik:** %98–102 geri kazanım aralığında doğrulanmalıdır, %BSS < 2 olarak belirlenmiştir. Günler arası, cihazlar arası ve kolon değişiklikleri test edilmeli ve tutarlı bir performans sağlanmalıdır. Doğruluk çözeltileri için 4, 8000 ve 9600  $\mu\text{g/mL}$  kullanılmış ve 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Kesinlik analizinde spesifikasyon derişimindeki (8000  $\mu\text{g/mL}$ ) test çözelti farklı günlerde 6'şar kez hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

**Sağlamlık:** Plackett-Burman tasarımı ile dalga boyu, sıcaklık, akış hızı ve pH derişimleri değerlendirilmeli, yöntem safsızlık analizinde istatistiksel olarak sağlam bulunmalıdır.

**Çözelti Kararlılığı:** Test ve standart çözeltilerin kaç gün stabil olduğu validasyon çerçevesinde analiz edilir. Limit derişimlerinde (%0.1, 8  $\mu\text{g/mL}$ ) safsızlık eklenmiş %100 derişimindeki (8000  $\mu\text{g/mL}$ ) test çözeltisi ve standart çözelti (8000  $\mu\text{g/mL}$ ) 48 saat boyunca çeşitli aralıklarda birer kez analiz edilerek sonuçları kaydedilmiştir ve başlangıç koşuluna göre derişimleri %98–102 aralığında olmalıdır.

**Filtre Seçimi:** Farklı şırınga tipi filtreler deneme yapılarak, tutunma olmaması ve optimum kromatogram için test edilmiştir.

### 3.8. Stabilite Çalışmaları

Farmasötik ürünlerin raf ömrü boyunca kalite özneliklerini koruyup korumadığını belirlemek ve ürünün raf ömrünü tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen

testlerdir. Bu çalışmalar, fiziksel, kimyasal ve biyolojik stabiliteyi kapsar ve ilaç formülasyonlarının güvenilirliğini sağlamak için kritik öneme sahiptir.

### 3.8.1. Hızlandırılmış Stabilite Testleri

Stres bozunma çalışmaları, karglumik asidin bozunma profillerini belirlemek ve yöntemin stabilite göstergesi olup olmadığını doğrulamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma, ICH Q1A(R2) ve ICH Q2(R2) kılavuzlarına uygun olarak tasarlanmış olup, ilacın çeşitli stres koşulları altında bozunma davranışını değerlendirmek için farklı bozunma koşulları uygulanmıştır.

Asit ve Baz Hidrolizi: Asit hidrolizi için numuneler %0.1 HCl çözeltisi ile 25°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Baz hidrolizi için ise aynı sıcaklık ve süre boyunca %0.1 NaOH çözeltisinde bekletilmiştir. İşlem sonunda çözeltiler nötralize edilerek analize uygun hale getirilmiştir.

Oksidatif Bozunma: Numuneler, oksidatif stres değerlendirmesi için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile 25°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Termal Bozunma: Termal stabilite değerlendirmesi için numuneler 90°C'de 21 gün boyunca kontrollü ortamda tutulmuştur.

Fotolitik Bozunma: ICH Q1B yönergelerine uygun olarak numuneler UV/Vis ışığa maruz bırakılmıştır.

- UV ışık maruziyeti: 200 W/m<sup>2</sup> UV-A ışık kaynağı altında 1.2 milyon lüks saat (120 saat) süreyle tutulmuştur.
- Görünür ışık maruziyeti: 1.2 milyon lüks saat (120 saat) boyunca beyaz ışığa maruz bırakılmıştır.
- Karşılaştırma amacıyla karanlıkta saklanan kontrol numuneleri de aynı koşullarda muhafaza edilmiştir.

Hızlandırılmış Stabilite Koşulları: Stabilite değerlendirmesi için numuneler 40°C/ %75 RH koşullarında 6 ay boyunca saklanmış ve belirli aralıklarla analiz edilmiştir.

Bütün bozunma koşulları tamamlandıktan sonra numuneler, UHPLC sisteminde analiz edilerek bozunma ürünlerinin ayrımı ve yöntemin stabilite göstergesi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

### 3.8.2. Formülasyon Stabilite Testi

Formülasyon stabilite testi, Karglumik asit formülasyonlarının uzun süreli depolama koşullarında stabilite profilini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. “Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy” dergisinde yayınlanan, yöntemin stabilite testleri için uygunluğu vurgulanmış, özellikle çözünme testleri ve pH 6.8 fosfat tamponu gibi bağırsak ortamını simüle eden koşullarda stabilite değerlendirilmiştir.

- Formülasyonlar, ICH Q1A(R2) kılavuzlarına uygun olarak 25°C/ %60 RH (12 ay) ve 40°C/ %75 RH (6 ay) koşullarında test edilmiştir. Çözünme hızı, tüm zaman noktalarında (0, 3, 6, 9, 12 ay; hızlandırılmış için 0, 3, 6 ay)  $Q \geq \%90$  olarak ölçülmüş, formülasyonun stabilite profilini koruduğu doğrulanmıştır.
- Analizler, geliştirilen HPLC-DAD/UV yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.
- Sonuçlar, formülasyonun stabilite profilini göstermektedir, özellikle çözünme hızı  $Q \geq \%90$  15 dakikada elde edilmiştir.

Bu testler, formülasyonun raf ömrü boyunca etkinliği ve kalitesini koruduğunu doğrulamaktadır.

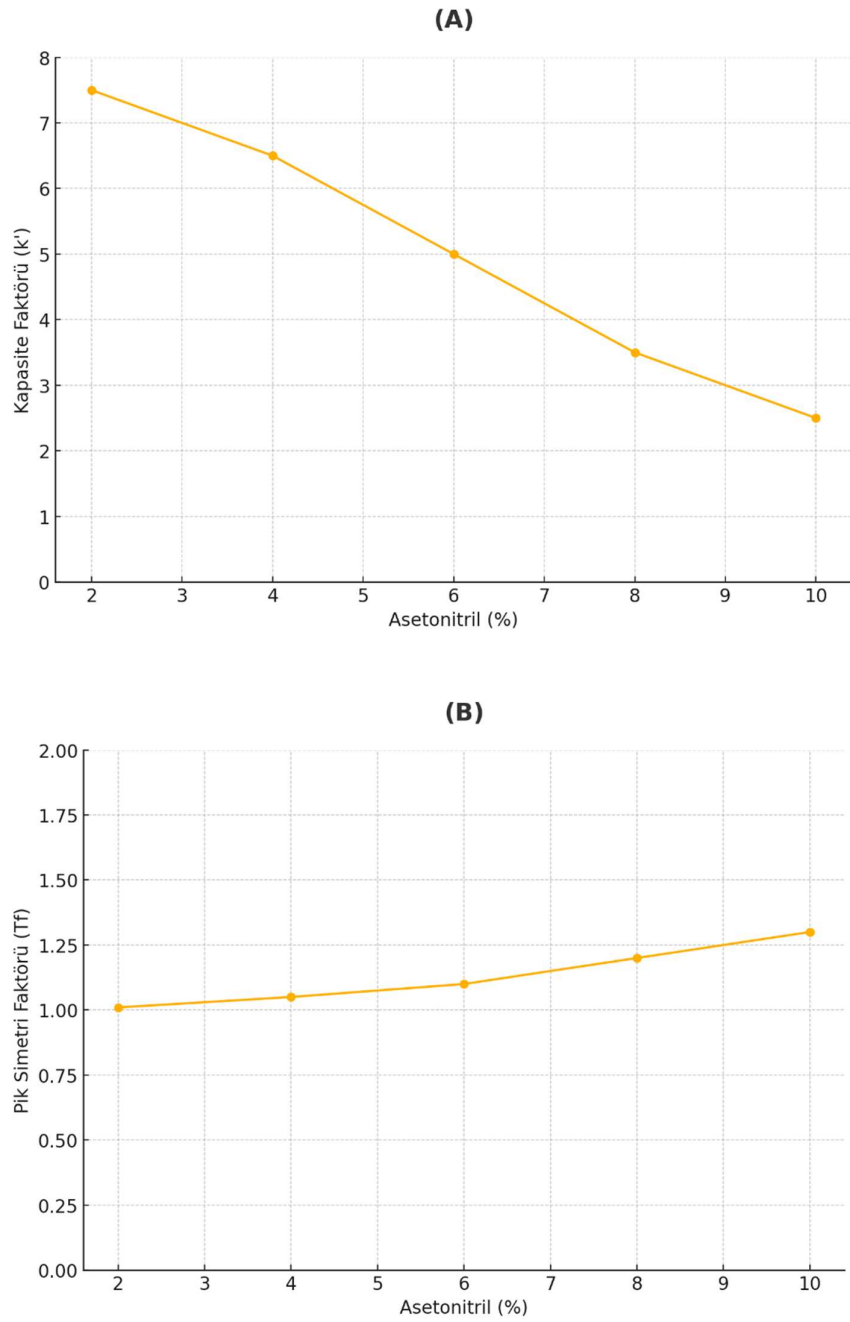
## 4. BULGULAR

### 4.1. Etken Madde ve Dissolüsyon Analizleri için HPLC Yöntemi

#### 4.1.1. Yöntem Geliştirme Çalışmaları

Karglumik asidin dissolüsyon analizi için HPLC-DAD yöntemi geliştirilirken, hareketli faz bileşimi, pH ve akış hızı gibi kritik kromatografik parametreler adım adım değiştirilerek en uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. İlk denemelerde bazı koşulların sistem uygunluk kriterlerini karşılamadığı görülmüştür. Örneğin, tampon kullanılmaksızın nötr pH'ya yakın bir hareketli faz ve yüksek organik çözücü oranı (%20 ACN) uygulandığında karglumik asidin piki ölü zamana çok yakın alıkonma zamanında gelmiş, kapasite faktörü  $k' < 1$  olarak hesaplanmıştır. Bu koşullarda karglumik asit molekülü yeterince tutunmadığı için keskin ve asimetrik bir pik profili oluşmuş; kuyruklanma faktörü  $T_f > 2.0$  olarak gözlenerek pik şeklinin kabul edilemez düzeyde bozulduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, hareketli faz tampon gücünün çok düşük olduğu bir koşulda (örneğin, 50 mM tamponlu, pH ~2 hareketli faz) kolondan elde edilen teorik plaka sayısı (N) yalnızca ~1800 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, genel kabul gören  $N > 2000$  kriterinin altında kalmakta ve kolon verimliliğinin yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu başlangıç verileri, yöntemin optimize edilmesi için hareketli faz koşullarında önemli ayarlamalar yapılması gerektiğine işaret etmiştir. Başlangıçta saptanan bu sorunları gidermek amacıyla hareketli faz pH'sı, tampon derişimi ve organik çözücü oranı sistematik olarak optimize edilmiştir.

Çalışma kapsamında fosfat tamponu ve asetonitril karışımları farklı pH ve oranlarda test edilmiş; ayrıca karglumik asidin alıkonmasını ve pik şeklini iyileştirmek için yeterli asidik ortam ve iyonik güç sağlanmasına özen gösterilmiştir. Örneğin, asetonitril yüzdesinin düşürülmesiyle analitin kolon üzerinde tutunma süresi artmış, kapasite faktörü değerleri 2'nin üzerine çıkmıştır (Şekil 4.1, Tablo 4.1).

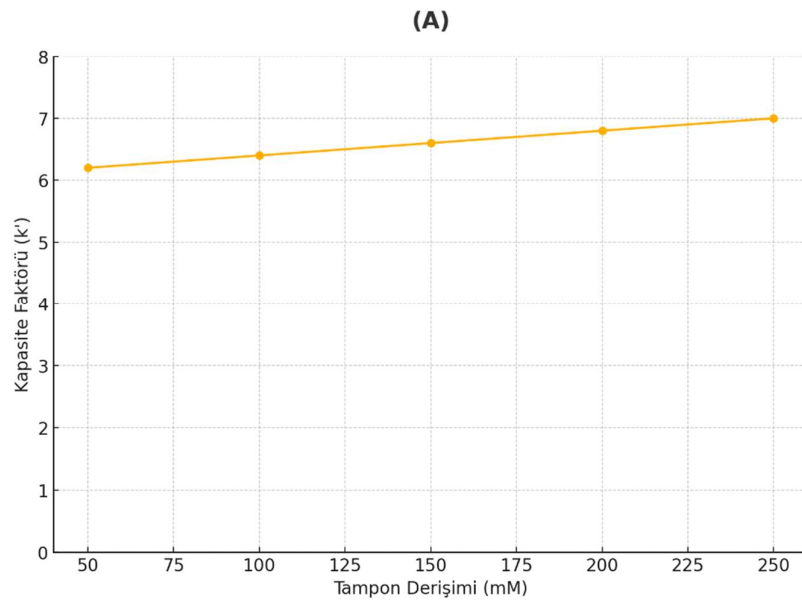


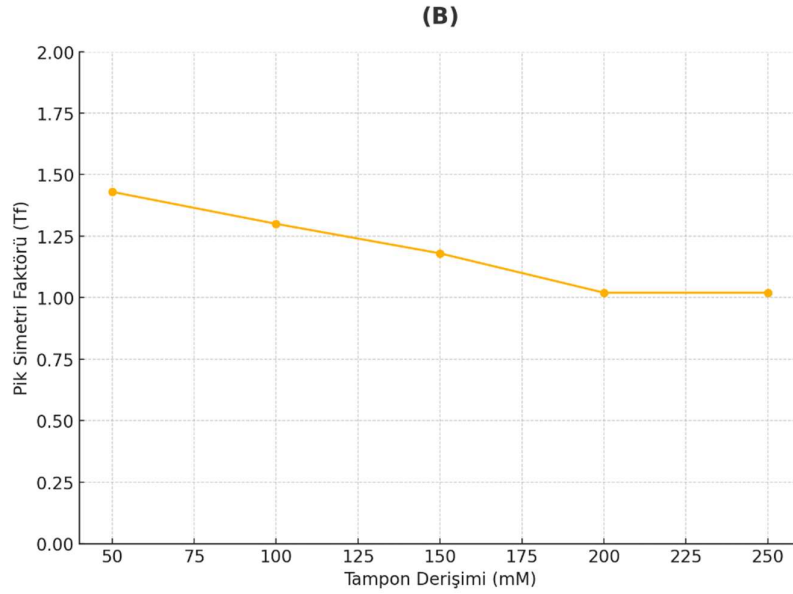
**Şekil 4.1.** Hareketli fazdaki asetonitril oranının değişimi ile **(A)** kapasite faktörü ve **(B)** pik simetrisindeki değişim.

**Tablo 4.1** Hareketli fazdaki asetonitril miktarının değişiminin kromatografik parametrelere etkisi

Asetonitril Oranı (%)	Kapasite Faktörü ( $k'$ )	Plaka Sayısı (N)	Pik Simetri Faktörü ( $T_f$ )
2	7.5	6800	1.01
4	6.5	6600	1.05
6	5.0	6000	1.10
8	3.5	4000	1.20
10	2.5	2000	1.30

Tampon derişiminin artırılması ve pH'nin uygun aralığa ( $\approx 2.0-3.5$ ) ayarlanması sayesinde pik simetrisinde belirgin iyileşme sağlanmıştır: düşük tampon kapasitesinde 1.43 olan  $T_f$  değeri, yüksek iyonik güçlü koşullarda  $\sim 1.0$  seviyesine inerek ideal simetrik pikler elde edilmiştir. Buna paralel olarak, artan tampon derişimi ve azalan organik çözücü oranıyla teorik plaka sayısı 1800'lerden 6650'ye kadar yükselmiş; kolon etkinliği ve ayırım kabiliyeti belirgin ölçüde artmıştır (Şekil 4.2, Tablo 4.2).





**Şekil 4.2.** Hareketli faz tampon derişimi değişimi ile **(A)** kapasite faktörü ve **(B)** pik simetrisi değişimi.

**Tablo 4.2** Hareketli faz tampon derişimi değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

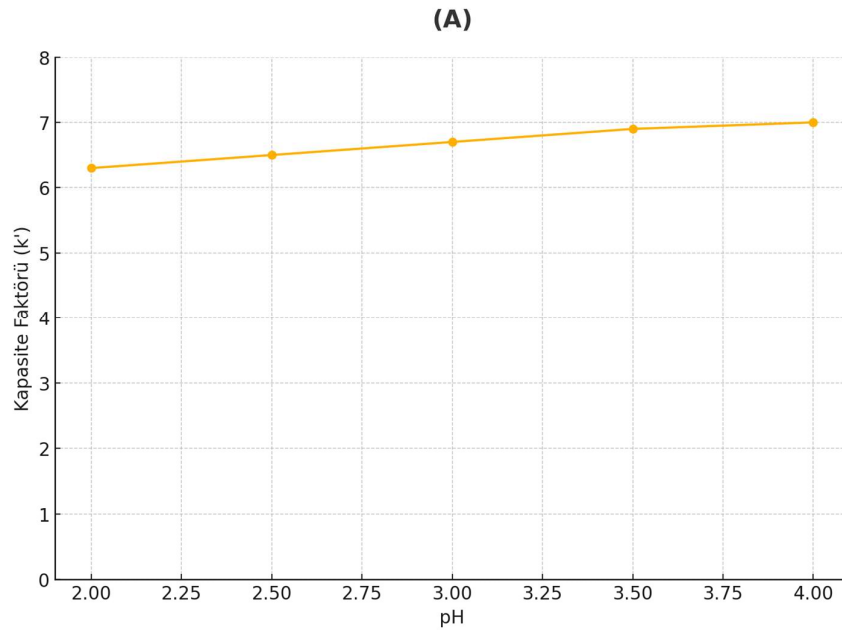
Tampon Derişimi (mM)	Kapasite Faktörü (k')	Plaka Sayısı (N)	Pik Simetri Faktörü (Tf)
50	6.2	1800	1.43
100	6.4	2100	1.30
150	6.6	4400	1.18
200	6.8	6650	1.02
250	7.0	6850	1.02

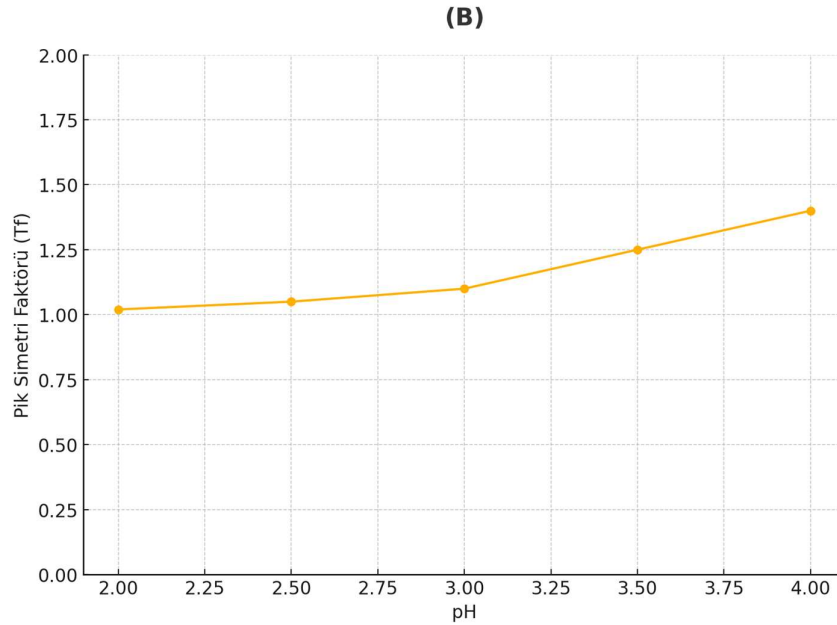
Hareketli fazın pH değerinin kromatografik performans üzerindeki etkisi, yöntemin optimizasyon sürecinde sistematik olarak değerlendirilmiştir. pH aralığı 2.0–4.0 arasında incelenmiş ve bu değişimin kapasite faktörü, teorik plaka sayısı ve pik simetri faktörü üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. pH değerinin artmasıyla birlikte kapasite faktöründe hafif bir artış gözlenmiş, pH 2.0'da 6.3 olan k' değeri pH

4.0'te 7.0'a ulaşmıştır. Bu artış, ayırım kapasitesinde küçük ama istikrarlı bir iyileşme olduğunu göstermektedir.

Plaka sayıları pH değişiminden anlamlı şekilde etkilenmemiş, 6200 ile 5800 arasında sabit bir profil sergilemiştir. Bu durum, kolon verimliliğinin pH'a karşı oldukça stabil olduğunu ortaya koymaktadır. En dikkat çekici değişim ise pik simetri faktöründe gözlemlenmiştir. pH 4.0'ta 1.40 olan simetri faktörü, pH 2.0'da 1.02'ye kadar düşmüş ve bu da düşük pH koşullarında daha keskin ve simetrik piklerin elde edildiğini göstermiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, yöntemin pH 2.0–2.5 aralığında çalıştırılmasıyla hem yüksek simetri hem de yeterli kapasite faktörü sağlandığı sonucuna varılmış ve bu pH aralığı ileri analizlerde tercih edilmiştir (Şekil 4.3 ve Tablo 4.3).



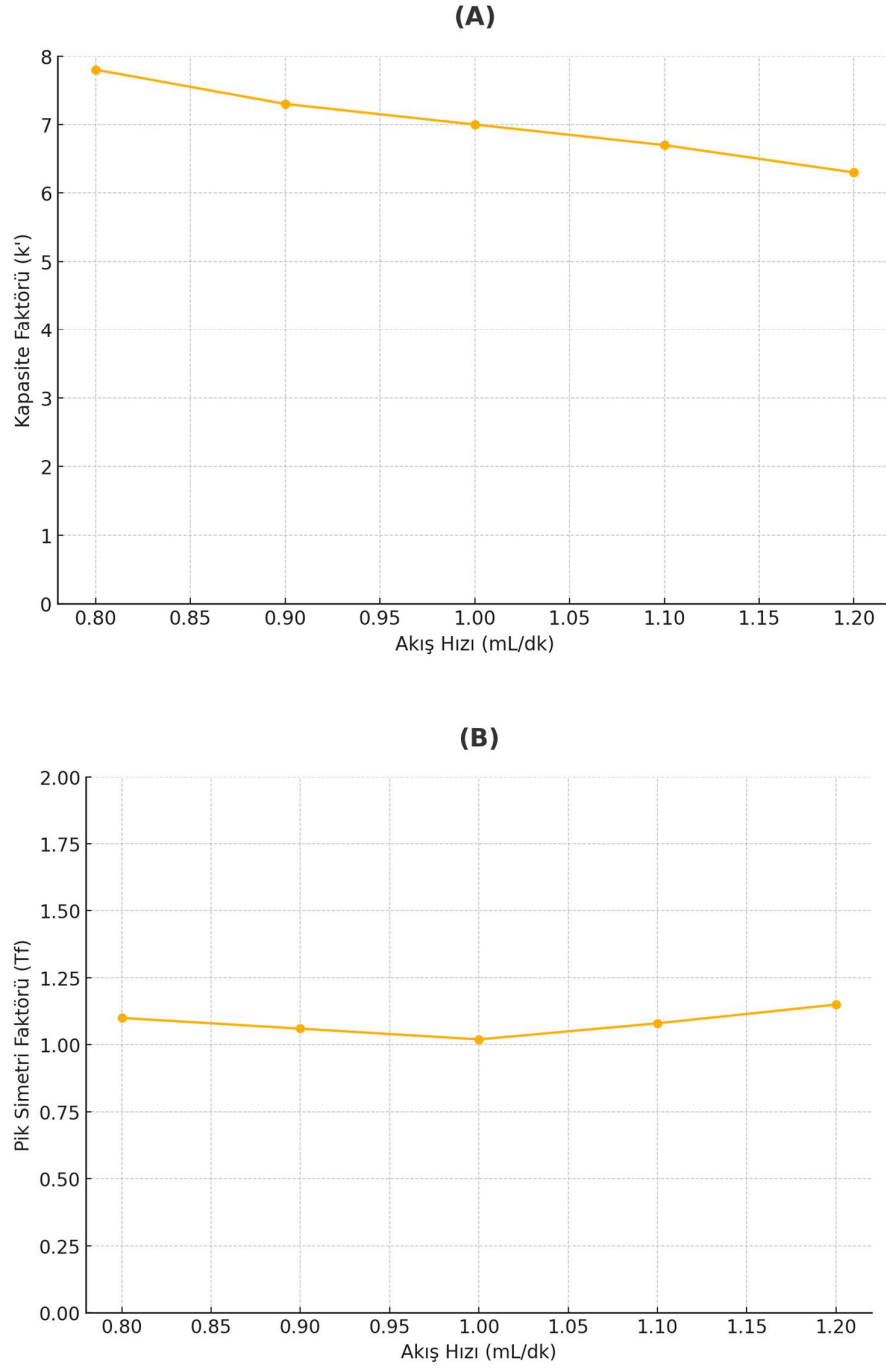


**Şekil 4.3.** Hareketli faz pH değişimi ile (A) kapasite faktörü ve (B) pik simetrisinin değişimi grafiği.

**Tablo 4.3.** Hareketli faz pH değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

pH	Kapasite Faktörü ( $k'$ )	Plaka Sayısı (N)	Pik Simetri Faktörü (Tf)
2.0	6.3	6200	1.02
2.5	6.5	6100	1.05
3.0	6.7	6000	1.10
3.5	6.9	5900	1.25
4.0	7.0	5800	1.40

Akış hızı da alıkonma üzerinde etkili olduğu için değerlendirilmiştir: çok yüksek akış hızlarında piklerin yeterince etkileşmeden kolonu terk ettiği (daha düşük N) görülmüş, buna karşın çok düşük akış hızları analiz süresini uzatmıştır. Bu nedenle optimum dengeyi sağlayan  $\sim 1.1$  mL/dk akış hızı tercih edilmiştir (Şekil 4.4 ve Tablo 4.4).



**Şekil 4.4.** Hareketli faz akış hızının değişimi ile **(A)** kapasite faktörü ve **(B)** pik simetrisinin değişimi grafiği.

**Tablo 4.4.** Hareketli faz akış hızı değişiminin kromatografik parametrelere etkisi.

Akış Hızı (mL/dk)	Kapasite Faktörü (k')	Plaka Sayısı (N)	Pik Simetri Faktörü (Tf)
0.8	7.8	6000	1.10
0.9	7.3	6400	1.06
1.0	7.0	6850	1.02
1.1	6.7	6300	1.08
1.2	6.3	5800	1.15

Karglumik asidin HPLC ile ayırımının optimizasyonu için uygulanan deneme-yanılma çalışmalarından elde edilen seçili koşullar ve bunların sistem uygunluk parametreleri aşağıdaki tabloda ayrıca özetlenmektedir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Deneme-yanılma yöntemiyle optimize edilen kromatografi koşulları birlikte değerlendirildiğinde sistem uygunluk sonuçları.

Dene y	Tampo n (mM)	p H	AC N (%)	Akış Hızı (mL/dk)	Teori k Plaka Sayısı (N)	Kuyruklan ma Faktörü (Tf)	Kapazit e Faktörü (k')	Uygunluk (Sistem Kriterleri)
1	50	2.0	10	1.0	1800	1.43	2.4	Uygun değil (N < 2000)
2	100	2.2	6	1.0	2100	1.30	3.1	Uygun
3	150	2.8	4	1.0	4400	1.18	5.5	Uygun
4	200	2.5	2	1.1	6650	1.02	6.9	Uygun (Optimum)
5	250	3.5	2	1.0	6850	1.02	7.0	Uygun

Her bir koşul için elde edilen N, Tf ve k' değerleri, ilgili koşulun belirlenen kriterlere göre uygun olup olmadığını göstermektedir. İlk koşullar istenen sınırları karşılamazken, optimizasyona yönelik değişikliklerle sonuçlar kademeli olarak

iyilemiştir. Özellikle Koşul 4, tüm sistem uygunluk kriterlerini karşıladığından en uygun değerleri sağlamıştır (N = 6650,  $T_f \sim 1$ ,  $k' > 5$ ). Bu nedenle Koşul 4 nihai yöntem koşulu olarak seçilmiş; 200 mM fosfat tamponu (pH 2.5) ve %2 ACN içeren hareketli faz ile 1.0 mL/dk akış hızında karglumik asit pikinin yeterli alıkonma ( $t_R \approx 5.9$  dk,  $k' \approx 6.9$ ), yüksek kolon verimliliği (N = 6650) ve simetrik pik şekli ( $T_f = 1.02$ ) sağladığı görülmüştür. Diğer alternatif koşullar içinde 5 no'lu koşul her ne kadar benzer bir kolon etkinliği gösterse de (%2 ACN, pH 3.5, 250 mM tampon; N = 6850,  $T_f = 1.02$ ), daha yüksek tuz derişiminin ileride oluşturabileceği olası sakıncalar nedeniyle 200 mM tampon içeren koşul tercih edilmiştir. Tezin bu aşamasına kadar elde edilen bulgulara dayanılarak dissolüsyon analizi için HPLC ile miktar tayini yönteminin optimize edilen parametreleri aşağıda verilen biçimde bulunmuştur (Tablo 4.6).

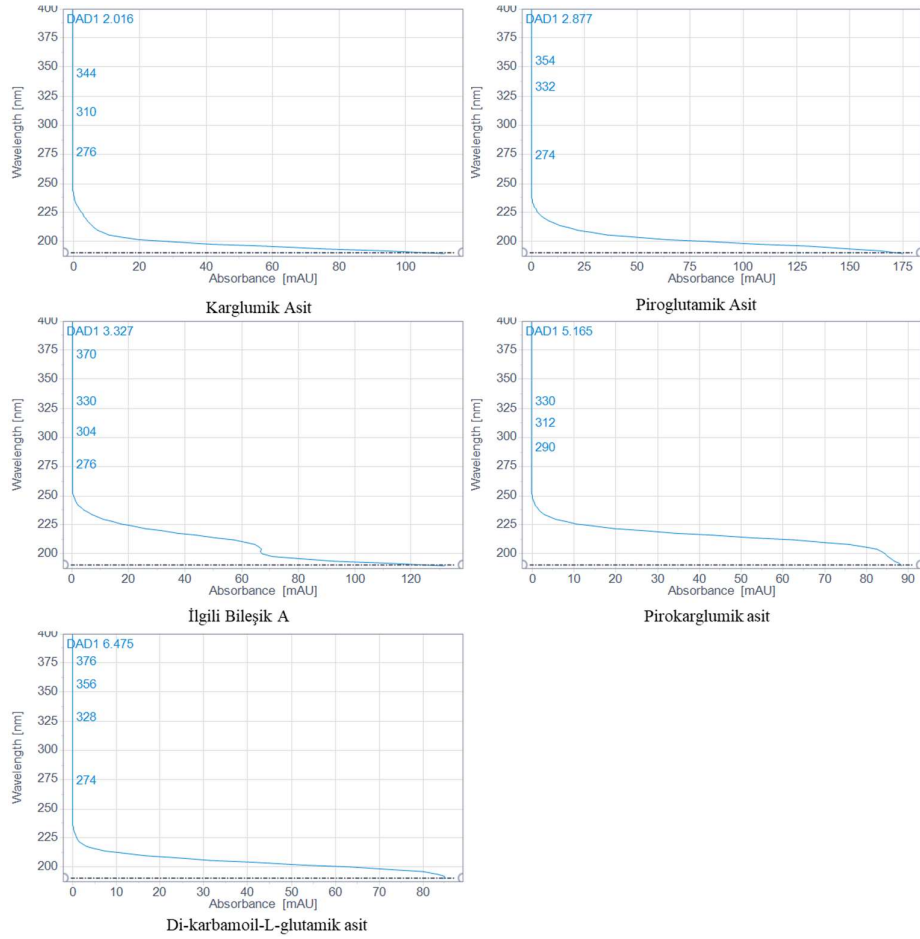
**Tablo 4.6.** Dissolüsyonda Karglumik Asit Miktar Tayini için HPLC yöntemi parametreleri.

Parametreler	Detayları
Kolon	C18; HSS T3; Xselect Peptide; 250 × 4.6 mm, 3 µm (Waters)
Dalga Boyu (nm)	205 nm
Hareketli Faz	200 mM, pH 2.5 fosfat tamponu: Asetonitril 98:2 (h/h)
Akış Hızı (mL/dk)	1.1 mL/dk
Kolon Sıcaklığı (°C)	30°C
Numune Sıcaklığı (°C)	5°C
Enjeksiyon Hacmi (µL)	100 µL
Analiz Süresi (dk)	12 dk

#### 4.1.2. Karglumik Asidin Miktar Tayini ve Dissolüsyon Analizi Bulguları

Karglumik asidin farmasötik tablet formülasyonlarında doğru ve güvenilir şekilde analiz edilmesi, ürünün kalite kontrolünde kritik bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, karglumik asidin miktar tayini ve dissolüsyon analizleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve diyot dizisi dedektörü (HPLC-DAD) kullanılarak kapsamlı bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, ters faz C18 kolon kullanılarak

optimize edilmiş olup, hareketli faz olarak fosfat tamponu ve asetonitril karışımı tercih edilmiştir. Karglumik asidin analizinde optimum dalga boyu olarak 205 nm seçilmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Karglumik asit, ilgili bileşik a (HPA), piroglutamik asit, pirokarglumik asit ve dikarbamoil L-glutamik asit'in UV spektrumları.

Geliştirilen yöntem, ICH Q2(R2) yönergelerine uygun olarak spesifiklik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, limit tayini (DL) ve miktar tayini limiti (QL) gibi kritik validasyon parametreleri açısından başarılı şekilde değerlendirilmiştir. Yöntemin hassasiyet ve sağlamlığı hem rutin kalite kontrol analizlerinde hem de çeşitli biyofarmasötik uygulamalarda kullanıma uygun olduğunu göstermiştir. Bu *in vitro* analiz yönteminin validasyonu, ürünün etkinliği ve regülasyonlara uyumunu garanti etmek amacıyla kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.3. Sistem Uygunluk Test Sonuçları

Analitik yöntemlerin tutarlılığı ve güvenilirliğini doğrulamak için sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler, yöntem geliştirme aşamasında elde edilen kromatografik koşulların, rutin kullanımda tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini kanıtlamak amacıyla yapılmıştır. Sistem uygunluğu testlerinde, karglumik asit standart çözeltisi ardışık olarak altı kez enjekte edilmiş ve her enjeksiyon sonucunda elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Bu değerlendirmelerde karglumik asit için elde edilen pik alanı, alıkonma zamanı, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü değerleri incelenmiştir. Karglumik asidin pik alanları için hesaplanan bağıl standart sapma (BSS) değerleri, ardışık altı enjeksiyonda %0,85 sınırının altında kalmış ve bu kriter sağlanmıştır. Ayrıca, kolon etkinliğinin bir göstergesi olan teorik plaka sayısının 2000'in üzerinde olduğu ve piklerin simetrisini gösteren kuyruklanma faktörünün ise 0,8-2 aralığında olduğu doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen HPLC yönteminin sistematik ve analitik güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 4.7).

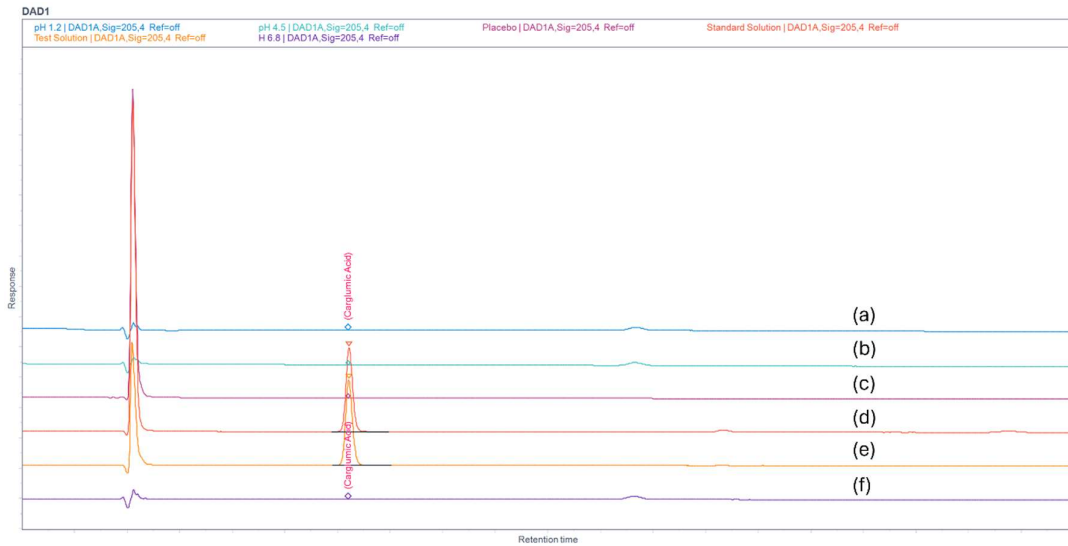
Sonuç olarak, sistem uygunluk testleri, geliştirilen yöntemin kromatografik performansının günlük analiz koşullarında tutarlı olduğunu ve güvenilir sonuçlar üretebildiğini doğrulamıştır. Bu bulgular yöntemin kalite kontrol süreçlerinde rutin kullanıma uygun olduğunu kanıtlamıştır.

**Tablo 4.7.** Sistem uygunluk çalışması sonuçları.

Enjeksiyon No.	Alan Değeri	Kuyruklanma Faktörü (Tf)	Kapasite Faktörü (k')	Plaka Sayısı (N)
1	2506.5	1.03	7.1	6815
2	2499.0	1.03	7.0	6875
3	2499.0	1.01	7.0	6838
4	2501.5	1.02	7.1	6844
5	2502.11	1.02	6.9	6862
6	2499.41	1.02	6.9	6856
Ortalama	2501.5	1.02	7.0	6850
SS	2.95	0.01	0.09	21.04
BSS	0.12	0.76	1.27	0.31

#### 4.1.4. Yöntemin Seçicilik ve Spesifiklik Değerlendirmesi

Yöntemin seçicilik ve spesifiklik değerlendirilmesi, analiz sırasında hedef bileşik olan karglumik asidin tablet formülasyonlarında bulunan yardımcı maddeler ve çözücü gibi diğer bileşenlerden kromatografik olarak ayrılıp ayrılmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu değerlendirme kapsamında, kör çözücü (hareketli faz ve kullanılan çözücüler), plasebo formülasyonu ve karglumik asit içeren standart çözeltilerin kromatogramları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Karglumik asit analiz yönteminin spesifitesi için örnek kromatogram: (a) pH 1.2 dissolüsyon ortamı, (b) pH 4.5 dissolüsyon ortamı, (c) pH 6.8 dissolüsyon ortamı, (d) Karglumik asit standart çözeltisi, (e) Karglumik asit test çözeltisi ve (f) Plasebo.

Bu incelemelerde, standart karglumik asit çözeltisinin kromatogramında tek, net ve simetrik bir pik elde edilmiş olup, bu pik diğer matris bileşenleri ile herhangi bir örtüşme göstermemiştir. Ayrıca, kullanılan kör çözücü ve plasebo çözeltilerinin kromatogramlarında hedef pikin alıkonma zamanında herhangi bir girişim gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin karglumik asidi, formülasyonda bulunan yardımcı maddelerden ve çözünme ortamındaki olası girişimlerden etkin bir şekilde ayırabildiğini ve spesifik bir şekilde ölçebildiğini kanıtlamıştır.

Sonuç olarak, yöntem hem formülasyon ortamında hem de çözünme ortamında yüksek seçicilik ve spesifiklik göstermiştir. Bu özellik, yöntemin farmasötik kalite kontrol süreçlerinde ve rutin analizlerde kullanılabilmesi için önemli bir avantaj sağlamaktadır.

#### **4.1.5. Çözelti Stabilitesi ve Filtre Seçimi Sonuçları**

Analitik yöntemin güvenilir ve tutarlı sonuçlar verebilmesi için, hazırlanan örnek çözeltilerin stabilitesi ve analiz öncesi kullanılan filtre tipinin analit üzerine etkisi detaylı şekilde incelenmiştir. Bu çalışmalar kapsamında, hazırlanan karglumik asit çözeltilerinin belirli sıcaklık koşullarında (5°C) zamana bağlı stabilitesi değerlendirilmiş ve farklı filtre tiplerinin etkinliği test edilmiştir.

Çözelti stabilitesi testleri, karglumik asit içeren standart ve numune çözeltilerinin 5°C'de 74 saat boyunca saklanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu süre içerisinde belirli zaman aralıklarıyla (0, 24, 48 ve 74 saat) örnekler analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda, çözeltilerin belirtilen süre boyunca herhangi bir bozunma veya anlamlı bir derişim değişimi olmaksızın kararlı kaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, analiz öncesi hazırlanan çözeltilerin 74 saat süreyle analiz doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini olumsuz etkilemeden kullanılabileceğini doğrulamıştır (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** Çözelti Stabilitesi analiz sonuçları.

Çözelti	Zaman(saat)	Alan Değeri	Başlangıca Göre Uyum (%)
Standart	0	2501.5	100.0
	24	2498.0	99.9
	48	2497.5	99.8
	74	2495.0	99.7
pH 1.2 Test	0	2502.0	100.0
	24	2500.0	99.9
	48	2499.5	99.9
	74	2498.0	99.8
pH 4.5 Test	0	2500.5	100.0
	24	2499.0	99.9
	48	2498.5	99.9
	74	2497.5	99.9
pH 6.8 Test	0	2501.0	100.0
	24	2500.0	99.9
	48	2499.0	99.9
	74	2498.5	99.9

Filtre seçim çalışmaları kapsamında ise, numunelerin analize uygun hâle getirilmesi sırasında kullanılacak filtrelerin etkinliği araştırılmıştır. Numunelerde bulunan partiküllerin giderilmesi ve aktif bileşenin adsorpsiyon kaybının minimize edilmesi açısından, farklı filtre tipleri (0,45 µm hidrofobik PTFE, 0,45 µm Nylon ve 0,45 µm Selüloz Asetat filtreler) test edilmiştir. Filtrasyon sonrası numuneler altı ardışık enjeksiyon yapılarak HPLC sistemi ile analiz edilmiş, elde edilen veriler filtre edilmemiş (santrifüj ile hazırlanan) numunelerle karşılaştırılmıştır.

Test edilen filtreler arasında, 0,45 µm hidrofobik PTFE filtrelerin, karglumik asit ve safsızlıkların derişimlerini koruma açısından üstün performans gösterdiği

belirlenmiştir. Bu filtrenin diğer filtrelere göre daha az analit adsorpsiyonuna neden olduğu ve dolayısıyla miktar tayini sırasında doğruluğu artırdığı görülmüştür. Sonuç olarak, 0,45 µm hidrofobik PTFE filtrelerin karglumik asit çözeltilerinin analize hazırlanmasında en uygun seçenek olduğu ve yöntemin bu filtre tipiyle kullanımının güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağladığı belirlenmiştir (Tablo 4.9).

**Tablo 4.9.** Filtre Çalışması Analiz Sonuçları.

Numune Hazırlama Yöntemi	Enjeksiyon	Alan	Uyum (%)
Santrifüj Edilmiş (Referans)	1	2501.0	
	2	2499.5	
	3	2500.0	
	4	2501.5	
	5	2499.0	
	6	2500.0	100.0
	Ortalama	2500.2	100.0
0,45 µm Hidrofobik PTFE	1	2499.5	
	2	2498.0	
	3	2497.5	
	4	2499.0	
	5	2498.5	
	6	2498.5	
	Ortalama	2498.5	99.9
0,45 µm Nylon	1	2426.0	
	2	2424.0	
	3	2425.5	
	4	2424.5	
	5	2425.0	
	6	2425.0	
	Ortalama	2425.0	97.0
0,45 µm Selüloz Asetat	1	2431.0	
	2	2430.5	
	3	2429.5	

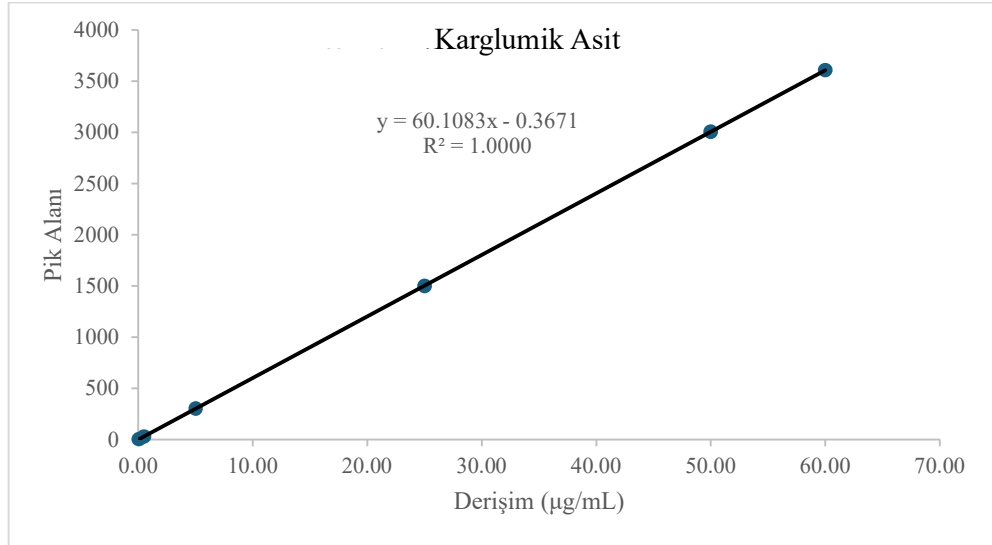
4	2429.0	
5	2430.5	
6	2429.5	
Ortalama	2430.0	97.2

Çözeltilerin stabilitesi değerlendirmesi hem de filtre seçim çalışmaları, geliştirilen analitik yöntemin etkinliğini ve tutarlılığını doğrulayan kritik unsurlardır. Bu değerlendirmeler, yöntemle elde edilen analitik sonuçların güvenilirliğini artırmakta ve rutin kalite kontrol analizlerinde kullanımını desteklemektedir.

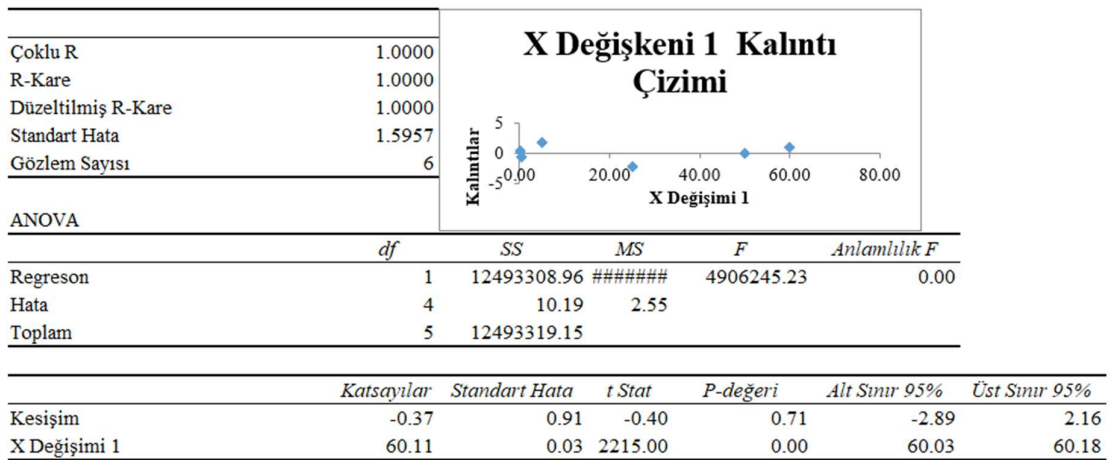
#### 4.1.6. Doğrusallık Parametresi Sonuçları

Doğrusallık çalışması, karglumik asidin miktar tayini yönteminin analitik performansını değerlendirmek amacıyla, %0.1 ile %120 derişim seviyelerini kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiştir. %100 seviye, 50 µg/mL derişime karşılık gelecek şekilde belirlenmiş ve bu referans noktasına göre 0.05, 0.5, 5.0, 25.0, 50.0 ve 60.0 µg/mL aralıklarında altı kalibrasyon noktası kullanılmıştır. Her bir derişim seviyesi için elde edilen pik alanları doğrultusunda yapılan regresyon analizinde, kalibrasyon eğrisinin  $R^2$  değeri 0.9997 olarak hesaplanmış ve yöntemin geniş bir aralıkta mükemmel doğrusal yanıt verdiği gösterilmiştir (Şekil 4.7).

Kalibrasyon eğrisi  $y=ax+b$  formunda tanımlanmış olup, eğimin yüksekliği ve kesişim değerinin düşük olması yöntemin duyarlılığını ve düşük seviyelerde bile güvenilir ölçüm yapabilme kapasitesini ortaya koymuştur, ilgili istatistiksel sonuçlar Şekil 4.8’ de verilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, geliştirilen HPLC-DAD yönteminin nicel analizlerde yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağladığını ve ICH Q2(R2) yönergelerinde tanımlanan validasyon kriterlerini eksiksiz olarak karşıladığını göstermektedir.



Şekil 4.7. HPLC analizinde Karglumik Asit doğrusallık eğrisi.



Şekil 4.8. Karglumik Asit doğrusallık analizi istatistiksel değerlendirme sonuçları.

#### 4.1.7. Doğruluk Parametresi Sonuçları

Doğruluk çalışması, geliştirilen HPLC-DAD yönteminin analitik performansını değerlendirmek amacıyla %0.1, %100 ile %120 arasında değişen derişim seviyelerinde gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 0.5–40–60 µg/mL aralığında hazırlanmış altı kalibrasyon noktası kullanılarak oluşturulmuş ve elde edilen regresyon analizinde yöntem, mükemmel doğrusal yanıt ( $R^2 = 0.9997$ ) vermiştir. Bu

sonuçlar, yöntemin geniş bir aralıktaki güvenilir nicel analiz yapabildiğini göstermektedir (Tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** Doğruluk sonuçlarının detayları.

Teorik Derişim (µg/mL)	llen Derişim (µg/mL)	Alan Değeri	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%) ± SS
0.5	0.508	30.9	101.55%	
0.5	0.508	30.9	101.51%	
0.5	0.505	30.7	101.09%	101.38% ±1.38
50	50.28	3015	100.71%	
50	50.27	3014	100.67%	
50	50.29	3015	100.72%	100.70% ±0.70
60	60.39	3620	100.78%	
60	60.58	3630	101.15%	
60	60.20	3610	100.40%	100.78% ±0.78

#### 4.1.8. Kesinlik Parametresi Sonuçları

Kesinlik alışmaları, geliştirilen analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla aynı gün içerisinde ve farklı günlerde, farklı kolon ve cihazda gerçekleştirilen analizlerle yürütülmüştür. Gün içi ve günler arası analizlerden elde edilen, %BSS değerini açısından ICH Q2(R2) yönergesinde belirtilen kabul sınırları içerisinde bulunmuştur. Gün içi ve günler arası %BSS değerleri 2’den küçük olarak bulunmuştur ve sonuçlar uygundur. Elde edilen sonuçlar, yöntemin hem kısa vadeli hem de zamana bağlı uygulamalarda tutarlı ölçümler sağladığını göstermektedir. Bireysel numune sonuçları ve hesaplamalara ilişkin veriler ilgili Tablo 4.11’de sunulmuştur. Bu kapsamda geliştirilen HPLC-DAD yönteminin nicel analizlerde yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik sağladığı doğrulanmıştır. Kesinlik analiz sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.11’de detaylı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Kesinlik, Ara Kesinlik ve günler arası kesinlik sonuçları.

Kesinlik	Alan Değeri	Tayin Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Miktar Tayini
1	2487	49.84	99.47
2	2480	49.60	99.19
3	2489	49.77	99.54
4	2499	49.97	99.94
5	2479	49.57	99.13
6	2479	49.57	99.15
Ortalama	2485.5	49.72	99.25
Güven Aralığı	$\pm 4.5$	$\pm 0.09$	$\pm 0.45$
(%) BSS	0.18	0.18	0.18
Ara Kesinlik	Alan Değeri	Tayin Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Miktar Tayini
1	2489	49.77	99.54
2	2481	49.62	99.23
3	2469	49.37	98.76
4	2479	49.57	99.15
5	2469	49.37	98.77
6	2468	49.35	98.75
Ortalama	2475.8	49.51	98.94
Güven Aralığı	$\pm 3.8$	$\pm 0.08$	$\pm 0.38$
(%) BSS	0.15	0.15	0.15
Parametre	Kesinlik (Gün içi)	Ara Kesinlik (Günler Genel (12 arası)	Genel (12 sonuç)
Ortalama Alan Değeri	2485.5	2475.8	2480.7
Ortalama Tayin Edilen Kons. ( $\mu\text{g/mL}$ )	49.72	49.51	49.61
Ortalama % Miktar Tayini	99.25%	98.94%	99.10%

Kesinlik	Alan Değeri	Tayin Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Miktar Tayini
(%) BSS		0.18	0.15

#### 4.1.9. Sağlamlık alışması Sonuçları

Kromatografik parametrelerin değerlendirilmesi için uygulanan Plackett-Burman deney tasarımı istatistiksel analizi sonucunda, oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve dūřuk bir tanımlayıcılık katsayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, deney sırasında gözlemlenen varyasyonların, oluşturulan istatistiksel model tarafından yeterince açıklanamadığını göstermektedir. Buna rağmen, geliştirilen analitik yöntemin kendi içerisinde sağlam ve güvenilir olduğu ortaya konmuştur. Yöntemin, kromatografik koşullarda yapılan küçük değişimlerden etkilenmediği ve analitik performansın istikrarlı şekilde sürdürüldüğü belirlenmiştir. Bu bulgu, yöntemin sağlamlığını ve rutin analizler için uygunluğunu destekler niteliktedir.

Analitik yöntemin sağlamlığı, kromatografik parametrelerdeki olası küçük değişimlerin sonuçlar üzerindeki etkilerinin minimize edilmesi amacıyla detaylı optimizasyon çalışmalarıyla güçlendirilmiştir. Bu optimizasyon kapsamında, kolon sıcaklığı, hareketli fazın pH değeri, akış hızı ve dalga boyu gibi kromatografik parametreler sistematik olarak incelenmiş ve yöntemin performansını en üst düzeye çıkaracak ideal koşullar belirlenmiştir. Böylece, analitik yöntemin rutin laboratuvar uygulamaları için dayanıklı ve güvenilir olduğu doğrulanmıştır. Yapılan değerlendirmeler, yöntemin sağlamlığını destekleyerek, rutin analitik uygulamalarda kullanımının güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar tablo 4.12 ve 4.13’ de verilmiştir.

Plackett-Burman sağlamlık analizi verileri, geliştirilen yöntemle ait iki kritik yanıtın regresyon modelleri için belirlenen  $R^2$  katsayılarını ortaya koymaktadır. % Karglumik asit miktar tayini modelinde  $R^2 = 0.4581$  bulunmuştur; yani hareketli faz pH’sı, kolon sıcaklığı, akış hızı ve dedeksiyon dalga boyu varyansın yalnızca % 46’sını açıklayabilmiştir. Bu durum, kantitatif sonucun söz konusu dört parametrenin dışında enjeksiyon hacmi, numune hazırlama veya dedektör duyarlılığı gibi ek değişkenlere de duyarlı olabileceğini gösterir. Buna karşılıklı, pik kuyruklanma faktörü için elde

edilen  $R^2 = 0,8894$  değeri, modelin varyansın yaklaşık % 89'unu açıkladığını ve değerlendirilen kromatografik parametrelerin pik simetrisi üzerinde belirleyici rol oynadığını ortaya koyar. Sonuç olarak, yöntem pik şekli bakımından yüksek sağlamlık sergilerken, doğru miktar tayini için sistem dışı kaynaklı değişkenlerin de yakından izlenmesi gerekmektedir.

**.Tablo 4.12.** Sağlamlık çalışması sonuçlarının detayları

Okutma Sırası	Hareketli Faz pH	Kolon Sıcaklığı (°C)	Akış Hızı (mL/min)	Dalga Boyu (nm)
1	2.4	28	1.15	203
2	2.4	32	1.15	207
3	2.6	28	1.15	207
4	2.4	28	1.05	203
5	2.6	32	1.05	207
6	2.6	32	1.15	203
7	2.4	32	1.15	203
8	2.4	28	1.05	207
9	2.4	32	1.05	207
10	2.6	28	1.15	207
11	2.6	32	1.05	203
12	2.6	28	1.05	203

**Tablo 4.13.** Plackett-Burman deney tasarımı analizi sonuçları.

Sonuçlar	Hareketli Faz pH	Kolon Sıcaklığı (°C)	Akış Hızı (mL/min)	Dalga Boyu (nm)	R <sup>2</sup> Değeri	
					Model	Model
%Karglumik Asit	0.112	0.226	0.762	0.412	0.305	0.4581
Kuyruklanma Faktörü	0.485	0.811	0.655	0.354	0.581	0.8894

#### 4.1.10. Saptama Limiti (DL) ve Tayin Limiti (QL)

Saptama limiti (DL) ve tayin limiti (QL) çalışmaları, geliştirilen HPLC-DAD yönteminin duyarlılığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, düşük derişim düzeylerinde elde edilen sinyal/gürültü (S/N) oranları değerlendirilmiş ve ICH Q2(R2) yönergesinde tanımlanan kriterlere göre LD ve QL değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular, yöntemin oldukça düşük derişimlerde dahi analiti tespit ve nicel olarak belirleme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bulunan değerler Tablo 4.14’de sunulmuş olup, yöntemin yüksek hassasiyet gerektiren farmasötik analizlerde güvenle kullanılabileceğini desteklemektedir. Bu sonuçlar tablo 4.14’de verilmiştir. Buradaki sonuçlarda yöntemin QL değerinde düşük %BSS değerine sahip olduğu ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği görülmüştür.

**Tablo 4.14.** Karglumik asit HPLC analizine ait Tespit ve Tayin Limiti sonuçları.

Parametre	Derişim (µg/mL)	Alan Değeri	Sinyal/Gürültü (S/N)
QL-1	0.05	2.52	13.10
QL-2	0.05	2.48	12.84
QL-3	0.05	2.53	13.16
QL-4	0.05	2.56	13.51
QL-5	0.05	2.47	12.79
QL-6	0.05	2.48	12.82
QL Ortalama	0.05	2.5	12.9

Parametre	Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Alan Değeri	Sinyal/Gürültü (S/N)
(%) BSS	-	3.2	-
DL-1	0.01	0.51	2.42
DL-2	0.01	0.52	2.58
DL Ortalama	0.01	0.52	2.50

#### 4.1.11. Validasyon Parametreleri ve Sonuçları

Geliştirilen HPLC-DAD analitik yönteminin güvenilirliğini ve tutarlılığını ortaya koymak amacıyla uluslararası geçerliliği olan ICH Q2(R2) validasyon kriterleri kullanılarak kapsamlı bir validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, sistem uygunluğu, seçicilik ve spesifiklik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, tespit limiti (DL) ve tayin limiti (QL) parametreleri ayrı ayrı değerlendirilmiş ve her parametre için elde edilen sonuçlar Tablo 4.14'de sunulmuştur.

Sistem uygunluğu testlerinde, yöntemin kabul kriterlerini karşıladığı görülmüştür. Bu parametre kapsamında pik alanı, alıkonma zamanı, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörleri değerlendirilmiş ve tüm sonuçlar, yöntem performansının tutarlılığını desteklemiştir (Tablo 4.7).

Seçicilik ve spesifiklik testleri, kromatogramların karşılaştırmalı analizleri ile gerçekleştirilmiş, yöntem bileşenler arasında hiçbir girişim olmadığını ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, placebo, kör çözücü ve standart çözelti kromatogramlarının karşılaştırılması yapılarak yöntemin hedef bileşiğe yönelik yüksek özgüllüğü doğrulanmıştır (Şekil 4.6).

Doğrusallık testlerinde elde edilen kalibrasyon eğrisi sonuçları, yöntem için belirlenen çalışma aralığında mükemmel bir doğrusal ilişki ( $R^2 \geq 0.999$ ) göstermiştir (Şekil 4.7). Bu sonuçlar, yöntemin geniş bir derişim aralığında hassas ve güvenilir ölçümler sağladığını göstermektedir.

Doğruluk çalışmaları, düşük, orta ve yüksek derişimlerde gerçekleştirilen geri kazanım testleriyle değerlendirilmiş ve tüm derişim seviyelerinde %98-102 arasında yüksek geri kazanım oranları elde edilmiştir (Tablo 4.7).

Keskinlik testleri ise gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlendirilerek yapılmıştır. Her iki değerlendirme sonucunda da BSS değerleri %2 sınırının altında kalmıştır. Bu da yöntemin yüksek hassasiyetini ve tutarlılığını kanıtlamaktadır (Tablo 4.11).

DL ve QL parametreleri, sinyal-gürültü oranı yöntemiyle belirlenmiş ve düşük derişimlerde dahi yöntemin hassas ve doğru sonuçlar verebildiği kanıtlanmıştır.

Son olarak, yöntem sağlamlığı Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucu küçük kromatografik değişimlerin yöntemin performansına etkisi minimal düzeyde kalmış, yöntem sağlamlığı başarıyla doğrulanmıştır (Tablo 4.12 ve 4.13).

Yukarıdaki bulgular, yöntemin farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir bir şekilde uygulanabilir olduğunu kanıtlamaktadır. Sunulan tablolar, validasyon parametrelerine ilişkin detaylı sonuçları içermektedir.

Tüm validasyon sonuçları özet bir tablo olarak Tablo 4.15’de verilmiştir.

**Tablo 4.15.** Validasyon parametreleri genel sonuçları.

Validasyon Parametreleri	Kabul Kriterleri	Sonuçlar
Sistem Uygunluk	$\% \text{BSS} \leq 0.85$ for $N = 6$ enjeksiyon	$\% \text{BSS} = 0.17$ $N = 6$
Seçicilik	Kör çözelti, plasebo ve karglumik asit arasında girişim gözlenmemeli.	Girişim Gözlenmedi
Doğrusallık ve Aralık	$R^2 \geq 0.99$	Uygun ( $R^2 \geq 0.9997$ , $0.5 \mu\text{g/mL}$ ve $60 \mu\text{g/mL}$ aralığında doğrusaldır.)
Doğruluk	$0.5 \mu\text{g/mL}$ (%1.0), $50 \mu\text{g/mL}$ (%100), $60 \mu\text{g/mL}$ (%120)	Her bir numune $98\% - 102\%$ aralığında olmalıdır.
Kesinlik	$\% \text{BSS} \leq 2$ $N = 6$ analiz yapılan gün ve günler arası.	Kesinlik ve ara kesinliğe ait $\% \text{BSS}$ değerleri belirlenen limitler içinde bulunmuştur. Kesinlik = $99.25 \pm 0.45$ $\% \text{BSS} = 0.18$ ( $N = 6$ ) Ara Kesinlik = $98.94 \pm 0.38$ $\% \text{BSS} = 0.15$ ( $N = 6$ ) Gün içi kesinlik = $99.10 \pm 0.12$ $\% \text{BSS} = 0.18$ ( $N = 12$ )
DL/QL	QL $s/N \geq 10$ ( $\% \text{BSS} \leq 10$ ) $N = 6$  DL $2 \leq s/N \leq 3$	$\bar{x} s/N = 12.9$ ( $\text{BSS} = 3.2$ , $N = 6$ ) $0.05 \mu\text{g/mL}$ $\bar{x} s/N = 2.5$ ( $N = 2$ ) $0.01 \mu\text{g/mL}$

#### 4.1.12. Dissolüsyon Profili Sonuçları

Dissolüsyon çalışmaları, karglumik asidin farmasötik formülasyonlardan *in vitro* koşullar altında çözünme davranışının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu testler, formülasyonun biyoyararlanımını öngörebilmek, ürünün kalitesini değerlendirmek ve farmasötik etkinliğini sağlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışmada kullanılan yöntem ve koşullar, ürünün referans farmasötik formülasyonu ile uyumlu olarak seçilmiş olup, uluslararası kabul gören standartlara uygun biçimde geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

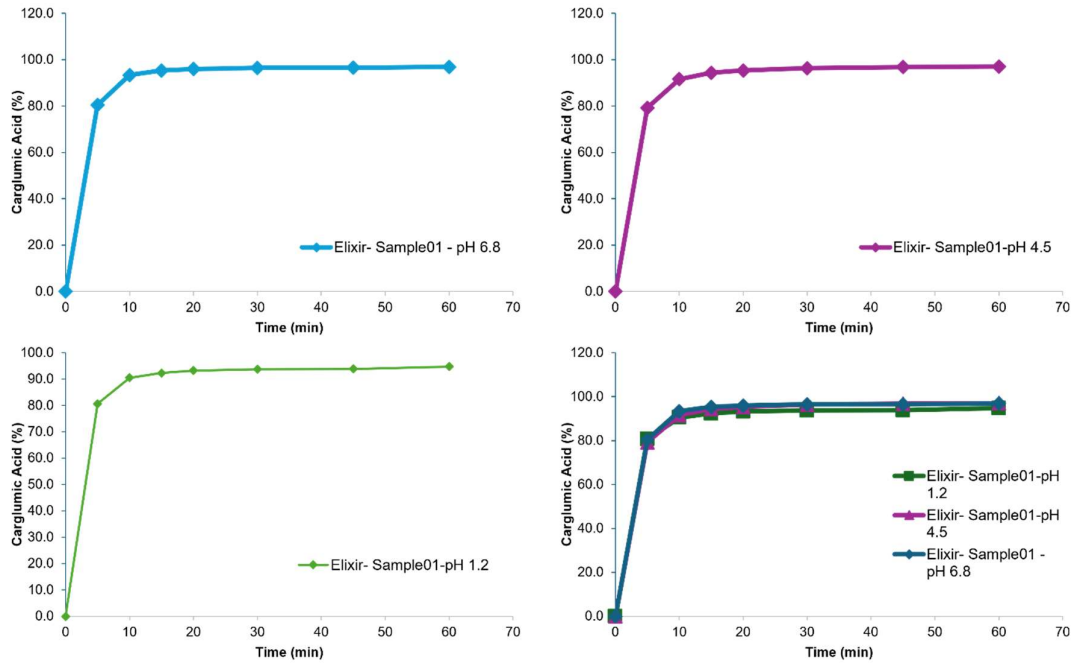
Dissolüsyon testleri için üç farklı pH ortamında (pH 1.2; pH 4.5 ve pH 6.8) ayrı ayrı çalışmalar yapılmıştır. Özellikle oral farmasötik formülasyonların emilim bölgesi olan ince bağırsak ortamını taklit etmek üzere, pH 6.8 fosfat tamponu tercih edilmiştir. Diğer yandan mide ortamını simüle eden pH 1.2 ve geçiş bölgesini simüle eden pH 4.5 tamponları da ürünün farklı fizyolojik koşullardaki davranışını değerlendirmek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

Dissolüsyon testleri USP Aparat II (pedal yöntemi) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, tüm analizler 750 mL tampon çözeltisi içerisinde, 37°C sıcaklıkta ve 100 devir/dk karıştırma hızı ile yürütülmüştür. Alınan örnekler, geliştirilen ve valide edilen HPLC-DAD yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz edilen örneklerden elde edilen kromatogramlarda, karglumik asidin miktarı net ve tekrarlanabilir bir şekilde tespit edilmiştir.

Analizler sonucunda, belirlenen spesifikasyon limitleri doğrultusunda (%90'ın üzerinde çözünme oranı 15 dakikada sağlanmalıdır) hazırlanan tablet formülasyonlarının tüm pH koşullarında bu kriteri karşıladığı gözlemlenmiştir. Özellikle pH 6.8 koşullarında elde edilen veriler, formülasyonun *in vitro* çözünme profilinin ideal olduğu ve gastrointestinal sistemin ince bağırsak ortamında beklenen biyoyararlanım için gerekli olan çözünme kinetiğini sağladığını göstermiştir. Farklı dissolüsyon ortamlarında yapılan dissolüsyon analiz sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.9'da verilmiştir. Bu grafiklerde çözünme eğrileri, yöntemin üç fizyolojik pH koşulunda gösterdiği performansı net biçimde ortaya koymaktadır. Eğrilerin hepsinde 15 dakika içinde %90'ı aşan çözünme elde edilmiş olup, en dik eğim pH 6,8 ortamında

gözenmiştir; bu, formülasyonun hedeflenen emilim bölgesinde hızlı ve tam çözünmeyi garanti ettiğini gösterir. pH 1,2 ve pH 4,5 ortamlarındaki profiller ise başlangıçta daha yavaş olsa da aynı sürede benzer çözünme düzeyine ulaşarak asidik ortam varyasyonlarına karşı formülasyonun dayanıklılığını kanıtlamıştır. Üç eğri arasındaki çözünme farkının  $< \%5$  olması, yöntemin tekrarlanabilirliğini ve formülasyonun sağlamlığını desteklerken,  $Q \geq \%90$  kriterinin tüm pH'larda sağlanması bu analitik yöntemin ürünün biyoyararlanım hedeflerine uyumlu olduğunu göstermek için yardımcı olduğunu kanıtlar.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen dissolüsyon testleri, karglumik asit içeren tabletlerin farmasötik kalite kriterlerini karşıladığını, biyoyararlanım açısından öngörülen hedeflere ulaştığını ve yöntemin stabil ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemlerin hem formülasyon geliştirme süreçlerinde hem de rutin kalite kontrol analizlerinde güvenle kullanılabileceğini desteklemektedir.



**Şekil 4.9.** Karglumik asit tabletinin pH 1.2, pH 4.5 ve pH 6.8 çözünme ortamlarındaki çözünme profilleri.

## 4.2. Bozunma Ürünleri Analiz Yöntemi

Safsızlıkların tespiti ve nicel analiz için yöntem optimizasyonu çalışmalarında deney tasarımı (DoE) yaklaşımı uygulanmıştır. Box-Behnken ve Plackett-Burman tasarımları, kromatografik parametrelerin optimize edilmesinde kullanılmıştır. Bu kapsamda, Box-Behnken Tasarımı (BBD) ve Plackett-Burman Tasarımı (PBD) gibi istatistiksel deney tasarımı yöntemleri uygulanmıştır. Safsızlık metodu geliştirilirken optimize edilen kritik parametreler, pH, kolon sıcaklığı ve akış hızıdır. Bu parametreler, safsızlıkların çözünürlüğünü ve pik şeklini iyileştirmek amacıyla ayarlanmıştır. DoE, yöntemin sağlamlığını ve hassasiyetini artırmakta, ayrıca analiz süresini kısaltmaktadır. Analitik yöntem geliştirme ve optimizasyon sürecinde, Deney Tasarımı (Design of Experiment, DoE) yaklaşımı kullanılarak yöntemin kritik değişkenleri sistematik şekilde değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir.

### Box-Behnken Tasarımı ile Parametrelerin İncelenmesi

Box-Behnken Tasarımı, yöntem geliştirme sürecinde seçilen kritik metodolojik parametrelerin (hareketli faz pH'ı, kolon sıcaklığı, akış hızı gibi) optimizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu tasarım, her faktör için üç farklı seviyede deney kombinasyonları oluşturarak en uygun çalışma koşullarını belirlemiştir.

- Bağımsız Değişkenler: Hareketli faz pH'ı, kolon sıcaklığı, akış hızı
- Bağımlı Değişkenler: Pik çözünürlüğü, alıkonma zamanı, pik kuyruklanma faktörü

Box-Behnken analizinden elde edilen veriler yanıt yüzey metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) kullanılarak değerlendirilmiş ve optimum kromatografik parametreler belirlenmiştir.

### Box-Behnken Tasarımı ile Kritik Parametrelerin Optimizasyonu

Analitik yöntem geliştirme sürecinde, Box-Behnken Tasarımı (BBD) kullanılarak yöntemin kritik parametreleri sistematik bir şekilde optimize edilmiştir. Bu deney tasarımı, minimum deney sayısı ile yöntemin performansını etkileyen faktörlerin etkileşimlerini belirlemeye ve en uygun koşulları seçmeye olanak tanımaktadır.

Optimizasyon çalışmasında, hareketli faz pH'ı, kolon sıcaklığı ve akış hızı bağımsız değişkenler olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin pik ayırıcılığı, alıkonma süresi ve pik kuyruklanma faktörü gibi analitik yanıtlar üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Box-Behnken Tasarımı kapsamında, her değişken üç seviyede (-1, 0, +1) değerlendirilmiş ve oluşturulan deney matrisine göre toplam 17 farklı deney koşulu uygulanmıştır. Elde edilen veriler, Yanıt Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) kullanılarak analiz edilmiş ve optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Bu deney tasarımı için yöntem parametreleri Tablo 4.16'da verilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme:

- Regresyon analizi ile bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki incelenmiş,  $R^2 \geq 0.999$  olarak hesaplanmıştır.
- ANOVA analizi ile faktörlerin etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve  $p < 0.05$  olan değişkenler anlamlı kabul edilmiştir.
- Yanıt yüzey grafikleri oluşturularak, değişkenlerin yöntem etkisi görselleştirilmiştir.

Bu optimizasyon çalışması sonucunda, UHPLC yönteminin kritik değişkenleri belirlenmiş ve analitik performans açısından en uygun koşullar seçilerek yöntem validasyon aşamasına hazır hale getirilmiştir.

**Tablo 4.16.** Kritik yöntem parametreleri için Box-Behnken deneyi çalışmaları ve yanıtları.

Analiz	Faktör 1 A: pH	Faktör 2 B: Kolon Sıcaklığı °C	Faktör 3 C: Akış Hızı (mL/dk)	Sonuç 1 Ayırıcılık	Sonuç 2 Alıkonma Zamanı (dk)	Sonuç 3 Kuyruklanma Faktörü
1	2.2	20	0.40	2.99	6.91	1.26
2	2.0	30	0.35	1.47	6.31	1.18
3	2.0	25	0.40	1.91	6.09	1.20
4	2.2	25	0.35	2.59	6.99	1.29
5	2.0	25	0.30	2.47	8.55	1.29
6	2.2	20	0.30	3.86	7.60	1.21
7	2.2	25	0.35	2.76	7.22	1.29
8	2.2	30	0.40	1.87	5.55	1.19
9	2.4	25	0.30	3.99	7.61	1.27
10	2.0	20	0.35	3.13	6.77	1.25
11	2.4	20	0.35	4.57	7.26	1.19
12	2.4	30	0.35	2.86	5.67	1.30
13	2.2	30	0.30	2.17	7.46	1.23
14	2.2	25	0.35	2.65	7.11	1.20
15	2.2	25	0.35	2.62	7.10	1.26
16	2.2	25	0.35	2.64	7.14	1.19
17	2.4	25	0.40	3.17	5.42	1.27

### Veri Analizi

Farmasötik analizlerde, elde edilen verilerin güvenilir ve doğru bir şekilde değerlendirilmesi, yöntemin analitik performansının doğrulanması açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu bölümde, UHPLC cihazlarında veri kaydı ve değerlendirilmesi, kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri ve analitik performans kriterlerinin değerlendirilmesi detaylandırılmıştır.

### Analitik Performans Değerlendirme:

- Özgünlük: Ana bileşik ve bozunma ürünleri arasındaki ayırıcılık ( $R_s > 1,5$ ) olarak bulunmuştur
- Doğruluk ve Kesinlik: Bozunma ürünleri için geri kazanım yüzdeleri %95-105 arasında bulunmalıdır. BSS değerleri %2'nin altındadır.
- Sağlamlık: pH ve hareketli faz oranlarındaki küçük değişiklikler, yöntemin performansını etkilememektedir.

### UHPLC Bozunma Ürünleri Yöntem Parametreleri

Karglumik asit ve bozunma ürünlerinin analizinde kullanılan UHPLC yönteminin temel parametreleri Tablo 4.17 ve 4.18'de UHPLC analizinin parametreleri verilmiştir.

**Tablo 4.17.** UHPLC analizi yöntem parametreleri.

Parametreler	Detayları
Kolon	C18; BEH; 150 × 2.1 mm, 1.7 µm (Waters)
Dalga Boyu (nm)	214 nm
Hareketli Faz	10 mM, pH 2.4 fosfat tamponu: Asetonitril (Gradient)
Akış Hızı (mL/dk)	0.39 mL/dk
Kolon Sıcaklığı (°C)	22°C
Numune Sıcaklığı (°C)	5°C
Enjeksiyon Hacmi (µL)	2 µL
Analiz Süresi (dk)	10 dk

**Tablo 4.18.** UHPLC metodu gradiyent koşulları.

Zaman (dk)	Fofat Tamponu (%)	Asetonitril (%)
0	100	0
7	100	0
10	80	20

Bu gradient, analit ve bozunma ürünlerinin farklı polaritelerine uyumlu şekilde ayırmak amacındadır. Düşük organik çözücü kullanımı (asetonitril %5-30), çevre dostu bir yaklaşımı hedefler.

Analizde ters faz, yüksek verimli bir C18 kolon tercih edilmiştir. Özellikle Waters Acquity BEH C18 (150 × 2.1 mm, 1.7 µm, 130 Å) kolonunun kullanılması, küçük partikül boyutu sayesinde yüksek ayırma verimliliği ve çözünürlük sağlayabilir

BEH tipi kolonlar geniş bir pH aralığında (yaklaşık pH 1–12) kararlılık gösterip düşük pH koşullarında da uzun ömürlülük sunduğundan, pH 2.4 gibi asidik hareketli faz koşullarında kolon güvenle kullanılabilmiştir. Kolon uzunluğunun 150 mm seçilmesi, analit ile olası bozunma ürünleri arasındaki ayırımı artırmak için yeterli etkileşim mesafesi sağlarken; 2.1 mm'lik dar iç çap ise daha az çözücü kullanımıyla yüksek duyarlılık elde edilmesine katkı yapmıştır. Sonuç olarak, seçilen kolon parametreleri birden fazla bileşenin kısa sürede etkin şekilde ayrılmasına imkân tanımıştır.

Bozunma ürünlerinin analizi, stabilite çalışmaları sırasında oluşabilecek potansiyel toksik bileşenlerin tanımlanmasını ve miktarlarının belirlenmesini içerir. Bu analiz, farmasötik ürünlerin uzun vadeli güvenilirliğini sağlamak için önemlidir. Yeni bir ilaç ürünü için verilmesi gereken safsızlık limitleri Tablo 4.19.'da gösterilmiştir (319–321).

**Tablo 4.19.** Yeni ilaç ürünlerinde bozunma ürünleri için eşik değerler(14,322,323).

Maksimum Günlük Doz	Eşik Değer
<b>Raporlama Eşik Değerleri</b>	
≤ 1 g	%0.1
> 1 g	%0.05
<b>Tanımlama Eşik Değerleri</b>	
< 1 mg	%1.0 veya 5 µg TDI*, hangisi daha düşükse
1 mg - 10 mg	%0.5 veya 20 µg TDI, hangisi daha düşükse
>10 mg - 2 g	%0.2 veya 2 mg TDI, hangisi daha düşükse
> 2 g	%0.10
<b>Nicelendirme Eşik Değerleri</b>	
< 10 mg	%1.0 veya 50 µg TDI, hangisi daha düşükse
10 mg - 100 mg	%0.5 veya 200 µg TDI, hangisi daha düşükse
>100 mg - 2 g	%0.2 veya 3 mg TDI, hangisi daha düşükse
> 2 g	%0.15

\*Toplam günlük alım dozu

Sistemik denemeler sonucunda, en iyi pik şekli ve ayrımı sağlayan kromatografik koşulların 200 mM fosfat tamponu ve %2 asetonitril içeren hareketli faz karışımı olduğu, tampon pH değerinin ise 2.5 olarak belirlendiği görülmüştür. Dedeksiyon dalga boyu seçiminde, karglumik asidin UV spektrumundaki maksimum absorbansına uygun olarak 205 nm dalga boyu tercih edilmiştir (Şekil 4.5).

Optimizasyon aşamasında kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve enjeksiyon hacmi gibi diğer önemli parametreler incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda kolon sıcaklığı 30°C, hareketli faz akış hızı 1.1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi ise 100 µL olarak belirlenmiştir. Bu parametreler ile karglumik asit pikinin net, simetrik ve tekrarlanabilir şekilde elde edilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen yöntem, sistem uygunluk testleri ile doğrulanarak analizlerin güvenilir ve tutarlı şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanımıştır.

Bu optimize edilmiş koşullar, tablet formülasyonlarından karglumik asidin doğru ve hassas miktar tayini ile etkin dissolüsyon profili değerlendirmesi için uygulanabilir hale gelmiştir. Geliştirilen yöntemin güvenilirliği ve analitik performansı, valide edilerek kalite kontrol süreçlerinde kullanımına hazır hale getirilmiştir.

#### **4.2.1. UHPLC ile Karglumik Asit Safsızlıkları için Yöntem Geliştirme**

Bu çalışmada, karglumik asit ve ilgili safsızlıklarının analizine yönelik, farmasötik kalite kontrol amaçlarına uygun ve endüstriyel standartlarla uyumlu bir UHPLC-DAD metodu geliştirilmiştir. Analizler için Agilent 1290 Infinity II UHPLC sistemi kullanılmış ve yöntem optimizasyonu Box-Behnken deney tasarımıyla gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen analitik yöntem için Waters BEH C18 kolon ( $150 \times 2.1$  mm,  $1.7 \mu\text{m}$  partikül boyutu) tercih edilmiştir. Hareketli faz olarak 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2,4) ve asetonitril kullanılmıştır. Optimum ayırım için, hareketli faz akış hızı 0,39 mL/dak ve kolon sıcaklığı  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon için ideal dalga boyu, yapılan ön çalışmalar sonucunda, 214 nm olarak seçilmiştir.

Yöntem geliştirme sürecinde pH, akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi kritik parametrelerin safsızlıkların ayırımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Başlangıç çalışmaları sırasında farklı kolon tipleri denenmiş ve Waters BEH C18 kolonunun ( $150 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$ ) safsızlıklar arasında yeterli çözünürlük ve uygun ayırımı sağladığı tespit edilmiştir. Başlangıçta, izokratik elüsyon kullanılarak yürütülen analizlerde bazı safsızlıklar arasında yeterli çözünürlüğün sağlanamaması üzerine, Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak pH, kolon sıcaklığı ve akış hızının etkileri sistematik olarak incelenmiştir.

Karglumik asit ve safsızlıklarının dedeksiyon limitleri (LOD ve LOQ) sırasıyla  $0,15 \mu\text{g/mL}$  ve  $0,7 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilmiştir. Yöntem validasyonu, ICH Q2 (R2) rehberine uygun olarak özgüllük, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık parametreleri için yapılmış, ayrıca Plackett-Burman deney tasarımıyla sağlamlık değerlendirilmiştir. Metodun sağlam olduğu, kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve

enjeksiyon dalga boyu gibi faktörlerde yapılan küçük değişimlere rağmen performansının etkilenmediği belirlenmiştir. Ancak hareketli faz pH değerindeki değişimlerin bazı safsızlıkların ayırıcılığını etkileyebileceği gözlenmiş ve analiz sırasında bu faktöre dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, geliştirilen yöntem, karglumik asit ve safsızlıklarının hızlı, hassas ve ekonomik analizine olanak sağlamaktadır. Bu yöntem, farmasötik analiz laboratuvarlarında hem rutin analizler hem de stabilite çalışmalarında kullanılabilecek güvenilir ve tekrarlanabilir bir analiz tekniği sunmaktadır. Ayrıca, yöntem geliştirme sürecinde deneysel tasarım (Box-Behnken ve Plackett-Burman) uygulaması sayesinde analitik yöntemlerin optimizasyon süreci etkinleştirilmiş ve önemli zaman tasarrufu sağlanmıştır. Bu yönüyle, ilaç kalite kontrol uygulamalarında geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir.

#### **4.2.2. Yöntem Geliştirme Çalışmaları ve Başlangıç Parametreleri**

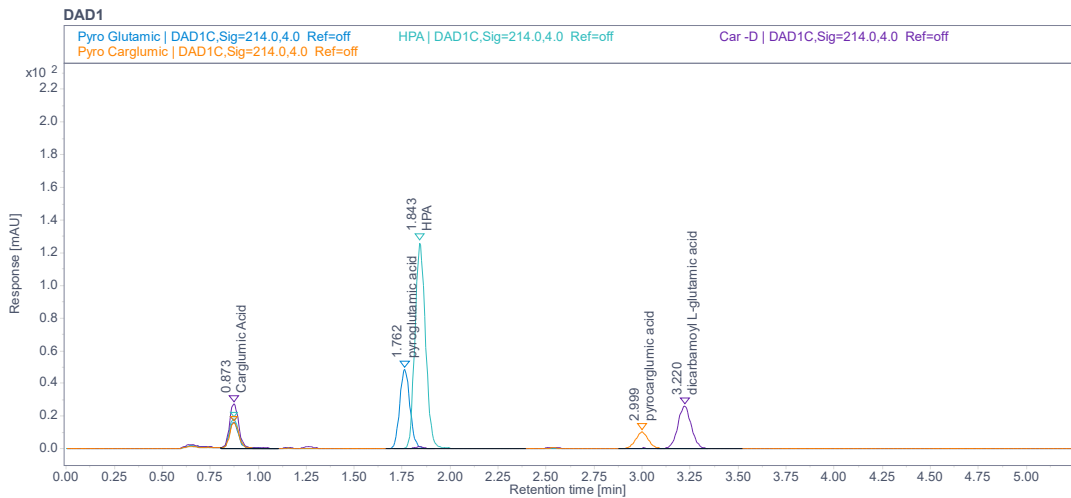
UHPLC-DAD ile karglumik asit ve safsızlıklarının analizi için yöntem geliştirme çalışmalarının erken aşamasında, en uygun analitik koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak, karglumik asit ve safsızlıkları için en uygun UV dalga boyunun belirlenmesi amacıyla diode array dedektör (DAD) kullanılarak analizler yapılmıştır. Karglumik asit ve safsızlıkların UV spektrumları incelenerek, optimum dedeksiyon için dalga boyu seçimi yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda, safsızlıkların büyük çoğunluğunun 230 nm altında maksimum absorpsiyon gösterdiği ve 214 nm dalga boyunun analiz için optimum olduğu belirlenmiştir. Daha düşük dalga boylarında sinyal şiddeti artmasına rağmen, temel gürültünün artması nedeniyle ideal dedeksiyon dalga boyu olarak 214 nm belirlenmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 4.5' de verilmiştir.

Yöntem geliştirme sürecinin erken aşamasında, analitik yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmaları hızlı analiz süresi, solvent tüketiminin azaltılması ve yüksek ayırma performansı gibi hedeflerle başlatılmıştır. Bu amaçla UHPLC sistemi tercih edilmiştir. İlk olarak kısa kolon uzunluğuna sahip Waters Acquity Premier BEH C18 kolon (50 mm × 2.1 mm, 1.7 µm) test edilmiştir. Ancak, bu kolonun tüm safsızlıkları yeterince ayıramadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, daha uzun ve ayırma gücü daha

yüksek olan 150 mm uzunluğunda Waters BEH C18 kolon (150 mm × 2.1 mm, 1.7 µm) tercih edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, bu kolonun safsızlıklar ve ana madde arasında etkili bir çözünürlük sağladığı görülmüştür.

Yöntem geliştirme aşamasında, karglumik asidin pKa değerleri (2.50, 3.55 ve 8.60) dikkate alınarak, hareketli faz pH aralığı olarak 2.5–3.5 belirlenmiş ve ilk testler izokratik koşullarda fosfat tamponu (pH 2.8) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda elde edilen kromatogramlarda özellikle piroglutamik asit ve ilgili bileşik A (HPA) arasındaki çözünürlüğün yeterli olmadığı gözlenmiştir. Bu durumun giderilmesi amacıyla, hareketli faz pH'sı, kolon sıcaklığı ve akış hızı gibi kritik parametrelerin etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu parametrelerin safsızlıklar ve karglumik asit ayrımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiş, pH değerinin safsızlıklar arasındaki çözünürlüğü belirgin şekilde etkilediği saptanmıştır.

Sonuç olarak, erken aşama yöntem geliştirme çalışmaları, temel kromatografik parametrelerin belirlenmesine ve sonraki optimizasyon süreçlerine yön vermiştir. Box-Behnken deney tasarımına temel teşkil edecek kritik parametreler olarak kolon sıcaklığı, akış hızı ve hareketli faz pH değeri belirlenmiştir. Böylece yöntem geliştirme sürecinde daha etkin ve verimli sonuçların elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu denemelerde elde edilen yönteme ait kromatogram Şekil 4.10'da verilmiştir.



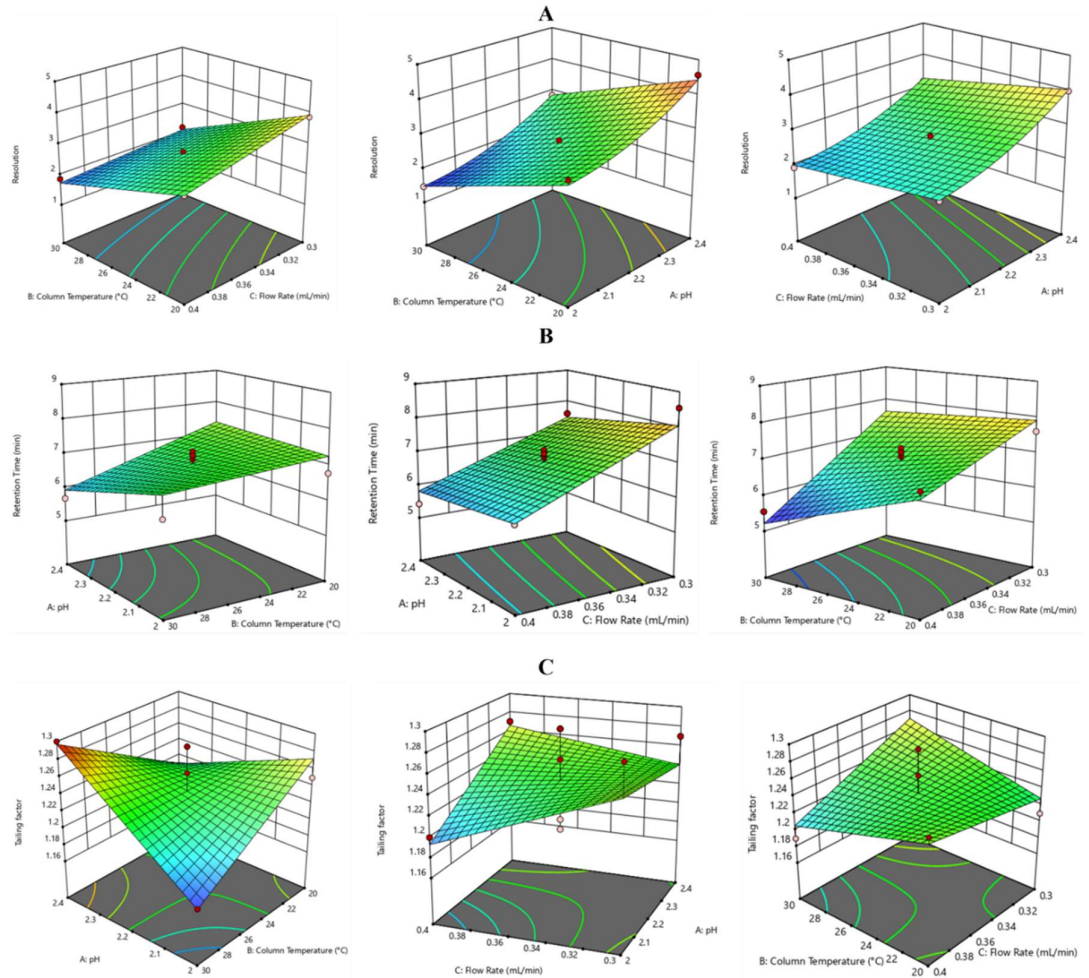
**Şekil 4.10.** Yöntem geliştirme çalışmalarının erken aşamalarında Karglumik Asit ve bilinen safsızlıklarının ayrımı.

### 4.2.3. Box-Behnken Deney Tasarımı ile Optimizasyon Sonuçları

UHPLC-DAD metodu geliştirme sürecinde optimum kromatografik koşulların belirlenmesi için Box-Behnken deney tasarımı (Box-Behnken Design, BBD) kullanılmıştır. Bu optimizasyon çalışması, üç kritik parametre üzerine odaklanmıştır: hareketli fazın pH değeri, kolon sıcaklığı ve akış hızı. Deney tasarımı için hareketli faz pH'sı 2,0-2,4 aralığında, kolon sıcaklığı 20-30 °C aralığında ve hareketli faz akış hızı 0,30-0,40 mL/dak aralığında belirlenmiştir.

Box-Behnken tasarımı kullanılarak toplam 17 deney gerçekleştirilmiş, bu deneylerin sonucunda elde edilen veriler kullanılarak kritik kalite parametreleri açısından analizler yapılmıştır. Bu parametreler; piroglutamik asit ile ilişkili bileşen A (HPA) arasındaki çözünürlük, toplam analiz süresi ve karglumik asit pik kuyruklanma faktörü olarak belirlenmiştir. Tasarım sonucunda oluşturulan regresyon modelleri, parametreler arası ilişkileri ifade eden ikinci dereceden denklemlerle tanımlanmıştır. Analizler sonucunda elde edilen verilere göre oluşturulan cevap yüzey grafikleri, optimum koşulların belirlenmesinde önemli rol oynamıştır.

Optimizasyon çalışmalarının sonucunda elde edilen nihai analitik koşullar şu şekildedir: hareketli faz pH değeri 2,4, kolon sıcaklığı 22 °C ve hareketli faz akış hızı 0,39 mL/dak olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda safsızlıklar ve karglumik asit arasında yeterli ve uygun çözünürlük sağlanırken, analiz süresi mümkün olan en kısa süreye indirilmiştir. Bu sayede hem analizlerin verimliliği artırılmış hem de laboratuvar maliyetleri ve çevresel etkileri azaltılmıştır. Deneysel tasarım yaklaşımı, geleneksel yöntem geliştirme süreçlerine kıyasla önemli miktarda zaman ve maliyet tasarrufu sağlayarak, yöntem geliştirme sürecinin etkinliğini artırmıştır. Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen yüzey analizi sonuçları Şekil 4.11'te verilmiştir ve devamında bu analizlerin denklemleri görülmektedir. Deney tasarımına ait bağımsız ve bağımlı değişkenlerin tablosu Tablo 4.20'de verilmiştir.



**Şekil 4.11.** Ayırıcılık (A), Alıkonma Zamanı (B) ve Kuyruklanma Faktörü (C) için Box-Behnken Tasarımı Yanıt Yüzeyi grafikleri

$$\begin{aligned} \text{Ayırıcılık (Rs)} = & + 2.68 + 0.7013 \times A - 0.7725 \times B - 0.3188 \times C - 0.0125 \times AB \\ & - 0.0650 \times AC + 0.1425 \times BC + 0.2629 \times A^2 \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Alıkonma Zamanı (RT)} \\ = & + 6.87 - 0.2200 \times A - 0.4438 \times B - 0.9063 \times C - 0.2825 \times AB \\ & + 0.0675 \times BC + 0.3050 \times BC \end{aligned} \quad (2)$$

Kuyruklanma Faktörü (Tf)

$$= +1.24 + 0.0138 \times A - 0.0012 \times B - 0.0100 \times C - 0.0450 \times AB \\ - 0.0225 \times BC + 0.0225 \times BC$$

(3)

**Tablo 4.20.** Box-Behnken kısıtlama ve önem belirleme tablosu

Bağımsız değişken	Aralık	kısıtlama	önem
Hareketli faz pH'sı	2.0 – 2.4	Aralıkta	+++
Akış hızı (mL/min)	0.30 – 0.40	Aralıkta	+++
Kolon sıcaklığı (°C)	20 – 30	Aralıkta	+++
Bağımlı Değişkenler		kısıtlama	önem
Ayırıcılık		Maksimum	+++++
Alıkonma zamanı		Minimum	+++
Kuyruklanma zamanı		hedef=1	+++

#### 4.2.4. Sistem Uygunluk Testleri

Analitik yöntemin güvenilirliğini ve performansını değerlendirmek için sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler, yöntemin doğruluk, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik açısından yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, safsızlık seviyesi limit derişiminde safsızlık eklenmiş çözelti ve karglumik asit standart çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltiler, aynı örnek vialinden ardışık altı kez enjektörde edilerek sistemin uygunluğu test edilmiştir.

Analizler sonucunda, tüm pik alanları için bağıl standart sapma (BSS) değeri  $\leq 2\%$  olarak hesaplanmıştır. Bu düşük varyasyon, yöntemin yüksek tekrarlanabilirlik sunduğunu göstermektedir. Ayrıca, sistem uygunluğu değerlendirmesi kapsamında şu kromatografik parametreler incelenmiştir:

- Teorik Plak Sayısı (N): Kolon verimliliğini belirlemek için hesaplanmış olup, tüm pikler için 2000'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu değer, kolon performansının yeterli olduğunu ve piklerin iyi ayrıldığını göstermektedir.

- Pik Kuyruklanma Faktörü (T): Piklerin simetrikliğini değerlendirmek için hesaplanmıştır. Tüm bileşenler için kuyruklanma faktörü 2'nin altında bulunmuş olup, ideal simetrik pikler elde edilmiştir.
- Kapasite Faktörü ( $k'$ ): Bileşenlerin alıkonma süresini değerlendirmek amacıyla hesaplanmış ve her bileşen için kapasite faktörünün 2'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum, bileşenlerin kolon üzerinde uygun ayırım sağladığını ve birbirleriyle çakışmadığını göstermektedir.
- Çözünürlük ( $R_s$ ): Her bir safsızlığın ayırım gücü değerlendirilmiş ve tüm safsızlıklar için çözünürlük değerinin 2'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, safsızlıkların karglumik asitten ve birbirlerinden yüksek çözünürlükle ayrıldığını doğrulamaktadır.

Sistem uygunluğu testlerinin daha ayrıntılı sonuçları Tablo 4.21'de sunulmuştur. Tüm bu veriler, geliştirilen UHPLC-DAD yönteminin hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir bir analitik araç olduğunu göstermektedir. Böylece, yöntemin farmasötik kalite kontrol uygulamalarında güvenle kullanılabileceği doğrulanmıştır.

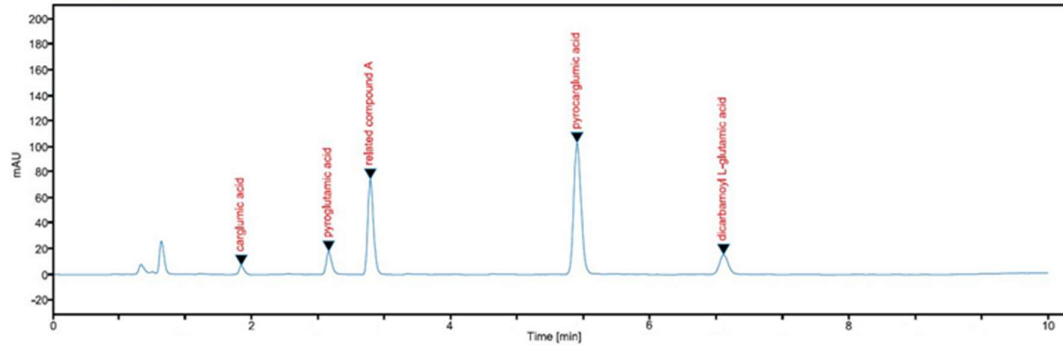
**Tablo 4.21.** Validasyon sistem uygunluk sonuçları.

Pik Adı	Ortalama Alan	Alan için % BSS ( $n = 6$ )	Plaka Sayısı	Ayırıcılık	Kuyruklanma Faktörü	Kapasite Faktörü ( $k'$ )
Karglumik asit	17.39	0.21	3578	-	1.21	2.11
Piroglutamik asit	48.60	0.15	5207	5.71	1.20	3.24
İlgili Bileşik A	60.96	0.11	6418	7.74	1.27	3.76
Pirokarglumik asit	184.01	0.08	6140	7.41	1.24	6.05
Dikarbamoil L-glutamik asit	342.90	0.12	5879	12.33	1.10	7.67

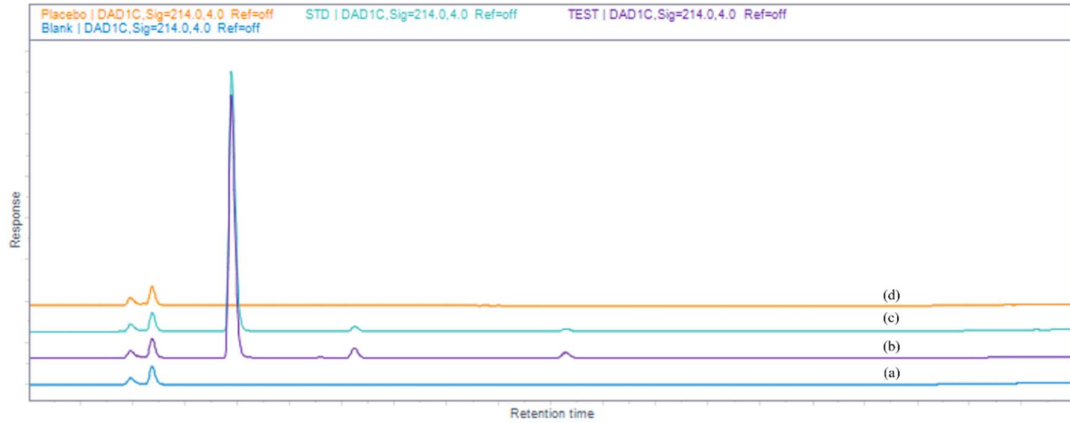
#### 4.2.5. Seçicilik

Bu çalışma, karglumik asit (9600 µg/mL) ve safsızlıklarının (40 µg/mL) pikleri arasında herhangi bir girişim oluşmadığını göstermiştir. Aynı zamanda, kör (blank) çözelti, plasebo, standart ve test çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırıldığında, analiz edilen bileşenler arasında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Bu durum, yöntemin yüksek seçiciliğe ve özgülüğe sahip olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.12 ve 4.13).

Bu çalışmada, miktar tayini için kullanılacak standart çözeltiler ve limit derişiminde zenginleştirilmiş çözeltiler hazırlanarak analiz edilmiştir. Yöntemin doğruluğunu ve stabiliteye duyarlılığını değerlendirmek amacıyla zorlanmış bozunma çalışmaları gerçekleştirilmiş ve karglumik asidin çeşitli bozunma koşulları (asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik) altında stabilitesini belirlemek için test edilmiştir. Bu analizler, yöntemin stabilite-İndikatör (stability-indicating) özellik taşıdığını ve bozunma ürünleri ile ana bileşik arasında yeterli çözünürlük sağlandığını kanıtlamıştır. Sonuçlar, yöntemin farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir bir şekilde uygulanabileceğini ve stabilite testleri için uygun bir analitik yaklaşım sunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Karglumik asit ve safsızlık piklerinin konumlarını gösteren kromatogram.



**Şekil 4.13.** Kör çözelti (a), plasebo (d), standart çözelti (c) ve test çözeltisi (b) kromatogramlarının üst üste çakıştırılmış görünümü.

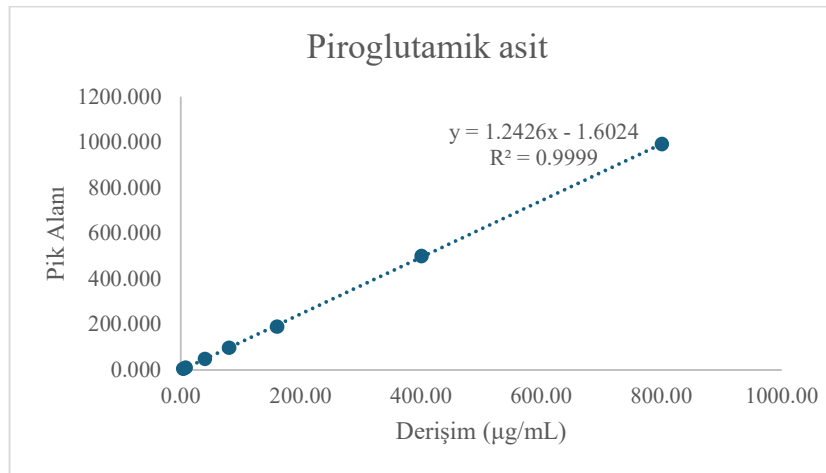
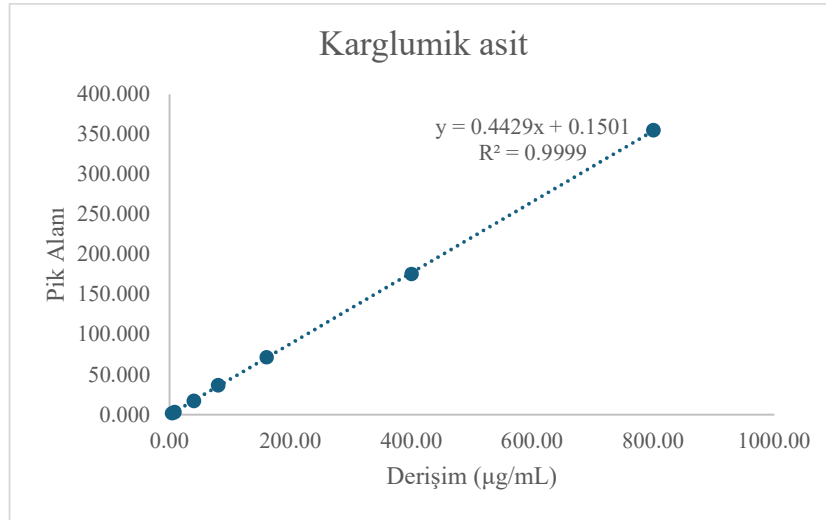
#### 4.2.6. Doğrusallık, Doğruluk ve Kesinlik Sonuçları

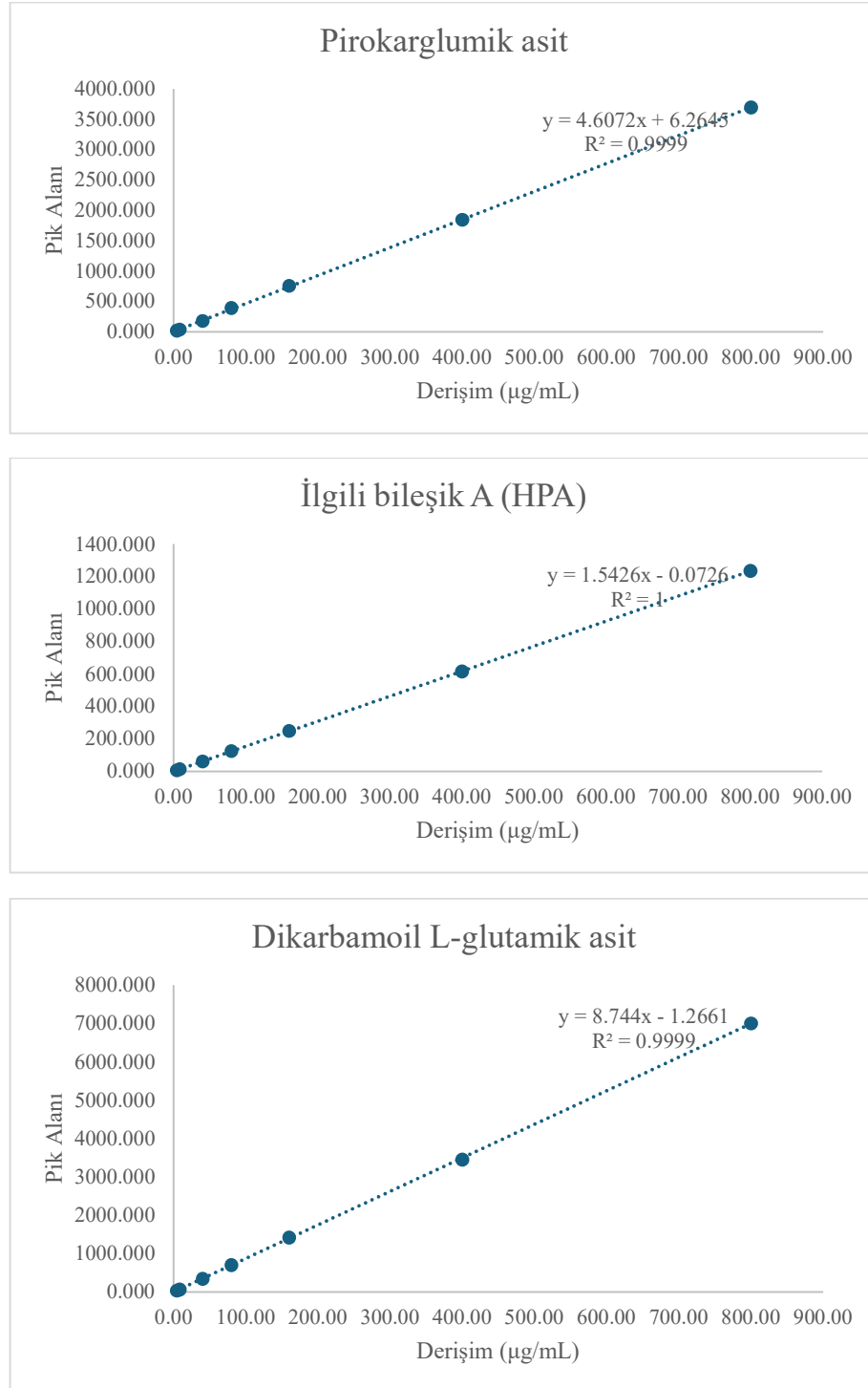
Karglumik asit analizi, 4 - 9600 µg/mL (% 0.05 - %120) derişim aralığında gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma aralığı hem safsızlık analizi hem de miktar tayini analizleri için uygun bulunmuştur. Bu geniş dinamik aralık, yöntemin hem düşük seviyedeki safsızlıkları tespit edebilmesini hem de etkin madde miktar tayini için doğrusal bir yanıt verebilmesini sağlamaktadır. Elde edilen doğrusal regresyon analizinde  $R^2$  değeri 1.0000 olarak belirlenmiş ve yöntemin mükemmel bir doğrusal ilişkiye sahip olduğu doğrulanmıştır.

Verilerin istatistiksel uygunluğunu değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiş ve ilgili sonuçlar aşağıdaki tablo da paylaşılmıştır. Doğrusallık modelinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek için P-değerleri incelenmiş ve kesme noktası ile x değişkeninin eğimi için istatistiksel kontrol kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterler şu şekilde oluşturulmuştur:

- Kesme Noktası için  $p > 0.05$  olması: Modelin sıfırdan sapmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir, yani doğrusal regresyonun kesme noktasının analiz doğruluğunu etkilemediğini ifade eder.
- X değişkeni (eğim) için  $p < 0.05$  olması: Bağımsız değişken olan derişimin sinyal yanıtı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğunu gösterir. Regresyon analizini içeren bu sonuçlar aşağıda Tablo 4.10' da verilmiştir.

Bu kriterler analiz edilen verilerde sağlanmış olup, yöntemin doğrusallık (linearity) açısından istatistiksel olarak geçerli ve güvenilir olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, yöntemin farmasötik kalite kontrol süreçlerinde hem düşük seviyeli safsızlık tespiti hem de yüksek hassasiyetli etkin madde miktar tayini için uygun olduğunu göstermektedir (Şekil 4.14).





**Şekil 4.14.** Karglumik asit ve safsızlıklarının doğrusallık sonuçları.

Doğrusallık grafikleri, yöntemin belirlenen derişim aralığında doğrusal yanıt verip vermediğini değerlendirmek için oluşturulmuştur. Yukarıda sunulan grafikler,

analitik yöntemin doğrusal olup olmadığını test etmek amacıyla regresyon analizine dayanmaktadır. Elde edilen veriler incelendiğinde, regresyon katsayısının  $R^2 \geq 0.999$  olduğu görülmüş, bu da yöntemin doğrusal bir yanıt verdiğini göstermiştir.

İstatistiksel analizlerde, regresyon doğrusunun eğimi ve kesme noktası değerlendirilmiş ve p-değerleri belirlenmiştir. Kesim noktası için  $p > 0.05$  bulunması, modelin sıfırdan anlamlı bir sapma göstermediğini ve doğrusal regresyonun güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır. Bağımsız değişkenin eğimi için  $p < 0.05$  değeri ise, analit derişiminin dedektör yanıtı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğunu doğrulamaktadır. İstatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.22’de verilmiştir.

Bu doğrusal ilişki, yöntemin farmasötik analizlerde yüksek duyarlılık ve hassasiyetle kullanılabileceğini göstermektedir. Doğrusallık değerlendirmesi, yöntemin belirlenen derişim aralığında güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar sağladığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, çalışma aralığının genişliği, yöntemin hem düşük seviyeli safsızlık analizleri hem de etkin madde miktar tayini için uygun olduğunu desteklemektedir

**Tablo 4.22.** Karglumik asit ve safsızlıkları için Regresyon İstatistikleri sonuçları.

Bileşik	Gözlem Sayısı (n)	Eğri Denklemi (Alan = $k \cdot C + b$ )	R <sup>2</sup>	Eğim k (%95 GA)	Kesişim b (%95 GA)	p (eğim)	Std. Hata
Karglumik asit	7	0.4429 C + 0.150	0.9999	0.4390 – 0.4468	–1.185 – 1.485	$8.6 \times 10^{-12}$	1.08
Piroglutamik asit	7	1.2426 C – 1.602	0.9999	1.2286 – 1.2567	–6.455 – 3.250	$3.1 \times 10^{-11}$	3.93
Pirokarglumik asit	7	4.6072 C + 6.264	0.9999	4.5668 – 4.6476	–7.688 – 20.217	$8.8 \times 10^{-12}$	11.29
İlgili Bileşik A	7	2.9867 C + 6.476	0.9999	2.9644 – 3.0089	–5.391 – 18.344	$3.9 \times 10^{-12}$	9.61
Dikarbamoil L-glutamik asit	7	5.6685 C – 0.881	0.99997	5.6303 – 5.7067	–21.211 – 19.448	$2.3 \times 10^{-12}$	16.46

Safsızlıkların yüksek maliyeti nedeniyle, harici standart yöntemi (external standard method) yerine, safsızlıkların analizini bağıl yanıt faktörü (Relative Response Factor, RRF) kullanarak değerlendirme kararı alınmıştır. Bu yaklaşım, karglumik asit pikine referansla safsızlıkların nicel tayinini sağlamaktadır ve farmasötik analizlerde sıkça tercih edilen, maliyet etkin bir yöntemdir. RRF hesaplamaları, 4 - 800 µg/mL (% 0.05 - %10.00) derişim aralığında analiz edilen örneklerin eğim değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RRF yöntemi, her bir safsızlığın dedektöre verdiği sinyalin karglumik asit ile karşılaştırılarak normalize edilmesini sağlamaktadır. Bu sayede, saf safsızlıkların standart çözeltilerinin hazırlanmasına gerek kalmadan, karglumik asit ana bileşigi referans alınarak safsızlık miktarlarının belirlenmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca, yöntemin doğruluğunu artırmak ve sistematik hataları en aza indirmek için, analiz edilen safsızlıkların pik eğimlerinin karglumik asit pik eğimine oranlanması sağlanmıştır.

Elde edilen RRF değerleri, yöntemin nicel doğruluğunu değerlendirmek ve farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir bir safsızlık profillemesi sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu analizlerin sonuçları detaylı olarak Tablo 23'de sunulmuştur. Yapılan çalışmalar, RRF yaklaşımının tekrar üretilebilir, hassas ve maliyet açısından verimli bir alternatif yöntem olduğunu ve farmasötik analizlerde safsızlıkların güvenilir bir şekilde belirlenmesine olanak tanıdığını göstermiştir.

**Tablo 4.23.** Karglumik asit safsızlıkları için bağıl yanıt faktörü sonuçları.

Molekül adı	R <sup>2</sup>	Eğim	Bağıl Yanıt Faktörü (RRF)
Karglumik asit	0.9999	0.4429	1.0
Piroglutamik asit	0.9999	1.2426	2.8
İlgili bileşik A	1.0000	1.5426	3.5
Pirokarglumik asit	0.9999	4.6072	10.4
Dikararbamoil L-glutamik asit	0.9999	8.744	19.7

Yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, 4 µg/mL (%0.05), 8000 µg/mL (%100) ve 9600 µg/mL (%120) derişimlerinde üç farklı karglumik asit örneği hazırlanarak analiz edilmiştir. Bu çalışmalar, farmasötik formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin (plasebo) etkisini değerlendirmek amacıyla, plasebo ile etken madde + plasebo içeren numuneler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Doğruluk çalışmaları, yöntemin analit geri kazanımını doğru ve güvenilir şekilde ölçüp ölçemediğini belirlemek için kritik bir aşamadır. Analiz edilen her derişim seviyesi için elde edilen geri kazanım yüzdeleri, %98 - %102 aralığında bulunmuş ve bu değerler, farmasötik kalite kontrol analizlerinde kabul edilen kriterlerle uyumlu olduğu için yöntem doğruluğunun yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar Tablo 4.24' de verilmiştir.

Bu değerlendirme sırasında, geri kazanım oranlarının plasebo bileşenlerinin varlığına rağmen herhangi bir sistematik hata veya matris etkisinden etkilenmediği doğrulanmıştır. Aynı zamanda, tüm derişim seviyelerinde bağıl standart sapma (BSS) ≤ %2 olacak şekilde düşük varyasyon elde edilmiştir. Bu sonuçlar, yöntemin farklı analit seviyelerinde tutarlı ve doğru ölçümler sağlayabildiğini ve farmasötik ürünlerin kalite kontrol süreçlerinde güvenle uygulanabileceğini göstermektedir.

**Tablo 4.24.** Doğruluk analizi sonuçları

Karglumik Asit	Hesaplanan Miktar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	BSS (%)
Doğruluk Çözeltisi (%0.05-1)	4.05	101.28	100.34	0.85
Doğruluk Çözeltisi (%0.05-2)	3.98	99.62	$\pm 0.34$	
Doğruluk Çözeltisi (%0.05-3)	4.00	100.11		
Doğruluk Çözeltisi (%100-1)	8055.06	100.69	100.10	0.55
Doğruluk Çözeltisi (%100-2)	7967.96	99.60	$\pm 0.10$	
Doğruluk Çözeltisi(%100-3)	8000.01	100.00		
Doğruluk Çözeltisi (%120-1)	9630.01	100.31	100.08	0.83
Doğruluk Çözeltisi (%120-2)	9674.06	100.77	$\pm 0.08$	
Doğruluk Çözeltisi(%120-3)	9519.01	99.16		

Kesinlik değerlendirilirken, yöntemin tekrar üretilebilirliğini ve güvenilirliğini belirlemek amacıyla altı farklı örnek eş zamanlı olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar, bağıl standart sapma (BSS)  $\leq$  %2 olacak şekilde hesaplanmıştır. Bu düşük varyasyon, yöntemin kısa vadeli tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu ve ölçüm sonuçlarının tutarlı olduğunu göstermektedir.

Ara kesinlik çalışmalarında ise, yöntemin farklı laboratuvar koşullarında aynı doğrulukla çalışıp çalışmadığını değerlendirmek amacıyla ek testler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, analizler farklı bir analitik kolon (aynı marka, ancak farklı üretim serisine ait kullanılarak, bir gün sonra ve farklı bir HPLC cihazında tekrar edilmiştir. Tüm analizler sonucunda, farklı cihaz ve kolon kullanımlarına rağmen % BSS değerinin 2'nin altında kaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, yöntemin cihazlar ve analitik sistemler arasında yüksek derecede tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Kesinlik ve ara kesinlik sonuçlar Tablo 4.25 - 4.28'de verilmiştir.

Ayrıca, yapılan analizler arasındaki istatistiksel farklılıkları değerlendirmek amacıyla t-testi ve F-testi uygulanmıştır. Bu testlerin sonuçları, ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermiştir. Bu bulgular,

yöntemin farmasötik kalite kontrol süreçlerinde güvenilir, tekrarlanabilir ve tutarlı bir analitik yaklaşım sunduğunu doğrulamaktadır.

**Tablo 4.25.** Safsızlık kesinlik sonuçları

Kesinlik	Karglumik asit (%)	Piroglutamik asit (%)	İlgili Bileşik A (HPA) (%)	Pirokarglumik asit (%)	Dikarbamoil L-glutamik asit (%)
Numune-1	99.78	0.13	0.16	0.15	0.13
Numune-2	100.57	0.13	0.16	0.15	0.13
Numune-3	100.59	0.13	0.16	0.15	0.13
Numune-4	98.19	0.12	0.17	0.15	0.13
Numune-5	98.62	0.13	0.17	0.15	0.13
Numune-6	99.77	0.13	0.17	0.14	0.14
Ortalama	99.59	0.13	0.16	0.15	0.13
(%) BSS	1.00	0.99	2.07	4.50	2.10
Mutlak Fark	-	0.00	0.01	0.02	0.01

**Tablo 4.26.** Günler-arası kesinlik sonuçları (ara kesinlik).

Ara Kesinlik	Karglumik asit (%)	Piroglutamik asit (%)	İlgili Bileşik A (HPA) (%)	Pirokarglumik asit (%)	Dikarbamoil L-glutamik asit (%)
Numune-1	97.99	0.13	0.19	0.16	0.14
Numune-2	97.93	0.13	0.19	0.16	0.14
Numune-3	98.25	0.13	0.19	0.16	0.14
Numune-4	97.70	0.13	0.20	0.16	0.14
Numune-5	99.63	0.13	0.21	0.17	0.14
Numune-6	98.67	0.13	0.22	0.14	0.14
Ortalama	98.36	0.13	0.20	0.16	0.14
(%) BSS	0.71	1.31	5.68	5.97	1.26
Mutlak Fark		0.00	0.03	0.03	0.00

**Tablo 4.27.** Günler arası kesinlik kıyaslama tablosu.

	Miktar Tayini (%)	Piroglutamik asit (%)	İlgili Bileşik A (HPA) (%)	Pirokarglumik asit (%)	Dikarbamoil L-glutar asit (%)
Kesinlik	99.6	0.13	0.16	0.15	0.13
Ara Kesinlik	98.4	0.13	0.20	0.16	0.14
Ortalama (%)	98.98	0.13	0.18	0.15	0.14
(%) BSS	0.87	2.96	14.48	4.92	4.82
Mutlak Fark	-	0.01	0.04	0.01	0.01

**Tablo 4.28.** Günler arası farkın f-test ve t-test ile değerlendirilmesine dair sonuçlar.

	Değişken 1	Değişken 2
Ortalama	99.59	98.36
Variance	0.99	0.50
Gözlemler	6	6
df	5	5
F	1.99	
P(F<=f) one-tail	0.23	
F Critical one-tail	5.05	

#### 4.2.7. DL ve QL Değerlendirmeleri

Tayin Limiti (QL) ve Tespit Limiti (DL) değerleri, S/N oranları dikkate alınarak hesaplanmış olup, QL değeri 0.7 µg/mL, DL değeri ise 0.15 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değerler, yöntemin düşük derişim seviyelerinde bile hassasiyetini koruyarak analit sinyalini arka plan gürültüsünden ayırt edebildiğini göstermektedir.

Yöntemin alt tayin limiti (QL) seviyesinde tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, QL seviyesinde hazırlanan çözelti ardışık 6 kez enjekte edilmiş ve elde edilen pik alanlarının bağıl standart sapma (BSS) değeri hesaplanmıştır. BSS değerinin %2'nin altında bulunması, yöntemin düşük derişim seviyelerinde bile yüksek

tekrarlanabilirlik sunduğunu ve analit sinyalinin güvenilir bir şekilde ölçülebileceğini doğrulamıştır.

Ayrıca, DL seviyesinde hassasiyet değerlendirmesi yapmak amacıyla, DL seviyesindeki çözelti ardışık iki kez enjekte edilmiş ve elde edilen S/N değerleri kıyaslanmıştır. Bu değerlendirme, yöntemin tespit sınırında bile analitin sinyalini baz hat gürültüsünden istikrarlı bir şekilde ayırt edebildiğini ve yöntemin dedeksiyon limitlerinin güvenilir olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmaların sonuçları detaylı olarak Tablo 29’da sunulmuştur. Elde edilen bulgular, geliştirilen UHPLC-DAD yönteminin farmasötik analizlerde düşük derişim seviyelerinde dahi güvenilir tespit ve tayin sınırları sunduğunu, dolayısıyla safsızlık analizleri ve safsızlık profillemesi gibi kritik kalite kontrol uygulamalarında etkin bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir.

**Tablo 4.29.** Tayin ve Tespit limiti sonuçları.

Tekrar	Alan	S/N
QL 1	6.0	14.2
QL 2	6.1	14.0
QL 3	5.9	14.1
QL 4	6.0	14.1
QL 5	6.1	14.2
QL 6	6.0	14.0
DL 1	1.5	2.1
DL 2	1.6	2.2
QL Ortalama $\pm$ SS (%BSS) 6.02 $\pm$ 0.08 (1.37%) 14.1 $\pm$ 0.1 (0.56%)		
DL Ortalama $\pm$ SS (%BSS) 1.55 $\pm$ 0.07 (4.71%) 2.2 $\pm$ 0.1 (3.23%)		

#### 4.2.8. Sağlamlık Analizi (Plackett-Burman)

İstatistiksel deney tasarımı, yöntemin sağlamlık parametrelerini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Bu kapsamda, Plackett-Burman deney

tasarımı kullanılarak, kromatografik koşullarda yapılan her bir değişikliğin analitik sonuçlar üzerindeki istatistiksel önemi incelenmiştir. Plackett-Burman tasarımı, yüksek verimlilik sunan ve en az deney sayısı ile en fazla faktörün etkisini değerlendirmeye olanak tanıyan bir deneysel yaklaşımdır. Bu yöntem sayesinde, UHPLC-DAD analizlerinde küçük değişimlerin yöntem performansına olan etkisi sistematik bir şekilde incelenmiştir.

Çalışmada, her bir parametre için ayrı ayrı standart çözelti ve test çözeltisi hazırlanarak enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, yöntemin sağlamlık açısından güvenilir olup olmadığını değerlendirmek ve küçük değişikliklerin analitik performansı nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Kromatografik koşullarda gerçekleştirilen değişiklikler ve deney tasarımına ilişkin bilgiler detaylı olarak Tablo 30'da sunulmuştur. Ayrıca, analiz sonuçlarına ilişkin veriler Tablo 31'de yer almaktadır.

Plackett-Burman sağlamlık değerlendirmesi, çalışılan dört kritik kromatografik parametrenin (dedeksiyon dalga boyu, kolon sıcaklığı, akış hızı ve hareketli faz pH'sı) hem etken madde hem de seçilen beş safsızlık üzerindeki istatistiksel etkilerini ortaya koymaktadır.

- Karglumik asit miktar tayini için tüm tekil faktörlerin p-değerleri 0.41–0.95 aralığında olup istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Buna rağmen modelin  $R^2 = 0.7812$  değeri, varyansın % 78'inin açıklanabildiğini, dolayısıyla yöntemin nicel doğruluğunda incelenen parametrelerin topluca ölçülü bir etkisi bulunduğunu göstermektedir.
- İlgili bileşik A ve pirokarglumik asit safsızlıkları, özellikle hareketli faz pH'ına duyarlı olup sırasıyla  $p = 0.028$  ve  $p = 0.008$  değerleriyle istatistiksel anlamlılık sınırının altındadır. Bu bulgu, düşük derişimlerde dahi pH değişiminin bu iki pik için ayırım ve/veya yanıt şiddetini etkileyebileceğini, dolayısıyla tampon pH'ının sıkı kontrolünün kritik olduğunu vurgular. Her iki modelin  $R^2$  değerleri (0.6102 ve 0.6951) orta-derecede açıklayıcılık sağlar.

- Dikarbamoil L-glutamik asit için faktörlerin tamamı sınırdadır ( $p \approx 0.10$ ) olup model p-değeri 0.125'tir;  $R^2 = 0.6000$ , parametrelerin birleşik etkisinin sınırlı ama göz ardı edilemeyecek düzeyde olduğunu gösterir.
- Piroglutamik asit ve toplam safsızlıklar için hem tekil faktörler hem de genel model p-değerleri anlamlılık eşiğinin üzerindedir ( $p > 0.37$ ) ve özellikle pirolglutamik asitte  $R^2 = 0.1869$  gibi oldukça düşük bir değer elde edilmiştir. Bu durum, söz konusu yanıtın büyük oranda çalışma dışı değişkenlerden etkilendiğini veya mevcut varyasyon aralığının bu pikler üzerinde kayda değer bir değişim oluşturmadığını düşündürür.

Genel olarak değerlendirildiğinde, çalışılan faktörler karglumik asit ana pikinde ve çoğu safsızlıkta istatistiksel açıdan önemli bir değişime yol açmamış, yalnızca pH'nın iki safsızlık üzerinde anlamlı etkisi saptanmıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen UHPLC yöntemi için yüksek düzeyde sağlamlık sağlandığını; ancak pH kontrolünün özellikle ilgili bileşik A ve pirokarglumik asit piklerinin tayininde kritik parametre olarak ele alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

**Tablo 4.30.** Sağlamlık alışması koşulları.

Parametreler	Seviye		
	Duşuk (-)	Gerçek	Yüksek (+)
Dalgaboyu (nm)	212	214	216
Kolon sıcaklığı (°C)	24.2	25	25.8
Akış hızı (mL/min)	0.38	0.39	0.40
Hareketli faz pH değeri	2.3	2.4	2.5

Koşullar				
Enjeksiyon	Dalgaboyu (nm)	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (mL/min)	Hareketli faz pH değeri
1	+	+	-	+
2	+	-	-	-
3	-	+	-	+
4	-	+	+	-
5	-	-	+	-
6	+	+	-	-
7	-	+	+	+
8	+	-	+	+
9	+	+	+	-
10	-	-	-	-
11	+	-	+	+
12	-	-	-	+

**Tablo 4.31.** Sağlamlık çalışması istatistiksel deney tasarımı sonuçları.

Results	Elde edilen <i>P</i> Değerleri					R <sup>2</sup>
	Dalgabo yu	Kolon Sıcaklığı	Akış Hızı	Hareketli faz pH değeri	Model	Model Değeri
Karglumik asit miktar tayini (%)	0.415	0.652	0.771	0.951	0.512	0.7812
İlgili Bileşik A (%)	0.598	0.142	0.598	0.028	0.116	0.6102
Pirokarglumik asit	0.879	0.197	0.454	0.008	0.054	0.6951
Dikarbamoil L- glutamik asit	1.000	0.104	0.104	0.104	0.125	0.6000
Piroglutamik asit	0.423	0.785	0.785	0.423	0.802	0.1869
Toplam İmpürteler	0.415	0.127	0.536	0.415	0.378	0.4134

#### 4.2.9. Çözelti Stabilesi ve Filtre Seçimi Sonuçları

Analiz çözeltilerinin stabilesini değerlendirmek amacıyla, 4°C'de otoörnekleyicide saklanan numuneler belirli zaman aralıklarında analiz edilmiştir. Bu çalışmanın amacı hem örnek çözeltilerinin hem de standart çözeltilerin belirli bir süre boyunca bozunmadan kalıp kalmadığını belirlemektir. Yapılan analizler sonucunda, numune ve standart çözeltilerin 48 saat boyunca stabil kaldığı tespit edilmiştir. Çalışmaya ait detaylı sonuçlar validasyon sonuçları Tablo 4.32'de sunulmuştur.

**Tablo 4.32.** Test ve standart çözeltiler için çözelti stabilitesi sonuçları.

Safsızlık eklenmiş test çözeltisi											Standart Çözelti	
Zaman (Saat)	Piroglutamik asit		İlgili Bileşik A (HPA)		Pirokarglumik asit		Dikarbamoil L- glutamik asit		Karglumik asit		Karglumik asit	
	Pik Alanı	% Değişim	Pik Alanı	% Değişim	Pik Alanı	% Değişim	Pik Alanı	% Değişim	Pik Alanı	% Değişim	Pik Alanı	% Değişim
0	49.11	-	62.15	-	182.14	-	339.91	-	3488.05	-	3495.05	-
2	49.05	0.12	62.25	0.16	182.85	0.39	338.11	0.53	3491.41	0.10	3495.55	0.01
4	49.01	0.20	62.10	0.08	182.25	0.06	338.55	0.40	3490.62	0.07	3495.01	0.00
6	48.95	0.33	62.01	0.23	182.44	0.16	339.05	0.25	3487.05	0.03	3490.05	0.14
8	49.17	0.12	61.85	0.48	182.05	0.05	338.15	0.52	3486.02	0.06	3491.61	0.10
12	48.61	1.02	61.71	0.71	181.12	0.56	335.95	1.17	3481.09	0.20	3481.02	0.40
24	48.55	1.14	61.55	0.97	180.10	1.12	334.05	1.72	3475.11	0.37	3478.43	0.48
36	48.50	1.24	61.03	1.80	179.55	1.42	334.12	1.70	3469.02	0.55	3469.04	0.74
48	48.32	1.61	60.98	1.88	178.96	1.75	334.25	1.67	3461.97	0.75	3468.88	0.75

Analiz öncesinde, formülasyonda bulunan çözünmeyen plasebo bileşenleri nedeniyle numunenin filtre edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. HPLC kolonu üzerinde olası bloke oluşumunu önlemek ve analiz sonuçlarında doğruluğu sağlamak için farklı filtre türleri test edilerek, etkin madde ve safsızlık açısından herhangi bir adsorpsiyon olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla, hidrofilik PTFE (Politetrafloroetilen), Naylon (Nylon) ve Selüloz Ester (CE) filtreler kullanılmış ve filtreleme sırasında herhangi bir bileşik kaybı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.33’ de verilmiştir

**Tablo 4.33.** Filtre seçimi sonuçları.

Filtre Seçimi	Test Çözeltileri			
	Filtresiz	Hidrofilik PTFE	CE	Naylon
Enjeksiyon				
1	3495.0	3494.0	3489.1	3440.6
2	3494.1	3497.5	3484.0	3446.1
3	3498.0	3496.0	3481.7	3434.7
4	3491.4	3490.6	3482.3	3440.9
5	3491.9	3491.4	3480.9	3445.3
6	3494.8	3490.2	3480.1	3437.1
Ortalama	3494.2	3493.3	3483.0	3440.8
SS	2.39	3.03	3.26	4.46
RSS (%)	0.07	0.09	0.09	0.13
Uyum(%)	-	99.97	99.71	98.79

Filtre karşılaştırma çalışmaları sonucunda, 0.45 µm hidrofilik PTFE filtresinin numunede bulunan karglumik asit ve safsızlıklar açısından en uygun filtre olduğu belirlenmiş ve tüm analizlerde bu filtrenin kullanılması kararlaştırılmıştır. Hidrofilik PTFE filtresi, yüksek kimyasal uyumluluğu, düşük bağlanma kapasitesi ve farmasötik analizlerde güvenilir bir performans sunması nedeniyle tercih edilmiştir. Filtrasyon sonrası elde edilen kromatogramlar değerlendirilmiş ve herhangi bir adsorpsiyon veya kayıp gözlemlenmemiştir.

İncelemeler, geliştirilen yöntemin numune stabilitesi açısından güvenilir olduğunu ve seçilen filtrasyon yönteminin analitik doğruluk ve tekrarlanabilirlik üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, tüm farmasötik analiz sürecinde hidrofilik PTFE filtresi (0.45 µm) kullanılmıştır.

**Tablo 4.34.** Validasyon sonuçları.

Validasyon Parametreleri	Kabul Kriterleri	Sonuçlar
Sistem Uygunluk	BSS % $\leq 0.85$ altı ardışık enjeksiyon	Uygun (Tablo 4)
Seçicilik	Karglumik asit ile bilinen safsızlıklar arasında, kör çözelti (blank), plasebo veya stres bozunma ürünlerinden kaynaklı herhangi bir girişim gözlenmemiştir.	Girişim Gözlenmedi (Tablo 5 Şekil 6)
Doğrusallık ve Aralık	$R^2 \geq 0.99$ $\geq 0.05$ kesim noktası için $P$ değeri için $\leq 0.05$ x değeri için	Uygun
Doğruluk	4 µg/mL (0.05%) 8000 µg/mL (100%) 9600 µg/mL (120%)	Her bir sonuç 98% - 102% aralığında olmalıdır. her bir enjeksiyon için
Kesinlik	BSS $\leq 2$ N = 6 Hergün ve günler arası	Uygun (Tablo S7 ve Şekil11-12)
DL / QL	LOQ $s/N \geq 10$ (BSS % $\leq 10$ N = 6) LOD $2 \leq s/N \leq 3$	$\bar{x}$ $s/N = 14.1$ (BSS= 0.95) $s/N = 2.1, 2.2$

Tablo 4.32'de sunulan validasyon sonuçları, geliştirilen UHPLC-DAD yönteminin farmasötik kalite kontrol süreçleri için güvenilirliğini ve geçerliliğini doğrulayan kritik parametreleri kapsamaktadır. Sistem uygunluk testleri, altı ardışık enjeksiyon için  $BSS \leq \%0.85$  kriterini sağlamış ve karglumik asit ile safsızlıklar arasında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Özgüllük testleri, boş çözelti (blank), plasebo ve zorlanmış bozunma ürünleri arasında girişim olmadığını ve yöntemin seçici olduğunu ortaya koymuştur.

Doğrusallık ve çalışma aralığı analizlerinde, regresyon katsayısı ( $R^2 \geq 0.99$ ) kriterini sağlamış olup, modelin istatistiksel olarak geçerli olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, P-değerleri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar sunmuş ve doğrusal modelin uygunluğunu göstermiştir. Doğruluk testleri, üç farklı derişim seviyesi (4  $\mu\text{g/mL}$ , 8000  $\mu\text{g/mL}$  ve 9600  $\mu\text{g/mL}$ ) için gerçekleştirilmiş ve geri kazanım yüzdelерinin  $\%98 - \%102$  aralığında olduğu belirlenmiştir.

Kesinlik değerlendirmelerinde hem gün içi hem de günler arası ölçümlerde  $BSS \leq 2\%$  kriterinin sağlandığı doğrulanmıştır. Bu bulgu, yöntemin yüksek tekrarlanabilirlik sunduğunu göstermektedir. Tespit ve tayin limitleri (LOD/LOQ) açısından, LOQ için  $S/N \geq 10$  ve LOD için  $2 \leq S/N \leq 3$  kriterleri sağlanmış, LOQ seviyesi için ortalama S/N değeri 14.1 ( $\% BSS = 0.95$ ) olarak hesaplanmıştır.

Genel olarak, elde edilen veriler yöntemin hassas, doğrusal, seçici ve sağlam olduğunu göstermekte olup, UHPLC-DAD yönteminin karglumik asit içeren farmasötik formülasyonların kalite kontrol süreçlerinde güvenle kullanılabileceğini doğrulamaktadır.

#### **4.2.10. Stres Bozundurma Çalışmaları ve Stabilite Sonuçları**

Yöntem bölümünde tanımlanan asidik, bazik, oksidatif, termal ve ışık bozundurma koşulları, numunelere uygulanmış ve elde edilen bozunma oranları Tablo 4.35'de sunulmuştur. Bu analizlerde, OpenLab yazılımı kullanılarak karglumik asit pikinin çeşitli stres koşulları altındaki  $\%K\ddot{u}t\ddot{u}l\ddot{e} Dengesi$  ( $\%Mass Balance$ ) ve  $\%Saf\ddot{u}k$  ( $\%Purity$ ) değeri hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen zorlanmış bozunma çalışmaları, karglumik asidin farklı bozunma mekanizmalarına karşı stabilitesini değerlendirmeye yönelik olup, farmasötik kalite kontrol süreçlerinde bozunma

ürünlerinin nicel olarak izlenmesini sağlamaktadır. Elde edilen veriler, karglumik asidin belirlenen stres faktörlerine karşı bozunma eğilimlerini ve safsızlık profiline etkilerini ortaya koymuştur.

**Tablo 4.35.** Stres testi çalışmalarının sonuçları.

Stres Bozundurma Koşulları	Bozunma (%)	Kütle Dengesi (%) <sup>a</sup>	Karglumik Asit Pik saflığı (%)
İşlem yapılmamış numune	-	-	99.50
Asit bozundurma (0.1 N HCl 2 Sa)	11.6	98.1	99.08
Baz bozundurma (0.1 N NaOH 2 Sa)	5.2	98.9	98.51
Oksidatif bozundurma (3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 Sa)	8.6	99.5	99.41
Termak bozundurma (90°C 21 gün)	7.6	98.3	99.35
Işık bozundurma (1200 lux)	1.2	99.9	99.47
Hızlandırılmış stabilite numunesi (6 ay 40° 75% Rh)	0.33	98.5	99.04

<sup>a</sup>Kütle dengesi denklemi; % stres uygulanmış numunenin miktar tayini + % safsızlıklar × 100 / % stres uygulanmamış numunenin miktar tayini.

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, karglumik asit içeren tablet formülasyonlarının kalite kontrolü ve ürün stabilitesinin sağlanması amacıyla iki aşamalı analitik yöntem geliştirme ve validasyon süreçleri gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada karglumik asidin miktar tayini ve dissolüsyon analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-DAD), ikinci aşamada ise safsızlıkların tayini için ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC-DAD) yöntemleri geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ve geliştirilen yöntemlerin etkinliği, literatürle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Yöntem geliştirme aşamasında, karglumik asidin miktar tayini için HPLC-DAD yönteminde farklı kolonlar, hareketli faz bileşimleri ve dedeksiyon dalga boyları test edilmiş ve karglumik asidin kimyasal yapısı ve fizikokimyasal özellikleri doğrultusunda ters faz kromatografi (Waters HSS T3 C18 kolon) seçilmiştir. Yapılan sistematik optimizasyon sonucunda hareketli faz olarak fosfat tamponu ve asetonitrilin düşük derişimlerde (%2) kullanılması ile simetrik ve keskin piklerin elde edilmesi sağlanmıştır.

Analitik yöntemin validasyon sürecinde ICH Q2(R2) kılavuzlarına uygun olarak sistem uygunluk testleri, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, sağlamlık, LOD ve LOQ parametreleri değerlendirilmiştir. Doğruluk testlerinde elde edilen %98-102 geri kazanım oranları ve sistem uygunluk testlerindeki %0,85'in altındaki bağıl standart sapma (BSS) değerleri yöntemin güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu doğrulamaktadır.

Dissolüsyon analizlerinde, tablet formülasyonlarının farklı fizyolojik pH koşullarında (pH 1,2; pH 4,5 ve pH 6,8) hızlı ve tam çözündüğü gözlenmiştir. Özellikle pH 6,8 ortamında %90'ın üzerindeki çözünme oranı, formülasyonun klinik biyoyararlanımı açısından olumlu bulunmuştur.

Çözelti stabilitesi çalışmalarında örneklerin 5°C'de 74 saate kadar kararlı olduğu, filtre seçiminde ise 0,45 µm hidrofobik PTFE filtrelerin analit adsorpsiyonunu minimize ederek analitik doğruluğu artırdığı tespit edilmiştir.

İkinci aşamada gerçekleştirilen UHPLC-DAD yöntem geliştirme çalışmaları, safsızlıkların etkili ve hızlı bir şekilde belirlenmesi amacıyla sistematik bir optimizasyon süreciyle gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda kolon sıcaklığı, akış hızı ve hareketli faz pH'ı gibi kritik kromatografik parametreler incelenmiş, deneysel tasarımlar aracılığıyla bu parametrelerin etkileri detaylı olarak analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, kolon sıcaklığının artırılmasıyla safsızlıkların ve ana bileşiğin ayrılmasında belirgin iyileşmeler gözlenmiş; ancak sıcaklık artışının belirli bir düzeyden sonra pik şekilleri ve retansiyon süreleri üzerinde olumsuz etkiler yaratabildiği belirlenmiştir. Bu nedenle, optimal kolon sıcaklığı dikkatli bir şekilde seçilerek hem hızlı analiz süresi hem de yüksek çözünürlük sağlanmıştır.

Kromatografik performansın optimizasyonu amacıyla Box-Behnken ve Plackett-Burman deney tasarımları kullanılarak kritik değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Box-Behnken deney tasarımının, özellikle yöntem parametrelerinin optimizasyonunda üstünlük sağladığı ve daha az deney ile daha güvenilir sonuçlar elde edilmesini mümkün kıldığı gözlenmiştir. Buna karşın, Plackett-Burman deney tasarımı ise faktörlerin tek başına etkisini göstermekte yeterli kalırken, faktörler arasındaki karmaşık etkileşimleri tam olarak açıklamakta sınırlı kalmıştır. Bu nedenle analitik yöntemin geliştirilmesi sürecinde çok değişkenli optimizasyon yaklaşımlarının tercih edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Geliştirilen UHPLC-DAD yönteminin validasyon sürecinde sistem uygunluk, özgüllük, doğruluk, kesinlik, doğrusallık, sağlamlık, LOD ve LOQ gibi temel validasyon parametreleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Sistem uygunluk parametrelerinde elde edilen yüksek teorik plaka sayıları ve düşük kuyruklanma faktörleri, yöntemin etkinliğini ve piklerin kalitesini kanıtlamaktadır. Ayrıca doğruluk ve kesinlik testlerinde safsızlıklar için elde edilen geri kazanım oranlarının %95-105 aralığında olması, yöntemin farmasötik analizlerde yeterli doğruluk ve hassasiyeti sağladığını göstermektedir. Doğrusallık testlerinde safsızlıklar için belirlenen derişim aralığının geniş olması, yöntemin farklı derişim seviyelerinde de tutarlı sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur.

Bu UHPLC yönteminin en önemli avantajlarından biri, safsızlıkların karglumik asitten ve birbirlerinden etkili bir şekilde ayrılmasını sağlamasıdır. Bu yöntem sayesinde, safsızlık profillerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde oluşturulabilmesi mümkün olmuştur. Yöntemin yüksek çözünürlük kapasitesi, safsızlıkların detaylı olarak nitel ve nicel analizlerine olanak tanırken, analiz sürelerinin kısılması rutin kalite kontrol süreçlerinde uygulama kolaylığı sağlamıştır. Bu özellikleriyle geliştirilen yöntem, farmasötik kalite kontrol süreçleri için önemli bir yenilik ve referans yöntem olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmadaki HPLC ve UHPLC yöntemleri hem rutin kalite kontrol hem de uzun vadeli stabilite analizleri için uygun, sağlam ve tekrarlanabilir yöntemler olarak tanımlanmıştır. Özellikle UHPLC yöntemi ile safsızlık analizlerinde sağlanan yüksek çözünürlük, hızlı analiz süresi ve doğruluk gibi avantajlar, bu yöntemin farmasötik analiz laboratuvarlarında güvenle kullanılacak standart bir yöntem haline gelmesini desteklemektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bu kritik sonuçlar, gelecekteki farmasötik ürünlerin kalite kontrol süreçlerinde önemli bir temel teşkil edecektir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, karglumik asidin tablet formülasyonlarında miktar tayini ve dissolüsyon analizleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diyot dizisi dedektörlü (HPLC-DAD) yönteminin geliştirilmesi, optimizasyonu ve validasyonu ayrıntılı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında öncelikle, kromatografik koşulların sistematik olarak optimize edilmesi sağlanmış ve yöntem geliştirme aşamasında elde edilen bulgular, literatürdeki mevcut bilgilerle karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında HPLC-DAD yöntemiyle miktar tayini ve dissolüsyon analizleri yapılmış ve yöntem başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Yöntemin optimizasyon aşamasında; hareketli faz kompozisyonu olarak düşük oranda asetonitril içeren fosfat tamponlu çözeltiler kullanılmıştır. Bu hareketli faz sistemiyle elde edilen kromatografik piklerin simetrik ve keskin olduğu görülmüş, literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, geliştirilen yöntemlerin daha yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Analitik yöntem geliştirme sürecinde sistem uygunluk testleri, validasyon çalışmalarının temelini oluşturmuştur. Yapılan sistem uygunluk testlerinde pik alanı, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörleri incelenmiş ve tüm parametrelerin uluslararası kabul edilen kriterleri sağladığı saptanmıştır. Ayrıca, yöntemin seçiciliği, farklı ortamların (plasebo ve tablet formülasyonları) incelenmesi ile doğrulanmış ve analiz sırasında herhangi bir girişimin olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmanın validasyon sürecinde, doğrusallık değerlendirmeleri yüksek korelasyon katsayıları ile başarılı sonuçlar vermiştir. Doğruluk ve kesinlik testleri ise, geliştirilen yöntemin rutin farmasötik kalite kontrol analizlerinde rahatlıkla kullanılacak derecede doğru ve tutarlı olduğunu kanıtlamıştır. Özellikle geri kazanım oranlarının %98-102 aralığında olması, yöntemin uluslararası geçerli kriterleri karşıladığını ortaya koymaktadır. Sağlık testlerinde ise, Plackett-Burman deney tasarımından elde edilen düşük tanımlayıcılık katsayısına rağmen, yöntemin performansının küçük değişikliklerden etkilenmediği ve rutin analiz uygulamalarında kullanılmak üzere güvenilir olduğu doğrulanmıştır.

Dissolüsyon çalışmaları, tablet formülasyonlarının gastrointestinal ortam koşullarını simüle eden üç farklı pH değerinde (pH 1,2; 4,5 ve 6,8) gerçekleştirilmiştir. Özellikle pH 6,8 tampon ortamında elde edilen sonuçlar, tabletlerin %90'ın üzerinde çözünme oranına hızla ulaştığını göstermiştir. Bu sonuç, geliştirilen formülasyonun klinik kullanıma uygunluğunu destekleyen kritik bir bulgu olarak yorumlanmıştır.

Çözelti stabilitesi ve filtre seçim çalışmalarında, analitik çözeltilerin 74 saate kadar (5°C'de) kararlı kaldığı belirlenmiş ve filtre seçiminde hidrofobik PTFE filtrelerin analit adsorpsiyonunu minimize ettiği ve yüksek doğruluk sağladığı saptanmıştır. Bu bulgular, örnek hazırlama basamağının analitik sonuçlar üzerindeki olası olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak adına önemli ve güvenilir bir yöntem sunmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşamasında geliştirilen UHPLC-DAD yönteminde, safsızlı analizleri için optimizasyon Box-Behnken deney tasarımıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, hızlı ve etkin kromatografik ayırımların yanı sıra analitik yöntemin sağlamlığı açısından da üstün performans sağladığını ortaya koymuştur. Bu süreçte, literatürde benzer analizlere kıyasla kısa analiz süreleri, daha düşük çözücü tüketimi ve daha yüksek duyarlılık elde edilmiştir.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen bu tez çalışması, karglumik asit formülasyonlarının miktar tayini, dissolüsyon analizi ve safsızlık tayini için geliştirilen HPLC ve UHPLC yöntemlerinin, farmasötik kalite kontrol süreçlerinde kullanımına uygun olduğunu göstermektedir. Literatürle karşılaştırıldığında, geliştirilen yöntemlerin analitik performansının daha iyi olduğu belirlenmiş ve bu yöntemlerin rutin kalite kontrol analizlerinde tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Yukarıda özetlenen sonuçlar ışığında, bu çalışmada geliştirilen yöntemlerin daha geniş kullanım alanına sahip olabilmesi ve gelecekteki çalışmalarda daha ileri seviyelere taşınabilmesi adına aşağıdaki öneriler sunulmuştur:

- **Analitik Yöntemlerin Diğer Farmasötik Formülasyonlara Uygulanması:** Geliştirilen yöntemlerin kapsül, süspansiyon ve diğer farklı farmasötik dozaj formlarına uygulanarak yöntemlerin etkinliği ve geçerliliğinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

- **Alternatif Kromatografik Sistemlerin Kullanımı:** Saptama hassasiyetini artırmak ve düşük derişimlerde safsızlıkların daha net analiz edilmesini sağlamak amacıyla LC-MS/MS sistemleri gibi ileri saptama tekniklerinin araştırılması önerilmektedir.
- **Uzun Süreli Stabilite Testleri:** Raf ömrü boyunca tablet formülasyonlarının kararlılığını değerlendirmek amacıyla uzun süreli stabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Bu, ürün kalitesi ve stabilitesinin sürekli olarak kontrol edilmesine olanak sağlayacaktır.
- **Çevresel Koşulların Etkisinin İncelenmesi:** Geliştirilen analitik yöntemlerin farklı sıcaklık, nem ve ışık koşulları altında incelenmesi ve bu çevresel parametrelerin analitik sonuçlar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.
- **Yöntemlerin Rutin Analizlerde Kullanımının Yaygınlaştırılması:** Endüstriyel kalite kontrol laboratuvarlarında geliştirilen yöntemlerin rutin kullanıma geçmeden önce endüstriyel validasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
- **Yeşil Kimya Yaklaşımlarının Benimsenmesi:** Geliştirilen yöntemlerin çözücü tüketimini azaltacak, çevre dostu çözücülerin kullanımıyla desteklenecek alternatif yeşil analitik tekniklere dönüştürülmesi için araştırmaların devam ettirilmesi önerilmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasıyla elde edilen analitik yöntemler, farmasötik kalite kontrol süreçleri için güvenilir ve sürdürülebilir çözümler sunmakta, aynı zamanda gelecek çalışmalarda farklı farmasötik ürünlerin analizlerinde uygulanabilmesi için değerli bir temel oluşturmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Welch N, Singh SS, Kumar A, Dhruva SR, Mishra S, Sekar J, et al. Integrated multiomics analysis identifies molecular landscape perturbations during hyperammonemia in skeletal muscle and myotubes. *J. Biol. Chem.*. 2021 Sep;297.
2. Kerbert AJC, Engelmann C, Habtesion A, Kumar P, Hassan M, Qi T, et al. Hyperammonemia induces programmed liver cell death. *Sci Adv.* 2025 Mar;11:eado1648.
3. Raina R, Bedoyan JK, Lichter-Konecki U, Jouvett P, Picca S, Mew NA, et al. Consensus guidelines for management of hyperammonaemia in paediatric patients receiving continuous kidney replacement therapy. *Nat Rev Nephrol.* 2020 Aug;16:471–82.
4. Regan JT, Mirczuk SM, Scudder CJ, Stacey E, Khan S, Worwood M, et al. Sensitivity of the natriuretic peptide/cgmp system to hyperammonaemia in rat c6 glioma cells and gpnt brain endothelial cells. *Cells.* 2021 Feb;10:1–24.
5. Regan JT, Mirczuk SM, Scudder CJ, Stacey E, Khan S, Worwood M, et al. Sensitivity of the natriuretic peptide/cgmp system to hyperammonaemia in rat c6 glioma cells and gpnt brain endothelial cells. *Cells.* 2021 Feb;10:1–24.
6. Yoo HW. Development of orphan drugs for rare diseases. *Clin Exp Pediatr.* 2024 Jul;67:315–27.
7. <https://sphu.org/en/revised-who-good-practices-for-pharmaceutical-quality-control-laboratories-annex-4-who-trs-1052-2024-webinars-recap-news.html> [Internet]. Revised WHO Good Practices for Pharmaceutical Quality Control Laboratories (Annex 4, WHO TRS 1052, 2024): Webinars Recap.
8. Saengsen C, Sookbampen O, Wu S, Seetasang S, Rongwong W, Chuaboon L. The potency of HPLC-DAD and LC-MS/MS combined with ion chromatography for detection/purification of levulinic acid and bio-compounds from acid hydrolysis of OPEFB. *RSC Adv.* 2022 Oct;12:28638–46.
9. Iqbal M, Haq N, Kalam MA, Imam F, Shakeel F. A Simple, Sensitive, and Greener HPLC-DAD Method for the Simultaneous Analysis of Two Novel Orexin Receptor Antagonists. *ACS Omega.* 2024 May;9:23101–10.
10. Chandra Sekhar Reddy Pulagam R, Chandra Sekhar Reddy R. UHPLC in the Analysis of Drug Components [Internet]. Vol. 66. 2013. Available from: <http://opus.govst.edu/capstoneshttp://opus.govst.edu/capstones/66>

11. Häberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. Vol. 7, Orphanet Journal of Rare Diseases. 2012.
12. Ma Y, Zeng Z, Kong L, Chen Y, He P. Determination of N-carbamylglutamate in feeds and animal products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Molecules*. 2019 Aug;24.
13. ICH. Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures [Internet]. 2023. Available from: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
14. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Ich Harmonised Tripartite Guideline Impurities in New Drug Products Q3B(R2). 2006.
15. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Ich Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005.
16. Attimarad M, Alali MJ, Alali HA, Alabdulmuhsin DH, Alnajdi AK, Venugopala KN, et al. Design of Experimental Approach for Development of Rapid High Performance Liquid Chromatographic Process for Simultaneous Estimation of Metoprolol, Telmisartan, and Amlodipine from Formulation: Greenness and Whiteness Evaluation. *Molecules*. 2024 Mar;29.
17. Kumar A, Bellar A, Mishra S, Sekar J, Welch N, Dasarathy S. L-Isoleucine reverses hyperammonemia-induced myotube mitochondrial dysfunction and post-mitotic senescence. *J Nutr Biochem*. 2024 Jan;123:109498.
18. Häberle J. Clinical practice: the management of hyperammonemia. *Eur J Pediatr*. 2011 Jan;170(1):21–34.
19. Gupta S, Fenves AZ, Hootkins R. The Role of RRT in Hyperammonemic Patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Oct 7;11(10):1872–8.
20. Moedas MF, Simões RJM, Silva MFB. Mitochondrial targets in hyperammonemia: Addressing urea cycle function to improve drug therapies. *Biochem Pharmacol*. 2024 Apr;222:116034.
21. Bachmann C. Mechanisms of Hyperammonemia. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jan 24;40(7).
22. Hadjihambi A, Khetan V, Jalan R. Pharmacotherapy for hyperammonemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2014 Aug 17;15(12):1685–95.

23. Ribas GS, Lopes FF, Deon M, Vargas CR. Hyperammonemia in Inherited Metabolic Diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 2022 Nov;42(8):2593–610.
24. Roberts SC, Malik W, Ison MG. Hyperammonemia syndrome in immunosuppressed individuals. *Curr Opin Infect Dis*. 2022 Jun 1;35(3):262–8.
25. Summar ML, Mew NA. Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia. *Pediatr Clin North Am*. 2018 Apr;65(2):231–46.
26. Auron A, Brophy PD. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatric Nephrology*. 2012 Feb 23;27(2):207–22.
27. Singh RH, Rhead WJ, Smith W, Lee B, King LS, Summar M. Nutritional Management of Urea Cycle Disorders. *Crit Care Clin*. 2005 Oct;21(4):S27–35.
28. Carglumic acid: new preparation. An advance in rare urea cycle disorders. *Prescrire Int*. 2004 Feb;13(69):3–4.
29. Carglumic acid: a second look. Confirmed progress in a rare urea cycle disorder. *Prescrire Int*. 2008 Apr;17(94):50–1.
30. Elvin JG, Couston RG, van der Walle CF. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm*. 2013 Jan 2;440(1):83–98.
31. Valayannopoulos V, Baruteau J, Delgado MB, Cano A, Couce ML, Del Toro M, et al. Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable risk-benefit profile: A retrospective observational study. *Orphanet J Rare Dis*. 2016 Mar 31;11(1).
32. Laurent S, Elst L Vander, Muller RN. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol Imaging*. 2006 May 22;1(3):128–37.
33. Talelli M, Barz M, Rijcken CJF, Kiessling F, Hennink WE, Lammers T. Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today*. 2015 Feb;10(1):93–117.
34. Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2971.
35. Center for Drug Evaluation and Research Application Number: 22-562 Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s).
36. Port M, Idée JM, Medina C, Robic C, Sabatou M, Corot C. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their

- possible clinical consequences: a critical review. *BioMetals*. 2008 Aug 15;21(4):469–90.
37. Alfadhel M, Nashabat M, Saleh M, Elamin M, Alfares A, Al Othaim A, et al. Long-term effectiveness of carnitine in patients with propionic acidemia (PA) and methylmalonic acidemia (MMA): a randomized clinical trial. *Orphanet J Rare Dis*. 2021 Dec 1;16(1).
  38. Mondal P, Trigun SK. Pannexin1 as a novel cerebral target in pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2014 Nov;29:1007–15.
  39. Bobermin LD, Souza DO, Gonçalves CA, Quincozes-Santos A. Lipoic acid protects C6 cells against ammonia exposure through Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter and PKC pathway. *Toxicology in Vitro*. 2013 Oct;27:2041–8.
  40. Lemay JF, Lambert MA, Mitchell GA, Vanasse M, Valle D, Arbour JF, et al. Hyperammonemia-hyperornithinemia-homocitrullinuria syndrome: Neurologic, ophthalmologic, and neuropsychologic examination of six patients. *J Pediatr*. 1992;121:725–30.
  41. Ikeda S, Sera Y, Ohshiro H, Uchino S, Uchino T, Endo F. Surgical indications for patients with hyperammonemia. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1012–5.
  42. Arias N, Fidalgo C, Felipe V, Arias JL. The effects of hyperammonemia in learning and brain metabolic activity. *Metab Brain Dis*. 2014;29:113–20.
  43. Albrecht J. Roles of neuroactive amino acids in ammonia neurotoxicity. Vol. 51, *Journal of Neuroscience Research*. 1998. p. 133–8.
  44. Aschner M, Kimelberg HK. The use of astrocytes in culture as model systems for evaluating neurotoxic-induced-injury. In: *NeuroToxicology*. 1991. p. 505–18.
  45. Jin X, Zeng X, Zhao D, Jiang N. Liver transplantation in rare late-onset ornithine transcarbamylase deficiency with central nervous system injury: A case report and review of the literature. Vol. 12, *Brain and Behavior*. John Wiley and Sons Ltd; 2022.
  46. Cooper AJL. Role of glutamine in cerebral nitrogen metabolism and ammonia neurotoxicity. Vol. 7, *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 2001. p. 280–6.
  47. Cagnon L, Braissant O. Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Res Rev*. 2007 Nov;56(1):183–97.
  48. Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Fecal transplant to mitigate hyperammonemia and hepatic encephalopathy in animal models. Vol. 14, *Annals of Hepatology*. Fundacion Clinica Medica Sur; 2015. p. 762–3.

49. Ni B, Qin M, Zhao J, Guo Q. A glance at transient hyperammonemia of the newborn: Pathophysiology, diagnosis, and treatment: A review. Vol. 101, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2022. p. E31796.
50. Arroyo V, Angeli P, Moreau R, Jalan R, Clària J, Trebicka J, et al. The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis. Vol. 74, *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V.; 2021. p. 670–85.
51. Won SM, Oh KK, Gupta H, Ganesan R, Sharma SP, Jeong JJ, et al. The Link between Gut Microbiota and Hepatic Encephalopathy. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
52. Piantanida E, Ippolito S, Gallo D, Masiello E, Premoli P, Cusini C, et al. The interplay between thyroid and liver: implications for clinical practice. Vol. 43, *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer; 2020. p. 885–99.
53. Figueira ERR, Filho JAR, Nacif LS, D' Albuquerque LC, Waitzberg DL. Soporte nutricional para la hepatitis fulminante. *Nutr Hosp*. 2015;32:2427–32.
54. Rahimi RS, Rockey DC. Novel Ammonia-Lowering Agents for Hepatic Encephalopathy. Vol. 19, *Clinics in Liver Disease*. W.B. Saunders; 2015. p. 539–49.
55. Olde Damink SWM, Jalan R, Dejong CHC. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. Vol. 24, *Metabolic Brain Disease*. 2009. p. 169–81.
56. Lichtenstein GR, Yang YX, Nunes FA, Lewis JD, Tuchman M, Tino G, et al. Fatal hyperammonemia after orthotopic lung transplantation. *Ann Intern Med*. 2000 Feb;132:283–7.
57. DeNotta SAL, Divers TJ. Clinical Pathology in the Adult Sick Horse: The Gastrointestinal System and Liver. Vol. 36, *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. W.B. Saunders; 2020. p. 105–20.
58. Inazumi H, Toyoda H, Shimano S, Sakuma H, Sakamoto M, Nakagawa T, et al. Efficacy and adverse events of L-Asparaginase administration as a first-line treatment for feline large-cell gastrointestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2024;86:727–36.
59. Soria LR, Brunetti-Pierri N. Ammonia and autophagy: An emerging relationship with implications for disorders with hyperammonemia. Vol. 42, *Journal of Inherited Metabolic Disease*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1097–104.
60. Soria LR, Brunetti-Pierri N. Ammonia and autophagy: An emerging relationship with implications for disorders with hyperammonemia. Vol. 42,

- Journal of Inherited Metabolic Disease. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1097–104.
61. Refardt J, den Hoed CM, Langendonk J, Zandee WT, Charehbili A, Feelders RA, et al. Prognostic significance of hyperammonemia in neuroendocrine neoplasm patients with liver metastases. *Endocr Relat Cancer*. 2022 May;29:241–50.
  62. Tranah TH, Ballester MP, Carbonell-Asins JA, Ampuero J, Alexandrino G, Caracostea A, et al. Plasma ammonia levels predict hospitalisation with liver-related complications and mortality in clinically stable outpatients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2022 Dec;77:1554–63.
  63. Vidal-Cevallos P, Chávez-Tapia NC, Uribe M. Current approaches to hepatic encephalopathy. Vol. 27, *Annals of Hepatology*. Elsevier Espana S.L.U; 2022.
  64. Summar ML, Mew NA. Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. Vol. 65, *Pediatric Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 231–46.
  65. Jover-Cobos M, Khetan V, Jalan R. Treatment of hyperammonemia in liver failure. Vol. 17, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2014. p. 105–10.
  66. Paine C, Pichler R. How We Treat Hyperammonemia in Acute Liver Failure. In: *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*. Lippincott Williams and Wilkins; 2024. p. 254–6.
  67. Bartlett JA, Kohli R. Hepatic Encephalopathy in Children. Vol. 91, *Indian J. Pediatr.*. Springer; 2024. p. 280–5.
  68. Duarte T, Fidalgo P, Karvellas CJ, Cardoso FS. What every Intensivist should know about .. Ammonia in liver failure. Vol. 81, *J. Crit. Care.*. W.B. Saunders; 2024.
  69. Xie Z, Song J, Peng Y, Jin S. A child with hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome treated with liver transplantation. *Asian J Surg*. 2024 Oct;47:4512–3.
  70. De Bruyne P, Verloo P, Van Hove JLK, de Hemptinne B, Vande Velde S, Van Winckel M, et al. Successful liver transplantation in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome: Case report. *Pediatr Transplant*. 2021 Sep;25.
  71. Kurtz CB, Millet YA, Puurunen MK, Perreault M, Charbonneau MR, Isabella VM, et al. An engineered E. Coli Nissle improves hyperammonemia and

- survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans. *Sci Transl Med.* 2019 Jan;11.
72. Dasarathy S, Hatzoglou M. Hyperammonemia and proteostasis in cirrhosis. Vol. 21, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 30–6.
  73. Gallego-Durán R, Hadjihambi A, Ampuero J, Rose CF, Jalan R, Romero-Gómez M. Ammonia-induced stress response in liver disease progression and hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2024 Nov;21:774–91.
  74. Jamshidzadeh A, Heidari R, Latifpour Z, Ommati MM, Abdoli N, Mousavi S, et al. Carnosine ameliorates liver fibrosis and hyperammonemia in cirrhotic rats. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2017 Sep;41:424–34.
  75. Jalan R, Lee WM. Treatment of Hyperammonemia in Liver Failure: A Tale of Two Enzymes. Vol. 136, *Gastroenterology.* W.B. Saunders; 2009. p. 2048–51.
  76. Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Karall D, Lindner M, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. Vol. 42, *Journal of Inherited Metabolic Disease.* John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1192–230.
  77. Song YZ, Yazaki M, Saheki T. Citrin Deficiency. In: *Human Pathobiochemistry: From Clinical Studies to Molecular Mechanisms.* Springer Singapore; 2019. p. 3–14.
  78. Seiler N. Ammonia and Alzheimer's disease. Vol. 41, *Neurochemistry International.* 2002. p. 189–207.
  79. Bartlett JA, Kohli R. Hepatic Encephalopathy in Children. Vol. 91, *Indian Journal of Pediatrics.* Springer; 2024. p. 280–5.
  80. Matsumoto S, Häberle J, Kido J, Mitsubuchi H, Endo F, Nakamura K. Urea cycle disorders—update. Vol. 64, *Journal of Human Genetics.* Nature Publishing Group; 2019. p. 833–47.
  81. El-hattab AW. GeneReviews: Systemic Primary Carnitine Deficiency. *GeneReviews.* 2012. 1–12 p.
  82. Bobermin LD, Roppa RHA, Gonçalves CA, Quincozes-Santos A. Ammonia-Induced Glial-Inflammaging. *Mol Neurobiol.* 2020 Aug;57:3552–67.
  83. Allen SL, Quinlan JI, Dhaliwal A, Armstrong MJ, Elsharkawy AM, Greig CA, et al. Sarcopenia in chronic liver disease: Mechanisms and countermeasures. Vol. 320, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* American Physiological Society; 2021. p. G241–57.

84. Summar ML, Mew NA. Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. Vol. 65, *Pediatric Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 231–46.
85. Adamovic T, Jouvet P, Vobecky S, Garel L, Rougemont AL, Alvarez F. Hyperammonemia and neonatal cardiac failure. *Minerva Anesthesiol*. 2011;77:554–7.
86. Scholte HR, Pereira RR, De Jonge PC, Luyt-Houwen IEM, Verduin MHM, Ross JD. Primary carnitine deficiency. In: *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 1990. p. 351–7.
87. Pratsinis A, Devuyst O, Leroux JC. Peritoneal dialysis beyond kidney failure? *Journal of Controlled Release*. 2018 Jul;282:3–12.
88. Yoshida EM, Ostrow DN, Erb SR, Fradet G. Hyperammonemia after heart-lung transplantation. *Gastroenterology*. 1997;112:2162.
89. Rissardo JP, Muhammad S, Yatakarla V, Vora NM, Paras P, Caprara ALF. Flapping Tremor: Unraveling Asterixis—A Narrative Review. Vol. 60, *Medicina (Lithuania)*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
90. Adeva MM, Souto G, Blanco N, Donapetry C. Ammonium metabolism in humans. Vol. 61, *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2012. p. 1495–511.
91. Cattaneo V, Caccioppola A, Colombo SM, Scaravilli V, Tubiolo D, Crotti S, et al. Hyperammonemia Syndrome After Lung Transplantation: A Double-Hit Fatal Syndrome. A Case Report. *Transplant Proc*. 2023 Oct;55:1991–4.
92. Manole A, Houlden H. Riboflavin Transporter Deficiency Neuronopathy. *GeneReviews®*. 1993.
93. El-hattab AW. *GeneReviews: Systemic Primary Carnitine Deficiency*. *GeneReviews*. 2012. 1–12 p.
94. Nunes V, Niinikoski H. Lysinuric Protein Intolerance. *GeneReviews®*. 1993.
95. Nagamani SCS, Erez A, Lee B. Argininosuccinate Lyase Deficiency. *GeneReviews®*. 1993.
96. Donovan K, Vaqar S, Guzman N. Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *StatPearls*. 2025.
97. Wang D, De Vivo D. *GeneReviews [Internet]: Pyruvate Carboxylase Deficiency*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2009 Jun 02 [updated 2011 Jul 21].; 1993.

98. Wada H, Goto M, Misonou M. Hyperammonemia Due to Empyema. *Internal Medicine*. 2023;62:2527–9.
99. Kumar A, Bellar A, Mishra S, Sekar J, Welch N, Dasarathy S. L-Isoleucine reverses hyperammonemia-induced myotube mitochondrial dysfunction and post-mitotic senescence. *J. Nutr. Biochem.*. 2024 Jan;123.
100. Hyperornithinemia, hyperammonemia, homocitrullinuria syndrome. In: *Atlas of Inherited Metabolic Diseases: Third Edition*. CRC Press; 2011. p. 229–34.
101. Sen K, Izem R, Long Y, Jiang J, Konczal LL, McCarter RJ, et al. Are asymptomatic carriers of OTC deficiency always asymptomatic? A multicentric retrospective study of risk using the UCDC longitudinal study database. *Mol Genet Genomic Med*. 2024 Apr;12.
102. Fuhrmann V, Jäger B, Zubkova A, Drolz A. Hypoxic hepatitis - Epidemiology, pathophysiology and clinical management. Vol. 122, *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2010. p. 129–39.
103. Pusterla N, Vin R, Leutenegger CM, Mittel LD, Divers TJ. Enteric coronavirus infection in adult horses. *Veterinary Journal*. 2018 Jan;231:13–8.
104. Chen C, Bain KB, Iuppa JA, Yusen RD, Byers DE, Patterson GA, et al. Hyperammonemia syndrome after lung transplantation: A single center experience. *Transplantation*. 2016;100:678–84.
105. El-Hattab AW, Dai H, Almannai M, Wang J, Faqeih EA, Al Asmari A, et al. Molecular and clinical spectra of FBXL4 deficiency. *Hum Mutat*. 2017 Dec;38:1649–59.
106. Sakusic A, Sabov M, McCambridge AJ, Rabinstein AA, Singh TD, Mukesh K, et al. Features of Adult Hyperammonemia Not Due to Liver Failure in the ICU. *Crit Care Med*. 2018 Sep;46:e897–903.
107. Kristiansen RG, Rose CF, Ytrebø LM. Glycine and hyperammonemia: potential target for the treatment of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2016 Dec;31:1269–73.
108. Francois B, Lachaux A, Gottrand F, De Smet S. Prenatally diagnosed congenital portosystemic shunts. Vol. 31, *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 1364–8.
109. Cardoso FS, Gottfried M, Tujios S, Olson JC, Karvellas CJ. Continuous renal replacement therapy is associated with reduced serum ammonia levels and mortality in acute liver failure. *Hepatology*. 2018 Feb;67:711–20.
110. Shih VE. Alternative-Pathway Therapy for Hyperammonemia. *N. Engl. J. Med.*. 2007 May;356:2321–2.

111. Balmer C, Pandey A V., Rüfenacht V, Nuoffer JM, Fang P, Wong LJ, et al. Mutations and Polymorphisms in the Human Argininosuccinate Lyase (ASL) Gene. *Hum Mutat.* 2014 Jan;35:27–35.
112. Nguyen KN, Tran VK, Nguyen NL, Can TBN, Dang TKG, Nguyen TH, et al. Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria Syndrome in Vietnamese Patients. *Medicina (Kaunas).* 2024 Nov;60.
113. Kuchay MS, Martínez-Montoro JI, Kaur P, Fernández-García JC, Ramos-Molina B. Non-alcoholic fatty liver disease-related fibrosis and sarcopenia: An altered liver-muscle crosstalk leading to increased mortality risk. Vol. 80, *Ageing Research Reviews.* Elsevier Ireland Ltd; 2022.
114. Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Häberle J. Mutations in the Human Argininosuccinate Synthetase (ASS1) Gene, Impact on Patients, Common Changes, and Structural Considerations. *Hum Mutat.* 2017 May;38:471–84.
115. Tetaj N, Stazi GV, Marini MC, Garotto G, Busso D, Scarcia S, et al. Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment of Non-Hepatic Hyperammonemia in ICU COVID-19 Patients. *J Clin Med.* 2022 May;11.
116. Wasim M, Awan FR, Khan HN, Tawab A, Iqbal M, Ayesha H. Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. Vol. 56, *Biochemical Genetics.* Springer New York LLC; 2018. p. 7–21.
117. Kwack DW, Kim DW. Risk factors of hyperammonemia in epilepsy patients with valproic acid therapy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2023 Oct;233.
118. Nashabat M, Obaid A, Al Mutairi F, Saleh M, Elamin M, Ahmed H, et al. Evaluation of long-term effectiveness of the use of carnitine in patients with propionic acidemia (PA) or methylmalonic acidemia (MMA): study protocol for a randomized controlled trial. *BMC Pediatr.* 2019 Jun 13;19(1):195.
119. Anthonipillai P, Sharp G, Kimber J, Ziauddin V. Valproate-Associated Hyperammonemic Encephalopathy. *Acute Medicine.* 2022;21:43–6.
120. Jover-Cobos M, Noiret L, Sharifi Y, Jalan R. Ornithine phenylacetate revisited. In: *Metabolic Brain Disease.* 2013. p. 327–31.
121. Matoori S, Leroux JC. Recent advances in the treatment of hyperammonemia. Vol. 90, *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier B.V.; 2015. p. 55–68.
122. Lu K. Cellular Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: An Update. Vol. 13, *Biomolecules.* MDPI; 2023.
123. Kramer L. Acute liver failure. Vol. 116, *Wiener Klinische Wochenschrift.* Springer Wien; 2004. p. 67–81.

124. Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, et al. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. In: *Metab. Brain Dis.*. 2007. p. 321–35.
125. Butterworth RF. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int.* 2002;41:81–5.
126. Moedas MF, Simões RJM, Silva MFB. Mitochondrial targets in hyperammonemia: Addressing urea cycle function to improve drug therapies. Vol. 222, *Biochem. Pharmacol.*. Elsevier Inc.; 2024.
127. Vidić V, Ilić V, Toskić L, Janković N, Ugarković D. Effects of calorie restricted low carbohydrate high fat ketogenic vs. non-ketogenic diet on strength, body-composition, hormonal and lipid profile in trained middle-aged men. *Clinical Nutrition.* 2021 Apr;40:1495–502.
128. Lineback D, DeVries J. Complex Carbohydrates: The Science and the Label. *Nutr Rev.* 1995;53:186–93.
129. Nagamani SCS, Erez A, Lee B. Argininosuccinate Lyase Deficiency. *GeneReviews®.* 1993.
130. García-Cazorla A. Propionic Acidemia. In: *Encyclopedia of Movement Disorders, Three-Volume Set.* Elsevier; 2010. p. V2-485-V2-488.
131. Barcelos RP, Stefanello ST, Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J, Soares FAA. Creatine and the Liver: Metabolism and Possible Interactions. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2015 Nov;16:12–8.
132. Wang ZX, Wang MY, Yang RX, Ren TY, Zhao ZH, Xin FZ, et al. Limited role for hyperammonemia in the progression of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Dig Dis.* 2023 Jun;24:408–18.
133. Jayakumar AR, Norenberg MD. Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol.* 2018 Sep;8:272–80.
134. Dai W, Shen J, Yan J, Bott AJ, Maimouni S, Daguplo HQ, et al. Glutamine synthetase limits  $\beta$ -catenin-mutated liver cancer growth by maintaining nitrogen homeostasis and suppressing mTORC1. *Journal of Clinical Investigation.* 2022 Dec;132.
135. Auron A, Brophy PD. Hyperammonemia in review: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. Vol. 27, *Pediatric Nephrology.* 2012. p. 207–22.
136. Wadzinski J, Franks R, Roane D, Bayard M. Valproate-associated hyperammonemic encephalopathy. *Journal of the American Board of Family Medicine.* 2007 Sep;20:499–502.

137. González-Regueiro JA, Higuera-de la Tijera MF, Moreno-Alcántar R, Torre A. Pathophysiology of hepatic encephalopathy and future treatment options. Vol. 84, *Revista de Gastroenterología de Mexico. Asociacion Mexicana de Gastroenterología*; 2019. p. 195–203.
138. Komatsu M, Tanaka N, Kimura T, Yazaki M. Citrin Deficiency: Clinical and Nutritional Features. Vol. 15, *Nutrients*. MDPI; 2023.
139. Seashore JH, Seashore MR, Riely C. Hyperammonemia During Total Parenteral Nutrition in Children. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1982;6:114–8.
140. Raina R, Bedoyan JK, Lichter-Konecki U, Jouvét P, Picca S, Mew NA, et al. Consensus guidelines for management of hyperammonaemia in paediatric patients receiving continuous kidney replacement therapy. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Aug;16:471–82.
141. Oette M, Stone MJ, Scholl HPN, Issa PC, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, et al. Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. In: *Encyclopedia of Molecular Mechanisms of Disease*. Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 1363–1363.
142. Holeček M. Aspartic Acid in Health and Disease. *Nutrients*. 2023 Sep;15.
143. Khoshnejad M, Dia Y, Patel A, Xu Z, Zhu X, Yun K, et al. DNA-Encoded Glutamine Synthetase Enzyme as Ammonia-Lowering Therapeutic for Hyperammonemia. *Nucleic Acid Ther*. 2020 Dec;30:379–91.
144. Marino RT, Sidlak AM. Hyperammonemia in acetaminophen toxicity. *Clin Toxicol*. 2022;60:126–30.
145. Naorungroj T, Yanase F, Eastwood GM, Baldwin I, Bellomo R. Extracorporeal Ammonia Clearance for Hyperammonemia in Critically Ill Patients: A Scoping Review. *Blood Purif*. 2021;50:453–61.
146. Deutsch-Link S, Moon AM, Jiang Y, Barritt AS, Tapper EB. Serum Ammonia in Cirrhosis: Clinical Impact of Hyperammonemia, Utility of Testing, and National Testing Trends. Vol. 44, *Clinical Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2022. p. e45–57.
147. Lee A, Eldem I, Altintas B, Nguyen H, Willis D, Langley R, et al. Treatment and outcomes of symptomatic hyperammonemia following asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Mol Genet Metab*. 2023 Jul;139.
148. Turgutkaya A, Bolaman AZ, Yavaşoğlu İ. Deferasirox-Induced Hyperammonemia in an Adult Patient After Allogeneic Stem Cell

- Transplantation. Vol. 56, *Annals of Pharmacotherapy*. SAGE Publications Inc.; 2022. p. 104–5.
149. Inoue K, Takahashi T, Yamamoto Y, Suzuki E, Takahashi Y, Imai K, et al. Influence of glutamine synthetase gene polymorphisms on the development of hyperammonemia during valproic acid-based therapy. *Seizure*. 2015;33:76–80.
  150. Espiritu-Ramírez P, Ortega-Balderas NY, Sevilla-Tapia L, Montiel-Martínez AG, Pastor-Flores AR, Palomares LA, et al. Gene therapy for treatment of chronic hyperammonemia in a rat model of hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol*. 2018 Nov;17:1026–34.
  151. Marchuk H, Wang Y, Ladd ZA, Chen X, Zhang GF. Pathophysiological mechanisms of complications associated with propionic acidemia. Vol. 249, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2023.
  152. Häberle J, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Karall D, Lindner M, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. Vol. 42, *Journal of Inherited Metabolic Disease*. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 1192–230.
  153. Mullins RA, Escribano Carrera A, Anderson DM, Billet JP, Brissot H, Broome C, et al. Postattenuation neurologic signs after surgical attenuation of congenital portosystemic shunts in dogs: A review. Vol. 51, *Veterinary Surgery*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 23–33.
  154. Wiedemann-Steiner syndrome. In: *Definitions*. Qeios; 2020.
  155. González-Regueiro JA, Higuera-de la Tijera MF, Moreno-Alcántar R, Torre A. Pathophysiology of hepatic encephalopathy and future treatment options. Vol. 84, *Revista de Gastroenterología de México*. Asociacion Mexicana de Gastroenterología; 2019. p. 195–203.
  156. Volans G, Wiseman H. Carglumic acid. In: *Drugs Handbook 2012–2013*. Bloomsbury Academic; 2022.
  157. Arabaci B, Yerlikaya F, Basci Akduman NE. A Novel Method for Development and Validation of the Degradation Products Analysis of N-Carbamylglutamate with UHPLC by Using Design of Experiment Approach. *ACS Omega*. 2024;
  158. Galsgaard KD, Pedersen J, Kjeldsen SAS, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Vilstrup H, et al. Glucagon receptor signaling is not required for N-carbamoyl glutamate- And L-citrulline-induced ureagenesis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2020 May;318:G912–27.

159. Ma Y, Yao J, Zhou S, Mi Y, Li J, Zhang C. Improvement of eggshell quality by dietary N-carbamylglutamate supplementation in laying chickens. *Poult Sci.* 2020 Aug;99:4085–95.
160. Caldovic L, Ah Mew N, Shi D, Morizono H, Yudkoff M, Tuchman M. N-acetylglutamate synthase: structure, function and defects. *Mol Genet Metab.* 2010;100.
161. Häberle J, Moore MB, Haskins N, Rüfenacht V, Rokicki D, Rubio-Gozalbo E, et al. Noncoding sequence variants define a novel regulatory element in the first intron of the N-acetylglutamate synthase gene. *Hum Mutat.* 2021 Dec;42:1624–36.
162. Arabaci B, Yerlikaya F, Basci Akduman NE. A Novel Method for Development and Validation of the Degradation Products Analysis of N-Carbamylglutamate with UHPLC by Using Design of Experiment Approach. *ACS Omega.* 2024 Oct;9:40346–57.
163. Sharma P, Shah PA, Sanyal M, Shrivastav PS. Challenges in optimizing sample preparation and LC-MS/MS conditions for the analysis of carginic acid, an N-acetyl glutamate derivative in human plasma. *Drug Test Anal.* 2015 Sep;7:763–72.
164. Yap S, Gougard N, Hart AR, Barcelona B, Rubio V. N-carbamoylglutamate-responsive carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency: A patient with a novel CPS1 mutation and an experimental study on the mutation's effects. *JIMD Rep.* 2019 Jul;48:36–44.
165. Ryder B, Inbar-Feigenberg M, Glamuzina E, Halligan R, Vara R, Elliot A, et al. New insights into carnitine-acylcarnitine translocase deficiency from 23 cases: Management challenges and potential therapeutic approaches. *J Inherit Metab Dis.* 2021 Jul;44:903–15.
166. Sharma P, Shah PA, Sanyal M, Shrivastav PS. Challenges in optimizing sample preparation and LC-MS/MS conditions for the analysis of carginic acid, an N-acetyl glutamate derivative in human plasma. *Drug Test Anal.* 2015 Sep;7:763–72.
167. Croissant JG, Fatieiev Y, Khashab NM. Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. *Advanced Materials.* 2017 Mar 13;29(9).
168. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. Vol. 4, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* Xi'an Medical University; 2014. p. 159–65.

169. Hotha KK, Reddy SPK, Raju VK, Ravindranath LK. Forced Degradation Studies: Practical Approach - Overview of Regulatory Guidance and Literature for the Drug Products and Drug Substances. *International Research Journal of Pharmacy*. 2013 May 28;4(5):78–85.
170. Burak ARABACI, Firat Yerlikaya, Nursabah Basci Akduman. Stability indicating method with ultra-performance liquid chromatography for N-carbamylglutamate and degradation products using statistical design. *ACS Fall 2023*. 2023 Aug;
171. Kovač L, Časar Z, Trdan Lušin T, Roškar R. Development of an Analytical Method for Determination of Related Substances and Degradation Products of Cabotegravir Using Analytical Quality by Design Principles. *ACS Omega*. 2022 Mar 15;7(10):8896–905.
172. Sathuluri K, Bakam R, Jain R, Dande A, Gajbhiye R, Ravichandiran V, et al. Analytical quality by design (AQbD) in the ICHQ14 guidelines for analytical procedure development. *Accreditation and Quality Assurance*. 2024 May 13;
173. ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Harmonised Guideline Quality Risk Management Q9(R1). 2023.
174. National Center for Biotechnology Information (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carglumic-Acid>. PubChem Compound Summary for CID 121396, Carglumic Acid.
175. Daniotti M, la Marca G, Fiorini P, Filippi L. New developments in the treatment of hyperammonemia: Emerging use of carglumic acid. Vol. 4, *International Journal of General Medicine*. 2011. p. 21–8.
176. Levrat V, Forest I, Fouilhoux A, Acquaviva C, Vianey-Saban C, Guffon N. Carglumic acid: An additional therapy in the treatment of organic acidurias with hyperammonemia? *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3(1).
177. Declarations under Rule 4.17: of inventorship (Rule 4. 7(iv)) TITLE PHARMACEUTICAL FORMULATION FOR CARGLUMIC ACID.
178. Sattar Y, Wasiq S, Yasin W, Khan AM, Adnan M, Shrestha S, et al. Carglumic Acid Treatment of a Patient with Recurrent Valproic Acid-induced Hyperammonemia: A Rare Case Report. *Cureus*. 2018 Sep 13;
179. Abacan M, Boneh A. Use of carglumic acid in the treatment of hyperammonaemia during metabolic decompensation of patients with propionic acidaemia. *Mol Genet Metab*. 2013 Aug;109(4):397–401.
180. United States Pharmacopeia. USP-NF Carglumic Acid. PF 47(6).

181. Sharma P, Shah PA, Sanyal M, Shrivastav PS. Challenges in optimizing sample preparation and LC-MS/MS conditions for the analysis of carginic acid, an N-acetyl glutamate derivative in human plasma. *Drug Test Anal.* 2015 Sep;7:763–72.
182. Maggio RM, Calvo NL, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. Vol. 101, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier; 2014. p. 102–22.
183. Jain D, Basniwal PK. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. Vol. 86, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013. p. 11–35.
184. Chan CP. Forced degradation studies: current trends and future perspectives for protein-based therapeutics. Vol. 13, *Expert Review of Proteomics*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 651–8.
185. Samad HA, Ali SN, Qayoom A, Haroon U, Saad M, Alavi GM. Development, validation and forced degradation studies of green liquid chromatographic method for determination of remdesivir in bulk drug and pharmaceutical formulation. *Pak J Pharm Sci.* 2023 Jan;36:159–70.
186. Hawe A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler HC, Jiskoot W. Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci.* 2012 Mar;101:895–913.
187. Tamizi E, Jouyban A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. Vol. 98, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier; 2016. p. 26–46.
188. Nowak C, K. Cheung J, M. Dellatore S, Katiyar A, Bhat R, Sun J, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. Vol. 9, *mAbs*. Taylor and Francis Inc.; 2017. p. 1217–30.
189. Liu G, Xiao L, Cao W, Fang T, Jia G, Chen X, et al. Changes in the metabolome of rats after exposure to arginine and N-carbamylglutamate in combination with diquat, a compound that causes oxidative stress, assessed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Food Funct.* 2016 Feb;7:964–74.
190. Singh RH, Bourdages MH, Kurtz A, MacLoed E, Norman C, Ratko S, et al. The efficacy of Carbamylglutamate impacts the nutritional management of patients with N-Acetylglutamate synthase deficiency. *Orphanet J Rare Dis.* 2024 Dec;19.

191. Kiykim E, Oguz O, Duman C, Zubarioglu T, Cansever MS, Zeybek ACA. Long-term N-carbamylglutamate treatment of hyperammonemia in patients with classic organic acidemias. *Mol Genet Metab Rep.* 2021 Mar;26:100715.
192. Žigart N, Časar Z. Development of a Stability-Indicating Analytical Method for Determination of Venetoclax Using AQbD Principles. *ACS Omega.* 2020 Jul 21;5(28):17726–42.
193. European Medicines Agency (EMA). ICH Topic Q1B. Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. 1998;
194. Patel MN, Kothari CS. Multivariate approaches for simultaneous determination of avanafil and dapoxetine by UV chemometrics and HPLC-QbD in binary mixtures and pharmaceutical product. *J AOAC Int.* 2016 May 1;99(3):649–63.
195. Marzouk HM, Rezk MR, Gouda AS, Abdel-Megied AM. A novel stability-indicating HPLC-DAD method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for COVID-19 treatment; application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling. *Microchemical Journal.* 2022 Jan;172:106917.
196. ACE UHPLC and HPLC Columns Cannabinoids in Rat Plasma Conditions [Internet]. Available from: [www.ace-hplc.com](http://www.ace-hplc.com)
197. Azhakesan A, Kuppusamy S. Analytical Quality by Design-Assisted HPLC Method for Quantification of Canagliflozin and Stability Studies. *ACS Omega.* 2023 Feb 28;8(8):7407–14.
198. ARISOY S, SAYINER Ö, ÇOMOĞLU T. Development and Validation of an In Vitro; Dissolution Method Based on HPLC Analysis for L-Dopa Release From PLGA Nanoparticles. *Bezmialem Science.* 2021 Jan 25;9(1):9–19.
199. Muramatsu H, Inouchi D, Yamada M, Koujitani A, Maguchi H, Kato SI. Purification and characterization of 3-(5-oxo-2-thioxoimidazolidin-4-yl) propionic acid desulfhydrase involved in ergothioneine utilization in *Burkholderia* sp. HME13. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2024 Jan;88:74–8.
200. Xia B, Wang T, Fox LM, Wang D. HPLC/MS/MS analysis of 3-carbamyl-4-methylpyrrole analog MNP001, a highly potent antihypertensive agent, in rat plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009 Jul;877:1867–72.
201. Tillotson JA, Ziporin ZZ. A modification in the synthesis of N'-methylnicotinamide chloride (3-carbamyl-1-methyl-pyridinium chloride). *Anal Biochem.* 1960;1:273–4.

202. Tillotson JA, Ziporin ZZ. A modification in the synthesis of N'-methylnicotinamide chloride (3-carbamyl-1-methyl-pyridinium chloride). *Anal Biochem.* 1960;1:273–4.
203. Gao M, Wang M, Meyer JA, Territo PR, Hutchins GD, Zarrinmayeh H, et al. Synthesis and in vitro biological evaluation of new P2X7R radioligands [ <sup>11</sup>C]halo-GSK1482160 analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Jun;29:1476–80.
204. Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: A truly functional amino acid. *Amino Acids.* 2013 Sep;45:413–8.
205. Tapiero H, Mathé G, Couvreur P, Tew KD. II. Glutamine and glutamate. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2002;56:446–57.
206. Petroff OAC. GABA and glutamate in the human brain. Vol. 8, *Neuroscientist.* 2002. p. 562–73.
207. <https://www.medicines.org.uk/emc/product/11814/smpc#gref> [Internet]. Carglumic Acid Waymade 200 mg Dispersible Tablets.
208. <https://carglumicacid.com/> [Internet]. Carglumic Acid | Official Site.
209. Carbaglu Carbaglu ® (carglumic acid) Monograph [Internet]. Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
210. Manousi N, Tzanavaras PD, Zacharis CK. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceuticals and biological materials: An updated review. Vol. 219, *J. Pharm. Biomed. Anal.*. Elsevier B.V.; 2022.
211. Ren J, Mao S, Lin J, Xu Y, Zhu Q, Xu N. Research Progress of Raman Spectroscopy and Raman Imaging in Pharmaceutical Analysis. *Curr Pharm Des.* 2022 May;28:1445–56.
212. Kalasz H, Antal I. Drug Excipients. *Curr Med Chem.* 2006 Aug;13:2535–63.
213. Vogel M, Norwig J. Analysis of genotoxic N-nitrosamines in active pharmaceutical ingredients and market authorized products in low abundance by means of liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Sep;219.
214. Paulekuhn GS, Dressman JB, Saal C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the orange book database. *J Med Chem.* 2007 Dec;50:6665–72.
215. Svensson Grape E, Rooth V, Nero M, Willhammar T, Inge AK. Structure of the active pharmaceutical ingredient bismuth subsalicylate. *Nat Commun.* 2022 Dec;13.

216. Newman AW, Byrn SR. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. Vol. 8, *Drug Discovery Today*. 2003. p. 898–905.
217. Izutsu KI, Koide T, Takata N, Ikeda Y, Ono M, Inoue M, et al. Characterization and quality control of pharmaceutical cocrystals. Vol. 64, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Pharmaceutical Society of Japan; 2016. p. 1421–30.
218. Rodrigues M, Baptista B, Lopes JA, Sarraguça MC. Pharmaceutical cocrystallization techniques. Advances and challenges. Vol. 547, *Int. J. Pharm.*. Elsevier B.V.; 2018. p. 404–20.
219. ElFar OA, Billa N, Lim HR, Chew KW, Cheah WY, Munawaroh HSH, et al. Advances in delivery methods of *Arthrospira platensis* (spirulina) for enhanced therapeutic outcomes. Vol. 13, *Bioengineered*. Taylor and Francis Ltd.; 2022. p. 14681–718.
220. Rattanawiwatpong P, Wanitphakdeedecha R, Bumrungpert A, Maiprasert M. Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Mar;19:671–6.
221. Hwang D, Ramsey JD, Kabanov A V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. Vol. 156, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2020. p. 80–118.
222. Lin SY. Current and potential applications of simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy for pharmaceutical analysis. *J Food Drug Anal*. 2021 Jun;29:182–202.
223. Kelani KM, Rezk MR, Monir HH, Elsherbiny MS, Eid SM. FTIR combined with chemometric tools (fingerprinting spectroscopy) in comparison to HPLC: Which strategy offers more opportunities as a green analytical chemistry technique for pharmaceutical analysis. *Analytical Methods*. 2020 Dec;12:5893–907.
224. Suys O, Derenne A, Goormaghtigh E. ATR-FTIR Biosensors for Antibody Detection and Analysis. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct;23.
225. van Haaren C, De Bock M, Kazarian SG. Advances in ATR-FTIR Spectroscopic Imaging for the Analysis of Tablet Dissolution and Drug Release. Vol. 28, *Molecules*. MDPI; 2023.
226. Hameedat F, Hawamdeh S, Alnabulsi S, Zayed A. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection for Quantification of Steroids in Clinical, Pharmaceutical, and Environmental Samples: A Review. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.

227. Lin SY. Simultaneous screening and detection of pharmaceutical co-crystals by the one-step DSC–FTIR microspectroscopic technique. Vol. 22, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2017. p. 718–28.
228. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory - Goals for further developments. Vol. 41, *Clinical Biochemistry*. 2008. p. 649–62.
229. Saha M, Dhiman S, Gupta G, Asati V. An Investigative Review for Pharmaceutical Analysis of Fenofibrate. Vol. 61, *Journal of Chromatographic Science*. Oxford University Press; 2023. p. 494–504.
230. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Dec 15;877(32):4115–24.
231. Danielson ND, Targove MA, Miller BE. Pre- and postcolumn derivatization chemistry in conjunction with hplc for pharmaceutical analysis. *J Chromatogr Sci*. 1988;26:362–71.
232. Elder DP, Kuentz M, Holm R. Pharmaceutical excipients - Quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016 May;87:88–99.
233. Patel R, Barker J, Elshaer A. Pharmaceutical excipients and drug metabolism: A mini-review. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–21.
234. Pockle RD, Masareddy RS, Patil AS, Patil PD. A comprehensive review on pharmaceutical excipients. Vol. 14, *Therapeutic Delivery*. Newlands Press Ltd; 2023. p. 443–58.
235. Radke M, Maier MP. Lessons learned from water/sediment-testing of pharmaceuticals. *Water Res*. 2014 May;55:63–73.
236. Klang MG. Developing guidance for feeding tube administration of oral medications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2023 May;47:519–40.
237. Covington CL, Polavarapu PL. Specific Optical Rotations and the Horeau Effect. *Chirality*. 2016 Mar;28:181–5.
238. (731) Loss on Drying. 2025.
239. <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/drug-quality-sampling-and-testing-programs> [Internet]. Drug Quality Sampling and Testing Programs.

240. Chuong MC, Taglieri CA, Huang SY, Sariol A, Kitagawa R, Barman K, et al. Compatibility of Flavoring Agents in Compounding Extemporaneous Omeprazole Oral Liquid. *Int J Pharm Compd.* 2019 Nov;23:504–10.
241. ICH. Analytical Procedure Development Q14. 2022.
242. Arabaci B, Basci Akduman NE. Robust In Vitro HPLC-DAD Method for Accurate Quantification of N-Carbamylglutamate in Drug Formulations. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy.* 2024 Dec;44:337–50.
243. <281> Residue on Ignition. 2025.
244. <467> Residual Solvents. 2025.
245. Step. Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q3C (R9) Guideline on impurities: guideline for residual solvents [Internet]. 2024. Available from: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact)
246. Ma Y, Zeng Z, Kong L, Chen Y, He P. Determination of N-carbamylglutamate in feeds and animal products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Molecules.* 2019 Aug;24.
247. Atole DM, Rajput HH. ULTRAVIOLET SPECTROSCOPY AND ITS PHARMACEUTICAL APPLICATIONS- A BRIEF REVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2018 Feb 1;11(2):59.
248. Batool M, Haider MN, Javed T. Applications of Spectroscopic Techniques for Characterization of Polymer Nanocomposite: A Review. *J Inorg Organomet Polym Mater.* 2022 Dec;32:4478–503.
249. Davis HF, Stauffer HU. Dynamics of Elementary Chemical Reactions. In: *Encyclopedia of Physical Science and Technology.* Elsevier; 2003. p. 697–715.
250. Olsztyńska-Janus S, Gasior-Głogowska M, Szymborska-Małek K, Komorowska M, Witkiewicz W, Pezowicz C, et al. Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. part II: Raman spectroscopy. *Acta Bioeng Biomech.* 2012;14:121–33.
251. M S, S M, S S. Highlights of Spectroscopic Analysis – A Review. *Int J Life Sci Pharma Res.* 2021 Mar;
252. Pellenz L, de Oliveira CRS, da Silva Júnior AH, da Silva LJS, da Silva L, Ulson de Souza AA, et al. A comprehensive guide for characterization of adsorbent materials. Vol. 305, *Separation and Purification Technology.* Elsevier B.V.; 2023.

253. Nahar L, Onder A, Sarker SD. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). Vol. 31, *Phytochemical Analysis*. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 413–57.
254. Bell D. <https://www.chromatographyonline.com/view/recent-developments-hplc-uhplc>. 2024. *Recent Developments in HPLC & UHPLC*.
255. Rahman M. Application of Computational Methods in Isolation of Plant Secondary Metabolites. In: *Computational Phytochemistry*. Elsevier; 2018. p. 107–39.
256. [https://www.researchgate.net/publication/344397502\\_HPLC\\_and\\_UHPLC\\_for\\_Practicing\\_Scientists\\_2nd\\_Edition](https://www.researchgate.net/publication/344397502_HPLC_and_UHPLC_for_Practicing_Scientists_2nd_Edition) [Internet]. (PDF) HPLC and UHPLC for Practicing Scientists 2nd Edition.
257. Nahar L, Onder A, Sarker SD. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). Vol. 31, *Phytochem. Anal.*. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 413–57.
258. <https://www.merckmillipore.com/TR/tr/products/biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/chromatography/reversed-phase-normal-phase-chromatography/WIGb.qB.NyAAAAFAbN5kiQpx,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F> [Internet]. Normal and Reversed Phase Chromatography for Reliable Polishing.
259. Driskell JA. VITAMIN B6 | Properties and Determination. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier; 2003. p. 6012–20.
260. Moravek. <https://www.moravek.com/reverse-phase-vs-normal-phase-hplc-a-brief-comparison/>. Reverse-Phase vs. Normal-Phase HPLC: A Brief Comparison.
261. Moldoveanu S, David V. Other HPLC separations performed on polar stationary phases. In: *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier; 2022. p. 479–84.
262. Jandera P. Comparison of reversed-phase and normal-phase column liquid chromatographic techniques for the separation of low and high molecular weight compounds. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2002;25:2901–31.
263. Abdu Hussen A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*. 2022 Jun;6:010–20.
264. Nikolin B, Imamović B, Medanhodžić-Vuk S, Sober M. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosnian journal of basic*

- medical sciences / Udruzenje basicnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences. 2004;4:5–9.
265. Hage DS. Chromatography. In: Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens. Elsevier; 2018. p. 1–32.
  266. Dong, Michael W. MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS. 1973.
  267. Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelińska A, Garbacki P. UHPLC: The greening face of liquid chromatography. Vol. 76, Chromatographia. 2013. p. 1429–37.
  268. Nováková L, Svoboda P, Pavlík J. Ultra-high performance liquid chromatography. In: Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition. Elsevier; 2017. p. 719–69.
  269. Mohedano ML, López P, Spano G, Russo P. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. In: Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits. Elsevier Inc.; 2015. p. 273–310.
  270. Müller ALH, De Oliveira JA, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Design of experiments and method development. In: Solid-Phase Extraction. Elsevier; 2019. p. 589–608.
  271. Müller ALH, De Oliveira JA, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Design of experiments and method development. In: Solid-Phase Extraction. Elsevier; 2019. p. 589–608.
  272. Demir Ö, Aksu B, Özsoy Y. İlaç formülasyonu geliştirilmesinde deney tasarımı (DoE) seçimi ve kullanımı. Vol. 21, Marmara Pharmaceutical Journal. Marmara University; 2017. p. 211–22.
  273. Costa S, Barroso M, Castañera A, Dias M. Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: Application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis. In: Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010. p. 2533–42.
  274. Takle MJ, Schrecker L, Deadman BJ, Dickhaut J, Wieja A, Hellgardt K, et al. Flash Thermal Racemization of Chiral Amine in Continuous Flow: An Exploration of Reaction Space Using DoE and Multivariate Transient Flow. Org Process Res Dev. 2025 Feb;
  275. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Vol. 597, Analytica Chimica Acta. 2007. p. 179–86.

276. LaPanse AJ, Krishnan A, Posewitz MC. Adaptive Laboratory Evolution for algal strain improvement: methodologies and applications. Vol. 53, Algal Research. Elsevier B.V.; 2021.
277. PLACKETT RL, BURMAN JP. THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS. *Biometrika*. 1946;33(4):305–25.
278. Oyebanji JA, Okekunle PO, Itabiyi OE. Box Behnken design application for optimization of bio-oil yield from catalytic pyrolysis of agro-residue. *Fuel Communications*. 2023 Sep;16:100091.
279. ALIEMEKE BNG, OLADEİNDE M. Box-Behnken Design Optimization of Sand Casting Process Parameters. *International Journal of Engineering Technologies IJET*. 2020 Oct;6:25–36.
280. [https://www.researchgate.net/publication/290350666\\_Using\\_Minitab-Box\\_Benken\\_Software\\_to\\_Optimize\\_the\\_Induction\\_Heating\\_Process](https://www.researchgate.net/publication/290350666_Using_Minitab-Box_Benken_Software_to_Optimize_the_Induction_Heating_Process) [Internet]. (PDF) Using Minitab-Box Benken Software to Optimize the Induction Heating Process.
281. Ngozi B, Aliemeke G, Oladeinde MH. Box-Behnken Design Optimization of Sand Casting Process Parameters. Vol. 6, INTERNATIONAL JOURNAL of ENGINEERING TECHNOLOGIES-IJET Aliemeke and Oladeinde. 2020.
282. Youssef YM, Mahrouse MA, Mostafa EA. Plackett–Burman and face-centered composite designs for development and optimization of chromatographic method for the simultaneous determination of glycopyrronium, indacaterol and mometasone in their fixed dose combination inhaler – Green profile assessment. *J Pharm Biomed Anal*. 2023 Sep;234.
283. Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of liquid chromatographic method robustness by use of Plackett-Burman design. *Acta Chromatogr*. 2010 Jun;22:281–96.
284. YerliKaya F, Arslan A, Arabaci B, Gençer P, Nemitlu E. APPLICATION OF PLACKETT-BURMAN DESIGN FOR DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A BETAMETHASONE SUSPENSION FOR INJECTION FORMULATION. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 2023;47:477–89.
285. Li W, Rasmussen HT. Strategy for developing and optimizing liquid chromatography methods in pharmaceutical development using computer-assisted screening and Plackett-Burman experimental design. *J Chromatogr A*. 2003 Oct;1016:165–80.

286. Domingo \*, Vera D, Austria RC. Playing with the senses: application of box-behnken design to optimize the bukayo formulation. Food Res [Internet]. 2019;pp-pp. Available from: <http://www.myfoodresearch.com>
287. <https://support.minitab.com/en-us/minitab/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/response-surface/create-response-surface-design/create-box-behnken-design/before-you-start/overview/> [Internet]. Overview for Create Response Surface Design (Box-Behnken).
288. Jain SP, Singh PP, Javeer S, Amin PD. Use of Plackett-Burman statistical design to study effect of formulation variables on the release of drug from hot melt sustained release extrudates. AAPS PharmSciTech. 2010 Jun;11:936–44.
289. Sangshetti JN, Chivte DK, Mohammed ], Anees I, Langade M, Khan F, et al. Determination of Tamsulosin by HPLC Section A-Research paper. Eur Chem Bull [Internet]. 2019;8(12):409–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.17628/ecb.2019.8.409-414>
290. Karlapudi AP, Krupanidhi S, E. RR, M. I, Md. NB, T.C. V. Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated Bacillus sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. Beni Suf Univ J Basic Appl Sci. 2018 Dec;7:543–6.
291. Patel K, Shah UA, Patel CN. Box–Behnken design-assisted optimization of RP-HPLC method for the estimation of evogliptin tartrate by analytical quality by design. Futur J Pharm Sci. 2023 Jul 19;9(1):57.
292. Patel K, Shah UA, Patel CN. Box–Behnken design-assisted optimization of RP-HPLC method for the estimation of evogliptin tartrate by analytical quality by design. Futur J Pharm Sci. 2023 Jul;9.
293. Beg S, Akhter S. Box–Behnken Designs and Their Applications in Pharmaceutical Product Development. In: Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development Volume I: Basics and Fundamental Principles. Springer Singapore; 2021. p. 77–85.
294. Aziz ARA, Aziz SA. Application of Box Behnken Design to Optimize the Parameters for Kenaf-Epoxy as Noise Absorber. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Institute of Physics Publishing; 2018.
295. Szpisják-Gulyás N, Al-Tayawi AN, Horváth ZH, László Z, Kertész S, Hodúr C. Methods for experimental design, central composite design and the Box–Behnken design, to optimise operational parameters: A review. Vol. 52, Acta Alimentaria. Akadémiai Kiado ZRt.; 2023. p. 521–37.
296. Robinson TJ. Box-Behnken Designs. In: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. Wiley; 2014.

297. Zambare V, Jacob S, Din MFM, Ponraj M. Box–Behnken Design-Based Optimization of the Saccharification of Primary Paper-Mill Sludge as a Renewable Raw Material for Bioethanol Production. *Sustainability* (Switzerland). 2023 Jul;15.
298. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Vol. 147, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 590–611.
299. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Vol. 147, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 590–611.
300. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Vol. 147, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 590–611.
301. Saha P, Pandey MM. Design of Experiment (DoE)-Approach Based RP-HPLC Analytical Method Development and Validation for Estimation of Efavirenz in Bulk and Formulations. *J Chromatogr Sci*. 2022 Jan;60:35–44.
302. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Vol. 147, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 590–611.
303. SARISALTIK YASIN D, ARSLANTÜRK BİNGÜL A, KARAKÜÇÜK A, TEKSİN ZŞ. Development and Validation of an HPLC Method Using an Experimental Design for Analysis of Amlodipine Besylate and Enalapril Maleate in a Fixed-dose Combination. *Turk J Pharm Sci*. 2021 Jun;18:306–18.
304. El Maaty MAA, Hanafi RS, Aboul-Enein HY, Gad MZ. Design-of-experiment approach for HPLC analysis of 25-hydroxyvitamin d: A comparative assay with ELISA. *J Chromatogr Sci*. 2015 Jan;53:66–72.
305. Ganorkar SB, Shirkhedkar AA. Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: Analytics, applications, implications and future prospects. *Rev Anal Chem*. 2017 Sep;36.
306. Doltade M, Saudagar R. The Analytical Method Development and Validation: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* [Internet]. 2019 May 15;9(3):563–70. Available from: <https://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/2774>

307. [https://www.researchgate.net/publication/345600243\\_A\\_Review\\_Article\\_on\\_Analytical\\_Method\\_Validation](https://www.researchgate.net/publication/345600243_A_Review_Article_on_Analytical_Method_Validation) [Internet]. (PDF) A Review Article on Analytical Method Validation.
308. Sushila Dagadu Chavan, Deepa Mahendra Desai. Analytical method validation: A brief review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2022 Nov 30;16(2):389–402.
309. Lal B, Kapoor D, Jaimini M. A review on analytical method validation and its regulatory perspectives. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019 Mar;9:501–6.
310. Teja GS, Archana D, Srinu B, Ali SKA, Reddy SSN, Parvez SK, et al. A Comprehensive Guide for Analytical Method Validation. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2023 Oct;82(2).
311. Shah FA, Parbat AY, Chavhan MR, Kitukale MD, Chandewar A V. A REVIEW ON ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. *Certified Journal | Shah et al World Journal of Pharmaceutical Research* [Internet]. 2021;10. Available from: [www.wjpr.net](http://www.wjpr.net)
312. Söğüt Ertaş Ö, Kayali A. An overview on analytical method validation. Vol. 34, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. University of Ankara; 2005. p. 41–57.
313. Clarke GS. The validation of analytical methods for drug substances and drug products in UK pharmaceutical laboratories. *J Pharm Biomed Anal*. 1994;12:643–52.
314. Rina R, Baile M, Jain A. A multifaceted review journal in the field of pharmacy A Review: Analytical Method Development and Validation. *Sys Rev Pharm*. 2021;12(8):450–4.
315. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/569734-Analytical-Method-Validation-for-Quality-Assurance-and-Process-Validation-Professionals/> [Internet]. Analytical Method Validation for Quality Assurance and Process Validation Professionals.
316. <https://www.wiley.com/en-kr/Method+Validation+in+Pharmaceutical+Analysis%3A+A+Guide+to+Best+Practice%2C+3rd+Edition-p-9783527348909> [Internet]. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, 3rd Edition*.
317. Shabir GA. Prepare a Protocol Validation Assay Testing for Impurities Identification Characteristics.

318. Lavanya G, Sunil M, Eswarudu MM, Eswaraiah MC, Harisudha K, Naga Spandana B. ANALYTICAL METHOD VALIDATION: AN UPDATED REVIEW. *Int J Pharm Sci Res* [Internet]. 2013;4(4):1280. Available from: [www.ijpsr.com](http://www.ijpsr.com)
319. Melo SRDO, Homem-De-Mello M, Silveira D, Simeoni LA. Advice on degradation products in pharmaceuticals: A toxicological evaluation. Vol. 68, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. Parenteral Drug Association Inc.; 2014. p. 221–38.
320. Alsante KM, Friedmann RC, Hatajik TD, Lohr LL, Sharp TR, Snyder KD, et al. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. In: *Separation Science and Technology*. 2001. p. 85–172.
321. Speight JG. Nomenclature and Terminology. In: *Asphalt Materials Science and Technology*. Elsevier; 2016. p. 3–43.
322. Teasdale A, Elder D, Harvey J, Spanhaak S. Impurities in New Drug Substances and New Drug Products. In: *ICH Quality Guidelines*. Wiley; 2017. p. 167–98.
323. Weidolf L, Andersson T, Bercu JP, Brink A, Glowienke S, Harvey J, et al. Qualification of impurities based on metabolite data. Vol. 110, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Academic Press Inc.; 2020.

## 8. EKLER

### EK 1. HPLC/UHPLC Kromatografi ile İlgili Formüller

#### 1. Kapasite Faktörü ( $k'$ )

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

- $t_R$ : alıkonma zamanı (dk)
- $t_0$ : ölü zaman (dk)

#### 2. Asimetri Faktörü (Tailing Factor, $T$ )

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

- $W_{0.05}$ : Pik genişliği (pik yüksekliğinin %5 seviyesinde)
- $f$ : Pik merkezinden önde kalan kısım

#### Validasyon ile İlgili Formüller

#### 5. Bağlı Standart Sapma (%BSS) – Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

$$\%BSS = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

- SD: Standart sapma
- $\bar{X}$ : Ortalama değer

#### 6. Doğrusallık İçin Regresyon Denklemi

$$y = ax + b$$

- $y$ : Pik alanı
- $a$ : Eğim
- $x$ : Konsantrasyon
- $b$ : Kesi noktası

#### 7. LOD (Tespit Limiti) ve LOQ (Tayin Limiti) İçin Formüller

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

- $\sigma$ : Standart sapma
- $S$ : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Dissolüsyon Analizi ve Çözünme Profili Formülleri

#### 8. Çözünme Yüzdesi

$$Q = \frac{C \times V \times D}{M} \times 100$$

- $C$ : Örnek derişimi ( $\mu\text{g/mL}$ )
- $V$ : Çözünme ortamı hacmi (mL)
- $D$ : Seyreltme faktörü
- $M$ : Tabletteki etkin madde miktarı ( $\mu\text{g}$ )

#### 9. $f_2$ Benzerlik Faktörü – Çözünme Profili Karşılaştırması

$$f_2 = 50 \times \log \left[ \left( 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right]$$

- $R_t$ : Referans ürün çözünme yüzdesi
- $T_t$ : Test edilen ürün çözünme yüzdesi
- $n$ : Örnekleme noktası sayısı


#### 10. Yarı Ömür ( $t_{1/2}$ ) Hesaplaması – Kimyasal Bozunma

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$


- $k$ : Bozunma hızı sabiti

## EK 2. Kullanılan Standartların Analiz Sertifikaları


### 1. Karglumik Asit

	<b>NURAY CHEMICALS PRIVATE LIMITED,</b> PLOT No.111, SIDCO INDUSTRIAL ESTATE, KAKKALUR, THIRUVALLUR DISTRICT – 602003 TAMILNADU. INDIA		
	<b>QUALITY CONTROL DEPARTMENT</b>		
	<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>		
Type of Standard	Working Reference Standard		
Name of the material	Carglumic acid	Standard Batch No.	WRS/3052/02
Quantity	22.0 g	Storage Condition	Store at controlled room temperature, 20°C to 25°C; excursions permitted between 15°C and 30°C.
Source Batch No.	CARM190001	Qualified against	Primary reference standard (B.No: PRS/CAR/045)
Evaluated on	18-12-2019	Use before	18-12-2020
Qualification Protocol No.	QC/RSQP/2019/052/00	Qualification Report No.	QC/RSQR/2019/052/00
S. No.	TEST	RESULTS	
01	Assay (on as is basis)	100.0% w/w	

### 2. Piroglutamik asit

	<b>NURAY CHEMICALS PRIVATE LIMITED,</b> PLOT No.111, SIDCO INDUSTRIAL ESTATE, KAKKALUR, THIRUVALLUR DISTRICT – 602003 TAMILNADU. INDIA		
	<b>ANALYTICAL DEVELOPMENT DEPARTMENT</b>		
	<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>		
Type of Standard	Impurity Standard	Project Name	L-Glutamine
Name of the standard	LGT Pyroglutamic acid	Standard No.	IRS/LGT/22/229
Quantity	17.5 g	Source B.No. / Lot No.	D300548
Storage Condition	At controlled room temperature, 20°C to 25°C; excursions permitted between 15°C and 30°C.		
Evaluated on	18-10-2022	Use before	18-10-2024
<b>S.No.</b>	<b>TEST</b>		<b>RESULTS</b>
1	Potency (On as is basis)		99.0 % w/w

## 3. Pirokarglumik asit

	<b>NURAY CHEMICALS PRIVATE LIMITED,</b> PLOT No.111, SIDCO INDUSTRIAL ESTATE, KAKKALUR, THIRUVALLUR DISTRICT – 602003 TAMILNADU. INDIA		
	<b>ANALYTICAL DEVELOPMENT DEPARTMENT</b>		
	<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>		
Type of Standard	Impurity Standard	Project Name	Carglumic acid
Name of the standard	CAR Pyro Carglumic acid	Standard No.	IRS/CAR/22/035
Quantity	3.52 g	Source B.No. / Lot No.	CAR/MSP/RD381/026
Storage Condition	At controlled room temperature, 20°C to 25°C; excursions permitted between 15°C and 30°C.		
Evaluated on	14-02-2022	Use before	14-02-2024
<b>S.No.</b>	<b>TEST</b>		<b>RESULTS</b>
1	Potency (On as is basis)		99.5 %w/w

CAR Pyro Carglumic acid: (S)-1-Carbonyl-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid

## 4. İlgili Bileşik A (HPA)

**NURAY CHEMICALS PVT. LTD.**

Plot No.111, SIDCO Industrial Estate, Kakkalur, Thiruvallur District - 602 003.  
 Tel : 044 - 66616700 / 703 Fax : 044 - 2766 1020  
 info@nuraychemicals.com www.nuraychemicals.com  
 GST No:33AAECN0289P1Z2



		<b>NURAY CHEMICALS PRIVATE LIMITED,</b> PLOT No.111, SIDCO INDUSTRIAL ESTATE, KAKKALUR, THIRUVALLUR DISTRICT – 602003 TAMILNADU. INDIA	
		<b>ANALYTICAL DEVELOPMENT DEPARTMENT</b>	
		<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>	
Type of Standard	Impurity Standard	Project Name	Carglumic acid
Name of the standard	CAR HPA Impurity	Standard No.	IRS/CAR/21/361
Quantity	3.4 g	Source B.No. / Lot No.	CAR/LKN/RD313/122
Storage Condition	At controlled room temperature, 20°C to 25°C; excursions permitted between 15°C and 30°C.		
Evaluated on	24-12-2021	Use before	24-12-2023
<b>S.No.</b>	<b>TEST</b>		<b>RESULTS</b>
1	Potency (on as is basis)		99.8 %w/w

## 5. Dikarbamoil L-glutamik asit

		<b>NURAY CHEMICALS PRIVATE LIMITED,</b> PLOT No.111, SIDCO INDUSTRIAL ESTATE, KAKKALUR, THIRUVALLUR DISTRICT – 602003 TAMILNADU. INDIA	
		<b>ANALYTICAL DEVELOPMENT DEPARTMENT</b>	
		<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>	
Type of Standard	Impurity Standard	Project Name	Carglumic acid
Name of the standard	CAR Dicarbamoil Impurity	Standard No.	IRS/CAR/22/129
Quantity	2.8 g	Source B.No. / Lot No.	CAR/SAM/RD342/80/P
Storage Condition	At controlled room temperature, 20°C to 25°C; excursions permitted between 15°C and 30°C.		
Evaluated on	07-06-2022	Use before	07-06-2024
<b>S.No.</b>	<b>TEST</b>		<b>RESULTS</b>
1	Potency (on as is basis)		94.8 %w/w

### EK 3. Orjinallik Raporu Örneği

Tezin Tam Adı: KARGLUMİK ASİT TABLET ÜRÜNÜ İÇİN KROMATOĞRAFİK TEKNİKLER KULLANILARAK BOZUNMA ÜRÜNLERİ TAYİN METODU GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU  
 ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: BURAK ARABACI  
 DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 134

#### ORIGINALITY REPORT

<b>4%</b>	<b>3%</b>	<b>2%</b>	<b>0%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

#### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> Internet Source	<b>1%</b>
<b>2</b>	Burak Arabaci, Fırat Yerlikaya, Nursabah Elif Basci Akduman. "A Novel Method for Development and Validation of the Degradation Products Analysis of N-Carbamylglutamate with UHPLC by Using Design of Experiment Approach", ACS Omega, 2024 Publication	<b>&lt;1%</b>
<b>3</b>	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr">openaccess.hacettepe.edu.tr</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	Ipek, Celaledin. "Turkiye'Deki Bal Numunelerinde Bulunan Hidroksimetilfurfural Miktari, Stabilitesi ve Hidrosimetilfurfural Miktar Tayini Analitik Metod Validasyonu.", Marmara Universitesi (Turkey), 2021 Publication	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<a href="http://dspace.cuni.cz">dspace.cuni.cz</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	Adigüzel, Canhasan. "Etodolakın Stabilite Göstergeli Sıvı Kromatografisi Ile İlaç Dozaj	<b>&lt;1%</b>

**EK 4. Dijital Makbuz****Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Burak Arabacı  
Assignment title: tez3  
Submission title: Burak Arabacı- Tez  
File name: Text\_Print\_V\_1.0\_-\_Turnitin.docx  
File size: 4.72M  
Page count: 134  
Word count: 24,875  
Character count: 177,983  
Submission date: 17-Jul-2025 03:14PM (UTC+0300)  
Submission ID: 2716317932



## 9. ÖZGEÇMİŞ