

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZLERİ

Kim. Merve GÖKŞEN

Analitik Kimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZLERİ

Kim. Merve GÖKŞEN

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ

ANKARA
2023

ONAY SAYFASI**GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZLERİ****Kim. Merve GÖKŞEN**

Bu tez çalışması 18.07.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Bengi Uslu (Ankara Üniversitesi)
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. İncilay Süslü (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Prof. Dr. Emirhan Nemetlu (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Tuba Reçber (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Cemil Can Eylem (Hacettepe Üniversitesi)

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

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

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

11/08/2023

.....

Kim. Merve GÖKŞEN

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

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze 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 imkânı 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 hiçbir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

.....

Kim. Merve GÖKŞEN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, sahip olduğu bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve yüksek lisans tezimin her aşamasında bana destek olan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. İncilay Süslü'ye,

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

Yüksek lisans eğitimimi destekleyen ve çalışmalarım süresince gerekli olan tüm imkanları bana sağlayan Genel Müdürü'müz Sayın Dr. Fırat Yerlikaya'ya, Elixir İlaç Araştırma ve Geliştirme ailesine ve Analitik Kimya Müdürü'müz Sayın Pelin Genç'er'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Gökşen M. Gadoterat Meglumin'in Bozunma Ürünlerinin Varlığında Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Analizleri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Gadolinyum kontrast maddeleri, manyetik rezonans görüntüleme için kullanılan kimyasal maddelerdir. Vücuda enjekte edildiğinde, gadolinyum kontrast maddesi manyetik rezonans görüntülerinin kalitesini artırır ve iyileştirir. Bu maddeler vücudumuzda herhangi bir hastalık veya anormallik olup olmadığını daha doğru bir şekilde rapor edilmesini sağladığı için manyetik rezonans görüntüleme için yaygın olarak kullanılır. Bu çalışmada, gadolinyum kontrast maddesi olan gadoterat meglumin'i içeren enjeksiyonluk çözeltisinde etkin madde ve ilgili safsızlıklarının analizleri için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve yöntem valide edilmiştir. Gadoterat meglumin aktif maddesinin, safsızlıklarının ve farmasötik preparatının farklı stres koşullarına maruz kalması sonucu oluşan bozunma ürünlerinin analizleri, geliştirilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminde en iyi koşullar; Phenomenex Luna Fenil-Hekzil kolonda (250 x 4.6 mm, 3 µm), 0.4 mL/dak akış hızı ve 200 nm UV dalga boyunda elde edilmiştir. 40 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) hareketli faz A olarak, 40 mM fosfat tamponu (pH = 4.3): asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B olarak kullanılarak gradiyent program uygulanmıştır. Örneklerin çözelti stabilitesini sağlayabilmek amacıyla örnekleyici sıcaklığı 4°C'ye ayarlanmıştır. Geliştirilen analitik yöntemde farmasötik preparata ve plaseboya stres çalışmaları (asit, baz, peroksit, ısı, ışık bozundurması) uygulanarak olası bozunma ürünleri belirlenmiştir. Geliştirilen analitik yöntemde seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık parametreleri uygulanarak valide edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntemin gadoterat meglumin etkin maddesi ile ilgili DOTA ve DO3A safsızlıklarının analizlerinde kullanılabileceği önerilmiştir. Valide edilen bu kromatografik yöntem, gadoterat meglumin ve safsızlıklarını içeren farmasötik preparatının analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gadoterat meglumin, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi, Validasyon, Stres testi, Bozunma ürünleri.

ABSTRACT

Goksen M. Analysis of Gadoterate Meglumine in the Presence of Degradation Products by High Performance Liquid Chromatography, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master's Thesis, Ankara, 2023.

Gadolinium contrast agents are chemicals used in magnetic resonance imaging. When injected into the body, gadolinium contrast agent enhances and improves the quality of magnetic resonance imaging. These substances are commonly used in magnetic resonance imaging as they allow more accurate reporting of how our body whether there are any diseases or abnormalities. In this study, high performance liquid chromatography method was developed and validated for the analysis of active substance and its impurities in the solution for injection containing gadoterate meglumine, which is a gadolinium contrast agent. Analysis of the gadoterate meglumine active substance, its impurities and degradation products formed by the exposure of its pharmaceutical formulations, to different stress conditions were carried out by the developed HPLC method. The optimum conditions in the developed HPLC method; on Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl column (250 x 4.6 mm, 3 μ m column), flow rate of 0.4 mL/min and UV wavelength of 200 nm. was obtained. Gradient program was applied using as 40 mM phosphate buffer (pH = 4.3) mobile phase A, 40 mM phosphate buffer (pH = 4.3): acetonitrile (90 : 10, v/v) mobile phase B. The sampler temperature was adjusted to 4°C in order to ensure the solution stability of the samples. In the developed analytical method, by applying stress studies (acid, base, peroxide, heat and light decomposition) to the pharmaceutical formulation and placebo, possible degradation products were determined.

The developed analytical method was validated by applying the parameters of selectivity, linearity, accuracy, precision, sensitivity, stability and robustness. It has been suggested that this developed and validated method can be used for analysis of gadoterate meglumine active ingredient and related to DOTA and DO3A impurities. This validated chromatographic method was successfully applied to the its pharmaceutical preparation containing gadoterate meglumin and its impurities.

Keywords: Gadoterate meglumine, High Performance Liquid Chromatography, Validation, Stress test, Degradation products.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kontrast Ajanlarla Manyetik Rezonans Görüntüleme	4
2.2. Gadoterat Meglumin	9
2.3. Gadoterat Meglumin'in Analiz Yöntemleri	12
2.4. Kromatografi	18
2.4.1. Kromatografi Yöntemlerin Sınıflandırılması (46)	19
2.4.2. Kromatografi Türleri	20
2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	24
2.5.1. Hareketli Faz Rezervuarı	25
2.5.2. Pompa	25
2.5.3. Örnekleyici (57)	26
2.5.4. Kolon ve Kolon Fırını	27
2.5.5. Dedektör	28
2.5.6. Yazılım	29
2.6. Kromatografik Parametreler (56, 58)	29
2.6.1. Kromatogram	29
2.6.2. Pik	30

2.6.3. Alıkonma Zamanı (t_R)	30
2.6.4. Alıkonma Hacmi (V_R)	30
2.6.5. Tutunma Zamanı (t_M)	30
2.6.6. Tutunma Hacmi (V_M)	31
2.6.7. Alıkonma Faktörü (k)	31
2.6.8. Kapasite Faktörü (k')	32
2.6.9. Seçicilik (α)	32
2.6.10. Teorik Tabaka Sayısı (N)	32
2.6.11. Ayırcılık (Rezolüsyon, R_s)	33
2.6.12. Simetri Faktörü (A)	33
2.6.13. Sinyal /Gürültü (S/G) Oranı	35
2.6.14. Sistem Tekrarlanabilirliği	36
2.7. Farmasötik Safsızlıklar	36
2.7.1. Safsızlık Kaynakları	39
2.8. Bozunma Ürünleri	42
2.9. Stres Testleri	44
2.10. Analitik Yöntem Validasyonu (4, 88-99)	47
2.10.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	48
2.10.2. Seçicilik (Özgünlük)	48
2.10.3. Sistem Tekrarlanabilirliği	49
2.10.4. Doğrusallık ve Aralık	49
2.10.5. Doğruluk	50
2.10.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)	51
2.10.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)	52
2.10.8. Sağlamlık	53
2.10.9. Kararlılık	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1. Çözeltilerin Hazırlanması	57
3.2. Kromatografik Koşullar	61
3.3. Validasyon Çalışmaları	61

3.3.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	62
3.3.2. Seçicilik (Özgünlük)	62
3.3.3. Sistem Tekrarlanabilirliği	62
3.3.4. Doğrusallık ve Aralık	63
3.3.5. Doğruluk	63
3.3.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)	64
3.3.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)	65
3.3.8. Sağlamlık	65
3.3.9. Kararlılık	65
3.4. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	66
4. BULGULAR	67
4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyonu	67
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi	67
4.1.2. Hareketli Faz Seçimi	69
4.1.3. Sabit Faz Seçimi	73
4.1.4. Seyreltme Çözeltisi Seçimi	75
4.1.5. Filtre Seçimi	78
4.2. Validasyon Çalışmaları	79
4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	79
4.2.2. Seçicilik (Özgünlük)	80
4.2.3. Sistem Tekrarlanabilirliği	89
4.2.4. Doğrusallık ve Aralık	89
4.2.5. Doğruluk	93
4.2.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)	98
4.2.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)	100
4.2.8. Sağlamlık	100
4.2.9. Kararlılık	104
4.3. Farmasötik Preparat Analizlerine İlişkin Bulgular	105
5. TARTIŞMA	106
5.1. Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu	107

5.2. Kromatografik Yöntemin Validasyonu	109
5.3. Kromatografik Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	116
7. KAYNAKLAR	118
8. EKLER	125
Ek 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	125
Ek 2. Orjinallik Raporu	128
Ek 3. Dijital Makbuz	129
9. ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER ve KISALTMALAR

BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
BT	Bilgisayarlı tomografi
C8	Oktildimetilsilan
C18	Oktadesilmetilsilan
CE	Kapiler Elektroforez
DAD	Diyot Dizi Dedektörü
dak	Dakika
EP	Avrupa Farmakopesi
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Gd	Gadolinyum
GC	Gaz Kromatografisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi
IR	İnfrared
LC	Sıvı Kromatografisi
mL	Mililitre
MR	Manyetik Rezonans
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Kütle Spektrometresi
N	Teorik tabaka sayısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NSF	Nefrojenik Sistemik Fibrozis
RRT	Bağıl alıkonma zamanı

Rs	Ayrıncılık (Rezolüsyon)
S/G	Sinyal/Gürültü
SS	Standart sapma
TE	Tespit edilemedi
tR	Alıkonma zamanı
TRL	Zamana-bağlı floresans
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Mor ötesi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Dokularda tutulabilen Gd türlerinin şematik gösterimi (7).	6
2.2. Gadoterat meglumin'in kimyasal yapısı (9).	10
2.3. DTPA (A, doğrusal şelat ajanı) ve DOTA (B makrosiklik şelat ajanı)'nın kimyasal yapısı (11).	10
2.4. Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi.	19
2.5. HPLC cihazının şematik gösterimi (54).	24
2.6. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.	30
2.7. Kromatografik parametrelere ilişkin görsel.	31
2.8. Simetri faktörüne ilişkin görsel (58).	34
2.9. Pikin vadiye oranının şematize edilmesi (58).	35
2.10. Sinyal/gürültü oranının şematize edilmesi (58).	35
2.11. İlaç etkin maddesi ve formülasyonuna uygulanan stres testleri (81).	44
4.1. % 100.0'lük derişimde gadoterik asite ait spektrum.	68
4.2. % 100.0'lük derişimde DOTA'ya ait spektrum.	68
4.3. % 100.0'lük derişimde DO3A'ya ait spektrum.	69
4.4. pH: 4.6 olan hareketli fazda % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	70
4.5. pH: 4.3 olan hareketli fazda % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	70
4.6. Hareketli faz B'ye % 8 oranında asetonitril eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	71
4.7. Hareketli faz B'ye % 10 oranında metanol eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	71
4.8. pH: 4.3 olan hareketli faza trietilamin eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	72
4.9. pH: 4.3 olan hareketli faza heksilamin eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).	72

4.10.	C18 250 x 4.6 mm, 5 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).	73
4.11.	C18 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).	74
4.12.	C8 250 x 4.6 mm, 5 µm kolon ile yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).	74
4.13.	Fenil hekzil 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).	75
4.14.	Su : asetonitril (80 : 20, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).	76
4.15.	Su : asetonitril (90 : 10, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).	76
4.16.	Su : metanol (80 : 20, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).	77
4.17.	Su : metanol (90 : 10, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).	77
4.18.	pH 4.3 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Optimum koşul).	78
4.19.	Optimum koşullarda hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram.	80
4.20.	Optimum koşullarda gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisi plasebosuna ait kromatogram.	81
4.21.	Optimum koşullarda meglumin plasebosuna ait kromatogram.	81
4.22.	Optimum koşullarda % 100.0'lük derişimde gadoterat meglumin standart çözeltisine ait kromatogram.	81
4.23.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti asit bozundurmasına ait kromatogram.	82
4.25.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.	82
4.25.	Meglumin plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.	82
4.26.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti baz bozundurmasına ait kromatogram.	83
4.27.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.	83
4.28.	Meglumin plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.	83

4.29.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti peroksit bozundurmasına ait kromatogram.	84
4.30.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.	84
4.31.	Meglumin plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.	84
4.32.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti ısı bozundurmasına ait kromatogram.	85
4.33.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.	85
4.34.	Meglumin plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.	85
4.35.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.	86
4.36.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.	86
4.37.	Meglumin plasebo görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.	87
4.38.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti UV bozundurmasına ait kromatogram.	87
4.39.	Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo UV bozundurmasına ait kromatogram.	88
4.40.	Meglumin plasebo UV bozundurmasına ait kromatogram.	88
4.41.	Regresyon analizi sonucunda gadoterik asit için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	90
4.42.	Regresyon analizi sonucunda DOTA için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	90
4.43.	Regresyon analizi sonucunda DO3A için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	91
4.44.	Gadoterik asit için doğrusallık kontrolü grafiği.	91
4.45.	DOTA için doğrusallık kontrolü grafiği.	92
4.46.	DO3A için doğrusallık kontrolü grafiği.	92
4.47.	Dotarem® adlı ticari farmasötik ürünün analizi sonucu elde edilen kromatogram.	105

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Klinikte kullanılan Gd bazlı kontrast maddeler (9, 10).	7
2.2. Gd bazlı kontrast maddelerin kimyasal formülleri (7, 9).	7
2.3. Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.	13
2.4. Avrupa Farmakopesi (USP)'nde yer alan sistem tekrarlanabilirliği kriterleri (56).	36
2.5. SUT kabul kriterleri.	48
3.1. Tez çalışmasında kullanılan etkin madde, safsızlıklar ve ticari farmasötik preparat.	56
3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.	56
3.3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.	56
3.4. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.	57
3.5. Analizde kullanılan gradiyent programı.	61
4.1. Filtre seçimi sonuçları.	79
4.2. Standart çözeltilerin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen N değerleri.	79
4.3. Standart çözeltilerin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen T değerleri.	80
4.4. Standart çözeltinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri.	89
4.5. Standart çözeltinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alıkonma zamanları.	89
4.6. Etkin madde ve ilgili safsızlıklarının kalibrasyon eğrilerine ait veriler.	92
4.7. Gadoterik asit için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	93
4.8. DOTA için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	94
4.9. DO3A için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).	95
4.10. Gadoterik asit için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).	95
4.11. DOTA için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).	96
4.12. DO3A için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).	96
4.13. Gadoterik asite ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).	96
4.14. DOTA'ya ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).	97
4.15. DO3A'ya ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).	97
4.16. Etkin maddelere ve safsızlıklara ait standart ekleme yönteminden elde edilen sonuçlar (n = 6).	98

4.17.	Gadoterik asite ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	99
4.18.	DOTA'ya ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	99
4.19.	DO3A'ya ait ara kesinlik çalışmaları sonuçları (n = 6).	99
4.20.	Gadoterik asit, DOTA ve DO3A'ya ait LOD sonuçları (n = 6).	100
4.21.	Gadoterik asit, DOTA ve DO3A'ya ait LOQ sonuçları (n = 6).	100
4.22.	Gadoterik asite ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	101
4.23.	DOTA'ya ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	102
4.24.	DO3A'ya ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).	103
4.25.	Etkin madde ve ilgili safsızlıklarını içeren standart çözeltiye ait kararlılık verileri.	104
4.26.	Etkin madde ve ilgili safsızlıklarını içeren numune çözeltisine ait kararlılık verileri.	104
4.27.	Dotarem® adlı ticari farmasötik ürüne ait analiz sonuçları (n = 6).	105

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), büyük mıknatıslar ile oluşturulan güçlü manyetik alanda ve radyo dalgaları kullanılarak belirli anatomik yapıları diğerlerinden net olarak ayırt etmek, sağlıklı ve hastalıklı dokular arasındaki farkları tanımlamak amacıyla kullanılan ve x-ışını veya diğer radyasyonların kullanılmadığı güvenli bir tıbbi tekniktir. Dokuları, organları ve iskelet sistemini görüntülemeye yararlanır. Vücuttaki bütün organları incelemek mümkündür ancak; özellikle beyin, omurilik, sinirler, kalp ve damarlar, meme, eklemler, karın içi organların incelenmesinde kullanılır. Özellikle yumuşak dokuların incelenmesinde kullanılan en uygun tanı yöntemidir. MRG, bir hastalığı veya hasarı tespit etmeye ve bir tedavinin etkinliğini izlenmesine yardımcı olur.

Bir manyetik rezonans (MR) görüntüsü insan vücudunun gerçek bir resmi gibidir. Diğer geleneksel görüntüleme tekniklerinden farklı olarak, insan vücudundaki doğal parametreleri (sıvı ve dokularda bulunan su moleküllerinde bulunan hidrojen atomlarındaki protonları) kullanarak görüntü oluşturulmaktadır. Mıknatısların oluşturduğu manyetik alan Tesla (T) birimi ile ifade edilir ve günümüzde kullanılan MR cihazları, 0.2 T - 3 T arasında manyetik alana sahip cihazlardır.

Gadolinium (Gd) kontrast maddeleri (MRG kontrast maddesi, boyalar veya ajanlar olarak adlandırılırlar), MRG taramalarında kullanılan kimyasal maddelerdir. Gd vücuda enjekte edildiğinde, MRG görüntülerinin kalitesini artırır ve iyileştirir. Bu maddeler, vücudun nasıl çalıştığını ve herhangi bir hastalık veya anormallik olup olmadığını daha doğru bir şekilde görüntülediği için MRG'de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gadoterat meglumin, MRG için kullanılan kontrast maddeler arasında yer alır. Enjekte edilebilir çözelti halinde bulunan ticari formülasyonu, yalnızca damar içine uygulama şeklinde kullanılır. Beyin, omurga, diğer tüm vücut MRG sırasında, görüntü kalitesini artırarak ilgili organların daha net görüntülenmesini sağlar (1).

Bir ilacın geliştirilmesindeki en önemli noktalardan biri etkin maddenin ve farmasötik preparatın stabilitesidir. Stabilite testinin amacı, bir ilacın veya ilacın kalitesinin raf ömrü

boyunca sıcaklık, nem ve ışık gibi farklı çevresel faktörlerin etkisiyle zamanla nasıl değiştiğine dair kanıt sağlamak ve tekrar bir test periyodu oluşturmaktır (2).

Bozunma ürünleri, bir molekülde zamanla meydana gelen ısı, kimyasal değişim, sıcaklık, nem, pH ve ışık gibi birçok çevresel faktörün etkisiyle, birincil ambalaj malzemesiyle veya yardımcı madde tepkimesiyle ile oluşan moleküllerdir. İlaçların dayanıklılığını ve stabilitesini gösteren en önemli parametrelerden biri de bozunma ürünlerinin miktarıdır. Bir ilacın etkinliğinin ve hasta açısından güvenilirliğinin kanıtlanması için ilacın bozunma ürünlerinin miktarlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu maddeler, kılavuzlarda verilen koşullarda stres koşullarına maruz bırakılarak (asit, baz, oksidasyon, sıcaklık, ışık ve nem çalışmaları uygulanarak) tespit edilir. Stres testleri, etkin maddelerin farklı koşullardaki parçalanma ürünleri ve olası parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi verir. Etkin madde, bitmiş ürün ve plaseboda oluşabilecek olası bozunma ürünlerinin tayininde kullanılacak koşullar kılavuzlarda (ICH Q1A ve ICH Q1B) belirtilmiştir (2, 3).

Analitik yöntem validasyonu, bir yöntemin geçerli olup olmadığını kanıtlamak ve yöntemin kullanımının uygunluğunu göstermek için yapılır. Geliştirilen bir analiz yönteminin o andaki ve sonraki kullanımlarında geçerli olup olmadığını göstermektedir. Uluslararası Uyum Konseyi (ICH)'e göre yöntem validasyonu parametreleri; seçicilik, sistem tekrarlanabilirliği, doğrusalılık ve aralık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, sağlamlık, tutarlılık ve kararlılıktır (4).

Literatür verilerine göre, bozunma ürünleri varlığında gadoterat meglumin'in analiz edildiği analitik bir yöntemle rastlanmamıştır. Bu amaçla, bu tez çalışması kapsamında, bozunma ürünlerinin varlığında gadoterat meglumin'in, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile UV dedektör kullanılarak aynı anda hem etkin maddenin hem de safsızlıklarının (DOTA ve DO3A) miktar tayini çalışmasının yapılması planlanmıştır. Gadoterat meglumin içeren farmasötik preparatın ve plasebosuna kılavuzlarda belirtilen koşullarda stres testleri uygulanarak (asite, baza, oksidasyona, sıcaklığa ve ışığa maruz bırakılarak) bozundurma çalışmaları gerçekleştirilecektir. Bozundurma çalışmaları doğrultusunda geliştirilen analitik yöntemin, kılavuzda belirtilen validasyon parametrelerine göre uygunluğu değerlendirilecektir. Elde edilen bulgular her aşamada uygun istatistiksel testlerle

değerlendirilecektir. Bu değerlendirmeden sonra geliştirilen ve valide edilen analitik yöntemin, ticari olarak bulunan ve gadoterat meglumin içeren farmasötik preparatlara uygulanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrast Ajanlarla Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRG, üç boyutlu ayrıntılı anatomik görüntüler veren non-invazif bir görüntüleme tekniğidir. Güçlü mıknatıslar ile oluşturulan manyetik alanda radyo dalgalarının kullanıldığı ve yansıtma yöntemiyle vücuttaki belirli anatomik iç yapılarını net olarak ayırt ederek, dokular arasındaki farklılıkların saptanması ve tanımlanması için kullanılan tıbbi cihazlardır. Genellikle hastalıkların teşhisi ve tedavinin takibi için kullanılır.

MRG cihazlarında, vücuttaki protonları bu alanla hizalanmaya zorlayan ve güçlü manyetik alan üreten mıknatıslar kullanılır. Hastaya bir radyo frekansı ışını gönderildiğinde, protonlar uyarılır ve uygulanan manyetik alana karşı direnir konumlarından saparlar. Radyo frekans ışını kapatıldığında, MRG sensörleri tarafından, protonlar temel hale dönerken salınan enerji algılanır. Güçlü manyetik alan etkisiyle protonlar, sinyal alan ve yayan anten gibi davranırlar. Protonlar temel hale dönerken aldıkları enerjiyi sinyal şeklinde yayarlar ve MR görüntüleri oluşur. Protonların manyetik alanla yeniden temel konumlarına dönüş süresi ve salınan enerji miktarı, çevreye ve moleküllerin kimyasal yapısına bağlı olarak değişir ve bu manyetik özelliklere dayanarak çeşitli doku türleri arasındaki farklılıklar ortaya çıkar.

MRG sinyalinin elde edilmesinde, hidrojen atomu kullanılır. Dokudaki hidrojen atomlarının yoğunluklarına ve hareketlerine göre görüntü oluşturmaktadır. MR'da rayyasyon kullanılmaz, onu yerine, manyetik alanla vücuttaki hidrojen atomlarının çekirdeklerindeki proton uyarılır. Vücutta en çok bulunan molekül olan suyun yapısında iki adet bulunan hidrojenin bolluğu bu kullanımın en önemli nedenidir. Hidrojen atomunda sadece bir proton ve bir elektron olup nötron yoktur. Hidrojenin bu özelliği, manyetik alanda etkileşimde önemli rol oynayan jromanyetik sabitinin (γ olarak gösterilir) diğer atomlardan çok daha yüksek olmasına neden olur. Bu özellikler nedeniyle MRG'de sinyal kaynağı olarak hidrojen atomu kullanılır. Temel olarak MRG sinyali, "dışsal bir kuvvetli manyetik alana yerleştirilen ve radyo frekans dalgaları ile enerji yüklenen hidrojen atomu protonlarının yaptığı presesyon yani salınım hareketinin alıcı sarmallarda oluşturduğu alternatif elektrik akımıdır" şeklinde

tanımlanabilir. Burada dokular arasındaki temel kontrastı belirleyen protonlar arasındaki relaksasyon farklılıklarıdır.

Bir MR görüntüsü elde etmek için, hasta büyük bir mıknatısın içine yerleştirilir ve görüntüyü bulanıklaştırmamak için görüntüleme sırasında hareketsiz kalması gerekir. Protonların manyetik alanla yeniden hizalanma hızını artırmak için MRG öncesinde veya sırasında hastaya damar yoluyla kontrast maddeler (genellikle Gd elementi içerir) verilebilir. Protonlar ne kadar hızlı hizalanırsa görüntü de o kadar parlak olur.

MRG tarayıcıları, vücudun kemikli olmayan bölümlerini veya yumuşak dokularını görüntülemek için özellikle uygundur. Bilgisayarlı tomografiden (BT) farklıdır; çünkü x-ışınlarının zararlı iyonlaştırıcı radyasyonu kullanılmaz. Beyin, omurilik ve sinirler ile kaslar, bağlar ve tendonlar MRG ile normal röntgen ve BT'ye göre daha net görülür; bu sebeple MRG genellikle diz ve omuz yaralanmalarını da görüntülemek için kullanılır.

Beyinde MRG, beyaz madde ve gri madde arasında ayırım yapabilir ve anevrizma ve tümörleri teşhis etmek için de kullanılabilir. MRG'de, x-ışınları veya diğer radyasyonlar kullanılmadığından, özellikle beyinde hastalık teşhis ve tedavisi için sık görüntüleme gerektiğinde, tercih edilen bir görüntüleme tekniğidir. MRG, x-ışını görüntüleme veya BT taramasından daha pahalıdır (5).

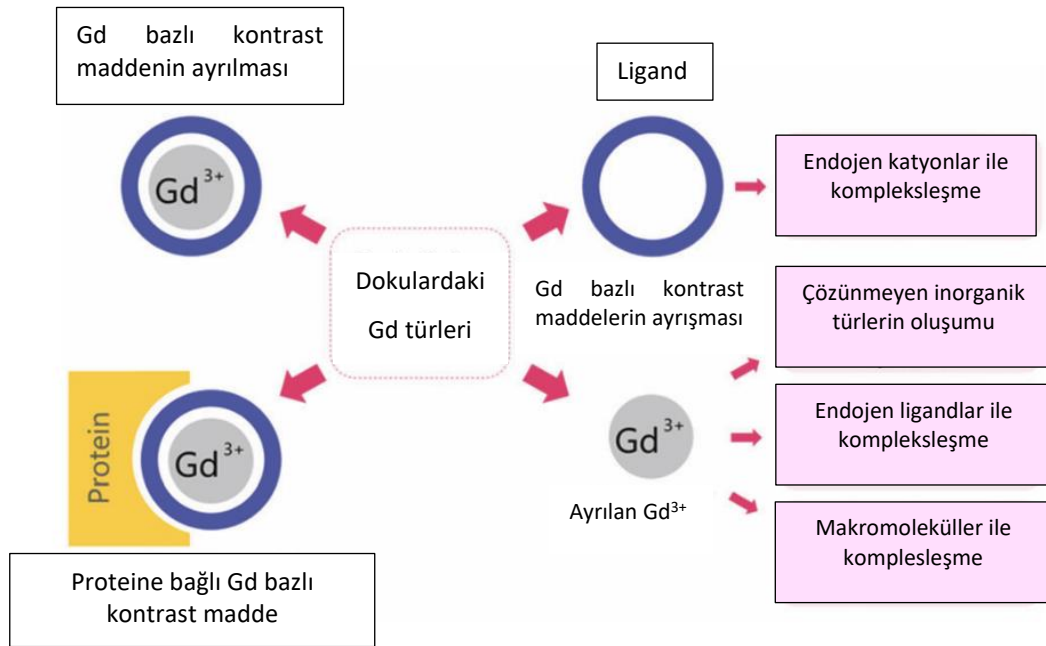
MRG, hastalıkların tanı ve tedavisi için gerekli olan önemli bir görüntüleme tekniğidir. MRG geliştirme için Gd bazlı kontrast maddelerinin kullanılması bazı durumlarda yararlıdır ve çoğu durumda güvenli kabul edilmiştir. Gd şu anda MRG iyileştirmesi için uygun olan tek ağır metaldir.

Gd, MRG'nin iyileştirmesi için önemli olan güçlü paramanyetik özellikleri nedeniyle değer verilen lantanit serisinin nadir bir toprak metalidir. Eşlenmemiş yedi elektronla 3+ yük oluşturan bir ağır metaldir. Bu eşleşmemiş elektronlar, sudaki gibi yakındaki protonları çeker. Gd³⁺ kompleksi, yakındaki protonların hastalık tanısında doku farklılaşması için önemli olan gelişmiş görüntü kalitesini sağlamak için düşük derişimlerde bir manyetik alandaki gevşeme süresini azaltır (6).

Gd, güçlü paramanyetik retansiyonu nedeniyle MRG'de tercih edilir. Farklı hayvan çalışmaları, iyonize Gd'un toksik olduğunu ve klinik kullanım için bir ligand tarafından şelatlanması gerektiğini göstermiştir. Bu gözlemler, iyonu kapsüllemek ve toksisitesini azaltmak için doğrusal veya makrosiklik organik ligandlar içeren Gd bazlı kontrast maddelerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Çok sayıda çalışmanın sonucu olarak, Gd, tek veya tekrarlanan dozlarda Gd bazlı kontrast maddelerin uygulamasından aylar hatta yıllar sonra dokularda bulunabilir, ancak tam olarak açıklığa kavuşturulması gereken bir soru vardır: "Gd'un hangi türü dokularda bulunur?". Buradaki "tür" terimi, Gd türlerinin dokulardaki kimyasal biçimini ifade eder.

- * Gd bazlı kontrast maddeler bozulmadan kalır mı?
- * Gd bazlı kontrast maddeler bir makromoleküle bağlı mıdır?
- * Gd^{3+} iyonu şelatöründen ayrıldı mı? Eğer ayrılırsa, Gd iyonu dokularda bulunan düşük moleküler ağırlıklı ligandlar (sitrata, laktat...) tarafından şelatlanabilir, makromoleküllere (proteinler, karbonhidratlar...) bağlanabilir, fosfat veya karbonat gibi endojen anyonlarla çözünmeyen inorganik türler oluşturabilir veya hatta hidroksiapatit gibi inorganik bir varlığın parçası olabilir (Şekil 2.1) (7).



Şekil 2.1. Dokularda tutulabilen Gd türlerinin şematik gösterimi (7).

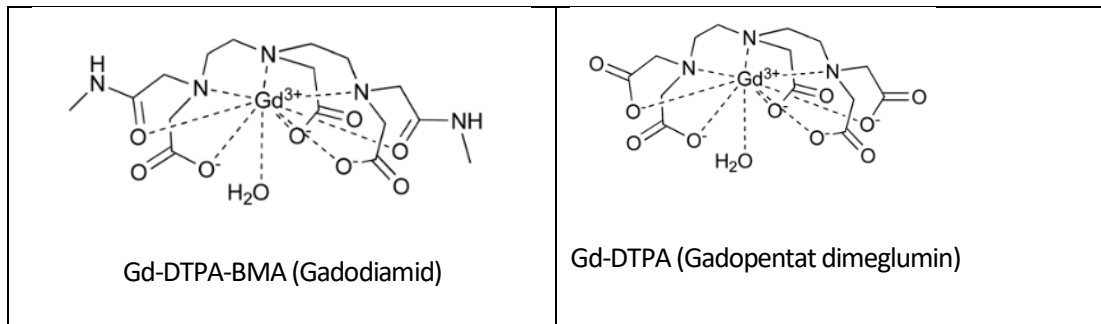
Gd bazlı kontrast maddeler, yapılarına göre farklılık gösterir ve doğrusal veya makrosiklik olmak üzere sınıflandırılır ve ayrıca bunlar da iyonik ve iyonik olmayan alt gruplara ayrılır ve doğrusal olanlar gadopentetat dimeglumin, gadodiamid ve gadoversetamid gibi ajanları içerir. Makrosiklik ajanlar, merkezi olarak Gd^{3+} ile kompleks oluşturan organik halkalar içerir ve gadoterat meglumin, gadobutrol ve gadoteridol gibi ajanları içerir (8). Makrosiklik ajanlar, doğrusal olanlardan daha yüksek yapısal stabiliteye sahiptir ve iyonik ajanlar non-iyonik olanlara göre Gd^{3+} 'ı daha fazla bağlama eğilimindedir.

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 1988'de onaylanan ilk Gd bazlı kontrast madde Magnevist (Gadopenetat dimeglumin, Almanya)'dir. Klinikte kullanılan Gd bazlı kontrast maddeler ve kimyasal yapıları Tablo 2.1 ve Tablo 2.2.'de verilmiştir (7-10).

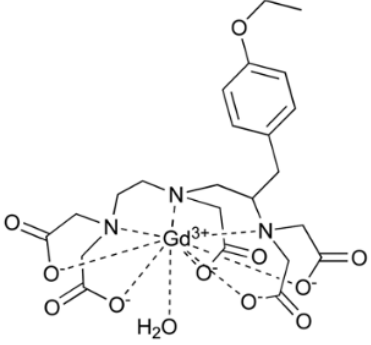
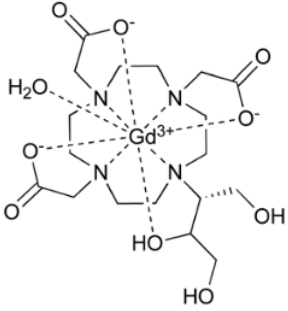
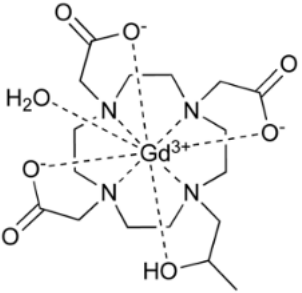
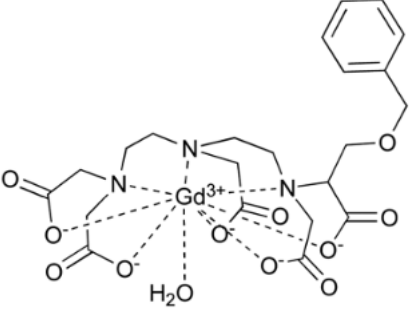
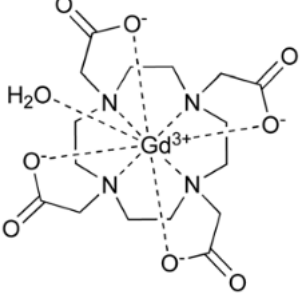
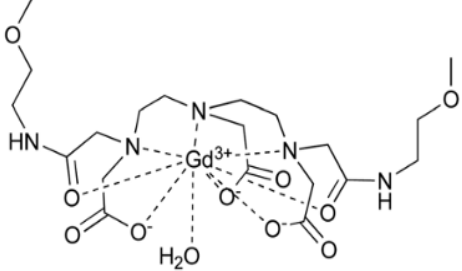
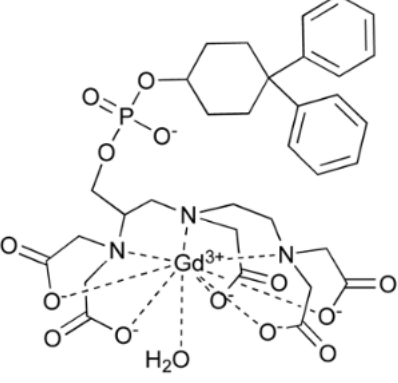
Tablo 2.1. Klinikte kullanılan Gd bazlı kontrast maddeler (9, 10).

Ticari adı	Etkin Madde	Kimyasal Fomül	Geometri	Yük
Omniscan	Gadodiamid	Gd-DTPA-BMA	Doğrusal	Non-iyonik
Magnevist	Gadopentat dimeglumin	Gd-DTPA	Doğrusal	İyonik
MultiHance	Gadobenat dimeglumin	Gd-BOPTA	Doğrusal	İyonik
Eovist	Gadoksetat disodyum	Gd-EOB-DTPA	Doğrusal	İyonik
ProHance	Gadoteridol	Gd-HP-DO3A	Makrosiklik	Non-iyonik
Gadovist	Gadobutrol	Gd-BT-DO3A	Makrosiklik	Non-iyonik
Dotarem	Gadoterat meglumin	Gd-DOTA	Makrosiklik	İyonik
Ablavar	Gadofosveset trisodyum	MS-325	Doğrusal	İyonik
OptiMARK	Gadoversetamid	Gd-DTPA-BMEA	Doğrusal	İyonik

Tablo 2.2. Gd bazlı kontrast maddelerin kimyasal formülleri (7, 9).



Tablo 2.2. (Devam) Gd bazlı kontrast maddelerin kimyasal formülleri (7, 9).

 <p>Gd-EOB-DTPA (Gadoksetat disodyum)</p>	 <p>Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)</p>
 <p>Gd-HP-DO3A (Gadoteridol)</p>	 <p>Gd-BOPTA (Gadobenat dimeglumin)</p>
 <p>Gd-DOTA (Gadoterat meglumin)</p>	 <p>Gadoversetamid Gd-DTPA-BMEA</p>
 <p>Gadofosveset trisodyum (MS-325)</p>	

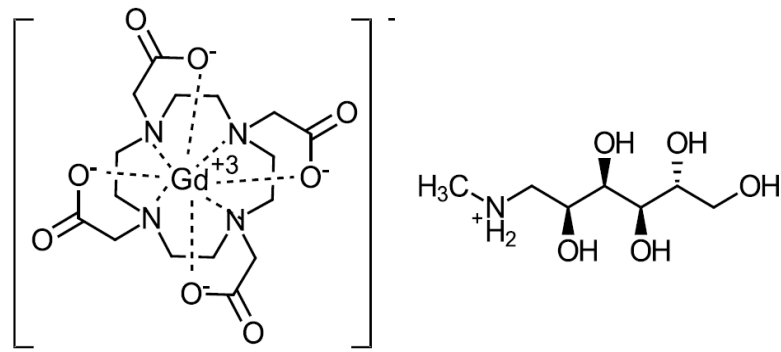
Ancak kontrast ajanlar kullanarak MRG taraması yaptırmanın da bazı riskleri vardır. Diyalize ihtiyaç duyan şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalar, gadodiamid ve diğerleri gibi bazı Gd içeren ajanların kullanımıyla bağlantılı olabilecek, nefrojenik sistemik fibroz adı verilen nadir fakat ciddi bir hastalık riski taşıyabilir. Nedensel bir bağlantı kurulmamış olsa da Amerika Birleşik Devletleri'ndeki mevcut kılavuzlar, diyaliz hastalarının yalnızca gerekli olduğunda Gd ajanları almasını ve ajanın vücuttan derhal uzaklaştırılması için taramadan sonra mümkün olan en kısa sürede diyaliz yapılmasını önermektedir (5).

2.2. Gadoterat Meglumin

MRG'de kontrast ajanlar, görüntü kalitesini arttırmak ve lezyonların görünülebilir olmasını artırmak için kullanılmaktadır. Kontrast maddelerin kullanım oranları, rutin yapılan tetkikler içerisinde yaklaşık % 25'lik bir orana sahiptir. MRG incelemelerinde kullanılan kontrast maddelerin önemli bir bölümünü Gd içeren ajanlar oluşturur. Bu kontrast maddeler rutin tetkiklerde genellikle neoplaziler, inflamasyon, enfeksiyon gibi patolojilerde ve anjiyografide çok kullanılırlar (11).

Bu tez çalışması kapsamında, MRG'de kullanılan gadoterat meglumin'in bozunma ürünlerinin varlığında farmasötik preparatlardan analizleri planlanmıştır.

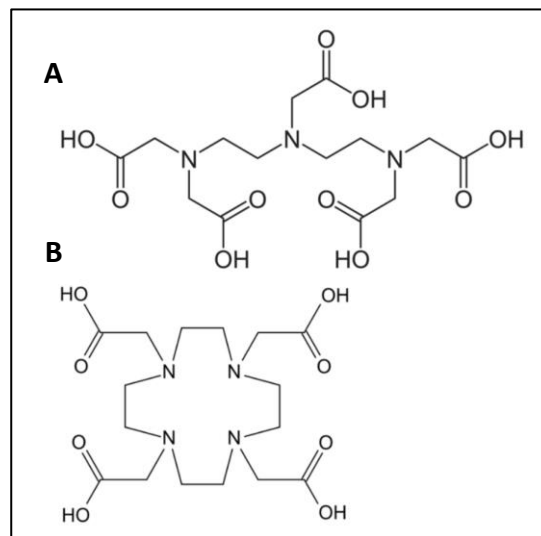
Gadoterat asit etkin maddesi, 2-[4,7-bis(carboxylatomethyl)-10-(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetrazacyclododec-1-yl]acetate; gadolinium(3+) ve meglumin (2R,3R,4R,5S)-6-(methylamino)hexane-1,2,3,4,5-pentol yapısındadır. Gadoterat meglumin, gadoterik asitin meglumin tuzudur. $C_{23}H_{42}GdN_5O_{13}$ molekül formülüne sahiptir. Kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir. 753.9 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Görünüşü beyaz tozdur. Sudaki çözünürlüğü 12.8 mg/ mL'dir.



Şekil 2.2. Gadoterat meglumin'in kimyasal yapısı (9).

Gadoterik asit, makrosiklik yapılı Gd bazlı bir MRG kontrast maddesidir. Anormal kan beyin bariyeri veya anormal vaskülariteye sahip intrakranial ve spinal lezyonlar için ve tüm vücut görüntüleme için kontrast artışı sağlamak üzere manyetik rezonans görüntüleme ile birlikte kullanılan tanısal bir kontrast maddesidir. Şelatlama özelliği için kullanılan organik asit DOTA (1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit) ve gadolinyumdan (Gd^{3+}) oluşur.

Polidentat şelat ajanları olan DTPA (dietilentriamin pentaasetik asit) ve DOTA ile kısmen daha düşük toksisite için Gd ile şelat kompleksleri oluşturulur (Şekil 2.3). Şelatları halinde Gd-(DOTA) ve ayrıca Gd-(DTPA), MRG'de kontrast madde olarak yaygın olarak kullanılır (12).



Şekil 2.3. DTPA (A, doğrusal şelat ajanı) ve DOTA (B makrosiklik şelat ajanı)'nın kimyasal yapısı (11).

Paramanyetik bir molekül olarak gadoterat, bir manyetik alana yerleştirildiğinde bir manyetik moment geliştirir. Bu manyetik moment, çevresindeki su protonlarının gevşeme oranlarını artırarak dokuların sinyal yoğunluğunun (parlaklığının) artmasına neden olur. Daha spesifik olarak, klinik faydasının kaynağı olan NMR'de T1 gevşeme süresini (ve bir dereceye kadar T2 ve T2* gevşeme sürelerini) azaltır. Artırılmış sinyal parlaklığı, kan damarlarının ve kan damarlarının “sızdıran” hale geldiği iltihaplı veya hastalıklı dokuların görüntülenmesinde kullanılmasına izin verir.

Gadoterik asit, FDA onaylı ürün Dotarem olarak, yetişkin ve pediatrik hastalarda (2 yaş ve üzeri) beyin (kafa içi), omurga ve ilişkili dokularda alanları saptamak ve görselleştirmek için MRG'de intravenöz kullanım için endikedir.

Gadoterat, proton gevşeme sürelerini ve sonuç olarak MR sinyalini etkiler ve elde edilen kontrast, gadoterat molekülünün gevşekliğiyle karakterizedir. Gadoterat için gevşeme değerleri, klinik MRG'de (0.2 - 1.5 T) kullanılan manyetik alan kuvvetleri spektrumunda benzerdir. Gadoterat, kan-beyin bariyerini geçmez ve bu nedenle normal beyin veya normal bir kan-beyin bariyerine sahip lezyonları (örneğin; kistler, olgun ameliyat sonrası yara izleri) iyileştirmez. Bununla birlikte, kan-beyin bariyerinin bozulması veya anormal vaskülarite, neoplazmlar, apseler ve enfarktler gibi lezyonlar da gadoteratın dağılımına izin verir (13).

Gd kontrast maddesi genellikle güvenlidir. Yan etkiler veya reaksiyonlar nadirdir, ancak ortaya çıkabilir. Normal böbrek fonksiyonu olan hastalarda, enjekte edilen Gd kontrast maddesinin çoğu (% 90'dan fazlası) 24 saat içinde idrar ile atılır.

Gd'a ait olası yan etkiler aşağıda sıralanmıştır (10, 14-17):

- **Geçici reaksiyonlar:** En yaygın yan etkiler; enjeksiyondan kısa bir süre sonra mide bulantısı, baş ağrısı ve baş dönmesidir. Hastalarda enjeksiyon bölgesinde soğukluk hissi olabilir.

- **Alerji benzeri reaksiyonlar:** Daha seyrek olarak, yaklaşık 1000 hastadan 1'inde, enjeksiyondan birkaç dakika sonra kaşıntılı bir deri döküntüsü ortaya çıkabilir. Bu hafif bir alerjiden kaynaklanıyor gibi görünüyor. Genellikle bir saat içinde kendi kendine geçer, ancak

nadiren gelişen daha ciddi bir alerjik reaksiyonun uyarı işareti olabilir. Gd'a şiddetli alerjik (anafilaktik) reaksiyonlar meydana gelebilir, ancak bunlar son derece nadirdir. Nefes almada zorluk, dudakların ve ağzın şişmesini içerebilen bu ciddi reaksiyonlar, diğer şiddetli alerjik reaksiyonlar için verilene benzer şekilde, standart acil ilaç tedavisine genellikle çok iyi yanıt verir.

- **Nefrojenik sistemik fibroz:** Nefrojenik sistemik fibrozis (NSF), cilt kontraktürlerine (veya lokalize cilt kalınlaşması ve sıkılaşmasına) ve iç organ hasarına neden olan, nadir görülen bir hastalıktır. Önceden ciddi böbrek fonksiyon anormallikleri olan hastaların küçük bir kısmında bazı Gd bazlı kontrast maddelerle meydana gelmiştir. NSF riskinin diğerlerine göre daha düşük olduğu görülen bazı Gd kontrast formları vardır ve bu düşük riskli formlar, daha az şiddetli böbrek hastalığı olan hastalarda, olası fayda (daha iyi tanı), çok düşük olasılığı haklı çıkarırsa kullanılır. Son dönem böbrek hastalığı olanlarda bile, daha düşük riskli bir ajanın tek bir enjeksiyonundan sonra NSF gelişme riskinin 100 enjeksiyonda 1'in çok altında olduğu düşünülmektedir.

- **Gd'un vücutta tutulması:** Son zamanlarda, Gd kontrastının en azından bazı formlarının çok küçük miktarlarının (enjekte edilen dozun yaklaşık % 1'i) dokularda, çoğunlukla kemiklerde ve küçük miktarlarda beyinde tutulduğu kabul edilmiştir. Bu, NSF için daha yüksek risk taşıyan aynı Gd kontrast formları ile daha olası görünmektedir. Bu çok küçük miktarlarda tutulan Gd'un bilinen herhangi bir olumsuz etkisi yoktur.

- **Hamilelik, olası hamilelik ve emzirme:** Hamilelik ve hamile olasılığının olduğu durumlarda çok gerekli olmadıkça Gd enjeksiyonu yaptırılması olası değildir. Emzirme durumu varsa, Gd kontrast maddesi verildikten sonra normal emzirmeye devam etmek güvenlidir. Yine de enjekte edilen Gd'un küçük bir kısmının (1000'de 1 kısımdan daha az) anne sütüne geçebileceği gösterilmiştir.

2.3. Gadoterat Meglumin'in Analiz Yöntemleri

Gadoterat meglumin'i de içeren Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.

Analit	Yöntem	Analiz Koşulları	Uygulama	Doğrusallık Aralığı	LOD	LOQ	Kaynak
Gd- DOTA Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA	LC/ESI-MS	LC: C18 kolon, HF: % 0.1 TFA su: asetonitril	İnsan plazması	-	-	-	18
Gd- DOTA Gd-DTPA	LC-TRL	$\lambda_{\text{eks}}= 274 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{eks}} 313 \text{ nm}$ LC: C ₈ kolon, HF: TRIS HCl (pH=7.6) : %7.8 asetonitril	İnsan plazması	10.0 - 5000 $\mu\text{mol/L}$	21.0 $\mu\text{mol/L}$	70.0 $\mu\text{mol/L}$	19
Gd- DOTA	LC-TRL	$\lambda_{\text{eks}}= 274 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{eks}} 313 \text{ nm}$ HF: TRIS HCl (pH=7.6) : %7.8 asetonitril	Polipropilen plastik şırınga	-	-	-	20
Gd- DOTA Gd-DTPA Gd-BOPTA Gd-DTPA-BMA Gd-BT-DO3A	LC/-ESI-MS ICP-OES	LC: ZIC-HILIC kolon, HF: % 76 12.5 mM amonyum format, % 24 asetonitril (pH 3.75) OES: Ion-trap MS (pozitif iyonlaşma) ICP-OES: 335.047 336.223 ve 342.247 nm	-	5.0 - 100 $\mu\text{mol/L}$	$2.5 \times 10^{-1} \mu\text{mol/L}$	-	21

Tablo 2.3. (Devam) Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.

Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-BOPTA	CE/ISE-MS ICP-OES	CE: 30 kV, Elektrolit: 25 mM morfolin: 12.5 mM asetik asit (pH 8.0) ICP-OES: 335.047, 336.223 ve 342.247 nm	İdrar	1.0 - 200 µmol/L	0.2 µmol/L	0.66 µmol/L	22
Gd-DOTA BT-DO3A Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA	LC/ICP-MS	LC: ZIC-HILIC, HF: % 76 12.5 mM amonyum asetat, % 24 asetonitril (pH 3.75)	Atık su	1.0×10^{-3} - 1.0 µmol/L	1.0×10^{-3} µmol/L (HILIC-ICP-MS) 2.0×10^{-4} µmol/L (ICP-MS)	3.3×10^{-3} µmol/L (HILIC-ICP-MS) 6.6×10^{-4} µmol/L (ICP-MS)	23
Gd- DOTA Gd-DTPA Gd-BOPTA Gd-DTPA-BMA Gd-DTPA-BMEA Gd-HP-DO3A	LC/ICP-OES	LC: C ₁₈ kolon, HF: 10 mM amonyum asetat: 5% asetonitril (pH 7.0) ICP-OES: 342.246 nm	Manyetik rezonans kontrast çözeltisi ve spike insan serumu	2.5×10^3 - 500.0 $\times 10^3$ µmol/L	8.0×10^{-3} µmol /mL	35.0×10^{-3} µmol /mL	24
Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA Gd-BT-DO3A	LC/ICP-MS	LC: ZIC-HILIC, HF: 20 mM amonyum asetat: asetonitril (60:40, h:h) (pH 3.75)	Yüzeysel su örnekleri Atık su-bitkileri	0.1-100 µg/L	17.0 ng/L	57.0 ng/L	25

Tablo 2.3. (Devam) Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.

Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-BT-DO3A Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA	EC/ESI-MS EC/CE/ESI-MS EC/CE/ICP-MS EC/LC/ESI-MS	ESI-MS: TOF (pozitif mod) veya Orbitrap (pozitif mod) CE: 30 kV, Elektrolit: 25 mM morfolin (pH 8.00) LC: PGC kolon, HF: 25 mM amonyum asetat (pH 5.0)	-	-	-	-	26
Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA Gd-BT-DO3A	LC/ICP - MS	LC: HILIC, % 30 50 mM amonyum asetat (pH 3.75), % 70 asetonitril	Atık su	-	0.13 µg/L	0.43 µg/L	27
Gd-DOTA Gd-DTPA	LC/ESI-MS	LC: HILIC kolon, MS (pozitif iyonizasyon) HILIC kolon, 25 mM amonyum asetat (pH 7.4): asetonitril (30:70, h/h)	İnsan plazması	50.0 × 10 ⁻³ µmol /L -500.0 µmol /L	200.0 × 10 ⁻³ µmol /L (DTPA)	660.0 × 10 ⁻³ µmol /L (DTPA)	28

Tablo 2.3. (Devam) Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.

Gd-DOTA Gd-BT-DO3A	HILIC-ICP-MS	LC: ZIC-HILIC kolon, HF: 20 mM amonyum asetat: su (65:35, h/h), pH 7.3)	Yüzeysel su örnekleri (Berlin- Teltow kanalı) Atık su bitkisi (<i>L. sativum</i> (tere))	0.5-50.0 µg/L	51.0 ng/L	153.0 ng/L	29
Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-BT-DO3A	HILIC-ICP-MS	HILIC kolon, HF: 50 mM amonyum format (pH 3.75): asetonitril 30:70, h/h)	Yüzeysel su örnekleri (Almanya) Atık su bitkileri	$0.1 \times 10^{-3} - 5.0 \times 10^{-3}$ µmol /L	0.10×10^{-3} µmol	0.37×10^{-3} µmol	30
Gd-DOTA Gd-BOPTA Gd-DPTA-BMA Gd- BT-DO3A Gd-DTPA	HILIC-ICP-MS	LC: ZIC-HILIC kolon, HF: 10 mM amonyum asetat: su:asetonitril (69:31, h/h), pH 5.0)	Musluk suyu (Berlin) Yüzeysel su örnekleri (Berlin)	0-10.0 µg/L	1.5 ng/L	4.9 ng/L	31
Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-BT-DO3A	HILIC-ICP-MS	HILIC kolon, HF: 50 mM amonyum format (pH 3.7): asetonitril (30:70, h/h)	Yüzeysel su örnekleri (Ruhr Nehri-Almanya) İçme suyu	-	11.0×10^{-6} µmol /L	37.0×10^{-6} µmol /L	32
Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA	GPC ICP-MS	Superdex 75 HR column, HF: 10 mM Tris and 40 mM amonyum format (pH 7.4)	Fare beyin dokusu	$0.1 \times 10^{-3} - 1000 \times 10^{-3}$ µmol /L	-	1.0×10^{-5} µmol /L	33

Tablo 2.3. (Devam) Gd bazlı kontrast maddelerin analiz yöntemleri.

Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-EOB-DTPA Gd-DTPA-BMA Gd-BT-DO3A Gd-HP-DO3A	HILIC-ICP-MS	HILIC kolon, HF: 10 mM amonyum asetat (pH=5.3)	Muko Nehri- Japonya) Atık su bitkileri	0-78.7 µg/L	5.9 ng/L	20.0 ng/L	34
Gd-DOTA Gd-BT-DO3A Gd-DTPA-BMA	HILIC-ICP-MS	HILIC silika kolon, HF: 10 mM amonyum asetat (pH 5.3): asetonitril 30:70, h/h)	Nehir ve deniz suyu örnekleri (Sidney)	-	120.0 ng/L	390.0 ng/L	35
Gd-DOTA Gd-DTPA-BMA Gd-BOPTA Gd-BT-DO3A	HILIC-ICP-MS	HILIC silika kolon, HF: 50 mM amonyum format (pH 5.5): asetonitril 35:65, h/h)	Kortikal kemik dokusu	0-50.0 ng/mol	$10^{-4} - 0.2 \times 10^{-3}$ µmol / g	$0.3 \times 10^{-3} - 0.6 \times$ 10^{-3} µmol / g	36
Gd-DOTA Gd-DTPA	ICP-MS UPLC-MS	HF: 12.5 mM amonyum format (pH= 3.75): asetonitril (76: 24, h/h)	Gebe ve gebe olmayan anne ve yavru fare beyin dokuları	0.5-10.0 µmol / L	-	-	37
Gd-DOTA	Dönüşümlü voltametri Kronoamperometri	TiO ₂ - Ni(SO ₄) _{0.3} (OH) _{1.4} ile nanokompozit grafit elektrot	-	-	-	-	38

TRL= Zamana-bağı floresans spektroskopisi/dedektör, λ_{eks} : Eksitasyon dalga boyu, λ_{em} : Eksitasyon dalga boyu, HF: Hareketli faz, ICP-MS: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi, ICP-OES: İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi, HILIC: Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi, MS: Kütle Spektrometresi, ESI: Elektrosprey İyonizasyon, GPC: Jel Geçirgenlik Kromatografisi.

2.4. Kromatografi

Kromatografi, karışım halindeki bileşenlerin, bir sabit fazda hareketli bir faz yardımıyla birbirinden ayrılması esasına dayanır. Bu ayırma işleminde etkili olan faktörler, adsorpsiyon (sıvı-katı), partiyon (sıvı-sıvı) ile ilgili moleküler özellikler, afinite ve moleküler ağırlıkları arasındaki farklılıkları içerir (39, 40). Bu farklılıklardan dolayı karışımdaki bazı bileşenler sabit fazda daha uzun süre alıkonurken, diğerleri hareketli fazla hareket ederek sistemden daha hızlı olarak ayrılır (41).

Bu yaklaşıma göre üç bileşen kromatografi tekniğinin temelini oluşturur.

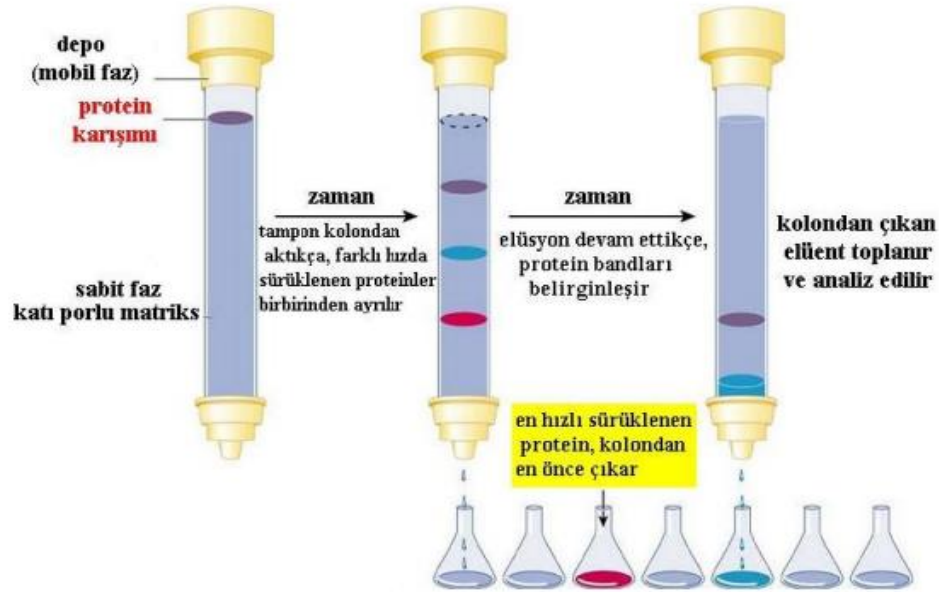
- Sabit faz: Bu faz her zaman bir katı fazdan veya katı bir desteğin yüzeyinde adsorbe edilmiş bir sıvı tabakasından oluşur.
- Hareketli faz: Bu faz sıvı, gaz veya süperkritik bir çözücüden oluşur.
- Karışımı oluşturan bileşenler veya moleküller.

Sabit faz, hareketli faz ve karışımı oluşturan maddeler arasındaki etkileşimin türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Partisyona dayalı kromatografi yöntemleri, amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri gibi küçük moleküllerin ayrılması ve tanımlanmasında çok etkilidir (42).

Kromatografide sabit faz, bir katı fazın yüzeye kaplanmış bir katı faz veya bir sıvı fazdan oluşur. Sabit fazın üzerinden akan hareketli faz, gaz veya sıvı fazdır. Hareketli faz sıvı ise sıvı kromatografisi (LC), gaz ise gaz kromatografisi (GC) olarak adlandırılır. GC; uçucu sıvı karışımları için uygulanır. LC ise, özellikle termal olarak kararsız ve uçucu olmayan numuneler için kullanılır (43).

Kromatografi 1903 yılında Rus bilim adamı Tswett tarafından bulunmuştur (Şekil 2.4). Tswett bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografiyi kullanmıştır ve toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolon kullanmış ve bu kolondan bitki pigmentlerini içeren numuneyi geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırabilmiştir. Ayrılan maddeler kolonda

renkli bantlar şeklinde gözüktüğü için yöntem kromatografi adını vermiştir ve kromatografi Yunanca'da chroma "renk" ve graphein "yazmak" anlamına gelmektedir (44, 45).



Şekil 2.4. Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi.

2.4.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması (46)

Kromatografide en genel sınıflandırma hareketli faza göre olan sınıflandırmadır ve üçe ayrılır;

- Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

Uygulama biçimine göre (kromatografik ortamın fiziksel şekline göre) kromatografisi;

- Kolon kromatografisi
- Düzlem kromatografisi

Ayrılma mekanizmasına göre kromatografisi;

- Adsorpsiyon (tutunma) kromatografisi

- Dağılma (partisyon) kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

2.4.2. Kromatografi Türleri

Kolon Kromatografisi ve Düzlem Kromatografisi (46)

Kolon kromatografisinde, sabit faz yüksek basınca dayanıklı kolona tutturulur ve hareketli faz basınç altında, bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlem kromatografisinde ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder.

Adsorpsiyon (Tutunma) Kromatografisi (47)

İlk geliştirilen ayırım tekniğidir. Adsorpsiyon, bir karışımdaki sıvı ya da gaz halindeki bileşenlerin katı faz üzerinde tutunmasıdır. Adsorpsiyon kromatografisi, analitlerin aynı zamanda sabit faz olarak da işlev gören desteğin yüzeyinde adsorpsiyon ve desorpsiyonlarına bağlı olarak tutunduğu bir sıvı kromatografi çeşididir. Bu yöntem sıvı-katı kromatografisi de denir. Katı adsorban (sabit faz), sıvı veya gaz hareketli faz kullanılır. Bu yöntemde alıkonma, her ikisi de desteğin yüzeyine bağlandığı için analitin hareketli faz molekülleri ile rekabetine dayanır.

Adsorpsiyon kromatografisinde bir bileşenin tutunma derecesi, bu kimyasalın sabit faza bağlanma gücüne, desteğin yüzey alanına, kimyasal tarafından sabit fazdan uzaklaştırılan hareketli faz miktarına ve hareketli fazın bağlanma gücüne bağlıdır. Elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimleri ve dağılma etkileşimleri (Van der Waals kuvvetleri) bu tür kromatografide alıkonmayı etkiler.

Sabit fazların; maddelerle etkileşime girmemesi, ayrılması gereken maddeleri parçalamaması ve adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması gerekmektedir. Silika ve alümina en çok tercih edilen adsorban çeşitleridir. Silikanın yüzeyi daha büyük olduğu için daha çok tercih edilmektedir.

Dağılma (Partisyon) Kromatografisi (48-50)

En çok kullanılan kromatografi türüdür. Bu kromatografide, bileşenler sıvı hareketli faz ile katı bir destek üzerine kaplanmış sıvı sabit faz arasında dağılır. Bu sebeple bu kromatografiye sıvı-sıvı kromatografisi de denir. Sıvılar arasındaki polarite farkına göre bileşenlerin ayırımı gerçekleşmektedir. Sabit faz ile benzer polaritede olan bileşenler sabit faza daha çok tutunur, hareketli faz ile benzer polarite olan bileşenler ise daha hızlı hareket edip kolonu daha önce terk eder.

Dağılma kromatografisi, normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisi olarak ikiye ayrılır.

Normal faz kromatografisinde; sabit faz polar, hareketli faz ise apolardır. Bu sabit fazlar, hidrojen bağları oluşturabilen veya çözünenlerle dipol etkileşimlerine girebilen siyano, amino veya diol gruplarına dayalı polar bölgeler içerir. Normal faz kromatografisinde sabit faz polar olduğundan, polar bileşikler için en güçlü tutma özelliğine sahiptir. Bununla birlikte, polar olmayan bileşikler ayırmak için de kullanılabilir.

Ters faz kromatografisinde; sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Bu türde sabit faz genellikle bir oktil grubu (C8) veya oktadesil grubu (C18) gibi bir alkandan oluşur. En çok kullanılan sıvı kromatografi türüdür. Popülaritesinin ana nedeni, su gibi polar bir çözücünün hareketli faz olarak kullanılıyor olmasıdır. Bu özellik, ters faz kromatografisini, klinik numunelerdeki ilaçlar gibi sulu bazlı sistemlerde çözünen maddelerin enjeksiyonu ve ayrılması için ideal hale getirir. Bu tür, silika veya alümina desteklerle gerçekleştirilen adsorpsiyon kromatografisine benzer uygulamalara sahiptir. Bu uygulamalar tipik olarak organik çözücüler ve polar fonksiyonel grupları içeren kimyasalları ayırmak için ters faz kromatografisinin kullanımını içerir. Steroidler,

böcek ilaçları, terpenoidler, iyonik olmayan deterjanlar, şekerler ve metal komplekslerinin ayırımında kullanılır. Bu tür, hem küçük moleküller (ilaçlar gibi) hem de makromoleküller (proteinler gibi) için kullanımı da dahil olmak üzere, sulu numunelerdeki çok çeşitli maddeleri ayırmak için kullanılır.

İyon Değiştirme Kromatografisi (51)

İyonik yapıdaki maddeleri ayırmak için kullanılan kromatografi tekniğidir. Bu kromatografide, analit iyonları ile sabit fazdaki iyonlar yer değiştirir. Bu sebeple, analitin de iyonik yapıda olması gerekir. Sabit faz, güçlü veya zayıf anyon ya da katyon değiştirici reçinedir ve analitle aynı yük olması gerekmektedir. Hareketli faz ise çoğunlukla pH değeri belli olan tampon içeren sulu çözeltilerdir ve sabit fazın tersinde yük içerir. Hareketli fazın zıt iyonları ile analit bileşenlerinin aynı yapıdaki iyonları sabit faza bağlanmak için zıt iyonlarla yarışa girerler. Sabit faza zayıf olarak bağlanan, yüksüz olan ya da uygun yükte olmayan bileşenler kolonu hızlı terk ederler, kuvvetli bağlanan uygun yükteki bileşenler kolonda uzun süre kalırlar.

Ortamın pH'sı, sabit ve hareketli fazın cinsi, iyon yükünün büyüklüğü, kolonun seçiciliği, kullanılan reçinenin gözenekli yapısı bu kromatografide etkilidir. Sabit faza ilgisi olan, yükü ya da iyon yarı çapı büyük olan kolonda tutunur ve geç elüe olur.

İyon değiştiriciler, inorganik iyon değiştiriciler ve organik iyon değiştiriciler olarak ikiye ayrılır. İnorganik iyon değiştiricilere örnek zeolitlerdir. Organik iyon değiştiricilere örnek reçinelerdir.

İyon değiştirme kromatografisi, proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin saflaştırılması için en sık kullanılan tekniklerden biridir. Sabit faz ve çözünen maddeler arasındaki farklı elektrostatik etkileşim derecelerine dayanır. Protein saflaştırmaları için çeşitli katyon ve anyon değişim kromatografisi ortamları geliştirilmiştir. Nükleik asitler düşük izoelektrik nokta (pI) değerlerine sahiptir ve genellikle anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılır.

Ayrışma özelliklerine göre iyon değiştirici ligandlar güçlü veya zayıf ligandlar olarak sınıflandırılır. Güçlü iyon değiştirici ligandlar, yüklerini geniş bir pH aralığında tutabilirler. Aksine,

zayıf iyon değiştirici ligandların iyonik halleri, bazı durumlarda daha fazla seçicilik sağlayabilen pH'ya bağlıdır.

Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi

Bu kromatografide, karışımdaki bileşenler moleküller büyüklüklerine göre birbirinden ayrılır. Sabit faz hidrofilik jeldir. Hareketli faz ise jel filtrasyon (süzme) kromatografisinde sulu czelti (polar veya iyonik moleküller için kullanılan) olup jel permeasyon kromatografisinde ise organik (apolar moleküller için kullanılan) czeltidir. Jellerin gözeneklerine göre bileşenler gözeneklere girip çıkar ve küçük moleküller gözeneklere girer ve en son elüe olurken büyük moleküller daha önce elüe olur.

İyon ifti Kromatografisi (52)

Bu kromatografi tekniği, ters faz dağılma kromatografisinde iyonlaşabilen bazik ya da asidik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Bu ayırma yönteminde hareketli faza iyon çifti eklenir. Hareketli fazda bulunan iyon çifti sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olan bileşenlerle iyon çifti oluşturur. Bu iyonik etkileşim sayesinde birbirinden ayrılırlar. Hareketli fazdaki iyonlarla analitteki iyonlar zıt yk ile yüklüdür. Alıkonma süresi ise iyon çiftinin polaritesine göre değişir. İyon ifti oluşturacak madde uzun zincirli bir alkilse iyon çifti daha apolar yapıda olur ve bu sebeple elüsyon süresi artar.

İyon ifti kromatografisinde en yaygın kullanılan kimyasallar; oktan sülfonik asit sodyum tuzu, heptan sülfonik asit sodyum tuzu, hekzan sülfonik asit sodyum tuzu, heksilamin, trietilamindir. Kullanılan sabit fazlar ters faz kromatografisinde kullanılan kolonlar ile aynıdır.

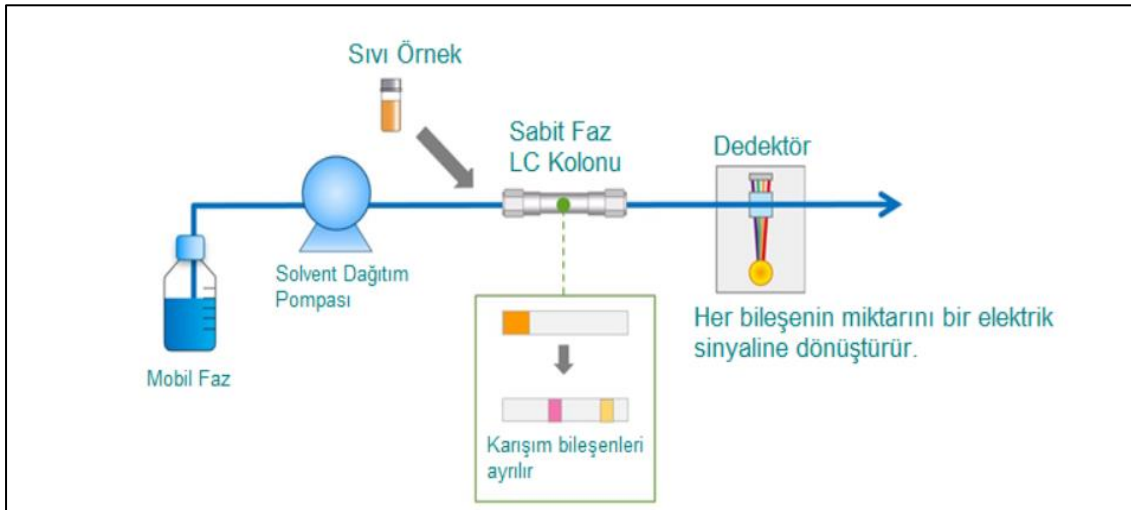
Afinite Kromatografisi

Bu teknikte, karışımdaki bileşenler sabit faza olan ilgilerine göre ayrılırlar. Ligand sabit faza kovalent bağlarla bağlanır, üzerine numune eklenir. Sonrasında liganda afinitesi olan moleküller tutunur, afinitesi olmayan ya da az olanlar daha hızlı elüe olur. Protein-ilaç, enzim-substrat, reseptör-ilaç ilgisi olarak da bilinir.

2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir karışımdaki bileşenlerin, bir kolon içindeki sabit faz ile birbirinden farklı etkileşimlere girerek ve kolonda farklı hızlarda ilerleyerek birbirinden ayrılması temeline dayanır. Analitik kimyada en çok kullanılan kromatografi tekniğidir. Bu kromatografi tekniğini kullanılarak kısa sürede birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizi ve saflaştırılması mümkündür. Bu teknik, amino asitlerin, karbonhidratların, lipidlerin, nükleik asitlerin, proteinlerin, steroidlerin ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin ayrılmasında ve tanımlanmasında iyi sonuçlar verir. HPLC'de hareketli faz, 10-600 atmosfer basıncında ve yüksek (0.1-5 mL/dak) akış hızında kolondan geçer. Bu teknikte küçük partiküllerin kullanılması ve çözücü akış hızına yüksek basınç uygulanması HPLC'nin ayırma gücünü artırır ve analizin kısa sürede tamamlanmasına olanak sağlar. Daha yüksek afiniteye sahip olan bileşenler daha uzun süre kolonda kalır ve kolondaki hareket hızları azalır. Daha düşük afiniteye sahip olan bileşenler daha kısa süre kolonda kalır ve kolonu ilk terk eden bileşenlerdir.

Bir HPLC cihazının temel bileşenleri hareketli faz rezervuarı, yüksek basınçlı pompa, kolon ve kolon fırını, örnekleyici (numune enjeksiyon sistemi), dedektör ve analizleri değerlendirebilmek için yazılımdan oluşur (Şekil 2.5) (53).



Şekil 2.5. HPLC cihazının şematik gösterimi (54).

2.5.1. Hareketli Faz Rezervuarı

Hareketli faz olarak kullanılan çözelti şişeleri HPLC cihazının en üst kısmında yer alırlar. Bunun sebebi, sıvıların yer çekimi etkisiyle aşağıya yani pompa ve degazer yönünde hareket edecek olmalarıdır (55, 56).

Hareketli faz rezervuarları marka ve modele bağlı olarak genellikle 2 veya 4 hattan oluşmaktadır. Kullanılan şişeler cam veya paslanmaz çelikten yapılmakta olup 100 - 10000 mL aralığında hacme sahiptir. Hareketli faz içerisine daldırılan hatların ucunda 0.45 µm çapında teflon veya cam filtreler kullanılmaktadır. Tüm çözücülerin degaze edilmesi gerekmektedir. Degaze edilmediğinde, hava kabarcıkları pompa ve kolonda sorunlara sebep olmaktadır. Çözeltilerdeki gazın alınması için; çözeltiler ısıtılabilir, karıştırılarak vakuma maruz bırakılabilir, ultrasonifikasyon yapılabilir veya çözelti rezervuarından helyum gazı geçirilebilir.

HPLC'de yaygın olarak ters faz kromatografisi kullanılmaktadır. Bu kromatografide hareketli fazlar genellikle polar sulu çözeltilerdir. Normal faz kromatografisi ise daha az tercih edilir ve bu kromatografide ise hareketli faz olarak apolar çözeltiler kullanılır.

2.5.2. Pompa

HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistemde; hareketli fazın enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır.

Hareketli faz, numune ve sabit faz arasındaki etkileşimlerin ayarlanabilmesi için değiştirilmektedir. Hareketli fazın akışı, izokratik ve gradiyent olmak üzere pompa sistemi sayesinde iki akışla uygulanabilir. İzokratik akışta; bileşenlerin sabit bileşimli tek bir hareketli ile elüsyonu sağlanır. Gradiyent akış; polariteleri birbirinden farklı (iki veya bazen daha fazla) hareketli faz sistemlerinin kullanıldığı tekniktir. Hareketli faz bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir.

HPLC analizlerinde kullanılan birçok pompa türü mevcuttur. Bunlardan en yaygın olanları; emme basma piston pompalar, şırınga tipi pompalar ve sabit basınç pompalarıdır. Sabit basınç pompaları, bir gaz silindirinden gelen basıncı kullanarak kolon boyunca tutarlı sürekli akış hızı sağlar. Sabit akışlı pompalar, kolondaki direnç ve hareketli fazın viskozitesinden dolayı oluşabilecek basınç değişikliklerini düzeltmesi nedeniyle daha sık kullanılmaktadır. Şırınga tipi pompalar ve emme basma piston pompalar sabit akışlı pompalardır. Şırınga tipi pompalar küçük çaplı kolonlar için uygundur. Pompalar, model ve markaya göre değişmekle birlikte en fazla 400-600 bar basınca dayanabilen sistemlerdir.

2.5.3. Örnekleyici (57)

Otomatik örnekleyici, enjeksiyonun otomatik bir şekilde gerçekleştiği modüldür.

Bir HPLC otomatik numune örnekleyici tipik olarak bir valf, bir numune dozlama veya ölçüm cihazı ve hareketli bir numune alma iğnesinden oluşan bir enjektör içeren bir numune saklama bölmesi içerir.

Enjeksiyon valfi, yüksek basınç ve akış koşulları altında HPLC kolonuna numunenin eklenmesine izin veren döner valfe benzeyen bir parçadır. Bir enjeksiyon valfi, bağımsız bir manuel valf veya otomatik numune alıcının bir parçası olabilir. Tipik olarak bir iğne portu, bir rotor ve stator kombinasyonu ve değiştirilebilir bir numune döngüsünden oluşur.

Numuneler, genellikle 5-100 µL hacimlerinde enjekte edilir. Fakat loop hacmi artırılarak enjeksiyon hacmi miktarı değiştirilebilmektedir. Marka ve modele göre iğnelerin yıkama özelliği değişebilir. İğnenin yıkanması akış ile yıkama veya vialden yıkama şeklindedir.

Örnekleyicilerde numunenin sıcaklığı da sabit tutulmaktadır. Markalara göre değişiklik gösteren bu sistemde genellikle eski cihazlarda numune soğutma sistemi yoktur fakat yeni modellerde soğutma sistemi de mevcuttur.

2.5.4. Kolon ve Kolon Fırını

Sıcaklık genellikle ayırma için gereken süreyi azalttığından, HPLC kolon fırınlarının kullanılması ayırma işleminin kontrol edilmesine ve optimize edilmesine olanak tanır. Sıcaklık miktarı genellikle ortam sıcaklığının hemen üzerindeki bir aralık ile 90 °C arasında değiştirilebilir.

HPLC'de kullanılan ayırma kolonları genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Sıklıkla kullanılan kolonlar 4.0-4.6 mm iç çaplı, 2.7-5 µm partikül büyüklüğünde ve 5-30 cm uzunluğundaki kolonlardır. Ancak çalışmaya göre çok farklı boyutlarda kolonları ticari olarak firmalardan temin etmek mümkündür.

HPLC sabit fazı kolon içindeki katı destek maddesidir. Sabit faz ve numunenin hareketli faz ile kimyasal etkileşimleri, alıkonma süresini ve örnek bileşenlerinin ayrılmasını belirler. Uygulanacak kromatografi türünün prensibine göre kolon dolgu maddeleri farklıdır. Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır; gözenekli (poröz), küresel, düzensiz, peliküller ve mikro tiplerinde olmaktadır. Dolgu maddesinin seçiminde tanecik biçimi, büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Kolon partikül büyüklüğü arttıkça numune ile yüzey etkileşimi azalmaktadır, partikül büyüklüğü azaldıkça yüzey etkileşimi artmaktadır. Yüzey etkileşimin artmasıyla birlikte daha simetrik pikler elde edilir ve pikler arasında ayırıcılık da artar. Kolon uzunluğu arttıkça analiz süresi de artmaktadır.

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

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

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

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

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

Ters faz kromatografisinde sabit faz apolar iken kullanılan hareketli faz ise polardır. Ters faz, sıvı kromatografinin en çok kullanılan türüdür ve hidrofobik türlerin ayırımı için kullanılmaktadır. Bu kromatografide, kolona bağlı fonksiyonel gruplar apolar özelliktedir ve end-capping işlemi olmuş kolonlar tercih edilmelidir.

Normal faz kromatografisinde ise sabit faz polar iken kullanılan hareketli faz apolardır. Kolon dolgu maddesi olarak saf silika kullanılmaktadır. Kullanılan diğer sabit fazlar ise siyano ve aminodur.

HILIC olarak bilinen hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi türünde ise sabit faz polar yapıdayken, hareketli faz ise daha az polarlıktadır. Bu kromatografik tür normal faz ile ters faz türlerinin bir bileşimidir. Kullanılan sabit faz normal faz ile hareketli faz ise ters fazinki ile aynı türdedir.

İyon değiştirme kromatografisinde ise sabit faz genellikle selüloz, dekstran ve reçine gibi polimerlerden oluşmaktadır. Kolon pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurulur.

2.5.5. Dedektör

Dedektörler, kolondan elüe olan numunedan alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan modüldür. Sıvı kromatografisi için ideal bir dedektör; geniş derişim aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen

seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik ayırcılığa kötü etki yapmaksızın kolondaki bileşenlere duyarlı olmalıdır.

Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numuneye uygun olmalıdır. Ultraviyole veya görünür bölge absorbands dedektörleri, kırılma indisi dedektörleri, floresans dedektör, iletkenlik dedektörleri, elektrokimyasal dedektörler, kütle spektrometreleri, ışık saçılım dedektörleri, radyoaktif dedektörler, çok-açılı ışık saçılım dedektörleri gibi birçok dedektör çeşidi analizlerde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan ultraviyole veya görünür ışık absorbands dedektörüdür.

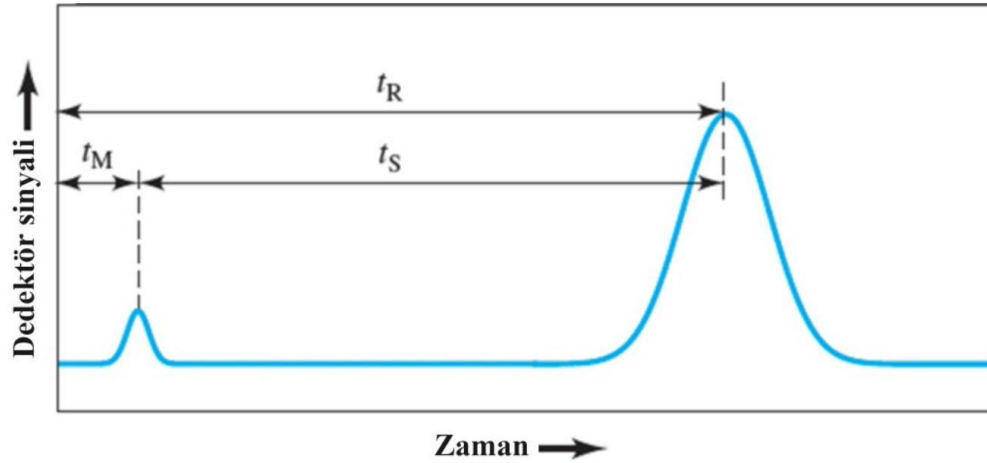
2.5.6. Yazılım

Bileşenlerin dedektörden çıktıktan sonra kaydının yapıldığı programlardır. Marka ve modele göre değişen bu programlarda (Chemstation, OpenLab CDS) enjeksiyon programları oluşturulur, analiz sonrası elde edilen kromatogramlar ve sonuçlar değerlendirilir.

2.6. Kromatografik Parametreler (56, 58)

2.6.1. Kromatogram

Kolon çıkışına, bileşeni tanımaya uygun bir dedektör yerleştirildiğinde dedektör sinyali elde edilir. Dedektörden gelen sinyal, Gauss eğrisi şeklinde bir derişim/zaman grafiğine dönüştürülür. Bu grafiğe "kromatogram" denir (Şekil 2.6). Kromatogram, dedektörden geçerken ayrılan ve üretilen piklerin gerçek zamanlı olarak grafiksel bir gösterimidir. Bir kromatogram, sistemde meydana gelen kromatografik ayrırımı temsil eder. Pikler bir taban çizgisinden bir zaman ekseni üzerinde çizilir. Her pik, farklı bir bileşen için dedektör yanıtını temsil eder. Karışımda bulunan her bir bileşen için farklı bir pik bulunur. Pikin alıkonma zamanı nitel analizde, pikin alanı ise nicel analizde kullanılır.



Şekil 2.6. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.

2.6.2. Pik

Dedektörün cevabı kaydedildiğinde elde edilen kromatogramda bir veya birden fazla bileşen için ayrı ayrı görülen tepelerdir.

2.6.3. Alıkonma Zamanı (t_R)

Bileşenlerin elüsyonu için gerekli olan zamandır. Numune enjeksiyonundan dedektöre ulaşana kadar geçen süre olarak ifade edilir (Şekil 2.7).

2.6.4. Alıkonma Hacmi (V_R)

Bileşenlerin elüsyonu için gerekli olan hareketli faz hacmidir. Akış hızına (F) ve alıkonma zamanına (t_R) bağlı olarak hesaplanır (Şekil 2.7).

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

2.6.5. Tutunma Zamanı (t_M)

Sabit fazda tutunamayan bileşenlerin elüsyonu için gerekli olan zamandır (t_0) (Şekil 2.7).

2.6.6. Tutunma Hacmi (V_M)

Sabit fazda tutunamayan bileşenlerin elüsyonu için gerekli olan hareketli faz hacmidir (V_0). Akış hızına (F) ve tutunma zamanına (t_M) bağlı olarak hesaplanır (Şekil 2.7).

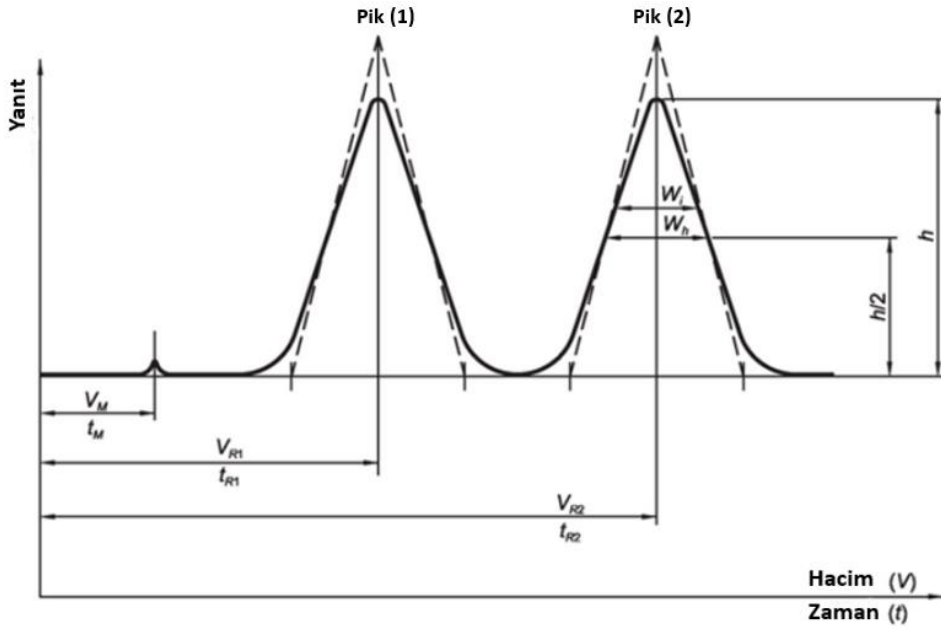
$$V_M = t_M \times F \quad (2.2)$$

2.6.7. Alıkonma Faktörü (k)

Alıkonma faktörü kütle dağılım faktörü (D_m) olarak da ifade edilir. Dağılım sabiti (K_C), sabit faz hacmi ve hareketli faz hacmi kullanılarak hesaplanır.

$k = \text{Sabit fazda bulunan bileşen miktarı} / \text{Hareketli fazda bulunan bileşen miktarı}$

$$k = K_C \times (V_S / V_M) \quad (2.3)$$



Şekil 2.7. Kromatografik parametrelere ilişkin görsel.

2.6.8. Kapasite Faktörü (k')

Bileşenlerin alıkonmasının ölçüsüdür. Sistemin ölü hacmi ile bileşenin alıkonma hacmi kullanılarak hesaplanır.

$$k' = (V_R - V_M)/V_M \quad (2.4)$$

Sistemde akış hızının sabit olduğu durumda kapasite faktörü alıkonma zamanlarına göre hesaplanır.

$$k' = (t_R - t_M)/t_M \quad (2.5)$$

İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1 ile 10 arasında olması gerekir. Hareketli faz değiştirilerek kapasite faktöründe ayarlama yapılabilir. Kapasite faktörü; sıcaklığa, hacme, hareketli fazın kimyasal yapısına ve sabit fazın kimyasal yapısına bağlıdır.

2.6.9. Seçicilik (α)

İki bileşene ait kapasite faktörü oranına seçicilik (α), bağlı alıkonma veya ayırım faktörü denir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M) \quad (2.6)$$

2.6.10. Teorik Tabaka Sayısı (N)

Kolon performansını gösteren değerdir. Alıkonma süresi (t_R) ve pikin yarı yüksekliği (W_h) kullanılarak hesaplanabilir. N , kolon etkinliğinin ölçüsüdür. Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir.

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (2.7)$$

N , bileşene bağlı olduğu gibi akış hızı, kolon özelliklerine (kolon sıcaklığına, uzunluğuna, iç çapına), hareketli faza ve alıkonma zamanına da bağlıdır.

2.6.11. Ayırıcılık (Rezolüsyon, R_s)

İki pikin birbirinden ayrılma derecesidir. Aynı çözelti içerisinde birden fazla bileşenin bulunması halinde, her bir bileşeni doğru ve kesin bir şekilde analiz edebilmek için bileşenlere ait piklerin ayırımının sağlanması gerekmektedir. Ayırıcılık, bu amacın ne derecede gerçekleştiğinin bir ölçüsüdür. İki bileşeni ait pikin birbirinden ne kadar ayrıldığıнын ölçüsüdür.

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

t_{R2} : İkinci pikin alıkonma süresi

t_{R1} : İlk pikin alıkonma süresi

W_{h1} ve W_{h2} : Her bir pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği.

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

Ayrıca aşağıdaki formül kullanılarak da ayırıcılık hesaplanabilir. Bu formüle göre; seçicilik, kapasite faktörü ve teorik tabaka sayısı arttıkça ayırıcılık da artar.

$$R_s = 1/4 \times \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \times \frac{k'}{(k' + 1)} \times \sqrt{N} \quad (2.9)$$

2.6.12. Simetri Faktörü (A)

Simetri faktörü kuyruklanma faktörü olarak da adlandırılır ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

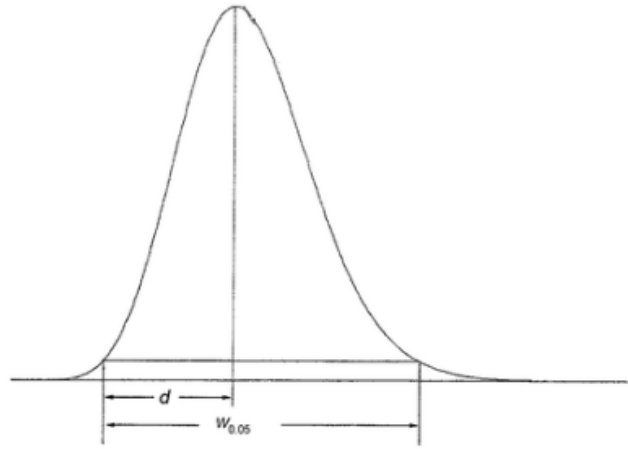
$$A = \frac{W_{0.05}}{2d} \quad (2.10)$$

$w_{0.05}$ = 0.05 kat pik yüksekliğinin genişliği

d: Pikin başlangıç noktasından pik tepesine kadar olan mesafe.

Pik yüksekliğinin 20'de birinin pikin başlangıç noktasından pikin tepesine kadar olan mesafenin 2 katına bölünmesi ile hesaplanır. Hesaplama sonucunda elde edilen simetri faktörü (A) değeri 1.0 ise pik simetriktir. A değeri 1.0'den büyük ise pikte kuyruklanma vardır. A değeri 1.0'den küçük ise pikte ön kuyruklanma söz konusudur (Şekil 2.8).

Derişime bağlı olarak maddenin alıkonma süresi artar ve ön kuyruklanma meydana gelir ya da alıkonma süresi azalır ve kuyruklanma meydana gelir.



Şekil 2.8. Simetri faktörüne ilişkin görsel (58).

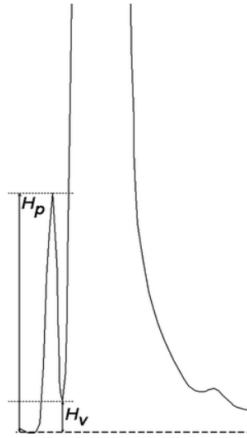
Pikin Vadiye Oranı (p/v)

İki pik arasında ayırıcılık sağlanamadığında, ilgili bileşikler analizinde sistem uygunluk kriteri olarak çalışılır (Şekil 2.9). Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (2.11)$$

H_p : Küçük pikin ekstrapole edilmiş zeminden yüksekliği

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



Şekil 2.9. Pikin vadiye oranının şematize edilmesi (58).

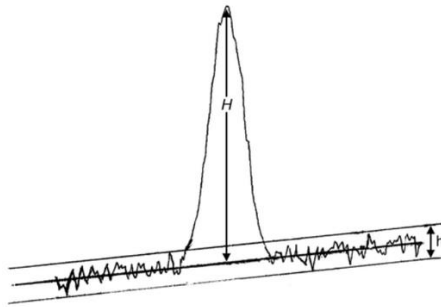
2.6.13. Sinyal/Gürültü (S/G) Oranı

Bir moleküle ait pikin yüksekliğinin baseline gürültüsüne oranıdır (Şekil 2.10) ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

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

H: Pikin yüksekliği

h: Enjeksiyon sonrasında oluşan kromatogramda kör çözelti enjeksiyon kromatogramındaki gürültünün oranı, gürültü oranı sinyal/gürültü (S/G) oranı hesaplanacak olan pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğinin 5 katı mesafede gözlemlenir ve bu pikin bulunduğu yerin etrafına eşit bir şekilde yerleştirilir.



Şekil 2.10. Sinyal/gürültü oranının şematize edilmesi (58).

2.6.14. Sistem Tekrarlanabilirliği

Analiz edilen bileşenin verdiği cevabın tekrarlanabilirliği, % bağıl standart sapma (BSS) cinsinden hesaplanır. Sistem tekrarlanabilirliği için en az 3 enjeksiyon yapılması gerekir (Tablo 2.4). Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

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

n: Ölçüm sayısı (enjeksiyon sayısı)

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

\bar{y} : Tüm değerlerin ortalaması

Tablo 2.4. Avrupa Farmakopesi (USP)'nde yer alan sistem tekrarlanabilirliği kriterleri (56).

	Enjeksiyon sayısı (n)			
	3	4	5	6
*B (%)	Miktar tayini için izin verilen en yüksek bağıl standart sapma (%)			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.1	1.27

*B: Test yöntemlerinde verilen üst limit /alt limit ± 100 .

2.7. Farmasötik Safsızlıklar

İlaç keşif sürecinde, ilacın güvenliğinin ve etkinliğinin doğrulanması tedavilerde temel parametrelerdir ve ilaç firmaları bunlara önem vermektedir. Bununla birlikte, ilacı geliştirmenin her adımında safsızlıkların tanımlanması, miktarının belirlenmesi, uzaklaştırılması önemlidir. ICH kılavuzlarına göre safsızlık, ilaç maddesinin kimyasal yapının bir parçası olmayan ve aktif bileşenlerin saflığını etkileyen herhangi bir bileşendir. Yukarıdaki tanımdan, safsızlıkların kaçınılmaz olduğunu ve küçük miktarlarda bulunacağını anlamak kolaylaşır ve sonuç olarak çeşitli

düzenleyici kurumlar, bir ilaç ürününü piyasaya sürmek için izin verilen safsızlık limitlerini belirlemek için uygulanabilir kılavuzları takip eder. Bu safsızlıkları belirlemek için de ürünü stres koşullarına (fotolitik, oksidatif, hidrolitik ve termal koşullara) maruz bırakarak yöntemler geliştirilir. Etkin maddenin ve ilaç ürünlerinin; üretimden gelen sentez safsızlıklarının, bozunma ürünlerinin, yardımcı maddelerin veya diğer tüm safsızlıkların varlığında, bir girişim olmadan analizini doğru bir şekilde yapmak çok önemlidir (2, 59, 60).

İlaçların geliştirilmesindeki en önemli noktalardan biri etkin maddenin ve farmasötik preparatının stabilitesidir. Stabilitate testinin amacı, bir ilacın veya ilacın kalitesinin raf ömrü boyunca sıcaklık, nem ve ışık gibi çeşitli çevresel faktörlerin etkisi altında zamanla nasıl değiştiğine dair kanıt sağlamak ve tekrar bir test periyodu oluşturmaktır (2, 3).

Bozunma ürünleri, bir molekülde zamanla meydana gelen ısı, kimyasal değişim, sıcaklık, nem, pH ve ışık gibi birçok çevresel faktörün etkisiyle, birincil ambalaj malzemesiyle veya yardımcı madde tepkimesiyle oluşan moleküllerdir. İlaçların dayanıklılığını ve stabilitesini gösteren en önemli parametrelerden biri de bozunma ürünlerinin miktarıdır. İlacın etkinliğinin ve hasta açısından güvenilirliğinin kanıtlanması için ilacın bozunma ürünleri miktarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu maddeler, kılavuzlarda verilen koşullarda stres koşullarına maruz bırakılarak (sıcaklık, oksidasyon, baz, asit çalışmaları uygulanarak) tespit edilir (2).

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

ICH Q3B (R2) kılavuzunda bulunan günlük maksimum alım dozuna göre safsızlıkların ihmal limitleri günlük maksimum alım dozu 1 g'dan fazla olan ürünler için % 0.05, günlük

maksimum alım dozu 1 g'a eşit veya 1 g'dan az olan ürünler için % 0.1'dir. Bu kılavuzda ürünün günlük maksimum alım dozuna göre tanımlanmamış impüriteler ve tanımlanmış impüriteler için limitler hesaplanmaktadır. İlaçta bulunan safsızlıklar hesaplanan bu yüzde limitlerden fazla olduğu takdirde, ürünün hasta üzerine olumsuz veya zararlı etkisi olacağı düşünülmektedir (61).

Safsızlıkların nitel ve nicel olarak belirlenmesi, resmi otoriteler tarafından üzerinde durulan ve ürün geliştirme çalışmalarında kritik olan noktalar arasında yer almaktadır. İngiliz Farmakopesi ve Amerikan Farmakopesi'nde; bitmiş ürün formülasyonlarında ve/veya etkin madde bileşimindeki safsızlık limitleri, Avrupa Farmakopesi'nde ise etkin madde bileşimine ait safsızlıkların limitleri belirtilmektedir. ICH'de ise yeni ilaç molekülleri, elementel safsızlıklar, çözücü safsızlıkları ile ilgili kılavuzlar bulunmaktadır. Tüm bu kılavuzlar sayesinde safsızlık limitleri belirlenebilmektedir (61-63).

Genel olarak, yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar ile ilgili olarak ICH kılavuzlarına göre; nadir görülen bir yan etkiye veya zehirli bir etkiye sahip olduğu bilinen ya da tahmin edilen ürünler dışında % 0.1 seviyesinin altındaki safsızlıkların belirlenmesine gerek yoktur (61, 64).

Farmakopelerde ve kılavuzlarda ilaçlar için limitler belirlenmesine rağmen dünyada geçerli ortak standartlar veya limitler henüz her ilaç için belirlenmemiştir. Aynı etkin madde için bile farklı safsızlıklar bulunabilmektedir.

Safsızlıkların standartlarının temin edilmesinde, resmi otoriteler ve ilaç firmalarının talepleri olmasına rağmen; bu safsızlık referans standartlarını üretmek veya izole ederek elde etmek oldukça zordur.

Farmasötik preparatlarda bulunan safsızlıkları karakterize etmek için HPLC, kapiller elektroforez (CE), elektron paramanyetik rezonans, gaz-sıvı kromatografisi, gravimetrik analiz, HPLC, UV spektrometrisi, İnfrared (IR) spektroskopisi, MS, nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve RAMAN spektroskopisi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında, ilaçların safsızlık profillemesi için en çok kullanılan teknikler, LC-MS ve GC-MS'dir (65-68).

2.7.1. Safsızlık Kaynakları

İlaçlarda bulunabilecek olası safsızlıklar ikiye ayrılmaktadır;

1. Etkin maddeden kaynaklanan safsızlıklar

2. Formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında oluşan safsızlıklar, üretim aşaması sırasında oluşan safsızlıklar veya zaman geçtikçe formülasyonda oluşan safsızlıklar (69-72).

Etkin Maddeden Kaynaklanan Safsızlıklar

ICH kılavuzuna göre, etkin maddeden kaynaklanan safsızlıklar;

- a) Organik safsızlıklar,
- b) Kalıntı çözücü (artık çözücü) safsızlıkları,
- c) İnorganik safsızlıklardır.

a) Organik Safsızlıklar: Etkin maddeden kaynaklanan organik safsızlıklar, üretim sırasında ve/veya saklama koşullarına göre oluşabilir. Etkin maddede tanımlanmış veya tanımlanmamış, uçucu veya uçucu olmayan birçok safsızlık bulunabilir.

Etkin maddelerin sentezlenme aşamasında oluşan başlangıç ürünleri veya ara ürünler en çok gözlenen safsızlıklardır. Etkin maddenin her bir sentez basamağında oluşabilirler. Yan ürünler yani sentez safsızlıkları ise; etkin maddenin sentezi sırasında oluşabilecek muhtemel safsızlıklardır. Etkin madde sentezi sonucunda % 100 verimle tek bir ürün elde etmek oldukça zor olup her zaman için yan ürünlerin oluşma olasılığı bulunmaktadır. Sentez safsızlıklarının oluşmaması veya limitler dahilinde bulunması için; özellikle çok adımlı sentez süreçlerinde etkin madde üreticilerinin her adımda gerekli özeni göstermesi gereklidir.

Bozunma (degradasyon) safsızlıkları ise; organik bileşiklerin stabilitelelerinden ve kimyasal yapılarından dolayı bozunmasıyla oluşan safsızlıklardır. Üretim aşamasında uygulanan proseslere

bağlı olarak üründe bozunma söz konusu olabilmekte ve safsızlıklar oluşabilmektedir. Bu safsızlıkların, ICH kılavuzunda limitlendirilmesi ve stabilite süresi boyunca takip edilmesi gerekir.

Kiral molekülün, enantiyomerlerinden sadece biri farmakolojik olarak aktif olup, terapötik yan etki ve indeks bakımından olumlu değerlendirilip ilaç molekülü gibi değerlendirilmektedir. Aktif olmayan diğer enantiyomer ise enantiyomerik safsızlık olarak adlandırılır. Safsızlık olarak kabul edilen enantiyomerin diğer enantiyomerden ayrılması ve miktarının belirlenmesi gerekir. Bu nedenle enantiyomerik safsızlıkların da takibi yapılmalıdır ve stres koşullarına bağlı olarak miktarı değişiyorsa stabilite takibinin de yapılması gerekmektedir (73).

b) İnorganik Safsızlıklar: İnorganik safsızlıklar; sentetik üretim işleminin başlangıç maddelerinden, reaktiflerinden ve çözücülerinden kaynaklanan inorganik asitlerin tuzları (klorürler, sülfatlar, fosfatlar vb.) olabilir. Ayrıca, üretim işleminde kullanılan reaksiyon kaplarından ve tüplerden kaynaklı inorganik safsızlık olarak ağır metaller de bulunabilir. Filtreler, santrifüj cihazları gibi yardımcı ekipmanlardan kaynaklı olarak da safsızlık görülebilmektedir. İlaç hammaddelerinin kristalizasyonu ve kromatografik saflaştırmaları sırasında ilaç hammaddesi çözeltilisini renksizleştirmek için sıklıkla kullanılan filtreler, süzme aparatları ve adsorbanlar ağır metallerin ve inorganik asit tuzlarının serbest hale geçerek safsızlık oluşturmasına neden olabilir.

c) Kalıntı Çözücü Safsızlıkları: İlaçların üretiminde kullanılan organik uçucu çözücülerin oluşturduğu safsızlıklardır. Çözücüler hammaddelerin sentezlenmesi ve/veya saflaştırma işlemleri sırasında kullanılır. Hammaddenin sentezlenmesi sırasında kullanılan bütün çözücüler önemlidir. Etkin madde üreticileri, sentez işlemi sırasında bu çözücülerini uzaklaştırmak amacıyla ek basamaklar eklemektedir. Ancak bu çözücülerini tamamen uzaklaştırmak çok zor olduğu için sentezleme basamaklarında kullanılan çözücülerin etkin maddede takibinin yapılması gerekmektedir. Organik çözücüler, insanlar ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerine bağlı olarak üç sınıfa ayrılmıştır.

1. sınıf çözücüler, en zararlı etkiye sahip olan toksik çözücülerin bulunduğu sınıftır. Bu sınıfta yer alan çözücülerin sentez işlemlerinde kullanılmaması gerekir (74). Benzen, karbon tetraklorür, 1,2-dikloroetan, 1,1-dikloroeten, 1,1,1-trikloroetan bu sınıfa ait çözücülerdir. Benzenin kanserojen etkisi, karbon tetraklorürün toksik ve çevreye zararlı etkisi, 1,2-dikloroetanın ve 1,1-dikloroetenin toksik etkisi, 1,1,1-trikloroetanın ise çevreye zararlı etkisi bulunmaktadır. Farmakopelere göre çözücü limitleri; benzenin 2 ppm, karbon tetraklorürün 4 ppm, 1,2-dikloroetanın ve 1,1-dikloroetenin 5 ppm ve 1,1,1-trikloroetanın 8 ppm'dir.

2. sınıf çözücüler, daha az toksik etkiye sahip çözücülerin bulunduğu sınıftır. Ancak bu sınıfta yer alan çözücüler potansiyel yan etkilere karşı hastaları korumak için sınırlandırılmalıdır. 2. sınıf çözücüler arasında 29 tane organik çözücü bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlar; asetonitril, metanol, kloroform, hekzan, diklorometan, 1,4-dioksan, formamide, toluen ve tetrahidrofurandır.

3. sınıf çözücüler, en az toksik etkiye sahip çözücülerin bulunduğu sınıftır. İdeali sentez sırasında bu gruptaki çözücülerin kullanılmasıdır. 3. sınıf çözücüler arasında 26 tane organik çözücü bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları; asetik asit, aseton, 2-bütanol, 1-bütanol, etanol, formik asit, dimetilsülfoksit, etil asetat, heptan, 1-propanol, 2-propanol ve trietilamindir. Bu çözücülerin farmakopelere göre göre etkin maddede bulunma limiti 5000 ppm'dir.

Bazı çözücüler için toksikolojik bir veri bulunmamaktadır. Bu çözücüler; 1,1-dietoksipropan, 1,1-dimetoksimetan, 1,1-dimetoksipropan, izooktan, izopropil eter, metilizopropil keton, metiltetrahidrofurandır, petrol eteri, trikloroasetik asit ve trifloroasetik asittir (75).

Formülasyonla ilgili Safsızlıklar

İlaç ürünlerinde etkin madde ve yardımcı maddeler dışındaki tüm maddeler formülasyonla ilgili safsızlıklar olarak değerlendirilebilir. Bu safsızlıkların; terapötik etkisi bilinmediği gibi belli limitler üzerinde olduklarında toksik etki de gösterebilirler. Bu sebeple diğer safsızlıklar gibi bunların da kılavuzda belirtilen limitler dahilinde olması gerekmektedir.

Formülasyon geliştirme sırasında oluşabilecek safsızlıklar;

- a) Çevresel faktörlerden kaynaklanan safsızlıklar (ışık, sıcaklık, nem)
- b) Dozaj formundan (özellikle sıvı dozaj formları) kaynaklanan safsızlıklar
- c) Yöntemden kaynaklanan safsızlıklar olarak üçe ayrılır.

2.8. Bozunma Ürünleri

İlaç ürünlerin üretimi ve/veya depolanması sırasında, ışık, sıcaklık, pH, nem etkisiyle veya bir yardımcı madde ve/veya ekşiyanla reaksiyona girerek ve/veya birincil ambalaj malzemesiyle reaksiyonu etkin maddede meydana gelen kimyasal bir değişiklikten kaynaklanan safsızlıklardır. Bunlar da farmasötik ürünlerin etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilecek istenmeyen kimyasallardır. Bozunma ürünlerinin önceden belirlenebilmesi amacıyla stres testleri yapılmaktadır. Bozunma ürünleri; oksidatif bozunma, fotolitik parçalanma, ester hidrolizi ve dekarboksilasyon sebebiyle oluşabilir (4).

Bozunma ürünleri; ince tabaka kromatografisi, HPLC, GC, CE, süper kritik akışkan kromatografisi ve MS yöntemleri ile belirlenebilir.

Zorlu bozundurma yani stres testleri uygulayarak bozundurma, ilaç maddelerinin ve ilaç ürünlerinin bozunma kimyası hakkında bilgi sağladığı için ilaç geliştirme sürecinin önemli bir parçasıdır. Bu bilgi öncelikle stabilite gösteren analitik yöntemler geliştirmek için kullanılır, ancak aynı zamanda formülasyon geliştirme, ambalaj geliştirme ve resmi stabilite çalışmalarının tasarımı gibi diğer amaçlar için de yararlıdır. Zorla bozundurmaya yönelik resmi bir düzenleyici

kılavuz bulunmadığından, % 5-20 oranında bozunma elde etmek için uygun koşulların kullanılması önerilir. Etkin madde, bitmiş ürün ve plaseboya uygulanacak stres testleri sonucunda oluşabilecek bozunma ürünlerinin bulunmasında kullanılan koşullar kılavuzlarda (ICH Q1A ve ICH Q1B) belirtilmiştir (2, 3).

Bozunma ürünlerinin oluşumu aşağıda verilen nedenlerden dolayı olabilir:

1. Farmasötik preparatın içindeki maddelerin birbiri ile etkileşimi nedeniyle veya saklama koşuluna bağlı olarak bozunmalar olabilir ve ürün geliştirme aşamasında bu bozunmalar kontrol edilmelidir. Koruyucu içermeyen sıvı dozaj formlarında bozunma daha hızlı gözlemlenebilir. Vitaminler, özellikle de sıvı dozaj formlarında zamanla bozunmaktadırlar (76).

2. Fonksiyonel gruplara bağlı oluşan bozunma ürünleridir.

Ester Hidrolizi: Hidroliz, özellikle ester tipi ilaçlarda görülen başlıca bozunma reaksiyonu olup genelde sıvı dozaj formlarında görülür. Ester bağı kolayca açılır ve ester grubu taşıyan ilaçların ana metabolitleri, hidroliz ürünleri veya bunların konjüгатları oluşur (77).

Oksidatif Bozunma: Aromatik halkaya doğrudan bağlı olan hidroksil grubu, heterosiklik aromatik halka, konjuge dien, nitrit ve nitrozo türevleri, aldehit grubu içeren ilaçlar oksidatif bozunmaya uğrayabilirler (78).

Fotolitik Parçalanma: Farmasötik preparatların; üretim ve ambalajlama sırasında, raf ömrü süresince ışığa maruz kalmaları durumunda bozunma ürünleri oluşabilmektedir. Florokinolon grubu antibiyotikler fotolitik parçalanmaya yatkın moleküllerdir (78, 79).

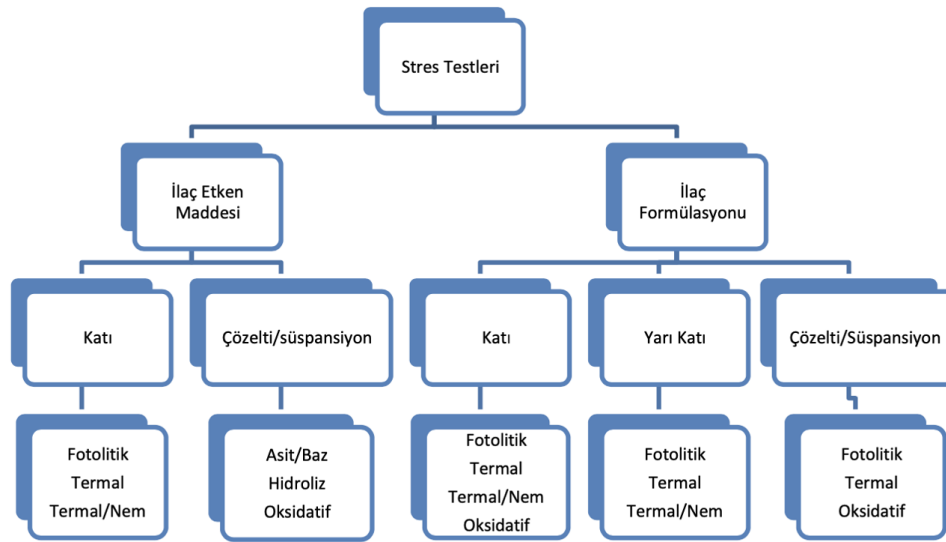
Dekarboksilasyon: Bazı karboksilik asitlerde ısı etkisiyle karboksil grubundan karbondioksit çıkar ve bozunma ürünleri oluşur (80).

2.9. Stres Testleri

Stres testlerine “zorlandırılmış bozundurma çalışmaları” da denmektedir ve ilaçların kararlılığının belirlenmesi ve ilaçların çeşitli çevresel koşullarda bozunma davranışlarını gözleyebilmek için ilaç geliştirme çalışmalarında yapılmaktadır. Zorlu saklama koşulları uygulanarak kimyasal bozunmayı ve fiziksel değişim hızını artırmak için yapılır. Bu testler, etkin maddeye ve ilgili bitmiş ürünün yapısına bağlı olabilir. Stres testlerinde etkin maddeyi bozundurma yüzdesinin yaklaşık olarak % 5-20 aralığında olması tercih edilir. Stres testleri; ilaç etkin maddesi için ve ilaç formülasyonları için uygulananlar olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.11).

Katı ilaç etkin maddeleri için fotolitik, ısı ve ısı/nem stres testleri uygulanır. İlaç etkin maddesinin çözelti veya süspansiyon olanları için ise asit/baz, hidroliz, oksidatif bozundurma uygulanır.

Katı haldeki ilaç formülasyonları için ise fotolitik, ısı, ısı/nem ve oksidatif bozundurma uygulanır. İlaç formülasyonunun yarı-katı olanları için fotolitik, ısı ve ısı/nem bozundurma uygulanır. Çözelti veya süspansiyon halindeki ilaç formülasyonları için fotolitik, ısı ve oksidasyon bozundurma uygulanır.



Şekil 2.11. İlaç etkin maddesi ve formülasyonuna uygulanan stres testleri (81).

Hidrolitik Bozundurma: Kimyasal bir maddenin suyla reaksiyona girerek parçalanmasına hidroliz denir. Hidroliz, bir kimyasalın çeşitli pH seviyelerinde su ile reaksiyona girdiğinde meydana gelen tipik bir parçalanma işlemidir. Etkin madde veya bitmiş ürün, hidrolitik bozunma sırasında asidik ve bazik koşullar altında su ile etkileşime girmektedir. Kullanılan asit veya bazın sınıfı, derişimi ve miktarı, ilaç içeriğinin stabilitesine göre belirlenmelidir. Asit hidrolizi için hidroklorik asit veya sülfürik asitler (0.1-1 M), baz hidrolizi için sodyum hidroksit veya potasyum hidroksitler (0.1-1 M) önerilir. Asidik ve alkali durumdaki yeni bir ilacın hidrolitik bozunması, ilacın içine 0.1 N HCl / 0.1 N NaOH eklenmesiyle incelenebilir. Makul bir bozulma görülürse, test bu noktada durdurulabilir. Ancak bu koşullar altında herhangi bir bozunma görülmezse, ilaca daha yüksek derişimli asit/alkali eklenmelidir. Alternatif olarak, ilaçlar başlangıç durumuna tabi tutulduktan sonra toplam bozunma görülürse, reaksiyon sıcaklığının düşmesiyle asit/alkali kuvveti azaltılabilir. Çözelti içindeki ilaç bileşikleri ve farmasötik formülasyonlar, oda sıcaklığında veya daha yüksek sıcaklıklarda asit ve baz hidrolitik stres testlerine tabi tutulabilir. İlaçların çoğunun hidrolizi, hidronyum ve hidroksil iyonlarının bağıl derişimine bağlıdır. Bu nedenle, her ilacın optimal olarak kararlı olduğu pH belirlenebilir (82-84).

Oksidatif Bozundurma: Bozundurma amacıyla ilaç maddelerinin oksidasyonu için hidrojen peroksit yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak metal iyonları, oksijen ve radikal başlatıcılar (azobisisobütironitril, AIBN) gibi diğer oksitleyici ajanlar da kullanılabilir. Hidrojen peroksit, uzun vadeli stabilite çalışmaları sırasında küçük safsızlıklar olarak ortaya çıkabilen oksidatif bozunma ürünleri oluşturmak için çok yaygın bir oksidandır. % 3-30 derişim aralığında 40°C'yi geçmeyen sıcaklıkta 2-8 gün kullanılabilir. Çalışmada, bozunmayı hızlandırmak veya bozunma miktarını arttırmak için ısı uygulanabilmektedir. (85, 86).

Isı ile Bozundurma: Genel olarak, sıcaklığın artmasıyla reaksiyon hızı artar. Bu nedenle, ilaçlar daha yüksek sıcaklıklarda bozunmaya karşı hassastır. Birçok etkin madde (vitaminler, peptidler, vb.) ısıya veya tropikal sıcaklıklara duyarlıdır. Termal bozunma, piroliz, hidroliz, dekarboksilasyon, izomerizasyon, yeniden düzenleme ve polimerizasyon gibi farklı reaksiyonları içerir. Termal bozundurma çalışmaları, genellikle 40-80 °C aralığında su banyosunda veya katı

haldeki maddeler için 90-110 °C aralığında etüv içerisinde gerçekleştirilir. En yaygın kabul gören sıcaklık, 1-2 ay boyunca düşük ve yüksek nemde 70°C'dir. Bozunma çalışmalarında yüksek sıcaklıkların kullanılması, ilaç molekülünün tüm sıcaklıklarda aynı ayrışma yolunu izleyeceğini varsayar. Bu varsayım tüm ilaç molekülleri için geçerli olmayabilir ve bu nedenle tahmine dayalı bozunma çalışmaları için kolayca erişilebilen aşırı sıcaklıkları kullanırken büyük özen gösterilmelidir (83, 85, 87).

Fotolitik Bozundurma: İlaç etkin madde veya bitmiş ürün (katı/sıvı), fotolitik bozundurma çalışmalarında ICH Q1B prosedürlerine göre UV veya görünür ışık kaynağına maruz bırakılmaktadır. Bitmiş ürün veya etkin madde, toplam maruziyet 1.2 milyon luks saat olacak şekilde görünür ışığa, toplam maruziyet 200 W s/m² olacak şekilde de UV ışığına maruz bırakılmaktadır. Fotolitik bozunma hızı, gelen ışığın yoğunluğuna ve ilaç molekülü tarafından emilen ışığın miktarına bağlıdır. Fotolitik bozunma, oksidatif olmayan veya oksidatif fotolitik reaksiyon yoluyla meydana gelebilir. Oksidatif olmayan fotolitik reaksiyon, izomerizasyon, dimerizasyon, siklizasyon, yeniden düzenlemeler, dekarboksilasyon ve X-C hetero bağlarının, N-alkil bağının vb. hemolitik bölünmesini içerir ve oksidatif fotolitik reaksiyon, tekli oksijen veya üçlü oksijen mekanizması yoluyla gerçekleşir. Singlet oksijen, fotolitik oksidatif bozunma ürünleri oluşturmak için alkenler, dienler, polinükleer aromatik hidrokarbon gibi doymamış bağlarla reaksiyona girerken, triplet oksijen, peroksit oluşturmak için bir triplet oksijen molekülü ile reaksiyona giren ilaç molekülünün serbest radikali ile reaksiyona girer. Bu nedenle ışık, oksidasyon reaksiyonları için bir katalizör görevi de görebilir (82, 83).

Nem ile Bozundurma: Bozundurma çalışmalarında, numunelerin % 75 ve üzerinde nemli ortamda 7 gün tutulması önerilir. Ayrıca, suda çözünen bileşikler, nem varlığında emilebilir. Sonuç olarak, molekül fiziksel ve kimyasal değişikliklere uğrayabilirler. Birden fazla etkin madde içeren ürünler için yapılan bozundurma çalışmalarında ise etkin maddeler ayrı ayrı çalışılmalı ve değerlendirilmelidir. Bitmiş ürüne uygulanan bozundurma çalışmalarında, aynı koşulların plasebo numunelerine de uygulanması önerilmektedir.

2.10. Analitik Yöntem Validasyonu (4, 88-99)

Validasyon, bir yöntemin amaçlanan kullanıma uygun olması için, o sistemin kullanımını onaylama işlemidir.

Analitik yöntem validasyonu ise belirli parametreleri uygulayarak geliştirilen analitik yöntemin geçerliliğinin ispatlanmasıdır. Geliştirilen analitik yöntemin rutin analizlerde kullanılması için uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardır. Yöntem validasyonu, geliştirilen ve önerilen bir analiz yönteminin o andaki ve daha sonraki kullanımlarında geçerliliğini ve uygunluğunu gösterir. Yeni geliştirilen veya standart olmayan bir yöntemin analiz öncesinde laboratuvar koşullarında valide edilmesi gerekmektedir. Analitik yöntem validasyonu; monograflar, kılavuzlar doğrultusunda yapılmaktadır. Bu doğrultuda analitik yöntem validasyonu için validasyon protokolü oluşturularak çalışılacak parametreler ve kabul kriterleri belirlenmektedir.

Ancak bazı durumlarda validasyonu tekrar yapmak gerekebilir. Bu durumlar;

- Etkin maddenin sentezinde değişiklik olması
- Bitmiş ürünün bileşiminde değişiklik olması
- Analitik yöntem prosedüründe değişiklik veya bir parametrenin çalışma aralığının dışında olması
- Yöntemin seçiciliği açısından yeni bir safsızlık bulunması
- Ekipman veya kimyasal maddelerin kalitelerindeki değişiklikler olmasıdır.

Geliştirilen miktar tayini ve safsızlıkların miktar tayini yöntemlerinde kullanılması gereken validasyon parametreleri aşağıda sıralanmıştır;

- Seçicilik (Özgünlük)
- Sistem tekrarlanabilirliği
- Doğrusallık ve aralık
- Doğruluk

- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara Kesinlik (Tutarlılık)
- Tespit Limiti (LOD)
- Alt Tayin Limiti (LOQ)
- Sağlamlık
- Kararlılık

2.10.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

Sistem uygunluk testleri (SUT), kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için kullanılır. Bu testlerin amacı, sistemin tamamının uygunluğundan emin olmaktır. Amerika Farmakopesi'ne (USP) göre SUT, sıvı ve gaz kromatografisi yöntemlerinin ayrılmaz bir parçasıdır. Kromatografik sistemin ayırıcılığı ve tekrar üretilebilirliği, analizin gerçekleşmesine yeterli olduğunun doğrulanması için kullanılır. SUT için kabul kriterleri Tablo 2.5'de verilmiştir (56, 58, 63, 98).

Tablo 2.5. SUT kabul kriterleri.

Parametre	Kabul kriteri
Kapasite faktörü (k')	$k' > 2.0$
Enjeksiyon kesinliği (tekrarlanabilirliği)	$\% BSS \leq 1.0, n = 5$
Ayırıcılık (R_s)	$R_s > 2$
Kuyruklanma faktörü (T)	$T \leq 2$
Teorik tabaka sayısı (N)	$N \geq 2000$

2.10.2. Seçicilik (Özgünlük)

Seçicilik, numunedeki diğer bileşenler varlığında analitin miktar tayini için yöntemin uygunluğudur ve analiti diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir. Matris ise analiz edilecek madde dışındaki tüm numune bileşenleridir. Bu sebeple, matristen herhangi bir girişimin

olmadığı yöntemler seçici olarak kabul edilir. İlaç matrisi; sentez bileşikleri, plasebo, ekşiyanlar ve proses safsızlıkları olabilir. Bu parametre, yöntem geliştirilirken sürekli kontrol edilmesi gereken en önemli validasyon parametrelerdendir.

Seçicilik parametresi için seyreltme çözeltisi, hareketli faz, plasebo çözeltisi, standart çözeltisi ve gerekli miktarda bozunma sağlanmış stres çözeltileri sisteme verilmektedir. Kromatogramlarda plasebo çözeltisi, seyreltme çözeltisi, hareketli faz piklerinin stres çözeltileri ile girişim yapmadığı kontrol edilip ve pik saflıklarına bakılmalıdır. Herhangi bir girişim yoksa yöntem seçicidir.

Seçicilik parametresi hem analitin hem de numunenin özellikleri dikkate alınarak, yöntem geliştirmenin başlangıcından itibaren dikkate alınmalıdır. Geliştirilen bir yöntemde yeterli bir seçicilik sağlanamazsa diğer validasyon parametreleri anlamsız kalmaktadır.

2.10.3. Sistem Tekrarlanabilirliği

Aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında sistemin değişkenliği olarak ifade edilir. Standart çözeltinin ardışık enjeksiyonlarının yapılması prensibine dayanır. Yöntemin doğrusal olduğu aralıkta seçilen bir derişimdeki standart çözeltisinin ardışık 10 veya 12 enjeksiyonunun yapılmasıyla elde edilen sonuçların % BSS değerleri ve ortalama değer hesaplanır. Yöntemde herhangi bir enjeksiyon sayısı belirtilmediği durumlarda ise her bir bileşen için en az 5 enjeksiyon yapılır.

2.10.4. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, yöntemin belirlenen derişim aralığında analit derişimi ile doğru orantılı olarak cevap vermesidir. Bu parametrede; en az 5 farklı derişimde en az 3 kez çalışılmalıdır. Derişimlere karşılık alınan cevaplar grafiğe geçirilir ve bir kalibrasyon eğrisi çizilir. Oluşturulan eğrinin regresyon analizi yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilir.

Aralık; analitin kesin, doğru ve doğrusal olarak belirlendiği en düşük ve en yüksek değerler aralığıdır. Geliştirilen analitik yöntemin kullanılacağı analize çeşidine göre çalışma aralığı belirlenir.

Analitik yöntemler için ICH kılavuzunda belirtilen çalışma aralıkları;

- Miktar tayini yöntemi için % 80 - 120
- Dozaj birimlerinin tekdüzeligi yöntemi için % 70 - 130
- Çözünme hızı tayini için % 80 - 120
- Safsızlık miktar tayini yöntemi için tayin sınırı (LOQ) - spesifikasyon limitinin % 120'si
- Miktar tayini ve safsızlık tayininin birlikte değerlendirildiği yöntemler için ise LOQ - test çözeltisi derişiminin % 120'sidir.

Doğrusallık çalışmasında kullanılan kalibrasyon eğrisinden elde edilen regresyon katsayısı (R^2) ≥ 0.990 , kesişimin p değeri ≤ 0.05 ve eğimin p değeri ≥ 0.05 olmalıdır.

2.10.5. Doğruluk

Doğruluk, analiz yöntemi ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığıdır. Bağıl hata (BH) ve mutlak hata üzerinden değerlendirilir. Biyolojik materyal için, LOQ seviyesinde doğruluk % 20'den fazla sapmamalıdır. Pratik olarak hesaplanan ortalama değer teorik yani gerçek değer \pm %15'i olmalıdır.

Doğruluk parametresi için çeşitli yöntemler vardır.

- Etkin madde için ilk yöntemde; 3 farklı derişimde en az 9 tayin yapılır. Bunlar; alt tayin sınırına yakın bir derişim, ortada bir derişim ve üst tayin sınırına yakın bir derişimdir.
- Etkin madde için ikinci yöntemde; elde edilen sonuçlar, doğruluğu tanımlanmış, iyi bilinen, bağımsız ikinci bir yöntem sonuçları ile karşılaştırılır.

- Bitmiş ürün için kullanılan ilk yöntem; matrikse yani ürün plasebosuna bilinen miktarlarda etkin madde eklenerek hazırlanan numunelerin analizi yapılır. Bu yöntemde; 3 farklı derişimde en az 9 tayin yapılır ve hesaplama aşğıdaki gibidir:

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \text{Bulunan Miktar} / \text{Eklenen Miktar} * 100 \quad (2.12)$$

- Bitmiş ürün için kullanılan ikinci yöntem ise tüm matriks bileşenleri ile sentetik karışımın yani plasebonun hazırlanması mümkün değilse numuneye bilinen miktarlarda etkin madde eklenerek analizler yapılır. Buna standart ekleme yöntemi de denilmektedir. Standart ekleme yönteminden elde edilen eğri ile doğrudan elde edilen eğrinin eğimleri paralel olursa herhangi bir girişim yok denilmektedir.

- Bitmiş ürün için üçüncü yöntemde ise; elde edilen sonuçlar, doğruluğı tanımlanmış, iyi bilinen, bağımsız ikinci bir yöntem sonuçları ile karşılaştırılır.

Ayrıca bu parametre kapsamında, gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları da yapılmaktadır. Gün içi doğruluk çalışması; 3 farklı derişimde en az 3 farklı çözelti hazırlayarak aynı gün içinde yapılmaktadır. Günler arası doğruluk çalışması; 3 farklı derişimde en az 3 farklı çözelti hazırlayarak 6 farklı günde yapılmaktadır. Doğruluk çalışmalarında; farmasötik preparatlarda BH değerleri % 0.1-1.5 arasında olmalıdır.

Geri kazanım ise bağıl geri kazanım ve mutlak geri kazanım olarak ikiye ayrılır. Bağıl geri kazanımda, numune ile aynı matrikse analiz edilecek madde eklenir ve geri kazanım işlemi yapılır. Mutlak geri kazanımda ise suya analiz edilecek madde eklenir ve geri kazanım işlemi yapılır.

2.10.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)

Kesinlik; analiz yönteminin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçülmesidir. Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik rastgele hataların dağılımı ile ilişkili olup gerçek değer ile ilişkisi yoktur. Kesinlik sonuçları; analizci, cihaz ve cihazın kalibrasyonu, sıcaklık ve

nem gibi çevre koşulları, ölçümler arasındaki zaman gibi parametrelerden etkilenebilir. Kesinlik çalışmalarında standart sapma (SS), % BSS ve güven aralığı değerleri değerlendirilmektedir.

Kesinlik parametresi iki farklı yöntemle uygulanabilir. İlk yöntem, 3 farklı derişimde 3 farklı çözelti hazırlanarak yani en az 9 numune ile yapılmaktadır. İkinci yöntemde ise test veya hedeflenen derişimdeki numuneden en az 6 tane hazırlanarak yapılmaktadır.

Ayrıca bu parametre kapsamında, gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları da yapılmaktadır. Gün içi kesinlik çalışmasında, 3 farklı derişimde uygun sayıda hazırlanan farklı çözeltilerin aynı gün analizleri yapılır ve % BSS değerleri hesaplanır. Günler arası kesinlik çalışmasında ise 3 farklı derişimde uygun sayıda hazırlanan farklı çözeltilerin farklı günlerde analizleri yapılır ve % BSS değerleri hesaplanır. Kesinlik çalışmalarında; farmasötik preparatlarda % BSS değerleri %1.5'dan fazla olmamalıdır.

Ara kesinlik yani tutarlılık çalışmalarında ise rastgele olayların etkisini saptamak için, aynı/farklı kolon ve aynı/farklı cihaz kullanılarak farklı günlerde, farklı analizciler tarafından % 100.0'lük derişimde altı ayrı çözelti hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerin sonuçları ile gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları arasındaki SS ve % BSS değerleri hesaplanır. Değiştirilen her koşulda elde edilen sonuçlar istatistiksel değerlendirilir.

2.10.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)

Tespit limiti (LOD), analiz edilecek maddenin sinyalinin gözlenebildiği ancak kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının hesaplanamadığı en küçük analit derişimidir. İstatistiksel kesinlikte kabul edilebilir ve gözlenebilen en düşük değerdir. Doğrusallık parametresinden elde edilen sonuçlardan hesaplama yoluyla veya kullanılan cihaz programının verdiği sinyal/gürültü (S/G) oranına göre yani analitin pik yüksekliğinin cihazın taban çizgisindeki gürültüye oranı ile belirlenmektedir.

LOD değeri, S/G oranının 3 : 1 veya 2 : 1 olduğu derişimdir. Ayrıca gürültünün ölçülemediği durumlarda aşağıdaki formül ile de hesaplanabilir;

$$\text{Tespit Limiti (LOD)} = \frac{3.3 \times SS}{m} \quad (2.13)$$

m: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

SS : Kesişimin standart sapması.

Alt tayin limiti (LOQ) ise tanımlanan yöntem şartlarında, uygun doğruluk ve kesinlikte tayin edilebilen en düşük analit derişimidir. Doğrusallık parametresinden elde edilen sonuçlardan hesaplama yoluyla veya kullanılan cihaz programının verdiği S/G değerine göre bulunabilir. S/G = 10 : 1 olduğu derişimdir. Ayrıca gürültünün ölçülemediği durumlarda aşağıdaki formül ile de hesaplanabilir;

$$\text{Alt Tayin Limiti (LOQ)} = \frac{10 \times SS}{m} \quad (2.14)$$

m : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

SS : Kesişimin standart sapması.

2.10.8. Sağlamlık

Sağlamlık, yöntem parametrelerindeki küçük kasıtlı değişimlere karşı yöntemin değişmeden kalma kapasitesidir. Yöntem akış hızında, hareketli faz pH'sında, hareketli faz bileşiminde, hareketli faz tampon derişiminde, çalışılan dalga boyunda veya kolon sıcaklığında değişiklikler yapılır. Standart yöntem koşullarında çalışılarak elde edilen sonuçlar ile bu değişiklikler sonucu elde edilen veriler karşılaştırılır. Elde edilen pikler sistem uygunluk kriterlerine göre değerlendirilir. Yapılan ardışık enjeksiyonlar için pik simetrisi, kuyruklanma faktörü, teorik tabaka sayısı (N), ayırıcılık ve alıkonma zamanı ve/veya pik alanlarının % BSS değerleri hesaplanır.

ICH'e göre; sağlamlık, yöntemin güvenilirliğinin bir göstergesidir ve analitik yöntem validasyonlarında çalışılması gereken bir parametredir. FDA ise, sağlamlık çalışmasının yöntem doğrulamasının bir parçası olduğunu ama genellikle sağlamlık verilerinin sunulmasına gerek olmadığını belirtmiştir.

2.10.9. Kararlılık

Bir analizde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için standart ve numune çözeltilerinin ne kadar süre kararlı olduğunun bilinmesi gerekir. Kararlılık, analit çözeltilerinin tanımlanan koşullarda ve belirli zaman aralıklarında elde edilen cevabı ile taze hazırlanmış çözeltilerin cevabı arasındaki farkın % 2'den küçük olmasıdır.

Standart ve numune çözeltileri oda sıcaklığında belirli zaman aralıklarında analiz edilir. Eğer oda sıcaklığında kararlı değilse buzdolabı koşullarında saklanıp cihazın oto-sampler modülü kullanılarak 2-8 °C 'de analiz edilirler.

Taze hazırlanan çözeltiler ile belli sürelerde bekletilen standart ve numunelerin kararlılıkları, analiz sonuçları ve istatistiksel hesaplamalar kullanılarak karşılaştırılır. Miktar tayini analizleri için aralarındaki fark % 2'den, safsızlık tayini analizleri için alt tayin sınırındaki standart veya numune çözeltilerinin cevabında yeni hazırlanmış standarda göre aralarındaki fark % 20'den fazla olmamalıdır.

Taze hazırlanan çözeltiler ile belli zamanlarda bekletilen ve o zaman aralıklarında analiz edilen standart ve numunelerin kararlılıkları analiz sonuçları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

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

A_n : n.'ci zaman noktasında yapılan ölçümden elde edilen cevap

A_0 : Taze hazırlanan çözelti ölçümünden elde edilen cevap.

Çözelti stabilitesi parametresinde, çözeltiler hazırlanır hazırlanmaz ve belirli sıcaklıkta bekletilerek aynı cihaz, aynı kolon ve aynı hareketli faz kullanılarak farklı zamanlarda analiz edilir. % fark hesaplanarak değerlendirilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında kullanılan etkin madde, safsızlıklar ve etkin maddeyi içeren ticari farmasötik preparat Tablo 3.1’de, cihaz ve ekipmanlar Tablo 3.2’de, kimyasallar Tablo 3.3’de ve sarf malzemeler Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan etkin madde, safsızlıklar ve ticari farmasötik preparat.

Gadoterat meglumin	Justesa
DOTA safsızlığı	Justesa
DO3A safsızlığı	Justesa
Dotarem®	Guerbet Laboratuvar Ltd. Şti.

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

HPLC Cihazı	Agilent, 1260 Infinity II
Fenil hekzil; 250 x 4.6 mm, 3 µm kolon	Phenomenex, Luna
pH metre	Mettler Toledo, SevenExcellence
Vorteks	Heidolph
Hassas terazi	Mettler Toledo, XS105
Karıştırıcı	IKA
Ultrasonik banyo	Bandelin

Tablo 3.3. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.

Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Asetonitril	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Orto-fosforik asit (% 85)	Merck
Hidrojen peroksit (% 30)	Merck
Hidroklorik asit	Merck

Tablo 3.4. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler.

Dereceli cam pipet	Isolab
Balon joje	Isolab
Şırınga ucu naylon filtre	Millipore
Şırınga ucu PTFE filtre	Millipore
Selüloz filtre	Sartorius
Vial	Agilent
Beher	Isolab

3.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon Çözelti (40.0 mM Fosfat Tampon Çözeltisi): 5.44 g potasyum dihidrojen fosfat tartılmıştır, üzerine bir miktar su eklenerek çözünmesi sağlanmış ve su ile 1000.0 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı fosforik asit çözeltisi ile 4.3 ± 0.05 'e ayarlanmıştır. Çözelti 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülüp degaze edilmiştir.

Hareketli Faz A: 40.0 mM Fosfat Tampon Çözeltisi.

Hareketli Faz B: 40.0 mM Fosfat Tampon Çözeltisi: Asetonitril (900:100, h/h).

Seyreltme çözeltisi ve kör çözelti: Tampon çözelti, seyreltme çözeltisi ve kör çözelti olarak da kullanılmıştır.

Stok Plasebo Çözeltisi: 2.5 mg DOTA 10.0 mL'lik balon jöjeye alınmıştır, saf su ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

Plasebo Çözeltisi: 319.6 mg stok plasebo çözeltisinden 10.0 mL'lik balon jöjeye alınmıştır, seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır.

Meglumin Çözeltisi: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözünmesi sağlanmış ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır (3750.0 µg/mL meglumin).

DOTA Stok Standart Çözeltisi: 16.67 mg DOTA referans standardı 100.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözünmesi sağlanmış ve seyreltme çözeltisi ile 100.0 mL'ye tamamlanmıştır (166.7 µg/mL DOTA).

DO3A Stok Standart Çözeltisi: 16.67 mg DO3A referans standardı 100.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözündürülmüş ve seyreltme çözeltisi ile 100.0 mL'ye tamamlanmıştır (166.7 µg/mL DO3A).

Standart Çözelti (% 100.0'lük derişimde): 150.0 mg gadoterat meglumin (111.2 mg gadoterik aside eşdeğer) referans standardı 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözünmesi sağlanmış ve 1.0 mL DOTA stok standart çözeltisinden ve 1.0 mL DO3A stok standart çözeltisinden eklenmiş, seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit, 16.67 µg/mL DOTA, 16.67 µg/mL DO3A).

Farmasötik Preparat Çözeltisi: 469.6 mg numune 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklenerek çözünmesi sağlanmış ve seyreltme çözeltisi ile 10.0 mL'ye tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Stres Testleri için Hazırlanan Çözeltiler

Gadoterat Meglumin Asit Bozundurması: 469.6 mg numune 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 0.5 N HCl çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek üzerine 1.0 mL 0.5 N NaOH çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo Asit Bozundurması: 319.6 mg plasebo 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 0.5 N HCl çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek

üzerine 1 mL 0.5 N NaOH çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebo Asit Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 0.5 N HCl çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek üzerine 1.0 mL 0.5 N NaOH çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Gadoterat Meglumin Baz Bozundurması: 469.6 mg numune 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 2.0 N NaOH çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek üzerine 1.0 mL 2.0 N HCl çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo Baz Bozundurması: 319.6 mg plasebo 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 2.0 N NaOH çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek üzerine 1.0 mL 2.0 N HCl çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebo Baz Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL 2.0 N NaOH çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek üzerine 1.0 mL 2.0 N HCl çözeltisi eklenerek nötrale edilmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Gadoterat Meglumin Peroksit Bozundurması: 469.6 mg numune 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL %10 peroksit çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo Hidrojen Peroksit Bozundurması: 319.6 mg plasebo 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL % 10 peroksit çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebo Hidrojen Peroksit Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır, üzerine 1.0 mL %10 peroksit çözeltisi eklenerek 70 °C'de 3 gün bekletilmiştir. Süre sonunda 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Gadoterat Meglumin Isı Bozundurması: 469.6 mg numune 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır, 105 °C'de 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek etüvden çıkartılmıştır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo Isı Bozundurması: 319.6 mg plasebo 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır, 105 °C'de 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek etüvden çıkartılmıştır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebo Isı Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır, 105 °C'de 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda örnek etüvden çıkartılmıştır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Gadoterat Meglumin Görünür Işık Bozundurması: Katı numune, görünür ışık kaynağında 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan numuneden 469.6 mg 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo Görünür Işık Bozundurması: Plasebo çözeltisi görünür ışık kaynağında 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan örnekten 469.6 mg 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebosu Görünür Işık Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır ve görünür ışık kaynağında 7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan numune 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Gadoterat Meglumin UV Bozundurması: Katı numune, UV ışık kaynağında 17 saat bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan numuneden 469.6 mg 10.0 mL'lik

balon jojeye tartılmıştır ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır (11120.0 µg/mL gadoterik asit).

Plasebo UV Işık Bozundurması: Plasebo UV ışık kaynağında 17 saat bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan örnekten 469.6 mg 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır ve 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Meglumin Plasebosu UV Işık Bozundurması: 37.5 mg meglumin 10.0 mL'lik balon jojeye tartılmıştır ve UV ışık kaynağında 17 saat bekletilmiştir. Süre sonunda fotostabilite kabininde çıkarılan numune 10.0 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır.

3.2. Kromatografik Koşullar

Geliştirilen HPLC yönteminde; analiz Phenomenex Luna Fenil-Hekzil, 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda, 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A (pH = 4.3), 40.0 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.5. Analizde kullanılan gradiyent programı.

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	100	0
6	100	0
30	0	100
35	0	100
36	100	0
50	100	0

3.3. Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için ICH Q2(R1) kılavuzu doğrultusunda validasyon çalışmaları yapılmıştır (4). Bu amaçla; seçicilik, tekrarlanabilirlik,

doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tespit limiti, alt tayin limiti, sağlamlık ve kararlılık parametreleri çalışılmıştır.

3.3.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

Etkin madde ve safsızlıklara ait standartlar kullanılarak % 100.0'lük derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerden ardışık 12 enjeksiyon yapılarak her bir pik için alan değerleri, alıkonma zamanları, N ve T değerleri incelenmiştir.

3.3.2. Seçicilik (Özgünlük)

Seçicilik, numunedeki diğer bileşenler varlığında analitin miktar tayini için yöntemin uygunluğunu gösteren parametredir. Matriksten herhangi bir girişimin olmadığı kanıtlanmış yöntemler seçici olarak kabul edilir.

Seçicilik parametresinde, etkin maddelere ve safsızlıklara ait standart çözeltiler, test çözeltileri, stres testi çözeltileri, plasebo çözeltisi, hareketli faz çözeltisi ve seyreltme çözeltisi sisteme verilmiştir. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak herhangi bir girişim olup olmadığına karar verilmiştir.

Seçicilik parametresi kapsamında yapılan stres testi çalışmasında ise gadoterat meglumin içeren numuneye, meglumin içeren plaseboya, DOTA ve meglumin içeren plaseboya ayrı ayrı asit, baz, peroksit, ısı ve ışık testleri uygulanmıştır.

3.3.3. Sistem Tekrarlanabilirliği

SUT kriterlerinden de biri olan sistem tekrarlanabilirliğinde, aynı çözeltiden yapılan ardışık enjeksiyonlar ile sistemin kesinliği değerlendirilmiştir.

Etkin madde ve safsızlıklara ait % 100.0'lük derişimde referans standartlar kullanılarak çözeltiler hazırlanmış ve sisteme ardışık 12 enjeksiyon yapılmıştır. Etkin madde ve safsızlıkların enjeksiyonlarından elde edilen pikler için % BSS değeri hesaplanmıştır.

3.3.4. Doğrusallık ve Aralık

Etkin maddenin standardı kullanılarak % 0.05 - 130 (6.04 - 15703.33 µg/mL) derişim aralığında 8 farklı artan derişimde doğrusallık çözeltileri, DOTA ve DO3A safsızlıklarının standartları kullanılarak % 0.05 - 1.0 (DOTA için 5.27 - 105.46 µg/mL ve DO3A için 5.27 - 105.37 µg/mL) derişim aralığında 6 farklı artan derişimde doğrusallık çözeltileri hazırlanmıştır ve hazırlanan bu çözeltiler ayrı ayrı analiz edilerek kromatogramlar kaydedilmiştir. Derişimlere karşılık alınan cevaplar yani alan değerleri grafiğe geçirilmiştir ve ilgili maddeler için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur ve regresyon analizleri de yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. ANOVA analizleri ile kalibrasyon eğrilerinin eğim değerlerinin sıfırdan farklı ($p < 0.05$), kesişim değerlerinin sıfıra eşit (anlamsız) ($p > 0.05$) ve korelasyon katsayısının tesadüfi değerler olup olmadığı F değerleri ile istatistiksel olarak belirlenmiştir. Olması gereken derişimlere karşı kalibrasyon grafiğinden elde edilen hesaplanan derişim verilerinin grafiğe geçirilmesi ile gadoterat meglumin'in analize yönelik geliştirilen yöntemin doğrusallığı kontrol edilmiştir.

3.3.5. Doğruluk

Bu parametre kapsamında, ilk olarak etkin madde ve safsızlıklar için gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Gün içi doğruluk, aynı gün içinde etkin madde için % 70.0, % 100.0 ve % 130.0 derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin (n=6) analiz sonuçları ile elde edilen verilerin % BH değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir ve safsızlıklar için % 0.05, % 0.15 ve % 0.5 derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin (n=6) analiz sonuçları ile elde edilen verilerin % BH değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Günler arası doğruluk ise aynı derişimlerdeki standart çözeltilerin 6 gün art arda analiz edilmesi sonucu elde edilen verilerin % BH değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Etkin maddenin % 70.0, % 100.0 ve % 130.0'u olacak şekilde 3 farklı derişimde, gadoterat meglumin standart çözeltileri plaseboya eklenerek geri kazanım çözeltileri hazırlanmıştır. Safsızlıkların ise % 0.05, % 0.15 ve % 0.5'i olacak şekilde 3 farklı derişimde, DOTA ve DO3A standart çözeltileri plaseboya eklenerek geri kazanım çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir derişim için 3 farklı çözeltiler hazırlanmıştır ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Bunlara ek olarak, standart ekleme yöntemi ile de doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Numune çözeltisi üzerine 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 70.0, 100.0 ve 130.0 derişim seviyelerinde gadoterat meglumin standart çözeltileri ve 0.05, 0.1, 0.15, 0.30, 0.5 ve 1.0 derişim seviyelerinde DOTA ve DO3A standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon eğrileri çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusu yönteminden ve standart ekleme yönteminden elde edilen kalibrasyon doğru denklemlerinin eğimleri karşılaştırılmıştır.

3.3.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)

Etkin maddeye ait standartlar kullanılarak % 70.0, % 100.0 ve % 130.0 olacak şekilde 3 farklı derişimde, safsızlıklara ait standartlar kullanılarak ise % 0.05, % 0.15 ve % 0.5 olacak şekilde 3 farklı derişimde kesinlik çözeltileri hazırlanmıştır. Kesinlik parametresi aynı gün ve 6 farklı günde çalışılmış olup her bir derişim seviyesi için ilk gün 6 farklı çözeltiler, farklı günlerde ise her bir derişim seviyesi için 3'er çözeltiler hazırlanıp analizleri tamamlanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik olarak adlandırılan bu çalışmalar sonucu elde edilen analiz sonuçları için % BSS değerleri hesaplanarak veriler değerlendirilmiştir.

Ara kesinlik yani tutarlılık çalışmalarında ise rastgele olayların etkisini saptamak için, farklı günlerde ve farklı analizciler tarafından etkin madde ve safsızlıklara ait referans standartlar kullanılarak % 100.0'lük derişimde 6 farklı çözeltiler hazırlanmıştır ve çözeltiler farklı kolon, farklı cihaz kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Analizde her bir çözeltilerden ardışık 3 enjeksiyon yapılmıştır. Analiz sonuçlarından elde edilen verilerin % BSS değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı ise t ve F-testleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.3.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)

LOD değerinin belirlenmesi amacıyla etkin madde, DOTA ve DO3A'ya ait referans standartlar kullanılarak S/G oranının yaklaşık 2-3 olduğu sırasıyla % 0.01, % 0.005 ve % 0.003'lük derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir çözeltiden altı ardışık enjeksiyon yapılmış ve elde edilen alan değerlerinin % BSS değerleri hesaplanmıştır. S/G değerleri kontrol edilmiştir.

LOQ değerinin tespiti için etkin madde, DOTA ve DO3A'ya ait referans standartlar kullanılarak S/G oranının yaklaşık olarak 10 olduğu sırasıyla % 0.03, % 0.015 ve % 0.010'lik derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir çözeltiden altı ardışık enjeksiyon yapılmıştır ve elde edilen alan değerlerinin % BSS değerleri hesaplanmıştır. S/G değerleri kontrol edilmiştir.

3.3.8. Sağlamlık

Etkin maddeye ve safsızlıklara ait referans standartlar kullanılarak % 100.0'lük derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. Yönteme ait optimum analiz koşullarında akış hızında, hareketli faz pH'sında, hareketli faz organik çözücü oranında, çalışılan dalga boyunda, kolon sıcaklığında küçük değişiklikler yapılarak hazırlanan standart çözeltiden 6 ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Her bir değişiklik sonucunda elde edilen piklerin SUT parametreleri olan alan değerleri, alıkonma zamanları, N, T ve % BSS değerleri değerlendirilmiştir.

3.3.9. Kararlılık

Kararlılık parametresinde %100.0'lük derişimde hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin takibi yapılmıştır. Bu doğrultuda, başlangıç noktasında elde edilen etkin madde ve safsızlıkların alan değerleri ile farklı zaman noktalarından elde edilen etkin madde ve safsızlıkların alan değerleri karşılaştırılmış ve % uyum değerleri hesaplanmıştır.

3.4. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve sonrasında valide edilen HPLC yöntemi, Türkiye'deki tek bir muadili bulunan Dotarem® Enjeksiyonluk Çözelti adlı ürüne uygulanmıştır. Numune çözeltileri 6 kez ayrı ayrı hazırlanmış olup elde edilen analiz sonuçlarına göre etkin madde ve safsızlık miktarları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, HPLC yöntemi ile bozunma ürünlerinin varlığında, gadoterat meglumin'in analizi için en iyi koşullar belirlenerek farmasötik preparattan miktar tayini çalışmalarının yapılması planlanmıştır. Bu etkin maddeyi içeren farmasötik preparatı ve plasebosu, kılavuzlarda verilen koşullarda stres koşullarına (asit, baz, oksidasyon, ısı ve ışık) maruz bırakılarak bozundurma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemin kılavuzlara uygun olacak şekilde validasyon çalışmaları da yapılmış ve elde edilen veriler uygun istatistiksel testlerle değerlendirilmiştir. Son olarak ise geliştirilen ve valide edilerek geçerliliği kanıtlanan yöntem, gadoterat meglumin içeren farmasötik preparatlara da uygulanmıştır.

4.1. Analiz Yönteminin Optimizasyonu

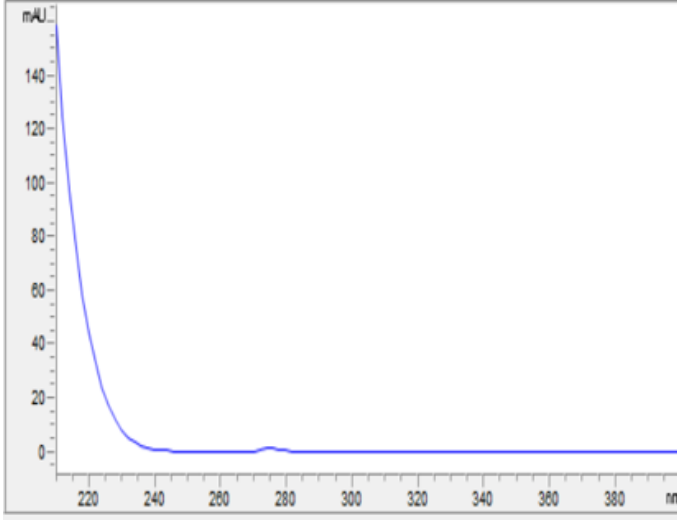
Bozunma ürünlerinin varlığında, gadoterat meglumin'in farmasötik preparattan analizinin yapılması amacıyla ilk olarak yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi için farklı sabit fazlar kullanılarak, hareketli faz bileşiminde, hareketli faz pH'sında ve seyreltme çözeltisi içeriğinde değişiklikler yapılarak elde edilen kromatogramlarda etkin madde ve safsızlıklara ait pik şekilleri ve pikler arasındaki ayıricılık ve SUT'ne ait parametreler incelenmiştir.

Ayrıca farklı stres koşullarının (asit, baz, oksidasyon, ısı ve ışık) uygulanması sonucu olası bozunma ürünleri de incelenmiştir.

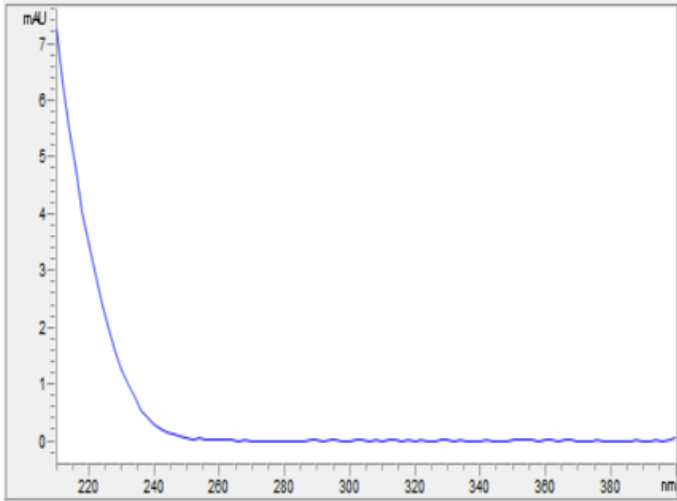
4.1.1. Dalga Boyu Seçimi

% 100.0'lük derişimde gadoterik asit (11120.0 µg/mL), DOTA (16.67 µg/mL) ve DO3A (16.67 µg/mL) standart çözeltileri dizi diyot dedektörü (DAD) kullanılarak sisteme ayrı ayrı enjekte edilmiştir. Analiz Phenomenex Luna Fenil-Hekzil, 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda, 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A (pH = 4.3), 40.0 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak

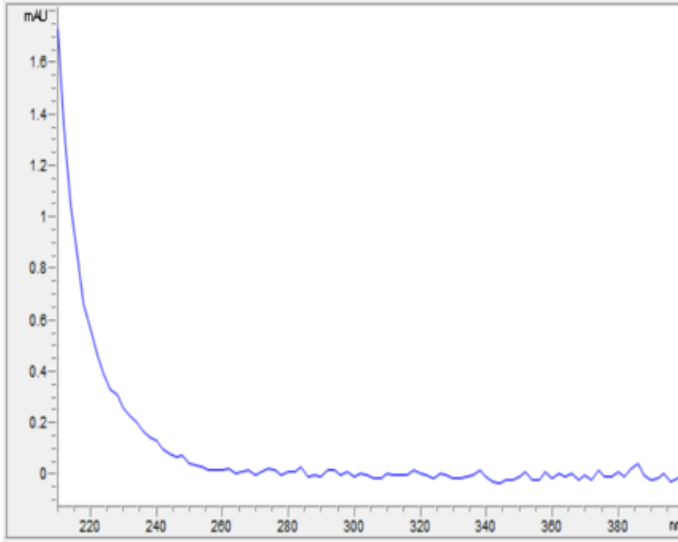
0.4 mL/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Her bir maddeye ait spektrumlar incelendiğinde 200 nm dalga boyunun miktar tayini için uygun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1 - 4.3).



Şekil 4.1. % 100.0'lük derişimde gadoterik asite ait spektrum.



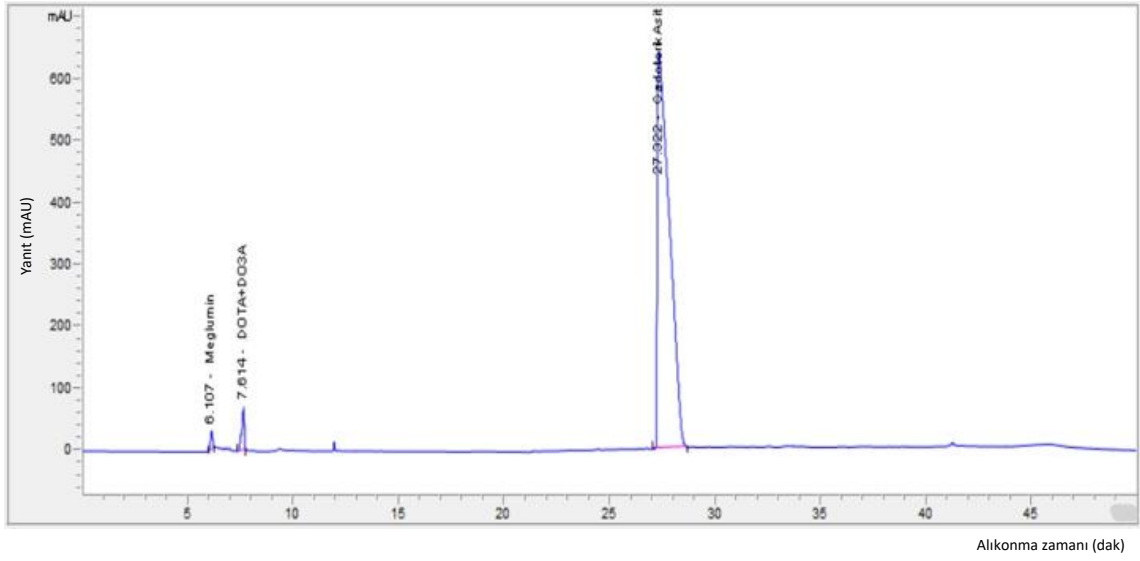
Şekil 4.2. % 100.0'lük derişimde DOTA'ya ait spektrum.



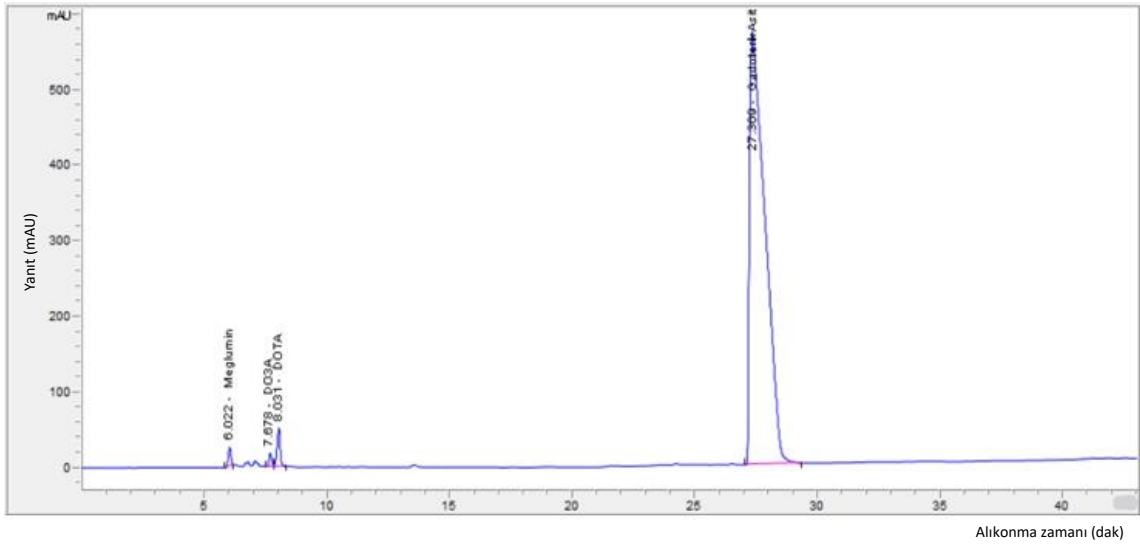
Şekil 4.3. % 100.0'lük derişimde DO3A'ya ait spektrum.

4.1.2. Hareketli Faz Seçimi

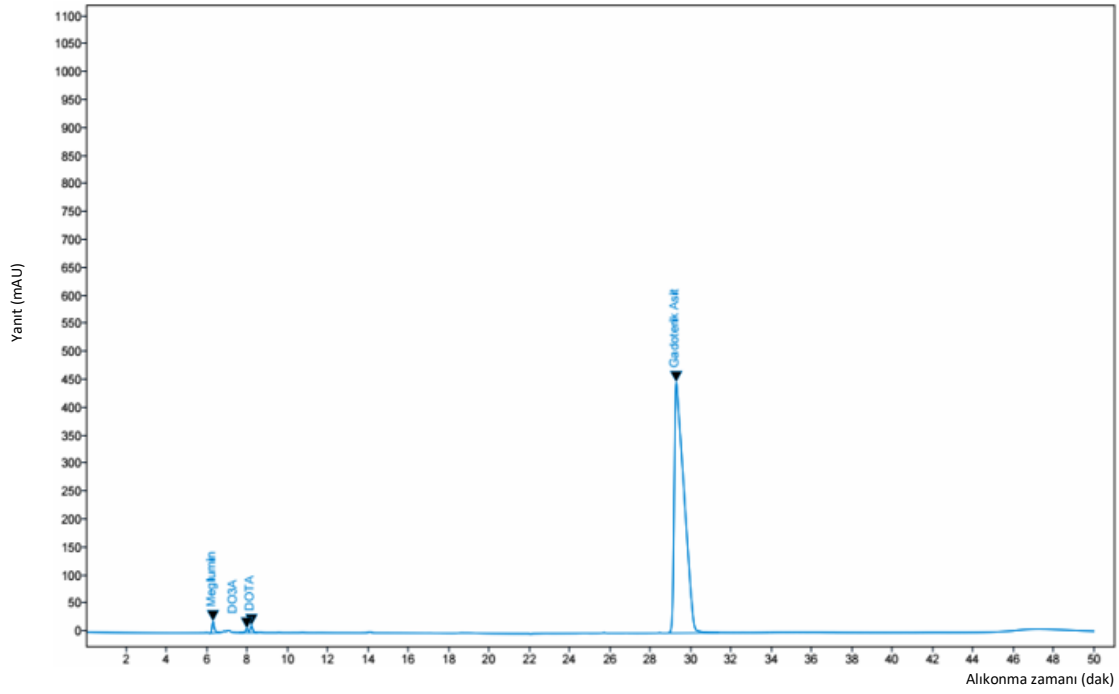
Analizler % 100.0'lük derişimde gadoterik asit (11120.0 µg/mL), DOTA (16.67 µg/mL) ve DO3A (16.67 µg/mL) standart çözeltileri, Phenomenex Luna Fenil-Hekzil, 250 x 4.6 mm, 3 µm kolon kullanılarak ve gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir (Çalışma koşulu 1). Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak hareketli faz pH'nın, hareketli fazdaki organik çözücü oranının, hareketli fazdaki farklı organik çözücülerin (asetonitril ve metanol) ve hareketli faz bileşimine eklenen iyon çifti ajanının kromatogramlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hareketli faz A'nın (fosfat tamponu) ve hareketli faz B'nin (fosfat tamponu ve asetonitril) pH'sı 4.6 ve 4.3'e ayarlanmıştır. Hareketli faz B'nin organik çözücü miktarı (% 8 asetonitril) değiştirilmiş ve farklı bir organik çözücü (% 10 metanol) kullanılarak hazırlanmıştır. Ayrıca hareketli faz A ve hareketli faz B iyon çifti ajanı eklenmeden ve eklenerek hazırlanmıştır. Hareketli faz A'da ve hareketli faz B'de iyon çifti olarak trietilamin ve hekzilamin kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.4 - 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hareketli faz A'nın (fosfat tamponu) ve hareketli faz B'nin (fosfat tamponu ve asetonitril) pH'sının 4.3 olmasına karar verilmiştir.



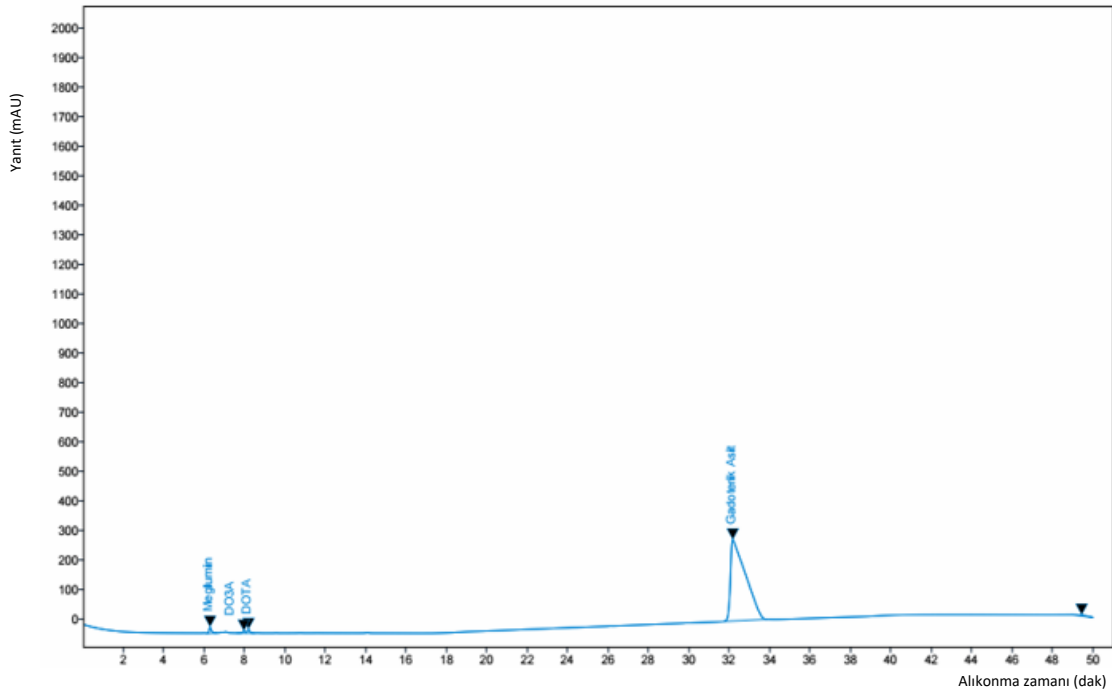
Şekil 4.4. pH: 4.6 olan hareketli fazda % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).



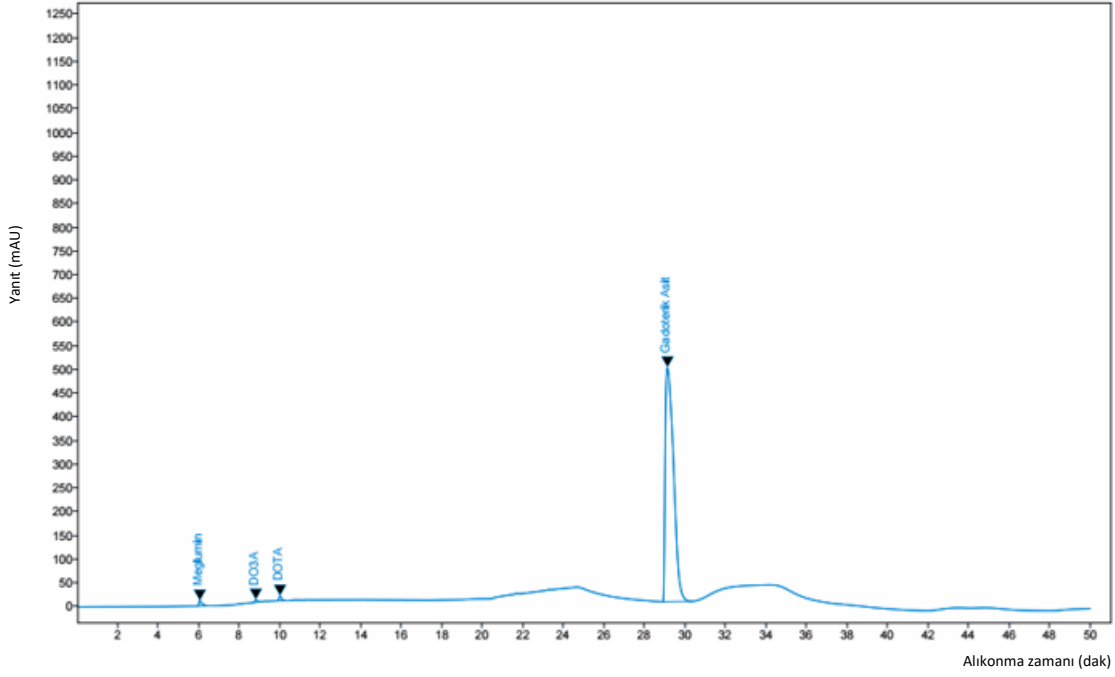
Şekil 4.5. pH: 4.3 olan hareketli fazda % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).



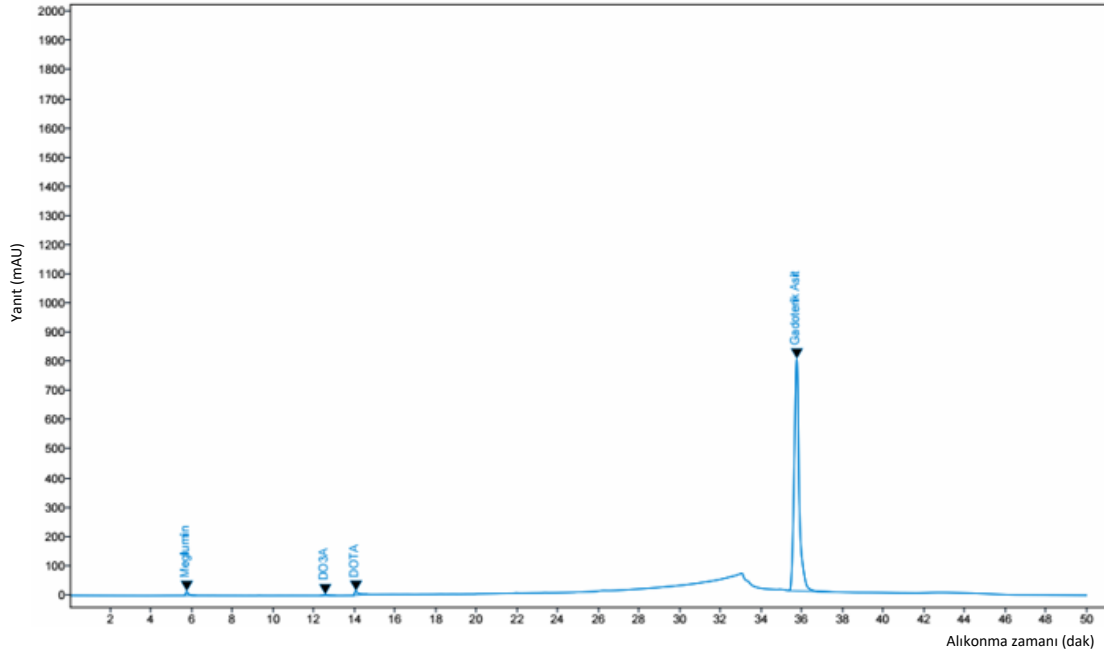
Şekil 4.6. Hareketli faz B'ye % 8 oranında asetonitril eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).



Şekil 4.7. Hareketli faz B'ye % 10 oranında metanol eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).



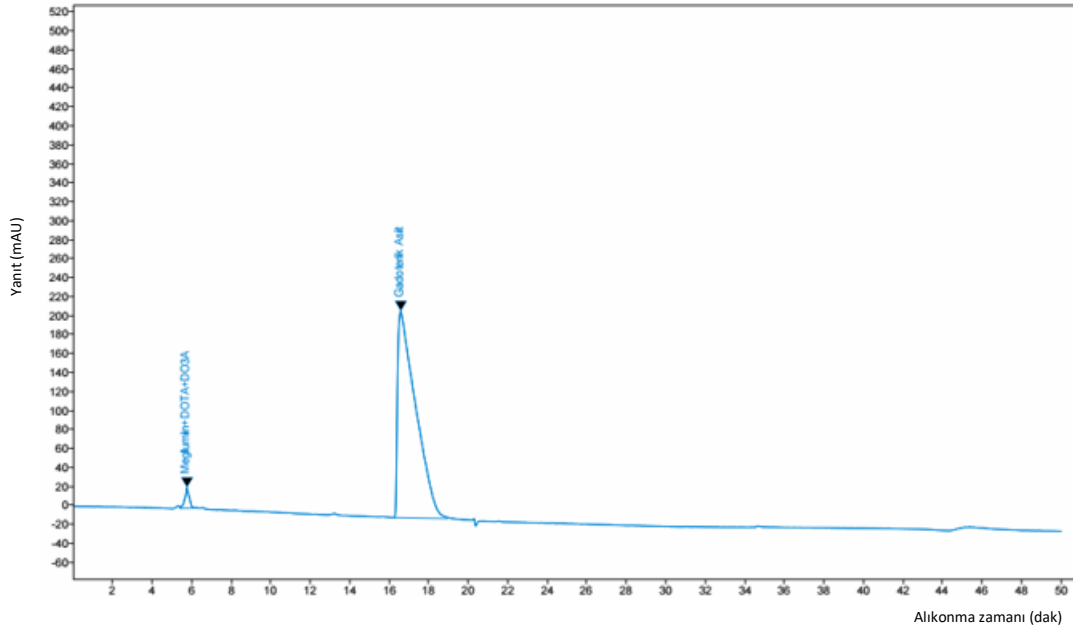
Şekil 4.8. pH: 4.3 olan hareketli faza trietilamin eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).



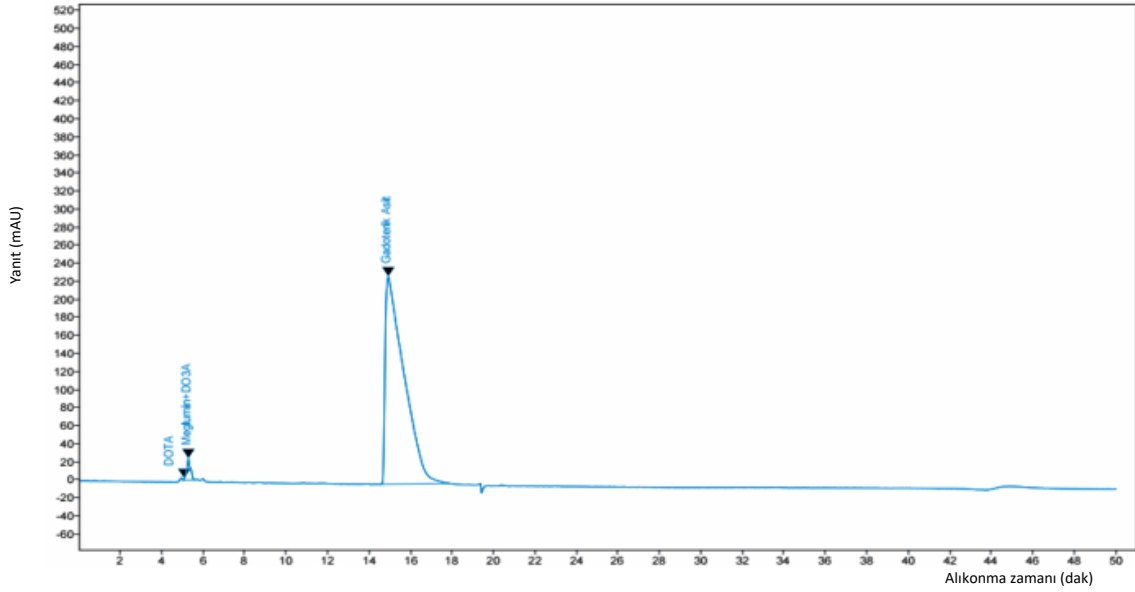
Şekil 4.9. pH: 4.3 olan hareketli faza heksilamin eklendiğinde % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.2. Çalışma koşulu 1).

4.1.3. Sabit Faz Seçimi

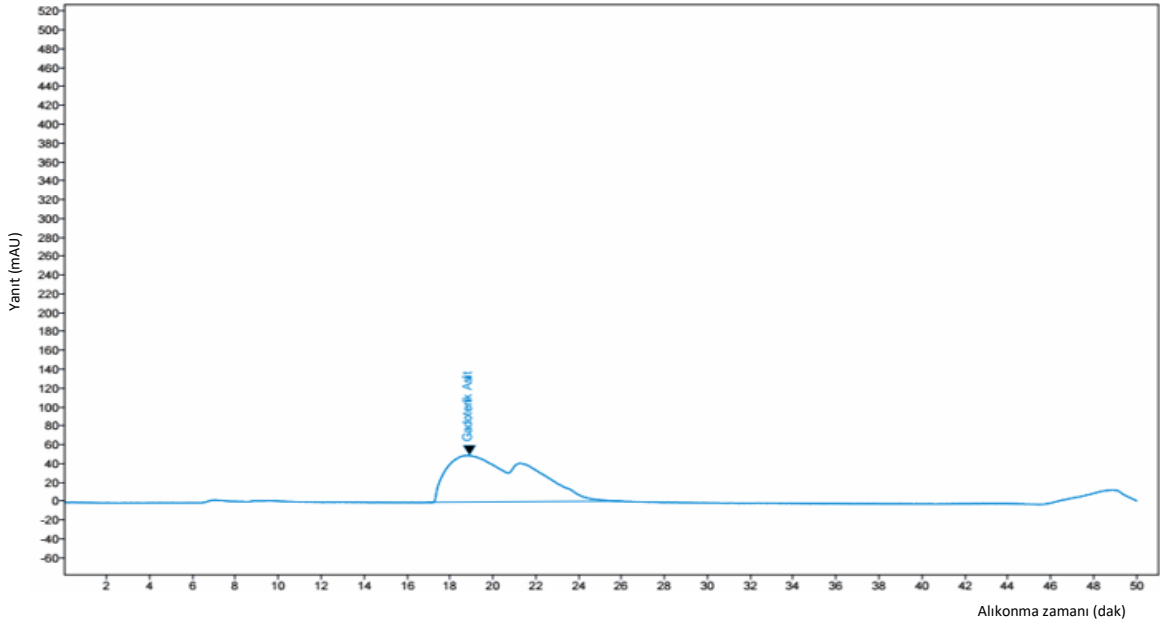
Analizler % 100.0'lük derişimde gadoterik asit (11120.0 µg/mL), DOTA (16.67 µg/mL) ve DO3A (16.67 µg/mL) standart çözeltileri ve 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A (pH = 4.3), 40.0 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak ve gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir (Çalışma koşulu 2). Gadoterik asit, DOTA ve DO3A tayini için fenil hekzil ve C18 kolonlar kullanılmıştır ve elde edilen kromatogramlar, Şekil 4.10 - 4.13'de verilmiştir. En iyi ayırımın fenil hekzil kolonda olduğu gözlenmiş olup çalışmalar fenil hekzil (Phenomenex, Luna 100 Å, 250 x 4.6 mm, 3 µm) kolon ile gerçekleştirilmiştir.



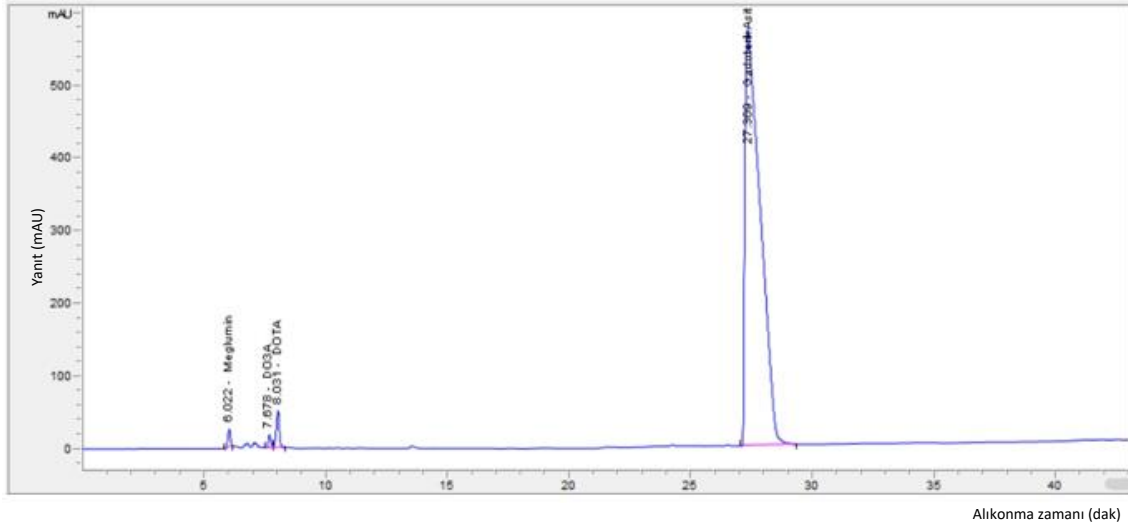
Şekil 4.10. C18 250 x 4.6 mm, 5 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözeltilerinin enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).



Şekil 4.11. C18 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).



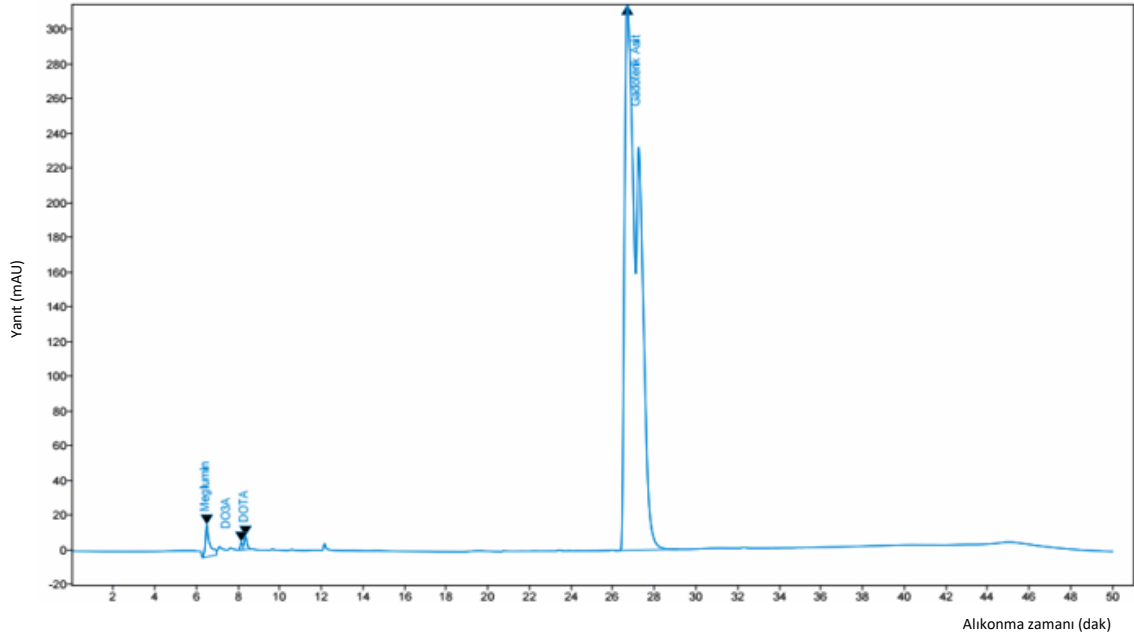
Şekil 4.12. C8 250 x 4.6 mm, 5 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).



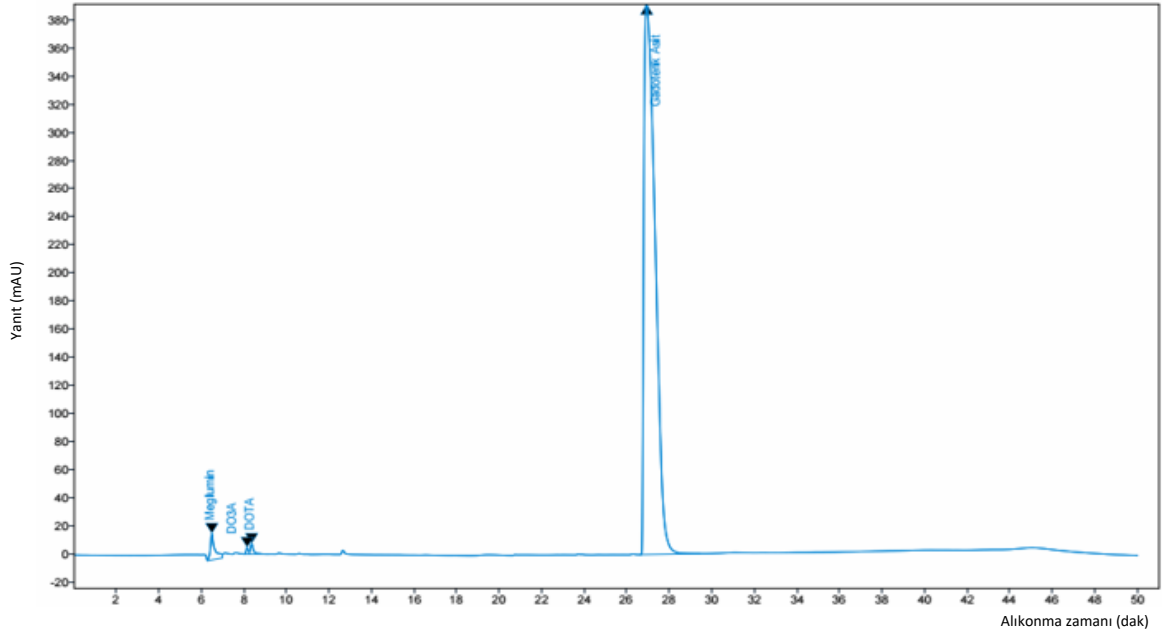
Şekil 4.13. Fenil hekzil 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda yapılan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Çalışma koşulu 2).

4.1.4. Seyreltme Çözeltisi Seçimi

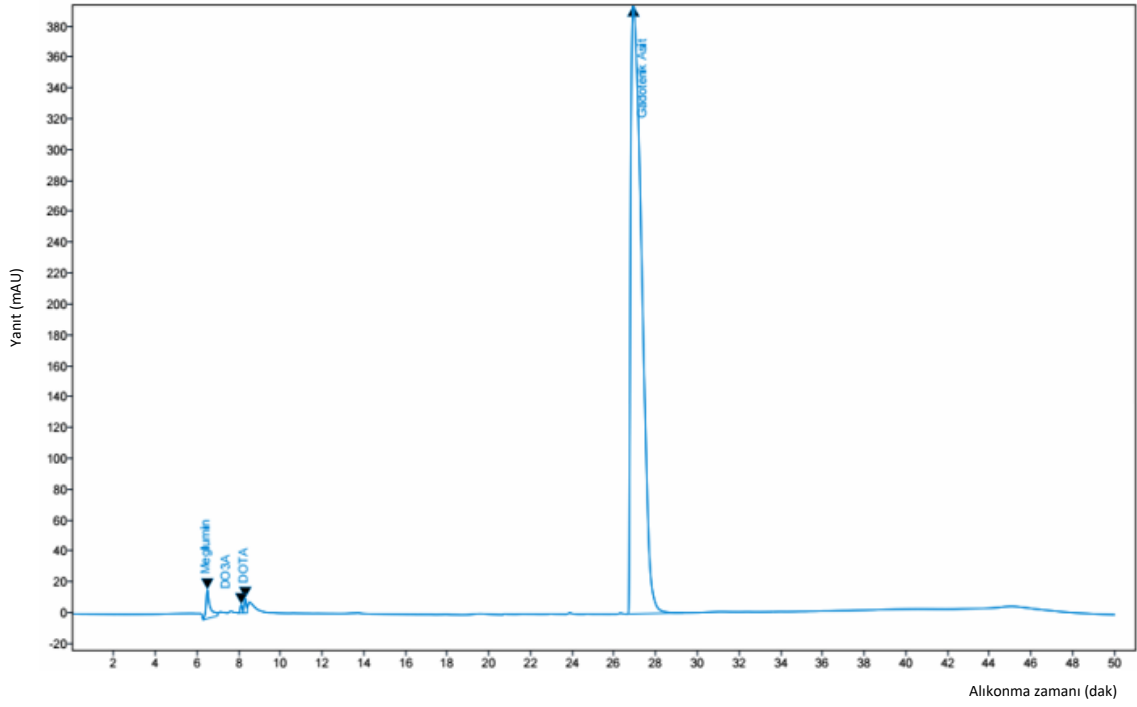
Analizler % 100.0'lük derişimde gadoterik asit (11120.0 µg/mL), DOTA (16.67 µg/mL) ve DO3A (16.67 µg/mL) standart çözeltileri, Phenomenex Luna Fenil-Hekzil, 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda, 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A (pH = 4.3), 40.0 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak ve gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir (Optimum koşul). Farklı oranlarda su - asetonitril karışımı, su - metanol karışımı ve pH 4.3 fosfat tamponu kullanılarak seyreltme çözeltileri hazırlanmış ve analizler yapılmıştır. Çalışmalarda su : asetonitril (80 : 20, h/h), su : asetonitril (90 : 10, h/h), su : metanol (80 : 20, h/h), su : metanol (90 : 10, h/h) karışımları ve pH 4.3 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.14 - 4.18'de verilmiştir. En iyi çözünmenin ve çözelti stabilitesinin pH 4.3 fosfat tampon çözeltisi ile sağlandığı belirlenmiştir.



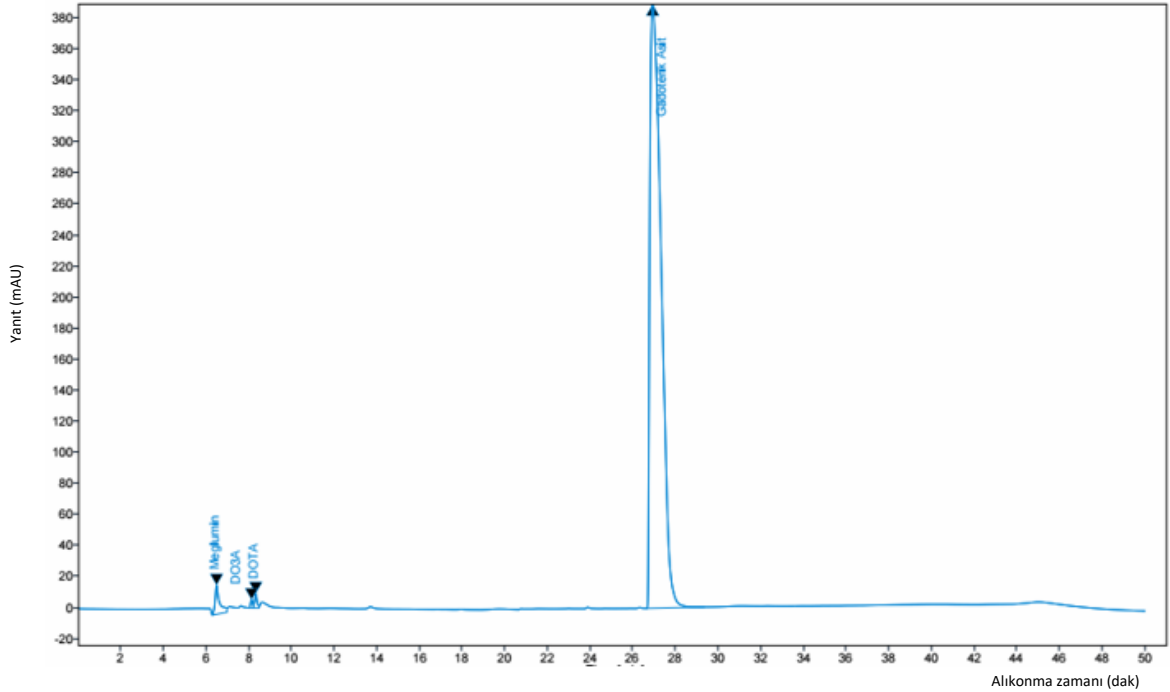
Şekil 4.14. Su : asetonitril (80 : 20, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).



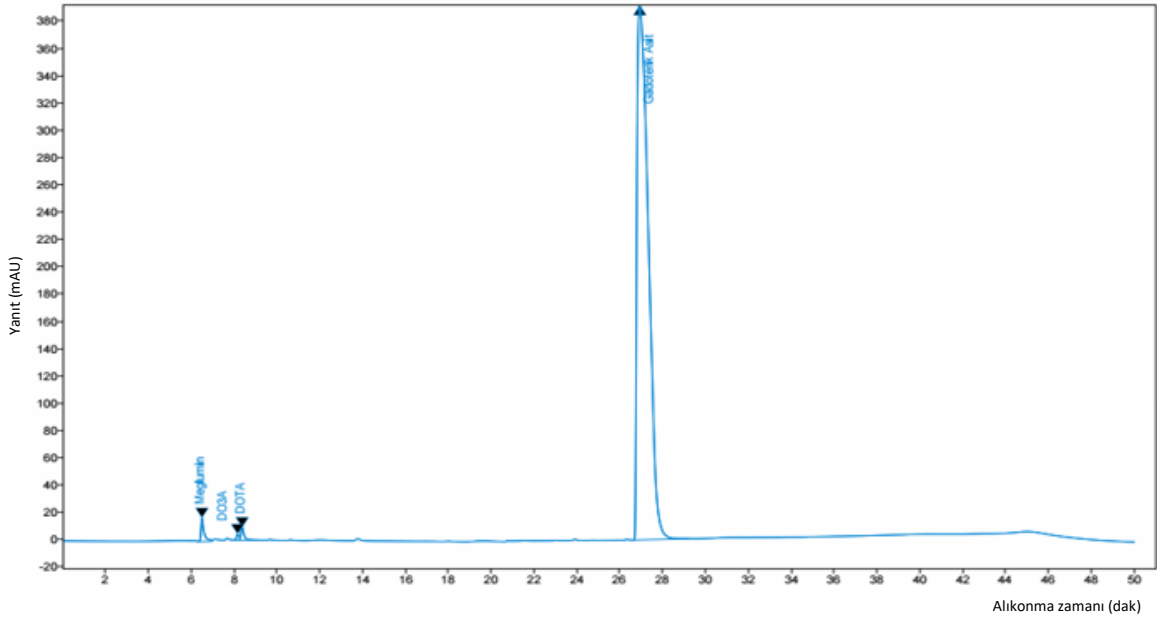
Şekil 4.15. Su : asetonitril (90 : 10, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).



Şekil 4.16. Su : metanol (80 : 20, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).



Şekil 4.17. Su : metanol (90 : 10, h/h) karışımı kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.4. Optimum koşul).



Şekil 4.18. pH 4.3 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan % 100.0'lük derişimde standart çözelti enjeksiyonuna ait kromatogram (Bkz. Bölüm 4.1.3. Optimum koşul).

4.1.5. Filtre Seçimi

Analizler % 100.0'lük derişimde gadoterik asit (11120.0 µg/mL), DOTA (16.67 µg/mL) ve DO3A (16.67 µg/mL) standart çözeltileri, Phenomenex Luna Fenil-Hekzil, 250 x 4.6 mm, 3 µm kolonda, 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A (pH = 4.3), 40.0 mM fosfat tamponu (pH = 4.3) : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak ve gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan standart çözeltiler (% 100.0'lük derişimde) 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden, 0.45 µm naylon filtreden, 0.45 µm selüloz filtreden süzülerek ve süzülmeden viallere alınmıştır. Süzülerek ve süzülmeden sisteme verilen standart çözelti kromatogramlarından elde edilen ana pik alanları karşılaştırılmış ve alan değerleri arasındaki % uyum hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Yapılan filtre seçimi çalışmasında gadoterik asitin, DOTA'nın ve DO3A'nın PTFE, selüloz ve naylon filtreye tutunmadığı belirlenmiştir. Çalışmalarda 0.45 µm hidrofilik PTFE filtre kullanılması uygun görülmüştür.

Tablo 4.1. Filtre seçimi sonuçları.

Çözeltiler	Gadoterik Asit Alanı	Uyum (%)	DOTA Alanı	Uyum (%)	DO3A Alanı	Uyum (%)
Süzülmeden sisteme verilen standart çözelti	16720.50	-	167.50	-	172.30	-
0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden süzülen standart çözelti	16752.30	100.20	167.00	99.70	174.10	101.00
0.45 µm selüloz filtreden süzülen standart çözelti	16736.80	100.10	166.60	99.50	173.50	100.70
0.45 µm naylon filtreden süzülen standart çözelti	16780.90	100.40	167.0	99.70	171.90	99.80

4.2. Validasyon Çalışmaları

4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

% 100.0'lük derişim seviyesinde hazırlanan gadoterik asit standart çözeltisinin, % 0.15 derişim seviyesinde hazırlanan DOTA ve DO3A standart çözeltisinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen sistem uygunluğu kriterlerinden olan alan değerleri, alıkonma zamanları, N ve T değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 - 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Standart çözeltilerin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen N değerleri.

	Gadoterik Asit	DOTA	DO3A
$\bar{x} \pm SH$	13304.33 \pm 63.72	23159.17 \pm 25.49	14141.67 \pm 116.46
SS	220.73	88.29	403.42
% BSS	1.66	0.38	2.85

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

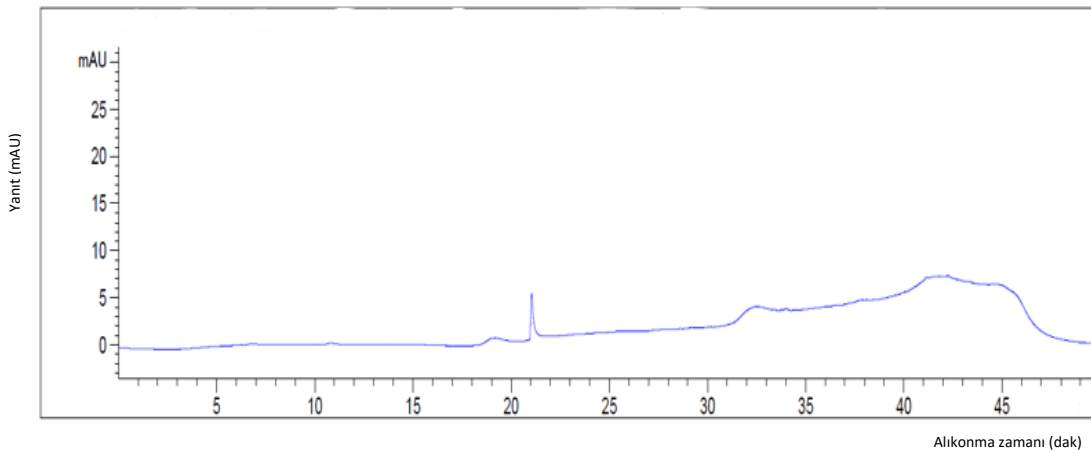
Tablo 4.3. Standart çözeltilerin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen T değerleri.

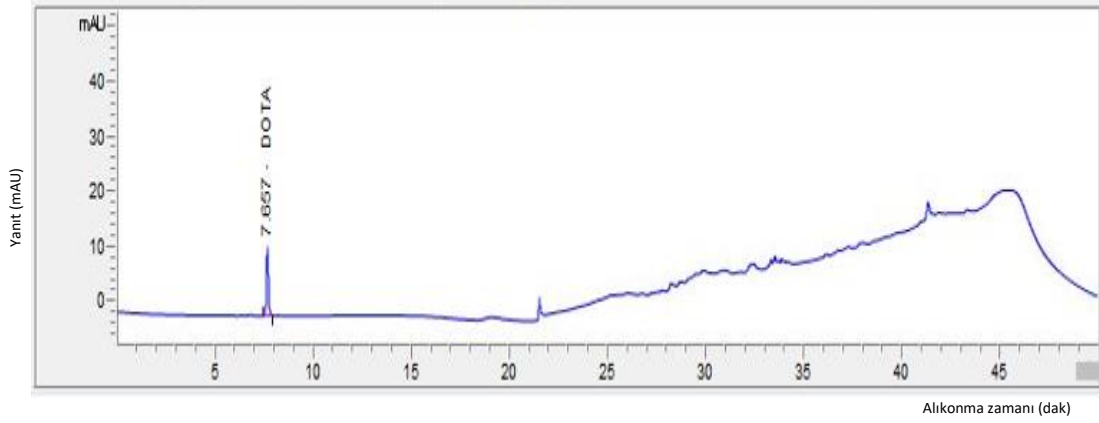
	Gadoterik Asit	DOTA	DO3A
$\bar{x} \pm SH$	1.69 \pm 0.00	1.05 \pm 0.00	1.15 \pm 0.01
SS	0.01	0.01	0.02
% BSS	0.42	1.37	2.13

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

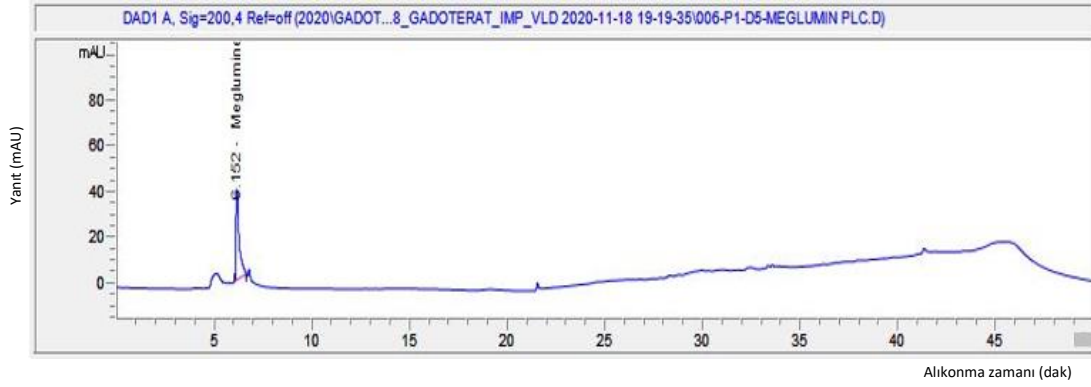
4.2.2. Seçicilik (Özgünlük)

Hareketli faz, gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebosu, meglumin plasebosu, gadoterat meglumin standart çözeltisi ve stres çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4.19 - 4.40'da verilmiştir. Stres çözeltilerine ait bozunma miktarları ise gadoterik asitin miktar tayinindeki azalmaya göre ya da safsızlıkların tek tek % cinsinden miktarlarının toplanmasıyla hesaplanmıştır.

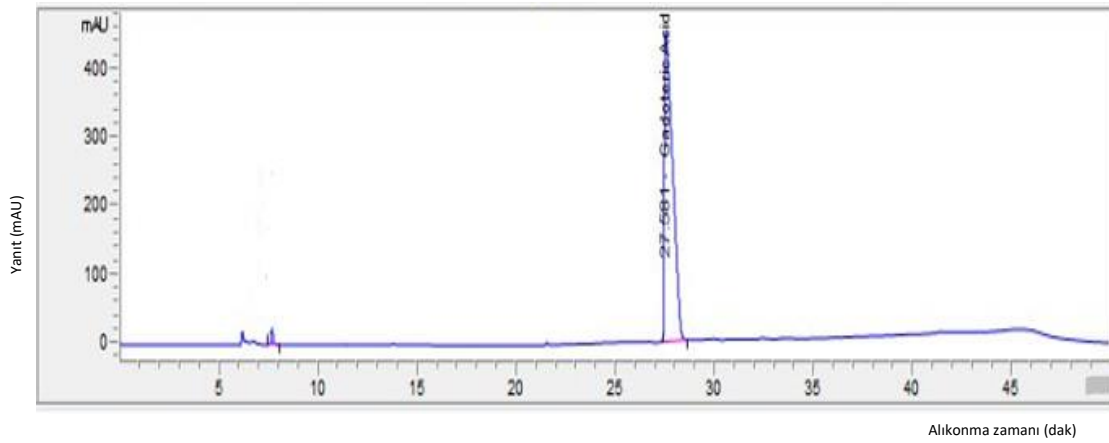
**Şekil 4.19.** Optimum koşullarda hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram.



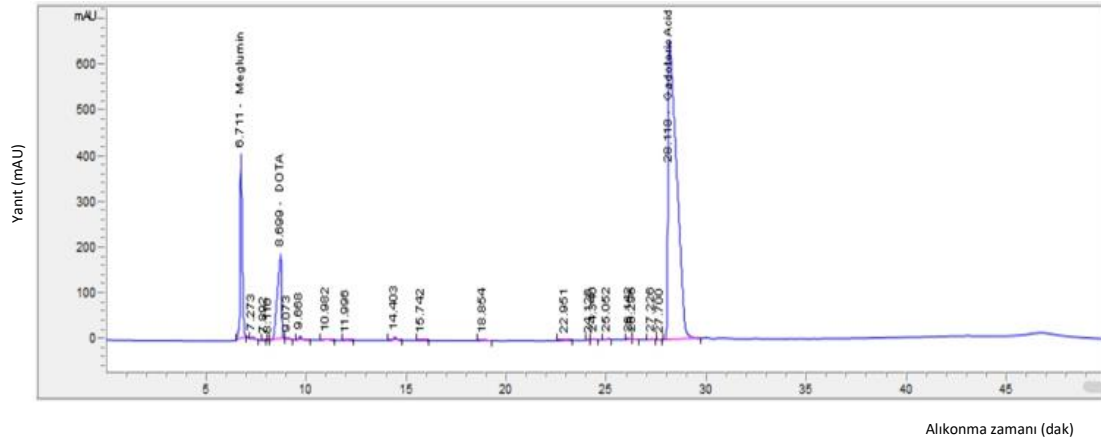
Şekil 4.20. Optimum koşullarda gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisi plasebosuna ait kromatogram.



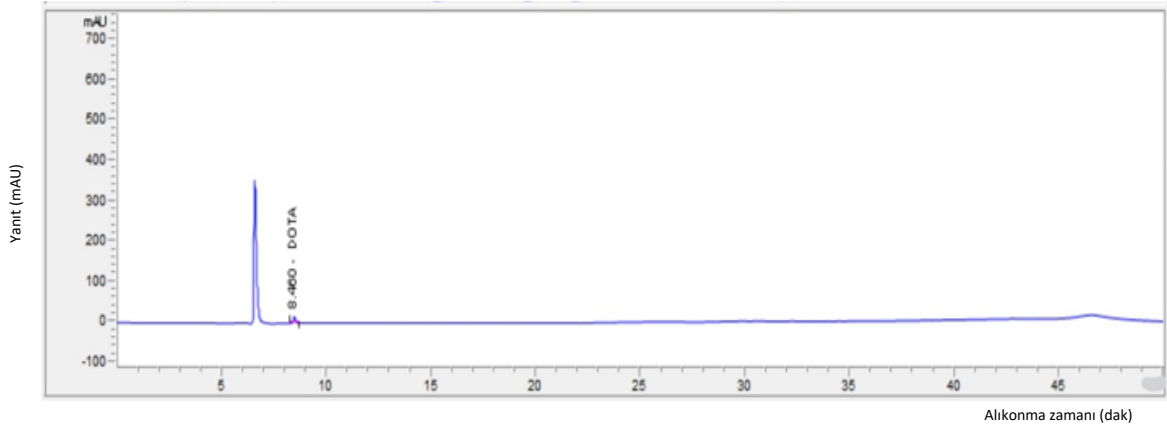
Şekil 4.21. Optimum koşullarda meglumin plasebosuna ait kromatogram.



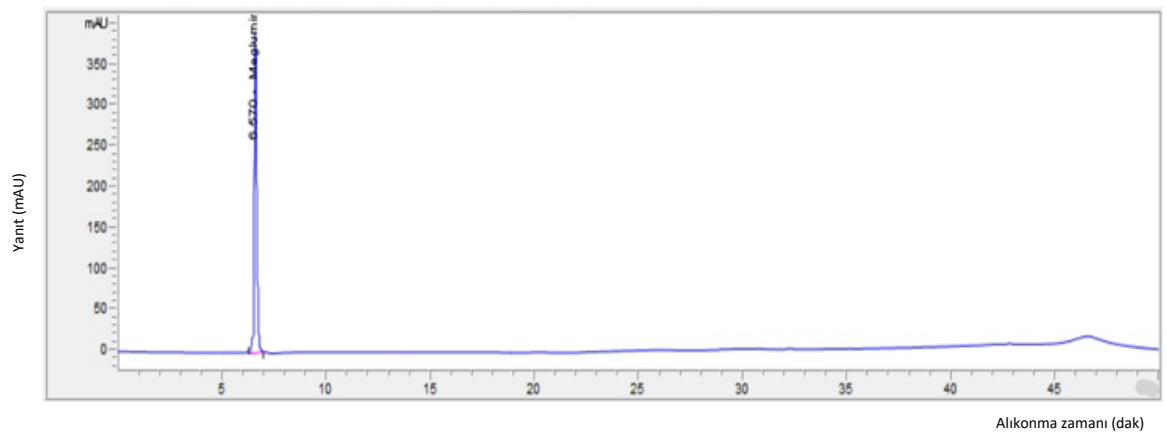
Şekil 4.22. Optimum koşullarda % 100.0'lük derişimde gadoterat meglumin standart çözeltisine ait kromatogram.



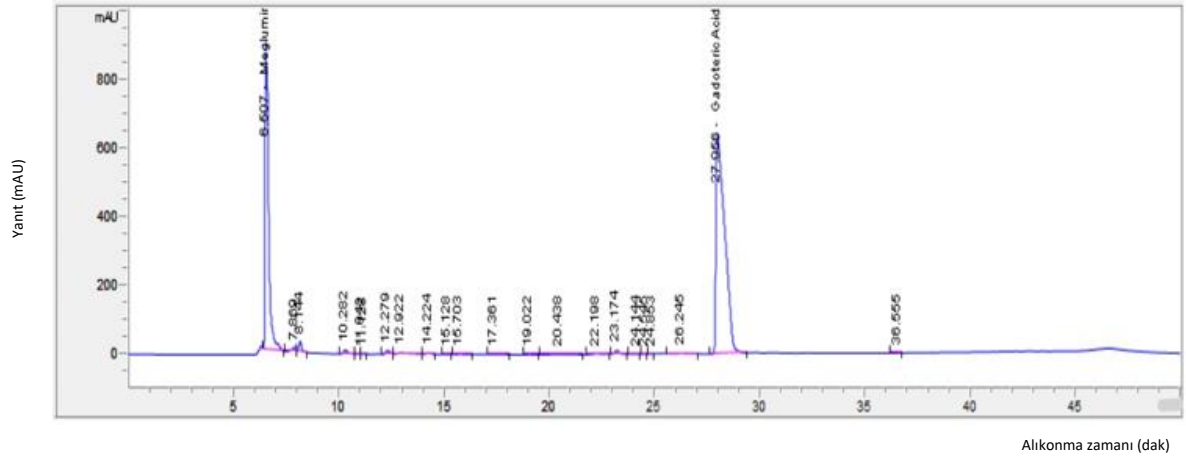
Şekil 4.23. Gadoterat meglumín enjeksiyonluk çözelti asit bozundurmasına ait kromatogram.



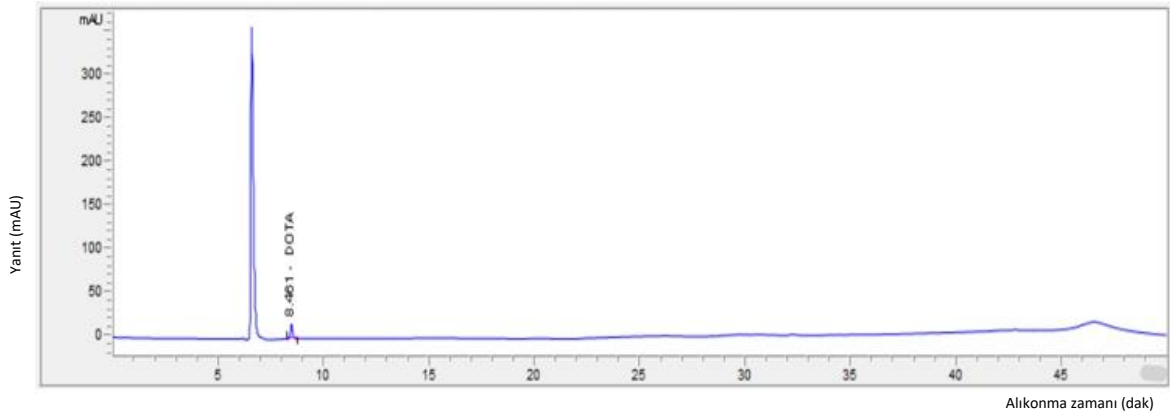
Şekil 4.24. Gadoterat meglumín enjeksiyonluk çözelti plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.



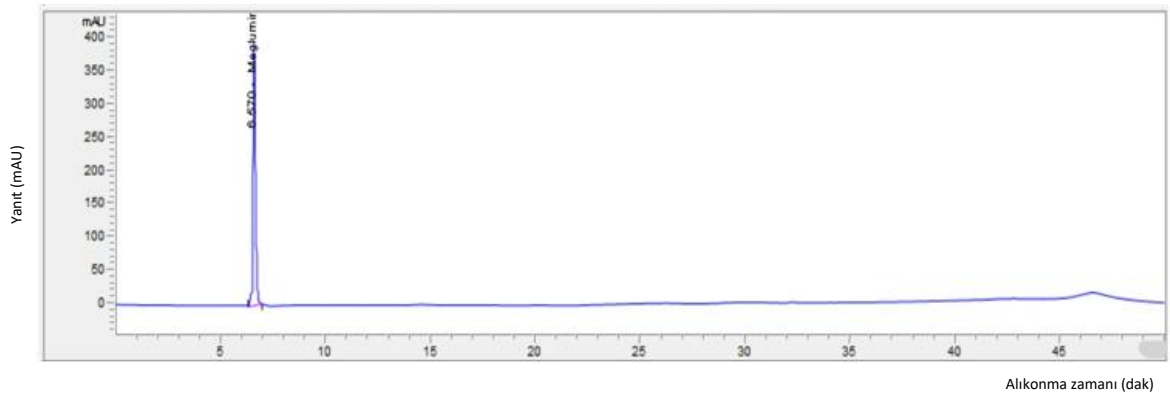
Şekil 4.25. Meglumín plasebo asit bozundurmasına ait kromatogram.



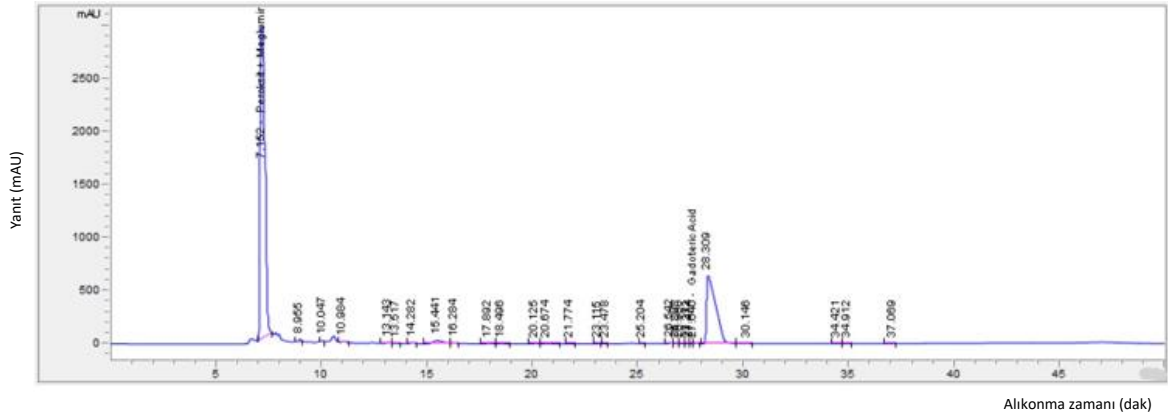
Şekil 4.26. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti baz bozundurmasına ait kromatogram.



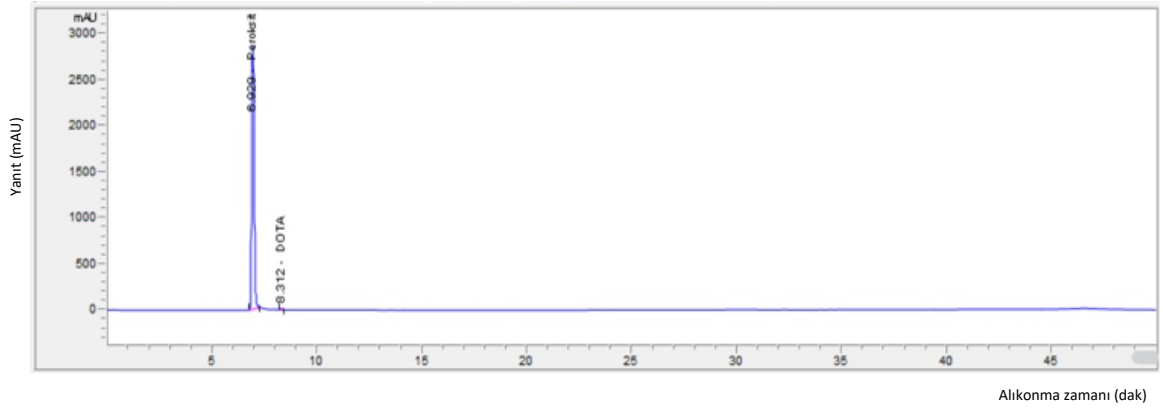
Şekil 4.27. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.



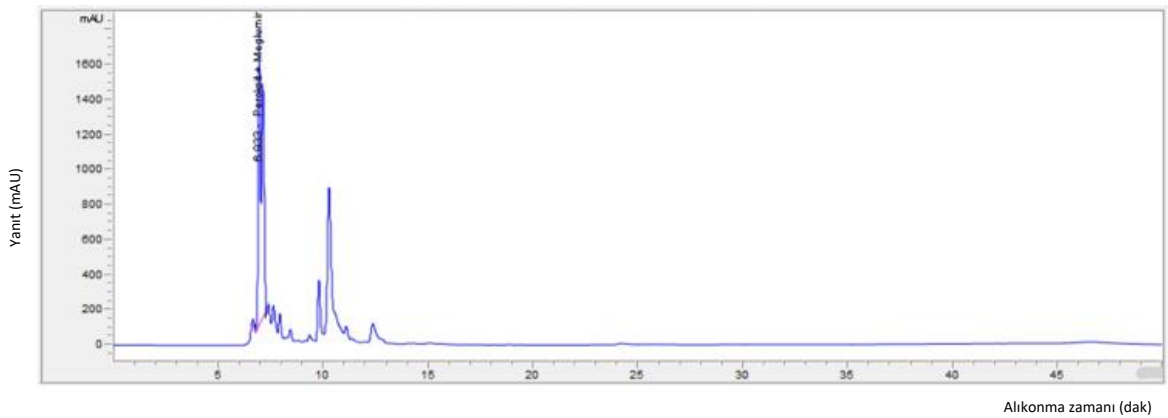
Şekil 4.28. Meglumin plasebo baz bozundurmasına ait kromatogram.



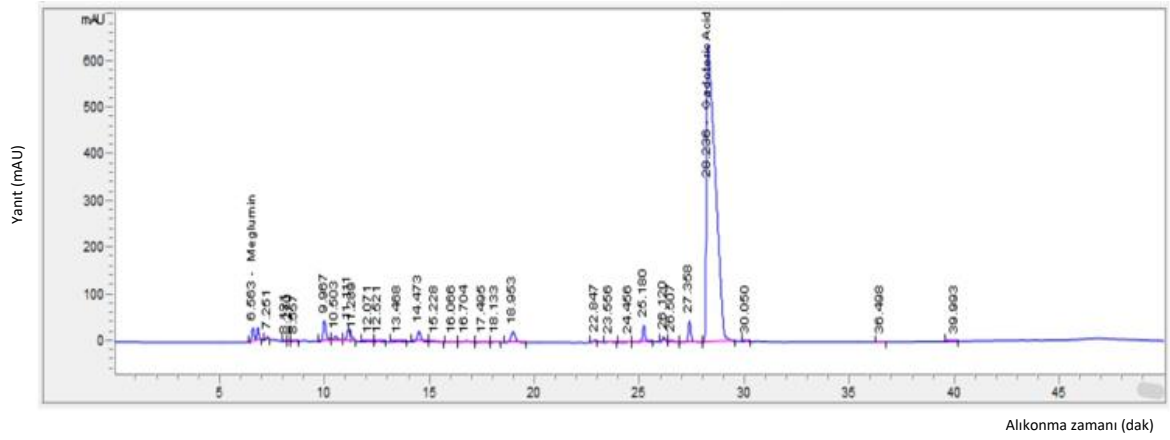
Şekil 4.29. Gadoterat meglumini enjeksiyonluk çözelti peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



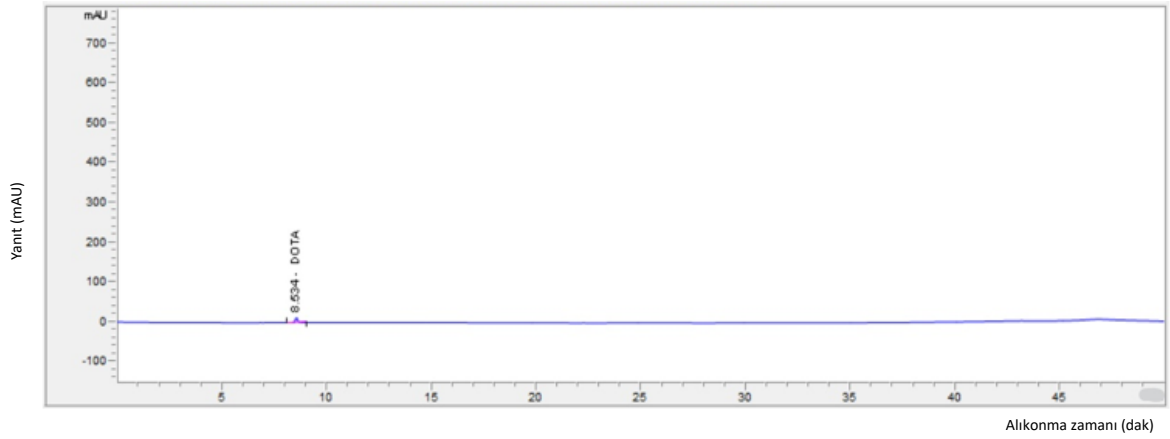
Şekil 4.30. Gadoterat meglumini enjeksiyonluk çözelti plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



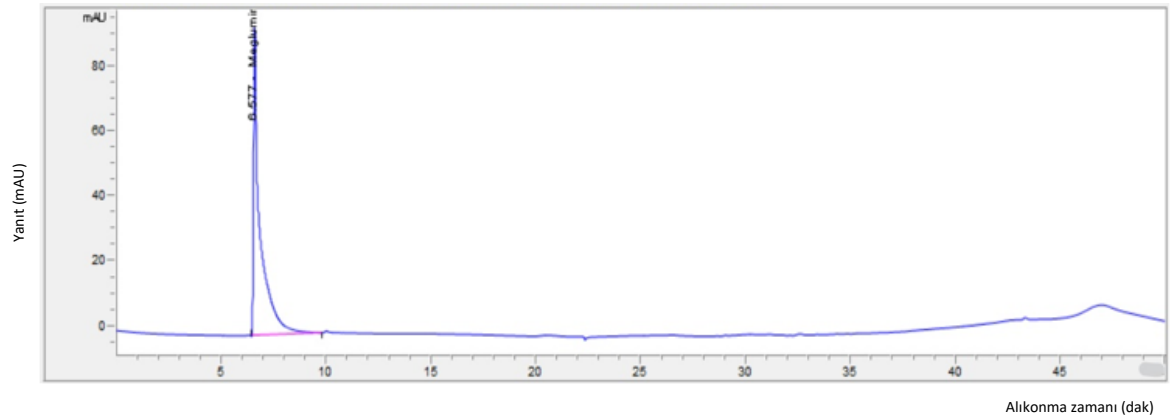
Şekil 4.31. Meglumini plasebo peroksit bozundurmasına ait kromatogram.



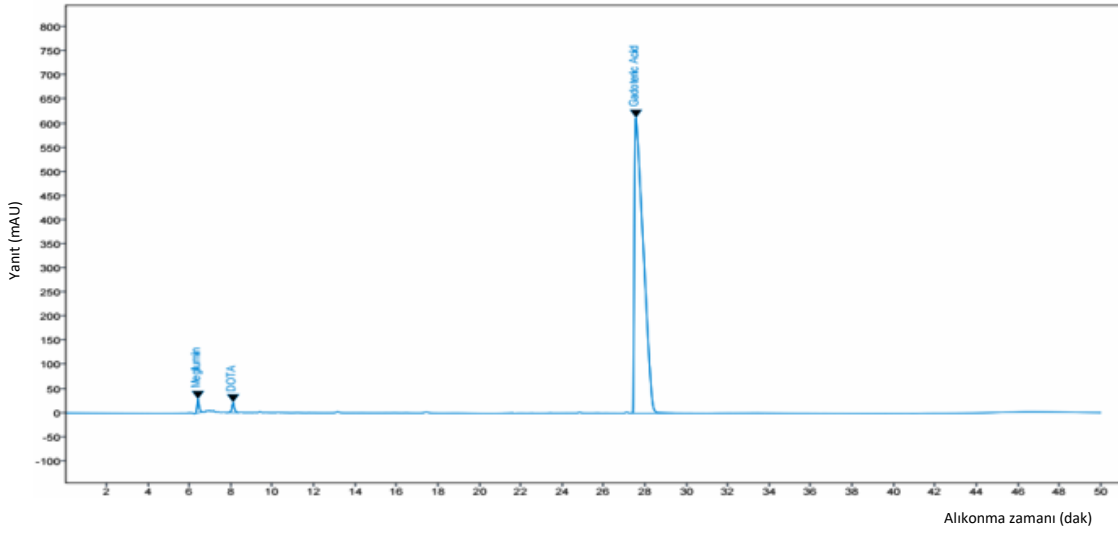
Şekil 4.32. Gadoterat meglumine enjeksiyonluk çözelti ısı bozundurmasına ait kromatogram.



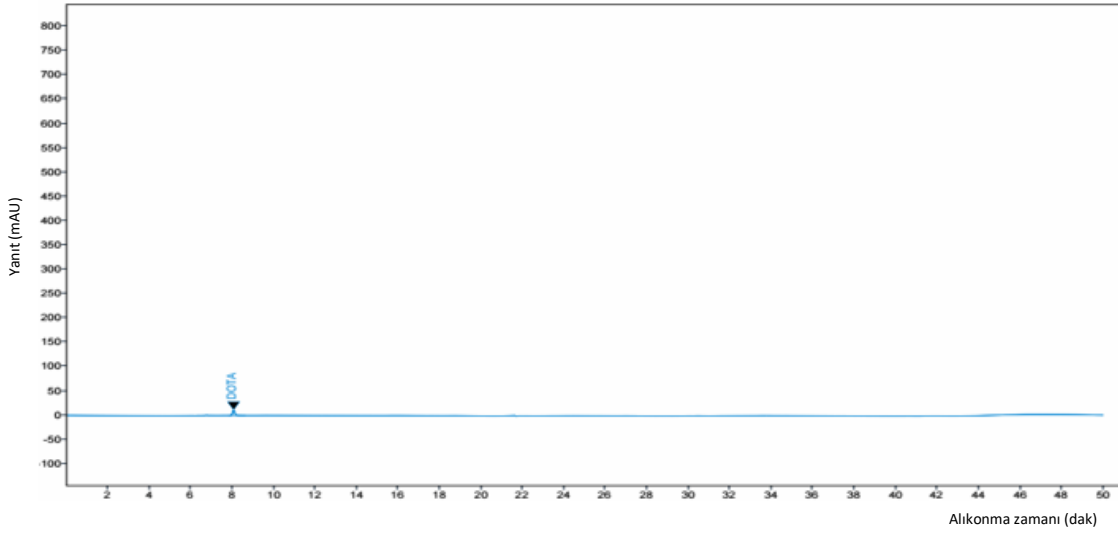
Şekil 4.33. Gadoterat meglumine enjeksiyonluk çözelti plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.



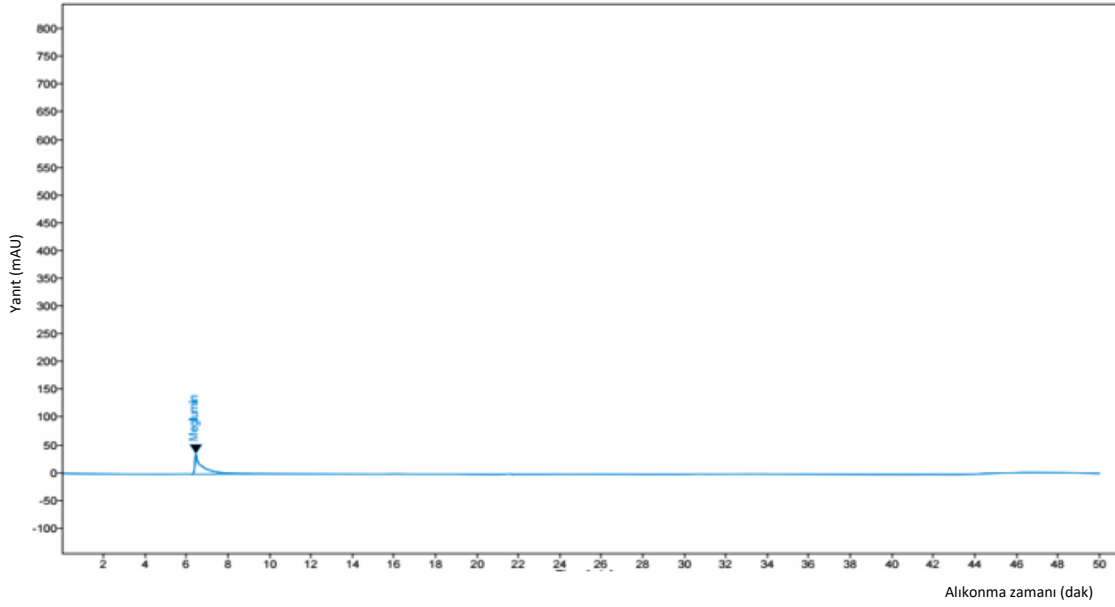
Şekil 4.34. Meglumine plasebo ısı bozundurmasına ait kromatogram.



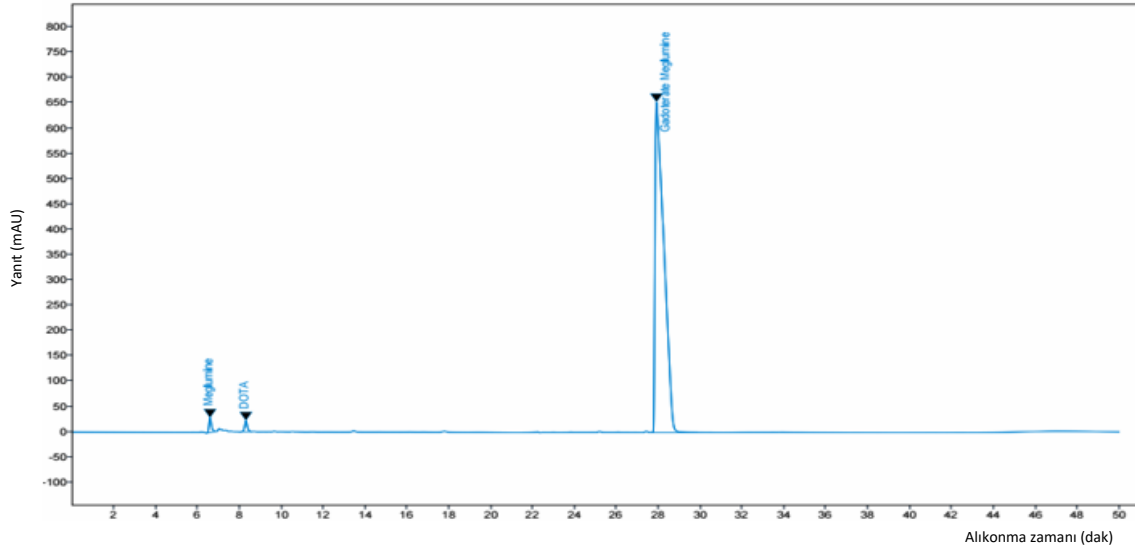
Şekil 4.35. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.



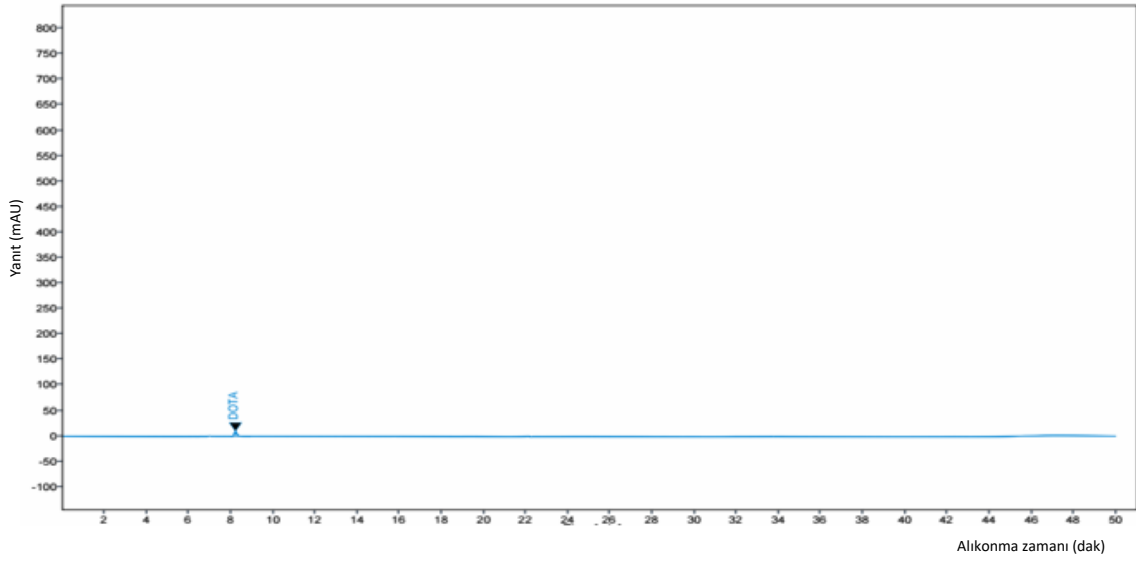
Şekil 4.36. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.



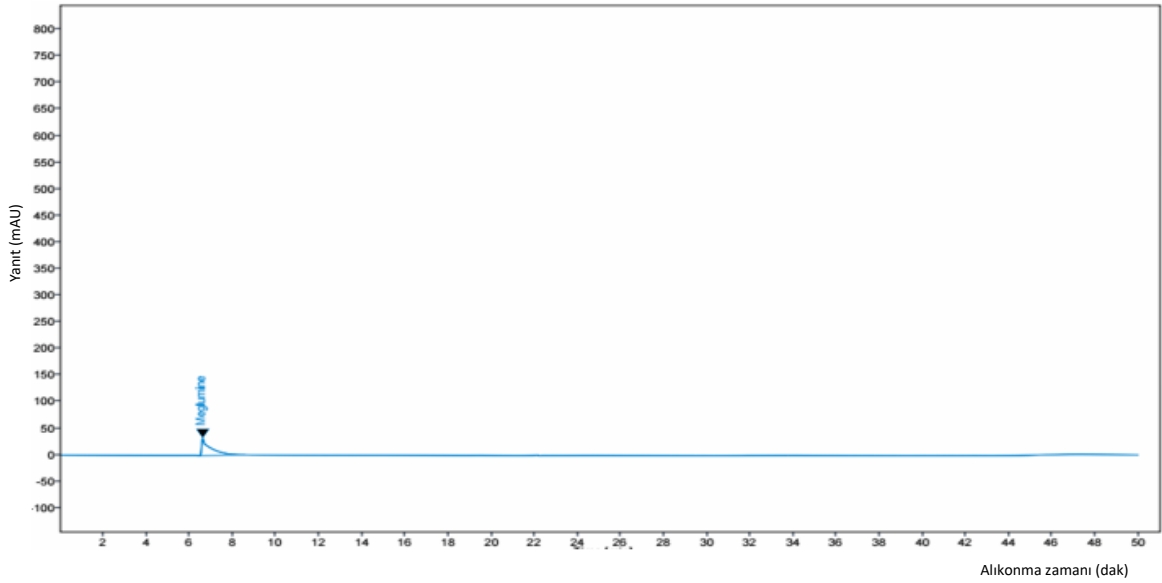
Şekil 4.37. Megluminin plasebo görünür ışık bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.38. Gadoterat megluminin enjeksiyonluk çözelti UV bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.39. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebo UV bozundurmasına ait kromatogram.



Şekil 4.40. Meglumin plasebo UV bozundurmasına ait kromatogram.

4.2.3. Sistem Tekrarlanabilirliği

Sistem tekrarlanabilirliğinde, % 100.0'lük derişimde gadoterik asitin, DOTA'nın ve DO3A'nın standart çözeltilerinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri ve alıkonma zamanları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Standart çözeltinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri.

	Gadoterik Asit	DOTA	DO3A
$\bar{x} \pm SH$	16165.70 \pm 3.56	166.60 \pm 0.18	175.28 \pm 1.30
SS	12.33	0.62	1.55
% BSS	0.08	0.37	0.88

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

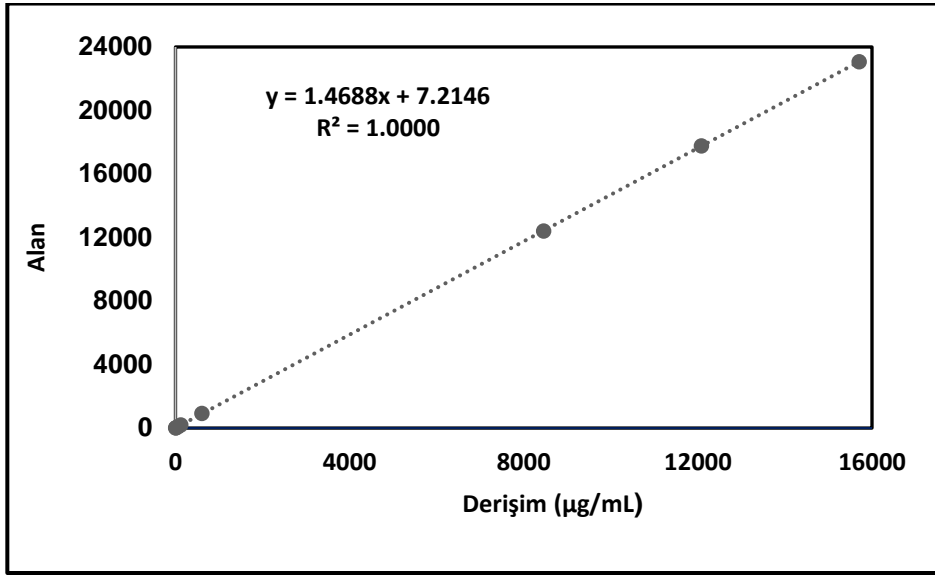
Tablo 4.5. Standart çözeltinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alıkonma zamanları.

	Gadoterik Asit	DOTA	DO3A
$\bar{x} \pm SH$	28.47 \pm 0.01	8.42 \pm 0.00	8.17 \pm 0.00
SS	0.03	0.02	0.01
% BSS	0.11	0.18	0.11

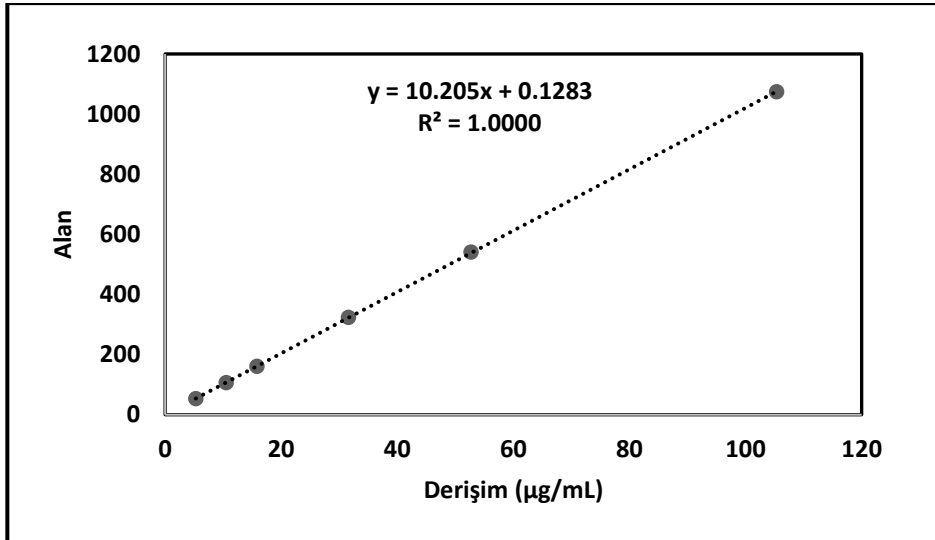
\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

4.2.4. Doğrusallık ve Aralık

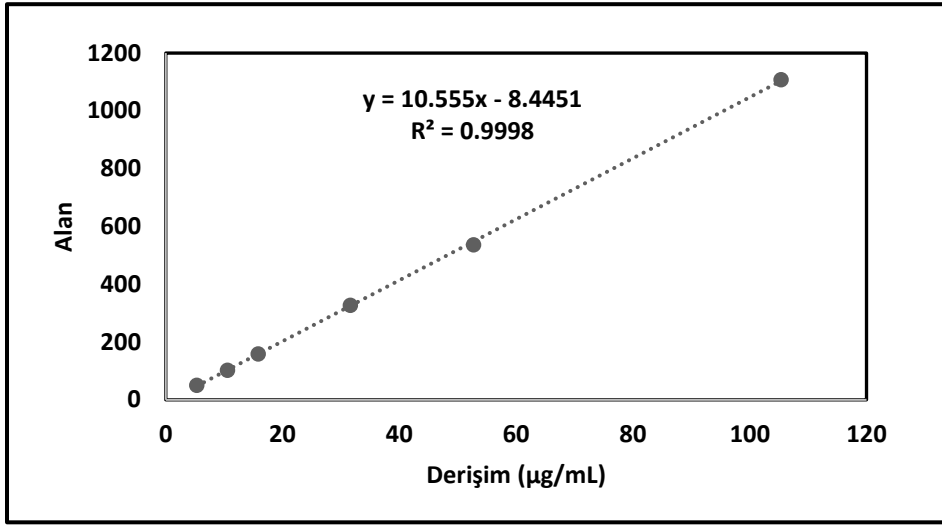
% 0.05 - 130.0 (6.04 - 15703.33 $\mu\text{g/mL}$) derişim aralığında hazırlanan gadoterik asit, % 0.05 - 1.0 (DOTA için 5.27 - 105.46 $\mu\text{g/mL}$, DO3A için 5.27 - 105.37 $\mu\text{g/mL}$) derişim aralığında hazırlanan DOTA ve DO3A standart çözeltilerinin analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.41 - 4.43'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ile korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin doğrusallık parametresi kontrolü için oluşturulan grafikler ise Şekil 4.44 - 4.46'da gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri ve ANOVA analiz sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir.



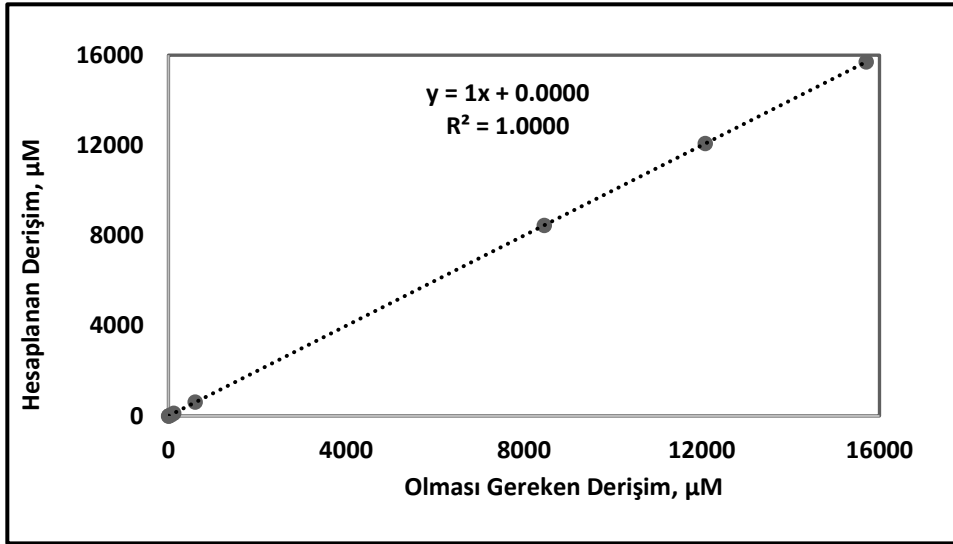
Şekil 4.41. Regresyon analizi sonucunda gadoterik asit için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



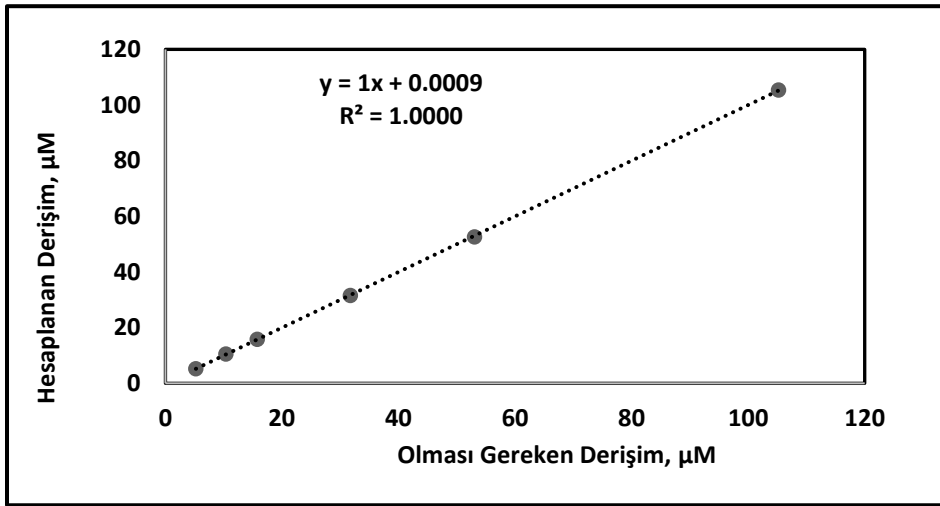
Şekil 4.42. Regresyon analizi sonucunda DOTA için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



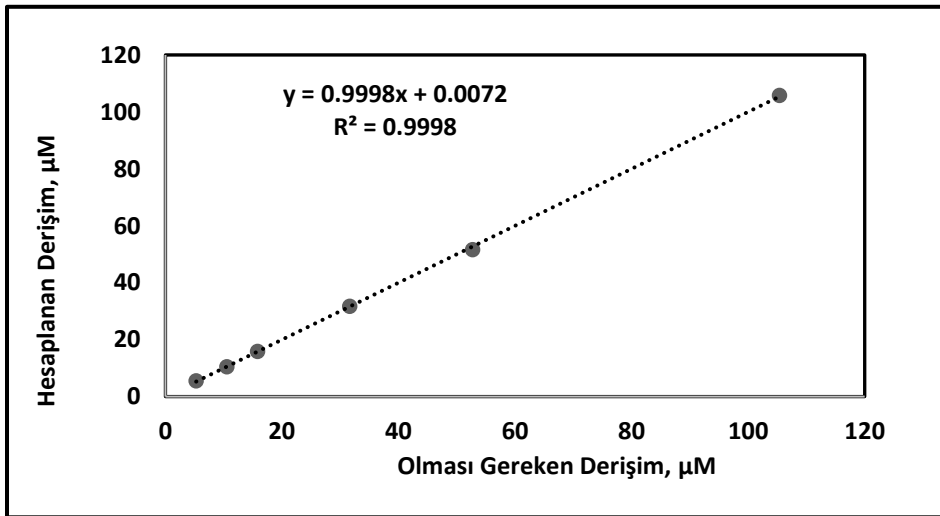
Şekil 4.43. Regresyon analizi sonucunda DO3A için elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.44. Gadoterik asit için doğrusallık kontrolü grafiği.



Şekil 4.45. DOTA için doğrusallık kontrolü grafiği.



Şekil 4.46. DO3A için doğrusallık kontrolü grafiği.

Tablo 4.6. Etkin madde ve ilgili safsızlıklarının kalibrasyon eğrilerine ait veriler.

Molekül	b	a	R	*p	**p	F
Gadoterik Asit	1.4688	7.2146	1.0000	0.0000	0.2202	4504061.816
DOTA	10.2047	0.1283	0.9999	0.0000	0.9250	161382.166
DO3A	10.5552	8.4451	0.9999	0.0000	0.0852	20580.44603

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

4.2.5. Doğruluk

Gadoterik asit için 3 farklı derişimde (% 70.0, % 100.0 ve % 130.0), DOTA ve DO3A için 3 farklı derişimde (% 0.05, % 0.15 ve % 0.5) hazırlanan 6 farklı standart çözeltinin analizinin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmalarından elde edilen veriler, kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve % BH ve % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.7 - 4.12).

Tablo 4.7. Gadoterik asit için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 70.0	11281.58	98.61	1.39	99.21 \pm 0.13	0.33	0.33
	11337.79	99.11	0.89			
	11359.04	99.29	0.71			
	11354.37	99.25	0.75			
	11377.03	99.45	0.55			
	11388.39	99.55	0.45			
% 100.0	16382.62	100.26	0.26	100.34 \pm 0.07	0.18	0.18
	16375.28	100.22	0.22			
	16363.44	100.14	0.14			
	16423.05	100.51	0.51			
	16440.00	100.61	0.61			
	16390.02	100.31	0.31			
% 130.0	21061.31	99.16	0.84	99.15 \pm 0.04	0.10	0.10
	21024.60	98.99	1.01			
	21048.95	99.10	0.90			
	21089.52	99.29	0.71			
	21068.92	99.20	0.80			
	21062.58	99.17	0.83			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.8. DOTA için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 0.05	54.24	95.81	4.19	96.76 \pm 0.26	0.63	0.65
	55.02	97.20	2.80			
	54.67	96.57	3.43			
	55.21	97.53	2.47			
	54.95	97.08	2.92			
	54.53	96.34	3.66			
% 0.15	166.37	97.82	2.18	97.68 \pm 0.13	0.31	0.32
	165.76	97.46	2.54			
	167.00	98.19	1.81			
	165.54	97.33	2.67			
	166.31	97.78	2.22			
	165.85	97.51	2.49			
% 0.5	553.63	97.60	2.40	97.42 \pm 0.18	0.45	0.46
	548.27	96.65	3.35			
	554.18	97.70	2.30			
	552.64	97.42	2.58			
	551.32	97.19	2.81			
	555.51	97.93	2.07			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.9. DO3A için gün içi doğruluk ve kesinlik sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 0.05	50.95	101.21	1.21	101.20 \pm 0.15	0.38	0.37
	50.63	100.66	0.66			
	51.02	101.33	1.33			
	51.31	101.82	1.82			
	50.92	101.16	1.16			
	50.86	101.05	1.05			
% 0.15	169.18	100.89	0.89	101.38 \pm 0.14	0.35	0.34
	169.91	101.30	1.30			
	170.20	101.47	1.47			
	170.99	101.92	1.92			
	169.70	101.18	1.18			
	170.35	101.55	1.55			
% 0.5	570.63	98.67	1.33	99.00 \pm 0.09	0.22	0.22
	572.52	98.99	1.01			
	571.96	98.90	1.10			
	572.46	98.98	1.02			
	573.54	99.17	0.83			
	574.32	99.30	0.70			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.10. Gadoterik asit için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 70.0	98.32	98.38	98.50	99.51	98.37	98.12	98.53 \pm 0.20	1.47	0.50
% 100.0	98.89	98.66	99.52	101.05	99.96	98.32	99.40 \pm 0.41	0.95	1.01
% 130.0	98.88	98.20	98.44	99.85	98.48	98.84	98.78 \pm 0.24	1.22	0.59

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.11. DOTA için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	% BSS
% 0.05	95.54	97.37	97.81	97.75	95.19	95.60	96.54 \pm 0.50	3.46	1.27
% 0.15	97.58	96.65	98.54	95.13	99.43	97.66	97.50 \pm 0.61	2.50	1.53
% 0.50	97.66	96.16	98.48	95.56	99.84	97.79	97.58 \pm 0.63	2.42	1.59

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.12. DO3A için günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları (n =3).

Derişim	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	$\bar{x} \pm SH$	% BH	%BSS
% 0.05	101.48	101.05	101.31	101.13	101.26	101.54	101.30 \pm 0.08	1.30	0.19
% 0.15	99.68	101.05	100.05	100.01	100.71	99.68	100.20 \pm 0.23	0.41	0.56
% 0.50	99.52	99.03	99.24	99.46	99.92	99.44	99.44 \pm 0.12	0.57	0.30

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Doğruluk parametresinin değerlendirilmesi için ayrıca geri kazanım çalışmaları da yapılmıştır. Bunun için 3 farklı derişimde (% 70.0, % 100.0 ve % 130.0) gadoterik asit standart çözeltilerinden plaseboya (DOTA plaseboya) eklenmiş, 3 farklı derişimde (% 0.05, % 0.15 ve % 0.5) DOTA ve DO3A standart çözeltilerinden plaseboya (gadoterat meglumin içeren plaseboya) eklenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.13 - 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.13. Gadoterik asite ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 70.0	11352.71	99.24	0.76	99.51 \pm 0.14	0.24	0.24
	11402.52	99.67	0.33			
	11395.59	99.61	0.39			
% 100.0	16231.53	99.34	0.66	99.59 \pm 0.13	0.22	0.23
	16301.41	99.76	0.24			
	16285.79	99.67	0.33			
% 130.0	20902.59	98.41	1.59	98.68 \pm 0.17	0.29	0.29
	20953.43	98.65	1.35			
	21023.91	98.98	1.02			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.14. DOTA'ya ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	% BSS
% 0.05	56.05	99.02	0.98	99.00 \pm 0.09	0.15	0.15
	56.13	99.15	0.85			
	55.96	98.85	1.15			
% 0.15	167.53	98.50	1.50	98.23 \pm 0.15	0.26	0.27
	166.64	97.97	2.03			
	167.03	98.20	1.80			
% 0.5	555.53	97.93	2.07	98.02 \pm 0.19	0.33	0.34
	558.12	98.39	1.61			
	554.47	97.75	2.25			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.15. DO3A'ya ait geri kazanım çalışmaları sonuçları (n = 6).

Derişim	Alan	% Bulunan	% BH	$\bar{x} \pm SH$	SS	BSS (%)
% 0.05	50.79	100.92	0.92	100.45 \pm 0.27	0.47	0.47
	50.24	99.99	0.01			
	50.50	100.43	0.43			
% 0.15	168.00	100.22	0.22	100.12 \pm 0.07	0.12	0.12
	167.89	100.16	0.16			
	167.59	99.98	0.02			
% 0.5	576.01	99.59	0.41	99.56 \pm 0.03	0.04	0.04
	575.92	99.57	0.43			
	575.53	99.51	0.49			

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, BH: Bağıl Hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma.

Doğruluk parametresi için standart ekleme yöntemi ile de çalışmalar yapılmıştır. Bu doğrultuda, numune çözeltilisine % 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 70.0, 100.0 ve 130.0 derişim seviyelerinde gadoterik asit standart çözeltileri ve % 0.05, 0.1, 0.15, 0.30, 0.5 ve 1.0 derişim seviyelerinde DOTA ve DO3A standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon doğruları çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Etkin madde ve safsızlıklara ait standart ekleme yönteminden elde edilen sonuçlar (n = 6).

	Kalibrasyon Eğrisinden Elde Edilen Regresyon Denklemi	Standart Ekleme Yönteminden Elde Edilen Regresyon Denklemi
Gadoterik Asit	$y = 1.4688x + 7.2146$ $R^2 = 1$	$y = 1.5283x + 1.7473$ $R^2 = 1$
DOTA	$y = 10.205x + 0.1283$ $R^2 = 1$	$y = 10.242x - 1.1593$ $R^2 = 1$
DO3A	$y = 10.555x - 8.4451$ $R^2 = 0.9998$	$y = 9.8436x - 0.1518$ $R^2 = 1$

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

4.2.6. Kesinlik ve Ara Kesinlik (Tutarlılık)

Gadoterik asit için 3 farklı derişimde (% 70.0, % 100.0 ve % 130.0) hazırlanan 6 farklı standart çözeltinin, DOTA ve DO3A için 3 farklı derişimde (% 0.05, % 0.15 ve % 0.5) hazırlanan 6 farklı standart çözeltinin analizine ilişkin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen veriler kalibrasyon eğrilerine göre değerlendirilmiş ve % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.7 - 4.12).

Ara kesinlik (tutarlılık) parametresinde; % 100.0'lük derişimde farklı analizci tarafından hazırlanan 6 farklı gadoterik asit, DOTA ve DO3A standart çözeltileri; farklı günde, farklı cihaz ve farklı kolon kullanarak analiz edilmiş olup analizler arası farkın anlamlılığı, t- testi ve F-testi ile gösterilmiştir (Tablo 4.17 - 4.19).

Tablo 4.17. Gadoterik asite ait ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 99.49 \pm 0.06$	$\bar{x} \pm SH = 99.30 \pm 0.05$
SS = 0.16	SS = 0.13
% BSS = 0.16	% BSS = 0.13
$t_H = 2.19, t_T = 2.23 (p > 0.05)$	
$F_H = 3.82, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

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

Tablo 4.18. DOTA'ya ait ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 98.95 \pm 0.15$	$\bar{x} \pm SH = 98.85 \pm 0.20$
SS = 0.36	SS = 0.49
% BSS = 0.36	% BSS = 0.50
$t_H = 0.40, t_T = 2.23 (p > 0.05)$	
$F_H = 0.52, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

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

Tablo 4.19. DO3A'ya ait ara kesinlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar (n = 6).

1. Analizci	2. Analizci
$\bar{x} \pm SH = 99.55 \pm 0.13$	$\bar{x} \pm SH = 99.49 \pm 0.11$
SS = 0.31	SS = 0.27
% BSS = 0.31	% BSS = 0.27
$t_H = 0.36, t_T = 2.23 (p > 0.05)$	
$F_H = 1.28, F_T = 5.05 (p > 0.05)$	

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

4.2.7. Tespit Limiti (LOD) ve Alt Tayin Limiti (LOQ)

Gadoteratik asit, DOTA ve DO3A standartları kullanılarak hazırlanan LOD ve LOQ değerlerinin tespiti çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.20 ve 4.21'de verilmiştir.

Tablo 4.20. Gadoterik asit, DOTA ve DO3A'ya ait LOD sonuçları (n = 6).

	Gadoterik asit		DOTA		DO3A	
	Alan	S/G Oranı	Alan	S/G Oranı	Alan	S/G Oranı
$\bar{x} \pm SH$	1.58 ± 0.03	2.65 ± 0.03	3.11 ± 0.04	2.85 ± 0.03	2.35 ± 0.04	2.68 ± 0.05
SS	0.08	0.08	0.11	0.07	0.09	0.13
% BSS	5.28	2.86	3.52	2.58	3.69	4.91

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, S/G: Sinyal/Gürültü.

Tablo 4.21. Gadoterik asit, DOTA ve DO3A'ya ait LOQ sonuçları (n = 6).

	Gadoterik asit		DOTA		DO3A	
	Alan	S/G Oranı	Alan	S/G Oranı	Alan	S/G Oranı
$\bar{x} \pm SH$	5.23 ± 0.06	11.04 ± 0.48	10.61 ± 0.09	11.85 ± 0.49	7.07 ± 0.06	12.88 ± 0.64
SS	0.15	1.17	0.23	1.19	0.15	1.56
% BSS	2.78	10.62	2.19	10.08	2.07	12.13

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, S/G: Sinyal/Gürültü.

4.2.8. Sağlamlık

Optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analiz yönteminin sağlamlığı değerlendirilmiştir. Bunun için % 100.0'lük derişim seviyesinde hazırlanan gadoterik asit standart çözeltileri, % 0.15 derişim seviyesinde hazırlanan DOTA ve DO3A standart çözeltileri değiştirilen akış hızında, dalga boyu, kolon fırın sıcaklığında, hareketli faz organik çözücü oranında ve hareketli faz pH'sında analiz edilmiştir. Her bir değişlikte elde edilen piklerin alıkonma zamanları, alanları, N ve T değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 4.22 - 4.24).

Tablo 4.22. Gadoterik asite ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T
Optimum koşullar	29.56 ± 0.01 % BSS = 0.04	16361.7 ± 11.65 % BSS = 0.17	21225.7 ± 27.57 % BSS = 0.32	1.74 ± 0.01 % BSS = 1.53
Akış hızı (0.35 mL/dak)	32.12 ± 0.00 % BSS = 0.02	18607.5 ± 12.22 % BSS = 0.16	24124.2 ± 16.00 % BSS = 0.16	1.67 ± 0.01 % BSS = 1.61
Akış hızı (0.45 mL/dak)	27.46 ± 0.01 % BSS = 0.05	14561.9 ± 8.31 % BSS = 0.14	18852.0 ± 28.49 % BSS = 0.37	1.83 ± 0.02 % BSS = 2.07
Dalga boyu (198 nm)	29.57 ± 0.02 % BSS = 0.15	21816.7 ± 16.01 % BSS = 0.18	20439.3 ± 212.52 % BSS = 2.55	1.77 ± 0.01 % BSS = 1.86
Dalga boyu (202 nm)	29.60 ± 0.00 % BSS = 0.04	12336.2 ± 4.34 % BSS = 0.09	21594.2 ± 19.97 % BSS = 0.23	1.75 ± 0.02 % BSS = 2.15
Kolon fırın sıcaklığı (33 °C)	29.84 ± 0.00 % BSS = 0.01	16250.3 ± 9.06 % BSS = 0.14	21808.0 ± 31.59 % BSS = 0.35	1.76 ± 0.01 % BSS = 1.78
Kolon fırın sıcaklığı (37 °C)	29.35 ± 0.01 % BSS = 0.06	16305.3 ± 12.83 % BSS = 0.19	20875.8 ± 173.79 % BSS = 2.04	1.79 ± 0.02 % BSS = 2.34
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 9)	30.25 ± 0.02 % BSS = 0.13	16590.8 ± 11.53 % BSS = 0.17	19093.7 ± 279.09 % BSS = 3.58	1.70 ± 0.03 % BSS = 4.96
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 11)	29.61 ± 0.00 % BSS = 0.03	16289.2 ± 6.29 % BSS = 0.09	19511.0 ± 593.08 % BSS = 7.45	1.50 ± 0.08 % BSS = 12.97
pH (4.20)	30.15 ± 0.01 % BSS = 0.05	16011.4 ± 20.07 % BSS = 0.31	21488.0 ± 28.20 % BSS = 0.32	1.63 ± 0.05 % BSS = 7.54
pH (4.40)	30.21 ± 0.00 % BSS = 0.04	15882.5 ± 20.52 % BSS = 0.32	21489.2 ± 43.33 % BSS = 0.49	1.75 ± 0.03 % BSS = 4.26

t_R : Alikonma zamanı, N: Teorik tabaka sayısı, T: Kuyruklanma faktörü, \bar{x} : Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma

Tablo 4.23. DOTA'ya ait sağlamlık çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T
Optimum koşullar	9.96 ± 0.01 % BSS = 0.16	192.5 ± 0.43 % BSS = 0.55	24771.7 ± 103.20 % BSS = 1.02	1.39 ± 0.01 % BSS = 1.98
Akış hızı (0.35 mL/dak)	11.39 ± 0.00 % BSS = 0.05	220.2 ± 0.63 % BSS = 0.70	27083.3 ± 77.06 % BSS = 0.70	1.42 ± 0.02 % BSS = 3.89
Akış hızı (0.45 mL/dak)	8.86 ± 0.00 % BSS = 0.06	173.1 ± 0.58 % BSS = 0.82	21206.8 ± 138.44 % BSS = 1.60	1.45 ± 0.01 % BSS = 2.21
Dalga boyu (198 nm)	9.99 ± 0.00 % BSS = 0.04	237.1 ± 2.97 % BSS = 3.07	23687.3 ± 170.55 % BSS = 1.76	1.58 ± 0.02 % BSS = 3.87
Dalga boyu (202 nm)	10.00 ± 0.00 % BSS = 0.05	152.6 ± 0.21 % BSS = 0.34	23152.7 ± 161.80 % BSS = 1.71	1.42 ± 0.09 % BSS = 15.42
Kolon fırın sıcaklığı (33 °C)	10.13 ± 0.00 % BSS = 0.00	194.9 ± 0.62 % BSS = 0.78	22991.0 ± 139.53 % BSS = 1.49	1.47 ± 0.06 % BSS = 9.91
Kolon fırın sıcaklığı (37 °C)	9.83 ± 0.00 % BSS = 0.08	205.1 ± 0.68 % BSS = 0.81	23924.5 ± 168.80 % BSS = 1.73	1.04 ± 0.01 % BSS = 1.65
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 9)	10.04 ± 0.01 % BSS = 0.23	212.7 ± 0.42 % BSS = 0.49	23164.7 ± 301.53 % BSS = 3.19	1.05 ± 0.01 % BSS = 3.46
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 11)	10.04 ± 0.00 % BSS = 0.07	215.8 ± 0.27 % BSS = 0.30	23334.7 ± 213.76 % BSS = 2.24	1.02 ± 0.01 % BSS = 1.62
pH (4.20)	10.00 ± 0.00 % BSS = 0.08	193.7 ± 0.39 % BSS = 0.49	23074.2 ± 167.78 % BSS = 1.78	1.09 ± 0.03 % BSS = 7.32
pH (4.40)	9.91 ± 0.00 % BSS = 0.12	196.1 ± 0.35 % BSS = 0.44	23044.5 ± 209.01 % BSS = 2.22	1.08 ± 0.03 % BSS = 6.27

t_R : Alınma zamanı, N: Teorik tabaka sayısı, T: Kuyruklanma faktörü, \bar{x} : Ortalama ± standart hata, BSS: Bağıl standart sapma.

Tablo 4.24. DO3A'ya ait sağlamlik çalışmaları sonuçları (n = 6).

	t_R	Alan	N	T
Optimum koşullar	8.18 ± 0.00 % BSS = 0.07	160.6 ± 0.41 % BSS = 0.63	5607.3 ± 10.20 % BSS = 0.45	1.20 ± 0.00 % BSS = 0.86
Akiş hızı (0.35 mL/dak)	9.34 ± 0.00 % BSS = 0.04	181.5 ± 0.51 % BSS = 0.69	6340.5 ± 17.75 % BSS = 0.69	1.18 ± 0.02 % BSS = 3.24
Akiş hızı (0.45 mL/dak)	7.27 ± 0.00 % BSS = 0.07	145.3 ± 0.55 % BSS = 0.93	4963.7 ± 16.38 % BSS = 0.81	1.20 ± 0.01 % BSS = 2.96
Dalga boyu (198 nm)	8.17 ± 0.00 % BSS = 0.00	234.3 ± 0.58 % BSS = 0.60	5532.3 ± 17.83 % BSS = 0.79	1.28 ± 0.00 % BSS = 0.77
Dalga boyu (202 nm)	8.80 ± 0.00 % BSS = 0.10	114.2 ± 0.64 % BSS = 1.36	5424.7 ± 22.01 % BSS = 0.99	1.13 ± 0.03 % BSS = 7.14
Kolon fırın sıcaklığı (33 °C)	8.17 ± 0.00 % BSS = 0.06	160.3 ± 1.00 % BSS = 1.53	5315.7 ± 17.43 % BSS = 0.80	1.31 ± 0.02 % BSS = 3.11
Kolon fırın sıcaklığı (37 °C)	8.16 ± 0.00 % BSS = 0.05	159.5 ± 0.57 % BSS = 0.88	5397.5 ± 14.41 % BSS = 0.65	1.33 ± 0.02 % BSS = 3.26
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 9)	8.13 ± 0.01 % BSS = 0.31	161.7 ± 0.88 % BSS = 1.33	5052.7 ± 13.73 % BSS = 0.67	1.39 ± 0.02 % BSS = 3.39
Hareketli faz B'deki asetonitril oranı (% 11)	8.12 ± 0.00 % BSS = 0.06	161.1 ± 0.97 % BSS = 1.47	5299.7 ± 29.48 % BSS = 1.36	1.39 ± 0.02 % BSS = 3.81
pH (4.20)	8.15 ± 0.00 % BSS = 0.11	162.1 ± 0.31 % BSS = 0.47	5187.7 ± 23.30 % BSS = 1.10	1.44 ± 0.04 % BSS = 7.28
pH (4.40)	8.21 ± 0.00 % BSS = 0.13	161.9 ± 0.26 % BSS = 0.39	5252.8 ± 18.09 % BSS = 0.84	1.44 ± 0.03 % BSS = 5.76

t_R: Alıkonna zamanı, N: Teorik tabaka sayısı, T: Kuyruklanma faktörü, \bar{x} : Ortalama ± standart hata, BSS: Bağılı standart sapma.

4.2.9. Kararlılık

Kararlılık parametresinde standart ve numune çözeltilerinin belli zaman noktalarında analizleri yapılmıştır. Bu doğrultuda, başlangıç noktasındaki ve farklı zaman noktalarındaki etkin madde ve safsızlıklarının alan değerleri karşılaştırılmış ve % uyum değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.25 ve Tablo 4.26'da sunulmuştur.

Tablo 4.25. Etkin madde ve ilgili safsızlıklarını içeren standart çözeltilere ait kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Gadoterik Asit Alanı	% BH	DOTA Alanı	% BH	DO3A Alanı	BH (%)
0	15307.43	-	185.70	-	170.12	-
17	15409.92	100.67	185.20	99.73	170.02	99.94
36	15191.34	99.24	180.28	97.08	168.63	99.12
54	15163.57	99.06	180.40	97.15	167.36	98.38
71	15121.72	98.79	178.10	95.91	165.89	97.51
89	15040.91	98.26	177.50	95.58	164.32	96.59

BH: Bağlı hata

Tablo 4.26. Etkin madde ve ilgili safsızlıklarını içeren numune çözeltilerine ait kararlılık verileri.

Zaman (saat)	Gadoterik Asit Alanı	% BH	DOTA Alanı	% BH	DO3A Alanı	BH (%)
0	16324.64	-	308.61	-	190.32	-
17	16568.83	101.50	306.63	99.35	189.65	99.65
36	16348.01	100.14	303.34	98.28	188.96	99.29
54	16394.22	100.43	302.52	98.02	188.25	98.91
71	16275.16	99.70	302.55	98.02	187.65	98.60
89	16059.87	98.38	303.91	98.48	187.35	98.44

BH: Bağlı hata

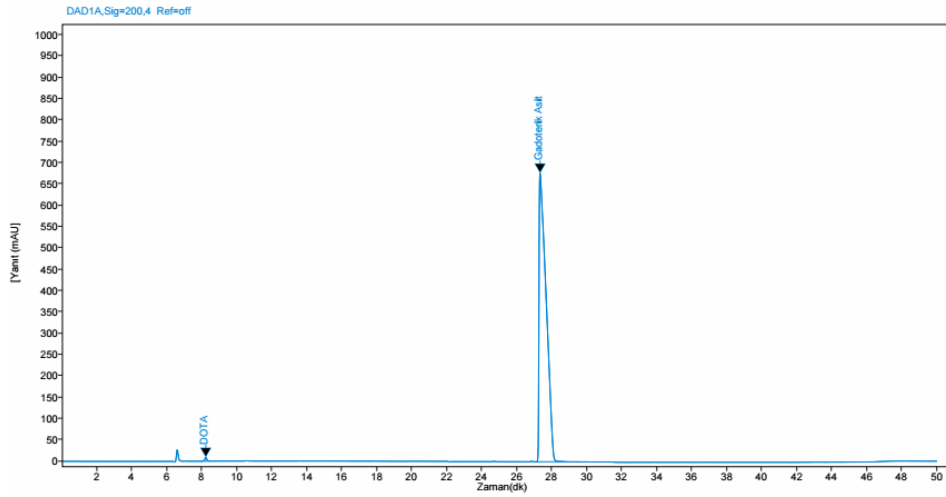
4.3. Farmasötik Preparat Analizlerine İlişkin Bulgular

Dotarem® adlı farmasötik üründen 6 ayrı çözelti hazırlanmıştır ve hazırlanan çözeltilerden ardışık 3 enjeksiyon yapılmıştır (Şekil 4.47). Elde edilen sonuçlar Tablo 4.30'da verilmiştir.

Tablo 4.27. Dotarem® adlı ticari farmasötik ürüne ait analiz sonuçları (n = 6).

	Gadoterik Asit Miktarı (%)	DOTA Miktarı (%)	DO3A Miktarı (%)
$\bar{x} \pm SH$	104.50 \pm 0.05	0.04 \pm 0.00	TE
SS	0.07	0.00	-
BSS	0.06	0.82	-

\bar{x} : Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, TE: Tespit Edilemedi.



Şekil 4.47. Dotarem® adlı ticari farmasötik ürünün analizi sonucu elde edilen kromatogram.

5. TARTIŞMA

Bir ilacın keşfi sürecinde, ilacın güvenliğinin ve etkinliğinin doğrulanması tedavilerde temel parametrelerdir ve ilaç firmaları için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, ilacı geliştirmenin her adımında safsızlıkların tanımlanması, miktarının belirlenmesi, uzaklaştırılması ve etkin maddenin miktar tayininin belirlenmesi önemlidir. ICH kılavuzlarına göre safsızlık, ilaç maddesinin kimyasal yapının bir parçası olmayan ve aktif bileşenlerin saflığını etkileyen bileşendir. Bu tanıma göre, safsızlıkların bulunması kaçınılmazdır, küçük miktarlarda bulunurlar ve çeşitli düzenleyici kurumlar, bir ilaç ürününü piyasaya sürmek için izin verilen miktarlarda safsızlık limitlerini belirlemek için uygulanabilir kılavuzları takip ederler. Bu olası safsızlıkları ve miktarlarını belirlemek için de ürünler, stres koşullarına (hidrolitik, oksidatif, fotolitik ve termal koşullara) maruz bırakılarak metotlar geliştirilir. Düzenleyici otoriteler, ilaç etkin maddesi ve ilgili dozaj formunun farklı çevresel faktörlerin etkisiyle zamanla nasıl değiştiğini gözlemleyebilmek için stres testlerini zorunlu tutar. Elde edilen sonuçlar, uygun formülasyon ve ambalajının seçilmesine ve raf ömrünün belirlenmesine yardımcı olur.

Farmasötik preparatlarda etkin maddelerin safsızlıklarının varlığında analizleri hem zaman hem de maliyet açısından avantaj sağlamaktadır. Farmasötik preparatlarda bulunan safsızlıkların miktarları genelde çok düşük olduğundan; etkin madde safsızlık ve/veya bozunma ürünlerinin tayinleri genelde zordur ve bu analizlerin yapılabilmesi ilaç endüstrisinde oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması kapsamında, enjeksiyonluk çözelti formunda olan ilaç ürünündeki gadoterat meglumin etkin maddesinin; DOTA ve DO3A safsızlıklarının varlığında analizleri için kromatografik bir yöntem geliştirilmiştir. HPLC analiz yöntemi, ürünün stres koşullarına (asit, baz, oksidasyon, ısı ve ışık) maruz bırakılarak oluşması olası safsızlıklarına göre geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine göre değerlendirilmiş ve istatistiksel testler uygulanmıştır. Daha sonra geliştirilen bu kromatografik yöntem, farmasötik preparatlara da uygulanarak yöntemin rutin analizlerde de kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

5.1. Kromatografik Yöntemin Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında ilk olarak, DOTA, DO3A safsızlıklarının ve stres testleri sonucu olası bozunma ürünlerinin varlığında; gadoterat meglumin etkin maddesinin miktar tayini için yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır. En uygun kromatografik parametrelerin belirlenebilmesi için farklı hareketli faz içeriği, sabit faz, hareketli faz pH'sı ve iyon çifti ajanı eklenmesi sonucu elde edilen kromatogramlar, pik şekilleri, pikler arasındaki ayırıcılık, teorik tabaka sayıları ve kuyruklanma faktörü gibi SUT'ne ait parametreler incelenmiştir.

DOTA, DO3A safsızlıklarına ve gadoterik asit etkin maddesine ait standart çözeltileri DAD dedektörü kullanılarak cihaza ayrı ayrı enjekte edilmiştir ve spektrumlar incelenmiştir. Tüm maddeler için 200 nm dalga boyunun miktar tayininde uygun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1 - 4.3).

Daha sonra hareketli faz pH'sının etkisi incelenmiştir. Hareketli faz A'nın (fosfat tamponu) ve hareketli faz B'nin (fosfat tamponu ve asetoniril) pH'sı 4.6 ve 4.3'e ayarlanmıştır. pH 4.3 fosfat tamponu kullanıldığında DO3A ve DOTA pikleri arasında ayırıcılığın pH 4.6 fosfat tamponu kullanıldığındakine göre daha iyi olduğu görülmüştür (Şekil 4.4 - 4.5).

Hareketli faz B'deki % 10 asetonitril oranı yerine % 8 asetonitril kullanılarak ve %10 metanol kullanılarak denemeler yapılmıştır (Şekil 4.6 - 4.7) Hareketli faz B içeriği olarak pH 4.3 fosfat tamponu : asetonitril (90 : 10, h/h) yerine pH 4.3 fosfat tamponu : asetonitril (92 : 8, h/h) ve pH 4.3 fosfat tamponu : metanol (90 : 10, h/h) kullanıldığında gadoterik asit pikinin kuyruklanma faktörünün arttığı ve teorik tabaka sayısının düştüğü görülmüştür. Bu sebeplerden dolayı, pH: 4.3 fosfat tamponu (hareketli faz A) ve pH: 4.3 fosfat tamponu : asetonitril (90 : 10) (hareketli faz B)'den oluşan hareketli faz kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.5).

Hareketli faz A içerisine iyon çifti ajanı eklenmeden ve iyon çifti ajanı (trietilamin ve heksilamin) eklenerek enjeksiyon yapılmıştır. Hareketli faza trietilamin eklendiğinde DOTA ve DO3A ayırımının iyi olduğu; fakat DOTA ve DO3A pik şekillerinin ve kromatogramın taban çizgisinin bozulduğu, dolayısıyla gadoterik asit pik ayırımının zorlaştığı görülmüştür (Şekil 4.8). Hareketli faza heksilamin eklendiğinde ise DOTA piki ile hareketli fazdan gelen pikin girişim yaptığı görülmüştür (Şekil 4.9). Bu sebeplerden ötürü hareketli faz A'da iyon çifti ajanı kullanılmamasına karar verilmiştir.

Yöntem optimizasyonunda uygun sabit fazın belirlenmesi için C18, C8 ve fenil heksil kolonlar denenmiştir ve elde edilen kromatogramlar Şekil 4.10 - 4.13'de verilmiştir. C18 (partikül çapı 5 µm) kolon kullanılarak yapılan enjeksiyonda meglumin, DOTA ve DO3A piklerinin birbirine girişim yaptığı görülmüştür (Şekil 4.10). C18 (partikül çapı 3 µm) kolon kullanılarak yapılan enjeksiyonda meglumin ve DO3A piklerinin birbirine girişim yaptığı görülmüştür (Şekil 4.11). C8 kolon kullanılarak yapılan enjeksiyonda ise gadoterik asit pik şeklinin ve kuyruklanma faktörünün kötü olduğu görülmüştür (Şekil 4.12). En düzgün pik şekillerinin ve ayırımın fenil heksil kolonda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13). Önerilen HPLC yönteminde, fenil-heksil (Phenomenex Luna Fenil-Heksil, 250 x 4.6 mm, 3 µm) kolon kullanılmasına karar verilmiştir.

Seyreltme çözeltisi etkisinin incelenmesine ait çalışmalarda, farklı oranlarda su - asetonitril karışımı, su - metanol karışımı ve pH 4.3 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan çözeltiler analiz edilmiştir. Çalışmalarda su : asetonitril (80 : 20, h/h), su : asetonitril (90 : 10, h/h), su : metanol (80 : 20, h/h), su : metanol (90 : 10, h/h) karışımları ve pH 4.3 fosfat tamponu kullanılmıştır (Şekil 4.14 - 4.18). Bütün karışımlar seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında, berrak bir standart çözelti elde edilmiştir. Su : asetonitril (80 : 20, h/h) karışımı seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında gadoterik asit pikinin yarıldığı görülmüştür (Şekil 4.14). Su : metanol (90 : 10, h/h) ve su : metanol (80 : 20, h/h) karışımları seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında ise elde edilen kromatogramlarda DOTA pikinin yanında girişim yapan bir pik tespit edilmiştir (Şekil 4.16-4.17). Su : asetonitril (90 : 10, h/h) karışımı ve pH 4.3 fosfat tamponu seyreltme çözeltisi olarak kullanıldığında ise elde edilen kromatogramlarda pik şekillerinin düzgün olduğu (Şekil 4.15 ve

Şekil 4.18) ve herhangi bir girişim olmadığı görülmüştür. Ancak hareketli fazda da pH 4.3 fosfat tamponu kullanıldığı için hem hazırlama zamanı açısından hem de maliyet açısından pH 4.3 fosfat tamponu seyreltme çözeltisi olarak seçilmiştir (Şekil 4.18).

Çalışmanın bundan sonraki aşamasında filtre etkisi incelenmiştir. Filtre seçimi için 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreler, 0.45 µm hidrofilik selüloz filtreler ve 0.45 µm naylon filtreler kullanılmıştır. % 100.0'lük derişimde hazırlanan standart çözeltiler süzülmeden ve bu filtrelerden süzülerek vialer alınmıştır. Süzülmeden ve bu filtrelerden süzülerek sisteme verilen standart çözelti kromatogramlarından elde edilen pik alanları karşılaştırılmıştır. Alan değerleri kıyaslanarak alanlar arasındaki yüzde % uyum hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Elde edilen sonuçlara göre; 0.45 µm hidrofilik PTFE filtreden, 0.45 µm hidrofilik selüloz filtreden ve 0.45 µm naylon filtreler süzülerek ve süzülmeden sisteme verilen çözeltilerden elde edilen alanların uygun olduğu ve gadoterik asitin, DOTA'nın ve DO3A'nın PTFE, selüloz ve naylon filtreye tutunmadığı görülmüştür. Maliyet ve kolay bulunabilirlik açısından çalışmalarda 0.45 µm hidrofilik PTFE filtrenin kullanılmasına karar verilmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminde; Phenomenex Luna Fenil-Hekzil (250 x 4.6 mm, 3 µm) kolonda, pH = 4.3, 40.0 mM fosfat tamponu hareketli faz A, pH = 4.3, 40.0 mM fosfat tamponu : asetonitril (90 : 10, h/h) hareketli faz B hareketli fazları kullanılarak gradiyent program (Tablo 3.5) uygulanarak 0.4 mL/dak akış hızında ve 200 nm'de gerçekleştirilmiştir.

5.2. Kromatografik Yöntemin Validasyonu

Bu tez çalışmasında, DOTA, DO3A safsızlıkları ve stres testleri sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin varlığında; gadoterik asit etkin maddesinin miktar tayini için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Uygun çalışma koşulları belirlendikten sonra geliştirilen bu kromatografik yöntemin; seçicilik, tekrarlanabilirlik, doğrusalılık ve aralık, doğruluk, kesinlik ve ara kesinlik (tutarlılık), duyarlılık (LOD ve LOQ), sağlamlık, kararlılık ve sistem uygunluğu incelenerek validasyonu tamamlanmıştır.

Geliştirilen HPLC yönteminin SUT parametrelerinin değerlendirilmesi için % 100.0'lük derişimde hazırlanan standart çözeltilerinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen sistem uygunluğu kriterlerinden olan alan değerleri, alıkonma zamanları, N ve T değerleri incelenmiştir (Tablo 4.2 - 4.5). Elde edilen sonuçlar SUT kabul kriterleri içinde olduğundan (enjeksiyon tekrarlanabilirliği % BSS \leq 2.0, N \geq 2000 ve T \leq 2) geliştirilen yöntemin bu etkin madde ve safsızlıklarının analizi için uygun olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemin seçiciliğini kanıtlamak için optimum koşullarda hareketli faz, gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebosu, meglumin plasebosu ve gadoterat meglumin standart çözeltisine ait kromatogramlar alınmış ve herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.19 - 4.22).

Optimize edilen yöntem ile DO3A, DOTA ve oluşabilecek bozunma ürünlerinin varlığında stres çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu stres çalışmalarında (asidik, bazik, oksidasyon, ısı ve ışık koşullarında) bitmiş ürüne, meglumin plasebosuna ve gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözelti plasebosuna stres testleri uygulanıp plasebolardan gelen herhangi bir girişim olmadığı ve yöntemin seçici olduğu görülmüştür (Şekil 4.24, 4.25, 4.27, 4.28, 4.30, 4.31, 4.33, 4.34, 4.36, 4.37, 4.39 ve 4.40).

Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisine 1.0 mL 0.5 N hidroklorik asit çözeltisi eklenerek ve 70 °C'de 3 gün bekletilerek yapılan asit bozundurması sonucunda; bağıl alıkonma zamanı (RRT) 0.26, RRT 0.28, RRT 0.29, RRT 0.31, RRT 0.32, RRT 0.34, RRT 0.39, RRT 0.43, RRT 0.51, RRT 0.56, RRT 0.67, RRT 0.82, RRT 0.86, RRT 0.87, RRT 0.89, RRT 0.93, RRT 0.94, RRT 0.97 ve RRT 0.99'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Bu bozundurma sonucunda % 13.6 bozunma sağlanmıştır (Şekil 4.23).

Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisine 1.0 mL 2.0 N NaOH çözeltisi eklenerek ve 70 °C'de 3 gün bekletilerek yapılan baz bozundurması sonucunda; RRT 0.28, RRT 0.29, RRT 0.37, RRT 0.39, RRT 0.40, RRT 0.44, RRT 0.46, RRT 0.51, RRT 0.54, RRT 0.56, RRT 0.62, RRT 0.68, RRT

0.73, RRT 0.79, RRT 0.83, RRT 0.86, RRT 0.88, RRT 0.89 ve RRT 0.94'da bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Bu bozundurma sonucunda % 6.4 bozunma sağlanmıştır (Şekil 4.26).

Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisine 1.0 mL % 10'luk peroksit çözeltisi eklenerek ve 70 °C'de 3 gün bekletilerek yapılan oksidasyon bozundurması sonucunda; RRT 0.32, RRT 0.35, RRT 0.39, RRT 0.46, RRT 0.48, RRT 0.50, RRT 0.55, RRT 0.58, RRT 0.63, RRT 0.65, RRT 0.71, RRT 0.73, RRT 0.77, RRT 0.82, RRT 0.83, RRT 0.89, RRT 0.94, RRT 0.95, RRT 0.95, RRT 0.97, RRT 0.97, RRT 0.98, RRT 1.06, RRT 1.22, RRT 1.23 ve RRT 1.31'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Bu bozundurma sonucunda % 10.4 bozunma sağlanmıştır (Şekil 4.29).

Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisine 105 °C etüvde 3 gün bekletilerek yapılan ısı bozundurması sonucunda; RRT 0.26, RRT 0.29, RRT 0.29, RRT 0.30, RRT 0.35, RRT 0.37, RRT 0.39, RRT 0.40, RRT 0.43, RRT 0.44, RRT 0.48, RRT 0.51, RRT 0.54, RRT 0.57, RRT 0.59, RRT 0.62, RRT 0.64, RRT 0.67, RRT 0.81, RRT 0.83, RRT 0.87, RRT 0.89, RRT 0.93, RRT 0.94, RRT 0.97, RRT 1.06, RRT 1.29 ve RRT 1.42'de bulunan safsızlıklarda artış olduğu görülmüştür. Bu bozundurma sonucunda % 13.4 bozunma sağlanmıştır (Şekil 4.32).

Fotostabilite çalışmaları için, belirlenen sıcaklıkta, cihazın gün ışığı lambasının ve UV lambasının şiddetleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlere göre ürünün ICH Q1B kılavuzunda belirtilen gün ışığı için 1.2 milyon lux saat, UV ışığı için 200 Watt saat/m²'ye maruz kalma süresi hesaplanmıştır. Hesaplanan süreler doğrultusunda ürünler belirlenen sıcaklıkta ve sürede fotostabilite kabiniinde ışığa maruz bırakılmıştır. Gadoterat meglumin enjeksiyonluk çözeltisi görünür ışıktaki 7 gün bekletilerek yapılan ve UV ışıktaki 17 saat bekletilerek bozundurması sonucunda safsızlıklarda artış görülmemiştir (Şekil 4.35 ve 4.38).

Sistem tekrarlanabilirliği parametresinde, % 100.0'lük derişimde gadoterik asit, DOTA ve DO3A standart çözeltilerinin ardışık 12 enjeksiyonundan elde edilen alan değerleri ve alıkonma zamanları incelenmiştir (Tablo 4.4 ve 4.5). Gadoterik asit, DOTA ve DO3A'ya ait pik alanları için % BSS değerleri sırasıyla % 0.08, % 0.37 ve % 0.88 ve alıkonma zamanları için ise % BSS değerleri sırasıyla % 0.11, % 0.18 ve % 0.11 olarak bulunmuştur. % BSS değerleri % 2.0'nin

altında bulunmuş olup bu tez çalışmasında kullanılan HPLC sisteminin tekrarlanabilir olduğu görülmüştür.

% 0.05 - 130.0 (6.04 - 15703.33 µg/mL) derişim aralığında hazırlanan gadoterik asit, % 0.05 - 1.0 (DOTA için 5.27 - 105.46 µg/mL, DO3A için 5.27 - 105.37 µg/mL) derişim aralığında hazırlanan DOTA ve DO3A standart çözeltilerinin analizleri sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri, geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (Şekil 4.41 - 4.43). Gadoterik asit ve DOTA için korelasyon katsayısı değeri 1.0000 ve DO3A için ise 0.9999 bulunmuştur. ANOVA analizleri yapılarak kalibrasyon eğrilerinin eğiminin olasılık değerlerinin sıfırdan farklı ($p < 0.05$), kesişimin olasılık değerlerinin sıfıra eşit (anlamsız) ($p > 0.05$) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6). Buna ek olarak, olması gereken derişimlere karşı kalibrasyon grafiğinden elde edilen hesaplanan derişim verilerinin grafiğe geçirilmesi ile gadoterat meglumin'in analize yönelik geliştirilen yöntemin doğrusallığı kontrol edilmiştir. Elde edilen doğruların eğimlerinin yaklaşık 1 olması ile geliştirilen HPLC yönteminin doğrusal olduğunu gösterilmiştir (Şekil 4.44 - 4.46).

Geliştirilen HPLC yöntemi ile gadoterik asitin kesinlik ve doğruluk çalışmaları için doğrusallık aralığından seçilen 3 farklı derişimde (% 70.0, % 100.0 ve % 130.0), DOTA ve DO3A'nın kesinlik ve doğruluk çalışmaları için doğrusallık aralığından seçilen 3 farklı derişimde (% 0.05, % 0.15 ve % 0.5) 6 farklı çözelti hazırlanarak aynı günde ve 6 farklı günde analizler yapılmıştır. Aynı günde (gün içi) ve farklı günlerde (günler arası) yapılan doğruluk çalışmaları için % BH ve kesinlik için % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.7 - 4.12). Geliştirilen HPLC yönteminin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen ortalama % BSS ve % BH değerlerinin % 2'nin altında olması gadoterik asitin safsızlıklarının (DOTA ve DO3A) ve bozunma ürünlerinin varlığında; geliştirilen HPLC yönteminin doğru ve kesin olduğunu göstermektedir.

Geri kazanım çalışmaları ise gadoterik asitin 3 farklı derişimde (% 70.0, % 100.0 ve % 130.0) standart çözeltilerinden plaseboya eklenmiş ve geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır. Gadoterik asit için % geri kazanım değerleri % 98.68 - 99.59 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.13). Geri kazanım çalışmaları DOTA ve DO3A için ise 3 farklı derişimde (% 0.05, % 0.15 ve % 0.5)

standart çözeltisinden plaseboya eklenmiş ve geri kazanım sonuçları hesaplanmıştır (Tablo 4.14 ve 4.15). DOTA için % geri kazanım değerleri % 98.02 - 99.00 ve DO3A için % 99.56 - 100.45 aralığında bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin doğruluğu geri kazanım sonuçları doğrultusunda kanıtlanmıştır.

Doğruluk parametresinin değerlendirilmesi için standart ekleme yöntemi ile de çalışmalar yapılmıştır. Bu doğrultuda, numune çözeltisi üzerine 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 70.0, 100.0 ve 130 derişim seviyelerinde gadoterik asit standart çözeltileri ve 0.05, 0.1, 0.15, 0.30, 0.5 ve 1.0 derişim seviyelerinde DOTA ve DO3A standart çözeltileri eklenmiştir ve kalibrasyon doğruları çizilerek regresyon denklemleri hesaplanmıştır (Tablo 4.16). Regresyon denklemlerinin eğimleri ile kalibrasyon eğrilerinin denklemlerinin eğimlerinin birbirine yakın değerler olması geliştirilen yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır. Ayrıca eğim değerlerinin yakın olması plasebodan kaynaklanan bir girişim olmadığını göstermektedir.

Ara kesinlik (tutarlılık) parametresinde; % 100.0'lük derişimde farklı analizci tarafından hazırlanan 6 farklı gadoterik asit, DOTA ve DO3A standart çözeltileri; farklı günde, farklı cihaz ve farklı kolon kullanarak analiz edilmiş olup iki analizci tarafından yapılan analizlerin farkının anlamlılığı, t- testi ve F-testi ile gösterilmiştir (Tablo 4.17 - 4.19). Gadoterik asit, DOTA ve DO3A için tablo t ve F değerleri, hesaplanan t ve F değerleri büyük olduğundan; ara kesinlik çalışması sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve geliştirilen kromatografik yöntemin kesin ve tutarlı olduğu belirlenmiştir.

Yöntemin duyarlılığını göstermek için gadoterik asit, DOTA ve DO3A için LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.20 ve Tablo 4.21). LOD değeri için S/G oranının yaklaşık olarak 2-3, LOQ değeri için S/G oranının yaklaşık olarak 10 olduğu değerler alınmıştır. Gadoterik asit için LOD değeri % 0.01 (1.10 µg/mL) ve LOQ değeri % 0.03 (3.34 µg/mL) olarak bulunmuştur. Gadoterik asit için LOD ve LOQ değerlerine ait S/G oranları sırasıyla 2.65 ve 11.04'dür. DOTA için LOD değeri % 0.005 (0.55 µg/mL) ve LOQ değeri % 0.015 (1.67 µg/mL) olarak bulunmuştur. DOTA için LOD ve LOQ değerlerine ait S/G oranları sırasıyla 2.85 ve 11.85'dir. DO3A için LOD değeri % 0.003 (0.37 µg/mL) ve LOQ değeri % 0.010 (1.11 µg/mL) olarak bulunmuştur. DO3A için LOD

ve LOQ değerlerine ait S/G oranları sırasıyla 2.68 ve 12.88'dir. Bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen yöntemin duyarlı olduğuna karar verilmiştir.

Sağlamlık parametresinde, gadoterik asit etkin maddesinin, DOTA ve DO3A safsızlıklarının % 100.0'lük derişimde standart çözeltiler hazırlanmış olup çalışılan akış hızında, dalga boyunda, kolon fırın sıcaklığında, hareketli faz organik çözücü oranında ve hareketli faz pH'sında değişiklikler yapılmıştır. Her koşul için gadoterik asit etkin maddesinin, DOTA ve DO3A safsızlıklarının % 100.0'lük derişimde standart çözeltilerinden 6 enjeksiyon yapılmıştır. Bu koşulların değişmesi sonucunda elde edilen piklerin alıkonma zamanları, alanları, N ve T değerleri değerlendirilmiş ve % BSS değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.22, 4.23 ve 4.24). Elde edilen sonuçlara ait % BSS değerlerine ve sistem uygunluk kriterlerine göre (enjeksiyon tekrarlanabilirliği % BSS \leq 1.0, N \geq 2000 ve T \leq 2) sistemin belirtilen değişikliklerden etkilendiği ve geliştirilen kromatografik yöntem için optimum koşullarda çalışılması gerektiği görülmüştür.

Kararlılık parametresinin değerlendirilmesinde; standart ve numune çözeltilerinin belli zaman noktalarında analizleri yapılmıştır. Bu doğrultuda, başlangıç noktasındaki ve farklı zaman noktalarındaki etkin madde ve safsızlıklarının alan değerleri karşılaştırılmış ve % BH değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.25 ve Tablo 4.26). Standart çözelti için gadoterik asit % BH değerleri sırasıyla % 98.26 - % 100.67, DOTA % BH değerleri sırasıyla % 95.58 - % 99.73 ve DO3A % BH değerleri sırasıyla % 96.59 - % 99.94 aralığında bulunmuştur. Numune çözeltisi için etkin madde için alan değerleri arasındaki % BH değerleri % 98.38 - 101.50 aralığında, safsızlıklar için alan değerleri arasındaki % BH değerleri DOTA için % 98.02 - 99.35 ve DO3A için % 98.44 - 99.65 aralığında bulunmuştur ve standart çözelti ve numune çözeltisinin 4 °C'de en az 89 saat stabil olduğu belirlenmiştir. Oda koşullarında DOTA ve DO3A standartları stabil olmadığı için HPLC'de kullanılan numune sıcaklığı olarak 4 °C seçilmiştir.

5.3. Kromatografik Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve valide edilen kromatografik yöntem, Türkiye'de tek muadil olan ticari Dotarem® enjeksiyonluk çözelti ürününe uygulanmıştır. % 100.0'lük derişimde 6 farklı numune

özeltisi hazırlanmış ve analiz edilmiştir (Şekil 4.47). Gadoterik asit, DOTA ve DO3A miktarları hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar ticari preparatlarda verilen limitlere göre uygun bulunmuştur (Tablo 4.27).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MRG, büyük mıknatıslarla oluşturulan güçlü manyetik alan içinde radyo dalgaları kullanılarak dokuları, organları ve iskelet sistemini görüntülemeye kullanılan bir tıbbi tekniktir. Beyin, omurilik, sinirler, eklemler, meme, kalp ve damarlar, karın içi organların incelenmesinde kullanılır. Özellikle yumuşak dokuların incelenmesi için en uygun tanı yöntemidir.

Vücudumuz primer olarak yağ ve sudan oluşmakta ve bu oluşumların moleküler yapısında ağırlıklı olarak hidrojen atomları yer almaktadır. MRG; su ve yağın, dolayısı ile de vücudumuzun büyük bir bölümünde bulunan hidrojen atomlarının, güçlü bir manyetik alanda, kendilerini rezonansa uğratacak bir radyo frekans dalgası ile uyarılıp titreştirilmesinden sonra elde olunan sinyallerin görüntüye dönüştürüldüğü doku kontrast ayırcılığı en yüksek ileri radyolojik görüntüleme tekniğidir (100-102).

Kontrastlı MRG, klinik ve prelinik araştırmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır ve dünya çapında 200 milyondan fazla Gd bazlı kontrast madde dozunun uygulandığı tahmin edilmektedir (10).

Gadoterat meglumin, kan beyin bariyerinin bozulduğu alanları tespit etmek ve görselleştirmek için yetişkin ve pediatrik hastalarda (yeni doğanlar dahil) beyinde, omurgada ve ilgili dokularda MRG'de intravenöz kullanılan Gd bazlı kontrast maddedir.

Yapılan kaynak araştırması sonucunda safsızlıklarının ve bozunma ürünlerinin varlığında, gadoterat meglumin'in analizlerinin yapıldığına dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez kapsamında, gadoterat meglumin'in, DOTA ve DO3A safsızlıklarının ve bozunma ürünlerinin varlığında analizleri için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Geliştirilen HPLC yönteminde bozunma ürünleri varlığında; gadoterik asitin miktar tayini için en iyi koşullar; Phenomenex Fenil hekzil (250 x 4.6 mm, 3 µm) kolonda, pH: 4.3 fosfat tamponu (hareketli faz A) ve pH: 4.3 fosfat tamponu : asetonyril (90 : 10, h/h) (hareketli faz

B)'den oluşan hareketli faz ile 0.4 mL/dak akış hızında, 35°C kolon sıcaklığı ve 200 nm dalga boyunda elde edilmiştir.

Daha sonraki aşamada geliştirilen analitik yöntem valide edilmiştir. Yöntemin; seçicilik, doğrusallık ve aralık, doğruluk, kesinlik ve ara kesinlik (tutarlılık), duyarlılık, sağlamlık ve kararlılık parametreleri ile sistem uygunluğu incelenerek validasyonu tamamlanmıştır. Validasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar kılavuzlarda verilen kabul kriterlerine uygun olarak bulunmuş ve önerilen bu kromatografik yöntemin rutin analizlerde de kullanılabileceği gösterilmiştir. Valide edilen analitik yöntem, gadoterat meglumin içeren ticari farmasötik preparatlara da uygulanmıştır.

Bunlara ek olarak seçicilik parametresi kapsamında, geliştirilen HPLC yöntemi farklı stres koşullarına maruz bırakılan numune ve plasebo çözeltilerine de uygulanmıştır. Asit, baz, oksidasyon, ısı ve stres koşullarında gadoterat meglumin'in bozunduğu belirlenmiş ve bozunma ürünlerinin miktarları saptanmıştır. Fakat ışık streslerine maruz bırakılan numune çözeltisine ait kromatogramlarda farklı bir pike rastlanmamıştır. Sonuç olarak UV ve görünür ışığa maruz bırakılan numunelerde bozunma safsızlığı ortaya çıkmamıştır.

Gadoterat meglumin'in ilgili safsızlık ve bozunma ürünlerinin varlığında analizleri için geliştirilen ve valide edilen HPLC yönteminin seçici, doğru ve kesin olması ve diğer validasyon parametrelerinin de kılavuzlarda belirtilen kabul kriterlerine uygun olması nedeniyle bu kromatografik yöntemin kalite kontrol ve araştırma-geliştirme laboratuvarlarında ve ayrıca stabilite çalışmalarında kullanılabileceği önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- (1) Kısa Ürün Bilgisi. [Internet]. [Erişim Tarihi: 05.03.2023]. Erişim Adresi: https://titck.gov.tr/storage/Archive/2019/kubKtAttachments/TITCK-UYGUN-KÜB-%20DOTAREM.pdf_3bbc52c4-92d6-4667-9673-5f2824c5d2e9.pdf.
- (2) Harmonised Tripartite Guideline (ICH), Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), International Conference on Harmonisation. 2003.
- (3) Harmonised Tripartite Guideline (ICH), Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B, International Conference on Harmonisation. 1996.
- (4) International Council on Harmonisation (ICH). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
- (5) National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Science Education -Science Topics-Magnetic Resonance Imaging (MRI). [Internet]. [Erişim Tarihi: 29.03.2023]. Erişim Adresi: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/magnetic-resonance-imaging-mri>
- (6) Weinmann H.J, Brasch R.C., Press W.R., Wesbey G.E. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. American Journal of Roentgenology. 1984; 142(3): 619-24.
- (7) Fur M.L., Caravan P. The biological fate of gadolinium-based MRI contrast agents: A call to action for bioinorganic chemists. Metallomics. 2019; 11: 240-54.
- (8) Aime S., Caravan P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2009; 30 (6): 1259-67.
- (9) Blumfield E., Swenson D.W., Iyer R.S., Stanescu A.L. Gadolinium-based contrast agents- review of recent literature on magnetic resonance imaging signal intensity changes and tissue deposits, with emphasis on pediatric patients. Pediatric Radiology. 2019; 49 (4): 448-50.
- (10) Garcia J, Liu S.Z, Louie A.Y. Biological effects of MRI contrast agents: Gadolinium retention, potential mechanisms and a role for phosphorus. Physical and Engineering Sciences. 2017; 375: 20170180.
- (11) De Haen C. Conception of the first magnetic resonance imaging contrast agents: A brief history. Topics in Magnetic Resonance Imaging. 2001; 12(4): 221-30.
- (12) Blomqvist L., Nordberg G.F., Nurchi V.M., Aaseth J.O. Gadolinium in medical imaging- usefulness, Toxic Reactions and Possible Countermeasures. Biomolecules. 2022; 12(6): 742-53.
- (13) Drugbank. Gadoteric acid. [Internet]. [Erişim Tarihi: 30.03.2023]. Erişim Adresi: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09132>.
- (14) Inside Radiology. Gadolinium Contrast Medium (MRI Contrast agents) [Internet]. [Erişim Tarihi: 29.03.2023]. Erişim Adresi: <https://www.insideradiology.com.au/gadolinium-contrast-medium/>.

- (15) Rogosnitzky M., Branch S., Gadolinium-based contrast agent toxicity: A review of known and proposed mechanisms. *Biometals*. 2016; 29(3): 365-76.
- (16) Guo B.J., Yang Z.L., Zhang L.J. Gadolinium deposition in brain: Current scientific evidence and future perspectives. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 1-12.
- (17) Kei P.L., Chan L.P. Gadolinium chelate-associated nephrogenic systemic fibrosis. *Singapore Med. J.* 2008; 49(3): 181-5.
- (18) Behra-Miellet J., Briand G., Kouach M., Gressier B., Cazin M., Cazin J. On-Line HPLC-electrospray ionization mass spectrometry: A pharmacological tool for identifying and studying the stability of Gd^{3+} complexes used as magnetic resonance imaging contrast agents. *Biomed. Chromatogr.* 1998; 12: 21-6.
- (19) Moutiez E., Prognon P., Bourrinet P., Zehaf S., Dencausse A., Mahuzier G. Time-resolved luminescence as a novel detection mode for the simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of gadolinium-DOTA and Gd^{3+} . *Analyst*. 1997; 122: 1347-52.
- (20) Micard S., Rieutord A., Prognon P., Hassan M., Brion F. Stability and sterility of meglumine gadoterate injection repackaged in plastic syringes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001; 212: 93-9.
- (21) Künnemeyer J., Terborg L., Nowak S., Scheffer A., Telgmann L., Tokmak F., Günsel A., Wiesmüller G.A., Reichelt S., Karst U. Speciation analysis of gadolinium-based MRI contrast agents in blood plasma by hydrophilic interaction chromatography/electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2008; 80: 8163-70.
- (22) Künnemeyer J., Terborg L., Nowak S., Brauckmann C., Telgmann L., Albert A., Tokmak F., Kramer B.K., Günsel A., Wiesmüller G.A., Karst U. Quantification and excretion kinetics of a magnetic resonance imaging contrast agent by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2009; 30: 1766-73.
- (23) Künnemeyer J., Terborg L., Meermann B., Brauckmann C., Möller J., Scheffer A., Karst U. Speciation analysis of gadolinium chelates in hospital effluents and wastewater treatment plant sewage by a novel HILIC/ICP-MS method. *Environ. Sci. Technol.* 2009; 43 (8): 2884-90.
- (24) Kahakachchi Chethaka L., Moore D.A. Speciation of gadolinium in gadolinium-based magnetic resonance imaging agents by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2009; 24: 1389-96.
- (25) Raju C.S.K., Cossmer A., Scharf H., Panne U., Lück D. Speciation of gadolinium-based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010; 25: 55-61.
- (26) Telgmann L., Faber H., Jahna S., Melles D., Simon H., Sperling M., Karst U. Identification and quantification of potential metabolites of Gd-based contrast agents by electrochemistry/separations/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2012; 1240: 147-55.

- (27) Telgmann L., Wehe C.A., Birka M., Künnemeyer J., Nowak S., Sperling M., Karst U. Speciation and isotope dilution analysis of gadolinium-based contrast agents in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46: 11929-36.
- (28) Telgmann L., Wehe C.A., Künnemeyer J., Bülter A., Sperling M., Karst U. Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404: 2133-41.
- (29) Lindner U., Lingott J., Richter S., Jakubowski N., Panne U. Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405: 1865-73.
- (30) Birka M., Wehe C.A., Telgmann L., Sperling M., Karst U. Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2013; 1308: 125-31.
- (31) Lindner U., Lingott J., Richter S., Jiang W., Jakubowski N., Panne U. Analysis of Gadolinium-based contrast agents in tap water with a new hydrophilic interaction chromatography (ZIC-chILIC) hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407: 2415-22.
- (32) Birka M., Wehe C.A., Hachmöller O., Sperling M., Karst U. Tracing gadolinium-based contrast agents from surface water to drinking water by means of speciation analysis. *J. Chromatogr. A.* 2016; 1440: 105-11.
- (33) Frenzel T., Apte C., Jost G., Schöckel L., Lohrke J., Pietsch H. Quantification and Assessment of the chemical form of residual gadolinium in the brain after repeated administration of gadolinium-based contrast agents comparative study in rats. *Investigative Radiology.* 2017; 52(7): 396-404.
- (34) Okabayashi S., Kawane L., Yusentri Mrabawani N.Y., Iwai T., Narukawa T., Tsuboi M., Chiba K. Speciation analysis of Gadolinium-based contrast agents using aqueous eluent-hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta.* 2021; 222: 121531-8.
- (35) Horstmann M., Vega R.G., Bishop D.P., Karst U., Doble P.A., Clases D. Determination of gadolinium MRI contrast agents in fresh and oceanic waters of Australia employing micro-solid phase extraction, HILIC-ICP-MS and bandpass mass filtering. *J. Anal. At. Spectrom.* 2021; 36: 767-75.
- (36) Schlatt L., Köhrer A., Factor C., Robert P., Rasschaert M., Sperling M., Karst U. Mild dissolution/recomplexation strategy for speciation analysis of gadolinium from MR contrast agents in bone tissues by means of HPLC-ICP-MS. *Anal. Chem.* 2021; 93: 11398-405.
- (37) Yao X., Zhang H., Shi D., Li Y., Guo Q., Yu Z., Wang S., Ren K. Gadolinium retention in the brain of mother and pup mouse: effect of pregnancy and repeated administration of gadolinium-based contrast agents. *J. Mag. Reson. Imaging.* 2022; 56(3): 835-45.
- (38) Gutierrez G.I.L., Davila O.O., Aguilar C.L., Jimenez M.M.D., Gonzalez R.S., Sires I., Brillas E., Fabregat-Safont D., Navarro A.F.R., Arandes J.B., Llopis J.V.S. Electrochemical oxidation of

meglumine in a pharmaceutical formulation using a nanocomposite anode. *Electrochimica Acta*. 2023; 437: 141457-67.

(39) Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1968; 61: 636-43.

(40) Porath J. From gel filtration to adsorptive size exclusion. *J. Protein Chem.* 1997, 16: 463-8.

(41) Harris DC. *Exploring Chemical Analysis*. 3rd Edition, WH. Freeman&Co 2004.

(42) Gerberding SJ, Byers CH. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *J. Chromatogr A*. 1998; 808: 141-51.

(43) Donald PL, Lampman GM, Kritz GS, Engel RG. *Introduction to Organic Laboratory Techniques*. 4th Edition. Thomson Brooks/Cole 2006; 797-817.

(44) Mikhail Tswett-Inventor of chromatography method) [Internet]. [Erişim Tarihi: 04.04.2023]. Erişim Adresi: <https://www.worldofchemicals.com/213/chemistry-articles/mikhail-tswett-inventor-of-chromatography-method.html>.

(45) High P, Thomas EC. High-performance liquid chromatography. Purification Characterization of Secondary Metabolites. 2020; 49-58.

(46) Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, T. A., *Enstrümental Analiz İlkeleri*, 5. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara. 1998.

(47) David S. Hage, Chapter 1 - Chromatography, Editor(s): Nader Rifai, Andrea Rita Horvath, Carl T. Wittwer. *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, Elsevier, 2018, 1-32.

(48) David S. Hage. Chapter 8 - Chromatography and electrophoresis, Editor(s): William Clarke, Mark A. Marzinke. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. 4th Edition, Academic Press, 2019, 135-57.

(49) Smith. R.M. (1988). *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*, UK.

(50) Bidlingmeyer, B.A. (1992). *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, USA.

(51) Y. Sun, Q.-H. Shi, L. Zhang, G.-F. Zhao, F.-F. Liu. *Adsorption and Chromatography*, Editor(s): Murray Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology*, 2011, 3rd Edition, Pergamon, 011, 739-53.

(52) J. Stahlberg. *Chromatography: Liquid | Ion Pair Liquid Chromatography*. Editor(s): Ian D. Wilson. *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press. 2000; 676-84.

(53) HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram [Internet]. [Erişim Tarihi: 15.03.2023]. Erişim Adresi: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

(54) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Nedir? [Internet]. [Erişim Tarihi: 18.03.2023]. Erişim Adresi: <https://labakademi.com.tr/yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc-nedir>.

- (55) HPLC Sistemine Genel Bakış-Solvent Rezervuarı [Internet]. [Erişim Tarihi: 20.03.2023]. Erişim Adresi: <https://labakademi.com/hplc-sistemi-solvent-rezervuari/>.
- (56) European Pharmacopeia (EP) 10.0, Chromatographic Separation Techniques (2.2.46), EDQM, Strasbourg, France.
- (57) Frank Steiner, Carsten Paul, Michael W. Dong. HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. LCGC North America. 2019; 37(8): 514-29.
- (58) United States Pharmacopeia (USP) 35, Chromatography (621), Rockville, MD.
- (59) Rowe, R.C., Sheskey, P.J and Quinn, M.E. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 441-5.
- (60) Guideline ICH: Impurities in new drug substances Q3A(R2). Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 2006.
- (61) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidance on Impurities in New Drug Products. Q3B(R). Federal Register. (2000). 65 (139).
- (62) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidelines for Residual Solvents. Q3C. Federal Register. 1997; 62 (247), 67377.
- (63) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidance on Impurities in New Drug Substances. Q3A(R). Federal Register. 2000; 65 (140).
- (64) Alsante, K.M., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R. Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates. American Pharmaceutical Review. 2001; 4 (1): 70-8.
- (65) Nageswara, R.R., Narasa, R.A., Narsimha, R. Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study. J. Pharm. Biomed. Analysis. 2008, 46 (3): 505-19.
- (66) Gadamasetti, K., Braish, T. (2008). Process Chemistry in Pharmaceutical Industry. USA: Taylor & Francis Group.
- (67) Basak, A.K., Rawa, A.S., Al Hakim, A.H., Furnessa, S., Samaana, N.I., Gilla, D.S., Patel, H.B., Powersa, R.F., Yua, L. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for abbreviated new drug applications. Advanced Drug Delivery Reviews. 2007; 59 (1): 64-72.
- (68) Ahuja, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. Advanced Drug Delivery Reviews. 2007; 59 (1): 3-11.
- (69) Görög, S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. Trends in Analytical Chemistry. 2006; 25 (8): 755-7.
- (70) Roy, J. Pharmaceutical Impurities-A Mini-Review. AAPS Pharmaceutical Science Technology. 2002; 3 (2): 1-8.
- (71) McGoverna, T., Jacobson-Kram, D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. Trends in Analytical Chemistry. 2006; 25(8): 790-95.

- (72) Jacobson-Kram, D., McGovern, T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59 (1): 38-42.
- (73) The British Pharmacopoeia Commission. (2001). *British Pharmacopoeia*. Vol 1, 123-128.UK; The Stationary Office.
- (74) Connor, K.A., Amidon, G.L., Stella, V.J. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals-A Handbook for Pharmacists*. New York: John Wiley & Sons.
- (75) *European Pharmacopoeia (EP) 10.0, Residual Solvents (5.4)*, EDQM, Strasbourg, France.
- (76) Yazawa, I., Katsuyama, N., Katsuyama, A. Properties of high resolution ODS columns. *Chromatography*. 2001; 21: 396-97.
- (77) Sunderland, J., Tobin, C.M., White, L.O., MacGowan, A.P., Hedges, A.J. Ofloxacin photodegradation products possess antimicrobial activity. *Drugs*. 1996; 58 (2): 171-2.
- (78) Condorelli, G., De Guidi, G., Giulfrido, S., Sortino, S., Chilleni, R., Sciuto, S. Molecular mechanisms of photosensitization induced by drugs XII. Photochemistry and photosensitization of rifloxacin: An unusual photodegradation path for the antibacterials containing a fluoroquinolone-like chromophore. *Photochemistry and Photobiology*. 1999; 70 (3): 280-6.
- (79) Alsante, K.M., Friedmann, R.C., Hatajik, T.D., Lohr, L.L., Sharp, T.R., Snyder, K.D., Szczesny, E.J. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. *Separation Science and Technology*. 2001; 3: 85- 172.
- (80) Ngwa, G. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. *Drug Delivery Technology*. 2010; 10(5): 56-9.
- (81) Green, J.M. A practical guide to analytical method validation, *Analytical Chemistry*. 1996; 68: 305A-9A.
- (82) Iram F, Iram H, Iqbal A, Husain A. Forced Degradation Studies. *J. Anal Pharm Res*. 2016; 3(6): 00073.
- (83) Patel D., Patel M., Ahir K., Singh S. A Review Article on Development of forced degradation and stability indicating studies for drug substance and drug product. *J Pharm Sci Bioscientific Res*. 2019; 9(2): 165-72.
- (84) Riddhiben MP, Piyushbhai MP, Natubhai MP. Stability indicating HPLC method development-A review. *Int Res J Pharm*. 2011; 2(5): 79-87.
- (85) Sowmyalakshmi V., Merugu M. Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products. *Journal of Drug Invention Today*. 2018; 10 (2): 137.
- (86) Annapurna MM, Mohapatro CM, Narendra A. Stability indicating liquid chromatographic method for the determination of Letrozolein pharmaceutical formulation. *Pharm Anal*. 2012; 2(4): 298-305.
- (87) Allwood M, Plane J. The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation. *Int J Pharm*. 1986; 31(1-2):1-7.

- (88) International Conferences on Harmonization (ICH), Guidelines for Validation of Analytical Procedures. Q2 (R1). Federal Register. (1995).
- (89) Bliesner D.M., Validating chromatographic methods: A practical guide. John Wiley & Sons., 2006.
- (90) Gumustas M., Kurbanoglu S., Uslu B., Ozkan S.A., UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters, *Chromatographia*. 2013; 76 (21-22): 1365-1427.
- (91) Watson D.G. *Pharmaceutical Analysis*, 2nd Edition, Elsevier, New York, 2005.
- (92) Hibbert D.B. Method validation of modern analytical techniques. *Accredit. Qual. Assur.* 1999; 4(8): 352-56.
- (93) Krull I.S., Swartz M. Analytical method development and validation for the academic researcher. *Anal Lett.*,1999; 32(6): 1067-80.
- (94) Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 24(5-6): 755-67.
- (95) Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 2003; 987(1- 2): 57-66.
- (96) Swartz M, Krull IS. *Handbook of analytical validation*. [electronic resource]: Boca Raton, Fla. CRC Press, 2012; 2012.
- (97) *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*, Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, MD, USA, 2015.
- (98) Research fDa, (CDER). *Food and Drug Administration Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods*. Rockville, MD.1994.
- (99) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. 2014.
- (100) Oyar O. *Radyolojide Temel Fizik Kavramlar*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 1998: 151-210.
- (101) Bushong SC. *Radiologic Science for Technologists. Physics, Biology, and Protection*. 3rd Edition, C.V. Mosby Company, St Luis, 1984: 387-412.
- (102) Yeşildağ A, Oyar O. *Manyetik rezonans görüntüleme fiziği*. Oyar O, Gülsoy UK ed. *Tıbbi Görüntüleme Fiziği*. Tisamat Basım, Ankara, 2003: 281-372.

8. EKLER

Ek 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Hata Değerinin Hesaplanması

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

Standart Hata Değerinin Hesaplanması

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

Bağıl Standart Sapma Değerinin Hesaplanması

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

Geri Kazanım (%) Hesaplaması

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

t - Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

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

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

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2. yöntemin standart sapması

\bar{x}_1 : 1. yöntemin ortalaması

\bar{x}_2 : 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

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

F - Testi

İki standart sapma arasında fark olup olmadığını test eder.

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

σ_1 = 1. yöntemin varyansı

σ_2 = 2. yöntemin varyansı

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

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

Ek 2. Orjinallik Raporu

GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞINDA YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZLERİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 15	% 14	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	brevets-patents.ic.gc.ca İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
7	slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
8	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1

hdl.handle.net

EK 3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Merve Gökşen
Ödev başlığı: GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞI...
Gönderi Başlığı: GADOTERAT MEGLUMİN'İN BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN VARLIĞI...
Dosya adı: Merve_G_k_en_Tez_Son_09.08.2023.pdf
Dosya boyutu: 3.68M
Sayfa sayısı: 120
Kelime sayısı: 23,401
Karakter sayısı: 138,848
Gönderim Tarihi: 10-Ağu-2023 01:02ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2143909456



9. ÖZGEÇMİŞ