ARİPİPRAZOL'ÜN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ VE BAZI BİYOLOJİK SIVILARDAKİ MİKTARININ YBSK YÖNTEMİYLE TAYİNİ

Yiğit LAFCI

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ARİPİPRAZOL'ÜN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ VE BAZI BİYOLOJİK SIVILARDAKİ MİKTARININ YBSK YÖNTEMİYLE TAYİNİ

Yiğit LAFCI

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Şubat 2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Göksel ARLİ

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimlerim sırasında her türlü sıkıntılarıma sabırla çözümler üreten, her zaman güleryüzle ve sevgiyle bana her konuda destek olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Göksel ARLİ'ye,

Araştırmalarım süresince hiçbir konuda benden desteğini esirgemeyen, karşılaştığım sorunlara özenle çözümler üreten, çalışmalarıma yön vermemi ve onları geliştirmeme büyük katkı sağlayan Sayın Hocam Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma ve laboratuvarda benimle beraber çalışmalarını sürdüren arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her alanda yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ARİPİPRAZOL'ÜN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ VE BAZI BİYOLOJİK SIVILARDAKİ MİKTARININ YBSK YÖNTEMİYLE TAYİNİ

ÖZET

Aripiprazol, yeni nesil atipik antipsikotik grubunun ilk üyesidir. Aripiprazol'ün şizofreni ve benzeri hastalıkların standart bakımında kullanımı oldukça yaygındır. Bu çalışmanın amacı, aripiprazolün analizi için yeni, basit ve duyarlı bir yöntem geliştirmek ve yöntemin farmasötik tabletlere uygulanmasını göstermektir. Aripiprazol ve diflunisal (iç standart), foto diyot dizisi dedeksiyonlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizlenmiştir. Analizlerde 2.7 µm büyüklüğünde partikül içeren 10 cm x 4.6 mm boyutlarındaki Supelco (Amerika) marka Fused-Core yapılı Ascentis® Express C_{18} ters faz kolonu kullanılmıştır. Analitler, MeOH:Tampon (%0.1 formik asit, %0.2 amonyum asetat) (60:40, h/h) mobil fazı kullanılarak, 255 nm dalga boyunda toplam 15 dakikada analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntem başarılı bir şekilde farmasötik tablet ve idrar örneklerine uygulanmıştır. Sonuç olarak yöntemin, aripiprazol rutin kalite kontrol analizlerine uygulanabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aripiprazol, YBSK, Fused-Core, tablet analizi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

DETERMINATION of ARIPIPRAZOLE in PHARMACEUTICAL PREPARATIONS and in SOME BIOLOGICAL FLUIDS with HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

ABSTRACT

Aripiprazole is the first member of new generation atypical antipsychotic group. The use of aripiprazole for standard care of schizophrenia and similar disorders are quite common. The purpose of this study is to develop a new, simple and sensitive method for the analysis of aripiprazole and to show its applicability to pharmaceutical tablets. Aripiprazole and diflunisal were analyzed by high performance liquid chromatography with photo diode array detector. A Supelco (USA) brand Fused-Core Ascentis ® Express C_{18} column, which has a size of 10 cm x 4.6 mm and contains 2.7 µm particle sized dimensions, was used for analyses. Analytes were analyzed using a mobile phase containing MeOH:Buffer (0.1% formic acid, 0.2% ammonium acetate) (60:40, v/v), at a wavelength of 255 nm for 15 minutes. The developed method was performed to pharmaceutical tablets successfully. As a result, its applicability to aripiprazole's routine quality control analyses was shown.

Key words: Aripiprazole, HPLC, Fused-Core, tablet analysis

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZGEÇMİŞ i

TEŞEKKÜR ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

İÇİNDEKİLER v

ÇİZELGELER DİZİNİ vii

ŞEKİLLER DİZİNİ viii

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ x

GİRİŞ ve AMAÇ 1

KAYNAK BİLGİSİ 3

Aripiprazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 9

Aripiprazol Analizi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar 9

GEREÇLER 15

Kullanılan Kimyasallar 15

Kullanılan Cihazlar 15

YÖNTEMLER 16

Hareketli Fazın Hazırlanışı 16

Standart Çözeltilerin Hazırlanışı 16

Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı 16

Analiz Parametreleri 16

Sonuçların Değerlendirilmesi 17

Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon) 17

Seçicilik 17

Doğruluk 17

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kesinlik 17

Saptama sınırı ve tayin alt sınırı 18

Doğrusallık 18

Sistem uygunluk testleri 18

BULGULAR ve TARTIŞMA 20

Aripiprazol'ün UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi 20

Aripiprazol'ün YBSK Yöntemi ile Analizi 23

Yöntem geliştirme 23

YBSK Yönteminin Validasyonu 49

Geliştirilen Yöntemin Numunelere Uygulanması 53

SONUÇ ve ÖNERİLER 55

KAYNAKLAR 56

EK 1 Supelco Ascentis® Express C_{18} (10 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) kolon analiz sertifikası 59

EK 2 Fortis C18 (5 µm, 100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası 60

EK 3 Aripiprazol standart maddesinin analiz sertifikası 61

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO VE ADI		SAYFA
Çizelge 1	USP Eşitlikleri	19
Çizelge 2	Sistem uygunluk testlerinin sonuçları	49
Çizelge 3	Doğruluk çalışmalarının sonuçları	50
Çizelge 4	Standart çözeltiler için kesinlik sonuçları	51
Çizelge 5	Standart çözeltiler için doğrusallık sonuçları	52
Çizelge 6	Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen tablet analizlerinin sonuçları	54

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI		SAYFA
Şekil 1	Şizofreniye katkıda bulunan faktörler	5
Şekil 2	ARP'nin molekül yapısı	9
Şekil 3	$1.01x10^{-3}$ M ARP spektrumu	20
Şekil 4	$1.01x10^{-4}$ M ARP spektrumu	21
Şekil 5	$1.01x10^{-5}$ M ARP spektrumu	21
Şekil 6	$1.01x10^{-6}$ M ARP spektrumu	22
Şekil 7	$1.01x10^{-7}$ M ARP spektrumu	22
Şekil 8	ARP'nin 10^{-5} (a) , 10^{-6} (b) ve 10^{-7} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	25
Şekil 9	DİF'in 10^{-3} (a) , 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	28
Şekil 10	ALB'nin 10^{-3} (a) , 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	31
Şekil 11	AML'nin 10^{-3} (a), 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	34
Şekil 12	DRO (a), ESS (b), KM (c) ve VER (d) çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	38
Şekil 13	ALB (a), ARP (b) ve DİF (c)'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (60:40, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları	41

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 14 DİF'in molekül yapısı 42

Şekil 15 ARP ve DİF'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (65:35, h/h) mobil fazında, 1 mL/dk (a) ve 0.8 mL/dk (b) akış hızlarında eş zamanlı analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları 43

Şekil 16 ARP ve DİF'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin, sırasıyla değişken bileşimli hareketli faz yöntemiyle, 1 mL/dk akış hızında eş zamanlı analizleri sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları 48

Şekil 17 Aripa® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram ARP (4.0144×10^{-6} M, 9.111 dk) ve DİF (1.0248×10^{-5} M) 53

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALB	: Albendazol
AML	: Amlodipin
ARP	: Aripiprazol
BSS	: Bağıl standart sapma
CN	: Siyano
DİF	: Diflunisal
DARP	: Dehidroaripiprazol
DRO	: Droperidol
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
ESS	: Essitalopram
FDA	: Gıda ve ilaç birliği
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IS	: İç standart
KM	: Klorfeniramin Maleat
LC	: Sıvı kromatografisi
LOD	: Saptama sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
LLOQ	: Tayin alt sınırı
LSD	: Liserjik asit dietil esteri
MeOH	: Metanol
MR	: Manyetik rezonans
MS	: Kütle spektrometrisi
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PDA	: Fotodiyod dizisi dedektör
PVDF	: Poliviniliden florür
PN	: Pik normalizasyonu
rpm	: Dakika başına dönüş sayısı
SEM	: Ortalamanın standart sapması
SS	: Standart sapma
UBSK	: Ultra-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV	: Mor ötesi
VER	: Verapamil
YBSK	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞ ve AMAÇ

Şizofreni, kişiyi alışılagelmiş algılama ve yorumlama biçimlerine yabancılaştıran, içinde yaşadığı toplumdan koparan ruhsal bir hastalıktır. İnsanı, gençlik çağından başlayarak üretim dışına itebilen, çevresiyle önemli uyumsuzluk ve çatışmalar yaşamasına neden olan bu hastalığın maliyeti oldukça yüksektir (Mete, 1998).

Şizofreni halen psikiyatrik hastalıkların en ağırı olarak kabul edilmektedir. Toplumda yaklaşık olarak %1 sıklıkla görülen, nörogelişimsel bozuklukla ilişkili önemli bir beyin hastalığıdır. Nörogelişimsel bozukluk beynin algı, bilişsel işlevler, düşünce ve duygulanım gibi neredeyse tüm fonksiyonlarında sorun yaratarak karmaşık bir tablo ortaya çıkarır. Bunun sonucu olarak şizofreni hastalarında halüsinasyonlar, bilişsel işlevlerde bozulma, katatonik semptomlar, düşünce bozuklukları ve delüzyonlar gibi beynin önemli işlevleri ile ilişkili birçok önemli belirti birlikte ortaya çıkar. Bu durum hastalığın rasyonel tedavisini güçleştiren en önemli etkenlerden biridir (Uzbay, 2007).

Aripiprazol (ARP) (OPC-14597) dopamin sistem dengeleyicileri olarak bilinen yeni bir atipik antipsikotik grubunun ilk üyesidir. Atipik antipsikotikler şizofreni ve benzeri hastalıkların standart bakımında kullanılırlar ve psikoz yönetiminde, klozapin hariç, birinci sıra tedavi seçeneği olarak düşünülebilirler. Klasik antipsikotiklerle karşılaştırıldığında ARP'nin kardiyovasküler reaksiyon insidansı çok düşüktür. ARP, QT aralığında uzamaya neden olmaz. Prolaktin mekanizması üzerinde bir etkisi gözlenmemiştir. ARP şizofreninin hem negatif hem de kognitif belirtilerini azaltır ve motor yan etkileri diğer antipsikotiklere kıyasla daha az sorun oluşturur (Üstünes, 2013).

ARP'nin tabletlerde ve biyolojik sıvılarda analizi; endüstriyel alanda kalite – kontrol açısından, klinik olarak ise hala bilinmeyen yönleri çok olan şizofreni hastalığının daha iyi anlaşılması ve daha etkin tedavi edilebilmesi açısından oldukça önemlidir. ARP'nin analitik olarak analizi için en çok tercih edilmiş yöntemlerden bir tanesi; alınan sonuçların güvenilirliği, uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti gibi avantajlarından dolayı günümüzde oldukça yaygın kullanımı olan, yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (YBSK).

Şizofreni hastalığının karmaşık yapısı ve şiddetli olması sebebiyle yapılmış olan çalışmalar genellikle ARP'nin terapötik olarak izlenmesiyle ilgilidir. Terapötik izlemeye dayalı çalışmalar her ne kadar önemli olsa da, ARP'nin tabletlerdeki analizi de tabletlerin standartları koruması ve bu tabletlerle yapılan tedavilerde olası olumsuzlukların engellenmesi açısından oldukça önemlidir.

ARP'nin analiziyle ilgili geçmişte yapılmış çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmaların büyük bir kısmının oldukça maliyetli olan kütle spektrometrisi (MS) kullanılarak yapılmış olduğu görülmektedir. MS birçok avantaja sahip olsa da maliyeti oldukça yüksektir. Yapılmış olan ya da yapılması planlanan bir analizin etkinliği en önemli unsur olsa da düşük maliyetli olması da istenen bir özelliktir.

Analizlerde önemli olan faktörlerden bir tanesi de uygulama kolaylığı ve kullanılan maddelerin kolay sağlanabilmesidir. ARP ile ilgili yapılmış olan çalışmalar bu açıdan da incelenmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bu çalışma ile amaçlanan, ARP'nin analizi için uygulaması kolay, maliyeti düşük ve etkin bir YBSK yöntemi geliştirilmesidir. Çalışma kapsamında ARP'nin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, geçmişte yapılmış ARP ile ilgili çalışmalar araştırılmış ve geliştirilecek yöntem için avantaj sağlayacak özellikler belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, ARP'nin analizi için kolaylıkla uygulanabilecek, ekonomik bir yöntem geliştirilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

KAYNAK BİLGİSİ

Eugen Bleuler, 1911'de yayınladığı Erken Bunama ve Şizofreniler Grubu adlı kitabında, bu bozukluğun mutlaka yıkımla sonlanmasının gerekmediğine dikkat çekerek, erken bunama yerine, zihin yarılması anlamına gelen schizo-phrenia teriminin kullanılmasını önermiş ve şizofreninin dört temel belirtisi olduğunu ileri sürmüştür. Bunlar gerçek dünya ile ilişkiyi azaltarak kendine özgü bir iç dünyaya çekilme anlamına gelen "otizm", birbirine karşıt duygu ve eğilimlerin aynı anda varlığı anlamında kullanılan "ambivalans", çağrışımların düzen ve sürekliliğinin bozulması anlamında "çağrışım çözüklüğü" ve duygusal tepkilerde küntleşme ya da uygunsuzluğu belirten "anormal duygulanım"dır. Bleuler, şizofreni kavramı içinde, çağrışım çözüklüğüne özel bir yer vermiş, bunun tüm hastalarda ve hastalığın her döneminde bulunduğunu ileri sürmüştür. Bu yaklaşım, uzun süre şizofreni konusundaki araştırmalara ve klinik uygulamalara yön vermiş ve günümüze kadar uzanan bir tartışmanın çıkış noktası olmuştur (Mete, 1998).

Tartışmanın diğer kutbunda, Kurt Schneider'ın 'birinci sıra belirtileri' yer almaktadır. Schneider, boşluktan sesler duyma, kendi düşüncelerinin yüksek sesle söylendiğini işitme, dış güçler tarafından bedeninin etkilendiği inancı, düşünce çalınması ve düşünce sokulması gibi tuhaf yaşantılardan oluşan bir grup belirtiyi, 'birinci sıra belirtiler' olarak adlandırmış ve şizofreni tanısında bunlara öncelik vermiştir (Mete, 1998).

1960'ların sonlarında, Schneider'ın 'birinci sıra belirtileri' Avrupa'da yaygın bir kullanım bulurken, Amerikalılar Bleuler'in şizofreni tanımına göre tanı koymaktaydılar. Ancak, bir taraftan Bleuler'in çağrışım çözüklüğü konusundaki iddialarının yapılan çalışmalarda doğrulanmaması, diğer taraftan Amerikan psikiyatrisinde altta yatan nedenleri dikkate almayan ve ruhsal bozuklukları Kraepelin'in yaptığı gibi ortaya çıkan belirtilere göre adlandırıp sınıflayan, betimleyici düzeyle sınırlı bir tanı sınıflamasının benimsenmeye başlaması, Schneider'ın ölçütlerinin Amerikalılar tarafından da ön plana çıkarılmasına yol açmıştır. Böylece, okyanusun iki tarafında da, şizofreni tanısı yaklaşık aynı ölçütlere göre konulmaya başlanmıştır (Mete, 1998).

Şizofreni oldukça değişik şekillerde kendini gösteren ve neden ortaya çıktığı bilinmeyen bir hastalıktır. Bu nedenle tedavide amaç semptomları yatıştırmaya ve hastalığın tekrar ortaya çıkışını önlemeye yöneliktir (http-3).

Şizofreni ile ilgili değişik teoriler ileri sürülmektedir. Klinik izlemelerde kan bağı olan kişilerde genetik yatkınlığın olduğu, başka nedenlerin de araya girmesi ile hastalığın ortaya çıktığı görülmektedir (http-3).

Tek yumurta ikizlerinin birinde şizofreni görülmesi durumunda diğerinde şizofreni ortaya çıkma olasılığı %50, anne ve babanın şizofren olması durumunda çocuklarda şizofreni görülme olasılığı %40, anne veya babanın şizofren olması durumunda çocuklarda görülme olasılığı %8, kardeşlerden birinin şizofren olması durumunda diğer çocukta hastalığın görülme olasılığı %12'dir. Genetik geçişten sorumlu tutulan bazı genler vardır ancak bu konu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (http-3).

Şizofren hastaların beyin tomografisi ve MR gibi radyolojik incelemelerinde beynin bazı bölgelerinde değişiklikler tespit edilmektedir ancak bu değişikliklerin

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

şizofreniye özgü olmadığı bilinmektedir. Yine ölen şizofren hastaların beyin biyopsilerinde beyinde bazı doku değişiklikleri görülmektedir. Bu değişikliklerin de hastalık oluşmadan önce mi olduğu veya hastalığın ortaya çıkışıyla mı geliştiği bilinememektedir (http-3).

Beyin biyokimyası ile ilgili araştırmalarda beyinde haberci rolü üstlenen (nörotransmitter) maddelerden biri olan dopaminin aktivite artışının hastalığa yol açtığı bilinmektedir (http-3).

Son yıllarda dopamin yanında serotonin ve norepinefrin gibi diğer habercilerin de şizofreni oluşumunda rol oynadığı belirtilmektedir. Kullanılan ilaçlar da bu sistemler üzerinden etki etmektedir. Her hastada aynı belirtilerin ortaya çıkmaması, her ilacın her hastaya yaramaması, hastalığın ortaya çıkışında bu maddelerle ilgili kişiden kişiye değişen özelliklerin olduğunu düşündürmektedir. Hastalığın ortaya çıkış nedeni olarak bazı hastalarda dopamin sistemi daha etkin olurken bazılarında sorun daha çok serotonin sisteminde olabilir (http-3).

Bağışıklık sisteminin bu hastalığa yol açtığı öne sürülen teoriler arasındadır. Gebelik sırasında grip enfeksiyonu geçiren annelerin çocuklarında bu hastalığın ortaya çıktığı ileri sürülmüştür, ancak araştırmalar bunu desteklememektedir (http-3).

Çevresel bazı etkenler hastalığın ortaya çıkışında rol oynamaktadır. Kalp hastaları nasıl çevresel stres yaratan durumlardan olumsuz etkileniyorsa veya stresli bir yaşam olayı nasıl hastalığın ortaya çıkmasında rol oynuyorsa, şizofrenlilerde de aynı durum geçerlidir. Bu hastalarda tek başına ilaç tedavisi genelde yeterli olmaz. Bu nedenle stres yaratan durumların da ele alınması gerekir. Bazı aile yapılarının şizofreniye yol açtığı öne sürülmüş ve şizofren aileler modeli geliştirilmeye çalışılmıştır, ancak daha sonra yapılan araştırmalar bu teoriyi desteklememiştir (http-3).

Stres-diyatez teorisine göre bünyesel olarak yatkın olan kişilerde stresli bir durumla karşılaşıldığında şizofreni ortaya çıkmaktadır. Şizofreninin ortaya çıkışında biyolojik, psikososyal ve çevresel etkenlerin birlikte rol oynadığı, stres yaratan bir durumla karşılaşıldığında hastalığın ortaya çıktığı ve stres yaratan durumun da bu etkenlerden biri ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Örneğin; ortaya çıkarıcı etken enfeksiyon gibi biyolojik bir neden veya bir yakınını kaybetme, sorunlu bir ailede yaşama gibi psikolojik bir neden olabilir. Her enfeksiyon hastalığı olan veya her yakınını kaybeden şizofreni olmaz, bu hastalığın ortaya çıkışı için bünyesel yatkınlığın da bulunması gerekir (http-3).

Şizofrenlerde hormonlarda bazı değişiklikler olduğu ve bunun da hastalığa yol açtığı belirtilmektedir (http-3).

Bazı yapısal ve kimyasal bozuklukların şizofren hastaların algılarında bozulmalara yol açtığı ve hastaların algılarında seçicilik olmaması dolayısıyla beynin çok fazla uyaranla karşılaştığı öne sürülmektedir. Örneğin; normal kişilerde bulundukları ortamda aynı anda ortaya çıkan seslere karşı bir seçicilik vardır. Televizyonun sesini dinlerken dışarıda bağıran satıcının sesini algılamayabilir. Oysa şizofrenlerde bu seçiciliğin olmadığı aynı anda var olan tüm seslerin algılandığı ve beynin fazla uyaranla karşı karşıya kaldığı belirtilmektedir (http-3).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şizofreni, birbirinden bağımsız üç temel semptom dizisi ile karakterize edilir. Bunlar şu şekilde açıklanabilir:

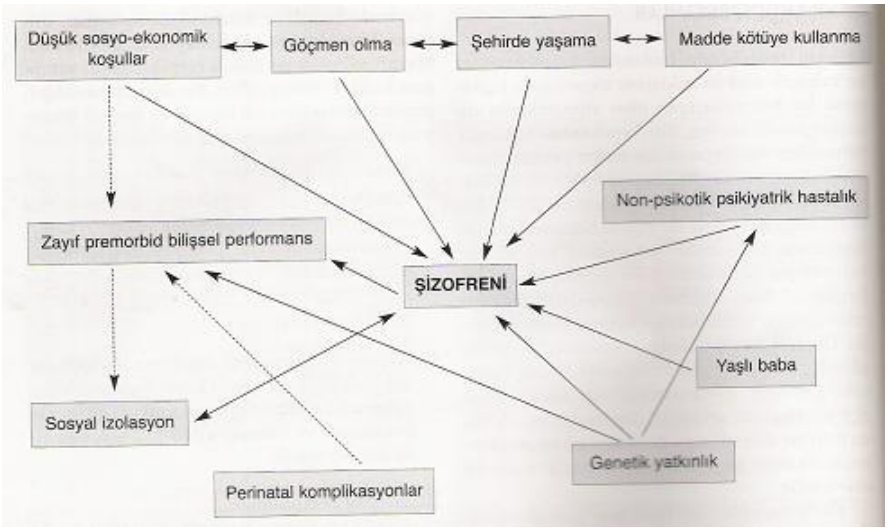
I. Psikotik semptomlar:
   Halüsinasyonlar ve delüzyonlar ile karakterizedir.
II. Ayrışmış (disosiyatif) düşünme bozukluğu:
   Yaşamla ilgili amaçların kaybı, tutarsızlık (inkoherens), birleştirici (asosiyatif) düşüncenin bozulması ve sözcük uydurma (neolojizm) ile kendini göstermektedir.
III. Negatif semptomlar:
   Afektif küntleşme, heyecan ve inisiyatif yokluğu, konuşma fakirliği, sosyal dürtünün azalması, kişisel hijyene ve görünüşe dikkat etmeme şeklinde açıklanır.

I. ve II. gruptakiler pozitif semptomlardır ve artmış dopaminerjik aktivite ile ilişkilidir. III. grupta gözlenenler beyinde yapısal değişikliklerle ilişkili olabilir, dopaminerjik aktivite azlığı söz konusudur ve klasik nöroleptiklerle kontrol edilebilmesi oldukça güçtür (Uzbay, 2007).

Şizofrenide akut epizotlar (çoğunlukla pozitif semptomlar ön planda) tekrarlayıcıdır ve negatif semptomlar ağırlıkta ise şizofreninin kronikleşme ihtimali daha fazladır (Uzbay, 2007).

Şizofreni temelleri prenatal dönemde atılan, zaman içinde gelişen ve olguların çoğunda yaşamın yirmili ve otuzlu yıllarında, genç erişkin dönemde, tüm belirtileri ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Nörogelişimsel probleme genetik, çevresel ve sosyal faktörler katkıda bulunur (Uzbay, 2007).

Şekil 1'de de görüleceği gibi şizofreni oluşumuna katkıda bulunan faktörlerin çeşitliliği ve bunların birbirleri ile ilişkileri hastalığın karmaşık yapısını açıkça göstermektedir. Sunulan proje açısından bunlar arasında en ilgi çekici olanlardan biri madde bağımlılığı ile şizofreni arasında kurulan doğrudan ilişkidir (Uzbay, 2007).



Şekil 1. Şizofreniye katkıda bulunan faktörler (Uzbay, 2007)

Şizofreninin nörokimyasal zeminini açıklamaya yönelik en önemli hipotez dopaminerjik fonksiyon değişiklikleri ile semptomlar arasındaki ilişkiye işaret

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

eder. Dopaminerjik sistemde, özellikle dopamin D_2 reseptörleri üzerinden yürütülen nörokimyasal aşırım ve ilişkili postsinaptik sinyal transdüksiyon değişiklikleri gerek şizofreni oluşumu gerekse antipsikotik ilaçlarla tedavi açısından oldukça önemlidir. Bunun dışında serotonerjik, GABA-erjik ve glutamaterjik sistemlerle ilişkili nörogelişimsel sorunlar da hastalık oluşumunda önemlidir. Son zamanlarda şizofreni oluşumunda nöroplastisite kavramı önem kazanmaya başlamıştır. Bu bağlamda, başta dopaminerjik sistem olmak üzere serotonerjik, GABA-erjik ve glutamaterjik sistemlerde nörogenezis ve nörotrofik faktörlerin şizofreni oluşumu ve tedavisindeki rolleri üzerinde durulmaktadır. Ayrıca santral nitrerjik sistemdeki değişikliklerin şizofreni ile ilişkisine işaret eden araştırma sonuçları yayınlanmıştır. Gerek beyin dokusunda gerçekleştirilen post-mortem çalışmaların sonuçları, gerekse plazma örneklerine dayanan biyokimyasal çalışmaların sonuçları şizofreni hastalarında nitrik oksit (NO) aktivitesinde artış olduğunu göstermektedir. Bu veriler, NO sentezleyen enzim olan NO sentazı (NOS) bloke eden L-NAME gibi ilaçların farelerde oluşturulan şizofreni modeli üzerinde olumlu etkilerinin saptandığına işaret eden deneysel verilerle de desteklenmektedir. Buna zıt yönde deneysel ve klinik verilerin yayınlanmış olması konunun daha kapsamlı araştırılması gerektiğine işaret etmektedir (Uzbay, 2007).

Şizofreni ile serotonerjik sistem arasında da bir ilişki kurulmaktadır ve şizofreninin serotonerjik sistem ile ilişkisine işaret eden hipotez dopaminerjik hipotezden daha eskidir. Bir halüsinojen olan liserjik asit dietil esterinin (LSD) serotonin aracılığı ile etki göstermesine dayanan bu düşünce 1950'li yıllarda ortaya atılmıştır. Serotonerjik ve dopaminerjik sistemler arasında işlevsel bir etkileşim de söz konusudur. Örneğin; 5-HT_{2A} reseptörlerin bloke edilmesi dopaminerjik etkinliği arttırabilmektedir. Klasik antipsikotik ilaçların aksine yeni tedaviye giren atipik antipsikotiklerin çoğu 5-HT_{2A} reseptörlerine dopamin D_2 reseptörlerinden daha yüksek bir afinite ile bağlanırlar (Uzbay, 2007).

Şizofreni oluşumunda, prefrontal korteks, talamus, striatum ve hipokampus gibi beyin bölgelerinde başta dopamin olmak üzere nörotransmitter değişiklikleri ve bu bölgelerin karşılıklı olarak birbirleri ile ilişkili iletişimlerinde yaşanan aksaklıklar rol oynamaktadır (Uzbay, 2007).

Antipsikotik ilaç etkileri ile ilişkili anatomik ve moleküler çalışmaların çoğu en yoğun dopaminerjik projeksiyonları aldığı ve yüksek yoğunlukta dopaminerjik reseptörler içerdiği için striatuma odaklanmıştır. Antipsikotik ilaçların korteks ve hipokampus üzerine etkilerini çalışmak daha zor olmakla beraber, antipsikotik etki düzeneğinin anlaşılması açısından daha yararlı bilgiler sunmaktadır (Uzbay, 2007).

Bugün için şizofreni rasyonel farmakoterapisi oldukça güç bir hastalık olma özelliğini korumaya devam etmektedir. Şizofreninin etiyopatogenezinde anlaşılması ve araştırılması gereken daha pek çok nokta vardır. Nörobiyolojik zeminde netlik sağlayabilecek her yeni bulgu şizofreni tedavisine yönelik önemli veriler sağlama potansiyeline sahiptir (Uzbay, 2007).

Şizofreni, çoğunlukla 15-35 yaş arası insanlarda görülen, yetişkin nüfusun yaklaşık olarak %0.7'sini etkileyen ağır bir ruhsal hastalıktır. İnsidansı küçük olmasına rağmen (3-10000), kroniklikten dolayı prevalansı yüksektir (http-1).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

- Şizofreni dünyada yaklaşık olarak 24 milyon insanı etkilemektedir.
- Şizofreni tedavi edilebilen bir rahatsızlıktır. Tedavi, hastalığın başlangıç evrelerinde daha etkili olmaktadır.
- Şizofrenili hastaların %50'den daha fazlası uygun bakım görmemektedir.
- Tedavi olmamış şizofreni hastalarının %90'ı gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır.
- Şizofreni hastalarının bakımı, aktif aile ve toplum katılımı ile toplum seviyesinde sağlanabilir.

Etkili müdahaleler (farmakolojik ve psikososyal) bulunmaktadır ve kronik bir şizofreni hastasının tedavisi aylık olarak yaklaşık 2 dolara mal olmaktadır. Tedavi ne kadar erken başlatılırsa, o kadar etkili olmaktadır. Ancak, şizofreni hastalarının çoğu tedaviye ulaşamamaktadır ki bu durum hastalığın kronikleşmesine yol açmaktadır (http-1).

Gelişmekte olan ülkelerin bazılarında (örn; Hindistan, İran, Pakistan, Tanzanya, Gine-Bissau) uygulanan pilot programlar birincil sağlık bakım sistemleri ile ağır ruhsal hastalığı olan insanlara bakım sağlamanın fizibilitesini göstermiştir(http-1):

- Birincil sağlık bakım personelinin uygun eğitimi
- Temel ilaçların tedarik edilmesi
- Ailelerin evde bakım için güçlendirilmesi
- Ruh sağlığı profesyonellerinden destek yönlendirilmesi ve
- Utanma ve ayrımcılığı azaltmak için halkın eğitimi

Antipsikotik ilaçlar, başta şizofreni olmak üzere psikotik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Bunlara, nöroleptikler, antişizofrenik ilaçlar veya major trankilizanlar adları da verilmektedir. Major trankilizan deyimi günümüzde geçerliliğini yitirmiştir (Uzbay, 2007).

Antipsikotik ilaçlar 1950'lerin başında fenotiyazin türevi bir ajan olan klorpromazinin antipsikotik etkilerinin ortaya çıkmasıyla tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Fenotiyazinler, butirofenonlar ve tiyoksantinlerden oluşan ilk grup ilaçlar klasik antipsikotikler veya tipik antipsikotikler olarak adlandırılmış ve gerek şizofreninin gerekse benzeri psikozların tedavisinde uzun süre kullanılmışlardır (Uzbay, 2007).

Antipsikotik ilaçlar temelde tipik (klasik) ve atipik antipsikotikler olmak üzere iki alt grupta incelenebilir. Klasik antipsikotikler kendi aralarında kimyasal yapıları temel alınarak Fenotiyazinler, Yapıca fenotiyazinlere benzeyen ilaçlar, Butirofenonlar ve Diğer (ikinci kuşak antipsikotikler) olmak üzere çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Fenotiyazinler Alifatik (Klorpromazin), Piperidinli (Tiyoridazin) ve Piperazinli (Flufenazin) olmak üzere üç alt gruba ayrılır. Yapıca fenotiyazine benzeyen ilaçlar grubunda; Klorprotiksen, Tiyotiksen, Loksapin ve Zuklopentiksol yer alır. Butirofenonlar grubunda; Haloperidol yer alırken, Diğer (ikinci kuşak antipsikotikler) grubunda ise Pimozid ve Amisülpirid yer alır. Atipik antipsikotikler grubunda ise; Klozapin, Olanzapin, Ketiyapin, Risperidon, Sertindol, Aripiprazol ve Ziprasidon yer alır (Uzbay, 2007).

ARP, 7-[4-[4-(2,3-diklorofenil)piperazin-1-il]bütoksi]-3,4-dihidro-1H-kinolin-2-on, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. tarafından geliştirilmiş olan yeni bir

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

antipsikotiktir (Kubo ve ark., 2005). ARP, yaygın ve iyi tanınan, merkezi sinir sistemindeki dopaminerjik sinir sisteminin düzensiz nörotransmisyon hareketi sonucu uyarılan bir psikiyatrik bozukluk olarak bilinen şizofreni hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Reddy ve ark., 2010). FDA tarafından 2002 yılının sonunda onaylanmıştır (Musenga ve ark., 2008).

ARP, "dopamin sistem dengeleyicileri" olarak adlandırılan antipsikotik ajanların yeni bir sınıfının ilk üyesidir (Lancelin ve ark., 2008). Bu yeni ajan ayrıca, ekstrapiramidal semptomlar ve sedasyon için düşük bir eğilim göstermesi, kilo artışı, prolaktin seviyesinin yükselmesi ve QT_c aralığının uzaması ile ilgili risk artışına dair bir bulguya sahip olmaması ile faydalı ve mükemmel bir güvenlik profili ve tolerabilite göstermiştir (Shimokawa ve ark., 2005). Ancak mide bulantısı, istifra, baş dönmesi, uyuşukluk, kabızlık ve vücudun duruş şekli ile ilgili sersemlik gibi yan etkileri bulunmaktadır (Musenga ve ark., 2008).

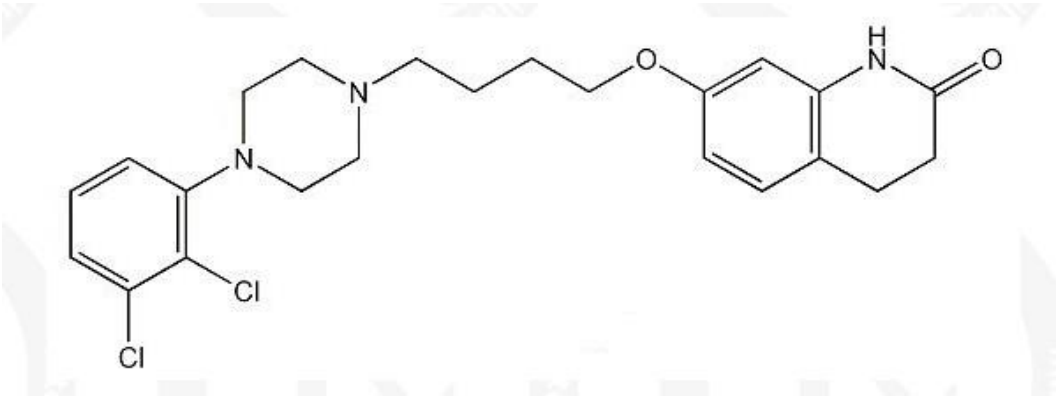
ARP, benzersiz farmakolojik profili ile diğer antipsikotiklerden farklılık gösterir. Örneğin; dopamin D_2 ve serotonin 5-HT_{1A} reseptörleri üzerinde parsiyel agonist etki gösterirken, serotonin 5-HT_{2A} reseptörleri üzerinde antagonist etki gösterir. Diğer reseptörler üzerinde de antagonist etki göstermektedir ancak bu düşük bir etkidir. Dopamin ve $5HT_2$ reseptörleri harici benzer reseptör afiniteleri olan diğer reseptörler üzerindeki antagonizma, ARP'nin diğer terapötik ve yan etkilerinden bazılarını açıklayabilir. Klinik çalışmalarda ARP'nin şizofren ve şizoaffektif bozukluk olan hastalarda pozitif ve negatif semptomların ikisini birden geliştirebileceği kanıtlanmıştır (Reddy ve ark., 2010).

ARP oral uygulamadan sonra hızla emilir. Doruk plazma konsantrasyonuna oral uygulamadan yaklaşık olarak 3-5 saat sonra ulaşılır ve ilacın biyoyararlanımı %87'dir (Lancelin ve ark., 2008). ARP plazma albuminine yüksek oranda bağlanır ve ana metabolik yolları karaciğerde sitokrom p450 sistemi (CYP3A4 ve CYP2D6 enzimleri) aracılığıyla gerçekleşen dehidrojenasyon, hidroksilasyon ve N-dealkilasyon'dur. Günlük doz aralığı 5-30 mg'dır ve terapötik plazma seviyeleri 80-450 ng mL^{-1}'dir (Musenga ve ark., 2008). ARP'nin çoklu oral dozlarının uygulanmasından sonra ortalama eliminasyon yarı ömrü 47-68 saat aralığında değişmektedir. Kararlı ilaç plazma konsantrasyonları, ARP ve dehidro-aripiprazol'ün (DARP) ikisi için de 14 günlük tedavi sonrasında ulaşılmıştır (Lancelin ve ark., 2008).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Aripiprazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Dopamin sistem dengeleyicisi bir antipsikotik olan ARP kimyasal olarak, 7-[4-[4-(2,3-diklorofenil)piperazin-1-il]bütoksi]-3,4-dihidro-1H-kinolin-2-on olarak adlandırılır. Kapalı formülü $C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$ ve molekül ağırlığı 448.39 g/mol'dür (Merck Index, 2006).



Şekil 2. ARP'nin molekül yapısı

ARP renksiz, kristal yapılı katı bir maddedir. Erime noktası 139–139.5°C'dir. Bazik karakterli olup LogP değeri 4.5, pKa değeri ise 7.6'dır. (Merck Index, 2006).

Aripiprazol Analizi ile İlgili Yapılmış Bilimsel Çalışmalar

Dorado ve ark. (2012), ARP ve DARP'nin psikiyatrik hastaların plazma örneklerindeki tayinleri için UV detektör ile saptama yapılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. UV detektör ile 254 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Ölçümler sonucunda ARP için 2 – 189 ng/mL, DARP için 11 – 359 ng/mL derişim aralıkları, doğrusal aralık gösterilmiş, LOD ile LOQ değerleri ARP ve DARP için sırasıyla 0.38 – 1 ng/mL ve 0.44 – 0.78 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kesinlik çalışmaları her iki analit için de 10.4'den küçük olarak saptanmıştır.

Thakkar ve ark. (2011), ARP'nin toz ve katı farmasötik dozaj formlarının analizi için UV detektör ile saptama yapılmış, YBSK ve Ultra-Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi'nin (UBSK) kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. YBSK için C_8 (250 x 4.0 mm, 5 µm partikül büyüklüğü), UBSK için C_8 (50 x 2.1mm, 1.7 µm partikül büyüklüğü) kolonlarını isokratik modda kullanmışlardır. Mobil faz için her iki yöntemde de asetonitril:20mM amonyum asetat (90:10, h/h) karışımını, YBSK için 1.0 mL/dk, UBSK için 0.25 mL/dk akış hızlarında kullanmışlardır. UV detektör ile 240 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Ölçümler sonucunda geri kazanımlar YBSK için %99 – 101, UBSK için %99 – 100 olarak belirlenmiştir. Bağıl standart sapma değerleri her iki yöntem için de %2.0'den küçük olarak saptanmıştır. 40 – 160 µg/mL derişim aralığı, her iki yöntemde de ARP için doğrusal aralık gösterilmiş ve LOD ile LOQ değerleri YBSK yöntemi için sırasıyla 0.05 ve 0.1 µg/mL, UBSK yöntemi için sırasıyla 0.01 ve 0.05 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Akamine ve ark. (2010), ARP ve DARP'nin insan plazma örneklerindeki tayinleri için UV detektör ile saptama yapılmış, kolon değişimli bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. 7-[5-[4-(3-kloro-2-metilfenil)-1-piperazinil]pentiloksi]-3,4 dihidro-2(1H)-kinolinon (OPC-14558) internal standart olarak kullanılmış ve

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ARP, DARP ile IS kloroform/n-heptan (3:7, v/v) karışımı kullanılarak 1 mL plazmadan ekstrakte edilmiştir. Temizleme için TSK BSA-ODS/S ön kolonu (5 µm), ayırım için C_{18} STR ODS-II analitik kolonu (5 µm) kullanılmıştır. Kromatografik ayırım yaklaşık olarak 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. UV detektör ile 254 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır. Ölçümler sonucunda, ortalama geri kazanımlar ARP ve DARP için sırasıyla %74 ve %74.7 olarak belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası varyasyon katsayıları ARP için 2 – 600 ng/mL derişim aralığında sırasıyla %7.5 ile %7.1'den, DARP için 2 – 160 ng/mL derişim aralığında sırasıyla %9.2 ve %4.5'ten küçük olarak belirlenmiştir. 1 – 500 ng/mL derişim aralığı her iki madde için de doğrusal aralık gösterilmiş ve LOD değerleri her iki madde için de 0.5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Lin ve ark. (2009), ARP'nin plazmada kararlı durumunun izlenmesi için bir sıvı kromatografisi – elektrosprey iyonizasyon – ikili kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Sıvı Kromatografisi için YMC ODS-AQ S (3 µm, 2.0 x 100 mm, Waters, Milford, MA) kolonu ile %0.1 formik asitin sulu çözeltisi ve asetonitrilden oluşan mobil fazı gradient metoduyla kullanmışlardır. Sıvı kromatografisi analizleri 12 dakikada sona ermiştir. Ölçümler sonucunda, gerikazanım değerleri, ARP'nin 2.5 ng/mL derişimi için %78.7, 100 ng/mL derişimi için %60.5 ve 350 ng/mL derişimi için ise %45.6 olarak saptanmıştır. 2 – 400 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve ARP için LLOQ değeri 2 ng/mL olarak belirlenmiştir. Analiz içi doğruluk ve kesinlik çalışmaları 2.5 ng/mL, 100 ng/mL ve 350 ng/mL konsantrasyonlarından 5 kez aynı şekilde hazırlanan örneklere uygulanmış ve varyasyon katsayıları sırasıyla 5.5, 1.9 ve 6.2 olarak saptanmıştır. Analizler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları ise bu 5'li örneklerin 3'er kez analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Varyasyon katsayıları sırasıyla 11.9, 6.5 ve 6.0 olarak belirlenmiştir.

Lancelin ve ark. (2008), ARP ve DARP'nin insan plazmasında tayini için diyot dizisi detektör kullanılmış olan bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz için C_{18} Waters XBridge (3.5 µm partikül büyüklüğü, 100 mm x 4.6 mm) ters-faz kolonu ile asetonitril:amonyum tamponundan (10mM; pH 8.35) (60:40, h/h) oluşan bir mobil faz kullanmışlardır. UV saptama 217 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analizler 7 dakika sonunda tamamlanmıştır. Ölçümler sonucunda kesinlik değerleri %12'den daha düşük belirlenirken, doğruluk değerleri %98 – 113 aralığında belirlenmiştir. 2 – 1000 ng/mL derişim aralığı her iki madde için de doğrusal aralık gösterilmiş ve LLOQ değerleri iki madde için de 2 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Wang ve ark. (2009), ARP'nin beyindeki konsantrasyonun P-glikoprotein eksikliği olan farelerdeki farklılığını çalışmışlar ve bu çalışma için Titier ve ark. (2003)'nın Haloperidol, Risperidon, 9-hidroksirisperidon, Olanzapin ve Klozapin maddelerinin analizi için uygulamış oldukları YBSK yöntemini kullanmışlardır. Analiz için Waters Novapack C_{18} kolonu (150 x 3.9 mm) ile asetonitril:fosfat tamponu pH 4.0:Metanol (MeOH) (26:52:22, h/h/h) karışımından oluşan mobil fazı kullanmışlardır. UV saptamayı 254 nm dalga boyunda gerçekleştirmişlerdir. ARP için LOD değeri 5 ng/mL olarak saptanmış ve gün içi ile günler arası varyasyon katsayıları %7'den düşük belirlenmiştir. Plazma ve dokuların ekstraksiyon geri kazanımları %85 – 98 aralığında saptanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Caloro ve ark. (2012), ARP ve DARP'nin serumdaki ölçümleri için bir YBSK-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Luna C_{18} (50 mm x 2.0 mm, 5 µm, 100 Å gözenek büyüklüğü) kolonu ile %0.1 sulu formik asit çözeltisi ve %100 asetonitril karışımından oluşan mobil faz gradient yöntemle kullanılmıştır. Analiz 10 dakika sonunda tamamlanmıştır. ARP için 2 – 1000 ng/mL, DARP için 3.5 – 500 ng/mL derişim aralıkları doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve her iki analit için de LOD değeri sinyal-gürültü oranı 5, LLOQ değeri ise sinyal-gürültü oranı 15 olarak saptanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk %10 içinde belirlenmiştir. Ortalama geri kazanım ise ARP için %95.2±4.5, DARP için %97.6±7.2 olarak saptanmıştır.

Shimokawa ve ark. (2005), UV detektör kullanarak, ARP'nin sıçan plazması ve beynindeki tayini ve bu tayinin farmakokinetik çalışmalara uygulanabilmesi için bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. UV saptamayı 254 nm dalga boyunda gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Nova-pak phenyl (150 mm x 3.9 mm, 4 µm partikül büyüklüğü, Waters) kolonu ile asetonitril-metanol-20mM sodyum sülfat-asetik asit (27:25:48:1, h/h/h/h) karışımını mobil faz olarak kullanmışlardır. ARP'nin plazma için 10 – 2000 ng/mL, beyin için 30 – 6000 ng/g aralıkları doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LLOQ değeri 10 ng/mL olarak belirlenmiştir. LLOQ değerinde kesinlik, plazma için %2, beyin için %5.2 olarak, doğruluk ise, plazma için %102, beyin için %108.7 olarak saptanmıştır. Gün içi kesinlik, plazma için %2, beyin için %10.6 olarak, doğruluk ise plazma için %96 – 102.4, beyin için %99 – 108.7 olarak saptanmıştır. Günler arası kesinlik değerleri plazma için %7.8, beyin için %9.6 olarak, doğruluk ise plazma için %96 – 102, beyin için %99.8 – 104 olarak belirlenmiştir. ARP için ortalama geri kazanım plazma için %87.2 – 91.1 beyin için %41.3 – 43.5 olarak belirlenmiştir.

Musenga ve ark. (2008), ARP'nin insan plazmasında analizi için diyot dizisi detektör kullanılan bir YBSK yöntemi ile kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. UV saptamayı 254 nm dalga boyunda yapmışlardır. Kromatografik analiz için Varian Microsorb C_8 ters faz kolonu (4 mm x 3 mm, 5 µm) ve C_8 kartuş önkolonu (4 mm x 3 mm, 5 µm) ile 12.5 mM fosfat tamponu (pH 3.5), %0.19 trietilamin (h/h) ve asetonitril (%35, h/h) karışımını mobil faz olarak kullanmışlardır. ARP için 70 – 700 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOQ ile LOD değerleri sırasıyla 50 ve 25 ng/mL olarak saptanmıştır. Yöntemin kesinlik değerleri %7'den düşük, doğruluk değerleri ise %95'ten yüksek olarak belirlenmiştir.

Song ve ark. (2009), ARP ve DARP'nin insan plazmasında tayini için MS/MS detektör kullanılan bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için BDS Phenyl (250 x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) ve ODS guard (2 x 4 mm) kolonları ile %30 amonyum asetat tamponu, %70 metanol içeren mobil fazı kullanmışlardır. ARP ve DARP için sırasıyla 0.1 – 600 ng/mL ve 0.01 – 60 ng/mL derişim aralıkları doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve ortalama gerikazanımlar %85'ten yüksek olarak saptanmıştır. LLOQ değerleri her iki madde için de en düşük konsantrasyonlarda saptanmıştır. Kesinliği ifade eden bağıl standart sapma (BSS) değeri %20'den düşük, doğruluğu ifade eden sapma değeri %±20 sınırları arasında tespit edilmişlerdir. Çalışma içi ve çalışmalar arası doğruluk ve kesinlik değerleri US FDA' ya göre uygun sınırlar içerisinde belirlenmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kubo ve ark. (2005), ARP'nin ve esas metaboliti olan OPC-14857'nin insan plazmasındaki tayini için MS/MS detektör kullanılan bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Chemcobond ODS-W (150 mm x 2.1 mm, 5 µm; Chemco, Osaka, Japan) kolonu ile asetik asidin sudaki %0.1 lik çözeltisi ve asetonitril (65:35, h/h) içeren mobil fazı kullanmışlardır. Her iki analit için de 0.1 – 100 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LLOQ değeri 0.1 ng/mL olarak belirlenmiştir. ARP için gün içi doğruluk değerleri minimum %-12 iken maksimum %4.8 olarak saptanmıştır. Günler arası doğruluk değerleri ise minimum %-8 ile maksimum %5.4 olarak belirlenmiştir. Kesinlik değerleri ise gün içi çalışmalarda %5.1'den düşük, günler arası çalışmalarda ise %6.2 den düşük olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri ise %91.5 – 93.2 sınırları arasında saptanmıştır.

Xu ve ark. (2012), ARP'nin asit – baz nötralizasyonuna dayanan homojenizasyon/nanoçöktürme yöntemleriyle hazırlanmış nanosüspansiyon formlarının gelişmiş çözünürlük ve biyoyararlanım özelliklerini incelemek amacıyla, köpek plazmasında ARP'yi tayin etmek için bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. UV detektör ile saptamayı 255 nm dalga boyunda gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Diamonsil C_{18} kolonu (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) ve doldurulabilir ön kolonu (C_{18}, 2.0 mm x 20 mm; Alltech, Lexington,USA) ile asetonitril – metanol – 20mM sodyum sülfat sulu çözeltisi – glasiyel asetik asit (15:37:48:1, h/h/h/h) karışımından oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 10 – 800 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LLOQ değeri 10 ng/mL olarak saptanmıştır. Doğruluk değerleri %103.81±8.57, gün içi ve günler arası kesinlik değerleri ise %8'den düşük olarak saptanmıştır. Geri kazanım %74.02±3.23 olarak belirlenmiştir.

Choong ve ark. (2009), yedi psikotropik ilaç ve 4 metabolitin insan plazmasında terapötik olarak izlenmesi çalışmalarında, aralarında ARP'nin de bulunduğu psikotropik ilaçların kromatografik analizi için MS ve ESI ile birlikte kullanılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Xbridge C_{18} kolonu (2.1 x 100 mm; 3.5 µm, Waters, Milford, MA, USA) ve koruyucu kartuşu (2.1 x 10 mm; 3.5 µm) ile %25 amonyum hidroksit ile pH değeri 8.1'e ayarlanmış amonyum asetat çözeltisi ve asetonitril çözeltisinden oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için LLOQ değeri 5 ng/mL, doğruluk değerleri minimum %105.6, maximum %111.4, kesinlik değerlerinden tekraredilebilirlik değerleri %10.3'den küçük, ara kesinlik değerleri ise %17.5'dan küçük olarak saptanmıştır.

Kirchherr ve ark. (2006), kırk sekiz farklı antidepresan ve antipsikotik ilacın insan serumundaki miktar tayini için MS/MS detektör ile kullanılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Chromolith Speed ROD C_{18} kolonu (50 mm x 4.6 mm, 5 µm, VWR/Merck, Darmstadt, Germany) ile metanol – amonyum çözeltisi ile pH değeri 3.9'a ayarlanmış 5mM asetik asit çözeltisi içeren mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 10 – 1000 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOQ değeri 0.8 ng/mL olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değeri %95 olarak, kesinlik değerleri çalışma içi %10.9'dan düşük, çalışmalar arası %10.8'den düşük olarak, doğruluk değerleri çalışma içi %-5.9 - +8.4 aralığında, çalışmalar arası %-1.4 - +7 aralığında saptanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Li ve ark. (2007), atipik antipsikotiklerin ve bazı metabolitlerin in vitro örneklerde tayini için MS/MS detektör kullanılmış bir UBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Acquity UBSK^{TM} BEH C_{18} kolonu (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm partikül büyüklüğü, Waters, Milford MA, US) ile %62 asetonitril ve %38 amonyum asetat içeren mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 0.05 – 5 µg/L derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LLOQ değeri 0.05 µg/L, LOD değeri 0.004 µg/L olarak saptanmıştır. Geri kazanım değerleri %64 – 92 aralığında, tekraredilebilirlik için bağıl standart sapma değeri %7, gün içi kesinlik değerleri %16'dan düşük, günler arası kesinlik değerleri %17 ve daha düşük olarak saptanmıştır.

Vecchione ve ark. (2012), on sekiz psikotropik ilacın plazmada tayini için ESI ve MS/MS ile beraber kullanılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Chromolith Speed ROD C_{18} kolonu (50 mm x 2 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) ve Chromolith C_{18} koruma kartuşu (5 mm x 2 mm, 5 µm, VWR/Merck, Darmstadt, Germany) ile %0.2 asetik asit eklenmiş su ve asetonitril karışımından oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 10 – 1000 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LLOQ ile LOD değerleri sırasıyla 0.15 ng/mL, 0.05 ng/mL olarak saptanmıştır. Çalışma içi kesinlik değerleri %11.3 ve daha düşük, çalışmalar arası kesinlik değerleri %15.6 ve daha düşük olarak belirlenmiştir. Çalışma içi doğruluk değerleri %-12.6 – 2.9 aralığında, çalışmalar arası doğruluk değerleri %-0.5 – 3.1 aralığında saptanmıştır. Geri kazanım %94 ve daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Sampedro ve ark. (2012), antipsikotik ilaçların insan beyin dokusunda izlenmesi ve tayini için MS/MS detektör kullanılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Zorbax (Agilent) Eclipse Plus C_8 Narrow Bore kolonu (2.1 mm x 150 mm, 5 µm) ve aynı paketleme malzemesi içeren koruyucu kolonu ile amonyum hidroksit kullanılarak pH'sı 8.2'ye ayarlanmış amonyum formatın sulu çözeltisi ve asetonitril karışımından oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 20 – 8000 ng/g derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOQ değeri 8 ng/g olarak saptanmıştır. Tekraredilebilirlik değerleri %3.9 – 4.2 arasında, ara kesinlik değerleri %13.4 – 22.7 arasında saptanmıştır.

Remane ve ark. (2011), insan plazmasında birçok analitin analizi için MS/MS detektör kullanılmış bir UBSK yöntemi geliştirmişlerdir. LOD ve LLOQ değerleri sırasıyla 37.5 µg/L ve 50 µg/L olarak saptanmıştır. Doğruluk değerleri %-16.1 – 4 arasında, tekraredilebilirlik değerleri %6.2 – 16.2 arasında, ara kesinlik değerleri %7.9 – 14.2 arasında saptanmıştır.

Saar ve ark. (2010), kanda otuz antipsikotik ilacın belirlenmesi ve miktar tayini için MS/MS detektör kullanılmış bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Agilent Zorbax Eclipse XDB-C_{18} kolonu (4.6 x 150 mm, 5µm partikül büyüklüğü; Biolab, Scoresby, VIC, Avustralya) ile formik asitle pH değeri 3.5'e ayarlanmış 50 mmol/L amonyum formatın sulu çözeltisi ve %0.1 formik asit içeren asetonitril çözeltilerinin karışımından oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 10 – 600 µg/L derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOQ değeri 10 µg/L olarak saptanmıştır. Tekraredilebilirlik değerleri %5.6 – 13.7, kesinlik değerleri %10.8 – 13.7, doğruluk değerleri %-5 – 0.3 aralığında saptanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Vincenti ve ark. (2012), kanda 88 farmasötik ilacın ve metabolitlerinin hızlı taranması için MS/MS detektör kullanılmış bir UBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için Zorbax XDB – C_{18} kolonu (100 x 2.1 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies, İtalya) ve C_{18} koruma kolonu ile 5 mM formik asidin sulu çözeltisi ve asetonitrilden oluşan mobil fazı kullanmışlardır. ARP için 10 – 150 ng/mL derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOD ile LOQ değerleri sırasıyla 0.68 ng/mL, 2.25 ng/mL olarak saptanmıştır. Çalışma içi kesinlik değerleri %4.9 – 16.1 arasında, doğruluk değerleri %-15.1 – +29.6 arasında, gerikazanım değerleri ise %53.4 – 67.3 arasında saptanmıştır.

Kirschbaum ve ark. (2005), ARP'nin terapötik izlenmesi için kolon değişimli bir YBSK yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik analiz için, bir analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü, LiChrospher CN, MZ-Analysentechnik) ve bir yıkama kolonu (20 µm partikül büyüklüğü, CN, MZ-Analysentechnik) ile fosfat tamponu [850 mL/L fosforik asit (Merck) ile pH değeri 6.4'e ayarlanmış deiyonize su içerisinde 1.825 g/L dipotasyum fosfat trihidrat (Merck)] içerisinde asetonitril çözeltisini içeren bir mobil faz kullanmışlardır. ARP için 50 – 1000 µg/L derişim aralığı doğrusal aralık olarak gösterilmiş ve LOQ değeri 50 µg/L olarak saptanmıştır. Çalışma içi kesinlik değerleri %9.1, %8.1 ve %7.8; günlerarası kesinlik değerleri %7, %3 ve %4.7 ve çalışmalar arası kesinlik değerleri %8, %3.4 ve %4.8 olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri %94.7 – 111.5 olarak saptanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasallar

YBSK saflıktaki MeOH Merck KGaA (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

YBSK saflıktaki su Merck KGaA (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan %99 saflıktaki amonyum asetat Sigma–Aldrich (Hollanda) firmasından, %98 saflıktaki formik asit Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Standart madde olarak kullanılan %100.8 saflıktaki ARP Ulkar Kimya Sanayii ve Ticaret A.Ş. (Tekirdağ) firmasından satın alınmıştır.

İç standart olarak kullanılan %99.8 saflıktaki DİF Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş. (İstanbul) firmasından satın alınmıştır.

Aripa® (30 mg ARP) ilaç tablet örneği Ali Raif İlaç San. A.Ş. (İstanbul) firmasından sağlanmıştır.

Kullanılan Cihazlar

YBSK analizleri Shimadzu (Japonya) firmasının ürünü olan LC-20AT model LPGE ünitesi takılmış gradient pompa, CBM-20A model iletişim ünitesi, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10-ASvp model kolon fırını, SPD-M20A model foto diyot dizisi dedektörü ve DGU-20A5 model gaz giderme ünitesinden oluşan YBSK cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, Intel Pentium 4 işlemcili bir bilgisayara yüklenmiş olan Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

UV-Spektrofotometrisi ile yapılan çalışmalar, Shimadzu (Japonya) firmasının üretmiş olduğu UV-2450 model UV-Vis spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 1 cm ışık yoluna sahip kuvars küvetler kullanılmıştır. Çalışmalar sonucu elde eldilen veriler Core 2 Duo işlemcili bir bilgisayara yüklenmiş olan UV Probe 2.33 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Numune ve çözeltilerin hazırlanmasında Mettler Toledo (İsviçre) marka Excellence Plus model hassas analitik terazi, Eppendorf (Almanya) marka 5810R model santrifüj aleti, IKA-Werke (Almanya) marka R015 Power model manyetik karıştırıcı, Bandelin (Almanya) marka RK 100H model ultrasonik banyo, 100 – 1000 µL, 20 – 100 µL ve 1 – 20 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) marka Research model pipetörler, 0.45 µm gözenek çapına sahip Lubitech Technologies (Çin) marka 25 mm çaplı steril PVDF membran filtreler, 2 mL hacimli Hayat A.Ş. marka enjektörler, Sartorius Stedim Biotech (Almanya) marka hareketli faz süzme sistemi ve Seven multi, Mettler Toledo (İsviçre) marka pH metre kullanılmıştır.

Analizler için 2.7 µm büyüklüğünde partikül içeren 10 cm x 4.6 mm boyutlarındaki Supelco (ABD) marka Ascentis® Express C_{18} ters faz kolonu ile Fortis C_{18} kolon (5 µm, 100 × 4.6 mm) kullanılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

YÖNTEMLER

Hareketli Fazın Hazırlanışı

Hareketli faz için kullanılmış olan tampon çözeltisi 150 mg %98 saflıktaki formik asit ile 300 mg %99 saflıktaki amonyum asetat bir miktar YBSK saflıktaki su ile çözülmüş ve hacmi YBSK saflıktaki su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan çözelti 0.45 µm gözenek çaplı steril selüloz asetat filtreden süzüldükten sonra YBSK cihazının pompa ünitesi kullanılarak istenen oranlarda (MeOH:Tampon çözeltisi, 60:40, h/h, pH:4.457) MeOH ile karıştırılarak sisteme verilmiştir.

Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

ARP standart çözeltisinin hazırlanması için, 45.82 mg standart madde tartılıp 60 mL MeOH ile çözüldükten sonra hacmi YBSK saflıktaki su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi $1.02x10^{-3}$ M (0.4582 $mg.mL^{-1}$, 458.2 ppm) olarak hesaplanmıştır. Hazırlanmış olan çözelti YBSK saflıkta su ile seyreltilerek çalışma aralığına uygun çözeltiler elde edilmiştir.

DİF standart çözeltisinin hazırlanması için, 12.65 mg standart madde tartılıp 30 mL MeOH ile çözüldükten sonra hacmi YBSK saflıktaki su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin derişimi $1.01x10^{-3}$ M (0.253 $mg.mL^{-1}$, 253 ppm) olarak hesaplanmıştır. Hazırlanmış olan çözelti YBSK saflıktaki su ile seyreltilerek çalışma aralığına uygun çözeltiler elde edilmiştir.

Örnek Çözeltilerin Hazırlanışı

10 adet ilaç tableti hassas terazide tartılmış ve tartım sonuçlarına göre ortalama tablet ağırlığı hesaplanmıştır. Tabletler toz haline getirildikten sonra 100 mL hacme sahip balon jojelere aktarılmıştır. 60 mL metanol eklenmiş ve hacim YBSK saflıktaki su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Tabletlerin dağılma işleminin hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesi için balon jojeler içlerine birer adet magnet atıldıktan sonra manyetik karıştırıcıda 20 dk bekletilmiştir. Manyetik karıştırıcıdan alınan balon jojeler 5 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Elde edilen homojen çözeltiden 10'ar mL santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 10 dk, 4000 rpm hızda santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işleminden sonra, üstteki süpernatanttan enjektörler aracılığıyla 2'şer mL çekilmiş ve PVDF filtreler yardımıyla süzülerek viallere aktarılmıştır. Viallerdeki çözeltilerden 6 µL, IS çözeltisinden 100 µL ve %60 MeOH çözeltisinden 894 µL alınarak yeni bir viale aktarılıp analizler yapılmıştır. Bu şekilde kalibrasyon aralığında orta bölgeye denk gelecek şekilde (4.0144×10^{-6} M) örnek çözeltisi hazırlanmıştır.

Analiz Parametreleri

UV-spektrofotometrisi ile yapılan çalışmalarda maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boylarını tespit edebilmek amacıyla 190 – 400 nm dalga boyu aralığında spektrum taramaları yapılmıştır. Yapılan taramalarda tarama modu tek, tarama hızı orta olarak çalışılmıştır. Örnekleme aralığı 0.2 nm, ışık yolu uzunluğu 1.0 cm, aralık genişliği ise 0.5 nm olarak incelemeler yapılmıştır.

YBSK analizleri için hazırlanmış olan mobil faz kolona 0.5 $mL.dk^{-1}$ akış hızıyla gönderilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C, enjeksiyon hacmi 5 µL olarak ayarlanmıştır. Analiz sonuçları, 255 nm dalga boyuna ayarlanmış, 6.25 Hz sinyal

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

toplama frekansı ile çalışan ve 1.2 nm slit genişliğine sahip olan foto diyot dizisi detektörü aracılığı ile cihaza bağlı bir bilgisayara kaydedilmiştir.

Her 10 analiz sonrasında kolondan metanol:su (80:20, h/h) çözeltisi geçirilmiş ve kolonun tekrar şartlandırılması sağlanmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Üçer kez tekrarlanan analizler sonucu elde edilen piklerin alanları ve tutunma zamanlarından faydalanılarak, pik normalizasyonu yöntemiyle PN değerleri hesaplanmış ve elde edilen değerler IS çözeltisinden elde edilen piklerden hesaplanan PN değerlerine oranlanarak değerlendirmeler yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri hesaplanarak yöntemin en düşük hangi konsantrasyonlarda uygulanabileceği belirlenmiş ve doğrusallık denklemleri kullanılarak ARP'nin tabletlerdeki miktarları hesaplanmıştır. Validasyon ve sistem uygunluk testleri Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) tavsiyelerine uygun olarak yapılmıştır. Yapılan testler sonucunda yöntemin yeterli analitik kalitede veri sağladığı tespit edilmiştir.

Yöntem Geçerliliğinin Tespiti (Validasyon)

Yöntemin geçerliliğinin tespiti için ICH kılavuzunda belirtilen şekilde seçicilik, doğruluk, kesinlik, saptama sınırı, tayin alt sınırı, doğrusallık ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır.

Seçicilik

Analitik bir yöntemin seçiciliği, numunede var olan safsızlıkların varlığında analitin tamamının ölçülebilme yeteneğidir. Yöntemin seçiciliğini incelemek için iki farklı analiz kolonu ile analizler yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve herhangi bir pozitif ya da negatif girişime rastlanmamıştır. Ayrıca analitlerin ve IS piklerinin saflıkları PDA dedektör ile kontrol edilmiştir.

Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, analizler sonucu elde edilen değerlerin doğru değer olarak kabul edilmiş değere yakınlığını ifade etmektedir. Analitik bir yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için gerçek değere ne kadar yaklaşıldığının bir göstergesi olan geri kazanım değerleri kullanılır. Önceden analizi yapılmış tablet çözeltisi içerisine düşük, orta ve yüksek seviyelerine denk gelecek şekilde ARP ilave edilmiştir. Her derişim seviyesi için üçer set hazırlanıp analiz gerçekleştirilmiş ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Kesinlik

Analitik bir yöntemin kesinliği, belirli koşullarda aynı homojen örnekten yapılan çoklu analiz serilerinin sonuçlarının birbirlerine olan yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik çalışmaları iki ayrı seviyede yapılmıştır. Tekraredilebilirlik ve ara kesinlik. Tekraredilebilirlik, kısa bir zaman aralığı sonrası aynı uygulama şartları altındaki kesinliği ifade etmektedir. Ara kesinlik, farklı günlerde yapılan çalışmaların kesinliğini ifade etmektedir. Doğrusallık çalışmaları için derişimleri sırasıyla, $1.032x10^{-5}$ M, $1.031x10^{-4}$ M olan ARP ve DİF çözeltilerinden belirli oranlarda, bir viale alınarak aynı gün içerisinde ve ardışık üç gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde ortalama,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ortalamanın standart hatası (SEM), SS, %BSS, ortalamanın %95 güven seviyesindeki olası sınırları parametreleri kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

Saptama sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ)

Analitik bir yöntemin saptama sınırı (LOD), bir örnekteki analitin kesin bir miktar değeri gerektirmeksizin saptanabildiği en düşük derişimidir. Tayin sınırı (LOQ) ise bir örnekteki analitin, uygun kesinlik ve doğruluk ile miktarının belirlenebildiği en düşük derişimidir. LOD ve LOQ değerleri, standart sapma ve kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Kesimin standart sapmasının eğime oranlanmasıyla elde edilen değer saptama sınırı için 3.3, tayin sınırı için ise 10 ile çarpılmıştır. Hesaplamada kullanılan istatistiksel veriler doğrusallığın günler arası çalışmalarından elde edilmiştir.

Doğrusallık

Analitik bir yöntemin doğrusallığı, örnekteki analitin derişimi ile doğrudan orantılı test sonuçlarının elde edilebilmesini ifade eder. Doğrusallığı ifade etmek için korelasyon katsayısı (r) adı verilen bir parametre kullanılır. Doğrusallığı belirlemek amacıyla $1.032x10^{-5}$ M derişiminde ARP çözeltisi hazırlandıktan sonra bu çözeltiden seyreltmeler yaparak $5.1605x10^{-7}$ – $9.2889x10^{-6}$ M derişim aralıklarında on farklı çözelti analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların derişime karşı grafiğe aktarılmasıyla doğrusallık ifade edilmiştir. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olarak incelenmiştir. Doğrusal regresyon analiziyle eğim, kesim, korelasyon katsayısı ile eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

Sistem uygunluk testleri

Sistem uygunluk testleri, kullanılan YBSK cihazının ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin hesaplanması ile gerçekleştirilen ve yöntemin uygulanmış olduğu cihazın performansı hakkında bilgi veren testlerdir. Bu testlerde ayırım gücü (Rs), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (As), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k) ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler kullanılır. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri ARP ve IS için USP metoduna göre Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan formüller **Çizelge 1**'de verilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 1. USP Eşitlikleri

Parametre	Eşitlik	
N	$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	*N*: teorik tabaka sayısı t_R: alıkonma zamanı *W*: pik genişliği
T	$T = \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$	*T*: kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
As	$As = \frac{\beta_{0.10}}{\alpha_{0.10}}$	*As:* asimetri faktörü $\beta_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Rs	$Rs = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	*Rs*: ayırım gücü t_R: alıkonma zamanı t_{Rp}: önceki pikin alıkonma zamanı *W*: pik genişliği W_p: önceki pikin pik genişliği
k'	$k' = \frac{t}{t_0} - 1$	*k'* = kapasite faktörü *t*: alıkonma zamanı t_0: ölü zaman
A	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	α: bağıl alıkonma zamanı k'_1: birinci pikin kapasite faktörü k'_2: ikinci pikin kapasite faktörü t_1: birinci pikin alıkonma zamanı t_2: ikinci pikin alıkonma zamanı t_0: ölü zaman

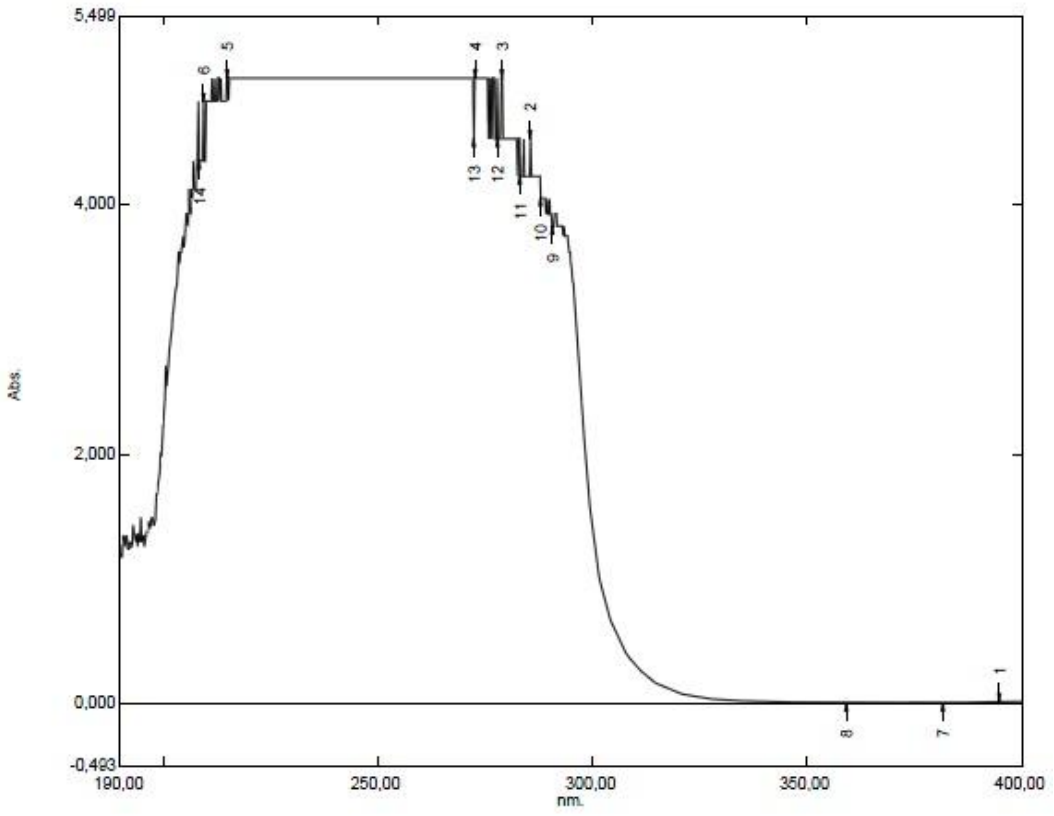
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BULGULAR ve TARTIŞMA

ARP analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniğinin seçilmiş olmasındaki en önemli faktörler, bu tekniğin yüksek ayırma gücü, doğruluk ve tekraredilebilirlik gibi önemli özelliklere sahip olmasıdır. YBSK günümüzde kalite kontrol laboratuvarlarında sıklıkça tercih edilen bir tekniktir. Her ne kadar çözücü maliyeti ve uzun analiz süresi gibi bazı dezavantajları olsa da elde edilen sonuçların kesinliği ve aralarındaki istatiksel uyum bu tekniğin ön plana çıkmasını sağlamaktadır. Avantajları ve dezavantajları göz önünde bulundurularak YBSK tekniğine karar verildikten sonra, bu teknikle maddenin analizinin gerçekleştirilebileceği bir yöntemin geliştirilmesi çalışmalarına başlanmıştır. Analiz süresinin en kısa, sonuçların en iyi ve maliyetin olabildiğince düşük olabilmesi için farklı hareketli ve sabit fazlar denenmiş ve en uygun analiz koşulları saptanmıştır. Geliştirilmiş olan yöntemin geçerliliğinin de sağlanmasıyla ticari tabletlere uygulaması yapılmıştır.

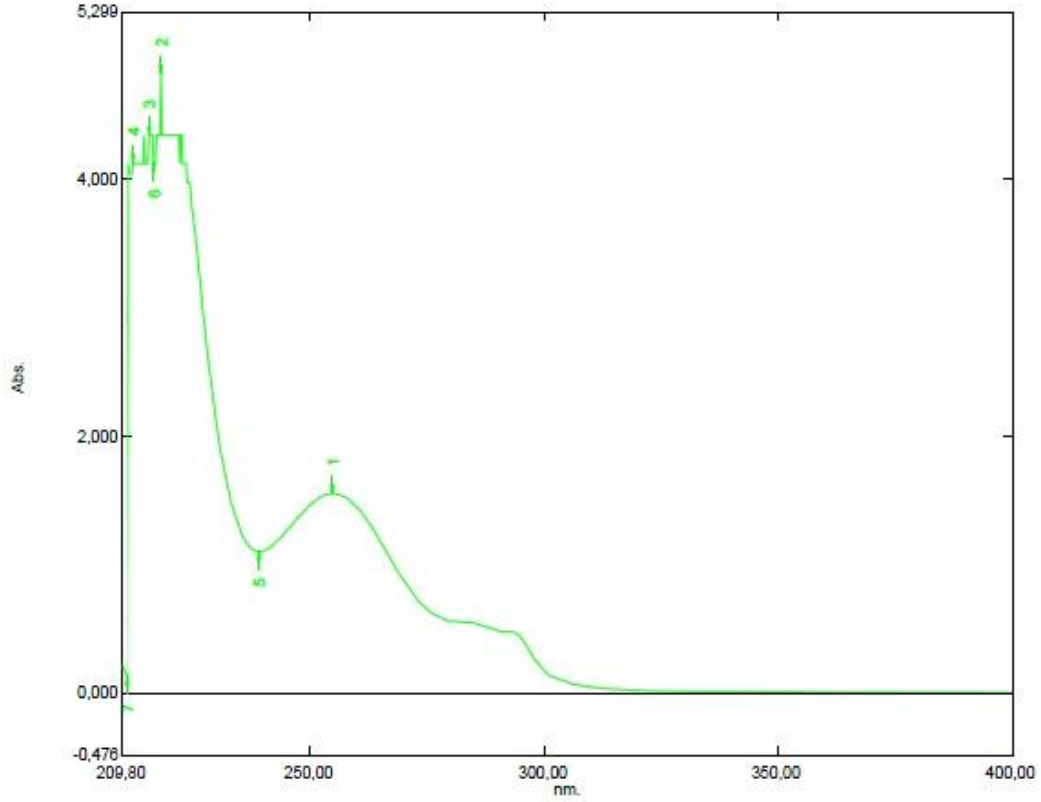
Aripiprazol'ün UV Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Yöntem geliştirme çalışmaları için öncelikle ARP'nin UV-görünür bölgedeki davranışları incelenmiştir. İnceleme için ARP'nin $1.01x10^{-3}$ M derişime sahip stok çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden $1.01x10^{-7}$ M derişimine kadar seyreltmeler yapılarak 5 farklı derişimde çözelti elde edilmiştir. Çözeltilerin hazırlanmasında, ARP'nin metanolde çözünürlüğünün iyi olmasından dolayı çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Elde edilen çözeltilerin sırasıyla metanol çözeltisine karşı spektrumları alınmıştır. Alınan spektrumlara göre çalışılacak dalga boyu ve çalışmalar sırasında inilebilecek derişim hakkında bilgi edinilmiştir.

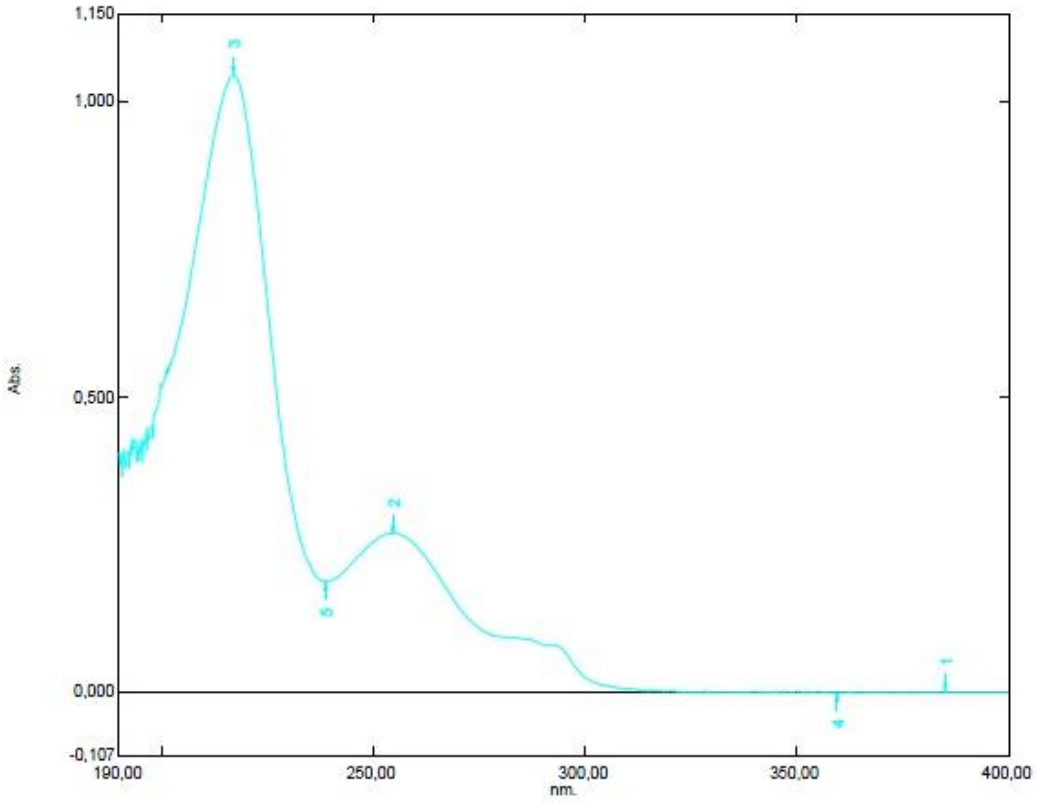


Şekil 3. $1.01x10^{-3}$ M ARP spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

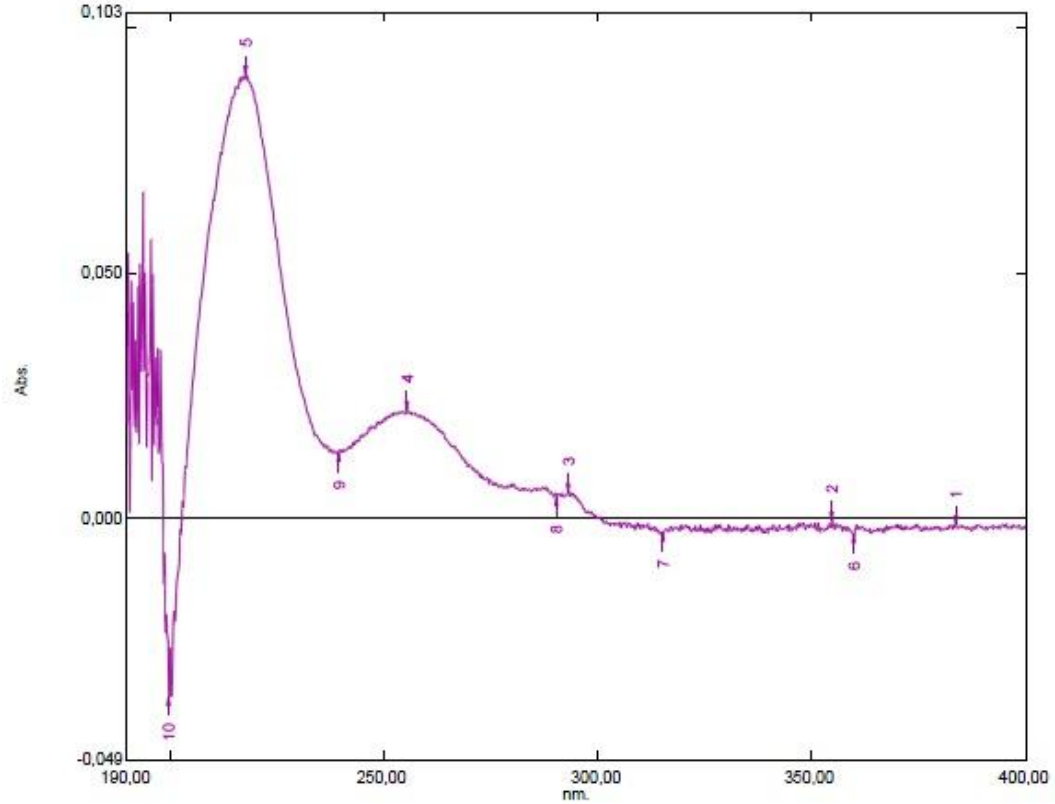


Şekil 4. 1.01x10^{-4} M ARP spektrumu (1: 254.60 nm, 2: 218.00 nm)

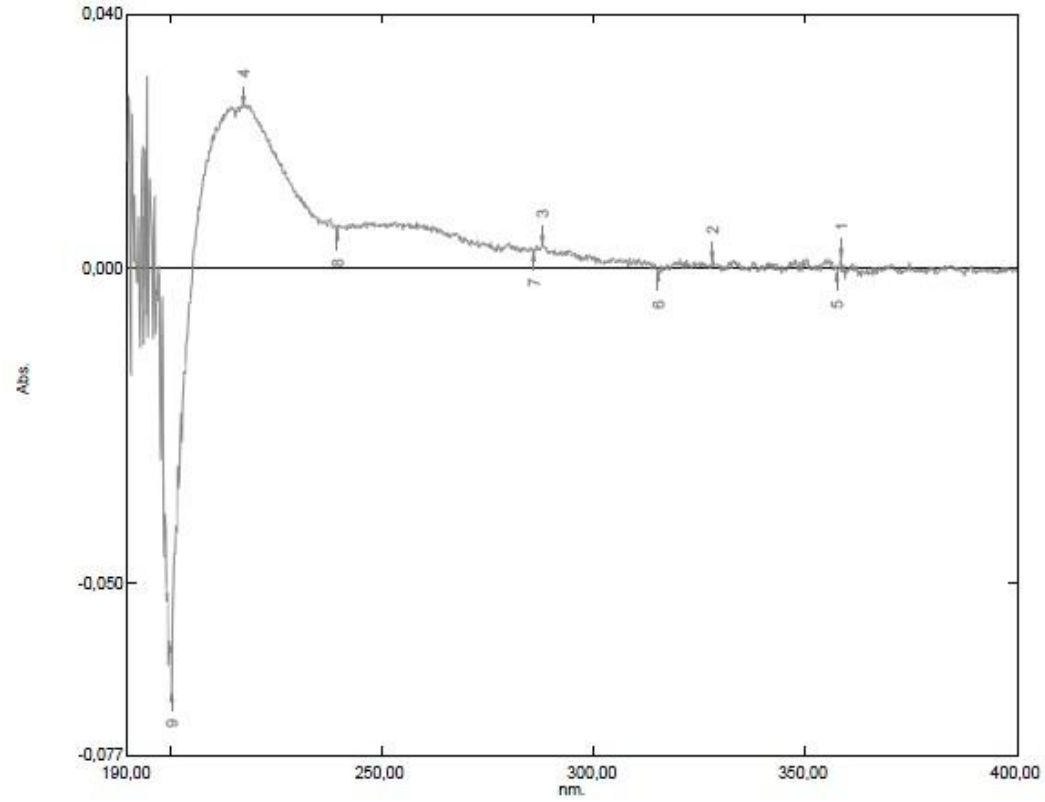


Şekil 5. 1.01x10^{-5} M ARP spektrumu (2: 254.60 nm, 3: 217.00 nm)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 6. 1.01x10^{-6} M ARP spektrumu (4: 255.40 nm, 5: 217.80 nm)



Şekil 7. 1.01x10^{-7} M ARP spektrumu (4: 217.20 nm)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Spektrumlara bakıldığında, tepe noktaları göz önüne alındığında ARP'nin en iyi absorbans verdiği dalga boyları 217 ve 255 nm oldukları belirlenmiştir. $1.01x10^{-7}$ M derişime sahip örneğin spektrumu incelendiğinde 255 nm'de absorbansın oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum göz önüne alındığında bu derişimde 255 nm dalga boyunda çalışmanın zor olacağı kanısına varılmıştır. Spektrumların değerlendirilmesi sonucunda 217 ve 255 nm dalga boylarının analiz için en uygun dalga boyları olduğu saptanmıştır. Derişimler kıyaslandığında ise, en iyi spektrum elde edilen en düşük derişimin $1.01x10^{-6}$ M derişimi olduğu belirlenmiştir. Madde sarfiyatının minimum elde edilecek absorbansın da maksimum olması açısından 10^{-6} M derişimde 217 ve 255 nm dalga boylarında çalışmanın en uygun koşullar olacağına karar verilmiştir.

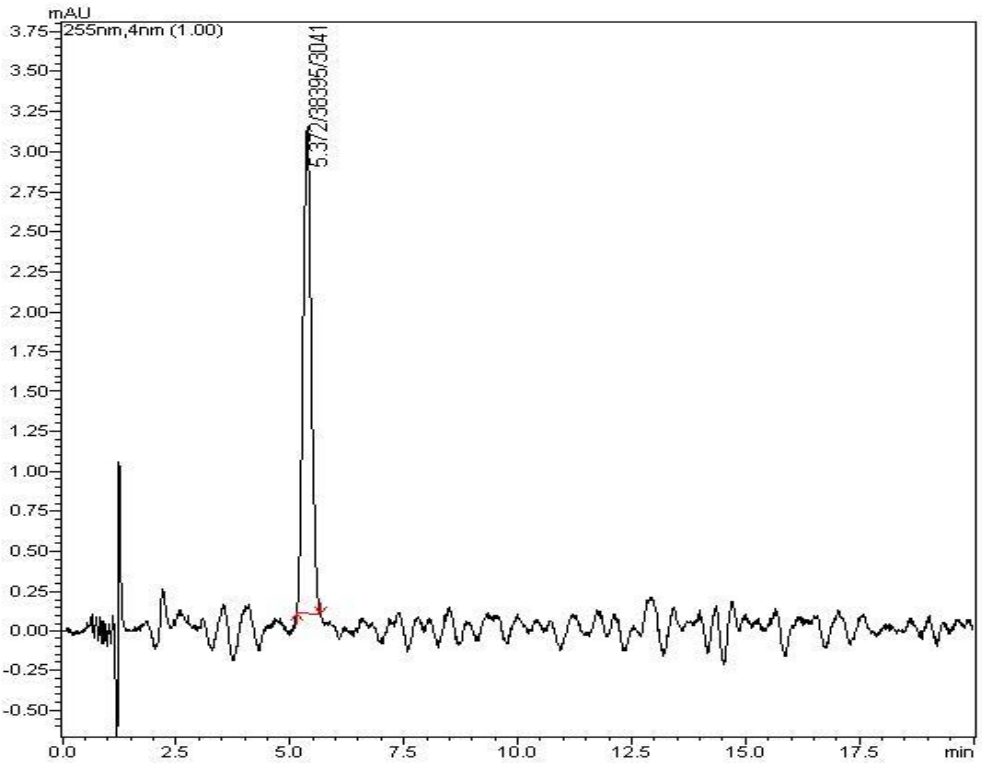
Aripiprazol'ün YBSK Yöntemi ile Analizi

Yöntem geliştirme

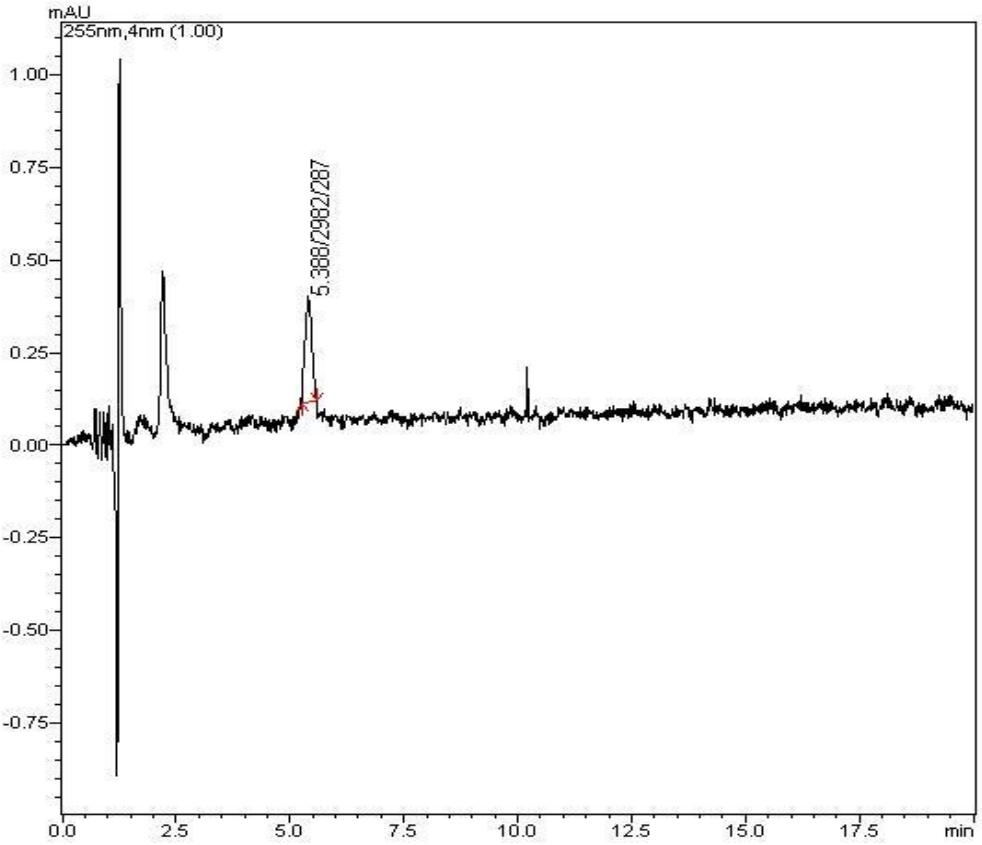
Hareketli fazın seçilmesi aşamasında, sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan metanol, asetonitril, su ve çeşitli tampon türlerini içeren çözeltiler denenmiştir. ARP orta seviyede polaritesi (logP=4.5) olan, zayıf bazik karakterli (pKa=7.6) bir maddedir. ARP'nin özellikleri ile daha önce yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, hareketli faz için metanol ve %0.1 oranında formik asit, %0.2 oranında amonyum asetat içeren bir tampon çözeltisinin uygun olabileceği düşünülmüştür. ARP ile ilgili çalışmaların incelenip değerlendirilmesi sonucunda, bu mobil faz için bileşimin metanol:tampon (70:30, h/h) şeklinde olmasının uygun olacağı belirlenmiş ve bu oranlarda mobil faz hazırlanarak çalışmalara başlanmıştır.

Mobil faz bileşiminin ARP'nin analizi için ne kadar etkili olacağı araştırılmıştır. 10^{-3} M derişime sahip bir stok çözeltisi hazırlanıp, bu stok çözeltiden 10^{-5}, 10^{-6} ve 10^{-7} M derişimlerde çözeltiler elde edecek şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Mobil faz hazırlanıp, kolon sıcaklığı 30 dereceye ayarlandıktan sonra hazırlanmış olan çözeltiler sırasıyla 1 mL/dk akış hızında sisteme verilmişlerdir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

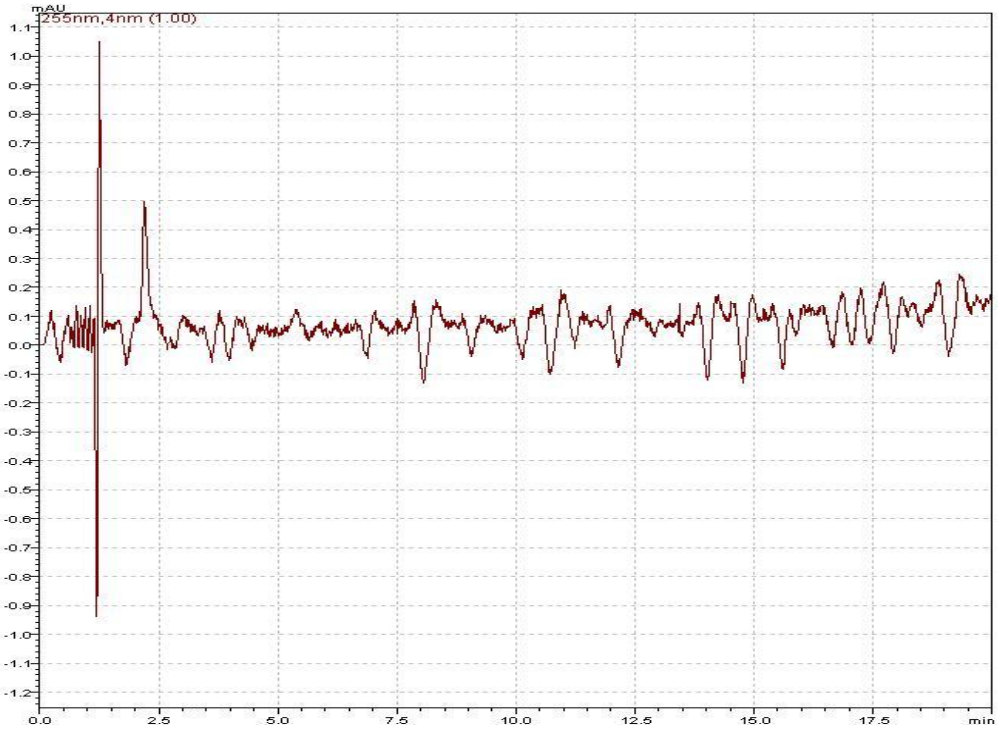


(a)



(b)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

Şekil 8. ARP'nin 10^{-5} (a) , 10^{-6} (b) ve 10^{-7} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinin ardından, iç standart belirlemek üzere çalışmalara başlanmıştır. İç standart olarak kullanılabilecek maddeler araştırılmış ve çözünürlük (logP) ve asitlik karakterlerine (pKa) göre ARP ile en yakın özellikteki maddeler belirlenmiştir. Yapılan araştırmalara göre belirlenen maddeler şu şekildedir: Diflunisal (DİF), Albendazol (ALB), Amlodipin(AML), Verapamil(VER), Essitalopram(ESS), Droperidol(DRO) ve Klorfeniramin Maleat(KM).

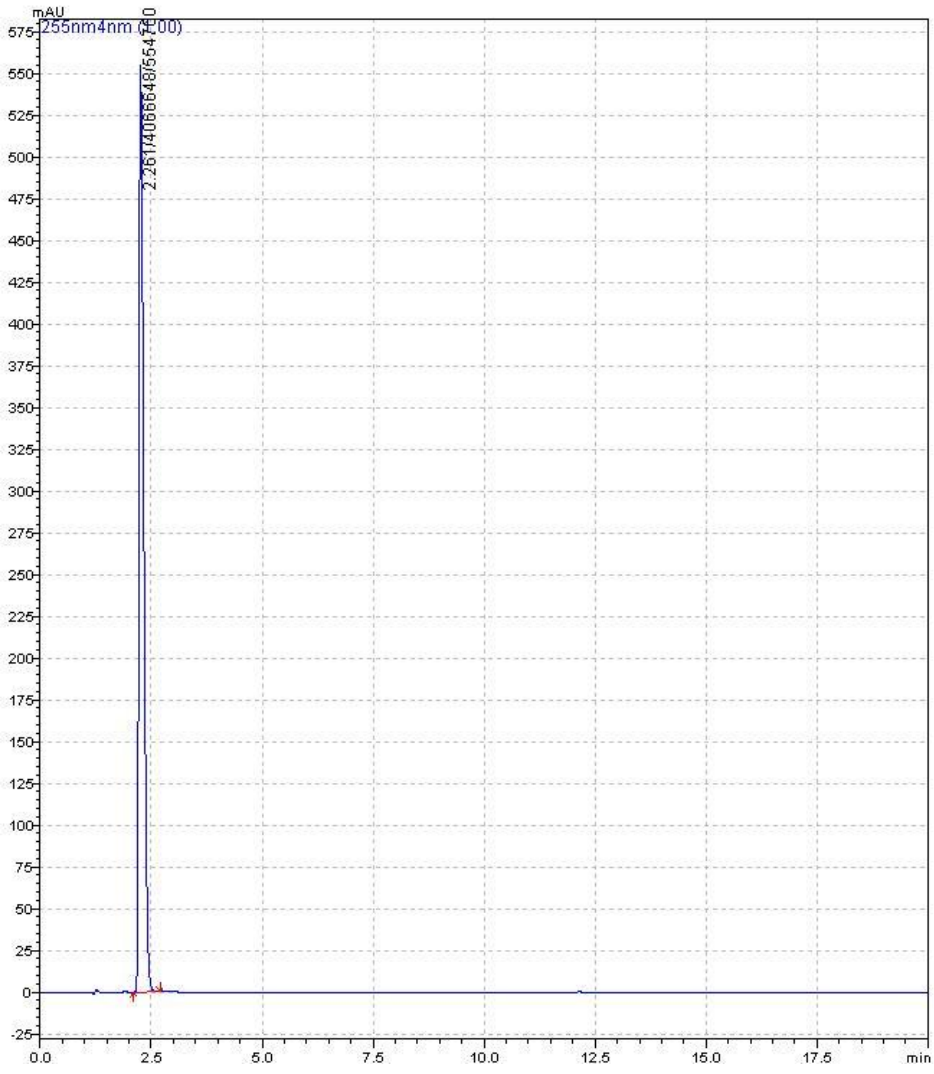
Çalışmalara ilk olarak DİF ile başlanılmıştır. Analiz için öncelikle 10^{-3} M derişime sahip olacak şekilde bir stok çözeltisi hazırlanmış olup daha sonrasında bu çözeltiden 10^{-5} ve 10^{-6} M derişimleri elde edecek şekilde seyreltmeler yapılarak yeni çözeltiler hazırlanmıştır. Daha önce ARP ile yapılan analizde kullanılan şartlar aynı şekilde uygulanmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

İç standart belirlemek için yapılan çalışmalara, ALB analizleri ile devam edilmiştir. Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra, 10^{-3} M derişime sahip olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden 10^{-5} M ve 10^{-6} M derişimine sahip çözeltileri elde etmek için gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Elde edilen çözeltiler aynı analiz koşulları altında incelenmiştir.

Çalışmalara, iç standart olabilecek maddelerden bir diğeri olan AML ile devam edilmiştir. Analiz için AML'nin 10^{-3} M derişime sahip stok çözeltisi hazırlandıktan sonra, bu stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 10^{-5} M ve 10^{-6} M derişimlere sahip çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanmış olan çözeltiler sırasıyla, aynı analiz koşullarında analiz edilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

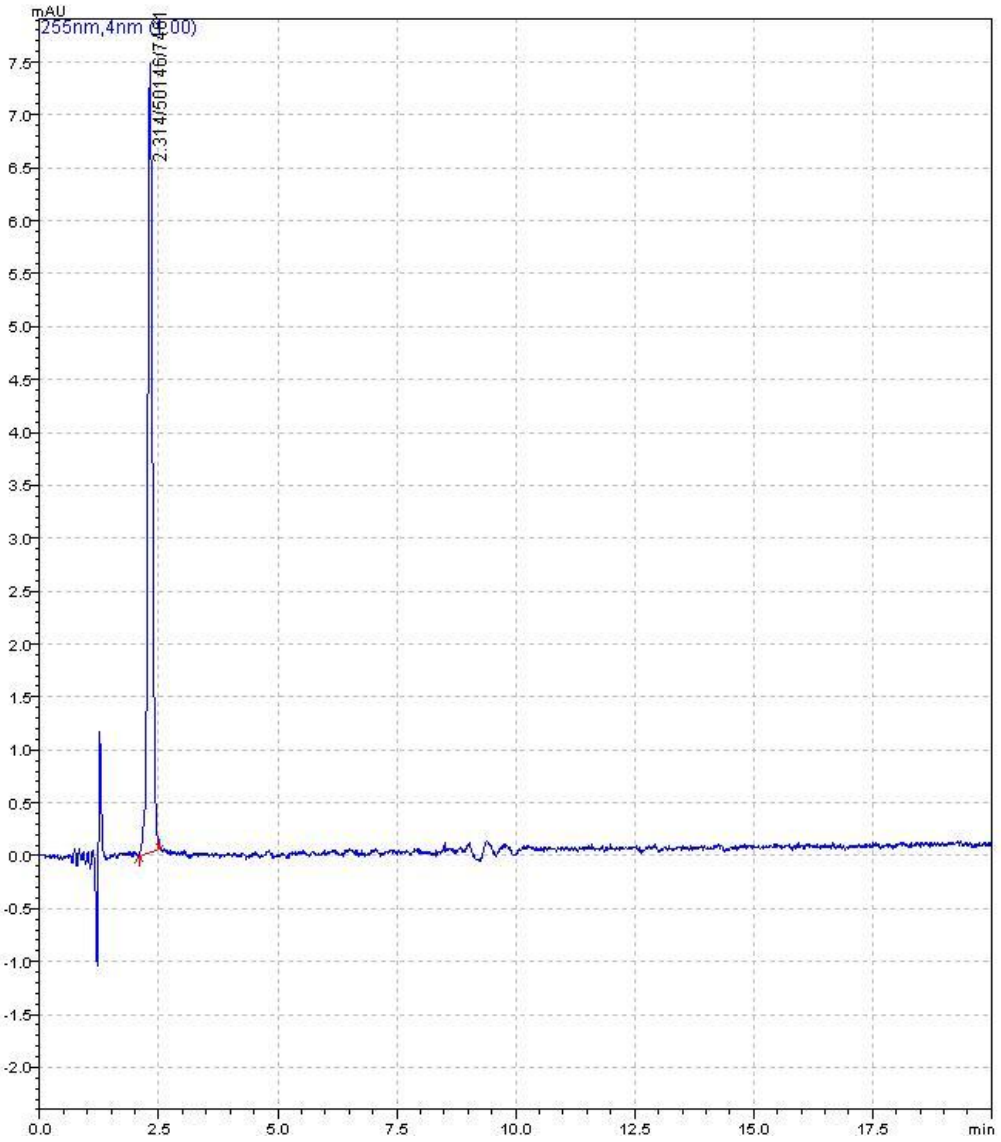
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çalışmalara; DRO, ESS, KM ve VER maddelerinin analizleriyle devam edilmiştir. Hesaplamalar yapıldıktan sonra, 10^{-3} – 10^{-5} M derişim aralığında çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler aynı analiz koşullarında analiz edilmişlerdir.



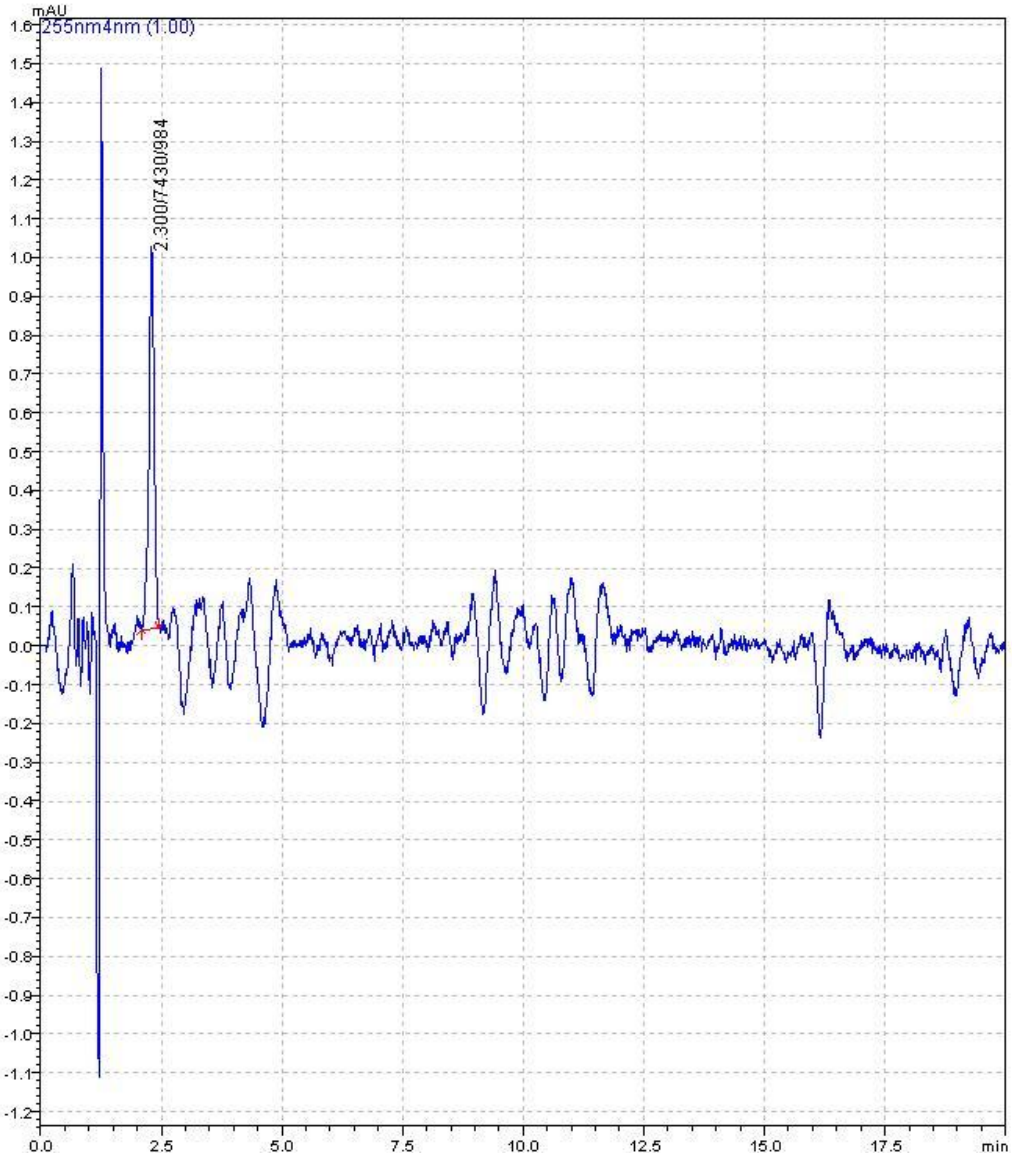
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(b)

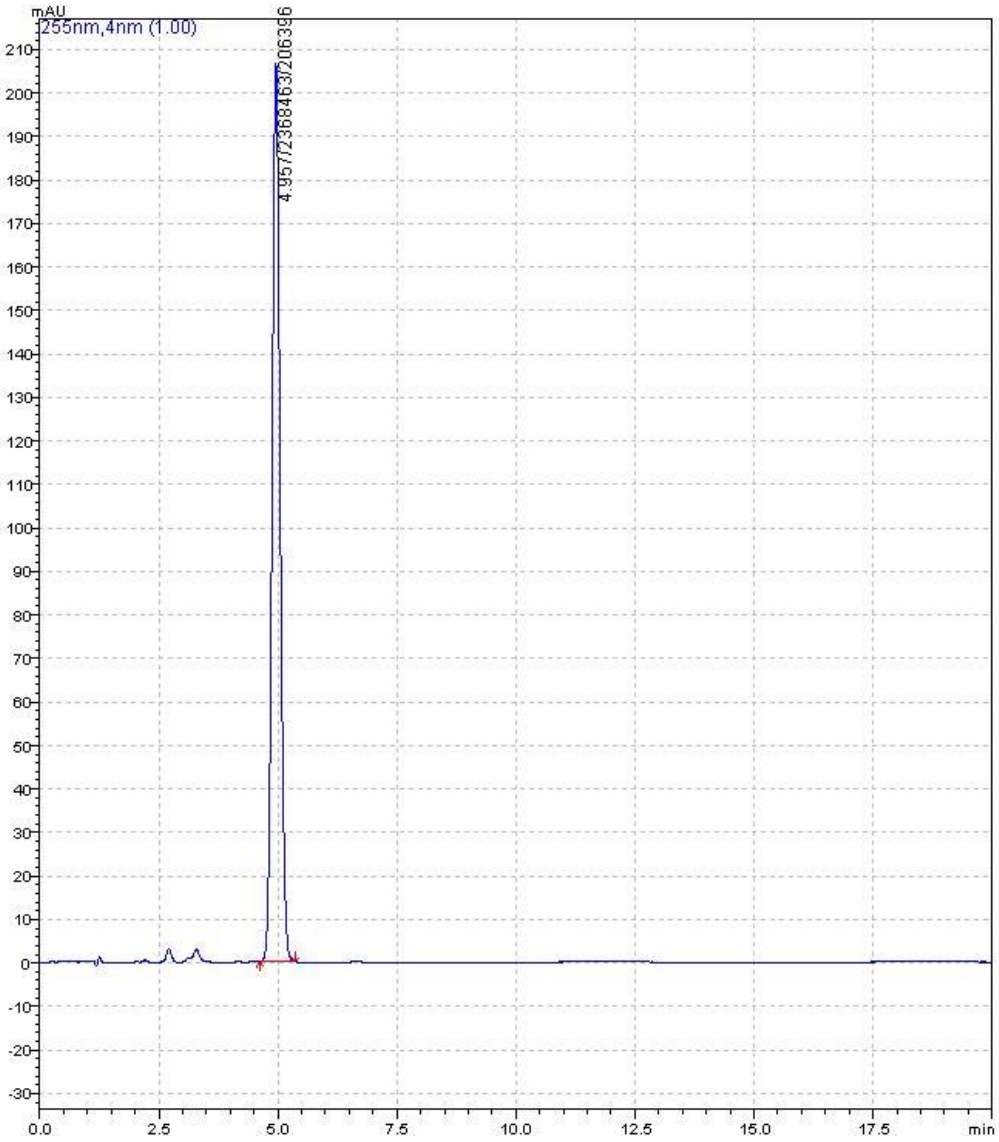
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

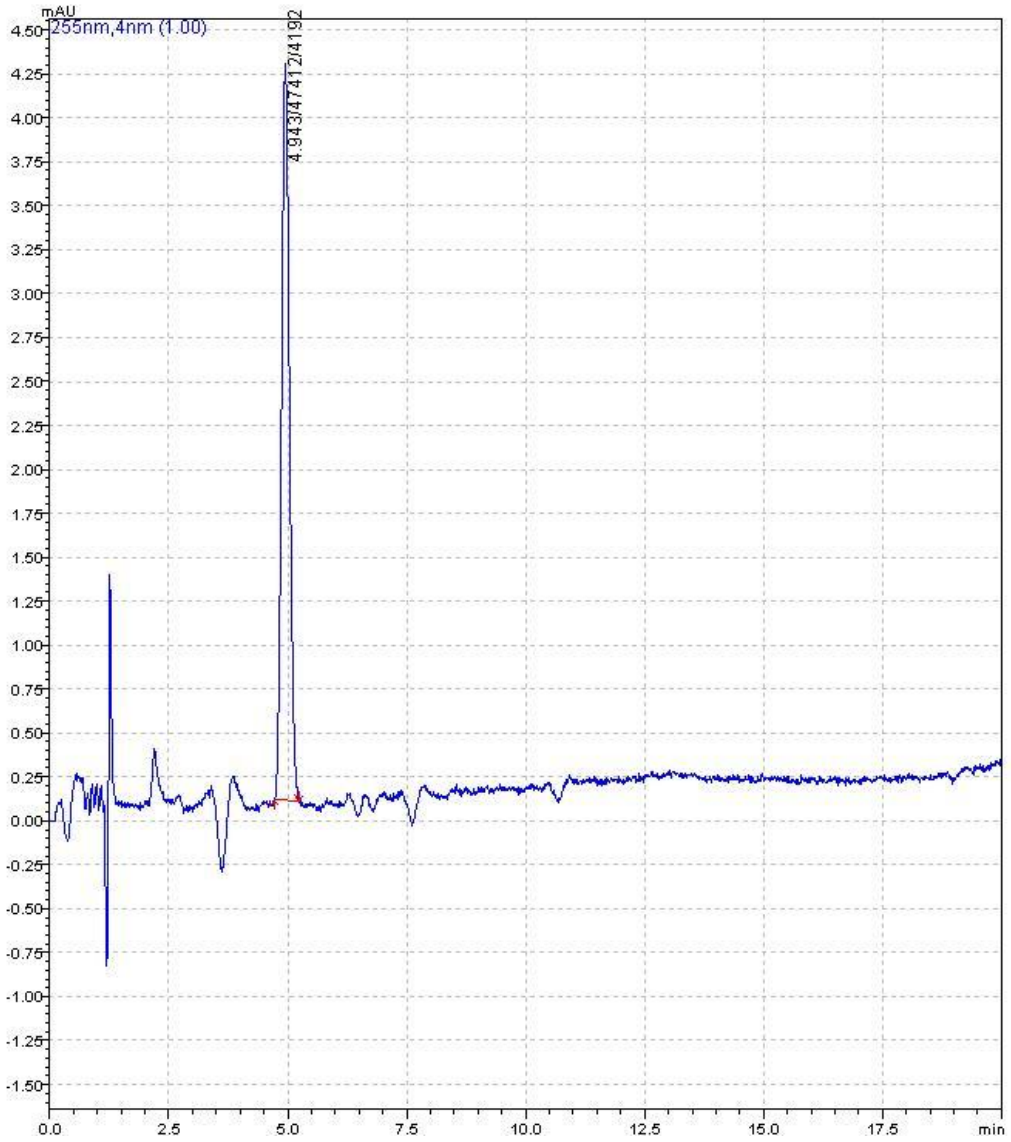
Şekil 9. DİF'in 10^{-3} (a) , 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



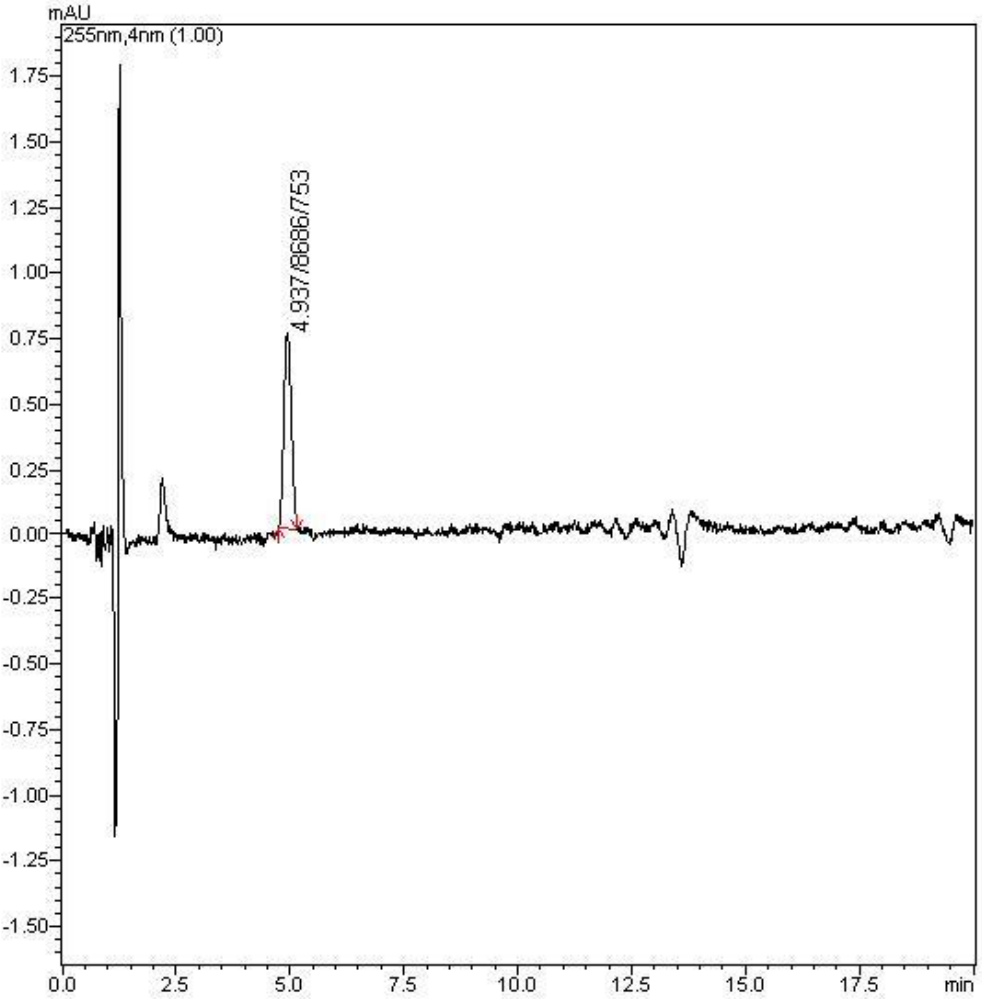
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(b)

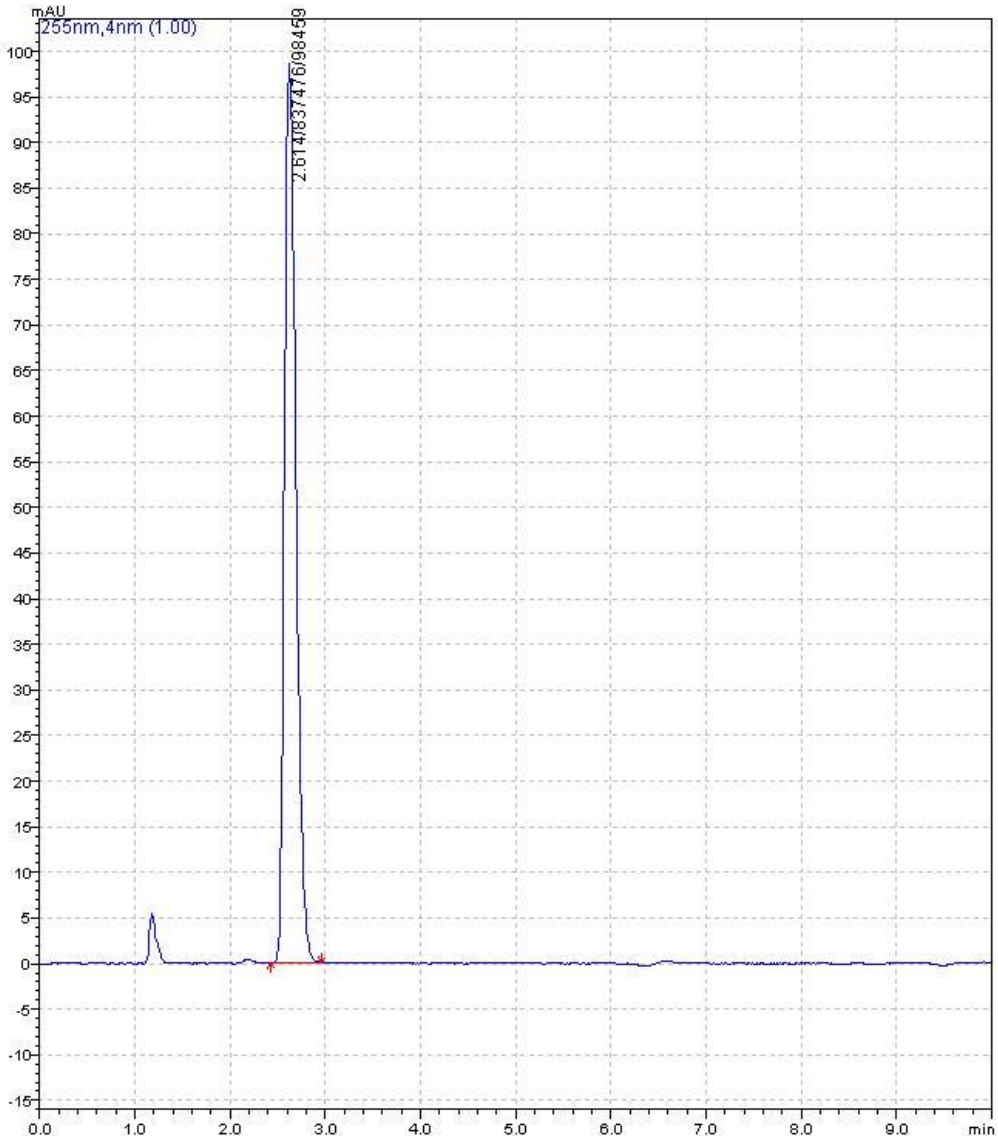
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

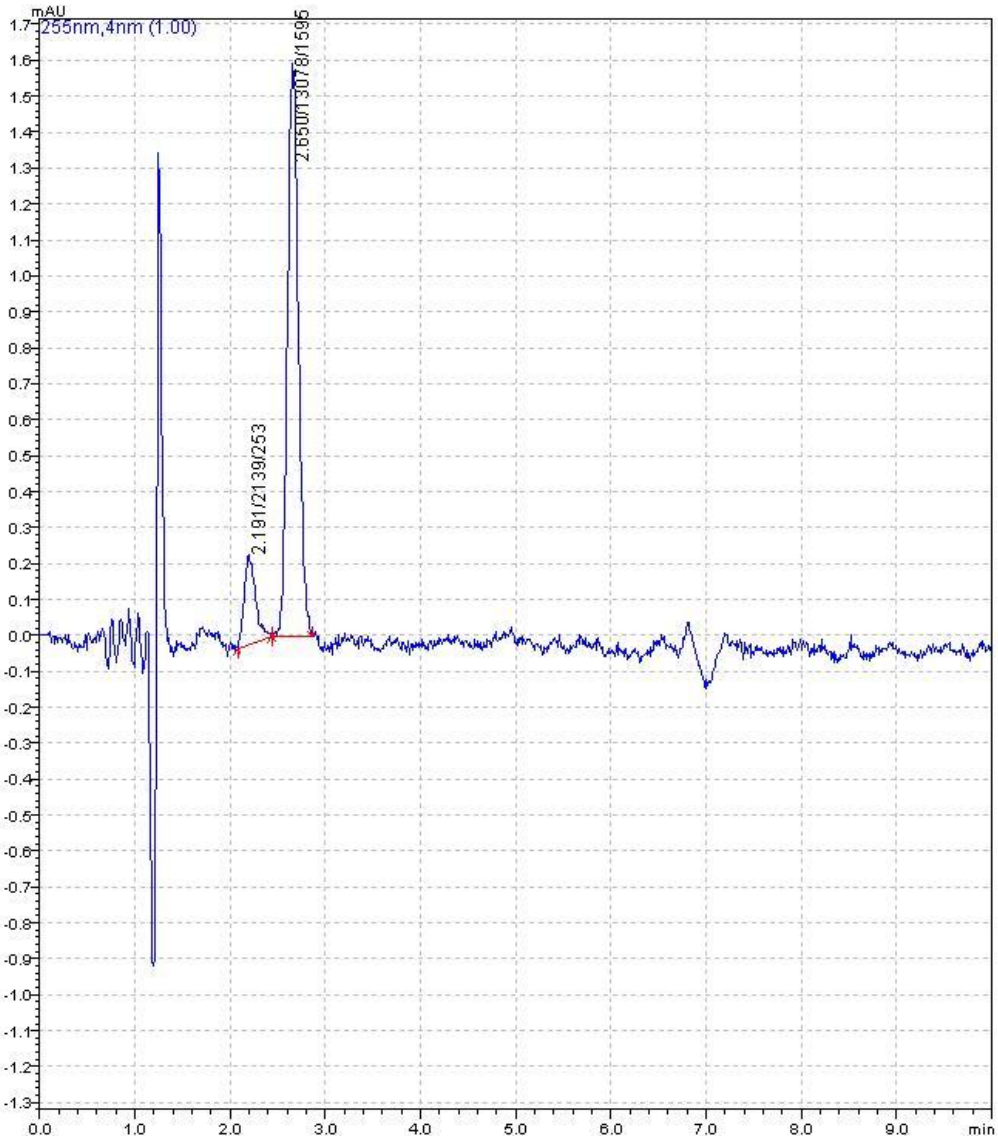
Şekil 10. ALB'nin 10^{-3} (a) , 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



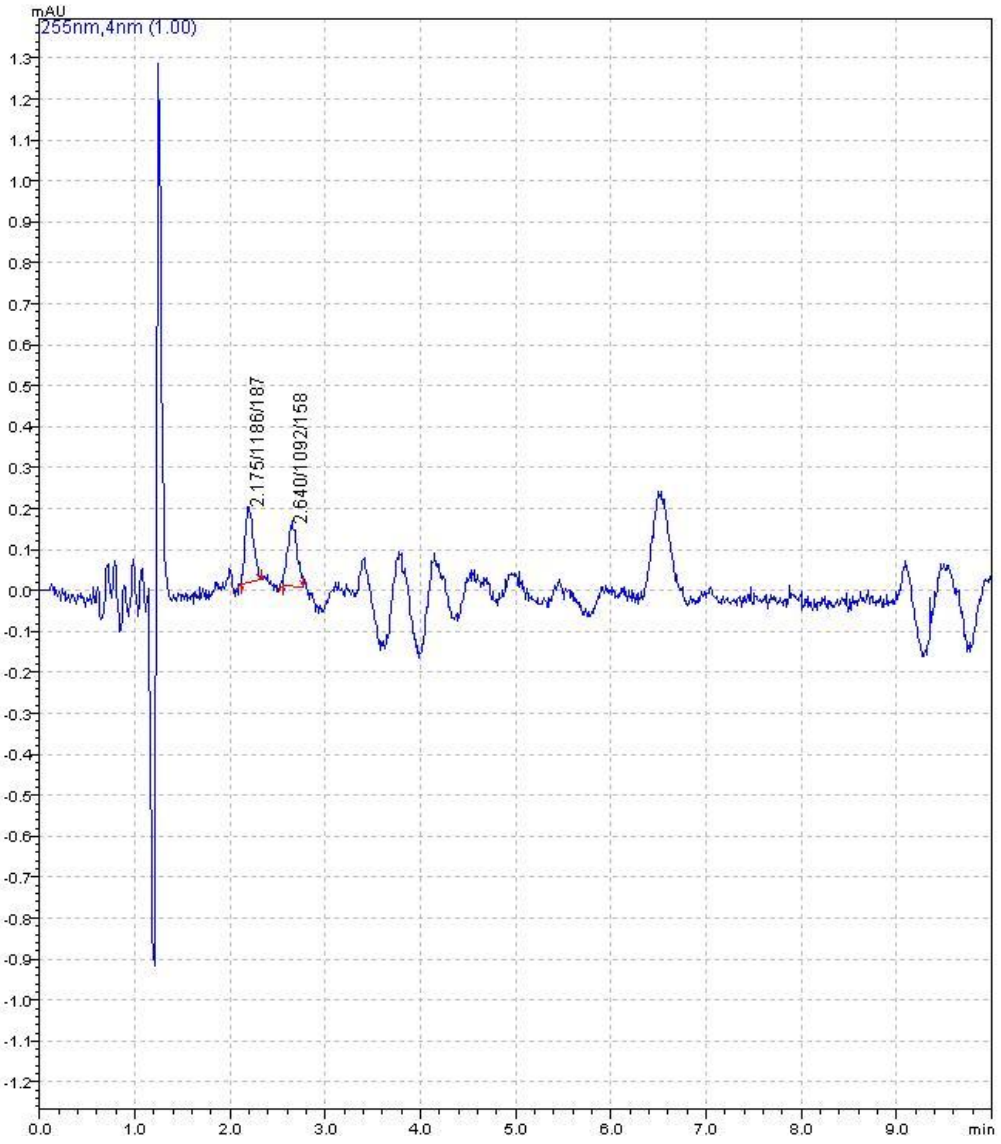
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(b)

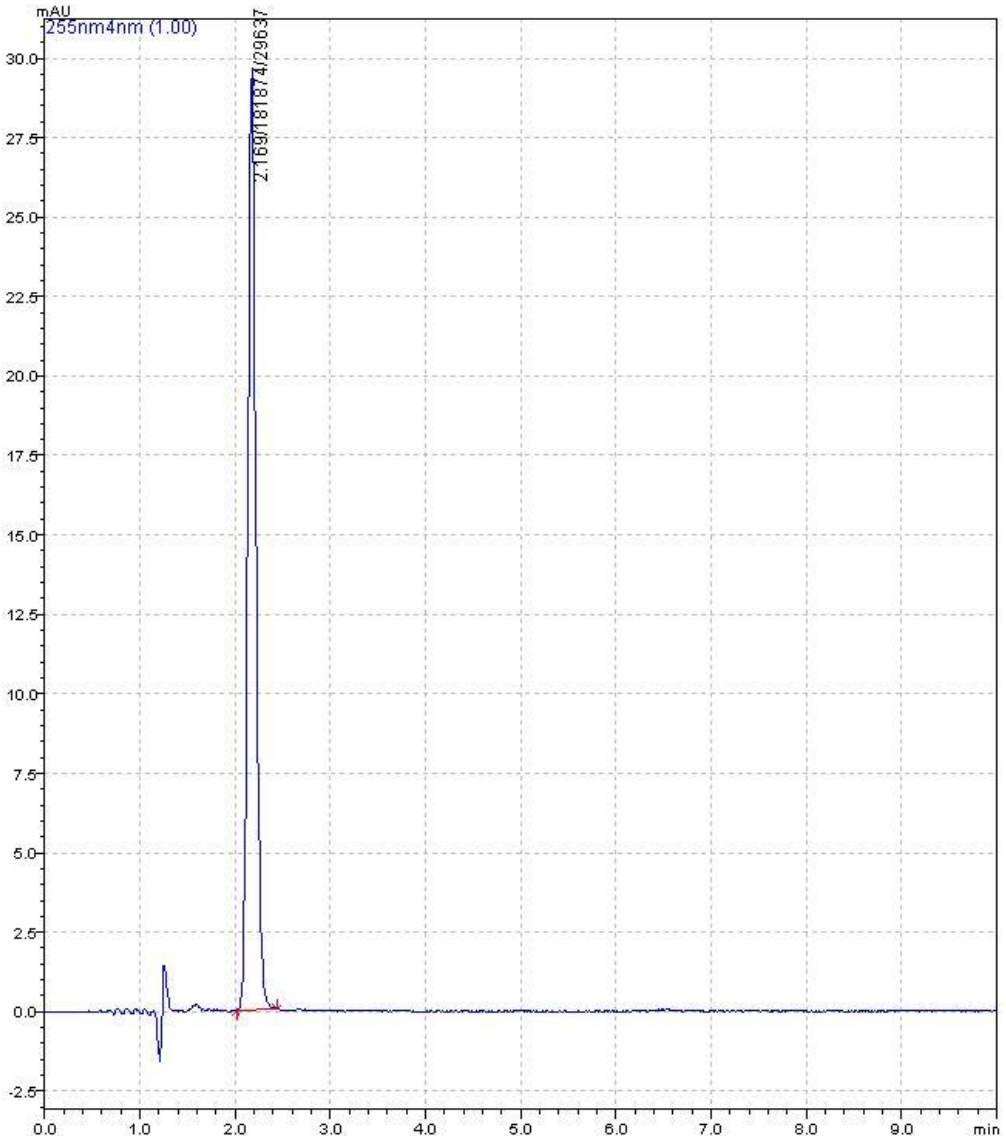
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

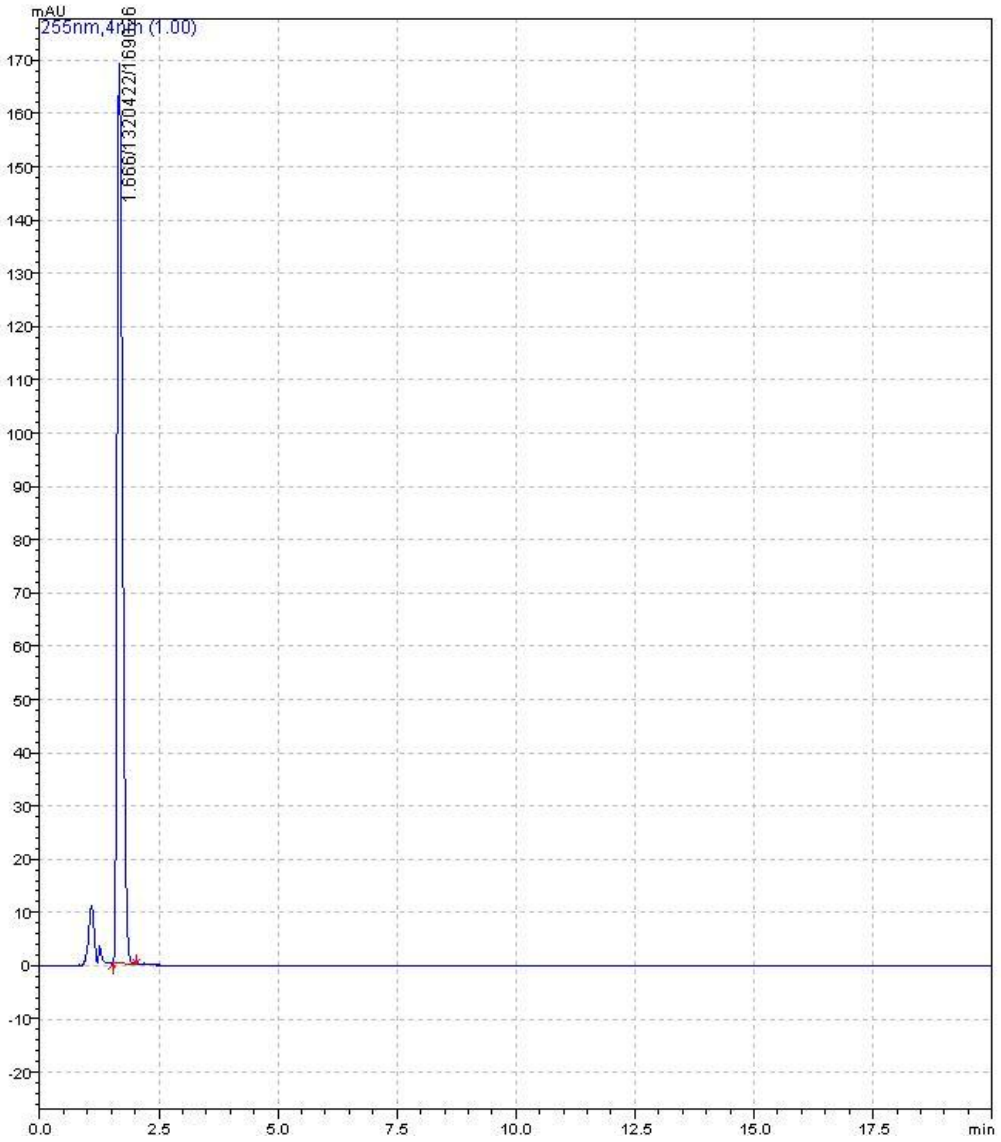
Şekil 11. AML'nin 10^{-3} (a) , 10^{-5} (b) ve 10^{-6} M (c) derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



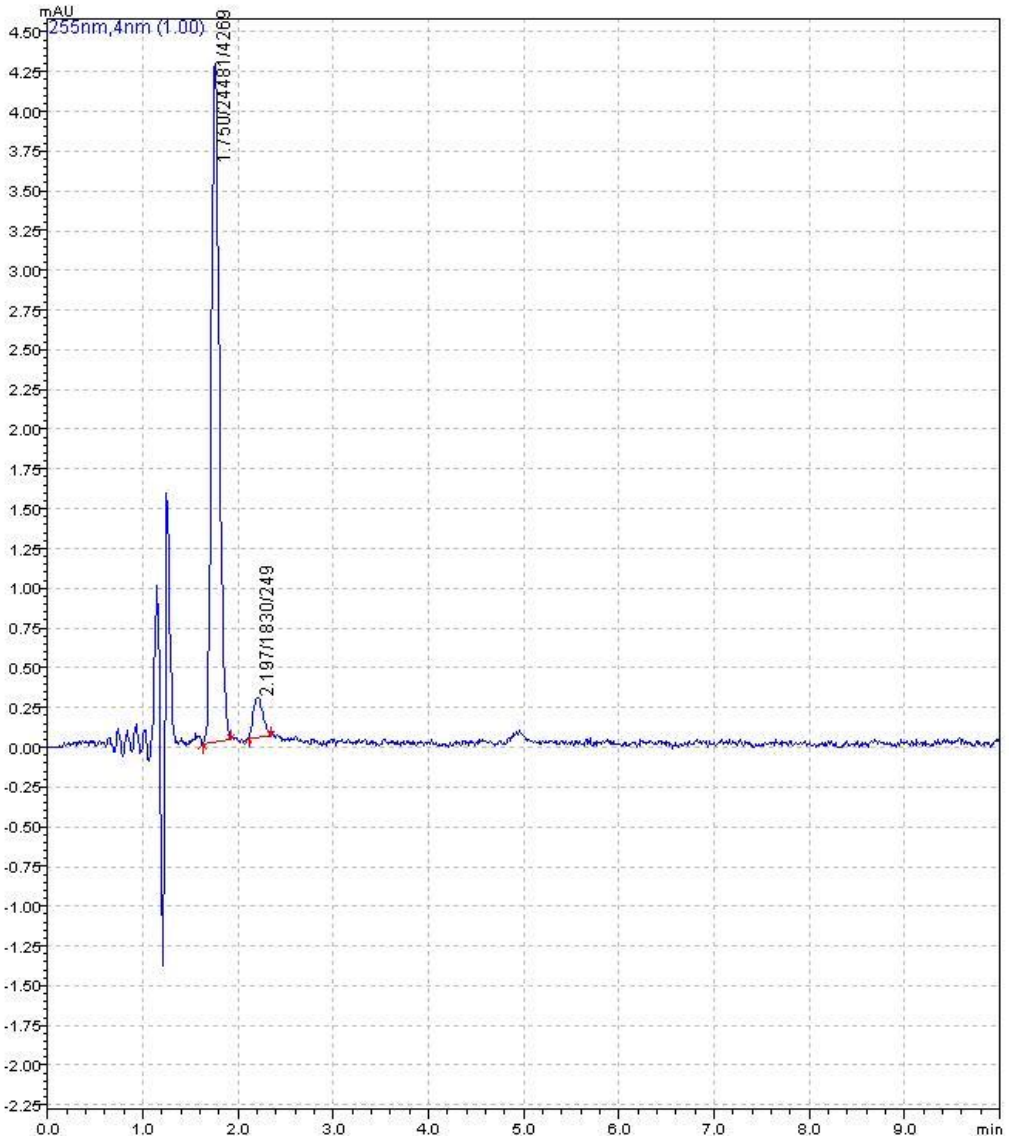
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



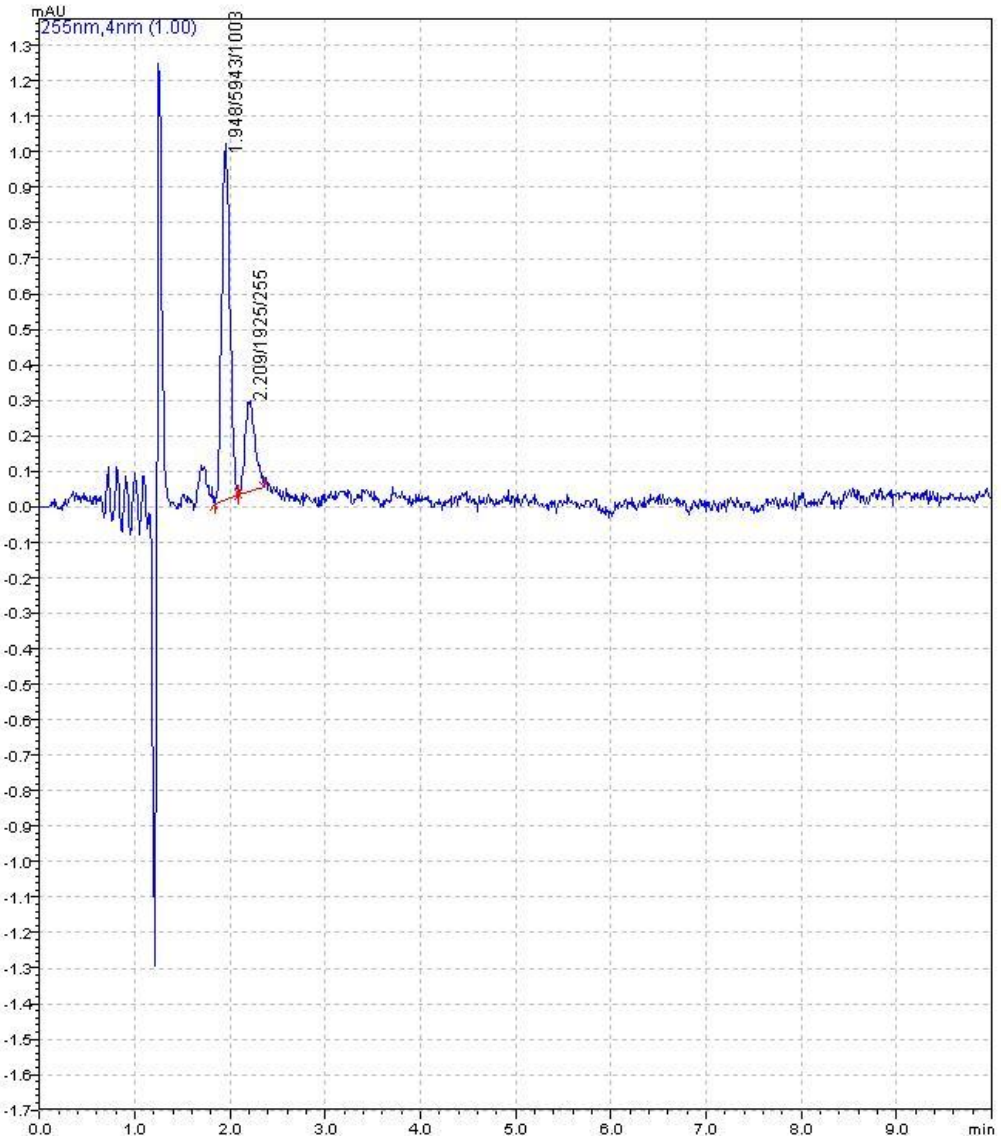
(b)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

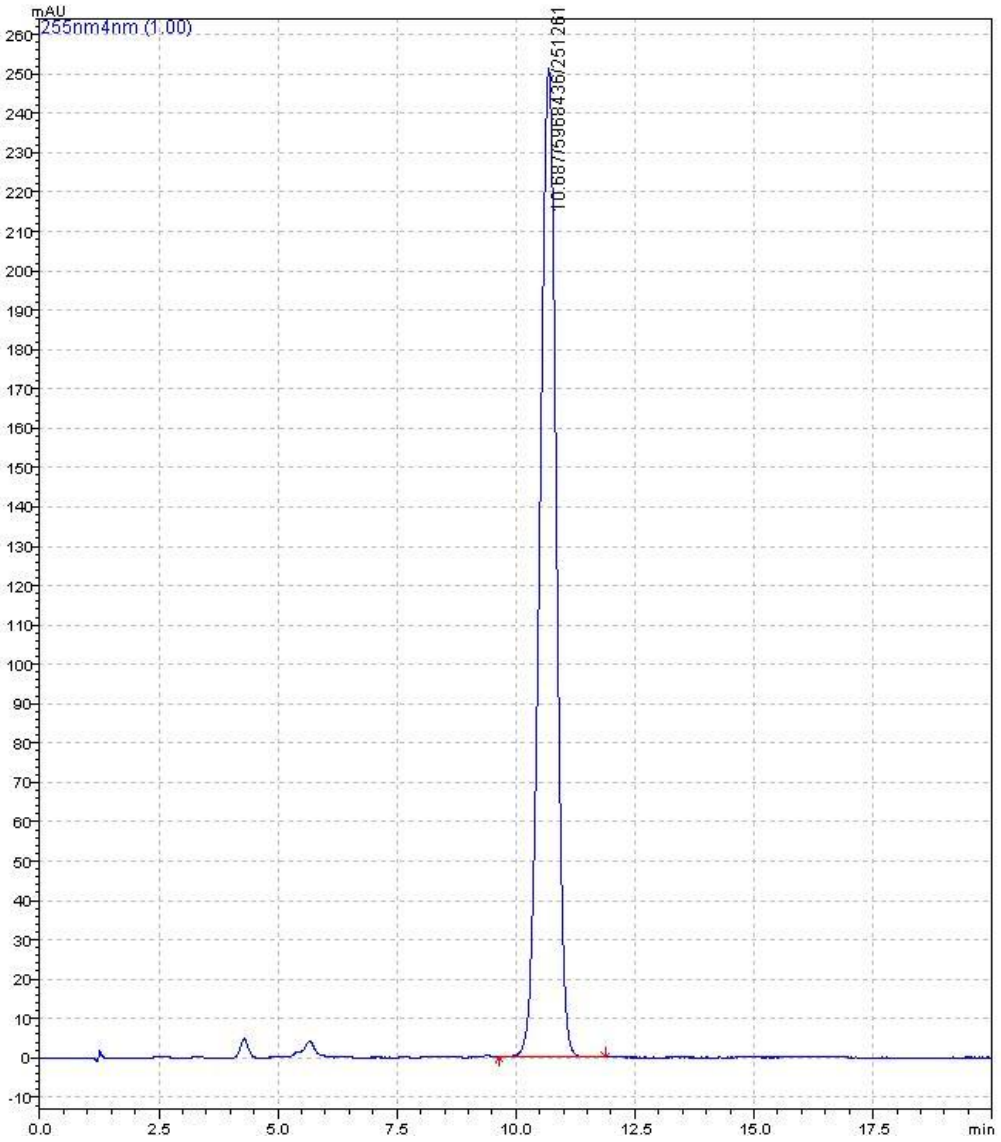


(d)

Şekil 12. DRO (a), ESS (b), KM (c) ve VER (d) çözeltilerinin MeOH:Tampon (70:30, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

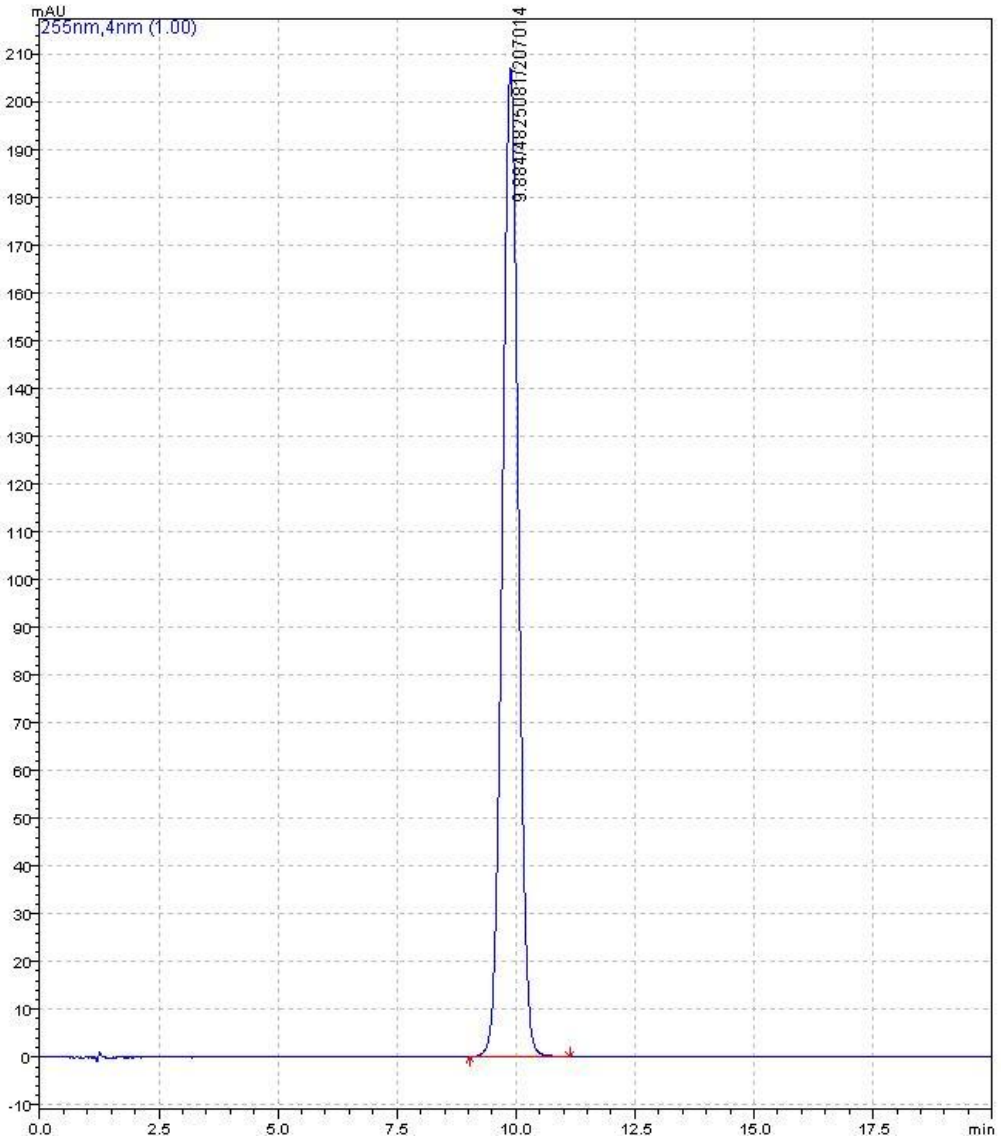
Yapılan analizlerin, pik morfolojileri, polarite, çözünürlük, tayin edilebilirlik ve alıkonma zamanı gibi parametreler göz önünde bulundurularak değerlendirilmesinden sonucu, iç standart olarak kullanılabilecek maddeler arasından en uygunlarının ALB ve DİF olduğu belirlenmiştir. İç standart belirlemek üzere yapılan çalışmalar sonrasında, iç standart ve maddemizin en iyi şekilde ayrılabilmesi için mobil faz bileşimi, akış hızı ve akış yöntemi gibi bazı parametrelerde değişimler denenmiş ve bu değişimlerin madde ile iç standart ayrımına etkileri incelenmiştir. Bu değişimlere ilk olarak mobil faz derişimini değiştirmekle başlanılmıştır. Bu amaçla yapılan ilk çalışmalarda MeOH derişimi %60 olarak değiştirilmiş olup, bu şartlarda ALB, ARP ve DİF maddelerinin 10^{-3} M' lık çözeltileri analiz edilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



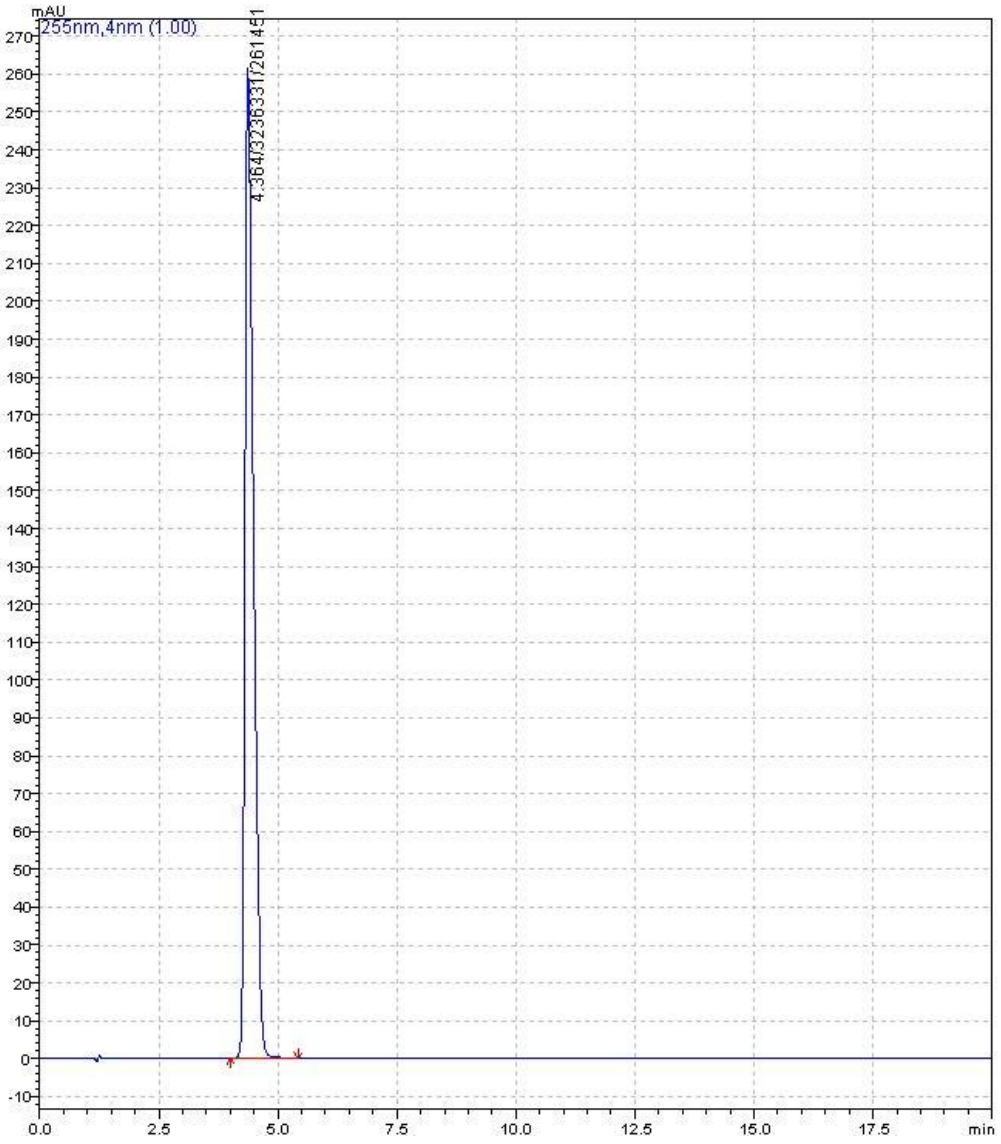
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(b)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

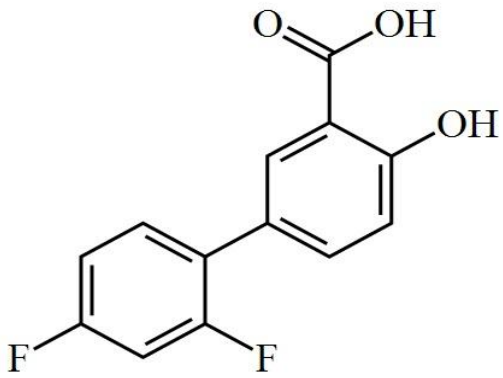


(c)

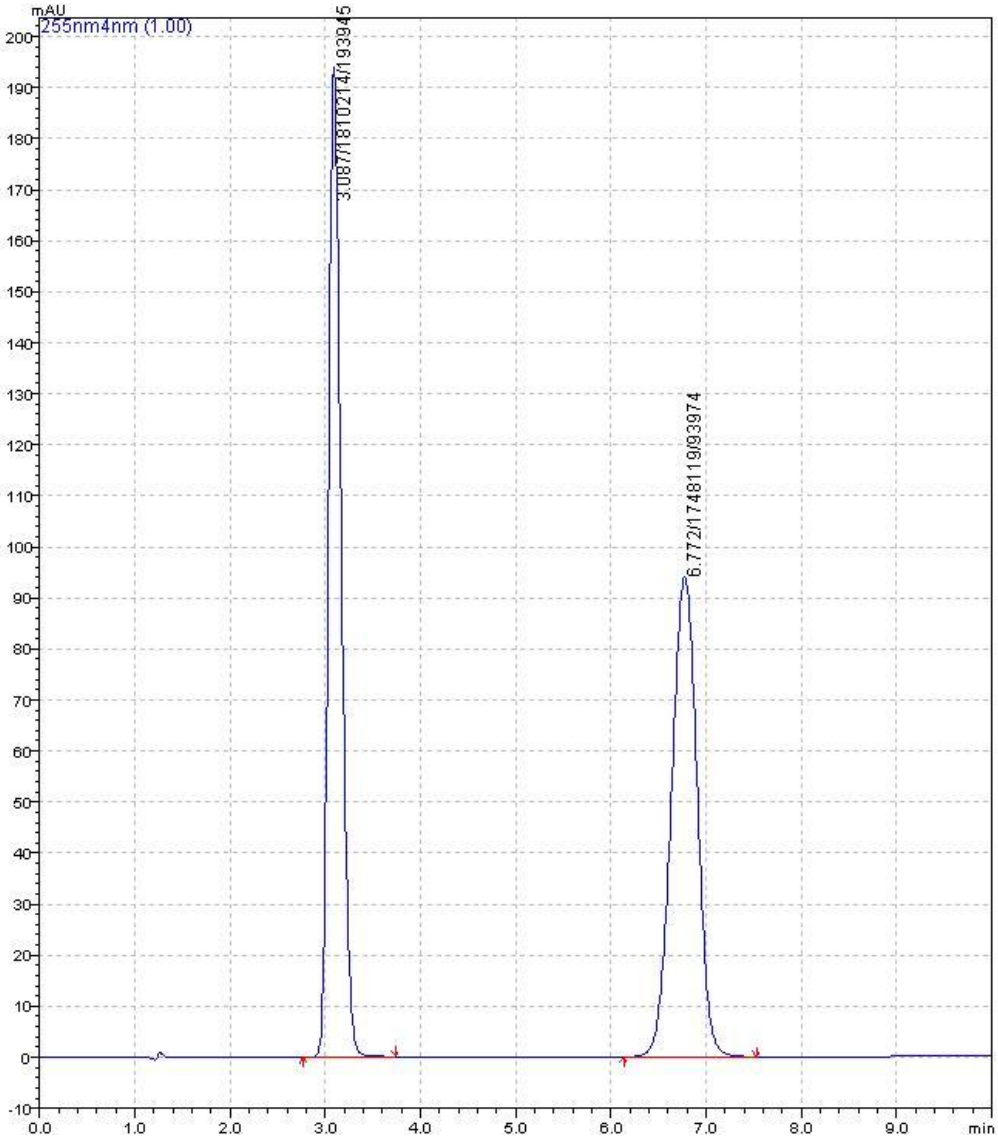
Şekil 13. ALB (a), ARP (b) ve DİF (c)'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (60:40, h/h) mobil fazında analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

ALB ile ARP'nin tutunma zamanlarının çok yakın değerlerde olması sonucu yeterince iyi ayırım gerçekleştirilememesi, iç standart olarak DİF'in kullanılmasını ön plana çıkartmıştır. İç standart olarak belirlenmiş olan DİF, kimyasal olarak "2', 4'-difloro-4-hidroksi-3-bifenilkarboksilik asit" şeklinde isimlendirilen, 210-211°C erime derecesine sahip, beyaz, kristal yapılı bir maddedir. Mobil faz derişim değişikliği çalışmalarına, MeOH derişimi %65 olarak ayarlanmasıyla devam edilmiştir. Bu şartlarda ARP ve DİF maddelerinin 10^{-3} M derişime sahip çözeltileri beraber analiz edilmiştir. Yine aynı mobil faz derişiminde, diğer koşullar sabit kalmak koşuluyla sadece akış hızının 1 mL/dk 'dan 0.8 mL/dk'ya düşürülmesiyle ayrımın nasıl gerçekleşeceği merak edilmiş ve hazırlanmış olan çözeltiler bu koşullarda tekrar analiz edilmişlerdir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

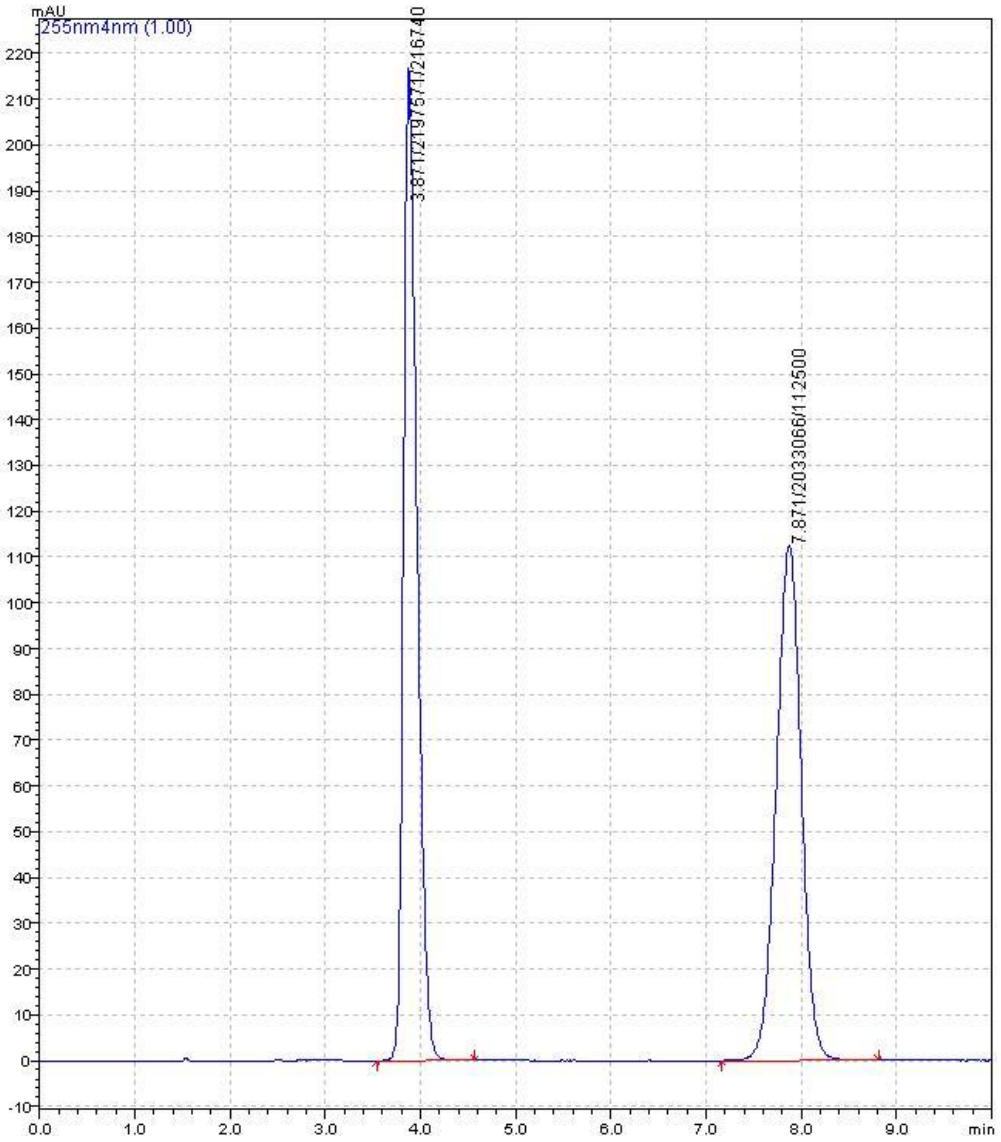


Şekil 14. DİF'in molekül yapısı



(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(b)

Şekil 15. ARP ve DİF'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin MeOH:Tampon (65:35, h/h) mobil fazında, 1 mL/dk (a) ve 0.8 mL/dk (b) akış hızlarında eş zamanlı analizi sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

Mobil faz derişiminin ayırım üzerinde etkileri gözlemlendikten sonra, değişken bileşimli hareketli faz yöntemi ile elde edilebilecek sonuçlar tartışılmış ve konsantrasyonlar belirlenerek bir program oluşturulmuştur. Bu programda, MeOH derişimi yüzdesi ilk 5 dakikada 55 olarak ayarlanmış ve 10. Dakikada 65 olacak şekilde doğru orantılı olarak artması sağlanmıştır. ARP ve DİF maddelerinin 10^{-3} M derişime sahip çözeltileri aynı anda bu programa göre analiz edilmişlerdir.

Yapılan ilk gradient çalışmada ARP'nin çok geç kolondan çıkması nedeniyle programda bazı değişimler gerekli görülmüştür. Yeni oluşturulan programa göre, MeOH oranı ilk 3 dakikada 55 olarak başlatılmış, 5. Dakikada 65 olacak şekilde doğru orantılı olarak artması sağlanmıştır. 5. dakika ile 8. dakika arası MeOH oranı sabit tutulmuş olup, 8.01. dakikada MeOH oranı tekrar 55'e düşürülmüştür. Geri kalan analiz süresinde de MeOH oranı aynı bırakılmış olup, ARP ve DİF

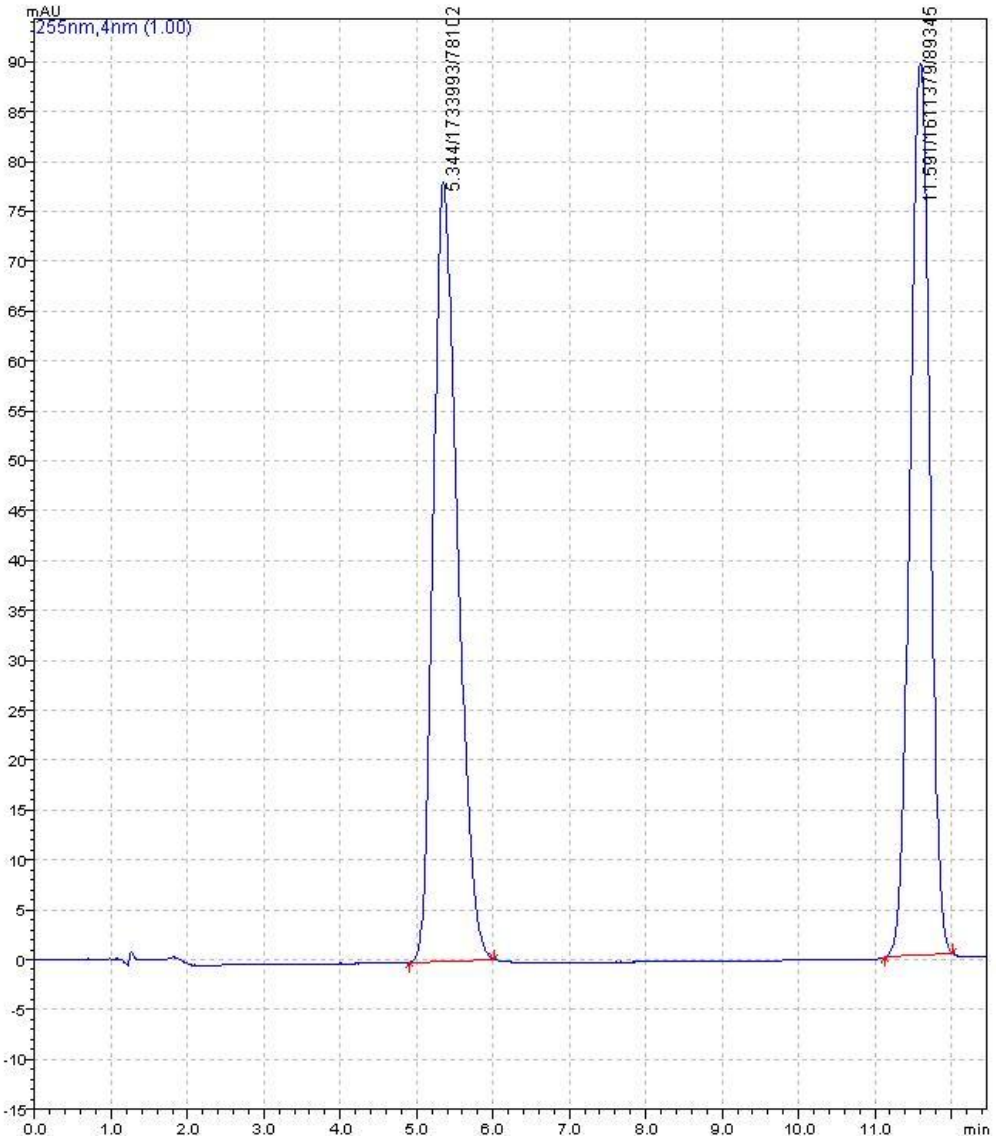
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

maddelerinin hazırlanmış olan 10^{-3} M derişimine sahip çözeltileri bu şartlar altında analiz edilmişlerdir.

Son yapılan değişken bileşimli hareketli faz çalışmasının sonuçları incelenmiş ve bazı değişimlerle yöntemin daha iyi ayırım yapabileceği düşünülmüştür. Bu değişimler göz önünde bulundurularak yeni bir yöntem daha geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde, MeOH derişim yüzdesi ilk 3 dakika içerisinde 60 olacak şekilde başlatılmış ve 3. dakikadan sonra, 5. dakikada 65 olacak şekilde doğru orantılı olarak artması sağlanmıştır. MeOH derişim yüzdesi 5. ve 8. dakikalarda sabit tutulmuş olup, 8.01. dakikada 60' a ayarlanmıştır. Analiz bitimine kadar bu oran sabit tutulmuştur. ARP ve DİF maddelerinin 10^{-3} M derişimindeki çözeltileri bu şartlara göre aynı anda tekrar analiz edilmişlerdir.

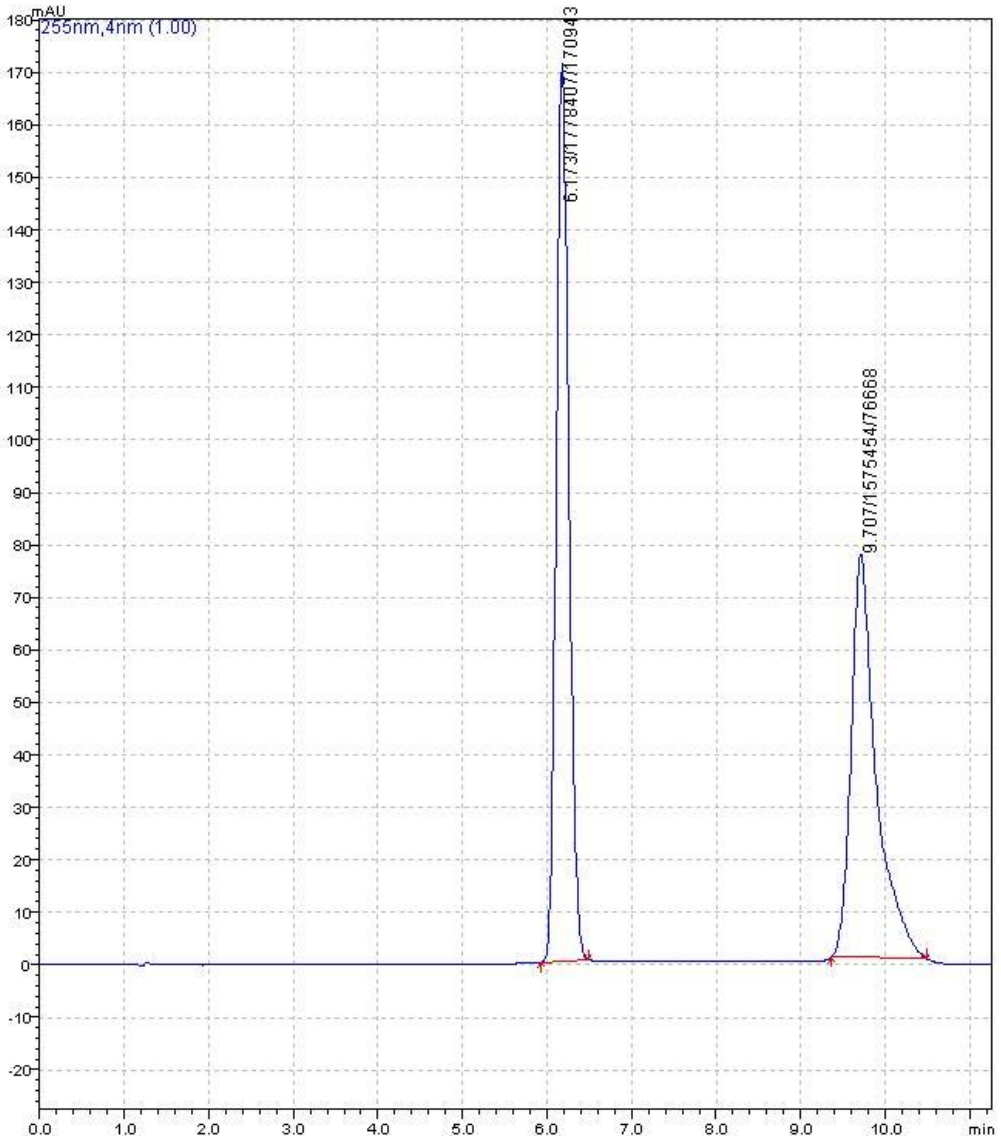
Çalışmalara, değerlendirmeler sonucu tekrar bir değişiklik yaparak devam edilmesine karar verilmiştir. Yeni hazırlanan analiz programına göre, MeOH derişim yüzdesi analizin ilk 4 dakikasında 60 olarak ayarlanmıştır. 4. dakikadan itibaren MeOH derişim yüzdesi, 5. dakikada 65 olacak şekilde doğru orantılı olarak arttırılmıştır. 5. ile 8. dakikalar arası MeOH oranı yine sabit tutulduktan sonra 8.01. dakikada 60 olacak şekilde ayarlanmıştır. Analiz bitimine kadar bu oran sabit tutulmuş ve analiz bu şekilde sonlanacak şekilde program ayarlanmıştır. Ayarlanan bu yeni programa göre ARP ve DİF maddelerinin 10^{-3} M derişimine sahip çözeltileri yeniden analize tabi tutulmuşlardır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



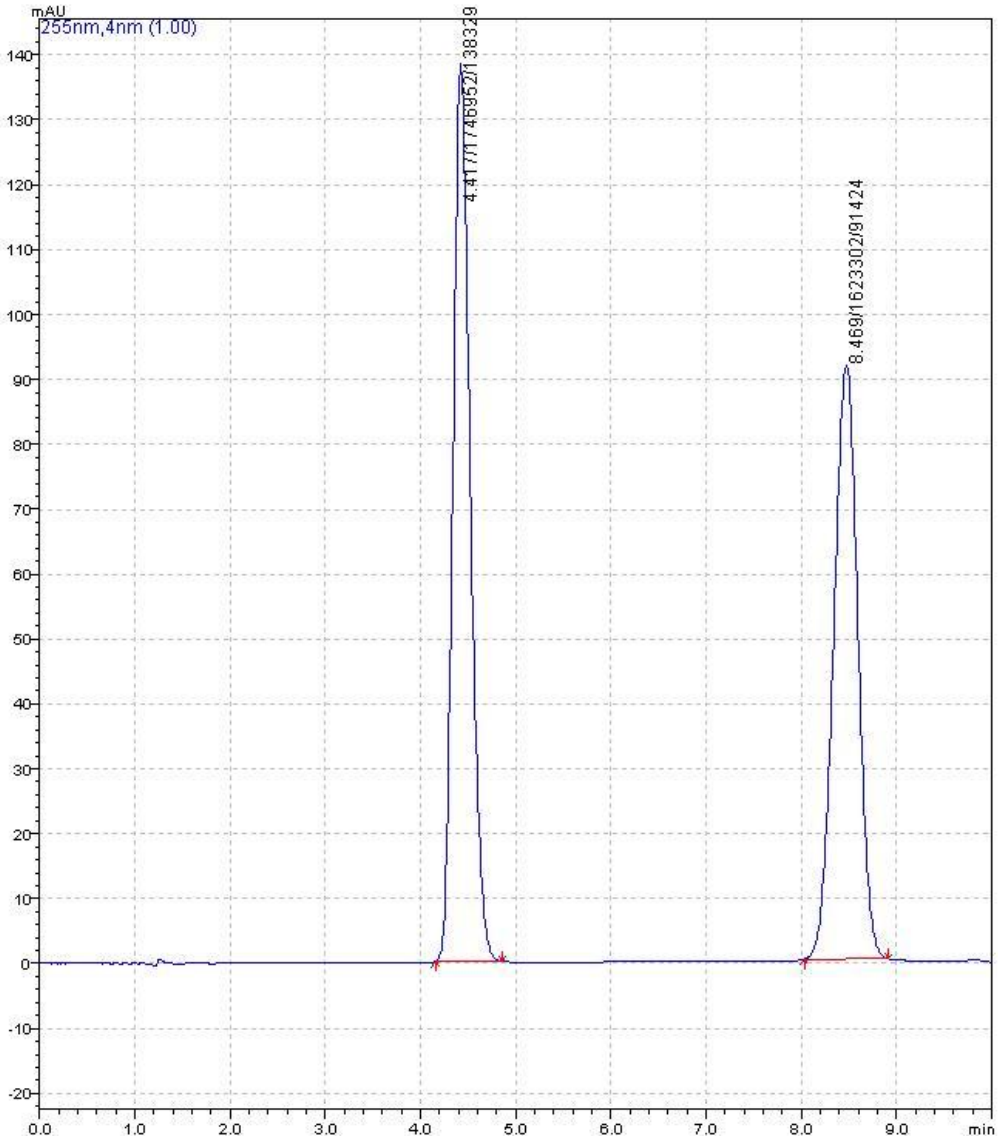
(a)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



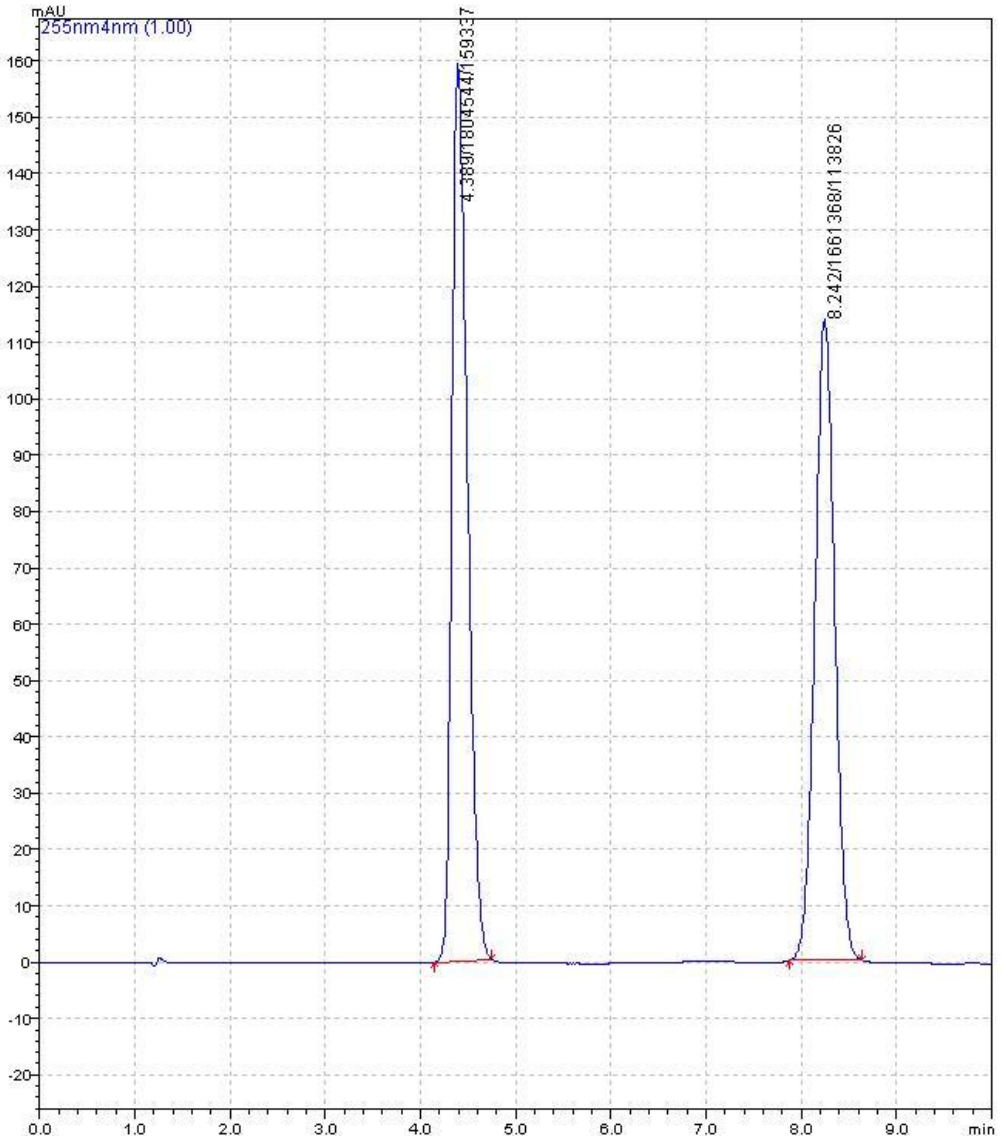
(b)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(c)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(d)

Şekil 16. ARP ve DİF'in 10^{-3} M derişimine sahip çözeltilerinin, sırasıyla değişken bileşimli hareketli faz yöntemiyle, 1 mL/dk akış hızında eş zamanlı analizleri sonucu 255 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramları

Yapılmış olan gradient çalışmalar, ayrımlar her ne kadar iyi gerçekleşmiş olsa da baz çizgisinin isokratik yönteme göre dalgalanmalar göstermesi sebebiyle tercih edilmemiştir. İsokratik yöntemle yapılan çalışmalarda en iyi ayrımın %60 MeOH oranı ile elde edildiğine karar verilmiştir.

Yönteme karar verildikten sonra, sırasıyla doğrusallık ve kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Ancak yapılan bu çalışmalardan sonra sonuçların istenen kalitede olmamasından dolayı farklı bir kolonla çalışmalara devam etme kararı alınmıştır. Yeni kolon olarak Supelco (Amerika) marka Ascentis® Express C_{18} ters faz kolonu (10 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) ile çalışmalara devam edilmiştir.

Yeni kolonla yapılan çalışmalara hareketli faz üzerinde değişiklik yapılmadan başlanmıştır. Kolonun özelliklerinden dolayı daha düşük akış hızında aynı sonuçların alınması mümkün olduğundan sadece akış hızında bir değişiklik

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

yapılarak çalışmalar yapılmıştır. %60 MeOH oranına sahip hareketli faz ve 0.5 mL/dk akış hızı ile yapılan analizlerin sonucu, ilk kolonla karar verilmiş en iyi şartlarla yapılan analizlere oldukça yakın sonuçlar verdiği için yeni kolonda bu şartlar uygulanarak analizlere devam edilmiştir.

YBSK Yönteminin Validasyonu

ARP analizi için geliştirilmiş olan yöntemin doğru, güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar verip vermediğinin belirlenebilmesi için ICH ve Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP)'nin önerdiği ölçütlere göre bazı değerlendirmeler yapılmıştır.

Validasyon işlemlerinden önce YBSK cihazının ve yöntemin performansını gösteren sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Bu testlerde teorik tabaka sayısı (N), ayırım gücü (Rs), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (As), seçicilik faktörü (α) ve kapasite faktörü (k) gibi parametreler hesaplanmıştır. Hesaplamalar YBSK cihazının bağlı olduğu bilgisayara yüklü olan Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak elde edilmiştir. Sonuçlar **Çizelge 2**'de verilmiştir.

Çizelge 2. Sistem uygunluk testlerinin sonuçları

Parametre	**Ascentis® Express C_{18}**		**Fortis C_{18}**		**Tavsiye edilen değer**
	ARP	**DİF**	**ARP**	**DİF**	
Alıkonma zamanı (dk)	9.092	4.743	9.424	4.511	
Teorik tabaka sayısı (*N*)	11680	5802	2249	2329	>2000
Kuyruklanma faktörü (*T*)	1.216	1.361	1.119	1.040	<2
Asimetri faktörü (A_s)	1.184	1.325	1.099	1.049	$0.95<A_s<1.2$
Kapasite faktörü (*k*)	4.092	1.657	9.163	3.865	2<k<10
Ayırım gücü (R_s)	14.851		8.21	9.431	>2
Seçicilik faktörü (α)	2.470		2.371	7.895	>1

ARP analizi için geliştirilen yöntemin validasyonu, ICH tarafından yayınlanan kılavuzda belirtilen tavsiyelere göre yapılmıştır. Bu kılavuz doğrultusunda doğruluk, kesinlik, doğrusallık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve spesifiklik testleri yönteme uygulanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Yöntemin doğruluğunu belirleyebilmek amacıyla standart katma yöntemine dayalı geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. ARP dışındaki bileşenlerin yöntem ile yaptığı etkileşimi incelemek için bilinen derişimde ARP ve IS karışımı, önceden analiz edilmiş tablet çözeltilerinin 1:2 (h/h) oranında seyreltilmesinden sonra elde edilen çözeltilere eklenmiş ve analiz edilmiştir. Geri kazanım verileri 3 farklı örnek çözeltisine katılan 3 farklı derişimde analit içeren çözeltilerin 3'er kez analiz edilmesi ile elde edilmiştir. Çözeltilere düşük, orta ve yüksek standart katma uygulamalarında sırasıyla 2.0642 x 10^{-6}, 4.1284 x 10^{-6} ve 6.1926 x 10^{-6} M derişimlerde analit içeren çözeltiler eklenmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler doğrusallık çalışmaları sonucu elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, numune bileşenlerinin analitlerin tayinine beklenenden olumsuz etki yapmadığını göstermektedir. Yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler **Çizelge 3**'te verilmiştir.

Yöntemin kesinliği, tekrar edilebilirlik ve orta dereceli kesinlik çalışmaları ile saptanmıştır. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan 4.1284x10^{-6} M derişime sahip ARP ile 1.0312x10^{-5} M derişime sahip DİF çözeltileri aynı gün içerisinde ve ardışık 3 gün süre ile belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların standart sapması, bağıl standart sapması ve güven aralığı parametrelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle geliştirilen yöntemin kesinlik yönünden analitik açıdan yeterli düzeyde olduğu görülmüştür. Kesinlik sonuçları standart çözeltiler için **Çizelge 4**'te verilmiştir.

Çizelge 3. Doğruluk çalışmalarının sonuçları

	Eklenen (M)	Bulunan (M)	Bulunan SS	% Geri Kazanım	% Geri Kazanım SS	Ortalama Geri Kazanım	%BSS	$GA_{\%\ 95}$
ARP Tablet	2,0642 × 10^{-6}	2,077 × 10^{-6}	2,471 × 10^{-8}	100.9	1.19	98.09	2.47%	1.86
	4,1284 × 10^{-6}	3,996 × 10^{-6}	7,427 × 10^{-8}	96.77	1.80			
	6,1926 × 10^{-6}	5,983 × 10^{-6}	4,288 × 10^{-8}	96.66	1.31			

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 4. Standart çözeltiler için kesinlik sonuçları

	Gün içi			Günler arası
Ortalama	0.1920	0.1924	0.1921	0.1922
En düşük ortalama GA %95	0.1912	0.1902	0.1906	0.1913
En yüksek ortalama GA %95	0.1928	0.1946	0.1936	0.1930
SS	0.001110	0.003046	0.002100	0.001205
Ortalamanın standart hatası	0.0003509	0.0009632	0.0006641	0.0003812
%BSS	%0.58	%1.58	%1.09	%0.63

Yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla 5.1605 x 10^{-7} M, 1.0321 x 10^{-6} M, 2.0642 x 10^{-6} M, 3.0963 x 10^{-6} M, 4.1284 x 10^{-6} M, 5.1605 x 10^{-6} M, 6.1926 x 10^{-6} M, 7.2247 x 10^{-6} M, 8.2568 x 10^{-6} M, 9.2889 x 10^{-6} M ARP ve 1.0312 x 10^{-5} M sabit derişimde DİF içeren çözeltiler hazırlanmış ve belirlenen koşullarda analiz edilmiştir. Doğrusallık çalışmalarında da analizler gün içi ve günler arası olarak 3 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler en küçük kareler metoduyla değerlendirilmiş, buna göre eğim, kesim ve bu değerlerin standart sapmaları ile korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. ARP için bu yöntemin belirtilen derişim aralığında doğrusal sonuçlar verdiği ve Lambert-Beer Yasası'na uyduğu görülmüştür. Yöntemin gün içi doğrusallığına ilişkin istatistiksel veriler standart çözeltiler için **Çizelge 5**'te verilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 5. Standart çözeltiler için doğrusallık sonuçları

	Gün içi			Günler arası
Aralık (M)	$5.1605 \times 10^{-7} – 9.2889 \times 10^{-6}$			
Eğim	47287 ± 715.7	46975 ± 675.3	47341 ± 683.8	47269 ± 369.2
Kesim	0.001649 ± 0.003945	0.002612 ± 0.003722	0.002575 ± 0.003769	0.0009586 ± 0.002035
r	0.9991	0.9992	0.9992	0,9992
Eğim GA %95	45636 – 48937	45418 – 48532	45764 – 48918	46513 – 48025
Kesim GA %95	-0.007449 – 0.01075	-0.005972 – 0.0112	-0.006117 – 0.01127	-0,003209 – 0,005126
LOQ (M)	8.34×10^{-7}	7.92×10^{-7}	7.96×10^{-7}	4.31×10^{-7}
LOD (M)	2.75×10^{-7}	2.61×10^{-7}	2.63×10^{-7}	1.42×10^{-7}

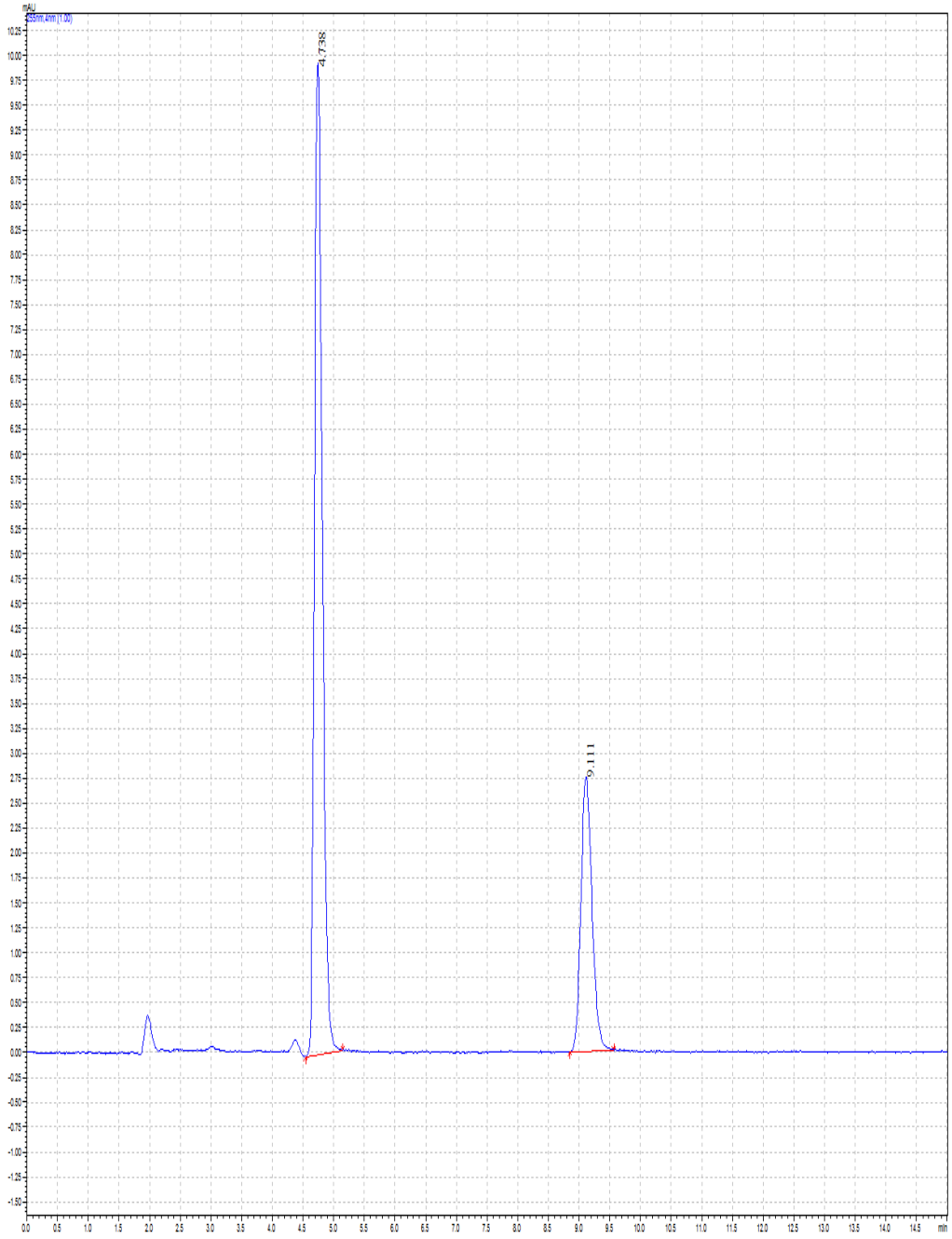
Analizi yapılacak numunede var olan ve bu maddeyle girişim yapabilecek safsızlıkların yanında analiz edilmek istenen maddenin ölçülebilme yeteneği olarak bilinen spesifikliğin belirlenmesi için numune analizleri farklı iki kolonla yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlardan hiçbirinde analit piklerine olumsuz etki yapan herhangi bir girişime rastlanmamıştır. Ayrıca kromatogramlardaki ARP piklerinin saflıkları PDA dedektör ile kontrol edilmiş ve etkileşim yapan bir madde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar değerlendirilerek yöntemin yeterli spesifikliğe sahip olduğu kabul edilmiştir.

Literatürlerde ARP'nin stabilitesi ile ilgili bazı çalışmalar yer almaktadır. ARP'nin MeOH:su (50:50, h/h) çözeltisi içindeki stabilitesi ile ilgili, yeni hazırlanmış çözeltiler ile -20°C'de 51 – 147 gün bekletilmiş stok çözeltileri ve oda sıcaklığında 6 saat bekletilmiş stok çözeltilerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Her koşul için 5 analiz yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında hiçbir çözelti yeni hazırlanmış çözeltiden %2.2 oranından daha fazla sapma göstermemiştir. (Lin ve ark., 2009). ARP'nin dimetilsülfoksit içinde çözüldükten sonra MeOH ile seyreltilmesi sonucu hazırlanan stok çözeltilerinin stabilitesi çalışılmıştır. Stok çözeltileri 4°C'de saklanmıştır ve en az 1 ay süre ile stabil olduğu saptanmıştır. (Kubo ve ark. 2005) Başka bir çalışmada ARP'nin 2-propanol çözücüsü içinde 1000 mg/L derişimindeki çözeltisinin stabilitesi çalışılmış ve -70°C'de en az 3 ay süreyle çözeltinin stabil olduğu tespit edilmiştir. (Sampedro ve ark. 2012)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Geliştirilen Yöntemin Numunelere Uygulanması

Bu çalışmada geliştirilen YBSK yöntemi ile ARP'nin ilaç tabletlerinde analizi yapılmıştır. Aripa® (30 mg ARP) ilaç tabletinin, daha önce deneysel kısımda anlatıldığı şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. Deneysel kısımda da bahsedildiği üzere hazırlanmış olan çözeltilerden 6 µL, IS çözeltisinden 100 µL ve %60 MeOH çözeltisinden 894 µL bir viale aktarılmıştır. Vialde oluşan bu yeni çözelti iyice karıştırılıp analize verilmiştir. Tablet çözeltisinden elde edilen kromatogram **Şekil 17**'de verilmiştir.



Şekil 17. Aripa® tablet çözeltisinin analizinden elde edilen kromatogram ARP (4.0144 x 10^{-6} M, 9.111 dk) ve DİF (1.0248 x 10^{-5} M, 4.738).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Tablet çözeltisinden analiz işlemi 10 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen kromatogramlardan ARP'nin IS'ye göre PN değerleri hesaplanmış ve bu PN değerleri yardımıyla ARP'nin doğrusallık çalışmalarından elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak tabletteki ARP miktarı hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 6**'da verilmiştir.

Çizelge 6. Belirlenen koşullar altında gerçekleştirilen tablet analizlerinin sonuçları (n=10)

	ARP
Ortalama	29.68
Minimum	27.04
Maksimum	31.23
Standart hata	1.219
Ortalamanın standart hatası	0.3856
En düşük ortalama GA $_{\%95}$	28.81
En yüksek ortalama GA $_{\%95}$	30.56
Varyasyon katsayısı	%4.11

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SONUÇ ve ÖNERİLER

ARP'nin farmasötik preparatlarda YBSK cihazı ve UV detektör kullanılarak tayin edilmesiyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Geliştirilmiş olan yöntem, önceden yapılmış olan çalışmalarda kullanılan yöntemlerle kıyaslandığında, düşük maliyeti, kısa analiz süresi ve uygulama kolaylığı gibi özellikleri ön plana çıkmaktadır. Yöntemin öneriler doğrultusunda validasyonu sonucu, güvenilirliği ve yeniden uygulanabilirliği gibi özellikleri açısından iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yöntemin başlıca avantajları, çalışmada kullanılan kimyasalların ve iç standardın, kolay bulunabilir ve ekonomik olmasıdır. Hiçbir ön deriştirme ve türevlendirme işlemi yapılmamış olan bu çalışmanın, tayin ve saptama sınırları açısından foto diyot dizisi detektörle çalışılmış bir yöntem için oldukça iyi, MS detektör kullanılmış çalışmalar ile karşılaştırıldığında ise maliyet açısından daha uygun olduğu sonucuna varılabilir.

Çalışmada incelenmiş olan ARP maddesinin, yakın tarihte üretilmiş olması ve şizofreni gibi çok önemli bir hastalık için kullanılıyor olması analizini daha önemli kılmaktadır. Üretim koşullarının belirli standartlara sahip olabilmesi ve üretilen ürünün etkinliği açısından, maddenin analizlerinin güvenilir ve ekonomik yöntemlerle yapılması oldukça önemlidir. Analiz yöntemlerinin çeşitliliği, maddenin üretim standartlarının ve kalitesinin geliştirilmesine olumlu etkiler yapmaktadır. Yapılan bu çalışma, ARP'nin analizi için güvenilir ve ekonomik olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilmesi gibi özelliklerinden dolayı diğer yöntemlere iyi bir alternatif oluşturabileceği kanıtlanmıştır. Ayrıca gerçekleştirilen bu çalışma ile ARP'nin farmasötik preparatlarda tayinini rutin kontrol laboratuvarlarında başarılı, doğru, hassas, güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilecektir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

KAYNAKLAR

Akamine, Y., Yasui-Furukori, N., Kojima, M., Inoue, Y., Uno, T., A sensitive column-switching HPLC method for aripiprazole and dehydroaripiprazole and its application to human pharmacokinetic studies, J. Sep. Sci., 33, 3292–3298 (2010).

Caloro, M., Lionetto, L., Cuomo, I., Simonetti, A., Pucci, D., Persis, S.D., Casolla, B., Kotzalidis, G.D., Sciarretta, A., Filippis, S.D., Simmaco, M., Girardi, P., An improved simple LC–MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite, J. Pharmaceut. Biomed., 62, 135– 139 (2012).

Choong, E., Rudaz, S., Kottelat, A., Guillarme, D., Veuthey, JL., Eap, C.B.., Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC–MS, J. Pharmaceut. Biomed., 50, 1000–1008 (2009).

Dorado P., de Andrés F., Naranjo ME., Peñas-Lledó EM., González I., González AP., de la Rubia A., Llerena A., High-performance liquid chromatography method using ultraviolet detection for the quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in psychiatric patients, Drug Metabol. Drug Interact., 27 (3), 165-70 (2012).

H. Kirchherr, W.N. Kühn-Velten, Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach, J. Chromatogr B, 843, 100–113 (2006).

http-1 Mental Health – Sczhiophrenia
http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/ (15.01.2013)

http-2 Note For Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology (CPMP/ICH/381/95)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf (21.09.2012)

http-3 Şizofreni Nedir? Tedavisi, Nedenleri, Belirtileri, Tanı
http://www.diyadinnet.com/SaglikBilgisi-565&Saglik=şizofreni-nedir-tedavisi-nedenleri-belirtileri-tanı (20.01.2013)

Kirschbaum, K.M., Müller, M.J., Zernig, G., Saria, A., Mobascher, A., Malevani, J., Hiemke, C., Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection, Clin. Chem., 51 (9), 1718-21 (2005).

Kubo, M., Mizooku, Y., Hirao, Y., Osumi, T., Development and validation of an LC–MS/MS method for the quantitative determination of aripiprazole and its main metabolite, OPC-14857, in human plasma, J. Chromatogr. B, 822, 294–299 (2005).

Lancelin, F., Djebrani, K., Tabaouti, K., Kraoul, L., Brovedani, S., Paubel, P., Piketty, ML., Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma, J. Chromatogr. B, 867, 15–19 (2008).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Li, KY., Zhou, YG., Ren, HY., Wang, F., Zhang, BK., Li, HD., Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in in vitro samples, J. Chromatogr. B., 850, 581–585 (2007).

Lin, S.N., Lamm, L., Newton, T.F., Reid, M.S., Moody, D.E., Foltz, R.L., A Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Aripiprazole in Human Plasma, J. Anal. Toxicol., 33, 237-242 (2009).

Maryadele J. O'Neil, The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Fourteenth Edition, Merck Research Laboratories Division of Merck&Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, ABD, 2006.

Mete, L., Şizofreni En Uzak Ülke, 1998.

Musenga A., Saracino, M.A., Spinelli, D., Rizzato, E., Boncompagni, G., Kenndler, E., Raggi, M.A., Analysis of the recent antipsychotic aripiprazole in human plasma by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with diode array detection, Anal Chim Acta, 612, 204-211 (2008).

Reddy, G.V.R., Kumar, A.P., Reddy, B.V., Kumar, P., Gauttam, H.D., Identification of degradation products in Aripiprazole tablets by LC-QToF mass spectrometry, Eur. J. Chem., 1 (1), 20-27 (2010).

Remane, D., Meyer, M.R., Wissenbach, D.K., Maurer, H.M., Ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multi-analyte procedure for target screening and quantification in human blood plasma: validation and application for 31 neuroleptics, 28 benzodiazepines, and Z-drugs, Anal. Bioanal. Chem. 401, 1341-1352 (2011).

Saar, E., Gerostamoulos, D., Drummer, O.H., Beyer, J., Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS, J. Mass Spectrom. 45, 915–925 (2010).

Sampedro, M.C., Unceta, N., Gomez-Caballero, A., Callado, L.F., Morentin, B., Goicolea, M.A., Meana, J.J., Barrio, R.J., Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest, Forensic Sci. Int., 219, 172–178 (2012).

Song, M., Xu, X., Hang, T., Wen, A., Yang, L., Development of an LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in human plasma, Anal Biochem, 385, 270–277 (2009).

Thakkar, R.S., Saravaia, H.T., Ambasana, M.A., Kaila, H.O., Shah, A.K., A Chromatographic determination of aripiprazole using HPLC and UPLC: a comparative validation study, Indian J. Pharm. Sci., 73 (4), 439-43 (2011).

Uzbay, T.İ., Nöropsikofarmakoloji Rasyonel İlaç Kullanımı, 81 – 88, 2007.

Üstünes, L., Rx MediaPharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2013.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Vecchione, G., Casetta, B., Chiapparino, A., Bertolino, A., Tomaiuolo, M., Cappucci, F., Gatta, R., Margaglione, M., Grandone, E., A reliable and rapid tool for plasma quantification of 18 psychotropic drugs by ESI tandem mass spectrometry, J. Pharmaceut. Biomed., 67– 68, 104– 113 (2012).

Vincenti, M., Cavanna, D., Gerace, E., Pirro, V., Petrarulo, M., Corcia, D.D., Salomone, A., Fast screening of 88 pharmaceutical drugs and metabolites in whole blood by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem., 405 (2-3), 863-79 (2012).

Wang, JS., Zhu, HJ., Donovan, J.L., Yuan, HJ., Markowitz, J.S., Geesey, M.E., DeVane, C.L., Aripiprazole brain concentration is altered in P-glycoprotein deficient mice, Schizophr Res, 110, 90–94 (2009).

Xu, Y., Liu, X., Lian, R., Zheng, S., Yin, Z., Lu, Y., Wu, W., Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid–base neutralization, Int. J. Pharmaceut., 438, 287– 295 (2012).

Shimokawa, Y., Akiyama, H., Kashiyama, E., Koga, T., Miyamoto, G., High performance liquid chromatographic methods for the determination of aripiprazole with ultraviolet detection in rat plasma and brain: Application to the pharmacokinetic study, J. Chromatogr. B, 821, 8–14 (2005).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

EK 1 Supelco Ascentis® Express C_{18} (10 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) kolon analiz sertifikası

SUPELCO™
Analytical

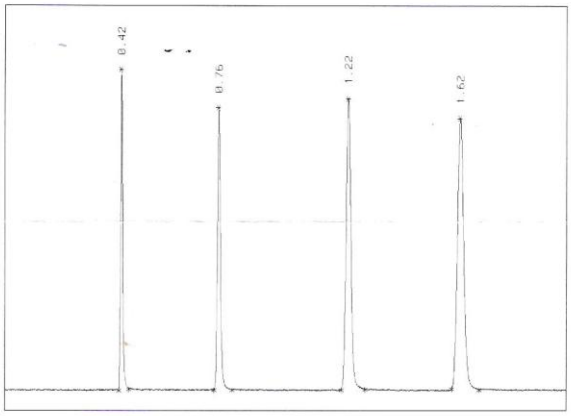
595 North Harrison Road
Bellefonte, PA 16823-0048 USA
Telephone 800-247-6628 • 814-359-3441
Fax 800-447-3044 • 814-359-3044
email: supelco@sial.com
sigma-aldrich.com/supelco

SERIAL NO.: USPY003871
COLUMN: Ascentis Express C18 10cm x 4.6mm
PART NO.: 53827-U
PACKING LOT NO.: S10041

TEST CONDITIONS:
MOBILE PHASE = 60/40 ACETONITRILE/WATER
PRESSURE = 230 bar
FLOW = 1.8 mL/min
LINEAR VELOCITY = 0.400 cm/sec
TEMPERATURE = AMBIENT

PERFORMANCE RESULTS FOR TOLUENE (K' = 2.90)

PARAMETER	SPECIFICATION	COLUMN USPY003871
THEORETICAL PLATES	MIN: 22000	28853
USP TAILING FACTOR	MAX: 1.25	1.17
SELECTIVITY	RANGE: 1.37 - 1.57	1.50



QC Sample:
Uracil (20 µg/ml)
Acetophenone (30 µg/ml)
4-Cl-Nitrobenzene (80 µg/ml)
Toluene (2.40 mg/ml)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

EK 2 Fortis C18 (5 µm, 100×4.6 mm) kolon analiz sertifikası

45 Coalbrookdale Road t: +44 151 336 2266

QUALITY ASSURANCE

Phase: 5um Fortis C18

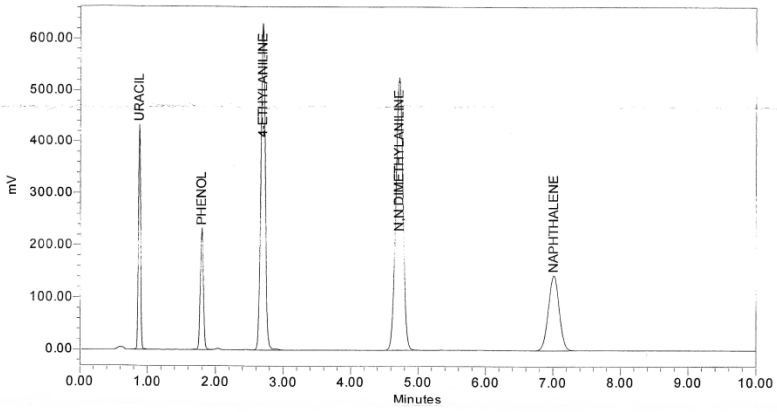
Part Number: F18-050505

Column Dimension: 100x4.6mm

Batch Number: 185-184
Column Backpressure: 60 Bar

Mobile Phase: 60:40 ACN:Water
Flow: 1.0ml/min
Sample Volume: 10ul
Wavelength: 254nm
Temperature: 20C

Serial Number: B10110305-1



Column Performance

	Name	RT(min)	Capacity	Resolution	Symmetry	Plate Count
1	URACIL	0.880	-0.120		1.13	3557
2	PHENOL	1.800	0.800	12.815	1.08	7698
3	4-ETHYLANILINE	2.697	1.697	8.818	1.07	8326
4	N,N DIMETHYLANILINE	4.718	3.718	12.731	1.03	9477
5	NAPHTHALENE	7.012	6.012	9.194	1.02	8999

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

EK 3 Aripiprazol standart maddesinin analiz sertifikası

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.
59500 Organize Sanayi Bölgesi, Çerkezköy,Tekirdağ

ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000043 ARIPIPRAZOLE		
Üretici/Satıcı Firma	: -		
Analiz Başlangıç Tar	:14.04.2011	Miktar	:11,510 KG
SAP Batch No	:04309003R2	Kontrol Parti No	:040000055070
Satıcı Batch No	: -	Analiz Bitiş Tarihi	:21.04.2011
		Üretim Tarihi	:13.04.2011
Yeniden Test Tarihi	: -	Son Kullanma Tarihi	:13.05.2011
Saklama Şartı	:Primer ambalaj: Sıkıca kapatılmış Alu-Alu ambalaj içinde ışık,nem ve havadan koruyarak 25°C'yi geçmeyen bir sıcaklıkta saklanmalıdır.		

ANALİZLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
GÖRÜNÜŞ	Beyaz, beyaza yakın kristal toz	UYGUN Berrak, kristal toz.	Firma içi.
ÇÖZELTI GÖRÜNÜŞÜ	Çözelti berrak olmalıdır.	UYGUN Test çözeltisi berraktır.	Ph.Eur.Cur Ed.2.2.1

SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	21.04.2011
AÇIKLAMA			

ANALİZİ YAPAN 21.04.2011 — KONTROL EDEN — ONAY 21.04.2011

3 / 3

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.
59500 Organize Sanayi Bölgesi, Çerkezköy,Tekirdağ

ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000043 ARIPIPRAZOLE		
Üretici/Satıcı Firma	: -		
Analiz Başlangıç Tar	:14.04.2011	Miktar	:11,510 KG
SAP Batch No	:04309003R2	Kontrol Parti No	:040000055070
Satıcı Batch No	: -	Analiz Bitiş Tarihi	:21.04.2011
		Üretim Tarihi	:13.04.2011
Yeniden Test Tarihi	: -	Son Kullanma Tarihi	:13.05.2011
Saklama Şartı	:Primer ambalaj: Sıkıca kapatılmış Alu-Alu ambalaj içinde ışık,nem ve havadan koruyarak 25°C'yi geçmeyen bir sıcaklıkta saklanmalıdır.		

ANALİZLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
ÇÖZÜNÜRLÜK	Suda çözünmez. Metilen klorürde ve dimetilformamid de serbestçe çözünür.	UYGUN Suda pratik olarak çözünmedi.Metilen klorür ve dimetilformamidde serbestçe çözündü.	Ph.Eur.Cur.Ed.
TANIMA A - IR SPEKTROPOTOMETRESI	Numune IR spektrumu, standart IR spektrumuna uymalıdır.	UYGUN Numune IR spektrumu standart IR spektrumuna uygundur.	Ph.Eur.Cur Ed.2.2.24
ERIME ARALIĞI	(137)-(141) °C	139 °C	Ph.Eur.Cur Ed.2.2.14
SU	Max 1,0 %	0,4 %	Ph.Eur.Cur Ed.2.5.12
NEM ÇEKICILIĞI	Min 0,4 %	2,2 %	Firma içi.
MIKTAR TAYINI (KURU MADDE)	(98,0)-(102,0) %	100,8 %	Firma içi.
ARTIK ÇÖZÜCÜ - ETIL ALKOL	Max 5000 ppm	112 ppm <LOQ =250 ppm	Firma içi.
ARTIK ÇÖZÜCÜ - ASETON	Max 5000 ppm	0 ppm <LOQ =250 ppm	Firma içi.
SÜLFAT KÜLÜ	Max 0,1 %	0,1 % (%0.05)	Ph.Eur.Cur Ed.2.4.14
PARTIKÜL BOYUTU - D(90)	Max 50 mikron	32 mikron	Firma içi.
AĞIR METALLER	Maks. 10 ppm	UYGUN <10 ppm	Ph.Eur.Cur Ed.2.4.8.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE A	Max 0,15 %	UYGUN <LOQ =% 0.045	Firma içi.

SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	21.04.2011
AÇIKLAMA	KA 21.04.2011		

ANALİZİ YAPAN 21.04.2011 Singe FIRAT — KONTROL EDEN KALEM 21.04.2011 — ONAY Dr. Mehmet Mutlu 21.04.2011

1 / 3

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.

ULKAR KİMYA SANAYİİ VE TİCARET A.Ş.
59500 Organize Sanayi Bölgesi, Çerkezköy, Tekirdağ

ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	:11000043 ARIPIPRAZOLE		
Üretici/Satıcı Firma	: -		
Analiz Başlangıç Tar	:14.04.2011	Miktar	:11,510 KG
SAP Batch No	:04309003R2	Kontrol Parti No	:040000055070
Satıcı Batch No	: -	Analiz Bitiş Tarihi	:21.04.2011
		Üretim Tarihi	:13.04.2011
Yeniden Test Tarihi	: -	Son Kullanma Tarihi	:13.05.2011
Saklama Şartı	:Primer ambalaj: Sıkıca kapatılmış Alu-Alu ambalaj içinde ışık,nem ve havadan koruyarak 25°C'yi geçmeyen bir sıcaklıkta saklanmalıdır.		

ANALİZLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE B	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE C	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ=% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE D	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE E	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE F	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE G	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE H	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - İMPÜRITE I	Max 0,15 %	0,00 % <LOQ =% 0.045	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - BILINMEYEN İMPÜRITE	Max 0,10 %	0,05 %	Firma içi.
İLGILI BILEŞIKLER - TOPLAM İMPÜRITE	Max 0,50 %	0,05 %	Firma içi.
POLIMORFIZM-A. XRD	Kristalin Tip I olmalıdır.	UYGUN Kristal tip 1	Ph.Eur.Cur Ed.2.9.33
POLIMORFIZM B.DSC	DSC termogramı 139°C - 141 °C'de endotermik pik göstermelidir.	UYGUN DSC termogramı 139-141°C'de endotermik pik gösterdi.	Ph.Eur.Cur Ed.2.9.34

SONUÇ	Kabul	ONAY TARİHİ	21.04.2011
AÇIKLAMA			

ANALİZİ YAPAN	KONTROL EDEN	ONAY
21.04.2011	21.04.2011	

2 / 3

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ULKAR KİMYA
SANAYİ VE TİCARET A.Ş.

MİKROBİYOLOJİ ANALİZ SERTİFİKASI

Malzeme Kodu/Tanımı	: Aripiprazole / 1100043		
Analiz Tarihi	: 14.04.2011	Miktar	: 11,910 kg
SAP Batch No	: 0430900382	Kontrol Parti No	: 4000055070
Satıcı Batch No	: -	Son Kullanma Tarihi	: 13.05.2011
Saklama Şartı	: Primer ambalaj: Sıkıca kapatılmış Al-Al ambalaj içinde ışık ve nemden, havadan korunarak, 25°C'yi geçmeyen bir sıcaklıkta saklanmalıdır. Sevkte ambalaj; sıgılı matbaa torba ve drum.		

ANALİZLER	SPESİFİKASYONLAR	SONUÇLAR	METOD
Toplam Bakteri Sayısı	1000 cfu/g	Ocfu/g	Ph. Eur. current Ed.
Toplam mantar sayısı	100 cfu/g	Ocfu/g	Ph. Eur. current Ed.
Escherichia coli	olmalı	Ocfu/g	Ph. Eur. current Ed.
Pseudomonas aeruginosa	olmalı	Ocfu/g	Firma spesifikasyonu

SONUÇ	KABUL	ONAY TARİHİ	21.04.2011
AÇIKLAMA	KABUL 19.04.2011		

ANALİZİ YAPAN	KONTROL EDEN	ONAY
Fatma Yanık 19.04.2011	Müh. Sibel Kılıçaslan 21.04.2011	Dr. Mehmet Hüsür 22.04.2011

1 / 1

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ