

NEVRUZ ORÇUN ÖZÇELİK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**FARMASÖTİK PREPARATLARIN
AMBALAJ MALZEMESİ SAFSIZLIK ANALİZLERİ**

NEVRUZ ORÇUN ÖZÇELİK

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

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.

Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı : Analitik Kimya

Programın seviyesi: Yüksek Lisans () Doktora (X)

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Tez Sahibi : Nevruz Orçunz ÖZÇELİK

Tez Başlığı : Farmasötik Preparatların Ambalaj Malzemesi Safsızlık Analizleri

Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi A blok seminer salonu

Sınav Tarihi : 10.02.2022

Tez Sınav Jürisi

1. “Prof. Dr. Durişehvar Ünal”, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD.

2. “Doç. Dr. Gülcemal Yıldız”, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya ABD.

3. Dr. Öğretim Üyesi Ebru Türköz Acar, Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD.

4. “Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş”, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD.

5. “Doç. Dr. Pelin Köseoğlu Yılmaz”, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD.

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a ve desteğini hiç esirgemeyen değerli tez izleme komitesi üyelerim Sayın Prof. Dr. Durişehvar Özer Ünal ve Dr. Öğretim Üyesi Ebru T. Acar'a, bu süreçte her zaman varlıklarını hissettirip yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genel tanımlar.....	3
2.1.1. Oftalmik preparatlar.....	3
2.1.2. Göz damlası	3
2.1.3. Çok Dozlu Oftalmik Damla.....	3
2.1.4. Tek dozluk oftalmik damla	4
2.1.5. Blow fill seal.....	4
2.1.6. Birincil ambalaj malzemesi	4
2.1.7. İkincil ambalaj malzemesi	5
2.1.8. Üçüncül ambalaj malzemesi	5
2.1.9. Polimer katkı maddeleri ve muhtemel safsızlıklar	5
2.1.9.1. Uçucu organik ambalaj malzemesi safsızlıkları	5
2.1.9.2. Yarı uçucu organik ambalaj malzemesi safsızlıkları	6
2.1.9.3. Uçucu olmayan organik ambalaj malzemesi safsızlıkları.....	6
2.1.9.4. İnorganik ambalaj malzemesi safsızlıkları	6
2.1.10. Ekstre edilebilir ambalaj safsızlıkları	7
2.1.11. Sızabilen ambalaj safsızlıkları	8
2.1.12. Güvenilirlik kaygısı eşiği (SCT).....	11
2.1.13. Analitik değerlendirme eşiği (AET)	11
2.1.14. Kalifikasyon eşiği (QT)	12

2.2. Maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikler	12
2.2.1 Siklosporin	12
2.2.2 Miristik asit	15
2.2.3 Irganox 1330	17
2.2.4 Irganox 1010	19
2.2.5 Irganox 1076	21
2.2.6 Irgafos 168	23
2.2.7 Tinuvin-326 (iç standart)	25
2.2.8 Oftalmik Emülsiyon (Restasis® %0.05).....	27
2.3. Geliştirilmiş analitik yöntemler ve yapılan çalışmalar	28
2.3.1. MA, Irg-1010, Irg-1076, Irg-1330, Irg-168 ambalaj malzemesi safsızlıkları ile yapılan çalışmalar	29
2.3.2. Diğer ambalaj malzemesi safsızlıkları ile yapılan çalışmalar	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	40
3.2. Çözeltiler	41
3.2.1. Hareketli fazlar	41
3.2.2. EEAS çalışması için hazırlanan çözeltiler	41
3.2.3. SAS çalışması için hazırlanan çözeltiler	43
3.3. Aletler ve diğer gereçler	45
3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar	48
3.5.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları	48
3.5.1.1. Hareketli Faz ve Çözücü Sisteminin Geliştirilmesi	48
3.5.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi	51
3.5.2. HPLC kolonu seçimi	53
3.5.3. Hareketli faz akış hızının belirlenmesi	53
3.5. Yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda elde edilen nihai analitik yöntem	55
3.6. Geliştirilen yöntemin validasyonu	61
3.7. Stabilitate Takip Çalışmaları	73
4. BULGULAR	75
4.1. Analiz yönteminin geliştirilmesiyle ilgili bulgular	75
4.1.1. Kütle dedektörü ile yapılan yöntem geliştirme çalışmaları	75
4.1.2. Kütle spektroskopisi parametrelerinin geliştirilmesi bulguları	78

4.1.3.	HPLC Kolonu Seçimi	87
4.1.4.	UPLC ve kütle dedektör koşullarının belirlenmesine ait bulgular	88
4.1.5.	Tek kullanımlık LDPE malzemesinden elde edilen EEAS numune sonuçları	91
4.2.	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	92
4.3.	Stabilite takip çalışması sonuçları.....	118
5.	TARTIŞMA	120
	KAYNAKLAR	124
	ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Farmasötik preparatlarda risk temelli yaklaşım ile SAS'ın değerlendirilmesi (24).....	9
Tablo 3-1: Ekstraksiyon parametreleri için çalışma tasarımı	43
Tablo 3-2: Hareketli faz belirleme çalışmalarında kullanılan hareketli faz bileşenleri..	48
Tablo 3-3: Ana iyon belirlenmesi için kütle dedektörü yazılımına girilen parametreler	52
Tablo 3-4: Yöntem geliştirme çalışmalarında kullanılan HPLC kolonlarının özellikleri	53
Tablo 3-5: EEAS ve SAS analizlerinde kullanılan MS/MS parametre bilgileri.....	56
Tablo 4-1: Irgonox-1010 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	75
Tablo 4-2: Irgonox-1330 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	76
Tablo 4-3: Irgonox-1076 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	76
Tablo 4-4: Irgafos-168 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	77
Tablo 4-5: Miristik asit standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (-) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonu.....	77
Tablo 4-6: Tinuvin-326 iç standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (-) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları	78
Tablo 4-7: Ambalaj malzemesi safsızlıkları ve iç standarta ait ana iyonlar	79
Tablo 4-8: Ambalaj malzemeleri safsızlıkları ve iç standart için belirlenen parçalanma iyonları.....	83
Tablo 4-9: Ambalaj malzemesi safsızlıkları ve iç standart pikine ait MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri	87
Tablo 4-10: Farklı HPLC kolonları ile elde edilen sistem uygunluk parametre değerleri	88
Tablo 4-11: Ambalaj malzemesi safsızlıklarına ait teşhis sınırı ve tayin sınırı çalışması	92
Tablo 4-12: Miristik aside ait doğrusallık çalışması sonuçları.....	94

Şekil 4-18: Miristik aside ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-13: Irganox-1076'ya ait doğrusallık çalışması sonuçları	94
Şekil 4-19: Irganox-1076'ya ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-14: Irganox-1330'a ait doğrusallık çalışması sonuçları	95
Şekil 4-20: Irganox-1330'a ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-15: Irganox-1010'a ait doğrusallık çalışması sonuçları	96
Şekil 4-21: Irganox-1010'a ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-16: Irgafos-168'e ait doğrusallık çalışması sonuçları	97
Tablo 4-17: EEAS için miristik aside ait doğruluk çalışması sonuçları		100
Tablo 4-18: EEAS için Irganox-1076'ya ait doğruluk çalışması sonuçları		100
Tablo 4-19: EEAS için Irganox-1330'a ait doğruluk çalışması sonuçları		101
Tablo 4-20: EEAS için Irganox-1010'a ait doğruluk çalışması sonuçları		101
Tablo 4-21: EEAS için Irgafos-168'ya ait doğruluk çalışması sonuçları		102
Tablo 4-22: SAS için miristik aside ait doğruluk çalışması sonuçları		103
Tablo 4-23: SAS için Irganox-1076'ya ait doğruluk çalışması sonuçları		103
Tablo 4-24: SAS için Irganox-1330'a ait doğruluk çalışması sonuçları		104
Tablo 4-25: SAS için Irganox-1010'a ait doğruluk çalışması sonuçları		104
Tablo 4-26: SAS için Irgafos-168'e ait doğruluk çalışması sonuçları		105
Tablo 4-27: Sistem kesinliği çalışması sonuçları		106
Tablo 4-28: EEAS çalışmasında gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları		106
Tablo 4-29: SAS çalışmasında gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları		107
Tablo 4-30: EEAS çalışmasında günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları		108
Tablo 4-31: SAS çalışmasında günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları		108
Tablo 4-32: EEAS çalışmasında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması		109
Tablo 4-33: SAS çalışmasında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması		110
Tablo 4-34: EEAS ve SAS çalışmalarında standarda ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları		111
Tablo 4-35: EEAS ve SAS çalışmalarında standarda ait 25°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları		112
Tablo 4-36: EEAS çalışmasında numunlere ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları		113

Tablo 4-37: EEAS çalışmasında numunlere ait 25°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları.....	114
Tablo 4-38: SAS çalışmasında numunlere ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları.....	115
Tablo 4-39: SAS çalışmasında numunlere ait 25°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları.....	116
Tablo 4-40: EEAS çalışmasında sağlamlık sonuçları.....	117
Tablo 4-41: SAS çalışmasında sağlamlık sonuçları	117
Tablo 4-42: Hızlandırılmış koşul stabilite analiz sonuçları (40 ±2 °C ve 75% ± 5 % RH)	118
Tablo 4-43: Ara koşul stabilite analiz sonuçları (30 ±2 °C 65% ± 5% RH).....	119

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: EEAS çalışma tasarımının, SAS çalışması ile korelasyonu durum-1	10
Şekil 2-2: EEAS çalışma tasarımının, SAS çalışması ile korelasyonu durum-2	10
Şekil 2-3: EEAS-SAS çalışma tasarımı akış şeması.....	12
Şekil 2-4 Siklosporin kimyasal yapısı	13
Şekil 2-5 Siklosporine ait UV spektrumu (%13.61, a/a, sulu çözelti) (32)	14
Şekil 2-6 Siklosporine ait FTIR spektrumu (33)	14
Şekil 2-7: Miristik asidin kimyasal yapısı	15
Şekil 2-8 Miristik aside ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)	16
Şekil 2-9 Miristik asidin FTIR spektrumu	16
Şekil 2-10: Irganox 1330 kimyasal yapısı	17
Şekil 2-11 Irganox-1330'a ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)	18
Şekil 2-12: Irganox-1330 FTIR spektrumu	18
Şekil 2-13: Irganox 1010 kimyasal yapısı	19
Şekil 2-14 Irganox-1010'a ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)	20
Şekil 2-15: Irganox-1010 FTIR spektrumu	20
Şekil 2-16: Irganox 1076 kimyasal yapısı	21
Şekil 2-17 Irganox-1076'ya ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)	22
Şekil 2-18: Irganox-1076 FTIR yapısı.....	22
Şekil 2-19: Irgafos 168 kimyasal yapısı	23
Şekil 2-20 Irgafos 168'e ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde).....	24
Şekil 2-21: Irgafos 168 FTIR spektrumu.....	24
Şekil 2-22: Tinuvin-326 (Bumetrisol) kimyasal yapısı	25
Şekil 2-23:Tinuvin-326'ya ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde).....	26
Şekil 2-24: Tinuvin-326 (Bumetrisol) FTIR spektrumu.....	26
Şekil 2-25: Restasis® %0.05 Oftalmik Emülsiyon.....	27
Şekil 3-1: Shimadzu UFLC XR HPLC ve LCMS-8030 kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) cihazı.....	46
Şekil 4-1: Irganox-1010 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	80
Şekil 4-2: Irganox-1330 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	80

Şekil 4-3: Irganox-1076 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	81
Şekil 4-4: Irgafos-168 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	81
Şekil 4-5: Miristik asit standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	82
Şekil 4-6: Tinuvin-326 (IS) standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL).....	82
Şekil 4-7: Irganox-1010 standart çözeltisine ait 80 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	83
Şekil 4-8: Irganox-1330 standart çözeltisine ait 32 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	84
Şekil 4-9: Irganox-1076 standart çözeltisine ait 36 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	84
Şekil 4-10: Irgafos-168 standart çözeltisine ait 58 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	85
Şekil 4-11: Miristik asit standart çözeltisine ait 12 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	85
Şekil 4-12: Tinuvin-326 (IS) standart çözeltisine ait 38 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL).....	86
Şekil 4-13: EEAS ve SAS standart çözeltisine ait UV dedeksiyonlu UPLC kromatogramı	89
Şekil 4-14: İç standart ve ambalaj malzemesi safsızlıkları katılmış Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyon numune çözeltisine ait elde edilen UV dedeksiyonlu UPLC kromatogramı.....	89
Şekil 4-15: EEAS ve SAS standart çözeltisine ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı..	90
Şekil 4-16: Numunedeki EEAS'na ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı.....	90
Şekil 4-17: Numunedeki SAS'na ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı	91
Şekil 4-18: Miristik aside ait doğrusallık grafiği	94
Tablo 4-13: Irganox-1076'ya ait doğrusallık çalışması sonuçları	94
Şekil 4-19: Irganox-1076'ya ait doğrusallık grafiği	95
Tablo 4-14: Irganox-1330'a ait doğrusallık çalışması sonuçları	95

Şekil 4-20: Irganox-1330'a ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-15: Irganox-1010'a ait doğrusallık çalışması sonuçları	96
Şekil 4-21: Irganox-1010'a ait doğrusallık grafiği	Tablo 4-16: Irgafos-168'e ait doğrusallık çalışması sonuçları	97
Şekil 4-22: Irgafos-168'e ait doğrusallık grafiği		98



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AET: Analitik değerlendirme eşiği (analytical evaluation threshold)

CAS: Chemical Abstracts Service

C18: Oktadesil silan

EAET: Tahmini analitik değerlendirme eşiği (estimated analytical evaluation threshold)

EEAS: Ekstre edilebilir ambalaj safsızlıkları (Extractables)

EMA: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı (European Medicines Agency)

EDQM: Avrupa İlaç Kalite Müdürlüğü (European Directorate for the Quality of Medicines)

FDA: Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

IS: İç standart

LDPE: Düşük yoğunluklu polietilen (low density polyethylene)

LOD: Teşhis sınırı

LOQ: Tayin sınırı

MRM: Çoklu reaksiyon monitörleme (Multi Reaction Monitoring)

PIS: Ürün iyon taraması (product ion scanning)

PODP: Parenteral ve oftalmik ilaç ürünleri (parenteral and ophthalmic drug products)

PQRI: Ürün Kalitesi Araştırma Enstitüsü (Product Quality Research Institute)

QT: Kalifikasyon Limiti

QTPP: Kalite hedefli ürün profili

Rs: Ayrılma faktörü

RSD: Bağlı standart sapma

Rt: Alıkonma zamanı

SAS: Sızabilir ambalaj safsızlıkları (Leachables)

SCT: Güvenilirlik kaygısı eşiği (safety concern threshold)

SD: Standart sapma

s/n: sinyal / gürültü oranı

Tf: Kuyruklanma faktörü

UV: Ultraviyole

UPLC-ESI-MS/MS: Ultra performanslı sıvı kromatografisi elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometresi

USP-NF: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi-Ulusal Formüler (United States Pharmacopeia-National Formulary)

ÖZET

Özçelik, N.O. (2022) Farmasötik Preparatların Ambalaj Malzemesi Safsızlık Analizleri İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi. İstanbul.

İlaç endüstrisinde oftalmik preparatlarda, düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) primer ambalaj malzemesi olarak kullanılmaktadır. Siklosporin etken maddesini içeren oftalmik bir preparatın LDPE ambalaj malzemesinden farmasötik preparata geçmesi en muhtemel 5 adet ambalaj malzemesi kaynaklı safsızlık bileşiği, yapılan detaylı literatür çalışması ile belirlenmiştir. Belirlenen safsızlıklar miristik asit, Irganox-1076, Irganox-1330, Irganox-1010 ve Irgafos-168'dir. Bu safsızlıklar için ekstre edilebilir ambalaj safsızlıkları (Extractables, EEAS) ve sızabilir ambalaj safsızlıkları (Leachables, SAS) çalışmaları kapsamında tandem kütle spektrometrik ultra hızlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemde 220 nm ultraviyole dedektör dalga boyu ve MRM mod kütle dedektörü kullanılmıştır. BEH fenil sabit fazı ve %0,1'lik amonyum format çözeltisi, metanol (50:50, h/h) hareketli faz sistemi ile 0,5 mL/dk akış hızında izokratik elüsyon uygulanmıştır. Toplam analiz süresi 2.4 dakikadır. Geliştirilen yöntemin validasyon parametreleri; teşhis sınırı, tayin sınırı, doğrusalık, doğruluk, sistem kesinliği, gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik, çözelti stabilitesi EEAS ve SAS için ayrı ayrı yapılmıştır. EEAS ve SAS'nın doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla, Miristik asit; 0,2751-3,7425 µg/mL, Irganox-1076; 0,06694-3,8250 µg/mL, Irganox-1330; 0,0747-3,7350 µg/mL, Irganox-1010; 0,02818-3,7575 µg/mL ve Irgafos-168; 0,02264-3,7725 µg/mL'dir. EEAS ve SAS'nın teşhis ve tayin sınırları sırasıyla, Miristik asit; 0,0834 µg/mL ve 0,2751 µg/mL, Irganox-1076; 0,0223 µg/mL ve 0,0669 µg/ mL, Irganox-1330; 0,0234 µg/mL ve 0,0747 µg/ mL, Irganox-1010; 0,0088 µg/mL ve 0,0282 µg/ mL, Irgafos-168; 0,0078 µg/mL ve 0,0226 µg/ mL, olarak saptanmıştır. Geliştirilen yöntem ile farmasötik preparatın SAS'nın stabilite takipleri yapılmış ve limit dışı bir bulgu saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: düşük yoğunluklu polietilen, ekstre edilebilir ambalaj safsızlığı, sızabilir ambalaj safsızlığı, UPLC-MS/MS, oftalmik, stabilite.

ABSTRACT

Özçelik, N.O. (2022). Analysis of extractables and leachables in pharmaceutical preparations. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Doctorate Thesis. İstanbul.

Low density polyethylene (LDPE) is used as primary packaging material in ophthalmic preparations in the pharmaceutical industry. The 5 most likely impurities compounds from LDPE packaging material to pharmaceutical preparation of an ophthalmic preparation containing the active substance of cyclosporin were determined by detailed literature studies. The impurities identified were myristic acid, Irganox-1076, Irganox-1330, Irganox-1010 and Irgafos-168. For these impurities, tandem mass spectrometric ultra-fast high performance liquid chromatography method was developed and validated within the scope of extractables (EEAS) and leachables (SAS) studies. In the developed method, 220 nm ultraviolet detector wavelength and MRM mode mass detector were used. Isocratic elution was applied with BEH phenyl stationary phase and 0.1% ammonium formate solution, methanol (50:50, v/v) mobile phase system at a flow rate of 0.5 mL/min. Total analysis time is 2.4 minutes. The validation parameters of the developed method; limit of detection, limit of detection, linearity, accuracy, system precision, intra-day reproducibility, inter-day reproducibility, solution stability were performed separately for EEAS and SAS. Linear ranges of EEAS and SAS, respectively, Myristic acid; 0.2751-3.7425 µg/mL, Irganox-1076; 0.06694-3.8250 µg/mL, Irganox-1330; 0.0747-3.7350 µg/mL, Irganox-1010; 0.02818-3.7575 µg/mL and Irgafos-168; It is 0.02264-3.7725 µg/mL. Detection and quantification limits of EEAS and SAS was determined as, respectively, Myristic acid; 0.0834 µg/mL and 0.2751 µg/mL, Irganox-1076; 0.0223 µg/mL and 0.0669 µg/mL, Irganox-1330; 0.0234 µg/mL and 0.0747 µg/mL, Irganox-1010; 0.0088 µg/mL and 0.0282 µg/mL, Irgafos-168; 0.0078 µg/mL and 0.0226 µg/mL.

Keywords: LDPE, Extractable, Leachable, UPLC-MS/MS method, Ophthalmic, stability.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Farmasötik preparatlar, koruyucular, antioksidanlar ve yardımcı maddeler gibi çeşitli hammaddeler ile formüle edilir ve pazara sunulmak üzere ambalajlanır. Formülasyon matrisinde, ilacın etkinliğini optimize etmek ve ilaç ürününün raf ömrünü uzatmak için tasarlanmıştır. Ambalaj sisteminden formülasyon matrisine geçebilecek herhangi bir bileşik, aktif farmasötik bileşenin (API) terapötik etkisini tehlikeye atabilir veya tüketici için bir sağlık riski oluşturabilir (1-2).

Plastik, cam ve metal malzemeler, farmasötik endüstride, kap, paketleme sistemleri, transfer ve taşıma sistemleri, üretim sistemleri, cihazlar gibi daha bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu malzemelerin fizyokimyasal doğası, farmasötik ürünlere gerekli ve istenen performans özelliklerini sağlar (3-4).

Düşük yoğunluklu polietilen (LDPE), etilen monomerden oluşan bir termoplastiktir. 1939'da Imperial Chemical Industries (ICI), günümüzde LDPE olarak bilinen yüksek basınçlı polietilenin (HPPE) ticari üretimine başladı ve ürün, II.Dünya Savaşı sırasında radar kablolarını yalıtım için kullanılmıştır. Günümüzde ise gıda, sağlık, temizlik, çocuk ürünleri ve ilaçlar gibi çok geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (5).

Bu kullanım alanlarından biri olan ilaç endüstrisinde ise LDPE primer veya sekonder ambalaj malzemesi olarak kullanılabilir. Bu kullanım sonucunda farmasötik ürün ve ambalaj malzemesinin etkileşimi ile etken maddeden kaynaklanmayan ve ürün kalitesi üzerine önemli bir etkisi olabilecek ambalaj malzemesinden kaynaklanan bir takım safsızlıkların ortaya çıkması ihtimalini beraberinde getirmektedir. Ortaya çıkabilecek bu tür safsızlıkların ürün geliştirme aşamasında tespitinin yapılıp konu ile ilgili yapılan çalışmalara dosya başvurusunun farmasötik geliştirme raporunda yer verilmelidir. Bu amaçla migrasyon çalışmaları, ekstre edilebilen ambalaj safsızlığı (Extractables, EEAS) ve sızabilen ambalaj safsızlığı (Leachables, SAS) çalışmaları yapılmaktadır. Aksi takdirde bitmiş ürün formülasyonun belirlenip stabiliteye kaldırıldıktan sonra bir anda ortaya çıkabilecek yüksek safsızlığın nereden geldiğini belirlemek çok zor olacaktır. Literatürde kullanıcıya zarar verebilecek bir noktaya kadar ulaşabildiği, 1998'de, öngörülemez bir SAS'nın neden olduğu saf kırmızı hücre aplazisinin (PRCA) advers çapraz reaksiyonu bildirilmiştir (6). Bu tür

durumlar ile karşı karşıya kalmamak veya ortadan kaldırmak, hasta ve kullanıcı sağlığını riske atmamak için atılması gereken adımlar son dönemlerde uluslararası kılavuzlarda hızlı bir şekilde yer almaya başlamıştır. Çünkü endüstri uygulamalarının, düzenleyici yaklaşımı, mevcut gereksinimlerinin ötesine geçmiştir ve hızlı adımların atılması gerekmektedir. Bu amaçla EEAS and SAS konusu hakkında çalışmalar yürüten önemli ve saygın kuruluşlar tarafından takip edilmesi gereken metodolojiler, izlenmesi gereken adımlar ve tanımlar yayınlanmıştır (7-10). Bu bağlamda ürün ambalaj malzemesine ait EEAS ve SAS çalışmasının yapılp ürüne geçme ihtimali olan safsızlıkların kaynağının anlaşılması ve önlem alınarak önüne geçilmesi sağlanabilir. Yapılacak bu çalışmalar ile yaşam döngüsü (life cycle) boyunca ürünün kalitesi güvence altına alınmış olacaktır.

Bu tez çalışmamızın amacı literatür bilgilerinden yola çıkılarak LDPE birincil ambalaj malzemesinden farmasötik preparata geçmesi muhtemel 5 maddenin EEAS çalışmasından elde edilip edilemeyeceği kıyaslanabilir bir şekilde belirledikten sonra SAS çalışmaları kapsamında stabilitede takip etmektir. Hem EEAS hem SAS ambalaj malzemesi safsızlıklarının tayini için kullanılabilecek kısa analiz süresine sahip ultra performanslı sıvı kromatografisi elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometresi (UPLC-ESI-MS/MS) metodu geliştirip, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH) Q2(R1) ve USP-NF <736> kılavuzlarına göre valide etmektir (11-12). Geliştirilecek yöntem ile LDPE primer ambalajında hasta kullanımına sunulan immunosuppressant etken maddesini içeren oftalmik preparatın ICH Q1A(R2) kılavuzunda “2.2.7. Genel Durum” başlığı altında tanımlı “Hızlandırılmış Stabilite” (6 ay 40°C %75RH) ve “Ara Koşul Stabilite” (30°C 65% RH) stabilite koşulunda stabilite takibi yapılp, primer ambalaj malzemesinden geçmesi muhtemel olan belirlenmiş 5 safsızlığın ürüne geçip geçmediğinin takibi yapılmıştır. Stabilite periyodu boyunca 40°C %75RH stabilite koşulu için Başlangıç, 1. ay, 3. ay ve 6. ay analizleri, 30°C 65% RH stabilite koşulu için ise Başlangıç, 1. ay, 3. Ay, 6. Ay ve 12. Ay analizleri yapılmıştır (13).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genel tanımlar

2.1.1. Oftalmik preparatlar

Oftalmik preparatlar (göz preparatları), konjunktiva, konjunktival kese veya göz kapaklarına uygulama amaçlı bir veya daha fazla aktif farmasötik bileşen içerebilen steril, sıvı, yarı katı veya katı preparasyonlardır. Farklı oftalmik preparat kategorileri arasında emülsiyonlardan oluşan damlalar, solüsyonlar veya süspansiyonlar ve merhemler bulunmaktadır. Kap ve kapaktan oluşan ambalaj malzemesi sistemleri için malzemeler, müstahzarın kalitesini olumsuz bir şekilde etkilememeli veya herhangi bir türden kabın malzemesi içine veya dışarıdan geçmesi muhtemel olumsuzluğun müstahzara difüzyonuna izin vermeyecek özellikte olmalıdır. Kap, mikrobiyal kontaminasyonu en aza indiren bir kapak ve kabın hiç açılıp açılmadığını ortaya çıkaran bir cihazla donatılmalıdır (14-15).

2.1.2. Göz damlası

Oftalmik damlalar (göz damlaları), konjunktival keseye damlatılması amaçlanan steril sulu veya yağlı çözeltiler, süspansiyonlar veya emülsiyonlardır. Sulu oftalmik damlaların hazırlanması, izotonisite ihtiyacının, belirli bir tamponlama kapasitesinin, istenen pH'nın, antimikrobiyal ajanların ve / veya antioksidanların eklenmesinin, viskozite artırıcı ajanların kullanılmasının ve uygun ambalaj seçiminin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesini gerektirir. Oftalmik göz damlalarının ambalaj malzemesi olarak LDPE, polipropilen ve yüksek yoğunluklu polietilen kullanılmaktadır. Bu ürünlerde herhangi bir renklendirici veya opaklaştırıcı kullanılamaz. Oftalmik emülsiyonlar ise genellikle sulu bir fazda yağlı damlacıkların dağılımlarıdır. ayrışma veya birleşme yönelik bir oluşum olmamalıdır (14-15).

2.1.3. Çok Dozlu Oftalmik Damla

Çok dozlu sistemler, normalde çoklu uygulama için on mililitreye kadar ilaç ürünü içeren plastik damlalıklı şişeleri içerir. Damla dozajı kolaylaştıran uygun bir ataşman ile donatılmıştır. Normalde şişe, göz damlasıyla tedavi edilecek gözün üzerinde dikey olarak tutulur. Sisteme bağlı olarak, kullanıcının ya konteyneri sıkıştırması ya da küçük bir pompalama işlemi gerçekleştirmesi gerekir. Çok dozlu oftalmik damla preparatları, kap ilk açıldıktan sonra 4 haftaya kadar kullanılabilir özelliktedirler (14-15).

2.1.4. Tek dozluk oftalmik damla

Tek dozluk ambalaj malzemesi kullanımı, oftalmik ürünler için çok önemli bir yere sahiptir. Tek kullanımlık flakonlar steril solüsyonlar içerir: kullanımdan hemen önce üstleri koparılır. Ancak her kullanımda sonra atıldıkları için bu sistemler kaynak tasarrufu sağlamaz. Patojenler flakonlara giremediği için tek dozlu sistemlere koruyucu eklemek gerekli olmayan sistemlerdir. Oftalmik damlalar, kullanım zamanına kadar içeriklerin ve aplikatörün sterilliğini koruyacak uygun tek dozluk kaplarda da sağlanabilir. Klasik tek dozlu sistemler, tek kullanımlık şişeleri olarak adlandırılan sistemlerde yer alırlar. Bu, bir doz için tam olarak yeterli göz kayganlaştırıcısı içeren plastikten yapılmış küçük, şeffaf bir flakondur. Tek dozluk göz damlalarının ambalaj malzemesinde çoğunlukla LDPE birincil ambalaj malzemesi kullanılır (14-15).

2.1.5. Blow fill seal

Blow-Fill-Seal (BFS) teknolojisi, küçük (0,1 mL) ve büyük hacimli (500 mL'den fazla) sıvı dolu kaplar üretmek için kullanılan bir üretim tekniğidir. Başlangıçta Avrupa'da 1930'larda geliştirilmiştir, 1960'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde tanıtıldı, ancak son 20 yılda ilaç endüstrisinde daha yaygın hale geldi ve şu anda farmasötik ve sağlık hizmetlerinin ambalajlanmasında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) dahil olmak üzere çeşitli ilaç düzenleme kurumları tarafından aseptik prosesin en avantajlı yöntemi olarak kabul edilmektedir. BFS'nin temel konsepti, bir makinenin içindeki steril kapalı bir alanda, insan müdahalesi olmadan sürekli bir işlemde bir kabın oluşturulması, doldurulması ve kapatılmasıdır. Bu nedenle bu teknoloji, steril farmasötik sıvı dozaj formlarını aseptik olarak üretmek için kullanılabilir (16).

2.1.6. Birincil ambalaj malzemesi

Dozaj formunu içeren, koruyan ve ileten ambalaj bileşenlerinin toplamı olarak tanımlanmıştır. Bu öğeler, potansiyel SAS'lar için en büyük riski oluşturur. Birincil paketleme bileşenlerinin tipik örnekleri, düşük veya yüksek yoğunluklu polietilen (LDPE / HDPE) kaplardır. Birincil ambalaj malzemelerinin imalatında kullanılan plastikleştiriciler, antioksidantlar, kaydırıcılar, UV stabilizörler üründe ortaya çıkması muhtemel SAS bileşenlerin tipik bir örnekleridir (2,17,76,77).

2.1.7. İkincil ambalaj malzemesi

İkincil bir ambalaj bileşeni, dozaj formu ile doğrudan temas halinde olmayan veya olmayacak bir paketleme bileşeni anlamına gelir. Tipik örnekleri, etiketler, mürekkepler, yapışkanlardır. İkincil bileşenlerin önemli bir düzeyde SAS ile sonuçlanma olasılığı daha düşüktür. UV mürekkep kürlenme işleminde kullanılan benzofenon başlatıcı, ikincil ambalajdan nihai ürüne sızması muhtemel bileşenlere bir örnektir (18).

2.1.8. Üçüncül ambalaj malzemesi

Üçüncül Ambalaj, ikincil bir ambalaj bileşeni ile doğrudan temas halinde olan ve nakliye ve / veya depolama sırasında ürüne ek koruma sağlayabilen ürün dağıtımı için kullanılan ambalaj bileşenleridir. Tipik örnekler, depolama ve nakliye için paletlenmiş ürünlerdir. Tahta paletlerin işlenmesi için kullanılan fungusit potansiyel olarak üçüncül ambalajdan nihai ürüne geçebilir (19).

2.1.9. Polimer katkı maddeleri ve muhtemel safsızlıklar

Tek kullanımlık ambalaj malzemelerinin işlenmesinde bir dizi katkı maddesi kullanılır ve potansiyel safsızlıklar olarak risk oluşturur. Bu katkı maddeleri çözücü içeren ortamlar içinde çözünür olma eğilimindedir, ve bu ortam ile etkileşime girer. Bu etkileşimin bir sonucu olarak, polimer matrisinden çözücü ortamına potansiyel olarak sızabilirler. Üretim süreçlerinde, kullanılan ambalajların reaktifler, reaksiyon solüsyonları, ara ürünler ve ilaç ürünleri ile doğrudan teması nedeniyle bu maddeler potansiyel olarak nihai ilaçta ambalaj malzemesi safsızlığı halinde ortaya çıkar ve farmasötik üründe kontaminasyona neden olurlar (20). Bu safsızlıklar temel kaynakları arasında, polimer üretim sürecinden kullanılan başlatıcılar, çözücüler, polimer matrisinde kalan düşük moleküler ağırlıklı maddeler, çapraz bağlama maddeleri, blok kurucu maddeler ve polimerize olmayan monomerler yer almaktadır. (21). Ambalaj malzemesinden kaynaklanan safsızlıklar kimyasal yapılarına göre genel olarak 4 başlık altında toplanmıştır. Bu safsızlıklara ilişkin detaylı tanımlar 2.1.8.1. ila 2.1.8.4 arasında verilmiştir.

2.1.9.1. Uçucu organik ambalaj malzemesi safsızlıkları

Uçucu organik safsızlıklar, oda sıcaklığında veya altında buharlaşan veya süblimleşen maddelerdir. Uçucu maddeler, aynı sıcaklıktaki uçucu olmayan maddelere göre daha yüksek buhar basınçlarına sahiptir. Bu safsızlıklar organik bileşikler olup

genellikle primer ambalaj malzemesindeki boyalardan, etiketlerden, yapıştırıcılardan veya proses çözücülerinden kaynaklanır. Headspace GC-MS cihazı kullanılarak analiz edilirler (22).

2.1.9.2.Yarı uçucu organik ambalaj malzemesi safsızlıkları

Yarı uçucu organik safsızlık grubu, geniş kimyasal özelliklere ve yapısal özelliklere sahip bileşiklerden oluşur. Yarı uçucu bileşiklerin örnekleri arasında hidrokarbonlar, aldehitler, eterler, esterler, fenoller, organik asitler, ketonlar, aminler, amitler, nitroaromatikler, ftalat esterler, nitrosaminler, haloerler ve trihalometanlar bulunur. Yarı uçucu bileşikler terimi, Henry yasası sabitlerine göre (H) $10^{-5} - 3 \times 10^{-7}$ atm*m³/mol aralığında sahip olan ve genellikle daha yüksek kaynama noktaları gösteren organik bileşikler ifade eder. $10^{-14} - 10^{-4}$ atm arası düşük buhar basıncı ile genellikle sudan daha yüksek olan daha yüksek kaynama noktaları gösterirler. Organik bileşikler, kalıntı monomerler, antioksidanlar, plastikleştiriciler, antistatik ajanlar, arındırıcı ajanlar, koruyucular ve kaydırıcı ajanlar bu safsızlıkların temel kaynağıdır. GC-MS enstrümantal analiz yöntemi ile analizleri yapılır (22).

2.1.9.3. Uçucu olmayan organik ambalaj malzemesi safsızlıkları

Uçucu olmayan organik safsızlıklar, mevcut koşullar altında kolay kolay buharlaşmayan bir maddeyi ifade eder. Uçucu olmayan maddeler, düşük bir buhar basıncı ve yüksek bir kaynama noktasına sahiptir. Büyük oligomerler, antioksidanlar, termal olarak kararsız bileşikler uçucu olmayan organik safsızlıkların kaynağıdır ve bu safsızlıkların genellikle LC-UV-MS enstrümantal analiz yöntemi kullanılarak analizleri gerçekleştirilir (22).

2.1.9.4. İnorganik ambalaj malzemesi safsızlıkları

Elementel safsızlıklar, bitmiş ilaç ürünlerinde bulunabilen metal izleridir. Nihai ilaç ürünlerindeki eser elementlerin konsantrasyonunu tanımlamak için temel safsızlıkların analizi gereklidir. Farmasötik formülasyonlardaki temel safsızlıklar katalizörlerden, formülasyon bileşenlerinden ve işlem kaplarından gelebilir. İlaç etkinliğine müdahale edebilir veya hasta üzerinde doğrudan toksik etki oluşturabilirler. Özellikle cam ve alimünyum ilaç ambalaj malzemelerinden kaynaklanabilen bu safsızlıklar için, ICP-MS enstrümantal analiz yöntemi kullanılarak analizleri yapılır (22).

2.1.10. Ekstre edilebilir ambalaj safsızlıkları

Ekstrakte edilebilir ambalaj safsızlığı (EEAS), farmasötik bir ürünün ambalaj malzemesinin, laboratuvar ortamında belirli ekstraksiyon prosedürlerine tabi tutulması sonucunda ekstraksiyon çözücüsüne geçen organik veya inorganik bileşiklerin tümüdür (17). EEAS çalışmasının önemini ortaya çıkaran neden ise ekstrakte edilebilir maddeler çalışmasından elde edilecek bilgi ışığında (Ekstrakte edilebilir maddelerin kendileri veya ekstrakte edilebilir maddelerden oluşması muhtemel maddeler) saklama koşullarında, ilaç ürünün matrisi ile ambalaj malzemesinin etkileşimi sonucunda ortaya çıkabilecek SAS'lar hakkında bilgi verebilecek olmasıdır.

EEAS çalışmasının tamamı laboratuvar şartları altında, kontrollü ekstraksiyon yöntemleri ile yapılması gereken çalışmalardır. Bu çalışmalarda izlenilmesi gereken yollar, seçilecek ekstraksiyon yöntemleri ve ekstraksiyon çözeltileri çeşitli kılavuzlarda son dönemlerde yerini almaya başlamıştır. Bu tarz çalışmalarda önemli ölçüde kabul görmüş PQRI (Product Quality Research Institute) tarafından yayınlanan PODP (Parenteral and Ophthalmic Drug Products) için ekstraksiyon matrisleri ve süreleri tanımlamaları ışığında belirli bir strateji belirlenmiştir (7).

EEAS ve SAS çalışmaları arasında bulunan korelasyon nedeni ile, ilaç ürün için yapılacak çalışma dizaynının en doğru şekilde seçilmesi karakterizasyon ve hedef moleküllerin tespiti noktasında kritik bir öneme sahiptir. Yapılacak dizayn ve edilecek sonuçlar ile ilgili korelasyon Şekil 2-1'de gösterilmiştir. Kontrollü ekstraksiyon çalışmaları için kullanılan ekstraksiyon teknikleri/yöntemleri teknik olarak gerekçelendirilmeli ve ilaç ürünü kullanımının en kötü koşullar altında elde edilen SAS profiline en azından hem kalitatif hem de kantitatif eşdeğer olacak şekilde optimize edilmelidir. Doğru bir şekilde yürütülecek bir kontrollü ekstraksiyon çalışması, farmasötik geliştirme sürecinin erken aşamalarında gerçekleştirildiğinde, farmasötik geliştirme ekibinin potansiyel ilaç ürünü SAS maddelerinin erkenden değerlendirilmesine ve önlem alınmasına veya değerlendirme yapmaya olanak verir. Alınacak bu önlem, farmasötik geliştirme ekibine toksikolojik endişelere yol açabilecek potansiyel SAS'a karşı uyarabilir ve uygun malzeme ile güvenlik çalışmalarına veya ambalaj malzemesinin modifikasyonuna başlamak için yeterli süre sağlar (23,77).

2.1.11. Sızabilen ambalaj safsızlıkları

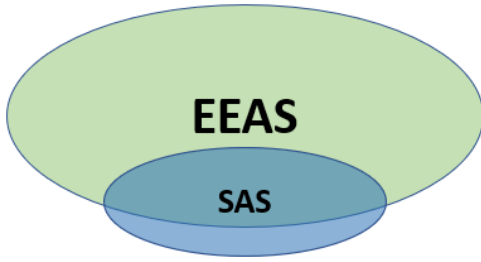
Sızabilen ambalaj safsızlığı (SAS), farmasötik ürüne ambalaj malzemesinden herhangi bir durum altında geçmesi muhtemel inorganik ve organik safsızlıkların tümüdür. USP-NF 1664 monografında bu safsızlıkların kaynağının primer ambalaj malzemesinin yanı sıra ambalaj malzemesi bileşenleri (etiket vb.), ürünün taşınması, dağıtımı gibi bir çok parametrenin etkili olduğu kompleks sistemler olabileceği belirtilmektedir (17, 24,77). Bu ortaya çıkan safsızlıklar ürünün etken maddesi veya yardımcı maddeleri ile herhangi bir ilgisi olmayan, ilaç ürününün matrisinin, ambalaj malzemesi olarak tanımlanan, dış yüzey ile etkileşiminin sonucu ortaya çıkan safsızlıklardır. İlaç ürün ile ambalaj malzemesi arasındaki etkileşimler, ilaç ürününün, birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül ambalaj malzemeleri ile etkileşimleri olarak sınıflandırılmıştır ve Bölüm 2-3, Bölüm 2-4 ve Bölüm 2-5’de tanımları yapılmıştır.

USP-NF kılavuzunun 1664 nolu monografında belirtilen SAS değerlendirilmesinde risk temelli yaklaşım tablosu Tablo 2-1’de verilmiştir.

Tablo 2-1 Farmasötik preparatlarda risk temelli yaklaşım ile SAS'ın değerlendirilmesi (24)

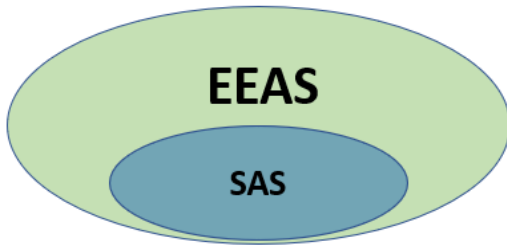
Farmasötik preparatın veriliş yoluna bağlı olarak risk derecesi	Ambalaj bileşeni-doza formu etkileşimi olasılığı		
	Yüksek	Orta	Düşük
En yüksek	İnhalasyon aerosoller ve spreyler	Enjeksiyonlar ve enjekte edilebilir süspansiyonlar, inhalasyon çözeltileri	Steril tozlar ve enjeksiyonluk tozlar; inhalasyon tozları
Yüksek	Transdermal merhemler ve patch	Oftalmik çözeltiler ve süspansiyonlar, burun aerosoller ve spreyleri	-
Orta	Topikal çözeltiler ve süspansiyonlar, topikal ve lingual aerosoller, oral çözeltiler ve süspansiyonlar	-	Oral tabletler ve oral (sert ve yumuşak jelatin) kapsüller; topikal tozlar; oral tozlar

Tablo 2-1 göre oftalmik emülsiyon çözeltisinin ambalaj malzemesi ile etkileşim olasılığı “Orta” bu etkileşimin risk derecesi ise “Yüksek” olarak verilmiştir. Bu sonuca göre oftalmik emülsiyon çözeltisi içeren ilaç ürünlerinin EEAS and SAS çalışmasının yapılmasının ürünün kalite değerlendirmesi üzerine etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmalar ile ortaya çıkabilecek 2 farklı durum Şekil 2-2 ve Şekil 2-3’te verilmiştir.



Şekil 2-1: EEAS çalışma tasarımının, SAS çalışması ile korelasyonu durum-1

Şekil 2-1’de görüldüğü üzere EEAS çalışmasının dizaynının düzgün tasarlanmadığı bir durumda farmasötik üründe saklama koşullarında beklenmeyen safsızlıkların ortaya çıkmasına sebep olabilir ve tüm çalışmaların en baştan tekrar başlaması gerekebilir. Bu durum kesinlikle istenmeyen ve zaman kaybına sebep olan bir durumdur.



Şekil 2-2: EEAS çalışma tasarımının, SAS çalışması ile korelasyonu durum-2

Şekil 2-2’de ise EEAS çalışması çalışma tasarımı doğru şekilde tasarlandığında, EEAS sonuçlarından elde edilen tüm safsızlıkların SAS çalışmasında ortaya çıkan tüm safsızlıkları kapsadığı bir senaryo ortaya çıkmıştır. Tüm EEAS ve SAS çalışmalarında amaç, elde edilen sonuçların bu korelasyon durumunda olduğu gibi olmasıdır (26-28).

Terapötik sınırların belirlenmesinde kılavuzlarda yer alan ve Bölüm 2.10. ve 2.11.’de tanımları verilen güvenlik kaygısı eşiği (SCT, (safety concern threshold), ve analitik değerlendirme eşiği (AET, analytical evaluation threshold) değerleri kullanılmıştır (7).

2.1.12. Güvenilirlik kaygısı eşiği (SCT)

SCT limitinin altında, ilaç ürününde olması muhtemel bir SAS'ın, karsinogenik ve kanserojen olmayan toksik etkilerinin ihmal edilebilecek kadar düşük bir dozu olduğu eşiktir (17, 24-25).

Parenteral ve oftalmik ilaç ürünleri (PODP) grubu ilaç ürünleri için farmasötik preparatın kullanım yoluna bağlı olarak, SCT limiti 1.5µg/gün olarak belirlenmiştir (29,7).

2.1.13. Analitik değerlendirme eşiği (AET)

Analitik Değerlendirme Eşiği (AET), toksikolojik değerlendirme için bir SAS'ın karakterize edilmesi ve raporlanması gereken eşik veya üzerinde olan eşiktir. AET, ilaç ürününün dozlama parametrelerini içeren faktörlere dayalı olarak SCT'den matematiksel olarak türetilir (17, 24-25).

Ambalaj malzemesi AET hesabı (µg/ambalaj):

(Denklem 2-1)

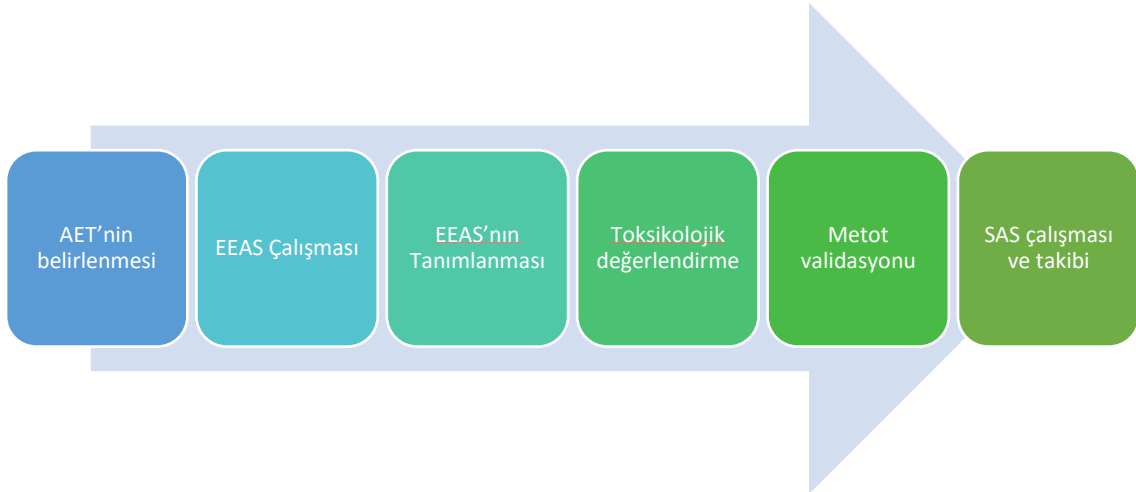
$$AET (\mu g/ambalaj) = \frac{SCT (\mu g/gün)}{Günlük kullanım dozu \left(\frac{doz}{gün} \right)} \times Ambalajdaki kullanılabilir doz \left(\frac{doz}{ambalaj} \right)$$

Farmasötik preparat AET hesabı (µg/mL):

(Denklem 2-2)

$$AET (\mu g/mL) = \frac{AET (\mu g/ambalaj)}{Ambalajdaki farmasötik preparatın hacmi \left(\frac{mL}{ambalaj} \right)}$$

Elde edilen AET değeri standart hazırlıklarında, farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin hazırlıklarında, EEAS ve SAS çalışmalarında belirlenen değerin üzerinde gelen piklerin tanımlanması konuları için kullanılır. Bir EEAS SAS çalışması için verilen tüm açıklamalara ait akış diyagramı olarak hazırlanan özet çalışma planı Şekil 2-4'de verilmiştir.



Şekil 2-3: EEAS-SAS çalışma tasarımı akış şeması

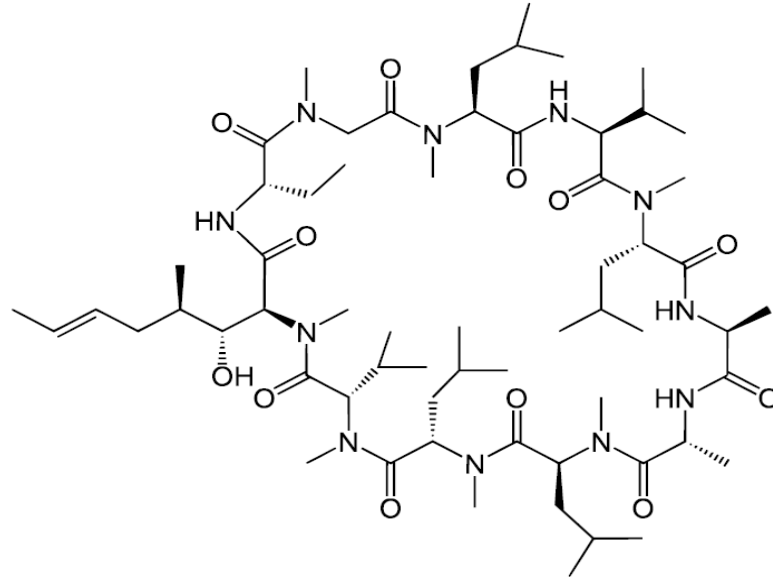
2.1.14. Kalifikasyon eşiği (QT)

QT, kanserojen olmayan belirli bir SAS'ın, yapı-aktivite ilişkisi (Structure–activity relationship, SAR) endişeleri göstermediği sürece güvenlik yeterliliği (toksikolojik değerlendirmeler) için dikkate alınmadığı eşiktir (30). Yapı-aktivite ilişkisi (SAR), bir molekülün kimyasal yapısı ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkidir. Bu fikir ilk olarak 1865'te Crum-Brown ve Fraser tarafından ileri sürülmüştür. SAR analizi, organizmada hedef biyolojik etkiyi çağrıştıran kimyasal grubun belirlenmesini sağlar (31). PQRI kılavuzuna göre kabul edilen limit değer ≤ 5 µg/gün olarak belirlenmiştir (30). Bu değer üzerinde bir SAS sonucu elde edilmesi durumunda bileşiğin toksikolojik değerlendirmeleri yapılmalıdır. Elde edilecek sonuca göre spesifikasyon limiti genişletilebilir.

2.2. Maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikler

2.2.1 Siklosporin

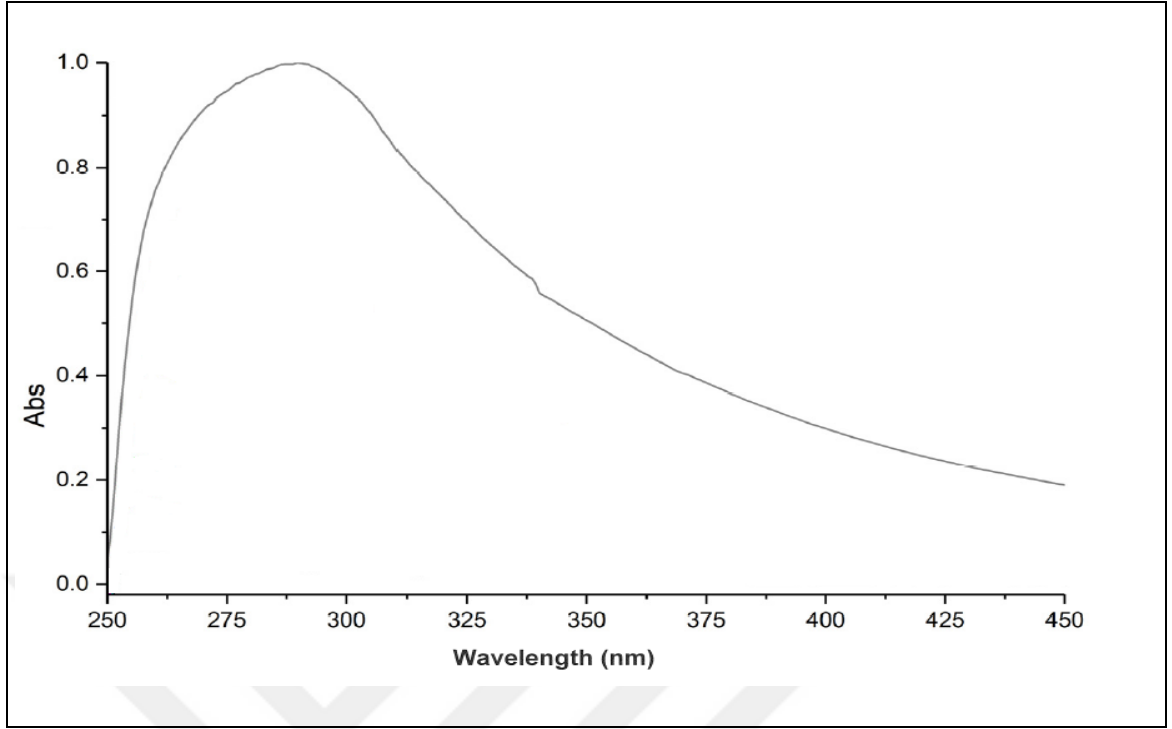
Kapalı formülü $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ olan Siklosporin 1202.6 g/mol molekül ağırlığına sahip organ transplantasyonlarında oral yol ile rutin olarak kullanılan, immünsupresif bir ajandır. CAS nosu: 59865-13-3 olan Siklosporin'in kimyasal formülü 30-etil-33-[(E)-1-hidroksi-2-metilheks-4-enil]-1,4,7,10,12,15,19,25,28-nonametil-6,9,18,24-tetrakis(2-metilpropil)-3,21-di(propan-2-yl)-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undekazasiklotritriakontan-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undekon'dur.



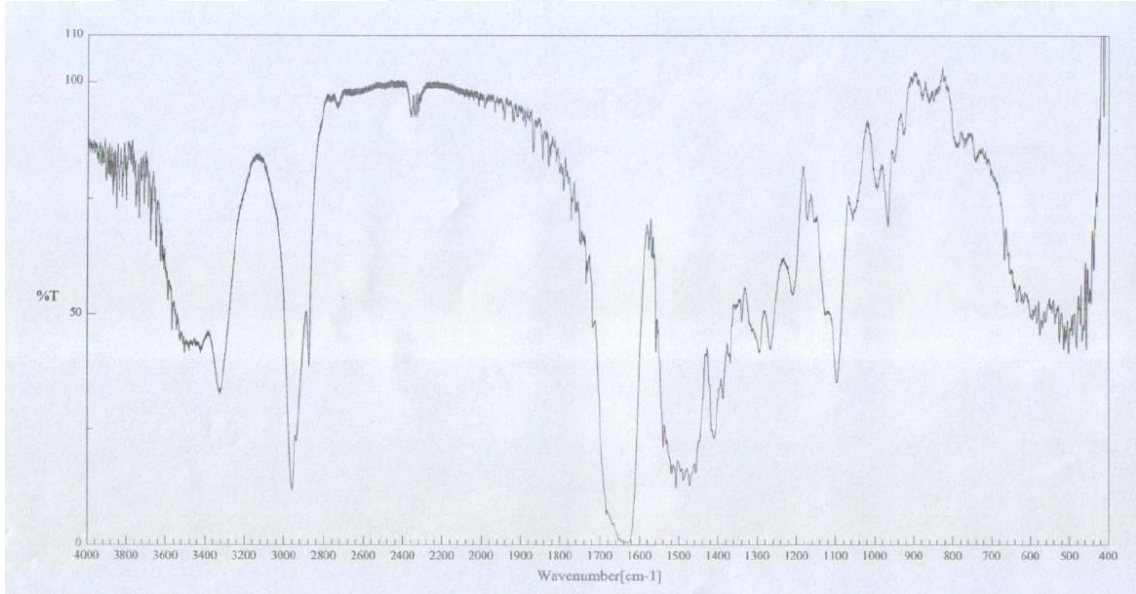
Şekil 2-4 Siklosporin kimyasal yapısı

Suda ve doymuş hidrokarbonlarda az çözünür; metanol, aseton ve dietil eterde çok çözünür. Siklosporin, beyaz prizmatik iğneler (asetondan) veya beyaz toz görünüşe sahiptir. 148-151 °C erime noktasına sahiptir. Siklosporin'in oftalmolojide kullanımı %0.05'lik topikal formülasyonu 2003 yılında FDA onayı alarak kuru göz hastalığının tedavisinde kullanıma sunulmasıyla başlamıştır.

Dönüşümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.3'te görülmektedir.



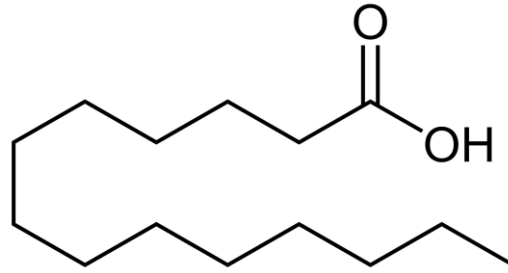
Şekil 2-5 Siklosporine ait UV spektrumu (%13.61, a/a, sulu çözelti) (32)



Şekil 2-6 Siklosporine ait FTIR spektrumu (33)

2.2.2 Miristik asit

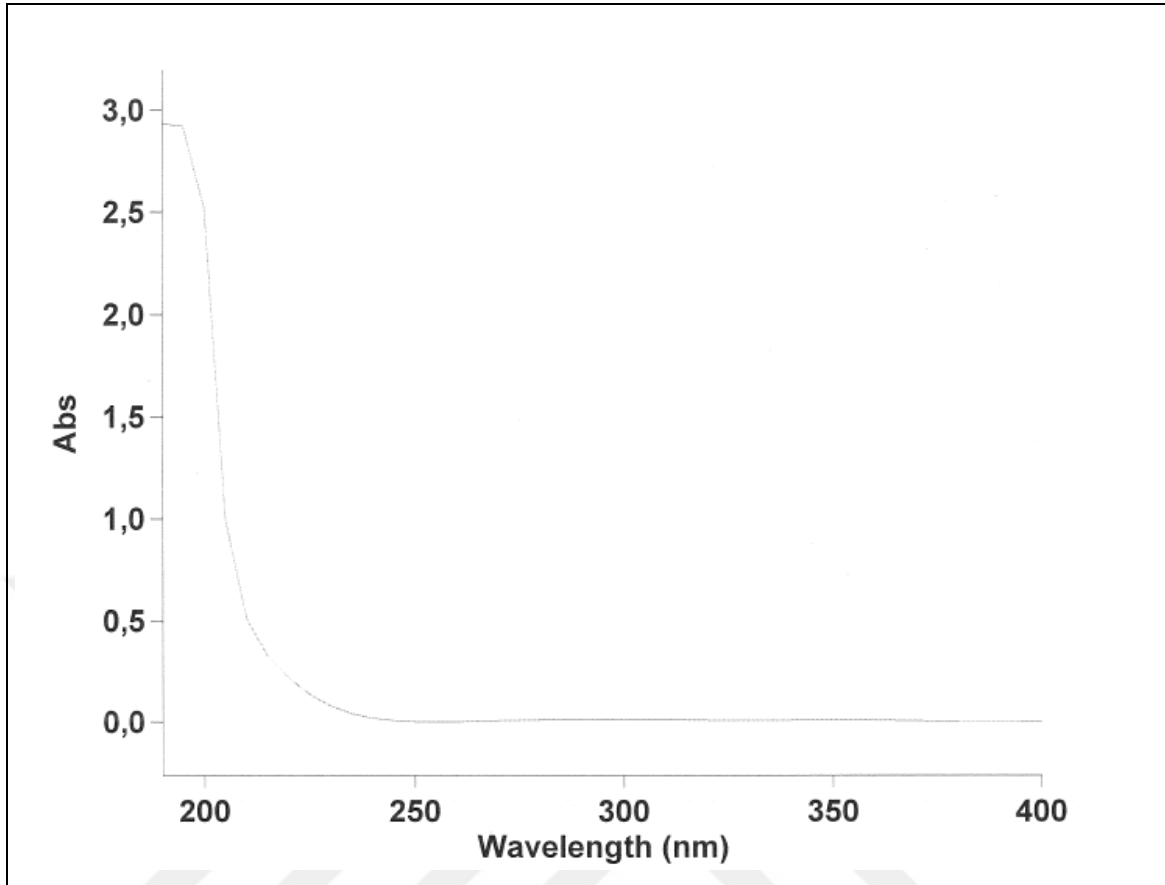
Kimyasal adı tetradekanoik asittir. Miristik asit, 14 karbonlu doymuş bir yağ asididir. CAS nosu:544-63-8, Kapalı formülü $C_{14}H_{28}O_2$ olan miristik asidin molekül ağırlığı 228.2 g/mol dür. Miristik asit suda çözünmez ancak etanol, eter ve kloroformda çözünür. Görünüşü bazen parlak kristal katı veya beyaz ila sarımsı beyaz bir tozdur. 0.8739 (80 °C) bağıl yoğunluğa, 54.5°C erime noktasına ve 326.2°C kaynama noktasına sahiptir. Refraktif indeksi 1.4310'dur.



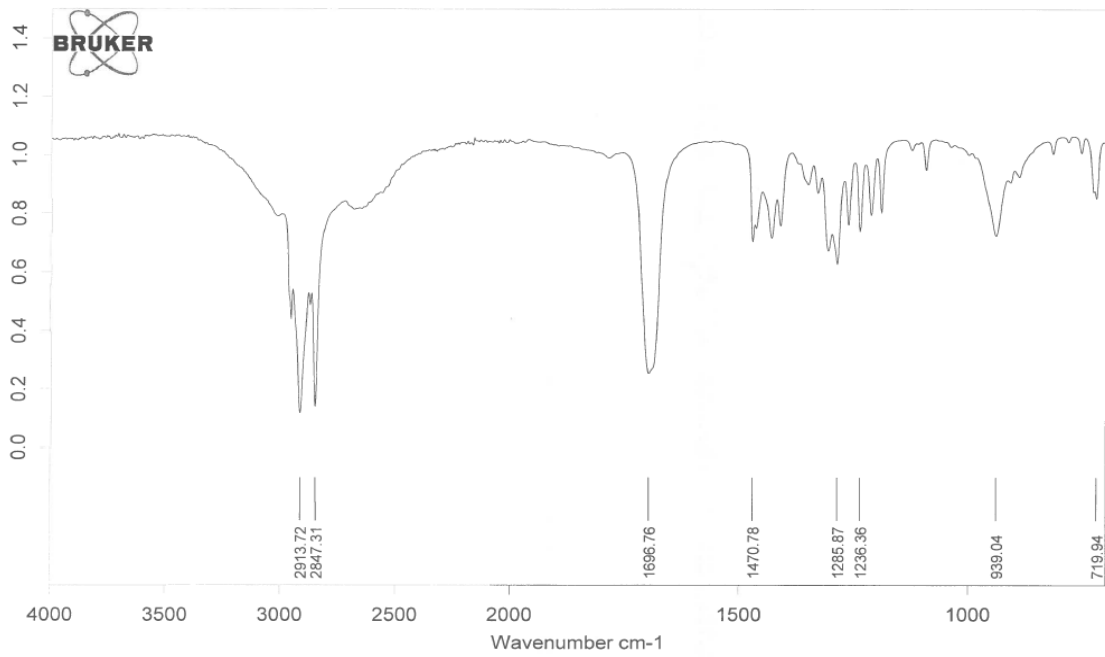
Şekil 2-7: Miristik asidin kimyasal yapısı

Polimer endüstrisinde lubrikant (kaydırıcı) olarak kullanılan yağ asitleri sınıfından olan miristik asit, metal kalıp yüzeyi ile plastik arasındaki etkileşimi azaltıp, film üretimine ve enjeksiyonlu kalıplamaya yardımcı olmak için yaklaşık %0,05-% 0,15 oranında formülasyona eklenir (34-36).

Miristik asidin metanolde alınan UV spektrumu Şekil 2.2’de verilmiştir. Maddenin Fourier Dönüşümlü İnfrared (FT-IR) spektrumu Şekil 2.3’te görülmektedir.



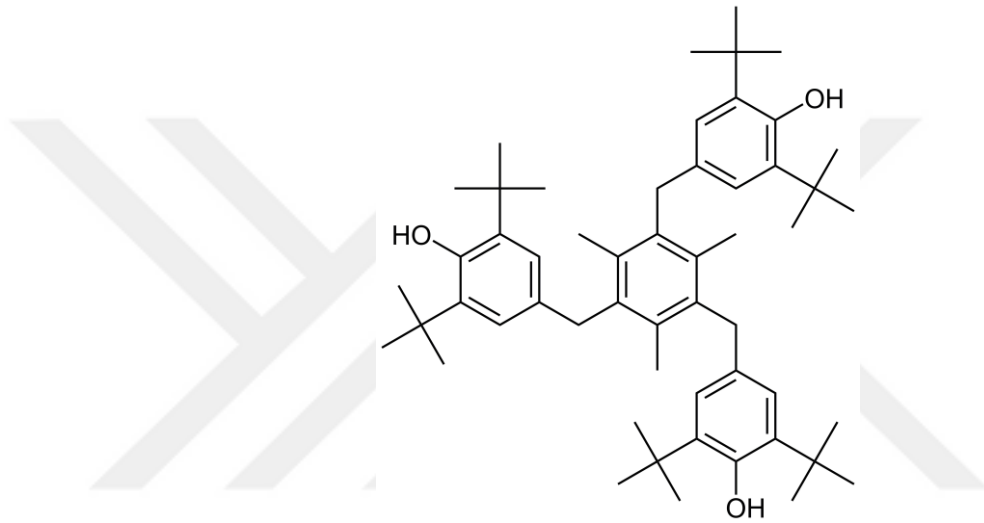
Şekil 2-8 Miristik aside ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-9 Miristik asidin FTIR spektrumu

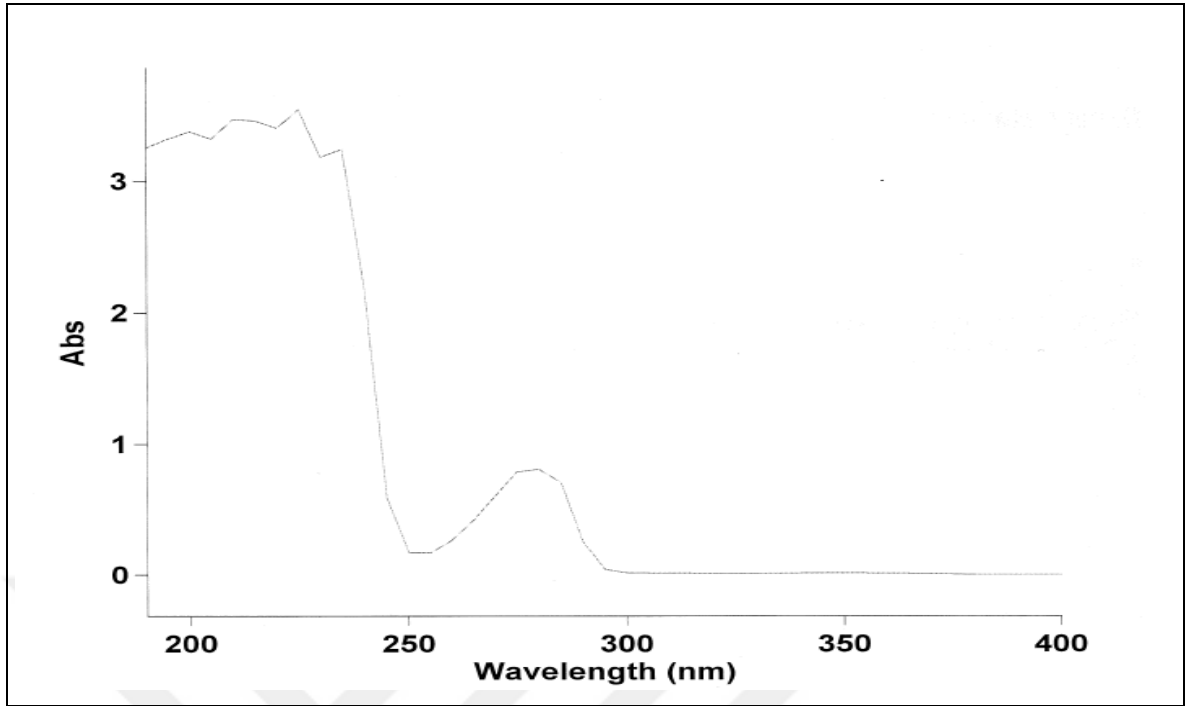
2.2.3 Irganox 1330

Avrupa farmakopesinde “Plastic additive 10” olarak tanımlıdır. Cas nosu: 1709-70-2’dir (37). Kimyasal formülü 4,4',4''-(2,4,6-trimethylbenzen-1,3,5-triyltrismethilen) trio[2,6-bis(1,1-dimethylethil) fenol]’dür. Kapalı formülü $C_{54}H_{78}O_3$ olan Irganox 1330’un molekül ağırlığı 774.6 g/mol, net kütlesi ise 774.5951 g/mol dür (38). Irganox 1330, beyaz, kristal toz formunda kokusuz bir bileşiktir. Benzen ve diklorometanda kısmen çözünür; suda çözünmez. 0,8883 yoğunluğa, 248-250°C erime noktasına ve 739.54°C kaynama noktasına sahiptir. Refraktif indeksi 1.58'dir.

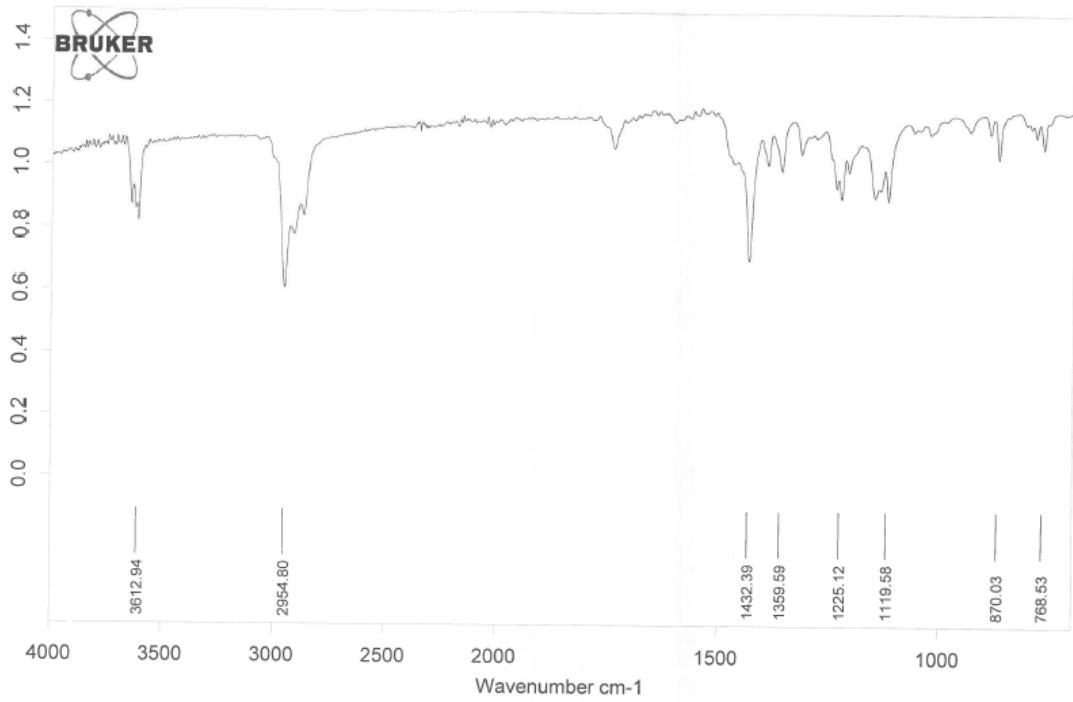


Şekil 2-10: Irganox 1330 kimyasal yapısı

Irganox 1330, organik substratları termo-oksidatif bozunmaya karşı koruyan, sterik olarak engellenmiş bir fenolik antioksidandır. Irganox 1330, boruların, kalıplanmış eşyaların, tellerin, kabloların, dielektrik filmlerin ve doğrusal poliesterler, poliamidler ve stiren homo- ve kopolimerler gibi mühendislik plastikleri gibi diğer polimerlerin stabilizasyonu için poliolefinlerde (ör. Polietilen, polipropilen, polibüten) kullanılır. Ayrıca PVC, poliüretanlar, elastomerler, yapıştırıcılar ve diğer organik substratlarda kullanılabilir. Bu stabilizatör için, maksimum kullanım seviyesi naylon reçineler için %1.0 diğer tüm polimerlerde maksimum %0,5 oranında kullanılabileceği FDA tarafından belirtilmiştir (34,39).



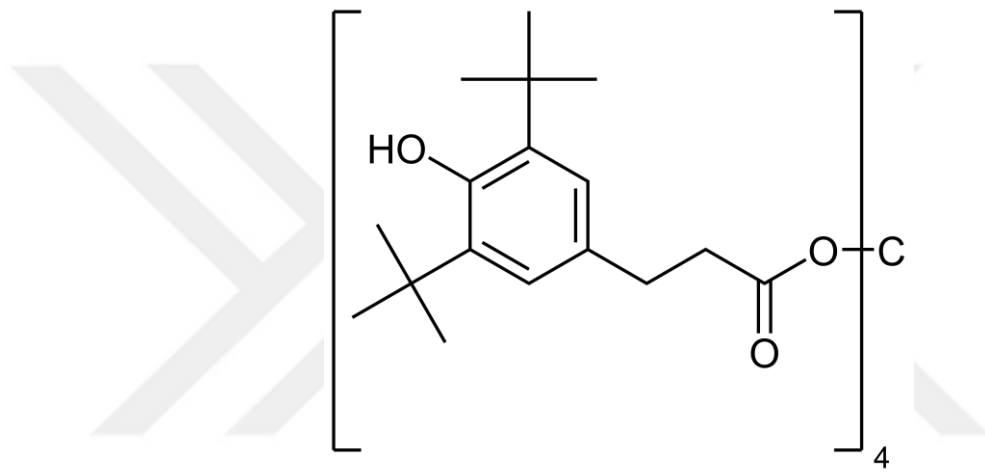
Şekil 2-11 Irganox-1330'a ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-12: Irganox-1330 FTIR spektrumu

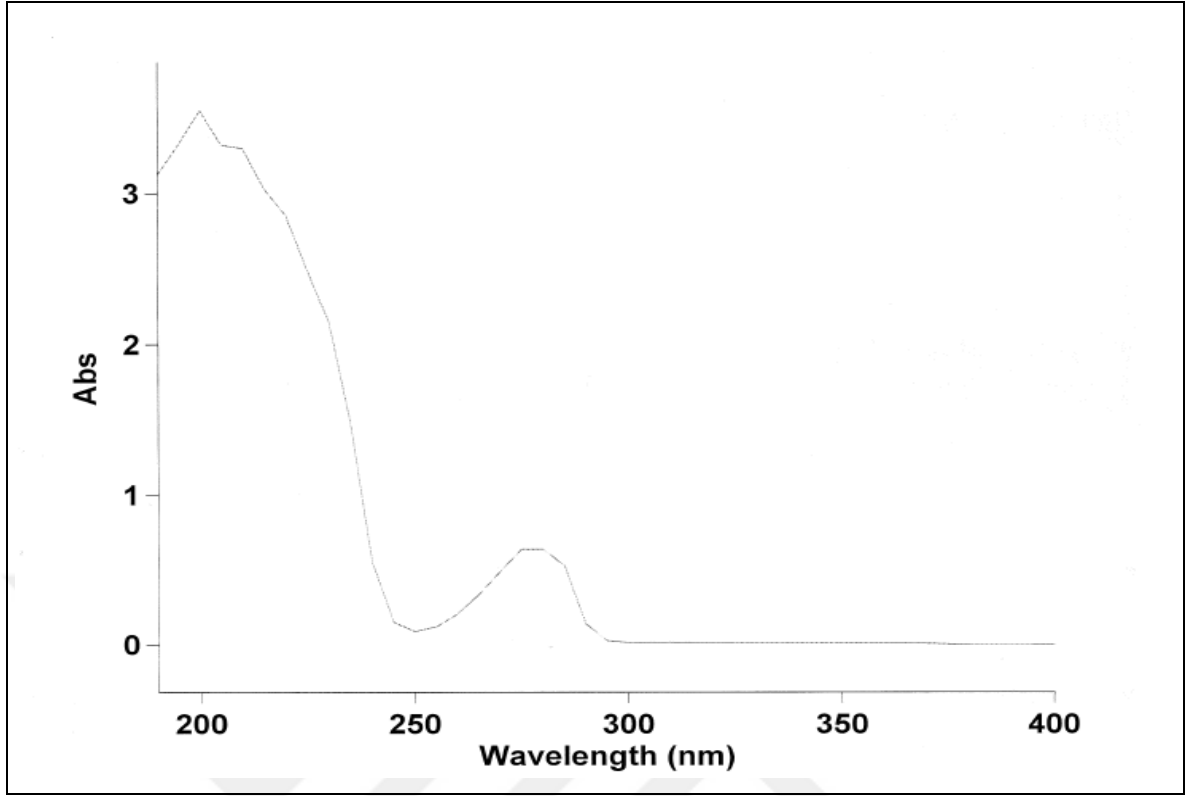
2.2.4 Irganox 1010

Avrupa farmakopesinde “Plastic additive 09” tanımlı olan, Irganox 1010, Cas no: 6683-19-8’dir ve beyaz, kristalimsi toz yapıdadır (40). Kimyasal formülü pentaerithritil tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hidroksfenil)propionate]’dır. Kapalı formülü $C_{73}H_{108}O_{12}$ olan Irganox 1010’un molekül ağırlığı 1177.6 g/mol, net kütlesi ise 1176,7841 g/mol dır (41). Asetonda 0,75 g/ml, Toluende 0,5 g/mL çözünürlüğe sahiptir; suda çözünmez. 1,077 g/cm³ yoğunluğa, 115-118°C erime noktasına ve 1005.8°C kaynama noktasına sahiptir. Refraktif indeksi 1,535’dir (42).

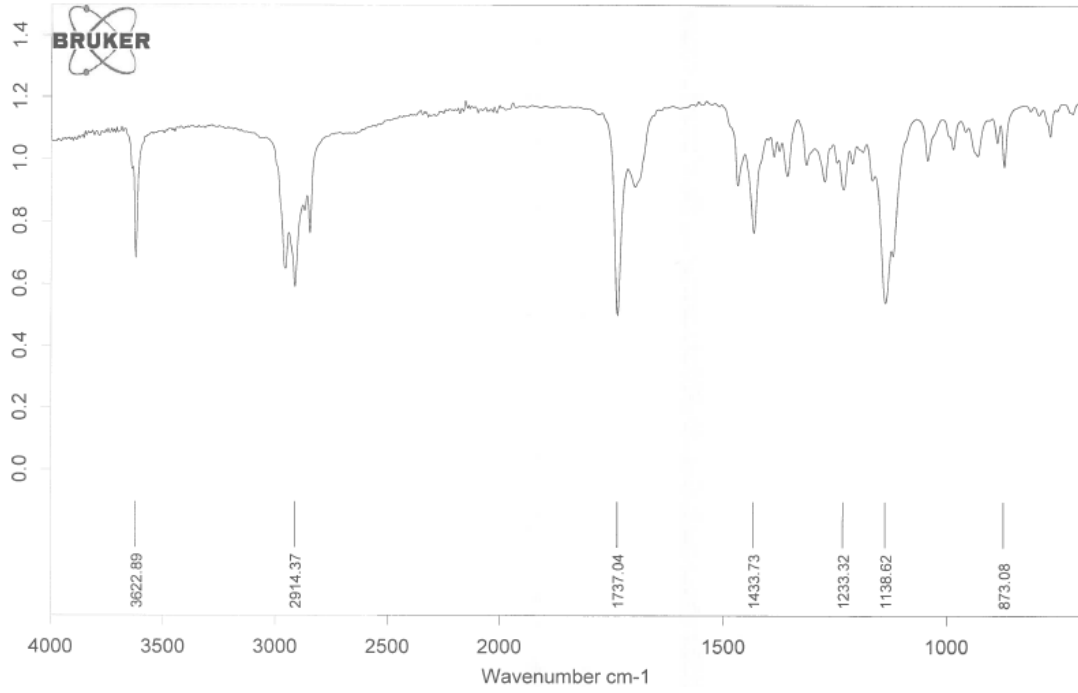


Şekil 2-13: Irganox 1010 kimyasal yapısı

Irganox 1010, sterik olarak engellenmiş bir fenolik birincil antioksidandır. Esas olarak poliolefinlerde uygulanan termo-oksidatif bozulmaya karşı koruma sağlar ve ayrıca poliasetaller, poliamidler ve poliüretanlar, polyesterler, PVC, ABS, butil kauçuk ve sentetik kauçuklar gibi elastomerlerin üretiminde kullanılır (34, 43).



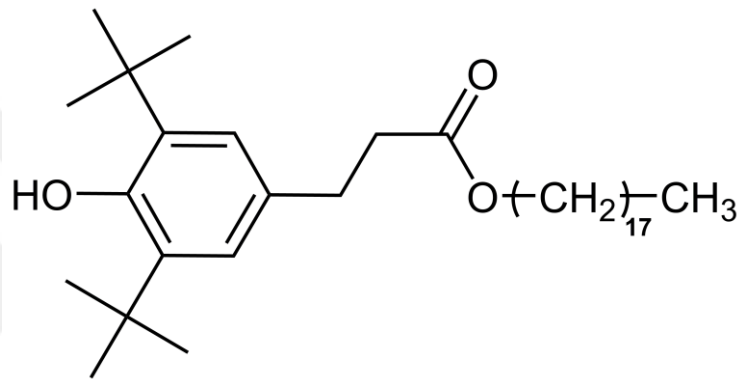
Şekil 2-14 Irganox-1010'a ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-15: Irganox-1010 FTIR spektrumu

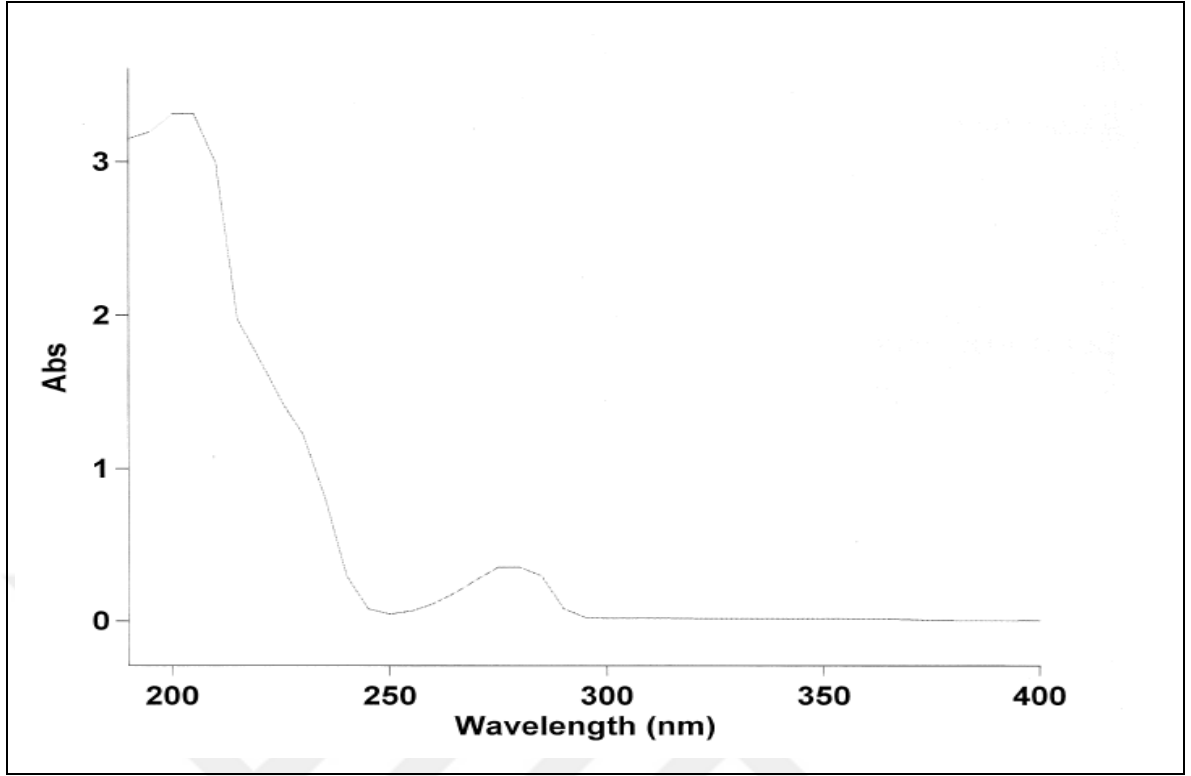
2.2.5 Irganox 1076

Avrupa farmakopesinde “Plastic additive 11” olarak tanımlı olan, Irganox 1076, kristalimsi beyaz tozdur (44). Cas nosu: 2082-79-3’tür. Kimyasal formülü Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hidroksifenil)-propionate’dır. Kapalı formülü $C_{35}H_{62}O_3$ olan Irganox 1076’nın molekül ağırlığı 530.9 g/mol, net kütlesi ise 530.4699 g/mol dür (45). 0.760 g/cm³ yoğunluğa, 50-55°C erime noktasına ve 568°C kaynama noktasına sahiptir. Benzen, kloroform, sikloheksan, aseton ve esterler gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünür, metanol, etanol, mineral yağda az çözünür, suda çözünmez.

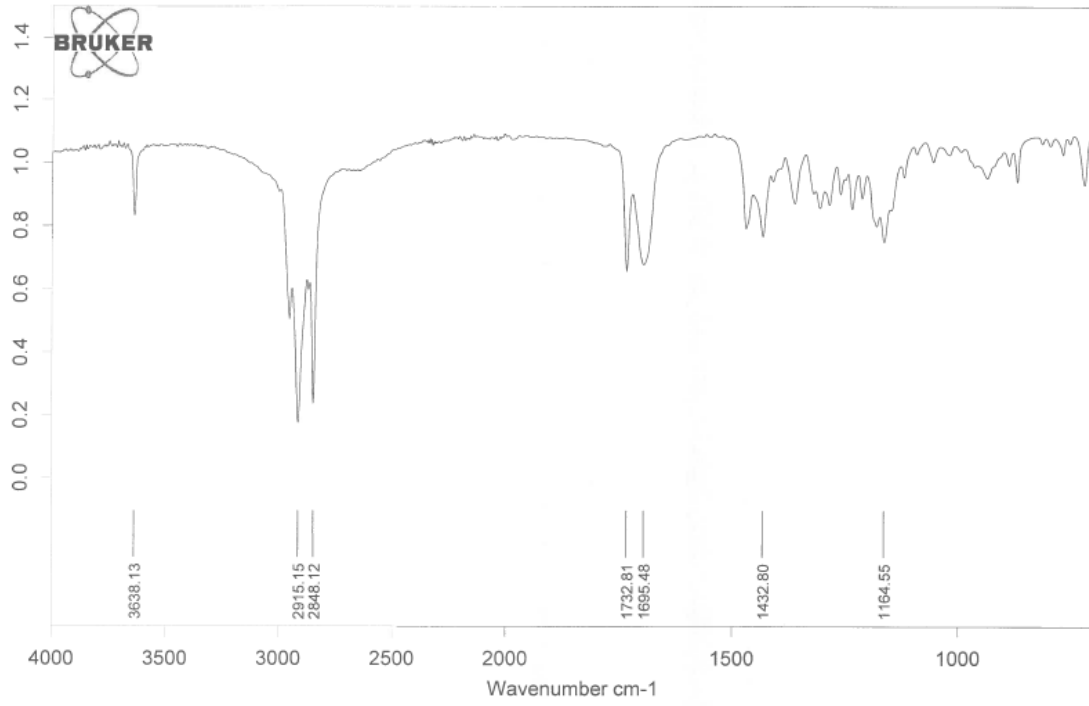


Şekil 2-16: Irganox 1076 kimyasal yapısı

Yüzeyleri termo-oksidatif bozulmaya karşı korur. Düşük uçuculuğa ve ekstraksiyona karşı yüksek dirence sahiptir (46-47). Yaygın olarak polietilen, polipropilen, polioksimetilen, polistiren, polivinil alkol, sentetik lifler, elastomerler, yapıştırıcılar, mumlar, sentetik kauçuk ve petrol ürünlerinin üretiminde, maksimum %0.5 oranında kullanılır (34,48).



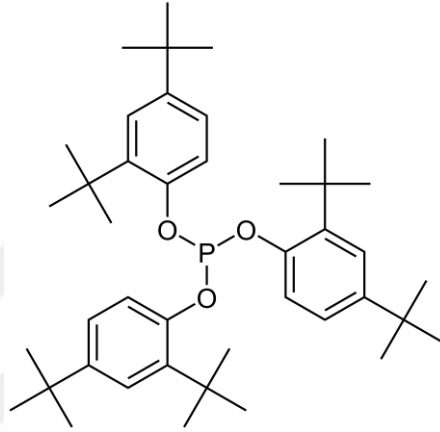
Şekil 2-17 Irganox-1076'ya ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-18: Irganox-1076 FTIR yapısı

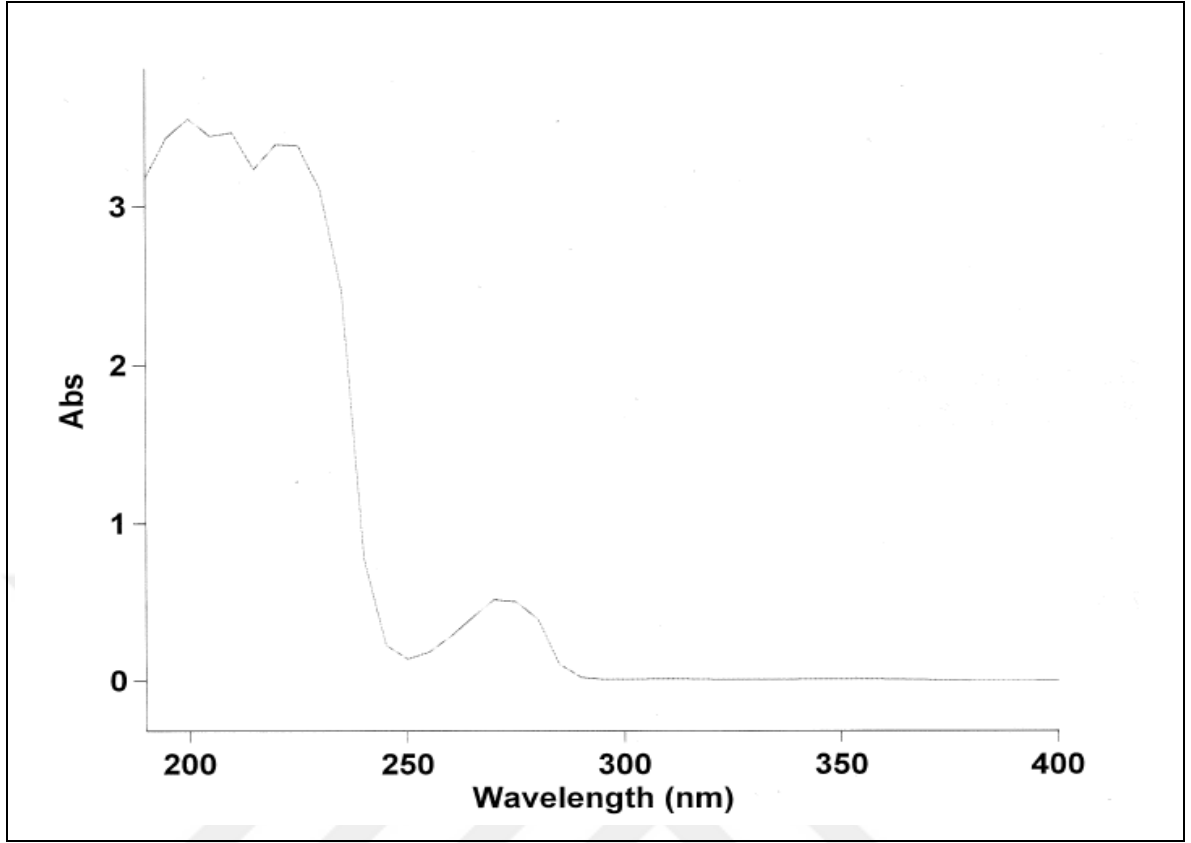
2.2.6 Irgafos 168

CAS nosu 31570-04-4 olan, Avrupa farmakopesinde “Plastic additive 12” olarak tanımlı olan, Irgafos 168, beyazımsı toz formdadır (49). Kimyasal formülü Tris (2,4-di-1,1-dimethylethylphenyl) phosphite R’dir. Kapalı formülü $C_{42}H_{63}O_3P$ olan Irgafos 168’in molekül ağırlığı 646.9 g/mol, net kütlesi ise 646.4515 g/mol dür (50). 0.98 g/cm^3 yoğunluğa, 181-184 °C erime noktasına ve $594.2 \pm 50.0^\circ\text{C}$ kaynama noktasına sahiptir. Kloroform, n-hegzan, toluen gibi organik çözücülerde çözünür, suda çözünmez.

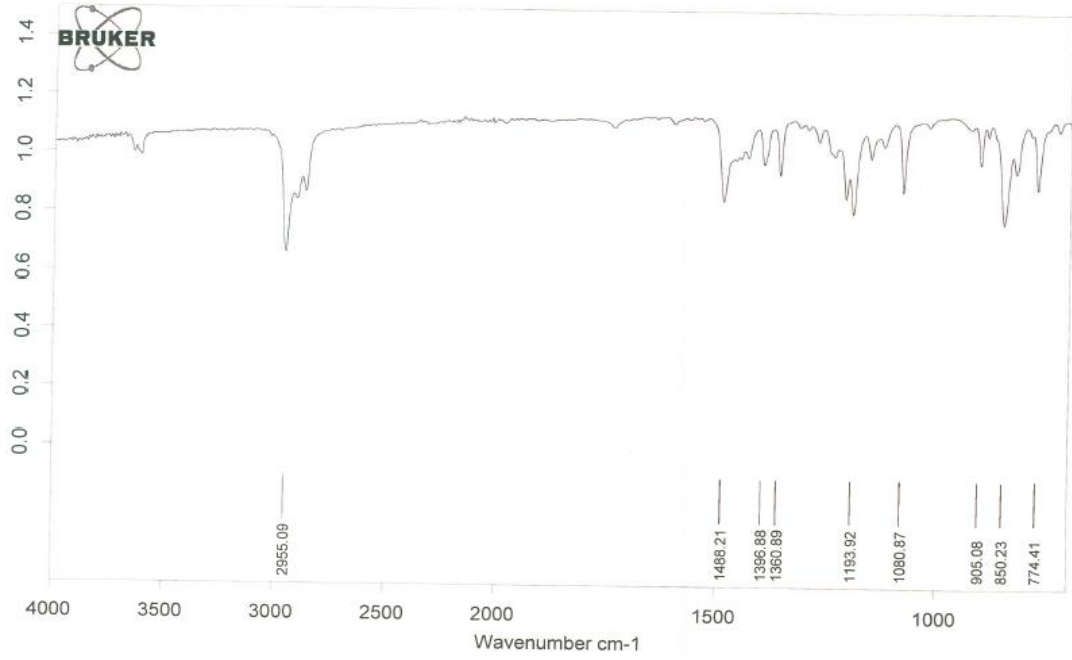


Şekil 2-19: Irgafos 168 kimyasal yapısı

Antioksidan 168, düşük uçuculuğa sahip bir organofosfittir ve özellikle hidrolize dirençlidir. Proses aşamalarında oksidasyona eğilimli polimerleri korur ve renk değişimini önler. İkincil bir antioksidan olarak Irgafos 168, proses sırasında meydana gelen bozunmayı önleyerek ve birincil antioksidanların performansını artırmak için polimerlerin otoksidasyonu ile oluşan hidroperoksitler ile reaksiyona girer (34,51).



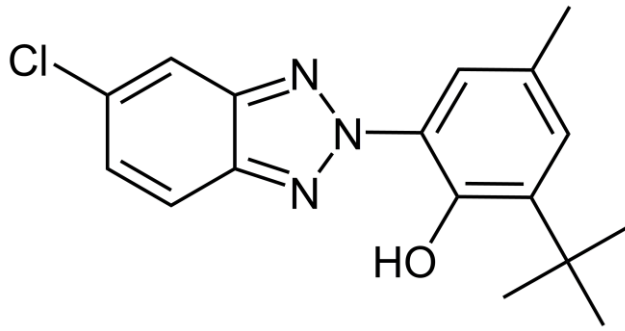
Şekil 2-20 Irgafos 168'e ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-21: Irgafos 168 FTIR spektrumu

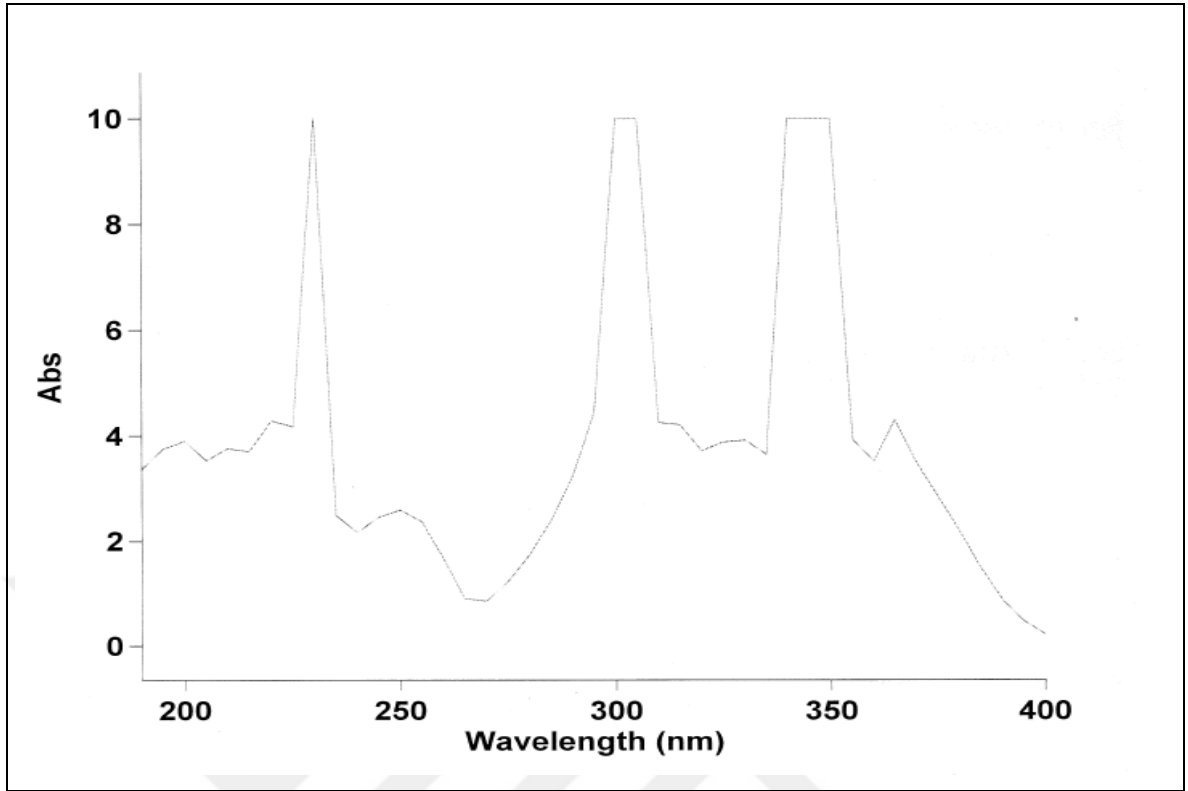
2.2.7 Tinuvin-326 (iç standart)

Analitik bir yöntem geliştirilirken, doğru iç standardın (IS) seçimi, yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini artırabilir. Uygun iç standart, analiz edilen bileşiklere kimyasal olarak benzer olmalıdır, ancak numunenizde doğal olarak bulunmaması numune ile reaksiyona girmemesi ve safsızlıkları içermemesi beklenir (52). Hedef bileşikler ile aynı fonksiyonel gruplara, kaynama noktalarına ve aktiviteye sahip bileşikler seçmek analiz açısından önemli bir parametredir. Bu bilgi ışığında, belirlenen moleküllere fiziksel ve kimyasal benzerliği göz önünde bulundurularak tez çalışmasında Tinuvin-326 bileşiğinin iç standart olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

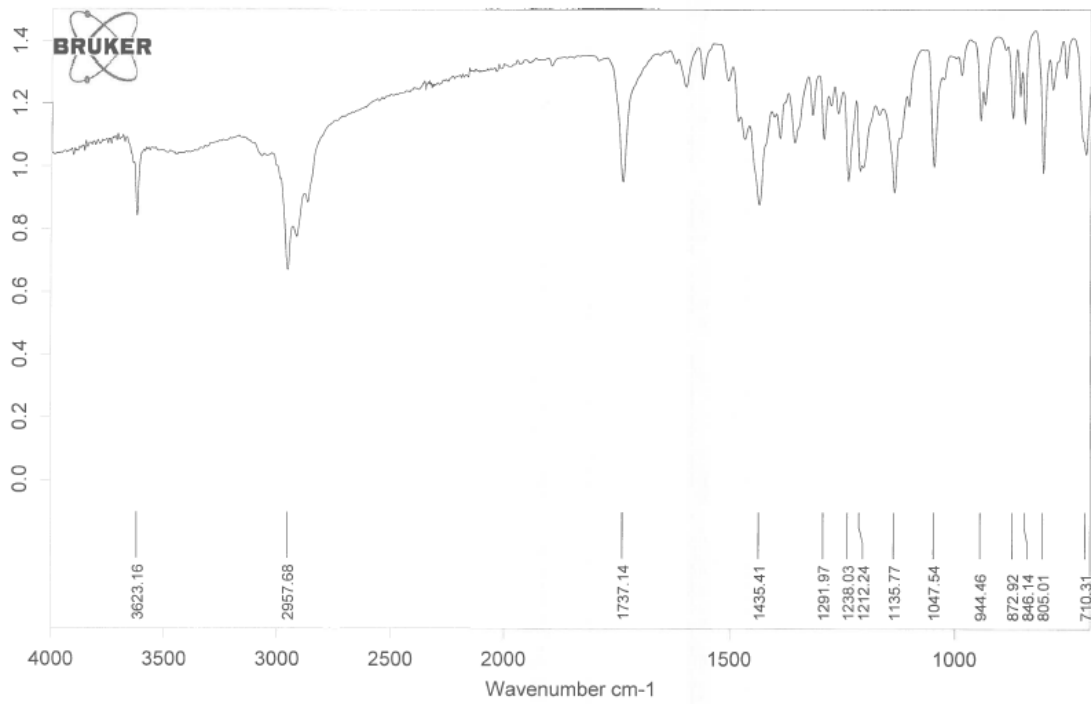


Şekil 2-22: Tinuvin-326 (Bumetrizol) kimyasal yapısı

CAS nosu 3896-11-5 olan, bileşik hafif sarımsı toz formdadır. Kimyasal formülü 2-(5-Kloro-2-benzotriazolil)-6-tert-butil-p-kresol2-(tert-Butil)-6-(5-kloro-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-yl)-4-metilfenol'dür. Kapalı formülü $C_{17}H_{18}ClN_3O$ olan Tinuvin 327'nin molekül ağırlığı 315,8 g/mol, net kütlesi ise 315,1138 g/mol dür (53). 1,26 g/cm³ yoğunluğa, 144-147°C erime noktasına ve 460,4±55,0 °C kaynama noktasına sahiptir. Kloroform, diklorometan çözücülerinde çözünür, suda çözünmez (54).



Şekil 2-23: Tinuvin-326'ya ait UV spektrumu (0,1 mg/ mL, metanolde)



Şekil 2-24: Tinuvin-326 (Bumetrizol) FTIR spektrumu

2.2.8 Oftalmik Emülsiyon (Restasis® %0.05)

RESTASİS®, tek kullanımlık 0.9 mL'lik flakonlarda 0.4 mL emülsiyon olarak bulunmaktadır. Her kutuda 30 adet tek kullanımlık flakon bulunmaktadır. RESTASİS® %0.05 (siklosporin oftalmik emülsiyon), anti-inflamatuvar etkilere sahip topikal bir immünomodülatör olan siklosporin içermektedir. (Ref-56) Keratokonjunktivitis sikka ile ilişkili oküler enflamasyona bağlı olarak gözyaşı yapımının baskılandığı öngörülen hastalarda gözyaşı yapımının artırılmasında endikedir. Başka bir topikal anti-inflamatuvar ilaç ya da punktal tıkaç kullanan hastalarda gözyaşı yapımında artış görülmemiştir. Önerilen dozaj, her bir göze yaklaşık 12 saat arayla günde 2 kez 1 damla RESTASİS® oftalmik emülsiyon damlatılmasıdır. Farmakokinetik özellikleri kapsamında Göze uygulanan RESTASİS® sonrasında kandaki siklosporin A konsantrasyonları spesifik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometri deneyi ile ölçülmüştür. İnsanda, RESTASİS® % 0.05'in günde iki kez 12 ay süreyle topikal olarak uygulanmasından sonra, siklosporinin kan konsantrasyonlarının 0,1 ng/mL'lik saptama sınırının altında olduğu bulunmuştur. RESTASİS® %0.05 oftalmik emülsiyonun 12 aylık tedavisi sırasında kanda herhangi bir ilaç birikimi saptanmamıştır. Oküler uygulama ile ilgili olarak emilim, dağılım, biyotransformasyon ve eliminasyon verileri bildirilmemiştir. 15-25°C'de oda sıcaklığında saklama koşuluna sahiptir (55-56).



Şekil 2-25: Restasis® %0.05 Oftalmik Emülsiyon

Bu tez çalışmasında tek kullanımlık 0,9 mL'lik LDPE flakonda 0,4 mL hacimdeki %0,05 Siklosporin etken maddesini içeren oftalmik emülsiyon (RESTASIS® %0,05, Allergan) kullanılmıştır. Ambalaj malzemesi için AET ($\mu\text{g}/\text{ambalaj}$) ve ilaç ürünü için AET ($\mu\text{g}/\text{mL}$) değerleri SCT ($\mu\text{g}/\text{gün}$) değeri, ambalajdaki kullanılabilir doz (doz/ambalaj), günlük kullanım dozu (doz/gün) ve ambalajdaki ilaç ürünün hacmi (mL/ambalaj) bilgilerinden yola çıkılarak ilgili denklem (Denklem 2-1 ve Denklem 2-2) kullanılarak hesaplanmıştır. Parenteral ve oftalmik ilaç ürünleri için SCT değeri $1,5\mu\text{g}/\text{gün}$ 'dür (30). Restasis® %0.05'lik oftalmik emülsiyonunun günlük kullanım dozu 4 doz/gün'dür ve her bir ambaladaki kullanılabilir doz miktarı 2 doz/ambalaj'dır. Bu bilgilere göre AET değeri $0.75\mu\text{g}/\text{ambalaj}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değer ve flakonda bulunan 0,4 mL/ambalaj ilaç ürün hacmi bilgisi kullanılarak $1,875\mu\text{g}/\text{mL}$ ilaç ürün değeri hesaplanmıştır. Bu değer tez çalışmasında standart ve %100 numune konsantrasyonu olarak kullanılmıştır. PQRI organizasyonunun baz aldığı $5\mu\text{g}/\text{gün}$ kalifikasyon limiti (Qualification Threshold, QT) kullanılarak stabilite periyodunun spesifikasyon limit değeri $6,25\mu\text{g}/\text{mL}$ ilaç ürün olarak hesaplanmıştır. Stabilite süresince bu değer üzerinde herhangi bir pik gelmesi durumunda ilgili safsızlık ile ilgili gerekli kalifikasyon sürecinin veya daha detaylı araştırma ile günlük maruziyet limitlerinin bilimsel veriler ışığında gerekçelendirilmesi gerekmektedir. Belirlenen beş plastik katkı maddesinin EEAS çalışmalarında $1,875\mu\text{g}/\text{mL}$ AET değerinin üzerinde olup olmadığının analizleri yapılmıştır. Yaklaşık 2cmx2cm boyutunda kesilen, 5 g LDPE materyali tartılarak 50 mL'lik erlene aktarıldı. Numuneler 25 mL 2-Propanol, 25 mL n-Hegzan ve 25 mL 2-Propanol/Su (50/50, h/h) çözücülerini ile ayrı ayrı yaklaşık 60-90°C'de 2 saat süre ile geri çeviren soğutucu altında ekstre edildi (7,23,57). Bu çalışmaların tümünde belirlenen beş plastik katkı maddesinin EEAS çalışmasında ekstraksiyon çözeltilerindeki konsantrasyonu $6,25\mu\text{g}/\text{mL}$ limitinin üzerinde olduğu ve bu safsızlıkların SAS çalışmalarının takibinin yapılması gerektiği sonucunu ortaya çıkarmıştır (29).

2.3. Geliştirilmiş analitik yöntemler ve yapılan çalışmalar

EEAS ve SAS çalışmaları için literatürde çeşitli analitik çalışmalar bulunmaktadır. Bu bölümde bu çalışmalara ait özetler aşağıda sunulmuştur.

2.3.1. MA, Irg-1010, Irg-1076, Irg-1330, Irg-168 ambalaj malzemesi safsızlıkları ile yapılan çalışmalar

Petruševski ve arkadaşları (2011) farmasötik ambalaj malzemelerinin kimyasal karakterizasyonu için HPLC-DAD / APCI MS yöntemlerini geliştirmişlerdir. Her iki yöntem de, düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) ve polipropilenden (PP) plastik malzemelerde yaygın olarak karşılaşılan 9 katkı için geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Genel plastik katkı maddeleri için geliştirilen HPLC-MS koşulları (Yöntem no 1) Waters XTerra RP18 150 x 3.0 mm; 3.5 µm sabit faz, A: 10 mM ammonium acetate, B: ACN gradient programlı hareketli faz kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı 0.3 mL/min, 10 - 50 µL (default 20 µL) enjeksiyon hacmi, 210, 220, 230, 240, 250 nm dalga boyları dedeksiyon için kullanılmıştır. HALS polimerleri için HPLC-MS koşulları (Yöntem no 2) de ise YMC Triart C18 250 x 4.6 mm; 5 µm kolonu, A: 22mL/L 25% NH₄OH in H₂O, B: 22mL/L 25% NH₄OH in MeOH mobil fazı gradient programı ile kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı 0.8 mL/min, 10 - 50 µL (default 20 µL) enjeksiyon hacmi, 210, 220, 230, 240, 250 nm dalga boyları kullanılmıştır. DEHP, BHT, Bisphenol A, Bisphenol M, Irganox 415, Irganox 1010, Irgafos 168 molekülleri için elde edilen linearite değerleri sırasıyla, 0.99998, 0.99987, 0.99999, 0.99998, 0.99995, 0.99999, 0.99995, 1,00000'dir. LOD (ppb)/LOQ (ppb) değerleride sırasıyla; 18/59, 11/36, 6/20, 7/25, 7/24, 8/26, 22/73, 21/69 olarak tespit edilmiştir. Aynı sıra ile 0.48, 4.26, 1.43, 1.37, 1.11, 0.69, 3.79, 2.32 %RSD değerleri ile yöntem tekrarlanabilirliği ispatlanmıştır. Pozitif ve negatif modda (100-3000 m/z) full tarama ile tarama çalışmaları yapılmıştır (57).

Zhang ve arkadaşları (2016) UPLC-QTOF MS Kullanılarak bazı plastik ambalaj malzemelerinden EEASların Tespiti ve Tanımlanması çalışmasında geliştirdikleri yöntem ile, aşı ve ara ürünlerdeki EEAS maddelerin konsantrasyonları 0.85 ila 21.91 µg/L arasında bir değerde olduğu bulunmuştur. Girişimleri en aza indirmek için deneyler plastik içermeyen koşullar altında gerçekleştirilmiş. SASları ekstrakte etmek için 15 mL'lik bir cam tüp içinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) kullanılmıştır. EEAS çalışması için ise triklorometan sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30°C'de, Waters Cortecs C18 kolon (1.6 µm, 2.1 × 100 mm) kolonunu ve mobil faz olarak metanol (çözücü A) ve% 0,1 formik asitli su (çözücü B) bileşenleri gradient program ile kullanılmıştır. Kütle dedektöründe elektrosprey iyonizasyon kaynağı ve üçlü kuadropol, hesaplamalar için çoklu reaksiyon izleme (multiple reaction monitoring, MRM) yöntemi

(+) MRM modunda kullanılmıştır. Kütle dedektörü parametreleri ise çarpışma enerjisi 20-60 eV arasında uygulanmış, Hesaplama tüm moleküllere ait kütle geçiş m/z değerleri sırasıyla Irgafos 168 için 441.2917→385.2291, Irganox 1010 için 957.6097→739.4427→205.1598, Irganox 1076 için 311.2956→267.2693, Irganox 3114 FF için 219.1743, isodesil oktil ftalate (ODP) için 261.1485→163.039→149.0233, dioktil ftalat(DOP), 279.1591→ 167.0339→149.0233, dibutil ftalat (DBP) için 205.0859→163.039→149.0233, bis(8-metilnonil) ftalat için 307.1904→289.1798→149.0233 olarak belirlenmiştir. Yapılan validasyon çalışmasında kesinlik değerleri (%RSD) 10'un altında, doğruluk değerleri %75.86-119.10 arasında bulunmuştur (58).

Ta ve arkadaşları (2017) Tek kullanımlık plastik filmlerden bis (2,4-di-tert-butilfenil) fosfat (bDtBPP) ve ilgili EEAS bileşiklerin belirlenmesi için UPLC-UV metodu geliştirmişlerdir. Mobil faz A, asetonitril / su (5:95, h/h) içinde 10 mM fosfat tamponu ve mobil faz B, asetonitril / su (3: 1, h/h)'dır. CSH (charged surface hybrid) florofenil kolon ve 220 nm'de UV dedeksiyon kullanılarak tek kullanımlık biyoişlem torbası filmlerinden bDtBPP ve Irgafos 168'in ilgili parçalanma bileşiklerinin saptanması için geliştirilen bu metodun tespit sınırları $16 \mu\text{g.L}^{-1}$ ve $60 \mu\text{g.L}^{-1}$, tekrarlanabilirlik % RSD ≤ 1.8 ve doğrusalılık $r^2 \geq 0.9992$ olarak bulunmuştur. Geliştirdikleri bu metodu, üç adet tek kullanımlık biyo-proses torba filminin EEAS ve SASları testi için kullanmışlardır. EEAS çalışması izopropanol / su (1: 1, h/h), ortamında 50°C'de, 200 rpm'de iki gün inkübatör çalkalayarak numune elde etme yöntemi birincil olmak üzere 3 farklı yöntem ile numune hazırlanmıştır. bDtBPP ve oksitlenmiş Irgafos, EEAS çalışmasında üç filmin tamamında tespit edilirken, SAS çalışmasında bu moleküller tespit edilmemiştir (59).

Legranda ve arkadaşları (2018) plastik torbada paketlenmiş kalsiyum glukonat glukohptonat çözeltisinden EEAS and SAS değerlendirme çalışması için HPLC/UV metodu geliştirmiştir. Polipropilen (PP) ve Polietilen (PE) plastik malzemelerinden olması muhtemel Butilhidroksitoluen (BHT), Hostanox O3, Irganox 1010, Irganox 1330, Irganox 1076, Irgafos 168, Irganox 3114, Bisphenol A, Bisphenol M, Irganox 415, ve Diphenylamine molekülleri için önce EEAS çalışması yapılmıştır. EEAS çalışmaları % 100 ACN, ACN / Su % 50/50, Su% 100 çözücülerinde yapılmıştır. SAS çalışması için PE ve PP ambalajlara doldurulan kalsiyum glukonat glukohptonat çözeltisi başlangıç-1-2-3. aylarda 25°C ve 40°C'de ürüne geçen SAS olup olmadığının kontrolü amacı ile

analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma, 150 × 4,6 mm; 3 µm Luna fenil heksil (Phenomenex) kolonu kullanılarak optimize edilmiştir. Mobil faz gradient programına sahip su ve asetronitril çözeltileri ile, 1 mL / dk akış hızında, 20 µL enjeksiyon hacmi ve 220 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Yapılan yöntem validasyon çalışmaları kapsamında tüm değerler limit içi bulunmuştur (60).

2.3.2. Diğer ambalaj malzemesi safsızlıkları ile yapılan çalışmalar

Tiller ve arkadaşları (1997) Farmasötik bir ambalajın etiketinden kaynaklanabilecek safsızlıklar için EEAS çalışması yapmıştır. Bunun için ekstraksiyon çözeltisi olarak su kullanılmıştır ve 50°C'de 3 gün bekletilerek numuneler toplanmıştır. HPLC- MS metodu geliştirmişlerdir. UV:220 nm dalga boyu ve Waters Novapak C18 150 × 2,1 mm kolonu, Su:% 0,1 asetik asitli asetronitril gradyanı kullanılmıştır. MS dedektörde APCI pozitif mod ve ESI pozitif mod çalışılmıştır. Isıtılmış kapiler, tüm analizler için elektrosprey iğnesine 3 kV uygulanarak 250 °C'ye ayarlanmıştır. Bu çalışma ile yapışkandan geçmesi muhtemel EEASlar tanımlanmıştır (61).

Jenke ve arkadaşları (2005), çok düşük yoğunluklu polietilen (VLDPE) materyalini, EEAS çalışması için 0,1% fosforik asit, (85:15, h/h) 0,1% fosforik asit /etanol, (70:30, h/h) 0,1% fosforik asit /ethanol, (55:45, h/h) 0,1 fosforik asit /ethanol ekstraksiyon karışımlarında 40°C'de 19 gün bekletmişler ve elde edilen EEAS bileşikleri için LC/MS metodu geliştirmişlerdir. Phenomenex Prodigy C8, 150 × 4.6 mm, 5 µm 10 mM kolonu ve Amonyum Format: Asetonitrilden oluşan hareketli fazı gradient programı kullanılmıştır. Dedeksiyon parametreleri 230 nm'de UV. API-ES (pozitif iyon): gaz sıcaklığı, 325°C; fragmentor, 65; Kurutma gazı, 11.0 L/dak; nebulizör basıncı, 35 psig; Vcap, 5000V'tur. İzlenen spesifik iyonlar kaprolaktam, 114; Extractable A, 229; Extractable C, 296; Extractable B, 271'dir. Negatif iyonlar ise heksanoik asit, 115; Extractable C, 277; stearik asit, 283 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma için doğruluk, kesinlik ve kalibrasyon eğrisi parametreleri çalışılmıştır (62).

Jenke ve arkadaşları (2006), farmasötik üretim tesislerinde potansiyel olarak karşılaşılan sekiz boru malzemesi (altı silikon malzeme ve iki Santoprene malzemesi) EEAS maddeleri için karakterize etmiştir. Hortumlar hem su hem de etanol ile statik ekstraksiyonu yapılmıştır. Boru malzemeleri 0.5-2 inç uzunluklarda kesilmiş ve 121 °C'de yaklaşık 1 saat suda otoklavlanmıştır. Alternatif olarak, uzun hortumların içi %100

etanol ile doldurulmuş, uçlarından cam veya teflon tıplar ile kapatılmış, ve yaklaşık 55 °C'de 24 saat saklanmıştır. Alkol ile yapılan çalışmada etanolün boru malzemesinden dış ortama çıkıp buharlaşması nedeni ile bu medyada test edebilmek yeterli çözelti elde etmek için, 2 L'lik bir cam şişe içerisine bir uzunlukta tüp yerleştirilerek ve 55 °C'de ekstraksiyon tekrarlamıştır. Daha sonra elde edilen çözeltiler farklı analitik sitemlerde analiz edilmiştir. Bu analizler ve test yöntemaları şu şekildedir; Toplam inorganik ve organik karbon (TIC ve TOC) analizi, pH ve UV absorbans ölçümleri, Endüktif olarak eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi (ICP-AES), Sıvı kromatografi – kütle spektrometrisi – UV spektroskopisi (LC/MS/UV), Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), Headspace GC – MS. ICP-AES analizinde Korelasyon katsayısı 0.995 olarak verilmiştir. en düşük tespit sınırı 0,01–0,10 mg/L olarak bulunmuş, ayrıca geri kazanım sonuçları %70-%130 aralığında bulunmuştur. Di-t-butil fenol EEAS ının tespit edildiği sistem Sıvı kromatografi – kütle spektrometrisi – UV spektroskopisi (LC/MS/UV) analiz koşulları UV: 210, 230, 250 and 280 nm MS: API-ES, pozitif ve negatif iyon, kütle aralığı range 80 – 800'dür. Waters Xterra MS C18 100 × 4.6 mm, 3.5 µm kolonu, 10 mM Amonyum format:asetonitril gradient yöntem ile ayırım gerçekleştirilmiştir. validasyonunda lineer çalışma aralığı 1.0-5.0 ppm olarak verilmiş olup, kesinlik değeri 1 ppm'de %2.0 olarak tespit edilmiştir. di-oktil adipat, DEHP, dibutil ftalat, Irganox degradantlarının tespit edildiği LC/MS/UV sisteminde ise, sabit faz Agilent Eclipse DB C8, 150 × 4.6 mm, 5 µm, hareketli faz ise 10 mM Ammonium Foramte:Acetonitrile gradient programında ayırım gerçekleştirilmiştir. UV: 250 nm MS: API-ES, pozitif iyon, Single Ion Monitoring (SIM) modunda 371 m/z di-oktil adipat, 391 m/z DEHP (Di-oktil ftalat), 279 m/z Dibutil ftalat, 296 m/z Irganox degradat değerleri için analitik yöntem çalışması gerçekleştirilmiştir. Lineerlik katsayıları sırasıyla; 0.999, 0.999, 0.998, 0.998'dir. Kesinlik çalışmasına ait UV/MS dedektöründen elde edilen % RSD değerleri sırasıyla, -/1.9, 0.3/1.1, 0.2/0.9, 0.4/4.1 olarak bulunmuştur (63).

Xiao ve arkadaşları (2006) Parenteral ilaç ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan karmaşık bir sürfaktan bileşen varlığında elastomerik tıpalardan potansiyel ekstrakte edilebilir maddelerin belirlenmesi için HPLC yöntemleri geliştirmiş ve valide etmiştir. Ürün formülasyonundaki benzer koşullardan yola çıkılarak hazırlanan test numuneleri, 1: 3 (h/h) polioksietillenmiş Hint yağı: etanol oranı elde etmek için eşit hacimlerde doğrudan etanol ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu kapsamda yöntem-1 için YMC-Pack Cyano (YMC-Pack Cyano, S-5 µm, 150mm×4.6 mm kolonu kullanılmıştır. Mobil faz A ve B

sırasıyla su: asetronitril: TFA (90: 10: 0.05, h/h/h) ve asetronitril: TFA (100: 0.05, h/h) gradient programı, 1 ml/dk akış hızı ve 215nm dalga boyu kullanılmıştır. çinko ditiokarbamat (Z), 2,6-di-tert-butil-parakresol (BHT) (B), pentilfenol (P) bileşiklerinin analizi bu yöntem ile yapılmıştır. Yöntem-2 için ise 50mm×4.6 mm, 5µm Waters XTerra™ MS C18 kolonu, hareketli faz A ve B sırasıyla asetronitril: su (25:75, h/h) ve asetronitril (100) kullanılmıştır. 210nm ve 1ml/dk akış hızında diğer ekipman parametreleri olarak verilmiştir. sülfür (S), ve tetrakis (metilen (3,5-di-tert-butil-4-hidroksihidro) sinamat)) metan (Organox 1010) (I) bileşiklerinin analizleri için yöntem-2 kullanılmıştır. Yöntem 3'te ise Yöntem 2'nin farklı gradient programı ile kullanılmış ve ayırım gerçekleştirilmiştir. Yöntem 3 oktilenmiş difenilamin antioksidan (ODA) analizi için kullanılmıştır. Bu yöntemlerden elde edilen Aralık (ppm) / Regresyon denklemi / r² sonuçları; Z bileşiği: 1–100 / Y = 44700x + 17975 / 0.999, P bileşiği: 5–100 / Y = 22569x + 64954 / 1.000, B bileşiği: 10–100 / Y = 20373x–15425 / 1.000, S bileşiği 5–50 / Y = 26668x–55198 / 0.994, I bileşiği: 5–50 / Y = 23042x–59307 / 0.997, ODA bileşiği 5–100 / Y = 8745x + 36424 / 0.990 olarak bulunmuştur. Metotun geri kazanım, kesinlik ve günler arası kesinlik çalışmaları uygun bulunmuştur (64).

Akapo ve arkadaşları (2008),Sulu bazlı farmasötik formülasyonlarda, üzeri sarılmış LDPE şişelerde paketlenmiş potansiyel uçucu organik sızıntı maddeler için katı faz mikro ekstraksiyon-gaz kromatografisi (SPME – GC) tayini yöntemi geliştirmişlerdir. Belirledikleri hedef bileşiklerin sulu faz farmasötik bileşikten ekstraksiyonunu gerçekleştirip, FID dedektörle, J&W Scientific DB-1701 (% 86 polidimetilsiloksan /% 14 siyanopropilfenil, 30m × 0.53mm, 1.5µm film kalınlığına sahip kapiler kolon kullanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Tüm analitler için ortalama geri kazanımlar, %97.9 ila %116.7 arasında, n-heptan ve toluen için ise yaklaşık %73.6 ila %100.0 arasında elde edilmiştir. Tüm bileşikler için standart eğriler, korelasyon katsayısı, r²≥0.98 olarak bulunmuştur. Tespit ve kantitasyon limitleri sırasıyla yaklaşık 0.6 ng/mL ile 1.7 g/mL ve 5ng/mL ila 4.2 g/mL arasında ve gün içi ve günler arası kesinlik RSD ≤% 16 olarak bulunmuştur. SPME tekniği ile numune hazırlanırken, kullanımdan önce 30 dakika süreyle 250 ° C'de koşullandırılmış 100-m PDMS fiber kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşikler, absorpsiyon fiberi, 100 rpm'de sabit çalkalama altında oda sıcaklığında 30 dakika boyunca septum kapaklı bir cam vialde yerleştirilen 9 ml'lik bir numune çözeltisine daldırılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyondan sonra fiber, analitlerin 5 dakika

boyunca desorbe edildiği 250°C'de tutulan GC enjeksiyon portuna yerleştirilerek analiz edilmiştir (65).

Haverkamp ve arkadaşları (2008), Yarı katı dozaj formlarının alüminyum tüplerden SAS maddelerle kontaminasyonu çalışmalarında amaç, bisfenol A (BPA), bisfenol A diglisidil eter (BADGE) ve türevlerinin, farmasötik ilaçlarda epoksi bazlı alüminyum tüp kaplamalarından ne ölçüde EEAS'a neden olabileceğini belirlemek ve bunların farklı yarı - katı dozaj formlarında ne kadar miktarda Leach olabileceğini belirlemektir. Bu çalışmada maksimum EEAS ları elde etmenin 40°C'de 10 gün boyunca asetonitril ile ekstraksiyonu ile elde edildiğini tespit etmişlerdir. SAS profilleri, depolama süresi ve sıcaklığın yanı sıra, matristen önemli ölçüde etkilendiğini ve özellikle, matris polaritesi çok önemli olduğunu tespit etmişlerdir.. Bu çalışmada, en yüksek SAS madde miktarı izopropanol bazlı karbomer jelde bulunmuştur. Analitik yöntem parametreleri olarak Multospher 100 RP18-5µ, 250x4 mm kolonu ile 5 mM amonyum format çözeltisi pH 3.0 (mobil faz A) ve asetonitril / metanol (1/2, h/h) (mobil faz B) mobil fazı kullanılmıştır. Dedektör olarak floresan dedektörde (275/305 nm)'de dedeksiyon sağlanmıştır. Doğrusallık, Lineerlik ve kesinlik gibi validasyon parametrelerinin uygun bulunduğu belirtilmiştir (66).

Corredor ve arkadaşları (2009), Yaygın olarak kullanılan beş tıpa formülasyonunu, üç farklı çözücü ile (% 20 w / v sülfobutileter-p-siklodekstrin içeren pH 3 sitrat tamponu, pH 8.0 fosfat tamponu ve 50/50 h/h polioksietillenmiş hint yağı / susuz alkol) kullanılarak EEAS maddeler için teste tabi tutmuşlardır. Butil ve halobutil kauçuklardan yapılmış, kendinden filmlerle kaplanmış ve kaplanmamış tıplar, 40°C / %75 bağıl nemde (RH) 6 aya kadar veya 25°C'de / % 60 bağıl nemde 24 aya kadar her iki ambalaj malzemesi ile ters bir şekilde konularak, tıpa ve ekstraksiyon çözücüleri temas olacak halde stabilite kabinlerine kaldırılmıştır. Örnekler, endüktif bağlanmış plazma atomik emisyon spektroskopisi, iyon kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi kullanılarak ekstrakte edilebilir maddelerin varlığı açısından analiz edilmiştir. Ekstrakte edilebilir maddeler, test edilen beş tıpadan sadece biri için 10 ppm'nin üzerinde gözlenmiştir. 0.03 ppm ve 17 ppm aralığında kantitasyon limiti ile çeşitli tıpa bileşenlerinden 24 farklı EEAS madde belirlenmiştir (67).

Constantinos ve arkadaşları (2011) farmasötik kap / kapak sisteminden göz damlası çözeltilerine potansiyel EEAS olması muhtemel 1,3-bütadienin(1,3-BD)

headspace gaz kromatografisi alev iyonizasyon dedeksiyon yöntemi geliştirilmiş ve yöntem valide edilmiştir. W125-9134 DB-ALCI kapiler 30m×0.53 mm, 3.0 µm Helyum gazı: 11 dakika için sıcaklık 85 derece ekipman ve ekipman parametreleri kullanımıştır. Göz damlası çözeltisi ambalaj malzemesi ile birlikte 2–8°C’de 0.33 ay (10 gün), 25°C’de (oda sıcaklığı) 0.66 ay (20 gün), ve 40 °C 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 periyotlarında stabilite koşullarında numuneler analizlenip ürüne 1,3-bütadienin(1,3-BD)’nin geçip geçmediğinin takibi yapılmıştır. En yüksek geçiş 12. Ay 40°C’de 52ppm olarak ölçülmüştür. Geliştirilen metodun geri kazanımı %91.6-109.2 arasında bulunmuştur. Gün içi kesinlik ve hata %12.27’den ve %8.66’dan az bulunurken, 3 farklı günde günler arası kesinlik ve hata sırasıyla% 12,73 ve% 10,0’dan az bulunmuştur. Plaseboda 4 farklı günde hazırlanan 1,3-BD’nin dört kalibrasyon eğrisinin ortalama regresyon denklemi ve eğimi (1,3-BD) = 0,66C (1,3-butadien) (± 0,07) + 0,07 (± 0,02); standart hata – 0,19 ile 4.89 arasındayken, ortalama korelasyon katsayısı $r^2=0.986$ [relative standart sapma (RSD),% 0.73] olarak belirlenmiştir. En düşük tespit limiti 0.03mg/L iken, LOQ, 0,1 mg/L’dir. Farklı kalibrasyon eğrileri arasındaki eğimlerin % RSD’si 9.95 bulunmuştur (68).

Garber ve arkadaşları (2011) plastik malzemelerden sulu çözelti ortamına geçmesi ihtimaline sahip Bisfenol A (BPA), 1-formilpiperidin (FP) ve bis- (pentametilen)-üre (BU) muhtemel EEAS bileşiklerinin düşük konsantrasyonlarda miktarını belirlemek amacıyla kütle spektrometrik sıvı kromatografik metodu geliştirilmiştir. Waters Xterra MS C18, 30 × 4.6 mm, 2.5 µm kolonu ve ~ 40°C kolon fırın sıcaklığında sabit faz kullanılmıştır. Mobil Faz A 10 mM Amonyum Asetat (suda) Mobil Faz B Metanol hareketli fazı pozitif ve negatif iyonlar için farklı gradient programı kullanılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. EEAS çalışması için pH 2 tamponu (0.01 M HCl, 0.01 M KCl), % 0.9 sodyumklorür (salin) ve pH 8 tamponu (0.065 M sodyum monohidrojen fosfat ve 0.0045 M potasyum dihidrojen fosfat) çözeltilerin ekstraksiyon işleminde yararlanılmıştır. BPA için m/z 227 negatif iyonu, FP m/z 114 pozitif iyonu, BPU m/z 197 pozitif iyonu dedeksiyon ve validasyonda kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem BPA, FP ve BPU bileşikleri için 10 ppb ‘den daha düşük kantitasyon limitine sahiptir. Yöntemin konsantrasyon çalışma aralığı ise her üç bileşik için 50 ila 300 ppb’dir. Tüm bileşikler için Doğrusallık ($r > 0,99$) olarak bulunmuş, doğruluk ise tüm ortamlarda $\pm$ %30 limiti içinde bulunmuştur. Gün için kesinlik $\leq$ %5.0 bulunurken günler arası kesinlik $\leq$ %10.0) değerleri elde edilmiştir (69).

Huang ve arkadaşları (2012), 2,4,6-tribromoanisol (TBA), 2,4,6-tribromofenol (TBP), 2,4,6-trikloroanisol (TCA) and 2,4,6-triklorofenol (TCP) moleküllerinin , Stir Bar Sorption ekstraksiyon (SBSE) tekniği ile numune hazırlığı ve GC–MS/MS analitik yöntemi geliştirmiştir. DB5 ultra inert (% 5 fenilmetil-siloksan) kapiler 20 m × 0,18 mm, 0,36 µm Helyum gazı: 1 dakika boyunca 65 derece sıcaklık, 25 derece / dakikada 285°C dereceye yükselme şeklinde yöntem geliştirilmiş olup, bu yöntem çeşitli katı dozaj formu ürünler için valide edilmiştir. Kontamine ilaç ürününü analizini gerçekleştirmek için standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Çalışma aralığı haloanizoller için 100-1000 pg/tablet ve halofenoller için 2500-10.000 pg/tablet olarak bulunmuştur (70).

Hoffmann ve arkadaşları (2015) İntravenöz ilaç ürünlerinde ambalaj malzemesi olarak kullanılan plastik ambalaj malzemesinden kaynaklanabilecek safsızlıklar için EEAS ve SAS molekülleri yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelili termal desorpsiyonlu gazı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmalarında “stir bar sorption (SBS)” tekniği kullanılarak ilgili safsızlıklar ekstrakte edilmiş ve bu safsızlıklar tanımlanmıştır. Agilent HP-5ms, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm sabit fazı, He, 1.0 mL / dak, sabit akışta hareketli fazı kullanılmıştır. 19 ile 350 m/z kütle değerleri arasında kütle dedektörde, 29 ile 350 m/z kütle değerleri arasında Q-TOF dedektörde tarama yapılmıştır. 80°C ve 200°C'de çeşitli solventler ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmaları ile moleküller ve bunların muhtemel kaynakları tanımlanmıştır. EEAS çalışmasından elde edilen moleküller; sikloheksanon, etil hekzanol, 1,3-di-tert-butyl benzen, difenil eter, 2,6-di-tert-butyl-p-benzokinon, butillenmiş hidroksitoluen (BHT), 2,4-di-tert-Butil fenol, Dietil ftalat (DEP), 2-etilhekzil benzoat, 2-etilheksil salisilat, dietilheksil ftalat (DEHP)'tır. SAS çalışması ise 40°C'de 250mL suda 48 saat bekletilerek yapılmıştır. Buradan elde edilen çözeltiden alınan 10 mL sıvı bölüntü boş bir viala transfer edilip içine Stir bar sorption tekniği için 24 mikrolitre Polidimetilsiloksan içeren Twister Stir bar atılıp elde edilen SASların absorbe edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu sistemden desorpsiyon için 240°C'de ağzı kapalı GC vialinde bekletilmiştir. Bu çalışmadan Sikloheksanon, 2-etil hekzanol, nonanal, nonanol, 2-tert-bütül-1,4-benzokinon, 1,3-di-tert-bütül benzen, asetil metiltiofen, difenil eter 9 1,1 - dimetiletil-4-metoksifenol (BHA) 10 2,6-di-tert-bütül-p-benzokinon 11 BHT 12 2,4-di-tert-bütül fenol 13 dietil ftalat 14 3,5-di-tert-bütül-4-hidroksibenzaldehit 15 izobütül ftalat 16 7,9-di-tert-bütül-1-oksaspiro- [4.5] deka-6,9-dien-2,8-dion 17 DEHP 17 farklı SAS bileşiğinin ürün matrisinde tespit etmişlerdir (71).

Jenke ve arkadaşları (2016), parenteral ve oftalmik ilaç ürünlerine uygulanabilecek ambalaj malzemeleri için simüle edilmiş SAS çalışması yapmışlardır. Bu ambalaj malzemesi sisteminde, düşük yoğunluklu polietilen şişe (birincil kap), polipropilen kapak ve bir elastomerik kapak astarı (kapak), etiket (etiketleme) ve bir folyo üst poşetten (ikincil kap) oluşmaktadır. Bu ambalaj malzemeleri simüle edici çözücülerle (pH 2.5'te sulu tuz / asit karışımı, pH 9.5'te sulu tampon ve 1/1 (h / h) IPA / su) doldurulmuş ve kapaklı şişelere konulup, etiket yapıştırılarak, şişeler folyo poşete yerleştirilmiştir. Bu doldurulan poşetlenen numuneler, 40°C'de 6 ay boyunca dik veya ters çevrilerek saklanmıştır. Stabilitate kabininde bekleyen numuneler, SAS'ların geçtiği çözeltilerden, potansiyel SAS'ın uçucu, yarı uçucu ve uçucu olmayan organik ve inorganik bileşik ve element, çok sayıda tamamlayıcı analitik teknik kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada 0.75, 2, 5, 12, 25, 70, 98, 105 ve 180. Günlerde stabilitate numuneleri analiz edilmiştir. SAS elementlerin analizi için ICP-MS kullanılmıştır. Uçucu bileşiklerin analizi için GC-MS sistemi kullanılmıştır. Restek (Bellefonte, PA) Rtx®-VMS, 30m x 0.25mm, 1.4 µm film kalınlığına sahip kolon ile 1.8ml/dk He gazı akışında analiz gerçekleştirilmiştir. Kütle dedektörü detayları is EI (70.3 ev), mass range 29 – 550 amu şeklindedir. LC/UV/MS sistem parametreleri, Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 100 x 3.0 mm, 3.5µm kolonu 50°C kolon fırın sıcaklığı, mobil faz olarak 10 mM amonyum asetat ve asetonitril bileşenlerinden oluşan gradient program kullanılmıştır. API-ES veya AP-CI, pozitif iyon ve negatif iyon modlarında kütle dedeksiyonu gerçekleştirilmiştir. (8).

García ve arkadaşları (2017) parenteral ilaç ürünlerde önceden doldurulmuş enjektörlerden uçucu olmayan EEAS analizi için yöntem ve yöntem geliştirmiştir. İki farklı markanın şırıngaları, piston tıparıyla birlikte analiz edildi. Şırıngalar 40°C'de 4 gün, piston tıparları 70°C'de 24 saat 2-propanol ile ekstrakte edildi. Dört EEAS çözücüsü seçilmiştir bunlardan 2-propanol: su (1:1, v/v) karışımı, organik katkı maddeleri ve suda çözünürlüğü zayıf olan maddeler için geniş bir EEAS madde yelpazesini çıkarması için agresif koşulları temsil etmesi amaçlanarak kullanılmıştır. pH 4, 7 ve 8'de Sitrat/fosfat tampon çözeltileri diğer ekstraksiyon çözücülerini olarak kullanılmıştır. EEASlar, hedeflenmemiş keşif stratejisi kullanılarak Q-TOF'lu UHPLC-MS metodu geliştirilmiştir. tanımlandı. Çoğunlukla polimer katkı maddeleri ve bunların bozunma ürünleri olmak üzere toplam 25 bileşik tanımlanmıştır. CORTECS UPLC C18 (1.6 µm; 2.1 mm × 50 mm) kolonu ve amonyum format (pH 3.0; 50 mM) (Mobil faz A) ve

asetonitril (Mobil faz B) bileşenlerinin olduğunu gradient sistemde ayırım elde edilmiştir. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılan sistemde analizler gerçekleştirilmiştir (72).

Solomon ve arkadaşları (2017), oftalmik ilaç ambalaj malzemelerinden EEAS ve SAS safsızlıkların profili kapsamında ICP-MS metodu ile inorganik maddelerin analizi için yöntem geliştirilmiştir. İnorganik safsızlıkları belirlemek için oftalmik ilaç şişeleri, iki ayrı ekstraksiyon koşulu altında pH 2.3 veya pH 9.5 çözeltilerinde 1 saat 140 ° C'ye ısıtma ve 10 ° C'de 2 saat sonikasyon işleme tabi tutulmuştur. Şişeler ayrıca izopropil alkol (IPA) ve deiyonize (DI) sudan oluşan polar çözücü karışımında 55°C'de 3 gün sonikasyon ile ekstraksiyon yapılmıştır. RF gücü 1550 W, RF eşleştirme 1,8 V, numune derinliği 10 mm ve 1,05 L / dak taşıyıcı gaz akışı yöntem parametreleri ayarlanmıştır. Daha sonra bu oftalmik şişeler ekstraksiyon ortamı ile doldurulmuş ve 50 gün boyunca farklı koşullarda saklanarak belirli periyotlarda analizlenmiştir. Yapılan bu stabilite takibi çalışmalarında Be, B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Pb, Th, ve U elementlerinin hepsi en düşük dedeksiyon seviyesinin üzerinde tespit edilmiştir (73).

Wei ve arkadaşları (2017), Enjekte edilebilir toz içeren kaplarda kullanılan kauçuk kapaklardan UV-absorblayıcı EEAS maddelerin tanımlanması ve ilaçtaki SAS maddelerin güvenlik değerlendirmesi çalışmasında UHPLC, GC-MS, ESI-MS/MS enstrümantal yöntemlerinden faydalanılarak analiz metodu geliştirilmiştir. UHPLC yöntemi için 40°C'de Agilent TC-C18 (2) kolon (4.6 mm×250mm, 5µm partikül boyutu) ve preparatif kolon olarak YMC-Pack ODS-A 250 mm×10, 5µm sabit fazı, asetonitril-su karışımı (75:25, h/h) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Dedeksiyon 280nm'de elde edilmiştir. GC-MS parametrelerinde ise Rxi-5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm kolonu ve Helyum taşıyıcı gazı ile ayırım gerçekleştirilmiştir ve MS dedektörde Electron Impact Ionization (EI) ile dedekte edilmiştir. ESI-MS/MS spektrumları, pozitif iyon modunda elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı uygulanarak quadrupole-time-of-flight (Q-TOF) Mikromass spektrometresi ile elde edilmiştir. Kapiler voltaj 3 kV, source sıcaklığı 90°C, desolvasyon sıcaklığı 150°C olarak uygulanmıştır. Klorometanda 8 saat bekletilerek elde edilen numunelerin en iyi EEAS profilini veren çözücüde katı faz ekstraksiyon tekniği ile hazırlanan numuneler analizlenmiştir. Bu çalışmadan 3 farklı

EEAS molekülü izole edilmiş, NMR ve diğer analizler yardımı ile yapıları tanımlanmış ve ilaç üründe takibi yapılmıştır. Bu bileşikler; N- (2- (2,2,4,4-tetrametilsikloheksil) alil) benzo [d] tiazol-2-amin (1), 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol ve sülfür olarak belirtilmiştir. Bu bileşikler için yapılan validasyon çalışmalarında lineerlik ve kesinlik parametreleri test edilmiştir. Lineerlik çalışmasında Korelasyon katsayılarının (r^2) tümü > 0.999 olarak bulunmuştur. Kesinlik çalışmasında ise yüzde RSD değeri 0.78 ile 0.81 aralığında tespit edilmiştir (74).

Singh ve arkadaşları (2018) Irganox 1010 bileşiğine ait 2 degradasyon ürünü olan 7,9-Di-tert-butil-1 oksaspiro[4.5]deka-6,9-dien-2,8-dion (safsızlık-1) ve 3-[3,5-bis(tert-butil)-1-hidroksi-4-oksoheksa-2,5-dienil] propanoik asit (safsızlık-2) bileşiklerinin, oftalmik ilaç ürününe geçip geçmediği kapsamında SAS çalışmasını yapmışlardır. Bu çalışma için LC-MS ve GC-MS yöntemleri geliştirilmiştir. LC yöntem için kromatografik ayırma, Zorbax Extend C18 kolon 100x2.1 mm, 1.8 μ m (Agilent Technologies) üzerinde gradyan elüsyonu (akış hızı: 0,4 mL/dak) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Solvent A olarak su ve solvent B olarak asetonitril kullanılmıştır. Safsızlık 1, ESI arayüzü kullanılarak negatif modda tespit edilirken, Safsızlık 2, APCI kullanılarak pozitif modda tespit edilmiştir (75).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya

Anabilim Dalında 2015-2022 yılları arasında yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Mirisitik asit (Tetradekanoik asit) (Sigma Aldrich, Missouri, ABD)

Irgonox–1076 (Plastic additive 11 CRS) (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, France)

Irgonox–1330 (Plastic additive 10 CRS) (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, France)

Irgonox–1010 (Plastic additive 09 CRS) (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, France)

Irgofos–168 (Plastic additive 12 CRS) (Ph. Eur. Reference Standard, Strasbourg, France)

Tinuvin-326 (IS) (Bumetrizole) (LGC Labor GmbH, Augsburg, Almanya)

Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyon (Allergan, ABD)

n-hekzan (Merck, Darmstadt, Almanya)

2-propanol (Merck, Darmstadt, Almanya)

Metanol (ultra gradiyent grade) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Amonyum Format (LC-MS saflıkta) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Yüksek saflıkta su (HPLC saflıkta)

3.2. Çözeltiler

3.2.1. Hareketli fazlar

Hareketli faz A (%0,1 amonyum format çözeltisi): 800 mL saf suya 1 g amonyum format eklendi. 1000 mL'ye saf su ile tamamlandı ve karıştırıldı. 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Ultrasonik banyoda degaze edildi.

Hareketli faz B (Metanol): 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Ultrasonik banyoda degaze edildi.

3.2.2. EEAS çalışması için hazırlanan çözeltiler

Ekstraksiyon tekniği geliştirme ve uygulama çalışmaları kapsamında tek kullanımlık LDPE malzemesinden EEAS Numunelerinin Hazırlığı için kullanılan solventler, amaçları ve ekstraksiyon sürelerine ait tüm detaylı bilgiler Tablo 3-1 de verilmiştir.

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1330}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1076}}$: 50 µg/mL).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten

sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Tinuvín-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvín-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvín-326(IS)}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvín-326(IS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Tek kullanımlık LDPE malzemesinden EEAS numunelerinin hazırlanışı: Tablo 3-1'de belirtilen Ekstraksiyon Parametreleri için Çalışma Tasarımı kapsamında belirtilen çözeltiler hazırlanmıştır. Ufak parçalara makas yardımı ile kesilen, tek kullanımlık ilaç preparatına ait yaklaşık 5 g LDPE materyal 50 mL'lik erlenmeyer şişelerine tartıldı ve ayrı ayrı sistemlerde 25 mL 2-Propanol, n-Hegzan ve 2-Propanol/Su (50:50, h/h) çözücüleri ile yaklaşık 60-90°C'de (kullanılan çözücüye bağlı olarak agresif kaynamadan kaçınılarak) 3 saat süreyle geri çeviren soğutucu sistemde numuneler ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra buradan elde edilen çözeltiler, mavi banttı süzöldü. Görünür partikül madde olmamasına dikkat edildi. Elde edilen çözeltiden 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarıldı. 0.375 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvín-326(IS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Tablo 3-1: Ekstraksiyon parametreleri için çalışma tasarımı

	Materyal karakterizasyonu için kullanılan çözücüler		Ambalaj malzemesinin değerlendirilmesi için kullanılan çözücü
Ekstraksiyon çözücüsü	2-Propanol	n-Hegzan	2-Propanol / Su (50:50, h/h)
Ekstraksiyon metodu	Geri çeviren soğutucu	Geri çeviren soğutucu	Geri çeviren soğutucu
Ekstraksiyon hacmi	200 mL	200 mL	200 mL
Numune ağırlığı	5 g	5 g	5 g
Ekstraksiyon süresi	3 saat	3 saat	3 saat

Tablo 3-1’de belirlenen ekstraksiyon çalışmasından elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.5’te verilmiştir.

Çözücü (blank) numunelerinin hazırlanışı: Numunelere paralel olarak, numunelerle aynı ekstraksiyon prosedürüne ekstraksiyon çözeltileride tabi tutulmuştur. Erlenmeyer şişelerine ayrı ayrı sistemlerde 25 mL 2-Propanol, n-Hegzan ve 2-Propanol / Su (50:50, h/h) çözücülerini ile yaklaşık 60-90°C’de 2 saat süreyle geri çeviren soğutucu sistemde ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra buradan elde edilen çözeltiler, mavi banttı süzöldü. Görünür partikül madde olmamasına dikkat edildi. Elde edilen çözeltilerin 3 mL’si 10 mL lik balon jöjeye aktarıldı. 0.375 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvın-326(İS)}}$: 1,875 µg/mL).

3.2.3. SAS çalışması için hazırlanan çözeltiler

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgonox-1010 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jöjeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL’ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgonox-1330 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jöjeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi

için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgonox-1330}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgonox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgonox-1076}}$: 50 µg/mL).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}$: 50 µg/mL).

Miristik Asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}}$: 50 µg/mL).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 50 µg/mL).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

SAS numunelerinin hazırlanışı: Her bir tek kullanımlık LDPE flakonunda 0.4 mL Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyon numunesinin 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarıldı. Daha sonra üzerine 0.75 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

SAS çalışması için plasebo numunelerinin hazırlanışı: Orijinal tek kullanımlık LDPE flakonda yer alan numunelere paralel olarak, numunelerle aynı stabilite prosedürüne tabi tutulmak üzere head space GC viallerine doldurulup ağzları sıkıca kapatılıp dik bir şekilde kutulara yerleştirilmiştir. Daha sonra her bir stabilite periyodundan çıkarıldığında 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye tartıldı. 0.75 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

3.3. Aletler ve diğer gereçler

1. Shimadzu UFLC XR HPLC Sistemi (Kyoto, Japonya)

Yüksek basınçlı pompa (LC-30 AD)

Soğutuculu Otomatik Örnekleyici (SIL-30 AC)

Kolon Fırını (CTO-20 AC)

Diode Array Dedektör (SPD-20A)

UV Dedektör (CMB-20A)

Lab Solutions Yazılımı (Version 5.6 SP2)

Entegre Bilgisayar (İntel Pentium Core 2 işlemci, 2048 MB Ram)

MS Windows 7 Professional Edition

2. Shimadzu LCMS-8030 Kütle Spektroskopi (LC-MS/MS) (Şekil 3-1)



Şekil 3-1: Shimadzu UFLC XR HPLC ve LCMS-8030 kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) cihazı

3. Bruker Compact ALPHA II FT-IR Cihazı (Massachusetts, ABD)

4. Yazılımlar:

MS Office XP Excel

MS Office XP Word

Cambridge ChemDraw programı (Cambridge, ABD)

5. HPLC Kolonları:

Waters Acquity UPLC BEH Phenyl (100 mm x 2,1 mm iç çap, 1,7 μ m) (Milford, ABD)

Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm iç çap, 1,7 μ m) (Milford, ABD)

Kromasil EternityXT C18 (100 mm x 2,1 mm iç çap, 1,8 μ m) (Mainz, Almanya)

6. Ultrasonik banyo Branson 221 (Danbury, ABD)

7. Waters Vida kapaklı HPLC Vialleri 2 mL (Massachusetts, ABD)

8. Millipore hareketli faz süzme filtresi 0,45 μ m (Massachusetts, ABD)

9. Metrohm 780 pH metre (Herisau, İsviçre)

10. IKA Manyetik Karıştırıcı RCT Basic (Staufen, Almanya)

11. Analitik Teraziler

Sartorius LA 200 Terazi (Goettingen, Almanya)

Sartorius Genius Terazi (Goettingen, Almanya)

Mettler Toledo Ultra Micro Terazı XP2U (Greifensee, İsviçre)

12. Sartorius Otomatik Pipetler (Goettingen, Almanya)

0.5-10 µl

20-200 µl

100-1000 µl

13. Elga Purelab Flex 2 Su Saflaştırma Sistemi (Saint-Maurice, Fransa)

14. Cam Malzemeler:

Isolab Balonjoje (5, 10, 100, 250 ml) (Wertheim, Almanya)

Isolab Mezür (500 ml, 1000 ml) (Wertheim, Almanya)

Isolab Beher (500 ml, 1000 ml) (Wertheim, Almanya)

15. Ekstraksiyon Ekipmanları

GFL Çoklu Su Banyosu (Königshofen, Almanya)

İldam spiralli geri çeviren soğutucu (Ankara , Türkiye)

İldam Erlen (50 mL) (Ankara , Türkiye)

3.4. Analiz Yönteminin Geliştirilmesiyle İlgili Çalışmalar

3.5.1. Kütle Dedektörü İçin Yapılan Geliştirme Çalışmaları

3.5.1.1. Hareketli Faz ve Çözücü Sisteminin Geliştirilmesi

Yapılan literatür araştırmasından edinilen bilgilere göre, analitlere ait hangi koşullarda en etkin yanıtın kütle dedektöründe gerçekleştiğini araştırmak amacıyla aşağıdaki denemeler planlanmıştır. En iyi iyonlaşma sağlayan ve uzun süreli çalışmalar sonrasında dedektörün kaynak bölümünde tuz kalıntıları bırakmayan hareketli faz ve çözücünün belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında kütle dedektörlerde çözelti ve hareketli faz hazırlığında yaygın olarak kullanılan amonyum asetat, formik asit ve amonyum format içeren çeşitli çözeltiler denendi. Tablo 3-1’de belirtilen çözeltiler kullanılarak belirlenen ambalaj malzemesi safsızlıklarının standart çözeltileri hazırlanarak HPLC vialine kondu. Yapılan bu geliştirme çalışması için HPLC pompası 0.5 mL/dakika akış hızına ayarlandı ve tabloda belirtilen hareketli faz A ve hareketli faz B nin eşit oranlarda (50/50, h/h) karışımı ile doğrudan MS /MS dedektörüne 5 µL lik enjeksiyonlar yapıldı.

Tablo 3-2: Hareketli faz belirleme çalışmalarında kullanılan hareketli faz bileşenleri

Hareketli faz no	A çözeltisi	B çözeltisi	Oran (h/h)
1	%0.02 amonyum format	Metanol	50:50
2	%0.05 amonyum format	Metanol	50:50
3	%0,10 amonyum format	Metanol	50:50
4	%0,15 amonyum format	Metanol	50:50
5	%0,10 amonyum format	Asetonitril	50:50

Geliştirme Çalışmalarında kullanılan standart çözeltilerinin hazırlanışı:

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1010}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1010 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irganox-1010 stok standart çözeltisinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1010}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$)

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1330}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irganox-1330 stok standart çözeltisinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1330}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$)

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1076}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1076 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irganox-1076 stok standart çözeltisinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye

aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL)

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}$: 50 µg/mL).

Irgofos-168 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgofos-168 stok standart çözeltisinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgofos-168}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL)

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}}$: 50 µg/mL).

Miristik asit standart çözeltisinin hazırlanışı: Miristik asit stok standart çözeltisinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Miristik asit}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL)

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 1.875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 1.875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1.875 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1.875 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1.875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1.875 µg/mL).

Tek kullanımlık LDPE malzemesinden EEAS numunelerinin hazırlanışı: Ufak parçalara makas yardımı ile kesilen, tek kullanımlık ilaç preparatına ait yaklaşık 5 g LDPE materyal 50 mL'lik erlenmeyer şişelerine tartıldı ve ayrı ayrı sistemlerde 25 mL 2-Propanol, n-Hegzan ve 2-Propanol/Su (50:50, h/h) çözücüleri ile yaklaşık 60-90°C'de (kullanılan çözücüye bağlı olarak agresif kaynamadan kaçınılarak) 2 saat süreyle geri çeviren soğutucu sistemde numuneler ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra buradan elde edilen çözeltiler, mavi banttı süzüldü. Görünür partikül madde olmamasına dikkat edildi. Elde edilen çözeltiden 3 mL alınıp 10 mL lik

balon jojeye aktarıldı. 0,375 mL stok iç standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 $\mu\text{g/mL}$).

İç Standart içeren plasebo amaçlı farmasötik preparat numunelerinin hazırlanışı: Her bir tek kullanımlık LDPE flakonunda 0.4 mL Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyondan 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarıldı. Daha sonra üzerine 0,375 mL stok iç standart çözeltisinden ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 $\mu\text{g/mL}$).

Farmasötik preparat numunelerinin hazırlanışı: LDPE flakonundaki göz damlası numunesinden 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarıldı. Daha sonra üzerine sırasıyla iç standart, Irganox 1010, Irganox 1330, Irganox 1076, Irgafos 168 ve Miristik asit Stok çözeltilerinden 0,375 mL ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irganox-1330}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irganox-1076}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1.875 $\mu\text{g/mL}$).

Prosedür: Tüm standart çözeltileri, EEAS numune çözeltisi, plasebo çözeltisi, farmasötik preparat çözeltisi ve karışım standart çözeltisi ile ana (precursor) iyonların elde edilmesi için tarama çalışması yapıldı. Hareketli faz ve çözücü sistem denemelerinden elde edilen ana iyonlar bir sonraki aşama olan PIS çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu çalışma ile ürün (product) iyonlarının en verimli şekilde dedekte edildiği hareketli faz ve çözücü sistem, tespit edildi. Burada amaç mümkün oldukça çok sayıda ürün iyonu elde edilmesi ve bu elde edilen ürün iyonların tekrarlanabilir olmasıdır. Optimum çözücü ve mobil faz tespit edildikten sonra ürün iyonlarının en kararlı şekilde elde edilmesi için belirlenen HPLC kolonu ile 3.4.1.2. de belirtilen ürün iyonları belirleme çalışması yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.1' de verilmiştir.

3.5.1.2. MS parametrelerinin geliştirilmesi

Kütle dedektörü için yapılan çalışmalar kapsamında taranacak bölge olarak Tablo 3-2'de belirtilen m/z değerleri arası bir aralık belirlendi. Bu değerlerden başlangıç m/z değerini belirlenirken anlamlı seviyede parçalanma ürünlerinin elde edilmesi amaçlandı. Diğer bir değer olan bitiş m/z değeri ise belirlerken molekül ağırlığının üstünde bir değer olmasına dikkat edildi. Bölüm 3.4.1.1'de belirtildiği şekilde ayrı ayrı hazırlanan çözeltiler Ana iyonun belirlenmesi için HPLC vialine konuldu. HPLC pompası 0,5 mL/dakika akış hızına ayarlandı ve mobil faz A (%0,1 lik amonyum format çözeltisi) ve mobil faz B

(metanol) ün 50:50 (h/h) karışımı ile doğrudan MS/MS dedektörüne 5 µL lik enjeksiyonlar yapıldı. Pozitif ve negatif modda tarama (SCAN) yapılarak en yüksek responsa sahip ana iyon belirlendi. Tarama sonucunda elde edilen ana (precursor) iyonlar bölüm 4.1.2 Tablo 4-7’de verilmektedir. Kütle dedektörüne yapılan enjeksiyonlar ile elde edilen ve ana iyonları gösteren kütle spektrumları bölüm 4.1.2 Şekil 4-1 ve Şekil 4-6 arasında verilmiştir.

Tablo 3-3: Ana iyon belirlenmesi için kütle dedektörü yazılımına girilen parametreler

Madde adı	Molekül ağırlığı	Başlangıç m/z değeri	Bitiş m/z değeri
Miristik asit	228	50	450
Tinuvin-326 (IS)	315	100	450
Irganox-1076	530	50	700
Irganox-1330	774	250	850
Irganox-1010	1177	50	1300
Irgafos-168	646	50	800

Çalışmanın yapıldığı sistem cihazına beklenen parçalanma ürünleri ve ana iyon değeri m/z aralığı girildi (Tablo 3-2). Yukarıda bölüm 3.4.1.1’de belirtilen çözeltiler enjekte edilerek bir önceki çalışmada belirlenen ana iyon değerlerinin de kullanılmasıyla bu ana iyonlardan meydana gelmesi muhtemel parçalanma iyonları belirlendi. En az üç farklı çarpışma enerjisi voltajında (15, 25 ve 40 volt gibi) taramalar yapılarak muhtemel en fazla miktarda ürün iyonun elde edilmesi hedeflendi. İlgilenilen maddeler için belirlenen ürün iyonları bölüm 4.1.2 Tablo 4-6 de verilmiştir. Kullanılan cihazın kütle dedektörünün diğer bir özelliği olan çoklu reaksiyon izleme (MRM: Multi reaction monitoring) özelliğinden faydalanılarak ve muhtemel ürün iyonlarına ait m/z değerleri kullanılarak yöntem yazılmıştır. Bu yöntemin temel özelliği olan otomatik tarama yapılmış ve en verimli iyonlaşmanın sağlandığı çarpışma enerjisinin tespiti sağlanmıştır. MRM özelliğinden elde edilen tüm değerler (çarpışma enerjisi) metoda girildi ve böylelikle konsolide bir yöntem elde edildi. Elde edilen bu konsolide yöntem ile belirlenen iyon çiftlerinin HPLC

kolonu ile çalışıldığı zamanki elde edilebilirlikleri ve kararlı olup olmadığı hakkında deneme çalışmaları yapıldı ve tüm kütle spektrumları, kromatogramlar incelenip en yüksek ve en tekrarlanabilir intensitelerin el edildiği iki iyon çifti belirlendi. Belirlenen bu iyon çiftlerinden ilki ambalaj malzemesinden kaynaklanan safsızlıkların hesaplanmasında, ikincisi ise ana iyonun doğruluğunu teyit etmek için kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen çarpışma enerjileri, dwell zamanları ile MRM çiftleri, ve belirlenen değerler ile elde edilmiş olan intensitelere ait grafikleri bölüm 4.1.2 Tablo 4-7’de verilmiştir.

3.5.2. HPLC kolonu seçimi

Yapılan literatür çalışmaları ışığında tüm detayları Tablo 3-3’de paylaşılan kolonlar ile bölüm 3.4.3’te belirlenen “Deneme 3” HPLC koşulları kullanılarak diğer kromatografik koşullar bölüm 3.4.1.1 de belirtilen standart, numune ve plasebo çözeltileri hazırlanıp 5 µl lik enjeksiyonlar yapılarak alan, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı gibi sistem uygunluk parametreleri incelenerek optimum kolon seçimi hedeflendi. Sonuçlar bölüm 4.1.3’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Yöntem geliştirme çalışmalarında kullanılan HPLC kolonlarının özellikleri

Kolon	Uzunluk (mm)	Çap (mm)	Tanecik Büyüklüğü (µm)	Gözenek çapı (Å)	İç yüzey alanı (m ² /g)	End-capping *	Karbon yükü oranı (%)
Waters Acquity UPLC BEH Phenyl	100	2,1	1,7	130	185	Evet	15
Waters Acquity UPLC BEH C18	50	2,1	1,7	130	185	Evet	18
Kromasil EternityXT C18	100	2,1	1,8	100	280	Evet	18

*Piklerin daha simetrik elde edilmesi için kolonlarda uygulanan kimyasal işlem.

3.5.3. Haraketli faz akış hızının belirlenmesi

Geliştirilen yöntemde kütle dedektörde analiz için piklerin herhangi bir ayırım olmasına gerek bulunmazken özellikle parçalanma ürünlerinin benzer olma ihtimali ve moleküllerin birbirine benzer yapıları dikkate alınarak piklerin ayrılması hedeflendi ve bu yönde bir akış türü belirlendi. Kılavuzların belirlediği pik etkinlik parametreleri,

ayırılma parametreleri gibi limitler baz alınarak geliştirilen yöntemde izokratik akış kullanılarak limitleri karşılayan sonuçlar elde edildiği için herhangi bir gradient program kullanılmasına gerek kalmadan geliştirilen yöntemde izokratik elüsyon kullanılmasına karar verilmiştir. Bu kapsamda denemeler yapılmıştır. Bu denemelerden 3 tanesi Aşağıdaki belirtilen Deneme 1, Deneme 2 ve Deneme 3’de verilmiştir.

Deneme 1:

Hareketli Faz A: %0,1 lik amonyum format çözeltisi.

Hareketli Faz B: Metanol

Akış Hızı: 0,5 mL/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Deneme 2:

Hareketli Faz A: %0,1 lik amonyum format çözeltisi.

Hareketli Faz B: Metanol

Akış Hızı: 0,6 mL/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Deneme 3:

Hareketli Faz A: %0,1 lik amonyum format çözeltisi.

Hareketli Faz B: Metanol

Akış Hızı: 0,4 mL/dakika

Kolon fırın sıcaklığı: 25°C

Deneme 1, 2 ve 3’ten elde edilen sonuca ait bilgiler Bölüm 4.1.4’de verilmiştir.

3.5. Yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda elde edilen nihai analitik yöntem

Kromatografik Sartlar

Kolon	: Waters Acquity UPLC BEH Phenyl (100 mm × 2.1 mm), 1.7µm
Numune sıcaklığı	: 10.0 °C
Akış hızı	: 0.5 mL/dak (İzokratik akış)
Hareketli faz	: A:B (50:50, h/h) A çözeltisi: %0,1 amonyum format B çözeltisi: Metanol
Dalga boyu	: 220 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 5.0 µL
Analiz süresi	: 2.4 dak
Kolon sıcaklığı	: 25.0 °C

MS şartları:

Kaynak	: ESI (Electron Spray Ionization)
Interface Sıcaklığı	: 350°C
Nebulizasyon gazı	: Helyum
Nebulizasyon gazı akış hızı	: 2.5 L/dakika
DL sıcaklığı	: 250°C
Isıtıcı blok sıcaklığı	: 450°C
Drying Gaz Akışı	: 15 L/dakika
Interface Voltajı	: 4.5 kV

HPLC sistemi

Cihaz	: Shimadzu UFLC XR HPLC Sistemi
Sistem	: Yüksek basınçlı pompa (LC-20 AD XR) : Soğutuculu Otomatik Örnekleyici (SIL-20 AC HT) : Kolon Fırını (CTO-10 AS VP) : Diode Array Dedektör (Nexera X2 SPD-30A) : Lab Solutions Yazılımı (Version 5.6 SP2)

Kütle Spektroskopi sistemi:

Cihaz	: Shimadzu LCMSMS-8030
--------------	------------------------

MS parametreleri bilgileri Tablo 3-5'te verilmiştir.

Tablo 3-5: EEAS ve SAS analizlerinde kullanılan MS/MS parametre bilgileri

Ambalaj malzemesi safsızlığı	Alıkonma Zamanı (dakika)	MRM Mod	Ana iyon (m/z)	Ürün iyonu (m/z)	Dwell zamanı (ms)	CE (+/-) (V)
Miristik Asit	0,64	(-)	227.10	209.2	50	12
Tinuvin-326 (IS)	1,13	(-)	314.1	229.0*	50	26
		(-)	314.1	152.0	50	38
Irganox-1076	1,55	(+)	548.4	475.4*	50	-34
		(+)	548.4	419.3	100	-36
Irganox-1330	1,70	(+)	792.6	205.2*	100	-29
		(+)	792.6	189.1	100	-32
Irganox-1010	1,86	(+)	1194.6	731.6*	100	-78
		(+)	1194.6	563.5	100	-80
Irgafos-168	2,09	(+)	647.4	441.3*	100	-55
		(+)	647.4	347.1	100	-58

* tanıma için kullanılan MRM çifti iyonlar.

3.5.1. EEAS ve SAS analizi

Aşağıda belirtilen çözeltiler analizlerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

EEAS çalışması için hazırlanan çözeltiler

Irganox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 50 µg/mL).

Irganox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1330}}$: 50 µg/mL).

Irganox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1076}}$: 50 µg/mL).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 1.875 \mu\text{g/mL}$).

Tek kullanımlık LDPE malzemesinden EEAS numunelerinin hazırlanışı: Ufak parçalara makas yardımı ile kesilen, tek kullanımlık ilaç preparatına ait yaklaşık 5 g LDPE materyal 50 mL'lik erlenmeyer şişelerine tartıldı ve ayrı ayrı sistemlerde 25 mL 2-Propanol, n-Hegzan ve 2-Propanol/Su (50:50, h/h) çözücüleri ile yaklaşık 60-90°C'de (kullanılan çözücüye bağlı olarak agresif kaynamadan kaçınılarak) 2 saat süreyle geri çeviren soğutucu sistemde numuneler ekstrakte edildi.

Ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra buradan elde edilen çözeltiler, mavi banttı süzüldü. Görünür partikül madde olmamasına dikkat edildi. Elde edilen çözeltiden 6 mL alınıp 20 mL lik balon jojeye aktarıldı. 0,75 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Çözücü (blank) numunelerinin hazırlanışı: Numunelere paralel olarak, numunelerle aynı ekstraksiyon prosedürüne ekstraksiyon çözeltileri de tabi tutulmuştur. Erlenmeyer

şişelerine ayrı ayrı sistemlerde 25 mL 2-Propanol, n-Hegzan ve 2-Propanol / Su (50:50, h/h) çözücüleri ile yaklaşık 60-90°C'de 2 saat süreyle geri çeviren soğutucu sistemde ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra buradan elde edilen çözeltiler, mavi banttı süzöldü. Görünür partiköl madde olmamasına dikkat edildi. Elde edilen çözeltiden 6 mL alınıp 20 mL lik balon jojeye aktarıldı. 0.75 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,375 µg/mL).

SAS çalışması için hazırlanan çözeltiler

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1330}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1076}}$: 50 µg/mL).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}$: 50 µg/mL).

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile

tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}} : 50 \mu\text{g/mL}$).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 50 \mu\text{g/mL}$).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3.75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$).

SAS numune çözeltisinin hazırlanışı: Her bir tek kullanımlık LDPE flakonunda 0.4 mL ilaç ürün bulunan Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyondan 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarılır. Daha sonra üzerine 0.375 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$).

SAS çalışması için plasebo çözeltisinin hazırlanışı: Orijinal tek kullanımlık LDPE flakonda yer alan numunelere paralel olarak, numunelerle aynı stabilite prosedürüne tabi tutulmak üzere Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyondan GC viallerine numune doldurulup ağzları sıkıca kapatılmıştır. Daha sonra her bir stabilite periyodundan çıkarıldığında 3 mL alınıp 10 mL lik balon jojeye aktarılır. 0.375 mL Stok İç Standart ilave edilip hacmine metanol ile tamamlandı. ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1.875 \mu\text{g/mL}$).

Hazırlanan numune, standart ve plasebo çözeltileri belirtilen analitik prosedüre göre kromatografik sisteme enjekte edilir.

Prosedür

- Çözücü 1 kez enjekte edilir.
- Plasebo bir kez enjekte edilir.
- Standart 1 çözeltisinden 6 ardışık enjeksiyon yapılır.
- Standart 2 çözeltisi ard arda 2 kere enjekte edilir.
- Numune çözeltileri 1'er kez enjekte edilir.

Çözücü ve plasebodan gelen pikler numune kromatogramında safsızlık olarak değerlendirilmez.

Sistem Uygunluk

- Standart Çözeltisi 1'den altı enjeksiyon yapılır ve ardışık altı enjeksiyondan elde edilen rölatif standart sapma $RSD \leq \% 10.0$ olmalıdır
- Standart çözelti ile kontrol standart çözelti arasındaki uyum $\% 90.0$ ile $\% 110.0$ arasında olmalıdır.

Hesaplama (EEAS ve SAS için)

Aşağıdaki hesaplama formülüne göre numunedeki ambalaj malzemesinden kaynaklı EEAS ve SAS miktarları hesaplanır (Denklem 3-1):

$$\frac{R_I}{R_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{5}{10} \times \frac{3,75}{100} \times P \times \frac{10}{W_{mL}} \times 1000 \text{ (Denklem 3-1)}$$

R_I : Numune çözeltisi kütle spektrumunda ilgilenilen ambalaj malzemesi kaynaklı safsızlık pik alanının İç Standart pik alanına oranı.

R_S : Standart çözeltisi 1 kütle spektrumunda ilgilenilen pik alanları ortalamasının İç Standart pik alanına oranı.

P : Standardının % as is potensi.

W_S : Ambalaj malzemesi Safsızlık Standardı tartımı, mg.

W_N : Numune hacmi, mL.

3.6. Geliştirilen yöntemin validasyonu

Yöntem geliştirme çalışmaları tamamlandıktan ve nihai analitik yönteme ulaşıldıktan sonra yöntem validasyonu güncel ICH Kılavuzu Q2 ve USP-NF 736'ya göre yapıldı (11-12)

3.6.1. Seçicilik

Validasyonun Seçicilik parametresi çalışması için kullanılan MRM modu ile Kütle dedektöründe analitler yeterli ve uygun sayıda iyon çiftleri ile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmektedir. EEAS ve SAS çalışması için hazırlanan numune matrisinde bulunan bileşenler (plasebo) ve ilgilenilen maddeler birbirleri ile girişim yapmamalıdır.

3.6.2. Teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

Geliştirilen yöntem ile gözlemlenebilen ancak kantitatif olarak tayin edilmesi gerekli olmayan en düşük konsantrasyon teşhis sınırı (LOD) olarak tanımlanmıştır. Kabul edilebilir uygun hassasiyet ve geri kazanım ile tayin işleminin yapılabilirdiği en düşük konsantrasyon, tayin sınırı (LOQ), olarak tanımlanmıştır. LOD ve LOQ konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için belirli konsantrasyonlardaki çözelti enjekte edilerek cihazdan elde edilen sinyal / gürültü (s/n) oranlarına göre muhtemel LOD ve LOQ değerlerine ait konsantrasyonlar hesaplandı ve görsel değerlendirme yoluyla değerlendirilip elde edilen s/n oranlarının uygunluğunun kontrolü yapıldı.

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irganox-1010}}: 50 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile

tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgonox-1330}}$: 50 µg/mL).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgonox-1076}}$: 50 µg/mL).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Irgafos-168}}$: 50 µg/mL).

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Miristik Asit}}$: 50 µg/mL).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 50 µg/mL).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Stok standart çözeltilerinin her birinden ve iç standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

EEAS ve SAS çalışması için belirlenmiş muhtemel safsızlıklar için ortak olan standart çözeltilerinin hepsinden çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanıp seri enjeksiyonlar yapıldı. Bu enjeksiyonlardan elde edilen cihazın gürültü/sinyal (s/n) değerleri hesaplatıldı. Kılavuzlar tarafından belirlenmiş kabul kriteri olan teşhis sınırı (LOD) için s/n değeri yaklaşık 3:1 oranına sahip konsantrasyonlar, tayin sınırı (LOQ) içinse yaklaşık

10:1 oranına sahip konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

Bu validasyon parametresi için kabul kriteri olarak teşhis sınırı olarak belirlenmiş konsantrasyonda maddeleri içeren çözeltinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramda pikler kolaylıkla detekte edilebilmeli ve piklere ait sinyal gürültü oranının yaklaşık 2 veya 3 olması kriteri baz alınmıştır. Tayin sınırı için belirlenmiş konsantrasyonlarda maddeleri içeren çözeltinin enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramda piklerin geri kazanım değeri ve hassasiyet yönünden uygun olmalı ve piklere ait sinyal gürültü oranının yaklaşık 10 olması gereklidir. Ayrıca LOQ seviyesindeki konsantrasyonlarda maddeleri içeren çözeltilerin ardışık yapılacak altı enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlardaki piklere ait alanlar arasındaki % RSD değeri 20,0 den az olmalıdır (12, 52).

3.6.3. Doğrusallık

Doğrusallık analitik bir metodun, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonuna karşı elde edilen test sonucunun belirli bir aralık içinde doğrusal olması olarak tanımlanır.

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 100 $\mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1330}}$: 100 $\mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi

için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1076}}: 100 \mu\text{g/mL}$).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgafos-168}}: 100 \mu\text{g/mL}$).

Miristik asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Miristik Asit}}: 100 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1010 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010 Stok Standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1330 Stok Standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1330}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1076 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1076 Stok Standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1076}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgafos-168 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgafos-168 Stok Standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgafos-168}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Miristik asit standart çözeltisinin hazırlanışı: Miristik Asit Stok Standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Miristik Asit}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL 'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL 'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 50 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 1. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltisinden 7,5 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}} : 3,750 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}} : 3,750 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}} : 3,750 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}} : 3,750 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}} : 3,750 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 2. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltisinden 3,75 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 3. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltisinden 3 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}} : 1,50 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}} : 1,50 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}} : 1,50 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}} : 1,50 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}} : 1,50 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 4. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgafos-168, Irgonox-1076, stok standart çözeltielerinden 2,25 mL, Miristik Asit stok standart çözeltisinden 1,875 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 1,1250 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 1,1250 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 1,1250 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 1,1250 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 0,9375 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 5. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgafos-168, Irgonox-1076, stok standart çözeltielerinden 187,5 μL , Miristik Asit standart çözeltisinden 9 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,375 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 0,9375 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 0,9375 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 0,9375 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 0,9375 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 1,1250 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 6. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgafos-168, Irgonox-1076, stok standart çözeltielerinden 187,5 μL , Miristik Asit standart çözeltisinden 16 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,75 mL alınarak 40 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 0,46875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 0,46875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 0,46875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 0,46875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 0,7500 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 7. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgafos-168, Irgonox-1076, standart çözeltielerinden 2 mL, Miristik Asit standart çözeltisinden 7 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,375 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}: 0,1875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1330}}: 0,1875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgonox-1076}}: 0,1875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Irgafos-168}}: 0,1875 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Miristik Asit}}: 0,65625 \mu\text{g/mL}$, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}: 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Doğrusallık 8. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgafos-168, Irgonox-1076, standart çözeltielerinden 1 mL, Irgonox-1330 stok standart çözeltisinden 30 µL, miristik asit standart çözeltisinden 6 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,375 mL alınarak 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 0,09375 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 0,1500 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 0,09375 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 0,09375 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 0,5625 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}$: 1,875 µg/mL).

Doğrusallık 9. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgafos-168, stok standart çözeltielerinden 37,5 µL, Irgonox-1076 standart çözeltisinden 4 mL, Irgonox-1330 stok standart çözeltisinden 112,5 µL, miristik asit standart çözeltisinden 25 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 1,875 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 0,03750 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 0,11250 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 0,07500 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 0,03750 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 0,46875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}$: 1,875 µg/mL).

Doğrusallık 10. seviye konsantrasyon çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010 standart çözeltisinden 1,5 mL, Irgafos-168, standart çözeltisinden 1,2 mL, Irgonox-1076 standart çözeltisinden 3,5 mL, Irgonox-1330 standart çözeltisinden 4 mL, miristik asit standart çözeltisinden 15 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 1,875 mL alınarak 100 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 0,028125 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 0,0750 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 0,065625 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 0,02250 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 0,28125 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(İS)}}$: 1,875 µg/mL).

Doğrusallık çalışması için hazırlanan 10 farklı seviyedeki çözeltielerin her birinden 3 er adet enjeksiyon yapıldı ve en küçük kareler metoduna göre doğrusallık denklemleri ve grafikleri elde edildi. Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri Bölüm 4.2.3 de verilmiştir. Elde edilen verilerin uygunluk değerlendirmesi tüm pikler için korelasyon katsayısı (r) 0,99 dan az olmamalıdır. Y-kesim değeri % 10 dan fazla olmamalıdır kriterine göre değerlendirilmiştir (12, 52).

3.6.4. Doğruluk

Doğruluk geliştirilen bir analitik metodun, referans olarak kabul edilen bir değerin, deneysel olarak elde edilen değere yakınlığıdır.

EEAS ve SAS’na ait doğruluk çalışması numune hazırlığı için kullanılan stok çözeltiler:

Irgonox-1010 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 15 mg Irganox-1010 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1010}}$: 150 $\mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 15 mg Irganox-1330 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1330}}$: 150 $\mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1076 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 15 mg Irganox-1076 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irganox-1076}}$: 150 $\mu\text{g/mL}$).

Irgafos-168 stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 15 mg Irgafos-168 standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL n-Hegzan ilave edildi. Çözünmesi için 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Dah sonra yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgafos-168}}$: 150 $\mu\text{g/mL}$).

Miristik Asit stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 15 mg Miristik Asit standardı tartıldı. 100 mL’lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi

için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Miristik Asit}} : 150 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1010 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1010 Stok Standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1330 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1330 Stok Standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1330}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgonox-1076 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgonox-1076 Stok Standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1076}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Irgafos-168 standart çözeltisinin hazırlanışı: Irgafos-168 Stok Standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Irgafos-168}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Miristik Asit standart çözeltisinin hazırlanışı: Miristik Asit Stok Standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 200 mL lik balon jojeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. ($C_{\text{Miristik Asit}} : 1,875 \mu\text{g/mL}$).

Tinuvin-326 (IS) stok standart çözeltisinin hazırlanışı: 10 mg Tinuvin-326 standardı tartıldı. 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Yaklaşık 20 mL metanol ilave edip çözünmesi için 20 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Çözündükten sonra hacmine aynı çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınarak 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi ($C_{\text{Tinuvin-326(IS)}} : 50 \mu\text{g/mL}$).

Standart çözeltisinin hazırlanışı: Ambalaj malzemesi safsızlık stok standart çözeltilerinin her birinden 2.5 mL ve iç standart çözeltisinden 7.5 mL alınarak 200 mL lik balon jöjeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

3.6.4.1 EEAS'na ait doğruluk çalışması

EEAS doğruluk numune çözeltilerinin hazırlanışı:

LOQ seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: Irgonox-1010 standart çözeltisinden 1,5 mL, Irgafos-168, standart çözeltisinden 1,2 mL, Irgonox-1076 standart çözeltisinden 3,5 mL, Irgonox-1330 standart çözeltisinden 4 mL, miristik asit standart çözeltisinden 15 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 3,75 mL alınarak 100 mL lik balon jöjeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 0,028125 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 0,0750 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 0,065625 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 0,02250 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 0,28125 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL).

% 100 seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltilerinden 2,5 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 7,5 mL alınarak 200 mL lik balon jöjeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 1,875 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL)

% 200 seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltilerinden 5 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 7,5 mL alınarak 200 mL lik balon jöjeye aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. ($C_{\text{Irgonox-1010}}$: 3,75 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1330}}$: 3,75 µg/mL, $C_{\text{Irgonox-1076}}$: 3,75 µg/mL, $C_{\text{Irgafos-168}}$: 3,75 µg/mL, $C_{\text{Miristik Asit}}$: 3,75 µg/mL, $C_{\text{Tinuvin-326(IS)}}$: 1,875 µg/mL)

1076: 3,75 µg/mL, C_{Irgafos-168}: 3,75 µg/mL, C_{Miristik Asit}: 3,75 µg/mL, C_{Tinuvin-326(IS)}: 1,875 µg/mL)

3.6.4.2 SAS'na ait doğruluk çalışması

SAS doğruluk numune çözeltilerinin hazırlanışı:

LOQ seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: 10 mL'lik balon jofeye Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyon 3 mL aktarılır ve üzerine sırasıyla Irgonox-1010 standart çözeltisinden 0,15 mL, Irgafos-168, standart çözeltisinden 0,12 mL, Irgonox-1076 standart çözeltisinden 0,35 mL, Irgonox-1330 standart çözeltisinden 0,4 mL, miristik asit standart çözeltisinden 1,5 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,375 mL ilave edildi ve metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. (C_{Irgonox-1010}: 0,028125 µg/mL, C_{Irgonox-1330}: 0,0750 µg/mL, C_{Irgonox-1076}: 0,065625 µg/mL, C_{Irgafos-168}: 0,02250 µg/mL, C_{Miristik Asit}: 0,28125 µg/mL, C_{Tinuvin-326(IS)}: 1,875 µg/mL).

% 100 seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: 20 mL'lik balon jofeye Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyondan 6 mL aktarılır ve üzerine sırasıyla Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltilerinden 0,25 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,75 mL eklenip metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. (C_{Irgonox-1010}: 1,875 µg/mL, C_{Irgonox-1330}: 1,875 µg/mL, C_{Irgonox-1076}: 1,875 µg/mL, C_{Irgafos-168}: 1,875 µg/mL, C_{Miristik Asit}: 1,875 µg/mL, C_{Tinuvin-326(IS)}: 1,875 µg/mL)

% 200 seviyesinde numune çözeltileri hazırlanışı: 20 mL'lik balon jofeye Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyondan 6 mL aktarılır ve üzerine sırasıyla Irgonox-1010, Irgonox-1330, Irgonox-1076, Irgafos-168, Miristik Asit stok standart çözeltilerinden 0,5 mL ve Tinuvin-326 iç stok standart çözeltisinden 0,75 mL eklenip metanol ile hacmine tamamlandı. Benzer şekilde toplam 3 farklı çözelti olacak şekilde diğer numuneler hazırlanır. (C_{Irgonox-1010}: 3,75 µg/mL, C_{Irgonox-1330}: 3,75 µg/mL, C_{Irgonox-1076}: 3,75 µg/mL, C_{Irgafos-168}: 3,75 µg/mL, C_{Miristik Asit}: 3,75 µg/mL, C_{Tinuvin-326(IS)}: 1,875 µg/mL)

Hazırlanan bu çözeltilerden standart-1 çözeltisinden 6 enjeksiyon ve standart-2 çözeltisinden 2 enjeksiyon yapıldı ve ortalama alanlar elde edildi. LOQ, % 100 ve % 200 seviyelerinde hazırlanan numune çözeltilerinden 3'er numune hazırlanıp bu çözeltilerden ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart-1 ve standart-2 uyumu kontrol edildikten sonra standart-1 konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar ng/mL cinsinden hesaplandı. Teorik konsantrasyon ve deneysel konsantrasyon değerleri kullanılarak geri kazanımlar Denklem 3-2 'ye göre hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.2.4'de verilmiştir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneysel Konsantrasyon}}{\text{Teorik Konsantrasyon}} \times 100 \quad (\text{Denklem 3-2})$$

Elde edilen sonuçlarda EEAS ve SAS safsızlık piklerine ait geri kazanım sonuçları için LOQ seviyesi için % 70,0-% 130,0 arasında diğer seviyeler için ise % 80,0 - % 120,0 arasında olmalıdır (12, 52).

3.6.5. Kesinlik

Analitik yöntem kesinliği, aynı standart veya numuneden hazırlanan çok sayıdaki numune ve standarttan elde edilen aynı gün içindeki sonuçların birbirlerine olan yakınlığı olarak tanımlanır

3.6.5.1. Cihaz kesinliği (sistem kesinliği)

Bölüm 3.5'te anlatıldığı %100 çalışma konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltisinden 6 ardışık enjeksiyon yapılır. Enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki relatif standart sapma değeri ölçülür. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5.1.'de verilmiştir. Bu enjeksiyonlardan elde edilen alanlar arasındaki % RSD değeri %10,0 dan düşük olmalıdır.

3.6.5.2. Gün içi tekrarlanabilirlik

Hem EEAS hem SAS gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için Bölüm 3.6.4'te anlatıldığı şekilde standart ve 6 adet %100 konsantrasyonda Doğruluk numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5.2.'de verilmiştir. Bu enjeksiyonlardan elde edilen sonuçlar arasındaki % RSD değeri %10,0 dan düşük olmalıdır.

3.6.5.3. Günler arası tekrarlanabilirlik

Farklı bir günde aynı cihaz kullanılarak hem EEAS hem SAS çalışması kapsamında günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için Bölüm 3.6.4'te anlatıldığı şekilde standart ve 6 adet % 100 konsantrasyonda doğruluk numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5.3.'te verilmiştir. Bu enjeksiyonlardan elde edilen sonuçlar ile gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları arasındaki % RSD değeri % 10,0 dan düşük olmalıdır.

3.6.6. Çözelti stabilitesi

Çözelti stabilitesi hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin alanlarındaki değişimlerin saklama koşulu değiştirilmeden ne kadar süre boyunca belirli bir aralıkta kalabileceğinin tespiti için çalışmasıdır. Bölüm 3.6.4'te anlatıldığı şekilde standart ve %100 konsantrasyonda ambalaj malzemesi safsızlıkları eklenmiş numune çözeltileri hazırlandı ve belirli zaman aralıkları boyunca saklama şartları sabit tutularak analiz edildi. Standart ve numune çözeltisinden, otosamplerda 25°C'de 24 saat ve 10°C'de 72 saat boyunca belirli zaman aralıklarında 2'şer enjeksiyon yapılır, elde edilen pik alanları kaydedilerek Denklem 3-3'e göre % uyum hesaplanır Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6' da verilmiştir. Çözeltiler arasındaki uyum %95.0 - %105.0 olan değerler için çözelti stabil sayılır.

$$\% \text{ Uyum} = \frac{\text{Pik Alanları Oranı } T_1}{\text{Pik Alanları Oranı } T_0} \times 100 \quad (\text{Denklem 3-3})$$

T_0 : Başlangıç pik alanları oranı (A/A_{IS})

T_1 : T_1 'deki pik alanları oranı (A/A_{IS})

3.6.7. Sağlamlık

Analiz şartlarında ufak değişiklikler yapılarak ambalaj malzemesi safsızlık analizleri yapılır ve metodun yapılan değişikliklere karşı dayanıklılığı test edilir. Yapılan değişiklikler ve elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.7' de verilmiştir.

3.7. Stabilite Takip Çalışmaları

Geliştirilen ve yöntem validasyonu yapılan analitik yöntem ile immunosupresant etken maddesini içeren oftalmik preparat çözeltisi SAS'ların herhangi birinde artış olup olmayacağının kontrolü amacıyla stabilite takibine tabii tutulmuştur. Bu çalışma için hızlandırılmış Stabilite koşulu olan 40°C %75 RH için 6 ay, ara koşul stabilite periyodu

olan 30°C 65% RH stabilite koşulunda 12 ay boyunca üründe primer ambalaj malzemesinden kaynaklı safsızlıklarda herhangi bir artış olup olmadığının takibi yapılmıştır (13). Stabilite periyodu boyunca 40°C %75RH stabilite koşulu için Başlangıç, 1. ay, 3. ay ve 6. Aylarda analiz edilirken, 30°C 65% RH stabilite koşulu için ise Başlangıç, 1. ay, 3. Ay, 6. Ay ve 12. Ay analiz edildi. Böylelikle yapılan bu çalışmalar ile ambalaj malzemesinden geçmesi muhtemel olan 5 safsızlığın ürüne geçip geçmediğinin herhangi bir etkileşim olup olmadığının takibi yapılmıştır. Stabilite takibi analizleri sırasında elde edilen sonuçlardan “µg/mL ilaç ürün” değeri LOQ değerinin üzerinde olanlar raporlanırken, “6,25 µg/mL ilaç ürün” limit değerinin üzerinde gelen sonuçlar ise limit dışı bulgu kabul edilecektir. Analizleri yapılacak standart, plasebo ve numunelerin hazırlığı Bölüm 3.5.1’de detaylı olarak verilmiştir. Stabilite takibi yapılan numunelerden elde edilen analizlere ait sonuçlar Bölüm 4-3’te verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz yönteminin geliştirilmesiyle ilgili bulgular

4.1.1. Kütle dedektörü ile yapılan yöntem geliştirme çalışmaları

Kütle dedektörü için yapılan geliştirme çalışmaları kapsamında öncelikle Bölüm 3.4.1.1’de belirtilen EEAS ve SAS çalışması için çözeltiler hazırlanarak ana (precursor) iyonlar belirlendi. Belirlenen bu ana iyonların elde edildiği hareketli faz ve çözücü sistemlerinde PIS çalışması yapılarak ürün (product) iyonlarının en efektif şekilde dedekte edildiği çözücü ve mobil faz sistemi tespit edildi. Bu çalışma yapılarak ana iyon ve ürün iyon piklerini en hassas şekilde veren uygun çözücü sisteminin bulunması hedeflendi. Aktif maddelere ait ürün iyonlarının değerleri ve hangi hareketli faz sisteminde tespit edilebildiği Tablo 4-1, 4-2, 4-3 4-4, 4-5 ve 4-6’da gösterilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen ürün iyonları bilgi amaçlıdır. Sonraki bölümde yüksek basınçlı likit kromatografi kolonu ile birlikte yapılan çalışma ile nihai ürün iyonlarına karar verilmiş ve en kararlı ikisi belirlenerek MRM çiftlerine karar verilmiştir.

Tablo 4-1: Irgonox-1010 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Irgonox-1010 ürün iyonları (m/z)					
Hareketli faz no	563.50	619.5	675.5	731.6	841.0
1*	-	+	+	+	+
2*	+	-	+	+	+
3*	+	+	+	+	+
4*	+	+	+	-	-
5*	+	-	+	+	+

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2’de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

Tablo 4-2: Irgonox-1330 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Irgonox-1330 ürün iyonları (m/z)					
Hareketli faz no	149.1	189.1	205.2	701.5	717.5
1*	-	-	+	+	-
2*	-	-	+	+	+
3*	+	+	+	+	+
4*	+	-	+	-	-
5*	-	+	+	+	+

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2'de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

Tablo 4-3: Irgonox-1076 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Irgonox-1076 ürün iyonları (m/z)						
Hareketli faz no	107.1	149.1	167.0	205.1	419.3	475.4
1*	+	-	+	+	+	+
2*	-	-	+	+	+	+
3*	+	+	+	+	+	+
4*	-	-	+	+	+	+
5*	+	+	+	+	-	+

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2'de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

Tablo 4-4: Irgafos-168 standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (+) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Hareketli faz no	Irgafos-168 ürün iyonları (m/z)					
	147.1	291.1	347.1	385.2	441.3	591.4
1*	+	-	+	+	+	+
2*	-	-	+	+	+	+
3*	+	+	+	+	+	+
4*	+	+	+	+	+	-
5*	+	+	+	+	+	+

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2’de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

Tablo 4-5: Miristik asit standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (-) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonu

Miristik Asit ürün iyonu (m/z)	
Hareketli faz no	209.2
1*	+
2*	-
3*	+
4*	+
5*	-

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2’de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

Tablo 4-6: Tinuvin-326 iç standart çözeltisinin farklı hareketli fazlar ile yapılan (-) mod PIS çalışması sonucunda elde edilen ürün iyonları

Hareketli faz no	Tinuvin-326 (IS) ürün iyonları (m/z)					
	88.0	116.0	152.0	193.1	229.0	263.1
1*	+	-	+	+	+	+
2*	-	-	+	+	-	+
3*	+	+	+	+	+	+
4*	+	+	+	+	-	+
5*	+	+	+	+	+	+

*Sayfa 48 tablo Tablo 3-2’de detaylı bilgi verilmiştir.

(+): ürün iyonu tespit edildi.

(-): ürün iyonu tespit edilmedi.

EEAS ve SAS analiz numuneleri için yapılan 5 farklı deneme çalışmasında optimum koşullarda yeterli ürün iyonları veren çözücü ve mobil faz sistemi tespit edilmiştir. Bu deneme çalışmaları göre tüm ürün iyonlarının gözlemlendiği %0,1’lik amonyum format çözeltisi / metanol sistemini hareketli faz sistemi olarak kullanılmasına ve metanolün ise çözücü olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

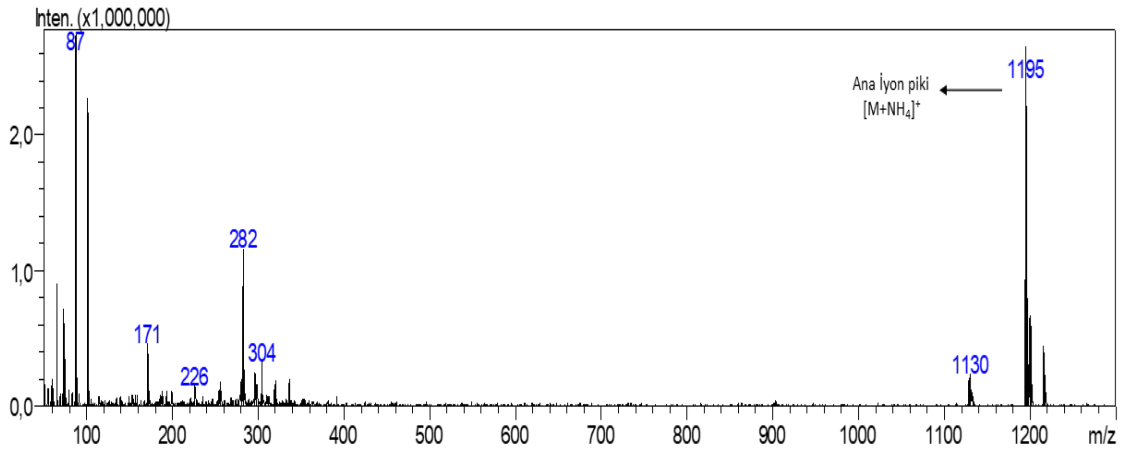
4.1.2. Kütle spektroskopisi parametrelerinin geliştirilmesi bulguları

Bölüm 3.4.1.1 belirtilen çözelti ile kütle dedektöründe yapılan tarama sonucunda hem EEAS hem SAS analizlerinde kullanılabilecek ana (precursor) iyonlar Tablo-4-7’de verilmektedir.

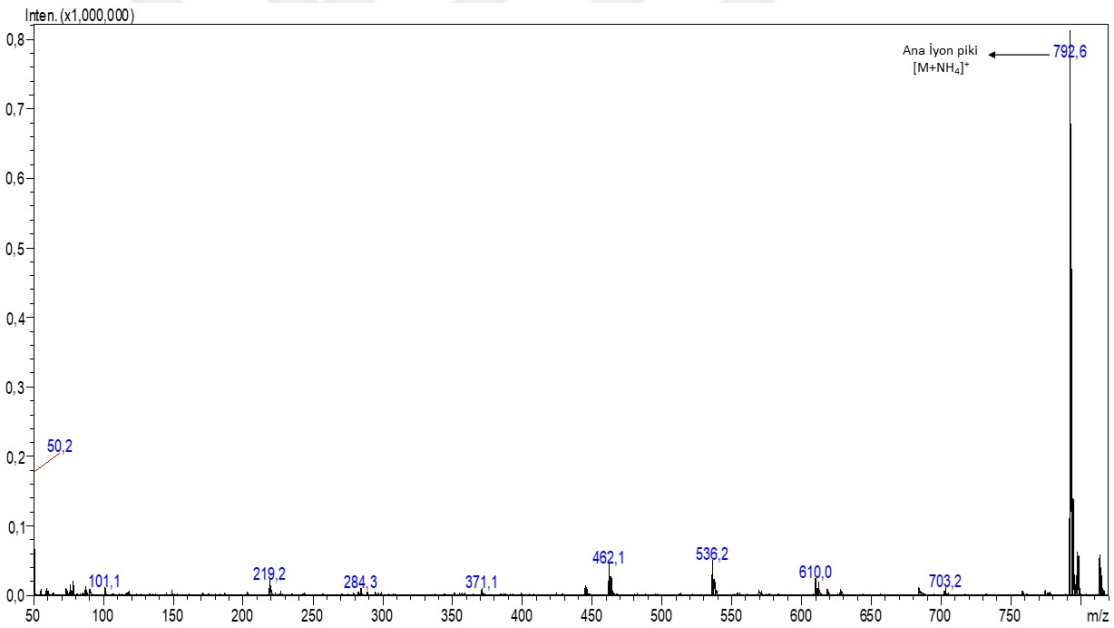
Tablo 4-7: Ambalaj malzemesi safsızlıkları ve iç standarta ait ana iyonlar

Madde adı	Molekül ağırlığı (g/mol)	Kütle analizör polaritesi	Ana (precursor) iyon m/z değeri
Irganox-1010	1177	+	1195
Irganox-1330	774	+	792
Irganox-1076	530	+	548
Irgafos-168	646	+	647
Miristik Asit	228	-	227
Tinuvin-326 (IS)	315	-	314

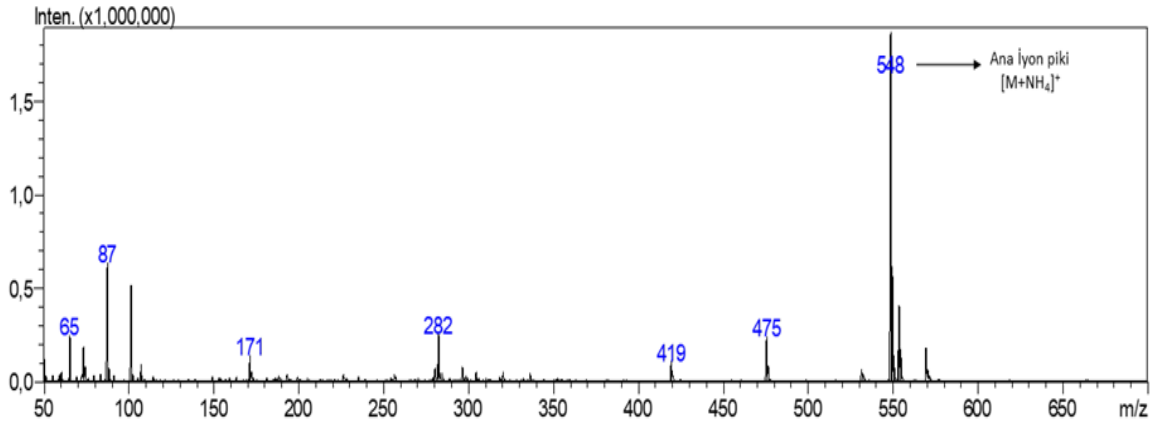
Yapılan enjeksiyonlardan elde edilen ana iyonları gösteren MS dataları Şekil 4-1 ve Şekil 4-6 aralığında verilmektedir.



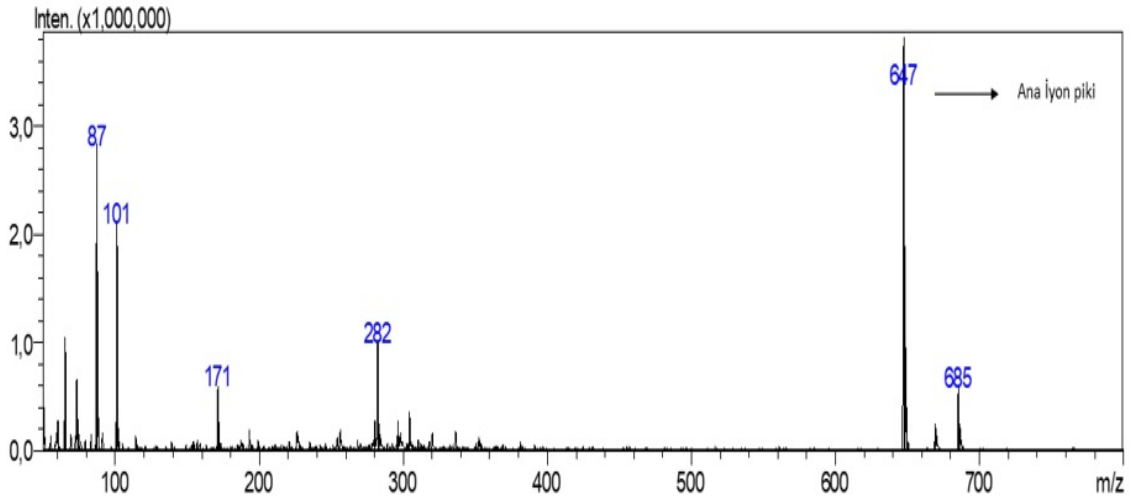
Şekil 4-1: Irganox-1010 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)



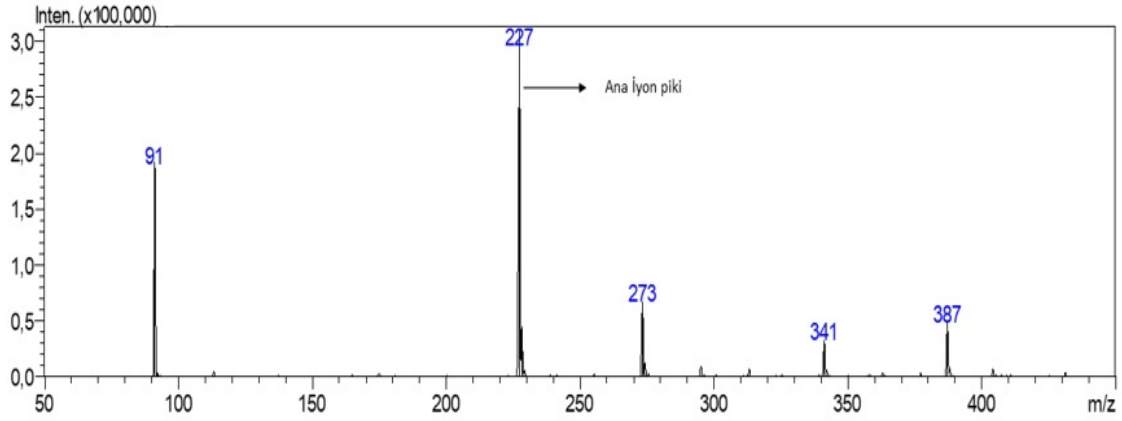
Şekil 4-2: Irganox-1330 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)



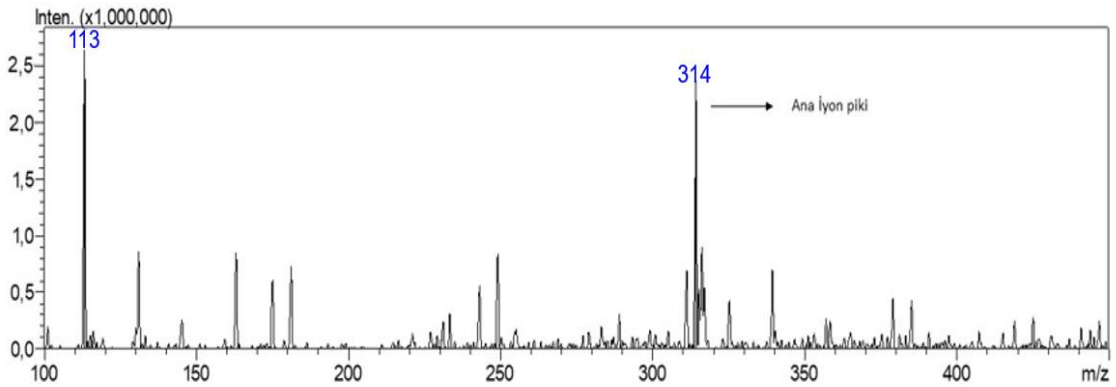
Şekil 4-3: Irganox-1076 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)



Şekil 4-4: Irgafos-168 standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)



Şekil 4-5: Miristik asit standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)

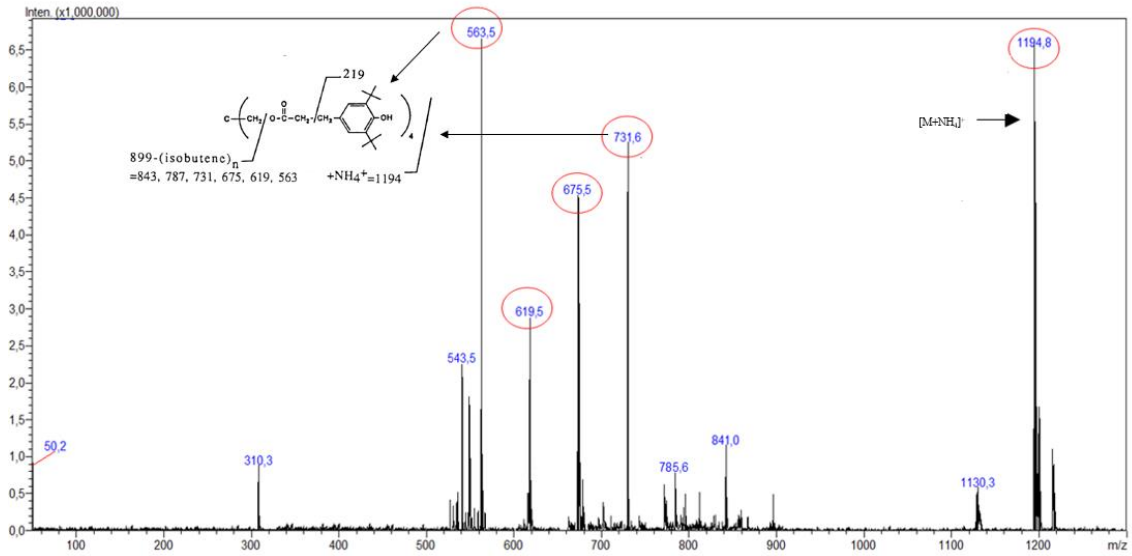


Şekil 4-6: Tinuvin-326 (IS) standart çözeltisine ait ana iyon taramasını gösteren kütle spektrumu (1,875 µg/mL)

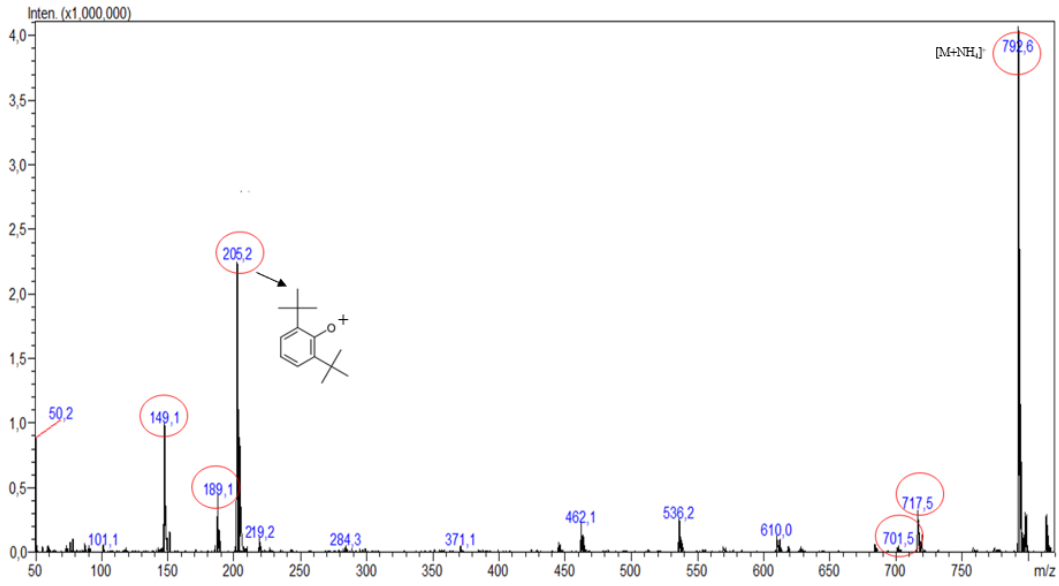
Ana iyon değerlerinin belirlenmesinin ardından hem EEAS hem SAS bileşikleri metodu için ambalaj malzemesi safsızlıklarının ürün iyonları belirlenmesi çalışması yapıldı. Ana iyon değeri ve beklenen ürün ürünleri m/z aralığı girilerek farklı çarpışma enerjileri voltajında taramalar yapılarak ürün iyonları belirlendi. Bu maddelere ait belirlenen ürün iyonları Tablo 4-8’de yer almaktadır. Şekil 4-7 – Şekil 4-12 arasında her madde için muhtemel ürün iyonlarını gösteren ilgili PIS spektrumları gösterilmektedir.

Tablo 4-8: Ambalaj malzemeleri safsızlıkları ve iç standart için belirlenen parçalanma iyonları

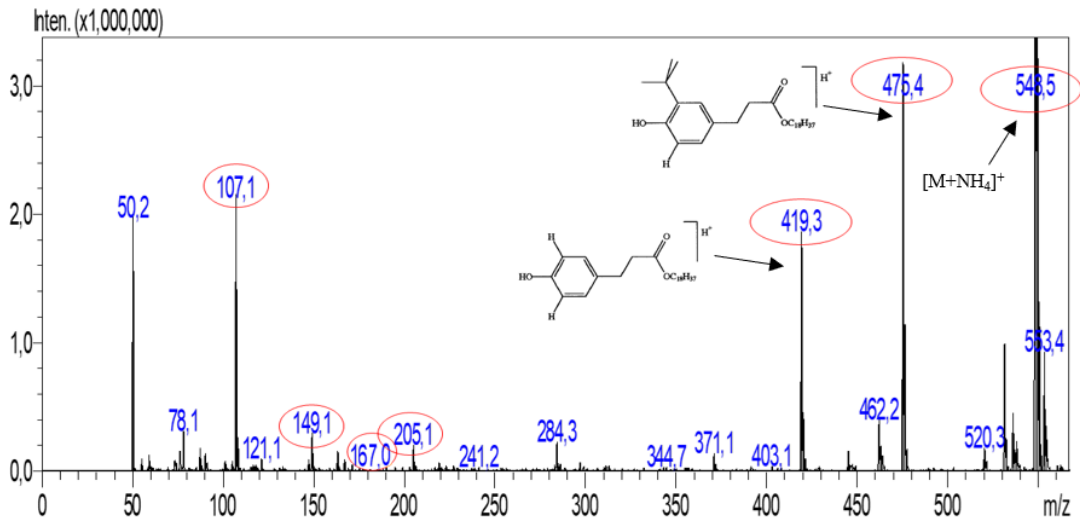
Madde adı	Ana iyon m/z değeri	Kütle analizör polaritesi	Parçalanma iyon/iyonları m/z değerleri
Irganox-1010	1194.6	+	841.0, 731.6, 675.5, 619.5, 563.50
Irganox-1330	792.6	+	717.5, 701.5, 205.2, 189.1, 149.1
Irganox-1076	548.4	+	475.4, 419.3, 205.1, 167.0, 149.1, 107.1
Irgafos-168	647.4	+	591.4, 441.3 385.2, 347.1, 291.1, 147.1
Miristik asit	227.2	-	209.2
Tinuvin-326 (IS)	314.1	-	263.1, 229.0, 193.1, 152.0, 116.0, 88.0



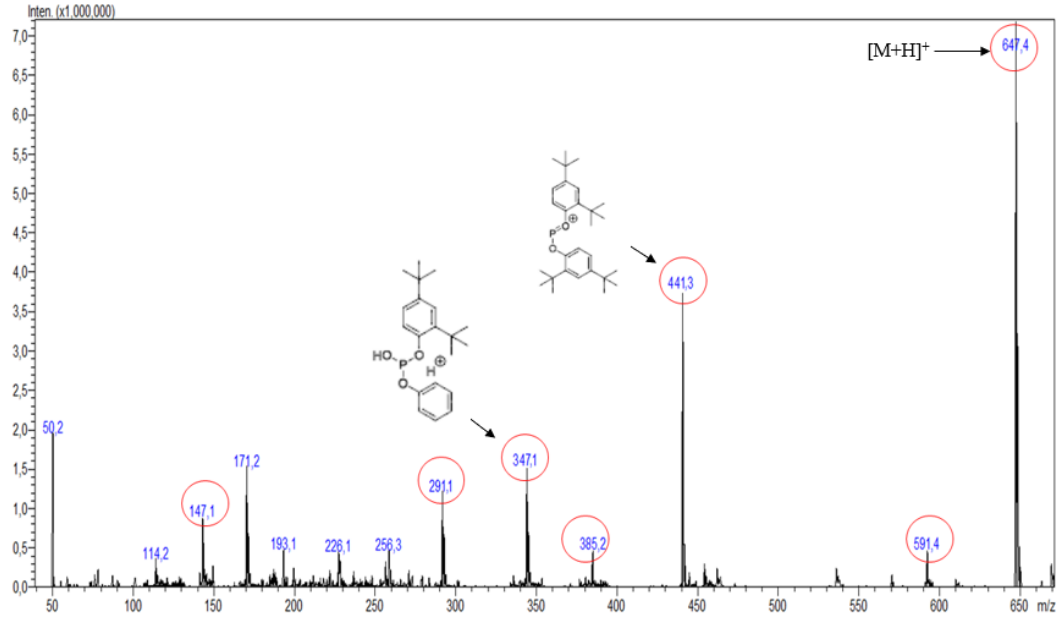
Şekil 4-7: Irganox-1010 standart çözeltisine ait 80 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)



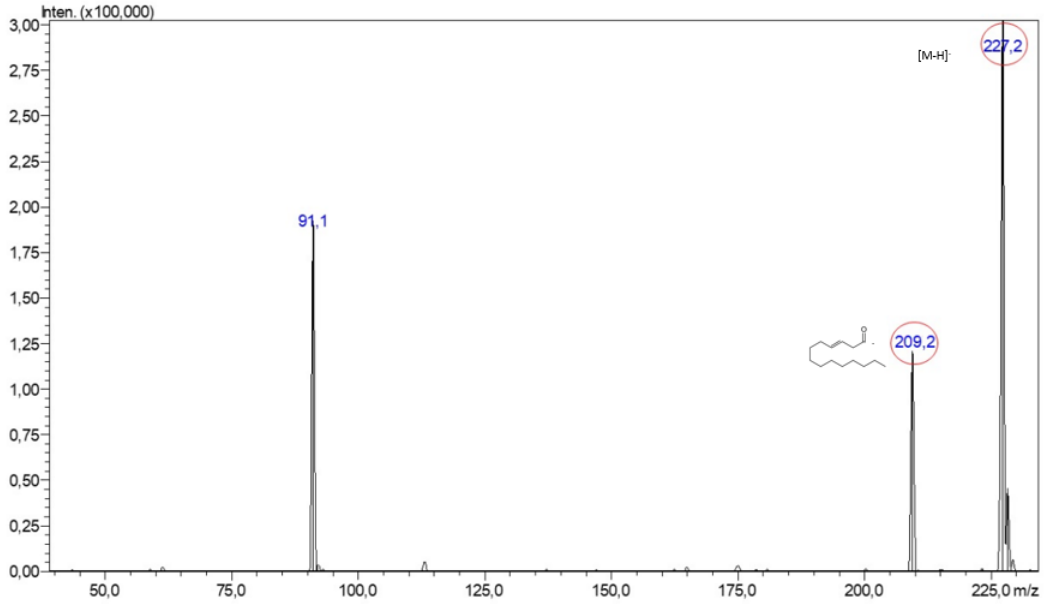
Şekil 4-8: Irganox-1330 standart çözeltisine ait 32 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)



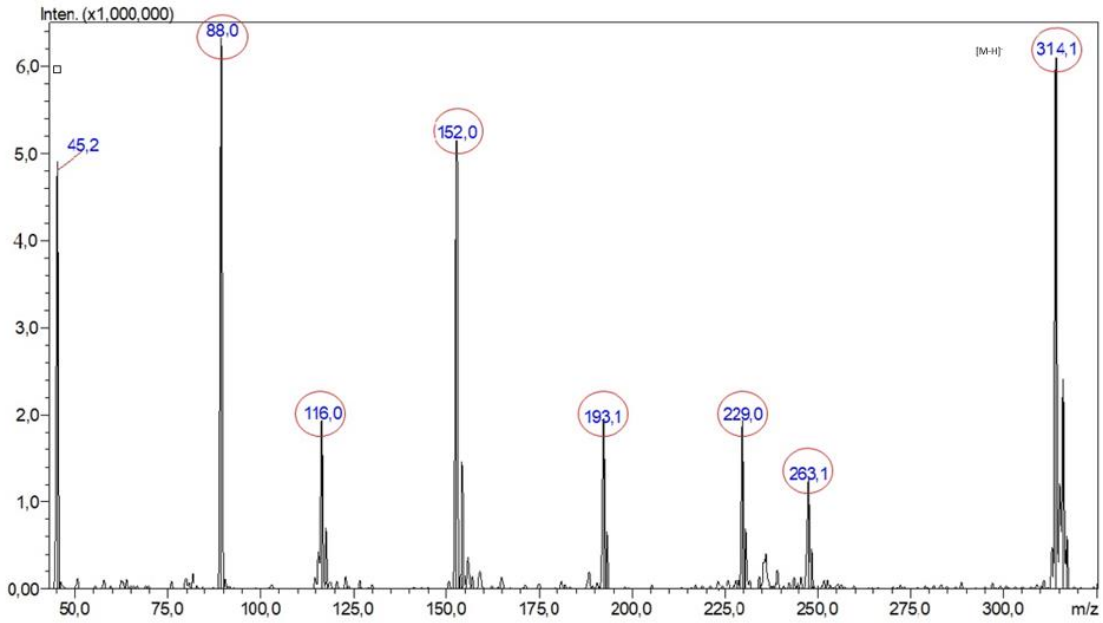
Şekil 4-9: Irganox-1076 standart çözeltisine ait 36 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)



Şekil 4-10: Irgafos-168 standart çözeltisine ait 58 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)



Şekil 4-11: Miristik asit standart çözeltisine ait 12 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)



Şekil 4-12: Tinuvin-326 (IS) standart çözeltisine ait 38 V çarpışma enerjisinde alınan PIS spektrumu (1,875 µg/mL)

Belirlenen ana iyon ve ürün iyon bilgileri doğrultusunda seçilen HPLC kolonu ve parametreleri kullanılarak dedektörün optimizasyon özelliği kullanıldı ve ana pikin ile birlikte kararlı halde olan ürün iyonlarından en iyi responsa sahip olan 2 tane ürün iyonu belirlendi. EEAS ve SAS çalışması kapsamında optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri Tablo 4-9'da verilmiştir

Tablo 4-9: Ambalaj malzemesi safsızlıkları ve iç standart pikine ait MRM çiftleri, dwell zamanları ve çarpışma enerjileri

Madde	Alıkonma Zamanı (dakika)	MRM Mod	Ana iyon (m/z)	Ürün iyonu (m/z)	Dwell zamanı (ms)	CE (+/-) (V)
Miristik Asit	0,64	(-)	227.10	209.2	100	12
Tinuvin-326 (IS)	1,13	(-)	314.1	229.0*	100	26
		(-)	314.1	152.0	100	38
Irganox-1076	1,55	(+)	548.4	475.4*	100	-34
		(+)	548.4	419.3	100	-36
Irganox-1330	1,70	(+)	792.6	205.2*	100	-29
		(+)	792.6	189.1	100	-32
Irganox-1010	1,86	(+)	1194.6	731.6*	100	-78
		(+)	1194.6	563.5	100	-80
Irgafos-168	2,09	(+)	647.4	441.3*	100	-55
		(+)	647.4	347.1	100	-58

* tanıma için kullanılan MRM çifti iyonlar.

4.1.3. HPLC Kolonu Seçimi

Bölüm 3.4.1.1’de belirtilen çözeltiler hazırlanıp belirlenen kromatografik koşullar altında 5 µL lik enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen piklerin sistem uygunluk parametreleri değerlendirildi ve pik simetrisi, teorik plaka sayısı ve alan değerlerine göre çalışmada kullanılacak kolona karar verilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 4-10’da verilmiştir.

Tablo 4-10: Farklı HPLC kolonları ile elde edilen sistem uygunluk parametre değerleri

	Waters Acquity UPLC BEH Phenyl			Waters Acquity UPLC BEH C18			Kromasil EternityXT C18		
	Alan	Tf	N	Alan	Tf	N	Alan	Tf	N
Miristik Asit	227891	0,9	2979	150955	0,7	2687	2002102	0,8	2264
Tinuvin-326 (IS)	2518976	1,4	5963	1755453	1,5	4480	1325112	1,4	3752
Irganox-1076	968981	1,2	3285	850056	1,0	2966	722391	1,1	2387
Irganox-1330	944778	1,2	4058	715433	1,4	3232	811485	1,3	2934
Irganox-1010	2328828	1,3	3018	1702654	1,2	2850	1882943	1,1	2636
Irgafos-168	3214495	1,1	6074	2903849	1,3	5958	2812989	1,4	4565

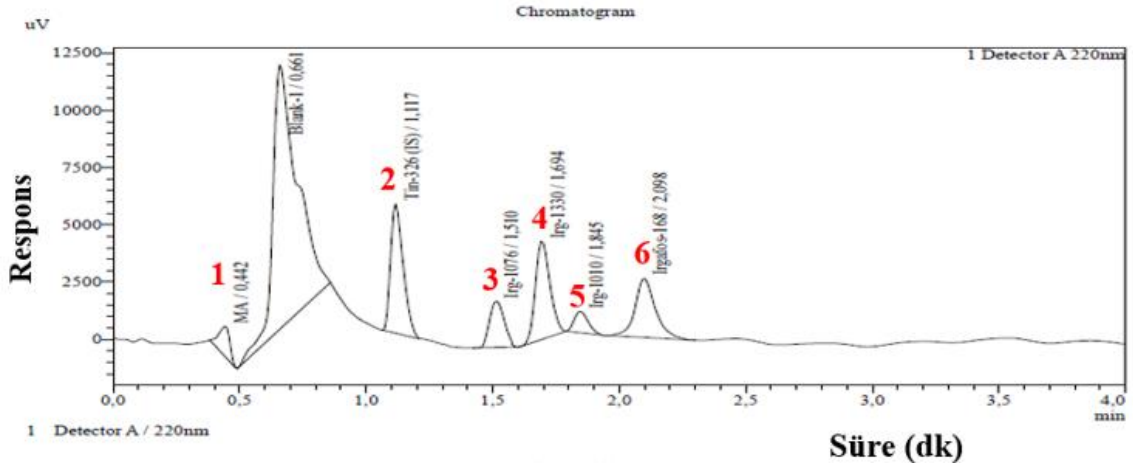
Tf: kuyruklanma faktörü

N: Teorik plaka sayısı

Elde edilen piklere ait sistem uygunluk değerleri incelendi. Kuyruklanma faktörü 0,8-ve 1,5 değerleri arasında olup gaussian pik şekline en yakın değer olan 1 değerine en yakın, teorik plaka sayısı olarak da en yüksek değeri veren kolon olan Waters Acquity UPLC BEH Phenyl kolon kullanılmasına karar verilmiştir.

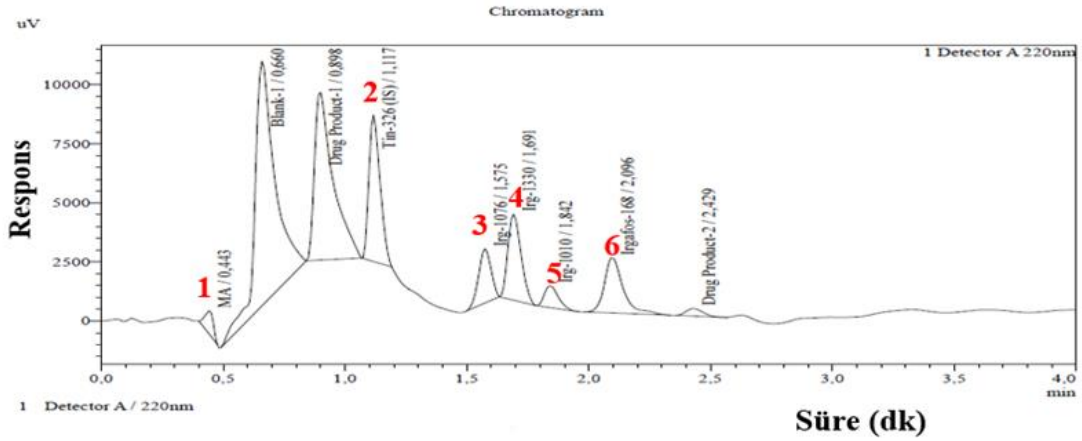
4.1.4. UPLC ve kütle dedektör koşullarının belirlenmesine ait bulgular

Geliştirilen yöntem ile elde edilen tüm kromatogramlar Şekil 4-13 ila Şekil 4-17 arasında verilmiştir. En uygun sonuçlar 0,5 mL/dk akış hızında izokratik elüsyon ile elde edilmiştir.



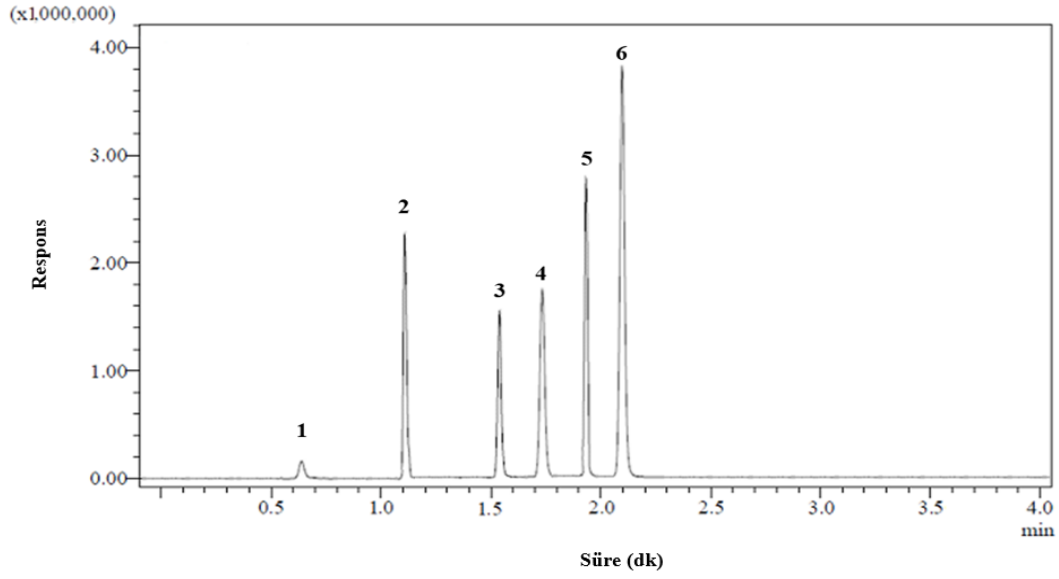
Şekil 4-13: EEAS ve SAS standart çözeltisine ait UV dedeksiyonlu UPLC kromatogramı

1: Miristik Asit (1,875 µg/mL); 2: Tinuvin-326(IS) (1,875 µg/mL); 3: Irgonox-1076 (1,875 µg/mL); 4: Irgonox-1330 (1,875 µg/mL), 5: Irgonox-1010 (1,875 µg/mL); 6: Irgafos-168 (1,875 µg/mL), Dalga Boyu: 220nm



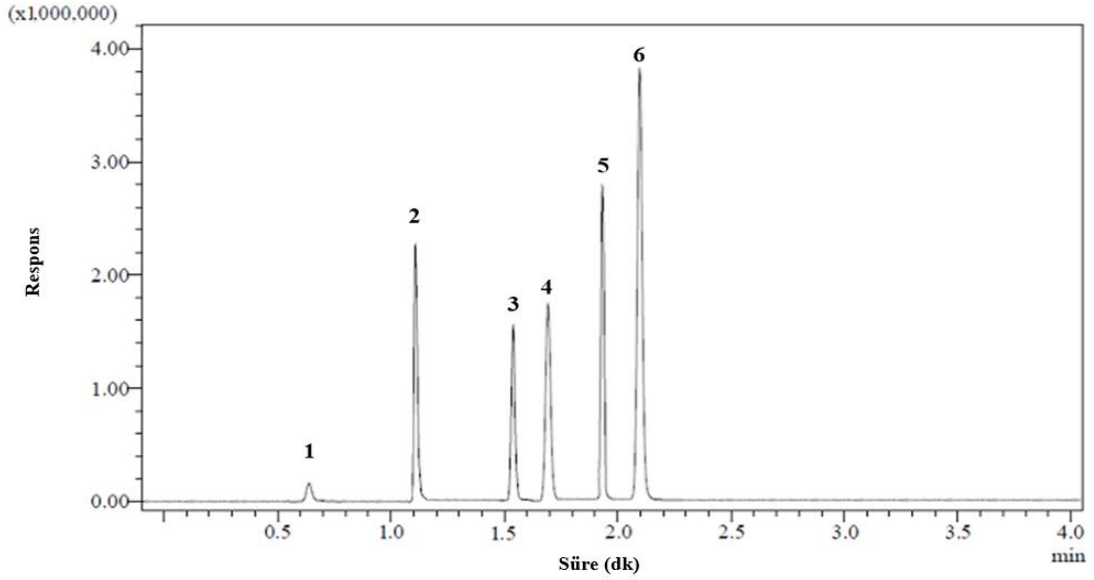
Şekil 4-14: İç standart ve ambalaj malzemesi safsızlıkları katılmış Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyon numune çözeltisine ait elde edilen UV dedeksiyonlu UPLC kromatogramı

1: Miristik Asit (1,875 µg/mL); 2: Tinuvin-326(IS) (1,875 µg/mL); 3: Irgonox-1076 (1,875 µg/mL); 4: Irgonox-1330 (1,875 µg/mL), 5: Irgonox-1010 (1,875 µg/mL); 6: Irgafos-168 (1,875 µg/mL), Dalga Boyu: 220nm



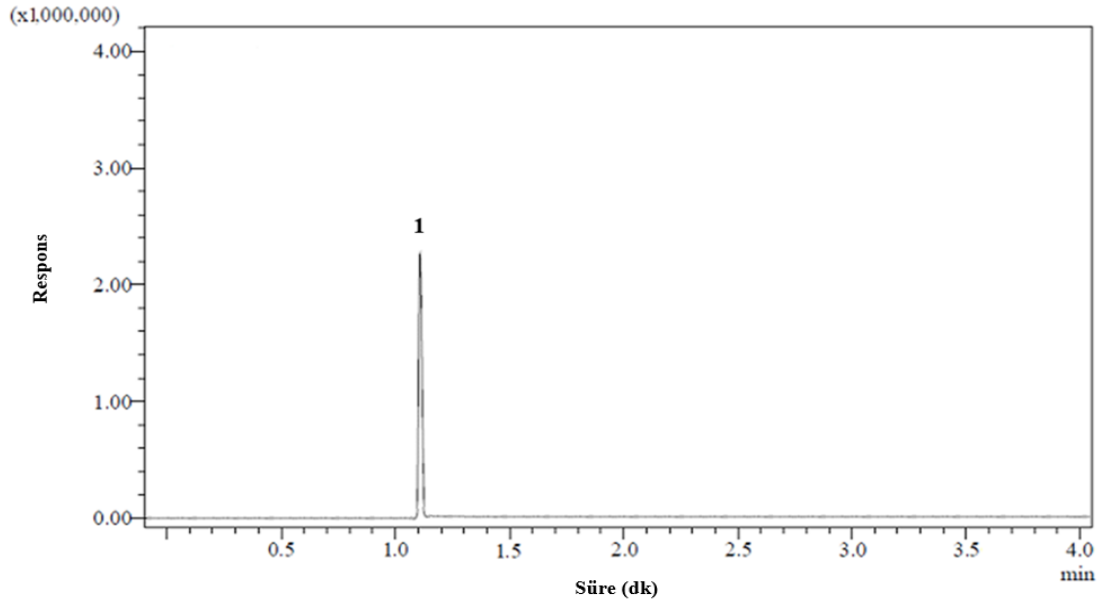
Şekil 4-15: EEAS ve SAS standart çözeltisine ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı

1: Miristik Asit (1,875 µg/mL); 2: Tinuvin-326(IS) (1,875 µg/mL); 3: Irgonox-1076 (1,875 µg/mL); 4: Irgonox-1330 (1,875 µg/mL), 5: Irgonox-1010 (1,875 µg/mL); 6: Irgafos-168 (1,875 µg/mL)



Şekil 4-16: Numunedeki EEAS'na ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı

1: Miristik Asit (1,875 µg/mL); 2: Tinuvin-326(IS) (1,875 µg/mL); 3: Irgonox-1076 (1,875 µg/mL); 4: Irgonox-1330 (1,875 µg/mL), 5: Irgonox-1010 (1,875 µg/mL); 6: Irgafos-168 (1,875 µg/mL)



Şekil 4-17: Numunedeki SAS'na ait UPLC-ESI-MS/MS kromatogramı

1: Tinuvin-326(IS) (1,875 µg/mL)

4.1.5. Tek kullanımlık LDPE malzemesinden elde edilen EEAS numune sonuçları

Geliştirilen analitik yöntem ile PQRI kılavuzuna göre PODP (Parenteral and Ophthalmic Drug Products) için tanımlanmış olan ve Bölüm 3.2'de tek kullanımlık LDPE malzemesinden EEAS numunelerinin hazırlığında belirtildiği gibi hazırlanan numuneler analiz edilmiştir. Ekstraksiyon çalışmasında her çözücü için 3 tekrarlı numune hazırlanmıştır. Materyal karakterizasyonu için kullanılan çözücülerden (2-Propanol, n-Hegzan) ve ambalaj malzemesinin değerlendirilmesi için kullanılan çözücünden (2-Propanol / Su (50:50, h/h)) elde edilen sonuçların tümü tanımlama ve güvenlik eşiği değerinin üzerinde bulunmuştur. EEAS SAS korelasyonuna göz önüne alındığında, belirlenen 5 adet ambalaj malzemesi safsızlığının Restasis® %0.05 oftalmik emülsiyonda stabilite koşullarında SAS olarak ortaya çıkabileceğini göstermiştir.

4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

EEAS ve SAS çalışması için geliştirilen metodun seçici olduğunu göstermek için yapılan analizler sonucunda ilgilenilen piklerin alıkonma zamanlarında çözücü, plasebo ve diğer pikler ile herhangi bir girişiminin olmadığı saptandı. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-13 ila Şekil 4-17 arasındaki şekillerde verilmiştir.

4.2.2. Tespit ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

EEAS ve SAS çalışması için Bölüm 3.6.2’de belirtilen çözeltilerden çeşitli seyreltmeler yapılarak seri enjeksiyonlar yapıldı, cihazın enjeksiyonlara ait gürültü/sinyal (s/n) değerleri hesaplatıldı. s/n değeri için yaklaşık 3:1 oranına sahip konsantrasyonlar teşhis sınırı (LOD), yaklaşık 10:1 oranına sahip konsantrasyonlar ise tayin sınırı (LOQ) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4-12’de verilmiştir.

Tablo 4-11: Ambalaj malzemesi safsızlıklarına ait teşhis sınırı ve tayin sınırı çalışması

	Teşhis sınırı			Tayin sınırı			
	Kons. (µg/mL)	Alan ortalaması	s/n	Kons. (µg/mL)	Alan ortalaması	s/n	%RSD
Miristik Asit	0,0834	13885	5	0,2751	33342	12	4,90
Irganox-1076	0,0223	9951	4	0,0669	30081	15	2,20
Irganox-1330	0,0234	6390	5	0,0747	33726	17	3,21
Irganox-1010	0,0088	10098	3	0,0282	37437	11	3,78
Irgafos-168	0,0078	14063	3	0,0226	32784	12	1,14

Yapılan çalışmalarda LOQ değerlerine ait enjeksiyonlardan 6 enjeksiyon yapılarak enjeksiyon tekrarlanabilirliği incelenmiş ve alan % RSD değerleri %20 nin altında bulunmuştur.

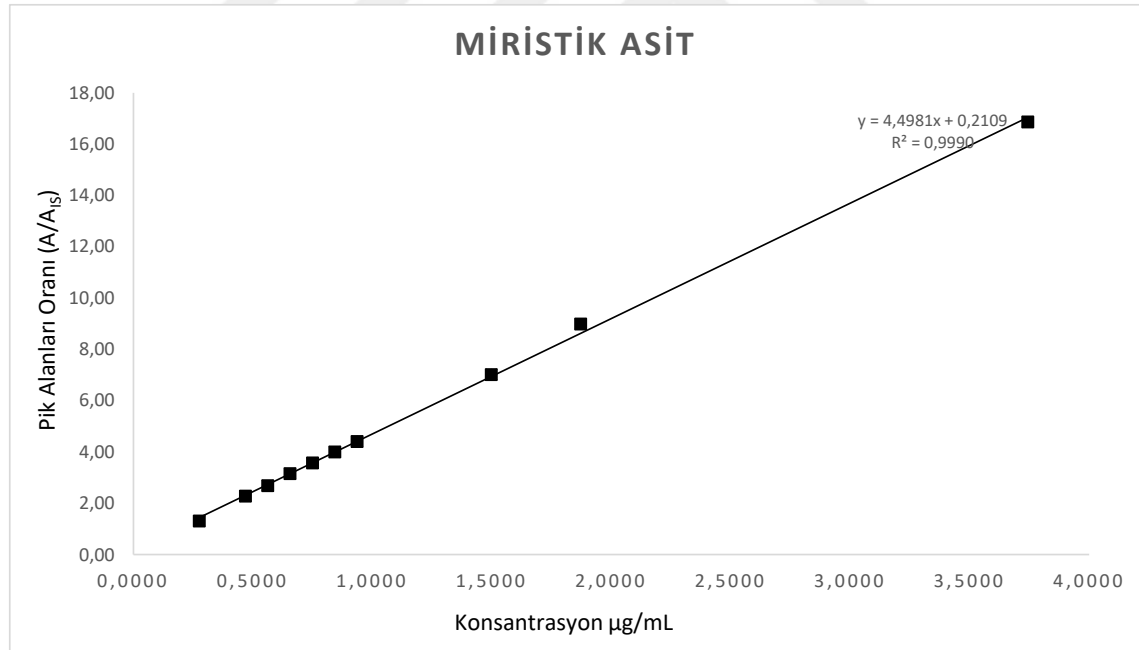
4.2.3. Doğrusallık

EEAS ve SAS doğrusallık analizleri için yapılan çalışma kapsamında Bölüm 3.6.3 de belirtilen çözeltiler hazırlandı ve her konsantrasyon seviyesinden 3 er enjeksiyon yapılarak en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri elde edildi. EEAS ve SAS için yapılan doğrusallık çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 4-13 ila Tablo 4-17 aralığında, bu sonuçlardan elde edilen grafiklere ait şekiller ise Şekil 4-25 ila Tablo 4-29 aralığında verilmiştir



Tablo 4-12: Miristik aside ait doğrusallık çalışması sonuçları

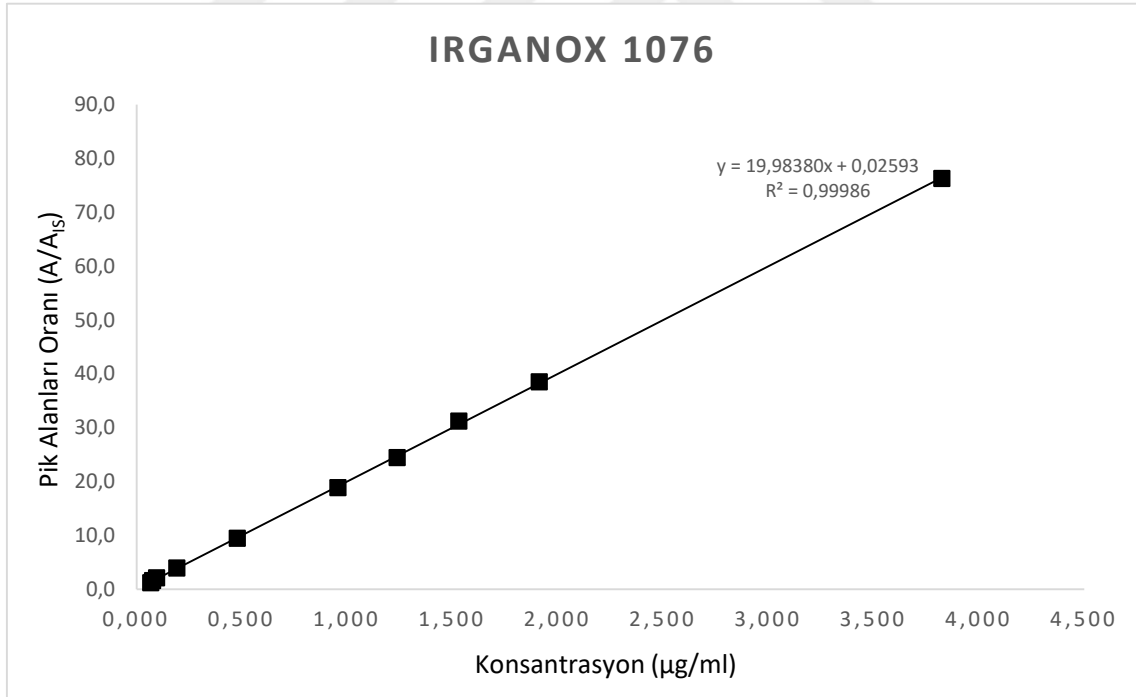
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Miristik Asit Pik Alanı	Tin-326 (IS) Pik alanı	Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})
LOQ-15%	0,2751	33342	2551326	1,30
25%	0,4678	58157	2550336	2,28
30%	0,5614	68016	2533236	2,68
35%	0,6549	79108	2508505	3,15
40%	0,7485	89560	2509332	3,57
45%	0,8421	100726	2518976	4,00
50%	0,9356	110540	2508880	4,41
80%	1,4970	175961	2507990	7,02
100%	1,8713	225591	2508810	8,99
200%	3,7425	439902	2608705	16,86
Eğim		4,49815		
y-kesim noktası		0,21092		
R		0,99949		
R ²		0,9990		



Şekil 4-18: Miristik aside ait doğrusallık grafiği

Tablo 4-13: Irganox-1076'ya ait doğrusallık çalışması sonuçları

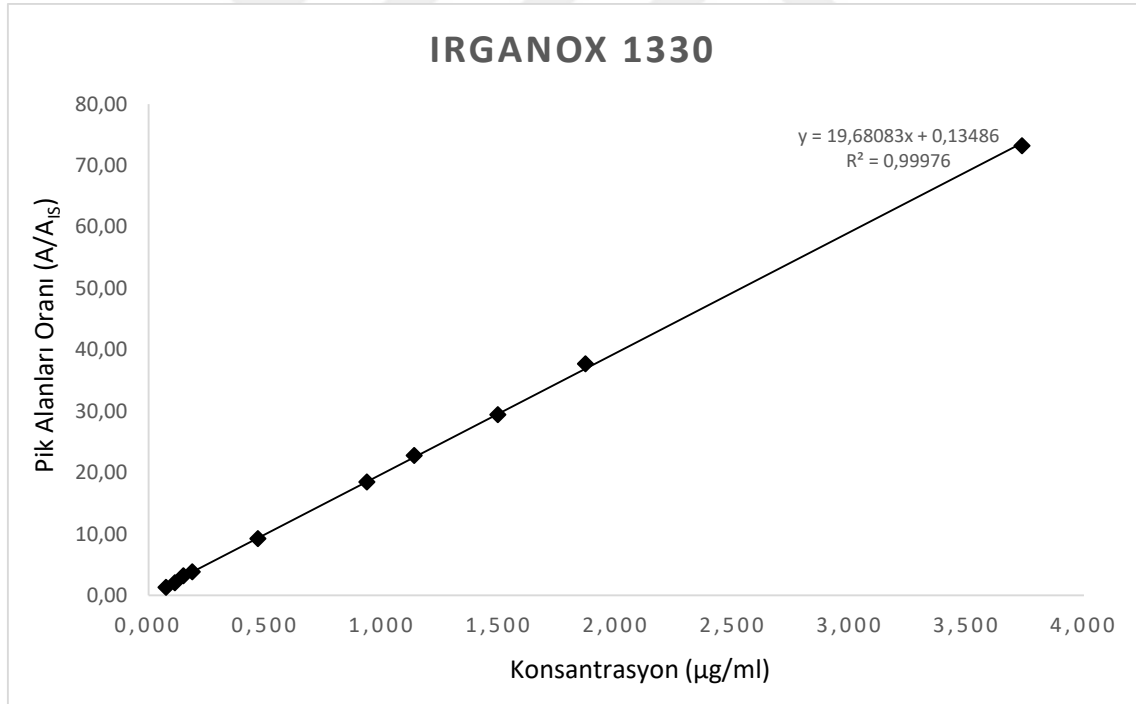
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Irganox-1076 Pik Alanı	Tin-326 (IS) Pik alanı	Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})
LOQ-3.5%	0,06694	30081	2550336	1,2
4%	0,07650	39702	2533236	1,6
5%	0,09563	52646	2508505	2,1
10%	0,19125	98047	2509332	3,9
25%	0,47813	238114	2518976	9,5
50%	0,95625	473331	2508880	18,9
60%	1,23739	632718	2589980	24,4
80%	1,53000	782445	2507990	31,2
100%	1,91250	965981	2508810	38,5
200%	3,82500	1989921	2608705	76,3
Eğim		19,9838		
y-kesim noktası		0,02593		
R		0,99993		
R ²		0,99986		



Şekil 4-19: Irganox-1076'ya ait doğrusallık grafiği

Tablo 4-14: Irganox-1330'a ait doğrusallık çalışması sonuçları

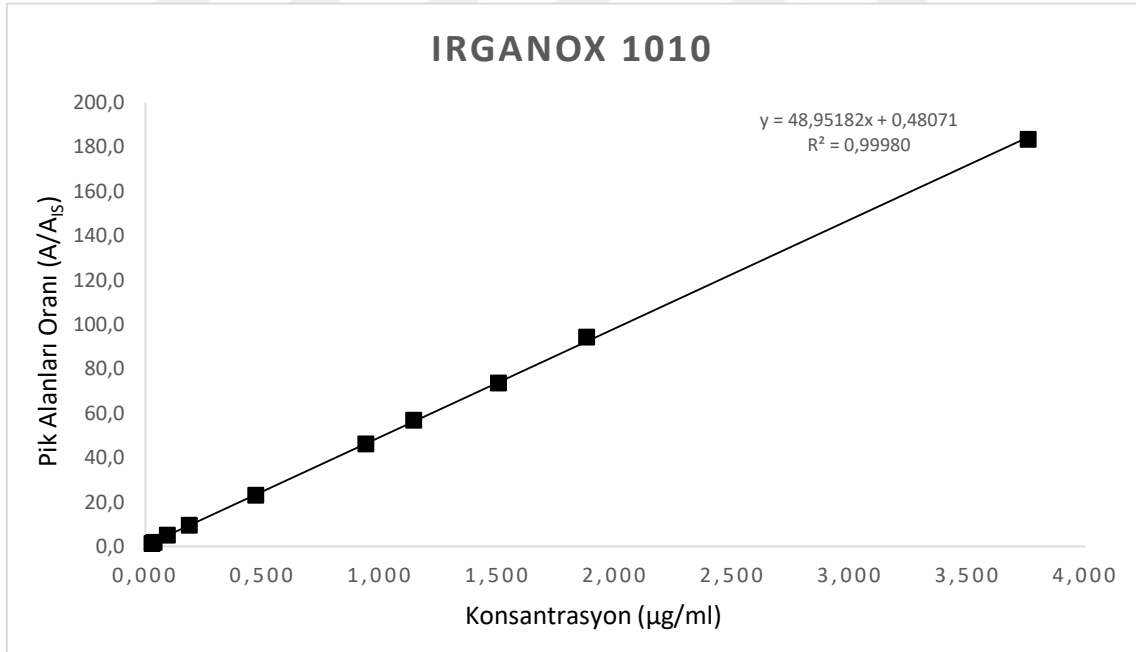
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Irganox-1330 Pik Alanı	Tin-326 (IS) Pik alanı	Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})
LOQ_4%	0,07470	33726	2550336	1,32
6%	0,11205	52171	2533236	2,06
8%	0,14940	79917	2508505	3,19
10%	0,18675	95995	2509332	3,83
25%	0,46688	233130	2518976	9,3
50%	0,93375	463423	2508880	18,5
60%	1,13544	574077	2523126	22,8
80%	1,49400	737694	2507990	29,4
100%	1,86750	945761	2508810	37,7
200%	3,73500	1910437	2608705	73,2
Eğim		19,68083		
y-kesim noktası		0,13486		
R		0,99988		
R ²		0,99976		



Şekil 4-20: Irganox-1330'a ait doğrusallık grafiği

Tablo 4-15: Irganox-1010'a ait doğrusallık çalışması sonuçları

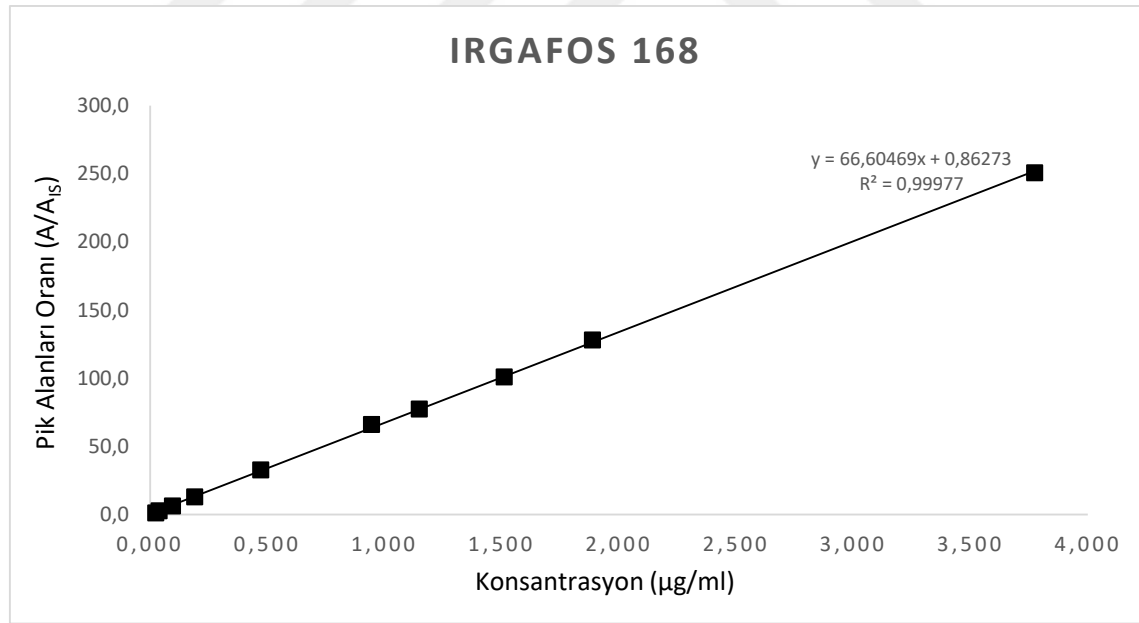
Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Irganox-1010 Pik Alanı	Tin-326 (IS) Pik alanı	Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})
LOQ-1.5%	0,02818	37437	2550336	1,5
2%	0,03758	48574	2533236	1,9
5%	0,09394	129135	2508505	5,1
10%	0,18788	240499	2509332	9,6
25%	0,46969	584068	2518976	23,2
50%	0,93938	1161029	2508880	46,3
60%	1,14228	1438254	2523126	57,0
80%	1,50300	1848168	2507990	73,7
100%	1,87875	2369446	2508810	94,4
200%	3,75750	4786281	2608705	183,5
Eğim		48,95182		
y-kesim noktası		0,48071		
R		0,99990		
R ²		0,99980		



Şekil 4-21: Irganox-1010'a ait doğrusallık grafiği

Tablo 4-16: Irgafos-168'e ait doğrusallık çalışması sonuçları

Seviye	Konsantrasyon (µg/mL)	Irgafos-168 Pik Alanı	Tin-326 (IS) Pik alanı	Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})
LOQ-1,2%	0,02264	32784	2550336	1,3
2%	0,03773	67784	2533236	2,7
5%	0,09431	160746	2508505	6,4
10%	0,18863	325678	2509332	13,0
25%	0,47156	825692	2518976	32,8
50%	0,94313	1656613	2508880	66,0
60%	1,14684	1951480	2523126	77,3
80%	1,50900	2534560	2507990	101,1
100%	1,88625	3214959	2508810	128,1
200%	3,77250	6542666	2608705	250,8
Eğim		66,60469		
y-kesim noktası		0,86273		
R		0,99988		
R ²		0,999850		



Şekil 4-22: Irgafos-168'e ait doğrusallık grafiği

Doğrusallık çalışmaları kapsamında yapılan sonucunda elde edilen verilerden doğrusallık denklemi eğimi, y-kesim noktası, korelasyon katsayısı (R), korelasyon katsayısının karesi (R^2) ve % y-kesim noktasının değeri hesaplatılmıştır. İlgilenilen tüm maddeler için korelasyon katsayısı 0,998 değerinin üstünde bulunmuştur. % Y-kesim noktası değeri ise %10 değerinin altında bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda sırasıyla , miristik asit için 0,2751-3,7425 µg/mL, , Irganox-1076 için 0,06694-3,82500 µg/mL, Irganox-1330 için 0,0747-3,7350 µg/mL, Irganox-1010 için 0,02818-3,75750µg/mL, Irgafos-168 için 0,02264-3,77250 µg/mL konsantrasyon aralıklarında, dedektör yanıtı ile konsantrasyon arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

4.2.4. Doğruluk (Geri Kazanım) Çalışmaları

4.2.4.1.EEAS Çalışması İçin Doğruluk

EEAS Doğruluk çalışması için Bölüm 3.6.4.'de belirtildiği şekilde standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve alanların ortalama değeri hesaplandı. Bölüm 3.6.4.1'de EEAS çalışması için hazırlıkları belirtilen LOQ, % 100 ve % 200 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3 er numune hazırlandı ve ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar µg/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-18 ila Tablo 4-22 aralığında paylaşılmıştır.

Tablo 4-17: EEAS için miristik aside ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%15 (LOQ)	1	0,3106	0,3184	102,5
	2	0,2992	0,3031	101,3
	3	0,2960	0,2795	94,4
%100	1	1,9620	1,9679	100,3
	2	1,8925	1,8849	99,6
	3	1,8695	1,8788	100,5
%200	1	3,9530	3,9135	99,0
	2	3,7655	3,8559	102,4
	3	3,6928	3,6558	99,0
Ortalama				99,9
SD				2,44
% RSD				2,44

Tablo 4-18: EEAS için Irganox-1076'ya ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%3.5 (LOQ)	1	0,0676	0,0702	104,0
	2	0,0667	0,0624	93,5
	3	0,0674	0,0719	106,7
%100	1	3,821	3,829	99,8
	2	3,791	3,841	98,7
	3	3,773	3,795	99,4
%200	1	15,400	15,569	98,9
	2	15,089	15,225	99,1
	3	14,901	15,095	98,7
Ortalama				99,9
SD				3,69
% RSD				3,69

Tablo 4-19: EEAS için Irganox-1330'a ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%4 (LOQ)	1	0,0755	0,0791	106,8
	2	0,0755	0,0727	96,2
	3	0,0773	0,0751	97,2
100%	1	1,8675	1,888	98,9
	2	1,8788	1,8769	100,1
	3	1,8919	1,9089	99,1
200%	1	3,763	3,6275	103,7
	2	3,7387	3,6565	102,3
	3	3,7365	3,7719	98,1
Ortalama				100,3
SD				3,40
% RSD				3,39

Tablo 4-20: EEAS için Irganox-1010'a ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%1,5 (LOQ)	1	0,0281	0,0269	95,7
	2	0,0287	0,029	101,1
	3	0,0285	0,0275	96,5
100%	1	1,8581	1,8488	100,5
	2	1,8956	1,8109	104,7
	3	1,8863	1,8544	101,7
200%	1	2,9953	3,048	98,3
	2	3,0557	3,0648	99,7
	3	3,0406	3,012	100,9
Ortalama				99,9
SD				2,76
% RSD				2,76

Tablo 4-21: EEAS için Irgafos-168'ya ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%1,2 (LOQ)	1	0,0225	0,0205	91,3
	2	0,0225	0,0208	92,2
	3	0,0226	0,0212	93,9
100%	1	1,8863	1,8542	101,7
	2	1,8956	1,8525	102,3
	3	1,8806	1,8512	101,6
200%	1	3,7538	3,7706	99,6
	2	3,7613	3,7706	99,7
	3	3,7463	3,7703	99,4
Ortalama				98,0
SD				4,30
% RSD				4,39

EEAS analizleri validasyonu kapsamında yapılan doğruluk çalışması sonucunda geri kazanım sonuçları sırasıyla, Miristik asit 0,3003-3,8084 µg/mL, Irganox-1076 0,0682-3,8241 µg/mL, Irganox-1330 0,0756-3,6853 µg/mL, Irganox-1010 0,0278-3,0416 µg/mL, Irgafos-168 0,0209-3,7705 µg/mL konsantrasyonları aralığında elde edilen sonuçlar, ilk konsantrasyon olan LOQ konsantrasyonları için %70,0-%130,0 arasında, diğer seviyelerdeki konsantrasyonlar için ise % 80,0 - 120,0 arasında bulunmuştur (12, 52).

4.2.4.2.SAS Çalışması için Doğruluk

SAS Doğruluk çalışması için Bölüm 3.6.4.'de belirtildiği şekilde standart çözeltiden 6 enjeksiyon yapıldı ve alanların ortalama değeri hesaplandı. Bölüm 3.6.4.2'de SAS çalışması için hazırlıkları belirtilen LOQ, % 100 ve % 200 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltilerinden 3 er numune hazırlandı ve ikişer enjeksiyon yapıldı. Standart konsantrasyonu ve ortalama alanları kullanılarak numunelerdeki deneysel miktarlar µg/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4-23 ila Tablo 4-27 aralığında paylaşılmıştır.

Tablo 4-22: SAS için miristik aside ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%15 (LOQ)	1	0,2969	0,3138	105,7
	2	0,2929	0,2855	97,5
	3	0,2897	0,2735	94,4
100%	1	1,9594	1,7889	91,3
	2	1,89	1,718	90,9
	3	1,8675	1,7629	94,4
200%	1	3,9481	3,6864	93,4
	2	3,7611	3,426	91,1
	3	3,6883	3,6121	97,9
Ortalama				95,2
SD				4,72
% RSD				4,95

Tablo 4-23: SAS için Irganox-1076'ya ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%3,5 (LOQ)	1	0,0629	0,059	93,9
	2	0,06	0,0538	89,7
	3	0,0629	0,059	93,9
100%	1	1,8581	1,7912	96,4
	2	1,8956	1,8425	97,2
	3	1,8863	1,807	95,8
200%	1	3,7441	3,8714	103,4
	2	3,7723	3,9458	104,6
	3	3,7253	3,8334	102,9
Ortalama				97,5
SD				5,07
% RSD				5,19

Tablo 4-24: SAS için Irganox-1330'a ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%4,0 (LOQ)	1	0,0715	0,0685	95,8
	2	0,0724	0,0703	97,0
	3	0,0744	0,0741	99,6
100%	1	1,8675	1,8003	96,4
	2	1,8788	1,8581	98,9
	3	1,8919	1,8673	98,7
200%	1	3,7948	3,8859	97,7
	2	3,7931	3,9107	97,0
	3	3,8102	3,7797	100,8
Ortalama				98,0
SD				1,63
% RSD				1,66

Tablo 4-25: SAS için Irganox-1010'a ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneyisel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%1,5 (LOQ)	1	0,0292	0,0303	103,7
	2	0,0288	0,0295	102,2
	3	0,0259	0,0237	91,8
100%	1	1,8769	1,905	98,5
	2	1,8675	1,8787	99,4
	3	1,86	1,8563	100,2
200%	1	3,7819	3,5777	105,7
	2	3,7163	3,668	101,3
	3	3,6735	3,7064	99,1
Ortalama				100,2
SD				3,92
% RSD				3,91

Tablo 4-26: SAS için Irgafos-168'e ait doğruluk çalışması sonuçları

Seviye	Numune	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Deneysel Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım
%1,2 (LOQ)	1	0,0232	0,0227	97,8
	2	0,0239	0,0228	95,5
	3	0,023	0,0226	98,4
100%	1	1,8863	1,7787	94,3
	2	1,8956	1,7743	93,6
	3	1,8806	1,7979	95,6
200%	1	3,8008	3,7144	102,3
	2	3,7723	3,7267	101,2
	3	3,7142	3,611	102,9
Ortalama				98,0
SD				3,50
% RSD				3,57

SAS analizleri validasyonu kapsamın da yapılan doğruluk çalışması sonucunda geri kazanım sonuçları sırasıyla, Miristik asit 0,2910-3,5748 µg/mL, Irganox-1076 0,0573-3,8835 µg/mL, Irganox-1330 0,0710-3,8588 µg/mL, Irganox-1010 0,0278-3,6507µg/mL, Irgafos-168 0,0227-3,6840 µg/mL konsantrasyonları aralığında elde edilen sonuçlar, ilk konsantrasyon olan LOQ konsantrasyonları için % 70,0-% 130,0 arasında, diğer seviyelerdeki konsantrasyonlar için ise % 80,0-120,0 arasında bulunmuştur (12, 52).

4.2.5. Kesinlik Çalışmaları

4.2.5.1.Cihaz Kesinliği (Sistem Kesinliği)

Bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde hazırlanan standart çözeltilerinden kromatografik sisteme ardışık enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen sonuçların % RSD değerleri hesaplanarak metodun sistem kesinliği belirlenmiştir. Sistem kesinliğinden elde edilen sonuçlar Tablo 4-34' de verilmiştir.

Tablo 4-27: Sistem kesinliği çalışması sonuçları

	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Pik Alanları Oranı değeri (A/A _{IS}) (n = 6)	Standart Sapma (SD)	Bağlı Standart Sapma (%RSD)
Miristik asit	1,875	16,9	0,69	4,09
Irganox-1076	1,875	42,1	1,53	3,64
Irganox-1330	1,875	38,8	1,02	2,64
Irganox-1010	1,875	98,6	4,69	4,76
Irgafos-168	1,875	130,7	3,17	2,42

4.2.5.2.Gün içi tekrarlanabilirlik

Hem EEAS hem SAS Tekrarlanabilirlik çalışması için Bölüm 3.6.4’te anlatıldığı şekilde standart ve 6 adet %100 konsantrasyonda Doğruluk numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-35 ve Tablo 4-36’te verilmiştir.

Tablo 4-28: EEAS çalışmasında gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

	Miristik asit	Irganox- 1076	Irganox- 1330	Irganox- 1010	Irgafos-168
Ölçüm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1	1,9555	1,9145	1,8881	1,8489	1,8863
2	1,8995	1,9203	1,8769	1,8110	1,8957
3	1,8601	1,8976	1,9089	1,8544	1,8805
4	1,9108	1,9127	1,8731	1,8581	1,8713
5	1,9655	1,9630	1,8921	1,8162	1,8563
6	1,8255	1,8512	1,8734	1,8938	1,9163
Ortalama	1,9028	1,9099	1,8854	1,8471	1,8845
SD	0,1081	0,0724	0,0279	0,0608	0,0412
% RSD	2,840	1,896	0,740	1,645	1,094

Tablo 4-29: SAS çalışmasında gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

	Miristik asit	Irganox-1076	Irganox-1330	Irganox-1010	Irgafos-168
Ölçüm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1	1,7890	1,7910	1,8005	1,9050	1,7785
2	1,7180	1,8425	1,8580	1,8785	1,7745
3	1,7630	1,8070	1,8675	1,8565	1,7980
4	1,8560	1,8280	1,7815	1,8280	1,8300
5	1,7790	1,7955	1,8000	2,0010	1,7615
6	1,6895	1,7890	1,8405	1,9360	1,8855
Ortalama	1,7650	1,8090	1,8245	1,9010	1,8045
SD	0,1162	0,0438	0,0707	0,1235	0,0925
% RSD	3,291	1,211	1,938	3,249	2,562

Elde edilen sonuçlar arasındaki % RSD değeri hem EEAS validasyonu kapsamında yapılan çalışma için hem de SAS validasyonu kapsamında yapılan çalışma için %10,0 dan az bulunmuştur.

4.2.5.3.Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Farklı bir günde aynı sistem kullanılarak hem EEAS hem SAS Günler Arası Tekrarlanabilirlik çalışması için Bölüm 3.6.4'te anlatıldığı şekilde standart ve 6 adet %100 konsantrasyonda Doğruluk numune çözeltileri hazırlandı ve analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-37 ve Tablo 4-38'de verilmiştir. Bu sonuçların Tekrarlanabilirlik sonuçları ile birleştirilmiş sonuçları ise Tablo 4-39 ve Tablo 4-40'da verilmiştir.

Tablo 4-30: EEAS çalışmasında günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

	Miristik asit	Irganox-1076	Irganox-1330	Irganox-1010	Irgafos-168
Ölçüm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1	1,9125	1,9528	1,8786	1,8285	1,8655
2	1,8786	1,8780	1,8356	1,8091	1,8938
3	1,8582	1,8957	1,8879	1,8748	1,9013
4	1,9318	1,9338	1,8937	1,8953	1,8619
5	2,0049	2,0022	1,8827	1,8071	1,8154
6	1,8163	1,8493	1,8715	1,8521	1,9144
Ortalama	1,9004	1,9186	1,8750	1,8445	1,8755
SD	0,1307	0,1108	0,0415	0,0719	0,0716
% RSD	3,440	2,889	1,107	1,949	1,908

Tablo 4-31: SAS çalışmasında günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

	Miristik asit	Irganox-1076	Irganox-1330	Irganox-1010	Irgafos-168
Ölçüm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1	1,7675	1,7105	1,7675	1,8655	1,9030
2	1,7335	1,8205	1,7335	1,7585	1,8405
3	1,7120	1,7545	1,9260	1,8525	1,8785
4	1,8540	1,8260	1,8710	1,7745	1,8075
5	1,6990	1,7145	1,8280	1,7545	1,8340
6	1,6325	1,7750	1,8190	1,8710	1,8605
Ortalama	1,7330	1,7670	1,8242	1,8128	1,8540
SD	0,1485	0,1000	0,1388	0,1116	0,0682
% RSD	4,286	2,831	3,805	3,079	1,838

Tablo 4-32: EEAS çalışmasında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması

Parametre	Ölçüm	Miristik asit	Irganox- 1076	Irganox- 1330	Irganox- 1010	Irgafos- 168
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Gün içi tekrarlanabilirlik	1	1,9555	1,9145	1,8881	1,8489	1,8863
	2	1,8995	1,9203	1,8769	1,8110	1,8957
	3	1,8601	1,8976	1,9089	1,8544	1,8805
	4	1,9108	1,9127	1,8731	1,8581	1,8713
	5	1,9655	1,9630	1,8921	1,8162	1,8563
	6	1,8255	1,8512	1,8734	1,8938	1,9163
Günler Arası tekrarlanabilirlik	1	1,7890	1,7910	1,8005	1,9050	1,7785
	2	1,7180	1,8425	1,8580	1,8785	1,7745
	3	1,7630	1,8070	1,8675	1,8565	1,7980
	4	1,8560	1,8280	1,7815	1,8280	1,8300
	5	1,7790	1,7955	1,8000	2,0010	1,7615
	6	1,6895	1,7890	1,8405	1,9360	1,8855
Ortalama		1,9015	1,9140	1,8800	1,8460	1,8800
SD		0,1144	0,0897	0,0354	0,0635	0,0565
% RSD		3,008	2,344	0,942	1,721	1,502

Tablo 4-33: SAS çalışmasında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçlarının karşılaştırılması

Parametre		Miristik asit	Irganox- 1076	Irganox- 1330	Irganox- 1010	Irgafos- 168
	Ölçüm	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Gün içi tekrarlanabilirlik	1	1,9125	1,9528	1,8786	1,8285	1,8655
	2	1,8786	1,8780	1,8356	1,8091	1,8938
	3	1,8582	1,8957	1,8879	1,8748	1,9013
	4	1,9318	1,9338	1,8937	1,8953	1,8619
	5	2,0049	2,0022	1,8827	1,8071	1,8154
	6	1,8163	1,8493	1,8715	1,8521	1,9144
Günler Arası tekrarlanabilirlik	1	1,7675	1,7105	1,7675	1,8655	1,9030
	2	1,7335	1,8205	1,7335	1,7585	1,8405
	3	1,7120	1,7545	1,9260	1,8525	1,8785
	4	1,8540	1,8260	1,8710	1,7745	1,8075
	5	1,6990	1,7145	1,8280	1,7545	1,8340
	6	1,6325	1,7750	1,8190	1,8710	1,8605
Ortalama		1,7495	1,7880	1,8245	1,8570	1,8295
SD		0,1317	0,0857	0,1050	0,1452	0,0931
% RSD		3,764	2,396	2,878	3,910	2,545

Günler arası Tekrarlanabilirlik çalışması sonucunda ortaya çıkan sonuçlar arasındaki % RSD değeri hem EEAS validasyonu kapsamında yapılan çalışma için hem de SAS validasyonu kapsamında yapılan çalışma için %10,0 dan az bulunmuştur. Ayrıca her iki çalışmadan elde edilen birleştirilmiş sonuçların kıyaslanması sonucu elde edilen %RSD değeri de %10,0 dan düşüktür (12, 52).

4.2.6. Çözelti Stabilesi

Yapılan çalışma kapsamında Bölüm 3.6.4'te belirtildiği gibi hazırlanan standart ve numune çözeltileri belirli zaman aralıklarında sisteme enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-35 ila Tablo 4-40 aralığında detaylı olarak paylaşılmıştır.

Tablo 4-34: EEAS ve SAS çalışmalarında standarda ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik asit pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,47	-	35,3	-	34,8	-	100,0	-	129,2	-
2	8,67	102,4	34,7	98,3	34,2	98,2	98,8	98,8	127,9	99,0
4	8,69	102,7	35,0	99,0	34,6	99,2	98,4	98,4	127,7	98,8
6	8,62	101,8	34,4	97,2	34,5	99,0	98,2	98,2	130,3	100,8
12	8,70	102,8	34,2	96,7	34,6	99,4	98,6	98,6	132,1	102,2
18	8,70	102,8	34,4	97,4	35,9	103,0	98,9	98,9	131,5	101,8
24	8,78	103,7	34,6	97,9	35,8	102,8	99,0	99,0	134,1	103,8
36	8,78	103,7	34,4	97,3	35,7	102,4	102,0	102,0	134,7	104,6
48	8,70	102,8	34,4	97,2	35,9	103,0	101,7	101,8	132,9	102,8
60	8,75	103,4	34,5	97,5	35,9	103,0	101,3	101,3	134,3	103,9
72	8,71	102,9	34,5	97,6	35,8	102,8	101,7	101,8	134,5	104,1

Tablo 4-35: EEAS ve SAS çalışmalarında standarda ait 25°C otosamplarda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik Asit Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,00	-	36,0	-	34,5	-	78,8	-	130,9	-
2	7,89	98,6	36,3	100,7	34,5	100,0	79,0	100,3	133,0	101,6
4	8,13	101,6	36,2	100,5	34,4	99,8	79,1	100,4	131,6	100,5
6	7,99	99,9	36,3	100,9	34,6	100,2	77,5	98,3	132,1	100,9
12	7,89	98,6	36,7	101,9	34,7	100,5	78,5	99,6	131,1	100,1
18	8,01	100,1	35,9	99,8	34,9	101,1	77,5	98,4	129,6	99,0
24	8,18	102,2	35,6	98,7	35,1	101,8	78,7	99,9	128,6	98,2

Tablo 4-36: EEAS çalışmasında numunlere ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik Asit pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,47	-	42,23	-	38,61	-	98,32	-	130,66	-
2	8,52	100,6	42,56	100,8	38,88	100,7	102,16	103,9	132,62	101,5
4	8,44	99,7	42,27	100,1	38,53	99,8	98,72	100,4	130,40	99,8
6	8,51	100,5	42,69	101,1	38,99	101,0	99,01	100,7	133,54	102,2
12	8,45	99,8	42,35	100,3	38,84	100,6	99,21	100,9	132,23	101,2
18	8,48	100,1	42,35	100,3	38,88	100,7	98,03	99,7	135,11	103,4
24	8,61	101,6	43,16	102,2	39,26	101,7	99,41	101,1	135,89	104,0
36	8,48	100,1	42,56	100,8	39,07	101,2	100,59	102,3	135,76	103,9
48	8,50	100,3	42,65	101,0	39,22	101,6	100,00	101,7	134,98	103,3
60	8,50	100,3	42,65	101,0	39,22	101,6	101,27	103,0	135,37	103,6
72	8,50	100,3	42,65	101,0	39,22	101,6	101,77	103,5	133,28	102,0

Tablo 4-37: EEAS çalışmasında numunlere ait 25°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik Asit pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,25	-	43,01	-	39,20	-	99,72	-	131,20	-
2	8,27	100,2	42,84	99,6	40,26	102,7	100,32	100,6	132,52	101,0
4	8,25	100,0	43,44	101,0	39,91	101,8	98,70	99,0	128,58	98,0
6	8,36	101,3	43,27	100,6	40,30	102,8	100,41	100,7	131,32	100,1
12	8,51	103,1	43,05	100,1	40,30	102,8	102,71	103,0	135,00	102,9
18	8,19	99,2	42,92	99,8	40,65	103,7	99,16	99,4	130,72	99,6
24	8,55	103,7	42,15	98,0	40,57	103,5	100,98	101,3	135,57	103,3

Tablo 4-38: SAS çalışmasında numunlere ait 10°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik asit pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 pik alanları oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,16	-	35,2	-	34,1	-	100,2	-	128,5	-
2	7,99	97,9	34,8	98,9	33,7	98,9	99,3	99,1	132,5	103,1
4	8,32	100,4	34,8	99,0	33,8	99,2	100,4	100,2	132,7	103,3
6	8,07	98,9	35,9	102,1	35,1	103,0	98,1	97,9	133,1	103,6
12	8,20	100,5	35,6	101,0	33,7	98,9	99,6	99,4	130,4	101,5
18	8,09	99,2	35,1	99,6	33,9	99,5	98,8	98,6	132,2	102,9
24	8,45	103,6	35,6	101,1	34,5	101,1	101,4	101,2	125,8	97,9
36	7,96	97,6	34,9	99,2	34,3	100,7	100,0	99,8	126,7	98,6
48	7,91	96,9	35,1	99,6	34,9	102,2	103,1	102,9	125,3	97,5
60	8,19	98,8	35,2	99,9	33,9	99,4	101,5	101,3	125,5	97,7
72	8,06	102,0	34,6	98,4	33,7	98,8	97,8	97,6	126,3	98,3

Tablo 4-39: SAS çalışmasında numunlere ait 25°C otosamplerda çözelti stabilitesi sonuçları

Süre (Saat)	Miristik Asit Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1076 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1330 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irganox-1010 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum	Irgafos-168 Pik Alanları Oranı (A/A _{IS})	% Uyum
Başlangıç	8,30	-	36,5	-	34,8	-	79,2	-	132,1	-
2	8,32	100,3	37,0	101,4	34,7	99,8	80,9	102,1	130,9	99,1
4	8,43	101,6	36,4	99,6	34,8	99,9	77,2	97,5	131,6	99,6
6	8,49	102,3	36,9	101,2	34,7	99,8	78,6	99,3	135,1	102,3
12	8,28	99,7	36,8	100,7	35,4	101,6	79,8	100,8	130,3	98,6
18	8,37	100,8	35,8	98,0	35,5	102,1	78,1	98,6	133,4	101,0
24	8,23	99,1	36,8	100,9	35,0	100,6	76,8	97,0	134,1	101,5

Yapılan enjeksiyonlardan elde edilen datalara göre EEAS ve SAS çalışmaları için hazırlanan Standart ve Numune çözeltilerinin her biri, 15°C’de, 72 Saat, 25°C’de 24 saat boyunca dayanıklılık göstermektedir.

4.2.7. Sağlamlık

Tablo 4-40: EEAS çalışmasında sağlamlık sonuçları

	Miristik asit	Irganox- 1076	Irganox- 1330	Irganox- 1010	Irgafos-168
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Tekrarlanabilirlik	1,9028	1,9099	1,8854	1,8471	1,8845
Kolon Sıcaklığı 23 °C	1,8533	1,9634	1,9273	1,8323	1,8506
Kolon Sıcaklığı 27 °C	1,8628	1,9806	1,9189	1,8286	1,8581
Akış Hızı 0.45 ml/dak	1,8514	1,9806	1,9566	1,8360	1,8638
Akış Hızı 0.55 ml/dak	1,8495	1,9634	1,9533	1,9025	1,8657
Drying Gaz Akışı 13.5 L/dakika	1,8552	1,9748	1,9382	1,8988	1,9222
Drying Gaz Akışı 16.5 L/dakika	1,8571	1,9653	1,9589	1,8914	1,9180
Ortalama	1,8618	1,9626	1,9341	1,8624	1,8804
SD	0,0186	0,0244	0,0263	0,0335	0,0290
% RSD	1,00	1,24	1,36	1,80	1,54

Tablo 4-41: SAS çalışmasında sağlamlık sonuçları

	Miristik asit	Irganox- 1076	Irganox- 1330	Irganox- 1010	Irgafos-168
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Tekrarlanabilirlik	1,7650	1,8090	1,8245	1,9010	1,8045
Kolon Sıcaklığı 23 °C	1,8074	1,7782	1,8136	1,9542	1,8366
Kolon Sıcaklığı 27 °C	1,8127	1,7909	1,8792	1,9713	1,8727
Akış Hızı 0.45 ml/dak	1,7968	1,7583	1,8756	1,9713	1,8695
Akış Hızı 0.55 ml/dak	1,8144	1,7493	1,8683	1,9542	1,8550
Drying Gaz Akışı 13.5 L/dakika	1,8144	1,7620	1,8792	1,9656	1,8749
Drying Gaz Akışı 16.5 L/dakika	1,8162	1,7710	1,8792	1,9561	1,8785
Ortalama	1,8038	1,7741	1,8599	1,9534	1,8559
SD	0,0184	0,0206	0,0284	0,0243	0,0269
% RSD	1,02	1,16	1,53	1,24	1,45

Dayanıklılık parametrelerinden elde edilen sonuçlar tekrarlanabilirlik sonuçları ile karşılaştırıldığında önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Yukarıda belirtilen bütün şartlarda metodun dayanıklılığı kanıtlanmıştır.

4.3. Stabilité takip çalışması sonuçları

Ürün ambalaj malzemesinden geçmesi muhtemel 5 ambalaj malzemesi safsızlığı ICH stabilité koşullarına göre stabilité takip edilmiş ve Bölüm 3.5.1’de hazırlıkları verilen çözeltiler her stabilité periyodunda çıkarılıp analizlenmiştir. Hızlandırılmış koşul (40 ± 2 °C ve $75\% \pm 5\%$ RH)’den elde edilen sonuçlar Tablo 4-41’de, ara koşul (30 ± 2 °C $65\% \pm 5\%$ RH)’den elde edilen sonuçlar ise Tablo 4-42’de verilmiştir. SAS ambalaj malzemesi safsızlıklarının takibi için numuneler 06.2019 tarihinde stabilité kabinlerine kaldırılmıştır.

Tablo 4-42: Hızlandırılmış koşul stabilité analiz sonuçları (40 ± 2 °C ve $75\% \pm 5\%$ RH)

Ambalaj malzemesi safsızlığı	Kalifikasyon limiti (QT) $\mu\text{g/mL}^*$	Raporlama limiti $\mu\text{g/mL}^*$	Başlangıç	1. Ay	3. Ay	6. Ay
Miristik asit	6,25	0,9170	-	-	-	-
Irganox-1076	6,25	0,2232	-	-	-	-
Irganox-1330	6,25	0,2490	-	-	-	-
Irganox-1010	6,25	0,0939	-	-	-	-
Irgafos-168	6,25	0,0755	-	-	-	-

*farmasötik preparattaki konsantrasyonu

Tablo 4-43: Ara koşul stabilite analiz sonuçları (30 ±2 °C 65% ± 5% RH)

Ambalaj malzemesi safsızlığı	Kalifikasyon limiti (QT) µg/mL*	Raporlama limiti µg/mL*	Başlangıç	1. Ay	3. Ay	6. Ay	12. Ay
Miristik asit	6,25	0,9170	-	-	-	-	-
Irganox-1076	6,25	0,2232	-	-	-	-	-
Irganox-1330	6,25	0,2490	-	-	-	-	-
Irganox-1010	6,25	0,0939	-	-	-	-	-
Irgafos-168	6,25	0,0755	-	-	-	-	-

*farmasötik preparattaki konsantrasyonu

5. TARTIŞMA

Farmasötik preparatlarda EEAS'ın ve SAS'ın kontrolü, ürünlerde güvenlik ve kalite için çok önemlidir. Sürekli daha çok önem kazanan bu konuda, tüm ülkeler ve uluslararası geçerliliğe sahip kurumlar (USP-NF, EMA vb.) hasta güvenliğini sağlamak için bu alandaki kılavuzlarını daima güncellemektedir. Bu nedenle, ambalaj malzemelerinden ilaç ürünlerine geçme ihtimali olan SAS bileşiklerinin önemini anlamak gerekmektedir. SAS'ların toksisite etkisini değerlendirmek, bu safsızlıkları karakterize etmek ve hastanın sağlığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisini önlemek için risk değerlendirmesi yapmak son derece önemlidir. Hasta maruziyetini tahmin etmek ve ilaç ürününün bütünlüğünü sağlamak için, nihai üründeki SAS'ları belirlemek ve miktarını tayin etmek artık birçok otorite için zorunludur (24).

İlaç ürünlerinde ambalaj malzemesi olarak kullanılan LDPE şişelerin, üretiminde yaygın olarak kullanılan beş polimer katkı maddesini belirleyebilen basit bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi hedeflenmiştir (34). Belirlenen bu beş polimer katkı maddesi için yapılan literatür araştırmasına göre çeşitli enstrümental analitik yöntemler ile analizleri bulunmaktadır. Bu katkı malzemelerinin bazıları için ayrı ayrı yapılmış EEAS, SAS ve EEAS/SAS çalışmalarında HPLC, UPLC, GC gibi çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmış olup, çalışmalarda dedeksiyonlar kütle, gaz ve spektrofotometrik dedektörler ile sağlanmıştır (58, 59, 68). Bu yöntemlerde polimer katkı maddelerinin biri ya da birkaçı çeşitli numune hazırlama teknikleri ile analiz edilmiştir. Tez çalışması için geliştirme çalışmalarının yapıldığı ana kadar bu beş polimer katkı maddelerinin kütle dedektör kullanılarak analiz edildiği bir yöntem yayınlanmamıştır. Hassasiyet seviyelerinin yüksek olması ve daha düşük konsantrasyonlarda tayin yeteneğinin yüksek olmasından dolayı kütle dedektörünün kullanılmasına karar verilmiş ve buna uygun olarak geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile düşük konsantrasyonlarda ve oldukça kısa bir zamanda beş EEAS bileşiğin analizi ve tespit edilmeleri sağlandı. Siklosporin etken maddesini içeren oftalmik çözeltinin temas halinde bulunduğu LDPE ambalaj malzemesinden, belirlenen beş katkı maddesinin SAS açısından stabilite periyodunda oftalmik preparata geçip geçmediğinin takibi ve ilacın kalitesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi geliştirilen yöntem yardımı ile yapılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda dahi dedektör hassasiyetini yüksek olması ve kromatografik

ayırma gerek olmadan analitik tayin gerçekleştirilebilmesinden dolayı kütle dedektörünün MRM modu kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda hata payını daha düşük oranlara indirmek için kütle dedektörünün beraberinde 220 nm dalgaboyunda spektrofotometrik dedektör kullanılarak piklerin kromatografik olarak da ayrılıp ayrılmadığına bakılmıştır. Numune hazırlığı çalışmalarında polimer katkı maddelerinin sulu çözücülerde iyi çözünmemesi sebebiyle numune hazırlıklarında iyi çözücü sistemi olan metanol tercih edilmiştir. Kromatografik geliştirme çalışmaları sonucu hareketli faz olarak %0,1 lik amonyum format çözeltisi (Mobil faz A) ve Metanol (Mobil faz B) olarak kullanılmıştır. Hareketli faz kolay hazırlanan, kütle dedektöründe kalıntı bırakmadan iyonlaşmayı kolaylaştıran, ucuz, bileşenlerden seçilmiştir. Ayrıca hareketli faz sisteminde kullanılan amonyum formatın özellikle pozitif iyon modunda ana iyon piklerine $[M^+ NH_4]^+$ iyon eklenmesi ile dedektör yanıtını artırıcı etki göstermiş, bunun sonucu olarak daha düşük konsantrasyonlara inilmesine olanak sağlamıştır. İzokratik çalışma uygulanarak farklı polaritelere sahip maddelerin, uzun gradiyent sürelerine gerek duyulmadan 5 dakikalık kısa bir enjeksiyon süresinde kolondan çıkmaları sağlanmıştır.

Yapılan optimizasyon çalışmalarında kütle dedektöründen en iyi verimi alabilmek için öncelikle analitlere ait ana iyon pikler belirlenmiştir. Bunun için analitlerin çözelti seviyesinde tam çözünmüş ayrıca iyonlaşmaya elverişli koşullarda olması önemli olduğundan çözeltilerin hazırlanmasında metanol (hareketli faz B) kullanılmıştır. Bu sayede çözücü ve hareketli faz uyumsuzluğunun önüne geçilmiş ve farklı çözücü hazırlama ihtiyacı duyulmamıştır. Her bir bileşik için saf çözeltiler ile kütle dedektöründe ayrı ayrı tarama çalışmaları yapılmış ve bu tarama çalışmalarında bulunan ana iyonların, literatürde aynı maddeler için belirlenen ana iyonlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Seçiciliği ve hassasiyeti yüksek şekilde piklerin tespit edilebilmesi için MRM modu kullanılmıştır. Kütle dedektöründe otomatik olarak farklı enerjilerde mümkün oldukça çok sayıda ürün iyonu belirlenmesi hedeflenmiş ve kolon ile birlikte yapılan enjeksiyonlar ile kararlı MRM çiftleri belirlenmiştir. İlk elde edilen MRM çifti kantitatif amaçlı diğer MRM çifti ise tanıma amaçlı kullanılmıştır.

Geliştirilen yöntem ile ICH kılavuzuna uygun olarak validasyon çalışması yapılmıştır. 2 adet MRM çifti ile kütle dedektör kullanılan yöntem 5 ambalaj malzemesi safsızlığı için seçicidir. Geliştirilen yöntem ile yapılan doğrusalılık çalışmalarından sırasıyla, miristik asit 0,2751-3,7425 µg/mL, Irganox-1076 0,06694-3,82500 µg/mL, Irganox-1330 0,0747-3,7350 µg/mL, Irganox-1010 0,02818-3,75750 µg/mL, Irgafos-168

0,02264-3,77250 µg/mL aralığında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

EEAS ve SAS için LOQ, %100 ve %200 seviyelerinde hazırlanmış numune çözeltileri ile doğruluk çalışması yapılmıştır. Tablo 4-18 ila Tablo 4-27 aralığında paylaşılan sonuçlara göre LOQ konsantrasyonları için %70,0 - %130,0 diğer seviyelerdeki konsantrasyonlar için ise %80,0 - %120,0 geri kazanım kabul kriterine uygun sonuçlar elde edilmiştir (12, 52).

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında EEAS ve SAS katılarak numune çözeltileri hazırlanmış ve elde edilen sonuçların % RSD'si hesaplanmıştır. Sonuçlar %10 değerinin altındadır. Farklı bir günde benzer şekilde hazırlanan tekrarlanabilirlik numunelerin sonuçları günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında karşılaştırılmış, bu sonuçlar arasındaki % RSD değeri de %10'nun altında bulunmuştur.

Çözelti stabilitesi kapsamında yapılan çalışmalarda, hazırlanan çözeltilerin otosamplarda 10°C'de 72 saat, 25°C'de ise 24 saat stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

Petruševski ve arkadaşları (2011) EEAS çalışmasında LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla Irgafos 168 için 21 ppb ve 69 ppb, Irganox 1010 için ise 22 ppb ve 73 ppb olarak bulmuşlardır. Tez çalışması için geliştirilen yöntemin bu iki bileşik için LOD ve LOQ değerleri ise sırasıyla Irgafos 168 için 8 ppb ve 23 ppb, Irganox 1010 için ise 9 ppb ve 28 ppb bulunmuştur (57).

Legrand ve arkadaşları (2018) geliştirdikleri yöntem ile polietilen infüzyon torbasından kalsiyum glukonat glukohexononat çözeltisine geçme ihtimali olan EEAS'nın 25°C ve 40°C'de başlangıç, 1., 2. ve 3. aylar için SAS takibi yapılmıştır. Bu süreler uluslararası kılavuzlara göre tavsiye edilen stabilite takip sürelerinden kısadır. Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem ile uluslararası kılavuzlarda yer alan stabilite koşullarına ve sürelerine uygun, ilaç sektöründe de yaygın olan 6 ay 40°C, %75RH ve 12 ay 30°C, 65% RH'de SAS takibi yapılmıştır (60, 13).

Günümüzde kütle dedektörlü analiz yöntemlerinin düşük konsantrasyon ve yüksek hassasiyet gerektiren uygulamalarda kullanımı artmıştır. Mirisitik asit, Irganox-1076, Irganox-1330, Irganox-1010 ve Irgafos-168 gibi EEAS ve SAS'nın farklı fizikokimyasal özellikleri, farmasötik preparatın viskoz ve karmaşık matriksinin ortaya çıkardığı zorluklar nedeniyle, UPLC-MS/MS ile analiz yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. İzokratik elüsyon avantajı olan yükleme kapasitesi maksimize edilerek yüksek oranda ilaç ürünü içeren numune çözeltisinin enjeksiyonu ile düşük seviyedeki

safsızlıkların tespiti sağlanmıştır. Yöntemin analiz süresi literatürde yapılan çalışmalara göre oldukça kısadır. Çözücü, API ve plasebo pikleri kolondan erken elue olduğu için ambalaj malzemesi safsızlıklarına herhangi bir kromatografik etkisi olmamıştır. MS dedektörünün teşhis güvenilirliği ile hassas nicelik tayini analizleri yapılmıştır. Elde edilen yüksek hassasiyetteki LOD ve LOQ değerleri sayesinde farmasötik preparata geçebilecek çok düşük konsantrasyonlardaki SAS'nın tespit edilebilmesine olanak sağlanmıştır. Geliştirilen yöntemin validasyon sonuçlarından yüksek doğruluk ve düşük % RSD (yüksek kesinlik) değerleri elde edilmiştir. 6 ay süre ile 40°C, %75RH ve 12 ay süre ile 30°C, 65% RH'de SAS takibi yapılan oftalmik preparatta herhangi bir limit dışı sonuç raporlanmamıştır. Geliştirilen analitik yöntem, oftalmik preparatlarda olduğu gibi benzer birincil ambalaj malzemesine sahip diğer farmasötik preparatların analizlerinde de kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Liu D, Nashed-Samuel Y, Bondarenko PV, Brems DN, Ren D. Interactions between Therapeutic Proteins and Acrylic Acid Leachable. *PDA J Pharm Sci. and Tech.* 2012; **66**:12-19.
2. Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY ve ark. Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environmental Health Perspectives.* 2009; **117**: 1368–1372.
3. Ball DJ, editor, Norwood DL, editor, Stults CLM, editor, Nagao LM, editor. *Leachables And Extractables Handbook.* New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.; 2012.
4. Paskiet D, Jenke D, Ball D, Houston C, Norwood DL, Markovic I. The Product Quality Research Institute (PQRI) Leachables and Extractables Working Group Initiatives for Parenteral and Ophthalmic Drug Product (PODP). *PDA J Pharm Sci. and Tech.* 2013; **67**:430-447.
5. Malpass DB. *Introduction to Industrial Polyethylene.* New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.; 2010.
6. Feinberg T. Extractables and Leachables: Best Practices to Ensure Patient Safety. *BioPharm International.* 2013; **26** (5): 40-45.
7. PQRI. *Thresholds and Best Practices for Extractable and Leachables* (İnternette) 2017, Mart. Erişim 28.10.2019, https://pqri.org/wp-content/uploads/2017/02/CombinedPQRI-PODPSlides_PQRI-FDA_22Mar2017.pdf
8. Jenke D, Egert T, Hendrick A, Castner J, Feinberg T, Houston C ve ark. Simulated Leaching (Migration) Study for a Model Container-closure System Applicable to Parenteral and Ophthalmic Drug Products (PODPs). *PDA J Pharm Sci. and Tech.* 2017; **71**(2):68-87.
9. PQRI. *Experimental Protocol for Simulation Study of Blow-Fill-Seal (BFS) PODP Container Closure Systems, Introduction and Experimental Design* (İnternette) 2011, Eylül. Erişim 18.12.2019, <https://pdf4pro.com/amp/cdn/study-protocol-stage-2-pqri-55a0cd.pdf>

10. PQRI. *Controlled Extraction Study on Low Density Polyethylene (LDPE)* (İnternette) 2015, Kasım. Erişim 05.02.2020, https://pqri.org/wp-content/uploads/2015/11/LDPE_Poster.pdf
11. ICH. *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (İnternette) 1995, Haziran. Erişim 17.06.2021, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology>
12. USP-NF, {736} *Mass Spectrometry*. Erişim: 29.11.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99525_02_01.html
13. ICH. *Q1A(R2) Stability Testing Of New Drug Substances And Products* (İnternette) 2003, Şubat. Erişim 14.12.2020, <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>
14. WHO. *Ophthalmic preparations* (İnternette) 2019. Erişim 06.10.2019, http://202.164.34.138/moodle/pluginfile.php/5056/mod_resource/content/0/6.2.1_3.Ophthalmic-preparations.pdf
15. Mantry S. *Ophthalmic preparations* (İnternette) 2011. Erişim 05.09.2019, <https://www.slideshare.net/shubhrajit/ophthalmic-preparation>
16. Vikipedi. *Blow fill seal*. Erişim: 16.06.2021, https://en.wikipedia.org/wiki/Blow_fill_seal
17. USP-NF, {1663} *Assessment of Extractables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems*. Erişim: 01.10.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M7126_03_01.html
18. Fang X, Cherico N, Barbacci D, Harmon AM, Piserchio M, Perpall H, *Leachable Study on Solid Dosage Form*. Erişim: 11.03.2020, https://www.researchgate.net/profile/Matt-Piserchio-2/publication/286293391_Leachable_study_on_solid_dosage_form/links/5b1192544585150a0a606e62/Leachable-study-on-solid-dosage-form
19. Koschier F, Gallo MA, Feng X, Baxter GE, Preston R, Stevens K, Powers W. Toxicological studies on 2,4,6-tribromoanisole. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(9):2074-2080.

20. Ambrogi V, Carfagna C, Cerruti P, Marturano V. Additives in Polymers. *Modif. Polym. Prop.* 2017; 87-108.
21. Scherer NMD. Leachable and Extractable Studies on Single-Use System Technologies in commercial scale Drug Filling Lines. Münih: Ludwig–Maximilians–Universität München (İnternette) 2019. Erişim: 14.06.2021, https://edoc.ub.uni-muenchen.de/24707/7/Scherer_Nicole.pdf
22. Tei A. *Analysis of Extractables & Leachables in Pharmaceutical Products (Regulatory & Analytical Aspects)* (İnternette) 2015. Erişim 11.02.2020, https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/Analysis_of_Extractables_Leachable_Compounds_in_Pharmaceutical_Products.pdf
23. Moyer KL, Scull J. Specification of Drug Substances and Products. İçinde Riley CM editor, Rosanske TW editor, Riley SRR editor. *Chapter 13 - Extractables and leachables*. Elsevier: Amsterdam, Hollanda: 2014. pp. 265-289.
24. USP-NF, (1664) *Assessment of Drug Product Leachables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems*. Erişim: 01.10.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M7127_02_01.html
25. USP-NF, (1664.1) *Orally Inhaled and Nasal Drug Products*. Erişim: 01.10.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M8146_02_01.html
26. Gao Y, Allison N. Extractables and leachables issues with the application of single use technology in the biopharmaceutical industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2016; **91**: 289-295.
27. Pan C, Harmon F, Toscano K, Liu F, Vivilecchia R. Strategy for identification of leachables in packaged pharmaceutical liquid formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; **46** (3): 520-527
28. Markovic I. Evaluation of safety and quality impact of extractable and leachable substances in therapeutic biologic protein products: a risk-based perspective. *Expert Opinion on Drug Safety.* 2007; **6** (5): 487-491
29. Sica VP, Krivos KL, Kiehl DE, Pulliam CJ, Henry ID, Baker TR. The role of mass spectrometry and related techniques in the analysis of extractable and leachable chemicals. *Mass Spectrom Rev.* 2020; **39** (1-2):212-226.

30. PQRI. *Safety Thresholds and Best Demonstrated Practices for Extractables and Leachables in Parenteral Drug Products (Intravenous, Subcutaneous, and Intramuscular)* (İnternette) 2020, Eylül. Erişim 06.10.2020, https://pqri.org/wp-content/uploads/2020/10/PQRI-PODP-Extractables-and-Leachables-Update_9Sept2020_FINAL.pdf
31. Vikipedi. *Structure–activity relationship*. Erişim: 15.02.2021, https://en.wikipedia.org/wiki/Structure%E2%80%93activity_relationship
32. Marzejon M, Kosowska M, Majchrowicz D, Bułło-Piontecka B, Wąsowicz M, Jędrzejewska-Szczerska M. Optical-Spectrometry-Based Method for Immunosuppressant Medicine Level Detection in Aqueous Solutions. *Sensors (Basel)*. 2018; **18** (7): 2001.
33. Aksungur P. Siklosporin İçeren Oftalmik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (İnternette) 2009. Erişim: 14.06.2021, <http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/45343.pdf>
34. Jenke D. *Compatibility of Pharmaceutical Products and Contact Materials*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.; 2009.
35. Garoff N, Zauscher S. The Influence of Fatty Acids and Humidity on Friction and Adhesion of Hydrophilic Polymer Surfaces. *Langmuir*. 2002; **18**: 6921–6927.
36. Bradley E, Coulier L. An Investigation Into The Reaction and Breakdown Products From Starting Substances Used to Produce Food Contact Plastics (İnternette) 2007. Erişim: 02.02.2021, <https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2014/06/Bradley-and-Coulier-2007.pdf>
37. EDQM. *Detailed view of Plastic additive 10 CRS*. Erişim 18.06.2019, <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/View=P2155010>
38. Pubchem. *1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)benzene*. Erişim: 15.06.2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ionox-330>
39. Chemical Book. *Antioxidant 1330*. Erişim: 10.06.2019, https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8234041.htm
40. EDQM. *Detailed view of Plastic additive 09 CRS*. Erişim 17.06.2019, <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/View=P2155009>

41. Pubchem. *Pentaerythritol tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate)*. Erişim: 13.06.2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Irganox-1010>
42. Chemical Book. *Irganox 1010*. Erişim: 11.06.2019, <https://www.chembk.com/en/chem/Irganox%201010>
43. BASF. *BASF to expand production capacity for Irganox® 1010 globally*. Erişim: 10.06.2019, <https://www.basf.com/global/en/media/news-releases/2018/07/p-18-256.html>
44. EDQM. *Detailed view of Plastic additive 11 CRS*. Erişim 16.06.2019, <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/View=P2155011>
45. Pubchem. *Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate*. Erişim: 12.06.2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Irganox-1076>
46. SpecialChem. *Irganox® 1076*. Erişim: 09.07.2019, <https://polymer-additives.specialchem.com/product/a-basf-irganox-1076?cs=1&ab=1>
47. ChemSrc. *Antioxidant 1076*. Erişim: 06.07.2019, https://www.chemsrc.com/en/cas/2082-79-3_509511.html
48. Haihang. *irganox 1076 cas 2082-79-3*. Erişim: 07.07.2019, <https://haihangindustry.com/products/irganox-1076-cas-2082-79-3/>
49. EDQM. *Detailed view of Plastic additive 12 CRS*. Erişim 17.06.2019, <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/View=P2155012>
50. Pubchem. *Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphite*. Erişim: 13.06.2019, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tris_2_4-di-tert-butylphenyl_-_phosphite
51. Chemical Book. *Antioxidant 168*. Erişim: 11.06.2019, https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5311800.htm
52. USP-NF, (621) *Chromatography*. Erişim: 01.02.2020, <https://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/usp35/PDF/0258-0265%20%5B621%5D%20CHROMATOGRAPHY.pdf>

53. Pubchem. *Bumetrizole*. Erişim: 09.05.2019, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bumetrizole>
54. Chemical Book. *UV Absorber* 326. Erişim: 12.06.2019, https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4256124_EN.htm
55. Allergan İlaçları. RESTASIS® %0.05 oftalmik emülsiyon kısa ürün bilgileri. Erişim 22.04.2021. <https://pdf.ilacprospektusu.com/4889-restasis-yuzde-0-05-oftalmik-emulsiyon-kub.pdf>
56. Allergan İlaçları. RESTASIS® %0.05 oftalmik emülsiyon kullanma talimatı. Erişim 21.04.2021. <https://pdf.ilacprospektusu.com/4888-restasis-yuzde-0-05-oftalmik-emulsiyon-kt.pdf>
57. Petruševski V, Jolevska ST, Ribarska JT, Chachorovska M, Petkovska A, Ugarković S. Development of complementary HPLC-DAD/APCI MS methods for chemical characterization of pharmaceutical packaging materials. *J Pharm Biomed Anal*. 2016; **124**: 228-235.
58. Zhang Y, Sun S, Xing X, Du Z, Guo Q, Yu W. Detection and Identification of Leachables in Vaccine from Plastic Packaging Materials Using UPLC-QTOF MS with Self-Built Polymer Additives Library. *Anal Chem*. 2016; **88**(13): 6749-6757
59. Ta C, Bones J. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography method for the determination of bis(2,4-di-tert-butylphenyl)phosphate and related extractable compounds from single-use plastic films. *J Chromatogr A*. 2017; **1492**: 49-54.
60. Legrand P, Desdion A, Boccadifuoco G, Dufay Wojcicki A, Worsley A, Boudy V, Dufay SG. Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; **155**: 298-305.
61. Tiller PR, Fallah ZE, Wilson V, Huysman J, Patel D. Qualitative Assessment of Leachables Using Data-dependent Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*. 1997; **11**: 1570–1574.

62. Jenke DR, Jene JM, Poss M, Story J, Tsilipetros T, Odufu A, Terbush W. Accumulation of extractables in buffer solutions from a polyolefin plastic container. *Int J Pharm.* 2005; **297**(1-2): 120-133.
63. Jenke DR, Story J, Lalani R. Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing. *Int J Pharm.* 2006; **315**(1-2): 75-92.
64. Xiao B, Gozo SK, Herz L. Development and validation of HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle used in the preparation of parenteral drug products. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; **43**(2): 558-565.
65. Akapo SO, McCrea CM. SPME-GC determination of potential volatile organic leachables in aqueous-based pharmaceutical formulations packaged in overwrapped LDPE vials. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; **47**(3): 526-534.
66. Haverkamp JB, Lipke U, Zapf T, Galensa R, Lipperheide C. Contamination of semi-solid dosage forms by leachables from aluminium tubes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; **70**(3): 921-928.
67. Corredor CC, Haby TA, Young JD, Shah PA, Varia SA. Comprehensive determination of EEAS from five different brands of stoppers used for injectable products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2009; **63**(6): 527-536.
68. Pistos C, Karampela S, Vardakou I, Papoutsis I, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Migration study of 1,3-butadiene in eye-drop solutions. *Drug Chem Toxicol.* 2012; **35**(3): 293-299.
69. Garber MJ, Gill M, Hua Y, Jenke D. Development and Characterization of an LC–MS Method for Quantitating Aqueous Extractables, including Bisphenol A, 1-Formylpiperidine, and Bis-(pentamethylene)-urea, from Plastic Materials. *Journal of Chromatographic Science.* 2011; **4**: 214-220.
70. Huang JT, Alquier L, Kaisa JP, Reed G, Gilmor T, Vas G. Method development and validation for the determination of 2,4,6-tribromoanisole, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-trichloroanisole, and 2,4,6-trichlorophenol in various drug products using stir bar sorptive extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry detection. *J Chromatogr A.* 2012; **1262**: 196-204.

71. Hoffmann A, Albinus T. Extractables and Leachables Analysis of IV Bag Systems using Direct Thermal Extraction of the Materials and Stir Bar Sorptive Extraction of Aqueous Solutions coupled with Thermal Desorption Gas-Chromatography with Unit Mass and High Resolution Mass Spectrometric Detection. (İnternette) 2015. Erişim: 03.03.2021, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6348EN.pdf>
72. Dorival-García N, Larsson I, Bones J. Non-volatile extractable analysis of prefilled syringes for parenteral administration of drug products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; **23**(3): 247-254.
73. Solomon P, Nelson J. Profiling extractable and leachable inorganic impurities in ophthalmic drug containers by ICP-MS. *Pharm Dev Technol*. 2017; **142**: 337-342.
74. Wei Y, Wu Y, Zhu T, Li Z, Zhang Y. Identification of UV-absorbing extractables from rubber closures used in containers of injectable powder and safety assessment of leachables in the drug. *J Pharm Biomed Anal*. 2017; **138**: 256-266.
75. Singh G, Gollapalli R, Blinder A, Patel M. Identification of leachable impurities in an ophthalmic drug product originating from a polymer additive Irganox 1010 using mass spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; **152**: 197-203.
76. USP-NF, (665) *Plastic Components and Systems Used to Manufacture Pharmaceutical Drug Products and Biopharmaceutical Drug Substances and Products*. Erişim: 01.02.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M11135_02_01.html
77. USP-NF, (661) *Plastic Packaging Systems and Their Materials of Construction*. Erişim: 01.03.2020, https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99420_04_01.html



FARMASÖTİK PREPARATLARIN AMBALAJ MALZEMESİ SAFSIZLIK ANALİZLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 9	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
2	9lib.net İnternet Kaynağı	% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	pdf.ilacprospektusu.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	doras.dcu.ie İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.waters.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<% 1
9	docplayer.net İnternet Kaynağı	<% 1

10	hanon.cc İnternet Kaynağı	<% 1
11	www.drug2gene.com İnternet Kaynağı	<% 1
12	Baiming Xiao, Stephen K. Gozo, Lori Herz. "Development and validation of HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle used in the preparation of parenteral drug products", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007 Yayın	<% 1
13	www.atamanchemicals.com İnternet Kaynağı	<% 1
14	tr.cenlamontessori.org İnternet Kaynağı	<% 1
15	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
16	M. J. Garber. "Development and Characterization of an LC-MS Method for Quantitating Aqueous Extractables, including Bisphenol A, 1 -Formylpiperidine, and Bis- (pentamethylene)-urea, from Plastic Materials", Journal of Chromatographic Science, 03/01/2011 Yayın	<% 1

17	theoutfitcollective.blogspot.com İnternet Kaynağı	<% 1
18	V. Petruševski, S.T. Jolevska, J.T. Ribarska, M. Chachorovska, A. Petkovska, S. Ugarković. "Development of complementary HPLC-DAD/APCI MS methods for chemical characterization of pharmaceutical packaging materials", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016 Yayın	<% 1
19	Samuel O. Akapo, Chithra M. McCrea. "SPME-GC determination of potential volatile organic leachables in aqueous-based pharmaceutical formulations packaged in overwrapped LDPE vials", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008 Yayın	<% 1
20	journal.pda.org İnternet Kaynağı	<% 1
21	epdf.pub İnternet Kaynağı	<% 1
22	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
23	Pauline Legrand, Anne Desdion, Gaétan Boccadifuoco, Amélie Dufay Wojcicki, Alan Worsley, Vincent Boudy, Sophie Goulay Dufay.	<% 1

"Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution",
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018

Yayın

24	acikerisim.lib.comu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
25	Hernan Cortes. "Analysis of polyolefin stabilizers and their degradation products", Journal of Separation Science, 11/2010 Yayın	<% 1
26	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
27	farmacep.com İnternet Kaynağı	<% 1
28	hplccolumns.org İnternet Kaynağı	<% 1
29	ihslc.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
30	worldwidescience.org İnternet Kaynağı	<% 1
31	www.wako-chem.co.jp İnternet Kaynağı	<% 1

docplayer.biz.tr

32	İnternet Kaynağı	<% 1
33	Christine Ta, Jonathan Bones. "Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography method for the determination of bis(2,4-di- tert - butylphenyl)phosphate and related extractable compounds from single-use plastic films", Journal of Chromatography A, 2017 Yayın	<% 1
34	Petruševski, V., S.T. Jolevska, J.T. Ribarska, M. Chachorovska, A. Petkovska, and S. Ugarković. "Development of complementary HPLC-DAD/APCI MS methods for chemical characterization of pharmaceutical packaging materials", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016. Yayın	<% 1
35	bictel.ulg.ac.be İnternet Kaynağı	<% 1
36	innovareacademics.in İnternet Kaynağı	<% 1
37	repositorio.ufsm.br İnternet Kaynağı	<% 1
38	www.semanticscholar.org İnternet Kaynağı	<% 1

- | | | |
|-------|--|------|
| 39 | acikerisim.pau.edu.tr
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 40 | www.hxchem.net
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 41 | ÇAVDAR, Zahide, EĞRİLMEZ, Mehtap Yüksel, BÜLBÜL, Memduh, GÜNER, Gül and KOÇTÜRK, Semra. "Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile eritrositlerde toplam ve indirgenmiş glutatyon miktarının tayini", Türk Biyokimya Derneği, 2006.
Yayın | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 42 | Shayne Green, Snow Bai, Mike Cheatham, Rongjuan Cong, Wallace Yau. "Determination of antioxidants in polyolefins using total dissolution methodology followed by RPLC", Journal of Separation Science, 2010
Yayın | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 43 | Xiao, B.. "Development and validation of HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle used in the preparation of parenteral drug products", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20070117
Yayın | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 44 | academic.oup.com
İnternet Kaynağı | <% 1 |

45	res.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
46	tel.archives-ouvertes.fr İnternet Kaynağı	<% 1
47	Xuechun Sun, Xuebin Xing, Zhenxia Du. "Application of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for the determination of extractables from pharmaceutical packaging materials", Talanta, 2020 Yayın	<% 1
48	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
49	katalog.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
50	openaccess.bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
51	rasayanjournal.co.in İnternet Kaynağı	<% 1
52	revroum.lew.ro İnternet Kaynağı	<% 1
53	www.chinaskyrin.com İnternet Kaynağı	<% 1
54	www.ebi.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1

55	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
56	Jiun-Tang Huang, Lori Alquier, Joyce P. Kaisa, Gail Reed, Timothy Gilmor, Gyorgy Vas. "Method development and validation for the determination of 2,4,6-tribromoanisole, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-trichloroanisole, and 2,4,6-trichlorophenol in various drug products using stir bar sorptive extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry detection", Journal of Chromatography A, 2012 Yayın	<% 1
57	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
58	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
59	pt.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
60	pusatfan.blogspot.com İnternet Kaynağı	<% 1
61	tr.ovalengineering.com İnternet Kaynağı	<% 1
62	ARSLAN, Uğur, IŞIK, Ferhat and TUNCER, İnci. "Klinik örneklerden soyutlanan Klebsiella pneumoniae suşlarında tigesikliğinin in-vitro	<% 1

aktivitesi", Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Derneği, 2006.

Yayın

63	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
64	forums.cnet.com İnternet Kaynağı	<% 1
65	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
66	zir.nsk.hr İnternet Kaynağı	<% 1
67	Şaziye Sezin PALABIYIK, Terken BAYDAR, Gönül ŞAHİN. "Genotoxic Impurities in Drugs for Human: Review", Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences, 2016 Yayın	<% 1
68	M.S. Dopico-García, J.M. López-Vilariño, M.V. González-Rodríguez. "Determination of antioxidant migration levels from low-density polyethylene films into food simulants", Journal of Chromatography A, 2003 Yayın	<% 1
69	Noemí Dorival-García, Iben Larsson, Jonathan Bones. "Non-volatile extractable analysis of prefilled syringes for parenteral administration of drug products", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017	<% 1

Yayın

70

hdl.handle.net
İnternet Kaynağı

<% 1

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

