

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**LANSOPRAZOL ETKEN MADDESİNE AİT SAFSIZLIKLARIN ULTRA
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ TEKNİĞİ İLE TAYİNİ VE
TAYİN YÖNTEMİNİN ANALİTİK VALİDASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet ÇALIKOĞLU

Tez Danışmanı

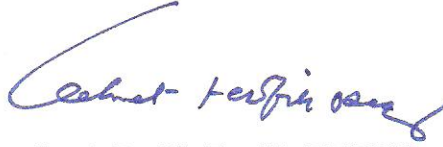
Prof. Dr. Mehmet Tevfik ORBEY

ANKARA - 2011

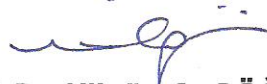
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

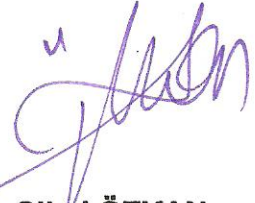
22/06/2011



Prof. Dr. M. Tefvik ORBEY
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nilgün G. GÖGER
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Sibel ÖZKAN
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller Listesi	VII
Tablolar Listesi	X
Kısaltmalar Listesi	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Lansoprazol	2
2.1.1. Moleküler Formül	2
2.1.2. Kapalı Formül	2
2.1.3. Moleküler Ağırlık	2
2.1.4. Kimyasal Ad	2
2.1.5. Çözünürlük	2
2.1.6. Polimorfizm	2
2.1.7. Diğer Özellikleri	3
2.2. Lansoprazol Etken Maddesine Ait Safsızlıklar	5
2.2.1. Safsızlık A	5
2.2.1.1. Kimyasal Adı	5

2.2.1.2. Özel Adı	5
2.2.2. Safsızlık B	5
2.2.2.1. Kimyasal Adı	5
2.2.2.2. Özel Adı	5
2.2.3. Safsızlık C	6
2.2.3.1. Kimyasal Adı	6
2.2.3.2. Özel Adı	6
2.2.4. Safsızlık D	6
2.2.4.1. Kimyasal Adı	6
2.2.4.2. Özel Adı	6
2.2.5. Safsızlık E	7
2.2.5.1. Kimyasal Adı	7
2.2.5.2. Özel Adı	7
2.2.6. Safsızlık F	7
2.2.6.1. Kimyasal Adı	7
2.2.6.2. Özel Adı	7
2.3. Lansoprazol Etken Maddesinin İlaç Endüstrisindeki Analizleri	8
2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	8
2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisinin Karşılaştırılması	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	12
3.1. Kullanılan Kimyasallar	12

3.2. Kullanılan Gereçler	12
3.3. Lansoprazol Etken Maddesine Ait Safsızlıklar İçin Tayin Yöntemi	13
3.3.1. Cihaz	13
3.3.2. Kolon	13
3.3.3. Mobil Faz Akış Hızı	13
3.3.4. Enjeksiyon Hacmi	13
3.3.5. Dalga Boyu	13
3.3.6. Kolon Sıcaklığı	13
3.3.7. Otomatik Örnekleyici Sıcaklığı	13
3.3.8. Kromatografi Süresi	13
3.3.9. Safsızlıklar İçin Bağlı Alıkonma Zamanları	13
3.3. 10. Gradient Zaman Programı	14
3.3.11. Sistem Uygunluk Kriterleri	14
3.3.12. Hareketli Faz A	14
3.3.13. Hareketli Faz B	14
3.3.14. Çözücü Karışımı	15
3.3.15. Test Çözeltisi	15
3.3.16. Referans Çözelti	15
3.3.17. Düzeltme Faktörü	15
3.3.18. Safsızlık Limitleri	15
3.3.19. Safsızlık Sonuçlarının Değerlendirmesi	16
3.3.19.1. Safsızlık B	16

3.3.19.2. Safsızlık A, D, E	16
3.3.19.3.Bilinmeyen Safsızlık	16
3.3.19.4. Toplam Safsızlık	16
3.3.19.5. İhmal Limiti	16
4. BULGULAR	17
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu	17
4.2. Safsızlık Tayin Yöntemi İçin Uygulanan Validasyon Parametreleri	18
4.1.1. Seçicilik	18
4.1.1.1. Seçicilik Kriteri	21
4.1.1.2. Sonuç	21
4.1.2. Sistem Uygunluk	31
4.1.3. Düzeltme Faktörü	33
4.1.4. Doğruluk ve Geri Kazanım	34
4.1.4.1 Doğruluk ve Geri Kazanım Kriteri	38
4.1.4.2. Sonuç	38
4.1.5. Kesinlik	43
4.1.5.1. Cihaz Kesinliği (Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği)	43
4.1.5.1.1. Cihaz Kesinliği Kriteri	45
4.1.5.1.2. Sonuç	46
4.1.5.2. Ara Kesinlik	50
4.1.5.2.1. Ara Kesinlik Kriteri	55
4.1.5.2.2.Sonuç	55

4.1.6. Doğrusallık	58
4.1.6.1. Kriter	66
4.1.6.2. Sonuç	66
4.1.7. Teşhis Limiti/Tayin Alt Limiti (LOD/LOQ)	74
4.1.7.1. Sinyal/Gürültü Oranı	74
4.1.8. Sağlamlık	77
4.1.8.1. Çözelti stabilitesi	78
4.1.8.1.1. Kriter	79
4.1.8.1.2. Sonuç	79
4.1.8.2. Kromatografik Parametre Değişikliği	87
4.1.8.2.1. Hareketli Fazın Kompozisyonu	87
4.1.8.2.2. Kolon Sıcaklığı	87
4.1.8.2.3. Akış Hızı	87
4.1.8.2.4. Kriter	89
4.1.8.2.5. Sonuç	89
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ	96
7. ÖZET	98
8. SUMMARY	100
9. KAYNAKLAR	102
10. EKLER	105
11. ÖZGEÇMİŞ	111

Şekiller Listesi

Şekil 1: Çözücü Kromatogramı	21
Şekil 2: Maleik Asit Kromatogramı	22
Şekil 3: Referans Çözelti Kromatogramı	23
Şekil 4: Limit Konsantrasyonda Safsızlıkları İçeren Test Çözeltisi Kromatogramı	24
Şekil 5: Safsızlık A Çözeltisi Kromatogramı	25
Şekil 6: Safsızlık B Çözeltisi Kromatogramı	26
Şekil 7: Safsızlık C Çözeltisi Kromatogramı	27
Şekil 8: Safsızlık D Çözeltisi Kromatogramı	28
Şekil 9: Safsızlık E Çözeltisi Kromatogramı	29
Şekil 10: Safsızlık F Çözeltisi Kromatogramı	30
Şekil 11: Sistem Uygunluk Kromatogramı (1)	31
Şekil 12: Sistem Uygunluk Kromatogramı (2)	32
Şekil 13: LOQ Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı	39
Şekil 14: %80 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı	40
Şekil 15: %100 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı	41
Şekil 16: %120 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı	42
Şekil 17: Cihaz Kesinliği Kromatogramı (1)	48
Şekil 18: Cihaz Kesinliği Kromatogramı (2)	49
Şekil 19: Analist I/Cihaz I Ara Kesinlik Kromatogramı	56

Şekil 20: Analist II/Cihaz II Ara Kesinlik Kromatogramı	57
Şekil 21: Safsızlık A için Doğrusallık Grafiği	59
Şekil 22: Safsızlık B için Doğrusallık Grafiği	60
Şekil 23: Safsızlık C için Doğrusallık Grafiği	61
Şekil 24: Safsızlık D için Doğrusallık Grafiği	62
Şekil 25: Safsızlık E için Doğrusallık Grafiği	63
Şekil 26: Safsızlık F için Doğrusallık Grafiği	64
Şekil 27: Lansoprazol için Doğrusallık Grafiği	65
Şekil 28: LOQ Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	66
Şekil 29: %10 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	67
Şekil 30: %20 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	68
Şekil 31: %40 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	69
Şekil 32: %60 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	70
Şekil 33: %80 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	71
Şekil 34: %100 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	72
Şekil 35: %120 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı	73
Şekil 36: LOQ Seviyesinde Sinyal/Gürültü Oranı Kromatogramı	75
Şekil 37: Çözelti Stabilitesi Başlangıç Kromatogramı (1)	78
Şekil 38: Çözelti Stabilitesi 6. Saat Kromatogramı (1)	79
Şekil 39: Çözelti Stabilitesi 12. Saat Kromatogramı (1)	80
Şekil 40: Çözelti Stabilitesi 36. Saat Kromatogramı (1)	81
Şekil 41: Çözelti Stabilitesi Başlangıç Kromatogramı (2)	82

Şekil 42: Çözelti Stabilitesi 6. Saat Kromatogramı (2)	83
Şekil 43: Çözelti Stabilitesi 12. Saat Kromatogramı (2)	84
Şekil 44: Çözelti Stabilitesi 36. Saat Kromatogramı (2)	85
Şekil 45: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (1)	88
Şekil 46: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (2)	89
Şekil 47: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (3)	90
Şekil 48: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (4)	91

Tablolar Listesi

Tablo 1: Kullanılan Kimyasallar Tablosu	12
Tablo 2: Gradient Zaman Programı Tablosu	14
Tablo 3: Seçicilik Tablosu	20
Tablo 4: Düzeltme Faktörü Tablosu	34
Tablo 5: Safsızlık A için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	35
Tablo 6: Safsızlık B için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	35
Tablo 7: Safsızlık C için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	36
Tablo 8: Safsızlık D için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	36
Tablo 9: Safsızlık E için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	37
Tablo 10: Safsızlık F için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu	37
Tablo 11: Geri Kazanım Kriteri Tablosu	38
Tablo 12: Safsızlık A için Cihaz Kesinliği Tablosu	43
Tablo 13: Safsızlık B için Cihaz Kesinliği Tablosu	44
Tablo 14: Safsızlık C için Cihaz Kesinliği Tablosu	44
Tablo 15: Safsızlık D için Cihaz Kesinliği Tablosu	44
Tablo 16: Safsızlık E için Cihaz Kesinliği Tablosu	45
Tablo 17: Safsızlık F için Cihaz Kesinliği Tablosu	45
Tablo 18: Lansoprazol için Cihaz Kesinliği Tablosu	45
Tablo 19: Safsızlık A için Ara Kesinlik Tablosu	50
Tablo 20: Safsızlık B için Ara Kesinlik Tablosu	51
Tablo 21: Safsızlık C için Ara Kesinlik Tablosu	52

Tablo 22: Safsızlık D için Ara Kesinlik Tablosu	53
Tablo 23: Safsızlık E için Ara Kesinlik Tablosu	54
Tablo 24: Safsızlık F için Ara Kesinlik Tablosu	55
Tablo 25: Safsızlık A için Doğrusallık Tablosu	59
Tablo 26: Safsızlık B için Doğrusallık Tablosu	60
Tablo 27: Safsızlık C için Doğrusallık Tablosu	61
Tablo 28: Safsızlık D için Doğrusallık Tablosu	62
Tablo 29: Safsızlık E için Doğrusallık Tablosu	63
Tablo 30: Safsızlık F için Doğrusallık Tablosu	64
Tablo 31: Lansoprazol için Doğrusallık Tablosu	65
Tablo 32: Teşhis Limiti/Tayin Limiti Tablosu	75
Tablo 33: Çözelti Stabilitesi Tablosu	77
Tablo 34: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (1)	86
Tablo 35: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (2)	87
Tablo 36: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (3)	87

Kısaltmalar Listesi

mg: Miligram

HPLC: High performance liquid chromatography

UPLC: Ultra performance liquid chromatography

t_{max} : Plazma doruk konsantrasyonu

dk.: Dakika

μ : Mikron

psi: Pound per square inch,

mL: Mililitre

PTFE: Poli tetra floro etilen

μ L: Mikrolitre

nm: Nanometre

$^{\circ}$ C: Santigrat derece

M: Molar

μ m: Mikrometre

ICH: International conference on harmonisation

k' : Kapasite faktörü

α : Seçicilik faktörü

t_R : Analitin Alıkonma Zamanı

t_0 : Kolon ölü hacmi

RT: Retention time

RRT: Relative retention time

R: Resolution

k: Cevap faktörü

1/k: Düzeltme faktörü

LOQ: Limit of quantitation

LOD: Limit of dedection

r: Korelasyon katsayısı

R^2 : Bakiye kareler toplamı

D_t : Herhangi bir t zamanında bulunan pik alanı

D_i : Başlangıçta bulunan pik alanı

mm: Milimetre

UV: Ultraviyole

s/n: Sinyal/Gürültü oranı

1. GİRİŞ

Lansoprazol, ülser tedavisinde kullanılan, proton pompası inhibitörü görevindeki bir etken maddedir. Türkiye ilaç pazarında, 15 ve 30 mg'lık dozaj formları halinde, mikropellet kapsül olarak satışa sunulmaktadır. Mikropellet şeklindeki üretimi, bu ilacı mide asidine karşı dayanıklı hale getirir. İlaç, böylece pH 1.2 mide ortamında çözünmezken, bağırsak ortamında hızla emilir.

Lansoprazol etken maddesini içeren farmasötik preparatlar için kalite kontrol laboratuvarlarında hızlı, kolay uygulanabilen, doğru ve güvenilir tayin yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi bu yöntemlerin başında gelen isimlerden biridir. Ancak etken madde ve safsızlık tayinleri için HPLC, oldukça vakit alan ve harcanan solvent miktarı açısından maliyeti daha yüksek olan bir yöntemdir.

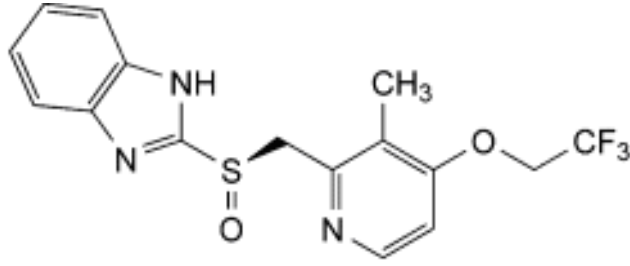
Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte sıvı kromatografi teknikleri de yeni bir boyut kazanmıştır. Son yıllarda çok daha küçük çaplı kolon dolgu maddeleri ile birlikte çalışan, daha yüksek basınç üretebilen ve kromatografik analiz için harcanan zamanı oldukça azaltan UPLC cihazları, ilaç endüstrisindeki yerini almaya başlamıştır.

Kaynaklarda lansoprazol etken maddesine ait safsızlıkların UPLC cihazıyla valide edilmiş tayin yöntemlerine rastlanmaması nedeniyle ve ilaç endüstrisinde meydana gelen yeniliklerin hayata geçirilmesini sağlayabilmek bu çalışmanın ana gerekçeleri olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lansoprazol

2.1.1. Moleküler Formül



2.1.2. Kapalı Formül

C₁₆H₁₄F₃N₃O₂S

2.1.3. Moleküler Ağırlık

369.4 g/mol

2.1.4. Kimyasal Ad

2-[(RS)-[[3-Metil-4-(2,2,2-trifloroetoksi)piridin-2-yl]metil]sülfinil]-1H-benzimidazol

2.1.5. Çözünürlük

Pratikte suda çözünmez, susuz etanolde çözünür, asetonitrilde çok az çözünür.

2.1.6. Polimorfizm

Polimorfizm gösterir.

2.1.7. Diğer Özellikleri

Lansoprazol, mide asidi salgılanmasını inhibe eden proton pompası inhibitörleri grubundan antiülser etkisine sahip bir etken maddedir. Bu madde, duodenal ülser, gastrik ülser, reflü özofajit, patolojik hipersekresyon ve Helicobacter pylori infeksiyonu ile birlikte görülen duodenal ülser tedavisinde endikedir.

Proton pompası inhibitörü olan imidazol türevi lansoprazol, asit salgılanmasını güçlü bir şekilde bloke eder.¹

Lansoprazol, terapötik etki mekanizması ve farmakolojik özellikleri bağlamında bir diğer proton pompası inhibitörü olan omeprazol ile benzerlik gösterir. Lansoprazol molekülünde, benzol halkasına bağlı bir imidazol halkası bulunmaktadır.

Günümüzde sık kullanılan lansoprazol, paryetal hücrelerde proton pompası görevi gören $H^+ - K^+$ ATPaz'ı inhibe ederek gastrik asit oluşumunu son aşamasında engeller.¹

Lansoprazol, oral uygulamadan sonra bağırsaktan hızla emilerek midedeki paryetal hücrelere varır. Plazma doruk konsantrasyonuna 1.7 saatte (t_{max}) ulaşan lansoprazolün mutlak biyoyararlanımı %80'in üzerindedir. Lansoprazol %97 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Hepatik biyotransformasyondan sonra tamamen elimine olur. Eliminasyonları özelliyle safra yoluylaadır.² İlk doz alımı ile mide asit salınımını %80 oranında baskılar ve ülserde ilk dozla birlikte semptomatik düzelmeler görülür.

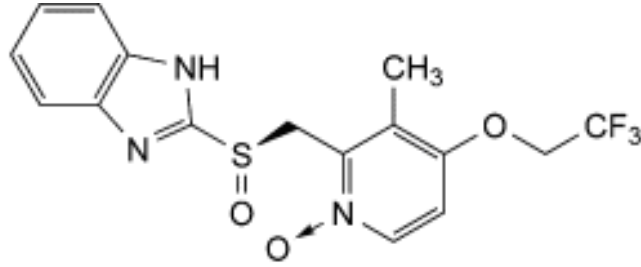
Lansoprazol, histamin ve asetilkolin reseptörleri üzerine etki etmez.

Lansoprazol ve aktif metabolitleri (AG-1812, AG-2000) *Helicobacter pylori*'ye karşı invitro olarak antimikrobiyal etkinlik gösterirler.³ Peptik ülser ve gastrik asit hastalıklarının tedavisinde kullanımı gün geçtikçe artan lansoprazolün yan etkileri ender görülür. Lansoprazol tedavisi sırasında görülen ve sıklığı %1'den az olan yan etkiler şunlardır: Anoreksi, konstipasyon, dispepsi, ağızda kuruluk, artralji, kaşıntı, adet düzensizliği, çarpıntı, miyalji, kulak çınlaması, deri inflamasyonu, saç dökülmesi, deride kuruma.⁴

Lansoprazolün diğer etken maddelerle olan etkileşimi hakkında şunlar söylenebilir: Lansoprazol, sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Ancak bu sistem ile metabolize edilen varfarin, antipirin, indometasin gibi etken maddeler ile etkileşmez, çünkü her biri farklı izoenzimleri kullanırlar. Teofilin kullanan hastalarda ise lansoprazol, teofilin klirensinde minör (%10) bir artış oluşturabileceğinden lansoprazol kullanımının başlangıcında ve sonunda serum teofilin düzeyi incelenmelidir. Sukralfat ile birlikte kullanımında da lansoprazol emilimi ve biyoyararlanımı %30 azalacağından, 30 dak. ara ile alınması tavsiye edilir. Antasitler ile birlikte kullanımında ise lansoprazol'ün aktivitesi etkilenmez. Ayrıca lansoprazol, gastrik asit sekresyonunu engellediğinden, biyoyararlanımları açısından gastrik pH'nın önemli olduğu ketokonazol, ampisilin esterleri, demir tuzları, digoksin gibi ilaçların emilimini etkileyebilir.³

2.2. Lansoprazol Etken Maddesine Ait Safsızlıklar

2.2.1. Safsızlık A



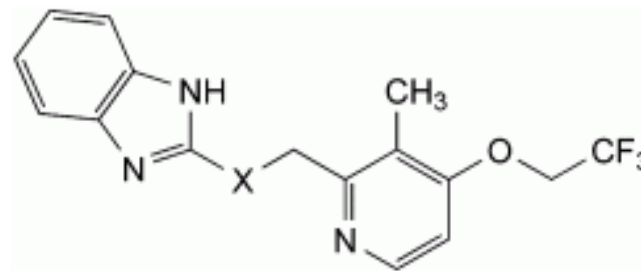
2.2.1.1. Kimyasal Adı

2-[(*RS*)-[[3-metil-1-oksid-4-(2,2,2-trifloroetoksi)piridin-2-il]metil]sülfinil]-1*H*-benzimidazol

2.2.1.2. Özel Adı

Lansoprazol N-Oksit

2.2.2. Safsızlık B



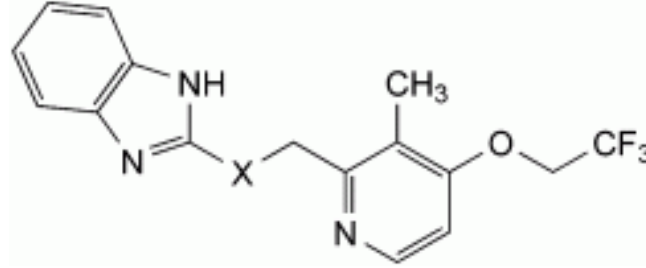
2.2.2.1. Kimyasal Adı

X = SO₂: 2-[[[3-metil-4-(2,2,2-trifloroetoksi)piridin-2-il]metil]sülfonil]-1*H*-benzimidazol

2.2.2.2. Özel Adı

Lansoprazol Sülfon

2.2.3. Safsızlık C



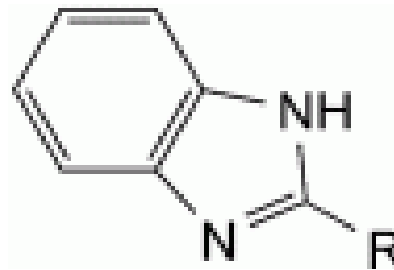
2.2.3.1. Kimyasal Adı

X = S: 2-[[[3-metil-4-(2,2,2-trifloroetoksi)piridin-2-il]metil]sülfanil]-1*H*-benzimidazol

2.2.3.2. Özel Adı

Lansoprazol Sülfid

2.2.4. Safsızlık D



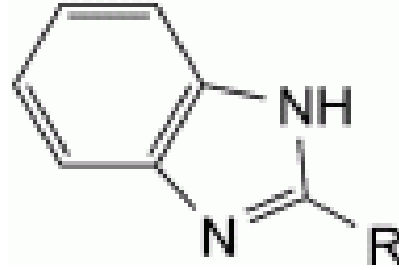
2.2.4.1. Kimyasal Adı

R = OH: 1*H*-benzimidazol-2-ol

2.2.4.2. Özel Adı

2-Hidroksi Benzimidazol

2.2.5. Safsızlık E



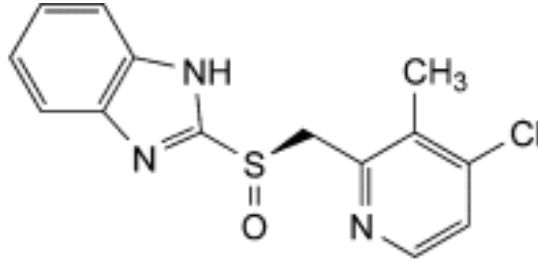
2.2.5.1. Kimyasal Adı

R = SH: 1*H*-benzimidazol-2-tiol

2.2.5.2. Özel Adı

2-Merkapto Benzimidazol

2.2.6. Safsızlık F



2.2.6.1. Kimyasal Adı

2-[(*RS*)-[(4-kloro-3-metilpiridin-2-il)metil]sülfinil]-1*H*-benzimidazol

2.2.6.2. Özel Adı

Bilinen bir özel adı bulunamamıştır.

2.3. Lansoprazol Etken Maddesinin İlaç Endüstrisindeki Analizleri

Lansoprazol etken maddesi ilaç endüstrisi için önemli bir yere sahip olup, ülkemizdeki ilaç kalite kontrol laboratuvarlarında genellikle Avrupa farmakopesi monografındaki spesifikasyonlara uygun olarak analiz edilir. Avrupa farmakopesinin 7.2 monografında bu etken madde için belirtilen testler şunlardır: Tanıma testi (Identification), çözelti görünüşü (Appearance of solution), ilgili bileşikler (Related substances), nem tayini (water), sülfatlanmış kül (sulphated ash), miktar tayini (Assay).⁵

Çalışmada, lansoprazol etken maddesi için ilgili bileşikler testi, farmakopede belirtilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı yerine, günümüzde kullanımı giderek yaygınlaşan, ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. HPLC cihazı yerine UPLC cihazının kullanılmasının gerekçesi ise, ilgili bileşik testlerinin HPLC cihazında daha çok vakit almasıdır. Ayrıca HPLC cihazı kullanılarak yapılan analizlerde harcanan solvent miktarları, UPLC cihazına nazaran daha fazladır.

Bir sonraki bölümde sıvı kromatografisi tekniği için kullanılan HPLC cihazı hakkında bilgi verilecek ve UPLC cihazı ile karşılaştırması yapılacaktır.

2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hareketli fazın, basınç yardımıyla kolona verildiği sistemlere yüksek performanslı sıvı kromatografisi adı verilir. Duyarlılığı, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen maddelerin ayrılmasını sağlaması, doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesi nedeniyle, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır.^{6, 7}

Kromatografi, numune karışımı içersindeki bileşenlerin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz üzerinden geçirilirken, bileşenlerin göç etme hızlarındaki farklılıklara dayanarak, kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz yapılabilmesini sağlayan bir ayırma tekniğidir. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

Kromatografi, uygulama biçimine göre düzlemsel ve kolon kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Düzlemsel kromatografi de kağıt ve ince tabaka kromatografisi olmak üzere iki alt bölüme ayrılır. Yine kolon kromatografisi de gaz ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi olmak üzere iki alt bölüme ayrılır.

Çalışmada kullandığımız UPLC cihazının temelinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi yer alır. Bu sebeple temel karakteristikler açısından yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile aynı alt yapıya sahiptir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Duyarlılığının yüksek olması, kolaylıkla uygulanabilir olması, kullanıcı becerisine daha az bağımlı olması ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması bu cihazın yaygın kullanıma sebeplerinin başında gelir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi uçucu olmayan ve sıcaklıkla bozunabilen maddelerin ayrılması için uygundur. Aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler ve ilaçlar bu yöntem ile kolayca ayrılabilirler. HPLC ve UPLC cihazlarını; kolon, dedektör, pompa ve enjektör olmak üzere 4 ana bölüme ayırmak mümkündür. Ticari olarak çalışan laboratuvarlarda ise HPLC ve UPLC cihazlarında bu 4 ana bölüme ek olarak otomatik örnekleyici de bulunmaktadır.

Çözücü içersinde çözünmüş bileşenler, kolon içersinde bulunan sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, değişik hızlarda ilerleyerek, kolonu farklı zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılmış olurlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Böylece ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşen, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip, derişimiyle orantılı olarak kaydedilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisini, hareketli ve sabit fazın polaritesine göre normal faz ve ters faz şeklinde iki sınıfa ayırmak mümkündür. Normal faz kromatografide sabit faz polar, hareketli faz nispeten apolar iken; ters faz kromatografide hareketli faz polar, sabit faz ise nispeten apolardır. Normal faz kromatografide çözelti içersindeki en polar bileşen, kolonu en geç terk ederken; ters faz kromatografide en polar bileşen kolonu ilk terk edendir. Normal faz kromatografide hareketli fazın akış kontrolü çok önemlidir. Burada meydana gelebilecek küçük değişiklikler bile kromatogramda belirgin farklılıklara sebebiyet verebilir. Normal faz kromatografide dengeye ulaşma daha yavaş iken, ters faz kromatografide bu süre daha kısadır. Ayrıca apolar çözücüler, polar çözücülere oranla daha pahalıdır.

2.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisinin Karşılaştırılması

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde, kolon dolgu maddesinin tanecik boyutunun küçük olması, hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanının artmasını sağlar ve böylece kolon etkinliği de arttırılmış olur. Günümüzde HPLC cihazları için kullanılan kolonlardaki dolgu maddesinin tanecik boyutu genellikle 3 – 10 μ arasında değişirken, bu rakam UPLC cihazları için 1.7 μ 'dur.

Bununla birlikte HPLC cihazları için tasarlanan pompa sistemleri genellikle 5000 psi'a kadar basınç üretebilirken, yine UPLC cihazları için bu rakam 15000 psi'a kadar ulaşmaktadır. Ayrıca UPLC cihazlarının yapısında bulunan boru sistemlerinin çapları da, HPLC cihazına göre oldukça küçüktür.

Bu sebeplerden dolayı UPLC cihazlarının kullanılmasıyla elde edilen pik alıkonma süreleri, HPLC cihazlarına nazaran çok daha kısadır. Böylece istenen ayırışmadan taviz verilmeden, daha kısa sürede analiz yapmak mümkündür.⁸

Sonuç olarak, yukarıda belirttiğimiz avantajlar dolayısıyla, özellikle ticari kalite kontrol laboratuvarları gün geçtikçe HPLC cihazları yerine, UPLC cihazlarını kullanmaktadırlar. Biz de çalışmada, bu gerekçelerden dolayı UPLC cihazını kullanmayı tercih ettik.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallara ait üretici firma, seri numarası ve son kullanma tarihi bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 1: Kullanılan Kimyasallar Tablosu

Kimyasal Adı	Firma	Seri Numarası	Son Kullanma Tarihi
Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat	Merck	A993246	07/2013
Asetonitril	J.T.Baker	1103320009	02/2013
Trietilamin	Merck	S6141852	04/2012
Fosforik Asit (%85)	Merck	K41258163	07/2015
Lansoprazol	Ulkar Kimya	00110020	10/2011
Safsızlık A (Lansoprazol N-Oxide)	Ulkar Kimya	4000007619	04/2012
Safsızlık B (Lansoprazol Sülfon)	Ulkar Kimya	VB-02-172	03/2012
Safsızlık C (Lansoprazol Sülfid)	Ulkar Kimya	7M005	03/2012
Safsızlık D (2-Hidroksi Benzimidazol)	Fluka	422882/1	05/2012
Safsızlık E (2-merkapt Benzimidazol)	Ulkar Kimya	4000009336	02/2012
Safsızlık F	Ulkar Kimya	1009197	06/2012

3.2. Kullanılan Gereçler

- Metler Toledo Analitik Terazisi
- Metler Toledo pH metre
- 1.0 ve 2.0 mL pipet
- 10.0, 50.0 ve 100.0 mL volumetrik balonjoje
- 0.45µ PTFE Enjektör Filtresi
- Manyetik Karıştırıcı

3.3. Lansoprazol Etken Maddesine Ait Safsızlıklar İçin Tayin Yöntemi

3.3.1. Cihaz

Waters H-CLASS UPLC

3.3.2. Kolon

Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 100 mm

3.3.3. Mobil Faz Akış Hızı

0.400 mL/dak.

3.3.4. Enjeksiyon Hacmi

3.0 µL

3.3.5. Dalga Boyu

285 nm

3.3.6. Kolon Sıcaklığı

25°C

3.3.7. Otomatik Örnekleyici Sıcaklığı

10°C

3.3.8. Kromatografi Süresi

10 dak.

3.3.9. Safsızlıklar İçin Bağlı Alıkonma Zamanları

Safsızlık A: 0.799

Safsızlık B: 1.085

Safsızlık C: 1.241

Safsızlık D: 0.400

Safsızlık E: 0.433

Safsızlık F: 0.866

3.3. 10. Gradient Zaman Programı

Tablo 2: Gradient Zaman Programı Tablosu

Zaman (dak.)	Akış Hızı (mL/dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	0.4	85	15
3.5	0.4	50	50
7	0.4	50	50
8	0.4	85	15
10	0.4	85	15

3.3.11. Sistem Uygunluk Kriterleri

- Test çözeltisinden elde edilen kromatogramda safsızlık B'ye ait pik bulunuyor ise bu pik ile Lansoprazol piki arasındaki ayrışma minimum 3.0 olmalıdır.
- Referans çözeltinin 6 enjeksiyonu sonunda elde edilen Lansoprazol piklerine ait alanların bağıl standart sapması maksimum 5.0 olmalıdır.
- Her bir analit piki için kuyruklanma faktörü 0.8 – 2.0 arasında olmalıdır.
- Her bir analit için teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.

3.3.12.Hareketli Faz A

0.010M Sodyum Dihidrojen Fosfat

3.3.13.Hareketli Faz B

Asetonitril

3.3.14.Çözücü Karışımı

1 hacim Trietilamin ile 60 hacim saf su karıştırılır. pH, %85'lik fosforik asit ile 10.5 ± 0.05 'e ayarlanır. Bu çözelti 40 hacim asetonitril ile karıştırılır.

3.3.15. Test Çözeltisi

50 mL'lik balonjoje içerisine 50.0 mg Lansoprazol referans standardı tartılır. Bir miktar çözücü karışımı ile çözülerek, hacmine çözücü karışımı ile tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve sonrasında 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek viallenir. (1.0 mg/mL)

3.3.16. Referans Çözelti

2.0 mL test çözeltisi 100.0 mL'ye çözücü karışımı ile seyreltilir. Bu çözeltinin de 1.0 mL'si 10.0 mL' ye çözücü karışımı ile seyreltilir. 0.45 µm PTFE filtreden süzülerek viallenir. (0.002 mg/mL)

3.3.17. Düzeltme Faktörü

Safsızlıkların miktarları hesaplanırken, Safsızlık B pikinin alanı 1.229, Safsızlık E pikinin alanı 0.475, safsızlık F pikinin alanı 0.778 ile çarpılmalıdır.

3.3.18. Safsızlık Limitleri

Safsızlık A: %0.1
Safsızlık B: %0.4
Safsızlık C: %0.1
Safsızlık D: %0.1
Safsızlık E: %0.1
Safsızlık F: %0.1
Bilinmeyen Safsızlık: %0.1
Toplam Safsızlık: % 0.6

3.3.19. Safsızlık Sonuçlarının Değerlendirmesi

3.3.19.1.Safsızlık B

Test çözeltisinden elde edilen kromatogramda safsızlık B'ye ait pik alanı, referans çözelti kromatogramındaki lansoprazol pik alanının 2.0 katından büyük olamaz (%0.4).

3.3.19.2. Safsızlık A, D, E

Test çözeltisinden elde edilen kromatogramda safsızlık A, D, E piklerinin her biri için elde edilen alan, referans çözelti kromatogramındaki lansoprazol pik alanının 0.5 katından büyük olamaz (%0.1).

3.3.19.3.Bilinmeyen Safsızlık

Test çözeltisinden elde edilen kromatogramda bilinmeyen her bir safsızlığa ait pik alanı, referans çözelti kromatogramındaki lansoprazol pik alanının 0.5 katından büyük olamaz (%0.1).

3.3.19.4. Toplam Safsızlık

Test çözeltisinden elde edilen bütün piklerin alanlarının toplamı, referans çözelti kromatogramındaki lansoprazol pik alanının 3.0 katından büyük olamaz (%0.6).

3.3.19.5. İhmal Limiti

Test çözeltisinden elde edilen kromatogramda, referans çözelti kromatogramındaki lansoprazol pik alanının 0.25 katından küçük pikler ihmal edilir (% 0.05).

4. BULGULAR

4.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamalar için gerekli yöntem performans parametrelerinin bulunmasıdır. Bunlar analitik parametreler cinsinden ifade edilir. Bu parametreler hem invivo hem de invitro çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir.^{9, 10, 11, 12}

Bir analitik metod validasyonunun ana hedefi, metodun planlanış amacına uygun olduğunu göstermektir. Metod validasyonu, kullanılan test yönteminin doğruluk ve güvenilirliğinin verilerle desteklenmesi (kanıtlanması) anlamına gelir.

Valide analitik yöntemler, kalibre gereç ve cihazlarla gerçekleştirildiği zaman her defasında doğru sonuç vermelidirler. Eğer analitik method ile elde edilen sonuçlar, analistten analiste, günden güne veya cihazdan cihaza farklılık gösteriyor ise, methodun validasyonundan şüphe duyulmalıdır. Çünkü methodun amacı, yöntemin bu tür varyasyonlara dayanıklı; doğru ve tekrarlanabilir oluşunu ispatlamaktır. Analitik metod validasyonu gerçekleştirebilmek için uygulanması gereken validasyon parametreleri ICH Q2(R1) rehberinde belirtilmiştir.¹³

4.2. Safsızlık Tayin Yöntemi İçin Uygulanan Validasyon Parametreleri

- Seçicilik
- Sistem Uygunluk
- Düzeltme Faktörü
- Doğruluk ve Geri Kazanım
- Kesinlik
 - o Cihaz Kesinliği (Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği)
 - o Ara Kesinlik
- Doğrusallık ve Çalışma Aralığı*
- Teşhis Limiti/Tayin Limiti
- Sağlamlık
 - o Çözelti Stabilitesi
 - o Kromatografik Parametre Değişikliği

4.1.1. Seçicilik

Seçicilik, numune matrisinde bulunması beklenen diğer bileşenlerin varlığında, tayin edilmek istenen analitlerin her birinin ayrı ayrı belirlenebilmesi yeteneğidir. Genellikle bütün analitik yöntemlerin validasyonu sırasında seçicilik parametresinin uygun bir şekilde sağlanabilmesi esastır. HPLC ve UPLC yöntemleri için seçicilik parametresinin uygunluğu, tayin edilmek istenen bütün bileşenlerin ayrı alıkonma zamanına sahip olması ve aralarındaki gerekli ayrışma ile uygun kapasite faktörlerinin sağlanabilmesi koşulu ile geçerlidir.

Seçicilik parametresinde önemli bir yeri olan ve kolondaki analitlerin göç hızlarını tespit etmek amacıyla kullanılan kapasite

* ICH' te "Range" olarak ifade edilen terim "Çalışma Aralığı" şeklinde kullanılmıştır.

faktörünün belirlenmesinde, polaritesi oldukça yüksek olan ve kolon içerisinde hemen hemen hiç tutunmadan dedektöre ulaşan maleik asit molekülü kullanılmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak her bir analit için kapasite faktörü hesaplanmıştır.

$$\text{Kapasite Faktörü (k')} = (t_R - t_0) / t_0$$

t_R = Analitin Alıkonma Zamanı

t_0 = Maleik Asit' in Alıkonma Zamanı (Kolon ölü hacmi)

Seçicilik faktörü ise, iki analite ait kapasite faktörlerinin birbirlerine oranıdır. Aşağıdaki formül kullanılarak her bir analit için seçicilik faktörü hesaplanmıştır.

$$\text{Seçicilik Faktörü } (\alpha) = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$$

Çalışmada Waters H-CLASS UPLC cihazına ait Empower bilgisayar yazılımı kullanılarak, analitlere ait alıkonma zamanları ve rezolüsyonları hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Tablo 2'de verilmiştir.

Validasyondaki seçicilik parametresi şu şekilde çalışılmıştır:

- Çözücü karışımı enjekte edildi.
- Maleik asit çözeltisi enjekte edildi.
- Referans çözelti enjekte edildi. (0.002 mg/ml)
- Limit derişiminde safsızlıkları içeren test çözeltisi enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık A enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık B enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık C enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık D enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık E enjekte edildi.
- Limit derişiminde safsızlık F enjekte edildi.

Tablo 3: Seçicilik Tablosu

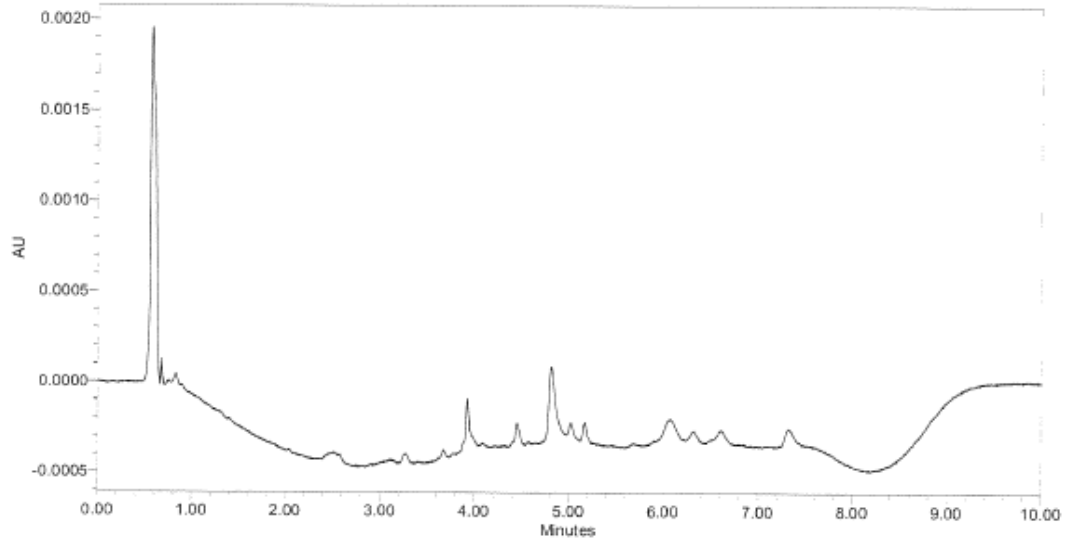
Bileşenler	Alıkonma Zamanı (RT)		Bağıl Alıkonma Zamanı (RRT)	Rezolüsyon (R)	Kapasite Faktörü (k')	Seçicilik Faktörü (α)
Çözücü	-		-	-	-	-
Maleik Asit Çözeltisi	0.595		0.163	-	-	-
Referans Çözelti	3.667		1.003	-	-	-
Limit Konsantrasyonda Safsızlıkları İçeren Test Çözeltisi	Lansoprazol	3.655	1.000	6.740	5.143	1.191
	Safsızlık A	2.915	0.797	22.956	3.899	2.350
	Safsızlık B	3.963	1.084	4.337	5.661	1.101
	Safsızlık C	4.537	1.241	10.546	6.625	1.170
	Safsızlık D	1.462	0.400	-	1.457	-
	Safsızlık E	1.582	0.433	1.863	1.659	1.139
	Safsızlık F	3.165	0.866	4.640	4.319	1.108
Safsızlık A Çözeltisi	2.922		0.799	-	-	-
Safsızlık B Çözeltisi	3.964		1.085	-	-	-
Safsızlık C Çözeltisi	4.536		1.241	-	-	-
Safsızlık D Çözeltisi	1.462		0.400	-	-	-
Safsızlık E Çözeltisi	1.580		0.433	-	-	-
Safsızlık F Çözeltisi	3.167		0.866	-	-	-

4.1.1.1. Seçicilik Kriteri

Safsızlıklara ve etken maddeye ait alıkonma zamanlarında başka bir pike rastlanmamalıdır. Her bir analit arasındaki ayrışma en az 1.5 ve her bir analit için kapasite faktörü minimum 1.0 olmalıdır.

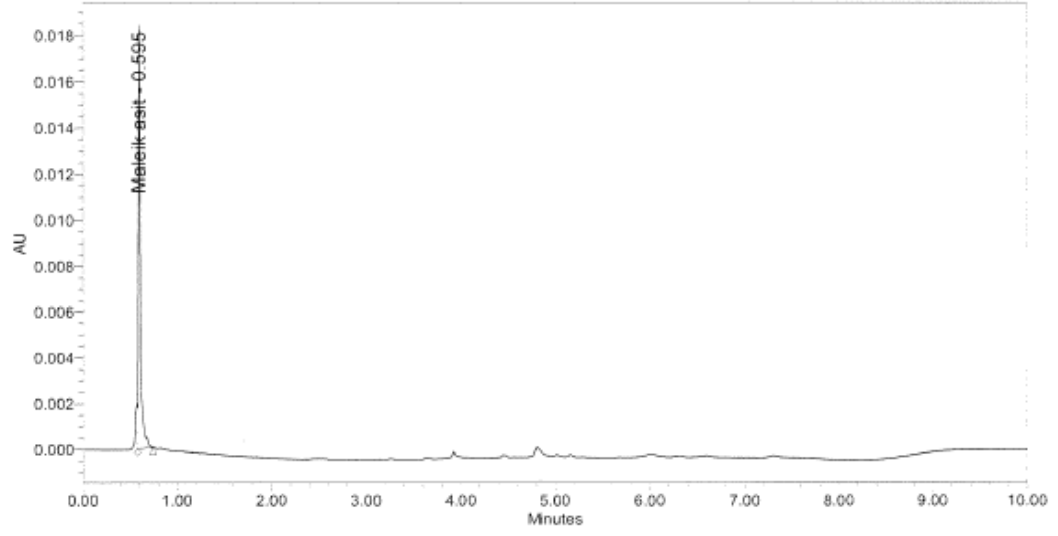
4.1.1.2. Sonuç

Safsızlıklara ve etken maddeye ait alıkonma zamanlarında başka bir pike rastlanmamıştır. Her bir analit arasındaki ayrışma en az 1.5 ve her bir analit için kapasite faktörü minimum 1.0 koşulu sağlanmaktadır.



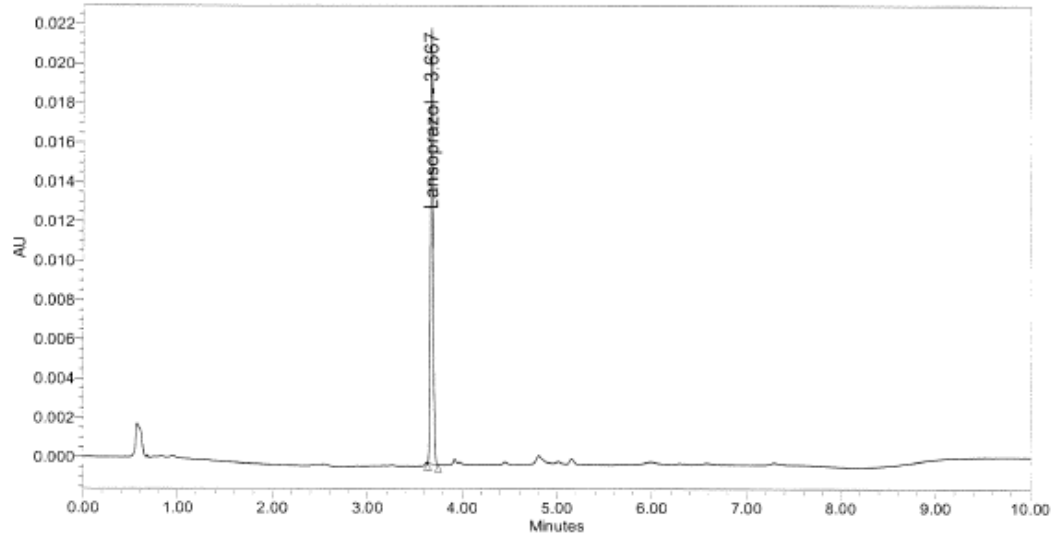
	Peak Name	RT
1	Safsızlık D	1.456
2	Safsızlık E	1.575
3	Safsızlık A	2.863
4	Safsızlık F	3.127
5	Lansoprazol	3.653
6	Safsızlık B	3.923
7	Safsızlık C	4.633

Şekil 1: Çözücü (1hacim Trietilamin ile 60 hacim saf su karıştırılır. pH, %85'lik fosforik asit ile 10.5 ± 0.05 'e ayarlanır. Bu çözelti 40 hacim asetonitril ile karıştırılır.) Kromatogramı



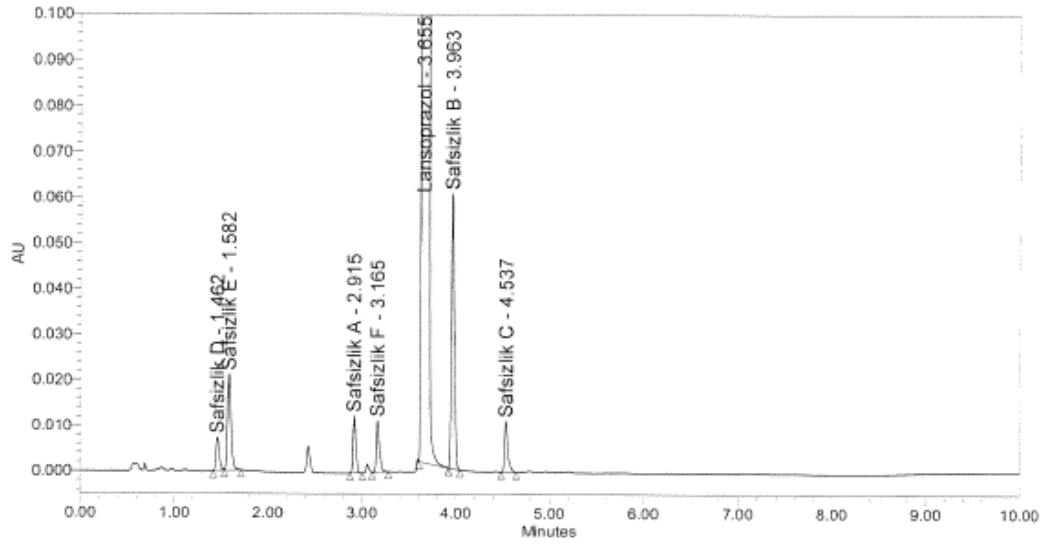
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Maleik asit	0.595	28219	100.00	18436
2	Safsizlik D	1.456			
3	Safsizlik E	1.575			
4	Safsizlik A	2.863			
5	Safsizlik F	3.127			
6	Lansoprazol	3.653			
7	Safsizlik B	3.923			
8	Safsizlik C	4.633			

Şekil 2: Maleik Asit Kromatogramı



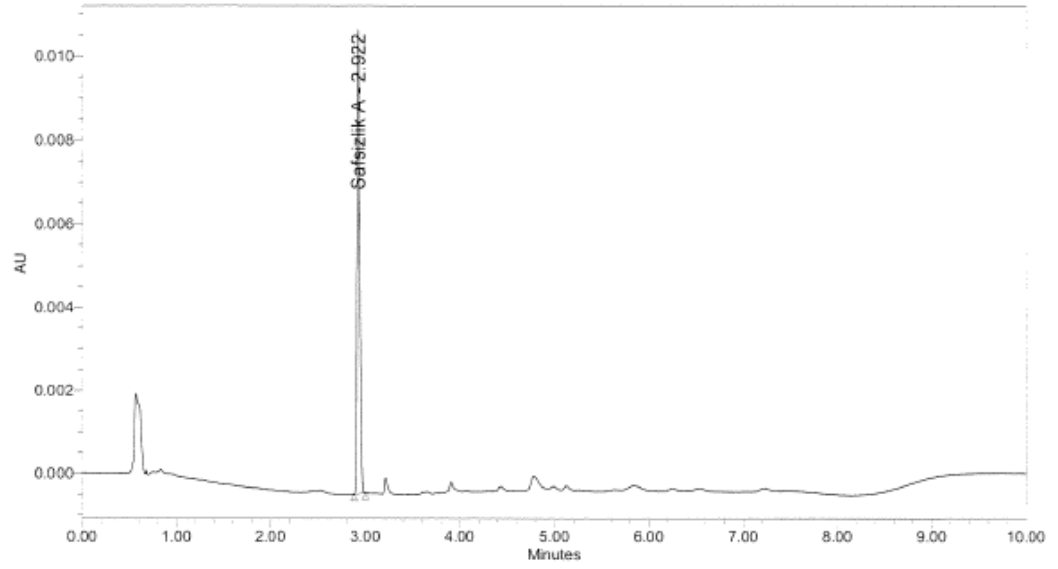
	Peak Name	RT	Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count
1	Safsizlik D	1.456				
2	Safsizlik E	1.575				
3	Safsizlik A	2.863				
4	Safsizlik F	3.127				
5	Lansoprazol	3.667	40585	22127	1.496636e+000	1.026909e+005
6	Safsizlik B	3.923				
7	Safsizlik C	4.633				

Şekil 3: Referans Çözelti Kromatogramı (0.002 mg/mL)



	Peak Name	RT	Area	Height	Symmetry Factor	Resolution	EP Plate Count
1	Safsızlık D	1.462	17869	7303	1.266382e+000		8.182812e+003
2	Safsızlık E	1.582	52332	21031	1.430508e+000	1.863219e+000	9.675848e+003
3	Safsızlık A	2.915	25303	12619	1.509869e+000	2.295577e+001	4.998317e+004
4	Safsızlık F	3.165	26321	11304	1.518604e+000	4.639786e+000	5.149225e+004
5	Lansoprazol	3.655	10582953	3199732	1.400104e+000	6.739814e+000	2.644409e+004
6	Safsızlık B	3.963	127870	60541	1.526364e+000	4.337004e+000	9.094828e+004
7	Safsızlık C	4.537	26853	11223	1.675797e+000	1.054589e+001	1.029282e+005

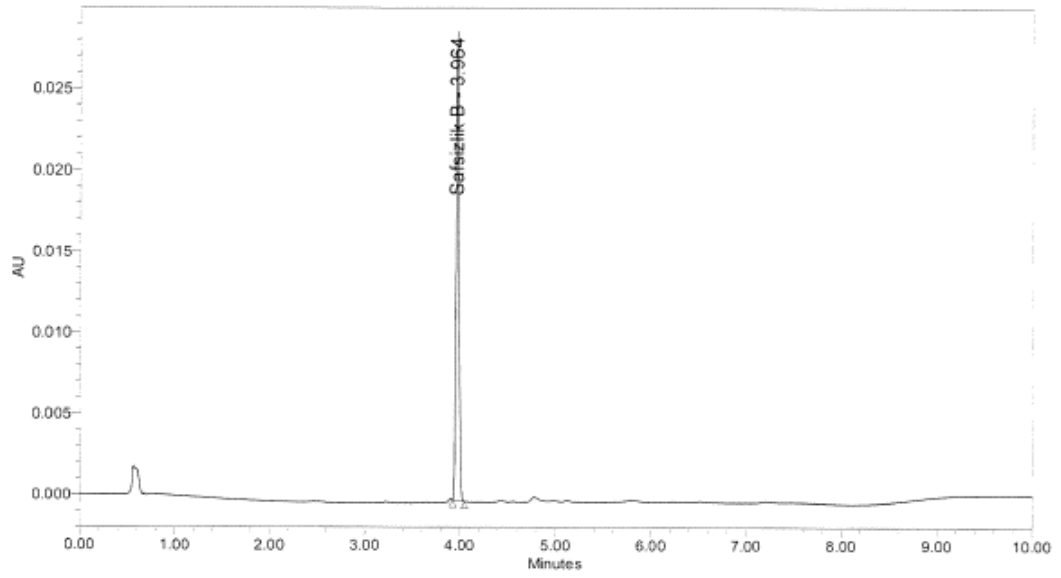
Şekil 4: Limit Konsantrasyonda Safsızlıkları İçeren Test Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık A

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	2	Safsızlık A	2.922	21565	237.825097
Mean			2.922	21564.9	237.83
Std. Dev.					
% RSD					

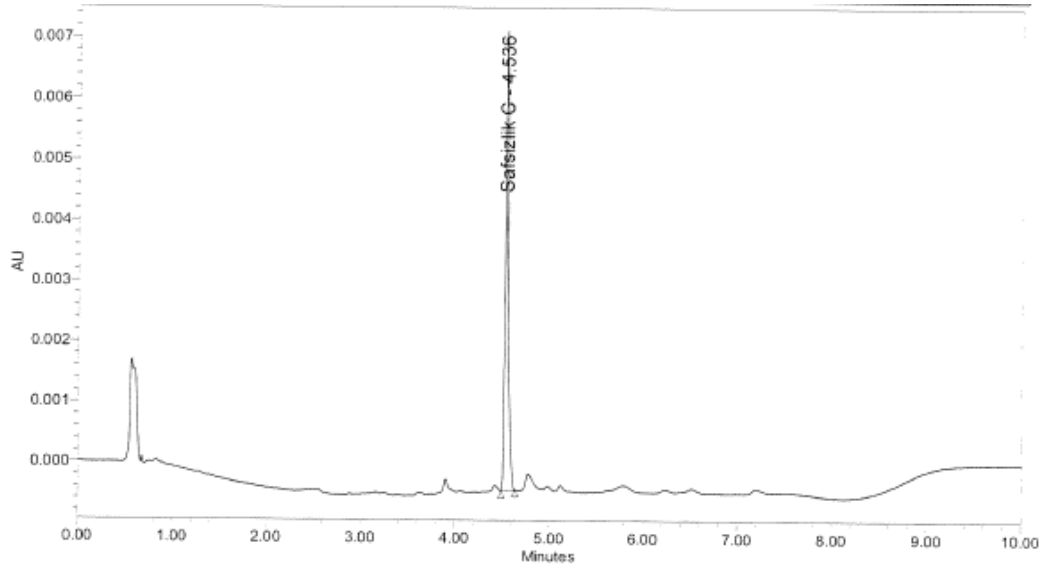
Şekil 5: Safsızlık A Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık B

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	2	Safsızlık B	3.964	61140	629.044188
Mean			3.964	61140.3	629.04
Std. Dev.					
% RSD					

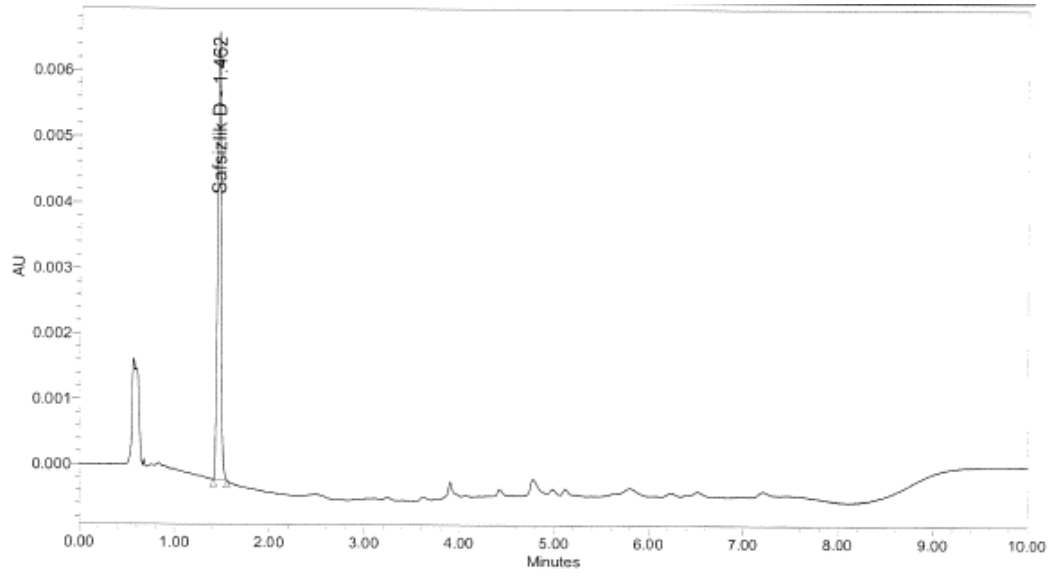
Şekil 6: Safsızlık B Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık C

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	1	Safsızlık C	4.536	18472	152.565345
Mean			4.536	18471.7	152.57
Std. Dev.					
% RSD					

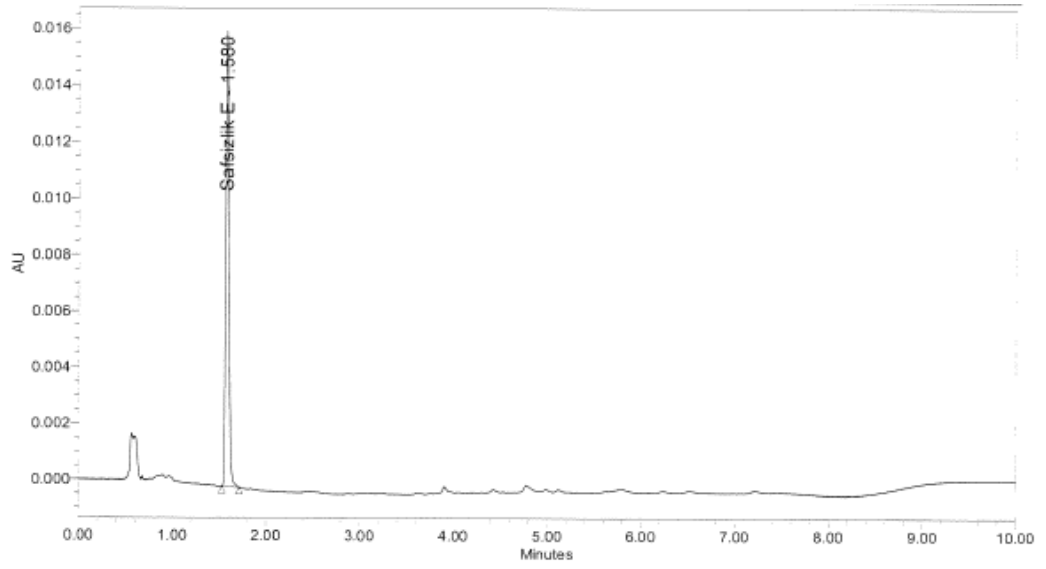
Şekil 7: Safsızlık C Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık D

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	2	Safsızlık D	1.462	17230	137.659443
Mean			1.462	17230.0	137.66
Std. Dev.					
% RSD					

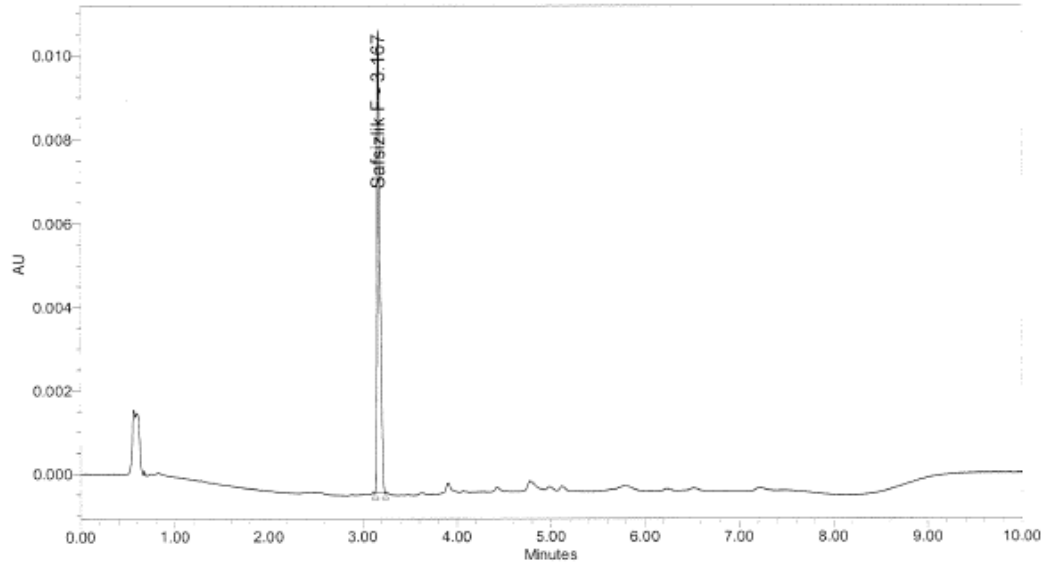
Şekil 8: Safsızlık D Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık E

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	1	Safsızlık E	1.580	40384	343.089723
Mean			1.580	40384.0	343.09
Std. Dev.					
% RSD					

Şekil 9: Safsızlık E Çözeltisi Kromatogramı



Peak Name: Safsızlık F

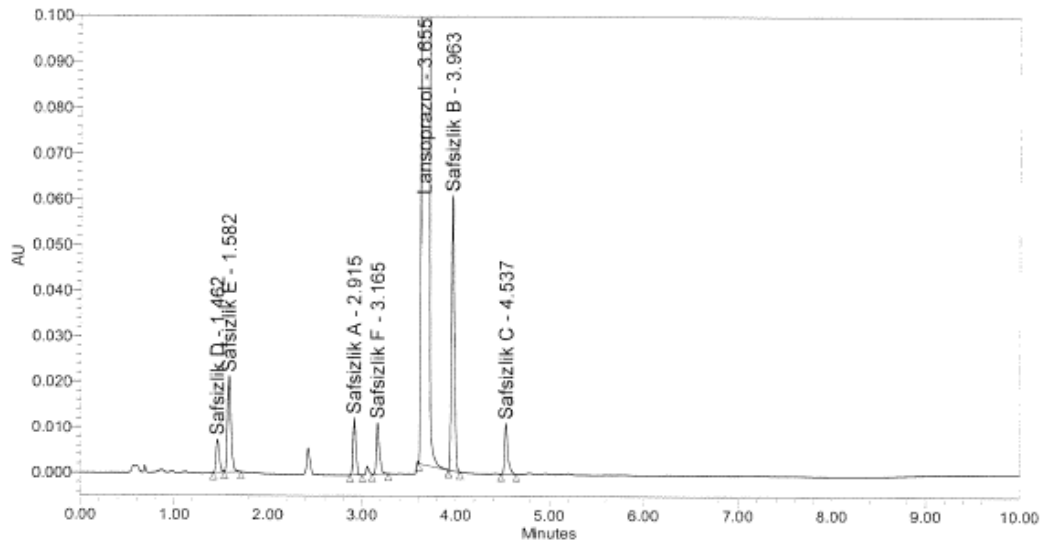
	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	1	Safsızlık F	3.167	22812	232.058315
Mean			3.167	22812.4	232.06
Std. Dev.					
% RSD					

Şekil 10: Safsızlık F Çözeltisi Kromatogramı

4.1.2. Sistem Uygunluk Testleri

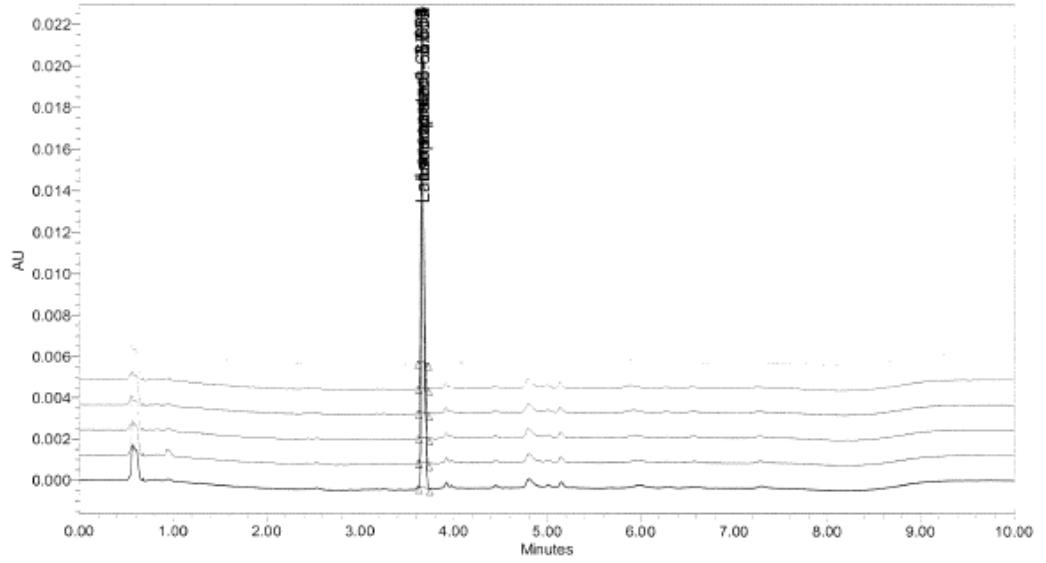
Sistem uygunluk testleri birçok analitik yöntemin ayrılmaz bir parçasıdır. Sistem uygunluk test parametreleri valide edilecek yöntem tipine göre değişir.¹³ Analiz öncesinde sistemin doğruluk ve performansını ölçmek amacıyla yapılır. Kromatografik analiz sırasında sistem uygunluk parametrelerinin sağlanamadığı durumlarda, o yöntemle elde edilen verilerin doğruluğundan şüphe edilmelidir.

Çalışmada verilen sistem uygunluk kriterleri aşağıda belirtilmiş olup, elde edilen sonuçlar kromatogramlarda gösterilmiştir.



	Peak Name	RT	Area	Height	Symmetry Factor	Resolution	EP Plate Count
1	Safsızlık D	1.462	17869	7303	1.266382e+000		8.182812e+003
2	Safsızlık E	1.582	52332	21031	1.430508e+000	1.863219e+000	9.675848e+003
3	Safsızlık A	2.915	25303	12619	1.509869e+000	2.295577e+001	4.998317e+004
4	Safsızlık F	3.165	26321	11304	1.518604e+000	4.639786e+000	5.149225e+004
5	Lansoprazol	3.655	10582953	3199732	1.400104e+000	6.739814e+000	2.644409e+004
6	Safsızlık B	3.963	127870	60541	1.526364e+000	4.337004e+000	9.094828e+004
7	Safsızlık C	4.537	26853	11223	1.675797e+000	1.054589e+001	1.029282e+005

Şekil 11: Sistem Uygunluk Kromatogramı (1)



Peak Name: Lansoprazol

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	1	Lansoprazol	3.667	40585	375.504817
2	2	Lansoprazol	3.666	40559	437.198066
3	3	Lansoprazol	3.664	40559	412.864175
4	4	Lansoprazol	3.662	40559	441.407349
5	5	Lansoprazol	3.661	40572	468.676619
6	6	Lansoprazol	3.656	40515	453.500748
Mean			3.663	40558.1	431.53
Std. Dev.			0.004	23.5	
% RSD			0.11	0.1	

Şekil 12: Sistem Uygunluk Kromatogramı (2)

4.1.3. Düzeltme Faktörü

Düzeltme faktörü, dedektör cevap faktörünün tersi olup (1/k), safsızlık yöntemlerinden elde edilen sonuçların hesaplanmasında önemli bir rol oynar. Test çözeltisi içerisindeki tanımlı safsızlıkların, referans çözeltideki etken madde alanına göre kıyaslandığı yöntemlerde, düzeltme faktörü kullanmak gerekmektedir. Çünkü doğru orantı üzerinden yapılan bu tür hesaplamalarda, doğru orantı mantığını koruyabilmek için düzeltme faktörü kullanılması zorunludur. Düzeltme faktörü, safsızlık alanını etken madde alanına dönüştürmeyi sağlar.

- Safsızlığın cevap faktörü 0.2'den az veya 5'den büyük ise, yöntem bu safsızlığı ölçmek için uygun değildir.
- Safsızlığın cevap faktörü 0.9 ile 1.1 arasında ise, safsızlıkların tepkisi etken maddeye benzerdir. Düzeltme faktörü gerekli değildir ve 1 kabul edilir.
- Safsızlıkların cevap faktörü 0.9 – 1.1 arasında değilse, düzeltme faktörü kullanmak zorunludur.

$$\text{Cevap faktörü (k)} = \frac{\text{İlgili safsızlığın doğrusallıktaki eğimi}}{\text{Etken maddenin doğrusallıktaki eğimi}}$$

$$\text{Düzeltme faktörü (1/k)} = \frac{1}{\text{Cevap faktörü}}$$

Tablo 4: Düzeltme Faktörü Tablosu

	Doğrusallık Grafiğine Ait Eğim	Cevap Faktörü (k)	Düzeltme Faktörü (1/k)
Safsızlık A	20703293.6891	1.084	1
Safsızlık B	15552031.0204	0.814	1.229
Safsızlık C	19111729.6832	1.001	1
Safsızlık D	17843276.5917	0.934	1
Safsızlık E	40205101.7691	2.105	0.475
Safsızlık F	24568135.8791	1.286	0.778
Lansoprazol	19099725.8153	-	-

4.1.4. Doğruluk ve Geri Kazanım

Doğruluk, bir analitik yöntem ile elde edilen sonuçlarla gerçek ya da bilinen analit derişimi arasındaki fark olarak tanımlanabilir. Doğruluğun kabul edilebilirliği için bu iki değer arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması gerekir.^{14, 15}

Doğruluk, ilgili yöntemle elde edilen tayin sonuçlarının, gerçek değere olan yakınlığının ölçüsüdür. Çözelti içersindeki miktarı bilinen analitin, tayin sonucunda bulunan miktarla karşılaştırılması sonucu, geri kazanım yüzdesinin hesaplanmasıyla ifade edilir.

ICH rehberinin, analitik prosedürlerin validasyonu Q2(R1) bölümü, doğruluk testinin, analitik yöntemin derişim aralığını (range) kapsayacak şekilde yapılmasını önermesinden dolayı, bu validasyon parametresi için aşağıda belirtilen derişim seviyeleri kullanılmıştır.¹³

Doğruluk parametresi için, Lansoprazol etken maddesine ait safsızlıklar, test çözeltisi içersine, her bir safsızlığın LOQ, %80, %100 ve %120 derişim seviyelerine tekabül edecek şekilde ilave edildi. Her bir derişim seviyesi (LOQ, %80, %100 ve %120) için 3 adet safsızlık ilave

edilmiş test çözeltisi hazırlandı ve referans çözeltiye karşı kıyaslanarak, test çözeltisi içerisindeki safsızlık miktarları hesaplandı.

Tablo 5: Safsızlık A için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık A (%)	Hesaplanan Safsızlık A (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0042	0.0039	92.86
		0.0038	90.48
		0.0040	95.24
%80	0.08	0.0775	96.88
		0.0816	102.00
		0.0817	102.13
%100	0.10	0.0976	97.60
		0.0997	99.70
		0.1019	101.90
%120	0.12	0.1189	99.08
		0.1200	100.00
		0.1196	99.67
Ortalama Geri Kazanım (%)			98.13
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			95.78 – 100.48

Tablo 6: Safsızlık B için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık B (%)	Hesaplanan Safsızlık B (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0064	0.0060	93.75
		0.0058	90.63
		0.0059	92.19
%80	0.32	0.3054	95.44
		0.2849	89.03
		0.2795	87.34
%100	0.40	0.3672	91.80
		0.3763	94.08
		0.4024	100.60
%120	0.48	0.4767	99.31
		0.4224	88.00
		0.4244	88.42
Ortalama Geri Kazanım (%)			92.55
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			89.81 – 95.29

Tablo 7: Safsızlık C için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık C (%)	Hesaplanan Safsızlık C (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0066	0.0061	92.42
		0.0062	93.94
		0.0060	90.91
%80	0.08	0.0703	87.88
		0.0745	93.13
		0.0739	92.38
%100	0.10	0.0921	92.10
		0.0925	92.50
		0.0970	97.00
%120	0.12	0.1036	86.33
		0.1083	90.25
		0.1081	90.08
Ortalama Geri Kazanım (%)			91.58
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			89.81 – 93.35

Tablo 8: Safsızlık D için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık D (%)	Hesaplanan Safsızlık D (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0073	0.0066	90.41
		0.0069	94.52
		0.0068	93.15
%80	0.08	0.0683	85.38
		0.0693	86.63
		0.0719	89.88
%100	0.10	0.0880	88.00
		0.0887	88.70
		0.0891	89.10
%120	0.12	0.1072	89.33
		0.1059	88.25
		0.1079	89.92
Ortalama Geri Kazanım (%)			89.44
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			87.85 – 91.03

Tablo 9: Safsızlık E için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık E (%)	Hesaplanan Safsızlık E (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0029	0.0026	89.66
		0.0025	86.21
		0.0025	86.21
%80	0.08	0.0786	98.25
		0.0798	99.75
		0.0832	104.00
%100	0.10	0.1066	106.60
		0.1018	101.80
		0.1046	104.60
%120	0.12	0.1149	95.75
		0.1240	103.33
		0.1193	99.42
Ortalama Geri Kazanım (%)			97.97
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			93.46 – 102.48

Tablo 10: Safsızlık F için Doğruluk ve Geri Kazanım Tablosu

Test	İlave Edilen Safsızlık F (%)	Hesaplanan Safsızlık F (%)	Geri Kazanım (%)
LOQ	0.0043	0.0039	90.70
		0.0040	93.02
		0.0041	95.35
%80	0.08	0.0811	101.38
		0.0814	101.75
		0.0808	101.00
%100	0.10	0.1005	100.50
		0.0994	99.40
		0.1023	102.30
%120	0.12	0.1232	102.67
		0.1218	101.50
		0.1171	97.58
Ortalama Geri Kazanım (%)			98.93
%95 Güven Aralığı Seviyesi (p=0.05):			96.43 – 101.43

4.1.4.1 Doğruluk ve Geri Kazanım Kriteri

Avustralya Pestisit & Veteriner İlaçlar Otoritesi'nin "Etken Maddeler, Zirai ve Veteriner Kimyasal Ürünler İçin Analitik Metot Validasyon Rehberi"nde belirttiği geri kazanım limitleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.¹⁶

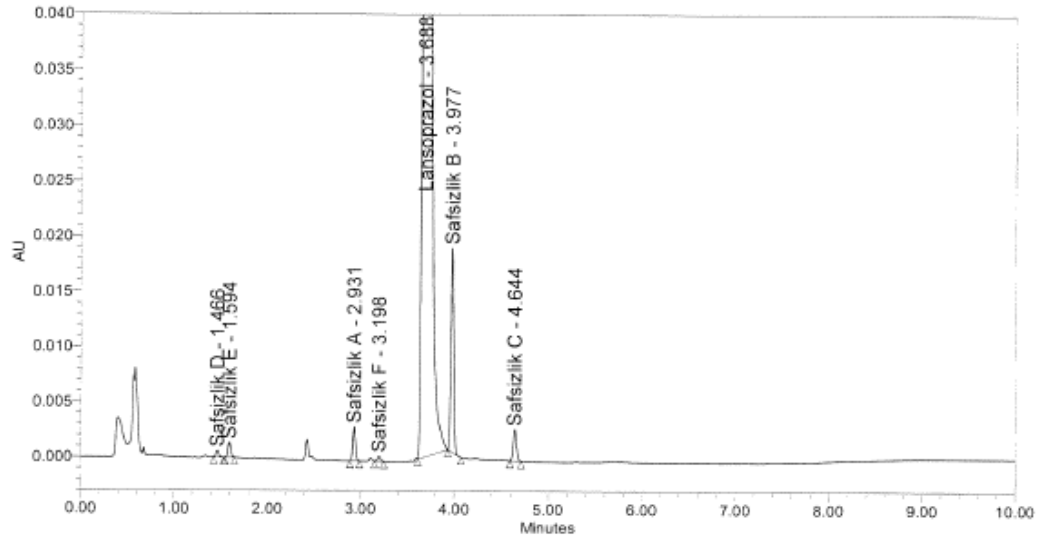
Tablo 11: Geri Kazanım Kriteri Tablosu

% Safsızlık İçeriği	Kabul Edilebilir Geri Kazanım Ortalaması
≥ 1	%90 - %110
0.1 – 1	% 80 - % 120
< 0.1	% 75 - % 125

Yöntemdeki safsızlıkların limitleri %0.1 - %0.4 aralığında olduğundan dolayı, kabul edilebilir geri kazanım ortalaması %80 - %120 aralığı içinde olmalıdır.

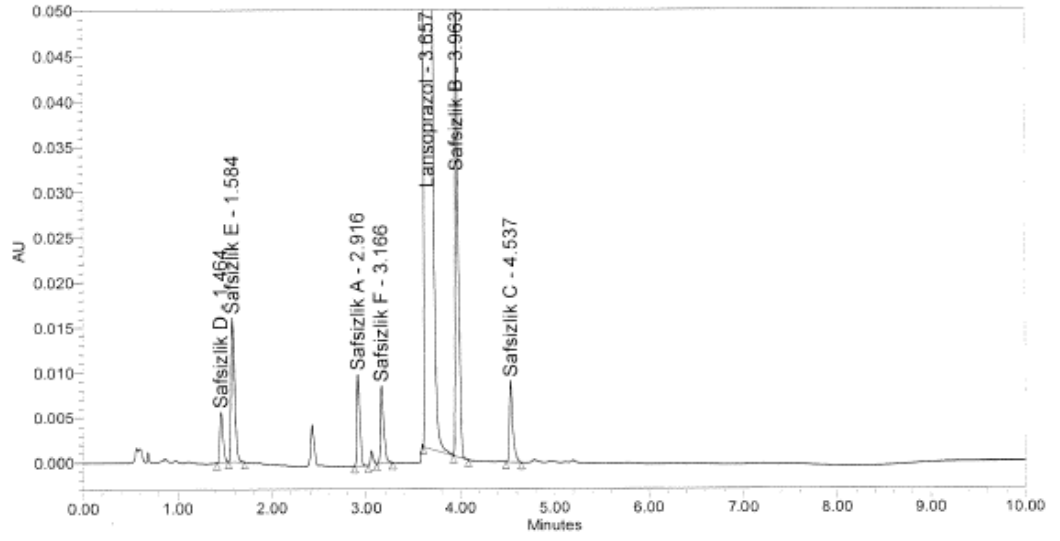
4.1.4.2. Sonuç

Her bir safsızlık için ortalama geri kazanım değeri %80 - %120 arasındadır.



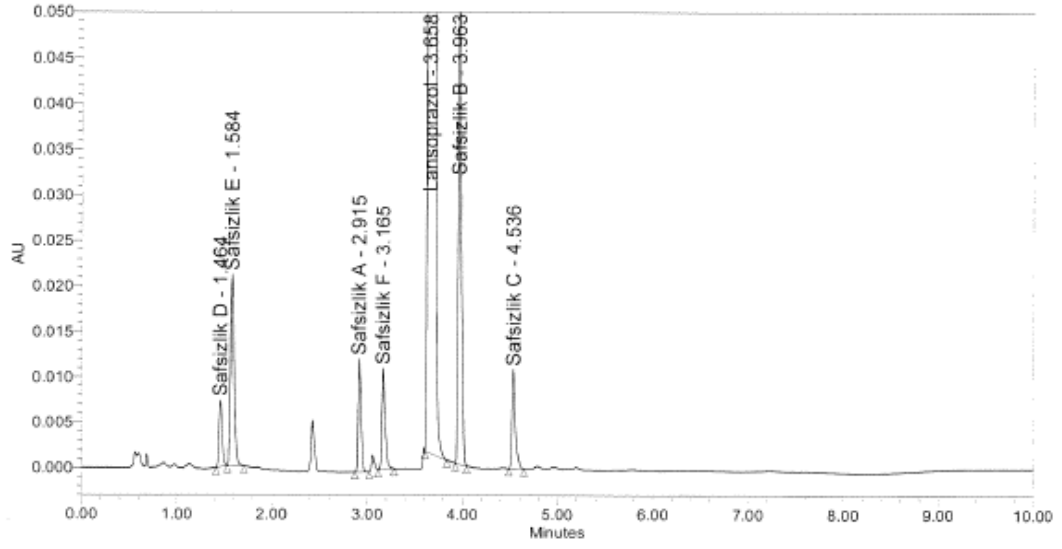
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsızlık D	1.466	1241	0.01	569
2	Safsızlık E	1.594	2842	0.03	1341
3	Safsızlık A	2.931	5968	0.06	3126
4	Safsızlık F	3.198	1014	0.01	476
5	Lansoprazol	3.688	10147378	99.45	3191668
6	Safsızlık B	3.977	38056	0.37	18520
7	Safsızlık C	4.644	6978	0.07	2857

Şekil 13: LOQ Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı



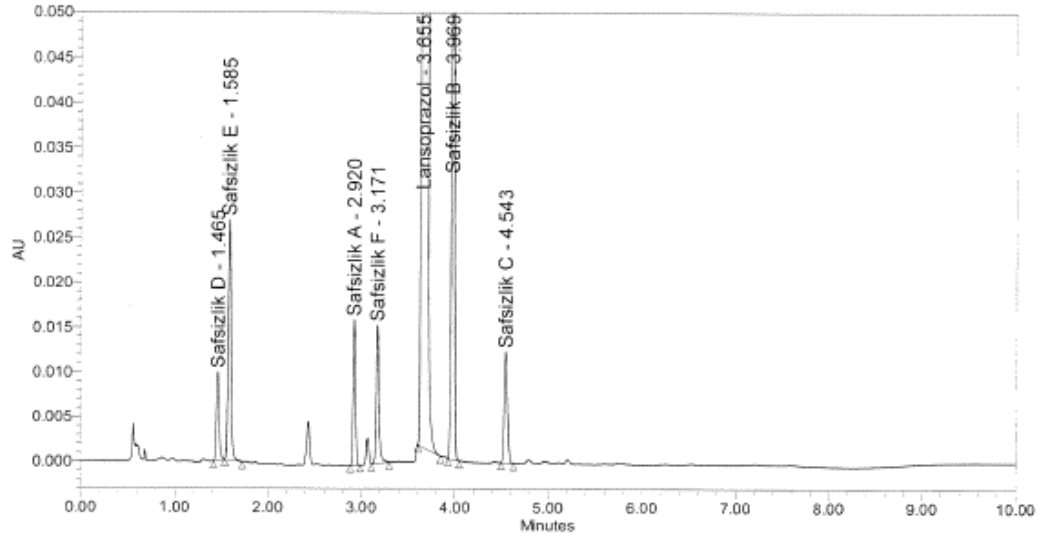
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsızlık D	1.464	13856	0.12	5623
2	Safsızlık E	1.584	39952	0.36	15976
3	Safsızlık A	2.916	21235	0.19	10164
4	Safsızlık F	3.166	21131	0.19	8662
5	Lansoprazol	3.657	10902230	97.91	3202409
6	Safsızlık B	3.963	113981	1.02	51545
7	Safsızlık C	4.537	22287	0.20	9041

Şekil 14: %80 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsızlık D	1.464	17840	0.16	7353
2	Safsızlık E	1.584	51875	0.46	21124
3	Safsızlık A	2.915	25300	0.23	12439
4	Safsızlık F	3.165	26196	0.23	11184
5	Lansoprazol	3.658	10887848	97.56	3200609
6	Safsızlık B	3.963	124185	1.11	57973
7	Safsızlık C	4.536	26709	0.24	10944

Şekil 15: %100 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Safsızlık D	1.465	21736	0.21	9965
2 Safsızlık E	1.585	55406	0.54	26899
3 Safsızlık A	2.920	29632	0.29	16303
4 Safsızlık F	3.171	32125	0.31	15465
5 Lansoprazol	3.655	9913902	96.97	3202730
6 Safsızlık B	3.969	142267	1.39	71802
7 Safsızlık C	4.543	29045	0.28	12455

Şekil 16: %120 Seviyesinde Doğruluk ve Geri Kazanım Kromatogramı

4.1.5. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, homojen numunenin tekrarlanan analizlerinden elde edilen sonuçlarının dağılım miktarıdır. Kesinlik, spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesi olarak da nitelendirilebilir. Analiz sonuçlarından elde edilen standart ve bağıl standart sapma ile ifade edilen kesinliği, iki kategori altında incelemek mümkündür:

4.1.5.1. Cihaz Kesinliği (Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği)

Aynı çözeltiden, aynı analist, aynı ekipman ve kısa zaman diliminde elde edilen veriler arasındaki uyumu tanımlar. Ölçümün tekrarlanabilirliğini gösterir.

Çalışmada, cihaz kesinliği parametresi, limit derişiminde safsızlıkları içeren test çözeltisi ile referans çözeltinin 6 kez ardı ardına enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.¹³

Tablo 12: Safsızlık A için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	25303	2.915
2	25275	2.916
3	25294	2.915
4	25330	2.915
5	25325	2.917
6	25354	2.916
Ortalama	25313.8	2.916
Standart sapma	28.5	0.001
Bağıl standart sapma	0.1	0.02

Tablo 13: Safsızlık B için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	127870	3.963
2	128106	3.963
3	128044	3.962
4	128065	3.963
5	128185	3.692
6	128210	3.961
Ortalama	128080.1	3.962
Standart sapma	121.8	0.001
Bağıl standart sapma	0.1	0.02

Tablo 14: Safsızlık C için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	26853	4.537
2	26919	4.535
3	26924	4.535
4	26883	4.535
5	26950	4.534
6	26907	4.533
Ortalama	26906.1	4.535
Standart sapma	33.8	0.001
Bağıl standart sapma	0.1	0.03

Tablo 15: Safsızlık D için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	17869	1.462
2	17923	1.463
3	17912	1.461
4	17892	1.464
5	17910	1.464
6	17903	1.465
Ortalama	17901.4	1.463
Standart sapma	18.9	0.001
Bağıl standart sapma	0.1	0.09

Tablo 16: Safsızlık E için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	52332	1.582
2	52502	1.582
3	52412	1.581
4	52436	1.584
5	52475	1.584
6	52475	1.584
Ortalama	52438.7	1.583
Standart sapma	61.2	0.001
Bağıl standart sapma	0.1	0.09

Tablo 17: Safsızlık F için Cihaz Kesinliği Tablosu

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	26321	3.165
2	26410	3.165
3	26330	3.165
4	26269	3.166
5	26241	3.167
6	26318	3.165
Ortalama	26314.7	3.166
Standart sapma	58.3	0.001
Bağıl standart sapma	0.2	0.02

Tablo 18: Lansoprazol için Cihaz Kesinliği Tablosu

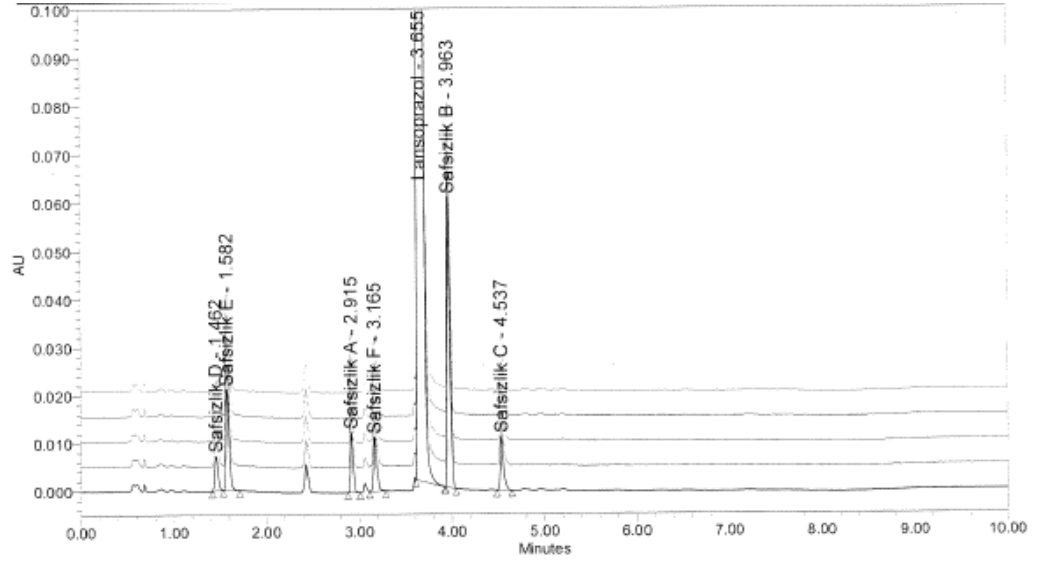
Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	40585	3.667
2	40559	3.666
3	40559	3.664
4	40559	3.662
5	40572	3.661
6	40515	3.656
Ortalama	40558.1	3.663
Standart sapma	23.5	0.004
Bağıl standart sapma	0.1	0.11

4.1.5.1.1. Cihaz Kesinliği Kriteri

Her bir safsızlık ve Lansoprazol etken maddesi için ardı ardına yapılan 6 enjeksiyon alanının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapması %5.0'den fazla olmamalıdır.

4.1.5.1.2. Sonuç

Her bir safsızlık ve Lansoprazol etken maddesi için ardı ardına yapılan 6 enjeksiyon alanının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapması %5.0'den fazla değildir.



Peak Name: Lansoprazol

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (µV)
1	1	Lansoprazol	3.655	10582953	3199732
2	2	Lansoprazol	3.654	10637618	3199801
3	3	Lansoprazol	3.658	10685346	3202065
4	4	Lansoprazol	3.656	10710556	3200404
5	5	Lansoprazol	3.659	10698819	3201980
6	6	Lansoprazol	3.657	10779795	3201852
Mean			3.656	10682514.4	
Std. Dev.			0.002	67010.3	
% RSD			0.05	0.6	

Peak Name: Safsizlik A

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (µV)
1	1	Safsizlik A	2.915	25303	12619
2	2	Safsizlik A	2.916	25275	12488
3	3	Safsizlik A	2.915	25294	12365
4	4	Safsizlik A	2.915	25330	12355
5	5	Safsizlik A	2.917	25325	12333
6	6	Safsizlik A	2.916	25354	12270
Mean			2.916	25313.8	
Std. Dev.			0.001	28.5	
% RSD			0.02	0.1	

Peak Name: Safsizlik B

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (μV)
1	1	Safsizlik B	3.963	127870	60541
2	2	Safsizlik B	3.963	128106	59940
3	3	Safsizlik B	3.962	128044	59528
4	4	Safsizlik B	3.963	128065	59240
5	5	Safsizlik B	3.962	128185	59306
6	6	Safsizlik B	3.961	128210	59029
Mean			3.962	128080.1	
Std. Dev.			0.001	121.8	
% RSD			0.02	0.1	

Peak Name: Safsizlik C

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (μV)
1	1	Safsizlik C	4.537	26853	11223
2	2	Safsizlik C	4.535	26919	11162
3	3	Safsizlik C	4.535	26924	11072
4	4	Safsizlik C	4.535	26883	11036
5	5	Safsizlik C	4.534	26950	10978
6	6	Safsizlik C	4.533	26907	10956
Mean			4.535	26906.1	
Std. Dev.			0.001	33.8	
% RSD			0.03	0.1	

Peak Name: Safsizlik D

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (μV)
1	1	Safsizlik D	1.462	17869	7303

Peak Name: Safsizlik D

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (μV)
2	2	Safsizlik D	1.463	17923	7319
3	3	Safsizlik D	1.461	17912	7320
4	4	Safsizlik D	1.464	17892	7309
5	5	Safsizlik D	1.464	17910	7334
6	6	Safsizlik D	1.465	17903	7339
Mean			1.463	17901.4	
Std. Dev.			0.001	18.9	
% RSD			0.09	0.1	

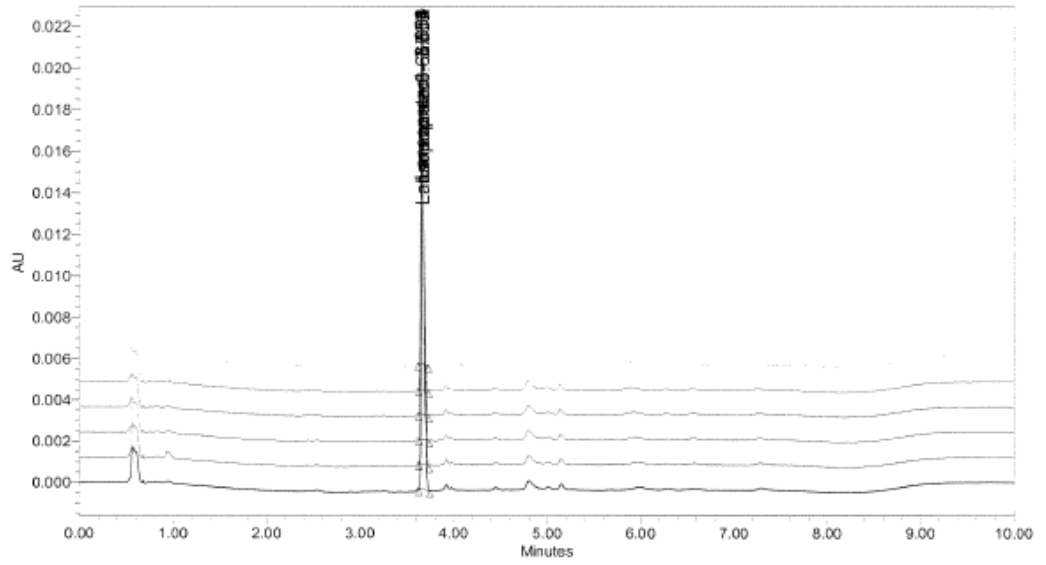
Peak Name: Safsizlik E

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (µV)
1	1	Safsizlik E	1.582	52332	21031
2	2	Safsizlik E	1.582	52502	21055
3	3	Safsizlik E	1.581	52412	21060
4	4	Safsizlik E	1.584	52436	21039
5	5	Safsizlik E	1.584	52475	21082
6	6	Safsizlik E	1.584	52475	21112
Mean			1.583	52438.7	
Std. Dev.			0.001	61.2	
% RSD			0.09	0.1	

Peak Name: Safsizlik F

	Injection	Peak Name	RT	Area	Height (µV)
1	1	Safsizlik F	3.165	26321	11304
2	2	Safsizlik F	3.165	26410	11215
3	3	Safsizlik F	3.165	26330	11142
4	4	Safsizlik F	3.166	26269	11116
5	5	Safsizlik F	3.167	26241	11094
6	6	Safsizlik F	3.165	26318	11067
Mean			3.166	26314.7	
Std. Dev.			0.001	58.3	
% RSD			0.02	0.2	

Şekil 17: Cihaz Kesinliği Kromatogramı (1)



Peak Name: Lansoprazol

	Injection	Peak Name	RT	Area	EP s/n
1	1	Lansoprazol	3.667	40585	375.504817
2	2	Lansoprazol	3.666	40559	437.198066
3	3	Lansoprazol	3.664	40559	412.864175
4	4	Lansoprazol	3.662	40559	441.407349
5	5	Lansoprazol	3.661	40572	468.676619
6	6	Lansoprazol	3.656	40515	453.500748
Mean			3.663	40558.1	431.53
Std. Dev.			0.004	23.5	
% RSD			0.11	0.1	

Şekil 18: Cihaz Kesinliği Kromatogramı (2)

4.1.5.2. Ara Kesinlik

Metodun aynı laboratuvarda farklı kişiler tarafından, farklı cihazlarda ve farklı günlerde uygulanması ile elde edilen sonuçların uyumu ve ölçüm işleminin uzun zaman dilimi içerisindeki değişkenliği olarak tanımlanabilir.¹³

Çalışmada ara kesinlik parametresi, farklı günlerde, farklı cihazlarda ve farklı analistler tarafından, test çözeltisi içerisinde, her bir safsızlık kendi limit derişiminde ilave edilerek, referans çözeltiye karşı kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir:

Tablo 19: Safsızlık A için Ara Kesinlik Tablosu

Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.0976	0.0987
Çözelti 2	0.0997	0.1012
Çözelti 3	0.1019	0.1039
Çözelti 4	0.0995	0.1003
Çözelti 5	0.0974	0.0979
Çözelti 6	0.0985	0.0996
Ortalama (%)	0.0991	0.1003
Bağıl Standart Sapma (%)	1.68	2.12
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.0997	
12 Analiz Sonucunun Bağıl standart sapması (%)	1.93	
%95 Güven Aralığı Sınırları	0.0985 – 0.1009	

Tablo 20: Safsızlık B için Ara Kesinlik Tablosu

Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.3672	0.4011
Çözelti 2	0.3763	0.4119
Çözelti 3	0.4024	0.4475
Çözelti 4	0.3721	0.4022
Çözelti 5	0.3789	0.3983
Çözelti 6	0.3705	0.3962
Ortalama (%)	0.3779	0.4095
Bağıl standart sapma (%)	3.36	4.73
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.3937	
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapması (%)	5.77	
%95 güven aralığı sınırları	0.3793 – 0.4081	

Tablo 21: Safsızlık C için Ara Kesinlik Tablosu

Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.0921	0.0957
Çözelti 2	0.0925	0.0965
Çözelti 3	0.0970	0.1017
Çözelti 4	0.0929	0.0948
Çözelti 5	0.0925	0.0951
Çözelti 6	0.0911	0.0941
Ortalama (%)	0.0930	0.0963
Bağıl standart sapma (%)	2.20	2.87
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.0947	
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapması (%)	3.05	
%95 güven aralığı sınırları	0.0929 – 0.0965	

Tablo 22: Safsızlık D için Ara Kesinlik Tablosu

Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.0880	0.0868
Çözelti 2	0.0887	0.0872
Çözelti 3	0.0891	0.0876
Çözelti 4	0.0875	0.0850
Çözelti 5	0.0885	0.0863
Çözelti 6	0.0882	0.0861
Ortalama (%)	0.0883	0.0865
Bağıl standart sapma (%)	0.64	1.06
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.0874	
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapması (%)	1.38	
%95 güven aralığı sınırları	0.0866 – 0.0882	

Tablo 23: Safsızlık E için Ara Kesinlik Tablosu

Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.1066	0.1060
Çözelti 2	0.1018	0.1016
Çözelti 3	0.1046	0.1044
Çözelti 4	0.1016	0.0996
Çözelti 5	0.1073	0.1052
Çözelti 6	0.1020	0.0999
Ortalama (%)	0.1040	0.1028
Bağıl standart sapma (%)	2.46	2.70
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.1034	
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapması (%)	2.54	
%95 güven aralığı sınırları	0.1017 – 0.1051	

Tablo 24: Safsızlık F için Ara Kesinlik Tablosu

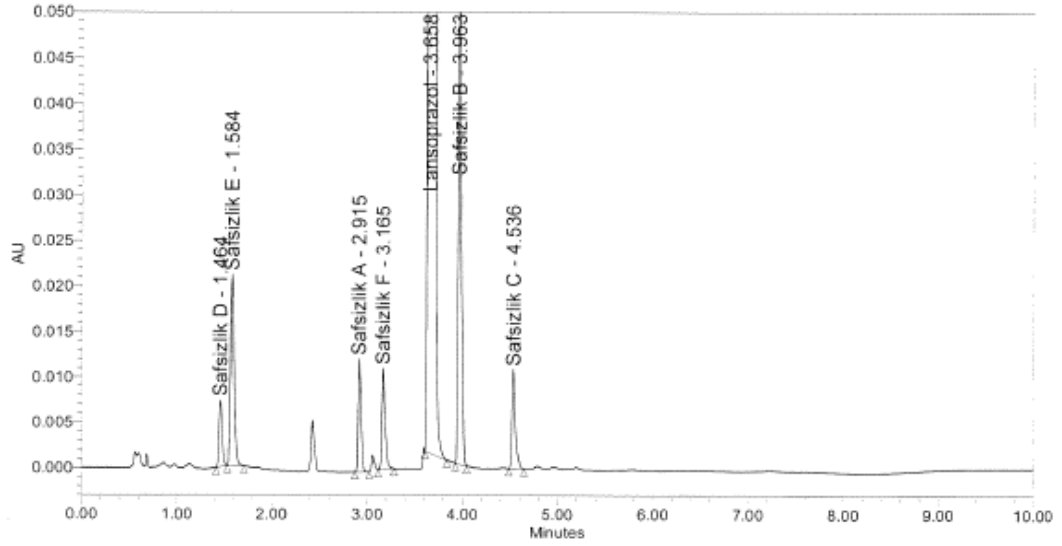
Ara Kesinlik	Analist I/Cihaz I (%)	Analist II/Cihaz II (%)
Çözelti 1	0.1005	0.0928
Çözelti 2	0.0994	0.0912
Çözelti 3	0.1023	0.0931
Çözelti 4	0.1015	0.0911
Çözelti 5	0.1022	0.0912
Çözelti 6	0.1008	0.0889
Ortalama (%)	0.1011	0.0914
Bağıl standart sapma (%)	1.10	1.64
12 Analiz Sonucunun Ortalaması	0.0963	
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapması (%)	5.44	
%95 güven aralığı sınırları	0.0930 – 0.0996	

4.1.5.2.1. Ara Kesinlik Kriteri

- 1- Analist I ile Cihaz I ve Analist II ile Cihaz II'den elde edilen sonuçların kendi içerisindeki bağıl standart sapması %10.0'dan fazla olmamalıdır.
- 2- Toplam 12 adet analiz sonucunun bağıl standart sapması %10.0'dan fazla olmamalıdır.

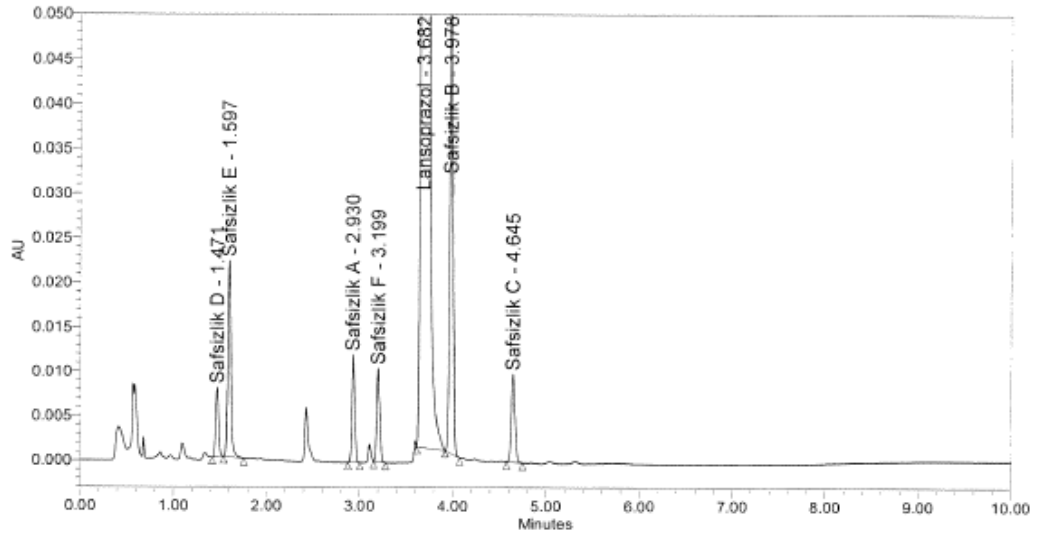
4.1.5.2.2.Sonuç

- 1- Analist I ile Cihaz I ve Analist II ile Cihaz II' den elde edilen sonuçların kendi içerisindeki bağıl standart sapması %10.0'dan fazla değildir.
- 2- Toplam 12 adet analiz sonucunun bağıl standart sapması %10.0'dan fazla değildir.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.464	17840	0.16	7353
2	Safsizlik E	1.584	51875	0.46	21124
3	Safsizlik A	2.915	25300	0.23	12439
4	Safsizlik F	3.165	26196	0.23	11184
5	Lansoprazol	3.658	10887848	97.56	3200609
6	Safsizlik B	3.963	124185	1.11	57973
7	Safsizlik C	4.536	26709	0.24	10944

Şekil 19: Analist I/Cihaz I Ara Kesinlik Kromatogramı



	Peak Name	RT	Area	Height
1	Safsizlik D	1.471	17602	7855
2	Safsizlik E	1.597	51622	22104
3	Safsizlik A	2.930	25527	12183
4	Safsizlik F	3.199	24201	10558
5	Lansoprazol	3.682	11239657	3190806
6	Safsizlik B	3.978	129784	56752
7	Safsizlik C	4.645	27438	9924

Şekil 20: Analist II/Cihaz II Ara Kesinlik Kromatogramı

4.1.6. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, bir derişim aralığındaki numunelerden elde edilen analit cevabının, derişimle doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir. Analitik yöntem için doğrusallık aralığı üst ve alt tayin sınırları arasındadır.^{17, 18, 19}

Doğrusallığın belirlenebilmesi için en az 5 farklı derişim önerilir. Doğrusallık grafiğı çizilir ve regresyon doğrusunun eğimi, y-kesişim noktası, korelasyon katsayısı ve bakiye kareler toplamı hesaplanır. Kesişim, %100'lük derişim seviyesindeki analit için elde edilen alanın %2.0'sinden az olmalıdır. Bunun yanı sıra regresyon doğrusundan elde edilen sonuçlar ile bulunan sonuçlar arasındaki sapmayı gösteren verilerin eklenmesi de doğrusallık parametresinin açıklanmasında faydalı olabilir.¹³

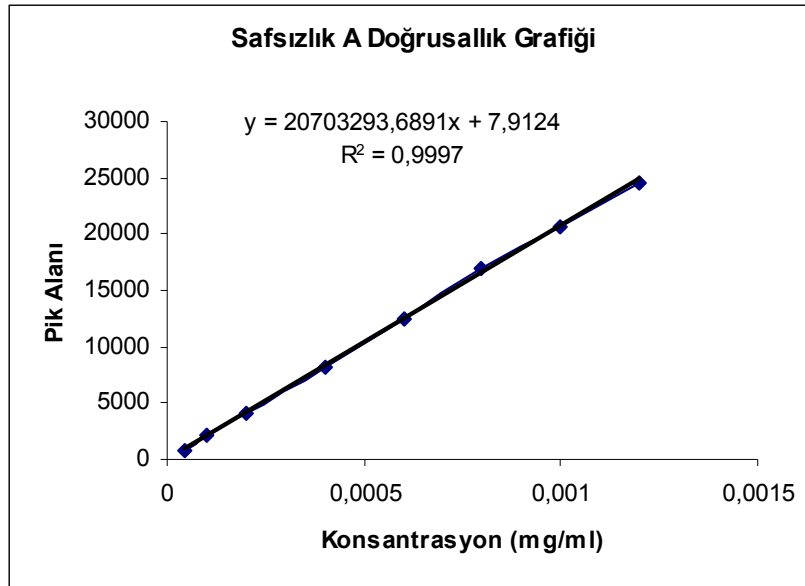
Çalışma aralığı, genel olarak doğrusallık çalışmasından çıkarılır ve yöntemin tasarlanan uygulamalarına bağlıdır. Çalışma aralığı, analitik prosedürün uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallıkla sonuçlar verdiği alt ve üst derişim aralığıdır.

Safsızlık tayin yöntemlerinin çalışma aralığı, ICH rehberinde belirtildiğı üzere, safsızlığın raporlama seviyesinden, spesifikasyon limitinin %120'sine kadar olan derişim aralığıdır.¹³

Çalışmada, her bir safsızlık ve Lansoprazol etken maddesi için kendi LOQ seviyelerinden, spesifikasyon limitinin %120'sine kadar olan 8 farklı derişim seviyesinde doğrusallık çalışması gerçekleştirilmiştir:

Tablo 25: Safsızlık A için Doğrusallık Tablosu

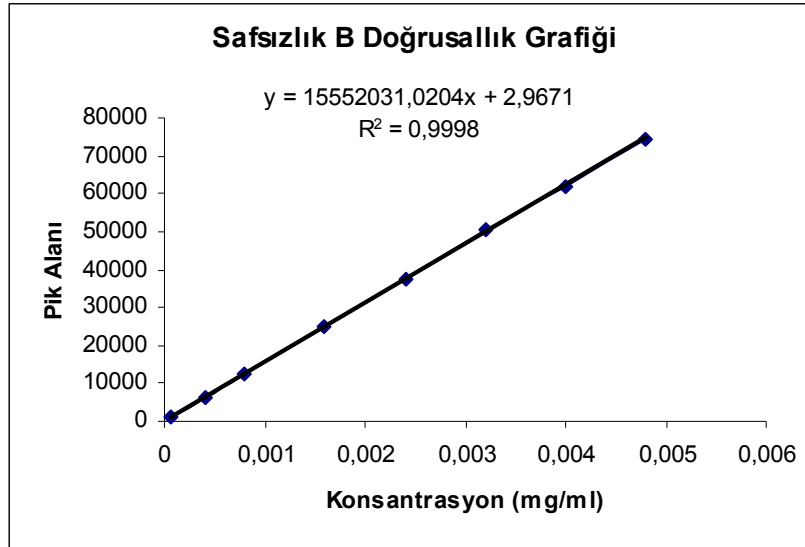
Değişim Seviyesi	Safsızlık A Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000042	819	877.45
2. %10	0.0001	2057	2078.24
3. %20	0.0002	4075	4148.57
4. %40	0.0004	8256	8289.23
5. %60	0.0006	12526	12429.89
6. %80	0.0008	16902	16570.55
7. %100	0.0010	20716	20711.21
8. %120	0.0012	24606	24851.86
Eğim:		20703293.6891	
Kesişim:		7.9124	
Korelasyon katsayısı (r):		0.9998	
Determinasyon katsayısı R ² :		0.9997	
y = mx + n:		20703293.6891x + 7.9124	



Şekil 21: Safsızlık A için Doğrusallık Grafiği

Tablo 26: Safsızlık B için Doğrusallık Tablosu

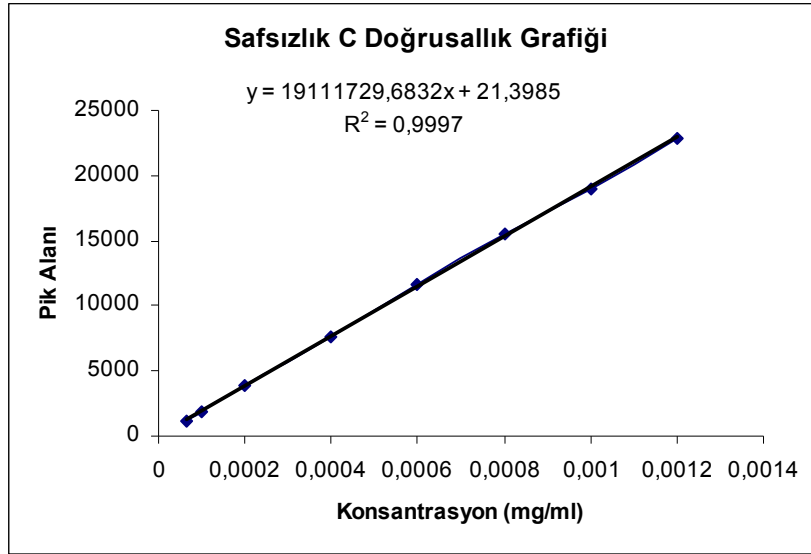
Değişim Seviyesi	Safsızlık B Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000064	949	998.30
2. %10	0.0004	6136	6223.78
3. %20	0.0008	12246	12444.59
4. %40	0.0016	24773	24886.22
5. %60	0.0024	37546	37327.84
6. %80	0.0032	50624	49769.47
7. %100	0.0040	62062	62211.09
8. %120	0.0048	74175	74652.72
		Eğim: 15552031.0204 Kesişim: 2.9671 Korelasyon katsayısı (r): 0.9999 Determinasyon katsayısı R ² : 0.9998 y = mx + n: 15552031.0204x + 2.9671	



Şekil 22: Safsızlık B için Doğrusallık Grafiği

Tablo 27: Safsızlık C için Doğrusallık Tablosu

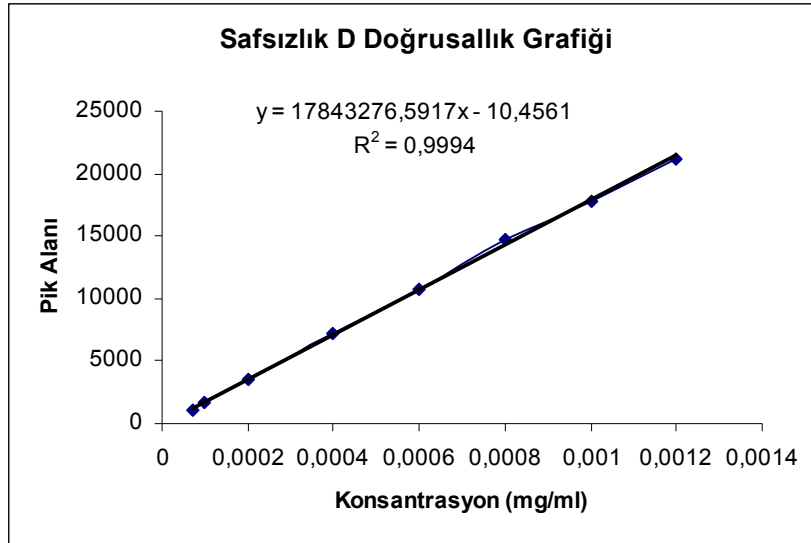
Değişim Seviyesi	Safsızlık C Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000066	1165	1282.77
2. %10	0.0001	1932	1932.57
3. %20	0.0002	3826	3843.74
4. %40	0.0004	7681	7666.09
5. %60	0.0006	11578	11488.44
6. %80	0.0008	15586	15310.78
7. %100	0.0010	19014	19133.13
8. %120	0.0012	22831	22955.47
Eğim:		19111729.6832	
Kesişim:		21.3985	
Korelasyon katsayısı (r):		0.9998	
Determinasyon katsayısı R ² :		0.9997	
y = mx + n:		19111729.6832x + 21.3985	



Şekil 23: Safsızlık C için Doğrusallık Grafiği

Tablo 28: Safsızlık D için Doğrusallık Tablosu

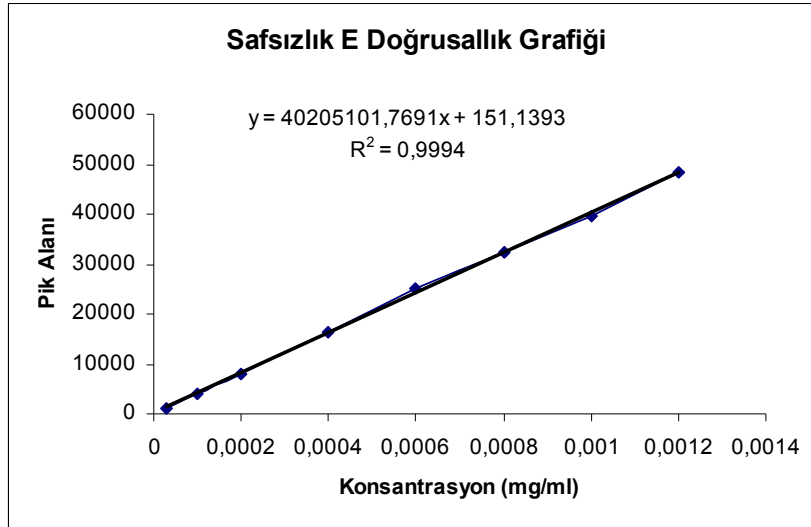
Değişim Seviyesi	Safsızlık D Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000073	1114	1292.10
2. %10	0.0001	1738	1773.87
3. %20	0.0002	3583	3558.20
4. %40	0.0004	7163	7126.85
5. %60	0.0006	10777	10695.51
6. %80	0.0008	14653	14264.17
7. %100	0.0010	17743	17832.82
8. %120	0.0012	21174	21401.48
Eğim:		17843276.5917	
Kesişim:		10.4561	
Korelasyon katsayısı (r):		0.9997	
Determinasyon katsayısı R ² :		0.999	
y = mx + n:		17843276.5917x - 10.4561	



Şekil 24: Safsızlık D için Doğrusallık Grafiği

Tablo 29: Safsızlık E için Doğrusallık Tablosu

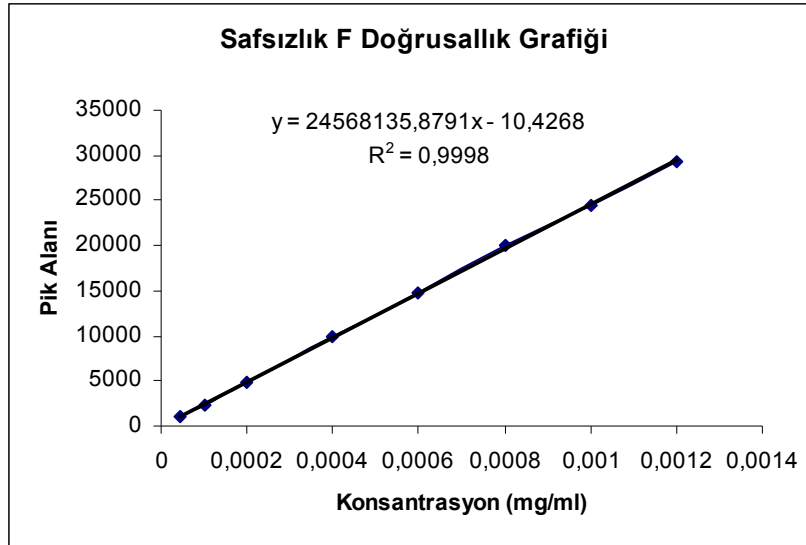
Değişim Seviyesi	Safsızlık E Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000029	1104	1317.09
2. %10	0.0001	4117	4171.65
3. %20	0.0002	7942	8192.16
4. %40	0.0004	16461	16233.18
5. %60	0.0006	25097	24274.20
6. %80	0.0008	32341	32315.22
7. %100	0.0010	39724	40356.24
8. %120	0.0012	48471	48397.26
Eğim:		40205101.7691	
Kesişim:		151.1393	
Korelasyon katsayısı (r):		0.9997	
Determinasyon katsayısı R ² :		0.9994	
y = mx + n:		40205101.7691x + 151.1393	



Şekil 25: Safsızlık E için Doğrusallık Grafiği

Tablo 30: Safsızlık F için Doğrusallık Tablosu

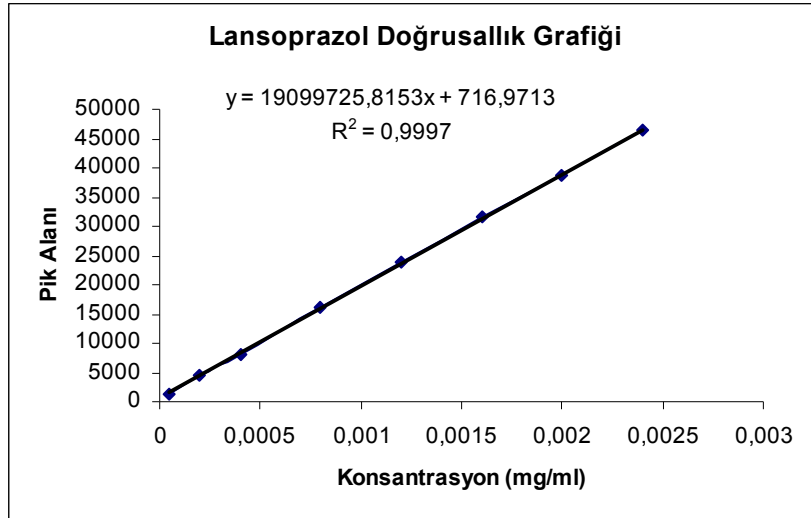
Değişim Seviyesi	Safsızlık F Değişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000043	973	1046.00
2. %10	0.0001	2406	2446.39
3. %20	0.0002	4867	4903.20
4. %40	0.0004	9805	9816.83
5. %60	0.0006	14845	14730.45
6. %80	0.0008	19958	19644.08
7. %100	0.0010	24459	24557.71
8. %120	0.0012	29303	29471.34
Eğim:		24568135.8791	
Kesişim:		10.4268	
Korelasyon katsayısı (r):		0.9999	
Determinasyon katsayısı R ² :		0.9998	
y = mx + n:		24568135.8791x - 10.4268	



Şekil 26: Safsızlık F için Doğrusallık Grafiği

Tablo 31: Lansoprazol için Doğrusallık Tablosu

Değişim Seviyesi	Lansoprazol Derişimi (mg/mL)	3 Enjeksiyon Ortalaması	Denklemden Hesaplanan Alan
1. LOQ	0.000046	1451	1595.56
2. %10	0.0002	4545	4536.92
3. %20	0.0004	8174	8356.86
4. %40	0.0008	16049	15996.75
5. %60	0.0012	23902	23636.64
6. %80	0.0016	31772	31276.53
7. %100	0.0020	38641	38916.42
8. %120	0.0024	46338	46556.31
		Eğim: 19099725.8153 Kesişim: 716.9713 Korelasyon katsayısı (r): 0.9998 Determinasyon katsayısı R ² : 0.9997 y = mx + n: 19099725.8153x + 716.9713	



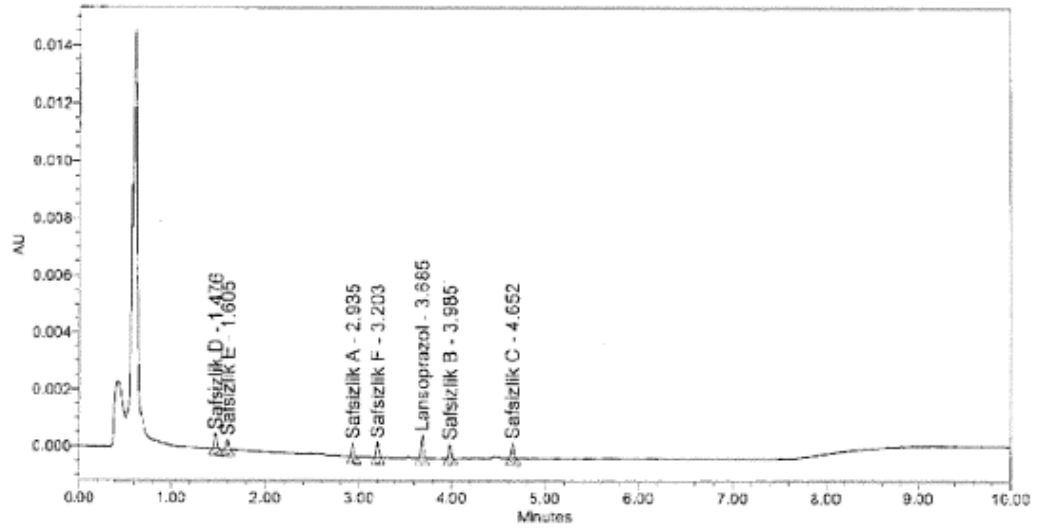
Şekil 27: Lansoprazol için Doğrusallık Grafiği

4.1.6.1. Kriter

Her bir safsızlık ve etken madde için çizilen doğrusallık grafiklerinde korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 olmalıdır. Ayrıca kesişim değerleri, %100'lük derişim seviyesindeki analit için elde edilen alanın %2.0'sinden fazla olmamalıdır.

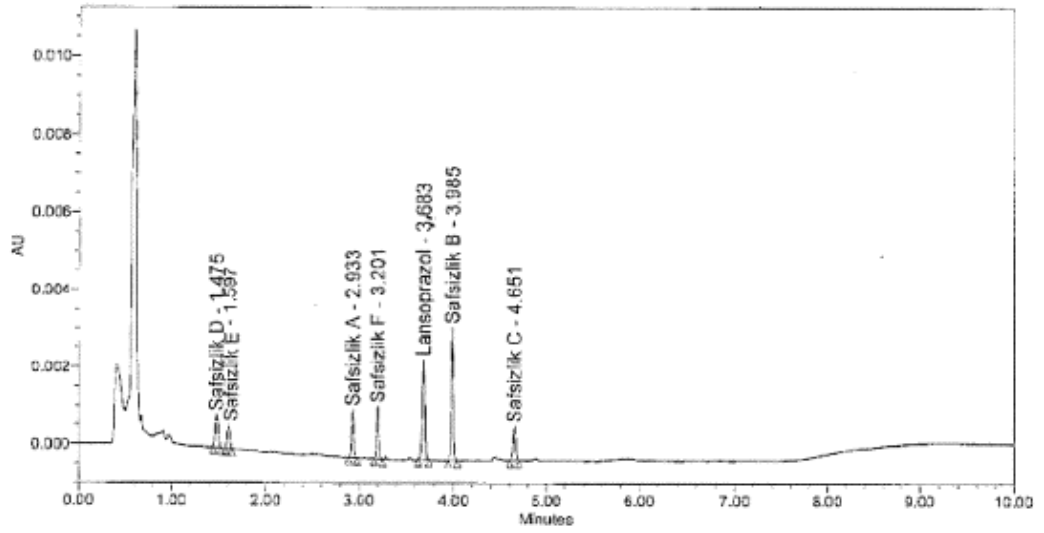
4.1.6.2. Sonuç

Her bir safsızlık ve etken madde için çizilen doğrusallık grafiklerinde korelasyon katsayıları 0.995 değerinden büyüktür. Ayrıca kesişim değerleri, %100'lük derişim seviyesindeki analit için elde edilen alanın %2.0'sinden fazla değildir.



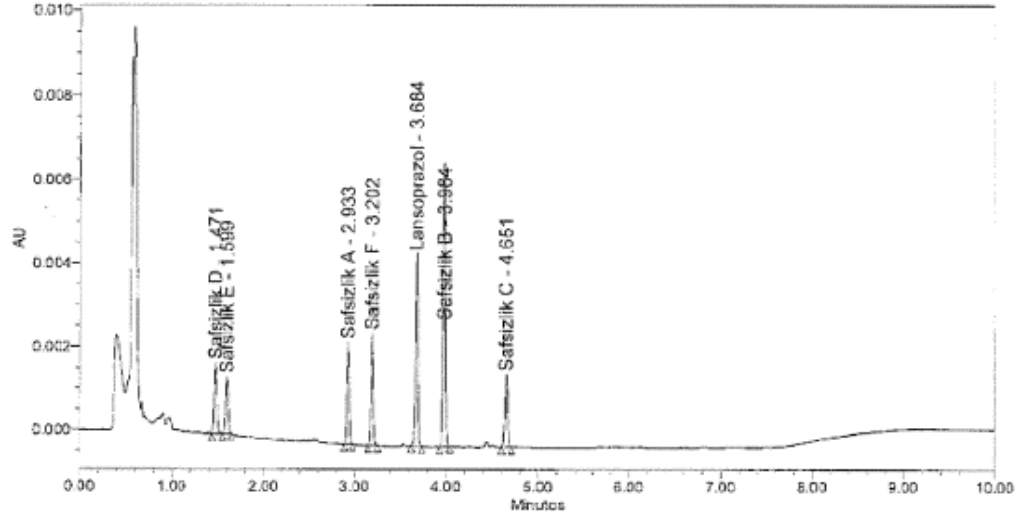
	Peak Name	RT	Area
1	Safsızlık D	1.476	1114
2	Safsızlık E	1.605	1104
3	Safsızlık A	2.935	819
4	Safsızlık F	3.203	973
5	Lansoprazol	3.685	1451
6	Safsızlık B	3.985	949
7	Safsızlık C	4.652	1165

Şekil 28: LOQ Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



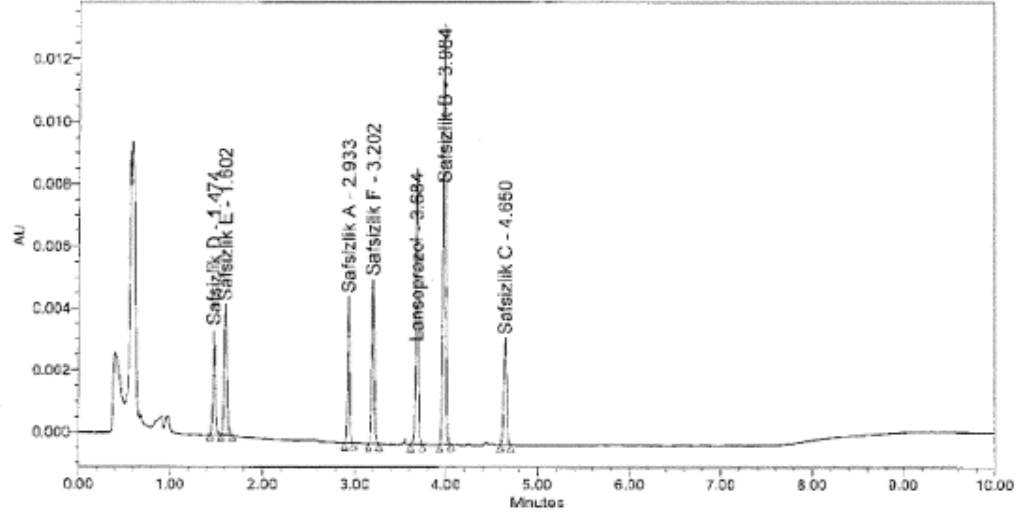
	Peak Name	RT	Area
1	Safsızlık D	1.475	1738
2	Safsızlık E	1.597	4117
3	Safsızlık A	2.933	2057
4	Safsızlık F	3.201	2406
5	Lansoprazol	3.683	4545
6	Safsızlık B	3.985	6136
7	Safsızlık C	4.651	1932

Şekil 29: %10 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



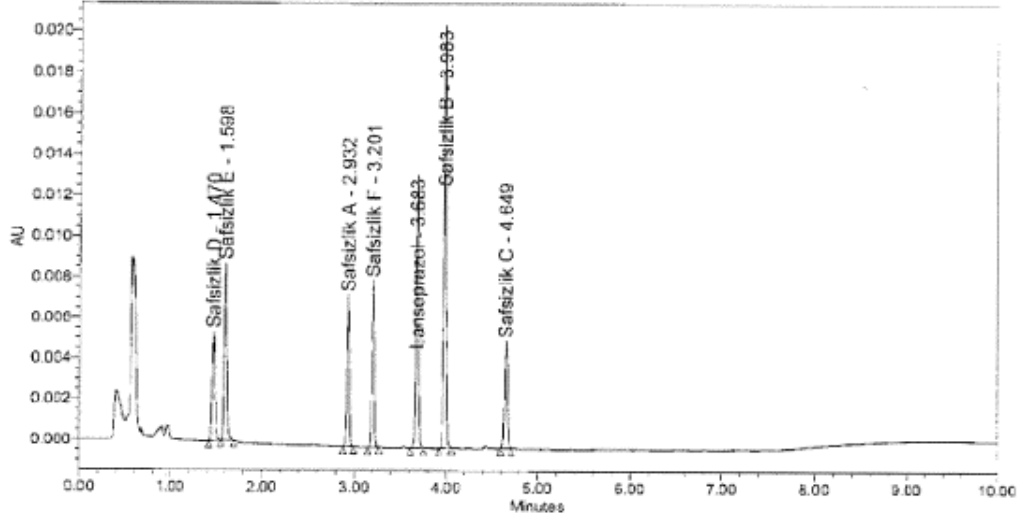
Peak Name	RT	Area
1 Safsızlık D	1.471	3583
2 Safsızlık E	1.599	7942
3 Safsızlık A	2.933	4075
4 Safsızlık F	3.202	4867
5 Lansoprazol	3.664	8174
6 Safsızlık B	3.964	12246
7 Safsızlık C	4.651	3626

Şekil 30: %20 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



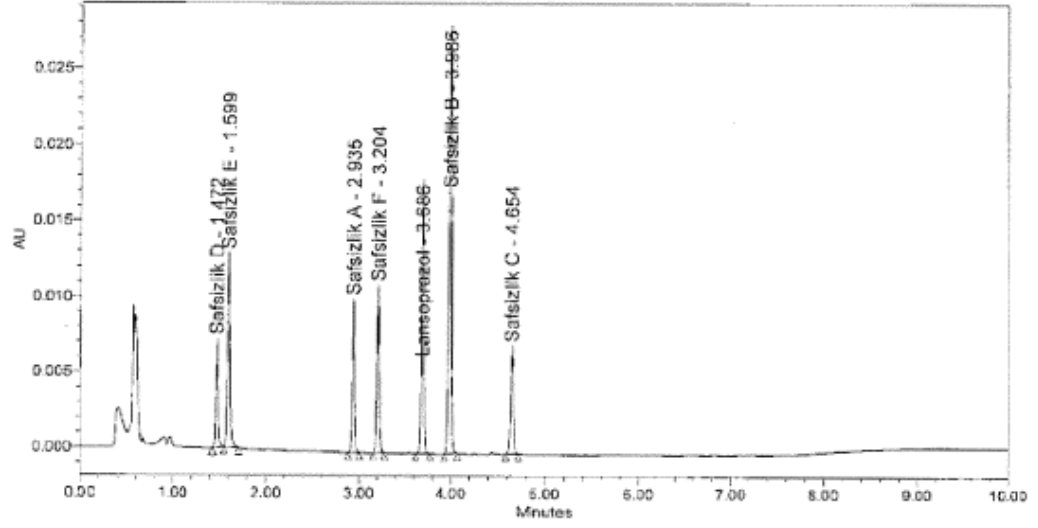
Peak No	RT	Area
1	Safsizlik D - 1.474	7163
2	Safsizlik E - 1.602	16461
3	Safsizlik A - 2.933	8256
4	Safsizlik F - 3.202	9605
5	Lansoprazol - 3.684	16049
6	Safsizlik B - 3.984	24773
7	Safsizlik C - 4.650	7681

Şekil 31: %40 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



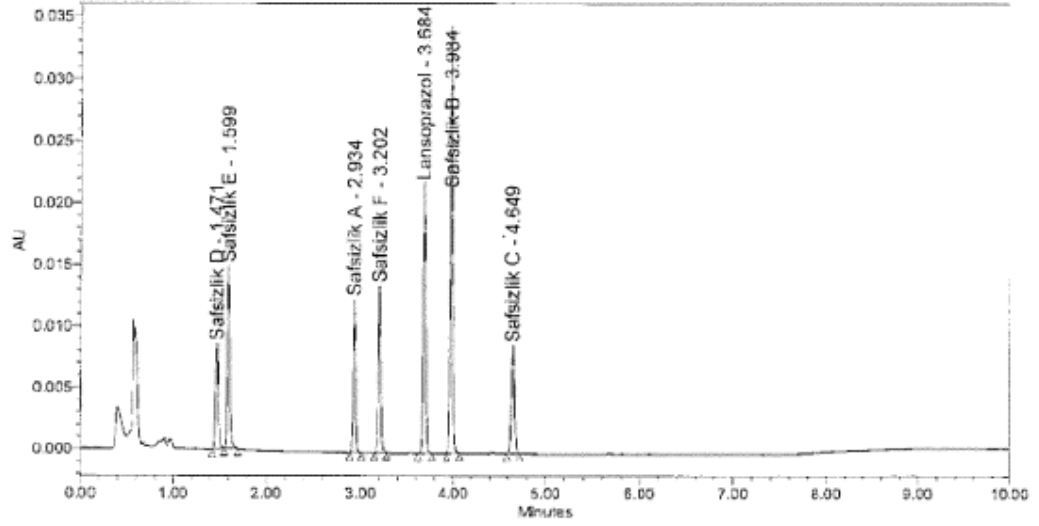
	Peak Name	RT	Area
1	Safsizlik D	1.470	10777
2	Safsizlik E	1.598	25097
3	Safsizlik A	2.932	12526
4	Safsizlik F	3.201	14845
5	Lansoprazol	3.683	23902
6	Safsizlik B	3.983	37546
7	Safsizlik C	4.649	11578

Şekil 32: %60 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



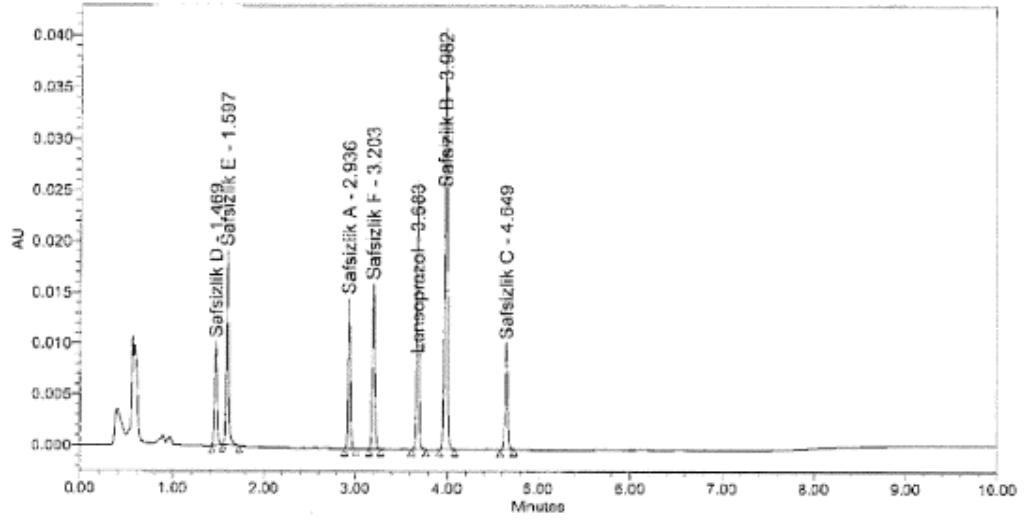
	Peak Name	RT	Area
1	Safsızlık D	1.472	14653
2	Safsızlık E	1.599	32341
3	Safsızlık A	2.935	16902
4	Safsızlık F	3.204	19958
5	Lansoprazol	3.686	31772
6	Safsızlık B	3.986	50627
7	Safsızlık C	4.654	15586

Şekil 33: %80 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



Peak Name	RT	Area
1 Safsızlık D	1.471	17743
2 Safsızlık E	1.599	39724
3 Safsızlık A	2.934	20716
4 Safsızlık F	3.202	24459
5 Lansoprazol	3.684	38641
6 Safsızlık B	3.984	62062
7 Safsızlık C	4.649	19014

Şekil 34: %100 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı



	Pek Name	RT	Area
1	Safsızlık D	1.469	21174
2	Safsızlık E	1.597	48471
3	Safsızlık A	2.936	24606
4	Safsızlık F	3.203	29303
5	Lansoprazol	3.683	46338
6	Safsızlık B	3.982	74175
7	Safsızlık C	4.649	22831

Şekil 35: %120 Seviyesinde Doğrusallık Kromatogramı

4.1.7. Teşhis Limiti/Tayin Alt Limiti (LOD/LOQ)

Duyarlılık; analit miktarı sürekli olarak azaltılırken, yöntemin verdiği cevabın hassasiyetinin bir ölçüsüdür. Teşhis limiti (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) duyarlılık analizleri için kullanılan terimlerdir.^{20, 21, 22}

Teşhis limiti, çözelti içerisindeki analitin teşhis edilebildiği en az miktardır. Bir başka deyişle, analitin, boş örnekten (blank) istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olan en düşük derişim düzeyidir. Genellikle bu seviyelerde güvenilir, kantitatif sonuçlar elde edilmez.

Tayin alt limiti ise, çözelti içerisindeki etken maddenin kantitatif olarak tayin edilebildiği minimum miktardır. Bu miktar, analiz koşullarında, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip en düşük derişimdeki madde miktarıdır.

Teşhis limiti ve tayin alt limitinin belirlenmesi etken madde ve bitmiş ürün safsızlık tayini analizlerinde önemli rol oynar.

4.1.7.1. Sinyal/Gürültü Oranı

Bu uygulama sadece zemin gürültüsü olan analitik yöntemlerde uygulanabilir. İncelenen maddenin bilinen düşük derişimde bir çözeltisinin sinyali ile kör numunenin sinyalinin mukayese edilmesi sonucunda, incelenen maddenin teşhis edilebilecek en düşük derişimi hesaplanır. İlgili cihaz yazılımı kullanılarak sinyal/gürültü oranı hesaplatılır. Teşhis limiti için 2:1 veya 3:1 sinyal/gürültü oranı kabul edilebilir orandır. Tayin limiti için ise 10:1 kabul edilebilir orandır.¹³

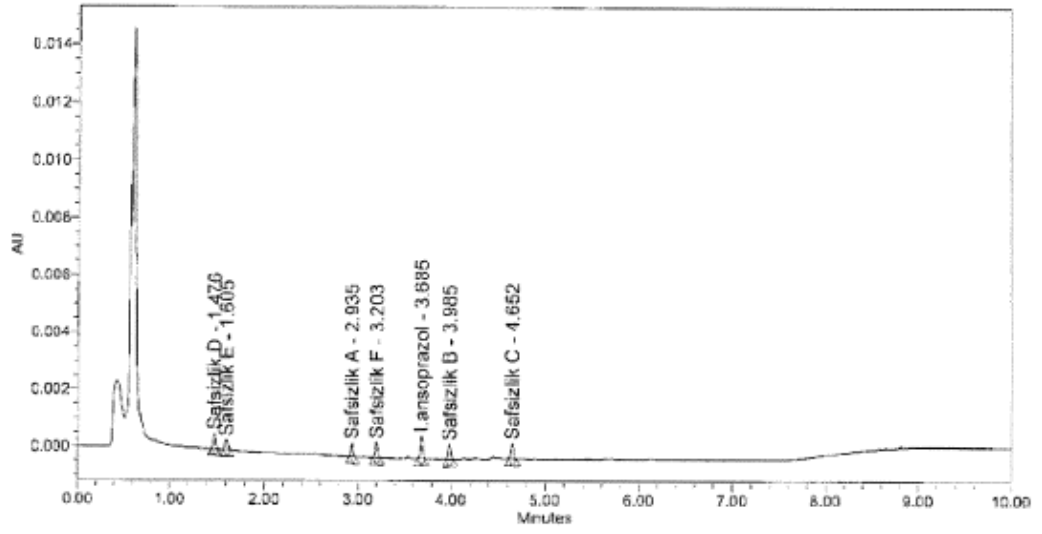
Çalışmada her bir analit için teşhis ve tayin limiti aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Teşhis Limiti (mg/mL)} = \frac{3 \times \text{Derişim}}{\text{Sinyal/Gürültü Oranı}}$$

$$\text{Tayin Alt Limiti (mg/mL)} = \frac{10 \times \text{Derişim}}{\text{Sinyal/Gürültü Oranı}}$$

Tablo 32: Teşhis Limiti/Tayin Limiti Tablosu

	Derişim (mg/mL)	Sinyal/Gürültü Oranı	Teşhis Limiti (LOD) (mg/mL)	Tayin Alt Limiti (LOQ) (mg/mL)	Teşhis Limiti (LOD) (%)	Tayin Alt Limiti (LOQ) (%)	Tayin Alt Limiti Seviyesinde Sinyal/Gürültü Oranı
Safsızlık A	0.001	237.83	0.000013	0.000042	0.0013	0.0042	9.117
Safsızlık B	0.004	629.04	0.000019	0.000064	0.0019	0.0064	10.111
Safsızlık C	0.001	152.57	0.000020	0.000066	0.0020	0.0066	10.312
Safsızlık D	0.001	137.66	0.000022	0.000073	0.0022	0.0073	10.089
Safsızlık E	0.001	343.09	0.0000087	0.000029	0.00087	0.0029	8.296
Safsızlık F	0.001	232.06	0.000013	0.000043	0.0013	0.0043	10.433
Lansoprazol	0.002	437.20	0.000014	0.000046	0.0014	0.0046	15.735



	Peak Name	RT	Area	FP s/n
1	Safsızlık D	1.476	1114	10.089251
2	Safsızlık E	1.605	1104	8.295827
3	Safsızlık A	2.935	819	9.116933
4	Safsızlık F	3.203	973	10.432966
5	Lansoprazol	3.685	1451	15.734582
6	Safsızlık B	3.985	949	10.110936
7	Safsızlık C	4.652	1165	10.311910

Şekil 36: LOQ Seviyesinde Sinyal/Gürültü Oranı Kromatogramı

4.1.8. Sağlamlık

Sağlamlık testinin amacı; analit veya analitlerle ilgili olarak örnek toplama ve analiz işlemleri süresince, depolama, örnek hazırlama ve analiz esnasında oluşabilecek herhangi bir bozulmanın saptanmasıdır. Bütün bu işlemler analitik yöntemin validasyonu çalışmaları esnasında yapılır.²³

Diğer bir ifadeyle; bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinde planlı küçük değişiklikler yapıldığında, etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsü ve normal kullanımı sırasındaki kararlılığı olarak ifade edilebilir. Sağlamlık parametresi, bu yöntemle yapılan analizlerin güvenilirliğini göstermelidir. Eğer yapılan ölçümler, analitik koşullardaki değişikliklere karşı duyarlı ise, analitik koşullar uygun şekilde kontrol altına alınmalı ya da yöntem içersine uyarıcı bir ifade eklenmelidir.

Sağlamlığın değerlendirilmesi, bir seri sistem uygunluk parametresinin sağlandığının gösterilmesiyle yapılmalıdır. Böylece analitik yöntemin, her uygulandığı için valide olduğu ifade edilmelidir.

Sağlamlık testinde yapılabilecek tipik değişiklikler, kullanılan çözeltilerin stabilitesi veya sıvı kromatografi teknikleri için hareketli faz pH'ının değişikliği, hareketli faz kompozisyonunun değişikliği, farklı kolon kullanımı, sıcaklık ve hareketli fazın akış hızı gibi parametreler olabilir.¹³

Çalışmada, analitik yöntemin sağlamlığını ispat etmek için çözelti stabilitesi ve kromatografik parametre değişikliği çalışmaları yapılmış olup, elde edilen sonuçlar ilgili tablolarda gösterilmiştir:

4.1.8.1. Çözelti stabilitesi

Bu test için, her bir safsızlığın limit derişiminde ilave edildiği test çözeltisi ve referans çözelti hazırlanarak, bu çözeltiler, hazırlanışının hemen sonrasında ayrıca 6, 12 ve 36 saat sonra UPLC cihazına enjekte edilmiştir. Çözeltiler bu zaman sürecinde buzdolabı koşullarında bekletilmiştir. 6, 12 ve 36 saat sonra etken madde ve safsızlıklardan elde edilen pik alanları ile başlangıçta elde edilen pik alanları arasındaki sapma hesaplanmıştır.¹³ Sapma değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Sapma (\%)} = \frac{(D_t - D_i)}{D_i} \times 100$$

D_t : Herhangi bir t zamanında bulunan pik alanı

D_i : Başlangıçta bulunan pik alanı

Tabloda görülen pozitif sonuçlar, sapmanın artış yönünde olduğunu, negatif sonuçlar ise sapmanın azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 33: Çözelti Stabilitesi Tablosu

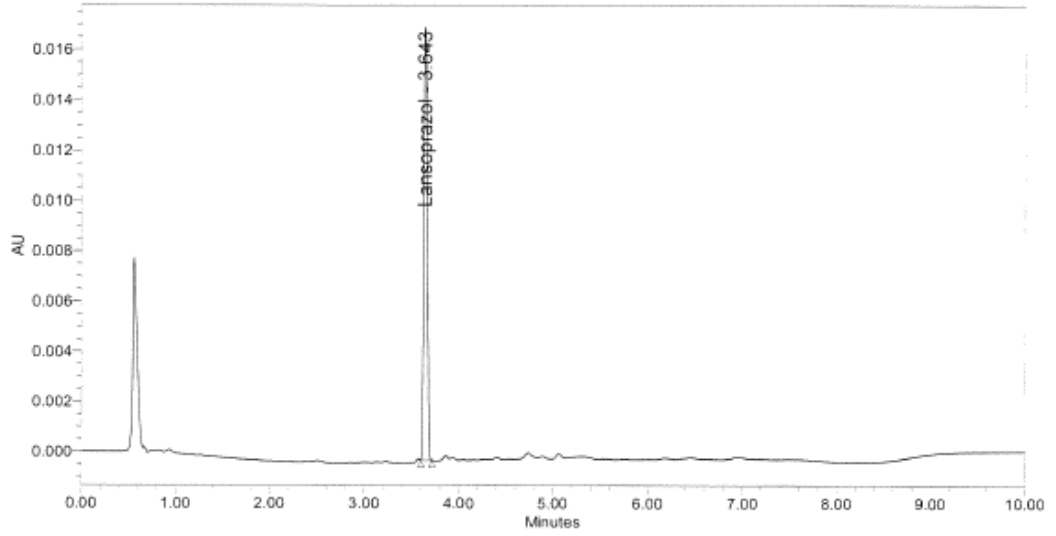
	Başlangıç	6. Saat	Sapma (%)	12. saat	Sapma (%)	36. Saat	Sapma (%)
Safsızlık A Pik Alanı	25427	25452	0.098	25804	1.483	25868	1.734
Safsızlık B Pik Alanı	130433	130373	-0.046	132661	1.708	137025	5.054
Safsızlık C Pik Alanı	27317	27206	-0.406	28054	2.698	28170	3.123
Safsızlık D Pik Alanı	18042	17999	-0.238	18013	-0.161	17821	-1.225
Safsızlık E Pik Alanı	52950	52960	0.019	51707	-2.348	52407	-1.026
Safsızlık F Pik Alanı	26846	26894	0.179	24896	-7.264	24516	-8.679
Lansoprazol Pik Alanı	41851	41771	-0.191	41694	-0.375	41872	0.050

4.1.8.1.1. Kriter

Başlangıç pik alanlarından sapma %10.0'dan fazla olmamalıdır.

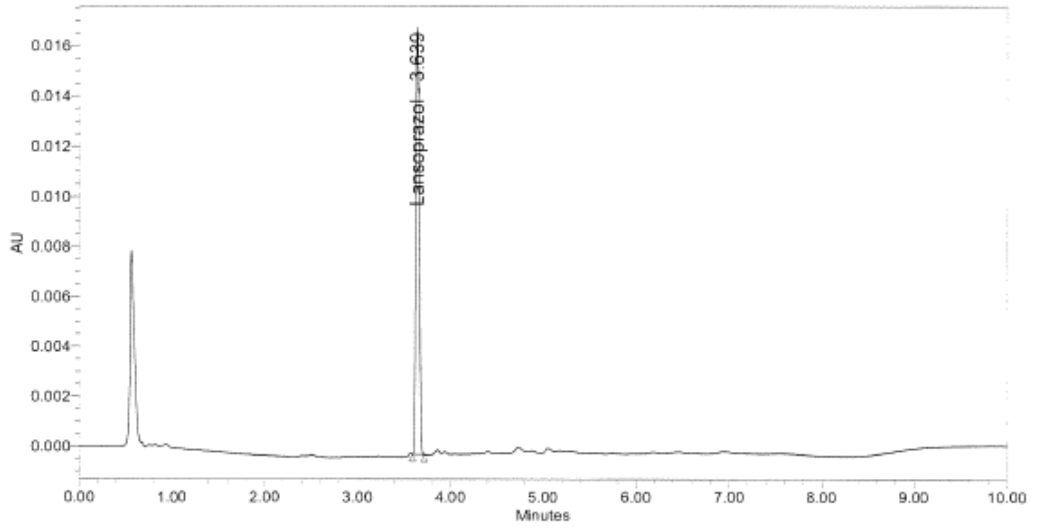
4.1.8.1.2. Sonuç

Başlangıç pik alanlarından sapma %10.0'dan fazla değildir.



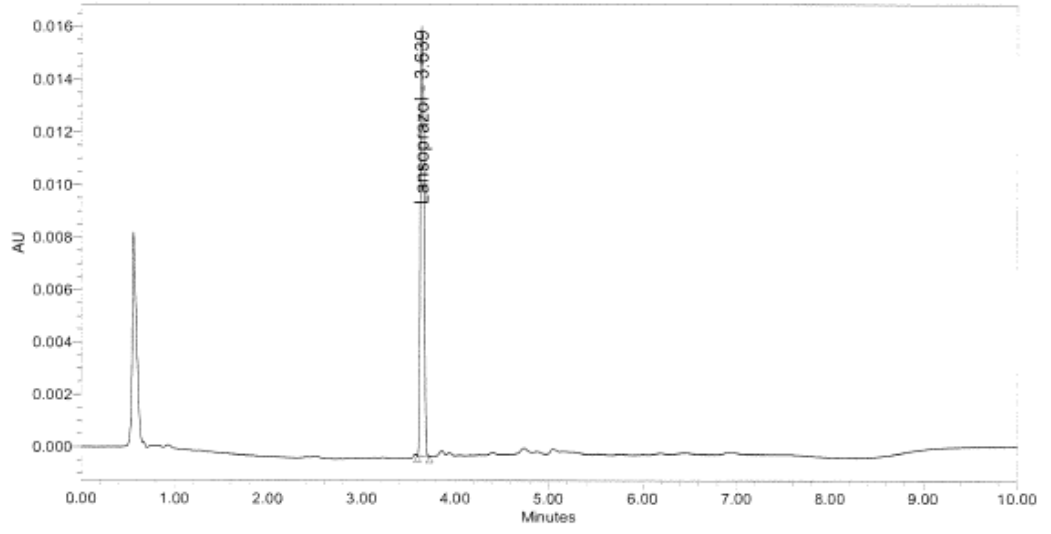
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsızlık D	1.456			
2	Safsızlık E	1.575			
3	Safsızlık A	2.863			
4	Safsızlık F	3.127			
5	Lansoprazol	3.643	41851	100.00	17213
6	Safsızlık B	3.923			
7	Safsızlık C	4.633			

Şekil 37: Çözelti Stabilitesi Başlangıç Kromatogramı (1)



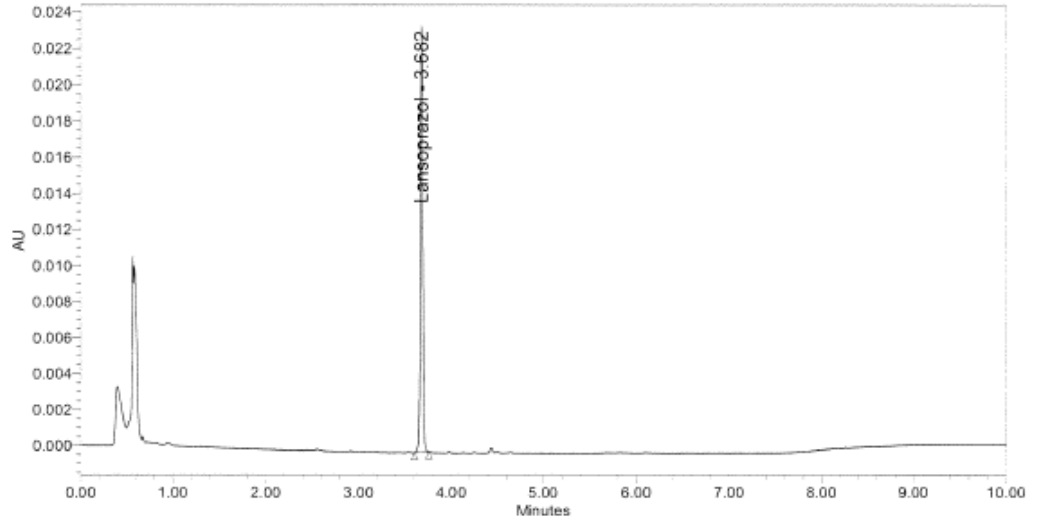
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.456			
2	Safsizlik E	1.575			
3	Safsizlik A	2.863			
4	Safsizlik F	3.127			
5	Lansoprazol	3.639	41771	100.00	17040
6	Safsizlik B	3.923			
7	Safsizlik C	4.633			

Şekil 38: Çözelti Stabilitesi 6. Saat Kromatogramı (1)



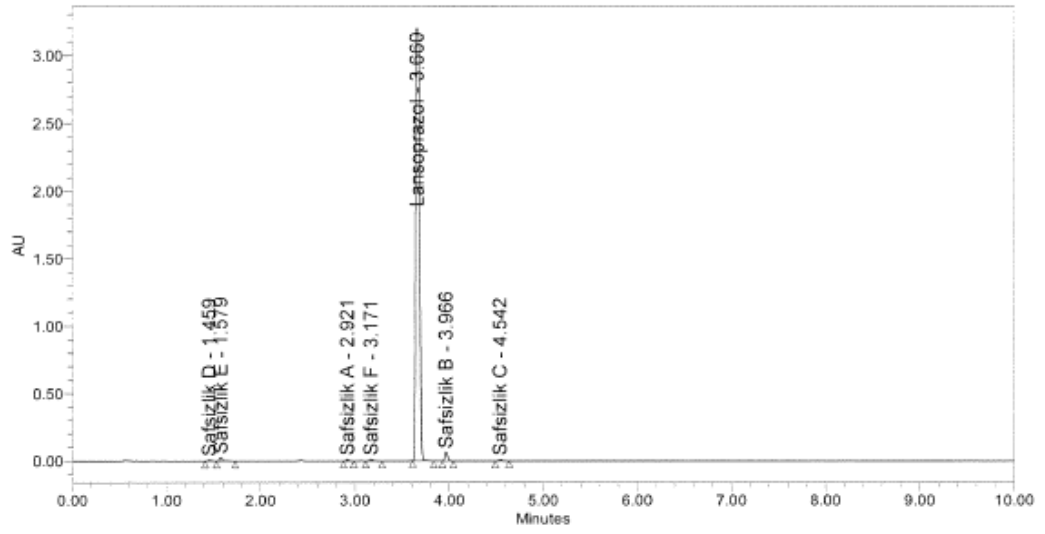
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.456			
2	Safsizlik E	1.575			
3	Safsizlik A	2.863			
4	Safsizlik F	3.127			
5	Lansoprazol	3.639	41694	100.00	16340
6	Safsizlik B	3.923			
7	Safsizlik C	4.633			

Şekil 39: Çözelti Stabilitesi 12. Saat Kromatogramı (1)



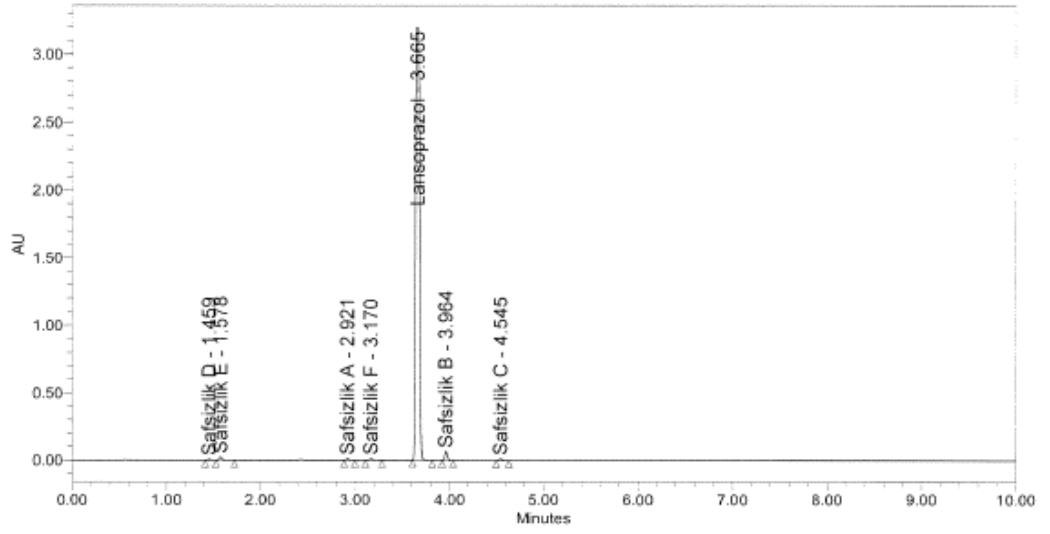
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.456			
2	Safsizlik E	1.575			
3	Safsizlik A	2.863			
4	Safsizlik F	3.127			
5	Lansoprazol	3.682	41872	100.00	23581
6	Safsizlik B	3.923			
7	Safsizlik C	4.633			

Şekil 40: Çözelti Stabilesi 36. Saat Kromatogramı (1)



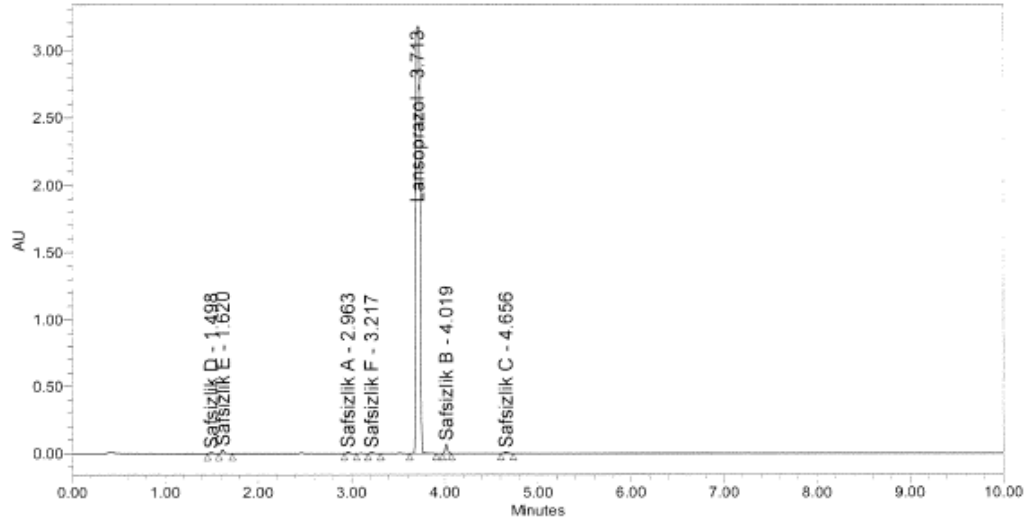
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.459	18042	0.17	8464
2	Safsizlik E	1.579	52950	0.51	24877
3	Safsizlik A	2.921	25427	0.25	13449
4	Safsizlik F	3.171	26846	0.26	12263
5	Lansoprazol	3.660	10096441	97.29	3196865
6	Safsizlik B	3.966	130433	1.26	64435
7	Safsizlik C	4.542	27317	0.26	11529

Şekil 41: Çözelti Stabilitesi Başlangıç Kromatogramı (2)



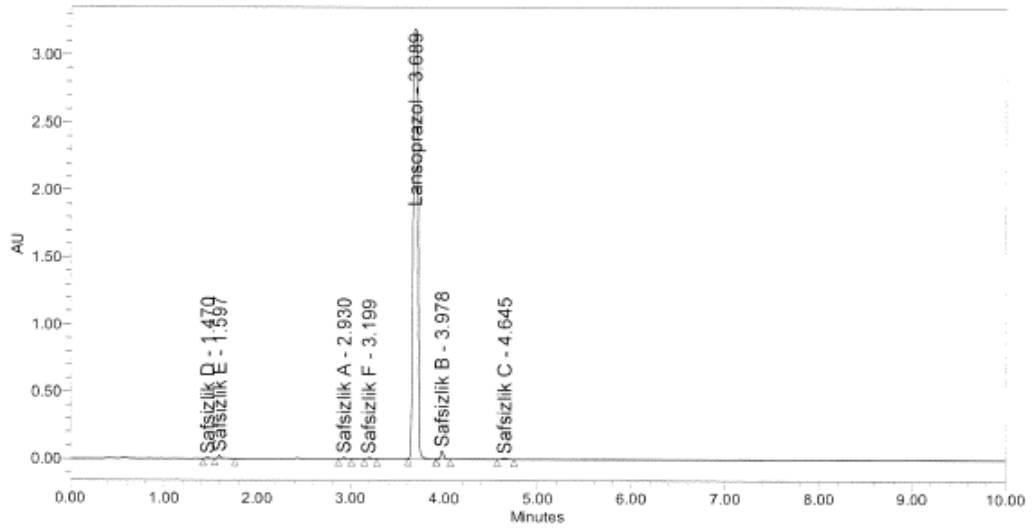
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.459	17999	0.18	7938
2	Safsizlik E	1.578	52960	0.53	23001
3	Safsizlik A	2.921	25452	0.26	13798
4	Safsizlik F	3.170	26894	0.27	12489
5	Lansoprazol	3.665	9698806	97.19	3195148
6	Safsizlik B	3.964	130373	1.31	66274
7	Safsizlik C	4.545	27206	0.27	11934

Şekil 42: Çözelti Stabilitesi 6. Saat Kromatogramı (2)



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsızlık D	1.498	18013	0.19	9047
2	Safsızlık E	1.620	51707	0.54	26699
3	Safsızlık A	2.963	25804	0.27	14615
4	Safsızlık F	3.217	24896	0.26	12752
5	Lansoprazol	3.713	9359833	97.08	3174657
6	Safsızlık B	4.019	132661	1.38	67477
7	Safsızlık C	4.656	28054	0.29	11796

Şekil 43: Çözelti Stabilitesi 12. Saat Kromatogramı (2)



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.470	17821	0.15	7950
2	Safsizlik E	1.597	52407	0.45	22219
3	Safsizlik A	2.930	25868	0.22	12219
4	Safsizlik F	3.199	24516	0.21	10603
5	Lansoprazol	3.689	11258650	97.52	3189584
6	Safsizlik B	3.978	137025	1.19	59914
7	Safsizlik C	4.645	28170	0.24	10183

Şekil 44: Çözelti Stabilitesi 36. Saat Kromatogramı (2)

4.1.8.2. Kromatografik Parametre Değişikliği

Bu test için, her bir safsızlığın limit konsantrasyonda ilave edildiği test çözeltisi hazırlanarak, bu çözelti öncelikle yönteme ait kromatografik şartlarda, sonra sırasıyla hareketli fazın kompozisyonu, kolon sıcaklığı ve akış hızı parametreleri değiştirilerek enjekte edilmiştir. Aynı anda sadece bir adet kromatografik parametre değiştirilmiş olup, diğer parametreler sabit bırakılmıştır.

4.1.8.2.1. Hareketli Fazın Kompozisyonu

0.010M NaH_2PO_4 içeren hareketli faz A'nın derişimi 0.0105M olarak değiştirilerek, orijinal yöntem koşullarına göre karşılaştırma yapılmıştır.

4.1.8.2.2. Kolon Sıcaklığı

25°C olan kolon sıcaklığı, 26°C'ye yükseltilerek, orijinal yöntem koşullarına göre karşılaştırma yapılmıştır.

4.1.8.2.3. Akış Hızı

0.400 mL/dk. olan hareketli faz akış hızı, 0.405 mL/dk.'ya yükseltilerek, orijinal yöntem koşullarına göre karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 34: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (1)

	Başlangıç (0.010M NaH₂PO₄)	Değişim (0.0105M NaH₂PO₄)	Sapma (%)
Safsızlık A Pik Alanı	25427	25877	1.770
Safsızlık B Pik Alanı	130433	132374	1.488
Safsızlık C Pik Alanı	27317	27437	0.439
Safsızlık D Pik Alanı	18042	17998	-0.244
Safsızlık E Pik Alanı	52950	51772	-2.225
Safsızlık F Pik Alanı	26846	24916	-7.189

Tablo 35: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (2)

	Başlangıç (25°C)	Değişim (26°C)	Sapma (%)
Safsızlık A Pik Alanı	25427	25275	-0.598
Safsızlık B Pik Alanı	130433	126113	-3.312
Safsızlık C Pik Alanı	27317	26736	-2.127
Safsızlık D Pik Alanı	18042	17956	-0.478
Safsızlık E Pik Alanı	52950	51339	-3.042
Safsızlık F Pik Alanı	26846	26001	-3.148

Tablo 36: Kromatografik Parametre Değişikliği Tablosu (3)

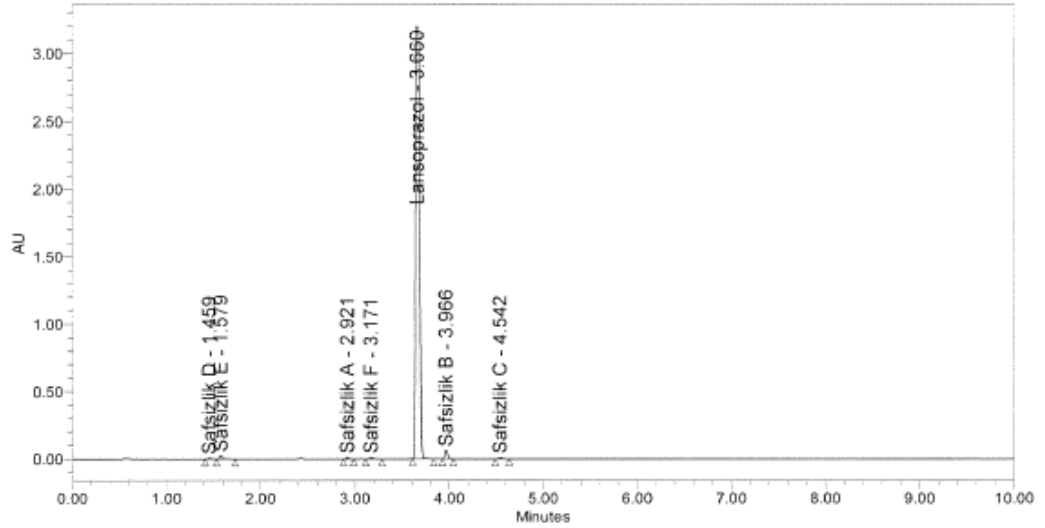
	Başlangıç (0.400 mL/dk.)	Değişim (0.405 mL/dk.)	Sapma (%)
Safsızlık A Pik Alanı	25427	25451	0.094
Safsızlık B Pik Alanı	130433	124555	-4.507
Safsızlık C Pik Alanı	27317	26437	-3.221
Safsızlık D Pik Alanı	18042	17772	-1.497
Safsızlık E Pik Alanı	52950	49895	-5.770
Safsızlık F Pik Alanı	26846	25966	-3.278

4.1.8.2.4. Kriter

Başlangıç pik alanlarından sapma %10.0'dan fazla olmamalıdır.

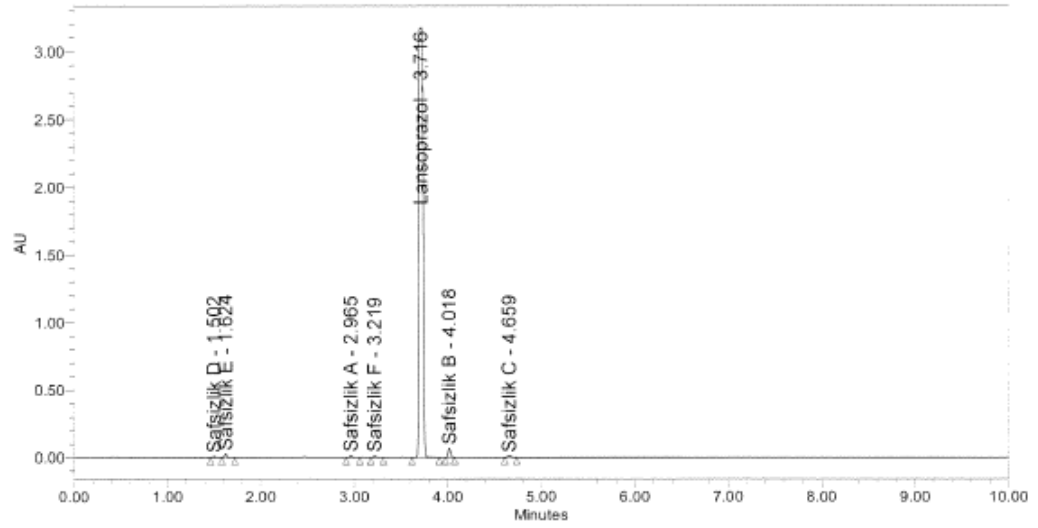
4.1.8.2.5. Sonuç

Başlangıç pik alanlarından sapma %10.0'dan fazla değildir.



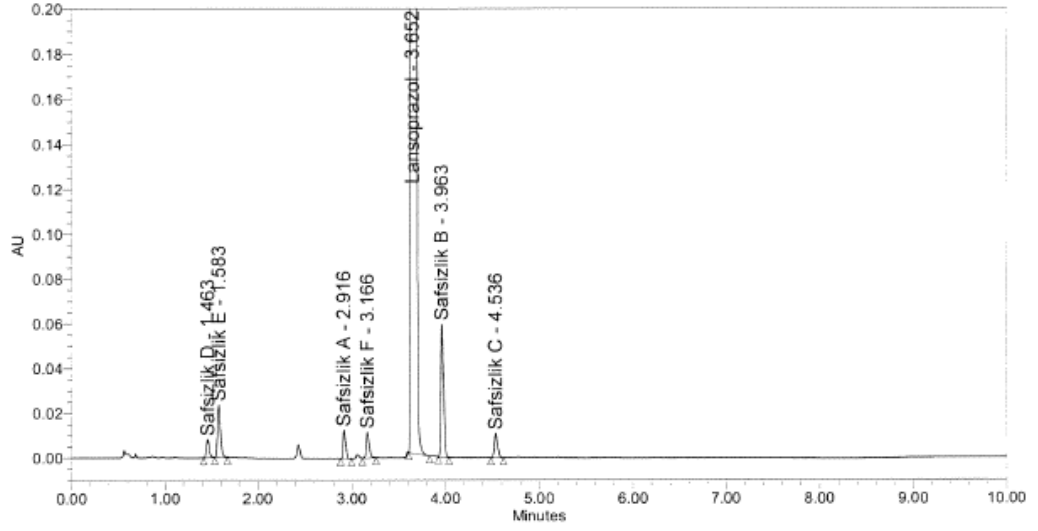
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.459	18042	0.17	8464
2	Safsizlik E	1.579	52950	0.51	24877
3	Safsizlik A	2.921	25427	0.25	13449
4	Safsizlik F	3.171	26846	0.26	12263
5	Lansoprazol	3.660	10096441	97.29	3196865
6	Safsizlik B	3.966	130433	1.26	64435
7	Safsizlik C	4.542	27317	0.26	11529

Şekil 45: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (1)



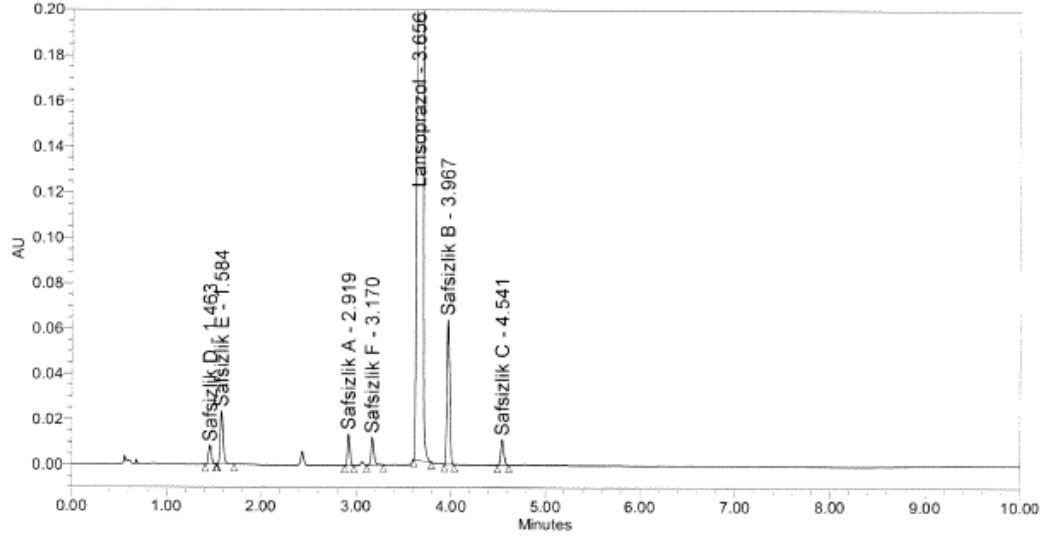
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.502	17998	0.19	9044
2	Safsizlik E	1.624	51772	0.53	26718
3	Safsizlik A	2.965	25877	0.27	14491
4	Safsizlik F	3.219	24916	0.26	12643
5	Lansoprazol	3.716	9405008	97.11	3174898
6	Safsizlik B	4.018	132374	1.37	66928
7	Safsizlik C	4.659	27437	0.28	11575

Şekil 46: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (2)



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.463	17956	0.17	8108
2	Safsizlik E	1.583	51339	0.48	23487
3	Safsizlik A	2.916	25275	0.24	12937
4	Safsizlik F	3.166	26001	0.24	11734
5	Lansoprazol	3.652	10372762	97.43	3203469
6	Safsizlik B	3.963	126113	1.18	59617
7	Safsizlik C	4.536	26736	0.25	10937

Şekil 47: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (3)



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Safsizlik D	1.463	17772	0.17	8245
2	Safsizlik E	1.584	49895	0.49	23633
3	Safsizlik A	2.919	25451	0.25	14174
4	Safsizlik F	3.170	25966	0.25	12488
5	Lansoprazol	3.656	9923046	97.35	3205538
6	Safsizlik B	3.967	124555	1.22	64061
7	Safsizlik C	4.541	26437	0.26	11466

Şekil 48: Kromatografik Parametre Değişikliği Kromatogramı (4)

5. TARTIŞMA

Lansoprazol içeren farmasötik preparatlar, duodenal ülser, gastrik ülser, reflü özofajit, patolojik hipersekresyon ve helicobacter pylori infeksiyonu ile birlikte görülen duodenal ülser tedavisinde kullanılırlar. Bu ilaçların rutin analizleri üretim ve kalite kontrol aşamasında yapılmaktadır. Kalite kontrol laboratuvarlarında, hızlı uygulanabilen, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar veren tayin yöntemlerine ihtiyaç vardır. “Avrupa Farmakopesi” ve diğer kaynaklarda lansoprazol etken maddesine ait safsızlıkların HPLC cihazıyla tayin edildiği yöntemlere rastlamak mümkündür. Ancak safsızlık tayin yöntemlerinin analiz sürelerinin uzunluğu ve analiz sırasında harcanan solvan miktarlarının yüksek olduğu düşünüldüğünde, safsızlıkların tayini için daha kısa sürede, doğru ve tekrarlanabilir sonuç veren analitik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kaynaklarda lansoprazol etken maddesine ait ilgili bileşikler testinin, HPLC'ye kıyasla daha kısa sürede tayin yapılabilen UPLC cihazıyla yapılmış ve valide edilmiş analiz yöntemine rastlanmaması, bu çalışmaya yönelmede etkili olmuştur.

UPLC cihazı kullanılarak valide edilmiş olan bu yöntem için, öncelikle “Avrupa Farmakopesi” 7.2 monografında belirtilen lansoprazol ilgili bileşikler yöntemine ait pH 6.2 trietilamin tampon çözeltisi ile asetonitril karışımı (60:40) şeklinde hazırlanan hareketli faz, izokratik akış kullanılarak denenmiştir. Ancak alıkonma sürelerini ve ayrışma optimizasyonunu daha iyi ayarlamak adına izokritik akış olan bu yöntem, gradient akışa dönüştürülmüştür.

Gradient akışla yapılan denemelerde ise, pH 6.2 trietilamin tampon çözeltisinin zemin sinyalinin ciddi derecede etkilediği ve tayin edilecek analitler ile girişim yaptığı saptanarak, bu tampon çözelti yerine, çeşitli denemelerin sonunda, daha düzgün zemin sinyali verdiğini ve

girişime sebep olmadığını belirlediğimiz 0.010M NaH₂PO₄ çözeltisinin kullanımının uygun olduğu saptanmıştır.

“Avrupa Farmakopesi” ilgili bileşikler testinde, HPLC cihazı için belirtilmiş olan 1.2 mL/dak.’lık hareketli faz akış hızı ile UPLC cihazında çalışmak mümkün değildir. Çünkü HPLC cihazına göre daha dar çaplı boru sistemine sahip olan ve kolon dolgu maddesi partikül çapı çok daha küçük olan UPLC sistemlerinde bu derece yüksek akış hızları, cihazın limit basınç seviyesi olan 15000 psi değerini aşmaktadır. Yapılan optimizasyonlar sonucu uygun hareketli faz akış hızı 0.400 mL/dak. olarak tespit edilmiştir.

Öncelikle daha da kısa analiz süresi elde etmek için Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 50 mm boyutunda kolon kullanılan çalışmada, safsızlık D ve safsızlık E pikleri ile lansoprazol ve safsızlık B pikleri arasındaki ayırışma yeteri ölçüde sağlanamadığından dolayı, bu kolona göre daha uzun olan Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 100 mm boyutundaki kolon kullanılmıştır. Sonrasında elde edilen kromatogramlarda gerekli ayırışma ve sistem uygunluk parametrelerinin sağlandığı görülmüştür.

Kapasite faktörünün minimum 1.0 olarak sağlanabilmesi için yapılan optimizasyon işlemlerinde, gradient akış sisteminin başlangıç değeri olan 85:15 tampon-asetonitril oranı uygun bulunmuştur. Bu tampon çözelti yüzdesinden daha düşük oranlarda yapılan enjeksiyonların kapasite faktörü gerekliliğini sağlayamadığı tespit edilmiştir.

Uygun kolon sıcaklığının belirlenmesi için 25°C - 40°C sıcaklık aralığında yapılan denemelerde, 25°C’lik kolon sıcaklığının, gerekli ayırışmanın sağlanabilmesi açısından daha uygun olduğu görülmüştür.

HPLC cihazlarına nazaran, çok daha düşük miktarlarda enjeksiyon yapabilen UPLC cihazının enjeksiyon hacmini belirlemek için, daha iyi geri kazanım ve tekrarlanabilirlik elde edilen 3.0 µL'lik enjeksiyon hacmi tercih edilmiştir.

Lansoprazol etken maddesine ait çözeltilerin oda sıcaklığında daha kısa sürede bozunması ve içerisindeki safsızlık miktarlarının artmasından dolayı, UPLC cihazının otomatik örnekleyici sıcaklığı 10°C'ye düşürülmüştür. Böylece, hazırlanan çözeltilerin UPLC ile analizi sırasında, bekleme süresince yaşanabilecek bozulmanın önüne geçilmiştir.

Kromatografik yöntemle yapılan safsızlık tayinlerinde tanımlı safsızlıkların yanı sıra, bilinmeyen (tanımsız) safsızlıkların da tayin edilebilmesi amacıyla, etken maddenin alıkonma süresinin yaklaşık 3 katı kadar kromatografi süresi gereklidir. Bu sebeple, UPLC cihazı kullanılarak valide edilen bu kromatografik yöntemde yaklaşık 5 dak. içerisinde toplam 7 adet tanımlı safsızlık piki elde edilmesine rağmen, bu gerekliliğe uymak açısından kromatografisi süresi 10 dak. olarak belirlenmiştir.

Optimizasyonlar sonucunda geliştirdiğimiz lansoprazol ilgili bileşikler UPLC yöntemi gerekli olan tüm sistem uygunluk ve ICH validasyon parametrelerinin gerekliliklerini yerine getirmektedir. Ayrıca bu yöntem "Avrupa Farmakopesi" 7.2 monografında önerilen HPLC ile ilgili bileşikler analizi yöntemine göre yaklaşık 2 kat daha kısa sürede safsızlık tayinine imkan sağlamaktadır.⁵

6. SONUÇ

Çalışmada, lansoprazol etken maddesine ait safsızlıkların tayini için UPLC cihazı kullanılarak bir ilgili bileşikler yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Validasyonun seçicilik parametresinde bütün analitler için uygun pik simetri faktörü, teorik plaka sayısı, ayrışma, kapasite ve seçicilik faktörlerinin sağlandığı ve analitlerin alıkonma zamanında çözücü ve diğer bileşenlere ait herhangi bir girişimin olmadığı saptanmıştır.

Düzeltilme faktörü bölümünde, elde edilen doğrusallık grafiklerinin eğiminden yola çıkılarak, her bir safsızlık için düzeltme faktörleri hesaplanmış ve bu faktörler kullanılarak, test çözeltisi içerisindeki safsızlıkların miktarları hesaplanmıştır.

Doğruluk ve geri kazanım testlerinde, ICH rehberinde belirtildiği üzere, yöntemin çalışma aralığını kapsayan dört ayrı derişimde (LOQ, %80, %100 ve %120) geri kazanım çalışması yapılmıştır.¹³ Her bir safsızlık test çözeltisi içerisinde kendi limit derişimi kadar eklenerek, referans çözelti ile karşılaştırıldığında, elde edilen geri kazanım yüzdelerinin limitler içerisinde olduğu görülmüştür.

Kesinlik parametresi için, cihaz kesinliği (enjeksiyon tekrarlanabilirliği) ve ara kesinlik testleri çalışılmıştır. Cihaz kesinliği testinde her bir analit için elde edilen pik alanlarının ve alıkonma zamanlarının bağıl standart sapması belirtilen kriterlere uygundur. Ara kesinlik parametresinde ise analist I ile cihaz I ve analist II ile cihaz II'den elde edilen sonuçların hem kendi içerisinde hem de birbirleri arasında uyumlu olduğu, bağıl standart sapma değerlerinin limitler içerisinde olduğundan anlaşılmıştır.

Doğrusallık çalışmasından elde edilen regresyon doğrularında, her bir safsızlık ve lansoprazol etken maddesi için bulunan korelasyon katsayıları (r) 0.995 değerinden büyüktür. Ayrıca tüm doğrusallık grafiklerindeki kesişim değerleri, %100'lik derişim seviyesinde elde edilen alanların %2.0'sinden büyük değildir. Bu sonuçlara dayanarak, geliştirilen yöntemin her bir analit için LOQ - %120 derişim aralığı içerisinde doğrusal olduğunu söyleyebiliriz.

Tayin alt limiti ve teşhis limiti sinyal/gürültü oranı yaklaşımına göre hesaplanmıştır. Hesaplanan LOQ değerleri doğrusallık verileri içerisinde değerlendirilmiş ve uygunlukları ispatlanmıştır. Elde edilen LOQ değerlerinin oldukça küçük olması yöntemin hassasiyetinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Validasyonun sağlamlık parametresi, çözelti stabilitesi ve kromatografik parametre değışikliğı testleriyle gerçekleştirilmiştir. Çözelti stabilitesi testinde hazırlanan çözeltiler test süresi boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Buzdolabı koşullarında test çözeltilerin 36 saat stabil kalabildiğı gözlemlenmiştir. Kromatografik parametre değışikliğı testinden elde edilen verilere göre ise, analiz sırasında meydana gelebilecek küçük değışikliklerin, sonuçlara etki etmediğı tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm verilerden anlaşıldığı üzere, UPLC cihazı kullanılarak geliştirilen yöntemin lansoprazol etken maddesine ait safsızlıkların tayinini 10 dak. gibi oldukça kısa bir sürede gerçekleştirdiğı görülmektedir. Bunun yanı sıra ICH validasyon rehberinin öngördüğü esaslara göre valide edilen bu yöntemin doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğı ispat edilmiştir.

7. ÖZET

Lansoprazol etken maddesine ait safsızlıkların ultra performanslı sıvı kromatografisi tekniği ile tayini ve tayin yönteminin analitik validasyonu

Bu çalışmada lansoprazol etken maddesinin safsızlıkları için “Avrupa Farmakopesi” 7. baskı referans alınmıştır. Gerekli optimizasyonlar yapılarak belirtilen safsızlıklar için UPLC cihazı kullanılarak bir safsızlık yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Hareketli faz olarak 0.010M NaH₂PO₄ çözeltisi ve Asetonitril ile bir gradient akış sistemi oluşturulmuştur. Waters H-CLASS UPLC cihazı kullanılarak, sabit faz olarak Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm, 2.1 × 100 mm kolon seçilmiştir. Software yardımı ile UV dedektörün dalga boyu 285 nm olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C, otomatik örnekleyici sıcaklığı ise 10°C’dir. Her çözelti için enjeksiyon hacmi 3.0 µL’dir. Çözücü olarak 1 hacim trietilamin ile 60 hacim saf su karıştırılmış, pH değeri %85’lik fosforik asit ile 10.5 ± 0.05’e ayarlanmıştır. Daha sonra bu çözelti 40 hacim asetonitril ile karıştırılmıştır.

Lansoprazol, safsızlık A, safsızlık B, safsızlık C, safsızlık D, safsızlık E ve safsızlık F pikleri için alıkonma zamanları sırasıyla 3.655, 2.915, 3.963, 4.537, 1.462, 1.582 ve 3.165 dak.’dır.

Tayin alt limiti safsızlık A için 0.000042 mg/mL, safsızlık B için 0.000064 mg/mL, safsızlık C için 0.000066 mg/mL, safsızlık D için 0.000073 mg/mL, safsızlık E için 0.000029 mg/mL, safsızlık F için 0.000043 mg/mL’dir.

Elde edilen validasyon sonuçlarına dayanarak, lansoprazol etken maddesinin safsızlıkları için, UPLC cihazı kullanılarak, hızlı, seçici, doğru, tekrarlanabilir ve duyarlı bir tayin yöntemi oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Lansoprazol, safsızlık, ultra performanslı sıvı kromatografisi, validasyon

8. SUMMARY

Determination of impurities of lansoprazole active substance with ultra performance liquid chromatography technique and analytical validation of determination method

In this study, 7th edition of European Pharmacopoeia was taken as a reference for the impurities of lansoprazole. Required optimizations were done and an impurity method was developed and validated for specified impurities by using UPLC device.

A gradient flow system was generated with 0.010M NaH₂PO₄ solution and acetonitrile as a mobile phase. Waters H-CLASS UPLC device was used and Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m, 2.1 $\times$ 100 mm column was selected as a stationary phase. The wavelength was set at 285 nm by the help of software. The column temperature is 25°C, autosampler temperature is 10°C. Injection volume for each solution is 3.0 μ L. As a solvent, 1 volume of triethylamine and 60 volumes of purified water was mixed and pH was adjusted to 10.5 $\pm$ 0.05 with 85% phosphoric acid. Then this solution was mixed with 40 volumes of acetonitrile.

The retention times for lansoprazole, impurity A, impurity B, impurity C, impurity D, impurity E, impurity F are 3.655, 2.915, 3.963, 4.537, 1.462, 1.582 ve 3.165 minutes respectively.

LOQ is 0.000042 mg/mL for impurity A, 0.000064 mg/mL for impurity B, 0.000066 mg/mL for impurity C, 0.000073 mg/mL for impurity D, 0.000029 mg/mL for impurity E, 0.000043 mg/mL for impurity F.

Based on the obtained validation results, a fast, selective, accurate, repeatable and sensitive determination method was generated for the impurities of lansoprazole active substance by using UPLC device.

Key words: Lansoprazole, impurity, ultra performance liquid chromatography, validation

9. KAYNAKLAR

1. Özdemir O, Kayaalp S.O. Peptik Ülser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar, Tıbbi Farmakoloji Kitabı. 11. Basım. Ankara: Hacettepe-Taş Yayıncılık; 2005.
2. Akyol H. Omeprazol, Lansoprazol ve Pantoprazolün Karaciğer Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2005.
3. Lansoprazol(online). 2003(19.05.2011). Available from : URL :
<http://www.bilimilac.com.tr/prospektus/aprazol-30-mg-kapsul-p-12004990-00.pdf>
4. Lanzedin Kapsül(online). 2002(19.05.2011). Available from : URL :
http://www.biofarma.com.tr/pdf/upload/P60_tr.pdf
5. EP, European Pharmacopoeia (monograph on CD-ROM). European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (edqm), 7 th ed. Vol. 2. Strasbourg, France; 2011.
6. Hamilton, R. J. Sewell, P.A. Introduction high performance liquid chromatography, liquid-liquid (partition) chromatography. New York: Chapman and Hall;1977.
7. Billingham N. C. Practical high performance liquid chromatography. J. Eth.Pharm.1976;66:277-282.
8. Lake R. Easy Transfer of HPLC methods to UHPLC. Using fully scalable pinnacle DB columns 2007;4:10-11.
9. Riley C.M., Rosanske T.W. Development and validation of methods. New York: Elsevier Science;1996.

10. Swartz M.E., Krull I.S. Analytical method development and validation. New York: Marcel Dekker; 1997.
11. Vessman J. Selectivity or specificity?. Validation of analytical method from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. J. Pharm. Biomed Anal. 1996: 867-869.
12. Lunte S. M., Radzik D.M. Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis. New York : Elsevier Science; 1996.
13. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (online). 2005(19.05.2011). Available from : URL :
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
14. Adamovics J. A. Chromatographic analysis of pharmaceuticals. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1997.
15. Gazdag M., Szepesi G., Szelecki E. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. I. Optimization for selectivity in reverse-phased chromatography. J. Chromatogr. 1988; 454: 83-94.
16. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products (Online). 2004(19.03.2011) Available from : URL :
http://www.apvma.gov.au/publications/guidelines/docs/gl_69_analytical_methods.pdf
17. Mulholland M., Hibbert D.B. Linearity and the limitations of least squares calibration. J. Chromatogr. 1997; A.762: 73-82.

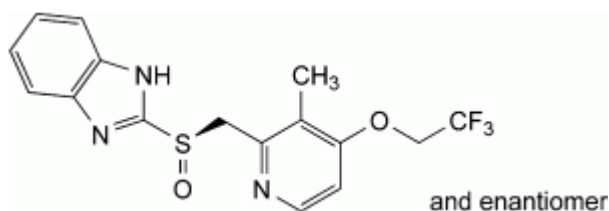
18. Buick A. R., Doig M.V., Jeal S.C., Land G.S., McDowall R.D. Method validation in the bioanalytical laboratory. *J. Pharm. Biomed Anal.* 1990;8:629-637.
19. Causon R., Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J Chromatogr.* 1997; 689: 175-180.
20. Dorsey J. G., Cooper W.T. Liquid chromatography: Theory and methodology. *Anal. Chem.* 1998; 70: 591R-644R.
21. Song Y.K., Maeng J. E., Hwang H.R., Park J.S., Kim B.C., Kim J.K., Kim C.K., Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore high performance liquid chromatography with column switching. *J. Chromatogr.* 2004; 810: 143-149.
22. Vial J., Jardy A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Anal. Chem.* 1999; 71: 2672-2677.
23. Berglund M., Byström K., Persson B., Screening chemical and physical stability of drug substances. *J. Pharm. Biomed Anal.* 1990; 8: 639-643.

10. EKLER

“Avrupa Farmakopesi” 7.2 lansoprazol monografi

LANSOPRAZOLE

Lansoprazolum



$C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$

M_r 369.4

[103577-45-3]

DEFINITION

2-[(*RS*)-[[3-Methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (anhydrous substance).

CHARACTERS

Appearance: white or brownish powder.

Solubility: practically insoluble in water, soluble in anhydrous ethanol, very slightly soluble in acetonitrile.

It shows polymorphism (5.9).

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: lansoprazole CRS.

If the spectra obtained in the solid state show differences, dissolve the substance to be examined and the reference substance separately in

anhydrous ethanol R, evaporate to dryness and record new spectra using the residues.

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution B₂ or BY₂ (2.2.2, Method II).

Dissolve 1.0 g in dimethylformamide R and dilute to 20 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). *Prepare the solutions immediately before use and protect them from light.*

Solvent mixture: mix 1 volume of triethylamine R and 60 volumes of water R and adjust to pH 10.5 with phosphoric acid R; mix this solution with 40 volumes of acetonitrile R1.

Test solution. Dissolve 10 mg of the substance to be examined in the solvent mixture and dilute to 10 mL with the solvent mixture.

Reference solution (a). Dissolve the contents of a vial of lansoprazole for peak identification CRS (containing impurities A and B) in 1.0 mL of the solvent mixture.

Reference solution (b). Dilute 2.0 mL of the test solution to 100.0 mL with the solvent mixture. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with the solvent mixture.

Reference solution (c). Dissolve 5 mg of 2-hydroxybenzimidazole R (impurity D) and 5 mg of 2-mercaptobenzimidazole R (impurity E) in the solvent mixture and dilute to 100 mL with the solvent mixture. Dilute 1 mL of this solution to 10 mL with the solvent mixture.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;
- stationary phase: amidohexadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: mix 1 volume of triethylamine R and 60 volumes of water R and adjust to pH 6.2 with phosphoric acid R; mix this solution with 40 volumes of acetonitrile R1.

Flow rate: 1.2 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 285 nm.

Injection: 10 μ L.

Run time: 3 times the retention time of lansoprazole.

Identification of impurities: use the chromatogram supplied with lansoprazole for peak identification CRS and the chromatogram obtained with reference solution (a) to identify the peaks due to impurities A and B; use the chromatogram obtained with reference solution (c) to identify the peaks due to impurities D and E.

Relative retention with reference to lansoprazole (retention time = about 7 min): impurity D = about 0.4; impurity A = about 0.5; impurity E = about 0.6; impurity B = about 1.2.

System suitability: reference solution (a):

- *resolution:* minimum 3.0 between the peaks due to lansoprazole and impurity B.

Limits:

- *correction factor*: for the calculation of content, multiply the peak area of impurity E by 0.4;
- *impurity B*: not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.4 per cent);
- *impurities A, D, E*: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.1 per cent);
- *unspecified impurities*: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.10 per cent);
- *total*: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.6 per cent);
- *disregard limit*: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

Water (2.5.32): maximum 0.1 per cent, determined on 0.150-0.200 g using the evaporation technique:

- *temperature*: 50-70 °C;
- *heating time*: 15 min;
- *flow rate*: 150 mL/min.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.300 g in 40 mL of ethanol (96 per cent) R and dilute to 50 mL with water R. Titrate with 0.1 M sodium hydroxide, determining the end-point potentiometrically (2.2.20).

1 mL of 0.1 M sodium hydroxide is equivalent to 36.94 mg of $C_{16}H_{14}F_3N_3O_2S$.

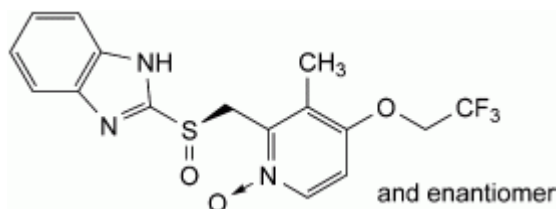
STORAGE

In an airtight container, protected from light.

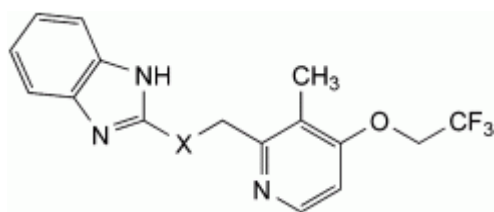
IMPURITIES

Specified impurities: A, B, D, E.

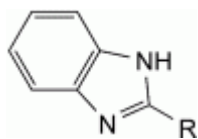
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph Substances for pharmaceutical use (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. Control of impurities in substances for pharmaceutical use): C, F.



- A. 2-[(*RS*)-[[3-methyl-1-oxido-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole,

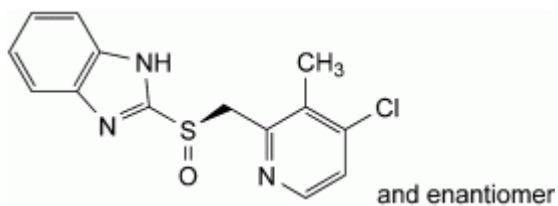


- B. X = SO₂: 2-[[[3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methyl]sulfonyl]-1*H*-benzimidazole,
- C. X = S: 2-[[[3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methyl]sulfanyl]-1*H*-benzimidazole,



D. R = OH: 1*H*-benzimidazol-2-ol,

E. R = SH: 1*H*-benzimidazole-2-thiol,



F. 2-[(*RS*)-[(4-chloro-3-methylpyridin-2-yl)methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazole.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Mehmet

Soyadı: ÇALIKOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Zonguldak / 08.10.1982

Eğitim:

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı (2009 –)

Lisans: Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2000 – 2004)

Lise: Mehmet Çelikel Lisesi (1996 – 2000)

Orta Okul: Gazi İlköğretim Okulu (1993 – 1996)

İlkokul: Ontemmuz İlkokulu (1988 – 1993)

Yabancı Dil: İngilizce