T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE ADI

DAPOKSETİN VE SİLDENAFİL'İN BİR ARADA TAYİNİNE YÖNELİK KROMATOGRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Proje No: 20789

Yüksek Lisans Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Doç. Dr. Hasan ERTAŞ
Kimya

Araştırmacı
Yalım TOSCALI
Kimya

Kasım 2020

İZMİR

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, erkeklerde erken ejekülasyon ve ereksiyon bozukluğu problemlerinin tedavisinde kullanılan Dapoksetin ve Sildenafil etken maddeleri için sentetik plazma ortamında sıvı-sıvı ekstraksiyon örnek hazırlama tekniğinden yararlanılarak kromatografik bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Hasan ERTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmam için bana teknik laboratuvar imkanlarını sunan Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi ARGEFAR'a teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi BAP koordinasyon birimi (20789) nolu yüksek lisans tez projesi tarafından desteklenmiştir.

İZMİR — Yalım TOSCALI

21/11/2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
1.1 Sildenafil ve Dapoksetin	3
1.2 Biyoeşdeğerlik ve Biyoyararlanım	5
1.3 Sildenafil ve Dapoksetin' in Biyolojik Ortamlarda Belirlenmesi	7
1.4 Çalışmanın Amacı	10
1.5 Sıvı Kromatografisi Sistemlerinde Örnek Hazırlama Yöntemleri	11
1.6 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	12
1.7 Kütle Spektroskopisi	13
1.8 Analitik Yöntem Validasyonu	14
2. DENEYSEL KESİM	17
2.1 Analitik Cihazlar ve Yöntem	17
2.2 Örnek Hazırlama Prosedürü	19
3. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME	20
3.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu Yöntemi Optimizasyonu	20
3.2 Validasyon Çalışması	32
3.2.1 Seçicilik	32
3.2.2 Taşınma	34
3.2.3 LLOQ	34
3.2.4 Doğruluk	35
3.2.5 Kesinlik	37
3.2.6 Dilüsyon Doğruluğu	38
3.2.7 Matriks Etkisi	39
3.2.8 Kararlılık	40
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Sildenafil Sitrat'ın moleküler yapısı 4

1.2 Dapoksetin'in kimyasal yapısı 5

1.3 Farmakokinetik terimlerin grafiksel gösterimi 7

1.4 HPLC sisteminin şematik gösterimi 12

1.5 Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi iyonlaştırma teknikleri 14

2.1 Sildenafil ve Dapoksetin tayini için uygulanan gradiyent eğrisi 18

3.1 Sildenafil için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 21

3.2 Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 21

3.3 Sildenafil için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 23

3.4 Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 23

3.5 Sildenafil için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 25

3.6 Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 25

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

Sayfa

3.7 Sildenafil için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 27

3.8 Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 28

3.9 Sildenafil için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 2-200 ng/mL 31

3.10 Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 0.04-1.5 ng/mL 31

3.11 Sentetik plazma örneklerinde MRM kromatogramları. a) Dapoksetin kör plazma, b) Dapoksetin ekimli plazma (0.04 ng/mL), c) Sildenafil kör plazma, d) Sildenafil ekimli plazma (2 ng/mL), e) Tadalafil kör plazma ve f) Tadalafil ekimli plazma (10.0 ng/mL) 33

3.12 Sildenafil için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 2-40 ng/mL 35

3.13 Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 0.04-1.0 ng/mL 36

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo Sayfa

1.1 Dapoksetin ve Sildenafil'in kimyasal özellikleri.……..……... 5

1.2 Sildenafil tayini için geliştirilen yöntemlerin özellikleri ……..…….…….... 9

1.3 Dapoksetin tayini için geliştirilen yöntemlerin özellikleri ……...…….…..... 10

2.1 Sildenafil ve Dapoksetin tayini için uygulanan gradiyent programı 18

2.2 Analitlerin LC-MS/MS Analizi için MS koşulları ……..……..….18

2.3 Analitlerin MRM değerleri …….……..18

3.1 Sildenafil ve Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri…….……..…. 22

3.2 Sildenafil ve Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri …….…….…….....…..….. 22

3.3 Sildenafil ve Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri …….……..……. 24

3.4 Sildenafil ve Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri …….……...……..24

TABLOLAR DİZİNİ (DEVAM)

Tablo Sayfa

3.5 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri……..…....26

3.6 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri…….…….27

3.7 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri ……...….. 28

3.8 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri...……...…….....29

3.9 Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil için farklı çözücü oranlarında mutlak geri kazanım değerleri..…….…….…… 30

3.10 Sildenafil ve Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası kalibrasyon eğrisi doğruluk değerleri ……..32

3.11 LLOQ düzeyinde Sildenafil ve Dapoksetin piklerinin boş plazmadan ayrımı…….……..……32

3.12 LLE yönteminin Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil analitleri üzerinde taşınma etkisi ……....34

3.13 Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil için LLOQ değerleri…….……...….36

3.14 LLE tekniği ile LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerde Sildenafil için doğruluk ve geri kazanım sonuçları …….……...….37

TABLOLAR DİZİNİ (DEVAM)

Tablo Sayfa

3.15 LLE tekniği ile LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerde Dapoksetin için doğruluk ve geri kazanım sonuçları …….…….…….……..…...….38

3.16 LLE tekniği ile üretilen farklı derişim seviyelerinde Sildenafil için kesinlik sonuçları.…….....…... 38

3.17 LLE tekniği ile üretilen farklı derişim seviyelerinde Dapoksetin için kesinlik sonuçları …….……..... 38

3.18 LLE tekniği ile elde edilen 80 ng/mL sildenafil ve 2 ng/mL dapoksetin derişimlerinde seyreltme etkisinin genel sonuçları …….....……..……..... 39

3.19 Sildenafil üzerindeki matriks etkisinin değerlendirilmesi..... 39

3.20 Dapoksetin üzerindeki matriks etkisinin değerlendirilmesi …….....…….40

3.21 Dapoksetin' in stok çözelti kararlılığının değerlendirilmesi ……...….41

3.22 Sildenafil' in stok çözelti kararlılığının değerlendirilmesi……...……...….. 41

3.23 Dapoksetin' in donma-erime kararlılığının değerlendirilmesi ……..…..... 42

3.24 Sildenafil' in donma-erime kararlılığının değerlendirilmesi ……...……..... 42

3.25 Dapoksetin’ in kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığının değerlendirilmesi..... 42

3.26 Sildenafil’ in kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığının değerlendirilmesi …..... 42

ÖZET

DAPOKSETİN VE SİLDENAFİL'İN BİR ARADA TAYİNİNE YÖNELİK KROMATOGRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

TOSCALI, Yalım

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan ERTAŞ

Dapoksetin ve Sildenafil etkin maddeleri, erkeklerde erken ejekülasyon ve ereksiyon bozukluğu problemlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu iki etken maddenin bir arada kullanıldığı farmasötik preparatlar dünyada ruhsatlandırılmaya başlanmış ve dolayısıyla farmosötik dozajlarda ve plazmada birarada tayinleri önemli hale gelmiştir. Bu çalışma kapsamında bu etken maddeler için sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılabilecek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Sentetik plazma ortamında Dapoksetin ve Sildenafil, örnek hazırlama aşamasında sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanılarak Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) sistemiyle eşzamanlı olarak tayin edilmiştir. Dapoksetin için 305.8 *m/z,* Sildenafil için 474.8 *m/z* ve iç standart olarak kullanılan Tadalafil için 389.7 *m/z* iyonları ana iyon olarak belirlenmiştir. Parçalanma iyonları için ise sırasıyla 100.1, 157 ve 268 *m/z* iyonları izlenmiştir. Ayırma gücü, seçimlilik ve alıkonma zamanları gibi parametreler dikkate alınarak cihaz koşulları optimize edilmiştir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinde yöntem validasyonu için geri kazanım, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, seçimlilik, matriks etkisi, kararlılık, dilusyon doğruluğu gibi EMA validasyon parametreleri incelenmiştir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde saptanan belirtme alt sınırları (LLOQ) Dapoksetin ve Sildenafil için sırasıyla 0.04 ng/mL ve 2.00 ng/mL'dir. Dapoksetin ve Sildenafil için doğrusal kalibrasyon eğrisi aralıkları sırasıyla 0.04-1.00 ve 2.00-40.0 ng/mL'dir. Geri kazanım değerleri LLOQ, düşük, orta, yüksek derişimlerde Dapoksetin için %87.5 - 112.5, Sildenafil için ise %85 – 113.5 aralığındadır.

Anahtar sözcükler: Dapoksetin, Sildenafil, Tadalafil, sıvı-sıvı ekstraksiyon, LC-MS/MS

.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SILDENAFIL AND DAPOXETINE

TOSCALI, Yalım

Master in Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan ERTAŞ

Dapoxetine and Sildenafil active ingredients are used in the treatment of early ejaculation and erectile dysfunction problems, respectively. Pharmaceutical preparations where these two active substances are used together have started to be registered in the world. Therefore, simultaneous determination of these two molecules in both pharmaceutical dosages and plasma has become important. The aim of the thesis is to develop a method that can be used in bioequivalence studies with liquid-liquid extraction technique for these active substances.

Dapoxetine and Sildenafil were determined simultaneously with the Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC-MS/MS) system using the liquid-liquid extraction technique in the sample preparation stage. 305.8 *m/z* for Dapoxetine, 474.8 *m/z* for Sildenafil and 389.7 *m/z* for Tadalafil which is used as internal standard, were determined as the main ion. For the fragmentation ions, 100.1, 157 and 268 *m/z* were observed respectively. The instrument working conditions are optimized by taking into account parameters; such as separation power, selectivity and retention times. In the liquid-liquid extraction technique, EMA validation parameters such as accuracy, linearity, repeatability, selectivity, matrix effect, stability, dilution integrity were examined for the method validation.

In addition, lower limit of quantitation of liquid-liquid extraction method are 0.04 ng/mL, 2.00 ng / mL for Dapoxetine and Sildenafil respectively. The linear calibration curve ranges varied between 0.04 - 1.00 and 2.00 - 40.0 ng/mL for dapoxetine and Sildenafil, respectively. Recovery values are in the range of 87.5 - 112.5% for Dapoxetine and 85 - 113.5% for Sildenafil at low, medium and high concentrations.

Keywords: Dapoxetine, Sildenafil, Tadalafil, liquid-liquid extraction, LC-MS/MS

1. GİRİŞ

İlaç sektörü, günümüzde en önemli sektörlerden biridir. İlaçlar, hastalıkların tedavisinde veya organizmaların bir fonksiyonunun düzeltilmesinde kullanılmaktadır. Belirli bir hastalığın tedavisinde gerekli bir ilacın yerine, ilaç dışında başka tür bir ürün kullanılamaz. İlacın bu özelliği, ilaç sektörünün neden en önemli sektör olduğunu ve bu sektörde ne olursa olsun varlığını devam ettireceğini göstermektedir.

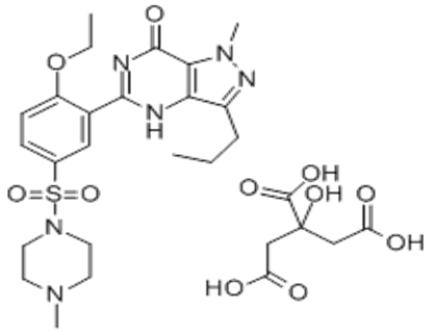
Orijinal ilaç, yıllar süren araştırmalar sonucunda belli bir hastalık üzerinde olumlu etki yaptığı kanıtlanmış, patentli bir moleküle dayanan ve ilk defa geliştirilmiş olan ilaçlardır. Orijinal ilaçlar, dünyada yasalarla, patent ve veri koruma hakları ile belli bir süre boyunca korunurlar. Bu süre zarfında, başka bir ilaç şirketinin, bu ilacın benzerini üretmesine izin verilmez. Orijinal ilacın yasal koruma süresinin dolması ile birlikte, ilaç şirketleri, orijinal ilacın benzerlerini piyasaya sürebilirler. Bu ilaçlar, "**Jenerik İlaç**" olarak adlandırılır. Jenerik ilaçları üreten firmaların, bu ilaçları piyasaya sürmeden önce jenerik ilacın, orijinal ilaçla aynı etken maddeyi, aynı miktarda içerdiğini, aynı formülasyonda ve farmasötik şekilde olduğunu, orijinal ilaçla biyoeşdeğer olduğunun kanıtlanmış olması gerekmektedir. Biyoeşdeğerliğin kanıtlanmasında gerekli verilerin eldesinde kullanılacak analitik yöntem önem kazanmaktadır (www.aifd.org.tr, 2017).

1.1 Sildenafil ve Dapoksetin

İlaç analizleri, halk sağlığı üzerinde hayati önemi olan, kalite kontrol analizlerinde ve ilaçların ruhsatlandırılma süreçlerinde önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle ilaç etken maddelerinin ve biyolojik maddelerin tayinine ilişkin basit, hızlı, seçimli, duyar ve doğru yöntem geliştirmeye yönelik birçok çalışma vardır.

Erektil disfonksiyon, 40 yaş üzeri erkeklerde görülebilen bir sağlık sorunudur. Sağlık bilincinin tam gelişmediği toplumlarda saklı tutulan bir durum olarak karşımıza çıkan erektil disfonksiyon, bir erkek için son derece önemli ve hassas bir durumdur. Erektil disfonksiyonun ortaya çıkmasında psikolojik nedenler, bazı ilaç etkileşimleri, damarsal sorunlar gibi sebepler gösterilmektedir (Liew vd., 2014).

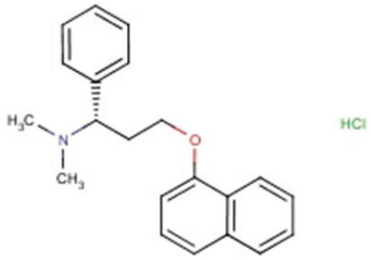
Sildenafil sitrat (1-[[3-(6, 7-dihydro-7-oxo-3-propyl-1Hpyrazolo [4, 3-d] pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl] sulfonyl]-4-methylpiperazine) genel olarak viagra ticari adıyla bilinen penis ereksiyon tedavisinde kullanılan oral bir farmasötik ajandır. Molekül formülü $C_{22}H_{30}N_6O_4S$ şeklindedir ve açık yapısı şekil 1.1'de gösterilmiştir. Molekül üzerindeki piridinyum ve benzimidazol grupları bazik özellik gösterir ve pKa değerleri sırasıyla 5.99 ve 10.92'dir. Bu haliyle sildenafil sitrat molekülü amfoterik özellik göstermektedir. Sildenafil sitrat su ve metanolde çözünür. Farmasötik tabletlerde ve biyolojik matrikslerde tayini genellikle sıvı kromatografik yöntemlerle yapılmaktadır. Bu amaçla, ters faz ve HILIC kolon sistemleri kromatografik ayırma işleminde kullanılırken, dedeksiyon sistemi olarak mor ötesi (UV) dedektör ve kütle spektrometresi (MS) kullanılmaktadır (www.rxlist.com, 2019).



Şekil 1.1 Sildenafil Sitrat'ın moleküler yapısı

Dapoksetin ((S) -N, N-dimetil-3- (naftalen-1-iloksi) -1-fenilpropan-1-amin) seçici bir serotonin geri alım inhibitörüdür. Dapoksetin anksetiye ve depresyon tedavisi için kullanılsa da erkeklerde erken ejekülasyon tedavisi için kullanılmaktadır. Dapoksetin, birçok Avrupa ve Asya ülkesinde "erken ejekülasyon"u önleyici olarak satılmaktadır. Dapoksetin molekül formülü $C_{21}H_{23}NO$ şeklindedir ve açık yapısı Şekil 1.2'de verilmektedir. Molekül üzerindeki tersiyer amin grubu zayıf bazik özelik göstermektedir ve pKa'sı 9.0'dur (Zhang vd., 2015, www.drugbank.ca, 2019).

Sildenafil ve Dapoksetin' in fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Dapoksetinin kimyasal yapısı

Tablo 1.1 Dapoksetin ve Sildenafil'in kimyasal özellikleri

Özellik	Sildenafil	Dapoksetin
Molekül Formülü	$C_{22}H_{30}N_6O_4S$	$C_{21}H_{23}NO$
Mol Kütlesi (g/mol)	474.5	305.4
pKa	5.99, 10.92	9.04
Çözünürlük	Su, Metanol	Su, Metanol
IUPAC adlandırması	(1-[[3-(6, 7-dihydro-7-oxo-3-propyl-1Hpyrazolo [4, 3-d] pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl] sulfonyl]-4-methylpiperazine)	((S) -N, N-dimetil-3- (naftalen-1-iloksi) -1-fenilpropan-1-amin)

1.2 Biyoyararlanım & Biyoeşdeğerlik

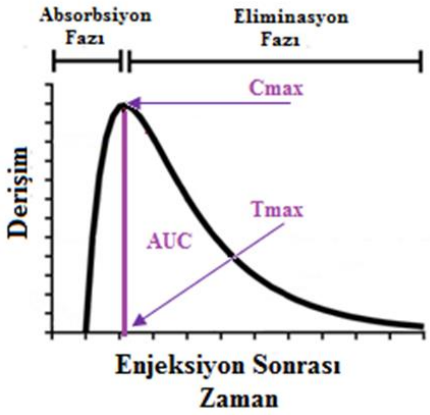
Biyoyararlanım; tabletin farmasötik formundan etken maddenin emilme ve sistematik dolaşim yoluyla etki bölgesinde bulunma hızı ve kapsamıdır. Bir ilaç intravenöz olarak verildiğinde ilaçın biyoyararlanımı %100 olarak kabul edilir. Bununla birlikte ilaç ağızdan veya başka yollarla verildiğinde eksik emilim nedeniyle biyoyararlanımı genellikle azalır (FDA, 2012).

Biyoeşdeğerlik, benzer koşullar altında aynı molar dozda uygulandığında, ilaç eylem bölgesinde mevcut olan farmasötik eşdeğerlerde, ilaç alternatiflerinde veya biyoyararlanımda önemli bir farkın olmamasıdır. Etken maddenin içeriğinde anlamlı bir fark bulunmadığında belirli farmasötik eşdeğerler veya alternatifler biyolojik olarak eşdeğer olarak kabul edilebilir (FDA, 2012).Eşdeğer olduğu düşünülen ilaçları üreten firmaların, bu ilaçların orjinal ilaçla aynı etken maddeyi, aynı miktarda içerdiğini, aynı formülasyonda ve farmasötik şekilde olduğunu ve orijinal ilaçla biyoeşdeğer olduğunun belgelendirilmesi gerekmektedir. Bir farmasötik ürünün içerdiği aktif bileşenin biyoyararlanımı bilinmeli ve tekrar edilebilirliği olmalıdır.

Biyoeşdeğerlik ve Biyoyararlanım çalışmalarında öne çıkan olaylardan biri ilaç maddesinin kendi dozaj formundan salınımı, diğeri ise sistematik dolaşımdaki emilimidir. Biyoyararlılık, zamana karşı ölçülmüş dolaşımdaki ilaç veya metabolit derişiminden yola çıkılarak oluşturulan bir profille belgelendirilebilir. Aynı etkiye sahip bileşeni içeren iki tıbbi ürünün karşılaştırılması için biyoeşdeğerlik çalışmaları yapılmalıdır. Farklı lisanslar tarafından pazarlanan iki ürünün, birbiriyle degiştirilebilir olarak tanımlanabilmesi için için terapötik olarak eşdeğer olduğu ispat edilmelidir. (Central Drugs Standart Control Organization, 2005).

Farmakokinetik çalışmalar, ilaç ürünündeki etken maddenin derişimindeki ve aynı zamanda insan veya hayvan vücudundaki etken madde ve metabolitlerindeki farklılıklarla ilgilidir. İlaç ürününün uygulanmasının ardından farklı vücut sıvıları ve dokularındaki ilaç derişimindeki meydana gelen değişim, dinamik sistem içerisindeki emilim, serbest bırakılma, depolanma, bağlanma ve atılma gibi bilgiler sayesinde veriler elde edilir. Farmakodinamik çalışmalar, iki farklı ürünün uygulanmasından sonra zamanın bir fonksiyonu olarak pato-fizyolojik bir süreç üzerindeki etkinin ölçülmesiyle biyoeşdeğerlik değerlendirmesinin temelini oluşturur (www.titck.gov.tr, 2008).

Biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde temel farmakokinetik parametreler incelenmektedir. $\mathbf{C_{max}}$, ilaç alımından sonra sistematik dolaşımdaki saptanan maksimum ilaç derişimidir. $\mathbf{C_{min}}$, kararlı durumda, çoklu dozajlama sonucunda sistematik dolaşımdaki ölçülen minimum ilaç derişimidir. $\mathbf{C_{pd}}$, kararlı durumda, bir doz verilmeden hemen önce belirlenen doz öncesi derişimdir. $\mathbf{T_{max}}$, sistematik dolaşımdaki maksimum ilaç derişimini elde etmek için gerekli olan zamandır. $\mathbf{AUC_{0\text{-}t}}$, yamuk kuralı kullanılarak hesaplanacak olan 0.saatten en son ölçülebilir derişime kadar olan, plazma derişimi ve zaman eğrisinin altında kalan alandır. $\mathbf{AUC_{0\text{-}\infty}}$, ölçülebilir son derişimin eliminasyon hızı sabitine olan oranı ve sıfırdan sonsuza kadar $AUC_{0\text{-}t}$'nin toplamı kullanılarak hesaplanan plazma derişim eğrisinin altındaki alandır. $\mathbf{AUC_{0\text{-}\tau}}$, modifiye edilmiş salınım ürünleri için tek bir dozu takiben, bir dozaj aralığı boyunca hesaplanan plazma derişim zaman eğrisi altındaki alandır. $\mathbf{AUC_{0\text{-}\tau(ss)}}$, kararlı durumda, çoklu doz çalışması esnasında bir doz aralığı boyunca hesaplanan plazma derişim zaman eğrisi altındaki alandır. $\mathbf{K_{el}}$, zaman eğrisine bağlı olarak plazma derişiminin yarı-log grafiğinden hesaplanan birinci dereceden terminal eliminasyon hızı sabitidir. $\mathbf{T_{1/2}}$, bir ilacın yarı ömrünü ortadan kaldırmak ve dengeye ulaşıldıktan sonra kandaki, plazmadaki veya serumdaki ilaç derişimini azaltmak için gereken zamandır. (Central Drugs Standard Control Organization, 2005; Acartürk et al, 2007).



Şekil 1.3 Farmakokinetik parametrelerin grafiksel gösterimi

Biyoeşdeğerliğin belirlenmesinde incelenen parametrelerin güvenilirliği, ilaç etkin madde verilerini elde etmede kullanılan analitik yöntemin doğruluğuna bağlıdır. Önceki yıllarda Sildenafil ve Dapoksetin' in birlikte tayinine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Erektil disfonksiyon ve erken ejekülasyon rahatsızlıklarının eş zamanlı tedavisinde Sildenafil ve Dapoksetin'in birlikte analizi önem kazanmaktadır. Sildenafil ve Dapoksetin' in analizine yönelik çalışılan analitik yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

1.3 Sildenafil ve Dapoksetin' in Biyolojik Ortamlarda Belirlenmesi

Biyolojik matrikslerde Sildenafili belirlemek için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) (Saisho vd., 2001) ve morötesi veya kütle spektrometrik tespiti ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Tripathi vd., 2012) gibi analitik yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerin, düşük hassasiyet, kapsamlı örnek hazırlama ihtiyacı gibi zayıflıkları vardır. Bu yöntemlerin duyarlılığı, genellikle düşük dozları içeren çalışmalar için veya halen geliştirilmekte olan formülasyonlar için yetersizdir (Wang vd., 2005).

Sheu vd., 2003 yılında sildenafil'in insan plazmasındaki derişimini saptamak için UV detektör ile kombine edilmiş HPLC cihazını kullanarak analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama işlemi için sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) yöntemini kullanmışlardır. Bazik ortamda etil asetat çözgeniyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Örnek hazırlama aşamasında, asetonitril kullanılarak protein çöktürme (Sharma vd., 2012), katı faz ekstraksiyonu (SPE) (Guermouche ve Bensalah, 2006) veya türevlendirme yöntemlerine (Wang vd., 2013) dayanır. Bu örnek hazırlama yöntemlerinin zaman kısıtlamaları, büyük örnek hacimleri veya karmaşık ekipmanlara ihtiyaç duyulması gibi sakıncaları vardır (Kim vd., 2003).

Kim vd. (2003), sildenafil ve onun metaboliti N-Desmetilsildenafil'in insan plazmasındaki derişimini tayin etmek için sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) sistemini kullanmışlardır. Bazik ortamda diklorometan çözgeni kullanılarak LLE yöntemi geliştirmişlerdir. Mutlak geri kazanımlar sildenafil (%59-63) ve seçilen iç standart udanafil (%51-56) için yeterli olmasa da, analit/iç standart oranları hesaplandığında Sildenafil için ortalama geri kazanım değeri %95-105 arasında değişmektedir. Khalid. M. Alkharfy, 2009 yılında yayınlamış olduğu çalışmada, Sildenafil'in insan plazmasındaki tayini için sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi (LC/MS) sistemini kullanarak seçilmiş iyon izleme modunda (SIM) tayin yapmışlardır. LLE ile örnek hazırlama aşamasında, analitin organik faza alınması için çözgen olarak dietileter kullanılmıştır.

Strano-Rossi vd. (2010), insan idrarındaki sildenafil, vardanafil, tadalafil ve bunların aktif metabolitlerinin tayini için GC-MS sistemi kullanılarak analitik yöntem ortaya koymuşlardır. İdrar örneklerinde, bazik ortamda tersiyer butil metil eter çözgeni kullanılarak LLE işlemi gerçekleştirilmiştir. Sildenafil ve metaboliti olan N-Desmetilsildenafil'in insan plazmasındaki derişimini belirlemek için LC-MS/MS sistemi kullanılarak LLE yöntemi bildirmişlerdir (Challa vd, 2010). Her iki molekül için de iç standart olarak kendi moleküler yapılarına çok benzeyen döteryumlu (d8) standartlar kullanarak geri kazanım ve kesinlik parametreleri için önemli bir üstünlük sağlamışlardır.

Kai Bin Liew vd. (2015), sildenafil ve onun metaboliti N-desmetilsildenafil'in insan plazmasındaki tayini için sundukları yöntemde LLE örnek hazırlama tekniği kullanarak Sildenafil ve metabolitini organik faza alınmasını sağlamışlar ve LC-MS/MS sistemi kullanarak analizlemişlerdir. Yokoyama vd. (2014), pulmoner arter hipertansiyonu olan pediatrik hastaların tedavisinde kullanılması amaçlanan sildenafil ve tadalafil birlikte tayini için LC-MS/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilen analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama işlemi için SPE kullanılmıştır.

SPE işlemindeki kartuşun şartlama ve dengeleme işlemleri için sırasıyla metanol ve su kullanılmıştır. Yıkama ve elüsyon işlemleri için sırasıyla %2'lik formik asit ve metanol kullanılmıştır. Al-Hroub vd., 2016 yılında Sildenafil'in insan plazmasındaki tayinini HPLC-UV sistemi kullanılarak gerçekleştirmiştir. Örnek hazırlama aşamasında bazik ortamda LLE uygulamışlardır. Sildenafil'in çeşitli matriklerde analiz yöntemleri Tablo 1.2' de özetlenmiştir.

Tablo 1.2 Sildenafil tayini için geliştirilen yöntemlerin özellikleri

Örnek Hazırlama	Analitik Yöntem	Doğrusal Aralık	Analitiksel Değerler	Kaynak
LLE	GC-MS	0.1–50 ng/mL	±20% doğruluk ve kesinlik	Saisho vd., 2001
LLE	LC-MS/MS	2–1000 ng/mL	Ortalama geri kazanım %95-105	Kim vd., 2003
LLE	HPLC-UV	10-1000 ng/mL	±20% doğruluk ve kesinlik	Sheu vd., 2003
LLE	LC-MS/MS	0.125 - 40 ng/mL	Ortalama geri kazanım %90-100	Wang Y. vd., 2005
SPE	HPLC-PDA	0.01-2 µg/mL	Ortalama geri kazanım %90-95	Guermouche ve Bensalah, 2006
LLE	LC-MS	0.5-2000 ng/mL	Ortalama geri kazanım %90-106	Alkharfy K.M, 2009
LLE	LC-MS/MS	1-1000 ng/mL	Ortalama geri kazanım %97-101	Challa vd, 2010
LLE	GC-MS	25-1000 ng/mL	±20% doğruluk ve kesinlik	Strano-Rossi vd., 2010
LLE	HPLC-UV	0.1-10 µg/mL	Ortalama geri kazanım %80-100	Sharma vd., 2012
LLE	HPLC-UV	0.1-6 µg/mL	Ortalama geri kazanım %89	Tripathi vd., 2012
Yüzey aktif madde kaplı polimerik reçine üzerinde önderiştirme	Spektro-Fluorometre	0.0003–7.0 µg/mL	Ortalama geri kazanım %100-105	Wang vd., 2013
SPE	LC-MS/MS	2-1000 ng/mL	Ortalama geri kazanım %95-105	Yokoyama vd., 2014
LLE	LC-MS/MS	10-800 ng/mL	Ortalama geri kazanım %80	Liew K.B vd., 2015
LLE	HPLC-UV	2-200 ng/mL	Ortalama geri kazanım %98-105	Al-Hroub vd., 2016

Dapoksetin' in insan plazmasında ki tayini için geliştirilen Kromatografik yöntemler ise Tablo 1.3'de verilmiştir. Plazmada Dapoksetin tayini için Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Floresans Dedektör (HPLC-FLD) ve Ultra Performans Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) yöntemleri uygulanmıştır (Hamilton ve Cornpropst, 1993; Kim vd., 2013). Bu çalışmada, iç standart olarak (internal standart-IS) karbamazepin kullanılarak insan plazmasında dapoxetin ve metabolitlerinin aynı anda belirlenmesi için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Bu metot Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) kurallarına göre tamamen doğrulanmış ve farmakokinetik profillerini karakterize etmek için başarıyla uygulanmıştır (Zhang vd., 2015).

Tablo 1.3 Dapoksetin tayini için geliştirilen yöntemlerin özellikleri

Örnek Hazırlama	Analitik Yöntem	Doğrusal Aralık	Analitiksel Değerler	Kaynak
LLE	HPLC-FLD	20–200 (ng/mL)	±20% doğruluk ve kesinlik	Hamilton CL ve Cornpropst JD, 1993
LLE	UPLC-MS/MS	1-500 (ng/mL)	Ortalama geri kazanım %101-109	Kim vd., 2013
LLE	UPLC-MS/MS	1-200 (ng/mL)	Ortalama geri kazanım %90	Zhang vd., 2015

1.4 Çalışmanın Amacı

Dapoksetin ve Sildenafil eczanelerden doğrudan temin edilebilen ve çokça satılan ilaçlardır. Bu moleküllere olan ilgi, bu ilaçların jeneriklerinin üretilmesine neden olmaktadır. Özellikle, son yıllarda bu iki molekülü tek bir formülasyonda birleştirmek üzere Amerika'da çalışmalar yapılmaktadır. Bu ilaçların formülasyonlarındaki değişiklik tekrar ruhsatlandırma sürecine girmelerine neden olmaktadır. Yeni geliştirilen ilacın orjinali ile aynı kalite, etkinlik ve güvenilirlikte olması beklenmektedir. Bu amaçla ilaç etken maddelerinin tayinine yönelik; sağlam, doğru, duyar ve kesin analitik metodlara ihtiyaç vardır. Dolayısıyla, bu iki molekülün yan yana tayini giderek önem kazanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında Sildenafil ve Dapoksetin moleküllerinin bir arada tayinine yönelik kromatografik yöntem geliştirilecektir. Bu amaçla ilk olarak uygun bir örnek hazırlama yöntemi geliştirilerek ve optimize edilecektir.

Bu çalışmada rutin laboratuvar analizlerinde kullanılabilecek bir analitik yöntem geliştirilecek ve Avrupa İlaç Ajansının (European Medicines Agency-EMA) Biyoanalitik Metot Validasyonu rehberine (2015) göre valide edilecektir. Literatürde var olan yöntemlere alternatif olması hedeflenen bu yöntem; hem düşük maliyeti, hem de kolay uygulanabilirliği nedeniyle önemli bir avantaj sağlayacaktır.

1.5 Sıvı Kromatografisi Sistemlerinde Örnek Hazırlama Yöntemleri

Ekstraksiyon, bir veya birden fazla bileşenin, farklı maddelerden oluşan bir ortamdan, uygun bir çözücü yardımıyla ayrılma işlemi olarak tanımlanır. Katı-sıvı, sıvı-sıvı, mikrodalga destekli solvent, ses dalgaları destekli sıvı, süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi çeşitleri vardır (Kromidas, 2006).

Bu tekniklerden en yaygın kullanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon (LLE) tekniği, matriks içerisindeki analitlere olabilecek herhangi bir girişimi engellemek için iki sıvı veya birbirine karışmayan iki faz arasındaki dağılma ilkesine dayanmaktadır. Dağılım veya bölünme katsayısı (K), bir organik bileşiğin sulu ve organik fazlar arasında hangi oranda dağılacağını veren nicel bir büyüklüktür. Organik faz içindeki maddenin çözünürlüğünün, sulu faz içerisindeki maddenin çözünürlüğüne oranına **K** sabiti denir.

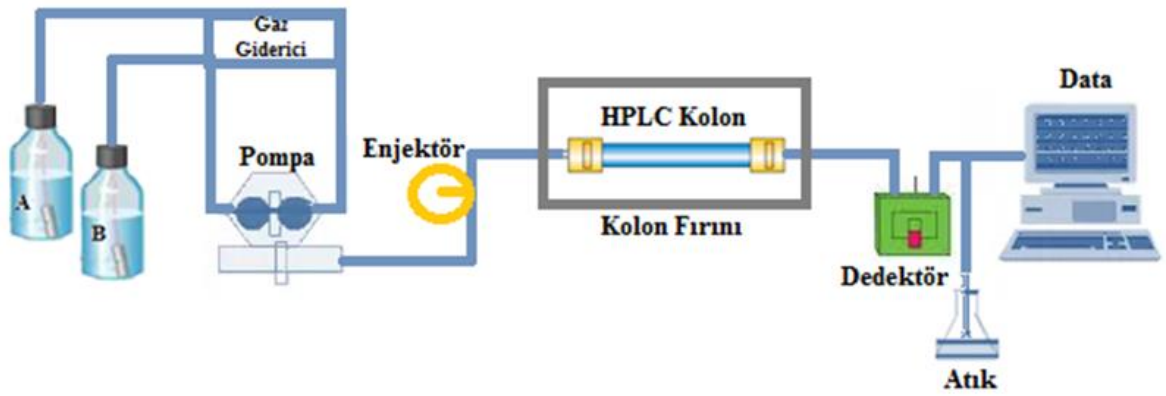
Hidrofilik (su seven) bileşikler, polar olan sulu fazı, hidrofobik (su sevmeyen) bileşikler ise organik fazı tercih ederler. Organik faza ekstrakte edilen analitler solventin buharlaştırılmasıyla kolayca geri kazanılırken, sulu faza ekstrakte edilen analitler doğrudan bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi kolonuna enjekte edilebilir. Hedef analit, doğru bir çözücü sistemi kullanılarak diğer çözücüden kolaylıkla seçilip çıkartılabilir (Blumberg R., 1988). Seçilen organik faz;

- Hedef bileşiğin sudaki çözünürlüğü %10'un altında olmalı,
- Ekstraksiyon sonrası kolayca uzaklaştırabilmesi için uçucu özellikte olmalı,
- Kromatografik sistemlerle barışık olmalı,
- Organik fazdaki analitlerin geri kazanımını arttırmak için gerekli olan hidrojen bağı yapabilme kapasitesi ve polarite gibi özelliklere sahip olmalı,
- Örnek kontaminasyonunu en aza indirgemek için yüksek saflıkta olmalıdır (Snyder, 1997; Kromidas, 2006).

1.6 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC sistemi, bir sıvı içerisinde çözünmüş bileşenlerin hareketli faz ve sabit faz arasında ayrılmasına dayanır. Fiziksel ve kimyasal etkileşimler sayesinde bileşenler kolon içinde farklı hızlarla hareket ederler ve böylece dedektörde farklı zamanlarda sinyal oluşumu gözlenir (Belanger vd., 1997). HPLC tekniği, farmasötik bileşenler, proteinler, polimerler, antibiyotikler, boyar maddeler gibi uçucu olmayan kimyasal ve biyokimyasal bileşenleri ayırmak için kullanılır.

Ayrılma, çözünen maddenin sabit ve hareketli faz arasındaki etkileşimi ile yönetilir. Ayırma mekanizması hareketli veya durgun fazın türüne göre; bölüşüm veya sıvı-sıvı kromatografisi, adsorpsiyon veya katı-sıvı kromatografi, iyon değişimi, afinite ve kiral kromatografi olarak sınıflandırılır. HPLC sistemlerinde, ayırma verimi hareketli ve sabit fazın polaritesine göre belirlenir. Buna göre yöntemler farklı adlarla adlandırılır.



Şekil 1.4 HPLC sisteminin şematik gösterimi.

1.7 Kütle Spektroskopisi

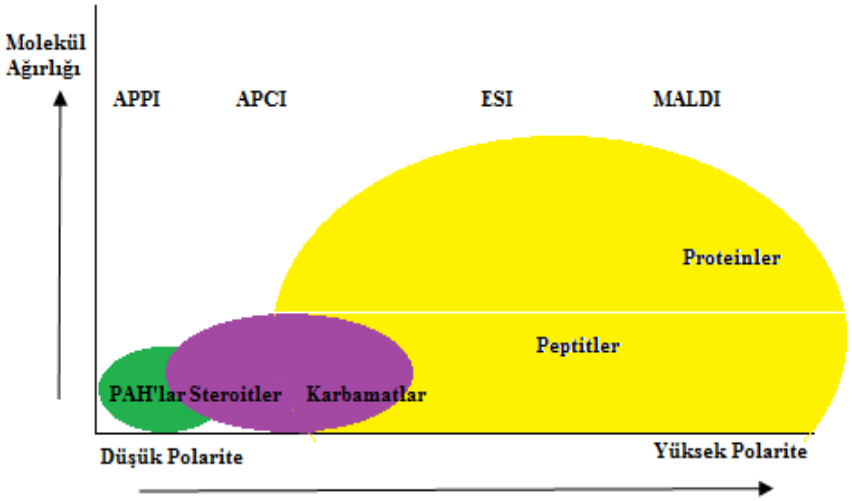
Kütle spektrometresi, geniş bir polarite ve molekül ağırlığında (m/z oranı 2000'nin altında olanlar) birçok bileşiğin (peptit, protein ve küçük moleküllü ilaç molekülleri gibi) analizi için ideal bir dedektördür. Bu teknik temel olarak iyonlaştırıcı enerjinin moleküller üzerindeki etkisini incelemektedir. İyonik ve nötr türlerin oluşumu sırasında örnek moleküllerin tüketildiği gaz fazındaki kimyasal reaksiyonlara bağlıdır. Girişimleri en aza indirgemesi, düşük saptama alt sınırlarına ulaşabilmesi, seçicilik, kolay numune hazırlığı ve düşük analiz süresine olanak sağlaması MS sisteminin en önemli üstünlüğüdür (www.premierbiosoft.com, 2019).

Organik bileşiklerin kütle spektrometrisi (MS) ile analizi, önce gaz fazı yüklü moleküler iyonların üretilmesini ve daha sonra aletin iyon kaynağında ana moleküllerin parçalanma iyonlarının üretilmesini ve daha sonra bu iyonların kütle şarj oranlarına göre ayrılmasını içerir. Bir kütle spektrometresi,

- Organik moleküllerin iyonlaşmasının gerçekleştiği ve daha sonra iyonların hızlandırıldığı (veya ekstrakte edildiği) iyon kaynağı
- İyonları *m/z* değerlerine göre ayıran kütle analizörü
- Ayrılan iyonların nispi yoğunluklarının (bolluklarının) belirlendiği dedektörden oluşmaktadır.

Cihaz, turbomoleküler veya yağ difüzyon pompaları sistemi tarafından düşük basınçta (yüksek vakum) tutulur. Cihazdaki düşük basınç, iyonların iyon kaynağından dedektöre geçmesine izin verir (Holcapek vd., 2012).

Elektrosprey iyonizasyon (ESI), atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınç fotoiyonizasyonu (APPI) olmak üzere üç tane yaygın iyonlaştırma tekniği vardır. Bunların yanında matriks yardımlı lazer bozundurma iyonizasyonu (MALDI) ve uçucu moleküller için hızlı atom bombardımanı (FAB) iyonizasyon teknikleri de kullanılmaktadır (Pitt., 2009). Şekil 1.5' de sıvı kromataografisi kütle spektrometresinde kullanılan iyonlaştırma teknikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 1.5 Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi iyonlaştırma teknikleri

1.8 Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, geliştirilmiş olan analitik yöntemin doğruluğunun ve kesinliğinin ispatlanması için gerçekleştirilmesi gereken işlemleri içerir. Bir validasyon sürecinde temel olarak; doğruluk, kesinlik, seçicilik, en düşük tayin sınırı ve en düşük belirtme sınırı gibi parametreler incelenir.

İlaç analizleri için yapılması gereken validasyonda, FDA, EMA, ICH (International Conference on Harmonisation-Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu) ve ANVISA (The Brazilian Health Regulatory Agency-Brezilya Sağlık Düzenleme Kurulu) gibi yönergelerdeki yer alan validasyon parametrelerinin gereklilikleri yerine getirilmektedir (www.kmoetkinlik.org, 2019).

Biyolojik matrislerde (örneğin serum, plazma, kan, idrar ve tükürük gibi) ilaç derişimlerinin ölçülmesi, tıbbi ürün geliştirmenin önemli bir yönüdür. EMA kılavuzu, farmakokinetik ve toksikokinetik parametre belirlemeleri için kullanılan nicel derişim verilerini üreten biyoanalitik yöntemlerin doğrulanması ve onaylanması için Avrupa'da lider konumdadır.

Biyoeşdeğerlik çalışmaları da dahil olmak üzere, hayvan toksikokinetik çalışmalarının ve klinik çalışmaların sonuçları, tıbbi bir ilaç maddesinin veya ürünün güvenliğini ve etkinliğini destekleyen kritik kararlar vermek için kullanılır. Bu nedenle, kullanılan

uygulamalı biyoanalitik yöntemlerin iyi sonuç vermesi, güvenilir sonuçlar elde etmek için tam olarak doğrulanması ve tatmin edici bir standarda dayanarak belgelenmesi önemlidir (www.ema.europa.eu, 2015). Bu rehberde tanımlanan validasyon parametreleri;

Seçicilik, bir analitik yöntemin örnekte ilgilenilen analit dışında başka bileşenlerin olması halinde ve matriksten olabilecek girişimlerin yanında tayin edilecek analitin miktarını belirleyebilme yeteneğidir. 6 farklı kör matriksin çalışılarak ilgilen analitin en düşük tayin sınırı (LLOQ) düzeyi ile karşılaştırıp girişimlerin değerlendirilerek kanıtlanmasıdır. Girişim yapan bileşenler analizlenmek istenen analitin LLOQ derişiminin %20' sinin, iç standartın ise %5' nin altında olmalıdır.

Taşınma, yöntem geliştirme sürecinde ele alınarak en aza indirilmelidir. Validasyon sürecinde, yüksek derişimde bir örnekten sonra kör matriks örneği veya kalibrasyon eğrisi için hazırlanan en yüksek kalibrasyon standardından sonra kör matriks örneği enjekte edilerek değerlendirilir. Yüksek derişim standardını takip eden kör matriks örneği üzerinde taşınması, en düşük tayin sınırı derişiminin % 20' sinden ve iç standart için %5' den az olmalıdır.

LLOQ, matriks ortamındaki analitin, kabul edilebilir bir doğruluk ve hassasiyetle güvenle ölçülebilen en düşük derişimidir. LLOQ örneğinin analit sinyali, kör örneğin sinyalinin en az 5 katı olmalıdır.

Kalibrasyon Eğrisi (Doğrusallık) aralığı, LLOQ ile üst tayin sınırı arasında oluşturulur. Kalibrasyon aralığı, analit ve iç standart katımı yapılmayan ve sadece iç standart katımı yapılmış bir kör örnek haricinde minimun altı derişimden oluşmalıdır. Kolerasyon katsayısı elde etmek için kalibrasyon oluşturulurken kör ve iç standart katımlı kör örnek dikkate alınmamalıdır. Kalibrasyon standartlarının kabul edilebilir sapma değerleri, LLOQ derişimi için ±20%, diğer derişimler için ise ±%15 olmalıdır. Belirlenen doğrusal aralıkta çalışılan kalibrasyon standartlarının en az % 75'i bu kriteri sağlamalıdır.

Doğruluk, ölçülen değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu gösterir. Bilinen miktarlarda analit içeren kalite kontrol (KK) örnekleri ile değerlendirilir ve bu KK örnekleri ayrı ayrı stok çözeltileri kullanılarak, kalibrasyon standartlarından bağımsız bir şekilde hazırlanır. KK örneklerinin derişimleri kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. Doğruluk, gerçek değerin yüzdesi olarak belirtilmelidir. Doğruluk, gün içi ve günler arası çalışılan KK örneklerinin derişimlerinin elde edilmesiyle değerlendirilir.

Gün içi doğruluk, kalibrasyon aralığı içerisinde, LLOQ, LLOQ değerinin üç katı, kalibrasyon aralığının orta noktası ve kalibrasyon aralığının en üst noktasının en düşük %75'inden oluşan dört derişim ile minumum beş analiz yapılır. Derişimler; LLOQ derişimi için, ortalama değer asıl değerin ± %20'si sınırları içerisinde olmalıdır. Diğer derişimler için ise bu değer ± %15'dir.

Günler arası doğruluk testi için en az 2 farklı günde çalışılan LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerin üçer kez analizi yapılmalıdır. LLOQ derişimi için, ortalama değer asıl değerin ±%20'si sınırları içerisinde olmalıdır. Diğer derişimler için ise bu değer ±%15'dir.

Kesinlik, belirli bir analitik koşul altında yapılan bir dizi ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığının ölçüsüdür. Bağıl standart sapma (Relative Standard Deviation-RSD) olarak ifade edilir. RSD, bir dizi ölçüm sonucunda elde edilen verilerin standart sapmasının ortalamaya bölünmesiyle hesaplanır. Kesinlik parametresi, elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk verileri kullanılarak hesaplanabilir.

Gün içi kesinlik, belirlenen LLOQ, düşük, orta ve yüksek KK örneklerinin her biri için en az beş enjeksiyon yapılarak değerlendirilir. LLOQ derişimi için RSD ±%20, diğer derişimler için ise ±%15 sınırları içerisinde olmalıdır.

Günler arası kesinlik testi için en az 2 farklı günde çalışılan LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerin üçer kez analizi yapılmalıdır. LLOQ derişimi için RSD ±%20, diğer derişimler için ise ±%15 sınırları içerisinde olmalıdır.

Dilüsyon Doğruluğu, örneklerde yapılan seyreltme işleminin doğruluğu ve kesinliği etkilemediğinin bir ölçüsüdür. Kalibrasyon eğrisinin en yüksek noktasının üzerinde, seyreltiğinde kalibrasyon eğrisi aralığında olacak şekilde bir analit derişimi seçilir. 5 paralel olacak şekilde kör matriks ile seyreltilmelidir. Sonuçlar, doğruluk ve kesinlik için belirtilen ±%15 değeri içerisinde olmalıdır.

Matriks Etkisi, en az altı farklı kör matriksi kullanılarak incelenmelidir. Her bir örnekteki analit ve iç standartın matriks etkisi ayrı ayrı hesaplanır. Standart katılmış matriks ortamındaki alanın, matriks olmayan ortamdaki alana oranlanması ve elde edilen analit matriks faktörünün iç standart faktörüne bölünmesiyle iç standart düzeltilmesi yapılır. En az

altı farklı matriksin iç standart düzeltilmesi yapılan matriks etkisinin RSD değeri %15' in altında olmalıdır.

Kararlılık, çalışılan matriksteki söz konusu analitin kararlılığı, uygulanan saklama koşullarından sonra ve QC örnekleri hazırlandıktan hemen sonrası için düşük ve yüksek derişimler kullanılarak değerlendirilir. Elde edilen değerler gerçek değerlerle karşılaştırılır. Her bir derişim için hesaplanan derişim ±%15 sınırları içerisinde olmalıdır.

Donma Erime Kararlılığı (DEK), yüksek ve düşük derişimdeki KK örnekleri dondurulup (-80°C) tekrar oda sıcaklığına (20°C) getirilir (her bir döngüde örnek çözündürülmeden önce 12 saat dondurulmuş olmalıdır).

Kısa süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı (KSOS), yüksek ve düşük derişimlerde KK örneklerinin oda sıcaklığında hazırlandığında derişimi saptanır, oda sıcaklığında 24.saatin sonunda derişimi kontrol edilir ve bir kayıp olup olmadığı değerlendirilir.

Uzun Süreli Kararlılığın (USK) tespit edilmesinde, çalışmada kullanılacak canlılara ilacın uygulandığı ilk gün, çalışmanın başlangıç tarihi olarak kabul edilir. Çalışmanın başladığı ilk gün, belirlenen derişimlerde KK örnekleri uzun süreli kararlılığın kontrol edileceği ortama alınarak çalışmanın son gününe kadar saklanır ve kararlılık durumları kontrol edilir.

Stok Çözelti Kararlılığı, validasyonun ilk günü kontrol edilen etken madde ve iç standart içeren KK örnekleri, stok çözelti kararlılığının kontrol edileceği ortama alınarak validasyonun son günü taze hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile tekrar çalışılır ve kararlılık durumları kontrol edilir (www.ema.europa.eu, 2015).

2. DENEYSEL KESİM

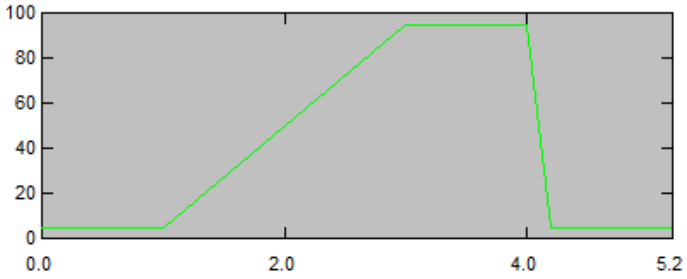
2.1 Analitik Cihazlar ve Yöntem

LC-MS/MS analizlerinin gerçekleştirilmesinde Shimadzu (Japonya, Kyoto) model UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) ve ABI SCIEX API 4000 MS modeli kullanılmıştır. LC sistemi, hareketli fazın akışını sağlayan LC-20AD model pompa A ve B, CTO-20A model kolon fırını, SIL-20AC model otomatik örnekleyici ve DGU-20A_3 model gaz giderici sisteminden oluşmaktadır. Zorbax XDB-C18 (2.1 x 50 mm, 5 µm) (Agilent

Technologies) analitik kolon 40ºC sabit sıcaklıkta tutulmuş ve hareketli fazın akış hızı 0.5 mL/dk olarak çalışılmıştır.Mobil Faz A (MFA), %0.05'lik formik asitli su ve Mobil Faz B (MFB), ACN olan sistemde çift pompa yardımıyla hareketli fazın taşınması sağlanır. Tablo 2.1'de verilen gradiyent programı 5.20 dakika süre uygulanmıştır ve uygulanan gradiyent programı Şekil 2.1'de görselleştirilmiştir.

Tablo 2.1 Sildenafil ve Dapoksetin tayini için uygulanan gradiyent programı

MFA (%)	95	95	5	5	95	95
MFB (%)	5	5	95	95	5	5
Zaman (dk)	0.01	1.00	3.00	4.00	4.20	5.20



Şekil 2.1 Sildenafil ve Dapoksetin tayini için uygulanan gradiyent eğrisi

MS ile analizler, ESI tekniği pozitif iyon modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha hassas çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda örneklerin nicel analizi yapılmıştır. Sildenafil için 474.8 *m/z*, Dapoksetin için 305.8 *m/z* ve iç standart olarak kullanılan Tadalafil için 389.7 *m/z* ana iyon olarak belirlenmiştir. Parçalanma iyonları için ise sırasıyla 100.1, 157 ve 268 *m/z* izlenmiştir. Söz konusu analitlerin MRM (*m/z)* değerleri ve MS koşulları Tablo 2.2 ve 2.3'de verilmiştir. Tüm integrasyonlar ve veri değerlendirmeleri Analyst 1.5 programı kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 2.2 Analitlerin LC-MS/MS Analizi için MS koşulları

Parametre	Değer	Parametre	Değer
Perdeleme gaz basıncı (psi)	30	Iyon Kaynağı Gaz Basıncı (Gaz 1) (psi)	55
Iyon Sprey Voltajı (V)	3500	Iyon Kaynağı Gaz Basıncı (Gaz 2) (psi)	45
Kaynak Gaz sıcaklığı (ºC)	550	Çarpışma Assosiyasyon-Disosiyasyon (CAD) Gazı	12

Tablo 2.3 Analitlerin MRM değerleri

Parametre	Sildenafil	Dapoksetin	Tadalafil (IS)

Alıkonma süresi t_R (min)	3.31	3.46	3.59
İyon Geçiş (m/z)	474.8→100.1	305.8 →157	389.7→268
Parçalama (Declustering) Portansiyeli (V)	60	70	100
Giriş Potansiyeli (V)	13	13	13
Çarpışma Enerjisi (V)	30	30	17
Çarpışma Hücre Çıkış Potansiyeli	16	14	16

2.2 Örnek Hazırlama Prosedürü

Sentetik plazma çözeltisinden 500 µL alınıp, 10 mL'lik polipropilen tüpe konur ve üzerine 0.5 µg/mL'lik tadalafil ara stok çözeltisinden 10 µL eklenerek, 30 s karıştırılır. Ardından 3 mL etilasetat/dietileter (v/v; 1/1) karışımı ilave edilir ve 3 dakika boyunca karıştırılıp, 10 dk süre ile +4ºC'de 4500 rpm'de santrifüjlenir. Üst faz (organik faz) temiz bir 10 mL'lik polipropilen tüpe aktarılarak, 40 ºC' de azot gazı altında kuruluğa dek uçurulur.

Ardından, 500 µL seyreltme çözeltisi eklenerek ultasonik su banyosunda 15 dk boyunca çözündürülür ve 2 mL'lik eppendof tüplere aktarılır. Çözündürülen örnekler, 10 dk süre ile +4˚C'de 15300 rpm hızda santrifüjlenip üst faz 13mm 0.45 µm naylon filtreden geçirilir ve HPLC viallerine aktarılarak, cihaza enjekte edilir

3. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışma kapsamında Sildenafil ve Dapoksetin moleküllerinin bir arada tayinine yönelik LC-MS/MS sistemi kullanılarak kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla önce sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi optimize edilerek, en iyi gerikazanımları veren çözücü türü tespit edilmiş, ardından, yöntemin validasyonuna geçilmiştir. Geliştirilen yöntem EMA Biyoanalitik Metot Validasyonu rehberine (2015) göre valide edilmiştir.

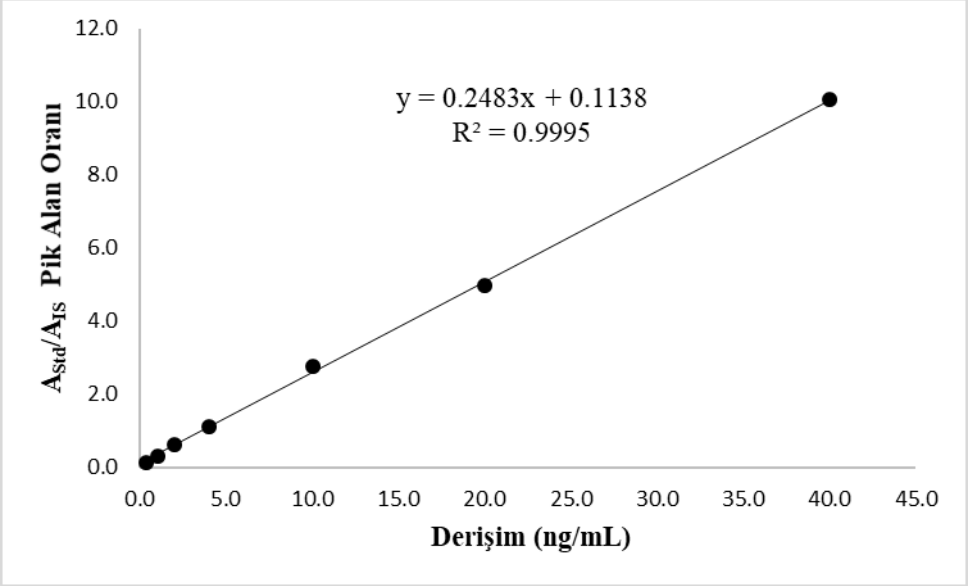
3.1 Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi Optimizasyonu

Sildenafil ve Dapoksetin'in eş zamanlı tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla farklı organik çözücüler ve bunların karışımları kullanılarak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla dietil eter, etil asetat, dietileter: ACN (4/1; v/v) ve dietil eter: etil asetat (1:1) karışımları ile çalışmalar yürütülmüş ve denel kesimde verilen prosedür uygulanmıştır. Bu yolla 0.4-40 ng/mL elde edilen LC-MS/MS kromatogramlardan elde edilen pik alanları (A_{std}/A_{IS}) iç standart olarak kullanılan Tadalafile ait pik alanlarına oranlanarak, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir.

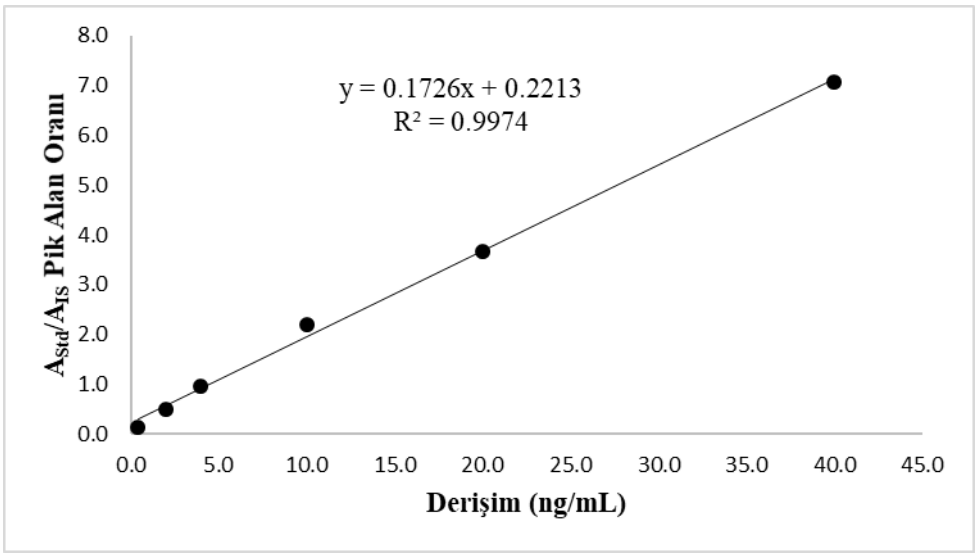
Bu amaçla öncelikle **dietil eter** kullanılarak yürütülen LLE çalışmasında sentetik plazma üzerine Sildenafil ve Dapoksetin standart çözeltilerinden eklenerek, 0.4 – 40.0 ng/mL derişim aralığında kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu grafikler Sildenafil ve Dapoksetin için Şekil 3.1 ve 3.2'de verilen grafiklerden çalışılan derişim aralığında doğrusal yanıt elde edilmiş ve korelasyon katsayılarının sırasıyla 0.9995 ve 0.9974 düzeyinde olduğu görülmüştür.

Bu kalibrasyon grafiklerinde yer alan her nokta için doğru denkleminden gidilerek hesaplanan derişim ile gerçek derişim oranlanarak doğruluk değerleri aşağıdaki formüle göre elde edilmiş ve her iki etken madde için Tablo 3.1'de verilmiştir.

$$\%Doğruluk = \frac{C_{hesaplanan}}{C_{gerçek}} x100$$



Şekil 3.1 Sildenafil için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.2 Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi

Tablo 3.1 Sildenafil ve Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri

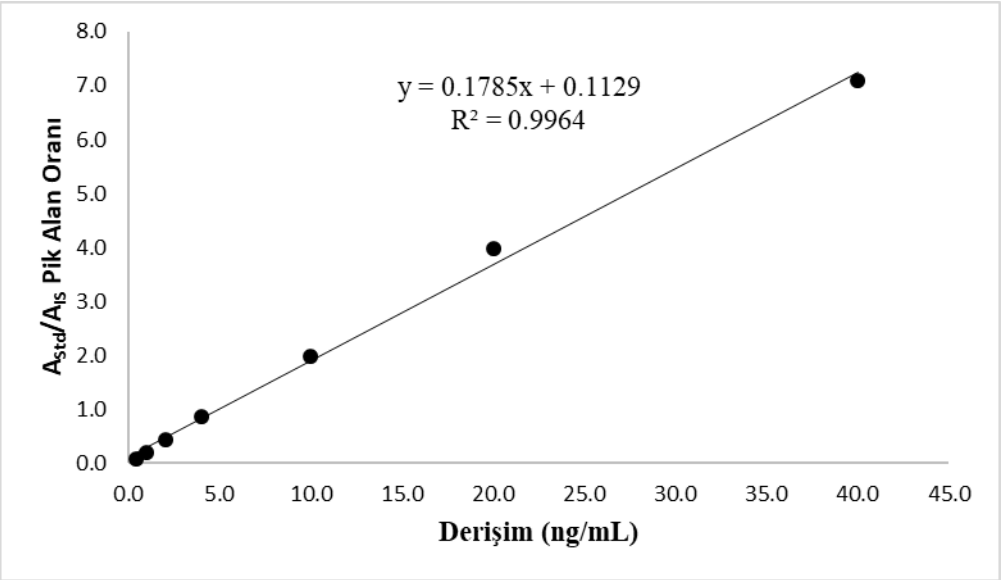
Gerçek Derişim (ng/mL)	Sildenafil		Dapoksetin	
	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	Doğruluk (%)	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	Doğruluk (%)
0.4	0.399	96.6	0.379	97.2
1.0	0.965	103.1	1.084	120.4
2.0	2.221	110.7	2.175	109.6
4.0	4.017	100.9	4.305	109.8
10.0	8.075	102.0	8.249	106.1
20.0	20.429	92.8	19.477	89.7
40.0	43.730	93.9	40.185	87.6

Bu verilere göre doğruluk değerleri EMA kriterlerini (±%15) karşılamaktadır. Dietileter ile yürütülen LLE işleminin uygunluğunu test etme amacıyla her iki etken madde için 0.4, 1.2 ve 40 ng/mL derişim düzeylerinde geri kazanım çalışmaları yapılmış ve elde edilen değerler Tablo 3.2'de verilmiştir.

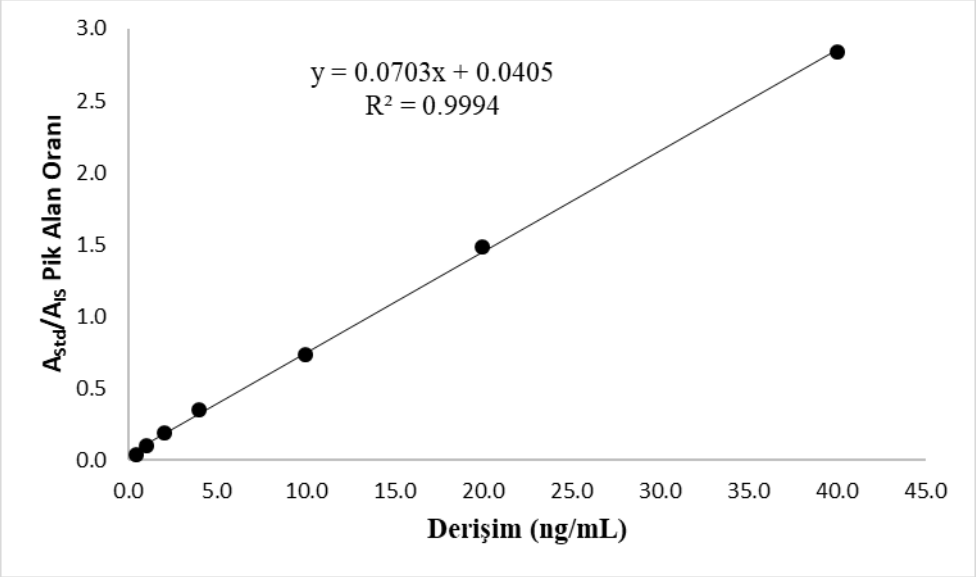
Tablo 3.2 Sildenafil ve Dapoksetin için dietil eter ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri

Derişim (ng/mL)	Gerikazanım (%)	
	Sildenafil	Dapoksetin
0.4	55.6	30.0
1.2	66.9	31.6
40.0	72.2	42.1

Yukardaki tablodan izleneceği üzere geri kazanım sonuçları EMA kriterlerine göre kabul edilebilir sınırlar (100 ± 15) içerisinde değildir. Dolayısıyla ekstraksiyon çözücüsü **etil asetat** ile değiştirilerek, aynı prosedürle 0.4-40 ng/mL derişim aralığında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.3 ve 3.4).



Şekil 3.3 Sildenafil için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.4 Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon grafiklerindeki her derişim değeri için doğruluk değerleri hesaplanmış ve her iki etken madde için Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3 Sildenafil ve Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri

Gerçek Derişim (ng/mL)	**Sildenafil**		**Dapoksetin**	
	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	**Doğruluk (%)**	**Hesaplanan Derişim (ng/mL)**	**Doğruluk (%)**
0.4	0.396	98.9	0.368	92.1
1.0	0.984	98.4	1.120	112
2.0	2.106	105.3	2.284	114.2
4.0	4.300	107.5	4.340	108.5
10.0	9.970	99.7	9.150	91.5
20.0	20.120	100.6	18.540	92.7
40.0	35.840	89.6	35.560	88.9

Bu verilere göre doğruluk değerleri EMA kriterini karşılamaktadır. Etilasetat ile yürütülen LLE işleminin uygunluğunu test etme amaçlı her iki etken madde için 0.4, 1.2 ve 40 ng/mL derişim düzeylerinde geri kazanım çalışmaları yapılmış ve elde edilen değerler Tablo 3.4'de verilmiştir.

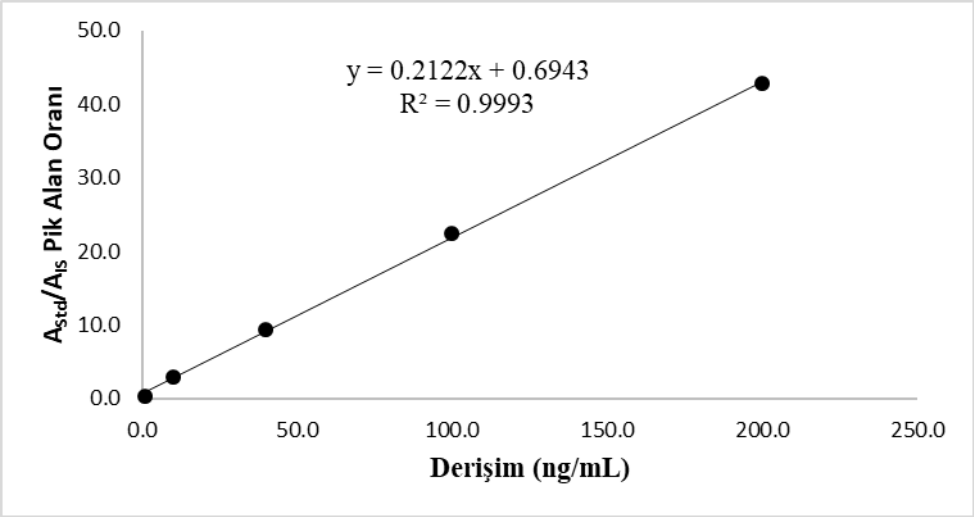
Tablo 3.4 Sildenafil ve Dapoksetin için etilasetat ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri

Derişim (ng/mL)	**Gerikazanım (%)**	
	Sildenafil	**Dapoksetin**
0.4	103.0	45.2

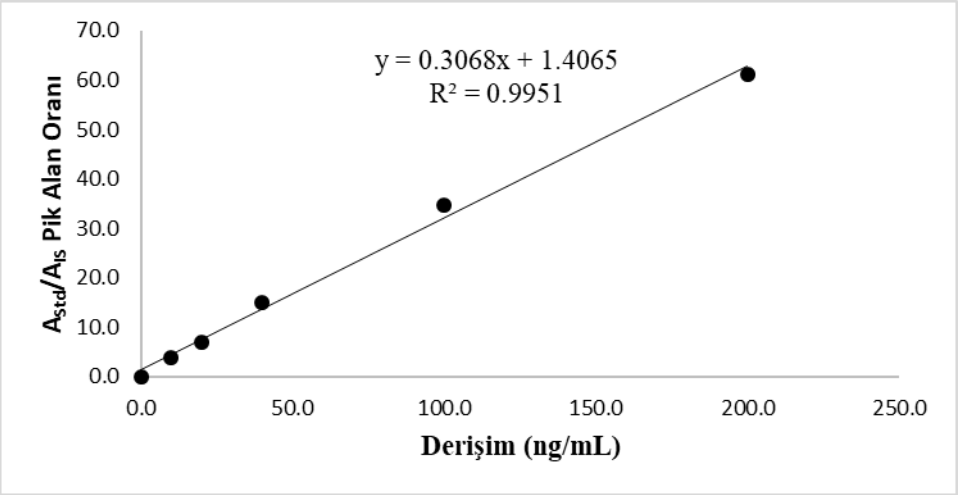
1.2	106.0	45.4
40.0	93.9	37.8

Yukarıdaki tablodan da görüleceği üzere sildenafil için uygun olmakla birlikte Dapoksetin için gerikazanım değerleri düşük bulunmuştur. Bu durumda Sildenafil ve Dapoksetin için molekül yapıları göz önüne alınarak, ekstraksiyon çözücüsünün polaritesini artırmak amacıyla ACN eklenmesine karar verilmiştir.

Bu amaçla çözücü olarak dietileter: ACN (4/1; v/v) karışımı kullanılmış ve aynı prosedür tekrarlanmıştır. Derişim aralığı üst limiti artıralarak, Sildenafil için 1-200 ng/mL ve Dapoksetin için 0.04-200 ng/mL aralığında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.5 Sildenafil için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.6 Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon grafiklerindeki her derişim değeri için doğruluk değerleri hesaplanmış ve her iki etken madde için Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri

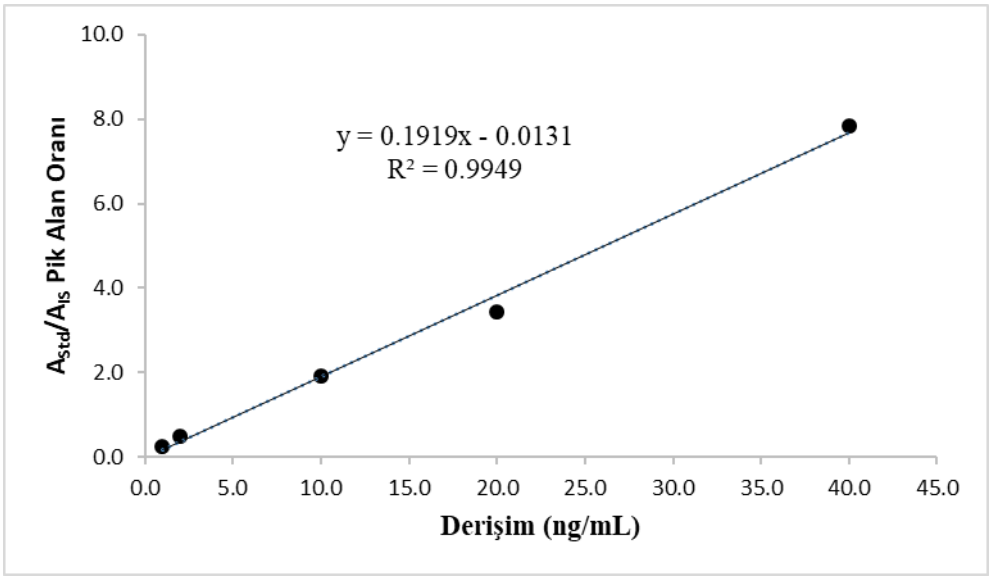
Gerçek Derişim (ng/mL)	Sildenafil		Dapoksetin	
	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	Doğruluk (%)	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	Doğruluk (%)
0.4	-	-	0.040	100
1.0	0.985	98.9	-	-
10.0	11.410	105.3	2.540	110.4
20.0	-	-	11.040	99.4
40.0	39.680	107.5	19.880	105.6
100.0	95.400	99.7	42.240	98.2
200.0	181.800	100.6	98.200	86.5

Bu verilere göre doğruluk değerleri EMA kriterlerini karşılamaktadır. Dietileter:ACN (4:1; v/v) karışımı ile yürütülen LLE işleminin uygunluğunu test etme amaçlı Sildenafil için 1 ve 3 ng/mL, Dapoksetin için ise 0.04, 0.12 ve 200.0 ng/mL derişimlerinde derişim düzeylerinde geri kazanım çalışmaları yapılmış ve elde edilen değerler Tablo 3.4'de verilmiştir.

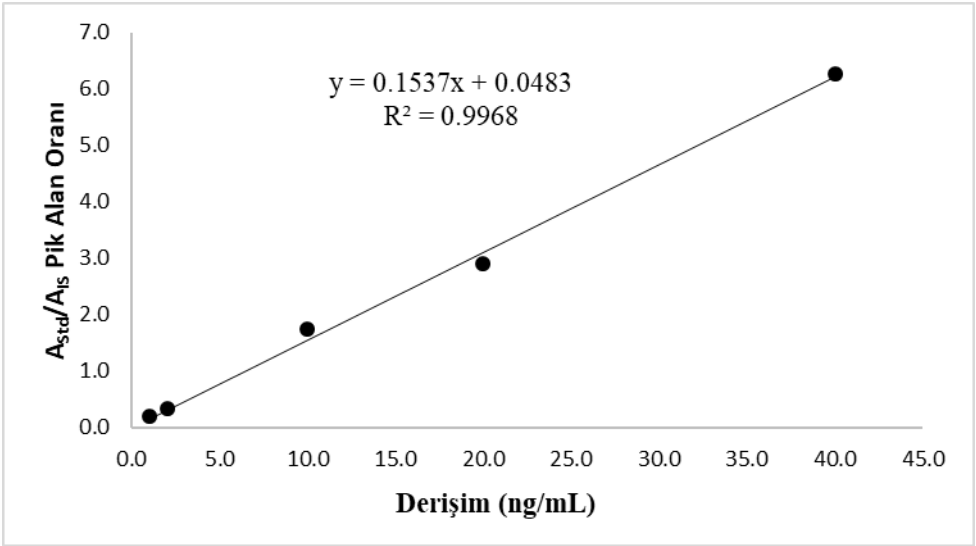
Tablo 3.6 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: ACN (4/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri

Derişim	**Gerikazanım (%)**	
(ng/mL)	**Sildenafil**	**Dapoksetin**
0.04	103.0	72.1
0.12	-	68.5
1.0	83.8	-
3.0	90.8	-
200.0	-	62.1

Bu verilerin ışığında ekstraksiyon çözücüsüne ACN ilavesinin eş zamanlı tayinde Sildenafil için negatif yönde, Dapoksetin için ise pozitif yönde etki yaptığı söylenebilir. Bununla birlikte, Dapoksetin için geri kazanım değerleri hala kabul edilebilir sınırlar içerisinde değildir. Son olarak, ekstraksiyon çözücüsü olarak dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı kullanılmış ve her iki etken madde için 1-100 ng/mL aralığında kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 3.7 ve 3.8).



Şekil 3.7 Sildenafil için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.8 Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon grafiklerindeki her derişim değeri için doğruluk değerleri hesaplanmış ve ilgili değerler her iki etken madde için Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi doğruluk yüzdeleri

Gerçek Derişim (ng/mL)	**Sildenafil**		**Dapoksetin**	
	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	**Doğruluk (%)**	**Hesaplanan Derişim (ng/mL)**	**Doğruluk (%)**
1.0	0.932	93.2	0.998	99.8
2.0	2.294	114.7	1.988	99.4
10.0	9.820	98.2	10.950	109.5
20.0	18.040	90.2	18.340	91.7
40.0	41.480	103.7	39.880	99.7

Bu verilere göre doğruluk değerleri EMA kriterini karşılamaktadır. Daha sonrasında üç ayrı derişimde (1.0, 3.0 ve 40.0 ng/mL) derişimlerinde yapılan geri kazanım çalışmasında elde edilen değerler Tablo 3.8'de özetlenmiştir.

Tablo 3.8 Sildenafil ve Dapoksetin için dietileter: etilasetat (1/1; v/v) karışımı ile ekstraksiyon sonrası hesaplanan gerikazanım değerleri

Derişim (ng/mL)	**Gerikazanım (%)**	
	Sildenafil	**Dapoksetin**
1.0	86.7	85.8
3.0	109.2	92.0
40.0	101.8	99.9

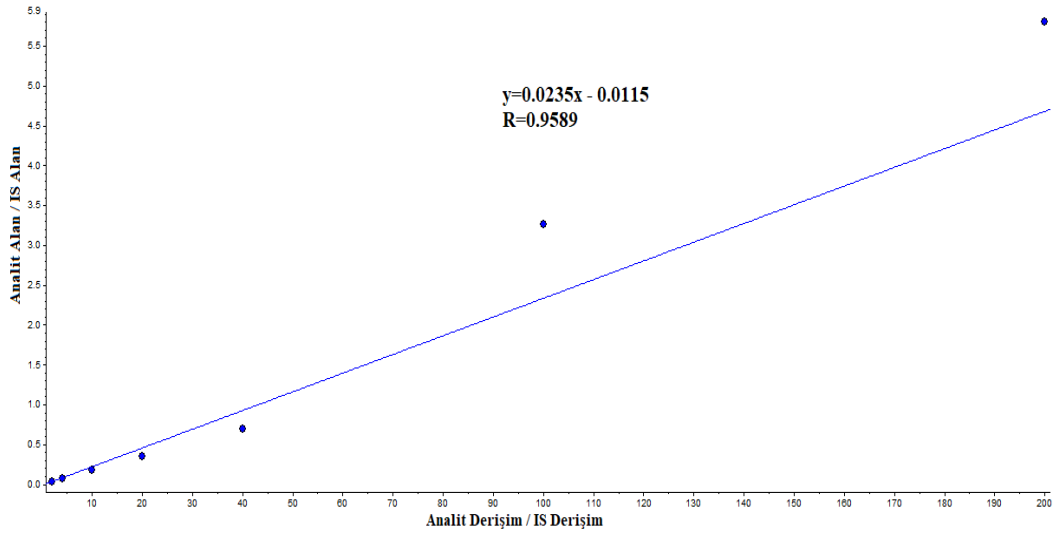
Tablodan görüleceği üzere her iki etken madde için geri kazanım değerleri %85-115 aralığında kabul edilebilir bulunmuştur. Dapoksetin ve Sildenafil için kalibrasyon eğrisinde 40 ng/mL derişiminden sonra doğrusallıktan sapma gözlemlenmiştir.

Bir sonraki aşamada çözücü karışım oranını optimize etmek için Dietileter: Etilasetat oranları (DEE/EtAc) hacimce 0.75/0.25 ve 0.25/0.75 olacak şekilde hazırlanmış ve mutlak geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla önce sentetik plazma numunesi LLE işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen ekstrat üzerine etken maddelerden 2.0 ng/mL ve iç standart olarak kullanılan Tadalafilden ise 10 ng/mL katılarak, LC-MS/MS cihazına enjekte edildiğinde elde edilen plazma katımlı pik alanları (A_{PK}) hesaplanmıştır. Ardından plazma numunesine doğrudan bu standartlar katılarak, LLE işlemi yürütülmüş ve elde edilen ekstrat doğrudan LC-MS/MS cihazına enjekte edilerek, edilen plazma ekimli pik alanları (A_{PE}) da ölçülmüştür. Mutlak gerikazanım (MGK) değerleri bu iki değerin oranından gidilerek (A_{PE} / A_{PK} x100) Tablo 3.9'da verilmiştir.

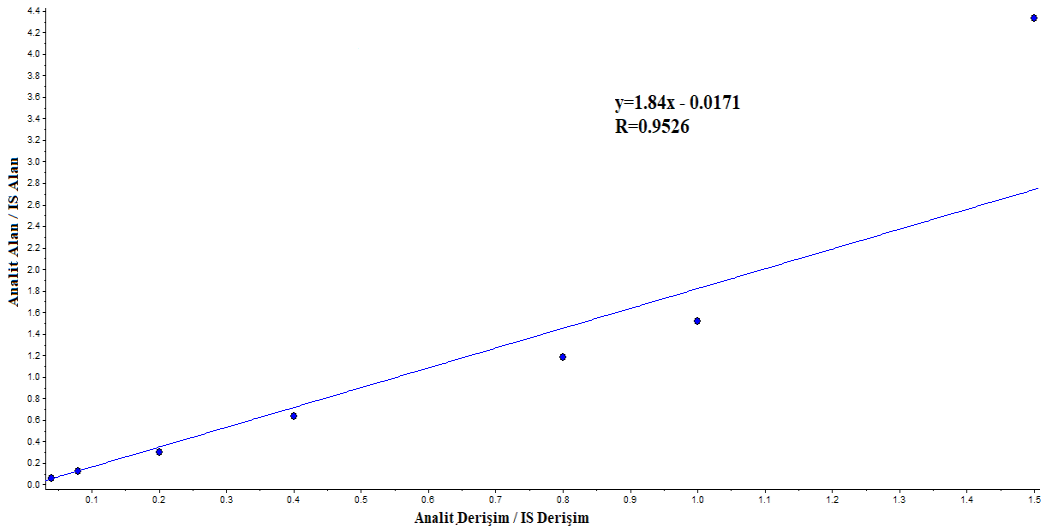
Tablo 3.9 Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil için farklı çözücü oranlarında mutlak geri kazanım değerleri

DEE/EtAc Hacim Oranı	Sildenafil			Dapoksetin			Tadalafil		
	A_{PK}	A_{PE}	MGK (%)	A_{PK}	A_{PE}	MGK (%)	A_{PK}	A_{PE}	MGK (%)
0.75 : 0.25	78 170	59 517		20 645	9 792		251 775	207 182	
	78 425	63 323	80.8	19 404	9 685	47.4	242 869	206 445	82.5
	72 073	61 839		19 131	8 603		249 454	200 308	
0.25 : 0.75	74 505	58 695		18 884	8.873		246 525	196 377	
	76 408	59 016	77.4	16 417	7.597	46.8	243 819	178 865	78.7
	75 281	57 531		14.215	6.375		228 843	190 609	

Bu karışımlarda mutlak geri kazanım değerleri Sildenafil ve Tadalafil için uyum gösterirken Dapoksetin için uygun bulunmamıştır. Sonuç olarak Shimatzu 8040 cihazı ile yürütülen çalışamlarda sıvı-sıvı ekstraksiyon için en iyi seçenek olarak Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) karışımının kullanılması uygun görülmüştür. Validasyon çalışmalarına geçmeden önce bu optimize koşullarda doğrusal aralık ABI SCIEX API 4000 cihazında tekrar denenmiştir. Bu amaçla Sildenafil için 2.0-200 ng/mL Dapoksetin 0.04-1.5 ng/mL ve aralığında doğrusallık çalışması yapılmıştır. Bu grafikler Şekil 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.9 Sildenafil için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 2-200 ng/mL



Şekil 3.10 Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 0.04-1.5 ng/mL

Bu kalibrasyon grafiklerindeki her bir derişim değeri için doğruluk yüzdeleri hesaplanmış ve Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10 Sildenafil ve Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası kalibrasyon eğrisi doğruluk değerleri

Sildenafil			**Dapoksetin**		
Gerçek Derişim (ng/mL)	**Hesaplanan Derişim (ng/mL)**	**Doğruluk (%)**	**Gerçek Derişim (ng/mL)**	**Hesaplanan Derişim (ng/mL)**	**Doğruluk (%)**
2.0	2.184	109.2	0.04	0.043	107.5
4.0	3.773	94.3	0.08	0.076	95.0
10.0	9.567	95.6	0.20	0.176	88.0
20.0	19.568	97.8	0.40	0.356	89.0
40.0	37.452	93.6	0.60	0.651	108.5
100.0	139.600	139.6	0.80	0.834	104.3
200.0	247.505	123.7	1.50	2.363	157.5

Bu verilerin ışığında kriterin sağlandığı aralık olarak Sildenafil için 2.0 – 40.0 ng/mL ve Dapoksetin için ise 0.04-1.00 ng/mL, olarak belirlenmiştir.

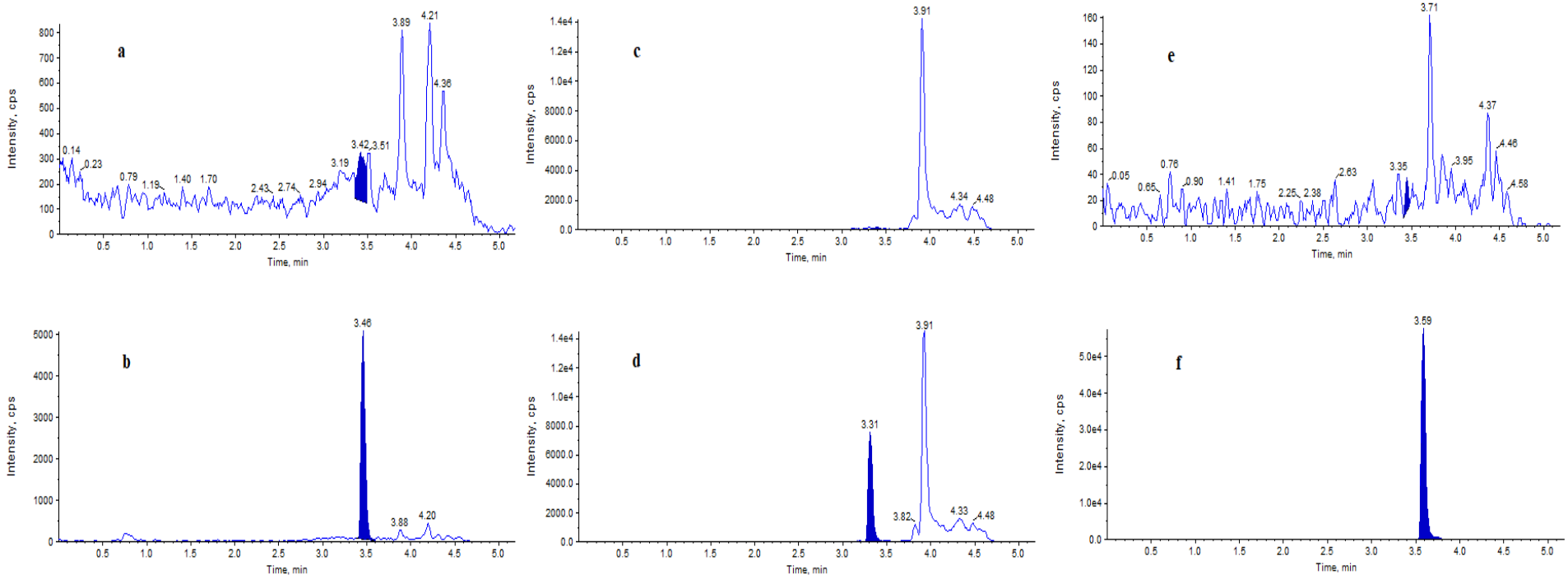
3.2 Validasyon Çalışması

3.2.1 Seçicilik

LLE yöntemi kullanılarak Dapoksetin ve Sildenafil için yöntemin geçerliliği test edilirken, LLOQ düzeyinde standart katımlı örnekle çalışmış ve altı farklı kör sentetik plazma ile de çalışmalar yürütülerek, pik alanları karşılaştırılmıştır. Tablo 3.11 ve Şekil 3.11'de görüldüğü üzere Dapoksetin, Sildenafil ve Tadalafil piklerine herhangi bir girişim söz konusu değildir.

Tablo 3.11 LLOQ düzeyinde Sildenafil ve Dapoksetin piklerinin boş plazmadan ayrımı

Örnek	Sildenafil		Dapoksetin		Tadalafil (IS)	
	Pik Alanı	Alan%	Alan	Alan%	Alan	Alan%
PELLOQ	17 265	-	20562	-	20042.781	-
Kör-1	166	0.963	2057	10.002	582.140	2.904
Kör-2	164	0.948	1999	9.720	614.000	3.063
Kör-3	121	0.698	2216	10.775	522.953	2.609
Kör-4	61	0.354	2016	9.802	578.214	2.885
Kör-5	121	0.698	2131	10.363	621.883	3.103
Kör-6	126	0.729	2026	9.854	688.939	3.437



Şekil 3.11 Sentetik plazma örneklerinde MRM kromatogramları. a) Dapoksetin kör plazma, b) Dapoksetin ekimli plazma (0.04 ng/mL), c) Sildenafil kör plazma, d) Sildenafil ekimli plazma (2 ng/mL), e) Tadalafil kör plazma ve f) Tadalafil ekimli plazma (10.0 ng/mL)

3.2.2 Taşınma (Carry-Over)

Geliştirilen yöntem üzerindeki taşınma etkisini değerlendirmek için sisteme 30 µl yüksek derişimli kalibrasyon örneği (Sildenafil → 40.0 ng / mL, Dapoksetin → 1.0 ng/mL) enjekte edilmiştir. Ardından kör örnek hemen enjekte edilmiş ve pik alanları PELLOQ düzeyinde karşılaştırılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda tüm analitler için anlamlı bir pik oluşmadığı görülmüştür (Tablo 3.12).

Tablo 3.12 LLE yönteminin Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil analitleri üzerinde taşınma etkisi

Örnek İsmi	Sildenafil		Dapoksetin		Tadalafil (İç Standart)	
	Alan	Alan%	Alan	Alan%	Alan	Alan%
PELLOQ	13 320.445	-	17 458	-	17 203.319	-
Yüksek Derişim	257 674.886	-	326 436	-	164 222.75	-
Kör	246.029	1.847	1 046	5.994	268.403	1.560

3.2.3 LLOQ

Alt belirtme sınırını belirlemek için, en düşük kalite kontrol örneği derişimi (dapoksetin için 0.04 ng/mL, sildenafil için 2.0 ng/mL ve tadalafil için 1 ng/mL) 7 kez enjekte edilmiştir. Daha sonra derişimler, 5 S/N (Sinyal/Gürültü) üzerinden hesaplanmıştır. Sentetik plazmadaki Dapoksetin, Sildenafil ve Tadalafil için alt belirtme sınırı sırasıyla 0.003, 0.033 ve 0.064 ng / mL olarak bulunmuştur. Her bir analit için hesaplanan LLOQ değerleri Tablo 3.13' te verilmiştir.

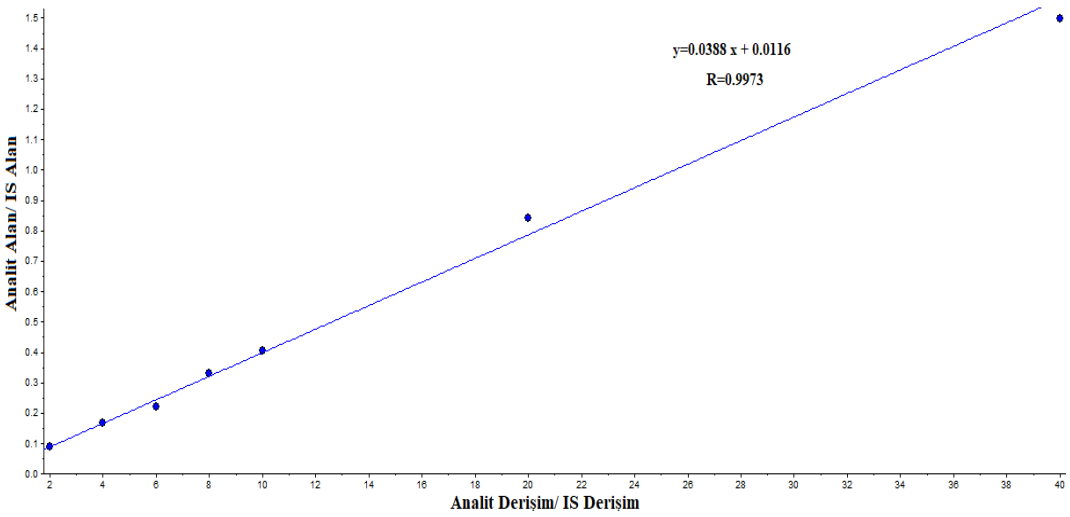
Tablo 3.13 Sildenafil, Dapoksetin ve Tadalafil için LLOQ değerleri

Örnek İsmi	Sildenafil (ng/mL)	Dapoksetin (ng/mL)	Tadalafil (ng/mL)
LLOQ-1	0.035	0.003	0.044
LLOQ-2	0.026	0.003	0.051
LLOQ-3	0.026	0.001	0.081
LLOQ-4	0.043	0.002	0.052
LLOQ-5	0.034	0.003	0.028
LLOQ-6	0.027	0.003	0.051
LLOQ-7	0.041	0.003	0.141
LLOQ Ortalama	**0.033**	**0.003**	**0.064**

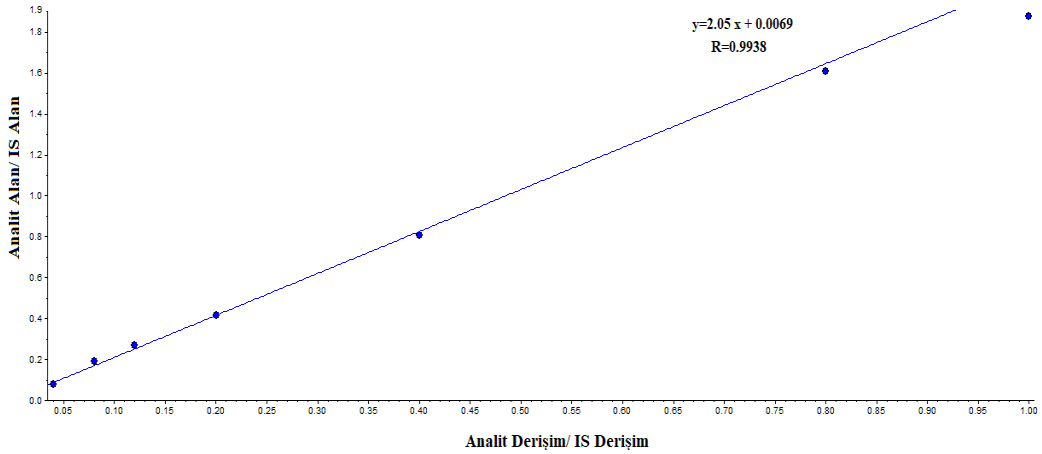
3.2.4 Doğruluk

Dapoksetin için 2.00-40.0 ng/mL ve Sildenafil için 0.04-1.00 ng/mL aralığında yedi noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Yöntemin doğrusallığı, ekstrakte edilmiş kör sentetik plazma üzerine farklı derişim seviyelerinde katımlı örneklerin pik alanları ile değerlendirilmiştir.

Doğrusallık, regresyon katsayısı (R) değeri kullanılarak hesaplanmıştır. LLE ile Sildenafil ve Dapoksetin için kalibrasyon eğrileri Şekil 3.12 ve 3.13'te verilmiştir. Yöntemin doğruluğu, üç gün süreyle katımlı kalite kontrol örnekleri analiz edilerek saptanmıştır. Deneyin doğruluğu, her bir kalite kontrol derişimi seviyesinde beş paralel katımlı Dapoksetin ve Sildenafil örneği ile ölçülmüştür (Dapoksetin; 0.04, 0.12, 0.40 ve 0.80 ng/mL, Sildenafil; 2.00, 6.00, 20.0 ve 32.0 ng/mL). Doğruluk ve geri kazanım Dapoksetin için % 85.0 ile 102.6 arasında, Sildenafil için % 90.7 ve 107.0 arasında değişen kabul edilebilir aralıklar içinde olduğu bulunmuştur. LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimde çalışılan kalite kontrol örnekleri için doğruluk ve geri kazanım sonuçları Tablo 3.14 ve Tablo 3.15' te verilmiştir.



Şekil 3.12 Sildenafil için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 2-40 ng/mL



Şekil 3.13 Dapoksetin için Dietileter: Etilasetat (1/1; v/v) ile ekstraksiyon sonrası elde edilen kalibrasyon eğrisi 0.04-1.0 ng/mL

Tablo 3.14 LLE tekniği ile LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerde Sildenafil için doğruluk ve geri kazanım sonuçları

Örnek İsmi	**LLOQ (2.000 ng/mL)**		**DÜŞÜK (6.000ng/mL)**		**ORTA (20.000 ng/mL)**		**YÜKSEK (32.000ng/mL)**	
	Hesaplanan Derişim	**Geri Kazanım%**	**Hesaplanan Derişim**	**Geri Kazanım%**	**Hesaplanan Derişim**	**Geri Kazanım%**	**Hesaplanan Derişim**	**Geri Kazanım%**
$N_{1.\ parallel}$	1.900	95.0	5.584	93.1	19.386	96.9	31.990	100.0
$N_{2.\ parallel}$	1.906	95.3	6.417	107.0	19.223	96.1	34.232	107.0
$N_{3.\ parallel}$	2.007	100.4	5.440	90.7	20.147	100.7	33.450	104.5
$N_{4.\ parallel}$	1.971	98.6	5.634	94.0	20.087	100.4	32.339	101.0
$N_{5.\ parallel}$	2.021	101.0	5.795	96.6	20.381	102.0	32.367	101.1
Ortalama	1.961	98.0	5.774	96.2	19.845	99.2	32.367	102.7
SD	0.056	2.802	0.381	6.353	0.509	2.543	0.936	2.923
Sapma %	-1.950	-1.950	-3.767	-3.767	-0.776	-0.776	1.147	2.736
RSD%	2.858	2.858	6.601	6.601	2.563	2.563	2.890	2.846

Tablo 3.15 LLE tekniği ile LLOQ, düşük, orta ve yüksek derişimlerde Dapoksetin için doğruluk ve geri kazanım sonuçları

Örnek İsmi	LLOQ (0.040 ng/mL)		DÜŞÜK (0.120 ng/mL)		ORTA (0.400 ng/mL)		YÜKSEK (0.800 ng/mL)	
	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%
$N_{1.\ parallel}$	0.034	85.0	0.114	95.0	0.365	91.2	0.712	89.0
$N_{2.\ parallel}$	0.038	95.0	0.107	89.1	0.370	92.5	0.751	93.9
$N_{3.\ parallel}$	0.040	100.0	0.108	90.0	0.382	95.50	0.821	102.6
$N_{4.\ parallel}$	0.039	97.5	0.110	91.7	0.401	100.2	0.774	96.8
$N_{5.\ parallel}$	0.035	87.5	0.109	90.8	0.386	96.5	0.695	86.9
Ortalama	0.037	93.0	0.110	91.3	0.381	95.2	0.751	93.9
SD	0.003	6.471	0.003	2.252	0.014	3.542	0.050	6.277
Sapma %	-7.000	-7.000	-8.667	-8.667	-4.800	-4.800	-6.175	-6.175
RSD%	6.958	6.958	2.465	2.465	3.720	3.720	6.690	6.690

3.2.5 Kesinlik

Gün içi ve günler arası kesinliği değerlendirmek için farklı derişim seviyelerinde (Dapoksetin; 0.04, 0.12, 0.40 ve 0.80 ng/mL ve Sildenafil; 2.00, 6.00, 20.0 ve 32.0 ng/mL) hazırlanan kalite kontrol örnekleri ardışık olarak üç enjeksiyon yapılmıştır. Farklı üç gün aynı şekilde örnek hazırlanıp değerlendirilmiştir.

Yöntem için gün içi ve günler arası kesinliğin genel sonuçları Tablo 3.14, 3.15, 3.16 ve 3.17'de verilmiştir. Gün içi bağıl standart sapma değerleri Dapoksetin için % 2.5 - % 7.0 ve Sildenafil için % 2.6 - % 6.6 aralığındadır. Günler arası kesinlikte ise sırasıyla Dapoksetin ve Sildenafil için %2.5-%11.0, %4.0-%8.3 değerleri aralığında değişiklik göstermektedir. Hem gün içi hem de günler arası çalışmalar için elde edilen sonuçların gün içi ve günler arası kesinlik kriterlerini karşıladığı görülmüştür.

Tablo 3.16 LLE tekniği ile üretilen farklı derişim seviyelerinde Sildenafil için kesinlik sonuçları

Örnek İsmi	LLOQ (2.000 ng/mL)		DÜŞÜK (6.000 ng/mL)		ORTA (20.000 ng/mL)		YÜKSEK (32.000 ng/mL)	
	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%
1.Gün Ort	1.863	93.1	5.750	95.8	19.080	95.4	32.845	102.6
2.Gün Ort	1.723	86.1	5.629	93.8	22.151	110.8	34.968	109.3
3.Gün Ort	1.820	91.0	5.248	87.4	22.047	110.2	35.517	111.0
Ort	1.802	90.0	5.542	92.3	21.093	105.5	34.443	107.6
SD	0.071	3.567	0.262	4.363	1.744	8.720	1.411	4.411
Günler Arası Tkr RSD%	3.960	3.960	4.723	4.723	8.269	8.269	4.098	4.098
Günler Arası Tkr Sapma%	-9.906	-9.906	-7.626	-7.626	5.463	5.463	7.635	7.635

Tablo 3.17 LLE tekniği ile üretilen farklı derişim seviyelerinde Dapoksetin için kesinlik sonuçları

Örnek İsmi	LLOQ (0.040 ng/mL)		DÜŞÜK (0.120 ng/mL)		ORTA (0.400 ng/mL)		YÜKSEK (0.800 ng/mL)	
	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%	Hesaplanan Derişim	Geri Kazanım%
1.Gün Ort	0.037	91.7	0.110	91.4	0.379	94.7	0.725	90.7
2.Gün Ort	0.044	110.8	0.128	106.4	0.360	90.1	0.727	90.8
3.Gün Ort	0.045	112.5	0.123	102.2	0.370	92.4	0.738	92.2
Ortalama	0.042	105.0	0.120	100.0	0.370	92.4	0.730	91.2
SD	0.005	11.577	0.009	7.743	0.009	2.292	0.007	0.846
Günler Arası Tkr RSD%	11.026	11.026	7.743	7.743	2.481	2.481	0.927	0.927
Günler Arası Tkr Sapma%	5.000	5.000	0.000	0.000	-7.611	-7.611	-8.764	-8.764

3.2.6 Dilüsyon Doğruluğu

Geliştirilen yöntemdeki seyreltme etkisini gözlemlemek için doğrusal kalibrasyon aralığının üzerinde olacak şekilde seçilen derişimler Sildenafil için 80.000 ng/mL, Dapoksetin için 2.000 ng/mL olarak alınmış ve bu derişimlerde katımlar yapılarak çalışılmıştır. Daha sonra 5 paralel olacak şekilde kör örnek ile 10 kat seyreltilmiştir. Bu işlemin sonucunda seyrelen örneklerin kalibrasyon aralığında yer aldığı ve analitlerde seyrelmeye bağlı gözlenen önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Tablo 3.18).

Tablo 3.18 LLE tekniği ile elde edilen 80.000 ng/mL sildenafil ve 2.000 ng/mL dapoksetin derişimlerinde seyreltme etkisinin genel sonuçları

Örnek İsmi	Hesaplanan Derişim (ng/mL)	
	Sildenafil	Dapoksetin
Dilüsyon-1	90.023	2.170
Dilüsyon-2	89.727	2.030
Dilüsyon-3	90.389	2.080
Dilüsyon-4	91.096	2.101
Dilüsyon-5	90.713	2.058
Ortalama	90.390	2.088
SD	0.542	0.053
RSD%	0.600	2.537
Sapma%	12.987	4.390

3.2.7 Matriks Etkisi

Matriks etkisi incelenirken 6 farklı sentetik plazma kullanılarak düşük (6.000 ng/mL Sildenafil, 0.120 ng/mL Dapoksetin) ve yüksek (32.000 ng/mL Sildenafil, 0.800 ng/mL Dapoksetin) derişimlerde kör sentetik plazma üzerine katım yapılarak örnek hazırlanmıştır. Mobil faz ortamında hazırlanan aynı derişimde örneklerle karşılaştırılarak örnekler üzerindeki iyon baskılama etkisi değerlendirilmiştir. Sildenafil ve Dapoksetin için matriks etkisi sonuçları Tablo 3.19 ve Tablo 3.20' da verilmiştir.

Tablo 3.19 Sildenafil üzerindeki matriks etkisinin değerlendirilmesi

Örnek İsmi	Düşük (6.000 ng/mL)			Yüksek (32.000 ng/mL)		
	Alan		Pik Alanı %	Alan		Pik Alanı %
	Sildenafil	Tadalafil		Sildenafil	Tadalafil	
KE	42541.145	332821	-	211282.428	332821	-
MF 1	41024.066	168167	190.853	197545.670	157977	196.980
MF 2	43746.398	175314	195.222	197994.549	157492	198.035
MF 3	41517.562	172915	187.845	197274.235	158063	196.601
MF 4	42819.623	171996	194.772	204081.182	155346	206.942
MF 5	42128.657	171414	192.289	203038.493	157355	203.256
MF 6	40619.100	169095	187.933	198471.090	161476	193.614
Ortalama			191.484	**Ortalama**		199.238

SD	3.215	**SD**	4.912
RSD%	1.679	**RSD%**	2.465

Tablo 3.20 Dapoksetin üzerindeki matriks etkisinin değerlendirilmesi

Örnek İsmi	**Düşük (0.120 ng/mL)**			**Yüksek (0.800 ng/mL)**		
	Alan		**Pik Alanı %**	**Alan**		**Pik Alanı %**
	Dapoksetin	**Tadalafil**		**Dapoksetin**	**Tadalafil**	
KE	73605.803	332821	-	473500.309	332821	-
MF 1	50180.700	168167	134.926	316399.965	157977	140.778
MF 2	52227.208	175314	134.704	314977.303	157492	140.576
MF 3	50189.255	172915	131.243	320142.928	158063	142.365
MF 4	52070.543	171996	136.890	317504.415	155346	143.661
MF 5	50008.888	171414	131.917	319150.551	157355	142.562
MF 6	52304.826	169095	139.866	323459.851	161476	140.800
Ortalama			134.924	**Ortalama**		141.790
SD			3.191	**SD**		1.258
RSD%			2.365	**RSD%**		0.887

3.2.8 Kararlılık

Dapoksetin ve Sildenafil'in sentetik plazma ile mobil faz içerisinde farklı zamanlarda ve sıcaklıklardaki kararlılığını belirlemek için kısa süreli oda sıcaklığı, donma erime kararlılığı, stok çözelti kararlılığı testleri uygulandı.

Stok Çözelti Kararlılığı değerleri Tablo 3.21 ve 3.22'de gösterilmektedir. Dapoksetin için 0.120 ve 0.800 ng/mL ve Sildenafil için 6.000 ve 32.000 ng / mL içeren ayrı ayrı standart stok çözeltileri hazırlandı ve -20 °C' de dört gün boyunca saklandı. Elde edilen sonuçlara göre dört gün boyunca Dapoksetin ve Sildenafil' in kararlı olduğu görüşmüştür.

Donma Erime Kararlılığı Dapoksetin için 0.120 ve 0.800 ng/mL, Sildenafil için 6.000 ve 32.000ng/mL derişimlerde iki seri örnek hazırlanarak analizlenmiştir. 1. Seri örnekler hemen analizlenmiştir. 2. Seri örnekler ise -80 °C derin dondurucuya alınarak donma-çözülme döngüsü başlatılmıştır. Üç donma-çözülme çevriminden sonra 2. seri örnekler ekstrakte edilerek analizlenmiştir. Donma-Erime Kararlılığı sonuçları Tablo 3.23 ve 3.24' te verilmiştir. Dapoksetin ve Sildenafil' in donma- erime döngüsünden etkilenmediği görülmüştür.

Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı sonuçları Tablo 3.25 ve 3.26' da verilmiştir. Sildenafil ve Dapoksetin' in analizlenen örnekleri 24 saat boyunca oda sıcaklığında

bekletilerek bu süre sonunda tekrar analizlenmiştir. Sildenafil ve Dapoksetin’ in 24 saat boyunca oda sıcaklığında kararlı olduğu görülmüştür.

Tablo 3.21 Dapoksetin'in stok çözelti kararlılığının değerlendirilmesi

	DÜŞÜK DERİŞİM (0.120 ng/mL)							YÜKSEK DERİŞİM (0.800 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ortalama	SD	%RSD	% Gerçek Değerden Sapma	% Sapma Dapoksetin (1.gün & 4.gün)	Hesaplanan Derişim	Ortalama	SD	%RSD	% Gerçek Değerden Sapma	% Sapma Dapoksetin (1.gün & 4.gün)
1.Gün 0.Saat	1	0.112	0.113	0.002	1.848	-6.111	-2.959	0.707	0.722	0.023	3.167	-9.792	2.263
	2	0.115						0.710					
	3	0.111						0.748					
1.Gün 5.Saat	1	0.110	0.116	0.007	5.653	-3.333		0.729	0.738	0.024	3.227	-7.750	
	2	0.123						0.720					
	3	0.115						0.765					
4.Gün	1	0.109	0.110	0.002	1.384	-8.056	-2.071	0.731	0.741	0.019	2.532	-7.333	2.725
	2	0.110						0.730					
	3	0.112						0.763					

Tablo 3.22 Sildenafil'in stok çözelti kararlılığının değerlendirilmesi

	DÜŞÜK DERİŞİM (6.000 ng/mL)							YÜKSEK DERİŞİM (32.000 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ortalama	SD	%RSD	% Gerçek Değerden Sapma	% Sapma Sildenafil (1.gün & 4.gün)	Hesaplanan Derişim	Ortalama	SD	%RSD	% Gerçek Değerden Sapma	% Sapma Sildenafil (1.gün & 4.gün)
1.Gün 0.Saat	1	6.014	5.857	0.196	3.353	-2.378	-2.333	33.399	33.828	0.373	1.102	5.713	-1.295
	2	5.921						34.072					
	3	5.637						34.013					
1.Gün 5.Saat	1	5.779	5.721	0.052	0.914	-4.656		33.985	33.390	0.688	2.060	4.344	
	2	5.705						33.548					
	3	5.678						32.637					
4.Gün	1	6.337	6.492	0.212	3.267	8.206	10.841	33.862	34.976	1.087	3.107	3.393	3.393
	2	6.406						36.033					
	3	6.734						35.032					

Tablo 3.23 Dapoksetin'in donma-erime kararlılığının değerlendirilmesi

Döngü	Prl	DÜŞÜK DERİŞİM (0.120 ng/mL)						Prl	YÜKSEK DERİŞİM (0.800 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma %
1.Döngü	1	0.115	0.115	0.001	0.501	-3.889	12.428	1	0.716	0.748	0.029	3.910	-6.458	-4.053
	2	0.116						2	0.773					
	3	0.115						3	0.756					
3.Döngü	1	0.135	0.130	0.005	3.882	8.056		1	0.696	0.718	0.030	4.160	-10.250	
	2	0.129						2	0.706					
	3	0.125						3	0.752					

Tablo 3.24 Sildenafil' in donma-erime kararlılığının değerlendirilmesi

Döngü	Prl	DÜŞÜK DERİŞİM (6.000 ng/mL)						Prl	YÜKSEK DERİŞİM (32.000 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma %
1.Döngü	1	5.579	5.855	0.370	6.327	-2.417	-7.560	1	33.285	33.199	0.486	1.465	3.746	6.476
	2	6.276						2	33.636					
	3	5.710						3	32.675					
3.Döngü	1	5.661	5.412	0.237	4.379	-9.794		1	34.635	35.349	0.829	2.345	10.465	
	2	5.387						2	35.153					
	3	5.189						3	36.258					

Tablo 3.25 Dapoksetin' in kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığının değerlendirilmesi

Zaman (Saat)	Prl	DÜŞÜK DERİŞİM (0.120 ng/mL)						YÜKSEK DERİŞİM (0.800 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%	Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%
0	1	0.116	0.115	0.003	2.301	-4.167	0.000	0.724	0.742	0.045	6.090	-7.292	-0.809
	2	0.112						0.793					
	3	0.117						0.708					
24	1	0.114	0.115	0.002	1.506	-4.167		0.721	0.736	0.014	1.909	-8.042	
	2	0.117						0.737					
	3	0.114						0.749					

Tablo 3.26 Sildenafil' in kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığının değerlendirilmesi

Zaman (Saat)	Prl	DÜŞÜK DERİŞİM (6.000 ng/mL)						YÜKSEK DERİŞİM (32.000 ng/mL)					
		Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%	Hesaplanan Derişim	Ort.	SD	RSD%	Gerçek Değerden Sapma%	Sapma%
0	1	5.539	5.442	0.136	2.507	-9.300	14.939	32.949	33.101	0.514	1.553	3.441	9.020
	2	5.501						32.680					
	3	5.286						33.674					
24	1	6.270	6.255	0.209	3.340	4.250		35.423	36.087	0.592	1.640	12.771	
	2	6.039						36.278					
	3	6.456						36.559					

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında erkeklerde erektil disfonksiyon ve erken ejekülasyon tedavisinde kullanılan Sildenafil ve Dapoksetin'in bir arada tayinine yönelik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve LC-MS/MS sistemiyle analizlenmiştir. Geliştirilen yöntemin gerçerliliği EMA validayon parametreleri dikkate alınarak yapılmıştır. Sildenafil 2.0-40.0 ng/mL aralığında doğrusallık sağlanmıştır. Dapoksetin ise 0.04-1.00 ng/mL aralığında doğrusaldır. Dapoksetin' in LLOQ düzeyi literatürde verilenden 25 kat daha düşük bulunmuş olup, daha iyi bir duyarlıkta tayin edilebildiği gösterilmiştir. HILIC kolon kullanılarak yöntem optimizasyonu sağlanırsa daha duyar seviyelere ulaşılabilir.

Bu iki etken maddenin bir arada tayini daha önce yapılmamış olup bu çalışmada ilk defa ikisinin birlikte tayinine yönelik yöntem geliştirilip valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem biyoyararlanım& biyoeşdeğerlik çalışmaları için uygulanılır bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T.,Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S. and Tırnaksız, F., 2007, Modern Farmasötik Teknoloji, Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, 484.

Al-Hroub H., Alkhawaja B., Alkhawaja E., Arafat T., 2016, Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step forthe determination of sildenafil in human plasma, Journal of Chromatography B, 1009-1010 (2016)

Alkharfy K.M., 2009, Simple and sensitive LC-ESI-MS method for the quantitation of sildenafil in plasma samples, J. Sep. Sci. 2009, 32, 3866–3870

Applied Biosystem Sciex, 2012, Intro triple_qtrapl, Erişim tarihi: 23.09.2019

Beebe R.K., Pell J.R., Seasholtz R.M., Chemometrics: A Practical Guide, Michigan, 360s

Bélanger, J.M.R., Paré, J.R.J., Sigouin, M., 1997, Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applicationsTechniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, 18, 37-59

Blumberg R., 1988, Liquid-Liquid Extraction, Academic Pr, Londra, 192s.

Challa B.R., Awen B.Z., Chandu B.R., Chandu M.K., Bannoth C.K., Kanala K., Shaik R.P., Peramane R. and Gogineni R., 2010, Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study, Anal. Methods, 2010, 2, 1043–1050

Guermouche M.H., Bensalah K., 2006, Solid phase extraction and liquid chromatographic determination of sildenafil and N-demethylsidenafil in rat serum with basic mobile phase, 952-957

KAYNAKLAR (DEVAM)

Hamilton C.L., Cornpropst J.D., 1993, Determination of dapoxetine, aninvestigational agent with the potential for treating depression, and its mono-and di-desmethyl metabolites in human plasma using column-switchinghigh-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. 612 (1993)253–261

Holcapek M., Jirásko R., Lísa M., 2012, Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques, Journal of Chromatography A, 1259 (2012) 3– 15

Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, and Tai HL, 2003, Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical, Clin Biochem Rev 2003; 24: 3-12

Kang, J.S., 2012, Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, InTech, 794

Kim J., Ji H., Kim S. J., Lee H.W., Lee S., Kim D.S., Yoo M., Kim W.B., Lee H.S., 2003, Simultaneous determination of sildenafil and its active metabolite UK-103,320 in human plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 32 (2003) 317/322

Kim T.K., Kim I.S., Hong S.H., Choi Y.K., Kim H., Yoo H.H., 2013, Determination of dapoxetine in rat plasma by ultra-performance liquidchromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B. Anal. Technol.Biomed. Life Sci. 926 (2013) 42–46.

Kromidas, S., 2006, HPLC Made to Measure, Wiley- VCH, Weinheim, 753.

Leiviskä, K., 2013**,** Introduction to Experiment Design, University of Oulu, Finland, http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/, Erişim Tarihi: 30.09.2019

KAYNAKLAR (DEVAM)

Liew K.B., Loh G.O.K., Tan Y.T.F. and Peh K.K., 2015, Simultaneous quantification of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by UFLC coupled with ESI-MS/MS and pharmacokinetic and bioequivalence studies in Malay population, Biomed. Chromatogr. 2015; 29: 953–960

Morgan L.S., Deming N.S., 1993, Experimental Design: A Chemometric Approach, Amsterdam, 436s

Otto M., 2016, Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry, Freiberg, 400s

Özdokur, K.V., 2019, Voltammetric Determination of Isoniazid Drug in Various Matrix by Using CuOx Decorated MW-CNT Modified Glassy Carbon Electrode, Electroanalysis, acceted manuscript, https://doi.org/10.1002/elan.201900307

Pitt, J.J., 2009, Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry Clin Biochem, 30, 19-34

Prasain J. K., 2012, TANDEM MASS SPECTROMETRY — APPLICATIONS AND PRINCIPLES, Croatia, 751s

SAISHO K., SCOTT K.S., MORIMOTO S. and NAKAHARA Y., 2001, Hair Analysis for Pharmaceutical Drugs. II. Effective Extraction and Determination of Sildenafil (Viagra®) and Its N-Desmethyl Metabolite in Rat and Human Hair by GC-MS, Biol. Pharm. Bull. 24(12) 1384—1388

Sharaf A.M., Illman L.D., Kowalski R.B., Chemometrics, Dhahran, Seattle, 327s

Sharma N., Rajput P., Thakkar A. and Sarma G.S., 2012, RP-HPLC Method Development for Estimation of Sildenafil Citrate in Tablets and in Seminal Fluid, Department of Pharmaceutical Analysis, I.S.F. College of Pharmacy, Near Ghal Kalan, LudhianaFerozepur Road, Moga. 142001, 2231-3354

KAYNAKLAR (DEVAM)

Sheu M., Wu A., Yeh G., Hsia A., Ho H., 2003, Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil, Journal of Chromatography B, 791 (2003) 255–262

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. and Glajch, J., L., 1997, Practical HPLC Method Development, AWiley-Interscience Publication, Canada, Second Edition: 765.

Strano-Rossi S., Anzillotti L., Torre X. and Botre F., 2010, A gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil and their metabolites in human urine, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010; 24: 1697–1706

Swartz, 2010, HPLC Detectors: A Brief Review, Swartz, M., Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33:9-12, 1130-1150

Tripathi A.S., Sheikh I., Dewani A.P., Shelke P.G., Bakal R.L., Chandewar A.V., and Mazumderd P.M., 2012, Development and validation of RP-HPLC method for sildenafil citrate in rat plasma-application to pharmacokinetic studies, Saudi Pharm J. 2013 Jul; 21(3): 317–321

Wang C.C., Gomez R.A., Fernandez L.P., 2013, Determination of sildenafil by preconcentration onsurfactant coated polymeric resin followed byspectrofluorimetry, Journal of Pharmaceutical Analysis 2013;3(3):173–179

Wang Y., Wang J., Cui Y., Fawcett J.P., Gua J., 2005, Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma, Journal of Chromatography B, 828 (2005) 118–121

Watson J.T. ve Sparkman O.D., 2014, Introduction to Mass Spectrometry, West Sussex, England, 862s

www.aifd.org.tr, 2017, Orijinal İlaç Nedir?, https://www.aifd.org.tr/yenilikcilik/orijinal-ilac-nedir/, Erişim Tarihi: 02.10.2019

KAYNAKLAR (DEVAM)

www.betest.kfda.go.kr, 2005, Central Drugs Standard Control Organization, "Guidelines for Bioavailability & Bioequivalence Studies, http://betest.kfda.go.kr/world/docu/(etc)india.pdf, Erişim Tarihi: 16.09.2019

www.cdsco.gov.in, 2005, https://cdsco.gov.in/opencms/opencms/en/bioequi_bioavail/, Erişim Tarihi: 13.09.2019

www.chromacademy.com, 2019, https://www.chromacademy.com/hplc-training.html, Erişim tarihi: 22.09.2019

www.drugbank.ca, 2019, Dapoxetine, Identification https://www.drugbank.ca/drugs/DB04884, Erişim tarihi: 13.09.2019

www.ema.europa.eu, 2015, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf , Erişim tarihi : 26.09.2019

www.fda.gov, FDA (Food and Drug Administration), "Guidance for Industry- Bioanalytical Method Validation", http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf, Erişim tarihi: 23.09.2019

www.itl.nist.gov, 2013, https://div898/handbook/pri/section1/pri11.htm, Erişim Tarihi: 09.10.2019

www.kmoetkinlik.org, 2019**,** http://www.kmoetkinlik.org/ICPC16/present/10.pdf, Erişim Tarihi : 25.09.2019

www.laboratoryinfo.com, 2019, https://laboratoryinfo.com/hplc/, Erişim Tarihi: 07.10.2019

www.premierbiosoft.com, 2019, Mass Spectrometry, http://premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html, Erişim Tarihi: 08.10.2019

KAYNAKLAR (DEVAM)

www.quimica.udea.edu.co, 2019, http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/detectors.html, Erişim Tarihi: 07.10.2019

www.rxlist.com, 2019. VIAGRA® (sildenafil citrate) Tablets, Descrıptıon https://www.rxlist.com/viagra-drug.htm, Erişim Tarihi: 13.09.2019

www.titck.gov.tr, 2008, https://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/ Uploads/ UnitPageAttachment/c7idnsSQ.docx, Erişim Tarihi: 13.09.2019

www.waters.com, 2012, https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf, Erişim Tarihi: 07.10.2019

Yokoyama Y., Tomatsuri M., Hayashi H., Hirai K., Ono Y., Yamada Y., Todoroki K., Toyo'oka T., Yamada H., Itoh K., 2014, Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 89 (2014) 227– 232

Zhang W., Wu Q., Wang Y., Sun M., Wang R., 2015, Development and validation of a sensitive UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of dapoxetine and its two metabolites in human plasma, 0731-7085/© 2015 Elsevier B.V.