

**ASENAPİN'İN STABİLİTE GÖSTERGELİ
YPSK YÖNTEMİ ile
FARMASÖTİK DOZAJ FORMLARINDAN
TAYİNİ ve VALİDASYONU**

Sakine ATİLA KARACA

Yüksek Lisans Tezi

**ASENAPİN'İN STABİLİTE GÖSTERGELİ
YPSK YÖNTEMİ ile FARMASÖTİK DOZAJ
FORMLARINDAN TAYİNİ ve
VALİDASYONU**

Sakine ATİLA KARACA

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ocak 2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Sakine Atila Karaca'nın "Asenapin'in Stabilité Göstergeli YPSK Yöntemi ile Farmasötik Dozaj Formlarından Tayini ve Validasyonu" başlıklı, Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 14.01.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Duygu YENİCELİ UĞUR Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Dilek AK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Bengi USLU Ankara Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...18...01...2016 tarih ve2..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Dilek AK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ASENAPİN'İN STABİLİTE GÖSTERGELİ YPSK YÖNTEMİ ile FARMASÖTİK DOZAJ FORMLARINDAN TAYİNİ ve VALİDASYONU

ÖZET

Asenapin, şizofreni tedavisi ve bipolar bozukluk ile ilişkili akut manik veya karma dönemin tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir. Diğer antipsikotik ilaçlardan farklı bir kimyasal yapısı, reseptör profili ve farmakolojik etkinliği olması ve daha az yan etkiye neden olması sebebiyle ilgi uyandırmaktadır.

Bu çalışmada asenapin'in tabletlerinde miktar tayini için bir iyon çifti kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem sırasında sabit faz olarak Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm partikül boyutu) kolonu, hareketli faz olarak 10 mM 1-heptansülfonik asit içeren fosfat tamponu (pH:3, 20 mM) ve ACN karışımı (60:40, h/h) kullanılmış, 1 ml/dk akış hızında çalışılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C ve enjeksiyon hacmi 5µl olarak ayarlanmıştır. Analitler 220 nm'de diyot dizisi dedektörü kullanılarak saptanmıştır.

Geliştirilen yöntem ilgili ICH kılavuzu ve Amerikan Farmakopesi'ne göre valide edilmiş; yöntem kesinlik, doğruluk, doğrusalık, özgünlük, sağlamlık ve stabilite parametreleri yönünden uygun bulunmuştur. Saptama sınırı ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0.0836 µg/ml ve 0.2788 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Yöntem asenapin'in tabletlerinde miktar tayini için başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: asenapin, YPSK, iyon çifti kromatografisi, tablet analizi

DETERMINATION and VALIDATION of ASENAPINE in PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS by A STABILITY INDICATING HPLC METHOD

ABSTRACT

Asenapine is an atypical antipsychotic agent that is used in the treatment of schizophrenia and acute manic and mixed episodes related to bipolar disorder. It is of interest because of its different chemical formula, receptor profile and pharmacological efficacy and having a better side effect profile compared with other antipsychotics.

An ion pair chromatography method was developed for the determination of asenapine in tablets. During analyzes an Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6x150 mm, 3.5 μ m particles) column was used as stationary phase and a mixture of phosphate buffer (pH 3, 20 mM) containing 10 mM 1-heptanesulfonic acid and ACN, (60:40, v/v) at a flow rate of 1 ml/min was used as a mobile phase. Column temperature was set at 30°C and the injection volume was 5 μ l. Analytes were detected at 220 nm with using a diode array detector.

Developed method was validated according to related ICH guideline and US Pharmacopeia. It was found suitable in terms of accuracy, precision, linearity, specificity, robustness and stability. Limit of detection and limit of quantification values were calculated as 0.0836 μ g/ml and 0.2788 μ g/ml, respectively.

The method was applied successfully for the determination of asenapine in tablets.

Keywords: asenapine, HPLC, ion pair chromatography, tablet analysis

ÖNSÖZ

Bu çalışmada asenapın'ın analizi amacıyla bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Validasyon çalışmaları ile yöntemin uygunluğu gösterilmiş ve yöntem tabletlerde asenapın analizi için başarıyla uygulanmıştır.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, her aşamada destekleyici ve pozitif tavırları ile yanımda olan danışman hocam Duygu Yeniceli Uğur'a,

Bana çok şey öğreten ve her sorunumda yardımcı olan hocam Erol Şener'e,

Destek ve yardımları ile her zaman yanımda olan hocam Arın Gül Dal'a,

Değerli bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren hocam Dilek Ak'a

Çalışmalarım boyunca bana yol arkadaşı olan, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Sema Koyutürk'e,

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmalarda kullanmış olduğum tabletin temini konusunda fikir veren arkadaşım Mustafa Kara'ya ve tabletin teminini sağlamış olan Sayın Atilla Hıncal ve arkadaşlarım Cemre Özseven ve Zeynep Bilgin'e,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan ve cesaretlendiren sevgili arkadaşım Merve Baysal'a,

Her zaman çalışmalarımı destekleyen ve arkadaşlıkları ile bana güç veren Bahar Akyüz, Ezgi Öner ve Z. Ceren Ertekin Özkan'a,

Sevgi ve destekleri ile her zaman yanımda olan aileme,

Tezimin bitimine kadar her aşamada sevgi, hoşgörü ve yardımları ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan eşim Ömer Faruk Karaca'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Asenapin	2
<i>Fizikokimyasal Özellikleri</i>	2
<i>Farmakokinetik Özellikleri</i>	3
<i>Farmakodinamik Özellikleri</i>	3
<i>Farmakolojik Özellikleri</i>	3
Asenapin Tayini ile İlgili Çalışmalar	6
İyon Çifti Kromatografisi	11
GEREÇLER	13
Kimyasal Maddeler	13
Cihazlar ve Diğer Gereçler	13
YÖNTEMLER	14
Standart Çözeltilerin Hazırlanması	14
Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması	14
Kromatografik Koşullar	14
Yöntemin Validasyonu	14
<i>Kesinlik</i>	14
<i>Doğruluk</i>	15
<i>Doğrusallık</i>	15
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı</i>	15
<i>Özgünlük</i>	16
<i>Sağlamlık</i>	16
<i>Stabilite</i>	16
Tabletlerde Miktar Tayini	16

BULGULAR ve TARTIŞMA	18
Yöntemin Optimizasyonu	18
Yöntem Validasyonu	21
<i>Kesinlik</i>	21
<i>Doğruluk</i>	22
<i>Doğrusallık</i>	24
<i>Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı</i>	25
<i>Özgünlük</i>	25
<i>Sağlamlık</i>	27
<i>Stabilite</i>	29
Tabletlerde Miktar Tayini	29
SONUÇ ve ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA	
Çizelge 1	Biyolojik örneklerde ASE analizi için geliştirilmiş yöntemler	10
Çizelge 2	Toz madde ve tablette ASE analizi için geliştirilmiş yöntemler	11
Çizelge 3	Matriks çözeltisi hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri	15
Çizelge 4	Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları	21
Çizelge 5	Kesinlik ve doğruluk sonuçları	22
Çizelge 6	ASE içeren matriks çözeltisi için doğruluk sonuçları	23
Çizelge 7	Doğrusallık sonuçları	24
Çizelge 8	Belirtilen koşullarda bekletilmiş ASE çözeltilerinin 120 dakika sonundaki % ASE miktarları	25
Çizelge 9	Sağlamlık sonuçları	28
Çizelge 10	Stabilite sonuçları	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 ASE'nin molekül formülü	2
Şekil 2 ASE'nin UV spektrumu	2
Şekil 3 pH değişimlerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi	18
Şekil 4 Tampon derişimi değişimlerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi	19
Şekil 5 Kolon sıcaklığındaki değişimlerin sistem uygunluk parametrelerine etkisi	19
Şekil 6 İyon çifti ajanı derişimindeki değişimlerin sistem uygunluk parametrelerine etkisi	20
Şekil 7 ASE (50 µg/ml) ve CBZ (16 µg/ml) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı	20
Şekil 8 a: CBZ (16 µg/ml) içeren matriks çözeltilisinin optimum koşullardaki kromatogramı, b: ASE (10 µg/ml) ve CBZ (16 µg/ml) içeren matriks çözeltilisinin optimum koşullardaki kromatogramı	24
Şekil 9 120 dakika boyunca 0.1 N NaOH ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C'de	25
Şekil 10 120 dakika boyunca 0.1 HCl ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C'de	26
Şekil 11 120 dakika boyunca %3'lük H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C'de	27

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-Hidroksitriptamin
ACN	: Asetonitril
ASE	: Asenapin
ASG	: Asenapin-N ⁺ -glukronid
BSS	: Bağlı standart sapma
CBZ	: Karbamazepin
DMA	: N-desmetilasenapin
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
GK	: Gaz kromatografisi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HSA	: 1-Heptansülfonik asit
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı (International Conference on Harmonization)
KS	: Kütle spektrometrisi
MeOH	: Metanol
ml	: mililitre
mM	: milimolar
NaOH	: Sodyum hidroksit
OSA	: 11-O-sulfataseenapin
SK	: Sıvı kromatografisi
SK-KS/KS	: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi/ kütle spektrometrisi
SS	: Saptama sınırı
TS	: Tayin sınırı
USP	: Amerikan Farmakopesi (The United States Pharmacopeia)
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
YPTK	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi

YPSK : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

GİRİŞ ve AMAÇ

Asenapin (ASE), şizofreni tedavisi ve bipolar bozukluk ile ilişkili akut manik veya karma dönemin tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir. 2009 yılında Saphris adıyla ABD’de ve 2010 yılında Sycrest adıyla Avrupa’da kullanımı onaylanmıştır. ASE’nin oral biyoyararlanımının düşük olması ve hepato-gastrointestinal ilk geçiş metabolizmasının yüksek olması nedeniyle oral formu kullanılamamış, dilaltı tableti (5 mg ve 10 mg) formunda piyasaya sürülmüştür (Citrome, 2014a).

Türkiye’de Lundbeck ilaç firması tarafından ASE ruhsatı alınmış ancak ilaç henüz piyasaya sürülmemiştir ([http-1](http://1)).

Literatürde ASE analizi için geliştirilmiş az sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında bir UV spektrometrik yöntem (Halima ve ark., 2012), bir titrasyon yöntemi (Aarely ve ark., 2012), bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi (Patel ve ark., 2015), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemleri (Chhalotiya ve ark., 2012, Parthasarathi ve ark., 2012, Kovatsi ve ark., 2015), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi/kütle spektrometrisi yöntemleri (SK-KS/KS) (de Boer ve ark., 2012a, de Boer ve ark., 2012b, Ansermot ve ark., 2013, Reddy ve ark., 2013, Patteet ve ark., 2014, Sempio ve ark., 2014) ve bir gaz kromatografisi (GK) yöntemi (Miller ve ark., 2013) sayılabilir.

YPSK birçok alanda olduğu gibi ilaç etkin madde analizlerinde de en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Analiz edilecek maddenin yapısına göre hareketli fazda birçok değişiklik yapılabilme olanağı, çok çeşitli kolon seçeneklerinin ticari olarak temin edilebilmesi ve YPSK sistemlerinin birçok dedektör türü ile birlikte kullanılabilmesi YPSK’nın çok geniş bir kullanım alanına sahip olmasının nedenleri arasında sayılabilir. UV/VIS dedektörler iyi doğruluk ve hızlı analiz sağlamaları ve çok yönlü kullanılabilir olmaları nedeniyle YPSK sistemleri ile çalışırken sıklıkla tercih edilir. Bir UV/VIS dedektör çeşidi olan diyot dizisi dedektörleri tek dalga boyu dedektörlerinden farklı olarak pik teşhisi ve pik saflığının belirlenmesi gibi avantajlara sahiptirler (Nikolin, 2004).

İyon çifti kromatografisi, hareketli faza eklenen bir iyon çifti ajanı yardımıyla iyonize haldeki moleküllerin ayrımında kullanılan bir ters faz sıvı kromatografisi yöntemidir. İlaç etkin maddelerinin genellikle asidik ve bazik moleküller olması nedeniyle ilaç analizlerinde sıklıkla yararlanılan bir yöntem haline gelmiştir (Wilson ve Poole, 2009).

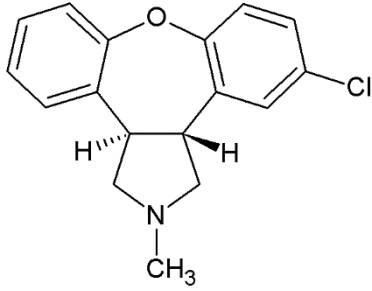
Bu çalışmada ASE’nin tabletlerindeki tayini için kesin, doğru ve hızlı bir YPSK yöntemi geliştirilmesi ve yöntemin tam olarak valide edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla YPSK cihazı ve görüntüleme için diyot dizisi dedektörü kullanılmış ve bir iyon çifti kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin tam validasyonu ilgili kılavuzlara uygun olarak tamamlanmıştır (ICH Q2(R1) 2005; USP 29, 2006).

KAYNAK BİLGİSİ

Asenapin

Fizikokimyasal Özellikleri

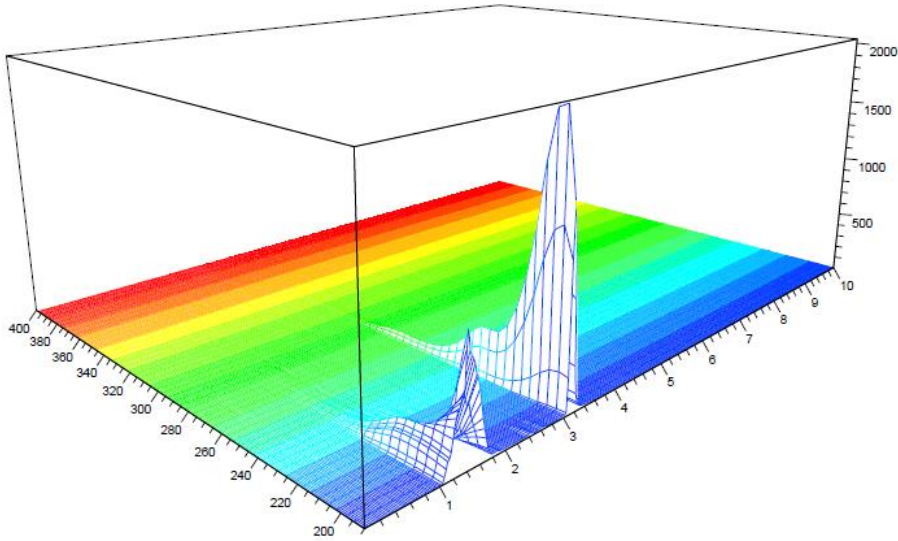
ASE, ASE maleat formunda bulunan, kimyasal adı (3a*RS*,12b*RS*)-5-kloro-2-metil-2,3,3a,12b-tetrahidro-1*H*-dibenzo[2,3:6,7]oksepino[4,5-*c*]pirol (2*Z*)-2-butendioat (1:1) ve moleküler formülü C₁₇H₁₆ClNO-C₄H₄O₄ olan bir ilaç etkin maddesidir (Şekil 1). Bileşiğin molekül ağırlığı 401.84'tür (http-2).



Şekil 1. ASE'nin molekül formülü

Beyaz veya kirli beyaz renkte toz formunda bulunan ASE'nin erime sıcaklığı 139°C ve pKa değeri 8.6 olup, suda çözünürlüğü düşük (3.7 mg/ml), metanol, etanol ve asetonda çözünürlüğü ise yüksektir. ASE molekülünün 2 kiral merkezi olmasına karşın ilaç formu rasemat şeklinde geliştirilmiştir (http-2).

ASE'nin diyot dizisi dedektörü ile elde edilmiş UV spektrumu Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2: ASE'nin UV spektrumu

Farmakokinetik Özellikleri

ASE'nin karaciğer ve bağırsaklarda yüksek oranda metabolize olması nedeniyle oral uygulama yerine dilaltı uygulama tercih edilmektedir. Bu yolla alındığında 5 mg'lık doz için yaklaşık % 35 biyoyararlanım gözlenmektedir. Maksimum ilaç derişimi (C_{maks}) 4 ng/ml ve bu değere ulaşmak için geçen süre (T_{max}) ortalama 1 saattir. Ortalama yarı ömür süresi ise yaklaşık 24 saattir. ASE'nin vücutta dağılım hacmi 20-25 l/kg olup ilaç % 95 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. ASE alımını takiben hızla metabolize olur ancak bileşiğin kendisi aktif bileşiktir. Molekülün yaklaşık 38 metaboliti bulunmasına karşın, metabolitlerinin hiçbiri yaygın bulunmamaktadır ve klinik etki ile ilişkilendirilememiştir. Bunun sebebinin metabolitlerin ASE'nin etkisinden sorumlu olan reseptörlere yüksek afinite göstermemesi ve/veya kan-beyin bariyerini geçememeleri olduğu düşünülmektedir. Başlıca metabolitleri glukuronidasyon, demetilasyon ve oksidasyon sonucu oluşan metabolitler olup dolaşımında en çok bulunan metabolitleri asenapin N^+ -glukronid, N-desmetilasenapin-N-karbamil-glukronid, N-desmetilasenapin ve asenapin 11-O sülfattır. ASE ve metabolitlerinin eliminasyonunda ise hepatik ve renal yollar rol almaktadır (Citrome, 2014a).

Farmakodinamik Özellikleri

ASE'nin serotonin reseptörleri (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₅, 5-HT₆ ve 5-HT₇), dopamin reseptörleri (D₁, D₂, D₃, ve D₄), adrenerjik reseptörler (α_1 ve α_2) ve histamin (H₁) reseptörlerine yüksek afinitesi olup, histamin (H₂) reseptörlerine ise orta derecede afinitesi bulunmaktadır. Bütün bu reseptörlerde antagonist görevi gören ASE'nin diğer bazı antipsikotiklerden farklı olarak muskarinik reseptörlere ilgisi yoktur (Gonzalez ve ark., 2011).

ASE'nin farmakodinamik profili diğer antipsikotiklere göre farklılık göstermektedir ve bu durum ilgi uyandırmaktadır. 5-HT₇ reseptörünün olası pro-kognitif etkisi ile ilgili prelinik veriler mevcut olup, bileşiğin 5-HT_{2C} reseptörlerinde antagonist etki göstermesinin algı ve ruh durumunda düzelmeler gibi istenilen klinik etkiler üretmesi ve muskarinik reseptörlere düşük afinite göstermesi nedeniyle antikolinergik yan etki eğiliminin az olması beklenmektedir. H₁ ve α_1 reseptörlerinin blokajı sedasyona, H₁ reseptörünün tek başına blokajı kilo almaya neden olabilmekte ancak klinikte bu etkiler şiddetli olarak gözlenmemektedir. α_1 reseptörlerinin blokajı ise bileşiğin kardiyovasküler etkileri ile ilişkilendirilmektedir (Citrome, 2014a).

Farmakolojik Özellikleri

ASE şizofreni tedavisi ve bipolar bozukluk ile ilişkili manik ve karma dönemin akut tedavisinde tek başına veya başka ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır.

Şizofreni

Şizofreni psikoz, içe kapanıklık, motivasyon eksikliği ve bilişsel bozukluklar ile karakterize kronik ve şiddetli psikiyatrik bir durumdur. Dünya çapında görülme oranı % 1 olup, genç yaşlarda başlayıp ömür boyu devam etmektedir. Şizofreni

bireylerin yaşamlarını ciddi şekilde etkileyen, morbidite ve mortalite oranı yüksek olan bir hastalıktır (Konopaske ve Coyle, 2015).

Şizofrenide gözlenen semptomlar pozitif semptomlar, negatif semptomlar, duygusal düzensizlik ve bilişsel bozukluklar şeklinde dört farklı gruba ayrılmaktadır. Pozitif semptomlar halüsinasyon ve delüzyonları içerir. Halüsinasyonlar kişinin dışarıdan bir uyarana olmadan duyu deneyimleri (işitsel, görsel, tat ve koku ile ilgili deneyimler) yaşaması olarak tanımlanırken, delüzyonlar ise gerçek olmayan bir düşünceye, aksini ispatlayan kanıtlar bulunmasına rağmen inanma olarak tanımlanabilir. Bu inanışlar olağan, olması olası şeyler olabileceği gibi hasta gerçekleşmesi imkansız düşüncelere de inanabilir. Hastaların zihinsel fonksiyonları bozulmuştur ve düşüncelerin düzensizliği (bir düşüncenin bir önceki ile uyumlu olmaması), düzensiz konuşma ve garip davranışlar gözlenebilmektedir. Negatif semptomlar ise azalmış duygusal tepkiler, az konuşma, motivasyon ve dikkat eksikliği ve zevk alamama gibi semptomları içermektedir. Hastalar sosyalleşme ve günlük yaşamsal aktivitelerini (kişisel hijyen gibi) yerine getirmede zorluk çekerler ve hastaların çalışması, hatta bağımsız yaşamları bile imkansız hale gelir. Duygusal düzensizlik semptomları duygulanımda eksiklik, depresyon, mani, anksiyete, moral bozukluğunu içermekte ve bu yönden kısmen negatif semptomlara benzemektedir. Bilişsel bozulmalar ise hastaların seçici dikkat, çalışan bellek, öğrenme işlevlerini içeren birçok bölgede oluşan bilişsel bozulmaları ifade etmektedir (Konopaske ve Coyle, 2015).

Bu semptomlar arasında antipsikotik ilaçlara en iyi yanıt verenler pozitif semptomlardır. Negatif semptom ve bilişsel bozukluklar ise özellikle geleneksel tedavilere iyi yanıt vermemektedirler (Konopaske ve Coyle, 2015).

Şizofreni gelişiminde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır, ancak hastalığın mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Temelde yer alan moleküler sistemler tam açıklanamasa da hastaların nörotransmitter sistemlerinde (özellikle GABA ve dopamin iletiminde) düzensizlikler gözlenmiştir (Volk ve Lewis, 2015).

Dopamin şizofreni patofizyolojisinde, özellikle psikoz ve bilişsel bozuklukların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Şizofreni hastalarının dopamin (D₂) reseptörlerinde dopamin iletimini arttıran ilaçlara aşırı hassasiyet gösterdiği ve dopamin iletimini engelleyen ilaçlarla ise hastaların pozitif semptomlarında rahatlama olduğu gözlenmiştir (Konopaske ve Coyle, 2015). Şizofrenideki moleküler, hücresel, yapısal ve davranışsal anormalliklerin en azından bir kısmı beyindeki NMDA glutamat reseptörlerinde azalmış sinirsel iletime bağlıdır. Glutamat-ilişkili genlerdeki polimorfizmler şizofreni gelişme riskini arttırmaktadır. Parvalbumin etkinliğinden sorumlu GABAerjik nöronlar da şizofrenide aktiftirler ve bu nöronlardaki değişimlerin NMDA reseptörlerindeki iletimde meydana gelen bozulmadan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca GABA iletimindeki bozukluklar bilişsel bozukluklara katkı sağlamaktadır (Konopaske ve Coyle, 2015, Volk ve Lewis, 2015).

Günümüzde şizofreni tedavisi için antipsikotik ilaçlar kullanılmaktadır. Geliştirilen ilk ilaçlar tipik antipsikotikler olup dopamin (D₂) reseptörlerini bloke ederler. Mesolimpik dopamin yolağında D₂ reseptörlerinin blokajı bu ilaçların antipsikotik etkisine neden olmaktadır. Ancak nigrostriatal dopamin yolağındaki D₂ reseptörlerinin blokajı ekstrapramidal yan etkilerden sorumludur. Tuberinfundibular dopamin yolağındaki D₂ reseptörlerinin antagonizması ise serum prolaktin seviyelerini arttırabilir, bu da kadınlarda düzensiz menstrual dönem ve anormal laktasyon, erkeklerde jinekomasti ile sonuçlanır. Bu gruptaki ilaçların uzun süreli kullanımı tardiv diskinezi (çiğneme, dil çıkarma, yüz buruşturma, uzuvların anormal hareketleri gibi tekrarlayan istemsiz hareketler) gelişimi ile ilişkilidir (Volk ve Lewis, 2015).

Atipik antipsikotikler olarak isimlendirilen, daha yakın zamanda geliştirilmiş antipsikotiklerin ise D₂ reseptörlerine daha az afinitesi vardır. Bu ilaçlar serotonin 5-HT_{2A} reseptörlerini bloke ederler. Diğer reseptör afinite profilleri ise ilaca göre değişkenlik göstermektedir. Bu gruptaki ilaçların tardiv diskinezi ve ekstrapramidal yan etkiye neden olma olasılıkları daha azdır. Ayrıca atipik antipsikotikler tipik antipsikotiklere göre şizofreninin negatif semptomlarında ve bilişsel bozuklukların tedavisinde daha etkilidirler. Ancak atipik antipsikotiklerin obezite, yüksek kan glukoz ve kolesterol seviyeleri ve yüksek kan basıncından oluşan metabolik sendrom geliştirme riski bulunmaktadır (Volk ve Lewis, 2015).

Yeni geliştirilmiş bir atipik antipsikotik olan ASE'nin şizofreni tedavisinde kullanımı 2009 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ABD'de, 2010 yılında da Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından Avrupa'da onay almıştır. 2011 yılında ise ilacın şizofreninin idame tedavisi için kullanımı onaylanmıştır (Citrome, 2014b).

ASE'nin şizofreni tedavisindeki etkinliği birçok prelinik çalışma ve kısa dönem ve uzun dönemli klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (Citrome, 2011). Daha önce bahsedilen kendine özgü reseptör profilinin yanısıra yapılan prelinik ve klinik çalışmalar ASE'nin şizofreninin pozitif, negatif ve bilişsel semptomlarını iyileştirdiğini ve ekstrapramidal, antimuskarinik ve metabolik yan etkilere daha az neden olduğunu göstermiştir. Özellikle ağır ve dirençli negatif semptomları olan hastalarda kullanımı yararlı olmaktadır (Bishara ve Taylor, 2008, Citrome, 2014b).

Bipolar bozukluk

ASE'nin etkili olduğu diğer bir hastalık, ruh durumu ve davranışlarda döngüsel değişimlerle karakterize edilen bipolar bozukluktur. Ruh durumundaki değişimler mani ve depresyon durumları arasında geçişler şeklinde görülür. Mani durumu öfori, aşırı konuşkanlık ve/veya huzursuzluk ile karakterize bir ruh durumudur ve bipolar bozukluk teşhisi için bakılan başlıca özelliktir. Hastaların yarısında psikotik semptomlar da gözlenir. Depresyon ise uyuma güçlüğü veya aşırı uyuma, zevk alamama, düşük enerji, sosyal izolasyon gibi durumların gözlemlendiği bir ruh halidir, bipolar bozuklukta karakteristik bir semptom olmakla birlikte depresyonun

gözlenmediği hastalar da olmaktadır. Hastalarda mani ve depresyonun bir arada ortaya çıktığı karma dönemler de gözlenebilmektedir.

Bipolar bozukluk çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır ancak hastalığın temelinde yatan biyolojik mekanizmaların çok az bir kısmı aydınlatılabilmektedir (Fears ve Reus, 2015).

Bipolar bozukluğun tedavisinde hastalığın dönemine ve semptomlara göre değişik psikofarmakolojik ilaçlar kullanılmaktadır. Akut manik dönemin tedavisinde standart tedavi olarak atipik antipsikotik ilaçlar lityum karbonat veya antikonvulsan bir ilaç ile kombine olarak kullanılırlar. Bipolar depresyonda antidepresanların kullanımı ise tartışmalıdır (Fears ve Reus, 2015).

ASE'nin bipolar bozukluğun akut manik ve karma dönemlerinde kullanımı da şizofreni tedavisi ile birlikte 2009 yılında FDA tarafından, 2010 yılında EMA tarafından onaylanmıştır. Ayrıca aynı endikasyon için lityum veya valproat ile birlikte kullanımı da 2011 yılında onaylanmıştır (Citrome, 2014b).

Yapılan klinik çalışmalar ile ASE'nin bipolar bozukluktaki manik ve karma dönemlerde etkili olduğu gösterilmiştir. Depresyon semptomlarında ise etkili bulunmamıştır (Fears ve Reus, 2015).

Asenapin Tayini ile İlgili Çalışmalar

Halima ve ark. (2012) ASE'nin toz madde ve farmasötik dozaj formlarındaki tayini için basit, kesin, doğru ve hassas bir UV spektrometrik yöntem geliştirmişlerdir. Çözücü olarak metanol kullanılmış ve 270 nm dalga boyunda saptama yapılmıştır. Yöntem 10-60 µg/ml derişim aralığında, 0.9997 korelasyon katsayısı ile doğrusal bulunmuş ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon eşitliği $y=0.0132x-0.0016$ olarak hesaplanmıştır (y absorbans, x ilaç çözeltisinin derişimidir). Yöntem Uluslararası Uyumlandırma Konferansı'na (ICH) göre kesinlik ve doğruluk gibi birçok parametre açısından valide edilmiş, bağıl standart sapma (BSS) ve geri kazanım verileri uygun bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin kesin ve doğru olduğu, bu nedenle ASE'nin toz madde ve farmasötik dozaj formlarındaki rutin analizi için kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Aarely ve ark. (2012) ASE'nin tayini için basit bir titrimetrik yöntem geliştirmişlerdir. ASE'nin sulu MeOH içerisindeki ilgili derişimleri asit-baz indikatörü olarak fenolftalein kullanılarak 0.1 N sodyum hidroksit ve 0.1 N potasyum hidroksit ile titre edilmiştir. 0.5-5 mg/ml derişim aralığında yöntem doğrusal bulunmuştur. Yöntem hassas ve ucuzdur ve herhangi bir örnek hazırlama basamağı gerektirmemektedir. Yöntemin toz madde ve formülasyonlardan ASE tayini amacıyla kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Patel ve ark. (2015) ASE'nin tabletlerde ve diğer formülasyonlarında kantitatif analizini gerçekleştirmek amacıyla yeni bir yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (YPİTK) yöntemi geliştirip, valide etmişlerdir. ICH'nın önerilerine uygun olarak, ASE'nin bozunması için farklı stres testleri (asit, alkali, ısı, ışık ve nem) uygulayıp, oluşan bozunma ürünlerini maddenin kararlılığını araştırmak

amacıyla kullanmışlardır. Ayrım daha önceden alüminyum tabaka üzerinde silika jel G 60 F254 ile kaplanmış YPİTK tabakası üzerinde, hareketli faz olarak metanol kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ASE bozunma ürünlerinden iyi ayrılmıştır. Densitometrik analiz kullanılarak ASE 235 nm’de gözlenmiştir. Saptama sınırı (SS) ve tayin sınırı (TS) değerleri sırasıyla 39.13 ng ve 118.57 ng olarak hesaplanmıştır. Yöntemin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve verilerin istatistiksel analizi yöntemin ASE analizi için özgün, doğrusal, kesin, doğru, tekrarlanabilir ve seçici olduğunu göstermiştir. Yöntem hem piyasadaki ASE tabletlerine hem de çalışmayı yapan araştırmacıların geliştirdikleri formülasyonlara başarı ile uygulanmıştır.

Parthasarathi ve ark. (2012) ASE maleat tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirip, valide etmişlerdir. Örnekler Waters x-terra C₁₈ (4.6 × 100 mm, 3.5 µm partikül boyutu) kolon üzerinde, hareketli faz olarak ACN ve 0.1 M fosfat tamponu (pH 3.2) karışımı (65:35, h/h) kullanılarak ayrılmıştır. Analizler 30 °C kolon sıcaklığı ve 1 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiş; saptama 272 nm dalga boyunda yapılmıştır. 5 dakikalık analiz süresine sahip olan yöntem seçicilik, doğrusallık, geri kazanım, kesinlik, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık yönünden valide edilmiştir. 10–50 µg/ml derişim aralığında doğrusal olan yöntemin saptama sınırının 1.85 µg/ml, tayin sınırının ise 2.34 µg/ml olarak hesaplandığı bildirilmiştir.

Chhalotiya ve ark. (2012) ASE’nin tabletlerinde kantitatif tayini için basit, spesifik ve maddenin kararlılığının araştırıldığı bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Bir SunFire C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon ve 0.02 M potasyum dihidrojen fosfat ve ACN (95:05, h/h) karışımından oluşan hareketli faz kullanılmıştır. 1.0 ml/dk akış hızında çalışılmış, analitler 232 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Yöntem ASE için 0.1-20 µg/ml derişim aralığında doğrusal bulunmuş, geri kazanımlar % 98-101 arasında hesaplanmıştır. ASE stok çözeltileri asit ve alkali hidrolize, kimyasal oksidasyona, gün ışığına ve kuru hava bozulmasına tabi tutulduktan sonra geliştirilen yöntem ile analiz edilmiş, bozunma ürünlerinin pikleri saf ilaç pikinden iyi ayrılmıştır. Yöntem doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından valide edilmiş ve ASE’nin tabletlerindeki tayini için başarı ile uygulanmıştır.

Kovatsi ve ark. (2015) ASE’nin saç ve tırnak gibi alternatif biyomatrikslerde analizi için bir YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrım bir İnertsil C₈ (4.0 x 250 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon üzerinde ve oda sıcaklığında, hareketli faz olarak asetat tamponu (pH 4.5), ACN ve MeOH (50:40:10, h/h/h) karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzokratik olarak ve 1 ml/dk akış hızında çalışılmış, analitler 240 nm’de gözlenmiştir. Yöntem gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk yönünden valide edilmiştir. Geri kazanım oranları saç numunelerinde % 95.0-102.5 arasında, tırnak numunelerinde ise % 98.8-105 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin SS ve TS değerleri saçta 1.3 ng/mg ve 4 ng/mg olarak bulunurken, tırnak numunelerinde sırasıyla 2.7 ng/mg ve 8 ng/mg olarak bulunmuştur.

de Boer ve ark. (2012a) insan plazmasında ASE ve üç metabolitinin [N-desmetilasenapin (DMA), asenapin-N+-glukronid (ASG) ve 11-O-sulfataseenapin(OA)] katı faz ekstraksiyonu ve SK-KS/KS ile tayini için yöntemler

geliştirmiş ve bu yöntemleri valide etmişlerdir. Yöntemlerden üç tanesi analitlerin insan plazmasında tayini için kabul edilebilir bulunmuştur. Boer ve ark. bu yayınlarında birisi ASE, DMA ve OSA için diğeri de ASG için geliştirilmiş ve valide edilmiş olan iki yöntemi sunmuşlardır. ASE analizinin gerçekleştirildiği Yöntem-A'da ayırım bir Discovery C8 (2.1 x 150 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon üzerinde, 0.01 M amonyum asetat çözeltisi (pH 4.2) ve ACN'den oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. ASE alıkonma zamanı 3.63 dakika olarak belirtilmiştir. Sıvı kromatografisi elüatı bölünmüş (220:280 µl) ve bir elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış API-3000 quadrapole KS/KS sistemi ile tayin edilmiştir. KS/KS sistemi pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. ASE için 0.025-20.0 ng/ml derişim aralığında çalışılmış ve tayin sınırı değeri 0.025 ng/ml olarak hesaplanmıştır.

de Boer ve ark. (2012b) başka bir çalışmalarında ASE'nin idrardaki farmakokinetik parametrelerinin değerlendirilmesi amacıyla, ASE ve 2 ana metabolitinin (DMA ve ASG) miktar tayini için online katı faz ekstraksiyonu SK-KS/KS yöntemleri geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Bu çalışmalarında önceki çalışmalarındaki yöntemi temel almışlar ve analitlerin idrarda tayini için iki yeni yöntem sunmuşlardır. ASE analizi için kullanılan yöntemde bir Discovery C8 (2.1 x 150 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon ve hareketli faz olarak 0.1 M amonyum asetat çözeltisi (pH 4.2) ve ACN gradient olarak kullanılmış ve oda sıcaklığında çalışılmıştır. ASE alıkonma zamanı 3.17 dakika olarak belirtilmiştir. SK elüatı direkt olarak elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış API-4000 triple quadrapole KS/KS sistemi ile tayin edilmiştir. KS/KS sistemi pozitif iyon modunda çalıştırılmıştır. Yöntem ASE'nin idrarda 0.500–100 ng/ml derişim aralığındaki miktar tayini için uygun bulunmuş ve faz I klinik çalışması ile yöntemin uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Ansermot ve ark. (2013) ASE'nin de içinde olduğu on psikotropik ilaç ve metabolitinin insan plazmasındaki hızlı miktar tayini için hassas ve seçici bir ultra-YPSK (UYPSK) ikili kütle spektrometrisi (KS/KS) yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama işlemi ACN kullanılarak, genel protein çöktürme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım 3 dakikadan daha kısa sürede, Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm partikül boyutu) kolon üzerinde, 10 mM amonyum format tamponu ve ACN'nin gradient elüsyonu ile 0.4 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bileşikler bir KS/KS sistemi ile pozitif elektrosprey iyonizasyon modunda ve çoklu reaksiyon izleme ile tayin edilmiştir. Yöntem uluslararası kılavuzlara göre tam olarak valide edilmiştir. ASE için 0.5-200 ng/ml derişim aralığında çalışılmış ve yöntem doğruluk ve kesinlik açısından uygun bulunmuştur. Matriks etkisi % 95-105 aralığında, toplam hata ise ± % 30 olacak şekilde kabul sınırları içerisinde bulunmuştur. Bu nedenle yöntemin hem terapötik ilaç izleme hem de farmakokinetik çalışmalar için uygun olduğu belirtilmiştir.

Reddy ve ark. (2013) birlikte kullanımları yasal olarak onaylanmış olan ASE ve valproik asitin insan plazmasında birlikte tayini için bir SK-KS/KS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Plazma örneklerine iç standartlar eklenmiş ve metil tersiyer bütül eter kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır. Kromatografik ayırım Phenomenex C18 (4.6 x 50 mm, 5 µm partikül boyutu) kolon

üzerinde, izokratik olarak ve 40°C’de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hareketli faz 10 mM amonyum format ve ACN karışımı (5:95, h/h) olup, akış hızı 0.8 ml/dk’dır. Üçlü kuadrapol kütle spektrometresinde çoklu reaksiyon izleme modunda saptama yapılmıştır. SK-KS/KS analizinde kullanılan enjeksiyon hacmi 15 µL’dir ve analiz süresi 2.5 dakika olarak belirtilmiştir. Düşük analiz süresi ve küçük enjeksiyon hacmi nedeniyle yüksek verimli olduğu belirtilen yöntem, ASE için 0.1–10.02 ng/ml derişim aralığında valide edilmiş, spike yapılmış plazma örneklerinden ASE geri kazanımı tutarlı ve tekrar edilebilir bulunmuştur. Yöntemin uygulaması, 5 mg ASE ve 250 mg valproik asit almış olan 8 sağlıklı erkek gönüllüde yürütülen bir farmakokinetik çalışma ile gösterilmiştir.

Patteet ve ark. (2014) sık kullanılan ve yeni piyasaya çıkmış on altı antipsikotik ilaç -ASE dahil- ve sekiz metabolitinin serumda tayini için bir UYPSK-KS/KS yöntemi geliştirmişlerdir. Örnekler metil tert-butil eter ile sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından analiz edilmiştir. Ayrım bir C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 µm partikül boyutu) kolon üzerinde, gradient elüsyon kullanılarak ve 0.5 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 6 dakikadır. Çalışmada 1-100 ng/ml derişim aralığında ASE çözeltileri ile çalışılmıştır. Saptama dinamik çoklu reaksiyon izleme ile gerçekleştirilmiştir. Ortalama geri kazanım, matriks etkisi ve doğruluk değerleri uygun bulunmuş ancak sadece 7-hidroksi desalkil ketiapin, ASE ve haloperidol için günler arası kesinlik uygun bulunmamıştır. Yöntem hastalardan alınan örneklerle uygulanmış ve 23 antipsikotik ilaç ve metabolit tayin edilmiştir.

Sempio ve ark. (2014) psikoaktif ilaçlar ve metabolitleri arasından ASE’nin de dahil olduğu 88 bileşiğin tam kan örneklerinde tespit ve tayini için basit, hassas ve spesifik bir yöntem geliştirmeyi, yöntemi valide etmeyi ve ölüm sonrası vakalara uygulamayı amaçlamışlardır. Örnekler sırayla metanol, ACN ve hareketli faz ile seyreltilmiştir. Analizler bir Hypersil Gold aQ (2.1 x 100mm, 3 µm partikül boyutu) kolon üzerinde, 25°C’de gerçekleştirilmiştir. Formik asit (% 0.1) ve metanol içeren hareketli faz kullanılmış, analizler 0.2 ml/dk akış hızında gradient elüsyonla gerçekleştirilmiştir. Bileşikler bir KS/KS sistemi ile elektrosprey iyonizasyon modunda ve çoklu reaksiyon izleme ile tayin edilmiştir. Ardından yöntemin uluslararası kılavuzlara göre tam validasyonu yapılmıştır. Yöntemin yüksek hassasiyette ve spesifik olduğu gösterilmiş ve tüm validasyon parametreleri kabul ölçütlerini karşılamıştır. Doğrusallık ASE için 16.1-1000 ng/ml derişim aralığında araştırılmış; matriks ve sürüklenme etkisi önemsiz bulunmuştur. Ayrıca bileşiklerin çoğunun birçok donma-çözme döngüsünün ardından kararlı olduğu belirlenmiştir. Yöntem birçok ölüm sonrası vakada uygulanmış ve sonuçlar yöntemin geliştirildiği laboratuvarında yapılan GK-KS analizi ile karşılaştırılmıştır. Yöntem iyi bir tamamlayıcı yöntem olarak değerlendirilmiş ve GK-KS’den daha iyi hassasiyet sağladığı vurgulanmıştır. SK-KS/KS yönteminin hem ölüm sonrası vakalardaki rutin analizlerde hem de klinik amaçlarla izleme yöntemi olarak kolayca kullanılabileceği ancak genel bir izleme yöntemi ile kombine olarak kullanılması gerektiği belirtilmiştir.

Miller ve ark (2013) ölüm sonrası vakalardaki örneklerde GK-KS ile ASE tespiti ve miktar tayini için analitik bir yöntem geliştirmişlerdir. ASE numunelerden basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu prosedürü ile izole edildikten sonra ayrım bir ZB-5 (15 m x 0.25 mm, 0.25 mm film kalınlığı) kapiler kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Fırın sıcaklığı başlangıçta 220°C'den 280°C'ye dakikada 10°C, sonra 325°C'ye dakikada 40°C artacak şekilde ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi 8 dakikadır. KS seçici iyon izlemi ile elektron iyonizasyon modunda çalıştırılmıştır. ASE için tayin sınırı 5 ng/ml olarak hesaplanmıştır. Yöntem validasyonu Bilimsel Çalışma Grubu Toksikoloji (SWGTOX) yöntem validasyonu taslak teklifi kullanılarak yürütülmüş ve dört vaka çalışmasının doku dağılımları tespit edilmiştir.

Çizelge 1 ve **Çizelge 2**'de daha önce geliştirilmiş olan ASE analiz yöntemleri ve bu çalışmada önerilen yöntem özetlenmiştir.

Çizelge 1. Biyolojik örneklerde ASE analizi için geliştirilmiş yöntemler

Yazarlar (Yayın Yılı)	Yöntem Adı	Matriks	Doğrusal aralık
de Boer ve ark. (2012)	SK-KS/KS	plazma	0.025-20.0 ng/ml
de Boer ve ark. (2012)	SK-KS/KS	idrara	0.500–100 ng/ml
Ansermot ve ark. (2013)	UYPSK	plazma	0.5-200 ng/ml
Reddy ve ark. (2013)	SK-KS/KS	plazma	0.1–10.02 ng/ml
Miller ve ark. (2013)	GK-KS	idrara, kan, karaciğer...	4-60 ng/mg
Patteet ve ark. (2014)	UYPSK-KS/KS	serum	1-100 ng/ml
Sempio ve ark. (2014)	SK-KS/KS	tam kan	16.1-1000 ng/ml
Kovatsi ve ark. (2015)	YPSK	saç ve tırnak	5-100 ng/ml

Çizelge 2. Toz madde ve tablette ASE analizi için geliştirilmiş yöntemler

Yazarlar (Yayın Yılı)	Yöntem Adı	Doğrusal aralık	ASE alıkonma zamanı
Halima ve ark (2012)	Spektrofotometri	10-60 µg/ml	-
Aarely ve ark (2012)	Titrasyon	0.5-5 mg/ml	-
Parthasarathi ve ark (2012)	YPSK	10-50 µg/ml	3.06 dakika
Chhalotiya ve ark (2012)	YPSK	0.1-20 µg/ml	5.51 dakika
Patel ve ark (2015)	YPİTK	0.3-1.8 µg/ml	-
Geliştirilen yöntem	YPSK	0.5-100 µg/ml	4.71 dakika

İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi, iyonik analitlerin analizi için sıklıkla kullanılan bir ters faz sıvı kromatografisi yöntemidir. Kullanılan hareketli ve sabit fazlar ters faz kromatografisi ile aynıdır, ters faz kromatografisinden farklı analitlerin alıkonma zamanlarını değiştirmek amacıyla hareketli faza bir iyon çifti ajanı eklenmesidir. Eklenen iyon çifti ajanının derişimi arttıkça, zıt yüklü analitler daha uzun süre, benzer yüklü analitler ise daha kısa süre kolonda alıkonurlar (Wilson ve Poole, 2009).

İyon çifti kromatografisi;

- Kolonda tutunmayan iyonların analizini gerçekleştirmek amacıyla,
- Bazı durumlarda alıkonma zamanlarını azaltmak ve pik şekillerini düzeltmek amacıyla
- İyon ve molekül karışımlarının ayrımında iyon-değişimi kromatografisine alternatif olarak kullanılmaktadır (Miller, 1988).

Bu yöntem kromatografinin kullanıldığı çoğu alanda, özellikle de ilaç endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptir. İlaçların genellikle asidik ve bazik maddeler olması, analizlerinde iyon çifti kromatografisinin geniş kullanım alanı bulmasını sağlamıştır (Wilson ve Poole, 2009).

İyon çifti kromatografisi, daha eski bir uygulama olan iyon çifti ekstraksiyonunun kromatografi biçiminde gerçekleştirilmesi ile geliştirilmiştir. İyon çifti ekstraksiyonunda iyonize olmuş çözünenler sisteme eklenen zıt yüklü bir iyon ile

iyon çifti oluşturur ve böylece maddenin organik fazdaki dağılımı arttırılır ve ekstraksiyon sağlanır.

Sıklıkla kullanılan iyon çifti ajanları, katyonlar için alkilsülfonatlar ve alkilsülfatlar, anyonlar için alkilamonyum tuzlarıdır (Wilson ve Poole, 2009).

İyon çifti kromatografisinde alıkonmayı açıklamak için ilk önceleri stokiyometrik teoriler ve daha sonra non-stokiyometrik teoriler geliştirilmiştir. Stokiyometrik teorilere göre alıkonma, iyon çifti ajanı ile ona zıt yüklü analit iyonu arasında 1:1 oranda oluşan kompleks nedeniyle oluşur. Bazı teoriler bu kompleksin sabit veya hareketli fazda meydana geldiğini savunurken, diğerleri iyon çifti ajanının sabit faz yüzeyine adsorbe olduğunu ve analit iyonu ile iyon çifti ajanına zıt yüklü iyonlar arasında stokiyometrik bir iyon değişimi sürecinin gerçekleştiğini savunmaktadır. Non-stokiyometrik teoriler ise bağlı faz yüzeyinin çok ince olduğunu, bağlı fazın yüzey alanı/hacim oranının yüksek olduğunu ve bu nedenle hem analit hem de iyon çifti ajanının sabit faza adsorbe olduğunu öne sürmüşlerdir. Alıkonma stokiyometrik olmayan bir elektrostatik etkileşim ile açıklanır. Bu teorilere göre iyon çifti ajanı sabit ve hareketli faz arasına adsorplanınca yüklü bir yüzey oluşur ve iyon çifti ajanına zıt yüklü iyonların da bu yüzeye dağınık olarak bağlanması ile bir çift tabaka meydana gelir, bu da elektrostatik potansiyelde bir farka neden olur. Bu elektrostatik çekim iyon çifti ajanına zıt yüklü iyonların alıkonmasını arttırırken, aynı yüklü olanlarınkini azaltır (Wilson ve Poole, 2009).

İyon çifti kromatografisi ile çalışılırken alıkonmayı etkileyen parametreler;

- iyon çifti ajanının zincir uzunluğu,
- iyon çifti ajanının derişimi,
- hareketli faz pH değeri,
- hareketli faz organik çözücü derişimidir (Lindsay, 1992).

İyon çifti ajanının zincir uzunluğunun ve derişiminin artması alıkonmayı arttırır. Hareketli faz pH değeri değiştirilerek analitlerin iyonize olması sağlanabilir, sadece iyonize olmuş moleküller iyon çifti ajanından etkilendiği için bu parametre ayırım için kullanılabilir. Hareketli fazdaki organik çözücü derişimindeki artış ise aynen ters faz sıvı kromatografisinde olduğu gibi alıkonmayı azaltacaktır (Lindsay, 1992).

Bir YPSK yöntemi geliştirirken, iyon çifti ile çalışmadan önce ters faz sıvı kromatografisinin denenmesi önerilir. İyon çifti kromatografisi kullanımına karar verilmesi durumunda ise yöntem önce ters faz modunda optimize edilir, daha sonra hareketli faza eklenecek olan iyon çifti ajanı ve derişimi seçilir ve gerekliyse iyon çifti kromatografisinde etkili olan parametrelerde değişiklikler yapılır (Synder ve ark., 2010). Bu yöntemin dezavantajları genellikle korozif olan iyonik çözeltilerin kolon ömrünü kısaltması ve bazı iyon çifti ajanlarının UV ışığı absorplaması nedeniyle UV dedektörlerle kullanılamamasıdır (Miller, 1988).

GEREÇLER

Kimyasal Maddeler

Asenapin maleat	: Sigma Aldrich, Hindistan
Karbamazepin	: Novartis, Türkiye
Asetonitril	: Sigma Aldrich, Almanya
Metanol	: Sigma Aldrich, Almanya
Su	: Sigma Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma Aldrich, Almanya
Hidrojen peroksit	: Merck, Almanya
1-Heptansülfonik asit	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck, Almanya
Sycrest 10 mg dilaltı tablet	: MSD, Walter Krebs Import-Export GmbH & Co. KG aracılığıyla, Almanya

Cihazlar ve Diğer Gereçler

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
pH metre	: Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion meter S220, İsviçre
Santrifüj cihazı	: Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Almanya
Su banyosu	: Memmert, WNB 14, Almanya
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech, VM 96 B, Kore
YPSK	: Agilent 1290 Infinity Binary (ikili pompa, degazör, otosampler ve termostatlı kolon bölümlerinden oluşan) LC Sistemi, Almanya
YPSK kolonu	: Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm parçacık boyutu) kolon, ABD

YÖNTEMLER

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1 mg/ml derişimdeki ASE stok çözeltisi, ASE maleat standart maddesi MeOH'de çözülerek hazırlanmıştır.

Bu stok ASE çözeltisinden MeOH ile gerekli seyreltmeler yapılarak, 0.5-100 µg/ml derişim aralığında 8 adet çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Kesinlik ve doğruluk çalışmalarında 0.5, 10 ve 100 µg/ml; özgünlük çalışmasında 5 µg/ml, sağlamlık çalışmasında 10 µg/ml ve stabilite çalışmasında 10 ve 100 µg/ml derişimlerde ASE içeren çözeltiler kullanılmıştır.

İç standart olarak karbamazepin (CBZ) standart maddesi kullanılmıştır. CBZ'nin stok çözeltisi 1.28 mg/ml derişimde MeOH içerisinde hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler MeOH ile yapılmış ve analiz edilen bütün çözeltiler 16 µg/ml CBZ içerecek şekilde eklemeler yapılmıştır.

Tablet Numune Çözeltilerinin Hazırlanması

10 mg ASE'ye eşdeğer ASE maleat içerdiği bilinen bir tablet 10 ml MeOH içerisinde ultrasonik banyo yardımıyla çözülmüş ve ardından 10 dk 25°C'de 1699 x g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant çökelektan ayrılmış ve böylece 1 mg/ml derişimde ASE içeren tablet çözeltisi elde edilmiştir.

Bu çözeltiden MeOH ile gerekli seyreltmeler yapılarak, 10 µg/ml derişimde ASE içeren tablet çözeltisi elde edilmiş ve analiz edilmiştir.

Kromatografik Koşullar

Analitlerin ayrımı Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm partikül boyutu) kolonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 10 mM 1-heptansülfonik asit içeren fosfat tamponu (pH:3, 20 mM) ve ACN (60:40, h/h) karışımı kullanılmış, 1 ml/dk akış hızında çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µl olup, kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Analitler diyot dizisi dedektörü kullanılarak, 220 nm'de gözlenmiştir.

Yöntemin Validasyonu

Validasyon çalışmaları ICH (ICH Q2(R1), 2005) ve Amerikan Farmakopesi'ne (USP 29, 2006) uygun olarak yürütülmüştür. Kesinlik, doğruluk, doğrusallık, özgünlük, sağlamlık ve Stabilite çalışmaları yapılmış, yöntemin saptama sınırı ve tayin sınırı belirlenmiştir.

Kesinlik

Yöntemin kesinliği gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları ile gösterilmiştir. Her biri 16 µg/ml CBZ içeren 0.5, 10 ve 100 µg/ml derişimlerindeki ASE çözeltileri kullanılmış, bu çözeltilerin her derişimi için aynı gün içerisinde 7'şer enjeksiyon olacak şekilde (gün içi), üç set halinde (günler arası) analizler yapılmıştır. Kesinlik, % BSS [(Standart sapma / ortalama) x 100] ile gösterilmiştir.

Doğruluk

Yöntemin doğruluğu iki farklı şekilde gösterilmiştir.

Öncelikle kesinlik çalışmaları için yapılmış üç farklı derişimdeki analizlerin verilerini kullanarak % geri kazanım ve % hata [(bulunan derişim – eklenen derişim) / eklenen derişim x 100] değerleri hesaplanmıştır.

İkinci yöntem olarak da tabletlerde yer alan yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan matriks çözeltisine etkin maddeler eklenerek analizleri gerçekleştirilmiş ve matriks ortamındaki % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Matriks çözeltisi tabletlerde sıklıkla kullanılan yardımcı maddelerin belirli oranlarda karıştırılması ile oluşturulan karışımın MeOH'de çözülmesi ile hazırlanmıştır (**Çizelge 3**). Bu çözeltiye etkin maddeler eklenerek 16 µg/ml CBZ ve 0.5, 10 ve 100 µg/ml ASE içeren matriks çözeltileri elde edilmiştir.

Çizelge 3. Matriks çözeltisi hazırlamak için kullanılan yardımcı maddeler ve yüzdeleri

Kullanılan yardımcı maddeler	Yüzdeleri
Hidroksi propil metil selüloz	8
Laktoz monohidrat	71
Magnezyum stearat	1
Polietilen glikol 4000	6
Nişasta	6
Povidon	6
Talk	1
Titanyum dioksit	1

Doğrusallık

Doğrusallık için 16 µg/ml CBZ içeren 0.5, 1, 2, 4, 25, 50 ve 100 µg/ml derişimlerdeki ASE çözeltileri 3 set halinde hazırlanmış ve her noktada üçer tekrarlar analiz yapılmıştır. ASE derişimleri ile onlara karşılık gelen pik alan oranları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı

Yöntemin saptama sınırı (SS) ve tayin sınırı (TS) değerlerini belirlemek amacıyla 0.50 ve 10 µg/ml derişimdeki ASE çözeltileri analiz edilmiştir (n=9). Analizler sonucu bulunan sinyal/gürültü oranlarından yararlanılarak aşağıdaki eşitliklerle SS ve TS değerleri hesaplanmıştır.

$$SS = 3 \times (\text{sinyal/gürültü})$$

$$TS = 10 \times (\text{sinyal/gürültü})$$

Özgünlük

Yöntemin özgünlüğünü göstermek ve maddenin kararlılığını değerlendirmek amacıyla ASE çözeltileri farklı koşullarda muamele edilmiş ve sonrasında analiz edilmiştir. 25 µg/ml derişimde standart ASE içeren 0.1 N NaOH, 0.1 N HCl ve % 3'lük H₂O₂ çözeltileri hazırlanmış ve her çözeltinin bir kısmı oda sıcaklığında bekletilirken, bir kısmı 60°C'de su banyosunda tutulmuştur. 0, 15, 30, 45, 60, 90 ve 120. dakikalarda çözeltilerden alınan numunelere CBZ çözeltisi eklenmiş ve MeOH ile seyreltme yapılarak 5 µg/ml ASE ve 16 µg/ml CBZ içeren çözeltiler elde edilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu uygulamalar sonunda bozunma gerçekleşip gerçekleşmediği ve eğer gerçekleşiyorsa bozunma ürünlerine ait piklerin ASE piki ile girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığını göstermek amacıyla 10 µg/ml ASE ve 16 µg/ml CBZ içeren çözelti, yöntem parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla değişiklik yapılan parametreler; hareketli faz pH'sı (2.9-3.1), organik faz yüzdesi (% 38-42), fosfat tamponu derişimi (18-22 mM), dedektör dalga boyu (218-222 nm), akış hızı (0.9-1.1 ml/dk) ve iyon çifti ajanı (HSA) derişimi (9-11 mM) olup, analizler her koşulda üçer kez tekrarlanmıştır.

Yapılan analizler sonucunda ASE alıkonma zamanı, % geri kazanım değerleri ve teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve rezolüsyon gibi sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır.

Stabilite

Stabilite çalışmaları 10 ve 100 µg/ml ASE ve 16 µg/ml CBZ içeren çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ASE çözeltilerinin kısa dönem (24 saat, oda sıcaklığında), uzun dönem (2 hafta, -20°C'de) ve eritme-dondurma döngüsü (3 döngü) sonrası stabilitelerini incelemek amacıyla 20 ve 200 µg/ml ASE içeren üçer çözelti hazırlanmıştır. Bu üç çözeltilerden birisi 24 saat oda sıcaklığında bekletilirken, ikincisi 2 hafta süreyle -20°C'de tutulmuştur. Üçüncü çözelti ise üçlü dondurup çözme döngüsüne maruz bırakılmıştır. Bekleme koşullarını tamamlayan her çözeltiye CBZ çözeltisi eklenmiş ve her biri için üçer analiz gerçekleştirilmiştir. Her koşuldaki analiz verileri ile % geri kazanım ve % BSS değerleri hesaplanmış ve ASE'nin belirtilen koşullardaki kararlılığı değerlendirilmiştir.

Tabletlerde Miktar Tayini

10 mg ASE'ye eşdeğer ASE maleat içerdiği bilinen tablet 10 ml MeOH'de çözülerek, 10 µg/ml ASE (maleat formunda) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak 10 µg/ml ASE ve 16 µg/ml CBZ içeren

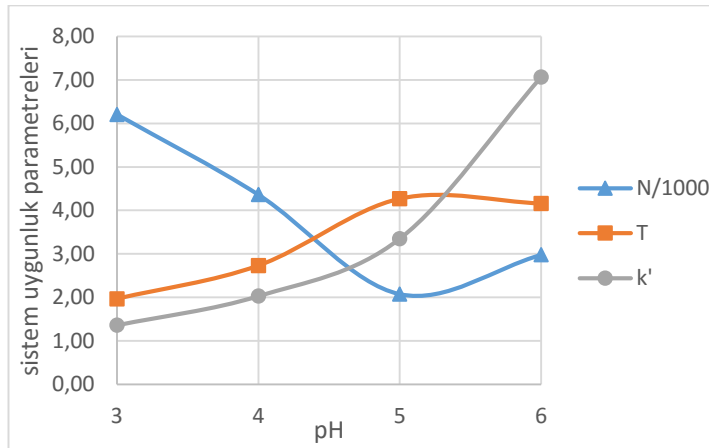
Çözelti hazırlanmış ve geliştirilen yöntem kullanılarak 8 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş, ortalama tablet içeriği, standart sapma ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

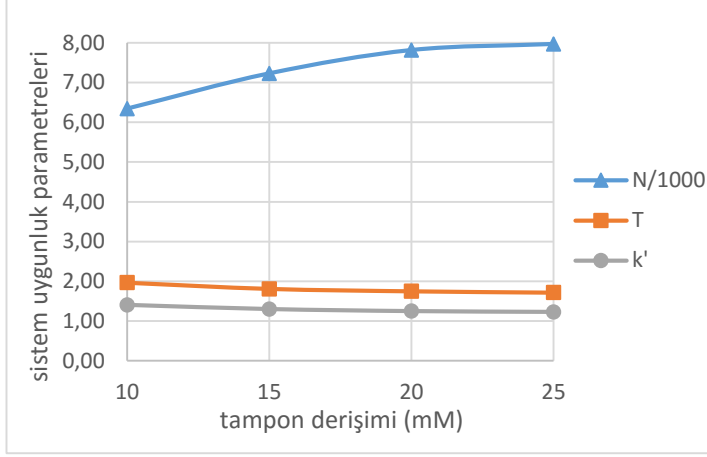
Yöntemin Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları sırasında 50 µg/ml ASE çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti 1 mg/ml ASE stok çözeltisinden MeOH ile seyreltme yapılarak hazırlanmıştır.

Optimizasyon çalışmalarına Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 µm partikül boyutu) kolon ile başlanmıştır. Hareketli faz olarak çeşitli oranlarda su-MeOH, su-ACN ve su-MeOH-ACN içeren çözeltiler denenmiş ve daha düşük alıkonma zamanı, nispeten daha simetrik pikler gözlenmesi nedeniyle su ve ACN karışımı hareketli faz olarak seçilmiştir. Su: ACN oranı (60:40, h/h) olarak ayarlandığında pik morfolojisi kısmen düzelmiş, fakat hala istenilen düzeyde olmaması nedeniyle tampon kullanımına ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla pH: 3 fosfat, pH: 4 asetat, pH: 5 asetat ve pH: 6 fosfat tamponları denenmiş, zayıf bazik bir madde olan ASE'nin artan pH ile elüsyon süresi artmış ve pik simetrisi bozulmuştur (Şekil 3). Bu nedenle pH:3 fosfat tamponu kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir. En uygun tampon derişimini belirlemek için 10 mM, 15 mM, 20 mM ve 25 mM derişimlerde fosfat tamponu içeren hareketli fazlar denenmiş, artan derişimler ile alıkonma zamanı azalırken, teorik tabaka sayısı ve pik simetrisi artmıştır (Şekil 4). 20 mM tampon ve 25 mM tampon kullanımında bu parametrelerde büyük bir fark olmaması nedeniyle ve yüksek derişimlerde tampon kullanımından kaçınmak amacıyla 20 mM tampon kullanımına karar verilmiştir. Tüm çalışma boyunca, 5µl enjeksiyon hacmi kullanılmış ve optimum sonuçlar elde edilmiştir.

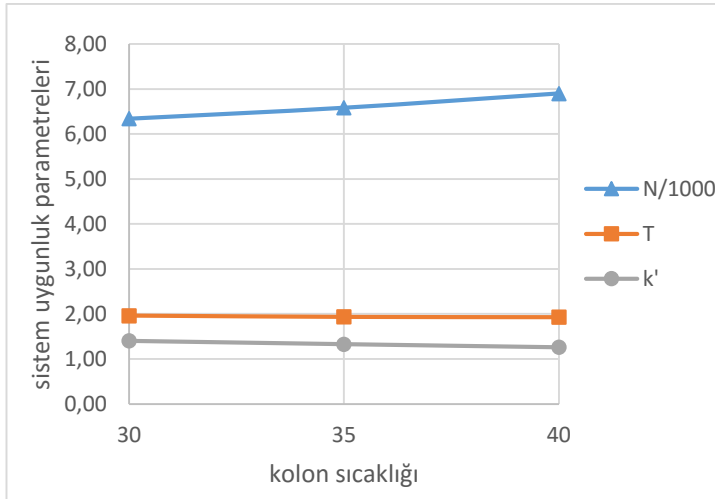


Şekil 3. pH değışimlerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi



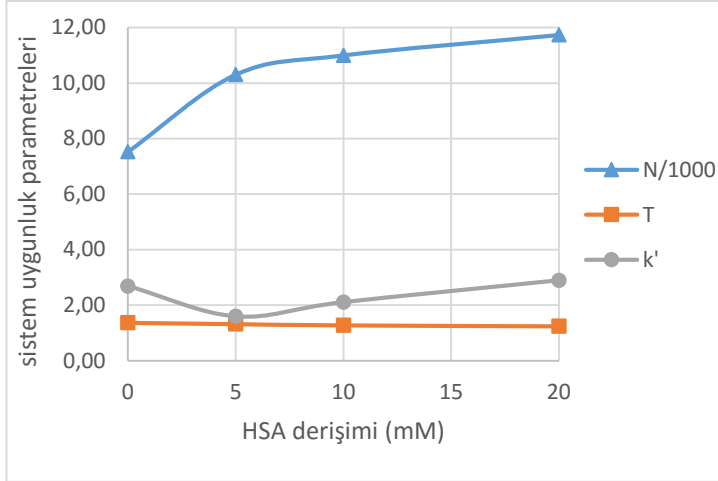
Şekil 4. Tampon derişimi değişimlerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi

Kolon sıcaklığını seçmek için 30, 35 ve 40°C’de analizler gerçekleştirilmiştir. Artan sıcaklıkla anlamlı bir fark gözlenmemesi nedeniyle kolon sıcaklığı 30°C’e ayarlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Kolon sıcaklığındaki değişimlerin sistem uygunluk parametrelerine etkisi

Tüm parametreler ile çeşitli denemeler yapılmasına karşın, pik simetrisinin istenilen değerlerde olmaması nedeniyle iyon çifti kromatografisi yöntemi denenmiştir. Bu amaçla kolon değiştirilmiş, bundan sonraki alışmalar Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm partikül boyutu) kolonunda gerçekleştirilmiştir. İyon ifti ajanı olarak 1-heptansülfonik kullanılmıştır. A hattında bulunan fosfat tamponuna (pH:3, 20 mM) sırasıyla 5 mM, 10 mM ve 20 mM 1-heptansülfonik asit eklenmiş ve analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. En uygun alıkonna zamanı 10 mM 1-heptansülfonik asit içeren hareketli faz ile gözlenmiş, diğer parametrelerin de uygun olması nedeniyle çalışmalara bu derişim ile devam edilmiştir (Şekil 6).

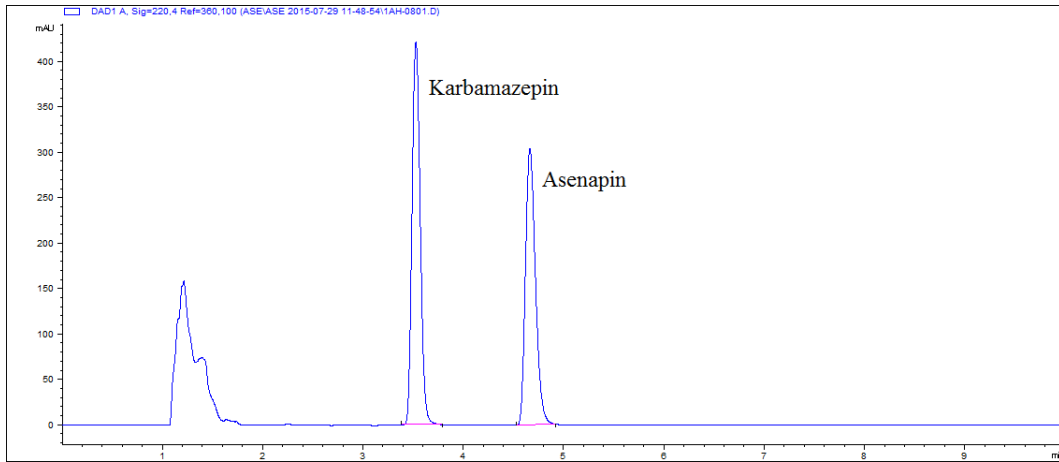


Şekil 6. İyon çifti ajanı derişimindeki değişimlerin sistem uygunluk parametrelerine etkisi

Çalışılacak dalga boyuna karar vermek amacıyla diyot dizisi dedektörü ile spektrum alınmış ve yüksek absorbans gözlenmesi nedeniyle 220 nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

Yöntem için iç standart seçmek amacıyla klorpromazin, karbamazepin, bupropion ve atomoksetin standart maddeleri sırasıyla denenmiştir. Optimize edilmiş deney koşullarında en uygun rezolüsyon, kapasite faktörü ve simetri karbamazepin ile gözlenmiş, alıkonma zamanının da uygun olması nedeniyle karbamazepin iç standart olarak seçilmiştir.

ASE (50 µg/ml) ve CBZ (16 µg/ml) standart maddelerini içeren bir çözeltinin optimum koşullarda yürütülen bir analizinden elde edilen kromatogramı Şekil 7’de görülmektedir.



Şekil 7. ASE (50 µg/ml) ve CBZ (16 µg/ml) standart çözeltilerinin optimum koşullardaki kromatogramı

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen optimum çalışma koşulları aşağıdaki gibidir:

Sabit faz	: Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm partikül boyutu)
Hareketli faz	: 10 mM HSA içeren fostat tamponu (20 mM, pH: 3) : ACN (60:40, h/h)
Kolon sıcaklığı	: 30°C
Çalışma dalga boyu	: 220 nm
Enjeksiyon hacmi	: 5 µl
İç standart	: CBZ

Optimum koşullarda yürütülen analizlerde gözlenen sistem uygunluk parametreleri ise **Çizelge 4**'te verilmiştir.

Çizelge 4. Optimum koşullarda gözlenen sistem uygunluk testi sonuçları

Parametre (n=7, 10 µg/ml)	Gözlenen değer	Önerilen değer
Alıkonma zamanı (dakika)	4.71	-
Kapasite faktörü (k')	2.15	2-10
Kuyruklanma faktörü (T)	1.20	≤2
Rezolüsyon (Rs)	7.46	>2
Teorik tabaka sayısı (N)	12040	>2000
Alıkonma zamanının % BSS 'si	0.03	<1

Yöntem Validasyonu

Validasyon parametreleri değerlendirilirken, pik alan oranları (ASE pikinin alanı / CBZ pikinin alanı) kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism 6 ve Microsoft Excel programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kesinlik

0.5, 10 ve 100 µg/ml ASE içeren çözeltilerle yapılan analizler sonucu elde edilen alan oranları kullanılarak istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır. Bulunan ortalama ASE derişimi, standart sapma ve % BSS'nin gün içi ve günler arası değerleri **Çizelge 5**'te gösterilmiştir. % 0.5'in altında % BSS değerleri yöntemin yüksek tekrar edilebilirlikte olduğunu göstermektedir.

Çizelge 5. Kesinlik ve doğruluk sonuçları

Parametre (0.5 µg/ml)	Gün İçi			Günler Arası
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	(n= 21)
Bulunan ASE derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	0.4967 ± 0.0013	0.4965 ± 0.0009	0.4955 ± 0.0015	0.4962 ± 0.0013
% BSS	0.2672	0.1732	0.2972	0.2649
% Geri Kazanım	99.35	99.30	99.09	99.25
% Hata	-0.65	-0.70	-0.91	-0.75

Parametre (10 µg/ml)	Gün İçi			Günler Arası
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	(n= 21)
Bulunan ASE derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	10.3625 ± 0.0448	10.3629 ± 0.0384	10.3788 ± 0.0108	10.3681 ± 0.0337
% BSS	0.4319	0.3705	0.1039	0.3254
% Geri Kazanım	103.62	103.63	103.79	103.68
% Hata	3.62	3.63	3.79	3.68

Parametre (100 µg/ml)	Gün İçi			Günler Arası
	I. Gün (n=7)	II. Gün (n=7)	III. Gün (n=7)	(n= 21)
Bulunan ASE derişimi (ortalama ± standart sapma) (µg/ml)	105.8704 ± 0.1919	105.4080 ± 0.2561	105.3336 ± 0.2589	105.5373 ± 0.3317
% BSS	0.1813	0.2430	0.2458	0.3143
% Geri Kazanım	105.87	105.41	105.33	105.54
% Hata	5.87	5.41	5.33	5.54

Doğruluk

Yöntemin doğruluğunu araştırmak için yedişer tekrarlı 3 setin analiz verileri ile yapılan hesaplamalar sonucunda % 99-106 arasında değişkenlik gösteren % geri kazanım değerleri ve % 6'dan az % hata değerleri elde edilmiştir. **Çizelge 5**'te

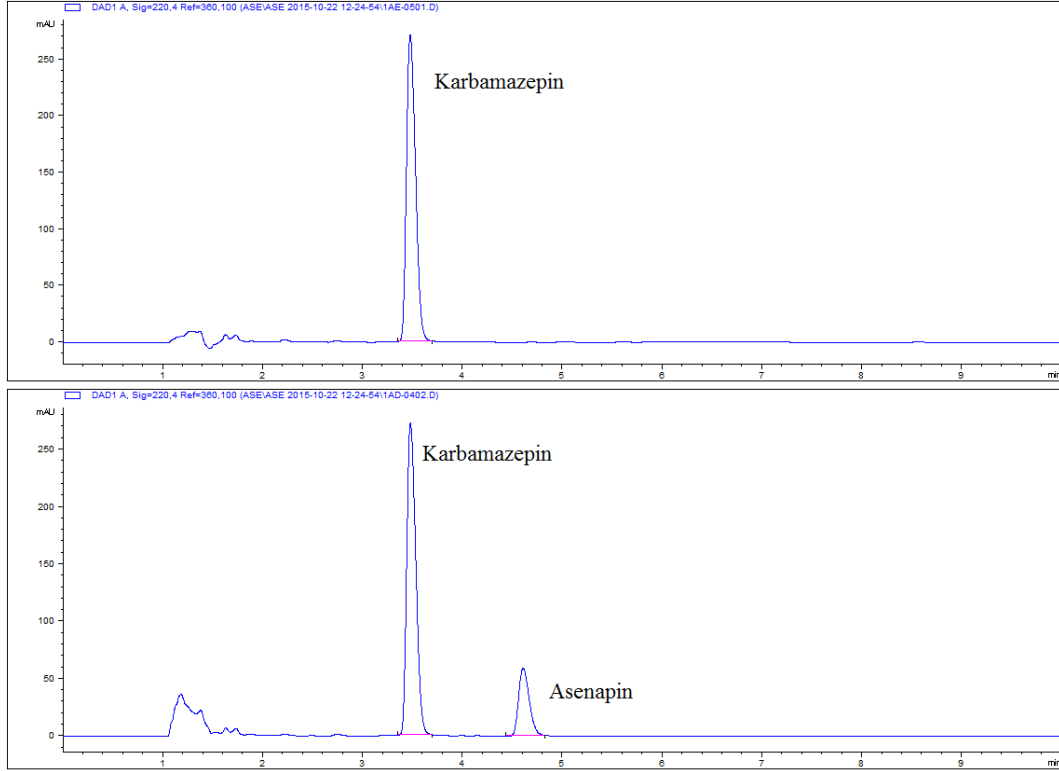
gösterilmiş olan % geri kazanım ve % hata değerleri yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Tabletteki yardımcı maddelerin yöntemin doğruluğuna etkisini göstermek amacıyla, ASE içeren matriks çözeltilerinin analizi yapılmış ve bulunan ASE derişimleri ile hesaplanan % geri kazanım değerleri **Çizelge 6**'da gösterilmiştir. % geri kazanım ve % hata değerlerinin kabul kriterleri içerisinde olması, tablet içeriğindeki yardımcı maddelerin yöntem doğruluğu üzerine etkili olmadığını yani yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Çizelge 6. ASE içeren matriks çözeltisi için doğruluk sonuçları

Matrikse eklenen ASE derişimi (ortalama \pm standart sapma) ($\mu\text{g/ml}$)	Bulunan ASE derişimi (ortalama \pm standart sapma) ($\mu\text{g/ml}$)	% Geri kazanım	% Hata	% BSS
0.5	0.4877 \pm 0.0024	97.54	2.46	0.4849
10	10.0939 \pm 0.0174	100.94	0.94	0.1727
100	100.44107 \pm 0.1232	100.44	0.44	0.1227

Ayrıca matriks çözeltilerinin analizi sonucu elde edilen kromatogramlarda (**Şekil 8**) ASE ile girişim yapabilecek hiç bir pike rastlanmamış, böylece tablet içeriğinde bulunan yardımcı maddelerin tableten ASE analizi sırasında yöntemin doğruluğunu etkilemeyeceği tekrar gösterilmiştir.



Şekil 8. a: CBZ (16 µg/ml) içeren matris çözeltisinin optimum koşullardaki kromatogramı, b: ASE (10 µg/ml) ve CBZ (16 µg/ml) içeren matris çözeltisinin optimum koşullardaki kromatogramı

Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla 7 nokta içeren 3 kalibrasyon setinin analizleri gerçekleştirilmiş, elde edilen veriler ile yapılan regresyon analizi sonucu hesaplanan değerler **Çizelge 7**'de gösterilmiştir.

Çizelge 7. Doğrusallık sonuçları

Parametre (0.5- 100 µg/ml)	Gün içi			Günler arası
	I. Gün (n=7)	2.gün (n=7)	3.gün (n=7)	Tüm günler (n=18)
Eğim ± standart sapma	0.0148 ± 0.0002	0.0176± 8.8E-6	0.0209 ± 0.0002	0.0176± 8.4E-5
Kesim ± standart sapma	0.0096 ± 0.0087	0.0004 ± 0.0004	0.0052 ± 0.0098	-0.0012 ± 0.0023
Tayin katsayısı (r ²)	0.9991	1.000	0.9994	0.9996
% 95 Güven aralığı (CL)	0.0142 - 0.0153	0.0175 - 0.0176	0.0203 - 0.0215	0.0173 - 0.0177

Saptama Sınırı ve Tayin Sınırı

Geliştirilen yöntemle ASE tayini için SS değeri 0.0836 µg/ml, TS değeri ise 0.2788 µg/ml olarak bulunmuştur.

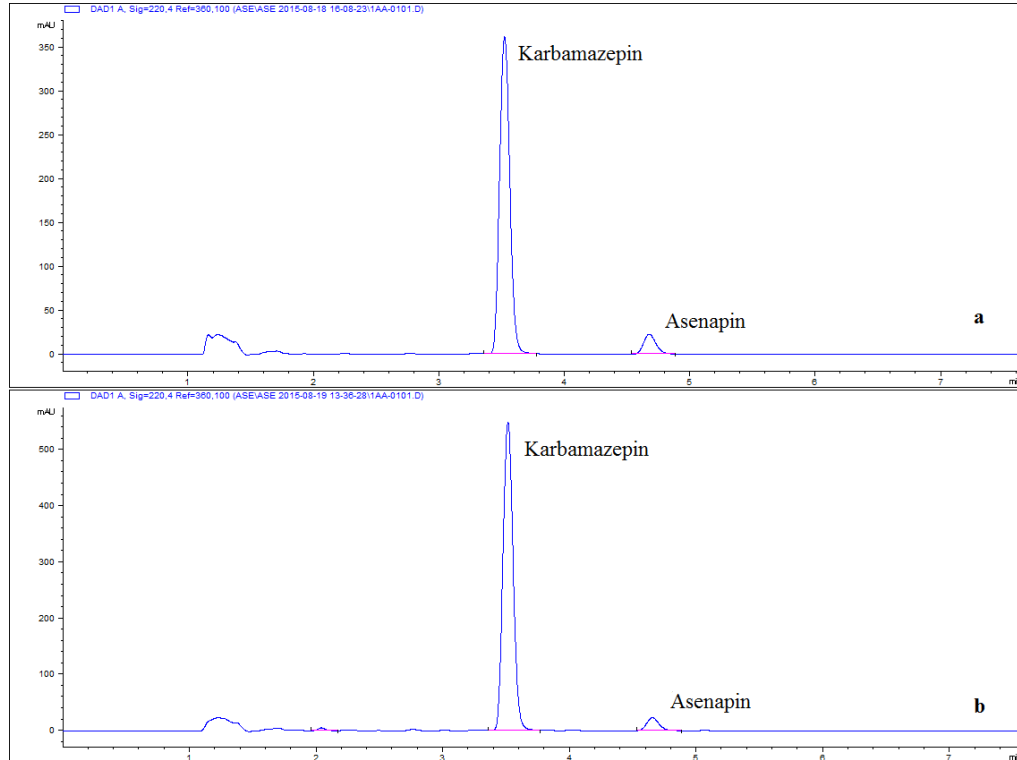
Özgünlük

Asit, baz ve % 3'lük H₂O₂ çözeltileri ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin 120. dk sonundaki % ASE miktarları **Çizelge 8**'de verilmiştir.

Çizelge 8. Belirtilen koşullarda bekletilmiş ASE çözeltilerinin 120 dakika sonundaki % ASE miktarları

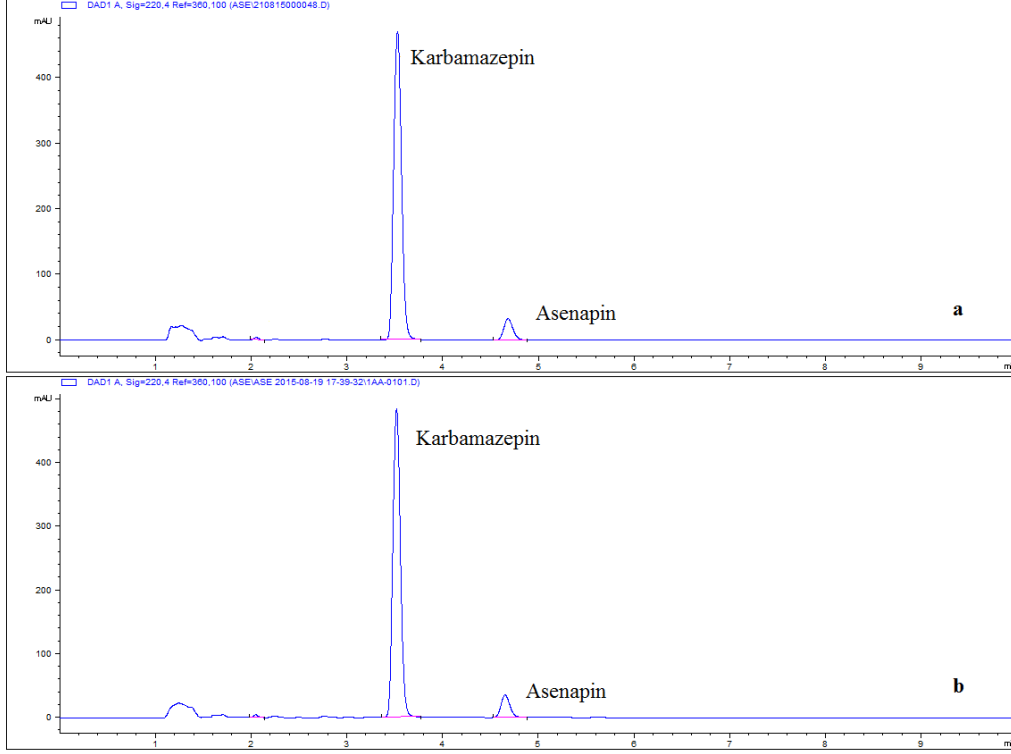
Koşullar	Oda sıcaklığı	60 °C
0.1 N NaOH	% 86.65	% 72.35
0.1 N HCl	% 93.73	% 106.00
% 3'lük H ₂ O ₂	% 94.28	% 80.55

ASE çözeltileri, bazla muamele edildiğinde oda sıcaklığında % 13 oranında bir bozunma görülürken, 60°C'de % 28'e varan bir bozunma olmuştur. Oda sıcaklığında kromatogramda herhangi bir bozunma ürünü gözlenmezken, 60°C'de bozunma pikleri gözlenmiştir (**Şekil 9**).



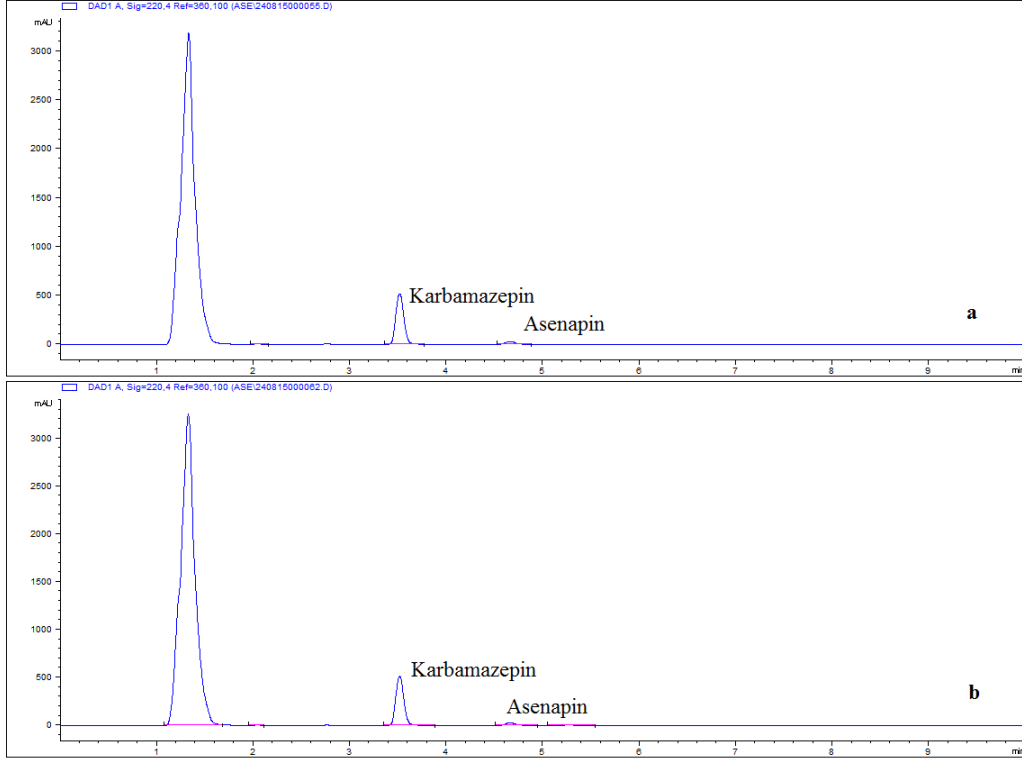
Şekil 9. 120 dakika boyunca 0.1 N NaOH ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C'de.

Asitle muamele sonucunda elde edilen ASE geri kazanımı hem oda sıcaklığında hem de 60 °C’de % 90-110 arasındadır. 120. dakikada görülen bozunma ürününe ait pikler **Şekil 10**’da görülmektedir.



Şekil 10. 120 dakika boyunca 0.1 N HCl ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C’de.

% 3’lük H₂O₂ ile muamele edilen ve oda sıcaklığında bekletilen çözeltilerde % 6 gibi düşük bir bozunma oranı gözlenirken, aynı koşulda 60°C’de bekletilen çözeltilerde yaklaşık % 20 oranında bir bozunma gözlenmiştir. Her iki koşulda da oluşan büyük H₂O₂ pikleri **Şekil 11**’de görülmektedir.



Şekil 11. 120 dakika boyunca %3'lük H₂O₂ ile muamele edilmiş ASE çözeltilerinin kromatogramları, a. oda sıcaklığında, b. 60°C'de.

Şekil 9, 10 ve 11'de görüldüğü gibi oluşan bozunma ürünlerine ait pikler ASE ve CBZ piklerine girişim yapmamaktadır. Böylece, bozunma ürünlerinin yöntemi etkilemediği ve yöntemin özgünlüğü gösterilmiştir.

Sağlamlık

Yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişiklikler sonucunda ASE alıkonma zamanı, % geri kazanım değerleri ve sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır. Bu değerler, yöntemin normal koşullarda uygulanması sonucu elde edilen değerler ile karşılaştırılmış ve birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca normal koşullar ve değiştirilmiş koşullar birlikte değerlendirildiğinde elde edilen % BSS değerleri hesaplanmış ve % 3'ten küçük bulunmuştur. Sonuçlar **Çizelge 9**'da gösterilmiştir.

Çizelge 9. Sağlıklik sonuçları

Parametre	% Geri kazanım	Alıkonma zamanı (dk)	Teorik tabaka sayısı	Kuyruklanma faktörü	Rezolüsyon
Hareketli faz pH değeri					
2.9	100.26 ± 0.44	4.692 ± 0.000	12298 ± 93.79	1.19 ± 0.01	7.52 ± 0.02
3.1	101.55 ± 0.76	4.670 ± 0.002	11778 ± 120.21	1.21 ± 0.01	7.26 ± 0.03
Organik faz yüzdesi (%)					
38	99.09 ± 0.54	5.783 ± 0.003	12349 ± 7.94	1.18 ± 0.01	10.07 ± 0.01
42	98.42 ± 0.56	3.914 ± 0.002	12160 ± 165.71	1.19 ± 0.01	5.37 ± 0.03
Tampon derişimi (mM)					
18	99.77 ± 0.10	4.729 ± 0.002	12309 ± 50.48	1.19 ± 0.01	7.73 ± 0.02
22	100.00 ± 0.11	4.608 ± 0.002	12204 ± 44.98	1.19 ± 0.01	7.06 ± 0.01
Dedektör dalga boyu (nm)					
218	104.88 ± 0.13	4.664 ± 0.003	11354 ± 49.86	1.20 ± 0.01	7.08 ± 0.01
222	100.03 ± 0.08	4.666 ± 0.001	11440 ± 87.93	1.19 ± 0.001	7.10 ± 0.02
Akış hızı (ml/dk)					
0.9	99.68 ± 0.22	5.162 ± 0.001	12033 ± 19.86	1.19 ± 0.01	7.26 ± 0.01
1.1	100.33 ± 0.14	4.257 ± 0.001	10858 ± 6.24	1.20 ± 0.01	6.96 ± 0.01
HSA derişimi (mM)					
9	100.13 ± 0.35	4.768 ± 0.003	11597 ± 28.50	1.19 ± 0.01	7.74 ± 0.01
11	99.96 ± 0.20	4.526 ± 0.003	11559 ± 32.87	1.20 ± 0.01	6.40 ± 0.02

Stabilite

Üç farklı koşulda (24 saat, oda sıcaklığında; 2 hafta, -20°C’de ve 3 eritme-dondurma döngüsü) bekletilen çözeltilerin analizleri sonucu elde edilen veriler ile hesaplanan % geri kazanım ve % BSS değerleri **Çizelge 10**’da görülmektedir.

% 90-115 aralığında bulunan % geri kazanım değerleri ASE kararlılığının her üç koşulda da uygun olduğunu göstermiştir.

Çizelge 10. Stabilite Sonuçları

Teorik derişim (µg/ml)	Kısa dönem kararlılığı (24 saat, oda sıcaklığında)		Uzun dönem kararlılığı (2 hafta, -20°C)		Dondurma eritme kararlılığı (3 döngü)	
	% Geri kazanım (ortalama ± standart sapma)	BSS (%)	% Geri kazanım (ortalama ± standart sapma)	BSS (%)	% Geri kazanım (ortalama ± standart sapma)	BSS (%)
	10	92.86 ± 0.11	0.12	112.29 ± 0.09	0.08	100.84 ± 0.38
100	110.94 ± 0.15	0.14	102.99 ± 0.04	0.04	105.03 ± 0.37	0.35

Tabletlerde Miktar Tayini

10 µg/ml ASE ve 16 µg/ml CBZ içeren tablet çözeltisinin analizi sonucunda hesaplamalar gerçekleştirilmiş ve bir tabletteki ortalama ASE miktarı 10.42±0.06 mg (ortalama ± standart sapma, n=8), % BSS değeri 0.55, % geri kazanım değeri ise % 104.18 olarak bulunmuştur. Hesaplanan % geri kazanım değerinin uygun olması yöntemin tabletlerde ASE analizi için kullanılabileceğini göstermektedir.

SONUÇ ve ONERILER

ASE şizofreni ve bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir. Bu çalışmada ASE'nin tabletlerindeki tayini için basit, kesin, doğru ve hızlı bir YPSK yöntemi geliştirilmiş ve ilgili ICH kılavuzu (ICH Q2(R1), 2005) ve USP'ye (USP 29, 2006) göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem 0.5-100 µg/ml derişim aralığında doğrusal bulunmuş, saptama sınırı 0.0836 µg/ml, tayin sınırı ise 0.2788 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Yöntem kesinlik, doğruluk, özgünlük, sağlamlık ve stabilite parametreleri açısından da değerlendirilmiş ve uygun bulunmuştur. Yöntem ASE'nin tabletlerde tayini için başarıyla uygulanmıştır.

Literatürde ASE'nin analizi için geliştirilmiş yöntemlerin çoğu ASE'nin biyolojik numunelerde tayinini amaçlamaktadır (de Boer ve ark., 2012a, de Boer ve ark., 2012b, Ansermot ve ark., 2013, Reddy ve ark., 2013, Miller ve ark., 2013, Patteet ve ark., 2014, Sempio ve ark., 2014, Kovatsi ve ark. 2015). Bu yöntemler arasında YPSK yöntemi (Kovatsi ve ark. 2015), YPSK-KS/KS yöntemleri (de Boer ve ark., 2012a, de Boer ve ark., 2012b, Ansermot ve ark., 2013, Reddy ve ark., 2013, Patteet ve ark., 2014, Sempio ve ark., 2014) ve GS-KS yöntemi (Miller ve ark., 2013) bulunmaktadır. ASE'nin toz madde ve tabletlerinde tayini amacıyla geliştirilmiş yöntemler sınırlı sayıdadır. Bunlar UV spektrometrik yöntem (Halima ve ark., 2012), titrimetrik yöntem (Aarely ve ark., 2012), YPİTK yöntemi (Patel ve ark., 2015) ve iki adet YPSK yöntemini (Chhalotiya ve ark., 2012, Parthasarathi ve ark., 2012) içermektedir; ancak bu yöntemlerin çoğu (Halima ve ark., 2012, Aarely ve ark., 2012, Parthasarathi ve ark., 2012) ASE'nin düşük derişimlerinde tayinine olanak sağlamamaktadır. Bu yöntemler arasından Aarely ve ark. (2012) tarafından geliştirilen titrimetrik yöntem 0.5-5 mg/ml ve Halima ve ark. (2012) tarafından geliştirilen spektrometrik yöntem 10-60 µg/ml derişim aralığında analize imkan sağlayan yöntemlerdir. Parthasarathi ve ark. (2012)'nin geliştirdikleri YPSK yöntemi ise 10-50 µg/ml derişim aralığında doğrusal bulunmuştur.

Patel ve ark. (2015) tarafından geliştirilen YPİTK yöntemi ve Chhalotiya ve ark. (2012) tarafından geliştirilmiş olan YPSK yöntemi ise ASE'nin tabletlerde tayini için daha düşük derişimlerde analize imkan sağlayan yöntemlerdir. Bu yöntemler sırasıyla 0.3-1.8 µg/ml ve 0.1-20 µg/ml derişim aralığında doğrusal bulunmuş ve TS değerleri sırası ile 0.12 µg/ml ve 0.10 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Chhalotiya ve ark. (2012)'nin geliştirdiği yöntemde ASE için alıkonma zamanı 5.51 dakika olarak bulunmuş, teorik tabaka sayısı değeri 3805 olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada geliştirmiş olduğumuz YPSK yöntemi, 0.5-100 µg/ml derişim aralığında doğrusal olması ve 0.2788 µg/ml TS değeri ile yukarıda bahsedilen iki yöntem ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Ayrıca daha düşük alıkonma zamanı (4.71 dakika), yüksek teorik tabaka sayısı (12040) ve daha geniş bir derişim aralığında analize olanak sağlaması ile bu yöntemlere alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. YPSK gibi çoğu analiz laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek ve pahalı olmayan bir yöntem kullanılması yöntemin avantajları arasındadır. Yöntemin tam validasyonu ve stabilite çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntem rutin olarak tabletlerde ASE tayini amacıyla kolaylıkla kullanılabilir, hızlı, uygun ve güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca yöntem çeşitli düzenlemeler yapılarak biyolojik sıvılarda ASE tayini için de uygulanabilir.

KAYNAKLAR

Aarely, K., Thimmaraju, M. K., Nerella, R., Quantitative determination of asenapine in both bulk and formulations using neutralization titrations, *J. App. Pharm. Sci.*, 2(8), 141-145 (2012).

Ansermot, N., Brawand-Amey, M., Kottelat, A.Eap, C. B., Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J. Chromatogr. A*, 1292, 160-172 (2013).

Bishara, D., Taylor, D., Upcoming agents for the treatment of schizophrenia mechanism of action, efficacy and tolerability, *Drugs*, 68(16), 2269-2292 (2008).

Chhalotiya, U. K., Bhatt, K. K., Shah, D. A.R., P. J., Stability-indicating liquid chromatographic method for the quantification of the new antipsychotic agent asenapine in bulk and in pharmaceutical formulation, *Sci. Pharm.*, 80, 407-417 (2012).

Citrome, L., Role of sublingual asenapine in treatment of schizophrenia, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 7, 325-339 (2011).

Citrome, L., Asenapine review, part I: chemistry, receptor affinity profile, pharmacokinetics and metabolism, *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 10(6), 893-903 (2014a).

Citrome, L., Asenapine review, part II: clinical efficacy, safety and tolerability, *Expert. Opin. Drug. Saf.*, 13(6), 803-830 (2014b).

de Boer, T., Meulman, E., Meijering, H., Wieling, J., Dogterom, P.Lass, H., Quantification of asenapine and three metabolites in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with automated solid-phase extraction: application to a phase I clinical trial with asenapine in healthy male subjects, *Biomed. Chromatogr.*, 26(2), 156-165 (2012a).

de Boer, T., Meulman, E., Meijering, H., Wieling, J., Dogterom, P.Lass, H., Development and validation of automated SPE-HPLC-MS/MS methods for the quantification of asenapine, a new antipsychotic agent, and its two major metabolites in human urine, *Biomed. Chromatogr.*, 26(12), 1461-1463 (2012b).

Fears, S. C., Reus, V. I., Chapter 104 - Bipolar disorder. Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease (Fifth Edition). Pascual, R. N. R. M., Academic Press. Boston, 1275-1291, 2015.

Gonzalez, J. M., Thompson, P. M.Moore, T. A., Review of the safety, efficacy, and side effect profile of asenapine in the treatment of bipolar 1 disorder, *Patient Prefer Adher*, 5, 333-341 (2011).

Halima, O. A., Aneesh, T. P., Ghosh, R., Thomas, N. R., Development and validation of UV spectrophotometric method for the estimation of asenapine

maleate in bulk and pharmaceutical formulation, *Der Pharma Chem.*, 4(2), 644-649 (2012).

http-1 Asenapin kısa ürün bilgisi, <http://www.titck.gov.tr/PortalAdmin/Uploads/KubKT/6969b22673534.pdf>, (16.11.2015).

http-2 Saphris (Asenapine) tablet FDA drug approval package, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2009/022117s000_ChemR.pdf, (16.11.2015).

ICH Steering Committee, Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). Harmonized Tripartite Guideline (2005).

Konopaske, G. T., Coyle, J. T., Chapter 39 - Schizophrenia. *Neurobiology of brain disorders*. Coyle, M. J. Z. P. R. T., Academic Press. San Diego, 639-654, 2015.

Kovatsi L., Titopoulou A., Tsakalof A., Samanidou V., HPLC analysis of antipsychotic asenapine in alternative biomatrices: hair and nail clippings, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 38 (18), 1666-1670 (2015).

Lindsay , S., *High performance liquid chromatography*, Wiley, Chichester, 180-185, 1992.

Miller, C., Pleitez, O., Anderson, D., Mertens-Maxham, D., Wade, N., Asenapine (Saphris (R)): GC-MS method validation and the postmortem distribution of a new atypical antipsychotic medication, *J. Anal. Toxicol.*, 37(8), 559-564 (2013).

Miller, J.M., *Chromatography: concepts and contrasts*, Wiley, New York, 180-185, 1988.

Nikolin B., Imamović B., Medanhodžić-Vuk S., Šober M., High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses, *Bosn. J. Basic. Med. Sci.*, 4 (2), 5-9 (2004).

Parthasarathi, T. R., Srinivas, T. S., Sri, M. V., Ram, S. S., Basha, M. M., Rajesh, P., Quantitative determination of asenapine maleate using reverse phase-high performance liquid chromatography, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 3(4), 360-366 (2012).

Patel R.B., Naregalkar N.S., Patel M.R., Stability-Indicating HPTLC method for quantitative estimation of asenapine maleate in pharmaceutical formulations, Equilibrium Solubility, and ex vivo Diffusion Studies, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 38 (19), 1731-1739 (2015).

Patteet, L., Maudens, K. E., Sabbe, B., Morrens, M., De Doncker, M., Neels, H., High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.*, 429, 51-58 (2014).

Reddy, A. V. B., Venugopal, N., Madhavi, G., Simultaneous determination of asenapine and valproic acid in human plasma using LC–MS/MS: Application of the method to support pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.*, 3(6), 394-401 (2013).

Sempio, C., Morini, L., Vignali, C., Groppi, A., Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: application on postmortem samples, *J. Chromatogr. B*, 970, 1-7 (2014).

Snyder R.S., Kirkland J.J., Dolan J.W., Introduction to modern liquid chromatography, Wiley, Hoboken, 330-349, 2010.

The United States Pharmacopeia XXIX, Marck Printing Co., Easton, 320-324 2006.

Volk, D. W., Lewis, D. A., Chapter 105 - Schizophrenia. Rosenberg's molecular and genetic basis of neurological and psychiatric disease (Fifth Edition). Pascual, R. N. R. M., Academic Press. Boston, 1293-1299, 2015.

Wilson, I. D., Poole, C. F., Liquid Chromatography: mechanisms: ion-pair chromatography. Handbook of methods and instrumentation in separation science, Volume 1. Wilson, I. D. P., Colin F., Elsevier, 524-532, 2009.