



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

**DOKTORA
TEZİ**

**HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ SABİT DOZLU
KOMBİNASYON TASARIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

DİREN SARISALTIK YAŞIN

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

KASIM 2018



**HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ SABİT DOZLU
KOMBİNASYON TASARIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Diren SARISALTİK YAŞIN

**DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2018

Diren SARISALTIK YAŞIN tarafından hazırlanan “Hipertansiyon tedavisinde etkili sabit dozlu kombinasyon tasarımı ve değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

Farmasötik Teknoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

Farmasötik Teknoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ

Farmasötik Teknoloji, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Erem BİLENSOY

Farmasötik Teknoloji, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN

Farmasötik Teknoloji, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 16/11/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Diren SARISALTIK YAŞIN

16.11.2018

HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ SABİT DOZLU KOMBİNASYON TASARIMI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Diren SARISALTIK YAŞIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2018

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, hipertansiyon tedavisinde farklı mekanizmalar ile etki gösteren amlodipin ve enalapril etkin maddelerini tablet dozaj şekli halinde içeren “Sabit Dozlu Kombinasyon”un (SDK) “Kalite Tasarımı” (QbD) prensiplerine göre geliştirilmesidir. SDK’nın önformülasyon aşamalarında etkin maddelerin fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmış ve miktar tayini analiz yöntemi geliştirilmiştir. Miktar tayini analiz yönteminin sağlamlığını test etmek için Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılmış ve geliştirilen Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi optimize edilmiştir. Formülasyon çalışmalarından önce etkin maddelerin birbirleriyle ve yardımcı maddeler ile geçimlilik çalışmaları yapılmıştır. Geçimlilik çalışmalarında termal (DSC, TGA, DTA), kromatografik (İTK) ve spektroskopik (FTIR) analiz yöntemleri kullanılmıştır. Geçimsizlik ihtimali olan yardımcı maddeler elenerek seçilen fonksiyonel yardımcı maddeler ile formülasyon aşamasına geçilmiştir. Formülasyon aşamasında her iki ilacın referans ürünlerinin fizikokimyasal ve biyofarmasötik özellikleri temel alınarak “Hedef Ürün Kalite Profili” (QTPP) belirlenmiştir. Daha sonra QTPP’yi etkileyebilecek olası “Kritik Kalite Özellikleri” (CQA) saptanmıştır. Ishikawa diyagramı ve neden-sonuç matrisi araçları ile risk analizi yapılarak CQA üzerine etkili “Kritik Materyal Özellikleri” (CMA) ve “Kritik Proses Parametreleri” (CPP) belirlenip bu faktörlerin risk düzeyleri Plackett-Burman tasarımı (PBD) ile değerlendirilmiştir. PBD sonucuna göre anlamsız faktörler elenerek, etkili faktörler BBD ile optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda kritik faktörler için tasarım alanı belirlenmiş ve seçilen final formülasyon tabletin kalite denetim kriterleri açısından referans ürünler ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, amlodipin ve enalapril içeren SDK ürününün formülasyon ve proses gelişimi sırasında kalitenin ürüne QbD yardımıyla inşası in vitro testlerle kanıtlanarak başarılı bir formülasyon tasarımı sağlanmıştır.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar : Sabit dozlu kombinasyon, Kalite tasarımı, Deney tasarımı,
Kelimeler : Amlodipin, Enalapril, Hipertansiyon
Sayfa Adedi : 185
Danışman : Doç. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

DESIGN AND EVALUATION OF A FIXED DOSE COMBINATION FOR THE
TREATMENT OF HYPERTENSION

(Ph. D. Thesis)

Diren SARISALTIK YAŞIN

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2018

ABSTRACT

The study aimed to develop a Fixed Dose Combination (FDC) as a tablet dosage form containing amlodipine and enalapril acting by different mechanisms by using “Quality by Design” (QbD) principles. In preformulation studies of the FDC, physicochemical characterizations were performed, and then analytical method for the assay was developed. Box-Behnken experimental design (BBD) was used for robustness testing of the High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analytical method for assay, and this method was optimized. Before the formulation studies, the compatibility studies of active substances with each other and with excipients were performed. Thermal (DSC, TGA, DTA), chromatographic (TLC) and spectroscopic (FTIR) methods were used in the compatibility studies. Excipients having possible incompatibility were eliminated and it proceeded to the formulation stage with the functional excipients selected in remaining ones. In the formulation stage, the Quality Target Product Profile (QTPP) was determined based on physicochemical and biopharmaceutic properties of the reference products of both drugs. Then the possible Critical Quality Attributes (CQA), which may affect to QTPP were determined. Risk analysis by using Ishikawa diagrams and cause-effect matrices was performed to define the Critical Material Attributes (CMA) and Critical Process Parameters (CPP) which has an effect on the CQA and the risk grade of these factors was investigated with Plackett-Burman design (PBD). According to the results of PBS, insignificant factors were elevated but the significant factors were optimized using BBD. As a result of optimization, the design space was established for critical factors and selected optimum formulation was compared to the reference products in terms of quality control criteria of tablets. In conclusion, the quality was constructed to the FDC product containing amlodipine and enalapril via QbD principles during the formulation and process development and an accomplished formulation design was achieved.

Science Code : 1020

Key Words : Fixed dose combination, Quality by Design, Design of Experiments,
Hypertension, Amlodipine, Enalapril

Page Number : 185

Advisor : Assoc. Prof. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumda bana 10 senedir her açıdan yol gösteren, her zor anımda arkamda desteğini hissettiğim, çok değerli danışman hocam Sayın **Doç.Dr.Zeynep Şafak Teksin**'e, Tez İzleme Komitemde yer alan ve kıymetli görüşleri ile tezime katkı sunan Sayın **Prof. Dr.Figen Tırnaksız**'a ve **Prof.Dr.Erem Bilensoy**'a, her ihtiyaç duyduğumda sonsuz deneyim ve bilgilerini benimle cömertçe paylaşan değerli hocalarım Sayın **Prof.Dr.Nevin Çelebi** ve Sayın **Prof.Dr.Fusun Acartürk**'e, doktora çalışmalarım sırasında sonsuz yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın **Prof.Dr.Meral Erdinç**'e, Design Expert yazılımı konusunda bilgilerini benimle paylaşan Sayın **Dr.Ecz.Alptuğ Karaküçük**'e ve Sayın **Dr.Ecz.Özgür Eşim**'e, HPLC kullanımı konusunda yardımcı olan Sayın **Prof.Dr.Uğur Tamer**, Sayın **Doç.Dr.Sibel İlbasmış Tamer**, Sayın **Dr.Ecz.Emre Yalçın**'a, ve Sayın **Alev Arslantuğ-Bingül**'e, etkin maddelerin ve bazı yardımcı maddelerin temininde desteğini esirgemeyen Nobel İlaç Ar-Ge Merkezi Grup Müdürü Sayın **Dr.Ecz.Abdullah Uslu**'ya, yine bazı yardımcı maddelerin temininde yardımcı olan Ashland Inc. Satış Müdürü Sayın **Dr.Ecz. Fırat Nalbanoğlu**'na, Drogosan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Proje Yöneticisi **Uzm. Ecz.Mehtap Saydam**'a, Berko İlaç ve Kimya Sanayi Genel Müdürü **Ecz.Bariş Özyurtlu**'ya, DSC ölçümlerinde destek olan Sayın **Dr.Serhat Uzan**'a, FTIR ölçümlerinde yardımcı olan Sayın **Dr.Ecz. Mahmut Gözelle**'ye, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve başta **Dr.Ecz.Başaran Mutlu Ağardan**, **Arş.Gör.Duygu Yılmaz Usta**, **Arş.Gör.Sıla Gülbağ Pınar**, **Arş.Gör.Ayşe Nur Oktay** ve **Dr.Ecz.Serdar Tort** olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın **Doç.Dr.Mehmet Boğa** ve Sayın **Doç.Dr.Abdulselam Ertaş**'a ve diğer hocalarıma, bana hep destek olan **Arş.Gör.Neslihan Genişel**, **Arş.Gör.Merve İnci Çamçi**, **Arş.Gör.Bülent Samancı**, **Arş.Gör.Serkan Yiğitkan**, **Arş.Gör.Cennet Duran**, **Arş.Gör.Ozan Toksoy** ve tüm diğer asistan arkadaşlarıma, motivasyonum her düştüğünde yaşam koçluğumu yapan tüm dostlarıma, doktora süresince bana evlerini açan Ankara'daki kardeşlerime, tüm hayatım boyunca varlığına hep şükrettiğim ve onlardan sonsuz güç aldığım **ablama**, **anneme**, **babama**, **yeğenlerime**, **eşıme** ve **minik kızıma** teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalite Tasarımı	3
2.2. Sabit Dozlu Kombinasyonlar (SDK).....	12
2.3. Amlodipin Besilat	15
2.4. Enalapril Maleat	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	21
3.1.1. Kullanılan malzemeler.....	21
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	22
3.2. Yöntem ve Deneyler.....	23
3.2.1. Etkin maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	23
3.2.2. Etkin maddelerin miktar tayini ve validasyonu	26
3.2.3. Çözünme hızı yöntem validasyonu.....	32
3.2.4. Formülasyon gelişimi	35
3.2.5. QbD aşamaları	40
3.2.6. Final formülasyonda yapılan safsızlık tayinleri.....	48
4. BULGULAR	55

	Sayfa
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	55
4.1.1. Etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı	55
4.1.2. Etkin maddelerin çözünürlük çalışmaları	56
4.1.3. Etkin maddelerin birbirleriyle geçimlilik çalışmaları	57
4.1.4. Etkin maddelerin yardımcı maddeler ile geçimlilik çalışmaları	65
4.2. Etkin Maddelerin Miktar Tayini ve Validasyonu	100
4.2.1. Box-Behnken deney tasarımıyla yöntemin optimizasyonu	101
4.2.2. Miktar tayini için analitik yöntem validasyonu	107
4.3. Çözünme Hızı Yöntem Validasyonu	113
4.4. Formülasyon Gelişimi	126
4.4.1. Referans ürünlerde yapılan kalite denetimleri	126
4.4.2. Deneme formülasyonun değerlendirilmesi	127
4.5. Deney Tasarımı (DOE)	128
4.5.1. Plackett-Burman deney tasarımı ile faktör sayısının azaltılması	128
4.5.2. Box-Behnken deney tasarımı ile verilerin değerlendirilmesi ve optimizasyon	138
4.6. Final Formülasyonun Hazırlanması ve Kontrolleri	149
4.6.1. Final formülasyonun hazırlanması	149
4.6.2. Final formülasyonda yapılan kalite denetimleri	150
5. TARTIŞMA	157
5.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu	157
5.2. Yardımcı Maddelerin Seçimi	159
5.3. Etkin Maddelerin Miktar Tayini ve Çözünme Hızı Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	161
5.4. Kalite Tasarımı ile Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	162
5.5. Plackett-Burman Deney Tasarımı	165

	Sayfa
5.6. Box-Behnken Deney Tasarımı	167
5.7. Optimizasyon İle Tasarım Alanının Belirlenmesi ve Final Formülasyonun Hazırlanması, Kalite Denetimleri ve Safsızlık Değerlendirmeleri.....	168
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	171
KAYNAKLAR	173
ÖZGEÇMİŞ	183

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 11 faktörlü bir tasarım için Plackett-Burman deney matrisi.....	8
Çizelge 3.1. Kullanılan malzemeler.....	21
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar.....	22
Çizelge 3.3. Miktar tayini için geliştirilen yönteme ait kromatografik koşullar.....	27
Çizelge 3.4. Geliştirilen analitik yöntemin sağlamlığının değerlendirilmesinde incelenen deney tasarımına ait bağımsız değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.....	28
Çizelge 3.5. Analitik yöntem optimizasyonu için oluşturulan BBD deney matrisi.....	29
Çizelge 3.6. Miktar tayini analizinde çalışma çözeltisine göre amlodipin (AML) ve enalapril maleat (ENA) yüzdelere karşılık gelen konsantrasyonlar	30
Çizelge 3.7. Çözünme hızı tayini için geliştirilen yöntemlere ait kromatografik koşullar	32
Çizelge 3.8. Çözünme hızı analiz yönteminde çalışma çözeltisine göre amlodipin ve enalapril maleat yüzdelere karşılık gelen konsantrasyonlar	34
Çizelge 3.9. Çözünme hızı testi koşulları	37
Çizelge 3.10. Formülasyon tasarımlarında kullanılacak yardımcı maddeler.....	38
Çizelge 3.11. Deneme formülasyon.....	38
Çizelge 3.12. Seçilen yardımcı maddelerin formülasyonda kullanım yüzdeleri	39
Çizelge 3.13. Hedef ürün kalite profili (QTPP).....	40
Çizelge 3.14. Kritik kalite özellikleri (CQA).....	41
Çizelge 3.15. Olası faktörlere ait başlangıç risk değerlendirmesi	43
Çizelge 3.16. Yardımcı maddelerin risk değerlendirmesine ait neden-sonuç matrisi. ...	44
Çizelge 3.17. PBD’de kullanılan faktörler ve seviyeleri	45
Çizelge 3.18. PBD deney matrisi.....	45
Çizelge 3.19. BBD’de kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	46
Çizelge 3.20.PBD tasarımıda değişken iken BBD’de sabit tutulan faktörler ve düzeyleri	46

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.21. BBD deney matrisi	47
Çizelge 4.1. Amlodipin besilatın çözünürlük ve D_0 değerleri	56
Çizelge 4.2. Enalaprilin çözünürlük ve D_0 değerleri	57
Çizelge 4.3. Amlodipin besilatın fonksiyonel grupları, gözlenen pikler ve amlodipin-enalapril karışımında bu piklerin dalga sayıları.....	62
Çizelge 4.4. Enalapril maleatın fonksiyonel grupları, gözlenen pikler ve amlodipin-enalapril karışımında bu piklerin dalga sayıları.....	63
Çizelge 4.5. Amlodipin besilatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler.....	85
Çizelge 4.6. Enalapril maleatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler.....	93
Çizelge 4.7. BBD tasarım ile analitik yöntemle ait faktörler ve elde edilen yanıtlar	102
Çizelge 4.8. Amlodipin konsantrasyonu cevabı için oluşan modelin ANOVA sonuçları.....	103
Çizelge 4.9. Enalapril konsantrasyonu cevabı için oluşan modelin ANOVA sonuçları.....	105
Çizelge 4.10. Analiz yöntemine ait sistem uygunluk parametreleri	107
Çizelge 4.11. AML için doğruluk sonuçları	111
Çizelge 4.12. ENA için doğruluk sonuçları	111
Çizelge 4.13. AML ve ENA'nın tekrarlanabilirlik sonuçları	112
Çizelge 4.14. AML ve ENA için ara kesinlik sonuçları	112
Çizelge 4.15. AML ve ENA çözeltilerinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları ...	113
Çizelge 4.16. pH 1,2 ortamında AML için doğruluk sonuçları	122
Çizelge 4.17. pH 1,2 ortamında ENA için doğruluk sonuçları.....	122
Çizelge 4.18. pH 4,5 ortamında AML için doğruluk sonuçları	122
Çizelge 4.19. pH 4,5 ortamında ENA için doğruluk sonuçları.....	122
Çizelge 4.20. pH 6,8 ortamında AML için doğruluk sonuçları	123
Çizelge 4.21. pH 6,8 ortamında ENA için doğruluk sonuçları.....	123

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.22. AML ve ENA için tekrarlanabilirlik sonuçları	123
Çizelge 4.23. AML ve ENA'nın ara kesinlik sonuçları (n=3)	125
Çizelge 4.24. AML ve ENA çözeltilerinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları ...	126
Çizelge 4.25. Referans tabletlerde yapılan kalite denetimleri	127
Çizelge 4.26. Deneme formülasyonda yapılan kontroller	128
Çizelge 4.27. PBD ile elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar	130
Çizelge 4.28. BBD ile elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar	140
Çizelge 4.29. Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y ₁₀) cevabı için oluşan kuadratik modelin ANOVA sonuçları	141
Çizelge 4.30. Dağılma cevabı için (Y ₁₁) oluşan kuadratik modelin ANOVA sonuçları	145
Çizelge 4.31. DOE sonucu optimum yanıtları sağlayan tasarım sahası	148
Çizelge 4.32. Seçilen optimizasyon değerleri	148
Çizelge 4.33. Final formülasyon bileşenleri	150
Çizelge 4.34. Final formülasyonda yapılan kalite denetimleri	151
Çizelge 4.35. Final formülasyon için BBD tasarım sonucu Design Expert®11 yazılımıyla tahmin edilen değerler ile deneysel olarak bulunan değerlerin karşılaştırılması	154
Çizelge 4.36. Final formülasyonda yapılan safsızlık tayini sonuçları	156

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Ishikawa diyagramı taslağı	6
Şekil 2.2. Amlodipinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.3. Enalaprilin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 3.1. CQA'leri etkileyebilecek etmenlerin yer aldığı Ishikawa diyagramı.....	42
Şekil 4.1. Amlodipin besilatın partikül büyüklüğü ve dağılımı	55
Şekil 4.2. Enalapril maleatın partikül büyüklüğü ve dağılımı.....	56
Şekil 4.3. Amlodipin besilata ait DSC termogramı.....	58
Şekil 4.4. Enalapril maleata ait DSC termogramı	58
Şekil 4.5. Amlodipin besilat ve enalapril maleatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları.....	59
Şekil 4.6. Amlodipin besilata ait TGA/DTA termogramı.....	60
Şekil 4.7. Enalapril maleata ait TGA/DTA termogramı	61
Şekil 4.8. Saf amlodipin (A), saf enalapril (E) ve bu iki maddenin karışımının (A+E) metanol:kloroform (1:1) çözücü sistemindeki çözeltilerinin ITK kromatogramı	62
Şekil 4.9. Amlodipin (a), enalapril (b) ve amlodipin-enalapril karışımının (c) FTIR spektrumu	64
Şekil 4.10. Amlodipin besilat ve mannitolün ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları.....	66
Şekil 4.11. Enalapril maleat ve mannitolün ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları.....	67
Şekil 4.12. Amlodipin besilat ve mikrokristal selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	68
Şekil 4.13. Enalapril maleat ve mikrokristal selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	68
Şekil 4.14. Amlodipin besilat ve mısır nişastasının ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları.....	69
Şekil 4.15. Enalapril maleat ve mısır nişastasının ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları.....	69

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. Amlodipin besilat ve prejelatinize nişastanın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	70
Şekil 4.17. Enalapril maleat ve prejelatinize nişastanın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	70
Şekil 4.18. Amlodipin besilat ve krospovidonun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	71
Şekil 4.19. Enalapril maleat ve krospovidonun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	72
Şekil 4.20. Amlodipin besilat ve kroscarmeloz sodyumun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	73
Şekil 4.21. Enalapril maleat ve kroscarmeloz sodyum ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	73
Şekil 4.22. Amlodipin besilat ve magnezyum stearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	74
Şekil 4.23. Enalapril maleat ve magnezyum stearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	75
Şekil 4.24. Amlodipin besilat ve gliseril distearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	76
Şekil 4.25. Enalapril maleat ve gliseril distearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	76
Şekil 4.26. Amlodipin besilat ve sodyum stearil fumaratın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	77
Şekil 4.27. Enalapril maleat ve sodyum stearil fumaratın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	78
Şekil 4.28. Amlodipin besilat ve hidroksipropil selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	79
Şekil 4.29. Enalapril maleat ve hidroksipropil selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	79
Şekil 4.30. Amlodipin besilat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	80
Şekil 4.31. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları	81

Şekil	Sayfa
Şekil 4.32. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen TGA termogramları.....	82
Şekil 4.33. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 ve 1:3 karışım halinde elde edilen DTA termogramları.....	83
Şekil 4.34. Amlodipin - mannitol karışımının FTIR spektrumu.....	87
Şekil 4.35. a) Amlodipin - krospovidon karışımının FTIR spektrumu b) krospovidonun saf haldeki spektrumu	87
Şekil 4.36. Amlodipin – sodyum bikarbonat karışımının FTIR spektrumu	88
Şekil 4.37. Amlodipin – mikrokristal selüloz karışımının FTIR spektrumu	88
Şekil 4.38. Amlodipin – nişasta karışımının FTIR spektrumu.....	89
Şekil 4.39. Amlodipin – hidroksipropil selüloz karışımının FTIR spektrumu	89
Şekil 4.40. Amlodipin – gliseril distearat karışımının FTIR spektrumu.....	90
Şekil 4.41. a) Amlodipin – magnezyum stearat karışımının FTIR spektrumu b) Magnezyum stearatın saf haldeki spektrumu.....	90
Şekil 4.42. Amlodipin – kroskarmeloze sodyum karışımının FTIR spektrumu	91
Şekil 4.43. Amlodipin – sodyum stearil fumarat karışımının FTIR spektrumu	91
Şekil 4.44. Amlodipin – prejelatinize nişasta karışımının FTIR spektrumu	92
Şekil 4.45. Enalapril – mannitol karışımının FTIR spektrumu	95
Şekil 4.46. Enalapril – krospovidon karışımının FTIR spektrumu	95
Şekil 4.47. Enalapril – sodyum bikarbonat karışımının FTIR spektrumu	96
Şekil 4.48. Enalapril – mikrokristal selüloz karışımının FTIR spektrumu	96
Şekil 4.49. Enalapril – nişasta karışımının FTIR spektrumu	97
Şekil 4.50. Enalapril – hidroksipropil selüloz karışımının FTIR spektrumu.....	97
Şekil 4.51. Enalapril – gliseril distearat karışımının FTIR spektrumu	98
Şekil 4.52. Enalapril – magnezyum stearat karışımının FTIR spektrumu.....	98
Şekil 4.53. Enalapril – kroskarmeloze sodyum karışımının FTIR spektrumu	99
Şekil 4.54. Enalapril – sodyum stearil fumarat karışımının FTIR spektrumu.....	99

Şekil	Sayfa
Şekil 4.55. Enalapril – prejelatinize nişasta karışımının FTIR spektrumu	100
Şekil 4.56. Amlodipin besilatın kalibrasyon doğrusu ve denklemi	100
Şekil 4.57. Enalapril maleatın kalibrasyon doğrusu ve denklemi	101
Şekil 4.58 Geliştirilen yöntemde gözlenen enalapril ve amlodipin pikleri.....	101
Şekil 4.59. Amlodipin konsantrasyonu üzerine faktörlerin etkisi.....	104
Şekil 4.60. Enalapril konsantrasyonu üzerine faktörlerin etkisi.....	106
Şekil.4.61. Amlodipinin kalibrasyon doğrusu ve denklemi	108
Şekil.4.62. Enalapril maleatın kalibrasyon doğrusu ve denklemi	108
Şekil 4.63. Optimize edilen yöntemde gözlenen enalapril ve amlodipin pikleri.....	109
Şekil 4.64. pH 1,2 enjeksiyonu ile elde edilen kör kromatogram	109
Şekil 4.65. Metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	110
Şekil 4.66. Distile su (pH 2,95) enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	110
Şekil 4.67 Amlodipinin pH 1,2'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	113
Şekil 4.68 Enalapril maleatın pH 1,2'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	114
Şekil 4.69. Amlodipinin pH 4,5'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	114
Şekil 4.70. Enalapril maleatın pH 4,5'teki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	115
Şekil 4.71. Amlodipinin pH 6,8'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	115
Şekil 4.72. Enalapril maleatın pH 6,8'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	116
Şekil 4.73. pH 1,2'de enalapril ve amlodipin pikleri.....	116
Şekil 4.74. pH 4,5'te enalapril ve amlodipin pikleri.....	117
Şekil 4.75. pH 6,8'de enalapril ve amlodipin pikleri.....	117
Şekil 4.76. pH 1,2 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	118
Şekil 4.77. pH 4,5 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	118
Şekil 4.78. pH 6,8 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	118
Şekil 4.79. pH 1,2 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	119

Şekil	Sayfa
Şekil 4.80. pH 4,5 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	119
Şekil 4.81. pH 6,8 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	120
Şekil 4.82. pH 1,2 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 2,95 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	120
Şekil 4.83. pH 4,5 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 3,0 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	121
Şekil 4.84. pH 6,8 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 3,0 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	121
Şekil 4.85. Amlodipin besilat miktarı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	131
Şekil 4.86. Enalapril maleat miktarı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	131
Şekil 4.87. Amlodipinin pH 1,2 (a, b); pH 4,5 (c, d) ve pH 6,8 (e, f) ortamlarında çözünmesine ilişkin yarı-logaritmik ve pareto grafikleri	133
Şekil 4.88. Enalaprilin pH 1.2 (a, b); pH 4.5 (c, d) ve pH 6.8 (e, f) ortamlarında çözünmesine ilişkin yarı-logaritmik ve pareto grafikleri	134
Şekil 4.89. Amlodipin besilat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	135
Şekil 4.90. Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	135
Şekil 4.91. Friabilite için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	136
Şekil 4.92. Dağılıma için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri	136
Şekil 4.93. PBD tasarımıda optimizasyon için seçilen faktörler ve cevaplar üzerine etkileri	138
Şekil 4.94. Enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı cevabı için BBD ile elde edilen tek faktör grafikleri	142
Şekil 4.95. BBD’de enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için kontur grafikleri	143
Şekil 4.96. BBD’de enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yüzey yanıt grafikleri	144
Şekil 4.97. Dağılıma cevabı için BBD ile elde edilen tek faktör grafikleri	146
Şekil 4.99. Dağılıma cevabı için BBD ile elde edilen yüzey yanıt grafikleri	147

Şekil	Sayfa
Şekil 4.100. Geliştirilen SDK tabletler için tasarım alanı	149
Şekil 4.101. Final ürünlerdeki (SDK) amlodipin ile referansın (Norvasc® 5 mg) a) pH 1,2, b) pH 4,5 ve c) pH 6,8'deki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri.....	152
Şekil 4.102. Final ürünlerdeki (SDK) enalapril ile referansın (Enapril® 5 mg) a) pH 1,2, b) pH 4,5 ve c) pH 6,8'deki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri	153
Şekil 4.103. Enalaprilat çözeltisi kromatogramı.....	154
Şekil 4.104. Enalapril diketopiperazin çözeltisi kromatogramı	155
Şekil 4.105. Amlodipin impürite D çözeltisi kromatogramı.....	155

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
L	Litre
log P	Partisyon katsayısı
pKa	İyonizasyon sabiti

Kısaltmalar

Açıklamalar

ADEİ	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü
AML	Amlodipin
ARB	Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans Analizi)
BBD	Box-Behnken Design (Box-Behnken Tasarımı)
BCS	Biopharmaceutics Classification System (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi)
CCD	Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım)
cGMP	Current Good Manufacturing Practices (Güncel İyi İmalat Uygulamaları)
CMA	Critical Material Attributes (Kritik Materyal Özellikleri)
CPP	Critical Process Parameters (Kritik Proses Parametreleri)
CQA	Critical Quality Attributes (Kritik Kalite Özellikleri)

Kısaltmalar	Açıklamalar
DOE	Design of Experiments (Deney Tasarımı)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
EMA	European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
ENA	Enalapril Maleat
FDA	(Food and Drug Administration) Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
ICH	International Conference on Harmonization (Uluslararası Uyum Konferansı)
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
KKB	Kalsiyum Kanal Blokeri
PAT	Proses Analitik Teknolojisi
PBD	Plackett-Burman Design (Plackett-Burman Tasarımı)
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt Yüzey Metodolojisi)
QbD	Quality by Design (Kalite Tasarımı)
QTPP	Quality Target Product Profile (Hedef Ürün Kalite Profili)
R²	Determinasyon Katsayısı
rpm	Rotations Per Minute (Dakikadaki dönüş sayısı)
SS	Standart Sapma
SDK	Sabit Dozlu Kombinasyon
TGA	Termogravimetrik Analiz
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi)
USP	United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)

Kısaltmalar**Açıklamalar****VK**

Varyasyon Katsayısı

WHO

World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

İlaçta kalite tasarımı, (Quality by Design, QbD) farmasötik gelişim sürecinde ürün kalitesi ve performansının inşasını ve sürekliliğini hedefleyen, risk yönetimi temeline dayanan, bilimsel ve sistematik bir yaklaşımdır (cGMP; ICH Q8). QbD kavramının Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) kılavuzlarında yer almasını takiben bu yaklaşım ilaç ve proses geliştirmenin ve ruhsatlandırmanın kilit bir parçası haline almıştır (ICH Q8; ICH Q9; ICH Q10). Kalite tasarımı ile ürün geliştirme aşamasında hedeflenen kalite profiline göre kritik parametreler belirlenerek bu parametrelerin kalite üzerindeki potansiyel riskleri tanımlanır ve bu riskleri en aza indirmek için istatistiksel deney tasarımlarından (Design of Experiments, DOE) yararlanır (Aksu ve Mesut, 2015). DOE, risk analizi sonucu seçilen bağımsız değişkenlerin (faktörlerin) belirlenen düzeylerde, yanıtlar üzerindeki etkisinin bir seri deney ile planlanması sürecidir. DOE farmasötik alanda en çok ilaç analiz yöntemi ve formülasyon/üretim yöntemi geliştirilirken kullanılır (Dejaegher ve VanderHeyden, 2011). DOE ile eleme (screening) tasarımları yapılarak çok sayıdaki faktör arasından en etkili olanlar seçilebilir ve optimizasyon tasarımları yapılarak etkili faktörler içinden en uygun kombinasyonlar elde edilebilir (Chudiwal ve diğerleri, 2017).

Bu tez çalışmasının amacı, QbD bileşenleri kullanılarak hipertansiyon tedavisinde etkili bir Sabit Dozlu Kombinasyon (SDK) tableti tasarlamaktır. SDK'lar birden fazla etkin maddeyi tek dozaj şeklinde bir arada içeren ilaç şekilleridir. Ancak her ilacın SDK şeklinde hazırlanması uygun değildir. İlaçların SDK olarak geliştirilmesi için; bileşenlerin mevcut terapötik etkiyi artırması veya maddelerden birinden kaynaklı bir advers etkinin, diğer bir maddeyle ortadan kaldırılması veya tedaviye uyumun artması beklenmektedir (EMA, 2017).

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde SDK'lar sıklıkla tercih edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ruhsatlandırılan SDK'ların %80'ini antihipertansif ajanlar oluşturmaktadır (Desai ve diğerleri, 2012). Bu tez çalışmasında da bir antihipertansif SDK geliştirilmesi amaçlanarak, etkin madde olarak bir kalsiyum kanal blokeri (KKB) olan amlodipin ile bir anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ADEİ) olan enalapril model madde olarak seçilmiştir. KKB ve ADEİ'ler sinerjik etkileri nedeniyle birlikte kullanımı tavsiye edilen iki antihipertansif ilaç grubudur (Locatelli ve diğerleri, 2002). Bunun

yanında, ADEİ'ler, KKB ile gözlenen önemli bir yan etki olan periferik ödemi de önlemektedir (Sica, 2003).

Bir SDK ürünü geliştirilirken diğer bir önemli nokta da etkin maddelerin birbirleri ile ve formülasyondaki diğer yardımcı maddeler ile geçimli olmasıdır (Salandova ve diğerleri, 2018). Bu nedenle formülasyonda yer alacak yardımcı maddelerin titizlikle seçilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda, seçilen yardımcı maddelerin ayrıntılı geçimlilik çalışmaları yapılmalı ve seçilen yardımcı maddelerin tipi ve oranının optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada etkin madde miktar tayini analiz yöntemi, formülasyon bileşenleri ve üretim proseslerinin geliştirilme aşamasında DOE prensipleri kullanılmıştır. Formülasyon ve üretim aşamalarında öncelikle eleme tasarımlarından olan PBD uygulanarak çok sayıdaki faktör içinden en etkili 3 faktör seçilmiş ve daha sonra BBD kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen final SDK formülasyonu in vitro karakterizasyon çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, kalitenin ürüne QbD yardımıyla inşası sağlanarak başarılı bir formülasyon tasarımı gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalite Tasarımı

QbD kavramı ilk olarak 1991 yılında Joseph M. Juran tarafından ileri sürülmüştür. Juran QbD'yi kalitenin planlanması, denetlenmesi ve geliştirilmesi olmak üzere üç temel işlemle değerlendirmiştir (Yu ve diğerleri, 2014). Bu kavram, uzun yıllardan beri otomotiv, petrokimya, yarı iletken endüstrisinde ve çeşitli mühendislik alanlarında kullanılmaktadır (Aksu ve Mesut, 2015). İlaç endüstrisinde kullanımının ilk adımları ise 2002'de güncel İyi İmalat Uygulamaları (cGMP) kılavuzunda vurgulanan risk temelli yaklaşım ve Amerika Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nin 2004'te yayınlanan Proses Analitik Teknolojisi Kılavuzu (PAT) ile atılmıştır (FDA, 2004). Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından yayınlanan Farmasötik Gelişim (ICH Q8), Kalite Risk Yönetimi (ICH Q9) ve Farmasötik Kalite Sistemi (ICH Q10) kılavuzlarının yayınlanması ile de QbD, ilaç geliştirme ve ruhsatlandırmanın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir (ICH Q8; ICH Q9; ICH Q10). ICH Q8(R2)'e göre QbD “Önceden tanımlanmış hedefler ile başlayan; ürün ve proses anlayışının ve kontrolünün sağlam bilim ve kalite risk yöntemi temelinde vurgulandığı sistematik bir yaklaşım” olarak tanımlanmaktadır.

Farmasötik alanda QbD, ilacın klinik performansını etkileyebilecek kalite spesifikasyonlarını tanımlamak; ürün hatalarını ve varyasyonları en aza indirmek; ürün geliştirme verimini artırmak ve ruhsat başvurusu sonrası kullanılabilir fonksiyonel bir tasarım sahası oluşturmak ve uzun vadede ürün maliyetini düşürmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Yu ve diğerleri, 2014).

QbD ile bir ürün geliştirmek için aşağıdaki aşamalar izlenebilir (ICH Q8):

- Hedef ürün kalite profilinin (Quality Target Product Profile, QTPP) belirlenmesi
- Kritik kalite özelliklerinin (Critical Quality Attributes, CQA) belirlenmesi
- Kritik materyal özelliklerinin (Critical Material Attributes, CMA) ve kritik proses parametrelerinin (Critical Process Parameters, CPP) belirlenmesi
- Risk analizi
- Deney tasarımı (Design of Experiments, DOE) yapılması ve tasarım sahasının oluşturulması

- Kontrol stratejisinin geliştirilmesi

Hedef ürün kalite profili (Quality Target Product Profile, QTPP)

ICH Q8’de QTPP “bir ilacın etkinlik ve güvenliği dikkate alınarak belirlenen hedef kalite özelliğini en iyi şekilde sağlayabilmesi için taşıması gereken kalite özelliklerinin bir özeti” şeklinde tanımlanmaktadır. QTPP, geliştirilecek ürünün kullanım amacı, salım özellikleri, dozaj formu, sterilitesi, saflığı, nem içeriği gibi çeşitli özellikleri kapsayabilir. Bu özellikler ürünün dozaj formuna ve içerdiği maddelerin spesifik özelliklerine ve ruhsat başvuru durumuna göre değişebilir (Lionberger ve diğerleri, 2008). QTPP, QbD’nin çekirdeğini oluşturur ve ürünün etkinliği ve güvenliğini sağlamasını amaçlar.

Kritik kalite özellikleri (Critical Quality Attributes, CQA)

QbD ile ilaç geliştirmenin ikinci basamağı CQA’lerin belirlenmesidir. CQA, ICH Q8’de “hedeflenen ürün kalitesinin sağlanması için uygun sınır, aralık veya dağılımda bulunması gereken fiziksel, kimyasal, biyolojik veya mikrobiyolojik özelliktir” şeklinde tanımlanmıştır.

Bir ürünün miktar tayini, içerik tekdüzeliği, salım özellikleri, nem içeriği, mikrobiyolojik özellikleri, görünüşü, sertliği gibi çok sayıda kalite özelliği olabilir. Ancak bu özelliklerin kritik olma durumunu belirleyen hastaya verebileceği potansiyel zarardır. Dolayısıyla eğer bir parametre QTPP’yi etkiliyorsa kritik, etkilemiyorsa kritik değildir (Aksu, 2015).

Kritik materyal özellikleri (Critical Material Attributes, CMA) ve Kritik proses parametreleri (Critical Process Parameters, CPP)

CMA’ler hammaddelere ait CQA’yi etkileyebilen fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik özelliklerdir. CMA, ICH Q8’de tanımlanmayan bir terim olduğundan bazen CQA ile karıştırılabilmektedir. Ancak CMA, etkin madde, yardımcı maddeler gibi girdi parametre özelliklerini içerirken, CQA bitmiş ürüne ait kalite özelliklerini kapsar (Lionberger ve diğerleri, 2008; Yu ve diğerleri, 2014). Örneğin, çözünme hızının CQA olarak kabul edildiği bir tasarımda, formülasyondaki dağıtıcı miktarı CMA olarak kabul edilebilir.

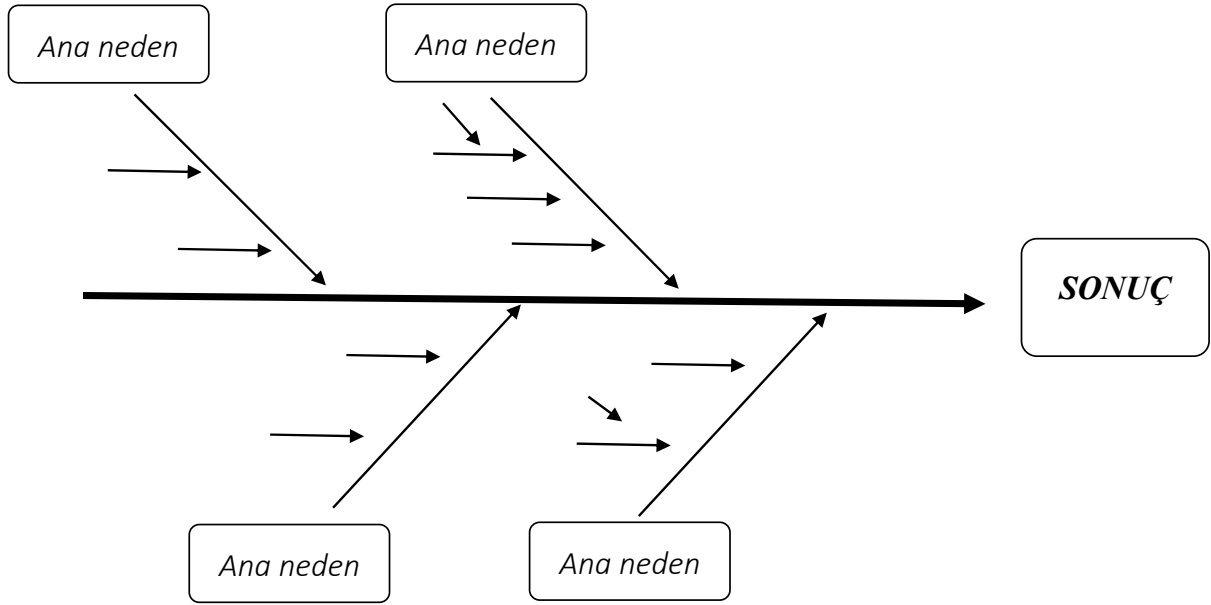
CPP ise, ICH Q8’de “CQA üzerine etkisi olan ve bu nedenle istenen kaliteyi temin edebilmek için izlenmesi veya kontrol altında tutulması gereken proses parametreleri” olarak tanımlanır. Örneğin, içerik tekdüzeliğinin CQA olarak belirlendiği bir proseste karıştırma süresi CPP olabilir. CMA ham maddelere, CPP ise prosese ait girdi parametreleri olup kontrol altında tutulması ürünün kalitesini garantilemektedir.

Risk analizi

QbD risk-temelli bir yaklaşım olduğundan risk analizi QbD’nin en önemli aşamalarındandır. Risk analizinde ICH Q9 Kalite Risk Yönetimi kılavuzundan yararlanılır. Risk değerlendirilmesi yapılırken öncelikle risk tanımlanır, daha sonra uygun risk değerlendirme araçları kullanılarak parametrelerin kritik olup olmadığı saptanır ve kritik olan faktörlerin düzeyleri belirlenir (Zalai, ve diğerleri, 2015). Değişkenlerin kritik olup olmadığının belirlenmesi, derecelendirilmesi, risk olasılığının düşürülmesi veya olduğu gibi kabul edilmesi gibi kararlar çeşitli risk analiz araçları ile belirlenir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan risk araçları akış diyagramları, kontrol listeleri, risk haritaları, Ishikawa (balık kılıcı) diyagramı, neden-sonuç diyagramı gibi basit araçlar ile Hata Türü ve Etki Analizi (Failure Modes and Effect Analysis, FMEA), Hata Ağacı Analizi (Fault Tree Analysis, FTA), Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Points) gibi gelişmiş araçlar kullanılır. Literatürde bu yöntemlerden en çok Ishikawa diyagramı kullanılmıştır (Chudiwal ve diğerleri, 2017; Mishra ve Rohera, 2017; Yerlikaya ve diğerleri, 2013).

Ishikawa diyagramı

Basit risk değerlendirme araçlarından olan Ishikawa diyagramı nitel bir analiz yöntemidir. Balık kılıcı diyagramı olarak da adlandırılır. Bir etkiye ve yanıtı giden ana etkenler ve bu etkenlere sebep olan çeşitli küçük etkenlerden oluşur. Şekil 1’de örnek bir Ishikawa diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.1. Ishikawa diyagramı taslağı

Formülasyon çalışmalarına geçmeden önce, başlangıçta yapılan bir risk analizi ile çeşitli faktörlerin kritikliği derecelendirilir ve önem sırasına göre seçilen faktörler ile deney tasarımı yapılması önerilir (Fahmy ve diğerleri, 2012).

Deney Tasarımı (Design of Experiments, DOE)

DOE, az sayıda deneyle en fazla bilgiyi elde edebilmek için yapılması gereken deneylerin planlanma stratejisidir. Bu yöntem çok sayıda değişkenin (faktör) bir veya daha fazla yanıt üzerine etkisinin aynı anda incelenebilmesine olanak sağlar. Bunun yanında bu değişkenlerin birbirleriyle olan muhtemel etkileşimleri de gözlenebilmektedir (Torbeck ve Branning, 2007: 98). DOE’de ürün kalitesi üzerinde kritik etkisi olduğu düşünülen faktörler deney planına sistematik bir şekilde dahil edilerek sonuçlar matematiksel ve istatistiksel olarak yorumlanır.

DOE basamakları aşağıda verilmiştir (Montgomery, 2013: 15; Politis ve diğerleri, 2017)

- Faktörlerin ve düzeylerin seçilmesi: Bu değerler literatüre veya ön çalışma sonuçlarına göre belirlenir.

- Uygun DOE yönteminin seçilmesi: Eğer en etkili faktörler seçilecekse PBD gibi bir eleme tasarımı kullanılabilir. Eğer faktörlerin birbirleri ile etkileşimi değerlendirilecekse ve zaman sıkıntısı yoksa tam faktöriyel tasarımlar tercih edilebilir.
- Deneylerin gerçekleştirilmesi: Uygun yöntemle göre matris oluşturulup deney planında verilen sıra ile deneyler gerçekleştirilir ve sonuçlar kaydedilir.
- Yanıtların istatistiksel ve grafiksel değerlendirilmesi ve yorumlanması: t-testleri, korelasyon katsayıları, ANOVA sonuçları ve spesifik grafikler incelenerek yorumlanır.
- Optimizasyon (gerekirse): Şayet bir eleme tasarımı kullanılarak en etkili faktörler belirlendiyse Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) veya BBD gibi bir yanıt yüzey metodolojisi (Response Surface Metodology RSM) kullanılarak yeni bir tasarım sonucu optimize koşullar saptanabilir.

DOE planlanırken istenen yanıt üzerinde etkili olduğu düşünülen çok sayıda faktörün içinden anlamlı olanların belirlenmesi amaçlanıyorsa bir eleme tasarımı kullanılması uygun olur. Ancak eğer amaç faktörler arası etkileşimi görmek veya optimizasyon yapmak ise RSM tasarımları tercih edilmelidir. Bazen de ilk önce PBD gibi bir eleme tasarımı yapılarak faktör sayısı düşürülür ve daha sonra en etkili bulunan faktörler ile optimizasyon tasarımı yapılır (Plackett ve Burman, 1946). Optimizasyon için RSM tasarımları kullanılmaktadır. Bu amaçla en sık CCD ve BBD kullanılmaktadır (Box ve Behnken, 1960; Dejaegher ve Heyden, 2011; Ferreira ve diğerleri, 2007). Bunların dışında tam ve kısmi faktöriyel tasarımlar, D-optimal tasarımlar ve karışık tasarımlar da kullanılan diğer tasarımlardır.

Plackett-Burman Tasarımı (PBD)

Çok sayıda faktörün bir veya daha fazla yanıt üzerindeki etkisi araştırılacaksa ve özellikle sınırlı zaman veya kısıtlı hammadde varsa PBD uygun bir DOE seçimi olarak düşünülmektedir (Yerlikaya ve diğerleri, 2013). Bu tasarımda dördün katı olan ancak ikinin kuvveti olmayan sayıda deney yapılır. Faktör düzeyi ikidir (Plackett ve Burman, 1946). Çok kısıtlı zamanda çok sayıda faktörün etkisinin incelenmesi ve etkili olmayan faktörlerin hızlıca elenebilmesi PBD'nin avantajıdır. Bu faktörlerin birbirleri ile etkileşiminin kolayca görülememesi ise bu tasarımın dezavantajıdır (BeresandHawkins, 2001; Vanaja ve Rani, 2007).

PBD’de incelenecek faktör sayısından bir fazla sayıda deney yapılmaktadır. Örneğin 11 faktör incelenecekse 12 deney gerçekleştirilebilir veya 99 faktör ile 100 deney gerçekleştirilebilir (Fahmy ve diğerleri, 2012). Ancak standart hatanın doğru olarak hesaplanması için faktör sayısının üçte biri kadar uydurma (dummy) faktör girilmesi önerilmektedir (Dejaegher ve Vander Heyden, 2011). Bu faktörler -1 veya +1 şeklinde kodlar ile belirtilir ve uydurma faktörlerin modelleme üzerinde standart hatanın hesaplanması dışında bir etkisi yoktur (Dejaegher ve Vander Heyden, 2011; Vander Heyden ve diğerleri, 1995). 11 faktör ve 12 deney için örnek Plackett-Burman deney matrisi Çizelge 2.1’de görülmektedir.

Çizelge 2.1. 11 faktörlü bir tasarım için Plackett-Burman deney matrisi

Deney No.	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4	Faktör 5	Faktör 6	Faktör 7	Faktör 8	Faktör 9	Faktör 10	Faktör 11
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PBD tasarım sonrası faktörlerin anlamlılık değerlendirmeleri grafiksel veya istatistiksel olabilir. Değerlendirmelerde yarı-normal olasılık eğrilerinden ve Pareto grafiklerinden yararlanılır (Fahmy ve diğerleri, 2012).

Box-Behnken Tasarımı (BBD)

BBD, üç seviyeli ve çok faktörlü bir RSM tasarımıdır. Birinci ve ikinci derece kinetik katsayılarının hesaplanmasında etkilidir. CCD’ye göre daha az sayıda deney ile optimizasyon yapılmasını sağlar, çünkü CCD’de faktörlerin kombinasyonunda tüm noktalar hesaba katılırken, BBD’de tüm faktörlerin aynı anda uç noktalarının kombinasyonu tasarıma dahil edilmez. Örneğin 4 faktörlü bir BBD tasarımı deney

planında bu 4 faktörün aynı anda en düşük (veya en yüksek) düzeylerinin kombinasyonu yer almaz. Bu durum hem deney sayısını ve maliyeti düşürür, hem de ihtiyaç duyulmadığında ekstrem (uç) senaryolar ile vakit kaybının önüne geçer (Myers ve diğerleri, 2009). Ancak bu tasarımın kullanılabilmesi için en az üç sayısal faktör gereklidir. Orta noktaları olmayan nitel tasarımlar için BBD uygun değildir. (Demir ve diğerleri, 2017). 3 faktörlü ve 3 merkez noktalı bir tasarım için örnek Box-Behnken deney matrisi Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. 3 faktörlü bir tasarım için örnek Box-Behnken deney matrisi örneği

Deney No.	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3
1	-1	0	1
2	0	-1	1
3	0	1	1
4	-1	1	0
5	1	0	1
6	0	-1	-1
7	0	0	0
8	1	1	0
9	0	0	0
10	-1	-1	0
11	1	0	-1
12	-1	0	-1
13	1	-1	0
14	0	0	0
15	0	1	-1

Özetlemek gerekirse, DOE farmasötik alanda analiz yöntemlerinin optimizasyonunda (Sahu ve diğerleri, 2018) ve ilaç formülasyonlarının veya üretim proseslerinin incelenmesi ve optimizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Dejaegher ve Heyden, 2011). Literatürde farmasötik alanda DOE’nin kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Vander Heyden ve diğerleri (1995) HPLC kullanarak geliştirdikleri analiz yönteminin sağlamlığını mobil faz pH’sı, trietilamin hacmi, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve kolon gibi değişkenler ile yapılan PBD ile değerlendirmiştir.

Kashid, Ghorpade, Toranmal ve Dhawale (2015) vildagliptinin analizi için HPLC yönteminde sağlamlık ve kesinlik parametrelerinde CCD kullanmış ve tampon pH'sı, akış hızı, mobil fazdaki asetonitril yüzdesi faktörlerinden sadece akış hızının konsantrasyon üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Li, Rekhi, Augsburger ve Shangraw (1996) ilaç tipi (metoprolol veya hidroklorotiyazid), intra ve ekstragranüler mikrokristal selüloz oranı, seyreltici tipi, dağıtıcı tipi ve düzeyi, magnezyum stearat yüzdesi ve rotor dönüş hızının çözünme, dağılma sertlik gibi tablet kalitesi üzerine etkilerini PBD ile değerlendirmiştir. PBD sonrasında seçilen en anlamlı üç faktörün ise (ilaç tipi, mikrokristal yüzdesi ve seyreltici tipi) birbirleri ile olan etkileşimlerini değerlendirmek için faktöriyel tasarımdan yararlanmıştır.

El Say, Refaey, Samy ve Badawi (2011) bezafibratin basılabilirliği ve akış özelliklerini iyileştirmek için hidroksipropil selüloz, aerosil ve magnezyum stearat miktarının tozun akış özelliği ve tabletlerin dağılma ve çözünme özellikleri üzerindeki etkilerini optimize ederken BBD'den yararlanmıştır.

Charoo, Shamsheer, Zidan ve Rahman (2012) tarafından yapılan çalışmada düşük çözünürlük gösteren diklofenak etkin maddesini içeren bir ağızda dağılan tablet formülasyonunu QbD ile geliştirilmiştir. Faktöriyel deney tasarımları kullanarak etkin maddenin partikül büyüklüğü, dağıtıcı, seyreltici ve kaydırıcı gibi CMA'lerin ve karıştırma, lubrikasyon süresi ve baskı kuvveti gibi CPP'lerin cevaplar üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Fahmy ve diğerleri (2012) tarafından yapılan bir çalışmada silindirler arası sıkıştırma tekniğiyle hazırladıkları siprofloksasin konvansiyonel tabletlerinin formülasyon ve proses parametrelerindeki ana etkileri belirlemek amacıyla PBD kullanılmıştır. 11 faktör ile (etkin madde partikül büyüklüğü, magnezyum stearat kaynağı, dağıtıcı:bağlayıcı oranı ve çeşitli kuru granülasyon parametreleri) toplam 12 deney yapılarak tasarım aralığı belirlenmiştir.

Monajjemzadeh ve diğerleri (2012), divalproeks sodyumun uzatılmış salımlı tabletlerinin RSM, karışık tasarım ile tasarımını ve optimizasyonunu gerçekleştirmiştir. Tasarım 4 faktörün (hidroksipropil metil selüloz, laktoz, mikrokristal selüloz ve silikon dioksit

yüzdeleri) incelendiği 21 deney ile gerçekleştirilmiştir. Tasarımda yanıt olarak kalınlık, friabilite, kırılma kuvveti, sertlik ve Carr indeksi gibi fiziksel özellikler dikkate alınmıştır.

Kushner ve diğerleri (2014), faktöriyel tasarım kullanarak geliştirdikleri tabletlerde üretim yöntemi (doğrudan basım veya kuru granülasyon), etkin madde tipi (ibuprofen veya teofilin), etkin madde partikül büyüklüğü, etkin madde yükleme yüzdesi, dağıtıcı:lubrikan partikül büyüklüğü oranı değişkenlerini tablet kalite testleri ile değerlendirmiştir.

Maltais, Vargas ve DiPaolo (2015) *Cassia acutifolia* bitkisinden elde edilen ve akış problemi gösteren doğal bir madde olan senna maddesini doğrudan basım ile tablet haline getirmek için PBD ile 11 faktörün etkisini değerlendirmiş ve daha sonra en etkili faktörleri (laktoz, sorbitol, hidroksipropil selüloz, hidroksietil selüloz, metil selüloz) seçerek faktöriyel tasarım ile final formülasyon bileşenlerine karar vermişlerdir. Tasarımda bağımlı değişkenler (yanıt) olarak miktar tayini, sertlik, friabilite, dağılma, görünüş ve ağırlık sapması dikkate alınmıştır.

Badawy ve diğerleri (2016), QbD yaklaşımıyla hazırlanan brivanib alaninat film kaplı tablet formülasyonundaki bağlayıcı, dağıtıcı ve kaydırıcı miktarını ve yaş granülasyon parametrelerini optimize etmek amacıyla faktöriyel tasarımdan faydalanmıştır.

Claycamp, Kona, Fahmy ve Hoag (2016), kuru granülasyon ile hazırlanan siprofloksasin tabletlerinin formülasyon ve proses parametrelerinin geliştirilmesi için fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanmıştır. Bu amaçla magnezyum stearatın, hidroksipropil selüloz kaynağının, nişasta miktarının, silindir baskısı ve hızı gibi kuru granülasyon parametrelerinin toz özellikleri üzerine etkileri incelenerek tasarım sahası belirlenmiştir.

Chudiwal, Shahi ve Shudiwal (2017) QbD elementlerinden faydalanarak nikardipinin uzatılmış salımlı midede tutulan tablet formülasyonunu geliştirirken PBD'yi takiben BBD tasarımı kullanmıştır. PBD'de gliseril behenat, hidroksipropil metil selüloz, sodyum bikarbonat, mikrokristal selüloz ve sertliğin ilacın çözünmesi ve yüzme zamanı üzerindeki etkileri incelenmiş ve en etkili üç faktör (gliseril behenat, hidroksipropil metil selüloz ve sodyum bikarbonat) tespit edilerek BBD ile optimizasyon yapılmıştır.

Mishra ve Rovera (2016) QbD prensibiyle geliştirdikleri karbamazepin ağızda dağılan tabletlerini BBD ile değerlendirmişlerdir. Bağımsız değişkenler olarak baskı kuvveti, sublimasyon ajanının miktarı ve dağıtıcı konsantrasyonunu almış ve bu faktörlerin sertlik, tablet porozitesi, dağılma süresi, su emilim zamanı, friabilite ve çözünme açısından değerlendirmiştir.

Eşim ve diğerleri (2018) 3^2 faktöriyel tasarım kullanarak kullanılan polimer tipinin bukkal tablet karakterizasyonuna etkisini incelemiştir. Faktör olarak karbopol veya kitosan polimerleri ele alınarak dağılma, yutma, çözünme, pik ayırma kuvveti ve in vitro permeasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

2.2. Sabit Dozlu Kombinasyonlar (SDK)

SDK'lar iki veya daha fazla etkin maddeyi tek dozaj formunda içeren ve bazı hastalıkların tedavisinde önemli rol oynayan oral dozaj formlarıdır (Desai ve diğerleri, 2012).

SDK'ların ilaçların ayrı ayrı kullanıldığı kombine tedaviye göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar aşağıda verilmiştir:

- Monoterapide yetersiz tedavi yanıtı alınması durumunda kombine tedavi ile elde edilen yanıtta artış gözlenebilir (EMA, 2017).
- Kombine tedavi ile bir ilacın advers etkisi ikinci bir ilaç ile azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Bu da ilacın güvenliğini artırmaktadır (EMA, 2017).
- Hastanın farklı ilaçları tek dozaj şeklinde alması ile tedaviye uyumunda ve tedavi etkinliğinde artış gözlenir (EMA, 2017). Özellikle bazı hastalıklarda tedavinin sağlanabilmesi için çok sayıda ilacın alınması adeta bir zorunluluktur. Örneğin kardiyovasküler hastalıklarda veya HIV/AIDS, sıtma, tüberküloz gibi bazı enfeksiyöz hastalıklarda tedavi birden fazla sayıda ilaçla gerçekleşir. Bu da hasta psikolojisi açısından negatif bir durumdur. Bu nedenle Avrupa Hipertansiyon Topluluğu ve Avrupa Kardiyoloji Topluluğu'nun Kılavuzlarında sabit dozlu kombinasyonların kullanımının iki ayrı tek dozluk ilacın kullanımına hasta uyumu açısından avantajlı bulunarak gerektiğinde 3. bir ilacın da eklenerek çoklu ilaç (polypill) geliştirilmesi teşvik edilmektedir (Mancia ve diğerleri, 2007).

- SDK'ların maliyetleri çoğu durumda ayrı ayrı ilaçlara göre daha düşüktür. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) Sağlık Teknolojileri Değerlendirme Raporu III verilerine göre antihipertansif SDK'ların maliyetleri, SDK'yı oluşturan ilaçların tek tek maliyetleri toplamından düşük bulunmuştur (TİTCK, 2016).

Avrupa İlaç Ajansı (European Medical Agency, EMA, 2017)'na göre iki veya daha fazla ilacın SDK olarak başvuru onayı alabilmesi için farmakolojik ve medikal gerekçelendirme gerekmektedir. Birbirleriyle doğrudan ilişkili olmayan endikasyonlara sahip ilaçların SDK başvuruları açıkça reddedilmektedir (EMA, 2017). SDK, başvurusunda kabul edilebilir bir risk-yarar dengesi olduğunu gösteren kanıtlar sunulmalıdır. Ayrıca farmakokinetik açıdan SDK'yı oluşturan iki ilaç çok farklı olmamalıdır.

EMA, SDK başvurularının değerlendirilmesinde üç farklı senaryo tanımlamıştır (EMA, 2017).

1. Add-on tedavi senaryosu: Monoterapide yetersiz tedavi yanıtı alındığı durumlarda tedavi etkinliğinin artırılması için yapılan ilaç ekleme tedavisidir. Bu senaryo hasta uzun dönem tek ilaçla optimal dozda tedavi gördüğü ancak yeterli yanıt alamadığı durumlarda geçerlidir. Bu durumda ilaçlar arasında farmakokinetik etkileşimin olmadığına dair çalışmalar (in vitro datalar, mekanistik anlayış veya yayınlanmış klinik çalışmalar) ve etkin maddeler arasında etkileşim olmadığını gösteren geçimlilik çalışmaları ve sinerjik veya additif etkiler gibi farmakolojik ilişkilerin incelendiği farmakodinamik datalar sunulmalıdır. Bunun yanında klinik etkinlik/güvenlik çalışmaları da ruhsatlandırma dosyasında sunulmalıdır.
2. Sübstitüsyon senaryosu: Bu senaryoda hastalar halihazırda iki ürünü de optimal dozlarda ayrı ayrı kullanmaktadır. Etkin maddeler, doz aralıkları ve dozaj konusunda bir farklılık yoktur. Hasta o iki ilacı ayrı ayrı almayı bırakıp geliştirilen SDK'yı almaya (sübstitüsyon) başlayacaktır. Bu durumda yarar-risk dengesi pozitifdir. Bu durumda başvuru dosyasına piyasadaki tek ilaçlara karşı yapılmış biyoeşdeğerlik çalışması konulmalıdır. Klinik etkinlik ve güvenliğinin gösterilmesi için yayınlanmış literatürler sunulabilir. Sağlık otoriteleri SDK'lara endikasyona dayalı onay verebilir, piyasadaki tek ilaçların endikasyonlarından daha dar bir endikasyon sınırını kabul edebilir.

3. Kombinasyon ile tedaviye başlangıç senaryosu: Bu senaryo, hastanın tedaviye hızla kombine ilaç olarak başlayacağı durumları içerir. Farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan 1. senaryoyla aynı belgeler istenir. Detaylı klinik ve güvenlik çalışmaları istenir.

SDK'ların geliştirilmesindeki etkinlik ve güvenlik gibi kaygıların yanında bir de formülasyon geliştirme aşamasında dikkat edilmesi gereken hususlar bulunmaktadır. Bir SDK geliştirilirken en önemli husus etkin maddelerin birbirleriyle etkileşme olasılıklarıdır. Bu nedenle önformülasyon aşamalarında kapsamlı geçimlilik çalışmaları yapılmalıdır (Salandova ve diğerleri, 2018). Eğer etkin maddeler birbirleri ile geçimli ise ve maddelerin çözünme hızı profilleri benzer ise konvansiyonel monolitik sistemler kullanılabilir (Desai ve diğerleri, 2012). Monolitik sistemler üretim ve uygulama kolaylığı açısından her zaman tercih edilmektedir. Ancak bu sistemlerin kullanılabilmesi için maddelerin geçimli ve salım özelliklerinin benzer olması istenmektedir (Koo, 2010). Eğer maddelerin geçimlilik sorunu varsa iki tabakalı (bilayer) veya çok tabakalı (multilayer) tablet şeklinde basılmaları uygun olabilir veya farklı teknolojiler ile çeşitli kaplamalar yapılabilir, ya da birbirleri ile temas etmeyecek şekilde hazırlanıp kaplanarak kapsüle konulabilir (Desai ve diğerleri, 2012).

Antihipertansif tedavide SDK'lar

SDK'lar birçok tedavi alanında kullanılıyor olsa da özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. ABD'de ruhsatlandırılan SDK'ların %80'ini antihipertansif ajanlar oluşturmaktadır (Desai ve diğerleri, 2012). "Dünya Sağlık Örgütü Kardiyovasküler Hastalıklar için Kombinasyon Tedavisi Çalışma Grubu" da optimum tedavi için sabit dozlu kombinasyonların geliştirilmesini destekleyen çalışmalar yapmaktadır (Huffman ve Yusuf, 2014).

Piyasadaki antihipertansif SDK'ların %75'ini diüretik içeren kombinasyonlar oluşturmaktadır (TİTCK, 2016). Ayrıca renin anjiyotensin inhibitörleri dünyada en yaygın tercih edilen antihipertansif ilaçlardır. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ADEİ) ve anjiyotensin II reseptör blokerleri (ARB) bu sınıfa girmektedir. Kontrendikasyon olmadığı sürece hipertansiyon tedavisinde ADEİ veya ARB bir ilaç mutlaka bulunmalıdır (Li ve diğerleri, 2014). ADEİ'ler proteinüriyi azaltmaları ve kronik

kalp yetmezliğini önlemeleri açısından ARB'lerden daha üstündür. Ancak inme riskini azaltma etkisi açısından ADEİ'ler diğer gruplara göre dezavantajlı konumdadır. İnmeyi önlemede en avantajlı grup ise KKB'lerdir (Webb ve diğerleri, 2010). Ayrıca gün geçtikçe KKB içeren kombinasyonlar diüretikli kombinasyonlara tercih edilmektedir (Shah ve Randall, 2017). Bunun yanında asemptomatik ateroskleroz, periferik arter hastalıkları ve metabolik sendrom durumlarında da KKB ve ADEİ kombinasyonlarının kullanılması önerilmektedir (Patel ve diğerleri, 2016).

Türkiye ilaç pazarında ADEİ ve KKB ürünleri bir arada içeren SDK'ların listesi aşağıda verilmiştir:

- Trandolapril ve verapamil
- Enalapril ve nitrendipin
- Perindopril ve amlodipin
- Ramipril ve felodipin

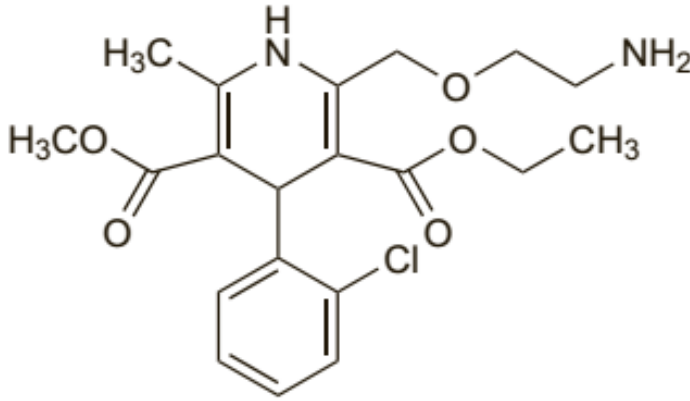
Bu tez çalışmasında bir KKB (amlodipin) ile bir ADEİ (enalapril) ilaç içeren SDK tablet formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.3. Amlodipin Besilat

Fizikokimyasal özellikleri

Amlodipin besilat beyaz veya beyazımsı tozudur. Suda ve izopropil alkolde zor çözünür. Dehidrate alkolde az, metanolde çok çözünür (USP 42a). Amlodipin besilatın log P (oktanol/su) değeri 0,65 olarak hesaplanmıştır. pKa değeri ise 8,6'dır (Burges ve Moisey, 1994). Erime noktası 200,41 °C'dir (Jiang ve diğerleri, 2008).

Kimyasal adı 3-Etil 5-metil (4RS)-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-klorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat benzensülfonattır. Amlodipinin kimyasal formülü $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ 'tir ve kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir (Sweetman, 2009). Amlodipin bazın molekül ağırlığı 408,9 Da; amlodipin besilatın molekül ağırlığı ise 567,1 Da'dır.



Şekil 2.2. Amlodipinin kimyasal yapısı

Farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri

Amlodipin, hipertansiyon ve koroner arter hastalıklarının tedavisinde oral yoldan kullanılan dihidropiridin türevi, uzun etkili bir KKB'dir. Vasküler düz kas hücreleri üzerindeki selektif etkisi kalp kası hücreleri üzerindeki etkisinden daha fazladır. Vasküler düz kaslar üzerinde vazodilatasyon yaparak periferik damar direncini azaltır ve bu sayede kan basıncı düşer. Etkisini aşamalı olarak gösterdiğinden, diğer periferik vazodilatörlerin sık görülen bir yan etki olan refleks taşikardiye neden olmaz (Norvasc, 2011; Sweetman, 2009; Üstünes, 2018). Amlodipin genel olarak çok iyi tolere edilir. En yaygın yan etkileri baş ağrısı, ödem, palpasyon, mide bulantısı, somnolenstir. Yan etkilerin şiddeti ise doza bağlıdır (Hong ve diğerleri, 2006; Kaynak ve diğerleri, 2011).

Amlodipin, farmakolojik etki açısından grubunun diğer üyelerine benzer güçlü bir periferik vazodilatör olmasına rağmen farmakokinetik açıdan diğer dihidropiridin türevlerine göre farklılık gösterir. Oral uygulamayı takiben emilim oranı %96; emilim hızı ise düşüktür. Doruk plazma konsantrasyonlarına 6-12 saatte ulaşır. Biyoyararlanım oranı %60-90 arasında çeşitlilik göstermektedir. Dağılım hacmi oral alımı takiben 16 ila 21 L/kg arasındadır. Yaklaşık %98 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde büyük oranda (%90 civarında) metabolize olur. Metabolizması karmaşık olup majör basamağı piridin analoguna oksidasyon şeklindedir. Ana bileşiğin %10'u ve inaktif metabolitlerinin %90'ı idrarla atılır. Eliminasyonu bifazik olup yarılanma ömrü 30-50 saattir. Diğer dihidropiridin türevi KKB'lere göre uzun olan yarılanma ömrü nedeniyle günde bir kez kullanımı uygundur. Emilimi yiyeceklerden etkilenmez. Kararlı durum

konsantrasyonlarına 7-8 günlük kullanımdan sonra ulaşılır (Kaynak ve diğerleri, 2011; Norvasc 2011; Sailer ve diğerleri, 2007; Sweetman, 2009;).

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemindeki yeri

Amlodipin pKa değeri 8,6 olan bir zayıf bazdır. Sudaki çözünürlüğü çok düşüktür. Ancak fizyolojik pH aralığında yüksek çözünürlük göstermektedir. pH 1,2-6,8 aralığında elde edilen en düşük çözünürlük değeri 1 mg/mL'dir. Bu değerden hareketle hesaplanan doz numarası 0,04 mg/mL olması amlodipinin çözünürlüğünün yüksek olduğunu göstermektedir (Oh ve diğerleri, 1993; WHO, 2006). Amlodipinin biyoyararlanımı %65-90 arasında çeşitlilik gösterse de inaktif metabolitleri halinde %90-95 idrarla atıldığından permeabilitesi yüksek kabul edilmektedir. Dolayısıyla BCS'e göre Sınıf 1 olarak yer almaktadır (Kaynak ve diğerleri, 2011; Olusola ve diğerleri, 2012; Shohin ve diğerleri, 2010). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) raporlarında da amlodipin BCS Sınıf 1 olarak tanımlanmıştır (WHO, 2006).

Dozaj ve uygulama yolu

Amlodipin oral kullanılan bir ilaçtır. Önerilen günlük dozu 5-10 mg'dır. Piyasada 2,5-10 mg amlodipin içeren ürünler vardır. Piyasada en çok besilat tuzu halinde bulunur ve 6,94 mg amlodipin besilat 5 mg amlodipine eşdeğerdir (Sweetman, 2009). Besilat dışında kamsilat, maleat ve mesilat tuzları içeren piyasa preparatları da bulunmaktadır. Piyasada amlodipini tek başına içeren tablet formları dışında hidroklorotiyazid, valsartan, atorvastatin, perindopril, olmesartan, indapamid, irbesartan, kandesartan, lisinopril ve rosuvastatin ile birlikte formüle edildiği ikili veya üçlü SDK tabletleri de bulunmaktadır. Bunun yanında amlodipin tabletin ağızda dağılan ve efervesan tablet formları da Türkiye'de ruhsatlandırılmış ancak kullanıma sunulmamıştır (Üstünes, 2008).

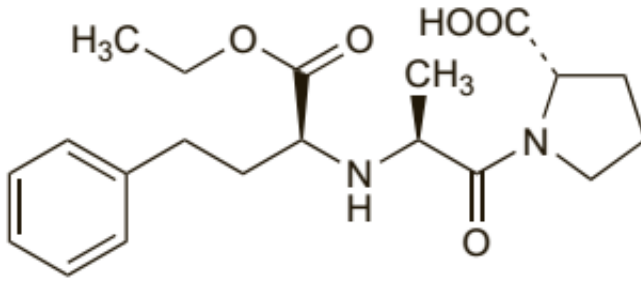
2.4. Enalapril Maleat

Fizikokimyasal özellikleri

Enalapril maleat kirli beyaz kristal tozudur. Suda az çözünür; alkolde çözünür; dimetilformamid ve metanolde çok kolay çözünür. Yarı polar organik çözücülerde zor

çözünürken polar olmayan organik çözücülerde pratikte hiç çözünmez (USP 42b). Log P (oktanol/su) değeri 2,45'tir (Verbeeck ve diğerleri, 2017).

Enalapril maleatın kimyasal formülü N-{N-[(S)-1-Etoksikarbonil-3-fenilpropil]-L-alanil}-L-prolin hidrojen maleat'tır. Yapısında iki iyonize grup bulunur. Karboksilik asit grubunun pKa'sı 2,97 iken amin grubunun pKa değeri 5,35'tir (Avdeefand Berger, 2001). Enalaprilin kimyasal formülü $H_{20}H_{28}N_2O_5$ 'tir. Kimyasal yapısı Şekil 3'te verilmiştir. Enalapril bazın molekül ağırlığı 376,4 Da; enalapril maleatın molekül ağırlığı ise 492,5 Da'dır.



Şekil 2.3. Enalaprilin kimyasal yapısı

Enalaprilin iki polimorfik formu bulunmaktadır. İki polimorfunun çözünürlüğü, erime noktası, IR ve Raman spektrumları benzerdir. Form II'nin diketopiperazin türevi degradasyon ürünü oluşturma potansiyelinin daha yüksek olduğu belirtilse de formülasyona eklenen sodyum bikarbonat gibi bir stabilizan madde ile enalapril maleatın in situ dönüşüm ile enalapril sodyuma dönüşmesi sağlanarak degradasyondaki olası artış önlenabilir (Eyjolfsson, 2002; Eyjolfsson, 2003; Ip ve diğerleri 1986; Kello ve Abdelwahed, 2014; Patchett, 1984; Rezende ve diğerleri, 2008; Verbeeck ve diğerleri, 2017).

Farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri

Enalapril hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan bir ADEİ'dir. Anjiyotensin I ile yarışarak anjiyotensin I'in güçlü bir vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye dönüşmesine engel olur. Anjiyotensin II'nin kandaki konsantrasyonunun azalmasıyla kan basıncı düşer ve renin aktivitesi artar. Enalapril, arteriyel dilatasyon oluşturarak toplam periferik vasküler direnci düşürür. Mortaliteyi azalttığına kanıtlanmasıyla konjestif kalp

yetmezliği tedavisinde ilk seçenek olmaya başlamıştır. Bunun yanında pulmoner ven basıncını, pulmoner vasküler direnci, ortalama arteriyel ve sağ atriyal basıncı da azaltır (Üstünes, 2018). Genellikle iyi tolere edilir ve enalapril tedavisi gören hastaların %10'unda görülen yan etkiler mide bulantısı, öksürük, bulanık görme, ortostatik etkiler, somnolens, halsizlik, karın ağrısı ve palpasyon olup hafif düzeyde seyreder ve tedavi gidişatını etkilemez (Todd ve Goa, 1992; Verbeeck ve diğerleri, 2017).

Enalapril bir ön ilaç olup enalaprilatın etil esteridir. Enalapril oral yoldan alındığında hızla emilir ve karboksil esteraz ile hidrolize uğrayarak aktif metaboliti olan enalaprilata dönüşür. Enalaprilat enalapril'e göre daha potent bir ADEİ'dir. Enalapril maleat oral uygulamayı takiben 1 saat içinde hızla emilir ve 3-4 saat içinde doruk konsantrasyona ulaşır. Emilimi yiyeceklerden etkilenmemektedir. Aktif metaboliti olan enalaprilat %50 oranında proteinlere bağlanır. Atılımı ise %61 (%43 enalaprilat ve %18 enalapril halinde) idrarla ve %33 (%27 enalaprilat ve %6 enalapril halinde) feçesle olur. Bir miktar enalapril de değişmeden idrarla atılır. Renal klirens değeri enalapril için 18 L/s; enalaprilat için ise 8-9,5 L/s'dir. Enalaprilin plazma yarılanma ömrü 2 saat iken enalaprilatın terminal faz yarı ömrü 30-40 saattir (Patchett, 1984; Todd ve Goa., 1992; Verbeeck ve diğerleri, 2017).

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemindeki yeri

Enalapril maleat suda az çözünür (USP 42b). pH 1,2-6,8 arasında, 37°C'de gerçekleştirilen çözünürlük deneylerinde hesaplanan en düşük değer 5 mg/mL bulunmuştur (Verbeeck ve diğerleri, 2017). Hesaplanan doz numarası 0,08 olduğundan enalapril yüksek çözünürlük göstermektedir.

Enalaprilin insan intestinal permeabilite değerleri in vivo intestinal perfüzyon tekniğiyle $1,57 \times 10^{-4}$ cm/sn bulunmuştur. Bu değer permeabilite ölçümlerinde referans olarak alınan metoprolol (1.34 x 10⁻⁴ cm/sn) çok yakındır. Enalaprilatın permeabilite değeri ise $0,20 \times 10^{-4}$ cm/sn olarak hesaplanmıştır. FDA'nın biyomuafiyet kılavuzunda eğer bir ilaçta ön ilaç-ilâç dönüşümü varsa, ön ilacın permeabilite değeri dikkate alınmalıdır" denilmektedir. Bu durumda, enalaprilin permeabilitesi yüksek olduğundan enalapril BCS Sınıf 1'de yer alması düşünülebilir. Ancak FDA ve EMA'nın biyomuafiyet kılavuzlarında "Emilen doz kesri %85 veya daha fazla olmalıdır" kriteri bulunmaktadır. Enalapril maleatın emilimi

%60-70 olduğundan bu kriteri karşılamamakta ve BCS Sınıf 3'e dahil olmaktadır (EMA, 2010; FDA, 2017; Verbeeck ve diğerleri, 2017).

Dozaj ve uygulama yolu

Enalapril piyasada maleat tuzu halinde bulunan bir ön ilaçtır ve oral yoldan uygulandığında karaciğerde hızla enalaprilata dönüşür. Parenteral formları ise doğrudan enalaprilat ihtiva eder. Türkiye'de sadece tablet formları piyasadadır ve tabletler 5, 10 veya 20 mg enalapril maleat içerir. Hastanın profiline göre günlük doz 2,5 mg ile 40 mg arasında değişebilmektedir. Hipertansiyon tedavisinde başlangıç dozu 5-20 mg arasında olmakla beraber uzun süreli kullanım dozu 20 mg'dır. Konjestif kalp yetmezliğinde ise başlangıç dozu 2.5 mg'a kadar düşer ve kademeli olarak artırılır (Todd ve Goa, 1992). Piyasada sadece enalapril maleat içeren tabletlerin dışında, hidroklorotiyazid, lerkandipin ve nitrendipin ile birlikte formüle edildiği SDK tabletler de bulunmaktadır (Üstünes, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan malzemeler

Tez çalışması sırasında kullanılan malzemeler ve ekipman Çizelge 3.1. ve 3.2.'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. Kullanılan malzemeler

Malzeme	Üretici
Amlodipin besilat	Hetero Drugs Ltd, Hindistan
Enalapril maleat	Zhejiang Huahai, Çin
Mısır nişastası	Roquette, Fransa
Mannitol	Roquette, Fransa
Mikrokristal selüloz 102	RanQ Remedies, Hindistan
Sodyum stearil fumarat	JRS Pharma, Almanya
Gliseril distearat	Gattefosse, Fransa
Magnezyum stearat	Magnesia, Almanya
Krospovidon	Ashland, ABD
Kroskarmeloz sodyum	Mingtai, Tayvan
Hidroksipropil selüloz	Ashland, ABD
Prejelatinize nişasta	Colorcon, İngiltere
Sodyum bikarbonat	Solvay-Carbonate, Fransa
Metanol, HPLC saflığında	Merck, Almanya
Asetonitril, HPLC saflığında	Merck, Almanya
Fosforik asit	Merck, Almanya
Hidroklorik asit, %37	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat trihidrat	Sigma-Aldrich, Almanya
Glasiyel asetik asit	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
C ₁₈ kolon (4.6 x 250 mm, 5 µm)	Waters, ABD
Silika jel plaka (60 RP-18 F _{254S})	Merck, Almanya
Norvasc® 5 mg tablet	Pfizer, Türkiye
Enapril® 10 mg tablet	Sandoz, Türkiye

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Gereç	Marka
Hassas terazi	Shimadzu ATX224, Japonya
Hassas terazi	Radwag AS 82/220.R2, Polonya
Ultrasonik banyo	Jeiotech 13AB-231-XS, Kore
Manyetik karıştırıcı	Velp-Scientifica ARE, İtalya
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Sympatec GmbH, Almanya
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60, Japonya
Termogravimetre (TGA)	Shimadzu DTG-60, Japonya
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	PerkinElmer Spectrum 400, ABD
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Shimadzu, Promanince LC 20-A serisi, Japonya
Tablet baskı makinesi	TDP 7, Çin
Çözünme hızı cihazı	Pharma Test, Almanya
Kübik karıştırıcı	Pharmag, Almanya
pHmetre	PASS1 P11-BNC-Bante, İngiltere
Etüv	Mikrotetst MST 120, Türkiye
Distile su sistemi	Nüve, Türkiye
Ultrasaf su sistemi	Millipore Direct-Q 3UV, ABD
Sertlik cihazı	Pharma Test, Almanya
Ufalanma aşınma cihazı	Pharma Test, Almanya
Dağılma cihazı	Pharma Test, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	Memmert, Almanya

3.1.3. Kullanılan yazılım

Etkin maddelerin miktar tayini analizlerinde ve tablet formülasyonlarının deney tasarımlarında Design Expert® 11 (Stat-Ease Inc., ABD) yazılımı kullanıldı.

3.2. Yöntem ve Deneyler

3.2.1. Etkin maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü ve dağılımı lazer difraksiyon yöntemiyle ölçüldü. Cihazın (Sympatec GmbH) kondansatörü açılarak tablaya yerleştirilen kuru toz numune vakumla alınarak ölçüm bölgesine püskürtüldü. Her madde için 3 ölçüm yapıldı. Ölçülen değerler ortalama ve standart sapma (SS) olarak verildi.

Etkin maddelerin çözünürlük çalışmaları

Çözünürlük analizlerinde şişe-çalkalama (shake-flask) yöntemi kullanıldı (Glomme ve diğerleri, 2005). Buna göre etkin maddelerin çözünürlük değerlerini belirlemek amacıyla çözünme ortamlarının çözebileceğinden fazla miktardaki maddeler erlenlere aktararak üzerlerine 10 mL ortam eklendi. Ortam olarak pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 tamponları kullanıldı. Erlenler 37 °C'deki çalkalamalı su banyosuna yerleştirilerek 24. ve 48. saatte örnekler alındı. Alınan örnekler gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra 0,45 µm'lik membran filtreden süzülerek HPLC yöntemiyle analiz edildi. Seyreltme faktörleri dikkate alınarak çözünürlük değerleri saptandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi.

Etkin maddelerin çözünürlüklerinin değerlendirilmesinde, Doz numarası (D_0) parametresinden yararlanıldı (Eş. 1.1). D_0 değerinin 1'den küçük olması o ilacın yüksek çözünürlük gösterdiğinin ifadesidir (Oh ve diğerleri, 1993).

$$D_0 = \frac{Doz/V_0}{C_s} \quad (1.1)$$

Bu eşitlikte, D_0 : doz numarasını; Doz: ilacın piyasadaki en yüksek dozunu; C_s : çözünürlük (mg/mL) değerini; V_0 : 250 mL (ABD, İngiltere ve İspanya kılavuzlarına göre) veya 150 mL (Japonya kılavuzlarına göre) ifade etmektedir.

Bu çalışmada amlodipin için piyasadaki en yüksek doz 10 mg, enalapril maleat için ise 20 mg olarak alındı. V_0 ise 250 mL olarak alındı.

Geçimlilik çalışmaları

Formülasyonda kullanılması düşünülen etkin maddelerin birbirleriyle ve yardımcı maddeler ile geçimli olma durumu termal ve termal olmayan yöntemler ile değerlendirildi.

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

DSC, ilaç-yardımcı madde geçimsizlik çalışmalarında sıklıkla kullanılan termal yöntemlerden biridir. Etkin maddeler ve yardımcı maddeler saf halde ve 1:1 oranında karıştırılarak aşamalı olarak yükseltilecek sıcaklığa maruz bırakılır. Saf maddenin termogramındaki pikler ile karışımın termogramındaki pikler karşılaştırılarak, piklerin şekli, kayma veya kaybolma durumu, yeni bir pik oluşumunun gözlenmesi ve entalpi değerlerinden hareketle maddelerin geçimsizlikleri hakkında yorum yapılabilir (Bharate ve diğerleri, 2010).

Çalışmada amlodipin ve enalapril etkin maddeleri birbirleri ve yardımcı maddeler ile 1:1 oranda karıştırılarak analiz edildi. Karışımlar etkileşim olasılığını artırmak amacıyla 3 hafta süresince oda sıcaklığında eczacı paketi içerisinde muhafaza edildi. Yardımcı madde olarak mannitol, mikrokristal selüloz, mısır nişastası, krospovidon, kroskarmeloz sodyum, hidroksipropil selüloz, prejelatinize nişasta, magnezyum stearat, gliseril distearat, sodyum stearil fumarat ve sodyum bikarbonat kullanıldı. Analizlerde 3-5 mg miktarda saf halde ve 1:1 oranında karışımlar halinde hazırlanan numuneler alüminyum panlara konularak preslendi ve cihaza yerleştirildi. Örnek içermeyen eşdeğer bir alüminyum pan referans olarak kullanıldı. Etkin madde - yardımcı madde karışımları 10 °C/dk hız ile 30-270°C aralığında ve 20 mL/dk debideki azot gazı altında incelendi. Amlodipin ve enalapril içeren karışım ise 45 °C/dk hızla ısıtılarak termogramlar karşılaştırıldı. Elde edilen termogramlar saf maddelerin termogramları ile karşılaştırıldığında etkin maddelerin piklerinde bir değişiklik olup olmadığı incelendi.

Termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel termal analiz (DTA)

TGA’da maddenin oda sıcaklığından, çok yüksek sıcaklıklara kadar ısıtıldığında kütesinde gözlenen değişiklikler kaydedilir. Kütle kaybı, maddenin bozunması ile ilişkilendirilir. DTA, DSC’ye benzer bir termal analiz yöntemidir. Örnek ve referans arasındaki sıcaklık farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. DTA, DSC kadar hassas bir yöntem olmamakla birlikte TGA ile eş zamanlı analiz edildiğinde yorumlamada avantaj sağlar (Joshi ve diğerleri, 2002).

Bu çalışmada, DSC termogramlarında karakterize edilemeyen pik gözlenen örneklerde, maddelerin bozunma davranışını gözlemlemek amacıyla TGA yapıldı. TGA analizinde 7-9 mg numune cihazın özel kapsülüne konularak cihaz 30-900°C’de çalıştırıldı ve cihazın hassas terazide sıcaklık artışına bağlı oluşan kütle kaybının kaydedildiği termogramlar incelendi. Aynı cihazda eş zamanlı olarak DTA analizi de yapılarak örnek ve referans arasındaki sıcaklık farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak izlendi.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Kızılötesi spektroskopisi, moleküllerdeki çeşitli bağların farklı dalga boylarındaki titreşim frekanslarını ölçerek moleküllerdeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. Moleküllerin titreşim hareketleri gerilme veya eğilme şeklinde olabilmektedir (Berthomieu ve Hienerwadel, 2009). FTIR, moleküllerin yapı analizinde ve ilaç-yardımcı madde geçimlilik çalışmalarında kullanılmaktadır. Birlikte kullanılan yardımcı maddeler etkin maddenin IR spektrum deseninde bir değişiklik yaparsa etkileşimden söz edilebilir.

Tez çalışmasında toplam yansıması azaltılmış fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) kullanıldı. Etkin ve yardımcı maddeler saf halde ve 1:1 oranında karıştırılarak cihazın ölçüm tablasına 1-2 mg civarında aktarıldı. Cihazın kolu indirilerek tozun tabla ve metal uç arasında sıkışması sağlandı. 400-4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında tarama yapıldı. Karışımlara ait spektrumlar saf maddeler ile karıştırıldığında etkin maddelerin fonksiyonel gruplarında bir değişiklik olup olmaması esas alınarak yorumlandı.

İnce tabaka kromatografisi (ITK)

İTK, geçimlilik çalışmalarında kullanılan kromatografik yöntemlerden biridir. Bu yöntemde etkileşimi araştırılan iki maddenin ayrı ayrı ve bir aradaki çözeltileri İTK plağına farklı noktalarda uygulanır ve oluşan lekelerin konumu karşılaştırılır.

Amlodipin besilat ve enalapril maleatın geçimliliğini kromatografik olarak incelemek için İTK'dan yararlanıldı. Bu amaçla üç farklı çözelti hazırlandı. Birincisi 5 mg amlodipin besilatın 1 mL metanol ve 1 mL kloroform karışımındaki çözeltisi; ikincisi 5 mg enalapril maleatın 1 mL metanol ve 1 mL kloroformdaki çözeltisi, üçüncüsü ise 5 mg amlodipin besilat ve 5 mg enalapril maleatın 1 mL metanol ve 1 mL kloroform karışımındaki çözeltisidir. Çözeltiler oda sıcaklığında 3 gün bekletildikten sonra silika plakaya kılcal boru yardımıyla uygulandı. İTK tankına mobil faz olarak aseton:metanol (6:1) karışımı ilave edildi. Mobil fazın plakaların üzerinde sürüklenmesi beklendi. İyot buharı altında bekletilerek, ultraviyole ışığı altında lekeler gözlemlendi. Her iki maddeyi içeren karışımındaki lekeler ile maddelerin ayrı ayrı yer aldığı çözeltilerdeki lekeler karşılaştırıldı.

3.2.2. Etkin maddelerin miktar tayini ve validasyonu

Analiz yönteminin geliştirilme aşamaları

Kolon seçimi

Amlodipin besilat ve enalapril maleat etkin maddelerinin HPLC ile analizlerinin yapıldığı makaleler incelendiğinde en sık kullanılan kolonun ters faz C₁₈, 5µm, 250 mm x 4.6 mm kolonu olduğu tespit edildi (Chaudhari, 2012; Elsebaei ve Zhu, 2011; Naidu ve diğerleri, 2005; Naveed ve diğerleri, 2012; Wankhede ve diğerleri, 2009). Bu nedenle yöntem geliştirilirken bu kolon tercih edildi.

Dedektör ve dalgaboyu seçimi

Kullanılan HPLC sisteminde PDA dedektör bulunmaktadır. PDA dedektör birden fazla dalga boyuyla aynı anda çalışma imkanı sağlar. Bu nedenle yapılan ön çalışmalarda başlangıçta etkin maddelerin UV spektrumlarında maksimum absorbands verdiği dalga

boyları dikkate alınarak amlodipin besilat için 237 nm ve enalapril maleat için ise 215 nm’de çalışılması düşünüldü. Ancak geliştirilen yöntemde 237 nm’de amlodipin piki gözlenmedi ve 215 nm’de her iki maddeye ait pikin ayrımı ve keskinliğinin uygun olduğu saptandı. Bu nedenle her iki etkin madde için de dalga boyu olarak 215 nm’de çalışılmasına karar verildi.

Mobil fazın seçimi

Çalışmada çözücü ve seyreltme çözeltisi olarak birçok çözücü ve bunların çeşitli oranlardaki karışımları denendi. Bunlar arasında metanol, asetonitril, ultra saf su, ve çeşitli tamponlar yer almaktadır. Ancak piklerin resolüsyonu, kuyruklanma faktörü, tabakalanma sayısı gibi parametreleri dikkate alındığında en uygun mobil faz metanol:su (pH 3,0) olarak belirlendi. Daha sonra deney tasarımı sonucu gerçekleştirilen optimizasyon ile pH fosforik asit ile 2,95’e ayarlandı.

Sonuç olarak HPLC kullanılarak amlodipin besilat ve enalapril maleatın miktar tayinini bir arada sağlayan bir analiz yöntemi geliştirildi. Geliştirilen yönteme ait kromatografik koşullar Çizelge 3.3’te verilmektedir:

Çizelge 3.3. Miktar tayini için geliştirilen yönteme ait kromatografik koşullar

Kolon	Waters, C ₁₈ , 5 µm, 250 x 4,6 mm
Dedektör	PDA
Dalga boyu	215 nm
Sıcaklık	30°C
Akış hızı	1,200 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Mobil faz	Metanol:Su (pH 3,0, o-fosforik asit ile ayarlanır) (10:90, h/h)
Analiz süresi	10 dk

Piyasada bulunan referans ürünlerden Norvasc[®] tablet, 5 mg amlodipine eşdeğer 6,94 mg amlodipin besilat içermektedir. Enapril[®] tablet ise 10 mg enalapril maleat içermektedir. Stok çözeltiler bu değerler göz önüne alınarak hazırlandı.

Seyreltme çözeltisi: 8,3 mL hidroklorik asit (%37) bir miktar distile suya eklendi. Distile suyla 1 L hacme tamamlandı. Elde edilen 0,1 N HCl çözeltisi (pH 1,2) çözücü olarak kullanıldı.

Stok çözelti: 6,94 mg amlodipin besilat (5 mg amlodipine eşdeğer) ve 10,0 mg enalapril maleat tartılarak 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. pH 1,2 ortamı ile hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 10 dk karıştırıldı. Elde edilen çözelti 0,1 mg/mL amlodipin; 0,2 mg/mL enalapril maleat ihtiva etmektedir.

Çalışma çözeltisi: Stok çözeltiden 4 mL alınarak 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Çözücüyle hacmine tamamlandı. Bu çözelti 0,016 mg/mL amlodipin ve 0,032 mg/mL enalapril maleat ihtiva etmektedir. Bu çözelti validasyonda %100'lük çözelti olarak değerlendirildi.

Yukarıda verilen kromatografik koşullar ile kalibrasyon denklemi elde edildi. "ICH Q2 – Analitik prosedürlerin validasyonu: test ve metodoloji" kılavuzunda önerildiği gibi yöntem geliştirme aşamasında sağlamlık parametresi incelendi. Sağlamlık, bir yöntemin planlı yapılan küçük değişikliklerden etkilenmeden, güvenilir sonuçlar vermesi olarak tanımlanabilir (ICH Q2). Çalışmada yöntemin sağlamlığı istatistiksel deney tasarımı kullanılarak değerlendirildi. Deney tasarımı yapılırken Design-Expert® 11 programı kullanıldı. Tasarım yanıt yüzey metodolojilerinden olan BBD kullanılarak gerçekleştirildi. BBD'de bağımsız değişken olarak mobil fazdaki metanol oranı, akış hızı, mobil fazın pH'sı ve kolon sıcaklığının etkin maddelerin pik alanları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Seçilen faktörler ve düzeyleri Çizelge 3.4'te verilmektedir:

Çizelge 3.4. Geliştirilen analitik yöntemin sağlamlığının değerlendirilmesinde incelenen deney tasarımına ait bağımsız değişkenler (faktörler) ve seviyeleri

Faktörler	Düşük seviye	Nominal seviye	Yüksek seviye
Mobil fazdaki metanol oranı (%)	5	10	15
Akış hızı (mL/dk)	1,000	1,200	1,400
Mobil fazın pH'sı	2,8	3,0	3,2
Kolon sıcaklığı (°C)	25	30	35

BBD tasarım oluşturulurken, faktör sayısı 4, blok sayısı 1, merkezi nokta sayısı 5 olan bir matris oluşturulmuştur. Design Expert® 11’de oluşturulan deney tasarımı matrisi Çizelge 3.5.’te verilmektedir:

Çizelge 3.5. Analitik yöntem optimizasyonu için oluşturulan BBD deney matrisi

No	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4
	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (mL/dk)	Mobil fazdaki metanol oranı (%)	Mobil fazın pH’sı
1	30	1,2	5	3,2
2	30	1,2	10	3,0
3	35	1,4	10	3,0
4	25	1,0	10	3,0
5	30	1,2	10	3,0
6	25	1,2	5	3,0
7	30	1,4	10	3,2
8	35	1,2	15	3,0
9	30	1,2	15	2,8
10	25	1,2	15	3,0
11	25	1,2	10	3,2
12	35	1,2	5	3,0
13	25	1,4	10	3,0
14	30	1,4	5	3,0
15	30	1,0	5	3,0
16	30	1,2	15	3,2
17	30	1,2	10	3,0
18	35	1,2	10	2,8
19	35	1,2	10	3,2
20	30	1,2	10	3,0
21	30	1,2	5	2,8
22	35	1,0	10	3,0
23	30	1,2	10	3,0
24	30	1,4	15	3,0
25	25	1,2	10	2,8
26	30	1,0	15	3,0
27	30	1,4	10	2,8
28	30	1,0	10	2,8
29	30	1,0	10	3,2

Çizelge 3.4’teki seviyelerde gerçekleştirilen tasarım sonucunda Design-Expert® 11’de optimizasyon yapılarak final yöntem belirlendi. Validasyon optimize edilen yönetime göre gerçekleştirildi. Validasyon çalışmalarında ICH’de tanımlanan parametreler incelendi. Bu parametreler aşağıda sunulmaktadır:

Sistem uygunluk parametreleri

Sistem uygunluğunu incelemek için %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi sisteme 6 kez art arda enjekte edildi. Gözlenen piklerin alanı, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, plaka sayısı ve çözünürlük değeri incelendi. Pik alanlarının varyasyon katsayısının (%VK) değeri 2'den küçük, kuyruklanma faktörünün 1,5'ten küçük, teorik plaka sayısının 3000'den büyük ve çözünürlük değerinin 3'ten büyük olması hedef spesifikasyonlar olarak belirlendi.

Doğrusallık (linearity)

Yöntemin doğrusallığı, belirlenen aralıkta elde edilen sonuçların numunedeki konsantrasyonlar ile orantılı olma yeteneğidir. Doğrusallığın kurulması için en az 5 konsantrasyon kullanılmalıdır (ICH Q2). Elde edilen sonuçlara göre regresyon doğrusu çizilir ve regresyon doğrusunun eğimi ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanır.

Tez çalışmasında, stok çözeltiden seyreltilerek elde edilen 3 seride ve 8 farklı derişimde örnekler hazırlandı. Amlodipin için konsantrasyon aralığı 0,8-24 µg/mL; enalapril maleat için ise 1,6-48 µg/mL olarak belirlendi. Bu değerler çalışma çözeltisinin %5-150 konsantrasyon aralığına denk gelmektedir. %100'lük potens değerine göre amlodipin ve enalapril maleat için Çizelge 3.6'da verilen konsantrasyonlar seçildi.

Çizelge 3.6. Miktar tayini analizinde çalışma çözeltisine göre amlodipin (AML) ve enalapril maleat (ENA) yüzdelere karşılık gelen konsantrasyonlar

	AML (µg/mL)	ENA (µg/mL)
%5	0,8	1,6
%10	1,6	3,2
%25	4,0	8,0
%50	8,0	16,0
%75	12,0	24,0
%100	16,0	32,0
%120	19,2	38,4
%150	24,0	48,0

Bu konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerlerinin ortalamalarına göre çizilen doğrunun regresyon analizi yapılarak determinasyon katsayısı ve doğrunun eğimi hesaplandı. R^2 değerinin 0,999'dan daha düşük olmaması hedeflendi.

Seçicilik (specificity)

Seçicilik, analiz edilecek maddeleri matristeki diğerk maddelerin varlığında doğru olarak ayırt edebilme yeteneğidir. Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla çözücü veya mobil faz çözeltilerinden ileri gelebilecek herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi.

Doğruluk (accuracy)

Bir analitik yöntemin doğruluğu, bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Doğruluk, konsantrasyonu bilinen numunelerin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçlardan geri kazanım yüzdesi ile belirlenebilir (ICH Q2). Doğruluk ölçütü hesaplanırken etkin maddelerin bilinen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı ve geliştirilen yöntem kullanılarak geri kazanım yüzdesi saptandı. Geri kazanım yüzdelерinin %98-102 arasında olması ve %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Kesinlik (precision)

Yöntemin kesinliği, numunede tekrar edilen ölçümlerin birbirine yakınlığını tanımlar. Üç seviyeden oluşur. Bunlar: Tekrarlanabilirlik, Tekrar elde edilebilirlik ve Ara kesinliktir (ICH Q2).

Tekrarlanabilirlik (repeatability)

Deney içi kesinlik olarak da bilinir. Bir numunenin aynı kişi tarafından aynı koşullarda kısa zaman aralıklarıyla yapılan ölçümlerinin yakınlığı ile ifade edilir. Çalışma çözeltisi örneğinin 10 kez art arda ölçümünün yapılmasıyla tekrarlanabilirlik ölçütüne bakıldı. %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)

Laboratuvarlar arası kesinlik olarak da bilinir. Aynı yöntem ile farklı laboratuvarlarda yakın sonuçların elde edilebilirliğinin göstergesidir. Tez çalışmasında bu parametre incelenmemiştir.

Ara kesinlik (intermediate precision)

Laboratuvar içi kesinlik olarak da bilinir. Farklı günler, farklı analist ve farklı ekipmanı kapsayan varyasyonlar ile ifade edilir. Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için 3 farklı günde düşük ve yüksek derişimde hazırlanan numuneler analiz edilerek sonuçlar değerlendirildi. %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Dayanıklılık (stability)

Etkin maddelerin iki farklı derişimini içeren çözeltiler oda sıcaklığında 72 saat bekletilerek başlangıçta ve 24 saat aralıklarla alınan örnekler analiz edildi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklılığı araştırıldı.

3.2.3. Çözünme hızı yöntem validasyonu

Üç farklı ortamda gerçekleştirilecek olan çözünme hızı analizleri için HPLC kullanıldı. pH 1,2 çözünme ortamı için etkin madde miktar tayini analizinde optimize edilen çözünme hızı yöntemi kullanıldı. Ancak pH 4,5 ve pH 6,8 ortamları için kromatografik koşullarda değişiklikler yapıldı. Yöntemlere ait kromatografik koşullar Çizelge 3.7'de sunulmaktadır:

Çizelge 3.7. Çözünme hızı tayini için geliştirilen yöntemlere ait kromatografik koşullar

	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Kolon	C ₁₈ , 5µm, 250x4,6mm	C ₁₈ , 5µm, 250x4,6mm	C ₁₈ , 5µm, 250x4,6mm
Dedektör	PDA	PDA	PDA
Dalgaboyu	215 nm	215 nm	215 nm
Sıcaklık	25°C	30°C	30°C
Akış hızı	1,205 mL/dk	1,000 mL/dk	1,200 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	5 µL	20 µL	5 µL
Mobil faz	Metanol:Su (pH 2.95) (10:90, h/h)	Metanol:Su (pH 3.0) (2:98, h/h)	Metanol:Su (pH 3.0) (10:90, h/h)
Analiz süresi	10 dk	25 dk	15 dk

Piyasada bulunan referans ürünlerden Norvasc® tablet, 5 mg amlodipine eşdeğer 6,94 mg amlodipin besilat içermektedir. Enapril® tablet ise 10 mg enalapril maleat içermektedir. Stok çözeltiler bu değerlerin 900 mL hacimdeki çözünme ortamında oluşturacağı konsantrasyonlar temel alınarak hazırlandı.

Çözücü: Her yöntemde ilgili çözünme ortamı çözücü olarak kullanıldı. Bu ortamlar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

0,1 N HCl çözeltisi (pH 1,2): 8,3 mL hidroklorik asit (%37) bir miktar distile suya eklendi. Distile suyla 1 L hacme tamamlandı.

pH 4,5 asetat tamponu: 2,99 g sodyum asetat trihidrat tartılarak 1 L'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 14,0 mL 2 N asetik asit eklendi ve distile suyla hacmine tamamlandı. pH 4,5'e ayarlandı.

pH 6,8 fosfat tamponu: 50 mL 0,2 M KH_2PO_4 ve 22,4 mL 0,2 M NaOH tartıldı ve distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. pH 6,8'e ayarlandı.

Stok çözelti: 7,72 mg amlodipin besilat (5,56 mg amlodipine eşdeğer) ve 11,12 mg enalapril maleat tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. Ultrasonik banyoda 10 dk karıştırıldı. Elde edilen çözelti 0,1 mg/mL amlodipin; 0,2 mg/mL enalapril maleat ihtiva etmektedir.

Çalışma çözeltisi: Stok çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Çözücüyle hacmine tamamlandı. Bu çözelti 5,56 $\mu\text{g/mL}$ amlodipin ve 11,12 $\mu\text{g/mL}$ enalapril maleat ihtiva etmektedir. Bu çözelti validasyonda %100'lük çözelti olarak değerlendirildi.

Çözünme hızı yöntem validasyonunda incelenen parametreler aşağıda tanımlanmaktadır:

Doğrusallık (linearity)

Stok çözeltiden seyreltilerek elde edilen 3 seride ve 6 farklı derişimde örnekler hazırlandı. Amlodipin için konsantrasyon aralığı 0,556-6,67 $\mu\text{g/mL}$; enalapril için ise 1,112-13,34 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Bu değerler çalışma çözeltisinin %10-120 konsantrasyon aralığına denk gelmektedir. %100'lük potens değerine göre amlodipin ve enalapril maleat için Çizelge 3.8'de verilen konsantrasyonlar seçildi:

Çizelge 3.8. Çözünme hızı analiz yönteminde çalışma çözeltisine göre amlodipin ve enalapril maleat yüzdelere karşılık gelen konsantrasyonlar

	AML (µg/mL)	ENA (µg/mL)
%10	0,556	1,112
%25	1,39	2,78
%50	2,78	5,56
%75	4,17	8,34
%100	5,56	11,12
%120	6,67	13,34

Bu konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerlerinin ortalamasına göre elde edilen doğrunun regresyon analizi yapılarak determinasyon katsayısı ve doğrunun eğimi hesaplandı. R^2 değerinin 0,999'den daha düşük olmaması hedeflendi.

Seçicilik (specificity)

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla çözücü veya mobil faz çözeltilerinden ileri gelebilecek herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi.

Doğruluk (accuracy)

Doğruluk ölçütü hesaplanırken etkin maddelerin bilinen düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı ve geliştirilen yöntem kullanılarak geri kazanım yüzdesi saptandı. Geri kazanım yüzdelерinin %95-105 arasında olması ve %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Kesinlik (precision)

Yöntemin kesinliği tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri ile değerlendirildi.

Tekrarlanabilirlik (repeatability)

Çalışma çözeltisi örneğinin 10 kez art arda ölçümünün yapılmasıyla tekrarlanabilirlik ölçütüne bakıldı. %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Ara kesinlik (intermediate precision)

Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için 3 farklı günde düşük ve yüksek derişimde hazırlanan numuneler analiz edilerek sonuçlar değeriendirildi. %VK'nin %2'den küçük olması hedeflendi.

Dayanıklılık (stability)

Etkin maddelerin iki farklı derişimini içeren çözeltiler oda sıcaklığında 48 saat boyunca bekletilerek başlangıç ve 24 saat aralıklarla alınan örnekler analiz edildi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklılığı araştırıldı.

3.2.4. Formülasyon gelişimi

Referans ürünler

Geliştirilecek SDK formülasyonuna referans olarak 5 mg amlodipine eşdeğer 6,94 mg amlodipin besilat içeren Norvasc® 5 mg Tablet (Pfizer, Türkiye) ve 10 mg enalapril maleat içeren Enapril® 10 mg Tablet (Sandoz, Türkiye) ürünleri seçildi.

Norvasc® 5 mg tablet, etkin madde olarak 5 mg amlodipine eşdeğer miktarda (6,94 mg) amlodipin besilat; yardımcı madde olarak da mikrokristal selüloz, dibazik kalsiyum fosfat, magnezyum stearat ve sodyum nişasta glikolat ihtiva etmektedir.

Enapril® 10 mg tablet, etkin madde olarak 10 mg enalapril maleat; yardımcı madde olarak ise mısır nişastası, laktoz monohidrat, hidroksipropil selüloz sodyum bikarbonat, talk, magnezyum stearat ve kırmızı demir oksit içermektedir.

Referans tabletlerde yapılan kontroller

Görünüş

Tabletler şekil, görünüş ve renk açısından değeriendirildi.

Ağırlık tekdüzeliği

Rastgele alınan 20 adet tablet tartılarak ortalama tablet ağırlığı hesaplandı. Daha sonra 20 tablet teker teker tartıldı. En fazla iki tablet ortalama tablet ağırlığının %7,5'inden fazla sapma gösterebilir ancak hiçbir tablet ortalamanın %15'inden fazla sapma göstermemelidir.

Çap – kalınlık tayini

Rastgele alınan 10 tabletin çap ve kalınlık ölçümleri mikrometre ile yapıldı. Sonuçlar %VK ile değerlendirildi.

Friabilite tayini

Rastgele alınan 20 adet tablet tartılarak cihazın haznesine yerleştirildi. Cihaz 25 devir/dk hızda 4 dk boyunca çalıştırılarak tabletlerin 100 devir dönmesi sağlandı. Daha sonra tabletler üzerlerindeki tozlardan arındırılarak yeniden tartıldı ve ağırlık kaybı % cinsinden hesaplandı. %1'den fazla ağırlık kaybı gözlenmemelidir.

Sertlik tayini

Rastgele alınan 10 adet tablet sertlik cihazına yatay olarak konuldu ve tabletleri kırmak için gereken kuvvet N cinsinden ölçüldü. Tabletlerin sertliğinin $45 \text{ N} \pm \%10$ olması istendi.

Dağılma testi

Dağılma cihazının beherine 800 mL distile su konularak sıcaklık $37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlandı. 6 adet tablet numune sepetinin haznelerine konularak üzerlerine pleksi diskler yerleştirildi. Tabletlerin tamamen dağılması için gereken süreler kaydedildi. Tabletler 5 dk içerisinde tamamen dağılmalıdır.

İçerik tekdüzeliği

Rastgele alınan 10 adet tabletin ortalama tablet ağırlığı saptandı. Daha sonra bu tabletler tek tek tartılarak 50 mL'lik balon jojelere ayrı ayrı aktarıldı. Üzerlerine 30 mL kadar çözücü (0,1 N HCl) konularak 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve çözücü ile hacme tamamlanarak 10 dk ultrasonik banyoda tutuldu. Bu çözeltiden 4 mL alınarak çözücü ile 25 mL'ye tamamlandı ve 10 dk ultrasonik banyoda karıştırılmasını takiben 0,45 µm'lik membran filtreden süzüldü ve Bölüm 3.2.2'de anlatılan yöntem ile HPLC'de analiz edildi.

Etkin madde miktar tayini

Rastgele alınan 10 adet tabletin ortalama tablet ağırlığı kaydedildi. Daha sonra bu tabletler havanda toz edilerek içerisinden bir tabletin ağırlığına eşit miktarda toz karışımı 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 30 mL kadar çözücü (0,1 N HCl) konularak 15 dk manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve çözücü ile hacme tamamlanarak 10 dk ultrasonik banyoda tutuldu. Bu çözeltiden 4 mL alınarak çözücü ile 25 mL'ye tamamlandı ve 10 dk ultrasonik banyoda karıştırılmasını takiben 0,45 µm'lik membran filtreden süzüldü ve Bölüm 3.2.2'de anlatılan yöntem ile HPLC'de analiz edildi.

Çözünme hızı testleri

Çözünme hızı koşulları Çizelge 3.9'da verildi. Bu koşullarda yapılan çözünme hızı analizlerinde, her numune alma zamanında ortamdan 3 mL örnek çekilip yerine aynı hacimde taze tampon ilave edildi. Alınan örnekler 0,45 µm'lik membran filtreden HPLC vialine süzüldü ve Bölüm 3.2.3'te anlatılan yöntemler ile analiz edildi.

Çizelge 3.9. Çözünme hızı testi koşulları

Yöntem	USP Cihaz II (Palet yöntemi)
Ortam	pH 1,2 / pH 4,5 / pH 6,8
Dönüş hızı	50 rpm
Çözücü hacmi	900 µL
Sıcaklık	37 ± 0,5 °C
Numune alma aralıkları	5, 10, 15, 20 ve 30. dk

Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler ve deneme formülasyon

Bölüm 3.2.5’te verilen risk analizi sonuçlarına göre CQA olarak kaydırıcı, bağlayıcı ve dağıtıcı kullanımı; CPP olarak ise karıştırma ve lubrikasyon işlemi seçildi. Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen geçimlilik sonuçlarına göre kullanılacak kaydırıcı, bağlayıcı ve dağıtıcı özellikteki maddeler seçildi. Formülasyon çalışmalarında kullanılan yardımcı maddelerin listesi Çizelge 3.10’da verilmektedir:

Çizelge 3.10. Formülasyon tasarımlarında kullanılacak yardımcı maddeler

Yardımcı madde	Fonksiyon	Genel kullanım yüzdesi*
Mikrokristal selüloz	Seyreltici, dağıtıcı	20-90
Krospovidon	Dağıtıcı	2-5
Gliseril distearat	Kaydırıcı	1-3
Prejelatinize nişasta	Seyreltici, dağıtıcı, bağlayıcı	5-75
Sodyum bikarbonat	Tamponlama ajanı, stabilizan	10-40
Hidroksipropil selüloz	Bağlayıcı, stabilizan	2-6

*Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition

Deney tasarımına geçmeden önce seçilen yardımcı maddeler ile ideal olmayan koşullarda hazırlanan Deneme bir tablet formülasyonunun kalite testleri yapılarak bir ön bilgi elde edilmesi amaçlandı. Deneme formülasyon Çizelge 3.11’de verilmektedir:

Çizelge 3.11. Deneme formülasyon

Formülasyon bileşenleri	%	Birim formül (mg/tb)
Amlodipin besilat	4,34	6,94
Enalapril maleat	6,250	10
Sodyum bikarbonat	20	32
Hidroksipropil selüloz	0,5	0,8
Mikrokristal selüloz	51,41	82,3
Prejelatinize nişasta	12,5	20
Krospovidon	3	4,8
Gliseril distearat	2	3,2
TOPLAM	100	160

Deneme formülasyonunun hazırlanmasında lubrikan dahil tüm maddeler elenerek birlikte kübik karıştırıcıda 12rpm hızla 7 dk karıştırıldı ve en kötü senaryonun elde edilmesi için lubrikasyon işlemi ayrıca yapılmadı. Toz karışımı toplam 24 g (200 tablet) ölçekte

hazırlandı. Hazırlanan toz karışım tablet ağırlığı 160 mg olacak şekilde basıldı. Rutin tablet üretim yöntemleri için kısa olan bu karıştırma süresi ile gerçekleştirilen kalite kontrol testlerinin sonuçlarına göre DOE’de kullanılacak proses parametreleri için ön bilgi elde edildi.

DOE’de kullanılan formülasyonlar ve üretim yöntemi

Formülasyonlar etkin madde olarak 6,94 mg amlodipin besilat (%4,34) ve 10 mg enalapril maleat (%6,25) ihtiva etmektedir. Deneme formülasyon sonuçlarına (Bölüm 4.4.2) göre yardımcı madde kullanım oranları Çizelge 3.12’de verilmektedir:

Çizelge 3.12. Seçilen yardımcı maddelerin formülasyonda kullanım yüzdeleri

Yardımcı madde	Fonksiyon	Formülasyonda kullanım yüzdesi*
Mikrokristal selüloz	Seyreltici, dağıtıcı	40-62
Krospovidon	Dağıtıcı	1-5
Gliseril distearat	Kaydırıcı	1-3
Prejelatinize nişasta	Seyreltici, dağıtıcı, bağlayıcı	5-20
Sodyum bikarbonat	Tamponlama ajanı, stabilizan	20
Hidroksipropil selüloz	Seyreltici, stabilize edici, bağlayıcı	0-1

* Deney tasarımına göre değişkenlik göstermektedir.

Tabletler hazırlanırken kullanılan üretim yöntemi aşağıda basamaklar halinde sunulmaktadır:

- Enalapril maleat ve sodyum bikarbonat 2 dk karıştırıldı.
- Amlodipin besilat ve varsa hidroksipropil selüloz tartılarak yukarıdaki karışımın üzerine eklendi ve 2 dk daha karıştırıldı.
- Daha sonra mikrokristal selüloz, krospovidon ve prejelatinize nişasta yukarıdaki karışım ile birlikte 18 mesh elekten elendi.
- Toz karışımı kübik karıştırıcıda tasarımda belirtilen süre ve hızda karıştırıldı.
- Kaydırıcı elenerek (40 mesh) kübik karıştırıcıya alındı ve tasarımda belirtilen süre ve hızda karıştırıldı (lubrikasyon).
- Toz karışımı tablet makinasının besleme haznesine dolduruldu ve ortalama 160 mg ağırlık ve ortalama 45 N sertlik olacak şekilde basıldı.
- Her formülasyon 300 tabletlik (48 g) seri boyutu ile hazırlandı.

Tabletlerde yapılan kalite denetimleri

Hazırlanan tabletlerde Bölüm 3.2.5'te verilen tasarımlarda yer alan bağımlı değişkeni (yanıt) oluşturan kontroller gerçekleştirildi. Optimize edilen final formülasyonda ise referans ürünlerde yapılan tüm kontroller yapıldı.

3.2.5. QbD aşamaları

Hedef ürün kalite profilinin (Quality of target product profile, QTPP) belirlenmesi

Ürünün kalitesi ile ilgili özellikleridir. Ürünün etkinliği ve güvenliğinin sağlanması amaçlanır. Geliştirilecek ürüne ait hedef kalite profili Çizelge 3.13'te verilmektedir:

Çizelge 3.13. Hedef ürün kalite profili (QTPP)

QTPP Elementleri	Hedef	Gerekçelendirme
Dozaj şekli	Tablet	Farmasötik eşdeğerlik* gerekliliği: Referans ürünler ile aynı dozaj formu
Dozaj tasarımı	Hemen salım yapan SDK tablet	Farmasötik eşdeğerlik* gerekliliği: Referans ürünler ile benzer salım özellikleri
Uygulama yolu	Oral	Farmasötik eşdeğerlik* gerekliliği: Referans ürünler ile aynı uygulama yolu
Dozlar	5 mg amlodipin ve 10 mg enalapril maleat	Farmasötik eşdeğerlik* gerekliliği: Referans ürünler ile aynı doz
Bitmiş ürün kalite özellikleri • Miktar tayini • İçerik tekdüzeliği • Çözünme hızı	• % 90-110 • Farmakope standartlarına uymalı • pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında 15 dk'da en az %85 çözünmeli	

Kritik kalite özelliklerinin (Critical quality attributes, CQA) belirlenmesi

QTPP'ye ulaşmak için hammaddelerin veya bitmiş ürünün taşınması gereken özelliklerdir. Geliştirilecek ürüne ait CQA Çizelge 3.14'te sunulmaktadır:

Çizelge 3.14. Kritik kalite özellikleri (CQA)

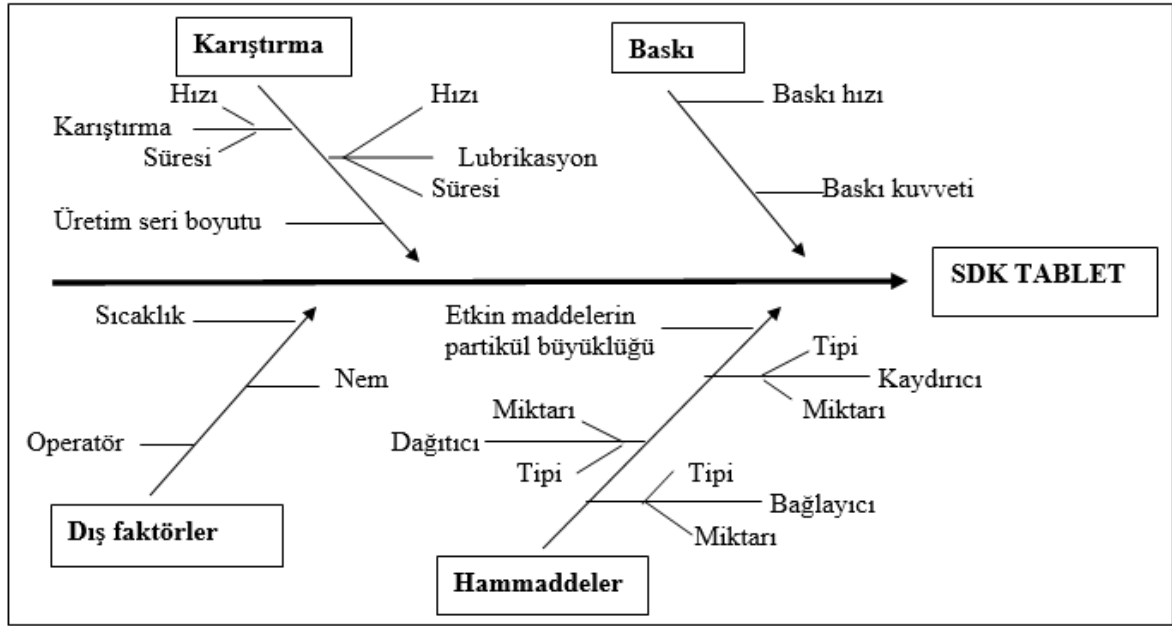
Ürünün kalite özellikleri	Hedef	Kritik mi?	Gerekçeleştirme
Fiziksel özellikler: Friabilite Sertlik Dağılma	%1'den fazla olmamalı 45 N olmalı ($\pm$ %10) 5 dakika içinde dağılmalı	Evet Evet* Evet	Etkinlik ve güvenliği doğrudan etkilemez. Ancak sağlam tabletlerin hazırlanması ürünün performansını ve kalitesini etkileyebilir.
Miktar tayini	Etikette belirtilen değeri karşılamalı ($\pm$ %10)	Evet	Biyoyararlanım, dolayısıyla etkinliği etkiler.
İçerik tekdüzeliği	Farmakope standartlarına uymalı	Evet	Etkinlik ve güvenliği doğrudan etkiler. Formülasyon ve proses parametrelerinden etkilenebilir.
Çözünme hızı	pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında 15 dakika içerisinde %85'ten fazla çözünmeli	Evet	Biyoyararlanımı ve etkinliği doğrudan etkiler. Hem proses hem de formülasyon değişkenliklerinden etkilenebilir.

*Sertlik de diğer fiziksel özellikler kadar önemlidir. Ancak geliştirilen formülasyonlarda sabit tutularak kritik olmaktan çıkartıldı.

Risk değerlendirmesi

Ishikawa (balık kılçığı) diyagramı

Belirlenen CQA'leri etkileyebilecek etmenlere ait Ishikawa diyagramı Şekil 3.1'de verilmektedir:



Şekil 3.1. CQA'leri etkileyebilecek etmenlerin yer aldığı Ishikawa diyagramı

Ishikawa diyagramında yer alan etmenlerin ilk risk değerlendirmesi Çizelge 3.15'te sunulmaktadır:

Çizelge 3.15. Olası faktörlere ait başlangıç risk değerlendirmesi

Faktör	Risk değerlendirmesi
Etkin ve Yardımcı maddeler	Etkin maddelerin partikül büyüklüğü BCS Sınıf 2 ilaçların biyoyararlanımını etkilerken, BCS Sınıf 1 ve 3 ilaçlar için kritik rol oynamamaktadır. Formülasyonda kullanılan amlodipin BCS Sınıf 1, enalapril ise BCS Sınıf 3 ilaçtır.
	Kaydırıcı olarak magnezyum stearat, sodyum stearil fumarat ve gliseril distearat gibi farklı kaydırıcıların kullanılması planlanmış ancak geçimlilik çalışmaları sonucunda yalnızca gliseril distearat kullanımı uygun görülmüştür. Bu nedenle kaydırıcı olarak gliseril distearat seçilerek farklı oranlarda kullanıldı.
	Dağıtıcı olarak bir süperdağıtıcı olan krospovidon ve yine dağıtıcı özellik de taşıyan prejelatinize nişasta çeşitli oranlarda kullanıldı.
	Bağlayıcı olarak hidroksipropil selüloz bazı formülasyonlarda (%1) kullanıldı ancak bazılarında kullanılmadı. Prejelatinize nişastanın aynı zamanda bağlayıcı fonksiyonu da bulunmaktadır.
Üretim prosesi	Degradasyonu önlemek için doğrudan basım tekniği kullanıldı.
	Karıştırma süresi ve hızı tekdüze bir karışımı sağlayacak kadar yüksek ancak segregasyona neden olmayacak kadar da düşük olmalıdır. Bu proses kritik olduğundan hem karıştırma süresi, hem de hızı incelendi.
	Kaydırıcı ile karıştırma (lubrikasyon) süresi ve hızı arttıkça tabletin çözünmesi ve dolayısıyla biyoyararlanımı azalabilir. Bu nedenle lubrikasyon süresi ve hızı da değerlendirildi.
	Tabletlerin seri boyutu, geliştirilen formülasyonun büyük ölçeğe transferinde önemli bir parametredir ancak bu çalışmada bu parametre incelenmedi.
	Tablet baskı kuvveti ve hızı dağılmayı ve çözünmeyi etkileyebilir ancak bu faktör üretilen tabletlerin sertliğinin standardize edilmesiyle (45 N $\pm$ %10) minimize edildi.
	Üretim prosesi sıcaklık ve nemden etkilenebilir. Havalandırma ile oda sıcaklığı sabit tutulmuştur. Çalışmanın gerçekleştirildiği ortamda nem değişkenliği oluşturacak bir risk bulunmamaktadır. Operatör değişikliği ise bu çalışma için uygulanabilir değildir.

Seçilen risk parametrelerinin etki şiddetinin gösterilmesinde neden-sonuç matrisinden yararlanıldı. Sonuçlar Çizelge 3.16'da verilmektedir. Bu matrislerde yüksek riskli olarak işaretlenenler kabul edilemez riskler olup, azaltılması gerekmektedir. Orta olarak tanımlanmış olanlar ise kabul edilebilir riskler olup ilave araştırma veya gerekçelendirme gerektirebilmektedir. Düşük riskli olanlar ise olduğu gibi kabul edilmektedir.

Çizelge 3.16. Yardımcı maddelerin risk değerlendirmesine ait neden-sonuç matrisi.

	Dağıtıcı	Bağlayıcı	Kaydırıcı	Karıştırma	Lubrikasyon
İçerik tekdüzeliği	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek	Düşük
Miktar tayini	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek	Düşük
Çözünme	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek
Friabilite	Orta	Düşük	Düşük	Düşük	Orta
Dağılma	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Yüksek

Çizelge 3.16’da orta ve yüksek risk teşkil eden parametreler değerlendirmeye alındı. Buna göre dağıtıcı, bağlayıcı ve kaydırıcı miktarı CMA olarak; karıştırma ve lubrikasyon süresi ve hızı ise CPP olarak belirlendi.

Deney Tasarımı (Design of Experiments, DOE)

Başlangıç risk değerlendirmesi sonucu seçilen faktörler karıştırma hızı, karıştırma süresi, lubrikasyon hızı, lubrikasyon süresi, krospovidon (dağıtıcı) miktarı, hidroksipropil selüloz (bağlayıcı) miktarı, prejelatinize nişasta (bağlayıcı, dağıtıcı, seyreltici) miktarı ve gliseril distearat (kaydırıcı) miktarıdır. Yardımcı maddelerin tipi geçimlilik testleri sonucunda belirlendiği için eksipiyan tipleri yerine, miktarlarının etkisi araştırıldı.

Faktör sayısının yüksek olması dolayısıyla öncelikle bir eleme tasarımı yapılarak en etkili faktörlerin tespit edilmesine karar verildi.

Plackett-Burman deney tasarımı

Risk değerlendirmesi sonucu seçilen bağımsız değişkenlerin CQA’ler üzerinde anlamlı etki oluşturup oluşturmadığını incelemek için eleme tasarımlarından olan PBD’den faydalanıldı. Toplam 12 deney ile 8 faktör incelendi. Seçilen faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.17’de verilmektedir:

Çizelge 3.17. PBD’de kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler		Düşük seviye (-1)	Yüksek seviye (+1)
X ₁	Prejelatinize nişasta (%)	5	20
X ₂	Krospovidon (%)	1	5
X ₃	Hidroksipropil selüloz (%)	0	1
X ₄	Gliseril distearat (%)	1	3
X ₅	Karıştırma hızı (rpm)	8	16
X ₆	Karıştırma süresi (dk)	8	20
X ₇	Lubrikasyon hızı (rpm)	8	16
X ₈	Lubrikasyon süresi (dk)	2	8
X ₉	Dummy	-1	+1
X ₁₀	Dummy	-1	+1
X ₁₁	Dummy	-1	+1

Design Expert® 11 kullanılarak oluşturulan deney matrisi Çizelge 3.18’de verilmektedir.

Çizelge 3.18. PBD deney matrisi

No	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	5,00	1,00	0,00	3,00	16,00	20,00	8,00	8,00
2	20,00	5,00	0,00	3,00	8,00	8,00	8,00	8,00
3	5,00	1,00	1,00	3,00	16,00	8,00	16,00	8,00
4	5,00	1,00	0,00	1,00	8,00	8,00	8,00	2,00
5	5,00	5,00	0,00	1,00	8,00	20,00	16,00	8,00
6	20,00	1,00	1,00	3,00	8,00	20,00	8,00	2,00
7	20,00	1,00	1,00	1,00	8,00	8,00	16,00	8,00
8	5,00	5,00	1,00	1,00	16,00	8,00	8,00	2,00
9	20,00	1,00	0,00	1,00	16,00	20,00	16,00	2,00
10	20,00	5,00	0,00	3,00	16,00	8,00	16,00	2,00
11	5,00	5,00	1,00	3,00	8,00	20,00	16,00	2,00
12	20,00	5,00	1,00	1,00	16,00	20,00	8,00	8,00

Bölüm 3.2.5’te anlatıldığı şekilde hazırlanan tabletler Çizelge 3.18’deki matriste belirtilen şekilde basıldı. Tabletler üzerinde tasarımda yanıt (bağımlı değişken) olarak seçilen içerik tekdüzeliği, miktar tayini, 3 farklı ortamda 15. dakikadaki çözünme yüzdesi, friabilite ve dağılma süresi testleri gerçekleştirilerek sonuçlar grafikler yardımıyla değerlendirildi.

Box-Behnken deney tasarımı

PBD ile yanıtlar üzerinde etkisi en yüksek olan üç faktör seçilerek BBD ile optimum koşulların sağlanması amaçlandı. BBD’de kullanılan faktörler ve düzeyleri Çizelge 3.19’da verilmektedir. Krospovidon ve gliseril distearat düzeyleri PBD ile aynıdır, ancak karıştırma süresi daha geniş bir aralıkta değerlendirildi.

Çizelge 3.19. BBD’de kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler		Düşük seviye	Orta seviye	Yüksek seviye
X ₂	Krospovidon (%)	1	2,5	5
X ₄	Gliseril distearat (%)	1	2	3
X ₆	Karıştırma süresi (dk)	5	12,5	20

PBD tasarımıda anlamlı bulunmayan faktörler BBD’de sabit tutuldu. Bu faktörlerin sabitlendiği değerler Çizelge 3.20’de verilmektedir:

Çizelge 3.20. PBD tasarımıda değişken iken BBD’de sabit tutulan faktörler ve düzeyleri

Faktörler		Düzy
X ₁	Prejelatinize nişasta (%)	15
X ₃	Hidroksipropil selüloz (%)	0,5
X ₅	Karıştırma hızı (rpm)	12
X ₇	Lubrikasyon hızı (rpm)	12
X ₈	Lubrikasyon süresi (dk)	5

Seçilen 3 faktör ile 3 seviyeli ve 5 merkez noktası içeren toplam 17 deney gerçekleştirildi. BBD deney matrisi Çizelge 3.21’de sunulmaktadır:

Çizelge 3.21. BBD deney matrisi

No	X ₂	X ₄	X ₆
1	1	2	20
2	5	1	12,5
3	5	3	12,5
4	3	2	12,5
5	5	2	5
6	3	3	5
7	3	2	12,5
8	3	2	12,5
9	3	1	20
10	3	2	12,5
11	3	1	5
12	1	2	5
13	3	3	20
14	1	3	12,5
15	5	2	20
16	3	2	12,5
17	1	1	12,5

Çizelge 3.21’de verilen matrise göre oluşturulan formülasyonlarda yanıt olarak miktar tayini, içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı, friabilite ve dağılmaya bakılmıştır. Her bir yanıt için anlamlılık değerlendirilmesi yapılarak sonuçlar grafiksel ve istatistiksel olarak değerlendirildi. 3 faktör için ikinci dereceden polinomiyal BBD denklemi Eş.3.1’de verilmektedir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte, Y yanıtı, X₁-X₃ faktörlerin ana etkilerini, X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃ faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimlerini, X₁₁, X₂₂, X₃₃ faktörlerin kuadratik etkileşimlerini, β_0 sabiti ve β_1 - β_3 ise faktörlerin katsayılarını göstermektedir.

BBD deney sonrası Design Expert® 11 yardımıyla optimizasyon işlemi gerçekleştirildi ve seçilen optimum koşullarda hazırlanan tabletlerde kalite denetimleri yapıldı.

3.2.6. Final formülasyonda yapılan safsızlık tayinleri

Optimize edilen final formülasyonda Bölüm 3.2.4'te verilen kalite denetimlerine ek olarak amlodipin besilat ve enalapril maleat ait safsızlık tayinleri de yapıldı¹.

Enalapril maleatın safsızlık tayin metodu

Enalapril maleatın safsızlıklarının tespitinde HPLC yöntemi kullanıldı. Yönteme ait kromatografik koşullar aşağıda verildi:

Cihaz	: HPLC
Kolon	: L7 içeren kolon, 4,6 mm x 25 cm, 5 µm
Dalga boyu	: 215 nm
Kolon sıcaklığı	: 50°C
Akış hızı	: 2 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 50 µL
Mobil faz	: Tampon çözelti:Asetonitril (75:25)

Tampon Çözelti: 1,38 g monobazik sodyum fosfat 800 mL saf suda çözüldü. Fosforik asit ile pH 2,2'ye ayarlandı.1000 mL'ye saf su ile seyrelti ve karıştırıldı.

Enalaprilat standart çözeltisi: 0,4 mg/mL konsantrasyonda enalaprilat referans standardı saf su ile hazırlandı.

Enalapril diketopiperazin çözeltisi: 20 mg enalapril maleat referans standardı 100 mL'lik beherin dibine dikkatlice tepe şeklinde yerleştirildi. Beher katı maddeyi eritmek üzere ısıtıcıya yerleştirildi. Isıtıcı ayarı yarım açıldı. Erime gözlemlendiğinde hemen beher ısıtıcıdan çekilerek soğutuldu. Soğutulan artığa 50 mL asetronitril eklenerek 5 dk ultrasonik banyoda tutuldu.

Standart Çözelti: 20 mg enalapril maleat referans standardı 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 0,5 mL enalaprilat standart çözeltisi ilave edildi. 50 mL tampon çözelti

¹ Safsızlık tayinleri Nobel ilaç Ar-Ge Merkezinde gerçekleştirildi.

ile çözüldü. Tampon çözelti ile hacmine seyreltildi. Bu çözelti 0,2 mg/mL enalapril maleat referans standardı ve 0,002 mg enalaprilat referans standardı içermektedir.

Safsızlık standart çözeltisi: 1 mL standart çözelti 100 mL'ye tampon çözelti ile seyreltilerek karıştırıldı. Bu çözelti 0,002 mg/mL enalapril maleat içermektedir.

Sistem uygunluk çözeltisi: 0,5 mL enalapril diketopiperazin çözeltisi 25 mL'lik balon jode standart çözelti ile hacmine seyreltilerek karıştırıldı.

Test çözeltisi: Minimum 20 tablet üzerinden ortalama ağırlık tayin edildi. 100 mg enalapril maleata eşdeğer toz karışımı tartılarak 500 mL'lik balon jodeye alındı. Balon jodeye yarısına kadar tampon çözelti eklenerek 15 dk ultrasonik banyoda tutuldu. Mekanik karıştırıcıda 30 dk karıştırıldı. Hacmine tampon çözelti ile seyreltilerek iyice karıştırıldı ve 15 dk ultrasonik banyoda tutuldu. 0,45 µm membran filtreden süzülerek ilk süzüntüler atıldı. Test çözeltisi 0,2 mg/mL enalapril maleat içermektedir.

İşlem: 50 µL standart çözelti, test çözeltisi, ilgili bileşikler çözeltisi ve tampon çözelti ayrı ayrı cihaza enjekte edildi. Kromatogramlar kaydedildi. Test çözeltisinden elde edilen enalapril pik alanının %0,1'inden fazla olan ve tampon çözelti kromatogramında gözlenmemiş tüm pikler değerlendirildi.

Relatif alıkonma zamanları aşağıdaki gibi belirlendi:

Maleik asit..... ≈ 0.3

Enalaprilat..... ≈ 0.5

Enalapril diketopiperazin..... ≈ 1.5

Fazla ısıtmadan dolayı enalapril diketopiperazinin degradasyon ürünü oluşmuş ise yaklaşık 1,2 relatif alıkonma zamanında pik verir. Bu pikin alanı enalapril diketopiperazin pik alanının %15'inden büyük olmaması istendi.

% Enalaprilat miktarı (enalapril maleat olarak) Eş. 3.2 yardımıyla hesaplandı.

$$\frac{M_{EM} \times C_{ST} \times R_N}{M_{SE} \times C_N \times R_S} \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte, M_{EM} , enalapril maleatın molekül ağırlığı (492,53 Da); M_{SE} , susuz enalaprilatın molekül ağırlığı; C_{ST} , standart çözeltideki enalaprilat referans standardının konsantrasyonu (mg/mL); C_N , test çözeltisindeki enalapril maleat konsantrasyonu (mg/mL); R_N , test çözeltisinden elde edilen enalaprilat pik alanı; R_S , standart çözeltiden elde edilen enalaprilat pik alanını ifade etmektedir.

% Diketopiperazin miktarı (enalapril maleat olarak) ise Eş. 3.3 yardımıyla hesaplandı.

$$\frac{M_{EM} \times C_{ST} \times R_N}{M_D \times C_N \times R_S} \times \frac{100}{1,25} \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte, M_{EM} , enalapril maleatın molekül ağırlığı (492,53 Da); M_D , enalapril diketopiperazinin molekül ağırlığı; C_{ST} , standart çözeltideki enalaprilat referans standardının konsantrasyonu (mg/mL); C_N , test çözeltisindeki enalapril maleat konsantrasyonu (mg/mL); R_N , test çözeltisinden elde edilen enalapril diketopiperazin pik alanı; R_S , ilgili bileşikler standart çözeltisinden elde edilen enalapril pik alanını; 1,25 değeri ise enalapril maleatın enalapril diketopiperazine relatif cevap faktörünü ifade etmektedir.

Diğer ilgili bileşikler ise Eş. 3.4 ile hesaplandı.

$$\frac{C_{ST} \times R_N}{C_N \times R_S} \times 100 \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte, C_{ST} , standart çözeltideki enalaprilat referans standardının konsantrasyonu (mg/mL); C_N , test çözeltisindeki enalapril maleat konsantrasyonu (mg/mL); R_N , test çözeltisinden elde edilen maleik asit, enalaprilat ve enalapril diketopiperazin dışında elde edilen diğer ilgili bileşikler pik alanları toplamı; R_S , ilgili bileşikler standart çözeltisinden elde edilen enalapril pik alanını ifade etmektedir.

Spesifikasyon

USP’de enalapril tabletler için toplam impürite değeri en fazla %5 olarak belirtilmiştir.

Amlodipin besilatın safsızlık tayin metodu

Amlodipin besilatın safsızlıklarının tespitinde Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) kullanıldı. Yönteme ait kromatografik koşullar aşağıda verildi:

Cihaz	: UPLC (H-CLASS)
Kolon	: Acquity UPLC BEH C18 1,7 mm; 2,1 x 50 mm
Dalga boyu	: 238 nm
Kolon sıcaklığı	: 50°C
Numune sıcaklığı	: 10°C
Akış hızı	: 0,4 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 5 µL
Akış süresi	: 8 dk
Mobil faz	: Tampon çözelti:Metanol (50:50)
Seyreltme çözeltisi	: Mobil faz

Tampon çözelti: 2.3 g/L’lik amonyum asetat çözeltisi hazırlandı.

Standart çözelti: 100 mL’lik balon jojeye 13,9 mg amlodipin besilat standardı tartıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dk bekletildi. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 100 mL’lik balon jojeye 1,0 mL alınarak hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Bu çözelti 0,001 mg/mL amlodipin içermektedir.

Test çözeltisi: En az 20 tablet tartılarak ortalama tablet ağırlığı belirlendi ve tabletler toz edildi. 10 mg amlodipine eşdeğer tablet tozu 20 mL’lik balon jojeye alındı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dk karıştırıldı. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 0,45 µm membran filtreden süzüldü. Bu çözelti 0,5 mg/mL amlodipin içermektedir.

Sistem uygunluk çözeltisi: 5 mL'lik balon jojeye 5 mg amlodipin besilat standardı tartıldı. Üzerine 5 mL %30'luk hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 2 dk tamamen çözünene kadar bekletildi. Bu çözelti 70°C'lik etüvde 10 dk bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığında soğutularak 0,45 µm membran filtreden süzüldü.

İşlem: Seyreltme çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözelti (3 enjeksiyon), test çözeltileri ve sistem uygunluk çözeltisi hazırlanarak cihaza enjeksiyon yapıldı. Kromatogramlar kaydedildi. Plasebodan gelen pikler, tayin limitinin altındaki pikler ve test çözeltisindeki amlodipine göre bağıl alıkonma zamanı ≈ 0.15 olan benzen sülfonat piki ihmal edildi. Bunların dışında, test çözeltisinden elde edilen safsızlıklar hesaplandı.

Relatif alıkonma zamanları aşağıdaki gibi belirlendi:

Amlodipin impürite D..... ≈ 0.50

% amlodipin impürite D, Eş. 3.5 yardımıyla hesaplandı.

$$\frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s \times P \times (100 - S_i)}{100 \times 100 \times 100} \times \frac{M_w \times 20}{W_t \times 5} \times 100 \times 0,72 \times DF \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte, A_t , test çözeltisinden elde edilen amlodipin impürite D alanını; A_s , standart çözeltiden elde edilen amlodipin alanını; W_s , standart çözeltisindeki amlodipin miktarını (mg); P , standardın potensini; S_i , standardın su içeriğini; M_w , ortalama tablet ağırlığını (mg); W_t , test çözeltisinin ağırlığını (mg); 5, tabletlerin teorik amlodipin içeriğini (mg); 0,72, amlodipin besilatı amlodipine dönüştürme faktörünü ve DF , ilgili safsızlığın düzeltme faktörünü (1,72) ifade eder.

Bilinmeyen her bir safsızlık ise Eş. 3.6 ile hesaplandı.

$$\frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s \times P \times (100 - S_i)}{100 \times 100 \times 100} \times \frac{M_w \times 20}{W_t \times 5} \times 100 \quad (3.6)$$

Bu eşitlikte, A_t , test çözeltisinden elde edilen safsızlık alanını; A_s , standart çözeltiden elde edilen amlodipin alanını; W_s , standart çözeltisindeki amlodipin miktarını (mg); P , standardın potensini; S_i , standardın su içeriğini; M_w , ortalama tablet ağırlığını (mg); W_t , test çözeltisinin ağırlığını (mg); 5, tabletlerin teorik amlodipin içeriğini (mg) ifade eder.

Spesifikasyon

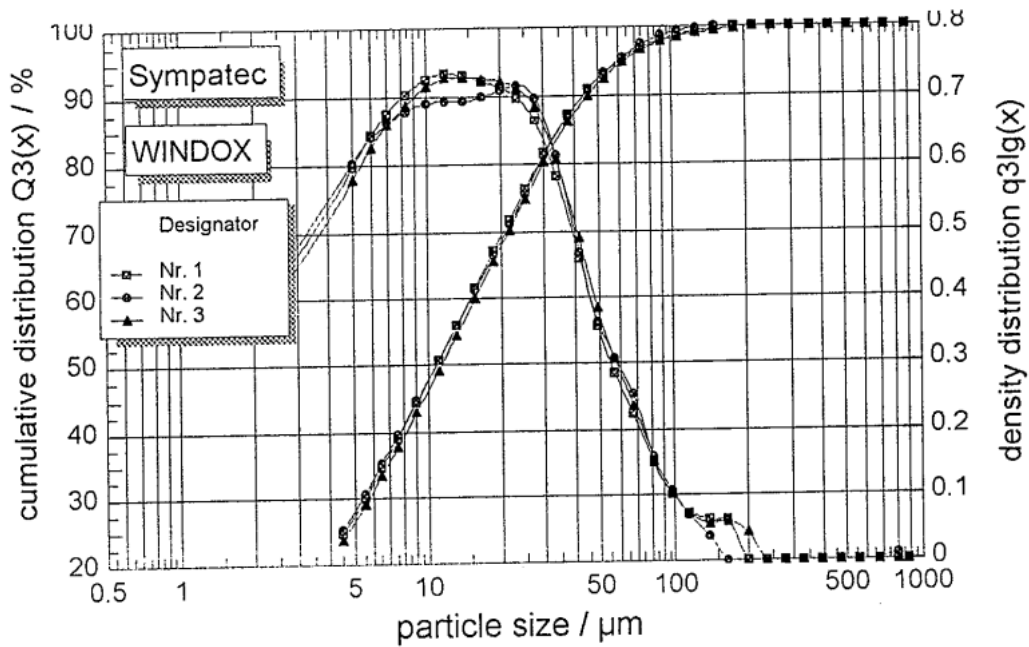
USP’de amlodipin tabletler için amlodipin impürite D en fazla %1, bilinmeyen safsızlık ise en fazla %0,20 olarak belirtilmiştir.

4. BULGULAR

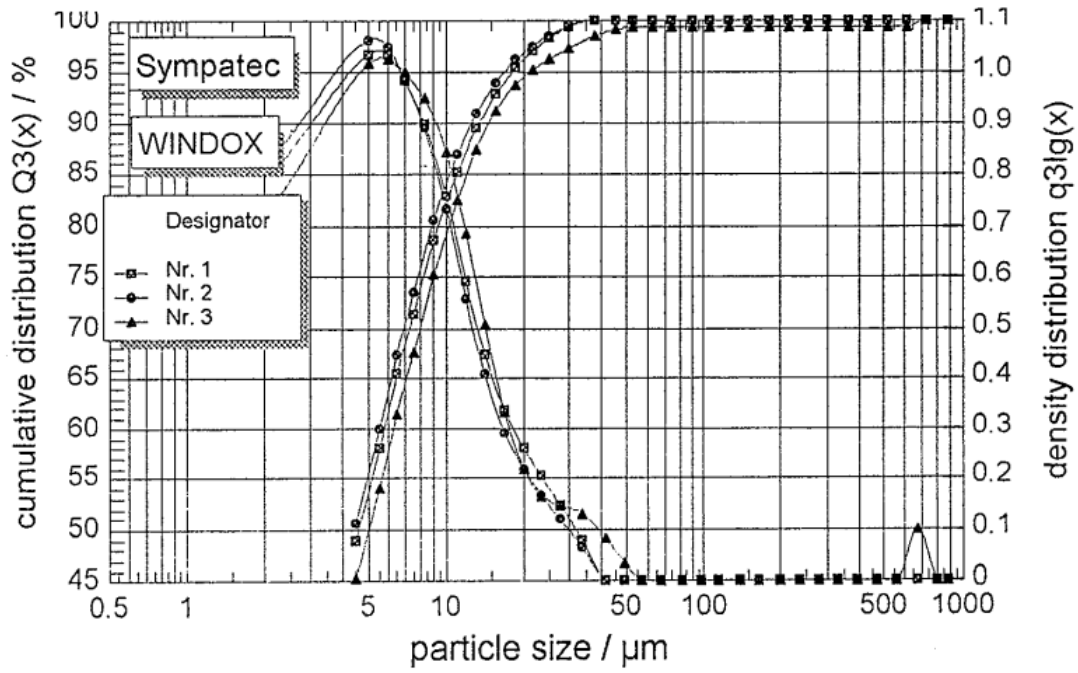
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

4.1.1. Etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen partikül büyüklüğü ölçümünde amlodipin besilatın ortalama partikül büyüklüğü $11,03 \pm 0,32 \mu\text{m}$; enalapril maleatın partikül büyüklüğü ise $4,72 \pm 0,30 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmektedir:



Şekil 4.1. Amlodipin besilatın partikül büyüklüğü ve dağılımı



Şekil 4.2. Enalapril maleatın partikül büyüklüğü ve dağılımı

4.1.2. Etkin maddelerin çözünürlük çalışmaları

Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen ve uygun oranlarda seyreltilerek Bölüm 3.2.3’te verilen yöntemler ile analiz edilen çözünürlük sonuçları amlodipin besilat ve enalapril maleat için sırasıyla Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de sunulmaktadır:

Çizelge 4.1. Amlodipin besilatın çözünürlük ve D_0 değerleri

Çözünme Ortamı	Çözünürlük (mg/mL) $\pm$ SS		$D_0 \pm SS$
	24. saat	48. saat	
pH 1,2	$3,46 \pm 0,72$	$3,78 \pm 0,60$	$0,0150 \pm 0,0026$
pH 4,5	$2,28 \pm 0,58$	$2,95 \pm 0,08$	$0,0188 \pm 0,0005$
pH 6,8	$4,94 \pm 0,25$	$4,71 \pm 0,07$	$0,0117 \pm 0,0002$

* D_0 değerleri 48. saate göre hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Enalaprilin çözünürlük ve D₀ değerleri

Çözünme Ortamı	Çözünürlük (mg/mL) ± SS		D ₀ ± SS*
	24. saat	48. saat	
pH 1,2	26,5 ± 0,6	26,7 ± 1,0	0,00301 ± 0,00011
pH 4,5	20,3 ± 2,4	25,2 ± 1,0	0,00318 ± 0,00013
pH 6,8	21,9 ± 0,2	23,6 ± 0,3	0,00339 ± 0,00036

*D₀ değerleri 48. saate göre hesaplanmıştır.

D₀ değerleri tüm ortamlarda 1'den küçük olduğu için her iki etkin madde de tüm ortamlarda yüksek çözünürlük göstermektedir.

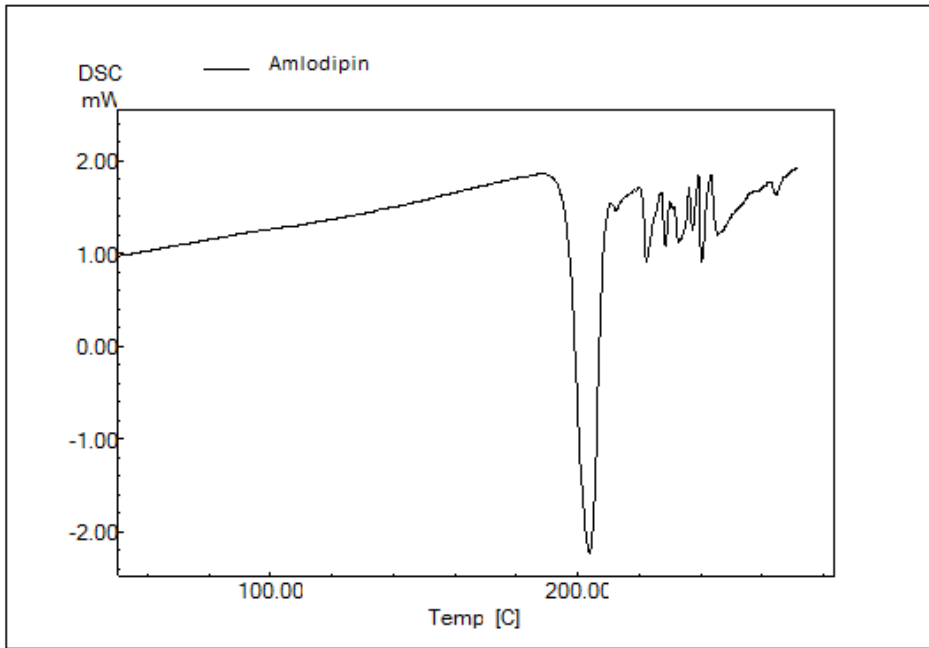
4.1.3. Etkin maddelerin birbirleriyle geçimlilik çalışmaları

Sabit dozlu kombinasyonları hazırlanmasında en önemli nokta kullanılan etkin maddelerin birbirleri ile ve yardımcı maddeler ile geçimli olması gerekliliğidir. Hedef tablet formülasyonunun etkin maddeleri olan amlodipin besilat ve enalapril maleat arasında bir etkileşim olup olmadığını görmek için termal analiz yöntemlerinden DSC, TGA, DTA; kromatografik analiz yöntemlerinden İTK ve spektroskopik analiz yöntemlerinden FTIR kullanıldı.

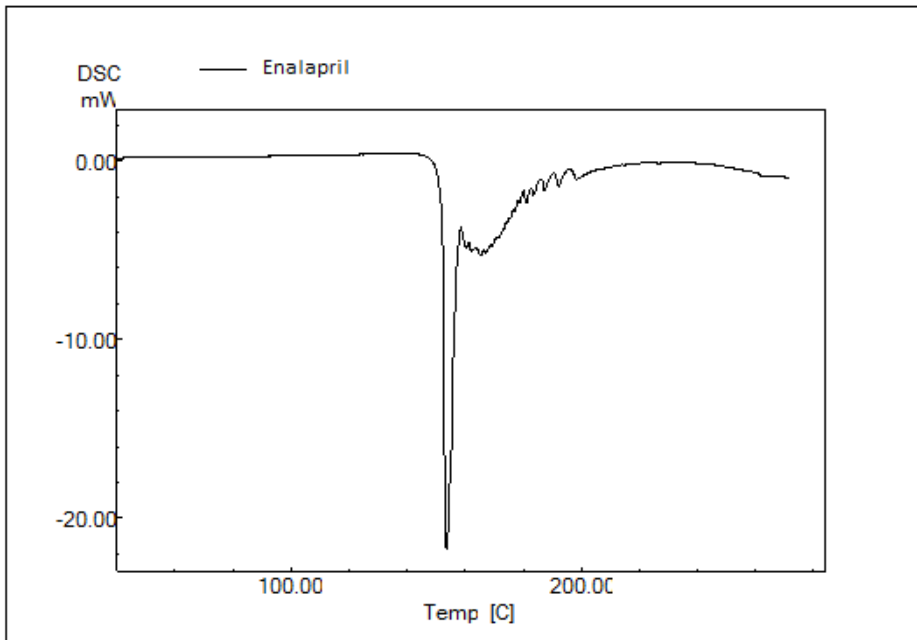
Etkin maddelerin DSC analizleri

Amlodipin besilata ait DSC termogramı Şekil 4.3.'te verilmiştir. Termogramda 196,85 °C ile 208,52 °C arasında endotermik bir pik gözlemlendi. Pikin doruk noktası 203,88 °C'dir. Bu pikin devamında termogramın taban çizgisinde (baseline) gözlenen dalgalanmalar maddenin erimeyi takiben bozulan bir madde olduğunu düşündürmektedir. Bu durum TGA verisi ile değerlendirildi.

Enalapril maleatın DSC termogramı Şekil 4.4.'te verilmiştir. Termogramda 152,36 °C – 156,90 °C arasında endotermik bir pik gözlemlendi. Pikin doruk noktası 153,69 °C'dir. Bu pike bitişik doruk noktası 165,20 °C olan ikinci bir pik daha gözlemlendi. Akabinde termogramın taban çizgisinde (baseline) gözlenen dalgalanmalar maddenin bu sıcaklığın devamında bozunmuş olabileceğini düşündürdü. Bu durum TGA verisi ile değerlendirildi.



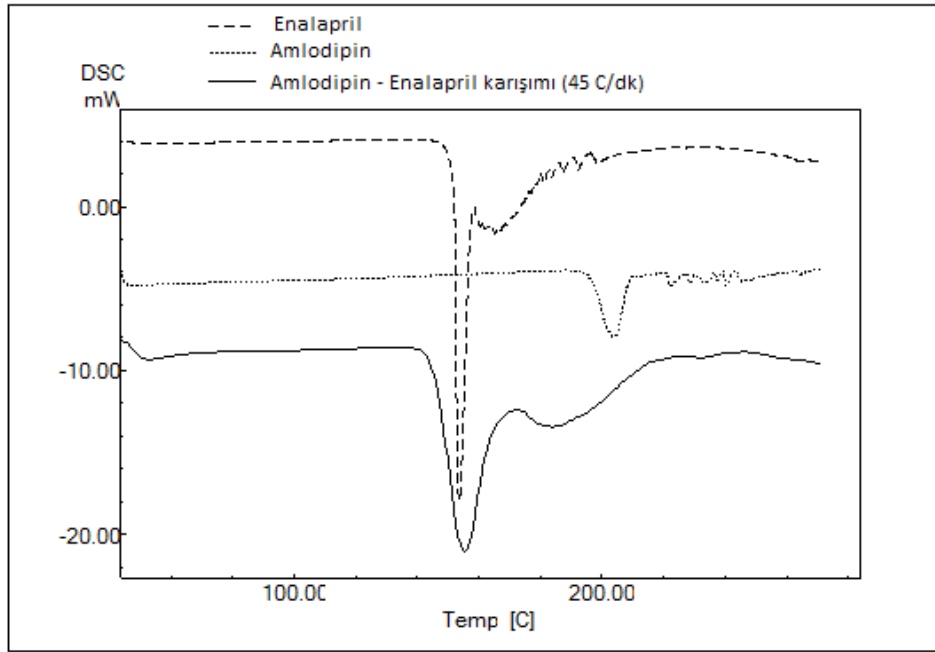
Şekil 4.3. Amlodipin besilata ait DSC termogramı



Şekil 4.4. Enalapril maleata ait DSC termogramı

Amlodipin besilat ve enalapril maleatın 1:1 oranda karıştırılıp 3 hafta süresince birlikte muhafaza edilmesini takiben yapılan DSC analizinde elde edilen termogram ise maddelerin ayrı ayrı termogramları ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.5.'te verilmiştir.

Karışımındaki enalapril piki saf halde gözlenen sıcaklıkta elde edildi. Amlodipin pikinin ise 203,88°C'den, 184,23°C'ye kaydığı gözlemlendi. Amlodipinin saf haldeki sıcaklığına göre 19 °C'lik bir kayma gözlenirse de saf amlodipinin gözlemlendiği 203,88°C, karışımda gözlenen amlodipin pikinin elde edildiği 172,06 °C – 213,88°C aralığı içerisinde yer almaktadır. Literatürde DSC ile yapılan geçimlilik çalışmalarında ilk önce eriyen maddenin, ikinci madde için safsızlık olarak algılanabileceği ve bu nedenle ikinci maddenin erime noktasında düşmeye sebep olabileceği belirtilmektedir (Oliveira, Yoshida, Silva, 2014; Pani, Nath, Acharya, 2011; Reddy, Ramesh, Kishan, 2013). Bu bilgidan hareketle enalaprilin oluşturduğu eriyiğin amlodipin için safsızlık olarak algılanarak amlodipinin daha erken bir sıcaklıkta erimeye başlaması muhtemeldir.

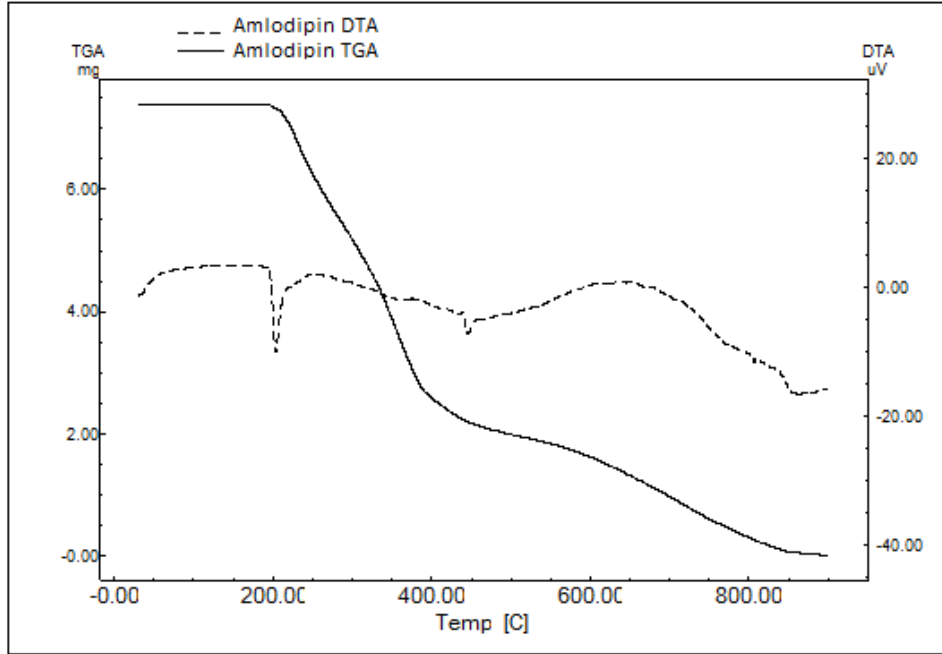


Şekil 4.5. Amlodipin besilat ve enalapril maleatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Etkin maddelerin DTA/TGA analizleri

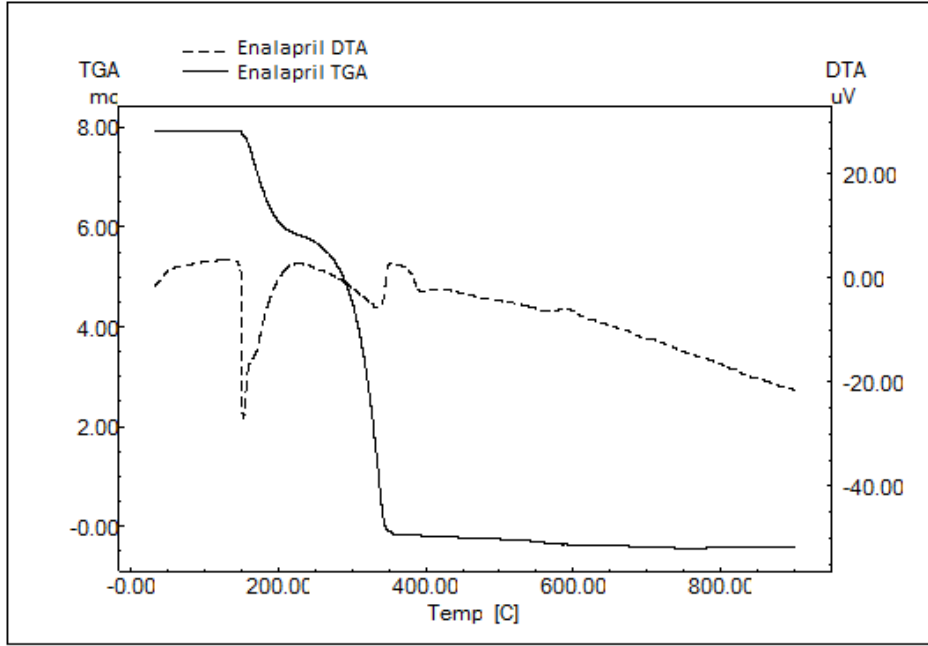
Amlodipin ve enalaprilin DSC analizlerinde gösterdiği endotermik pikleri daha iyi değerlendirebilmek için etkin maddelerin TGA/DTA analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.6'da verilen TGA termogramına bakıldığında amlodipin 210 °C'ye kadar %1,7; 211-386°C arasında %60,5; 386-900°C arasında ise %37,6 oranında kütle kaybına uğradığı gözlemlendi. Bozunmaya başladığı sıcaklık 211°C olarak değerlendirildiğinde, DSC'de 204°C'de gözlenen pikin erime piki olduğu söylenebilir. Bir başka deyişle amlodipin

besilat erimeyi takiben bozunmaya başlamaktadır (Silva ve diğerleri, 2015). DTA eğrisinde bozunmanın başladığı noktada endotermik pikte omuz oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Amlodipin besilata ait TGA/DTA termogramı

Enalapril maleatın TGA/DTA termogramı Şekil 4.7’de verilmiştir. TGA sonuçlarına göre enalapril maleatın 154°C’ye kadar %1,4; 154-196 °C arasında %20,7; 197-282 °C arasında %12,8; 283-344°C arasında %64,8 ve 345-900°C arasında ise %5,8 oranında kütle kaybına uğradığı gözlemlendi. DSC’de 154°C’deki endotermik pik ve DTA piki göz önüne alındığında, enalapril maleatın bozunarak eriyen bir madde olduğu sonucuna varıldı. Bu bilgi literatür ile uyumludur (Tawfeek, Faisal ve Soliman, 2017). Bu bilgiden hareketle enalaprilin DSC termogramında (Şekil 4.4) yanında gözlenen ikinci pikin bozunmaya ait olduğu düşünüldü.



Şekil 4.7. Enalapril maleata ait TGA/DTA termogramı

Etkin maddelerin İTK analizleri

Bölüm 3.2.1’de belirttiği şekilde gerçekleştirilen İTK deneyinde plakalar iyot buharına maruz kaldıktan sonra Şekil 4.8’deki görüntü elde edildi. Şekil 4.8’deki ilk leke amlodipine, ikinci leke ise enalapril aittir. Üçüncü leke ise amlodipin ve enalapril bir arada içeren karışımın plakaya uygulanmasıyla elde edildi. Görüldüğü üzere her madde kendi yerinde lekelenme oluşturdu. Buradan hareketle iki maddenin de karışımda bozunmadan kaldığını, dolayısıyla iki etkin maddenin birbiriyle geçimli olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4.8. Saf amlodipin (A), saf enalapril (E) ve bu iki maddenin karışımının (A+E) metanol:kloroform (1:1) çözücü sistemindeki çözeltilerinin ITK kromatogramı

Etkin maddelerin FTIR analizleri

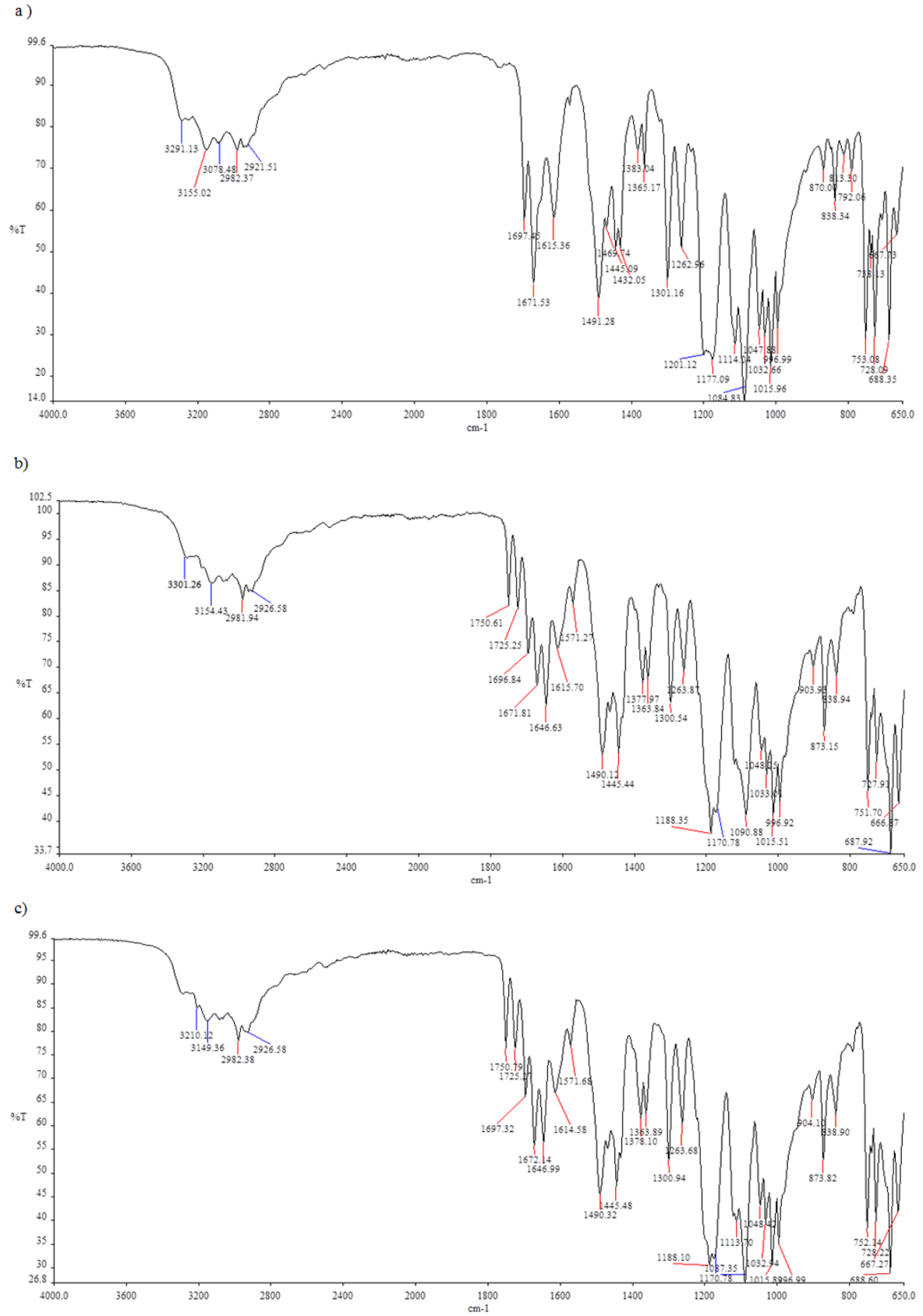
Ham maddelerin geçimliliğinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem FTIR'dır. FTIR çalışmaları Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Amlodipin besilat ve enalapril maleatın IR spektrumlarında gözlenen fonksiyonel grupları sırasıyla Çizelge 4.3. ve 4.4.'te verilmiştir. İki maddenin saf halde ve karışım halindeki IR spektrumları da Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi her iki etkin madde de fonksiyonel gruplarını korumaktadır (Silverstein, Bassler ve Morrill, 1981).

Çizelge 4.3. Amlodipin besilatın fonksiyonel grupları, gözlenen pikler ve amlodipin-enalapril karışımında bu piklerin dalga sayıları

Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm^{-1})	Gözlenen pik (cm^{-1})	
		<i>Amlodipin</i>	<i>Amlodipin-Enalapril</i>
N-H gerilme	3500-3300	3291	3291
C-H gerilme, aromatik	3100-3000	3078	3078
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2982, 2921	2982, 2926
C=O gerilme	1820-1670	1697, 1671	1697, 1672
N-H eğilme	1600	1615	1614
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1490, 1445	1490, 1445
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1300, 1263
C-O gerilme	1150-1070	1114, 1084	1113, 1087

Çizelge 4.4. Enalapril maleatın fonksiyonel grupları, gözlenen pikler ve amlodipin-enalapril karışımında bu piklerin dalga sayıları

Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm^{-1})	Gözlenen pik (cm^{-1})	
		<i>Enalapril</i>	<i>Amlodipin-Enalapril</i>
N-H gerilme	3500-3300	3210	3210
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2981, 2926	2982, 2926
C=O gerilme, asit	1740-1720	1750, 1725	1750, 1725
C=O gerilme, amid	1690-1640	1646	1646
N-H eğilme	1600	1615	1614
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1572, 1490, 1445	1571, 1490, 1445
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1300, 1263
C-O gerilme	1150-1070	1090	1087



Şekil 4.9. Amlodipin (a), enalapril (b) ve amlodipin-enalapril karışımının (c) FTIR spektrumu

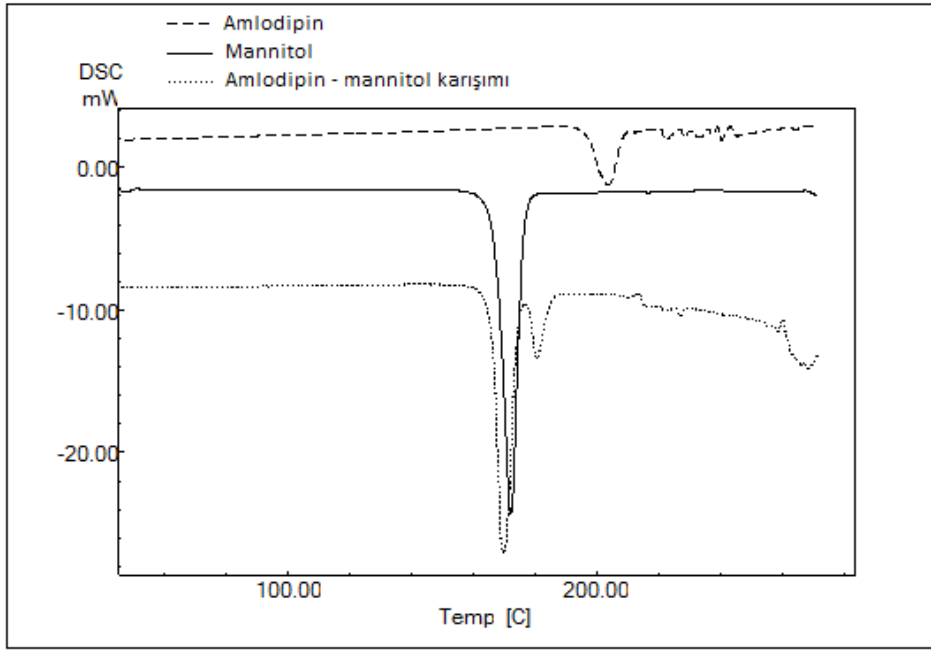
4.1.4. Etkin maddelerin yardımcı maddeler ile geçimlilik çalışmaları

Etkin maddeler ile yardımcı maddelerin DSC analizleri

Formülasyon çalışmalarına geçmeden önce kullanılacak yardımcı maddelerin etkin maddeler ile etkileşimi olup olmadığının gösterilmesi amacıyla her fonksiyonel madde için birden fazla aday belirlenip DSC ile geçimlilik durumları araştırıldı.

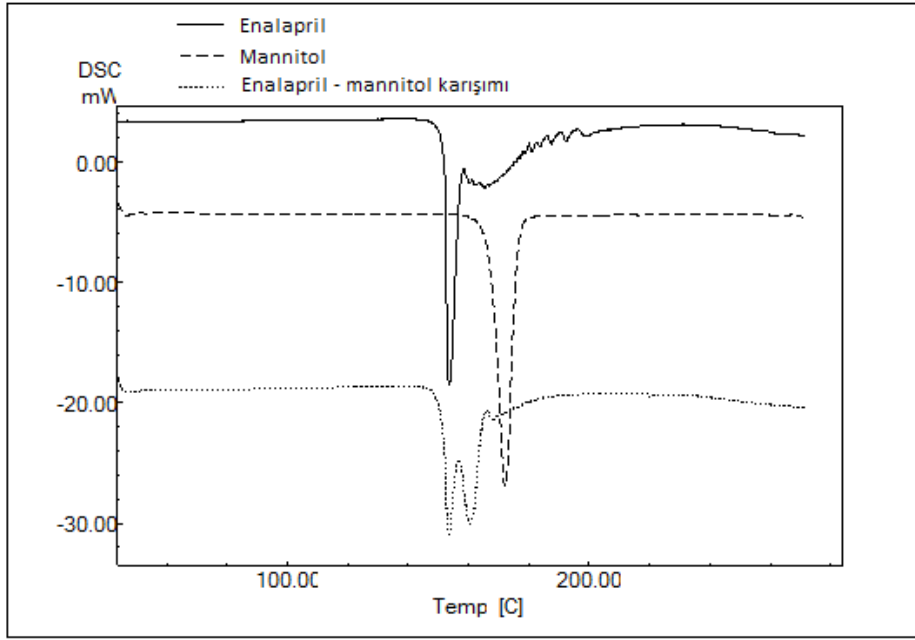
Dolgu maddesi olarak mannitol, mikrokristal selüloz ve nişasta seçildi. Amlodipin ve enalaprilin bu maddeler ile DSC termogramları karşılaştırıldı.

Şekil 4.10'da amlodipin besilat ile mannitol karışımına ait termogramlar saf hammaddeler ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Mannitolün saf halde analiz edilen DSC sonuçlarından 172,04°C'de endotermik bir pik verdiği gözlemlendi. Mannitol karışımında beklenen sıcaklıkta pik vermesine rağmen, amlodipinin maksimum pikinin 203,88 °C'den 180,70°C'ye kaydığı gözlemlendi. Amlodipin pikinde görülen bu 23°C'lik kaymanın nedeni bir geçimsizlik olabileceği gibi daha önce açıklandığı üzere önce eriyen maddenin ikinci madde için bir safsızlık olarak algılanması olarak da yorumlanabilir. Pikin şeklinde de bir değişiklik gözlenmemiş olması nedeniyle bir geçimsizlik beklenmemektedir. Tek başına DSC analizi ile iki maddenin geçimsiz olduğu kanaatine varmak doğru olmayacağından FTIR sonuçları ile paralel değerlendirme yapıldı.



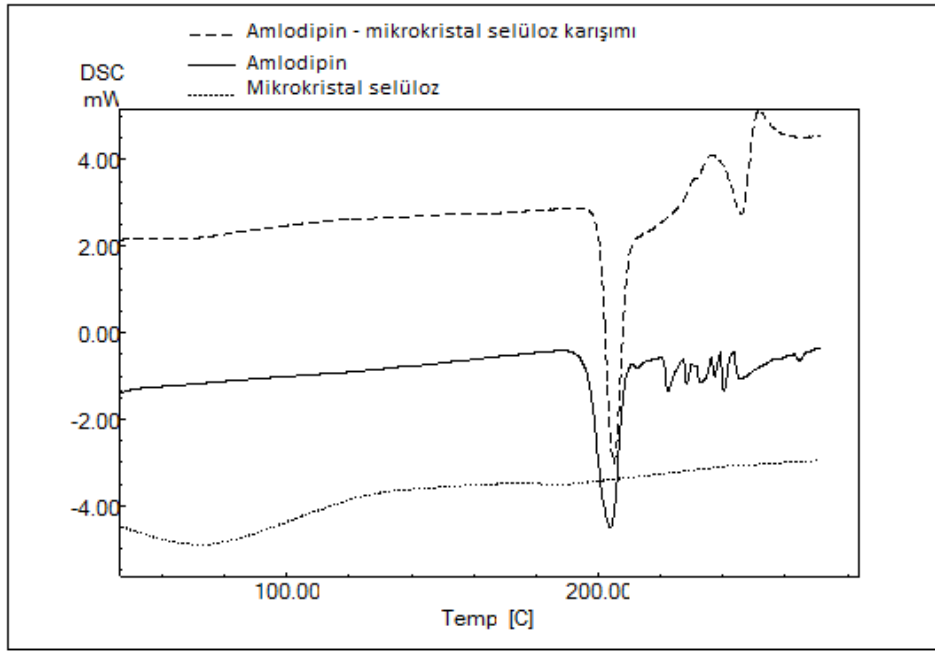
Şekil 4.10. Amlodipin besilat ve mannitolün ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Şekil 4.11’de ise enalapril maleat ile mannitolün karışımı ve saf haldeki termogramları görülmektedir. Enalapril ile ait endotermik pik kendi yerinde gözlenirken, mannitole ait pikin 10°C kadar öne kayarak ve enalapril ile ait ikinci pik ile çakıştığı gözlemlendi. Bu durumun iki maddenin etkileşmesinden değil erime noktalarının birbirine çok yakın olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

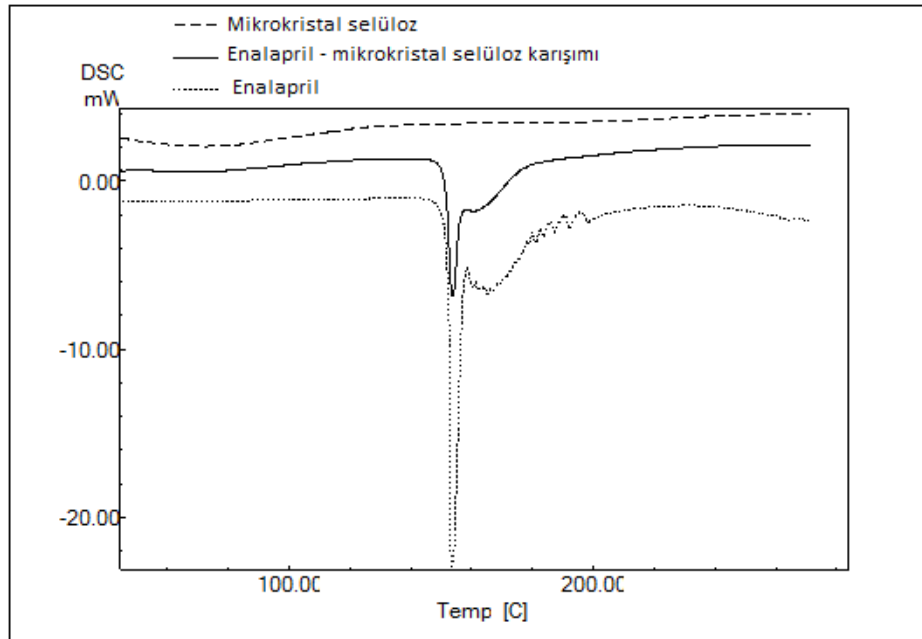


Şekil 4.11. Enalapril maleat ve mannitolün ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Aday dolgu maddelerinden bir diğeri mikrokristal selülozdur. Mikrokristal selülozun saf termogramında 100°C'nin altında gözlenen geniş bant su pikine aittir. Maddeye özel bir pik gözlenmedi. Amlodipin besilat ve enalapril maleatın mikrokristal selüloz ile karşılaştırmalı DSC termogramları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verildi. Şekillerden görüleceği üzere mikrokristal selüloz amlodipin ve enalaprilin pikinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü. Buradan hareketle etkin maddelerin mikrokristal selüloz ile geçimli olduğunu söylemek mümkündür.

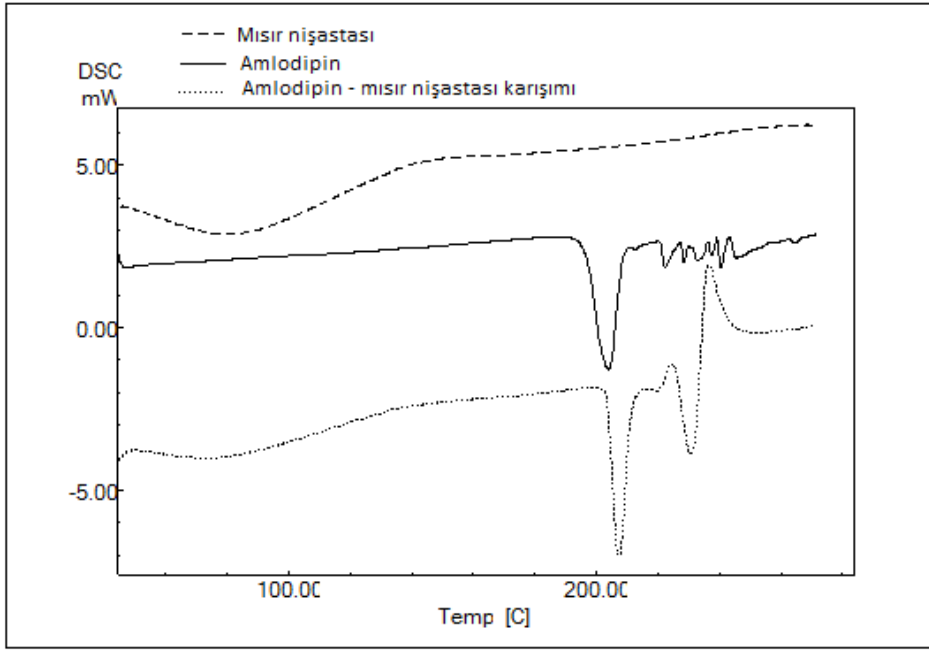


Şekil 4.12. Amlodipin besilat ve mikrokrystal selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

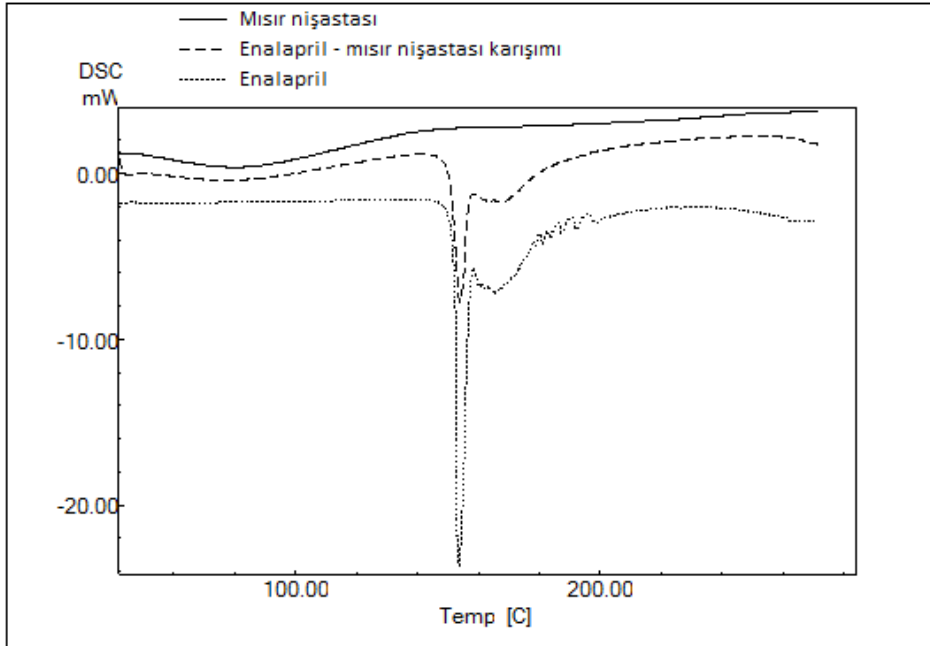


Şekil 4.13. Enalapril maleat ve mikrokrystal selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Diğer bir dolgu maddesi mısır nişastasıdır. Mısır nişastasının saf haldeki DSC termogramında su piki haricinde bir endotermik pik gözlenmedi. Karışımın DSC termogramında gözlenen amlodipine ve enalapril'e ait piklerde de bir kayma gözlenmedi. Bu termogramlar Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verildi.



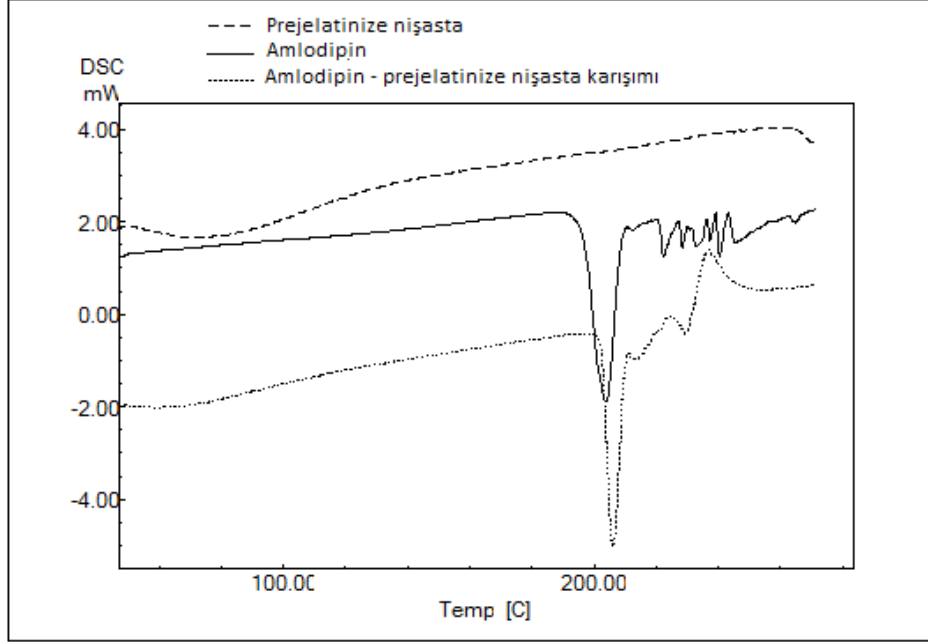
Şekil 4.14. Amlodipin besilat ve mısır nişastasının ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



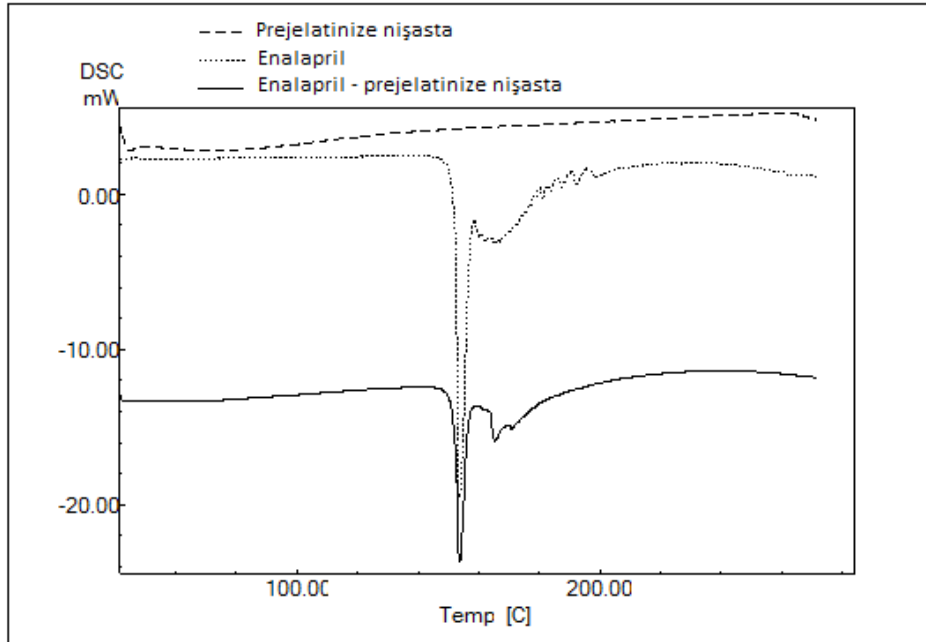
Şekil 4.15. Enalapril maleat ve mısır nişastasının ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Prejelatinize nişasta da dolgu maddesi, dağıtıcı ve bağlayıcı özelliği bulunan bir maddedir. Çok fonksiyonel özelliği ile formülasyonda kullanılacak adaylardan biridir. Prejelatinize nişastanın DSC termogramında geniş su bandı dışında bir pik gözlenmedi. Amlodipin veya enalapril ile karışım halinde ise elde edilen pikler amlodipin ve enalapril pikleri ile aynı

sıcaklıkta gözlemlendi. Termogramlar Şekil 4.16 ve 4.17’de verilmiştir. Prejelatinize nişasta ile etkin maddeler arasında bir etkileşim beklenmemektedir.



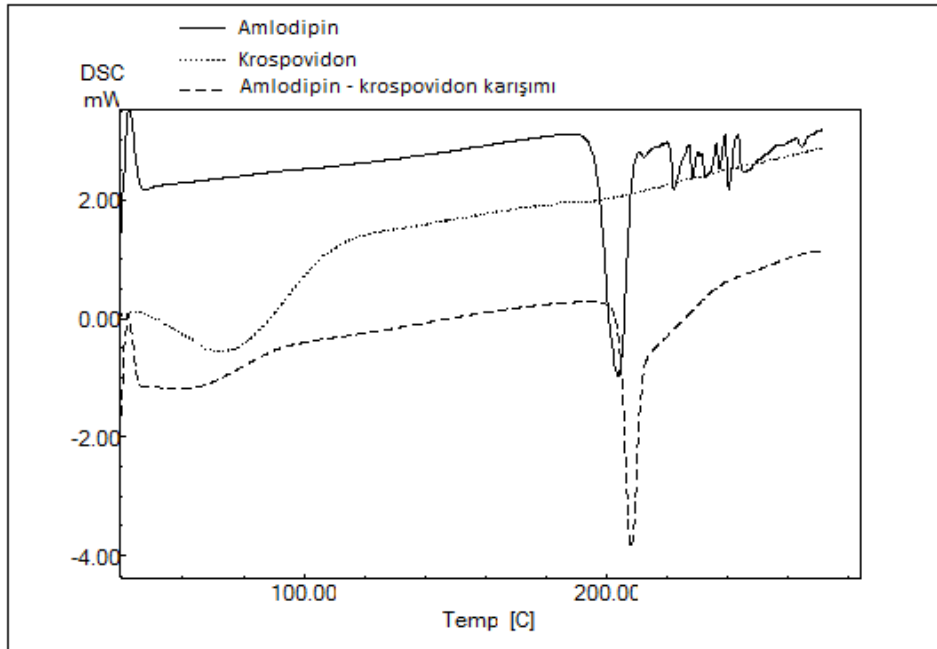
Şekil 4.16. Amlodipin besilat ve prejelatinize nişastanın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



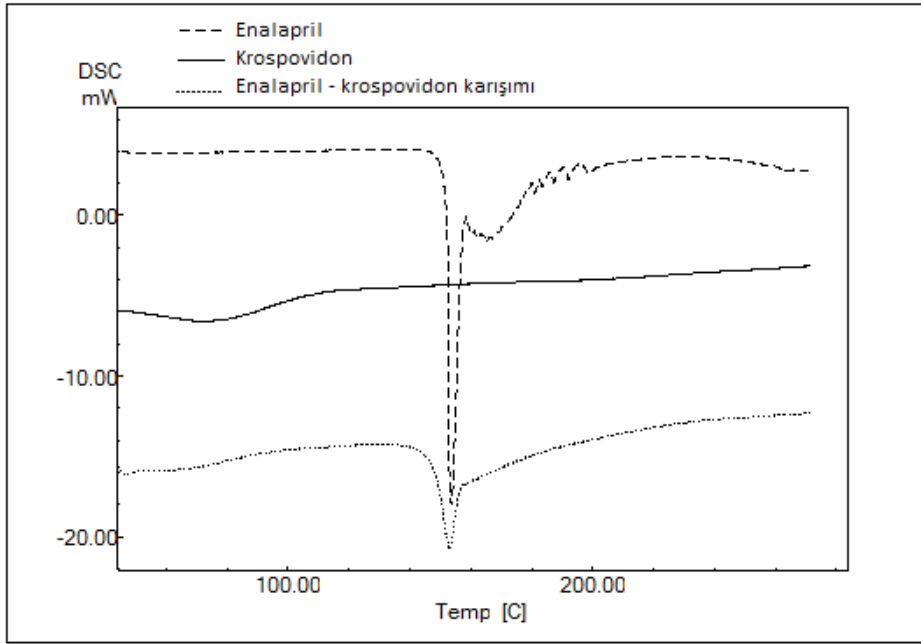
Şekil 4.17. Enalapril maleat ve prejelatinize nişastanın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Formülasyonda kullanılacak dağıtıcı adayları olarak krospovidon ve kroskarmeloz sodyum seçildi. Etkin maddelerin bu maddeler ile geçimliliği araştırıldı.

Krospovidonun, saf haldeki DSC termogramında suyun neden olduğu pik dışında bir endotermik pik gözlenmedi. Krospovidonun amlodipin ile 1:1 oranındaki karışımının termogramında gözlenen amlodipine ait pikte ise 5°C'lik bir kayma gözlendi (Şekil 4.18). Bu değer DSC deneylerinde ihmal edilebilir bir değerdir. İki madde arasında olası bir etkileşim beklenmemektedir. Krospovidonun enalapril ile olan karışımında gözlenen pik ise enalapril ile aynı sıcaklıkta gözlendi (Şekil 4.19). Bu iki madde arasında da herhangi bir etkileşim beklenmemektedir.

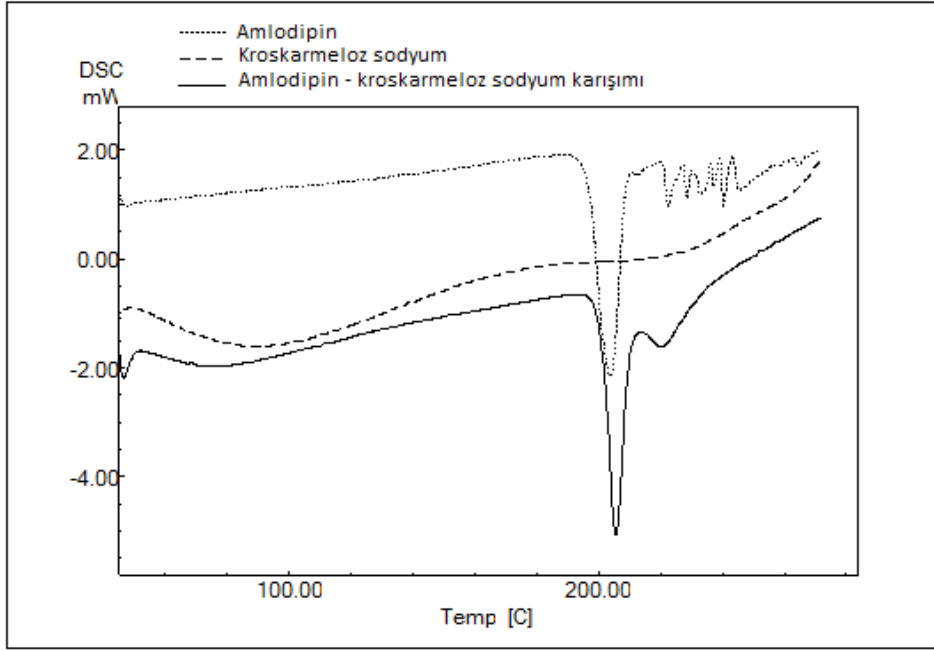


Şekil 4.18. Amlodipin besilat ve krospovidonun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

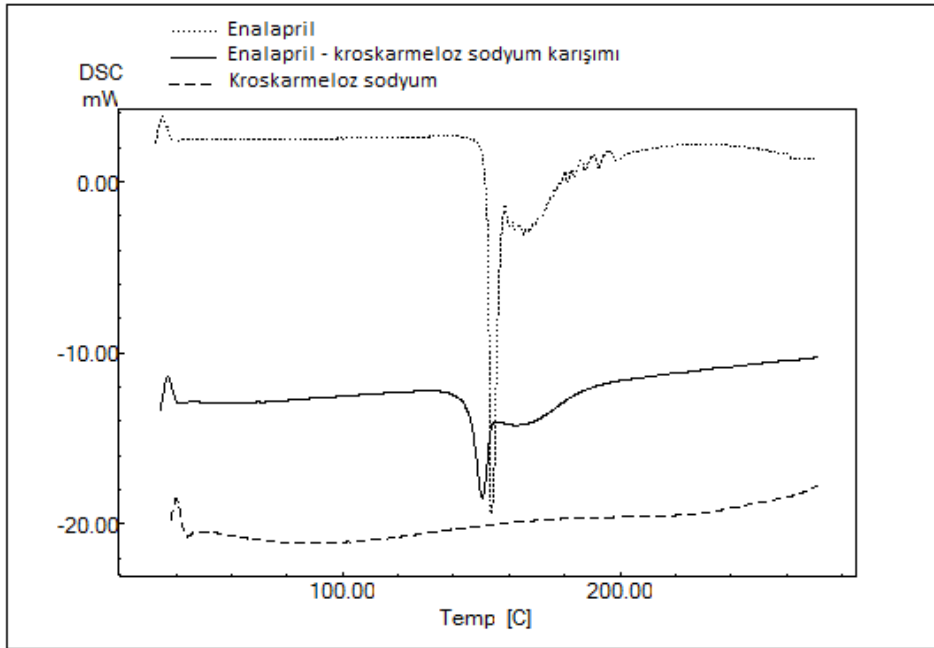


Şekil 4.19. Enalapril maleat ve krospovidonun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Bir diğer dağıtıcı kroscarmeloz sodyumdur. Krospovidonun DSC analizinde su bandı dışında bir pik gözlenmedi. Amlodipin ile karışımının termogramında ise amlodipine ait pik aynı yerde gözlemlendi. Enalapril ile karışımının termogramında ise ihmal edilebilir 5°C'lik bir kayma gözlemlendi. Bu termogramlar Şekil 4.20 ve 4.21'de verilmiştir. Kroscarmeloz sodyum ile etkin maddeler arasında bir etkileşim beklenmemektedir.



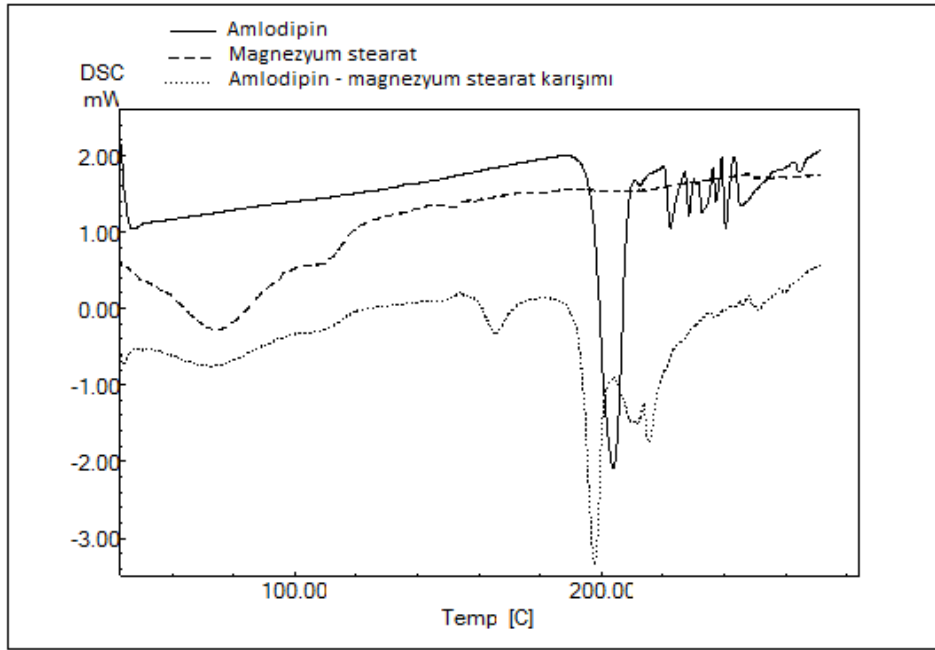
Şekil 4.20. Amlodipin besilat ve kroscarmeloz sodyumun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



Şekil 4.21. Enalapril maleat ve kroscarmeloz sodyum ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

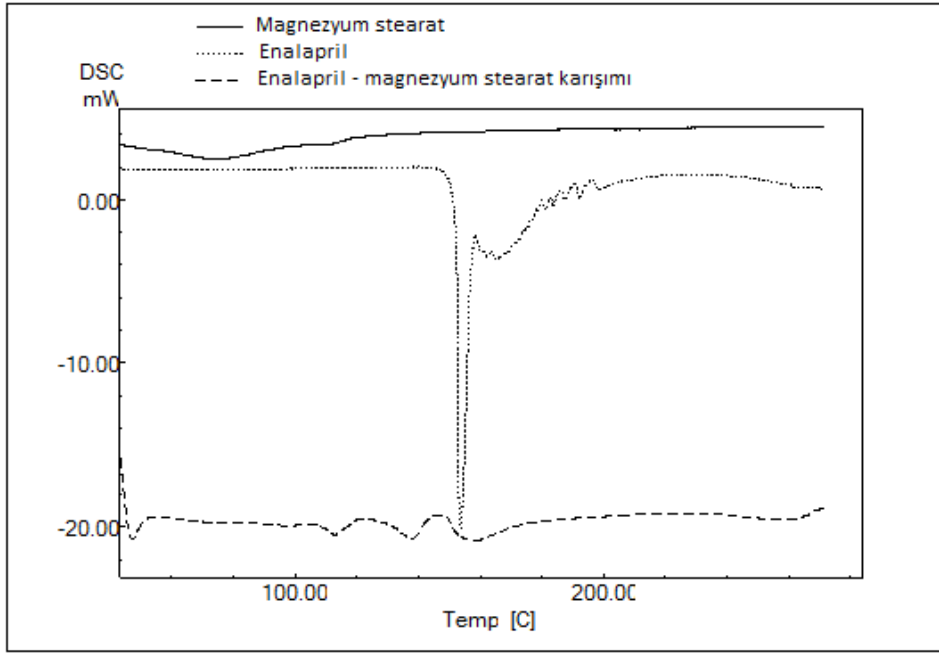
Formülasyonda kaydırıcı madde olarak magnezyum stearat, gliseril distearat ve sodyum stearil fumarat değerlendirildi.

Magnezyum stearatın DSC analizinde doruk noktası 75,07°C’de olan endotermik bir pik gözlemlendi. Amlodipin ile karışımının analizinde ise amlodipinin saf halinde bulunmayan ve doruk noktası 165,25 °C’de olan ilave bir endotermik pik oluşumu gözlemlendi. Bunun yanında amlodipinin erime noktasından sonra gözlenen bozunma piklerinin boyunda artış da gözlemlendi. Bu işaretler bize 1:1 oranında karıştırıldığında amlodipin ve magnezyum stearatın geçimsiz olabileceğini göstermektedir. Amlodipin ve magnezyum stearat termogramları Şekil 4.22’de karşılaştırıldı.



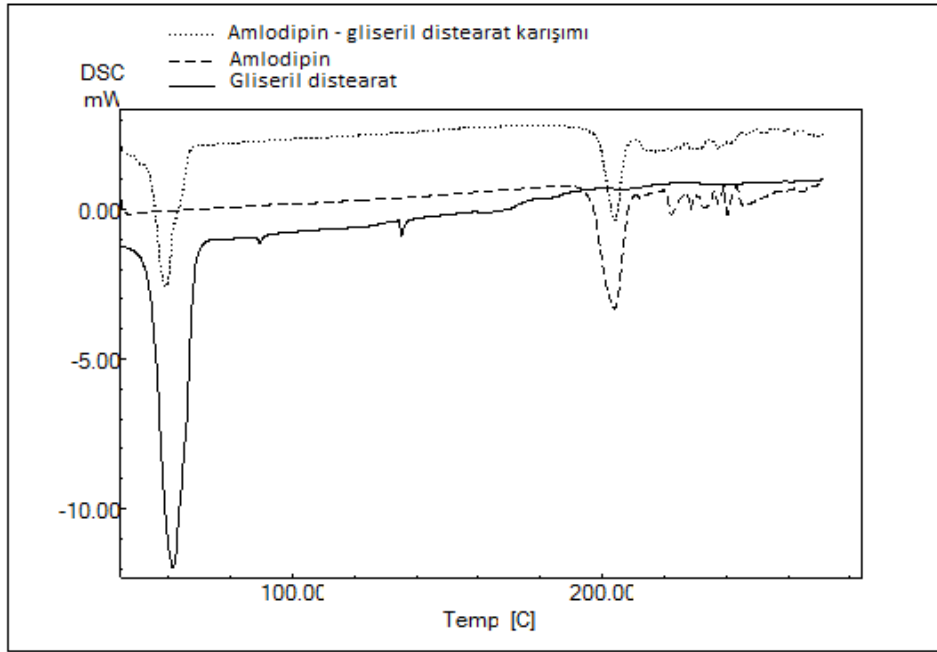
Şekil 4.22. Amlodipin besilat ve magnezyum stearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Enalapril maleat ve magnezyum stearat karışımının Şekil 4.23’te verilen termogramında enalapril ile ait pik tamamen kayboldu. Bu sonuç iki maddenin 1:1 oranında karıştırıldığında geçimsiz olabileceğini desteklemektedir.

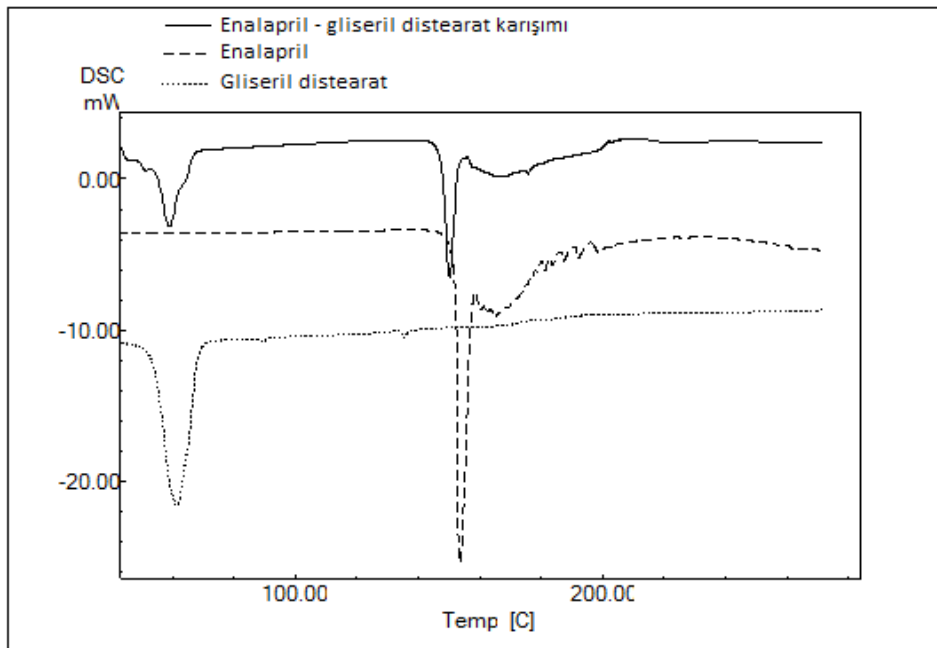


Şekil 4.23. Enalapril maleat ve magnezyum stearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Gliseril distearat DSC analizinde doruk noktası 59,05°C’de olan keskin bir pik verdi. Etkin maddeler ile 1:1 oranındaki karışımlarında ise etkin maddelerin ve gliseril distearatın pikinde kayma gözlenmedi. Bu nedenle amlodipin ve enalaprilin gliseril distearat ile geçimli olduğu söylenebilir. Gliseril distearatın amlodipin ve enalapril ile olan karşılaştırmalı termogramları Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’te verildi.



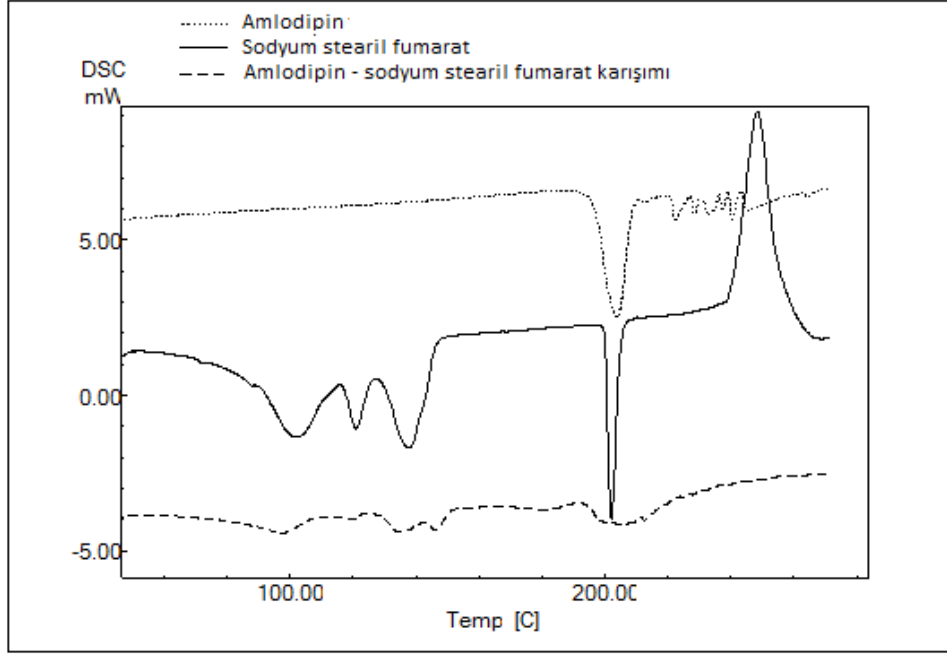
Şekil 4.24. Amlodipin besilat ve gliseril distearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



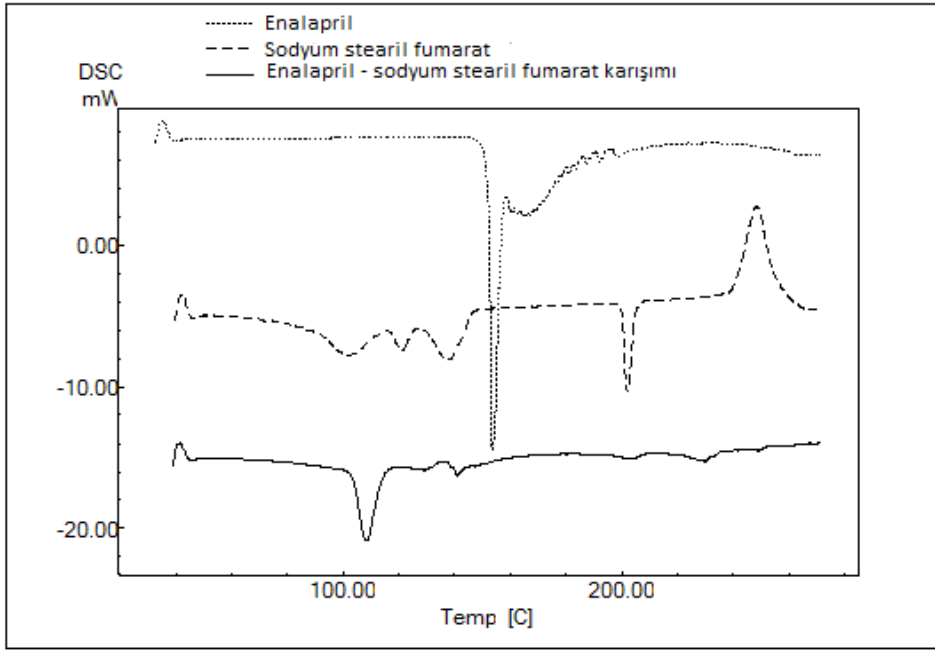
Şekil 4.25. Enalapril maleat ve gliseril distearatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Bir diğer kaydırıcı madde olan sodyum stearil fumaratın DSC termogramında 4 endotermik ve 1 ekzotermik pik gözlemlendi (Şekil 4.26). Endotermik piklerden en keskin ve büyük olanı amlodipin ile aynı sıcaklıkta pik verdi. Pikler çakıştığı için iki maddenin geçimliliği hakkında DSC tekniğiyle yorum yapmak güçtür.

Enalapril ve sodyum stearyl fumarat karışımının termogramında ise enalapril'e ait pik ve sodyum stearyl fumarata ait bazı pikler kayboldu. Bu nedenle 1:1 oranında karıştırıldığında bu iki maddenin de geçimsiz olabileceği düşünüldü. İlgili termogramlar Şekil 4.27'de verildi.



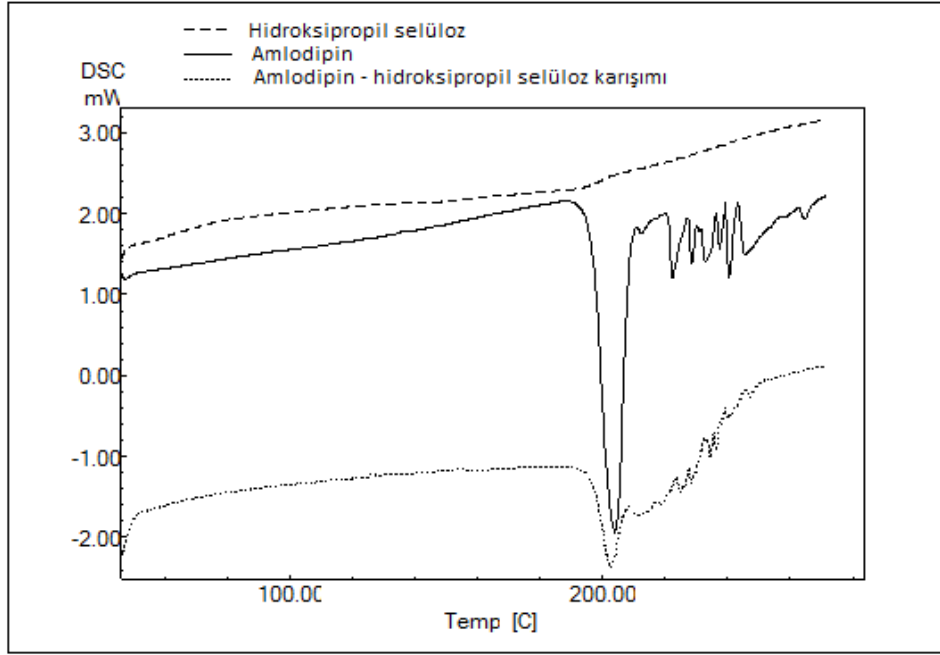
Şekil 4.26. Amlodipin besilat ve sodyum stearyl fumaratın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



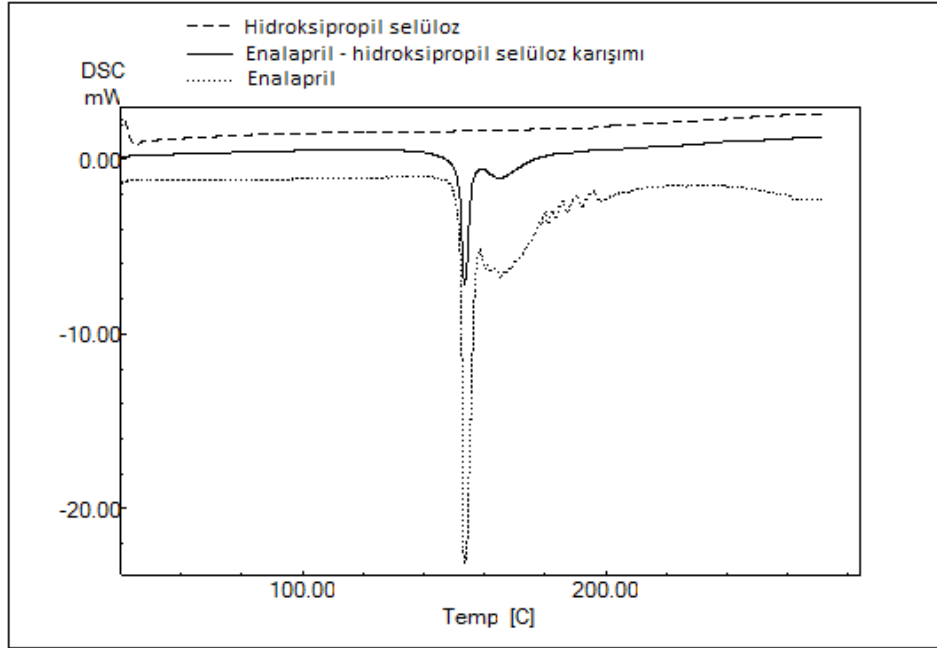
Şekil 4.27. Enalapril maleat ve sodyum stearil fumaratın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Formülasyon geliştirme çalışmalarında bağlayıcı adayı olarak hidroksipropil selüloz kullanıldı.

Hidroksipropil selülozun saf haldeki DSC termogramında herhangi bir pik gözlenmedi. Etkin maddeler ile karışımının termogramında ise hem amlodipin hem de enalaprilin pikleri beklenen sıcaklıkta gözlemlendi. Hidroksipropil selülozun amlodipin ile ve enalapril ile birlikte değerlendirildiği termogramlar sırasıyla Şekil 4.28 ve Şekil 4.29’da verilmiştir. Hidroksipropil selüloz ile etkin maddeler arasında olası bir etkileşim beklenmemektedir.



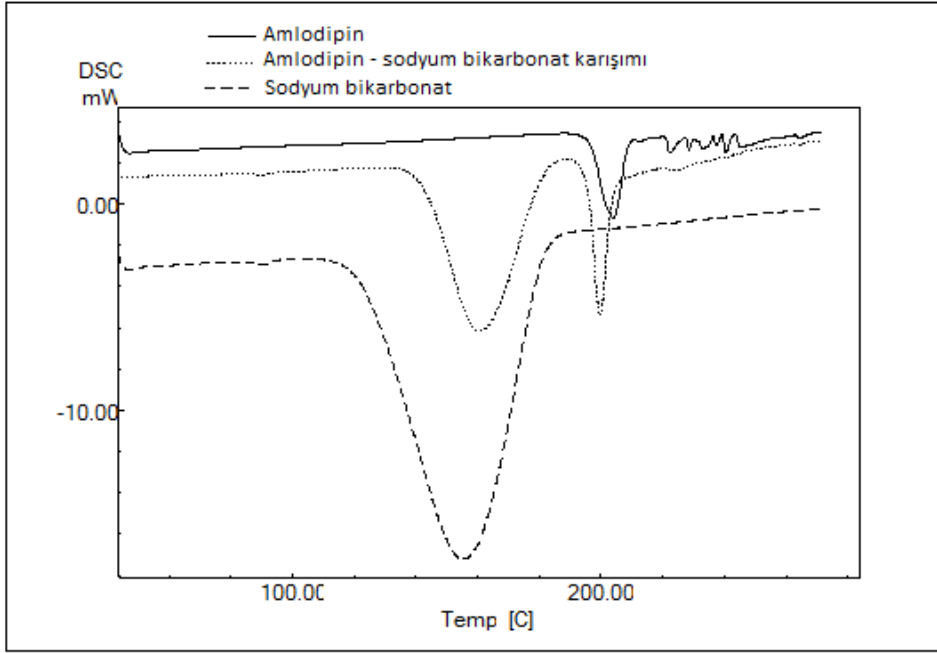
Şekil 4.28. Amlodipin besilat ve hidroksipropil selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları



Şekil 4.29. Enalapril maleat ve hidroksipropil selülozun ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

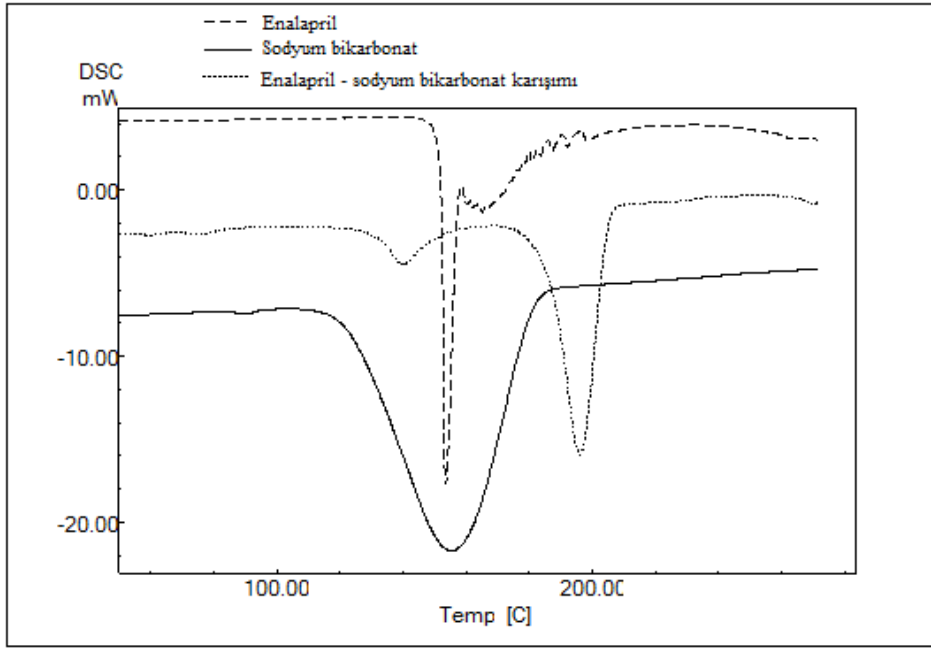
Formülasyonda kullanılması düşünülen bir madde de stabilizan olarak sodyum bikarbonattır. Sodyum bikarbonat enalapril maleatı in situ konversiyon ile enalapril sodyuma dönüştürerek stabilizasyon sağlar (Verbeeck ve diğerleri, 2017). Bu nedenle formülasyon aday bileşenlerinden biri olarak sodyum bikarbonat seçildi.

Sodyum bikarbonatın saf haldeki DSC termogramı incelendiğinde doruk noktası 155,45 °C olan geniş bir endotermik pik verdiği gözlemlendi. Amlodipin besilat ve sodyum bikarbonat karışımında maddeler saf halde gözlenen piklerinin yerini korudular (Şekil 4.30). Bu da sodyum bikarbonatın amlodipin besilat ile etkileşmediğinin göstergesidir.



Şekil 4.30. Amlodipin besilat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Enalapril ve sodyum bikarbonatın karşılaştırıldığı termogram Şekil 4.31’de verilmiştir. Sodyum bikarbonat ve enalapril maleat aynı sıcaklık aralığında endotermik pik vermektedir. Bu nedenle enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın 1:1 karışımına ait DSC termogramında 132°C ile 150°C aralığında gözlenen pikin hem enalapril maleatı hem de sodyum bikarbonatı kapsadığı düşünüldü (Şekil 4.31). Karışımında 196,14°C’de gözlenen keskin endotermik pikin ise in situ dönüşüm sonucu oluşan enalapril sodyuma ait olduğu düşünüldü. Bu durumu doğrulamak için TGA-DTA analizleri gerçekleştirildi.

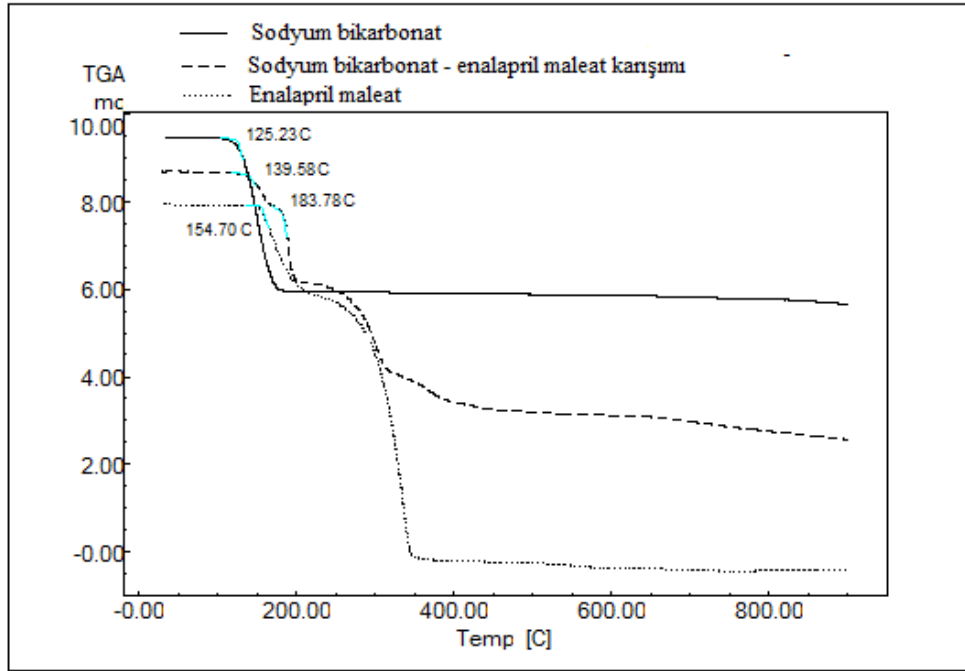


Şekil 4.31. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen termogramları

Enalapril maleat ve sodyum bikarbonata ait TGA/DTA analizi

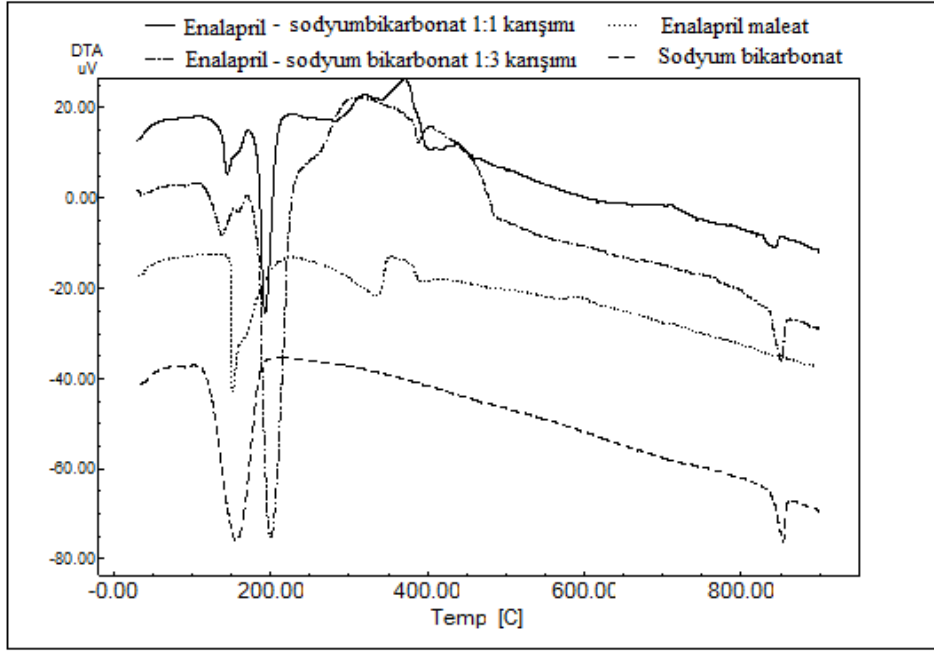
Enalapril maleat ile sodyum bikarbonatın reaksiyona girerek enalapril sodyum oluşturduğunu gözlemlemek için bu tez çalışmasında enalapril maleat ve sodyum bikarbonat karışımının TGA-DTA analizleri gerçekleştirildi.

Enalapril maleat ve sodyum bikarbonata ait TGA analizi Şekil 4.32’de görülmektedir. Karışımın TGA verisindeki ilave bir bozunma basamağı oluşmasının, enalapril sodyum olduğu düşünülen yeni bir maddenin oluşup bozulduğuna işaret ettiği düşünüldü (Rezende ve diğerleri, 2008).



Şekil 4.32. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 karışım halinde elde edilen TGA termogramları

Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın DTA verisi Şekil 4.33'te verilmektedir. DSC termogramında (Şekil 4.31) 196,14°C'de gözlenen yeni pikin reaksiyon sonucu oluşan enalapril sodyuma ait olduğu düşünüldü. Şekil 4.33'te görülen termogramda sodyum bikarbonat miktarının artırılmasıyla enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın çakışmasıyla oluşan ilk pikin küçüldüğü ve ortaya çıkan enalapril sodyum pikinin de büyüdüğü gözlemlendi. Bu da enalapril maleattan enalapril sodyum oluşumunu destekleyen bir bulgudur.



Şekil 4.33. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonatın ayrı ayrı ve 1:1 ve 1:3 karışım halinde elde edilen DTA termogramları

Etkin maddeler ile yardımcı maddelerin FTIR analizleri

Amlodipin besilatın diğer yardımcı maddeler ile karışım halinde fonksiyonel grupların pikleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Amlodipin besilatın diğer yardımcı maddeler ile karıştırıldığında elde edilen spektrumlar ise Şekil 4.34–4.44'te görülmektedir. Bu spektrumlar ile Çizelge 4.5'deki pik değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde amlodipin, yardımcı maddelerden mannitolle, sodyum bikarbonatla, mikrokristal selülozla, nişastayla, hidroksipropil selülozla, gliseril distearatla, kroskarmeloz sodyumla, sodyum stearil fumaratla ve prejelatinize nişastayla birebir oranda karıştırıldığında kritik fonksiyonel gruplarını içeren pikler karışımlarda da benzer dalga sayısında gözlemlendi.

Yardımcı maddelerden krospovidonda dikkat çekici bazı pik değişiklikleri gözlemlendi. Amlodipinin krospovidon ile karışımı değerlendirildiğinde 3291 cm^{-1} 'deki N-H gerilme pikinin kaybolduğu ve onun yerine 3443 cm^{-1} ve 3234 cm^{-1} 'de daha geniş yeni iki pik oluştuğu gözlemlendi. Bu piklerin saf krospovidona ait olup olmadığının gözlenmesi için krospovidona ait FTIR ölçümü yapıldığında krospovidona ait 3443 cm^{-1} 'de geniş bir pik olduğu ve amlodipinin pikini içine aldığı gözlemlendi. DSC çalışmalarında da bir etkileşim gözlenmemesi bu bulguyu desteklemektedir.

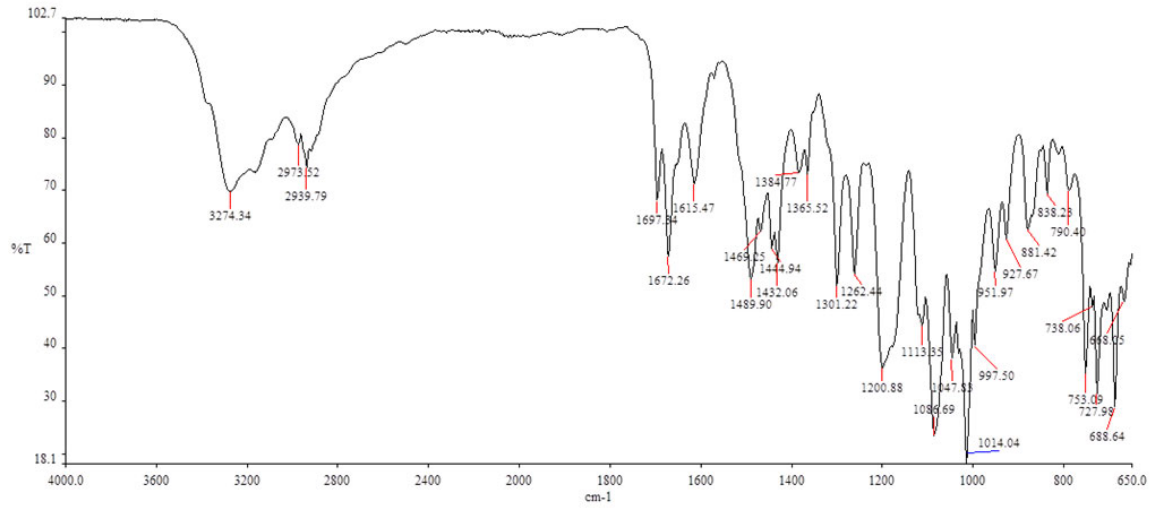
Amlodipin ve magnezyum stearat karışımına ait spektrum değerlendirildiğinde amlodipinin 1615 cm^{-1} 'de görülen N-H eğilme piki ve 1490 cm^{-1} C=C piki karışmada gözlenmedi, ancak bu durumun bir geçimsizlik ihtimalinin dışında saf magnezyum stearat spektrumunda (Şekil 4.41b) gözlenen 1571 cm^{-1} 'deki geniş pikin altında kalma ihtimali de göz önüne alınabilir.

Çizelge 4.5. Amlodipin besilatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler

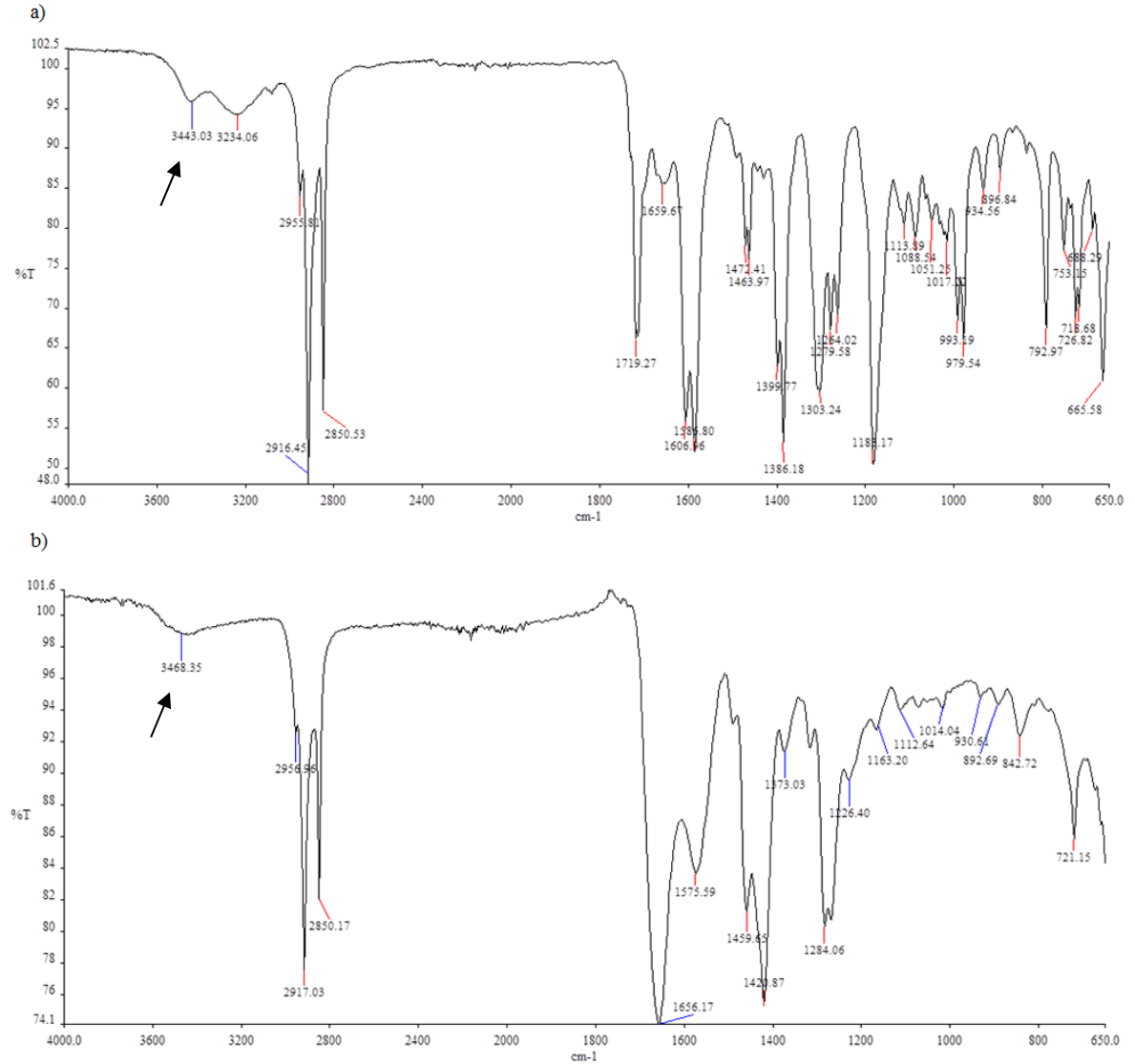
Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm ⁻¹)	Gözlenen pikler (cm ⁻¹)						
		<i>Amlodipin</i>	<i>Amlodipin-Mannitol</i>	<i>Amlodipin-Krospovidon</i>	<i>Amlodipin-Sodyum bikarbonat</i>	<i>Amlodipin-Mikrokristal selüloz</i>	<i>Amlodipin-Nişasta</i>	<i>Amlodipin-Hidroksipropil selüloz</i>
N-H gerilme	3500-3300	3291	3291	-	3286	3293	3291	3299
C-H gerilme, aromatik	3100-3000	3078	3085	3091	3068	3078	3058	3070
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2982, 2921	2973, 2939	2955, 2916	2981, 2921	2981, 2927	2981, 2930	2972, 2929
C=O gerilme	1820-1670	1697, 1671	1697, 1672	1719, 1659	1697, 1672	1697, 1672	1697, 1672	1697, 1672
N-H eğilme	1600	1615	1615	1606	1615	1615	1615	1615
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1490, 1445	1489, 1444	1489, 1463	1492, 1445	1491, 1445	1491, 1445	1491, 1445
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1301, 1262	1303, 1264	1301, 1262	1301, 1263	1301, 1263	1301, 1263
C-O gerilme	1150-1070	1114, 1084	1113, 1086	1113, 1088	1114, 1087	1113, 1089	1114, 1089	1113, 1089

Çizelge 4.5 (devam). Amlodipin besilatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler

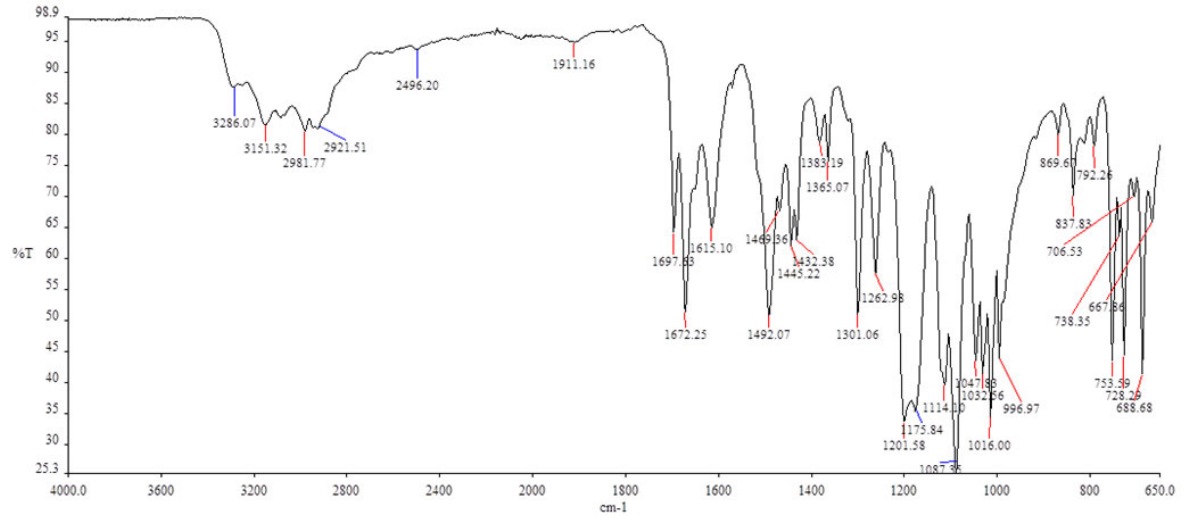
Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm ⁻¹)	Gözlenen pikler (cm ⁻¹)					
		<i>Amlodipin</i>	<i>Amlodipin-Gliseril distearat</i>	<i>Amlodipin-Magnezyum stearat</i>	<i>Amlodipin-Kroskarmeloz sodyum</i>	<i>Amlodipin-Sodyum stearil fumarat</i>	<i>Amlodipin-Prejelatinize nişasta</i>
N-H gerilme	3500-3300	3291	3291	3291	3291	3291	3296
C-H gerilme, aromatik	3100-3000	3078	3070	3061	3010	3099	3086
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2982, 2921	2956, 2915	2982, 2916	2982, 2927	2982, 2917	2982, 2927
C=O gerilme	1820-1670	1697, 1671	1697, 1671	1696, 1672	1697, 1672	1697, 1672	1697, 1672
N-H eğilme	1600	1615	1615	-	1613	1609	1615
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1490, 1445	1491, 1445	1445	1491, 1445	1491, 1445	1492, 1445
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1301, 1264	1301, 1263	1301, 1263	1301, 1263	1301, 1263
C-O gerilme	1150-1070	1114, 1084	1113, 1090	1114, 1090	1113, 1089	1114, 1090	1113, 1089



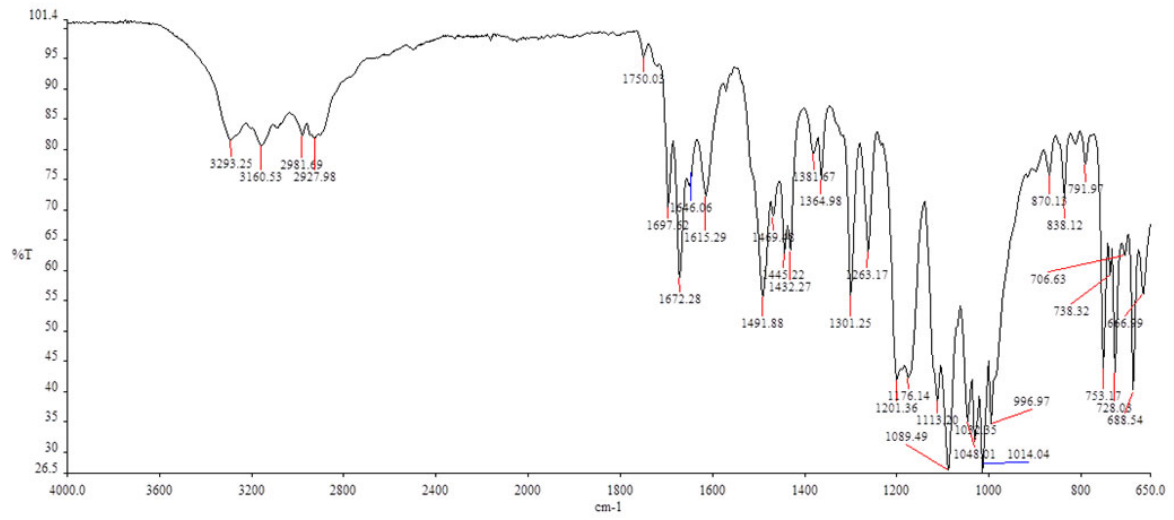
Şekil 4.34. Amlodipin - mannitol karışımının FTIR spektrumu



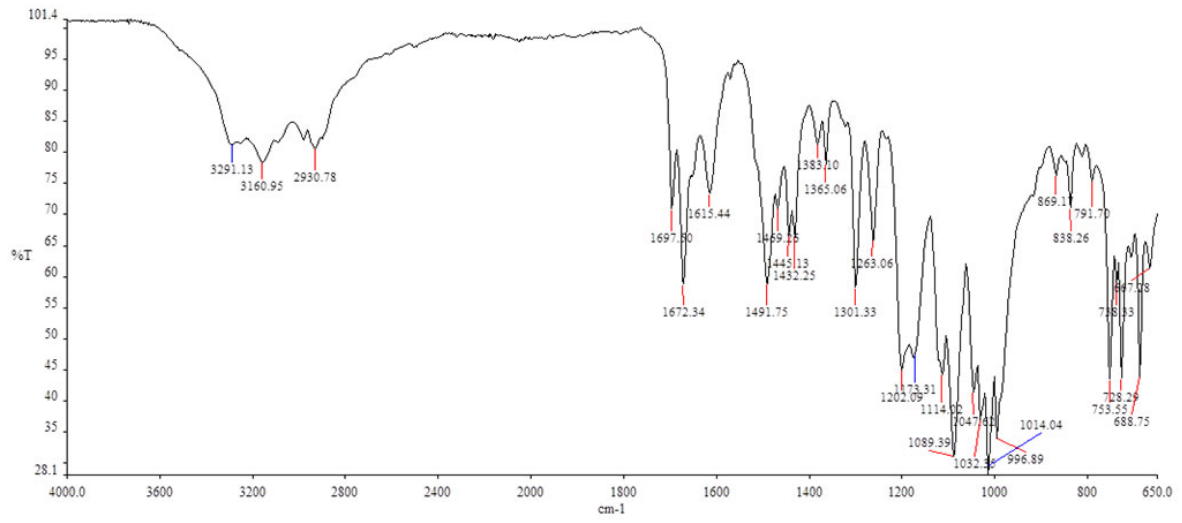
Şekil 4.35. a) Amlodipin - krospovidon karışımının FTIR spektrumu b) krospovidonun saf haldeki spektrumu



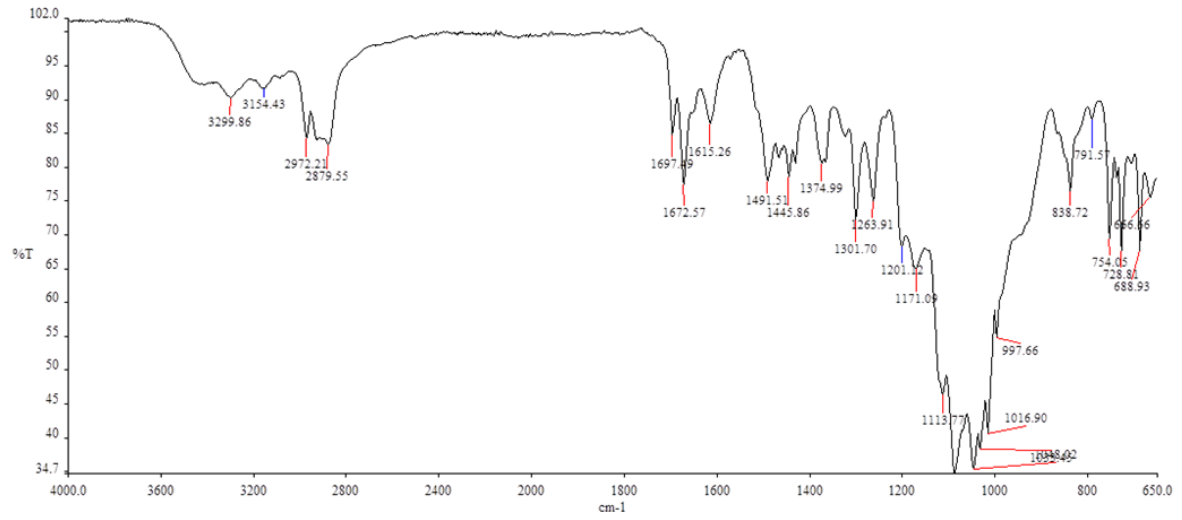
Şekil 4.36. Amlodipin – sodyum bikarbonat karışımının FTIR spektrumu



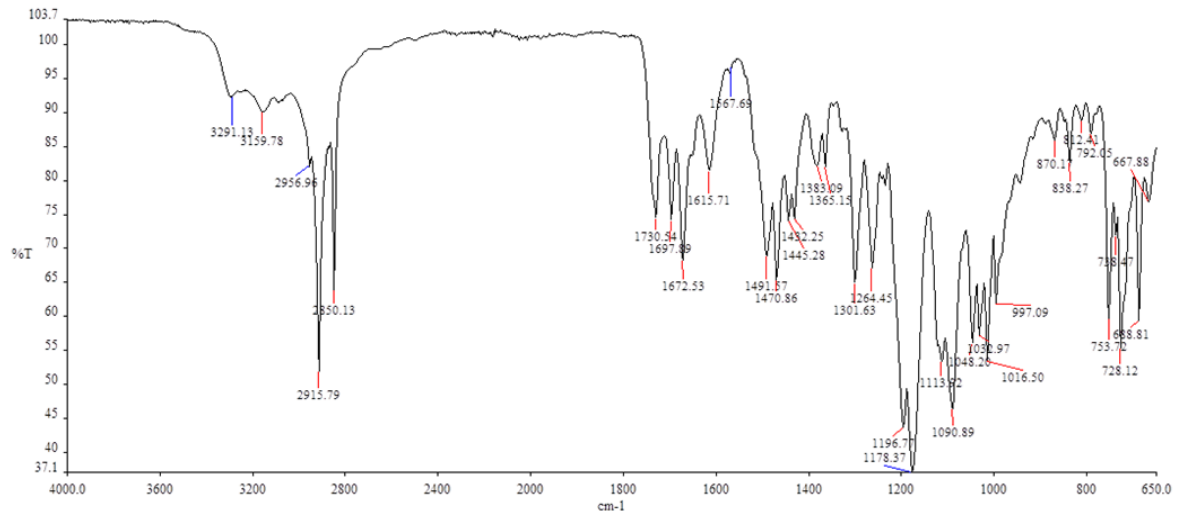
Şekil 4.37. Amlodipin – mikrokristal selüloz karışımının FTIR spektrumu



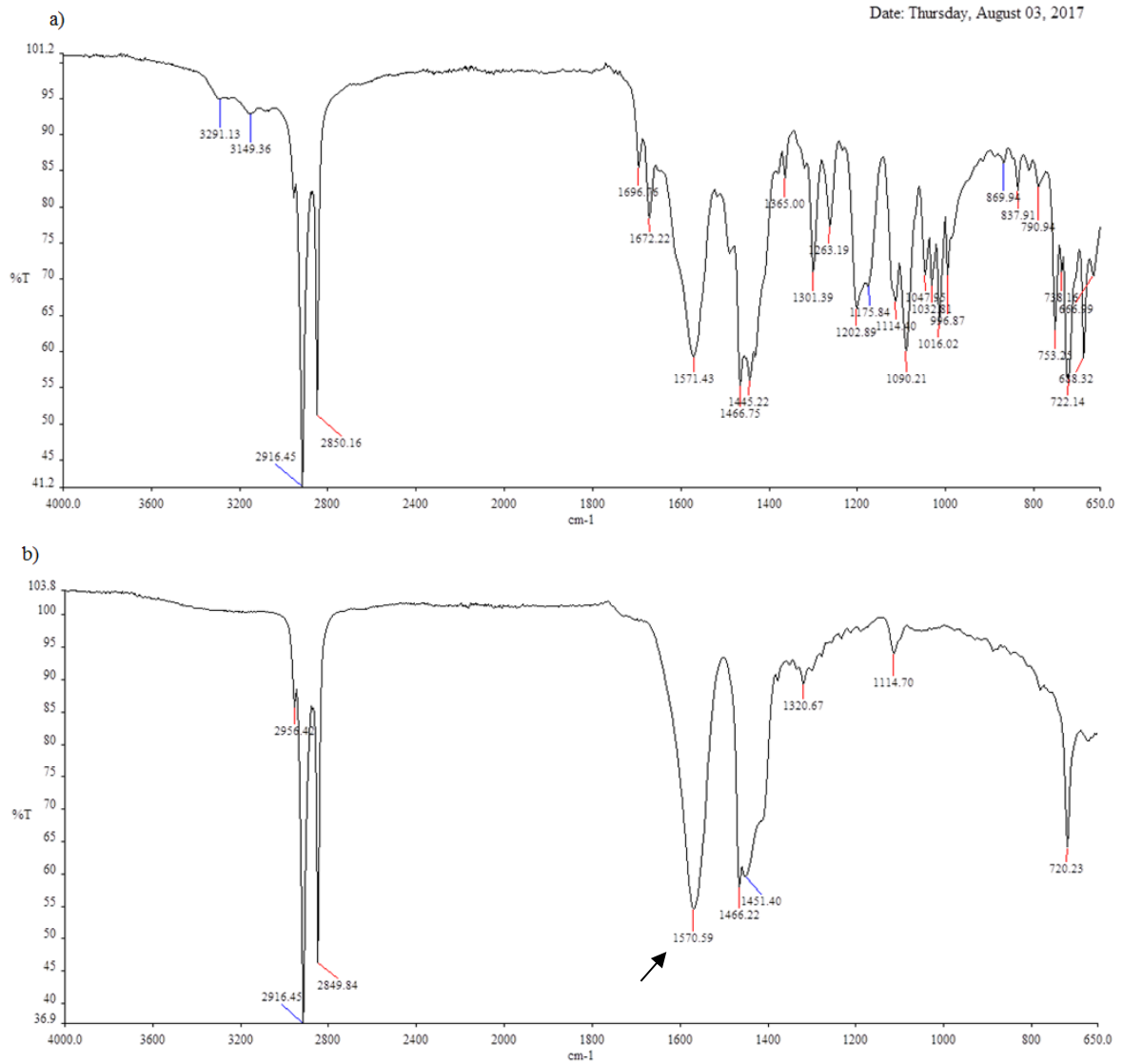
Şekil 4.38. Amlodipin – nişasta karışımının FTIR spektrumu



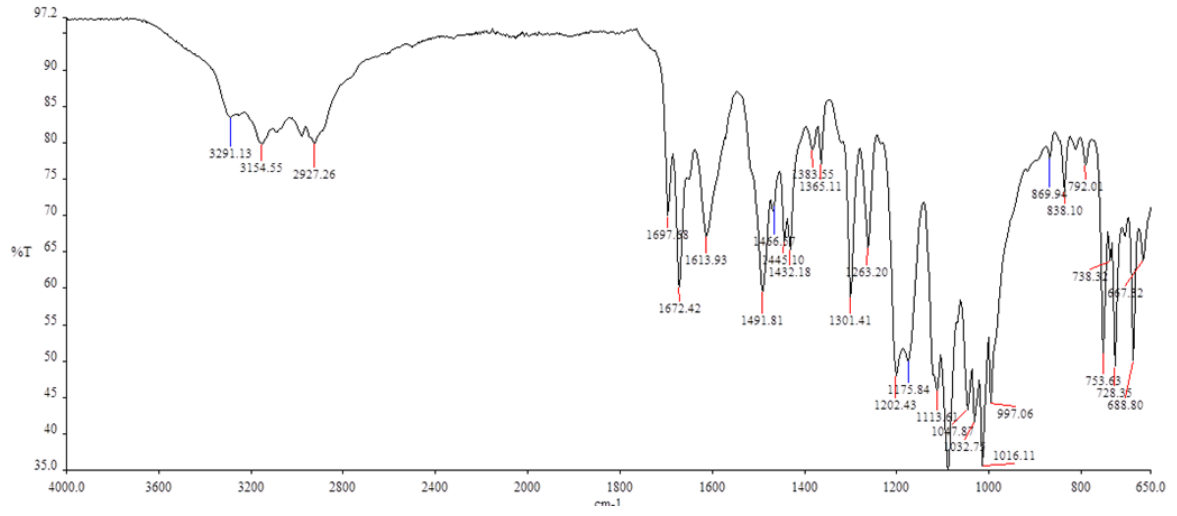
Şekil 4.39. Amlodipin – hidroksipropil selüloz karışımının FTIR spektrumu



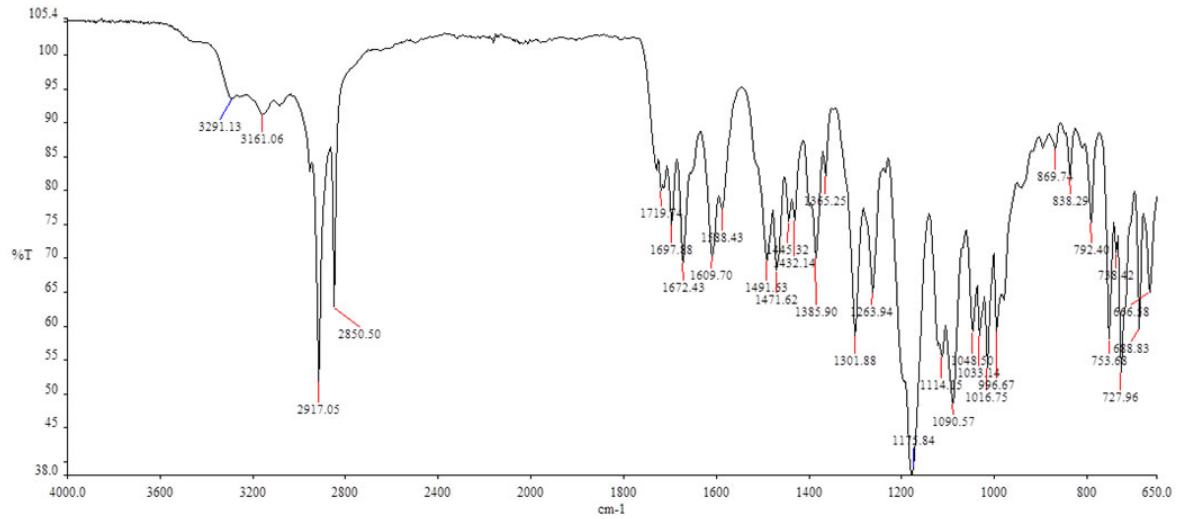
Şekil 4.40. Amlodipin – gliseril distearat karışımının FTIR spektrumu



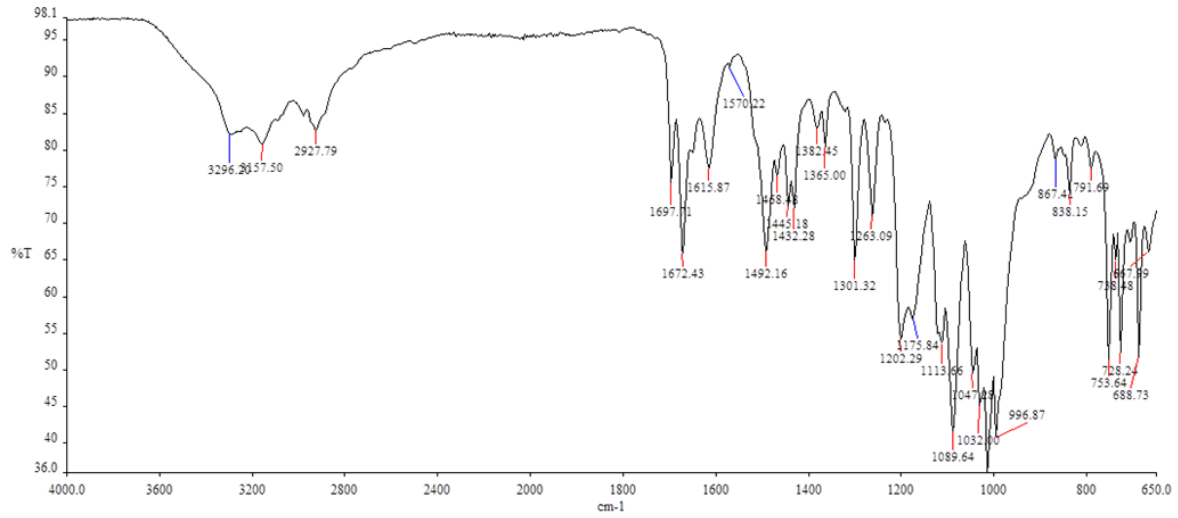
Şekil 4.41. a) Amlodipin – magnezyum stearat karışımının FTIR spektrumu
b) Magnezyum stearatın saf haldeki spektrumu



Şekil 4.42. Amlodipin – kroskarmeloz sodyum karışımının FTIR spektrumu



Şekil 4.43. Amlodipin – sodyum stearil fumarat karışımının FTIR spektrumu



Şekil 4.44. Amlodipin – prejelatinize nişasta karışımının FTIR spektrumu

Enalapril maleatın diğer yardımcı maddeler ile karışım halinde fonksiyonel grupların pikleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Enalapril maleatın diğer yardımcı maddeler ile karıştırıldığında elde edilen spektrumlar ise Şekil 4.45-4.56’da görülmektedir. Bu spektrumlar ile Çizelge 4.6’daki pik değerleri birlikte değerlendirildiğinde enalapril, yardımcı maddelerden mannitolle, krospovidonla, sodyum bikarbonatla, mikrokristal selülozla, nişastayla, hidroksipropil selülozla, gliseril distearatla, kroscarmeloz sodyumla, sodyum stearil fumaratla ve prejelatinize nişastayla birebir oranda karıştırıldığında kritik fonksiyonel gruplarını içeren pikler karışımlarda da benzer dalga sayısında gözlemlendi.

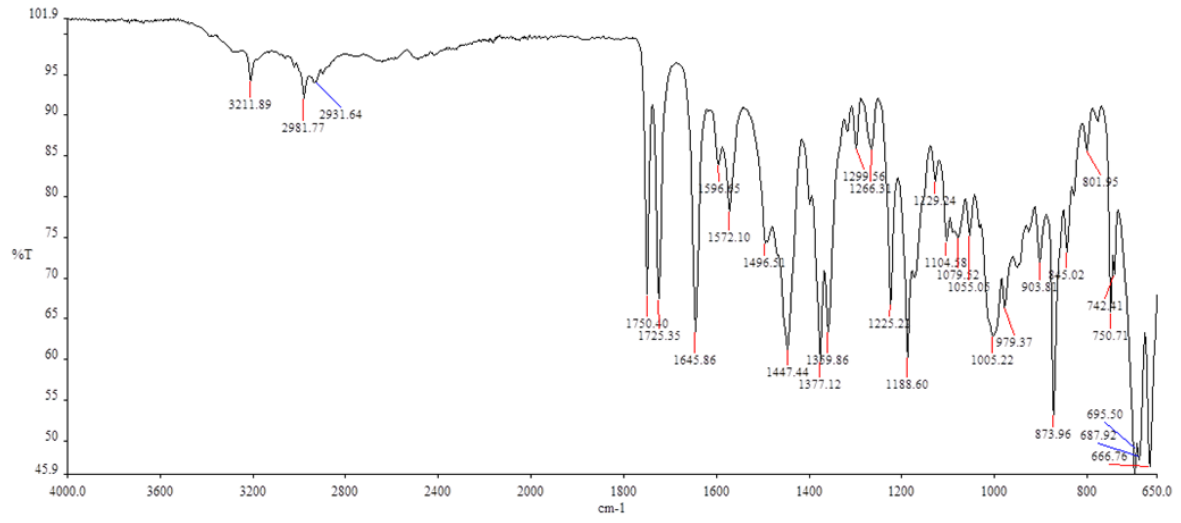
Enalapril ve magnezyum stearat karışımına ait spektrum değerlendirildiğinde enalapril ile ait 3301 cm⁻¹’de görülen N-H gerilme ve 1615 cm⁻¹’deki N-H eğilme piklerinin karışımda gözlenmedi. Geçimsizlik söz konusu olabileceği gibi N-H eğilme pikinin magnezyum stearatın saf haldeki spektrumunda gözlenen 1571 cm⁻¹’deki büyük ve keskin pikin altında kalmış olabileme ihtimali düşünüldü.

Çizelge 4.6. Enalapril maleatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler

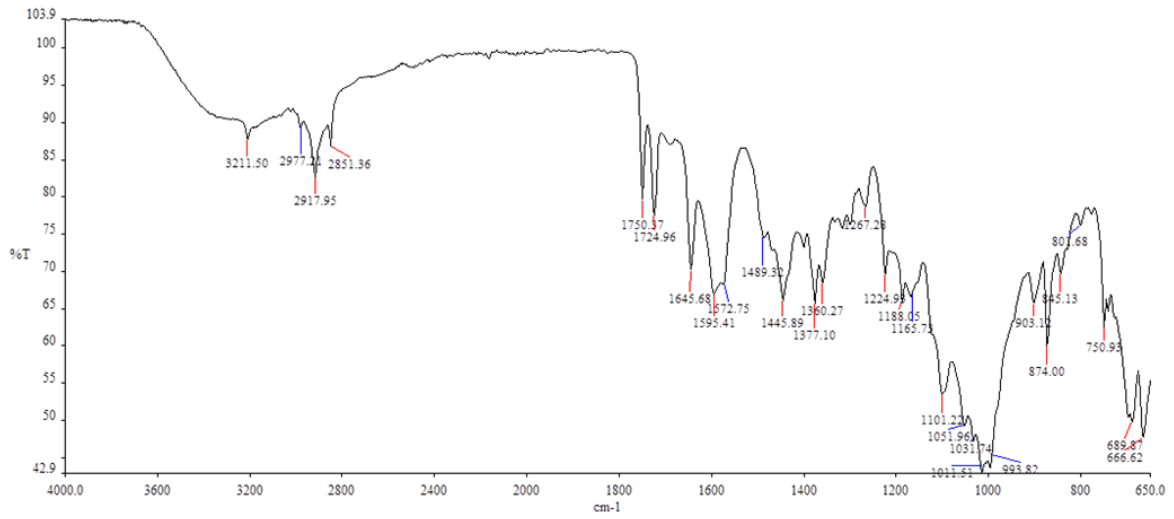
Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm ⁻¹)	Gözlenen pikler (cm ⁻¹)						
		<i>Enalapril</i>	<i>Enalapril-Mannitol</i>	<i>Enalapril-Krospovidon</i>	<i>Enalapril-Sodyum bikarbonat</i>	<i>Enalapril-Mikrokristal selüloz</i>	<i>Enalapril-Nişasta</i>	<i>Enalapril-Hidroksipropil selüloz</i>
N-H gerilme	3500-3300	3301	3211	3211	3211	3212	3210	3210
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2981, 2926	2981, 2931	2982, 2926	2981, 2930	2982, 2926	2982, 2931	2981, 2931
C=O gerilme, asit	1740-1720	1750, 1725	1750, 1725	1750, 1725	1750, 1724	1750, 1725	1750, 1725	1750, 1725
C=O gerilme, amid	1690-1640	1645	1645	1645	1645	1645	1647	1646
N-H eğilme	1600	1615	1596	1597	1598	1596	1613	1612
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1572, 1490, 1445	1572, 1496, 1445	1572, 1491, 1446	1572, 1488, 1446	1572, 1494, 1447	1571, 1491, 1445	1571, 1489, 1445
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1299, 1266	1299, 1261	1300, 1266	1300, 1267	1300, 1263	1300, 1264
C-O gerilme	1150-1070	1090	1079	1104	1092	1054	1088	1091

Çizelge 4.6 (devam). Enalapril maleatın çeşitli yardımcı maddeler ile karışım halinde spektrumunda gözlenen pikler

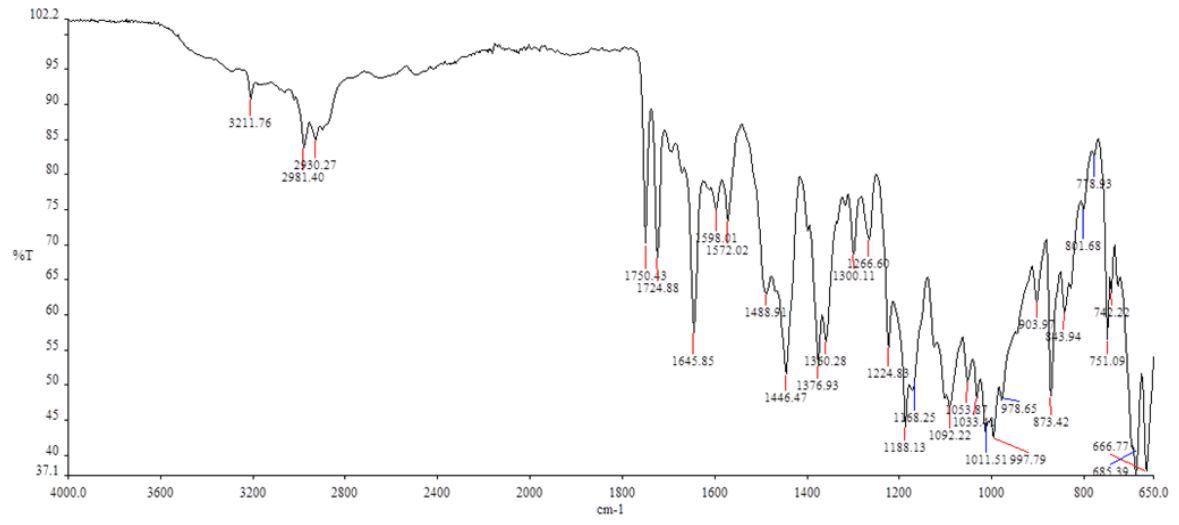
Fonksiyonel grup ve titreşim tipi	Karakteristik pik (cm ⁻¹)	Gözlenen pikler (cm ⁻¹)					
		<i>Enalapril</i>	<i>Enalapril-Gliseril distearat</i>	<i>Enalapril-Magnezyum stearat</i>	<i>Enalapril-Kroskarmeloz sodyum</i>	<i>Enalapril-Sodyum stearil fumarat</i>	<i>Enalapril-Prejelatinize nişasta</i>
N-H gerilme	3500-3300	3301	3212	-	3211	3212	3211
C-H gerilme, alkan	3000-2850	2981, 2926	2981, 2915	2956, 2915	2977, 2917	2955, 2918	2981, 2926
C=O gerilme, asit	1740-1720	1750, 1725	1749, 1727	1750, 1724	1750, 1724	1750, 1720	1750, 1725
C=O gerilme, amid	1690-1640	1646	1645	1646	1645	1645	1645
N-H eğilme	1600	1615	1596	-	1595	1606	1596
C=C gerilme, aromatik	1600-1400	1572, 1490, 1445	1572, 1491, 1448	1571, 1491, 1448	1572, 1489, 1445	1586, 1490	1572, 1496, 1447
C-N gerilme	1360-1080	1301, 1262	1299, 1266	1299, 1262	1301, 1267	1311, 1264	1299, 1267
C-O gerilme	1150-1070	1090	1104	1105	1101	1105	1104



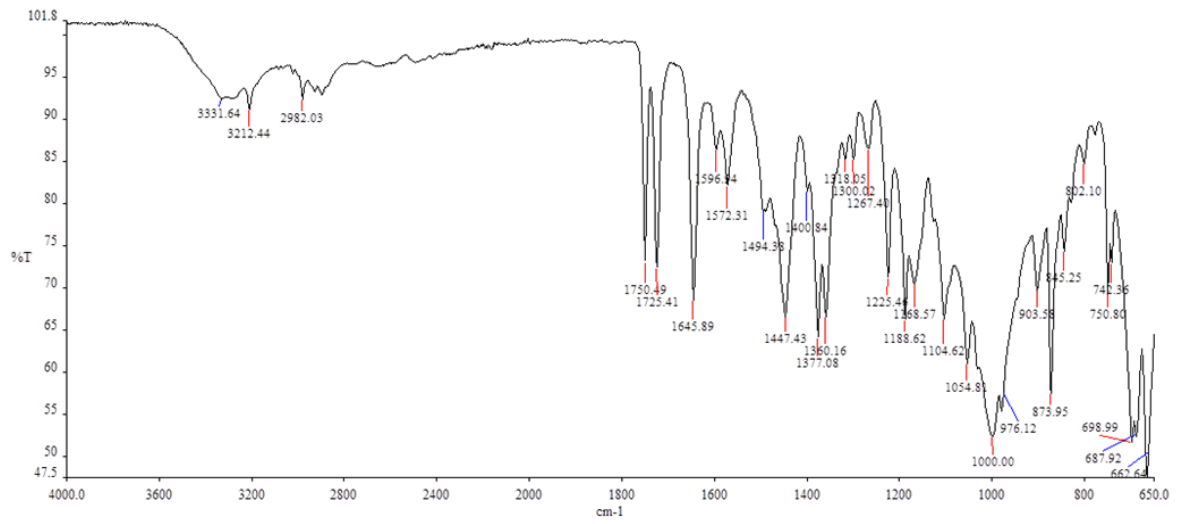
Şekil 4.45. Enalapril – mannitol karışımının FTIR spektrumu



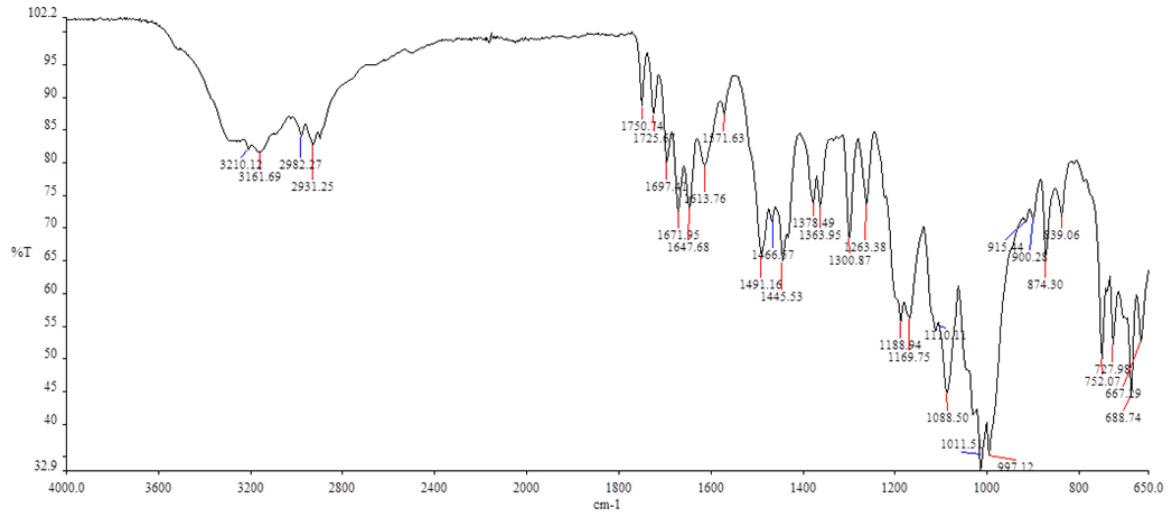
Şekil 4.46. Enalapril – krospovidon karışımının FTIR spektrumu



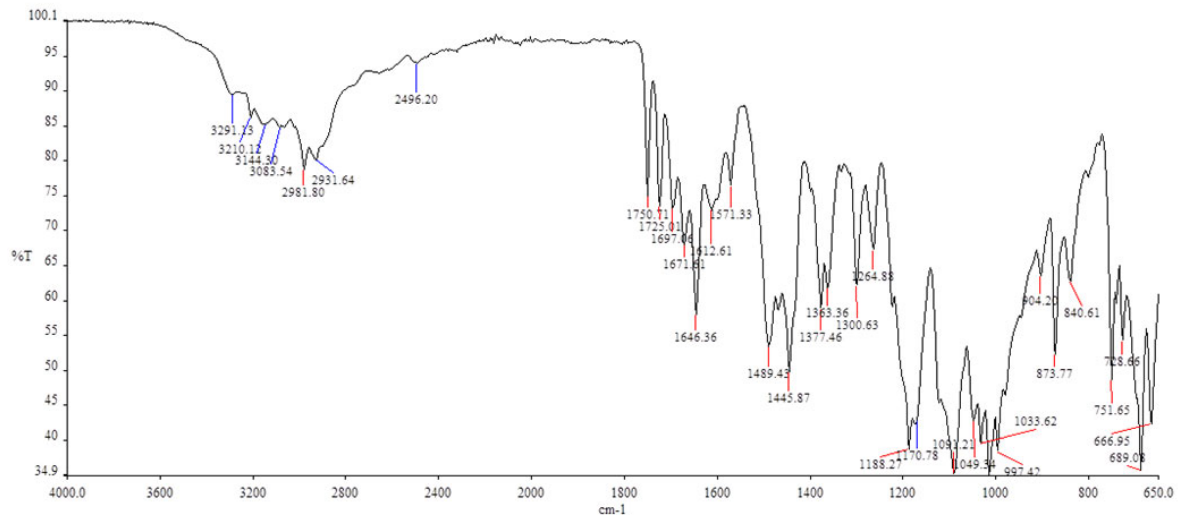
Şekil 4.47. Enalapril – sodyum bikarbonat karışımının FTIR spektrumu



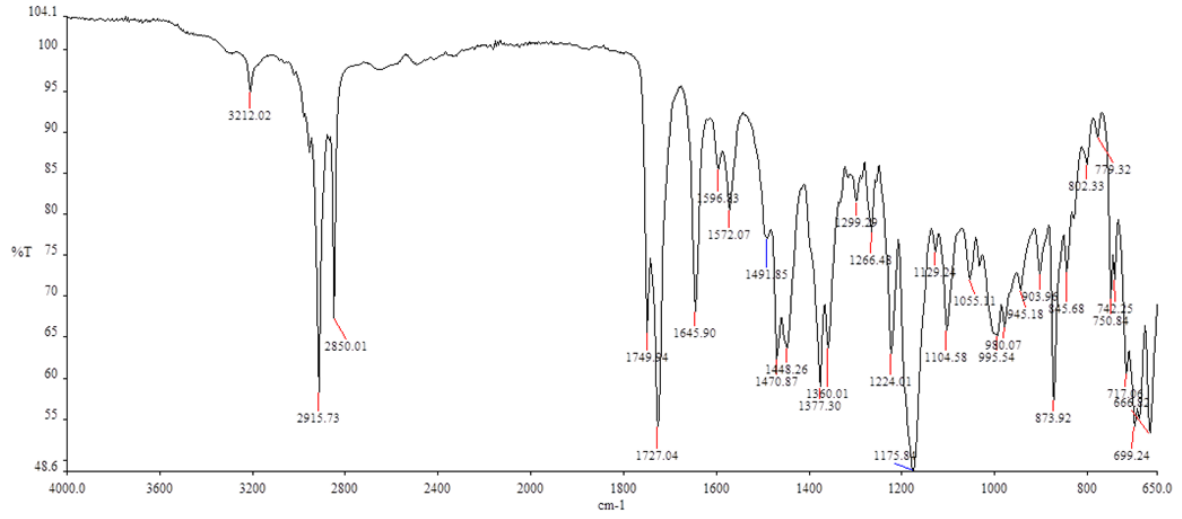
Şekil 4.48. Enalapril – mikrokristal selüloz karışımının FTIR spektrumu



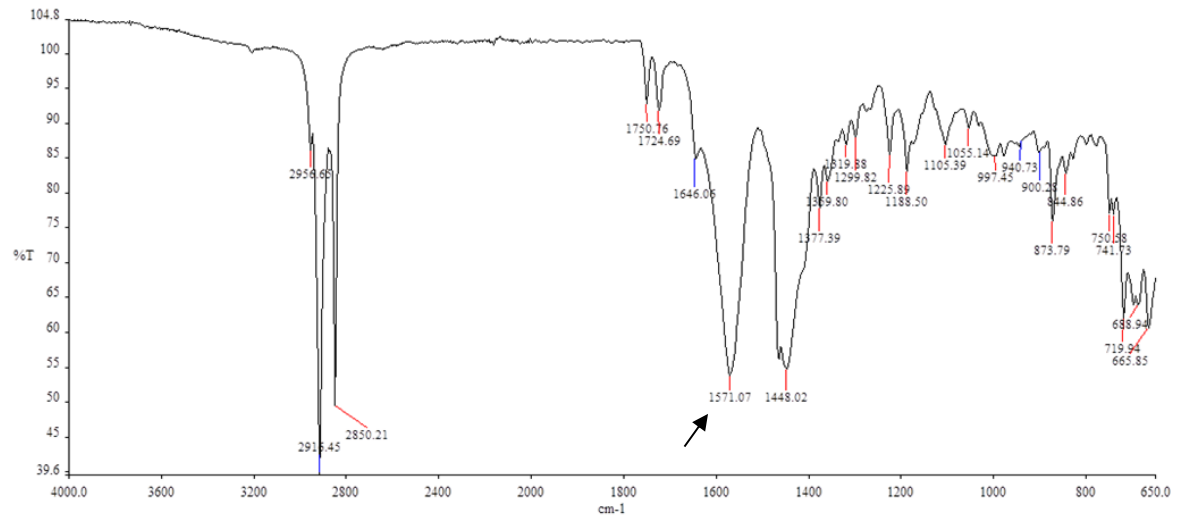
Şekil 4.49. Enalapril – nişasta karışımının FTIR spektrumu



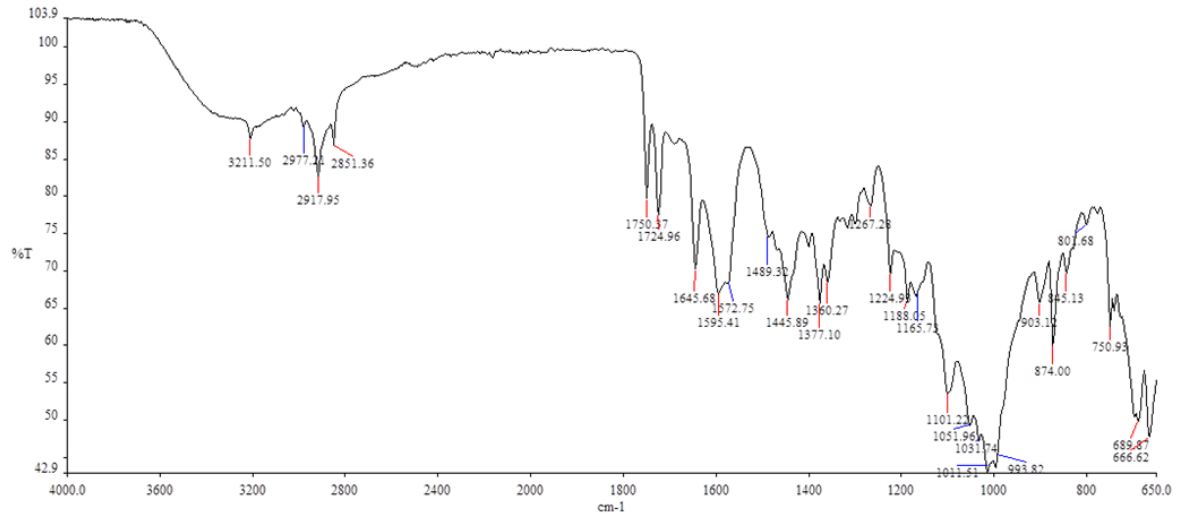
Şekil 4.50. Enalapril – hidrokshipropil selüloz karışımının FTIR spektrumu



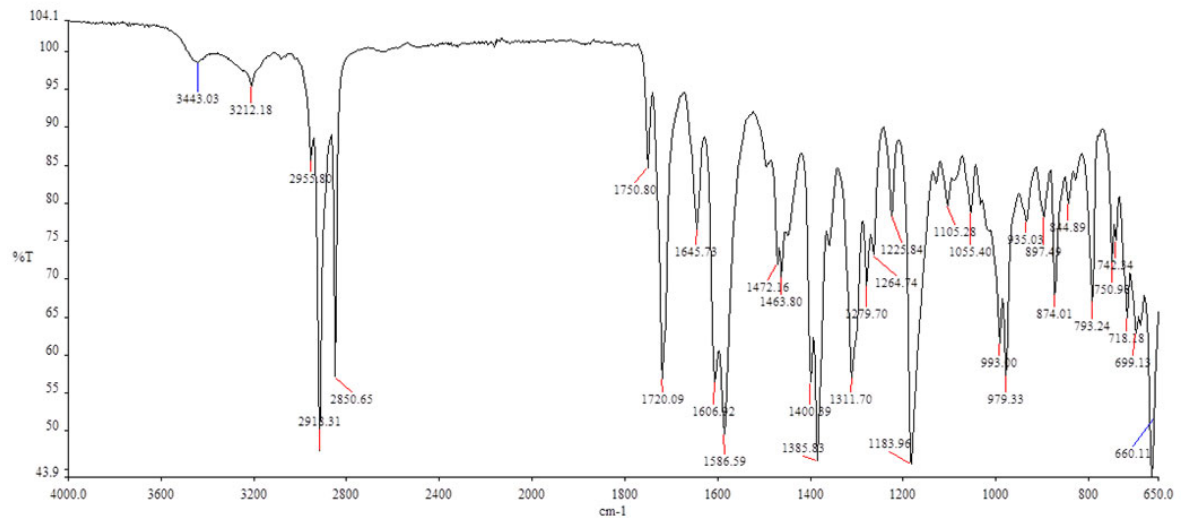
Şekil 4.51. Enalapril – gliseril distearat karışımının FTIR spektrumu



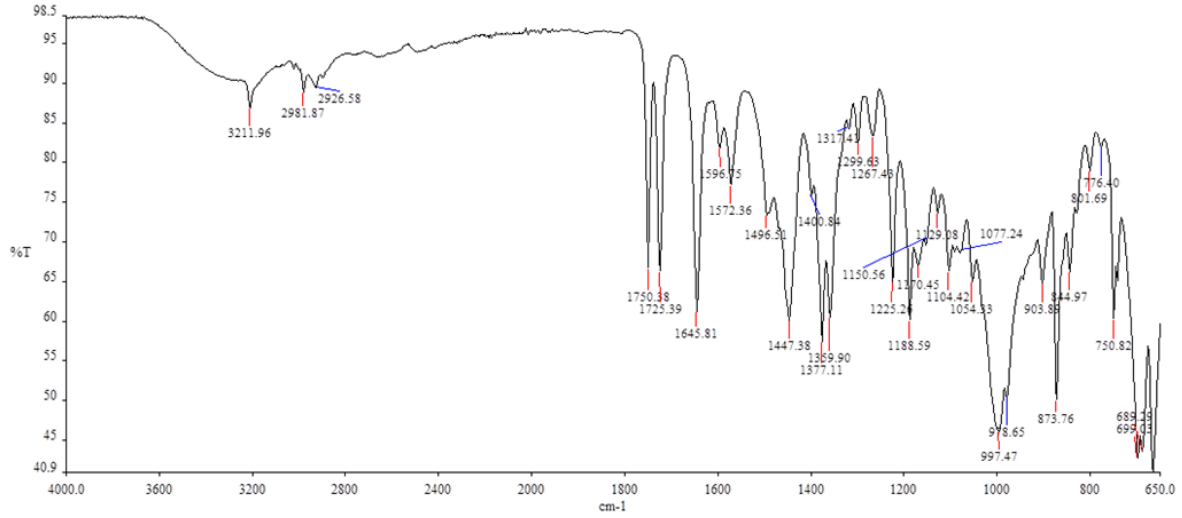
Şekil 4.52. Enalapril – magnezyum stearat karışımının FTIR spektrumu



Şekil 4.53. Enalapril – kroskarmeloz sodyum karışımının FTIR spektrumu



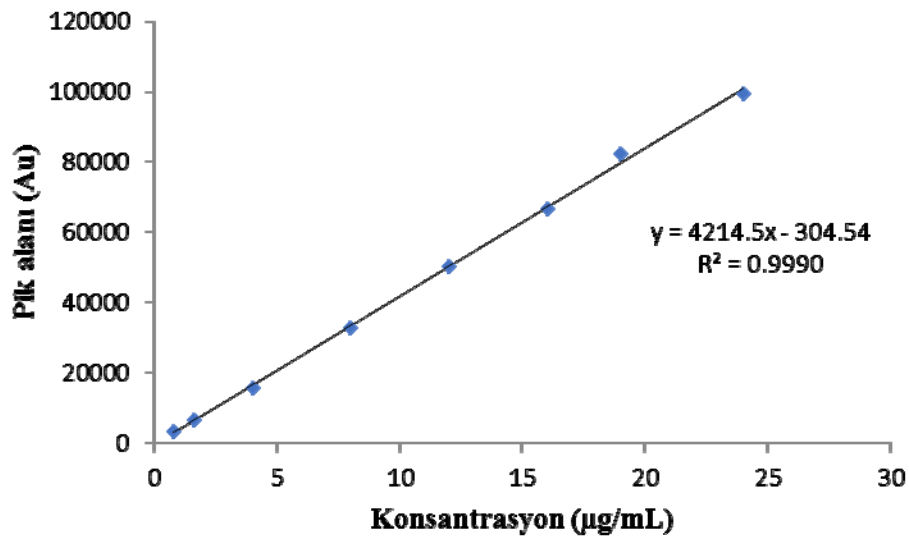
Şekil 4.54. Enalapril – sodyum stearil fumarat karışımının FTIR spektrumu



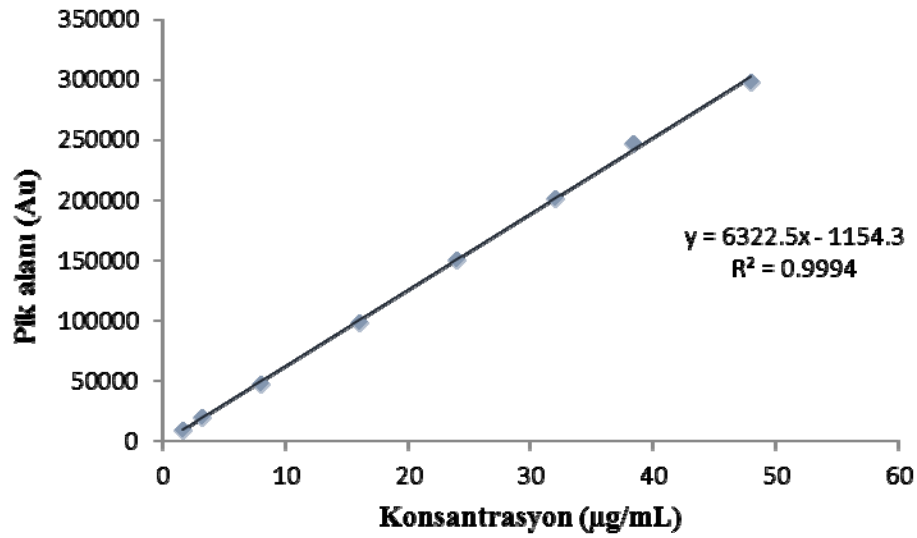
Şekil 4.55. Enalapril – prejelatinize nişasta karışımının FTIR spektrumu

4.2. Etkin Maddelerin Miktar Tayini ve Validasyonu

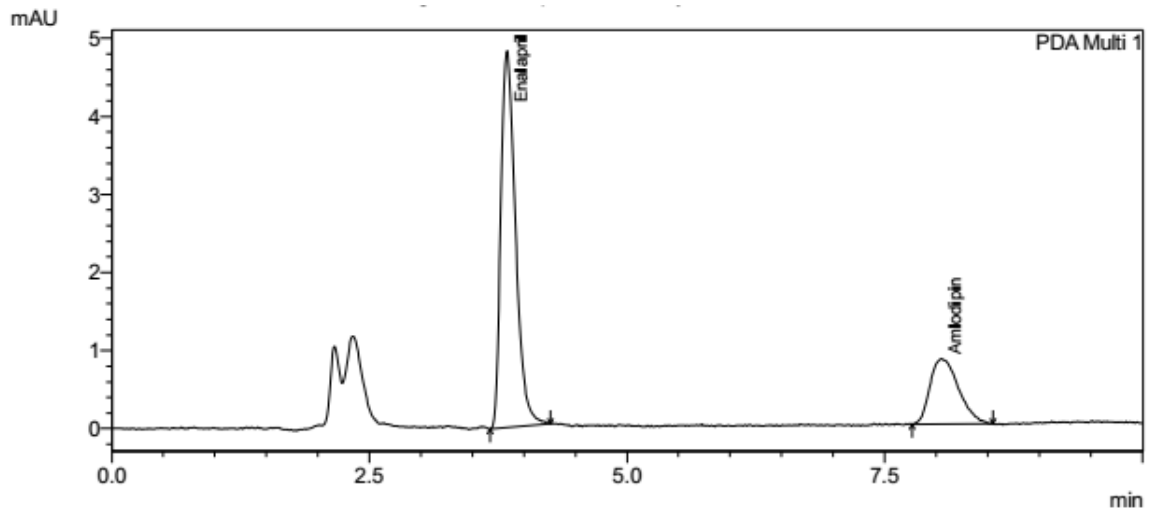
Bölüm 3.2.2’de belirtilen kromatografik koşullar kullanılarak geliştirilen HPLC analiz yöntemine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi amlodipin ve enalapril için sırasıyla Şekil 4.56 ve Şekil 4.57’de verilmiştir. Bu yöntem ile gözlenen piklere ait kromatogram ise Şekil 4.58’de verildi. Alıkonma zamanları enalapril için 3,8 dk; amlodipin için ise 8,0 dk olarak kaydedildi.



Şekil 4.56. Amlodipin besilatın kalibrasyon doğrusu ve denklemi



Şekil 4.57. Enalapril maleatın kalibrasyon doğrusu ve denklemini



Şekil 4.58 Geliştirilen yöntemde gözlenen enalapril ve amlodipin pikleri

4.2.1. Box-Behnken deney tasarımıyla yöntemin optimizasyonu

Geliştirilen yöntemi sağlamlığı Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi incelendi. BBD tablosu ve yanıtlar Çizelge 4.7'de verildi.

Çizelge 4.7 BBD tasarım ile analitik yöntemle ait faktörler ve elde edilen yanıtlar

No	Faktörler				Yanıtlar	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂
	Kolon sıcaklığı (°C)	Akış hızı (mL/dk)	Mobil fazdaki metanol oranı (%)	Mobil faz pH'sı	Amlodipin konsantrasyonu (µg/mL)	Enalapril maleat konsantrasyonu (µg/mL)
1	30	1,2	5	3,2	15,888	32,058
2	30	1,2	10	3,0	16,171	32,090
3	35	1,4	10	3,0	13,729	27,696
4	25	1,0	10	3,0	18,749	37,797
5	30	1,2	10	3,0	15,991	31,951
6	25	1,2	5	3,0	15,998	31,954
7	30	1,4	10	3,2	13,837	28,039
8	35	1,2	15	3,0	16,102	32,001
9	30	1,2	15	2,8	15,954	31,684
10	25	1,2	15	3,0	16,047	32,003
11	25	1,2	10	3,2	16,051	32,185
12	35	1,2	5	3,0	16,078	31,909
13	25	1,4	10	3,0	13,022	27,539
14	30	1,4	5	3,0	13,822	27,465
15	30	1,0	5	3,0	19,209	38,283
16	30	1,2	15	3,2	16,084	32,385
17	30	1,2	10	3,0	16,059	31,844
18	35	1,2	10	2,8	16,045	31,391
19	35	1,2	10	3,2	16,099	32,295
20	30	1,2	10	3,0	16,083	31,960
21	30	1,2	5	2,8	16,137	31,772
22	35	1,0	10	3,0	19,132	38,345
23	30	1,2	10	3,0	16,094	31,998
24	30	1,4	15	3,0	13,868	27,869
25	25	1,2	10	2,8	15,920	31,214
26	30	1,0	15	3,0	19,321	38,836
27	30	1,4	10	2,8	13,721	26,818
28	30	1,0	10	2,8	19,084	36,981
29	30	1,0	10	3,2	19,149	39,053

Çizelge 4.7’de verilen deney sonuçları Design Expert® 11’de değerlendirildiğinde yazılım görüldüğü gibi her iki yanıt için de lineer model kullanımını önerdi.

Deney tasarımında önemli adımlardan biri anlamlı bir model elde etmektir. Uyum eksikliği (Lack of fit) parametresinin de anlamsız olması istenir.

Birinci yanıt (Y_1) olan amlodipin konsantrasyonu için program lineer model kullanılmasını önermiştir. Oluşan modele ait ANOVA sonuçları Çizelge 4.8’de sunulmuştur. Buna modele göre pik alanlarının ölçümü ile tespit edilen amlodipin konsantrasyonu üzerinde anlamlı tek faktör akış hızı bulundu.

Çizelge 4.8. Amlodipin konsantrasyonu cevabı için oluşan modelin ANOVA sonuçları

	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
Model	64,98	4	16,24	16,05	< 0,0001	Anlamlı
X ₁	0,1848	1	0,1848	0,18	0,6730	
X ₂	64,74	1	64,74	63,97	< 0,0001	Anlamlı
X ₃	0,1671	1	0,1671	0,17	0,6881	
X ₄	2,02	1	2,02	1,99	0,1708	
Residual	24,29	24	1,01			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	13,85	19	0,7291	0,3492	0,9569	Anlamsız
Saf hata (pure error)	10,44	5	2,09			
Total	89,27	28				

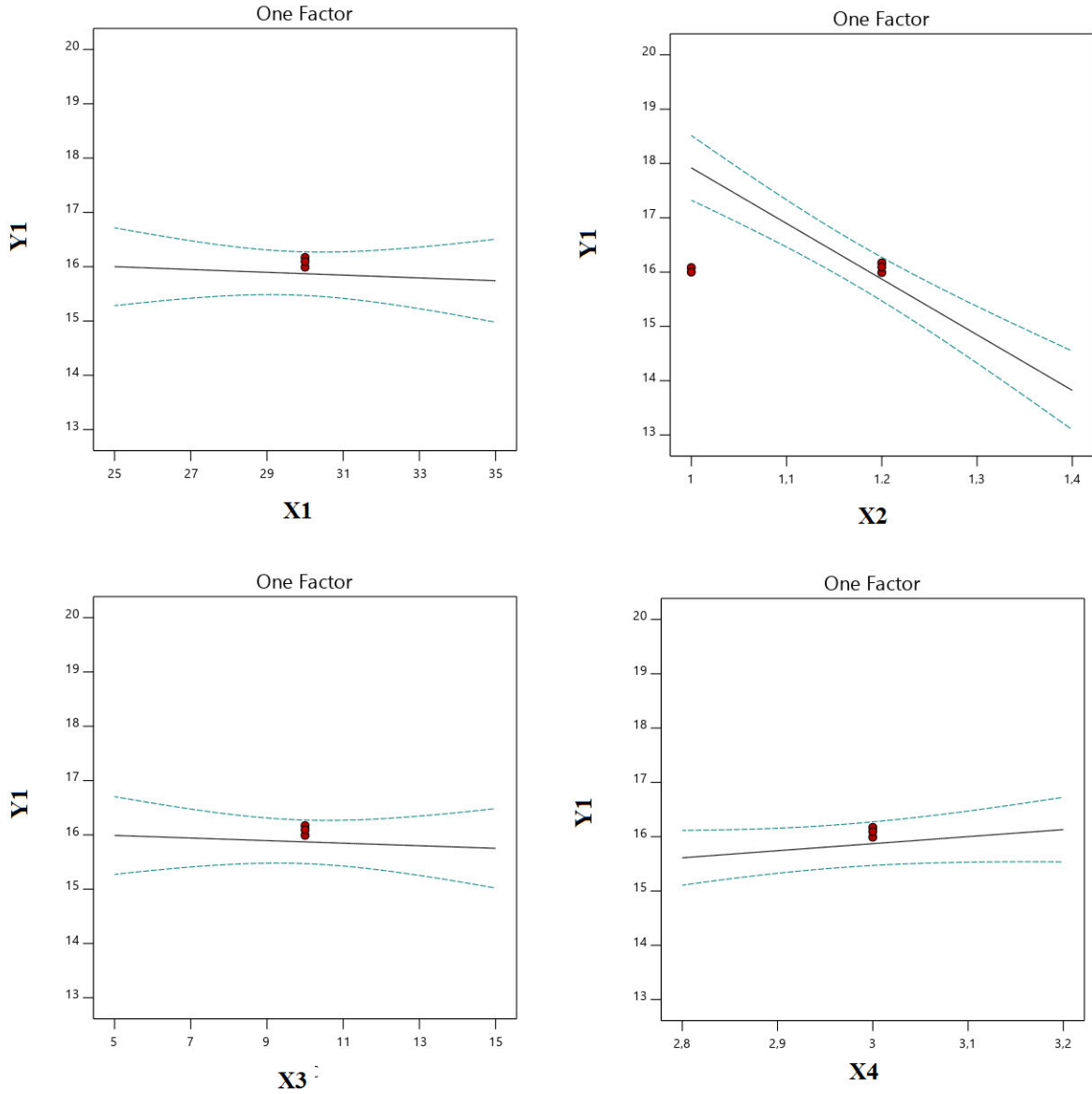
Modelin uyumu için R^2 , ayarlanmış determinasyon katsayısı (R^2_{adj}), tahmin edilen determinasyon katsayısı (R^2_{pred}) ve yeterli kesinlik (Adeq Precision) parametreleri değerlendirilmiştir. R^2 ’nin 1’e yakın olması, R^2_{adj} ve R^2_{pred} değerleri arasındaki farkın 0,2’den düşük olması istenir. Adeq Precision değeri ise sinyal/gürültü oranını ifade eder ve bu değer 4’ten büyük olması istenir.

Amlodipin konsantrasyonu cevabı R^2 değeri 0,7279’dur. Bu değer 1’e çok yakın olmasa da deney tasarımlarında kabul edilebilir bir değerdir. R^2_{adj} ve R^2_{pred} farkı 0,0862 ve Adeq Precision değeri 11,05’tir.

Amlodipin konsantrasyonu cevabı için kurulan ikinci derece polinomiyal model Eş. 4.1’de verildi.

$$Y_1 = 25,28703 - 0,025796X_1 - 10,24626X_2 - 0,023682X_3 + 1,29672X_4 \quad (4.1)$$

Model sonuçlarına göre tek anlamlı faktör olan akış hızı amlodipin konsantrasyonu üzerinde negatif etkili bulundu. Akış hızı arttıkça hesaplanan amlodipin konsantrasyonunun azaldığı gözlemlendi. Sonuçlara göre faktörler arasında bir etkileşim gözlenmedi. Faktörler ve amlodipin konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren tek yönlü grafikler Şekil 4.59’da verildi.



Şekil 4.59. Amlodipin konsantrasyonu üzerine faktörlerin etkisi

(Y1: amlodipin konsantrasyonu; X1: Kolon sıcaklığı; X2: Akış hızı; X3: Mobil fazdaki metanol oranı; X4: Mobil fazın pH'sı.)

İkinci yanıt (Y2) olan enalapril maleat konsantrasyonu için program lineer model kullanılmasını önermiştir. Oluşan modele ait ANOVA sonuçları Çizelge 4.9’da

sunulmuştur. Buna modele göre pik alanlarının ölçümü ile tespit edilen enalapril konsantrasyonu üzerinde anlamlı tek faktör önceki cevapla benzer olarak akış hızı bulundu.

Çizelge 4.9. Enalapril konsantrasyonu cevabı için oluşan modelin ANOVA sonuçları

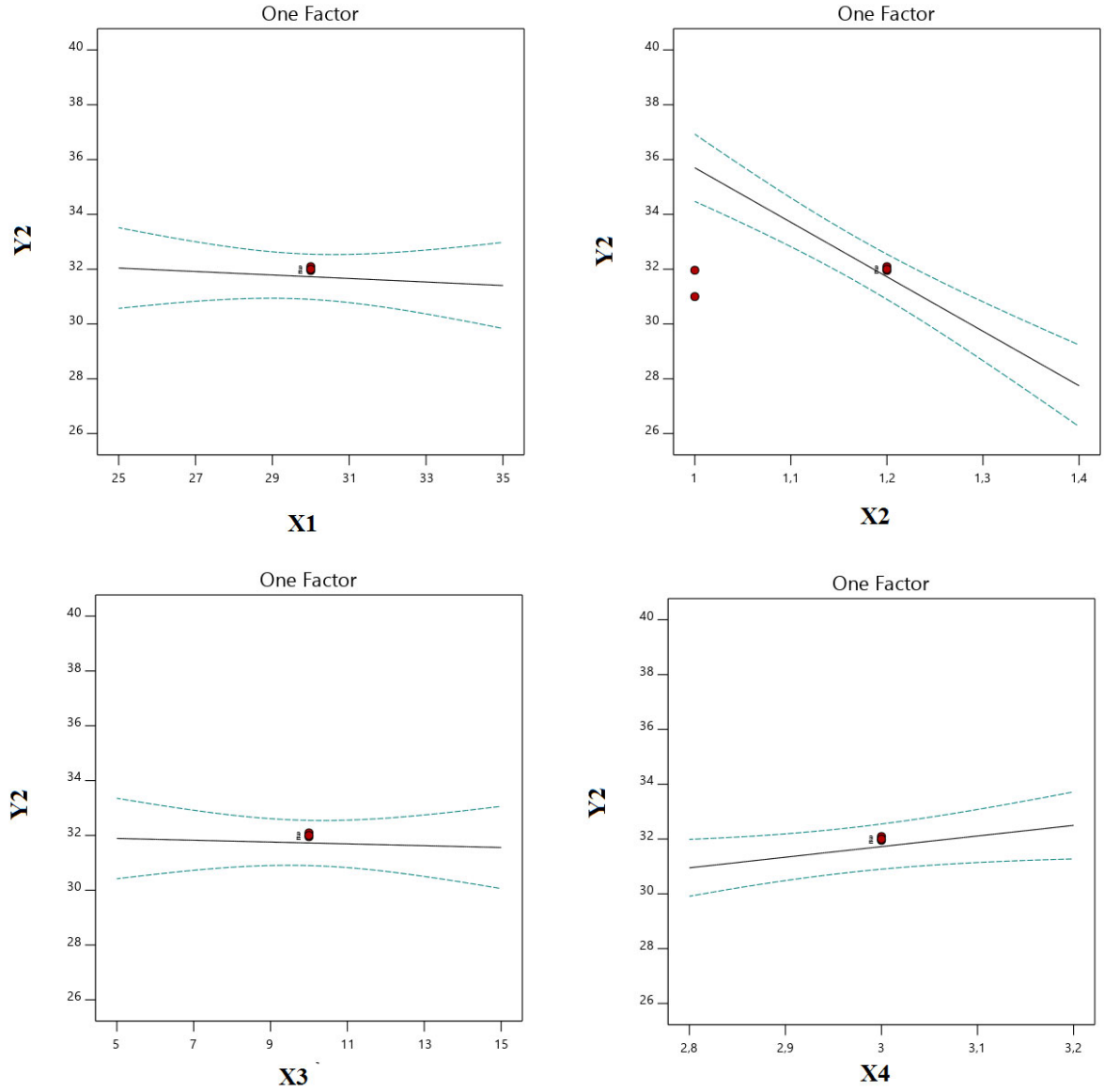
	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
Model	248,31	4	62,08	14,54	< 0,0001	Anlamlı
X ₁	1,13	1	1,13	0,2639	0,6122	
X ₂	243,80	1	243,80	57,10	< 0,0001	Anlamlı
X ₃	0,3202	1	0,3202	0,0750	0,7866	
X ₄	18,00	1	18,00	4,21	0,0511	
Residual	102,48	24	4,27			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	58,51	19	3,08	0,3502	0,9564	Anlamsız
Saf hata (pure error)	43,97	5	8,79			
Total	350,78	28				

Enalapril konsantrasyonu cevabı R^2 değeri 0,7079'dur. R^2_{adj} ve R^2_{pred} farkı 0,0587 ve Adeq Precision değeri 11,07'dir.

Enalapril konsantrasyonu (Y_2) cevabı için kurulan ikinci derece polinomial model Eşitlik 4.2'de verildi.

$$Y_2 = 46,20388 - 0,063693X_1 - 19,88294X_2 - 0,032785X_3 + 3,87259X_4 \quad (4.2)$$

Model sonuçlarına göre tek anlamlı faktör olan akış hızıdır. Akış hızı arttıkça hesaplanan enalapril konsantrasyonunun azaldığı gözlemlendi. Sonuçlara göre faktörler arasında bir etkileşim gözlenmedi. Faktörler ve enalapril konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren tek yönlü grafikler Şekil 4.60'da verildi.



Şekil 4.60. Enalapril konsantrasyonu üzerine faktörlerin etkisi

(Y2: enalapril konsantrasyonu, X1: Kolon sıcaklığı; X2: Akış hızı; X3: Mobil fazdaki metanol oranı; X4: Mobil fazın pH'sı.)

Yöntemin optimizasyonu

BBD tasarım sonucunda Design Expert® 11'e hedeflenen konsantrasyonlar tanımlanarak optimizasyon işlemi yapıldı. Önerilen optimum yöntemlerden arzulanabilirlik (desirability) değeri 0,996 olan bir yöntem seçildi. Optimize yöntemin kromatografik koşulları aşağıda verilmektedir:

Cihaz	: HPLC
Kolon	: Waters, C ₁₈ , 5 µm, 250 x 4,6 mm
Dedektör	: PDA
Dalga boyu	: 215 nm
Sıcaklık	: 30°C
Akış hızı	: 1,205 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 5 µL
Mobil faz	: Metanol : Su (pH 2,95; o-fosforik asit ile ayarlanır) (10 : 90, h/h)

4.2.2. Miktar tayini için analitik yöntem validasyonu

Validasyon, optimize edilen yöntem ile gerçekleştirildi. Validasyonda incelenen parametrelere ait veriler aşağıda sunulmaktadır:

Sistem uygunluğu (System suitability)

%100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisinin sisteme 6 kez art arda enjeksiyonu sonucu gözlenen piklerin alanı, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, plaka sayısı ve resolüsyon değeri Çizelge 4.10'da verildi.

Çizelge 4.10. Analiz yöntemine ait sistem uygunluk parametreleri

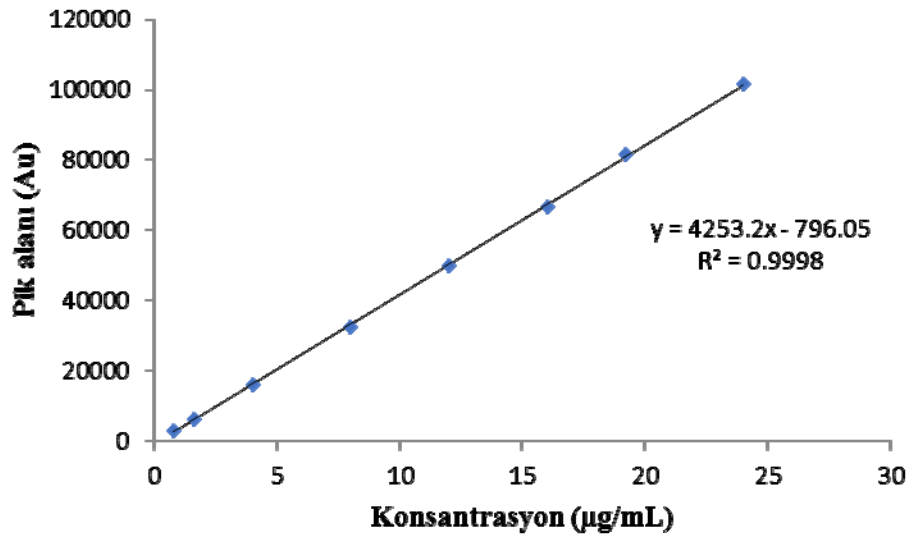
	AML					ENA				
	t _R	A	T	N	Rs	t _R	A	T	N	Rs
1	7,94	67398	1,34	6338	13,11	3,80	198580	1,46	4297	5,26
2	7,95	66956	1,32	6495	13,27	3,80	198336	1,47	4338	5,48
3	7,94	66765	1,32	6656	13,37	3,81	198609	1,47	4408	5,47
4	7,94	66806	1,34	6709	13,44	3,80	198476	1,48	4432	5,37
5	7,90	67485	1,35	6811	13,51	3,78	198938	1,48	4452	5,53
6	7,90	66983	1,35	6888	13,55	3,78	199003	1,47	4430	5,52
Ort	7,93	67066	1,34	6650	13,37	3,79	198657	1,47	4393	5,44
%VK	0,253	0,454	0,894	3,063	1,22	0,270	0,132	0,409	1,40	1,94

(t_R: alıkonma zamanı; A: pik alanı; T: kuyruklanma faktörü; N: plaka sayısı; Rs: resolüsyon)

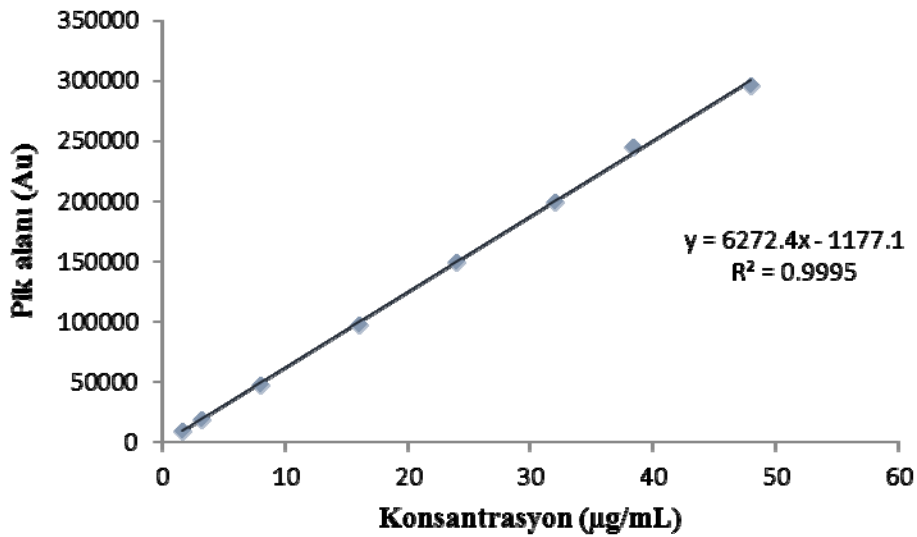
Pik alanlarının %VK değeri 2'den küçük, kuyruklanma faktörü 1,5'ten küçük, teorik plaka sayısının 3000'den büyük ve resolüsyon değeri 3'ten büyüktür. Spesifikasyonları karşılamaktadır.

Doğrusallık (linearity) ve aralık (range)

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Kalibrasyon doğruları maddelerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları temel alınarak çizildi. Amlodipin için R^2 0,9998, enalapril maleat için ise 0,9995 olarak hesaplandı. Amlodipin ve enalapril maleat için kalibrasyon doğruları sırasıyla Şekil 4.61 ve 4.62’de verildi.



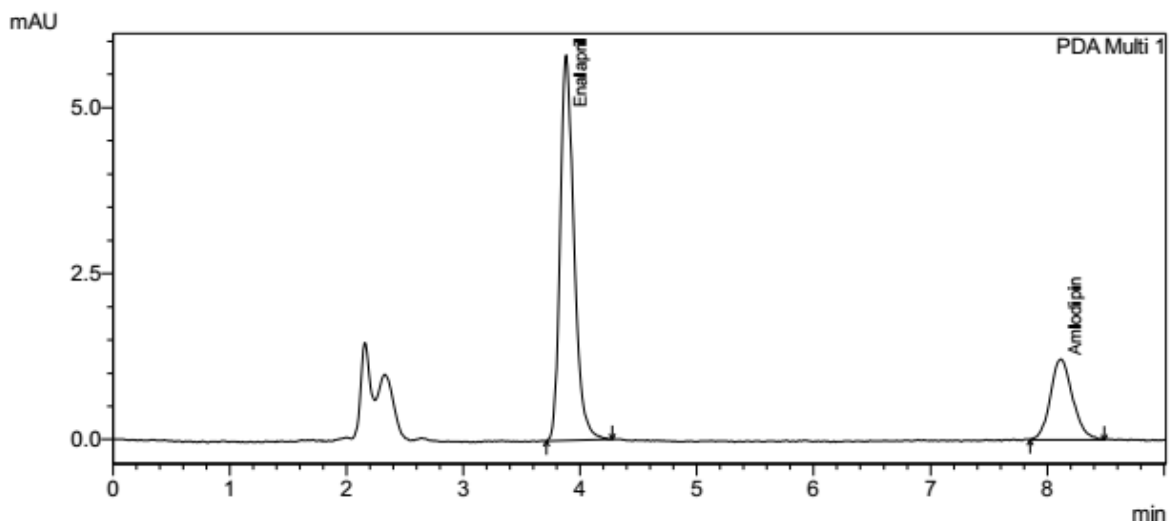
Şekil.4.61. Amlodipinin kalibrasyon doğrusu ve denklemi



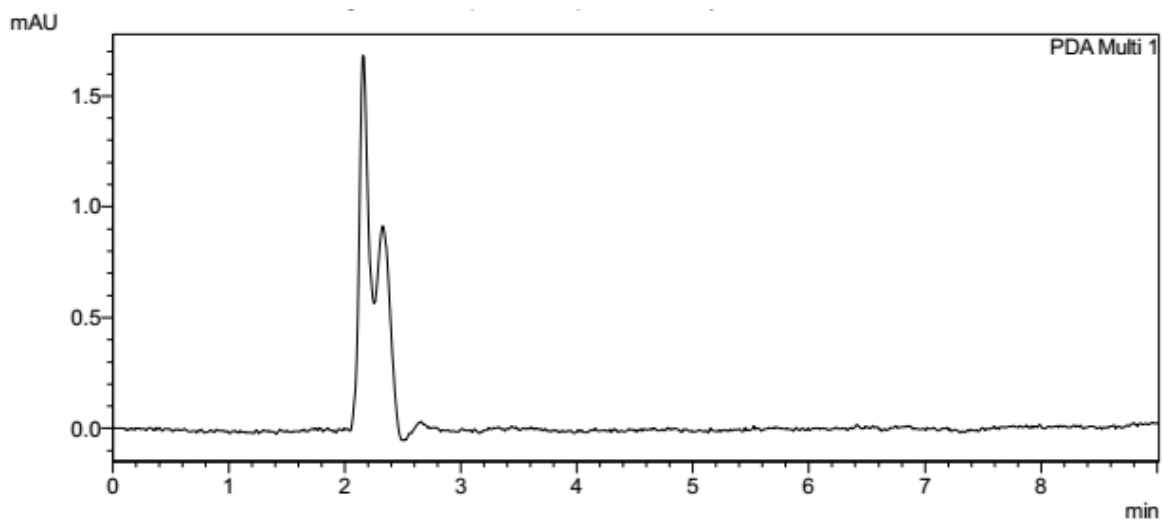
Şekil.4.62. Enalapril maleatın kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Seçicilik (specificity)

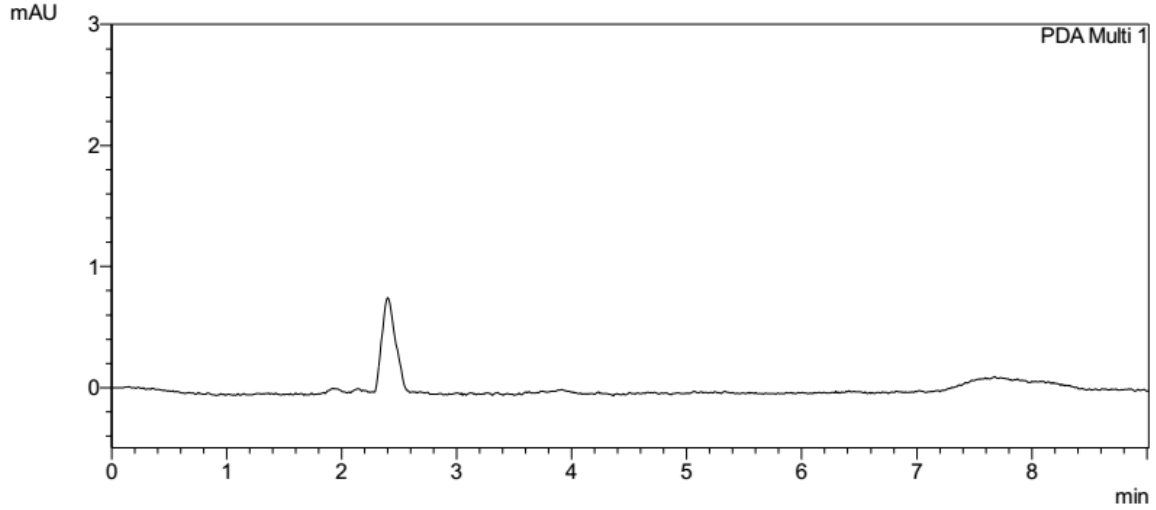
Kolona seyreltme çözeltisi olan pH 1,2 tamponu ve mobil fazı oluşturan metanol ve su (mobil faz pH'sı 2,95) enjekte edildiğinde amlodipin ve enalapril pikinin elde edildiği dakikalarda herhangi bir girişim gözlenmedi. Şekil 4.63'de %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisinin analizine ait kromatogram görülmektedir. Şekil 4.64-4.66'da ise mobil fazı oluşturan çözücülere ait pikler görülmektedir.



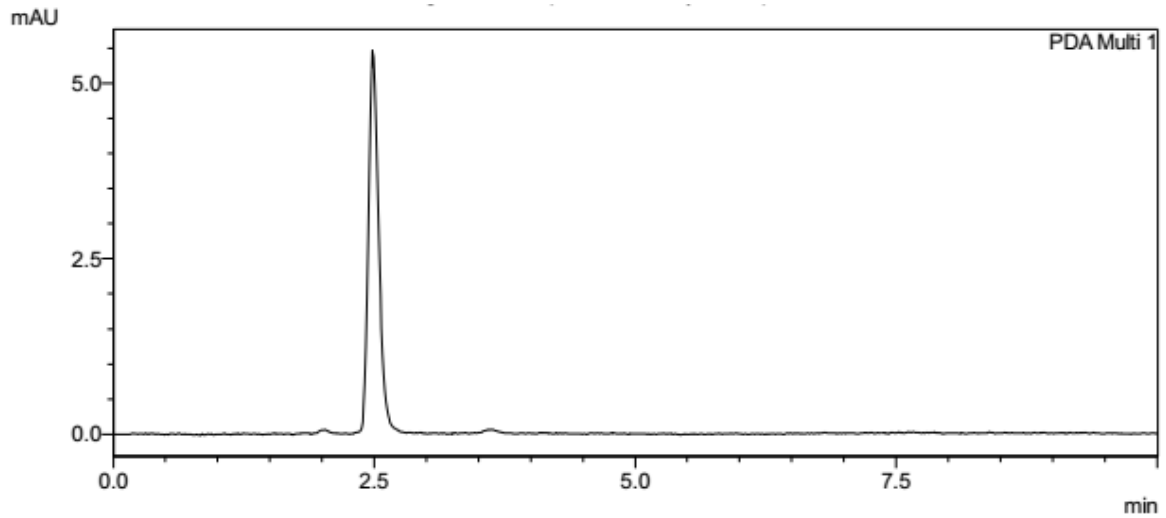
Şekil 4.63. Optimize edilen yöntemde gözlenen enalapril ve amlodipin pikleri



Şekil 4.64. pH 1,2 enjeksiyonu ile elde edilen kör kromatogram



Şekil 4.65. Metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.66. Distile su (pH 2,95) enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram

*Distile su pH'sı fosforik asitle 2,95'e ayarlandı

Doğruluk (accuracy)

Doğruluk ölçütü hesaplanırken çalışma konsantrasyonunun %75, %100 ve %120'sine denk gelen çözeltiler hazırlanarak, optimize edilen yöntem ile analiz edildiğindeki geri kazanım yüzdeleri saptandı. Her iki etkin maddenin geri kazanım yüzdeleri %99-102 arasında bulundu. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11 ve 4.12'de verildi.

Çizelge 4.11. AML için doğruluk sonuçları

AML						
No	12 µg/mL	% geri elde	16 µg/mL	% geri elde	19,2 µg/mL	% geri elde
1	11,99	99,89	15,97	99,81	19,45	101,3
2	12,00	100,0	15,98	99,85	19,46	101,3
3	12,05	100,4	15,93	99,56	19,32	100,6
Ort	<i>12,01</i>	<i>100,1</i>	<i>15,96</i>	<i>99,74</i>	<i>19,41</i>	<i>101,1</i>
SS	<i>0,03</i>	<i>0,3</i>	<i>0,03</i>	<i>0,16</i>	<i>0,08</i>	<i>0,4</i>
VK(%)	<i>0,27</i>	<i>0,3</i>	<i>0,16</i>	<i>0,16</i>	<i>0,40</i>	<i>0,4</i>

Çizelge 4.12. ENA için doğruluk sonuçları

ENA						
No	24 µg/mL	% geri elde	32 µg/mL	% geri elde	38,4 µg/mL	% geri elde
1	24,05	100,2	31,99	99,97	39,12	101,9
2	24,02	100,1	31,92	99,75	38,99	101,5
3	23,96	99,85	31,83	99,47	38,90	101,3
Ort	<i>24,01</i>	<i>100,0</i>	<i>31,91</i>	<i>99,73</i>	<i>39,00</i>	<i>101,6</i>
SS	<i>0,05</i>	<i>0,2</i>	<i>0,08</i>	<i>0,25</i>	<i>0,11</i>	<i>0,3</i>
VK(%)	<i>0,19</i>	<i>0,2</i>	<i>0,26</i>	<i>0,26</i>	<i>0,28</i>	<i>0,3</i>

Kesinlik (precision)

Yöntemin kesinliğini değerlendirmek için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelendi.

Tekrarlanabilirlik (repeatability)

Tekrarlanabilirlik ölçütü hesaplanırken %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi 10 kez art arda ölçüldü. %VK değerleri 1'den küçük bulundu. Sonuçlar Çizelge 4.13'te verilmektedir:

Çizelge 4.13. AML ve ENA'nın tekrarlanabilirlik sonuçları

No	AML	ENA
1	15,92	31,95
2	15,96	32,01
3	15,99	32,02
4	16,07	31,99
5	16,01	32,01
6	15,95	32,02
7	16,00	31,99
8	15,93	32,03
9	15,93	31,98
10	16,02	31,99
Ort	15,98	32,00
SS	0,05	0,02
VK(%)	0,31	0,07

Ara kesinlik (intermediate precision)

Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için üç farklı günde iki farklı derişimde hazırlanan numuneler analiz edildi. Sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmektedir:

Çizelge 4.14. AML ve ENA için ara kesinlik sonuçları

	AML		ENA	
	4 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	32 µg/mL
1.gün	3,91	15,92	7,93	31,94
	3,99	16,03	7,94	31,94
	3,97	15,99	7,96	31,91
2.gün	3,91	15,92	7,91	31,92
	3,92	15,94	7,94	31,96
	3,95	15,86	7,95	31,95
3.gün	3,94	15,98	7,98	32,01
	3,99	15,95	7,97	31,98
	3,96	15,92	7,81	32,01
Ort	3,94	15,93	7,93	31,96
SS	0,03	0,04	0,06	0,04
VK(%)	0,75	0,25	0,82	0,11

Dayanıklılık (stability)

Etkin maddeleri içeren çözeltiler oda sıcaklığında 72 saat boyunca bekletilerek 24 saatte bir alınan örnekler analiz edildi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklı olduğu gözlemlendi. Sonuçlar Çizelge 4.15’te verilmektedir:

Çizelge 4.15. AML ve ENA çözeltilerinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları

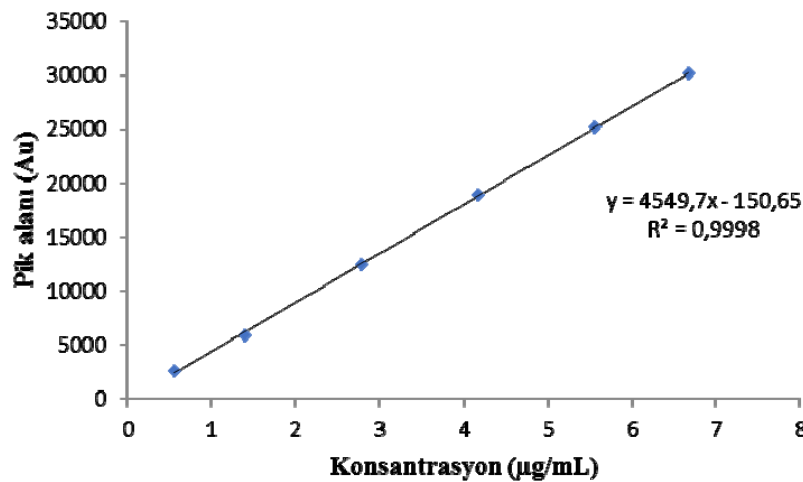
	Başlangıç (µg/mL)	24. saat (µg/mL)	48. saat (µg/mL)	72. saat (µg/mL)	SS	VK (%)
AML	8,01	8,01	7,98	7,99	0,02	0,20
ENA	15,91	15,95	15,91	15,81	0,06	0,38

4.3. Çözünme Hızı Yöntem Validasyonu

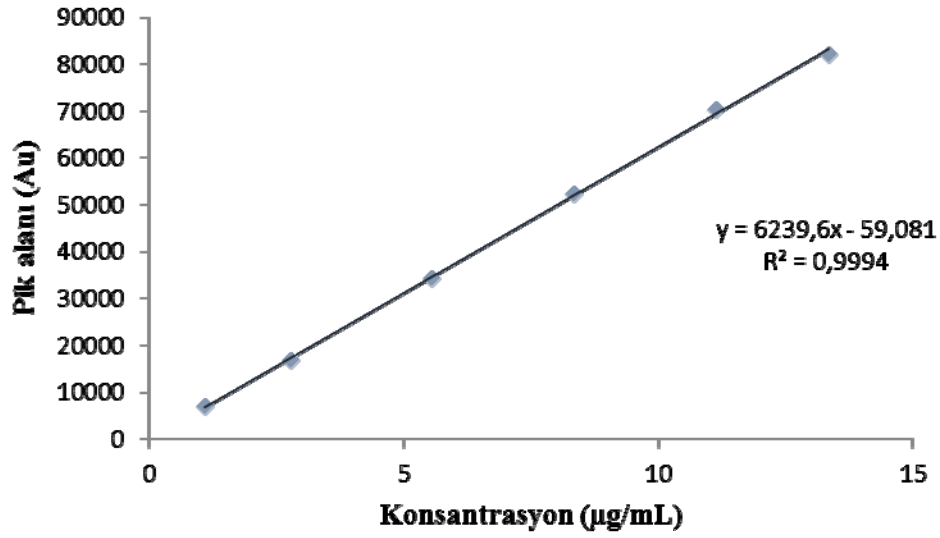
Bölüm 3.2.3’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Validasyonlarda incelenen parametrelere ait veriler aşağıda verildi.

Doğrusallık (linearity) ve aralık (range)

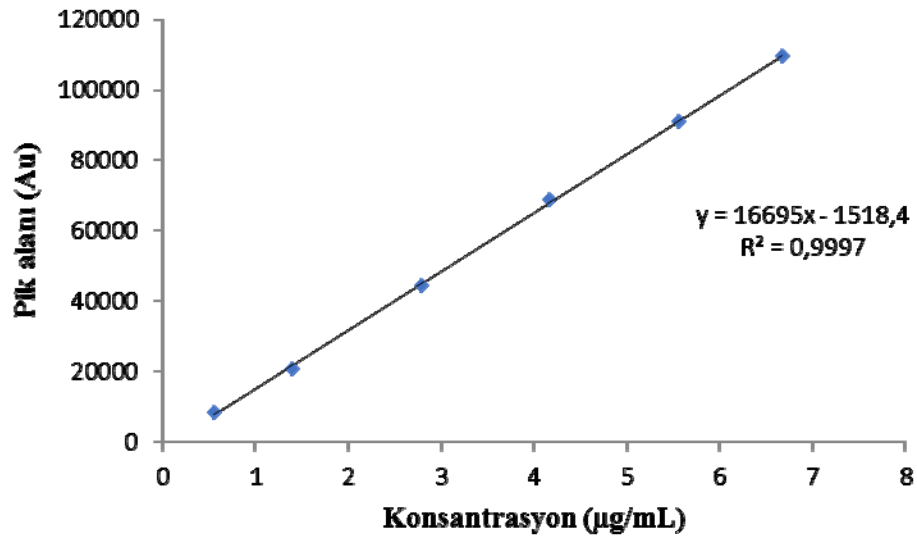
Kalibrasyon doğruları maddelerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları temel alınarak çizildi. Her iki madde için de R^2 değeri tüm ortamlarda 0,999’dan yüksek bulundu. Amlodipin ve enalapril için üç çözünme ortamında çizilen kalibrasyon doğruları Şekil 4.67-4.72’de sunulmaktadır:



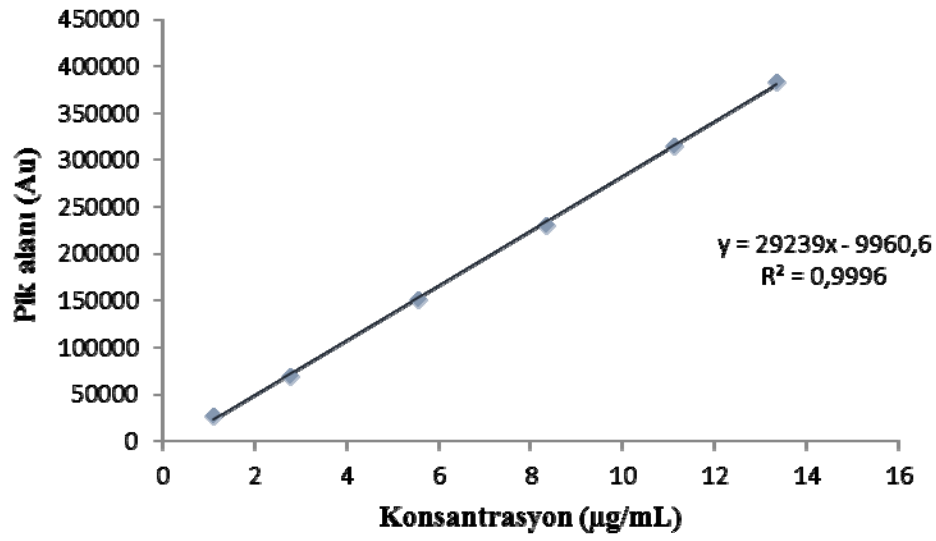
Şekil 4.67 Amlodipinin pH 1,2’deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi



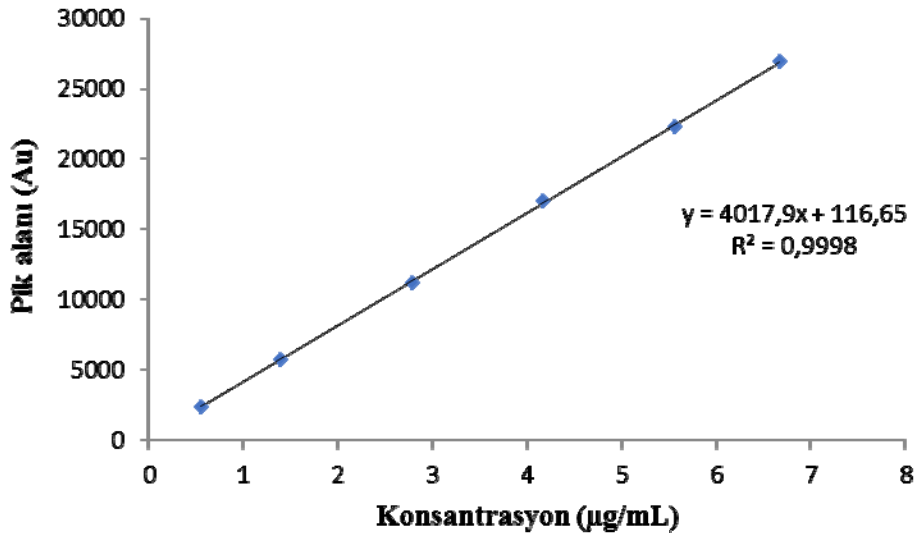
Şekil 4.68 Enalapril maleatın pH 1,2'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi



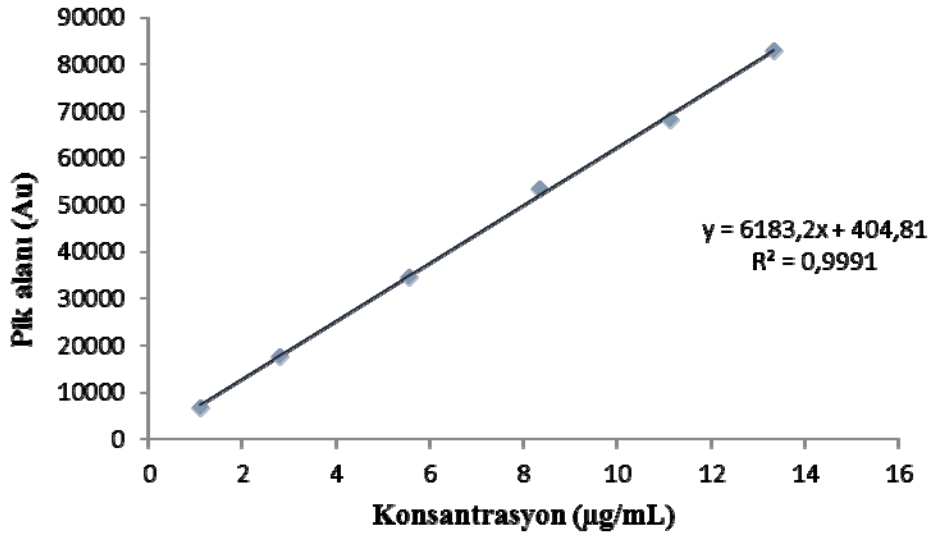
Şekil 4.69. Amlodipinin pH 4,5'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi



Şekil 4.70. Enalapril maleatın pH 4,5'teki kalibrasyon doğrusu ve denklemi



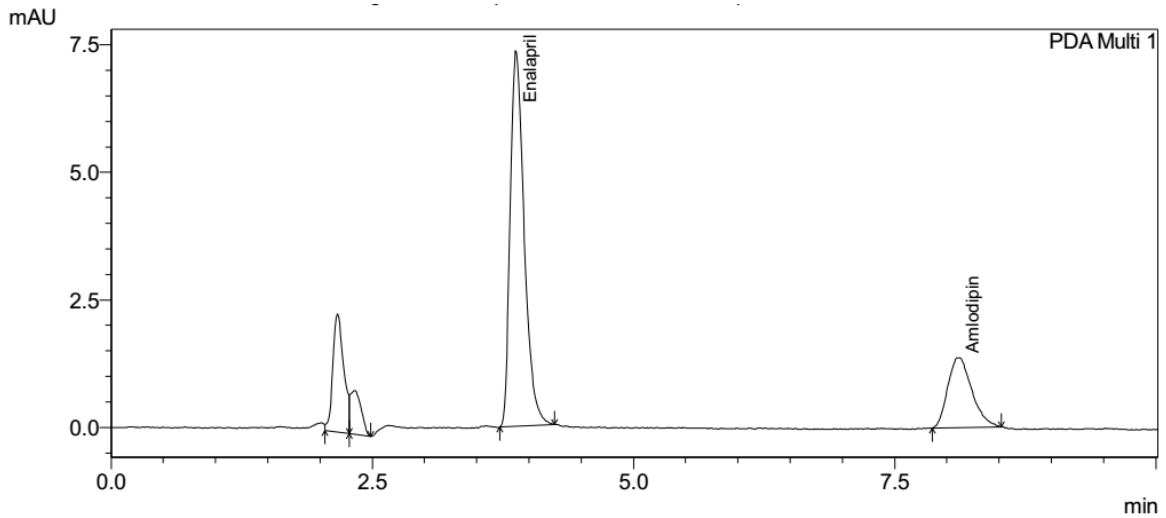
Şekil 4.71. Amlodipinin pH 6,8'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi



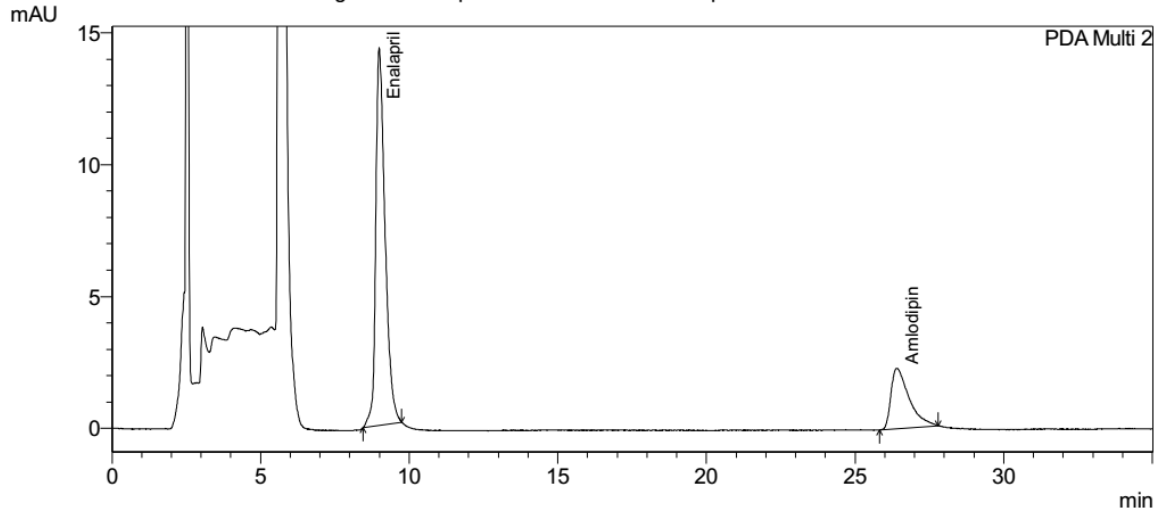
Şekil 4.72. Enalapril maleatın pH 6,8'deki kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Seçicilik (specificity)

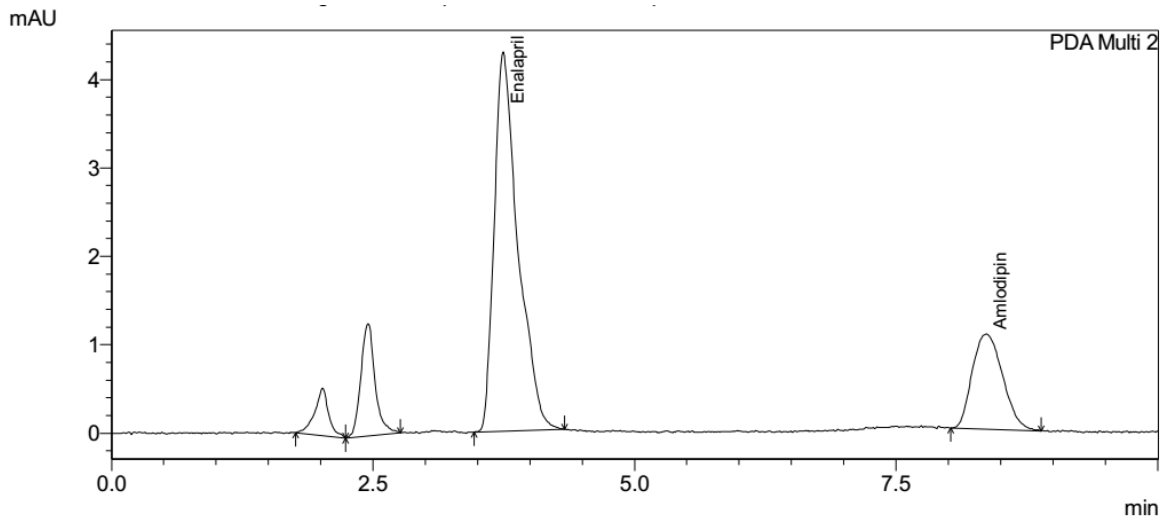
Kolona seyreltme çözeltileri ve mobil fazı oluşturan çözeltiler enjekte edildiğinde amlodipin ve enalapril pikinin elde edildiği dakikalarda herhangi bir girişim gözlenmedi. Şekil 4.73-4.75'te %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltilerinin analizine ait kromatogram görülmektedir. Şekil 4.76-4.84'te ise mobil fazı oluşturan çözücülere ait pikler görülmektedir. Etkin maddelerin çözücü ve mobil faz pikleriyle bir girişim yapmadığı gözlemlendi.



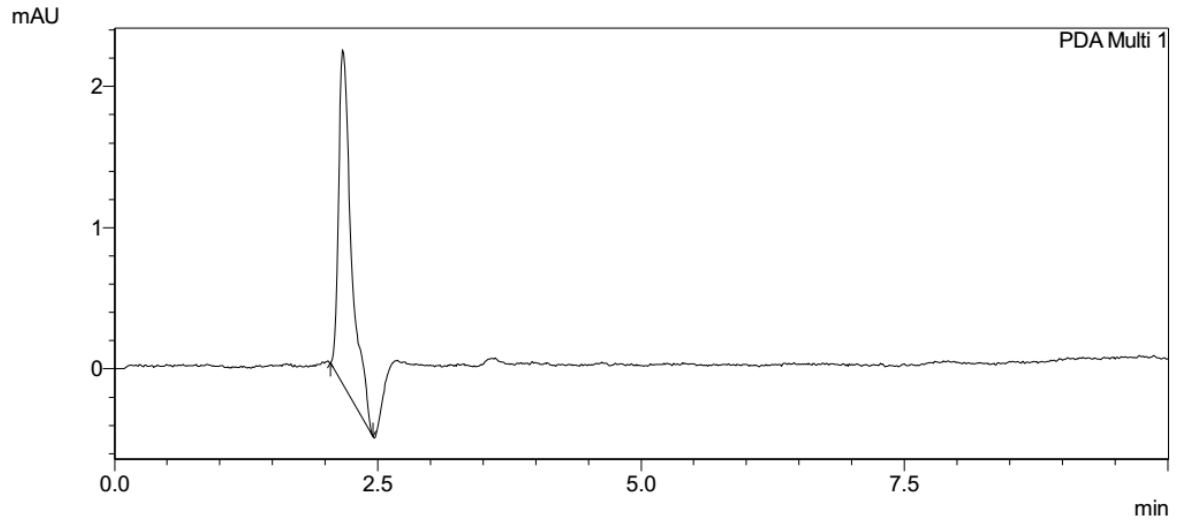
Şekil 4.73. pH 1,2'de enalapril ve amlodipin pikleri



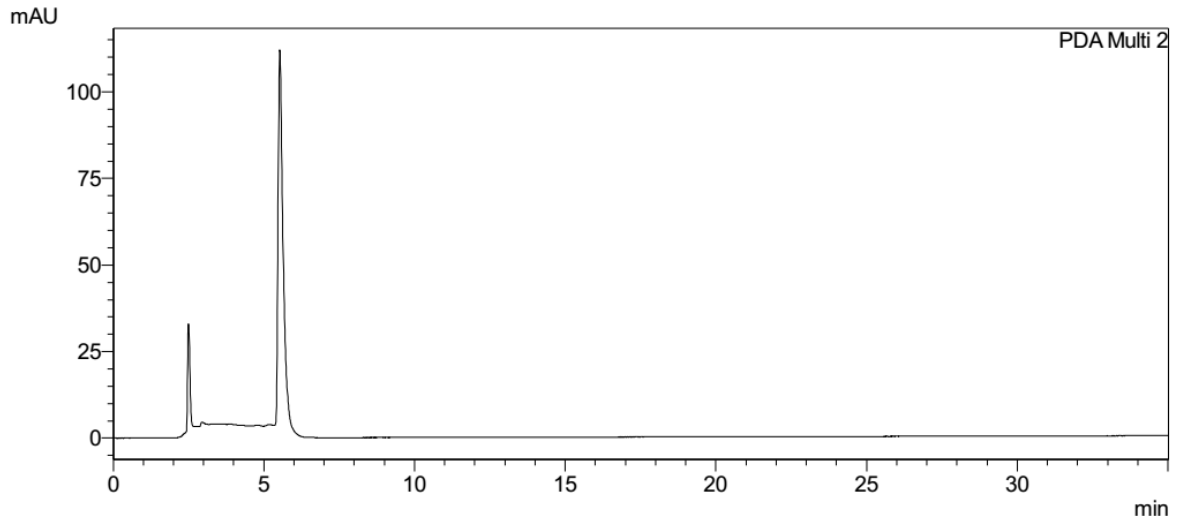
Şekil 4.74. pH 4,5'te enalapril ve amlodipin pikleri



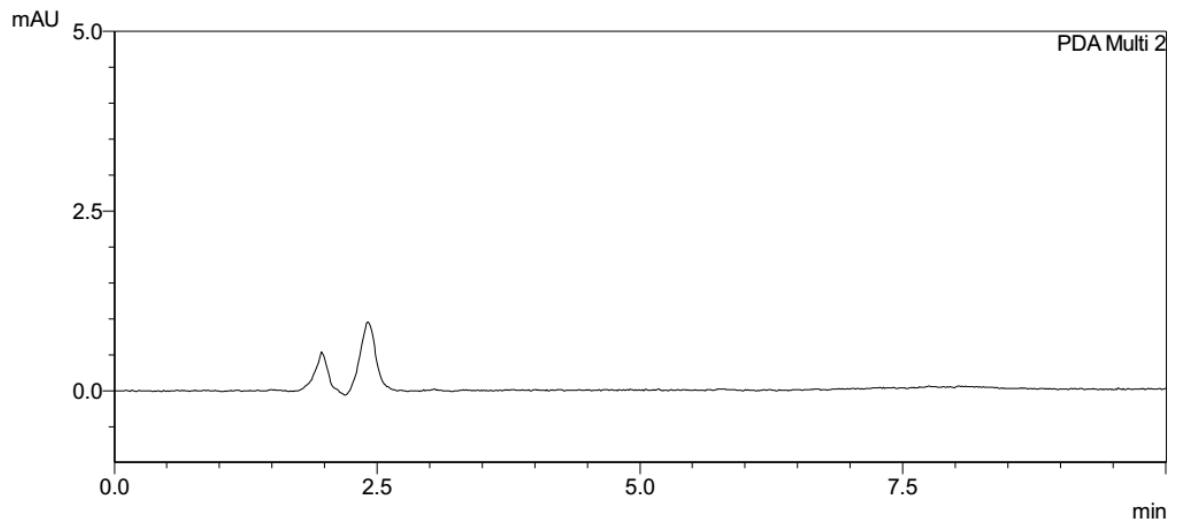
Şekil 4.75. pH 6,8'de enalapril ve amlodipin pikleri



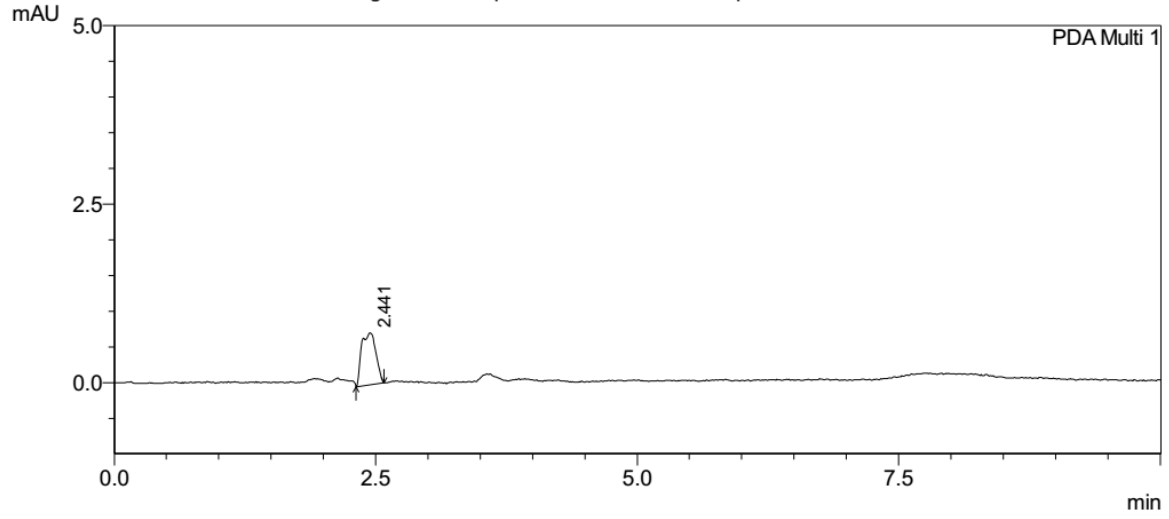
Şekil 4.76. pH 1,2 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



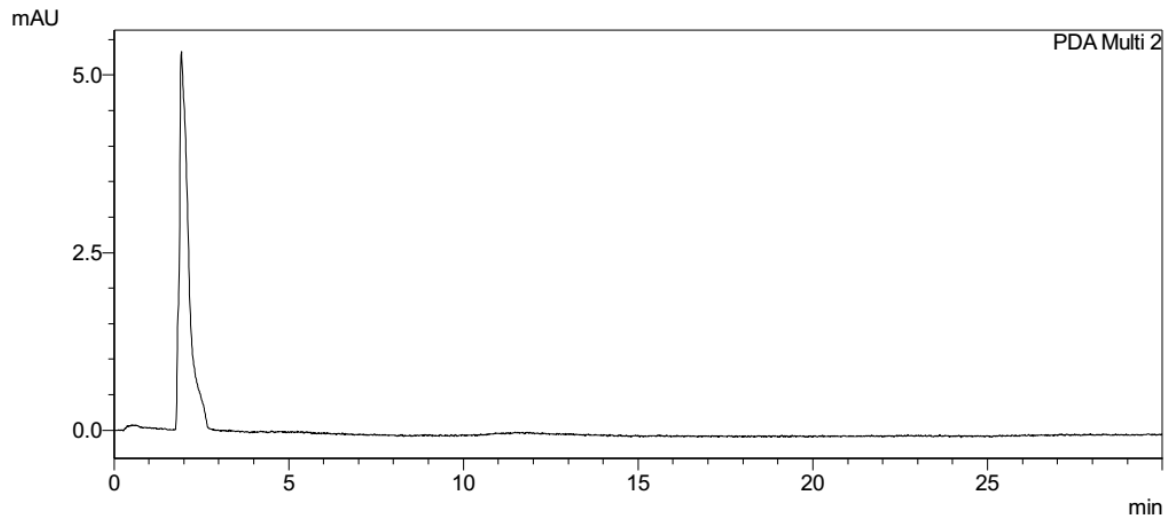
Şekil 4.77. pH 4,5 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



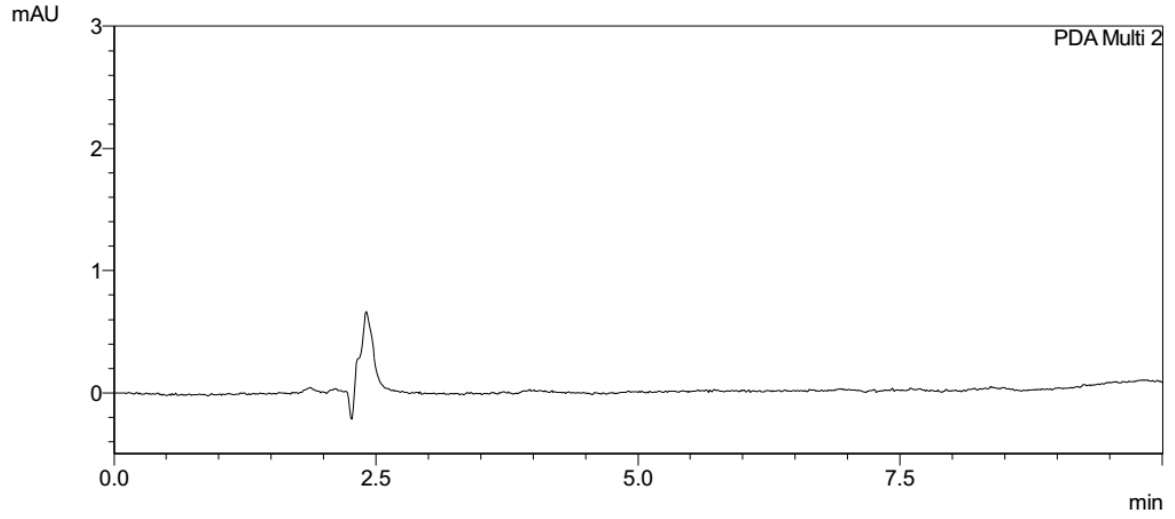
Şekil 4.78. pH 6,8 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



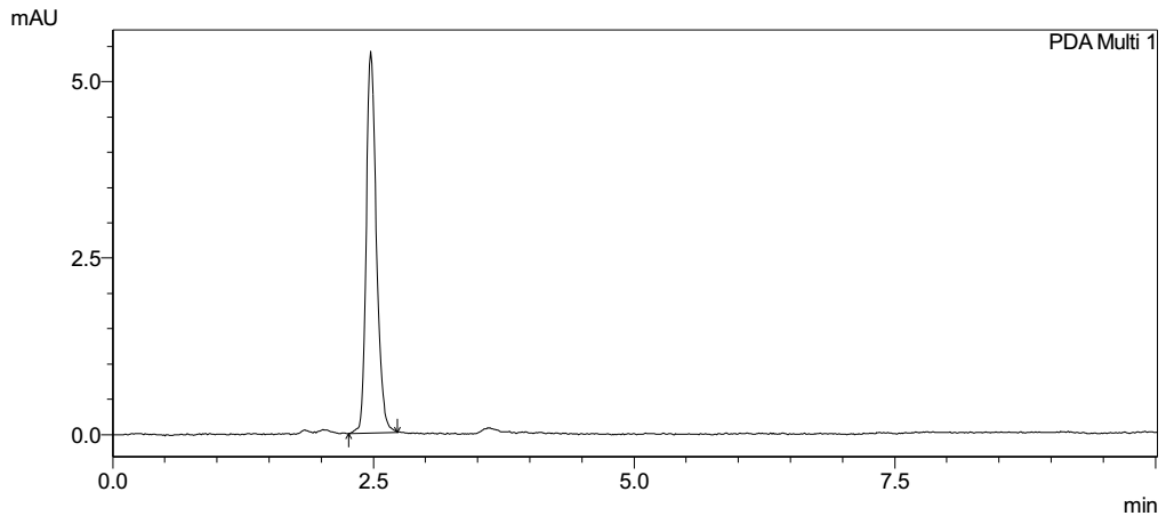
Şekil 4.79. pH 1,2 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



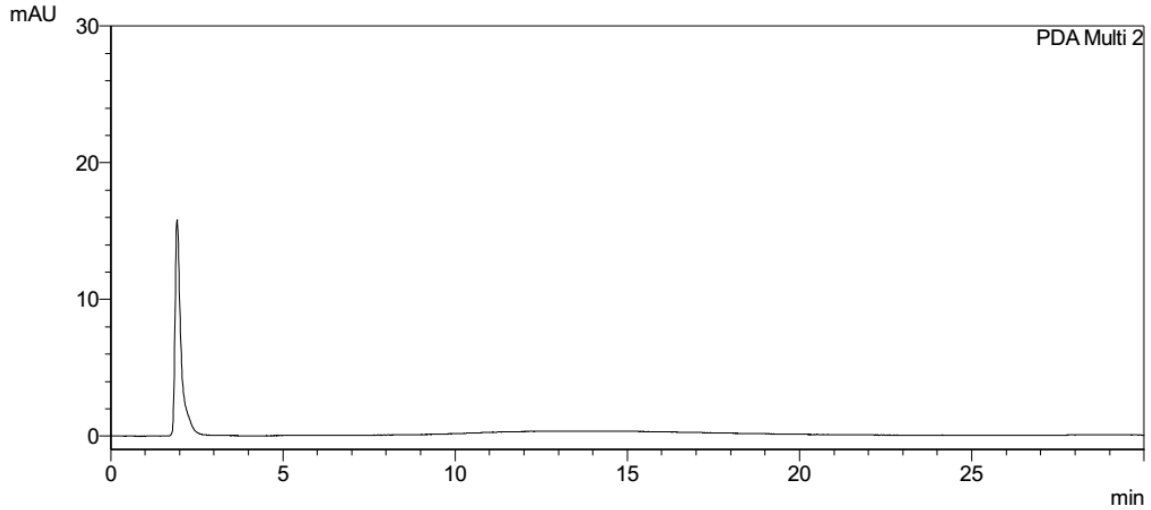
Şekil 4.80. pH 4,5 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



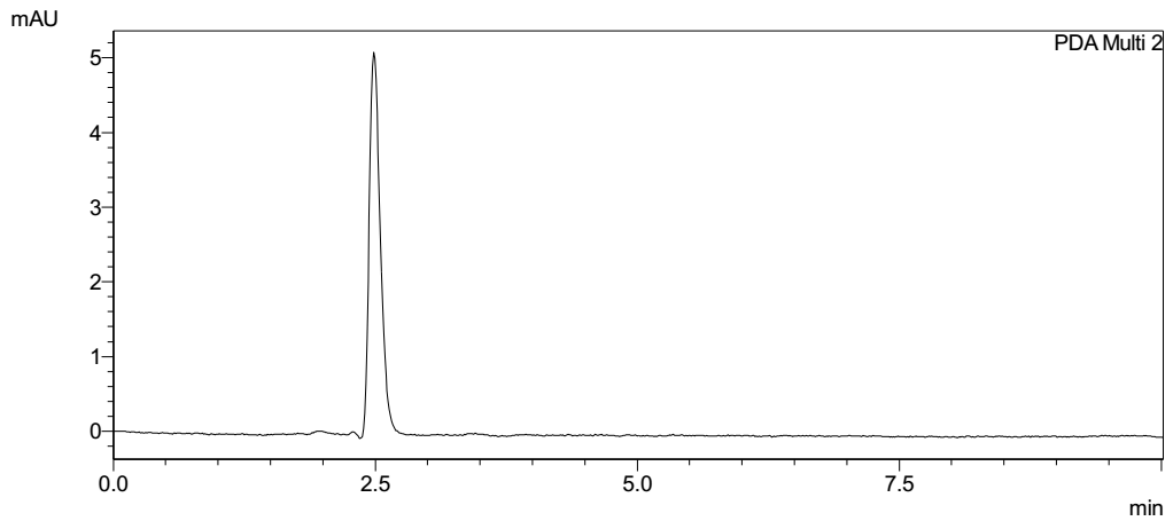
Şekil 4.81. pH 6,8 ortamı için geliştirilen yöntemde metanol enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.82. pH 1,2 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 2,95 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.83. pH 4,5 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 3,0 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 4.84. pH 6,8 ortamı için geliştirilen yöntemde pH 3,0 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram

Doğruluk (accuracy)

Doğruluk ölçütü hesaplanırken çalışma konsantrasyonunun %25, %50 ve %100'sine denk gelen çözeltiler hazırlanarak, optimize edilen yöntem ile analiz edildiğindeki geri kazanım yüzdeleri saptandı. Her iki etkin maddenin geri kazanım yüzdeleri %95-105 arasında bulundu. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16-4.21'de verilmektedir:

Çizelge 4.16. pH 1,2 ortamında AML için doğruluk sonuçları

AML						
No	1,39 µg/mL	% geri elde	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde
1	1,37	98,7	2,75	99,0	5,58	100,4
2	1,39	99,8	2,78	99,9	5,53	99,5
3	1,37	98,6	2,69	96,8	5,56	100,1
Ort	<i>1,38</i>	<i>99,0</i>	<i>2,74</i>	<i>98,6</i>	<i>5,56</i>	<i>100,0</i>
SS	<i>0,01</i>	<i>0,7</i>	<i>0,04</i>	<i>1,6</i>	<i>0,02</i>	<i>0,4</i>
VK(%)	<i>0,68</i>	<i>0,7</i>	<i>1,59</i>	<i>1,6</i>	<i>0,42</i>	<i>0,4</i>

Çizelge 4.17. pH 1,2 ortamında ENA için doğruluk sonuçları

ENA						
No	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde	11,12 µg/mL	% geri elde
1	2,78	100,0	5,53	99,5	11,18	100,5
2	2,78	100,0	5,54	99,6	11,17	100,4
3	2,81	101,1	5,54	99,6	11,20	100,7
Ort	<i>2,79</i>	<i>100,4</i>	<i>5,54</i>	<i>99,6</i>	<i>11,18</i>	<i>100,6</i>
SS	<i>0,02</i>	<i>0,6</i>	<i>0,01</i>	<i>0,1</i>	<i>0,02</i>	<i>0,1</i>
VK(%)	<i>0,64</i>	<i>0,6</i>	<i>0,08</i>	<i>0,1</i>	<i>0,14</i>	<i>0,1</i>

Çizelge 4.18. pH 4,5 ortamında AML için doğruluk sonuçları

AML						
No	1,39 µg/mL	% geri elde	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde
1	1,38	99,0	2,76	99,2	5,57	100,1
2	1,39	99,9	2,77	99,6	5,54	99,7
3	1,37	98,6	2,70	96,9	5,57	100,2
Ort	<i>1,38</i>	<i>99,2</i>	<i>2,74</i>	<i>98,6</i>	<i>5,56</i>	<i>100,0</i>
SS	<i>0,01</i>	<i>0,6</i>	<i>0,04</i>	<i>1,4</i>	<i>0,02</i>	<i>0,3</i>
VK(%)	<i>0,63</i>	<i>0,6</i>	<i>1,46</i>	<i>1,5</i>	<i>0,28</i>	<i>0,3</i>

Çizelge 4.19. pH 4,5 ortamında ENA için doğruluk sonuçları

ENA						
No	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde	11,12 µg/mL	% geri elde
1	2,80	100,5	5,49	98,7	11,13	100,1
2	2,79	100,4	5,35	96,2	11,23	101,0
3	2,80	100,6	5,51	99,1	11,18	100,5
Ort	<i>2,79</i>	<i>100,5</i>	<i>5,45</i>	<i>98,0</i>	<i>11,18</i>	<i>100,5</i>
SS	<i>0,002</i>	<i>0,1</i>	<i>0,09</i>	<i>1,6</i>	<i>0,05</i>	<i>0,5</i>
VK(%)	<i>0,09</i>	<i>0,1</i>	<i>1,62</i>	<i>1,6</i>	<i>0,45</i>	<i>0,4</i>

Çizelge 4.20. pH 6,8 ortamında AML için doğruluk sonuçları

AML						
No	1,39 µg/mL	% geri elde	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde
1	1,39	100,0	2,76	99,4	5,51	99,2
2	1,38	99,2	2,74	98,5	5,50	99,0
3	1,39	100,1	2,76	99,1	5,58	100,4
Ort	<i>1,39</i>	<i>99,8</i>	<i>2,75</i>	<i>99,0</i>	<i>5,53</i>	<i>99,5</i>
SS	<i>0,01</i>	<i>0,5</i>	<i>0,01</i>	<i>0,5</i>	<i>0,04</i>	<i>0,8</i>
VK(%)	<i>0,48</i>	<i>0,5</i>	<i>0,47</i>	<i>0,5</i>	<i>0,79</i>	<i>0,8</i>

Çizelge 4.21. pH 6,8 ortamında ENA için doğruluk sonuçları

ENA						
No	2,78 µg/mL	% geri elde	5,56 µg/mL	% geri elde	11,12 µg/mL	% geri elde
1	2,76	99,4	5,55	99,9	10,98	98,7
2	2,79	100,5	5,55	99,8	10,92	98,2
3	2,78	100,1	5,56	99,9	10,95	98,4
Ort	<i>2,78</i>	<i>100,0</i>	<i>5,55</i>	<i>99,9</i>	<i>10,95</i>	<i>98,5</i>
SS	<i>0,02</i>	<i>0,57</i>	<i>0,003</i>	<i>0,1</i>	<i>0,03</i>	<i>0,23</i>
VK%	<i>0,57</i>	<i>0,57</i>	<i>0,06</i>	<i>0,1</i>	<i>0,24</i>	<i>0,24</i>

Tekrarlanabilirlik (repeatability)

Tekrarlanabilirlik ölçütü hesaplanırken %100 konsantrasyondaki çalışma çözeltisi 10 kez art arda ölçüldü. Sonuçlar Çizelge 4.22’de verilmektedir.

Çizelge 4.22. AML ve ENA için tekrarlanabilirlik sonuçları

No	pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
	AML	ENA	AML	ENA	AML	ENA
1	5,55	11,16	5,58	11,11	5,53	10,91
2	5,55	11,20	5,56	11,15	5,51	10,91
3	5,59	11,14	5,55	11,11	5,52	10,96
4	5,56	11,11	5,56	11,15	5,53	10,95
5	5,57	11,20	5,55	11,15	5,53	10,94
6	5,59	11,20	5,57	11,12	5,53	10,92
7	5,55	11,17	5,58	11,09	5,53	10,94
8	5,54	11,14	5,55	11,10	5,52	10,93
9	5,55	11,18	5,55	11,11	5,53	10,91
10	5,57	11,20	5,55	11,09	5,52	10,95
Ort	<i>5,56</i>	<i>11,17</i>	<i>5,56</i>	<i>11,12</i>	<i>5,52</i>	<i>10,93</i>
SS	<i>0,02</i>	<i>0,03</i>	<i>0,01</i>	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>	<i>0,02</i>
VK(%)	<i>0,32</i>	<i>0,28</i>	<i>0,21</i>	<i>0,22</i>	<i>0,14</i>	<i>0,18</i>

Ara kesinlik (intermediate precision)

Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için üç farklı günde iki farklı derişimde hazırlanan numuneler analiz edildi. Sonuçlar Çizelge 4.23'te sunulmaktadır:

Çizelge 4.23. AML ve ENA'nın ara kesinlik sonuçları (n=3)

	pH 1,2				pH 4,5				pH 6,8			
	AML		ENA		AML		ENA		AML		ENA	
	<i>1,39 µg/mL</i>	<i>5,56 µg/ML</i>	<i>2,78 µg/mL</i>	<i>11,12 µg/mL</i>	<i>1,39 µg/mL</i>	<i>5,56 µg/mL</i>	<i>2,78 µg/mL</i>	<i>11,12 µg/mL</i>	<i>1,39 µg/mL</i>	<i>5,56 µg/mL</i>	<i>2,78 µg/mL</i>	<i>11,12 µg/mL</i>
1.gün	1,40	5,54	2,79	11,17	1,38	5,57	2,80	11,13	1,38	5,57	2,80	11,13
	1,40	5,55	2,78	11,17	1,39	5,54	2,79	11,23	1,39	5,54	2,79	11,23
	1,38	5,60	2,78	11,10	1,37	5,57	2,80	11,18	1,37	5,57	2,80	11,18
2.gün	1,37	5,55	2,80	11,19	1,35	5,55	2,75	11,14	1,35	5,55	2,75	11,14
	1,39	5,58	2,80	11,15	1,32	5,55	2,79	11,18	1,32	5,55	2,79	11,18
	1,39	5,56	2,79	11,02	1,37	5,55	2,80	11,13	1,37	5,55	2,80	11,13
3.gün	1,39	5,56	2,76	11,10	1,35	5,53	2,77	11,14	1,35	5,53	2,77	11,14
	1,40	5,59	2,78	11,12	1,37	5,66	2,77	11,12	1,37	5,66	2,77	11,12
	1,39	5,57	2,77	11,13	1,38	5,56	2,80	11,16	1,38	5,56	2,80	11,16
Ort	<i>1,39</i>	<i>5,57</i>	<i>2,78</i>	<i>11,13</i>	<i>1,36</i>	<i>5,57</i>	<i>2,78</i>	<i>11,14</i>	<i>1,36</i>	<i>5,57</i>	<i>2,78</i>	<i>11,14</i>
SS	<i>0,01</i>	<i>0,02</i>	<i>0,01</i>	<i>0,05</i>	<i>0,03</i>	<i>0,05</i>	<i>0,02</i>	<i>0,02</i>	<i>0,03</i>	<i>0,05</i>	<i>0,02</i>	<i>0,02</i>
VK(%)	<i>0,65</i>	<i>0,36</i>	<i>0,53</i>	<i>0,47</i>	<i>1,55</i>	<i>0,87</i>	<i>0,67</i>	<i>0,21</i>	<i>1,55</i>	<i>0,87</i>	<i>0,67</i>	<i>0,21</i>

Dayanıklılık (stability)

Etkin maddeleri içeren çözeltiler oda sıcaklığında 48 saat boyunca bekletilerek 24 saatte bir alınan örnekler analiz edildi. Analiz süresi boyunca etkin maddelerin çözelti içerisindeki dayanıklı olduğu gözlemlendi. Sonuçlar Çizelge 4.24’te verildi.

Çizelge 4.24. AML ve ENA çözeltilerinin oda sıcaklığındaki dayanıklılık sonuçları

		Başlangıç (µg/mL)	24. saat (µg/mL)	48. saat (µg/mL)	SS*	VK (%)
pH 1,2	AML	4,11	4,06	4,10	0,03	0,81
	ENA	8,21	8,17	8,32	0,03	0,38
pH 4,5	AML	4,19	4,18	4,160	0,003	0,085
	ENA	8,26	8,34	8,16	0,06	0,66
pH 6,8	AML	4,16	4,15	4,13	0,01	0,24
	ENA	8,38	8,37	8,36	0,01	0,10

*48. saatin SS değeri

4.4. Formülasyon Gelişimi

Bu çalışmada 5 mg amlodipine eşdeğer 6,94 mg amlodipin besilat ve 10 mg enalapril maleat içeren bir sabit dozlu kombinasyon tableti geliştirilmesi gerçekleştirildi. Kombine tedavideki additif etki beklenmesi nedeniyle dozları piyasadaki küçük dozları kapsamaktadır.

4.4.1. Referans ürünlerde yapılan kalite denetimleri

Amlodipin besilat için seçilen referans Norvasc® 5 mg tablettir. Firması Pfizer, Türkiye, Seri Numarası 805113; son kullanma tarihi Aralık 2022’dir.

Enalapril maleat için seçilen referans ise Enapril® 10 mg tablettir. Firması Sandoz, Türkiye, Seri Numarası, HV5236; Son kullanma tarihi, Kasım 2019’dur. 1

Seçilen referans tabletlerde Bölüm 3.2.4’te anlatılan kalite denetimleri yapıldı. Bu testlerin sonuçları Çizelge 4.25’te sunulmaktadır.

Çizelge 4.25. Referans tabletlerde yapılan kalite denetimleri

Test	Norvasc® 5 mg	Enapril® 10 mg
Görünüş	Beyaz, yuvarlak, bombeli, bir yüzü NVC5, diğer yüzü Pfizer baskılı tabletler	Kiremit rengi, yuvarlak, düz yüzeyli, çentikli tabletler
Ağırlık tekdüzeliği (mg)	201,3 ± 1,1	164,9 ± 1,00
Çap (mm)	8,06 ± 0,02	8,10 ± 0,0423
Kalınlık (mm)	3,214 ± 0,07	2,40 ± 0,00843
Friabilite (%)	0,0199	0,0270
Sertlik (N)	88,16 ± 6,15	22,85 ± 1,05
Dağılma (sn)	17,0 ± 1,2	196,7 ± 4,3
İçerik tekdüzeliği (%)	101,6 ± 2,0	99,20 ± 2,36
Miktar tayini (mg)	6,68 ± 0,07 (amlodipin besilat)	10,06 ± 0,06 (enalapril maleat)
Çözünme hızı (15.dk'da) (%)		
pH 1,2	94,3 ± 0,7	96,1 ± 0,8
pH 4,5	99,2 ± 2,1	98,2 ± 2,4
pH 6,8	100,4 ± 1,1	99,2 ± 1,9

*Değerler standart sapmaları ile birlikte verildi.

4.4.2. Deneme formülasyonun değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.4'te formülasyonu ve üretim yöntemi verilen deneme formülasyonun tablet kontrollerine ait sonuçlar Çizelge 4.26'da sunulmaktadır:

Çizelge 4.26. Deneme formülasyonda yapılan kontroller

Test	Sonuçlar
Görünüş	Beyaz, yuvarlak, tabletler
Ağırlık tekdüzeliği (mg)	159 mg $\pm$ 5,1
Friabilite (%)	0,408
Sertlik (N)	36,03 $\pm$ 4,75
Dağılma (sn)	24,0 $\pm$ 3,8
İçerik tekdüzeliği (%)	105,6 $\pm$ 9,8 (%VK=9,28) (amlodipin besilat) 111,9 $\pm$ 10,0 (%VK=8,94) (enalapril maleat)
Miktar tayini (mg)	6,87 (amlodipin besilat) 10,16 (enalapril maleat)
Çözünme hızı (15.dk'da) (%) pH 1,2	88,0 $\pm$ 10,6

Çizelge 4.26.'daki sonuçlarda görüldüğü üzere ideal olmayan koşullarda hazırlanan tabletlerde friabilite, miktar tayini, dağılma ve çözünme hızı sonuçları uygun bulundu. Lubrikanın 7 dakika karıştırmayla dağılma ve çözünme üzerinde negatif etkili olmadığı görüldü. Ancak içerik tekdüzeliği sonuçları farmakope limitleri dışında gözlendi. Bu sonuçlar risk analizi ile birlikte değerlendirildiğinde karıştırma süresi ve kullanılan yardımcı madde oranlarının optimize edilmesi, lubrikasyon aşamasının ayrıca optimize edilmesi ve dağılma parametresinin yanıt olarak alınıp sertliğin standardize edilmesine karar verildi.

4.5. Deney Tasarımı (DOE)

4.5.1. Plackett-Burman deney tasarımı ile faktör sayısının azaltılması

PBD tasarımıda 8 faktör, 3 uydurma (dummy) faktör ile toplam 12 deney gerçekleştirildi. Faktörler, formülasyondaki prejelatinize nişasta (dağıtıcı, bağlayıcı, seyreltici) yüzdesi (X_1), krospovidon (dağıtıcı) yüzdesi (X_2), hidroksipropil selüloz (bağlayıcı) yüzdesi (X_3), gliseril distearat (kaydırıcı) yüzdesi (X_4), karıştırma hızı (X_5), karıştırma süresi (X_6), lubrikasyon hızı (X_7) ve lubrikasyon süresi (X_8) olarak belirlendi.

Bağımlı değişken (yanıt) olarak amlodipin besilat miktar tayini (Y_1), enalapril maleat miktar tayini (Y_2), amlodipin besilat için pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de 15 dk'da çözünen madde miktarı (Y_3 , Y_4 ve Y_5), enalapril maleat için pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8'de 15 dk'da çözünen madde miktarı (Y_6 , Y_7 ve Y_8) amlodipin besilat için içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y_9), enalapril maleat için içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y_{10}), friabilite (Y_{11}) ve dağılma (Y_{12}) olarak seçildi.

Bölüm 3.2.5'te Çizelge 3.18'deki PBD deney matrisine göre gerçekleştirilen deneylerde elde edilen bağımlı değişken sonuçları Çizelge 4.27'de verilmektedir.

PBD ile incelenen faktörlerin yanıtlar üzerine etkilerini incelemek amacıyla yarı-normal olasılık grafiklerinden ve Pareto grafikler inden faydalanıldı (Şekil 4.85-4.90).

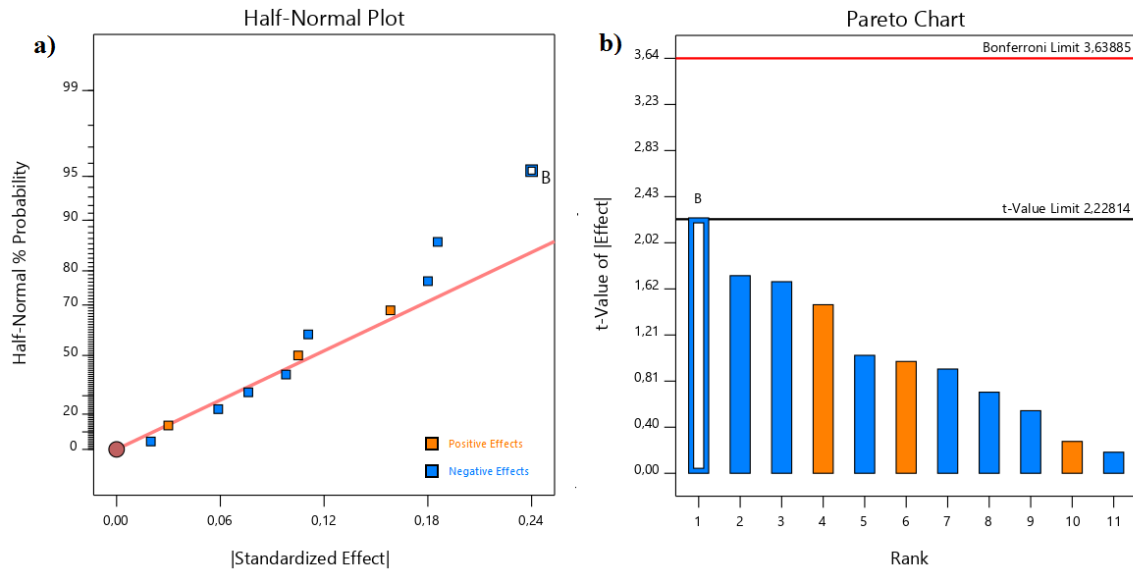
Bağımlı değişkenlere ait değerlendirmeler şu şekildedir:

Amlodipin besilat miktar tayini: Amlodipin besilata ait miktar tayini sonuçları 6,29 mg-7,00 mg aralığında bulundu (Çizelge 4.27). Tüm formülasyonların QTPP'de belirtilen spesifikasyon sınırları ($\pm \%10$) içerisinde olduğu gözlemlendi. Amlodipin besilat miktar tayini sonuçlarından hesaplanan yarı-normal olasılık grafiğine (Şekil 4.84a) göre formülasyonda kullanılan krospovidon miktarı anlamlı ($p<0.05$) bulundu. Hesaplanan t-değerleri de bu sonucu doğruladı (Şekil 4.85b).

Enalapril maleat miktar tayini: Enalapril maleata ait miktar tayini sonuçları 9,05 mg - 10,85 mg aralığında bulundu. Tüm formülasyonlar spesifikasyon sınırları ($\pm \%10$) içerisinde yer aldı. Yarı-normal olasılık grafiğine (Şekil 4.86a) göre formülasyonda etkili faktör prejelatinize nişasta olarak görüldü. Ancak pareto grafiklerinden tüm faktörlerin t-değerinin altında olduğu gözlemlendi ($p>0,05$).

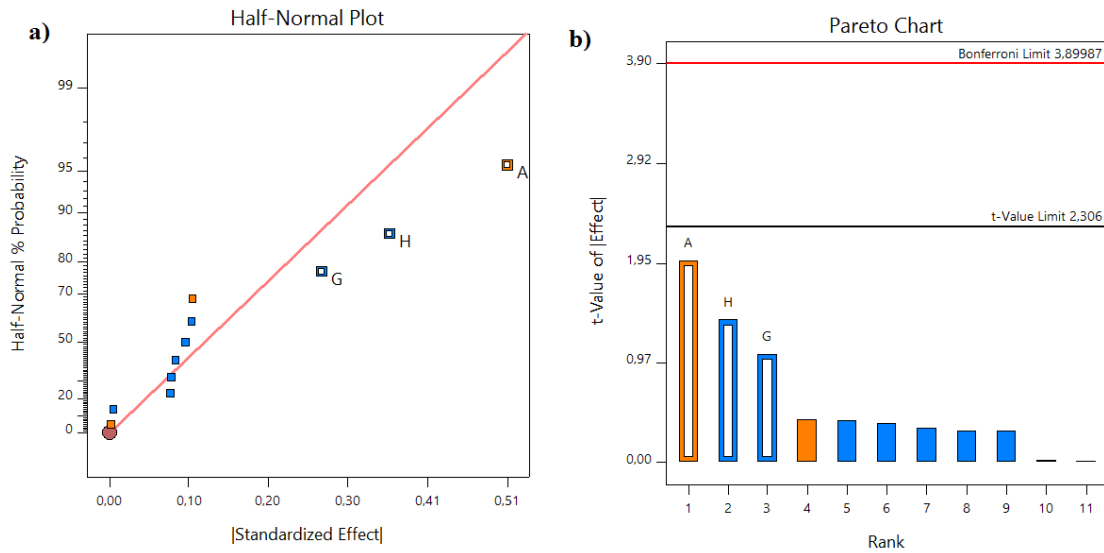
Çizelge 4.27. PBD ile elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar⁶

	Y ₁ (mg)	Y ₂ (mg)	Y ₃ (%)	Y ₄ (%)	Y ₅ (%)	Y ₆ (%)	Y ₇ (%)	Y ₈ (%)	Y ₉ (%)	Y ₁₀ (%)	Y ₁₁ (%)	Y ₁₂ (dk)
PBD1	6,43	9,81	91,6	92,4	96,1	90,6	94,7	97,2	1,69	4,82	0,121	1,91
PBD2	6,80	9,77	92,2	92,2	99,0	97,6	99,1	103,9	1,30	3,31	0,120	1,68
PBD3	6,71	9,34	92,8	89,5	101,3	101,1	97,0	103,0	5,62	4,52	0,146	1,88
PBD 4	6,92	9,79	93,6	98,0	101,9	104,6	101,1	104,3	0,69	5,45	0,155	0,75
PBD 5	6,57	9,17	91,2	97,5	98,1	99,9	100,9	102,0	2,07	7,17	0,181	0,44
PBD 6	7,00	10,85	99,6	94,3	103,2	104,5	104,9	104,0	3,16	6,19	0,137	2,53
PBD 7	6,75	10,06	91,8	90,5	104,7	104,9	102,1	101,5	2,02	5,23	0,253	0,90
PBD8	6,43	9,82	95,0	100,6	102,0	101,4	101,3	104,3	2,28	4,68	0,301	0,58
PBD 9	6,76	10,41	94,3	93,1	102,1	102,3	104,1	104,1	2,28	9,69	0,139	1,08
PBD 10	6,61	9,66	94,6	98,3	98,2	99,0	101,2	103,1	4,13	6,19	0,176	1,12
PBD 11	6,29	9,05	93,8	94,8	103,9	105,1	100,1	104,6	1,76	8,91	0,119	0,43
PBD 12	6,40	9,28	95,0	92,7	100,0	98,0	103,4	103,2	3,47	6,69	0,246	0,67



Şekil 4.85. Amlodipin besilat miktarı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri

(B: Krospovidon yüzdesi)



Şekil 4.86. Enalapril maleat miktarı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri

(A: Prejelatinize nişasta yüzdesi; H: Lubrikasyon süresi; G: Lubrikasyon hızı)

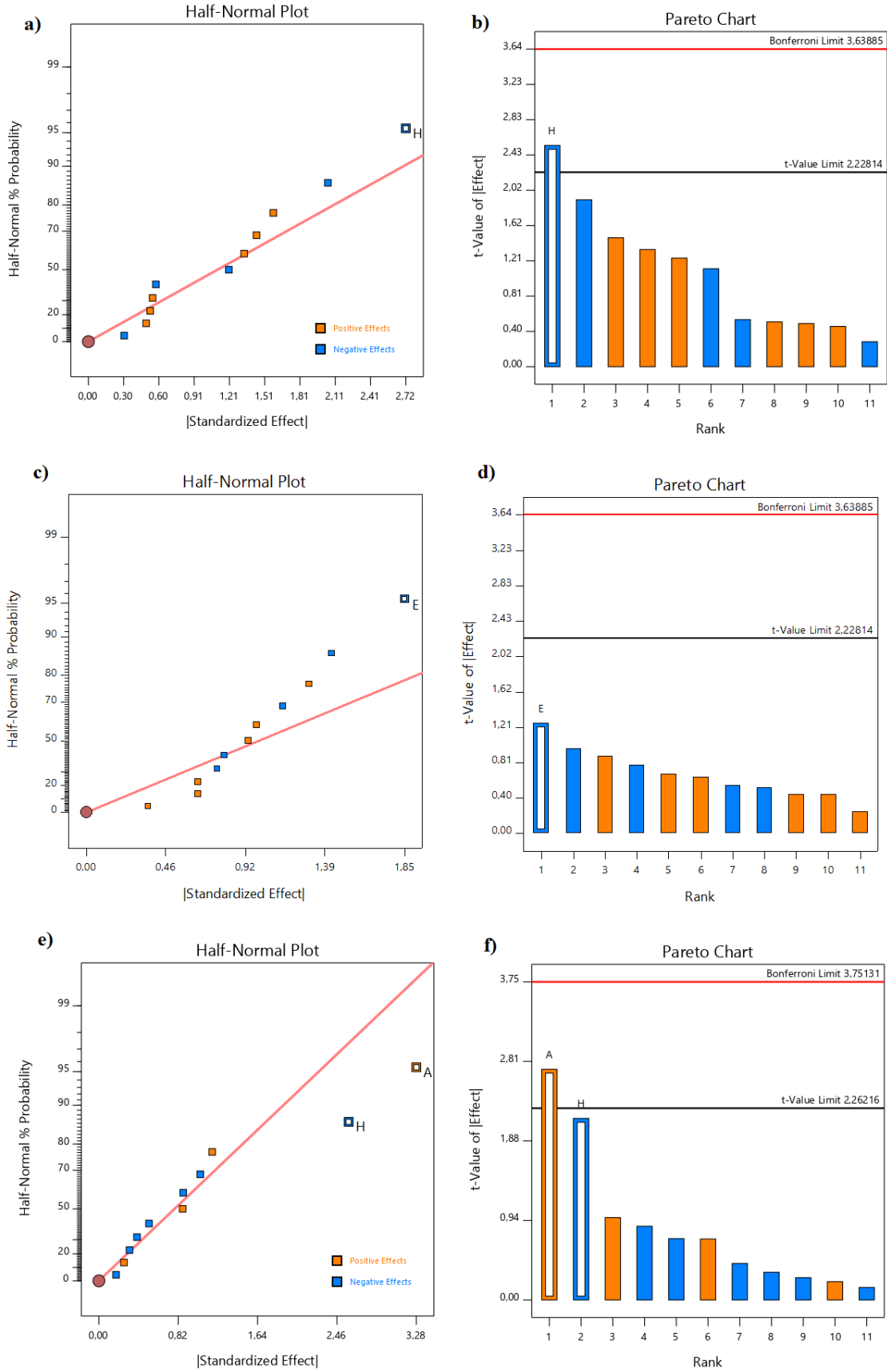
Amlodipin besilat ve enalapril maleatın çözünme hızı sonuçları: Amlodipin BCS Sınıf 1, enalapril ise BCS Sınıf 3 grup ilaç olduğundan her ikisi de yüksek çözünürlük gösterir. Spesifikasyonlarda her üç ortam için 15 dk içerisinde en az %85 çözünmesi hedeflendi.

Tüm formülasyonlarda her üç ortamda her iki etkin maddenin de tamamına yakını çözüldü. Amlodipin çözünme hızına ait yarı-normal ve pareto grafikleri Şekil 4.87’de, enalapril ait grafikler ise Şekil 4.88’de görülmektedir. Elde edilen çözünme sonuçları Çizelge 4. 27’de görüldüğü gibi birbirine yakın ve QTPP’de belirtilen spesifikasyonlara uygun sonuçlar verdi. Pareto grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.87 ve 4.88) t-değeri çizgisine göre genel olarak çözünme hızı üzerinde faktörlerin etkileri anlamlı bulunmadı. Sadece pH 1,2 ortamında her iki etkin madde için de en etkili faktör lubrikasyon süresi, pH 6,8 ortamında da amlodipin yanıtı için prejelatinize nişasta miktarı olarak görüldü. Ancak çözünme hızı testleri genel olarak varyasyonu yüksek testlerdir ve deney sonuçlarında en ufak ve kabul edilebilir bir farkın modeli değiştirebildiği görüldü. Bu nedenle yanıltıcı olmaması bakımından optimizasyon tasarımında çözünme hızı testleri bağımlı değişkenlerden çıkartıldı ve dağılmanın çözünmeyi temsil edebileceğine karar verildi.

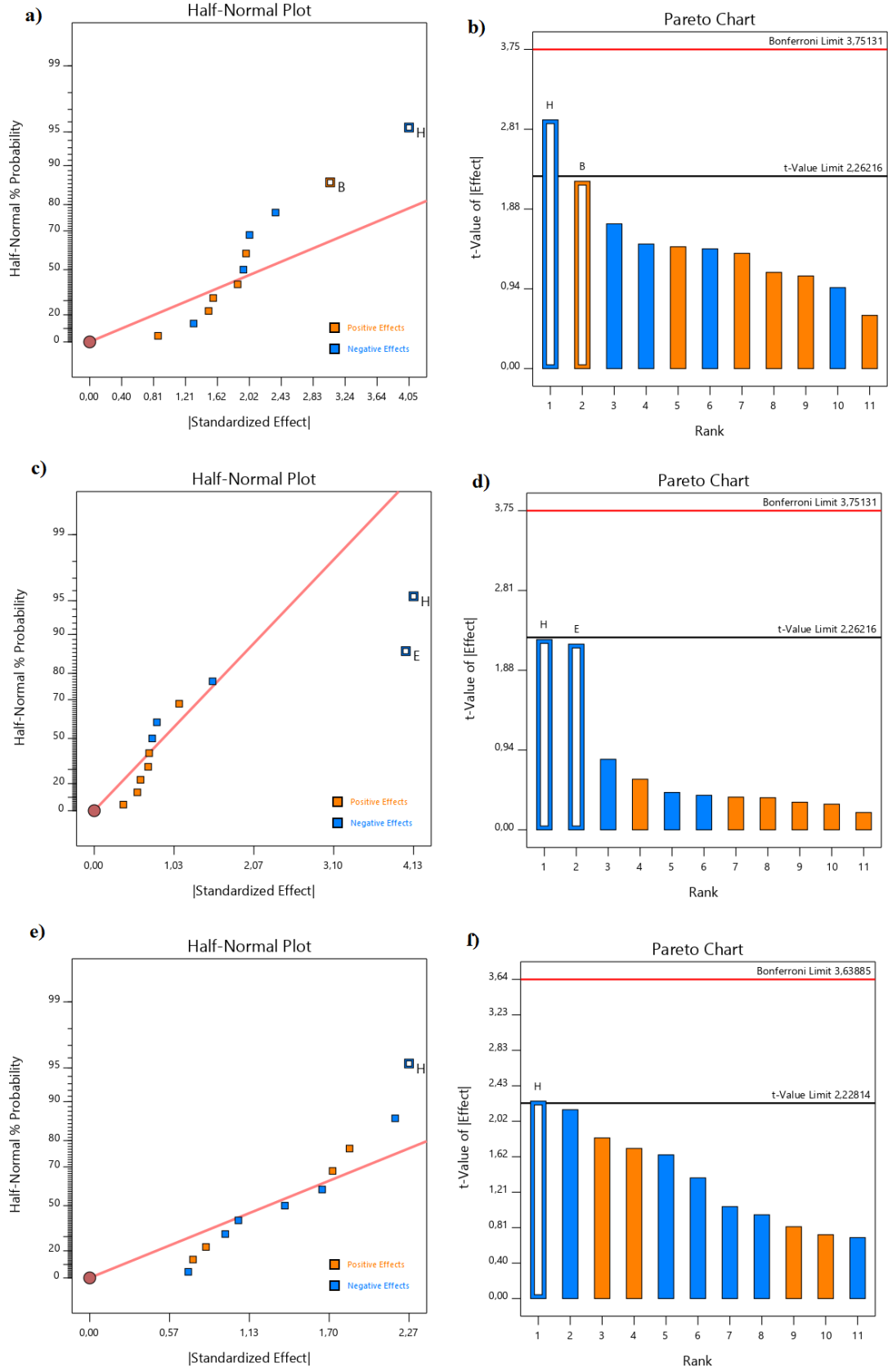
Amlodipin besilat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı: Amlodipin besilata ait varyasyon katsayısı yüzdesi %0,69-5,62 arasındadır. Oluşturulan modelde incelenen faktörlerin hiçbirinin bu yanıtı etkilemediği görüldü. Şekil 4.89’da verilen pareto grafiğinde görüldüğü üzere en etkili faktör karıştırma hızı olsa da faktörün etkisi anlamlı bulunmadı ($p < 0,05$).

Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı: Enalapril maleata ait varyasyon katsayısı yüzdesi %3,31-9,69 arasındadır. Şekil 4.90’da verilen yarı-normal grafiğe göre karıştırma süresi, lubrikasyon hızı ve lubrikasyon süresinin enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı üzerinde etkili olduğu görüldü. En etkili faktör olan karıştırma süresi arttıkça varyasyon katsayısında artış olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu durum, uzun süreli karıştırmanın enalaprilin segregasyonuna neden olabileceğini düşündürdü. Bu nedenle BBD tasarımda karıştırma süresinin aralığının genişletilerek daha detaylı incelenmesine karar verildi.

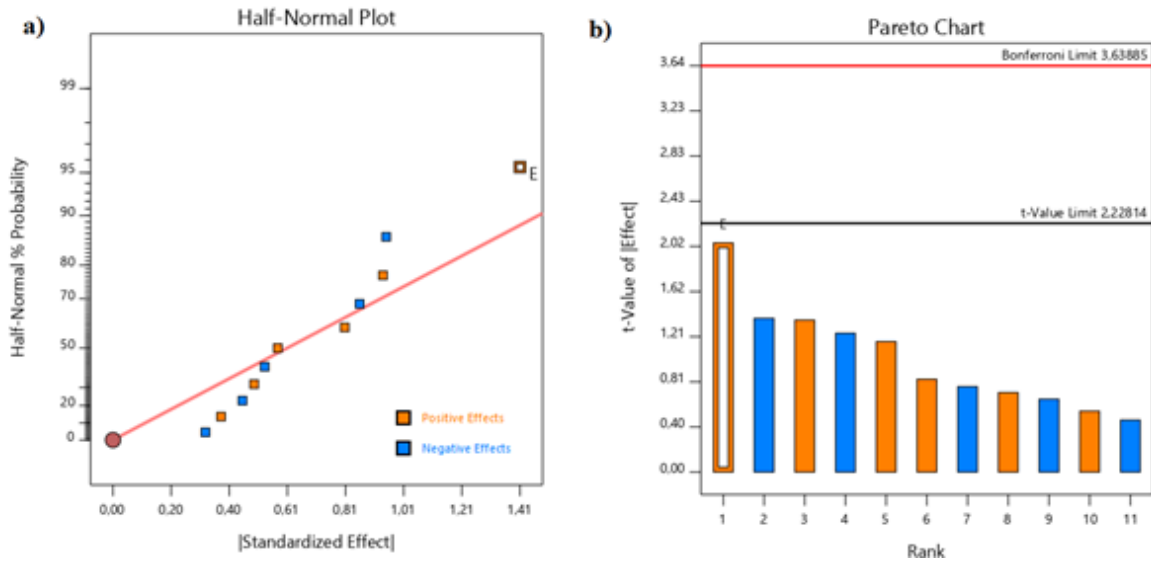
Friabilite: Hazırlanan formülasyonlar için elde edilen friabilite yüzdesi %0,1-0,3 arasında bulundu. Tüm formülasyonların friabilite değeri %1’in altında ve uygundur. Şekil 4.91’de verilen grafikler incelendiğinde friabilite üzerine tek anlamlı faktörün gliseril distearat yüzdesi olduğu görüldü ($p < 0,05$). Hidroksipropil yüzdesinin etkisi ise anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).



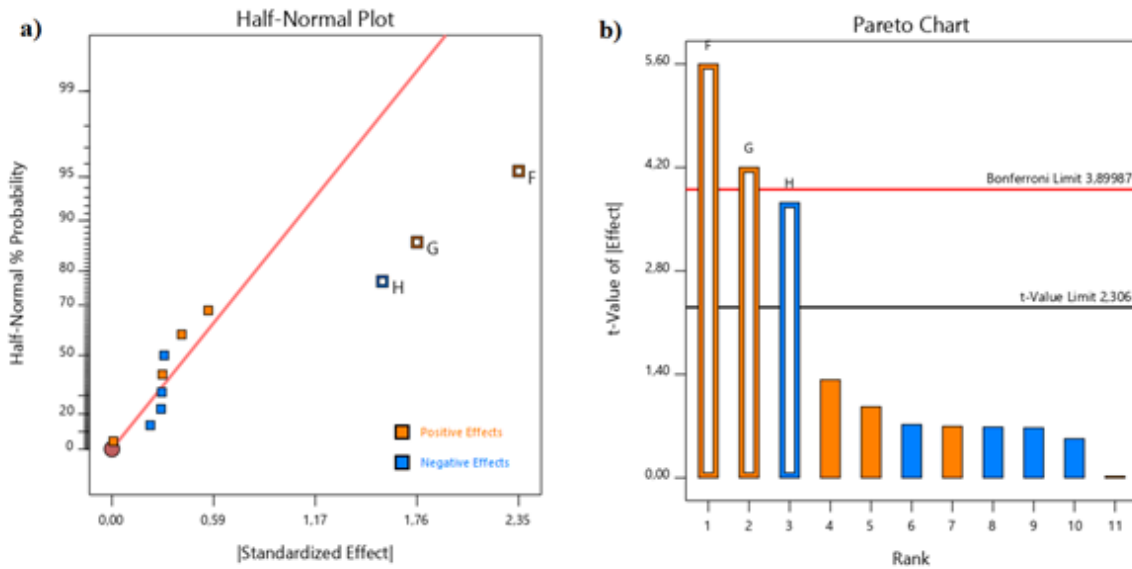
Şekil 4.87. Amlodipinin pH 1,2 (a, b); pH 4,5 (c, d) ve pH 6,8 (e, f) ortamlarında çözünmesine ilişkin yarı-logaritmik ve pareto grafikleri (E: Karıştırma hızı; H: Lubrikasyon süresi; A: Prejelatinize nişasta yüzdesi)



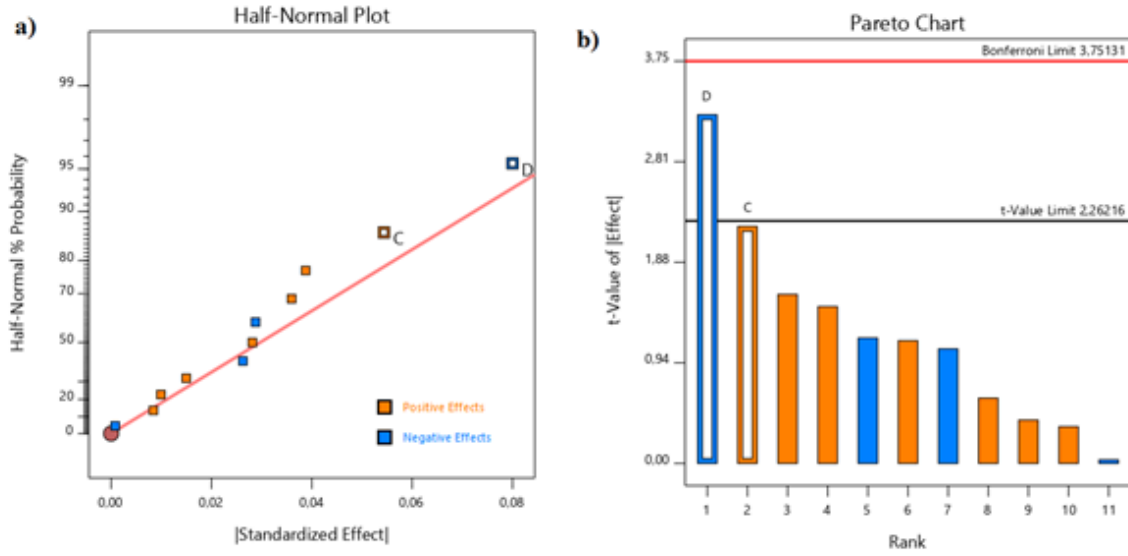
Şekil 4.88. Enalaprilin pH 1.2 (a, b); pH 4.5 (c, d) ve pH 6.8 (e, f) ortamlarında çözünmesine ilişkin yarı-logaritmik ve pareto grafikleri (H: Lubrikasyon süresi; B: Krospovidon yüzdesi; E: Karıştırma hızı)



Şekil 4.89. Amlodipin besilat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri (*E: Karıştırma hızı*)



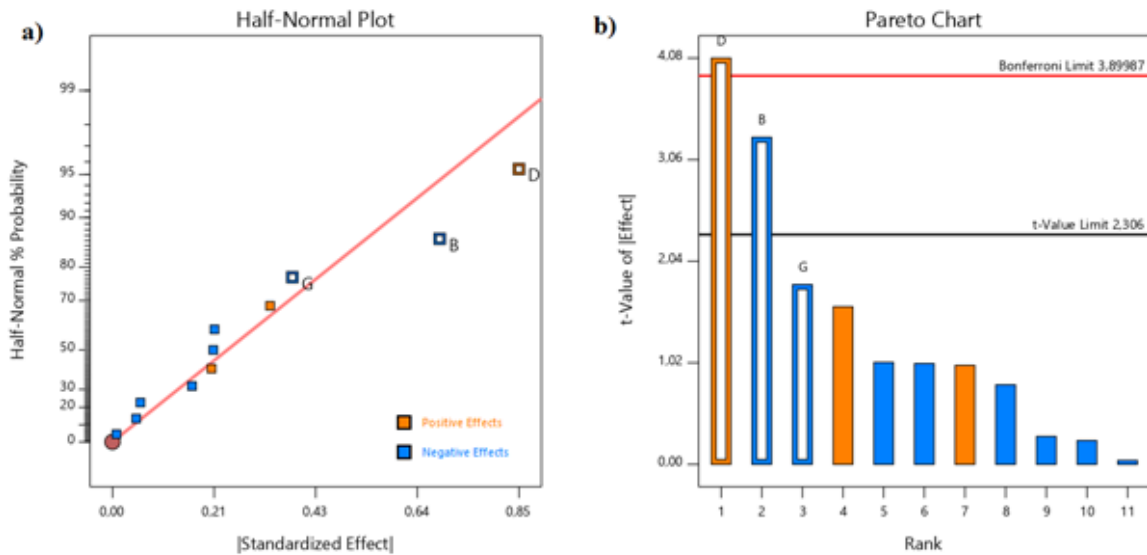
Şekil 4.90. Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri (*F: Karıştırma süresi, G: Lubrikasyon hızı, H: Lubrikasyon süresi*)



Şekil 4.91. Friabilite için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri

(D: Gliseril distearat, C:Hidroksipropil selüloz miktarı)

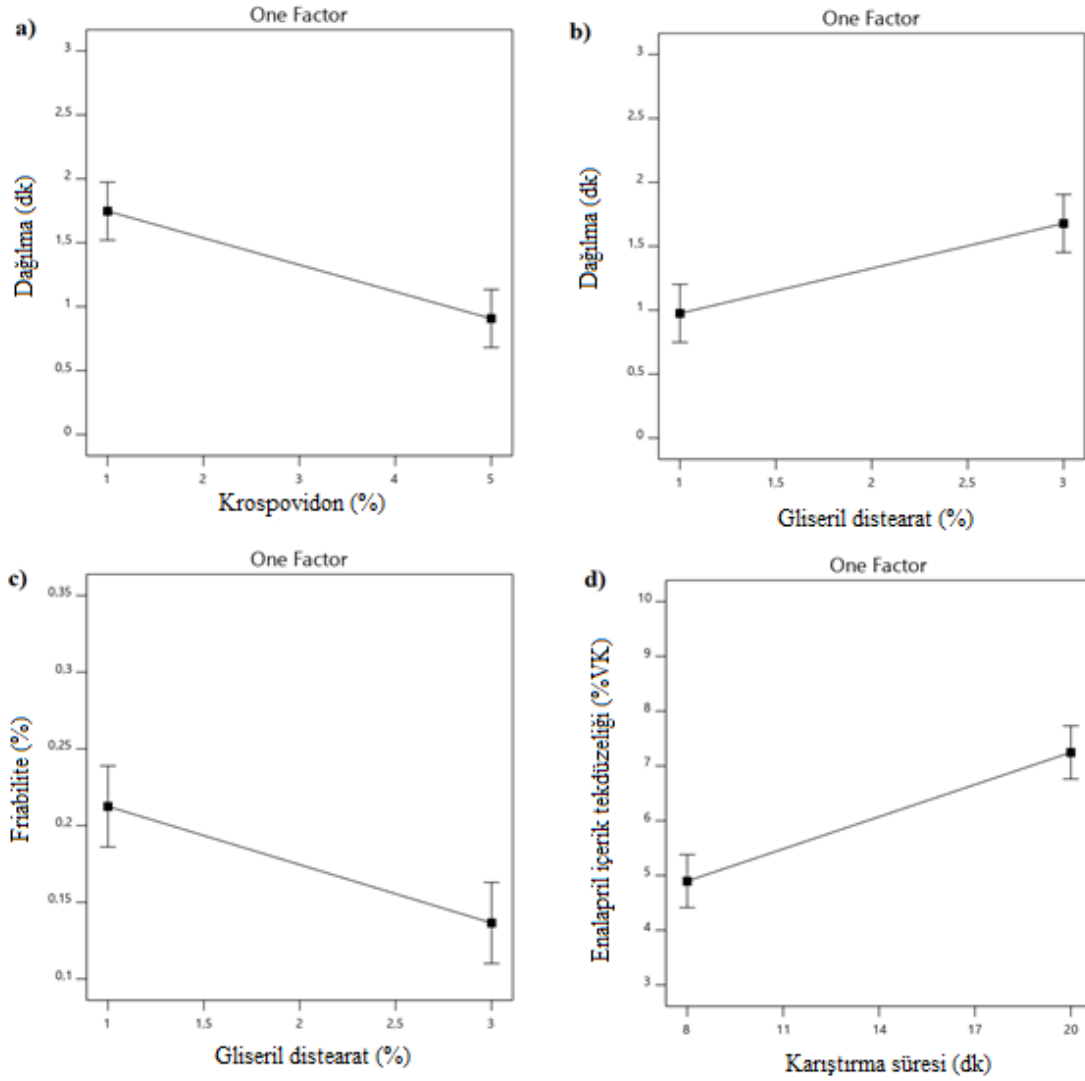
Dağılma süresi: Hazırlanan tabletlerin dağılma süreleri 0,43-2,53 dakika arasında bulundu. Tabletlerin tamamı spesifikasyonlarına uygun şekilde 5 dk içerisinde dağıldı. Dağılma süresi çözünme testleri hakkında fikir verdiği için önemlidir. Şekil 4.92’de görüldüğü gibi dağılma üzerine en etkili faktör gliseril distearat yüzdesi; onu takiben krospovidon yüzdesidir ($p < 0,05$).



Şekil 4.92. Dağılma için yarı-normal (a) ve Pareto (b) grafikleri (B: Krospovidon yüzdesi, D: Gliseril distearat, G: Lubrikasyon hızı, A: Prejelatinize nişasta miktarı)

PBD tasarım sonucunda; çözünme sonuçlarına ait yarı-normal grafikler incelendiğinde faktörlerin çok değişken dağıldığı görüldü. Bu nedenle çözünme hızı sonuçları yerine dağılma sonuçlarının daha gerçekçi sonuçlar verebileceği düşünüldü. Dağılma üzerine en etkili faktör olan gliseril distearat yüzdesinin friabilite üzerine etkisi de önemsendiğinden bu değişken optimizasyon tasarımı için seçilen faktörlerden biri oldu. Dağılma üzerinde etkili diğer bir faktör olan krospovidon yüzdesinin amlodipin miktarı üzerindeki en etkili faktör olması nedeniyle bu değişken de ikinci faktör olarak seçildi. Yanıtlar üzerinde önemli bir varyasyon da enalaprilin içerik tekdüzeliğinde gözlenen değişiklik olduğu görüldü. Amlodipin etkin maddesi ve içerik tekdüzeliği hiçbir faktörden etkilenmezken, enalapril maleatın proses parametrelerine duyarlı olduğu saptandı. Bu nedenle karıştırma hızı da optimizasyon tasarımına dahil edildi.

Sonuç olarak, yüzey-cevap metodlarından olan BBD için bağımsız değişken olarak kritik materyal özelliklerinden kaydırıcı (gliseril distearat) ve dağıtıcı (krospovidon) miktarı; kritik proses parametrelerinden ise karıştırma süresi seçildi. Seçilen faktörlerin yanıtlar üzerine etkisini gösteren etkileşim tabloları Şekil 4.93'te verildi.



Şekil 4.93. PBD tasarımı optimizasyon için seçilen faktörler ve cevaplar üzerine etkileri

4.5.2. Box-Behnken deney tasarımı ile verilerin değerlendirilmesi ve optimizasyon

Bölüm 3.2.5.'te anlatıldığı gibi PBD'de seçilen üç faktör ile üç seviyeli, beş merkez noktalı 17 deneyli bir tasarım gerçekleştirildi.

Faktörler, formülasyondaki krospovidon (dağıtıcı) yüzdesi (X_2), gliseril distearat (kaydırıcı) yüzdesi (X_4), ve karıştırma süresi (X_6) olarak belirlendi.

Bağımlı değişken (yanıt) olarak amlodipin besilat miktar tayini (Y_1), enalapril maleat miktar tayini (Y_2), amlodipin besilat için içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y_9),

enalapril maleat için içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y_{10}), friabilite (Y_{11}) ve dağılma (Y_{12}) olarak seçildi. Bölüm 3.2.5'te Çizelge 3.21'deki PBD deney matrisine göre gerçekleştirilen deneylerde elde edilen bağımlı değişken sonuçları Çizelge 4.28'de verilmektedir.

Bağımlı değişkenlere ait değerlendirmeler şu şekildedir:

Amlodipin besilat miktar tayini: Amlodipin besilata ait miktar tayini sonuçları 6,36 mg-7,06 mg aralığında bulundu (Çizelge 4.28). Tüm formülasyonların QTPP'de belirtilen spesifikasyon sınırları ($\pm \%10$) içerisinde olduğu gözlemlendi. BBD tasarım ile amlodipin besilat miktar tayini için anlamlı bir istatistiksel model oluşumu gözlenmedi.

Enalapril maleat miktar tayini: Enalapril maleata ait miktar tayini sonuçları 9,13 mg-10,68 mg aralığında bulundu (Çizelge 4.28). Tüm formülasyonlar QTPP'de belirtilen spesifikasyon sınırları ($\pm \%10$) içerisinde yer aldı. BBD tasarım ile enalapril maleat miktar tayini için anlamlı bir istatistiksel model oluşumu gözlenmedi.

Amlodipin besilat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı: Amlodipin besilata ait varyasyon katsayısı yüzdesi $\%1,40$ - $4,54$ arasında bulundu (Çizelge 4.28). Amlodipinin içerik tekdüzeliğinde görülen varyasyonlar istatistiksel bir model ile ilişkilendirilmedi. Amlodipin tüm karıştırma hızlarında uygun içerik tekdüzeliği varyasyonu gösterdi.

Çizelge 4.28. BBD ile elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar

	Y ₁ (mg)	Y ₂ (mg)	Y ₉ (%)	Y ₁₀ (%)	Y ₁₁ (%)	Y ₁₂ (sn)
BBD1	6,44	9,43	4,41	7,22	0,31	51
BBD2	6,38	9,14	3,68	6,03	0,334	23
BBD3	6,36	9,85	1,40	3,75	0,099	46
BBD 4	6,38	9,42	2,6	5,06	0,117	59
BBD 5	6,64	9,48	2,63	7,47	0,144	25
BBD 6	6,61	9,55	2,37	7,01	0,15	76
BBD 7	6,47	9,13	2,04	4,18	0,304	55
BBD8	6,43	9,47	2,40	6,34	0,147	67
BBD 9	6,53	9,34	2,04	5,92	0,134	46
BBD 10	7,06	9,89	2,76	4,37	0,125	58
BBD 11	6,42	9,25	3,58	8,24	0,117	39
BBD 12	6,61	9,95	4,48	8,45	0,137	50
BBD 13	6,63	10,01	4,54	6,28	0,111	55
BBD 14	6,59	10,68	2,45	5,39	0,142	55
BBD 15	6,57	9,76	2,43	5,02	0,108	30
BBD 16	6,41	10,18	3,03	6,15	0,217	48
BBD 17	6,59	10,28	2,65	4,94	0,264	40

Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı: Enalapril maleata ait varyasyon katsayısı yüzdesi %3,75-7,22 arasında bulundu. Design Expert® 11’de önerilen kuadratic model uygulanınca anlamlı bir model elde edildi. Modele ait ANOVA tablosu Çizelge 4.29’da verilmiştir. Çizelgedeki p değerleri dikkate alındığında enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyonu üzerinde etkili, anlamlı tek faktör karıştırma süresi ve karıştırma süresinin karesi olarak bulundu.

Çizelge 4.29. Enalapril maleat içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı (Y_{10}) cevabı için oluşan kuadratik modelin ANOVA sonuçları

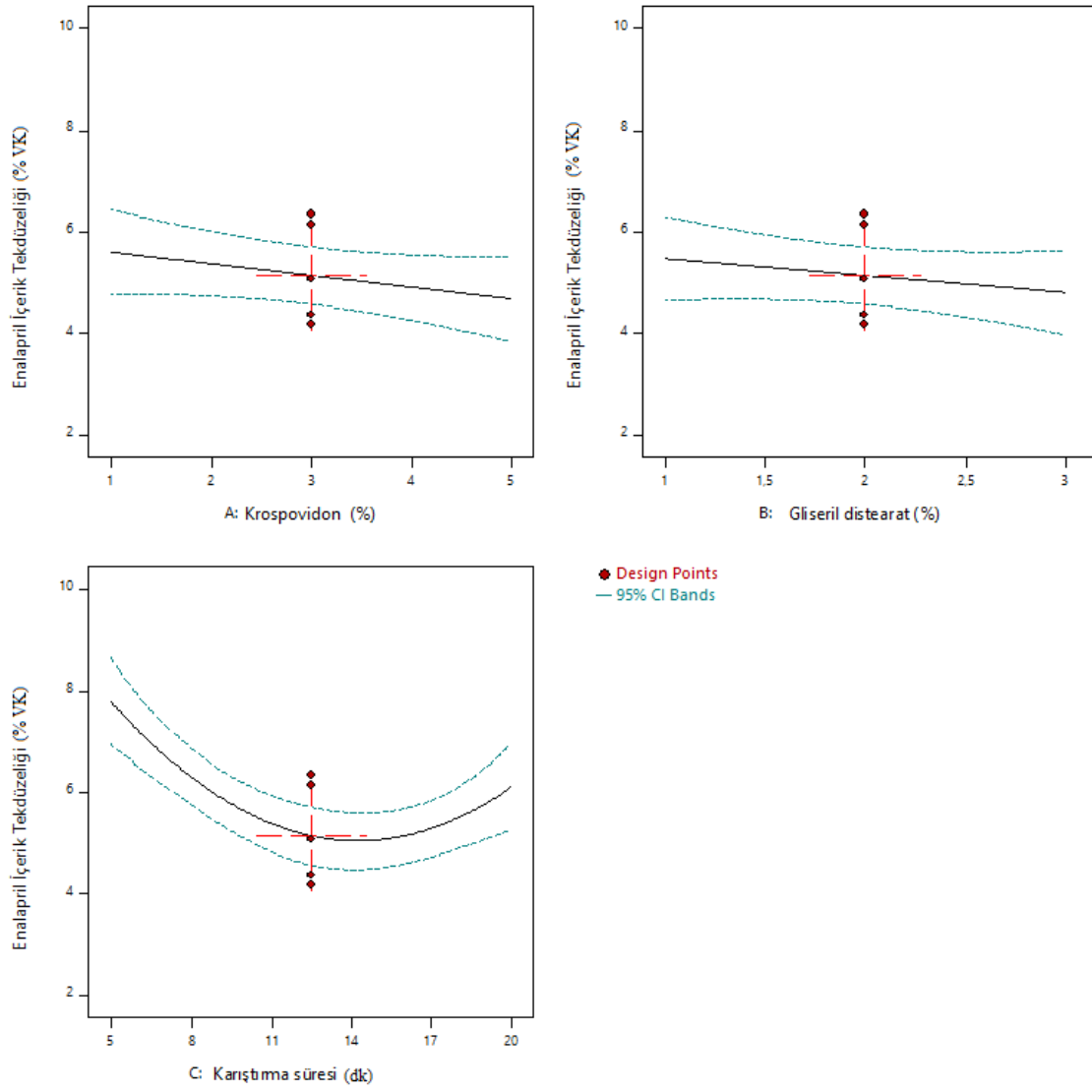
	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
Model	25,16	7	3,59	6,31	0,0067	Anlamlı
X_2 :Krospovidon	1,74	1	1,74	3,05	0,1144	
X_4 :Gliseril distearat	0,9113	1	0,9113	1,60	0,2376	
X_6 :Karıştırma süresi	5,66	1	5,66	9,94	0,0117	Anlamlı
X_2X_4	1,86	1	1,86	3,27	0,1039	
X_2X_6	0,3721	1	0,3721	0,6536	0,4397	
X_4X_6	0,6320	1	0,6320	1,11	0,3195	
X_6^2	13,98	1	13,98	24,56	0,0008	Anlamlı
Residual	5,12	9	0,5693			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	1,17	5	0,2350	0,2380	0,9263	Anlamsız
Saf hata (pure error)	3,95	4	0,9873			
Total	30,28	16				

Elde edilen ikinci derece polinomial model Eş. 4.2’de verildi.

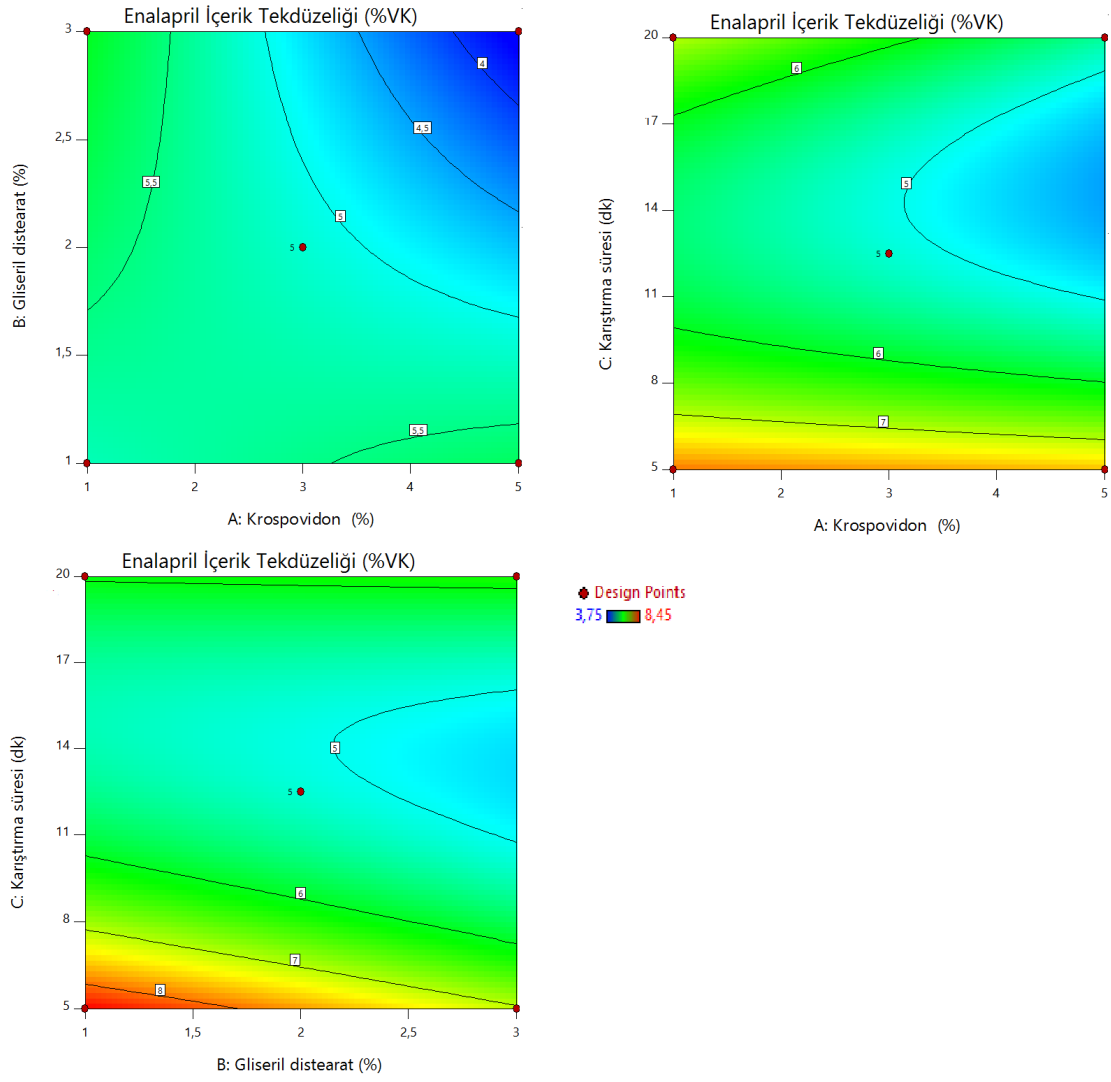
$$\begin{aligned}
 Y_{10} = & 11,47258 + 0,703542X_2 + 0,023750X_4 - 0,964636X_6 - 0,341250X_2X_4 \\
 & - 0,020333X_2X_6 + 0,0530X_4X_6 + 0,032299X_6^2
 \end{aligned}
 \tag{4.2}$$

Modelin R^2 değeri 0,8308’dir. Bu değer deney tasarımlarında uygun bir değerdir. R^2_{adj} ve R^2_{pred} farkı 0,1242 ve Adeq Precision değeri 9,42’dir.

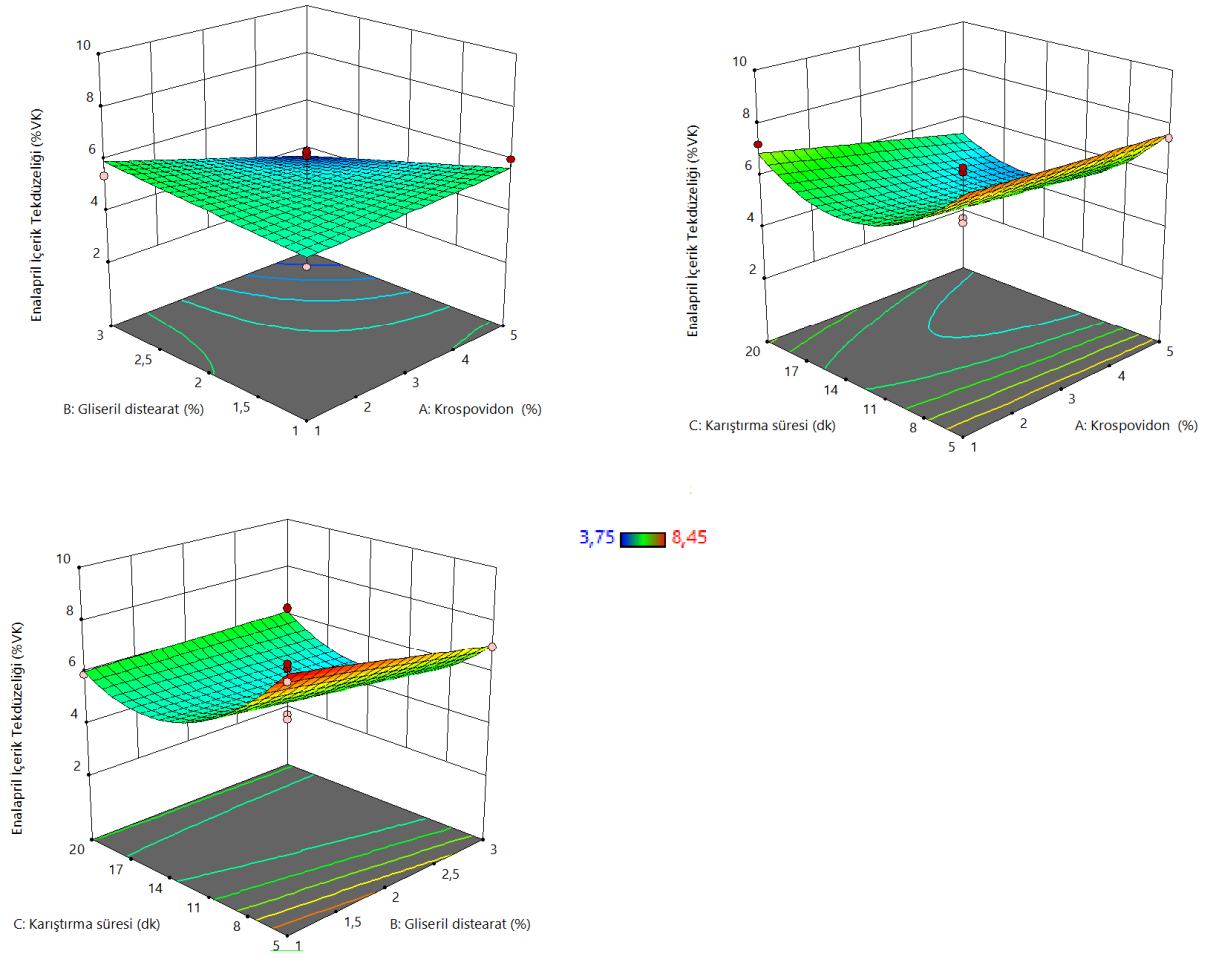
Oluşturulan modelde her üç faktöre ait tek faktör grafikleri Şekil 4.94’te verilmiştir. Bu grafiklerde de sadece karıştırma süresinin etkili olduğu görülmektedir. Faktör etkilerinin daha ayrıntılı gözlenmesi amacıyla kontur grafikleri (Şekil 4.95) ile yüzey yanıt grafikleri de (Şekil 4.96) de sunulmaktadır.



Şekil 4.94. Enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı cevabı için BBD ile elde edilen tek faktör grafikleri



Şekil 4.95. BBD’de enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için kontur grafikleri



Şekil 4.96. BBD’de enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için yüzey yanıt grafikleri

Friabilite: Hazırlanan formülasyonlar için elde edilen friabilite yüzdesi %0,09-0,334 arasında bulundu. Tüm formülasyonların friabilite değeri %1'in altında ve uygundur. BBD tasarım ile friabilite için anlamlı bir istatistiksel model oluşmadı.

Dağılma: Hazırlanan tabletlerin dağılma süreleri 23-76 saniye arasında bulundu. Tabletlerin tamamı spesifikasyonlarına uygun şekilde 5 dk içerisinde dağıldı. Design Expert® 11'de önerilen kuadratik model uygulanınca anlamlı bir model elde edildi. Modele ait ANOVA tablosu Çizelge 4.30'da verilmiştir. Çizelgedeki p değerleri dikkate alındığında enalaprilin dağılmasında krospovidon ve gliseril distearatın etkisi anlamlı görüldü.

Çizelge 4.30. Dağılma cevabı için (Y_{12}) oluşan kuadratik modelin ANOVA sonuçları

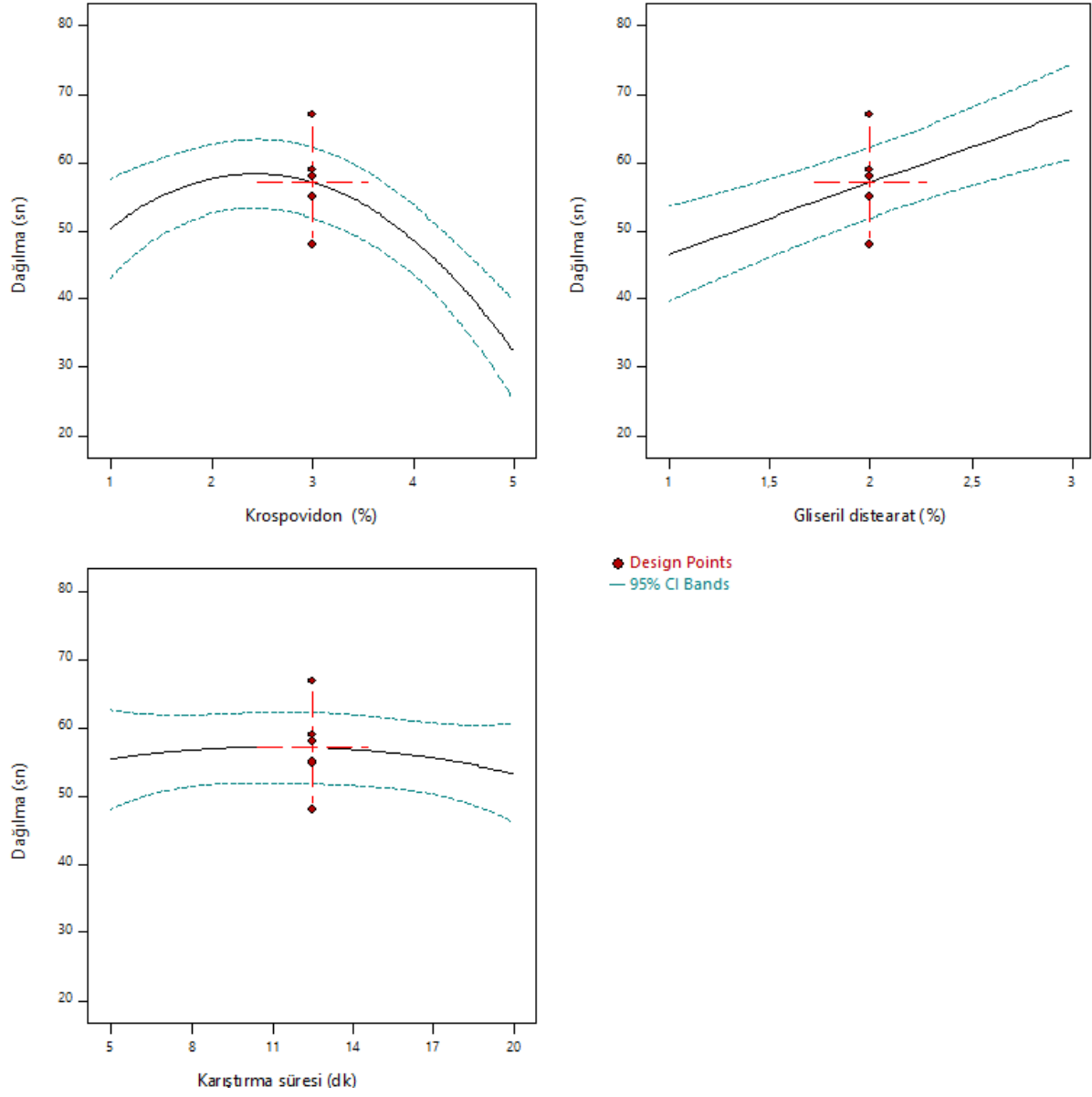
	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
Model	2854,85	7	407,26	12,09	0,0006	Anlamlı
X ₂ :Krospovidon	648,00	1	648,00	19,23	0,0018	Anlamlı
X ₄ :Gliseril distearat	882,00	1	882,00	26,18	0,0006	Anlamlı
X ₆ :Karıştırma süresi	8,00	1	8,00	0,2374	0,6377	
X ₂ X ₄	16,00	1	16,00	0,4748	0,5081	
X ₄ X ₆	196,00	1	196,00	5,82	0,0391	
X ₂ ²	1045,63	1	1045,63	31,03	0,0003	Anlamlı
X ₆ ²	31,63	1	31,63	0,9386	0,3580	
Residual	299,26	9	33,70			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	110,06	5	27,81	0,4823	0,7779	Anlamsız
Saf hata (pure error)	189,20	4	47,30			
Total	3154,12	16				

Elde edilen ikinci derece polinomial model Eş. 4.3'de verildi.

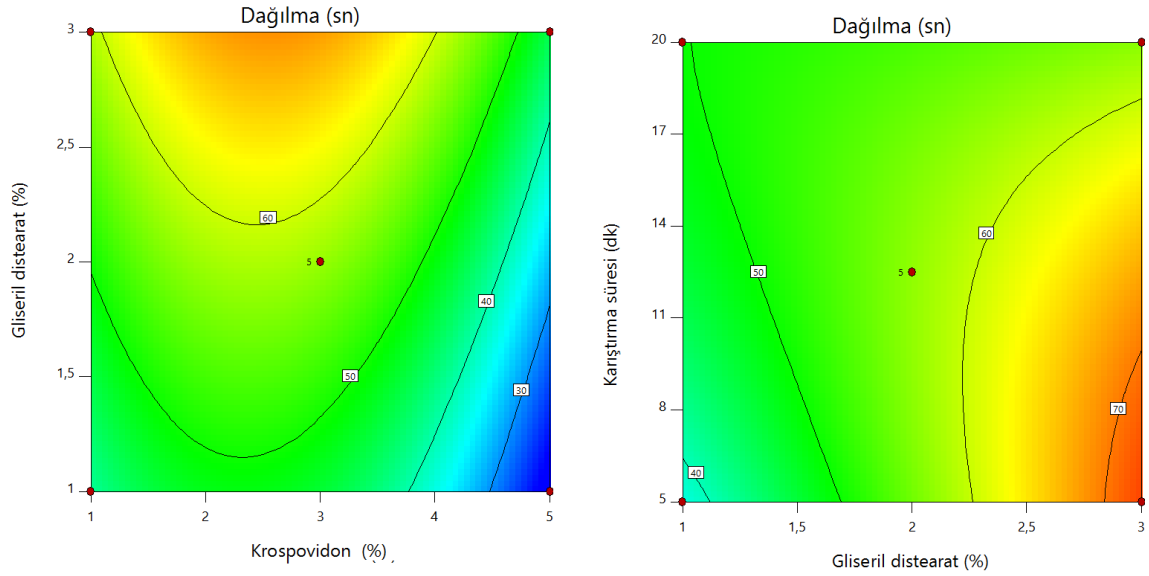
$$Y_{12} = -9,07164 + 17,10526X_2 + 19,16667X_4 + 2,94971X_6 + 1,00X_2X_4 - 0,933333X_4X_6 - 3,93421X_2^2 - 0,048655X_6^2 \quad (4.3)$$

Modelin R² değeri 0,9039'dir. Bu değer deney tasarımlarında uygun bir değerdir. R²_{adj} ve R²_{pred} farkı 0,15558 ve Adeq Precision değeri 13,31'dir

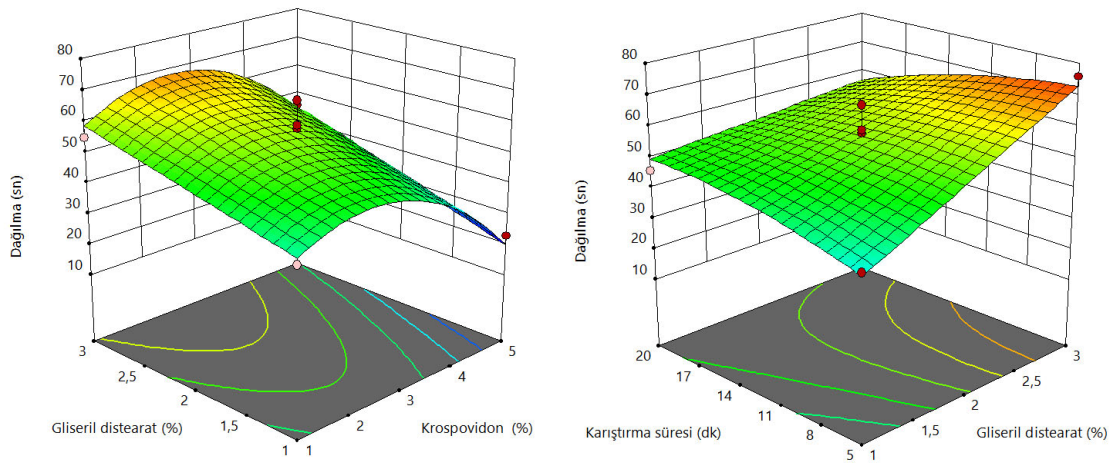
Elde edilen modelde her üç faktöre ait tek faktör grafikleri Şekil 4.97’de verilmiştir. Faktör etkilerinin daha ayrıntılı gözlenmesi amacıyla kontur grafikleri (Şekil 4.98) ile yüzey yanıt grafikleri de (Şekil 4.99) de sunuldu.



Şekil 4.97. Dağılma cevabı için BBD ile elde edilen tek faktör grafikleri



Şekil 4.98. Dağılma cevabı için BBD ile elde edilen kontur grafikleri



Şekil 4.99. Dağılma cevabı için BBD ile elde edilen yüzey yanıt grafikleri

Bağımlı değişkenlerin yanıtlar üzerine etkisini açıklayan istatistiksel analizler gerçekleştirildikten sonra anlamlı iki yanıt olan dağılma ve enalapril maleatın içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı parametrelerinden hareketle formülasyon ve proses optimize edildi. Programa dağılma “minimize edilsin” ve “enalapril maleatın içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı %5’ten az olsun” komutları verildikten sonra elde edilen tasarım alanı Şekil 4.100’de kontur grafikleri halinde verildi. Grafiklerdeki sarı bölgeler dağılma ve enalaprilin içerik tekdüzeliği için hedef düzeyleri sağlayan tasarım

alanını göstermektedir. Tasarım sahası proses girdileri (faktörler) ile kritik kalite özellikleri arasındaki ilişkiyi sağlar. Optimizasyon sonucu seçilen faktörler için elde edilen tasarım alanı değerleri Çizelge 4.31’de verildi.

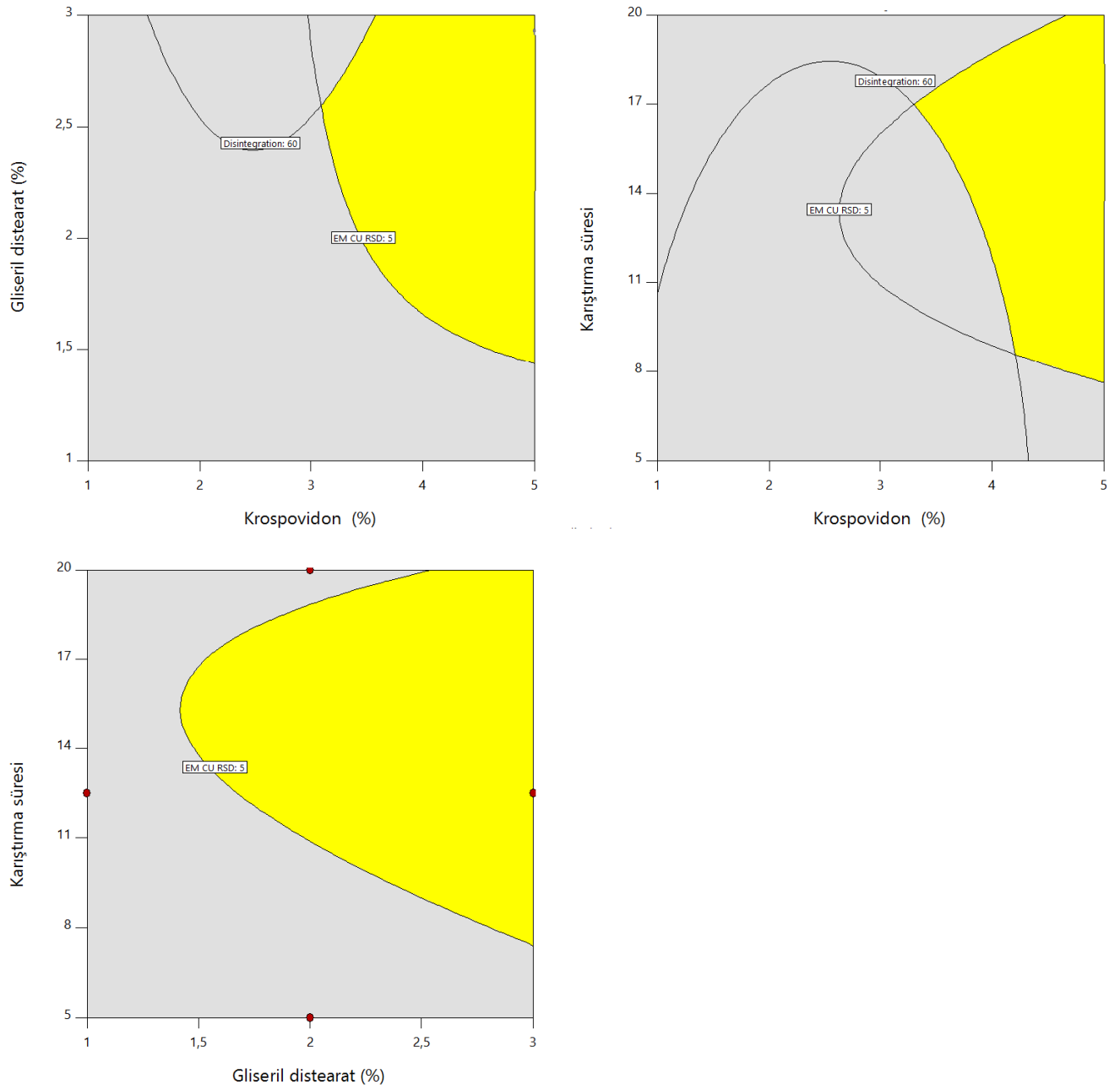
Çizelge 4.31. DOE sonucu optimum yanıtları sağlayan tasarım sahası

Faktör	Optimizasyon değerleri
Krospovidon	%4,98 – %5,0
Gliseril distearat	%2,54-%3,0
Karıştırma süresi	13 dk 8 sn – 16 dk 53 sn.

Önerilen optimum formülasyonlar içinden en yüksek arzulanabilirlik (desirability function) değerine sahip (0,848) olanlar arasından bir formülasyon seçildi. Bu formülasyona ait değerler Çizelge 4.32’de gösterildi.

Çizelge 4.32. Seçilen optimizasyon değerleri

Faktör	Optimum Değer
Krospovidon	%5
Gliseril distearat	%2,902
Karıştırma süresi	15 dk 46 sn



Şekil 4.100. Geliştirilen SDK tabletler için tasarım alanı

4.6. Final Formülasyonun Hazırlanması ve Kontrolleri

4.6.1. Final formülasyonun hazırlanması

QbD ile tasarlanan ve DOE ile optimize edilen formülasyon bileşenleri Çizelge 4.33'te verildi. Final formülasyon 600 tabletlik seri boyutu ile basıldı.

Çizelge 4.33. Final formülasyon bileşenleri

Formülasyon bileşenleri	%	<i>Birim formül (mg/tb)</i>	<i>Seri formülü (g) (600 tablet)</i>
Amlodipin besilat	4,338	6,94	4,164
Enalapril maleat	6,25	10,0	6,00
Sodyum bikarbonat	20,0	32,0	19,2
Hidroksipropil selüloz	0,50	0,80	0,48
Mikrokristal selüloz	46,01	73,6	44,2
Prejelatinize nişasta	15,0	24,0	14,4
Krospovidon	5,00	8,00	4,80
Gliseril distearat	2,902	4,64	2,786
TOPLAM	100,0	160,0	96,0

Üretim yöntemi

Enalapril maleat ve sodyum bikarbonat 2 dk karıştırıldı. Amlodipin besilat ve hidroksipropil selüloz tartılarak yukarıdaki karışımın üzerine eklendi ve 2 dk daha karıştırıldı. Daha sonra mikrokristal selüloz, krospovidon ve prejelatinize nişasta yukarıdaki karışımla birlikte 18 mesh elekten elendi. Toz karışımı kübik karıştırıcıda tasarımıda 15 dk 46 sn sürede ve 12 rpm hızda karıştırıldı. Bu süre sonunda 40 mesh'ten elenen gliseril distearat kübik karıştırıcıya alındı ve toz karışım ile birlikte 5 dk ve 12 rpm hızda karıştırıldı (lubrikasyon). Toz karışımı tablet makinasının besleme haznesine dolduruldu ve ortalama 160 mg ağırlık ve ortalama 45 N sertlik olacak şekilde basıldı.

4.6.2. Final formülasyonda yapılan kalite denetimleri

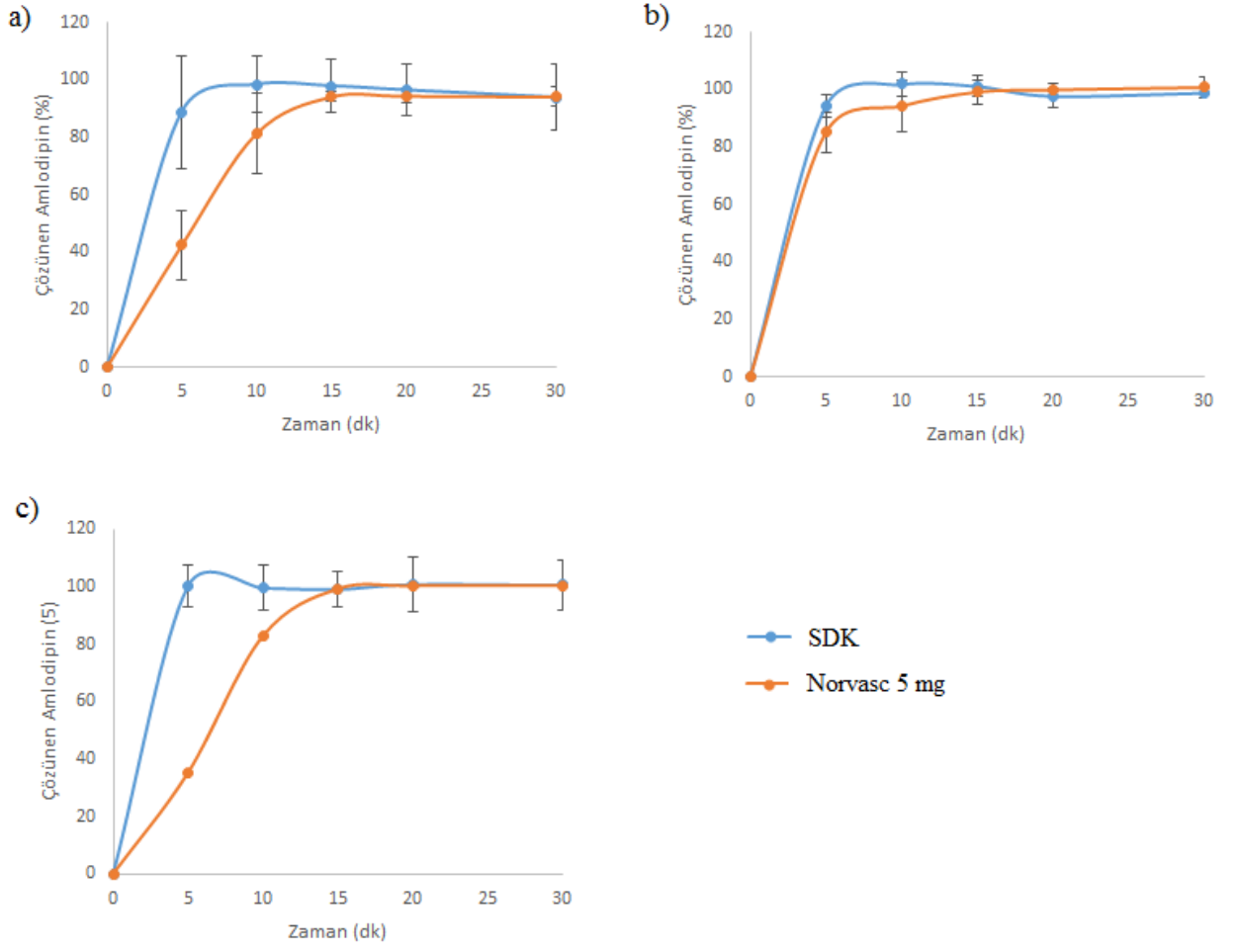
Tabletler üzerinde farmakopelerde belirtilen kontroller gerçekleştirildi. Sonuçlar Çizelge 4.34'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.34. Final formülasyonda yapılan kalite denetimleri

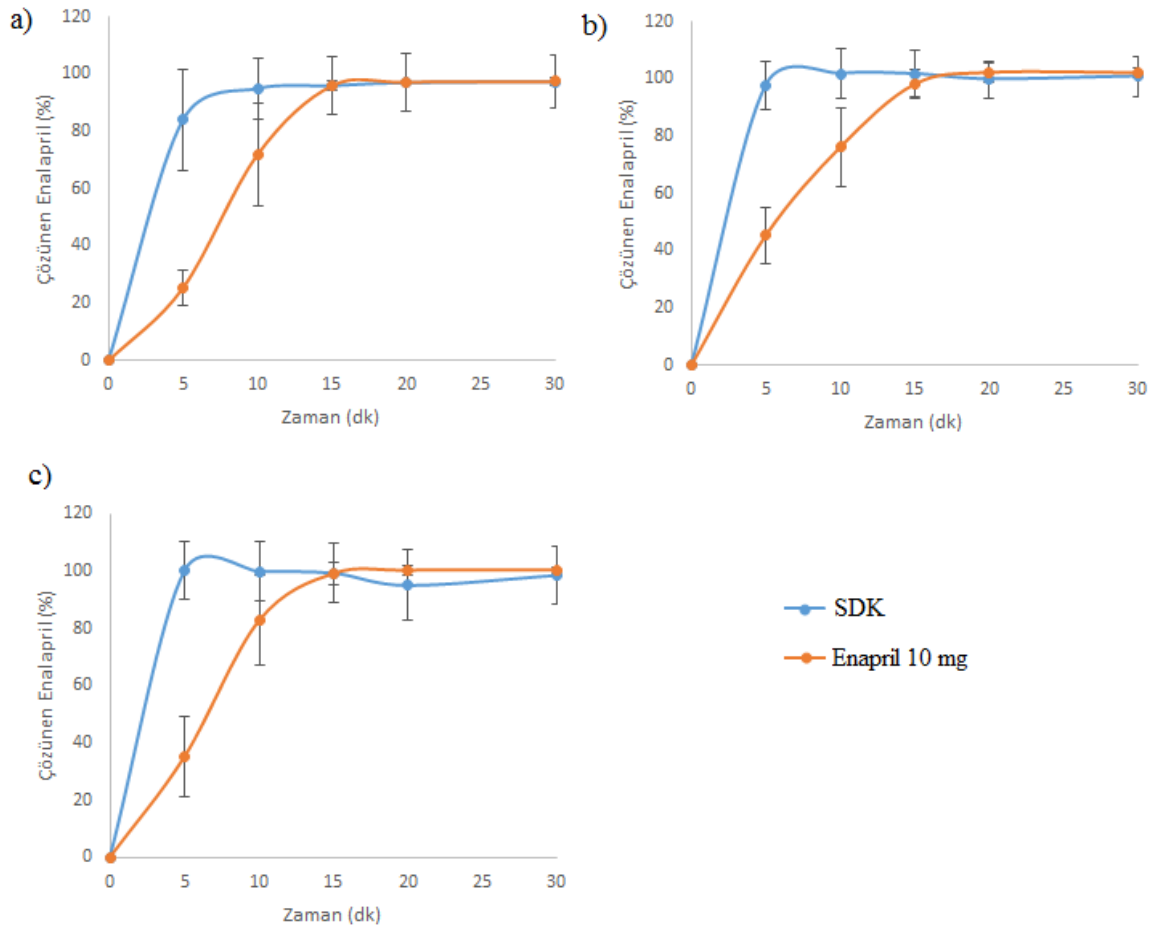
Test	Sonuçlar
Görünüş	Beyaz, yuvarlak, düz yüzeyli tabletler
Ağırlık tekdüzeliği (mg)	160,7 ± 1,5
Çap (mm)	8,04 ± 0,02
Kalınlık (mm)	2,250 ± 0,004
Friabilite (%)	0,0563
Sertlik (N)	45,12 ± 2,26
Dağılma (sn)	41,0 ± 5,9
İçerik tekdüzeliği (%)	96,4 ± 3,1 (%VK=3,23) (amlodipin besilat) 98,5 ± 3,8 (%VK=3,85) (enalapril maleat)
Miktar tayini (mg)	6,32 ± 0,04 (amlodipin besilat) 10,32 ± 0,06 (enalapril maleat)
Çözünme hızı (15.dk'da) (%)	
pH 1,2	97,9 ± 4,4 (amlodipin besilat) 96,0 ± 4,8 (enalapril maleat)
pH 4,5	101,2 ± 1,8 (amlodipin besilat) 101,7 ± 3,9 (enalapril maleat)
pH 6,8	99,1 ± 2,9 (amlodipin besilat) 99,3 ± 5,1 (enalapril maleat)

*Değerler standart sapmaları ile birlikte verildi.

Tabletlerin çözünme hızı profilleri referanslar ile karşılaştırmalı olarak amlodipin besilat için Şekil 4.101'de; enalapril maleat için ise Şekil 4.102'de verilmektedir. SDK ve referanslarında 15 dk'da %85'ten fazla çözünme gözlemlendiği için profiller benzerlik faktörü (f_2) hesaplanmaksızın benzer kabul edildi (EMA, 2010).



Şekil 4.101. Final ürünlerdeki (SDK) amlodipin ile referansın (Norvasc® 5 mg) a) pH 1,2, b) pH 4,5 ve c) pH 6,8'deki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri



Şekil 4.102. Final üründeki (SDK) enalapril ile referansın (Enapril® 5 mg) a) pH 1,2, b) pH 4,5 ve c) pH 6,8'deki karşılaştırmalı çözünme hızı profilleri

Optimize edilen koşullarda hazırlanan tabletlerin BBD tasarımca tahmin edilen sonuç verileri ile karşılaştırmalı tablosu Çizelge 4.35'te verilmektedir.

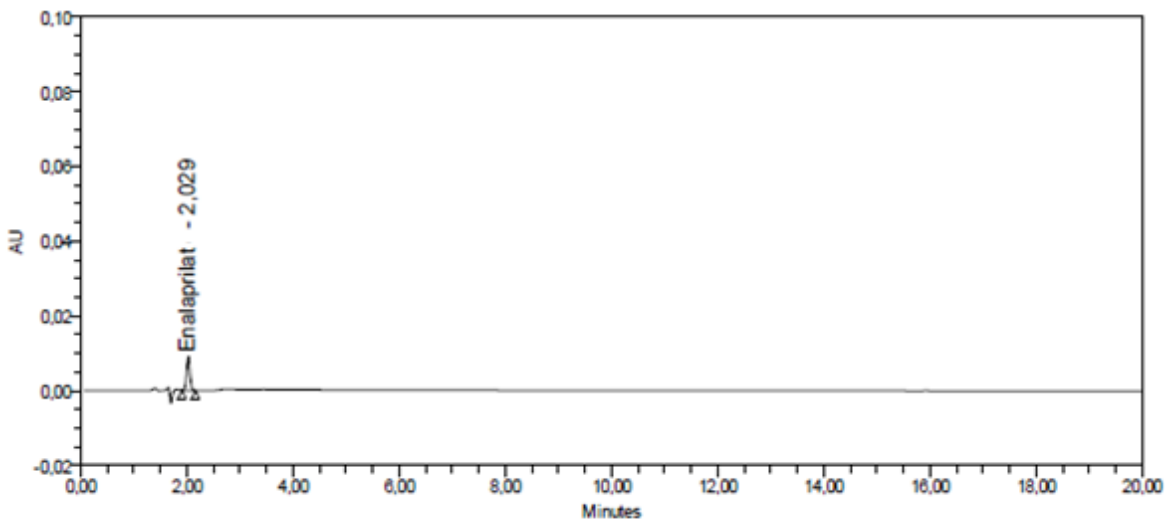
Çizelge 4.35. Final formülasyon için BBD tasarım sonucu Design Expert®11 yazılımıyla tahmin edilen değerler ile deneysel olarak bulunan değerlerin karşılaştırılması

Yanıtlar	Tahmin edilen değerler	Deneysel değerler
Amlodipin besilat miktarı	6,536 mg	6,320 mg
Enalapril maleat miktarı	9,682 mg	10,32 mg
Amlodipin besilat içerik tekdüzeliği için varyasyon katsayısı	%2,795	%3,23
Enalapril maleat içerik tekdüzeliği için varyasyon katsayısı	%3,750	%3,85
Friabilite	%0,066	%0,0563
Dağılma	39,93 sn	41 sn

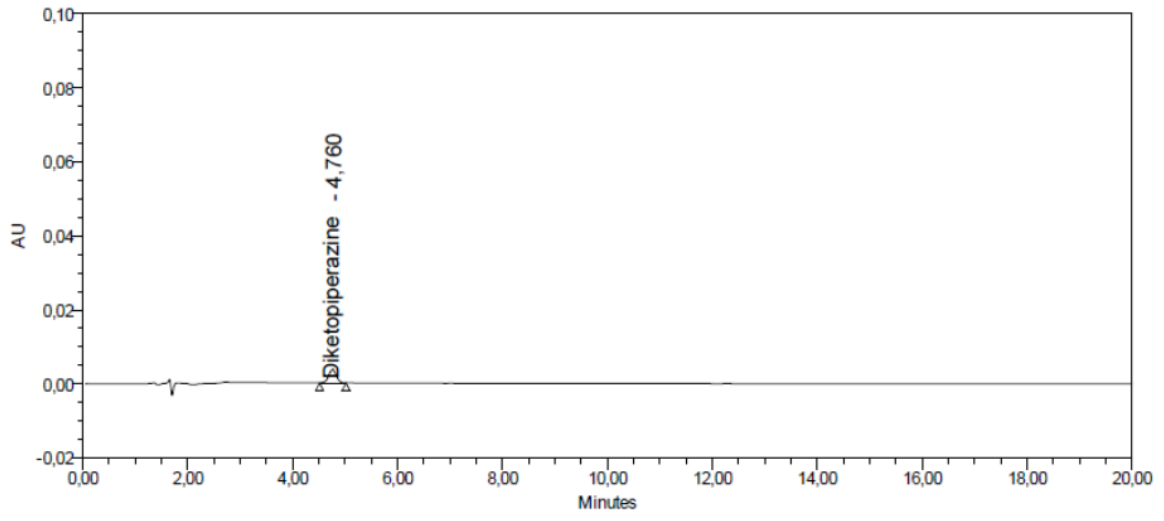
Çizelge 4.35'te görüldüğü gibi model oluşmayan yanıtlarda bile tahmin edilen değer ve elde edilen değerler birbirine çok yakın bulundu.

4.6.3. Final formülasyonda yapılan safsızlık tayinleri

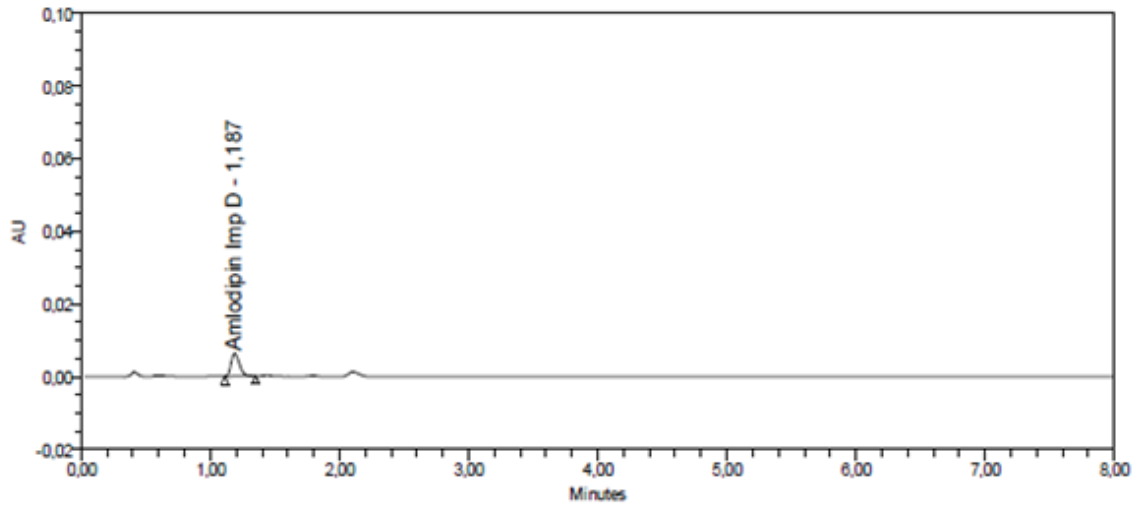
Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde yapılan safsızlık tayinlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 103-Şekil 105'te; safsızlık tayin sonuçları ise Çizelge 4.36'da verilmektedir.



Şekil 4.103. Enalaprilat çözeltisi kromatogramı



Şekil 4.104. Enalapril diketopiperazin çözeltisi kromatogramı



Şekil 4.105. Amlodipin impürite D çözeltisi kromatogramı

Çizelge 4.36. Final formülasyonda yapılan safsızlık tayini sonuçları

Safsızlıklar	Sonuçlar
Enalaprilin safsızlıkları (%)	
Enalaprilat	0,118
Enalapril diketopiperazine	0,013
Bilinmeyen her bir safsızlık	0,067
Toplam safsızlık	0,198
Amlodipinin safsızlıkları (%)	
İmpürite D	Tespit edilemedi
Bilinmeyen her bir safsızlık	0,055
Toplam safsızlık	0,055

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, KKB olan amlodipin besilat ile ADEİ olan enalapril maleatın QbD prensibiyle doğrudan basım yöntemi ile SDK tablet halinde kalite tasarımı prensipleri kullanılarak geliştirilmesi amaçlanmıştır.

SDK ürünlerin formülasyon geliştirme çalışmalarında etkin maddelerin farmakolojik etki mekanizmaları, ilaç-ilaç etkileşimleri, farmakokinetik profilleri, formülasyon ve üretilebilirliğinin dikkate alınması gereklidir (Desai ve diğerleri, 2012).

Hipertansiyon tedavisinde aditif etkili olduğu bilinen ve ESH ve ESC tarafından en çok önerilen antihipertansif kombinasyon grubu olan KKB ve ADEİ kombinasyonunu içeren çeşitli ilaçlar piyasada bulunsa da amlodipin ve enalapril bir arada ihtiva eden SDK tablet Türkiye, Avrupa ve ABD ilaç pazarında henüz yer almamaktadır (Mancia, 2007; Rienzo, 2009; TİTCK, 2016). Bu iki etkin maddenin SDK uygunluğu değerlendirildiğinde yarılanma ömrü açısından amlodipin (30-50 saat) ile enalaprilin aktif metaboliti olan enalaprilat (30-40 saat) benzerlik göstermektedir (Kaynak ve diğerleri, 2011; Sweetman, 2009; Verbeeck ve diğerleri, 2017). Çözünürlük ve dolayısıyla in vitro çözünme özellikleri de benzerdir. Bu nedenle bu iki ürünün SDK şeklinde üretilmesi seçilen yardımcı maddelerin uygunluğuna bağlıdır. Tez çalışması kapsamında etkin maddelerin karakterizasyonu, hammaddelerin geçimlilik çalışmaları, analiz yöntemi geliştirme çalışmaları, QbD bileşenleri ve risk analizi yardımıyla formülasyon geliştirme, deney tasarımı ve optimizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar yorumlanmıştır.

5.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

Lazer difraksiyon yönteminde kuru toz ölçümü ile hesaplanan partikül büyüklüğü yöntemine göre çalışılan iki etkin maddenin de partikül boyutunun da küçük olduğu görüldü. Ortalama partikül büyüklüğü sonuçları amlodipin besilat için $11,03 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ve enalapril maleat için ise $4,72 \pm 0,30 \mu\text{m}$ olarak bulundu.

Amlodipin besilatın çözünürlük sonuçları incelendiğinde, pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 için sırasıyla 2,72 mg/mL, 2,12 mg/mL ve 3,93 mg/mL olarak bulundu. Literatürde de pH 1,2-6,8 arasında en az 1 mg/mL çözünürlük gösterdiği belirtilmiştir (Oh ve diğerleri, 1993).

BCS'e göre ilacın en yüksek dozunun 250 mL çözünme ortamında tamamen çözünmesi yüksek çözünürlüğe işaret eder (Amidon ve diğerleri, 1995). Bu parametrelerden hareketle hesaplanan D_0 değeri 1'den küçük bulundu. Bu da amlodipinin çözünürlüğünün yüksek olduğunu göstermektedir. Amlodipin literatürde ve WHO'nun "Esansiyel ilaçların model listesi" raporunda BCS Sınıf 1 ilaç olarak tanımlanmıştır (Kaynak ve diğerleri, 2011; Olusola ve diğerleri, 2012; Shohin ve diğerleri, 2010; WHO, 2006).

Enalapril maleatın çözünürlük sonuçları ise pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 için sırasıyla 26,6 mg/mL, 25,2 mg/mL ve 23,6 mg/mL olarak bulundu. Literatürde bu pH aralığında en az 5 mg/mL'ye sahip olduğu belirtilmiştir (Verbeeck ve diğerleri, 2017). Hesaplanan D_0 değerleri enalaprilin yüksek çözünürlük gösterdiğini desteklemektedir. Enalapril maleat da literatürde BCS Sınıf 3 ilaç olarak yer almaktadır (Verbeeck ve diğerleri, 2017).

SDK tabletler için etkin maddelerin birbirleri ile geçimlilik çalışmaları çok önemlidir. Literatürde amlodipin ve enalaprilin etkileştiğine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında bu iki etkin maddenin geçimliliği çeşitli yöntemler ile kapsamlı olarak incelenmiştir.

Yapılan DSC çalışmalarında amlodipin besilatın 203,8°C'de eridiği gözlenmiştir. Enalapril maleatın ise erime sıcaklığı 153,7°C olarak bulunmuştur. Her iki maddenin de eridikten hemen sonra bozunduğu, endotermik piki takiben oluşan küçük piklerden anlaşılmaktadır. Bu durum yapılan çalışmalar kapsamında TGA verileri ile de desteklenmiştir. Amlodipin besilatın ve enalapril maleatın 1:1 oranda karıştırılıp 3 hafta süresince birlikte muhafaza edilmesini takiben yapılan DSC analizinde, enalapril pikinde değişiklik gözlenmemiş, ancak amlodipinin pikinde öne kayma ve yayılma gözlenmiştir. Ancak, kayan pik amlodipinin saf halde pik verdiği sıcaklık sınırları içerisindeydir. İlk pik olan enalapril pikinin hiç bozulmaması ancak ikinci pik olan amlodipinin öne doğru kayması bu durumun bir geçimsizlik olarak düşünülmemesine neden olmuştur. Literatürde DSC ile yapılan geçimlilik çalışmalarında ilk önce eriyen maddenin, ikinci madde için safsızlık olarak algılanabileceği ve bu nedenle ikinci maddenin erime noktasında düşmeye sebep olabileceği belirtilmiştir (Oliveira, Yoshida, Silva, 2014; Pani, Nath, Acharya, 2011; Reddy, Ramesh, Kishan, 2013). Buradan hareketle enalaprilin oluşturduğu eriyiğin amlodipin için safsızlık olarak algılandığı ve amlodipinin daha erken bir sıcaklıkta erimeye başlayarak endotermik pikinin daha erken geldiği düşünülmüştür.

Amlodipin ve enalaprilin geçimliliği kromatografik yöntemlerden olan İTK analizi ile değerlendirilmiştir. Etkin maddeler çözelti içerisinde bir arada 3 gün bekletildikten sonra İTK plakasına uygulandığında, her madde kendi yerinde gözlemlendi. Bu durum etkin maddelerin birbiriyle geçimli olduğunu doğrulamaktadır.

Etkin maddelerin geçimliliği ayrıca spektroskopik bir yöntem olan FTIR ile de değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, iki maddenin birbirlerinin FTIR spektrum örgüsünü değiştirmediği ve her maddenin kendi fonksiyonel grup piklerini koruduğu gözlemlenmiştir.

5.2. Yardımcı Maddelerin Seçimi

Aday yardımcı maddeler belirlenirken kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Amlodipin besilatin yardımcı maddeler ile etkileşiminin incelendiği bir çalışmada laktoz ve magnezyum stearat ile birlikte formüle edilen amlodipinin degradasyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkileşimin, amlodipinin yapısında bulunan amin grubu ile laktozun maillard reaksiyonuna girmesi sonucu gözlemlendiği düşünülmüştür (Abdoh ve diğerleri, Jaber, 2004). Amlodipinin oluşan majör degradasyon ürünü, oksidasyon ve asit degradasyonu ile ortaya çıkan ve Avrupa Farmakopesi'nde tanımlı İmpurite D'dir (Saxena, Damale, Joshi, Datar, 2014). Muhtemel maillard reaksiyonuna neden olmamak için laktoz yardımcı madde adaylarına dahil edilmemiştir. Aynı literatürde belirtilen magnezyum stearat ile amlodipinin etkileşme ihtimali tez çalışmasındaki DSC sonuçlarında da gözlemlenmiştir. Amlodipin ve magnezyum stearatın 1:1 oranında karıştırıldığında gözlenen ilave bir pik (Şekil 4.22) geçimsizlik ihtimalini düşündürmüştür.

Enalapril maleat için durum biraz daha karmaşıktır. Literatürde enalapril maleatın, magnezyum stearat, mikrokristal selüloz, dibazik kalsiyum fosfat, tribazik kalsiyum fosfat, kalsiyum stearat, krospovidon, sodyum nişasta glükolat (Bhushan ve Somani, 2001), kroscarmeloz sodyum (Sherman, 1996), koloidal silikon dioksit (Rezende, Santoro ve Matos, 2008) gibi tablet formülasyonlarında yaygın kullanılan birçok yardımcı madde ile geçimsiz olduğuna ilişkin çalışmalar ve patentler bulunmaktadır. Enalapril maleatın iki majör degradasyon ürünü bulunmaktadır. Bunlar bazik ortamda ester hidrolizi ile açığa çıkan enalaprilat ve asidik ortamda intramoleküler siklizasyon ile ortaya çıkan diketopiperazin türevidir (Al-Omari ve diğerleri, 2001; DeSouza ve diğerleri, 2015). Enalaprilin geçimsizlik problemi, otosiklizasyon ile diketopiperazine dönüşme eğilimi,

hidroliz ile diasid oluşumu veya oksidasyon ile diskolorasyon şeklindedir (Bhushan ve Somani, 2001; Harris ve diğerleri, 1988). Enalapril maleat toz kristalleri, tek başına ağız açık kapta ve 40°C ve %75 nemde 4 seneye kadar degrade olmadan stabil kalabilen bir maddedir (Ip ve Brenner, 1987). Bitmiş ürün formülasyonunda kullanılan bazı yardımcı maddelerin sebep olduğu enalapril maleatın degradasyon ihtimali, yine bazı stabilizan yardımcı maddelerin kullanılması ile ortadan kaldırılabilmektedir. Çalışmalarda stabilizan olarak en çok sodyum bikarbonat kullanımı önerilmiştir. İn situ dönüşüm olarak adlandırılan bu stabilizasyon işleminde sodyum bikarbonat ve enalapril maleat birlikte formüle edildiğinde, enalapril maleat enalapril sodyuma dönüşmektedir. Ortamın bazik hale getirilmesi de majör impürite olan diketopiperazin türevinin oluşmasını önlemektedir (Verbeeck ve diğerleri, 2017). Oda sıcaklığında bile hızla gerçekleşen bu dönüşüm ile enalaprilin stabilitesi sağlanmaktadır. Enalapril maleatın tablet formülasyonlarında başka stabilizanlar da kullanılmıştır. Bhushan ve diğerleri (2001), formülasyon patentlerinde enalapril maleatın tablet formülasyonlarına stabilizan olarak silikon dioksit ve maleik asit ilave ettiklerinde 60°C’de ve 40°C/%75 nemde uygun sonuçlar elde etmişlerdir. Sherman (1994) da geliştirdiği formülasyonun patentinde stabilizan olarak maleik asit kullandığında stabil formülasyonlar elde edildiğini belirtmektedir. Harris ve diğerleri (1988) yayınladıkları patentte ADEİ’lerin formülasyonlarında toprak alkali metallerin, bilhassa magnezyum, sodyum ve kalsiyumun karbonat tuzlarının enalaprilin stabilizasyonunu sağladığını belirtmiştir. Murthy ve diğerleri (1986) ise stabilizasyonu, formülasyona askorbik asit/sodyum askorbat ilavesi ile sağlamıştır. Cunha ve diğerleri (2013) enalapril maleattan enalapril sodyuma in situ dönüşümün hem sodyum bikarbonat hem de stearik asit ile sağlanabildiğini göstermiştir. Kello ve Abdelwahed (2014) enalapril maleat, mikrokristal selüloz, anhidr laktoz, kolloidal silikon dioksit, çinko stearat ve stabilizan olarak anhidr sitrik asit kullanarak doğrudan basım ile büyük ölçekte ürettikleri tabletlerde stabilite sonuçlarının uygun olduğunu göstermiştir. Rx Media Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı incelendiğinde piyasada bulunan enalapril ve diğer birçok ADEİ formülasyonlarının bileşiminde stabilizan olarak sodyum bikarbonat ihtiva ettiği görülmüştür (Üstünes, L., 2018). Bu bilgiler ışığında hazırlanan SDK formülasyonunda stabilizasyon ve geçimlilik açısından sodyum bikarbonat kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmalarımızda enalapril maleattan in situ dönüşüm ile enalapril sodyum olduğu DSC ve TGA/DTA sonuçları ile gösterilmiştir.

Diğer yardımcı maddelerle enalaprilin geçimliliğinin değerlendirilmesi için DSC ve FTIR yöntemlerinden yararlanılmıştır. DSC ölçümlerinde magnezyum stearat ve sodyum stearil fumarat kullanımında bazı etkileşimler gözlenmesi ile bu iki maddeye formülasyon tasarımı yer verilmemiştir. Literatürde de enalaprilin magnezyum stearat ile etkileşmesine rağmen çinko stearat ve gliseril monostearat gibi diğer stearik asit türevleriyle etkileşimin gözlenmediği belirtilmiştir (Cunha ve diğerleri, 2013). Bu nedenle kaydırıcı olarak gliseril distearat kullanılmış olup sonuçlarımız literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, geliştirilen SDK formülasyonu yardımcı madde olarak mikrokristal selüloz, prejelatinize nişasta, hidroksipropil selüloz, krospovidon, sodyum bikarbonat ve gliseril distearatı içermektedir.

5.3. Etkin Maddelerin Miktar Tayini ve Çözünme Hızı Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

USP’de yer alan amlodipin tablet ve enalapril tablet monografları incelendiğinde, önerilen analiz yöntemlerinin mobil faz, tampon, kolon ve akış hızı açısından çok farklı olduğu görülmektedir (USP 42a, USP 42b). Bu monograflarda önerilen yöntemler tekli dozaj formları için uygun olup her iki maddenin eş zamanlı analizine olanak sağlamamaktadır. Bhushan, Guta ve Singh (2006) enalapril, amlodipin ve ramiprilin analizi için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Yöntemde enalaprilin alıkonma zamanı 1,78 dk, amlodipinin alıkonma zamanı ise 2,06 dk olarak bulunmuştur. Alıkonma zamanları birbirine çok yakın olduğu için pikler arasında keskin bir ayırım gözlenmemiştir. Tez çalışmasında geliştirilen HPLC analiz yönteminde ise enalapril için 3,8 dk; amlodipin için ise 8,0 dk’lık alıkonma zamanları ile çok iyi bir ayırım sağlanmıştır.

ICH Q2 “Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Test ve Metodoloji” kılavuzunda araştırmacılar analiz yöntemi geliştirirken DOE kullanılması konusunda teşvik edilmektedir. Buna istinaden birçok araştırmacı, kromatografik koşulları, sağlamlığı ve kesinliği değerlendirirken çeşitli deney tasarımlarından faydalanmışlardır. Vander Heyden ve diğerleri (1995), geliştirdikleri analiz yönteminin sağlamlığı üzerinde anlamlı etkileri olan faktörleri görmek için altı faktörün (mobil faz pH’sı, kolon sıcaklığı, trietilamin hacmi, gradient kompozisyonu, dalga boyu ve kolon çeşidi) PBD deney tasarımını

kullanmıştır. Mirza ve Tan (2001) geliştirdikleri analiz yönteminde BBD tasarımıdan faydalanarak potasyum hidrojen ftalat miktarı, metanol yüzdesi ve kolon sıcaklığını optimize etmiştir. Kashid ve diğerleri (2015) de vildaglapatinin miktar tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminin sağlamlık parametresini mobil faz bileşimi, akış hızı ve tampon pH'sı açısından; kesinlik parametresini ise analist, cihaz ve gün sayısı bakımından değerlendirmek için yüzey yanıt metodolojisinden olan CCD'den yararlanmışlardır.

Tez çalışmasında da iki etkin maddenin bir arada analizini sağlayan ve geliştirilen SDK'nın miktar tayini ve çözünme hızı testinde kullanılan HPLC yöntemi geliştirilmiş ve sağlamlık parametrelerinin optimizasyonu için BBD'den faydalanılmıştır. BBD'de yöntemin akış hızı, mobil fazdaki metanol oranı, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığının pik alanlarının ölçümü ile hesaplanan amlodipin ve enalapril maleat üzerindeki etkisi araştırılarak etkili tek faktör olan akış hızı üzerinden optimizasyon yapılmıştır. Optimize edilen yöntemde amlodipin piki daha keskin ve simetrik hale gelmiş (Şekil 4,63) ve bu durum ilk yöntemdeki kuyruklanma (simetri) faktörü değeri (1,417) ile optimize yöntemdeki değer (1,164) karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). ICH Q2'ye göre valide edilen optimize edilmiş yöntemde tüm validasyon parametreleri uygun bulunmuştur. Bu yöntem üzerinden mobil fazdaki tampon yüzdesi ve akış hızında küçük değişiklikler yapılarak pH 4,5 ve pH 6,8 için de uygun analiz yöntemleri geliştirilerek valide edilmiştir.

5.4. Kalite Tasarımı İle Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Geliştirilen formülasyon iki antihipertansif etkin maddeyi tek formülasyonda içeren bir SDK tabletidir. TİTCK'da iki etkin maddeyi aynı anda içeren bir SDK'nın ruhsatlandırılması için ayrı bir yönerge bulunmamaktadır. Bu ürünler “Beşeri ürünler ve ruhsatlandırma kılavuzu” ve “Farmasötik müstahzarların biyoyararlanım ve biyoeşdeğerliliğinin değerlendirilmesi hakkında yönetmelik”te eşdeğer ürünler için belirtilen kriterler dikkate alınmaktadır (TİTCK, 1994, TİTCK, 2016).

EMA'nın 2017'de yayınladığı “Sabit dozlu kombinasyon ürünleri için klinik gelişim üzerine kılavuz”da SDK ürününün içerdiği ilaçları hasta hali hazırda birlikte kullanıyorsa (süstitüsyon senaryosu), herhangi bir doz farklılığı yoksa ruhsatlandırılması için referans tek ürünlerle biyoeşdeğerlik çalışması istendiği belirtilmiştir (EMA, 2017). Bu nedenle

QTPP hazırlanırken farmasötik eşdeğerlik gereklilikleri dikkate alınmıştır. Referans ürün olarak Türkiye ilaç pazarında yer alan Norvasc® 5 mg (Pfizer) ile Enapril® 10 mg (Sandoz) seçilmiştir. Etkin maddelerin dozları kombine tedavide gözlenmesi beklenen aditif etki ve düşürülmesi hedeflenen yan etki insidansı göz önüne alınarak SDK'da kullanılacak doz olarak piyasadaki düşük dozlar (5 mg amlodipin ve 10 mg enalapril maleat) seçilmiştir. QTPP'de hedeflenen miktar tayini ve içerik tekdüzeliği doğrudan etkinliği; çözünme hızı ise biyoyararlanımı etkilediği için önemlidir.

Literatürde amlodipin BCS Sınıf 1, enalapril ise BCS Sınıf 3 olarak yer almıştır (Kaynak ve diğerleri, 2011; Verbeeck ve diğerleri, 2017). FDA, EMA ve WHO gibi sağlık otoritelerinin belirlediği kriterlere göre uygun koşulları sağladığı takdirde BCS Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçlar için biyoeşdeğerlik çalışmalarından muafiyet söz konusu olabilmektedir. Buna göre BCS Sınıf 1 ilaçlar içeren dozaj formları pH 1,2, pH 4,5 ve pH 6,8 ortamlarında, 37°C sıcaklıkta, 900 mL hacimde (FDA için 500mL), palet yöntemi için 50 rpm dönüş hızında, sepet yöntemi için ise 100 rpm hızda 30 dk'da en az %85 çözünmelidir. BCS Sınıf 3 ilaçlar ise aynı koşullarda gerçekleştirilen çözünme testinde üç ortamda 15 dakika içinde en az %85 çözünmelidir (WHO, 2006; EMA, 2010; FDA, 2017). Tez çalışmasında geliştirilen SDK'nın QTPP'de biyomuafiyet şartlarını sağlayabileceği de görülmüştür. Bu amaçla geliştirilen SDK'nın içerdiği etkin maddelerin bu üç ortamda 15 dakikada %85'den fazla çözünmesi nedeniyle eşdeğer ürünler benzerlik faktörü (f2) kriterine bakılmaksızın referans ile benzer olduğu bulunmuştur.

QTPP belirlendikten sonraki adım muhtemel CQA'nın belirlenmesidir. Etkinlik ve güvenilirliği etkileyen miktar tayini, içerik tekdüzeliği ve çözünme hızı, CQA olarak seçilmiştir. CQA aynı zamanda formülasyon parametrelerinden de etkilenebildiğinden friabilite, sertlik ve dağılma gibi fiziksel özellikler de CQA olarak alınmıştır. Fiziksel testler etkinlik ve güvenliği doğrudan etkilemese de bu testlerin ürünün performansı üzerinde etkili olması söz konusudur (Yu ve diğerleri, 2014). Fahmy ve diğerleri (2012) de FDA ile ortak yaptıkları bir çalışmada geliştirdikleri tablet formülasyonlarında sertlik, friabilite ve dağılma süresini CQA olarak kabul etmiştir. Aynı makalede QbD ile geliştirilen ürünler için QTPP ve CQA belirlenmesinde kesin doğrular bulunmadığını ve parametrelerin kritikliğinin ürünün özelliklerine göre risk analizleri yardımıyla saptanabileceği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında bir diğer kalite özelliği olarak dağılmanın 5 dakika içerisinde tamamlanması hedeflenmiştir. Bunun sebebi çalışmada

geliştirilen SDK'nın 15 dk'da en az %85 çözünerek referans ile in vitro benzerliğinin sağlanmasında dağılmanın etkili faktör olarak kabul edilmesidir.

Bir tabletin sertliği dağılmayı ve çözünmeyi etkileyebileceğinden kritik olarak nitelendirilebilir. Bir tasarımda sertliğin bağımlı değişken olarak değerlendirilmesi için en kritik parametrelerden biri tablet makinesinin baskı kuvveti ve hızıdır. QbD ile tablet üretilen çalışmalarda bu parametre genellikle değerlendirilmektedir (Badawy ve diğerleri, 2016; Mishra ve Rohera, 2017; Fahmy ve diğerleri 2012). Ancak bu tez çalışmasında kullanılan tablet makinasının baskı kuvveti manuel olarak ayarlandığından baskı kuvveti ve hızı bağımlı değişken olarak değerlendirilememiştir. Tabletlerin sertliğinde gözlenen varyasyonların CQA olan dağılma üzerindeki etkisini bertaraf etmek için basılan tabletlerin sertliğinin standardize edilmesine karar verilmiştir. CQA olarak hazırlanan tabletlerin sertliği $45 \text{ N} \pm \%10$ olarak standardize edilmiştir. FDA'nın jenerik ilaç firmalarına rehberlik etmesi için hazırladığı "Jenerik ürünlere kalite tasarımı uygulanması: Hemen-salın yapan dozaj şekilleri için bir örnek" isimli farmasötik gelişim dokümanı örneğinde bağımlı değişken olarak çözünme hızı değerlendirilmesinde sertlik parametresi sabit tutularak cevap değişkeni üzerinde bir etki oluşturarak modeli etkilemesinin önüne geçildiği görülmüştür (FDA, 2012).

CQA'leri etkileyebilecek CMA ve CPP tespit edilmesi amacıyla Ishikawa diyagramından faydalanılmıştır. Ishikawa diyagramı ilk risk değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (FDA, 2012; Fahmy ve diğerleri, 2012; Yerlikaya ve diğerleri, 2013). Şekil 3.1'de verilen diyagramdaki faktörler Çizelge 3.15'te değerlendirilmiştir. Uygun hammadde oranlarını belirlemek ve seçilen yardımcı maddelerin basılabilirliğini gözlemek ve proses parametrelerini yorumlamak için bir deneme formülasyon hazırlanmıştır. Ip ve Brenner (1987) enalapril tabletlerin çok yüksek sıcaklık ve nemden korunabildiğinde degradasyon oluşmadığını vurgulamıştır. Bu tez çalışmasında geliştirilen formülasyonun hazırlanmasında etkin maddelerin degradasyonunu önlemek amacıyla doğrudan basım yöntemi tercih edilmiştir. Deneme formülasyonda kullanılan yardımcı madde oranlarının belirlenmesinde, Farmasötik yardımcı maddelerin miktarları, Handbook of Pharmaceutical Excipients'da yer alan limitlerin içerisinde olacak şekilde belirlenmiştir (Rawe ve diğerleri, 2009). Ancak proses parametrelerinde özellikle ideal olmayan karıştırma süreleri tercih edilmiştir. Bu sayede içerik tekdüzeliğinin ve diğer cevapların zorlanmış koşullarda nasıl sonuç vereceği incelenmiştir. Deneme formülasyonda etkin

madde miktar tayini, friabilite, dağılma ve miktar tayini sonuçları uygun bulunmuştur. Çözünme hızı değerinin ortalaması uygun bulunmakla beraber standart sapması çok yüksek bulunmuştur. Bu nedenle prosesin daha iyi anlaşılması için karıştırma işleminin CPP olarak incelenmesine karar verilmiştir. Lubrikanın toplam kütle ile birlikte 7 dakika karıştırıldığında bile uygun dağılma ve çözünme sonuçları vermesi de kullanılacak lubrikan aralığının geniş tutulabileceğinin işareti olarak düşünülmüştür.

5.5. Plackett-Burman Deney Tasarımı

PBD, yanıtlar üzerinde etkisi olduğu düşünülen çok sayıda faktörün ana etkilerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılır. Sastry ve Khan (1998) formülasyon parametrelerinde ana etkilerin belirlenmesi için ön çalışmalarda PBD kullanımının çok yararlı olduğunu vurgulamıştır. Literatürde formülasyon tasarımında ve üretim yöntemi geliştirmede PBD'nin kullanılarak ana etkilerin değerlendirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Badawy ve diğerleri, 2016; Chudiwal ve diğerleri, 2017; Claycamp ve diğerleri, 2016; Eşim ve diğerleri, 2018; Fahmy ve diğerleri, 2012; Kushner ve diğerleri, 2014; Maltais ve diğerleri, 2015; Monajjemzadeh ve diğerleri, 2014). Tez çalışmasında da faktörlerin CQA olarak belirlediğimiz yanıtlar üzerindeki etkilerini gözlemek ve önceliğini belirlemek için PBD'den yararlanılmıştır. PBD sonuçları yorumlanırken grafiksel değerlendirmelerden veya istatistiksel değerlendirmelerden yararlanılabilir. Fahmy ve diğerleri (2012) PBD tasarımlarındaki sonuçları yorumlamak için en pratik ve kullanışlı yolun yarı-normal grafikler ve pareto grafikleri olduğundan bahsetmiş ve kendi çalışmalarında 11 faktör ile gerçekleştirdikleri 12 deneyin sonucunu bu grafikler yardımıyla yorumlamışlardır. Tez çalışmasında da sonuçlar yarı-normal grafikler ve pareto grafikleri ile değerlendirildi. Yarı-normal grafiklerde anlamlı olmayan faktörler orijinden itibaren bir doğru oluşturma eğiliminde iken anlamlı faktörler bu çizginin uzağındadır. Pareto grafiklerinde ise her faktörü sembolize eden sütunlar bulunur ve her etkinin bağlı düzeyi görsel olarak incelenebilir. Bu sütunların yüksekliği etki sırasını göstermektedir. En uzun sütun en etkili faktörü simgeler. t-değeri çizgisinin altında olan değerler anlamsız, üzerindkiler anlamlıdır ve değerlendirmesi en kolay etki aracıdır (Vanaja ve diğerleri, 2007).

PBD sonucu elde edilen değerler (Çizelge 4.27) ve grafikler (Şekil 4.85-4.92) değerlendirildiğinde karıştırma süresinin enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon

katsayısındaki en önemli faktör olduğu gözlenmiştir. Ancak beklenenin aksine karıştırma süresi arttıkça varyasyon katsayısının da arttığı görülmüştür. Bunun sebebinin PBD tasarımı karıştırma süresi düzeylerinin çok geniş seçilmesi olduğu düşünülmektedir. Karıştırma süresi 8 dk ila 20 dk olarak verilmiştir. 20 dk'lık karıştırmanın enalapril için uygun olmadığı ve çok küçük partikül boyutuna (4,72 μm) sahip olması dolayısıyla uzun süre karıştırıldığında segregasyon oluşma ihtimali göz önüne alınarak karıştırma süresinin BBD tasarım için daha geniş düzeylerde (5 ila 20 dk) kullanılmasına karar verilmiştir. Eleme tasarımını takiben optimizasyon yapılan çalışmalarda seçilen faktör düzeylerinin değiştirilmesi olası bir durumdur ve düzeyleri yeniden gözden geçirme fırsatı PBD'nin sağladığı olanaklardan birisidir. Literatürde, PBD tasarımı sonrası yüzey yanıt metodolojisi tasarımlarına geçilmeden genellikle düzeylerin sınırlarının artırıldığı belirtilmiştir (Shabbiri ve diğerleri, 2012b; Zhu ve diğerleri, 2013). Bu durum göz önüne alınarak bu çalışmada da BBD tasarımı karıştırma süresi faktörüne ait düzeyler 5-20 dk olarak genişletilmiştir.

Çözünme hızı verileri değerlendirildiğinde tüm formülasyonlar hedef spesifikasyona (15 dakikada en az %85 çözünme) uygun bulunmuştur. Ancak çözünme hızına ait pareto grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.87, Şekil 4.88) sadece amlodipin için pH 1,2 ve pH 6,8; enalapril için ise yalnızca pH 1,2 ortamında t-değerini aşan faktörler olduğu görülmüştür. pH 1,2'de her iki madde için lubrikasyon süresi anlamlı görülmüş ancak pH 6,8'de sadece amlodipin için en etkili faktörün prejelatinize nişasta olduğu saptanmıştır. Burada, çözünme hızı yanıtında anlamlı gibi görülen faktörler birbiri ile tutarlı sonuçlar vermemiştir. Formülasyonlardaki çözünen miktarlar arasında yalnızca %1-5 civarında farklılıklar görülmüş ve modeller bu farkı temel alarak oluşturulmuştur. Oysa konvansiyonel ve yüksek çözünürlük/çözünme gösteren BCS Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçlar için eğer spesifikasyonlar karşılanıyorsa %1-5'lik bir fark kabul edilebilir bir orandır. Bu nedenle çözünme hızı cevabının bağımlı değişkenlerden çıkartılmasına ve BBD tasarımı kullanılmamasına karar verilmiştir. Literatürde bağımlı değişken olarak çözünme hızının alındığı çalışmalar bulunmaktadır ancak bu çalışmalarda kullanılan ilaçlar BCS Sınıf 2 veya BCS Sınıf 4 ilaçlardır (Badawy ve diğerleri, 2016; Charoo ve diğerleri, 2012; El Say ve diğerleri, 2011; Esim ve diğerleri 2018; Fahmy ve diğerleri, 2012; FDA, 2012; Mishra ve Rovera 2016). Bu nedenle faktörlerin çözünme sonuçları üzerindeki etkisi daha net görülebilmektedir. ICH Q8(R2) "Farmasötik Gelişim" kılavuzunda da hızlı çözünen ilaçların katı dozaj formları için dağılma testinin çözünmenin yerine geçebileceği

belirtilmiştir (ICH Q8). Bu nedenle, çalışmamızda çözünme hızı cevabı BBD tasarıma dahil edilmemiştir. Onun yerine mevcut yanıtlardan olan dağılma süresinin çözünmeyi temsil edeceği düşünülmüştür. Kushner ve diğerleri (2014) QbD ile geliştirdiği tablet formülasyonunda faktör olarak etkin maddenin tipini incelemesi ve BCS Sınıf 1 olan teofilin ile BCS Sınıf 2 olan ibuprofeni karşılaştırmasına rağmen yanıtlarda çözünme hızı yerine dağılmayı kullanmıştır.

Tezde dağılma süresini kısaltmak ve dolayısıyla çözünmeyi hızlandırmak bir diğer hedef olduğu için BBD tasarım için seçilen diğer iki faktör de dağılma üzerinde oluşturdukları anlamlı etki nedeniyle krospovidon ve gliseril distearat yüzdesidir. Krospovidon miktarı arttıkça dağılma süresi kısalmış; gliseril stearat miktarı arttıkça dağılma süresi artmıştır. Bu veriler ışığında optimizasyon modeline geçilmiştir.

5.6. Box-Behnken Deney Tasarımı

PBD sonucu seçilen en etkili üç faktörün (krospovidon miktarı, gliseril distearat miktarı ve karıştırma süresi) etkisini matematiksel olarak açıklamak ve faktörlerin optimizasyonunu sağlamak için BBD'den yararlanılmıştır. Literatürde BBD, faktör sayısının düşük olması durumunda optimizasyona çok elverişli bir yöntem olarak belirtilmiştir (Maurya ve diğerleri, 2012). PBD tasarım sonucu seçilen üç faktörden gliseril distearat ve krospovidon düzeyleri BBD'ye olduğu gibi aktarılarak tasarıma orta değerler de ilave edilmiştir. Ancak üçüncü faktör olan karıştırma süresinin düzeyleri Bölüm 5.5'te belirtildiği üzere güncellenmiş ve 5, 12,5 ve 20 dk olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 3 faktör, 3 seviye, 1 blok ve 5 merkez noktalı 17 deney gerçekleştirilmiştir. İncelenen yanıtlardan enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı ve dağılma yanıtları için anlamlı modeller olduğu görülmüştür.

Enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı için oluşturulan modelde faktörlerin grafikleri (Şekil 4.94-4.96) karıştırma süresi için 5 dk'nın yetersiz olduğunu, karıştırma süresi arttıkça varyasyonun azaldığını ancak 20. dk'ya yaklaştıkça yeniden artmaya başladığını göstermiştir. Bu da uzun süreli karıştırmada segregasyon ihtimalini desteklemiştir. BBD ile oluşan modele ait denklem ve varyans analizi sonuçları Bölüm 4.5.2'de verilmiştir. Modelin R^2 değeri 0,8308 olarak bulunmuştur. Bu değer deney tasarımları için uygun bir değerdir (Shabbiri ve diğerleri, 2012b) ve modelin verilerinin

%83'ünü doğru şekilde açıklayabildiğini ifade eder (Rossi ve diğerleri, 2013). Modelin R^2_{adj} ve R^2_{pred} farkı 0,1242 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin birbirine mümkün olduğu kadar yakın olması istenir. Design Expert® 11 yazılımında bu değer 0,2'den küçük olmasının tahmin edilen değerler ile elde edilen değerler arasında geçerli bir uyum olacağı belirtilmektedir. Modelde Adeq Precision değeri 9,42 bulunmuştur. Bu değer de sinyal/gürültü oranıdır ve de 4'ten büyük olması durumunda tasarım sahasının oluşturulmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (Sibanda ve Pretorius, 2013).

Krospovidon ve gliseril distearatın dağılma süresi üzerindeki etkisi PBD'de elde edilen bulgularla paralellik göstermiştir. Matematiksel ve istatistiksel açıdan değerlendirmeler Bölüm 4.5.2'de verilmiştir. Modelin R^2 değeri 0,9039 bulunmuştur. R^2_{adj} ve R^2_{pred} farkı 0,15558 ve Adeq Precision değeri 13,31 olarak hesaplanmıştır. Bu model de uygun istatistiksel sonuçları sağlamıştır. Bu sonuçlar temel alınarak optimizasyon yapılmıştır.

5.7. Optimizasyon İle Tasarım Alanının Belirlenmesi ve Final Formülasyonun Hazırlanması, Kalite Denetimleri ve Safsızlık Değerlendirmeleri

BBD ile incelenen faktörlerin optimizasyonu için Design Expert® 11 yazılımında sayısal optimizasyon verisi olarak enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısı cevabı için hedef kriter olarak “%5'ten küçük”, dağılma kriteri için ise “minimize edilsin” komutları girildiğinde bu sonuçları sağlayan optimize edilmiş 31 öneri elde edilmiştir. Optimum değerlerden hareketle faktörler için bir tasarım alanı hesaplanmıştır (Çizelge 4.31). Bu tasarım sahası içerisinde çalışıldığı takdirde hedef kriterler karşılanacaktır. Bunu göstermek ve final formülasyonu elde etmek için programın önerdiği 31 öneri içerisinde arzulanabilirlik (desirability) değeri en yüksek (0,848) olan modellerden biri final formülasyon olarak seçilmiştir.

Bu modele göre final formülasyon %5 krospovidon ve %2,902 gliseril stearat içermektedir. Karıştırma süresi 15 dk 46 sn'dir. Diğer optimize formüller de dikkate alınarak oluşturulan tasarım alanı Şekil 4.100'de verilmiştir.

Tez çalışmasında PBD ve BBD tasarımlardaki tüm formülasyonlarda seri boyutu 48 g (300 tablet) olarak hazırlanmıştır. Ancak optimize formül 96 g (600 tablet) hazırlanmıştır. Literatürde tasarım sahasının herhangi bir ölçekte oluşturulabilir, ancak bunun üretim

ölçeğine uygulanabilir olması gerektiği belirtilmiştir (Badawy ve diğerleri, 2016). Ancak tez çalışmasında ticari üretim hedeflenmediğinden seri boyutu 96 g'a (600 tablet) çıkarılmıştır. Final formülasyonda programda tahmin edilen değerlere çok yakın sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4.35'te görüldüğü üzere tahmin edilen değerler ile deneysel olarak bulunan değerler karşılaştırıldığında etkin madde miktarı, içerik tekdüzeliği, friabilite ve dağılma açısından hedefe ulaşılmıştır.

Optimize final formülasyon ile referans ürünlerin karşılaştırmalı çözünme profilleri Şekil 401 ve 402'de verilmiştir. SDK ve referans ürünler her üç ortamda da 15 dk'da %85'ten fazla çözündüğünden in vitro benzerlik sağlanmıştır. İlk 15 dk'da geliştirilen SDK kaplama materyali içermediği ve %5 oranında krospovidon içerdiğinden referans ürünlerden daha hızlı çözünme göstermiştir.

Final formülasyonda yapılan safsızlık tayininde farmakopede belirtilen spesifikasyonlara uygun sonuçlar elde edilmiştir. Tabletlerin stabilitesinin takibine karar verilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 5 mg amlodipine eşdeğer miktarda amlodipin besilat ve 10 mg enalapril maleat içeren antihipertansif etkili sabit dozlu kombine tablet formülasyonu, kalite tasarımı prensipleri kullanılarak geliştirilmiştir. Bu kombinasyon henüz Amerika, Avrupa ve Türkiye pazarında bulunmamaktadır.

Model ilaç olarak amlodipin ve enalaprilin seçilmesi ve tezde yapılan çalışmaların gerekçelendirilmesi aşağıda özetlenmiştir:

- Fizikokimyasal açıdan gerekçelendirme: SDK'yı oluşturan ilaçlar geçimli olmalıdır. Etkin maddelerin birbirleriyle ve seçilen diğer yardımcı maddeler ile etkileşim göstermediği ayrıntılı geçimlilik çalışmaları ile gösterilmiştir. Enalapril maleat ve sodyum bikarbonat arasındaki etkileşim in situ dönüşümden kaynaklı, formülasyon açısından istenen bir etkileşimdir.
- Farmakodinamik açıdan gerekçelendirme: SDK'ların farklı etki mekanizmaları ile etki göstermeleri beklenir. Amlodipin bir kalsiyum kanal blokeri, enalapril ise bir anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür. Avrupa Hipertansiyon Topluluğu tarafından kombine tedaviye bu iki grubun kombinasyonu ile başlanması önerilmiştir.
- Farmakokinetik açıdan gerekçelendirme: SDK bileşenlerinin farmakokinetik özelliklerinin çok farklı olmaması istenir. Amlodipinin yarılanma ömrü 30-50 saattir. Enalapril ise bir ön ilaçtır ve etkin metaboliti olan enalaprilatın yarılanma ömrü 30-40 saattir. Bu nedenle birlikte formüle edilmeleri farmakokinetik açıdan sorun oluşturmamaktadır.
- Biyofarmasötik açıdan gerekçelendirme: Amlodipin BCS Sınıf 1; enalapril ise BCS Sınıf 3 ilaçtır. Geliştirilen SDK tabletin pH 1,2-pH 6,8 arasında çok hızlı çözünme (15 dk'da %85'ten fazla) göstermesi QTPP spesifikasyonlarında hedeflenmiştir.

Yukarıda verilen gerekçeler doğrultusunda geliştirilen SDK'ya ait QTPP ve CQA belirlenmiştir. CQA'nın risk değerlendirmesi Ishikawa diyagramı ve neden-sonuç matrisi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Risk analizi sonucunda belirlenen CMA krospovidon miktarı, gliseril distearat miktarı, hidroksipropil selüloz miktarı ve prejelatinize nişasta miktarı iken CPP ise karıştırma hızı, karıştırma süresi, lubrikasyon hızı ve lubrikasyon

süresidir. Bu parametrelerin kritik kalite özellikleri üzerindeki önem derecesinin saptanması amacıyla Plackett-Burman eleme tasarımı kullanılmıştır.

PBD’de her biri nicel 2 düzey içeren 8 faktör toplam 12 deney ile gerçekleştirilmiştir. PBD sonuçları grafiksel olarak değerlendirilmiş ve en etkili faktörler tespit edilmiştir. Bu faktörler gliseril distearat (kaydırıcı) miktarı, krospovidon (dağıtıcı) miktarı ve karıştırma süresidir. Bu üç faktörün istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve optimizasyon basamağıyla tasarım alanının belirlenmesi amacıyla yüzey yanıt metodlarından olan BBD kullanılmıştır.

BBD tasarım üç faktör, üç düzey ve beş merkez noktasıyla toplam 17 deney ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler ANOVA sonuçları ve çeşitli istatistiksel parametreler aracılığıyla değerlendirildiğinde yanıtlardan ikisi için (dağılma süresi ve enalaprilin içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısında) anlamlı kuadral modeller gelişmiştir. Bu modellerde dağılma süresinin en fazla 60 saniye olduğu ve enalapril içerik tekdüzeliğinin varyasyon katsayısının da %5’ten az olduğu ve her iki parametrenin de minimize edildiği bir optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonucu önerilen 31 optimum koşuldan hareketle bir tasarım alanı belirlenmiştir. Daha sonra seçilen optimum koşullarda (desirability 0,848) hazırlanan tabletlerde kalite denetimleri gerçekleştirilmiştir. Bu denetimler Design Expert® 11 yazılımında optimizasyon sonucu tahmin edilen değerlere oldukça yakın bulunmuş olup hedef spesifikasyonları karşılamaktadır. Final formülasyondaki safsızlık sonuçları da farmakope limitleri içerisinde bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışmasında antihipertansif etkili SDK tabletin geliştirilmesinde formülasyon ve proses aşamalarına kalitenin nasıl inşa edileceği başarıyla gösterilmiştir. Geliştirilen bu kombine ürünün öncelikle hipertansiyon oluşturulmuş hayvan modellerinde in vivo farmakodinamik çalışmalarla etkinliğinin incelenmesi de tablet kombinasyonun ADEİ ve KKB’nin aditif etkisini görmek açısından önemli olacaktır. Çalışmanın in vivo çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdoh, A., Al-Omari, M., Badwan, A.A., Jaber, A.M.Y. (2004). Amlodipine besylate-excipients interaction in solid dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology*. 9(1), 15-24.
- Aksu, B. (2015). Tasarımla kalite (Quality by Design, QbD) ve kalite risk yönetimi. (2015). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19, 12-18.
- Aksu, B. ve Mesut, B. (2015). Quality by Design (QbD) for pharmaceutical area. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 45(2), 233-251.
- Al-Omari, M.M, Abdelah, M.K., Badwan, A.A., Jaber, A.M.Y. (2001). Effect of the drug matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 25, 893-902.
- Amidon, G., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
- Badawy, S.I.F., Narang, A.S., LaMarche, K.R., Subramanian, G.A., Varia, S.A., Lin, J., Stewens, T and Shah, P.A. (2016). Integrated application of quality-by-design principles to drug product development: a case study of brivanib alaninate film coated tablets. *Journal of Pharmaceutical Science*, 105, 168-181.
- Beres, D.L. and Hawkins, D.M. (2001). Plackett-Burman technique ffor sensitivity analysis of many parametered models. *Ecological Modelling*, 141, 171-183.
- Berthomieu, C. and Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101, 157-170.
- Bharate, S.S., Bharate, S.B. and Bajaj, A.N. (2010). Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *Journal of Excipients and Food Chemistry*, 1(3), 3-26.
- Bhushan, I., Somani, J.K. (2001). Stable solid pharmaceutical compositions containing enalapril maleate. *US Patent No: 6,296,871 B1*.
- Bhushan, R., Gupta, D. and Singh, S.K. (2006). Liquid chromatographic separation and UV determinationof certain antihypertensive agents. *Biomedical Chromatography*. 20, 217-224.
- Burges, R. and Moisey, D. (1994). Unique pharmacologic properties of amlodipine. *The Americam Journal of Cardiology*, 73, 2A-9A.
- Charoo, N.A., Shamsheer, A.A.A, Zidan, A.S. and Rahman, Z. (2012). Quality by design approach for formulation development: A case study of dispersible tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 423, 167-178.

- Chaudhari, B.G. (2012). Development and validation of rp-hplc method for simultaneous estimation of enalapril maleate and amlodipine besylate in combined dosage form. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(9), 54-57.
- Claycamp, H.G., Kona, R., Fahmy, R. and Hoag, S.W. (2016). Quality-by-Design II: Application of quantitative risk analysis to the formulation of ciprofloxacin tablets. *American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutical Science and Technology*, 17(2), 233-244.
- Dejaegher, B. and Vander Heyden Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 141-158.
- Desai, D., Wang, J., Wen, H., Li, X, and Timmins, P. (2012). Formulation design challenges and development considerations for fixed dose combination (FDC) of oral solid dosage forms. *Pharmaceutical Development Technology*, 1-12.
- DeSouza, S.M.M, Franco, P.I.B.M., Leles, M.I.G. ve Conceição, E.C. (2016). Evaluation of thermal stability of enalapril maleate tablets using thermogravimetry and differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(3), 1943-1949.
- Elsebaei, F. and Zhu, Y. (2011). Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma and urine. *Talanta*, 85, 123-129.
- EMA 2010, European Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2010). *Guideline on the Investigation of Bioequivalence*, 25-27.
- EMA 2017, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use (2017). *Guideline on clinical development of fixed dose combination medicinal products*, 5-11.
- Esim, O., Savaser, A., Ozkan, C.K., Bayrak, Z., Tas, C., Ozkan, Y. (2018). Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 53-63.
- Eyjolffson, R. (2002). Enalapril maleate polymorphs: Instability of form II in a tablet formulation. *Pharmazie*, 57(5), 347-348.
- Eyjolffson, R. (2003). Enalapril maleate form II: Stabilization in a tablet formulation. *Pharmazie*, 58(5), 357.
- Fahmy, R., Kona, R., Dandu, R., Xie, W., Claycamp, G. And Hoag, S.W. (2012). Quality by Design I: Application of Failure Mode Effect Analysis (FMEA) and Plackett–Burman Design of Experiments in the identification of “main factors” in the formulation and process design space for roller-compacted ciprofloxacin hydrochloride immediate-release tablets. *American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutical Science and Technology*, 13(4), 1243-1254.

- FDA 2004, U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry. (2004). *PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*, 5.
- FDA 2012, U.S. Food and Drug Administration (2012). *Quality by Design for ANDAs: An Example for Immediate-Release Dosage Forms*, 35.
- FDA 2017, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry. (2017). *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System*, 10-15.
- Glomme, A., Marz, J. and Dressman, J.B. (2005). Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(1), 1-16.
- Harris, M., Hokanson, G., Murthy, K., Reisch, R., Waldman, F. (1988). Stabilized compositions. *US Patent No: 4,743,450*.
- Hong, S.J., Ahn, T.H., Baek, S.H., Cho, W.H., Jeon, H.K., Kwan, J., Yoon, M.H., Lee, K.J. and Lim, D.S. (2006). Comparison of efficacy and tolerability of amlodipine orotate versus amlodipine besylate in adult patients with mild to moderate hypertension: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, 8-week follow-up, noninferiority trial. *Clinical Therapeutics*, 28(4), 537-551.
- Huffman, M.D., Yusuf, S. (2014). Polypills: essential medicines for cardiovascular disease secondary prevention?. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(14), 1368-1370.
- ICH Q2, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), step 4 version.
- ICH Q8, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. (2009). *Pharmaceutical Development Q8(R2)*, step 4 version, 1-16.
- ICH Q9, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. (2005). *Quality Risk Management Q9*, step 4 version, 11, 14.
- ICH Q10, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. (2008). *Pharmaceutical Quality System Q10*, step 4 version, 4-6.
- Ip, D.P., Brenner, G.S., Stevenson, J.M., Lindenbaum, S., Douglas, A.W., Klein, S.D. and McCauley, J.A. (1986). High resolution spectroscopic evidence and solution calorimetry studies on the polymorphs of enalapril maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, 28, 183-191.

- Ip, D.P. and Brenner, G.S. (1987). Enalapril maleate. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 16, 207-243.
- Jiang, Y., Fang, L., Niu, X., Ma, R. and He, Z. (2008). The effect of ion pairing on the skin permeation of amlodipine. *Pharmazie*, 63, 356-360.
- Joshi, B.V., Patil, V.B. and Pokharkar, V.B. (2002). Compatibility studies between carbamazepine and tablet excipients using thermal and non-thermal methods. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 687-694.
- Kashid, A.M., Ghorpade, D.A., Toranmal, P.P. and Dhawale, S.C. (2015). Development and validation of reversed phase HPLC method for the determination of vildagliptin using an experimental design. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(4), 510-515.
- Kaynak, M.S., Bogacz, A., Stelmasinski, M. ve Şahin, S. (2011). Bioavailability File: Amlodipine. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, 36, 207-222.
- Kello, R. and Abdelwahed, W. (2014) Design and evaluation of a new formulations of enalapril maleate 20 mg tablet in a time efficient and on a large industrial scale. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(6), 378-382.
- Internet: Koo, O. (April, 2010). Manufacturing process considerations for Fixed-Dose Combination drug products. *American Pharmaceutical Review*, Web: URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.americanpharmaceuticalreview.com%2FFeatured-Articles%2F117118-Manufacturing-Process-Considerations-for-Fixed-Dose-Combination-Drug-Products%2F&date=2018-11-03>. Son erişim tarihi: 03.11.2018.
- Kushner, J., Langdon, B.A., Hicks, I., Song, D., Li, F., Kathiria, L., Kane, A., Ranade, G. and Agarwal, K. (2014). A Quality-by-Design study for an immediate-release tablet platform: Examining the relative impact of active pharmaceutical ingredient properties, processing methods, and excipient variability on drug product quality attributes. *Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology*, 103, 527-538.
- Li, J.Z., Rekhi, G.S., Augsburger, L.L. and Shangraw, R.F. (1996) The role of intra and extragranular microcrystalline cellulose in tablet dissolution. *Pharmaceutical Development and Technology*. 1(4), 343-355.
- Li, E. C., Balraj S. H. and James M.W. (2014). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors versus angiotensin receptor blockers for primary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Review*, 8, 1-39.
- Lionberger, R.A., Lee, S.L., Lee, L., Raw, A. and Yu, L.X. (2008). Quality by Design: Concepts for ANDA. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 10(2), 268-276.
- Locatelli, F., Vecchio, L.D., Andrull, S. and Colzani, S. (2002). Role of combination therapy with ACE inhibitors and calcium channel blockers in renal protection. *Kidney International*, 62(82), S53-S60.

- Maltais, M., Vargas, R. and Dipaolo, T. (2015). Development of a new formulation for direct compression of a natural product. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*. 4(2), 1-6.
- Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kiildsen, S.E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R.E., Boudier, H.A., Zanchetti, A., Vahanian, A., Camm, J., De Caterina, R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellems, I., Kristensen, S.D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J.L., Erdine, S., Kiowski, W., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Lindholm, L.H., Viigimaa, M., Adamopoulos, S., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Bertomeu, V., Clement, D., Erdine, S., Farsang, C., Gaita, D., Lip, G., Mallion, J.M., Manolis, A.J., Nilsson, P.M., O'Brien, E., Ponikowski, P., Redon, J., Ruschitzka, F., Tamargo, J., van Zwieten, P., Waeber, B. and Williams, B. (2007). 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European society of hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 34(28), 2159-2219.
- Maurya, D.P., Sultana, Y., Aqil, M. and Ali, A. (2012). Formulation and optimization of rifampicin microparticles by Box-Behnken statistical design. *Pharmaceutical Development and Technology*. 17(6), 687-696.
- Mirza, T. and Tan, H.S.I. (2001). Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion Exchange HPLC using indirect photometric detection: a study in systematic method development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 25, 39-52.
- Mishra, S.M. ve Rohera, B.D. (2017). An integrated, quality by design (QbD) approach for design, development and optimization of orally disintegrating tablet formulation of carbamazepine. *Pharmaceutical Development and Technology*. 22(7), 889-903.
- Monajjemzadeh, F., Hamishehkar, H., Zakeri-Milani, P., Farjami, A. and Valizadeh, H. (2012). Design and optimization of sustained-release divalproex sodium tablets with response surface methodology. *American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutical Science and Technology*. 14(1), 245-253.
- Montgomery, D.C. (2013). *Design and analysis of experiments*. (Sekizinci Baskı). New Jersey: John Wiley and Sons, 15.
- Naidu, K.R., Kale, U.N. and Shingare, M.S. (2005). Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 147-155.
- Naveed, S., Sultana, N. and Arayne, M.S. (2012). HPLC-UV method for the determination of enalapril in bulk, pharmaceutical formulations and serum. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. 3(1), 1-4.
- İnternet: Norvasc, Full Describing Information. Pfizer (2011). Web: URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.accessdata.fda.gov%2Fdr>

[ugsatfda_docs%2Flabel%2F2011%2F019787s052lbl.pdf&date=2018-11-03](#) Son Erişim Tarihi: 04.11.2018.

- Oh, D.M., Curl, R.L. and Amidon, G.L. (1993). Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: a mathematical model. *Pharmaceutical Research*, 10(2), 264-270.
- Olusola, A.M., Olubukola, O.O., Emeka, O.H. and Lilian, A.E. (2012). Equivalence of two generic brands of amlodipine besylate under biowaiver conditions. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 265-268.
- Patchett, A.A. (1984). The chemistry of enalapril. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 18, 201S-207S.
- Patel, P., Ordunez, P., DiPette, D., Escobar, M.C., Hassel, T., Wyss, F., Hennis, A., Asma, S. and Angel, S. (2016). Improved blood pressure control to reduce cardiovascular disease morbidity and mortality: the Standardized Hypertension Treatment and Prevention Project. *The Journal of Clinical Hypertension*, 18(12), 1284-1294.
- Politis, S.N., Colombo, P., Colombo, G. and Rekkas, D.M. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 43(6), 889-901.
- Rawe, R.C., Sheskey, P.J. and Quinn, M.E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Vol. 6th Ed., London, UK, 129, 208, 629.
- Rezende, R.L.O., Santoro, M.I.R.M. and Matos, J.R. (2008). Stability and compatibility study on enalapril maleate using thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93(3), 8881-8886.
- Rossi, D.M., de Souza, E.A., Flores, S.H. and Ayub, M.A.Z. (2011). Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Renewable Energy*, 55, 404-409.
- Sailer, R., Arnold, P., Erenmemişoğlu, A., Martin, W., Tamur, U., Kanzık, İ. And Hincal, A. (2007). Pharmacokinetics and bioequivalence study of a generic amlodipine tablet formulation in healthy male volunteers. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 57(7), 462-466.
- Salandova, J., Franc, A., Hofman, J., Dumicic, A., Kukackova, L., Gervena, T., Beranek, J., Srbek, J., Repicky, A., Vladovicova, B. and Vetchy, D. (2018). The effect of the composition of a fixed dose combination on bioequivalence results. *International Journal of Pharmaceutics*, 546, 235-246.
- Saxena, D., Damale, S., Joshi, A., Datar, A. (2014). Forced degradation studies of amlodipine besylate and characterization of its major degradation products by LC-MS/MS. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(3), 196-207.

- Sastry, S.V. and Khan, M.A. (1998). Aqueous based polymeric dispersion: Plackett–Burman design for screening of formulation variables of Atenolol gastrointestinal therapeutic system. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 105-112.
- Shabbiri, K., Adnan, A., Jamil, S., Ahmad, W., Noor, B. and Rafique. (2012). Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using statistical approach. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1051-1061.
- Shabbiri, K., Adnan, A., Noor, B. and Jamil, S. (2012b). Optimized production, purification and characterization of alpha amylase by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using bio-statistical approach. *Annals of Microbiology*. 62, 523-532.
- Shah, S.J. and Randall S.S. 2017. "Current trends of hypertension treatment in the United States." *American journal of hypertension*. 30(10), 1008-1014.
- Sherman, B.C. (1996). Stable solid pharmaceutical compositions containing enalapril maleate. *US Patent No: 5,562,921*.
- Shohin, I.E., Ramenskaya, G.V., Vasilenko, G.F. and Malashenko, E.A. (2010). In vitro dissolution kinetics of amlodipine tablets marketed in Russia under biowaiver conditions. *Dissolution Technologies*, 17(3), 20-22.
- Sibanda, W. and Pretorius, P. (2013). Comparative study of the application of central composite face-centred (CCF) and Box–Behnken designs (BBD) to study the effect of demographic characteristics on HIV risk in South Africa. *Network Modelling and Analysis in Health Informatics and Bioinformatics Journal*, 2, 137-146.
- Sica, D.A. (2003). Calcium channel blocker-related peripheral edema: can it be resolved? *The Journal of Clinical Hypertension*, 5(4), 291-297.
- Silva, A.C.M., Galico, D.A., Guerra, R.B., Perpetuo, G.L., Legendre, A.O., Rinaldo, D., Bannach, G. (2015). Thermal stability and thermal decomposition of the antihypertensive drug amlodipine besylate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120, 889-892.
- İnternet: Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; and Morrill, T.C. (1981) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed. New York: John Wiley and Sons. <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww2.ups.edu%2Ffaculty%2Fhanson%2FSpectroscopy%2FIR%2FIRfrequencies.html&date=2018-11-12> Son Erişim Tarihi: 09.12.2017.
- Sweetman, S.C. (Editör). (2009). *Martindale, The Complete Drug Reference*, Vol. 38th Ed., London, UK, 1214.
- TİTCK, 1994. *Farmasötik Müstehzarların Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerliliğinin Değerlendirilmesi Hakkında Yönetmelik* (1994), 1-8.
- TİTCK, 2016. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, *Sağlık Teknolojileri Değerlendirme Raporu III (2016). Kronik hastalıklarda kullanılan sabit doz kombine ilaçlara ilişkin maliyet değerlendirmesi ve bütçe etkisi analizi*, 39.

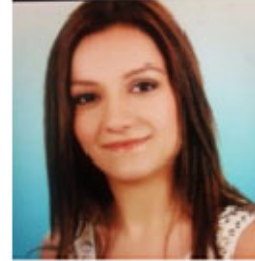
- Todd, P.A and Goa K.L. (1992). Enalapril: A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in hypertension. *Drugs*, 43(3), 346-381.
- USP 42a. The United States Pharmacopeia USP 42-NF 37. (2018). *Amlodipine besylate monograph*.
- USP 42b. The United States Pharmacopeia USP 42-NF 37. (2018). *Enalapril maleate monograph*.
- Üstünes, L. (Editör). (2018). *RxMediaPharma 18.0.0, İnteraktif ilaç bilgi kaynağı*.
- Vanaja, K. and Rani, R.H.S. (2007). Design of Experiments: Concept and applications of Plackett-Burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*. 24(1), 1-23.
- Vander Heyden, Y., Hartmann, C., Massart, D.L., Michel, L., Kiechle, P. and Erni, F. (1995). Ruggedness tests for a high-performance liquid chromatographic assay: coparison of an evaluation at two and three levels by using two-level Plackett-Burman designs. *Analytica Chimica Acta*, 316: 15-26.
- Verbeeck, R.K., Kanfer, I., Löbenberg, R., Abrahamsson, B., Cristofolletti, R., Grool, D.W., Langguth, P., Polli, J.E., Parr, A., Shah, V.P., Mehta, M. and Dressman, J.B. (2017). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(3), 522-531.
- Wankhede, S.B., Wadkar, S.B., Raka, K.C. and Chitlange, S.S. (2009). Simultaneous estimation of amlodipine besilate and olmesartan medoxomil in pharmaceutical dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(5), 563-567.
- Webb, A.J.S., Fischer, U., Mehta, Z. and Rothwell, P.M. (2010). Effects of antihypertensive-drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis, *The Lancet*, 375, 906-915.
- WHO 2006, World Health Organization (WHO), Annex 8 (2006). Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for *WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms*. WHO Technical Report Series No: 937, 403, 406.
- Yerlikaya, F., Özgen, A., Vural, I., Guven, O., Karaagaoglu, E., Khan, M. and Capan, Y. (2013). Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using Quality by Design approach. *Journal of Pharmaceutical Science*, 102, 3748-3761.
- Yu, X.L., Amidon, G., Khan, M.A., Hoag, S.W., Polli, J., Raju, G.K. and Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical Quality by Design. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 16(4), 771-783.
- Zalai, D., Dietzsch, C. and Herwig, C. (2013). Risk-based process development of biosimilars as part of the Quality by Design paradigm. *Parenteral Drug Association, Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 67, 569-580.

Zhu, Z., Zhang, F., Wei, Z., Ran, W. and Shen, Q. (2013). The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 127, 96-102.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SARISALTIK YAŞIN, Diren
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1985 / DİYARBAKIR
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 531 922 25 11
 e-mail : dirensarisaltik@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	2006-2010
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2002-2006
Lise	Diyarbakır Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2013-Devam ediyor	Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2006-2013	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş.	Ruhsatlandırma Uzmanı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.Ş. (2018). Açlık ve Tokluk Durumlarını Taklit Eden Biyoyoumlu Çözünme Ortamlarının Değerlendirilmesi. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, 48(3), 217-232.

2. Sarısaltık-Yaşın, D., Yılmaz, Ş., Teksin, Z.Ş. (2018). Evaluation of biorelevant media to investigate the dissolution properties on flurbiprofen and to assess cytotoxicity effects on Caco-2 cell line. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 48(3) (baskıda)
3. Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.Ş. (2018). Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi: Uluslararası Kılavuzlar ve Ülkeler Bazında Değerlendirmeler. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(2), 160-174.
4. Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.Ş. (2011). Biyoeşdeğerlik Çalışmalarından Vazgeçilmesinde Biyofarmasötik İlaç Sınıflandırma Sistemlerinin Değerlendirilmesi: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 1(1), 16-30.
5. Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.Ş. (2007). Bioavailability File: Levofloxacin. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32, 197-208.

Projeler

1. Dicle Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, İbuprofen İçeren Enterik Kaplı Tablet Formülasyonları Hazırlanması ve Tabletlerin Hedef Spesifikasyonlarının Belirlenmesi, **Proje kodu: 15.002**, 2015-Devam ediyor. (Araştırmacı).
2. Gazi Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Safra tuzları içeren in vitro çözünme ortamlarında yapılan çözünme hızı çalışmalarının değerlendirilmesi, **Proje kodu: 02/2008-20**. (Araştırmacı)

Bildiriler

1. Sarısaltık-Yaşın, D., Arslantürk-Bingöl, A., Karaküçük, A., Teksin, Z.S. (2018) Development and Validation of an HPLC Method for Amlodipine Besylate and Enalapril Maleate Using an Experimental Design and its Application to Soluibility and Dissolution Tests, **12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences**, June 26-29. Ankara, Turkey. (Oral presentation).
2. Sarısaltık-Yaşın, D., Teksin, Z.S., Yılmaz, S. (2017). Evaluation of Cytotoxic Effect of Biorelevant Media on Caco-2 Cell Line. **2nd International Gazi Pharma Symposium Series**, October 11-13. Ankara, Turkey. (Poster presentation).

3. Sarısaltık-Yaşın, D., Bektaş, D., Uslu, A., Ökçelik, C., Temel, H., Teksin, Z.S. (2015). Evaluation of in vitro Dissolution Characteristics of Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs in the Turkish Drug Market – 2: Ibuprofen, A BCS Class IIA Drug. **1st International Gazi Pharma Symposium Series**, November 12-14. Antalya, Turkey. (Poster presentation).

Katılınan seminerler

1. 14th International Pharmaceutical Technology Symposium. “Overcoming biological barriers in innovative delivery systems”, Antalya, Turkey. Hacettepe Üniversitesi, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology. (06.09.2008-11.08.2008).
2. International Symposium on Drug Research & Development, Ankara, Turkey. Hacettepe Üniversitesi, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology. (04.05.2009-07.05.2009).
3. Recent Development on Regulatory and Bioequivalency of Fixed Dose Combinations. Ankara, Turkey. IDE Seminars. (21.05.2009).
4. Nanopharmaceutics: Development and Applications. Gazi Üniversitesi, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology (20.11.2009).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

