

T.C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

ÜLKEMİZDE SATILMAKTA OLAN BAZI İÇECEKLERDE
PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFI İLE
TAYİNİ VE METOT VALİDASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF KESKİN

ARALIK 2021

T.C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

ÜLKEMİZDE SATILMAKTA OLAN BAZI İÇECEKLERDE
PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFI İLE
TAYİNİ VE METOT VALİDASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF KESKİN

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi DİLA KAYA

ARALIK 2021

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.

ELİF KESKİN

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığını taahhüt ederim.

Dr. Öğr. Üyesi DİLA KAYA

İMZA SAYFASI

Elif KESKİN tarafından hazırlanan “Ülkemizde Satılmakta Olan Bazı İçeceklerde Pde-5 İnhibitörlerinin Sıvı Kromatografi İle Tayini ve Metot Validasyonu” başlıklı bu yüksek lisans tezi, Adli Bilimler Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Dila KAYA

.....

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Nuriye AKBAY

.....

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Nevim SAN

.....

Kurumu: Yıldız Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 28/ 12 / 2021

ÖNSÖZ

Bilgisine, tecrübesine, nitelikli kişiliğine, samimiyetine ve özverili olmasına hayranlık duyduğum saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Dila KAYA'ya

Bilgileri ve tecrübeleri ile tez savunmamda bulunun kıymetli jüri üyelerim Prof. Dr. Nevin SAN ve Prof. Dr. Nuriye AKBAY'a

Eğitim öğretim hayatım boyunca bilgisini ve tecrübelerini örnek aldığım tüm hocalarıma

Mekândan ve koşullardan bağımsız olarak gönülden sunduğu manevi desteğini her daim yaşadığım ve hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Zerrin BÜYÜKS AVRAN'a

Çalışmalarım esnasında samimi duygularla yanımda olan ve her daim içtenlik ve samimiyetle arkadaşlıklarını hissedeceğim Çağan AĞTAŞ, Nurten RIDVANOĞLU, Fatma Gözde AYDIN, Doç. Dr. Esen BELLUR ATICI'ye ve DEVA API ARGE ailesinin tüm üyelerine,

Deneyisel çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde, gerekli ekipmanlar ve kimyasalların tedarikinde ve laboratuvarlarını kullanma imkânı sunan Deva Holding A.Ş'ye

Hayatıma ani girişiyle tüm yaşam tarzımın değişmesine neden olan, aidiyet duygusunu en üst seviyede yaşatan, varlığı varlık sebebim olan yeğenim Emine Ece GEZER ve tüm çocuklara

Gidişiyle hayatımda oluşan büyük boşluğu asla dolduramayacağım, bir yanımın hep karanlık kaldığını bildiğim, her nefeste yokluğunu daha da hissettiğim, yaşamı boyunca dik duruşunu inancını ve koşulsuz sevgisini örnek aldığım, yaptığım ve yapacağım tüm iyiliklerimi ve başarılarımı uğruna adadığım ve özleminin her an çığ gibi büyüdüğünü hissettiğim, her daim yanımda olduğunu ve olacağını bildiğim rahmetli babaannem Emine KESKİN'e

Ve aileme

Şükran ve minnetimi sunarım...

ÖZET

ÜLKEMİZDE SATILMAKTA OLAN BAZI İÇECEKLERDE PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFI İLE TAYİNİ VE METOT VALİDASYONU

Elif Keskin

Yüksek Lisans Tezi, Adli Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi, Dila KAYA

Aralık, 2021. 126 Sayfa.

Teknoloji alanında hızla gelişen dünyada nüfus olarak da hızlı bir artış görülmektedir. Her ne kadar teknolojinin hızlı gelişimi iyi bir gelişme olsa da toplumların teknoloji ulaşılabilirliği ve ekonomik koşulları arasındaki fark ciddi anlamda açılmaktadır. Toplumun bir kesimi teknolojik ve ekonomik olarak hızla büyürken bir kısmı da aynı hızla yoksullaşmaktadır. Bu durum insanların sağlık harcamalarını kısıtlamalarına ve muadil ürünler kullanımının artmasına sebep olmaktadır. Bu da hali hazırda büyük bir pazar olan ilaç ve takviye ürünlerde sahteciliğin artması ve yasa dışı üretimler yapılması ile sonuçlanmaktadır. Sahte ilaç ve takviye ürünlerin içeriği kontrol edilmediğinden içerisinde bulunabilecek ilaç etken maddelerin miktarları ve türevleri bilinmemekte olup, bu durum halk sağlığı için ciddi tehdit oluşturan bir suç unsurudur.

Sahte ilaç ve takviye ürünleri arasında büyük yer tutan gruplardan biri erkeklerde erektil disfonksiyon (ED) hastalığının tedavisinde kullanılan fosfodiesteraz tip 5 (PDE-5) inhibitörleri (sildenafil, vardenafil, tadalafil vs.) ve türevleridir. Bu ürün grubunun sahte ilaç ve takviye gıdalarda sıklıkla tercih edilmesinin nedenlerinden biri toplumda tabu olarak kabul gören ED hastalığının teşhis ve tedavilerinde kişilerin utanmaları ve doktor ziyaretinden kaçınmalarıdır. Ancak piyasaya sürülmekte olan bu ürünlerde kişilerin sağlığını tehlikeye atabilecek ya da hastalığın tedavisini etkileyecek pek çok sahtecilik söz konusudur. Bunlardan bazıları; ürünlerin etken madde içermemesi, yanlış miktarda etken maddeye sahip olmaları, etiketinde yazandan farklı bir etken madde içeriğine sahip olmaları ve/veya yüksek miktarda safsızlık içermeleridir. Bu ürünlerin analizinde iki önemli unsur karşımıza

çıkılmaktadır. Halk sağlığının korunması için toksik kimyasal içeriğinin belirlenmesi gerekirken, diğer yandan ürünlerin profillerinin çıkartılması, yasa dışı kimyasalların kaynağı ve ilgili diğer adli bilgiler hakkında çıkarımlarda bulunulması gerekmektedir. Bu rnlerin içeriğindeki ilaç etken maddelerin tespiti için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografi-ktle spektrometrisi (LC-MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografi-ktle spektrometrisi (UPLC- MS) nükleer manyetik rezonans (NMR), Fourier dönüştürülmüş kızılıtesi spektroskopisi (FTIR) ve Raman mikro spektroskopisi gibi analitik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden UPLC-MS'i LC-MS'ten üstün kılan yanı ise, daha yüksek basınçlara çıkararak pikleri daha kısa sürede ve daha net ayırıyor ve daha az çözücü kullanıyor olması gibi özellikleridir.

Bu tez çalışması kapsamında içeriğinde ED hastalığında kullanılan ilaçların etken maddesi olan sildenafil, vardenafil ve tadalafil etkenlerinin yaşa dışı olarak üretilen ve satılmakta olan enerji ieceklerindeki varlığını tespit etmek amacıyla yeni bir UPLC-MS metodu geliştirilerek, metot validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen metot ile seçicilik, doğrusallık, algılama limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), aralık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik, ara keskinlik) ve sağlamlık (metot parametreleri değişiklikleri) validasyon parametreleri incelenmiştir. Yapılan bu metot ile altı adet enerji ieeğinin içeriğinde bu etkenlerin varlığı başarılı bir şekilde tespit edilmiş ve raporlanmıştır. Altı enerji ieeğinde de sildenafil'in farklı miktarlarda varlığı tespit edilirken vardenafil ve tadalafil varlığına rastlanılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: PDE-5 İnhibitörleri, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Erektile Disfonksiyon.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PDE-5 INHIBITORS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY IN SOME BEVERAGES SOLD IN OUR COUNTRY AND METHOD VALIDATION

Elif Keskin

Master Thesis, Department of Forensic Sciences

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Dila KAYA

December, 2021. 126 Pages.

Technology is rapidly developing worldwide while the population is growing fast. Although the development of technology is considered as an improvement, the gap between technology accessibility and economic status in the society is seriously widening. While a part of the society is growing fast technologically and economically, the other part is getting poorer at the same time. This poverty limits access to basic needs and leads to increase in the use of substitute products. This results in the increase of counterfeiting and illegal production of pharmaceuticals and supplements which already have a large market. The content of counterfeit drugs and supplements is not controlled and the amounts or derivatives of active pharmaceutical ingredients are not known which is a situation that seriously threatens public health.

Phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors (sildenafil, vardenafil, tadalafil, etc.) and their derivatives, which are used in the treatment of erectile dysfunction (ED) disease in men, occupy a large share in counterfeit drugs and supplements market. One of the reasons why this product group is often preferred in counterfeit medicines and supplements is that people are embarrassed of being diagnosed or treated for ED disease, which is considered taboo in the society and patients avoid visiting a physician. However, there are many counterfeit products on the market, which threaten people's health or affect the successful treatment of the disease. Some of those can be summarized as; falsified medical products may contain no active ingredient, the wrong active ingredient, the wrong amount of the correct active ingredient or high amount of unknown impurities. There are two important factors in

the analysis of these products. While it is necessary to determine the toxic chemical content in order to protect public health, on the other hand, it is required that profiling the products and making inferences about the source of illegal chemicals and other relevant forensic information. Analytical methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), ultra high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), nuclear magnetic resonance (NMR), Fourier transformed infrared and Raman micro spectroscopy are used to determine the active pharmaceutical ingredients in these products. Among these methods, the UPLC-MS system is superior to LC-MS system because the UPLC system operates at high pressure which allows for shorter run times with high resolution and sensitivity while minimizing the consumption of mobile-phase.

Within the scope of this thesis, a new UPLC-MS method was developed and method validation was carried out in order to detect the presence of sildenafil, vardenafil and tadalafil which are the active substances of the drugs used in the treatment of ED disease in energy drinks produced and sold illegally. The presence of these substances in six energy drinks was successfully detected and reported by using this method. The validation parameters of selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), range, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision) and robustness (method parameters changes) were examined. With this method, the presence of these factors in the content of six energy drinks was successfully detected and reported. While the presence of sildenafil in different amounts was detected in six energy drinks, the presence of vardenafil and tadalafil was not found.

Keywords: PDE-5 Inhibitors, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Erectile Dysfunction

İTHAF

Babaannem Emine KESKİN ve yeğenim Emine Ece GEZER'e

İÇİNDEKİLER

BİLDİRİM	ii
İMZA SAYFASI.....	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İTHAF	ix
BÖLÜM I	1
1. GİRİŞ	1
2. FOSFODİESTERAZ TİP 5 (PDE-5) İNHİBİTÖRLERİ.....	6
1.1 Sildenafil.....	9
1.2 Tadalafil	11
1.3 Vardenafil	12
3. PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİ İÇEREN YASA DIŞI ÜRÜNLER.....	13
4. PDE-5 İNHİBİTÖRÜ İÇEREN YASA DIŞI İLAÇLARIN KAYNAĞI	18
5. DİYET TAKVİYELERİNDE YASA DIŞI DURUMLARI ÖNLEMEK AMACIYLA UYGULANAN YASAL DÜZENLEMELER	20
6. LİTERATÜR ÖRNEKLERİ	22
7. PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİ İÇEREN YASA DIŞI ÜRÜNLERİNİN ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	34
7.1 PDE-5 İnhibitörü İçeren Ürünlerin Analiz Yöntemleri	35
7.2 TLC (inca tabaka kromatografisi) kullanarak ön tanımlama.....	35
7.3 UV spektrumlarındaki karakteristik farklılıklar	35
7.4 Tespit ve miktar tayini için HPLC yöntemleri.....	35
7.5 LC-MS tabanlı tanımlama	36
7.6 Kimyasal türevlendirme.....	36
7.7 MS analizlerinde önerilen genel strateji	37
7.8 Raman spektroskopisi	40
7.9 XRD (X-ray Difraksiyonu).....	40
7.10 NMR spektroskopisi (Nükleer Manyetik Rezonans).....	40
7.11 NIR spektroskopisi (Yakın Kızılötesi)	41
8. ANALİZ MEDOTLARININ PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ VE VALİDE EDİLMESİ	42
8.1 Validasyon	42

8.2	Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	43
8.3	Doğruluk	43
8.4	Kesinlik.....	43
8.4.1	Gün içi tekrarlanabilirlik.....	44
8.4.2	Ara kesinlik.....	44
8.5	Seçicilik	44
8.6	Algılama limiti (LOD)	44
8.7	Tayin Limiti (LOQ)	45
8.8	Doğrusallık.....	45
8.9	Çalışma Aralığı.....	45
8.10	Sağlamlık	45
8.11	İstatistiksel Terimlerin Tanımları	46
8.11.1	Standart sapma.....	46
8.11.2	Bağıl standart sapma	46
8.11.3	Ortalamanın güven aralığı (μ)	46
BÖLÜM II		48
9. DENEYSEL BÖLÜM		48
9.1	Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler	48
9.1.1	Kimyasal maddeler	48
9.1.2	Araç ve gereçler	49
9.2	Standartların İyonlaşma Kütleleri.....	49
9.3	Miktar Tayini Metot Validasyonunda İncelenen Parametreler.....	54
9.4	Validasyon Çalışmasındaki Kromatografik Koşullar, Kullanılan Ekipmanlar ve Ekipman Parametreleri.....	54
9.5	Validasyon Çalışmasında Kullanılacak Standart ve Numune Çözeltilerin Hazırlanmaları ve Hesaplamalar.....	55
9.5.1	Standart Çözeltisi Kabul Kriterleri	55
9.5.2	Stok çözeltilerinin hazırlanması.....	56
9.5.2.1	Sildenafil stok çözeltisinin hazırlanması	56
9.5.2.2	Vardenafil hidroklorür stok çözeltisinin hazırlanması	56
9.5.2.3	Tadalafil için stok çözeltisinin hazırlanması	56
9.5.2.4	Stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisinin hazırlanması.....	56
9.5.2.5	Stok LOQ standart çözeltisinin hazırlanması	56

9.5.2.6	LOD çözümlerinin hazırlanması	57
9.5.3	Numunelerin hazırlanması	58
9.6	Seçicilik	59
9.6.1	Seçicilik sonuçları	59
9.7	Doğrusallık	63
9.7.1	Doğrusallık sonuçları	64
9.8	Çalışma Aralığı	68
9.8.1	Çalışma aralığı sonuçları	68
9.9	Algılama ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ)	69
9.9.1	Algılama ve tayin limiti sonuçları	69
9.10	Doğruluk	72
9.10.1	Doğruluk sonuçları	74
9.11	Kesinlik	75
9.11.1	Sistem kesinliği	75
9.11.2	Sistem kesinliği sonuçları	76
9.11.3	Metot kesinliği	76
9.11.4	Metot kesinliği sonuçları	77
9.11.5	Ara kesinlik	85
9.11.6	Ara kesinlik sonuçları	85
9.12	Sağlamlık	87
9.12.1	Sağlamlık sonuçları	87
10.	SONUÇ VE TARTIŞMA	89
11.	KAYNAKÇA	94
12.	EKLER	102
	ÖZGEÇMİŞ	108

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. PDE-5 inhibitörlerinin farmakokinetiği.....	8
Tablo 2. PDE-5 inhibitörlerinin farmakodinamiği.....	8
Tablo 3. 2007'den 2016'ya ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin Kusurlu Takviyeler Veritabanında Raporlanan Ürünlerin Özeti	15
Tablo 4. Bitkisel gıda takviyelerinde sildenafil, tadalafil ve vardenafil'in GC-MS ile tanımlanması.	23
Tablo 5. Sildenafil (A), sildenafil sitrat (B), MeSO ₃ H varlığında sildenafil (C), MeSO ₃ H varlığında sildenafil sitrat (D) NMR kimyasal kaymalarının değerleridir.	29
Tablo 6. LC-QTOF-MS yönteminin çalışma parametreleri.....	31
Tablo 7. Her bileşik için niceleyici/niteleyici iyonlar ve LC QTOF-MS/MS sisteminin analitik performansı.....	32
Tablo 8. Sildenafil ve analoglarının yapıları, tam kütleleri, MS parçalanma verileri ve λ_{max}	37
Tablo 9. Sildenafil iyonlaşma kütleleri	50
Tablo 10. Vardenafil iyonlaşma kütleleri	51
Tablo 11. Tadalafil iyonlaşma kütleleri	52
Tablo 12. Seçicilik parametresine ait sonuçlar	59
Tablo 13. Sildenafil doğrusalılık çalışma sonuçları	65
Tablo 14. Vardenafil doğrusalılık çalışma sonuçları	66
Tablo 15. Tadalafil doğrusalılık çalışma sonuçları	67
Tablo 16. Çalışma aralığı sonuçları	68
Tablo 17. Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil'in S/N oran sonuçları	70
Tablo 18. LOD ve LOQ sonuçları % ve çözelti konsantrasyonları	70
Tablo 19. LOQ alan sonuçları.....	70
Tablo 20. Sildenafil doğruluk çalışması sonuçları.....	74
Tablo 21. Vardenafil hidroklorür doğruluk çalışması sonuçları	75
Tablo 22. Tadalafil doğruluk çalışması sonuçları	75
Tablo 23. Sistem kesinlik sonuçları	76
Tablo 24. Sildenafil metot kesinlik sonuçları	77
Tablo 25. Numunelerdeki sildenafil miktar sonuçları.....	78
Tablo 26. Sildenafil ara kesinlik sonuçları.....	86
Tablo 27. Sağlamlık sonuçları	88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. PDE-5 inhibitörleri.....	2
Şekil 2. 2007'den 2016'ya ABD gıda ve ilaç idaresinin kusurlu takviyeler veritabanından 353 cinsel iyileştirme ürünlerinde tanımlanmış beyan edilmemiş içerikler	16
Şekil 3. 2007'den 2016'ya ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin Kusurlu Takviyeler Veritabanından 317 Kilo Verme Ürünlerinde Tanımlanan Beyan Edilmemiş İçerikler	17
Şekil 4. Karbodenafil, Asetildenafil, Hidroksiasetildenafil ve N-Desetil Vardenafil'in pozitif sonucu için önerilen parçalanma yapıları	25
Şekil 5. Sildenafil mesilat (A) ve 2-merkaptobenzotiyazol (B) yapıları. Sildenafilin atom numaralandırması.....	27
Şekil 6. Sildenafil aktif maddesinin titreşim spektroskopik analizi. Kızılötesi (A) ve Raman (B) spektrumlarının parmak izi bölgeleri gösterilmektedir.	28
Şekil 7. Sildenafil ve tadalafil yapısının ESI ⁺ analizi ile önerilen parçalanmaları	32
Şekil 8. Çeşitli PDE-5 analoglarından ortak parçaların oluşumu	39
Şekil 9. Vardenafil, sildenafil ve tadalafil'in pozitif (+) iyonlaşma kütleleri	53
Şekil 10. Stok standart çözeltisinde sildenafil, vardenafil ve tadalafil piklerinin kromatografik ayırma kromatogramı.....	60
Şekil 11. Stok standart çözeltisinde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı.....	61
Şekil 12. Çözücü sisteminde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı.....	62
Şekil 13. Plasebo çözeltisinde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı.....	63
Şekil 14. Kalibrasyon eğrisi (Sildenafil).....	65
Şekil 15. Kalibrasyon eğrisi (Vardenafil)	66
Şekil 16. Kalibrasyon eğrisi (Tadalafil).....	67
Şekil 17. Tadalafil, vardenafil ve sildenafil'in LOD çalışmasının kromatografik sonucu	71
Şekil 18. Tadalafil, sildenafil ve vardenafil'in LOQ çalışmasının kromatografik sonucu	72
Şekil 19. Numune A kromatogramı	79
Şekil 20. Numune B kromatogramı	80
Şekil 21. Numune C kromatogramı	81
Şekil 22. Numune D kromatogramı	82
Şekil 23. Numune E kromatogramı.....	83
Şekil 24. Numune F kromatogramı.....	84

DENKLEMLER

Denklem 1. LOD hesaplama denklemi	44
Denklem 2. Standart sapma denklemi.....	46
Denklem 3. Bağıl standart sapma denklemi.....	46
Denklem 4. Güven limiti denklemi.....	47
Denklem 5. LOQ konsantrasyonunda numune hazırlama denklemi	57
Denklem 6. LOD ve LOQ hesaplama denklemi	69
Denklem 7. Deneysel miktar hesaplama formülü	73
Denklem 8. Geri kazanım hesaplama denklemi.....	74
Denklem 9. Numune miktarı hesaplama.....	77
Denklem 10. İki analiz arasındaki % fark.....	85
Denklem 11. Numunedeki sildenafil miktarı hesaplama	86

EKLER

EK- 1. Sildenafil analiz sertifikası-1	102
EK- 2. Sildenafil analiz sertifikası-2	103
EK- 3. Tadalafil analiz sertifikası-1	104
EK- 4. Tadalafil analiz sertifikası-2	105
EK- 5. Vardenafil hidroklorür analiz sertifikası-1	106
EK- 6. Vardenafil hidroklorür analiz sertifikası-2	107

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Cinsel sağlık, hayati bazı hastalıkların yanında zaman zaman çok önemsenmese de insanların genel sağlığının oldukça önemli bir boyutudur. Çünkü cinsel sağlık, kişilerin fizyolojik olduğu kadar psikolojik olarak da etkilenmelerine sebep olmaktadır. En sık rastlanan cinsel bozukluklardan biri olan erektil disfonksiyon (ED), bir erkeğin tatmin edici cinsel performans gösterebilmesi için yeterli bir ereksiyona ulaşma ve bunu sürdürmedeki yetersizlik olarak tanımlanır (Wespes, 2002; Sung, 2012; Gresser, 2002; Smith, 2013; Greco, 2006). 5000 yıldan daha eski olduğu bilinen eski Mısır metinlerindeki bu bozukluktan, erkeklerdeki zayıf penis ereksiyonu olarak bahsedilmektedir (Shamloul, 2013).

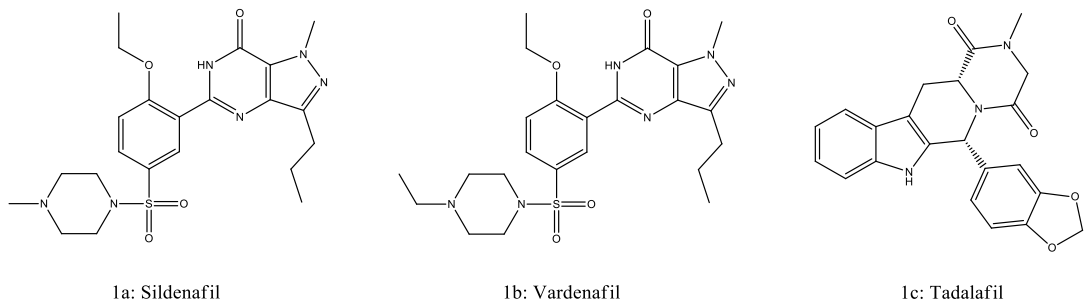
ED, genellikle 40 yaşın üzerindeki erkekleri etkileyen yaygın bir tıbbi bozukluktur (Shamloul, 2013). ED risk faktörleri ile ilgili Uluslararası Cinsel Tıp Danışma Komitesi tarafından bildirilen veriler üzerine yayınlanmış kapsamlı bir çalışmada, ED'nin görülme sıklığı, 40 yaşından küçük erkeklerde %1-10 olduğunu ifade edilmiştir. ED'nin görülme sıklığı, 40-49 yaşları arasındaki erkeklerde %2-9, 60-69 yaş arası erkeklerde %20-40, 70 yaşından büyük erkeklerde ise %50-100 arasında değişmektedir. Dünya çapında ED hastalığının 2025 yılına kadar 322 milyon vakaya ulaşacağı tahmin edilmektedir. ED, giderek daha sağlıklı yaşlanan dünya nüfusu için önemli sağlık sorunlarından olarak kabul edilmektedir (Shamloul, 2013). ED, hastaların ve eşlerinin yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmasının yanı sıra, kardiyovasküler hastalığın potansiyel bir uyarı işareti olarak da değerlendirilmelidir. ED'nin koroner arter ve periferik vasküler hastalığın erken bir belirtisi olabileceğine dair artan kanıtlar vardır (Wespes, 2002).

ED'nin sebebi genellikle kardiyovasküler, nörolojik, psikolojik, endokrin bozuklukları, obezite, yüksek tansiyon ve sigara ile ilişkilendirilmektedir (Wespes, 2002; Sung, 2012; Smith, 2013). ED hastalığının en önemli sebebinin

kardiyovasküler risk faktörü olduğu bilinmektedir (Gresser, 2002). Braun ve arkadaşlarının çalışmasına göre, ED hastalarının %20'si şeker hastalığı, %30'u arteriyel hipertansiyon, %30'u sigara içen ve %38'i düzenli olarak alkol tüketmektedir (Braun, 2000). Benzer şekilde Roumeguère ve arkadaşları ED hastalarının %20'sinde diabetes mellitus, %26'sında hipertansiyon ve %76'sında hiperlipidemi bulmuştur (Roumeguère, 2001).

Oral PDE-5 inhibitörleri, ED hastaları için önemli bir tedavi yöntemidir ve ED için invazif (cerrahi işlem gerektiren uygulamalar) olmayan, etkili bir tedavi sağlamaktadır. Bununla birlikte, ED'ye neden olan etkinin düzeltilmesinden sonra bile hastaların %30-40'ı yeterli iyileşme görmediklerini veya tedaviden memnun kalmadıklarını belirtmektedirler (Sung, 2012). Bu durum da insanları tedavi amaçlı çeşitli ürün ve takviye ilaçlara yönlendiren unsurlardan biridir.

ED'nin tedavisi için ilk defa 1998 yılında oral ilaç olarak sildenafil sitratın etkili olması bu hastalığın tedavisinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (Shamloul, 2013). Sildenafil (Şekil 1a) ve daha sonra geliştirilen vardenafil (Şekil 1b) ve tadalafil (Şekil 1c) etkenleri PDE-5 inhibitörleridir. Sildenafil ve vardenafil, yapıları açısından sadece minimal düzeyde farklılık gösterirken, tadalafil moleküler yapısı açısından sildenafil ve vardenafilden belirgin şekilde farklılık gösterir ve bu da farmakokinetik farklılıklara sebep olmaktadır (Gresser, 2002).



Şekil 1. PDE-5 inhibitörleri

Dijital satış ağı, sahte ilaç gibi ürünler de dâhil olmak üzere kanunlara aykırı ürünler sağlayarak yasa dışı ticarete kritik bir rol oynamaktadır (Romolo, 2019). Ne yazık ki, bu kazançlı pazar, özellikle sentetik ED ilaçlarında yaygın bir sahteciliğe yol açmaktadır. Daha da kötüsü, bu ürünler genellikle onaylı ilaçların analoglarını, yani

sildenafil, vardenafil ve tadalafil içerir ve bunlar adli ilaç test laboratuvarları tarafından uygulanan rutin tarama prosedürüne dâhil olmadıkları için sıklıkla tespit edilmeden geçer. Çoğu durumda, sahte ilaçlar orijinal ürünlerle aynı görünür, ancak içerikleri belirsizdir (Park, 2012). PDE-5 inhibitörlerinin onaylanmış ilaçların ana yapısındaki analogu, genellikle küçük değişikliklerle sentezlenir; böylece fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirirler. Ayrıca, bu analoglardan bazıları, birbirlerinin yapısal izomerleri olup, tanımlanmasını zor bir hale getirmektedir (Mohd, 2020).

Bitkisel içerikli tüketilebilir ürünler, modern ilaçlara kıyasla genellikle sağlıklı ve güvenli olarak algılanmaktadır. “Tamamen doğal, sertifikalı organik ve kimyasal içermeyen” gibi sloganlar genellikle tüketicileri çekmek için bu ürünlerle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, internet pazarlama stratejileri ile birlikte, belirgin bir şekilde sosyal medya aracılığıyla yanıltıcı bilgilerin yayılması kaçınılmazdır (Mohd, 2020). Sahte ilaçlar için yasa dışı pazarlar, yüksek kar marjları, düşük tespit ve adli kovuşturma riskleri, zayıf cezalar ve tüketicilerin sahte ürünlerin gerçek olduğuna inandırılma kolaylığı nedeniyle dolandırıcılar için caziptir (Romolo, 2021). En çok reklamı yapılan ürün erkeklerin cinsel performansını artırmaya yönelik olduğu iddia edilen gıda takviyeleridir. Bu ürünlerin etiketlerinde genellikle Panax ginseng, Eurycoma longifolia ve Lepidium meyenii gibi bitkisel afrodizyak içerdiği belirtilmektedir (Mohd, 2020). PDE-5 inhibitörleri Avrupa'da en çok taklit edilen ilaçlardır ve ayrıca gıda takviyelerinde de bulunurlar (Romolo, 2019). Geçtiğimiz yıllarda sildenafil ve diğer PDE-5 inhibitörleri internette, cinsel ihtiyaca yönelik ürün satan dükkânlarda, sosyal medyada ve el altından satılan “doğal” veya “bitkisel” afrodizyak takviyelerinin çoğunda tespit edilmiştir. Hollanda'da yapılan bir araştırma, cinsel gücü artırmak için kullanılan bitkisel takviyelerin dörtte üçünden fazlasının terapötik dozlarda sildenafil veya analoglarını içerdiğini bildirilmiştir (Graziano, 2017).

Broséus ve arkadaşları ticari bir site olan darknet (yalnızca özel bir web tarayıcısı ile erişilebilen gizli internet siteleri topluluğu) pazarını incelemiş ve satış tekliflerinin çoğunun (%63) uyuşturucularla ilgili olduğunu ancak bu kategoride reçeteli ilaçların da bulunduğunu tespit etmişlerdir (Romolo, 2019). Sahte ve onaylanmamış ürünler; (1) doğru aktif farmasötik bileşeni (active pharmaceutical ingredient, API) ve/veya ekspiyanları içerebilir, (2) yanlış API ve yardımcı maddelere sahip olabilir, (3) çok

az API içerir veya hiç API içermeyebilir, (4) potansiyel olarak zararlı miktarda API içerebilirler. Sonuç olarak, hem sahte hem de onaylanmamış farmasötik ürünler önemli bir halk sağlığı riski oluşturur ve ölüm dâhil ciddi tıbbi komplikasyonlara neden olabilmektedir (Lanzarotta, 2017; Park, 2012; Romolo, 2019). Bu ürünlerin analizi ile içeriğindeki toksik ürünlerin tespiti ve ilgili adli bilgilerin kaynağı hakkında çıkarımlar yapmak gibi iki önemli nokta söz konusudur. Bu durum araştırmacıları, bu tür ürünlerin adli karakterizasyonunu yapabilmek için birçok analitik yöntem geliştirmeye yönlendirmiştir. Ürün içeriğini analiz etmek için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS), nükleer manyetik rezonans (NMR), Fourier dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Raman spektroskopisi gibi analitik yöntemler kullanılmaktadır (Romolo, 2019). Farmasötik ürünlerde takibi yapılacak safsızlıklar olarak ağır metaller de bulunabilmektedir. Bazı metallerin küçük dozlarda bile toksik olduğu bilinmektedir. Beşeri İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Uluslararası Konseyi (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH), Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia, EP) ve Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (United States Pharmacopeia, USP) inorganik safsızlıklar için düzenlemeler yapmıştır. Uygun yöntemler arasında, ng/g seviyelerinde ve altında hızlı ve doğru çok elemanlı analiz yapma kabiliyetine sahip endüktif olarak eşleştirilmiş plazma atomik emisyon spektrometrisi (ICP-AES) ve endüktif olarak eşleştirilmiş plazma atomik kütle spektrometrisi (ICP-MS) bulunmaktadır (Romolo, 2019, 2021).

HPLC–MS spektroskopisindeki algılama hassasiyeti, UPLC kullanımıyla önemli ölçüde geliştirilmiştir. Artan analit konsantrasyonu ve azaltılmış kromatografik dispersiyon ile artan elektrosprey iyonizasyon verimini destekleyerek yanıtta ve kimliğin doğrulanmasında iyileştirmeler sağlanmıştır. Miktar belirleme ve doğrulama için HPLC–MS’e göre UPLC–MS analizlerindeki yanıtın ve S/N'nin artması nedeniyle sonuçların daha iyi doğrulanmasına olanak tanımaktadır. UPLC kullanımının bir diğer önemli avantajı, kromatografik ayırmanın hızlı olması, kullanılan çözücü ve numunenin enjeksiyon hacminin az olmasıdır. Bu durum ise

adli açıdan çok az miktarda tespit edilen numunelerin analizinin doğru, hızlı ve güvenilir bir şekilde analizlenmesini sağlamaktadır.

PDE-5 inhibitörleri içeren yasa dışı ilaçlardaki ve takviye ürünlerdeki organik ve inorganik bileşiklerin analizi için literatürde bilimsel çalışmalar tanımlanmıştır. Bu çalışmalar, bu ilaçlardan bazılarının etken madde içermediğini, bazılarının yanlış miktarda etken maddeye sahip olduklarını, sildenafil içerdiğini iddia ettiklerini ancak bunun yerine tadalafil veya bu etken maddelerin bir karışımına sahip olduklarını ve/veya yüksek miktarda safsızlık içerdiklerini göstermiştir (Reis, 2021).

Bu çalışmada ülkemizde satılmakta olan bazı enerji içeceklerinde ED hastalığı tedavisinde kullanılmakta olan sildenafil, vardenafil ve tadalafil etken maddelerinin varlığını tespit etmek amaçlı valide bir UPLC-MS metodu geliştirmektedir. Bu içeceklerin hiçbirinin etiketinde yer almayan bu etken maddelerin olası varlığı, kişilerin sağlığını tehdit etmekte olan bir unsurdur. Gıdada sahtecilik olayları kapsamında bu tür maddelerin varlığına yönelik hızlı ve etkin bir metot geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. FOSFODİESTERAZ TİP 5 (PDE-5) İNHİBİTÖRLERİ

Sildenafilin sentezi ve penil ereksiyon üzerindeki etkilerinin keşfi, ED tedavisinde büyük bir atılım sağlamış ve bu ilaç sınıfı için yeni klinik uygulama alanları açmıştır. O zamandan beri birçok PDE-5 inhibitörü sentezlenmiş ve geliştirilmiş olmasına rağmen, mevcut bilgilerin çoğu sildenafil, tadalafil ve vardenafil içindir (Andersson, 2018). PDE-5 inhibitörleri sildenafil, vardenafil, tadalafil, lodenafil (Andersson, 2018), mirodenafil (Andersson, 2018), udenafil (Andersson, 2018) ve avanafil (Curvature, 2016) ED için kullanılan birinci basamak tedavi edici API'lerdir (Sandner, 2007; Wright, 2006).

Sildenafil'in 1998'de ortaya çıkışından bu yana, dünya çapında 40 milyondan fazla erkek bu etken madde ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir. PDE-5 inhibitörlerinin güvenliği ve yüksek tolere edilebilirliği, PDE-5'in fizyolojik işlevlerini araştırmak için motivasyon kaynağı olmuştur (Sandner, 2007).

Birçok erkek, ED için risk faktörleri olan komorbiditelere (tıpta bir veya daha fazla bozukluk veya hastalığın temel hastalığa veya bozukluğa ek olarak aynı zamanda görülmesi durumu) sahiptir. Bunlar diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, depresyon, prostat hipertrofisi, sigara, ilaç tedavisi, hareketsiz yaşam tarzı, uyuşturucu ve alkol kullanımı gibi etkenlerdir. Bu risk faktörlerinin kontrolü, ED tedavisinin önemli bir parçasıdır (McMahon, 2006).

Yapılan bir araştırmaya göre, sildenafil kullanmaya başlamadan önce ilişkili risk faktörlerini değiştirmenin, genel başarı oranını %82'ye çıkardığını ve hastaların %77'sinin her cinsel ilişki girişiminde başarılı olduğunu göstermiştir. Başarı oranı farklı komorbiditelere göre değişiklik göstermiş olup birden fazla risk faktörü olan hastalarda başarı oranı daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, risk faktörlerinin modifikasyonunun oral PDE-5 inhibitörlerinin başarısında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (McMahon, 2006).

PDE-5 inhibitörlerinin cinsel ilişkiden önce kullanılması gereken optimum süreleri sildenafil ve vardenafil için 30-60 dakikadır ve her ikisi de ilaç emiliminin hızını ve kapsamını azaltabileceğinden, yiyecek ve aşırı miktarda alkolden kaçınılmalıdır. Tadalafilin emilimi ise yiyecek ve alkolden etkilenmez, ancak ilaç iki saatten önce

maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşmaz. İlacı kullanan erkeklerin yaklaşık yarısında 30 dakika içinde yanıt vermesine rağmen, hastalara cinsel aktiviteden birkaç saat önce tadalafil almaları ve uzun etki süresinden (36 saate kadar) yararlanmaları tavsiye edilir. Sildenafil ve vardenafil 4-6 saat süreyle aktiftir ve vücuttan hızla atılır. 17.5 saatlik yarılanma ömrüne sahip tadalafil, 36 saate kadar aktiftir (McMahon, 2006; Wright, 2006). Çoğu erkek bir veya iki dozdan sonra yanıt verse de, bazı erkeklerin optimum yanıt oluşmadan önce altı ila sekiz doza ihtiyacı olabilmektedir (McMahon, 2006).

Etki gösterme süreleri ile ilgili olarak, sildenafil ile tedavi edilen hastaların %35'inde 14 dakika içinde, vardenafil ile tedavi edilen hastaların %21'inde 10 dakika içinde ve tadalafil ile tedavi edilen hastaların %16'sında 16 dakika içinde başarılı cinsel ilişkiye yol açan bir ereksiyonun elde edildiği bildirilmiştir (Wright, 2006).

PDE-5 inhibitörlerinin etkileri yüksek dozlarda daha fazladır. Sildenafil ve vardenafil tadalafil'e göre daha kısa süreli etki gösteren ajanlarken, tadalafil ise daha uzun bir yarı ömre sahiptir ve kullanıcıya cinsel aktivite açısından daha fazla esneklik sağlamaktadır (Basu, 2004).

PDE-5 inhibitörlerinden vardenafil ve tadalafilin gelişimi, sildenafilden etkinlik ve yan etkiler açısından farklı olup olmadığı ve nasıl farklılaştığı sorusunu gündeme getirmektedir (Gresser, 2002).

PDE-5 inhibitörleri için benzer etkinlik ve toksisite profilleri mevcuttur (Wright, 2006). PDE-5 inhibitörleri arasındaki yapısal farklılıklar küçük olmasına rağmen farklı farmakokinetik (Tablo 1) ve dinamik özelliklere sahiptirler (Tablo 2). Bu durum klinik uygulamada etki sürelerine de yansımaktadır (Andersson, 2018). Sildenafil ve vardenafil benzer moleküler yapılara sahipken, tadalafil farmakokinetik profiline de yansıyan yapısal farklılığa sahiptir. PDE-5 inhibitörleri arasındaki diğer bir fark ise; yiyecekler (özellikle yağlı yiyecekler), sildenafil ve vardenafilin farmakokinetik profillerini etkilerken, tadalafilin farmakokinetik profilini etkilememesidir. ED tedavisinin önemli bir parçası olan hasta tercihi, PDE-5 inhibitörleri arasındaki bu farmakokinetik farklılıkların altında yatan sebep olabilmektedir (Wright, 2006).

Tablo 1. PDE-5 inhibitörlerinin farmakokinetiği (Hatzimouratidis, 2016)

PDE-5 inhibitörü	T _{max} (saat)	t _{1/2} (saat)	C _{max} (ng/mL)
Avanafil (200 mg)	0.75	5.1	2920
Lodenafil (160 mg)	1.2	2.4	157
Mirodenafil (100 mg)	1.4	2.5	2989
Sildenafil (100 mg)	0.95	3.98	514
Tadalafil (20 mg)	2	17.5	378
Vardenafil FCT (20 mg)	0.66	3.9	20.9
Vardenafil ODT (10 mg)	1.5	4.23	7.34
Udenafil (200 mg)	0.76	9.88	1137

C_{max}, maksimum plazma konsantrasyonu; FCT, film kaplı tablet; ODT, ağızda dağılabilen tablet; t_{1/2}, inhibitörün yarisının plazmadan elimine edilmesi için gereken süre; T_{max}, maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için gereken süre.

Tablo 2. PDE-5 inhibitörlerinin farmakodinamiği (Andersson, 2018)

PDE-5 inhibitörleri	Molekül ağırlığı (g/mol)	Molekül formülü	PDE-5 için IC ₅₀ (nmol/L)	PDE seçiciliği
Avanafil	483.957	C ₂₃ H ₂₆ CIN ₇ O ₃	5.2	PDE-5 için yüksek seçici
Lodenafil	1035.206	C ₄₇ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁ S ₂	0.015	PDE-1 ve PDE-6'ya karşı düşük aktivite
Mirodenafil	531.672	C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S	0.33	PDE-5 için sildenafil ile karşılaştırılabilir
Sildenafil	474.580	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	3.7	PDE-6'ya karşı düşük aktivite PDE1'e karşı çok düşük aktivite
Tadalafil	389.411	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	1.8	PDE-11'e karşı düşük aktivite PDE-6'ya karşı çok düşük aktivite
Vardenafil	408.607	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	0.091	PDE-6'ya karşı düşük aktivite PDE1'e karşı çok düşük aktivite
Udenafil	516.661	C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S	8.25	PDE-5 için sildenafil ile karşılaştırılabilir

IC₅₀; etkiyi %50 oranında engelleyen konsantrasyon.

PDE-1 (fosfodiesteraz tip 1), kalsiyum ve kalmodulin bağımlı fosfodiesteraz olarak da bilinen bir fosfodiesteraz enzimidir (Deshmukh, 2009) PDE6 enzimi, memeli gözlerinde retinanın çubuk ve koni fotoreseptörlerdeki görsel transdüksiyon zincirinde merkezi anahtar efektör enzimdir (Kayık, 2017; Barren, 2009). PDE11

(Fosfodiesteraz 11), fosfodiesteraz ailesinin tanımlanacak en son izoformudur. PDE11'e olan ilgi, bir oral PDE-5 inhibitörü olan tadalafil'in PDE11 ile çapraz reaksiyona girmesi nedeniyle son zamanlarda artmıştır. PDE11'in işlevi büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak artan kanıtlar erkek üremesinde olası bir role işaret etmektedir (Makhlouf, 2006).

Son yıllarda PDE-5 inhibitör ilaç sınıfının ED tedavisinde etkin rol oynamasıyla çeşitli modifikasyonlarla türetilen analogları için temel sağlamış olmasına rağmen beraberinde potansiyel tehlikeler de doğurmuştur. Bugüne kadar, 50'den fazla PDE-5 inhibitörü analogu geliştirilmiş ve bunlardan en az 46'sının, performansı artırmak için sağlık takviyelerinde, fonksiyonel gıdalarda ve enerji içeceklerinde yasa dışı katkı maddesi olduğu doğrulanmıştır (He, 2021).

Aşırı enerji içeceği tüketimi, özellikle çocuklarda, gençlerde ve genç yetişkinlerde yüksek kafein ve şeker alımından kaynaklanan ciddi sağlık etkilerine neden olabilir. Aşırı veya tekrarlanan enerji içeceği tüketimi, aritmi ve kalp krizi gibi kalp sorunlarına, anksiyete ve fobiler gibi psikiyatrik durumlara yol açabilmektedir (Al-Shaar, 2017).

Enerji içeceklerinde bulunan ED ilaçları ve analogları, potansiyel olarak ciddi ilaç-ilac etkileşimlerine neden olabilmektedir. Ayrıca, bu analogların toksikolojik veya farmakolojik etkilerine ilişkin hiçbir bilgi mevcut değildir (Sakamoto, 2018).

PDE-5 inhibitörlerinin, kan basıncını düşürmek için kullanılan nitrat içeriğine sahip ilaçlarla (örneğin nitrogliserin) önemli ölçüde etkileşime girdiği bilinmektedir. Diyabet, hiperlipidemi ve hipertansiyon gibi hastalıklara sahip kişilere sıklıkla nitrat içeren ilaçlar reçete edilmektedir. PDE-5 inhibitörleri bu tür hastalarda ters etki gösterdiğinden, genellikle erektil disfonksiyon tedavisi için şifalı bitkiler ve gıda takviyeleri almaya meyillidirler. Bu takviyeler PDE-5 inhibitörleri ile karıştırılırsa, ciddi sağlık sonuçlarına yol açabilmektedir (Walker, 2016).

1.1 Sildenafil

Zaprinast tarafından 1974'te sentezlenmiş ve daha sonra ilk seçici PDE-5 inhibitörü olarak karakterize edilmiştir (Andersson, 2018). Sildenafil, erkekte ED ve pulmoner

arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde oral yoldan alınarak kullanılmaktadır. İlk olarak antianjinal (koroner kalp hastalığının bir semptomu olan anjina pectorisin tedavisinde kullanılan ilaç grubuna verilen isim) bir ilaç olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen, daha sonra ED ve pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

İmpotans (iktidarsızlık/sertleşme sorunu) tedavisinde penise enjeksiyonu veya üretral supozituar (fitil) şeklinde üretra içine uygulanarak kullanılmayı gerektiren diğer ilaçların aksine oral yoldan uygulanan sildenafil, 21 klinik araştırmada 4000'den fazla erkek hastada denenmiştir. Bu çalışmada ortalama yaşı 55 olan deneklerin araştırmaya girmeden ortalama 5 yıl öncesinden başlayan ED sorunları olduğu bildirilmiştir. Sildenafil'in bu deneklerin ortalama %70'inde etkili bulunmuştur. Yanıt oranı psikojenik impotans sorunu olan hastalarla yapılan deneylerde %90'ı bulunmuştur (WEB3).

Araştırmacılar ED tedavisi için onaylanan sildenafil'in pulmoner arter hipertansiyonunda (akciğerlerdeki damarları ve kalbin sağ tarafındaki odacıkları etkileyen yüksek tansiyon türü) da etkili olduğunu tespit etmişlerdir (WEB3).

Sildenafil (Pfizer firması tarafından Viagra ismi ile üretilmektedir) ABD'de FDA tarafından ED'nin tedavisi için 27 Mart 1998 ve pulmoner arteriyel hipertansiyonun tedavisi (Pfizer firması tarafından Revatio ismi ile üretilmektedir) için 3 Temmuz 2005 tarihinde onaylanmıştır. Sildenafil pulmoner arter hipertansiyon tedavisi için Avrupa Birliği İlaç Ajansı (EMA) tarafından tüm Avrupa Birliği ülkelerinde geçerli olmak üzere 28 Ekim 2005 tarihinde onaylanmıştır. EMA tarafından 12 Aralık 2003 tarihinde yetim ilaç statüsüne alınmıştır (WEB3).

Sildenafil fototransdüksiyonda yer alan bir retina enzimi olan fosfodiesteraz tip 6 (PDE-6) için de yüksek bir afiniteye sahiptir. PDE-6'nın inhibisyonu, mavi ve yeşil renkleri ayırt etme yeteneğini engelleyebilmektedir. Hastaların sadece %3'ü görme bozukluğu bildirmiş olsa da, bu mavi-yeşil bozukluk belirli görevleri yerine getirirken sorunlara neden olabilmektedir. Örneğin bu bozulma, gece uçuşlarında veya olumsuz meteorolojik koşullarda pilotlar için sorunlara yol açabilmektedir (Dural, 2020).

Kadınlarda görülen seksüel disfonksiyondaki etkinliğinin belirlenmesine yönelik klinik araştırmalar devam etmektedir (WEB3).

1.2 Tadalafil

Tadalafil, erkekte ED bozukluğunun tedavisi için kullanılan popüler bir ilaç etken maddesi olan sildenafil gibi selektif bir PDE-5 inhibitörüdür. Tadalafil 24 saate kadar uzayan etki süresi ile sildenafil ve vardenafil'e kıyasla daha uzun süre etkilidir. PDE-5 inhibitörlerinin yaptığı ereksiyon sadece cinsel uyarılma ile ortaya çıktığından, tadalafil'in uzun etki süresi cinsel aktivitedeki kendiliğindenliği artırır. Tadalafil'in sildenafil'e kıyasla daha az görme bozukluğuna neden olmadığı bildirilmemiştir. Bunun nedeni Tadalafil'in retinada bulunan PDE-6'ya kıyasla PDE-5'e daha selektif olmasıdır (WEB3).

Tadalafil, erkeklerde ED bozukluğunun tedavisi için, ABD'de FDA tarafından 21 Kasım 2003 tarihinde onaylanmıştır. Tadalafil'in Avrupa'da, Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onay tarihi ise 12 Kasım 2005'tir. Türkiye'de aynı indikasyon için Sağlık Bakanlığı tarafından 28 Mart 2005'te onay almıştır (WEB3).

In vitro araştırmalar Tadalafil'in PDE-5'e seçici olduğunu göstermiştir. PDE-5'e olan bu seçiciliği PDE-6 hariç diğer fosfodiesterazlara (PDE-1, PDE-2, PDE-3 ve PDE-4) kıyasla 10.000 kat daha fazladır. Tadalafil'in PDE-5 enzimine seçiciliği, retinada bulunan ve fototransdüksiyon ile ilgili PDE-6 ile kıyaslandığında yaklaşık 780 kat daha yüksektir. Sildenafil ile iki enzim arasındaki seçicilik bakımından orandaki bu fark sadece 10'dur. Sildenafil'in yüksek dozları veya yüksek plazma konsantrasyonları ile ortaya çıkan renkleri ayırt etme ile ilgili anomalilerin sildenafil'in PDE-5 ile PDE-6 arasındaki seçiciliğinin az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (WEB3).

Tadalafil ilk olarak 2.5 mg veya 5 mg'lık düşük dozlarda günlük uygulama için onaylanmıştır. Tadalafilin 17.5 saatlik yarı ömrü ile farmakokinetik özellikleri, onu günlük dozlama ve kararlı durum serum konsantrasyonuna ulaşmaya uygun hale getirmektedir (Sung, 2012).

Tadalafilin, kadındaki seksüel fonksiyon bozukluğu tedavisi yönünden etkili olup olmadığı araştırılmaktadır (WEB3).

1.3 Vardenafil

İmpotans olarak da bilinen ED bozukluğunun tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Sildenafil ve tadalafil gibi selektif bir PDE-5 inhibitörüdür. Bu gruptaki ilaçlar, impotans tedavisinde kullanılan diğer bazı ilaçlar (örneğin, alprostadil) gibi, prostaglandinleri inhibe etmezler. Vardenafil ve tadalafil PDE-6 ile kıyaslandığında PDE-5'e daha selektiftir. Bu özellik sildenafil tedavisi gören hastalarda bildirilen görme ile ilgili yan etkilerin azalmasını sağlar. Vardenafil'in sildenafil ve tadalafil'e olan avantajı, etkinin daha hızlı başlamasını sağlayabilecek maksimum plazma konsantrasyonuna daha hızlı ulaşmasıdır (WEB3).

Vardenafil, ABD'de FDA tarafından 2003 yılında, Avrupa'da EMEA tarafından 6 Mart 2003 tarihinde onaylanmıştır. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'ndan da gerekli onayı 16 Mart 2004 tarihinde aldıktan sonra satışa sunulmuştur (WEB3).

Maksimum doz limitleri yetişkinlerde ve yaşlılarda 40 mg/gün PO (ağızdan alınan) doz düzeyine kadar araştırılmıştır, fakat yaşlılar başlangıçta düşük dozla başlamalıdır. Çocuklarda ise güvenli ve etkin kullanımı kanıtlanmamıştır (WEB3).

3. PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİ İÇEREN YASA DIŞI ÜRÜNLER

Doğal ürünlerin sentetik bileşenlerden daha güvenli ve sağlıklı olduğuna dair yaygın inanç nedeniyle, bitkisel ilaçlar ve diyet takviyeleri tüm dünyada popülerlik kazanmaktadır. Son zamanlarda sağlık bilincinin artmasıyla birlikte bitkisel besin takviyelerinin tüketimi yıldan yıla artış göstermiştir. Bununla birlikte, bu ürünlerin güvenliğiyle ilgili en büyük endişelerden biri, etikette belirtilen iddiaları güçlendirmek için beyan edilmemiş sentetik kimyasallarla karıştırılmasıdır (Cai, 2010).

Gıda güvenliği, gıdaların sağlıklı ve kusursuz bir şekilde üretilmesi için üretim, işleme, muhafaza ve dağıtım aşamasında belirlenen kural ve önlemlere uyulması olarak tanımlanmaktadır. Güvenli gıdanın üretilmesi sistemin doğru yönetilmesi ile mümkündür. Gelişen dünyada tüketicilerin bilinçlenmesi ile ülkeler gıda ile ilgili kanunlarını güncellemeye ve daha sıkı denetlemeye başlamışlardır. Üretim aşaması veya sistemin herhangi bir noktasında oluşabilecek sıkıntı, gıda ürünlerinin güvenliğinde risk oluşturabilmektedir. (Türkmen, 2020).

Son yıllarda, ağırlıklı olarak cinsel aktivite arttırdığı iddia eden ve genellikle doğal maddeler olarak adlandırılan bir dizi ürünün küresel pazar payının artışı söz konusudur. Bazıları, ED tedavisinde kullanılan PDE-5 enzim inhibitörleri sildenafil, tadalafil ve vardenafil, gibi aktif maddelerle yasa dışı olarak karıştırılmaktadır (Damiano, 2014; Cai, 2010). Tüketiciler, bu “doğal” ürünlerin bazılarının PDE-5 inhibitörleri ve analogları gibi yapısal olarak değiştirilmiş analoglar olan gizli maddeler içerdiğini bilmeden bu ürünleri almaktadırlar (Cai, 2010).

Eretil disfonksiyon tedavisi ve cinsel performansın artırılması için gıda takviyeleri ve bitkisel ilaçlara olan talebin artması çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörleri kısaca özetlenirse; tüketiciler doğal ürünleri sentetik aktif maddeler içeren ilaçlardan çok daha güvenli ve sağlıklı olarak algılamaktadır. Bu ürünler reçetesiz olarak da temin edilebilmekte olup, genellikle resmi ilaçlardan daha ucuzdur (Bortolini, 2015).

Son yıllarda, daha çok kar elde etmek isteyen dolandırıcılar sildenafil sitrat ile karıştırılmış ürünleri piyasaya sürmektedirler (Yacob, 2013). Sildenafil sitratın yanı sıra bitkisel takviyelerde homosildenafil, hidroksihomosildenafil, asetildenafil,

hidroksiasetildenafil ve piperidino asetildenafil dahil sildenafil analogları, tadalafilin aminotadalafil analogu ve vardenafil analogu olan piperidenafil tespit edilmiştir. Bunların dışında thiohomosildenafil, thiosildenafil, thiomethisosildenafil, cyclopentynafil ve N-octylnortadalafil gibi bazı yeni analoglar da bulunmuştur (Cai, 2010).

Ülkemizde ise PDE-5 inhibitörleri içeren gıda ürünleri arasında enerji içecekleri, çikolatalar, kahveler ve macun gibi çeşitleri bulunmaktadır. Özellikle enerji içecekleri kolay tüketim ve kolay ulaşılabilirlik açısından yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enerji içeceği terimi, taurin, guarana, ginseng, karnitin gibi diğer bileşenlerle birlikte kafein içeren ve tüketicilerine ekstra enerji sağladığını iddia eden bir içeceği ifade eder (Abdullah, 2014). Dünya çapında enerji içeceği pazarı 2016 yılında 43 milyar dolar (Trapp, 2020), 2018'de 53 milyar dolar olarak belirlenmiş olup 2026 yılına kadar 86 milyar dolara yükseleceği öngörülmektedir (Somers, 2020). Genç yetişkinlerin yarısından fazlası en az bir kutu enerji içeceği tüketmektedir. Popüler enerji içeceklerinde bulunan guarana, taurin ve ginseng miktarları, terapötik faydalar veya yan etkiler açısından beklenen miktarların çok altındadır (Kevin, 2020).

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), beyan edilmemiş, onaylanmamış farmasötik bileşenler içeren çok sayıda diyet takviyesi konusunda uyarıda bulunmuştur. 2007'den 2016'ya kadar, FDA tarafından 776 katkılı diyet takviyesi tespit edilmiş ve 146 farklı besin takviyesi şirketi suçlu bulunmuştur. Bu ürünlerin %20.2'sinde (157 katkılı ürün) birden fazla onaylanmamış bileşen içerdiği, %45.5'inde cinsel güçlendirme (353 katkılı ürün), %40.9'unda kilo verme (317 katkılı ürün) ve %11.9'unda kas geliştirme (92 katkılı ürün) etkeni içerdiği tespit edilmiştir. Bu ürünler kullanılan en yaygın katkı maddeleri, cinsel güçlendirici takviyeler için sildenafil (353 üründen 166 sı [47.0%]), kilo kaybı takviyeleri için sibutramin (317 üründen 269 u [84.9%]) ve kas geliştirme takviyeleri için sentetik steroidler veya steroid benzeri (92 üründen 82 si [89.1%]) maddelerini içermektedir. Ayrıca, diğer endikasyonlar için (diğer olarak kategorize edilmiş) pazarlanan ve esas olarak eklem veya kas ağrısını içeren 14 ürün (%1.8) tespit edilmiştir (Tablo 3). Katıştırılmış tüm

takviyelerin onaylanmamış ilaç bileşenleri içerdiği bulunmuş olup vakaların çoğunda (776'nın 757'si [%97.6]) bu bileşenler etikette belirtilmemiştir (Tucker, 2018).

Tablo 3. 2007'den 2016'ya ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin Kusurlu Takviyeler Veritabanında Raporlanan Ürünlerin Özeti (Tucker, 2018)

Değişken	Sayısı (%)
Toplam katkılı ürünler	776 (100.0)
Yıl	
2007	15 (1.9)
2008	39 (5.0)
2009	173 (22.3)
2010	67 (8.6)
2011	39 (5.0)
2012	48 (6.2)
2013	92 (11.9)
2014	97 (12.5)
2015	123 (15.9)
2016	83 (10.7)
Kategori	
Cinsel geliştirme	353 (45.5)
Kilo kaybı	317 (40.9)
Kas geliştirme	92 (11.9)
Diğer	14 (1.8)
Bulunan gizli içerik sayısı	
1	619 (79.8)
2	124 (16.0)
3	25 (3.2)
4	5 (0.6)
5	1 (0.1)
6	2 (0.3)
İlgili uyarı	
Gönüllü geri çağırma	360 (46.4)
Genel bildirim	342 (44.1)
Haber bülteni	58 (7.5)
Tüketici güncellemesi	8 (1.0)
Firmaya uyarı mektubu	7 (0.9)
ABD Adalet Bakanlığı basın açıklaması	1 (0.1)

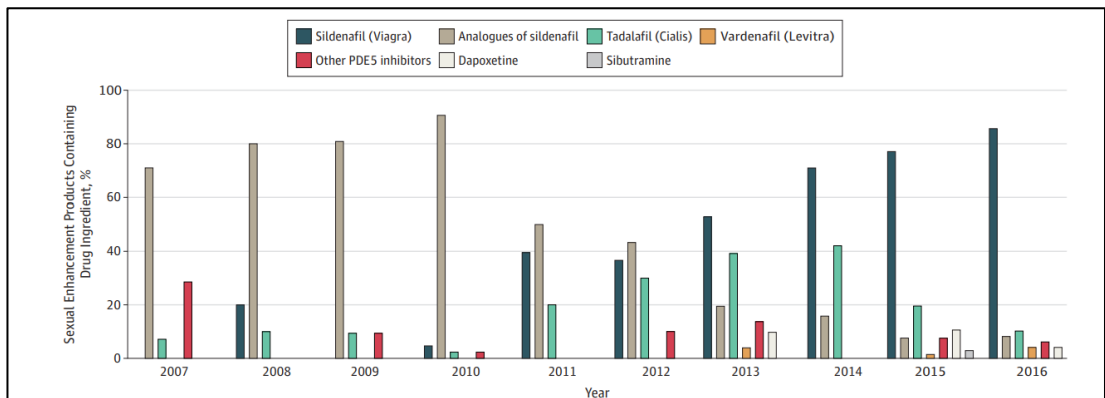
Aktif farmasötikler FDA uyarılarına rağmen özellikle cinsel güçlendirme veya kilo kaybı için pazarlanan diyet takviyelerinde tanımlanmaya devam etmektedir. Bu diyet takviyelerindeki ilaç bileşenlerinin yanlış veya aşırı kullanımı, diğer ilaçlar ile

etkileşimi, altta yatan sağlık koşulları veya takviye içindeki diğer farmasötiklerle etkileşim nedeniyle ciddi sağlık problemlerine neden olma potansiyeline sahiptir (Tucker, 2018).

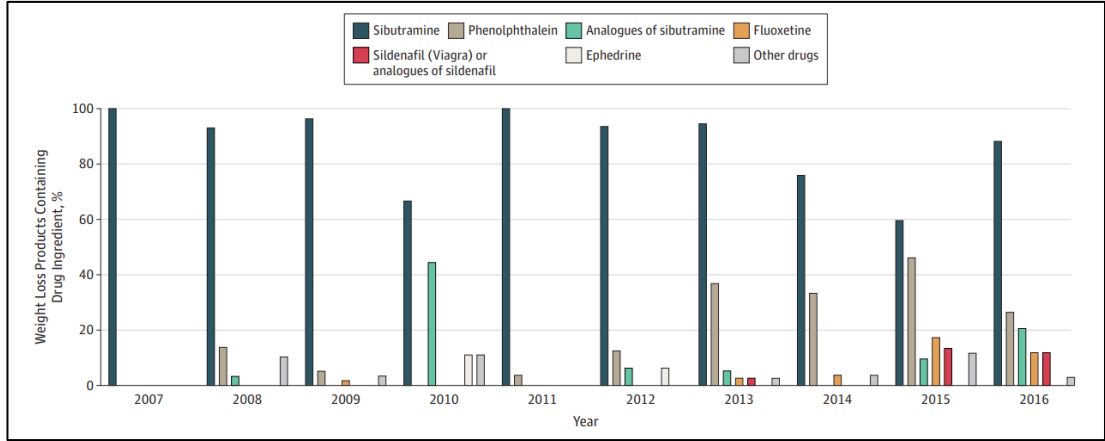
Belirli ilaç bileşenleri, aynı amaçlarla pazarlanan ürünlerde yaygın olarak tespit edilmiştir (Şekil 2 ve Şekil 3). Genel olarak, 353 katkılı cinsel güçlendirme takviyesinin 287'si (81.3%) sildenafil (353 ürünün 166'sı [47.0%]) ve/veya yapısal analoglarından en az birini (353 ürünün 134'ü [38.0%]) içermektedir. 2007'den 2016'ya kadar olan 10 yıllık dönemin başında, sildenafil analogları, katkısız cinsel güçlendirme takviyelerinin çoğunda tespit edilmiştir (Şekil 2). 2012 yılında ise sildenafil içeren ürünlerin oranı artmaya başlamıştır (Tucker, 2018).

Tadalafil 353 cinsel güçlendirme takviyesinin 72'sinde (%20.4) tespit edilmiştir. Vardenafil ise 10 yıllık süre içinde 5 üründe tespit edilmiştir. PDE-5 inhibitör analogları dahil olmak üzere diğer PDE-5 inhibitörleri de 353 katkılı cinsel güçlendirme ürününün 27'sinde (%7.6) tespit edilmiştir (Tucker, 2018).

FDA tarafından onaylanmayan bir antidepresan olan Dapoksetin, 353 katkılı cinsel güçlendirme takviyesinin 14'ünde (%4.0) tespit edilmiştir. Cinsel güçlendirme için pazarlanan iki ürünün, kilo verme takviyelerinde yaygın olarak bulunan bir ilaç bileşeni olan sibutramin içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 3). Genel olarak, 353 katkılı cinsel gelişim takviyesinin 65'inin (%18.4) 1'den fazla gizli ilaç bileşeni içerdiği bulunmuştur (Tucker, 2018).



Şekil 2. 2007'den 2016'ya ABD gıda ve ilaç idaresinin kusurlu takviyeler veritabanından 353 cinsel iyileştirme ürünlerinde tanımlanmış beyan edilmemiş içerikler (Tucker, 2018)



Şekil 3. 2007'den 2016'ya ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin Kusurlu Takviyeler Veritabanından 317 Kilo Verme Ürünlerinde Tanımlanan Beyan Edilmemiş İçerikler (Tucker, 2018)

Cinsel güçlendirici takviyelerde bulunan en yaygın katkı maddesi, son yıllarda sildenafil analoglarından Sildenafil'in kendisine geçmiştir. Bunun nedeni, Pfizer'ın Viagra patentinin Amerika Birleşik Devletleri dışındaki ülkelerde 2012'de sona ermesi olduğu düşünülmektedir. Sildenafil'in böylece uluslararası pazarda daha erişilebilir hale gelmesi ve bu nedenle cinsel güçlendirme için pazarlanan diyet takviyelerinde giderek daha fazla kullanılmasını mümkün kılmaktadır (Tucker, 2018).

Sildenafil gibi PDE-5 inhibitörleri, diyabet, yüksek tansiyon veya yüksek kolesterol gibi durumlar için reçete edilen bazı farmasötik ilaçlarda bulunan nitratlarla etkileşime girme potansiyeline sahiptir ve kan basıncını tehlikeli seviyelere düşürebilmektedir. Reçeteli ilaçların her biri 1 aktif bileşene sahiptir ve ayrıntılı uyarılar, kullanım talimatları, ilaç-ilaç etkileşimleri ve kontrendikasyonları ambalajlarının içerisinde bulunan reçetelerde açıklanmaktadır. Karışık diyet takviyeleri ise 1'den fazla aktif farmasötik bileşen içerebilir, gerekli uyarı ve kontrendikasyonları içermeyebilir; bu ürünler güvenlik varsayımı altında tüketilebilir ve yanlış kullanım veya aşırı doz durumunda tehlikeli sonuçlara yol açma potansiyeline sahiptir (Tucker, 2018).

4. PDE-5 İNHİBİTÖRÜ İÇEREN YASA DIŞI İLAÇLARIN KAYNAĞI

İnsanların yasa dışı ilaçlara ya da ilaç etken madde içeren gıda ve içeceklerle yönelmesinde pek çok farklı unsur etkindir. Bu yasadışı ürünler, kişilerin sağlıklarını çeşitli sebeplerle olumsuz etkileyebilmektedir.

Sahte ve diğer yasadışı ilaçların ticareti, reçete almak için doktora gitmeden elde edilebilecek ekonomik fiyatlı ilaçlara önemli bir talep olduğu için kazançlıdır. Yasadışı ilaçların kullanımı önemli bir oranda artmıştır. 2014 yılında Hollanda'da kullanılan ED ilacı sildenafilin %60'tan fazlasının yasal olan eczaneler dışındaki kaynaklardan geldiği tahmin edilmektedir. Bu sahte ED ürünleri, yetişkinlere yönelik gıda takviyeleri ve yasal olmayan ilaçlar yoluyla tüketilmektedir. Yasadışı bu ilaçların üretiminin ve kullanımının altında yatan bir aktif madde ticareti olduğu açıkça görülmektedir (Keizers, 2016).

Yasadışı aktif maddelerin kontrolsüz koşullarda üretilmesi nedeniyle, ürünlerin kalitesi ve saflıklarıyla ilgili endişe veren sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin, sildenafil ve antidiyabetik ilaç aktif maddesi olan glibenklamidin, Güney Doğu Asya'da bir hipogliseminin salgınına neden olan yasadışı ED ilaç ve takviyelerinde son derece değişken oranlarda bulunmuştur (Keizers, 2016).

Bir ilaç etken maddesinin üretim koşulları, üretim tesisi ve hammaddeleri onaylı ilaç kayıt dosyasına uygun olmalıdır. Farklı şekilde üretilen bir aktif bileşen, farmasötik bir formülasyonda kullanılmamalıdır. Sahte aktif maddeler özellikle (genotoksik) safsızlıkların beklenmedik varlığında sağlık riski oluşturmaktadır (Keizers, 2016).

Sahte ve yasa dışı ilaçlar dünya çapında potansiyel tehdit oluşturmaktadır, ancak riskin niteliği ülkeye göre değişkenlik göstermektedir ve yasal denetimin asgari düzeyde olduğu veya hiç olmadığı ülkelerde daha yüksek riskler söz konusudur. Bu ilaçlar, hastalıklara karşı çok az koruma sağlar ve daha da kötüsü, büyük zararlara sebebiyet verebilmektedir. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkelerde sorunların büyük çoğunluğu, yetersiz ve güvenli olmayan ilaçların milyonları etkileyen ölümcül hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve ilaç direncini hızlandırdığı ortaya çıkmaktadır (Buckley, 2013).

Sahte ilaçların çok büyük kısmı düşük ve orta gelirli ülkelerde satılmaktadır. Bu ülkelerde, ilaç maliyeti sağlık harcamalarının %20 ila %60'ını oluştururken insanların %90'ı ilaçların parasını cebinden ödemektedir. Örneğin, en düşük fiyatlı jenerik ülser ilacının bir aylık kullanım maliyeti, Afrika, Doğu Avrupa ve Orta Doğu lkelerinin çoğunda ortalama bir devlet memurunun  günlük maaşına mal olmaktadır (Buckley, 2013). Bu gibi ekonomik kaygılar, insanları ilaçları yasadışı temin etmeye zorlayan koşulların başında gelmektedir.

Genel olarak, suç ve yolsuzluk sahte/yasa dışı ilaç işini yönlendiren en önemli unsurlardandır. Sahte ilaç üretiminin maliyetinin düşük olması ve genellikle hiçbir kâğıt izi bırakmadığından, soruşturma ve kovuşturma yapılmasını zorlaştırdığı için ilaçlarda sahtecilik yapmak "mükemmel suç" olarak adlandırılmıştır. Sahte bir ilacı tespit etmek, özel beceriler ve ekipman gerektirmektedir (Buckley, 2013).

5. DİYET TAKVİYELERİNDE YASA DIŞI DURUMLARI ÖNLEMEK AMACIYLA UYGULANAN YASAL DÜZENLEMELER

1960'larda ve 1970'lerde tüketiciler ve üreticiler tarafından yapılan protestolar gibi güçlü bir direnişle karşılaşan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) diyet takviyelerini ilaç olarak düzenlemek için ilk adımı atmıştır. 1994'te ABD Kongresi, diyet takviyelerinin ilaç olarak değil gıda olarak ele alınmasını ve daha sıkı düzenlemelere tabi tutulmasını belirleyen Diyet Takviyesi Sağlık Eğitimi Yasası'nı (DSHEA) onaylamıştır. Bu kanun, halkın diyet takviyelerine sınırsız erişimini etkin bir şekilde güvence altına alınmasını sağlamıştır. 2011'de ABD hükümeti, gıda takviyesi pazarını düzenlemek için biraz daha sıkı önlemler almıştır. 4 Ocak 2011'de yürürlüğe giren Gıda Güvenliği Modernizasyon Yasası (FSMA), Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası'nın bir kısmını değiştirerek, bir memurun veya kalifiye bir FDA çalışanının, ürünün tahrif edilmiş veya yanlış markalanmış olduğuna dair yeterli bilgi ve belgeye sahiplerse herhangi bir gıda maddesinin geri çekilmesine onay verebileceğini beyan etmiştir (Da Justa Neves, 2015).

Avrupa Birliği'nde (AB), (EC) 178/2002 sayılı Yönetmelikte “gıda”nın tıbbi ürünleri içermeyeceği açıkça belirtilmiştir. 1925/2006 sayılı Tüzük, 2002/46/EC sayılı Direktif ve 1924/ 2006 sayılı tüzük gibi gıda ürünlerini düzenlemek için çeşitli normlar da vardır. Bu normların bazıları hali hazırda mevcut olan daha geniş bir ürün yelpazesini kapsayacak şekilde ek kılavuzlar oluşturma ihtiyacını öngörmektedir. AB'nin göre tıbbi ürünler “(a) İnsanlarda hastalıkları tedavi etme veya önleme özelliklerine sahip olarak sunulan herhangi bir madde veya maddeler kombinasyonu; veya (b) Farmakolojik, immünolojik veya metabolik bir etki uygulayarak fizyolojik fonksiyonları eski haline getirmek, düzeltmek veya değiştirmek veya tıbbi bir teşhis koymak amacıyla insanlarda kullanılabilen veya insanlara uygulanabilen herhangi bir madde veya maddeler kombinasyonu” olarak tanımlanmaktadır. Bu ürünler, üye devletin yetkili makamları tarafından önceden verilmiş bir izin olmaksızın piyasaya sürülemez (Da Justa Neves, 2015).

Ülkemizde, Tarım ve Orman Bakanlığı'nın (TOB) ürünler üzerinde yaptığı resmi analizler sonucunda elde ettiği olumsuz sonuçları ile ilgili bilgileri paylaşması hakkın sağlığının korunması adına son derece önemlidir. Bu durumun kontrolünün

sağlanması adına, 17 Aralık 2011 tarihli 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu ve Gıda ve Yemin Resmi Kontrolüne Dair Yönetmelik yayınlanmıştır. Gıda ürünlerinde taklit ve tağşişin belirlenmesi ve önlenmesine yönelik hükümlerin yer aldığı bu kanunda taklit, gıda maddesinin ve gıda ile temasta bulunan malzemelerin şekil, içerik ve niteliklerin gıdaya ait olmayan özelliklere sahipmiş gibi gösterilmesi olarak tanımlanmıştır. “Kanun’un 31. maddesinin 6. fıkrası ile TOB’un gıda ile ilgili yaptığı resmi kontrollere ilişkin bilgileri kamuoyunun bilgisine sunabileceği hükme bağlanmıştır. Ayrıca, 17 Aralık 2011 tarihli Gıda ve Yemin Resmi Kontrolüne Dair Yönetmeliğin “Şeffaflık ve Gizlilik” başlıklı 8. maddesi gereğince laboratuvar sonucuyla taklit veya tağşiş yapıldığı kesinleşen gıdayı üreten/ithal eden firmanın adı, ürün adı, markası, parti ve/veya seri numarası ile insan sağlığını tehlikeye düşürecek şekilde bozulmuş, değiştirilmiş gıdaları üreten ve/veya satan firmanın adı, ürün adı, markası, parti ve/veya seri numarasının TOB resmi internet sitesinde kamuoyunun bilgisine sunabileceği hükmü” yer almaktadır (Türkmen, 2020).

Gıda konusunda yasal dayanak olan “5996 sayılı Kanunun 24. maddenin 4. fıkrasında gıdada taklit ve tağşiş yapılamaz” hükmü yer almaktadır. “5996 sayılı Kanun’un 40. maddesinin 1 bendi gereği taklit ve tağşiş yapan gıda işletmelerine 2020 yılı için 27877 TL idarî para cezası verilmekte”, taklit ve tağşiş edilmiş ürünlere de el konulmaktadır. Ayrıca, “5996 sayılı kanunun 40. maddesinin a bendi gereği laboratuvar analizleri neticesinde insan sağlığını tehlikeye düşürecek şekilde bozulmuş, değiştirilmiş gıdaları üreten veya piyasaya arz edenler” hakkında kamunun sağlığına karşı suçlar kapsamında Cumhuriyet Savcılığı’na suç duyurusunda bulunulmakta ve bu ürünler masrafları sorumlusuna ait olmak üzere piyasadan toplatılarak imha edilmektedir (Türkmen, 2020).

Ticaret Bakanlığı Gümrük Muhafaza ekipleri tarafından 2020’de toplam 270 olayda 64 milyon 741 bin 260 lira değerinde tıbbi malzeme ve ilaç yakalaması gerçekleştirilmiştir. Bu ürünler içerisinde, 699 bin 776 adet tıbbi ilaç, 296 bin 224 adet vitamin hâpı, 19 bin 471 adet bitkisel ilaç, 57 bin 115 adet cinsel gücü artırıcı ilaç, 669 adet zayıflama ilacı ele geçirilmiştir. Ayrıca 13 milyon 203 bin 420 adet kaçak muhtelif tıbbi malzeme ürünleri ele geçirilmiştir (WEB4).

6. LİTERATÜR ÖRNEKLERİ

Yukarıdaki bölümlerde anlatıldığı üzere gıda takviye ürünlerinde sahtecilik yapıldığı bilinmektedir. Bu ürünlerin içeriğini tespit etmek üzere literatürde yayınlı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birkaçı aşağıda örneklendirilmiştir:

Popescu ve arkadaşları son zamanlarda Romanya'da bitkisel gıda takviyesinde özellikle cinsel performans ve kilo verdirme ürünlerinde, beyan edilmemiş aktif farmasötik içeriklerin bileşimini analiz etmeye yönelik metot geliştirme üzerine çalışmışlardır. Ulusal Tıbbi, Aromatik Bitkiler ve Arı Ürünleri Ofisi tarafından temin edilen ve Romanya pazarından satın alınan bitkisel gıda takviyesi numuneleri olarak sunulan kapsüllenmiş katı toz (17 ürün) ve tabletlerin (9 ürün) GC-MS analizlerini yapmışlardır (Popescu, 2014).

Numune hazırlığında her kapsül boşaltılmış ve her tablet ezilerek toz haline getirilmiştir. Her 100 mg ince toz üzerine 1 mL metanol eklenerek vorteksleme ile iyice karıştırılmış, ardından 15 dakika sonikasyon ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar toplanarak GC-MS analizi için 0.2 µm membran filtrelerle süzölmüştür. Referans madde olarak kullanılan Viagra, Levitra ve Cialis tabletleri ezilerek her 100 mg ince toz üzerine 5 mL seyreltici çözücü (metanol içinde %10 etanol) eklenerek ekstrakte edilmiştir. Elde edilen standart çözeltiler, vorteksleme ve ardından oda sıcaklığında 30 dakika sonikasyon ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme ile karıştırılmıştır. Bu çözeltiler, analiz için doğrusal dinamik aralığı oluşturmak amacıyla 15, 7.5, 3.75 ve 1.5 ppm'e kadar seyreltici çözücü ile seyreltilmiştir (Popescu, 2014).

GC-MS sistemi, GC (HP6890), MS (HP5973) ve erimiş silika kapiler kolondan (HP-5MS, 30 m x 0.25 mm i.d. 0.25 µm film kalınlığı) oluşmaktadır. 1.2 mL/dk helyum akışı ile 280 °C 1 µL enjeksiyon yapılmıştır. Fırın sıcaklık artışı 25 °C/dk hızında 250-320 °C (2 dk bekletme) olarak programlanmıştır. Tarama m/z, 99, 404 (sildenafil), 389, 262 (tadalafil), 113, 448 (vardenafil)'de seçilen iyon izleme modunda yapılırken, tam tarama modunda (40-500 amu) tanımlama yapılmıştır. Elde edilen bileşiklerin spektrumları, NIST Kütle Spektral Arama Programı kullanılarak NIST/EPA/NIH Kütle Spektral Kitabında bilinen bileşiklerin spektrumları ile

karşılaştırılmıştır. Analiz edilen 26 ürünün tamamı Tablo 4'te açıklanmıştır. Bunlardan 6 bitkisel gıda takviyesinin PDE-5 inhibitörleri ile karıştırıldığı tespit edilmiştir (Popescu, 2014).

Tablo 4. Bitkisel gıda takviyelerinde sildenafil, tadalafil ve vardenafil'in GC-MS ile tanımlanması (Popescu, 2014).

Örnek	Ürün Türü	Menşei Ülke	PDE-5 inhibitörü
1	Kapsül	Çin	-
2	Tablet	Kanada	Tadalafil
3	Kapsül	Çin	-
4	Kapsül	Çin	-
5	Tablet	Japonya	Sildenafil
6	Tablet	Birleşik Krallık	-
7	Tablet	Çin	-
8	Tablet	SUA	-
9	Kapsül	Çin	-
10	Tablet	SUA	-
11	Tablet	SUA	-
12	Kapsül	Birleşik Krallık	-
13	Kapsül	Fransa	-
14	Tablet	Romanya	-
15	Kapsül	Çin	Vardenafil
16	Kapsül	Hindistan	-
17	Tablet	Japonya	Sildenafil, Tadalafil, Vardenafil
18	Kapsül	SUA	-
19	Kapsül	Romanya	-
20	Kapsül	Fransa	-
21	Kapsül	Birleşik Krallık	-
22	Kapsül	Çin	-
23	Kapsül	Kanada	-
24	Kapsül	Birleşik Krallık	-
25	Kapsül	Çin	Vardenafil
26	Kapsül	Çin	Vardenafil

Sildenafil, tadalafil ve vardenafilin 18.163, 15.876 ve 20.226 dakikalık alıkonma sürelerinde etkin kromatografik ayrımı, bu analizin hidroliz veya türevlendirme prosedürü gerektirmediğini göstermiştir. Bu tür analizin avantajlarının ise hızlı bir numune hazırlama ve PDE-5 inhibitörlerinin tespiti için hızlı bir tarama olduğu belirtilmiştir (Popescu, 2014).

Singh ve arkadaşları, “Bitkisel gıda takviyelerinde sildenafil, vardenafil, tadalafil ve analoglarını karakterize etme ve bu ilaçları içeren sahte ürünleri tespit etme stratejileri” başlığıyla bir derleme yayınlamışlardır. Bu derleme çalışmasında ürünlerin analiz öncesi hazırlama yöntemleri, hangi tür ürünlerin hangi analitik

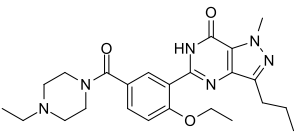
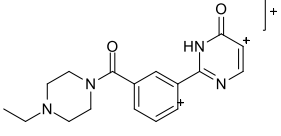
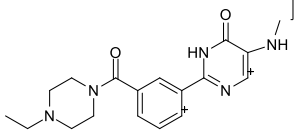
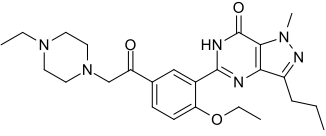
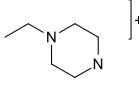
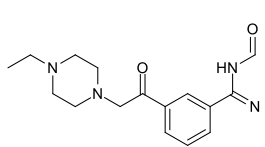
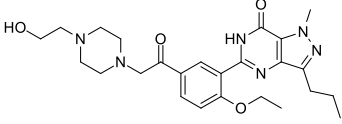
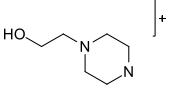
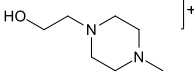
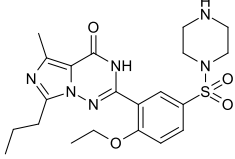
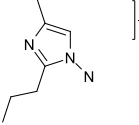
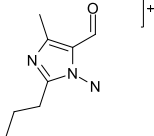
metodlarla analiz edileceği ve içeriğindeki PDE-5 inhibitörlerinin tespiti için yapılan çalışmaları özetlemişlerdir (Singh, 2009).

Karmaşık matrislerde karıştırılan PDE-5 inhibitör ilaçlarının ayrılması ve saptanması için teknikler karması (TLC, HPLC, LC-MS vb) kullanılmıştır. Bilinmeyen PDE-5 inhibitör analoglarının karakterizasyonu için, ultraviyole (UV) spektroskopisi, kızılötesi (IR), nükleer manyetik rezonans (NMR), MS [LC-MS, yüksek çözünürlüklü hızlı atom bombardımanı (FAB)-MS], kimyasal türevlendirme ve ardından GC-MS veya LC-MS ve birkaç diğer tamamlayıcı tekniklerin kullanımının faydalı olduğu bulunmuştur (Singh, 2009).

Numune hazırlama, sahte ürünlerin profilinin belirlenmesinde önemli bir aşamadır. Numune hazırlama yöntemlerinin çoğu, istenen bileşiğin bir organik çözücü içinde ekstrakte edilmesini içermektedir (Singh, 2009).

Yacob ve arkadaşları 2013 yılında Malezya'da bulunan toz kahveler içerisinde sildenafil ve analoglarının tespiti üzerine LC-MS/MS kullanarak ve kahve tozunda bulunan sildenafil analoglarını tespit etmek için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Malezya Kimya Departmanına göre, karaborsada henüz tespit edilmemiş sildenafil analogları olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, geliştirdikleri yeni yöntem ile yerel yetkililerin, bu ilacın kötüye kullanımının engellenmesine ve en aza indirmesine yardımcı olacağını düşünmüşlerdir (Yacob, 2013).

Yaptıkları çalışmada numunelerdeki sildenafil analoglarının tayinini kütle/atomik orana (m/z) göre yapmışlardır; bulunan analogların m/z sonuçları sırasıyla 453/311 (karbodenafil), 461/151 (N-desetil vardenafil), 483/127 (hidroksi asetildenafil), 467/1119 (asetildenafil), 505/298 (tiodymetil sildenafil), 438/297 (piperi asetildenafil) ve 453/296 (N-desmetil asetildenafil)'dır. Test edilen her Sildenafil analogu kalitatif olarak analiz edilmiştir. karbodenafil, asetildenafil, hidroksi asetildenafil ve N-desetil vardenafil için önerilen parçalanma yapıları Şekil 4'te gösterilmiştir (Yacob, 2013).

 Karbodenafil Ana iyon m/z: 452.25	 Parçalanma iyonu m/z 311	 Parçalanma iyonu m/z 339
 Asetildenafil Ana iyon m/z: 466.58	 Parçalanma iyonu m/z 111	 Parçalanma iyonu m/z 297
 Hidroksiasetildenafil Ana iyon m/z: 482.58	 Parçalanma iyonu m/z 127	 Parçalanma iyonu m/z 143
 N-Desetil Vardenafil Ana iyon m/z: 460.55	 Parçalanma iyonu m/z 151	 Parçalanma iyonu m/z 169

Şekil 4. Karbodenafil, Asetildenafil, Hidroksiasetildenafil ve N-Desetil Vardenafil'in pozitif sonucu için önerilen parçalanma yapıları (Yacob, 2013)

Dural ve arkadaşları Sivas'ta internetten ve bir bitki pazarından satın aldıkları erkeklerde cinsel performansı artırmak için reklamı yapılan markalardan elli bir farklı bitkisel besin takviyesindeki, sildenafil varlığının tespitine ilişkin HPLC- UV ile analizleri üzerine çalışma yapmışlardır (Dural, 2020).

Gerçekleştirdikleri çalışmada, numune hazırlama aşamasında, tüm katı ilaç ve tablet numuneleri bir havan ile toz haline getirilmiştir. Tartılan 200 mg (sıvı, katı ve toz) numune, 10 mL metanol ve %1.5 Na₂CO₃ (7:3, v/v) karışımı içinde çözündürülmüştür. Daha sonra karışım 250 mg Na₂SO₄ ile kurutulmuştur. Ekstrakt, bir rotator çalkalayıcıda 1200 rpm'de 10 dakika boyunca karıştırılmış ve 30 dakika boyunca bir ultrasonik banyoda çözündürülmüştür. Örnek 3000 rpm'de 5 dakika

santrifüj edilmiş ve üst fazın yaklaşık 10 mL'si temiz bir test tüpüne aktarılarak 0.45 µm'lik bir filtre ile süzölmüştür. Daha sonra 10 µL numune filtratı ve 10 µL iç standart (100 µg/mL) mobil faz ile 10 mL'ye tamamlanarak ve 1200 rpm'de 1 dakika vortekslenmiştir. Son olarak, bu karışımın 20 µL'si, belirtilen kromatografik koşullar altında HPLC'ye uygulanmıştır (Dural, 2020).

Bu yöntemde, mobil faz olarak %0.1 trietil amin içeren 10 mM fosfat tamponu ve asetonitril (65:35, v/v) karışımı ve 4.6x250 mm, 5 µm partikül boyutunda bir analitik kolon kullanılmıştır. UV detektörü 293 nm'ye ayarlanmıştır ve toplam analiz süresi 7.5 dakikadır. Geliştirilen yöntemin geçerliliği, sıvı (sıvı ve macun) ve katı (tablet, kapsül ve toz) formdaki 50 bitkisel gıda takviyesi analiz edilerek kanıtlanmıştır. Sonuçlar, ED tedavisi için bitkisel gıda takviyesi olarak satılan ürünlerin, analiz edilen 50 örneğin 37'sinde (%74) SDF içeriğinin 0.01 ila 465.47 mg/g aralığında bulunması nedeniyle halk sağlığını ciddi şekilde tehdit ettiğini göstermiştir. Geliştirilen yöntem, özgüllük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, geri kazanım ve sağlamlık açısından doğrulanmıştır. Uluslararası Uyum Konferansı'na uygun olarak doğru ve kesin ölçümler elde etmek için, yöntem ve aracın tekrarlanabilirliği dikkate alınarak gün içi ve günler arası geçerlilik protokolleri uygulanmıştır (Dural, 2020).

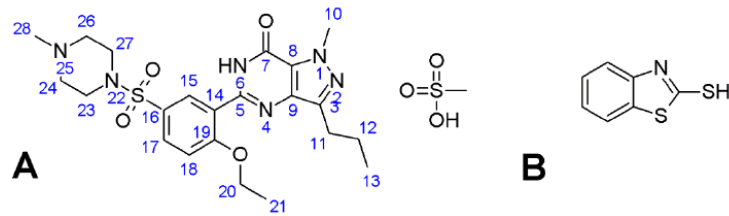
Bu çalışmada, yerleşik HPLC-UV yönteminin, gıda kontrolü veya toksikoloji ile ilgili referans laboratuvarları için hızlı, ucuz ve doğruluğu gösterilmiştir. Geliştirilen yöntemin bitkisel ürünlere uygulanabilirliği 50 bitkisel gıda takviyesi analizi ile kanıtlanmıştır. Aynı zamanda piyasada ED tedavisi için pazarlanan bitkisel ürünlerin insan sağlığına risk oluşturabilecek yüksek miktarda sildenafil içerdiği gösterilmiştir (Dural, 2020).

Geliştirilen yöntem ile toplam 7.5 dakika analiz süresi ile hızlı analiz, düşük numune gereksinimi (0.2 g) ve yüksek analitik doğruluk (LOD: 1.88 ng/mL) gibi önemli avantajlar sağladığı belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemde sonuçlar, kesinlik için 2.34 ile 8.13 (%RSD) arasında, doğruluk için -4.02 ile 7.14 (%RE, relative error, göreceli hata) arasında olan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri ve geri kazanım değerlerinin %87.57 ile %111.65 arasındadır. Yöntemin ayrıca mobil faz içeriği, kolon sıcaklığı ve akış hızı gibi bazı analitik koşullardaki değişikliklere ve ayrıca

sağlamlık testlerine karşı sağlam olduğu kanıtlanmıştır. Yöntem 50 bitkisel ürüne de rahatlıkla uygulanmış ve tüm ürünlerde analizler başarıyla tamamlanmıştır. Ayrıca numune hazırlama ve analiz sırasında az miktarda solvent kullanılmıştır (Dural, 2020).

Yasadışı ilaçlarda bulunan aktif maddeler, saflık ve kullanıcının sağlığına ilişkin riskler açısından yasal emsallerinden farklılık gösterebilir. Bu aktif maddeleri içeren ürünlerin kullanıcısı için, safsızlığın doğal özellikleri ve aşırı doz olasılığı nedeniyle yan etki riskleri artar (Keizers, 2016).

Keizers ve arkadaşları, ED ürünlerinde kullanılan aktif madde sildenafil'in Avrupa Farmakopesi kalitesinde olmadığı iki örneği FTIR spektroskopisi, OPLC-QTOF-MS/MS, UHPLC-Orbitrap-MS/MS, Raman mikroskopisi, erime noktası tayini cihazı, NMR spektroskopisi, HPLC-DAD cihazları ile analizlenmiştir. Bir örnekte 2-merkaptobenzotiazol kontaminasyonunun miligram ölçekli miktarlarını, diğer örnekte ise sitrat yerine mesilat tuzu kullanıldığını tespit etmişlerdir (Şekil 5) (Keizers, 2016).

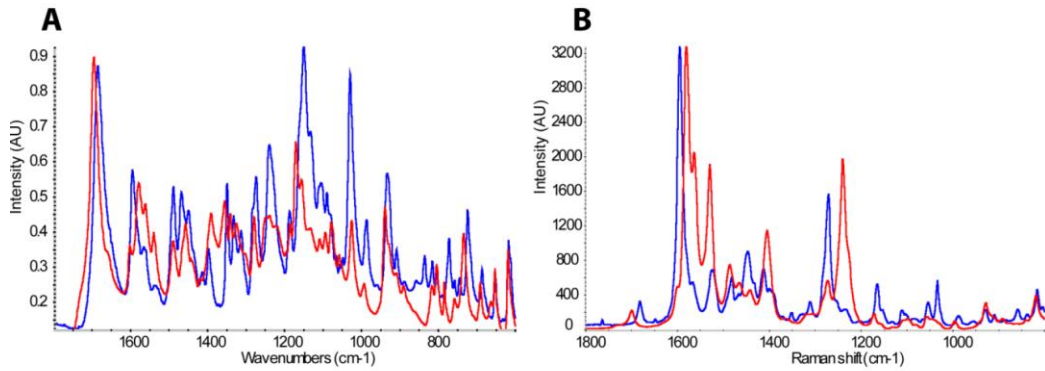


Şekil 5. Sildenafil mesilat (A) ve 2-merkaptobenzotiyazol (B) yapıları. Sildenafilin atom numaralandırması (Keizers, 2016)

Bu çalışmada, Hollanda Sağlık Müfettişliğinden temin edilen normal postayla gönderilen bir paketin parçası olan sildenafil aktif maddesi olarak adlandırılan birinci örnek ve Alman polisi tarafından ele geçirilen 100 mg Kamagra tabletleri olan ikinci örneğin analizleri yapılmıştır. Kamagra, Avrupa'da kayıtlı olmayan bir sildenafil içeren ED ürünüdür (Keizers, 2016).

FTIR analizi; Sildenafil sitrat spektrumu içeren bir veri tabanı sahip el tipi FTIR spektrometresi ile hiçbir pozitif tanımlama elde edilememiştir. Daha sonra

numuneden bir masaüstü FTIR spektrumu ve bir Raman spektrumu alınmıştır. Spektrumların referans sildenafil sitrattan farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, farklı bir polimorfik form veya tuzun varlığının söz konusu olduğunu göstermektedir (Şekil 6). Sildenafil sitrat referansının spektrumları kırmızı, sildenafil referansının spektrumları mavidir (Keizers, 2016).



Şekil 6. Sildenafil aktif maddesinin titreşim spektroskopik analizi. Kızılötesi (A) ve Raman (B) spektrumlarının parmak izi bölgeleri gösterilmektedir (Keizers, 2016).

Erime noktası analizi; ürünün erime noktası, 183 °C'deki referans standardından önemli ölçüde farklı ve yüksek olan 263 °C olarak bulunmuştur. Daha yüksek erime noktasına sahip olması polimorfizm olasılığını ortadan kaldırarak, bir sülfonat tuzunun varlığını akla getirmiştir. Genel olarak, sülfonat tuzlarının diğer tuzlardan daha yüksek erime noktalarına sahip olduğu bilinmektedir (Keizers, 2016).

Ürünün sildenafil içerdiği, LC-MS kullanılarak belirlenmiştir. LC-MS verilerinde hiçbir sülfonat tanımlanamamıştır. Bu nedenle üründe organik tuzların varlığını belirlemek için NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Ürün açıkça 2.6676 ppm'de sitrat pikine sahip değildir ve 2.9619 ve 2.5562 ppm'de piperazin etilen pikleri yoktur (Tablo 5). Bunun yerine ürün, 3.8148, 3.4893, 3.1698 ve 2.6114 ppm'de bazı diğer pikler ve 3.3804 ppm'de yüksek yoğunluklu bir pik belirlenmiştir. Ürüne metansülfonik asit ilavesi üzerine 3.8148, 3.4893, 3.1698 ve 2.6114 ppm'deki pikler daha keskin hale gelmiş ve 3.381'deki pik kaybolmuştur. 2.5175 ppm'de bir mesilat metil piki mevcuttur. Sildenafil sitrat referans standardına metansülfonik asidin eklenmesi üzerine, 2.9619 ve 2.5562 ppm'deki piperazin etilen pikleri, ürünün

piklerine benzer şekilde 3.8200, 3.5088, 3.1736 ve 2.6630 ppm'de piklere dönüşmüştür. Mesilat metil piki şimdi 2.5175 ppm'de mevcuttur. Açıkça görünüyor ki, bu pik, üründe pH nedeniyle 3.3804 den, ilave edilmiş örnekte 2.5536 ve 2.5175 ppm'ye kaydırmaktadır. Mesilat metilden gelen sinyal, eklenmiş numunelerde piperazin metilden (28) gelen sinyalle örtüşmektedir. NMR spektrumları, ürünün sildenafil mesilat olduğunu onaylamaktadır. Sildenafil mesilatın saflığının, sildenafil sitratın EP monografında açıklanan yöntem kullanılarak ve mesilat kütlesi için düzeltme yapılarak %100 olduğu belirlenmiştir (Keizers, 2016).

Tablo 5. Sildenafil (A), sildenafil sitrat (B), MeSO₃H varlığında sildenafil (C), MeSO₃H varlığında sildenafil sitrat (D) NMR kimyasal kaymalarının değerleridir (Keizers, 2016).

Atom numaraları	Protonların sayısı ve yarılmaları	A (J, Hz)	B (J, Hz)	C (J, Hz)	D (J, Hz)
10	3 (s)	4.1707	4.1656	4.1729	4.1749
11	2 (t)	2.7807(7.48)	2.7768 (7.48)	2.7853 (7.48)	2.7886 (7.45)
12	2 (m)	1.7456	1.7392	1.7403	1.7376
13	3 (t)	0.9449 (7.35)	0.9388 (7.38)	0.9434 (7.38)	0.9428 (7.38)
15	1 (s)	7.9103	7.8538	7.9235	7.9320
17	1 (d)	7.8910 (2.45)	7.8349 (2.45)	7.9047 (2.45)	7.9131 (2.45)
18	1 (d)	7.4306 (8.65)	7.3888 (8.65)	7.4433 (8.95)	7.4499 (8.70)
20	2 (q)	4.2306 (6.95)	4.2147 (6.93)	4.2332 (6.95)	4.2353 (6.95)
21	3 (t)	1.3445 (6.93)	1.3336 (6.93)	1.3394 (6.95)	1.3376 (6.93)
23,27	4 (m)	3.8148, 3.4893	2.9619	3.8212, 3.5079	3.8200, 3.5088
24,26	4 (m)	3.1698, 2.6114	2.5562	3.1710, 2.6498	3.1736, 2.6630
28	3 (s)	2.3171	2.2747	-	-
6	1 (s)	12.2959	12.2550	-	-
Sitrat	4 (dd)	-	2.6676 (47.37;15.32)	-	2.7141 (51.96;15.40)
MeSO ₃ H	3	3.3804	-	2.5175	2.5536
H ₂ O	1	-	3.5193	6.5532	8.2217
Bilinmeyen	-	2.8076	-	2.8215	2.8229
Bilinmeyen	-	9.4732	-	9.6302	9.6573

Kamagra'nın, tanımlaması için LC-MS ve miktar tayini için HPLC-DAD kullanılarak 44 mg sildenafil içerdiği bulunmuştur. Ayrıca, tablet başına 2.2 mg 2-merkaptobenzotiazol (MBT, endüstride kauçuk vulkanizasyon hızlandırıcı, korozyon önleyici ve mantar ilacı olarak kullanılmaktadır.) mevcut olduğu belirlenmiştir (Keizers, 2016).

Raman mikroskobu kullanılarak, 1582 cm^{-1} 'de spesifik bir sildenafil sitrat bandının ve 395 cm^{-1} 'de spesifik bir MBT bandının yoğunluğunu gösteren haritalar yapılmıştır. Sildenafil aktif maddesinin lokalizasyonu, MBT'ninki ile ilişkili görünmektedir. Lazeri düşük yoğunlukta sildenafil içeren bir noktaya odaklayarak, kalsiyum karbonatın ekşiyanların spektrumuna büyük katkı sağladığı bulunmuştur. Daha sonra, ekşiyanların lokalizasyonunu gösteren 1085 cm^{-1} 'de kalsiyum karbonat bandının bir haritası yapılmıştır. Kalsiyum karbonatın maksimumlarının pozisyonları, aktif maddenin kontaminasyonun kaynağı olduğunu gösteren, sildenafil ve MBT haritalarının minimumları ile iyi bir şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir (Keizers, 2016).

Yasadışı ilaçlarda kullanılan etken maddeler yasal muadillerinden farklı olabilir. Bu çalışmada, etken madde sildenafil'in Avrupa Farmakopesi kalitesinde olmadığı iki örnek gösterdik. Bir çalışmada, büyük miktarlarda 2-merkaptobenzotiazol kontaminasyonu ve sitrat yerine mesilat tuzu kullanıldığı tespit edilmiştir (Keizers, 2016).

Özelliği bilinmeyen ve üst dozaj limitleri (sildenafil için 100 mg/gün ve tadalafil için 20 mg/gün) olan bazı bileşenlerin gıda takviyelerine yasa dışı olarak eklenmesinin halk sağlığı için potansiyel risk taşıdığı iyi bilinmektedir. Öte yandan, ED ilaçlarının su ortamındaki kontaminasyonu tüm dünyada küresel bir sorundur ve çevresel risklerin değerlendirilmesi için çevresel numunelerdeki kontaminant seviyelerinin belirlenmesi su döngüsünün güvenliği için önlem alınması açısından çok önemlidir. Sildenafil ve Tadalafil'in 45 gün boyunca çok çeşitli çevresel koşullara maruz kaldıklarında yüksek stabilite sergiledikleri bildirildiğinden, çevresel numunelerde düzeylerinin tespiti gereklidir (Er, 2018).

Er ve arkadaşları, enerji içecekleri, musluk suyu ve kanalizasyon çamurunda Sildenafil ve Tadalafil'in eş zamanlı tayini için basit ve güvenilir bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada enerji içeceği, musluk suyu ve kanalizasyon çamuru örneklerinde sildenafil ve tadalafil tayini için doğrudan enjeksiyon yöntemi kullanılmış ve eş zamanlı olarak kuadropol uçuş süresi kütle spektrometrisine (QTOF-MS) bağlı sıvı kromatografisi (LC) ile bir doğrudan enjeksiyon yöntemi bildirilmemiştir. On yedi enerji içeceği numunesi, Sildenafil ve Tadalafil içerikleri açısından analiz edilmiştir. Arıtma çamurunda örneği İstanbul Su ve Kanalizasyon İdaresi (İSKİ) Ataköy İleri Biyolojik Arıtma Tesisi havalandırma tankından, musluk suyu numunesi ise İstanbul'un Esenler ilçesinden alınmıştır (Er, 2018). Bu çalışma boyunca kullanılan LC-QTOF-MS/MS sistemlerinin enstrümental parametreleri Tablo 6'da verilmiştir (Er, 2018).

Tablo 6. LC-QTOF-MS yönteminin çalışma parametreleri (Er, 2018)

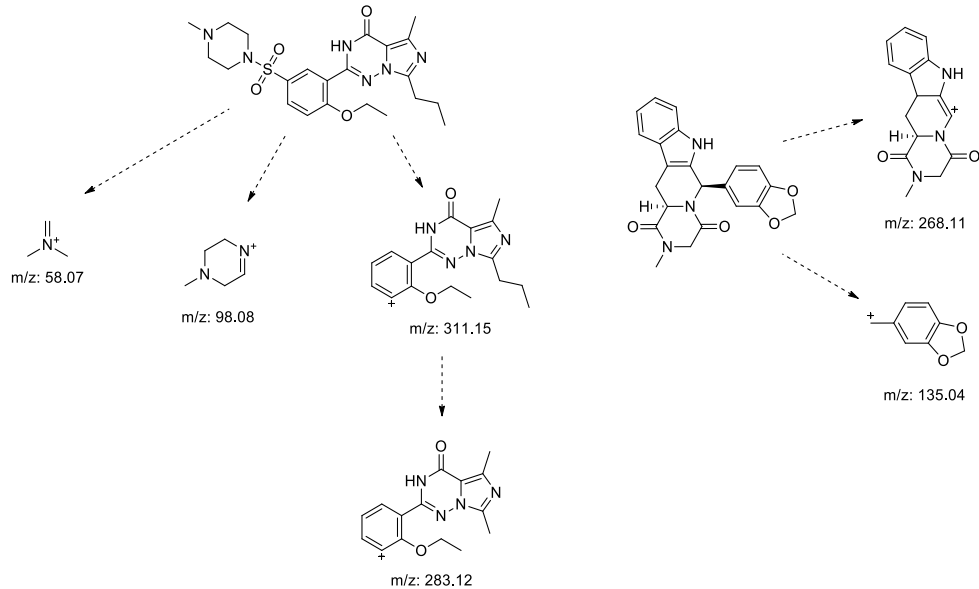
Ekipman	Parametre	Özellikler
LC	Mobil faz	A: 50/50 (v/v) ACN/H ₂ O, pH 3.5 tampon (Amonyum format/formik asit) B: ACN ve %0.10 (v/v) formik asit
	Akış hızı	0.40 mL/dk
	Kolon tipi	Poroshell (3.0 x 150 mm, 2.7 µm) EC C18
	Kolon sıcaklığı	40 °C
	Enjeksiyon hacmi	20 µL
	Gradient elüsyonu	Süre, dk
		A (%)
		B (%)
		0.0
		100
		0
		2.00
		100
		0
		4.00
		0
		100
		5.50
		0
		100
		7.00
		100
		0
		8.00
		100
		0
Q-TOF-MS	Kurutma gazı sıcaklığı	350 °C
	Nebulizatör gaz akışı	40 psig
	Kılcal voltaj	4.0 kV
	Parçalayıcı voltajı	150 V

İç standart (IS) olarak 100 ng/g konsantrasyonda Zopiklon kullanılmıştır. İç standart, MS ölçümlerindeki değişiklikler ve analiz sırasındaki iyonizasyon farklılıklarından kaynaklanan aletsel hataları ortadan kaldırmak için kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir (Er, 2018).

Tablo 7. Her bileşik için niceleyici/niteleyici iyonlar ve LC QTOF-MS/MS sisteminin analitik performansı (Er, 2018)

	Sildenafil	Tadalafil	IS
Öncü iyon $[M+H]^+$	475.2107	390.1429	389.1096
Niceleyici/niteleyici iyon	58.0657/ 100.0993	268.1071/135.0435	245.0217/217.0270
LOD/LOQ, ng/g	0.16/0.53	0.28/0.93	
Doğrusal aralık, ng/g	0.50-2000	0.50-2000	
Doğrusal Denklemi	$y = 0.003x - 0.0278$	$y = 0.0011x - 0.0211$	
R^2	0.9993	0.9992	

Arıtma çamuru ve musluk suyu numunelerinde tespit limitleri dahilinde ne Sildenafil ne de Tadalafil tespit edilmemiştir. Şekil 7’de sildenafil, tadalafil ve IS yapıların gözlenen iyonu için önerilen parçalanmaları gösterilmektedir (Er, 2018).



Şekil 7. Sildenafil ve tadalafil yapısının ESI⁺ analizi ile önerilen parçalanmaları (Er, 2018)

Kromatografik ayırma başarıyla sağlanmıştır. Analiz, 4.0 dakika içinde hedeflenen MS/MS modu aracılığıyla bir elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. LOD/LOQ değerleri sildenafil ve tadalafil için sırasıyla 0.16/0.53 ve 0.28/0.93 ng/g olarak hesaplanmıştır. On yedi farklı marka enerji içeceği üzerinde kantitatif ölçümler yapılmış ve sonuçlar şişelerin üzerinde yazılı içeriklerle karşılaştırılmıştır. Musluk suyu ve kanalizasyon çamuru örnekleri de analiz edilmiş ve sildenafil ve tadalafil için geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Er, 2018).

Optimum koşullar altında on yedi farklı enerji içeceğindeki sildenafil ve tadalafil miktarları belirlenmiştir. Dört numunenin insan sağlığına potansiyel riskleri olan yüksek miktarda sildenafil ve tadalafil içerdiği bulunmuştur. Elde edilen tüm sonuçlar, geliştirilen yöntemin rutin analiz laboratuvarlarında kısa sürede analiz edilen matrislerdeki analitlerin eş zamanlı tayini için uygulanabileceğini göstermektedir (Er, 2018).

7. PDE-5 İNHİBİTÖRLERİNİ İÇEREN YASA DIŞI ÜRÜNLERİNİN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Gıda takviyeleri, bileşimi, sunumu ve kullanım koşulları nedeniyle bitkisel ilaçlar ile gıda arasında yer alan özel bir ürün kategorisidir. Son yıllarda bu ürünlerin sayısı giderek artmış ve formülleri çeşitlendirilerek (içerikler ve kombinasyonlar) dev bir pazar oluşturulmuştur (Popescu, 2014).

Bitkisel gıda takviyelerinin, steroidler (kuvvet arttırıcılar); PDE-5 inhibitörleri veya analogları (cinsel performans arttırıcılar) ve sibutramin ve analogları (kilo verme ürünleri) gibi ilaç etkenleri ile karıştırıldığına dair birçok rapor bulunmaktadır. Cinsel performans arttırıcı olarak önerilen birçok gıda takviyesi, "tamamen doğal" olarak sunulup ve reklamı yapılırken, sentetik PDE-5 inhibitörleri içerdiği bulunmuştur. Bu nedenle, ticari olarak temin edilebilen bitkisel ürünler, resmi farmakokinetik veya diğer farmakolojik testlere tabi tutulmamış yasal ilaçlar veya bunların analogları ile "katıştırılmıştır" (Popescu, 2014). Bu durum açıkça göstermektedir ki bu ürünlerin analiz edilmeleri konusundaki durumun ciddiyeti giderek artmaktadır.

PDE-5 inhibitörlerinin ve bazen metabolitlerinin, farmasötikler, gıda takviyeleri, insan kanı, idrar, plazma, saç ve atık su numunelerindeki miktar tayini için çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bu numunelerdeki PDE-5 inhibitörlerini tespit etmek için birçok analitik yöntem ve cihazlar kullanılmaktadır. Bunlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), iyon hareketliliği spektrometrisi (IMS), elektrokimyasal algılama (ECD), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ve sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) gibi cihazlardır. Bu numunelerin analizler için hazırlanmasında ise katı faz ekstraksiyonu (SPE), sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu gibi yöntemler dahil olmak üzere bir çok çalışmada çeşitli ekstraksiyon yöntemleri bildirilmiştir. Bu yöntemlerin tümü, numunelerin hazırlanmasında zaman alıcı işlemler içermektedir (Er, 2018).

7.1 PDE-5 İnhibitörü İçeren Ürünlerin Analiz Yöntemleri

PDE-5 inhibitörleri içeren bitkisel gıda takviyelerinin analiz yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

7.2 TLC (ince tabaka kromatografisi) kullanarak ön tanımlama

İnce tabaka kromatografisi, ham bitki ilacını ve farmakolojik olarak aktif bileşenle zenginleştirilmiş standardize ekstreleri ve formülasyonlarını karakterize etmek için kullanılan rasyonel ve pratik bir çözümdür. Aynı zamanda kimyasal ilaçlarla taklit edilen bitkisel ürünlerin tanımlanması için de kullanılabilir (Cai, 2010). Bu yaklaşım, bitkisel gıda takviyelerinde sahteciliği tespit etmek için yüksek verimli bir araç olarak kullanılabilir (Singh, 2009). TLC prosedürü, PDE-5 inhibitörleri eklendiğinden şüphelenilen bitkisel ürünlerin hızlı tarama analizi için etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Cai, 2010).

7.3 UV spektrumlarındaki karakteristik farklılıklar

UV spektrumları, farklı PDE-5 inhibitörleri kategorilerini ayırt etmek için bir ön tanı olarak yardımcı olabilir. Referans olarak kullanılan PDE-5 inhibitörleri ile karıştırılan maddenin birbiri ile uyumu/uyumsuzluğu UV spektrumlarının karşılaştırılma ile yapısal benzerlikleri hakkında bilgi verebilmektedir (Lin, 2017).

7.4 Tespit ve miktar tayini için HPLC yöntemleri

Gıdaların denetlenmesi sırasında bazı şüpheli durumlar söz konusu olabilmektedir. Gıda takviyelerinde erektil disfonksiyona olan ilgiye karşılık, ithal edilen bazı gıdaların PDE-5 inhibitörleri içerip içermediği incelenmektedir (Shin, 2003). HPLC cihazına bağlı bir fotodiyot dizisi (PDA) dedektörü, dalga boylu ultraviyole (UV) dedektörü, floresan dedektör ve refraktif indeks dedektörü (RID) gibi farklı ekipman türleriyle, PDE-5 ilaçlarının veya analoglarının tespiti ve miktarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, standartların mevcut olması koşuluyla,

basit RRT (safsızlık pikinin alıkonma zamanının ana pik alıkonma zamanına oranı) eşleştirmesiyle kolayca tespit edilebilir (Singh, 2009; Shin, 2003).

7.5 LC-MS tabanlı tanımlama

Farmasötik analiz için en yaygın olarak uygulanan metodlar arasında HPLC, LC/MS ve spektroskopik yöntemler bulunur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bitkisel ürünlerdeki katkı maddelerinin taranması için HPLC, GC/MS ve LC/MS yöntemleri bildirilmiştir. Bununla birlikte, mevcut yöntemlerin hiçbiri, toplu bitkisel ilaç ve besin takviyesi örneklerinden gelen katkı maddelerinin güvenilir ve yüksek verimli taranması için yeterli değildir. İlk olarak, bu ürünler genellikle şifalı otlar ve diğer doğal ürünlerin bir karışımını içerir ve bu ürünlerin formülleri, markalar arasında oldukça değişkendir, bu nedenle bu numunelerin matrisleri hem spektroskopik hem de kromatografik deneyleri etkilemektedir. Örneğin, bazı durumlarda matristen bir bileşiğin alıkonma süresi (RT) analitinkiyile çakışır (yanlış pozitif) ve bazen analitlerin RT'si matrislerden gelen girişim nedeniyle yer değiştirir (yanlış negatif). İkincisi, mevcut yöntemlerin analiz süreleri nispeten uzundur; örneğin, karmaşık matrislerden ilaçların analizi için tipik bir HPLC analiz süresi genellikle 15 dakikadan fazladır. Bu durum bu yöntemlerin büyük miktarda numuneyi analizlemesini engellerken, günümüz pazarında bu tür ürünlerin çok sayıda olması nedeniyle uygulanabilirliği çok uygun olmamaktadır. Bu nedenle, çok karmaşık matrislerde sentetik ilaç katkı maddelerinin hızlı ve güvenilir tespiti için LC/MS/MS yöntemi kullanılmaktadır (Liang, 2006).

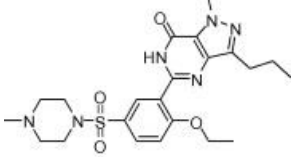
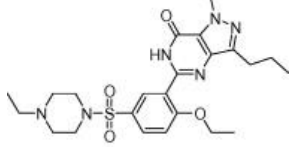
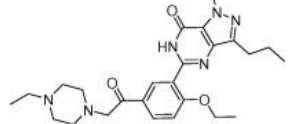
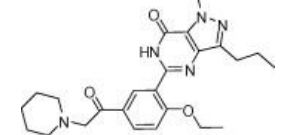
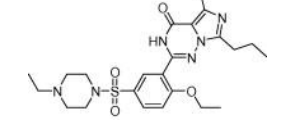
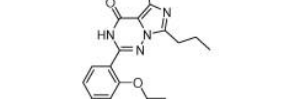
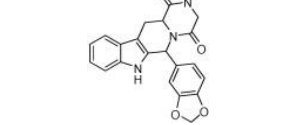
7.6 Kimyasal türevlendirme

Birçok adli tıp laboratuvarı, analizler için ağırlıklı olarak gaz kromatografisi-kütle spektrometrisine (GC-MS, tipik olarak tek bir dört kutuplu kütle spektrometresi kullanır) güvenir. Analit uçucu veya yarı uçucu ise, GC-MS, bu ürünleri analiz etmede çoğunlukla tercih sebebidir. Kimyasal türevlendirme, daha az uçucu molekülleri GC-MS'ye uygun hale getirmek için kullanılmıştır; bu uygulama, özellikle LC-MS mevcut olmadığında, çoğu adli tıp laboratuvarında, uçucu olmayan ve yarı uçucu analitler için hala kullanılmaktadır (Patterson, 2012).

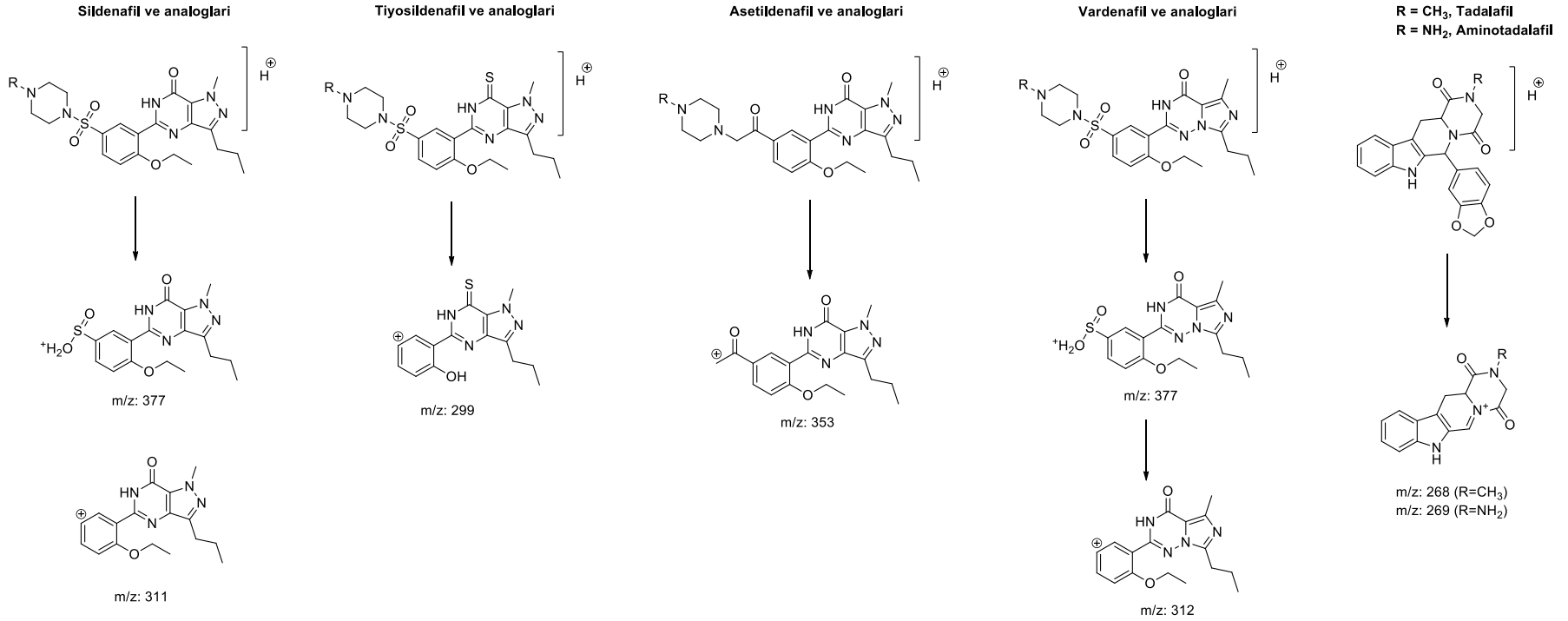
7.7 MS analizlerinde önerilen genel strateji

Tablo 8'de gösterildiği gibi, ilaçlar ve analogları ortak yapısal iskeletlere sahiptirler, dolayısıyla bu bileşiklerin çalışmalarda gözlemlendiği gibi ortak parçalanma yapıları vermesi beklenebilir (Singh, 2009).

Tablo 8. Sildenafil ve analoglarının yapıları, tam kütleleri, MS parçalanma verileri ve $\lambda_{\max}$ (Singh, 2009)

PDE-5 inhibitörü	Tam kütle (g/mol)	Ana parçalanmanın m/z oranı	Yaygın parçalanma	$\lambda_{\max}$
Sildenafil, $C_{27}H_{30}N_6O_4S$ 	474.2049	475, 447, 418, 391, 377, 374, 346, 329, 311, 297, 283, 255, 163, 160, 100	377, 311	230, 292
Homosildenafil, $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ 	488.2206	489, 467, 461, 377, 313, 312, 283, 127, 111, 113, 99, 97, 72	377, 311	226, 292
Acetildenafil, $C_{25}H_{34}N_6O_3$ 	466.2692	467, 449, 439, 420, 404, 396, 381, 355, 353, 339, 325, 324, 311, 297, 166, 127, 111, 99, 97, 84, 72	353	
Piperidinoacetildenafil, $C_{24}H_{31}N_5O_3$ 	437.2427	438, 410, 353, 341, 325, 288	353	
Vardenafil, $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ 	488.2206	489, 461, 420, 377, 376, 375, 346, 339, 329, 312, 299, 283, 169, 151, 123, 99	377, 312	230
Vardenafil hydrolysis product, $C_{17}H_{20}N_4O_2$ 	312.1586	313, 284, 256, 169, 151		
Tadalafil, $C_{27}H_{32}N_2O_4$ 	389.1376	390, 302, 268, 262, 250, 240, 197, 169, 135	268	230, 283

Tablo 8'de bildirilen MS parçalanma verilerine dayanarak, Şekil 8'de gösterildiği gibi ortak bir parçalanma modeli geliştirilebilir. Şüpheli bir bitkisel gıda takviyesi örneğinin LC-MS analizinde 377 ve 311'de (m/z) karakteristik parçalanma iyon piklerinin varlığı, sildenafil ve analoglarının varlığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Benzer şekilde, vardenafil (377 ve 312), tadalafil'in (268) karakteristik parçalanmaları, bu ilaçların ve analoglarının varlığını iddia etmek için kullanılabilir. Diğer PDE-5 inhibitörleri için de benzer verilerin ortaya çıkması muhtemeldir, çünkü zaman içinde MS profillerini içeren çalışmalar artacak ve yayınlar ortaya çıkacaktır. Bu nedenle, Tablo 8 ve Şekil 8'de verilen veriler, bitkisel gıda takviyelerinde gizli katkı maddesi olarak kullanılan PDE-5 inhibitör(ler)inin yapısını belirlemek için iyi bir başlangıç çalışması olarak kabul edilebilir (Singh, 2009).



Şekil 8. Çeşitli PDE-5 analoglarından ortak parçaların oluşumu (Singh, 2009)

7.8 Raman spektroskopisi

Katkılı sağlık őrőnlerinde PDE-5 inhibitörleri taraması için tahribatsız bir teknik olarak mikro-Raman spektroskopisi kullanıldığı bilinmektedir. Bir gőrőntőleme mikroskobu kullanılarak, çevredeki bőlgeden ayırt edilebilir bir kristal formuna veya şekline sahip olan sağlık őrőnlerinin şüpheli alanı seçilerek, arka plan floresansını azaltmak için Raman spektrometresinin enstrőmental parametrelerinin optimizasyonu seçilir ve Raman spektrumları toplanır. Toplanan spektrumlar, saf PDE-5 inhibitörlerinin standart Raman spektrumları ile karşılaştırıldı. Mikro Raman spektroskopisinin kullanımı, sağlık őrőnlerindeki katkılı kimyasalların taranması için hızlı, kullanışlı ve tahribatsız bir yöntem sağlamaktadır (Mao, 2012).

7.9 XRD (X-ray Difraksiyonu)

XRD kırınım çalışmaları genellikle yapıların kristal ve amorf formunu tanımlamak için kullanılır. Bu teknik, doğrudan kompleksleşmiş yapılar için sonuç varmaz ancak ana kristal form içerisinde bulunan farklı kristal formları ya da amorf yapıların etkileşimi nedeniyle kristal formdaki değişiklikleri tespit etmek için yararlı bir araçtır (Chen, 2013). Sahte ilaç tespiti, genellikle çeşitli kimyasal analizlerin kullanılmasını gerektiren karmaşık bir sőretir. Son yıllarda X-ışını kırınımı karmaşık yapılar içerisindeki PDE-5 inhibitörlerinin varlığını tespit etmede kullanılmaktadır (Trefi, 2008).

7.10 NMR spektroskopisi (Nőkleer Manyetik Rezonans)

Kontrol laboratuvarlarında diyet takviyelerine hileli olarak dahil edilebilecek PDE-5 inhibitörlerinin bilinmeyen herhangi bir yeni analogunu tespit edebilmektir. Çoğu zaman bu tőr analoglar, sertifikalı aktif maddeye çok benzer bir yapıya sahiptir ve bazen de izomerdir. Bu nedenle, yeni bir analogu tespit etmek ve yapısını aydınlatmak için ^1H ve ^{13}C NMR deneylerine ihtiyaç vardır (Mustazza, 2014). ^1H ve ^{13}C NMR analizleri ile kimyasal yapı aydınlatılabilmekte olup, yapılar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilerek őrőnlerdeki PDE-5 inhibitörleri ve analogları tespit edilebilmektedir.

7.11 NIR spektroskopisi (Yakın Kızılötesi)

NIR gibi kemometrik analizler, sahte ilaç tespiti için basit, hızlı ve sağlam ilaç analiz prosedürleri olduğu kanıtlanmıştır. Şüpheli tabletlerin orijinal tabletlerin spektrumları ile karşılaştırılması ve aktif farmasötik bileşenlerin veya tabletlerin kaynaklarının belirlenmesi yoluyla analiz yapılabilir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin uygulanması çoğunlukla, test spektrumları ile karşılaştırma için referans bileşiklerin veya ürünlerin mevcudiyetine bağlıdır (Said, 2014). Bu yöntem, daha önce bahsedilen NIRS tekniklerini kullanarak neredeyse imkânsız olan, standarda dayanmadan tağşişli numunelerin doğrudan tanımlanması olasılığını göstermiştir (Said, 2014).

NIR ile elde edilen spektroskopik parmak izleri, sadece aktif bileşenleri değil, aynı zamanda tüm diğer kimyasal bileşimleri/yardımcı maddeleri de yansıttığı ve aynı zamanda kullanılan üretim süreçlerindeki değişkenliği gösterdiği için, benzer kimyasal varlıklarına rağmen özgün bitkisel formülasyonların belirgin bir temsilini sağlamıştır (Said, 2014).

8. ANALİZ METOTLARININ PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ VE VALİDE EDİLMESİ

Bir analitik metodun validasyonunun amacı, yöntemin istenilen hedefe uygun olduğunu göstermektir (ICH, 1994). Analitik metodların validasyon tartışması, en yaygın dört analitik metod tipine yöneliktir:

- Tanımlama testleri
- Safsızlıkların içeriği için nicel testler
- Safsızlıkların kontrolü için limit testleri
- Etken madde/ilaç ürünü/ilaç ürünündeki diğer seçilmiş bileşen(ler)in numunelerindeki aktif kısmın kantitatif testleridir.

8.1 Validasyon

Akredite olmuş analitik laboratuvarlarda validasyon uluslararası bir zorunluluktur. Valide edilmiş metodların kullanımı analitik laboratuvarın yeterli ve kalifiye olduğunun göstergesidir. Bir metodu valide etmek, kabul edilebilir belirsizlik seviyesinde analitik sonuçlar elde etmede başarılı olup olmadığının araştırılmasıdır.

Bütün analitik metodlarının validasyonu, homojen numune üzerinden yapılmalı, metod validasyonu süresince kullanılan referansların ve kimyasalların kaynakları/saflıkları biliniyor olmalıdır. Herhangi bir analitik validasyon başlatılmadan önce validasyonun kapsamı, analitik sistem ve gereklilikleri içerecek şekilde belirlenmelidir.

Validasyonu doğruluk, kesinlik, seçicilik, algılama limiti, tayin limiti, doğrusallık, çalışma aralığı ve sağlamlık gibi metod çalışmalarının değerlendirilmesi ile yapılmalıdır. Hangi kriterin değerlendirileceği metodun çeşidine bağlıdır (Taverniers, 2004).

8.2 Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Metot validasyonuna başlamadan önce, validasyon parametreleri, gereklilikleri, amacı ve kabul kriterleri belirlenmiş olmalıdır. Her bir parametre bu amaçlar ve kabul kriterleri doğrultusunda değerlendirilmektedir.

8.3 Doğruluk

Bir analitik prosedürün doğruluğu, bir gerçek değer/kabul edilen bir referans değeri ile bulunan değer olarak kabul edilen değer arasındaki uyumu ve yakınlığını ifade eder. Doğruluk aşağıda verilen yaklaşımlar değerlendirilerek belirlenir;

- Seçicilik, kesinlik ve doğrusallık,
- Elde edilen sonuçların, başka bir geçerli ve farklı analiz yöntemi ile karşılaştırılması,
- Standarda dışarıdan ekleme yapılarak geri kazanımının bulunması,
- Analizi yapılacak gerçek numuneye uygulanması ile saptanabilir.

En önemli nokta, doğruluk ve geri kazanım hesaplamasında kullanılan kalibrasyon eşitliği ile esas analizde standart madde ile elde edilen doğru denklemine ait eşitlikle aynı olması gerekliliğidir (ICH, 1994).

8.4 Kesinlik

Bir yöntemin kesinliği art arda enjeksiyon yapıldığında elde edilen sonuçların birbirine yakınlık derecesi ile ifade edilir. Farklı bir ifade ile homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir analitik prosedürün kesinliği genellikle bir dizi ölçümün varyansı, standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak ifade edilir. Kesinlik için kabul kriteri yapılan analizin türüne bağlıdır. İlaç analizlerinde safsızlık çalışmalarında kabul edilebilirlik limiti %10'lar da iken, miktar tayinin de %2'ler arasında değişmektedir.

Tekrarlanabilirlik, gün içi, günler arası ve laboratuvarlar arası olmak üzere 3 grupta incelenir (ICH, 1994).

8.4.1 Gün içi tekrarlanabilirlik

Bir analistin laboratuvarında bir cihaz ile bir analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuçların uyumluluğudur. 2 ya da 3 farklı derişimde aynı standartlar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, aynı gün içerisinde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve % RSD (bağıl standart sapma) hesaplanır.

8.4.2 Ara kesinlik

Ara kesinlik, farklı günler, farklı analistler, farklı cihaz gibi laboratuvar içi değişimleri ifade eder.

8.5 Seçicilik

Analitin, olması beklenen diğer bileşenlerin (safsızlıklar, bozunma ürünleri, ortam vb.) varlığında kesin olarak tespit edilip değerlendirilmesini ifade eder (ICH, 1994).

8.6 Algılama limiti (LOD)

Analitik metot tarafından gözlemsel olarak tespit edilebilen ancak mutlak kesin bir değer olarak nicelendirilemeyen, analit sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gereken en az analit miktarıdır (ICH, 1994). Çeşitli yollar ile belirlenebilir;

Gözleme Dayalı Belirleme; Hazırlanan bir dizi seyreltik çözelti analiz edilir ve maddenin gözlemlenebildiği en düşük derişim teşhis limiti olarak kaydedilir.

Sinyal / Gürültü (S/N) Oranına Dayanarak Belirleme; Elde edilen S/N oranları incelenir; en küçük konsantrasyon maddenin cevap sinyalinin, piklerin taban çizgisinin gürültüye oranının matematiksel olarak 3'e eşit olduğu konsantrasyon gözlenebilme limiti olarak alınabilir.

Hesaplamaya Dayalı Belirleme; Standart sapma ve kalibrasyon doğrusuna ait denklemdeki eğim değeri kullanılarak, aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır (Denklem 1);

$$LOD = 3.3 \times \text{Eğim} / m$$

Denklem 1. LOD hesaplama denklemi

m: baselinin standart sapması

8.7 Tayin Limiti (LOQ)

Uygun doğruluk ve kesinlik ile niceliksel olarak belirlenebilen numune içerisindeki en küçük analit miktarıdır. Tayin limiti, genellikle numune matrisi içerisinde düşük miktarlarda bulunan bileşiklerin kantitatif analizlerinin bir parametresidir. Özellikle safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin belirlenmesi için kullanılır (ICH, 1994).

8.8 Doğrusallık

Bir analitik metodun doğrusallığı, numunedeki analitin konsantrasyonu (miktarı) ile cihazın verdiği sinyal değeri arasında ne derece orantılı olduğu ile tespit edilir (ICH, 1994). Kabul kriteri safsızlık çalışmasında tüm pikler için korelasyon katsayısı (r) 0,99'dan az olmamalıdır. Miktar tayini çalışmalarında ise (r) 0,999'dan az olmamalıdır.

8.9 Çalışma Aralığı

Analitik metodun uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallık sonuçları verdiği numunedeki analit konsantrasyonunun en alt ve en üst noktaları dahil olmak üzere bu aralığı ifade eder (ICH, 1994).

8.10 Sağlamlık

Analitik metod parametreleri üzerinde yapılan küçük değişiklikler (kolon sıcaklığı, akış hızı, mobil faz bileşeni değişikliği, pH değişikliği ve kolon değişikliği) yöntemin etkilenmemesi ve normal kullanım sırasında metodun güvenilirliğini sağlamalıdır (ICH, 1994).

8.11 İstatistiksel Terimlerin Tanımları

8.11.1 Standart sapma

Standart sapma (SD, standard deviation), analizle ilgili sistematik hatanın ölçüsüdür. Her bir değerin ortalamadan sapmasının karelerinin toplamının serbestlik derecesine bölümünün karekökü ile ifade edilir (Denklem 2). Serbestlik derecesi sayısı, bir standart sapma hesaplamasında kullanılan bağımsız veri sayısını gösterir (Skoog, 1996).

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

Denklem 2. Standart sapma denklemi

8.11.2 Bağlı standart sapma

Farmasötik endüstrisinde, varyasyon katsayısının mutlak değeri genellikle bağlı standart sapma (RSD, relative standard deviation) olarak adlandırılır (Denklem 3) ve birim doz ürünlerinde aktif farmasötik bileşenin toplam dozunun değişkenliğini tanımlamak da dahil olmak üzere (karışım numunelerindeki aktif farmasötik bileşen konsantrasyonundaki değişkenlik, ilaç çözünmesindeki ve biyoyararlanımdaki varyasyonlar, vb.) birçok amaç için kullanılır (Gao, 2013).

$$RSD = \frac{s}{\bar{X}}$$

Denklem 3. Bağlı standart sapma denklemi

s: Standart sapma

$\bar{X}$: Numune değerlerinin ortalaması

8.11.3 Ortalamanın güven aralığı (μ)

Bilinmeyen bir popülasyon parametresinin değerini içermesi muhtemel, örnek istatistiklerden türetilen bir dizi değer. Rastgele yapıları nedeniyle, belirli bir

popölasyondan iki örneğın aynı güven aralıklarını vermesi olası değildir. Ancak örneğınızı birçok kez tekrarlırsanız, elde edilen güven aralıklarının belirli bir yüzdesi bilinmeyen popölasyon parametresini içerecektir. Parametreyi içeren bu güven aralıklarının yüzdesi, aralığın güven düzeyidir. Güven aralığı, bir nokta tahmini hesaplanarak ve ardından hata payı belirlenerek belirlenir (Denklem 4). Bir değeri tahmin etmek için istatistikleri kullandığınızda, çalışmanız ne kadar iyi tasarlanmış olursa olsun, tahmininizin rastgele örnekleme hatasına tabi olduğunu unutmamak önemlidir. Hata payı, bu hatayı ölçer ve tahmininizin kesinliğini gösterir. İki taraflı bir güven aralığı için, hata payı, tahmin edilen istatistikten her bir güven aralığı değerine olan mesafedir. Bir güven aralığı simetrik olduğunda, hata payı güven aralığının genişliğinin yarısıdır. Hata payı ne kadar büyükse, aralık o kadar genişir ve nokta tahmininin değeri hakkında o kadar az emin olabilirsiniz (WEB6).

$$GS = \bar{x} \pm \frac{t \cdot SD}{\sqrt{N}}$$

Denklem 4. Güven limiti denklemi

$\bar{x}$: Numune değerlerinin ortalaması

SD: Standart sapma

n: Değer sayısı

GS: güven limiti

BÖLÜM II

9. DENEYSEL BÖLÜM

Altı enerji içeceği numunesi, sildenafil, vardenafil ve tadalafil içerikleri açısından analiz edilmiştir. Numunelere rastgele A, B, C, D, E ve F isimleri verilmiştir. Tüm numuneler Tekirdağ ilindeki büfelerden satın alınmıştır. Numunelerin şişesi üzerinde verilen ifadelere göre, A, D, E ve F numunelerinin menşei İstanbul olduğu belirtilirken, B ve C numunelerinde herhangi bir üretim yeri belirtilmemektedir. Tüm markalar, aynı üretim partisinden üç kopya halinde analiz edilmiştir. Hiçbir markanın şişe üzerinde bulunan etiketlerinde sildenafil, vardenafil ve tadalafil bileşenleri içerdiği belirtilmemektedir. Plasebo olarak Red Bull markasına ait enerji içeceği kullanılmıştır.

Geliştirilen UPLC-MS metodunun validasyonu için seçicilik, doğrusallık, algılama limiti, tayin limiti, aralık, doğruluk, sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik, ara keskinlik ve sağlamlık (Metot Parametreleri Değişiklikleri) parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Tüm analizler DEVA Holding Çerkezköy-II API üretim tesisi analitik laboratuvarında yapılmıştır.

9.1 Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

9.1.1 Kimyasal maddeler

- Sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil EP (Avrupa Farmakopisi) referans standartları. (Kullanılan referans standartlara ait analiz sertifikaları EK-1, EK-2, EK-3, EK-4, EK-5 ve EK-6’da verilmiştir.)
- Formik asit (%98 – 100, Merck)
- Asetonitril (Analitik Kalitede) (J.T.Baker)

- Ultra saf su Merck Milipore su sistemi tarafından sağlanmıştır.

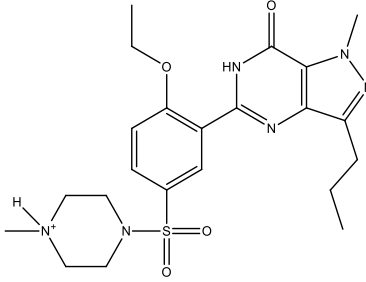
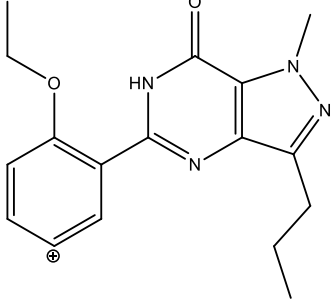
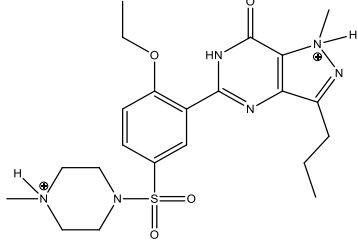
9.1.2 Araç ve gereçler

- UPLC Cihazı: Waters Acquity H-Class UPLC system
- Mass Detector: QDA/ ESI negatif (–) ve pozitif (+)
- UPLC Kolonu: Waters Acquity BEH C₈ (2.1 mm x 100 mm 1.7 µm) (ABD)
- Su Saflaştırma Sistemi: Millipore Gradient
- Manyetik Karıştırıcı: Heidolph MR 3001
- Analitik Terazî: Sartorius LA 200
- Otomatik pipetler: Eppendorf ve Nichipet EX II
 - 100-1000 µl
 - 500-5000 µl arasında
- Ultrasonik Banyo
- Balon jojeler: İso-Lab DIN EN ISO 1042 ve DIN/ISO Class “A” sertifikalı

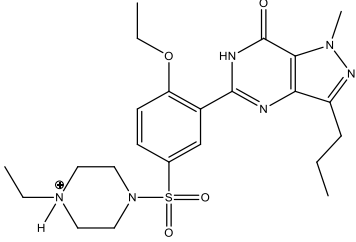
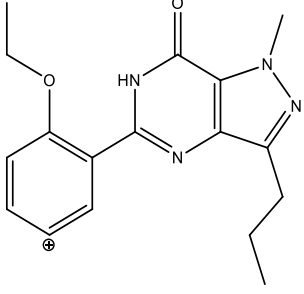
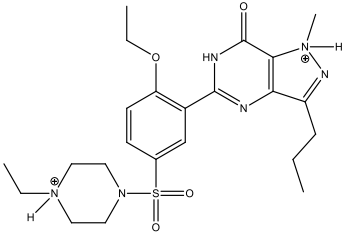
9.2 Standartların İyonlaşma Kütleleri

İlk olarak standartların UPLC-MS analizleri yapılarak iyonlaşma kütleleri belirlenmiş ve bu doğrultuda analiz metodu geliştirilmeye başlanmıştır. Standartlara ait iyonlaşma spektrumları Şekil 9’da, iyonlaşma kütleleri Tablo 9, Tablo 10 ve Tablo 11’de verilmiştir.

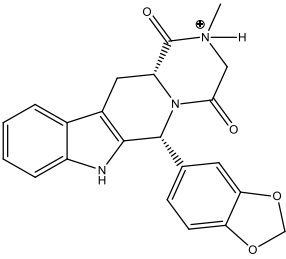
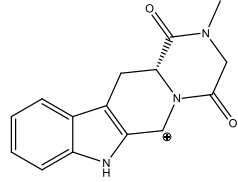
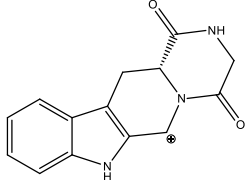
Tablo 9. Sildenafil iyonlaşma kütleleri

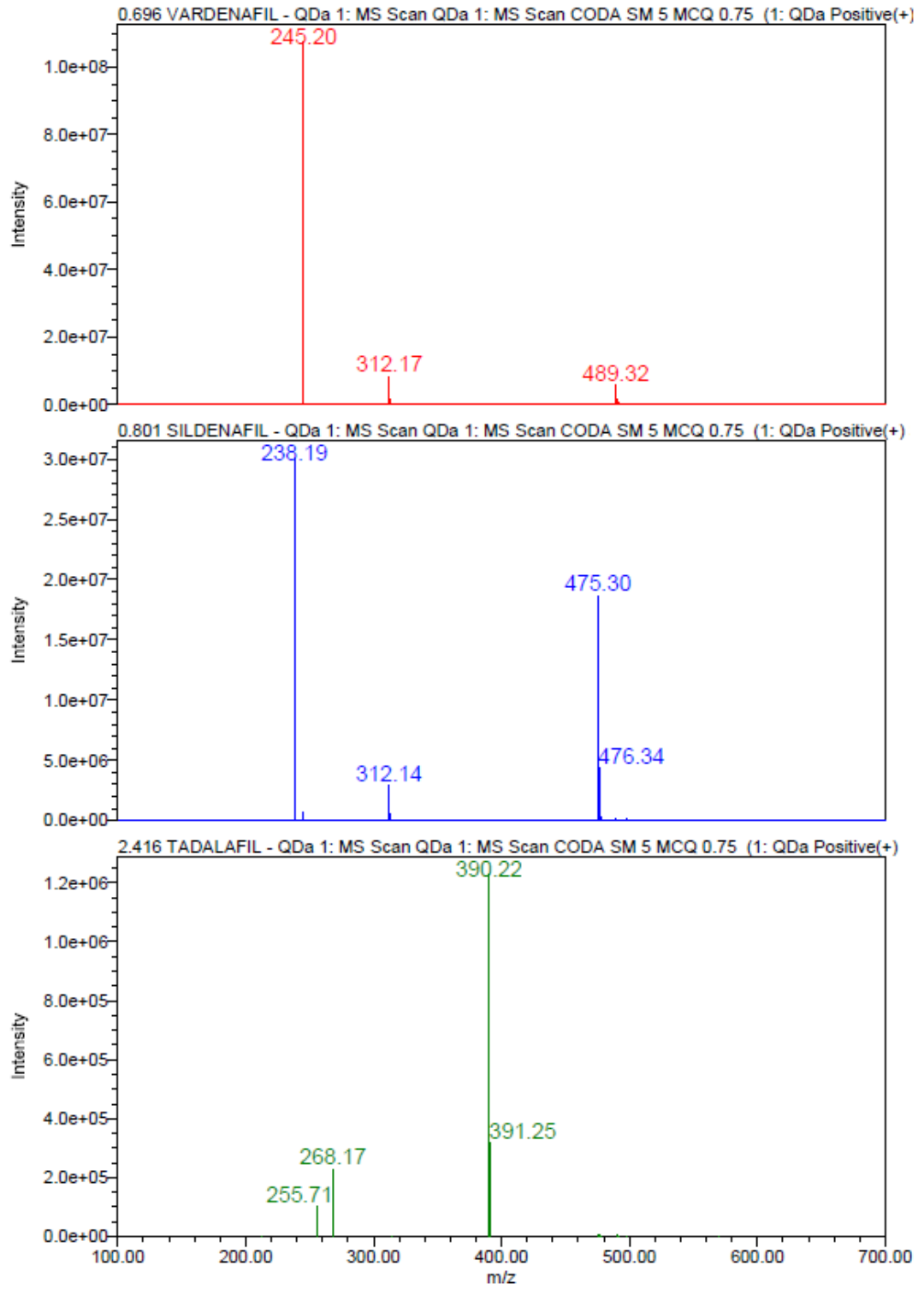
Hesaplanan m/z	Bulunan m/z	Pozitif iyon
475.21	475.30	 Kimyasal formül: $C_{22}H_{31}N_6O_4S^+$ m/z: 475.21
312.15	312.14	 Kimyasal formül: $C_{17}H_{19}N_4O_2^+$ m/z: 312.15
238.11	238.19	 Kimyasal formül: $C_{22}H_{32}N_6O_4S^{2+}$ m/z: 238.11

Tablo 10. Vardenafil iyonlaşma kütleleri

Hesaplanan m/z	Bulunan m/z	Pozitif iyon
489.32	489.23	 Kimyasal formül: $C_{23}H_{33}N_6O_4S^{2+}$ m/z: 489.23
312.15	312.14	 Kimyasal formül: $C_{17}H_{19}N_4O_2^{+}$ m/z: 312.15
245.12	245.20	 Kimyasal formül: $C_{23}H_{34}N_6O_4S^{2+}$ m/z: 245.12

Tablo 11. Tadalafil iyonlaşma kütleleri

Hesaplanan m/z	Bulunan m/z	Pozitif iyon
390.15	390.22	 Kimyasal formül: $C_{22}H_{20}N_3O_4^+$ m/z: 390.15
268.11	268.17	 Kimyasal formül: $C_{15}H_{14}N_3O_2^+$ m/z: 268.11
255.10	255.71	 Kimyasal formül: $C_{14}H_{12}N_3O_2^+$ m/z: 255.10



Şekil 9. Vardenafil, sildenafil ve tadalafil'in pozitif (+) iyonlaşma kütleleri

9.3 Miktar Tayini Metot Validasyonunda İncelenen Parametreler

Aşağıdaki parametreler sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil'in miktar tayini yöntemi için analitik metot validasyonunda incelenmiştir:

- Seçicilik
- Doğrusallık
- Algılama Limiti (LOD)
- Tayin Limiti (LOQ)
- Aralık
- Doğruluk
- Kesinlik (Sistem kesinlik, Tekrarlanabilirlik, Ara kesinlik)
- Sağlamlık (Metot Parametreleri Değişiklikleri)

9.4 Validasyon Çalışmasındaki Kromatografik Koşullar, Kullanılan Ekipmanlar ve Ekipman Parametreleri

Kolon;

Tip	: Water Acquity BEH C ₈
Partikül boyut	: 1.7 µm
Uzunluk	: 100 mm
Çap	: 2.1 mm
Kolon sıcaklığı	: 30 °C
Numune sıcaklığı	: 25 °C
Akış hızı	: 0.3 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 3.0 µl
Analiz süresi	: 4 dk
Elüsyon	: İzokratik (%60 MF-A ve %40 MF-B)

Ekipman;

Cihaz	: Kütle dedektörlü UPLC sistemi
-------	---------------------------------

Dedektör	: Kütle dedektörü
İyonlaşma	: ESI-pozitif ve negatif
Tespit edilen iyon m/z (SIM)	: 474.58 Da (sildenafil), 488.60 Da (vardenafil), 389.40 Da (tadalafil)

Ekipman parametreleri;

Prop sıcaklığı	: 600 °C
Cone voltaj (V)	: 15 V
Capiler voltaj (kV)	: 0.8 kV
Gain	: 1

Mobil fazlar;

Mobil faz A: 1.0 L suya 1.0 mL formik asit eklenir.

Mobil faz B: Asetonitril

Çözücü: Asetonitril ve su karışımı (50: 50, h/h)

9.5 Validasyon Çalışmasında Kullanılacak Standart ve Numune Çözeltilerin Hazırlanmaları ve Hesaplamalar

Standart olarak; sildenafil (potens; %98.4), vardenafil hidroklorür (potens; %90.5) ve tadalafil (potens; %100.0) kullanıldı.

9.5.1 Standart Çözeltisi Kabul Kriterleri

Standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen sildenafil, tadalafil ve vardenafil pik alanlarının bağıl standart sapması (RSD) $\leq$ % 5.0 olmalıdır.

9.5.2 Stok çözeltilerinin hazırlanması

Her bir standart için EP (European Pharmacopoeia, Avrupa Farmakopesi) sertifikalarında belirtilen potensleri de dikkate alınarak tartım miktarları ve seyreltme hacimleri hesaplanarak stok çözeltisi hazırlandı.

9.5.2.1 Sildenafil stok çözeltisinin hazırlanması

14.26 mg Sildenafil referans standardı 100.0 mL’lik balon jojeye tartıldı. Su ile çözülüp hacmine tamamlandı.

9.5.2.2 Vardenafil hidroklorür stok çözeltisinin hazırlanması

11.88 mg vardenafil hidroklorür referans standardı 100.0 mL’lik balon jojeye tartıldı. Çözücü ile çözülüp hacmine tamamlandı.

9.5.2.3 Tadalafil için stok çözeltisinin hazırlanması

10.00 mg tadalafil referans standardı 100.0 mL’lik balon jojeye tartıldı. Asetonitril ile çözülüp hacmine tamamlandı.

9.5.2.4 Stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisinin hazırlanması

Sildenafil, vardenafil ve tadalafil stok çözeltilerinden 2.0’şer mL 20.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

9.5.2.5 Stok LOQ standart çözeltisinin hazırlanması

Sildenafil stok çözeltisinden 1.40 mL, vardenafil hidroklorür stok çözeltisinden 0.95 mL ve tadalafil stok çözeltisinden 3.30 mL 50.0 mL’lik balon jojeye alındı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 2.0 mL alınıp 20 mL’lik balon jojeye alınıp hacmine tamamlandı (Denklem 5).

Seviye – 1 (LOQ): 1.0 mL LOQ stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}} = 0.0028 \mu\text{g/mL}$ $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}} = 0.0019 \mu\text{g/mL}$ $C_{\text{Tadalafil}} = 0.0066 \mu\text{g/mL}$).

$$\frac{Ws}{100} \times \frac{2}{20} \times \frac{x}{50} \times \frac{1}{100} \times P = C_{\text{LOQ}}$$

Denklem 5. LOQ konsantrasyonunda numune hazırlama denklemi

W_s : Standart tartımı (mg)

P: Potens

X: Stok çözeltiden alınan numune hacmi (mL)

C_{LOQ} : S/N oranına göre hesaplanan LOQ konsantrasyonu

Seviye – 2 (%50): 0.5 mL stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}}$, $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}}$, $C_{\text{Tadalafil}} = 0.005 \mu\text{g/mL}$).

Seviye – 3 (%75): 0.75 mL stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}}$, $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}}$, $C_{\text{Tadalafil}} = 0.075 \mu\text{g/mL}$).

Seviye – 4 (%100): 1.0 mL stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}}$, $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}}$, $C_{\text{Tadalafil}} = 0.100 \mu\text{g/mL}$).

Seviye – 5 (%150): 1.5 mL stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}}$, $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}}$, $C_{\text{Tadalafil}} = 0.150 \mu\text{g/mL}$).

Seviye – 6 (%200): 2.0 mL stok standart çözeltisi 100.0 mL’lik balon jojeye alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Sildenafil}}$, $C_{\text{Vardenafil hidroklorür}}$, $C_{\text{Tadalafil}} = 0.200 \mu\text{g/mL}$).

9.5.2.6 LOD çözeltisinin hazırlanması

LOQ çözeltisinden 3.0 mL 10.0 mL’lik balon jojelere alındı ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

9.5.3 Numunelerin hazırlanması

Numune stok çözeltileri hazırlanmadan önce tüm numuneler ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca degaze edildi. Sildenafil, vardenafil ve tadalafil standartları ile yapılan doğrusalılık çalışmaları neticesinde numune hazırlığındaki seyreltmeler numune alanları doğrusalılık limiti içerisinde kalacak şekilde yapılmıştır.

Numune – A: 150.0 mL’lik Numune – A’dan 1.0 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 5.0 mL’si çözücü ile 25.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 50.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Numune – B (Validasyon numunesi): 150.0 mL’lik Numune – B’den 0.5 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2.0 mL’si çözücü ile 10.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 100.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Numune – C: 15.0 mL’lik Numune – C’den 1.0 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 5.0 mL’si çözücü ile 25.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 150.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Numune – D: 15.0 mL’lik Numune – D’den 1.0 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 5.0 mL’si çözücü ile 25.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 0.285 mL’si 100.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Numune – E: 30.0 mL’lik Numune – E’den 1.0 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 5.0 mL’si çözücü ile 25.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 5.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Numune – F: 25.0 mL’lik Numune – F’den 1.0 mL alınarak 50.0 mL’lik balon jojeye transfer edildi ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 5.0 mL’si çözücü ile 25.0 mL’ye seyreltildi. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 100.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Plasebo: 150.0 mL’lik Plasebo’dan 0.5 mL alınarak 50.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2.0 mL’si 10.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1.0 mL’si 100.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

9.6 Seçicilik

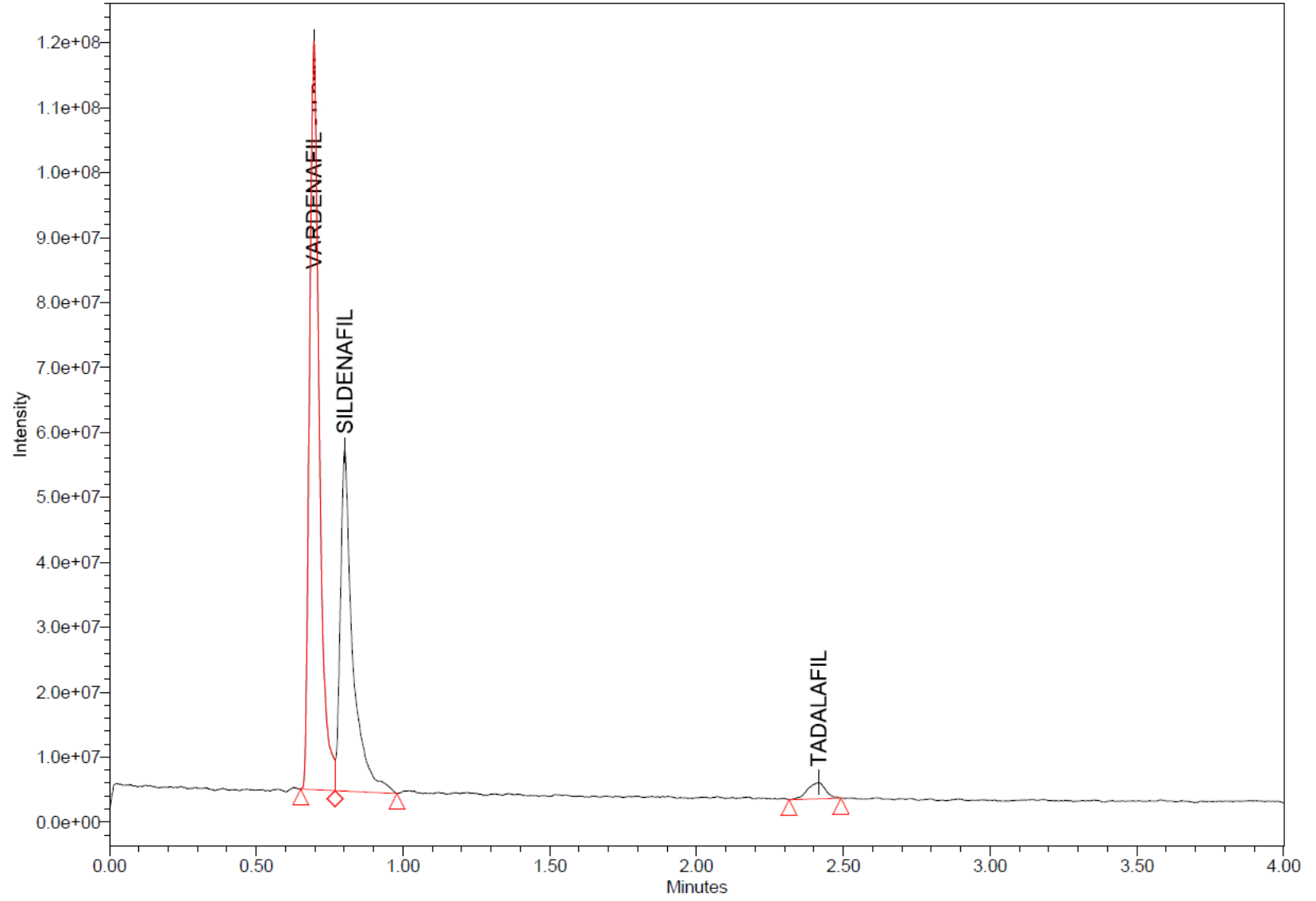
Seçicilik çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olası için, sildenafil, vardenafil ve tadalafil pikleri kromatografik olarak ayırım göstermelidir. Sildenafil, vardenafil ve tadalafil piklerinin alıkonma zamanında plasebo ve çözücünden pik gelmemelidir. Plasebo ve çözücü spektrumlarında sildenafil, vardenafil ve tadalafil’in molekül ağırlığına eşit kütle değerleri gözlemlenmemelidir.

9.6.1 Seçicilik sonuçları

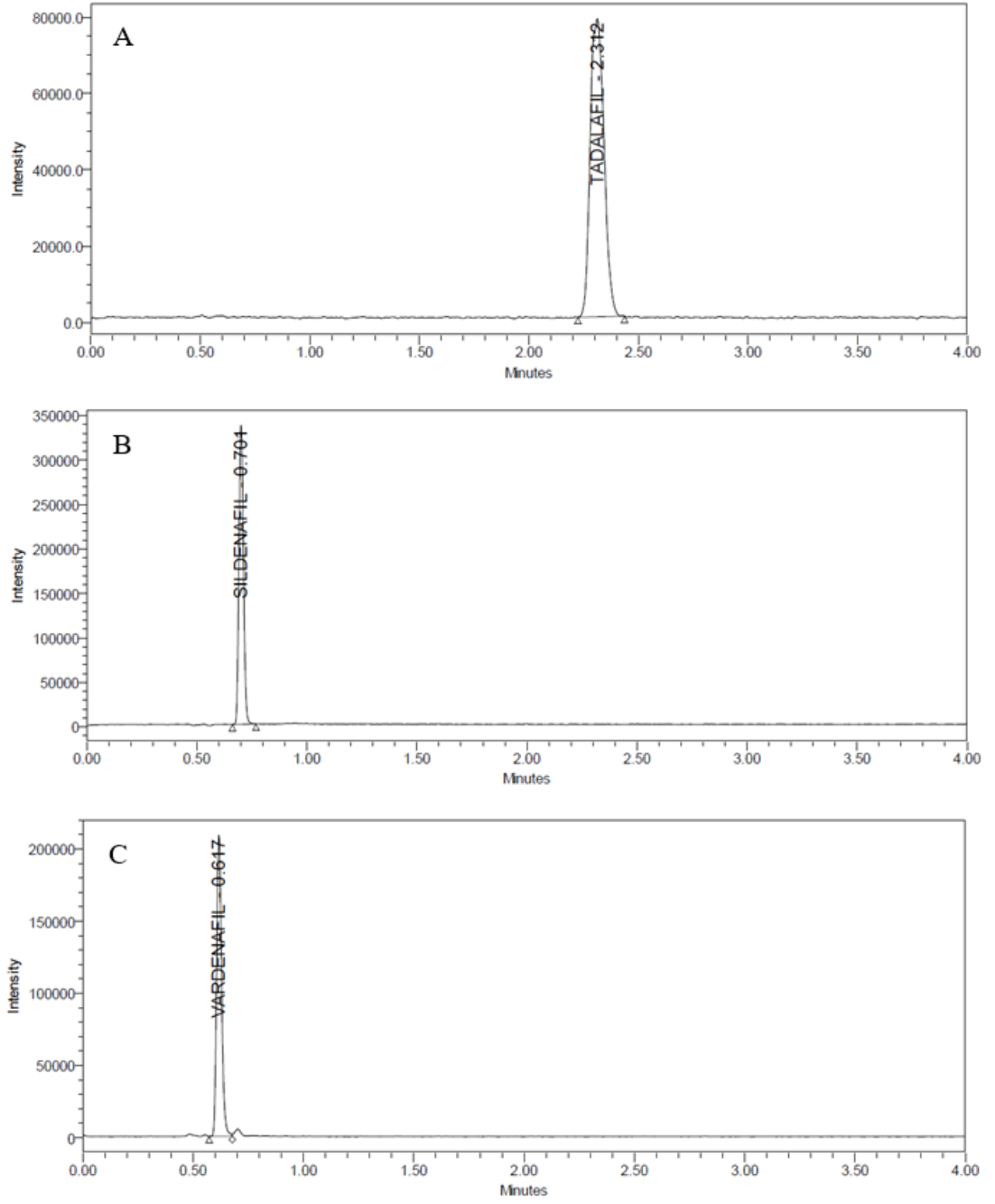
Sildenafil, vardenafil ve tadalafil pikleri arasında kromatografik ayırım sağlanmıştır (Şekil 10). Sildenafil, vardenafil ve tadalafil piklerinin alıkonma zamanında plasebo ve çözücüde pik gözlenmemiştir. (Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13). Plasebo ve çözücü spektrumlarında sildenafil, vardenafil ve tadalafil’in molekül ağırlığına eşit kütle değerleri gözlenmemiştir. Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13’teki kromatogramlara göre metot seçicidir. Seçicilik kabul kriterlerine göre incelenen sonuçlar uygun bulunmuştur. Standartların alıkonma zamanları Tablo 12’de verilmiştir.

Tablo 12. Seçicilik parametresine ait sonuçlar

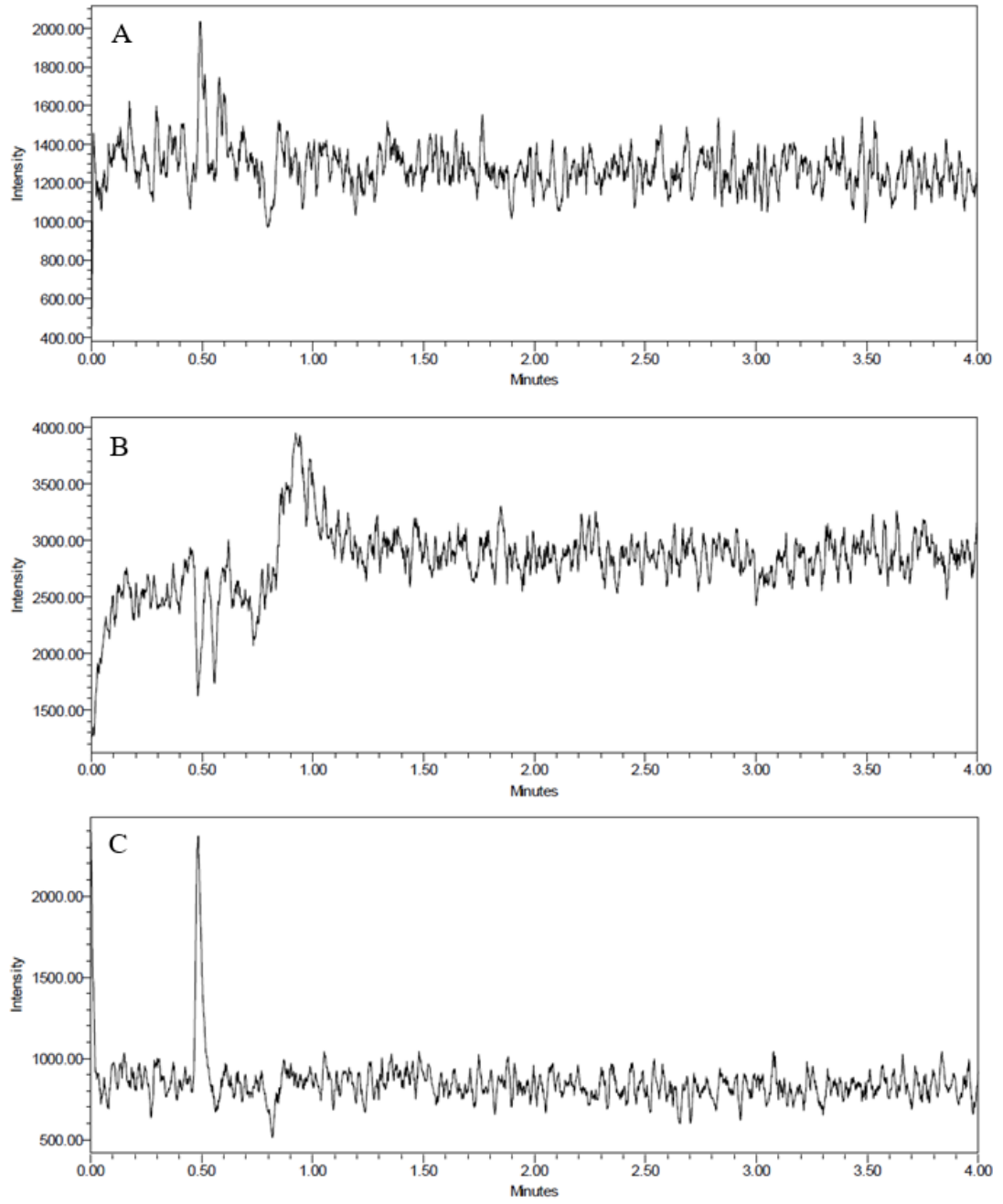
Standartlar	Alıkonma Zamanı (dk)
Sildenafil	0.70
Vardenafil	0.62
Tadalafil	2.31



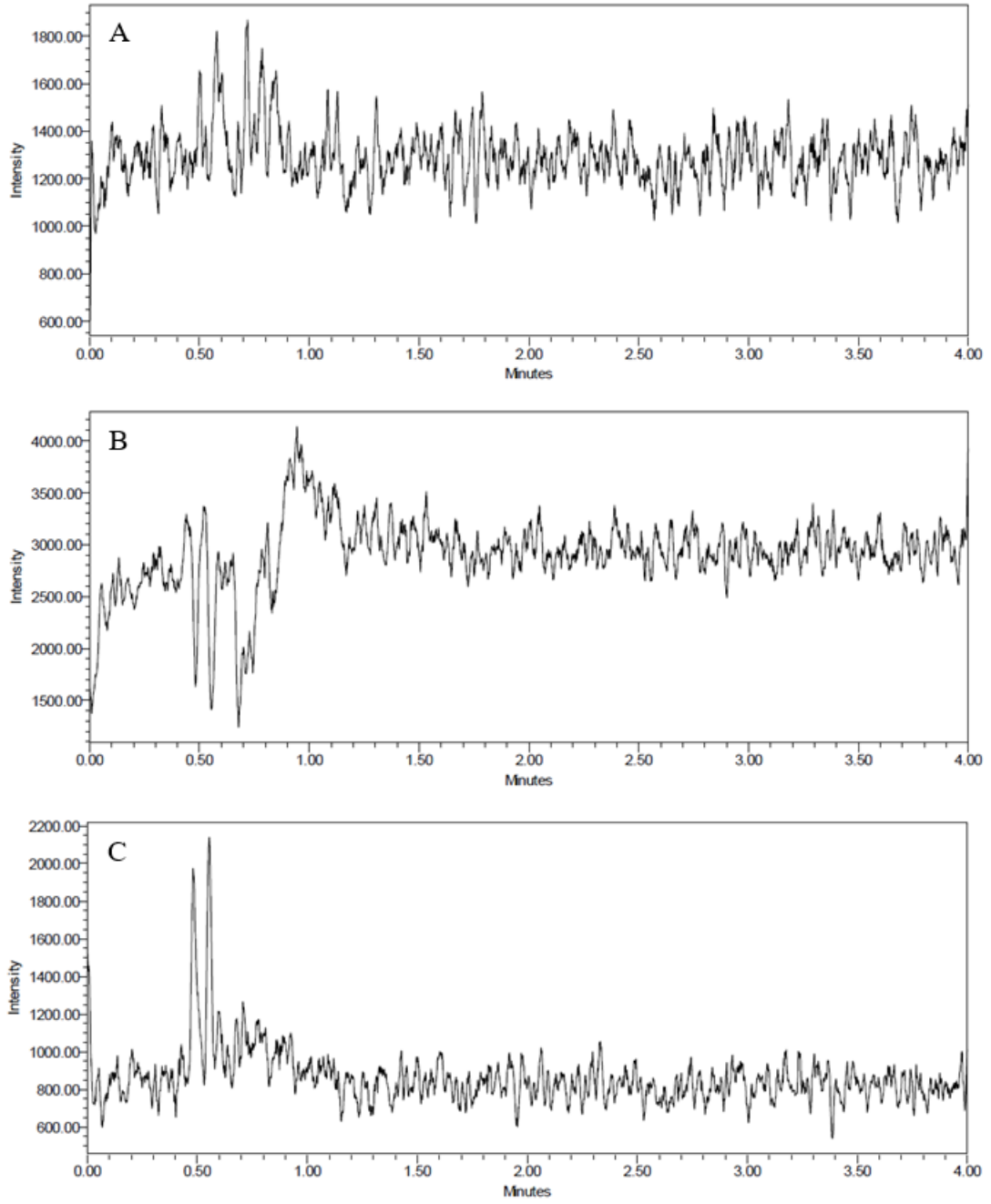
Şekil 10. Stok standart çözeltisinde sildenafil, vardenafil ve tadalafil piklerinin kromatografik ayırım kromatogramı



Şekil 11. Stok standart çözeltisinde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı



Şekil 12. Çözücü sisteminde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı



Şekil 13. Plasebo çözeltisinde tadalafil (A), sildenafil (B) ve vardenafil (C) kütlelerinin tarama kromatogramı

9.7 Doğrusallık

LOQ ile spesifikasyon limitinin %200'sine karşılık gelen aralıkta 6 farklı konsantrasyonda (LOQ, %50, %75, %100, %150 ve %200) standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltiden 3'er enjeksiyon, LOQ ve maksimum

(%200'lik) seviyelerde 6 kez enjeksiyon yapıldı.

Doğrusallık sonuçlarının uygunluğunun kabul edilebilir olması için, korelasyon kat sayısı 0.98'den az olmamalıdır. Kesim noktası: %100 derişime karşılık gelen alanın %10'undan fazla olmamalıdır. Eğim (m) raporlanır. Karelerin farklarının toplamı (RSS) raporlandırılır.

$$\frac{Y - \text{kesim noktası}}{\%100 \text{ seviyedeki alan}} \times 100 < \%10$$

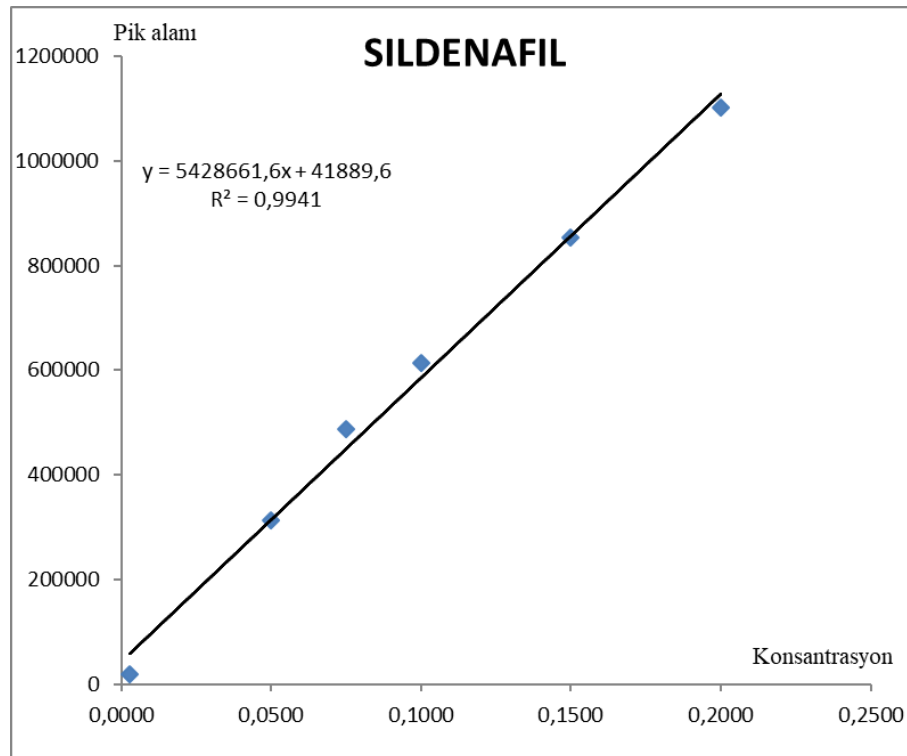
Doğrusallık analizlerinde Seviye – 1 (LOQ), Seviye – 2 (%50), Seviye – 3 (%75), Seviye – 4 (%100), Seviye – 5 (%150), Seviye – 6 (%200) çözeltileri kullanılmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanması Bölüm 9.5.2.5'te verilmiştir.

9.7.1 Doğrusallık sonuçları

Doğrusallık çalışma sonuçları sildenafil için Şekil 14 ve Tablo 13'te, vardenafil için Şekil 15 ve Tablo 14'te ve tadalafil için Şekil 16 ve Tablo 15'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Şekil 14, Şekil 15 ve Şekil 16'da gösterilen grafiklerde korelasyon katsayısı sildenafil, vardenafil ve tadalafil için sırasıyla 0.994, 0.999 ve 0.999 olarak bulunmuştur. Kesim noktası: %100 derişime karşılık gelen alanın sildenafil için %6.8, tadalafil için %0.0 ve vardenafil için %4.4 hesaplanarak kabul kriterleri sağlanmıştır.

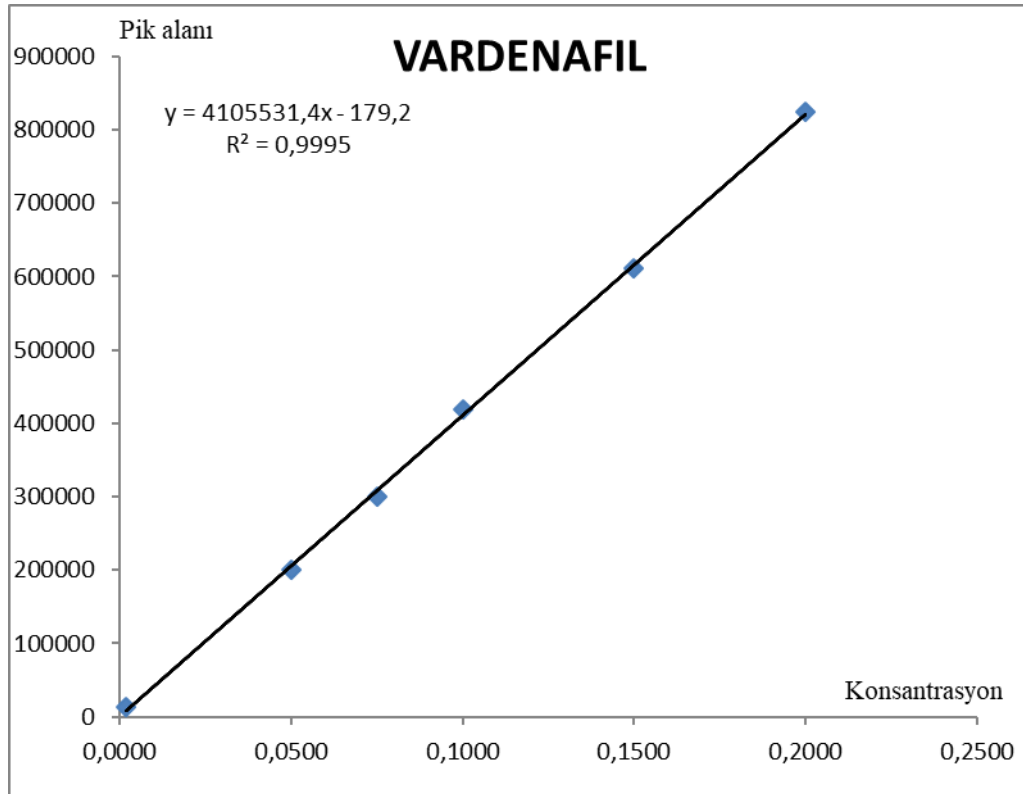
Tablo 13. Sildenafil doğrusallık çalışma sonuçları

Seviyeler	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Alanlar- Y1 (AU)	Hesaplanan alanlar- Y2(AU)	Farkların Karesi (Y1-Y2) ²
LOQ	0.0028	19451	57090	1416694321
50%	0.050	312970	313323	124609
75%	0.075	486353	449039	1392334596
100%	0.100	614560	584756	888278416
150%	0.150	852801	856189	11478544
200%	0.200	1101883	1127622	662496121
RSS				3708910486
Korelasyon katsayısı				0.9941
Eğim				5428661.6
y-kesim noktası				41889.6
y-kesim noktası x100 / % seviyedeki alan				6.8

**Şekil 14.** Kalibrasyon eğrisi (Sildenafil)

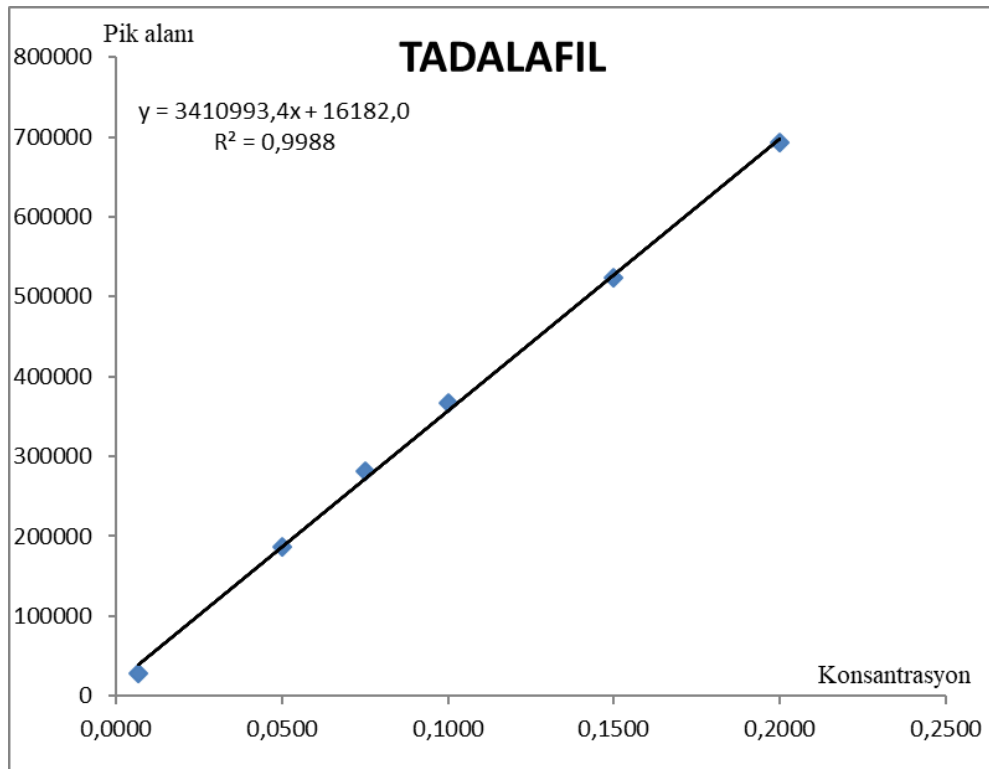
Tablo 14. Vardenafil doğrusallık çalışma sonuçları

Seviyeler	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Alanlar- Y1 (AU)	Hesaplanan alanlar- Y2(AU)	Farkların Karesi (Y1-Y2) ²
LOQ	0.0019	13104	7621	30063289
50%	0.050	201041	205097	16451136
75%	0.075	299285	307736	71419401
100%	0.100	418790	410374	70829056
150%	0.150	610392	615651	27657081
200%	0.200	824794	820927	14953689
RSS				216419963
Korelasyon katsayısı				0.9995
Eğim				4105531.4
y-kesim noktası				-179.2
y-kesim noktası x100 / % seviyedeki alan				0.0

**Şekil 15.** Kalibrasyon eğrisi (Vardenafil)

Tablo 15. Tadalafil doğrusallık çalışma sonuçları

Seviyeler	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Alanlar- Y1 (AU)	Hesaplanan alanlar-Y2(AU)	Farkların Karesi (Y1-Y2) ²
LOQ	0.0066	28788	38695	98148649
50%	0.050	186415	186732	100489
75%	0.075	281138	272007	83375161
100%	0.100	367440	357281	103205281
150%	0.150	523954	527831	15031129
200%	0.200	693191	698381	26936100
RSS				299860709
Korelasyon katsayısı				0.9988
Eğim				3410993.4
y-kesim noktası				16182
y-kesim noktası x100 / % seviyedeki alan				4.4

**Şekil 16.** Kalibrasyon eğrisi (Tadalafil)

9.8 Çalışma Aralığı

Doğrusallık çalışmasında, minimum ve maksimum derişimdeki alanlar kullanılmıştır. Burada sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil karışım çözeltisi 6 kez enjekte edilmiş ve ortalamaları alınmıştır. Çalışma aralığının uygunluğunun kabul edilebilmesi için minimum ve maksimum seviyede alanların da $RSD \leq \%5.0$ olmalıdır.

9.8.1 Çalışma aralığı sonuçları

Çalışma aralığı sonuçları Tablo 16’da verilmiştir. Tüm standartlar için minimum ve maksimum seviyelerde $RSD \leq \%5.0$ bulunmuştur. Bu çalışmaya göre elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygundur.

Tablo 16. Çalışma aralığı sonuçları

	Enjeksiyonlar	Sildenafil	Vardenafil	Tadalafil
Min. Derişim alanları	1	18390	12173	29042
	2	18724	12829	26712
	3	18931	13130	28631
	4	20553	13386	29653
	5	20388	14042	29307
	6	19717	13064	29381
	Ortalama	19450.5	13104.0	28787.7
	SS	904.2	617.1	1074.1
	% RSD	4.6	4.7	3.7
Maks. Derişim alanları	1	1090713	801784	695763
	2	1070701	807760	688189
	3	1127137	812469	686081
	4	1118493	826296	700193
	5	1095932	855054	683159
	6	1108321	845401	705761
	Ortalama	1101882.8	824794.0	693191.0
	SS	20433.3	21513.2	8830.2
	% RSD	1.9	2.6	1.3

9.9 Algılama ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ)

Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil karışım çözeltisi 6 kez enjekte edildi ve sinyal/gürültü oranları hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü oranı sonuçlarına göre, LOD ve LOQ limitleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama (Denklem 6);

$$\text{LOD} = \frac{3}{\text{S/N}} \times C \quad \text{LOQ} = \frac{10}{\text{S/N}} \times C$$

Denklem 6. LOD ve LOQ hesaplama denklemi

SN: Sinyal-Gürültü oranı

C: Standart çözeltideki konsantrasyonlar (µg/mL).

LOD çözeltisi 3 kez enjekte edildi. LOQ çözeltisi 6 kez enjekte edildi.

Algılama ve tayin limiti çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olması için, LOQ tüm standartlar için raporlama seviyesinden büyük olmamalıdır. 6 LOQ çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen alanlarında $\text{RSD} \leq 5.0\%$ olmalıdır. Sinyal/gürültü oranı LOD konsantrasyonunda ≥ 3 olmalıdır. Sinyal/gürültü oranı LOQ konsantrasyonunda ≥ 10 olmalıdır.

Algılama ve tayin limiti çözeltileri olarak, spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.5 (Seviye – 4)), LOQ çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.5 (Seviye – 1)) LOD çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.6) kullanıldı.

9.9.1 Algılama ve tayin limiti sonuçları

Standartların sinyal/gürültü oran sonuçları Şekil 17 ve Tablo 17’de LOD ve LOQ sonuçları Şekil 18 ve Tablo 18’de, LOQ alan sonuçları Tablo 19’da verilmiştir. Sinyal/gürültü oranı LOD konsantrasyonunda ≥ 3 , LOQ konsantrasyonunda ≥ 10 olarak bulunmuştur. 6 kez enjekte edilen LOQ çözeltisinden elde edilen alanlarında $\text{RSD} \leq 5.0\%$ bulunmuştur.

Tablo 17. Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil'in S/N oran sonuçları

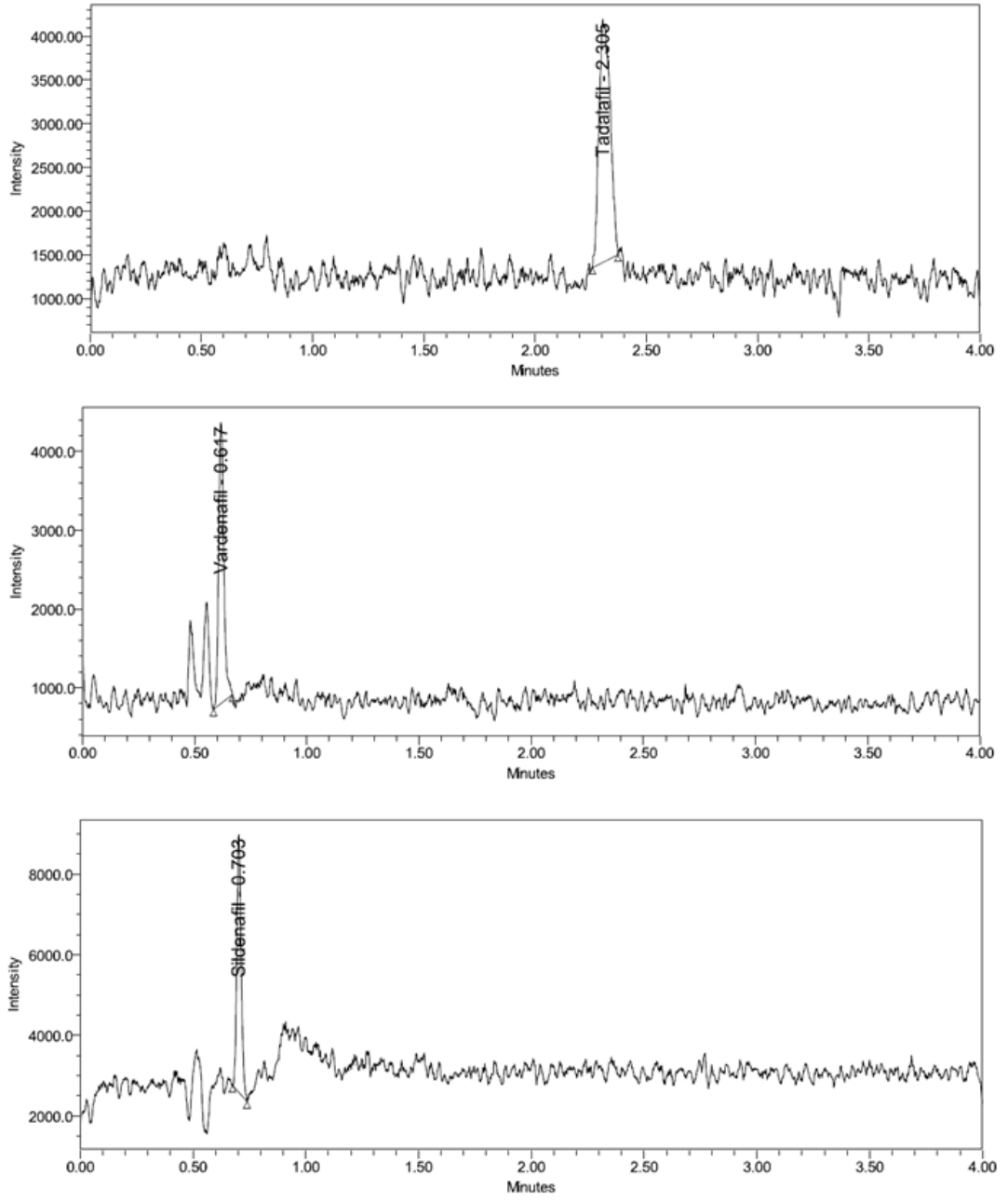
Standartlar	Konsantrasyonlar (µg/mL)	Sinyal/gürültü oranları (S/N)
Sildenafil	0.10	363
Vardenafil hidroklorür	0.10	515
Tadalafil	0.10	151

Tablo 18. LOD ve LOQ sonuçları % ve çözelti konsantrasyonları

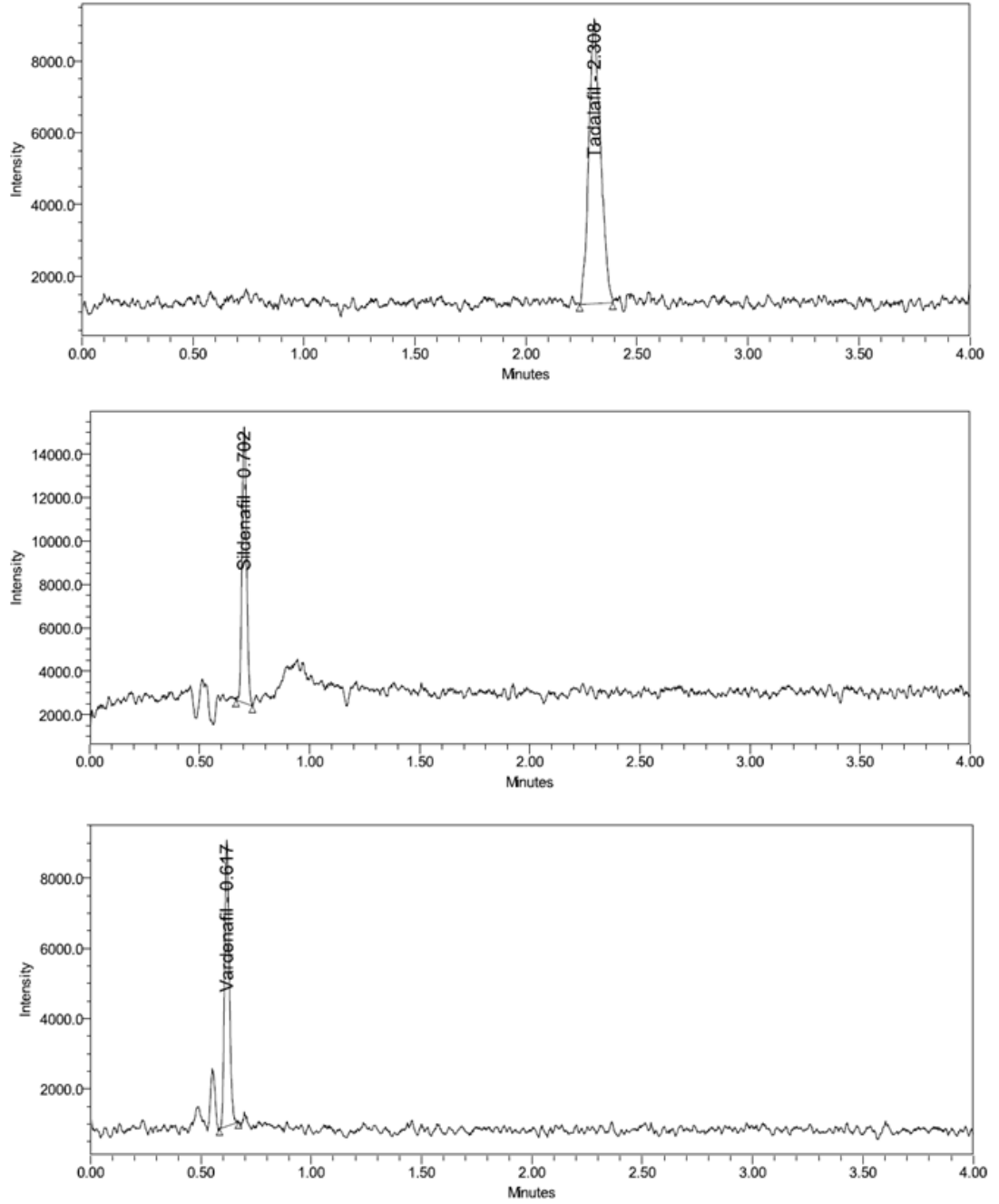
Standartlar	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	S/N	
			LOD	LOQ
Sildenafil	0.00084	0.0028	7	10
Vardenafil hidroklorür	0.00057	0.0019	6	14
Tadalafil	0.00198	0.0066	5	13

Tablo 19. LOQ alan sonuçları

Enjeksiyonlar No	Sildenafil	Vardenafil	Tadalafil
1	18390	12173	29042
2	18724	12829	26712
3	18931	13130	28631
4	20553	13386	29653
5	20388	14042	29307
6	19717	13064	29381
Ortalama	19450.5	13104.0	28787.7
SS	904.2	617.1	1074.1
% RSD	4.6	4.7	3.7



Şekil 17. Tadalafil, vardenafil ve sildenafil'in LOD çalışmasının kromatografik sonucu



Şekil 18. Tadalafil, sildenafil ve vardenafil'in LOQ çalışmasının kromatografik sonucu

9.10 Doğruluk

LOQ konsantrasyonunda ve spesifikasyon limitinin %50, %100 ve %150'sine karşılık gelen konsantrasyonlarda plaseboya sildenafil, vardenafil ve tadalafil eklendi. Her seviyede 3'er numune hazırlandı, her biri 1 kez enjekte edildi.

Doğruluk çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olması için, her bir geri kazanım %80.0 – %120.0 arasında olmalıdır. LOQ düzeyinde geri kazanım %70.0 – %130.0 arasında olmalıdır.

Doğruluk çözeltileri olarak; sildenafil stok çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.1), vardenafil hidroklorür stok çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.2), tadalafil stok çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.3), sildenafil, vardenafil ve tadalafil stok çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.4), LOQ stok çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.5) kullanıldı. Bunların haricinde aşağıda hazırlığı anlatılan çözeltiler kullanıldı.

Stok Plasebo: 150.0 mL’lik numune hacmine sahip Plasebo’dan 0.5 mL alınarak 50.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2.0 mL’si 10.0 mL’lik balon jojeye aktarıldı ve çözücü ile hacmine tamamlandı.

Doğruluk numune çözeltisi 1 (LOQ seviyesi): Stok LOQ çözeltisinden 1.0 mL ve stok plasebo çözeltisinden 1.0 mL alınarak 100.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı.

Doğruluk numune çözeltisi 2 (%50 seviyesi): Stok standart çözeltisinden 0.5 mL ve stok plasebo çözeltisinden 1.0 mL alınarak 100.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı.

Doğruluk numune çözeltisi 3 (%100 seviyesi): Stok standart çözeltisinden 1.0 mL ve stok plasebo çözeltisinden 1.0 mL alınarak 100.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı.

Doğruluk numune çözeltisi 4 (%150 seviyesi): Stok standart çözeltisinden 1.5 mL ve stok plasebo çözeltisinden 1.0 mL alınarak 100.0 mL’lik balon joje de hacmine tamamlandı.

Hesaplama (Denklem 7, Denklem 8):

Teorik miktar: Plasebo üzerine eklenen numune konsantrasyonu (µg/mL)

$$\text{Deneyisel miktar} = C_{std} \times \frac{A_N}{A_{std}}$$

Denklem 7. Deneyisel miktar hesaplama formülü

C_{std} : Standart konsantrasyonu (µg/mL)

A_N : Numune alanı

A_{std} : Standart alanı

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{Deneyisel miktar}}{\text{Teorik miktar}} \times 100$$

Denklem 8. Geri kazanım hesaplama denklemi

9.10.1 Doğruluk sonuçları

Doğruluk çalışması sonuçları Sildenafil için Tablo 20’de, vardenafil hidroklorür için Tablo 21’de ve tadalafil için Tablo 22’de verilmiştir. Doğruluk çalışmasında elde edilen sonuçlara göre her bir standart için geri kazanım %80.0 – %120.0 arasında bulunmuştur. LOQ düzeyinde geri kazanımları ise %70.0 – %130.0 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar doğruluk çalışmasının kabul kriterleri ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

Tablo 20. Sildenafil doğruluk çalışması sonuçları

Numune	Spike Derişim (µg/mL)	Teorik (µg/mL)	Deneyisel (µg/mL)	Geri kazanım (%)
LOQ	0.0028	0.0028	0.0028	100.0
		0.0028	0.0030	107.1
		0.0028	0.0031	110.0
%50	0.050	0.050	0.052	104.0
		0.050	0.051	102.0
		0.050	0.048	96.0
%100	0.100	0.100	0.110	110.0
		0.100	0.100	100.0
		0.100	0.010	100.0
%150	0.150	0.150	0.156	104.0
		0.150	0.159	106.0
		0.150	0.145	96.7

Tablo 21. Vardenafil hidroklorür doğruluk çalışması sonuçları

Numune	Spike Derişim (µg/mL)	Teorik (µg/mL)	Deneyisel (µg/mL)	Gerikazanım (%)
LOQ	0.0019	0.0019	0.00200	105.3
		0.0019	0.00210	110.5
		0.0019	0.00190	100.0
%50	0.0500	0.050	0.054	108.0
		0.050	0.052	104.0
		0.050	0.049	98.0
%100	0.1000	0.100	0.120	120.0
		0.100	0.110	110.0
		0.100	0.115	115.0
%150	0.1500	0.150	0.159	106.0
		0.150	0.152	101.3
		0.150	0.153	102.0

Tablo 22. Tadalafil doğruluk çalışması sonuçları

Numune	Spike Derişim (µg/mL)	Teorik (µg/mL)	Deneyisel (µg/mL)	Gerikazanım (%)
LOQ	0.0066	0.0066	0.0072	109.1
		0.0066	0.0069	104.5
		0.0066	0.0066	100.0
%50	0.0500	0.050	0.0550	110.0
		0.050	0.0620	120.0
		0.050	0.0490	98.0
%100	0.1000	0.100	0.1000	100.0
		0.100	0.1150	115.0
		0.100	0.1100	110.0
%150	0.1500	0.150	0.1600	106.7
		0.150	0.1620	108.0
		0.150	0.1540	102.7

9.11 Kesinlik

9.11.1 Sistem kesinliği

Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisi 6 kez enjekte edildi. Sistem kesinliği çalışmasının uygunluğunun kabul

edilebilir olması için, spesifikasyon limitinde sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisinin, 6 ardışık enjeksiyonunda elde edilen pik alanlarında $RSD \leq \%5.0$ olmalıdır. Sistem kesinliği çözeltileri olarak, spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisi (Bkz. Bölüm 9.5.2.4) kullanıldı.

9.11.2 Sistem kesinliği sonuçları

Sistem kesinlik sonuçları Tablo 23'te verilmiştir. Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisinin enjeksiyonları sonucunda elde edilen pik alanlarında $RSD \leq \%5.0$ bulunarak kabul kriterlerini sağladığı belirlenmiştir.

Tablo 23. Sistem kesinlik sonuçları

Enjeksiyon No	Alanlar		
	Sildenafil	Tadalafil	Vardenafil
1	484146	342559	326931
2	470793	351010	335994
3	460949	356165	322416
4	457971	350216	324749
5	462237	349088	329321
6	492662	347460	337107
Ortalama	471459,7	349416,3	329419,7
SD	14059,9	4465,0	5989,8
%RSD	3,0	1,3	1,8

9.11.3 Metot kesinliği

Her biri aynı hacim ve seyreltme oranında 6 numune analiz edildi. Metot kesinliği çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olması için; ardışık 6 numuneden elde edilen sonuçlarında $RSD \leq \%10.0$ olmalıdır. Burada ayrıca %95 güven aralığı hesaplanır.

Metot kesinliği çözeltileri olarak; Numune – B (Bkz. Bölüm 9.5.2.6) kullanılmıştır.

9.11.4 Metot kesinliği sonuçları

Sildenafil için metot kesinlik sonuçları Tablo 24’te verilmiştir. Numune – B’nin ardışık 6 analizinden elde edilen sonuçlarında RSD %3.2 bulunarak kabul kriterlerini sağladığı belirlenmiştir.

Tablo 24. Sildenafil metot kesinlik sonuçları

Numune	Numune Alanı	Standart Alanı	İçecek Hacmi (mL)	Toplam Seyreltme (mL)	Numunedeki miktar mg/150mL
1	88328	471459.7	150	50000	140.5
2	86441				137.5
3	89692				142.7
4	85762				136.4
5	93474				148.7
6	87217				138.7
Ortalama					140.7500
SD					4.5
%RSD					3.2
%95 Güven Aralığı					136.1 – 145.5
Standart Derişimi (mg/mL)					0,00010

Hesaplama (Denklem 9);

$$W = \frac{A_N \times C_{std} \times D}{A_{std}}$$

Denklem 9. Numune miktarı hesaplama

A_N : Numune alanı

C_{std} : Standart konsantrasyonu (mg/mL)

D : Seyreltme

A_{std} : Standart alanı

W : Numune miktarı (mg/ 150 mL)

Her numune 3 kez enjekte edilmiş olup, bulunan sonuçların ortalamaları alınmıştır. Numunelerdeki sildenafil miktar sonuçları Tablo 25’te verilmiştir. Numune – A’da 68.4 mg, numune – B’de 140.75 mg, numune – C’de 66.5 mg, numune – D’de 125.0 mg, numune – E’de 3.1 mg ve numune – F’de 53.2 mg sildenafil API’si tespit edilmiştir.

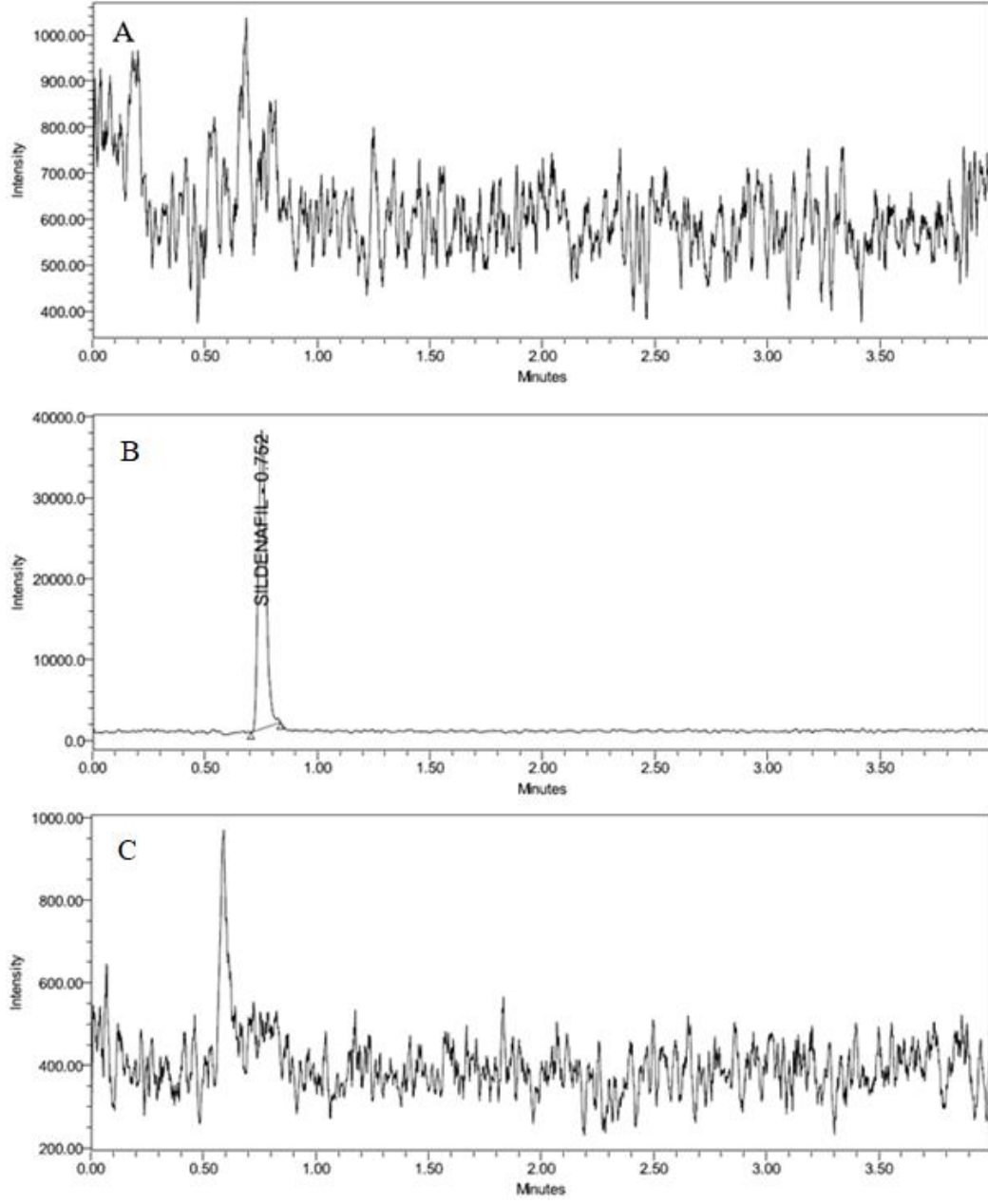
Tablo 25. Numunelerdeki sildenafil miktar sonuçları

Sildenafil							
Numune Adı	Numune Analiz Sayısı	İçecek Hacmi (mL)	Numunedeki miktar mg/ X mL	Ortalama mg/ X mL	SD	%95 Güven Aralığı	Standart Derişimi (mg/mL)
Numune A	1	150 mL	63.9	68.4	4.9	63.3 - 73.5	0.00010
	2		73.6				
	3		67.8				
Numune B	1	150 mL	139	140.75	4.5	136.1 - 145.5	
	2		139.6				
	3		143.7				
Numune C	1	15 mL	58.6	66.5	13.8	52 - 81	
	2		82.4				
	3		58.5				
Numune D	1	15 mL	117.5	125.0	11.4	113 – 137	
	2		119.5				
	3		138.1				
Numune E	1	30 mL	3.0	3.1	0.2	2.9 - 3.3	
	2		3.3				
	3		3.0				
Numune F	1	25 mL	53.6	53.2	1.7	51.4 - 55.0	
	2		54.7				
	3		51.4				

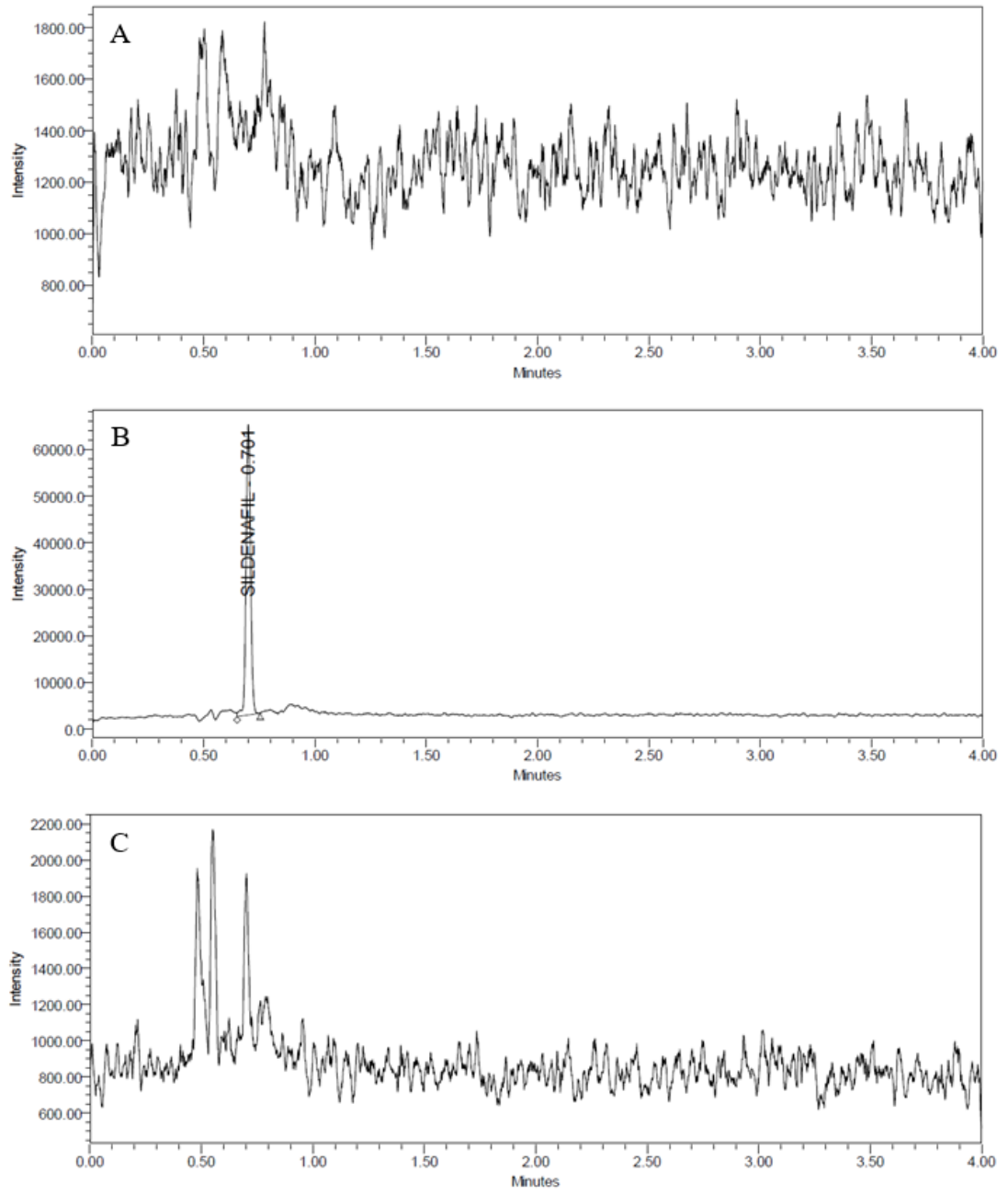
X: İçecek hacmi.

Çalışma yapılan 6 adet numunenin (Numune – A,B,C,D,E,F) sildenafil, tadalafil ve vardenafil içerip içermediğini belirlemek üzere yapılan analizin kromatografi sonuçları Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23 ve Şekil 24’te gösterilmiştir. Şekillerdeki kromatogramlar üzerinde bulunan A harfi tadalafil, B harfi sildenafil ve C harfi vardenafil kromatogramını belirtmektedir. Kromatogramlarda gösterildiği üzere tüm numunelerde sadece sildenafil varlığına rastlanmış olup tadalafil ve

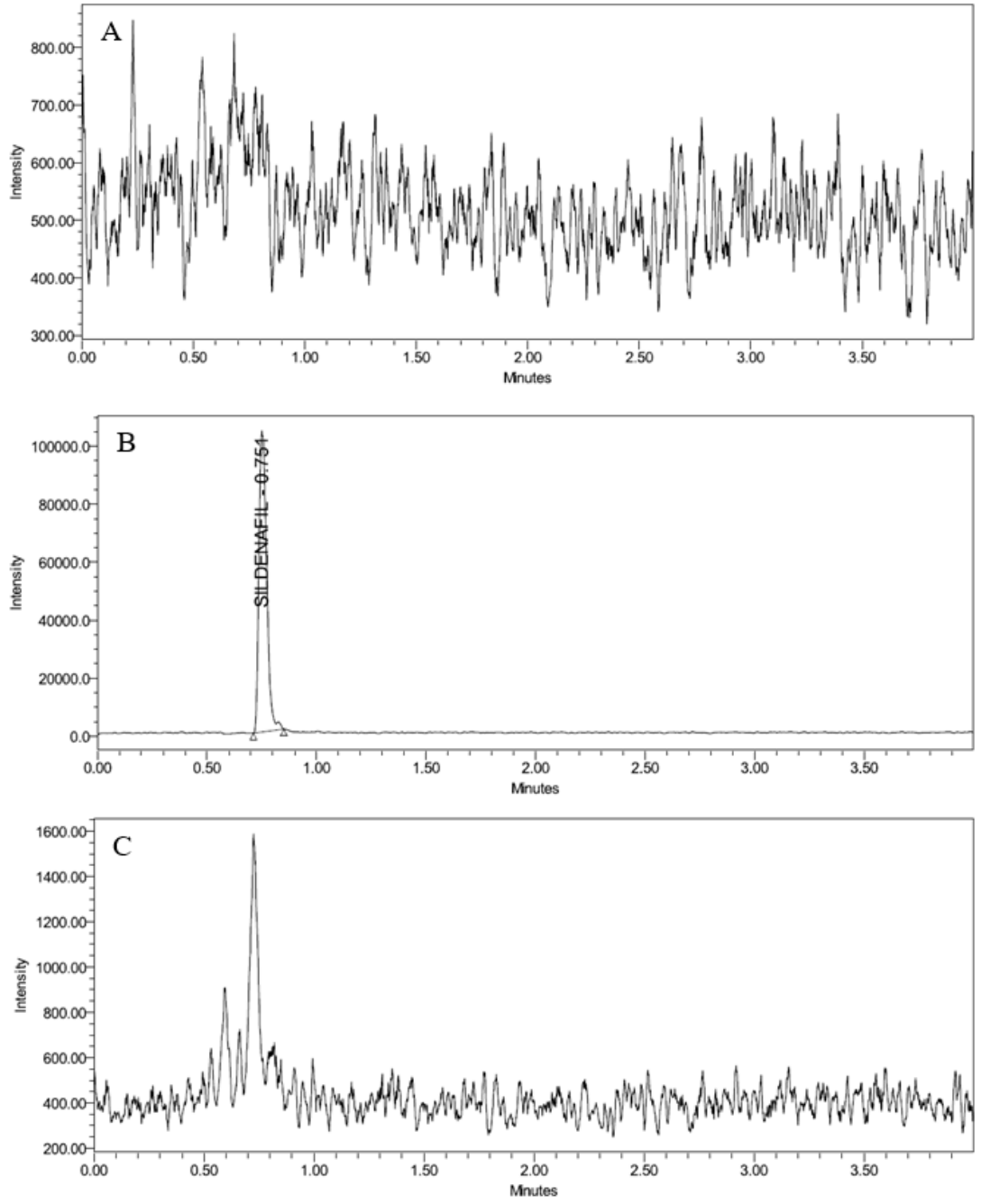
vardenafil varlığı tespit edilmemiştir. Numunelerin 1 mL'sinde farklı miktarlarda sildenafil bulunmuş olup Numune A, B, C, D, E ve F'de sırasıyla 0.456 mg, 0.938 mg, 4.433 mg, 8.333 mg, 0.103 mg ve 2.128 mg sildenafil tespit edilmiştir.



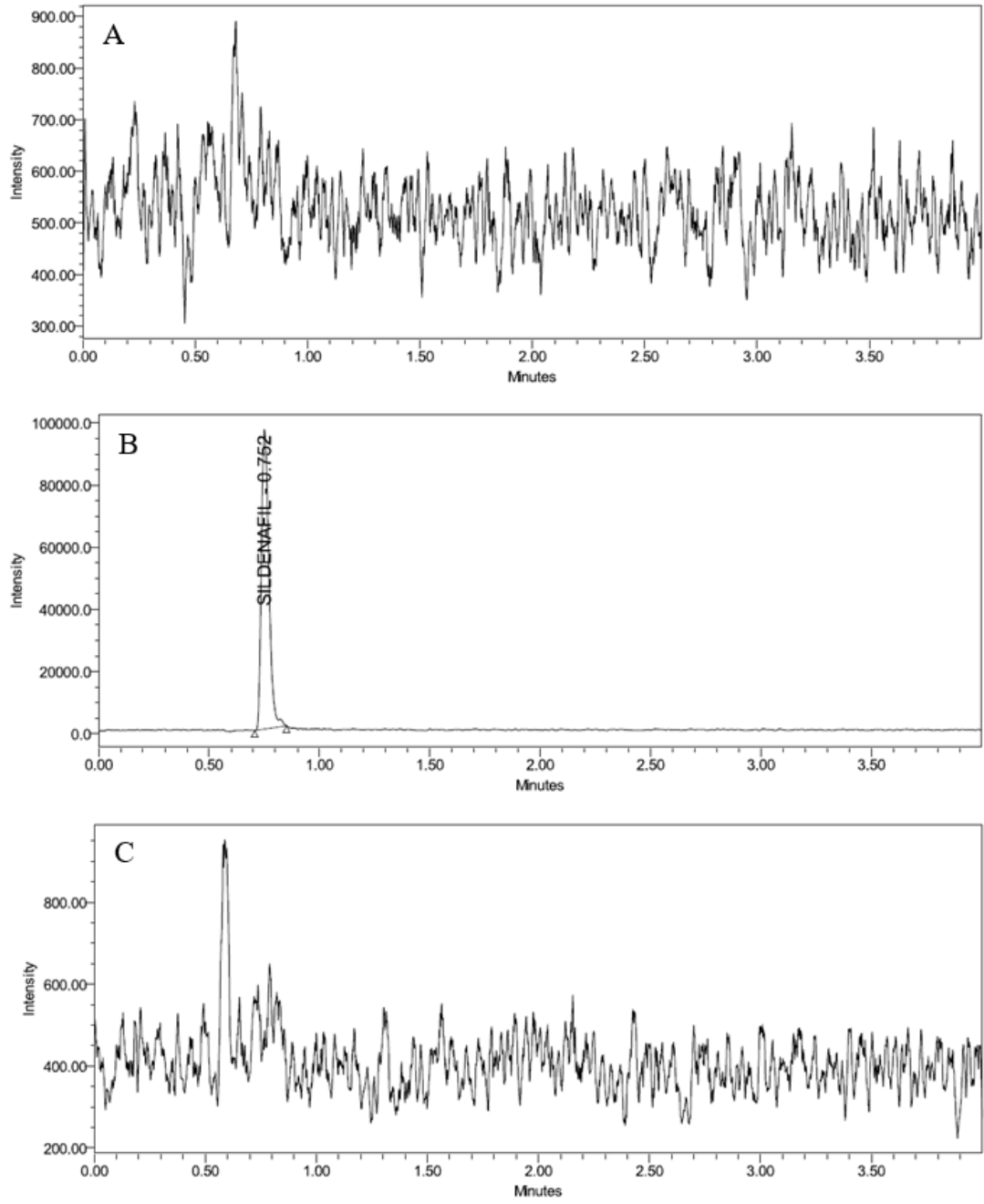
Şekil 19. Numune A kromatogramı



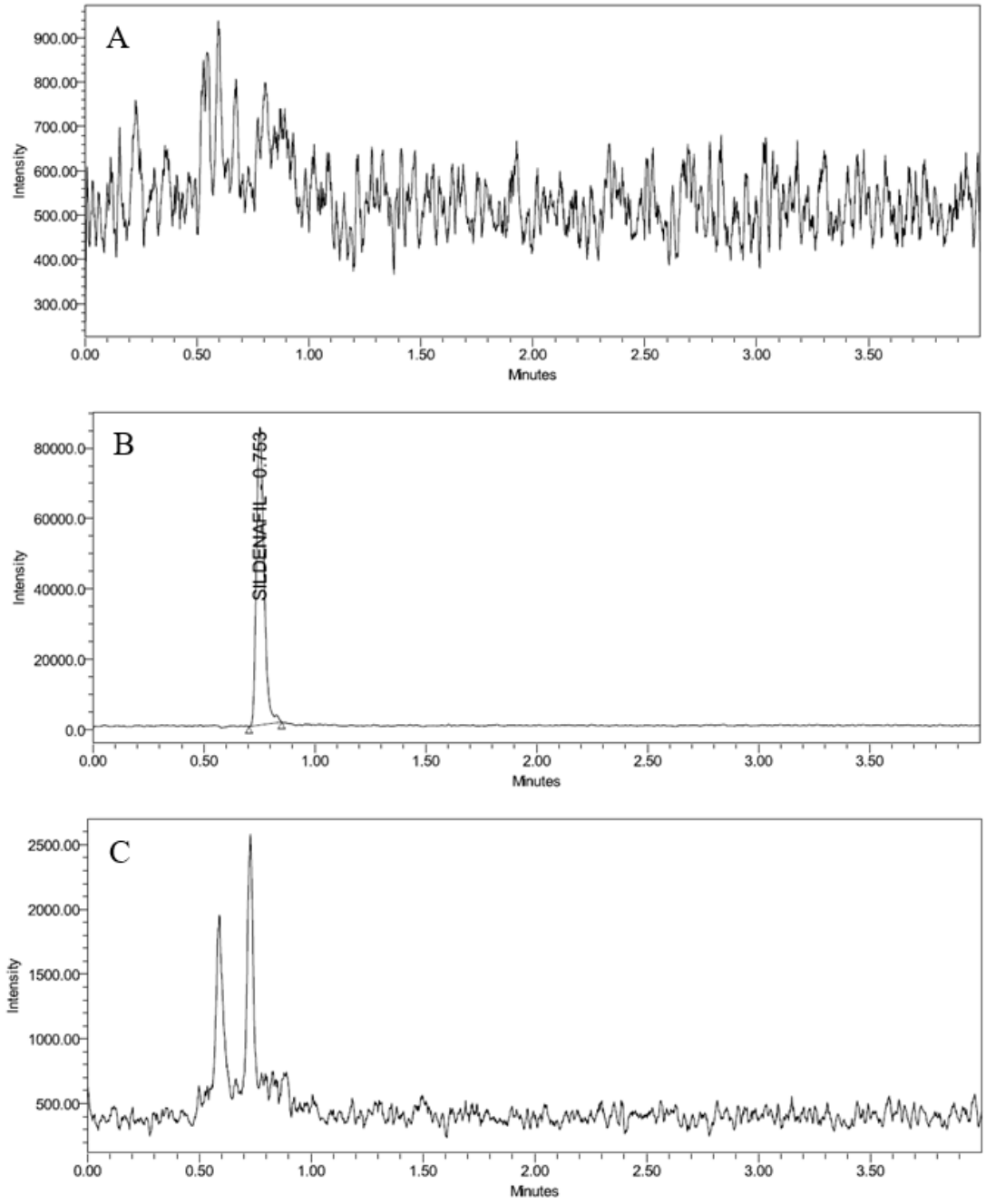
Şekil 20. Numune B kromatogramı



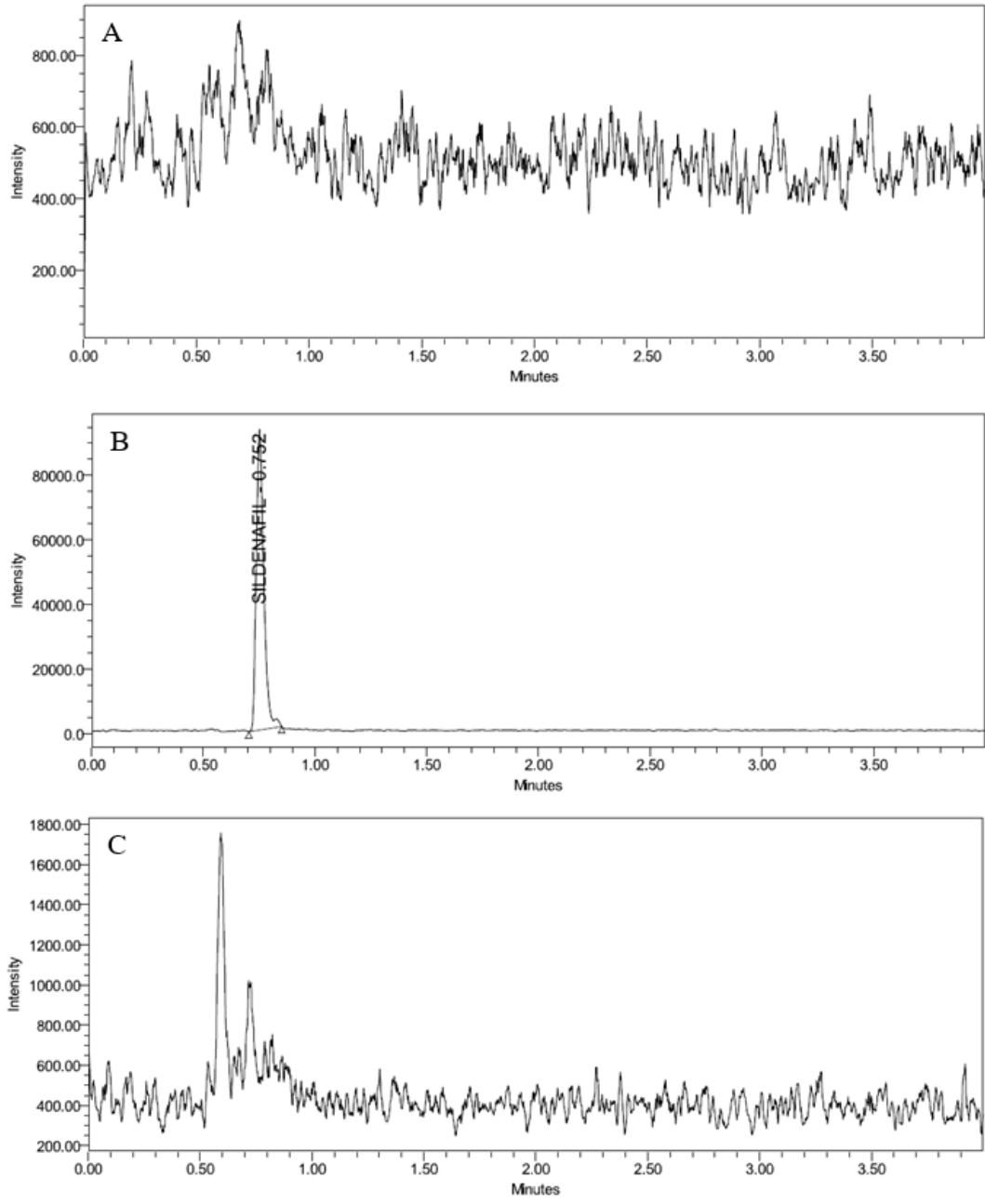
Şekil 21. Numune C kromatogramı



Şekil 22. Numune D kromatogramı



Şekil 23. Numune E kromatogramı



Şekil 24. Numune F kromatogramı

9.11.5 Ara kesinlik

Farklı günde, farklı bir analist tarafından tekrarlanabilirlik çalışmasındaki işlem uygulanmıştır. 6 numune analiz edilmiştir.

Ara kesinlik çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olması için; her çalışmada sonuçlarının arasındaki $RSD \leq \%10.0$ olmalıdır. %95 Güven aralığı hesaplanır. İki çalışma arasındaki fark %10'nin altında olmalıdır (Denklem 10).

$$\frac{|1.\text{analiz ort.} - 2.\text{analiz ort.}|}{1.\text{analiz ort.}} \times 100 = \dots\%$$

Denklem 10. İki analiz arasındaki % fark

Ara kesinlik çözeltileri olarak, Numune – B çözeltileri (Bkz. Bölüm 9.5.2.6) kullanılmıştır.

9.11.6 Ara kesinlik sonuçlar

Sildenafil için ara kesinlik sonuçları Tablo 26'da verilmiştir. İki çalışmada sonuçlarında da $RSD \leq \%10.0$ altında bulunmuştur. İki çalışma arasındaki fark ise %0.5 bulunarak sonuçların kabul kriterlerini sağladığı belirlenmiştir.

Tablo 26. Sildenafil ara kesinlik sonuçları

Numune	Numune Alanı	Standart Alanı	İçecek Hacmi (mL)	Toplam Seyreltme (mL)	Numunedeki miktar mg/150mL
1	88328	471459.7	150	50000	140.5
2	86441				137.5
3	89692				142.7
4	85762				136.4
5	93474				148.7
6	87217				138.7
Ortalama					140.75
SD					4.5
%RSD					3.2
%95 Güven Aralığı					136.1 - 145.5
Standart Derişimi (mg/mL)					0.00010
1	92345	488318.0	150	50000	141.8
2	91543				140.6
3	92612				142.2
4	92763				142.5
5	91231				140.1
6	92158				141.5
Ortalama					141.45
SD					0.9
%RSD					0.6
%95 Güven Aralığı					140.6 - 142.35
Standart Derişimi (mg/mL)					0.00010
%Fark					0.50

Hesaplama (Denklem 11);

$$\text{Sildenafil miktarı (mg /150 mL)} = \frac{A_N \times C_{std} \times D}{A_{std}} \times 150$$

Denklem 11. Numunedeki sildenafil miktarı hesaplama

A_N : Numune alanı

C_{std} : Standart konsantrasyonu (mg/mL)

D : Seyreltme (50000)

A_{std} : Standart alanı

9.12 Sağlamlık

Sağlamlık için aşağıdaki metot değişiklikleri incelenmiştir:

Kolon ve cihazda değişiklik yapılmamış, metot değişiklikleri incelenmiştir. Metot değişikliğinde kolon sıcaklığı, mobil faz akış hızı ve mobil faz gradienti ile ilgili 3 parametrede değişiklikler yapılmıştır.

Sağlamlık çalışmasının uygunluğunun kabul edilebilir olması için, sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil pikleri kromatografik olarak ayırım göstermelidir. Standart alan $RSD \leq 5.0$ olmalıdır.

Normal Metot:

Kolon sıcaklığı	: 30 °C
Numune sıcaklığı	: 25 °C
Akış hızı	: 0.3 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 3.0 µl
Analiz süresi	: 4 dk
Elüsyon	: İzokratik (%60 MF-A, %40 MF-B)

Mobil faz akış hızı değişimi

Mobil fazın akış hızı ± 0.03 mL/dk değiştirildi.

Kolon sıcaklığı değişimi

Kolon fırınının sıcaklığı $\pm 3^\circ\text{C}$ değiştirildi.

Mobil faz gradient değişimi

Mobil faz gradienti ± 2 değiştirildi.

9.12.1 Sağlamlık sonuçları

Yapılan tüm metot değişiklikleri sonucunda sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil pikleri kromatografik olarak ayırım göstermiştir. Standart alanların $RSD \leq 5.0$ bulunmuş olup, sağlamlık çalışmalarına göre yöntem, parametrelerdeki

küçük değişimlerden etkilenmediği belirlenmiştir. Sağlamlık sonuçları Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27. Sağlamlık sonuçları

ŞARTLAR	Sildenafil		Vardenafil		Tadalafil	
	RT	%RSD	RT	%RSD	RT	%RSD
Normal Şartlar	0.71	1.17	0.62	2.32	2.32	0.76
Kolon akışı: 0.27 mL/dk	0.77	1.30	0.68	1.19	2.56	1.31
Kolon akışı: 0.33 mL/dk	0.64	3.42	0.56	2.91	2.09	1.19
Kolon sıcaklığı: 27 °C	0.71	1.60	0.62	2.10	2.36	1.52
Kolon sıcaklığı: 33 °C	0.71	1.74	0.62	2.40	2.26	1.07
Gradient değişimi: MFA (%58)	0.66	1.83	0.60	2.72	1.98	2.12
Gradient değişimi: MFA (%62)	0.75	2.32	0.65	6.19	2.60	1.05

10. SONUÇ VE TARTIŞMA

Sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil'in analitik çalışmaları için Deva Holding A.Ş. laboratuvarında detaylı bir UPLC-MS metodu validasyon çalışması yapılmıştır. Metodun seçicilik, doğrusallık, çalışma aralığı, algılama ve tayin limiti, kesinlik, ara kesinlik, doğruluk ve sağlamlık parametreleri kontrol edilmiştir.

PDE-5 inhibitörleri olan sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil ilaç etken maddeleri olup, yetkili firmalar haricinde üretilip kullanılması yasaktır. Özellikle gıda ürünlerinde PDE-5 inhibitörlerinin varlığının halk sağlığı açısından ciddi risk oluşturduğu bilinmektedir. Etiketlerde belirtilmemiş bu etken maddelerin varlığı ve miktarları, kişiler üzerinde beklenmeyen etkilere sebep olabileceği gibi diğer ilaçlarla etkileşim ya da doz aşımı gibi sebeplerle de tehlike arz etmektedir. Bu yüzden bu maddelerin tespiti önem taşımaktadır.

Literatür araştırmalarında, gıda takviyelerinde PDE-5 inhibitörlerinin tespiti üzerine yapılmış çalışmalar incelendiğinde nitel ve nicel tayinlerde çoğunlukla spektroskopik ve kromatografik metotlar olarak TLC, FTIR, UV, HPLC, LS-MS ve GC-MS analiz yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir. İlgili literatür çalışmaları gözönüne alındığında bu çalışmaların çoğunda analizleme için ön hazırlık metodlarının zaman alıcı ve uğraştırıcı olması, analiz sürelerinin uzun olması ve dolayısıyla kullanılan kimyasal sarfların fazla olması gibi durumlar tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında enerji içeceklerinde sildenafil, vardenafil ve tadalafilin nitel ve nicel tespitinde kullanılmak amacıyla numune hazırlama ve analiz süresinin oldukça kısa olduğu, tekrarlanabilir ve kesin sonuçların elde edildiği, bir UPLC-MS metodu geliştirilerek valide edilmiştir.

Deva Holding bünyesinde bulunan Çerkezköydeki üretim tesisinde ilaç etken maddesi olarak kullanılan Avrupa Farmakopisi sertifikalı sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil standartlarının temin edilmesinde kolaylık sağlamıştır.

Yöntem geliştirme çalışmasında ilk olarak sistem uygunluk parametreleri belirlenmiştir. Geliştirilen metodun validasyon çalışması ICH Q2 (R1)'de göre yapılmıştır. Validasyon çalışmalarında; seçicilik, doğrusallık, algılama limiti, tayin limiti, aralık, doğruluk, sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve sağlamlık

(Metot Parametreleri Değişiklikleri) parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Seçicilik çalışmasında, sildenafil, vardenafil ve tadalafil piklerinde kromatografik ayırım sağlanmıştır. Standartlara ait spesifik molekül ağırlıkları, kullanılan çözücülerde ve plesaboda tespit edilmemiştir. Geliştirilen seçicilik çalışması metodun seçici olduğu kanıtlanmıştır.

Doğrusallık çalışmasında, sildenafil için 0.0028 µg/mL – 0.200 µg/mL, vardenafil için 0.0019 µg/mL – 0.200 µg/mL, ve tadalafil için 0.0066 µg/mL – 0.200 µg/mL derişimleri arasında kalibrasyon eğrileri doğrusal bulunmuştur ($r > 0.98$).

Çalışma aralığı incelenmesinde, minimum seviyede alanların RSD'si sildenafil için %4.6 vardenafil için %4.7 ve tadalafil için %3.7 bulunmuştur. Maksimum seviyede alanların RSD'si ise sildenafil için %1.9 vardenafil için %2.6 ve tadalafil için %1.3 bulunmuştur. Bulunan sonuçlar kabul kriterleri olan $RSD \leq \%5.0$ olma koşulu sağlandığından çalışma aralığı analizinin uygulanabilirliği ispatlanmıştır.

Algılama ve tayin limitleri, sildenafil için LOD: 0.00084 µg/mL – LOQ: 0.0028 µg/mL, vardenafil için LOD: 0.00057 µg/mL – LOQ: 0.0019 µg/mL ve tadalafil için LOD: 0.00198 µg/mL – LOQ: 0.0066 µg/mL olarak bulunmuştur. Sinyal/gürültü oranı ise sildenafil için LOD: 7 – LOQ: 10, vardenafil için LOD: 6 – LOQ: 14 ve tadalafil için LOD: 5 – LOQ: 13 olarak bulunmuştur. Spesifikasyon limitinde stok standart sildenafil, vardenafil ve tadalafil standart çözeltisinin, 6 ardışık enjeksiyonu sonucunda elde edilen pik alanlarının RSD'si sildenafil için %3.0, tadalafil için %1.3 ve vardenafil için %1.8 olarak hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar doğrultusunda LOD değerleri kabul kriteri olan ≥ 3 'ten büyük, LOQ değerleri kabul kriteri olan ≥ 10 'dan büyük ve pik alanların da $RSD \leq \%5.0$ bulunmuş olup tüm sonuçlar kabul kriterlerini karşılamaktadır.

LOQ düzeyinde geri kazanım sildenafil için %100.0 – 110.1, vardenafil için %100.0 – 110.5 ve tadalafil için %100 – 109.1 olarak bulunmuştur. LOQ düzeyinde geri kazanım için bulunan sonuçlar kabul kriteri olan %70.0 – 130.0 arasında olduğundan metodun doğruluğu ispatlanmıştır.

Analiz edilen numunelerde PDE-5 inhibitörü olarak sadece sildenafil bulunduğu tespit edildiğinden kesinlik çalışmaları sildenafil üzerinden yapılmıştır. Kesinlik

çalışmasında numune olarak rastgele seçilmiş olan Numune – B kullanılmıştır. Metot kesinlik çalışmasında RSD %3.2 bulunmuş olup kabul kriteri olan $RSD \leq \%10.0$ olma koşulu sağlamıştır. Ara kesinlik çalışmasında ise iki çalışma arasındaki fark %0.05 bulunarak kabul kriteri olan $\leq \%10$ 'nin altında bulunmuştur. Kesinlik çalışmasında her iki çalışmada da bulunan sonuçlar kabul kriterini sağladığından metodun kesinliği ispatlanmıştır.

Sağlamlık çalışmasında mobil faz değişimi, kolon sıcaklığı değişimi ve mobil faz gradient değişimi ile elde edilen kromatogramlarda sildenafil, vardenafil ve tadalafil pikleri kromatografik olarak ayırım göstererek parametrelerde yapılan küçük değişikliklerin yöntemin doğruluğunu etkilemediği tespit edilmiştir.

Numunelerde vardenafil ve tadalafil varlığına rastlanılmamış olup, farklı miktarlarda sildenafil içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. A numunesinde 68.4 mg/150 mL, B numunesinde 140.75 mg/150 mL, C numunesinde 66.5 mg/15 mL, D numunesinde 125.0 mg/15 mL, E numunesinde 3.1 mg/30 mL ve F numunesinde 53.2 mg/25 mL sildenafil varlığı tespit edilmiştir. Etiketinde kesinlikle sildenafil içerdiği belirtilmemiş olan numunelerdeki bu sonuçlar bu içecekleri kullanmanın ne kadar riskli olduğunu ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceğini göstermektedir.

Damiano ve arkadaşları İtalya pazarında satılan yasa dışı diyet takviyelerinin PDE-5 inhibitörlerini UPLC-TOF metodu ile analiz yapmışlardır. Bu metotta sildenafil, tadalafil ve vardenafilin analiz süresi 15 dakika olarak belirlemişlerdir. Bu metot ile sadece bu üç PDE-5 inhibitörlerini değil aynı zamanda tiyohomosildenafil ve tiyoaildenafil'in analizi yapılmıştır. Fakat bu iki analog sildenafil, tadalafil ve vardenafilden sonra bir alıkonma zamanı göstermiştir. Tiyohomosildenafil 9.80 tiyoaildenafil ise 10.00 alıkonma zamanına sahiptir. PDE-5 inhibitörlerinin alıkonma zamanının tamamlandığı süre ise 9.00 dakikalık bir analiz süresine denk gelmektedir (Damiano, 2014). Bu durumda geliştirdiğimiz 4 dakikalık analiz süresinin üstünlüğünü göstermektedir.

Ortiz ve arkadaşları Brezilya farmasötik pazarlamasında en çok taklit edilen ilaçlar olan Viagra (sildenafil sitrat, Pfizer) ve Cialis'in (tadalafil, Eli Lilly) kalitatif ve kantitatif kimyasal profili UPLC-MS kullanılarak araştırmışlardır. Kromatografik ayırmanın süresi 2.0 dakikadır. Mobil faz akış hızı 0.7 mL/dk kolon sıcaklığı 60°C

dalga boyu ise 290 nm olarak belirlenmiştir. MS spektrumları 50 ila 1000 m/z aralığında taranmıştır (Ortiz, 2013).

Ortiz ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada 2 dakikalık analiz süresi avantaj olarak görülmüşse kolon sıcaklığının 60°C olması analiz hazırlıklarında kolonun analiz için optimum koşullara gelmesinin süresinin uzun olması ve kolonun bu sıcaklığa gelmesi ve bu sıcaklıkta stabil kalması için fazla enerji harcadığı gerçeğini ortaya koymaktadır. Geliştirdiğimiz UPLC-MS metodunda kolon sıcaklığının 30°C olması bu çalışmaya göre üstünlük sağladığını göstermektedir.

Proença ve arkadaşları, ölüm sonrası alınan kan örneklerinde PDE-5 inhibitörlerinin (sildenafil, tadalafil ve vardenafil) belirlenmesi için UPLC-MS/MS metodu geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu metotta mobil faz akış hızı 0.50 mL/dk, analiz süresi 6 dakika, kolon sıcaklığı 35 °C ve numune fırın sıcaklığı 15 °C olarak belirlenmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda sildenafil, tadalafil ve vardenafil için LOQ sonuçlarını sırasıyla 8, 4 ve 8 ng/mL, LOD sonuçlarını ise 3, 1 ve 3 ng/mL olarak bulmuşlardır (Proença, 2013). Bu literatür örneği gerek analiz sonucunun uzun olması gerek LOQ ve LOD sonuçlarının bizim elde etmiş olduğumuz sonuçlardan yüksek olması sebebiyle metodumuzun üstünlüğünü açıkça göstermektedir.

Yukarıda ayrıntıları anlatılan tüm bu çalışmalar neticesinde geliştirilen yeni bir UPLC-MS metodu ile enerji içeceklerinde yasal olmamasına rağmen farklı miktarlarda PDE-5 inhibitörü olan sildenafil içerdiği belirlenmiştir. Gerek içeriğindeki sildenafil varlığı gerek miktarlarının günlük alım dozunundan çok farklı olması nedeniyle bu enerji içeceklerinin tüketilmesi ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Analiz edilmiş olan bu enerji içeceklerinin hiç birisinin etiketinde sildenafil içerdiğinden bahsedilmemiştir. Bu enerji içeceklerinin kontrol edilmemesi ve insanların kolay ulaşabileceği yerlerde alelade satılıyor olması nedeniyle ciddi anlamda halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı bu durum adli bir sorun olarak değerlendirilmeli ve incelenmelidir.

UPLC cihazı ile yüksek basınçlarda mobil faz akışı sağlandığından diğer sıvı kromatografi cihazlarına göre avantaj sağlamaktadır. Geliştirilen bu metot literatürde bahsedilen sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi türevli cihazlarla geliştirilen

metodlara göre kullanılan mobil faz miktarının az olması ve analiz süresinin kısa olması yönü ile üstünlük sağlamaktadır.

Geliştirilen UPLC-MS metodu ile 4 dakikalık analiz süresinde sildenafil, vardenafil ve tadalafil'in kromatografik ayrımları başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Yapılan validasyon çalışmasında tüm parametreler ICH Q2 kabul kriterlerine uygun bulunmuştur. Bu da metodun sildenafil, vardenafil hidroklorür ve tadalafil'in enerji içeceklerindeki nitel ve nicel varlığını tespit etmek üzere analitik çalışmalarda başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir.

11. KAYNAKÇA

- Wespes, E., Amar, E., Hatzichristou, D., Montorsi, F., Pryor, J. ve Vardi, Y. (2002). Guidelines on Erectile Dysfunction. *European Urology*, 41(1), 1–5. DOI: 10.1016/s0302-2838(01)00008-2
- Sung, H. H. ve Lee, S. W. (2012). Chronic Low Dosing of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor for Erectile Dysfunction. *Korean Journal of Urology*, 53(6), 377-385. DOI: 10.4111/kju.2012.53.6.377
- Gresser, U. ve Gleiter, C. H. (2002). Erectile Dysfunction: Comparison of Efficacy and Side Effects of The PDE-5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil and Tadalafil- Review of The Literature. *European Journal of Medical Research*, 7 (10), 435-446.
- Smith, W. B., McCaslin, I. R., Gokce, A., Mandava, S. H., Trost, L. ve Hellstrom, W. J. (2013). PDE5 inhibitors: Considerations For Preference and Long-Term Adherence. *International journal of clinical practice*, 67(8), 768-780. DOI: 10.1111/ijcp.12074
- Greco, E. A., Spera, G. ve Aversa, A. (2006). Combining Testosterone and PDE5 Inhibitors in Erectile Dysfunction: Basic Rationale and Clinical Evidences. *European urology*, 50(5), 940-947. DOI: 10.1016/j.eururo.2006.06.049
- Shamloul, R. ve Ghanem, H. (2013). Erectile Dysfunction. *The Lancet*, 381, 153–165. DOI: 10.1016/s0140-6736(12)60520-0
- Braun, M., Wassmer, G., Klotz, T., Reifenrath, B., Mathers, M. ve Engelmann, U. (2000). Epidemiology of Erectile Dysfunction: Results of The “Cologne Male Survey.” *International Journal of Impotence Research*, 12(6), 305–311. DOI: 10.1038/sj.ijir.3900622
- Roumegère, T., Bollens, R. ve Wespes, E. (2001). Prevalence of hyperlipidemia and risk of coronary heart disease in a population with erectile dysfunction. *J Urol*, 165(5).
- Romolo, F. S., Salvini, A., Zelaschi, F., Oddone, M., Odoardi, S., Mestria, S. ve Rossi, S. S. (2019). Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) And Liquid Chromatography (LC) Coupled to High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) Characterisation of Sildenafil Based Products Seized on The Italian Illegal

Market. *Forensic Science International: Synergy*, 1, 126-136. DOI: 10.1016/j.fsisyn.2019.07.004

Park, M. ve Ahn, S. (2012). Quantitative Analysis of Sildenafil and Tadalafil in Various Fake Drugs Recently Distributed in Korea. *Journal of Forensic Sciences*, 57(6), 1637–1640. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2012.02164.x

Mohd Yusop, A. Y., Xiao, L. ve Fu, S. (2020). Isolation and Identification of An Isomeric Sildenafil Analogue As An Adulterant in An Instant Coffee Premix. *Forensic Sciences Research*, 1-9. DOI: 10.1080/20961790.2020.1829375

Romolo, F. S., Sarilar, M., Antoine, J., Mestria, S., Rossi, S. S., Gallidabino, M. D., ... & Dias, J. F. (2021). Ion Beam Analysis (IBA) and Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA) For Forensic Characterisation of Authentic Viagra® and of Sildenafil-Based Illegal Products. *Talanta*, 224, 121829. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121829

Graziano, S., Montana, A., Zaami, S., Rotolo, M. C., Minutillo, A., Busardò, F. P. ve Marinelli, E. (2017). Sildenafil-Associated Hepatotoxicity: A Review of The Literature. *European Review for Medical and Pharma. Sciences*, 21(1), 17-22.

Lanzarotta, A., Lorenz, L., Batson, J. S. ve Flurer, C. (2017). Development and Implementation of A Pass/Fail Field-Friendly Method For Detecting Sildenafil in Suspect Pharmaceutical Tablets Using A Handheld Raman Spectrometer and Silver Colloids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 146, 420-425. doi:10.1016/j.jpba.2017.09.005

Reis, N. F. A., Silva, L. F. G., Souza, M. A. C. E., Fialho, S. L., Souza Moreira, C. P., Oliveira Andrade, M. V., ... & Fernandes, C. (2021). UHPLC For Quality Evaluation of Genuine and Illegal Medicines Containing Sildenafil Citrate and Tadalafil. *Journal of Chromatographic Science*, 59(1), 30-39. DOI: 10.1093/chromsci/bmaa073

Andersson, K. E. (2018). PDE5 Inhibitors–Pharmacology and Clinical Applications 20 Years After Sildenafil Discovery. *British journal of pharmacology*, 175(13), 2554-2565. DOI: 10.1111/bph.14205

Curvature, P. (Mart 2018). Erectile Dysfunction, Premature Ejaculation, Penile Curvature and Priapism. European Association of Urology 2018 Guidelines on. *EAU Annual Congress Copenhagen*.

Sandner, P., Hütter, J., Tinel, H., Ziegelbauer, K. ve Bischoff, E. (2007). PDE5 Inhibitors Beyond Erectile Dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, 19(6), 533-543. DOI: 10.1038/sj.ijir.3901577

Wright, P. J. (2006). Comparison of Phosphodiesterase Type 5 (PDE5) Inhibitors. *International journal of clinical practice*, 60(8), 967-975. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2006.01049.x

McMahon, C. N., Smith, C. J. ve Shabsigh, R. (2006). Treating Erectile Dysfunction When PDE5 Inhibitors Fail. *Bmj*, 332(7541), 589-592. DOI: 10.1136/bmj.332.7541.589

Basu, A. ve Ryder, R. E. (2004). New Treatment Options For Erectile Dysfunction in Patients With Diabetes Mellitus. *Drugs*, 64(23), 2667-2688. DOI: 10.2165/00003495-200464230-00004

Hatzimouratidis, K., Salonia, A., Adaikan, G., Buvat, J., Carrier, S., El-Meliegy, A., ... ve Khera, M. (2016). Pharmacotherapy for erectile dysfunction: recommendations from the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015). *The journal of sexual medicine*, 13(4), 465-488. DOI: 10.1016/j.jsxm.2016.01.016

Deshmukh, R., Sharma, V., Mehan, S., Sharma, N., ve Bedi, K. L. (2009). Amelioration of Intracerebroventricular Streptozotocin Induced Cognitive Dysfunction And Oxidative Stress By Vinpocetine—A PDE1 Inhibitor. *European journal of pharmacology*, 620(1-3), 49-56.

Kayık, G., Tüzün, N. Ş. ve Durdagi, S. (2017). Investigation Of PDE5/PDE6 And PDE5/PDE11 Selective Potent Tadalafil-Like PDE5 Inhibitors Using Combination of Molecular Modeling Approaches, Molecular Fingerprint-Based Virtual Screening Protocols And Structure-Based Pharmacophore Development. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 311-330. DOI: 10.1080/14756366.2016.1250756

Barren, B., Gakhar, L., Muradov, H., Boyd, K. K., Ramaswamy, S. ve Artemyev, N. O. (2009). Structural Basis of Phosphodiesterase 6 Inhibition By The C-Terminal Region of The Γ -Subunit. *The EMBO journal*, 28(22), 3613-3622. DOI: 10.1038/emboj.2009.284

Makhlouf, A., Kshirsagar, A. ve Niederberger, C. (2006). Phosphodiesterase 11: A Brief Review of Structure, Expression And Function. *International journal of impotence research*, 18(6), 501-509. DOI: 10.1038/sj.ijir.3901441

He, F., Yang, J., Zou, T., Xu, Z., Tian, Y., Sun, W., ... ve Shen, Y. (2021). A Gold Nanoparticle-Based Immunochromatographic Assay For Simultaneous Detection of Multiplex Sildenafil Adulterants in Health Food By Only One Antibody. *Analytica Chimica Acta*, 1141, 1-12. DOI: 10.1016/j.aca.2020.10.032

Al-Shaar, L., Vercammen, K., Lu, C., Richardson, S., Tamez, M., ve Mattei, J. (2017). Health Effects and Public Health Concerns of Energy Drink Consumption in The United States: A Mini-Review. *Frontiers in public health*, 5, 225.

Sakamoto, M., Suzuki, J., Saito, Y., Shimizu, S., Kobayashi, K., Nagashima, M., ... ve Saito, K. (2018). Structural Characterization of Dimethyldithiodenafil And Dimethylthiocarbodenafil, Analogs of Sildenafil. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 148, 136-141. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.09.025

Walker, M. J., Naughton, D. P., Deshmukh, N. ve Burns, D. T. (2016). A Review of Methods For The Simultaneous Detection of Illegal Ingredients in Food Supplements. *Journal of the Association of Public Analysts*, 44, 51-66.

WEB3 <https://portal.rxmediapharma.com.tr/> adresinden 12.12.2021 tarihinde erişilmiştir.

Dural, E. (2020). Investigation of The Presence of Sildenafil in Herbal Dietary Supplements By Validated HPLC Method. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 56. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2018.91249

Cai, Y., Cai, T. G., Shi, Y., Cheng, X. L., Ma, L. Y., Ma, S. C., ... ve Feng, W. (2010). Simultaneous Determination of Eight PDE5-IS Potentially Adulterated in Herbal Dietary Supplements With TLC and HPLC-PDA-MS Methods. *Journal of*

liquid chromatography & related technologies, 33(13), 1287-1306. DOI: 10.1080/10826076.2010.488979

Türkmen, S. ve Ataseven, Y. Türkiye’de Taklit ve Tağşiş Yapılan Gıdalara İlişkin Yasal Düzenlemelerin ve Uygulamaların Değerlendirilmesi. *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi*, 6(1), 65-75.

Damiano, F., Silva, C., Gregori, A., Vacondio, F., Mor, M., Menozzi, M. ve Di Giorgio, D. (2014). Analysis of Illicit Dietary Supplements Sold in The Italian Market: Identification of A Sildenafil Thioderivative As Adulterant Using UPLC–TOF/MS and GC/MS. *Science and Justice*, 54(3), 228-237. DOI: 10.1016/j.scijus.2014.02.009

Bortolini, C., Pivato, A., Bogialli, S. ve Pastore, P. (2015). “One-Shot” Analysis Of PDE-5 İnhibitors And Analogues in Counterfeit Herbal Natural Products Using An LC-DAD-QTOF System. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(20), 6207-6216. DOI: 10.1007/s00216-015-8801-4.

Yacob, A. R., Onn, Z. S. Ve Ismail, S. B. (2013). Detection of Sildenafil Analogues in Coffee Powder by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 7(2), 144.

Abdullah, M. M. (2014). *Determination of Sildenafil Levels in Rat Plasma in Presence of Red Bull® By Using High Performance Liquid Chromatography (Hplc-Uv) Method*. Doctoral dissertation, University of Petra.

Trapp, G., Hurworth, M., Jacoby, P., Christian, H., Ambrosini, G., Oddy, W., ... ve Allen, K. (2020). Energy Drink Intake And Metabolic Syndrome: A Prospective Investigation In Young Adults. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(10), 1679-1684. DOI: 10.1016/j.numecd.2020.06.012

Somers, K. R. ve Svatikova, A. (2020). Cardiovascular and Autonomic Responses to Energy Drinks—Clinical Implications. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 431. DOI: 10.3390/jcm9020431

Kevin, O. I., Fredrick, A. O., MacDonald, I., & Gabriel, B. O. (2020). Comparative aphrodisiac and toxicity effect of energy drinks consumption in male wistar rats. *Journal of Basic Pharmacology and Toxicology*, 4(2), 30-37.

Tucker, J., Fischer, T., Upjohn, L., Mazzera, D. ve Kumar, M. (2018). Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated With US Food and Drug Administration Warnings. *JAMA network open*, 1(6), e183337-e183337. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2018.3337

Keizers, P. H., Wiegard, A. ve Venhuis, B. J. (2016). The Quality of Sildenafil Active Substance of Illegal Source. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 133-139. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.08.027

Buckley, G. J. ve Gostin, L. O. (Eds.). (2013). *Countering the Problem of Falsified and Substandard Drugs*. Washington, DC: The National Academies Press. DOI: 10.17226/18272.

Da Justa Neves, D. B. ve Caldas, E. D. (2015). Dietary Supplements: International Legal Framework And Adulteration Profiles, And Characteristics of Products on The Brazilian Clandestine Market. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 93-104. DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.06.013.

WEB4 <https://ticaret.gov.tr/haberler/gumruklerde-ilac-ve-gida-kacakcilarina-goz-actirilmadi> adresinden 08.12.2021 tarihinde erişilmiştir.

Popescu, A. M., Radu, G. L., Onisei, T., Raducanu, A. E. ve Niculae, C. G. (2014). Detection by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Adulterated Food Supplements. *Rom Biotechnolog Lett*, 19(4), 9485-92.

Singh, S., Prasad, B., Savaliya, A. A., Shah, R. P., Gohil, V. M. ve Kaur, A. (2009). Strategies for Characterizing Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil and Their Analogues in Herbal Dietary Supplements, and Detecting Counterfeit Products Containing These Drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 13-28. DOI: 10.1016/j.trac.2008.09.004

Er, E. Ö., Özbek, B. ve Bakırdere, S. (2018). A Sensitive And Selective Analytical Method For The Simultaneous Determination of Sildenafil and Tadalafil in Water, Energy Drinks and Sewage Sludge Matrices By LC-QTOF-MS/MS. *Measurement*, 124, 64-71. DOI: 10.1016/j.measurement.2018.04.011

Lin, Y. T., Huang, Y. C., Lee, H. C., Liao, C. H., Lin, Y. L., Tsai, C. F. ve Cheng, H. F. (2017). Isolation And Identification of A Novel Sildenafil Analogue Adulterant in

Herbal Products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(3), 330-334. DOI: 10.1080/19440049.2016.1272137

Shin, M. H., Hong, M. K., Kim, W. S., Lee, Y. J. ve Jeoung, Y. C. (2003). Identification of A New Analogue of Sildenafil Added Illegally To A Functional Food Marketed For Penile Erectile Dysfunction. *Food Additives & Contaminants*, 20(9), 793-796. DOI: 10.1080/0265203031000121455

Liang, Q., Qu, J., Luo, G. ve Wang, Y. (2006). Rapid And Reliable Determination of Illegal Adulterant in Herbal Medicines And Dietary Supplements By LC/MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 305-311. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.07.035

Patterson, R., Mabe, P., Mitchell, E. N. ve Cory, W. (2012). Lifestyle Illicit Drug Seizures: A Routine ESI–LC–MS Method For The Identification of Sildenafil And Vardenafil. *Forensic science international*, 222(1-3), 83-88. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.05.003.

Mao, D. Z., Weng, X. X. ve Yang, Y. J. (2012). Rapid Screening of Sildenafil And Tadalafil Adulterated in Healthcare Products By Micro-Raman Spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 43(12), 1985-1990. DOI: 10.1002/jrs.4102

Chen, F. F., Xie, X. Y. ve Shi, Y. P. (2013). Magnetic Molecularly Imprinted Polymer For The Selective Extraction Of Sildenafil, Vardenafil And Their Analogs From Herbal Medicines. *Talanta*, 115, 482-489. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.06.009

Trefi, S., Routaboul, C., Hamieh, S., Gilard, V., Malet-Martino, M. ve Martino, R. (2008). Analysis of Illegally Manufactured Formulations of Tadalafil (Cialis®) By ¹H NMR, 2D DOSY ¹H NMR And Raman Spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(1), 103-113.

Mustazza, C., Borioni, A., Rodomonte, A. L., Bartolomei, M., Antoniella, E., Di Martino, P., ... ve Gaudiano, M. C. (2014). Characterization of Sildenafil Analogs By MS/MS And NMR: A Guidance For Detection And Structure Elucidation of Phosphodiesterase-5 Inhibitors. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 96, 170-186. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.03.038

Said, M. M., Gibbons, S., Moffat, A. C. ve Zloh, M. (2014). Rapid Detection of Sildenafil Analogue in Eurycoma Longifolia Products Using A New Two-Tier Procedure of The Near İnfrared (NIR) Spectra Database. *Food chemistry*, 158, 296-301. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.125

Taverniers, I., De Loose, M. ve Van Bockstaele, E. (2004). Trends in Quality in The Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation And Quality Assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552. DOI: 10.1016/j.trac.2004.04.001

ICH Harmonised Tripartite Guideline. (1994). Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), (27 Ekim 1994 tarihli Mevcut 4. Adım Ana Yönergesi Versiyonu)

WEB5 <https://support.minitab.com/en-us/minitab/19/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/data-concepts/what-is-the-standard-deviation/> adresinden 21.12.2021 tarihinde erişilmiştir.

Skoog, D. A., West, D. M. ve F James Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. (7. baskı) Fort Worth: Saunders College Publisher.

Gao, Y., Ierapetritou, M. G. ve Muzzio, F. J. (2013). Determination of The Confidence Interval of The Relative Standard Deviation Using Convolution. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 8(2), 72-82. DOI: 10.1007/s12247-012-9144-8

WEB6 <https://support.minitab.com/en-us/minitab-express/1/help-and-how-to/basic-statistics/inference/supporting-topics/basics/what-is-a-confidence-interval/> adresinden 06.12.2021 tarihinde erişilmiştir.

Ortiz, R. S., de Cássia Mariotti, K., Holzschuh, M. H., Romão, W., Limberger, R. P. ve Mayorga, P. (2013). Profiling Counterfeit Cialis, Viagra and Analogs by UPLC–MS. *Forensic Science International*, 229(1-3), 13-20.

Proença, P., Mustra, C., Marcos, M., Franco, J. M., Corte-Real, F. ve Vieira, D. N. (2013). Validated UPLC-MS/MS Assay for the Determination of Synthetic Phosphodiesterase Type-5 Inhibitors in Postmortem Blood Samples. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 655-658.

12. EKLER

EK- 1. Sildenafil analiz sertifikası-1

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)
7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)
Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. + 33 (0)3 88 41 27 71
For any questions: www.edqm.eu (HelpDesk)



INFORMATION LEAFLET Ph. Eur. Reference Standard

Sildenafil citrate CRS batch 2

1. Identification

Catalogue code: Y0001578

Unit Quantity: ca 100 mg

2. Scientific Information

2.1 Intended use

Reference Standard for laboratory tests as prescribed in the European Pharmacopoeia only.
Established for use with the monograph(s): 2270.

2.2 Analytical information related to intended use, when applicable

The "as is" content is : 98.4% of C28H38N6O11S

2.3 Uncertainty of the assigned value, when applicable

The uncertainty of the assigned value is not stated since it is considered to be negligible in relation to the defined limits of the method-specific assays for which the reference standard is used. Please also refer to Ph. Eur. chapter 5.12.

2.4 Validity

Ph. Eur. RS are periodically tested to ensure their continuous fitness for purpose. For each valid Ph. Eur. RS, a Batch Validity Statement at the time of use can be downloaded and printed from the EDQM website (Reference Standards Database).

2.5 Instructions for use

The container should not be opened until required for use. Allow the closed container to equilibrate at ambient temperature before opening to avoid uptake of moisture. Use "as is". Do not dry/desiccate before use. Ph. Eur. RS are for immediate use. Once the container has been opened, its entire content must be used immediately. Any further storage and re-use are not warranted.

3. Storage conditions

In the original container at +5°C ± 3°C, protected from light. Re-instate promptly upon receipt.

4. Safety

For scientific research, development and analysis only. Handle in accordance with good occupational hygiene, safety and laboratory practices and take precautions to avoid exposure. More information is available at the EDQM website (Reference Standards Database): Safety Data Sheet for hazardous chemicals and Safety Data Statement for other materials.

5. Shipping conditions

Each Ph. Eur. RS is shipped under conditions that preserve its suitability for use and comply with the relevant regulations. For more details see EDQM website (Reference Standards Database).

6. Warranties, Liabilities and responsibility

- Safety

In the event of any safety concerns, please read carefully the safety data sheets or safety data statements available for each product. It is for Purchasers to determine independently the risks associated with the items and to take appropriate safety measures, including the provision of appropriate information, equipment and training of those persons coming into contact with the item.

- Warranties

Except for the use of Reference Standards in tests and assays carried out in accordance with the official methods of the European Pharmacopoeia and by professionals with the necessary technical skills and at their own discretion and risk, the EDQM makes no representation, contractual statement, or expression of opinion

Signed on: 26/09/2019
FORM/597 Rev. 03/14/01/2019



00Y0001578

Rev.3 1/2

EK- 2. Sildenafil analiz sertifikası-2

concerning the quality or safety of any item supplied, the presence of any defect in it, or its fitness for any particular purpose except that as described above.

The EDQM does not guarantee that the items will meet the Purchaser's specific expectations. The EDQM only guarantees that the items (i) were fit for use according to EDQM's intended use of the product ;(ii) were fit for use at the moment that they were handed over to the carrier being responsible for the delivery of the items to the Purchaser with such accessories including packaging, delivery instructions or other instructions for the item's delivery and reception as the Purchaser may expect to receive; and (iii) possess qualities and performance capabilities which are normal in goods of the same type and which the Purchaser may expect given the nature of the goods and the information provided on the EDQM's website and (iv) the carrier and the Purchaser received clear and accurate instructions for the item's delivery and reception. No other guarantees, whether explicitly or implied, are given by the EDQM. The EDQM does not guarantee that the purchase or use of the items will not infringe any intellectual property rights, in particular patents.

- Limitation of Liability

In no event shall the EDQM be liable for any damages due to the use of items, included, but not limited to loss of business, loss of profit, loss of use, loss of opportunity, costs of procurement of substitute goods, services or systems or for any indirect, special, incidental, punitive or consequential damages, however caused and, whether in contract, tort or under any other theory of liability, whether or not the Purchaser has been advised of the possibility of such damages or costs.

Any liability of the EDQM for injury, loss or damage arising from the supply or use of any such item is in any event hereby excluded to the fullest extent permitted internationally accepted commercial standards; in particular, no liability is accepted for loss of profits or indirect or consequential loss.

7. Arbitration & Applicable Law

The aim of the EDQM is to settle any disputes amicably in the framework of its Terms and Conditions. In accordance with the provisions of article 21 of the General Agreement on the Privileges and Immunities of the Council of Europe, all disputes between the EDQM and the Purchaser as regards the application of these General Terms shall be submitted, if a mutual agreement cannot be reached between the parties, to arbitration as laid down in Order No. 481 of the Secretary General, approved by the Committee of Ministers.

This transaction shall be governed by the Council of Europe's relevant regulatory framework, complemented, where necessary, by French national substantive law.

8. Citation

Users shall ensure that any reference made to an EDQM Reference Standard in any publication, presentation or public document (ex. scientific articles, data sheets for kits) bears the exact name, and catalogue code of the Reference Standard and the exact name and address of EDQM as given on the first page of this information leaflet.

9. Adoption

The suitability for intended use has been officially adopted by the European Pharmacopoeia Commission.

10. Signature

This document is approved by:

Ms Caroline Offerlé
Head of the Quality and Risk Management Section

EK- 3. Tadalafil analiz sertifikası-1

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)
7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)
Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. + 33 (0)3 88 41 27 71
For any questions: www.edqm.eu (HelpDesk)



INFORMATION LEAFLET Ph. Eur. Reference Standard

Tadalafil CRS batch 3

1. Identification

Catalogue code: Y0001417

2. Scientific Information

2.1 Intended use

Reference Standard for laboratory tests as prescribed in the European Pharmacopoeia only.
Established for use with the monograph(s): 2606.

2.2 Analytical information related to intended use, when applicable

The "as is" content is : 100.0% of C22H19N3O4

2.3 Uncertainty of the assigned value, when applicable

The uncertainty of the assigned value is not stated since it is considered to be negligible in relation to the defined limits of the method-specific assays for which the reference standard is used. Please also refer to Ph. Eur. chapter 5.12.

2.4 Validity

Ph. Eur. RS are periodically tested to ensure their continuous fitness for purpose. For each valid Ph. Eur. RS, a Batch Validity Statement at the time of use can be downloaded and printed from the EDQM website (Reference Standards Database).

2.5 Instructions for use

The container should not be opened until required for use. Allow the closed container to equilibrate at ambient temperature before opening to avoid uptake of moisture. Use "as is". Do not dry/desiccate before use. Ph. Eur. RS are for immediate use. Once the container has been opened, its entire content must be used immediately. Any further storage and re-use are not warranted.

3. Storage conditions

In the original container at $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, protected from light. Re-instate promptly upon receipt.

4. Safety

For scientific research, development and analysis only. Handle in accordance with good occupational hygiene, safety and laboratory practices and take precautions to avoid exposure. More information is available at the EDQM website (Reference Standards Database): Safety Data Sheet for hazardous chemicals and Safety Data Statement for other materials.

5. Shipping conditions

Each Ph. Eur. RS is shipped under conditions that preserve its suitability for use and comply with the relevant regulations. For more details see EDQM website (Reference Standards Database).

6. Warranties, Liabilities and responsibility

- Safety

In the event of any safety concerns, please read carefully the safety data sheets or safety data statements available for each product. It is for Purchasers to determine independently the risks associated with the items and to take appropriate safety measures, including the provision of appropriate information, equipment and training of those persons coming into contact with the item.

- Warranties

Except for the use of Reference Standards in tests and assays carried out in accordance with the official methods of the European Pharmacopoeia and by professionals with the necessary technical skills and at their own discretion and risk, the EDQM makes no representation, contractual statement, or expression of opinion

Signed on: 12/05/2020
FORM/597 Rev. 04 [03/02/2020]



Rev.1 1/2

EK- 4. Tadalafil analiz sertifikası-2

concerning the quality or safety of any item supplied, the presence of any defect in it, or its fitness for any particular purpose except that as described above.

The EDQM does not guarantee that the items will meet the Purchaser's specific expectations. The EDQM only guarantees that the items (i) were fit for use according to EDQM's intended use of the product ;(ii) were fit for use at the moment that they were handed over to the carrier being responsible for the delivery of the items to the Purchaser with such accessories including packaging, delivery instructions or other instructions for the item's delivery and reception as the Purchaser may expect to receive; and (iii) possess qualities and performance capabilities which are normal in goods of the same type and which the Purchaser may expect given the nature of the goods and the information provided on the EDQM's website and (iv) the carrier and the Purchaser received clear and accurate instructions for the item's delivery and reception. No other guarantees, whether explicitly or implied, are given by the EDQM. The EDQM does not guarantee that the purchase or use of the items will not infringe any intellectual property rights, in particular patents.

- Limitation of Liability

In no event shall the EDQM be liable for any damages due to the use of items, included, but not limited to loss of business, loss of profit, loss of use, loss of opportunity, costs of procurement of substitute goods, services or systems or for any indirect, special, incidental, punitive or consequential damages, however caused and, whether in contract, tort or under any other theory of liability, whether or not the Purchaser has been advised of the possibility of such damages or costs.

Any liability of the EDQM for injury, loss or damage arising from the supply or use of any such item is in any event hereby excluded to the fullest extent permitted internationally accepted commercial standards; in particular, no liability is accepted for loss of profits or indirect or consequential loss.

7. Arbitration & Applicable Law

The aim of the EDQM is to settle any disputes amicably in the framework of its Terms and Conditions. In accordance with the provisions of article 21 of the General Agreement on the Privileges and Immunities of the Council of Europe, all disputes between the EDQM and the Purchaser as regards the application of these General Terms shall be submitted, if a mutual agreement cannot be reached between the parties, to arbitration as laid down in Order No. 481 of the Secretary General, approved by the Committee of Ministers.

This transaction shall be governed by the Council of Europe's relevant regulatory framework, complemented, where necessary, by French national substantive law.

8. Citation

Users shall ensure that any reference made to an EDQM Reference Standard in any publication, presentation or public document (ex. scientific articles, data sheets for kits) bears the exact name, and catalogue code of the Reference Standard and the exact name and address of EDQM as given on the first page of this information leaflet.

9. Adoption

The suitability for intended use has been officially adopted by the European Pharmacopoeia Commission.

10. Signature

This document is approved by:

Ms Caroline Offerlé
Head of the Quality and Risk Management Section

EK- 5. Vardenafil hidroklorür analiz sertifikası-1

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)
7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)
Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. + 33 (0)3 88 41 27 71
For any questions: www.edqm.eu (HelpDesk)



INFORMATION LEAFLET Ph. Eur. Reference Standard

Vardenafil hydrochloride CRS batch 2

1. Identification

Catalogue code: Y0001647

Unit Quantity: ca 130 mg

2. Scientific Information

2.1 Intended use

Reference Standard for laboratory tests as prescribed in the European Pharmacopoeia only.
Established for use with the monograph(s): 2782.

2.2 Analytical information related to intended use, when applicable

The "as is" content is : 90.5 % of C₂₃H₃₃ClN₆O₄S

2.3 Uncertainty of the assigned value, when applicable

The uncertainty of the assigned value is not stated since it is considered to be negligible in relation to the defined limits of the method-specific assays for which the reference standard is used. Please also refer to Ph. Eur. chapter 5.12.

2.4 Validity

Ph. Eur. RS are periodically tested to ensure their continuous fitness for purpose. For each valid Ph. Eur. RS, a Batch Validity Statement at the time of use can be downloaded and printed from the EDQM website (Reference Standards Database).

2.5 Instructions for use

The container should not be opened until required for use. Allow the closed container to equilibrate at ambient temperature before opening to avoid uptake of moisture. Use "as is". Do not dry/desiccate before use. Ph. Eur. RS are for immediate use. Once the container has been opened, its entire content must be used immediately. Any further storage and re-use are not warranted.

3. Storage conditions

In the original container at +5°C ± 3°C, protected from light. Re-instate promptly upon receipt.

4. Safety

For scientific research, development and analysis only. Handle in accordance with good occupational hygiene, safety and laboratory practices and take precautions to avoid exposure. More information is available at the EDQM website (Reference Standards Database): Safety Data Sheet for hazardous chemicals and Safety Data Statement for other materials.

5. Shipping conditions

Each Ph. Eur. RS is shipped under conditions that preserve its suitability for use and comply with the relevant regulations. For more details see EDQM website (Reference Standards Database).

6. Warranties, Liabilities and responsibility

- Safety

In the event of any safety concerns, please read carefully the safety data sheets or safety data statements available for each product. It is for Purchasers to determine independently the risks associated with the items and to take appropriate safety measures, including the provision of appropriate information, equipment and training of those persons coming into contact with the item.

- Warranties

Except for the use of Reference Standards in tests and assays carried out in accordance with the official methods of the European Pharmacopoeia and by professionals with the necessary technical skills and at their own discretion and risk, the EDQM makes no representation, contractual statement, or expression of opinion concerning the quality or safety of any item supplied, the presence of any defect in it, or its fitness for any particular purpose except that as described above.

Signed on: 19/12/2018
FORM/597 Rev. 02/29/10/2018



00Y0001647

Rev.2 1/2

EK- 6. Vardenafil hidroklorür analiz sertifikası-2

The EDQM does not guarantee that the items will meet the Purchaser's specific expectations. The EDQM only guarantees that the items (i) were fit for use according to EDQM's intended use of the product ;(ii) were fit for use at the moment that they were handed over to the carrier being responsible for the delivery of the items to the Purchaser with such accessories including packaging, delivery instructions or other instructions for the item's delivery and reception as the Purchaser may expect to receive; and (iii) possess qualities and performance capabilities which are normal in goods of the same type and which the Purchaser may expect given the nature of the goods and the information provided on the EDQM's website and (iv) the carrier and the Purchaser received clear and accurate instructions for the item's delivery and reception. No other guarantees, whether explicitly or implied, are given by the EDQM. The EDQM does not guarantee that the purchase or use of the items will not infringe any intellectual property rights, in particular patents.

- Limitation of Liability

In no event shall the EDQM be liable for any damages due to the use of items, included, but not limited to loss of business, loss of profit, loss of use, loss of opportunity, costs of procurement of substitute goods, services or systems or for any indirect, special, incidental, punitive or consequential damages, however caused and, whether in contract, tort or under any other theory of liability, whether or not the Purchaser has been advised of the possibility of such damages or costs.

Any liability of the EDQM for injury, loss or damage arising from the supply or use of any such item is in any event hereby excluded to the fullest extent permitted internationally accepted commercial standards; in particular, no liability is accepted for loss of profits or indirect or consequential loss.

7. Arbitration & Applicable Law

The aim of the EDQM is to settle any disputes amicably in the framework of its Terms and Conditions. In accordance with the provisions of article 21 of the General Agreement on the Privileges and Immunities of the Council of Europe, all disputes between the EDQM and the Purchaser as regards the application of these General Terms shall be submitted, if a mutual agreement cannot be reached between the parties, to arbitration as laid down in Order No. 481 of the Secretary General, approved by the Committee of Ministers.

This transaction shall be governed by the Council of Europe's relevant regulatory framework, complemented, where necessary, by French national substantive law.

8. Citation

Users shall ensure that any reference made to an EDQM Reference Standard in any publication, presentation or public document (ex. scientific articles, data sheets for kits) bears the exact name, and catalogue code of the Reference Standard and the exact name and address of EDQM as given on the first page of this information leaflet.

9. Adoption

The suitability for intended use has been officially adopted by the European Pharmacopoeia Commission.

10. Signature

This document is electronically signed by:

Dr Pierre Leveau
Head of the Quality, Safety and Environment Division

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	YTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya	2013
Yüksek Lisans	YTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya	2016
Yüksek Lisans	YTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	2018

İŞ TECRÜBESİ

Tarih	Kurum	Görev
2016	MSGSÜ, MERLAB	Proje Bursiyeri
2016-2019	İstanbul Medipol Üniversitesi, REMER	Proje Bursiyeri / Sentez Uzmanı
2019-Halen	DEVA Holding, ARGE API	API Sentez Uzman

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Kongreler;

1. Elif Keskin, Feray Aydoğan, Çiğdem Yolaçan. “İzatoik Anhidritten Türeyen Kiral Dipeptidlerin Sentezi ve Katalitik Aktivite Çalışmaları”, 27. Ulusal Kimya Kongresi, Çanakkale, 2015.
2. Elif Keskin, Feray Aydoğan, Çiğdem Yolaçan. “L-Prolin Temelli Kiral Dipeptid Bileşik Sentezi ve Katalitik Aktivite Çalışmaları”, 4. İlaç Kimyası Kongresi, İzmir, 2016.

3. Aslıhan Gölcük, Elif Keskin, Bilgesu Onur Sucu, Mustafa Güzel, Mehmet Hikmet Üçışık. “Contemporary Drug Discovery and Delivery Studies for Leishmaniasis Treatment as Antiparaitic Agents: Synthesis of Novel BNIP Analogs”, 4. Uluslararası İlaç Geliştirme Kongresi, İstanbul, 2016.
4. Elif Keskin, Mustafa Güzel, Mehmet Hikmet Üçışık. “Leishmaniasis’in Tedavisine Yönelik BNIP Temelli Özgün İlaç Moleküllerinin Tasarımı ve Sentezi ”, 5. İlaç Kimyası Kongresi, Antalya, 2017.
5. Elif Keskin, Bilge Coşkuner Filiz, Aysel Kantürk Figen, “Amonyum Boran Pelletlerinin Farklı Koşullar Altında Depolanmasının İncelenmesi: Fiziksel, Stabilitate ve Performans Testleri”, 8. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, İstanbul, 2017.
6. Elif Keskin, Zeynep İşlek, Mustafa Güzel, Mehmet Hikmet Üçışık, “Leishmania Hastalığına Karşı Etkin Yeni BNIP Türevlerinin Tasarım ve Sentezi”, 6.İlaç Kimyası Kongresi, Antalya, 2018.
7. Mehmet Hikmet Üçışık, Zeynep İşlek, Elif Keskin, Bilgesu Onur Sucu, Mustafa Güzel, Fikrettin Şahin, “Solid Lipid Emulsions for Delivery of Water-Insoluble Drug Candidates Against Leishmaniasis Solid Lipid Emulsions for Delivery of Water Insoluble Drug Candidates Against Leishmaniasis”, CLINAM (European Foundation for Clinical Nanomedicine), Basel, İsviçre, 2018.
8. Elif Keskin, Essam Hamied Ahmed Hanashalshahaby, Özge Sensoy, Mustafa Güzel, “Design and Synthesis of Novel Heterobivalent Molecules having Therapeutic Potential for Treatment of Parkinson s Disease”, 6. Uluslararası İlaç Geliştirme Kongresi, İstanbul, 2018.

Yayınlar;

1. Elif Keskin, Bilge Coşkuner Filiz, Serpil Kılıç Depren, Aysel Kantürk Figen, “Recommendations for Ammonia Borane Composite Pellets as a Hydrogen Storage Medium”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018, 1-7.
2. Elif Keskin, Bilgesu Onur Sucu, Mehmet Hikmet Üçışık, Mustafa Güzel, “Novel Synthetic Approaches for Bisnaphthalimidopropyl (BNIP)

Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents for the Treatment of Leishmaniasis”, *Molecules*, 2019, 24(24), 4607.

3. Elif Keskin, Cigdem Yolacan, Feray Aydogan, “Synthesis of New Di- and Triamides as Potential Organocatalysts for Asymmetric Aldol Reaction in Water”, *Acta Chim. Slov.*, 2020, 67, 1014–1023.
4. Zeynep Islek, Mehmet Hikmet Ucisik, Elif Keskin, Bilgesu Onur Sucu, Ana G Gomes-Alves, Ana Maria Tomás, Mustafa Guzel, Fikrettin Sahin, “Antileishmanial Activity of BNIPDaact-and BNIPDanon-loaded Emulsomes on Leishmania infantum Parasites”, *Frontiers in Nanotechnology*, basım aşamasında.

Patentler;

1. Mustafa Guzel, Elif Keskin, Mehmet Hikmet Ucisik, Zeynep Islek, Fikrettin Sahin “Naphthalimide Derivatives as Anti-Parasitic Agents for the Treatment of Leishmaniasis as well as Viral, Bacterial and Neoplastic Diseases”, WO2020139291A1
2. Aslıhan Gölcük, Bilgesu Onur Sucu, Elif Keskin, Mehmet Hikmet Ucisik, Mustafa Guzel, “Parazitik ve Neoplastik Hastalıkların Tedavisinde Kullanıma Uygun Özgün İlaç Molekülleri ve Bunların Hazırlanmasında Kullanılacak Usuller”, TR201618160A2
3. Aslıhan Gölcük, Mustafa Güzel, Elif Keskin, Bilgesu Onur Sucu, Mehmet Hikmet Üçışık, “Original Drug Molecules for the Treatment of Parasitic and Neoplastic Diseases and Methods for Preparation Thereof”, WO2018106200A1
4. Elif Keskin, Aslıhan Gölcük, Bilgesu Onur Sucu, Mustafa Güzel, Mehmet Hikmet Üçışık, “Leishmaniasis’in Tedavisine Yönelik Özgün İlaç Moleküllerinin Keşfi ve Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi”, PCT/TR2017/000131.
5. Özge Şensoy, Mustafa Güzel, Bilal Ersen Kerman, Neslihan Üstündağ Okur, Samman Mansoor, Essam Alshahaby, Elif Keskin, Serdar Durdağı, Gülru Kayık, “Parkinson Hastalığının Tedavisinde Kullanıma Uygun Heterobivalent Ligandlar”, PCT/TR2018/050166.

6. Özge Şensoy, Mustafa Güzel, Bilal Ersen Kerman, Neslihan Üstündağ Okur, Samman Mansoor, Essam Alshahaby, Elif Keskin, Serdar Durdağı, Gülru “Kayık, Heterobivalent Ligands Suitable For Use in The Treatment of Parkinson’s Disease”, US 11,053,270 B2
7. Patent holder: DEVA Holding A.Ş.; Inventors: Esen Bellur Atici, Elif Keskin, Philipp Daniel Haas, Hartwig Andreas Steckel, Eltrombopag Novel Salts, Application number: *PCT/TR2020/050899*, Filing: 30.09.2020.
8. Patent holder: DEVA Holding A.Ş.; Inventors: Esen Bellur Atici, Elif Keskin, Philipp Daniel Haas, Hartwig Andreas Steckel, New polymorph of vismodegib and method for its preparation, Application number: *PCT/TR2021/050644*, Filing: 23.06.2021.

Tezler;

1. Elif Keskin, Feray Aydoğan, “İyonik Sıvılar ve Organik Sentezde Katalitik Etkileri”, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü lisans Bitirme Tezi, 2013.
2. Elif Keskin, Feray Aydoğan, “Organokatalizör Olarak Kullanılabilecek Diamid Yapılı Bileşiklerin Sentezi”, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü, Yüksek lisans Bitirme Tezi, 2016.
3. Elif Keskin, Aysel Kantürk Figen, “Amonyum Boran Pelletlerin Hidrojen Üretim Özelliklerinin İncelenmesi”, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Yüksek lisans Bitirme Tezi, 2017.