

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

ASEMETASİN (ACEMETACİN) ETKEN MADDEİNİN HPLC'DE METOT
VALİDASYONU VE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özer Can ÇAPRAZ

OCAK - 2024

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

ASEMETASİN (ACEMETACİN) ETKEN MADDEİNİN HPLC'DE METOT
VALİDASYONU VE OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özer Can ÇAPRAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR
Eş Danışman: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

Ocak – 2024

“ASEMETASİN (ACEMETACİN) ETKEN MADDEİNİN HPLC’DE METOT VALİDASYONU VE OPTİMİZASYONU” adlı tez çalışması adlı tez çalışması **Özer Can ÇAPRAZ** tarafından hazırlanmış olup aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR
Kırklareli Üniversitesi

.....

Eş Danışmanı:

Prof. Dr. Cemile ÖZCAN
Kırklareli Üniversitesi

.....

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Dilek BAKIRCIOĞLU
Trakya Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Nurdan Kurnaz YETİM.
Kırklareli Üniversitesi

.....

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

.....
Doç. Dr. H. Hale KARAYER
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez ve Proje Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum bilgileri, verileri ve dokümanları, değişik sonuç verebilecek şekilde araştırma araç gereçleri kullanmadan, işlem veya kayıt sonuçlarını değiştirmeden akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza
Özer Can ÇAPRAZ
16/01/2024

ÖZET

ASEMETASİN (ACEMETACİN) ETKEN MADDEİNİN HPLC'DE METOT VALİDASYONU VE OPTİMİZASYONU

Özer Can ÇAPRAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kırklareli Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR

Eş Danışman: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

OCAK 2024, 49 sayfa

Asetmetasin, anti-inflamatuar ve analjetik (ağrı giderici) etkiler üreten bir siklooksijenaz (COX) inhibitörü olarak görev yapar. Vücutta kısmen COX inhibitörü olarak da görev yapan indometazine metabolize edilir. Aynı mekanizma, klinik olarak kullanılmayan antipiretik ve antiplatelet etkilerin yanı sıra tipik NSAID yan etkilerinden de sorumludur. Asetmetasinin bir avantajı, muhtemelen asetmetasinin lökotrien B₄ sentezi ve tümör nekroz faktörü (TNF) ekspresyonu artışı üzerinde daha az etkiye sahip olması ve lökosit-endotelyal yapışmanın daha az indüklenmesine yol açması nedeniyle, indometazine kıyasla mide hasarını azaltmasıdır.

Bu çalışmanın amacı, Asetmetasin için HPLC-DAD-UV ile yeni bir metot validasyonu ve optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Asetmetasin için yöntem doğrulaması, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık ve seçicilik çalışmaları ile doğrulanmıştır. Asetmetasin için optimizasyon ve doğrulamanın çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asetmetasin, COX inhibitörü, HPLC, TNF.

ABSTRACT

METHOD VALIDATION AND OPTIMIZATION OF ACEMETACIN (ACEMETACIN) ACTIVE SUBSTANCE BY HPLC

Özer Can ÇAPRAZ

MSc Thesis

Kirklareli University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR

Co-Supervisor: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

January 2024, 49 pages

Acemetacin acts as a cyclooxygenase (COX) inhibitor, producing anti-inflammatory and analgetic (pain-relieving) effects. It is partially metabolized in the body to indomethacin, which also acts as a COX inhibitor. The same mechanism is responsible for typical NSAID side effects as well as antipyretic and antiplatelet effects that are not used clinically. An advantage of acemetacin is probably that acemetacin has less effect on the increase of leukotriene B₄ synthesis and tumor necrosis factor (TNF) expression and causes less induction of leukocyte-endothelial adhesion. It reduces stomach damage compared to indomethacin because it causes.

The aim of this study is to conduct a new method validation and optimization study for Acemetacin with HPLC-DAD-UV. Method validation for acemetacin was confirmed by linearity, precision, accuracy, robustness and selectivity studies. Optimization and validation studies have been conducted for acemetacin.

Anahtar Kelimeler: Acemetacin, COX inhibitor, HPLC, TNF

TEŞEKKÜR

Çalışmamda desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmanın yürütülmesine katkıda bulunan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Kırklareli Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden değerli hocam Prof. Dr. Cemile ÖZCAN başta olmak üzere Deva Holding. Ar-Ge Müdürüm Dr. Cem SARIOĞLU ile Analitik şefim Kadir ALICI 'ya teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Asetmetasin.....	4
2.2 Asetmetasin'in Fotodinamik Tedavideki Rolü.....	4
2.3. Analitik Metot Validasyonu.....	9
2.3.1. Doğruluk	6
2.3.2. Kesinlik	6
2.3.3. Seçicilik	6
2.3.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	7
2.3.5. Sağlamlık	7
3. METERYAL METOT	9
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Standartlar ve Reaktifler.....	9
3.2. Validasyon Çalışmaları.....	13
3.2.1. Filtre Etkisi	Error! Bookmark not defined.
3.2.2. Seçicilik	Error! Bookmark not defined.
3.2.3. Sistem Uygunluğu.....	15
3.3.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	15
3.3.5. Doğruluk	18
3.3.6. Kesinlik	19
3.3.7. Sağlamlık	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR.....	47

ÖZGEÇMİŞ	49
-----------------------	-----------



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge 2.1. Analitik validasyon sırasında dikkate alınması gereken özellikler.	8
Çizelge 3.1. Asetetasin 60 mg kapsül için kullanılan analitik metot parametreleri	10
Çizelge 4.1. Filtre etkisi	25
Çizelge 4.2. Seçicilik sonuçları	26
Çizelge 4.3. Asetetasin için sistem uygunluk sonuçları	29
Çizelge 4.4. Asetetasin için elde edilen doğrusallık sonuçları	30
Çizelge 4.5. Uygulama aralığı sonuçları	33
Çizelge 4.6. Doğruluk sonuçları	34
Çizelge 4.7. Asetetasin için sistem kesinliği sonuçları	35
Çizelge 4.8. Yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik sonuçları	36
Çizelge 4.9. İki analizci sonuçları arasındaki fark	37
Çizelge 4.10. Akış hızı Standard değişimi sonuçları	37
Çizelge 4.11. Akış hızı Numune değişimi sonuçları	38
Çizelge 4.12. Kolon Sıcaklığı Standart değişimi sonuçları	38
Çizelge 4.13. Kolon Sıcaklığı Numune değişimi sonuçları	39
Çizelge 4.14. Çözelti stabilitesi sonuçları	42
Çizelge 4.15 Mobil faz stabilitesi sonuçları	43
Çizelge 4.16. Asetetasin için HPLC’de uygulanan optimum kromatografik koşullar .	44

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1: Asemetasin kimyasal yapısı.	4
Şekil 4.1: Blank çözeltisi HPLC kromatogramı.	26
Şekil 4.2: Matrix çözeltisi HPLC kromatogramı.	26
Şekil 4.3: Standart çözeltisi HPLC kromatogramı..	27
Şekil 4.4: Standart çözeltisi pik saflığı değerleri.	27
Şekil 4.5: Numune çözeltisi pik saflığı değerleri..	27
Şekil 4.6: Asemetasin etken maddesinin XRD monografi	28
Şekil 4.7: Doğrusallık için doğrusallık çalışması HPLC kromatogramı.	31
Şekil 4.8: Doğrusallık kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 4.9: Akış hızı: 1.0 mL/dk ,1.2 mL/dk ve 1.4 mL/dk değişim kromatogramları.....	40
Şekil 4.10: Kolon sıcaklığı 35 °C , 40 °C , 45 °C değişim grafiği..	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

mL	Mililitre
L	Litre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
M	Molarite
m	Metre
dk	Dakika

Kısaltmalar

Açıklamalar

ACN	Asetonitril
ACM	Asetmetasin
COX	Siklooksijenaz
DAD	Diode-Array Detection
DST	Dünya Sağlık Teşkilatı
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	International Conference on Harmonization
RSD	Relatif Standart Sapma
S/N	Sinyal/Gürültü
NSAID	Antiinflamatuvar ilaç
SDPD	X-ışını kırınım

1. GİRİŞ

Ağrı, doktora başvurmaının en sık rastlanan nedenidir. Hastanın ağrısını önlemek için klinisyen opioid ve opioid olmayan aljezikleri seçebilir. Günümüzde ağrı tedavisi için en çok reçete edilen ilaçlar arasında opioid olmayan analjezikler yer almaktadır.

Ağrıyı hafifletme potansiyelleri nedeniyle tıbbi tedavide önemli bir rol oynarlar. Mevcut çeşitli analjeziklere rağmen, giderilmeyen ağrı, hematolojik toksisiteler, böbrek fonksiyon bozuklukları ve mide-bağırsak yaraları gibi önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir [1,2]. Oral yolla alınan ilaç tedavisi bu hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan yöntemlerden biridir. Diğer yöntemlere göre cerrahi operasyon gerektirmez.

Sonuç olarak, tıp araştırmacıları son zamanlarda, güvenlik profilleri iyileştirilmiş, opiatlar kadar etkili olan ilaçların geliştirilmesine daha fazla ilgi gösterdiler. Asetamin (ACM), steroidal olmayan antiinflatuar ilaç (NSAID) sınıfına giren, opioid olmayan analjeziklerden biridir. Günümüzde asetamin bel ağrısı, ameliyat sonrası ağrı, travma ağrısı vb. tedavisinde potansiyel olarak faydalıdır [3,4].

Asetamin, iltihap giderici (anti-inflatuar), ağrı kesici ve ateş düşürücü etkilere sahip steroid olmayan anti-inflatuar (NSAİ) bir ilaç grubuna dahildir [5].

Bu çalışmada Asetamin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyot array detektörü/ultraviyole (HPLC-PDA/UV) dedektör kullanılarak metod validasyonu ve optimizasyonu çalışmasının yapılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Asetmetasin

Ticari adı Acetudil olan Asetmetasin (Şekil 2.1), IUPAC adlandırma 2-[2-[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetyl] oksiasetik asittir. CAS Kayıt Numarası 53164-05-9'dır. Molekül formülü C₂₁H₁₈ClNO₆ molekül ağırlığı 415.82 g/mol olan asetmetasin, indometazinin glikolik asit esteri'dir. 150-153 °C'de (302-307 °F) eriyen ince, hafif sarımsı, kristal bir tozdur. Bilinen dört susuz (susuz) ve iki monohidrat kristal formuyla polimorfiktir [6]. İndometazinin bir karboksimetil esteri olan asetmetasin, Boitze ve arkadaşları tarafından geliştirilen güçlü bir anti-inflamatuar ilaçtır [7].

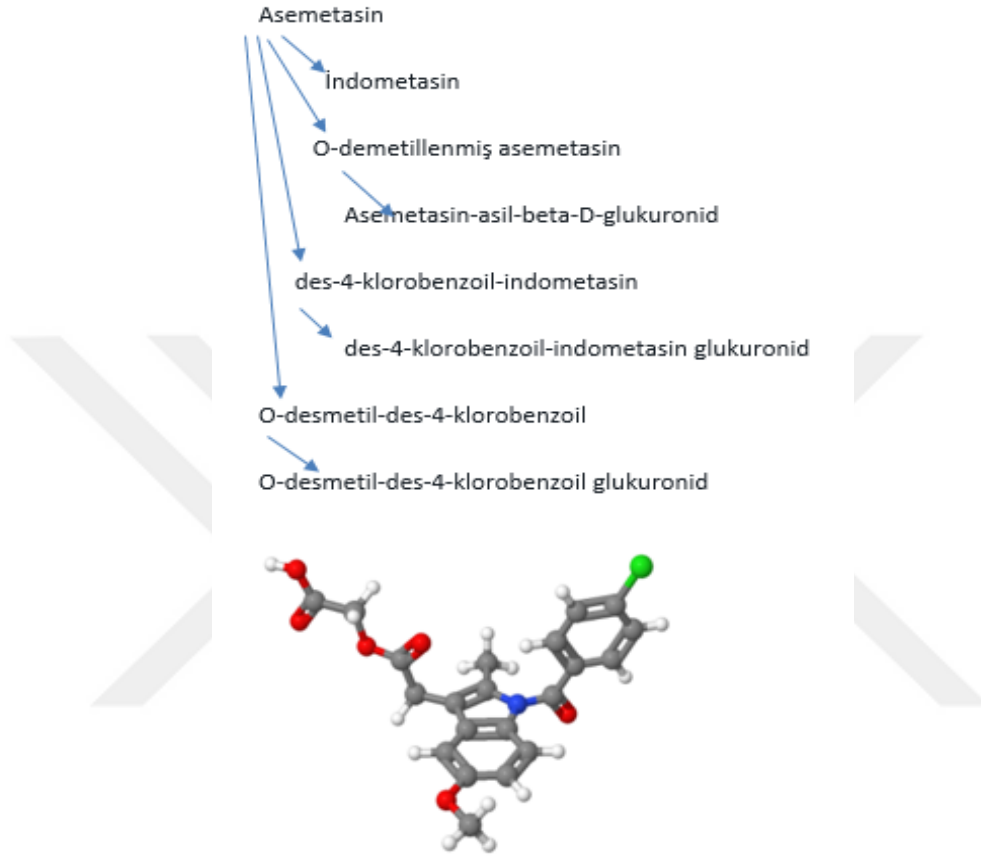
Asetmetasin, karboksilik asit katomeri ve dimer O-H...O sentonlarına sahip bir API polimorfunun ilk örneğidir. Dimer yapısındakilerle karşılaştırıldığında daha güçlü C-H...O ve C-Cl...O etkileşimlerinden katomer motifinin yardımcı stabilizasyonu bir polimorf çifti için tartışılmıştır. Kararlı dimer polimorfunun kristal yapısı, toz X-ışını kırınım verilerinden (SDPD) yapı tespiti yoluyla çözülmüştür [8].

Asetmetasinin sadece indometazinin bir ön ilacı değil aynı zamanda muhtemelen lökosit yapışmasında bir azalmayı da içeren mide koruyucu mekanizmalara sahip bir ajan olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur [9,10].

Daha güvenli bir ilaç sağlamak amacıyla Almanya'da E. Merck and Company tarafından geliştirilen, fakat gastrointestinal etkilerin iyileştirilmesi dışında asetmetasinin metabolizması indometasin oluşumuna yol açtığı ve aynı yan etkileri gösterdiği belirlenmiştir [11].

Günde iki kez asetmetasinin 8 gün boyunca oral uygulanmasından sonra, yaşlılarda yaşa bağlı C_{maks} değeri 276,8 ng/mL iken, genç bireylerde 187 ng/mL olmuştur. Ayrıca 2,5 saatlik bir T_{max} ve 483-712 ng·s/mL aralığında bir AUC (ilacın sistemik dolaşıma geçen miktarını) olduğu belirlenmiştir [12]. Tekrarlanan dozlardan sonra asetmetasinin biyoyararlanımı plazmada yaklaşık %66 ve idrarda %64'tür [13].

Asetmetasin yüksek oranda metabolize olur ve ana ve aktif metaboliti olan indometasini oluşturmak üzere esterolitik bölünmeyle parçalanır. O-demetilasyon, N-desasilasyon reaksiyonuyla yapılan diğer inaktif metabolitleri sunar ve bunların bir kısmı da glukuronik asit ile konjugasyon yoluyla dönüştürülür [14].



Şekil 2.1 Asetmetasinin bozunma ve kimyasal yapısı

2.2. Asetmetasin'nin Ağrı Tedavisindeki Rolü

Asetmetasin, anti-inflamatuar ve analjetik (ağrı giderici) etkiler üreten bir siklooksijenaz (COX) inhibitörüdür. Asetmetasin, COX enziminin etkisinden türetilen proinflamatuar medyatörlerin üretiminin seçici olmayan bir inhibitörüdür. COX, yağ asitlerinden türetilen ve hücre zarında depolanan moleküller olan prostaglandin E2 ve F2'nin sentezi için gereklidir [15]. Asetmetasin metabolize olur ve aynı zamanda seçici olmayan bir COX inhibitörü olan ana metabolit indometasini oluşturur ve nitrik oksit yolunu ve vazokonstriksiyonu modüle ederek polimorfonükleer lökositlerin hareketliliğini ve serebral akışın azalmasını engelleme kapasitesi sergiler [11].

1829'un başlarında, salisilik asittin izolasyonu ile birlikte NSAİİ'ler ağrının (düşük dozlarda) ve inflamasyonun (yüksek dozlarda) ilaçla tedavisinin önemli bir kısmını oluşturmaya başladı. NSAİİ'lerin popüler olmasında opoitlere göre çok az bağımlı potansiyeli taşıması ve sedasyon veya solunum depresyonu yapmaması büyük rol oynamaktadır.

Asetasetinin etkisi, antiinflamatuvar ve analjezik etki oluşturan prostaglandin sentezinde zayıf bir azalmaya neden olur. Prostaglandinin zayıf inhibisyonu, gastrointestinal sistemin mukoza zarında meydana gelen hasarı önemli ölçüde azaltır. Çalışmalar, asetasetinin mast hücrelerinden histamin salınımını ve hipertermi oluşumunu güçlü bir şekilde engellediğini göstermiştir. Asetasetin etkisi ayrıca sistolik ve diyastolik kan basıncında değişikliklere ve ayrıca trombosit agregasyonunun inhibisyonuna neden olur [16].

Daha güvenli bir ilaç sağlamak amacıyla Almanya'da E. Merck and Company tarafından geliştirildi, ancak gastrointestinal etkilerin iyileştirilmesi dışında asetasetinin metabolizması indometasin oluşumuna yol açtı ve aynı yan etkileri korudu [11].

Ne yazık ki yanlış kullanılan ilaçların başında analjezikler gelmektedir. Yanlış kullanımın kökeni, hekimlerin ve hastaların bu ilaç grubuna karşı bilgi ve anlayışlarındaki eksikliğe dayanmaktadır. Son 20-30 yıldır ağrı biliminin ortaya çıkması ile analjezikler daha doğru kullanılır hale gelmiştir. Analjeziklerin doğru kullanımını amaçlayan çalışmalar Dünya Sağlık Teşkilatı (DST) bünyesinde 1980'li yıllarda başlamıştır. 1986 yılında kanser ağrılarında analjezik kullanım ilkeleri broşürü yayınlamıştır.

2.3. Analitik Metot Validasyonu

Analitik bir prosedürün doğruluğunu kanıtlamak için yapılan validasyon çalışmaları, laboratuvarda uygulanan prosedürde metot ve yöntem performansına yönelik ihtiyaçların karşılanması için tespit edilen işlemlerdir. Metot validasyonlarında doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusalılık, çalışma aralığı, sağlamlık, vb. kullanılan validasyon parametreleridir [17].

2.3.1. Doğruluk

Analitik prosedürün doğruluğu, gerçek değerler ile analitik prosedürden elde edilen test sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilmektedir. Analitik prosedürümüzün doğruluğu çalışma aralığına karşı saptanır. Etken maddenin miktar tayininde doğruluk, analitik prosedürün bilinen saflıktaki analite uygulanmasıyla ya da iyi karakterize edilmiş bir prosedürün sonuçları ile karşılaştırılmasıyla belirlenebilmektedir. Formülize edilmiş müstahzarda (önceden hazırlanarak eczanelerde satışa sunulan ilaç, hazır ilaç, vs) ise, çalışma aralığına göre, derişimi bilinen etken maddemizin ürün içerisindeki karışıma (matrix) eklenmesiyle belirlenir. Doğruluk, numunede eklenen miktardaki etken maddenin geri kazanımının yüzdesiyle ya da güven aralığı ile birlikte ortalama ve kabul edilen gerçek değer arasındaki farkların hesaplandığı bir validasyondur. Analitik yöntemin doğruluğu için miktar tayini derişimi %100 kabul edilerek %80, %100, %120 olmak üzere 3 derişimde 3 paralel numune hazırlığı yapılarak çalışılır. Her bir numuneye %100 derişimdeki matrix karışımı ilave edilir. Tüm seviyeler için 3'er numune hazırlanır. Her numuneden 2'şer enjeksiyon yapılır [17].

2.3.2. Kesinlik

Analitik prosedürün kesinliği seri yapılan ölçümlerin standart sapması ya da relatif Standard sapması (%RSD) olarak ifade edilmektedir. Analitik prosedürün tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür [17].

Uluslararası İnsan Kullanımı Amacıyla İlaçlar İçin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH=International Conference on Harmonisation) dökümanları kesinliğin, prosedürün belirlediği çalışma aralıklarında üçer derişimlerden 3'er tekrar şeklinde ya da % 100 lük test derişiminde 6 tekrar şeklinde değerlendirilmesini önerilmektedir [17].

2.3.3. Seçicilik

ICH'e göre seçicilik; safsızlıklar, bozunma ürünleri ve matris bileşenleri gibi mevcut bileşenlerin varlığında analitin kesin olarak değerlendirilme çalışmasıdır [18]. Miktar tayini analizlerinde prosedürün, safsızlıkların veya ekşiyanların (ilaç katkı maddeleri) varlığından etkilenmediğinin gösterilebilmesi gerekmektedir. Miktar tayini analizleri yapıldığında eklenen maddelerin miktar tayini sonuçlarını etkilemeyecek şekilde etken maddeye ya da ürüne uygun seviyede safsızlık ya da yardımcı madde ilave edilmesiyle

yapılmaktadır. Miktar tayini analizlerindeki sonuçlar, kromatografik safsızlık testlerinde ise safsızlık profilleri kıyaslanmaktadır [17].

XRD seçicilik çalışması asemetasin etken maddemizin two-thate (2-Theta) koşullarının sağlaması beklenmelidir [19].

2.3.4. Doğrusallık ve çalışma aralığı

Analitik prosedürün doğrusallığı, test sonuçlarının verilen aralık içinde, numunedeki etken madde derişimi ile orantılı olması durumudur. Doğrusallık çalışmasında etken madde derişimi ve miktar tayini sonuçları lineer bir ilişki içinde olmalıdır. Analitik prosedürün çalışma aralığı uygun kesinlik, doğrusallık ve doğruluk verileri kullanılarak elde edilen veriler etken maddenin en yüksek ve en düşük seviye aralığı olarak tanımlanmaktadır. Doğrusallık analitik prosedürün çalışma aralığına karşı saptanır. Numunedeki etken madde derişimine karşı dedektör sinyalinin çizildiği grafikdir. Eğer etken madde derişimi ile detektörden elde edilen sinyal doğrusal ilişkiliyse test sonuçları uygun istatistik metotlarla belirlenir (regresyon doğrusunun hesabı en küçük kareler yöntemiyle yapılır) [17]. Çalışma aralığı uygulanabilmesi için az beş derişim kullanılmalıdır [20]. ICH in önerdiği çalışma aralıkları [18]:

- Miktar tayini için: Test derişimi %80 ile %120'si
- İlgili bileşikler için: kabul kriterinin %50 si ile %120'si
- İçerik tekdüzeliği için: Test derişimi %70'i ile %130'u
- Dissolüsyon için: Tanımlı aralığın $\pm$ %20'si.

2.3.5. Sağlamlık

Analitik bir prosedürün sağlamlığı, prosedür parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür. Tipik parametreler, çözelti stabilitesi, farklı ekipman ve farklı analizci olarak sıralanabilir. Likit kromatografide ise tipik parametreler mobil faz derişimi, stabilitesi, pH'ı, farklı lot numaralı kolon, sıcaklık ve akış hızıdır [17].

Farklı türde analitik prosedürler kullanılırken dikkate alınması gereken özellikler (testler dahil) Çizelge2.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Analitik validasyon sırasında dikkate alınması gereken özellikler [20]

Parametreler	Tanıma	Tayin testleri	Limit testleri	Miktar Tayini
Doğruluk	-	✓	-	✓
Kesinlik				
Tekrarlanabilirlik	-	✓	-	✓
Ara kesinlik ^a	-	✓	-	✓
Seçicilik	✓	✓	✓	✓
Doğrusallık	-	✓	-	✓
Çalışma aralığı	-	✓	-	✓

^a Yapılması zorunlu değil

- Değerlendirilmez.

✓ Değerlendirilir.

Çalışmamızda ise asemetasin için hızlı, doğruluğu ve kesinliği yüksek, seçici, düşük RSD yüzdesi ve kısa sürede analizi yapılabilen bir teknik geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile metot validasyonu, geliştirilmesi ve iyi tekrarlanabilirlik sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca optimize edilen koşullar gerçek örneklerle uygulanmıştır.

3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Standartlar ve Reaktifler

Asemetasin bileşeninin metot validasyonu ve optimizasyonu Shimadzu marka LC-2030C sistemi kullanılarak HPLC-PDA/UV sistemi ile yapıldı. Standartların ve numunelerin hazırlanmasında ultrasonik banyo (Bandelin RK 1050 CH, RR.20762 modeli), terazi (Mettler Toledo, MX5 ve XP205), pH metre (Mettler Toledo) kullanıldı.

Asemetasin standardı (Lot 1836H013, %100.0 saflıkta) Siegfried kaynağı kullanıldı. Kullanılan diğer reaktifler de HPLC kullanımına uygun saflıkta ve Sigma- Aldrich veya muadiliydi. Çalışmamızda kimyasal madde olarak asetonyril (ACN) (JT Baker, Lot 2124405860), Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Lot B2037170), Sodyum hidroksit (J.T Baker, Lot 2209706814), Orto fosforik asit (MERCK, Lot K44422173) kullanıldı.

Asemetasin 60 mg kapsül miktar tayini validasyonu için oluşturulurken kullanılan HPLC/DAD cihazındaki kromatografik koşullar çizelge 3.1’de gösterilmiştir

Çizelge 3.1 Asetetasin 60 mg kapsül için kullanılan analitik metot parametreleri.

Parametreler	Analitik koşullar
Kolon	:Nucleosil 100 C18
Partikül Boyut	:5µm
Uzunluk	:250 mm
Çap	:4,0mm
Dalga boyu	: 235 nm
Akış hızı	: 1,2 mL/dk
Kolon sıcaklığı	: 40°C
Autosampler Sıcaklığı	: 15°C
Enjeksiyon hacmi	: 5µL
Analiz süresi	: 8 dk
Pik alıkonma süresi	:~6,3 dk
Kullanılan çözücüler	:Asetonitril, pH 6,8 tamponu ve ultra saf su
Hareketli faz	:Hareketli faz-A/B (80/20) (h/h)

Çözeltilerin Hazırlanması:

Tampon Çözelti Hazırlığı: 1,31 gr Sodyum dihidrojen fosfat 1000 mL suda çözülür. pH'ı %85'lik ortofosforik asit ile $2,5\pm0,05$ 'e ayarlanır.

Derişik Sodyum Hidroksit Çözeltisi: 42 gr NaOH 100 mL suda çözülür.

Mobil Faz: Tampon çözeltisi: Asetonitril (ACN) h:h (450:550)

Çözücü: Asetonitril ve pH 6,8 tampon çözeltisi.

pH 6,8 Tampon Çözeltisi: 6,8 gr sodyum dihidrojen fosfat 1000 mL suda çözülür, pH'ı derişik sodyum hidroksit çözeltisi ile $6,8\pm0,05$ 'e ayarlanır.

Blank Çözeltisi Hazırlığı: Çözücü.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg Asetetasin standardı 50.0 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik

balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33mg Asemetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}= 0,066 \text{ mg/mL}$).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: 20 adet kapsül dolu ve boş tartımları alındıktan sonra içerikleri karıştırılır. Bu karışımdan yaklaşık 78,1 mg (33 mg asemetasin'e denk) tartılarak 50 mL balon joje'ye aktarılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 5 dakika ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}= 0,066 \text{ mg/mL}$).

HPLC cihazı kullanılacağı zaman baseline düzelene kadar mobil faz akışı verildi ve ICH in önerdiği prosedüre göre aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı:

- Çözücü 'den 1 enjeksiyon yapılır.
- Standart çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Kontrol Standart çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılır.
- Numune çözeltisinden 2 paralel numune hazırlığı yapılır, her bir numune için 2 enjeksiyon yapılır.
- Her 12 numune enjeksiyonunda bir, standart çözeltisinden ara standart olarak 2 enjeksiyon yapılır.
- Analiz sonunda standart çözeltisinden son standart olarak 2 enjeksiyon yapılır.

ICH in önerdiği prosedüre göre sistem uygunluk parametreleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki Asemetasin piki için $RSD \leq 2,0$ olmalı,

- Standart çözeltisindeki Asetetasin pikleri için kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalı,
- Standart çözeltisindeki Asetetasin pikleri için teorik plaka sayısı en az 2000 olmalı,
- Kontrol standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum %98,0-%102,0 arasında olmalı,
- Ara standart çözeltisi ve son standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98,0 -%102,0 arasında olmalı,

Asetetasin miktarını hesaplariken aşağıdaki denklem kullanıldı;

$$Mg_{Asetetasin} = \frac{A_{Num}}{A_{Std}} \times \frac{W_{Std}}{50} \times \frac{5}{50} \times \frac{P}{100} \times \frac{50}{W_{Num}} \times \frac{50}{5} \times W_{ort}$$

A_{Num}: Numune çözeltisine ait kromatogramdaki asetetasin izomer pik alanları toplamı

A_{Std}: Standart çözeltisine ait kromatogramdaki asetetasin izomer pik alanları toplamı

W_{Std}: Asetetasin çalışma standardı tartım miktarı (mg)

P: Asetetasin çalışma standardı potensi, %

W_{Num}: Numune tartım miktarı (mg)

W_{Ort}: Ortalama numune tartım miktarı (mg)

Sonuçların Raporlandırılması:

Asetetasin 60 mg kapsül miktar tayini için sonuç verilirken virgülden sonra 2 basamak olarak raporlandırıldı.

Kabul Kriteri:

Serbest bırakma ve raf ömrü 60,00 mg olan ürün için kabul kriteri 57,00 mg – 63,00 mg (%95,0 – %105,0) aralığında kabul edilmektedir.

3.2. Validasyon Çalışmaları

HPLC’de asemetasin miktar tayini analizi için validasyon-optimizasyon çalışmaları yapılırken filtre etkisi, doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık, çalışma aralığı, sağlamlık parametreleri çalışıldı. Bu parametreler, belirtilen koşullarda ve kabul kriterlerine uygunluğu saptanarak valide edildi.

3.2.1. Filtre Etkisi

Tanımlama: Standart çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı. Standart çözeltisi için ardışık 6 enjeksiyon yapıldı. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. Sistem uygunluk sonuçları, yöntem kesinliği çalışmasından alındı.

Çözelti Hazırlığı

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg Asemetasin standardı 50 mL’lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balon jojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 10 mL enjektör yardımı ile 1 mL’den 10 mL’ye kadar kullanılacak filtelerden 1’er mL HPLC viallerine sırası ile aktarılır ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar

- Referans çözeltisindeki asemetasin pikinin Tailing faktörü 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- %98,0 - %102,0 güven aralığında filtrenin doygunluğa ulaştığı an gözlemlenir.

3.2.2. Seçicilik

Piklerin tanımlanması, blank ve matrix etkisi

Tanımlama: Çözücü (blank), matrix çözeltisi, standart çözeltisi ve numune çözeltisi analiz edilerek herbirinden gelen pikler tespit edildi.

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi: Çözücü 0,45 RC filtreden süzülerek HPLC vialine alındı.

Matrix Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 76,5 mg asemetasin matrix'i 50 mL'lik balon jojeye alındı. Üzerine 2,5 mL ACN eklendi ve 3 dk ultrasonik banyoda çözüldü. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alınıp 50 mL'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlandı. 0,45 (RC) filtreden HPLC vialine süzülüp enjekte edildi. Kromatogramlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asemetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: 20 adet kapsül dolu ve boş tartımları alındıktan sonra içerikleri karıştırılır. Bu karımdan yaklaşık 78,1 mg (33 mg asemetasine denk) tartılarak 50 mL balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 5 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 5 mL alınıp 50 mL'lik balon jojeye aktarılır ve son hacmine tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

PDA Tanımlama için: Metotta belirtildiği şekilde blank, matrix, standart çözeltisi, kontrol standart çözeltisi ve numune çözeltisi hazırlandı. 1 blank, 1 matrix, 1 standart çözeltisi, 1 kontrol standart çözeltisi, 1 numune çözeltisi hazırlığı yapıldı ve blank ile matrix'den 1'er enjeksiyon, standart ve numune enjeksiyonundan 2'ser enjeksiyon yapıldı. 190 nm-800 nm arasında standart ve numune spektrumu taraması yapılır.

XRD tanımlama için; XRD cihazına etken maddemisi verilmiş olan spesifikasyonlar değerinde okutup oluşan kromotogramda 2-Theta değerleri ile kıyaslanır.

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar

- Metotta belirtilen sistem uygunluk parametrelerini sağlamalı,
- Metot yeterli derecede seçici olmalı,
- Aktif madde piki alıkonma zamanında çözücü ve diğer maddelerden gelen herhangi bir pik gözlenmemeli,

- Aktif madde piki; çözücü ve matrix piklerinden ayrılmalı,
- Pik saflık sonucu uygun (saf) olmalıdır
- 2-Theta Değeri 18.88°, 21.24°, 22.05°, 23.46° karşılmalıdır.

Seçicilik parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

3.2.3. Sistem Uygunluk

Çözelti Hazırlığı

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetmetasin standardı 50 mL’lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetmetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar

- Standart çözeltisindeki Asetmetasin pikinin Tailing faktörü 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki Asetmetasin pikinin teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki Asetmetasin pikinin 6 enjeksiyonundan elde edilen %RSD en fazla %2 olmalıdır

Sistem uygunluk parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

3.2.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Tanımlama:

Standart çözeltisinin %50, %70, %80, %90, %100, %110 ve %120, %150 derişim aralığında olacak şekilde, 8 farklı derişimde standart çözeltisi hazırlanarak analiz edilir ve dedektör yanıtına göre derişim/alan grafiğı çizilerek kabul kriterlerine uygunluğu test edilir. %50, %100 ve %150 standart çözeltiilerinden 6’şar enjeksiyon ve diğler standart çözeltiilerden 2’şer enjeksiyon yapılır.

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi: Çözücü 0,45 RC filtreden süzülerek HPLC vialine alındı.

Stok Doğrusallık Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33,21 mg aasetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartıldı. Üzerine 2,5 mL ACN eklendi ve 3 dk ultrasonik banyoda çözüldü. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözeltiden 20 mL alınıp 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,132 \text{ mg/mL}$).

Standart 1 (%50) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 2,5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,033 \text{ mg/mL}$).

Standart 2 (%70) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 3,5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,0462 \text{ mg/mL}$).

Standart 3 (%80) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 4 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,0528 \text{ mg/mL}$).

Standart 4 (%90) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 4,5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,0594 \text{ mg/mL}$).

Standart 5 (%100) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Standart 6 (%110) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 5,5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,0726 \text{ mg/mL}$).

Standart 7 (%120) Çözeltisi Hazırlığı: Aasetasin stok standart çözeltisinin 6 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Aasetasin}}=0,0792 \text{ mg/mL}$).

Standart 8 (%150) Çözeltisi Hazırlığı: Asetetasin stok standart çözeltisinin 7,5 mL'si 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı ($C_{\text{Asetetasin}}=0,099$ mg/mL).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar

En küçük kareler yöntemi ile derişime karşı alan grafiğinden regresyon doğrusu çizilir. Korelasyon katsayısı (r) 0,995'dan az olmamalıdır. r^2 0,99'dan az olmamalıdır.

$$\frac{Y_{\text{int}}}{\%100'lık\ standart\ alanı} \times 100 \leq \%10,0$$

Öngörülen doğru denklemi: $Y = mX + b$

Y: Alanlar

X: derişim (mg/mL)

m: Regresyon doğrusunun eğimi

b: Doğrunun Y eksenini kestiği nokta

Metodun geçerli olması için aralığın %50 ve %150 derişimleri aralığında doğrusal olması gerekir.

Uygulama Aralığı

İşlem: Doğrusallık alt ve üst derişimlerdeki çözeltilerden 6'şar ölçüm/enjeksiyon yapıldı ve uygulama aralığı tespitinde kullanıldı.

Kabul kriterleri ve sonuçlar

Alt ve üst derişimlerdeki çözeltilerden ardışık 6 enjeksiyonundaki EDTA piki alanları arasındaki $\%RSD \leq 2,0$ olmalıdır.

Uygulama aralığı parametre sonuçları "Bulgular ve Tartışma" bölümünde verildi.

- Standart çözeltisindeki Asetetasin pikinin Tailing faktörü 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki Asetetasin pikinin teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.

- Standart çözeltisindeki Asetmetasin pikinin 6 enjeksiyonundan elde edilen %RSD en fazla %2 olmalıdır

Sistem uygunluk parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

3.2.5. Doğruluk

Tanımlama:

Numune çözeltisinin matrix miktarları sabit olacak şekilde, etken madde miktarının %80, %100 ve %120 seviyelerinde Asetmetasin hammadresi ilave edilerek her seviye için ayrı 3 paralel numune çözeltisi olacak şekilde toplam 9 numune çözeltisi hazırlanır. Aynı anda hazırlanmış standarda karşı geri kazanım miktarı hesaplanır ve kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneyisel sonuç}}{\text{Teorik sonuç}} \times 100$$

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı: Çözücü.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetmetasin standardı 50 mL ‘lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetmetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetmetasin standardı 50 mL’lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetmetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

%80 standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 26,6 mg asetmetasin standardı ve 76,5 mg matrix 50 mL’lik balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 2.5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetmetasin}}=0,0528 \text{ mg/mL}$).

%100 standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 33,21 mg asetetasin standardı ve 76,5 mg matrix 50 mL'lik balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrosonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

%120 standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 39,86 mg asetetasin standardı ve 76,5 mg matrix 50 mL'lik balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrosonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,0792 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Doğruluk için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Her bir seviye için geri kazanım %98,0 - %102,0 arasında olmalıdır.
- Her bir seviye için geri kazanım sonuçları arasındaki $RSD \leq \% 2,0$ olmalıdır.

3.2.5. Kesinlik

Sistem Kesinliği

Tanımlama: Standart çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlanır. Standart çözeltisi için ardışık 6 enjeksiyonyapılır. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. Sonuçlar, yöntem kesinliği çalışmasından alınmıştır.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrosonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Sistem kesinliği için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki asemetasin piki için $\%RSD \leq 2,0$ olmalı,
- Standart çözeltisindeki asemetasin pikleri için kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalı,
- Standart çözeltisindeki asemetasin pikleri için teorik plaka sayısı en az 2000 olmalı,

Yöntem Kesinliği

Tanımlama: Asemetasin 60 mg kapsül ürünü kullanılarak yöntem kesinliği çalışması yapılır. Yöntem kesinliği çalışması için metotta belirtildiği standart çözeltisi, kontrol standart çözeltisi ve 6 farklı numune çözeltisi hazırlanır ve analiz edilir. Kabul kriterlerine uygunluğu incelenir.

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı: Çözücü.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asemetasin standardı 50 mL’lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asemetasin standardı 50 mL’lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: 20 adet kapsül dolu ve boş tartımları alındıktan sonra içerikleri karıştırılır. Bu karımdan yaklaşık 78.1 mg (33 mg asemetasin’e denk) tartılarak 50.0 ml balon joje’ye aktarılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 5 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp

100 mL’lik balon jojeye aktarılır ve hacmine tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Yöntem kesinliği için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Ardışık 6 numunenin analiz sonucunun $RSD \leq 2,0$ olmalıdır,
- Tüm sonuçlar limit içi olmalıdır,
- % 95 güven aralığı hesaplanmalıdır.

$$\text{Güven Aralığı} = \bar{X} \pm t. 2. \frac{s}{\sqrt{N}} (3.3)$$

$\bar{X}$: Ortalama değer

N : Numunesayısı

s : Standart sapma

t : Güvenilirlik katsayısı

3.2.5. Sağlamlık

Metot Stabilitesi

Tanımlama: Metot parametrelerinde akış hızı, ve kolon sıcaklığı değişimi etkisi dikkate alınarak bu değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri ve numune sonuçları üzerinde etkisi incelenir.

Akış hızı değişimi etkisi: Akış hızı 1,2 mL/dk iken, 1,0 mL/dk ve 1,4 mL/dk olarak değiştirildi. Çözücü, standart çözeltisi ve numune çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Kolon sıcaklığı değişimi etkisi: Kolon sıcaklığı 40 °C iken, 35 °C ve 45 °C olarak değiştirildi. Çözücü, standart çözeltisi ve numune çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı: Çözücü.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asemetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrosanik banyoda çözölür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzölür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kontrol Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asemetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrosanik banyoda çözölür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzölür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: 20 adet kapsöl dolu ve boş tartımları alındıktan sonra içerikleri karıştırılır. Bu karımdan yaklaşık 78,1 mg (33 mg asemetasine denk) tartılarak 50 mL balon jojeye aktarılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 5 dk ultrosanik banyoda çözölür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzölür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asemetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Sağlamlıkta metot stabilitesi için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir:

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki asemetasin piki için $RSD \leq \% 2,0$ olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki asemetasin pikleri için kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki asemetasin pikleri için teorik plaka sayısı en az 2000 olmalıdır.
- Tüm sonuçlar limit içi olmalıdır.
- Tüm koşullar için değişimler sonucunda elde edilen sonuçlar ile başlangıçta elde edilen sonuçlar arasındaki değişim $\pm \% 2,0$ olmalıdır.

Sağlamlıkta önemli parametrelerden olan metot stabilitesi için akış hızı (1,2 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,4 mL/dk), kolon sıcaklığı (35 °C, 40 °C ve 45 °C) parametreleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

Çözelti Stabilitesi

Tanımlama: Standart çözeltisi ve Asetetasin 60 mg Kapsül için numune çözeltisi hazırlanarak +15°C’de belli zaman aralıklarında 28 saat boyunca analizlenir ve sonuçlar arasındaki % relatif değişim hesaplanır.

Çözelti Hazırlığı

Blank Çözeltisi Hazırlığı: Çözücü.

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetetasin standardı 50 mL’lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjöjeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,066$ mg/mL).

Kontrol Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetetasin standardı 50 mL’lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balonjöjeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,066$ mg/mL).

Numune Çözeltisi Hazırlığı: 20 adet kapsül dolu ve boş tartımları alındıktan sonra içerikleri karıştırılır. Bu karımdan yaklaşık 78,1 mg (33 mg asetetasine denk) tartılarak 50 mL balon jöjeye aktarılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 5 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL’lik balon jöje’ye aktarılır ve hacmine tamamlanır. 0,45 RC filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetetasin}}=0,066$ mg/mL).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Sağlamlık çözelti stabilitesi için başlangıç alan değerine göre % relatif değişim %98,0-%102,0 arasında olacağı kabul edilmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

Mobil Faz Stabilitesi

Tanımlama: Metotta belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan mobil faz en az 48 saat süre ile bekletilerek, belirlenmiş sürelerin sonunda taze standart çözeltisi hazırlanır ve bekletilen mobil faz ile analiz yapılır. Sonuçlar başlangıç analizi sonuçlarıyla karşılaştırılır.

Çözelti Hazırlığı

Standart Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 33 mg asetmetasin standardı 50 mL'lik balon jojeye tartılır. Üzerine 2,5 mL ACN eklenir ve 3 dk ultrasonik banyoda çözülür. Hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL'lik balonjojeye aktarılır ve hacmine pH 6,8 tampon çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 Rc filtreden HPLC vialine süzülür ve enjekte edilir ($C_{\text{Asetmetasin}}=0,066 \text{ mg/mL}$).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Sağlamlık mobil faz stabilitesi için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki asetmetasin piki için $RSD \leq \%2,0$ olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki asetmetasin pikleri için kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki asetmetasin pikleri için teorik plaka sayısı en az 2000 olmalıdır.
- Başlangıç analiz sonucu ile analiz edilen süredeki analiz sonuçları arasındaki % relatif değişim $\leq \%2,0$ olmalıdır

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada öncelikle asemetasin için metot validasyonu ve optimizasyon çalışması yapıldı çalışıldı. HPLC cihazı ile seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık çalışmaları yapıldı. Valide edilen sonuçlar Çizelge 4.1-4.13, kromatogramlar ise Şekil 4.1-4.8 aralığında verilmiştir.

Filtre etkisi sonuçları Çizelge 4.1’de, HPLC’de alınan standart çözeltisi için alan sonuçları verilmiştir.

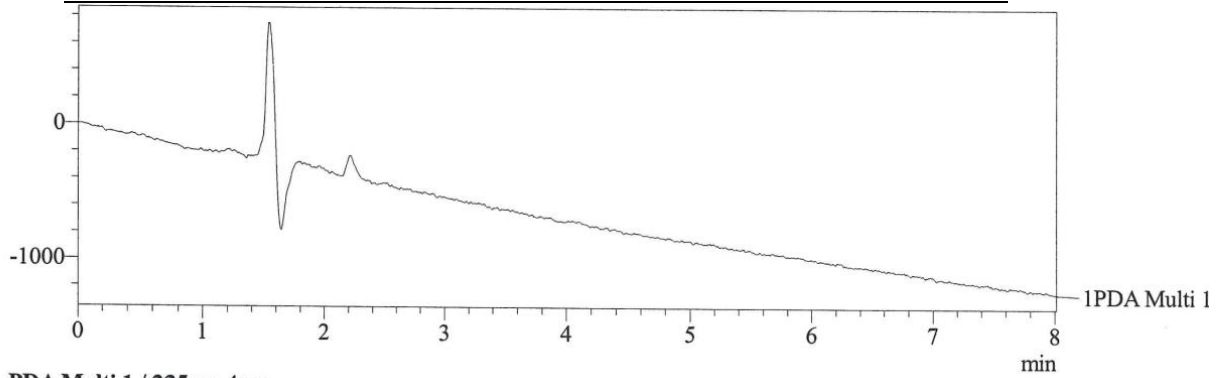
Çizelge 4.1 Filtre etkisi

	PVDF 40/25		Rc 20		Rc 45	
	ALAN	% Değişim	ALAN	% Değişim	ALAN	% Değişim
1 mL	564669	-	663232	-	661081	-
2 mL	691217	15,02	721881	6,96	717010	6,64
3 mL	709963	2,22	723641	0,21	724132	0,85
4 mL	713690	0,44	718559	0,60	723507	0,07
5 mL	714040	0,04	723503	0,59	724111	0,07
6 mL	718219	0,50	731692	0,97	722141	0,23
7 mL	719039	0,10	723591	0,96	723311	0,14
8 mL	720161	0,13	723458	0,02	722930	0,05
9 mL	724418	0,51	729195	0,68	725850	0,35
10 mL	727588	0,38	727209	0,24	726844	0,12

Seçicilik sonuçları Çizelge 4.2’de, HPLC’de alınan blank çözeltisi için kromatogram Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Seçicilik sonuçları

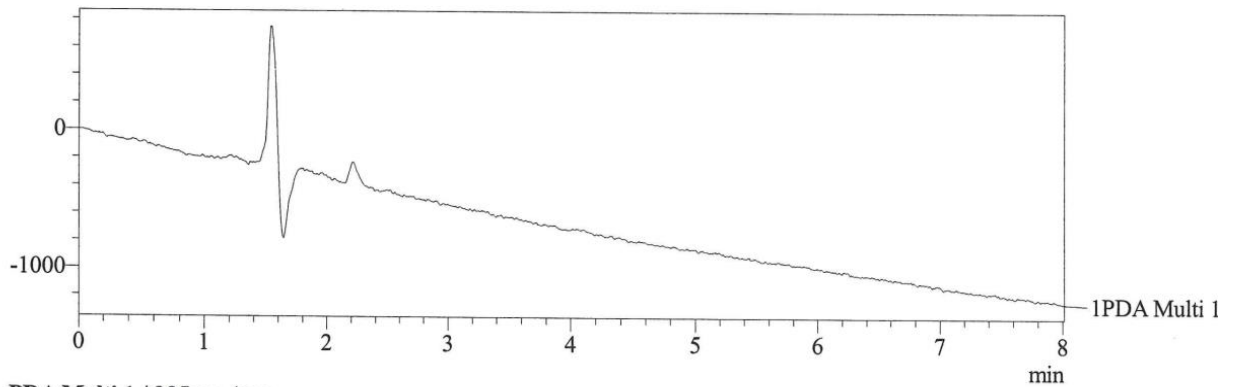
Numune Adı	Alıkonma zamanı, dk	Pik saflığı
Blank	U.Y.	U.Y.
Matrix	U.Y.	U.Y.
Standart Çözeltisi	6,28	0,999708
Numune Çözeltisi	6,28	0,999686



1 PDA Multi 1 / 235nm 4nm

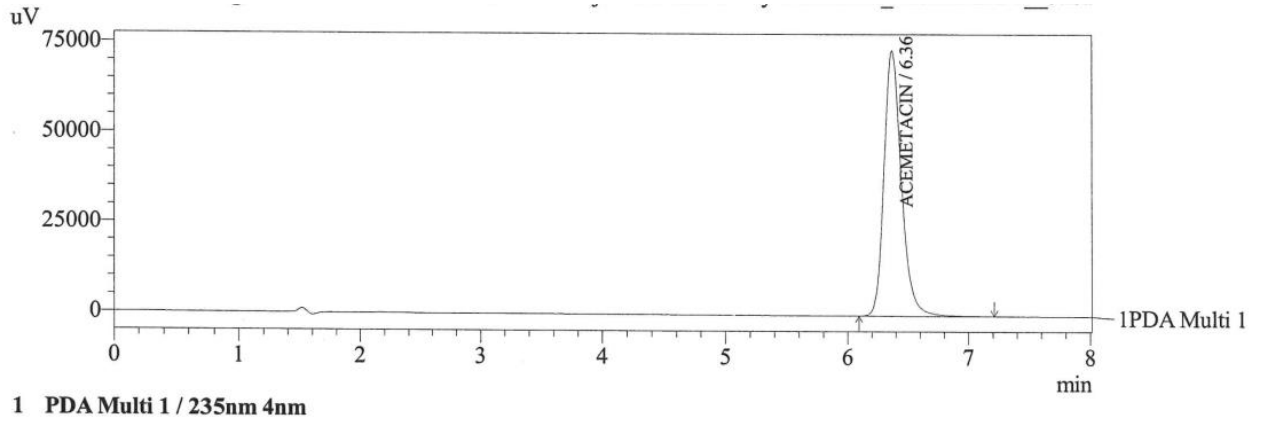
Şekil 4.1 Blank çözeltisi HPLC kromatogramı

Matrix çözeltisi için kromatogram Şekil 4.2 de ve asemetasin standardı için alınan kromatogram Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Asemetasin standart çözeltisinin pik saflığı değerleri için alınan UV spektrumu Şekil 4.4de verilmiştir.

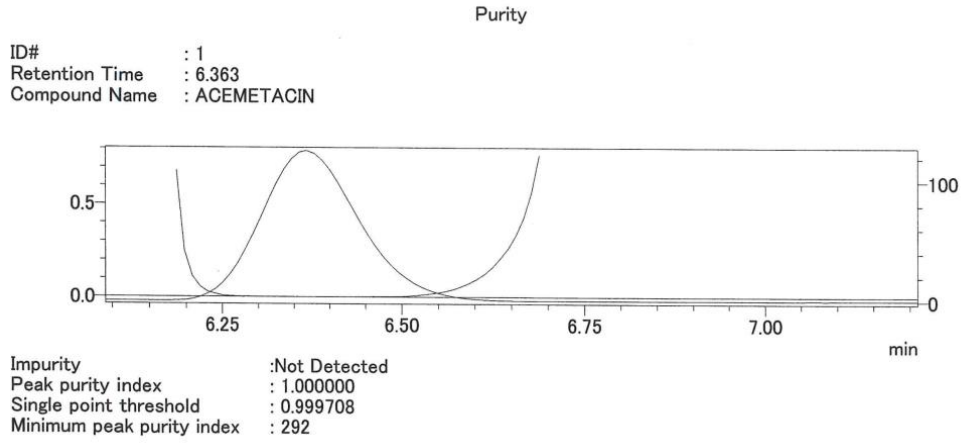


1 PDA Multi 1 / 235nm 4nm

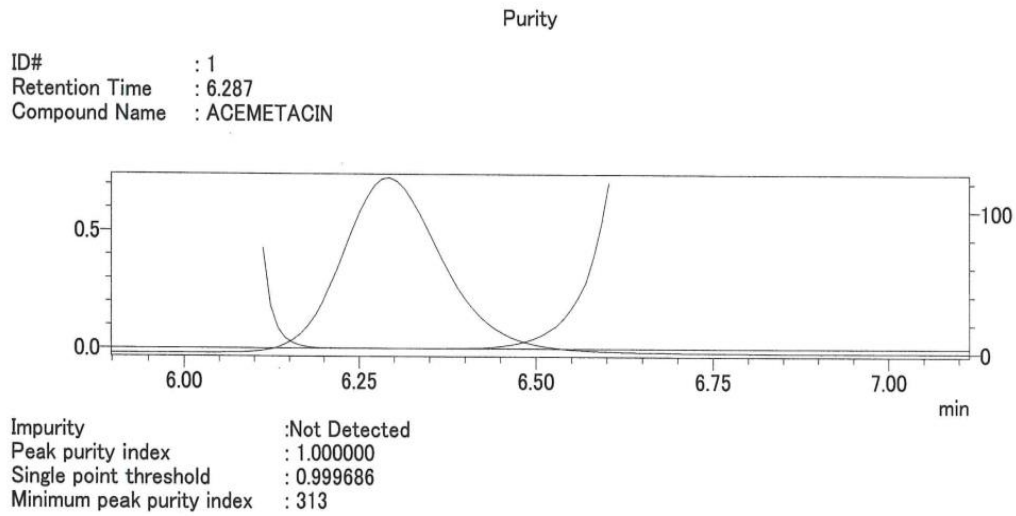
Şekil 4.2. Matrix çözeltisi HPLC kromatogramı



Şekil 4.3. Standart çözeltisi HPLC kromatogramı

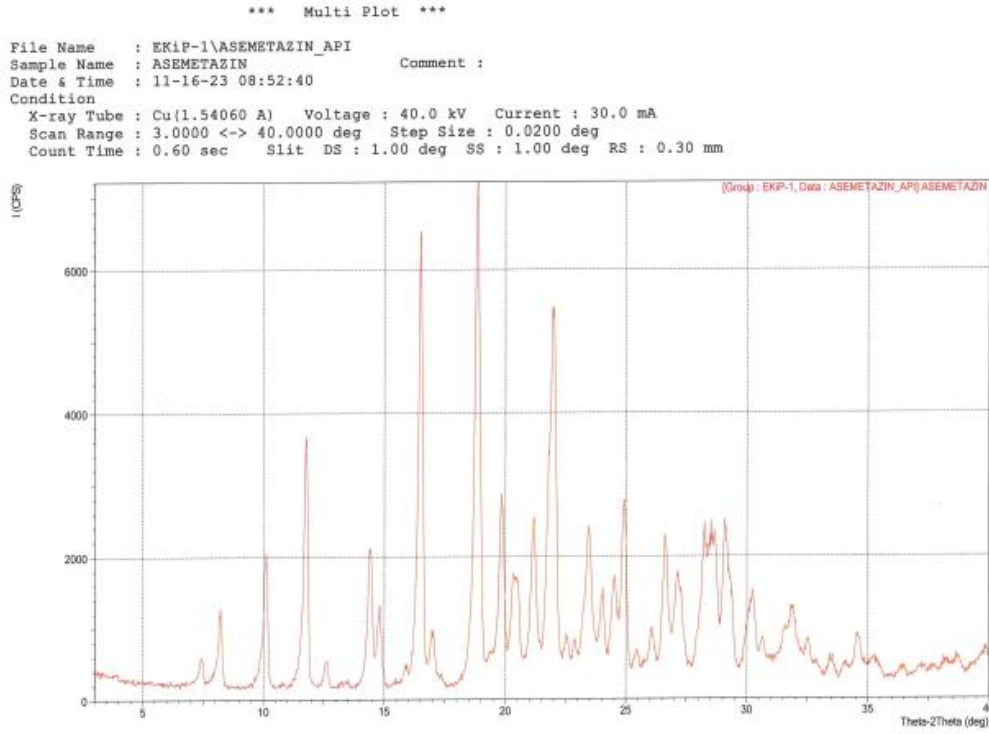


Şekil 4.4 Standart çözeltisi pik saflığı



Şekil 4.5 Numune çözeltisi pik saflığı

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te asetmetasin standart çözeltisinin ve numune çözeltisinin saflığı değerleridir.



Şekil

4.6 Asetmetasin etken maddesinin XRD monografı

Bu monografda asetmetasin etken maddesinin karakteristik yapısını XRD cihazını kullanarak kromatografik görüntüsünü yakaladık. Bu monograf sayesinde miktar tayininde olası düşüşleri yada etken maddedeki olası bozulmaları gözlemlemek adına kullanmak üzere yapılmış olup 2-Theta değerlerini sağlamaktadır.

Çizelge 4.3'te Asetmetasin için sistem uygunluk sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.3 Asetetasin için sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon no	Asetetasin Alanı	Alıkonma zamanı, dk	Teorik plaka sayısı	Kuyruklanma faktörü
1	742520	6,36	8815	1,2
2	740158	6,30	8660	1,2
3	740725	6,29	8597	1,2
4	739205	6,30	8518	1,3
5	740117	6,29	8441	1,3
6	740246	6,29	8428	1,3
Ortalama	740495	6,30	8577	1,3
Standart Sapma	1108			
% RSD	0,15			

Elde edilen sistem uygunluk sonuçları (Çizelge 4.3) değerlendirildiğinde kabul kriterlerine uygun olduğu ve Asetetasin için %RSD 0,15 olduğu belirlenmiştir. Asetetasin teorik plaka değeri 8577 olduğu görülmektedir.

Asetetasin için elde edilen doğrusallık sonuçları Çizelge 4.4'te, üst üste çakıştırılmış kromatogram Şekil 4.7'da verilmiştir.

Çizelge 4.4. Asetmetasin için elde edilen doğrusallık sonuçları

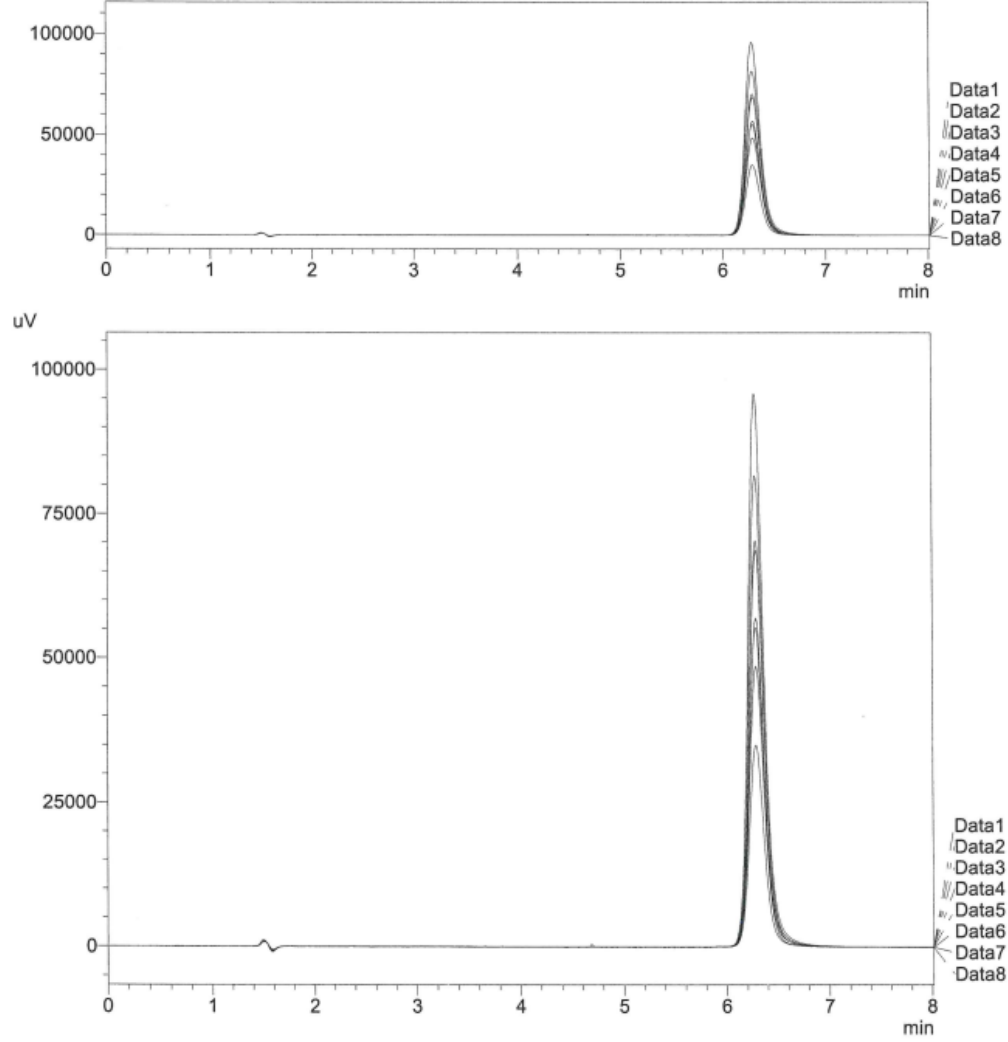
Standart derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)(x)	Alan ortalaması (Y-1)	Hesaplanan alan (Y-2)	Fark (Y1-Y2)	Farkların karesi (Y1-Y2) ²
%50	0,033000	356844	362385	5541	30706824
%70	0,0426200	502449	496497	5952	35431500
%80	0,052800	566823	563552	3271	10698405
%90	0,059400	628131	630608	2477	6134307
%100	0,066000	703107	697663	5444	29633346
%110	0,072600	758123	764719	6596	43506463
%120	0,079200	831416	831775	359	128549
%150	0,099000	1033247	1032941	306	93439
				RRS**	156332833
				RSD	4167,8

* Hesaplanan Alan: Derişim değerlerinin doğru formülünde ($y=mx \pm n$) “x” yerine konulması ile hesaplanan alan değerleridir.

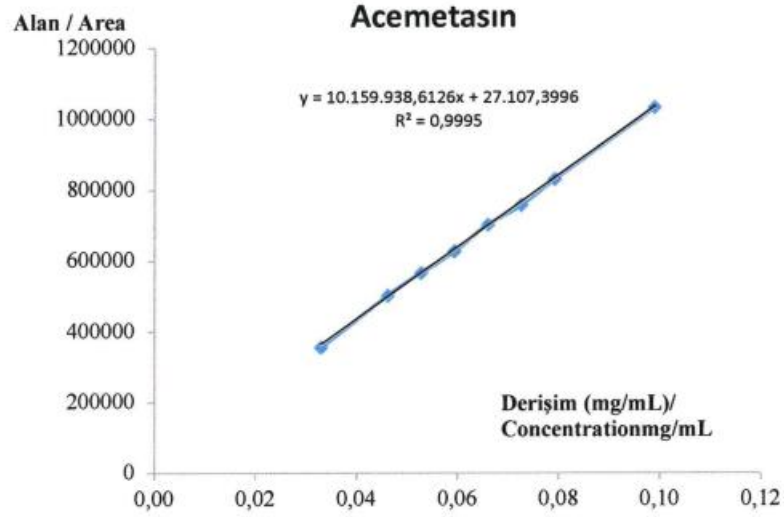
**RSS: Farkların Karesinin Toplamı

RSD : Bağlı Standart Sapma

Data1 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%50-1__10-UV.lcd
 Data2 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%70-1__16-UV.lcd
 Data3 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%80-1__18-UV.lcd
 Data4 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%90-1__20-UV.lcd
 Data5 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%100-1__22-UV.lcd
 Data6 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%110-1__28-UV.lcd
 Data7 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%120-1__30-UV.lcd
 Data8 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Dogrusallik\%150-1__32-UV.lcd



Şekil 4.7 Dogrusallık için doğrusallık çalışması HPLC kromatogramları



Şekil 4.8 Asemetasin kalibrasyon grafiği

Doğrusallık kalibrasyon grafiği de Şekil 4.8’de verilmiştir. Doğrusallık için yapılan analizler sonunda, elde edilen veriler kabul kriterlerine uygundur. Sonuç olarak; asemetasin için %50 ve %150 derişim aralığında derişime bağılı olarak alan değışiminin doğrusal olduğı kanıtlandı (Şekil 4.8). Ayrıca doğrusallık parametrelerinden olan korelasyon değıerlerinin 0,9995 olduğı belirlendi.

Standart çözeltisinde ardışık 6 enjeksiyonundaki asemetasin piki alanları arasındaki %RSD $\leq 2,0$ olmalı genel kabulü dikkate alındığında uygulama aralığı Çizelge 4.5’te görüldüğü gibi alt ve üst derişim %RSD değıerlerinin sırasıyla 0,168 ile 0,057 olduğı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğı belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Uygulama aralığı sonuçları

Enjeksiyon no	%50 standart alanı	%150 standart alanı
1	357846	1032885
2	356535	1033469
3	356526	1033426
4	356143	1033674
5	357175	1033789
6	356839	1032237
Ortalama	356844	1033247
Standart sapma	600	585
% RSD	0,168	0,057

Doğruluk parametresinde %80, %100 ve %120 derişim aralıklarında numuneler cihaza enjekte edildi ve enjekte edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Doğruluk sonuçları

Seviye	Numune	Teorik derişim mg/mL	Deneyssel derişim mg/mL	%Geri kazanım,	% Ortalama	% RSD
80%	1	0,05280	0,05287	100,1		
	2	0,05280	0,05274	99,9	100,0	0,14
	3	0,05280	0,05280	99,9		
100%	1	0,06600	0,06609	100,5		
	2	0,06600	0,06595	100,1	100,4	0,26
	3	0,06600	0,06604	100,6		
120%	1	0,07920	0,07926	100,1		
	2	0,07920	0,07914	99,9	100,1	0,25
	3	0,07920	0,07951	100,4		

Numune çözeltilerinin matrix miktarları sabit olacak şekilde, etken madde miktarlarının %80, %100 ve %120 seviyelerinde asemetasin hammaddesi ilave edildiği zaman Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi geri kazanım değerleri 99,9-100,6 arasında, %RSD değerleri ise 0,14-0,25 arasında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu belirlenmiştir.

Kesinlikte sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar için kesinlik parametreleri incelendi. Sistem kesinliği sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Asemetasin için sistem kesinliği sonuçları

Enjeksiyon sayısı	Asetmetasin standart çözeltisi alanı
1	742520
2	740158
3	740725
4	739205
5	740117
6	740246
Ortalama	740495
Standart sapma	1108
% RSD	0,150
Kuyruklanma faktörü	1,3
Teorik plaka sayısı	8577

Asetmetasin için sistem kesinliğinde 6 enjeksiyondan sonra %RSD değeri 0,150; kuyruklanma faktörü 1,3; teorik plaka sayısı 8577 bulunmuştur. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

Asetmetasin etken maddesinin yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik sonuçları

Asetetasin Kapsül		
Numune	1. Analizci	2. Analizci
	Asetetasin mg	Asetetasin mg
1	60,010	60,062
2	60,075	60,102
3	60,005	60,011
4	60,023	60,027
5	60,109	60,083
6	60,047	60,063
Ortalama	60,045	60,058
Standart sapma	0,04	0,03
% RSD	0,07	0,06
% 95 Güven aralığı	60,045 $\pm$ 0,043	60,058 $\pm$ 0,047

Yöntem kesinliğinde ve laboratuvar içi kesinlikte güven aralığı hesaplanırken 6 analiz için serbestlik derecesi 5 (N-1), t değeri 2,571’dir. Standart sapma değeri ile %95 güven sınırı değerleri hesaplandıktan sonra ortalama olan değerler ile güven aralığı belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Yöntem kesinliği için yapılan analizlerin sonucunda %RSD değeri 0,07 olarak bulunmuş ve elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur. Ayrıca asetetasin kapsül numunesi için yapılan farklı iki analizci sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. İki analizci sonuçları arasındaki fark

Analizci	Asetmetasin mg
1. Analizci	60,045
2. Analizci	60,058
% Fark	0,02

Laboratuvar içi kesinlik çalışması ikinci analizci tarafından farklı zamanda, farklı ekipman ile yapılmıştır. Ardışık 6 numunenin analizlenmesi sonucu $RSD \leq 2,0$ dir. Tüm sonuçlar limit içindedir ve %95 güven aralığı hesaplanmıştır. Ayrıca, iki farklı analizcinin sonuçlarının ortalamaları arasındaki fark %0,1'den az bulunmuştur.

Sağlamlık metot stabilitesi ve çözelti stabilitesi çalışmalarını içeren validasyon parametresidir. Metot stabilitesi için elde edilen sonuçları içeren Çizelgeler 4.10-4.16 aralığında verilmiştir.

Çizelge 4.10. Akış hızı standard değişimi sonuçları

Standartlar Arası Değişim						
Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı, dk	alanları arası % RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	%Değişim
1,0	7,64	0,214	1,1	7564	708327	2
1,2*	6,30	0,148	1,3	8567	691629	-
1,4	5,40	0,124	1,3	6432	678944	2

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Çizelge 4.11. Akış hızı numune değişimi sonuçları

Numuneler Arası Değişim						
Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı, dk	alanları arası % RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	%Değişim
1,0	7,65	0,200	1,1	7551	705315	2
1,2*	6,28	0,149	1,3	8203	676751	-
1,4	5,41	0,114	1,3	6328	678520	2

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Çizelge 4.12. Kolon sıcaklığı standart değişimi sonuçları

Standart Arası Değişim						
Kolon sıcaklığı °C	Alıkonma zamanı, dk	Alanlar arası % RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	%Değişim
35	6,53	0,065	1,2	6608	677827	2
40*	6,30	0,148	1,3	8567	691629	-
45	6,17	0,038	1,2	7061	679234	2

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışması sonuçları alınmıştır.

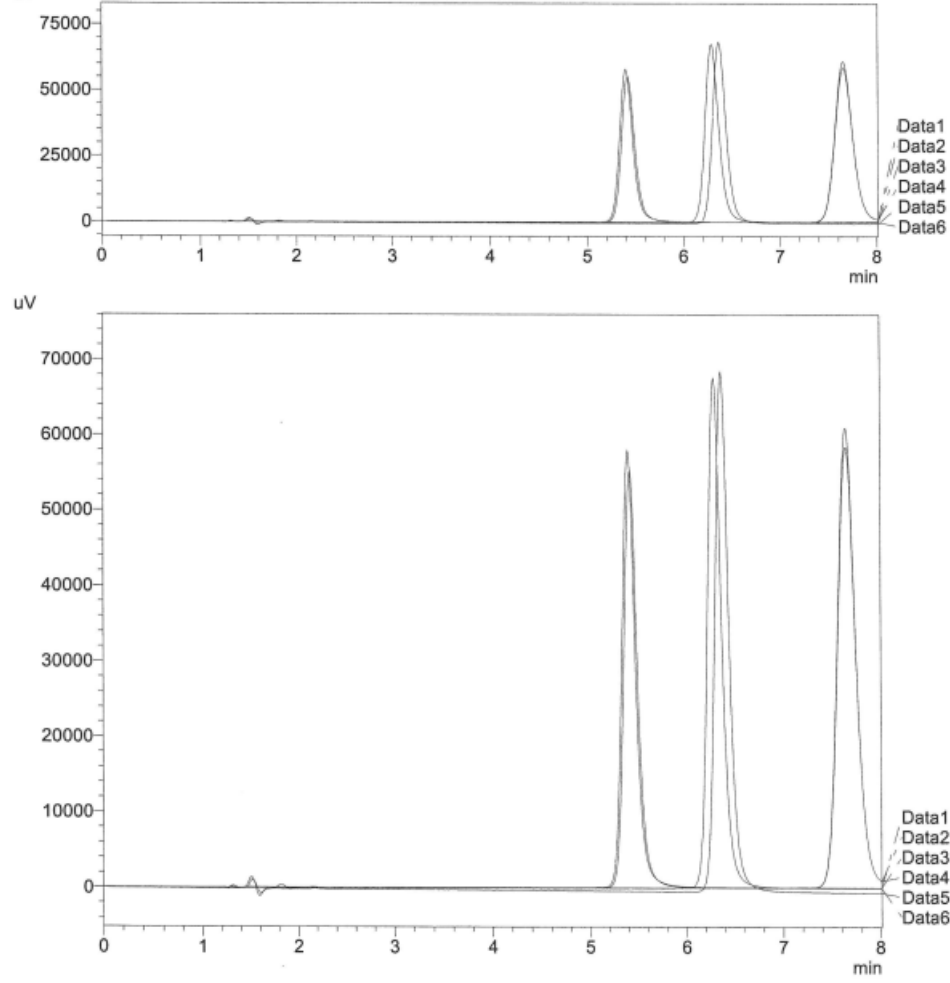
Çizelge 4.13. Kolon sıcaklığı numune değişimi sonuçları

Numune Arası Değişim						
Kolon sıcaklığı °C	Alıkonma zamanı, dk	Alanlar arası %RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	%Değişim
35	6,54	0,315	1,2	6521	679515	2
40*	6,30	0,148	1,3	8567	691629	-
45	6,18	0,073	1,2	7000	675513	2

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışması sonuçları alınmıştır.

Metot stabilitesi için akış hızı değişimi Standart ve Numune için HPLC cihazı kromatogramları Şekil 4.9 ve 4.10’de verilmiştir.

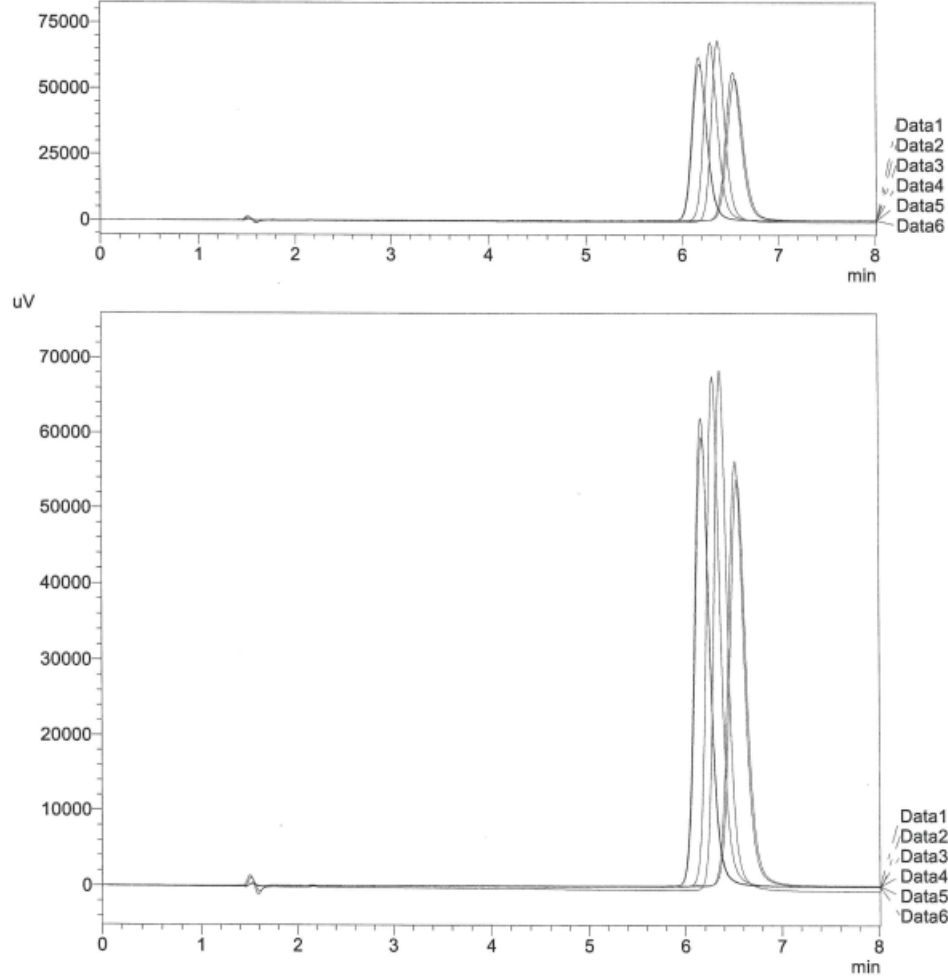
Data1 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Range_Sagliamlık\Std-1_1.4 Flow_2-UV.lcd
Data2 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Range_Sagliamlık\Std-1_1.0 Flow_16-UV.lcd
Data3 : @C:\...Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Range_Sagliamlık\Num-1-1_1.4 Flow_10-UVUV.lcd
Data4 : @C:\...Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Range_Sagliamlık\Num-1-1_1.0 Flow_24-UVUV.lcd
Data5 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Secicilik_Kesinlik\Std-1_3-UVUV.lcd
Data6 : @C:\...Data\Acemetacın\Proje Bazlı\Miktar Tayini\Secicilik_Kesinlik\Num-1-1_60_Mg_KP SL_11-UVUV.lcd



Şekil 4.9. Akış hızı: 1,0 mL/dk , 1,2 mL/dk ve 1,4 mL/dk değişim kromatogramları

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Data1 : @C:\...\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Range_Sağamlık\Std-1_45C Column_30-UV.lcd
Data2 : @C:\LabSolutions\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Secicilik_Kesinlik\Std-1_3-UVUV.lcd
Data3 : @C:\...\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Secicilik_Kesinlik\Num-1-1_60_Mg_KP SL_11-UVUV.lcd
Data4 : @C:\...\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Range_Sağamlık\Std-1_35C Column_45-UV.lcd
Data5 : @C:\...\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Range_Sağamlık\Num-1-1_45C Column_38-UVUV.lcd
Data6 : @C:\...\Data\Acemetacin\Proje Bazlı Miktar Tayini\Range_Sağamlık\Num-1-1_35C Column_53-UVUV.lcd



Şekil 4.10. Kolon sıcaklığı 35 °C , 40 °C , 45 °C değişim grafiği.

Sağamlık metot stabilitesi parametrelerinden elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar arası % değişim 2'dir.

Çizelge 4.14. Çözelti stabilitesi sonuçları

	Standart çözeltisi		Numune çözeltisi	
Zaman	Alan	%Relatif Değişim	Alan	% Relatif Değişim
Başlangıç	721080	-	718747	-
4.Saat	720876	99,9	718344	99,9
8.Saat	719765	99,8	717103	99,8
12.Saat	719841	99,8	717649	99,8
16.Saat	719356	99,7	716889	99,7
20.Saat	719908	99,8	717584	99,7
24.Saat	719017	99,7	717784	99,9
28.Saat	718162	99,6	717018	99,8

Sağlamlık; çözelti stabilitesindeki elde edilen sonuçları istinaden, 15°C’de standart çözeltisi ve numune çözeltisi 28 saat stabildir.

Çizelge 4.15. Mobil faz stabilitesi sonuçları

	Alıkonma Zamanı	% Relatif Değişimi	Asemetasın alanları arası RSD	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Başlangıç	6,30	U.Y	0,03	1,2	8920
1.Gün	6,30	0	0,04	1,2	8905
2.Gün	6,29	0,16	0,12	1,2	8858
3.Gün	6,29	0,16	0,13	1,2	8845
4.Gün	6,27	0,47	0,15	1,2	8715
5.Gün	6,25	0,8	0,22	1,3	8602
6.Gün	6,23	1,1	0,35	1,3	8438
7.Gün	6,17	2,1	0,49	1,3	8021

Sağlamlık; mobil faz stabilitesi parametrelerinden ve sonuçlarından elde edilen verilere göre mobil faz çözeltisi oda şartlarında 6 gün stabildir.

Çizelge 4.16.Asemetasin için HPLC’de uygulanan optimum kromatografik koşullar

Kolon Özellikleri	Nucleosil 100 c18 5µm 250mm 4.0mm
Dedektör	PDA/UV
Dalga Boyu	235 nm
Akış Hızı	1,2 mL/dakika
Kolon Sıcaklığı	40 °C
Numune Bölmesi Sıcaklığı	15 °C
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Analiz Süresi	8 dakika
Alıkonma Zamanı	6,3 dakika

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asetetasin etkin bir ağrı kesici etken maddesidir. Bu çalışmada, ağrı kesici olarak kullanılan asetetasin etken maddesinin HPLC-PDA-UV’de miktar tayini metot validasyonu, geliştirilmesi yapıldı.

Çalışmada asetetasin için miktar tayini metot validasyonunda yüksek doğruluk, yüksek kesinlik (sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik), seçici, hızlı, düşük relatif standart sapmaların yüzdesi sağlandı. Ayrıca, doğrusallık, doğruluk, çalışma aralığı, sağlamlık, stabilite parametreleri ve filtre etkisi çalışılarak kabul kriterlerine uygunluğu kanıtlandı. Çalışmada ICH kabul kriteri sağlandı.

Filtre etkisi çalışmamızda kullanabileceğimiz üç farklı filtreden maliyet ve performans olarak en uygun olan ve filtremizin etken maddemiz ile doyumluğa en erken ulaşan filtre olan RC 0,45 filtreyi kullanmayı uygun bulduk.

Seçicilik çalışmasında piklerin tanımlanabilmesi için blank, matrix, standart ve kapsül numunesi çözeltisi HPLC’de analiz edildi ve her birinden gelen kromatogramdaki pikler tespit edildi. Seçicilik sonuçlarının ICH kabul kriterlerine uyduğu, elde edilen kromatogramlardaki asetetasin pikinin aynı tutunma zamanında çıktığı kromatogramlar sayesinde belirlendi. Ayrıca, asetetasin pikinde pik saflığı değerleri için alınan UV spektrumunda seçicilik ve tanımlama sağlandı. Asetetasin pikinin XRD kromatogramı çekilerek etken maddemizin parmak izi belirlendi.

ICH kabul kriterine göre asetetasin için sistem uygunluk sonuçları ve yöntem kesinliği için 6 enjeksiyon yapıldı. Sistem uygunluk sonuçlarında %RSD değerlerinin 0,15 bulundu. %50-%150 derişim aralığında asetetasin standardı ile kalibrasyon grafiğı çizildi ve korelasyon değeri 0.9995 olarak tespit edilip belirlendi. %80, %100 ve %120 derişimli standart çözeltileri için 6’şar enjeksiyon verilerek alt ve üst derişim %RSD değerlerinin sırasıyla 0,14 ile 0,25 olduğu ve derişimlerdeki “%RSD $\leq$ 2,0 olmalı ICH kabul kriteri” sağladığı da kanıtlandı. Ayrıca, numune çözeltisinin matrix miktarı sabit olacak şekilde, etken madde miktarının %80, %100 ve %120 derişimlerde asetetasin etken maddesi ilave edildiğinde geri kazanım değerleri 99,9-100,5 arasında, %RSD değerleri ise 0,14-

0,25 arasında olduğu bulundu. Doğrusallık için elde edilen kabul kriterler sonuçları ICH kabul kriterlerine uygundu.

Asetetasin kapsül ürünü kullanılarak yapılan kesinlik çalışmasında sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik çalışmaları yapıldı. Sistem kesinliğinde ICH kabul kriterlerine göre yapılan 6 enjeksiyondan sonra elde edilen %RSD değeri 0,150; kuyruklanma faktörü 1,3; teorik plaka sayısı 8577 olarak bulundu bulundu. Bulunan sonuçlar neticesinde elde edilen veriler ICH kabul kriterlerine uygundu.

Yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlikte asetetasin kapsül numunesi için yapılan farklı iki analizci sonucu arasında elde edilen veriler %95 güven sınırında güven aralığı belirlendi. Yöntem kesinliği için yapılan analizler bizlere sonuç olarak %RSD değeri 0,07 olarak bulunduğunu gösterdi ve elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu tespit edildi. Ardışık analizlerin sonuçlarının $RSD \leq 2,0$ ve iki farklı analizcinin sonuçlarının ortalamaları hesaplandığında aralarındaki fark %0,1'den küçük olduğu belirlendi.

Sağlamlık validasyon parametresinde mobil faz, çözelti ve metot stabilitesi çalışmaları yapıldı. Metot stabilitesinde akış hızı ve kolon sıcaklığı değişimi etkisi dikkate alınarak yapılan çalışmaların sonucunda, sonuçlar arasındaki değişim %2 olduğu bulunmuş olup elde edilen sonuçların ICH kabul kriterlerine uygunluğu gözlenmiştir. Çözelti stabilitesinde 15 °C'de standart çözelti ve numune çözeltisinin 28 saat stabil olduğu başlangıçtan itibaren her 4 saatte bir aynı vialdeki numuneyi HPLC cihazında okutarak kromotogramdaki alanların Relatif değişimleri sonucunda varılmıştır.

Sonuç olarak; bu metot, asetetasin kapsül numunesi kullanılacak miktar tayini metot validasyonu sonucunda, tanıma (UV) ve tanıma (PDA) için uygun olduğu kanıtlandı

KAYNAKLAR

- [1] Munir, M. A., Enany, N., & Zhang, J. M. Nonopioid analgesics. *Anesthesiology clinics*, 25(4), 761-774.
- [2] Ünlü, S., Önkol, T., Dundar, Y., Ökçelik, B., Küpeli, E., Yeşilada, E., Noyanalpan, N Şahin, M. F. (2003). Synthesis and Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Some New (6-Acyl-2-benzoxazolinone and 6-Acyl-2-benzothiazolinone Derivatives with Acetic Acid and Propanoic Acid Residues. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 336(8), 353-361.
- [3] Kim, Y. B., Kim, J. A., & Park, I. Y. (1993). The crystal structure of acemetacin monohydrate (C 21 H 18 NO 6 Cl- H 2 O), A non-steroidal antiinflammatory agent. *Archives of Pharmacal Research*, 16, 134-139.
- [4] Gelbrich, T., Haddow, M. F., & Griesser, U. J. (2007). Acemetacin monohydrate. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 63(8), o451-o453.
- [5] URL-1 <<https://www.santafarma.com.tr/assets/urunler/acetudilfortekapsul/kt/acetudil-forte-kapsul.pdf>>, erişim tarihi 29.05.2023
- [6] URL-2 <<https://en.wikipedia.org/wiki/Acemetacin>>, erişim tarihi 29.05.2023
- [7] Boltze, KH, Brendler, O., Jacobi, H., Opitz, W., Raddatz, S., Seidel, PR ve Vollbrecht, D. (1980). İkame edilmiş indol-3-asetik asitler grubundaki kimyasal yapı ve anti-inflamatuar aktivite (yazarın çevirisi). *Arzneimittelforschung*, 30 (8A), 1314-1325..
- [8] Sanphui, P., Bolla, G., Das, U., Mukherjee, A. K., & Nangia, A. (2013). Acemetacin polymorphs: a rare case of carboxylic acid catemer and dimer synthons. *CrystEngComm*, 15(1), 34-38.
- [9] Chávez-Piña, A. E., McKnight, W., Dicay, M., Castaneda-Hernandez, G., & Wallace, J. L. (2007). Mechanisms underlying the anti-inflammatory activity and gastric safety of acemetacin. *British journal of pharmacology*, 152(6), 930-938.
- [10] Chavez-Piña, AE, Vong, L., McKnight, W., Dicay, M., Zanardo, RCO, Ortiz, MI, ... ve Wallace, JL (2008). Asemetasinin lökosit yapışması için sinyal yolları üzerindeki etkisinin olmaması, gastrointestinal güvenliğini açıklayabilir. *İngiliz farmakoloji dergisi*, 155 (6), 857-864.
- [11] Sneader, W. E. (2001). History of drug discovery. e LS.
- [12] Jones, RW, Collins, AJ, Notarianni, LJ ve Sedman, E. (1991). Genç bireylerde ve yaşlı hastalarda asemetasinin karşılaştırmalı farmakokinetiği. *İngiliz klinik farmakoloji dergisi*, 31 (5), 543-545.
- [13] Dell, H. D. (1980). Metabolism and pharmacokinetics of acemetacin in man. *Arzneimittelforschung*, 30, 1391-1398.

- [14] Seyffart, G. (2012). Drug dosage in renal insufficiency. *Springer Science & Business Media*.
- [15] Chian, R. C., Nargund, G., & Huang, J. Y. (2017). Development of in vitro maturation for human oocytes. *Switzerland: Springer*, 59-74.
- [16] Jacobi, H., & Dell, H. D. (1980). On the pharmacodynamics of acetaminophen (author's transl). *Arzneimittel-forschung*, 30(8A), 1348-1362.
- [17] USP-NF Volume 1<1225>VALIDATION OF COMPENDIAL METHODS.
- [18] ICH Q2 (R1) (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, International Conference on Harmonisation.
- [19] EstechPharma Co., Ltd. (Baran Factory) 25, Barangongdan-ro, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18608, Korea (Republic of Korea) Asetmetasin DMF
- [20] WHO (2016).APPENDIX 4 3 ANALYTICAL METHOD VALIDATION

