DÜZCE ÜNİVERSİTESİ | LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RASEKADOTRİL MOLEKÜLÜ İÇİN YENİ ÇÖZÜNME ORTAMI VE ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

ONUR ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

RASEKADOTRİL MOLEKÜLÜ İÇİN YENİ ÇÖZÜNME ORTAMI VE ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Onur ÇAKIR tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Baki ÇİÇEK
Balıkesir Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28 Temmuz 2023

Onur ÇAKIR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Gözde HAS ÇAKIR ve ailem ile çalışma arkadaşlarım Cem ÇALIŞKAN, Müge GÜLELİ ve Melise YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

28 Temmuz 2023 **Onur ÇAKIR**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

RASEKADOTRİL MOLEKÜLÜ İÇİN YENİ ÇÖZÜNME ORTAMI ve ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU i

ŞEKİL LİSTESİ vii

ÇİZELGE LİSTESİ viii

KISALTMALAR ix

SİMGELER x

ÖZET xi

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. RASEKADOTRİL 2
2.2. DİSSOLÜSYON 3
2.2.1. İlaç Maddesinin Çeşitli Ortamlarda Çözünürlüğü 3
2.2.2. Ortam ve Hacim Seçimi 4
2.2.3. Aparat Seçimi 5
2.2.4. Dissolüsyon Prosedürlerin Değerlendirilmesi 5
2.3. DİSSOLÜSYON KOŞULLARI İÇİN METOT GELİŞTİRME 6
2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) CİHAZI 6
2.5. VALİDASYON 8

3. DENEYSEL MALZEMELER ve YÖNTEMLER 11

3.1. KİMYASALLAR VE REAKTİFLER 11
3.2. DİSSOLÜSYON (ÇÖZÜNME HIZI) İÇİN UYGUN ORTAMIN SEÇİMİ 11
3.3. DİSSOLÜSYON KOŞULLARI 11
3.4. KROMATOGRAFİK KOŞULLAR 12

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 13

4.1. VALİDASYON YÖNTEMLERİ VE BULGULARI 13
4.1.1. Çözünme Hızı Yöntem Validasyonu 13
4.1.2. Çözünme Hızı Tayini Yöntemi Validasyon Parametreleri 13
4.1.3. Filtre Etkisi 14
4.1.4. Spesifiklik 14
4.1.4.1. *Prosedür 14*
4.1.4.2. *Spesifiklik kriterleri 15*
4.1.4.3. *Sistem uygunluğu 20*
4.1.4.4. *Doğruluk 21*
4.1.4.5. *Kesinlik 25*
4.1.4.6. *Metot kesinliği 26*
4.1.4.7. *Ara kesinlik 28*
4.1.4.8. *Doğrusallık ve çalışma aralığı 29*
4.1.4.9. *Güvenilirlik 38*
4.1.4.10. *Çözelti Stabilitesi 38*

4.1.4.11. *Metod dayanıklılık* *40*
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 43
6. KAYNAKLAR 45
ÖZGEÇMİŞ 47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Rasekadotril Benzyl 2-[[2-(acetylsulfanylmethyl)-3 phenylpropanoyl]amino]acetate- Molekül Yapısı 2
Şekil 2.2. Dissolüsyon analizlerinde kullanılan USP tipi aparat çeiştleri 5
Şekil 2.3. HPLC Cihazı 7
Şekil 2.4. HPLC Cihazında kullanılan üniteler 8
Şekil 4.1. Seyreltme Çözeltisi Kromatogramı 14
Şekil 4.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı 14
Şekil 4.3. Standart çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı 15
Şekil 4.4. Numune çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı 16
Şekil 4.5. Plasebo + hammadde çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı 17
Şekil 4.6. Çözünme hızı tayinindeki sistem uygunluğu kromatogramı 18
Şekil 4.7. LOQ Doğruluk kromatogramı 20
Şekil 4.8. %80 doğruluk kromatogramı 20
Şekil 4.9. %100 doğruluk kromatogramı 21
Şekil 4.10. %120 doğruluk kromatogramı 21
Şekil 4.11. Çözünme hızı tayinindeki cihaz kesinliği kromatogramı 23
Şekil 4.12. Çözünme hızı tayinindeki metot kesinliği kromatogramı 24
Şekil 4.13. Çözünme hızı tayinindeki ara kesinlik kromatogramı 26
Şekil 4.14. Analiz sonuçları ile gerçekleştirilen doğrusallık grafiği 28
Şekil 4.15. LOQ doğrusallık kromatogramı 28
Şekil 4.16. %0.25 doğrusallık kromatogramı 29
Şekil 4.17. %0.5 doğrusallık kromatogramı 29
Şekil 4.18. %1 doğrusallık kromatogramı 30
Şekil 4.19. %2.5 doğrusallık kromatogramı 30
Şekil 4.20. %5 doğrusallık kromatogramı 31
Şekil 4.21. %10 doğrusallık kromatogramı 31
Şekil 4.22. %20 doğrusallık kromatogramı 32
Şekil 4.23. %40 doğrusallık kromatogramı 32
Şekil 4.24. %80 doğrusallık kromatogramı 33
Şekil 4.25. %100 doğrusallık kromatogramı 33
Şekil 4.26. %120 doğrusallık kromatogramı 34
Şekil 4.27. %140 doğrusallık kromatogramı 34
Şekil 4.28. Çözünme hızı tayinindeki çözelti stabilitesi kromatogramı 36
Şekil 4.29. Çözünme hızı tayinindeki metot dayanıklılık kromatogramı 38

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Alıkonma ve Bağıl Alıkonma Zamanları 15
Çizelge 4.2. LOQ, %80, %100, %120 konsantrasyonlarında hazırlanan doğruluk parametresi için geri kazanım değerleri 18
Çizelge 4.3. Kabul edilebilir geri kazanım değerleri 19
Çizelge 4.4. Standart çözeltisi enjeksiyon tekrarlanabilirliği 22
Çizelge 4.5. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen metot kesinliği sonuçları 23
Çizelge 4.6. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik değerleri 25
Çizelge 4.7. LOQ, %0.25 %0,5, %1.0, %2,5 %5 %10, %20, %40, %60, %80, %100, %120, %140 ortamlarında hazırlanan doğrusallık ve çalışma aralığı değerleri 26
Çizelge 4.8. Standart ve numune çözeltileri ile hazılanan oda koşullarındaki stabilite sonuçları 35
Çizelge 4.9. Standart ve numune çözeltileri ile hazılanan buzdolabı koşullarındaki stabilite sonuçları 35
Çizelge 4.10. Metot dayanıklılık parametresi için farklı kolon analiz sonuçları 37
Çizelge 4.11.Metot dayanıklılık parametresi için farklı sıcaklık değerleri analiz sonuçları 37
Çizelge 4.12. Metot dayanıklılık parametresi için farklı dalga boyu analiz sonuçları ... 38

KISALTMALAR

FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Tayin Alt Limiti
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
RSD	Bağıl Standart Sapma Değeri
SLS	Sodyum Lauril Sülfat
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

SİMGELER

%	Yüzde İşareti
Q	Dissolüsyon Çözünme Limit Değeri
N	Normalite

ÖZET

RASEKADOTRİL MOLEKÜLÜ İÇİN YENİ ÇÖZÜNME ORTAMI ve ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Onur ÇAKIR
Düzce Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Temmuz 2023, 47 sayfa

Rasekadotril ishal rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan asetorfan etkin metabolitine sahip olan moleküldür. Ancak molekül yapısından dolayı organik çözücülerde çok iyi çözünürken sulu ortamlardaki çözünürlüğü çok düşük seviyelerde kalmaktadır. Yüksek lisans tezi olarak gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı Rasekadotril için uygun olan yeni bir çözünme ortamının bulunması ve uygun metodun geliştirilerek yöntemin validasyonu gerçekleştirilip farmasötik analizlerde uygulanabilirliği hakkında bilgi vermektir. Bu kapsamda sulu ortamda Polioksietilen 10 Lauril Eter (Brij-35) çözeltisi, dissolüsyon anlizleri için ortam olarak belirlenmiş ve HPLC metodu geliştirilerek yöntemin validasyon çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Rasekadotril, Dissolüsyon, Polioksietilen 10 Lauril Eter (Brij-35), Analitik Yöntem Validasyonu

ABSTRACT

NEW DISSOLUTION MEDIUM AND ANALYTICAL METHOD VALIDATION FOR RASECADOTRIL MOLECULE

Onur ÇAKIR
Düzce University
Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry
Master's Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim Uğraş
July 2023, 47 pages

Racecadotril is the molecule that has the active metabolite of acetorphan, which is used in the treatment of diarrheal disorders. However, due to its molecular structure, it dissolves very well in organic solvents, while its solubility in aqueous media remains at very low levels. The aim of this study, which was carried out as a master's thesis, is to provide information about the finding of a new dissolution medium suitable for racecadotril, the development of a suitable method, the validation of the method and its applicability in pharmaceutical analysis. In this context, Polyoxyethylene 10 Lauryl Ether (Brij-35) solution in aqueous medium was determined as the medium for dissolution analyzes and validation studies were carried out by developing the HPLC method.

Keywords: Racecadotril, Dissolution, Polyoxietilen 10 Lauril Eter (Brij-35), Analytical Method Validation.

1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütüne (WHO) göre diyare (ishal) rahasızlığı beş yaşın altındaki çocuklarda ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve yaklaşık olarak her yıl 525.000 çocuğun ölümüne neden olmaktadır. Diyare rahatsızlığı birkaç günden fazla sürebilir, vücudun ihtiyacı olan su ve tuzların alınmasına engel olarak kullanılan besin maddelerinin vücuttan atılmasına neden olabilir [1]. Daha geçmiş yıllarda ise sadece çocuklar için değil çoğu insan için şiddetli dehidrasyon ve sıvı kaybı ishal ölümlerinin ana nedenleriydi. Günümüzde ise etkin ölüm nedenlerinden olan septik bakteriyel enfeksiyonların ana nedenlerinden olma özelliğini göstermektedir [2,3].

Diyare normal dışkılama alışkanlığından daha fazla, yumuşak kıvamda veya sulu dışkılama olarak tanımlanır. Diyare ile birlikte vücutta ateş ve kusma belirtileri görülebilir. Genel olarak yedi günden daha az sürer ve on dört günü aşmaz. İki haftadan daha kısa süren ishal ataklarının tümü akut gastroenterit olarak adlandırılır. İnce bağırsağın epitel dokusunda bulunan hücre membranı peptidaz enzimi ve tiorfan inhibitörü, endojen peptidazın yıkımını ve sindirilmesini sağlar. Rasekadotril endojenleri enzimatik degredasyonlardan koruyarak ince bağırsaklardaki sinapslarda etki sürelerini uzatan asetorfan aktif metabolitine sahiptir. Ayrıca bazal sekretuvar aktiviteye etkide bulunmadan su ve elektrolit kaybını azaltarak hızlı bir şekilde antidiyareal etkisini gerçekleştirir[4].

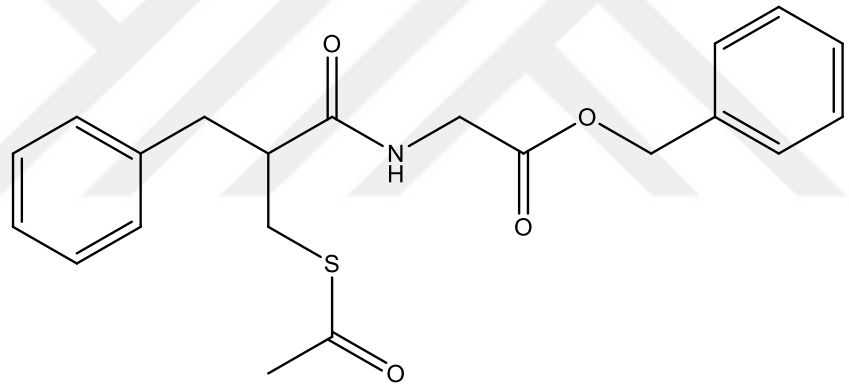
Rasekadotril'in çözünebilirliği ile ilgili olarak literatürde sınırlı çalışmalar yer almaktadır[5]. Yapısından dolayı organik çözücülerde iyi bir çözünme gösterirken sulu ortamlardaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Ancak organik çözücülerin bulunması insan sağlığını tehdit eden bir unsur olmasından dolayı Rasekadotril için yeni çözünme ortamlarının oluşturulması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır [6].

Bu yüksek lisans teznin amacı Rasekadotril için uygun olan yeni bir çözünme ortamının bulunması ve uygun metodun geliştirilerek yöntemin validasyonu gerçekleştirilip farmasötik analizlerde uygulanabilirliği hakkında bilgi vermektir. Bu kapsamda sulu ortamda Brij-35 çözeltisi, dissolüsyon anlizleri için ortam olarak belirlenmiş ve HPLC metodu geliştirilerek yöntemin validasyon çalışmaları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RASEKADOTRİL

Rasekadotril, bir enkefalinaz inhibitörü olan ve ishale karşı kullanılan tiorfanın ön ilacı olarak bilinir. İshal tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında, bağırsaklara su ve elektrolitlerin salgılanmasını azaltan, salgı önleyici etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, ilaç hiçbir farmakopide resmi olarak bulunmamaktadır. Racecadotril beyaz kristalli tozlar içerir ve metanol, etanol ve asetonitril gibi çözücülerde çözülebilir. Racecadotrilin en büyük dezavantajlarından biri suda yeterince çözünür olmamasıdır. Sudaki çözünürlüğü sınırlı bir bileşik olmasından dolayı biyoyararlanımını arttırmak için çözünürlüğünü arttıracak yeni ortamlar geliştirilmelidir.



Şekil 2.1. Rasekadotril Benzyl 2-[[2-(acetylsulfanylmethyl)-3 phenylpropanoyl]amino]acetate- Molekül Yapısı

Gautam S. ve ark. çeşitli formlarda 0.1N HCl, pH 4.5 asetat ve pH 6.8 fosfat tamponlarında rasekadotrilin literatür araştırmalarına katılmıştır. Ancak çeşitli çözünme ortamlarında yapılan denemelerde çözünürlük belirli değerleri aşamamıştır [7].

Jia D. ve ark. başka bir araştırmada 6.8 fosfat tamponu ve yüzey aktif madde kullanarak araştırma gerçekleştirmişlerdir. Sodium Dodecyl Sulphate (Sodium Lauryl Sulphate-SLS-) yüzey aktif maddesinin çözünme üzerindeki olumlu etkisi burada gösterilmektedir [8].

Lakshmana P. ve ark. çok çeşitli çözünme ortamlarını kapsayacak şekilde çalışmışlardır. Bu incelemede, 0.1N HCl varlığında çözünürlüğün belli bir noktaya kadar tatmin edici olduğu belirtilmiş olsa da en iyi çözünürlüğün organik çözücülerin varlığında bulunduğu keşfedilmiştir [9].

2.2. DİSSOLÜSYON

Bir maddenin çözünürlüğü belirli bir sıcaklık ve basınçta, çözelti ve aşırı doz arasındaki denge koşullarında o maddenin ilgili sıvıya geçen miktarı olarak tanımlanabilir. Bir ilaç molekülü ya da aktif farmasötik maddenin en yüksek dozunun 250 mL sıvı içeren çeşitli pH aralığındaki ortamlarda çözünür olması durumunda o maddenin yüksek çözünürlüğü olduğu varsayılır. 250 mL' lik sıvı hacmi oral uygulama sırasında tüketilen yaklaşık bir su bardağı sıvıdan yola çıkılarak belirlenmiştir. Bu sınırlayıcı değer aynı zamanda ilaç uygulaması sırasında midede bulunan minimum sıvı hacmini de göstermektedir.

Biyofarmasötüklerin sınıflandırılması kısmında ise ilaç moleküllerinin sudaki çözünürlükleri ve geçirgenliklerine göre yapılan bilimsel bir sınıflandırma çeşididir.
Sınıf 1 Yüksek Çözünürlük ve Yüksek Geçirgenlik: Yüksek absorbsiyon ve yüksek dissolüsyon gösterirler.
Sınıf 2 Düşük Çözünürlük ve Yüksek Geçirgenlik: Yüksek absorbsiyon gösterirler ancak dissolüsyonları düşüktür.
Sınıf 3 Yüksek Çözünürlük ve Düşük Geçirgenlik: İlacın absorbsiyon oranı ve hızında çok fazla varyasyon görülür çünkü dissolüsyonları hızlıdır.
Sınıf 4 Düşük Çözünürlük ve Düşük Geçirgenlik: Etkin bir oral uygulama için problemli olan sınıftır [10].

FDA'ye ait kılavuzlarda bir ilaç molekülünün hızlı salınım gösterebilmesi için 30 dakika içinde %85'i USP Aparat 1 ve 100 rpm hızda ve her biri 900 mL ya da daha az hacimde 0.1N HCl, pH 4.5 tamponu ve pH 6.8 tamponu ortamlarının hepsinde çözünebilir olması gerekir. Bu durumda o ilaç molekülü hızlı çözünen ilaç olarak kabul edilir [11].

2.2.1. İlaç Maddesinin Çeşitli Ortamlarda Çözünürlüğü

İlaç maddesinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, uygun çözünme ortamını seçme sürecinin bir parçası olarak belirlenmesi gerekir. Çözünme testi için ortamın bileşimine

karar verirken, ilaç maddesinin çözünürlüğü ve stabilitesi üzerindeki tamponların, pH'ın ve gerekirse farklı yüzey aktif maddelerin etkisinin değerlendirilmesi önemlidir. İlaç maddesinin çözünürlüğü genellikle ilacın farklı ortamlarda, 37°C 'de doyma konsantrasyonu belirlenerek değerlendirilir. İlaç ve ortamda kullanılan tamponlar arasındaki potansiyel iyon etkilerini dengelemek için, hidroklorik asit ve sodyum hidroksit karışımları kullanılır. Çözünürlük denemeleri sırasında pH'ın değişip değişmediğini belirlemek için berrak tampon çözeltisinin pH'ı kontrol edilmelidir.

Tipik çözünme ortamı seyreltilmiş hidroklorik asit, fizyolojik pH aralığı 1.2-7.5 olan tamponlar (fosfat veya asetat), simüle edilmiş mide veya bağırsak sıvısı (enzimlerle veya enzimler olmadan) ve suyu kapsamaktadır. Bazı ilaçlar için, ilacın belirli tamponlar veya tuzlarla uyumsuzluğu tampon seçimini etkileyebilir. Kullanılan tamponların ve asitlerin molaritesi çözündürme etkisini etkileyebilir ve bu faktör değerlendirilebilir.

Sulu çözeltiler (asidik veya tampon çözeltiler), ilacın çözünürlüğünü arttırmak için bir yüzey aktif madde yüzdesi içerebilir. Çözünürlük araştırmaları için seçilen yüzey aktif cisimleri, tüm yaygın yüzey aktif cismi tiplerini, yani anyonik, noniyonik ve katyonik, kapsamalıdır. Çözünme ortamı olarak saflaştırılmış suyun kullanılması, ortamın pH'ından bağımsız bir çözünme davranışına sahip ürünler için uygundur. Arıtılmış suyun tercih edilmemesinin birkaç nedeni vardır. Su kalitesi, kaynağına bağlı olarak değişebilir ve suyun pH'ı, tampon çözeltilerin pH'ı kadar sıkı bir şekilde kontrol edilmez. Ek olarak, pH günden güne değişebilir ve ayrıca çalışma sırasında ilaç maddesi ve yardımcı maddelere bağlı olarak değişebilir [12].

2.2.2. Ortam ve Hacim Seçimi

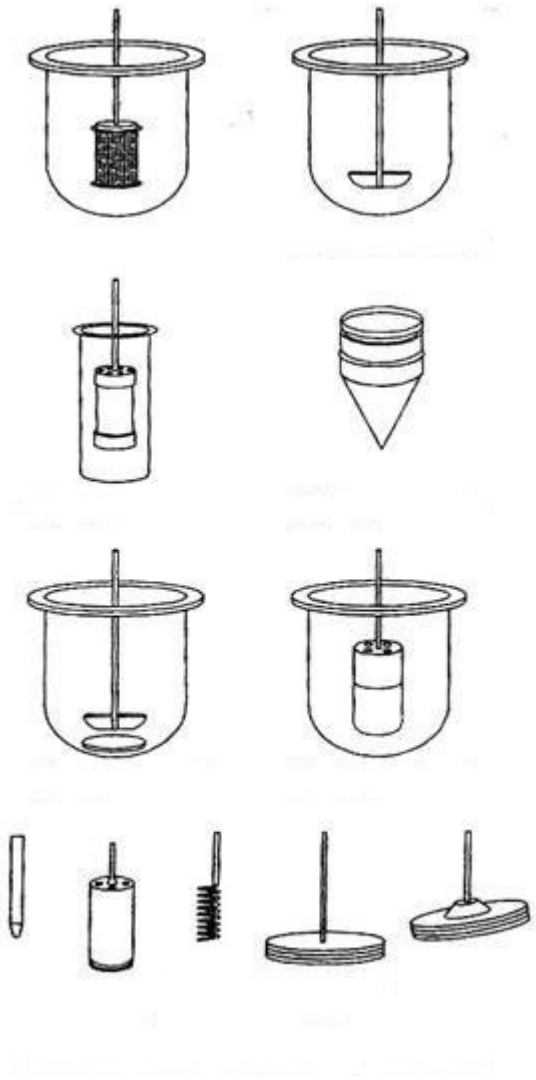
Çözünme ortamının bileşimi ve hacmi, çözünürlük incelemeleri tarafından belirlenir. Örneğin, bir yüzey aktif maddenin seçimi ve konsantrasyonu, çözünürlük verileri ve çözünme profillerine göre yorumlanabilir.

Diğer bir seçenek, mide ve bağırsak yolundaki sıvıların bileşimini daha yakından takip eden ortamı kullanmaktır. Bu ortamlar, taurokolatlar gibi fizyolojik yüzey aktif bileşenler içerebilir. Ortam aynı zamanda emülgatörler (lesitin) ve ozmolaliteyi artıran salin solüsyonu gibi bileşenler içerebilir. Aynı zamanda, tampon çözeltilerinin iyonik kuvveti

veya molaritesi de değiştirilebilir. Ortam, mide ve ince bağırsakta tokluk ve açlık durumunu temsil edecek şekilde tasarlanmıştır [13].

2.2.3. Aparat Seçimi

Dissolüsyon ortamında çözünmelerin kıyaslanabilmesi adına USP aparatları kullanılır. Çeşitlerine göre aparatlar USP Aparat 1 Basket ve USP Aparat 2 Pedal başta olmak üzere USP Aparat 3 ve 4 modelleri de kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Dissolüsyon analizlerinde kullanılan USP tipi aparat çeiştleri [14]

2.2.4. Dissolüsyon Prosedürlerin Değerlendirilmesi

Çözündürme prosedürü, birlikte kritik kalite özelliklerindeki değişikliklere duyarlı, ancak yine de yeterince sağlam ve günlük operasyon için yeniden üretilebilir bir yöntem

sağlayan bir aygıt, bir çözünme ortamı ve test koşulları gerektirir. Yöntem, laboratuvarlar arasında aktarılabilmelidir.

2.3. DİSSOLÜSYON KOŞULLARI İÇİN METOT GELİŞTİRME

Metot geliştirme aşamasında amaçlanan salım mekanizmalarını anlamak ve çözünme prosedürünün bir ilaç ürününün kritik kalite özelliklerinde değişiklik gösterip gösteremeyeceğini belirlemektir. Bu analizler için çoğunlukla dissolüsyon analizlerinden sonra spektrofotometrik cihazlar veya HPLC kullanılır. Örnekler çözünme ortamından çekildikten sonra, çözünen miktarı belirlemek için kullanılan analitik metoda uygun olacak şekilde yöntemler geliştirilmelidir. Örneğin, çözülmemiş partikül maddeyi çıkarmak için filtrasyon kullanılabilir veya numunelerin ışığa maruz kalmadan korunması gerekebilir veya soğutulmuş depolama gerekebilir. Ek olarak, numunelerin yöntemin doğrusal aralığı içindeki bir seviyeye seyreltilmesi gerekebilir. HPLC analizlerinde, kullanılan çözünme ortamından kaynaklı etkiyi azaltmak için numunenin mobil faz ile seyreltilmesi gerekli olabilir. Çözücüden kaynaklanacak sonucu etkileyebilen durumlar yanıtın doğruluğunu ve kesinliğini etkileyebilir. Büyük enjektör hacimlerine (>100 µL) ihtiyaç duyulduğunda bu daha da önemlidir. Sistem uygunluk testleri ile ana pikin şekline değerlendirmeler yapılabilir. Metot geliştirme aşamasında en önemli kısımlar ana pikin çözücü bozulmasından ve resolüsyonu düşük çıkan piklerden ayrılması ile oluşabilecek sorunları çözebilmektir [15].

İdeal olarak, standart çözeltiler, yöntemin doğrusal aralığı dahilindeki bir konsantrasyonda, örneğin %100 veya dozaj gücünün seçilen Q değerinde çözünme ortamı ile seyreltilmelidir. Ancak, doğrulama sırasında doğruluk kriterlerinin karşılanması şartıyla, standardın hazırlanmasında organik çözücü kullanılabilir. Bazı durumlarda, pik şeklini iyileştirmek için numune mobil faz ile seyreltilebilir. Standart ve numune solüsyonlarının her ikisi de doğrusal konsantrasyon aralığında hazırlanmalı ve aynı dalga boyunda ölçülmelidir [16].

2.4. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC) CİHAZI

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), günümüzde birçok alanda vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmekte ve çeşitli organik, inorganik ve biyolojik numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek için

kullanılmaktadır [17].

HPLC bir sıvıda çözünmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır [18].



Şekil 2.3. HPLC Cihazı [19]

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. HPLC ünitesi: Degazör, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır.

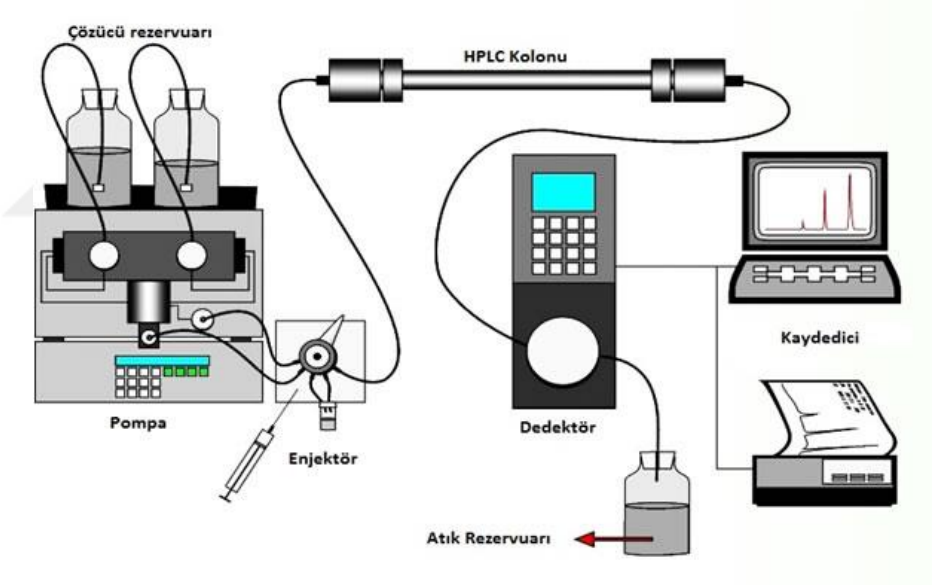
Degazör: Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar.

Pompa: Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir.

Autosampler: Numunelerin kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar.

Kolon: Kolon veya sabit faz maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle çelikten imal edilen kolonların içleri polimer ve silika gibi dolgu maddeleri ile doldurulur. HPLC nin hayata geçmesiyle kullanılmaya başlanan silika bazlı kolonlar artık yerini yavaş yavaş hızlı analiz yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlara bırakmaya başlamıştır. Kullanılan mobil faz ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC teknikleri ters faz kromatografisi, normal faz kromatografisi, kiral ayırma, iyon değiştirme ve eleme şeklinde gruplandırılabilir.

Dedektör: Sıvı akışlardaki düşük analit derişimlerini ölçmek üzere uyarlanmış geleneksel analitik cihazlardır. Dedektörden elde edilen verilen Software yardımı ile kromatogram olarak incelenir ve yorumlanabilir. HPLC'lerde çoğunluklu olarak PDA, UV, Floreasns olmakla birlikte MS, IR, ELSD ve elektrokimyasal dedektör çeşitleri kullanılmaktadır [20,21].



Şekil 2.4. HPLC cihazında bulunan üniteler [22]

2.5. VALİDASYON

Validasyon, bir yöntemin belirlenen kriterlere uygunluğunun saptanması için, yöntem parametrelerinin incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Kapsamlı validasyon, rutin kullanım öncesi yöntem performans kriterlerinden belirli bir kısmının incelenip, dökümante edilmesi anlamına gelirken; tam validasyon yöntemin tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya

geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametre değişikliklerinden sonra yapılır [23]. Analitik metot validasyonu ise bir metodun performansını belirmeke için yapılan bir takım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir.

Özellikle ilaç endüstrisinde performans karakteristik özellikleri için öncelikle validasyon parametrelerinin ICH Q2 kılavuzuna göre belirlenmesi gerekir. Belirtilen kılavuzda validasyon parametreleri;

-Filtre etkisi,

-Spesifiklik,

-Doğruluk,

-Kesinlik (Ara kesinlik, Cihaz ve Metot Kesinliği),

-Doğrusallık ve çalışma aralığı,

-Güvenilirlik başlıklarından oluşmaktadır.

Filtre etkisinde, analitik metoda göre çalışılmış olan standart ve numune çözeltilerinin kullanılacak olan cihazlara uyumu açısından belirli filtrelerden test edilmesi ile gerçekleştirilir. Dissolüsyon test yöntemlerinin validasyonlarında ise ilk önce "Filtre etkisi" yapılarak başlanması bundan elde edilen sonuçların diğer parametrelerin validasyonu sırasında kullanılabilmesi için gereklidir [11].

Spesifiklik, bir analitik yöntemin aranan analiti diğer bileşenlerin bulunduğu numune içinde ayırt edebilme yeteneğine denir. Seçiciliğin belirlenebilmesi için blank çözeltisine aranan analit eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenir.

Doğruluk, çok sayıdaki ölçüm sonucunun ortalamasının gerçek değere yakınlığıdır. Doğruluk için sistematik hata hesabı yapılarak sonuçları yorumlanabilir.

LOD-LOQ, LOD (Tespit Limiti), tespit edilebilen, fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen ve analit sinyalinin, gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük derişimdir. LOQ (Tayin Alt Limiti) ise kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. Analitlik metot validasyon parametrelerinin gerçekleştirilmesi sırasında LOD ve LOQ tanımlarına da uygun olacak şekilde hesaplamalar gerçekleştirilmelidir.

Kesinlik, bağımsız ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı ve rastgele hataların dağılımını gösterir.

Doğrusallık ve çalışma aralığı, yöntemin uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde, ölçülen analitin derişimi ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır [24,25].

3. DENEYSEL MALZEMELER VE YÖNTEMLER

3.1. KİMYASALLAR VE REAKTİFLER

Rasekadotril CRS'nin (European Pharmacopoeia Reference Standard) farmasötik dereceli bir örneği EP'den (European Pharmacopoeia) satın alınmıştır.

Potasyum dihidrojen fosfat Merck'ten satın alınmıştır. HPLC saflığında saf su (0.05 µc), Sartorius Stedim Biotech sistemine ait saf su cihazı ile kullanılmıştır. Mobil fazda kullanılan Asetonitril JT Baker'dan, çözünme ortamı olarak kullanılan Brij 35, Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

3.2. DİSSOLÜSYON (ÇÖZÜNME HIZI) İÇİN UYGUN ORTAMIN SEÇİMİ

Çözünme hızı çalışmaları, literatürde yaygın olarak kullanılan rasekadotril saşe numunelerinde, pH 1.2 (0.1N HCl, gastrointestinal sistemde mide asitliği ortamı), pH 6.8 Fosfat ve pH 4.5 Fosfat ortamı (Gastrointestinal sistemde bağırsağı simüle eden ortamlar) kullanılarak yapılmıştır. Uygun bulgular elde edilemediği için yüzey aktif maddeler eklenerek ortamda test edilmesine karar verilmiştir. Bu aşamada Sodyum Lauril Sülfat denendi, ancak uygun sonuçlar elde edilmedi. İyonik olmayan bir yüzey aktif madde olan Brij-35 denenmiş ve metodu geliştirilerek araştırmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmıştır.

3.3. DİSSOLÜSYON KOŞULLARI

Çözünme çalışması, USP Pedal aparatı (Tip 2) kullanılarak 45 dakika süreyle gerçekleştirilir. Dissolüsyon karıştırma hızı 100 rpm'dir. Çözünme ortamı (900 mL) olarak Brij-35 kullanılır ve sıcaklık 37±0.5^{o}C'dir.

Tartılan 37.56 g Brij 35 dikkatlice 1000 mL'lik bir şişeye aktarılır. Üzerine bir miktar saf su eklenir ve tamamen çözülür. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra saf su ile hacmine tamamlanır.

DISTEK cihazındaki çözündürme kaplarının her birine belirlenmiş olan Brij-35 çözünme ortamı konur ve 37.0±0.5°C'ye ısıtılır. Her çözündürme kabına tartılmış bir numune saşe ürün atılır ve çözündürme cihazı çözünme parametrelerine göre çalıştırılır. Test süresinin

sonunda her kaptan bir numune alınır. Yapılan çalışmada numunelerin ve standart çözeltinin konsantrasyonu 0.0056 mg/mL olarak çalışılmıştır.

3.4. KROMATOGRAFİK KOŞULLAR

Sıvı kromatografi yöntemi geliştirme ve doğrulama için Waters E2695 HPLC (Singapur, Asya) sistemi, veri işleme ve değerlendirme için Empower 3 Yazılımı kullanılmıştır. KROMASIL C18 150 mm × 4.6 mm, 5 µm kolonu kullanılarak gerçekleştirilen analiz için kromatogramlar UV detektörden alınmıştır. Dalga boyu 210 nm, numune sıcaklığı 5°C, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 100 µl, akış hızı 1.5 ml/dk, enjeksiyon süresi 7 dk ve akış izokratik sistemdir. (40:60 v/v Tampon solüsyon : Asetonitril.) Racecadotril'in bu koşullar altında yaklaşık alıkonma süresi 4 dakikadır. Tampon çözeltisi için 1.0 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 ml saf su içinde çözülür. Daha sonra 0,50 ml trietilamin eklenir. Çözeltinin pH'ı, orto-fosforik asit (% 85) ile 3.95±0.05'e ayarlanır. Filtrelenir ve degaze edilerek kullanılır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. VALİDASYON YÖNTEMLERİ VE BULGULARI

Validasyon yöntemlerinde amaç kullanılan test yöntemlerinin geçerli olduğunu göstermektir. Kromatografik koşulları belirtilen analiz için öncelikle sistem uygunluk parametreleri sağlanmalıdır. Ardından validasyon parametrelerinin uygun olduğu gösterilmelidir.

Sistem uygunluk parametreleri:

Rasekadotril EP CRS kullanılarak, 0.0056 mg/mL konsantrasyonunda iki standart çözeltisi hazırlanır. Standart çözeltisi 1 ve standart çözeltisi 2 arasındaki uyum %98.0-%102.0 arasında olmalıdır.

Standart çözeltisi 1'e ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Rasekadotril pik alanlarına ait %RSD (Bağıl standart sapma) değeri en fazla %2.0 olmalıdır.

ICH parametrelerine göre standart çözeltisi 1 kromatogramından elde edilen Rasekadotril pikine ait teorik plaka sayısı en az 2000 olmalıdır ve Rasekadotril pikine ait simetri faktörü en fazla 2.0 olmalıdır.

4.1.1. Çözünme Hızı Yöntem Validasyonu

Bütün parametreler HPLC yöntemi için değerlendirilir.

4.1.2. Çözünme Hızı Tayini Yöntemi Validasyon Parametreleri

- Filtre Etkisi
- Spesifiklik
- Doğruluk
- Kesinlik
- Cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği
- Metot kesinliği
- Ara kesinlik
- Tekrarlanabilirlik
- Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

- Güvenilirlik

4.1.3. Filtre Etkisi

Yöntemde belirtildiği gibi dissolüsyon şartlarında test numunesi hazırlandı. 0.45 µm PTFE ve 0.45 µm RC membran filtreden fazla miktarda sıvı geçirilerek test numunesi süzüldü. Süzülen çözeltilerin alanları kaydedildi. Maksimum alan veren filtre uygun filtre olarak seçildi.

Rasekadotril Granül'e ait çözünme hızı tayini metot validasyonunda 0.45 µm PTFE membran filtrenin kullanımı uygun görülmüştür.

4.1.4. Spesifiklik

Çözünme ortamı, standart ve numune çözeltileri metotta belirtildiği gibi hazırlandı.

4.1.4.1. *Prosedür*

- Çözünme ortamı enjekte edildi.
- Plasebo (saşe numunesinde etken harici bulunan kimyasallar) çözeltisi enjekte edildi.
- Standart çözeltisi (0.0056 mg/mL konsantrasyonunda) enjekte edildi.
- Rasekadotril saşe numunelerinin çözeltisi enjekte edildi.
- Plasebo + hammadde (saşe numunesinde kullanılan Rasekadotril hammaddesi) çözeltisi enjekte edildi.

Enjeksiyon yapılan çözeltilerin alıkonma ve bağıl alıkonma zamanları not edildi. Pik saflıklarına bakıldı.

Çizelge 4.1. Standart ve Numune Çözeltilerinin Alıkonma ve Bağıl Alıkonma Zamanları

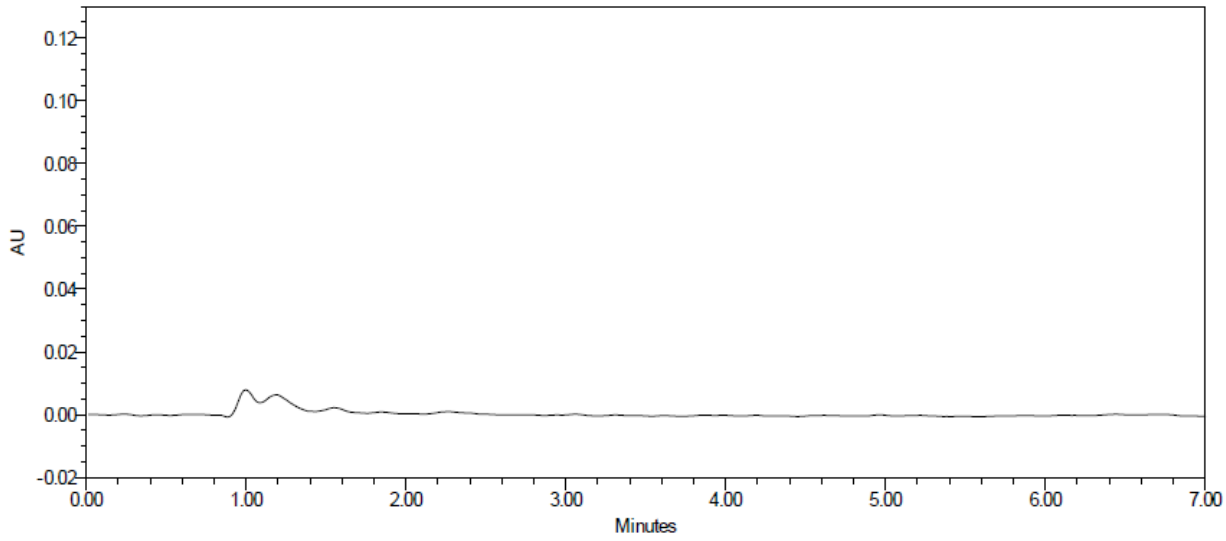
Bileşenler	**Alıkonma zamanı**	**Bağıl alıkonma zamanı**	**Pik saflığı açısı**	**Pik saflığı eşiği**
Seyreltme çözeltisi	-	-	-	-
Plasebo çözeltisi	-	-	-	-
Standart çözeltisi	3.869	1.00	0.323	0.526
Plasebo + hammadde çözeltisi	3.891	1.00	0.376	0.811
Numune çözeltisi	3.864	1.00	0.456	1.110

4.1.4.2. *Spesifiklik kriterleri*

Rasekadotril'in alıkonma zamanında başka pik görülmemelidir.

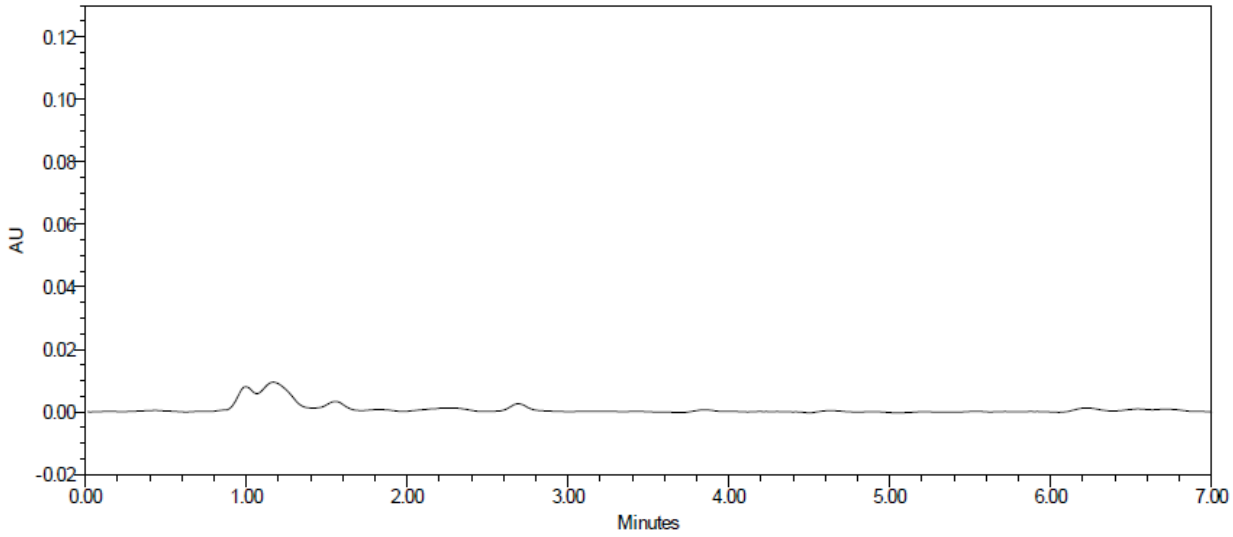
Bütün bileşenlerin pik saflıkları uygun olmalıdır.

Bu sonuçlara dayanarak, çözünme testinde bu yöntemin spesifiklik parametresi uygundur.



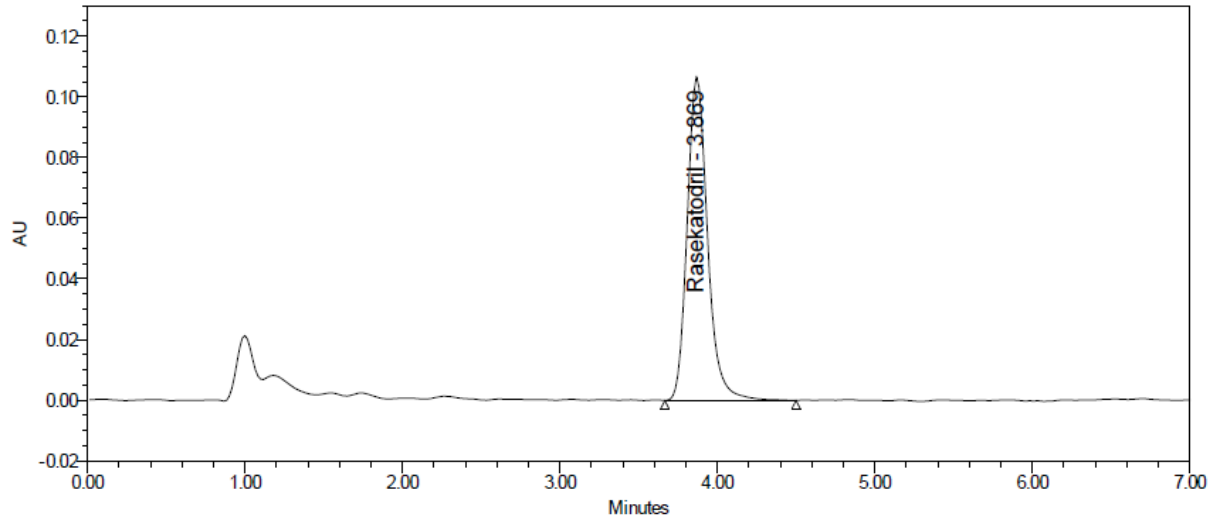
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	Rasekatodril	3.869			

Şekil 4.1. Seyreltme Çözeltisi Kromatogramı

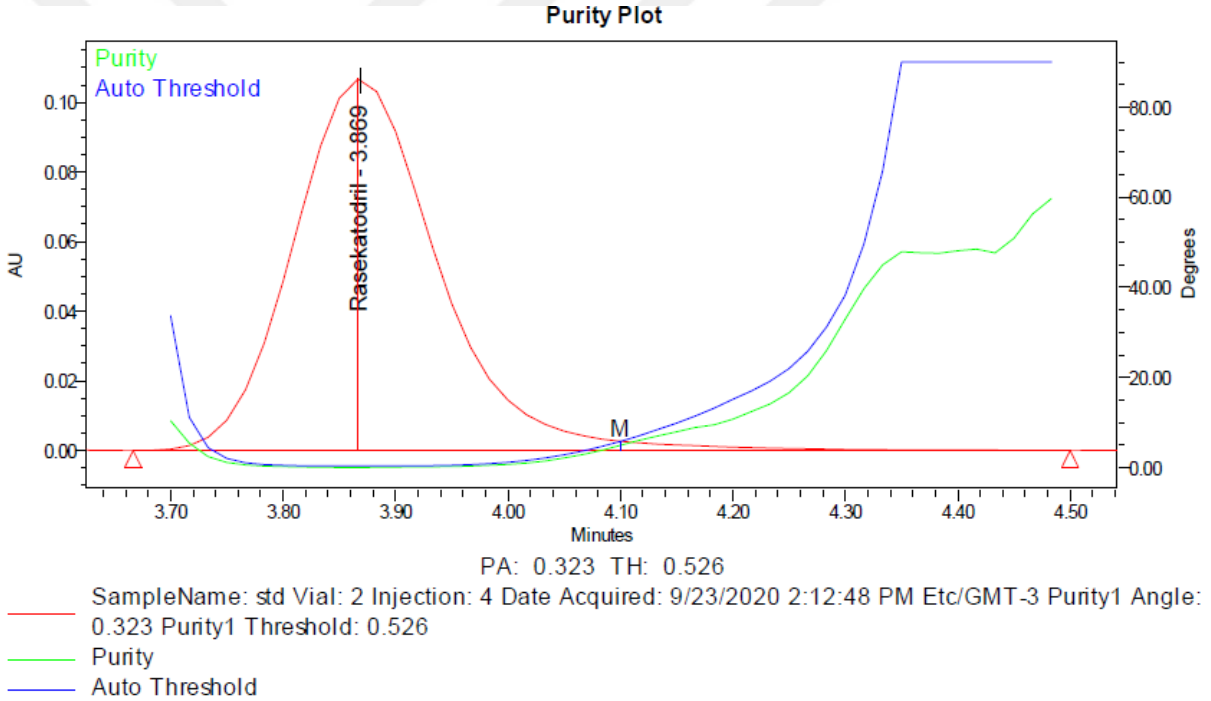


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	Rasekatodril	3.869			

Şekil 4.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı

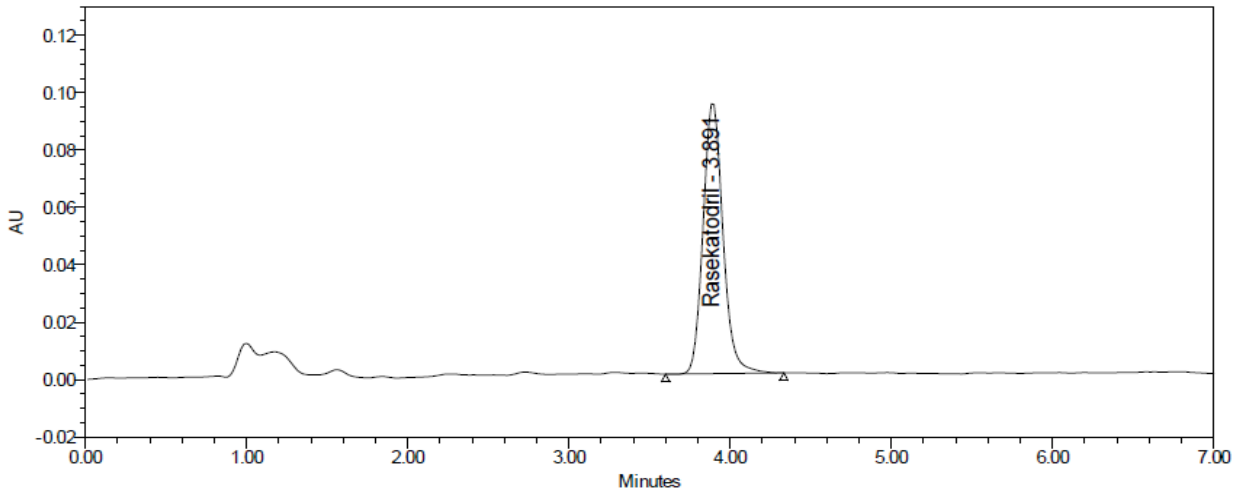


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	Rasekatodril	3.869	959867	100.00	106704

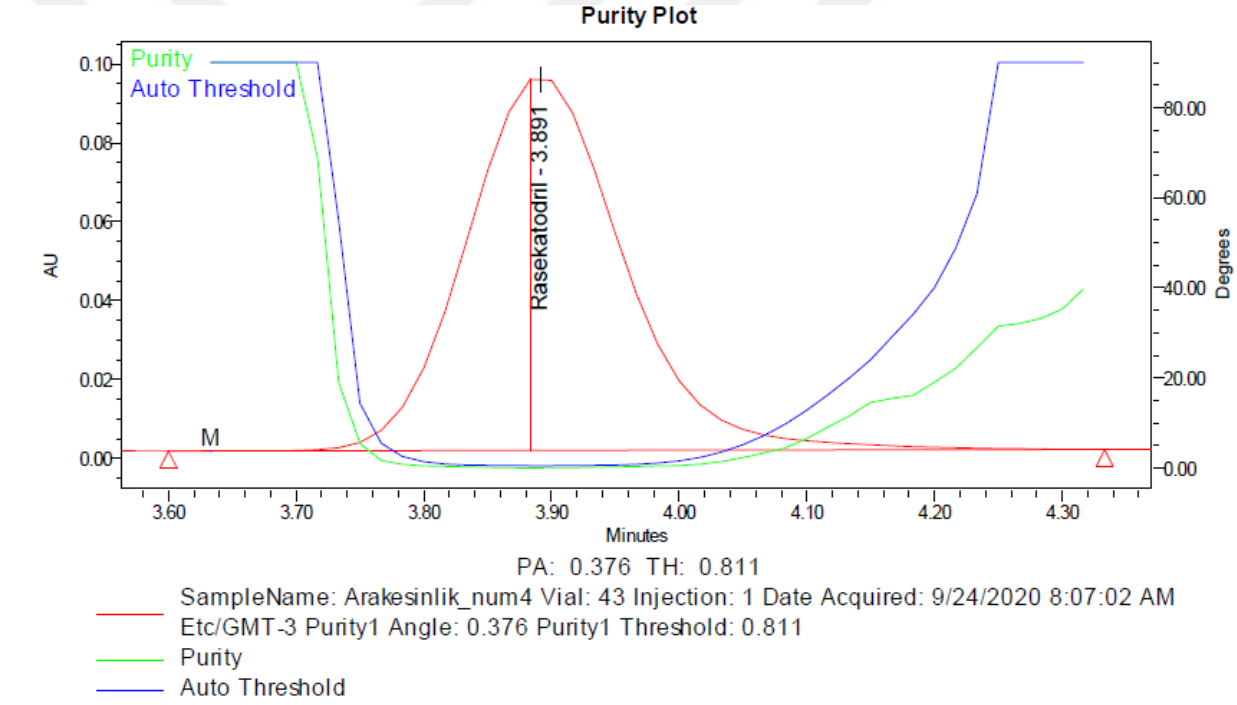


	Peak Name	RT	Area	Height	Purity Angle	Purity Threshold	Purity_Criteria
1	Rasekatodril	3.869	959867	106704	0.323	0.526	Pass

Şekil 4.3. Standart çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı

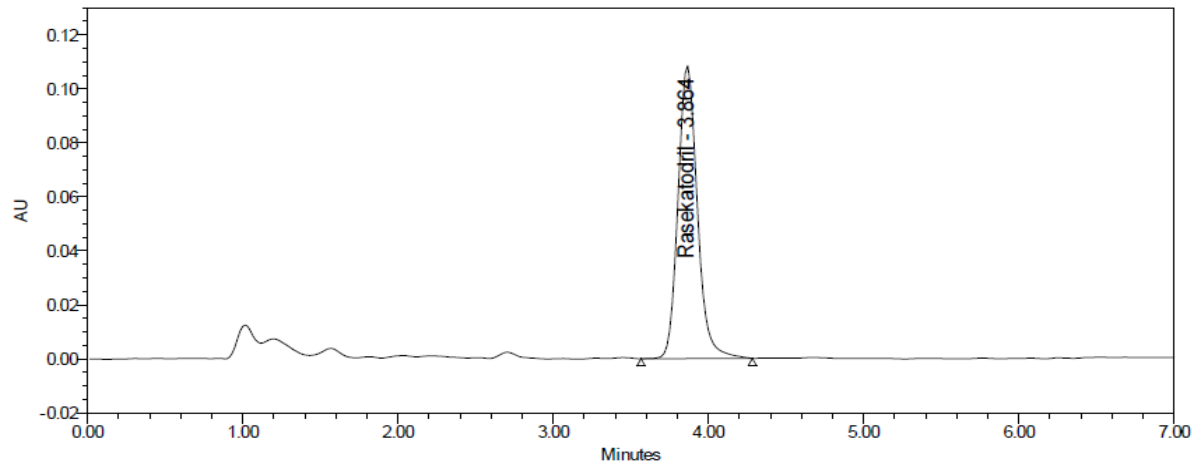


	Peak Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	Rasekatodril	3.891	810705	100.00	94724

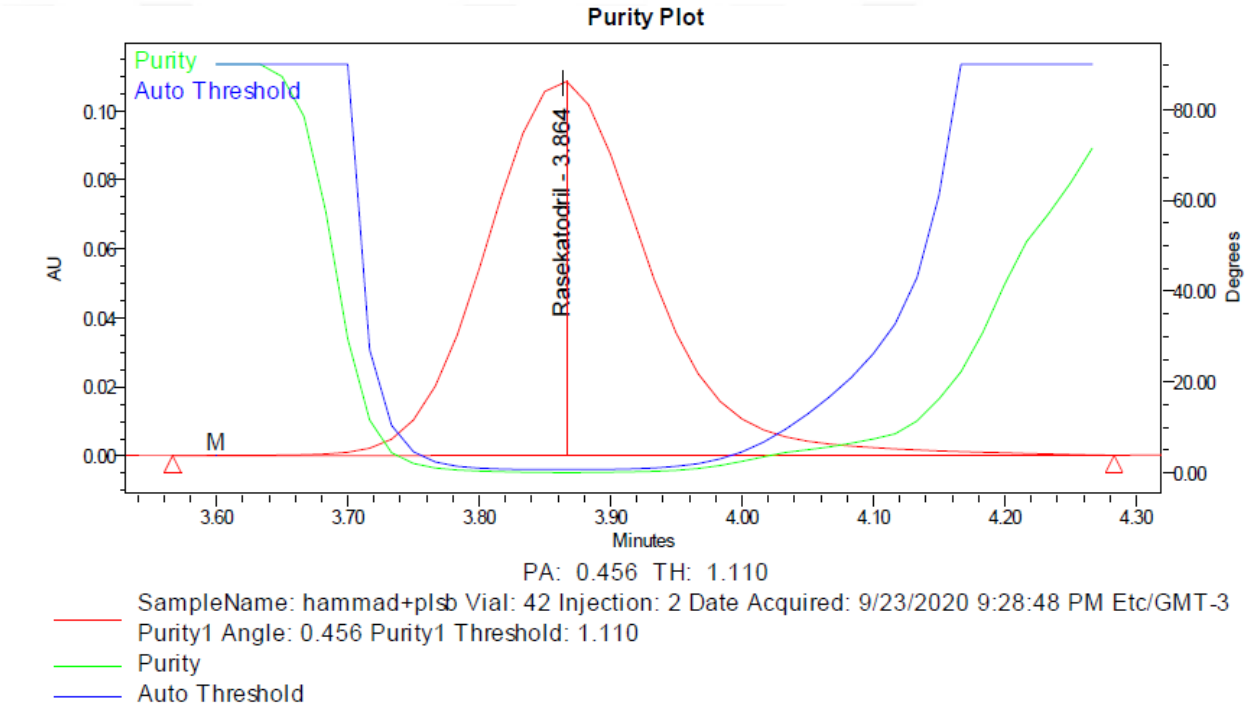


	Peak Name	RT	Area	Height	Purity Angle	Purity Threshold	Purity_Criteria
1	Rasekatodril	3.891	810705	94724	0.376	0.811	Pass

Şekil 4.4. Numune çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height (µV)
1	Rasekatodril	3.864	938917	100.00	108362



	Peak Name	RT	Area	Height	Purity Angle	Purity Threshold	Purity_Criteria
1	Rasekatodril	3.864	938917	108362	0.456	1.110	Pass

Şekil 4.5.Plasebo + hammadde çözeltisi kromatogramı ve pik saflığı

4.1.4.3. *Sistem uygunluğu*

ICH kılavuzlarında belirtilen değerlere uygun olabilmesi adına standart çözeltisi 1'e ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Rasekadotril pik alanlarına ait %RSD değeri en fazla %2.0 olmalıdır.

Standart çözelti-1 kromatogramından elde edilen Rasekadotril pikine ait teorik plaka sayısı en az 2000 olmalıdır.

Standart çözelti-1 kromatogramından elde edilen Rasekadotril pikine ait simetri faktörü en fazla 2.0 olmalıdır.

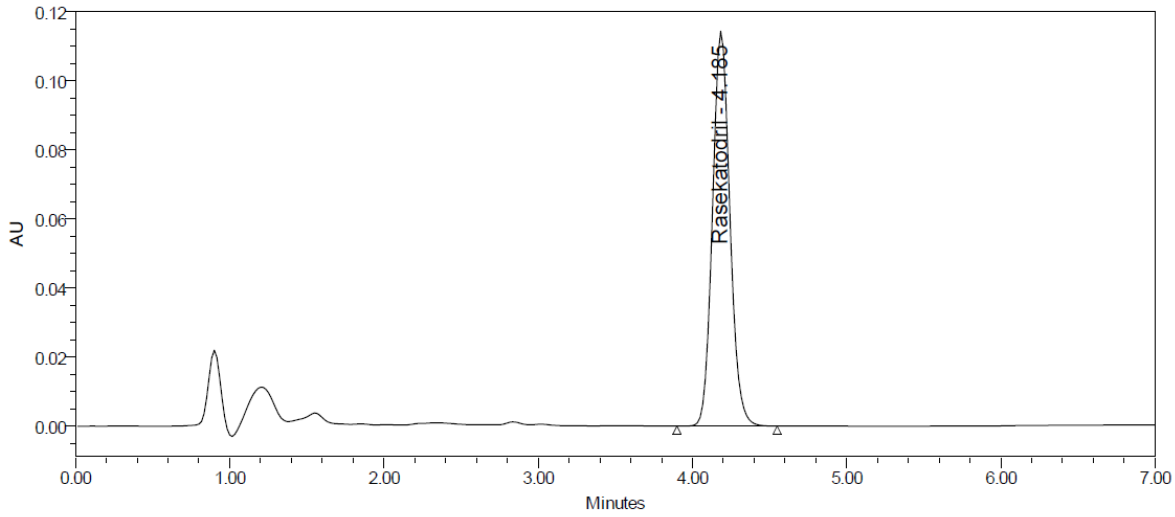
Gerçekleştirilen çalışma kapsamında;

Standart çözeltisi 1'e ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Rasekadotril pik alanlarına ait %RSD değeri %0.05'dir.

Standart çözelti-1 kromatogramından elde edilen Rasekadotril pikine ait teorik plaka sayısı 6646'dır.

Standart çözeltisi 1 kromatogramından elde edilen Rasekadotril pikine ait simetri faktörü 1.1' dir.

Bu sonuçlara dayanarak, çözünme testinde bu yöntemin sistem uygunluğu parametreleri uygundur.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1	Rasekatodril	4.185	100.00	897616	114000	88.71	1.10	6646.39	

Şekil 4.6. Çözünme hızı tayinindeki sistem uygunluğu kromatogramı

4.1.4.4. *Doğruluk*

Plasebo ile beraber LOQ, %80, %100, %120, konsantrasyonlarında ayrı ayrı çözelti hazırlanmıştır. Çözünme testindeki koşullar ile çalışılmıştır. Her bir çözelti 3 kere enjekte edilmiştir.

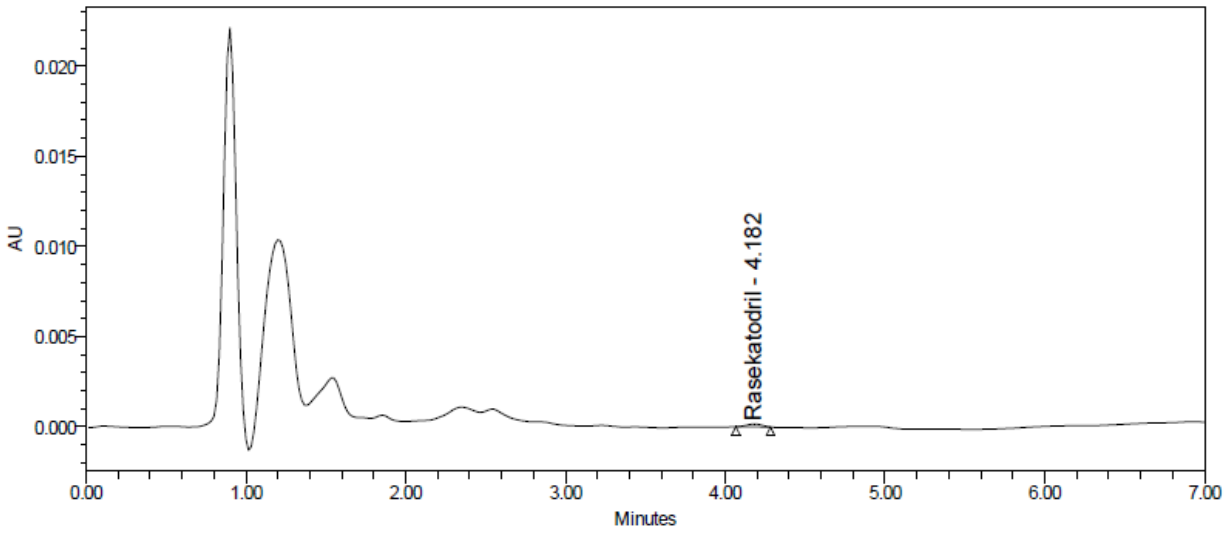
Çizelge 4.2. LOQ, %80, %100, %120 konsantrasyonlarında hazırlanan doğruluk parametresi için geri kazanım değerleri

Test	**Tartılan etken, (mg/mL)**	**Hesaplanan etken, (mg/mL)**	**Geri kazanım, %**
LOQ	0.0000059	0.0000060	101.62
	0.0000059	0.0000060	100.93
	0.0000059	0.0000060	100.65
%80	0.0044420	0.0044670	100.56
	0.0044420	0.0044630	100.47
	0.0044420	0.0044638	100.49
%100	0.0052960	0.0053229	100.51
	0.0052960	0.0052523	99.17
	0.0052960	0.0053206	100.46
%120	0.0066713	0.0066458	99.62
	0.0066713	0.0066458	99.62
	0.0066713	0.0066488	99.66
Ortalama geri kazanım, %:			100.31
Geri kazanım 95% güven aralığı sınırları:			99.88 – 100.75

Çizelge 4.3. Kabul edilebilir geri kazanım değerleri

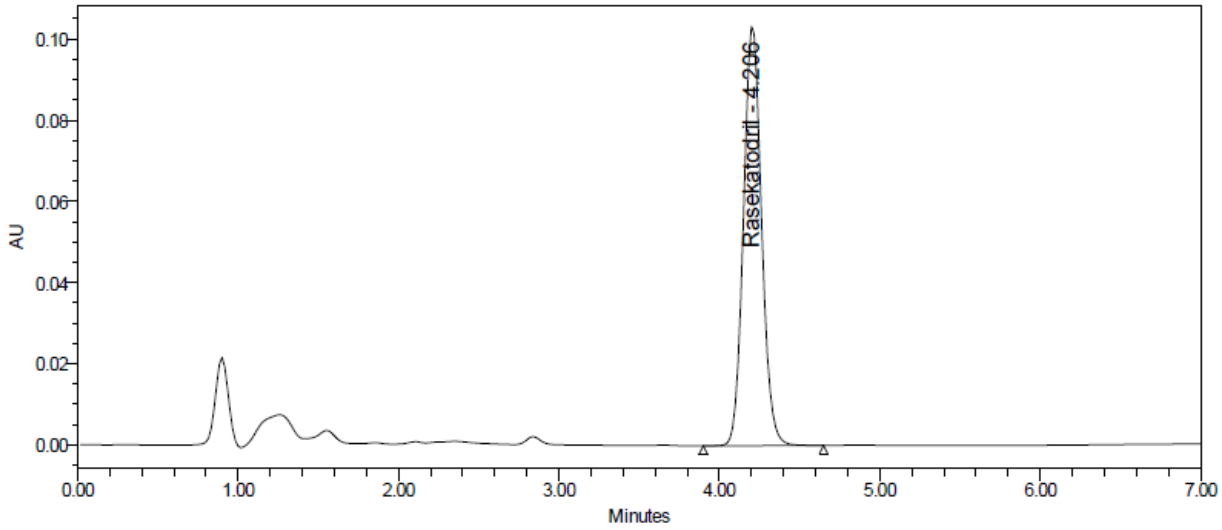
% Aktif içerik	**Kabul edilebilir geri kazanım**
% 100	98-102 %
> %10	98-102 %
> %1	97-103 %
> %0.1	95-105 %

Ortalama geri kazanım değeri %100.31’ dir. Çözünme yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu sonuca göre LOQ, %80, %100, %120 konsantrasyonlarında geri kazanım yeterlidir ve farmasotik olarak saşe formdaki Rasekadotril aktif madde çözünme testi doğruluk parametresine göre yöntem uygundur.



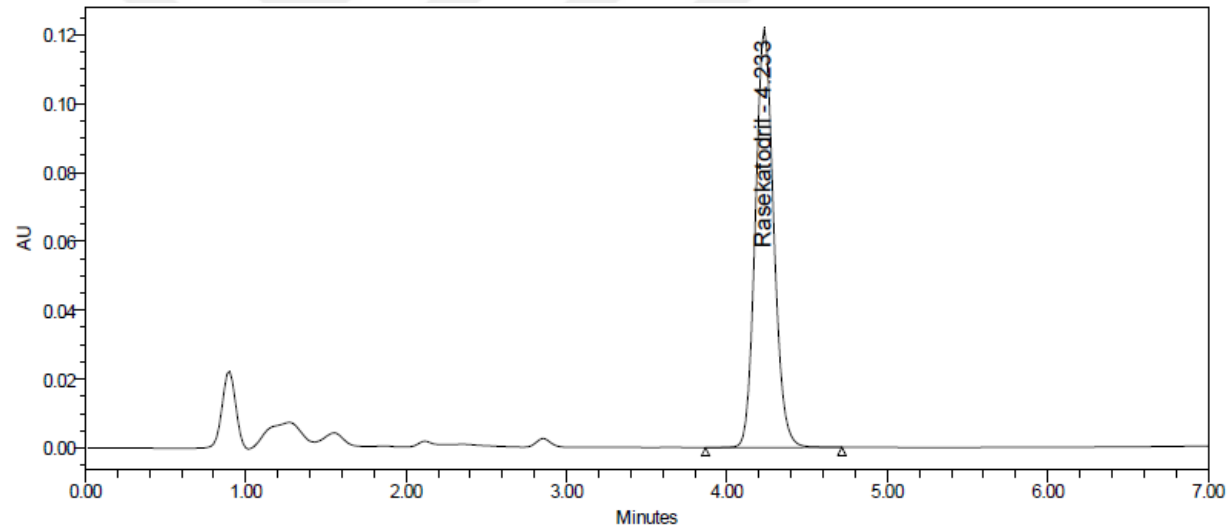
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.182	100.00	1061	158	100.50

Şekil 4.7. LOQ doğruluk kromatogramı



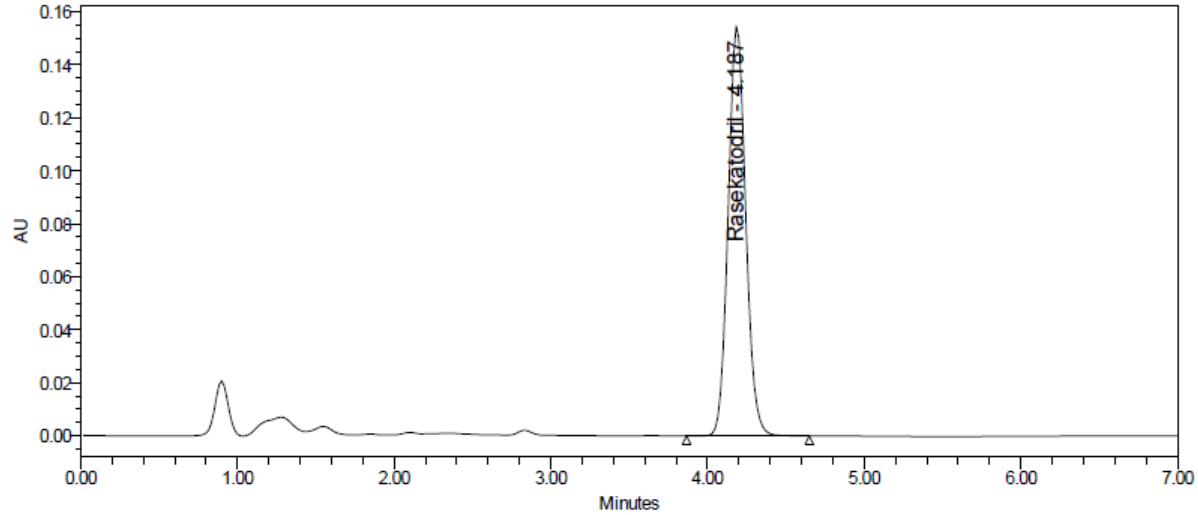
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.206	100.00	810904	103601	100.50

Şekil 4.8. %80 Doğruluk kromatogramı



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.233	100.00	967544	121497	101.11

Şekil 4.9. %100 Doğruluk kromatogramı



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.187	100.00	1207172	154705	99.62

Şekil 4.10. %120 Doğruluk kromatogramı

4.1.4.5. *Kesinlik*

Bir analitik yöntemin kesinliği homojen numunenin tekrarlanan analizlerinden elde edilen sonuçlarının dağılma miktarıdır.

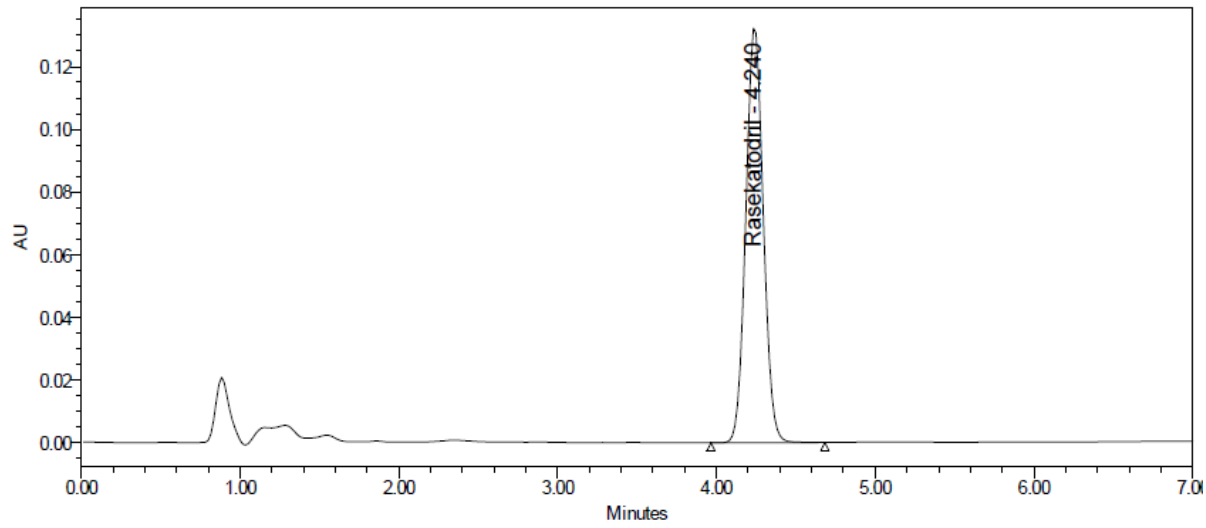
4.1.4.5.1. *Cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği*

Test, en az %100 konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltinin 6 enjeksiyonu ile yapılmıştır. Standart çözeltisi konsantrasyonu belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.4. Standart çözeltisi enjeksiyon tekrarlanabilirliği

Enjeksiyon sayısı	**Alan**	**Alıkonma zamanı**
1	1016906	4.240
2	1015629	4.229
3	1016611	4.221
4	1016085	4.219
5	1016586	4.218
6	1017124	4.217
Ortalama, %	1016490	4.224
Standart sapma, %	548	0.009
Bağıl std. sapma, %	0.05	0.21

Bağıl standart sapma değeri pik alanları için %0.05 ve pik alıkonma zamanları için %0.21'dir. Yöntemin cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği uygundur.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.240	100.00	1016906	132990	0.005589

Şekil 4.11. Çözünme hızı tayinindeki cihaz kesinliği kromatogramı

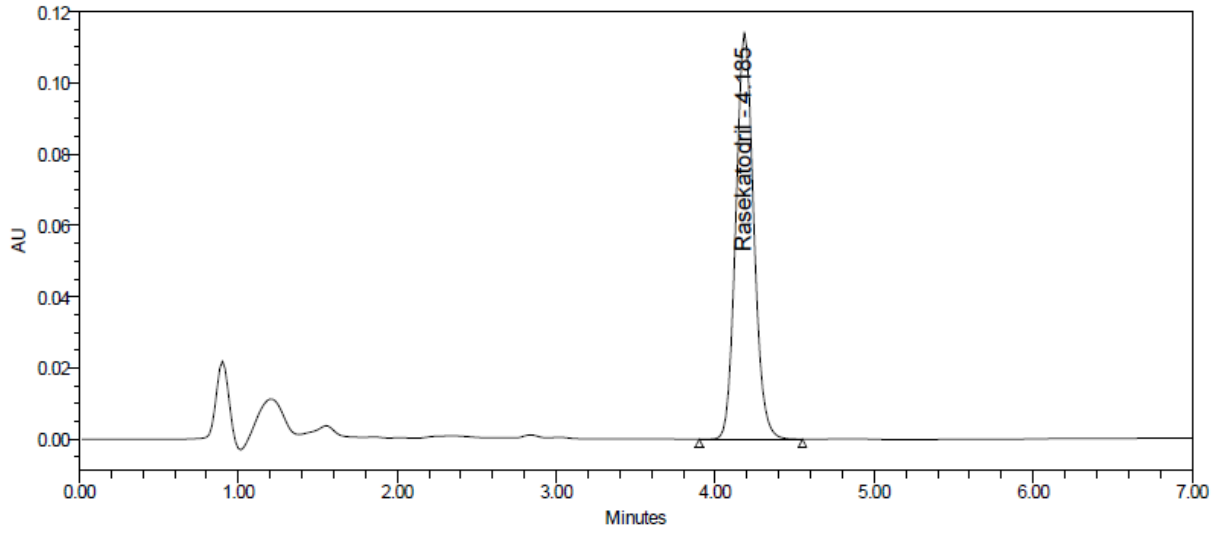
4.1.4.6. *Metot kesinliği*

Test, en az 6 numune ile gerçekleştirilmiştir. Test numunesinin hazırlanışı yöntemde belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen metot kesinliği sonuçları

Metot kesinliği	**Sonuç, %**
Numune çözeltisi 1	88.84
Numune çözeltisi 2	86.99
Numune çözeltisi 3	89.40
Numune çözeltisi 4	89.40
Numune çözeltisi 5	89.18
Numune çözeltisi 6	89.18
Ortalama, %	88.83
Bağıl standart sapma, %	1.04
%95 güven aralığı sınırları	87.79 – 89.87

Analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %1.04’ tür.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.185	100.00	897616	114000	88.84

Şekil 4.12. Çözünme hızı tayinindeki metot kesinliği kromatogramı

4.1.4.7. *Ara kesinlik*

Her analist tarafından 6 adet saşe numunesi belirtilen konsantrasyonlarda çözünme testi gerçekleştirilmiştir.

Tüm numune çözeltileri birinci analist tarafından, I. cihazda analiz edilmiştir.

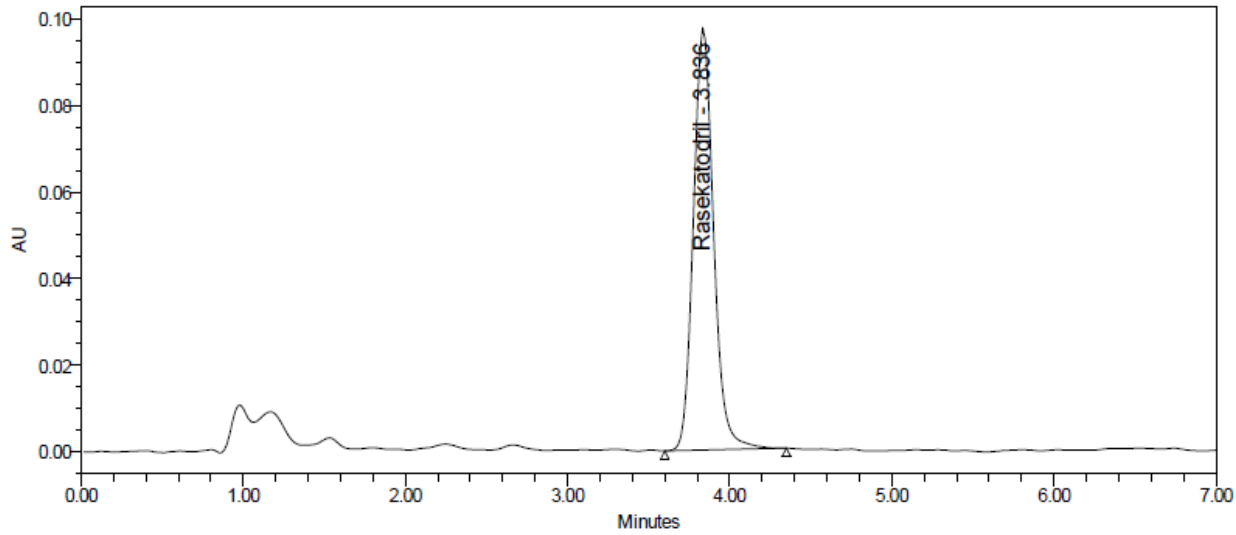
Tüm numune çözeltileri ikinci analist tarafından, II cihazda analiz edilmiştir.

Bütün sonuçlar kıyaslanıp bağıl standart sapma hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6. Numune çözeltileri ile gerçekleştirilen ara kesinlik değerleri

Ara kesinlik	**Analist 1**	**Analist 2**
	1.Cihaz (%)	**2. Cihaz (%)**
Numune çözeltisi 1	88.84	88.59
Numune çözeltisi 2	86.99	87.40
Numune çözeltisi 3	89.40	88.21
Numune çözeltisi 4	89.40	85.12
Numune çözeltisi 5	89.18	88.26
Numune çözeltisi 6	89.18	87.61
Ortalama, %	88.83	87.53
Bağıl standart sapma, %	1.04	1.44
12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri (%)	1.42	
%95 güven aralığı sınırları	87.38-88.98	

Analiz 1 ve cihaz 1'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri %1.04 ve Analiz 2 ve cihaz 2'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri %1.44'tür. 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %1.42'dir.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	3.836	100.00	843836	97580	88.59

Şekil 4.13. Çözünme hızı tayinindeki ara kesinlik kromatogramı

4.1.4.8. *Doğrusallık ve çalışma aralığı*

Doğrusallık çalışması bir konsantrasyon aralığındaki numune çözeltilerindeki analit cevabının konsantrasyonla doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir.

LOQ, %0.25 %0,5, %1.0, %2,5 %5 %10, %20, %40, %60, %80, %100, %120 ve %140' lık konsantrasyonlarda olmak üzere standart çözeltiler hazırlanmıştır.

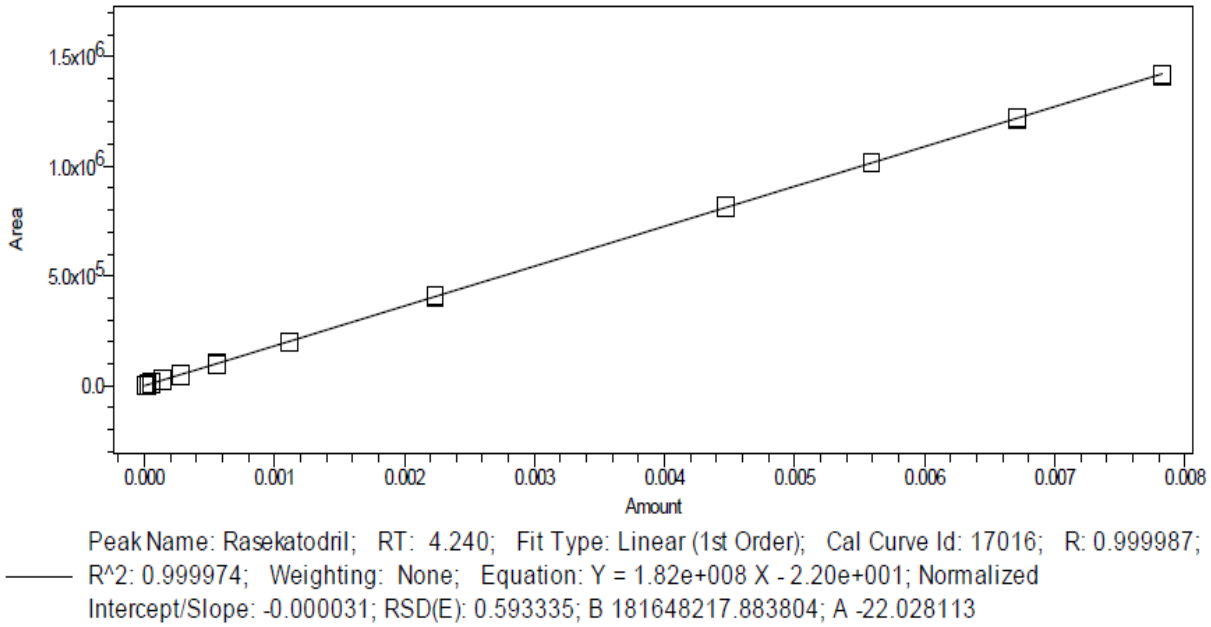
100% standart çözeltisi 6 kez, diğer standart çözeltiler 3' er kez enjekte edilmiştir.

Doğrusallık grafiği çizilmiştir.

Eğim, kesişim, korelasyon katsayısı elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. LOQ, %0.25 %0,5, %1.0, %2,5 %5 %10, %20, %40, %60, %80, %100, %120, %140 ortamlarında hazırlanan doğrusallık ve çalışma aralığı değerleri

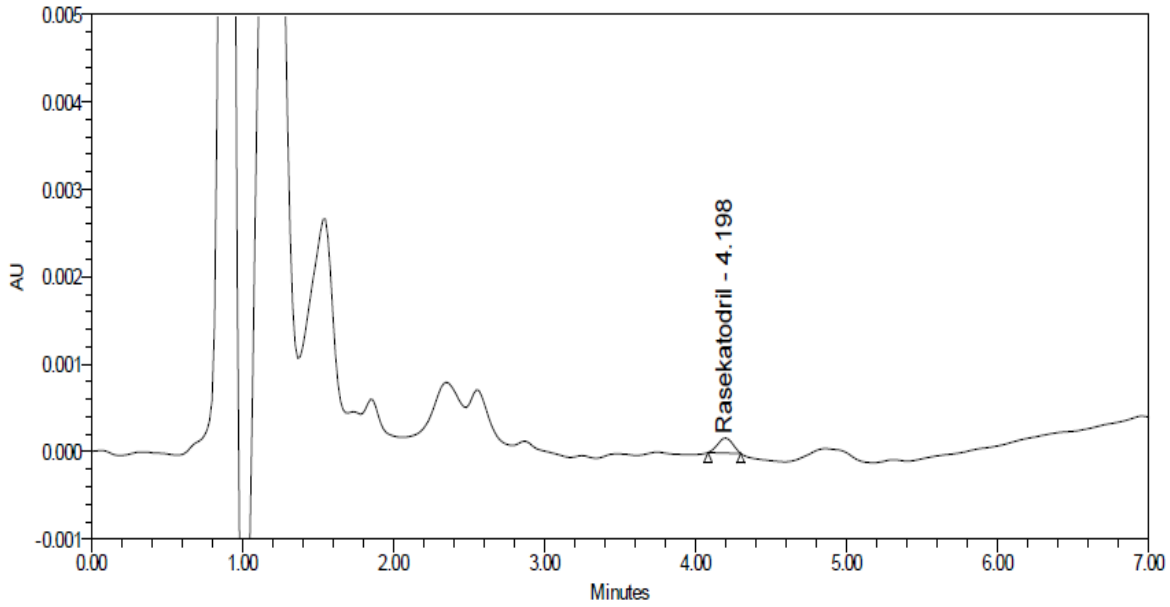
Etiketlenmiş içerik çözelti seviyesi	**Hammadde çözelti konsantrasyonu, (mg/mL)**	**3 enjeksiyonun alan ortalaması**	**Hesaplanan alan**
LOQ	0.000007	1162	1250
%0.25	0.000014	2805	2521
%0.5	0.000028	5744	5064
%1	0.000056	12504	10150
%2.5	0.000140	25560	25409
%5	0.000279	49549	50658
%10	0.000559	98074	101519
%20	0.001118	198496	203061
%40	0.002236	409335	406143
%80	0.004472	815738	812309
%100	0.005589	1016490	1015210
%120	0.006707	1219578	1218293
%140	0.007825	1416488	1421375
Eğim :	181648217.883804		
Kesişim :	-22.028113		
Korelasyon katsayısı (r) :	0.999987		
r^2:	0.999974		
y = mx + n :	181648217.883804x-22.028113		



Şekil 4.14. Analiz sonuçları ile gerçekleştirilen doğrusallık grafiği

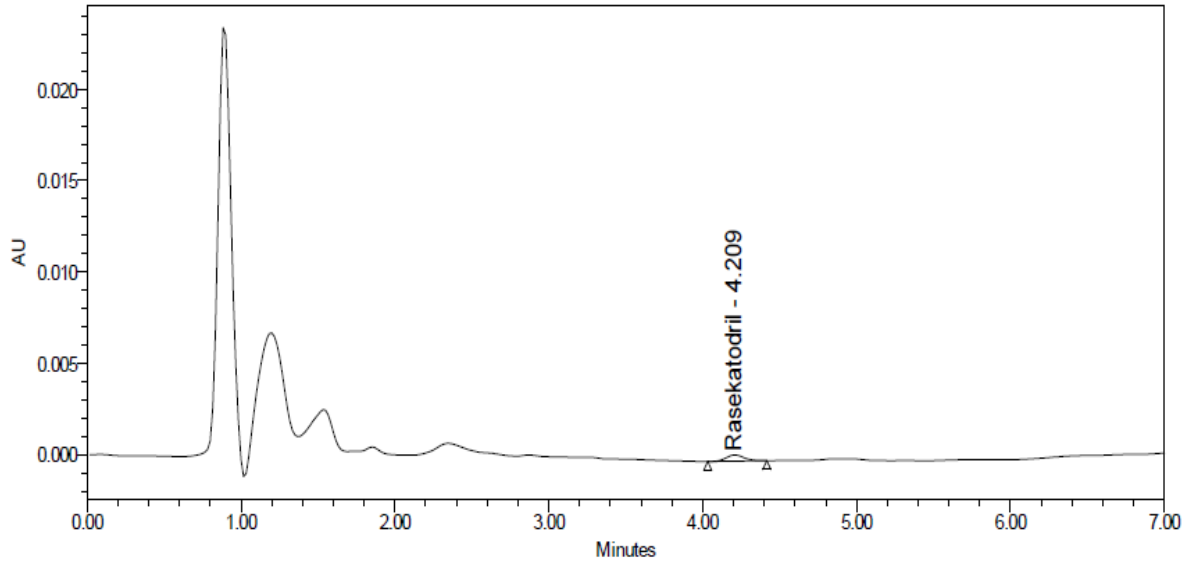
Korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 ve r^2 değeri minimum 0.99 olmalıdır.

Çözünme testi için doğrusallık kriteri geçerlidir. Bu sonuca göre çözünme yöntemi LOQ ve %140 konsantrasyonları arasında doğrusaldır.



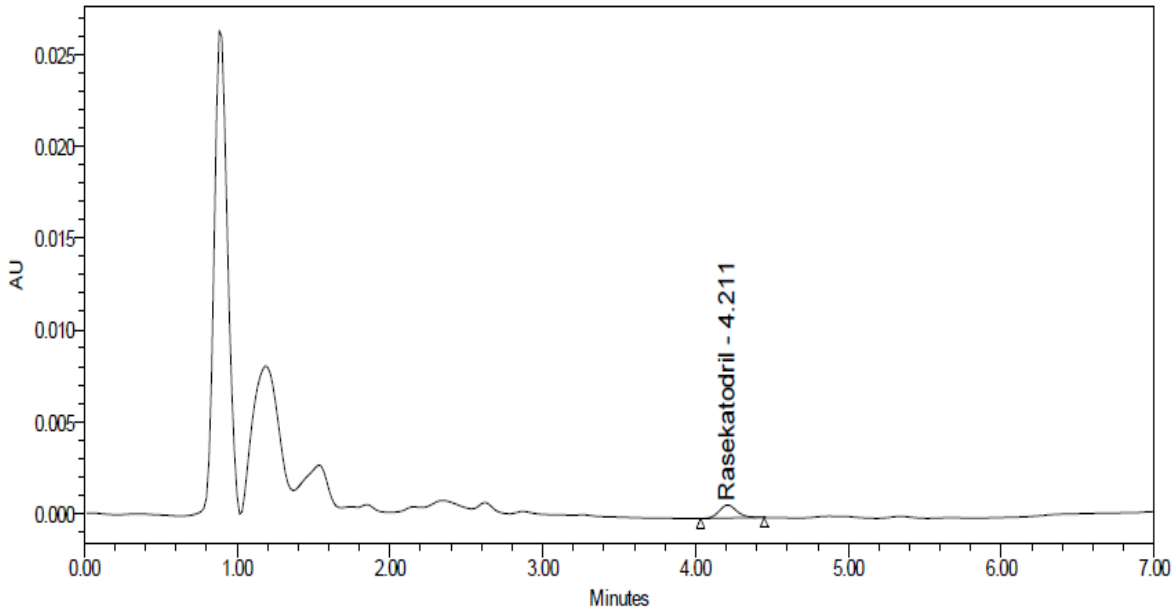
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount	EP s/n
1	Rasekatodril	4.198	100.00	1179	172	0.000007	10.88

Şekil 4.15. LOQ doğrusallık kromatogramı



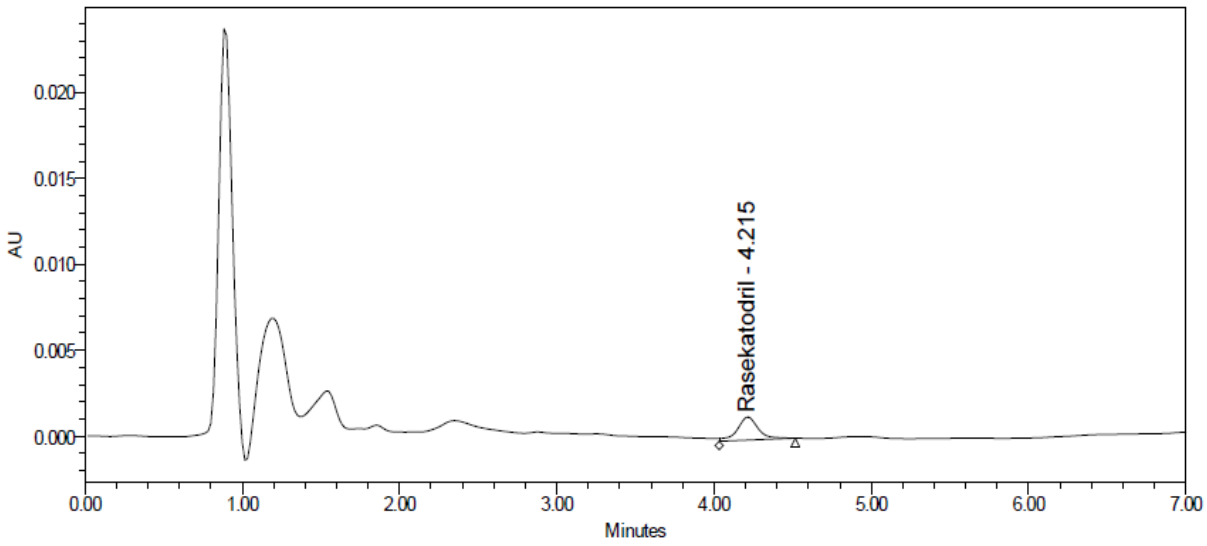
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.209	100.00	2704	340	0.000014

Şekil 4.16. %0.25 doğrusallık kromatogramı



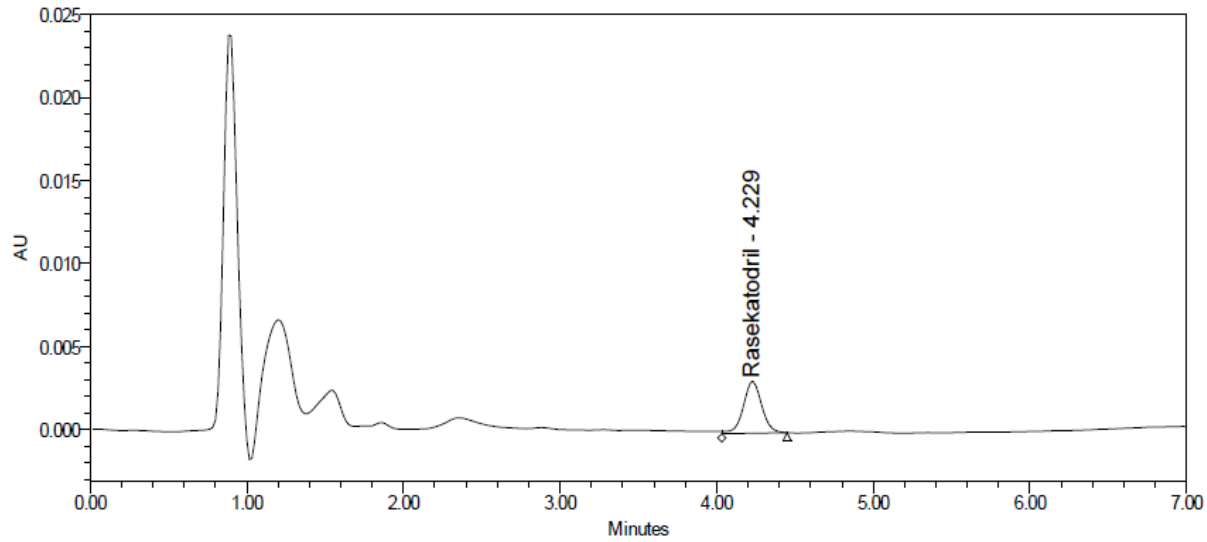
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.211	100.00	5684	706	0.000028

Şekil 4.17. %0.5 doğrusallık kromatogramı



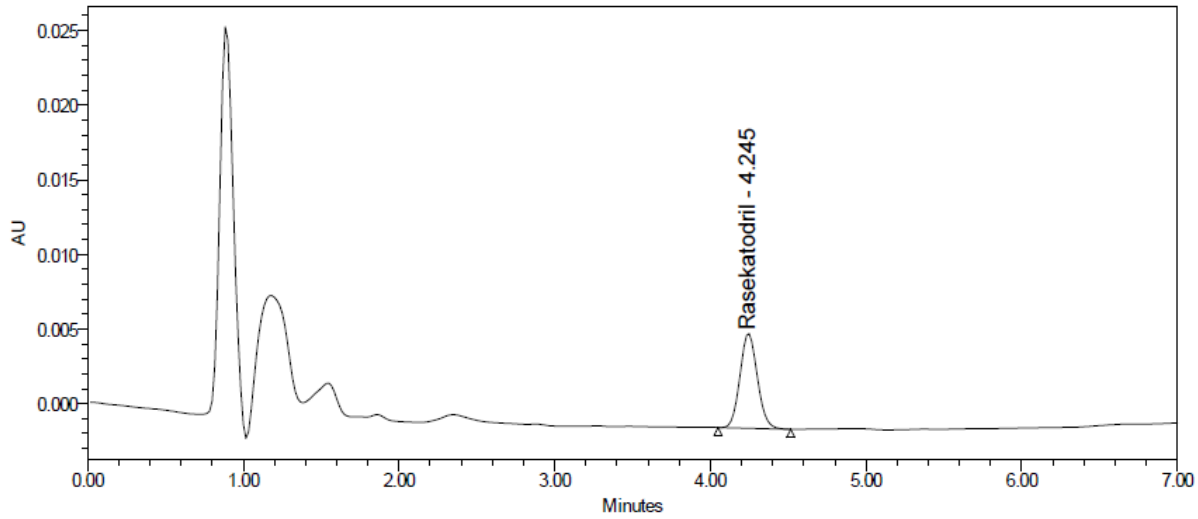
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.215	100.00	12400	1341	0.000056

Şekil 4.18. %1 doğrusallık kromatogramı



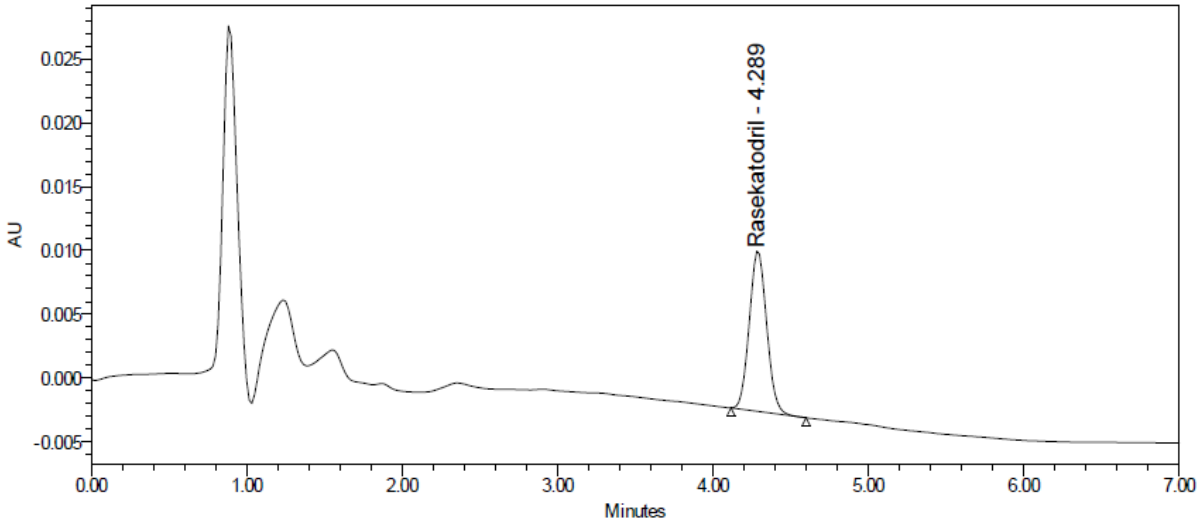
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.229	100.00	25597	3121	0.000140

Şekil 4.19. %2.5 doğrusallık kromatogramı



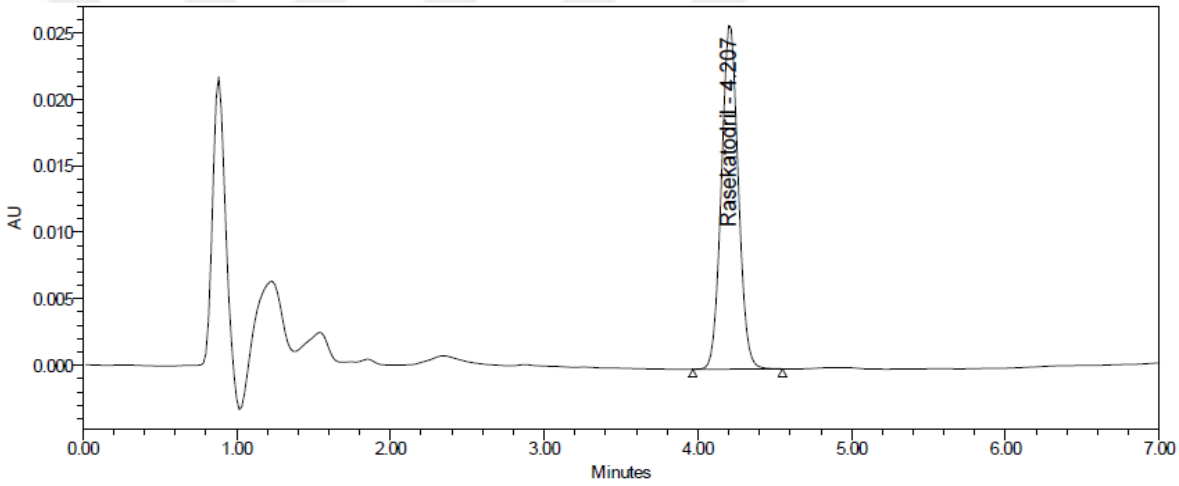
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.245	100.00	49372	6348	0.000279

Şekil 4.20. %5 doğrusallık kromatogramı



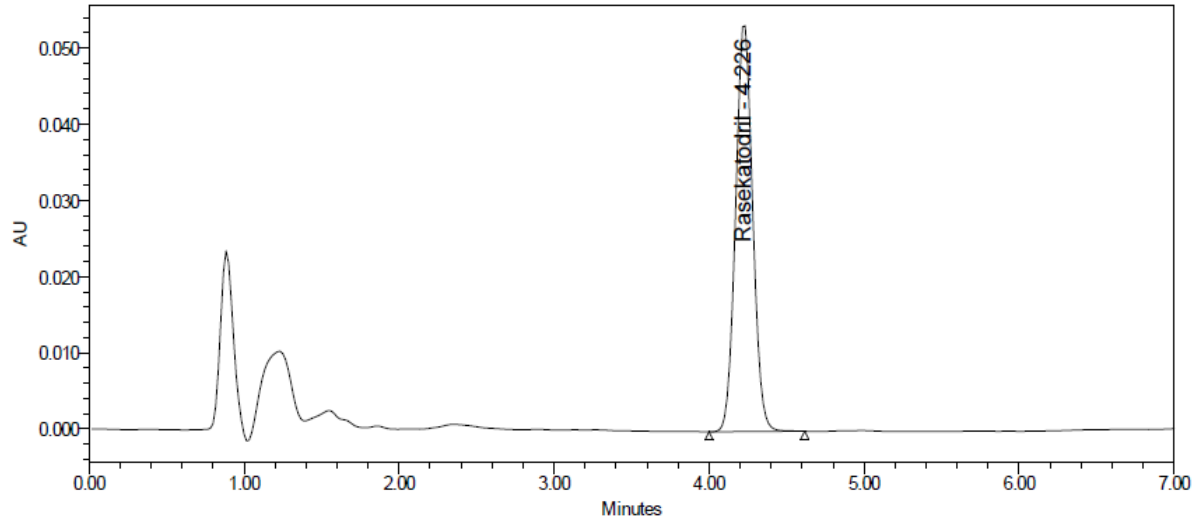
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.289	100.00	97759	12583	0.000559

Şekil 4.21. %10 doğrusallık kromatogramı



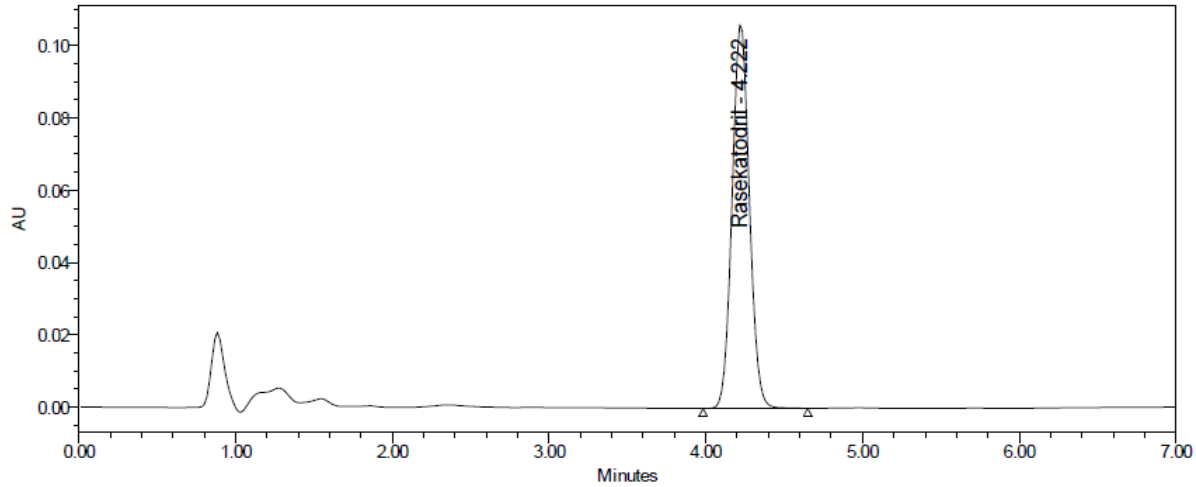
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.207	100.00	198401	25971	0.001118

Şekil 4.22. %20 doğrusallık kromatogramı



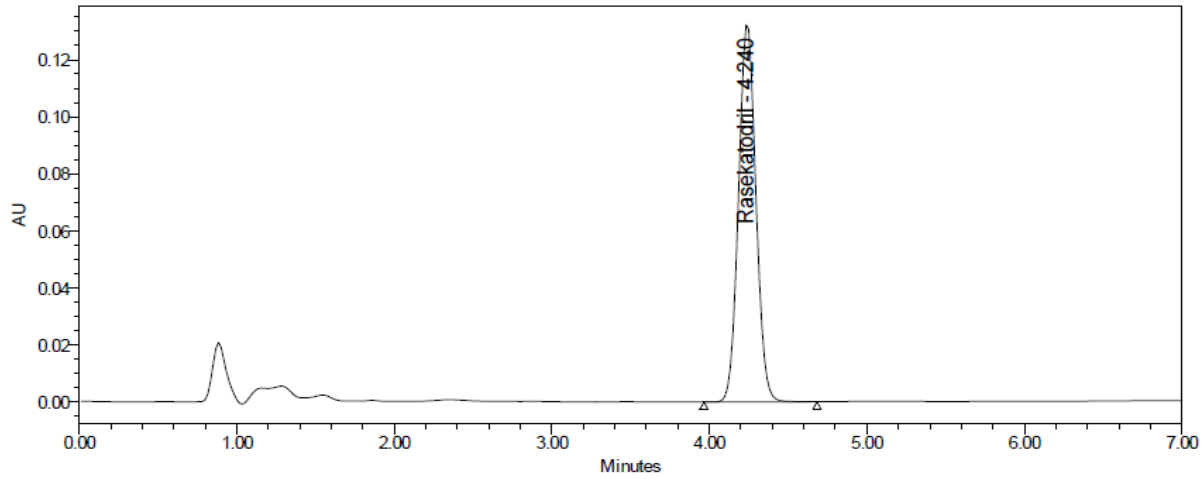
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.226	100.00	410835	53604	0.002236

Şekil 4.23. %40 doğrusallık kromatogramı



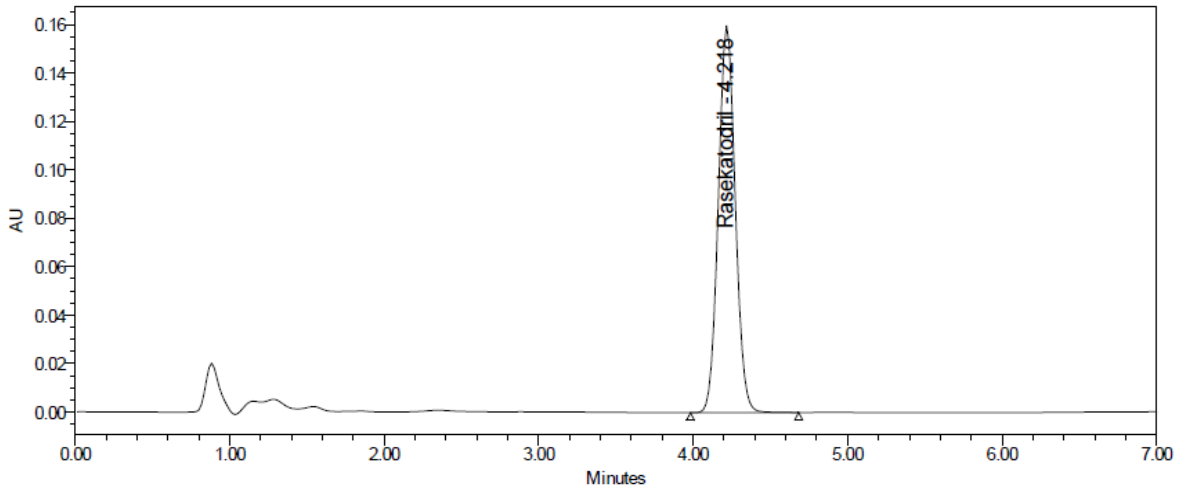
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.222	100.00	815116	106503	0.004472

Şekil 4.24. %80 doğrusallık kromatogramı



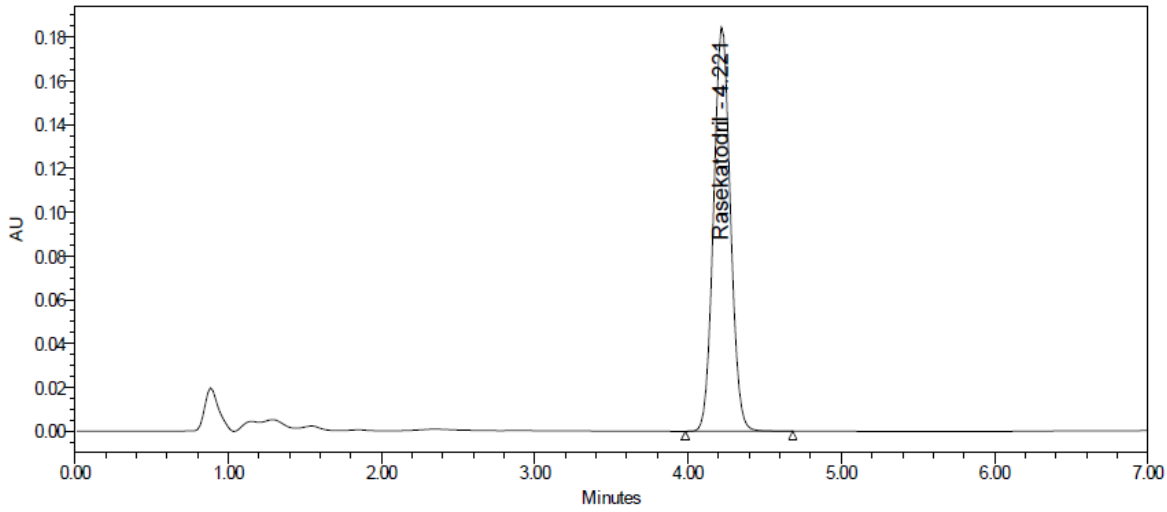
	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.240	100.00	1016906	132990	0.005589

Şekil 4.25. %100 doğrusallık kromatogramı



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.218	100.00	1218992	159415	0.006707

Şekil 4.26. %120 doğrusallık kromatogramı



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Calculated_Amount
1	Rasekatodril	4.221	100.00	1416548	185144	0.007825

Şekil 4.27. %140 doğrusallık kromatogramı

4.1.4.9. *Güvenilirlik*

Bir analitik prosedürün güvenilirliği, analitik prosedürün küçük fakat dikkatli yöntem parametreleri değiştirildiğinde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür. Ayrıca normal kullanımda kararlılığını gösterir.

4.1.4.10. *Çözelti Stabilitesi*

Yöntemde belirtildiği gibi standart ve numune çözeltisi hazırlanmıştır.

Bu çözeltiler oda ve buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

Bu çözeltiler başlangıçta, 6 saat sonra ve 24 saat sonra analiz edilmiştir.

Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

%Değişim = (Di – Dt) x 100

Dt: Herhangi bir t anında bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çizelge 4.8. Standart ve numune çözeltileri ile hazılanan oda koşullarındaki stabilite sonuçları

Oda koşullarında	**Başlangıç**	**6. saat**	**% |Değişim|**	**24. saat**	**% |Değişim|**	**48. saat**	**% |Değişim|**
Standart alanı	1009659	1016711	0.70	1015280	0.56	1019685	0.99
Numune alanı	901635	900563	0.12	901998	0.04	902857	0.14

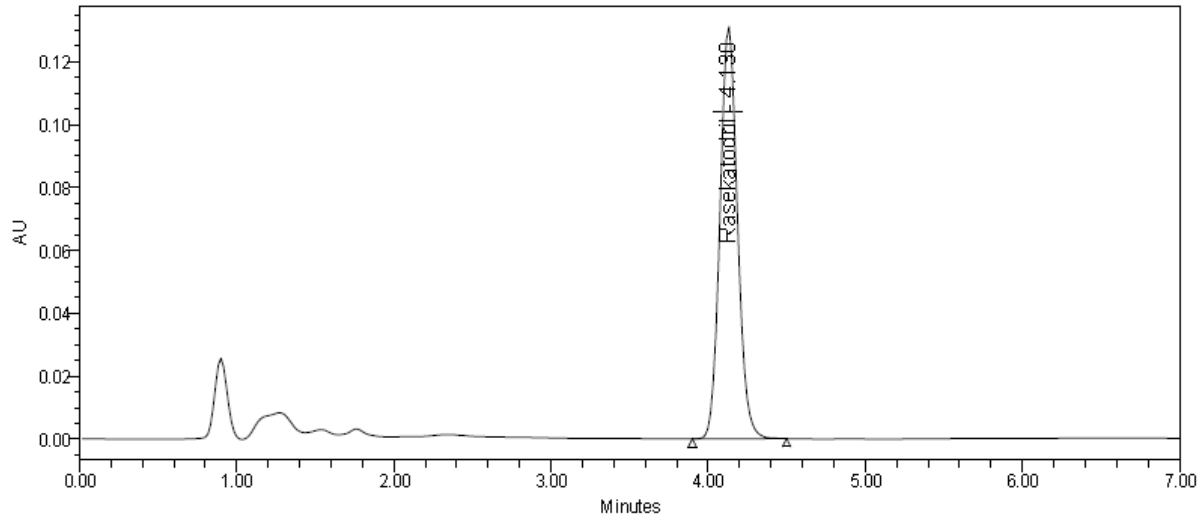
Çizelge 4.9. Standart ve numune çözeltileri ile hazılanan buzdolabı koşullarındaki stabilite sonuçları

Buzdolabı koşullarında	**Başlangıç**	**6. saat**	**% |Değişim|**	**24. saat**	**% |Değişim|**	**48. saat**	**% |Değişim|**
Standart alanı	1009659	1017465	0.77	1015042	0.53	1015263	0.56
Numune alanı	901635	905635	0.44	901524	0.01	902589	0.11

Başlangıç değerinden değişim %2.0'den fazla olmamalıdır.

Standart ve numune çözeltisi oda ve buzdolabı koşullarında 48 saat stabildir.

Yöntemin çözelti stabilitesi uygundur.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Recovery
1	Rasekatodril	4.130	100.00	1015042	130994	100.53

Şekil 4.28. Çözünme hızı tayinindeki çözelti stabilitesi kromatogramı

4.1.4.11. *Metod dayanıklılık*

Bu bölümde metoda özel kritik sayılabilecek parametrelerden 3 tanesi seçilmiştir.

4.1.4.11.1. *Farklı kolon*

Yöntemde belirtilen konsantrasyonda standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti metotda belirtilen kolonda ve farklı lot numaralı kolonda analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Metot dayanıklılık parametresi için farklı kolon analiz sonuçları

	Başlangıç kolonu	**Değişim sonrası farklı kolon**	**% |Değişim|**
Rasekadotril	1020622	1020813	0.02

4.1.4.11.2. *Kolon sıcaklığı*

Yöntemde belirtilen konsantrasyonda gibi standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti kolon sıcaklığı ±2ºC değiştirilerek, 23ºC ve 27ºC'de analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

Çizelge 4.11. Metot dayanıklılık parametresi için farklı sıcaklık değerleri analiz sonuçları

	Başlangıç (25°C)	**Değişim sonrası (23°C)**	**% |Değişim|**
Rasekadotril	1020622	1022663	0.20

	Başlangıç (25°C)	**Değişim sonrası (27°C)**	**% |Değişim|**
Rasekadotril	1020622	1024300	0.36

4.1.4.11.3. *Farklı dalga boyu*

Yöntemde belirtilen konsantrasyonda standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti başlangıç, 210 nm dalga boyu, 208 nm ve 212 nm olarak değiştirildikten sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

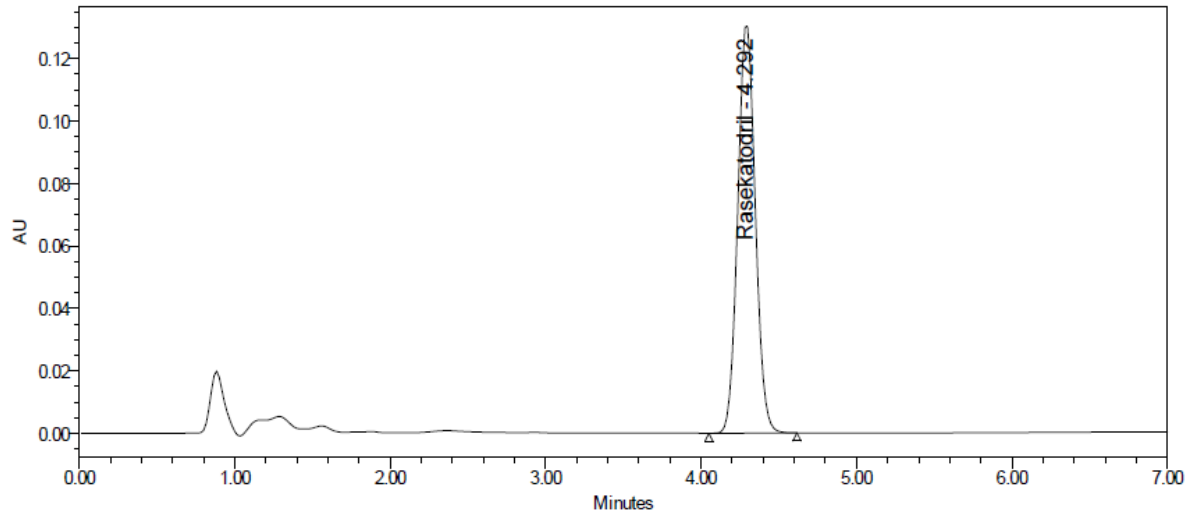
Çizelge 4.12. Metot dayanıklılık parametresi için farklı dalga boyu analiz sonuçları

	Başlangıç (210 nm)	**Değişim Sonrası (208 nm)**	**% |Değişim|**
Rasekadotril	1020622	1078510	5.67

	Başlangıç (210 nm)	**Değişim Sonrası (212 nm)**	**% |Değişim|**
Rasekadotril	1020622	936403	8.25

Metot dalga boyu değişimine duyarlıdır. Metotta belirtilen dalgaboyunda çalışılmalıdır. Diğer parametreler için başlangıç değerinden değişim %2.0'den fazla değildir.

Yöntemin metot dayanıklılığı uygundur.



	Peak Name	RT	% Area	Area	Height (µV)	Recovery
1	Rasekatodril	4.292	100.00	1022663	131229	100.20

Şekil 4.29. Çözünme hızı tayinindeki metot dayanıklılık kromatogramı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Rasekadotril molekülü, aktif metaboliti sayesinde hızlı hidrolize olabilmesinden dolayı diyare rahsızlığında enkefalinaz inhibisyonu yaparak, endojen enkefalin aktivitesini güçlendiren güvenli ve etkili bir salgı önleyici ilaç olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Literatür taraması gerçekleştirildiğinde Rasekadotril molekülünün yapısından dolayı organik çözücülerde iyi çözündüğü ancak sulu ortamlardaki çözünürlüğünün yüksek seviyelerde olmadığı görülmektedir. Ayrıca Rasekadotril molekül yapısından dolayı ortaklaşmamış elektron çiftlerinin etkisi ile apolar halkaların kapanarak suda çözünürlüğü daha zor hale gelen bir moleküldür. Farklı çalışmalarda çeşitli yüzey aktif maddeleri ile denemeler gerçekleştirilip literatüre girmiş olsa da ilaç endüstrisindeki verimliliği açısından yeterli düzeyde değildir. İlaç endüstrisi açısından organik çözücülerin kullanılması sağlık açısından uygun olmadığı için ve yapılan diğer çalışmalarda istenilen seviyelerde çözünürlük görülmemesinden dolayı gerçekleştirilen çalışmada yeşil kimya adına uyumlu sayılan sulu ortamda çözünebilen Brij-35 yüzey aktif maddesi ile çözünürlük çalışması gerçekleştirilip yüksek çözünürlük görülmesinden dolayı analitik metot validasyonu yapılmıştır.

Validasyon çalışmaları esnasında ICH Q2 kılavuzu esas alınarak çalışmalar gerçekleştirilmiş ve çözünme ortamı ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Analitik yöntem validasyonundaki tüm parametreler belirtildiği gibi çalışılmış olup tüm sonuçlar validasyonu destekler niteliktedir. Bu çalışma ile valide edilen metot sayesinde ilaç etken maddesinin ilaç endüstrisinde rutin analizlerde kullanılabilirliği ispatlanmıştır. Ayrıca, kullanılan yüzey aktif madde kolayca erişilebilir ve ucuzdur, bu durum analiz maliyetini oldukça düşürmektedir. Brij-35, yeşil kimya kullanılarak üretildiğinden ve organik çözücüler içermediğinden insan vücuduna organik çözücülere göre çok daha az zararlı olduğu bilinmektedir.

Farmakopilerden faydalanarak oluşturulan metot sayesinde tek çözücü sistemi kullanılarak izokratik akışta 7 dakika süre ile HPLC'de çözünme hızı analizleri yapılabilirliği gösterilmiştir. HPLC ilaç endüstrisinde rutin analizler arasında kullanılan en yaygın cihaz olmasından dolayı ve analiz süresinin çok kısa bir zamanda gerçekleşmesinden dolayı zaman ve verimlilik açısından çalışma sonuçlarının literatüre

olumlu yönde katkısı olacağı düşünülmüştür. Belirlenen koşullar ile gerçekleştirilen yeni yöntemin çalışmalardaki uygulanabilirliği açısından tekrarlanablirlik, doğrusallık, sağlamlık, doğruluk ve geri kazanım ile seçicilik ve yöntem kesinliği çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel olarak elde edilen sonuçlar tablolar halinde detaylı olarak gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak yöntem geçerliliği sağlanmış olup sürekli kullanıma uygundur.

Gerçekleştirilen çalışmada numune olarak World Medicine İlaç Sanayi şirketine ait olan Rasekadotril Saşe ürünü kullanılmış olup, saşe formundaki ilaç için metodun çalışılabilir olduğu görülmektedir. Bu durum yeni geliştirilen çözünme ortamı için aynı formun farklı dozlarında ve farklı ilaç formlarında denenebilirliği açısından da ilk çalışma olma niteliğinde olup endüstrideki geniş ürün formlarına göre de çalışılabileceği yorumlanmıştır.

Genel özeti ile yapılan bu çalışmada Rasekadotril molekülünün yeni bir çözünme ortamı belirlenerek ilaç endüstrisindeki analizlerinde kullanımı kolay, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği bulunan, çok kısa enjeksiyon süresine sahip yöntem olarak geliştirilmiştir. Validasyonu yapılan bu yöntemin analizlerde zaman yönetimi açısından oldukça verimli ve analiz sonuçları açısından ise güvenilir, hızlı ve pratik olduğu belirlenmiş olup tekrarlı kullanımlara oldukça elverişlidir.

6. KAYNAKLAR

[1] Dünya Sağlık Örgütü, (2017, 2 Mayıs). [Online]. Erişim: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease

[2] E. Binay, "Rasekadotril'in Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Tabletlerde Analizi," Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 2019.

[3] C. Eken, "Güncel Klinik Yaklaşım Önerisi: Acil Serviste Akut İshalli Hastaya Yaklaşım," *Türkiye Acil Tıp Dergisi-Turk J Emerg Med 2011;11(1):33-39.*

[4] Z. Kurugöl, & İ. Devrim, "Gastrointestinal Infections" *J. Pediatr Inf. 2014; 8: 71-81.*

[5] S. Huilan, L. Zhen, & M. Mathan, "Etiology of acute diarrhea among children in developing countries," *Bull World Health Organ. 1991; 69: 549-53.*

[6] Avrupa Farmakopesi, "Racecadotril, European Pharmacopoeia," Vol. 9.0, Q-R Monographs, P: 3472.

[7] G. Singhvi, G. Gampa, N. Yadav, V. Kumar, & R. Ukawala "Design and Evaluation of Rapidly Disintegrating Tablets of Racecadotril with Enhanced in-vitro Dissolution Achieved by Solid Dispersion Technique," *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, Vol 47, Issue 3, Jul–Sep, 2013.*

[8] S. Jia Deng, S. Staufenbiel, B. Hao, A. Wang, & R. Dashevskiy, "Development of a discriminative biphasic in vitro dissolution test and correlation with in vivo pharmacokinetic studies for differently formulated racecadotril granules," *Journal of Controlled Release, 2017.*

[9] S. L. Prabu, S. Tarunveer, & D. Kumar, "Development of Dissolutıon Medium For Poorly Water Soluble Drug Racecadotril," *Journal of Pharmaceutical Research Vol. 8, No. 4, October 2009 : 213-215.*

[10] Amerikan Farmakopesi, "USP-NF ⟨1092⟩ The Dissolution Procedure: Development And Validation," *USP 36 P, 735, 2014.*

[11] Uluslararası Uyum Konseyi, "Ich Harmonısed Trıpartıte Guıdelıne, Valıdatıon Of Analytıcal Procedures: Text And Methodology Q2(R1)."

[12] Amerikan Farmakopesi, "USP-NF ⟨1094⟩ Capsules—Dissolutıon Testing And Related Quality Attributes", *USP, 2014.*

[13] C. Jia, D. Wenwen, L. Xiao, W. Xuanxuan, & X. Yuxiu, "Hexafluoroisopropanol/Brij 35 based supramolecular solvent forliquid-phase microextraction of parabens in different matrix samples," *Journal of Chromatography A, 1591 (2019) 33–43.*

[14] M. Bhowmick, & T. Sengada "Evaluation and Characterization of Transdermal Therapautic Systems: An exhaustive pictorial and figurative review"

[15] G.L. Amidon, H. Lennemas, V.P. Shah, & J.R Crison. "*Pharm Res. 1995; 12: 413-420."*

[16] A.V.B. Glen. *"Dissoln. Tech. 1995; 3.*

[17] Anonim, [Online]. Erişim: https://acikders.ankara.edu.tr-HPLC.

[18] Anonim, [Online]. Erişim: https İnternet-https://acikders.ankara.edu.tr–Çözünme Hızı Yöntemleri ve Kullanılan Cihazlar.

[19] Anonim, [Online]. Erişim: https İnternet-waters.com.

[20] A. S. Abdul Hasan, & V. Selvaraj, "Enhancement Of Solubility And Dissolution Rate Of Racecadotril By Solid Dispersion Methods," *J. Curr. Chem. Pharm. Sc.: 2(3), 2012, 209-225, ISSN 2277-2871*.

[21] T. Pintoo, Z. Aarti, A.K. Seth, & K. Sharad, "Development Of New Analytıcal Methods For Quantıtatıve Estımatıon Of Racecadotrıl As An Actıve Pharmaceutıcal Ingredıen By Uv Spectrophotometer," *IJPSR, 2012; Vol. 3(5): 1495-1497.*

[22] Anonim, [Online]. Erişim: https İnternet-https://inovatifkimyadergisi.com/hplc-ve-ilac-sanayinde-uygulamalari.

[23] T. Z. Çabuk, "Bazı Asidik Ve Bazik Doping Maddelerinin At İdrarından Analizi İçin Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyon Ve Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (Lc-Ms/Ms) Yöntemi Geliştirilmesi Ve Validasyonu," Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2018.

[24] A. Yılmaz, "Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu," *Turklab Rehber, No:01, 2012.*

[25] Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)," Center for Veterinary Medicine (CVM), 2013.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Onur ÇAKIR

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2023
Lisans	Kimya	Bursa Teknik Üniversitesi	2018
Lise		Hasan Ali Yücel Lisesi	2011

YAYINLAR

[1] G. Koz, A. Haliç, O. Çakır, H. Çelik, M. Orhan, M.Şentürk, & N. Coşkun, "Synthesis and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity Studies of Arilidenemalononitriles", 16-18 March 2016, Blankenberge, Belgium"

[2] A. Haliç, O. Çakır, G. Koz, & Ö. Koz, "Cercis siliquastrum L. subsp. Siliquastrum L. Çiçeklerinin İçerdiği Uçucu Yağ Bileşenlerinin GC-MS ile İncelenmesi", 6. Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi, 17-19 Mayıs 2015, İzmir, Türkiye."