

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KOMBİNE İLAÇ FARMASÖTİK FORMLARINDA,
ADENOZİNİN SAFSIZLIK PROFİLİ İÇİN STABİLİTE
GÖSTERGELİ, YEŞİL TERS FAZ HPLC YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ, REGRESYON ANALİZİ VE
VALİDASYONU**

Cem ÇALIŞKAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU

Haziran, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI FARKLI KOMBİNE İLAÇ FARMASÖTİK
FORMLARINDA, ADENOZİNİN SAFSIZLIK PROFİLİ İÇİN
STABİLİTE GÖSTERGELİ, YEŞİL TERS FAZ HPLC YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ, REGRESYON ANALİZİ VE VALİDASYONU**

Cem ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan tez çalışması 15.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İkbāl KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İkbāl KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Abdürrezzak Emin BOZDOĞAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU, Üye
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Sevgi KOCAOBA, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Gülçin YILMAZ, Üye
İstanbul Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Farklı Kombine İlaç Farmasötik Formlarında, Adenozinin Safsızlık Profili için Stabilit  Göstergeli, Yeşil Ters Faz HPLC Yöntemi Geliştirilmesi, Regresyon Analizi ve Validasyonu” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Cem ÇALIŞKAN

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 1245A numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme

ve

Kıymetli çalışma arkadaşlarıma

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım için tez yöneticiliğini kabul ederek, tezin planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında bilgi, tecrübe ve yardımlarından sürekli olarak faydalandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesi görevleri kapsamında, tez çalışmamın tüm süreçlerinde her zaman desteklerini hissettiğim, sorularına cevaplar bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Abdürrezzak Emin BOZDOĞAN'a ve Prof. Dr. Ece KÖK YETİMOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bana destek oldukları için başta Dr. Müge GÜLELİ olmak üzere tüm değerli çalışma arkadaşlarıma ve okul arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca manevi desteği ile her an yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Cem ÇALIŞKAN

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	7
2 ADENOZİN	8
2.1 Giriş	8
2.2 Adenozin Oluşumu	8
2.3 Adenozin Reseptörleri	9
2.4 Adenozin Farmakolojisi	10
2.5 İlaç Endüstrisinde Adenozin	11
3 ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ	13
3.1 Giriş	13
3.2 Analitik Yöntem Geçerlilik Çeşitleri	14
3.3 Analitik Yöntem Geçerlilik Parametreleri	15
3.3.1 Seçicilik (Specificity)	15
3.3.2 Doğrusallık (Linearity)	17
3.3.3 Aralık (Range)	17
3.3.4 Doğruluk (Accuracy)	18
3.3.5 Kesinlik (Precision)	19
3.3.6 Teşhis sınırı (Detection Limit)	20
3.3.7 Tayin alt sınırı (Quantitation Limit)	20
3.3.8 Sağlamlık (Robustness)	21
3.3.9 Sistem uygunluğu testleri	22
4 DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR	23
4.1 Materyal ve Yöntem	23
4.2 Ürün Bilgileri	27

4.3	Adenozin İlgili Bileşikler Tayini Yöntemi	27
4.3.1	Kromatografik koşullar	27
4.3.2	İlgili Bileşikler Yöntem Validasyonu	29
4.4	Stres Çalışması	91
4.4.1	Bozunma Ürünleri Tespit Çalışması Koşulları	91
4.4.2	Stres Testi Sonuçları	96
4.4.3	LC-Q/TOF ile Safsızlık Karakterizasyonu.....	99
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	102
	KAYNAKÇA	111
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	116



SİMGE LİSTESİ

Å	Angstrom
°C	Celsius
m	Eğim
r	Korelasyon Katsayısı
N	Normal
d	Yoğunluk
%	Yüzde



KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AD	Adenozin
Adenoscan®	Adenozinin farmakolojik formülasyonu
AgNP	Gümüş Nanopartikül
AMP	Adenozin Monofosfat
Anvisa	Brezilya Sağlık Düzenleme Kurumu
AP	Anti-AD Aptamer
Apt – AuNP	Altın Nanopartikül
ATP	Adenozin Trifosfat
A1	Adenosin Ap Reseptörü
A2A	ADORA2A Adenosin Reseptörü
A2B	ADORA2B Adenosin Reseptörü
A3	ADORA3 Adenosin Reseptörü
BP	İngiliz Farmakopesi
cAMP	Sıklık Adenozin Monofosfat
CD39	Ektonükleosid Trifosfat Difosfohidrolaz-1
CD73	Ekto-5p-nükleotidaz
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CRS	Sertifikalı Referans Standart
DF	Düzeltilme Faktörü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EP	Avrupa Farmakopesi
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GSH	Glutatyon
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSA	Singapur Sağlık Bilimleri Kurumu
HPLC / PDA	HPLC Foto Diod Array Dedektör
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
ICH	Uluslararası Beşerî İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi
ICH Q2 (R1)	Analitik Prosedürlerin Doğrulanması: Metin ve Metodoloji

ICH Q3B(R2)	Yeni İlaç Ürünlerindeki Safsızlıklar Kılavuzu
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
LC/APCI-MS/MS	Sıvı Kromatografisi Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon Kütle Spektrometresi
LC/ESI-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonizasyon-Kütle Spektrometrisi
LC-QTOF-MS	Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
MFDS	Güney Kore Gıda ve İlaç Güvenliği Bakanlığı
NaOH	Sodyum Hidroksit
NMPA	Çin Ulusal Tıbbi Ürünler İdaresi
PCDL	Kişisel Bileşik Veritabanı ve Kütüphane
PEI	Polietilenimin
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PMDA	Japonya İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
PTFE	Politetrafloroetilen
P1	Adenozin Reseptörü
P2	Adenozin Reseptörü
RNA	Ribonükleik Asit
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RRT	Bağıl Alıkonma Zamanı
Rs	Ayrım Gücü
RSD	Bağıl Standart Sapma
SALDI	Yüzey Destekli Lazer Desorpsiyon / iyonizasyon
SD	Standart Sapma
Sinyal/gürültü	Sinyal Gücünün Gürültü Gücüne Oranı
SNAr	Nükleofilik Aromatik Yerdeğiştirme Reaksiyonları
Swissmedic	İsviçre Terapötik Ürünler Ajansı
TE	Tespit Edilmedi
TBAH	Tetrabutylamonyum Hidroksit
TBAHS	Tetra-butyl-ammonium-hydrogen-sulfate
TFDA	Tayvan Gıda ve İlaç İdaresi
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
Varyasyon	Değişim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WPW	Wolff-Parkinson-White Sendromu
WS	Çalışma Standardı



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Adenozin kimyasal yapısı	2
Şekil 1.2	Adenozin impüritelerinin kimyasal yapısı	3
Şekil 2.1	Adenozin'in kimyasal yapısı	8
Şekil 2.2	ATP'nin Adenozin'e yıkımı	9
Şekil 4.1	Seyreltme çözeltisi seçicilik kromatogramı	34
Şekil 4.2	Plasebo çözeltisi seçicilik kromatogramı (Formülasyon-1)	34
Şekil 4.3	Plasebo çözeltisi seçicilik kromatogramı (Formülasyon-2)	34
Şekil 4.4	Standart çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	35
Şekil 4.5	Sistem uygunluk çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	36
Şekil 4.6	Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-1)	37
Şekil 4.7	Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-2)	38
Şekil 4.8	Mix standart çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	40
Şekil 4.9	Plasebo (Formülasyon-1) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	41
Şekil 4.10	Plasebo (Formülasyon-2) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	42
Şekil 4.11	Numune + limit konsantrasyonda impürte spike çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-1)	44
Şekil 4.12	Numune + limit konsantrasyonda impürte spike çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-2)	46
Şekil 4.13	Adenozin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	47
Şekil 4.14	Üridin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	48
Şekil 4.15	İnosin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	49
Şekil 4.16	Guanozin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	50
Şekil 4.17	Adenin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı	51
Şekil 4.18	Sistem uygunluk parametresi kromatogramı	56
Şekil 4.19	Adenozin için kalibrasyon grafiği	58
Şekil 4.20	Üridin için kalibrasyon grafiği	58
Şekil 4.21	İnosin için kalibrasyon grafiği	59
Şekil 4.22	Guanozin için kalibrasyon grafiği	59
Şekil 4.23	Adenin için kalibrasyon grafiği	59
Şekil 4.24	Baz bozundurması LC-Q/TOF sonucu	101
Şekil 4.25	Oksidasyon bozundurması LC-Q/TOF sonucu	101
Şekil 4.26	Asit bozundurması LC-Q/TOF sonucu	101

Şekil 5.1 Nikotinik asit hammadde monograf metodu - Adenozin impüriteleri	102
Şekil 5.2 Kromasil 250 x 4,6 mm x 5 µm ile Üridin ve 6,6'-dinikotinik asit	104
Şekil 5.3 LUNA C18 (2) 100Å ve Simetri RP18 ve YMC-Pack Pro kolon denemeleri.....	105
Şekil 5.4 Adenozin monograf yöntemi sonuçları	105
Şekil 5.5 Geliştirilen yöntemde nikotinik asit, nikotinamid ve ilgili safsızlıklarının alıkonma zamanları	106
Şekil 5.6 Adenozinden Adenin ve Riboz Oluşumu	108
Şekil 5.7 Adenin için LC-QTOF-MS tarama sonucu	109
Şekil 5.8 İnosin için LC-QTOF-MS tarama sonucu.....	109
Şekil 5.9 Üridin için LC-QTOF-MS tarama sonucu	110



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	23
Tablo 4.2 Reaktifler, standart ve safsızlıklar	24
Tablo 4.3 Kullanılan metot validasyon kolonları.....	26
Tablo 4.4 LC-QTOF kolonu	27
Tablo 4.5 Seçicilik sonuçları.....	32
Tablo 4.6 Üridin ve İnosin için sistem uygunluk sonuçları	53
Tablo 4.7 Guanozin ve Adenin için sistem uygunluk sonuçları	54
Tablo 4.8 Adenozin için sistem uygunluk sonuçları.....	55
Tablo 4.9 Adenozin için doğrusallık sonuçları	60
Tablo 4.10 Üridin için doğrusallık sonuçları	61
Tablo 4.11 İnosin için doğrusallık sonuçları.....	62
Tablo 4.12 Guanozin için doğrusallık sonuçları	63
Tablo 4.13 Adenin için doğrusallık sonuçları	64
Tablo 4.14 Formülasyon-1 için doğruluk sonuçları.....	67
Tablo 4.15 Formülasyon-2 için doğruluk sonuçları.....	68
Tablo 4.16 Üridin, İnosin ve Guanozin için cihaz kesinliği sonuçları.....	69
Tablo 4.17 Adenin ve Adenozin için cihaz kesinliği sonuçları	70
Tablo 4.18 Formülasyon-1 için metot kesinliği sonuçları	71
Tablo 4.19 Formülasyon-2 için metot kesinliği sonuçları	72
Tablo 4.20 Formülasyon-1 Üridin için ara kesinlik sonuçları	73
Tablo 4.21 Formülasyon-1 İnosin için ara kesinlik sonuçları.....	74
Tablo 4.22 Formülasyon-1 Guanozin için ara kesinlik sonuçları	75
Tablo 4.23 Formülasyon-1 Adenin için ara kesinlik sonuçları	76
Tablo 4.24 Formülasyon-1 bilinmeyen impürite için ara kesinlik sonuçları	77
Tablo 4.25 Formülasyon-1 toplam impürite için ara kesinlik sonuçları	78
Tablo 4.26 Formülasyon-2 Üridin için ara kesinlik sonuçları	79
Tablo 4.27 Formülasyon-2 İnosin için ara kesinlik sonuçları.....	80
Tablo 4.28 Formülasyon-2 Guanozin için ara kesinlik sonuçları	81
Tablo 4.29 Formülasyon-2 Adenin için ara kesinlik sonuçları	82
Tablo 4.30 Formülasyon-2 bilinmeyen impürite için ara kesinlik sonuçları	83
Tablo 4.31 Formülasyon-2 toplam impürite için ara kesinlik sonuçları	84
Tablo 4.32 LOD ve LOQ sonuçları.....	85

Tablo 4.33	Standart çözeltisi için çözelti stabilitesi sonuçları	86
Tablo 4.34	Formülasyon-1 için çözelti stabilitesi sonuçları	87
Tablo 4.35	Formülasyon-2 için çözelti stabilitesi sonuçları	88
Tablo 4.36	Dalgaboyu değişimi sonuçları	89
Tablo 4.37	Kolon sıcaklığı değişimi sonuçları	90
Tablo 4.38	Farklı lot numaralı kolon sonuçları.....	90
Tablo 4.39	25°C asit degradasyonu sonuçları.....	96
Tablo 4.40	60°C asit degradasyonu sonuçları.....	96
Tablo 4.41	25°C baz degradasyonu sonuçları.....	97
Tablo 4.42	60°C baz degradasyonu sonuçları.....	97
Tablo 4.43	25°C oksidasyon degradasyonu sonuçları	98
Tablo 4.44	60°C ısı degradasyonu sonuçları.....	98
Tablo 4.45	Işık degradasyonu sonuçları.....	99
Tablo 5.1	Nikotinik asit EP ve USP metotları	103

Farklı Kombine İlaç Farmasötik Formlarında, Adenozinin Safsızlık Profili için Stabilité Göstergeli, Yeşil Ters Faz HPLC Yöntemi Geliştirilmesi, Regresyon Analizi ve Validasyonu

Cem ÇALIŞKAN

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU

İlaç endüstrisinde her geçen gün aynı moleküle ait farklı kombinasyon ve endikasyon çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Tez çalışması literatürde eksikliği tespit edilen kombine, farklı endikasyon içeren göz damlaları ürünlerinin muhteviyatının belirlenmesine dair metod geliştirme ve tespit çalışmalarıyla başlamıştır. Ürün formülasyonlarının doğrulanmasından sonra ilgili ürünler içerisinde Adenozine ait safsızlık profilinin tespiti kapsamında yöntem geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmaların ilk safhasında kombine ürün formlarında herhangi bir çalışma bulunmadığından dolayı sadece Adenozine ait, bulunan tüm literatür ve farmakopeyal yöntem değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda kombine ürünler içerisinde bulunan birden fazla aktif madde ve sahip oldukları safsızlık profilinin Adenozin safsızlık profilini doğru değerlendirmeye fırsat vermediği belirlenmiştir. Tüm bu farklı etken madde ve safsızlık profillerinden seçici olarak Adenozin safsızlıklarına uygun bir yöntem geliştirilmiştir. Kombine ürünlerde safsızlık profilinin kesin, doğru ve güvenilir şekilde tespit edildiği yapılan stres çalışmaları ile desteklenmiş ve yöntemin stabilite göstergeli olduğu kanıtlanmıştır. Stres çalışmaları esnasında elde edilen safsızlıkların karakterizasyonu LC-QTOF-MS ile desteklenerek ortaya konmuştur. Geliştirilen bu yöntem

regresyon analizi ve validasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. Bu alışmalar sonucunda elde edilen veriler, ilaç sektöründe farklı içeriklere sahip Adenozin bulunduran ürünlerde Adenozine ait ilgili bileşikler (safsızlık) için yöntemin efektif olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Adenozin, HPLC ilgili bileşikler, LC-QTOF-MS, karakterizasyon



Development of Green Reverse Phase HPLC Method with Stability Indicator for the Impurity Profile of Adenosine in Different Combined Pharmaceutical Pharmaceutical Forms, Regression Analysis and Validation

Cem ÇALIŞKAN

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İkbâl KOYUNCU

In the pharmaceutical industry, different combination and indication studies for the same molecule are carried out every day. The thesis started with method development and determination studies on the specification of the contents of eye drops products with the combined different indications, which were found to be lacking in the literature. After the product formulations were verified, method development studies were carried out within the scope of determining the impurity profile of Adenosine in the related products. In the first phases of these studies, since there was no study on the combined product forms, all the literature and pharmacopoeial method evaluations related to Adenosine were carried out. As a result of the studies, it was determined that more than one active substance in the combined products and their impurity profiles do not give the opportunity to evaluate the impurity profile of Adenosine correctly. From all these different active substances and impurity profiles, a method has been developed that is selectively suitable for Adenosine impurities. The precision, accuracy and reliability determinations of the impurity profile in the combined products have been supported by the stress studies and the method has been proven to be a stability indicator. The characterization of the impurities obtained in

stress studies was demonstrated by supporting LC-QTOF-MS. This developed method has been validated by regression analysis and validation studies. The data obtained as a result of these studies revealed that the method is effective for related compounds (impurities) belonging to Adenosine in products containing Adenosine with different contents in the pharmaceutical industry.

Keywords: Adenosine, HPLC related compounds, LC-QTOF-MS, characterization



1.1 Literatür Özeti

Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ile insan sağlığına verilen önem artmıştır. Bu bağlamda, gıda, ilaç, kozmetik gibi endüstri ürünlerinden kaynaklanan insan sağlığını tehdit edici unsurlar tahlil benzeri analizleri yetersiz kılmaktadır. Bu durum, Uluslararası Beşeri İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi ulusal ve uluslararası otoritelerin safsızlık çalışmalarına karşı duyarlılıkları artırmasına neden olmuştur [1,2].

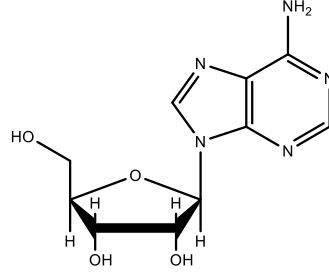
Adenozin (**Şekil 1.1**), vazodilatör, analjezik ve antiaritmik özellikleri sayesinde ilaç formülasyonlarında kullanılabilen, adenin ve ribozun β -N9-glikosidik bağ ile bağlanmasıyla sonucu oluşan, kimyasal, biyokimyasal ve fermentasyon yolu ile sentezlenebilen bir ribonükleosittir [3].

Fizyolojik ve patofizyolojik proseslerde bilinen bir modülatör olarak görev yapan bu doğal nükleozid, vücutta farklı organlarda bulunarak çekirdeğinde meydana gelen kimyasal modifikasyonlar sayesinde biyolojik uygulamalara yol açan bileşikler üretir. Adenozin türevlerinin yarı sentezi ve biyolojik etkileri ile ilgili çalışmalar mevcut olup, bu çalışmalar sırasında saflaştırma işleminin spesifikliği, daha düşük verime sahip yöntemlerle çalışılmıştır [4,5].

Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde yüksek miktarda adenozin içeriği tespit edilmiş olsa da adenozin ve türevleri çoğu hücresel fonksiyonu düzenlemek için oldukça önemlidir [6,7].

Adenozin reseptörlerinin farmakolojik potansiyeli ilaç kapsamında incelenmiş ve reseptörlerin etkileri sıçanlarla yapılan çalışmalar doğrultusunda değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, adenozinin 1'-C-metil modifikasyonu, özellikle A₁ ve A_{2A} reseptörlerinde belirgin olan afiniteye bir azalmaya neden olmuştur [8].

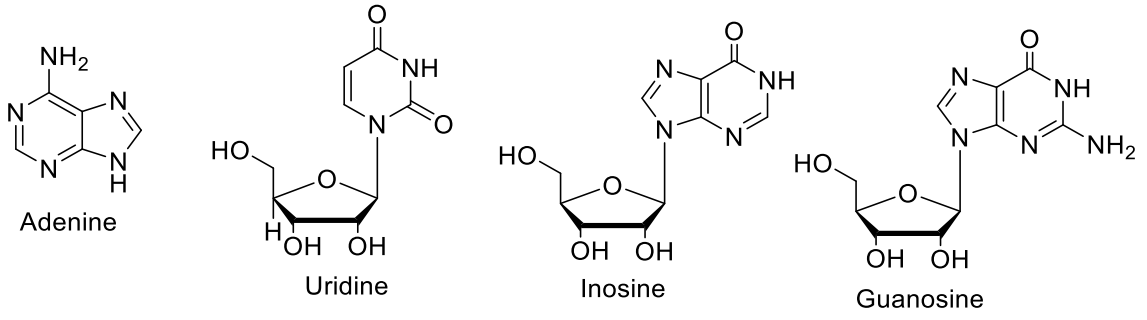
A_{2A} reseptörü (A_{2A}R) moleküler biyoloji, farmakoloji ve fizyolojide incelenerek, pozitron emisyon tomografisi (PET) ile insan beyinde adenosin reseptörü için kantitatif analiz yöntemi geliştirilmiştir [9 -12].



Şekil 1.1 Adenosin kimyasal yapısı

Yapılan farmakope çalışmalarında, İngiliz (BP) ve Avrupa (EP) farmakopelerinde yalnızca adenosine ait hammadde monografisi bulunurken, ABD (USP) Farmakopesi hammadde monografisi ile birlikte Adenosin Enjeksiyon bitmiş ürün monografisi bulundurmaktadır. Hammadde monograflarındaki ilgili maddelerin tayin yöntemleri aynıdır. Burada adenin, inozin, üridin ve guanozin (**Şekil 1.2**) bilinen safsızlıklar olarak tanımlanırlar. Yöntem, adenosin enjeksiyon ürünü monografında farklıdır ve bilinen safsızlık limiti verilmemiştir. Katarakt ve lens opaklaştırma tedavilerinde kullanılan ve adenosin, nikotinik asit, nikotinamid, sitokrom C gibi farklı aktif farmasötik maddeler içeren göz damlası gibi ürün formlarının üretimlerinde monograf yöntemlerinin çalışmaması, özellikle sadece adenosin için yeni bir araştırma geliştirme yöntemi başlatmıştır. Adenosin ile birlikte kullanılan farklı aktif bileşenlerden meydana gelen safsızlıklar için hem farmakopede hem de literatürde mevcut olan yöntemler dışında yeni bir yöntem ihtiyacı duyulmuştur. Nikotinik aside ait BP'de 9 adet, USP'de 12 adet tanımlanmış safsızlık bulunurken, nikotinamid için BP'de 5 tanımlanmış safsızlık mevcuttur [13-16].

Yapılan çalışmalar, bu etken maddelerin ve safsızlıklarının aynı sistem içerisinde değerlendirilmesinin uygun olmadığını göstermiştir. Yöntem tek bir sistem için geliştirilmiş olup uzun süreli enjeksiyonlarda etkili ve uygun bulunmamıştır.



Şekil 1.2 Adenozin impüritelerinin kimyasal yapısı

Adenozin tayini yöntemlerinden UV saptamalı HPLC, elektrokimyasal saptama, türevlendirmeden sonra floresan saptama, dansil klorür türevlendirmeli LC-MS/MS, sıvı kromatografi/atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-tandem kütle spektrometrisi (LC/APCI-MS/MS) ve sıvı kromatografi/elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometrisi (LC/ESI-MS/MS) gibi prosedürler literatürde yer almaktadır [17-22]. Bunların çoğu HPLC yönteminin mobil faz bileşiminde, monograflarda olduğu gibi yüksek miktarlarda tetrabutilamonyum hidrojen sülfat (TBAHS) içerir. TBAHS, iyon kenetleme ajanı olması ve analit ile kompleks oluşturması sayesinde faydalı olmasına rağmen, kullanımından sonra kolonun kimyasal özelliğinin değişmesi ve ömrünün kısılması gibi bir dezavantaja sahiptir. Ayrıca, adenozin tayini yöntemlerinin çoğu ilaç formülasyonları için geliştirilmemiş olup hücresel çalışmalardan oluşmaktadır.

Yapılan adenozin tayini çalışmalarında kullanılan bir HPLC yöntemi, tıbbi amaç veya gıda katkı maddeleri için yaygın olarak kullanılan birkaç *Cordyceps* türünü içeren *Cordyceps* ailesi ile uygulanmıştır. *Cordyceps* türüne ait, bir çeşit doğal ham ilaç ve yenilebilir mantar olan *Cordyceps sinensis*, Çin'de birkaç yüzyıl boyunca, çeşitli hastalıkları önlemek veya iyileştirmek için bir tür tonik gıda ve bitkisel ilaç olarak yaygınca kullanılmıştır. *C. sinensis*, solunum ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde, vücut immünomodülatör fonksiyonunun arttırılmasında, karaciğer ve böbrek metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Yapay kültürde daha kapsamlı dağıtım ve fizibilite uygulaması ile *C. sinensis*'in en değerli ikame maddelerinden biri haline gelen *Cordyceps militaris*, 2008 yılında Sağlık Bakanlığı, Çin Halk Cumhuriyeti tarafından Yeni Kaynak Gıda olarak onaylanmıştır. *Cordyceps militaris* için başlıca biyoaktif bileşenlerin adenozin ve cordycepin olduğu kabul edilmektedir. Şimdiye kadar, *C. sinensis* veya *C. militaris*'ten adenozin ve kordiyasinin

belirlenmesinde, çeşitli gıda ve ilaç ürünlerinin kalite izlemesinde ve tayinlerde yaygın olarak kullanılan HPLC yöntemleri bulunmaktadır [23-31].

Adenozinin tayini ve belirlenmesinin sahip olduğu önem, miktarlandırma ve tanıma çalışmaları için farklı sistemlerle çalışma ihtiyacına yol açmıştır. Bu kapsamda, terapötik adenozin iletimi nöral kök hücreleri tasarlamak ve hücre bazlı adenozin salınımını ölçmek amacıyla sıvı kromatografi-atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-tandem kütle spektrometresi (LC-APCI-MS / MS) kullanılarak adenozin ölçüm yöntemi geliştirilmiştir [32].

İnsan idrar örneklerinde adenozinin (AD) kolorimetrik tayini için kolorimetrik eleman olarak gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) ve tanıma probu olarak anti-AD aptamer (AP) içeren bir optik sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensör iyileşme yüzdesi %98-107 olan iki akciğer kanseri hastasının idrar örneklerinde kullanılarak AD' nin saptanmasındaki yöntemin güvenilirliği tespit edilmiştir [33].

Adenozin tayini kapsamında yapılan örnek çalışmalardan bir diğerinde ise insan hücrelerindeki lizatlarda bulunan Adenozin Trifosfat (ATP) ve Glutatyon (GSH) analizlenmiştir. Bu çalışmada seçici prob olarak aptamer ile modifiye edilmiş altın nanopartiküllerin (Apt – AuNP'ler) kütle spektrometrisi (MS) ile yüzey destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon (SALDI) matrisleri kullanılmıştır. Elde edilen çıktılar ATP ve GSH konsantrasyonlarının belirlenmesi sayesinde hücrelerin biyoaktivitesinin izlenmesine olanak sağladığını göstermektedir [34].

Yapılan elektrokimyasal çalışmalar incelendiğinde, esnek entegre elektrotlara dayanan in vivo adenozin izlemesi için implante edilebilir ve minimal invaziv bir mikro-aptasensör geliştirildiği görülmüştür [35].

Ayrıca, biyolojik materyallerin analizinde işlev görme potansiyeline sahip olan elektrokimyasal çalışmalar da yapılmış ve böylece elektrokimyasal saptamanın, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile adenozin ve diğer pürin nükleozidleri ve bazlarının tayininde kullanılan UV absorbansına veya floresans saptamaya alternatif bir seçenek olduğu gösterilmiştir [36].

Kan trombositlerinin agregasyonuna ve sığır adrenal medullasından katekolaminlerin salınmasına neden olduğu bulunan Adenozin Tetrafosfat (ATP)'yi ayırmak ve nicelleştirmek için Polietilenimin (PEI) ince tabaka saflaştırma yöntemi kullanılmıştır. Adenozin Tetrafosfat at kası, tavşan iskelet kası, böbrek ve karaciğer, sıçan karaciğeri, mitokondri ve bazı bitkiler gibi çeşitli kaynaklarda bulunabilir ancak biyolojik önemi bilinmemektedir [37-43].

Adenozin trifosfatın (ATP) hücre metabolizmasında oynadığı rolün önemi ve depolama sırasında preparatlarının kararsızlığı analiz yöntemlerinde büyük bir ilginin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu bağlamda ATP'nin en tatmin edici analizi yüksek derecede saflaştırılmış enzim sistemlerinin hazırlanması ve kullanılması ile yapılmıştır. İlerleyen zamanla kâğıt kromatografisini içeren ve daha az vakit alan başka yöntemler de meydana çıkmıştır [44-46].

Adenozin ile ilgili biyomedikal, biyolojik, insan, hayvan, hammadde, kan vb. çeşitli alanlarda araştırmalar ortaya konmuş olup bu çalışmalar için önceki yıllarda daha kaba ve zorlu yöntemlerin kullanılmasına mecbur kalınmıştır. Güncel yapılan çalışmalar da HPLC çalışmalarıdır ancak bu çalışmaların ilaçlar endüstrisinde ve özellikle kombine ilaçlarda kullanımı uygun değildir. Ayrıca, literatürde bu konu hakkında safsızlık üzerine yeterli sayıda çalışma bulunmamasıyla birlikte, yapılan çalışma yalnızca hammadde üzerine yapılmış safsızlık çalışmasıdır. Buradaki yöntem Avrupa farmakopesi Adenozin monografi ile aynı doğrultudadır. Fakat yöntemin kombine ilaç formlarında yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir [47-51].

Kombine ilaç formlarında uygulanabilecek basit, seçici, doğru, kesin ve güvenilir bir HPLC yönteminin eksikliği sebebiyle, ilgili adenozin maddelerinin belirlenmesine yönelik RP-HPLC stabilite gösterge yöntemi, "ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology" kılavuzuna göre geliştirilerek valide edilmiştir [52].

1.2 Tezin Amacı

İnsan hücrelerinde de yer alan Adenozin maddesi birçok özelliğinden dolayı ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Geçmiş yıllarda bu tarz insan vücudunda yer alan maddeler, vitaminler veya gıda takviyesi olarak nitelendirebilecek çeşitli maddeler için sadece miktar tayini çalışmaları, tanıma çalışmaları otoriteler tarafından yeterli olarak görülmekteydi. Günümüzde teknolojinin ilerlemesi ve insan sağlığına verilen önemin artması ile kullanmış olduğumuz gıda, ilaç, kozmetik vb. ürünlerden insan sağlığını tehdit eden etkenlerin tespit edilmesi sonucunda yapılan miktar tayini vb. analizler yetersiz görülmektedir. Uluslararası İnsan Kullanımı için İlaçlar için Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve T.C. Sağlık Bakanlığı gibi ulusal ve uluslararası otoriteler safsızlık çalışması konularında hassasiyetlerini arttırmışlardır. Bu kapsamda hala çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde güncel olarak regülasyonlara Extractable&Leachable, elementel impürite gibi çok hassas ve detay parametreler içeren analizler eklenmektedir. Günümüzde bu kadar hassas çalışmalar tartışılırken, literatürde kombine ilaç formlarında Adenozin' e ait safsızlık çalışmalarının görülmemesi, ürün kalitesinin raf ömrü boyunca Adenozin safsızlığı bakımından uygunluğunun saptanabilmesi amacıyla analitik bir yöntemin geliştirilmesi ihtiyacını meydana çıkartmıştır. Bu çalışmada ihtiyaç duyulan analitik yöntemin geliştirilerek, stress çalışmaları, karakterizasyon, regresyon analizi ve validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda Adenozin safsızlık tayini çalışmalarında kullanılabilecek yöntemin geliştirilmesi ile hem literatüre katkıda bulunmayı hem de ilaç sektöründe farklı farmasötik kombine ürünlerde kullanılabilecek stabilite göstergeli, çevreye duyarlı bir yöntem elde etmeyi hedeflenmiştir.

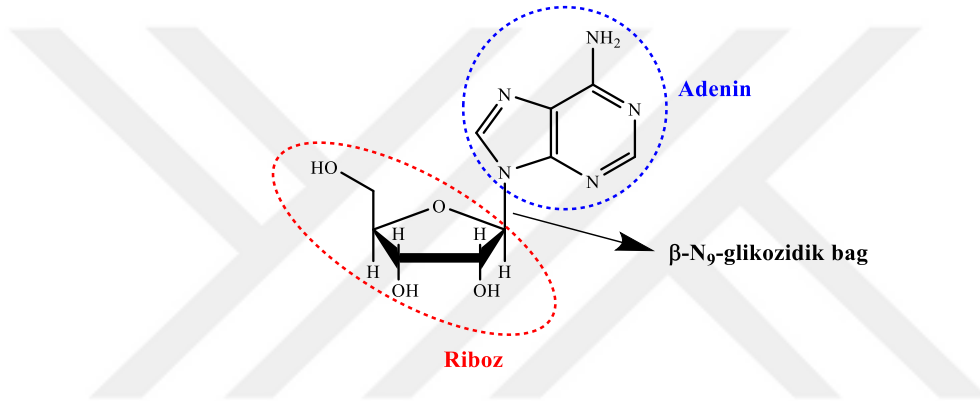
1.3 Hipotez

Araştırma konumuz olan Adenozin üzerine farklı bilim dallarında birçok önemli çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar Adenozin etken maddesinin önemini ortaya koymaktadır. Literatürde bu kadar çalışma bulunmasına karşın, hedeflediğimiz çalışmaya referans olabilecek bir çalışma bulunmamaktadır. Projemizde farklı farmasötik formlarda bulunan kombine ilaçlara yönelik öncelikli olarak Adenozin safsızlık kontrolü için çevreye duyarlı, stabilite göstergeli bir yöntem geliştirerek, validasyon çalışmaları yapılacaktır. İkincil hedefimiz, kombine ilaç içeriğinde bulunan diğer aktif maddeler üzerine değerlendirme yaparak yöntemin zenginleştirilmesini sağlamaktır.

Bu proje ile hem literatüre hem de ilaç sektöründe Adenozin içeren farklı farmasötik kombine ürünlerde kullanılabilecek özgün bir çalışma ile katkıda bulunulmuş olacaktır.

2.1 Giriş

Adenozin, pürin bazlarından biri olan Adenin'in β -N₉-glikosidik bağ (6-amino-9- β -D-ribofuranosil-9-H-purin) yoluyla bir monosakkarit olan riboza bağlanmasıyla oluşan endojen bir nükleozittir (Şekil 2.1) [23]. Kimyasal adı 6-amino-9- β -D-ribofuranosil-9-H-adenin, kimyasal formülü C₁₀H₁₃N₅O₄ ve molekül ağırlığı 267,25 g/mol'dür.

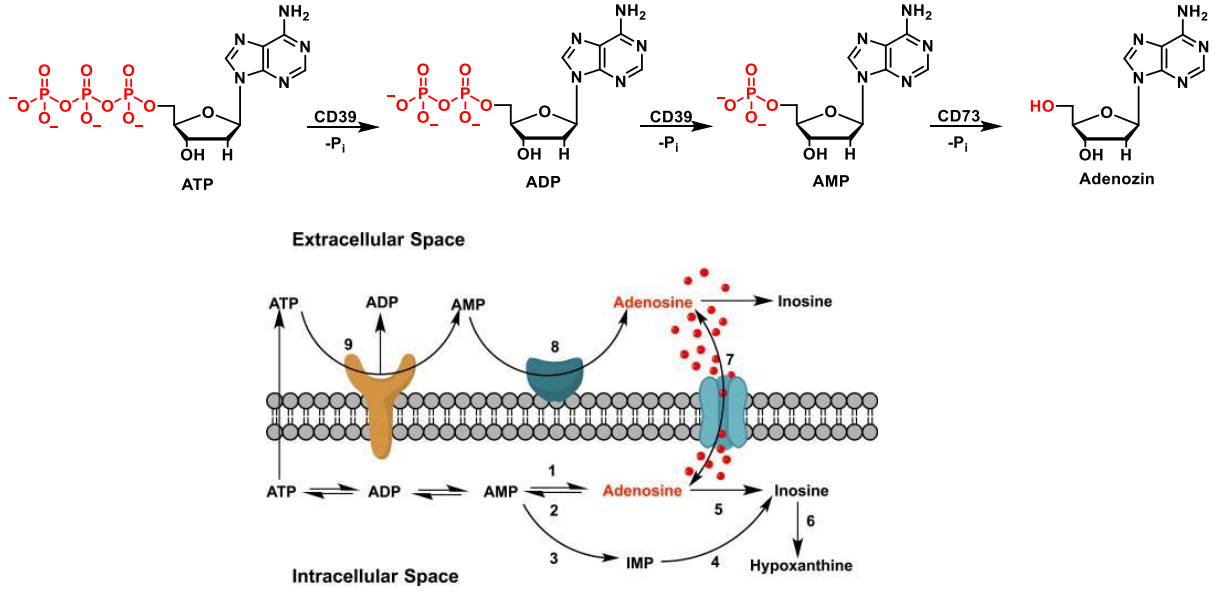


Şekil 2.1 Adenozin'in kimyasal yapısı

Adenozin, insan fizyolojisinde temel işlevlere sahip her yerde bulunan hücre dışı bir sinyal molekülüdür. ATP ve adenozin difosfat etkileşimleri aracılığıyla enerji transferinin belkemiği olmasından dolayı hücre sinyal iletimine kadar insan biyolojisinde temel bir bileşenidir. Bu nedenle çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda önemli bir rol oynar [23,24].

2.2 Adenozin Oluşumu

Hücreler içinde Adenozin (1) elde etmek için biyokimyasal süreç Şekil 2.2'de verilmiştir. İnsan vücudunun her hücresinde bulunan Adenozin 5'-trifosfat (ATP)'nin enzimatik yıkımı (CD₃₉ ve CD₇₃ enzimleri) ile Adenozin oluşur [25]. Adenozin oluşturulduktan sonra, bu bir adenozin kinaz tarafından fosforile edilebilir (reaksiyon 1) veya adenozin deaminaz etkisi ile inosine dönüştürülebilir [26].



Şekil 2.2 ATP'nin Adenozin'e yıkımı

2.3 Adenozin Reseptörleri

Adenozin, fizyolojik sistemlerde değişken dağılıma sahip Adenozin Reseptörleri olarak da bilinen G protein-bağlı P_1 reseptörleri için doğal ligand olarak hizmet eder. Farmakolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine göre bu reseptörler A_1 , A_{2A} , A_{2B} ve A_3 olmak üzere dört alt tipte sınıflandırılır. Bu G-protein-bağlı reseptörler hızla üretilir ve hemen hemen tüm organ ve dokulara yaygın olarak dağılır [26].

A_1 vücutta en yaygın beyinde olmak üzere omurilik, atriyum ve yağ dokusunda eksprese edilir. Adenozin, eksprese edilen bu reseptör ile etkileşime girerek kalp hızını, glomerüler filtrasyon hızını ve böbrekte renin salınımını düşürürken bronkokonstriksiyonu indükler ve lipolizi inhibe eder. Ayrıca, bu reseptörün aktivasyonu, adenilat siklaz II üzerindeki antagonistik bir etki ile cAMP üretimini azaltır. Bunun yanı sıra, diğer kardiyak reseptörlerin adenozin tarafından etkilenebileceği de tespit edilmiştir. Son çalışmalar, A_1 reseptörü üzerindeki antagonistik etkilerin astım tedavisinde potansiyel bir rol oynayabileceğini ve glioblastomalara karşı anti-tümör etkisi olabileceğini göstermiştir [26].

A_2 reseptörleri ise sinir hücrelerinde, mast hücrelerinde, solunum yollarındaki düz kaslarda ve dolaşımdaki lökositlerde daha bol bulunmaktadır. Ayrıca bu reseptörler trombositlerde kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve oksidatif stres koşulları altında eksprese edildikleri gösterilmiştir [26].

A₂ reseptörleri adenosin afinitelerine göre A_{2A} ve A_{2B} reseptörleri olarak gruplandırılabilir. A_{2A} reseptörleri beyin (CNS) boyunca eksprese edilerek özellikle bazal ganglionlarda yoğunlaşırlar. Beynin yanı sıra, vasküler düz kas, endotel, nötrofiller, trombositler, mast hücreleri ve T hücrelerinde de eksprese edilirler. Bu grubun aksine A_{2B} reseptörleri vasküler alanlarda, retinada ve beyinde yüksek düzeyde eksprese edilirken trombositlerde düşük ekspresyon seviyelerine sahiptirler. Son çalışmalar, bu reseptör alt grubunun stres, inflamasyon ve hipoksi durumunda ve yüksek yağlı diyet yapanlar kişilerde yüksek eksprese edildiğini göstermiştir [26].

1992'de Zhous, A₁ ve A₂ reseptörleri ile yüksek benzerliğe (%58) ancak farklı farmakolojik özelliklere sahip olan G protein kenetli reseptörler olarak A₃ tipi reseptörleri keşfetti. Bu reseptörler testislerde, akciğerde, böbrekte, plasentada, kalpte, beyinde, dalakta, karaciğerde, uterusu, mesanede, jejunumda, proksimal kolon ve sıçan gözünde, koyunlar ve insanlarda eksprese edilirken türler içinde ve arasında ekspresyon seviyelerinde belirgin farklılıklar gösterirler. Ayrıca, bu tip adenosin reseptörleri, anti-inflamatuar etkilerde rol oynar. Bazı çalışmalarda A₃ adenosin reseptörlerinin çeşitli tür ve modellerde kardiyoproteksiyondan sorumlu olduğunu bildirilmiştir [26].

2.4 Adenosin Farmakolojisi

Tarihsel bir bakış açısından, adenosin çağı 1929'da Drury ve Gyorgyi'nin çalışmalarıyla başlar [27]. Bu araştırmacılar ilk olarak bu nükleozidin kardiyovasküler sistemde (bir vazodilatör olarak, bradikardi indükleyicisi olarak ve negatif bir inotropik ajan olarak) ve ayrıca gastrointestinal sistemde etkilerini göstermişlerdir [26]. 1930'da Honey ve meslektaşları ilk olarak adenosinin insan kalbindeki atriyoventriküler düğümdeki iletimi bloke etme özelliklerini tanımladılar; bu bulgu, kardiyovasküler ilaçlar olarak adenosin ve türevleri üzerine araştırmaları başlatan bir bulgudur [26]. On yıl sonra, Lindner ve Rigler, adenosinin koroner damarların güçlü bir dilatörü olduğunu gösterdiler ve bu nükleozidin kan akışının ana düzenleyicisi olduğunu öne sürdüler. Ayrıca bu bileşiğin beyin omurilik sıvısını düzenlemede önemli bir rol oynadığını gösterdiler [26]. Daha sonra 1954'te Feldberg ve Sherwood, intraserebro-ventriküler enjeksiyonunu takiben adenosinin yatıştırıcı etkilerini gösterdi. 1963'te Berne ve Gerlach, miyokardın hipoksisi veya iskemisine yanıt olarak adenosinin fizyolojik rolünü koroner vazodilatasyonun bir aracısı olarak tanımladılar. Aynı yıl, Born ve Cross, adenosinin trombosit agregasyonu üzerindeki inhibitör etkilerini bildirdi [28]. Daha sonra 1970 yılında Sattin ve Rall, adenosinin memelilerin beyinde siklik AMP (cAMP) konsantrasyonunda bir artışa

neden olduğunu gösterdi. Yedi yıl sonra, Londos ve Wolff, adenozinin negatif kronotropik ve dromotropik etkilerine, spesifik reseptörlerin doğrudan aktivasyonunun aracılık ettiğini gösterdiler [26]. 1978'de Burnstock, sırasıyla nükleozidlere ve nükleotitlere duyarlılıklarına dayalı olarak iki sınıf purinerjik reseptör, P₁ (adenozin) ve P₂ (ATP ve ADP) reseptörlerinin varlığını formüle etti [29].

1980'lerde Belardinelli ve Snyder grupları, adenozinin kardiyak elektrofizyolojideki rolüne ve nörotransmisyon üzerindeki modülatör etkilerine odaklandı [30]. Bir yıl sonra (1982), Spielman ve Thomson, renal kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızının intrinsik düzenleyicisi olarak adenoziini önerdiler [26]. Birkaç yıl sonra FDA, supraventriküler taşikardi tedavisi için adenzin kullanımıını onayladı. Daha sonra 1991'de Cohen ve Downey, adenozinin ön koşullu iskemide önemli bir rol oynadığını bildirdi [31]. Daha sonra, Adenoscan® (adenozinin farmakolojik formülasyonu), kalp fonksiyonunu görselleştirmeyi ve değerlendirmeyi amaçlayan stres testi "miyokardiyal perfüzyon görüntüleme"nin bir bileşeni olarak pazarlandı [24]. 1999'da, sıçan serebral korteksinde bulunan A₃ reseptör alt tipi ile afinitelerine göre değerlendirilen adenzin türevleri sentezlendi [26].

21. yüzyılın başında, bazı araştırmacılar, hücre dışı adenozinin uzaklaştırılmasının, bu nükleozitin hücre dışı seviyelerini azaltmada, D-glukoz seviyelerini artırarak vasküler hücrelerdeki biyolojik eylemlerini modüle etmede anahtar bir mekanizma olduğunu gösterdiler [53]. Ayrıca, diğer araştırmacılar, adenozinin uykunun düzenlenmesi ve modülasyonundaki önemi hakkında çalışmalar bildirmiştir [54]. 2005 yılında, farelerde meme kanseri tedavisi için siklik adenzin monofosfat (cAMP) analoglarına yönelme oldu [55]. Aynı dönemde, nükleofilik aromatik yerdeğiştirme reaksiyonları (SNAr) altında alifatik ve aromatik aminlerle tek adımda N⁶-adenozin ve N⁶-2'-deoksiadenozin türevlerinin sentezi geliştirilmiştir [56]. Daha sonra, diğer araştırmacılar, adenosinin pulmoner anjiyogenezin indüklenmesinde önemli bir rol oynadığını gösterdi [57]. Daha sonra, 2012'de, hücre içi Ca²⁺ salınımında rol oynayan kimyasal ve biyolojik araçlar olarak işlev gören adenosin 5'-difosfatribozun kararlı siklik türevlerinin toplam sentezi sunuldu [58].

2.5 İlaç Endüstrisinde Adenzin

Adenzin; tüm insan hücrelerinde bulunan ve ilaç olarak da kullanılan endojen kimyasal bir maddedir. Adenzin monofosfat (AMP) ve adenzin trifosfat (ATP) dâhil çeşitli

kimyasal bileşikleri oluşturmak üzere fosfatla reaksiyona girer. Adenozin, göz yaşam merceğinin hayati fonksiyonu için gerekli enerjinin üretilmesinde, örneğin glutatyonun biyosentezi, iyonların ve amino asidin zarlar arası aktif taşınması, DNA, RNA ve nükleik asitlerin sentezinde önemli rol oynar. ATP bir adenozin türevidir ve metabolik süreçleri uyarır. Koroner ve serebral arterlerde vazodilatasyon etkisi vardır. Dokuların metabolizmasını ve enerji arzını iyileştirir. Hipotansif ve antiaritmik etkileri vardır. ATP'nin etkisi altında, kan basıncında bir azalma, düz kasların gevşemesi ve sinir uyarılarının iletimi artar. Adenozin tüm bu yaşamsal özelliklerinden dolayı farklı ilaç muhtevalarında bulunmaktadır. Bu tez kapsamında, 2 farklı kombine göz damlası ilaç formu çalışmalarda kullanılmıştır. Kan damarlarını gevşeten ve genişleten doğal olarak oluşan bir madde olması ve kalbin elektriksel aktivitesini de etkilemesi sayesinde belirli kalp ritmi bozuklukları olan kişilerde normal kalp atışlarını düzeltmeye yardımcı olmak için kullanılır. Aynı zamanda, kalbin stres testi sırasında da kullanılır. Onaylı endikasyonları; koroner arter hastalığı teşhisi, paroksizmal supraventriküler taşikardi ve Wolff-Parkinson-White (WPW) sendromudur. Onaysız endikasyonu ise geniş kompleks taşikardi teşhisidir. Bu endikasyonlar için enjeksiyonluk çözelti içeren ampul, enjeksiyon ve infüzyon için çözelti içeren ampul ve enjeksiyon ve infüzyon için çözelti içeren flakon formları bulunmaktadır [59].

Adenozinin bu endikasyonlarının yanında kataraktlarda koruyucu ve tedavi amaçlı kullanılır. Tez kapsamında yapılmış olan çalışmalar bu endikasyona yönelik formüle edilen göz damlası formları ile gerçekleştirilmiştir. Kombine bileşimlerle besleme mekanizması oksijen ve besin maddeleri ile hücreler aktive edilir ve böylece göz, dokularda metabolik süreçlerin iyileştirilmesine katkı sağlar.

İlaç endüstrisinde adenozinin bu kullanım alanları dışında adenozin türevleri farklı besin takviyelerinde, özel tıbbi amaçlı gıdalarda ve geleneksel tıpta çokça faydalanılmaktadır.

3

ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

3.1 Giriş

Uluslararası adlandırma olarak kabul edilen analitik yöntem validasyonu, ülkemizde analitik yöntem geçerliliği olarak adlandırılmaktadır. İlaç endüstrisinde validasyon, tüm süreçler için (analitik metot, temizlik, ekipman, üretim, bilgisayarlı sistemler vb.) istenilen kalitenin sağlanmasında hayati bir parametredir. Çok sıkı kurallar ve denetimler ile validasyon süreçleri denetlenmektedir.

Analitik yöntem geçerliliği bir ilaç etken maddesinin ve son ürün olan dozaj şeklinin her aşamada seçici, tekrarlanabilir, kesin, doğru, dayanıklı, saf ve gerek kimyasal gerek fiziksel özelliklerinin ürünün kalitesine negatif bir etki olmadığına çeşitli testler ile değer biçilmesidir [60].

İlaç endüstrisinde analitik yöntem geçerliliği “ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)” kılavuzu referans alınarak detaylı şekilde uygulanmaktadır. Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH) 1990 yılında ABD, Avrupa Birliği ve Japonya ilaç otoriteleri tarafından kurulmuş, yayınladığı kılavuzlar ile ilaçların etkili, güvenli ve yüksek kalitede olduğunu garanti etmek için dünya çapında regülasyonların uyumlaştırılmasını amaç edinmiş bir kuruluştur. Hâlihazırda tüm dünyada ilaç regülasyonlarını yayımlayan, düzenleyen ve yönlendiren temel kuruluştur.

2017 Kasım ayından beri Konseye gözlemci statüsünde katılan Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun (TİTCK), üyelik kriterlerinin tamamını yerine getirerek ABD (FDA), Avrupa Birliği (EMA), Japonya (PMDA), İsviçre (Swissmedic), Kanada (Health Canada), Singapur (HSA), Güney Kore (MFDS), Çin (NMPA), Tayvan (TFDA), Brezilya (Anvisa) gibi ilaç otoritelerinin yanında tam üye olarak yerini almıştır.

Analitik yöntem geçerliliğinin amaçları;

- Olası hataların kök nedenlerinin belirlenmesi,
- Yöntemin kullanım amacına uygunluğunun kontrolü,
- Yöntemin değişikliklere cevap verebilme durumunun değerlendirilmesi,
- Ulusal ve uluslararası otorite gerekliliklerin karşılanmasıdır [61].

3.2 Analitik Yöntem Geçerlilik Çeşitleri

Analitik prosedürlerin en yaygın 4 çeşidi:

- Tanımlama testi; Bir numunenin tanımlanmasını sağlamayı amaçlar. Numune, referans standartlarla kıyaslanarak spektrum, kromatografik davranış, kimyasal reaktivite gibi özellikler belirlenir.
- Safsızlık miktarları için kantitatif testler; Safsızlıklar için testler ya kantitatif ya da bir numunenin safsızlık limit testi olabilir. Bu testler numunenin karakteristik safsızlığını kesin olarak yansıtmayı amaçlamaktadır. Farklı validasyon karakterleri limit testlerinden çok kantitatif test için gereklidir
- Safsızlıkların kontrolü için limit testler; numunenin karakteristik safsızlığını kesin olarak yansıtmayı amaçlamaktadır.
- Bitmiş ürünlerdeki müstahzarın veya etkin maddenin veya diğer seçilmiş bileşik(lerin) aktif kısımlarının kantitatif testleridir. Miktar tayin prosedürü, verilen bir numunenin analitik olarak ölçülmesini amaçlar. Miktar tayini müstahzarın temel bileşenlerinin kantitatif ölçümünü belirtir. Müstahzar için benzer validasyon karakterleri aktif veya diğer seçilen bileşik/ler için örnek alındığında uygulanır. Aynı validasyon karakterleri diğer analitik prosedürlerle bağlantılı miktar tayinleri de uygulanabilir (örn.; dissolüsyon).

Yöntem geçerlilik testlerinin bazı durumlarda tekrar edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır:

- Etkin madde sentezindeki değişiklikler (safsızlık profilinde değişim var ise elzemdir)
- Nihai ürün bileşimindeki değişiklikler
- Analitik prosedürdeki değişimler

Yeniden geçerlilik derecesi değişikliğin niteliğine bağlıdır. Diğer bazı değişiklikler için de validasyon gerekebilir.

3.3 Analitik Yöntem Geçerlilik Parametreleri

Değerlendirilmesi gereken analitik yöntem geçerlilik çeşidi özellikleriyle yönlendirilecek olan analitik prosedürlerin amacı net bir şekilde anlaşılmalıdır. Bu amaç doğrultusunda minimum gerekli yöntem geçerlilik parametreleri belirlenerek protokolümüzü oluşturabiliriz. İncelenmesi gereken tipik geçerlilik parametreleri aşağıda listelenmiştir:

- Seçicilik (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Aralık (Range)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
 - Tekrar edilebilirlik (Repeatability)
 - Ara Kesinlik (Intermediate Precision)
- Teşhis sınırı (Detection Limit)
- Tayin alt sınırı (Quantitation Limit)

Bu incelenmesi gereken tipik karakteristik parametrelerin yanında sağlamlık (metot dayanıklılığı, çözelti stabilitesi vb.) ve sistem uygunluk testleri de önemli olarak değerlendirilmelidir.

Geliştirilen bir analitik yöntemin uygunluğunu belirleyen parametreler ICH' in yanı sıra çeşitli farmakopelerde ve otoritelerde tanımlanmıştır. ICH, Amerikan Farmakopesi (USP), Avrupa Farmakopesi (EP) ve Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından tanımlanan parametreler de farklılıklar gösterebilmektedir [60].

3.3.1 Seçicilik (Specificity)

Seçicilik parametresi tüm geçerli kılma prosedürlerinin gerekliliği olan elzem parametresidir. Seçiciliğin kanıtlanmasında kullanılan parametreler, analitik yöntemimizin amacına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Matris içerisinde belirli bir analiti tam ayırarak göstermek her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle iki veya daha fazla analitik prosedürün kombinasyonu ile gerekli ayırım seviyesini ispatlamak önerilir.

3.3.1.1 Tanımlama

Analizi yapacak olduğumuz maddenin (analit) numune içerisinde (matris) girişim yapabilecek olan tüm maddelerden (safsızlık, bozunma ürünleri, yardımcı maddeler, farklı etken maddeler vb.) ayırt edilerek ölçülebilme kabiliyetidir. Seçiciliği yeterli şekilde ortaya koyarak kanıtlanamayan yöntemler için geçerlilik çalışmalarını sürdürebilmek imkansızdır. Seçicilik parametresinin açık şekilde kanıtlanması ile yöntem için geçerlilik protokolü oluşturabiliriz [60].

3.3.1.2 Miktar Tayini ve Safsızlık Testi/Testleri

Kromatografide kritik ayrılmalar özel olarak yöntem ve geçerli kılma prosedüründe araştırılmalıdır. Kritik ayrımlar için, seçicilikde birbirine çok yakın ayrışan iki bileşenin rezolüsyonu vb. parametreler ile araştırılarak ve ortaya konarak açıklanabilir.

Spesifik olmayan bir miktar tayini olduğu durumlarda, diğer destekleyici analitik prosedürler tüm özgünlükleri göstermek için kullanılmalıdır. Örneğin, bir titrasyon serbest bırakma için etkin madde miktarı kabul edildiği yerde, madde miktarı ve safsızlığa uygun bir test kombinasyonu kullanılabilir. Miktar ve safsızlık tayin çalışmaları iki farklı şekilde değerlendirilebilir. Mevcut safsızlık veya bozunma ürünlerinin varlığında ve bu ürünlerin çalışma esnasında elimizde olmaması koşulları doğrultusunda seçicilik prosedürü farklı şekillerde oluşturulabilir.

- **Mevcut Safsızlıklar**

Miktar tayini çalışmaları için analitimizin sonuçlarının tanımlı safsızlıkların belirli seviyelerde eklenmesi ile etkilenmediğinin gösterilmesi ile seçicilik parametresi saptanır.

Safsızlık testi çalışmalarında ise her bir tanımlı ilave edilen safsızlığın birbirlerinden ve matrisden ayrıştığının kanıtlanması gerekmektedir. Benzer şekilde matrisde yer alan hiçbir bileşenin etken madde ile de girişim yapmaması zorunludur.

Yukarıda belirtilmiş olan matris girişiminin önüne geçmek için birçok ayrı parametre ve çalışma bulunmaktadır. Kromatografi ve spektrofotometrede çalışma gerçekleştireceğimiz analite özgü dedektör seçimi yapılarak duyarlılık artırılabilir. Analite özgü seçim ile diğer matris bileşenlerin cevap vermesinin önüne geçilecektir. Benzer şekilde analite özgü kolon teknolojisi ile seçicilik özelliği artırılabilir. Değerlendirmeye aldığımız analit ve tanımlı safsızlıkların pik saflıkları, deney

çıktılarında ayrıştırmayı göstermenin yanı sıra ilgili cihaz yazılımları kullanılarak da gösterilir [60,62].

- **Mevcut Olmayan Safsızlıklar**

Eğer safsızlık veya bozunma ürünü standartları mevcut değilse, seçicilik ikinci iyi karakterize olmuş bir prosedürle, safsızlıkla veya bozunma ürünü ile devam eden numunelerin test sonuçları karşılaştırılarak açıklanabilir.

Farmakopede olan metot veya diğer valide edilmiş analitik prosedür (bağımsız prosedür) bozundurma çalışmaları (stress testi) gerçekleştirilerek karşılaştırma sonucu doğrulanabilir.

Bozundurma çalışmaları, olası bozunma ürünlerini ve ayırma yöntemlerinde elde edilen kromatogramlarda birbirleriyle, etken madde ve plasebo, bozunma ürünleri gibi maddelerle olan girişimlerini tespit etmek amacıyla uygulanır [60].

Bozundurma çalışmaları test parametreleri, kılavuzlardan (ICH) ve diğer literatür bilgilerinden yararlanılarak tespit edilen, etkin madde, bitmiş ürün ve plaseboya ait oluşabilecek bozulma ürünlerinin saptanmasında kullanılan parametrelerdir. Yapılan literatür araştırmaları sonucu stres testinde en sık kullanılan test parametreleri aşağıdaki gibi verilebilir;

1. Asit Degredasyonu
2. Baz Degredasyonu
3. Oksidasyon Degredasyonu
4. Isı Degredasyonu
5. Isı/Nem Degredasyonu
6. Işık Degredasyonu [60,64,65].

3.3.2 Doğrusallık (Linearity)

Analitin derişime karşı alınan cevapta doğrusal bir ilişki varsa test sonuçları uygun istatistiksel metotlar yardımıyla değerlendirilmelidir. Doğrusallığın oluşumu için, en az 5 konsantrasyon ICH kılavuzu doğrultusunda tavsiye edilir [60,61].

3.3.3 Aralık (Range)

Aralık, doğrusallık çalışmalarından elde edilir ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Aralık, ilgili yöntem test konsantrasyonları üzerinden amacına bağlı olarak kılavuzlar neticesinde belirlenen kabul kriterlerini karşılayacak

şekilde belirlenir. İlgili kabul kriterlerinin alt ve üst limitlerini kapsayacak şekilde geniş olarak tasarlanmalıdır. Bazı örnek testlere ait aralıklar aşağıdaki şekilde belirtilmiştir.

- Etkin maddenin veya bitmiş ürünün miktarı için; normal olarak test konsantrasyonunun %80-120 aralığında;
- İçerik tekdüzeliği için; test konsantrasyonunun en az % 70-130'nin kapsamı, uygun bir aralık ve daha geniş olmadıkça, dozaj formunun (örneğin, ölçülü inhaler doz) niteliğine dayalı olarak ayarlanır.
- Dissolüsyon testi için; % +/-20 belirtilen aralığında olmalıdır. Örneğin; kontrollü serbest bırakılan ürünün spesifikasyonları 1 saat sonra %20 oranından %90'a kadar bir bölgeyi kapsar ise valide edilmiş aralık etikette belirtilenin %0-110 arasında olmalıdır.
- Bir safsızlığa belirlemek için: spesifikasyonların %120'ye kadar safsızlık seviyesinin raporlamasından;
- Bilinen safsızlıklar için olağan dışı etkili olmak için veya toksik üretim için veya beklenmeyen farmakolojik etkiler, saptama/ miktar tayini limiti safsızlıkları kontrol edilmesi gereken seviyelerle oranlı olmalıdır;
- Miktar ve saflık birlikte bir test gibi uygulandıysa ve yalnızca %100 standart kullanıldıysa, doğruluk miktar tayini spesifikasyonunun %120'si safsızlıkların raporlama seviyesindeki aralığı kapsamalıdır.

3.3.4 Doğruluk (Accuracy)

Bir analiz yönteminin doğruluk, elde edilen analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. Analitik prosedürlerde belirlenen aralıkta çalışılmalıdır. Her konsantrasyonda 3 tekrarlı olmak üzere en az 3 konsantrasyon seviyesi ile çalışılması gerekmektedir. Doğruluk, geri kazanım olarak da adlandırılır. Analiz sonucunda bulunan miktar, eklenen gerçek miktarın geri kazanılan miktarı (% geri kazanım) olarak tanımlanır [60,61].

Çalışma aralığı konsantrasyon belirleme prensibi ile aynı olarak doğruluk parametreleri belirlenir.

Miktar tayini testi için, etken madde ise kılavuzlar doğrultusunda belirlenebilecek olan limitler çerçevesinde analitin çalışma derişiminin %80, %100 ve %120' sinden 3'er numune olacak şekilde 9 çözelti hazırlanır. Bu çözeltelerde plasebo %100 derişim konsantrasyonundaki miktar olarak sabit tutulur. Analit derişim miktarı farklılandırılarak

matris içerisinde kabul kriterleri içerisinde alınması değerlendirilir. Eğer etken madde değil de koruyucu, antioksidan vb. özellikte bir madde için miktar tayini çalışması ise limit seviyesi daha düşük olabileceği için bu limit değerine uygun (alt limitin altı, üst limitin üstü) olarak % derişim miktarları belirlenir.

İçerik tekdüzeliği için, kabul kriteri miktar tayini çalışmalarına göre daha geniş olarak kılavuzlar neticesinden belirtilmektedir. Bu doğrultuda geri kazanım aralıkları %60-%140 analit derişimlerini kapsayacak şekilde belirlenir.

Dissolüsyon testi için, belirlenen kabul kriteri doğrultusunda geri kazanım alt limiti -%20 olarak belirlenir. Üst geri kazanım değeri ise analit çalışma derişiminin +%20' si olacak şekilde belirlenerek çalışılır. Eğer ilgili dissolüsyon testi yöntem geçerliliği referans alınarak in-vitro çalışmaları gerçekleştirilmesi söz konusu ise geri kazanım alt limit değeri kantitatif tayin sınırı olarak belirlenmelidir.

Safsızlık testi için, geri kazanım alt derişim limiti gelebilecek tüm safsızlıkların değerlendirebilmesi için kantitatif tayin sınırı olarak belirlenmelidir. Üst derişim limiti ise serbest bırakma ve raf ömrü limitlerini karşılayacak şekilde limitin %20 üstüne çıkılarak belirlenir. Safsızlık testinde geri kazanım çalışmaları miktar tayini, dissolüsyon, içerik tekdüzeliği çalışmalarından farklı olarak gerçekleştirilmektedir.

Eğer tanımlı safsızlık içeriyor ise numune çözeltisine ilgili tanımlı safsızlıklar limit konsantrasyon üzerinden belirlenen % derişimlerde eklenerek (spike) gerçekleştirilmektedir. Eğer tanımlı safsızlık içermiyor ise plasebo çözeltisine (numune derişimi konsantrasyonuna eşdeğer miktarda) limit konsantrasyon üzerinden belirlenen % derişimlerde etken madde spike edilerek gerçekleştirilmektedir [60,66].

3.3.5 Kesinlik (Precision)

Aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların, birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini, diğer bir deyişle; ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermek için kullanılır. Ölçüm sonuçlarının benzerliğini diğer bir deyişle tekrarlanabilirliği gösterir. Standart sapma, Varyans veya Varyasyon Katsayısı vb. parametreleri ile verilir.

3.3.5.1 Tekrarlanabilirlik

Tekrar edilebilirlik aşağıdaki maddeler kullanılarak değerlendirilmelidir:

a) Prosedürde belirlenen aralığı kapsayan en az 9 saptama (örn.; 3 konsantrasyon/her birinin 3 tekrarı). Bu çalışma doğruluk parametresinde zaten gerçekleştirilmektedir.

veya

b) Test konsantrasyonunun %100'ünde en az 6 saptama. Bu ilave parametre yöntem şartlarında numune çalışmasının tekrarlabirliğini kanıtlamaktadır.

3.3.5.2 Ara Kesinlik

Ara kesinlik, aynı yöntem hiçbir parametresi değiştirilmeden, farklı günler, analistçiler, ekipman vb. içerir. Bu etkiler ayrı ayrı çalışma için kaçınılmaz olarak düşünülmemelidir. Deneysel bir tasarım kullanımının matrisimize göre yapılması teşvik edilir.

3.3.5.3 Tekrar Edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik, laboratuvarlar arası bir deneme yoluyla değerlendirilir. Tekrar edilebilirlik analitik bir prosedürün standardizasyonu durumunda düşünülmelidir. Bu parameter, ilgili yöntemin farklı bir laboratuvara transferine karşılık gelmektedir. Metot transfer çalışması olarak değerlendirilebilir [60].

3.3.6 Teşhis sınırı (Detection Limit)

Analizi yapılan analitin belirdiği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Bu derişimin daha düşük konsantrasyonlara düşürülerek hassasiyetin artırılmasında yöntem kadar cihaz duyarlılığı da önemlidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek hesaplamada HPLC'de Sinyal/Gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olduğu kabul edilir [60].

Hesaplama yolu ile Teşhis Sınırı saptanmasında;

$LOD = 3.3 \times SD / m$ eşitliği kullanılır.

SD= Boş çözeltinin çok az derişimdeki madde çözeltisinin veya kesişim değerinin standart sapması

m= Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

3.3.7 Tayin alt sınırı (Quantitation Limit)

Analizi yapılan analitin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeydir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek tayin sınırı için Sinyal/Gürültü oranı sinyalin gürültüye oranının 10:1 olduğu derişim olarak alınır.

Hesaplama yolu ile Tayin sınırı saptanmasında;

$LOQ = 10 \times SD / m$ eşitliğı kullanılır.

SD= Boş çözeltinin çok az derişimdeki madde çözeltisinin veya kesişim değerinin standart sapması

m= Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

3.3.8 Sağlamlık (Robustness)

Sağlamlık değerlendirmesi, geliştirme aşamasında göz önünde bulundurulmalı ve incelenen prosedürün türüne bağlıdır. Metot parametrelerinde kasıtlı çeşitlilik açısından bir analizin güvenilirliğini göstermelidir. Ölçümler, analitik koşullardaki değişikliklere duyarlıysa, analitik koşullar uygun şekilde kontrol edilmeli veya bir ihtiyati ifade prosedüre dahil edilmelidir. Sağlamlık değerlendirmesinin bir sonucu, her kullanıldığında analitik prosedürün geçerliliğinin korunmasını sağlamak için bir dizi sistem uygunluk parametresinin oluşturulması gereklidir.

Faktörler tanımlandıktan sonra, her bir faktör üzerinde biraz değişiklikler uygulanır. Sonuçları önemli ölçüde etkileyen faktörlerin metot protokolünde açık bir şekilde tanımlanması gerekmektedir. Metot parametrelerinde rutin işlem sırasında ufak değişikliklerin analiz sonucuna etkisi ne kadar az ise metot o kadar sağlamdır [60].

Tipik varyasyon örnekleri:

- Analitik çözeltilerin stabilitesi
- Ekstraksiyon zamanı

Sıvı kromatografi durumunda, tipik varyasyon örnekleri:

- Bir mobil fazda pH değişimlerinin etkisi
- Mobil faz bileşimi değişikliğinin etkisi
- Farklı kolonlar (farklı parti ve/veya tedarikçiler)
- Sıcaklık
- Akış hızı

Gaz-kromatografisi durumunda, tipik varyasyon örnekleri:

- Farklı kolonlar (farklı partiler ve/veya tedarikçiler)
- Sıcaklık
- Akış hızı

3.3.9 Sistem uygunluğu testleri

Sistem uygunluğu testi parametreleri, her analiz için en az kabul edilebilirlik parametrelerini içerir. Özel bir prosedür için oluşturulacak sistem geçerliliği test parametreleri valide olmuş prosedür tipine bağlıdır. Ayrım gücü, kesinlik, pik kuyuklama faktörü, bağıl alıkonma vb faktörler sistem uygunluk testleri arasında yer almaktadır. Kromatografi piklerinin doğruluğu ve ideal oluşu tanımlanmış olan ve sistem uygunluk testleri parametreleri asimetri faktörü ve kuyuklanma faktörü ile saptanır. Kolonun tabaka sayısı (N) da pikin şekli üzerinde önemli rol oynayan parametrelerdendir. Ayrım gücü olarak adlandırılan (R_s) parametre de iki sinyalin birbirlerinden ayrılması dolayısıyla kolonun gücü ile ilgili bilgi verir. Hassasiyet çözeltisi ise safsızlık analizlerinde kullanılan ilgili cihazın o yöntemdeki değerlendirmeye uygunluğunu kontrolü açısından önemlidir [60].

DENEYSEL ÇALIŞMA VE BULGULAR

4.1 Materyal ve Yöntem

Çalışmalarda kullanılan cihaz ve ekipmanlar, reaktifler, standart ve safsızlıklar, kolonlar aşağıda listelenmiştir.

Tablo 4.1 Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Ekipman	Üretici Firma / Model	Cihaz Kod No / Seri No	Kalifikasyon Tarihi	Bir Sonraki Kalifikasyon Tarihi
HPLC / UV	Waters / E2695	150400045 / D15SM4250A	06.2019	06.2020
HPLC / PDA	Waters / E2695	150400032 / A14SM4397A	05.2019	05.2020
LC / Q-TOF	Agilent / 6546 Q-TOF	150523001 / SG1937E201	07.2020	07.2021
Analitik Terazı	Mettler Toledo / XP6	150411015 / B243240491	05.2019	05.2020
Analitik Terazı	Mettler Toledo/ XP205DR	150411014 / B124152490	05.2019	05.2020
Analitik Terazı	Mettler Toledo/ XP205DR	150411013 / B124152489	05.2019	05.2020
Analitik Terazı	Mettler Toledo/ XP205DR	150411016 / B125153895	05.2019	05.2020

Tablo 4.2 Reaktifler, standart ve safsızlıklar

Bileşenler	Üretici Firma	Lot Numarası	Son Kullanım Tarihi
1-Oktansülfonik asit sodyum tuzu	J.T. Baker	0000127933	05.2022
Üridin USP	USP	F1K301	Güncel
Guanozin WS	LGC	1075856	05.2022
Inosin WS	LGC	41216	04.2021
Adenin CRS	EP	3.0	Güncel
Adenozin CRS	EP	1.0	Güncel
Adenozin EP Hammadde	Wockhardt	GRS10176	05.2021
Nikotinik asit	Divi's Laboratories	ROV-0080315	08.2019
Nikotinamid	DSM	OP11905013	05.2022
İzosinkomeronik Asit	Sigma Aldrich	STBJ0581	02.2024
6-Hidroksinikotinik Asit	USP	F1K176	Güncel
İzonikotinik Asit	Divi's Laboratories	IPS008ROB	07.2021

Tablo 4.2 Reaktifler, Standart ve Safsızlıklar (devamı)

Bileşenler	Üretici Firma	Lot Numarası	Son Kullanım Tarihi
6-Metilnikotinik Asit	USP	F001Y0	Güncel
6,6'-Dinikotinik Asit	USP	F00200	Güncel
Piridin	Sigma Aldrich	SHBG4712V	08.2020
3-Nitropiridin	Sigma Aldrich	MKCF4981	17.2022
Hidroklorik Asit (%37)	Merck	K49997917	02.2022
Hidrojen Peroksit (%30)	Merck	K51180997	02.2021
Tetrabütil Amonyum Hidroksit (%40)	Merck	K51180997	02.2021
Sodyum Hidroksit	Fisher Chemical	1855430	04.2022
Formik Asit	Thermo Scientific	A0416519	02.2023
Asetonitril MS grade	Merck	I1047129	09.2022
Saf su MS grade	Merck	Z0772733	11.2024

Tablo 4.3 Kullanılan metot validasyon kolonları

Kolon 1	
Türü	μBONDAPAK C18 125Å
Uzunluğu	300 mm
Çapı	3,9 mm
Partikül boyutu	10 μm
Üretici firma	WATERS
Seri numarası	235390513
Lot numarası	0235
Kolon 2	
Türü	μBONDAPAK C18 125Å
Uzunluğu	300 mm
Çapı	3,9 mm
Partikül boyutu	10 μm
Üretici firma	WATERS
Seri numarası	233373222
Lot numarası	7620

Tablo 4.4 LC-QTOF kolonu

Türü	Infinitylab Poroshell HPH C18
Uzunluğu	100 mm
Çapı	2,1 mm
Partikül boyutu	1,9 µm
Üretici firma	AGILENT
Seri numarası	695675-702
Lot numarası	B19427

4.2 Ürün Bilgileri

Metot geliştirme ve metot validasyon çalışmalarında; katarakt tedavisinde kullanılan ve etkin madde olarak adenzin (1 mg/ml), kalsiyum klorür (2 mg/ml), magnezyum klorür (3 mg/ml), nikotinik asit (0,3 mg/ml) içeren göz damlası (Formülasyon-1) ve adenzin (2 mg/ml), sitokrom C (0,675 mg/ml), nikotinamid (20 mg/ml) içeren göz damlası (Formülasyon-2) kullanılmıştır. Her 2 üründe günde 3 kez en fazla 2 damla kullanılmaktadır. ICH Q3B(R2) Yeni İlaç Ürünlerindeki Safsızlıklar Kılavuzu doğrultusunda yapılan hesaplamalara göre hem bilinen impürite limiti hem de bilinmeyen impürite limiti %1,0 olarak hesaplanmıştır. Validasyon çalışmaları bu limitlere göre gerçekleştirilmiştir.

4.3 Adenzin İlgili Bileşikler Tayini Yöntemi

4.3.1 Kromatografik koşullar

Kolon	: µBONDAPAK C18 125Å 300 x 3,9 mm, 10 µm
Dalga boyu	: 254 nm
Akış hızı	: 2,5 ml/dk.
Kolon sıcaklığı	: 25°C
Numune sıcaklığı	: 25°C
Enjeksiyon hacmi	: 10 µl
Enjeksiyon süresi	: 80 dk.

Hareketli faz: 0,50 g 1-oktan sülfonik asit sodyum tuzu 1000 ml' lik balon içerisine dikkatlice aktarılır. Üzerine 1000 ml saf su ilave edilir ve karışması sağlanır. Süzülür ve degaze edilir.

Düzeltilme Faktörleri:

Bileşen	RRT (Adenozin'e göre)	DF
Üridin	0,10	1,38
İnosin	0,27	1,34
Guanozin	0,38	0,91
Adenin	0,48	0,63
Adenozin	1,00	1,00

Hesaplamalar:

$$\text{Bilinen İmpürite, \%} = \frac{A_N}{A_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{P}{100} \times \frac{100-LOD}{100} \times \frac{10}{W_N} \times \frac{d}{LC} \times DF \times 100 \quad (4.1)$$

A_N : Numune çözeltisinden elde edilen ilgili bilinen impürite pik alanı

A_S : Standart çözeltisinden elde edilen Adenozin ortalama pik alanı

W_S : Standart çözeltisi için Adenozin CRS veya WS tartımı, mg,

P : Standart çözeltisi için Adenozin CRS veya WS potensi (kuru baz), %.

LOD : Standart çözeltisi için alınan Adenozin CRS veya WS kurutma kaybı, %

W_N : Numune tartımı, g

d : Numune yoğunluğu, g/ml

LC : Etiket değeri, mg/ml

DF : Her bir bilinen impürite için düzeltme faktörü

$$\text{Bilinmeyen İmpürite, \%} = \frac{A_N}{A_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{5}{50} \times \frac{P}{100} \times \frac{100-LOD}{100} \times \frac{10}{W_N} \times \frac{d}{LC} \times 100 \quad (4.2)$$

A_N : Numune çözeltisinden elde edilen bilinmeyen impürite pik alanı

A_S : Standart çözeltisinden elde edilen Adenozin ortalama pik alanı

W_S : Standart çözeltisi için Adenozin CRS veya WS tartımı, mg,

P : Standart çözeltisi için Adenozin CRS veya WS potensi (kuru baz), %.

LOD : Standart çözeltisi için alınan Adenozin CRS veya WS kurutma kaybı, %

W_N : Numune tartımı, g

d : Numune yoğunluğu, g/ml

LC : Etiket değeri, mg/ml

4.3.2 İlgili Bileşikler Yöntem Validasyonu

4.3.2.1 Seçicilik

- **Seçicilik Çözeltilerinin Hazırlanması**

Seyreltme çözeltisi: 50°C - 55°C'lik saf su.

Standart çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı. 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Plasebo çözeltisi: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo hassas bir şekilde 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

Numune çözeltisi: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune hassas bir şekilde 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice tartıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

Sistem uygunluk çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin CRS ve 3,0 mg Adenin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir

miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı. 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Stok Adenozin Çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Üridin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Üridin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok İnosin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg İnosin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Guanozin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Guanozin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Adenin çözeltisi: Tartımı alınmış 3.0 mg Adenin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Mix standart çözeltisi: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 5,0' er ml alındı, 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Plasebo + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi: Stok Adenozin çözeltisinin 1,0 ml' si 10 ml' lik balon jojeye dikkatlice aktarıldı, üzerine 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo dikkatlice aktarıldı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

Numune + impürite spike çözeltisi: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune hassas bir şekilde tartılarak 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinden 1,0' er ml dikkatlice aktarıldı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

Adenozin yer görme çözeltisi: Stok Adenozin çözeltisinin 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Üridin yer görme çözeltisi: Stok Üridin çözeltisinin 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

İnosin yer görme çözeltisi: Stok İnosin çözeltisinin 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Guanozin yer görme çözeltisi: Stok Guanozin çözeltisinin 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Adenin yer görme çözeltisi: Stok Adenin çözeltisinin 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Seçicilik Kriterleri

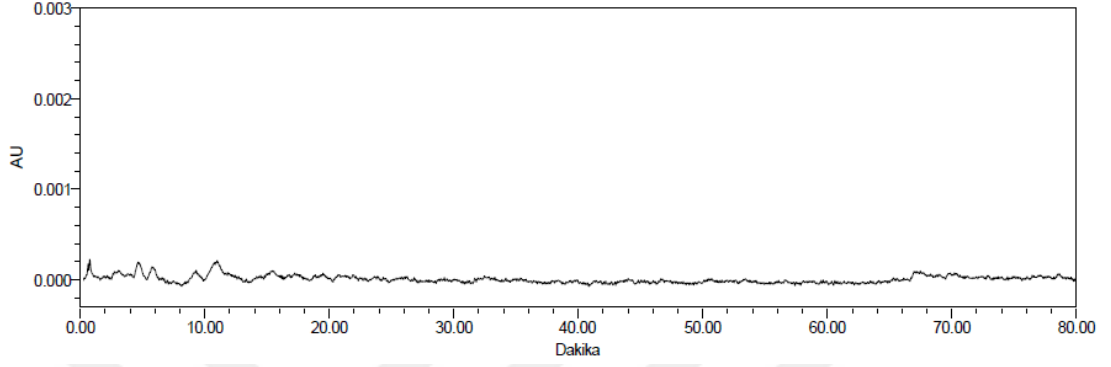
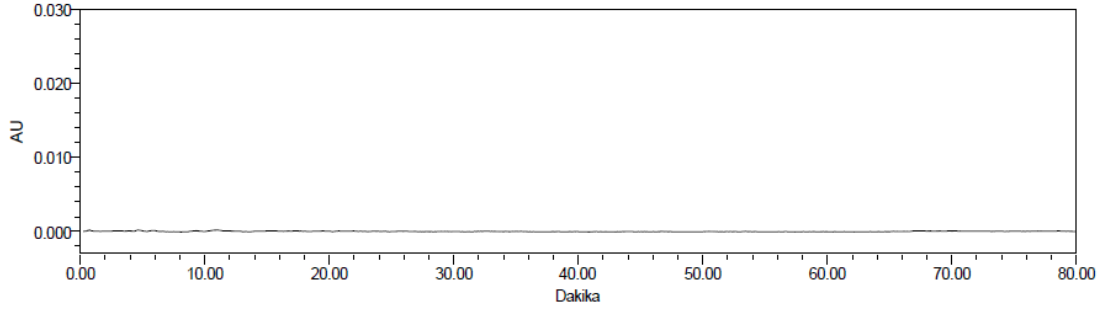
Seçicilik; yöntemin amaçlanan bir analiti, örnek matriksindeki diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir. Enjeksiyonu yapılan çözeltilerin diod-array dedektörde pik saflığı açısı ve pik saflığı eşiği ile alıkonma ve bağlı alıkonma zamanları not edildi. Bütün bileşenlerin pik saflıklarının uygun olduğu (Pik saflığı açısı < Pik saflığı eşiği) ve etken madde alıkonma zamanında başka pik görülmediği kontrol edildi. Tüm sonuçlar **Tablo 4.5'te ve Şekil 4.1- Şekil 4.17** arasında verilmiştir.

Tablo 4.5 Seçicilik sonuçları

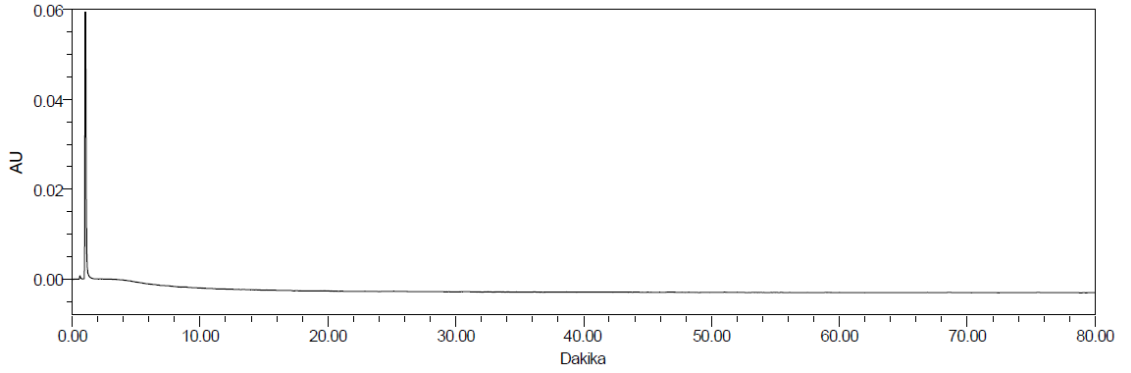
Bileşenler		Tespit Zaman	Bağlı Tespit Zamanı	Pik Saflık Açısı	Pik Saflık Eşik
Seyreltme çözeltisi		-	-	-	-
Plasebo çözeltisi		-	-	-	-
Standart çözeltisi	Adenozin	44,225	1,00	10,159	11,104
Sistem uygunluk çözeltisi	Adenin	21,101	0,47	5,122	5,683
	Adenozin	44,721	1,00	10,539	10,752
Numune çözeltisi (Formülasyon-1)	Adenin	19,069	0,43	34,565	47,961
	Adenozin	44,663	1,00	0,249	0,398
Numune çözeltisi (Formülasyon-2)	Adenozin	44,238	1,00	0,183	0,641
Mix standart çözeltisi	Üridin	4,593	0,10	3,788	4,068
	İnosin	11,839	0,27	4,191	4,480
	Guanozin	16,735	0,38	3,849	7,018
	Adenin	21,077	0,48	5,236	5,454
	Adenozin	44,220	1,00	9,047	9,573
Plasebo (Formülasyon-1) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi	Adenozin	43,882	1,00	13,610	14,554
Plasebo (Formülasyon-2) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi	Adenozin	41,795	1,00	10,305	12,033

Tablo 4.5 Seçicilik sonuçları (devamı)

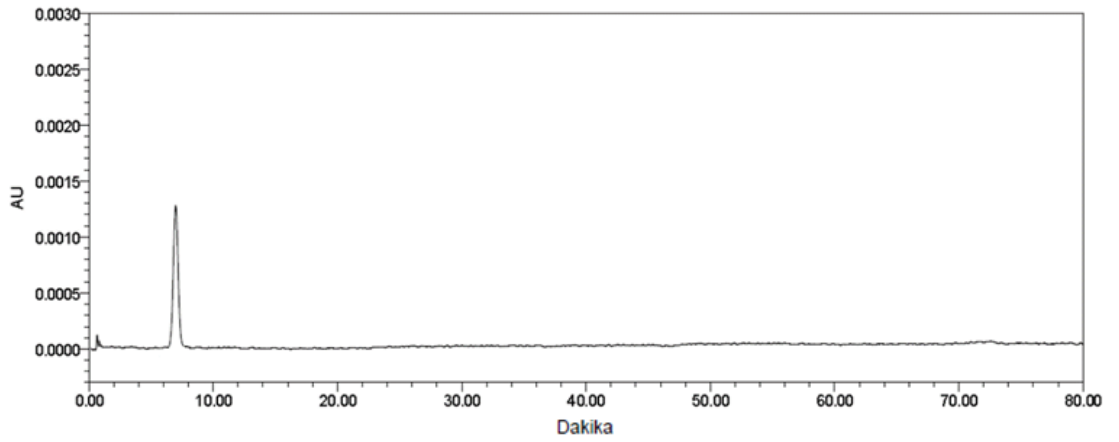
Bileşenler		Tespit Zaman	Bağlı Tespit Zamanı	Pik Saflık Açısı	Pik Saflık Eşik
Numune + limit konsantrasyonda impürite spike çözeltisi (Formülasyon-1)	Üridin	4,592	0,10	2,004	2,495
	İnosin	11,687	0,27	3,873	4,490
	Guanozi	16,743	0,38	3,104	6,245
	Adenin	20,699	0,47	6,336	7,014
	Adenozi	44,089	1,00	0,250	0,411
Numune + limit konsantrasyonda impürite spike çözeltisi (Formülasyon-2)	Üridin	4,594	0,10	1,533	1,966
	İnosin	11,673	0,26	3,836	4,481
	Guanozi	16,735	0,38	5,140	6,038
	Adenin	20,701	0,47	6,532	7,156
	Adenozi	44,095	1,00	0,252	0,415
Adenozin yer görme	Adenozi	44,225	1,00	9,956	10,983
Üridin yer görme çözeltisi	Üridin	4,635	1,00	1,767	2,199
İnosin yer görme çözeltisi	İnosin	11,863	1,00	4,236	4,992
Guanozin yer görme	Guanozi	16,642	1,00	2,261	6,024
Adenin yer görme çözeltisi	Adenin	20,963	1,00	6,943	7,025



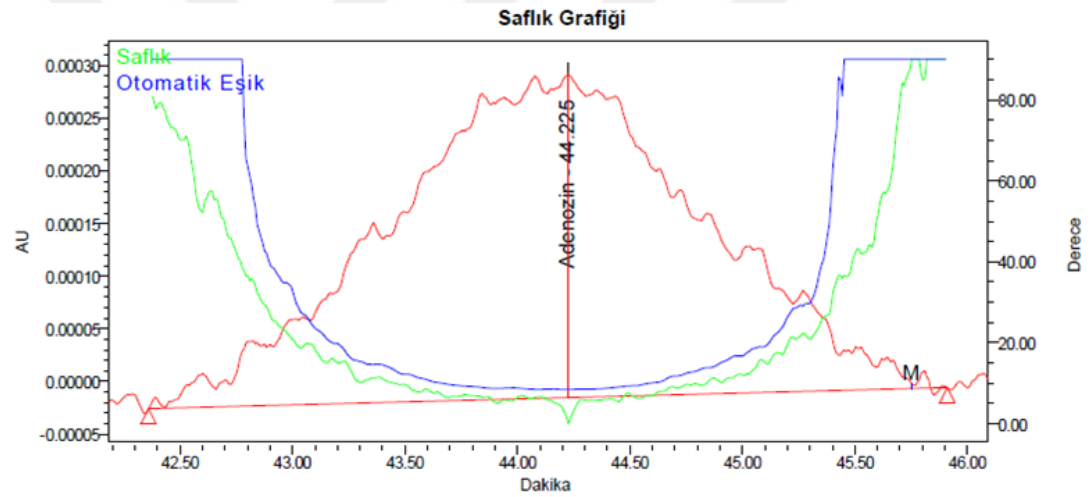
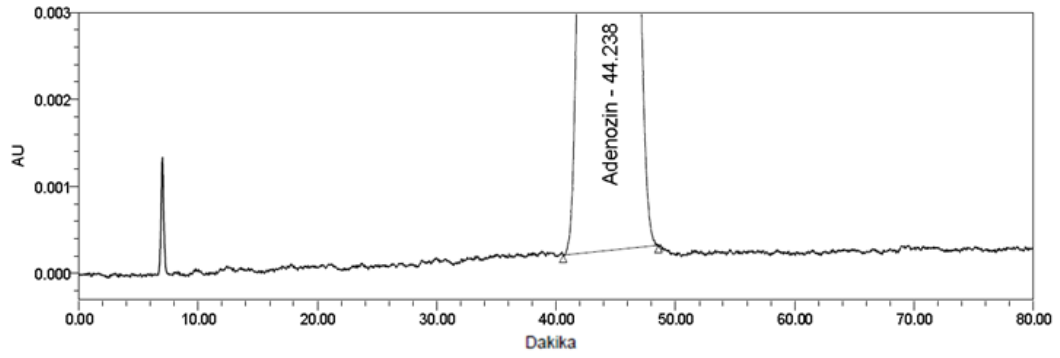
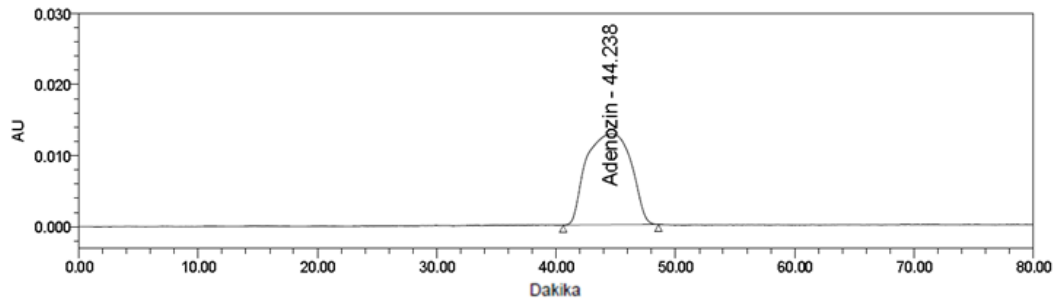
Şekil 4.1 Seyreltme çözeltisi seçicilik kromatogramı



Şekil 4.2 Plasebo çözeltisi seçicilik kromatogramı (Formülasyon-1)



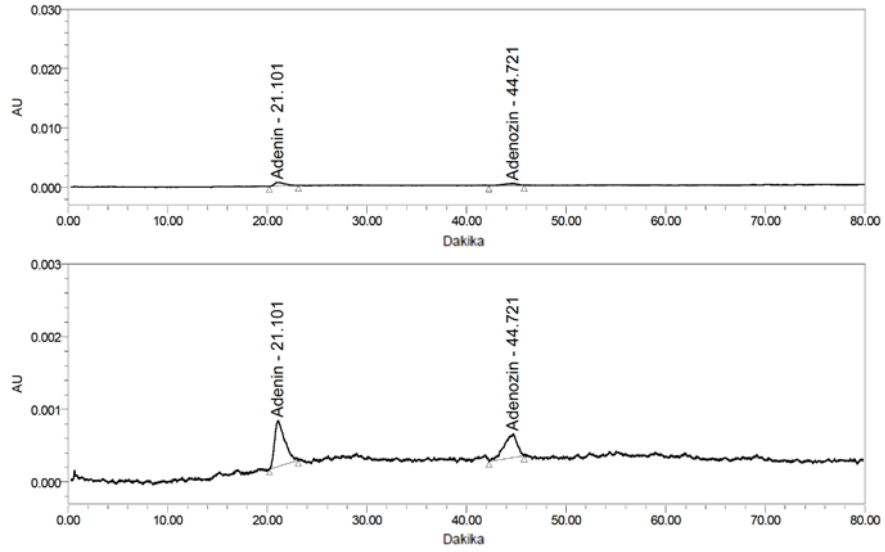
Şekil 4.3 Plasebo çözeltisi seçicilik kromatogramı (Formülasyon-2)



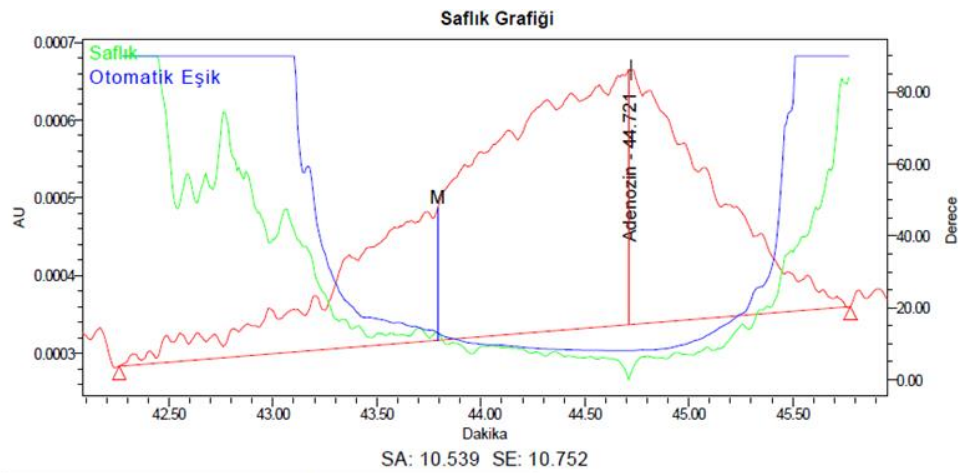
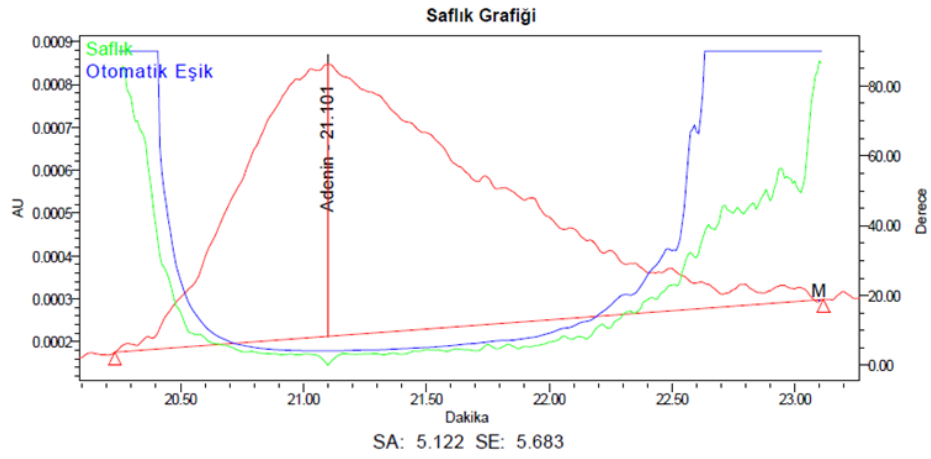
SA: 10.159 SE: 11.104

	Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Saflik Açısı	Saflik Eşığı	Saflik_Kriteri
1	Adenozin	44.225	29878	307	10.159	11.104	Geçer

Şekil 4.4 Standart çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı

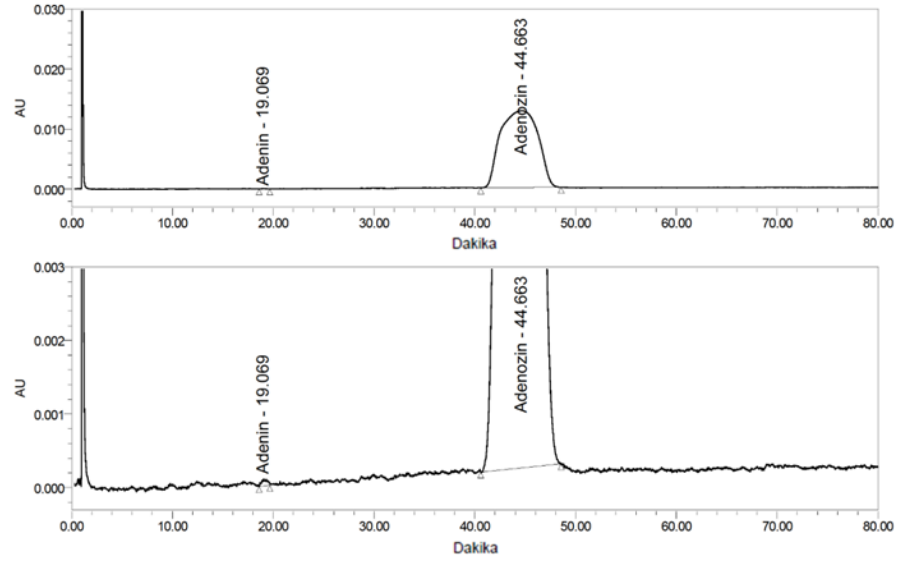


Pik Adı	RT	% Alan	Alan	Yükseklik
1 Adenin	21.101	60.13	45074	635
2 Adenozin	44.721	39.87	29889	328

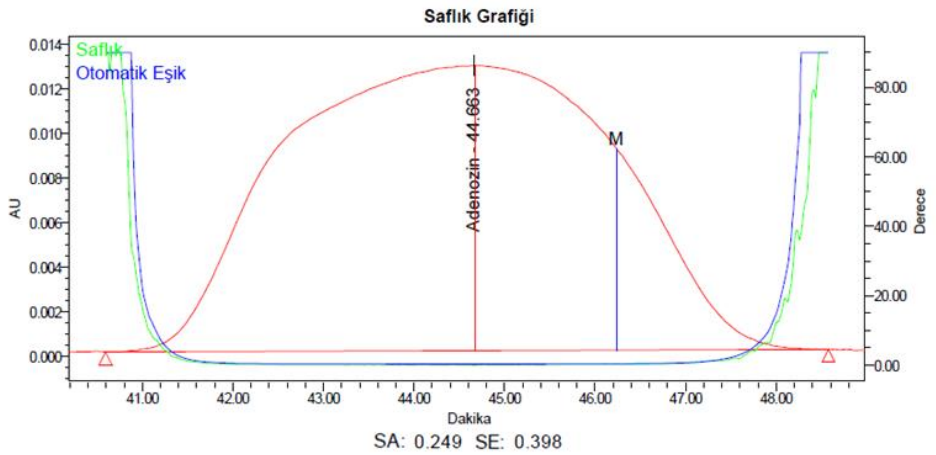
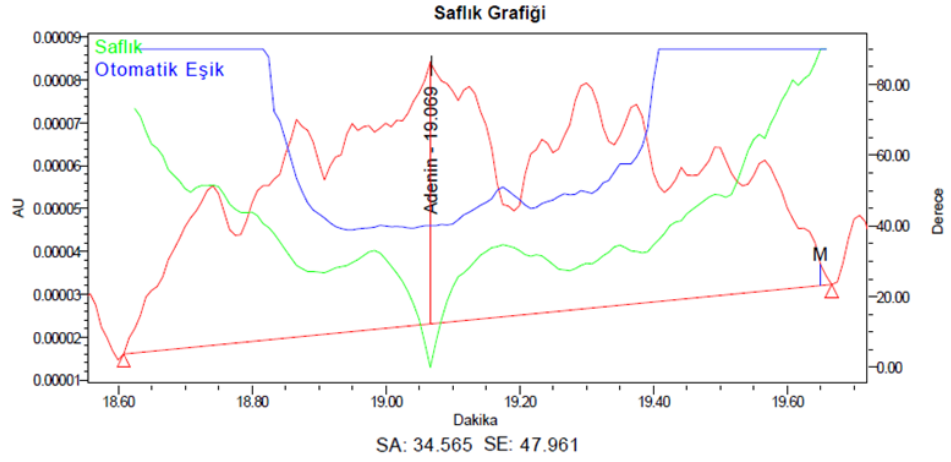


Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşığı	Safılık Kriteri
1 Adenin	21.101	45074	635	5.122	5.683	Geçer
2 Adenozin	44.721	29889	328	10.539	10.752	Geçer

Şekil 4.5 Sistem uygunluk çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı

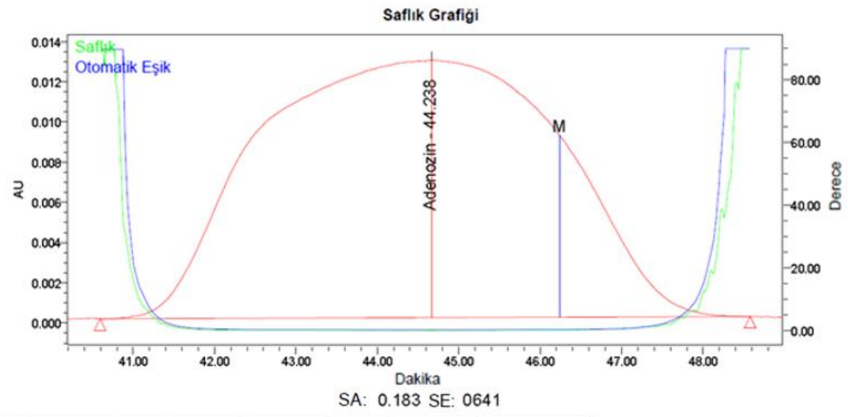
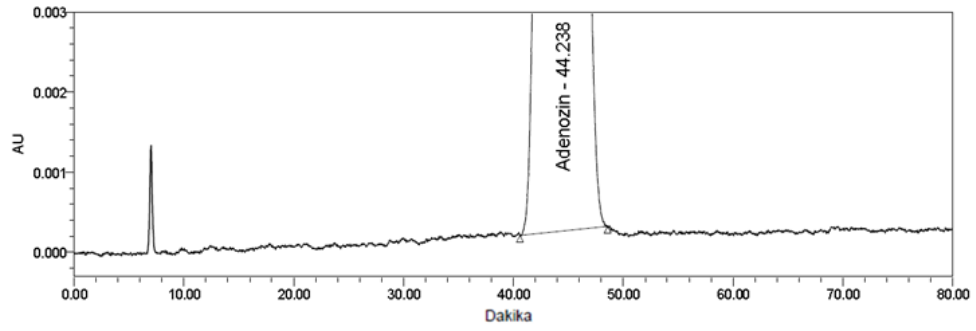
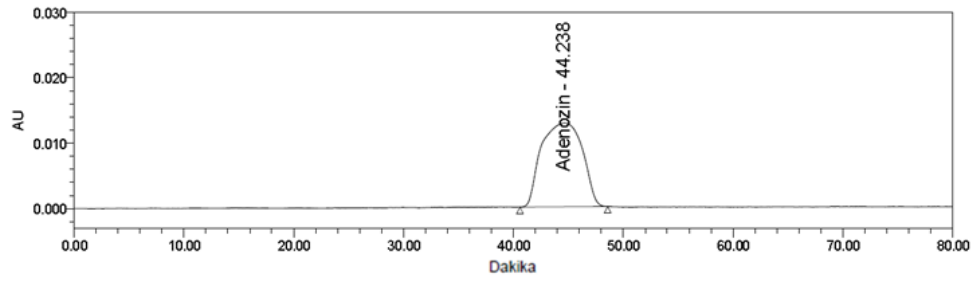


Pik Adı	RT	% Alan	Alan	Yükseklik
1 Adenin	19.069	0.07	2232	60
2 Adenozin	44.663	99.93	3329968	12799



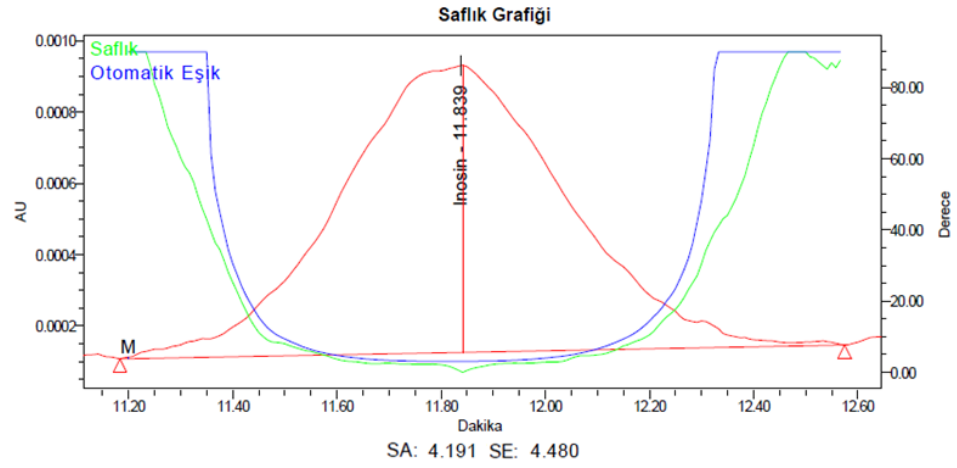
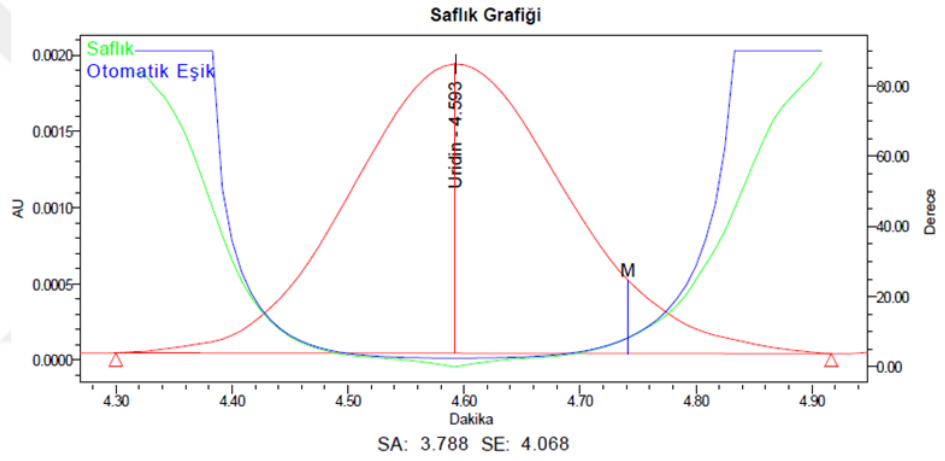
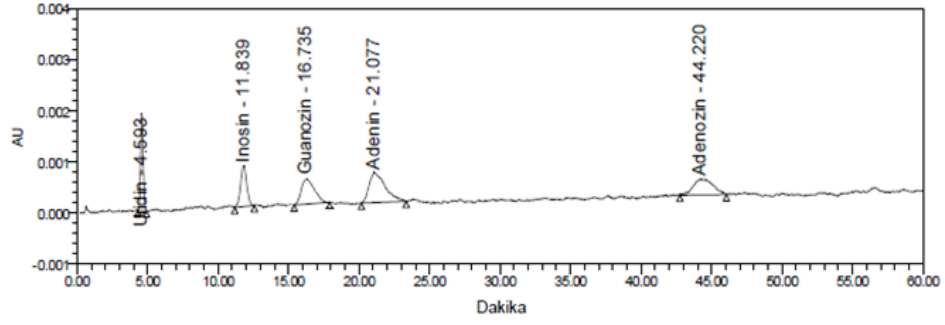
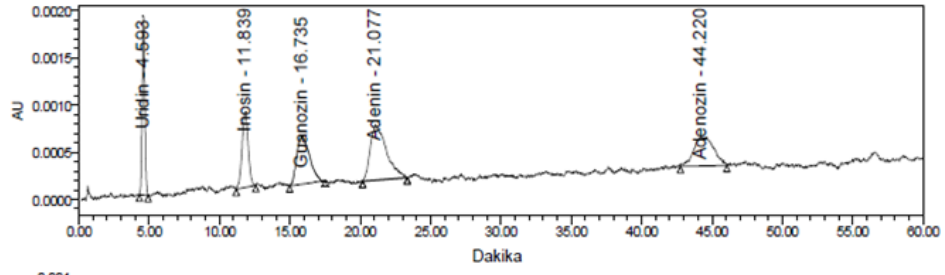
Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşiği	Safılık Kriteri
1 Adenin	19.069	2232	60	34.565	47.961	Geçer
2 Adenozin	44.663	3329968	12799	0.249	0.398	Geçer

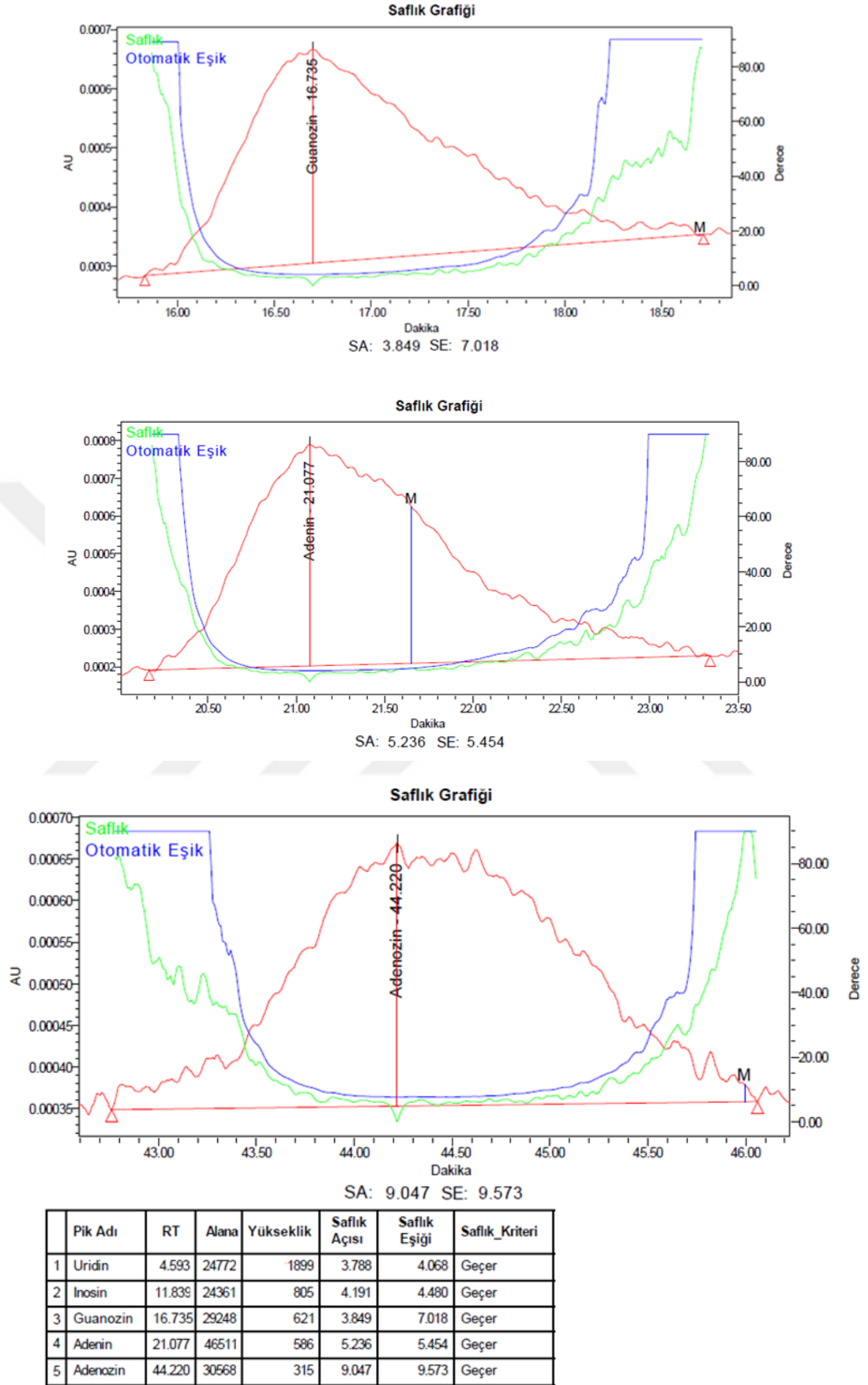
Şekil 4.6 Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-1)



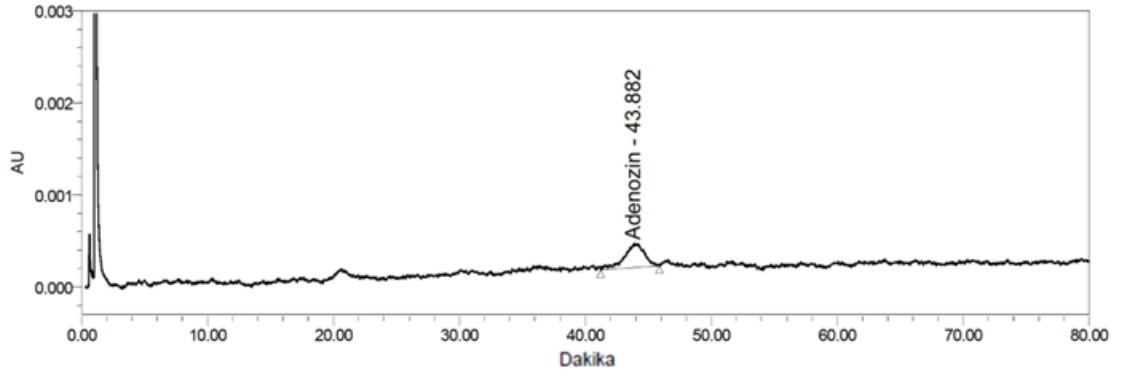
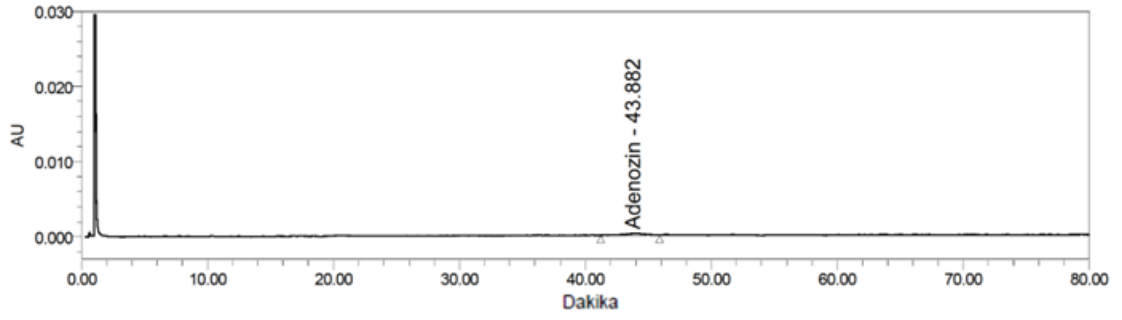
Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşiği	Safılık_Kriteri
1 Adenozin	44.238	3456129	13056	0.183	0.641	Geçer

Şekil 4.7 Numune çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-2)



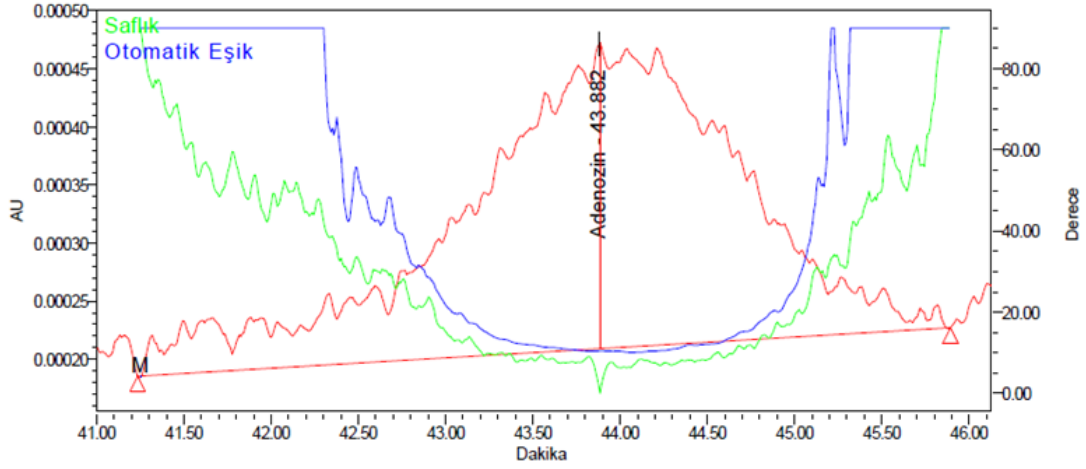


Şekil 4.8 Mix standart çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



Pik Adı	RT	% Alan	Alan	Yükseklik
1 Adenozin	43.882	100.00	28875	263

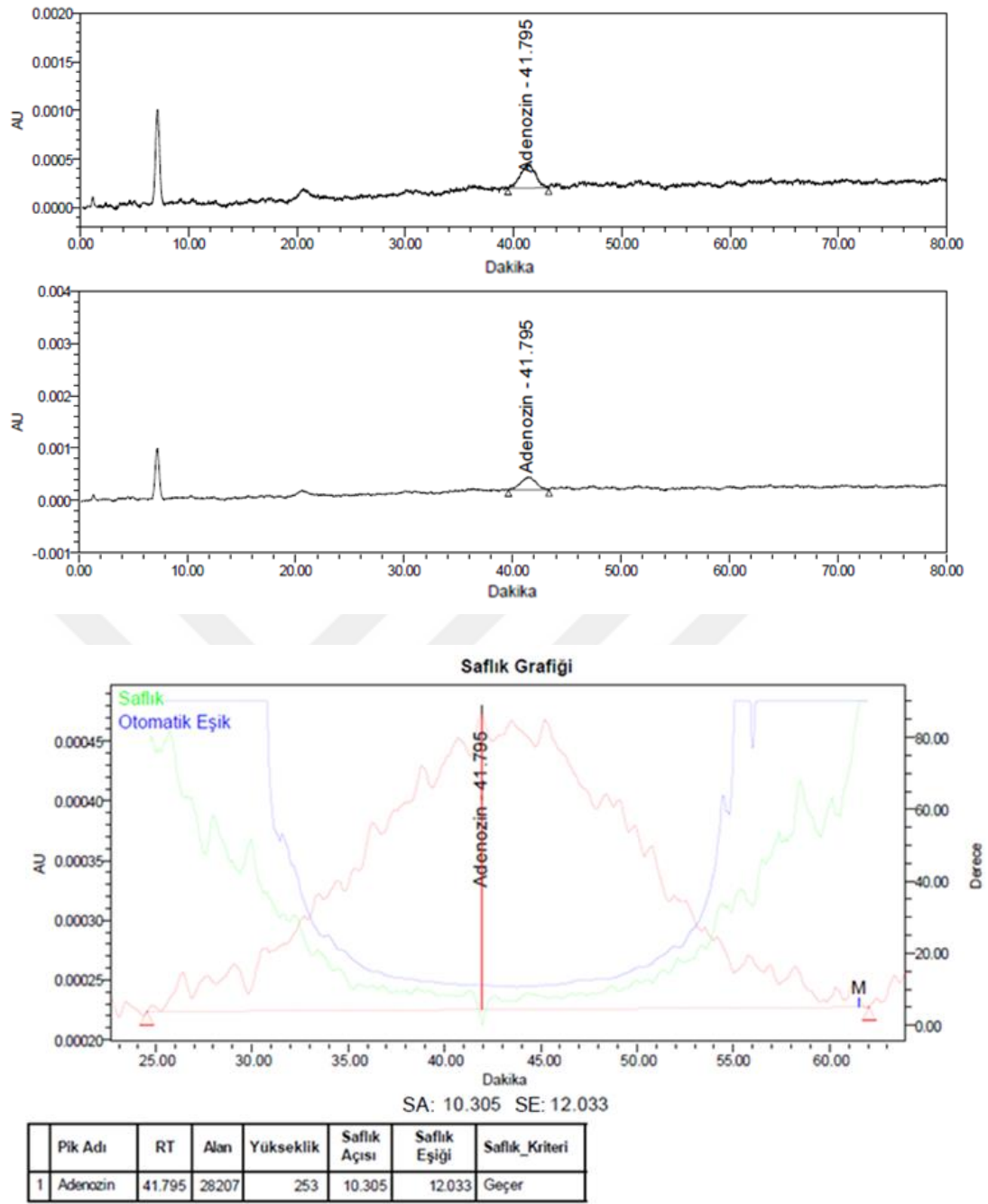
Saflık Grafiği



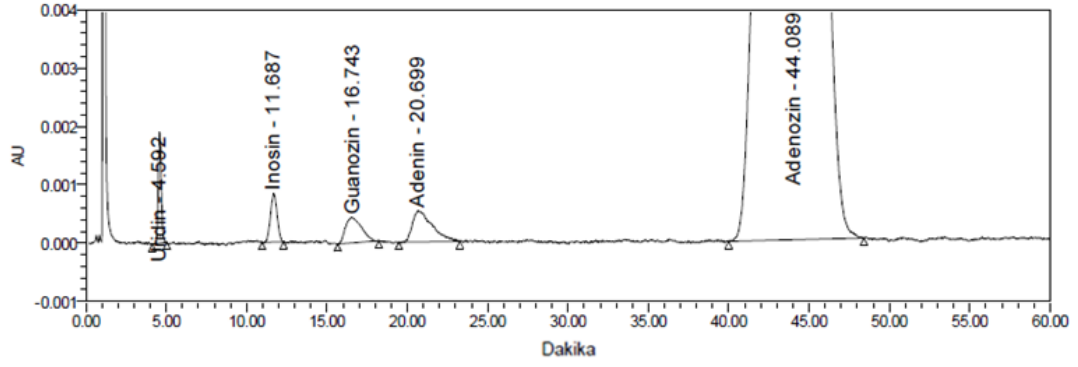
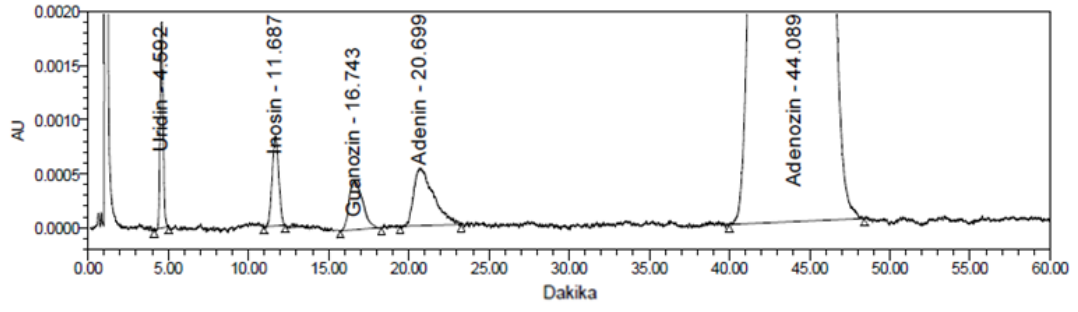
SA: 13.610 SE: 14.554

Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Saflik Açısı	Saflik Eşiği	Saflik_Kriteri
1 Adenozin	43.882	28875	263	13.610	14.554	Geçer

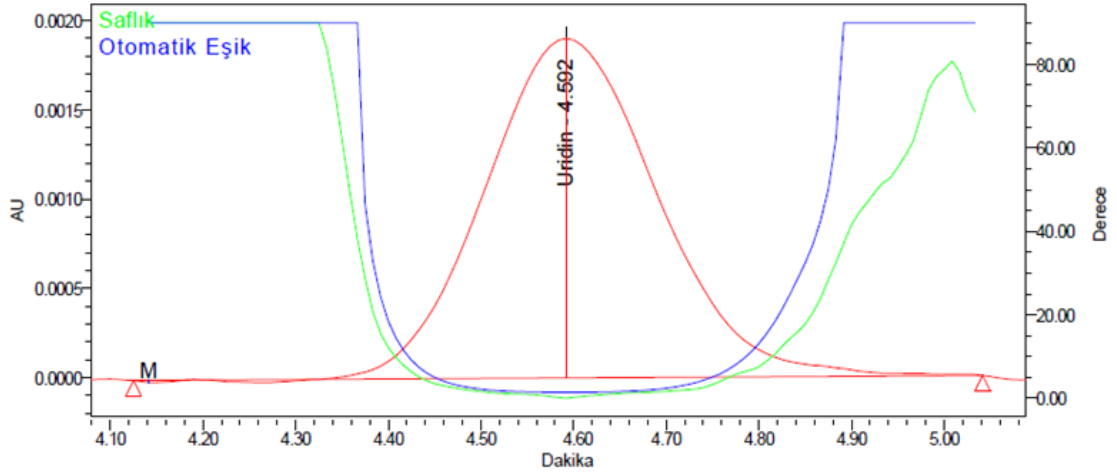
Şekil 4.9 Plasebo (Formülasyon-1) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



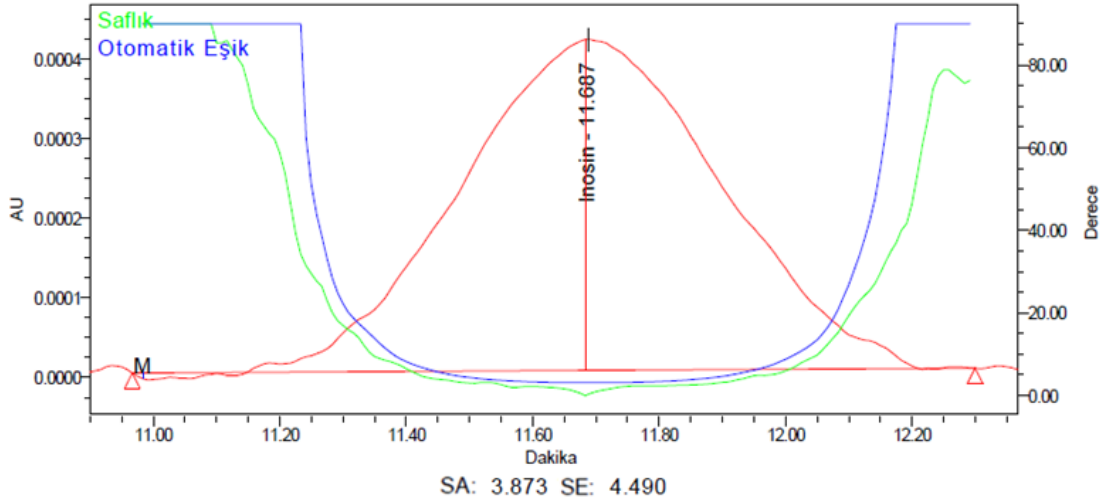
Şekil 4.10 Plasebo (Formülasyon-2) + limit konsantrasyonda hammadde çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı

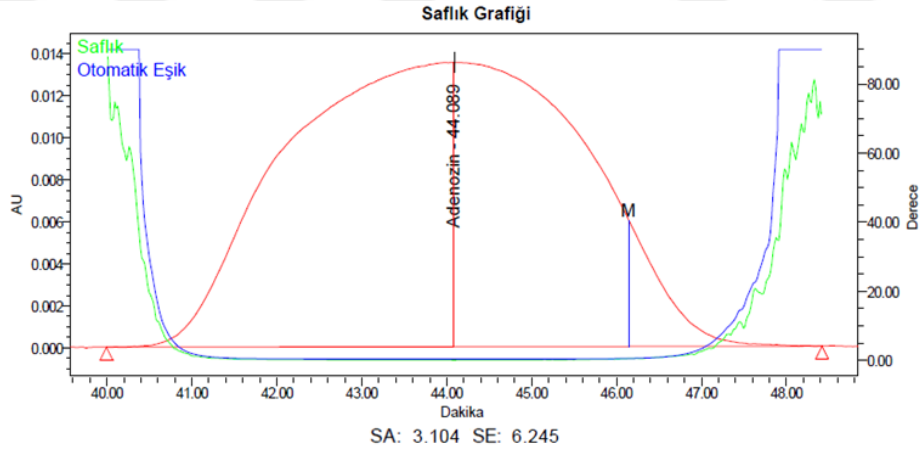
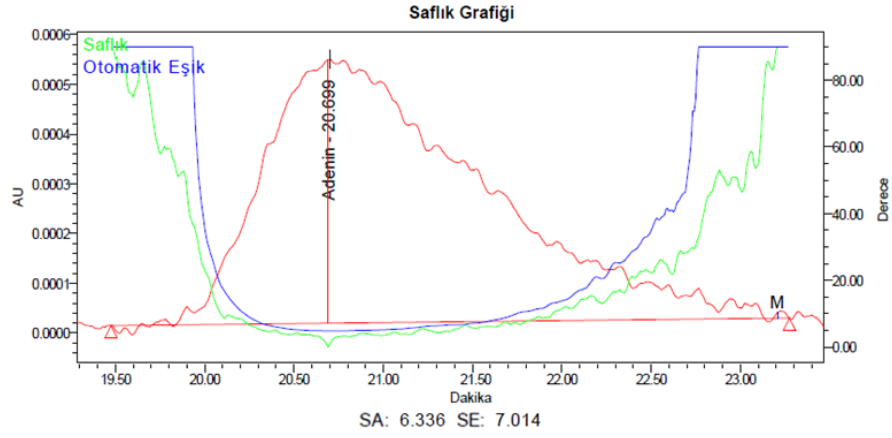
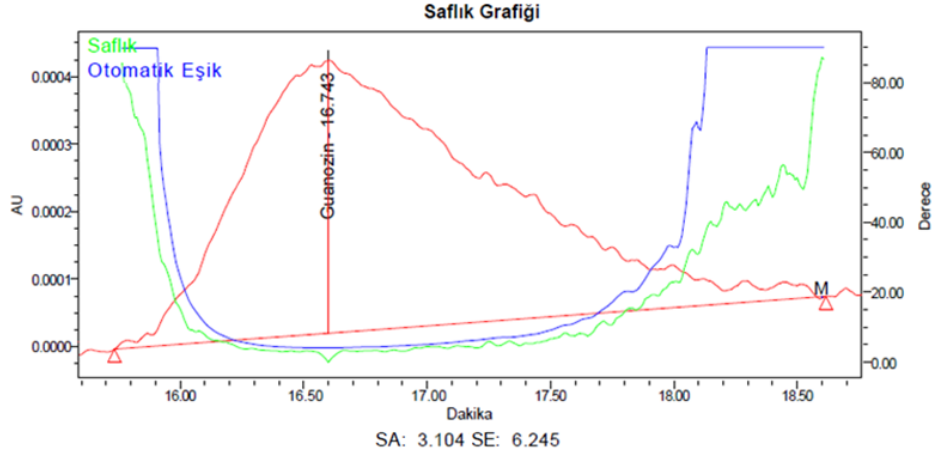


Saflık Grafiği



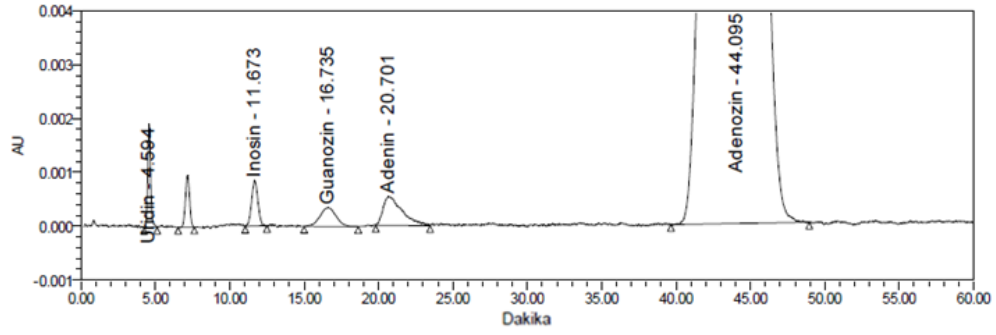
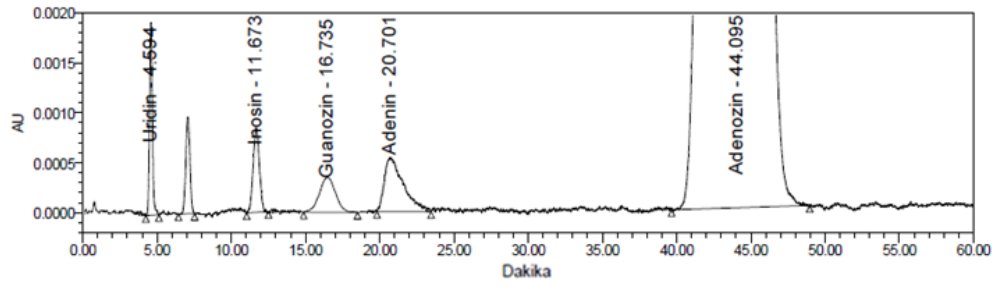
Saflık Grafiği



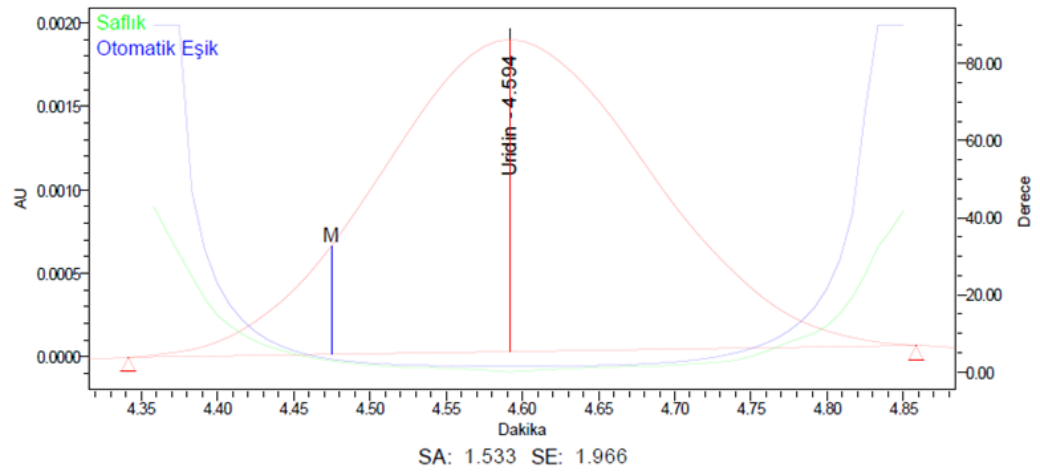


	Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşığı	Safılık_Kriteri
1	Uridin	4.592	24701	1902	2.004	2.495	Geçer
2	Inosin	11.687	23796	831	3.873	4.490	Geçer
3	Guanozin	16.743	35274	485	3.104	6.245	Geçer
4	Adenin	20.699	45421	530	6.336	7.014	Geçer
5	Adenozin	44.089	3391420	13537	0.250	0.411	Geçer

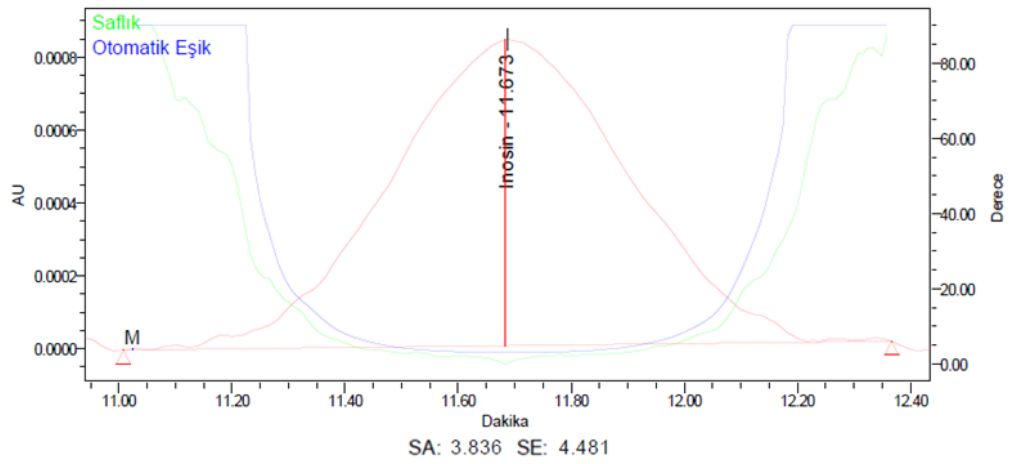
Şekil 4.11 Numune + limit konsantrasyonda impürite spike çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-1)

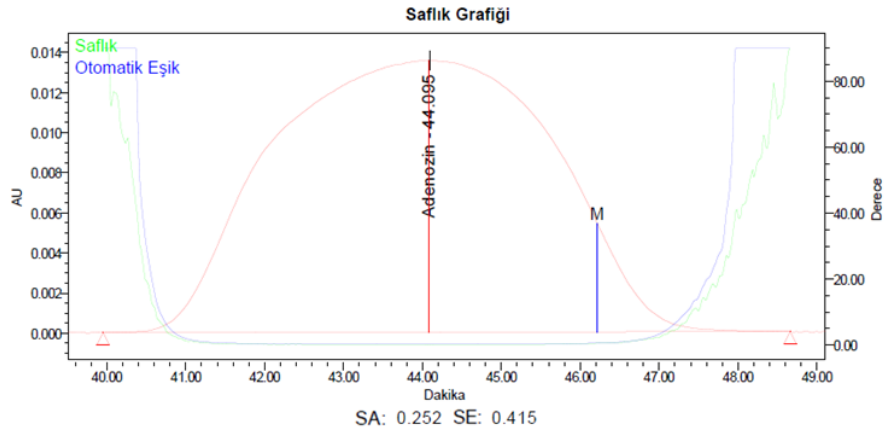
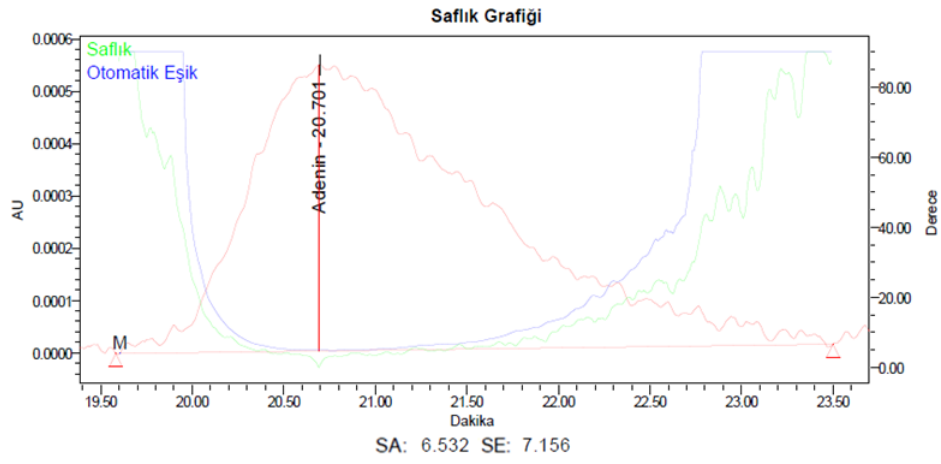
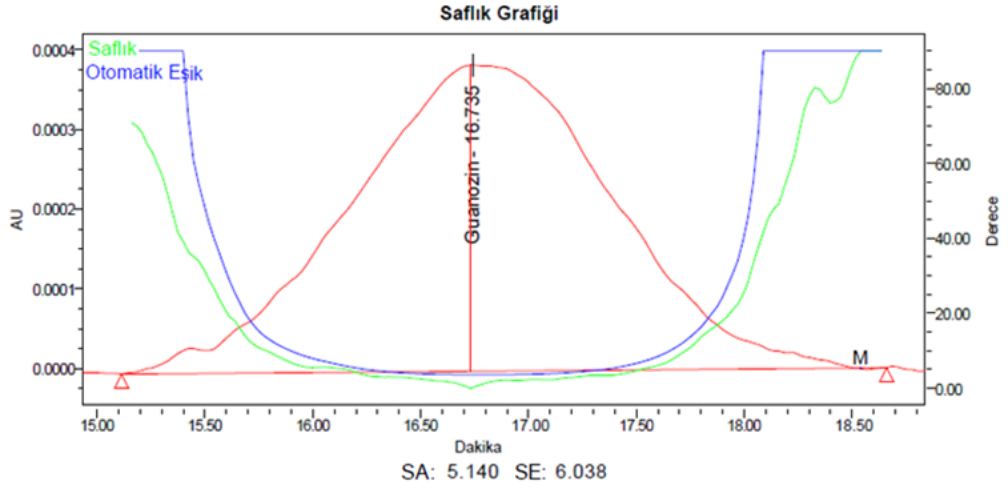


Safılık Grafiği



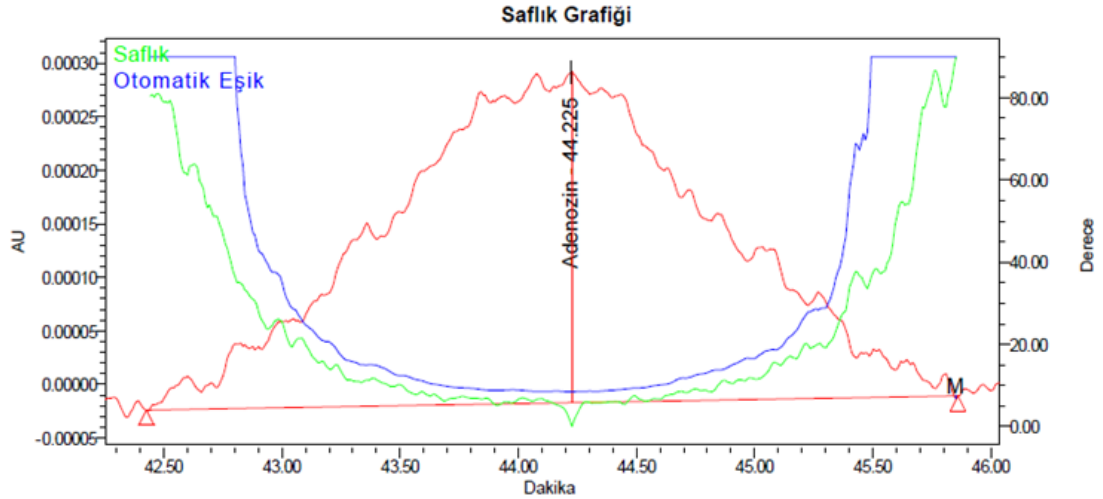
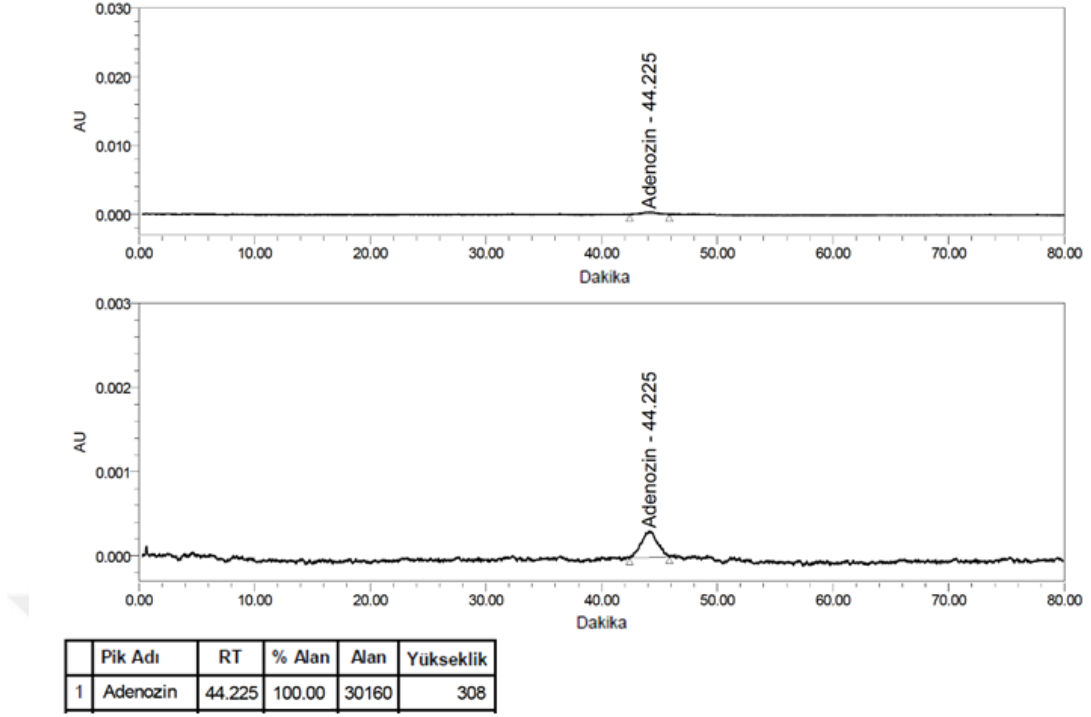
Safılık Grafiği





Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşığı	Safılık_Kriteri
1. Uridin	4.594	25749	1925	1.533	1.966	Geçer
2. İnosin	11.673	24845	845	3.836	4.481	Geçer
3. Guanozin	16.735	38134	421	5.140	6.038	Geçer
4. Adenin	20.701	47765	537	6.532	7.156	Geçer
5. Adenozin	44.095	3395663	13545	0.252	0.415	Geçer

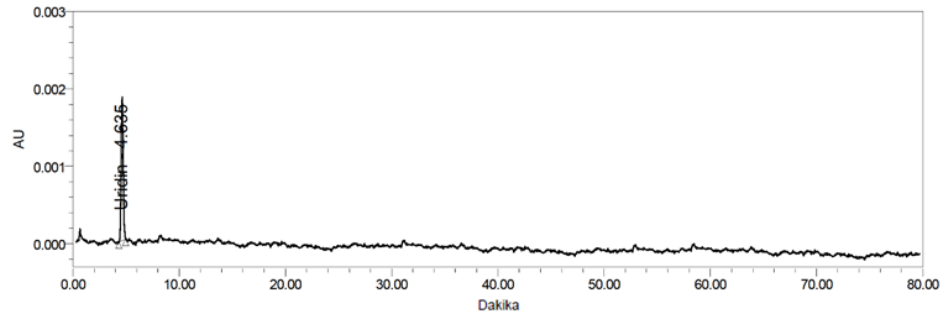
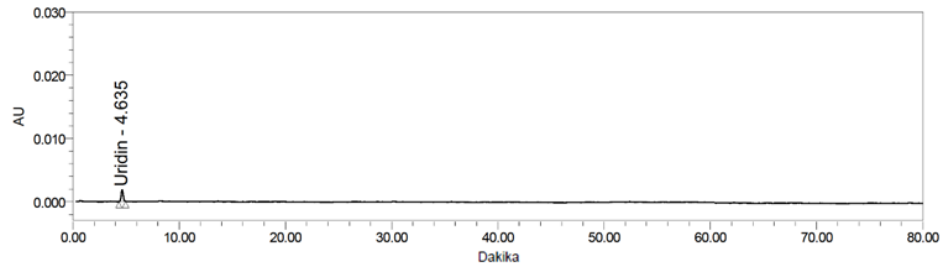
Şekil 4.12 Numune + limit konsantrasyonda impürite spike çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı (Formülasyon-2)



SA: 9.956 SE: 10.983

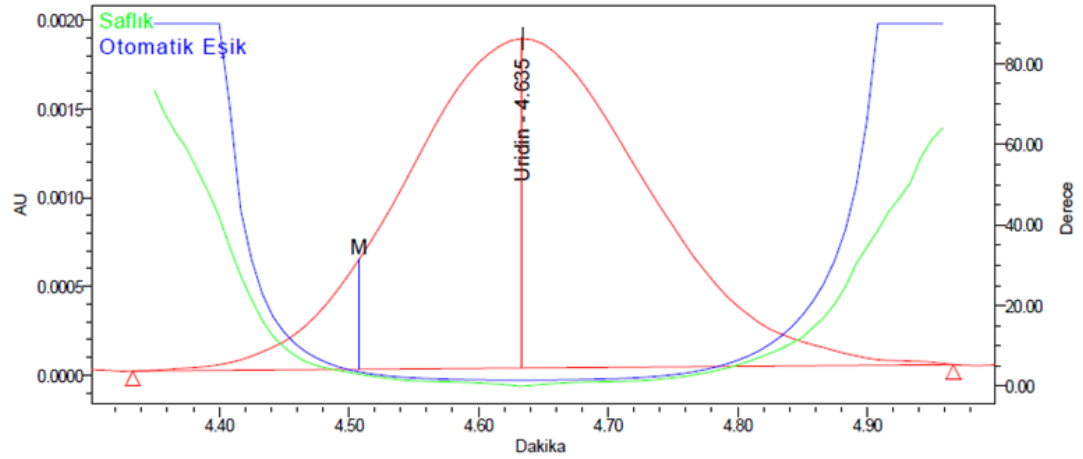
Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşığı	Safılık_Kriteri
1 Adenozin	44.225	30160	308	9.956	10.983	Geçer

Şekil 4.13 Adenozin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



Pik Adı	RT	% Alan	Alan	Yükseklik
1 Üridin	4.635	100.00	24378	1856

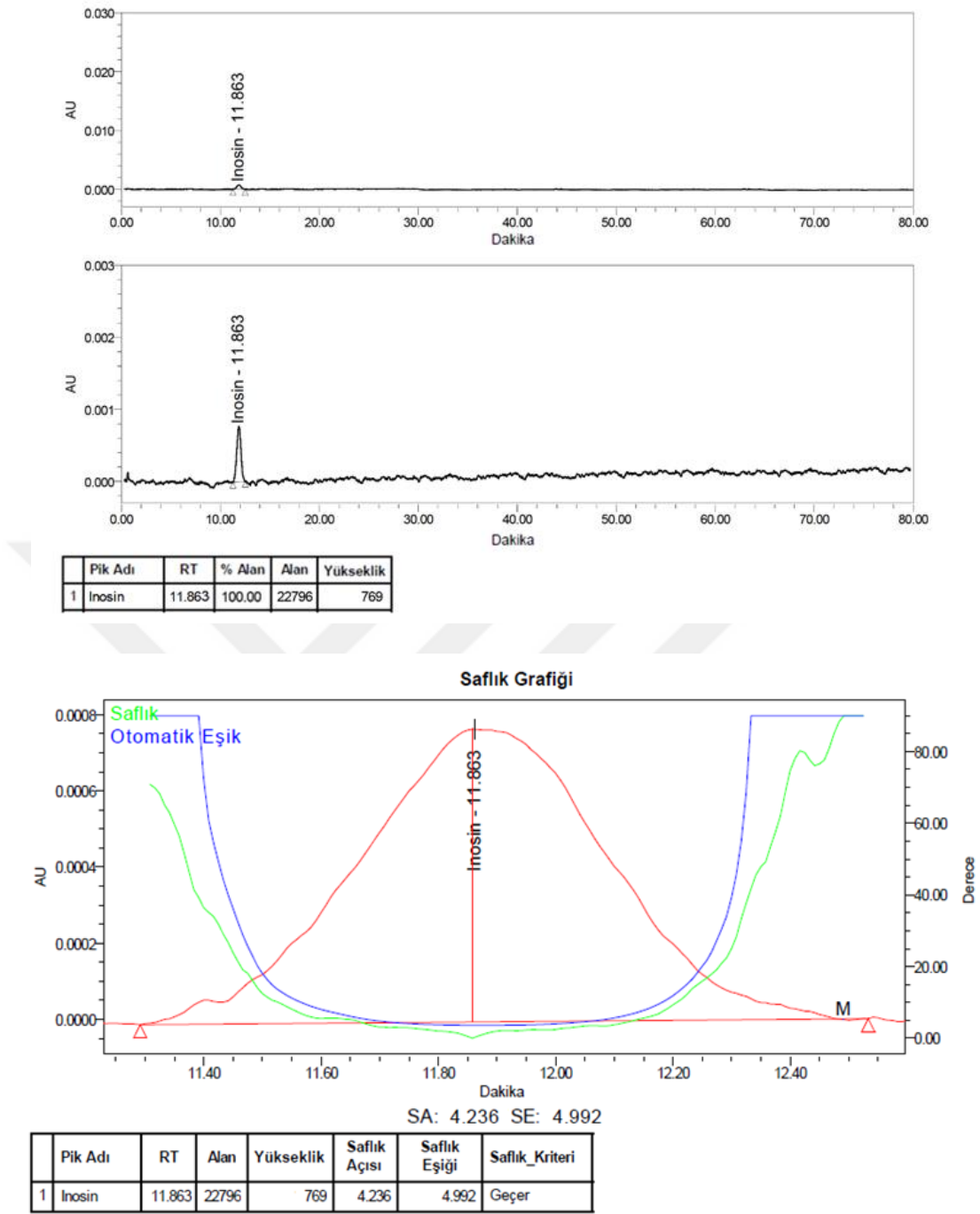
Safılık Grafiği



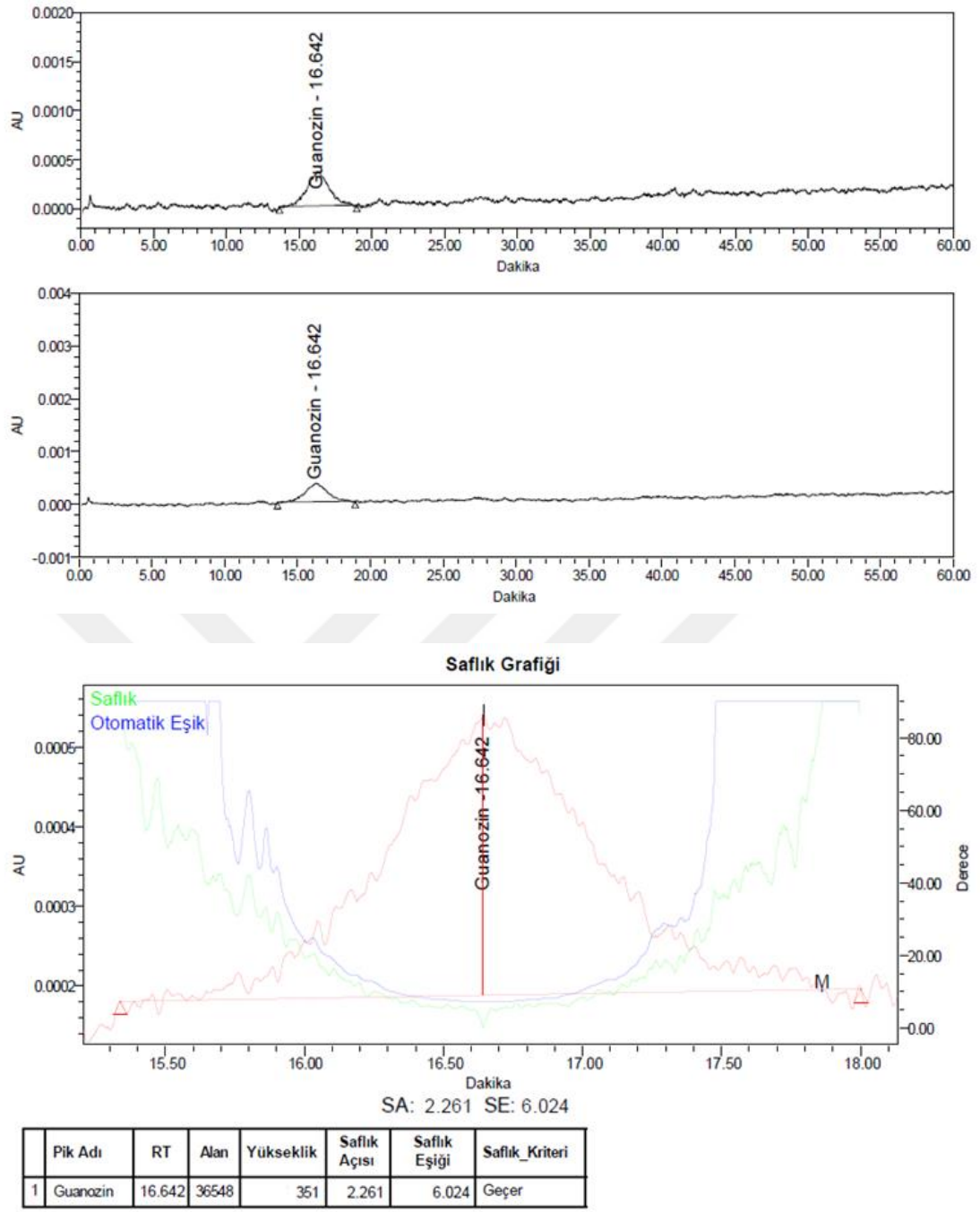
SA: 1.767 SE: 2.199

Pik Adı	RT	Alan	Yükseklik	Safılık Açısı	Safılık Eşiği	Safılık_Kriteri
1 Adenozin	4.635	24378	1856	1.767	2.199	Geçer

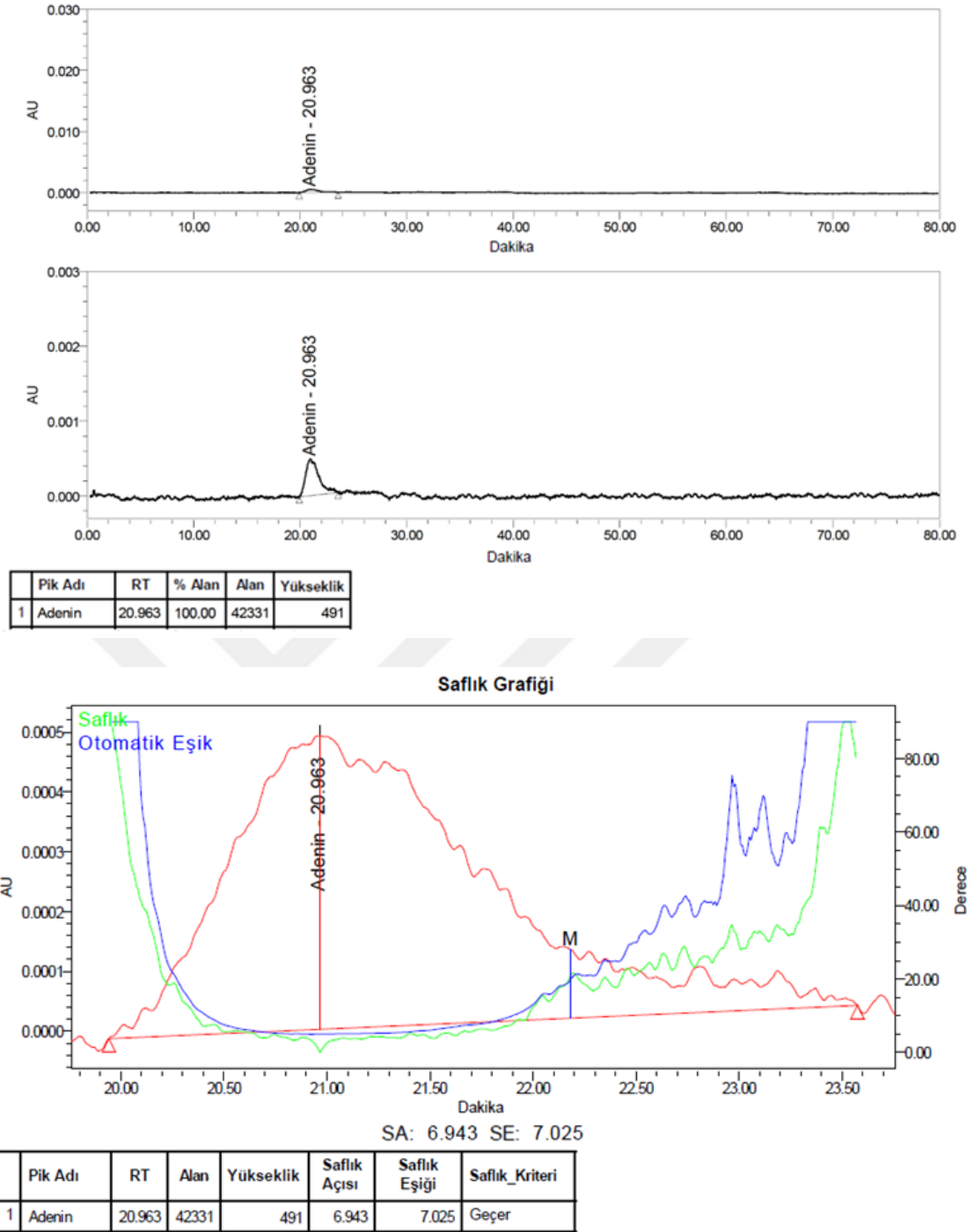
Şekil 4.14 Üridin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



Şekil 4.15 İnosin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



Şekil 4.16 Guanozin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı



Şekil 4.17 Adenin yer görme çözeltisi seçicilik kromatogramı ve pik saflığı

4.3.2.2 Sistem Uygunluk Parametresinin Kontrol Edilmesi

• Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Sistem uygunluk çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin CRS, 3,0 mg Üridin WS, 3,0 mg İnosin WS, 3,0 mg Guanozin WS ve 3,0 mg Adenin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave

edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı. 5,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltilti. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

Sistem Uygunluk Kriterleri ve Sonuçlar

- Sistem uygunluk çözeltisine ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Adenozin, Üridin, İnosin, Guanozin ve Adenin pik alanlarına ait %RSD değeri Adenozin için %1,5, Üridin için %0,6, İnosin için %1,1, Guanozin için %1,5 ve Adenin için %1,5 olarak hesaplandı ve <%2,0 kabul kriterini sağladı.
- Sistem uygunluk çözeltisine ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Adenozin, Üridin, İnosin, Guanozin ve Adenin piklerine ait teorik plaka sayılarının ortalama değerleri Adenozin için 6106, Üridin için 3948, İnosin için 4878, Guanozin için 2528 ve Adenin için 1280'dir. Teorik plaka sayılarına ait RSD değerleri sırasıyla Adenozin için %1,9, Üridin için %0,6, İnosin için %0,9, Guanozin için %1,7 ve Adenin için %1,9 olarak hesaplandı.
- Sistem uygunluk çözeltisine ait 6 ardışık enjeksiyondan elde edilen Adenozin, Üridin, İnosin, Guanozin ve Adenin piklerine ait ortalama simetri faktörü değerleri Adenozin için 1,0, Üridin için 1,0, İnosin için 1,0, Guanozin için 1,2 ve Adenin için 1,5 olarak hesaplandı ve 0,8-1,5 arasında olmalı kabul kriterini sağladı.
- Sistem uygunluk çözeltisinden elde edilen Adenozin, Üridin, İnosin, Guanozin ve Adenin pikleri arasındaki rezolüsyon Üridin-İnosin arasında 15,2, İnosin-Guanozin arasında 3,4, Guanozin-Adenin arasında 5,1 ve Adenin- Adenozin arasında 9,1 olarak hesaplanmıştır.

Sistem uygunluk parametresine ait sonuçlar **Tablo 4.6 - 4.8**'de ve **Şekil 4.18**'de verilmiştir.

Tablo 4.6 Üridin ve İnosin için sistem uygunluk sonuçları

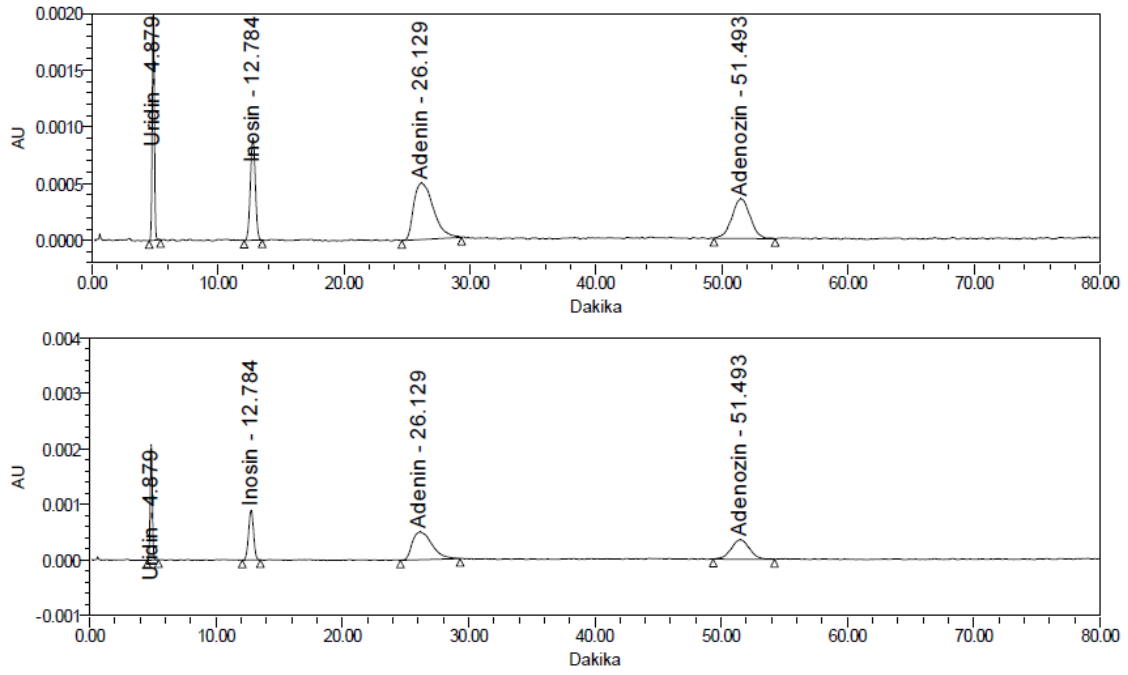
	Üridin			İnosin			
Enjeksiyon	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon (Üridin ile)
1	24613	3967	1,0	25204	4866	1,0	15,2
2	24746	3960	1,0	25316	4813	1,0	15,1
3	24465	3965	1,0	24656	4934	1,0	15,3
4	24500	3961	1,0	24694	4902	1,0	15,2
5	24658	3930	1,0	25052	4912	1,0	15,2
6	24870	3907	1,0	25023	4841	1,0	15,1
Ortalama	24642	3948	1,0	24991	4878	1,0	15,2
Standart Sapma	151,9	24,4	0,0	266,9	46,1	0,0	0,1
%RSD	0,6	0,6	0,0	1,1	0,9	0,0	0,5

Tablo 4.7 Guanozin ve Adenin için sistem uygunluk sonuçları

	Guanozin				Adenin			
Enjeksiyon	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon (İnosin ile)	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon (Guanozin ile)
1	33642	2507	1,2	3,4	54542	1301	1,5	5,1
2	32759	2428	1,2	3,3	55023	1250	1,5	4,9
3	33528	2471	1,2	3,4	53016	1262	1,5	5,0
4	33764	2460	1,2	3,4	53895	1312	1,5	5,0
5	34016	2549	1,2	3,3	54515	1282	1,6	5,2
6	32965	2454	1,2	3,3	53307	1270	1,5	5,1
Ortalama	33446	2528	1,2	3,4	54050	1280	1,5	5,1
Standart Sapma	484,7	81,5	0,0	0,1	781,1	23,6	0,0	0,1
%RSD	1,5	1,7	0,0	1,6	1,5	1,9	2,7	2,1

Tablo 4.8 Adenozin için sistem uygunluk sonuçları

	Adenozin			
	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon (Adenin ile)
Enjeksiyon				
1	35698	6058	0,9	9,1
2	34788	6328	1,0	9,1
3	34479	6094	1,0	9,1
4	35279	6070	1,0	9,2
5	34232	6100	1,0	9,1
6	34730	5987	1,0	9,1
Ortalama	34868	6106	1,0	9,1
Standart Sapma	536,5	116,0	0,0	0,0
%RSD	1,5	1,9	4,2	0,4



	Pik Adı	RT	% Alan	Alan	Yükseklik	EP Plaka Sayısı	Simetri Faktörü	Rezolüsyon
1	Uridin	4.879	14.23	24500	2081	3961	1.0	
2	Inosin	12.784	14.35	24694	897	4902	1.2	15.2
3	Guanozin	18.750	19.62	33764	279	2460	1.0	3.4
4	Adenin	26.129	31.31	53895	498	1312	1.5	5.0
5	Adenozin	51.493	20.50	35279	349	6070	1.0	9.2

Şekil 4.18 Sistem uygunluk parametresi kromatogramı

4.3.2.3 Doğrusallık

• Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanması

Stok Adenozin Çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Üridin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Üridin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok İnosin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg İnosin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Guanozin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Guanozin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Adenin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edildi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%140' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 7,0' şer ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%120' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 6,0' şar ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%100' lük doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 5,0' er ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%80' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 4,0' er ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%40' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 2,0' şer ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

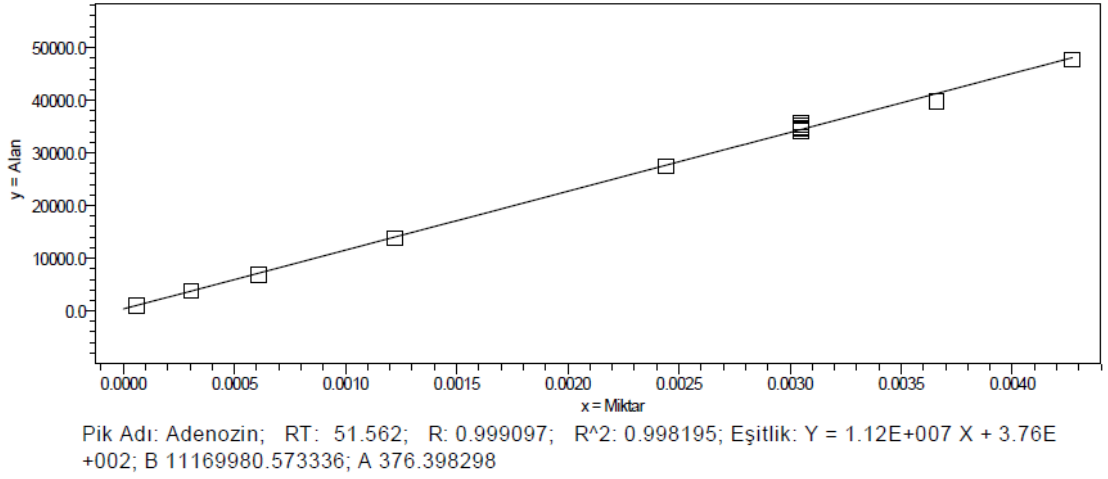
%20' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin, stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin herbirinden 1,0' er ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%10' luk doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: %20' lik doğrusallık çözeltisinin 5,0 ml' si 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

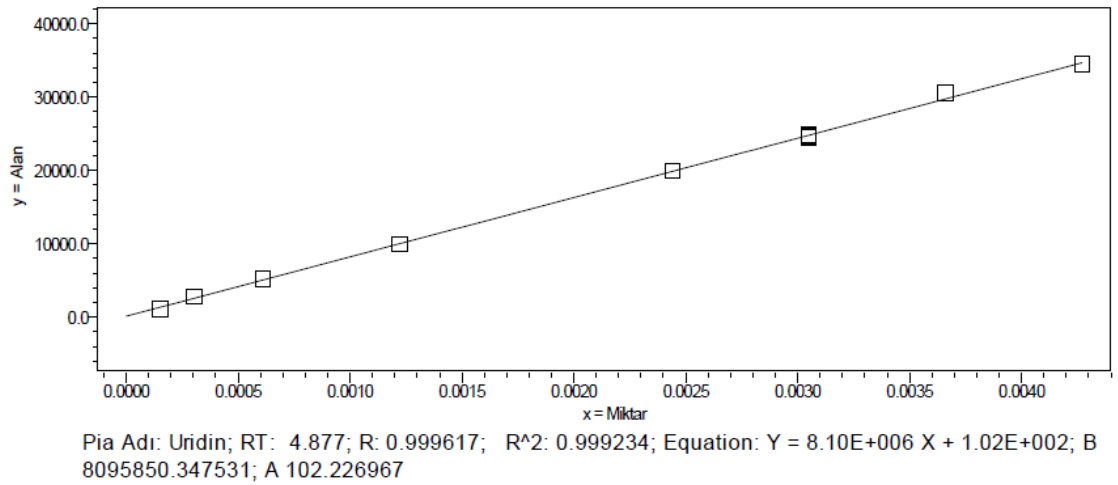
%5' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: %10' luk doğrusallık çözeltisinin 5,0 ml' si 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltilti. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

%2' lik doğrusallık çözeltisinin hazırlanması: %100' lük doğrusallık çözeltisinin 2,0 ml' si 100 ml' ye aynı çözücü ile seyreltilti. İyice karıştırıldı. Enjeksiyona hazır hale getirildi.

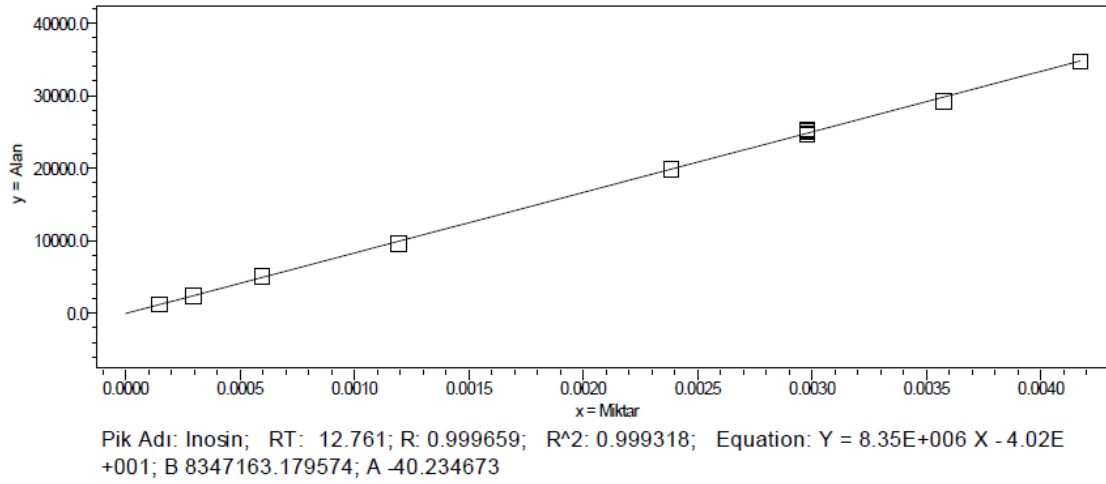
Hazırlanan çözeltilerden %100'lük doğrusallık çözeltisi 6 tekrarlı, diğer çözeltiler 3 tekrarlı okutuldu. Eğim, kesişim ve korelasyon katsayıları elde edildi. Tüm sonuçlar **Tablo 4.9 – Tablo 4.13** arasında ve kalibrasyon grafikleri **Şekil 4.19 – Şekil 4.23** arasında verilmiştir.



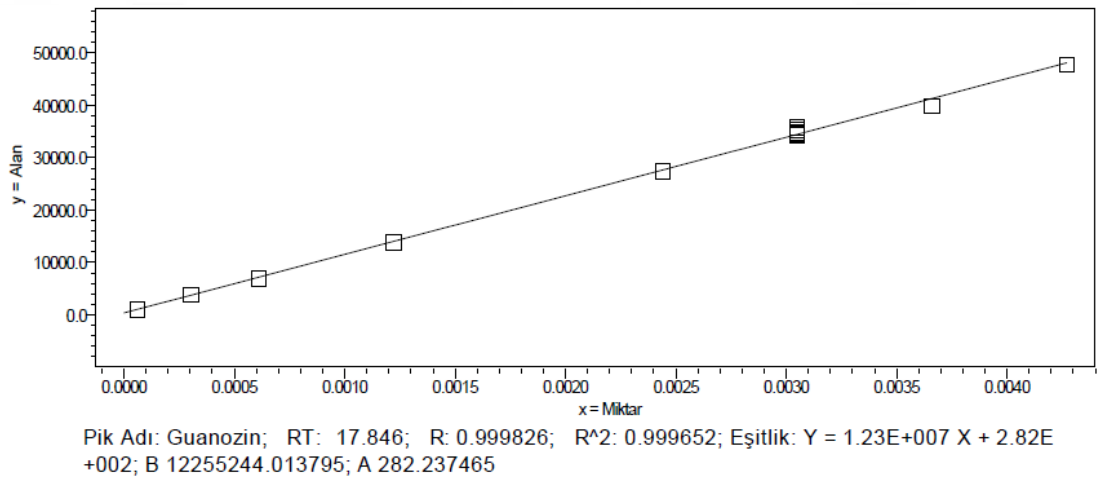
Şekil 4.19 Adenozin için kalibrasyon grafiği



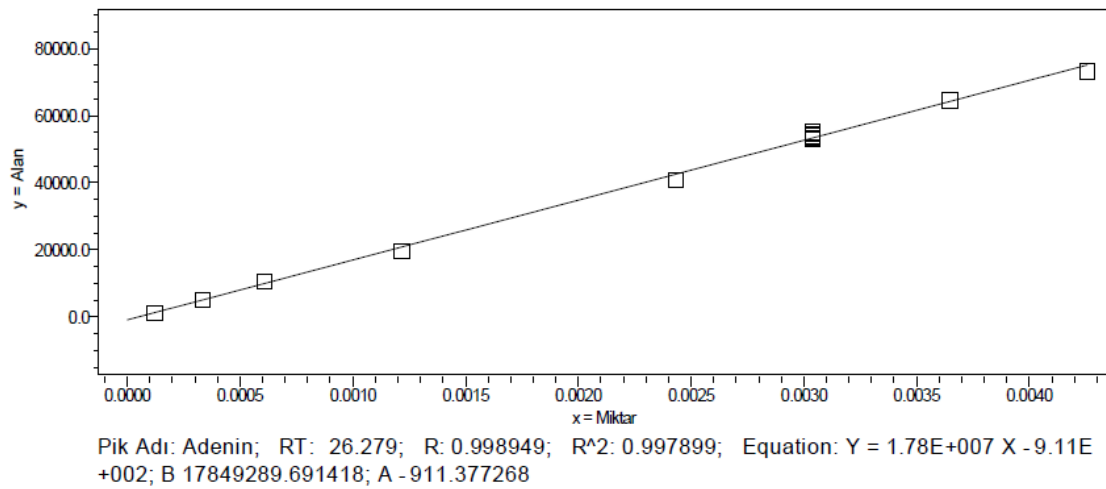
Şekil 4.20 Üridin için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.21 İnosin için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.22 Guanozin için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23 Adenin için kalibrasyon grafiği

Tablo 4.9 Adenozin için doğrusallık sonuçları

Çözelti Seviyesi	Konsantrasyon, mg/ml	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan
%2 (LOQ)	0,000061	945	1058
%10	0,000305	3849	3783
%20	0,000610	6872	7190
%40	0,001220	13858	14004
%80	0,002440	27424	27631
%100	0,003050	34868	34445
%120	0,003660	39787	41259
%140	0,004270	47723	48072
Eğim:		$1,12 \times 10^7$	
Kesişim:		$3,76 \times 10^2$	
Korelasyon katsayısı:		0,9991	
y = mx + n:		$1,12 \times 10^7 x + 3,76 \times 10^2$	

Tablo 4.10 Üridin için doğrusallık sonuçları

Çözelti Seviyesi	Konsantrasyon, mg/ml	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan
%5 (LOQ)	0,000153	1128	1341
%10	0,000305	2780	2571
%20	0,000610	5197	5041
%40	0,001220	9969	9979
%80	0,002440	19919	19856
%100	0,003050	24642	24795
%120	0,003660	30570	29733
%140	0,004270	34546	34672
Eğim:		8,10 x 10 ⁶	
Kesişim:		1,02 x 10 ²	
Korelasyon katsayısı:		0,9996	
y = mx + n:		8,10 x 10 ⁶ x + 1,02 x 10 ²	

Tablo 4.11 İnosin için doğrusallık sonuçları

Çözelti Seviyesi	Konsantrasyon, mg/ml	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan
%5 (LOQ)	0,000149	1215	1203
%10	0,000298	2364	2447
%20	0,000596	5051	4935
%40	0,001192	9614	9910
%80	0,002384	19850	19859
%100	0,002980	24991	24834
%120	0,003576	29205	29809
%140	0,004172	34709	34784
Eğim:		8,35 x 10 ⁶	
Kesişim:		-4,02 x 10 ¹	
Korelasyon katsayısı:		0,9997	
y = mx + n:		8,35 x 10 ⁶ x - 4,02 x 10 ¹	

Tablo 4.12 Guanozin için doğrusallık sonuçları

Çözelti Seviyesi	Konsantrasyon, mg/ml	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan
%5 (LOQ)	0,000126	1228	1826
%10	0,000342	4678	4474
%20	0,000622	8457	7905
%40	0,001244	15402	15528
%80	0,002488	31496	30773
%100	0,003110	33446	38396
%120	0,003732	45302	46019
%140	0,004354	54117	53642
Eğim:		1,23 x 10 ⁷	
Kesişim:		2,82 x 10 ²	
Korelasyon katsayısı:		0,9998	
y = mx + n:		1,23 x 10 ⁷ x + 2,82 x 10 ²	

Tablo 4.13 Adenin için doğrusallık sonuçları

Çözelti Seviyesi	Konsantrasyon, mg/ml	Ortalama Alan	Hesaplanan Alan
%5 (LOQ)	0,000122	1117	1266
%10	0,000334	4978	5050
%20	0,000608	10562	9941
%40	0,001216	19659	20793
%80	0,002432	40777	42498
%100	0,003040	54050	53350
%120	0,003648	64401	64203
%140	0,004256	73117	75055
Eğim:		$1,78 \times 10^7$	
Kesişim:		$-9,11 \times 10^2$	
Korelasyon katsayısı:		0,9989	
y = mx + n:		$1,78 \times 10^7 x - 9,11 \times 10^2$	

4.3.2.4 Doğruluk

- Hammadde için Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanması**

Bu çalışma her iki formülasyon içinde aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

Stok Adenozin Çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer hammadde hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar

seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%2'lik (LOQ) hammadde doğruluk çözeltisinin hazırlanması: Stok Adenozin çözeltisinin 1,0 ml' si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. İyice karıştırıldı. Bu çözeltinin 1,0 ml'si 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo ilave edildi ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%80'lik hammadde doğruluk çözeltisinin hazırlanması: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Adenozin çözeltisinin 0,8 ml' si ilave edildi ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%100' lük hammadde doğruluk çözeltisinin hazırlanması: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Adenozin çözeltisinin 1,0 ml' si ilave edildi ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%120' lik hammadde doğruluk çözeltisinin hazırlanması: 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer plasebo 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Adenozin çözeltisinin 1,2 ml' si ilave edildi ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

- **Üridin, İnosin, Guanozin ve Adenin için geri kazanım çözeltilerinin hazırlanması**

Bu çalışma her iki formülasyon içinde aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. Formülasyon-1 içerisinde %0,4 Adenin impüritesi bulunduğundan Formülasyon-1 için LOQ seviyesinde Adenin geri kazanımı yapılmamıştır.

Stok Üridin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Üridin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok İnosin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg İnosin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve

ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Guanozin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Guanozin WS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

Stok Adenin çözeltisi: Tartımı alınmış 3,0 mg Adenin CRS hassas bir şekilde 100 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine bir miktar seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

%5'lik (LOQ) Numune (Formülasyon-2) + limit konsantrasyonda spike impüriteler doğruluk çözeltisinin hazırlanması; Stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinin 2,5 ml'si 50 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 1,0 ml'si 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune ilave edildi ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı ve iyice karıştırıldı, enjeksiyona hazır hale getirildi.

%80'lik Numune + limit konsantrasyonda spike impüriteler doğruluk çözeltisinin hazırlanması; 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune hassas bir şekilde tartılarak 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinden 0,8' er ml dikkatlice aktarıldı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

%100' lük Numune + limit konsantrasyonda spike impüriteler doğruluk çözeltisinin hazırlanması; 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune hassas bir şekilde tartılarak 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinden 1,0' er ml dikkatlice aktarıldı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

%120' lik Numune + limit konsantrasyonda spike impüriteler doğruluk çözeltisinin hazırlanması; 3,0 mg Adenozin'e eşdeğer numune hassas bir şekilde tartılarak 10 ml' lik balon joje içerisine dikkatlice aktarıldı. Üzerine stok Üridin, stok İnosin, stok Guanozin ve stok Adenin çözeltilerinden 1,2' şer ml dikkatlice aktarıldı ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. İyice karıştırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi.

Doğruluk çözeltilerinin her biri 3'er tane hazırlandı ve 3 tekrarlı okuma yapıldı. Elde edilen tüm sonuçlar **Tablo 4.14 – Tablo 4.15** arasında verilmiştir.

Tablo 4.14 Formülasyon-1 için doğruluk sonuçları

	Bileşen	Geri Kazanım (n=3)				
		Eklenen Miktar (%)	Kons. (µg/mL)	Ortalama Geri Kazanım (%)	RSD (%)	%95 Güven Aralığı
Formülasyon-1	Adenozin	LOQ	0,06	99,90	1,31	99,90 ± 0,91
		80	2,43			
		100	3,04			
		120	3,65			
	Üridin	LOQ	0,15	102,57	2,64	102,57 ± 1,88
		80	2,45			
		100	3,06			
		120	3,67			
	İnosin	LOQ	0,15	101,24	1,33	101,24 ± 0,93
		80	2,39			
		100	2,99			
		120	3,59			
	Guanozin	LOQ	0,12	100,19	2,64	100,19± 1,83
		80	2,50			
		100	3,12			
		120	3,74			
	Adenin	80	2,50	104,00	4,04	104,00 ± 3,23
		100	3,12			
		120	3,74			

Tablo 4.15 Formülasyon-2 için doğruluk sonuçları

	Bileşen	Geri Kazanım (n=3)				
		Eklenen Miktar (%)	Conc. (µg/mL)	Eklenen Miktar (%)	RSD (%)	Eklenen Miktar (%)
Formülasyon-2	Adenozin	LOQ	0,06	99,81	0,89	99,81 ± 0,61
		80	2,43			
		100	3,04			
		120	3,65			
	Üridin	LOQ	0,15	100,11	1,16	100,11 ± 0,81
		80	2,45			
		100	3,06			
		120	3,67			
	İnosin	LOQ	0,15	99,80	0,89	99,80 ± 0,62
		80	2,39			
		100	2,99			
		120	3,59			
	Guanozin	LOQ	0,12	102,26	1,55	102,26± 0,94
		80	2,50			
		100	3,12			
		120	3,74			
	Adenin	LOQ	2,50	100,03	1,62	100,03 ± 1,12
		80	3,12			
		100	3,74			
		120	0,06			

4.3.2.5 Kesinlik

- **Cihaz Kesinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği**

Bölüm 4.3.2.3 Sistem Uygunluk Parametresinin Kontrol Edilmesi bölümünde anlatıldığı gibi sistem uygunluk çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti için 6 tekrarlı enjeksiyon yapıldı. Bu tekrarlardan elde edilen pik alanı ve pik alıkonma zamanları için Bağlı Standart Sapma (RSD) hesaplandı. Sonuçlar **Tablo 4.16 – Tablo 4.17** arasında verildi.

Tablo 4.16 Üridin, İnosin ve Guanozin için cihaz kesinliği sonuçları

Enjeksiyon	Üridin		İnosin		Guanozin	
	Alan	Alıkonma Zamanı	Alan	Alıkonma Zamanı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	24613	4,877	25204	12,761	33642	18,714
2	24746	4,882	25316	12,783	32759	18,744
3	24465	4,883	24656	12,789	33528	18,649
4	24500	4,879	24694	12,784	33764	18,750
5	24658	4,876	25052	12,766	34016	18,767
6	24870	4,874	25023	12,763	32965	18,754
Ortalama	24642	4,879	24991	12,774	33446	18,730
Standart Sapma	151,9	0,0	266,9	0,0	484,7	0,0
%RSD	0,6	0,1	1,1	0,1	1,5	0,2

Tablo 4.17 Adenin ve Adenozin için cihaz kesinliği sonuçları

Enjeksiyon	Adenin		Adenozin	
	Alan	Alıkonma Zamanı	Alan	Alıkonma Zamanı
1	54542	26,279	35698	51,562
2	55023	26,263	34788	51,584
3	53016	26,222	34479	51,613
4	53895	26,129	35279	51,493
5	54515	26,142	34232	51,443
6	53307	26,017	34730	51,331
Ortalama	54050	26,175	34868	51,504
Standart Sapma	781,1	0,1	536,5	0,1
%RSD	1,5	0,4	1,5	0,2

- **Metot Kesinliği**

Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi 6 adet %100' lük Numune + limit konsantrasyonda spike impüriteler çözeltisi hazırlandı. Her bir çözelti sisteme enjekte edildi. İnosin, Üridin, Guanozin ve Adenin için % geri kazanım hesaplandı. Limit konsantrasyonda ilave edilen bilinen impüritelerin sonuçları, bilinmeyen impürite sonuçları ve toplam impürite sonuçları için Bağıl Standart Sapma (RSD) hesaplandı ve sonuçların $RSD \leq 10\%$ kabul kriterini karşıladığı teyit edildi. Sonuçlar Formülasyon-1' e ait **Tablo 4.18'** de ve Formülasyon-2' e ait **Tablo 4.19'** da verilmiştir.

Tablo 4.18 Formülasyon-1 için metot kesinliği sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Üridin Geri Kazanım, %	İnosin Geri Kazanım, %	Guanozin Geri Kazanım, %	Adenin Geri Kazanım, %	Bilinmeyen İmpürite Sonuç, %	Toplam İmpürite Sonuç, %
1	1,006	0,984	1,012	0,984	TE*	3,986
2	0,994	0,957	0,995	0,996	TE	3,942
3	1,023	0,975	1,002	0,973	TE	3,973
4	1,018	0,993	1,009	0,979	TE	3,999
5	1,001	0,960	0,983	0,985	TE	3,929
6	1,025	0,989	0,998	0,996	TE	4,008
Ortalama, %	1,011	0,976	1,000	0,986	0,000	3,973
SD	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,03
%RSD	1,25	1,55	1,05	0,93	0,00	0,79

*TE = Tespit Edilmedi.

Tablo 4.19 Formülasyon-2 için metot kesinliği sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Üridin Geri Kazanım, %	İnosin Geri Kazanım, %	Guanozin Geri Kazanım, %	Adenin Geri Kazanım, %	Bilinmeyen İmpürite Sonuç, %	Toplam İmpürite Sonuç, %
1	0,993	1,001	1,024	0,966	TE	3,984
2	0,987	0,973	1,019	0,990	TE	3,969
3	1,011	0,984	0,996	1,013	TE	4,004
4	1,005	1,016	0,981	1,021	TE	4,023
5	0,996	0,993	0,974	1,005	TE	3,968
6	1,010	0,988	1,007	0,982	TE	3,987
Ortalama, %	1,000	0,993	1,000	0,996	0,000	3,989
SD	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00	0,02
%RSD	0,98	1,49	2,02	2,07	0,00	0,53

- **Ara Kesinlik**

Ara kesinlik, Metot kesinliği bölümünde anlatıldığı gibi 6 adet numune farklı bir günde, farklı bir analist tarafından, farklı bir cihazda çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Limit konsantrasyonda ilave edilen bilinen impüritelerin sonuçları, bilinmeyen impürite sonuçları ve toplam impürite sonuçları için Bağıl Standart Sapma (RSD) hesaplandı. Analiz 1 ve cihaz 1’den elde edilen sonuçların Bağıl standart Sapma değeri, Analiz 2 ve cihaz 2’den elde edilen sonuçların kendi içindeki Bağıl Standart Sapma değeri ve 12 analiz sonucunun RSD değerlerinin kabul kriteri olan %10,0’dan küçük olduğu Formülasyon-1 için **Tablo 4.20 – Tablo 4.25** arasında ve Formülasyon-2 için **Tablo 4.26 - Tablo 4.31** arasında verilmiştir.

Tablo 4.20 Formülasyon-1 Üridin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	0,993	1,017
Çözelti 2	0,987	1,017
Çözelti 3	1,011	1,019
Çözelti 4	1,005	1,005
Çözelti 5	0,996	1,002
Çözelti 6	1,010	0,986
Ortalama, %	1,000	1,008
% Bağlı std. sapma	0,98	1,26
12 Analiz sonucunun %RSD	1,21	
%95 Güven aralığı sınırları	1,00 – 1,02	

Tablo 4.21 Formülasyon-1 İnosin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	0,984	0,995
Çözelti 2	0,957	0,983
Çözelti 3	0,975	0,990
Çözelti 4	0,993	0,982
Çözelti 5	0,960	1,002
Çözelti 6	0,989	0,997
Ortalama, %	0,976	0,992
% Bağlı std. sapma	1,55	0,80
12 Analiz sonucunun %RSD	1,42	
%95 Güven aralığı sınırları	0,98 – 0,99	

Tablo 4.22 Formülasyon-1 Guanozin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	1,012	0,977
Çözelti 2	0,995	0,993
Çözelti 3	1,002	1,011
Çözelti 4	1,009	1,001
Çözelti 5	0,983	0,999
Çözelti 6	0,998	1,005
Ortalama, %	1,000	0,998
% Bağlı std. sapma	1,05	1,18
12 Analiz sonucunun %RSD	1,07	
%95 Güven aralığı sınırları	0,99 – 1,01	

Tablo 4.23 Formülasyon-1 Adenin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	0,984	0,988
Çözelti 2	0,996	0,999
Çözelti 3	0,973	0,993
Çözelti 4	0,979	0,972
Çözelti 5	0,985	0,988
Çözelti 6	0,996	0,972
Ortalama, %	0,986	0,985
% Bağlı std. sapma	0,93	1,13
12 Analiz sonucunun %RSD	0,99	
%95 Güven aralığı sınırları	0,98 – 0,99	

Tablo 4.24 Formülasyon-1 bilinmeyen impürite için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	TE	TE
Çözelti 2	TE	TE
Çözelti 3	TE	TE
Çözelti 4	TE	TE
Çözelti 5	TE	TE
Çözelti 6	TE	TE
Ortalama, %	0,000	0.000
% Bağlı std. sapma	0,00	0.00
12 Analiz sonucunun %RSD	0,00	
%95 Güven aralığı sınırları	0,00 – 0,00	

Tablo 4.25 Formülasyon-1 toplam impürite için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	3,986	3,977
Çözelti 2	3,942	3,992
Çözelti 3	3,973	4,013
Çözelti 4	3,999	3,960
Çözelti 5	3,929	3,991
Çözelti 6	4,008	3,960
Ortalama, %	3,973	3,982
% Bağlı std. sapma	0,79	0,52
12 Analiz sonucunun %RSD	0,65	
%95 Güven aralığı sınırları	3,96 – 3,99	

Tablo 4.26 Formülasyon-2 Üridin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	0,993	0,981
Çözelti 2	0,987	1,016
Çözelti 3	1,011	1,034
Çözelti 4	1,005	1,005
Çözelti 5	0,996	0,996
Çözelti 6	1,010	0,987
Ortalama, %	1,000	1,003
% Bağlı std. sapma	0,98	1,95
12 Analiz sonucunun %RSD	1,48	
%95 Güven aralığı sınırları	0,99 – 1,01	

Tablo 4.27 Formülasyon-2 İnosin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	1,001	0,969
Çözelti 2	0,973	0,976
Çözelti 3	0,984	0,984
Çözelti 4	1,016	0,973
Çözelti 5	0,993	0,980
Çözelti 6	0,988	0,996
Ortalama, %	0,993	0,980
% Bağlı std. sapma	1,49	0,98
12 Analiz sonucunun %RSD	1,38	
%95 Güven aralığı sınırları	0,98 – 0,99	

Tablo 4.28 Formülasyon-2 Guanozin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	1,024	1,016
Çözelti 2	1,019	1,008
Çözelti 3	0,996	1,005
Çözelti 4	0,981	0,994
Çözelti 5	0,974	0,989
Çözelti 6	1,007	0,991
Ortalama, %	1,000	1,001
% Bağlı std. sapma	2,02	1.08
12 Analiz sonucunun %RSD	1,54	
%95 Güven aralığı sınırları	0,99 – 1,01	

Tablo 4.29 Formülasyon-2 Adenin için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	0,966	1,013
Çözelti 2	0,990	0,992
Çözelti 3	1,013	0,996
Çözelti 4	1,021	1,006
Çözelti 5	1,005	1,001
Çözelti 6	0,982	0,997
Ortalama, %	0,996	1,001
% Bağlı std. sapma	2,07	0,76
12 Analiz sonucunun %RSD	1,50	
%95 Güven aralığı sınırları	0,99 – 1,01	

Tablo 4.30 Formülasyon-2 bilinmeyen impürite için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	TE	TE
Çözelti 2	TE	TE
Çözelti 3	TE	TE
Çözelti 4	TE	TE
Çözelti 5	TE	TE
Çözelti 6	TE	TE
Ortalama, %	0,000	0.000
% Bağlı std. sapma	0,00	0.00
12 Analiz sonucunun %RSD	0,00	
%95 Güven aralığı sınırları	0,00 – 0,00	

Tablo 4.31 Formülasyon-2 toplam impürite için ara kesinlik sonuçları

	Analizci 1 1.Cihaz (%)	Analizci 2 2.Cihaz (%)
Çözelti 1	3,984	3,979
Çözelti 2	3,969	3,992
Çözelti 3	4,004	4,019
Çözelti 4	4,023	3,978
Çözelti 5	3,968	3,966
Çözelti 6	3,987	3,971
Ortalama, %	3,989	3,984
% Bağlı std. sapma	0,53	0,48
12 Analiz sonucunun %RSD	0,49	
%95 Güven aralığı sınırları	3,97 – 4,00	

4.3.2.6 Teşhis ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Bölüm 4.3.2.4’de belirtildiği şekilde %100’ lük doğrusallık çözeltisi hazırlandı. Empower yazılımı ile her bir pik için s/n (signal to noise) oranı belirlendi. s/n değeri LOD için 3 ve LOQ için 10 olacak şekilde uygun seyreltmeler yapıldı. Adenozin ve bilinen impüriteler için LOD ve LOQ s/n değerleri ve konsantrasyonları **Tablo 4.32**’de verilmiştir.

Tablo 4.32 LOD ve LOQ sonuçları

Bileşen	LOD		LOQ		S/N	
	µg/ml	%	µg/ml	%	LOD	LOQ
Adenozin	0,018	0,006	0,06	0,02	3,38	8,33
Üridin	0,031	0,010	0,15	0,05	3,65	10,70
İnosin	0,075	0,025	0,15	0,05	3,07	10,15
Guanozin	0,038	0,013	0,13	0,04	3,19	10,06
Adenin	0,037	0,012	0,12	0,04	3,85	10,85

4.3.2.7 Sağlamlık

Sağlamlık parametresi 2 alt başlık şeklinde incelenmiştir.

- **Çözelti Stabilesi**

Bölüm 4.3.2.4’de belirtildiği şekilde %100’ lük doğrusallık çözeltisi ve Bölüm 4.3.2.5 Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi %100’ lük Numune + limit konsantrasyonda spike impüriteler çözeltisi (her iki formülasyon içinde) hazırlandı. Bu çözeltiler oda sıcaklığında ve buzdolabı sıcaklığında; başlangıçta, 6 saat sonra, 24 saat sonra ve 48 saat sonra analiz edildi. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslandı ve aşağıdaki formüle göre % değişim hesaplandı.

$$\% \text{ Değişim} = ((D_i - D_t)) / D_i \times 100 \quad (4.3)$$

Dt: Herhangi bir t anında bulunan değer

Di: Başlangıçta bulunan değer

Çözeltilerin stabilite süresinin belirlenmesi için başlangıç değerinden değişimin %10,0’dan düşük olması kabul kriteri olarak belirlenmiştir. Standart çözeltisi için **Tablo 4.33**’te ve Formülasyon-1 ile Formülasyon-2 için **Tablo 4.34** ile **Tablo 4.35**’te stabilite sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.33 Standart çözeltisi için çözelti stabilitesi sonuçları

5°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	24709	24930	0,89	24691	0,07	24685	0,10
İnosin	25287	24954	1,32	25471	0,73	24740	2,16
Güanozin	32864	33015	0,46	32649	0,65	31976	2,70
Adenin	51568	53191	3,15	54804	6,28	53438	3,63
Adenozin	33581	35535	5,82	35525	5,79	33447	0,40
25°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	24709	24819	0,45	24681	0,11	24962	1,02
İnosin	25287	25316	0,12	25633	1,37	24919	1,46
Güanozin	32864	32966	0,31	31990	2,66	31865	3,04
Adenin	51568	52561	1,93	53440	3,63	54110	4,93
Adenozin	33581	33926	1,03	33653	0,21	33856	0,82

Tablo 4.34 Formülasyon-1 için çözelti stabilitesi sonuçları

5°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	24832	25119	1,16	25271	1,77	24795	0,15
İnosin	25934	25512	1,63	25305	2,43	25500	1,67
Guanozin	31649	32027	1,19	31816	0,53	30907	2,34
Adenin	53212	55210	3,75	55875	5,00	55525	4,35
Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	0,00	TE	0,00	TE	0,00
Toplam İmpürite	135627	137868	1,65	138267	1,95	136727	0,81
25°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	24832	24664	0,68	24893	0,25	25012	0,72
İnosin	25934	26583	2,50	25590	1,33	25740	0,75
Guanozin	31649	32375	2,29	32409	2,40	31016	2,00
Adenin	53212	54660	2,72	54614	2,63	55262	3,85
Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	0,00	TE	0,00	TE	0,00
Toplam İmpürite	135627	138282	1,96	137506	1,39	137030	1,03

Tablo 4.35 Formülasyon-2 için çözelti stabilitesi sonuçları

5°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	25031	24883	0,59	25182	0,60	24381	2,60
İnosin	25659	25908	0,97	25414	0,95	25340	1,24
Guanozin	32487	31996	1,51	32770	0,87	31562	2,85
Adenin	52745	54867	4,02	53924	2,24	55155	4,57
Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	0,00	TE	0,00	TE	0,00
Toplam İmpürite	135922	137654	1,27	137290	1,01	136438	0,38
25°C	Başlangıç	6. Saat	1% Değişim	24. Saat	1% Değişim	48. Saat	1% Değişim
Üridin	25031	24980	0,20	25207	0,70	25449	1,67
İnosin	25659	25309	1,36	26018	1,40	24776	3,44
Guanozin	32487	32660	0,53	31934	1,70	33041	1,71
Adenin	52745	52067	1,29	53001	0,49	52280	0,88
Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	0,00	TE	0,00	TE	0,00
Toplam İmpürite	135922	135016	0,67	136160	0,18	135546	0,28

- **Metot Dayanıklılık**

Bölüm 4.3.2.4'de belirtildiği şekilde %100' lük doğrusallık çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti metota özel kritik parametrelerden 3 tanesi değiştirilerek analiz edildi. Bu parametreler; dalga boyu ± 2 nm değişimi, farklı lot numaralı kolon ve kolon sıcaklığı $\pm 2^\circ\text{C}$ olarak belirlendi. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslandı ve aşağıdaki formüle göre % değişim hesaplandı.

$$\% \text{ Değişim} = ((D_i - D_t)) / D_i \times 100 \quad (4.4)$$

D_t : Herhangi bir t anında bulunan değer

D_i : Başlangıçta bulunan değer

Metot parametre değişimine karşı dayanıklılık sonuçları **Tablo 4.36 - Tablo 4.38** arasında verilmiştir.

Tablo 4.36 Dalgaboyu değişimi sonuçları

	Başlangıç (254 nm)	Değişim Sonrası (252 nm)	% Değişim 	Değişim Sonrası (256 nm)	% Değişim
Üridin	24709	22555	8,72	26089	5,59
İnosin	25141	27963	11,22	21951	12,69
Guanozin	32864	34856	6,06	28744	12,54
Adenin	51161	48769	4,68	56844	11,11
Adenozin	33581	33247	0,99	36945	10,02

Tablo 4.37 Kolon sıcaklığı değişimi sonuçları

	Başlangıç (25°C)	Değişim Sonrası (23°C)	% Değişim 	Değişim Sonrası (27°C)	% Değişim
Üridin	24709	24819	0,45	24527	0,74
İnosin	25141	24397	2,96	25715	2,28
Güanozin	32864	33651	2,39	31699	3,54
Adenin	51161	52448	2,52	54193	5,93
Adenozin	33581	34505	2,75	33089	1,47

Tablo 4.38 Farklı lot numaralı kolon sonuçları

	Başlangıç Kolonu	Farklı Kolon	% Değişim
Üridin	24709	24649	0,24
İnosin	25141	24502	2,54
Güanozin	32864	32503	1,10
Adenin	51161	50837	0,63
Adenozin	33581	35425	5,49

4.4 Stres Çalışması

4.4.1 Bozunma Ürünleri Tespit Çalışması Koşulları

Adenozin molekülünün iç stabilitesini belirlemek, bozunma yollarını saptamak ve kullanılan analitik yöntemin stabilitesini göstermek için ICH Q1A ve Q1B yönergelerine uygun olarak stres testi yapıldı (67, 68). Bunun için aktif maddenin bozunma çalışmaları asit (1N HCl, 25°C’de 4 gün, 60°C’de 3 gün), baz (5N NaOH, 25°C’de 4 gün, 60°C’de 3 gün), oksidasyon (%30 H₂O₂, sadece 25°C’de 3 gün), ısı (60°C’de 1 hafta) ve fotostabilite (soğuk beyaz floresan ve ultraviyoleye yakın lamba ile 2 hafta) koşullarında gerçekleştirildi. Aynı bozunma koşulları altında, her etkin maddenin bozunma ürünleri aynı analitik yöntemle kontrol edildi ve piklerin saflığı bir PDA detektörü yardımıyla kontrol edildi.

Adenozin Aktif Madde:

İşlem görmemiş Adenozin hammaddesi metota göre analiz edildi.

1N HCl: Yaklaşık 10 ml saf su 100 ml’lik balon joje içerisine alındı ve üzerine yaklaşık 8,3 ml %37’lik HCl eklendi, karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

1N NaOH: 4,0 g NaOH 100 ml’lik balon joje içerisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözelti sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin hammaddesi 50 ml’ lik balon jojeye tartıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml 1N HCl çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml’si 10 ml’ lik balon jojeye alındı, üzerine 0,2 ml 1N NaOH çözeltisi eklendi, seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine seyreltildi ve karıştırıldı. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml’si atıldıktan sonra vial e alındı.

5N NaOH: 20,0 g NaOH 100 ml’lik balon joje içerisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözeltinin sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

5N HCl: Yaklaşık 50 ml su 100 ml’lik balon joje içerisine alındı ve üzerine yaklaşık 41,5 ml %37’lik HCl eklendi ve karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin hammaddesi 50 ml' lik balon jojeye tartıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml 5N NaOH çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml'si 10 ml balon jojeye alındı, üzerine 0,2 ml 5N HCl çözeltisi eklendi, seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine seyreltildi. Son çözelti 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra viale alındı.

%30 H₂O₂: %30'luk H₂O₂ R kullanıldı.

%30 TBAH: %40 TBAH reaktifinden 75,0 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin hammaddesi 50 ml' lik balon jojeye tartıldı, üzerine 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml %30'luk H₂O₂ çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml alınarak 10 ml balon jojeye aktarıldı, üzerine 0,2 ml %30 TBAH çözeltisi eklendi, seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine seyreltildi. Son çözelti 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra viale alındı.

Isı

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin hammaddesi 100 ml' lik balon jojeye tartıldı, üzerine 70,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra viale alındı.

Işık

Bir miktar Adenozin hammaddesi yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Yaklaşık 30,0 mg Adenozin hammaddesi 100 ml balon jodede tartıldı, 40,0 ml seyreltme çözelti eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Son çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra viale alındı.

Plasebo Çözeltisi:

İşlem görmemiş plasebo metota göre analiz edildi.

1N HCl: Yaklaşık 10 ml saf su 100 ml'lik balon joje içerisine alındı ve üzerine yaklaşık 8,3 ml %37'lik HCl eklendi, karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

1N NaOH: 4,0 g NaOH 100 ml'lik balon joje içerisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözelti sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer plasebo 50 ml balon joje içerisine aktarıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml 1N HCl çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml'si üzerine 0,2 ml 1N NaOH çözeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vialle alındı.

5N NaOH: 20,0 g NaOH 100 ml'lik balon joje içerisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözeltinin sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

5N HCl: Yaklaşık 50 ml su 100 ml'lik balon joje içerisine alındı ve üzerine yaklaşık 41,5 ml %37'lik HCl eklendi ve karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer plasebo 50 ml balon joje içerisine aktarıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml 5N NaOH çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda bu çözeltinin 5,0 ml' si üzerine 0,2 ml 5N HCl çözeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vialle alındı.

%30 H₂O₂: %30'luk H₂O₂ R kullanıldı.

%30 TBAH: %40 TBAH reaktifinden 75,0 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer plasebo 50 ml' lik balon jojeye tartıldı, üzerine 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml %30'luk H₂O₂ çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen

sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml' si üzerine 0,2 ml %30 TBAH çözeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

Isı

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer plasebo 100 ml' lik balon j o j e y e tartılır, üzerine 70,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

Işık

Bir miktar plasebo yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletilir. Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer plasebo 100 ml balon jo j e içine tartıldı. 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Son çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

Numune Çözeltisi:

İşlem görmemiş numune metota göre analiz edildi.

1N HCl: Yaklaşık 10 ml saf su 100 ml'lik balon jo j e iç erisine alındı ve üzerine yaklaşık 8,3 ml %37'lik HCl eklendi, karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

1N NaOH: 4,0 g NaOH 100 ml'lik balon jo j e iç erisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözelti sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30.0 mg Adenozin' eşdeğer numune 50 ml balon jo j e iç erisine aktarıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Üzerine 2,0 ml 1N HCl çözeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu çözelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml'si üzerine 0,2 ml 1N NaOH çözeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

5N NaOH: 20,0 g NaOH 100 ml'lik balon joje içerisine tartıldı ve bir miktar saf su ile çözüldü, çözeltinin sıcaklığı oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hacmine saf su ile tamamlandı.

5N HCl: Yaklaşık 50 ml su 100 ml'lik balon joje içerisine alındı ve üzerine yaklaşık 41,5 ml %37'lik HCl eklendi ve karıştırıldı ve daha sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer numune 50 ml balon joje içerisine aktarıldı, 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. zerine 2,0 ml 5N NaOH zeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu zelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda bu çözeltinin 5,0 ml' si üzerine 0,2 ml 5N HCl zeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

%30 H₂O₂: %30'luk H₂O₂ R kullanıldı.

%30 TBAH: %40 TBAH reaktifinden 75,0 ml alınarak 100 ml'lik balon jojeye aktarıldı. Hacmine saf su ile tamamlandı.

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer numune 50 ml' lik balon jojeye tartıldı, üzerine 40,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. zerine 2,0 ml %30'luk H₂O₂ zeltisi eklendi ve seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Bu zelti yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. Süre sonunda 5,0 ml' si üzerine 0,2 ml %30 TBAH zeltisi eklenerek 10 ml' ye aynı çözücü ile seyreltildi. 0,45 µm PTFE filtre yardımıyla süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

Isı

Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer numune 100 ml' lik balon jojeye tartılır, üzerine 70,0 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme zeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletildi. 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra vial e alındı.

Işık

Bir miktar numune yukarıda belirtilen stres koşullarında ve belirtilen sürelerde bekletilir. Yaklaşık 30,0 mg Adenozin' eşdeğer numune 100 ml balon joje içine tartıldı. 40,0 ml

seyreltme çözeltisi eklendi. Ultrasonik banyo yardımıyla çözünmesi sağlandı. Seyreltme çözeltisi ilave edilerek hacmine tamamlandı. Son çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 2,0 ml'si atıldıktan sonra viale alındı.

4.4.2 Stres Testi Sonuçları

Tablo 4.39 25°C asit degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
1N HCl (25°C) 4 gün	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Guanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	14,84	15,25
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	TE
	Toplam İmpürite	0.00	14,84	15,25

Tablo 4.40 60°C asit degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
1N HCl (60°C) 3 gün	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Guanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	28,62	31,89
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	0,20	0,05
	Toplam İmpürite	0.00	28,82	31,94

Tablo 4.41 25°C baz degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
5N NaOH (25°C) 4 gün	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Güanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	0,13	0,15
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	0,14	0,05
	Toplam İmpürite	0,00	0,27	0,20

Tablo 4.42 60°C baz degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
5N NaOH (60°C) 3 gün	Üridin İmpüritesi	TE	0,33	0,25
	İnosin İmpüritesi	TE	1,14	1,23
	Güanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	11,07	13,23
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	TE
	Toplam İmpürite	0,00	12,54	14,71

Tablo 4.43 25°C oksidasyon degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
%30 H ₂ O ₂ (25°C) 3 gün	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Guanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	51,67	50,34
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	TE
	Toplam İmpürite	0,00	51,67	50,34

Tablo 4.44 60°C ısı degradasyonu sonuçları

	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
60°C 1 hafta	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Guanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	TE	TE
	Toplam İmpürite	0,00	0,00	0,00

Tablo 4.45 Işık degradasyonu sonuçları

Işık 2 hafta	(%)	Başlangıç	Hammadde	Bitmiş Ürün
	Üridin İmpüritesi	TE	TE	TE
	İnosin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Guanozin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Adenin İmpüritesi	TE	TE	TE
	Herhangi Bilinmeyen İmpürite	TE	0,03	0,06
	Toplam İmpürite	0,00	0,03	0,06

4.4.3 LC-Q/TOF ile Safsızlık Karakterizasyonu

4.4.3.1 Analiz Metodu

Safsızlıkları tanımlamak için 1290 serisi HPLC cihazından (Agilent Technologies, ABD) ve bir ESI kaynağı ile donatılmış dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometresinden (Agilent Q-TOF-MS 6546) oluşan bir sıvı kromatografi cihazı kullanıldı. Veri toplama için Mass Hunter Workstation yazılımı kullanıldı. Sonuçları değerlendirmek için Agilent PCDL (Kişisel Bileşik Veritabanı ve Kütüphane) veri tabanı kullanıldı.

Mobil Faz-A: %0,1 formik asit içeren saf su.

Mobil Faz-B: LC-MS grade asetronitril.

Gradient Programı:

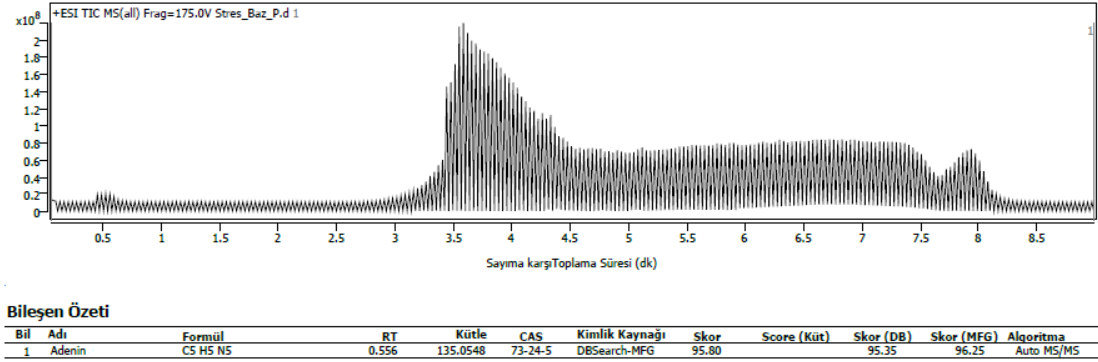
Süre, dk.	Mobil Faz-A, %	Mobil Faz-B, %
1,00	90	10
3,00	10	90
6,00	10	90
6,01	90	10
9,00	90	10

Kromatografik koşullar:

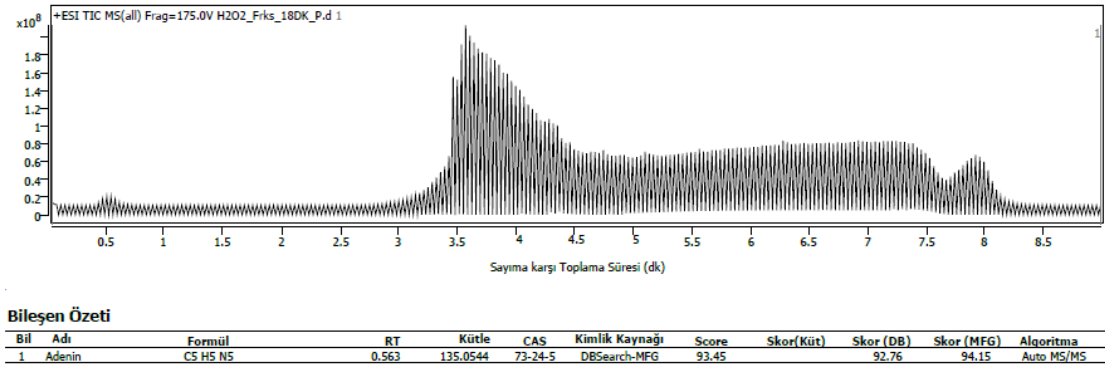
Kolon	: Agilent Poroshell HPH C18 100 × 2,1 mm, 1,9 µm
Akış Hızı	: 0,5 ml/dk.
Enjeksiyon Hacim	: 5 µl
Kolon sıcaklık	: 30 °C
Numune sıcaklık	: 15 °C
Enjeksiyon zamanı	: 9 dk.
İyon Kaynağı	: Elektron Sprey İyonizasyon
Tarama Modu	: MS Scan
Polarite	: Pozitif - Negatif
Gaz sıcaklığı	: 320 °C
Nebulizer Basıncı	: 35 psi.
Kurutucu Gaz Sıcaklığı	: 320 °C
Kurutucu Gaz Akışı	: 8 l/dk.
Kapiler Voltaj	: 3500 V
Nozzle Voltaj	: 1000 V

Stres çalışması yürütülen enjeksiyonlarda bozunmaların olduğu fraksiyonlar preparatif HPLC ile ayrılarak LC-Q/TOF sisteminde yukarıda verilen metot şartlarında analiz edildi. Stres çalışmalarında özellikle asidik, bazik ve oksidatif koşullarda bozunmanın Adenin impüritesini oluşturacak yönde olduğu belirlenmiştir. İlgili bozundurma

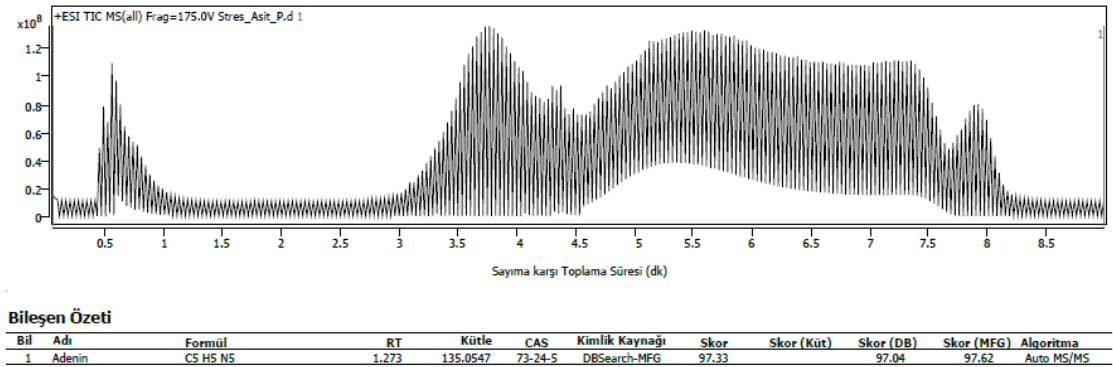
çalışmalarının LC-Q/TOF ile kontrol sonuçları için temsili kromatogramlar **Şekil 4.24 - Şekil 4.26** arasında verilmiştir.



Şekil 4.24 Baz bozundurması LC-Q/TOF sonucu



Şekil 4.25 Oksidasyon bozundurması LC-Q/TOF sonucu

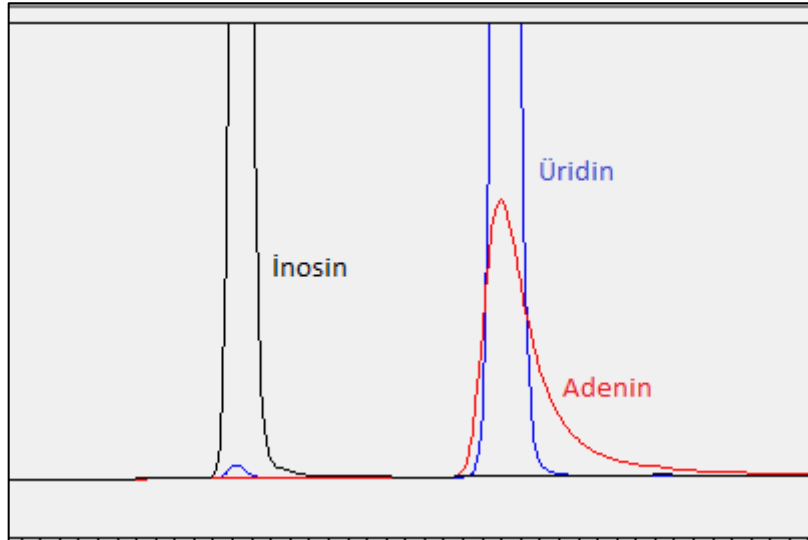


Şekil 4.26 Asit bozundurması LC-Q/TOF sonucu

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Tezin teorik kısmında Adenozin'in (Bölüm 2) tıbbi kimyada ve hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli olduğu detaylı olarak anlatılmıştır. Bu çalışmanın amacı katarakt ve lens opaklaştırma tedavilerinde kullanılan ve kombine ilaç formülasyonlarında kullanılan Adenozin için stabilite göstergeli, yeşil, ters faz bir HPLC yöntemi geliştirmek ve endüstriye ve literatüre katkı sağlamaktır.

Birden fazla safsızlığın tanımlandığı farklı aktif maddelerin varlığında adenozin safsızlıklarını herhangi bir örtüşme olmaksızın tanımlamak için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Safsızlıklar arasında iyi bir ayırım elde etmek için 1. Bölüm Literatür özetinde bahsedilen monograf yöntemleriyle deneyler başlatılmıştır. USP ve EP monograflarında belirtilen nikotinik asit yöntemi (**Tablo 5.1**) ile yapılan çalışmalarda adenozin safsızlıkları da sisteme yüklenip kontrol edildiğinde adenin ve inosin arasında rezolüsyon olduğu, nikotinik asit ve safsızlıklarla çakışmadığı ancak üridin safsızlığının adenin ile çakıştığı bulunmuştur (**Şekil 5.1**).

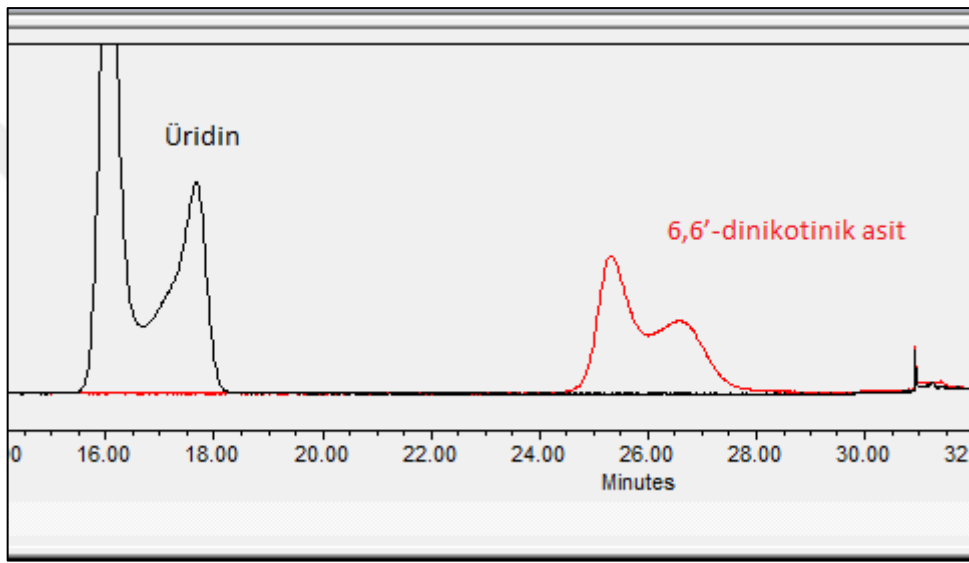


Şekil 5.1 Nikotinik asit hammadde monograf metodu - Adenozin impüriteleri

Tablo 5.1 Nikotinik asit EP ve USP metotları

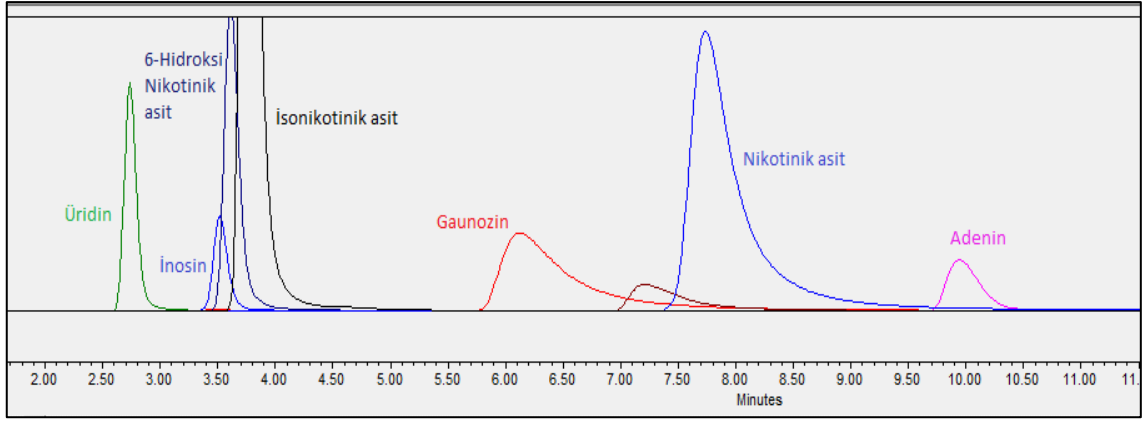
EP Nikotinik Asit Metodu	Nicotinic acid Column: - size: $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm; - stationary phase: end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography compatible with 100 per cent aqueous mobile phases R (4 μm); - temperature: 15 °C. Mobile phase: - mobile phase A: dilute 2 mL of acetic acid R in 950 mL of water for chromatography R, adjust to pH 5.6 with dilute ammonia R1 and dilute to 1000 mL with water for chromatography R; - mobile phase B: acetonitrile R, methanol R (50:50 V/V); <table><thead><tr><th>Time (min)</th><th>Mobile phase A (per cent V/V)</th><th>Mobile phase B (per cent V/V)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0 - 10</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>10 - 30</td><td>100→20</td><td>0→80</td></tr><tr><td>30 - 35</td><td>20</td><td>80</td></tr></tbody></table> Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: spectrophotometer at 250 nm. Injection: 10 μL.	Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)	0 - 10	100	0	10 - 30	100→20	0→80	30 - 35	20	80									
Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)																				
0 - 10	100	0																				
10 - 30	100→20	0→80																				
30 - 35	20	80																				
USP Nikotinik Asit Metodu	• RELATED COMPOUNDS Solution A: Dissolve 0.35 g of glacial acetic acid in 1 L of water and adjust with 10% ammonium hydroxide solution to a pH of 5.6 Solution B: Acetonitrile and methanol (1:1) Mobile phase: Gradient elution. See Table 1 Table 1 <table><thead><tr><th>Time (min)</th><th>Solution A (%)</th><th>Solution B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>10^a</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>30</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>35</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>36</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>48</td><td>100</td><td>0</td></tr></tbody></table> <	Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)	0	100	0	10 ^a	100	0	30	20	80	35	20	80	36	100	0	48	100	0
Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)																				
0	100	0																				
10 ^a	100	0																				
30	20	80																				
35	20	80																				
36	100	0																				
48	100	0																				

Yöntemin gradient elüsyonu ile modifikasyonlar yapıldığında, özellikle yakın alıkonma zamanlarında 6-metilnikotinik asit ile 6,6'-dinikotinik arasındaki çözünürlüğün kaybolduğu ve 6-metilnikotinik asit ile örtüşmeler olduğu gözlenmiştir. İdeal gradient elüsyon belirlendikten sonra yapılan çalışmalarda kolonda tuz oluşumundan kaynaklanan çökeltilerin hem nikotinik asit hem de adenozin safsızlıklarının asidik ve bazik özelliklerinden dolayı kolonu bloke ettiği görülmüştür. Monograf kolonu olan Synergy Hydro RP-80Å yerine Kromasil kolonunda Üridin ve 6,6'-dinikotinik asit pikleri bölünmüş (**Şekil 5.2**) ve YMC Pack ODS-AQ, YMC Pack Pro C18 gibi kolonlarda çok fazla safsızlığın çakıştığı tespit edilmiştir.



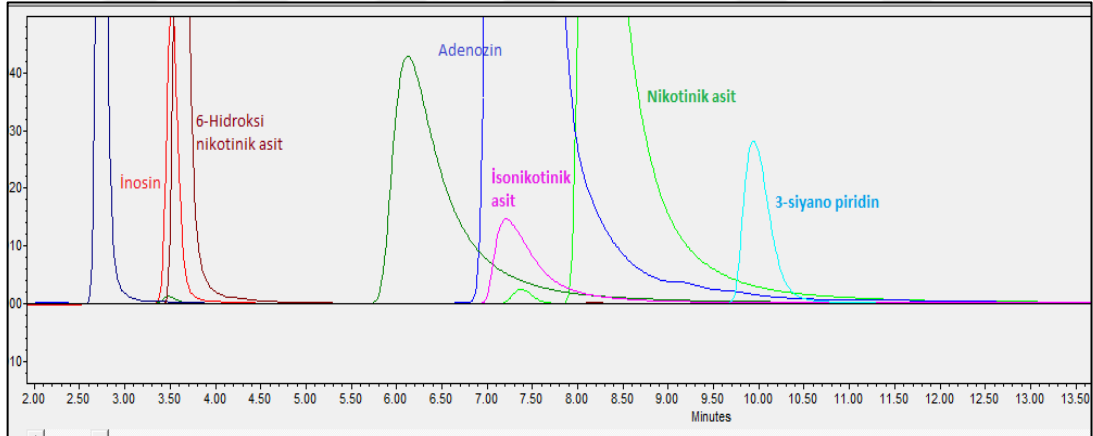
Şekil 5.2 Kromasil 250 x 4,6 mm x 5 µm ile Üridin ve 6,6'-dinikotinik asit

LUNA C18 (2) 100Å ve Simetri RP18 ve YMC-Pack Pro kolonları ile hemen hemen tüm piklerin kolonda hiç tutulmadığı ve ilk 10 dakikada geldiği tespit edilmiştir (**Şekil 5.3**). EP monografında Nikotinamid ile ilgili bileşikler için verilen hareketli faz, nikotinik asit ile ilgili bileşikler yöntemine benzer olduğundan, bu sistemde adenozin safsızlıkları değerlendirilmemiştir. Bu monografda nikotinamid için bahsedilen bilinen safsızlıklardan biri, diğer aktif bileşen olan nikotinik asit ve türevleridir.



Şekil 5.3 LUNA C18 (2) 100Å ve Simetri RP18 ve YMC-Pack Pro kolon denemeleri

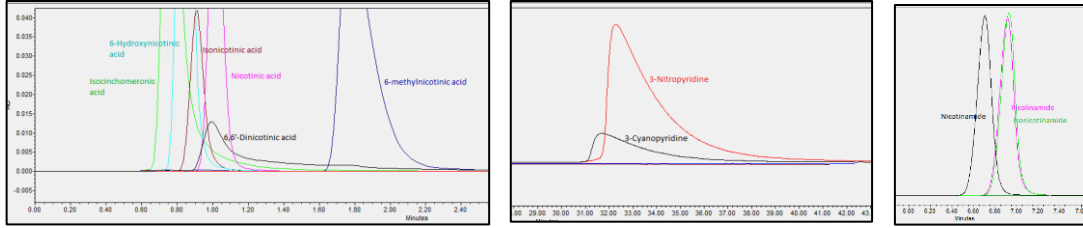
Nikotinik asit sistemi ile yapılan çalışmalara paralel olarak yürütülen Adenozin monograf yöntemi çalışmalarında, sistem uygunluğu olarak belirtilen Adenin ile İnosin arasındaki ayrımın sağlandığı ancak nikotinik asit ve adenozin piklerinin çakıştığı gözlemlenmiştir. Buna göre ODS Hypersil ve Symmetry RP18 dışında farklı özelliklere sahip BDS Hypersil, Hypersil Gold, Symmetry Shield RP 18 gibi birçok kolon denenmesine rağmen ne sistem uygunluk parametresi elde edilmiş ne de etken maddeler arasındaki çakışma ortadan kaldırılmıştır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 Adenozin monograf yöntemi sonuçları

Adenozin ve ilgili safsızlıklar için geliştirilen spesifik HPLC yönteminde, mobil faz olarak 0,50 g/L 1-oktan sülfonik asit sodyum tuzu çözeltisi ve ideal kolon olarak µBONDAPAK C18 125Å 300 x 3,9 mm, 10µm seçilmiştir. Yöntem, ayırmanın en iyi şekilde elde edildiği 2,5 ml/dk'lık bir akışla 25°C'lik bir numune ve kolon sıcaklığı ile optimize edilmiştir. Bu sistemde nikotinik asit ve ilgili maddelerin çoğu ilk 2,5 dakika içinde tespit edildi. Piridin türevi safsızlıkların ise 30 ila 40 dakika arasında tutulduğu

tespit edilmiştir. Benzer şekilde, nikotinamid ve ilgili safsızlıklar sistemi 6,4 – 7,2 dakika arasında alıkonmuştur (Şekil 5.5). Ayrıca Formülasyon-2'deki Sitokrom-C bu sistemde belirlenmemiştir. Bu nedenle, adenozin ve bununla ilgili safsızlıklar ile herhangi bir çakışma gözlenmemiştir.



Şekil 5.5 Geliştirilen yöntemde nikotinik asit, nikotinamid ve ilgili safsızlıklarının alıkonma zamanları

İlgili çalışma tasarımında pH etkisi büyük önem taşımaktadır. UV aktif tüm etken maddelerin ve ilgili safsızlıklarının asidik ve bazik özelliklerde olması metot tasarımını oldukça fazla etkileyen parametre olmuştur. Farmakope metotlarında kullanılan asidik hareketli fazların adenozin için seçicilik sağlamaması, buna karşın Adenozin etken maddesinin bazik yapıda olması metodun geliştirilmesinde referans olmuştur. Yöntemde kullanılan bazik özellikteki mobil fazın Adenozin için seçici olduğu, her iki formülasyonda bulunan diğer ilaç aktif moleküllerin ve bunlara ait safsızlıkların asidik özellikleri nedeni ile kolonda tutunmayarak erken alıkonma zamanında sistemden uzaklaştığı tasarlanan metodun spesifikliğini sağlamıştır. Asit özellikte bulunan etken maddelere ait tanımlı bazik safsızlıklar ise kullanmış olduğumuz rezolüsyona katkı sağlayan tuz katkısı ile ayrıştırılmıştır. Böylelikle kolon içerisinde asit-baz etkileşimlerinden kaynaklanan tuz çökmelerinin önüne geçilmiş ve rutin çalışmalar için daha ekonomik bir yöntem geçerli kılınmıştır.

Optimize edilmiş yöntemin geçerliliği, ICH Q2 (R1) kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluğu, seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve stabilite gibi farklı doğrulama parametreleri incelenmiştir.

Geliştirilen yöntemin seçiciliği, numunedeki hedeflenen aktif maddenin numunedeki diğer aktif maddeler ve safsızlıklar ile etkileşimini ölçerek elde edilmiştir. Blank, plasebo, numune solüsyonu ve bilinen safsızlıklar sisteme ayrı ayrı verilmiş ve PDA dedektöründe enjekte edilen çözeltilerin pik saflık açısı ve pik saflık eşiği, alıkonma ve relatif alıkonma süreleri kaydedilmiştir. Tüm bileşenlerin pik saflıkları uygun şekilde belirlenmiş ve aktif bileşenin alıkonma zamanında başka bir pik gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar ışığında, bu

analiz için yöntemin özgünlüğü doğrulanmıştır. Seçicilik için temsili kromatogramlar Bölüm 4'te **Şekil 4.1 – Şekil 4.17** arasında verilmiştir.

Doğrusallık çalışması sonuçları, adenozin, üridin, inosin, guanozin ve adenin konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir. Sistemin doğrusallığını kanıtlamak için LOQ'dan başlayarak farklı konsantrasyon aralıklarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu konsantrasyon aralığı adenozin için 0,06 µg/ml – 4,27 µg/ml, üridin için 0,15 µg/ml – 4,27 µg/ml, inosin için 0,15 µg/ml – 4,17 µg/ml, guanozin için 0,13 µg/ml – 4,35 µg/ml ve adenin için 0,12 µg/ml – 4,26 µg/ml olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda her bir bileşen için yapılan regresyon analizinden lineer bir eşitlik elde edilmiş ve korelasyon katsayısının $r \geq 0,99$ kabul kriterini karşıladığı tespit edilmiştir. Elde edilen özet veriler Bölüm 4'te **Tablo 4.9 – Tablo 4.13** arasında ve ilgili grafikler **Şekil 4.19 – Şekil 4.23** arasında gösterilmiştir.

Optimize edilmiş koşullar altında, adenozin, üridin, inosin, guanozin ve adenin bileşenlerinin doğruluğu, geri kazanımlarla değerlendirildi. Safsızlık eklenmiş numune çözeltileri ve LOQ'dan %120 spesifikasyon sınırına kadar bilinen 4 farklı konsantrasyonda adenozin eklenmiş plasebo çözeltileri hazırlandı, her konsantrasyon üç tekrar halinde hazırlandı ve 3 tekrar halinde analiz edildi. Adenozin, Formülasyon-1 numunesinde %20 konsantrasyon seviyesinde bulunduğundan, bu safsızlık numuneye LOQ konsantrasyonunda eklenmedi. Bu okumaların ortalama geri kazanım değerleri, RSD ve %95 güven aralığı Bölüm 4 **Tablo 4.14 – 4.15** arasında verilmiştir.

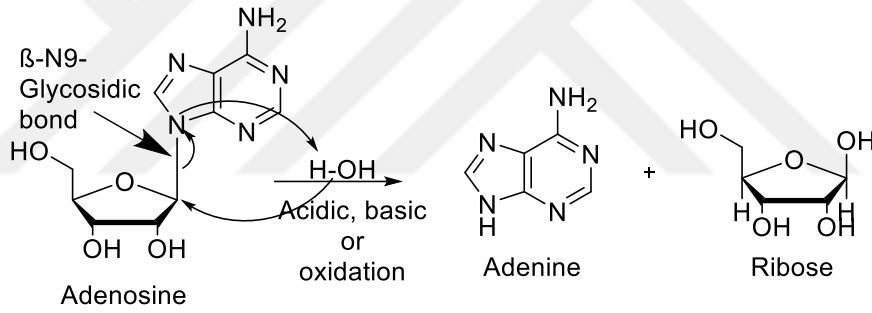
Kesinlik ve ara kesinlik parametreleri, spesifikasyon sınırında safsızlık eklenmiş altı farklı numune çözeltisiyle kontrol edildi. 2 farklı analist tarafından 2 farklı cihazda ve farklı günlerde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda %80-%120 ve $RSD \leq \%10$ sınır aralığındaki safsızlıkların yüzde geri kazanımları ile kabul kriterlerini karşılayıp karşılamadığı değerlendirilmiştir. Sonuçlar kesinlik için Bölüm 4 **Tablo 4.18 ve 4.19**'da arakesinlik için **Tablo 4.20 – Tablo 4.31** arasında kanıtlanmıştır.

Sinyal/gürültü oranı, teşhis sınırı (LOD) için 3:1 ve tayin sınırı (LOQ) için 10:1 olarak değerlendirildi. Adenozin ve bilinen safsızlıklar için belirlenen LOD ve LOQ değerlerinin ICH Q2 (R1) kılavuzunda belirtilen bu kabul limitlerini karşıladığı Bölüm 4'te **Tablo 4.32**'de verilmiştir.

Kritik yöntem parametrelerinin adenozin ve safsızlıklar üzerindeki etkisini belirlemek için dayanıklılık parametresi değerlendirilmiştir. Bunun için dalga boyu değişimi (± 2

nm), kolon sıcaklığı değişimi ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve farklı kolon seçimi kritik üç parametre olarak belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar başlangıç değerleri ile karşılaştırılmıştır. Dalga boyu değişiminin safsızlıklar üzerinde etkisinin olduğu, başlangıç değerinden değişimin %10'dan fazla olduğu tespit edilmiştir. Çözeltilerin ise 48 saat oda ve buzdolabı koşullarında stabil olduğu gözlemlenmiştir. Standart ve numune çözeltileri için çözelti stabilitesi sonuçları Bölüm 4'te **Tablo 4.33 – Tablo 4.35** arasında, yöntem dayanıklılık sonuçları ise **Tablo 4.36 – Tablo 4.38** arasında gösterilmiştir.

Stres testi çalışmaları sırasında, adenosin ısı ve fotostabiliteden çok az etkilenirken, asit (3 gün boyunca 60°C), baz (3 gün boyunca 60°C) ve peroksit (3 gün boyunca 25°C) muamelesinden oldukça etkilenmiştir. Adenin safsızlığının aşağıdaki mekanizmaya göre (**Şekil 5.6**) asidik koşullarda %31,89, bazik koşullarda %13,23 ve oksidasyon koşullarında %50,34 bozunma ile oluştuğu belirlenmiştir. Asidik ve oksidasyon koşullarında sadece adenin oluştuğu, bazik koşullarda ise %0,25 Üridin ve %1,23 İnosin safsızlıklarının oluştuğu tespit edilmiştir.

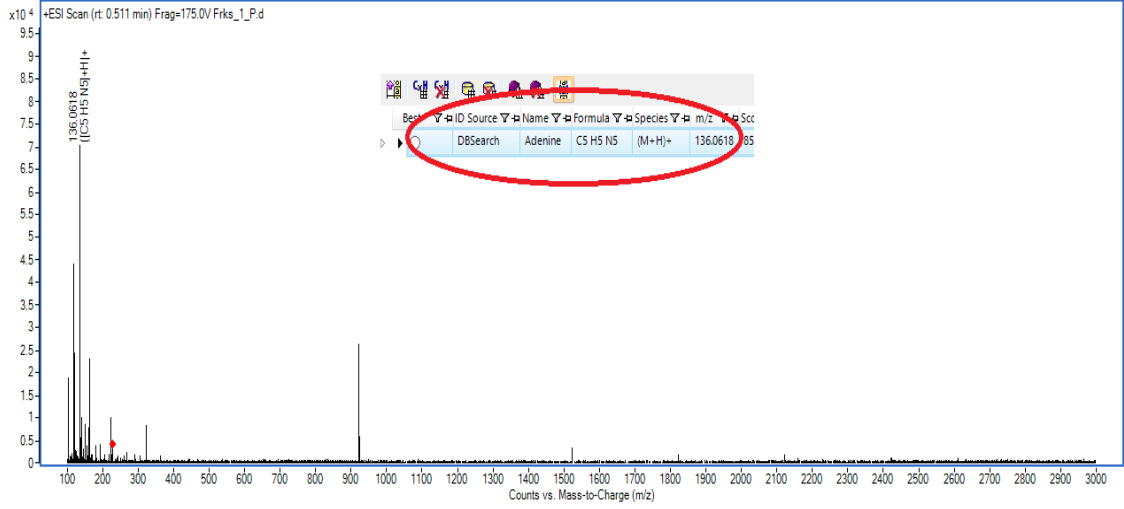


Şekil 5.6 Adenozinden Adenin ve Riboz Oluşumu

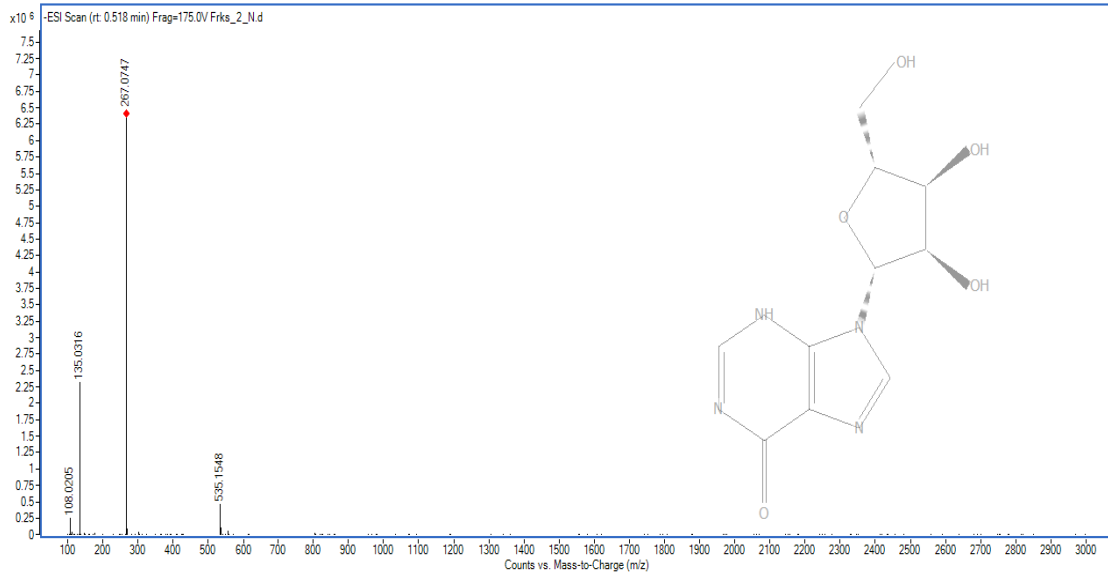
Adenosinin en zayıf bağının N-glikozidik bağ olduğu bilinmektedir (0.772) [69]. Adenosinin parçalanmasıyla oluşan adenin, UV aktif olduğu için HPLC-UV dedektörü ile tespit edilmiş, ancak Riboz bir şeker olduğu ve UV aktif olmadığı için HPLC-UV sistemi tarafından izlenememiştir.

Öte yandan Shen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, fermentasyon ile üretilen adenosin kaynaklı safsızlıkların ADP-riboz, 5'-adenilik asit, hipoksantin, 5'-deoksi-5'-metilsulfinil adenosinin iki S-epimeri, 3'- α -glukozil adenosin ve 2'-deoksiadenosin gibi biyoaktif moleküller olduğu belirlenmiştir [70]. LC-QTOF-MS sonuçları, bu safsızlıkların kimyasal sentez tarafından üretilen Adenozinden oluşmadığını desteklemektedir. Bu nedenle, çalışmalar bu safsızlıkların bitmiş ürünlerde oluşmadığını kanıtlamıştır.

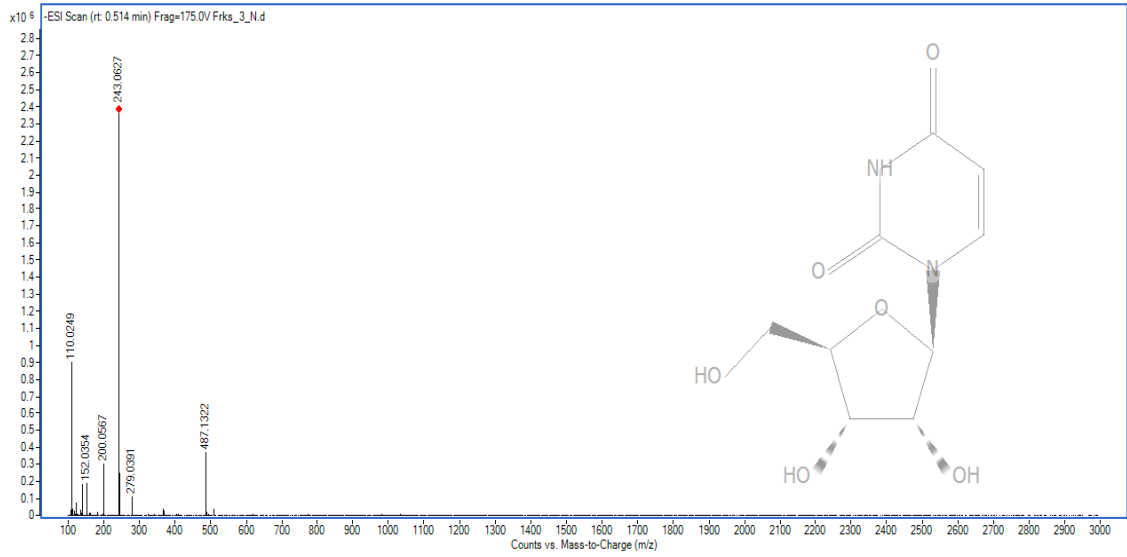
Elde edilen bozunma ürünlerinin saflığı PDA dedektörü ile belirlense de, olası bir girişimi tespit etmek için safsızlıklara ait fraksiyonlar ayrı ayrı toplanmış ve LC-QTOF-MS sistemine aktarılmıştır. Adenin ile aynı alıkonma zamanında fraksiyon için LC-QTOF-MS çalışması için kitaplık tarama sonucu **Şekil 5.7**'de verilmiştir. İnösin ve Üridine karşılık gelen fraksiyonlar için sırasıyla **Şekil 5.8** ve **Şekil 5.9**'da verilmiştir.



Şekil 5.7 Adenin için LC-QTOF-MS tarama sonucu



Şekil 5.8 İnösin için LC-QTOF-MS tarama sonucu



Şekil 5.9 Üridin için LC-QTOF-MS tarama sonucu

Bu çalışma ile, Adenozin ile kombinasyon halinde farklı aktif bileşenler içeren farmasötik formlar için, Adenozin için ilgili bileşiklerin yeni bir stabilite gösteren yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Yöntem geliştirme aşamasında hem monograflar hem de literatür çalışmaları değerlendirilmiş, tüm aktif maddeler ve ilgili safsızlıklar açısından müdahale olmadan iyi bir ayırım sağlanmış ve basit, seçici, doğru, doğrusal, dayanıklı, ekonomik sağlayan yeni bir yöntem oluşturulmuştur. Yöntemin, yeşil kimya kriterleri ve rutin analizler için çok uygun olduğu belirlenmiştir. LC-QTOF-MS sistemi, stres çalışmaları sırasında elde edilen safsızlıklar için örtüşme olmadığını kanıtlamak ve ilgili piklerin yapısını belirlemek için kullanılmıştır. Hem stres çalışmaları hem de stabilite çalışmaları değerlendirildiğinde ürünlerin normal şartlar altında stabil olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, stres çalışmaları sırasında tespit edilen safsızlıkların diğer aktif moleküller ve bunlarla ilişkili safsızlıklarla çelişmediği hem LC-QTOF-MS hem de HPLC çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Tez amacımıza uygun şekilde çok detaylı değerlendirme ve parametreleri içeren bir çalışma ile hem literatüre hem de ilaç sektöründe Adenozin içeren farklı farmasötik kombine ürünlerde kullanılabilecek bir çalışma kazandırılmıştır.

- [1] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, Current Step 4 version, dated 31 March 2017.
- [2] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q3B(R2) Impurities in New Drug Products, Current Step 4 version, dated 2 June 2006.
- [3] Susanne, K., Stefan, A., Ulrike, H. (2006) *Pharmaceut. Sci. Notes* 2, 17-21
- [4] Cristalli, G.; Cacciari, B.; Dal Ben, D.; Lambertucci, C.; Moro, S.; Spalluto, G.; Volpini, R. Highlights on the development of A2A adenosine receptor agonists and antagonists. *Chem. Med. Chem.* (2007), 2, 260–281.
- [5] Valdés Zurita, F., Brown Vega, N., & Gutiérrez Cabrera, M. Semisynthesis, Characterization and Evaluation of New Adenosine Derivatives as Antiproliferative Agents. *Molecules*, (2018), 23(5), 1111.
- [6] Francisco. Z. V., Víctor, Z. L., Bárbara. R. A., Nelson, V. B., Margarita, C. G. (2018) *Mini Rev. Med. Chem* 18, 1684-1701. Doi: 10.2174/1389557518666180516163539
- [7] Stefania, G., Stefania, M., Valeria, S., Carolina, S., Pier, A. B. (2011) *Biochim Biophys Acta*, 1808, 1400-1412. Doi: 10.1016/j.bbame.2010.09.020
- [8] Cappellacci, L., Barboni, G., Palmieri, M., Pasqualini, M., Grifantini, M., Costa, B., Franchetti, P. Ribose-Modified Nucleosides as Ligands for Adenosine Receptors: Synthesis, Conformational Analysis, and Biological Evaluation of 1'-C-Methyl Adenosine Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, (2002). 45(6), 1196–1202.
- [9] Collis MG, Hourani SMO. Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* (1993); 14:360–6.
- [10] Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* (1994); 46: 143– 56.
- [11] Haas HL, Selbach O. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2000); 362: 375– 81.
- [12] Kimura, Y., Ishii, K., Fukumitsu, N., Oda, K., Sasaki, T., Kawamura, K., & Ishiwata, K. Quantitative analysis of adenosine A1 receptors in human brain using positron emission tomography and [1 -methyl-11C]8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine. *Nuclear Medicine and Biology*, (2004). 31(8), 975–981.
- [13] Adenosine, British Pharmacopoeia, 2021.
- [14] Adenosine, European Pharmacopoeia 10.0, 01/2009:1486.
- [15] Adenosine, US Pharmacopoeia, 2021.
- [16] Adenosine Injection, US Pharmacopoeia, 2021.

- [17] Rodrigo, M. M., Kleber, G. F., Silvana, A. R. (2007) J. Sep. Sci. 30, 2473-2479. Doi: 10.1002/jssc.200700194
- [18] Ralph, J. H., Charles, A. G. (1984) J. Chromatogr. A 298, 231-242. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92718-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92718-9)
- [19] Gesine, H., Andreas, D. (2003) J. Chromatogr. B 784, 189-193. Doi: 10.1016/s1570-0232(02)00752-3
- [20] Kelly, J. G., Eric, C., Ujjal, S., Petar, P., Natalie, J., Alexandra, B., Richard, W., Adrian, J. F. (2019) Anal. Biochem. 568, 78-88. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.004>
- [21] Annelies, V. D., Alain, V., Kristof, P. Robrecht, R., Kristl, V., Detlev, B., Paul, B. (2010) J. Chromatogr. B, 878, 1493-1498. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.047>
- [22] Kuldeep, S., Radheraman, S., Sanjeev, G., Sriram, R., Ramesh, (2011) Biomed. Chromatogr. 26, 81-88. Doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.1629>
- [23] Fan H, Li SP, Xiang JJ, Lai CM, Yang FQ, Gao JL, Wang YT. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured Cordyceps by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography– electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS). Anal. Chim. Acta (2006) 567: 218-228.
- [24] Guo C, Zhu J, Zhang C, Zhang LJ. Determination of adenosine and 3'-deoxyadenosine in Cordyceps militaris (L.) Link. by HPLC. J. Chinese Med. (1998) 23: 236-237.
- [25] Hsu TH, Shiao LH, Hsieh C, Chang DM. DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of Cordyceps sinensis. Food Chem. (2002) 78: 463-469.
- [26] Koh JH, Yu KW, Suh HJ, Choi YM, Ahn TS. Activation of macrophages and the intestinal immune system by an orally administered decoction from cultured mycelia of Cordyceps sinensis. Biosci. Biotechnol Biochem. (2002) 66: 407- 411.
- [27] Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: Cordyceps sinensis: part I. J. Altern. Complem. Med. (1998) 4:289-303.
- [28] Zhu JS, Halpern GM, Jones K. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: Cordyceps sinensis part II. J. Altern. Complem. Med. (1998) 4: 429-457.
- [29] Guo FQ, Li A, Huang LF, Liang YZ, Chen BM. Identification and determination of nucleosides in Cordyceps sinensis and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. J. Pharmaceut. Biomed. (2006) 40: 623-630.
- [30] Li SP, Yang FQ, Tsim KW. Quality control of Cordyceps sinensis, a valued traditional Chinese medicine. J. Pharmaceut. Biomed. (2006) 41:1571- 1584.
- [31] Huang LF, Liang YZ, Guo FQ, Zhou ZF, Cheng BM. Simultaneous separation and determination of active components in Cordyceps sinensis and Cordyceps militaris by LC/ESI-MS. J. Pharmaceut. Biomed. (2003) 33: 1155-1162.

- [32] Van Dycke, A., Verstraete, A., Pil, K., Raedt, R., Vonck, K., Boison, D., & Boon, P. Quantitative analysis of adenosine using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (LC/APCI-MS/MS). *Journal of Chromatography B*, (2010). 878(19), 1493–1498.
- [33] Yousefi, S., & Saraji, M. Optical aptasensor based on silver nanoparticles for the colorimetric detection of adenosine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2019). 213, 1–5.
- [34] Huang, Y.-F., & Chang, H.-T. Analysis of Adenosine Triphosphate and Glutathione through Gold Nanoparticles Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, (2007). 79(13), 4852–4859.
- [35] Zhang, D., Ma, J., Meng, X., Xu, Z., Zhang, J., Fang, Y., & Guo, Y. Electrochemical aptamer-based microsensor for real-time monitoring of adenosine in vivo. *Analytica Chimica Acta*. (2019).
- [36] Henderson, R. J., & Griffin, C. A. Electrochemical detection of adenosine and other purine metabolites during high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, (1984). 298, 231–242.
- [37] Small, G. D., and Cooper, C. *Biochemistry* (1966) 5,26-33.
- [38] Heldt, H. W., and Klingenberg, M. *Biochem. Z.* (1965) 353, 433-451.
- [39] Bielski, R. L. *Anal Biochem.* (1963) 6, 54-68
- [40] Clayton, S., Born, G. V. R., and Cross, M. J. (1963) *Nature (London)* 200, 138-139.
- [41] Skalkecg, B. A., Hellem, A. J., and Odegaard, A. E. *Thromb. Diath. Haemorrh.* (1964) 31, 305-316.
- [42] Poisner, A. M., and Trifaro, J. M. *Mol. Pharmacol.* (1967) 3, 561-571.
- [43] Manandhar, M. S. P., & Dyke, K. V. Adenosine tetraphosphate analysis: Polyethyleneimine (PEI) thin layer purification and firefly-extract liquid scintillation quantitation. *Analytical Biochemistry*, (1974) 58(2), 368–375.
- [44] Bailey, K. *Biochem. J.* (1949). 45, 479.
- [45] Wade, H. E., & Morgan, D. M. The analysis of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate preparations by paper ionophoresis. *Biochemical Journal*, (1954). 56(1), 41–43.
- [46] Cohn, W. E., & Carter, C. E. The Separation of Adenosine Polyphosphates by Ion Exchange and Paper Chromatography1. *Journal of the American Chemical Society*, (1950). 72(9), 4273–4275.
- [47] Hartwick, R. A., & Brown, P. R. Selective analysis for adenosine using reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, (1977). 143(4), 383–389.
- [48] Haink, G., & Deussen, A. Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *Journal of Chromatography B*, (2003). 784(1), 189–193
- [49] Sonoki, S., Tanaka, Y., Hisamatsu, S., & Kobayashi, T. High-performance liquid chromatographic analysis of fluorescent derivatives of adenine and adenosine and its nucleotides. *Journal of Chromatography A*, (1989). 475(2), 311–319.

- [50] Marin, R. M., Franchini, K. G., & Rocco, S. A. Analysis of adenosine by RP-HPLC method and its application to the study of adenosine kinase kinetics. *Journal of Separation Science*, (2007). 30(15), 2473–2479.
- [51] Ph. Eur. Monograph 1486, Adenosine, 2019
- [52] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994.
- [53] Parodi J, Flores C, Aguayo C, Rudolph M.I, Casanello P, Sobrevia L. Inhibition of Nitrobenzylthioinosine-Sensitive Adenosine Transport by Elevated D-Glucose Involves Activation of P2Y2 Purinoceptors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circulation Research*, (2002). 90(5), 570–577.
- [54] Morairty S, Rainnie D, McCarley R, Greene R. Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience*. 2004;123(2):451-7.
- [55] Actis, A.; Croci, M.; Bergoc, R. Efectos farmacológicos de un análogo de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico sobre útero de ratones consideraciones terapéuticas. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam.*, 2005, 39(2), 197-202. ISSN: 1851-6114.
- [56] Wan ZK, Binnun E, Wilson DP, Lee J. A highly facile and efficient one-step synthesis of N6-adenosine and N6-2'-deoxyadenosine derivatives. *Org Lett*. 2005 Dec 22;7(26):5877-80.
- [57] Valdivia-Silva, J.; López-Molina, G.; González-Altamirano, J. Angiogénesis pulmonar mediada por adenosina vía CXCL1/CXCR2. En: *Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. Facultad de Medicina.*, 2007, 68(3), 211-221.
- [58] Swarbrick JM, Potter BV. Total synthesis of a cyclic adenosine 5'-diphosphate ribose receptor agonist. *J Org Chem*. 2012 May 4;77(9):4191-7.
- [59] RxMediaPharma 2022.
- [60] Türk Farmakope Dergisi Analitik Yöntem Geçerliliği Cilt:2 Sayı:1 Yıl: 2017.
- [61] Cem Çalışkan, Askorbik Asit Miktar ve Doz Tekdüzeliliği için Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, 2016.
- [62] Snyder LR, Kirkland JJ, Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2th ed. USA: John Wiley & Sons Inc.; 1979, p:91, 334.
- [63] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)
- [64] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version, dated 25 February 2003.
- [65] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version, dated 6 November 1996.

- [66] Schauwechwr P, Frei RW. Chromatography LC Magazine. 14th ed. 1977.
- [67] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version, dated 6 February 2003.
- [68] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version, dated 6 November 1996.
- [69] Xue-Jie, W., Jin-Zong, Y. (2015) *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. **111**, 1-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.12.024>
- [70] Yeming, S., Peilu, Z., Pengxuan, X., Chen, C., Fangjing, M., Fuxin, L., Jianye, Z. (2019) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **33**, 1739-1750. doi: 10.1002/rcm.8487



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Cem ÇALIŞKAN, “Farklı Kombine İlaç Farmasötik Formlarında, Adenozinin Safsızlık Profili için Stabilit  Göstergeli, Yeşil Ters Faz HPLC Yöntemi Geliştirilmesi, Regresyon Analizi ve Validasyonu”, 32. Ulusal Kimya Kongresi, S-064, 17-19 Eylül 2020, Online.

Makaleler

1. Cem Çalışkan and İkb l Koyuncu, “Validation of Stability-Indicating RP-HPLC Method and Determination of Impurities by LC-QTOF-MS for Adenosine in Eye Drops”, Journal of AOAC International, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac022>