

AYŞE ZEHRA ÖZDEMİR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ASETİLSİSTEİN SAFSIZLIKLARININ STABİLİTE
GÖSTERGELİ UPLC YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

AYŞE ZEHRA ÖZDEMİR

DANIŞMAN
PROF.DR.SIDIKA TOKER

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen, bilgisi ve yönlendirmeleriyle çalışmalarına ışık tutan Tez Danışmanım Prof. Dr. Sıdıka Toker'e, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmalar süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığım Abdi İbrahim İlaç Sanayi A.Ş.'ye ve aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	İ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.1. Klinik Farmakolojisi.....	3
2.1.1. Etki Mekanizması.....	3
2.1.2. Emilim.....	3
2.1.3. Dağılım	3
2.1.4. Biyotransformasyon ve Eliminasyon	4
2.1.5. Atılım.....	4
2.2. Asetilsistein'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.2.1. Asetilsistein'in Safsızlıkları.....	5
2.2.1.1. Safsızlık A (L-sistin).....	5
2.2.1.2. Safsızlık B (L-sistein)	6
2.2.1.3. Safsızlık C (N,N'-diasetil-L-sistin).....	6
2.2.1.4. Safsızlık D (N,S-diasetil-L-sistein).....	8
2.3. Asetilsisteine ait Geliştirilmiş Analitik Yöntemler	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	13
3.2 Çözeltiler	14
3.1.1 Mobil faz	14
3.1.2 Çözücü.....	14
3.1.3 Asetilsistein Safsızlık Analizi için Hazırlanan Çözeltiler	14
3.2 Aletler ve Diğer Gereçler	17
3.3 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar	17
3.3.1 Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi	17
3.3.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	18

3.4	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu.....	20
3.4.1	Seçicilik	20
3.5.1.1	Çözelti Hazırlığı.....	20
3.4.2	Doğrusallık	21
3.4.3	Kesinlik.....	24
3.5.3.1	Sistem Kesinliği.....	24
3.5.3.2	Tekrarlanabilirlik	24
3.5.3.3	Ara Kesinlik	25
3.4.4	Doğruluk ve Geri Kazanım	25
3.4.5	Sağlamlık.....	27
3.4.6	Çözelti Stabilitesi.....	28
4.	BULGULAR	29
4.1	Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular	29
4.1.1	Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi Seçimi Çalışmalarına ait Bulgular	29
4.1.2	Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	31
4.2	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu İle İlgili Bulgular.....	32
4.2.1	Seçicilik	32
4.2.2	Doğrusallık	44
4.2.3	Kesinlik.....	50
4.2.3.1	Sistem Kesinliği.....	50
4.2.3.2	Tekrarlanabilirlik	51
4.2.3.3	Ara Kesinlik	52
4.2.4	Doğruluk ve Geri Kazanım	55
4.2.5	Sağlamlık.....	58
4.2.6	Çözelti Stabilitesi.....	59
4.3	Stres Çalışması	61
5.	TARTIŞMA	69
	KAYNAKLAR	71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: N-Asetilsisteinin önerilen metabolik yolu	7
Tablo 2-2: RP-HPLC /UPLC /MS Analiz Yöntemleri.....	9
Tablo 3-1: Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Çözelti Hazırlığı.....	22
Tablo 3-2: Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık A Çözelti Hazırlığı.....	22
Tablo 3-3: Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık B Çözelti Hazırlığı.....	23
Tablo 3-4: Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık C Çözelti Hazırlığı.....	23
Tablo 3-5: Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık D Çözelti Hazırlığı.....	24
Tablo 3-6: Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe -Safsızlık A, Safsızlık B, ve Safsızlık D Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu.....	26
Tablo 3-7: Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe -Safsızlık C Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu.....	27
Tablo 3-8: Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe - Bilinmeyen Safsızlık Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu.....	27
Tablo3-9: LOD&LOQ Özet tablosu.....	28
Tablo 4-1: Mobil Faz A Seçicilik sonuçları.....	42
Tablo 4-2: Mobil Faz B Seçicilik sonuçları.....	42
Tablo 4-3: Çözücü Seçicilik sonuçları.....	42
Tablo 4-4: Plasebo Çözeltisi Seçicilik sonuçları	43
Tablo 4-5: Sistem Uygunluk Çözeltisi Seçicilik sonuçları	43
Tablo 4-6: Asetilsistein Standart Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	43
Tablo 4-7: Asetilsistein Safsızlık A, B, C, D Standart Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	43
Tablo 4-8: Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Numune Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	44
Tablo 4-9: Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Numune Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	44
Tablo 4-10: Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	45
Tablo 4-11: Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Seçicilik sonuçları.....	45
Tablo 4-12: Asetilsistein doğrusallık çalışmasının verileri.....	46
Tablo 4-13: Asetilsistein Safsızlık A doğrusallık çalışmasının verileri.....	46

Tablo 4-14: Asetilsistein Safsızlık B doğrusallık çalışmasının verileri.....	47
Tablo 4-15: Asetilsistein Safsızlık C doğrusallık çalışmasının verileri.....	47
Tablo 4-16: Asetilsistein Safsızlık D doğrusallık çalışmasının verileri.....	48
Tablo 4-17: Asetilsistein Sistem Kesinliği Parametre sonuçları.....	51
Tablo 4-18: Aynı gün içerisinde yapılan Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları.....	52
Tablo 4-19: Aynı gün içerisinde yapılan Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları.....	52
Tablo 4-20: Farklı bir günde yapılan yapılan Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları.....	53
Tablo 4-21: Farklı bir günde yapılan yapılan Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları.....	54
Tablo 4-22: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numunesi sonuçları Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması...	54
Tablo 4-23: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık Eklenmiş Numunesi sonuçları Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması..	55
Tablo 4-24: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Bilinmeyen Safsızlık Geri Kazanım Sonuçları.....	56
Tablo 4-25: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık A Geri Kazanım Sonuçları.....	57
Tablo 4-26: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık B Geri Kazanım Sonuçları.....	57
Tablo 4-27: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık C Geri Kazanım Sonuçları.....	58
Tablo 4-28 Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Şaşe Safsızlık D Geri Kazanım Sonuçları.....	58
Tablo 4-29: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe Standart Çözeltisi için Analiz Şartlarında Değişiklik.....	59
Tablo 4-30: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe için Analiz Şartlarında Değişiklik - Numune Çözeltisi -1.....	60
Tablo 4-31: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe için Analiz Şartlarında Değişiklik - Numune Çözeltisi -2.....	60
Tablo 4-32: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe için Analiz Şartlarında Değişiklik – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi.....	60
Tablo 4-33: Asetilsistein Standart Çözelti Stabilitesi.....	61

Tablo 4-34: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -1.....	61
Tablo 4-35: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -2.....	61
Tablo 4-36: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -3.....	62
Tablo 4-37: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözelti Stabilitesi -1.....	62
Tablo 4-38: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözelti Stabilitesi -2.....	62
Tablo 4-39: Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe	63
Tablo 4-40: Safsızlık Tayini Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe.....	64
Tablo 4-41: Safsızlık Tayini Stres Sonuçları Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe.....	65
Tablo 4-42: Safsızlık Tayini Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe.....	66
Tablo 4-43: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Bağlı Kütle Dengesi-1.....	67
Tablo 4-44: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Bağlı Kütle Dengesi-2.....	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Asetilsistein'in Kimyasal Formülü	4
Şekil 2-2: Asetilsistein'in IR Spektrumu	5
Şekil 2-3: Safsızlık A (L-sistin) kimyasal formülü.....	5
Şekil 2-4: Safsızlık B (L-sistein) kimyasal formülü	6
Şekil 2-5: Safsızlık C (N,N'-diasetil-L-sistin) kimyasal formülü.....	7
Şekil 2-6: Safsızlık D (N,S-diasetil-L-sistein) kimyasal formülü.....	8
Şekil 4-1: Asetilsistein standart Çözeltisinin spektrumu	30
Şekil 4-2: Asetilsistein Safsızlık A standart Çözeltisinin spektrumu.....	30
Şekil 4-3: Asetilsistein Safsızlık B standart Çözeltisinin spektrumu	31
Şekil 4-4: Asetilsistein Safsızlık C standart Çözeltisinin spektrumu.....	31
Şekil 4-5: Asetilsistein Safsızlık D standart Çözeltisinin spektrumu.....	31
Şekil 4-6: Mobil Faz A ait kromatogram-1.....	33
Şekil 4-7: Mobil Faz A ait kromatogram-2.....	33
Şekil 4-8: Mobil faz B ait kromatogram-1.....	33
Şekil 4-9: Mobil faz B ait kromatogram-2.....	34
Şekil 4-10: Çözücüye ait kromatogram-1.....	34
Şekil 4-11: Çözücüye ait kromatogram-2.....	34
Şekil 4-12: Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe plasebosuna ait kromatogram-1.....	35
Şekil 4-13: Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Şaşe plasebosuna ait kromatogram-2.....	35
Şekil 4-14: Asetilsistein Standardına ait kromatogram-1.....	35
Şekil 4-15: Asetilsistein Standardına ait kromatogram-2.....	36
Şekil 4-16: Asetilsistein Safsızlık A Standardına ait kromatogram-1.....	36
Şekil 4-17: Asetilsistein Safsızlık A Standardına ait kromatogram-2.....	36
Şekil 4-18: Asetilsistein Safsızlık B Standardına ait kromatogram-1.....	37
Şekil 4-19: Asetilsistein Safsızlık B Standardına ait kromatogram-2.....	37
Şekil 4-20: Asetilsistein Safsızlık C Standardına ait kromatogram-1.....	37
Şekil 4-21: Asetilsistein Safsızlık C Standardına ait kromatogram-2.....	38
Şekil 4-22: Asetilsistein Safsızlık D Standardına ait kromatogram-1.....	38

Şekil 4-23: Asetilsistein Safsızlık D Standardına ait kromatogram-2.....	38
Şekil 4-24: Asetilsistein Sistem Uygunluk Çözeltisine ait kromatogram-1.....	39
Şekil 4-25: Asetilsistein Sistem Uygunluk Çözeltisine ait kromatogram-2.....	39
Şekil 4-26: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-1.....	39
Şekil 4-27: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-2.....	40
Şekil 4-28: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-1.....	40
Şekil 4-29: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-2.....	40
Şekil 4-30: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık Eklenmiş numunesine ait kromatogram-1.....	41
Şekil 4-31: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık Eklenmiş numunesine ait kromatogram-2.....	41
Şekil 4-32: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık Eklenmiş numunesine ait kromatogram-1.....	41
Şekil 4-33: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık Eklenmiş numunesine ait kromatogram-2.....	42
Şekil 4-34: Asetilsistein doğrusallık grafiği.....	48
Şekil 4-35: Asetilsistein Safsızlık A doğrusallık grafiği.....	49
Şekil 4-36: Asetilsistein Safsızlık B doğrusallık grafiği.....	49
Şekil 4-37: Asetilsistein Safsızlık C doğrusallık grafiği.....	50
Şekil 4-38: Asetilsistein Safsızlık D doğrusallık grafiği.....	50
Şekil 4-39: Işık Bozundurması UV Bölge (200 W / m ²)- Numune Kromatogramı.....	68
Şekil 4-40: Isı Bozundurması (80°C) 2 gün- Numune Kromatogramı.....	68
Şekil 4-41: Işık Bozundurması Görünür Bölge (1.2 milyon lüks)- Numune Kromatogramı.....	68
Şekil 4-42: Isı ve Nem Bozundurması 40 oC 75 RH - 7 gün- Numune Kromatogramı.....	69
Şekil 4-43: Asidik Bozundurma 1N HCl - 2 saat- Numune Kromatogramı.....	69
Şekil 4-44: Asidik Bozundurma 10N HCl - 24 saat- Numune Kromatogramı.....	64
Şekil 4-45: Bazik Bozundurma 10N NaOH - 24 saat- Numune Kromatogramı.....	70
Şekil 4-46: Oksidatif Bozundurma % 1 H ₂ O ₂ - 2 saat- Numune Kromatogramı.....	70
Şekil 4-47: Oksidatif Bozundurma % 30 H ₂ O ₂ - 2 saat- Numune Kromatogramı.....	70

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NAC: N-Asetilsistein

BP: İngiliz Farmakopesi

EP: Avrupa Farmakopesi

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FT-IR: Fourier Dönüşümlü İnfrared

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

µg : mikrogram

mg: miligram

mL: mililitre

PDA: Fotodiyot serili dedektör

µg : mikrogram

RSD: Bağlı Standart Sapma

RT: Alıkonma Zamanı

SD: Standart Sapma

T.E: Tespit edilemedi

UPLC: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

USP: Amerikan Farmakopesi

UV: Ultraviyole

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

LOQ: Nicelik sınırı

TE : Tespit edilmedi

ÖZET

Ayşe Zehra Özdemir (2023), Asetilsistein safsızlıklarının stabilite göstergeli UPLC yöntemi ile tayini, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Bu tez çalışması kapsamında Asetilsistein ile ilgili safsızlık tayini için ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılarak bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen metodun validasyonu başarı ile tamamlanmıştır. Kromatografik ayırmalar, gradient elusyonla, C8 kolonda, mobil faz A: pH 2,5 tampon ve mobil faz B: Metanol kullanımıyla, 0,5 mL/dak akış hızında, PDA ve UV dedektör kullanılarak 205 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık ve aralık Asetilsistein için 2,3–49,0 µg/mL aralığında, safsızlık A için 3,2 µg/mL ve 47,6 µg/mL aralığında, safsızlık B için 3,2 µg/mL ve 46,7 µg/mL aralığında, safsızlık C için 5,7 µg/mL ve 240,1 µg/mL aralığında, safsızlık D için 4,6 µg/mL ve 48,6 µg/mL aralığında bulunmuştur. Doğruluk çalışmaları sınır değeri LOQ seviyesi, %100, %120 (Safsızlık C için %300) arasında yapılmıştır. Geliştirilen bu yöntem ilaç etken maddesinin ve saşe formunun safsızlıklarının stres çalışması sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin analizinde başarı ile uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asetilsistein, safsızlık, UPLC, validasyon.

ABSTRACT

Ayşe Zehra Özdemir (2023), Determination of Acetylcysteine impurities by stability UPLC method, Istanbul University Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry USA, Master Thesis, Istanbul.

An ultra performance liquid chromatographic method was developed for the determination of Acetylcysteine impurities. The validation of the developed method has been successfully completed. Chromatographic separations were performed by gradient elution with C8 column using mobile phase A: pH 2.5 buffer and: mobile phase B: Methanol using 0,5 mL/min flow rate. It was carried out at 205 nm wavelength using PDA and UV detector. The linear range of Acetylcysteine is between 2.3– 49 µg/mL, impurity A as 3.2 µg/mL ve 47.6 µg/mL, impurity B as 3.2 µg/mL ve 46.7 µg/mL, impurity C as 5.7 µg/mL ve 240.1 µg/mL, impurity D as 4.6 µg/mL ve 48.6 µg/mL. Accuracy studies were carried out between LOQ level, 100%, 120% (for impurity C, the upper level is 300%). This developed method has also been successfully applied to drug substance and its impurities in the pharmaceutical formulation and the analysis of the degradation products formed as a result of the stress study.

Keywords: Acetylcysteine, impurity, UPLC, validation.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Asetilsistein L-sistein'in N-asetil türevidir. Kapalı kimyasal formülü; $C_5H_9NO_3S$, molekül ağırlığı 163,19 g/mol, açık kimyasal adı [[(2R)-2-(asetilamino)-3-sülfanilpropanoik asit olan ve CAS Reg.No. 616-91-1 kodu ile tanımlanan, beyaz ya da hemen hemen beyaz renkli kristal toz ya da renksiz kristal görünümünde bir maddedir.[1]

Asetilsistein 14 Eylül 1963'te FDA onayını almıştır. [2]

Başlangıçta mukolitik bir ilaç olarak bronşiyal salgıların temizlenmesi için üretilmiş olmasına karşın, bugün daha çok akut asetaminofen (parasetamol) zehirlenmesinin tedavisi için kullanılmaktadır. Asetilsistein son zamanlarda kronik nitrat tedavisi gören hastalarda nitrat reseptörlerinin aktivitesini rejenere etmek için bir sülfhidril substratı olarak araştırılmıştır. [3]

Kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH) altta yatan lokal ve sistemik oksidatif stres ve inflamasyonun önemi uzun zamandır bilinmektedir. Hastalığın ilerlemesini engelleyebilecek tedavi eksikliği göz önüne alındığında, patolojik süreçleri etkileyerek akciğer fonksiyonu, hava yolu temizliği gibi KOAH tedavisinde sonraki sorunları etkileyecek başarılı bir terapötik yaklaşıma acil bir ihtiyaç vardır. N-asetilsistein (NAC), çeşitli enflamatuar yolları da etkileyebilen mukolitik ve antioksidan bir ilaçtır. [4]

Molekül yapısındaki sülfhidril grupları bronş salgılarında bulunan mukoproteinlerin disülfid bağlarıyla reaksiyona girer. Böylece akciğerlerdeki mukus salgılarının yoğunluğunu azaltır; salgıların öksürük, mekaniksel mekanizmalar ve postüral drenaj ile uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. [3] Sülfhidril grupları hem indirgenmiş glutatyonun öncüsü hem de doğrudan reaktif oksijen türleri (ROS) temizleyicisi olarak hareket eder, dolayısıyla hücrelerdeki redoks durumunu düzenler. Değişen redoks durumu, enflamasyonu kontrol eden yolları etkileyebilir. Ayrıca mukolitik bir ilaç olarak balgamın viskozitesini azaltarak bronşları temizleyerek dispne azalmaya ve akciğer fonksiyonlarında iyileşmeye yol açabilir. Bununla birlikte in vitro çalışmalarda ve yüksek dozda in vivo çalışmalarda başarılı olduğu kadar KOAH tedavisinde kullanılan dozlardaki etkileri tartışmalıdır. Alevlenme oranını azaltarak hastanede yatış günlerini sınırlıyor gibi görülmekte akciğer fonksiyon parametreleri

üzerinde çok az etkisi olduğu veya hiç etkisi olmadığı da düşünülmektedir. Bu düşüncelere rağmen ve KOAH'ta hastalığın ilerlemesini önleyecek etkili terapilerin mevcut eksikliği göz önüne alındığında, NAC ve türevleri çoklu moleküler etki modları ile dozlar ve uygulama yolu optimize edildikten sonra ümit verici ilaçlar olmaya devam etmektedir. [4]

Bu yüksek lisans tezi kapsamında Asetilsistein safsızlıklarının stabilite göstergeli UPLC yöntemi ile UV/PDA dedeksiyonuna dayanan bir safsızlık tayini yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, *International Conference Harmonization Q2(R1)*) klavuzuna göre validasyonu yapılmış ve geliştirilen yöntem asetilsistein safsızlıklarının analizine başarıyla uygulanmıştır. [5]



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Klinik Farmakolojisi

2.1.1. Etki Mekanizması

Asetilsistein mukolitik bir ilaçtır. Molekül yapısındaki sülfhidril grupları bronş salgılarında bulunan mukoproteinlerin disülfid bağlarıyla reaksiyona girer. Böylece akciğerlerdeki mukus salgılarının yoğunluğunu azaltır; salgıların öksürük, mekaniksel mekanizmalar ve postüral drenaj ile uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Asetilsistein proteinleri depolimerize etmediği gibi fibrin ve diğer canlı hücreler üzerinde de herhangi bir etkisi yoktur. [3]

Asetilsistein akut asetaminofen zehirlenmesi sonrası görülen hepatotoksisitenin tedavisinde antidot olarak da kullanılır. Yapısında bulunan sülfhidril grupları toksik asetaminofen metabolitleri için, karaciğerde bulunan glutatyon'un yerine substrat görevi yapar. Asetaminofen'in glutatyon'da bulunan sülfhidril gruplarını tüketerek hepatotoksisite oluşturduğuna inanılmaktadır. Asetilsistein'in asetaminofen zehirlenmesinde etkili olabilmesi için akut zehirlenmeden hemen sonraki birkaç saat içinde verilmesi gerekir. [6]

2.1.2. Emilim

Asetilsistein oral alımı takiben hızla ve çoğunlukla tamamen absorbe olur. Yüksek ilk geçiş etkisine bağlı olarak oral asetilsisteinin biyoyararlanımı çok düşüktür. [6] 60 dakika sonra 4.6 µM'lık bir zirve ile 600 mg'lık bir oral dozu takiben hızla emilir ve uygulamadan 10-12 saat sonra tamamen atılmış olur. Bozulmamış NAC molekülünün oral biyoyararlanımının yaklaşık %10 olduğu tahmin edilmektedir. [4] Ek olarak sisteinin asetillenmiş formu olarak, biyoyararlıdır.[7]

2.1.3. Dağılım

Asetilsistein 1-3 saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır, aktif metabolit sisteinin doruk plazma konsantrasyonu yaklaşık 2 mmol/l civarındadır. Asetilsistein proteinlere yaklaşık % 50 oranında bağlanır. Asetilsistein ve metabolitleri organizmada kısmen serbest olarak, kısmen kararsız disülfidler yoluyla proteinlere

bağlanarak ve kısmen de aminoasitlere bağlanmış halde olmak üzere üç farklı formda bulunur. Sıçanlarda asetilsisteinin plasentayı geçtiği ve amniyotik sıvıda bulunduğu saptanmıştır. 100 mg/kg asetilsisteinin oral uygulamadan 0.5, 1, 2 ve 8 saat sonra L-sistein metabolitinin konsantrasyonu plasenta ve fetusta maternal plazma konsantrasyonundan daha yüksektir. Asetilsisteinin insan kan-beyin bariyerini geçip geçmediğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. [6]

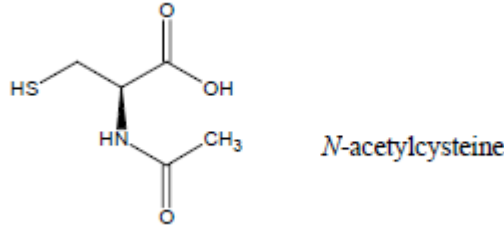
2.1.4. Biyotransformasyon ve Eliminasyon

Karaciğerde, farmakolojik olarak aktif metaboliti olan sisteine, ayrıca diasetilsisteine ve diğer karışık disülfidlere metabolize olur. Asetilsisteinin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 2.27 saattir. Karaciğer fonksiyonlarındaki bir bozukluk plazma ömrünün 8 saate kadar uzamasına yol açar. [6]

2.1.5. Atılım

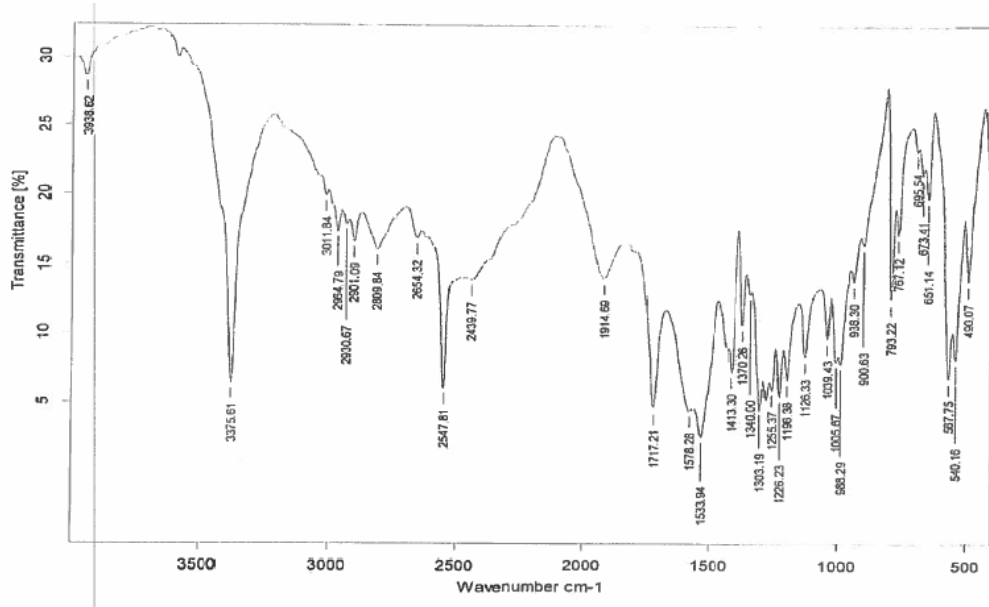
Asetilsistein, çoğunlukla inaktif metabolitler halinde böbrekler yoluyla vücuttan atılır. [6]

2.2. Asetilsistein'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1: Asetilsistein'in Kimyasal Formülü

Asetilsistein beyaz renkte ve kristalize bir tozudur. Asidik kokulu yada çürük yumurta kokuludur. Açık adı; (R)-2-Asetamido-3-sulfanilpropionik asit, kapalı formülü ise; $C_5H_9O_3NS$ şeklinde (Şekil 2-1) olup moleküler ağırlığı 163,19'dir. BP'ye göre suda ve alkolde serbestçe çözünür, metilen klorürde pratik olarak çözünmez. USP'ye göre suda 1:5 ve alkolde 1:4 oranında çözünür; kloroform ve eterde pratik olarak çözünmez. [1]



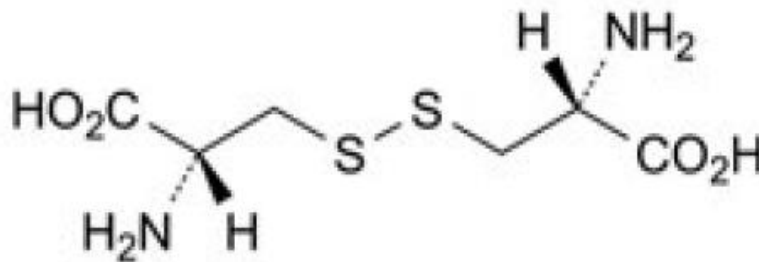
Şekil 2-2: Asetilsistein'in IR Spektrumu

2.2.1. Asetilsistein'in Safsızlıkları

Asetilsistein monografi, The European Pharmacopoeia (EP 10.3) monograflarında yer almaktadır. Bu monograflarda yer alan safsızlıklar, geliştirilecek analitik metodun validasyon parametrelerindeki çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2.1.1. Safsızlık A (L-sistin)

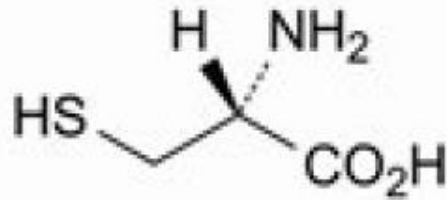
Kimyasal adı (L-sistin) 3,3'-disulfanediylbis[(2R)-2-aminopropanoik asit] (Şekil 2-3) ve kapalı formülü $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 240,29 g/mol'dür. Başlangıç materyali olarak kabul edilir. [1]



Şekil 2-3: Safsızlık A (L-sistin) kimyasal formülü

2.2.1.2. Safsızlık B (L-sistein)

Kimyasal adı (2R)-2-amino-3-sulfanilpropanoik asit (L-cysteine) (Şekil 2-4). Ve kapalı formülü $C_3H_7NO_2S$ 'dir. Molekül ağırlığı 121,15 g/mol'dür. Başlangıç materyali olarak kabul edilir. [1]



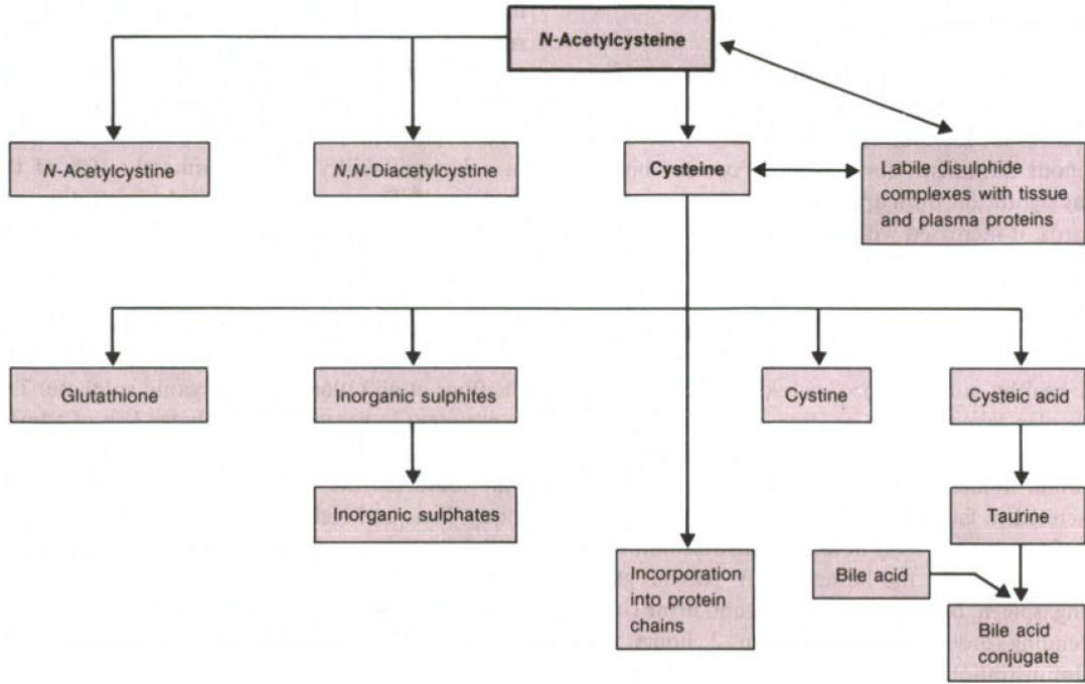
Şekil 2-4: Safsızlık B (L-sistein) kimyasal formülü

2.2.1.3. Safsızlık C (N,N'-diasetil-L-sistin)

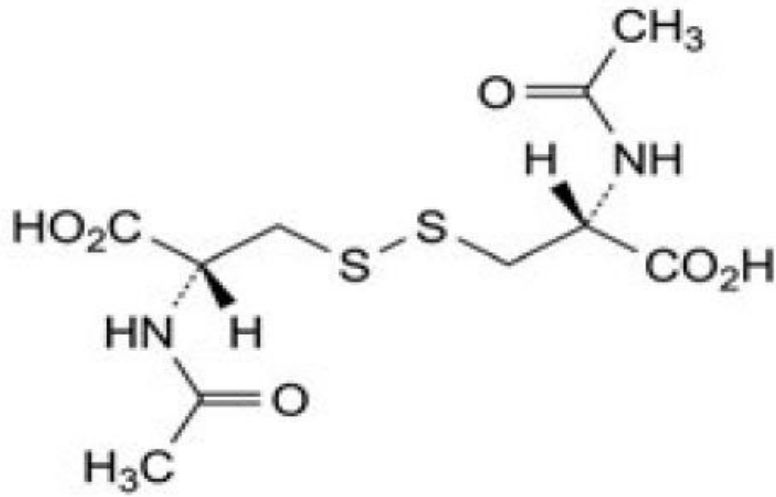
Kimyasal adı (2R,2'R)-3,3'- disulfanediylbis[2-(asetilamino) propanoik asit] tir. (Şekil 2-5). Kapalı formülü $C_{10}H_{16}N_2O_6S_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 324,37 g/mol'dür. Üretim çıktısı olarak kabul edilir.[1]

Safsızlık C, tiol gruplarının oksidasyonu ile oluşan bir asetilsistein metabolitidir ve yapı API'nin dimeridir. Safsızlık C ve Asetilsisteinin yapısı aynı kimyasal yapıyı paylaşır ve her iki safsızlık için de genotoksik yapısal uyarılar yoktur. Safsızlıklar için EMEA yönergeleri, hayvan ve insan çalışmalarında bulunan önemli metabolitler olan bozunma ürünlerinin genellikle nitelikli ve güvenli olduğunu kabul edildiğini belirtir. [8]

N-Asetilsisteinin önerilen metabolik yolu aşağıdaki tablodaki gibidir. [9]



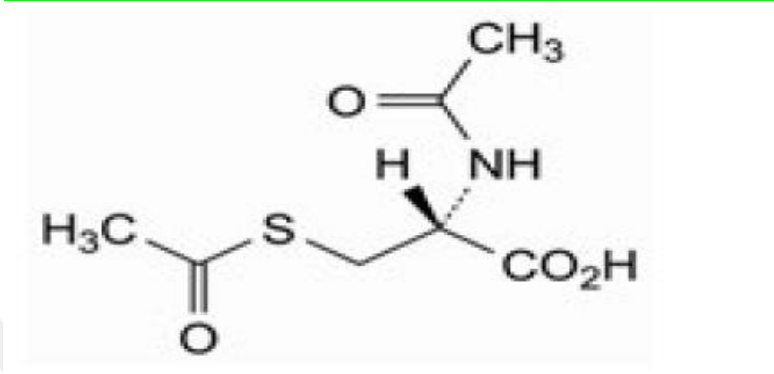
Tablo 2-1: N-Asetilsisteinin önerilen metabolik yolu



Şekil 2-5: Safsızlık C (N,N'-diasetil-L-sistin) kimyasal formülü

2.2.1.4. Safsızlık D (N,S-diasetil-L-sistein)

Kimyasal adı, 1- metiletil propil (5RS)-5-{[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-il)-1-metiletoksi]metil}-5-okso-2,4,6,8- tetraoksa -5-λ 5 – fosfanonandioat'tır (Şekil 2-6). Kapalı formülü $C_7H_{11}NO_4S$ ve molekül ağırlığı 205,23 g/mol'dür. Reaksiyon sonuç çıktısı olarak kabul edilir. [1]



Şekil 2-6: Safsızlık D (N,S-diasetil-L-sistein) kimyasal formülü

2.3. Asetilsisteine ait Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

Asetilsistein safsızlık tayini için literatürde standart yüksek performanslı sıvı kromatografik (HPLC) [1, 10, 11, 13, 15, 16] ve Kütle dedektörlü sıvı kromatografisi (LC/MS) [12, 14] yöntemleri mevcuttur. Tablo 2-2 geliştirilen bu yöntemlere ait ayrıntılar verilmiştir.

Tablo 2-2: RP-HPLC /UPLC/MS Analiz Yöntemleri

Etken Maddeler	Kolon	Mobil faz	Akış Hızı (mL/dk)	Dedeksiyon	Kaynak
N-asetils-L-sistein Efervesan Tablet	Cadenza C18 colon	pH2.20 : Metanol : Asetonitril (90:8:2)	1.0	UV dad 210 nm	[10]
N-asetils-L-sistein Efervesan Tablet	C18(250 x 4.6mm, 5µ)	pH2.0 : Mfaz B (Metanol,100ml:A setonitril,900 ml)	1.0	UV 205 nm	[11]
N-asetils-L-sistein	0.25 m x4,0 mm, 5 µm	pH3.0: Asetonitril (97:3)	1,0	UV 220 nm	[1]
N-asetils-L-sistein	C Platinyum EPS kolon (5mm, 150 mm 32.1 mm I.D.)	Asetonitril : pH 3.0 (2:98)	0,3	UV-MS	[12]
N-asetils-L-sistein	250 x 4.6mm, 5µ; Inertsil ODS-3V	pH2.5: MFaz B (Asetonitril 870ml : Metanol 130 ml)	1.0	225nm	[13]
N-asetils-L-sistein 200 mg effervesan tablet	C Platinyum EPS kolon (5µm, 150 mm32.1 mm I.D.)	Asetonitril ve amonyak formik asit (7/12mM) pH 3.0 tampon (2:98)	0.3	UV deteksiyon- kütle spektrometre si	[14]
N-asetils-L-sistein için çeşitli farmasötik formlarda (tabletler, kapsüller, efervesan tabletler, enjeksiyonlar, granüller, şuruplar)	Erimiş silika kapiler kolon 60 cm (53 cm detektör)375cm µm I.D	pH 8.40	-	UV - 214 nm	[15]
N-asetils-L-sistein Efervesan Tablet	C18 kolon [150 mm X 4.6 mm, 3µ]	0.01M Oktan- 1- sülfonik asit monohidrat sodyum tuzu / Metanol : Asetonitril [80:20]	1.0	UV-DAD detektör	[16]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez Çalışması Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve A.Ş. Esenyurt Ar-Ge merkezinde yapılmıştır.

3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler aşağıdaki gibidir:

Asetilsistein ¹

Safsızlık-A²

Safsızlık-B²

Safsızlık-C ²

Safsızlık-D³

Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe⁴

Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Ortak Granülü Plasebo⁴

Heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu ⁵

Hidroklorik Asit⁶

Monobazik Potasyum Fosfat⁶

Metanol⁷

Orto Fosforik Asit %85⁸

Yüksek saflıkta su (HPLC saflığında)

¹Wuhan

²VSK

³EP

⁴Abdi İbrahim İlaç Sanayi

⁵Fischer

⁶Merck

⁷Sigma

⁸Isolab

3.2 Çözeltiler

3.1.1 Mobil faz

Mobil faz A: 3.2 gram Heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu ve 2.72 gram monobazik potasyum fosfat 1000 ml' lik balona alındı. Bir miktar saf su ilave edilip çözüldükten sonra üzerine 4 ml seyreltik fosforik asit çözeltisi ilave edildi. Su ile hacmine tamamlandı. Hazırlandıktan sonra pH kontrol edildi ve pH değeri 2.5 ± 0.05 'e seyreltik fosforik asit ile ayarlandı. 0.45 mikron membran filtre ile süzüldü.

Mobil faz B: Metanol

3.1.2 Çözücü

Çözücü -1 Karışımı

1000 ml'lik balon jojeye 83 ml HCl (%37.'lik) ilave edildikten sonra hacmine deiyonize su ile tamamlandı.

Çözücü -2 Karışımı

5 ml 1 N HCl çözeltisinden pipetle çekilerek 100 ml'lik balon jojeye alındı. Su ile hacmine tamamlandı.

3.1.3 Asetilsistein Safsızlık Analizi için Hazırlanan Çözeltiler

Asetilsistein Stok Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Yaklaşık 4 mg asetilsistein çalışma standardı 10 ml'lik bir balon jojeye tartıldı. 0.5 ml 1 N HCl eklenerek çözülmesi sağlandı. Su ile hacmine tamamlandı. Çözelti 0.45 μ m PVDF filtreden süzüldü. ($C_{\text{Asetilsistein}}$: 0.4 mg/ml).

Asetilsistein Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Asetilsistein stok standart çözeltisinden 1 ml alınarak 10 ml'lik bir balon jojeye tartıldı. 0.05 N HCL çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Çözeltiler 0.45 μ m PVDF filtreden süzülerek vialle aktarıldı. ($C_{\text{Asetilsistein}}$: 0.04 mg/ml).

Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Yaklaşık 3500 mg Asetilsistein 600 mg Saşe numunesi 25 ml balon jojeye tartıldı. 5 ml 1 N HCl eklenerek 2-3 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlandı. Hacmine su ile tamamlandı. Çözelti 1 saat bekletildi ve sonra 0.45 μ m PVDF filtreden süzülerek vialle aktarıldı.

Not: Numune hazırlandıktan 1 saat sonra tekrar enjekte edildi. Numunede alanı artan pik 2-metil-2-tiazolin karboksilik asit olarak tanımlandı ve bu alıkonma zamanındaki pik safsızlık olarak kabul edilmedi.

Asetilsistein 200 mg Saşe için Safsızlık Tayini Numune Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 3500 mg numune (200 mg Asetilsistein'e eşdeğer) tartılarak 25 ml'lik balon jojeye aktarıldı. 5 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözünme için 3-4 ml su eklenerek 2-3 dakika sıcak olmamasına dikkat edilen bir ultrasonik banyoda tutuldu. Hacmine su ile tamamlandı. Çözelti 0.45µm PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı. ($C_{\text{Asetilsistein}} : 8.0 \text{ mg/ml}$).

Asetilsistein 600 mg Saşe için Safsızlık Tayini Numune Çözeltisi Hazırlığı

Yaklaşık 3500 mg numune (200 mg Asetilsistein'e eşdeğer) tartılarak 25 ml'lik balon jojeye aktarıldı. 5 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözünme için 3-4 ml su eklenerek 2-3 dakika sıcak olmayan bir ultrasonik banyoda tutuldu. Hacmine su ile tamamlandı. Çözelti 0.45µm PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı.

Plasebo Çözeltisi Hazırlanması

200 mg asetilsisteine karşılık gelen plasebo 25 ml'lik balon jojeye aktarıldı. 5 ml 1 N HCl eklenerek 2-3 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve çözünmesi sağlandı. Hacmine su ile tamamlandı. Çözelti 0.45µm PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı.

Safsızlık A (L-cystine) Stok Standart Çözeltisi Hazırlanışı

4.0 mg Safsızlık A (L-cystine) standardı 10 ml'lik amber renkli balon jojeye aktarıldı. Üzerine 0.5 ml 1 N HCl eklendi ve hacmine distile su ile tamamlandı.

Safsızlık A (L-cystine) Standart Çözeltisi Hazırlanışı

Safsızlık A (L-cystine) stok standardı çözeltisinden 1.0 ml alınarak 10 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak aktarıldı, çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. 0.45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı.. ($C_{\text{Safsızlık A}} : 0.04 \text{ mg/ml}$).

Safsızlık B (L-cysteine) Stok Standart Çözeltisi Hazırlanışı

4.0 mg Safsızlık B (L-cysteine) standardı 10 ml'lik amber renkli balon jojeye aktarıldı. Üzerine 0.5 ml 1 N HCl eklendi ve hacmine distile su ile tamamlandı.

Safsızlık B (L-cysteine) Standart Çözeltisi Hazırlanışı

Safsızlık B (L-cysteine) stok standardı çözeltisinden 1.0 ml alınarak 10 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak aktarıldı, çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. 0.45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı. ($C_{\text{Safsızlık B}} : 0.04 \text{ mg/ml}$).

Safsızlık C (N, N'-diacetyl-L-cystine) Stok -1 Standart Çözeltisi Hazırlanışı

8.0 mg Safsızlık C (N, N'-diacetyl-L-cystine) standardı 20 ml'lik amber renkli balon jojeye aktarıldı. Üzerine 0.1 ml 5 N HCl eklendi ve hacmine distile su ile tamamlandı. Bu çözeltiden 12.0 ml alınarak 20 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak aktarıldı, çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı.

Safsızlık C (N, N'-diacetyl-L-cystine) Standart Çözeltisi Hazırlanışı

Safsızlık C (N, N'-diacetyl-L-cystine) stok standardı çözeltisinden 5 ml alınarak 15 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak aktarıldı, çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. 0.45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı. (C_{Safsızlık C}: 0.08 mg/ml).

Safsızlık D (N, S-diacetyl-L-cysteine) Stok Standart Çözeltisi Hazırlanışı

4.0 mg Safsızlık D (N, S-diacetyl-L-cysteine) standardı 10 ml'lik amber renkli balon jojeye aktarıldı. Üzerine 0.5 ml 1 N HCl eklendi ve hacmine distile su ile tamamlandı.

Safsızlık D (N, S-diacetyl-L-cysteine) Standart Çözeltisi Hazırlanışı

Safsızlık D (N, S-diacetyl-L-cysteine) stok standardı çözeltisinden 1.0 ml alınarak 10 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak aktarıldı, çözücü ile hacmine tamamlanarak karıştırıldı. 0.45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı. (C_{Safsızlık D}: 0.04 mg/ml).

Safsızlık İlave Edilmiş Numune Hazırlığı

10 adet Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Şaşe Hazırlamak için Granül tartılarak ortalama şaşe ağırlığı belirlendi. Bu karışımdan yaklaşık 3500.0 mg toz (200 mg Asetilsisteine eşdeğer) tartılarak 25 ml' lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 5 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözünme için 3-4 ml su eklenerek 2-3 dakika sıcak olmamasına dikkat edilen bir ultrasonik banyoda tutuldu. Üzerine Safsızlık A (L-cystine), Safsızlık B (L-cysteine), Safsızlık C (N, N'-diacetyl-L-cystine), Safsızlık D (N, S-diacetyl-L-cysteine) stok çözeltilerinden 2.5'er ml eklendi. Hacmine distile su ile tamamlanarak karıştırıldı. 0.45 µm'lik PVDF filtreden süzülerek viale aktarıldı.

(C_{Asetilsistein} : 8.0 mg/ml, C_{Safsızlık A (L-Cystine)} : 0.04 mg/ml, C_{Safsızlık B (L-Cysteine)} : 0.04 mg/ml, C_{Safsızlık C} : 0.08 mg/ml , C_{Safsızlık D} : 0.04 mg/ml)

3.2 Aletler ve Diğer Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve gereçler aşağıda sıralanmıştır.

1. UPLC Cihazı: Agilent - Alliance UPLC Sistemi UV ve PDA dedektör), , Dedektör UV/Visible, Dedektör PDA (Photodiode Array Dedector) 2996 Empower Yazılımı (versiyon 3)
2. UPLC Kolonu: UPLC Acquity C8, 1.7 µm, 100 x 2.1mm
3. Analitik Teraziler
Mettler Toledo AX204 Terazi (Goettingen, Almanya)
Mettler Toledo UMX-2 Terazi (Goettingen, Almanya)
4. Transonic 890 ultrasonik Banyo
5. Waters Vida kapaklı UPLC Vialleri 2 mL (Massachusetts, ABD)
6. Elga Purelab Flex 2 Su Saflaştırma Sistemi (Saint-Maurice, Fransa)
7. Cam Malzemeler:
Isolab Balonjoje (10, 25, 100, 200 mL) (Wertheim, Almanya)
Isolab Mezür (50, 100, 2000 mL) (Wertheim, Almanya)
Isolab Mezür (2000 mL) (Wertheim, Almanya)

3.3 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

Literatür çalışmaları incelendikten sonra UPLC sisteminde Asetilsistein ve safsızlıklarının yan yana analizlerinin yapılmasına karar verilmiştir. Analiz yönteminin geliştirilmesi aşamasında aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.3.1 Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi

Asetilsisteinin etken madde kapsamında yapılan çalışmada PDA dedektörde 3 boyutlu tarama yaparak en uygun dalga boyu seçimi yapılmıştır. Kimyasal yapıları dolayısıyla sahip oldukları UV absorpsiyonlarına dayanarak metot geliştirme çalışmalarında Ultraviyole Visible (UV/VIS) veya PDA dedektörlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Aynı anda çoklu dalga boyu ölçme avantajına sahip olduğu için PDA dedektör kullanılmıştır. Sonuçlar bölüm 4.2.1’de verilmiştir.

3.3.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Metot geliştirme çalışmaları boyunca stasyonier faz olarak Acquity C8, 1.7 µm, 100 x 2.1mm ve Inertsil ODS4, 250 x 4.6 mm, 3 µm analitik kolonu, mobil faz karışımları olarak da Tampon: Metanol (92:8) ile metanolün gradient uygulamaları (Deneme-1) ve pH 2.5 Fosfat Tamponu ve metanol kombinasyonları (Deneme 2) denenmiştir. Elde edilen sonuçlar bölüm 3.1.2' de verilmiştir.

Kromatografik Şartlar

Deneme -1

Kullanılacak Cihaz	: HPLC, Waters UV veya PDA
Kolon	: Inertsil ODS4, 250 x 4.6 mm, 3 µm
Mobil Faz A	: Tampon: Metanol (92:8)
Mobil Faz B	: Metanol
Dalga Boyu	: 215 nm
Akış Hızı	: Gradient
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µl
Enjeksiyon Süresi	: 35 dakika (standart için) 75 dakika (çözücü, plasebo, numune için)
Kolon Sıcaklığı	: 25 ° C
Numune Sıcaklığı	: 10 ° C
Çözücü: 1.0	ml, 1 N HCl 100 ml' lik amber renkli balon jojeye aktarıldı ve hacmine saf su ile tamamlanıp, karıştırıldı.

Tampon Çözeltisi Hazırlığı

2.800 g Potasyum Dihidrojen Fosfat, 1.750 g Heptan-1-Sülfonik Asit Sodyum tuzu ve 2.200 g 1- Hekzan Sülfonik Asit Sodyum tuzu 1000 ml saf su ile çözüldü. pH 2.5 ± 0.05'e Fosforik Asit ile ayarlandı. 0.45 µm membran filtre ile süzülerek degaze edildi.

1 N HCl Çözeltisinin Hazırlanması

100 ml'lik balon jojeye 50 ml saf su konuldu. Üzerine 8.3 ml konsantre HCl (% 37'lik) ilave edildikten sonra hacmine saf su ile tamamlandı.

Gradient Program:

Zaman (dk.)	Akış	Mobil faz A	Mobil faz B
0	1.0	100	0
10	1.0	100	0
12	1.3	100	0
27	1.3	100	0
30	1.0	100	0
35	1.0	100	0
50	1.0	20	80
55	1.0	20	80
60	1.0	100	0
75	1.0	100	0

Deneme -2**Kullanılacak Cihaz** : UPLC; UV ve PDA dedektör**Kolon** : UPLC Acquity C8, 1.7 µm, 100x2.1mm**Mobil faz A** : pH 2.5 Fosfat Tamponu**Mobil faz B** : Metanol**Akış hızı** : 0.5 ml/dk**Dalga Boyu** : 205 nm**Dedektör Numunelerndirme Oranı:** 20**Zayıf Yıkama** : %95 Su, %5 Metanol**Zayıf Yıkama Hacmi** : 600 µl**Güçlü Yıkama** : Metanol**Güçlü Yıkama Hacmi** : 200 µl**Numuneleme döngü seçeneği** : Parçalı döngü **Loop Hacmi** : 5 µl**Enjeksiyon hacmi** : 2 µl**Şırınga Çekiş Hızı** : 60 µl /dk**Kolon Sıcaklığı** : 40° C**Numune Sıcaklığı** : 10° C**Çözücü** : 1N HCl (%5)- Su (%95)**Gradient Programı:**

Zaman (dk.)	Mobil faz A	Mobil faz B
0	95	5
5	95	5
5.01	90	10
14	90	10
14.01	95	5
16	95	5

3.4 Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Metot geliştirilmesi tamamlandıktan sonra metodun validasyonu ICH Kılavuzu Q2 (R1)'ye göre yapılmıştır. [5]

3.4.1 Seçicilik

Seçicilik testi için çözücü, Asetilsistein Saşe hazırlamak için Granül plasebosu, Asetilsistein standardı, Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Saşe hazırlamak için Granül numune, Asetilsistein safsızlık standartları ve safsızlık eklenmiş Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Saşe hazırlamak için Granül numune çözeltileri sisteme enjekte edildi. Enjekte edilen çözeltilerin spektrumları alındı ve ilgili kromatogramlar Şekil 4-6 ve Şekil 4.33 arasında yer almaktadır.

Çalışma sonunda elde edilen kromatogramlar ve pik saflık değerleri bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

3.4.1.1 Çözelti Hazırlığı

Çözücü, Asetilsistein Saşe hazırlamak için Granül plasebosu, Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Saşe hazırlamak için Granül numune, Asetilsistein Standardı ve AsetilsisteinSafsızlık Standardları Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Kabul Kriteri

- Standart, numune ve safsızlık ilave edilmiş numune çözeltisi kromatogramlarında Asetilsistein ve Safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık C ve Safsızlık D piklerinin alıkonma zamanında çözücü ve plasebodan gelen herhangi bir pik olmamalıdır.

- Standart, numune ve safsızlık ilave edilmiş numune çözeltisi kromatogramlarında Asetilsistein ve Safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık C ve Safsızlık D piklerinin spektrumları diğer pikler ile girişim yapmadığını göstermelidir.
- Standart, numune ve safsızlık ilave edilmiş numune çözeltisi kromatogramlarında Safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık C ve Safsızlık D piki için purity angle < purity threshold olmalıdır.

3.4.2 Doğrusallık

Asetilsistein standardı ve Asetilsistein safsızlık standartları A, B, C ve D için lineer cevap ilişkisi çalışılmalarında LOQ seviyesi ile spesifikasyonun %120' si arasındaki 8 farklı konsantrasyonda, Safsızlık C için ise LOQ seviyesi ile spesifikasyonun %300' ü arasındaki 9 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin konsantrasyon aralığında pik alanları ölçüldü.

Asetilsisteinin doğrusallık çalışması için Bölüm 3.1.3' de hazırlanışı anlatılan Asetilsistein standart çözeltisi Tablo 3-1'de belirtilen oranlarda seyreltilerek doğrusallık çözeltileri hazırlandı.

Tablo 3-1 Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Çözelti Hazırlığı

Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg mL)
Linearite-1	LOQ	*	*
Linearite-2	% 10	0.25/25	4,00
Linearite-3	% 20	0.5/25	8,00
Linearite-4	% 30	0.75/25	16,0
Linearite-5	% 60	1.5/25	24,0
Linearite-6	% 75	1.875/25	30,0
Linearite-7	% 100	2.5/25	40,0
Linearite-8	% 120	3/25	48,0

Safsızlık A için doğrusallık çözeltileri Bölüm 3.1.3’de hazırlanışı anlatılan Asetilsistein Safsızlık A standart çözeltisi Tablo 3-2’de belirtilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

Tablo 3-2 Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık A Çözelti Hazırlığı

Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg mL)
Linearite-1	LOQ	*	*
Linearite-2	% 10	0.25/25	4,00
Linearite-3	% 20	0.5/25	8,00
Linearite-4	% 30	0.75/25	16,0
Linearite-5	% 60	1.5/25	24,04
Linearite-6	% 75	1.875/25	30,0
Linearite-7	% 100	2.5/25	40,0
Linearite-8	% 120	3/25	48,0

Safsızlık B için doğrusallık çözeltileri Bölüm 3.1.3’de hazırlanışı anlatılan Asetilsistein Safsızlık B standart çözeltisi Tablo 3-3’de belirtilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

Tablo 3-3 Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık B Çözelti Hazırlığı

Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg mL)
Linearite-1	LOQ	*	*
Linearite-2	% 10	0.25/25	4,00
Linearite-3	% 20	0.5/25	8,00
Linearite-4	% 40	0.75/25	16,0
Linearite-5	% 80	1.5/25	24,0
Linearite-6	% 75	1.875/25	30,0
Linearite-7	% 100	2.5/25	40,0
Linearite-8	% 120	3/25	48,0

Safsızlık C için doğrusallık çözeltileri Bölüm 3.1.3’de hazırlanışı anlatılan Asetilsistein Safsızlık C stok standart ve Asetilsistein Safsızlık C stok-2 standart çözeltileri ile Tablo 3-4’de belirtilen oranlarda seyreltme yapılarak hazırlandı.

Tablo 3-4 Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık C Çözelti Hazırlığı

Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg / mL)
Linearite-1	LOQ	*	*
Linearite-2	% 10	0.5/15	8,00
Linearite-3	% 20	1.0/15	16,0
Linearite-4	% 30	1.0/10	32,0
Linearite-5	% 60	5/25	48,0
Linearite-6	% 75	5/20	64,0
Linearite-7	% 100	5/15	80,0
Linearite-8	% 120	4/10	96,0
Linearite-9	% 300	Stok	240,0

Safsızlık D için doğrusallık çözeltileri Bölüm 3.1.3’de hazırlanışı anlatılan Asetilsistein Safsızlık D standart çözeltisi Tablo 3-5’de belirtilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

Tablo 3-5 Doğrusallık Çalışması için Asetilsistein Safsızlık D Çözelti Hazırlığı

Çözelti Adı	Doğrusallık Seviyesi	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg /mL)
Linearite-1	LOQ	*	*
Linearite-2	% 10	0.25/25	4,00
Linearite-3	% 20	0.5/25	8,00
Linearite-4	% 40	0.75/25	16,0
Linearite-5	% 80	1.5/25	24,0
Linearite-6	% 75	1.875/25	30,0
Linearite-7	% 100	2.5/25	40,0
Linearite-8	% 120	3/25	48,0

Her bir standart çözeltinin derişiminden ardışık 6 şar enjeksiyon yapıldı ve elde edilen pik alanları ile en küçük kareler yöntemine göre doğrusallık denklemleri hesaplanmıştı.

Sonuçlar ve doğrusallık grafikleri bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

3.4.3 Kesinlik

3.5.3.1 Sistem Kesinliği

Asetilsistein Standart çözeltisinden ardışık 6 enjeksiyon yapıldı. Elde edilen pik alanlarının relatif standart sapma değeri (% RSD) hesaplandı. Standart sapma (SD), güven aralığı (GA %95) ve pik performans parametreleri raporlandı.

Kabul Kriteri

- Standart çözeltisi 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen alanlar arasındaki % RSD değeri % 4.0’dan fazla olmamalıdır.

SD, GA (%95) ve sistem uygunluk parametrelerini (Alıkonma Zamanı, Simetri Faktörü, Teorik Plaka Sayısı) içeren sonuçlar bölüm 4.2.3.1’ de verilmiştir.

3.5.3.2 Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.1.3’ de anlatıldığı şekilde 1 adet çözücü, 1 adet plasebo, 2 adet standart, 2 adet Asetilsistein 200 mg Şaşe hazırlamak için Granül numunesi, 2 adet Asetilsistein 600 mg Şaşe hazırlamak için Granül numunesi, 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 200 mg Şaşe Hazırlamak için Granül numunesi ve 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 600 mg Şaşe Hazırlamak için Granül numunesi hazırlanarak analiz edildi.

Kabul Kriteri

- Safsızlık eklenmemiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.

- 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD % 4.0’dan büyük olmamalıdır.

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.3.2’ de verilmiştir.

3.5.3.3 Ara Kesinlik

Farklı bir günde, farklı UHPLC cihazı kullanarak, farklı bir analist tarafından, farklı seri numaralı kolon ile bölüm 3.1.3’de anlatıldığı şekilde 1 adet çözücü, 1 adet plasebo, 2 adet standart, 2 adet Asetilsistein 200 mg Saşe hazırlamak için Granül numunesi, 2 adet Asetilsistein 600 mg Saşe hazırlamak için Granül numunesi, 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi ve 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi hazırlanarak analiz edildi.

Kabul Kriteri

- Safsızlık eklenmemiş numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.
 - 6 adet numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD % 4.0’dan büyük olmamalıdır.
 - Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizlerine ait 12 numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD % 4.0’dan büyük olmamalıdır.
- Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.3.3’ de verilmiştir.

3.4.4 Doğruluk ve Geri Kazanım

Bir analitik metodun doğruluğu, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonuna karşı elde edilen test sonucunun her seviye için belirli bir aralık içinde olması olarak açıklanır.

Asetilsistein 200mg ve 600 mg Bilinen safsızlık için Numune Çözeltisi Hazırlığı:

Bölüm 3.1.3’ de anlatıldığı şekilde Asetilsistein safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık ve Safsızlık D stok standart çözeltileri hazırlandı. Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül Plasebo’dan yaklaşık 3200 mg 25 ml’lik amber renkli balon jöjeye tartıldı ve üzerilerine her bir seviye için Tablo 3-1, 3-2, 3-3, 3-4 ve 3-5’de belirtilen hacim ve miktarda safsızlık standart stok çözeltisinden eklenir. Daha sonra üzerine 5 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözünme için 3-4 ml su eklenerek 2-3 dakika ultrasonik banyoda tutuldu, ancak ultrasonik banyonun sıcak olmamasına dikkat edildi. Üzerine aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda bilinmeyen safsızlıklar için stok

standart çözeltisi ilave edildi. Hacmine saf su ile tamamlandı. Çözelti 0.45 µm' lik PVDF filtreden süzülerek vial e aktarıldı. Her bir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlandı.

Tablo 3-6 Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe - Safsızlık A, Safsızlık B, ve Safsızlık D Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu

Çözelti Adı	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg /mL)
LOQ	*	*
% 100	2.5/25	40,0
% 120	3/25	48,0

Tablo 3-7 Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe - Safsızlık C Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu

Çözelti Adı	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (µg / mL)
LOQ	*	*
% 100	7.5/25	80,0
% 300	Stok	240,0

Asetilsistein 200mg ve 600 mg Bilinmeyen safsızlık için Numune Çözeltisi Hazırlığı:

Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı şekilde her bir seviye için Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül Plasebo'dan yaklaşık 3200 mg 25 ml'lik amber renkli balon jofeye tartıldı. 5 ml 1 N HCl ilave edildi. Çözünme için 3-4 ml su eklenerek sıcak olmamasına özen gösterilerek 2-3 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Üzerine aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda bilinmeyen safsızlıklar için stok standart çözeltisi ilave edildi. Hacmine saf su ile tamamlandı. Çözelti 0.45 µm' lik PVDF filtreden süzülerek vial e aktarıldı. Her bir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlandı.

Bilinmeyen Safsızlıklar İçin Stok Standart Çözeltisi Hazırlığı

4.0 mg Asetilsistein çalışma standardı 10 ml'lik amber renkli balon jojeye hassas olarak tartıldı. Üzerine 5 ml 1 N HCl ve yaklaşık 3 ml saf su eklenerek çözülmesi sağlandı. Saf su ile hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Atomoksetin}}$:0.4 mg/ml)

Tablo 3-8 Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe - Bilinmeyen Safsızlık Geri Kazanım numuneleri hazırlama tablosu

Çözelti Adı	Seyreltme (mL/mL)	Konsantrasyon (μg /mL)
LOQ	*	*
% 100	2.5/25	40,0
% 120	3/25	48,0

Kabul Kriteri

- Çalışılan LOQ seviyesi numunlerinin % geri kazanımı % 85.0 ile % 115.0 arasında olmalıdır.
- Çalışılan % 100 ve % 120 seviyeleri numunelerinin % geri kazanımı % 95.0 ile % 105.0 arasında olmalıdır.

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.4' de verilmiştir.

3.4.5 Sağlamlık

Sağlamlık yöntem parametrelerindeki kasıtlı varyasyonlara karşı bir analizin güvenilirliğinin gösterilmesidir. Sağlamlığın değerlendirilmesi metot geliştirme aşamasında yapılmalıdır ve çalışılan prosedürün türüne bağlı olarak farklılık gösterebilir. Ölçümler koşullardaki değişikliklere duyarlıysa, analitik koşullar kontrol edilmeli veya prosedüre bir önlem ifadesi dahil edilmelidir.

Bölüm 3.1.3'de anlatıldığı şekilde 1 adet çözücü, 1 adet plasebo, 2 adet standart çözeltisi, 2 adet Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi, 2 adet Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi, 2 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi ve 2 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi

hazırlanarak analiz edildi. % Safsızlık sonuçları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tekrarlanabilirlik sonuçları ile karşılaştırıldı.

Uygulanacak değişiklikler aşağıdaki gibidir:

- Dalga Boyu : 200 nm & 210 nm
- Akış hızı : 0.4ml/dk & 0.6ml/dk

Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.5’de verilmiştir.

3.4.6 Çözelti Stabilitesi

Stabilite çalışmaları numune ve standart çözeltilerinin belirlenen koşullarda ne kadar süre ile stabil kaldığının ve ne kadar süre kullanılabilir olduğunun ölçüldüğü çalışmalardır. Standart, numune ve safsızlık eklenmiş numune çözeltileri hazırlanır. Belirli zaman aralıkları boyunca saklama şartları (10°C) sabit tutularak analiz edilir.

Bölüm 3.1.3’de anlatıldığı şekilde Asetilsistein standardı, Asetilsistein Safsızlık Standartları, Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi ve Safsızlık eklenmiş Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Granül numunesi çözeltisi hazırlandı. En az 36 saat boyunca belirli zaman aralıklarında saklama şartları sabit tutularak analiz edildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

Kabul Kriteri:

Çalışma sonucunda % 95,0 - %105,0 olan değerler için çözelti stabil sayılmalıdır.

Tablo 3-9: LOD&LOQ Özet Tablosu

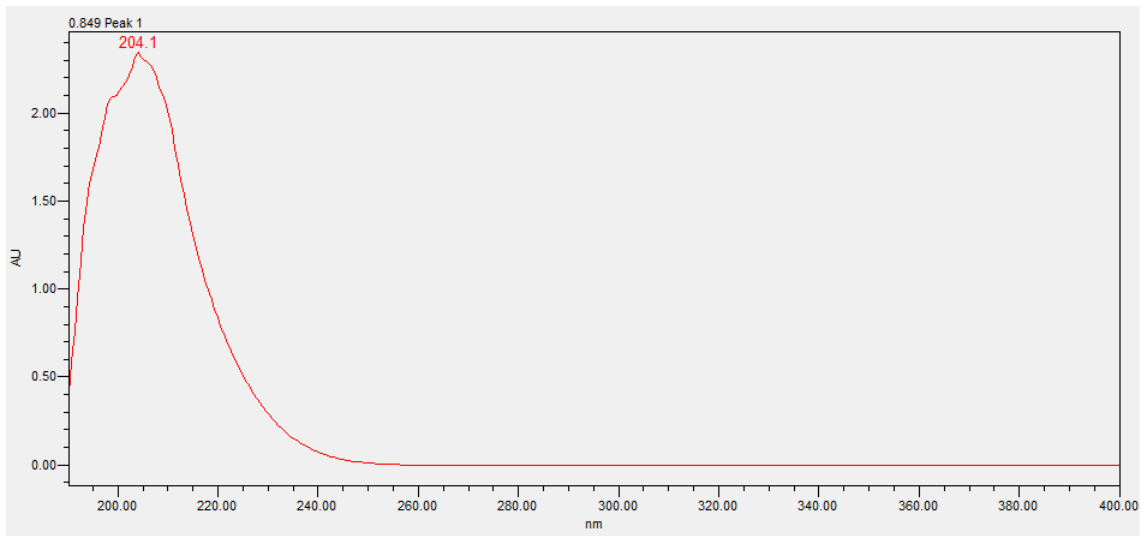
Numune Adı	LOD (%)	LOQ (%)
Asetilsistein	0.010	0.031
Safsızlık-A	0.013	0.040
Safsızlık-B	0.013	0.041
Safsızlık-C	0.024	0.072
Safsızlık-D	0.019	0.057

4. BULGULAR

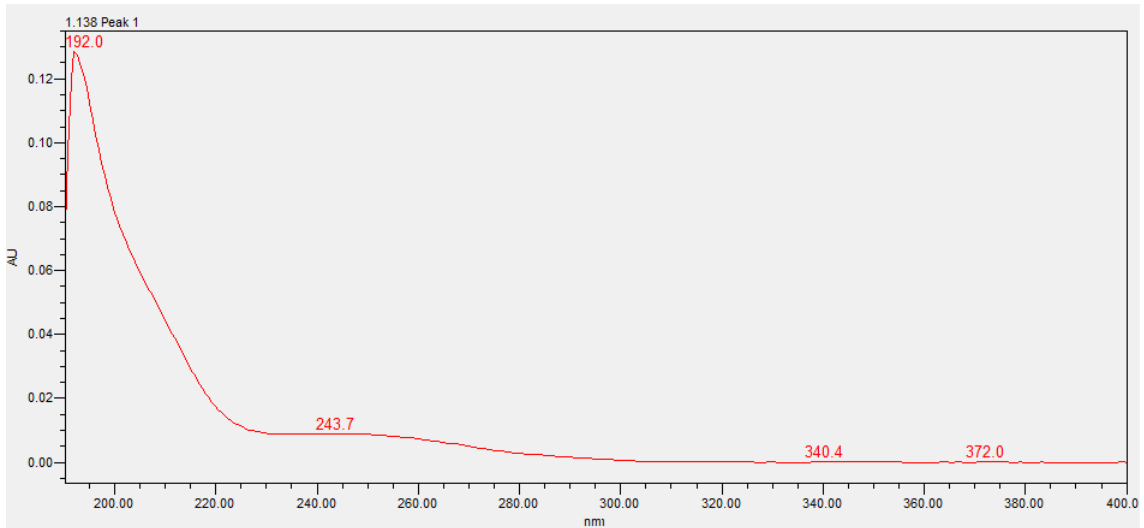
4.1 Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

4.1.1 Dedektör ve Dalga Boyu Seçimi Çalışmalarına ait Bulgular

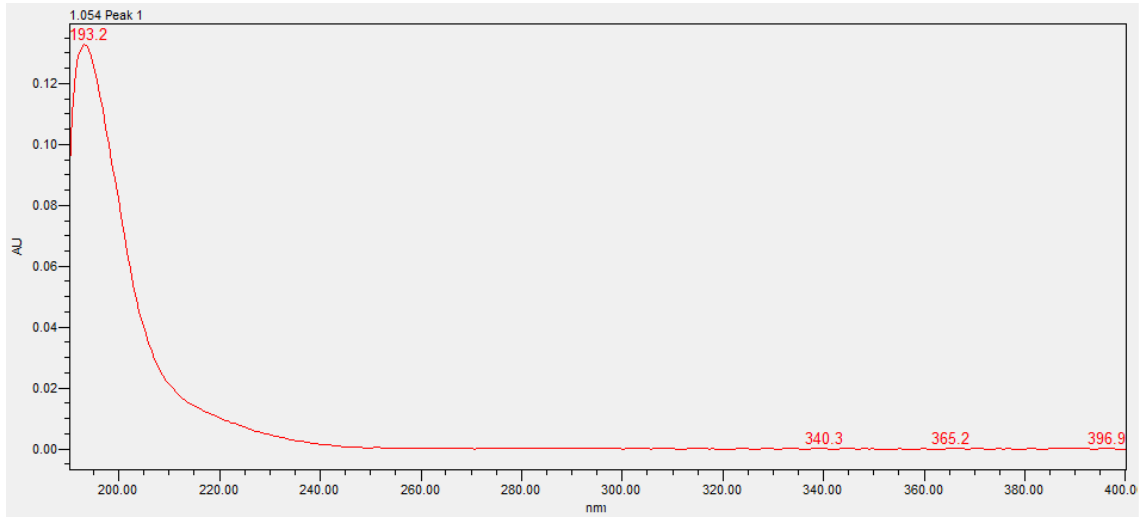
Geliştirilen yöntemin dalga boyu seçiminde Asetilsistein'nin maksimum absorbans verdiği dalgaboyuna yakın olan 205 nm dalga boyu seçilmiştir. Asetilsistein, Safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık C, ve Safsızlık D standart Çözeltilerinin spektrum sonuçları Şekil 4-1 ve Şekil 4-5 arasında yer almaktadır.



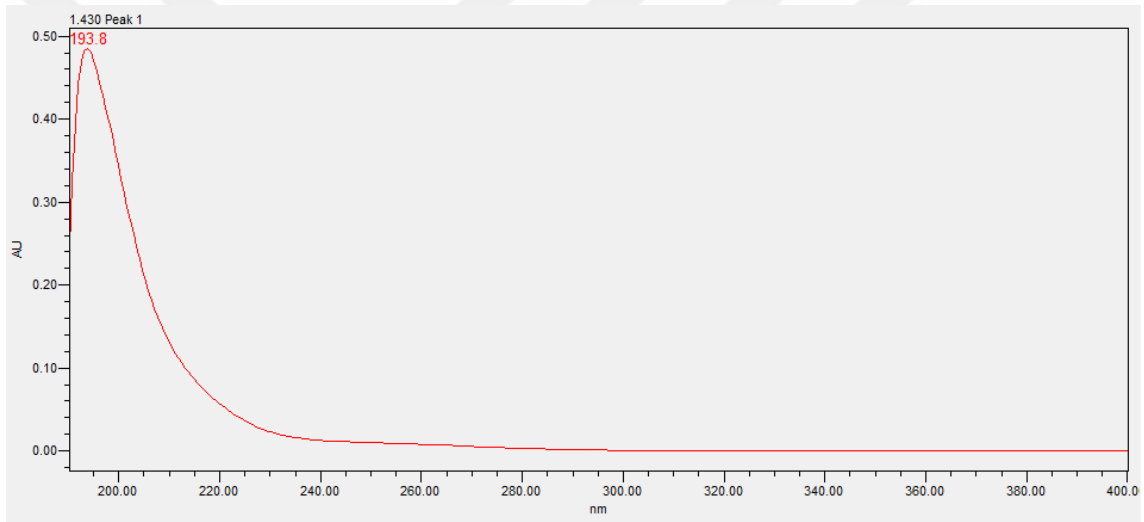
Şekil 4-1: Asetilsistein standart Çözeltilisinin spektrumu



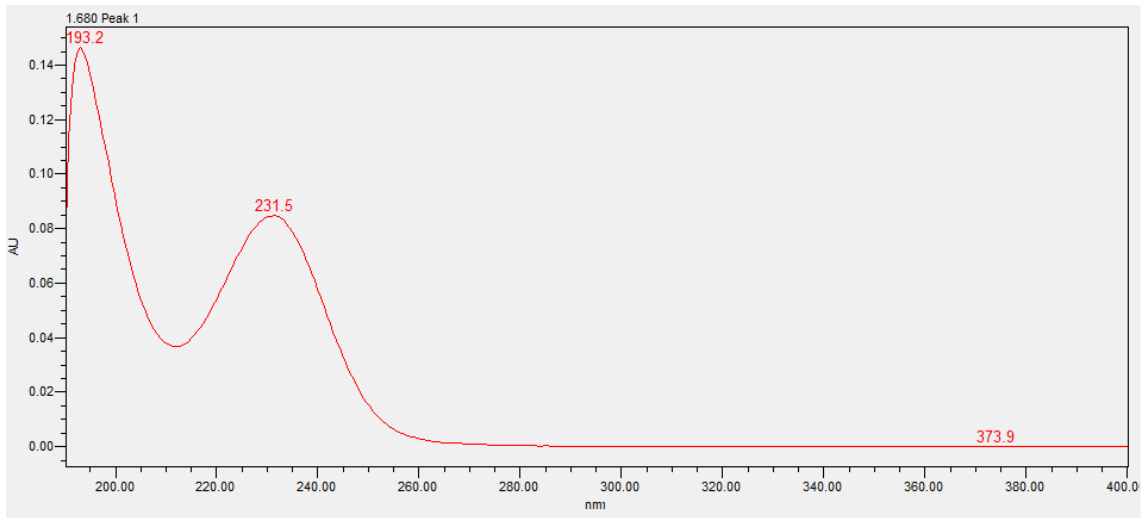
Şekil 4-2: Asetilsistein Safsızlık A standart Çözeltilisinin spektrumu



Şekil 4-3: Asetilsistein Safsızlık B standart Çözeltisinin spektrumu



Şekil 4-4: Asetilsistein Safsızlık C standart Çözeltisinin spektrumu



Şekil 4-5: Asetilsistein Safsızlık D standart Çözeltisinin spektrumu

4.1.2 Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Geliştirilen yönteme ait kromatografik şartlar ve gradient elüsyon programı aşağıda verilmiştir.

Kromatografik Şartlar

UPLC

Kullanılacak Cihaz	: UPLC; UV ve PDA dedektör
Kolon	: UPLC Acquity C8, 1.7 µm, 100x2.1mm
Mobil faz A	: pH 2.5 Fosfat Tamponu
Mobil faz B	: Metanol / (Methanol)
Akış hızı	: 0.5 ml/dk
Dalga Boyu	: 205 nm
Dedektör Numunelendirme Oranı	: 20
Zayıf Yıkama	: % 95 Su, %5 Metanol
Zayıf Yıkama	: 600 µl
Güçlü Yıkama	: Metanol
Güçlü Yıkama Hacmi	: 200 µl
Numuneleme döngü seçeneği	: Parçalı döngü
Loop Hacmi	: 5 µl
Enjeksiyon hacmi	: 2 µl
Şırınga Çekiş Hızı	: 60 µl /dk
Kolon Sıcaklığı	: 40° C
Numune Sıcaklığı	: 10° C
Çözücü	: 1N HCl (%5)-Su (%95)

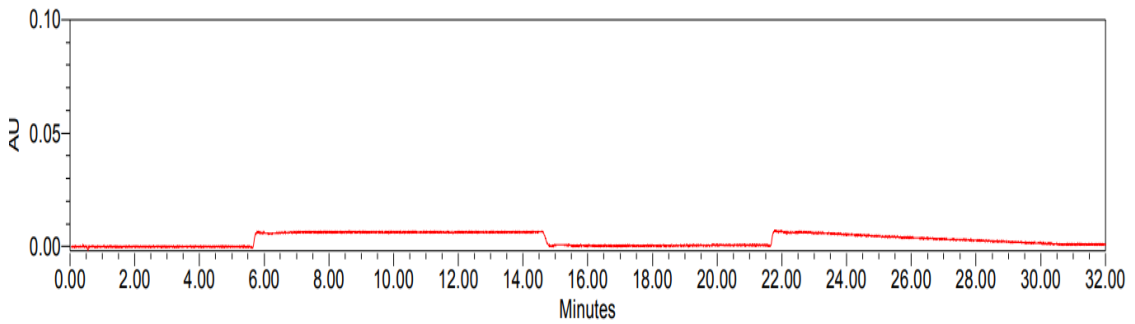
Gradient Programı:

Zaman (dk.)	Mobil faz A	Mobil faz B
0	95	5
5	95	5
5.01	90	10
14	90	10
14.01	95	5
16	95	5

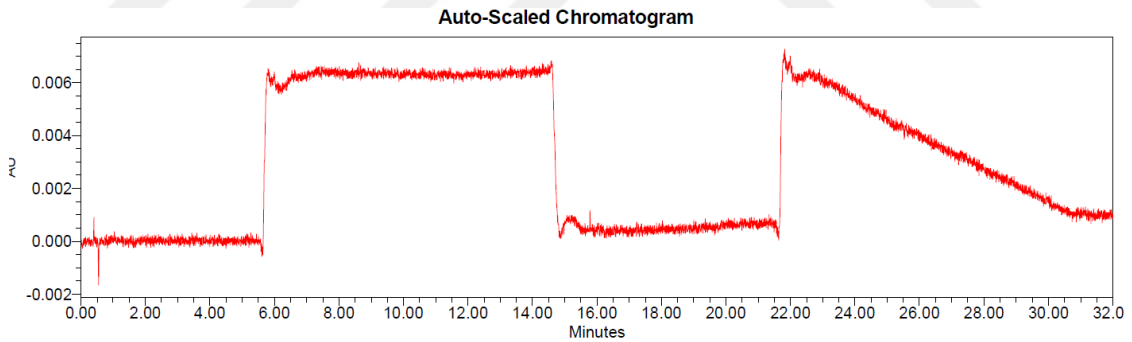
4.2 Geliştirilen Yöntemin Validasyonu ile İlgili Bulgular

4.2.1 Seçicilik

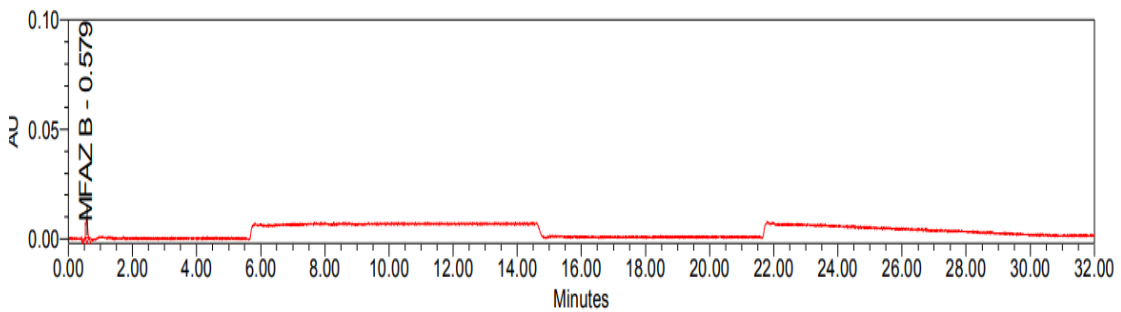
Seçicilik enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramlarda, ana pik ile herhangi bir pikin girişiminin olmadığı belirlenmiştir. Çözeltilere ait kromatogramlar Şekil 4-6 ile Şekil 4-33 arasında yer almaktadır. Seçicilik parametrelerine ait sonuçlar Tablo 4-1 ile 4-11 arasında verilmiştir.



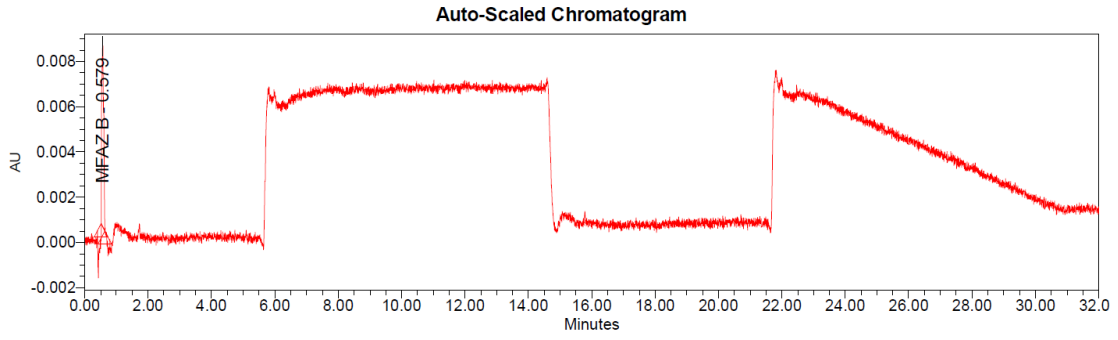
Şekil 4-6: Mobil Faz A ait kromatogram-1



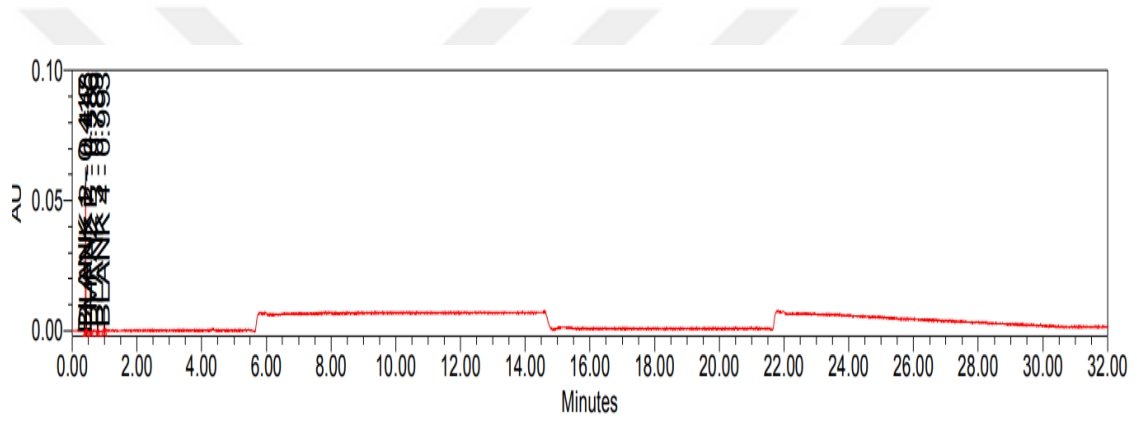
Şekil 4-7: Mobil Faz A ait kromatogram-2



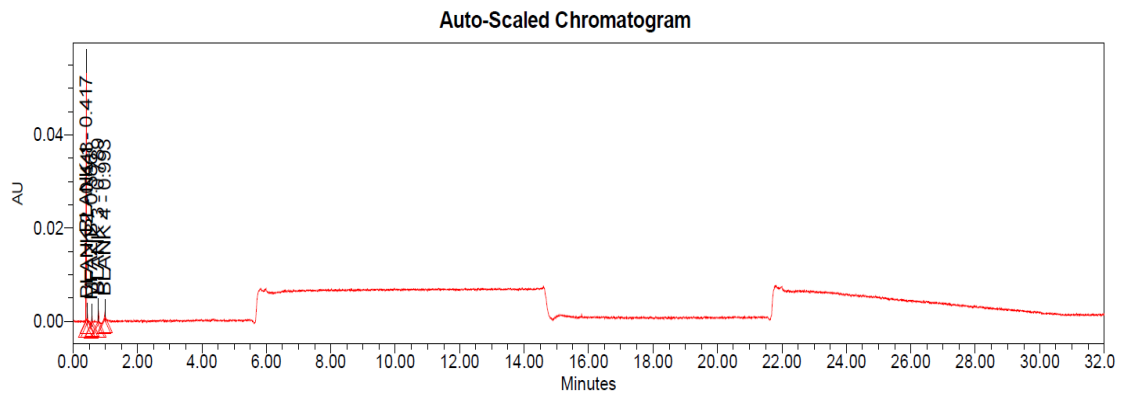
Şekil 4-8: Mobil faz B ait kromatogram -1



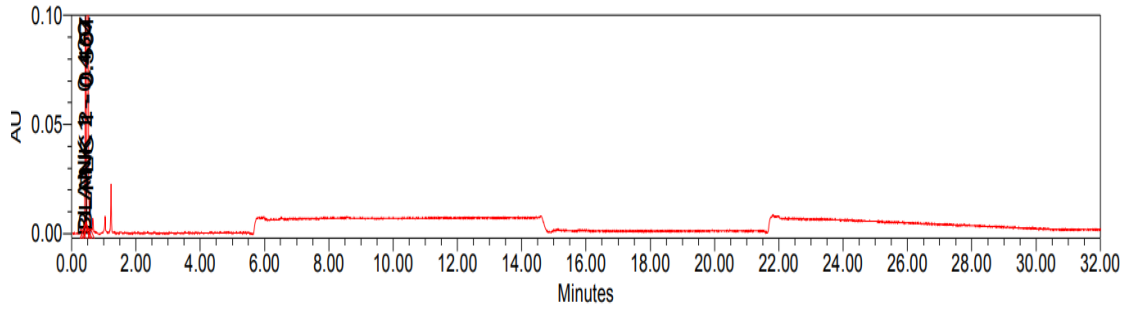
Şekil 4-9: Mobil faz B ait kromatogram -2



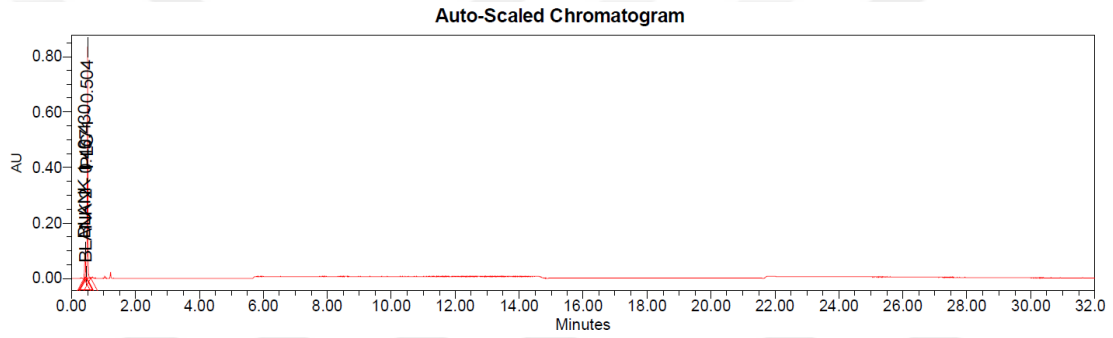
Şekil 4-10: Çözücüye ait kromatogram-1



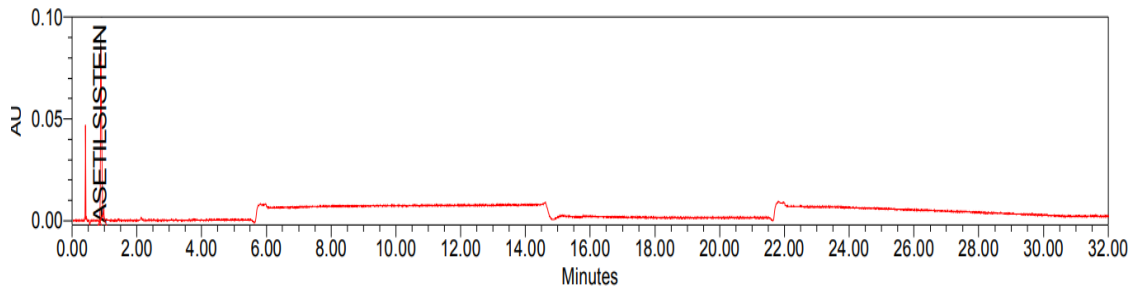
Şekil 4-11: Çözücüye ait kromatogram-2



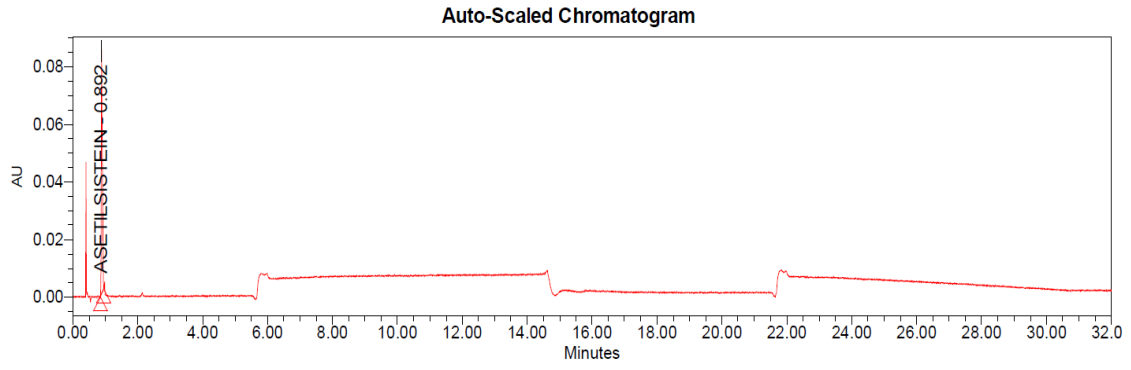
**Şekil 4-12: Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe
plasebosuna ait kromatogram-1**



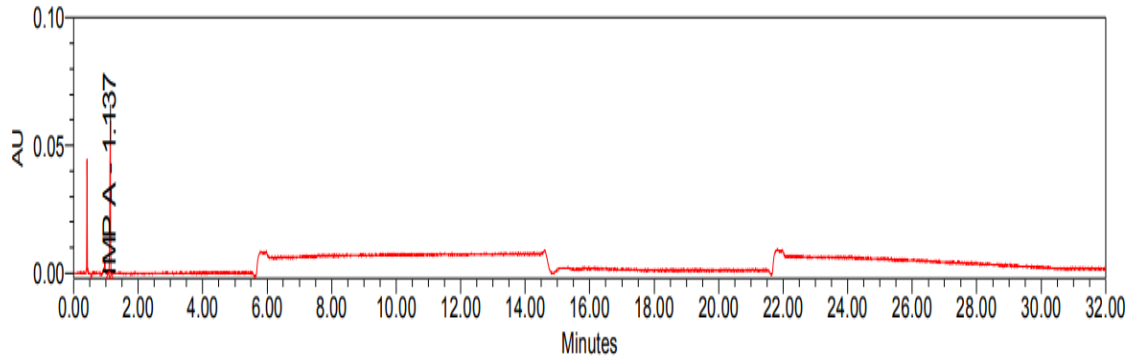
**Şekil 4-13: Asetilsistein 200 mg & 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe
plasebosuna ait kromatogram-2**



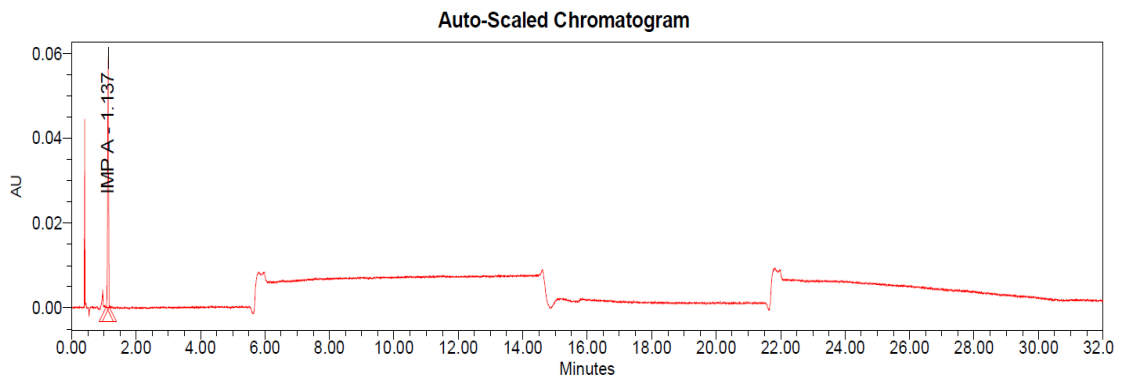
Şekil 4-14: Asetilsistein Standardına ait kromatogram-1



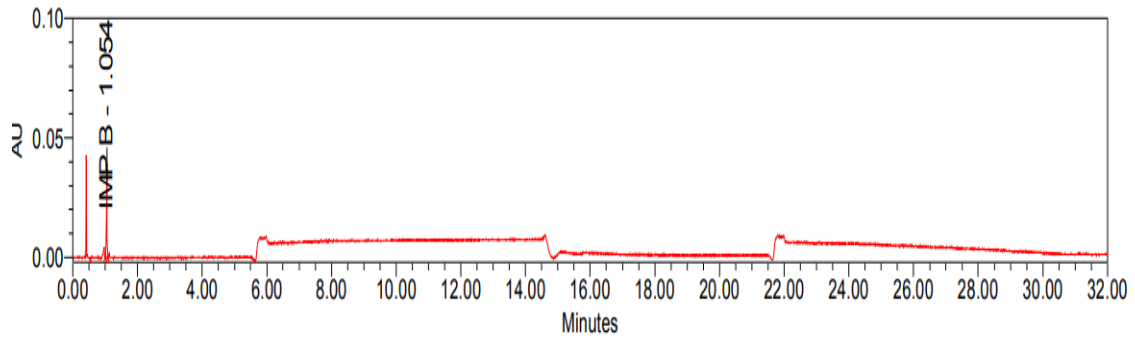
Şekil 4-15: Asetilsistein Standardına ait kromatogram-2



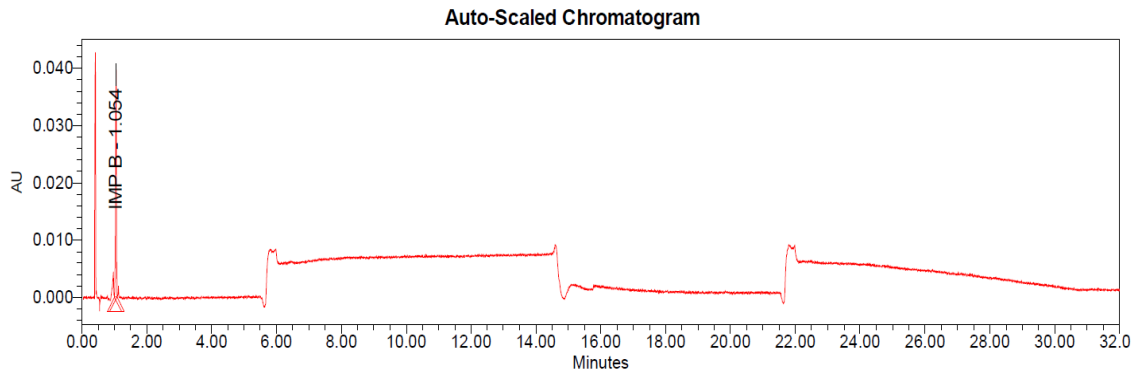
Şekil 4-16: Asetilsistein Safsızlık A Standardına ait kromatogram-1



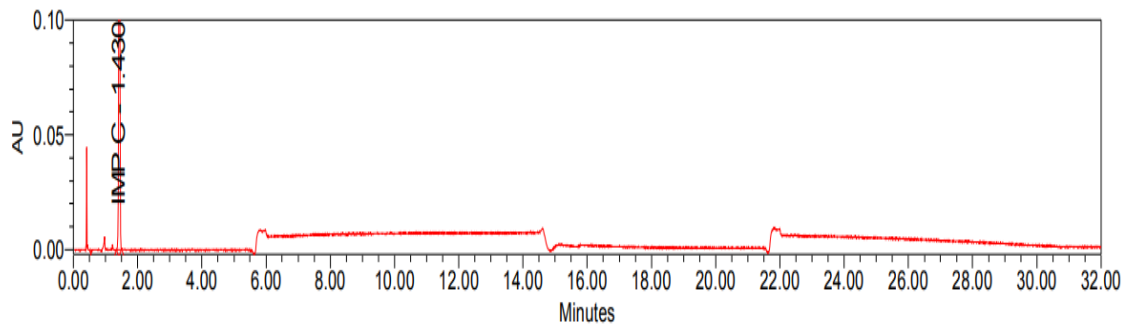
Şekil 4-17: Asetilsistein Safsızlık A Standardına ait kromatogram-2



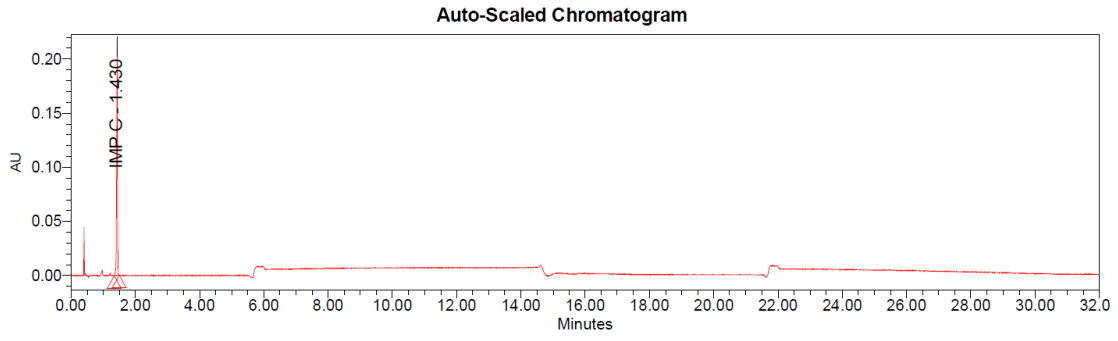
Şekil 4-18: Asetilsistein Safsızlık B Standardına ait kromatogram-1



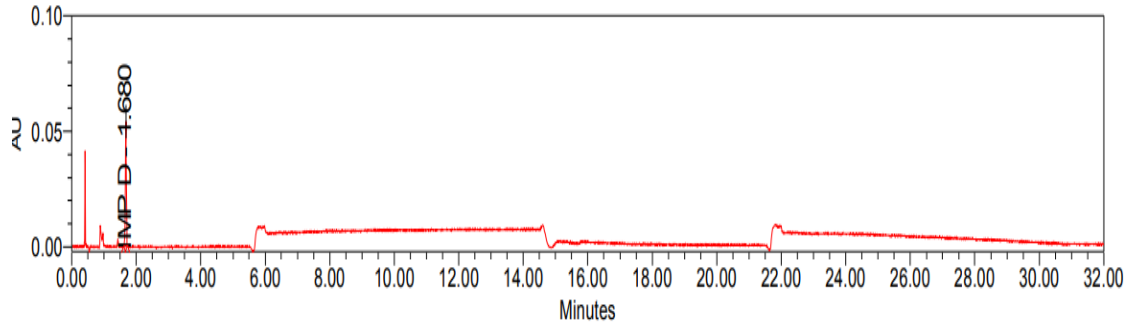
Şekil 4-19: Asetilsistein Safsızlık B Standardına ait kromatogram-2



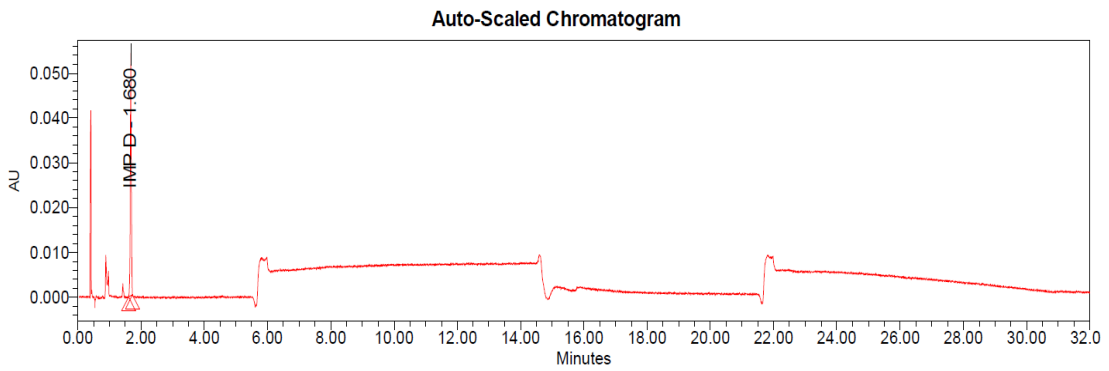
Şekil 4-20: Asetilsistein Safsızlık C Standardına ait kromatogram-1



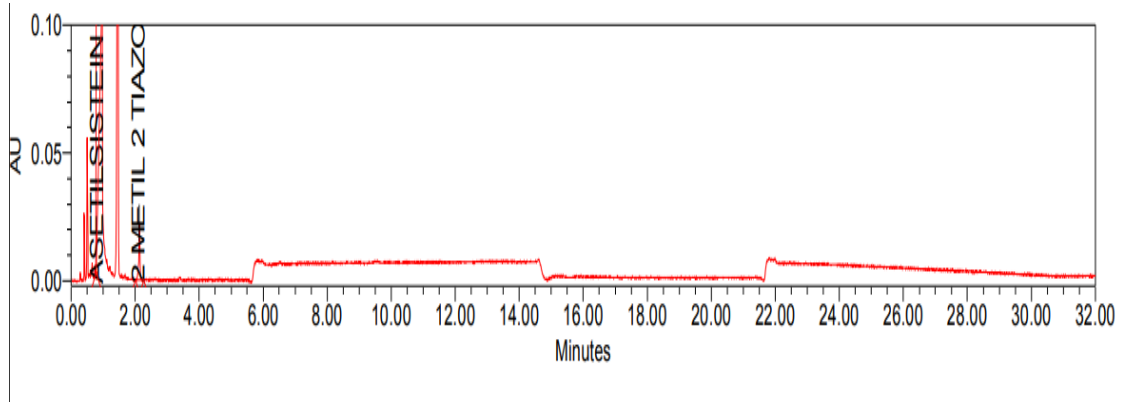
Şekil 4-21: Asetilsistein Safsızlık C Standardına ait kromatogram-2



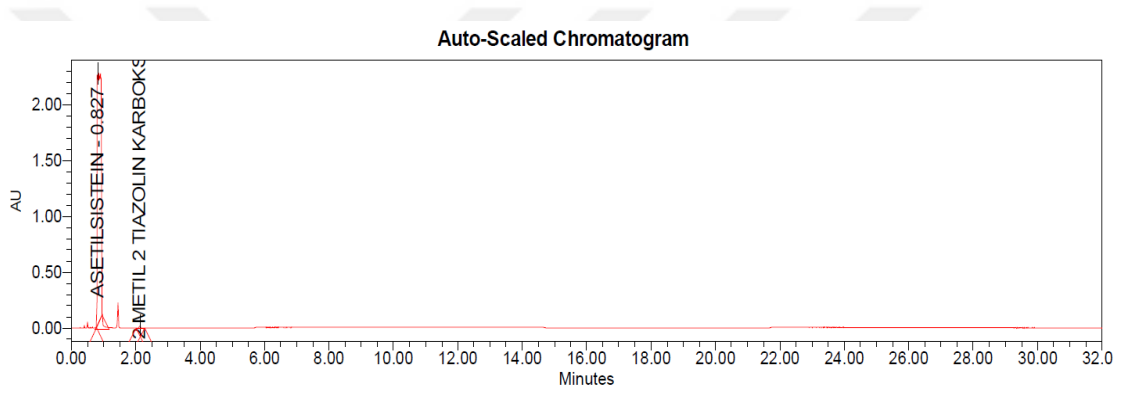
Şekil 4-22: Asetilsistein Safsızlık D Standardına ait kromatogram-1



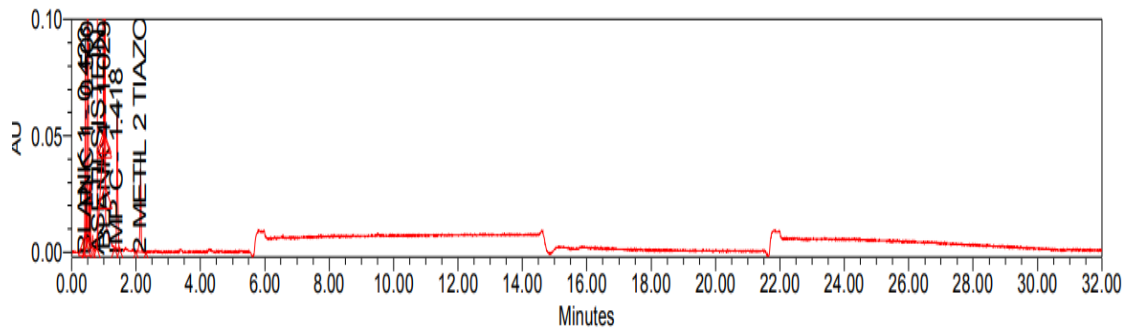
Şekil 4-23: Asetilsistein Safsızlık D Standardına ait kromatogram-2



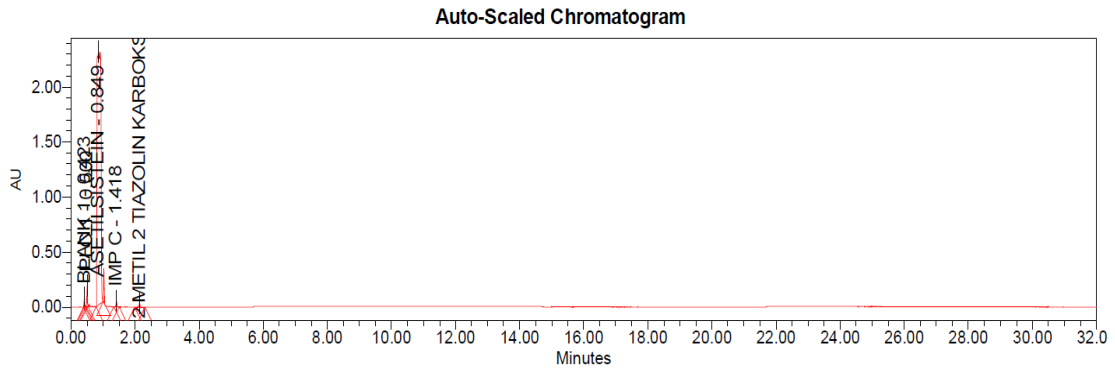
Şekil 4-24: Asetilsistein Sistem Uygunluk Çözeltisine ait kromatogram-1



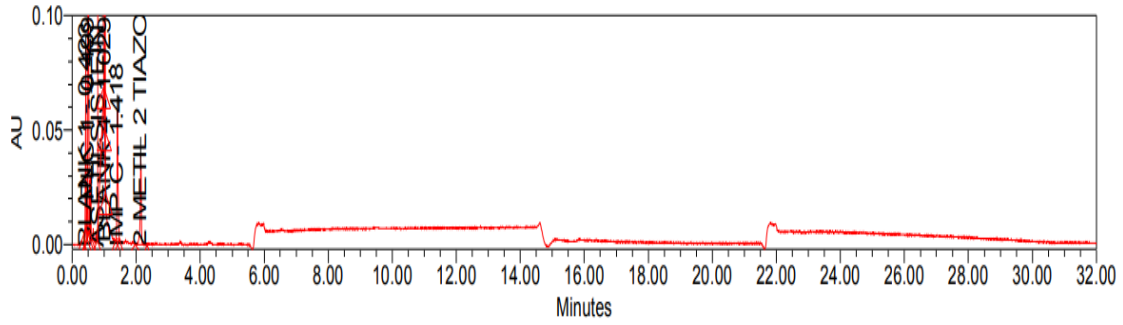
Şekil 4-25: Asetilsistein Sistem Uygunluk Çözeltisine ait kromatogram-2



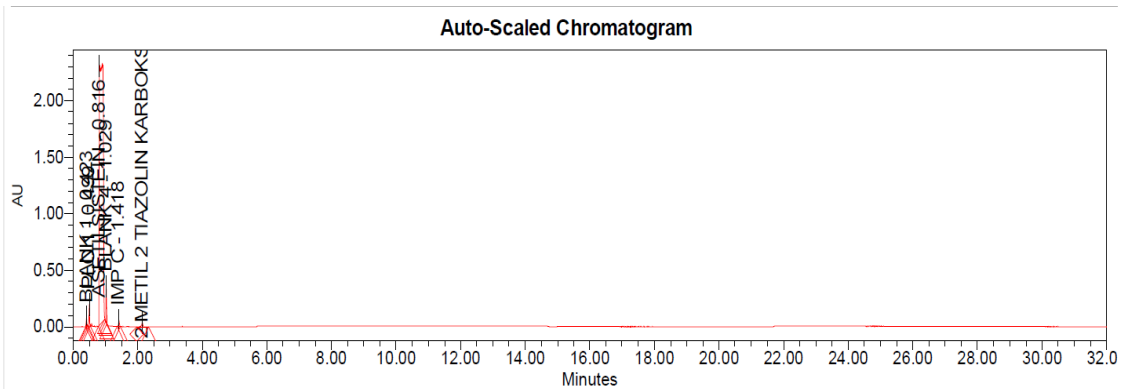
Şekil 4-26: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-1



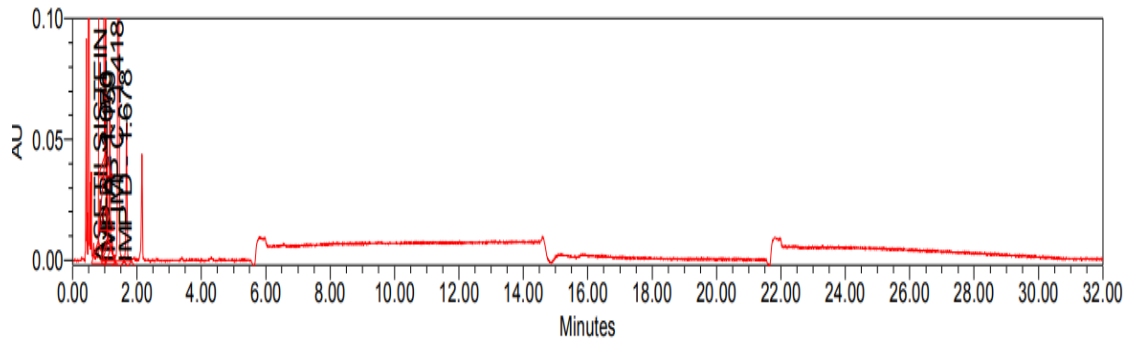
Şekil 4-27: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-2



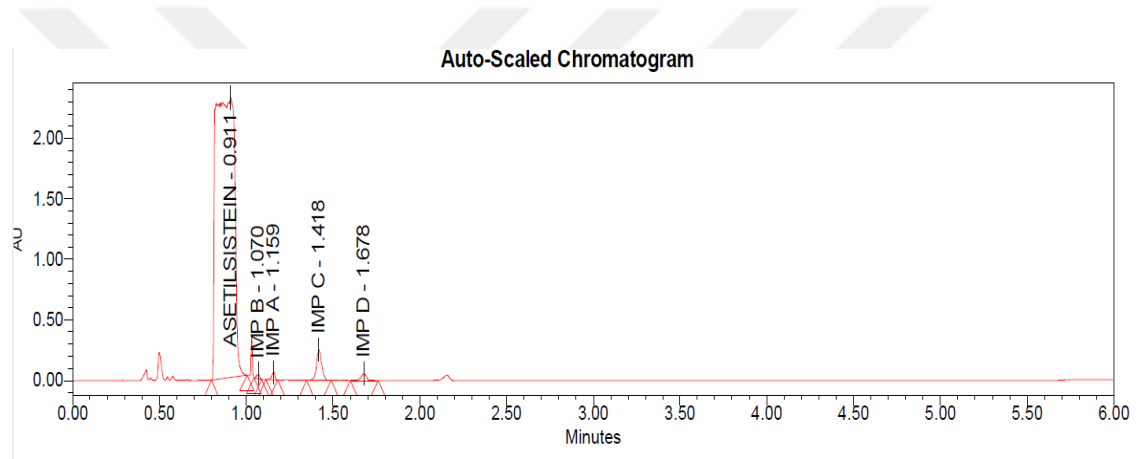
Şekil 4-28: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-1



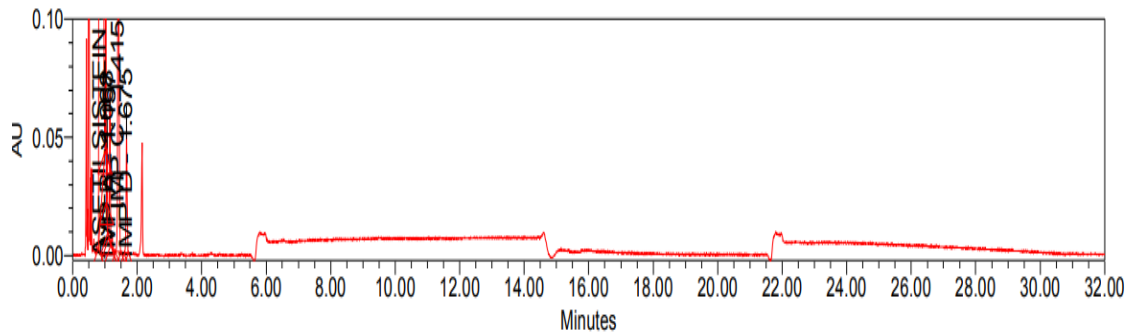
Şekil 4-29: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesine ait kromatogram-2



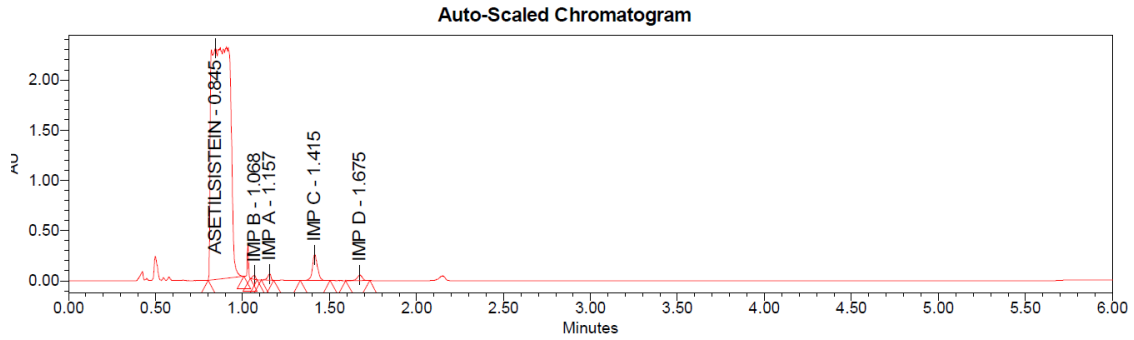
**Şekil 4-30: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık
Eklenmiş numunesine ait kromatogram-1**



**Şekil 4-31: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık
Eklenmiş numunesine ait kromatogram-2**



**Şekil 4-32: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık
Eklenmiş numunesine ait kromatogram-1**



Şekil 4-33: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe- Safsızlık Eklenmiş numunesine ait kromatogram-2

Tablo 4-1: Mobil Faz A Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Mobil Faz A	T.E	-	-	-	-	-

Tablo 4-2: Mobil Faz B Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Mobil Faz B	0.579	33687	-	-	-	-

Tablo 4-3: Çözücü Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Çözücü-1	0.417	57463	-	-	-	-
Mobil faz B	0.586	1431	-	-	-	-
Çözücü-2	0.448	833	-	-	-	-
Çözücü-3	0.789	2566	-	-	-	-
Çözücü-4	0.993	1750	-	-	-	-

Tablo 4-4: Plasebo Çözeltisi Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Çözücü-1	0.430	131283	-	-	-	-
Çözücü-2	0.457	3475	-	-	-	-
Plasebo-1	0.504	1160756	-	-	-	-

Tablo 4-5: Sistem Uygunluk Çözeltisi Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Asetilsistein	0.827	18577615	-	-	-	-
2-metil-2- tiazolin karboksilik asit	2.133	59984	-	-	-	-

Tablo 4-6: Asetilsistein Standart Çözeltisi Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Asetilsistein	0.892	179245	Uygun	1.3	3913	-

Tablo 4-7: Asetilsistein Safsızlık A, B, C, D Standart Çözeltisi Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Safsızlık A	1.137	87131	Uygun	0.71	14514	-
Safsızlık B	1.054	51885	Uygun	0.72	15595	-
Safsızlık C	1.430	418973	Uygun	0.91	13062	-
Safsızlık D	1.680	105284	Uygun	0.86	19016	-

Tablo 4-8: Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Numune Çözeltili Seçicilik sonuçları

Çözeltili Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Çözücü-1	0.423	90344	-	-	-	-
Plasebo-1	0.500	241799	-	-	-	-
Asetilsistein	0.849	19117567	Uygun	-	-	-
Çözücü-4	1.029	172251	-	-	-	-
Safsızlık C	1.418	117674	Uygun	1.05	-	12.04
2-metil-2-tiazolin karboksilik asit	2.143	92863	-	-	-	-

Tablo 4-9: Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Numune Çözeltili Seçicilik sonuçları

Çözeltili Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Çözücü-1	0.423	91169	-	-	-	-
Plasebo-1	0.499	249914	-	-	-	-
Asetilsistein	0.816	19044675	Uygun	-	-	-
Çözücü-4	1.029	183830	-	-	-	-
Safsızlık C	1.418	110742	Uygun	1.04	-	12.11
2-metil-2-tiazolin karboksilik asit	2.145	104966	-	-	-	-

Tablo 4-10: Asetilsistein 200 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltileri Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Asetilsistein	0.911	17452067	Uygun	-	-	-
Safsızlık-B	1.070	45954	Uygun	0.82	14808	1.28
Safsızlık-A	1.159	81257	Uygun	0.76	19259	2.59
Safsızlık C	1.418	551111	Uygun	1.04	12199	6.14
Safsızlık D	1.678	129754	Uygun	0.86	16510	5.02

Tablo 4-11: Asetilsistein 600 mg Saşe Hazırlamak için Oral Solüsyon Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltileri Seçicilik sonuçları

Çözelti Adı	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Pürite Kriteri	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayırım Faktörü (Rs)
Asetilsistein	0.845	17511321	Uygun	-	-	-
Safsızlık-B	1.068	45754	Uygun	0.84	15387	1.79
Safsızlık-A	1.157	83890	Uygun	0.72	19268	2.62
Safsızlık C	1.415	520697	Uygun	1.05	12936	6.23
Safsızlık D	1.675	112951	Uygun	0.87	17273	5.17

4.2.2 Doğrusallık

Lineer cevap ilişkisini kanıtlamak için Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan çözeltilerin pik alanları ölçüldü. Doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen verilerden ve gerçekleştirilen regresyon analizinden doğrusallık denklemi eğimi, y-kesim noktası, korelasyon katsayısının karesi (R^2) hesaplatılmıştır. Lineerlik parametresinin tayininde yapılan lineer regresyon hesabında "x=0" değeri, b değerinin (ordinat kesim aralığı, intercept) güven aralığı (lower 95% ve upper 95% değerleri) “0” değerini içermektedir. (y : Alan; a : eğim; b : kesme noktası; x : Konsantrasyon, $\mu\text{g /mL}$)

Elde edilen sonuçlara ait veriler Tablo 4-12 ile Tablo 4-16 arasında ve bu sonuçlarla hesaplanmış doğrusallık grafikleri Şekil : 4-20 ile 4-24 arasında verilmiştir.

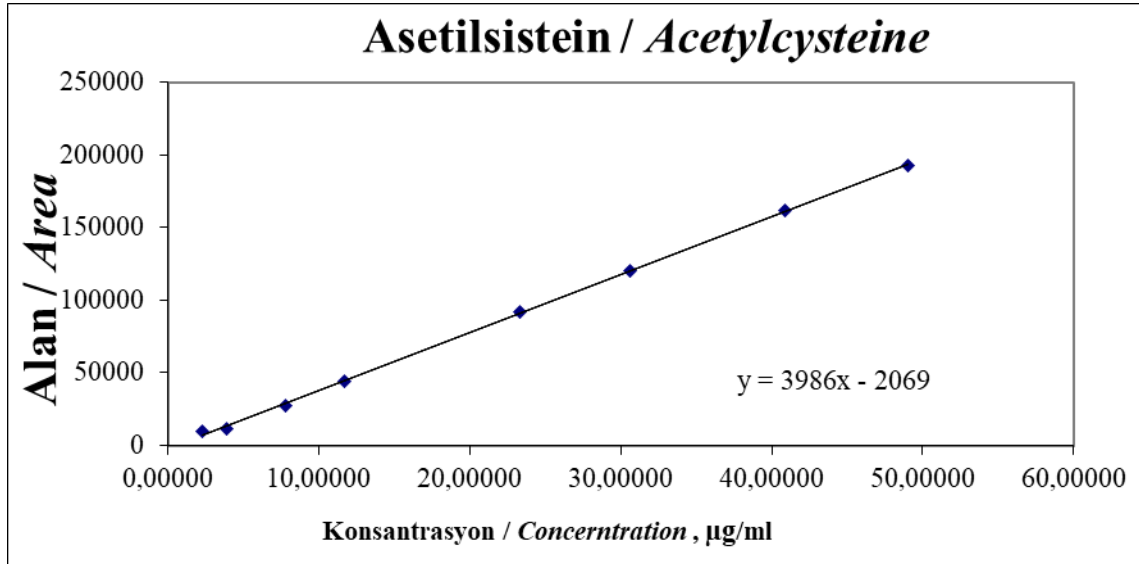
Tablo 4-12: Asetilsistein doğrusallık çalışmasının verileri

Seviye (%)	Konsant. (µg /mL)	Ortalama Alan
LOQ (% 6.0)	2,30	9396
% 10	3,90	11567
% 20	7,80	27751
% 30	12,0	44118
% 60	23,0	92271
% 75	31,0	120018
% 100	41,0	161739
% 120	49,0	192348

Eğim : 3986

y-kesim noktası : -2069

R² : 1.000



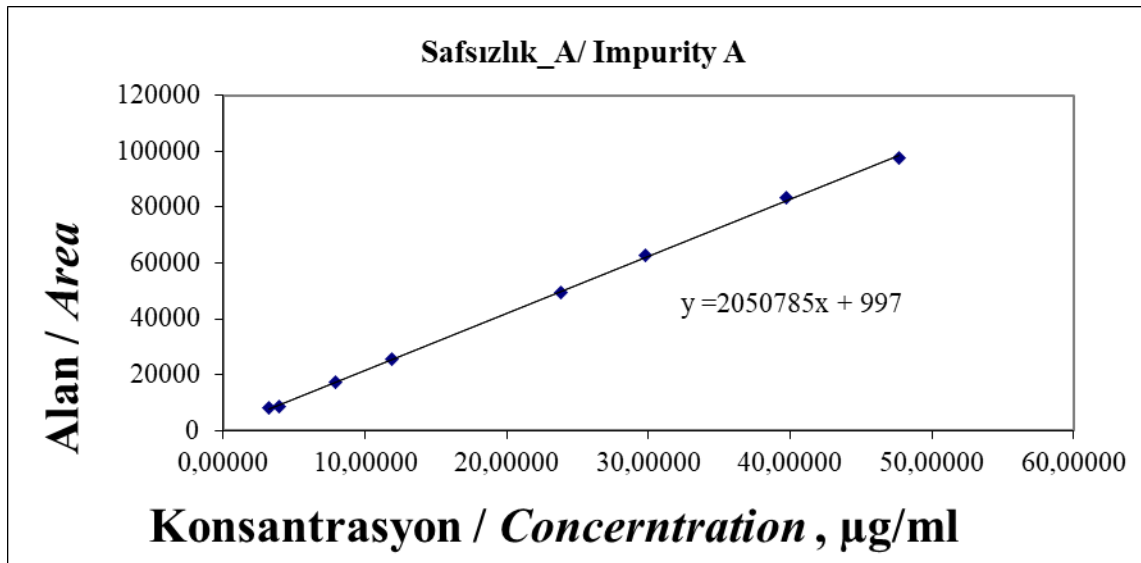
Şekil 4-34: Asetilsistein doğrusallık grafiği

Tablo 4-13: Asetilsistein Safsızlık A doğrusallık çalışmasının verileri

Seviye (%)	Konsant. (µg /mL)	Ortalama Alan
LOQ (% 8.0)	3,20	7929
% 10	4,00	8462
% 20	7,90	17312
% 30	12,0	25404
% 60	24,0	49587
% 75	30,0	62884
% 100	40,0	83218
% 120	48,0	97690

Eğim : 2050785

y-kesim noktası : 997

 $R^2 : 0.9998$ 

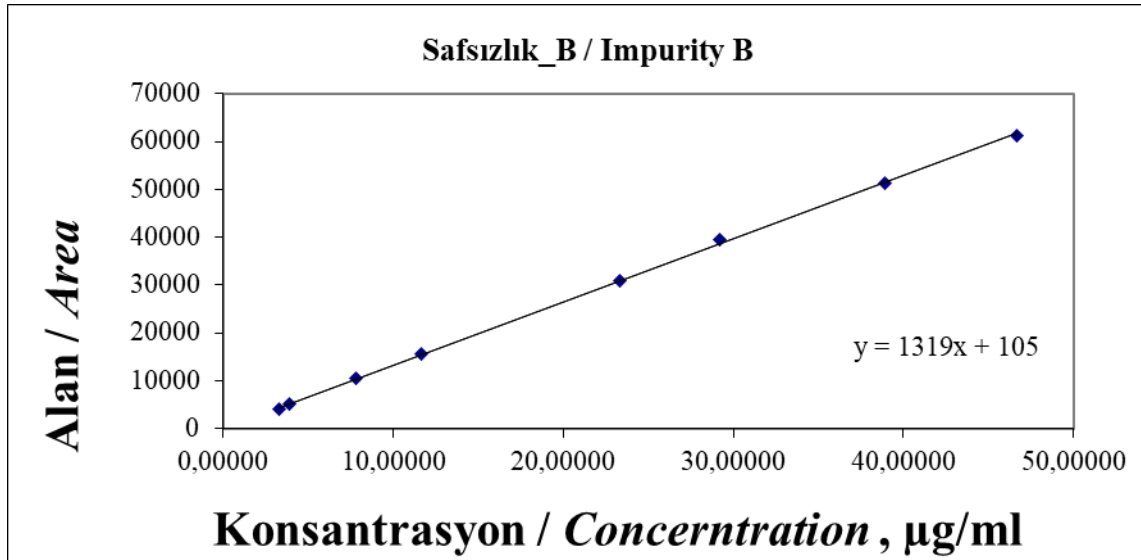
Şekil 4-35: Asetilsistein Safsızlık A doğrusallık grafiği

Tablo 4-14: Asetilsistein Safsızlık B doğrusallık çalışmasının verileri

Seviye (%)	Konsant. (µg /mL)	Ortalama Alan
LOQ (% 8.4)	3,30	4008
% 10	3,90	5160
% 20	7,80	10591
% 30	12,0	15490
% 60	23,0	30786
% 75	29,0	39591
% 100	39,0	51174
% 120	47,0	61338

Eğim : 1319

y-kesim noktası : 105

 $R^2 : 0.9998$ 

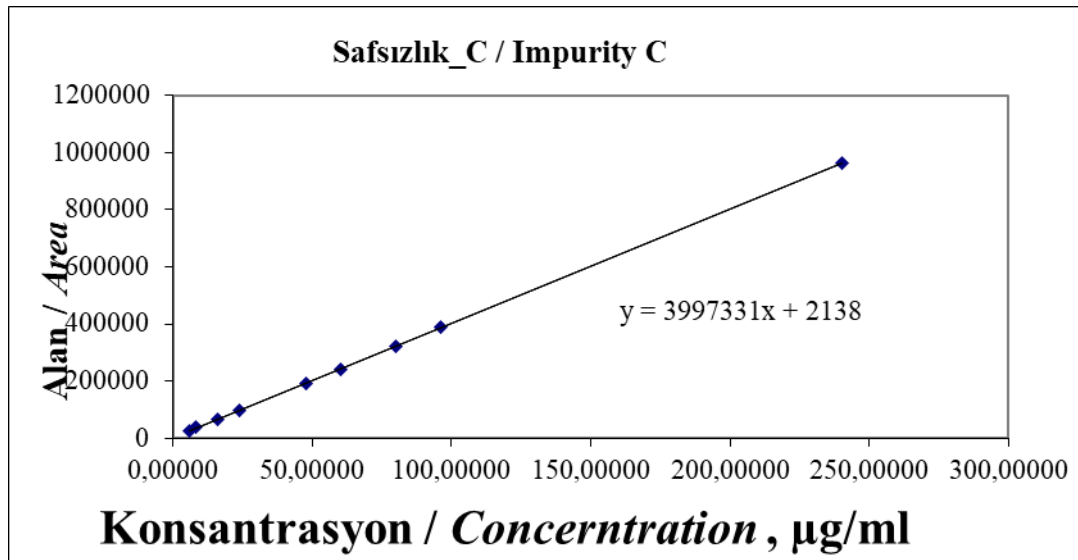
Şekil 4-36: Asetilsistein Safsızlık B doğrusallık grafiği

Tablo 4-15: Asetilsistein Safsızlık C doğrusallık çalışmasının verileri

Seviye (%)	Konsant. (µg /mL)	Ortalama Alan
LOQ (% 7.2)	5,80	23797
% 10	8,00	36820
% 20	16,0	67531
% 30	24,0	96253
% 60	48,0	190382
% 75	60,0	242833
% 100	80,0	323298
% 120	96,0	386998
% 300	240,0	961549

Eğim : 3997331

y-kesim noktası : 2138

R² : 1.000

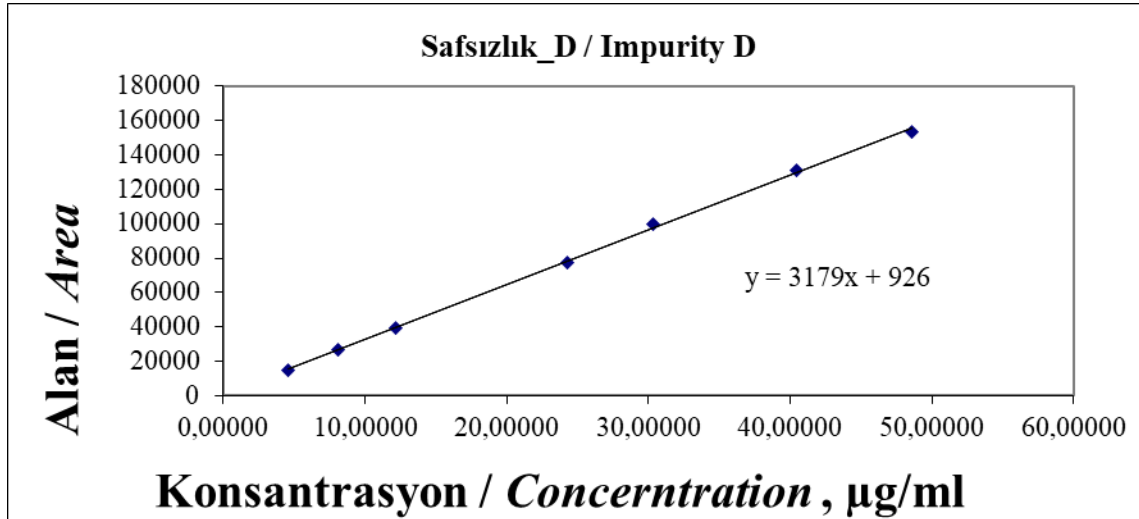
Şekil 4-37: Asetilsistein Safsızlık C doğrusallık grafiği

Tablo 4-16: Asetilsistein Safsızlık D doğrusallık çalışmasının verileri

Seviye (%)	Konsant. (µg /mL)	Ortalama Alan
LOQ (% 11.3)	4,60	14597
% 20	8,10	26397
% 30	12,2	39648
% 60	24,3	77761
% 75	30,4	99956
% 100	40,5	130949
% 120	48,6	153076

Eğim : 3179

y-kesim noktası : 926

 $R^2 : 0.9996$ 

Şekil 4-38: Asetilsistein Safsızlık D doğrusallık grafiği

Doğrusallık için yapılan tüm çalışmalarda konsantrasyon ve alanlar arasındaki korelasyon katsayısı 0,99'dan büyük bulunmuştur. Seçilen konsantrasyon aralıklarında dedektör yanıtı ile konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır.

4.2.3 Kesinlik

4.2.3.1 Sistem Kesinliği

Sitem kesinliği için Bölüm 3.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan Asetilsistein standart çözeltisi enjeksiyonlardan elde edilen pik alanları ve aralarındaki bağıl standart sapma değeri hesaplanmış ve Tablo 4-17 'de verilmiştir.

Tablo 4-17: Asetilsistein Sistem Kesinliği Parametre sonuçları

Enjeksiyon No	Alıkonma Zamanı (dakika)	Pik Alanı	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	0.981	156590	1.6	6533
2	0.981	157796	1.6	6590
3	0.980	161731	1.6	6541
4	0.980	157265	1.6	6584
5	0.980	159412	1.6	6564
6	0.982	162840	1.6	6704
ORTALAMA	0.981	159272	1.6	34341
SD	0,001	2537.49	-	-
% RSD	0.06	1.59	-	-

Sonuç

- Standart çözeltisi 6 ardışık enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarının % RSD değeri 1.59 olarak hesaplanmış ve limitimiz olan % 4.0'ten küçük bulunmuştur.
- Yönteme ait sistem kesinliği kanıtlanmıştır.

4.2.3.2 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik için Bölüm 3.1.3’ de anlatıldığı şekilde hazırlanan çözeltilerin safsızlık tayini analizleri yapıldı, sonuçlar Tablo 4-18 ile Tablo 4-19 arasında verilmiştir.

Tablo 4-18: Aynı gün içerisinde yapılan Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.533	0.484	1.052	0.495
2	0.535	0.483	1.060	0.487
3	0.512	0.463	1.008	0.468
4	0.531	0.483	1.065	0.490
5	0.536	0.499	1.094	0.483
6	0.531	0.488	1.097	0.484
Ortalama	0.530	0.483	1.063	0.485
SD	0.01	0.012	0.03	0.009
% RSD	1.68	2.415	3.06	1.895

Tablo 4-19: Aynı gün içerisinde yapılan Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Sase Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.523	0.469	1.095	0.461
2	0.514	0.460	1.087	0.450
3	0.522	0.471	1.092	0.458
4	0.521	0.452	1.083	0.454
5	0.525	0.461	1.100	0.462
6	0.516	0.460	1.090	0.460
Ortalama	0.52	0.462	1.091	0.458
SD	0.004	0.007	0.006	0.005
% RSD	0.779	1.495	0.548	1.014

Sonuç

- Çalışılan numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içindedir.
- 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD değeri % 4.0'dan küçüktür.
- Metodun tekrarlanabilirliği kanıtlanmıştır.

4.2.3.3 Ara Kesinlik

Ara kesinlik için farklı bir analist tarafından farklı bir günde, farklı UPLC cihazı kullanarak, farklı lot numaralı kolon ile Bölüm 3.1.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan çözeltilerin safsızlık tayini analizleri yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-20 ile Tablo 4-21'de verilmiştir.

Tablo 4-20: Farklı bir günde yapılan yapılan Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Sase Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.500	0.477	1.049	0.454
2	0.504	0.470	1.097	0.452
3	0.502	0.478	1.077	0.454
4	0.503	0.482	1.091	0.455

5	0.506	0.485	1.097	0.460
6	0.489	0.461	1.095	0.450
Ortalama	0.501	0.476	1.084	0.454
SD	0.006	0.009	0.019	0.003
% RSD	1.209	1.837	1.741	0.742

Tablo 4-21: Farklı bir günde yapılan yapılan Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık Eklenmiş Numune Sonuçları

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.505	0.479	1.092	0.450
2	0.494	0.477	1.094	0.452
3	0.488	0.464	1.079	0.450
4	0.496	0.479	1.095	0.453
5	0.502	0.487	1.089	0.458
6	0.488	0.486	1.094	0.454
Ortalama	0,496	0,479	1,266	0,453
SD	0,007	0,008	0,006	0,003
% RSD	1,420	1,726	0,476	0,661

Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması için her iki çalışmadan elde edilen verilerin ortalaması alınarak, SD ve % RSD değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-22 ile Tablo 4-23'te görülmektedir.

Tablo 4-22: Asetilsistein 200 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Safsızlık Eklenmiş Saşe Numunesi Tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.533	0.484	1.052	0.495
2	0.535	0.483	1.060	0.487
3	0.512	0.463	1.008	0.468
4	0.531	0.483	1.065	0.490

5	0.536	0.499	1.094	0.483
6	0.531	0.488	1.097	0.484
7	0.500	0.477	1.049	0.454
8	0.504	0.470	1.097	0.452
9	0.502	0.478	1.077	0.454
10	0.503	0.482	1.091	0.455
11	0.506	0.485	1.097	0.460
12	0.489	0.461	1.095	0.450
Ortalama	0.515	0.479	1.073	0.469
SD	0.02	0.01	0.03	0.02
% RSD	3.26	2.22	2.56	3.66

Tablo 4-23: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Safsızlık Eklenmiş Saşe Numunesi tekrarlanabilirlik ve Ara Kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması

Numune No	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
1	0.523	0.469	1.095	0.461
2	0.514	0.460	1.087	0.450
3	0.522	0.471	1.092	0.458
4	0.521	0.452	1.083	0.454
5	0.525	0.461	1.100	0.462
6	0.516	0.460	1.090	0.460
7	0.505	0.479	1.092	0.450
8	0.494	0.477	1.094	0.452
9	0.488	0.464	1.079	0.450
10	0.496	0.479	1.095	0.453

11	0.502	0.487	1.089	0.458
12	0.488	0.486	1.094	0.454
Ortalama	0.508	0.470	1.091	0.455
SD	0.01	0.01	0.06	0.004
% RSD	2.76	2.40	0.53	0.98

Sonuç

- Çalışılan numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde bulunmuştur.
- 6 adet %100 konsantrasyonda olacak şekilde safsızlık eklenmiş numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD % 4.0'dan küçüktür.
- Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analizlerine ait 12 numunenin % safsızlık sonuçları arasındaki % RSD % 4.0'dan küçüktür.

4.2.4 Doğruluk ve Geri Kazanım

Bölüm 3.5.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan doğruluk miktar tayini numunelerinin enjeksiyonları yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-24 ile Tablo 4-28 arasında verilmiştir.

Tablo 4-24: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Bilinmeyen Safsızlık Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Asetilsistein % Geri Kazanım	
OQ	1	99.6
	2	101.3
	3	97.3
%100	1	101.3
	2	101.3
	3	99.3
%120	1	102.7
	2	101.5
	3	95.8
ORTALAMA		100.0
SD		2.24

% RSD	2.24
-------	------

Tablo 4-25: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık A Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Safsızlık A % Geri Kazanım	
%LOQ	1	104.5
	2	103.6
	3	104.0
%100	1	103.4
	2	100.8
	3	97.3
%120	1	100.3
	2	103.9
	3	103.8
ORTALAMA		102.4
SD		2.41
% RSD		2.36

Tablo 4-26: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık B Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Safsızlık B % Geri Kazanım	
LOQ	1	100.4
	2	98.2
	3	100.7
%100	1	100.8
	2	102.0
	3	98.6
%120	1	102.9
	2	104.5
	3	104.8

ORTALAMA	101.4
SD	2.34
% RSD	2.30

Tablo 4-27: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık C Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Safsızlık C % Geri Kazanım	
%LOQ	1	95.5
	2	95.5
	3	96.1
%100	1	104.0
	2	103.6
	3	98.7
%120	1	97.1
	2	98.3
	3	100.2
ORTALAMA		98.8
SD		3.25
% RSD		3.28

Tablo 4-28: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak İçin Saşe Safsızlık D Geri Kazanım Sonuçları

Seviye	Safsızlık D % Geri Kazanım	
%LOQ	1	103.2
	2	101.4
	3	102.8
%100	1	100.2
	2	100.6
	3	98.6
%120	1	104.6
	2	95.0
	3	100.6
ORTALAMA		100.8
SD		2.82
% RSD		2.79

Sonuç

-Doğruluk Çalışması sonucunda elde edilen her bir safsızlığa ait doğruluk sonuçları % 95,0 -105,0 limitleri dahilinde bulunmuştur.

- % Geri kazanım değerleri arasındaki % RSD % 4.0'dan küçüktür.

4.2.5 Sağlamlık

Her bir değiştirilen parametre için Bölüm 3.4.5'de anlatılan numuneler hazırlanarak analiz edildi. % Safsızlık sonuçları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tekrarlanabilirlik sonuçları ile karşılaştırarak metodun analiz şartlarına karşı dayanıklılığı test edildi. Sonuçlar Tablo 4-29 ile Tablo 4-32 arasında verilmiştir.

Tablo 4-29: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Standart Çözeltisi için Analiz Şartlarında Değişiklik

Analiz Şartları	Ahkonma Zamanı (dk)	Teorik Plaka Sayısı	Simetri Faktörü
Normal Şartlar	0.981	6586	1.6
Akış Hızı : 0.4 ml/dk	1.270	3781	1.6
Akış Hızı : 0.6 ml/dk	0.831	4486	1.3
Dalga Boyu : 200 nm	1.073	1148	1.1
Dalga Boyu : 210 nm	1.066	1148	1.2

Tablo 4-30 Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Analiz Şartlarında Değişiklik - Numune Çözeltisi -1

Analiz Şartları	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
-----------------	--------------------	--------------------	--------------------	--------------------

Normal Şartlar	<LOQ	T.E	0.224	T.E
Akış Hızı : 0.4 ml/dk	T.E	T.E	0.362	<LOQ
Akış Hızı : 0.6 ml/dk	T.E	T.E	0.300	<LOQ
Dalga Boyu : 200 nm	T.E	T.E	0.451	<LOQ
Dalga Boyu : 210 nm	T.E	T.E	0.628	<LOQ

Tablo 4-31 Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Analiz Şartlarında Değişiklik - Numune Çözeltisi -2

Analiz Şartları	Maks. Bilinmeyen Safsızlık (%)	%Toplam Safsızlık
Normal Şartlar	<LOQ	0.224
Akış Hızı : 0.4 ml/dk	<LOQ	0.362
Akış Hızı : 0.6 ml/dk	<LOQ	0.300
Dalga Boyu : 200 nm	<LOQ	0.451
Dalga Boyu : 210 nm	T.E	0.628

Tablo 4-32 Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Analiz Şartlarında Değişiklik – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi

Analiz Şartları	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)
Normal Şartlar	0.521	0.462	1.091	0.458
Akış Hızı : 0.4 ml/dk	0.671	0.811	1.636	0.456
Akış Hızı : 0.6 ml/dk	0.651	0.748	1.720	0.438
Dalga Boyu : 200 nm	0.351	0.543	0.431	0.372
Dalga Boyu : 210 nm	0.779	0.310	1.443	0.618

Sonuçlar yöntemin dalga boyu ve akış hızı değişikliğine karşı hassas olduğunu göstermiştir.

4.2.6 Çözelti Stabilitesi

Belirli zaman aralıklarında hazırlanan standart, numune ve safsızlık eklenmiş numune çözeltileri, belirli zaman aralıkları boyunca az 48 saat, saklama şartları (10°C)

sabit tutularak enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-33 ve Tablo 4-38 arasında verilmiştir.

Tablo 4-33: Asetilsistein Standart Çözelti Stabilitesi

Saat	Pik Alanı	(%) Uyum	Alıkonma Zamanı	(%) Uyum	Simetri Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Başlangıç	156590	-	0.981	-	1.6	6533
89. Saat	160423	102.4	0.974	99.3	1.6	6869
188. Saat	160413	102.4	0.974	99.3	2.0	5865
194. Saat	184484	117.8	0.973	99.2	2.1	5678

Tablo 4-34: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -1

Saat	Safsızlık A Alanı	Safsızlık A % Uyum	Safsızlık B Alanı	Safsızlık B % Uyum
Başlangıç	2608	-	ND	-
6. Saat	3307	126.8	ND	-

Tablo 4-35: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -2

Saat	Safsızlık C Alanı	Safsızlık C % Uyum	Safsızlık D Alanı	Safsızlık D % Uyum
Başlangıç	88845	-	ND	-
6. Saat	1162130	520.0	ND	-

Tablo 4-36: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Numunesi Çözelti Stabilitesi -3

Saat	Maks. Bilinmeyen Safsızlık Alanı	Maks. Bilinmeyen Safsızlık % Uyum
Başlangıç	3948	-

6. Saat

3303

83.7

Tablo 4-37: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözelti Stabilitesi -1

Saat	Safsızlık A Alanı	Safsızlık A % Uyum	Safsızlık B Alanı	Safsızlık B % Uyum
Başlangıç	85114	-	47907	-
6. Saat	82870	97.4	48083	100.4

Tablo 4-38: Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe – Safsızlık Eklenmiş Numune Çözelti Stabilitesi -2

Saat	Safsızlık C Alanı	Safsızlık C % Uyum	Safsızlık D Alanı	Safsızlık D % Uyum
Başlangıç	487491	-	107004	-
6. Saat	605044	124.1	105711	98.8

Elde edilen sonuçlar 10°C’de standart çözeltisinin 185 saat stabil kaldığını Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Çözelti numune çözeltileri ve Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe Çözelti safsızlık eklenmiş numune çözeltisinin iser her analizden önce taze hazırlanması gerektiğini göstermiştir.

4.3 Stres Çalışması

Stres testi için aşağıda belirtilen stres koşullarına maruz bırakılmış numune, belirtilen sürelerde sisteme enjekte edildi. Sonuçlar Tablo 4-39 ile Tablo 4-44 arasında yer almaktadır. Bozundurma numunelerine ait kromatogramlar Şekil 4-25 ve Şekil 4-33 arasında verilmiştir.

- Asit Ortam (1N HCl) : 2 saat
- Asit Ortam (10N HCl) : 24 saat
- Baz Ortam (10N NaOH) : 24 saat

- Oksidasyon Ortamı (1% H ₂ O ₂)	: 2 saat
- Oksidasyon Ortamı (30% H ₂ O ₂)	: 2 saat
- Isı Bozundurması (80°C)	: 2 gün
- Işık (fotostabilite kabini) Bozundurması Görünür Bölge (1.2 milyon lüks):	3.2 gün
- Işık (fotostabilite kabini) Bozundurması UV Bölge (200 W / m ²)	: 2.8 gün
- Isı ve Nem Bozundurması (40 °C % 75 RH)	: 7 gün

Tablo 4-39: Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe

Stres Koşulları	Asetilsistein %	Saflık
Başlangıç	94.5	Uygun
Asidik Bozundurma 1N HCl - 2 saat	96.3	Uygun
Asidik Bozundurma 10N HCl - 24 saat	92.8	Uygun
Bazik Bozundurma 10N NaOH - 24 saat	94.0	Uygun
Oksidatif Bozundurma % 1 H₂O₂ - 2 saat	93.5	Uygun
Oksidatif Bozundurma % 30 H₂O₂ - 2 saat	87.9	Uygun
Işık Bozundurması Görünür Bölge (1.2 milyon lüks)	94.2	Uygun
Işık Bozundurması UV Bölge (200 W / m²)	93.6	Uygun
Isı ve Nem Bozundurması 40 °C 75 RH 7 gün	95.7	Uygun
Isı Bozundurması (80°C) 2 gün	93.9	Uygun

Tablo 4-40: Safsızlık Tayini Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe

Stres Koşulları	Sonuç %					
	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)	Maksimum Bilinmeyen İmpürite	Toplam İmpürite
Başlangıç	<LOQ	TE	0.17	<LOQ	<LOQ	0.17
Asidik Bozundurma 1N HCl - 2 saat	<LOQ	0.13	0.34	<LOQ	0.30	0.84
Asidik Bozundurma 10N HCl - 24 saat	<LOQ	0.27	0.85	<LOQ	0.89	2.21
Bazik Bozundurma 10N NaOH - 24 saat	0.31	0.62	0.98	<LOQ	0.49	2.86

Tablo 4-41: Safsızlık Tayini Stres Sonuçları Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe

Stres Koşulları	Sonuç %					
	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)	Maksimum Bilinmeyen İmpürite	Toplam İmpürite
Başlangıç	<LOQ	TE	0.17	<LOQ	<LOQ	0.17
Oksidatif Bozundurma % 1 H₂O₂ - 2 saat	<LOQ	TE	1.07	<LOQ	<LOQ	1.07
Oksidatif Bozundurma % 30 H₂O₂ - 2 saat	<LOQ	TE	10.70	<LOQ	<LOQ	10.7
Isı Bozundurması (80°C) 2 gün	<LOQ	TE	0.64	0.16	0.12	0.96

Tablo 4-42 : Safsızlık Tayini Stres Sonuçları- Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe

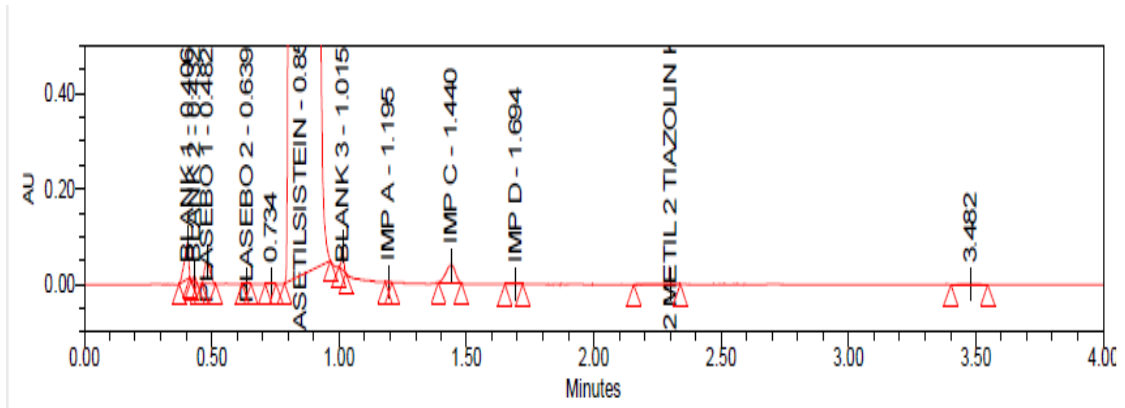
Stres Koşulları	Sonuç %					
	Safsızlık A (%)	Safsızlık B (%)	Safsızlık C (%)	Safsızlık D (%)	Maksimum Bilinmeyen İmpürite	Toplam İmpürite
Başlangıç	<LOQ	TE	0.17	<LOQ	<LOQ	0.17
Işık Bozundurma Görünür Bölge (1.2 milyon lüks)	<LOQ	TE	0.37	<LOQ	<LOQ	0.37
Işık Bozundurma UV Bölge (200 W / m ²)	<LOQ	TE	0.32	<LOQ	<LOQ	0.32
Isı ve Nem Bozundurma 40 °C 75 RH - 7 gün	<LOQ	TE	0.40	<LOQ	<LOQ	0.40

Tablo 4-43 : Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Bağlı Kütle Dengesi

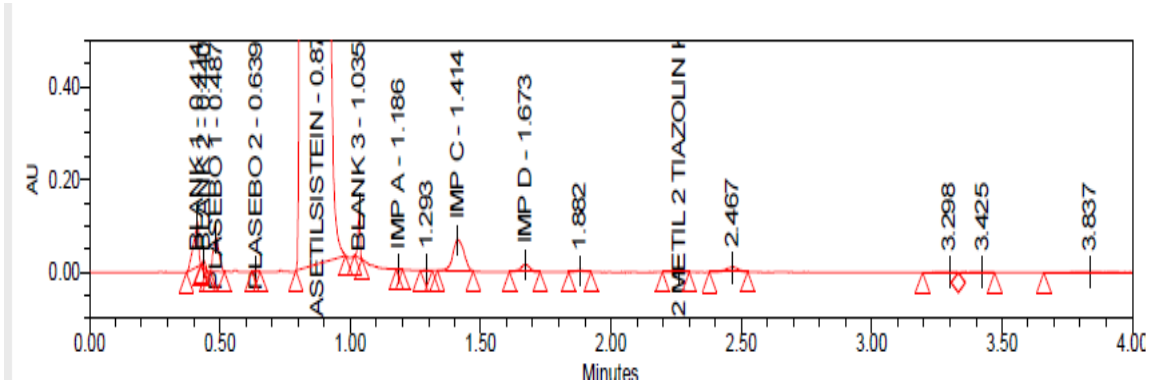
Stres Koşulları	% Asetilsistein	% Toplam İmpürite	% Bağlı Kütle Dengesi
Başlangıç	94.5	0.17	-
Asidik Bozundurma 1N HCl - 2 saat	96.3	0.84	102.6
Asidik Bozundurma 10N HCl - 24 saat	92.8	2.21	100.4
Bazik Bozundurma 10N NaOH - 24 saat	94.0	2.86	102.3
Oksidatif Bozundurma % 1 H ₂ O ₂ - 2 saat	93.5	1.07	99.9
Oksidatif Bozundurma % 30 H ₂ O ₂ - 2 saat	87.9	10.7	104.2

Tablo 4-44 : Asetilsistein 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için Bağlı Kütle Dengesi

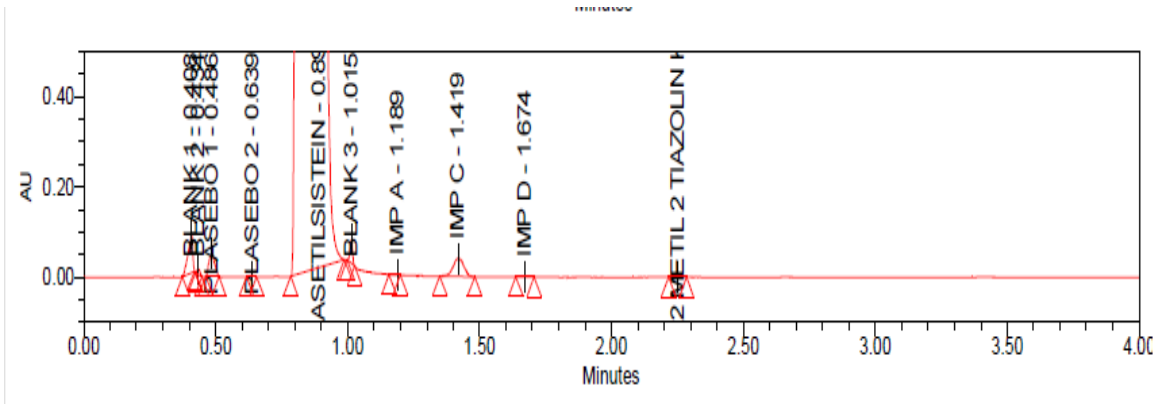
Stres Koşulları	% Asetilsistein	% Toplam İmpürite	% Bağlı Kütle Dengesi
Başlangıç	94.5	0.17	-
Işık Bozundurması Görünür Bölge (1.2 milyon lüks)	94.2	0.37	99.8
Işık Bozundurması UV Bölge (200 W / m2)	93.6	0.32	99.2
Isı ve Nem Bozundurması 40 °C 75 RH - 7 gün	95.7	0.40	101.5
Isı Bozundurması (80°C) 2 gün	93.9	0.96	100.2



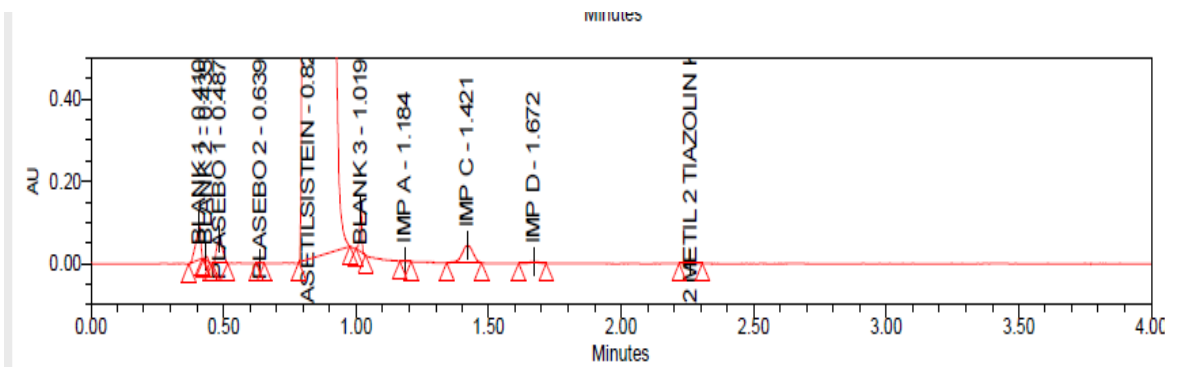
Şekil 4-39: Işık Bozundurması UV Bölge (200 W / m2) Numune Kromatogramı



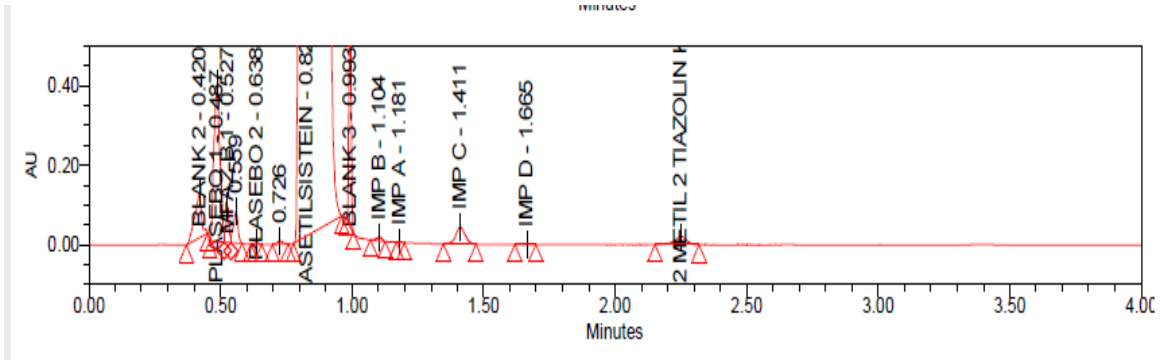
Şekil 4-40: Isı Bozundurması (80°C) 2. gün Numune Kromatogramı



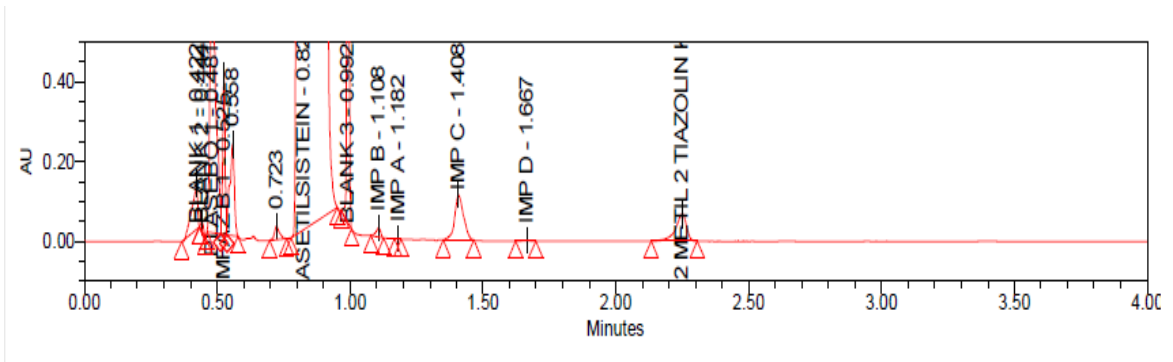
Şekil 4-41: Işık Bozundurması Görünür Bölge (1.2 milyon lüks) Numune Kromatogramı



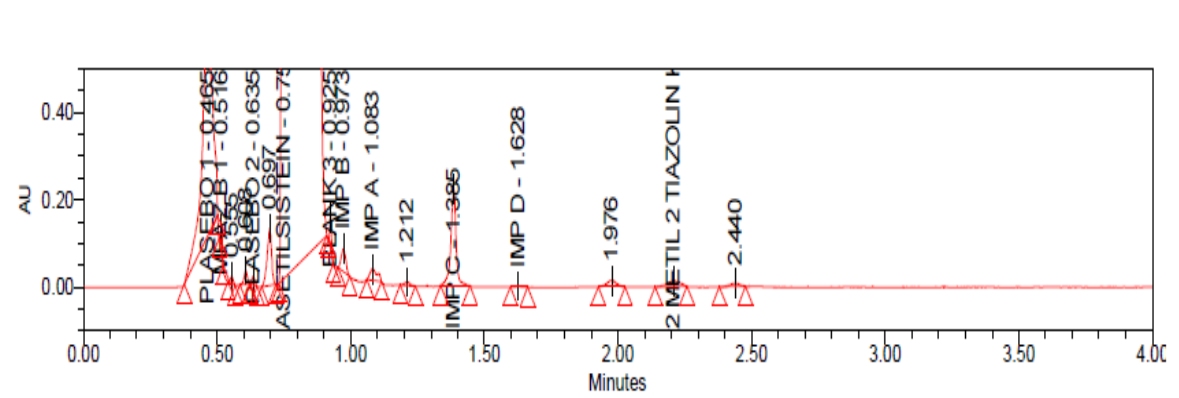
Şekil 4-42: Isı ve Nem Bozundurması 40 °C 75 RH 7. gün Numune Kromatogramı



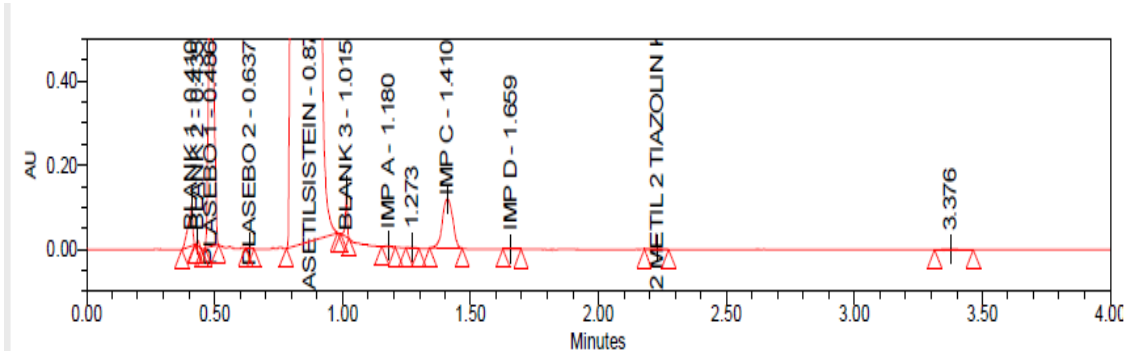
Şekil 4-43: Asidik Bozundurma 1N HCl 2. saat Numune Kromatogramı



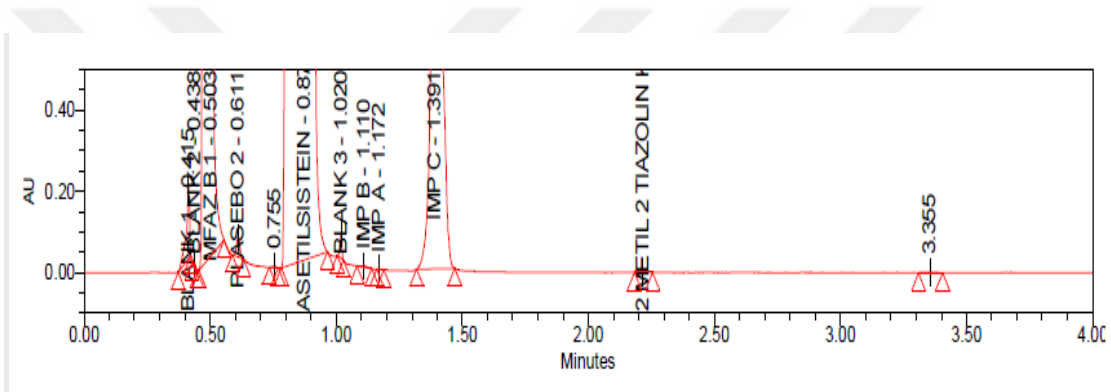
Şekil 4-44: Asidik Bozundurma 10N HCl 24. saat Numune Kromatogramı



Şekil 4-45: Bazik Bozundurma 10N NaOH 24. saat Numune Kromatogramı



Şekil 4-46: Oksidatif Bozundurma % 1 H₂O₂ 2. saat Numune Kromatogramı



Şekil 4-47: Oksidatif Bozundurma % 30 H₂O₂ – 2. saat Numune Kromatogramı

Yapılan stres çalışmalarında elde edilen sonuçlar numunelerin Isı-nem (40 °C 75 RH - 7 gün), Işık Bozundurması UV Bölge, Görünür Bölge, yüksek ısı (80°C 2gün), asidik ve bazik stres koşullarında stabil olduğunu bilinen ve bilinmeyen impüritelerde artış olmadığını göstermiştir. Ancak Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesi oksidasyona maruz bırakıldığında stres koşulunda Safsızlık C sonuçlarında artış olduğu, miktar tayini sonuçlarında ise bu artışı karşılayacak şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

L-sistein'in N-asetil türevi olan Asetilsistein mukolitik bir ilaç olarak bronşiyal salgıların temizlenmesi için 14 Eylül 1963'te FDA onayını almış bir ilaç maddesidir. Bugün hem mukolitik özellikleri hem de akut asetaminofen (parasetamol) zehirlenmesinin tedavisi için kullanılmaktadır. [3]

Molekül yapısındaki sülfhidril grupları bronş salgılarında bulunan mukoproteinlerin disülfid bağlarıyla reaksiyona girerek akciğerlerdeki mukus salgılarının yoğunluğunu azaltır; salgıların öksürük, mekaniksel mekanizmalar ve postüral drenaj ile uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Ayrıca mukolitik bir ilaç olarak balgamin viskozitesini azaltarak bronşları temizleyerek dispne azalmaya ve akciğer fonksiyonlarında iyileşmeye yol açabilir. KOAH tedavisinde kullanılan dozlardaki etkileri tartışmalı olmakla beraber KOAH'ta hastalığın ilerlemesini önleyecek etkili terapilerin mevcut eksikliği göz önüne alındığında, NAC ve türevleri çoklu moleküler etki modları ile dozlar ve uygulama yolu optimize edildikten sonra ümit verici ilaçlar olmaya devam etmektedir. [4]

Bu yüksek lisans tezi kapsamında Asetilsistein safsızlıklarının stabilite göstergeli UPLC yöntemi ile UV/PDA dedeksiyonuna dayanan bir safsızlık tayini yöntemi geliştirilmiştir. Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için safsızlık tayini metoduna spesifiklik, lineerlik ve aralık, LOD&LOQ, kesinlik, doğruluk ve geri kazanım, dayanıklılık parametreleri uygulanarak validasyonu başarıyla tamamlanmıştır. Metodun dalga boyu ve akış değişimine karşı dayanıklı olmadığı görülmüştür. Tüm validasyon sonuçları limitlere uygun bulunmuştur.

Yöntemin validasyonundan sonra Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe için safsızlık stres çalışmaları da başarıyla tamamlanmıştır. Yapılan stres çalışmalarında elde edilen kromatogramlarda yabancı piklerle, birincil pikler arasında bir girişim gözlenmemiştir.

Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesi ile yapılan stres çalışmalarında Isı-nem (40 °C 75 RH - 7 gün), Işık Bozundurması UV Bölge, Görünür Bölge, yüksek ısı (80°C 2gün), asidik ve bazik stres koşullarında stabil olduğu bilinen ve bilinmeyen impüritelerde artış olmadığı görülmüştür.

Asetilsistein 200 mg ve 600 mg Oral Çözelti Hazırlamak için Saşe numunesi oksidasyona maruz bırakıldığında stres koşulunda Safsızlık C sonuçlarında artış olduğu, miktar tayini sonuçlarında ise bu artışı karşılayacak şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen stres çalışmaların sonuçlarına göre miktar tayinindeki azalmaya karşılık toplam safsızlık sonuçlarında artış görülmüştür ve kütle denklığı sağlanmıştır. Böylece geliştirilen miktar tayini ve safsızlık yönteminin stres koşullarındaki değişimleri yansıttığı ve stabilitede ayırt edici özelliğe sahip olduğu ispatlanmıştır.



KAYNAKLAR

1. EP EUROPEAN PHARMACOPEIA 10.3
2. U.S. Food and Drug Administration (2019) Drug Approval Package: FDA Releases Final Guidance on Enforcement Discretion for Certain NAC Products
3. RX Media. (2022). Asetilsistein
4. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2006 Dec; 1(4): 425–434. Published online 2006 Dec. doi: 10.2147/copd.2006.1.4.425
5. ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005 Kasım, Erişim 11.10.2022;
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
6. RX Media. (2022). Muconex Saşe
7. Biomed Res Int. 2018; 2018: 2469486. Published online 2018 Oct 22. doi: 10.1155/2018/2469486
8. EMA guidelines on Limits of Genotoxic impurities.
9. Clinical Pharmacokinetics of N-Acetylcysteine. *Mack R. Holdiness. Clin. Pharmacokinet* 20 (2); 123-134. 1991
10. Mathew, Elizabeth Mary, et al. "Development and Validation of an Analytical Method for Related Substances in N-acetyl–L-cysteine Effervescent Tablets by RP-HPLC." *Indian J Pharmaceut Educ Res* 51 (2017): 626-35.
11. Ghanshyamsinh Chauhan, D., Patel, A., Shah, D., & Shah, K. (2014). Development & Validation of High Pressure Liquid Chromatography Analytical Method for Related Substance of Acetylcysteine Effervescent Tablet.
12. TOUSSAINT, B., et al. Quantitative analysis of N-acetylcysteine and its pharmacopeial impurities in a pharmaceutical formulation by liquid chromatography–UV detection– mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, 896: 191-199.
13. GOKUL RAJ, M. Formulation and Evaluation of Bilayer Tablet of Acebrophylline and N- Acetylcysteine. 2021. PhD Thesis. CL Baid Metha College of Pharmacy, Chennai.

14. Toussaint B, Pitti C, Streel B, Ceccato A, Hubert P, Crommen J. Quantitative analysis of N-acetylcysteine and its pharmacopeial impurities in a pharmaceutical formulation by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000 Oct 27;896(1-2):191-9. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00741-X. PMID: 11093654.
15. Jaworska, Mallgorzata, et al. "Capillary electrophoretic separation of N-acetylcysteine and its impurities as a method for quality control of pharmaceuticals." *Journal of Chromatography A* 853.1-2 (1999): 479-485.
16. Elizabeth MM, Ravi A, Rameshwar N, Sudheer M, Krishnamurthy B. Development and validation of an analytical method for related substances in N-acetyl-L- cysteine effervescent Tablets by RP-HPLC. *Indian J of Pharmaceutical Education and Research*. 2017;51(4):626-35. INTIHAL RAPORU