

**TRİFLURİDİN VE TİPİRACİL HİDROKLORÜRÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN UPLC VE LC-MS/MS
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Murat KOZANLI

Eskişehir 2022

**TRİFLURİDİN VE TİPİRACİL HİDROKLORÜRÜN FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN UPLC VE LC-MS/MS
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU**

Murat KOZANLI

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1703S083 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Murat KOZANLI'nın "Trifluridin ve Tipiracil Hidroklorürün Farmasötik Preparatlardan Eş Zamanlı Tayini İçin UPLC ve LC-MS/MS Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Bozunma Ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile Karakterizasyonu" başlıklı tezi 27.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Doktora Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Üye	: Prof. Dr. Göksel ARLI
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY
Üye	: Prof. Dr. Sermet KABASAKAL
Üye	: Doç. Dr. Musa ŞÖLENER

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

TRİFLURİDİN VE TİPİRACİL HİDROKLORÜRÜN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN UPLC VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU

Murat KOZANLI

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Kanser, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme sonuçlanan hastalıktır. Ve insanlarda görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Kolon kanseri, kanser insidansı ve mortalite sıralamasında çok yüksek sıralamaya sahip bir gastrointestinal kanser türüdür. Kolon kanseri tedavisi için 2015 yılında FDA tarafından onaylanan Lonsurf isimli ilaç Trifluridin (TRI) ve Tipiracil HCl (TIP) etken maddelerinin kombinasyonunu içermektedir.

Söz konusu bu çalışmada TRI/TIP kombinasyonu içeren farmasötik formülasyonlarının analizi için UPLC ve LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. UPLC metodu bozunma ürünleri varlığında optimize edilmiş ve asidik, bazik ve oksidatif gibi zorlu bozma koşullarında her iki etken maddeye ait yeni bozunma ürünleri tespit edilmiştir. Bozunma ürünlerinin kalitatif analizi LCMS-IT-TOF cihazı ile yapılmıştır.

Geliştirilen her iki metotun kromatografik ayırımı için çekirdek kabuk ve monolitik silika yapıda olmak üzere farklı sabit fazlar denenmiştir. En başarılı ayırım Kinetex® 2.6 µm PS C₁₈ Core-Shell (100×4.6 mm, ID 2.7µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz ise metanol ve tampon karışımı olup, tampon olarak 10 mM amonyum asetat (pH 5.8) ile en iyi şekilde ayırım elde edilmiştir. Akış hızı UPLC için 1 mL/dk ve LC-MS/MS için 0.5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Optimum koşulların elde edildiği yöntemin geçerlilik çalışmaları ve TRI/TIP içeren farmasötik preparatta numune analizi yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Trifluridin, Tipiracil HCl, Bozunma Ürünü, UPLC,
LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF, Farmasötik preparat

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE UPLC AND LC-MS/MS METHODS FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TRIFLURIDINE AND TIPIRACIL HYDROCHLORIDE FROM PHARMACEUTICAL PREPARATIONS AND CHARACTERIZATION OF DEGRADATION PRODUCTS BY LCMS-IT-TOF

Murat KOZANLI

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Cancer is the disease that causes the most deaths after cardiovascular diseases in the world. And its incidence in humans is increasing day by day. Colon cancer is a type of gastrointestinal cancer that ranks very high in cancer incidence and mortality. The drug named Lonsurf, which was approved by the FDA in 2015 for the treatment of colon cancer, contains the combination of Trifluridine and Tipiracil HCl active ingredients.

In this study, UPLC and LC-MS/MS methods were developed for the analysis of pharmaceutical formulations containing TRI/TIP combination. The UPLC method was optimized in the presence of degradation products and a new degradation products of both active substances were detected under acidic, basic and oxidative harsh degradation conditions. Qualitative analysis of the degradation product was performed with the LCMS-IT-TOF instrument.

For the chromatographic separation of both developed methods, different stationary phases including core shell and monolithic silica structure were tested. The most successful separation was achieved on the Kinetex® 2.6µm PS C18 Core-Shell (100×4.6 mm, ID 2.7 µm) column. The mobile phase is the methanol buffer mixture, and optimum separation was achieved with 10 mM ammonium acetate (pH 5.8) as a buffer. The flow rate was determined as 1 mL/min for UPLC and 0.5 mL/min for LC-MS/MS. Validation studies of the method obtained with optimum conditions and on the pharmaceutical preparation containing TRI/TIP were performed.

Keywords: Trifluridin, Tipiracil HCl, Degradation product, UPLC, LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF, Pharmaceutical preparation

TEŞEKKÜR

27/06/2022

Doktora çalışmamın her aşamasında sahip olduğu değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman geri kalmayan, bilimsel anlamda gelişmem, pişmem için tüm imkanları sağlayan, iyi bir eğitmen ve bilim insanı olmam için de her zaman ve her koşulda desteğini esirgemeyen, hoşgörüsünü ve içtenliğini hiçbir zaman eksiltmeyen saygın duruşuyla her zaman örnek aldığım sosyal hayatta bir abi, akademik hayatta da hocam tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a;

Lisansüstü eğitim hayatımda yol göstericiliğiyle, engin tecrübe ve öngörülerıyla her zaman yanımda olup bana destek olan çok Sevgili Hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya;

Doktora çalışmam boyunca bilimsel görüşü ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY'a,

İlk tanıştığım andan itibaren gülen yüzüyle manevi desteğini her zaman hissettiren Sevgili Hocam Prof. Dr. Özgür Devrim CAN'a

Tez deney çalışmalarım boyunca her zaman sabır ve özveriyle yardımlarını esirgemeyen çok sevgili çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Saniye ÖZCAN, Öğr. Gör. Serkan LEVENT, Öğr. Gör. Ecz. Asaf Evrim Evren ve Uzm. Ecz. Aysun GEVEN'e;

Tez dönemimde ve çalışma hayatımda her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Ve bu süreçte benim için her türlü fedakarlığı yapan canım aileme,

En içten sonsuz şükran ve minnetlerimi sunuyorum...

27/06/2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Murat KOZANLI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	6
2.1. Trifluridin	6
2.1.1. Trifluridin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	6
2.1.2. Trifluridin'in farmakokinetik özellikleri	7
2.1.3. Trifluridin'in Farmakolojik Özellikleri	8
2.2. Tipirasil HCl.....	9
2.2.1. Tipirasil HCl'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
2.2.2. Tipirasil HCl'in farmakokinetik özellikleri	9
2.2.3. Tipirasil HCl'in Farmakolojik Özellikleri	10
2.3. Tipirasil HCl ve Trifluridin Etki Mekanizması	10
2.4. Tipirasil HCl ve Trifluridin Analizleri ile İlgili Çalışmalar	11
2.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	14
2.6. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi.....	19
2.6.1. İyonlaştırma yöntemleri	20

	<u>Sayfa</u>
2.6.1.1. Elektron etkisi (EI).....	20
2.6.1.2. Kimyasal iyonizasyon (CI).....	21
2.6.1.3. "Hafif" elektrosprey iyonizasyonu (ESI).....	21
2.6.1.4. Hızlı atom bombardımanı iyonizasyonu (FAB).....	22
2.6.1.5. Alan desorpsiyon iyonizasyonu	22
2.6.1.6. MALDI 'hafif' iyonizasyon.....	22
2.6.2. Kütle Spektrumu.....	23
2.6.3. Kalitatif ve kantitatif analiz	23
2.7. Sıvı Kromatografisi İyon Tuzaklı/Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi ...	24
3. GEREÇLER.....	25
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler.....	25
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	25
4. YÖNTEMLER	27
4.1. Deneysel parametreler	27
4.1.1. Enstrümental parametreler	27
4.1.2. Standart çözeltilerin hazırlanışı.....	27
4.1.3. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı	28
4.1.4. Tablet çözeltilerinin hazırlanışı	28
4.1.5. Analiz parametreleri.....	29
4.1.6. Bozundurma çözeltilerinin hazırlanışı	29
4.1.6.1. Hidroklorik asit çözeltisi (1 N)	29
4.1.6.2. NaOH çözeltisi (1 N).....	29
4.1.6.3. H ₂ O ₂ çözeltisi (%3, h/h)	30
4.1.7. Bozundurma Koşulları	30
4.1.8. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	30
4.1.9. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti	31
4.1.9.1. Kararlılık	31

	<u>Sayfa</u>
4.1.9.2. Seçicilik.....	31
4.1.9.3. Doğrusallık ve Çalışma aralığı.....	31
4.1.9.4. Doğruluk	32
4.1.9.5. Kesinlik.....	32
4.1.9.6. Teşhis ve tayin alt sınırı	32
4.1.9.7. Sistem uygunluk testleri	32
4.1.9.8. Sağlamlık.....	33
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR.....	33
5.1. TRI ve TIP'in UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin.....	33
İncelenmesi	33
5.2. NMR Spektroskopisi Tekniği ile TRI ve TIP'in ¹ H NMR ve.....	35
¹³ C NMR Spektrumlarının Tespiti	35
5.3. IR Spektroskopisi Tekniği ile Karakterizasyonu	40
5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme	41
5.5. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme.....	48
5.6. Bozunma Davranışları.....	48
5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini.....	57
5.8. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması.....	64
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	67
KAYNAKÇA.....	69
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Tipirasil HCl ve Trifluridin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler	12
Tablo 2.2. Tipirasil HCl ve Trifluridin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler (Devamı).....	13
Tablo 4.1. Hareketli fazın optimizasyon koşulları.....	29
Tablo 4.2. Hızlandırılmış bozundurma koşulları.....	30
Tablo 5.1. TIP'nın çoklu reaksiyon izleme koşulları	45
Tablo 5.2. TRI'nin çoklu reaksiyon izleme koşulları	45
Tablo 5.3. Optimum koşullarda TRI ve TIP analizi için elde edilen SUT verileri	47
Tablo 5.4. TIP için doğrusallık ve kesinlik verileri	58
Tablo 5.5. TRI için doğrusallık ve kesinlik verileri.....	59
Tablo 5.6. TIP için geri kazanım verileri.....	60
Tablo 5.7. TRI için geri kazanım verileri	60
Tablo 5.8. TIP için Ara kesinlik verileri.....	61
Tablo 5.9. TRI için Ara kesinlik verileri	61
Tablo 5.10. TIP için metot sağlamlık çalışmaları (n = 3).....	62
Tablo 5.11. TRI için metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)	63
Tablo 5.12. 10 µg/mL TIP için karalılık çalışmaları (n = 6)	65
Tablo 5.13. 10 µg/mL TRI için karalılık çalışmaları (n = 6)	65
Tablo 5.14. LONSURF® tablet analiz sonuçları TIP (n = 6).....	66
Tablo 5.15. LONSURF® tablet analiz sonuçları TRI (n = 6)	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Sindirim sisteminde kolonun yapısı ve sindirim sisteminin alt kısmı olan kalın bağırsakta (kolonda) gözlenen kolon kanseri (8).....	2
Şekil 1.2. İyi huylu poliplerin kötü huylu poliplere dönüşümü (10).....	3
Şekil 2.1. Trifluridin'in molekül yapısı.....	7
Şekil 2.5. YPSK kolonu	16
Şekil 2.7. Kütle spektrometresinin şematik gösterimi	19
Şekil 5.1. TIP'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (10 µg/mL)	34
Şekil 5.2. TRI'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (10 µg/mL).....	34
Şekil 5.3. TRI için alınmış ¹ H NMR spektrumu	36
Şekil 5.4. TIP için alınmış ¹ H NMR spektrumu.....	37
Şekil 5.5. TRI için alınmış ¹³ C NMR spektrumu	38
Şekil 5.6. TIP için alınmış ¹³ C NMR spektrumu	39
Şekil 5.7. TRI için IR Spektrumu.....	40
Şekil 5.8. TIP için IR Spektrumu	41
Şekil 5.9. Aynı koşullarda yapılan analizler sonucunda farklı kolonlarda TIP/TRI kromatogramı.....	43
Şekil 5.10. Optimize koşullar altında kör çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram	44
Şekil 5.11. Optimize koşullar altında gerçek zamanlı etken madde karışım çözeltisinden elde edilen kromatogram.....	44
Şekil 5.12. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı LC-MS/MS kromatogramı	46
Şekil 5.13. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod).....	46
Şekil 5.14. TRI etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod)	46
Şekil 5.15. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması... (Yalnız TPI/TRI, 0. saat)	49
Şekil 5.16. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması... (Yalnız TPI/TRI, 48. saat)	49
Şekil 5.17. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması... (NaOH ile TIP/TRI, 0. saat)	50
Şekil 5.18. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması... 50	

(NaOH ile TIP/TRI, 48. saat)	50
Şekil 5.19. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması....	51
(HCl ile TPI/TRI, 0. saat)	51
Şekil 5.20. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması....	51
(HCl ile TIP/TRI, 48. saat)	51
Şekil 5.21. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması... 52	
(H ₂ O ₂ ile TPI/TRI, 0. saat)	52
Şekil 5.22. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması....	52
(H ₂ O ₂ ile TPI/TRI, 48. saat)	52
Şekil 5.23. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması....	53
(UV ile TIP/TRI, 48. saat)	53
Şekil 5.24. TIP ve TRI etken maddelerinin oda sıcaklığında eş zamanlı stres koşullarında bozundurma çalışması	53
Şekil.5.25. TIP etken maddesinin eş zamanlı LCMS-IT-TOF kromatogramı ...	54
Şekil 5.26. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Pozitif Mod)	54
Şekil 5.27. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod).....	54
Şekil 5.28. NaOH bozundurma sonucu elde edilen TIP yeni impüritesi için kütle atlası.....	55
Şekil 5.29. TIP'in NaOH ortamda meydana gelen bozunma reaksiyonu	56

KISALTMALAR DİZİNİ

AAs	: Amonyum Asetat
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
API	: Aktif farmasötik bileşen
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Konsantrasyon
C ₈	: Oktildimetilsilan
C ₁₈	: Oktadesilmetilsilan
DAD	: Photodiode array detector
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dUMP	: 2'-deoksiüridin-5'-monofosfatın
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GI	: Gastrointestinal
HETP	: Teorik Tabaka Yüksekliği
HPLC	: Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi
HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
ICH	: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IR	: Kızılötesi
ID	: İç çap
IT	: İyon Tuzağı
IT-TOF-MS	: İyon Tuzaklı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
k	: Kapasite faktörü
KK	: Kolorektal kanser
LCMS-IT-TOF	: Sıvı Kromatografisi İyon Tuzaklı/Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
MALDI	: Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon
MKK	: Metastatik kolorektal kanser

MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme Modu
MS	: Kütle Spektrometresi
N	: Teorik Plaka Sayısı
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
Rs	: Ayrım Gücü
SH	: Standart Hata
SI	: Ara Kesinlik Varyansı
Sr	: Tekrarlanabilirlik Varyansı
SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
T	: Kuyruklanma Faktörü
TFTMP	: Trifluridin monofosfat
TFTTP	: Trifluridin trifosfat
TIP	: Tipirasil HCl
TK	: Timidin kinaz
TOF	: Uçuş Süresi
TQ	: Triple Quadrapol (Üçlü Dört Kutuplu)
TRI	: Trifluridin
UPLC	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
USP	: United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hem genetik olarak hem de çevresel koşullara göre görülme sıklığı her geçen gün artan, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölümlü sonuçlanan hastalık tipidir [1].

Kanser, bir doku veya organdaki hücrelerin kontrolsüz ve yayılarak çoğalması ile bilinen bir hastalıktır. Vücut hücreleri normal sağlıklı zamanlarında sınırlı ve kontrollü bir biçimde bölünebilme yeteneğine sahiptir. Ölen hücrelerin yenilenmesi, yaralanan veya yaşlanan hücrelerin yeniden tamir edilmesi amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar, buna paralel olarak vücutta işlevler normal bir şekilde devam eder. Kanserli hücrelerde çoğalmayı düzenleyici mekanizmaların bozulması olasıdır. Bu mekanizmalar ortadan kalktığında, hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalmaya devam ederler. Kanser gelişiminde, çoğalmayı kontrol eden mekanizmaların bozulması, birçok mutasyonlar ve kromozomal anomalinin hücrelerde birikmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Yayılma ve metastaz kanser hücrelerinin tanımlayıcı özellikleridir. Genetik mutasyon yoluyla normal hücreden malign hücreye dönüşümünden sonra kanser hücresi; hızlı bir şekilde çoğalır, çevresindeki dokuları işgal eder, ana yumrudan koparak kan ya da lenf sistemi ile göç ederek diğer bölgelerde kanser büyümesi için ikincil odaklar oluşturabilir. Kanser hücrelerinin kendine özgü özelliklerinden birisi, belirli organ(lar)a metastaz yapma eğilimleridir [2].

Bu şekilde tümörler buldukları doku ve organlar dışında başka doku ve organlara da sıçrayabilirler. Metastaz, kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %90'ında görülmektedir [3].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerinde, kanser 2020'de yaklaşık olarak 10 milyon insanın öldüğü dünya çapında önde gelen bir hastalık tipidir. 2020 verilerine göre en sık görülen kanser vakaları;

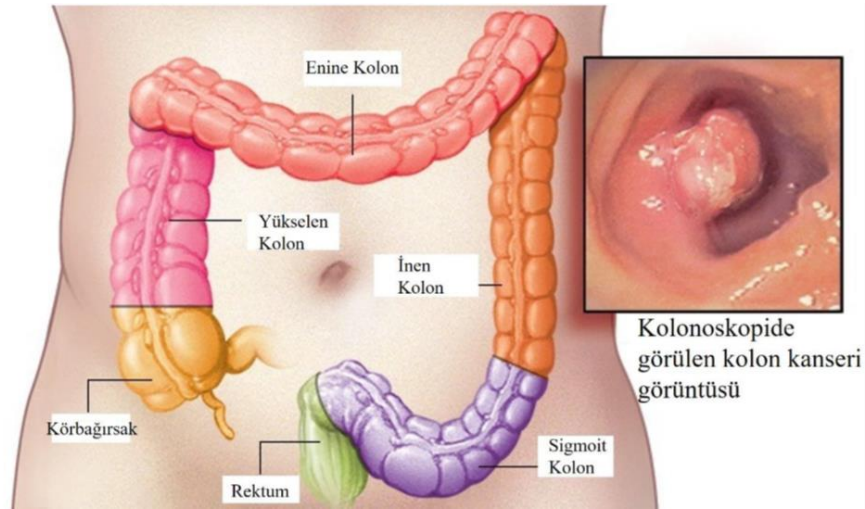
- 2.26 milyon meme kanseri,
- 2.21 milyon akciğer kanseri,
- 1.93 milyon kolon ve rektum kanseri,
- 1.41 milyon prostat kanseri,
- 1.20 milyon cilt kanseri ve
- 1.09 milyon mide kanseri [4].

Her sene binlerce kişinin ölümüne sebep olan kanser, oldukça önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Gastrointestinal kanserleri (GI), kanser insidansı ve mortalite sıralamasında hatırı sayılır şekilde yukarılarda olan bir grup hastalıktır. GI, sindirim sistemini ve er bezlerini etkileyen kötü huylu tümörleri kapsayan geniş bir tanımlamadır ve bunlardan bazıları insanlarda en agresif ve dirençli kanserler arasında yer almaktadır [5].

Mide kanseri, kolon kanseri, karaciğer kanseri, yemek borusu kanseri, bağırsak kanseri ve pankreas kanseri GI kanser türleridir [6].

Kolon kanseri en yaygın malign neoplazmalardan biridir ve küresel olarak kanserde insidans oranında üçüncü ve mortalite oranında ikinci sırada yer almaktadır. Özellikle batı ülkelerinin çoğunda önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır [7].

Kolon kanseri, sindirim sisteminin son kısmı olan kalın bağırsakta (kolon) oluşur ve rektal kanser ise kolonun uç kısımlarında ortaya çıkar (Şekil 1.1). Kolon ve rektal kanser, ikisi birlikte kolorektal kanseri tanımlamaktadır [8].



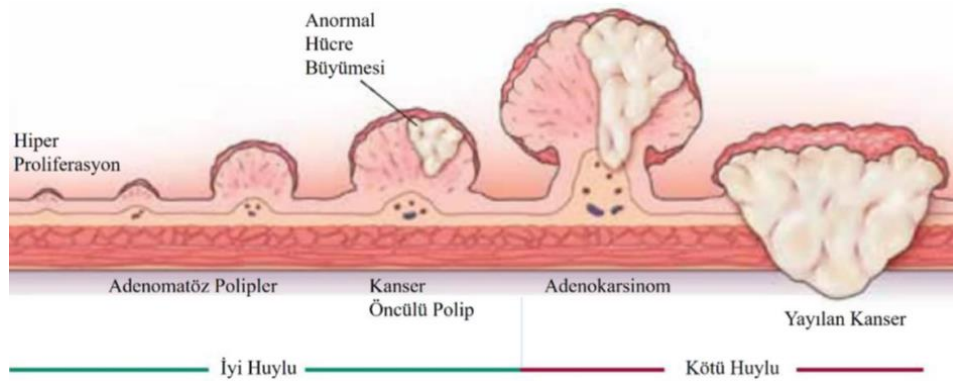
Şekil 1.1. Sindirim sisteminde kolonun yapısı ve sindirim sisteminin alt kısmı olan kalın bağırsakta (kolonda) gözlenen kolon kanseri (8)

Kolorektal kanser (KK), genetik ve epigenetik değişiklikler ile normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmalarının bozulması sonucunda meydana gelmektedir [9].

2018 yılında dünyada beş yıllık yaşama süresi %50-55'lerde olan; akciğer, karaciğer, meme ve prostat kanserinden sonra en sık rastlanan malignitedir. Metastatik kolorektal kanserde (MKK), birincil metastaz yeri karaciğerdir ve kansere bağlı ölümlerin

ilk sebebidir. Metastatik kanserlerin biyolojik özellikleri tümörden tümöre değişmesinin yanında mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Kanser vakalarında adenomatöz polip olarak adlandırılan küçük ve sağlıklı hücre kümeleri bulunurken zamanla bu poliplerin bazıları bozularak kanserli hücrelere dönüşebilir. Kolon kanseri ise, kolon ve rektum duvarlarındaki bu tip iyi huylu poliplerin zamana bağlı olarak kötü huylu poliplere dönüşümüyle meydana gelir (**Şekil 1.2**) [10].



Şekil 1.2. İyi huylu poliplerin kötü huylu poliplere dönüşümü (10)

Anormal büyüyen polipler kanserli hale geldiğinde, rektum veya kolon duvarında tümör oluşturur ve diğer anatomik bölgelere metastaz yoluyla kan damarları veya lenf damarları boyunca büyür [11].

KK kanser insidansının %10'unu oluşturduğu için dünya çapındaki önemli düzeyde sağlık sorunu olarak dikkat çekmektedir [12].

Son dönemde kanser nedenli ölümlerin artması sonucu bilim insanları bu alanda bilimsel çalışmalara daha fazla yoğunlaşmıştır. Kanser, normal sağlıklı hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi ve bu hücrelerin başka organlara metastazı ile ortaya çıkan dünya çapında ciddi bir sağlık sorunudur [13].

Bilim insanları yıllardır kanserin neden ortaya çıktığını ve nasıl geliştiğini anlamaya çalışmaktadırlar [14]. Bu şekilde hastalığı erken dönemde tespit edebilecek yeni ve etkili stratejiler ortaya koyabilecek ve bu hastalık ile bağlantılı ölüm sıklığının azaltılması yönünde daha güvenli ve etkili tedaviler geliştireceklerdir.

Diğer taraftan kanser gibi uzun süre tedavi ihtiyacı duyulan hastalıklarda yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için ihtiyaç duyulan yeni ilaçların keşfi devamlı olarak araştırılıp geliştirilmektedir.

Günümüzde insan sağlığına verilen önem teknolojinin kullanımı ile birlikte giderek artmıştır. Bir ülkenin ekonomik ve sosyal açıdan gelişmiş olması öncelikle sağlıklı bir toplum ile mümkündür. Sağlıklı bir toplum yaratılması ve bireylerin yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesinde en önemli faktörlerden biri olan ilacın üretiminden tüketimine kadar tüm kuralların uygulanması ve ihtiyacı olan herkese zamanında ulaştırılması önem teşkil etmektedir.

İlaç endüstrisi ileri düzeyde araştırma ve geliştirme imkanı olan küresel bir endüstriyel bir güce sahiptir. Günümüz teknolojisinin çok hızlı gelişmesine paralel olarak bilimsel alanda yapılan çalışmalarda da birçok yenilik ve keşif olmaktadır. Dolayısıyla bilimsel alanda yapılan çalışmaların sayılarında artış ile birlikte elde edilecek sonuçlar başka çalışmaları da desteklemektedir. Böylece çok disiplinli çalışmalarla elde edilen veriler sonucunda ilaç gelişimi devamlılık kazanmıştır. Tüm insanlığı etkileye kanser hastalığına karşı da ilaç gelişimi üzerine ileri düzeyde çalışmalar yürütölmektedir.

İnsanoğlunun kullanmış olduğu ilaçların içerisinde bulunan ve insan sağlığını yakından ilgilendiren etkenlerin ortaya konulması için madde içeriği, miktar tayini, etkin madde ya da yardımcı maddeden kaynaklanan safsızlıkların teşhisi ve tayini gibi analizler yapılmaktadır. İlacın üretimi, ambalajlanması, sevkiyatı ve depolanması koşullarında güvenilirliğin sağlanması gerekmektedir.

Bir ilaç ürünü içerisinde formölasyon harici ortaya çıkan safsızlıkların varlığı ve bunların kontrolü önem teşkil etmektedir. Bu nedenle ilaç ürünlerinin kalitesi, güvenliği ve etkinliğinin sağlanması için bu safsızlıkların belirlenip yok edilmesi gerekmektedir.

İlaç endüstrisinde hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaç ürünlerinin içerisinde bulunan saf aktif farmasötik bileşenlerin (API) analizi önem arz etmektedir. Bu ilaç ürünleri tablet, krem, merhem, tentür, losyon, supozituar, ve damla gibi çeşitli formlarda bulunabilmektedir. Bu formların içerisinde farmasötik olarak aktif madde ve en az bir farmasötik yan ürün içerik olarak bulunmaktadır.

İlaç analizleri, ilaç başlangıç ürünleri, yan ürünler ve API'nin tanımlanması, içeriği, saflığı ve stabiliteleri hakkında bilgi elde etmek için yapılan çalışmalardır. Safsızlıklar, sıklıkla API'nin sentezlenmesi sırasında ortaya çıkmaktadır ve International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) kılavuzları ve çeşitli farmakopeler ile takip edilmektedir.

Ön tedavi görmüş hastalığı olanların karşılanmamış tıbbi ihtiyaçlarını karşılamak için klinik uygulamada kabul edilebilir ve düşük toksisiteye sahip etkili ajanlara ihtiyaç vardır. Bu birincil ajanlar (5-FU, oksaliplatin, irinotekan, bevacizumab, aflibercept, setuksimab, panitumumab ve regorafenib) MKK tedavisi için onaylandığından, kontrendike olmaları dışında hem erken hem de/veya metastatik hastalık için kullanılmıştır.

Tüm aktif ilaçlara maruz kalmış MKK'li hastalar sınırlı bir sağ kalıma sahiptir. Bu nedenle, KK'li hastaların önemli bir yüzdesi, önceki kemoterapi rejimlerinin başarısızlığından sonra daha fazla aktif tedaviye ihtiyaç duyar ve bu hastalar için TAS-102, uygulanabilir yeni bir seçeneği temsil etmektedir.

TAS-102, bir timidin analogu olarak kabul edilir ve deoksinükleozit analogları ailesine aittir. Özellikle TRI, aktif monofosfat türevi TF-TMP olmasına neden olan timidin kinaz tarafından fosforile edilir.

TAS-102, tüm etiketli ve aktif ajanlar başarısız olduktan sonra, MKK için mevcut tedavi seçimini temsil etmektedir. Gelecekteki bir senaryo, ilacı diğer aktif tedavilerle kombinasyon halinde KK'in erken aşamalarında ve diğer gastrointestinal kanserlerde test etmek şeklindedir. İnsan KK ksenograflarında, TAS-102'nin irinotekan, oksaliplatin, bevacizumab, setuksimab veya panitumumab ile kombinasyonları, tek başına herhangi bir ajandan daha büyük bir büyüme inhibisyonu ortaya çıkarmaktadır [15].

Trifluridin/tipiracil (TAS-102, Lonsurf®) (Taiho Oncology, 2015), MKK tedavisi için yeni bir oral tedavidir ve standart tedavilere dirençli MKK hastaları için bir seçenektir. Timidin bazlı bir nükleik asit analogu olan trifluridin ve bir timidin fosforilaz inhibitörü olan tipiracil'in 2:1 molar oranda bir kombinasyonudur ve trifluridinin uzun süreli yarı ömrüne yol açar ve günde iki kez dozlamaya izin verir [16].

Trifluridin/tipirasil'in etki mekanizması, MKK tedavisinin temel taşı olan urasil bazlı bir analog olan 5-florourasilden (5-FU) farklıdır [17].

Klinik öncesi çalışmalar, 5-FU'ya dirençli tümörlerin hala trifluridin/tipirasil'e duyarlı olduğunu göstermektedir [18].

Trifluridin/tipirasil monoterapisi, önceden iki veya daha fazla standart kemoterapi rejimine sahip mKK'li hastalar için yeni bir sonraki basamak tedavi seçeneği olmuştur [16].

2. KAYNAK BİLGİSİ

Lonsurf® ismiyle pazarlanan trifluridin tipiracil ile kombinasyon ürünü, floropirimidin, oksaliplatin ve irinotekan bazlı kemoterapi tedavisi sonrası metastatik kolorektal kanserli yetişkin hastaların tedavisi için Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği'nde onaylanmıştır. Bir anti-VEGF biyolojik tedavisi ve eğer RAS vahşi tip ise bir anti-EGFR tedavisi şeklindedir. Antikanser tedavisinde, trifluridin, hücre replikasyonu sırasında DNA fonksiyonunu bozmak için hücre alımını takiben kanser hücrelerinin DNA'sına dahil olan timidin bazlı bir nükleozid metabolik inhibitör görevi görür. Tipiracil ise trifluridin bozulmasını önleyen ve böylece trifluridine sistemik maruziyeti artıran bir inhibitördür [19].

2.1. Trifluridin

Trifluridin (triflorotimidin veya TFT olarak da adlandırılır), esas olarak gözde kullanılan bir anti-herpesvirüs antiviral ilaçtır [19]. Bir dönem Glaxo tarafından ticari adı Viroptic olarak satılmış ve daha sonra GlaxoSmithKline ile birleştirilmiştir. Trifluridin göz damlaları, herpes simpleks virüs tip 1 ve 2'nin neden olduğu keratit ve keratokonjonktivit tedavisinde ve ayrıca göz enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde de kullanılır. Son dönemde de kanser tedavisi için Trifluridin/Tipiracil HCl kombinasyonu şeklinde kullanılmaktadır [20].

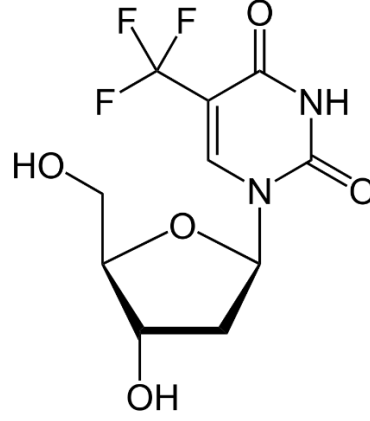
TRI potansiyel antineoplastik aktiviteye sahip florlu bir timidin analogudur. TRI, DNA'ya dahil edilir ve timidilat sentezi inhibe ederek DNA sentezinin inhibisyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve apoptoz ile sonuçlanır. Bu ajan ayrıca antiviral aktivite sergiler [20].

TRI, herpes simpleks virüsü tip 1 ve 2'ye bağlı primer keratokonjonktivit ve tekrarlayan epitelyal keratit tedavisinde oftalmik solüsyonlar olarak kullanılan aktif bir antiviral ilaçtır. Antiviral etkisi, replikasyon sırasında viral DNA'ya dahil edilerek üretilir, bu da kusurlu protein oluşumuna ve artan mutasyon oranı neden olur [21].

2.1.1. Trifluridin fiziksel ve kimyasal özellikleri

TRI, nükleobaz olarak 5-triflorometilurasile sahip bir pirimidin 2'-deoksiribonükleosit bileşiğidir. Esas olarak primer keratokonjonktivit ve tekrarlayan epitelyal keratit tedavisinde kullanılan bir antiviral ilaçtır. Bir nükleozid analogu, bir organoflorin bileşiği ve bir pirimidin 2'-deoksiribonükleosittir.

IUPAC ismi 1-[4-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5-(trifluoromethyl)-(1H,3H)-pyrimidine-2,4-dione olan TRI, C₁₀H₁₁F₃N₂O₅ molekül formülüne sahip ve molekül ağırlığı 296,202 g/mol'dür. CAS numarası 70-00-8'dir. (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Trifluridin'in molekül yapısı

TRI, kristal formda beyaz renkte bir katıdır [20]. Su ($1,56 \times 10^{-4}$ mg/L at 25 °C), metanol ve etanolde serbest şekilde çözünür ve dietil eterde ise çözünürlüğü azdır [22]. Ve erime noktası 186-189 °C'dir [23].

2.1.2. Trifluridin'in farmakokinetik özellikleri

Trifluridin'in oral biyoyararlanımı, karaciğerde ve gastrointestinal (GI) sistemde yüksek oranda eksprese edilen timidin fosforilazın ilk geçiş etkisinden dolayı düşüktür; bu nedenle trifluridin ile monoterapi mümkün değildir.

Trifluridin, hem in vitro hem de in vivo 1 herpes simpleks virüsüne, tip 1 ve 2'ye ve aşı virüsüne karşı bir antiviral etki gösterir. Keratokonjonktivit patolojisine katkıda bulunan bazı adenovirüs suşlarının in vitro olarak trifluridine duyarlı olduğu gösterilmiştir.

Trifluridin ile idoxuridin veya vidarabin arasında çapraz direnç gelişebileceğine dair bir çalışmadan elde edilen kanıtlar olsa da maskeli karşılaştırmalı çalışmaların sonuçlarına dayanarak trifluridin'in, idoksuridin veya vidarabine yanıt vermeyen herpetik keratitli hastalarda dendritik ülserlerin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir [24].

Klinik olmayan çalışmalarda, trifluridin/tipirasil hidroklorür, hem 5-florourasil (5-FU) duyarlı hem de dirençli kolorektal kanser hücre hatlarına karşı antitümör aktivite

göstermiştir. Trifluridin ve tipiracilin birkaç insan tümör ksenogreftine karşı sitotoksik aktivitesi, DNA'ya dahil edilen trifluridin miktarı ile yüksek korelasyon gösterir; bu, trifluridinin birincil etki mekanizmasının kanser hücresi DNA'sına doğrudan dahil edilmesini içerdiğini gösterir.

Daha önce tedavi görmüş metastatik kolorektal kanserli hastalardan oluşan klinik çalışmalarda, 5 veya 7 aylık bir süre boyunca en iyi destekleyici bakımın yanı sıra tipiracil ile kombinasyon halinde trifluridin tedavisi, progresyonsuz sağkalımda, genel yanıt oranı ve hastalık kontrol oranı plaseboya kıyasla artışla sonuçlanmıştır .

2.1.3. Trifluridinin farmakolojik özellikleri

TRI, herpes simpleks virüsüne, tip 1 ve 2'ye ve aşı virüsüne karşı in vitro ve in vivo aktiviteye sahip florlu bir pirimidin nükleosididir. Adenovirüsün bazı suşları da in vitro olarak inhibe edilir.

TRI ayrıca, idoksuridinin topikal uygulamasına klinik olarak yanıt vermeyen epitelyal keratitin tedavisinde veya idoksuridine karşı oküler toksisite veya aşırı duyarlılık oluştuğunda da etkilidir. Topikal vidarabine dirençli bulunan daha az sayıda hastada Trifluridin de etkilidir.

TRI, kültürlenmiş memeli hücrelerinde DNA sentezine müdahale eder. Bununla birlikte, antiviral etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Eksize edilmiş tavşan korneaları üzerinde yapılan in vitro perfüzyon çalışmaları, TRI'in, ana ilacın ve ana metaboliti olan 5-karboksi-2'-deoksiüridin korneanın endotel tarafında geri kazanılmasıyla kanıtlandığı gibi, bozulmamış korneaya nüfuz ettiğini göstermiştir. Kornea epitelinin yokluğu, TRI'in penetrasyonunu yaklaşık iki kat artırır.

TRI'in intraoküler penetrasyonu, TRI'in insan gözüne topikal olarak damlatılmasından sonra meydana gelir. Azalan kornea bütünlüğü veya stromal veya uveal inflamasyon, Trifluridinin aköz hümöre penetrasyonunu artırabilir. TRI'in in vitro oküler penetrasyonunun sonuçlarının aksine, 5-karboksi-2'-deoksiüridin insan gözünün aköz hümörü içinde saptanabilir konsantrasyonlarda bulunmamıştır.

TRI ile terapötik dozlamayı takiben TRI'in sistemik absorpsiyonu ihmal edilebilir gibi görünmektedir. Ardışık 14 gün boyunca günde yedi kez gözlerine TRI damlatılmış yetişkin sağlıklı normal deneklerin serumlarında saptanabilir TRI veya 5-karboksi-2'-deoksiüridin konsantrasyonları bulunmamıştır.

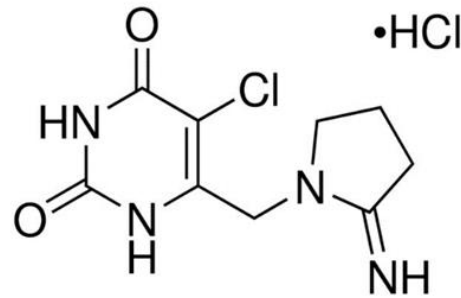
TRI, oftalmik solüsyonlarda tip 1 ve 2 herpes simpleks virüsüne bağlı primay keratokonjonktivit ve tekrarlayan epitelyal keratit tedavisinde kullanılır. Trifluridin, tipiracil ile kombinasyon halinde, daha önce floropirimidin-, oksaliplatin- ve irinotekan bazlı kemoterapi, bir anti-VEGF biyolojik tedavisi ile tedavi edilmiş MKK'li yetişkin hastaların tedavisinde endikedir ve eğer RAS vahşi tip, bir anti-EGFR tedavisi şeklindedir.

2.2. Tipiracil HCl

Tipiracil hidroklorür, tipiracilin bir eşdeğer hidroklorik asit ile birleştirilmesiyle elde edilen bir hidroklorürdür. Bir nükleozid metabolik inhibitörü olan TRI ile kombinasyon halinde, ilerlemiş veya nüksetmiş kolorektal kolon kanserinin tedavisinde kullanılır. Bir hidroklorür ve iminium tuzudur . TIP, rezeke edilemeyen ilerlemiş veya tekrarlayan kolorektal kanserin tedavisi için TRI ve TIP formunda kombinasyon ilacı olarak onaylanmıştır. TIP, TRI'in bozulmasını önleyen ve böylece TRI'e sistemik maruziyeti artıran bir timidin fosforilaz inhibitörüdür [21].

2.2.1. Tipirasil HCl'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

IUPAC ismi 5-chloro-6-[(2-iminopyrrolidin-1-yl)methyl]-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-2,4-dione hydrochloride olan TIP, $C_9H_{12}Cl_2N_4O_2$ molekül formülüne sahip ve molekül ağırlığı 279.12 g/mol'dür. CAS Numarası 183204-72-0'dır. (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. Tipirasil Hidroklorür'ün molekül yapısı

2.2.2. Tipirasil HCl'in farmakokinetik özellikleri

TIP, timidin fosforilaz enzimini inhibe ederek trifluridinin aktif olmayan bir ana metabolit olan 5-triflorometil-2,4(1H,3H)-pirimidindion'a dönüşmesini engeller. Böylece

tipiracil, trifluridin biyoyararlanımını artırabilir. Öte yandan, timidin fosforilaz, bilinen bir trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörüdür ve bunun inhibisyonu, dolaylı bir antianjiyogenik fayda sağlar [25].

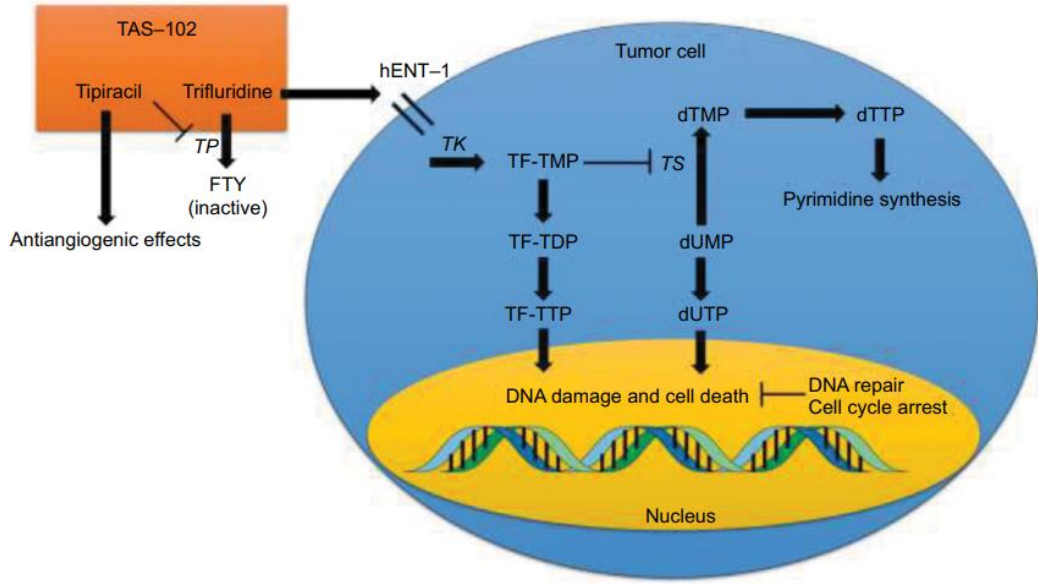
2.2.3. Tipirasil HCl'in farmakolojik özellikleri

TIP, TRI ile kombinasyon halinde, daha önce floropirimidin-, oksaliplatin- ve irinotekan bazlı kemoterapi, bir anti-VEGF biyolojik tedavisi ile tedavi edilmiş metastatik kolorektal kanserli yetişkin hastaların tedavisinde endikedir ve eğer RAS vahşi tip ise, bir anti-EGFR tedavisi. Bu kombinasyon kullanımı ayrıca, daha önce bir floropirimidin, bir platin, bir taksan veya irinotekan ve uygunsu HER2 içeren en az iki önceki kemoterapi dizisi ile tedavi edilen metastatik gastrik veya gastroözofageal bileşke adenokarsinomunu tedavi etmek için kullanılır.

2.3. Tipirasil HCl ve Trifluridin Etki Mekanizması

1:0.5 molar oranında TRI ve TIP'den oluşan TAS-102, Eylül 2015'te refrakter MKK tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır [26]. Trifluridin (5-trifloro-2'-deoksitimidin), 1964 yılında Heidelberger ve arkadaşları tarafından 5-FU'ya alternatif olarak geliştirildi [27]. DNA sentezini etkileyerek hücre büyümesini engelleyen bir timidin analogudur (**Şekil 2.3.**). Timidin kinaz (TK), trifluridini monofosfat formuna, timidilat sentazı (TS) inhibe eden ve 2'-deoksiüridin-5'-monofosfatın (dUMP) 2'-deoksitimidin-5'e metilasyonunu önleyen trifluridin monofosfata (TFTMP) fosforile eder [28]. dUMP daha sonra alternatif olarak trifosfat formuna, 2'-deoksiüridin-5'-trifosfata fosforile edilir, bu da urasil'in DNA'ya dahil edilmesine, DNA sentezini inhibe etmesine ve hücre ölümüne yol açmasına neden olur [29] [30]. Ek olarak, ayrı bir yolda, TF-TMP ayrıca DNA'ya doğrudan katılma yoluyla hücre ölümüne neden olan trifluridin trifosfata (TFTTP) fosforile edilir [31] [32].

TAS-102, DNA'ya doğrudan TF-TTP dahil edilmesi ve trifluridin DNA glikosilaz tarafından bozunmaya karşı direnci nedeniyle 5-FU'ya dirençli KK hücre hatlarında etkilidir, bu da 5-FU'ya dirençli MKK'de etkinlik olduğunu gösteriyor [33] [34].



Şekil 2.3. Tipirasil HCl ve Trifluridin etki mekanizması (28)

2.4. Tipirasil HCl ve Trifluridin Analizleri ile İlgili Çalışmalar

TIP ve TRI, MKK'in üçüncü veya dördüncü basamak tedavisinde kullanılan antikanser ilaç etken maddeleridir [21]. Bu iki ilaç etken maddenin kombinasyonu son dönemde geliştirilmiş olup FDA onayını yeni alması nedeniyle analizleri konusunda kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, çalışılan yöntem, kullanılan gerekli madde ve malzeme, yöntemin optimize koşulları ve sonuçları şeklinde hazırlanmış olan **Tablo 2.1** ve **Tablo 2.2**'de bulunmaktadır.

Tablo 2.1 *Tipirasil HCl ve Trifluridin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler*

Analitik Yöntem	Sabit Faz Kolon Sıcaklığı	Hareketli faz	Akış Hızı mL/dk.	Altkonma Zamanı Analiz Süresi	Dedektör Enj.Hacmi, Dalga Boyu	Doğrusal Aralık TIP/TRI	LOD TIP/TRI	LOQ TIP/TRI	Numune	Kaynak
RP-HPLC (TIP/TRI)	XterraC18 (150mmx4.5mm x 5µm) 30 °C	Trietylamine tampon: Asetonitril (40:60)	1	2.016/3.471 10 dk.	DAD 272 nm	4.5-22.5 (µg/mL)/ 10-50 (µg/mL)	0.162/ 0.090 µg/mL	0.446/ 0.360 µg/mL	Tablet	[22]
Elektrokinetik Kromatografi (TIP/TRI)	silika kapiler (65 cm toplam uzunluk, 55 cm etkin uzunluk and 50 mm i.d.)	-	-	10.40/6.34 13 dk.	DAD 205 nm	100–1000 ng/mL/ 200–4000 ng/mL	-	100/ 200 ng/mL	Sıçan Plazması	[35]
UPLC (TIP/TRI)	Hibera C18 (100 × 2.1mm, 1.8 µm)	0.1% orto fosforik asit: asetonitril (50:50)	1	1.287/ 0.551	DAD 1.5 µL 230 nm	2.225- 13.35 µg/mL / 5- 30 µg/mL	0.04/ 0.20 µg/mL	0.13/ 0.61 µg/mL	Formülasyon	[36]

Tablo 2.2. *Tipirasil HCl ve Trifluridin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler (Devamı)*

Analitik Yöntem	Sabit Faz Kolon Sıcaklığı	Hareketli faz	Akış Hızı mL/dk	Alıkonma Zamanı Analiz Süresi TIP/TRI	Dedektör Enj.Hacmi, Dalga Boyu	Doğrusal Aralık TIP/TRI	LOD TIP/TRI	LOQ TIP/TRI	Numune	Kaynak
RP-HPLC (TIP/TRI)	Qualisil BDS C-18 (250x4.6mm) 5µm	Metanol: Su (55:45)	1	5.037/ 3.627 8 dk.	DAD 292 nm	6-22 (µg/mL)/ 3-9 µg/mL	0.17/ 0.06 µg/mL	0.53/ 0.019 µg/mL	Tablet, Kapsül Dozaj Form	[37]
LC-MS/MS (TRI)	Phenomenex-RP-C18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm) 40 °C	Asetonitril: Metanol: 5 mM Amonyum format (45:40:15)	0.8	1,7 4 dk.	MS/MS	5-2000 ng/mL			İnsan plazması	[38]
RP HPLC	Intersil ODS C ₁₈ kolon (250 mm × 4.6 mm×5µ)	NaClO ₄ tampon (PH 4.5): Metanol 15:85 Fosfat tampon pH 7.0 & Borat tampon	1	7.43/ 3.42	UV 260 nm	0.2-1.6 (µg/mL)/ 0.5-4.0 µg/mL	0.005/ 0.0125 µg/mL	0.02/ 0.05 µg/mL	İnsan plazması	[39]
Spektrofotometri					261.24 nm 301.87 nm	1-80/ 1-80 µg/mL			Tablet	[21]

2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, karışım halindeki moleküllerin hareketli bir faz yardımıyla akışkan sabit faz üzerinde hareket ederken birbirlerinden ayrılması esasına dayalı bir ayırım tekniğidir. Ayırımında etkili olan faktörler, adsorpsiyon (sıvı-katı), bölme (sıvı-katı) ile ilgili moleküler özellikleri ve afinite veya moleküler ağırlıkları arasındaki farklılıkları içerir.

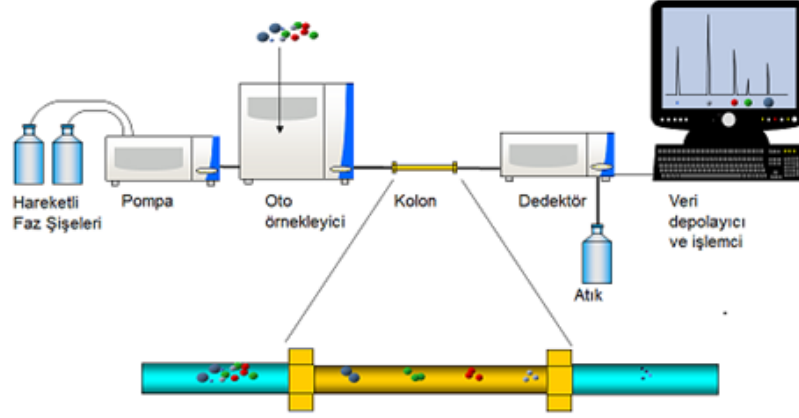
Moleküllerin özellikleri ve molekül ağırlıkları arasındaki farklılıklar nedeniyle karışımdaki bir bileşen diğer bileşenden durağan fazda daha uzun süre kalması veya daha hızlı bir şekilde mobil faza geçerek sistemden ayrılması esasına dayanır [40].

Durağan faz, hareketli faz ve karışımın içerdiği maddeler arasındaki etkileşim türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşenlerdir.

Numune içerisindeki analitleri birbirinden iyi bir şekilde ayırmak ve bunların miktarını belirlemek için kullanılan kromatografi yöntemindeki amaç, analitleri en uygun zamanda ve güçlü bir ayırım ile analizi gerçekleştirmektir [41].

Kromatografik yöntemler içerisinde olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC veya kısaca LC), farmasötik preparatlardaki ve biyolojik materyaldeki ilaçları belirlemek için en yaygın olarak kullanılan kromatografik tekniktir. LC'de mobil faz, sisteme verilen analitleri geciktiren bir malzeme ile dolu bir kolondan zorlanan bir sıvıdır. Analitler, ayırma kolonunun hemen önündeki mobil fazın akışına enjekte edilir. Kolonun çıkışı, ayrıştırılan maddelerin tespit edildiği bir dedektöre bağlıdır.

LC'nin isimleri çöktür. 1960'ların sonlarında HPLC tanıtıldığında, yüksek basınçlı sıvı kromatografi adı kullanıldı. Bununla birlikte, baskı bir arzu değil, daha çok kaçınılmaz bir dezavantajdır ve elde edilen çok iyi ayrımlara odaklanılarak adı HPLC olarak değiştirilmiştir. Artık sadece kısaltılmış LC terimini kullanmak yaygın bir uygulama haline geliyor. Çok yüksek basınçlarda çalışabilen sistemler de ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC veya sadece UPLC; bu bir ticari marka olarak kullanılır) adı altında tanıtılmıştır. Bir LC sisteminin ana bileşenleri **Şekil 7.1'de** gösterilmiştir [42].



Şekil 7.1. *Sıvı kromatografi sistemi*

Farmasötik preparatların tahlilinde stabilite ve kararlılık gösteren metot olan hplc günümüzde açık ara yaygın olarak kullanılmaktadır [43, 44].

Kolon ve mobil faz, kapasite faktörlerini (tepe konumları), yöntem seçiciliğini, kromatografinin süresini ve tepe çözünürlüğünü tanımlar. Kaydedilen kararlılık gösteren yöntemlerin çoğu, bir silikajel matrisine kimyasal olarak bağlı kromatografik olarak aktif fazlar ile paketlenmiş ters fazlı HPLC kullanılarak geliştirilmiştir. Bu matris, olağan ters fazlı organik çözücülerle uyumludur ve asit koşulları altında stabildir, ancak 7.0'ın üzerindeki pH'da yavaş yavaş çözünür. Bu durumlarda ihtiyaç duyulması halinde alkali koşullara dayanıklı özel kolonlar mevcuttur.

Son literatürün bir araştırması, en yaygın olarak kullanılan durağan fazların C₈ ve C₁₈ olduğunu göstermiştir [44, 45]. Son literatürün bir araştırması, en yaygın olarak kullanılan durağan fazların C₈ ve C₁₈ olduğunu göstermiştir [45].

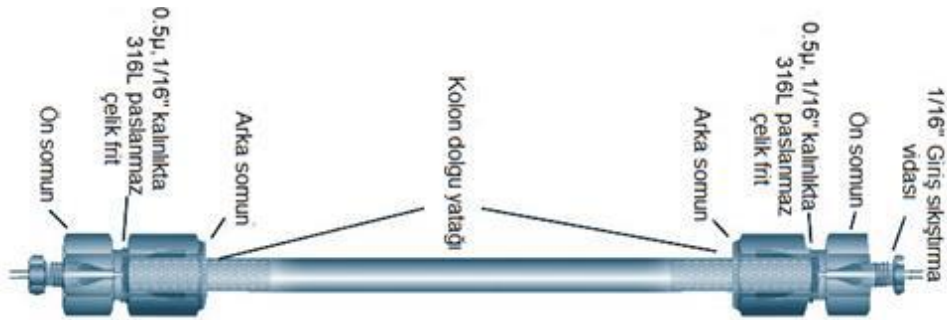
Siyano, amino, diol ve diğerleri gibi özel işlevler daha az kullanım bulmuş ve daha özel amaçlar için kullanılmıştır. Ek olarak, yöntem geliştirme için zaman zaman kiral kolonlar kullanılmıştır [46].

Polar olmayan kolonlar, %90'dan fazla su içeren mobil fazlar ile kullanıldığında çökebilir ve yeniden dengeleme için ayrıca zorluklar gösterebilir. Oldukça sulu mobil fazlar ve polar olmayan kolonlara sahip bazı dağınık, başarılı metotlar yayınlanmış olmasına rağmen, polar gömülü gruplar içeren durağan fazların kullanımı bu problemler için ve seçicilik sorunlarını çözmek için endikedir [47].

Genellikle 25 cm'lik sütunlar kullanılır, ancak daha hızlı ayrımları mümkün kıldığından, iyi çözünürlükler elde edilirse, küresel boncuklarla doldurulmuş daha kısa sütunlar (15 cm veya daha az) tercih edilebilir. Parçacık boyutu, ayırma verimliliği ile ilgilidir, ancak aynı zamanda sistemin çalışma geri basıncını da belirler. HPLC için şu anda en yaygın olarak kullanılan parçacık boyutu 5 µm'dir; bununla birlikte, 7 µm ve 10 µm'lik partikül boyutları halen kullanılmaktadır, genel olarak daha zorlu UPLC tabanlı ayrımlar için 3 µm çapında veya daha küçük partiküllerle dolu kolonlar kullanılabilir [48].

Farklı üreticiler, aynı üretici ve aynı sütun için genellikle geniş sütunlar arası varyasyonlara ve bazen küçük lotlar arası farklılıklara neden olan sabit fazları hazırlamak için farklı teknolojiler kullanır. Bu, doğrudan kolon değişimini çok zorlaştırır ve genellikle yöntemin tekrarlanabilirliğini engeller; bu nedenle, bir yöntem geliştirirken, sütun özelliklerini tam olarak tanımlamak gelecekteki tekrarlanabilirliği için çok önemlidir [49].

Şekil 2.5 de geleneksel bir kolon yapısı verilmiştir. YPSK'nde yaygın olarak kullanılan kolon dolgu malzemesi, dar gözenek boyutuna sahip ve yüksek verimlilikte analizlere imkan sağlayan silika bazlı dolgu malzemesidir. Geniş pH aralığında çalışılabilmesi ve düşük geri basınç oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir [50].



Şekil 2.5. YPSK kolonu

Literatürde kaydedilen metotlarda kullanılan mobil fazların çoğu, su veya sulu tampon çözeltilerinin (örneğin fosfat ve asetat) organik bir çözücüyle (esas olarak metanol veya asetonitril) karışımlarıdır (çok farklı oranlarda). İzopropanol, tetrahidrofuran ve diğer çözücülerde daha az ölçüde de olsa kullanılmıştır. Katkı

maddeleri da eklenebilir. Ancak, MS veya aerosol bazlı dedektörler kullanıldığında uçucu tamponlar veya tamponsuz mobil fazlar gereklidir. Her durumda, mobil fazın kompozisyonunun mümkün olduğu kadar basit tutulması tavsiye edilir [52].

İlk yöntem geliştirme ve koşulların taranması için, geniş gradyanların kullanımı, erken ayrılan piklerin ayrılmasını maksimize etmek için en uygun yaklaşımdır ve daha fazla tutulan pikleri tespit etme şansını artırır. Bununla birlikte, son yöntem için, kromatografik ayırmanın mümkün olduğu kadar kısa ve verimli, genellikle ana analitin alıkonma süresinin 2.5 katından daha uzun olmaması arzu edilir. İzokratik mod, mobil faz bileşimindeki ve iç basınçtaki değişikliklerden kaynaklanan sütun stresini ve ayrıca yeniden dengeleme için fazladan zaman harcamayı önler; bununla birlikte, oldukça farklı polaritelere sahip çok sayıda (yani >10) bileşiğin karmaşık ayrımlarıyla karşılaşıldığında bir gradyan mod kullanılması önerilmektedir [51].

Sıcaklık değişiklikleri, analitlerin alıkonma sürelerini etkileyebilir. Bu etki, tüm YPSK ayrımlarında ortaktır ve özellikle gradyanlar çalıştırıldığında çözünürlük, seçicilik ve yöntem tekrarlanabilirliği üzerindeki etkiler. Bu nedenle kolonun genellikle 25–35 °C aralığında termostatlanması arzu edilir. Daha yüksek sıcaklıklar bazen avantajlı olarak kullanılabilir, çünkü bunlar solvent viskozitesini düşürür, karşı basıncı düşürür ve kolonun faydalı ömrünün bir miktar kısalması pahasına olsa da daha yüksek akış hızlarında çalışmaya izin verir. Ancak akış hızları, makul karşı basınç ve kromatografik çalışma süreleri ile orantılı olmalıdır [52-54].

İlgili tüm analitlerin tepe tepkileri dedektörün lineer aralığı içinde olmalıdır ve bozunma ürünlerine karşılık gelen tepe noktalarının DS'den çözülmesi gerekir. Bununla birlikte, tüm bozunma ürünlerinin her zaman birbirinden çözülmesi gerekmez, bu nedenle algılama genellikle ilgili bozunma ürünlerinin optimum saptanabilirliğini garanti eden koşullara yöneliktir.

Ayrıca, bir SIM, genellikle beklenen veya gerekli LOQ'da (ana analitin %0.05'ine kadar) düşük seviyelerde oluşan ilgili tüm safsızlıkları ölçebilmelidir.

Tüm bileşiklere eşit yanıt verebilen evrensel bir dedektör yoktur ve en çok kullanılan değişken dalga boylu UV dedektörleridir; ancak, yüksek düzeyde ayırt edici ayrımlar gerektiren metotların geliştirilmesi, muhtemelen LC-DAD ve HPLC/UPLC-MS gibi birleştirilmiş tekniklerin kullanılmasını gerektirecektir [55].

DAD ve MS detektörleri ayrıca kromatogramlardaki spektral homojen olmama durumlarını da saptayarak maskelenmiş birlikte yıkanan bileşiklerin olmamasını sağlar.

Pik saflık belirleme algoritmaları yöntem seçiciliğini doğrulamak için kullanılır. Bu amaçla, analitler ve tespit edilen enterferanslar farklı spektrumlara ve bir dereceye kadar ayrılmaya sahip olmalıdır. MS tespiti, birlikte yıkanan diastereomerler (aynı moleküler ağırlık) ile ve bozunma ürününün iyonizasyonu birlikte yıkanan bileşen tarafından bastırılırsa zorluklarla karşılaşabilir [56].

Bozunma ürünlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu için ek yararlı bilgiler sağlayan LC-NMR, rutin kullanım için gereken daha yüksek analit konsantrasyonu nedeniyle metot geliştirmede daha az kullanılır. Yüklü aerosol dedektörü (CAD) ve evaporatif ışık saçılım dedektörü (ELSD) gibi daha evrensel dedektörler, özellikle DS veya ilgili bozunma ürünlerinin iyi kromoforlara sahip olmadığı durumlarda metotların geliştirilmesinde artan bir kullanım bulmaktadır [57].

Bununla birlikte, kırılma indisi dedektörü gibi daha az hassas dedektörler ve amperometrik veya florometrik dedektörler gibi daha spesifik dedektörler, kendi eksiklikleri nedeniyle daha az kullanım bulmaktadır (örneğin florometrik dedektörlerin kullanımında türevlendirme ihtiyacının olması gibi) [58] [59].

Bazı rasyonel stratejilerin uzun süredir mevcut olmasına rağmen, saptama koşullarının optimizasyonu hala çoğunlukla spektral gözlemlerle veya ilgili analitlerin özelliklerine ilişkin ön bilgiler dikkate alınarak gerçekleştirilmektedir [60].

YPSK yöntemlerinde çoğunlukla spektrofotometrik dedektörler kullanılmaktadır. Bu dedektörlerde dedeksiyon, kolonun son uç kısmından kolonu terk eden bileşikler kolondan ayrıldıktan sonra hücre içerisinden geçerken ultraviyole ışını absorplaması ile enerji seviyelerindeki değişimi ölçülür. Sabit, değişken ve çoklu dalga boyu dedektörleri şeklinde farklı tipleri bulunmaktadır.

YPSK için ideal bir dedektör, yüksek derecede hassas, geniş bir aralıkta doğrusallığa sahip, seçici, hızlı cevap alınabilen, kararlı, tekrarlanabilir, güvenilir ve kullanımı kolay olması nedenleriyle tercih edilebilir.

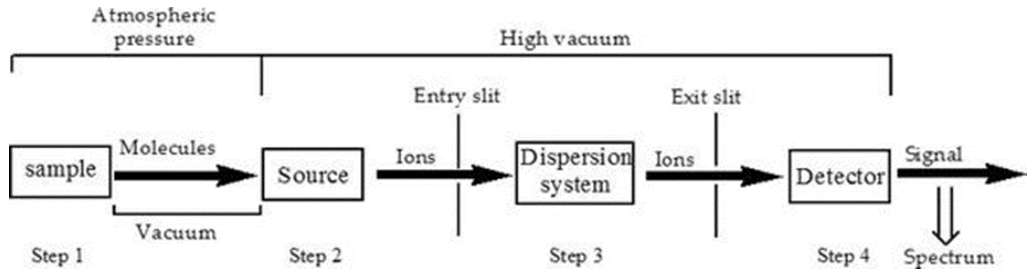
Optik özelliği ile birlikte tarama spektrofotometresi özelliği gösteren UV/Vis dedektörleri, analitin kimyasal yapısına göre belirli dalga boylarında görüntülenmesini sağlarlar. Bu dedektörler, yüksek hassasiyet (10^{-9} g/mL), az miktarda numune ile tespit etme yeteneği, geniş konsantrasyon aralıklarında doğrusal olabilme gibi avantajlara sahiptir. Eksik yanı ise, seçilen dalga boyu bölgesinde ışığı absorplamayan bileşiklerin tespit edilememesidir [61]. Işığı absorplamayan bu tür bileşiklerin tespiti için, ayırımı yapılan numunenin iletkenliğini ölçmek için iletkenlikteki değişikliği ölçen iletkenlik

dedektörü kullanılmaktadır. Özellikle iyon değişimi kromatografisinde kullanılmaktadır [62].

YPSK yönteminde hareketli fazın polar olması sebebiyle sabit faz olarak apolar yapıda olan C_8 ya da C_{18} gibi kolonlar kullanılmaktadır. Analitin de apolar olması nedeniyle polar yapıdaki hareketli faz ile etkileşimi sonucunda olumsuz durumlardan kaçınmak için nispeten apolar özelliği olan metanol ve asetonitril gibi bir hareketli faz bileşeninin su ile kullanımı tercih edilir.

2.6. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi

Kütle Spektrometresi, molekülün buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine göre ayrılarak analiz edilmesi ile analitin tanımlanmasında kullanılan bir tekniktir. Moleküler ağırlığı ölçmek ve moleküler yapı hakkında veri sağlamak için kullanılan yıkıcı bir yöntemdir; örneğin iyonize olması ve elektromanyetik radyasyona maruz kalmaması ile diğer yöntemlerden farklıdır. İyonize bileşikler uyarılır ve bu da parçalanmaya neden olur. Bu tür parçaların analizi, moleküllerin yapısı hakkında bilgi sağlar. Her parça, kütle-yük oranı, m ile karakterize edilir.



Şekil 2.7. Kütle spektrometresinin şematik gösterimi

Bir kütle spektrometresi, moleküllerin iyonlaşmasının ve iyon parçalanmasının meydana geldiği kaynak, kütle/yük oranı ile iyon ayırımını sağlayan dispersiyon sistemi olan analizör kısmı ve her iyonun göreceli bolluğunu ölçen dedektörden oluşmaktadır. Sistemde birinci MS aşaması, bir iyonun seçilmesine hizmet ederken, ikinci kısımda iyon analizleri, birinci aşamada ayrılan iyonun parçalanmasından kaynaklanır.

Kütle spektrometresinde bir molekülün elektron bombardımanı altında çoğunlukla tek yüklü pozitif iyonlar üretilir. Bu iyonların ayırımı kütle/yük oranına göre yapılır ve iyon tanımlanır. Elde edilen bağlı moleküler ağırlık kütle spektroskopisi ile çok yüksek

doğrulukta tanımlanır. Bu şekilde yöntemin kesinliğine göre moleküler formül çıkarılabilir. Bununla birlikte aynı yöntemle molekül içindeki olası gruplar tanımlanabilir.

LC-MS tekniği, YPSK'nin fiziksel ayırımı sonrasında kütle spektrometrisinin kütle analizi ile birleşmesiyle kalitatif ve kantitatif analizlerin daha ileri teknolojiyle yapılmasını sağlamaktadır. Yüksek hassasiyet ve hızlı bir şekilde karmaşık bir karışımdaki kimyasalların tanımlanması, sulu numuneler ile doğrudan çalışılması, analiz sırasında ısıl bozulma olmaması, daha kullanışlı alıkonulma süreleri ve moleküler ağırlık saptanması ile kalitatif analizdeki üstünlüğü gibi avantajları bulunmaktadır.

2.6.1. İyonlaştırma yöntemleri

Kütle spektrometri yöntemlerinde kullanılan birçok iyonizasyon yöntemi vardır. Çoğu kimyagerin aşına olduğu klasik yöntemler elektron etkisi (EI) ve Hızlı Atom Bombardımanıdır (FAB). Bu teknikler, GC-MS kullanılarak çevresel çalışma için EI dışında modern kütle spektrometrisi ile pek kullanılmaz. Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI), elektrosprey iyonizasyon (ESI), matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ve diğer türev yöntemlerinin daha modern teknikleri kütle spektrometrisi laboratuvarında yerini almıştır. EI yerine APCI'nin nedeni, APCI'nin protonlanmış bir molekül oluşturması ve Sıvı Kromatografisi (LC) ile tamamen uyumlu olması, EI'nin iyonu parçalama olasılığının daha yüksek olması ve molekül ağırlığının daha belirsiz bir şekilde tanımlanmasına yol açmasıdır ve LC ile uyumsuzdur. ESI, Matrix destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ile birlikte, FAB'yi bu kadar popüler hale getiren, ancak çok daha hassas olan protonlanmış molekülleri ürettiği için temel olarak FAB kullanımını ortadan kaldırmıştır. Ek olarak, MALDI ile birlikte ESI, daha önce FAB tarafından bile yapılamayan büyük moleküler ağırlığın iyonizasyonuna ve ölçülmesine izin verdi. ESI, LC ile kolay uyumluluğunda bir avantaja sahiptir. MALDI, kütle spektrometrisinin görüntülenmesi için avantajlara sahiptir.

2.6.1.1. Elektron etkisi (EI)

Elektron iyonizasyonu (EI), hareketli elektronların iyon üretmek için katı veya gaz fazındaki atomlar ve moleküller ile etkileşime girdiği bir iyonizasyon yöntemidir. Kütle spektrometrisi için geliştirilen iyonizasyon tekniklerinden biridir.

Bu teknikte yüksek enerjili elektronlar kullanılarak iyon üretildiği için sert (yüksek parçalanma) bir iyonizasyon yöntemi olarak kabul edilir. Bu şekilde yapısı bilinmeyen bileşiklerin belirlenmesine yardımcı olabilecek kapsamlı parçalanmaya yol açılır. BU yöntem, moleküler ağırlığı 600'ün altında olan organik bileşikler için en kullanışlısıdır. Ayrıca, çeşitli ayırma yöntemleri ile birleştiğinde bu tekniğin kullanımı ile katı, sıvı ve gaz halindeki bileşikler tespit edilebilir.

2.6.1.2. Kimyasal iyonizasyon (CI)

Kimyasal iyonizasyon (CI), kütle spektrometrisinde kullanılan yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir. Bu teknik, gaz halindeki iyon-molekül kimyasının bir dalıdır [67]. Reaktif gaz molekülleri (çoğunlukla metan veya amonyak), reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron iyonizasyonu ile iyonize edilir, bu daha sonra gaz fazındaki analit molekülleri ile reaksiyona girerek kütle spektrometrisi ile analiz için analit iyonları oluşturur.

Bu teknik, negatif kimyasal iyonizasyon (NCI), yük değişimli kimyasal iyonizasyon, atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ve atmosferik basınçlı fotoiyonizasyon (APPI) gibi farklı iyonlaştırma şekillerine kullanılmaktadır.

CI kütle spektrometrisi, organik bileşiklerin tanımlanmasında, yapısının aydınlatılmasında ve nicelendirilmesinde genel uygulama alanı bulur ve ayrıca biyokimyasal analizde bir miktar fayda sağlar.

2.6.1.3. "Hafif" elektrosprey iyonizasyonu (ESI)

Normal koşullar altında, ESI "yumuşak" bir iyonizasyon kaynağı olarak kabul edilir, yani analite nispeten az enerji verilir ve dolayısıyla çok az parçalanma meydana gelir. Bu, örneğin GC-MS'de yaygın olarak kullanılan ve kapsamlı parçalanmaya neden olan elektron darbe kaynağı gibi diğer MS iyon kaynaklarının aksinedir. Azot molekülleri ile çarpışmaları artırmak için kaynak içindeki voltajları artırarak ESI "kaynak içi" parçalanmasını artırmak mümkündür. Bazı analitler için faydalı olsa da, kaynak içi parçalanma diğerleri için sınırlıdır ve yapısal çalışmalar ve tandem MS için gereken kapsamlı parçalanmayı sağlamak için çarpışma kaynaklı ayrışma gibi daha tutarlı parçalama yöntemleri gereklidir.

ESI biyolojik moleküller için en yaygın kullanılan iyon kaynağı iken, lipitler gibi nötr ve düşük polariteli moleküller bu yöntemle verimli bir şekilde iyonize edilemeyebilir.

2.6.1.4. Hızlı atom bombardımanı iyonizasyonu (FAB)

Hızlı atom bombardımanı (FAB), kütle spektrometrisinde kullanılan, yüksek enerjili atomlardan oluşan bir ışının iyonlar oluşturmak için bir yüzeye çarptığı bir iyonizasyon tekniğidir.

2.6.1.5. Alan desorpsiyon iyonizasyonu

Alan desorpsiyon (FD), bir jilet gibi keskin yüzeye sahip emitöre (filaman) yüksek potansiyelli bir elektrik alanının uygulandığı kütle spektrometrisinde (MS) kullanılan bir iyon oluşumu yöntemidir.

Alan iyonizasyonunda, elektronlar bir türden yüksek bir elektrik alanında kuantum mekanik tünelleme ile uzaklaştırılır, bu da moleküler iyonların oluşumuyla sonuçlanır (pozitif iyon modunda M^+). Bu iyonizasyon yöntemi genellikle polar olmayan veya hafif polar organik bileşiklerde gerçekleşir.

2.6.1.6. MALDI 'hafif' iyonizasyon

Kütle spektrometrisinde, matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI), büyük moleküllerden çok küçük parçalanma ile iyonlar oluşturmak için lazer enerji emici matris kullanan bir iyonizasyon tekniğidir.

DNA, proteinler, peptitler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerin ve polimerler, dendrimerler ve diğer makromoleküller gibi çeşitli organik moleküllerin analizinde kullanılmaktadır. Çünkü bu moleküller daha geleneksel iyonizasyon yöntemleriyle iyonize edildiğinde kırılabilir ve parçalanma eğilimindedir. MALDI tekniği tipik olarak çok daha az çok yüklü iyon üretmesine rağmen, her iki tekniğin de gaz fazında büyük moleküllerin iyonlarını elde etmenin nispeten yumuşak şekilde olması bakımından, elektrosprey iyonizasyona (ESI) karakter olarak benzerdir.

MALDI metodolojisinde ilk olarak numune uygun bir matris malzemesi ile karıştırılıp metal bir plakaya uygulanır. Daha sonra darbeli bir lazer numuneyi ışınlayarak numune ve matris malzemesinin desorpsiyonunu tetikler. Son olarak da, analit

molekülleri, kesilen gazların sıcak bulutunda protonlanarak veya deprotone edilerek iyonize edilir ve bu şekilde onları analiz etmek için kullanılan kütle spektrometresine hızlandırılabilirler.

2.6.2. Kütle spektrumu

Kütle spektrumu, yatay eksenindeki m/z oranına karşı dikey eksenindeki sinyal yoğunluğunun (tepe noktası) iki boyutlu temsilidir. Pik yoğunluğu, ilgili m/z oranıyla iyonik türlerin bolluğunu doğrudan yansıtır.

Veri toplama ve işleme, aşağıdaki şemaya göre bir bilgisayar tarafından gerçekleştirilir. Bazı tepe noktası, %100 değerine atanan en yoğun sinyalin seçiminden oluşan spektrum normalizasyonundan kaynaklanır. Bununla ilgili olarak, her bir iyon parçasının nispi bolluk yüzdesini temsil eden her sinyale yüzde yoğunluk atanır.

Moleküler pik, ana pik, saf bileşiklerde M^+ moleküler iyonuna karşılık gelir. Bu, en büyük, kolayca tanımlanabilen m/z oranına sahip olanıdır. Spektrumda moleküler iyonun varlığı, moleküler kütlelerin doğru bir şekilde belirlenmesini sağlar. Bazı bileşiklerde moleküler iyon mevcut değildir çünkü çok kararsızdır ve moleküler kütle belirlenemez. Moleküler iyonun parçalanmasından kaynaklanan elektron çifti katyonları genellikle moleküler iyondan daha kararlıdır ve dolayısıyla daha fazla bolluğa sahiptir.

2.6.3. Kalitatif ve kantitatif analiz

Kütle spektrometrisi, organik kimya için özellikle önemlidir, çünkü bileşim ve özellikle moleküler bileşiklerin yapısı hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Kütle spektrumları, yapısal değerlendirmeler için veri sağlar; parçalanma, bilinmeyen bileşiklerin çalışmasına hizmet eden yarı deneysel kurallarla gerçekleştirilir.

Tanımlanan moleküler iyon, parçaların kaybıyla üretilen spektrum iyonlarına karşılık gelmelidir.

Moleküler iyonun yüksek yoğunluğu, kararlı moleküler yapıyı gösterir.

Moleküler iyon alanındaki bir çoklu, silika, kükürt, klor ve brom gibi spesifik bir izotopik yapı heteroatomunun varlığını gösterir.

Sinyal yoğunluğunun analit miktarı ile orantılı olması, nicel analizlerde kütle spektrometrisinin kullanılmasına izin verir. Bu amaçla dahili standart yöntemler kullanılır. Standart olarak, iyonizasyonun analitinkinden farklı iyonları izlemek için kolayca üretmesi koşuluyla analite benzer bir bileşik kullanılır. Analite benzer kimyasal

bileşik olarak, örneğin iyonizasyonu iyonları izlemek için kolayca üreten döteryumlu bir izotop veya analog gibi, analitinkinden farklı olarak kullanılabilir.

2.7. Sıvı Kromatografisi İyon Tuzaklı/Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi

Yeni bir kütle spektrometre sistemi olan LCMS-IT-TOF sistemi QIT (ion tuzaklama) ve TOF (uçuş zamanlı) teknolojinin birleştirilmiş halidir. QIT ve TOF kombinasyonu oluşturulduğunda karşılaşılan en büyük zorluk, iyonların etkili bir şekilde QIT içerisine girmesi ve eş zamanlı olarak da iyonların QIT ünitesinde tuzaklanmasıdır. Yeni geliştirilen IT-TOF teknolojisi ile bu zorluğa çözüm getirilmiştir.

LC-MS tekniği, bir maddenin bileşenlerinin hızlı bir şekilde taranması ve karakterizasyonu için günümüzde kullanılan seçici tanıma tekniklerinden bir tanesidir. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI) ve elektrosprey iyonizasyonu (ESI) içeren ara yüzler, analizler için uygun olan LC-MS konfigürasyonunda başarıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Dört kutuplu (Q), iyon tuzağı (IT) ve uçuş süresi (TOF) olmak üzere üç tip kütle analiz cihazı bulunmaktadır. TOF kütle spektrometreleri, ilaç keşfi, mikrobiyoloji, hücre biyolojisi ve protein biyokimyası gibi alanlarda yaşam bilimleri araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. TOF kütle analizörü, iyonize numune parçacıklarını bir ışın olarak veya bir dedektöre doğru yansıtarak hızlandırır. Tanımlanmış kinetik enerji altında, parçacığın dedektöre ulaşmadan önceki uçuş süresi (belirli bir mesafede) doğrudan kütle/yük oranı (m) ile ilgilidir.

TOF-MS çok fazla çözünürlüğe sahip olması nedeniyle oldukça güçlüdür ve bu özelliğiyle ön plana çıkmaktadır. TOF-MS, yüksek veri toplama hızına sahip olup tam tarama spektral hassasiyetinin yanı sıra, doğru kütle ölçümü sunmaktadır. Doğru kütle ölçümü ile bilinmeyen türlerin tanımlanması için kullanılan ana ve yavru iyonlarının temel bileşimini verir. Buna bağlı olarak, özellikle çoklu parçalanma adımları (MS^n) için iyon tuzağı analizörleri geliştirilmiştir [63].

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler

Deneysel çalışmalar için, olası kirlilik ya da safsızlıklardan durumundan meydana gelebilecek bir problem yaşanmaması için kullanılan tüm maddeler analitik saflıkta tercih edilmiştir. Analiz edilecek etken maddelerden TIP Sigma Aldrich (Missouri, ABD) firmasından ve TRI Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada) firmasından satın alınmıştır.

Deneysel işlemlerde kullanılan reaktifler ve hareketli faz hazırlanması için seçilen organik çözücüler hepsi LC/MS saflıkta olup sırasıyla;

- Asetonitril (J.T.Baker, Allentown/ABD)
- Metanol (Merck KGaA, Massachusetts, ABD)
- Amonyum Asetat (Fisher Chemicals, New Hampshire, ABD)
- Asetik Asit (Fisher Chemicals, New Hampshire, ABD)
- Amonyum Hidroksit (Sigma Aldrich, Missouri, ABD)
- Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich, Missouri, ABD),
- Hidroklorik asit (Sigma Aldrich, Missouri, ABD),
- Hidrojen peroksit (Sigma Aldrich, Missouri, ABD)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Sıvı kromatografisi çalışmalarında modüller sistem olan LC-MS/MS 8040:Nexera XR Serisi (Kyoto, Japonya) model cihaz kullanılmıştır. Modüller sırasıyla DGU-20A3R model gaz giderme modülü, LC-20AD gradient pompası, SIL-20AC otomatik örnekleyici sistem, CTO-10ASVP kolon fırını, CBM-20A iletişimi ünitesi ve SPD-M20A model fotodiyod dizi dedektör sisteminden oluşan YPSK sistemine bağlı bilgisayar Windows XP işletim sistemine sahiptir. Laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışmaları için kullanılan diğer YPSK cihazı ise Nexera-i LC-2040C 3D Shimadzu (Kyoto, Japonya) markadır. Sistem kontrolü ve kromatogramların eldesi için LCSolutions 1.11 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrik tayinleri, uçuş tuzağı spektrometresi Shimadzu (Kyoto, Japonya) firmasının ürünü LCMS-IT-TOF ile gerçekleştirilmiştir. Prominence serisi sıvı kromatografisinden oluşan modüller sistemde DGU-20A3R 3 hatlı gaz giderme ünitesi, iki adet LC-20AD ikili gradient pompa, bir SIL-20A HT otomatik

örnekleyici, bir CTO-10ASVP kolon fırını, bir CBM-20A iletişim ünitesi ve SPD-M20A fotodiyod dizi dedektörden oluşmaktadır. Ayrıca Shimadzu LC LabSolutions 3.43 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

Deney çalışmalarında Mettler Toledo (Greifensee, İsviçre) marka XSE 105 Dual Range analitik terazisi ile tartımlar yapılmış ve pH ölçümleri için SevenMulti pH metre, küçük miktarlarda hazırlanan çözeltileri karıştırmak için Heidolph (Berlin, Almanya) marka Reax Top karıştırıcı, çözeltilerin karıştırılmasında ve gazlarının giderilmesinde Bandelin Sonorex (Berlin, Almanya) marka RK 100 H ultrasonik banyo kullanılmıştır. Etken maddelerin karakterizasyon çalışmaları için ise Shimadzu (Kyoto, Japonya) IR Affinity-1S model kızıl ötesi spektrofotometresi, Bruker (Massachusetts, ABD) firmasına ait UltraShield 300 MHz nükleer manyetik rezonans spektrometresi kullanılmıştır.

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneysel parametreler

4.1.1. Enstrümental parametreler

UPLC çalışmalarında 1 mL/dk hareketli faz akış hızı, 30.0 ± 0.1 °C kolon sıcaklığı ve 25 ± 0.1 °C otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Tüm sıvı kromatografisi çalışmalarında enjeksiyon hacmi 1 mL'dir. Tüm çözeltiler enjeksiyondan önce PVDF tipi filtrelerden süzülmüştür.

LC-MS/MS sistemindeki kütle spektrometresi, pozitif modda (ESI-) elektrosprey iyonizasyonu kullanarak, m/z 100 ila m/z 800 arasında başlayan kütle aralığında çalıştırılmıştır. MS koşulları aşağıdaki gibi optimize edilmiştir:

- Kurutma gazı (azot)
- Akış hızı: 15 L/dk;
- Nebülize edici gaz (azot) akış hızı: 3.0 L/dk;
- Çarpışma gazı: Argon;
- CDL sıcaklığı: 250 °C
- Isı bloğu sıcaklığı: 450 °C.

Tüm analizlerde Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) modu kullanılmıştır.

LC-DAD sistemindeki diyot dizisi dedektörü 272 nm dalga boyuna ayarlandı ve gerçek zamanlı spektrum 1.5625 Hz veri örnekleme frekansında 190 ve 400 nm arasında kaydedilmiştir. Dedektör örnekleme hızı ve dedektör zaman sabiti 640 msn'dir.

LCMS-IT-TOF sistemindeki kütle spektrometresi, negatif iyon modunda çalışan ESI ara yüzü ile; yüksek gerilim probu potansiyeli -3.5 kV; nebülize edici gaz (Azot) akış hızı 1.5 L/dk; CDL sıcaklığı 200 °C; ısı bloğu sıcaklığı 200 °C ve kurutma gazı basıncı 200 KPa olarak seçilmiştir. CID parametreleri, CID enerjisi için %50, çarpışma gazı parametresi için %50 seçilmiş ve CID için argon gazı seçilmiştir. TOF dedektör voltajı 1.6 kV olarak ayarlanmıştır. Çalışmalarda trifloroasetik asit çözeltisi ile cihazın hassasiyetini, çözünürlüğünü ayarlamak ve kütle sayısı kalibrasyonunu yapmak için (iyon kaparı ve TOF analizörü) standart numune olarak kullanılmıştır.

4.1.2. Standart çözeltilerin hazırlanışı

TRI standart stok çözeltisi için; 10 mg standart madde tartılıp 10 mL balon jodede %30 MeOH ile çözünmenin sağlanması için karıştırıcı ile 3 dakika karıştırılarak

çözölmüştür. Elde edilen 1 mg/mL stok TRI çözeltilisinden 1 mL alınıp %30 MeOH ile 10 mL'ye tamamlanarak 100 mg/mL ara stok çözeltilisi hazırlanmıştır. Daha sonra stok ve ara stok bu çözeltiler tüm deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

TIP standart stok çözeltilisi için; 10 mg standart madde tartılıp 10 mL balon jode %30 MeOH ile çözümlenmesi için karıştırıcı ile 3 dakika karıştırılarak çözülmüştür. Elde edilen 1 mg/mL stok TIP çözeltilisinden 1 mL alınıp %30 MeOH ile 10 mL'ye tamamlanarak 100 mg/mL ara stok çözeltilisi hazırlanmıştır. Daha sonra stok ve ara stok bu çözeltiler tüm deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Her iki stok çözeltilinin kısa süreli (7 gün) ve uzun süreli (30 gün) periyotlarda +4 °C'de, gün ışığından uzakta ve -20 °C'de tutulduğunda en az 3 ay boyunca stabil olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmalar gerekli tüm çözeltiler için seyreltmeler yine %30 MeOH yapılmış ve tam çözünmeyi sağlamak için karıştırıcıda 2 dakika tutulmuştur.

4.1.3. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

Sıvı kromatografisi çalışmalarında hem foto diyot dizisi dedektörü hem de kütle dedektörlerine uygun bir hareketli faz çalışması yapılmıştır. Bu amaçla farklı organik çözücüler ile bir takım denemeler yapılmış sonucu hareketli faz olarak metanol ve 10 mM pH 5.8 amonyum asetat tamponundan oluşmaktadır.

10 mM pH 5.8 amonyum asetat tamponu için 0.77 g amonyum asetat tartılarak 500 mL YPSK saflıktaki su ile 1000 mL şişede çözülmüştür. Daha sonra 990 mL'ye YPSK saflıktaki su ile tamamlanmış ve pH'ı LC-MS saflıktaki asetik asit ve LC-MS saflıktaki amonyum hidroksit ile 5.8 olarak ayarlanmıştır. Son olarak çözelti 1000 ml'ye YPSK saflıktaki su ile tamamlanmıştır.

Hazırlanan mobil fazlar 22 µm'lik poliviniliden florür filtre ile süzölmüş ve çözelti içindeki çözümlü gazların uzaklaştırılması sağlamak için ise 10 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur.

4.1.4. Tablet çözeltilerinin hazırlanışı

20 tane LONSURF® ilaç tableti (15 mg TRI/6.14 mg TIP) hassas terazide tek tek tartımı yapılmış ve ortalama tablet ağırlığı hesaplanmıştır. Daha sonra 20 tabletin hepsi kapsülde toz haline getirilmiştir.

YPSK analizleri için toz haline getirilen tabletlerden ortalama tablet ağırlığına (X g) eşit miktar tartılıp 100 mL %30 MeOH'de çözülmüştür. Bu çözelti 4000 rpm hızda 10 dk santrifüjlenmiştir. Üstte kalan berrak çözelti 0.22 µm gözenek çaplı PVDF filtreden süzülmüştür. Elde edilen çözelti 1:5 oranında %30 MeOH ile seyreltilmiştir. Çözelti içerisindeki TRI derişimi 30 ug/mL ve TIP derişimi 12.28 ug/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tablet çözeltisi vial içerisinde 500:1000 (1:2) oranında %30 MeOH ile seyreltilip sisteme verilmiştir.

4.1.5. Analiz parametreleri

Hareketli fazın optimizasyonu çalışması sonucunda LC-DAD, LC-MS/MS ve LCMS-IT-TOF ile yapılan analizler boyunca **Tablo 4.1** deki gibi değişken hareketli fazla elüsyon yapılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.1. Hareketli fazın optimizasyon koşulları

Süre (dakika)	LC-DAD		LC-MS/MS		LC-IT-TOF	
	Organik Çözücü Yüzdesi		Organik Çözücü Yüzdesi		Organik Çözücü Yüzdesi	
	MeOH	10mM AAs	MeOH	10mM AAs	MeOH	10mM AAs
0-2	2	98	2	98	2	98
2-4	15	85	10	85	10	85
4-7	15	85	10	85	10	85
7-9	2	98	2	98	2	98
9-12	2	98	2	98	2	98

4.1.6. Bozundurma çözeltilerinin hazırlanışı

4.1.6.1. Hidroklorik asit çözeltisi (1 N)

16,6 mL hidroklorik asit alınarak içerisinde bir miktar su bulunan 100 mL balon jojeye yavaş yavaş ilave edilir. Daha sonra su ilavesiyle hacmi 100 mL'ye tamamlanarak 1 Normal HCl stok çözeltisi hazırlanır. Bu stok çözeltiden seyreltme yapılarak hızlı bozundurma için asidik ortam hazırlanmıştır.

4.1.6.2. NaOH çözeltisi (1 N)

8,0 g sodyum hidroksit katısı tartılarak içinde bir miktar su bulunan 100 mL balon jojeye ilave edilir. Daha sonra yavaş yavaş su ilave edilerek çözünmesi sağlanır. Son olarak hacmi 100 mL'ye su ile tamamlanır. Etken maddelerin 0,1 N NaOH bazik çözeltisi içerisinde hızlı bozundurulması sağlanmıştır.

4.1.6.3. H₂O₂ çözeltisi (%3, h/h)

20 mL %30 H₂O₂ (h/h) çözeltisinden alınıp içinde bir miktar su bulunan 100 mL balon jöjeye ilave edilir. Daha sonra yavaş yavaş su ilave edilerek hacmi 100 mL'ye tamamlanır. Etken maddelerin hızlı bozundurulması %3 H₂O₂ (h/h) içinde gerçekleştirilmiştir.

4.1.7. Bozundurma koşulları

Etken maddelerin bozunma çalışmaları ICH'de belirtilen sınırlar dahilinde etken maddenin önce oda sıcaklığında bozunma olmuyorsa 60 °C'de hızlı bir biçimde bozunması sağlanarak safsızlıkların veya bozunma sonucunda oluşan ürünlerin analize etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda incelenen parametreler **Tablo 4.2**'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hızlandırılmış bozundurma koşulları

Bozunma koşulu	Uygulanış biçimi	Açıklama
Sıcaklık	Çözelti	Oda sıcaklığı ve gerekiyorsa 60 °C sabit sıcaklıkta 1 saat bekletilen analit çözeltilerinin analizi
Nem	Katı	%75 nemli ortamda katı halde 1 saat bekletildikten sonra analit çözeltilerinin analizi
Işık	Çözelti	Gün ışığında 6 saat bekletilen analit çözeltilerinin analizi
Asit hidrolizi	Çözelti	HCl çözeltisi içerisinde hazırlanan maddelerin çözeltilerinin belirli sürelerle analizi
Baz hidrolizi	Çözelti	NaOH çözeltisi içerisinde hazırlanan maddelerin çözeltilerinin belirli sürelerle analizi
Yükseltgenme	Çözelti	%3 (h/h) oranında H ₂ O ₂ çözeltisi içerisinde hazırlanan maddelerin çözeltilerinin belirli sürelerle analizi

4.1.8. Sonuçların değerlendirilmesi

Sıvı kromatografisi ile elde edilen kromatogramlardaki piklerin alanları analitik cevap olarak kullanılmıştır. Çalışmada matris ortamı olması nedeniyle iç standart kullanılmasına gerek duyulmamıştır. Sonuçta belli derişimlere karşılık gelen pik alanlarından yöntem geçerliliği çalışması ICH kılavuzundaki parametreler dikkate alınarak yapılmıştır.

4.1.9. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Yöntem geçerliliğini sağlamak için, ICH kılavuzunda belirtildiği şekilde yöntem geçerlilik işlemleri oluşturulan yeni yöntemde uygulanmıştır. Sonuçlara bakıldığında yöntemde analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağlandığı gözlemlenmiştir [44]. Yöntemin geçerliliği için ICH kılavuzunda da değinildiği şekilde yöntemin spesifik, kesin, doğru, doğrusal olduğunun ispatı için ve tayin alt sınırı ile saptama sınırının belirlenmesi ve sağlanması gereken sistem uygunluk testleri yapılmıştır [45].

4.1.9.1. Kararlılık

TRI ve TIP standart maddelerinin 1 mg/mL olan stok çözeltileri %30 MeOH ile son derişimi 10 µg/mL olarak seyreltilmiş ve periyodik aralıklarla analizler yapılmak suretiyle kararlılıkları incelenmiştir.

4.1.9.2. Seçicilik

ICH Q2 (R1) kılavuzunda belirtildiği üzere analizler sırasında olası safsızlıkları veya bozunma ürünlerinin olup olmadığının kontrolü için yapılan analitik prosedürdür [46, 47]. Kılavuzda belirtildiği şekilde TRI ve TIP için hızlı bozundurma koşulları uygulanarak çözeltileri hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar spesifikliği belirlemek için kullanılmıştır. Pozitif veya negatif bir cevabın gözlenmediğini onaylamak için kromatogramlar ve ilgilenilen aktif bileşen piklerinde şüpheli veya belirsiz sinyaller araştırılmıştır. Ayrıca, analizler sırasında fotodiyot dizilimi ile pik saflığı ve kütle dedektörü ile de elde edilen piklerin sadece analite ait olup olmadığı incelenmiştir [48].

4.1.9.3. Doğrusallık ve çalışma aralığı

Doğrusallık için her iki etken maddenin yedi konsantrasyon seviyesini kapsayan test çözeltilerinin %25-200'üne karşılık gelen seviyelerde çözeltileri hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. 3'er kez enjeksiyonla yapılan analizlerin ortalama değerleri hesaplamaya katılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası 3 tekrar olmak üzere çalışılmış ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir. Eğim, kesim, regresyon katsayısı, eğim ve kesim değerleri hesaplanmıştır. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum,

tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. GraphPad Prism v6.0b programı ile sonuçlar istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

4.1.9.4. Doğruluk

Geri kazanım çalışmalarıyla yöntemin doğruluğu incelenmiştir. Tabletten bilinen derişimlerde TRI ve TIP çözeltileri ile düşük seviyede (%80), orta seviyede (%100) ve yüksek seviyede (%120) olmak üzere 3 farklı çözeltili hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlarla ortalama geri kazanım çalışması yapılmıştır.

4.1.9.5. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları için gün içinde ve farklı günlerde deneyler yapılmıştır. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan çözeltilerin %100'ne denk gelen derişimlere sahip standart madde ve tablet çözeltileri, ardışık 3 günde önerilen yöntem kullanılarak 8 tekrar analiz edilerek yöntemin kesinliği araştırılmıştır. Sonuçlar, ortalama, ortalama standart hata, standart sapma, %BSS ve %95 güven seviyesi olmak üzere istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Ayrıca günler arası gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA ile incelenmiş ve istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır.

4.1.9.6. Teşhis ve tayin alt sınırı

Yöntemin geçerliliği için iki etken maddenin önemli bir parametre olan LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzunda belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Teşhis sınırını belirlemek için gürültünün 3,3 katını veren konsantrasyonun analizi 10 tekrarlı yapılmıştır. Tayin sınırı için ise gürültünün 10 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltili hazırlanarak analizi 10 tekrarlı yapılmıştır.

4.1.9.7. Sistem uygunluk testleri

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazlarının ve analiz kolonlarının performansını göstermek için yapılan sistem uygunluk parametrelerinin hesaplanması yöntem optimizasyonu sırasında test edilen bir parametredir. Burada T, N, k ve USP genişlik gibi sistem uygunluk parametreleri incelenmiştir.

Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri iki standart madde için Amerikan Farmakopesi (USP) metotuna göre Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.1.9.8. Sağlamlık

Bir analitik yöntemde, yöntem parametrelerindeki gözlenen küçük değişmelerin analitik cevaba etkisinin kabul edilebilir düzeylerde olup olmadığının ölçüldüğü parametre sağlamlık parametresidir. LC-DAD ve LC-MS/MS için 10.0 µg/mL derişimindeki TIP ve TRI çözeltilerinin bazı parametrelerinde küçük değişiklikler yapılarak 3'er tekrarlı analizleri yapılmış ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

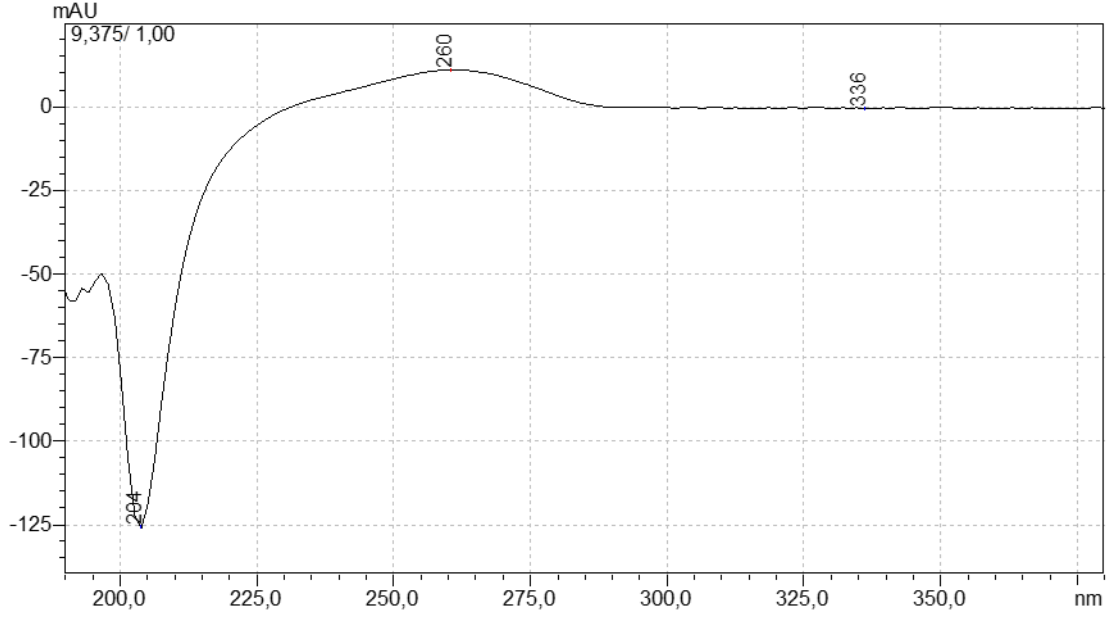
TIP VE TRI etken maddelerinin analizinde yüksek doğrulukta, iyi tekrarlanabilir ve ayırma gücü ile düşük tayin ve tespit sınırları sağladığı için foto diyot dizisi ve kütle dedektörleri ile sıvı kromatografisinde ayrımları yapıp ardından tayin ve tespitleri yapılmıştır. Foto diyot dizisi dedektör için metotdaki seçiciliğin sağlanması amacıyla hızlı bozundurma koşulları uygulanarak olası girişimlerin varlığında maddelerin tayini yapılmıştır. Metot geliştirme çalışmaları her iki tipteki dedektör için kullanılabilir ortak metot olması amacıyla kullanılan dedektör tiplerine uygun metot bileşenleri ile çalışılmıştır. Sıvı kromatografisi ile geliştirilen metot ile bozundurma koşulları altında elde edilen bozunma ürünlerinin tespiti yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) özelliğine sahip LC/MS-IT-TOF cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Etken maddelerin spektroskopik özellikleri de analiz edilmiştir. Çalışmada son olarak TRI VE TIP etken maddelerinin kombinasyonu olarak kolon kanseri tedavisinde kullanılan LONSURF® (TAIHO ONCOLOGY, INC. USA) isimli ilacın tablet formülasyonunun her iki cihazda analizleri yapılmıştır.

5.1. TRI ve TIP'in UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin

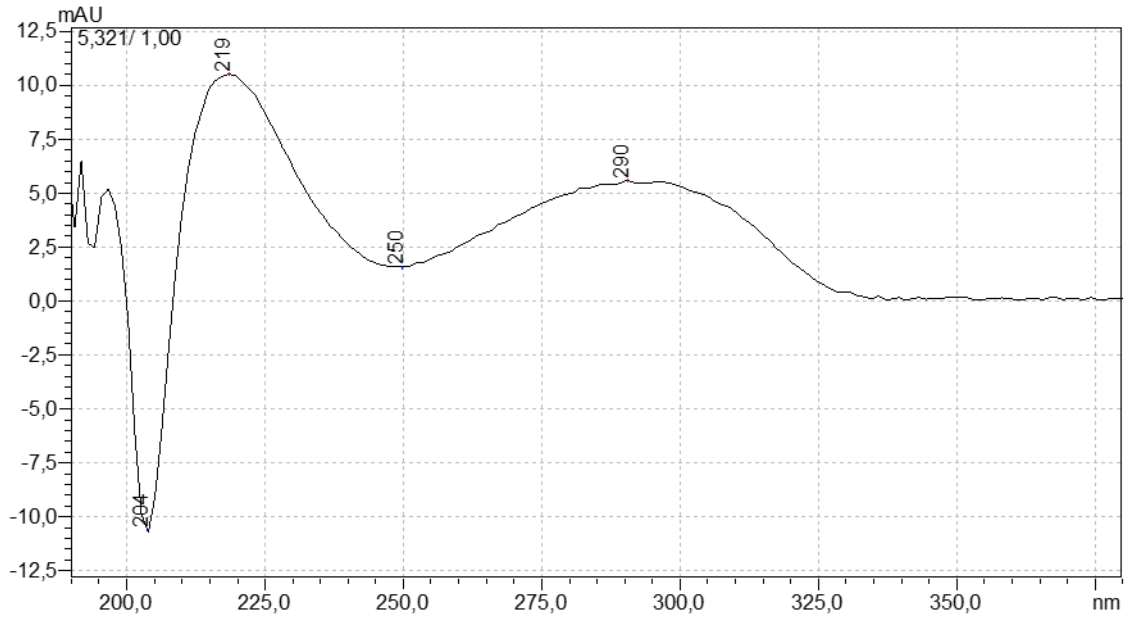
İncelenmesi

Çalışmaların bir basamağında foto diyot dizisi dedektör ile hedef API'lerin tayin ve tespit işlemleri yapılacağından öncelikle UV-Vis spektroskopisinde bileşiğin maksimum absorbanst yaptığı dalga boyu analiz edilmiştir. Bunun için 10 µg/mL derişimde % 30

metanolde hazırlanan TIP ve TRI etken maddelerinin dalga boylarının 190-400 nm aralığında okunmuştur.(Şekil 5.1 ve Şekil 5.2)



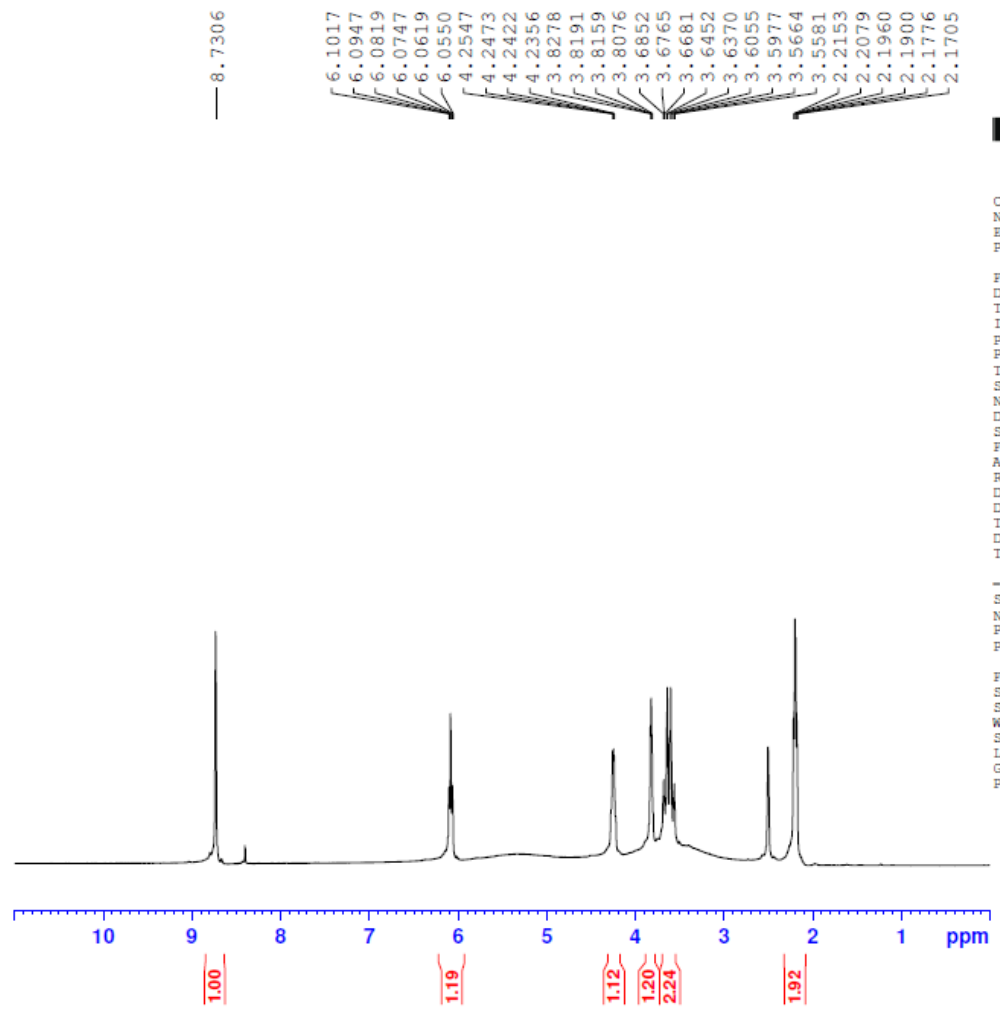
Şekil 5.1. TIP'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (10 µg/mL)



Şekil 5.2. TRI'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (10 µg/mL)

5.2. NMR Spektroskopisi Tekniği ile TRI ve TIP'in ^1H NMR ve ^{13}C NMR Spektrumlarının Tespiti

TIP ve TRI etken maddelerinin standardının spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla ^1H NMR ve ^{13}C NMR spektrumları alınmış ve yapıların görüntüsü belirlenmiştir. Elde edilen ^1H NMR spektrumları **Şekil 5.3** ve **Şekil 5.4**'de, ^{13}C NMR spektrumları ise **Şekil 5.5** ve **Şekil 5.6**'da verilmiştir.



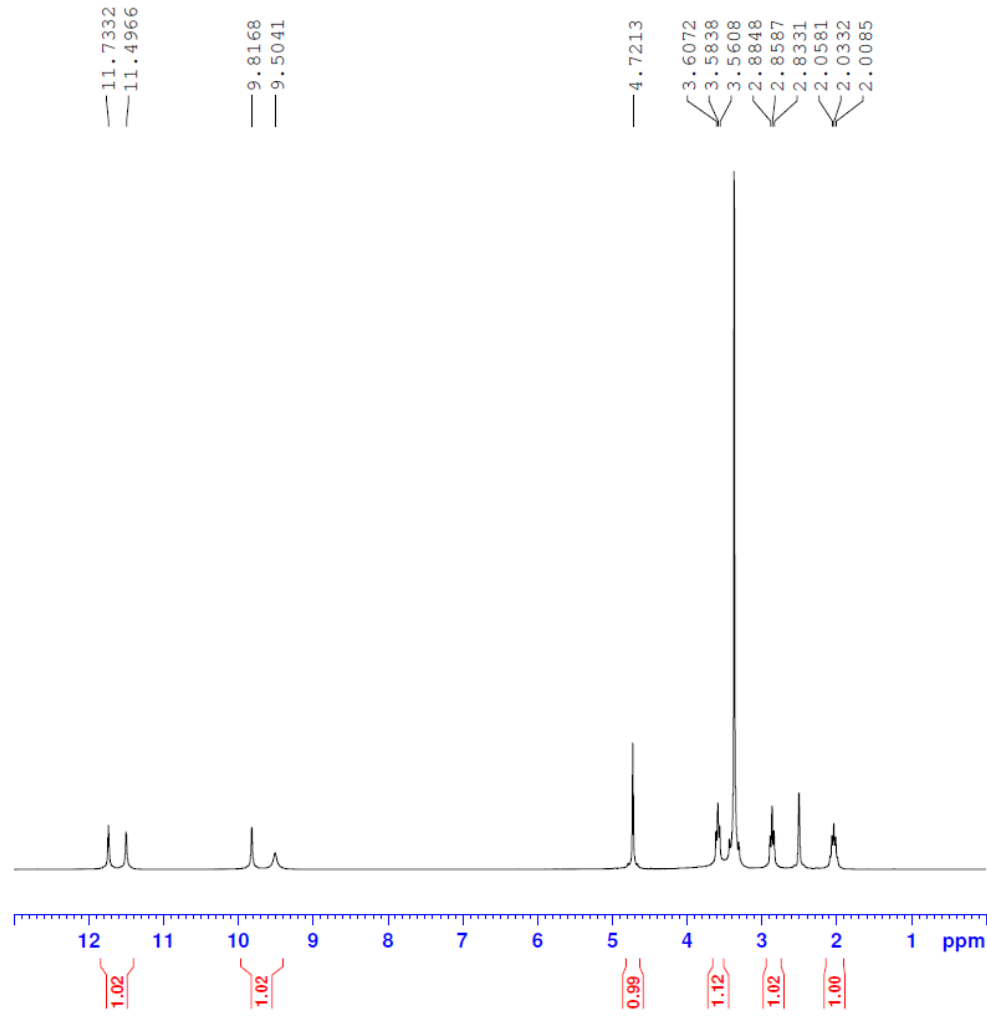
Current Data Parameters
 NAME TRI
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20211206
 Time 14.36
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 16384
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.372529 Hz
 AQ 1.3421773 sec
 RG 13.491
 DW 81.920 usec
 DE 6.50 usec
 TE 293.2 K
 D1 3.00000000 sec
 TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
 SFO1 300.1818537 MHz
 NUC1 1H
 P1 13.00 usec
 PLW1 10.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1800000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Şekil 5.3. TRI için alınmış ¹H NMR spektrumu



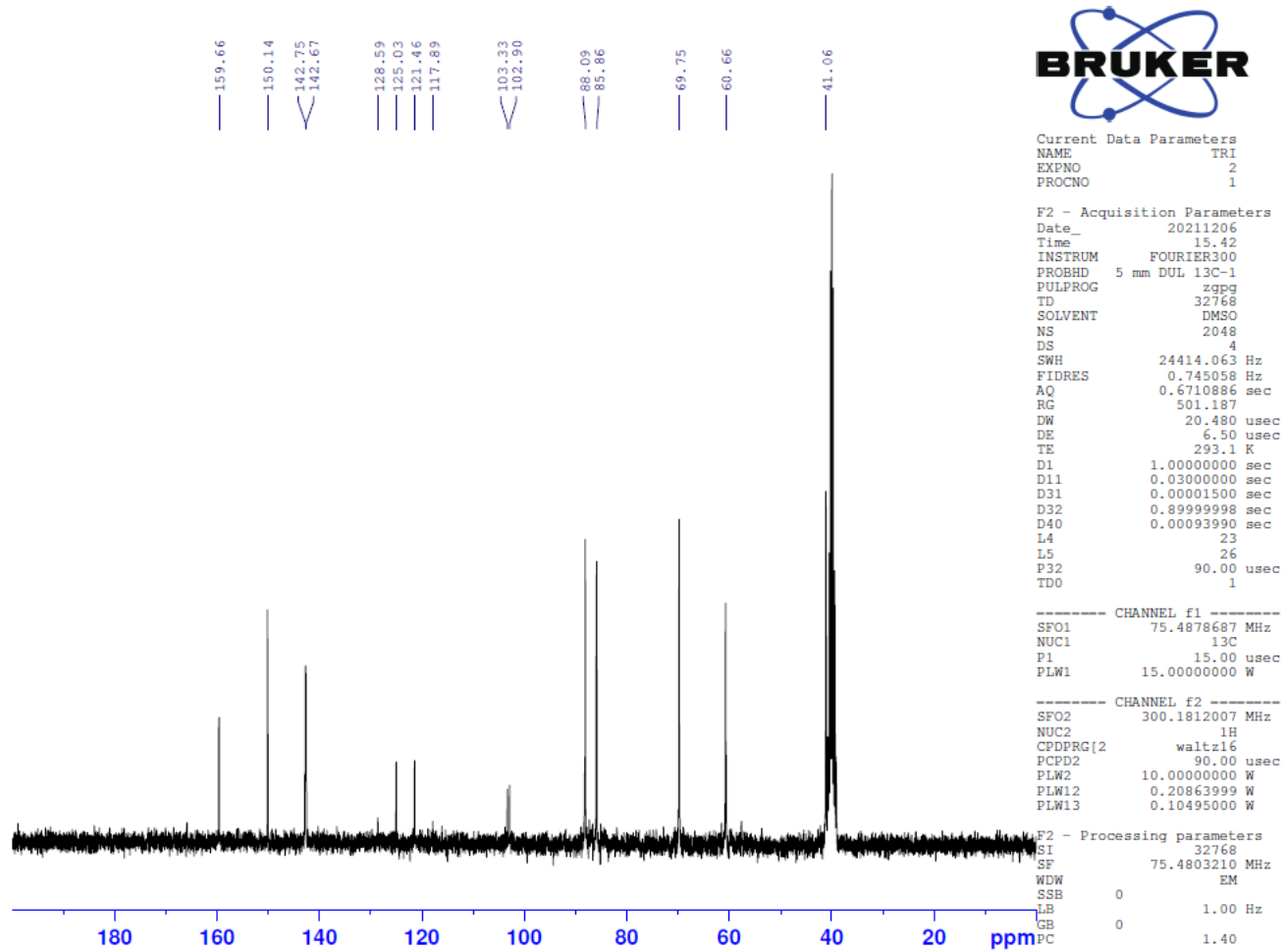
Current Data Parameters
 NAME TIP
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20211206
 Time 14.30
 INSTRUM FOURIER300
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1
 PULPROG zg
 TD 16384
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 0
 SWH 6103.516 Hz
 FIDRES 0.372529 Hz
 AQ 1.3421773 sec
 RG 21.9859
 DW 81.920 usec
 DE 6.50 usec
 TE 293.2 K
 D1 3.00000000 sec
 TD0 1

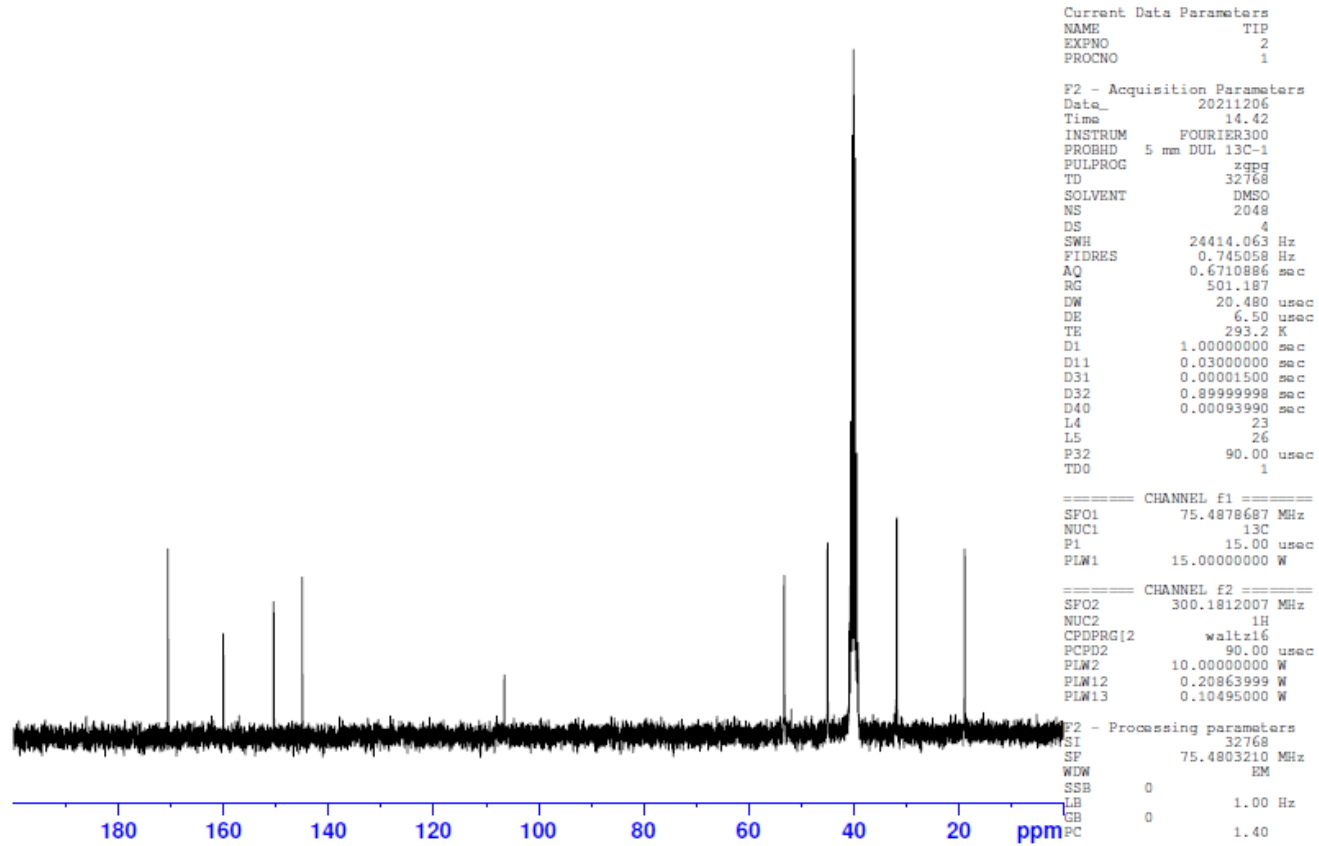
===== CHANNEL f1 =====
 SF01 300.1818537 MHz
 NUC1 1H
 P1 13.00 usec
 PLW1 10.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1800000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Şekil 5.4. TIP için alınmış ¹H NMR spektrumu



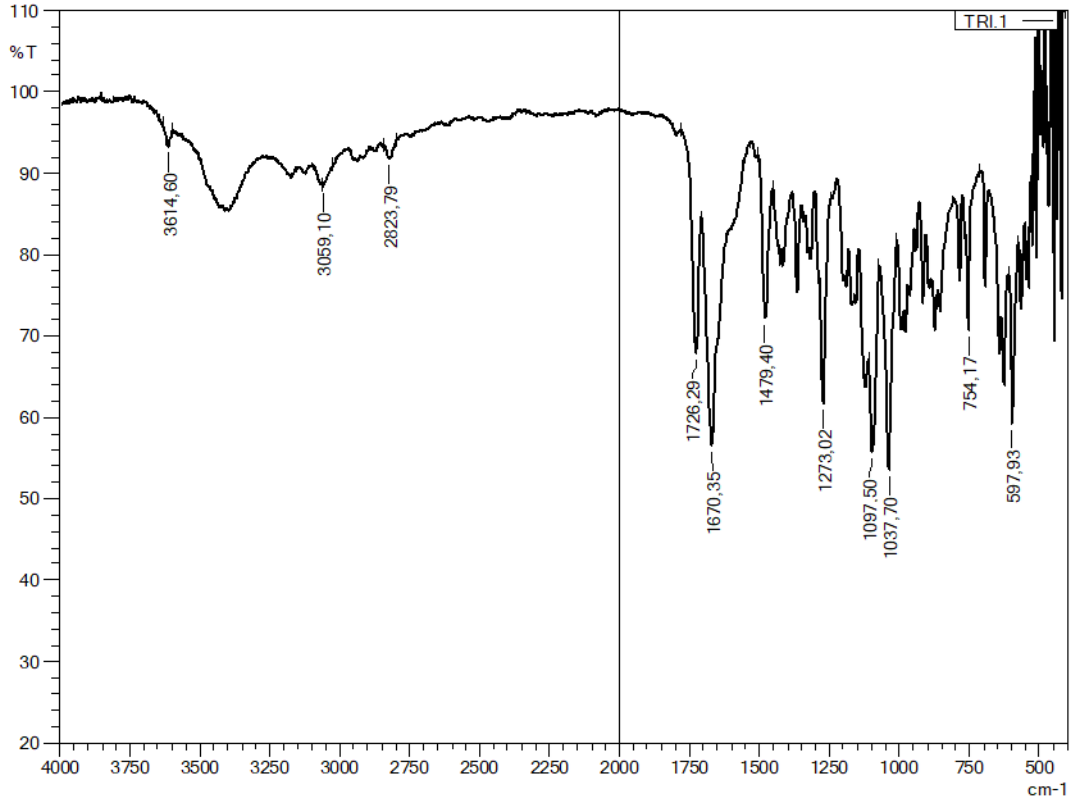
Şekil 5.5. TRI için alınmış ^{13}C NMR spektrumu



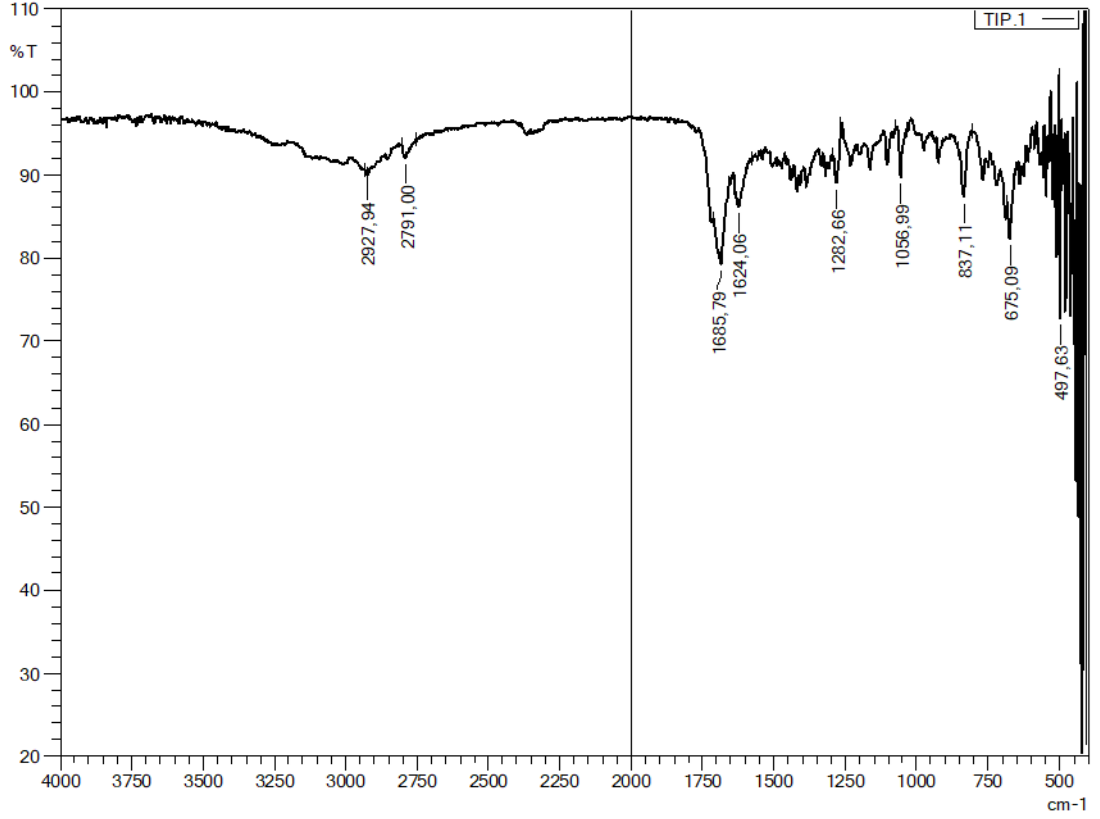
Şekil 5.6. TIP için alınmış ^{13}C NMR spektrumu

5.3. IR Spektroskopisi Tekniği ile Karakterizasyonu

TIP ve TRI etken maddelerinin standardının spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla IR spektrofotometresi ile analiz yapılmış ve yapıya özgü fonksiyonel gruplar **şekil 5.7** ve **şekil 5.8**'deki gibi belirlenmiştir.



şekil 5.7. TRI için IR Spektrumu



Şekil 5.8. TIP için IR Spektrumu

5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

Bu çalışmada farklı dedektörlerde uygulanabilecek nitelikli kromatografik yöntemler geliştirmek olup çalışmanın çok yönlülüğü sağlanmış olacaktır. Bu nedenle, etken maddelerin tespiti ve girişimsiz olarak ayrılması amaçlanmıştır. Bunun için, sıvı kromatografisi koşullarında ortak noktaları değerlendirilmiş ve yöntem geliştirme sürecinde test edilmiştir.

TIP ve TRI ilaç etken maddelerinin sıvı kromatografisi ile metot geliştirme çalışmaları öncelikle tüm deney ve testlerde kullanılacak erişimi kolay olan bir çözücü ortamı arayarak başlatılmıştır. TIP ve TRI, fiziksel ve kimyasal özelliklerinde de bahsedildiği şekilde polariteleri düşük olduğu için apolar çözücülerde çözünme kabiliyeti iyi olan bileşiklerdir. Bu nedenle evrensel olan çözücüler asetonitril, metanol ve etanol gibi evrensel çözücüler denenmiştir. Yapılan ön deneme çalışmalarında çözücünün hareketli faz olarak da kullanılması düşünüldüğünden asetonitril çözücüsünün TIP ve TRI maddelerinin ayırımında istenilen uygun şartları sağlamadığı gözlenmiş ve metanol ile denemeler yapılmıştır. Metanol çözücüsünün sıvı kromatografisi koşullarında hareketli

faz olarak değerlendirildiğinde TIP ve TRI etken maddelerinin ayırımı için olumlu cevap vermesi nedeniyle çözücü olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Kromatografik yöntem geliştirmede sistem uygunluk koşullarının istenilen aralıklarda olması için kromatografik ayırımı iyi ve pik şekillerinin düzgün olması gerekmektedir. Bu nedenle iki koşulda da hareketli fazın yetersiz olması durumunda tampon sistemi kullanılmaktadır.

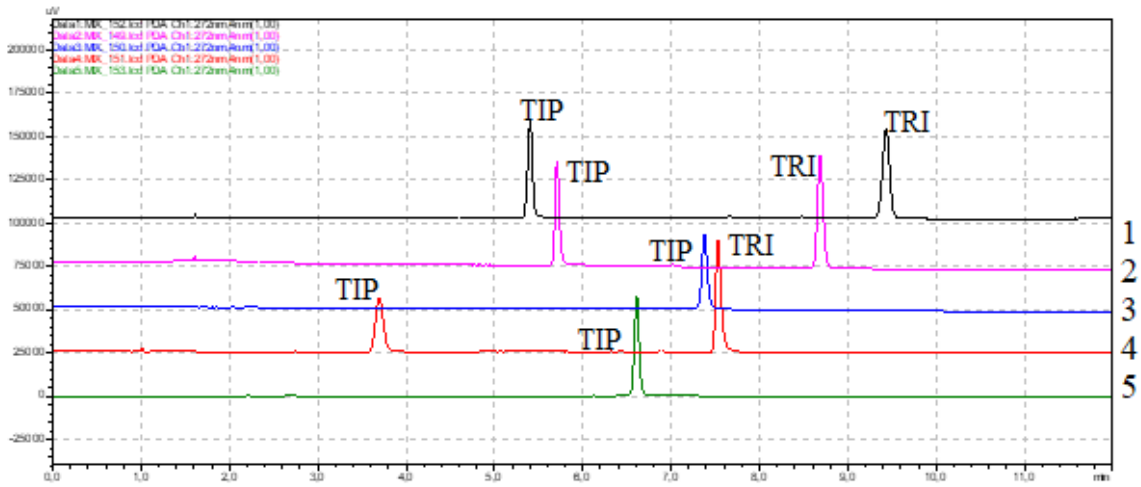
UPLC ve LC-MS/MS ile geliştirilecek kromatografik yöntem koşullarının olabildiğince ortak olması amaçlanmasından dolayı, LC-MS/MS koşullarında iyon baskılayıcı maddelerin sınırlı olması nedeniyle asetik asit, formik asit, amonyum asetat ve amonyum format maddeleri çeşitli konsantrasyonlarda test edilmiştir. TIP ve TRI ilaç etken maddelerinin ayırımında pik şekilleri istenilen düzgünlükte olmadığı için testler sonucunda hareketli faz olarak metanol ile birlikte 10 mM amonyum asetat maddesinin tampon olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmada kolon dolgu maddesi silika olan kolonlarla çalışıldığı için kolonun fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önüne alınarak hareketli faz pH seçimi değerlendirilmiştir. pH seçiminde kullanılacak olan tampon maddenin tamponlama kapasitesi özelliği de göz önüne alınmıştır.

Birçok doğal ESI-MS çalışmasında amonyum asetat 10 mM civarında konsantrasyonlarda kullanılması uygundur ve daha yüksek konsantrasyonlar genellikle tolere edilebilir. Bu daha yüksek konsantrasyonlar, ESI işlemi sırasında pH değişikliklerini azaltmaya yardımcı olabilir.

UPLC yöntemi geliştirme çalışmasında temel mobil faz bileşeni ve oranı ön deneme çalışmaları sonucunda en uygun ayırım ve pik şekli Metanol/Amonyum Asetat Tamponu ile elde edilmiştir. Daha sonra bozunma çalışmalarında bu hareketli faz ile çeşitli denemeler yapılarak etken maddelerin bozunma ürünleri ile girişimini önlemek için analizler boyunca değişken hareketli fazla elüsyon yapılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz analiz başlangıç koşulları Metanol/Amonyum Asetat (2:98, hacim/hacim) şeklindedir.

Hareketli faz ile birlikte yöntemlerde bütünlüğü sağlamak için yüksek verimli ayırmalar sağlayan verimli ve sağlam bir analitik kolonun kullanılması düşünülmüştür. Bu nedenle mevcut olan dolgu materyali silika olup farklı fonksiyonel gruba sahip farklı özellik ve boyutlarda sabit faz denemeleri yapılmıştır. Denemeler sonucunda Phenomenex marka Kinetex® C18 fonksiyonel gruba ve 100 Å por büyüklüğüne sahip 150 mm × 4.6 mm boyutlarında ve 2.6 µm gözenek büyüklüğü olan sabit fazda belirlenen

hareketli faz ile etkileşimin çok daha iyi olduğu ve sistem uygunluk parametrelerinin üstünlüğü gözlemlenmiş ve analitlerin pikleri daha efektif sonuç vermiştir. (Şekil 5.9.)



Şekil 5.9. Aynı koşullarda yapılan analizler sonucunda farklı kolonlarda TIP/TRI kromatogramı

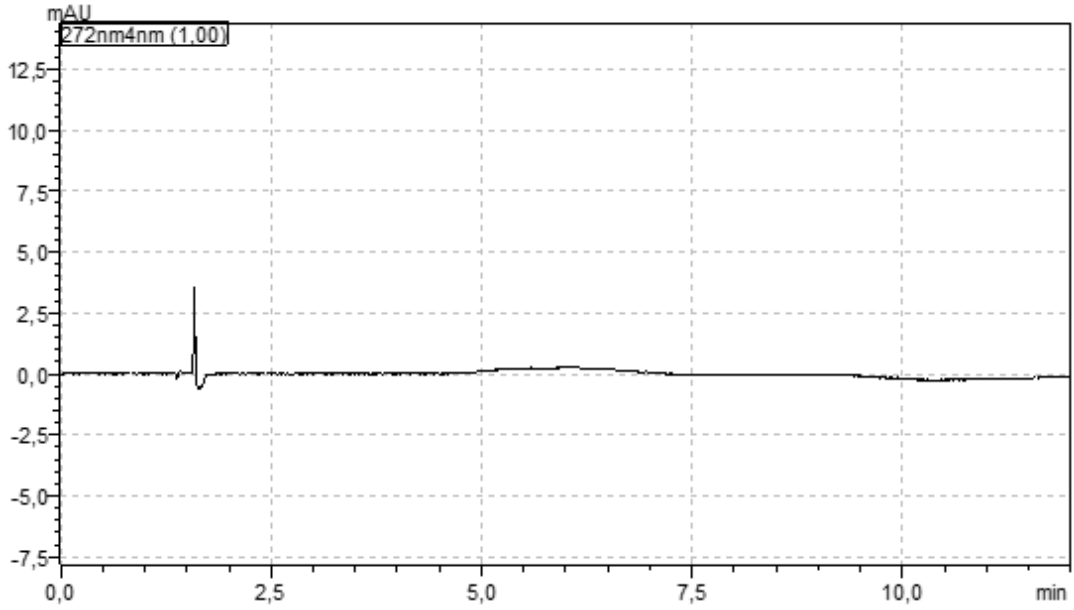
¹Kinetex® C18 100 Å, 2.6 µm, 150 mm × 4.6 mm, ²Kinetex® Phenyl Hexyl 100 Å, 2.6 µm, 150 mm × 4.6 mm, ³Luna® Phenyl Hexyl 100 Å, 3 µm, 150 mm × 4.6 mm, ⁴Ascentis® Express C18 100 Å, 2.7 µm, 100 mm × 4.6 mm, ⁵Inertsil® ODS-SP, 5 µm, 150 mm × 4.6 mm

Kolon sıcaklığı çalışmalarında ise, 25-40 °C arasında çalışmalar yapılmıştır. 25 °C sıcaklık ile elde edilen kromatogramlarda kolon içerisinde etkileşimlerin yetersiz kaldığı ve bu nedenle kromatogramda ciddi bozulmalar ve buna bağlı olarak ayrımların yetersiz kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca yüksek viskozite nedeniyle pik sinyallerinde küçülmeler olmuştur. 30 °C kolon sıcaklığında kromatografik çalışma yapıldığında ise yeterli iyi kromatografik ayırımın gerçekleştiği ve düzgün pik morfolojisinde ile pik simetrisinde olduğu gözlemlenmiştir. Bir de 40 °C'de deneme yapıldığında gürültü sinyallerinin büyüklüğünün arttığı ve bozulmaların olduğu görülmüştür.

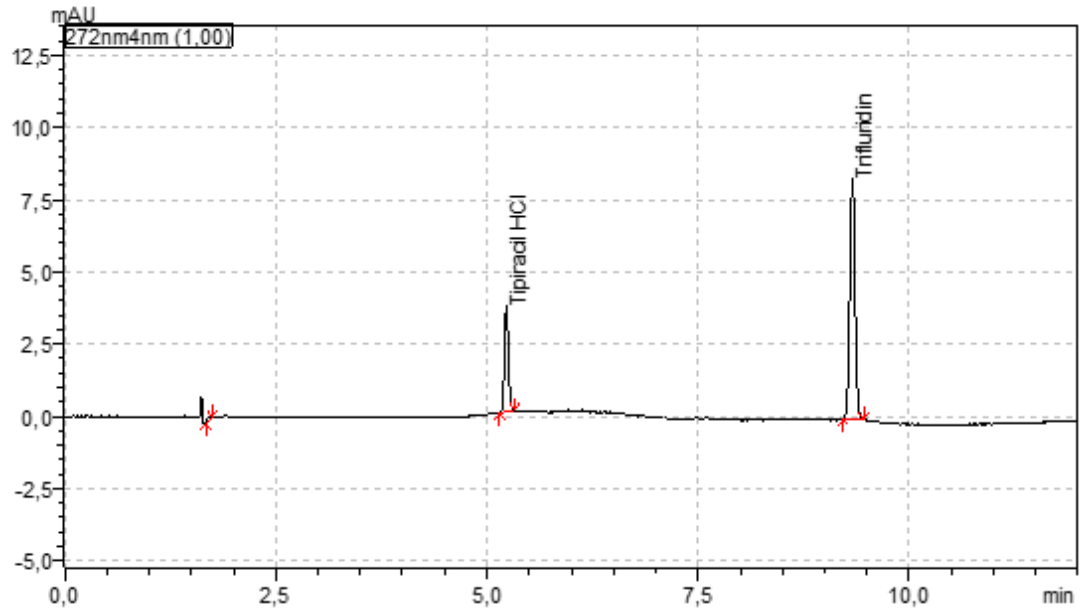
Akış hızı denemelerinde ise, ilk olarak UPLC cihazında cihazın basıncı da göz önünde tutularak analizin stabil ve analiz süresinin en uygun zamanda gerçekleşmesi için 0,1-1 mL/dk akış hızı aralığında çalışmalar yapılmıştır. Çalışma sonucunda UPLC cihazı için 1 mL/dk. akış hızındaki analizlerin daha uygun olduğu saptanmıştır. Ve enjeksiyon hacminin pik şeklinin uygunluğuna göre 1 µL ve çalışma dalga boyunun da her iki etken maddenin ortak en yüksek absorbansa sahip olduğu 272 nm olarak belirlenmiştir.

Optimize edilmiş koşullar altında sıvı kromatografisi cihazı olan UPLC ile yapılan analiz sonucunda etken maddelerin eş zamanlı ayırımı gerçekleştirilmiştir. Öncesinde

kromatogramda ortaya çıkabilecek girişimlerin olup olmadığını görmek için kör çözelti enjeksiyonu ve gerçek zamanlı analiz sonucu Şekil 5.10 ve Şekil 5.11’de gösterilmiştir.



Şekil 5.10. Optimize koşullar altında kör çözelti enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram



Şekil 5.11. Optimize koşullar altında gerçek zamanlı etken madde karışım çözeltisinden elde edilen kromatogram

Kütle dedektörü kullanılarak da TIP ve TRI etken maddelerinin MS/MS tekniği ile tayini için çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, her iki analitin eşit derişimde çözeltisi

hazırlanmış ve hem pozitif hem de negatif iyonizasyon çalışması denemeleri kütle dedektöründe genel tarama ile gerçekleştirilmiştir. Ve negatif iyonizasyonda iyonlaşmanın her iki etken madde için yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Maddelerin yapısındaki karboksi amid grubu nedeniyle iyonlaşmanın negatif yönde daha iyi olmasını sağlamıştır. Negatif iyonlaşmada MRM ile tespit edilen iyonları ve bu iyonların oluşumu için uygulanacak optimum enerjileri **Tablo 5.1** ve **Tablo 5.2**'de görülmektedir.

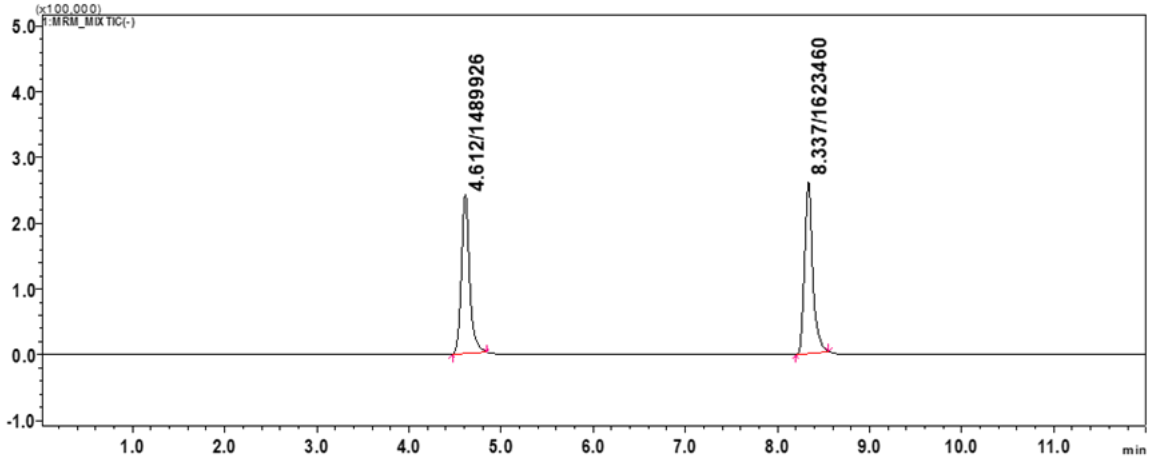
Tablo 5.1. TIP'nin çoklu reaksiyon izleme koşulları

Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
TIP	241.10	144.95	26.0	15.0	20.0
		198.05	26.0	18.0	26.0

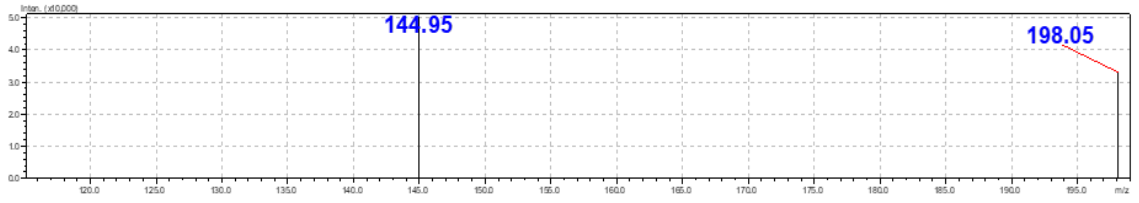
Tablo 5.2. TRI'nin çoklu reaksiyon izleme koşulları

Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
TRI	295.15	116.15	30.0	22.0	21.0
		179.10	19.0	14.0	18.0

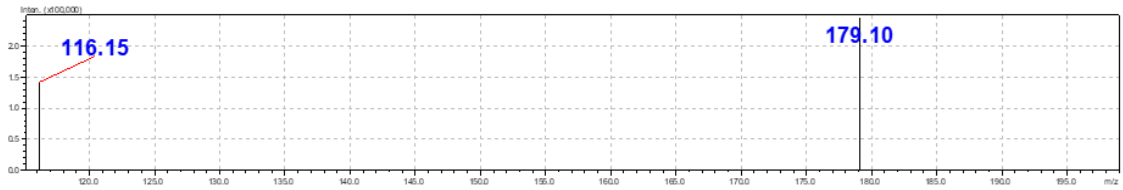
Yapıların ana iyon m/z değerleri için tarama sonucu kütle spektrumunda TIP için 241.10 ve TRI için 295.15 m/z değerlerinde şiddetli pikler tespit edilmiştir. Daha sonra kütle parçalanmalarını inceleme amacıyla moleküllerin MRM analizi yapılmıştır. Moleküllerin parçalanması sonucu TIP için m/z 144.95 ve 198.05 değerleri ile TRI için m/z 116.15 ve 179.10 değerlerinde şiddetli pikler tespit edilmiştir. Bu şekilde miktar tayininde kullanılacak yavru iyonlar ortaya çıkmıştır. Daha sonra bu iyonların elde edilmesinde uygulanacak optimum enerjiler tespit edilmiştir.



Şekil 5.12. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 5.13. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod)



Şekil 5.14. TRI etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod)

Tablo 5.3. *Optimum koşullarda TRI ve TIP analizi için elde edilen SUT verileri*

Parametre	Hesaplanan Değer				Tavsiye Edilen Değer
	UPLC		LC-MS\MS		
	TIP	TRI	TIP	TRI	
Alıkonulma zamanı (dk) GA%95	5.251	9.334	4.612	8.337	-
Alıkonulma zamanı için %BSS	0.048	0.252	0.067	0.136	BSS ≤ %1
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0.801	0.546	0.431	0.233	BSS ≤ %1
Alıkonulma zamanı için enjeksiyon kesinliği %BSS (n=6)	0.104	0.692	0.083	0.357	BSS ≤ %1
Kuyruklanma faktörü (T)	1.050	1.012	1.63	1.55	T ≤ 2
Kapasite faktörü (k)	2.066	4.217	-	-	2 < k < 10
Teorik tabaka sayısı (N)	31220	96072	11387	5684	N > 2000

5.5. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme

Moleküllerin kalitatif analizlerinde önceleri klasik yöntemler kullanılmaktaydı. Bilim ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte cihazların kullanıldığı analizlere geçilmiştir. Analitik çalışmalarda çok düşük miktarlarda maddelerle analizler yapılabildiği için cihazların kullanımıyla birlikte hassasiyetlik artırılmıştır. Bu durum göz önüne alındığında kalitatif tayinler için NMR ve IR spektroskopi yöntemleri geliştirilmiştir. Ve günümüze gelindiğinde artık teknolojinin de hızlı bir şekilde gelişmesiyle yeni yöntemler ve cihazlar geliştirilmiştir. Bu süreçte kütle spektroskopisi teknolojisi de gelişerek yeni tandem kütle analizörleri ile bu alanda ilerleme sağlamıştır. Böylelikle kalitatif analiz kısmında saflaştırma ya da mg seviyesinde numune gerektiren geleneksel spektroskopik yöntemlere üstünlük sağlanmıştır. Bu çalışmada hassasiyeti oldukça yüksek olan iyon tuzaklı (IT)- uçuş zamanlı (TOF) kütle spektrometresini kullanılmıştır. Mevcut cihaz sunduğu yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) ile 0.0000 ölçeğinde kütle vermektedir. Ayrıca MSn tekniği ile seçilen yavru iyonlar dedektör tarafından tutulup daha küçük yavru iyonlar parçalanarak büyük moleküllerin açık formülleri yüksek doğrulukta ortaya konulabilmektedir. Bu kalitatif analiz için devrim niteliğinde yenilik anlamındadır.

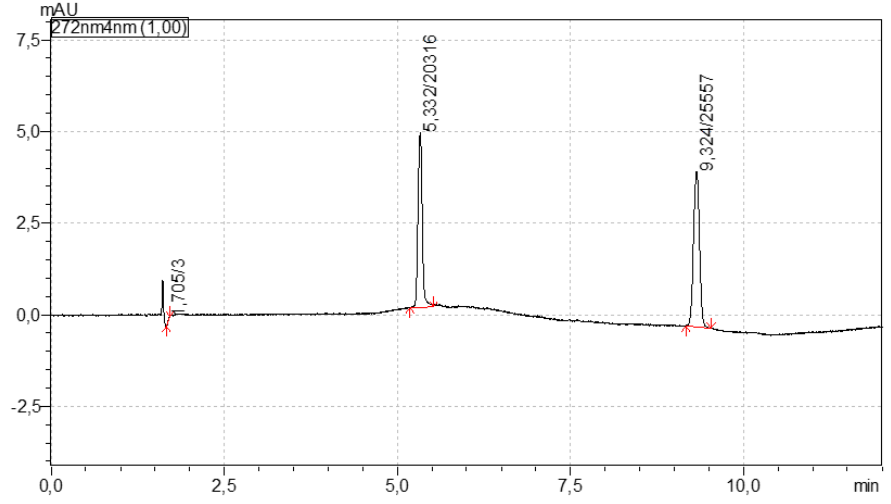
Geliştirilen bu yöntemde etken maddeler ile birlikte bozunma ürünleri varlığında UPLC analizleri yapılmış ve bozunma ürünleri tespit edilmiştir. UPLC yöntemi koşullarının içeriği birebir LCMS-IT-TOF sistemine taşınması ile tespit edilmiş ve karakterizasyon yapılmıştır.

5.6. Bozunma Davranışları

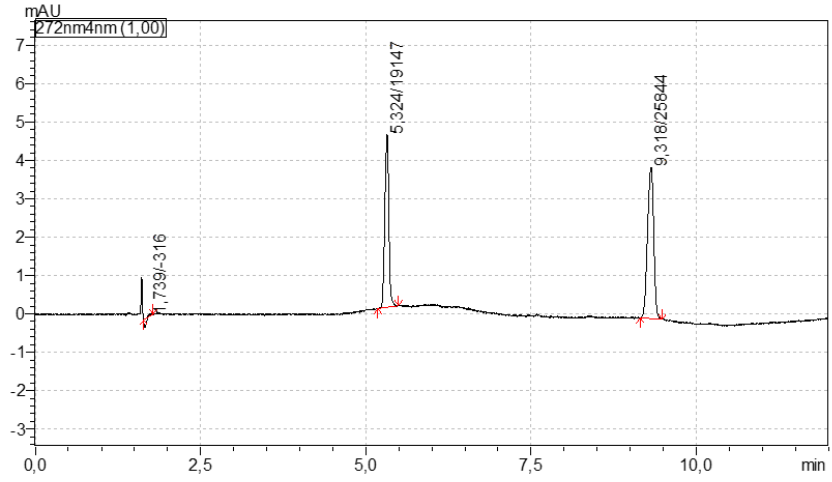
TRI/Tıp Etken maddelerinin UHPLC için seçicilik çalışmaları ve bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF cihazında kalitatif analizi amacıyla etken madde zorlu bozma koşullarına maruz bırakılmıştır. Etken maddelerinin maruz bırakıldığı zorlu bozma koşulları ICH Q2(R1) kılavuzunda belirtilen termolitik, asidik/bazik, hidrolitik ve oksidatif stres koşulları altında yapılmıştır.

Çalışmada etken maddelerin çözeltileri ayrı ayrı 1 mg/mL ana stok çözeltilerinden seyreltme yoluyla 10 µg/mL derişimde olacak şekilde hazırlanarak öncelikle oda koşullarında 1, 2, 48, 12, 24 ve 48 saat sürelerde farklı stres ortamlarına maruz bırakılmıştır.

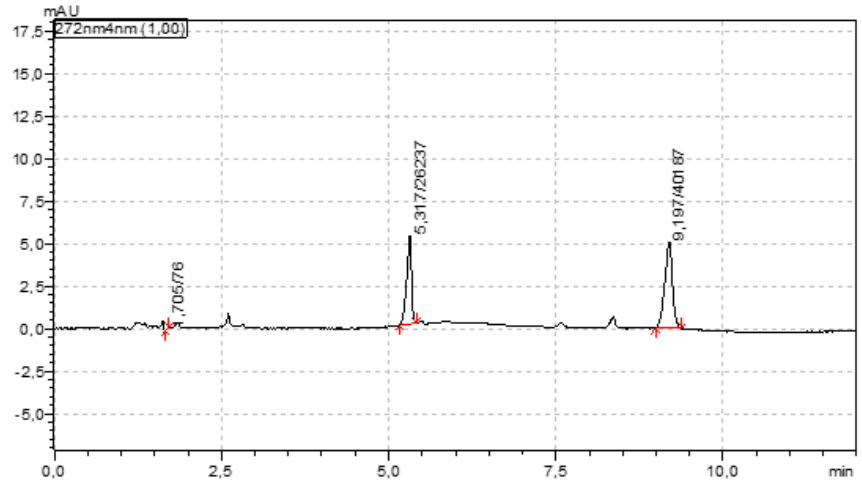
Stres koşulları sonucunda oluşan bozunma ürünlerinin UHPLC ile ayırımı ve LCMS-IT-TOF cihazı ile de teşhisleri gerçekleştirmiştir.



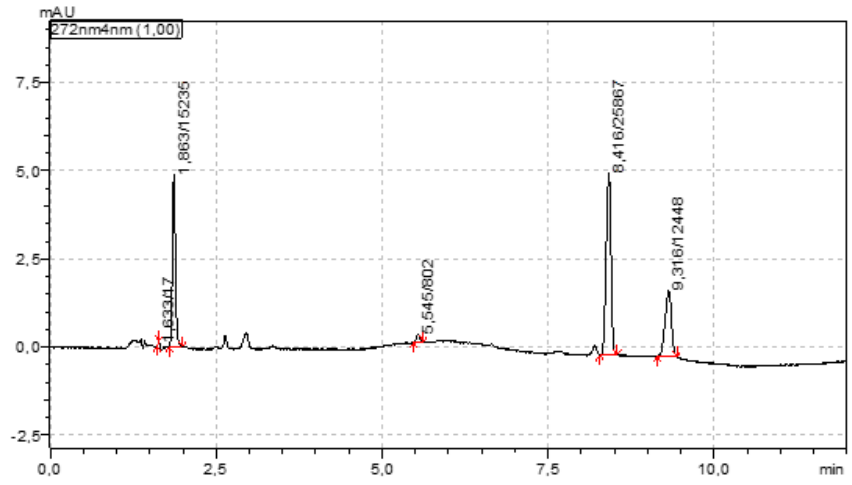
Şekil 5.15. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması
(Yalnız TPI/TRI, 0. saat)



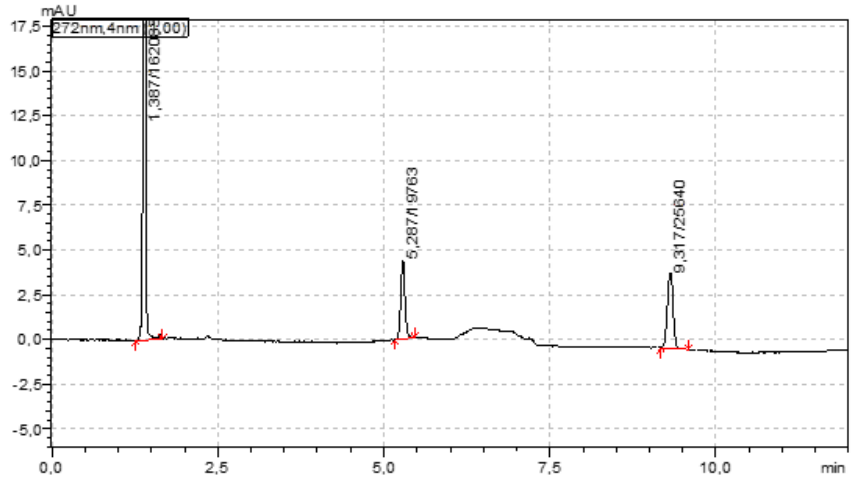
Şekil 5.16. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması
(Yalnız TPI/TRI, 48. saat)



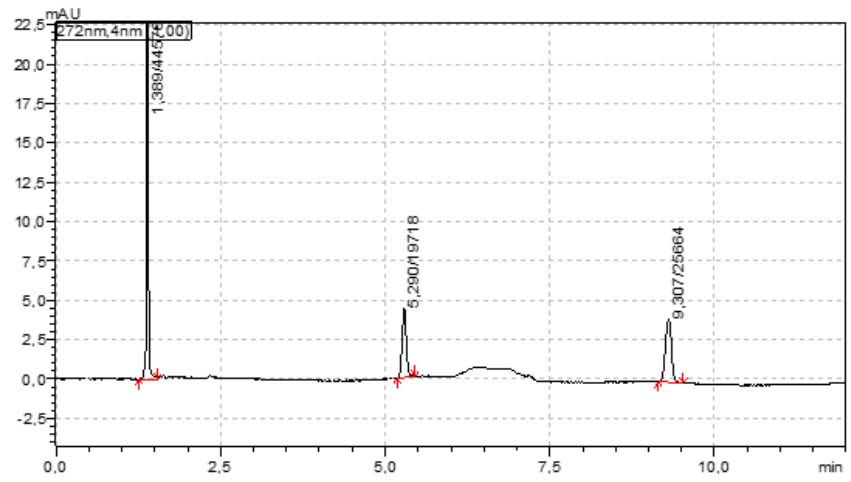
Şekil 5.17. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması
(NaOH ile TIP/TRI, 0. saat)



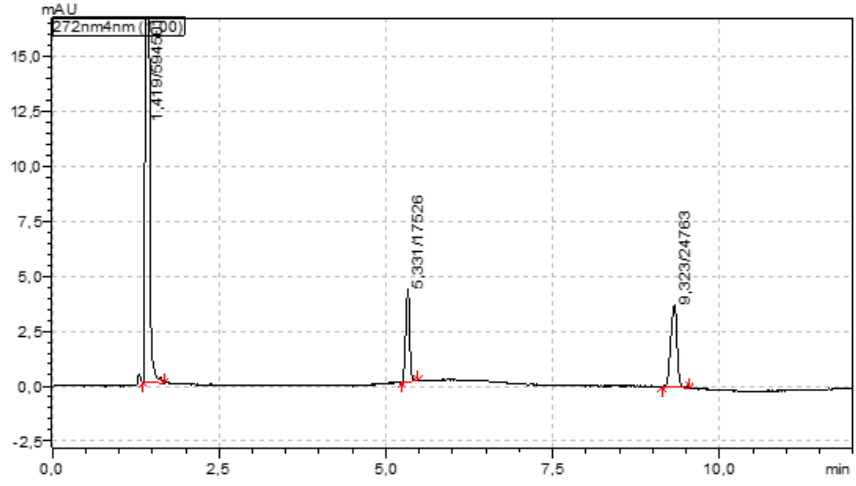
Şekil 5.18. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması
(NaOH ile TIP/TRI, 48. saat)



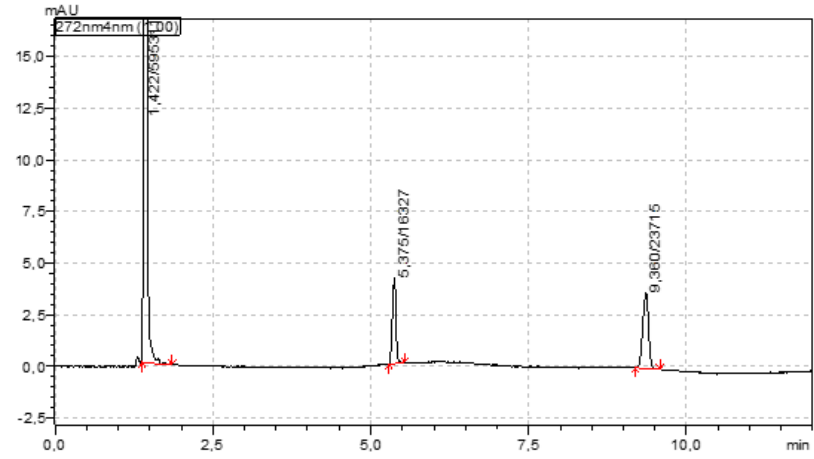
Şekil 5.19. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması (HCl ile TPI/TRI, 0. saat)



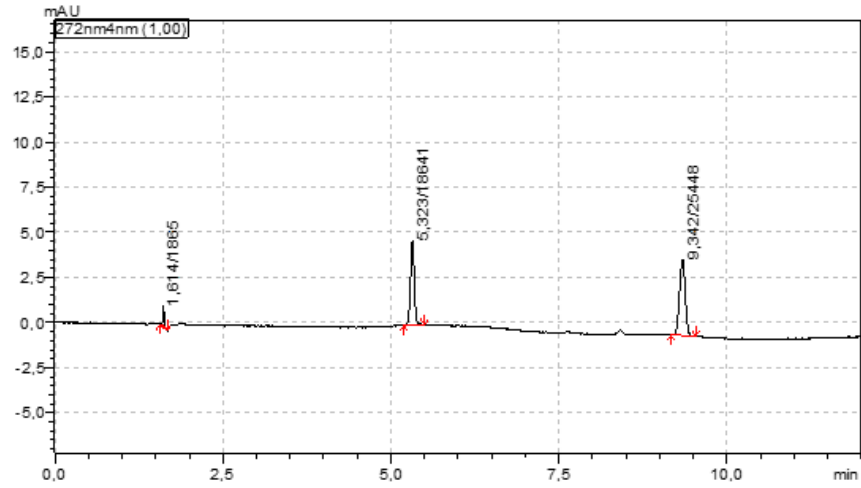
Şekil 5.20. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması (HCl ile TIP/TRI, 48. saat)



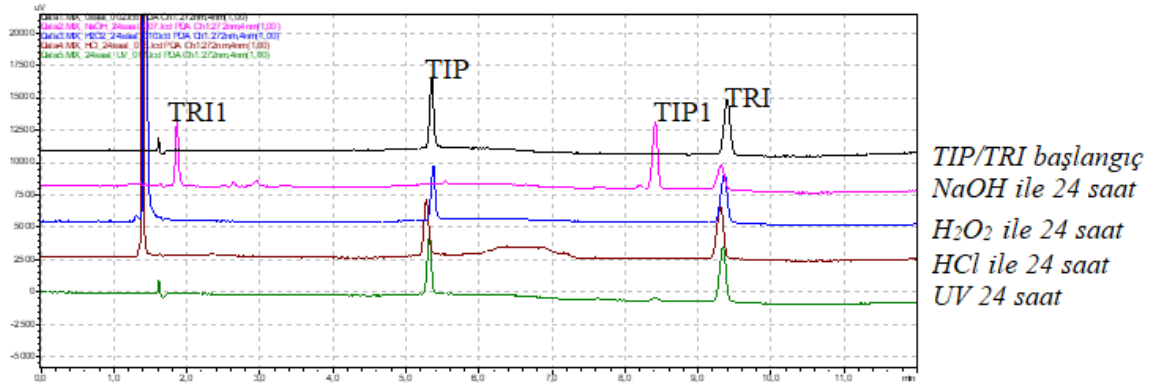
Şekil 5.21. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması (H_2O_2 ile TPI/TRI, 0. saat)



Şekil 5.22. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozundurma çalışması (H_2O_2 ile TPI/TRI, 48. saat)



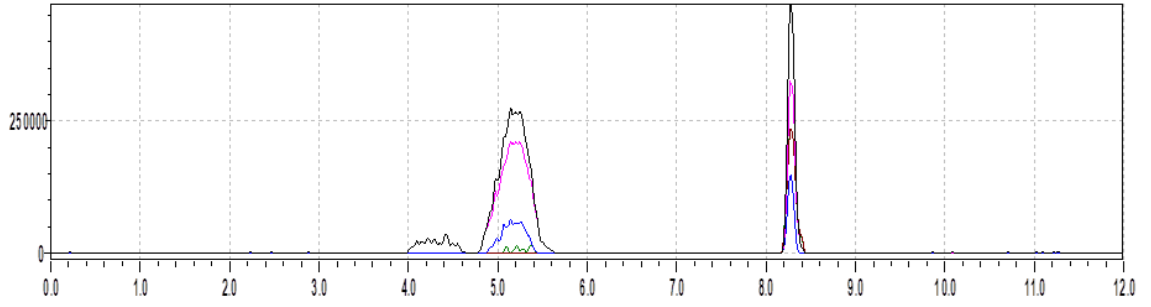
Şekil 5. 23. TIP ve TRI etken maddelerinin eş zamanlı bozunurma çalışması
(UV ile TIP/TRI, 48. saat)



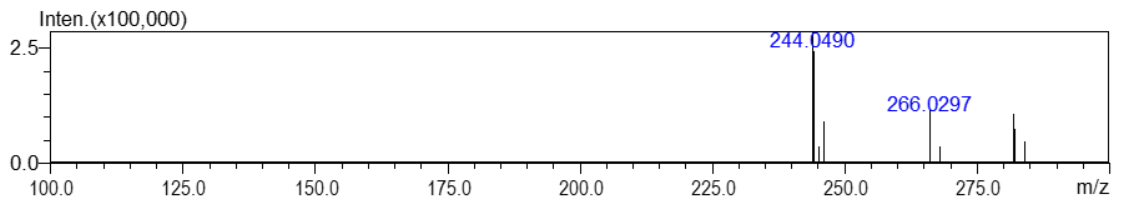
Şekil 5.24. TIP ve TRI etken maddelerinin oda sıcaklığında eş zamanlı stres koşullarında bozunurma çalışması

Oda sıcaklığında gerçekleştirilen bozunma çalışmalarında NaOH bazik stres koşulu altında hem TIP hem de TRI etken maddelerinin bozunduğu görülmüştür. Daha sonra rehberde belirtildiği üzere bozunmanın gerçekleşmediği stres koşullarında sıcaklık 60 °C'de kontrollü olarak uygulanmıştır. Bu sıcaklıkta yine aynı şekilde NaOH bazik ortamda TIP VE TRI etken maddelerinin bozunduğu gözlenmiştir.

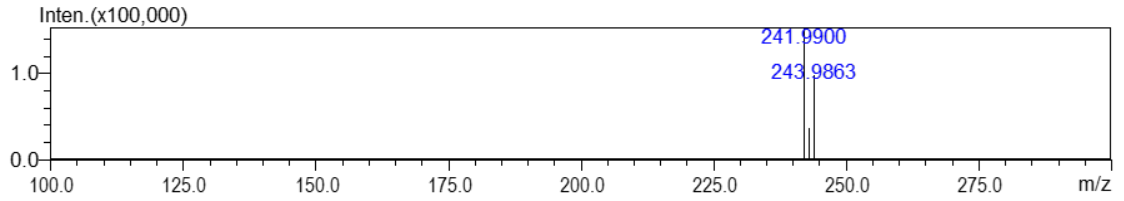
Daha sonra NaOH bozunma koşulu altında ayırımı yapılan bozunma ürünlerinin teşhisi ve karakterizasyonu LCMS-IT-TOF yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil.5.25. TIP etken maddesinin eş zamanlı LCMS-IT-TOF kromatogramı



Şekil 5.26. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Pozitif Mod)



Şekil 5.27. TIP etken maddesi LC-MS/MS Spektrumu (Negatif Mod)

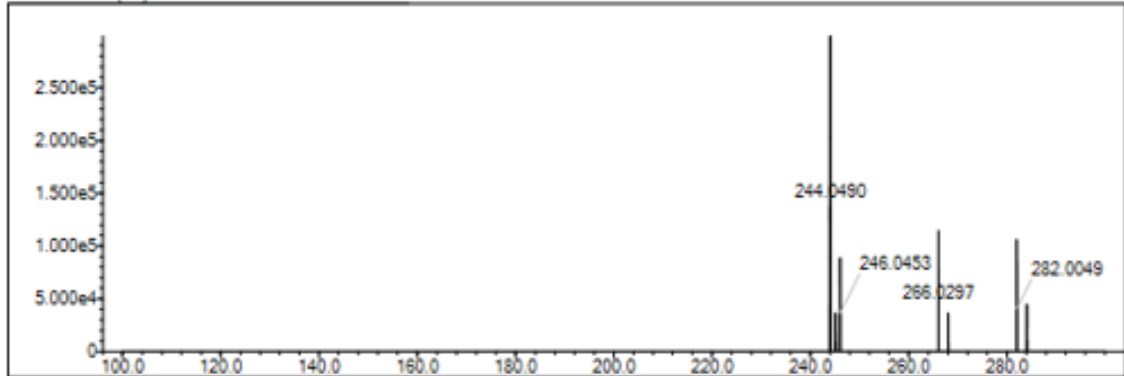
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct	
H	1	0	19	O	2	2	7	Cl	1	1	1		1	3	0	0	H
B	3	0	0	F	1	0	0	Br	1	0	0						
C	4	0	10	P	3	0	0	Ru	2	0	0						
N	3	2	3	S	2	0	0	Pd	2	0	0						

Error Margin (ppm): 50
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

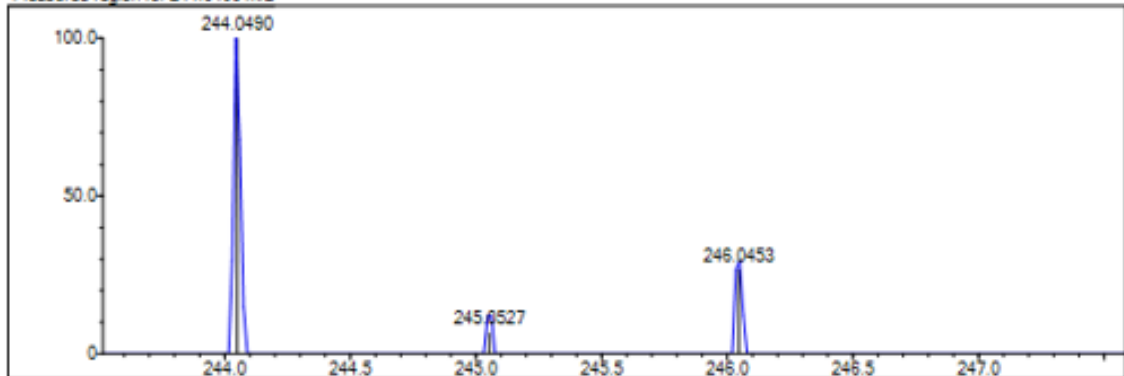
DBE Range: 5.0 - 30.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

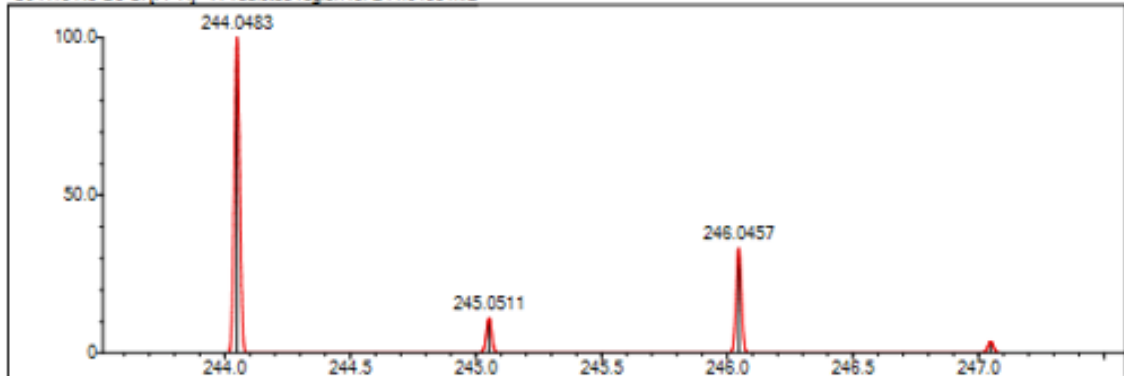
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 8.253 Scan#: 1239



Measured region for 244.0490 m/z

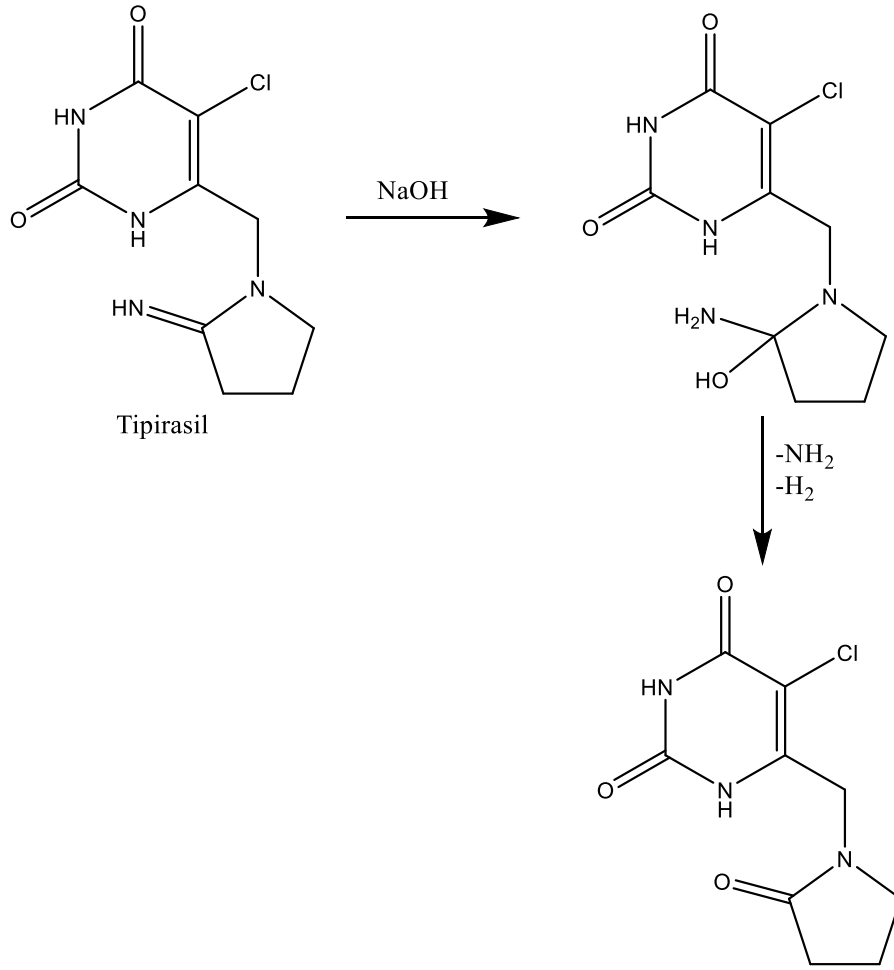


C9 H10 N3 O3 Cl [M+H]+ : Predicted region for 244.0483 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	62.43	C9 H10 N3 O3 Cl	[M+H]+	244.0490	244.0483	0.7	2.87	65.49	6.0

Şekil 5.28. NaOH bozundurma sonucu elde edilen TIP yeni impüritesi için kütle atlası



Şekil 5.29. TIP'in NaOH ortamında meydana gelen bozunma reaksiyonu

Yapılan bozundurma çalışmaları sonucu bazik stres koşullarında elde edilen TIP için karakterize edilen bozunma ürününe ait tahmin edilen oluşum mekanizması **Şekil 5.29'** da verilmiştir.

Alkali bozundurma koşullarında elde yeni TIP1 maddesinin oluşumu 2 aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak ortamda bulunan NaOH, TIP ana ürünündeki imin karbonuna atak ediyor ve imin yapısındaki çiftli bağ kopmasıyla OH⁻ iyonu bu karbona bağlanarak ara ürünü oluşturmaktadır. Daha sonra yapıda zayıf bağlı halde bulunan NH₂ ve hidroksildeki H ara üründen ayrılarak buradaki karbondaki C=O çiftli bağ oluşmaktadır. Bazik ortamda gerçekleşen reaksiyon sonucu literatürde bulunmayan yeni bir bozunma ürünü elde edilmiştir.

Elde edilen TIP1 bozunma ürünü C₉H₁₀ClN₃O₃ kapalı formülüne sahip ve molekül ağırlığı 243,65 g/mol olarak bulunmuştur. IUPAC ismi ise 5-chloro-6-((2-oxopyrrolidin-1-yl)methyl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione olarak not edilmiştir.

Yine bazik stres koşullarında UPLC'de elde edilen TRI için bozunma ürünü olan TRI1, LCMS-IT-TOF ile m/z değerinin teşhisi gerçekleşmediği için karakterizasyonu

yapılamamıştır. Bunun nedeni olarak bozunma ürününün ESI soft iyonlaşma ile iyonlaşamadığı ve daha sert iyonlaşmanın yapılabildiği kütle spektrometresi cihazı ile analiz edilebilmesinin mümkün olabileceğine karar verilmiştir.

5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

ICH kılavuzunda belirtilen bir yöntemin geçerli olabilmesi için gerekli parametreler incelenmiştir.

Yöntem geçerliliğinde doğrusallık farklı analit derişimlerine karşı elde edilen dedektör sinyallerinde alanların hesaplanmasıyla yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildiğinde, çözeltilerin farklı derişimine karşılık okunan pik alanları ile kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Doğrusallık çalışmaları her iki dedektör ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar **Tablo 5.4** ve **Tablo 5.5**'de verilmiştir. UPLC cihazında gerçekleştirilen YPSK yöntemi laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla başka bir laboratuvarda tekrarlanmış ve gerekli tüm doğrulama işlemleri yapılmıştır. Analitler için en yüksek saflık, TIP ve TRI için sırasıyla UPLC'de 0.9999 ve 0.99982 ile LC-MS/MS için 0.9968 ve 0.99942 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 5.4. TIP için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	LC-DAD	LC-MS\MS
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	3.07-24.56	0.11-20.22
Eğim \pm SS^a (gün içi, n=6)	13541.7 \pm 47.8808	1050831 \pm 21020.79
Kesim \pm SS^a (gün içi, n=6)	-214.744 \pm 501.381	616418.5 \pm 208823.21
Regresyon katsayısı (intraday, n=6)	0.9999	0.9968
Teşhis sınırı	0.07 $\mu\text{g/mL}$	24.6 pg/ mL
Tayin sınırı	0.217 $\mu\text{g/ mL}$	76.8 pg/mL
Eğim \pm SH^b (günler arası, k= 3, n=18)	13666.57 \pm 40.1874	1045318 \pm 20774.33
Kesim \pm SH^b (günler arası, k= 3, n=18)	286.928 \pm 399.227	559535.5 \pm 206374.8
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k= 3, n=18)	0.9999	0.9968
ANOVA	F (1.8) = 1.044 P>0.05	F (1.8) = 1.576 P>0.05
Tekrarlanabilirlik \pm SS^a (günler arası, ortalama, n = 6)	137912.1 \pm 3095.079	11462880 \pm 326933.5
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c %, n = 6)	2.24424	2.852106
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH^d, n = 6)	893.4725	94377.58
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA^e, n = 8)	1966.52	207723.6
Tekrarlanabilirlik \pm SS^a (gün içi, ortalama, n = 6)	135270 \pm 778.594	11334389 \pm 387818.5
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c %, n = 6)	0.57558	3.421609
Tekrarlanabilirlik (gün içi, OSH^d, n = 6)	317.8596	158326.2
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA^e, n = 8)	577.7657	406990.6
ANOVA	F (105.106) = 0.1287 P>0.05	F (1.106) = 1.200 P>0.05

Tablo 5.5 TRI için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	LC-DAD	LC-MS\MS
Doğrusal aralık (µg/mL)	7.5-60 (µg/mL)	2.63-105.0 (ng/mL)
Eğim ± SS^a (gün içi, n=6)	15279.9±84.33	21459.1±194.57
Kesim ± SS^a (gün içi, n=6)	-4955.15±2315.8	18129.8±10487.4
Regresyon katsayısı (günüçi, n=6)	0.99982	0.99942
Teşhis sınırı	0.03 µg/mL	155.4 pg/mL
Tayin sınırı	0.093 µg/mL	481.7 pg/mL
Eğim ± SS^a (günler arası, k= 3, n=18)	15219.0±65.04	21343.48±514.79
Kesim ± SS^a (günler arası, k= 3, n=18)	-5510.0±1786.0	17221.34±2774777
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k= 3, n=18)	0.99960	0.985665
ANOVA	F(2.15)=1.437 P=0.268507 (P>0.05)	F(2.15)=0.554 P=0.585997 (P>0.05)
Tekrarlanabilirlik ± SS^a (günler arası, ortalama, n = 6)	765.66	33300.72
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c %, n = 6)	2.09	2.89
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH^d, n = 6)	180.47	13594.96
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA^e, n = 8)	353.72	26646.13
Tekrarlanabilirlik ± SS^a (gün içi, ortalama, n=6)	370.42	15036.15
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c %, n = 6)	%1.014	%1.33
Tekrarlanabilirlik (gün içi, OSH^d, n = 6)	151.23	6138.48
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA^e, n = 8)	296.401	12031.41
ANOVA	F (2.21)=0.000402 P=0.999598 (P>0.05)	F (2.24)=0.0899 P=0.914251 (P>0.05)

^a Standart sapma, ^b Standart hata, ^c Bağıl standart sapma, ^d Ortalamanın standart hatası, ^e %95 güven seviyesinde güven aralığı.

Tablet analizleri için doğruluk geri kazanım ile test edilmiştir. Geri kazanım deneyleri için standart ekleme metodu kullanılmış ve doğrusallık aralığında bulunan düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda analizler yapılmıştır. Bu amaçla LONSURF[®] tabletine belirli miktarda TIP ve TRI çözeltileri ilave edilerek geri

kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak birbiriyle bir bütünlük içerisinde oldukça başarılı olarak elde edilmiştir. Doğruluk için elde edilen sonuçlar **Tablo 5.6** ve **Tablo 5.7**'de verilmektedir. Bileşiklerin gözlemlenen geri kazanımları, analiz ön hazırlık aşamasında yapılan seyreltme ve süzme gibi işlemlerin sonuçlarda etki ettiği gözlemlenmiştir.

Tablo 5.6. TIP için geri kazanım verileri

	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk
				BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
UPLC	9.824	9.689±0.064	0.075	0.932	98.63	-2.12
	12.28	11.989±0.014	0.117	0.823	97.63	-2.44
	14.736	14.894±0.006	0.251	1.006	101.07	-2.26
LC-MS/MS	9.824	9.628± 0.025	0.221	0.956	98.00	-0.22
	12.28	12.450±0.096	0.115	0.886	101.39	2.58
	14.736	14.379±0.053	0.023	0.103	97.58	1.98

*%95 Güven seviyesinde

Tablo 5.7. TRI için geri kazanım verileri

	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk
				BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
UPLC	24	24.423 ± 0.025	0.246	0.923	101.76	-2.15
	30	30.609 ± 0.113	0.117	0.931	102.03	-5.22
	36	35.429 ± 0.144	0.009	0.788	98.41	-0.26
LC-MS/MS	24	23.816 ± 0.005	0.221	0.931	99.23	-1.88
	30	31.029 ± 0.033	0.335	0.896	103.43	-2.42
	36	36.195 ± 0.045	0.125	0.958	100.54	-3.4

*%95 Güven seviyesinde

Geliştirilen yöntem ile aynı kalibrasyon çözeltileri kullanılarak ve aynı koşullar altında başka bir YPSK cihazında ara kesinlik çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Ara kesinlik sonuçları **Tablo 5.8** ve **Tablo 5.9**'daki gibidir.

Tablo 5.8. *TIP için ara kesinlik verileri*

Parametre	
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	3.07-24.56
Eğim \pm SS (gün içi, n=6)	961.24 \pm 321.74
Kesim \pm SS (gün içi, n=6)	-450.08 \pm 305.08
Regresyon katsayısı (intraday, n=6)	0.9997
Enjeksiyon kesinliği (SS)	0.013

Tablo 5.9. *TRI için ara kesinlik verileri*

Parametre	
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	7.5-60
Eğim \pm SS (gün içi, n=6)	1193.4 \pm 545.14
Kesim \pm SS (gün içi, n=6)	733.41 \pm 263.01
Regresyon katsayısı (intraday, n=6)	0.9995
Enjeksiyon kesinliği (SS)	0.027

Yöntemin sağlamlığı, akış hızı, tampon derişimi, hareketli faz pH'sı ve kolon sıcaklığında ufak değişiklikler yapılarak her iki dedektör için 10 $\mu\text{g/mL}$ derişimde TIP ve TRI çözeltilerinin üç tekrarlı enjeksiyonları ile hesaplanmıştır. **Tablo 5.10** ve **Tablo 5.11**'deki sonuçlar yöntemin sağlamlığını göstermektedir.

Tablo 5.10. *TIP için metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)*

	Parametre		Alkonulma	%Fark	N	%Fark	T	%Fark
			zamanı (dk)	(ortalama±GA*)		(ortalama±GA*)		(ortalama±GA*)
UPLC	Akış hızı (1.0	1.2	5.17	-0.68±0.002	11.818	0.01 ± 0,168	1.196	0.26 ± 0.012
	mL/dk)	0.8	5.46	0.88 ± 0.009	10.830	-0.252 ± 0.409	1.426	0.256 ± 0.585
	Tampon	8 mM	5.75	-0.148 ± 0.006	12.376	0.317 ± 0.074	1.166	-0.004 ± 0.020
	Derişimi	12 mM	5.22	0.82 ± 0.006	10.564	-0.271 ± 0.263	1.172	0.002 ± 0.001
	(10 mM AAc)							
	Hareketli faz	pH:5.78	5.84	-2.235 ± 0.006	10.866	3.507 ± 0,174	1.276	0.106 ± 0.004
	pH'sı	pH:5.82	5.30	4.31 ± 0.074	10.134	-2.752 ± 0,302	1.119	-0.051 ± 0.155
	(pH:5.80)							
	Kolon sıcaklığı	32	5.14	-0.004 ± 0.015	10.657	-0.271 ± 0.116	1.184	0.014 ± 0.008
	(30 °C)	28	5.92	-0.005 ± 0.016	10.533	-0.262 ± 0.098	1.185	0.02 ± 0,018
LC-MS/MS	Akış hızı (0.5	0.6	4.46	0.896 ± 0.007	10.643	-0.296 ± 0.75	1.556	-0.08 ± 0.094
	mL/dk)	0.4	4.77	-0.703 ± 0.004	10.137	0.425 ± 0.160	1.666	0.034 ± 0.083
	Tampon	8 mM	4.69	-0.154 ± 0.007	10.836	0.964 ± 0.610	1.698	0.066 ± 0.057
	Derişimi	12 mM	4.52	0.078 ± 0.005	10.338	0.111 ± 0.775	1.667	0.0343 ± 0.044
	(10 mM AAc)							
	Hareketli faz	pH:5.78	4.84	-2.242 ± 001	11.447	-3.733 ± 0.999	1.852	0.226 ± 0.017
	pH'sı	pH:5.82	4.32	4.311 ± 0.063	11.522	-2.752 ± 0.302	1.428	0.034 ± 0.083
	(pH:5.80)							
	Kolon sıcaklığı	32	4.45	-0.53±0.12	10.774	-0.271 ± 0.116	1.556	0.014 ± 0.008
	(30 °C)	28	4.72	-2.19±0.06	10.326	0.317 ± 0.074	1.276	0.014 ± 0.008

Tablo 5.11. TRI için metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)

	Parametre		Alkonulma	%Fark	N	%Fark	T	%Fark
			zamanı (dk)	(ortalama±GA*)		(ortalama±GA*)		(ortalama±GA*)
UPLC	Akış hızı (1.0	1.2	9.18	-0.256±0.002	10.818	0.01 ± 0.168	1.656	0.126 ± 0.012
	mL/dk)	0.8	9.46	0.844 ± 0.009	12.830	-0.252 ± 0.409	1.226	0.136 ± 0.58T
	Tampon	8 mM	8.75	-0.138 ± 0.006	10.533	0.317 ± 0.074	1.498	-0.104 ± 0.040
	Derişimi	12 mM	9.42	0.832 ± 0.006	10.515	-0.271 ± 0.263	1.227	0.022 ± 0.031
	(10 mM AAc)							
	Hareketli faz	pH:5.78	9.14	-2.234± 0.006	11.416	3.507 ± 0.174	1.836	0.106 ± 0.104
	pH'sı	pH:5.82	9.39	4.332 ± 0.074	10.612	-2.752 ± 0.302	1.248	-0.221 ± 0.235
	(pH:5.80)							
	Kolon sıcaklığı	32	9.08	-0,344 ± 0.015	10.733	-0.271 ± 0.116	1.662	0.244 ± 0.038
	(30 °C)	28	10.12	-0.425 ± 0.016	10.335	-0.262 ± 0.098	1.325	0.052 ± 0.116
LC-MS/MS	Akış hızı (0.5	0,6	8.66	0.446 ± 0.007	12.006	-0.296 ± 0.75	1.633	-0.28 ± 0.083
	mL/dk)	0,4	10.27	-0.533 ± 0.004	10.932	0.425 ± 0.160	1.337	0.144 ± 0.035
	Tampon	8 mM	9.69	-0.126 ± 0.007	11.246	0.964 ± 0.610	1.338	0.052 ± 0.142
	Derişimi	12 mM	9.52	0.178 ± 0.005	10.664	0.111 ± 0.775	1.995	0.034 ± 0.134
	(10 mM AAc)							
	Hareketli faz	pH:5.78	9.84	-2.247 ± 0.011	11.337	-3.733 ± 0.999	1.472	0.242 ± 0.337
	pH'sı	pH:5.82	9.32	4.221 ± 0.063	10.537	-2.752 ± 0.302	1.224	0.043 ± 0.233
	(pH:5.80)							
	Kolon sıcaklığı	32	9,45	-0.153±0.12	10.535	-0.271 ± 0.116	1.316	0.015 ± 0.38
	(30 °C)	28	8.72	-2.139±0.06	11.822	0.317 ± 0.074	1.221	0.054 ± 0.045

TIP ve TRI çözeltilerinin stabilitesi, farklı koşullar altında depolama yapıldıktan sonra stok çözeltilerinden 10 µg/mL derişime sahip set çözeltiler hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Kısa süreli stabiliteyi değerlendirmek için bir set çözelti 24 ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında, bir başka set çözelti uzun sürede maddelerin stabilitelelerini değerlendirmek için -20 ° C'de ve 3 hafta boyunca ve donma-çözülme yapılarak depolanmıştır. Tüm çözümler 3'er tekrarlı olmak üzere analizleri yapıp elde edilen sonuçlarla %95 güven seviyesinde geri kazanımları ve %BSS'ları bulunmuştur. Çalışılan koşullar altında TIP ve TRI çözeltilerinin stabil olduğunu görülmektedir. (**Tablo 5.12 ve Tablo 5.13**)

5.8. Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

Analizciler için metot oluşturma sürecinin her basamağı çok büyük önem taşır ve kendinden sonra ki aşamada daha az soru işaretinin olmasını sağlar. Metot optimizasyonu aslında metot geçerliliğinin daha kolay sağlanmasına zemin oluştururken yöntemin zayıf noktalarının da keşfini sağlar. Metotun tam olarak geçerliliğinin sağlanması ise yöntemin tekrarlanabilir ve uygulanabilirliğinin daha kolay olması anlamına gelir. Ancak tüm bu süreçten sonra metot geliştiricinin elindeki imkanlar dahilinde numune uygulama çalışmaları yapması ise kullanıma sunulan yöntemin kendini bir kez daha ispatlaması demektir. Bu çalışmada bu anlayış benimsenerek LONSURF® analizleri yapılmıştır. Bu analizler ile geliştirilen tam valide edilmiş her iki metotunda uygulanabilirliği gösterilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları ise **Tablo 5.14** ve **Tablo 5.15**'de verildiği gibidir.

Tablo 5.12. 10 µg/mL TIP için kararlılık çalışmaları (n = 6)

	Eklenen derişim (µg/mL)	Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, oda sıcaklığı)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, -20°C)		Dondurma çözme kararlılığı (3 tekrar)	
		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)	
YPSK	10	10.18 ± 0.14	0.65	10.72 ± 0.09	0.52	10.45 ± 0.09	0.82	10.05 ± 0.09	0.08
MS	10	10.27 ± 0.02	0.32	10.39 ± 0.19	0.24	10.69 ± 0.19	0.65	10.38 ± 0.59	0.42

*%95 Güven seviyesinde

Tablo 5.13. 10 µg/mL TRI için kararlılık çalışmaları (n = 6)

	Eklenen derişim (µg/mL)	Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, oda sıcaklığı)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, -20°C)		Dondurma çözme kararlılığı (3 tekrar)	
		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)		Bulunan (Ortalama ± BSS (%) GA*)	
YPSK	10	11.08 ± 0.15	0.68	10.15 ± 0.09	0.33	10.21 ± 0.35	0.35	10.08 ± 0.09	0.28
MS	10	9.89 ± 0.02	0.45	10.46 ± 0.42	0.12	10.09 ± 0.04	0.19	10.29 ± 0.15	0.44

*%95 Güven seviyesinde

Tablo 5.14. LONSURF® tablet analiz sonuçları TIP (n = 6)

	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$) $\pm\text{GA}^*$	Kesinlik		Doğruluk	
			SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
YPSK	9.824	9.76 \pm 0.044	0.235	0.463	99.35	-4.06
	12.28	12.64 \pm 0.041	0.346	0.475	102.93	-4.62
	14.736	14.48 \pm 0.054	0.566	0.138	98.26	-5.33
LC-MS/MS	9.824	9.67 \pm 0.082	0.412	0.844	98.43	4.73
	12.28	12.22 \pm 0.136	0.637	0.245	99.51	11.01
	14.736	14.57 \pm 0.371	0.045	0.532	98.87	-3.68

Tablo 5.15. LONSURF® tablet analiz sonuçları TRI (n = 6)

	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$) $\pm\text{GA}^*$	Kesinlik		Doğruluk	
			SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
YPSK	24	23.76 \pm 0.044	0.148	0.062	99.00	-4.06
	30	31.24 \pm 0.041	0.342	0.138	104.13	-4.62
	36	35.48 \pm 0.054	0.547	0.442	98.56	-5.33
LC-MS/MS	24	24.47 \pm 0.082	0.084	0.026	101.96	4.73
	30	30.22 \pm 0.136	0.435	0.102	100.73	11.01
	36	36.57 \pm 0.371	0.783	0.329	101.58	-3.68

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sıvı kromatografisi, ilaç endüstrisinde etkili bir şekilde kullanılan enstrümental bir tekniktir. İlaç endüstrisinin yanı sıra tıp, çevre, gıda ve tarım gibi birçok alanda kalitatif ve kantitatif sonuçlar almak için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ve hassasiyetinden dolayı oldukça güvenilir ve uygulanabilir sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu ayırma tekniğinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte analiz yapılabilmesi için gerek çözelti hazırlama kısmında gerek de analiz kısmında kullanılan sarf malzemelerin de aynı yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Sıvı kromatografisi tekniği sabit faz ve hareketli faz arasındaki etkileşime dayalı bir ayırma tekniğidir. Bu nedenle sabit fazın da önemi unutulmamalı. Sabit fazın önemiyle birlikte kolon teknolojisi de gün geçtikçe gelişmekte olan bir teknolojidir. Sıvı kromatografisinin diğer önemli unsuru olan dedektörler yine günümüz teknolojisiyle birlikte çok farklı alanlarda deteksiyon gerçekleştirilmektedir. Çalışmalarda hangi dedektör sisteminin kullanılacağını saptamak için hedef maddenin kimyasal özellikleri ön plana çıkmaktadır. Özellikle çoğu ilaç moleküllerinin kromofor gruplara sahip olmaları nedeniyle HPLC tekniği sık kullanılmaktadır. Bunun yanısıra sıvı kromatografisinde kullanılan LC-MS/MS sistemleri oldukça yüksek seçicilik, hassasiyet ve daha düşük tayin ve deteksiyon limitlerinde çalışma imkanları ile kullanımı cazip hale gelmektedir. Bu nedenle analizlerde gerek HPLC yöntemi gerek kütle spektrometrisi yöntemi çoğunluk olarak kullanılmaktadır. Gerek duyulduğunda her ikisi de birlikte birbirini tamamlayıcı olarak kullanılabilir. Bu iki sistemle aynı koşullar altında ve aynı madde veya maddeler analiz edilebiliyorken aynı zamanda maddelerin bozunma ürünlerini belirlemede birbirini destekleyerek daha güvenilir , hassas ve seçiciliği iyi olan sağlam sonuçlar elde edilebilmektedir.

Sıvı kromatografisi temelde ayırım tekniği olarak bilinse de analitlerin kalitatif ve kantitatif bakımdan da analizleri güvenilir şekilde yapılmaktadır. Bu sayede ilaç etken maddelerinin sentezlenmesinde ve ilaçların üretiminde, depolanmasında, sevkiyatında ve eczanelerde raflarda bulunma şartlarına kadar bütün koşullar test edilerek analizleri bu iki yöntem ile yapılmaktadır. Bu şekilde etkin olarak kullanılan sıvı kromatografisi yöntemi teknolojiyle birlikte devamlı olarak ilerleme göstermektedir. Bunun göstergelerinden bir tanesi de yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi etkin şekilde kullanılıyor olmasıdır. Analiz sonrasında veri işleme yazılımı ile 0.0000 basamağında molekül kütlesi ile kalitatif veri sunan bu spektrometre, seçilen bir iyonu daha alt yavru

iyonlarına parçalayarak hedef molekülün açık formülünü ortaya çıkarıp tasarlandırılmasına imkan sağlamaktadır. Tekniğin şu an için benzer parçalanmış iyonlar üreten hidrokarbonları açık formüllerinin tespiti, optik ve geometrik izomerlerin tayini, aromatik halkadaki o-, m- ve p- dallanma pozisyonlarını birbirinden ayrılması ve analitin iyonlaşabilmesi gibi zayıf noktaları vardır. Ancak yine de kalitatif analizlerde oldukça güvenilir sonuçlar vermesi ile az madde sarfıyatı ve analizcinin deneysel iş yükünü çok azaltması ile ilaç analizlerinde önemlidir.

Hedeflenen bir analiz için analizcinin her zaman aklında tutması gereken iki önemli nokta vardır: Analitin kimyasal özellikleri ve analizin yapılacağı matris ortamı. Bu iki nokta analiz yönteminin türünü ve uygulanacak prosedürlerin yol haritasını çizecektir. Bu iki nokta aynı zamanda analizcinin hem özgürlüğünü hem de sınırlarını belirleyecektir. Bunlara istinaden analize başlamadan önce hedef bileşiğe ve matrise daha yakından bakmakta ve gerçekleşen kimyasal olayları az ya da çok öngörebilmek analizcinin işini kolaylaştıracaktır.

Çalışmada TIP ve TRI kromofor gruplarının absorpsiyonunun çok şiddetli olmaması nedeniyle HPLC/UPLC ile elde tayin sınırları nispeten yüksektir. Ancak kütle dedektöründeki iyonlaşma karakteristikleri oldukça şiddetli olmuş ve ng/mL seviyesinde tayin sınırlarına imkân vermiştir. Ayrıca kütle dedektöründe iyonlaşma özelliği ürettiği bozunma ürünlerine karakterize olup kalitatif analizi başarılı şekilde yapılabilmektedir. Söz konusu çalışma günümüzdeki formülasyonların analizleri için gerekli bir farmasötik analiz metodunun sahip olması gereken özelliklere ve gerekliliklere güzel bir örnek olarak sunulmuştur.

KAYNAKÇA

- [1] Kaur, V., Kumar, M., Kumar, A., Kaur, K., Dhillon, V.S., Kaur, S. (2018). Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. *Biomed Pharmacother*, 97, 564-586.
- [2] Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3 (6), 453-458.
- [3] Patel, P., Chen, E.I. (2012). Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 125.
- [4] Cabasag, C.J., Fagan, P.J., Ferlay, J., Vignat, J., Laversanne, M., Liu, L.H., Aa, M.A., Bray, F., Soerjomataram, I. (2022). Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development Index using GLOBOCAN 2020. *International Journal of Cancer*,
- [5] Popescu, G.D.A., Scheau, C., Badarau, I.A., Dumitrache, M.D., Caruntu, A., Scheau, A.E., Costache, D.O., Costache, R.S., Constantin, C., Neagu, M., Caruntu, C. (2020). The Effects of Capsaicin on Gastrointestinal Cancers. *Molecules*, 26 (1)
- [6] Yao, X., Ajani, J.A., Song, S. (2020). Molecular biology and immunology of gastric cancer peritoneal metastasis. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 5, 57.
- [7] Perse, M., Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 473964.
- [8] Ricchi, P., Zarrilli, R., Di Palma, A., Acquaviva, A.M. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer*, 88 (6), 803-807.
- [9] Hermsen, M., Postma, C., Baak, J., Weiss, M., Rapallo, A., Sciutto, A., Roemen, G., Arends, J.W., Williams, R., Giaretti, W., De Goeij, A., Meijer, G. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology*, 123 (4), 1109-1119.
- [10] Borinstein, S.C., Conerly, M., Dzieciatkowski, S., Biswas, S., Washington, M.K., Trobridge, P., Henikoff, S., Grady, W.M. (2010). Aberrant DNA methylation occurs in colon neoplasms arising in the azoxymethane colon cancer model. *Mol Carcinog*, 49 (1), 94-103.
- [11] Valastyan, S., Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147 (2), 275-292.
- [12] Schetter, A.J., Okayama, H., Harris, C.C. (2012). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J*, 18 (3), 244-252.
- [13] Ren, A., Dong, Y., Tsoi, H., Yu, J. (2015). Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 16 (2), 2810-2823.
- [14] Jones, P.A., Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4), 683-692.
- [15] Zaniboni, A., Bertocchi, P., Barni, S., Petrelli, F. (2016). TAS-102 (Lonsurf) for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. A Concise Review. *Clin Colorectal Cancer*, 15 (4), 292-297.
- [16] White, T., Larson, H., Minnella, A., Hochster, H.S. (2017). Metastatic Colorectal Cancer: Management With Trifluridine/Tipiracil. *Clin J Oncol Nurs*, 21 (2), E30-E37.
- [17] Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3 (5), 330-338.

- [18] Peters, G.J. (2015). Therapeutic potential of TAS-102 in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Ther Adv Med Oncol*, 7 (6), 340-356.
- [19] Kang, C., Dhillon, S., Deeks, E.D. (2019). Trifluridine/Tipiracil: A Review in Metastatic Gastric Cancer. *Drugs*, 79 (14), 1583-1590.
- [20] Hoofnagle, J.H. (2013). LiverTox: a website on drug-induced liver injury, in *Drug-Induced Liver Disease* (s. 725-732). Elsevier.
- [21] yasaswini, R.S., Annapurna, M.M., Pratyusha, S.M. (2020). Simultaneous spectrophotometric determination of Tipiracil and Trifluridine. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13 (4)
- [22] Mastanamma, S., Nagaraju, K., Reehana, S., Radhakrishnaveni, V. (2019). Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Trifluridine and Tipiracilin Bulk and their Combined Dosage form. *International Journal of ChemTech Research*, 12 (04), 117-126.
- [23] O'Neill, M. (2006): The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Whitehouse Station, New Jersey: Merck Research Laboratories, Division of Merck and Co. Inc.
- [24] Carmine, A.A., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S. (1982). Trifluridine: a review of its antiviral activity and therapeutic use in the topical treatment of viral eye infections. *Drugs*, 23 (5), 329-353.
- [25] Puthiamadathil, J.M., Weinberg, B.A. (2017). Emerging combination therapies for metastatic colorectal cancer - impact of trifluridine/tipiracil. *Cancer Manag Res*, 9, 461-469.
- [26] Marcus, L., Lemery, S.J., Khasar, S., Wearne, E., Helms, W.S., Yuan, W., He, K., Cao, X., Yu, J., Zhao, H., Wang, Y., Stephens, O., Englund, E., Agarwal, R., Keegan, P., Pazdur, R. (2017). FDA approval summary: TAS-102. *Clin. Cancer Res.*, 23(12),2924-2927.
- [27] Heidelberger, C., Parsons, D.G., Remy, D.C. (1964). Syntheses of 5-Trifluoromethyluracil and 5-Trifluoromethyl-2'-deoxyuridine. *J Med Chem.*, 7,1-5.
- [28] Eckstein, J.W., Foster, P.G., Finer-Moore, J., Wataya, Y., Santi, D.W. (1994). Mechanism-based inhibition of thymidylate synthase by 5-(trifluoromethyl)-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate. *Biochemistry*, 33(50).15086-15094.
- [29] Aherne, G.W., Hardcastle, A., Raynaud, F., Jackman, A.L. (1996). Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition. *Biochem Pharmacol.*, 51(10),1293-1301.
- [30] Webley, S.D., Welsh, S.J., Jackman, A.L., Aherne, G.W. (2001). The ability to accumulate deoxyuridine triphosphate and cellular response to thymidylate synthase (TS) inhibition. *Br J Cancer*, 85 (3), 446-452.
- [31] Emura, T., Nakagawa, F., Fujioka, A., Ohshimo, H., Kitazato K. (2004). Thymidine kinase and thymidine phosphorylase level as the main predictive parameter for sensitivity to TAS-102 in a mouse model. *Oncol. Rep.*, 11(2),381-387.
- [32] Markley, J.C., Chirakul, P., Sologub, D., Sigurdsson, S.T. (2001). Incorporation of 2'-deoxy-5-(trifluoromethyl)uridine and 5-cyano-2'-deoxyuridine into DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11(18),2453-2455.
- [33] Temmink, O.H., Emura, T., de Bruin, M., Fukushima, M., Peters, G.J. (2007). Therapeutic potential of the dual-targeted TAS-102 formulation in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Cancer Sci.*, 98(6),779-789.
- [34] Suzuki, N., Emura, T., Fukushima, M. (2011). Mode of action of trifluorothymidine (TFT) against DNA replication and repair enzymes. *Int. J. Oncol.*, 39(1),263-270.

- [35] Hefnawy, M., Alzamil, A., Abuelizz, H., AlShehri, M. (2019). New bioanalytical microemulsion Electrokinetic chromatography method for the simultaneous determination of Trifluridine with its metabolites and Tipiracil in rat plasma: Application to pharmacokinetic studies. *Saudi Pharm J*, 27 (8), 1075-1084.
- [36] Maneka, S.L., Saravanakumar, R.T., Anjana, C.K.V.L.S.N. (2021). Development of Stability-Indicating UPLC Method for the Simultaneous Determination Of Tipiracil and trifluridine In Formulation. *IJPSR*, 12 (7), 3701-3708.
- [37] Mainaaz, S.H.R., Bhameshan, K.M., Sultana, A. (2017). Analytical method development and validation for the simultaneous determination of tipiracil and trifluridine in bulk and capsule dosage form by RP-HPLC method. *Int J Innov Pharm Sci Res*, 5 (9), 32-42.
- [38] Mohammad, A.S., Ahmad, F., Jayanthi, B. (2020). Method Development and Validation for the Quantitation Of Trifluridine In Human Plasma by Using LC-MS/MS Technique. *IJPSR*, 11 (7), 3252-3259.
- [39] Ch, P.R.S., Prasad, K.R.S., Mallu, U.R. (2017). New Bio Analytical Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Trifluridine and Tipiracil in spiked human plasma. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10 (12)
- [40] Harris, D.C. (2004). *Exploring chemical analysis*. Macmillan.
- [41] Harwood, L.M., Moody, C.J. (1989). *Experimental organic chemistry*. Blackwell Scientific.
- [42] Hansen, S.H., Pedersen-Bjergaard, S. (2015). Bioanalysis of Pharmaceuticals.
- [43] Al-Ghannam, S.M., Al-Olayan, A.M. (2019). Stability-indicating HPLC method for the determination of nifedipine in capsules and spiked human plasma. Identification of degradation products using HPLC/MS. *Arabian journal of chemistry*, 12 (8), 1983-1993.
- [44] Junwal, M., Sahu, A., Handa, T., Shah, R.P., Singh, S. (2012). ICH guidance in practice: Degradation behaviour of oseltamivir phosphate under stress conditions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 62, 48-60.
- [45] Murthy, M.V., Srinivas, K., Kumar, R., Mukkanti, K. (2011). Development and validation of a stability-indicating LC method for determining Palonosetron hydrochloride, its related compounds and degradation products using naphthaethyl stationary phase. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56 (2), 429-435.
- [46] Gavin, P.F., Olsen, B.A. (2008). A quality by design approach to impurity method development for atomoxetine hydrochloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 46(3), 431-441.
- [47] Sari, P., Razzak, M., Tucker, I.G. (2004). Rapid, simultaneous determination of levamisole and abamectin in liquid formulations using HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 27 (2), 351-364.
- [48] Kirkland, J.J. (2004). Development of some stationary phases for reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1060(1-2), 9-21.
- [49] Poole, C. (2013). *Liquid Chromatography: Chapter 2. Derivatization in Liquid Chromatography*. Elsevier Inc. Chapters.
- [50] Nageswari, A., Reddy, K.V.S.R.K., Mukkanti, K. (2012). Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinib Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 66,109-115.

- [51] Gritti, F., Guiochon, G. (2013). Realization and potential advantages of gradient separations performed under steady state temperature regime. *Journal of chromatography A*, 1291,104-113.
- [52] Scott, K.J., Hart, D.J. (1993). Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC—2: Column temperature. *Food chemistry*, 47(4), 403-405.
- [53] Heinisch, S., Rocca, J.L. (2009). Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 16(4), 642-658.
- [54] Chitturi, S.R., Somannavar, Y.S., Peruri, P.G., Nallapati, S., Sharma, H.K., Budidet, S.R., Handa, V.K., Vurimindi, H.B. (2011). Gradient RP-HPLC method for the determination of potential impurities in atazanavir sulfate. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(1), 31-47.
- [55] Bryant, D.K., Kingswood, M.D., Belenguer, A. (1996). Determination of liquid chromatographic peak purity by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 721(1), 41-51.
- [56] Silvio, A., Giorgio, G. (2012). Forced degradation study of thiocolchicoside: characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 61, 215-223.
- [57] De Spiegeleer, B.J., D'Hondt, M., Vangheluwe, E., Vandercruyssen, K., De Spiegeleer, B.V., Jansen, H., Koijen, I., Van Gompel, J. (2012) Relative response factor determination of β -artemether degradants by a dry heat stress approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 70, 111-116.
- [58] Hanco, V.P., Rohrer, J.S., Liu, H.H., Zheng, C., Zhang, S., Liu, X., Tang, X. (2008). Identification of tobramycin impurities for quality control process monitoring using high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(4-5), 828-833.
- [59] Hatrak, S., Lehotay, J. (2006). Optimization of the Detection Wavelength Applied to the HPLC Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of liquid chromatography*, 2833-2844.
- [60] Raposo, F. (2016). Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 167-185.
- [61] Kissinger, P.T., Refshauge, C., Dreiling, R., Adams, R.N. (1973). An Electrochemical Detector for Liquid Chromatography with Picogram Sensitivity. *Analytical Letters*, 6 (5), 465-477.
- [62] Chen, X.F., Wu, H.T., Tan, G.G., Zhu, Z.Y., Chai, Y.F. (2011). Liquid chromatography coupled with time-of-flight and ion trap mass spectrometry for qualitative analysis of herbal medicines. *J Pharm Anal*, 1 (4), 235-245.