



**ALEKTİNİB TAYİNİ İÇİN SIVI KROMATOĞRAFİK METOT
GELİŞTİRİLMESİ, VALİDASYONU VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Serkan LEVENT

Eskişehir 2024

**ALEKTİNİB TAYİNİ İÇİN SIVI KROMATOĞRAFİK METOT
GELİŞTİRİLMESİ, VALİDASYONU VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU**

Serkan LEVENT

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat 2024

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2208S156 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

ALEKTİNİB TAYİNİ İÇİN SIVI KROMATOĞRAFİK METOT GELİŞTİRİLMESİ, VALİDASYONU VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Serkan LEVENT

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Şubat 2024

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

İlaç ürünlerinde kalite doğrudan ürün ile ilişkili olup kaliteyi belirleyen en önemli faktör çeşitli üretim basamaklarında yapılan analizlerdir. Kalite zincir halkalarının birleşmesi gibidir ve herhangi bir zayıf halka kalitede yetersizlik anlamına gelir. Literatürde ilaç analizleri ve yöntemleri ile ilgili birçok veri ve öneri mevcuttur. Söz konusu bu çalışmada gelişen analiz tekniklerine ayak uydurulamaya çalışılarak önemli bir ilaç etkin maddesi için analiz yöntemi önerilmiştir. Alektinibin farmasötik formülasyonlarda analizi için bir sıvı kromatografisi tekniği oluşturulmuştur. Analitik yöntemi optimize etmek için üç seviyeli Box-Behnken yanıt yüzeyi tasarımı kullanılmıştır. Optimize edilmiş analitik yöntem, doğrusallık, hassasiyet, doğruluk ve kesinlik ve sağlamlık içeren ICH kılavuzlarına göre doğrulanmıştır. Ayrıca, valide edilmiş yöntemin etkin maddenin bozunma ürünlerine karşı duyarlılığı, stres kaynaklı bozunma çalışmaları ile doğrulanmıştır. LCMS-IT-TOF çalışmaları ile bozunma ürünlerinin tamamı karakterize edilmiştir. Ayrıca, onaylanmış yöntem, Alecense® formülasyon miktarını tahmin etmek için başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemlerin yeşillik değerlendirmesi NEMI, Analitik Eko-ölçek, AGREE ve GAPI kullanılarak değerlendirilmiştir. Formülasyonların içerik maddelerinin etkin maddenin alıkonma sürelerine herhangi bir müdahalesi gözlenmemiştir.

Anahtar Sözcükler: Alektinib, Bozunma ürünü, LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF, Farmasötik uygulama, HPLC.

ABSTRACT

DEVELOPMENT, VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF ALECTINIB AND CHARACTERIZATION OF ITS DEGRADATION PRODUCTS

Serkan LEVENT

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institute of Graduate Schools, February 2024

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Quality in pharmaceutical products is directly related to the product, and the most important factor determining quality is the analyses performed at various production stages. Quality is similar to the joining of chain links, and any weak link means lack of quality. There are numerous data and recommendations in the literature regarding drug analyses and methods. In this study, an analysis method was proposed for a significant pharmaceutical active ingredient by trying to keep up with the developing analysis techniques. A robust liquid chromatography technique has been established for the analysis of alectinib in pharmaceutical formulations. A three-level Box-Behnken response surface design with the highest affinity was used to optimize the analytical method. The optimized analytical method was validated against ICH guidelines, which include linearity, sensitivity, accuracy and precision, and robustness. Additionally, the sensitivity of the validated method to the degradation products of the active ingredient was confirmed by stress-induced degradation studies. All the degradation products were characterized by LCMS-IT-TOF studies. Additionally, the validated method has been successfully applied to estimate the amount of Alecense® formulation. Moreover, the greenness evaluation of the developed method was evaluated using NEMI, Analytical Eco-scale, AGREE and GAPI. No interference of the ingredients of the formulations with the retention times of the active ingredient was observed. development.

Keywords: Alectinib, Degradation product, LC-MS/MS, LCMS-IT-TOF, Pharmaceutical application, HPLC.

TEŞEKKÜR

Şubat, 2024

Doktora eğitimim boyunca bölüm içinde ve dışında her türlü imkan ve desteği veren tez danışmanım Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Eskişehir'e geldiğim günden itibaren bana sağlamış olduğu sonsuz katkı için hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY'a,

Bu tez çalışmasının her basamağında çok büyük katkısı olan ve katkıları sadece bu tezle sınırlı olmayan sevgili arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Saniye ÖZCAN'a,

Tanıştığımız günden beri sürekli yanımda olan sevgili oda arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Derya OSMANİYE ve Doç. Dr. B. Nurpelin SAĞLIK ÖZKAN'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimlerini esirgemeyen ve gerekli şartları sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı ve Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nın çok kıymetli öğretim üyelerine,

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Abeer ELRİŞ'e,

Ve

Son olarak her zaman yanımda olan sevgili ailem ve çok kıymetli eşim Medine'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum....

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 aşamalarında 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 programı”yla 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 sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	4
2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	4
2.2. Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK).....	6
2.3. Alektinibin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	7
2.4. Alektinibin Etki Mekanizması.....	8
2.5. Alektinibin Farmakokinetik Özellikleri.....	9
2.6. Alektinibin Farmakodinamik Özellikleri.....	10
2.7. Alektinib Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler.....	11
2.8. Deneysel Tasarım	17
2.8.1. Tarama tasarımları.....	21
2.8.2. Yanıt yüzey tasarımları.....	22
2.9. Kemometride Matematiksel Modelleme	23
2.10. Kemometrik Tasarımın Uygulamaları.....	26
2.10.1. Kemometri ve DoE	28
2.11. Farmasötik Analizlerde Moleküler Docking.....	31
2.12. Yeşil Kimya	34

2.12.1. Yeşil analitik kimya için metrikler	36
2.12.2. Ulusal Çevresel Yöntem Endeksi: NEMI	38
2.12.3. Analitik Eko Ölçek	38
2.12.4. Yeşil Analitik Prosedür Endeksi: GAPI	41
2.12.5. Analitik Yeşillik Hesaplayıcı: AGREE	44
3. GEREÇLER	49
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler	49
3.2. Kullanılan Cihazlar	49
3.3. Kullanılan Sabit Fazlar	50
4. YÖNTEMLER	51
4.1. Deneysel Parametreler	51
4.1.1. Enstrümental parametreler	51
4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı	52
4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı	52
4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı	53
4.1.5. Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı	53
4.1.6. Bozunma ürünleri için moleküler docking çalışmaları	54
4.1.7. DoE çalışmaları	54
4.1.8. Sonuçların değerlendirilmesi	55
4.1.9. Yöntem geçerliliğinin tespiti	55
4.1.9.1. Sistem uygunluk testleri	56
4.1.9.2. Seçicilik ve spesifiklik	57
4.1.9.3. Kararlılık	57
4.1.9.4. Doğrusallık	58
4.1.9.5. Doğruluk	58
4.1.9.6. Kesinlik	58
4.1.9.7. Teşhis ve tayin alt sınırı	59

4.1.9.8. Sağlamlık	59
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
5.1. Alektinibin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi	62
5.2. NMR spektroskopisi tekniği ile ALEK'in ¹ HNMR spektrumlarının tespiti.....	63
5.3. IR spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu	65
5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme	66
5.4.1. DoE Çalışmaları	70
5.5. Kütle Dedektöründe ALEK İyonlaşma Karakteristiği	79
5.6. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme.....	83
5.6.1. ALEK'in hızlı bozundurma koşullarında davranışları	88
5.7. Bozunma Ürünlerine Ait Moleküler Docking Çalışmaları.....	108
5.8. Yöntem Geçerliliğinin Tayini	113
5.9. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması	120
5.10. Geliştirilen Yöntemin Yeşillik Değerlendirilmesi	123
5.10.1. Geliştirilen yöntemin ulusal çevresel yöntem endeksi: NEMI.....	123
5.10.2. Geliştirilen yöntemin analitik eko ölçeği	124
5.10.3. Metodun yeşil analitik prosedür endeksi: GAPI.....	125
5.10.4. Geliştirilen metodun analitik yeşillik hesabı:AGREE	126
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	129
ÖZGEÇMİŞ	139

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. <i>Sıvı kromatografisinde deneysel tasarımlar ve alanlar</i>	19
Tablo 2.2. <i>Tarama tasarımlarının avantaj ve dezavantajları</i>	21
Tablo 2.3. <i>Kemometrinin geleneksel yaklaşımlara göre avantajları</i>	27
Tablo 2.4. <i>Yaygın kullanılan bazı çözücüler ve reaktifler için tehlike PP'leri</i>	40
Tablo 2.5. <i>Sık kullanılan bazı alet ve proseslerin ceza puanları</i>	41
Tablo 2.6. <i>GAC'ye dayalı olarak puan atamak için AGREE prosedürü</i>	45
Tablo 3.1. <i>Kullanılan sabit fazların özellikleri</i>	50
Tablo 4.1. <i>Optimize LC-MS/MS koşulları</i>	51
Tablo 4.2. <i>Hızlı bozundurma koşulları</i>	53
Tablo 4.3. <i>Farmasötik formülasyonlarda ALEK'i belirlemek için Box-Behnken tasarımı</i> <i>tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin kodları, aralıkları ve ilgili seviyeleri</i>	54
Tablo 4.4. <i>SUT parametrelerinin sınırları</i>	56
Tablo 4.5. <i>USP'ye SUT parametrelerinin formülleri</i>	56
Tablo 5.1. <i>Deneysel olarak sabit fazlardan elde edilen SUT verileri</i>	70
Tablo 5.2. <i>Üç seviyeli Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak yöntem optimizasyonuna yönelik deneysel çalışmaların özeti</i>	71
Tablo 5.3. <i>Box-Behnken tasarımının varyans analizi (ANOVA) sonuçları</i>	72
Tablo 5.4. <i>Optimizasyon sonucu beklenen ve gözlenen yanıt değerleri.</i>	77
Tablo 5.5. <i>ALEK analizi için elde edilen SUT verileri</i>	78
Tablo 5.6. <i>ALEK'in pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları</i>	80
Tablo 5.7. <i>Çeşitli stres koşullarında ALEK'in elde edilen bozunma ürünleri</i>	88
Tablo 5.8. <i>Bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile karakterizasyonu</i>	97
Tablo 5.12. <i>Metot sağlamlık çalışmaları (n=3)</i>	118
Tablo 5.13. <i>ALEK standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)</i>	119
Tablo 5.14. <i>Alecense® formülasyonu sonuçları (n=6)</i>	121
Tablo 5.15. <i>Geliştirilen LC-PDA yöntemin analitik eko ölçeği</i>	124
Tablo 5.16. <i>Geliştirilen yöntemin GAPI'si</i>	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. ALK'nin keşfi ve ALK-TKI'ların ABD FDA onayı zaman çizelgesi.....	7
Şekil 2.2. ALEK'in molekül yapısı.....	8
Şekil 2.3. KHDAK'de ALK yeniden düzenleme hedefli kanser tedavisi.	9
Şekil 2.4. Deneysel tasarımların sınıflandırılması	18
Şekil 2.5. Deneysel tasarımlarda MLR modelleme şeması	28
Şekil 2.6. QbD odaklı kromatografik yöntem geliştirmede önemli adımlar	30
Şekil 2.7. Yeşil Analitik Kimyanın 12 ilkesi	36
Şekil 2.8. Yeşil analitik kimyada kullanılabilecek seçilmiş metrikler	37
Şekil 2.9. GAPI piktogramındaki farklı pentagramların açıklaması.....	42
Şekil 5.1. ALEK'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (50,0 µg/mL).	62
Şekil 5.2. ALEK'e ait ¹ H NMR spektrumu	64
Şekil 5.3. ALEK'e ait ¹³ C NMR spektrumu	65
Şekil 5.4. ALEK'e ait IR Spektrumu	66
Şekil 5.5. ALEK çözeltisinin farklı kolonlardaki LC-MS/MS kromatogramları ...	69
Şekil 5.6. Genel isteklilik için kontur, 3D yüzey ve etkileşim grafikleri.	76
Şekil 5.7. ALEK için ana iyon ve baskın parçalanma yolları	82
Şekil 5.8. ALEK'e ait kütle atlası.....	86
Şekil 5.9. ALEK'in MS ⁿ karakterizasyonu	87
Şekil 5.10. ALEK'in sıcaklık şartlarındaki PDA ve MS kromatogramları	89
Şekil 5.11. ALEK'in fotolitik şartlardaki PDA ve MS kromatogramları	90
Şekil 5.12. ALEK'in asidik şartlardaki PDA ve MS kromatogramları	92
Şekil 5.13. ALEK'in alkali şartlardaki PDA ve MS kromatogramları	94
Şekil 5.14. ALEK'in oksidatif şartlardaki PDA ve MS kromatogramları.....	96
Şekil 5.15. Alektinib Morfolin Azot N-oksit'e ait kütle atlası.....	99
Şekil 5.16. Alektinib Azot N-oksit'e ait bozunma mekanizması ve MS ⁿ yolağı ...	100
Şekil 5.17. YB1'e ait kütle atlası.....	101
Şekil 5.18. YB1'e ait bozunma yolağı	102
Şekil 5.19. Alektinib De-karboksilat safsızlığına ait kütle atlası.....	103
Şekil 5.20. Alektinib De-karboksilat safsızlığı	104
Şekil 5.21. YB2'ye ait kütle atlası.....	105
Şekil 5.22. YB2'ye ait bozunma yolağı	106

Şekil 5.23. YB3 için kütle atlası.....	107
Şekil 5.24. YB3'e ait bozunma yolağı ve MS ⁿ karakterizasyonu	108
Şekil 5.25. ALEK ve bozunma ürünlerinin PDB ID:5XV7 ile etkileşim pozları .	110
Şekil 5.26. ALEK ve Alektinib N-oksit bileşiklerinin üst üste çakıştırılmış pozu	111
Şekil 5.27. ALEK ve YB-1 moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu	111
Şekil 5.28. ALEK ve YB-2 moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu	112
Şekil 5.29. ALEK ve YB-3 moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu	112
Şekil 5.30. ALEK ve De-karboksilat moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu .	113
Şekil 5.31. Alecense® numune çözeltisinin MS ve HPLC kromatogramları	122
Şekil 5.32. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun NEMI piktogramı	123
Şekil 5.33. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun GAPI piktogramı.....	126
Şekil 5.34. Geliştirilen yöntemin AGREE piktogramı	127

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALEK	: Alektinib
AGREE	: Analytical Greenness Calculation Metric (Analitik Yeşillik Hesaplama Metriği)
AMVI	: Analytical Method Volume Intensity (Analitik Yöntem Hacim Yoğunluğu)
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Konsantrasyon
CDL	: Curved Desolvation Line (Kavisli Desolvasyon Hattı)
CHEMS-1	: Yönetim Stratejileri için Kimyasal Tehlike Değerlendirmesi
CID	: Çarpışma ile İndüklenen Ayrışma
C ₈	: Oktildimetilsilan
C ₁₈	: Oktadesilmetilsilan
DBE	: Double Bond Equivalent (Çift Bağ Eşdeğeri İndeksi)
DSM	: Diagnostic and Statistical Manual (teşhis ve İstatistik El Kitabı)
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GAPI	: Yeşil Analitik Prosedür Endeksi
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 (Uluslararası Uyum Komitesi)
IR	: Kızılötesi
ID	: İç çap
IT	: İyon Tuzağı
IT-TOF-MS	: İyon Tuzaklı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
K	: Kapasite faktörü
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

QbD	: Tasarımla kalite
LCA	: Yaşam Döngüsü Değerlendirmesi
LCMS-IT-TOF	: Sıvı Kromatografisi Hibrit İyon Tuzağı/Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme Modu
MS	: Kütle Spektrometresi
N	: Teorik Plaka Sayısı
NEMI	: Ulusal Çevre Yöntemleri Endeksi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	: Oktadesil Silika
PFS	: Progresyonsuz sağkalım
RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
R_s	: Ayırım Gücü
S_1	: Ara Kesinlik Varyansı
S_r	: Tekrarlanabilirlik Varyansı
SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
T	: Kuyruklanma Faktörü
TOF	: Time of Flight (Uçuş Süresi)
TRI	: Toksik madde salınım envanteri
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan
USP	: United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)
YB1	: Yeni bozunma ürünü 1
YB2	: Yeni bozunma ürünü 2
YB3	: Yeni bozunma ürünü 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kromatografi, karmaşık karışımlardan kimyasalların saflaştırılması için sıklıkla kullanılan sofistike bir yöntemdir. Kromatografik saflığın değerlendirilmesi, herhangi bir referans standardı için önemli bir kalite göstergesi olarak belirlenmiştir. Amaç, gerekli analitlerin safsızlıklardan etkili bir şekilde izole edilmesi amacıyla güvenilir bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniği geliştirmektir. Bu safsızlıklar ilgili kimyasalları, doğal kirleticileri ve benzer kimyasal özellikleri paylaşan ve depolama sırasında oluşma potansiyeli olan proses veya stres kaynaklı safsızlıkları içerebilir. LC yöntemlerinin basit bir şekilde geliştirilmesinin aksine, kararlılığı gösteren tahlil yöntemlerinin geliştirilmesi artan karmaşıklıkla karakterize edilir. Bu karmaşıklık, çalışma boyunca çeşitli stres koşulları altında oluşan bilinmeyen birkaç bozucunun ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Hedef kimyasal ve kirleticiler arasında optimum ayırımı elde etmek için birçok parametrenin dikkatlice ayarlanması ve çok değişkenli istatistiksel optimizasyon tekniklerinin kullanılması gerekir.

Bir olguyu tanımlamak veya yorumlamak için modellemek, insan düşüncesinin ötesinde anlaşılma sağlar. Genel olarak kullanılan iki temel model türü teorik ve ampiriktir. İlkinden farklı olarak ampirik modeller herhangi bir teorik temele bağlı olmayıp veriye dayalıdır. Kimyasal sistemler veya süreçler üzerinde yapılan ölçümleri matematiksel ve istatistiksel modellemenin uygulanması yoluyla bunların durumlarıyla ilişkilendiren bilim olan kemometri çağdaş analitik kimyada iyi tanınan bir alt disiplin haline geldi. Çeşitli değişkenlerin yönlendirdiği sıvı kromatografisi analitik stratejilerindeki ilerlemeler, analitik ölçümler sırasında büyük miktarda veri sağlar. HPLC, geniş uygulama yelpazesine sahip çok yönlü bir ayırma tekniği olmasına rağmen, her çalıştırmadan önce uygun şekilde ayarlanması gereken çok sayıda değişken nedeniyle süreç bazen kritik öneme sahiptir. Sonuç olarak bu tür yöntemlerin daha derinlemesine anlaşılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Uygun istatistiksel analize sahip kemometrik araçlar, birçok avantaj sayesinde popüler hale gelmiştir. HPLC yöntemlerinin optimizasyonunda istenen ayırımların elde edilmesinde çeşitli değişkenler eşzamanlı olarak kontrol edilmesi gerektiğinden karmaşık bir süreçtir. Bu nedenle değişkenlerin istenen kromatografik yanıtlar üzerindeki etkilerinin istatistiksel değerlendirme kapasitesi çok önemli yardımcı araçtır.

HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi, analistin uzmanlığı, bilgisi ve bilgeliğiyle desteklenen deneme yanılma yaklaşımıyla sürdürülmektedir. Yöntemin optimizasyonu

her seferinde bir faktörü değiştirirken diğerlerini sabit tutmayı içerir. Böylece istenen ayırım sağlanır ancak gerçek optimal koşullar hakkında sağlıklı bir fikir vermemektedir. Bu yaklaşım yalnızca zaman, para ve iş gücü açısından yk değil aynı zamanda hataları düzeltmek için kritik, öngörülemeyen ve hatta yetersiz olduğuna dair öngörülerde mevcuttur (Singh vd., 2005). Tek bir kromatografik koşul, kromatografik süreci etkileyen tüm faktörlere ilişkin yeterli bilgiyi karşılayamaz. Bu zorluğun üstesinden gelmek için çok sayıda değişkenin dikkatle tanımlanması, araştırılması ve kontrol edilmesi gereklidir. Deneysel değişkenlerin birbirine kenetlenmesi ve her birinin teker teker ayarlanması çok fazla ham veri üretmektedir. Bu da gerçek bir optimal sisteme ulaşmada daha sabit ve kısıtlanmış bir bakış açısı sunar. Kemometrik bir deney tasarımı, deneyleri sınırlı sayıda deneyle verimli bir şekilde modelleneceği şekilde planlayarak bu sorunun üstesinden gelebilir. Tasarımın temel amacı genellikle faktörlerin ve bunların etkileşimlerinin kromatografik ayırma üzerindeki etkisini tahmin etmektir (Otto, 2016).

Stabilite, ilaç sektöründe ürünlerin kalitesini doğrudan etkileyen önemli bir husustur. Dr. Janet Woodcock’a göre kalite, etikette belirtildiği gibi kontaminasyonun olmaması ve kullanıcıya vaat edilen terapötik faydanın tutarlı bir şekilde sağlanması anlamına gelir. Stabilite, bir maddenin farklı çevresel koşullara maruz kaldığında bile raf ömrü boyunca tutarlı kalite ve tedavi edici faydalarını koruyabilme yeteneğini ifade eder. Terapötik ürünün etkinliği tüketilen ürünün stabilitesine ve doğru dozajda alınmasına bağlıdır. İstikrarsızlıklar ürünün geri çağrılmasına ve mali kayıplara uğramasına neden olabilir. Ürünün stabilitesini sağlama yükümlülüğü hem sağlık otoritelerine hem de üreticilere aittir. Yirmi birinci yüzyılda ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu gibi sağlık otoriteleri, ilaç ürünlerinin kalitesini tüm raf ömrü boyunca garanti etmek amaçlama kararı almış ve bir dizi uygulama getirmiştir. Burada en önemli nokta ise üretim her bir basamağında sürdürülebilir kalite anlayışı ve kritik noktalarda kontroldür. Kontrol ise doğru ve kesin sonuçlar veren analiz ile sağlanabilir. Bu nedenle ilaç analizleri literatürde önemli bir yere sahiptir. Ancak analizin kapsamı ve hedefi asıl konudur. İhtiyacı karşılayan, uygulanabilir, hızlı ve verimli metotlar analiz yükünü alacak özelliklerin başında gelir.

Literatürde etkin madde analizi için yapılan çalışmalar farmakokinetik analizleri karşılama amaçlı plazma analizleri ya da metabolit tayinleri olup analitik hedeflerin bir kısmını karşılamaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında yapılan çalışmada hedef ALEK’in farmasötik preparatlardan analizi için bozunma ürünleri varlığında tam olarak

metot geçerliliği sağlanmış, hızlı, yüksek doğruluğa sahip rutin analizlerde kullanıma sunulacak sıvı kromatografisi metodu geliştirmektir. Ayrıca etkin maddenin zorlu bozma koşullarına maruziyeti sonucu elde edilen bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile kalitatif olarak tayin edilmesidir. Geliştirilen yöntem rutin analiz ve kalite kontrol için uygun olacaktır. Yöntemin validasyonu Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre yapılmıştır.



2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, hem küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hem de küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), dünya çapında yılda 1,8 milyon ölümle kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (Thandra vd., 2021). Erkeklerde prostat kanserinden sonra ve kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci en yaygın kanser olarak kabul edilir ve 2018’de bu patolojiden kaynaklanan ölümler, dünya çapındaki tüm kanser ölümlerinin %18,4’ünü oluşturmaktadır (Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr/today>, Erişim tarihi; Aralık 2023). KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85’ini oluşturan bir akciğer kanseri türüdür ve hücrelerin türüne göre üç ana tipte sınıflandırılır (Ramos-Esquivel, 2022):

Adenokarsinom: Bu en yaygın KHDAK türüdür ve genellikle akciğerlerin dış kısımlarında gelişir. Genellikle sigara içmeyenlerde bulunur ve kadınlarda daha yaygındır.

Skuamöz hücreli karsinom: Bu tip KHDAK tipik olarak akciğerlerin merkezi hava yollarında ortaya çıkar. Sigara ile güçlü bir şekilde ilişkilidir.

Büyük hücreli karsinom: Bu daha az yaygın bir KHDAK türüdür ve akciğerlerin herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir. Hızlı büyüme ve yayılma eğilimindedir. Klinik alt tiplerin çeşitli kombinasyonları ve varyantları da vardır.

KHDAK için birincil risk faktörü sigara içmektir. Diğer risk faktörleri arasında pasif içiciliğe maruz kalma, belirli kimyasallara ve maddelere (asbest, krom, berilyum, ağır metaller ve radon gibi) maruz kalma, ailede akciğer kanseri öyküsü ve belirli genetik mutasyonlar yer alır. KHDAK’nin yaygın semptomları arasında inatçı öksürük, öksürükle kan tükürme, nefes darlığı, göğüs ağrısı, ses kısıklığı, açıklanamayan kilo kaybı ve tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları yer alır (Alduais vd., 2023).

Genellikle, KHDAK ileri bir duruma gelene kadar saptanamaz. Öksürük, hastaların %50 ila 75’inde ortaya çıkan en yaygın semptomdur, bunu hemoptizi, dispepsi ve göğüs ağrısı izler (Kocher vd., 2015). Pozitron emisyon tomografisi ve bilgisayarlı tomografi (BT), N-evreli tanının daha doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar. BT ve manyetik rezonans görüntüleme taramaları, küratif tedavi gören veya beyin metastazı belirtileri/semptomları sergileyen bireylerin beyinlerini görüntülemek için sıklıkla uygulanmaktadır (Darling vd., 2011). Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği, Amerikan Toraks Derneği ve Avrupa Solunum Derneği’nin yeni akciğer kanseri

sınıflandırmasına göre yeterli doku materyali toplamak da hayati önem taşımaktadır (Travis vd., 2010). Mutasyonları belirleme olasılığı ve kişiye özel tedavi, ilk muayene sırasında şüpheli tüm akciğer tümörleri için sonuçlar doğurur. Şu anda, pozitif prediktif değer (%2,4-7,5), akciğer kanserinin ana semptomlarından biri olan hemoptizi tahmin etmede en iyi tekniktir (Shim vd., 2014). Bunun dışında tümör DNA'sı, mikroRNA ve dolaşımdaki tümör hücreleri gibi kanser biyobelirteçlerini saptamak için bir sıvı biyopsi de kullanılır. Daha az müdahaleci bir yaklaşım olan dolaşımdaki tümör DNA testi ile tek başına doku analizine kıyasla biyobelirteç keşif oranlarını %48 artırmıştır (Alduais vd., 2023, Tokunaga vd., 2019). Kısaca; KHDAK tipik olarak görüntüleme testleri (göğüs röntgenleri ve BT taramaları gibi), biyopsiler (inceleme için küçük bir doku örneğinin alındığı) ve moleküler testlerin bir kombinasyonu ile teşhis edilir.

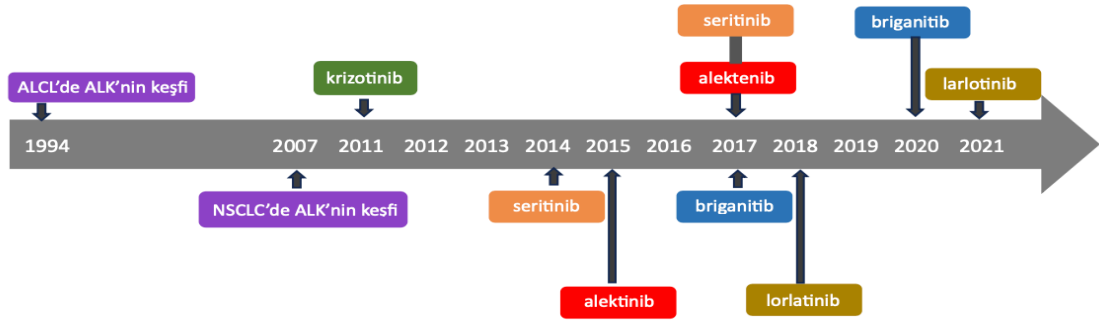
KHDAK için tedavi seçenekleri kanserin evresine bağlıdır ve cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiyi içermektedir. Hastanın genel sağlığına ve hastalık evresine bağlı olarak, KHDAK'nin I, II ve IIIA evreleri olan tıbbi olarak stabil hastaların küratif cerrahi eksizyonu kabul etmesi gerekir. 5 yıl sonra, yüksek nüks ve toksisite oranlarıyla ilgili büyük endişelere rağmen, evre II ila IIIA'daki hastalar için adjuvan platin bazlı kemoterapi önerilmektedir. Ayrıca evre III KHDAK hastalarının tedavisinde kemoterapi ve immünoterapi kullanılmaktadır. KHDAK için tedavi yaklaşımının, yeni araştırmalar ve klinik deneyler daha etkili tedavilere ilişkin içgörüler sağladıkça sürekli olarak gelişmekte olduğunu unutmamak önemlidir. Bu duruma en iyi örneklerden birisi KHDAK'li hastalarda sağkalımı iyileştirmek için moleküler hedefli tedavilerin sunulmasıdır. Son yıllarda, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi, hızlıca önemli gelişmeler elde etmektedir (Alduais vd., 2023).

2.2. Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK)

Anaplastik büyük hücreli lenfoma içindeki kromozomal translokasyonda bir füzyon partneri olarak Anaplastik Lenfoma Kinazın (ALK) ilk kez tanımlanması, Morris vd. tarafından 1994 yılında yapılmıştır (Morris vd., 1994). ALK, ALK geni tarafından kodlanan ve 2. kromozomda bulunan bir transmembran tirozin kinazdır. İnsülin reseptörleri üst ailesinin bir üyesidir. ALK ekspresyonunun sinir sisteminin gelişiminde rolü olduğu kabul edilmektedir (Ando vd., 2023). ALK, hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve hücre döngüsü ilerlemesi ile ilgili çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinden sorumludur (Soda vd., 2007). EML4-ALK füzyon geninden üretilen EML4-ALK füzyon proteini, doğal bir tirozin kinazın aktivasyonunu indükleyerek karsinogenez sürecini kolaylaştırır. ALK-TKI'lerin antineoplastik etkinliği, hücre içi tirozin kinaz alanı içinde yer alan ATP bağlama bölgesi ile etkileşimlerine, dolayısıyla sinyal iletim yollarını modüle etmelerine bağlanır. KHDAK vakalarının yaklaşık %70-80'inde sürücü mutasyonunun varlığı tespit edilmiştir (Chu, 2020). ALK yeniden düzenlemesinin meydana gelmesinin, KHDAK vakalarının kabaca %3-8'iyle bağlantılı olduğunu gösterilmiştir (Lucken vd., 2022, Zhuang vd., 2019). Bulgulara göre, ALK yeniden düzenlemesine sahip olma olasılığı daha yüksek olan kişiler genellikle daha genç yaşta, hiç sigara içmemiş veya hafif sigara içmiştir, adenokarsinom sergilemiştir ve merkezi sinir sisteminde metastaz yaşamaya daha yatkındır (Desai ve Lovly, 2023, Schneider vd., 2023).

ALK'nın kromozomal yeniden düzenlemesinin tanımlanması, KHDAK teşhisi konan bireylerin yaklaşık %5'ini içeren ayrı bir alt grubu karakterize eder (Soda vd., 2007). Yapılan çalışmalar hedefli bir ALK inhibitörü olan krizotinibin kullanımı, geleneksel kemoterapiye kıyasla progresyonsuz sağkalımda önemli bir iyileşme göstermiştir (Solomon vd., 2014). İlaç, 2012'de ikinci basamak tedavi olarak ve 2016'da birinci basamak tedavi olarak FDA'dan izin almıştır. O zamandan beri, ALK pozitif KHDAK hastaların ilk tedavisi için yerleşik bir bakım standardı haline gelmiştir (Herden ve Waller, 2018). Tedavinin kayda değer etkinliğine rağmen, hastaların önemli bir kısmında bir yıllık zaman çerçevesi içinde nüks görülür. Tedaviye direnç, ALK genindeki edinilmiş mutasyonlar veya alternatif sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla ortaya çıkabilir (Herden ve Waller, 2018, Muller vd., 2016). Krizotinibin kan-beyin bariyerini etkili bir şekilde geçme yeteneğinin sınırlı olmasına bağlanmaktadır (Yoshida vd., 2016). Göğüs dışı ilerlemenin, özellikle merkezi sinir sisteminde meydana gelmesi

ALK+KHDAC'de yaygındır. Bu nedenle, ikinci ve üçüncü nesil ALK inhibitörlerinin araştırılması, çağdaş araştırmalarda önemli bir öneme sahiptir. Seritinib, brigatinib ve alektinib (ALEK), ikinci nesil ALK inhibitörleri olarak sınıflandırılır. Ek olarak, artık erişilebilen lorlatinib gibi üçüncü nesil ALK inhibitörleri de vardır (Sullivan ve Planchard, 2016).



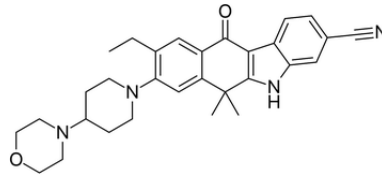
Şekil 2.1. ALK'nin keşfi ve ALK-TKI'ların ABD FDA onayı zaman çizelgesi. ALCL: anaplastik büyük hücreli lenfoma, NSCLC: küçük hücreli dışı akciğer kanseri (Fukui vd., 2022).

KHDAC'de ALK yeniden düzenlemeleri ile tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Çağdaş zamanlarda, ALK+KHDAC hastalarının prognozu, beş yıllık bir sağkalım oranını göstermektedir. Şu anda FDA, toplam beş anaplastik lenfoma kinaz tirozin kinaz inhibitörüne (ALK-TKI'lar) Şekil 2.1'de zaman çizelgesinde görüldüğü gibi onay verilmiştir. Ayrıca, bileşik ALK mutasyonlarını hedeflemek için özel olarak tasarlanmış ensartinib ve dördüncü nesil ALK-TKI gibi yeni ALK-TKI'ların etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için güncel klinik araştırmalar yürütülmektedir (Fukui vd., 2022).

2.3. Alektinibin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

ALEK, hepatik metabolizma yoluyla düşük sistemik klirensi, geniş dağılım hacmi ve orta derecede biyoyararlanımı olan lipofilik bazik bir bileşiktir (Morcos vd., 2017b). ALEK'in kimyasal yapısı (Şekil 2.2), 9-Etil-6,6-dimetil-8-(4-morfolin-4-ilpiperidin-1-il)-11-okso-5H-benzo[b]karbazol-3-karbonitril olup kimyasal formülü $C_{30}H_{34}N_4O_2$ şeklindedir. 482,628 g/mol olan nispeten yüksek bir molekül kütlesine sahiptir. Suda çözünürlüğü 0,0105 mg/mL olup çok düşüktür. Yine pH aralığında sulu tamponlarda düşük çözünürlüğe sahiptir. Dimetilsülfoksit içinde 2 mg/mL çözünürlüğe sahip olup

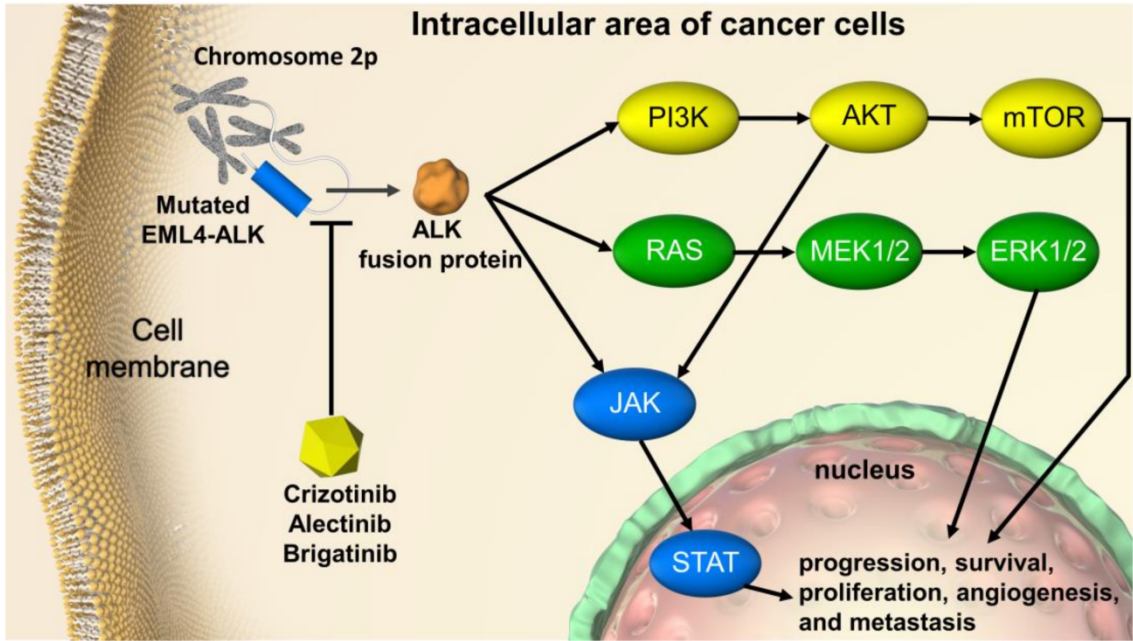
organik çözücülerde çözünürlüğü daha yüksektir (Tomar vd., 2019). Bu nedenle çözünmeyi ve klinik biyoyararlanımı en üst düzeye çıkarmak için ALEK, inaktif madde olarak fonksiyonel yardımcı madde sodyum lauril sülfat içeren 150 mg'lık güçlü sert kapsüller olarak formüle edilmiştir (Parrott vd., 2016). Bu kapsüllerde etkin madde olarak ALEK'in HCl tuz formu kullanılmıştır. Beyaz veya sarımsı beyaz toz olarak bulunan maddenin pKa değeri 7,05 olarak bildirilmiştir.



Şekil 2.2. ALEK'in molekül yapısı

2.4. Alektinibin Etki Mekanizması

CH5424602 olarak bilinen ve ALK ikinci nesil bir inhibitörü olan ALEK, ALK'yi krizotinibe kıyasla daha etkili ve seçici bir şekilde inhibe etmek amacıyla geliştirilmiştir. ALEK oral olarak aktif olan ve ATP ile rekabet eden küçük bir moleküldür. Reseptör tirozin kinazlara bağlanan ATP seçici rekabetçi bir inhibitörü olarak görev yapar. ATP bağlama bölgesinin inhibisyonunun neden olduğu fosforilasyonun bozulması, aşağı akış yollarında, yani STAT3 ve PI3K/AKT'de aktivasyonun olmamasıyla sonuçlanır. Bu sonuçta hücrel ölümün tetiklenmesine yol açar. Preklinik araştırma, farelerin plazmasındaki konsantrasyonuna kıyasla beyindeki ALEK konsantrasyonunun önemli bir oranını göstermiştir (Herden ve Waller, 2018, Kodama vd., 2014a). Kan-beyin bariyerinin geçişi *in vitro* araştırmalarla kanıtlanmıştır. Krizotinib ile karşılaştırıldığında ALEK, MET ve ROS1'de etki eksikliği göstermektedir. ALEK'in hem plazma hem de beyin omurilik sıvısında benzer konsantrasyonlarda bulunması, merkezi sinir sistemi metastazları üzerindeki önemli etkisini açıklayabilir (Kinoshita vd., 2012, Sakamoto vd., 2011).



Şekil 2.3. KHDAK'de ALK yeniden düzenleme hedefli kanser tedavisi (Ando vd., 2023).

Şekil 2.3'de önerildiği gibi EML4-ALK translokasyonu, PI3K-AKT, RAS ve JAK/STAT sinyal kaskadlarını aktive ederek tümörün ilerlemesini, hayatta kalmasını ve büyümesini etkiler. Krizotinib, ALEK ve brigatinib gibi ALK inhibitörleri, ELM4-ALK gibi mutasyona uğramış ALK'ler üzerinde etki gösterir ve ALK yeniden düzenlemesinden kaynaklanan ALK füzyon proteininin üretimini baskılar (Shim vd., 2014). Faz çalışmalarında ikinci basamak tedavide krizotinibin başarısız olmasından sonra PFS bir iyileşmeyi ALEK göstermiştir. Ayrıca, birinci basamak tedavi olarak yürütülen bir çalışmada, krizotinib ile karşılaştırıldığında PFS, genel yanıt oranı ve merkezi sinir sistemi progresyonuna kadar geçen sürenin arttığını göstermiştir (Peters vd., 2017). ALEK, ALK+KHDAK hastalarında krizotinibin başarısız olmasının ardından ikinci basamak tedavi seçeneği olarak kullanılmak üzere ruhsat onayı almıştır. Birinci basamak tedavi için FDA onayı Kasım 2017'de, Avrupa'daki onayı ise Aralık 2017'de alınmıştır (Herden ve Waller, 2018).

2.5. Alektinibin Farmakokinetik Özellikleri

Önerilen ALEK dozu oldukça yüksektir (günde iki kez 150 mg'lık 4 kapsül) ve klinik etkinliği karşılamak için tok karnına alınmalıdır. Bunun nedeni düşük oral biyoyararlanım (%37) ve açlık koşullarındaki biyoyararlanımın, tokluk koşullarındakinin üçte birine daha da düşük olmasıdır (Morcos vd., 2017a). Bu, biyo-İlgili ortamlar ALEK

çözünürlüğü ile ilişkilidir. ALEK, Aç Kalmış Durum Simüle Bağırsak Sıvısında (FaSSiF) Federal Durum Simüle Bağırsak Sıvısı (FeSSiF) ile karşılaştırıldığında nispeten daha düşük çözünürlük sergilemiştir (Parrott vd., 2016). Bu nedenle, ALEK'in düşük çözünürlüğü, klinik biyo-elverişlilik için zorluklar ortaya koymakta olup bununla ilgili çeşitli çalışmalar ve öneriler devam etmektedir (Saha vd., 2023). Zaten kararlı durum konsantrasyonuna günde iki kez 600 mg'lık yedi günlük sürekli uygulamadan sonra ulaşılır ve birikim oranı kabaca altı kattır (Hsu vd., 2016).

Sağlıklı bireylerde, tek doz 600 mg ALEK'in yağ ve kalori bakımından zengin bir yemekle birlikte alınması, aç karnına alınmasına kıyasla ALEK'in maruziyetinde üç kat artışa neden olmuştur. Atılımı ise çoğunlukla dışkıda görülmüş ve radyoaktif dozajın %97,8'ini oluştururken, idrarla atılım %0,46 ile ihmal edilebilir düzeyde kalmıştır (Agency, 2018, information, 2017).

ALEK'in farmakokinetiği yaş, ırk, cinsiyet, vücut ağırlığı ve hafif ila orta derecede böbrek yetmezliği (kreatinin klirensi 30-89 mL/dak) gibi birçok demografik parametreden etkilenmez. Sonuç olarak, bu faktörlere dayalı olarak ALEK için herhangi bir doz modifikasyonu yapmaya gerek yoktur. Şiddetli böbrek yetmezliği, son evre böbrek hastalığı veya orta ila şiddetli karaciğer yetmezliği olan hastalarda ALEK'in farmakokinetiğini değerlendiren çalışma eksikliği vardır. Bununla birlikte, ALEK'in sadece minimal bir miktarı idrar yoluyla elimine edildiğinden, Avrupa Birliği'nde şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalar için ALEK dozajının ayarlanması önerilmemektedir (Agency, 2018, information, 2017).

2.6. Alektinibin Farmakodinamik Özellikleri

ALEK, ALK ($IC_{50} = 1,9$ nM) ve RET'e ($IC_{50} = 4,8$ nM) karşı belirgin seçiciliği ve potensi olan bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Kodama vd., 2014b, Sakamoto vd., 2011). ALEK'in M4 olarak anılan birincil metabolitlerinden biri, ALK'ye ($IC_{50} = 1,2$ nM) karşı karşılaştırılabilir etkiye ve orijinal molekülünkiyle in vitro aktiviteye sahip olup M4'ün ALEK'in terapötik etkinliğinde rol oynadığı varsayılmaktadır (Agency, 2018). ALEK, ALK+KHDAK hücrelerinde ALK'nin otofosforilasyonunu engelleme ve STAT3 ve ALK'nin (ERK_{1/2} hariç) fosforilasyonunu azaltma yeteneğini göstermiştir. ALEK hem in vitro hem de in vivo prelinik çalışmalarda ALK füzyon pozitif (EML4-ALK gibi) ve RET füzyon pozitif (CCDC6-RET gibi) tümör hücreleri üzerinde önemli inhibitör etkiler sergilemiştir. ALEK, krizotinib tedavisinin ardından devam eden tümörlerin boyutunda

istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p < 0.001$) göstermiştir. Bu etki sadece primer ALK direnç mutasyonları olan kanserlerde değil, sekonder ALK direnç mutasyonları olan tümörlerde de görülmüştür (Kodama vd., 2014a). ALEK, ALK gen değişiklikleri sergileyen hücrelere karşı, bu tür genetik anormallikleri olmayan hücrelere kıyasla daha yüksek derecede antitümör etkinliği göstermiştir (Paik ve Dhillon, 2018, Sakamoto vd., 2011).

ALEK, merkezi sinir sistemine ALEK'in serbest sistemik konsantrasyonu ile karşılaştırılabilir penetrasyon seviyelerine sahiptir. Bileşik, muhtemelen akış taşıyıcıları P-gp ve BCRP tarafından taşınamaması nedeniyle merkezi sinir sistemi boyunca dağılır ve içinde kalır. ALEK, KHDAK ksenograft modellerinde intrakraniyal EML4-ALK-pozitif tümörlerin tedavisinde güçlü etkinlik sergilemiştir. ALEK'in hem sistemik hastalıkta hem de beyin metastazlarında kanser büyümesini önlemedeki etkinliği, faz I-III klinik deneylerinde kanıtlanmıştır (Kodama vd., 2014a, Paik ve Dhillon, 2018).

ALEK terapötik avantajlar göstermiş olsa da hastaların büyük çoğunluğunun sonunda bu ilaca karşı direnç geliştirdiği gözlemlenmiştir. ALEK tedavisini takiben in vitro, ksenograft modellerinde ve insanlarda çeşitli direnç mekanizmaları gözlenmiştir. Spesifik mutasyonların ortaya çıkması gibi, direnç mutasyonlarının oluşumuna katkıda bulunan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Ek olarak, TGF- α -EGFR sinyal yolu gibi baypas sinyal yollarının aktivasyonu ve MET aktivasyonu gibi kurtarma sinyal yollarının aktivasyonu da bu süreçte yer almıştır (Agency, 2018, information, 2017, Paik ve Dhillon, 2018).

2.7. Alektinib Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler

ALEK'in miktarının belirlenmesine yönelik mevcut metodolojiler oldukça kısıtlı olup HPLC (Almutairi vd., 2023, Kolasani vd., 2022, Kumar vd., 2020, Lee vd., 2020, Prashanthi vd., 2018, Saha vd., 2023) ve LC-MS/MS (Aikawa vd., 2016, Cheruku ve Bhikshapathi, 2021, Heinig vd., 2017, Huang vd., 2017, Kumar vd., 2023, Maher vd., 2021, Morcos vd., 2017b, Ryu vd., 2018, Sparidans vd., 2018, van Veelen vd., 2021) yöntemlerini kapsamaktadır. HPLC yöntemleri yığın ve formülasyon analizleri amacıyla geliştirilirken LC-MS/MS yöntemleri biyoanalitik yöntemler olup özellikle farmakokinetik çalışmalarda kullanılmak amacıyla geliştirilmiştir. Biyoanalitik çalışmalarda numune matrisleri ise sıçan, fare ve insan plazması; idrar ve doku homejanatlarından oluşmaktadır. Her iki teknik için de geliştirilen yöntemlerde

doğrulama çalışmaları ya ICH'ye göre yapılmış ya da herhangi bir kılavuzdan bahsedilmemiştir. LC-MS/MS olağanüstü seçicilik ve hassasiyete sahip bir tekniktir. Bununla birlikte, kullanımı önemli maliyetleri beraberinde getirmekte ve ekonomik olarak dezavantajlı ülkelerdeki laboratuvarların çoğu için hazır veya uygun fiyatlı olmayabilecek özel teknik yeterlilik gerektirmektedir. HPLC ise iyi bir seçiciliğe sahiptir; ancak sınırlı hassasiyet sergilemektedir. Ayrıca, bu metodolojilerin ister kalite kontrol amacıyla ister klinik laboratuvarlar bağlamında olsun, büyük miktarlarda numunenin incelenmesinde düzenli uygulama için sınırlı bir kapasiteye sahip olduğu unutulmamalıdır. Geliştirilen yöntemler hakkında genel analitiksel bilgiler aşağıda ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Saha vd. ALEK'in çözünürlük çalışmaları için, HPLC metodu geliştirmiştir (Saha vd., 2023). Enjeksiyon hacmi 10 µL seçilerek C18 kolonunda (250 × 4,6 mm, 5 µm, Waters) analizler gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, pH'ı 7 olan bir tampon çözeltisi ve iki farklı oranda asetonitrilden oluşmuştur: 90:10 (mobil faz A) ve 30:70 (mobil faz B). Bu iki mobil faz arasında geçiş yapmak için bir gradyan programı kullanılmıştır. Diğer parametreler şu şekilde ayarlanmıştır: akış hızı 1,5 mL/dk ve kolon sıcaklığı 40 °C'de sabit tutulmuştur. 230 nm dalga boyuna ayarlanmış PDA dedektörde analizler yapılmıştır.

Kumar vd. ALEK'in hem aktif farmasötik bileşen (API) hem de tablet formülasyonlarında kantitatif tayini için UPLC metot geliştirmişlerdir (Kumar vd., 2020). Kromatografik ayırma, 0,05 M fosfat tamponu ve 45:55 oranında metanolden oluşan bir mobil faz ile bir DIKMA Endoversil kolon (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil fazın akış hızı 0,4 mL/dk olarak ayarlanmış ve 265 nm dalga boyunda tespit yapılmıştır. ALEK'in alıkonulma zamanı 0,418 dk olup 1-100 µg/mL derişim aralıklarında doğrusallık sergilemiştir. LOD 0,015 µg/mL iken, LOQ 0,07 µg/mL olduğu görülmüştür. Piyasada bulunan dozaj formunun test yüzdesi %97,80 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ALEK'in zorlu bozunma koşulları altında analiz edilmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Prashanthi vd. ALEK'in kantitatif analizi için HPLC metodu geliştirmiş ve metot geçerliliğini sunmuşlardır (Prashanthi vd., 2018). Kromatografik ayırma izokratik ayırma modunda Inertia ODS C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılarak yapılmıştır. Analizde kullanılan mobil faz, %70:30 (h/h) olan pH 3 fosfat tamponu ve metanol karışımından oluşmuştur. Akış hızı 1 mL/dak olarak ayarlanmış ve kolon fırın sıcaklığı ortam sıcaklığıdır. PDA dedektörü 265 nm'lik dalga boyuna ayarlanmıştır. Kalibrasyon

eğrisi 10-50 ppm konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiş olup LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,77 µg/mL ve 2,35 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Lee vd., insan plazmasında ALEK miktarının belirlenmesi için izokratik HPLC-PDA kullanan analitik bir yöntemin tanımını sunmuşlardır (Lee vd., 2020). Kromatografik ayırım ters faz C18 (250 mm ×4,6 mm) kolon ile 4,6 dakikalık bir sürede yapılmıştır. Hareketli faz 35:65 (*h/h*) oranında %0,1 sulu formik asit ve metanol karışımından oluşur. Elüsyon 1 mL/dak akış hızında ve dalga boyu 339 nm olarak seçilmiştir. 0,1-20 µg/mL konsantrasyon aralığı boyunca doğrusal olup tespit ve miktar belirleme sınırları sırasıyla 0,05 ve 0,1 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Kolasani vd. biyo-ilişkili ortam HPLC tekniği kullanılarak gastrointestinal pH'da ALEK miktarını belirlemişlerdir (Kolasani vd., 2022). Metot Box-behnken tasarımına göre geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Kromatografik ayırım için Phenomenex C8 (150 mm×4.6 mm, 5 µM) kolon kullanılmış olup alıkonma zamanı 9,7 dk'dir. Çalışılan dalga boyu ve validasyon parametreleri hakkında bilgi verilmemiştir.

Almutairi vd. 96-mikrowell tabanlı spektrofotometrik (MW-SFL) ve HPLC ile olmak üzere ALEK'in bulk ve idrarda analiz için iki metot geliştirmişlerdir (Almutairi vd., 2023). HPLC tekniğinde diğer kromatografik yöntemlerden farklı olarak floresans dedektör (FD) kullanmışlardır. MW-SFL'de, sulu bir ortamda yüzey aktif madde ile arttırılan ALEK'in doğal floresansı kullanılarak geliştirilmiştir. Floresan yoğunluğu 280 nm'de uyarıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda bir floresan plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. HPLC-FD yönteminde ise ALEK ve ponatinibi (IS) ayırmak için Eclipse plus C₁₈ HPLC kolon (5 µm, 250 × 4,6 mm i.d.) ve 80:20 (*h/h*) metanol ve potasyum dihidrojen fosfat (pH 7) karışımından oluşan bir mobil faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresan dedektörü, 365 nm'de uyarma ve 450 nm'de emisyon ile elüe edilen ALEK ve IS'yi tespit etmek için kullanılmıştır. ICH tarafından sağlanan kılavuzlar kullanılarak doğrulanmıştır. MW-SFL yöntemi 30-500 ng/mL aralığında, HPLC yöntemi ise 5-1000 ng/mL aralığında doğrusaldır. MW-SFL ve HPLC tekniklerden sırasıyla 6,46 ve 2,60 ng/mL LOD değerleri ve 19,60 ve 7,81 ng/mL LOQ değerleri elde edilmiştir. Her iki teknik de ALEK'in hem saf formunda hem de ALEK eklenmiş idrar örneklerinde miktar tayini için ortalama geri kazanım değerleri MW-SFL ve HPLC-FD prosedürleri için sırasıyla %86,90 ve %95,45'e eşit veya daha yüksek bulunmuştur.

Zhao vd. ALEK ve aktif metaboliti M4'ün idrarda eş zamanlı analizi için HPLC metot geliştirmişlerdir (Zhao vd., 2023). Çalışmanın odak noktası ise numune hazırlama için petek reçine bazlı katı faz ekstraksiyon yöntemi geliştirmeleridir. Kromatografik ayırım koşullarını, Accucore C₁₈ kolon (2,6 µm, 4,6 mm × 100 mm i.d.) sabit fazı, asetonitril-su (30:70, *h/h*, %0,3 TFA) hareketli fazı ve 1,0 mL/dakika akış hızı olarak bildirmişlerdir. Ayrıca enjeksiyon hacmi 20 µL ve çalışma dalga boyu 339 nm'dir. Doğrusal aralık 0,0200 µg/mL-5,00 µg/mL ve LOD 3,39 ng/mL ve LOQ 11,3 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Ryu vd. ALEK'in matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometresi görüntülemeyle ortaya çıkan nöroblastoma ksenograftları incelemesini yapmışlardır. Yöntemde kromatografik ayırım, 2,1 × 50,0 mm boyutlarında ve 3,5 µm partikül boyutunda bir Waters Xbridge C18 HPLC kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ryu vd., 2018). Kolon sıcaklığı 40°C'de tutulmuştur. Mobil fazlar A ve B sırasıyla suda %0,1 formik asit (FA) ve metanolde %0,1 FA oluşmuştur. Ayırma işlemi 0,2 mL/dk akış hızında %50 B izokratik elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör pozitif modda elektrosprey iyonizasyonu (ESI⁺) kullanılmıştır. Kullanılan reaksiyon izleme geçişi (MRM) *m/z* 483,2 → 396,0 olarak seçilmiştir. Matris etkisini hesaba katmak için standart ekleme yaklaşımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak hedef ALEK'in kantitasyonu değil görüntülenmesidir.

Kumar vd. tavşan plazmasında ALEK'in farmakokinetik çalışmalarını yapmak amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği kullanarak numune hazırlamış ve ardından C18 (4.6mm id × 50mm) analitik kolon kullanarak kromatografik ayırımını yapmışlardır (Kumar vd., 2023). Ayırma için kullanılan mobil faz, hacim oranı 75:25 olan asetonitril ve %0,1 formik asit içeren sudan oluşmuştur. MRM⁺ kullanılarak ana iyon *m/z* 483,2→396,1 ve iç standart balbosiklik *m/z* 447,5→380,3 değerlerinde çalışılmıştır. Geliştirilen metot için kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı 0,5 ila 600 ng/mL arasında olup LLOQ için 0,5 ng/mL ve LQC için 10 ng/mL derişimlerine sahiptir.

Sparidans vd. etilen köprülü oktadesil silika kolonda ALEK, brigatinib ve lorlatinibin eş zamanlı analizi için kromatografik metot geliştirmişlerdir (Sparidans vd., 2018). Ayırma işlemi, su ve asetonitril içinde %1 (*h/h*) formik asitten oluşan bir mobil faz ile 600 µL/dk akış hızında gradyan elüsyonda yapılmıştır. Tesbit edilen kütle seçilmiş reaksiyon izleme (SRM) modunda 483,3→396,2 şeklindedir. Doğrulama süreci ALEK için 2-2000 ng/mL konsantrasyon aralığında ve LLOQ değeri 2 ng/mL olarak tespit

edilmiştir. İnsan ve fare plazması ile karaciğer, beyin böbrek ve dalak homojenatları numune matrisi olarak seçilmiş ve geri kazanım çalışmaları yapılmış olup geri kazanım %108,4-%87,2 aralığında elde etmişlerdir.

Aikawa vd. ALEK'in plazma, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve doku kesitlerinde farmakokinetik analizi için LC-MS/MS metodu önermişlerdir (Aikawa vd., 2016). Analizlerde 100 ng/mL derişiminde erlotinib-d6 iç standart olarak kullanılmıştır. XBridge C18 (2,1 × 5,0 mm, 3,5 µm) kolonu kullanılarak kromatografik ayırım yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C olup A ve B mobil fazları sırasıyla %0,1 sulu formik asit çözeltisi ve %0,1 formik asit içeren metanolden oluşmuştur. Ayırma işlemi 0,2 mL/dak akış hızıyla izokratik elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çözücü A'nın çözücü B'ye elüsyon oranı 1:1'de tutulmuştur. Analiz süresi 6 dk olup enjeksiyon hacmi 2 µL olarak seçilmiştir. Ancak bu çalışmada da Ryu v ark. çalışmasına benzer şekilde ALEK'in BOS geçişini görüntülemektir (Ryu vd., 2018).

Huang vd. sıçan plazmasında ALEK miktar tayini için UHPLC-MS/MS metodu geliştirmiştir (Huang vd., 2017). IS olarak diazepam seçmişler ve kromatografik ayırma da RRHD Eclipse Plus C18 (2,1 × 50 mm, 1,8 µm) kolon kullanmışlardır. Ayırma işlemi için %0,1 formik asit içeren asetonitril ve sudan oluşan bir gradyan mobil faz kullanılmıştır. ESI+ MRM ile ALEK m/z 483,2 → 396,1 iken diazepam (IS) için m/z 285,0 → 192,9 elde edilmiştir. Yöntem 1–500 ng/mL aralığında doğrusal olup LLOQ 2 ng/mL olarak bulunmuştur. Sıçan plazmasındaki ALEK için gözlenen geri kazanımları %84,2 ile %92,2 arasında değiştiği görülmüştür.

Cheruku vd. LC-MS/MS ile biyoanalitik yaklaşım geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Kromatografik ayırım Phenomenex C18 (50mm × 4.6 mm, 2.4 µm) ters faz kolonunda yapılmıştır (Cheruku ve Bhikshapathi, 2021). Ayırma işlemi, %15:85 hacimsel oranda %0,1 formik asit ve metanolden oluşan izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,7 mL/dk olup efavirenz IS olarak seçilmiştir. ESI+MRM ile ALEK için m/z 483.27→145.10 ve efavirenz (IS) için 316.00→273.00 seçilmiştir. Plazma numunelerinde 37,5-1500 ng/ml konsantrasyon aralığında ve gözlenen ortalama geri kazanım sonuçları %96,06 ile %102,68 arasında değişmektedir.

Heinig vd. ALEK analizi için farklı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (Heinig vd., 2017). Buna göre araştırmacı ve ekibi, ALEK ve aktif metaboliti M4'ün kantitatif tayini için iki farklı laboratuvarında LC–MS/MS yöntemi geliştirmiş ve doğrulama çalışması yapmışlardır. Geliştirilen yöntemin birisinde Pompa A, su/formik asit 1000:1 (h/h) içeren

mobil faz A ve metanolden oluşan mobil faz B'dir. ALEK m/z 483,3 $\rightarrow$ 396,4 MS/MS geçişinde ve IS ALEK- d^8 m/z 491,4 $\rightarrow$ 396,2 değerinde izlenmiştir. Diğer analit M4 ise, m/z 457,3 $\rightarrow$ 396. MS/MS geçişinde ve IS M4- d^4 m/z 461,2 $\rightarrow$ 400,3 değerinde izlenmiştir. Alıkonma süresi ALEK için yaklaşık 2,1 dk ve M4 için 2,2 dk ve analiz süresi 3,5 dakikadır. Diğer yöntemde ise 0,6 mL/dak akış hızında mobil faz A (suda %0,1 formik asit) ve mobil faz B (asetonitrilde aseton/0,1 formik asit 5:95, h/h) verilmiştir. Analitlerin ve IS'nin tespiti ve miktar tayini için SRM modu kullanılmıştır. İzlenen geçiş m/z 483,3 $\rightarrow$ 396,2, ALEK- d^8 için 491,3 $\rightarrow$ 396,2 şeklindedir. ALEK ve IS'nin alıkonma süresi 0,8 dakika ve M4 ve IS'nin 0,6 dakika, toplam analiz süresi 3,5 dk ve otomatik örnekleyici yıkama dahil toplam döngü süresi 4,5 dakika olmuştur. Yöntem 0,5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ve LLOQ değeri 0,5 ng/mL derişimindedir. Doğruluk %92,0 ila 112,2 arasında değişmektedir. Ayrıca çapraz doğrulama değerlendirmesi, iki biyoanalitik laboratuvar arasında bir yanlılık ortaya çıkarmış ve bu, farklı biyoanalitik yöntemler kullanan her iki pivotal çalışma arasındaki klinik verileriyle doğrulamışlardır.

Morcos vd. ALEK'in emilim, dağıtım, metabolizma ve boşaltım mekanizmasını ortaya koymak amacıyla LC-MS/MS metodu geliştirmişlerdir (Morcos vd., 2017b). Kromatografik ayırım Waters XBridge™ Shield RP18 analitik kolon (2,1 $\times$ 50 mm, 5 μ m) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ayırma tekniği gradyan elüsyonudur. Bu çalışmada mobil faz A %0,1 formik asit içeren su ve mobil faz B %5 aseton, %95 asetonitril ve %0,1 formik asitten oluşan bir karışımdır. MRM+ modunda seçilen geçişler ALEK için 483,3 $\rightarrow$ 396,2, ALEK- d^8 için 491,3 $\rightarrow$ 396,2 şeklindedir. Plazmada analit için kalibrasyon aralığı 1,50-1500 ng/mL, idrarda ise 0,5-500 ng/mL olup LLOQ 0,874 pg/mL olarak sunulmuştur.

Maher vd. sıçan plazmasında ALEK ve diğer iki ALK inhibitörü olan seritinib ve krizotinibin eş zamanlı analizi için UPLC-MS/MS biyoanalitik yöntem geliştirmişlerdir (Maher vd., 2021). Kromatografik analiz, mobil faz olarak %0,1 formik asit (70:30, h/h) içeren asetonitril/su karışımı ile Waters BEH™ C18 (100 $\times$ 1,0 mm, 1,7 μ m) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Kantitasyon, SRM ile $[M+H]^+$, m/z 482,26 $\rightarrow$ 395,23 değerinde gerçekleştirilmiştir, Yöntem, ALEK için 2-200 ng/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal olup LLOQ derişimi 2 ng/mL olarak verilmiştir.

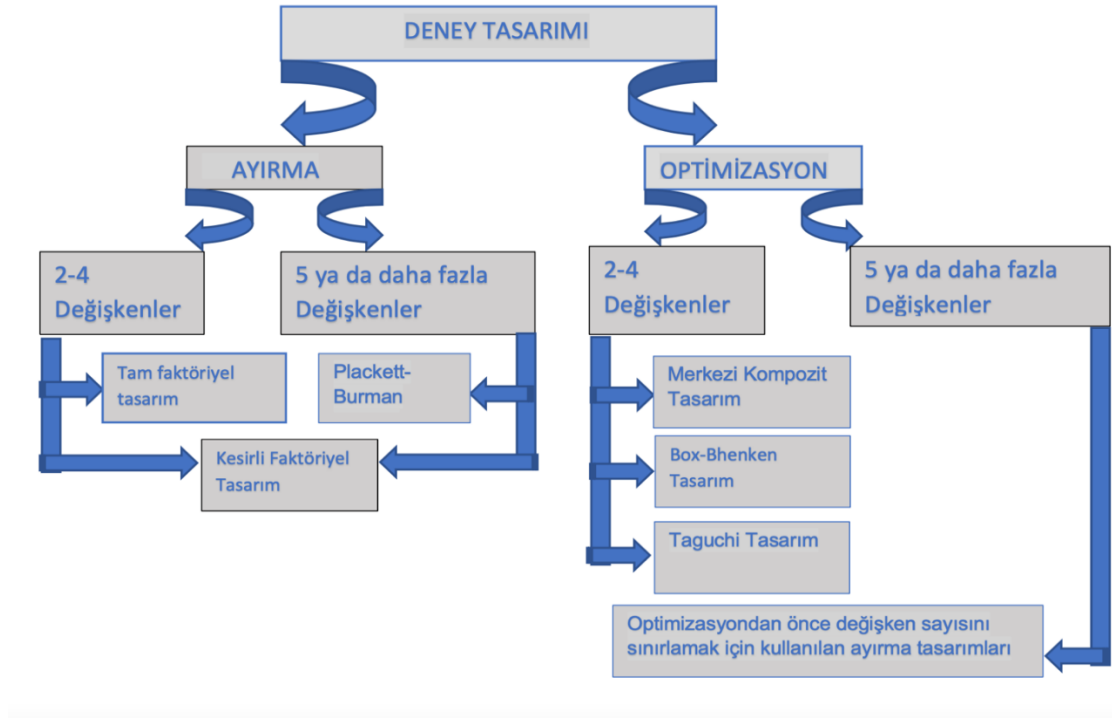
Veelen vd. insan plazmasında ALEK'in, krizotinib, erlotinib ve gefitinibin ile eş zamanlı miktar tayini LC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve doğrulamıştır (van Veelen vd., 2021). Kromatografik ayırma, HyPurity® C18 (50 $\times$ 2,1 mm, 3 μ m) analitik kolon

üzerinde, her ikisi de %0,1 formik asit ile asitlendirilmiş su ve metanol içinde amonyum asetat elüsyon gradyanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ESI+ modda 483,3→396,2 tespit yapılmıştır. Yöntem 100-2000 ng/mL aralıkta doğrusal ve LLOQ 572 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Literatürde söz konusu tez çalışmasına en yakın doğrultuda çalışma Parmar vd.'ne ait olduğu görülmektedir (Parmar vd., 2021). Bu çalışmada ALEK'e hızlı bozundurma koşulları uygulayarak bozunma ürünlerinin eldesi ve preparatif HPLC ile saflaştırma yaparak LC-MS/MS, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile kalitatif tayinlerini yapmışlardır. Ayrıca ALEK'in bozunma mekanizmaları içinde önerilerde bulunmuşlardır. ALEK'in hidroklorürü formunun oksidatif stres durumunda dört bozunma ürünü ürettiğini ve üçünün moleküler kütleye (498 Da) sahip olsalar da sırasıyla N-oksit, epoksit ve N-hidroksi safsızlığı olarak tanımlanan farklı moleküller olduğunu keşfetmişlerdir. Dördüncü bozunma ürünü ise epoksit safsızlığı olup önceki üçünden farklı bir moleküler kütleye sahip ve amid safsızlığı olduğu doğrulanmıştır. Çalışmada ALEK ya da herhangi bir bozunma ürünü için tayin yöntemi önerilmemiştir.

2.8. Deneysel Tasarım

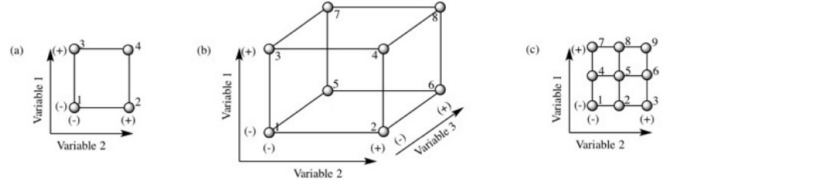
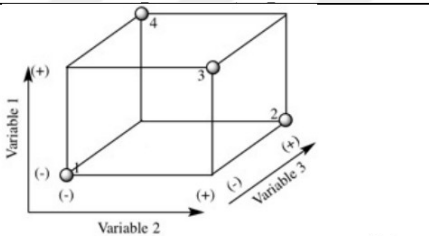
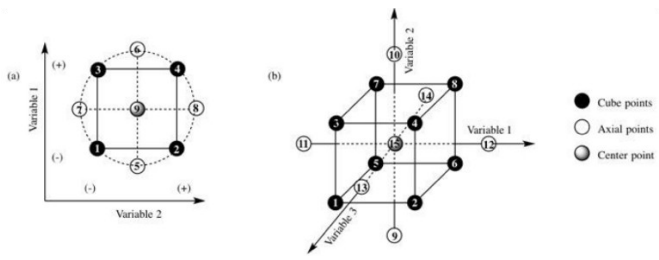
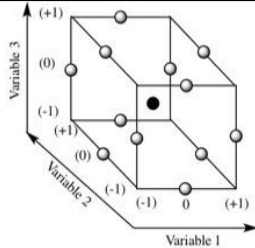
Deneysel tasarımlar, çeşitli proseslerdeki çalışma parametrelerini optimize etmek, kromatografik ayırma performansını artırmak ve aynı zamanda yüksek ekstraksiyon verimliliği elde etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Food and Administration, 2004). İdeal olarak, birden fazla unsur belirli bir süreç üzerinde eş zamanlı etki gösterir. Bununla birlikte, daha az deneysel denemeyle yetkin bir sonuç elde etmek için en başarılı yaklaşım, deneysel tasarım kullanılarak ilgili bileşenlerin belirlenmesi ve optimize edilmesidir. Bu nedenle deneysel tasarım, zorlukları çözmeyi ve bol miktarda bilgi içeren sonuçlar elde etmeyi amaçlayan metodik bir strateji olarak doğru bir şekilde nitelendirilebilir. Analitik süreçte deneysel tasarım kullanmanın temel amacı, gerekli iş, zaman ve kaynakları en aza indirirken optimum ve geçerli sonuçlar elde etmektir. Bir deneysel tasarım bağlamında, önceden belirlenmiş bir veya daha fazla parametre, deneyin sonucu üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla kasıtlı olarak manipüle edilir (Food and Administration, 2021, Holm vd., 2017).



Şekil 2.4. Deneysel tasarımların sınıflandırılması (Sahu vd., 2018).

Deneysel tasarımların kategorizasyonu, Şekil 2.4’de gösterildiği gibi genel olarak Tarama Tasarımları ve Yanıt Yüzeyi Tasarımları (optimizasyon tasarımı olarak da bilinir) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Tablo 2.1 ise çeşitli deneysel tasarımlara ve bunlara karşılık gelen deneysel alanlara ilişkin kapsamlı bir genel bakış sunmaktadır (Sahu vd., 2018).

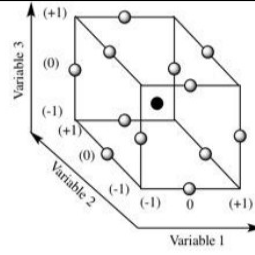
Tablo 2.1. Sıvı kromatografisinde deneysel tasarımlar ve alanlar (Sahu vd., 2018)

Deneysel Tasarım	Seviye	Uzay Tasarımı
Tarama		
Tam Faktöriyel Tasarım(FFD)	2 ya da 3 seviyeli	 (a) İki faktörlü, iki seviyeli (2^2), (b) üç faktörlü, iki seviyeli (2^3), (c) iki faktörlü, üç seviyeli (3^2) nokta sayısını gösteren tam faktöriyel tasarımlar (deneysel çalışmalar).
Kesir Faktöriyeli Tasarım(FrFD)	2 seviyeli	 Kesirli faktöriyel tasarım (2^{3-1}).
Plackett–Burman Tasarım(PBD)	2 seviyeli	Tasarım iki seviyeli FrFD'ye benzer. Bir deneyde N (4'ün katı) çalıştırmayla maksimum N-1 faktör incelenebilir. Deneysel hataları belirlemek için tekrarlanan deneyler ve kukla faktörler kullanılabilir.
Yanıt yüzeyi (optimizasyon)		
Merkezi Kompozit Tasarım(CCD)	3 seviyeli	 (a) 2 değişken ve (b) çalışma sayısını gösteren 3 değişken için üç seviyeli çevrelenmiş merkezi kompozit tasarımlar.
Box Bhenken Tasarım (BBD)	3 düzey	 3 değişken için Box-Behnken tasarımı.

Tablo 2.1. (Devam) Sıvı kromatografisinde deneysel tasarımlar ve alanlar (Sahu vd., 2018)

Box Bhenken
Tasarım (BBD)

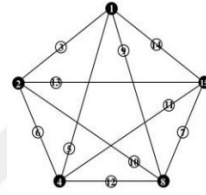
3 düzey



3 değişken için Box-Behnken tasarımı.

Taguchi
Tasarım

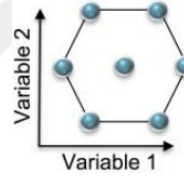
2 düzey



Taguchi tasarımına göre L16 ortogonal dizisi (2^{15}) için doğrusal takma ad modeli.

Doehlert
Tasarım

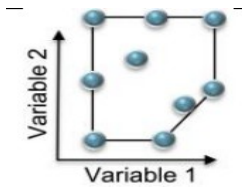
Çoklu
düzey



7 çalıştırmayı gösteren 2 değişken için Doehlert tasarımı.

D-optimal
Tasarım

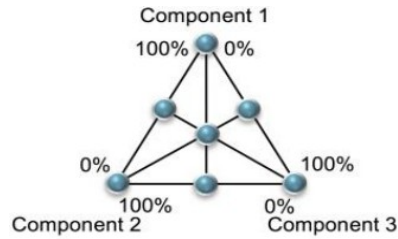
2 düzey



İki faktör için 9 çalıştırmayı gösteren D-optimal tasarım

Hibrit
Tasarım

Çoklu
düzey



Değer toplamı %100 olan üç bileşen için hibrit tasarım.

2.8.1. Tarama tasarımları

HPLC sürecini etkileyen çok sayıda faktör göz önüne alındığında, bu süreç üzerinde önemli bir etkisi olmayanların elenmesi zorunludur. HPLC deneysel tasarım uygulamanın temel amacı, en etkili unsurları taramaktır. Bu tasarımlar, tüm olası faktörlerden oluşan bir havuzdan en önemli bileşenleri ve bunların etkileşimlerini belirlemek amacıyla kullanılır. Niteliksel, niceliksel ve karıştırıcı ile ilgili yönlerin eş zamanlı olarak incelenmesi oldukça değerlidir. İki seviyeli tasarımlar, daha az sayıda test kullanarak çok sayıda parametrenin verimli bir şekilde taranmasını sağlar. İncelenen faktörlerin belirli bir yanıt üzerindeki etkisinin hesaplanması, varyans analizi (ANOVA) veya regresyon analizi kullanılarak kolaylaştırılabilir. Bu yöntemlerin uygulanması genellikle ayırma tekniklerinin, formülasyonların, ürünlerin ve kalite kontrolle ilgili süreçlerin geliştirilmesinde görülür. Ayrıca, bu yöntemlerin sağlamlığını ve dayanıklılığını test etmek için de kullanılmaktadırlar. Bu tasarımlarda yer alan prosedürler sağlamlık veya dayanıklılık testlerine benzemektedir; tek fark değişkenlerin iki seviyesi arasındaki aralıkların değişmesidir. Çeşitli tarama tasarımlarının avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2’de kısaca özetlenmiştir (Sahu vd., 2018).

Tablo 2.2. *Tarama tasarımlarının avantaj ve dezavantajları (Sahu vd., 2018)*

Tasarım	Amaç	Sonuç
FFD (2-4 faktörü optimize etme)	Bağımsız faktörlerin etkilerini ve etkileşimlerini belirlemektir.	Faktör sayısının artması deneme sayısında aritmetik artışa yol açtığı için on altıdan fazla faktörün taranması imkansızdır.
FrFD (4’den fazla faktörü optimize etme)	Eşit sayıda faktör için daha az deneysel denemeye ihtiyaç duyulduğundan FFD’den daha verimlidir.	Yetersiz etkileşim etkileri ve deneysel bir hata olmadığı için tedbirsiz olabilir.
PBD (Optimizasyonun daha fazla doğrulanması için çok sayıda deneysel faktörden az sayıda önemli faktörü belirleme)	Çok sınırlı deneysel çalışmalarda çok sayıda faktör değerlendirilebilir.	Tasarım, önemli ana etkilerin belirlenmesine kesinlikle uygun olup ve herhangi bir etkileşim etkisi dikkate alınmamaktadır.

2.8.2. Yanıt yüzeyi tasarımları

Yanıt yüzeyi tasarımları, araştırma ve istatistiksel analizlerde yaygın olarak kullanılan bir deneysel tasarım türüdür. Bu tasarımlar, bağımsız değişkenlerin sistematik olarak manipüle edilmesini ve buna karşılık gelen sonuçların gözlemlenip analiz edilmesini içerir.

Optimizasyon, kemometri alanında belirli bir süreç için en uygun koşulların veya ayarların belirlenmesini kolaylaştıran tamamlayıcı bir tekniktir. Bu strateji genellikle olası faktörleri belirlemek için bir tarama tasarımının uygulanmasını içerir. İki ana tip yanıt yüzeyi tasarımı vardır: simetrik tasarımlar ve asimetrik modeller. Üç seviyeli FFD, Merkezi Kompozit tasarım (CCD), Box-Behnken tasarımı (BBD), Taguchi tasarımı (TD) ve Doehlert tasarımlarının kullanımı akademik araştırmalarda yaygındır. Bu tasarımlar, deneysel hatanın tahmin edilmesine olanak tanıyan bir merkez noktası içeren simetrik alanı kapsamak için kullanılır. Asimetrik özelliklere sahip bir deneysel alan analiz edildiğinde, D-optimal tasarım gibi tasarımlar asimetrik şekiller sergiler. Ayrıca, bu tasarımlar simetrik bir bağlamda simetrik konfigürasyonlar sergileme potansiyeline sahiptir. Karışım tasarımları yalnızca karışım faktörlerinin incelenmesi için, özellikle de belirli bir karışımın bileşimini optimize etmek amacıyla kullanılır. Yanıt yüzeyi tasarımları için istatistiksel analiz yaklaşımları ANOVA, sinyal-gürültü oranı ve aralık analizi üzerine kuruludur. Aralık analizi, bireysel bileşenlerin etkisini değerlendirmek ve çeşitli faktörlerin en uygun seviyelerini belirlemek için kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Belirli bir faktör için ortalama aralığı, bu faktörün tüm seviyelerinde gözlemlenen maksimum ve minimum ortalamalar arasındaki mutlak fark olarak hesaplanabilir. Belirli bir sistemde, en geniş ortalama aralığını sergileyen faktör, performans üzerinde en belirgin etkiyi gösterir. Aralık analizi, çeşitli unsurların ideal değerlerini belirlemek için kullanılabilecek bir tekniktir. Ancak, bu yöntemin bu unsurların göreceli önemine ilişkin net ve nicel bir değerlendirme sağlamadığına dikkat etmek önemlidir. ANOVA, verileri incelemek için bir F-testinin kullanılmasını içerir. Her bir bileşenle ilişkili F değeri, bu faktöre atfedilen varyansın deneysel hataya atfedilen varyansa oranıdır. Her bir unsurun yüzde katkısı, söz konusu faktöre atfedilebilecek genel kare sapma toplamının oranını ifade eder. Yukarıda belirtilen ifade, söz konusu faktör tarafından uygulanan etkinin bir göstergesi olarak hizmet etmektedir. Regresyon analizi, bir regresyon fonksiyonunun kullanılması yoluyla değişkenler arasındaki ilişkilerin tahmin edilmesini sağlar. Doğrusal birinci dereceden ve ikinci dereceden modellere

akademik araştırmalarda ve pratik uygulamalarda sıklıkla rastlanır. HPLC deneysel tasarımın başarılı bir şekilde yürütölmesi uygun bir tasarımın seçilmesi, ilgili yazılımın kullanılması, deneysel denemelerin yapılması ve elde edilen verilerin analiz edilmesi ile bulguların yorumlanması olmak üzere dört temel unsura gerek vardır (Sahu vd., 2018).

2.9. Kemometride Matematiksel Modelleme

Model terimi genellikle bir yanıt değişkeni ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi tanımlamak için kullanılır. Matematiksel modeller iki ana kategoride sınıflandırılabilir: ampirik modeller ve teorik modeller (Singh vd., 2005). Ampirik bir model, belirli bir bileşen ile buna karşılık gelen yanıt arasındaki ilişkiyi ifade etmek için bir araç sunar. Her zaman tutarlı olmasa da belirli bir düzendeki polinomlar kümesi yaygın olarak gözlemlenir. En sık kullanılan doğrusal modeller (2.1)'den (2.3)'e kadar olan denklemlerle temsil edilir (Sahu vd., 2018).

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (2.1)$$

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (2.2)$$

$$E(y) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (2.3)$$

Yukarıdaki denklemde $E(y)$ ölçülen yanıt değişkenidir. X_1 ve X_2 seçilen faktörlerdir, β_0 ise kesişme noktasını temsil etmektedir. β_1 ve β_2 birinci dereceden parametreler, β_{12} etkileşim parametresi ve β_{11} ve β_{22} ikinci dereceden parametrelerdir. Katsayılar ya çoklu doğrusal regresyon analizi ya da karşıtlıklar yöntemi kullanılarak hesaplanır. Denklem (2.1) ve (2.2) değişkenler açısından doğrusallık sergilemekte ve sırasıyla üç boyutlu uzayda düzlemsel bir yüzeyi ve düzlemsel olmayan bir yüzeyi ifade etmektedir. Denklem (2.3), ikinci dereceden terimlerin varlığı nedeniyle eğrilik sergileyen çarpık bir düzlemi karakterize eden doğrusal bir ikinci dereceden model vermektedir. Üç boyutlu yanıt yüzeyi grafiklerinin kullanılması, bağımsız faktörlerin etkisini görsel olarak göstererek sistem davranışının anlaşılmasını kolaylaştırır. Kontur grafikleri yanıt yüzeyinin kesitlerini göstermektedir. Normalleştirilmiş grafikler, normalleştirilmiş faktör değerlerine (N) karşı çizilen bir yanıt değişkeninin grafiksel tasvirini göstermektedir. Tipik olarak, bu grafikler yalnızca unsurların seviyelerinin eşit uzaklıkta olmadığı, yani orta seviyenin yüksek ve düşük seviyelerin ortalamasına karşılık gelmediği durumlarda oluşturulur. Bu durumlarda, normalleştirme süreci genellikle

verileri daha sonraki özel matematiksel analizler için uygun hale getirir. Normalleştirilmiş faktör seviyelerinin hesaplanması Denklem (2.4) kullanılarak gerçekleştirilebilir (Sahu vd., 2018).

$$N = (X - L)/(H - L) \times 100 \quad (2.4)$$

X normalize edilmemiş bir faktör seviyesini, L ve H ise sırasıyla en düşük ve en yüksek faktör seviyelerini temsil etmektedir (Sahu vd., 2018).

Faktöriyel Kesirli Tasarımlar (FFD) bağlamında, önemli sayıda bileşen söz konusu olduğunda, en yüksek mertebedeki etkileşimlerin istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermeyebileceği düşünülebilir. Bu tür durumlarda, deney sayısını sistematik olarak azaltmak mümkündür ve bu da FrFD olarak bilinen bir tasarımın geliştirilmesine yol açar. FrFD ($1/X^p$)'nin kesri olarak tanımlanabilir; burada p, kesir derecesini temsil eder. FrFD tasarımları için gereken toplam deney sayısı X^{n-p} ile belirlenebilir. Bir 2^3 faktöriyel tasarım için polinom denkleminin açılımı, Denklem (2.5)'de görüldüğü gibi genel form kullanılarak elde edilir (Sahu vd., 2018).

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n B_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \sum_{k=j+2}^n B_{ijk} X_i X_j X_k \quad (2.5)$$

Yukarıdaki denklemde, n eleman sayısını (özellikle 2.3) temsil ederken, X kodlama kurallarına göre +1 veya -1'dir. Dönüşüm formülü Denklem (2.6) olarak gösterilir (Sahu vd., 2018).

$$Dönüştürülmüş\ orantı = \frac{kullanılan\ miktar - (\frac{maksimum + minimum}{2})}{(\frac{maksimum - minimum}{2})}$$

B_i , B_{ij} ve B_{ijk} katsayılarının ölçülen yanıtı Y olarak gösterilir. Bu katsayılar, deneysel tasarımlar için özel olarak uyarlanmış RSM kullanılarak yanıtlardan türetilir (Sahu vd., 2018).

FFD veya FrFD özellikle iki seviye göz önünde bulundurulduğunda, yanıt denklemlerinde doğrusallık öncülü altında çalışan matematiksel modellerdir. Potansiyel eğrilik varlığını belirlemek için ikinci derece modellerin kullanılması gerekir. Merkezi kompozit tasarımlar olarak da bilinen CCD'ler, FFD veya FrFD ve yıldız tasarımının avantajlı özelliklerini bir araya getiren etkili ikinci dereceden deneysel tasarımlar olarak kabul edilmektedir. Genellikle Box-Wilson tasarımları olarak adlandırılan bu tasarımlar, kapsamlı deney ihtiyacını en aza indirirken yüksek derecede bilgi sunar. Söz konusu tasarım, iki seviyeli faktöriyel tasarımı (2^n) takip eden merkezi bir çekirdekten oluşmaktadır. Ayrıca, $\pm\alpha_1, \pm\alpha_2, \dots, \pm\alpha_x$ koordinat eksenleri boyunca çiftler halinde düzenlenmiş bir merkezi nokta ve 2^n dış nokta içerir. Bu bağlamda α , eksenel noktalar ile merkez arasındaki mesafeyi temsil eder ve böylece bir yıldız tasarımını andırır (Singh vd., 2005). Etkiler ve etkileşimler, denklem katsayıları ve katsayıların istatistiksel anlamlılığı için hesaplamalar yapmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılabilir. Kontrastlar yöntemi ve Yates algoritmasının uygulanması, etkilerin ve etkileşimlerin hesaplanmasını sağlar. Katsayılar regresyon analizi ya da Davies tarafından önerilen yaklaşımla hesaplanabilir. Katsayıların anlamlılığının belirlenmesi, Yates'in yöntemi kullanılarak ANOVA'nın uygulanması veya Student's t-testinin kullanılması yoluyla gerçekleştirilebilir. CCD temsil eden polinom denklemi, Denklem (2.7)'de verilen genel formun genişletilmesiyle elde edilebilir (Sahu vd., 2018).

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n B_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n B_{ii} X_i^2 \quad (2.7)$$

B_i ve B_{ij} katsayıları ampirik yanıt değişkeni Y 'den türetilir. Belirtilen CCD'ye göre, X için potansiyel değerler $0, \pm 1$ veya $\pm\alpha$ 'dır (Sahu vd., 2018).

Matematiksel optimizasyon hem eşitlik hem de eşitsizlik kısıtlamalarını dikkate alırken, denklemi (amaç fonksiyonu olarak adlandırılır) maksimum veya minimum bir değer için çözerek en uygun çözümü bulmak için kullanılır (Singh vd., 2005). Amaç fonksiyonu matematiksel olarak Denklem (2.8) ile gösterilebilirken, eşitsizlik ve eşitlik kısıtlamaları matematiksel olarak sırasıyla Denklem (2.9) ve (2.10) ile tanımlanır (Sahu vd., 2018).

$$Y = f(X_1, X_2) \quad (2.8)$$

$$G(X) = f_1(X_1, X_2) \geq 0, \text{ yani eşitsizlik kısıtı} \quad (2.9)$$

$$H(X) = f_2(X_1, X_2) = 0, \text{ yani eşitlik kısıtı} \quad (2.10)$$

Klasik optimizasyon yaklaşımları, amaç fonksiyonu $Y = f(X)$ olarak gösterilen tek bir değişkenin fonksiyonu olarak temsil edildiğinde kullanılabilir. Bu teknikler, bir fonksiyonun maksimum veya minimumunu belirleme temel problemini çözmek için hesaplama uygulanmasını içerir. Fonksiyonun birinci türevi hesaplanabilir ve sıfıra eşitlenerek maksimum veya minimum değeri verecek X değeri belirlenebilir. Yanıt değişkeni Y (amaç fonksiyonu olarak da bilinir) arasındaki ilişki, X_1 ve X_2 için Denklem (2.11)'de olduğu gibi iki veya daha fazla bağımsız değişkenin bir fonksiyonu olarak ifade edildiğinde, sorun daha karmaşık hale gelir. Matematiksel olarak, kısmi türevlerin fonksiyona uygulanması, optimum X değerleri çiftinin bulunabileceği kritik noktaların tanımlanmasını sağlar (Sahu vd., 2018).

$$Y = F(X_1, X_2) \quad (2.11)$$

Çok sayıda yanıt sürecinin varlığıyla karşı karşıya kalındığında optimize etmek için isteklilik fonksiyonu tekniğini kullanmak gerekli hale gelir. Bu metodoloji, en çok istenildiği düşünülen yanıt değerlerini veren işletim ayarlarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Bu bağlamda, bir yanıtla ilişkili değerleri $[0,1]$ sayısal aralığına dönüştürmek için bir istenebilirlik fonksiyonunun kullanıldığını belirtmek önemlidir. Bu aralıkta, 0 değeri tamamen istenmeyen bir yanıtı temsil ederken, 1 değeri tamamen istenen veya ideal olarak kabul edilen bir yanıtı ifade eder. Bireysel arzu edilebilirlikler daha sonra geometrik ortalama kullanılarak toplanır ve sonuçta genel isteklilik belirlenir (Candiotti vd., 2014).

2.10. Kemometrik Tasarımın Uygulamaları

Kemometrinin birincil amacı, problem modlarını belirleyerek önemli sistem uygunluk kriterlerine bağlı kalan ve kesintisiz döngü yönetimi sağlayan güvenilir bir tasarım alanı oluşturmaktır. Amaç, ampirik ve geleneksel tek değişkenli veya her

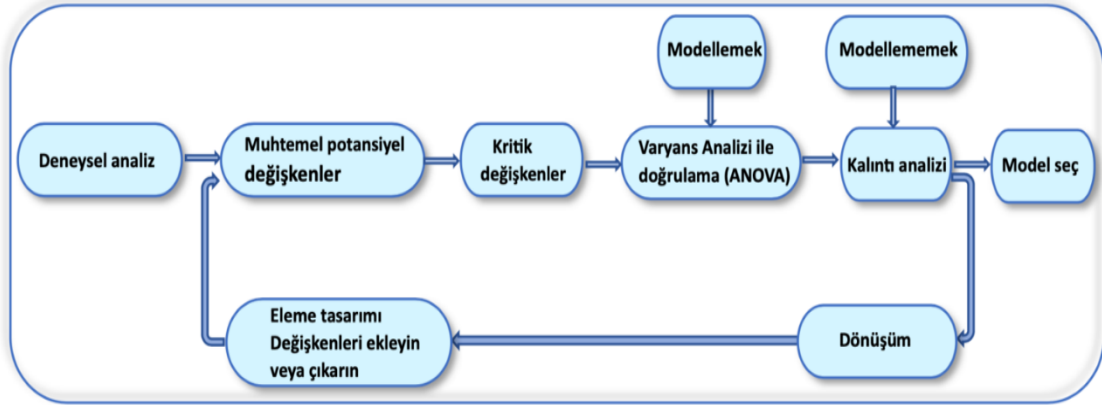
seferinde bir faktör tekniklerine güvenmek yerine, mantıksal çok değişkenli denemeler kullanarak esnek bir tasarım alanı elde etmektir (Molnár vd., 2010). Kemometrinin geleneksel yaklaşımlara kıyasla sayısız avantajı Tablo 2.3'te kapsamlı bir şekilde listelenmiştir. Kemometrik yaklaşım değişkenlerin daha iyi anlaşılması ve yönetilmesi için matematiksel veri sunar. Bu veri sayesinde sorunsuz metot transferi, farmakope sınırlarının daha net rotaya konmasına ve hedefe daha rasyonel yaklaşım sağlar.

Tablo 2.3. *Kemometrinin geleneksel yaklaşımlara göre avantajları*

Bilgi	Geleneksel yaklaşım	Kemometrik yaklaşım
Hedef/amaç	Deneme yanılma yaklaşımı	İsteklilik fonksiyonu
Performans	Doğrulama	Hedefe yönelik deneme
Yöntem değişkenlerini anlama	Değişkenler göz ardı r	Lineer ve kuadratik denklemlerle rasyonel değerlendirme
Kalite	Yöntem validasyonuna dayalı	Performans kalifikasyonu
Yeterlilik, doğrulama ve transfer	Ayrı ayrı uygulama	Sürekli uygulanabilirlik
Mevzuat esnekliği	Yok	Daha az
Geliştirme	Daha az	Sürekli

Kemometrinin kullanılması, araştırmacıların önemli sonuçlar üzerinde etkisi olan birçok yöntem faktörü ve değişken hakkında bilgi edinmesini sağlarken, aynı zamanda etkileşimlerin varlığını aydınlatır ve karmaşıklıkları azaltır. Kemometrik bir çalışmayı etkin bir şekilde yürütmek için yanıt değişkenleri, önemli yöntem değişkenleri, bunların ilgili aralıkları ve kullanılacak uygun matematiksel model(ler) hakkında kapsamlı bir anlayışa sahip olmak çok önemlidir. RSM değişkenler ve yanıtlar arasında önemli bir ilişki kurmak için çeşitli kemometrik tasarımlar kullandığından analitik yöntemlerin sistematik olarak oluşturulmasında değerli bir yaklaşımdır (Bhoop vd., 2013). Deneysel tasarımlar, çalışmanın belirli hedeflerine dayalı olarak yanıtları sistematik olarak analiz etmek ve yorumlamak için kullanılır. Bu tasarımlar, yüksek (+1), orta (0) veya düşük (-1) olarak kategorize edilen çeşitli değişken seviyelerinde kritik yanıtların incelenmesine olanak tanır (Sahu vd., 2018). Araştırmada resimsel ve grafiksel araçların kullanılması, faktörler ve bunlara karşılık gelen yanıtlar arasındaki ilişkinin mekanik anlayışının yanı sıra bunlarla ilişkili etkileşimlerin aydınlatılmasına yardımcı olur. Yanıt yüzeyi grafikleri, kontur grafikleri, pertürbasyon grafikleri, doğrusal korelasyon grafikleri, aykırı değer grafikleri ve hem 3D hem de 2D Box-Cox grafiklerinin bu bağlamda oldukça değerli araçlar olduğu görülmüştür. Seçilen araştırma tasarımıyla elde edilen verilerin

toplanmasından sonra, verileri analiz etmek için MLR analizi gibi istatistiksel teknikler kullanılabilir. Bu, nesnel sonuçların türetilmesine olanak tanır (Abba vd., 2020). Şekil 2.5, yöntem geliştirme ve veri analizi amacıyla kullanılan geleneksel bir kemometrik tabanlı regresyon modelinin akış düzenini göstermektedir (Sahu vd., 2018).



Şekil 2.5. Deneysel tasarımlarda MLR modelleme şeması (Sahu vd., 2018)

Yukarıdaki şekilde birçok etkileyici yöne ve sonuçların deneysel tasarım yoluyla değerlendirilmesine odaklanılmaktadır. Balık kılçığı diyagramı, kontrol değişkenleri ve gürültülü değişkenler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin, yöntem arzu edilebilirliği kriterlerinde (yanıt değişkenleri) gözlemlenen değişkenliğe katkıda bulunabileceğini göstermektedir. DoE araçlarının uygulanması yoluyla çok değişkenli bir yaklaşımın kullanılması, tüm kontrol değişkenlerinde aynı anda mantıksal ayarlamalar yaparak belirli bir numunenin (karışımın) yanıt değişkenlerini optimize etmeyi sağlar. Öte yandan, geleneksel tek değişkenli strateji istekliliği tam olarak sunmada yetersi kalır ya da hiç yapamaz. HPLC için deneysel tasarım seçimi, çalışmanın hedefleri, araştırmacıların odaklandığı alanlar, deneyin yürütülmesinin pratikliği, seçilen tasarımın maliyet etkinliği ve tamamlanması için gereken süre dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Belirli bir deneydeki en önemli bileşenleri belirlemek için araştırmacılar genellikle iki seviyeli faktöriyel tasarımlar kullanırlar (Del Castillo, 2007).

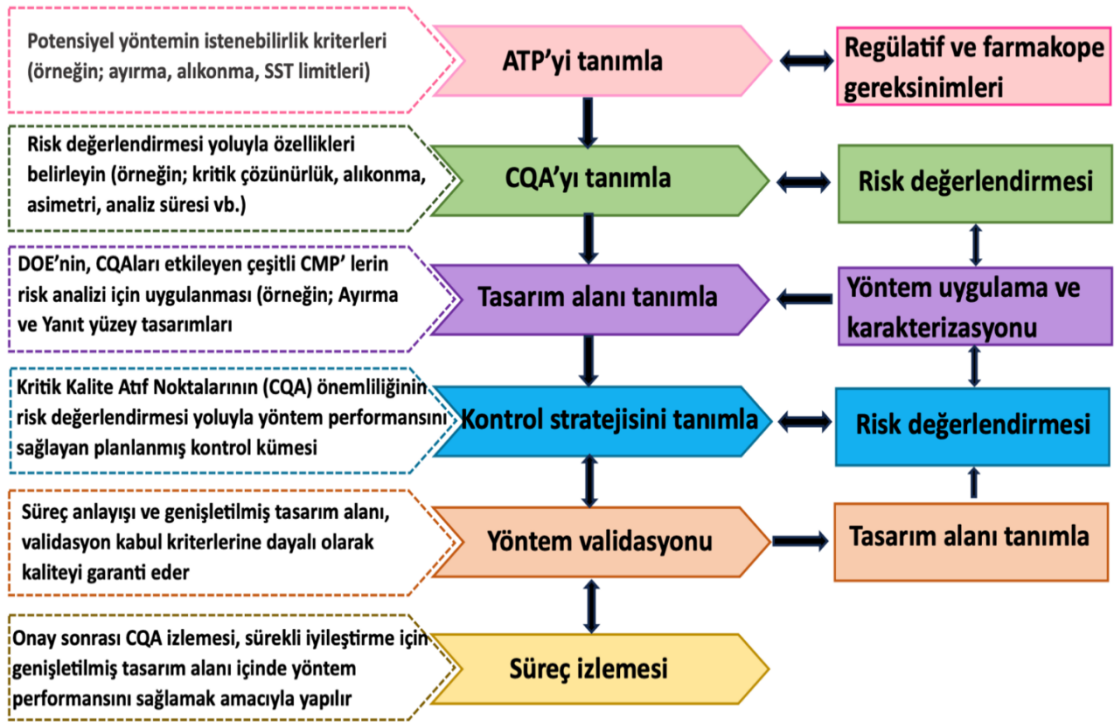
2.10.1. Kemometri ve DoE

Kromatografide DoE yaklaşımının benimsenmesi arzu edilen ayırma sonuçlarını vermesine rağmen yöntemin daha da geliştirilmesi inkar edilemez. Ayrıca DoE tek başına

memnuniyeti sağlamak için yeterli değildir. Tasarımla Kalite (QbD) projesinin FDA ve ICH tarafından Q8 ile Q11 kılavuzları şeklinde uygulanması, ilaç endüstrisi üzerinde dönüştürücü bir etki yaratmıştır (Rathore, 2016). Testlerin tasarımı (DoE), QbD yaklaşımına doğru bir dönüşüm geçirmiştir. ICH Q8 kılavuzunda tanımlandığı şekliyle QbD kavramı, önceden belirlenmiş hedeflerle başlayan geliştirmeye yönelik metodik bir yaklaşımı ifade etmektedir. Hem ürünün hem de sürecin anlaşılmasına ve süreç üzerinde kontrol uygulanmasına büyük önem verir. Bu yaklaşım, iyi bilim ve kalite risk yönetimi ilkelerine dayanmaktadır (Holm vd., 2017). QbD uygulamasının hayata geçirilmesi, DoE kavramı ile belirlenen kapsamlı bir tasarım alanının oluşturulmasını gerektirir. Bu tasarım alanı, bir HPLC yöntemi için istenen performans düzeyine ulaşmak üzere ideal global koşulun belirlenebileceği bir dizi ön koşulu kapsar.

Bu tasarım alanı, HPLC yöntemi için istenen performans düzeyine ulaşmak üzere ideal global koşulun belirlenebileceği bir dizi koşulu kapsar. QbD ilkelerinin uygulanması, sağlam analitik tekniklerin oluşturulması için uygun ayırma koşullarının belirlenmesini kolaylaştırır ve böylece yöntem aktarım zorluklarının ve başarısızlıklarının oluşumunu azaltır (Rozet vd., 2013). QbD konsepti, sıvı kromatografi teknolojilerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır.

"Farmasötik" terimi, tıbbi amaçlarla kullanılan madde veya ürünleri ifade eder QbD, önceden belirlenmiş hedeflerle başlayan ve kalite risk yönetimi yoluyla hem ürünü hem de süreci anlamaya ve kontrol etmeye büyük önem veren yenilikçi bir geliştirme metodolojisidir. QbD paradigmasında, bir metodoloji, performans isteklilik kriterlerini sürekli olarak karşılamak amacıyla geliştirilir. Bu durum, hem düzenleyici ve farmakope gerekliliklerine bağlı kalırken hem de analitlerin daha verimli bir şekilde ayrılmasına sebebiyet verir. Süreç ve ürün geliştirme sırasında QbD benimsenmesi, Rathore ve Winkle tarafından özetlendiği gibi beş farklı aşamadan oluşan sıralı bir döngüyü takip eder. Bu aşamalar şunlardır: i) tanımlama, ii) tasarım, iii) karakterizasyon, iv) doğrulama v) izleme ve kontrol (Rathore ve Winkle, 2009, Sahu vd., 2018).



Şekil 2.6. QbD odaklı kromatografik yöntem geliştirmede önemli adımlar

Şekil 2.6, süreçlerin veya yöntemlerin geliştirilmesinde QbD uygulamasının kapsadığı temel aşamaları göstermektedir. QbD uygulamasının ilk aşamasında Analitik Hedef Profiline (AHP) belirlenmesi yer alır. Analitik yöntemin AHP'si, gerekli ayırıştırmanın sürekli olarak elde edilmesini sağlamak için ideal olarak ulaşılması gereken performans veya süreç kabiliyeti gibi kalite niteliklerini ifade eder. Bu, yöntemin ayırma verimliliği, analitlerin alıkonma özellikleri ve katı faz ekstraksiyon tekniğinin sınırları gibi faktörleri kapsar. Yaklaşımın kritik kalite özelliklerinin (KKÖ) belirlenmesi, AHP hedefine dayanmaktadır. Sonraki araştırma, analistin kritik yöntem parametrelerini (KYP'ler) belirlemesine ve bunların kritik kalite nitelikleri (KKN'ler) üzerindeki etkilerini değerlendirmesine olanak tanıyan risk analizi için tasarım alanlarının kullanılmasını içerir. HPLC yöntemleri, bilgisayar modelleme yazılımı kullanarak tasarım yoluyla kalite çerçevesinde KYP'leri yaygın olarak değerlendirir. Tasarım uzayında dikkate alınan bu KYP'ler tipik olarak kolon sıcaklığı, gradyan süresi, sulu eluent pH'ı ve sabit fazı kapsar. DoE tarafından önerilen testlerin yürütülmesi, tasarım alanı içindeki ideal koşulların belirlenmesine yardımcı olan Kritik Malzeme Süreci (KMS) kontrol stratejisinin tanımlanmasını sağlar. Bu yaklaşım aynı zamanda süreç

doğrulama aşamasında esneklik sağlar. Bu, metodolojinin performansında sürekli izleme ve yinelemeli iyileştirme için bir temel oluşturulmasını sağlar.

Bilgisayar destekli sıvı kromatografik teknik geliştirmede QbD ilkelerinin uygulanması, analitlerin yüksek verimli taranmasını kolaylaştırma kabiliyeti nedeniyle önemli ölçüde uluslararası kabul görmüştür. Analitik karakterizasyon için çeşitli kromatografik modların kritik değerlendirmesi, en önemli kritik değişkenlerle (KYP'leri) ilişkili olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Tyteca vd., 2016). Çok sayıda örnek, HPLC yöntemlerinin oluşturulması ve doğrulanmasının QbD ilkelerinin yokluğunda yetersiz kaldığını göstermiştir (Sahu vd., 2018).

Modeller gözlemlenebilir gerçeklerden anlam çıkarmada çok önemli bir rol oynadığından, ham deneysel verilerin yorumlanması anlamlı öngörüler elde etmek için gereklidir. Bir kromatografik yöntemin geliştirilmesinde optimum deneysel koşulların rasyonel seçimi, pH, katkı maddelerinin türü ve lipofilikliği, organik değiştiricilerin konsantrasyonları, iyonik güç ve sabit faz paketleme gibi faktörleri içeren genişletilmiş optimizasyon parametre alanı nedeniyle önemli bir zorluk olabilir. Ayrıca, iyonik olmayan, iyonize olabilen ve iyonik çözünenler dahil olmak üzere farklı analit türlerinin varlığı süreci daha da karmaşık hale getirmektedir. Yerleşik teorik kanunlardan veya ilkelere türetilen ve tahmin yetenekleri içeren teorik modellerin aksine, kemometrik modeller doğası gereği ampiriktir. Bununla birlikte, büyük bir çok yönlülük sergilerler ve bir sistemin tepkisini tanımlamada oldukça değerlidirler (Kalinowska vd., 2021).

2.11. Farmasötik Analizlerde Moleküler Docking

API'deki safsızlıkların etkilerinin erken tanımlanması, ilaç keşfinde büyük önem arz etmektedir. Aslında safsızlıkların çoğunun, hedef dışı etkileşimlerden kaynaklanan yan etkiler nedeniyle klinik denemelerde başarısız olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca, onaylanmış ilaçlara ilişkin pazarlama sonrası safsızlık etki analizleri (örn. farmakovijilans) da önemlidir. Çünkü bunlar, klinik ve toksikolojik araştırmalarda sıklıkla tespit edilemeyen potansiyel güvenlik risklerinin ortaya çıkarılmasına olanak tanır (de Oliveira Melo vd., 2014). Bunun için çeşitli hesaplamalı yaklaşımlar mevcuttur (Parenti ve Rastelli, 2012). Ancak bunların çoğu, model eğitimi için bir girdi olarak tatmin edici miktarda biyoaktivite verisine veya halihazırda rapor edilmiş olumsuz etkilere ihtiyaç duyar (Daoud vd., 2021). Öte yandan, moleküler kenetlenme tahminlerini gerçekleştirmek için ise yalnızca hedeflerin yapısal bilgisine ihtiyaç duymaktadır. Bu

nedenle, bileşiklerin potansiyel yan etkilerini klinik ve klinik öncesi gelişmelerin erken aşamalarında veya henüz kapsamlı ilaç etiketleri ve biyoaktivite kayıtları rapor edilmemiş olan pazarlanan ilaçlar üzerinde tahmin etmek için değerli bir yaklaşım olacaktır (Ganorkar ve Vander Heyden, 2022, Pinzi ve Rastelli, 2019).

Moleküler docking, proteinlerin aktif bölgelerindeki bir veya daha fazla molekülün tercih edilen yönelimini bulan bir yöntemdir (Lengauer ve Rarey, 1996). En iyi konformasyon, puanlama işlevleriyle seçmek, yerleştirme ise bir dizi olası kompleks oluşturmak ve aynı zamanda tercih edilen yönelim de bağlanma afinitesini tahmin etmek için kullanılır. Moleküler docking, küçük moleküller ile proteinin bağlanma bölgeleri arasındaki optimal konformasyonu tahmin etme yeteneğine sahip olduğu için ilaç tasarımında sıklıkla kullanılmaktadır. Bağlanma yapısının karakterizasyonu, ilaçların makul tasarımında ve biyokimyasal süreçlerin esaslarının açıklığa kavuşturulmasında büyük rol oynar. Docking yani tamamlayıcılık, moleküler kenetlenmenin ana ilkesidir. Yerleştirme sürecinde geometri ve enerji olmak üzere iki önemli parça vardır. Geometrik tamamlayıcı görüşü, uygun konfigürasyon oluşturmak için protein ve ligandın topografik özelliklerin tanımlayıcılarıyla eşleştiğine işaret eder (Liu vd., 2018).

Küçük bir molekülün bir proteine kenetlenmesine yönelik algoritma, ligand-protein esnek kenetlemede kullanılabilecek benzer bir yaklaşıma dayanmaktadır. Bu yaklaşımda, tekli veya çoklu konformasyonlardaki tekli veya çoklu küçük moleküller, potansiyel ligandları bulmak için bir reseptör bölgesine bağlanmaya çalışılır. Ligandları ve bağlanma konformasyonlarını tanımlama yetenekleri nedeniyle, bu algoritmaların, küçük bir molekülün bağlanabileceği veya zayıf bir şekilde bağlanabileceği birden fazla protein hedefini bulmak için ters yerleştirme işlemine eşit derecede uygulanabilir olması beklenir.

Bu yöntem, reseptör bazlı bir yaklaşım olması açısından benzersizdir. Bir ilaç molekülünün potansiyel toksisitesi ve yan etkisi, toksisite ve yan etkilerle ilgili potansiyel protein hedeflerinin araştırılmasıyla araştırılır. Bu potansiyel hedefler iki kriterden seçilir: birincisi, bu molekülün bu proteinlerin her birine bağlanıp bağlanamayacağı, ikincisi ise bağlanan molekülün reseptörüne bağlanmasının, mekanik ligand-protein etkileşim enerjisi ile bir moleküler analiz tarafından değerlendirilecek kadar güçlü olup olmadığıdır.

Son yıllarda tartışılan metodolojilerin her birinde, Bağlantı Haritasına (CMap) dayanan transkripsiyon yöntemlerinin bazı etkileyici in vivo doğrulamaları da dahil

olmak üzere gelişmeler olmuştur. Ayrıca, verileri platformlar arasında birleştiren diğer yöntemleri ve elektronik sağlık kayıtları gibi ek veri kaynaklarını ve son derece umut verici olan ancak henüz yeniden konumlandırma için doğrudan uygulanmamış tarama verileri mevcuttur.

Yeniden konumlandırma yöntemlerinin standart ilaç keşfi yöntemleriyle ortak özellikleri vardır; varlıklar arasındaki yeni bağlantıları tespit ederler ve alan uzmanlığını kullanarak ilaç-hastalık bağlantısını tamamlarlar. Geleneksel hedefe dayalı ilaç keşfi, bir hedefi bir hastalığa bağlar ve hedefe bağlanan ilaca benzer molekülleri bulmak için bir tarama süreci kullanılır. Fenotipik tarama hedefi atlar ve doğru fenotipik davranışı sergileyecek ilaç benzeri bir molekül bulmak için doğrudan girişimde bulunur. Yeniden konumlandırma yöntemlerinin çoğu benzer yaklaşımlar kullanır ancak farklı kavramları birbirine bağlar. Bu yöntemlerden üçünü daha ayrıntılı olarak ele alıyoruz:

1. CMap gibi transkriptomik yöntemler, ilacı bir hastalığın belirli bir yönü ile ilişkilendirir (örneğin, genom çapında gen ekspresyonuna dayalı yeni bir fenotip) ve daha sonra bu bilgiyi hastalığın kendisine tahmin eder.

2. Yan etki yöntemleri, bir hastalığı tedavisiyle ilişkili bir dizi yan etki temelinde temsil ederek ve ardından benzer yan etkilere sahip diğer ilaçları belirleyerek ilaçları yeni hastalık belirtileriyle ilişkilendirir.

3. Genetiğe dayalı yöntemler, hedefi, hastalığın kendisi veya hastalıkla ilgili bir fenotip olabilen genetik bir fenotipe bağlar.

Substrat ve enzim arasında iyonik etkileşimler, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve Van der Waals kuvveti vb. içeren birçok afinite vardır. Genellikle hidrojen bağı, oksijen gibi yüksek elektronegatif bir atoma bağlanan hidrojen atomu tarafından oluşturulur ve nitrojen, etkileşimlerin istikrarını korumada hayati bir rol oynar. İyonik etkileşimler, zıt yüklü iyonların veya moleküllerin çekilmesini içerir ve elektrostatik etkileşimlerde moleküller arasında güçlü bir kuvvettir. Örneğin iyonik etkileşimler proteindeki termostabiliteyi koruyabilir. Van der Waals, iyonik bağların veya kovalent bağların oluşumundan farklı moleküler varlıklar arasındaki itici veya çekici kuvvetlere aittir. Hidrofoblar ve su arasındaki ilişkileri temsil eden hidrofobik etkileşimler, iç moleküller veya moleküller sırasındaki daha zayıf etkileşimlerdir. Genellikle su molekülleriyle etkileşime girmeyen uzun karbon zincirlerinden oluşan hidrofoblar, polar olmayan moleküllerdir. Hidrofobik etkileşimler aynı zamanda uzaysal yapının ve

biyolojik aktivitenin stabilitesi açısından da önemlidir, çünkü proteinlerin hidrofilik yüzeyi küçülecek ve azalacaktır (Liu vd., 2018).

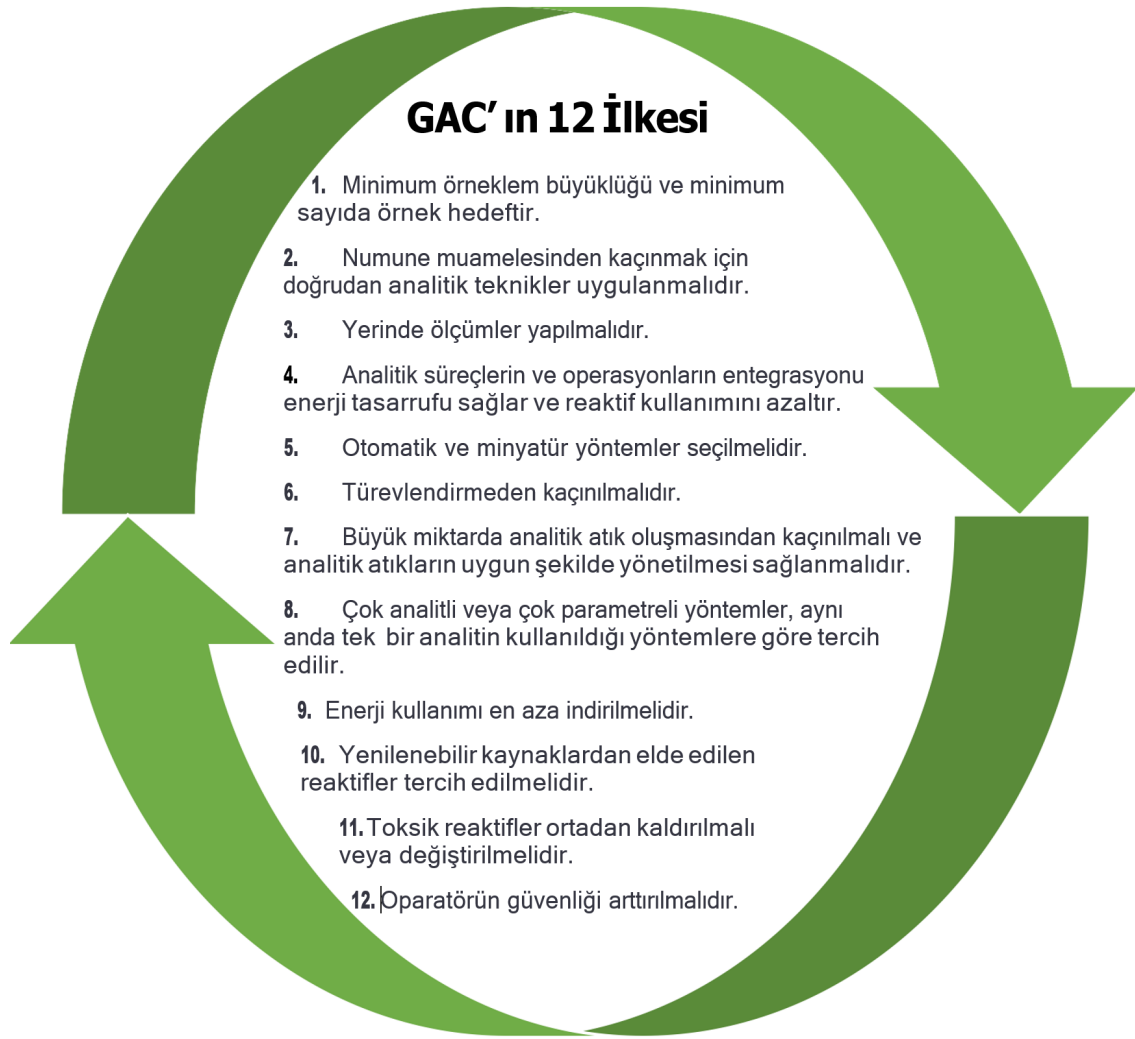
2.12. Yeşil Kimya

Sürdürülebilir büyümenin teşvik edilmesi, yeşil kimyanın hem laboratuvar hem de endüstriyel ortamlarda merkezi bir itici güç olarak yaygın bir şekilde benimsenmesine yol açmıştır. Yeşil kimyanın on iki ilkesi, yeşil kimyanın benimsenmesini ilerletmek isteyen herkes için temel bir çerçeve görevi görmektedir (Anastas ve Eghbali, 2010). Bu bulgular, kimyasal malzemelerin ve süreçlerin çevresel sürdürülebilirliğini artırmayı amaçlayan stratejilerin uygulanması için bir temel sağlar (Anastas ve Kirchhoff, 2002). Organik sentez, kimya mühendisliği ve analitik kimya dahil olmak üzere kimya alanındaki çeşitli disiplinlerden kimyagerler bu prosedürlerin formüle edilmesinden sorumludur. Kimyasal proseslerin çevresel sürdürülebilirliğini artırmaya yönelik çabaların çoğunun odak noktası daha temiz, daha az zararlı ve daha çevre dostu çözümlerin kullanılması, çözümlerin azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılması ve aynı zamanda reaktiflerin ve yardımcı maddelerin kullanımının en aza indirilmesidir. Diğer stratejiler, daha az şiddetli reaksiyon koşullarının kullanılması, türevlendirmeden kaçınılması ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilen substratların araştırılması yoluyla enerji tüketiminin azaltılmasını kapsamaktadır (Wardencki vd., 2005). Yukarıda bahsedilen çözümler 1998 yılından itibaren açıkça tanımlanmış ve amaca yönelik olarak uygulanmış olup, varlıkları uygulamalarından çok önce kabul edilmiştir (Paul, 2008).

Yeşil kimya alanında, kimyasal süreçlerin çevresel sürdürülebilirliğinin değerlendirilmesi ve ölçülmesi kayda değer bir zorluktur (Plotka-Wasyłka vd., 2021). Ölçülebilirlikten yoksun süreçlerin doğası gereği kontrol dışı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Yeşil kimyasal yönetim kavramı, en çevre dostu seçeneğin seçilmesini teşvik eden bir mekanizma olarak anlaşılabilir. Geliştirme ve uygulama sürecinde ölçütlerin kullanılması, mevcut ve yeni geliştirilen çözümlerin çevresel sürdürülebilirliğinin değerlendirilmesini ve karşılaştırılmasını kolaylaştırır. Halihazırda kimyasal süreçlerin çevresel etkilerini değerlendirmek için farklı karmaşıklık düzeylerine sahip farklı ölçütler kullanılmaktadır (Tobiszewski vd., 2015).

Endüstriyel süreçlerin çoğunda birincil amaç belirli bir ürün elde etmektir. Bu nedenle, nihai bir çıktıya dönüşmeyen herhangi bir girdi, süreçte atık olarak sınıflandırılır. Kimyasal reaksiyonların, ilgili ürünlerin ve atıkların etkisinin ölçümü, yeşil kimya

kavramları uygulanarak gerçekleştirilebilir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022). Bununla birlikte, tipik sentetik kimya veya endüstriyel prosedürlerle kıyaslandığında analitik kimyanın sonuçlarında belirgin farklılıklar vardır. Sonuç, analitik ölçüm süreci sırasında elde edilen nihai sonucu ifade eder (Tobiszewski vd., 2015). Endüstriyel prosedürlerin aksine, çözücülerin ve reaktiflerin kullanımı önemli ölçüde azaltılmış bir ölçekte gerçekleşir ve bu da atık maddelerin üretiminde orantılı bir azalmaya neden olur. Daha önce de belirtildiği gibi, analitik bir süreç veya tekniğin doruk noktası analitik sonuçlar verir; burada çözücüler, reaktifler ve diğer girdiler toplu olarak atık oluşumuna katkıda bulunur. Daha küçük ölçekte olsa da, analitik atıklar yine de dağınık kontaminasyona katkıda bulunur ve bu nedenle miktarını mümkün olduğunca en aza indirmek için çaba gösterilmelidir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022). Bu da solvent, reaktif ve diğer girdilerin miktarının azaltılmasıyla sağlanabilir. Ayrıca, çevre dostu alternatiflerin uygulanması etkin bir şekilde organize edilebilir (Tobiszewski, 2016). Analitik prosedürün çevresel etkisi, tüketilen enerji miktarından da etkilenebilir (Tobiszewski vd., 2015). Tüm yeşil kimya ilkelerinin analitik kimya alanına sınırlı uygulanabilirliği nedeniyle, 2013 yılında yeşil analitik kimyaya (GAC) özel olarak uyarlanmış on iki ilkedен oluşan bir dizi oluşturulmuştur (Gałuszka vd., 2013). GAC, analitik prosedürlerin çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmede farklı hedeflere ve amaçlara sahiptir (Tobiszewski vd., 2015).



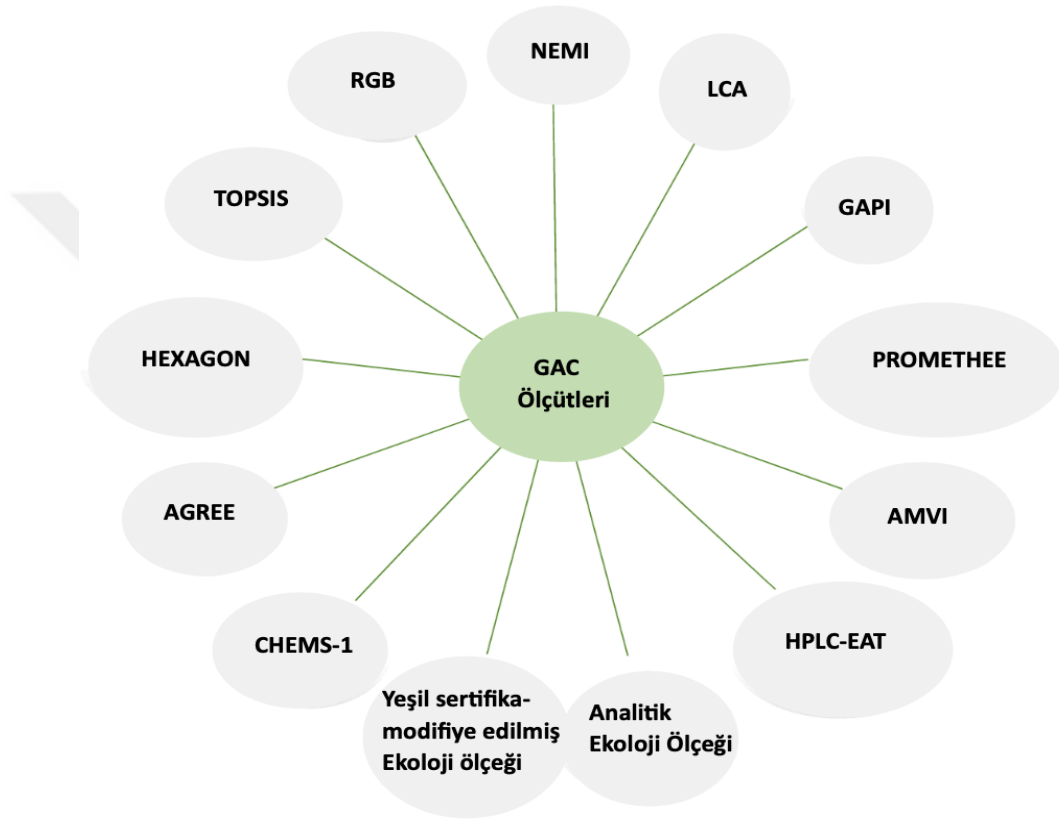
Şekil 2.7. Yeşil Analitik Kimyanın 12 ilkesi (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022)

GAC'ın on iki ilkesi analitik tekniğin birçok yönünü kapsamakta ve her bir yön için en çevre dostu çözümü önermektedir (Şekil 2.7). Analitik yöntemlerin çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmek için çeşitli ölçütler geliştirilmiştir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

2.12.1. Yeşil analitik kimya için metrikler

Zaman içinde, analitik tekniklerin çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmek için çok sayıda ölçüt geliştirilmiştir (Şekil 2.8). Bazı araçlar belirli analitik prosedür türleri için özel olarak tasarlanırken, diğerleri daha genel bir yapıya sahiptir ve çok çeşitli analitik tekniklere uygulanabilir. Bu seçenekler arasında sınırlı sayıda araç son zamanlarda önemli ölçüde popülerlik kazanmıştır. Yeşil analitik kimya alanında

kullanılabilecek çeşitli metrikler arasında; Analitik Yöntem Hacim Yoğunluğu (AMVI), Yönetim Stratejileri için Kimyasal Tehlike Değerlendirmesi (CHEMS-1), Yeşil Analitik Prosedür Endeksi (GAPI), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - çevresel değerlendirme araçları (HPLC-EAT), Yaşam Döngüsü Değerlendirmesi (LCA), Ulusal Çevre Yöntemleri Endeksi (NEMI), Analitik Yeşillik Hesaplama Metriği (AGREE) şeklinde tercih sıralaması bulunmaktadır (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).



Şekil 2.8. Yeşil analitik kimyada kullanılabilecek seçilmiş metrikler (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022)

Ancak; Analitik Eko Ölçek, GAPI ve AGREE ölçütleri, çok çeşitli analitik tekniklere uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.8’de atıfta bulunulan ölçümlerden bazıları belirli analitik teknik türleriyle sınırlıdır Analitik Eko-Ölçek, GAPI ve AGREE metrikleri, Scopus’taki önemli atıf sayıları nedeniyle akademik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

2.12.2. Ulusal Çevresel Yöntem Endeksi: NEMI

NEMI etiketleme sistemi, analitik yöntemlerin çevresel sürdürülebilirliğinin değerlendirilmesine yönelik en eski ve en köklü mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir. NEMI etiketi, dört farklı alana bölünmüş dairesel bir şekil ile karakterize edilir. Bağlam içindeki her bir alan analitik yaklaşımın farklı bir yönünü temsil etmektedir. Belirli kriterler karşılandığında alan "yeşil" olarak belirlenir (Keith vd., 2005). İlk kategorinin "yeşil" olarak tanımlanabilmesi için, analitik süreçte kullanılan maddelerin hiçbirinin kalıcı, biyo-birikimli ve tehlikeli bileşikler listesinde yer almaması gerekmektedir. İkinci alanın yeşil renk göstermesi için, süreçte kullanılan kimyasalların hiçbirinin D, F, P veya U listelerine göre tehlikeli atık olarak sınıflandırılmamış olması zorunludur. Üçüncü alan, numunenin pH'ı 2 ile 12 aralığında olduğunda yeşil olarak belirlenebilir, böylece çok aşındırıcı koşullar riski azaltılmış olur. Dördüncü alan, üretilen çöp miktarı 50 gramı geçmediğinde yeşil olarak belirlenir. İlgili alanlara kırmızı, sarı ve yeşilden oluşan bir renk şeması ekleyerek NEMI aracının anlamlılığını ve ölçülebilirliğini artırmak için bir öneride bulunulmuştur. Kırmızı renk çevre dostu olmayan bir analitik tekniği gösterirken, sarı renk orta düzeyde bir çevresel etkiyi ifade etmektedir. Öte yandan, yeşil renk iyi huylu ve çevre dostu bir analitik prosedürü temsil etmektedir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

Bir yeşillik değerlendirme yöntemi olarak NEMI'nin başlıca faydalarından biri, altta yatan sürecin anlaşılmasını kolaylaştıran kullanıcı dostu doğasıdır. NEMI sembolünün üstünkörü bir incelemesi, çevre üzerindeki operasyonel sonuçlar hakkında temel bilgi sağlamak için yeterlidir. NEMI sembolü ile ilgili iki temel sınırlama bulunmaktadır. İlk olarak, bu sembolle elde edilen veriler geniş ve genelleştirilmiş bir yapıya sahip olma eğilimindedir. İkinci olarak, NEMI sembolünü tamamlama süreci zaman alıcıdır. NEMI sembolü, her bir tehlikenin belirli bir eşik değerine göre konumlandırılması için bir gösterge görevi görmektedir. Sonuç olarak, yarı niceliksel olarak sınıflandırılması mümkün değildir. Bir diğer dezavantaj ise, özellikle prosedür sırasında birden fazla atipik bileşik kullanıldığında, işaretlemenin hazırlanmasındaki zorluktur (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

2.12.3. Analitik Eko Ölçek

2012'de geliştirilen Analitik Eko-Ölçek, analitik prosedürlerin çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmek için kullanılan yaygın bir araç olarak kabul

edilmektedir (Galuszka vd., 2012). Analitik Eko-Ölçek, 100'lük kümülatif bir puandan ceza puanları düşerek çalışır. Araç, "ideal yeşil analiz" kavramına 100 puan vermiştir. Ceza puanları, kullanılan çözücülerin ve reaktiflerin türleri ve miktarları, enerji tüketimi, mesleki riskler, atık üretimi ve atık yönetimi uygulamaları dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak belirli bir sürece tahsis edilir. Analitik eko-ölçek tarafından üretilen sayısal sonuç, kümülatif ceza puanlarının 100 değerinden çıkarılmasıyla elde edilir. Puan 100'e yaklaştıkça analiz daha yüksek bir yeşillik derecesi sergileyecektir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

Analitik Eko Ölçeğe göre, bir teknik aşağıdaki kriterleri karşılıyorsa "ideal yeşil analiz" olarak sınıflandırılabilir:

- i. Çözücüler veya reaktifler herhangi bir fiziksel, çevresel veya sağlık riski oluşturmaz.
- ii. Numune başına enerji kullanımı 0,1 kilowatt-saatten (kWh) azdır.
- iii. Atık üretimi yoktur.

Bu koşul yalnızca doğrudan ölçümleri içeren ve numune seyahati, muhafazası, işlenmesi veya hazırlanmasını içermeyen sınırlı sayıda prosedürle karşılanabilir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

Kimyasalların en eksiksiz ve güncel kategorizasyonu olan Küresel Uyumlaştırılmış Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesi Sistemi (GHS) çözücülerin veya reaktiflerin fiziksel, çevresel ve sağlık tehlikelerine erişmek için kullanılır (Nations, 2011).

Reaktiflere veya solventlere ceza puanı atama yöntemi oldukça basittir. Bu, kimyasal bir kap veya şişe üzerinde etiketlenmiş tehlike piktogramları ile başlar. Her tehlike piktogramı bir ceza puanı kazandırır. Ayrıca, kimyasal "tehlike" kelimesiyle tanımlanmışsa, tehlike piktogramlarının sayısı iki ile çarpılırken, kimyasal "uyarı" kelimesiyle tanımlandığında, tehlike piktogramlarının sayısı bir ile çarpılır. Tablo 2.4, yaygın olarak kullanılan bazı solventler ve reaktifler için tehlike PP'lerini hesaplamak için örnekler vermektedir. Bu şekilde hesaplanan ceza puanlarının sayısı ayrıca reaktif veya çözücü miktarıyla ilgili ceza puanlarıyla çarpılır. Reaktif veya çözücü miktarı 10 mL veya 10 g'dan az ise tehlike puanı bir ile, miktar 10 ile 100 mL (g) arasında ise iki ile ve miktar 100 mL veya 100 g'dan fazla ise üç ile çarpılır. Bu hesaplamalar için genel denklem aşağıdaki gibi sunulabilir (Tobiszewski vd., 2015):

Tablo 2.4. Yaygın olarak kullanılan bazı çözücüler ve reaktifler için tehlike PP'leri (Tobiszewski, 2016)

Kimyasal	Piktogram sayısı	Sembol etiketi (Uyarı = 1, Tehlike = 2)	Tehlike PP'leri
Asetonitril	2	2	4
Metanol	3	2	6
Etil asetat	2	2	4
Dietil eter	2	2	4
Aseton	2	2	4
Benzen	3	2	6
İzooktan	4	2	8
İzopropanol	2	2	4
Toluen	3	2	6
Kloroform	3	2	6
Etanol	2	2	4
Diklorometan	2	2	4
n-hekzan	4	2	8
Karbon tetraklorür	2	2	4
Nitrik asit (%65)	2	2	4
Benzoik asit	1	1	1

Çözücü veya reaktif PP'leri = Tehlike piktogramlarının sayısı $\times$ Risk etiketi (Uyarı = 1 veya Tehlike = 2) $\times$ Kimyasal miktarı (<10 mL veya 10 g = 1, 10-100 mL veya g = 2, >100 mL veya 100 g = 3).

Çözücülerin veya reaktiflerin toplam PP'lerini hesaplamak için, Tablo 2.4'de verilen tehlike PP'leri kimyasalın veya reaktifin hacmi/miktarı ile ilişkili PP'lerle çarpılacaktır (<10 mL veya 10 g = 1, 10-100 mL veya g = 2, >100 mL veya 100 g = 3).

Enerji tüketimi için PP'ler aşağıdaki kriterlere göre atanır:

Numune başına $\leq 0,1$ kWh enerji tüketimi = 0, Numune başına $\leq 1,5$ kWh enerji tüketimi = 1, Numune başına $\geq 1,5$ kWh enerji tüketimi = 2.

Yaygın olarak kullanılan bazı alet ve proseslerin listesi, enerji tüketimi açısından karakterizasyonu ve ilgili ceza puanları ile ilgili bilgiler Tablo 2.5'te verilmiştir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Tablo 2.5. Yaygın olarak kullanılan bazı alet ve proseslerin listesi, enerji tüketimleri ve ilgili ceza puanları (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022)

Enstrüman/Proses	Kullanılan enerji	PP'ler
FTIR, İmmünoassay, Spektrofluorometri, Titrasyon, UPLC, UV-VIS spektrometresi, sıcak plaka çözücü buharlaştırma (<10 dakika), iğneli buharlaştırıcı, sonikatör	Numune başına <0,1 kWh	0
AAS, GC, ICP-MS, LC	Örnek başına ≤1,5 kWh	1
NMR, GC-MS, LC-MS, XRD, sıcak plaka çözücü buharlaştırma (>2,5 saat)	Örnek başına >1,5 kWh	2

Analitik prosedür sırasında havaya herhangi bir gaz veya buhar salınırsa, buna üç PP atanır. Bununla birlikte, analitik süreç hermitize edilmişse, hiçbir PP düşülmez. Analitik prosedür atık oluşumuyla sonuçlanırsa, bu atığa aşağıda verildiği gibi miktarına göre PP'ler atanır:

<1 mL veya 1 g = 1, 1-10 mL veya 1-10 g = 3, >10 mL veya 10 g = 5.

Atığın üretilmesi durumunda, işlenmesine de aşağıdaki kriterlere göre bir puan verilir:

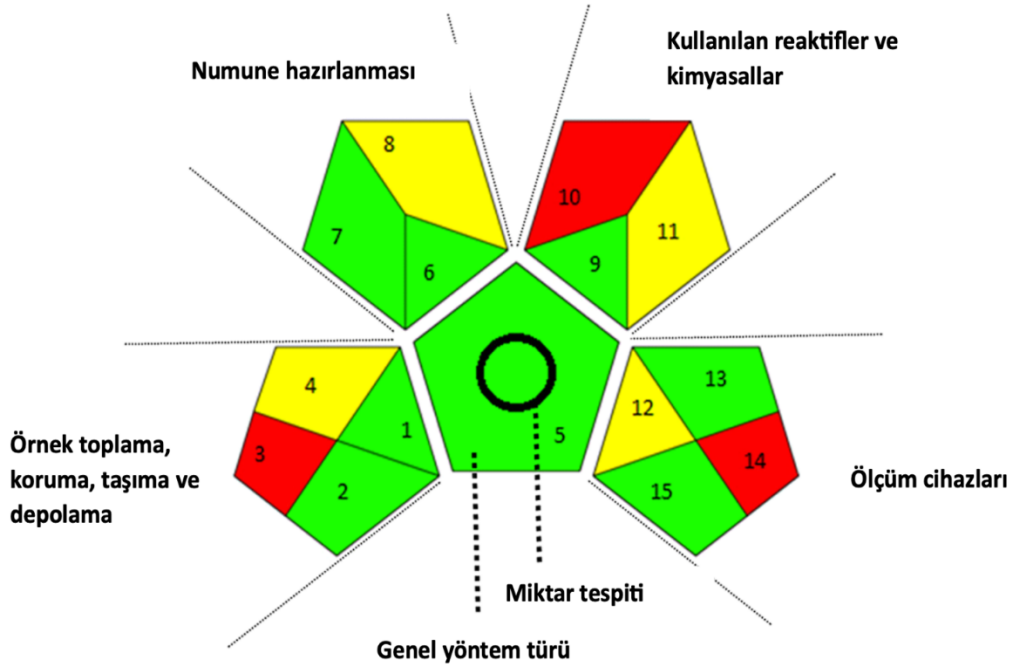
Geri dönüşüm = 0, Bozunma = 1, Pasivasyon = 2, İşlem yok = 3.

Nihai puan, toplam PP'lerin 100'den çıkarılmasıyla elde edilir. 75'in üzerindeki bir puan "mükemmel yeşil analiz" olarak kabul edilir. 50-75 aralığındaki bir puan "kabul edilebilir yeşil analiz" olarak kabul edilir. 50'den düşük bir puan "yetersiz yeşil analiz" olarak kabul edilir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

2.12.4. Yeşil Analitik Prosedür Endeksi: GAPI

GAPI ilk olarak 2018 yılında, analitik tekniğin tamamının çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmenin bir yolu olarak oluşturulmuştur (Płotka-Wasyłka, 2018). GAPI çerçevesi, beş pentagram içeren bir piktogram üzerine kurulmuştur. Her bir pentagram, analitik teknikteki her bir aşama ile ilişkili çevresel zararı temsil etmektedir. Pentagramın bileşenlerine, etkinin ciddiyetinin değişen derecelerini belirtmek üzere yeşil, sarı ve kırmızı gibi farklı renkler atanmıştır. GAPI, okuyuculara analitik teknikteki çeşitli

aşamaların çevresel sürdürülebilirliğinin kısa ve eksiksiz bir değerlendirmesini sunmaktadır (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).



Şekil 2.9. GAPI piktogramındaki farklı pentagramların açıklaması (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022)

GAPI sembolü beş adet beş köşeli yıldızdan oluşmaktadır (Şekil 2.9). Beş pentagram, analitik metodoloji çerçevesinde farklı aşamalarla ilgilidir.

İlk pentagram örnekleme ile ilgilidir ve 1, 2, 3 ve 4 numaraları ile gösterilen dört alana sahiptir. Alan 1 numune toplama ile ilgilidir. Bu alan, numune hat içinde toplanmışsa yeşil, numune hat üzerinde veya hatta toplanmışsa sarı ve numune hat dışında toplanmışsa kırmızı olarak etiketlenir. Alan 2 numunenin muhafazası ile ilgilidir. Numune, bütünlüğünü korumak için korunur. Numunenin korunması gerekmiyorsa 2. alan yeşil olarak etiketlenir. Fiziksel veya kimyasal koruma gerektiğinde sarı olarak etiketlenir. Hem fiziksel hem de kimyasal korumanın gerekli olduğu durumlarda 2. alan kırmızı renkte etiketlenir. Alan 3 numunenin taşınması ile ilgilidir ve taşıma gerekmiyorsa yeşil, taşınması gerekiyorsa sarı renkte etiketlenir. Alan 4 numunenin depolanması ile ilgilidir. Numunenin herhangi bir depolama gerektirmemesi durumunda, alan 4 yeşil olarak etiketlenir. Ancak numune normal koşullarda saklanıyorsa sarı renkte olacaktır. Numunenin saklanması için özel koşullar gerekiyorsa 4. alan kırmızı olarak

etiketlenmelidir. Özetle, pentagram 1'in farklı alanlarının renklerine baktıktan sonra, farklı numune alma adımlarının çevresel etkileri hakkında bir fikir sahibi olunabilir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

İkinci pentagram yöntemin türüyle ilgilidir. Sadece bir alanı vardır ve bu alan 5 rakamı ile gösterilir. Yöntem herhangi bir numune hazırlığı gerektirmiyorsa Alan 5 yeşil olarak etiketlenir. Filtrasyon, dekantasyon gibi bazı basit adımların gerekli olması durumunda sarı renkte olacaktır. Numune hazırlığının bir ekstraksiyon adımı gerektirmesi durumunda, 5 numaralı alan kırmızı olarak etiketlenecektir. (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022)

Üçüncü pentagram, ekstraksiyon ölçeği, kullanılan çözücüler/reaktifler ve ek işlemler gibi farklı numune hazırlama adımlarıyla ilgilidir. Bu pentagramın 6, 7 ve 8 numaralarıyla etiketlenmiş üç alanı vardır. Alan 6 ekstraksiyon ölçeği ile ilgilidir ve ekstraksiyon nano ölçekte gerçekleştiriliyorsa yeşil, mikro ölçekte gerçekleştiriliyorsa sarı ve makro ölçekte gerçekleştiriliyorsa kırmızı olarak etiketlenir. Alan 7, ekstraksiyon adımıyla kullanılan çözücülerin doğası ile ilgilidir. Yöntem solventsiz veya çözücüsüz olduğunda yeşil olarak etiketlenir. Yeşil çözücüler/reaktifler kullanılmışsa sarı olarak etiketlenir. Ekstraksiyon için yeşil olmayan çözücüler/reaktifler kullanıldığında kırmızı renklidir. Alan 8 bir yöntemin ekstraksiyona ek olarak gerektirebileceği ek işlemlerle ilgilidir. Ek bir işlem gerekmediğinde bu alan yeşil renklidir. Bir yöntemin çözücü giderme veya temizleme gibi basit bir işlem gerektirmesi durumunda sarı olarak etiketlenir. Ancak, türevlendirme veya mineralizasyon gibi ileri işlemlerde 8 numaralı alan kırmızı olarak etiketlenecektir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Dördüncü pentagram çözücülerin/reaktiflerin miktarı ve bunların sağlık ve güvenlik tehlikeleriyle ilgilidir. Bu pentagram 9, 10 ve 11 rakamlarıyla gösterilen üç alan içerir. Alan 9 çözücülerin/reaktiflerin hacmi/miktarı ile ilgilidir. Hacim/miktar 10 mL'den (10 g) az ise 9 numaralı alan yeşil renklidir. Hacim/miktar 10-100 mL (g) olduğunda sarı renkle etiketlenir. Çözücü hacmi/miktarı 100 mL'yi (g) aşıyorsa kırmızı olarak etiketlenir. Alan 10 kullanılan solventlerin/reaktiflerin sağlık tehlikesi ile ilgilidir. Eğer solventler/reaktifler gözle görülür derecede toksikse ve NFPA sağlık tehlikesi skoru 0 veya 1 ise, alan 10 yeşil olarak etiketlenir. Solventler/reaktifler orta derecede toksikse ve NFPA sağlık tehlikesi puanı 2 veya 3 ise, 10 numaralı alan sarı olarak etiketlenir. Ancak, kullanılan çözücüler/reaktifler yüksek derecede toksikse ve NFPA sağlık tehlike puanı 4 ise, 10 numaralı alan kırmızı olarak etiketlenecektir. Alan 11 kullanılan

solventlerin/reaktiflerin güvenlik tehlikesi ile ilgilidir. NFPA yanıcılık veya kararsızlık puanı 0 veya 1 ise yeşil, NFPA yanıcılık veya kararsızlık puanı 2 veya 3 ise sarı ve NFPA yanıcılık veya kararsızlık puanı 4 ise kırmızı olarak işaretlenir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Beşinci pentagram, alet tarafından tüketilen enerji, mesleki tehlikeler, üretilen atıklar ve bunların işlenme biçimiyle ilgilidir. 12, 13, 14 ve 15 sayıları ile gösterilen dört alana sahiptir. Alan 12, cihazın numune başına enerji tüketimi ile ilgilidir. Numune başına enerji tüketimi 0,1 kWh'den az ise, 12 numaralı alan yeşil olarak etiketlenecektir. Eğer 1,5 kWh'e eşit veya daha az ise, bu alan sarı renkte olacaktır. Numune başına enerji tüketimi 1,5 kWh'den fazlaysa, alan 12 kırmızı renkte olacaktır. Alan 13 mesleki tehlikelerle ilişkilidir. Yeşil veya kırmızı olarak etiketlenir. Analitik sürecin hermetik sızdırmazlığı varsa, yeşil renklidir. Atmosfere buhar veya gaz yayılması durumunda, alan 13 kırmızı olarak etiketlenir. Alan 14 analitik prosedür sırasında ortaya çıkan atık miktarı ile ilişkilidir. Bu miktar 1 mL'den (g) az ise 14 numaralı alan yeşil olarak etiketlenecektir. Bu miktar 1 ila 10 mL (g) arasında değişiyorsa sarı olarak işaretlenecektir. Atık miktarı 10 mL'yi (g) aşıyorsa, alan 14 kırmızı olarak etiketlenecektir. Alan 15 atığın işlenmesi ile ilgilidir. Atığın geri dönüştürülmesi durumunda yeşil olarak işaretlenecektir. Atığın bozunma veya pasifleştirme yoluyla arıtılması durumunda sarı olarak işaretlenecektir. Ancak, atığın hiç işlenmemesi durumunda 15. alan kırmızı olarak işaretlenecektir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

İkinci pentagramın içindeki daire, yöntemin sadece kalifikasyon için mi yoksa hem kalifikasyon hem de miktar tayini için mi kullanıldığını belirtmek için kullanılır. Yöntem hem kalifikasyon hem de miktar belirleme için kullanılıyorsa bir daire yerleştirilir. Yöntem sadece kalifikasyon için kullanılıyorsa daire yerleştirilmez (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

2.12.5. Analitik Yeşillik Hesaplayıcı: AGREE

AGREE 2020 yılında geliştirilmiş olup AGREE'nin tüm fikri, GAC'nin 12 ilkesi etrafında dönmektedir (Pena-Pereira vd., 2020). Daha çevreci analitik metodolojiler geliştirmek için bu 12 ilkeye mümkün olduğunca uyulmalıdır. AGREE metriği, girdinin kapsamlılığına, girdi öneminin esnekliğine (her ilke için farklı ağırlıklar), çıktının basitliğine ve çıktının netliğine izin vermek amacıyla geliştirilmiştir. Her bir girdi ilkesi 0-1 arasında bir puan aralığına dönüşür. Nihai puan tüm ilkelerin değerlendirilmesinden

elde edilir. Çıktı, nihai puan ve rengin ortada gösterildiği saat benzeri bir piktogramdır. 12 ilke orta kısmın etrafında segmentler halinde gösterilir ve her bir ilkenin ağırlığı segmentin genişliği ile temsil edilir. Her segment yeşil karakterine göre 0'dan 1'e kadar bir renk skalasında renklendirilir, 1 çok yeşil ve 0 en az yeşildir (renk 1'den 0'a koyu yeşilden kırmızıya değişir). Bu şekilde, bir yöntemin 12 GAC ilkesi ve genel prosedür açısından yeşilliği kolayca değerlendirilebilir. Farklı GAC ilkelerine puan atama prosedürü Tablo 2.6'da verilmiştir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

Tablo 2.6. GAC'nin 12 ilkesine dayalı olarak puan atamak için AGREE prosedürü.

Prensip No	GAC Prensip	Durum	Puan
1	Numune hazırlamadan kaçınmak için doğrudan analitik teknikler uygulanmalıdır.	Örnek ön arıtma faaliyetleri *Numuneye zarar vermeden uzaktan algılama *Çok az fiziksel hasarla uzaktan algılama, invazif olmayan analiz *Saha örnekleme ve doğrudan analiz *Saha örnekleme ve çevrimiçi analiz *Çevrimiçi analiz *At-line analiz *Çevrimdışı analiz *Dış örnek ön işlemleri ve işlem sonrası işlem ve parti analizi (adım sayısının azaltılması) *Dış örnek ön işlemleri ve işlem sonrası işlem ve toplu analiz (yüksek adım sayısı)	Puan *1.00 *0.95 *0.90 *0.85 *0.78 *0.70 *0.60 *0.48 *0.30
2	Minimum örnek büyüklüğü ve minimum örnek sayısı hedeflerdir.	Analiz türü (örnek boyutu mg veya µL) *Ultramikroanaliz (<1) Mikroanaliz (1-10) Yarı mikroanaliz (10-100) *Makroanaliz (>100)	Puan 1.00 $= -0,142 \times \ln(\text{örnek miktarı g veya mL cinsinden}) + 0,65$
3	Yerinde ölçümler yapılmalıdır.	Enstrümantal pozisyon In-line analiz On-line analiz At-line analiz Off-line analiz	Puan 1.00 0.66 0.33 0.00

Tablo 2.6. (Devam) GAC'nin 12 ilkesine dayalı olarak puan atamak için AGREE prosedürü.

4	Analitik süreçlerin ve operasyonların entegrasyonu enerji tasarrufu sağlar ve reaktif kullanımını azaltır.	Analitik süreçteki adım sayısı *3 ya da daha az *4 *5 *6 *7 *8 ya da daha fazla	Puan 1.00 0.80 0.60 0.40 0.20 0.00
5	Otomatik ve minyatürleştirilmiş yöntemler seçilmelidir.	Otomasyon seviyesi ve küçültme düzeyi *Otomatik, miniaturize edilmiş *Yarı otomatik, miniaturize edilmiş *Manuel, miniaturize edilmiş *Otomatik, küçültülmemiş *Yarı otomatik, küçültülmemiş *Manuel, küçültülmemiş	Puan 1.00 0.75 0.50 0.50 0.25 0.00
6	Türevlendirmeden kaçınılmalıdır	Türev durumu Türevlendirme uygulanmamış Türevlendirme uygulanmış	Puan 1.00 $= DA_1 \times DA_2 \times DA_3 \times \dots \times DA_n$ Burada DA_i , belirli türevlendirme işlemine karşılık gelen skoru temsil eder.
7	Büyük miktarda analitik atık oluşturulmamalı ve analitik atıkların uygun bir şekilde yönetilmesi sağlanmalıdır.	Atık miktarı 0.1 g (mL) 10 g (mL) 25 g (mL) 100 g (mL) Başka bir miktar	Puan 1.00 0.40 0.25 0.1 $= -0.134 \times \ln(\text{atık miktarı g veya mL cinsinden}) + 0.6946$
8	Çoklu analitik veya çoklu parametre yöntemleri, tek bir analiti kullanma yöntemlerine tercih edilir.	Saatteki analit sayısı 1 10 50 70 Başka analit sayısı	Puan 0,0 0,5 0,9 1,0 $= 0.2429 \times \ln(1 \text{ saatte belirlenen analit sayısı}) - 0.0517$

Tablo 2.6. (Devam) GAC'nin 12 ilkesine dayalı olarak puan atamak için AGREE prosedürü.

9	Enerjinin kullanımı minimize edilmelidir.	Enerji miktarı <0.1 kWh 0.1-1.5 kWh >1.5 kWh	Puan 1,0 0,5 0,0
10	Toksik reaktifler elimine edilmeli veya değiştirilmelidir.	Durum Toksik reaktifler veya çözücüler kullanılmaz. Toksik reaktifler veya çözücüler kullanılır.	Puan 1,00 = $-0.156 \times \ln(\text{reaktif veya çözücü miktarı g veya mL cinsinden}) + 0.5898$
11	Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen reaktifler tercih edilmelidir.	Durum Hiçbir reaktif uygulanmıyor veya tüm reaktifler biyobazlı kaynaklardan gelen Bazıları biyobazlı kaynaklardan türetilmişken, diğerleri ise değilse Reaktiflerin hiçbiri biyobazlı kaynaklardan gelmeyen	Puan 1,0 0,5 0.0
12	Operatörün güvenliği artırılmalıdır.	Tehtitler Kaçınılmayan tehditler aşağıdaki liste içerisinde seçilmelidir: • Su yaşamı için toksik • Biyobirikimli • Kalıcı • Yüksek derecede yanıcı • Yüksek derecede oksitlenebilir • Patlayıcı • Korozyon oluşturabilen Tüm tehditler önlenmiş. Bir tehdit mevcut İki tehdit mevcut Üç tehdit mevcut Dört tehdit mevcut Beş ya da daha fazla tehdit mevcut	Puan 1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0

Yeşil kimya, tehlikeli maddelerin ve atıkların kullanımını ve üretimini azaltan ürünlerin ve süreçlerin tasarımına vurgu yapmaktadır. Warner'ın 1998 yılında Yeşil Kimyanın 12 ilkesini sunmasının ardından yeşil kimya hareketi büyük ilgi görsede, bu kavram "yeşil kimya" teriminin ortaya atılmasından uzun yıllar önce, özellikle kimyasal

kirlilik ve kaynakların tükenmesiyle ilgili endişeler nedeniyle vardı (Plotka-Wasyłka vd., 2018). Yeşil kimya, üreticiyi kimyasalların ve atıkların zararlı etkilerini göz önünde bulundurmaya ve bunların insanlar ve çevre üzerindeki etkilerini azaltmaya teşvik eder. Ürünlerin daha yeşil öncüller ve daha verimli reaksiyon koşulları (düşük enerji sistemleri ve daha az reaksiyon) kullanılarak sentezlenmesini destekler. Yeşil kimyanın 12 ilkesi atık oluşumunun önlenmesi, atom ekonomisi (reaktiflerin nihai ürüne verimli bir şekilde dönüştürülmesi), daha güvenli kimyasal sentez, daha güvenli kimyasal ürünler, daha çevreci çözücülerin, yenilenebilir hammaddelerin ve katalitik reaktiflerin kullanımı, kimyasal ürünlerin zararsız bir şekilde bozunması, kirliliği önlemek için gerçek zamanlı analiz, kazalardan kaçınma konularından bahseder. Yeşil kimyanın çevre ve genel ekonomi ile ilgili faydaları, atık depolama ve arıtma harcamalarını azaltması ve çevresel bozulmaları telafi etmesidir (de Marco vd., 2019). Sonuç olarak, çevreye zarar vermeyen çözücülerin sentezlenmesinde, sulu katalizde, kimyasal reaksiyonlarda süperkritik sıvıların kullanılmasında ve enerji tasarruflu kimyasalların geliştirilmesinde kayda değer ilerlemeler kaydedilmiştir (Gałuszka vd., 2013).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler

Analitik saflıkta kimyasallar; amonyum format (%99,8, *a/a*), sodyum hidroksit, hidroklorik asit, hidrojen peroksit, formik asit, trifloroasetik asit ve HPLC sınıfı çözücüler; asetonitril ve metanol Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. %99,9 (*a/a*) saflıkta ALEK standardı TRC Company'den (Kanada) satın alınmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Kütle detektörü çalışmaları için LC-MS/MS 8040: Nexera XR serisi Shimadzu (Japonya) marka cihaz kullanılmıştır. Cihaz DGU-20A3R gaz giderici, LC-20AD gradyan pompa, SIL-20AC otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, SPD-M20A PDA dedektörüne sahip olup parçalar arası bağlantı CBM-20A iletişim modülü ile sağlanmaktadır. Cihaz Windows 7 ve LabSolutions 5.86 SP1 yazılımına sahiptir.

LCMS-IT-TOF Shimadzu (Japonya) cihazı ise DGU-20A3 gaz giderici, LC-20AD gradyan pompa, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO-10ASVP kolon fırını, CBM-20A iletişim modülü ve IT-TOF kütle spektrometresinden oluşmaktadır. Cihaz Windows 7 ve LCMS solutions 3.80 yazılımına sahiptir.

NMR spektrumları (¹H ve ¹³C), sırasıyla 300 MHz ve 75 MHz'de Bruker dijital FT-NMR spektrometresi (Bruker Bioscience, ABD) ile DMSO-*d*₆'da alınmıştır. IR spektrumları, IRAffinity-1S Fourier dönüşümü IR (FTIR) spektrometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya) ile kaydedilmiştir.

Kullanılan diğer yardımcı cihazlar ise Mettler Toledo (İsviçre) firmasına ait XSE 105 Dual Range model analitik terazi ve SevenMulti model pH metre, Bandelin (Almanya) firmasına ait RK 100 H model ultrasonik banyo, Heidolph (Almanya) firmasına ait reax top model karıştırıcı ve Hettich (Almanya) firmasına ait Rotina 380 R santrifüj cihazı, KRC Laboratory (Türkiye) firmasına ait stabilite kabini ve çözeltilerin hazırlanmasında 20-100 µL ve 100-1000 µL aralığında çalışabilen Eppendorf (Almanya) firmasına ait Research model pipetörlerdir.

3.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Etkin maddenin bozunma ürünleri varlığında kromatografik ayırımı ve ürünlerin kalitatif analizi için 6 farklı sabit faz denenmiştir. Bu sabit fazlar iki farklı gruba ayrılabilir. Sabit fazlardan üçü Sigma Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Supelco Ascentis® Express model oktadesil silan (C₁₈), fenil hekzil ve pentaflorofenil (F₅) fonksiyonel gruplarına ve ölçülerine (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) sahiptir. Diğer gruptaki üç sabit faz ise Merck (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Chromolith® Performans RP-18e 100×4,6 mm, Chromolith® Performans RP-18e 100×2 mm ve Chromolith® HR RP-18e 100×4,6 mm ölçü ve fonksiyonel gruplarına sahiptir. Denemeleri yapılan sabit fazların genel özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan sabit fazların özellikleri

	Chromolith® Performans RP-18e 100×4,6 mm	Chromolith® HR RP-18e	Chromolith® Performans RP-18e 100×2 mm	Ascentis® Express C₁₈	Ascentis® Express F₅	Ascentis® Express fenil hekzil
Partikül Boyutu	-	-	-	2,7	2,7	2,7
Makropor/ Mezopor Büyüklüğü	2 µm/13 nm	1,15 µm/15 nm	1,5 µm/13 nm	-	-	-
Yüzey Alanı (m²/g)	300	250	300	150	135	135
Karbon Yüzdesi (%)	18	18	18	25	5,5	7,1
Toplam Geçirgenlik (%)	>80	>80	>80	-	-	-
Por Hacmi/Çapı	1,0 mL/g	1,0 mL/g	1,0 mL/g	90 Å	90 Å	90 Å
pH Aralığı	2,0-7,5	2,0-7,5	2,0-7,5	2-9	2-9	2-9
USP Kodu	L1	L1	L1	L1	L11	L43

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneysel Parametreler

4.1.1. Enstrümental parametreler

HPLC analizleri için optimize kromatografik ayırım koşulları izokratik modda 5 mM amonyum format:asetonitril (46:54, *h/h*) oranında olup akış hızı 0,45 mL/dk olarak seçilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 40,0±0,1 °C olarak seçilmiştir. LC-MS/MS analizleri için ise optimize kromatografik koşullar 5 mM amonyum format:asetonitril (25:75, *h/h*) oranında olup akış hızı 0,50 mL/dk olarak tercih edilmiştir. Diğer kromatografik parametreler ise HPLC yöntemi ile aynı olup otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı numune ve standart çözeltilerin stabilitesinin korunması amacıyla 15±0,1 °C'ye sabitlenmiş olup enjeksiyon hacmi ise 10 µL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan tüm hareketli faz çözeltileri 0,22 µm CA filtre ile süzölmüştür.

ALEK'in maksimum absorbanası 232 nm'de tespit edildiği için HPLC sisteminde foto diyot dizisi dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayrıca dedektörde spektrumlar 190 ve 800 nm arasında 40 Hz veri örnekleme frekansında ve 0,640 sn zaman sabitinde izlenmiştir.

Analizlerde kullanılan optimize LC-MS/MS koşulları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Optimize LC-MS/MS koşulları*

Kurutucu gaz akış hızı (azot)	15 L/dk
Nebülize edici gaz akış hızı (azot)	3,0 L/dk
Arayüz akımı	0,1 µA
DL sıcaklığı	250 °C
Isı bloğu sıcaklığı	450 °C
İyon tarama şekli	Çoklu Reaksiyon İzleme Modu (MRM)
İyon kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
Kolon sıcaklığı	35,0±0,1 °C
Enjeksiyon hacmi	1 µL

IT-TOF kütle spektrometresi de Shimadzu (Japonya) firmasına ait olup analizler, ESI arayüzlü hibrit bir IT-TOF kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. IT-TOF dedektörün kalibrasyonu sodyum trifloroasetat çözeltisi ile yapılmıştır. Analiz koşulları; nebülize edici gaz akışı 1,5 L/dk; yüksek gerilim probu -3,5 kV; kurutma gazı basıncı 200 KPa, ısı bloğu sıcaklığı ve CDL sıcaklığı 200 °C olarak ayarlanmıştır. CID

parametreleri çarpışma gazı parametresi için %50, CID enerjisi için %50 ve CID için argon gazı seçilmiştir. Ayrıca, TOF'un dedektör voltajı 1,6 kV'a ayarlanmıştır.

HPLC çalışmalarında laboratuvarlar arası karşılaştırma yapmak için yine Shimadzu (Japonya) firmasına ait Nexera-i LC-2040C 3D cihazı kullanılmıştır. Cihaz sisteminin yazılımı da Shimadzu (Japonya) firmasına ait LabSolutions 5.81 yazılımıdır. Sistem ayrıca Windows 10 ile donatılmıştır.

4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Referans standartların tüm stok çözeltileri ve çalışma çözeltileri, ALEK'in çözünürlük sorunu nedeniyle metanol ve dimetilsülfoksit karışımı ile hazırlanmıştır. ALEK'in stok çözeltisini hazırlamak için 6,25 mg ALEK hassas terazi ile tartılmış ve içerisinde bir miktar metanol olan 10 mL balon jojeye aktarılmıştır. Ardından karışıma 3 mL dimetilsülfoksit ilave edilerek tam çözünme gözlenene kadar vortekste karıştırılmıştır. Son olarak çözelti hacmi metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kalibrasyon, LOD, LOQ ve QC çözeltileri için diğer dilüsyonlar LC-PDA ve LC-MS/MS için bu stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yine metanolde yapılarak hazırlanmıştır.

4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

ALEK'nin geri kazanım çalışmaları için ticari kapsülü olan Alecensa® (Roche, İsviçre) (150 mg/kapsül ALEK içerir) ile çalışılmıştır. Bu amaçla 10 adet kapsül ultra hassas teraziyle tartılmış ve ortalama bir adet kapsül ağırlığı hesaplanmıştır. Ardından 10 adet kapsül porselen havanda toz haline gelene kadar öğütülerek ortalama bir adet kapsül ağırlığı kadar tartılmıştır. Tartılan toz kapsül 100 mL hacme sahip balon jojeye ilave edilerek asetonitrilde çözülmüştür. Ardından vortekste 5 dk karıştırılmış ve ultrasonik banyoda çözünmesi için 15 dakika bekletilerek tekrar 5 dk daha vorteks ile karıştırılmıştır. Çözünmenin tamamlanmasından sonra heterojen çözelti şırınga filtreler ile süzölmüştür. Süzme işlemi için naylon, PES, PTFE ve PVDF tipte şırınga filtrelerinin hepsi denenmiş ve en yüksek pik alanı PTFE (22/25 mm, 0,22 µm gözenek boyutu, Isolab, Almanya) ile elde edildiği için numune hazırlamada kullanılmıştır. Bu stok çözelti 1/10 oranında ara stok olarak seyreltilip geri kazanım çözeltileri bu ara stoğun gerekli oranlarda seyreltilmesi ile kalibrasyon çözeltileri serisinde hem PDA hem de MS dedektör için %80, %100 ve %120 oranlarına gelecek şekilde hazırlanmıştır.

4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

HPLC çalışmalarında kromatografik ayırım izokratik elüsyon modunda yapılmıştır. Hareketli faz karışımı asetonitril: amonyum format tamponu (5 mM, pH 3,8) olup (53:47, *h/h*) oranında kullanılmıştır. Tampon çözeltisi, 1,82 g amonyum formatın 1 L su içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti çözünmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından Sartorius firmasına ait steril olmayan selüloz asetat membran filtrelerden (47 mm ID, 0,2 µm gözenek boyutu, Almanya) süzölmüştür. Optimum kolon sıcaklığı 40,0±0,1 °C, otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı ise 15±0,1 °C olarak seçilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL olarak optimize edilmiştir. Ayrıca, HPLC'deki optimize edilmiş yöntem koşulları tam olarak laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için LC-MS/MS sistemindeki PDA dedektöre aktarılmıştır. ALEK'in LC-MS/MS çalışmalarında kromatografik ayırım da aynı şekilde yapılmıştır.

4.1.5. Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı

Etkin maddenin HPLC için seçicilik çalışmaları ve hızlı bozundurma ürünlerinin LCMS-IT-TOF cihazında kalitatif analizi amacıyla etkin madde hızlı bozundurma koşullarına maruz bırakılmıştır. Etkin maddenin maruz bırakıldığı hızlı bozundurma koşulları ICH Q1A(R2) kılavuzunda belirtilen termolitik, asidik/bazik, hidrolitik ve oksidatif stres koşulları altında yapılmıştır (2023a). Bozunma çözeltileri stok etkin madde çözeltisinin 125 µg/mL derişimde olacak şekilde farklı stres ortamlarında hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda incelenen parametreler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hızlı bozundurma koşulları

Bozunma koşulu	Uygulanış biçimi	Açıklama
Sıcaklık	Çözelti	60 °C sabit sıcaklıkta analit çözeltisi 10 °C'lik artışlarla 2 saat süre ile bekletilip analizi yapılmıştır.
Nem	Katı	%75 oranındaki nemde 2 saat süre ile bekletilip maddenin çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.
Işık	Çözelti	UV radyasyon ışığında 2 saat bekletilen numunenin çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.
Asit hidrolizi	Çözelti	1,0 N HCl çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilmiştir.
Baz hidrolizi	Çözelti	1,0 N NaOH çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilmiştir.
Yükseltgenme	Çözelti	%15 (<i>h/h</i>) oranında H ₂ O ₂ çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilmiştir.

4.1.6. Bozunma ürünleri için moleküler docking çalışmaları

ALEK'in zorlu bozundurma koşullarında elde edilen bozunma ürünleri LCMS-IT-TOF ile karakterize edildikten sonra moleküler docking çalışmaları etkileşim analizleri yapılmıştır. Bu bozunma ürünleri arasında 5XV7 pdb numaralı transferaz enzim kristaline karşı ALEK ve bozunma çalışmaları sonrasında elde edilen bozunma ürünlerinin etkileşimlerini ortaya çıkarmak adına, yapı temelli in silico docking yöntemi uygulanmıştır (Hatcher vd., 2018).

İlk olarak kristal yapı Schrödinger Suite 2020 Update 2'de (Schrödinger, 2017) yer alan "Protein Preparation Wizard" protokolü uygulanmış ve kristal yapı docking çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. Daha sonra bağ uzunlukları OPLS 2005 kuvvet alanı kullanılarak düzenlenmiş ve yüklü amino asitlerin üzerindeki atomların belirtilen ortam koşullarındaki olası yükleri otomatik olarak belirlenmiştir. LigPrep 3.8 (Schrödinger, 2016b) modülü ile moleküler docking çalışmaları yürütülecek bileşikler docking için hazırlanmıştır. Grid oluşturulurken Glide 7.1 (Schrödinger, 2016a) kullanılmış ve yine aynı modülün yardımı ile single precision (SP) ile docking çalışmaları tamamlanmıştır.

4.1.7. DoE çalışmaları

Retrospektif literatür analizi ve başlangıç yöntem geliştirme denemeleri ile metanol ve ACN oranı, organik faz oranı (X_1), kolon sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacmi gibi farklı proses değişkenlerinin t_R , pik alanı ve çözünürlük gibi sonuçlara etkisi ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Ayrıca, yöntem çıktıları üzerinde önemli etkiye sahip olanları belirlemek amacıyla bu değişkenleri taramak için her seferinde bir faktör ile bir ön araştırma yapılmış ve her değişken için bir çalışma aralığı oluşturulmuştur. Tablo 4.3'de seçilen aralıklar ve değişkenler verilmiştir.

Tablo 4.3. *Farmasötik formülasyonlarda ALEK'i belirlemek için Box-Behnken tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin kodları, aralıkları ve ilgili seviyeleri*

Faktör	İsim	Birim	Tür	Minimum	Maksimum	Kod düşük	Kod yüksek	Ortalama	Standart sapma
A	FR	(mL/min)	Nümerik	0,4500	0,5500	-1 ↔ 0,45	+1 ↔ 0,55	0,5000	0,0354
B	ACN %		Nümerik	45,00	55,00	-1 ↔ 45,00	+1 ↔ 55,00	50,00	3,54
C	AF	mM	Nümerik	5,00	15,00	-1 ↔ 5,00	+1 ↔ 15,00	10,00	3,54

Yöntem optimizasyonu, sağlam deneysel parametreler elde etmek için belirlenen kritik değişkenlerin iyileştirilmesini içerir. LC için, faktörler arasındaki kimyaları ve etkileşimleri anlamak, bu kritik değişkenlerin değerlerini ayarlamak açısından önemlidir. Bu nedenle DoE gibi sistematik bir yöntem, bu değişken karmaşıklıkları anlamak için faydalıdır. DoE, sağlam bir yanıt elde etmek için en uygun parametre aralığının belirlenmesine yardımcı olan farklı yanıt yüzeyi tasarımlarını içerir. Bunu başarmak için merkezi kompozit tasarım ve BBD gibi tasarımlar kullanılabilir. Ancak merkezi kompozit tasarım, pratik aralığın dışında olabilecek yıldız noktalarını dikkate alır ve dolayısıyla bu denemenin gerçekleştirilmesi mümkün olmaz. Bu açılarından BBD, daha az deneysel çalışmayla daha yüksek dereceli yanıt yüzeyi sonuçları üretmede etkili bir yanıt yüzeyi tasarımıdır. Bireysel değişkenlerin etkilerinin yanı sıra etkileşim etkilerinin de değerlendirilmesine olanak sağlayan ikinci dereceden bir tasarımıdır. Bu tasarım değişkenlerin uç değerlerini dikkate almaz ve dolayısıyla daha gerçekçi bir analiz sağlar (Ferreira vd., 2007). Bu nedenle, Design-Expert® yazılımı (ücretsiz deneme version 13 sürümü) kullanılarak yöntem optimizasyonu için BBD modeli kullanılmıştır. Bu çok değişkenli optimizasyon prosesinde, üç faktör (kromatografik parametreler) akış hızı (A), organik faz oranı (B) ve amonyum format derişimi (C) bağımsız değişkenler olarak tanımlanırken ALEK'in için rezolüsyon (yanıt 1), kapasite faktörü (yanıt 2), kuyruklanma faktörü (yanıt 3) ve alıkonma zamanı (yanıt 4) yanıt olarak seçilmiştir.

4.1.8. Sonuçların değerlendirilmesi

Hem MS dedektörü hem de PDA dedektör sistemi için analitik yanıt, elde edilen kromatogramda etkin maddenin sinyalinin alanı olarak alınmıştır. Elde edilen sonuçların gruplar arası uyumu, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar Excel programı ile yapılmıştır.

4.1.9. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Geliştirilen her iki yöntem de ICH kılavuzunun tavsiye ettiği şekilde metot geçerliliği sağlanmış ve analitik kriterleri sağladığı gösterilmiştir (Guideline, 2005). Yöntem geçerliliği için spesifiklik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri tam olarak yapılmıştır (Guideline, 2005, Peters vd., 2007, Swartz ve Krull, 2018).

4.1.9.1. Sistem uygunluk testleri

Analizler esnasında mevcut sistemin metot geçerliliği sağlanmış sisteme aktarılabilirliğini ve sistemin düzgün çalışmasını sağlayacak ayrıca lüzumlu olmayan kromatografik verimlilik gerekliliğini önleyecek sistem uygunluk kriterleri oluşturulmuştur. Bu kriterler genel olarak; teorik tabaka sayısı (N), ayırım gücü (Rs), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (As), kapasite (k') ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametreleridir. Bu parametrelerin hesaplanması ve kabul edilebilirlik sınırları içerisinde olması gereklidir. Bu kabul edilebilirlik sınırları Tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. SUT parametrelerinin sınırları

SUT parametresi	Kabul edilebilirlik sınırı (USP)
Bağıl alıkonulma	-
Teorik plaka sayısı	$N > 2000$
Kapasite faktörü	$1 \leq k \leq 10$
Seçicilik	$\alpha > 1$
Kuyruklanma faktörü	$2 \leq T$
Ayırım gücü	$R_s > 1,5$
Pik asimetrisi	$0,95 \leq A_s \leq 2$
Pik alanının tekrar edilebilirliği	%BSS < 1,5 Genel ayırımlar %BSS < 5 Biyolojik numuneler %BSS 5-15 Eser element analizleri

Metot geliştirme sürecinde bu parametrelerin her biri Tablo 4.5'de verildiği gibi Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre hesaplanmıştır.

Tablo 4.5. USP'ye SUT parametrelerinin formülleri

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	N: teorik tabaka sayısı t_R : alıkonulma zamanı W: pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0,05}}{2 \times \alpha_{0,05}}$	T: kuyruklanma faktörü $W_{0,05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0,05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği

Tablo 4.6. (Devam) USP'ye SUT parametrelerinin formülleri

Asimetri faktörü	$A_S = \frac{\beta_{0,10}}{\alpha_{0,10}}$	As: asimetri faktörü $\beta_{0,10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0,10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Ayırım gücü	$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}}$	t_1 : önceki pikin alıkonulma zamanı t_2 : pikin alıkonulma zamanı $W_{0,5}$: pik genişliği $W_{P0,5}$: önceki pikin genişliği
Kapasite faktörü	$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	k: kapasite faktörü t_R : alıkonulma zamanı t_M : ölü zaman

4.1.9.2. Seçicilik ve spesifiklik

Seçicilik; bir yöntemde hedeflenen bileşiğin sinyalinin, matrislerdeki girişim yapabilecek maddelerin varlığında tayin edilebilme yeteneğidir. Bir analit veya analit grubu için mükemmel seçici olan bir yöntem spesifiktir. Spesifiklik ise validasyon prosedürüdür ve yöntemin mevcut olabilecek diğer bileşenler (örneğin safsızlıklar, bozunma ürünleri ve matris bileşenleri) varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneğini teyit etmektir (Aboul-Enein, 2000). Bu amaçla etkin madde ALEK derişimi bilinen miktarda zorlu bozma koşullarına tabi tutularak bozunma ürünleri elde edilmiş, kromatografik ayırım bu bileşenlerin varlığında yapılmış ve elde edilen sonuçlar standart ALEK çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca elde edilen bozunma ürünlerinin kalitatif tayini LCMS-IT-TOF ile yapılmış ve mekanizması MSⁿ çalışması yapılarak ayrıntılı incelenmiştir.

4.1.9.3. Kararlılık

ALEK'in stok çözeltisi, metanolde (PDA dedektör için 87,10 µg/mL, LC-MS/MS için 1,72 µg/mL) uygun şekilde seyreltilmiş ve periyodik olarak (6, 12, 18, 24, 48 saat, üç hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü) olmak üzere çözelti ve hareketli faz kararlılığını incelemek için analizleri yapılmıştır.

4.1.9.4. Doğrusallık

Bir yöntemin doğrusallığı, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan veya bir tür matematiksel dönüşümden sonra doğrudan orantılı olan ölçüm sonuçları sağlama yeteneği olarak tanımlanır. Doğrusallık genellikle, artan analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülen enstrümental tepkilerin (pik alan veya yükseklik) normal en küçük kareler eğrisi veya sadece doğrusal regresyon eğrisi olarak ifade edilir. Kalibrasyon eğrisinin yapılması için pik yüksekliklerin kullanımına kıyasla pik alanların kullanılması tercih edilir (Yuwono ve Indrayanto, 2005).

Geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için ALEK standart çözeltileri %10-200'üne karşılık gelen (PDA için 8,71; 21,8; 43,6; 69,8; 87,1; 104,5; 130,7; ve 174,2 µg/mL ve MS/MS için 0,17; 0,43; 0,86; 1,38; 1,72; 2,07; 2,59; ve 3,45 µg/mL) 8 konsantrasyon seviyesinde metanolde hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Analizler en az üç tekrarlı olmak üzere yapılmış ve hesaplama elde edilen alanların ortalaması ile yapılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olmak üzere üç tekrar ile çalışılmış ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir.

4.1.9.5. Doğruluk

Doğruluk bir analitik yöntemin sonucunun, gerçek değerden sapma derecesinin büyüklüğü ile ifade edilir. Bilinen bir derişimde bir numunenin analiz edilmesini ardından sonuçların, ölçümle elde edilen büyüklüğü ve gerçek değer arasında bir karşılaştırma yapılması, yöntemin doğruluğuna ilişkin tahmin yöntemlerinden biridir. Yöntemin doğruluğunu tahmin etmek amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Her bir metot için elde hazırlanmış ALEK tablet çözeltilerinden düşük (HPLC için 20,0 µg/mL; LC-MS/MS için 42 ng/mL), orta (HPLC için 25,0 µg/mL; LC-MS/MS için 52,5 ng/mL) ve yüksek seviyelerde (HPLC için 30,0 µg/mL; LC-MS/MS için 63 ng/mL) olmak koşuluyla 3 farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her bir seviye için 3 paralel set hazırlanmış ve analizler sonucunda elde edilen değerlerin standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

4.1.9.6. Kesinlik

Kesinlik, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç farklı şekilde ifade edilir. Gün içi kesinlik çalışması olarak da ifade edilebilen

tekrarlanabilirlik belli bir ekipman kullanılarak bir analistin bir iş günü içerisinde analizi gerçekleştirmesiyle belirlenir. Analizin farklı analistler tarafından farklı ekipmanlar, farklı reaktifler veya kolonlar kullanılarak tek bir laboratuvarında birkaç gün veya hafta boyunca gerçekleştirilmesiyle elde edilen kesinlik de ara kesinlik olarak ifade edilir. Her iki metot için standart ve psödo formülasyon çözeltilerin %100 noktasına denk gelen (HPLC için 25,0 µg/mL; LC-MS/MS için 52,5 ng/mL) konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak üç gün sırası ile 5, 3 ve 3 tekrarlı olmak üzere analiz edilmiştir. Ayrıca HPLC metodu için ara kesinlik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar varyans analizi ile yorumlanmıştır. Sonuçlar, ortalama, ortalama standart hata, standart sapma, %BSS ve %95 güven seviyesi dahil olmak üzere istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

4.1.9.7. Teşhis ve tayin alt sınırı

Teşhis alt sınırı (LOD) belirlenen analitik koşullar altında saptanabilen fakat kantitatif olarak ölçülemeyen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır ve analitin varlığı hakkında bilgi verir. Tayin alt sınırı (LOQ) ise belirlenen analitik koşullar altında kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle saptanan ve kantitatif olarak ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Genellikle LOQ, LOD'nin üç katı olarak tahmin edilebilir. Bu amaçla her bir metot için dedektörde elde edilen gürültü sinyalinin 3,3 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=6). Buna göre tayin sınırı için çalışılan her bir sıvı kromatografisi cihazında elde edilen gürültünün 10 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=6).

4.1.9.8. Sağlamlık

Sağlamlık bir analitik yöntemin metot parametrelerindeki herhangi bir değişimden etkilenmeme yeteneğinin ölçüsüdür. Metodun sağlamlığı kontrollü olarak yapılan değişikliklerden anlamlı olarak etkilenmediğinin gösterilmesiyle ifade edilir. Bu nedenle sağlamlık normal kullanımda yöntemin güvenilirliğinin bir göstergesidir. Bir yöntemin sağlamlığı farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı ekipmanlar, farklı reaktifler, farklı günler, vb. gibi farklı koşullarda aynı numunelerin analizi ile elde edilen analiz sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesidir. Bu amaçla HPLC ve LC-MS/MS için konsantrasyon seviyesinde %100 karşılık gelen standart ALEK çözeltileri hazırlanmış ve akış hızı ($\pm\%10$), kolon sıcaklığı ($\pm\%10$), ve hareketli fazın apolar bileşen yüzdesi

($\pm 10\%$) ve çalışılan dalga boyunda değişiklik yapılarak çeşitli sistem uygunluk parametrelerindeki sapmalar hesaplanmıştır.



5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Stabilite, üretilen farmasötik ürünlerin kalitesini ve kabul edilebilirliğini belirlemede çok önemli bir faktördür. Ürünlerin kararlılık çalışmaları endüstriyel ticaretin en önemli bileşenlerinden biridir. İmalat sektörleri, formüle edilmiş ürünlerin raf ömrünü belirlemek ve farmasötiklerin etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için stabilite çalışmalarına güvenmektedir (Huynh-Ba, 2009). İlaçların stabilite çalışmaları, formülasyon hazırlığı, analitik çalışmalar ve kalite kontrolleri de dahil olmak üzere araştırma ve geliştirme süreciyle ilgili birçok hususu kapsar. Bu faktörler, ilaç sentezinden formülasyona, onaya ve pazarlamaya kadar uzanan düzenleyici hususları önemli ölçüde etkiler. Stabilite çalışmaları, bir ürünün her partisi üzerinde birden fazla hususu inceleyerek yürütülmelidir. Elde edilen veriler, raf ömrünün veya son kullanma süresinin sonuna kadar tüm parametreleri karşılamalı, tatmin edici ve düzenleyici kurumlar tarafından onay ve tescile uygun olmalıdır. Bir ilacın stabilitesi, tıbbi bütünlüğünün doğrulanmasında çok önemli bir faktördür.

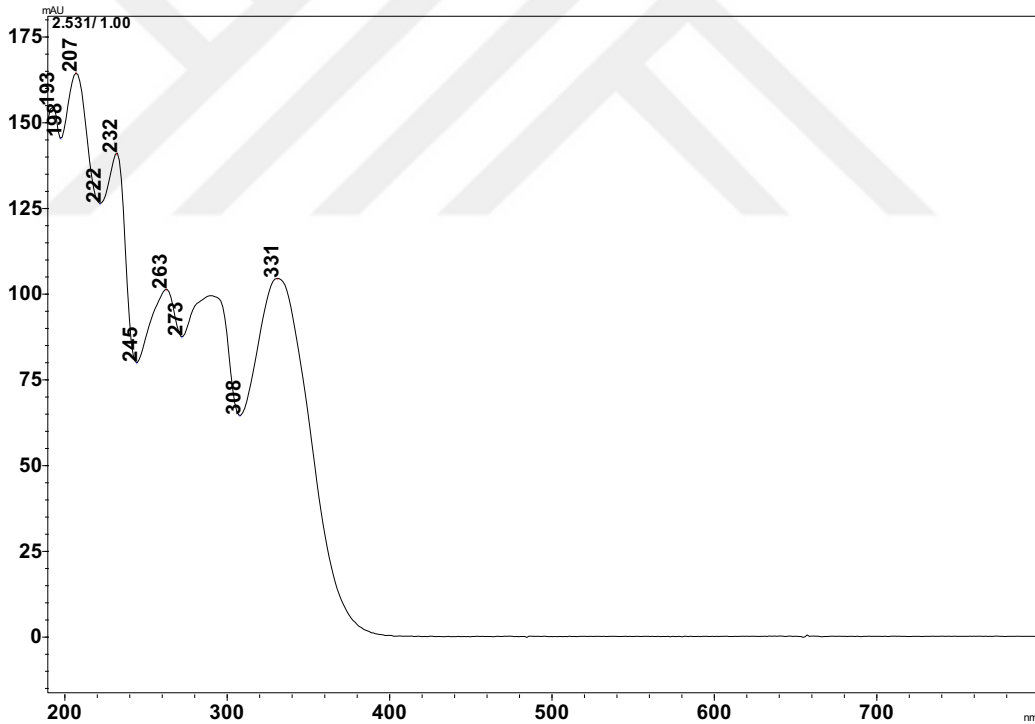
Günümüzde enstrümental yöntemlerde çok hızlı değişim ve gelişimler gözlenmektedir. Özellikle elektrokimyasal yöntemlerde yenilikler ve gelişmeler baş döndürücü ve etkileyicidir. Ancak ilaç analizlerinin doğası gereği fazla numune sayısı, üretim hattı hızına sahip gerekli paralellikte analiz hızı ve yüksek doğruluk ve kesinlikte veri ihtiyacı kromatografik yöntemlerin bir süre daha baskın yöntem olacağına işaret etmektedir. Sıvı kromatografisine yapılan yatırımlar özellikle kolon teknolojisinin avantajları da bu durumu destekler niteliktedir.

Söz konusu çalışmada sıvı kromatografisi ile ALEK'in PDA ve MS dedektörde eş zamanlı analizi için uluslararası geçerliliğe sahip metot önerilmiştir. Bu amaçla ICH kılavuzunun gereklilikleri kapsamında Q1A(R2) yönergelerine göre bu yeni etkin maddede stabilite çalışmaları yapılmıştır. Yapılan stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen çözeltiler yüksek çözünürlüklü kütle spektrometre (HRMS) özelliğine sahip LC/MS-IT-TOF cihazı ile analiz edilerek yapı ve oluşum mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu basamak ayrıca ICH Q2(R2) kılavuzunun önerdiği seçicilik çalışmalarını da içermektedir. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun optimizasyonu elde edilen bozunma ürünleri varlığında yapılmıştır. Optimize sıvı kromatografisi koşulları her iki dedektör içinde (PDA ve MS) uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle metot tek sıvı kromatografisi koşulları ile ALEK hem PDA hem de MS dedektörde analiz edilebilecek şekilde tasarlanmıştır. Validasyon çalışmaları ise dedektörlerin doğasından ve

özelliklerinden dolayı ayrı ayrı yapılmıştır. Böylece her türlü imkana sahip laboratuvarlar uygun ALEK'in farmasötik preparatlarda analizi için hızlı, kolay, yüksek doğruluk ve kesinliğe sahip metot sunulmuştur. Geliştirilen her iki metot ile dünyada onaylı tek farmasötik preparat olan Alecense®'nin analizi de yapılarak sonuçlar ortaya konmuştur.

5.1. Alektinibin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Kromatografik ve bitmiş üründe etkin madde tanıma tayini çalışmaları için ALEK'in UV-görünür alan bölgedeki spektroskopik özellikleri incelenmiştir. Bunun için ALEK stok çözeltisinden hareketle metanolde hazırlanmış 50,0 µg/mL derişimdeki çözelti 190-800 nm aralığında taranmıştır. Elde edilen UV-görünür alan spektrum Şekil 5.1'de verilmiştir. Molekülün maksimum absorbands yapan dalga boyları 207 nm, 232 nm, 263 ve 331 nm olarak gözlenmiştir. Ortam çözücüsü nispeten polar metanol ve çok az miktarda apolar dimetilsülfoksittir.



Şekil 5.1. ALEK'in UV-görünür bölgedeki spektrumu (50,0 µg/mL).

Bilindiği üzere moleküllerin UV absorbandslarını sağlayan elektronik geçişlere en büyük etki ortam çözücüsü ve sahip olduğu fonksiyonel gruplardan gelmektedir. ALEK'in sahip olduğu fonksiyonel gruplar indol ve benzendir. Elde edilen spektrumda 190-222 nm aralığında merdivene benzer spektrumun benzen yapısının karakteristiği

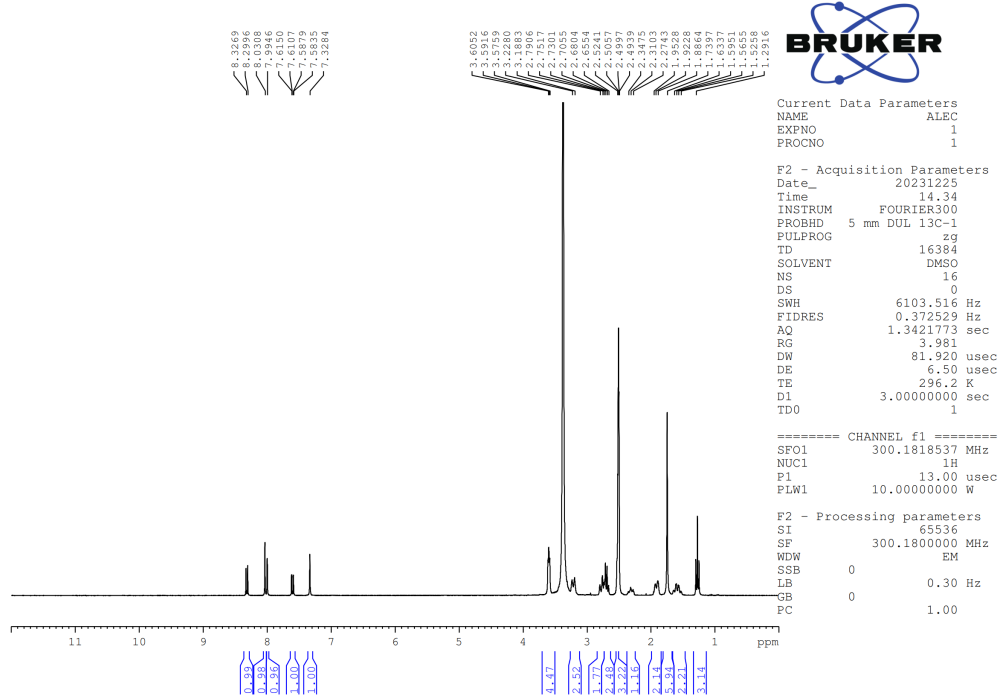
olduğu görülmektedir. 222 nm dalga boyundan 400 nm'ye doğru kaydığımızda ise molar absorptivite katsayısı daha yüksek olan ve moleküler elektronik geçişleri benzene göre daha düşük enerjide olan indol yapısının etkisi görülmektedir. İndol yapısı 220 nm ile 240 nm bölgesinde dalgali spektrumu gözlenmiştir. 400 nm'den sonra herhangi bir absorpsiyon görülmemesi de yapıda sadece indol ve benzen geçişlerinin aktif olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Benzen yapısının maksimum UV absorbans bölgesi 220 nm'nin altında olup görünür bölgeye doğru herhangi bir absorpsiyon bandı yoktur. ALEK'teki benzen yapısının piperidin ve karboksil gruplarına komşu olmasından dolayı elektronik geçişlerinde batokromik kayma görülmektedir. Ortam çözücüsünün polar yapıdaki metanol olması nedeniyle bu batokromik kaymanın daha da desteklenmekte olduğu tahmin edilmektedir. İndol absorpsiyonu ise 380 nm ye kadar uzanan bir bölgede devam eder. İndol fonksiyonel grubu ise yapının asıl UV-görünür bölge spektrumunu sağlayan ve 232 nm'de maksimum absorbansı veren olduğu düşünülmektedir. Çünkü indol yapısının maksimum moleküler absorbansı 220 nm civarında görülmekte olup, ardından 270 nm ve 280 nm ile devam eden, yayvan merdivene benzer ardıl maksimum bantları gözlenir. Polar çözücü olan metanol varlığında bu spektrumların benzen halkasında olduğu gibi yine batokromik kayma yaptığı öngörülmektedir. Bu kayma sonucunda ALEK'in maksimum absorbansı indol halkasından kaynaklı olarak 232 nm de gözlenmektedir.

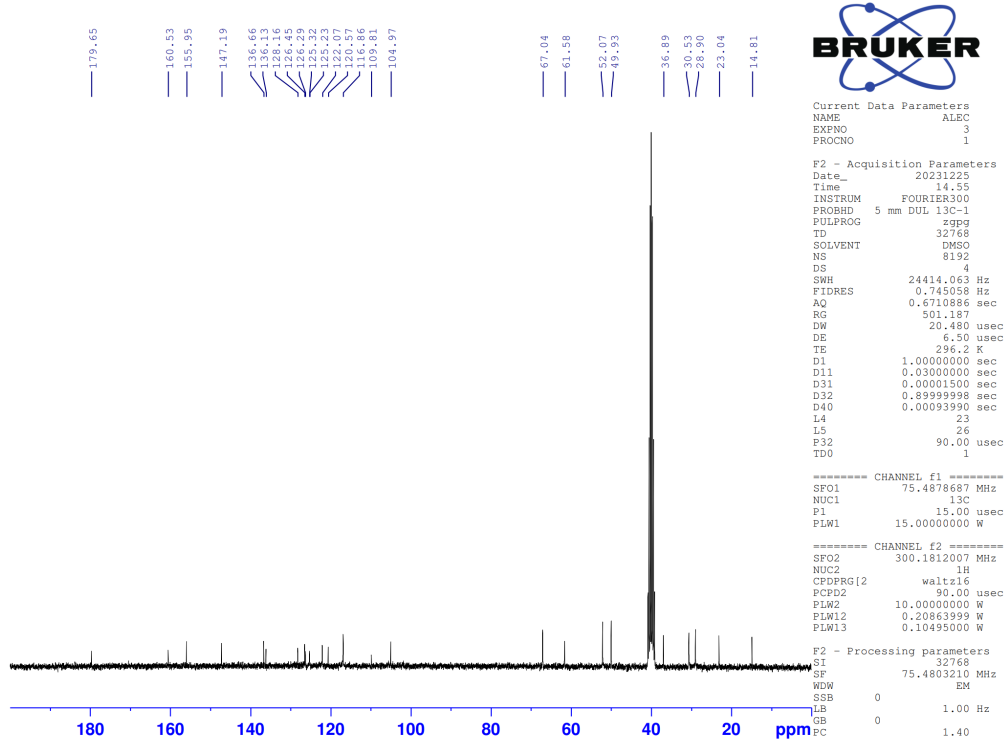
5.2. NMR Spektroskopisi Tekniği ile ALEK'in ¹H-NMR Spektrumlarının Tespiti

ALEK etkin maddesinin spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları alınmış ve yapının iskeleti teorik verilerle uyumlu olarak belirlenmiştir. Şekil 5.2'deki ¹H-NMR verileri incelendiğinde alifatik bölgede belirgin olarak etil grubuna ait triplet pik 1,27 ppm'de görülürken, kuartet pik ise 2,69 ppm'de görülmüştür. Ana iskelet üzerindeki iki metil grubu beraber tek singlet içerisinde 1,74 ppm'de görülürken, morfolin ve piperidin halkası üzerindeki protonlar konformasyonlardan kaynaklı olarak dağınık olarak 1,53 ppm ila 1,60 ppm arasında beklenen hidrojen sayısında gözlemlenmiştir. Ana iskeletin indol kısmındaki protonlar geniş singlet, dublet ve dubletin dubleti olarak aromatik bölgede görülürken aynı bölgede iskeletin benzen kısmına ait protonlar iki farklı singlet olarak beklenildiği gibi görülmüştür. Şekil 5.3'deki ¹³C-NMR spektrumuna bakıldığında alifatik karbonlar, 14,8-

67,0 ppm arasında özdeş karbonlar olması sebebiyle dokuz farklı singlet pik şeklinde gözlenmiştir. Aromatik karbonlar ise 105,0 ppm ile 160,5 ppm arasında 15 adet olarak kaydedilmiştir. Son karbon piki ise karbonil karbonuna ait ve 179,8 ppm’de görülmüştür.



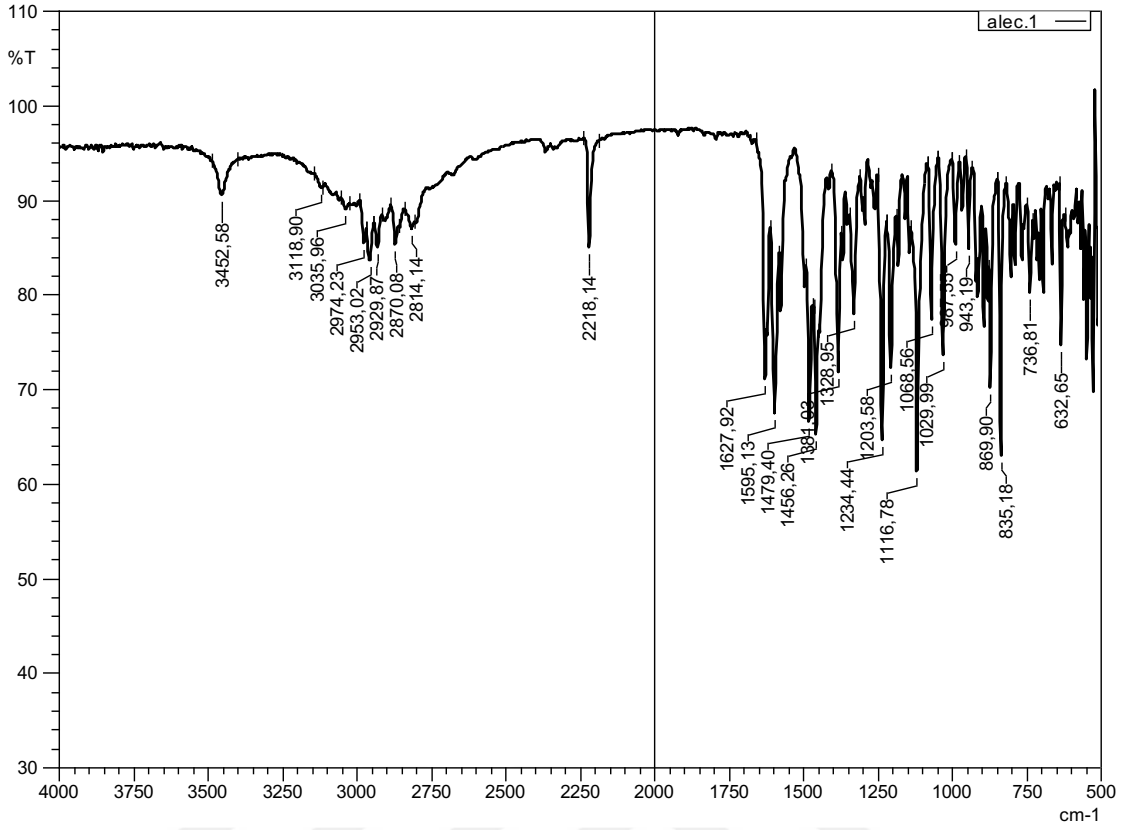
Şekil 5.2. ALEK'e ait ¹H NMR spektrumu



Şekil 5.3. ALEK'e ait ^{13}C NMR spektrumu

5.3. IR Spektroskopisi Tekniği ile Karakterizasyonu

ALEK etkin maddesinin spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla IR spektrofotometresi ile analiz yapılmış ve yapıya özgü fonksiyonel gruplar Şekil 5.4'deki gibi belirlenmiştir. FTIR spektrumunda sekonder amine ait NH bandı 3453 cm^{-1} 'de, siyano grubu içerisinde üçlü bant 2218 cm^{-1} 'de ve keton grubundaki karbon oksijen ikili bandı 1628 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bunların dışında kalan alifatik ve aromatik karbon hidrojen bantları 3000 cm^{-1} 'in etrafında gelirken parmak izi bölgesine ait bantlarda beklenildiği gibi gözlemlenmiştir.



Şekil 5.4. ALEK'e ait IR Spektrumu

5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

Yüksek ayırma verimliliği ve daha hızlı analiz, sıvı kromatografisinde her zaman önemli bir hedef olmuştur. İlaç analizlerindeki iş yükü göz önüne alındığında bu daha da önemli hale gelmektedir. Partiküllü silikadan yekpare (monolitik) silikalara geçiş ile kolon teknolojisi yeni bir dönemece gitmiştir. Tek bir yapıdan oluşan bu kolonlar düşük basınç, yüksek enjeksiyon hacmi ve dayanıklılıkları ile analizcilere kromatografik ayırmada yeni bir yol oluşturmuştur. Bu tip kolonlar yüksek akış hızı olanağı nedeniyle analiz süresini kısaltır, mobil faz viskozitesinden daha az etkilenir ancak kütle transferinin daha az olması gibi avantaj ve dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca yüzey alanları daha az olup kromatografik ayırım etkinlikleri bu nedenle daha zayıftır. Ayrıca hareketli faz değişimlerinin ayırım etkinliğine etkisi daha az olup yapılan varyasyonlar ile çok az değişir. Bu tip kolonların çıkış noktası tamamen gözenekli yapıdaki sabit fazlara göre düşük kütle transferine sahip olarak yüksek akış hızları sağlaması olmuştur (Fekete ve Fekete, 2011).

Kromatografik performansı ifade eden çözünürlük, teorik tabaka sayısı, teorik tabaka yüksekliği, pik kapasitesi ve pik genişliği gibi nesnel ölçüler vardır. Bunlardan çözünürlük ve pik kapasitesi gradyan sistemlerdeki verimliliği ifade eder ve kromatografik ayırımın bir ölçüsüdür (Giddings, 1967). Bu nesnel ölçüler kolon fırın sıcaklığı, hareketli faz bileşenleri, akış hızı ve analit ile doğrudan ilişkili olup bu özelliklerin bir fonksiyonudur (Fekete ve Fekete, 2011).

Çekirdek kolonlarda ise en büyük avantaj kısa difüzyon yolu ile açıklanır ve parçacık çapı kolon verimliliğinin bir ölçüsü olarak ifade edilir. Bunun yanı sıra parçacık boyutu dağılımı ve gözenek çapı gibi diğer birçok fiziksel özellik de kolon verimliliğini etkiler. Hareketli fazın bileşimi ve akış hızı ile doğrudan etkilenirler. Kolon performansı genellikle bu ikisinin uygun şekilde ayarlama yapılması ile sağlanır. Günlük pratik uygulamalar çoğu zaman bu iki bileşen dikkate alınarak yapılır. Mobil faz bileşimi kolon verimliliği üzerinde doğrudan etkiye sahip iken akış hızı, kapasite faktörü ve dolaylı olarak analiz süresi üzerinde etkilidir.

Kromatografik ayırimda akış hızı veya birim zamana düşen basınç miktarı izokratik ayırımlarda sabit olup, etkisi enstrümantasyon sistemine ve kullanılan sabit fazın sınırlarına bağlıdır. Öte yandan gradyan ayırımlarda birim zamandaki hareketli faz yüzdesi değişkenlik gösterdiğinden hareketli fazın viskozitesi değişken olmakla birlikte birim zamana düşen basınç, pik kapasitesi verimliliği için göz önüne alınması gereken önemli bir faktördür (Fekete ve Fekete, 2011).

Bu çalışmada ise izokratik ayırım ile optimize kromatografik koşullar sağlandığı için bu durum sadece enstrümental olarak göz önüne alınmıştır. Ascentis Express® ve Chromolith® olmak üzere iki farklı kolon serisi yukarıda bahsedilen olayların gözlenmesi ve optimum koşulların sağlanması amacıyla denenmiştir.

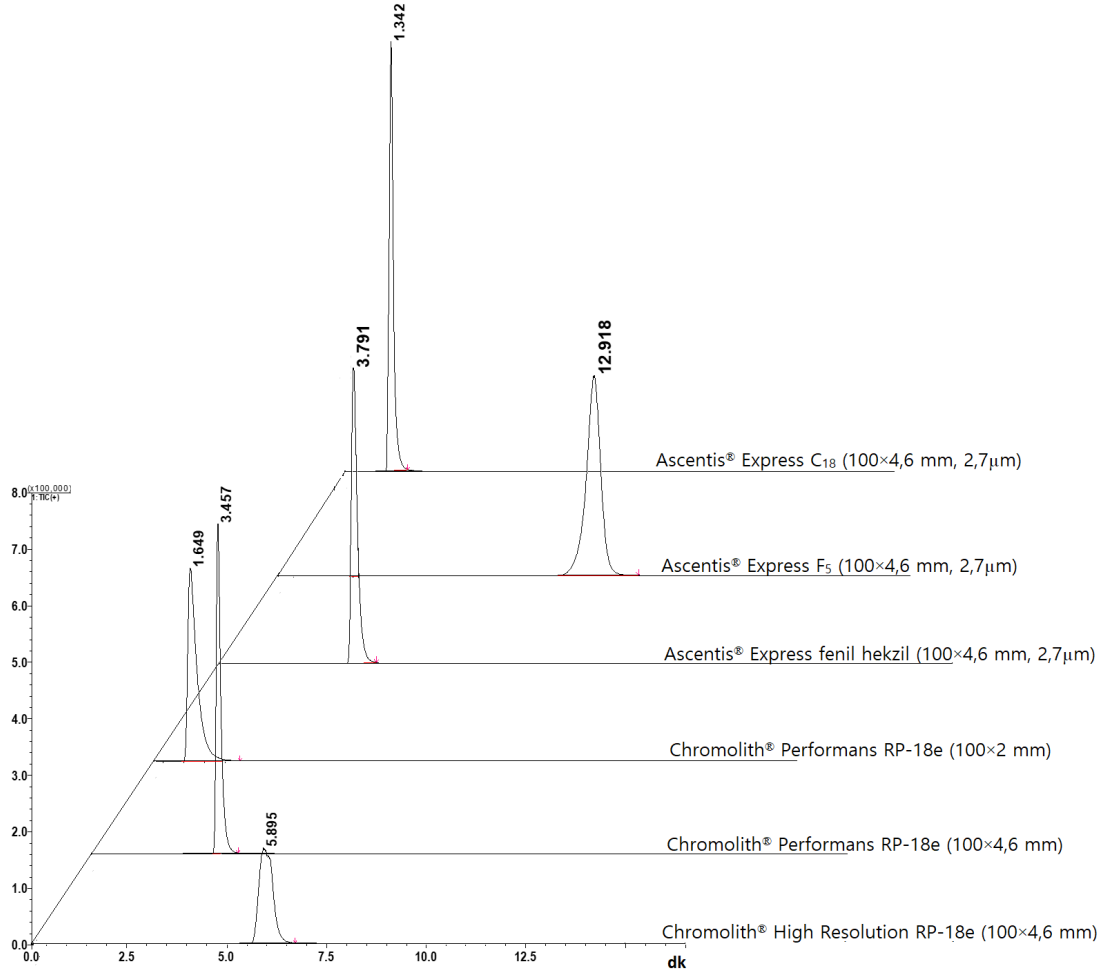
ALEK'in kromatografik ayırımı için metot optimizasyon çalışmaları bozunma ürünü tespit edilen tüm stres çözeltilerinin analizleri ile yapılmıştır. ALEK, analit olarak apolarlığı yüksek bir moleküldür. Yapılan incelemede hareketli fazın apolar bileşeni olarak metanol denendiğinde verimli bir ayırım etkinliği elde edilememiştir. Bu nedenle hareketli fazın apolar bileşeni olarak doğrudan asetonitrilde karar kılınmıştır.

ALEK'in kromatografik ayırımında en önemli nokta ise geliştirilen metodun kütle dedektörüne de uygulanabilir olması olmuştur. Bu nedenle yöntem geliştirme çalışmalarında hareketli faz tamponu seçilirken kütle dedektöründe iyonlaşma ajanı olarak görev alacak bileşenler denenmiştir. Bu bileşenler formik asit, amonyum asetat ve

amonyum formattır. Tampon denemeleri yapılırken hem ALEK'in hem de tespit edilen bozunma ürünlerinin her iki dedektördeki pik morfolojileri ve kütle dedektöründeki iyonlaşma verimlilikleri göz önüne alınmıştır. Amonyum asetat tampon olarak 10 mM derişimde ve çeşitli pH'larda (4,5; 5,0 ve 5,5) denendiğinde ALEK'in pik morfolojisinin yetersiz kalitede olduğu görülmüştür. Hareketli fazın su bileşeni %0,1 oranında formik asit ile hazırlandığında ise ALEK'in iyonlaşma karakteristiği iyi olmakla birlikte bozunma ürünlerinin pik morfolojilerinin oldukça kötü olduğu görülmüştür. Öte yandan amonyum format tampon olarak denendiğinde hem kütle dedektöründe hem de PDA dedektörde sistem uygunluğu açısından oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir; bunun yanı sıra hem bozunma ürünlerinin hem de ALEK'in iyonlaşmasının yeterli olduğu görülmüştür. Ardından 10 mM amonyum format derişiminde çeşitli pH denemeleri (3,5; 3,8 ve 4,1) yapılarak optimum pH değeri belirlenmeye çalışılmıştır. En yüksek pik alanı ve en iyi kromatografik ayırım pH 3,8'de elde edilmiştir.

Son olarak kromatografik ayırımın en önemli unsuru olan kolon seçimi yapılmıştır. Buraya kadar olan optimizasyon çalışmasında kolon olarak Ascentis® Express fenil heksil tercih edilmiş ve kromatografik ayırım bileşenleri bu kolon ile test edilmiştir. Ancak hem kolon performanslarının incelenmesi hem de bozunma ürünlerinin yüksek ayırım verimliliği ile elde edilmesi amacı ile 2 farklı kolon iskeletine sahip toplam 6 sabit faz denenmiştir. Chromolith® kolonlar yekpare silika yapısına sahip iken Ascentis® Express kolonlar ise tanecikli yapıda silika içeren kolonlardır. Yukarıda da bahsedildiği gibi yekpare yapıdaki kolonlar düşük geri basınç ve sağlamlıkları ile fayda sağlarken tanecikli kolonlarda ise hızlı ve verimli kromatografik ayırımlar gözlenmiştir. Kolon denemelerinde kromatografik koşullar 0,5 mL/dk akış hızında hareketli fazın polar bileşeni 10 mM amonyum format çözeltisi olup oranı asetonitril:amonyum format tamponu (50:50, *h/h*), kolon fırın sıcaklığı 40 °C ve enjeksiyon hacmi 1 µL'dir. Kromatografik ayırımın sistem uygunluk verileri bu koşullar altında PDA dedektörde yeterli olduğu görüldüğü için ayrıntılı kıyaslamaların yapılması için kütle dedektörü tercih edilmiştir. Şekil 5.5'de denemesi yapılan tüm sabit fazlardan elde edilen TIC spektrumlarının kıyaslaması görülmektedir. Chromolith® High Resolution RP-18e ile en bozuk pik morfolojisi elde edilirken şaşırtıcı şekilde Chromolith® Performans 2 mm çapındaki kolon ile en geç alıkonma zamanı gözlenmiştir. Chromolith® Performans RP-18e 4,6 mm çapındaki kolon ile oldukça dik ve yüksek ALEK piki elde edilmiştir. Ascentis® Express marka kolonlara bakıldığında ise F5 fonksiyonel gruba sahip kolonda

kuyruklanma faktörünün fazla olduğu gözlenirken fenil hekzil ve C18 fonksiyonel gruba sahip kolonlarda kuyruklanma ICH kabul sınırları içindedir. Ancak C18 kolon kullanılırken gözlenen pikin alanı ve yüksekliği fenil hekzil kolona göre daha düşüktür.



Şekil 5.5. Standart ALEK çözeltisinin farklı kolonlardan elde edilen LC-MS/MS kromatogramları

Chromolith® Performans RP-18e 4,6 mm çapındaki kolon ile Ascentis® Express fenil hekzil kolonda benzer sistem uygunluk verileri elde edilmesine rağmen daha iyi kromatografik ayırım elde edildiği için Ascentis® Express kolon tercih edilmiştir. 6 farklı sabit faza ait SUT verileri Tablo 5.1’de detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 5.1. Deneyisel olarak sabit fazlardan elde edilen SUT verileri

Kolon türü	Alıkonulma zamanı (dk)	Pik alanı	Pik Yüksekliği	Kuyruklanma faktörü	USP Genişlik
Ascentis® Express fenil heksil (100×4,6 mm, 2,7µm)	3,79	3600426	421768	1,765	0,215
Ascentis® Express C ₁₈ (100×4,6 mm, 2,7µm)	1,34	4934458	706320	1,404	0,173
Ascentis® Express F ₅ (100×4,6 mm, 2,7µm)	12,92	5551918	277673	0,861	0,496
Chromolith® Performans RP-18e (100×4,6 mm)	3,45	4271890	550090	1,769	0,197
Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4,6 mm)	5,90	4081866	168975	1,460	0,556
Chromolith® Performans RP-18e (100×2 mm)	1,65	5066782	324086	2,565	0,374

5.4.1. DoE Çalışmaları

Mevcut çalışmada optimizasyon prosedürünün uygulanması, kromatografik çıktıları etkileyebilecek kritik yöntem parametrelerinin analizini mümkün kılmıştır. ALEK'in bozunma ürünleri varlığında tahmini için mevcut literatür raporları olmasına rağmen (Prashanthi vd., 2018), kritik yöntem değişkenleri veya organik faz oranı veya akış hızı gibi parametrelerin ve bunların dahili etkileşimlerinin alıkonma süresi veya pik alanı gibi kromatografik özellikleri nasıl etkilediğine ilişkin tartışma eksiktir. Kritik yöntem parametrelerinin tanımlanması, yöntemin sağlamlığını sağlar ve aynı zamanda yöntemin transferinde başarısızlık şansını azaltır (Tome vd., 2019). Mevcut çalışmada, akış hızı (A), asetonitril oranı (B) ve amonyum format derişimi (C) gibi seçilen bağımsız değişkenleri optimize etmek için üç seviyeli bir BBD kullanılmıştır. Üst ve alt limitleri belirlemek için bu kritik faktörlerden ön OFAT çalışmaları uygulanmıştır. Organik faz için mobil fazdaki oran alt sınır olarak %45, üst sınır olarak %55; akış hızı için alt sınır 0,45 mL/dk, üst sınır 0,55 mL/dk olarak ayarlanıp ve amonyum format derişimi için sırasıyla alt sınır ve üst sınır değerler olarak 5 ve 15 mM seçilmiştir. Ancak yalnızca OFAT tabanlı yöntem geliştirme hem zaman alıcı hem de optimizasyonun ne derece

verimli olduğunu anlama konusunda yeteri düzeyde sonuç vermemektedir. Böylece OFAT'ın burada kullanılan yanıt yüzeyi tasarımları yani BBD ile birleştirilmesi, hızlı optimizasyona ve sağlam yöntem geliştirilmesine yol açacaktır. Üç merkez noktayı içeren toplam 17 deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar ve yanıtlar Tablo 5.2'de gösterilmektedir. Varyans analizi (ANOVA) testi, seçilen bağımsız değişken için modelin $P < 0,001$ ile anlamlı olduğunu göstermiştir. Yanıt yüzey analizi, bağımsız faktörler ile modelde seçilen yanıtlar arasındaki etkileşimleri ortaya çıkarmıştır. Etki analizi, her bağımsız değişkenin etkisinin ve bunların tepkiler üzerindeki etkileşimlerinin çözünürlük (yanıt 1), kapasite faktörü (yanıt 2) ve alıkonma zamanı (yanıt 3) ile anlaşılmasına yardımcı olmuştur.

Tablo 5.2. Üç seviyeli Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak yöntem optimizasyonuna yönelik deneysel çalışmaların özeti

Analiz	Faktör A (FR)	Faktör B (ACN)	Faktör C (AF)	Yanıt 1 k'	Yanıt 2 T	Yanıt 3 T_R
1	0,50	55	15	1,944	1,28	5,33
2	0,45	55	10	2,887	1,325	6,59
3	0,50	50	10	3,58	1,309	8,33
4	0,55	45	10	7,595	1,291	12,10
5	0,50	50	10	4,432	1,309	8,34
6	0,50	45	5	6,515	1,198	13,75
7	0,50	55	5	2,499	1,259	6,36
8	0,55	50	15	3,88	1,188	6,85
9	0,55	50	5	3,873	1,291	8,09
10	0,50	50	10	4,433	1,331	8,33
11	0,45	50	5	3,816	1,265	9,72
12	0,45	50	15	3,095	1,174	8,23
13	0,50	50	10	4,461	1,32	9,28
14	0,45	45	10	7,564	1,131	14,43
15	0,50	45	15	5,045	1,2	11,02
16	0,50	50	10	3,708	1,372	8,57
17	0,55	55	10	2,302	1,351	5,47

ANOVA, bağımsız değişkenlerin, akış hızının (A), organik faz oranının (B) ve amonyum format derişiminin (C) (üçü için de $P < 0,05$) çözünürlük üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Her üç bağımsız değişken içinde denklemler ikinci

dereceden ve kuadritiktir. Tablo 5.3’de elde edilen denklemler ve modellerin ANOVA sonuçları verilmiştir.

Kapasite faktörü pikin kolondan çıkış süresi ile ilgili büyüklüktür; maddenin, kolondan tutunmadan çıkan türlerden ne kadar süre sonra geldiğini oransal olarak tanımlar. DoE çalışmalarında kapasite faktörü denklemine bakıldığında bağımsız değişkenler; bağımsız değişken A’nın yanıt 2 üzerindeki etkisi daha anlamlıyken, B ve C’nin etkisinin daha az anlamlı olduğu gözlenmiştir; ancak üç değişkenin de etkisi negatiftir. ANOVA ile elde edilen 2 faktörlü etkileşim denkleminin gösterdiği gibi akış hızındaki (A) artışla birlikte kapasite faktöründe şiddetli azalma olduğu ortaya çıkmıştır. Teorik olarak akış hızı ile birlikte kapasite faktöründe de azalma meydana gelir, çünkü akış hızı arttıkça piklerin çıkış süresi de kısalmır. Diğer taraftan akış hızının kapasite faktörüne etkisi ise çok az olup negatiftir. Ancak akış hızı amonyum format derişimi ile birlikte arttığında ya da organik faz yüzdesi ile birlikte arttığında etki pozitif olup benzer şekilde yine azdır. Bu sonuçlar yanıt 2 için bağımsız değişken amonyum format, akış hızı ve organik faz yüzdelerinin etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Üç bağımsız değişken için de varyans analizinde $P < 0,05$ bulunmuştur.

Tablo 5.3. Box-Behnken tasarımının varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Yanıt türü	Denklem	P-değeri	F-değeri	R ²	Yeterli kesinlik
Yanıt 1	$k^* = 111,95520 - 101,65000A - 2,80857B - 0,272755C - 0,616000AB + 0,728000AC + 0,009150BC + 125,89000A^2 + 0,025979B^2 - 0,030861C^2$	0,0009	2,55	0,9496	13,0239
Yanıt 2	$T_F = -8,36820 + 19,07500A + 0,172875B + 0,047805C + 0,134000AB + 0,012000AC + 0,000190BC + 11,69000A^2 + 0,000979B^2 - 0,002779C^2$	0,0462	4,95	0,8299	5,1792
Yanıt 3	$R_t = 8,57 - 0,8062A - 3,45B - 0,8096C + 0,3028AB + 0,0617AC + 0,4230BC - 0,0931A^2 + 0,9843B^2 - 0,4382C^2$	<0,0001	81,15	0,9905	29,79

ANOVA ile elde edilen ikinci dereceden denklem bağımsız değişkenlerin tek tek ve denklemde temsil edilen etkileşimlerin Y2’yi etkilediğini gösteren üstel faktörlere sahip değildir. A faktörünün etkisi, diğer bağımsız faktörlerin yanı sıra en yüksek F

oranının (4,95) gösterdiği gibi kuyruklanma faktörü (yanıt 2) üzerinde önemi etkisiz bile sayılabilir. Etkileşim etkisi arasında, ikili kombinasyonların etkisi pozitif olmakla beraber etki oldukça azdır. Etki analizi, A, B ve C'deki artışla yanıt 2'nin arttığını göstermektedir.

Yanıt 3, bu çalışmada analiz edilen tüm diğer yanıtlar arasında bağımsız değişkenlerden en az etkilenen yanıttır. Alıkonma zamanı, elüsyon süresi ile doğrudan ilişkili bir büyüklük olup, kolon içi etkileşimlerden önemli ölçüde etkilenen bir parametredir. İkinci dereceden kuadratik bir denklem üç değişkenin de negatif bir korelasyona sahip olduğunu göstermektedir. A ve B bağımsız değişkenlerinde artışın alıkonma zamanını azaltması beklenen bir durumdur. Çünkü akış hızı ve bu tip kolon-elüent türlerinde organik faz yüzdesi arttıkça alıkonma zamanı azalır. Kolonda analit ile fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşim hareketli fazın apolarlığı arttıkça azalır ve akış hızı da aynı şekilde türlerin daha hızlı elüe olmasına neden olur. Etki analizine bakıldığında ise en fazla etkinin faktör B'den geldiği, faktör B ile C'nin benzer değerde etki ettikleri görülmektedir. Eş zamanlı artışta B*C etkisi yani asetonitril oranı ile amonyum format derişimdeki artış ile pozitif ve 0,4 kat etkileyecek şekilde kayda değerdir. Bu etki A*B etkisinden bile daha fazla olup amonyum format derişiminde akış hızı kadar etki değerine sahip olduğu kuadratik denklemde görülmüştür.

Model oluşturulduktan sonra DoE çalışmalarında ele alınan iki önemli nokta vardır: Birincisi, yukarıda da bahsedildiği üzere doğru modeli oluşturmak, ikincisi ise hedef yanıtları veren bağımsız değişkenleri seçebilmektir. 1980 yılında Derringer ve Suich, o zamandan beri endüstride yaygın olarak kullanılan isteklilik fonksiyonunu geliştirerek çoklu yanıtları optimize edecek çözümlerden birini bulmuşlardır (Derringer ve Suich, 1980). Bu işlev, birçok özelliğe sahip bir ürün veya sürecin kalitesinin, eğer bunlardan biri “isteklilik” sınırının dışındaysa, tamamen kabul edilemez olduğu fikrine dayanmaktadır. Amacı, ilgili tüm yanıtların kriterlerine uygunluğu sağlayan çalışma koşullarını bulmak ve aynı zamanda arzu edilen ortak yanıtta en iyi uzlaşma değerini sağlamaktır (Lee ve Gilmore, 2005). Bu, çoklu yanıtların tek bir yanıtla dönüştürülmesi, bireysel yanıtların bileşik bir fonksiyonda birleştirilmesi ve ardından optimizasyonu yoluyla elde edilir. Derringer'in isteklilik fonksiyonu, analistin, optimizasyon prosedürü sırasında araştırmacının öncelikleri de dahil olmak üzere, değerlendirilen tüm değişkenler için en uygun değere aynı anda ulaşmak için deneysel koşulları (faktör seviyelerini) bulmasına olanak tanır. İlk adımda, her bir yanıt $\hat{y}_i(k)$ için bireysel bir isteklilik fonksiyonu $d_i(\hat{y}_i)$, uygun modeller kullanılarak ve optimizasyon kriterleri oluşturularak

sağlanmalıdır. İsteklilik her zaman 0 ile 1 arasında değerler alır; burada $di(\hat{y}_i)=0$, istenmeyen bir yanıttır ve $di(\hat{y}_i)=1$ tamamen arzu edilen bir değeri, yani ideal yanıtı temsil eder. $di(\hat{y}_i)$ 'nin ara değerleri az çok arzu edilen yanıtları gösterir. U_i 'nin yanıt için kabul edilebilir üst değer ve L_i 'nin düşük olduğu, (U_i-L_i) tarafından verilen kabul edilebilir yanıt değerleri aralığı dahilinde, benimsenen optimizasyon kriterlerine bağlı olarak farklı işlevler oluşturulabilir. Ağırlık parametrelerinin düşük değerlerinin, yanıtın hedef değere tam olarak yakın olmasının gerekmediğini, geniş bir yanıt aralığı için tatmin edici isteklilik seviyelerine ulaştığını göstermek önemlidir. Bunun tersine, yanıt hedefe çok yaklaşmadığı sürece arzu edilirliliğin çok düşük olduğu anlamına gelir. N sayıda değişken (faktör ve tepki seviyeleri) i fonksiyonlarına dönüştürüldükten sonra, aşağıdaki denklemi kullanarak en iyi ortak tepkileri bulmak için Global İstenebilirlik (D) adı verilen benzersiz bir fonksiyonda birleştirilirler. Design Expert® yazılımında, analist tarafından belirlenen önem, en az önemli değişken için 1'den en önemli değişken için 5'e kadar değişebilir. D sıfırdan farklı bir değere ulaştığında eş zamanlı olarak optimize edilen tüm değişkenlerin arzu edilen bir değere sahip olduğu düşünülebilir. Öte yandan, yanıtlardan biri tamamen istenmeyen ise $di(\hat{y}_i)=0$, D sıfır olacaktır. Optimizasyon prosedürü, çeşitli toplama şemalarının kullanılabileceği D'yi maksimuma çıkarmayı gerektirir (Candiotti vd., 2014).

Çalışmada seçilen yanıt değerleri için istenirlikler mümkün olan en küçük değerleri olarak seçilmiştir. ICH kılavuzunun önerdiği sınır değerler tercih edilmiştir. Yanıt değerleri analiz süresini kısa tutulmasına yardımcı (kapasite faktörü) ve daha dik pikler elde edildiğini gösteren (kuyruklanma faktörü) sistem uygunluk parametreleri olduğu için bu şekilde tercih edilmiştir. Program bu sınırları içeren D değerine uygun 12 çözüm sunmuştur. D değeri için kontur ve 3D yüzey grafikleri Şekilde 5.6'da verilmiştir.

Factor Coding: Actual

All Responses

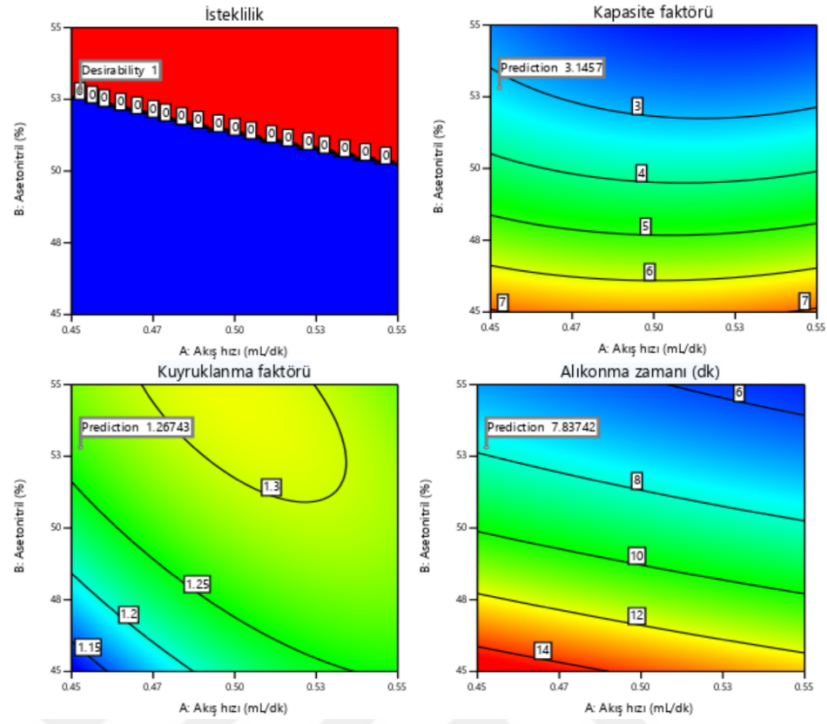
0 1

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 5



(a)

Factor Coding: Actual

Kapasite faktörü

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

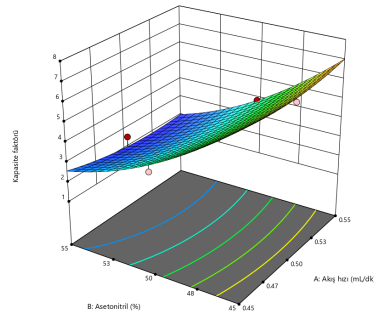
1.944 7.595

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 5



Factor Coding: Actual

Kuyruklanma faktörü

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

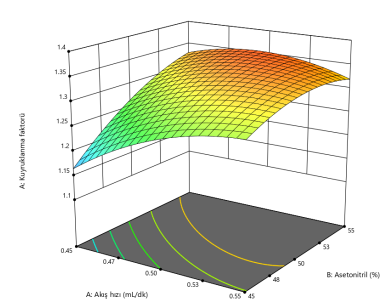
1.131 1.372

X1 = A

X2 = B

Actual Factor

C = 10



Factor Coding: Actual

Alikonma zamanı (dk)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

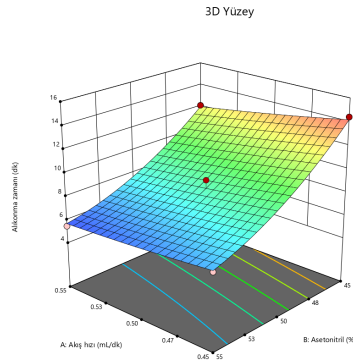
5.326 14.432

X1 = A

X2 = B

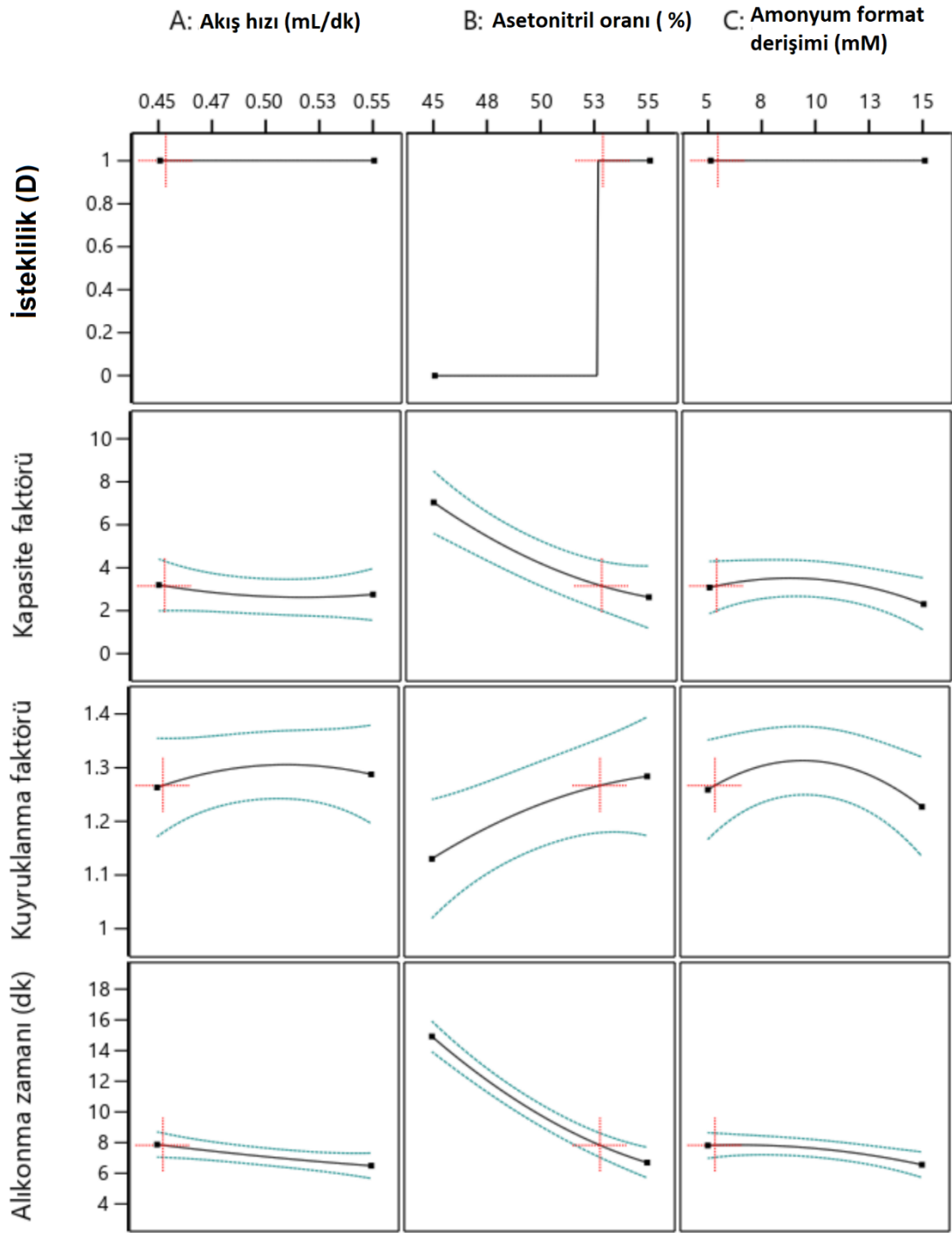
Actual Factor

C = 10



(b)

Şekil 5.6. A, B ve C'nin bir fonksiyonu olarak genel isteklilik (D) için kontur, 3D yüzey grafikleri ve etkileşim grafikleri (c).



(c)

Şekil 5.7. (Devam) A, B ve C'nin bir fonksiyonu olarak genel isteklilik (D) için kontur, 3D yüzey grafikleri ve etkileşim grafikleri (c).

D fonksiyonu yaklaşımının başarısının tamamen optimizasyon sürecinde kullanılan modellerin kalitesine bağlı olduğunu belirtmek gerekir. Bu yöntemi doğru bir şekilde uygulamak için, kısmi isteklilik fonksiyonlarını oluşturmada yalnızca istatistiksel olarak doğrulanmış modeller kullanılmalıdır; bu durumda, bu modellerde uyum testinin bulunmama olasılığı 0,05'ten büyük olmalıdır. Diğer dikkat edilmesi gereken durum ise şu şekilde açıklanabilir; (a) isteklilik yaklaşımı tek boyutlu bir optimizasyondan oluşur ki bu D'nin maksimumlarını aramanın her zaman kolay olduğu anlamına gelmez ve (b) D türevlenebilir değildir, dolayısıyla alternatif algoritmalar kullanılmalıdır. Bu bağlamda, kabul edilebilirlik ve hedef için kritik değerlerin yanı sıra işlevin şekli ve farklı yanıtların göreceli ağırlığı, kullanıcı tarafından keyfi olarak (az ya da çok) “öncelikli” olarak tanımlanır. Bu parametrelerden bazılarının biraz değiştirilmesinin bile D'nin tamamen farklı olacağını dikkate almak gerekir. (Candioti vd., 2014).

Tablo 5.4. Optimizasyon sonucu beklenen ve gözlenen yanıt değerleri.

Yanıt	Beklenen değer	Ölçülen değer
Kapasite faktörü (k')	3,14	3,44
Kuyruklanma faktörü (T_f)	1,26	1,25
Alıkonma zamanı (T_R)	7,83	8,95

Yapılan DoE çalışmaları ile isteklilik Şekil 5.6 ile optimize edilmiş organik faz oranı %54, akış hızı 0,45 mL/dk, amonyum format derişimi 5 mM, enjeksiyon hacmi 10 µL ve kolon fırın sıcaklığı 40 °C olarak elde edilmiştir. Optimize edilmiş çözümün deneysel çalışmaları (n=6) gerçekleştirilmiştir. Son olarak belirlenen optimum koşullarda analizler gerçekleştirilerek yanıt değerlerinin beklenen değer ile yakınlıkları Tablo 5.4'de kıyaslanmıştır. Her yanıtın elde edilen sonuçları, regresyon modelinin tahmin edilen değerleriyle karşılaştırılmış ve tüm yanıtlar için % bağıl hatanın, %95 güven aralıklarıyla <%10 olduğu bulunmuştur. Bu optimize edilmiş koşullar, ICH Q2(R1) yönergelerine göre optimum koşullar altında SUT verileri hesaplanarak her üç cihaz sistemi için Tablo 5.5'de verilmiştir.

Tablo 5.5. ALEK analizi için elde edilen SUT verileri

Parametre	Hesaplanan Değer			Tavsiye Edilen Değer
	HPLC	HPLC-2	LC-MS\MS	
Ahkonulma zamanı (dk)±GA *	8,78±0,01	8,94±0,01	3,42±0,02	-
Ahkonulma zamanı için %BSS	0,13	0,12	0,04	BSS ≤ %1
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0,63	0,82	0,43	BSS ≤ %1
Ahkonulma zamanı için enjeksiyon kesinliği %BSS (n=6)	0,09	0,08	0,47	BSS ≤ %1
Kuyruklanma faktörü (T)	1,36	1,24	1,38	T ≤ 2
Kapasite faktörü (k)	2,89	4,08	-	2<k<10
Teorik tabaka sayısı (N)	9020	4948	6957	N > 2000
USP Genişlik	0,26	0,51	0,17	≤1
HETP (USP)	16,6	31,32	21,6	-

*%95 güven seviyesinde

5.5. Kütle Dedektöründe ALEK İyonlaşma Karakteristiği

HPLC ve MS arasındaki çatışma, HPLC'nin sıvı faza dayalı bir teknik olması ve MS'in doğası gereği bir gaz fazı tekniği olmasıdır. Bir numunenin sıvı fazdan gaz fazına düzgün geçişini sağlayacak kanalların bulunmaması, bir balık ile bir kuş arasındaki evliliğe benzetilen, LC ve MS arasında arayüz oluşturan büyük bir bariyerdir (Lee, 2005).

Elektrosprey bir yüzyılı aşkın süredir bilinmektedir, ancak MS için iyonizasyon yöntemi olarak önemi ise çok yenidir. Elektrosprey iyonizasyonun ortaya çıkışıyla birlikte, artık polar yapıdaki ve termal olarak kararsız biyomedikal numunelerin iyonizasyon olayından önce buharlaştırılmasına gerek kalmamıştır. Çözücü damlacıklardan buharlaştıkça damlacıkların boyutu azalır, bu da yük konsantrasyonunun artmasına neden olur. Yük konsantrasyonu, yükler arasındaki Coulomb itme kuvvetinin damlacık sıvısının yüzey gerilimini aştığı Rayleigh sınırına ulaştığında, damlacıklar Coulomb patlamasına uğrayarak daha küçük damlacıklar oluşturur. Bu işlem, analit iyonları sıvı fazdan sıvı faza “buharlaşıma” kadar gaz fazında (iyon buharlaşma modeli) veya damlacıkta tek bir çözünen molekül kalana kadar (yükli kalıntı modeli) birçok kez tekrarlanır. Bu nedenle, elektrosprey iyonizasyon (ESI) işlemi, kısaca, sıvı fazdaki çözünen analit iyonlarını gaz fazına aktarır. ESI, düşük yüzey gerilimine sahip metanol, etanol ve asetonitril gibi organik çözücülerle iyi çalışırken ESI duyarlılığı daha yüksek yüzey gerilimine sahip suyla düşer.

Sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisinin tek ve iyi entegre bir sistem halinde birleşimi (LC-MS), karmaşık numunelerdeki organik bileşiklerin nicel analizine yönelik yaklaşımda bir devrim yaratmıştır. Yaşam bilimleri, çevre, gıda güvenliği ve ülke güvenliğine yönelik yeni uygulamalarla birlikte bu ve benzer alanlardaki ilerlemeler LC-MS'in kullanılmasıyla büyük ivme kazanmıştır. Tandem kütle analizörü (LC-ESI-MS/MS) ile birleştirilmiş bir elektrosprey iyon kaynağı kullanan LC-MS sistemleri, orta ve yüksek iz düzeyindeki kantitatif tayinlerdeki etkinlikleri nedeniyle büyük bir popülerlik kazanmıştır. Modern MS/MS sistemlerinin yüksek seçiciliği ve hassasiyeti, çok az veya hiç numune hazırlama gerektirmeyen ve minimum kromatografik alıkonma gerektiren yüksek verimli analizlere yönelik artan bir eğilime yol açmıştır. Bu önemli yönleri sayesinde LC-ESI-MS/MS, ilaç endüstrisinde, klinik araştırmada, adli analizde, çevre biliminde ve karmaşık karışımlarda eser miktarda analitin bulunduğu diğer birçok alanda köklü bir standart analitik teknik haline gelmiştir. Ancak son birkaç yılda LC-MS/MS'in yüksek seçiciliğinin endojen safsızlıklardan kaynaklanan müdahalelerin etkili

bir şekilde ortadan kaldırılmasını garanti ettiği yönündeki ortak algı kırılmaya başlamıştır (Niessen vd., 2006, Taylor, 2005). Birçok araştırmacı matris varlığının, ESI ve atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI) LC-MS yöntemlerine dayalı ölçüm prosedürlerini ciddi şekilde etkileyebileceğini bildirmiştir (Cortese vd., 2020). Bu olguya matris etkileri (ME) adı verilir ve birlikte elüsyon matrisinin neden olduğu analit tepkisinin beklenmeyen bir baskılanması veya artırılması olarak kabul edilir. Yöntemin tekrarlanabilirliğini, doğrusallığını ve doğruluğunu büyük ölçüde etkileyerek hatalı kantitatif tayinlere neden olabilir. ME'nin kesin mekanizması hala bilinmemektedir. Birlikte elüe edilen matrisin, mevcut yükler için olası bir rekabette ve gaz fazı emisyonu için damlacık yüzeyine erişimde sinyal yoğunluğunu etkileyebileceği varsayılmaktadır (Cappiello vd., 2008).

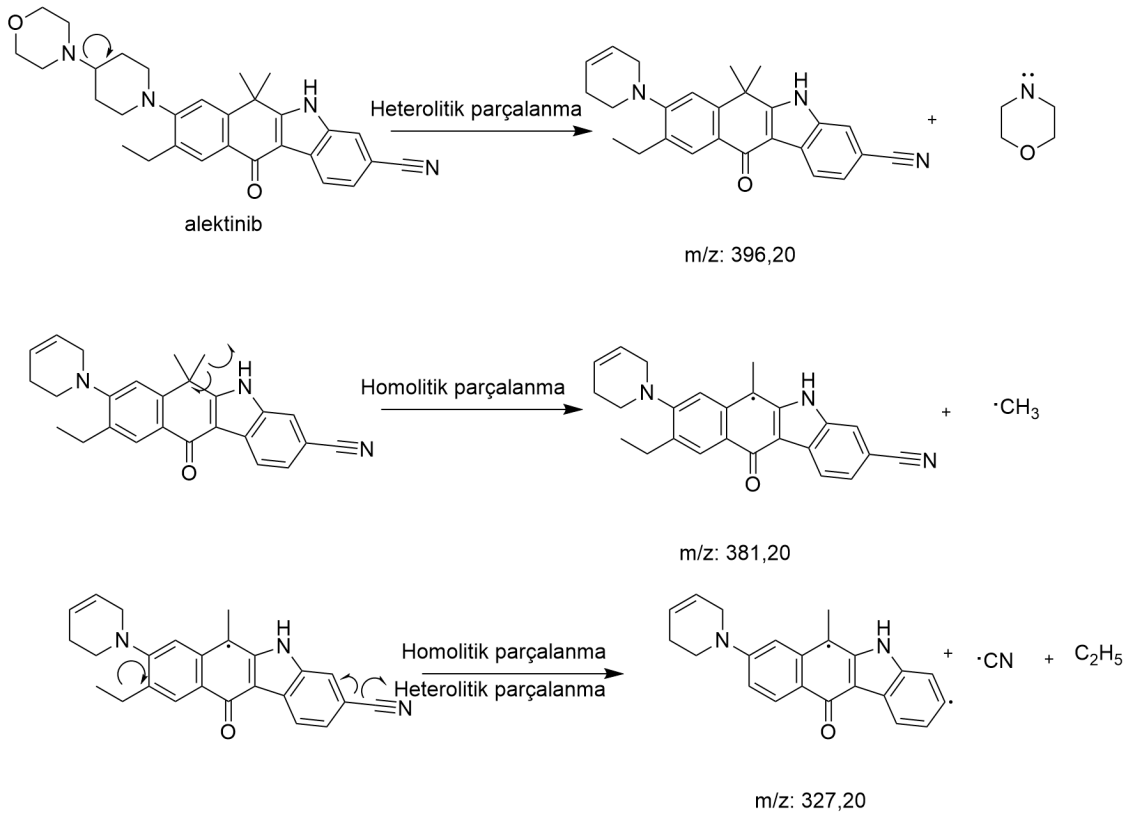
ALEK'in farmasötik formülasyonlarda analizi için geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun diğer MS'dir. MS, yukarıda bahsedilen zorlukları olsa da birçok açıdan avantajlara sahiptir. Özellikle yüksek seçiciliğe sahip olması ve çok düşük kantitasyon limitlerine inilebilmesi bu yöntemin gelecek vaat ettiğini göstermektedir. Özellikle ME sinyal üzerindeki etkileri ile baş edildiğinde yöntem kalitatif ve kantitatif tayinlerde analizcilere çok büyük kolaylıklar sağlayacaktır.

Kütle dedektöründe ALEK analizi için yüksek spesifiklik ve seçicilik sağlanması nedeniyle MS/MS tekniği kullanılmıştır. Bunun için stok ALEK çözeltisinden 10 µg/mL derişimde metanol ile seyreltme yapılarak standart çalışma çözeltisi hazırlanmış ve ESI ile kütle spektrometresinde karakterize edilmiştir. Analitin ESI çoklu reaksiyon görüntüleme pozitif modda (MRM⁺) iyonlaşmaya daha yatkın olduğu yüksek şiddette elde edilen sinyallerden anlaşılmıştır. Analitin çoklu reaksiyon izleme koşullarında elde edilen yavru iyonlar ve uygulanan enerji düzeyleri Tablo 5.6'da verilmiştir. Her bir iyon için tutma süresi 100 ms olarak uygulanmıştır.

Tablo 5.6. ALEK'in pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları

Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
ALEK	483,00	396,20	-18,0	-28,0	-27,0
		381,20	-18,0	-41,0	-17,0
		327,20	-24,0	-48,0	-16,0

Günümüzde MS, küçük moleküllerin tanımlanmasında önemli bir teknolojidir. MS, nükleer manyetik rezonansla (NMR) karşılaştırıldığında, kat kat daha yüksek hassasiyet sunar. Gaz kromatografisi MS (GC-MS) ve sıvı kromatografisi MS (LC-MS) başta olmak üzere çeşitli analitik kurulumlar geliştirilmiştir. Referans spektrumları uzun yıllar boyunca toplandığından ve parçalanma mekanizmaları farklı cihazlar üzerinde tekrarlanabildiğinden, GC-MS spektrumları veri tabanı araması yoluyla otomatik olarak yorumlanabilir. Ancak GC-MS, metabolitin de termal olarak stabil olmasını gerektirir. Polar lipitler, şeker içeren metabolitler, fenolikler, peptitler veya nükleotidler gibi biyolojik açıdan önemli birçok bileşik sınıfı için durum böyle değildir. Bu bileşikler LC-MS ile analize daha uygundur. Burada, çalışılan bileşiğin eklenti iyonu (örneğin, $[M + H]^+$) kütle olarak seçilir ve inert gazla doldurulmuş bir çarpışma hücresinde parçalanır (çarpışma kaynaklı ayrışma, CID) ve kütle-yük oranları (ortaya çıkan parçaların m/z oranları) tandem kütle spektrumları olarak kaydedilir (Rasche vd., 2011). Bu tür verilerin hesaplamalı analizi henüz emekleme aşamasındadır. Küçük moleküllerin değişen parçalanma enerjileri altında parçalanması tam olarak anlaşılmadığından, bu verilerin zaman alıcı manuel analizi bile önemlidir. CID kütle spektrumlarının farklı cihazlar üzerinde sınırlı tekrarlanabilirliği nedeniyle, spektral kütüphanelerde arama yapmak bile ciddi bir sorundur. Bu nedenle bu alandaki her bir veri ve mekanistik açıklama çok değerli olup bu yolda atılan önemli bir adımdır. Bu nedenle ALEK'in tandem kütle dedektöründeki fragmantasyonu ayrıntılı olarak gözlenmiş ve açıklanmaya çalışılmıştır.



Şekil 5.8. ALEK için ana iyon ve baskın parçalanma yolları

Protonlanmış $[M + H]^+$ moleküllerindeki en önemli çift elektron parçalanması ya endüktif bölünmeyle (yükün α -karbona geçişiyle) ya da bir proton yeniden düzenlenmesiyle (yükli) karbon-heteroatom (N, O, S) bölünmelerini (heteroatom da tutma) içerir. ALEK, yapısında O ve N heteroatomları içeren, organik yapıda, küçük bir moleküldür. Yapısında aromatik benzen ve indol grupları kütle dedektöründe parçalanmaya uygun kısımlardır. Kütle dedektöründe organik yapıdaki moleküllerde genelde heterolitik ya da homolitik parçalanmalar göze çarpar. Yapı kararlı halde kalabileceği, üzerindeki yükü taşıyabileceği şekilde yüklenmeye meyillidir. ALEK'in kütle dedektöründe parçalanmasında baskın olarak 3 adet yavru iyon m/z 396,20; m/z 381,20 ve m/z 327,20 gözlenmiştir. İyonlaşma yüzdesi en yüksek olan m/z 396,20 yavru iyon ve en düşük olan ise m/z 327,20 olan yavru iyondur. ALEK yapısı, en uç kısım olan ve hetero atom C ve N içeren bölgesinden parçalanarak, en yüksek yüzdeye sahip fragmentasyon gerçekleşmiştir; yapıdan morfolin grubu ayrılmıştır. Morfolini piperidine bağlayan sigma bağı, piperidin halkası üzerine kırılarak bir π bağı oluşturarak kararlı forma geçmiştir. Heterolitik parçalanma bölgedeki sterik etkinin daha az olması ve

piperidinin elektronegativite etkisi nedeniyle, olasılığı yüksek bir parçalanma yolağıdır. Çünkü indüktif bölünme ya da yeniden düzenlenme reaksiyonları rekabetçi ve tamamlayıcı reaksiyonlar olarak düşünülmelidir. İki parçanın göreceli bolluğu öncelikle Field kuralıyla belirlenir. Bu kurala göre, daha yüksek proton ilgisine sahip parçada yük tutulmasının daha uygun olduğunu ve dolayısıyla düşük proton ilgisine sahip nötr molekülün kaybının daha olası olduğunu gösterir. Bu nedenle oluşan diğer ikinci büyük bağıl yüzdeye sahip yavru iyon ise homolitik parçalanma ile meydana gelmiştir. Field kuralı, elektrosprey iyonlaşmada Stevenson kuralının çift elektronlu karşılığı olarak düşünülebilir. Ek olarak, iki olası parçanın göreceli bolluğu, onların göreceli stabilitesidir. Bu parçaların m/z değerlerinin toplamı, $[M + H]^+ + 1$ 'in m/z'sini verir (Niessen, 2011). ALEK'in iyonlaşmasında ortaya çıkan ikinci yavru iyonda birinci parçalanma ürününün ana iskeletine bağlı olan metil gruplarından biri, bağı oluşturan elektronlardan birini alarak ayrılmış ve radikalik bir ürün oluşmasına sebep olmuştur. Son parçalanma ürününde ise ikinci üründen etil grubu bağ elektronlarının tamamını alarak, siyano grubu ise bağ elektronlarını paylaşarak ayrılmıştır. Söz konusu önerilen mekanizma Şekil 5.7'de verildiği gibidir.

5.6. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme

Nihai formundaki (ilaç ürünü) farmasötik açıdan aktif bileşik (API), yardımcı maddeler içeren bir formülasyonun parçasıdır. Yardımcı maddeler, güvenlik açısından uygun şekilde değerlendirilen ve bir ilaç ürününe kasıtlı olarak dahil edilen maddelerdir. API ve yardımcı maddelerin üretimi ve bozunması, belirli bir sınırın üzerinde mevcut olması durumunda, safsızlıkların, terapötik faydası olmayan bileşiklerin oluşmasına yol açabilir (Shaikh, 2019). Diğer taraftan, (örneğin peroksitler gibi) bazı safsızlıklar reaktif olabilir ve ürün kalitesini ve hasta güvenliğini eser düzeylerde olsalar bile etkileyebilir (Zhang vd., 2018). Olası safsızlık oluşumunu tahmin etmek amacıyla, katı hal çalışmaları için ısıya, neme ve ışığa ve/veya çözelti durumu çalışmaları için bir dizi pH değerine maruz bırakılarak API ve ilaç ürünleri üzerinde zorunlu bozunma çalışmaları gerçekleştirilir (Blessy vd., 2014). ICH kurallarına göre içeriği %0,1'den fazla olan herhangi bir safsızlık tanımlanmalı ve karakterize edilmelidir. Herhangi bir potansiyel genotoksik bileşiğin, toksikolojik endişe sınırlarına uymak için üretim sürecini değiştirerek veya konsantrasyonunu azaltarak uzaklaştırılması gerekir (Shaikh, 2019). Safsızlık profili oluşturma, kalite kontrol ve gözetim için yüksek çözünürlüklü kütle

spektrometrisinin (HRMS) avantajları literatürde tanımlanmış olsa bile, safsızlıkların değerlendirilmesi klasik olarak kromatografi yoluyla gerçekleştirilir ki bu da düzenlenmiş kontrolde olası bir HRMS uygulamasını öngörmektedir (Géhin ve Holman, 2021). Ancak bunlar çoğunlukla, çözünürlükten ödün vererek hassasiyeti ve/veya hızlı taramayı artıran nicel ayarlarla gerçekleştirilir. HRMS'nin karmaşık karışımları analiz etme ve güvenilir tanımlamalar için ince izotopik dağılımlar sağlama gücüne rağmen, bu deneylerin neredeyse hiçbiri HRMS ayarları kullanılarak gerçekleştirilmemiştir (Deschamps vd., 2023). Burada sadece birkaç uygulama anlatılacak olsa da formülasyon analizi için HRMS'yi kullanan yayınların sayısı gelecekte artabilir. Kompleks ilaç yardımcı madde bileşimleri, formülasyonun *in vivo* performansını, dolayısıyla ilaç emilimini etkiler. Bu nedenle, farklı tedarikçilerden veya partilerden gelen yardımcı maddelerdeki farklılıklar, bir ilaç ürününün etkinliği üzerinde etkiye sahip olabilir.

HRMS'nin en avantajlı yönlerinden biri, deneysel ve teorik izotopik dağılımların karşılaştırılması yoluyla moleküler formüllerin güvenli bir şekilde atanmasına yardımcı olan bir iyonun ince izotopik dağılımına erişimdir. Bu kapsamda çoğunlukla direkt enjeksiyon modunda elde edilebilen çok yüksek çözme gücünde ince izotopik yapıya erişim sağlanabilmektedir. İzotopik ince yapılar ve benzersiz moleküler formül atamaları daha sonra yapısal açıklamalar gerçekleştirmek için MS/MS deneyleriyle birleştirilebilir. Binlerce bileşiğin birkaç dakika içinde son derece bilgilendirici spektrumlarını elde etme olanağı, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerini, farklı numunelerin hızlı profilinin çıkarılması ve karşılaştırılması için uygun hale getirir. Bu, farmasötik serilerin değerlendirilmesinde ve safsızlık araştırmalarında değerli bir **özellik** oluşturmaktadır. Diğer uygulama alanlarında olduğu gibi, pik alanlarının karşılaştırılması yoluyla elde edilen yarı kantitatif analiz, çeşitli konsantrasyonlarda ilaç üretimindeki farklılıklardan kaynaklanan farklı safsızlıkların varlığını ortaya koyabilir. Sonuç olarak HRMS, yüksek duyarlılıkları ve parçalanma deneyleri gerçekleştirme olasılıkları sayesinde, çok düşük konsantrasyonlarda hem ana bileşikler hem de safsızlıklarla ilgili bilgilere erişim sağlayarak ilaç formülasyon çalışmaları için avantajlar sunar. Ayrıca, ince izotopik dağılımlara erişim, güvenilir moleküler formül niteliklerine ve hızlı profil oluşturma ve karşılaştırmaya olanak tanır. Bununla birlikte ilaç formülasyonlarının değerlendirilmesi aynı zamanda bileşik dağılımlarını da içermektedir (Deschamps vd., 2023).

ALEK, bozunma ürünlerinin karakterizasyonuna ön basamak olması amacıyla MSⁿ çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu işlemde, molekül iyon tuzağında MS/MS, MS³ ve MS⁴ parçalanmaları kullanılarak, moleküler iyonun ve fragmanlarının yapısının aydınlatılması sağlanmıştır. Kimlik doğrulaması, moleküler formülleri çıkarmak için ESI-IT-TOF kullanılarak doğru kütle belirlemeyle sağlanmıştır. Protonlanmış ALEK molekülünden MS¹'de yapıdan heterolitik eliminasyon ile morfolin yapısı ayrılmış ve piperidine bağlayan sigma bağı kırılarak çifte bağ oluşturarak kararlı hale gelmiştir. İkinci ve üçüncü parçalanma basamaklarında ana iskelet üzerindeki metil grupları sırayla bağı oluşturan elektronların birini ana iskelete bırakarak ayrılmış ve radikalik bozunma ürünü oluşturmuştur. Dördüncü ve son basamakta ise yine ana iskelette bir kopuş gerçekleşmiştir. Etil grubu yapıdan ayrılırken kopan parça yerine yapıya katılan proton aromatikliği korumuştur. HRMS çalışmalarına ait kütle atlası Şekil 5.8'de verilmiş, muhtemel mekanizma ise Şekil 5.9'da şematize edilmiştir.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\sn\alec\alec176.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	0	4	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	3	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 25.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

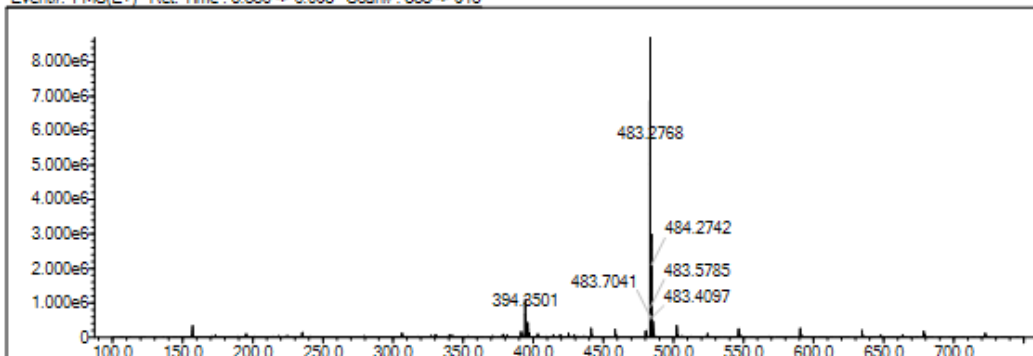
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

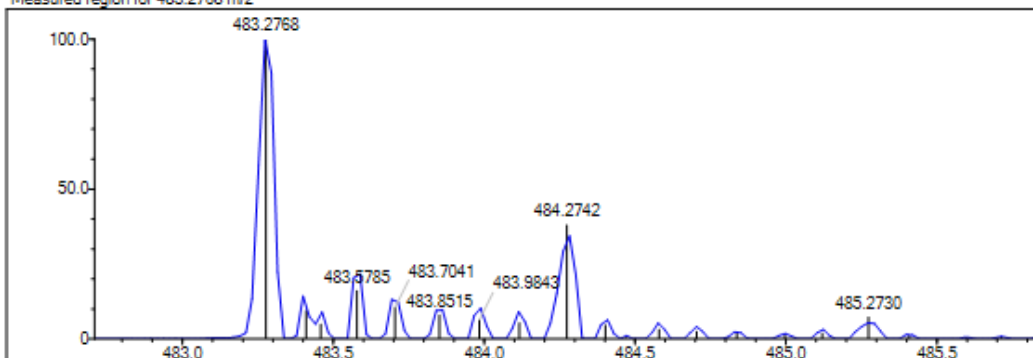
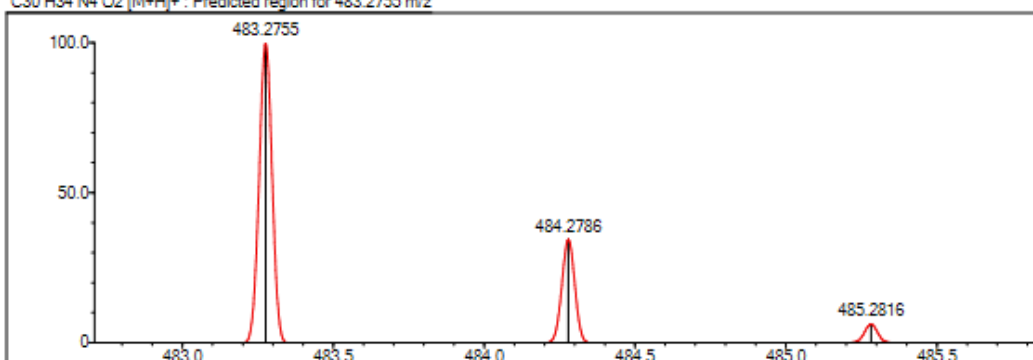
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 5.880 -> 6.093 Scan#: 883 -> 915

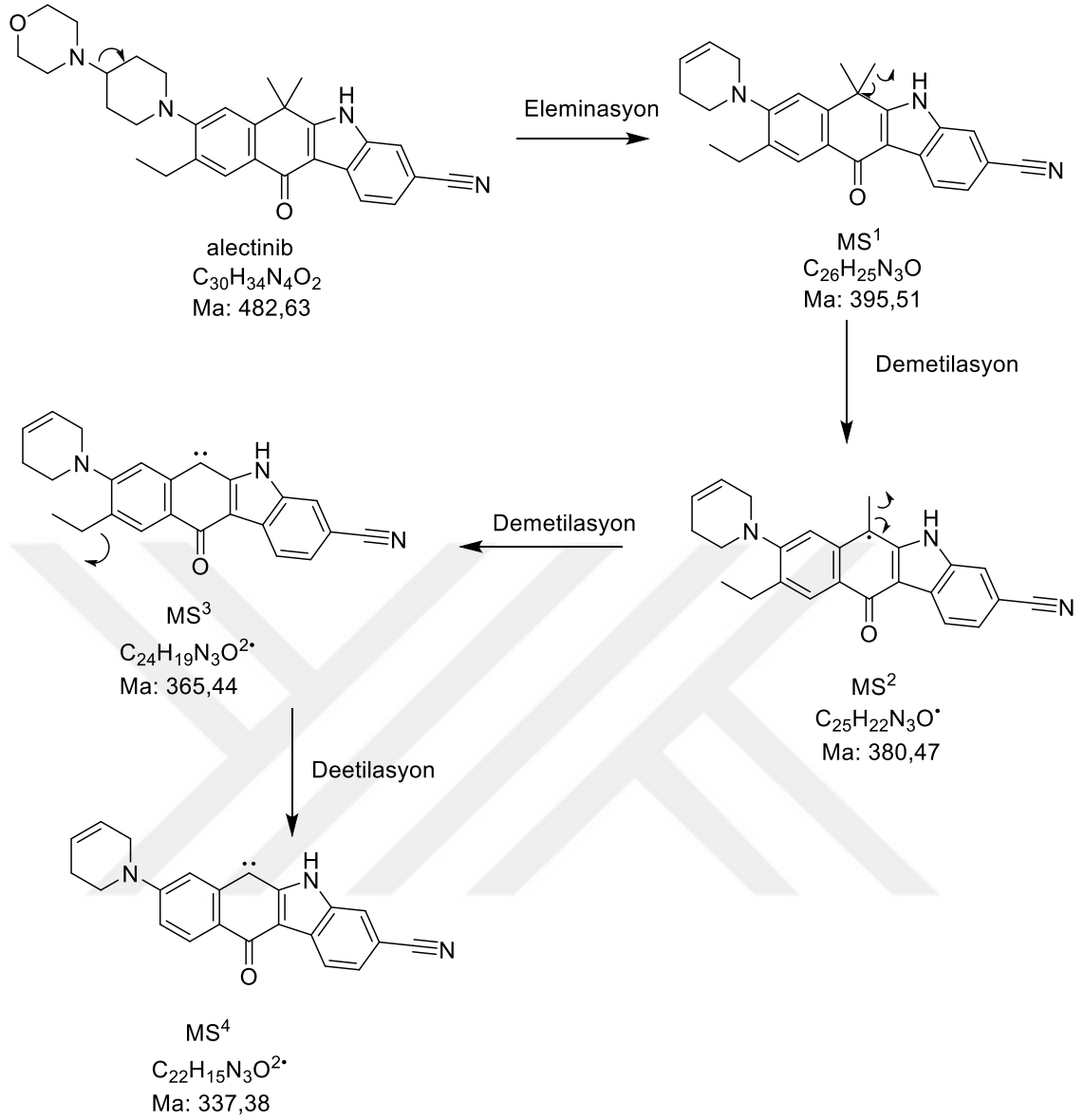


Measured region for 483.2768 m/z

C30 H34 N4 O2 [M+H]⁺ : Predicted region for 483.2755 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	81.10	C30 H34 N4 O2	[M+H] ⁺	483.2768	483.2755	1.3	2.69	84.68	16.0

Şekil 5.9. ALEK'e ait kütle atlası



Şekil 5.10. ALEK'in MSⁿ karakterizasyonu

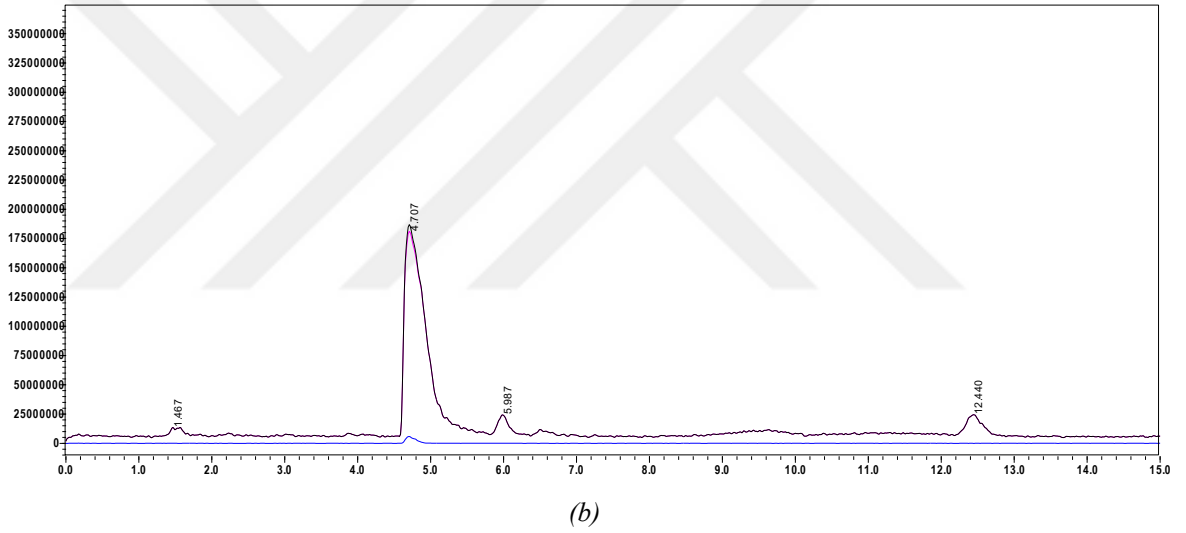
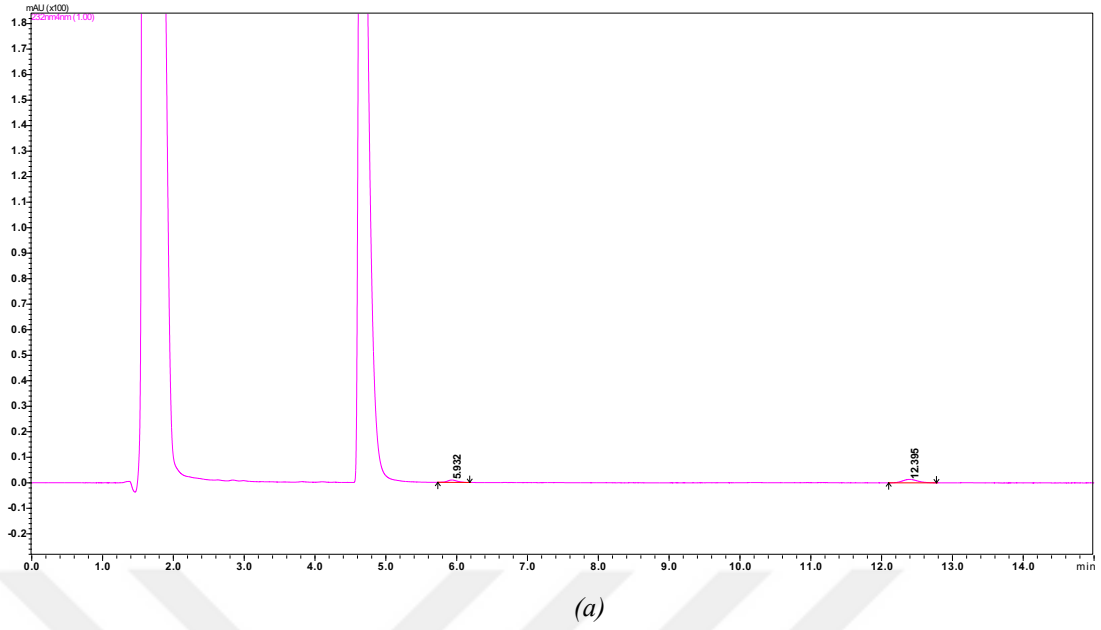
ALEK'in bozunma ürünleri varlığında analizi PDA ve MS/MS dedektör ile yapılmış ve çeşitli hızlı bozundurma koşulları altında 6 farklı türde bozunma ürünü tespit edilmiştir. Bu bozunma ürünlerinin türleri ve bulundukları koşullar Tablo 5.3'de özetlenmiştir. Elde edilen bu bozunma ürünleri karakterizasyonu ise LCMS-IT-TOF ile yapılmıştır. Sıvı kromatografisinde optimize edilen yöntem birebir olarak LCMS-IT-TOF cihazına sabit faz ile birlikte taşınmış ve etkin madde de dahil olmak üzere bozunma ürünleri MSⁿ tekniği ile karakterize edilmiştir.

Tablo 5.7. *Çeşitli stres koşullarında ALEK'in elde edilen bozunma ürünleri*

Oksidatif hızlı bozundurma koşulları	Alkali hızlı bozundurma koşulları	Termal hızlı bozundurma koşulları	Fotolitik hızlı bozundurma koşulları
Alektinib			
Morfolin Azot N-oksit	Yeni bozunma ürünü 2	Kuarternize ALEK	Alektinib De-karboksilat safsızlığı
Yeni bozunma ürünü 1	Yeni bozunma ürünü 3	Alektinib De-karboksilat safsızlığı	
Alektinib De-karboksilat safsızlığı	Kuarternize ALEK		
	Alektinib De-karboksilat safsızlığı		

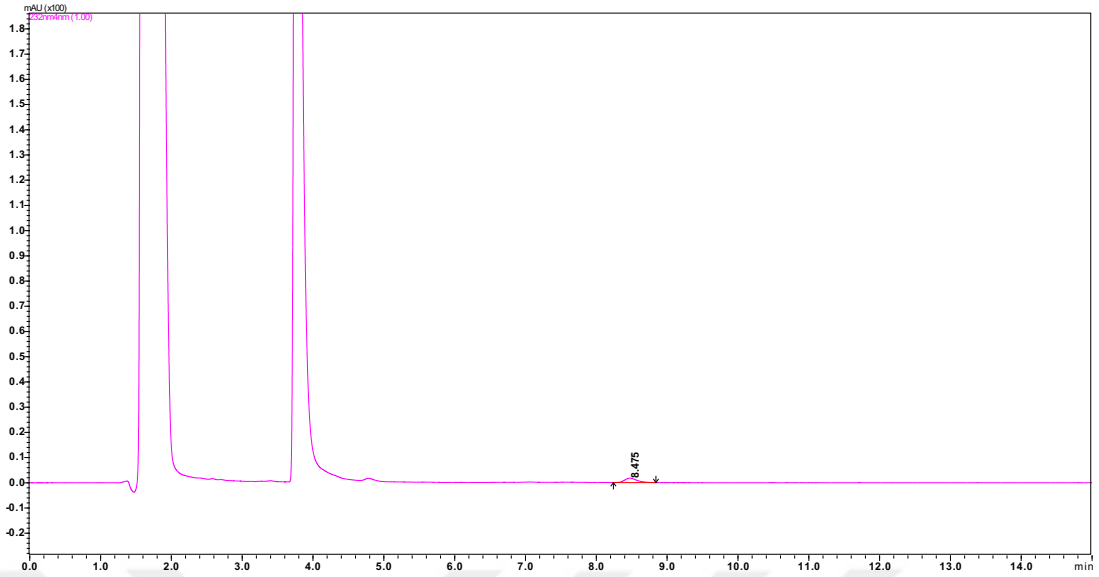
5.6.1. ALEK'in hızlı bozundurma koşullarında davranışları

ALEK'in bozunma özelliklerini analiz etmek için çeşitli stres ortamlarında ALEK çözeltileri muamele edilmiş ve bozunma sürecini hızlandırmak için 60 °C'de kontrollü ısıya tabi tutulmuştur. Yalnızca ısıya maruz kalan aktif bileşenin standart çözeltisinden elde edilen PDA dedektöre ait kromatogram Şekil 5.10(a) ve HRMS Şekil 5.10(b)'de verilmiştir. Kromatogram incelendiğinde 5,9 ve 12,4. dakikalarda olmak üzere 2 adet pik gözlenmiştir. Bu pikler çözeltinin HRMS spektrumunda da eş zamanlı olarak görülmektedir. Bu safsızlıkların LCMS-IT-TOF'da bağıl bolluklarının oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

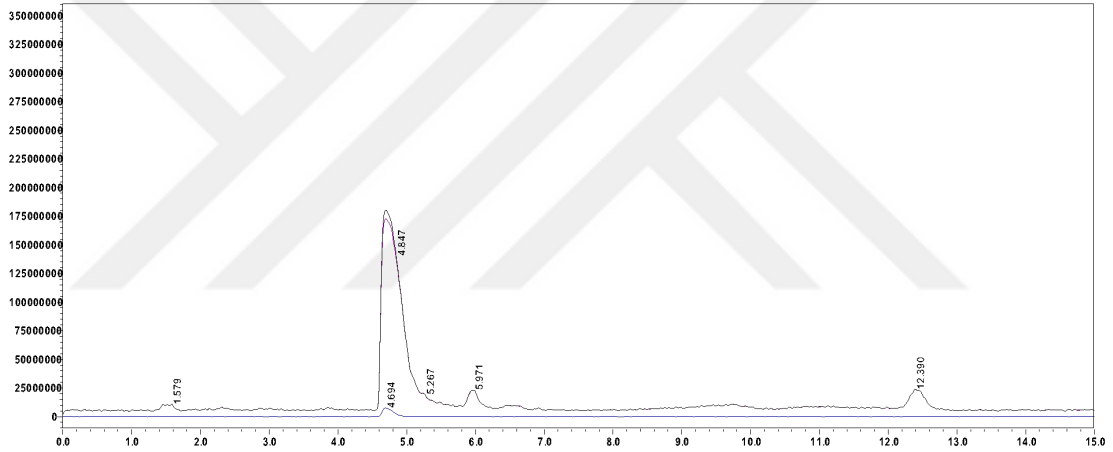


Şekil 5.11. ALEK'in sıcaklık uygulandığında elde edilen PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (b)

ALEK'in fotolitik duyarlılığını değerlendirmek için metanol içindeki bir ALEK çözeltisi 24 saat ışığa maruz bırakılmıştır. LCMS-IT-TOF kullanılarak yapılan analizde ise ALEK çözeltisinde 1 adet bozunma ürünü tespit edilmiştir. PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.11(a)'da ve Şekil 5.11(b)'de verilmiştir.



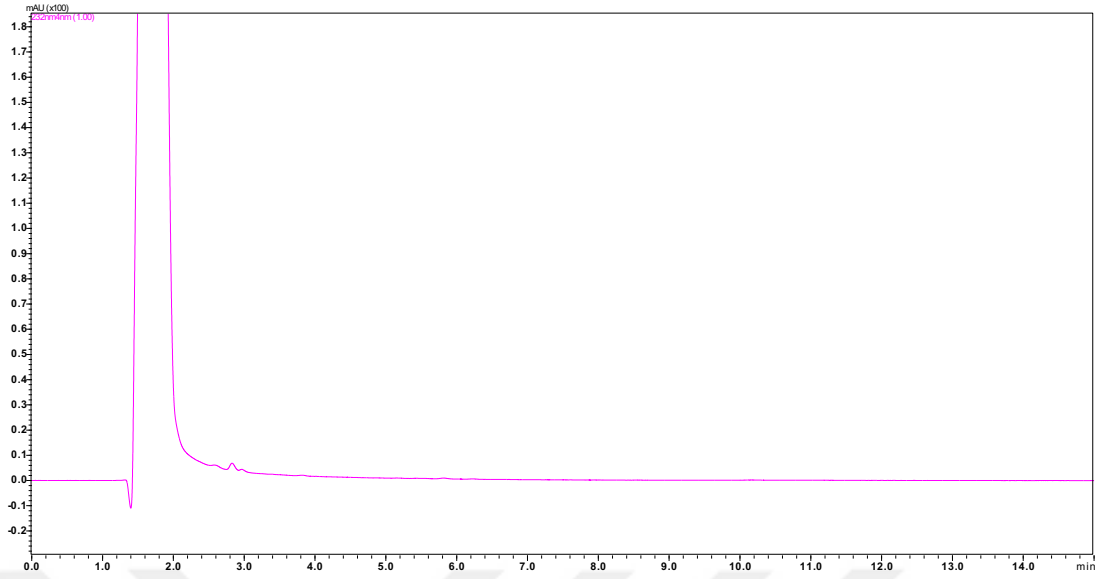
(a)



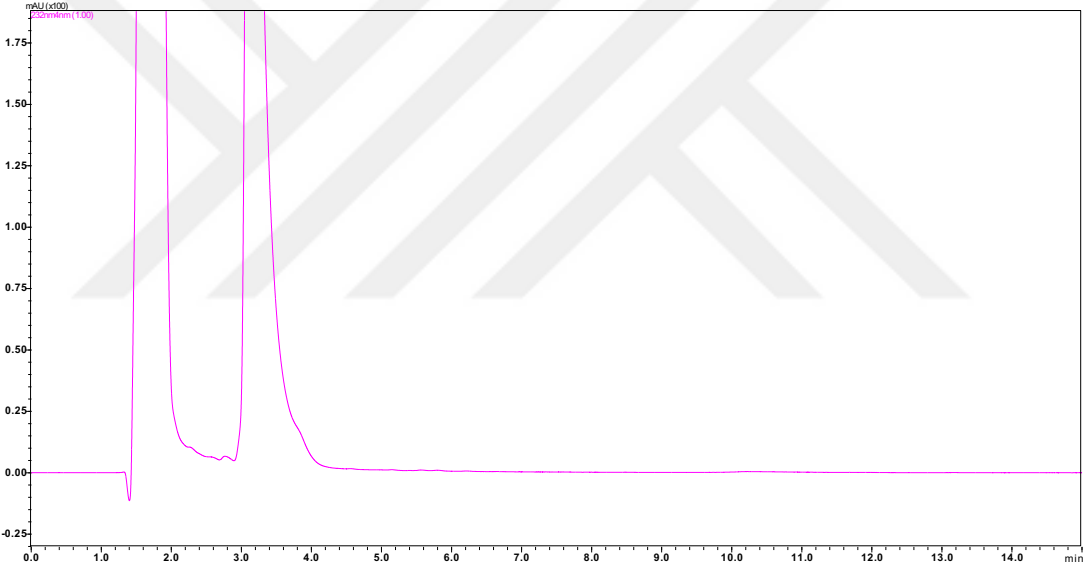
(b)

Şekil 5.12. Fotolitik şartlarda ALEK çözeltisine ait PDA (a) ve HRMS kromatogramı (b)

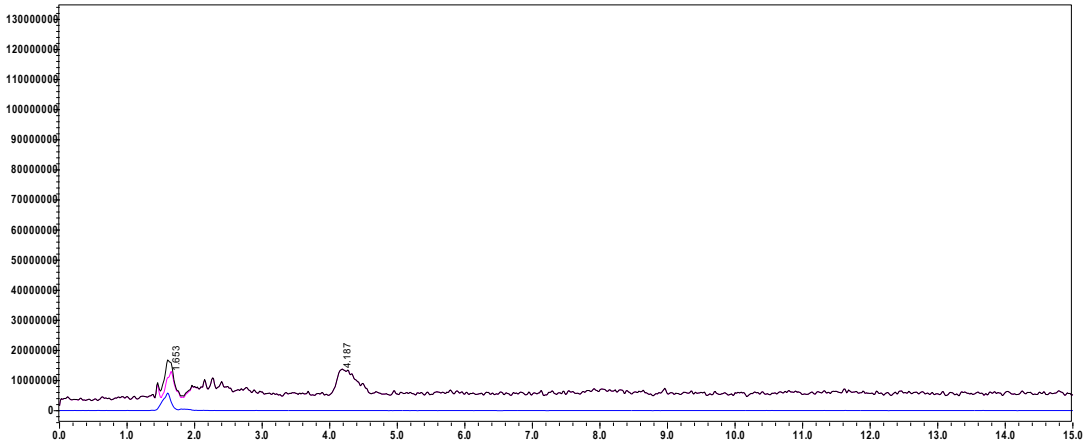
Etkin maddenin zorlu bozma koşullarından asidik strese maruziyeti sonucu LCMS-IT-TOF ile elde edilen kör çözeltiye ait PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.12(a) ve 5.12(b)'de, ALEK bozunma çözeltisine ait PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar ise sırasıyla Şekil 5.12(b) ve Şekil 5.12(d)'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, ALEK'in asidik koşullar altında herhangi bir bozunma ürünü vermediği tespit edilmiştir.



(a)

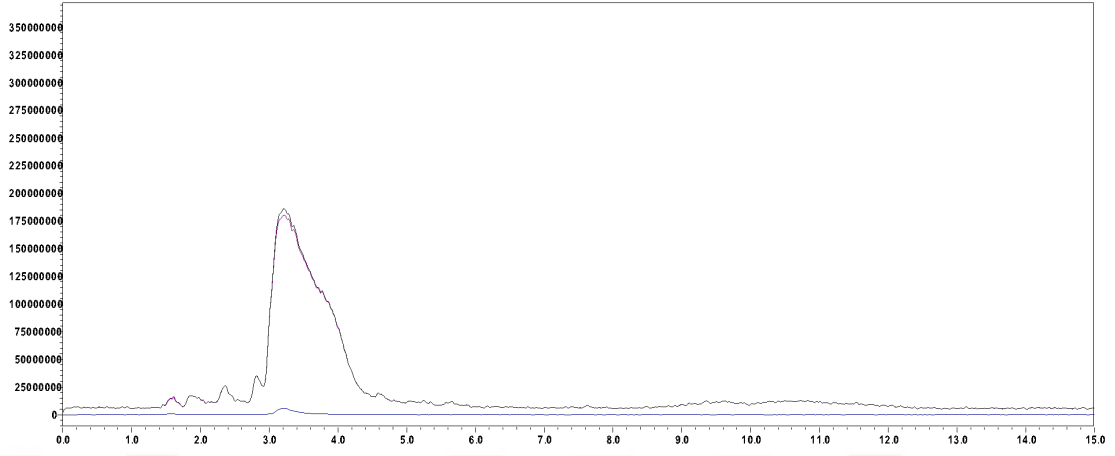


(b)



Şekil 5.13. Asidik koşullarda kör çözeltiye ait PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA kromatogramı (b) ve MS spektrumu (d)

(c)

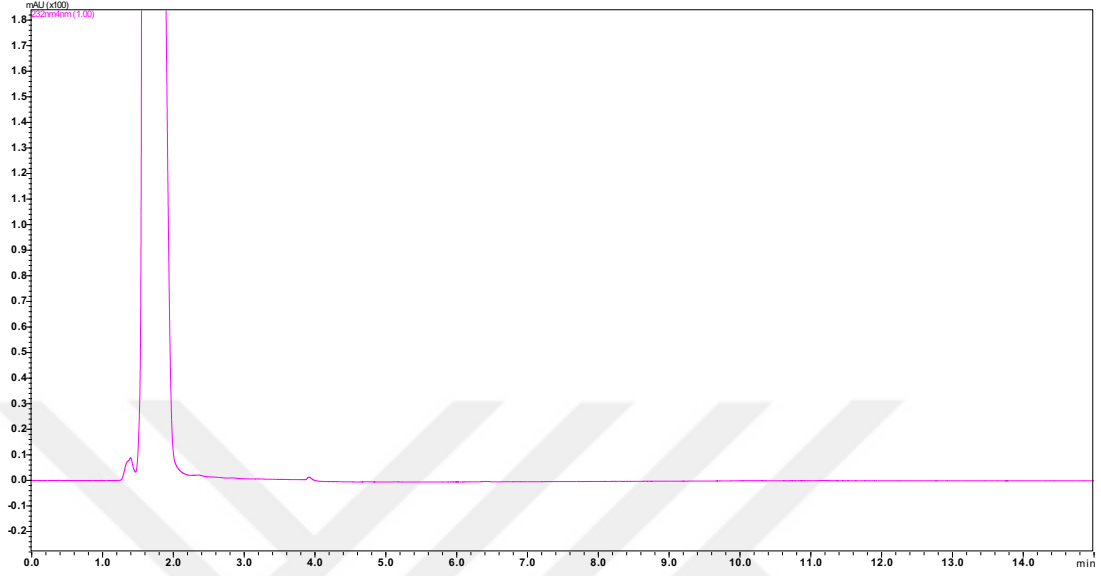


(d)

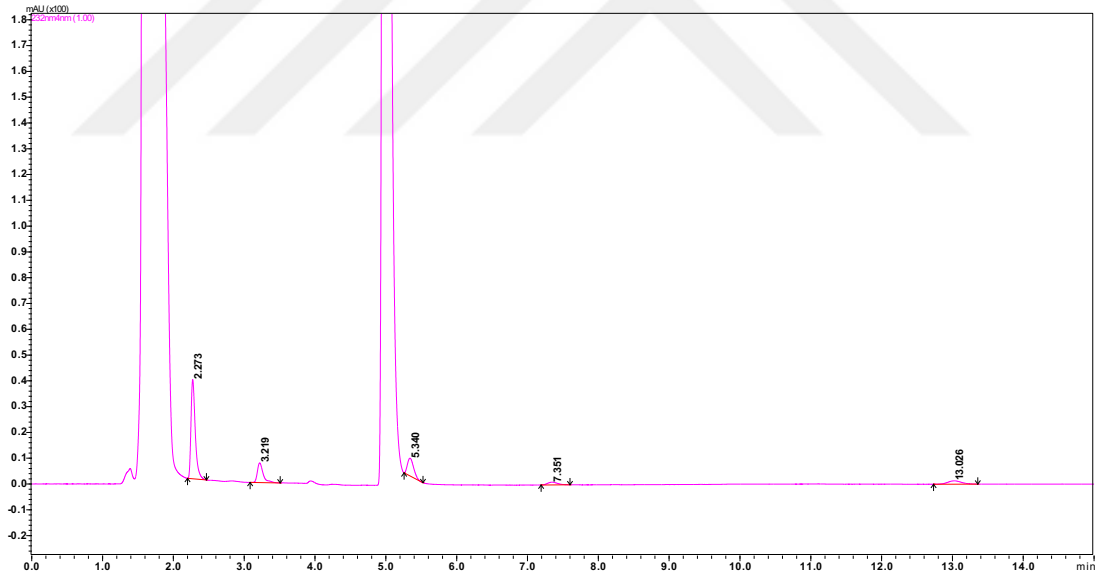
Şekil 5.14. (Devam) Asidik koşullarda kör çözeltiye ait PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA kromatogramı (b) ve MS spektrumu (d)

Bileşiği içermeyen alkali ortamda LCMS-IT-TOF cihazı ile elde edilen kör çözeltiye ait PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.13(a) ve 5.13(c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.13(b) ve Şekil 5.13(d)'de verildiği gibidir. Yapılan çalışmada API'nın bazik koşullara oldukça dayanaksız olduğu tespit edilmiştir. Alkali ortamda 5 adet safsızlık piki gözlenmiştir. Bu safsızlıkların alıkonma zamanları sırası ile 2,27; 3,21; 5,34; 7,35 ve 13,03 dakikalardadır. Yapılan HRMS çalışmalarında ise 5,34 dk'da elde edilen pikin herhangi bir bozunma ürününe ait olmadığı ALEK'in bazik koşullarda kuarterize yapısına ait olduğu tespit edilmiştir. Bozunma çözeltisi uygun miktarda 2 N HCl asit çözeltisi ile nötrleştirilerek analiz edildiğinde ise bu quartenize yapıya ait pikin kaybolduğu görülmüştür. Diğer yandan API bu koşullar altında bekletildiğinde ise bozunma hızında kayda değer değişiklik gözlenmemiştir. Bu da bu savı destekleyen diğer bir veri olarak ele alınmıştır. Ayrıca elde edilen PDA ve HRMS detektörleriyle elde edilen kromatogramlar birbiri ile örtüşmektedir. Analiz edilen kör çözelti kromatogramlarında ise bahsedilen piklerin hiçbirisi tespit edilmemiştir. API'nin alkali ortamda bozunma çözeltisi hazırlanır hazırlanmaz analiz edildiğinde de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Daha sonra sıcaklık uygulandığında ise yine benzer bozunma ürünleri ancak bir miktar daha fazla olacak şekilde tespit edilmiştir. Buna göre yapı alkali ortamda muamele edildiğinde ve/veya bir

miktar sıcaklık uygulandığında parçalanıyor ardından da dengeye gelip oluşan reaksiyonların hızında yavaşlamalar olduğu söylenebilir.

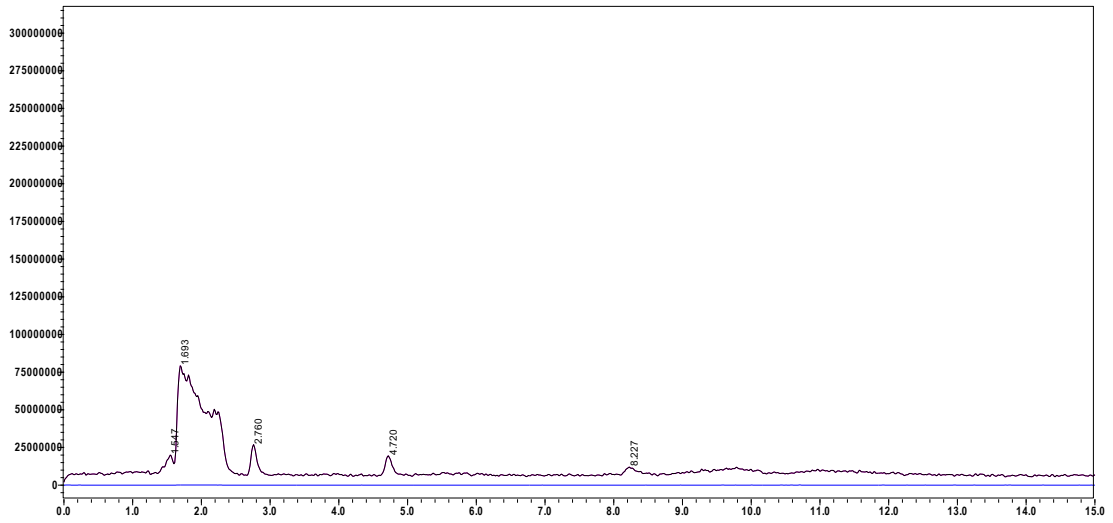


(a)

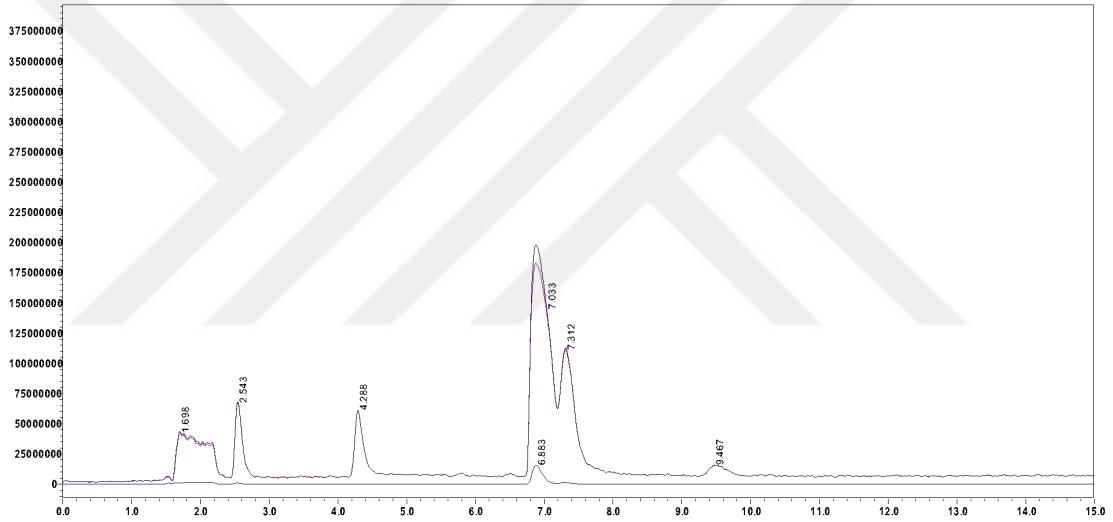


(b)

Şekil 5.15. Alkali koşullarda kör çözeltiye ait PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA kromatogramı (b) ve MS spektrumu (d)



(c)

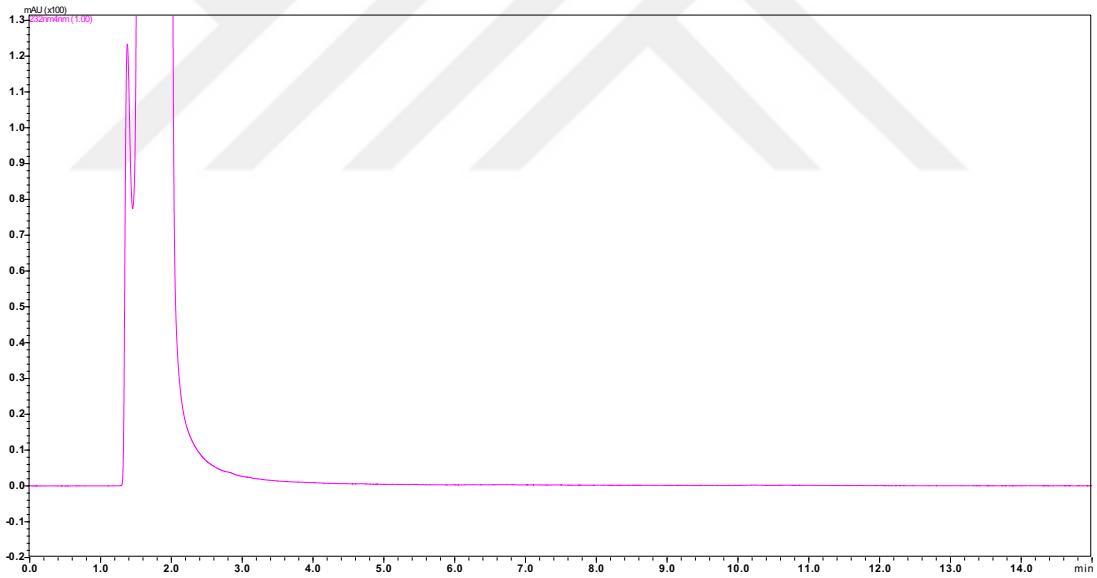


(d)

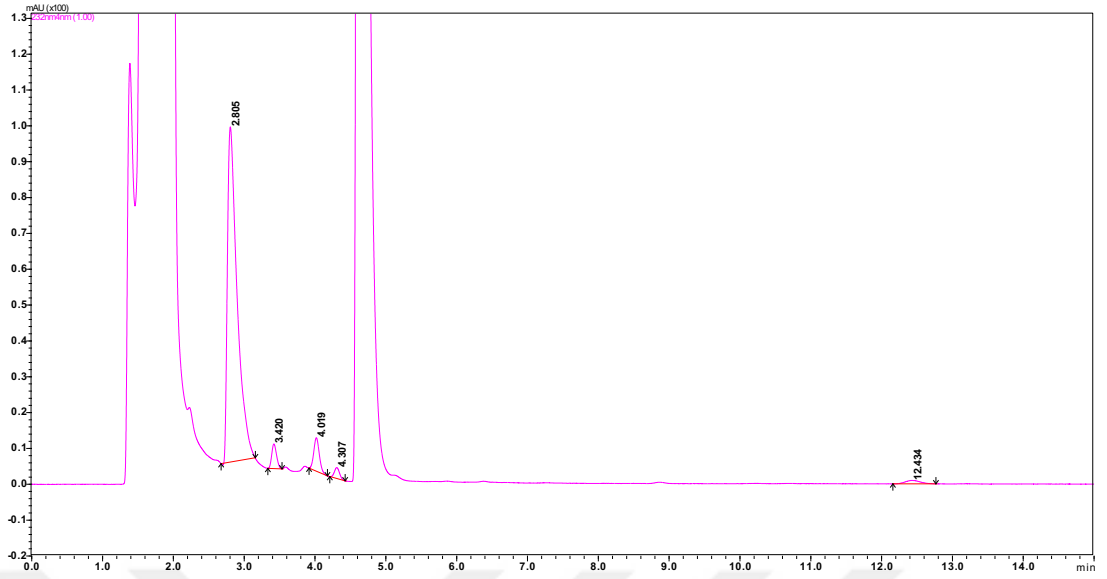
Şekil 5.16. (Devam) Alkali koşullarda kör çözeltiliye ait PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (c) ve ALEK bozunma çözeltilisine ait PDA kromatogramı (b) ve MS spektrumu (d)

Yapılan hızlı bozundurma deneylerinde ALEK'in oksidasyon koşullarında da dayanıksız olduğu görülmüştür. Çalışmada maddenin oksidasyon koşullarına maruz kaldığı andan itibaren ayrışmaya başlamıştır. Sıcaklık ile muamele edildiğinde ise bu koşullar altında maddenin parçalanması hızlanmıştır. Bazik ortam çalışmalarından farklı olarak oksidasyon koşullarında API ısıtılma devam ettiği sürece parçalanma da devam etmiştir. Denemeler yapılırken çeşitli yüksek sıcaklık uygulamalarında maddenin tamamen parçalandığı da gözlenmiştir. Ancak bazik koşullarda ısıtılmanın devam etmesine rağmen (buradaki zaman dilimi >2 saat) etkin maddenin tamamen bittiği hiç gözlenmemiştir. LCMS-IT-TOF cihazı ile elde edilen kör çözeltiliye ait PDA ve HRMS

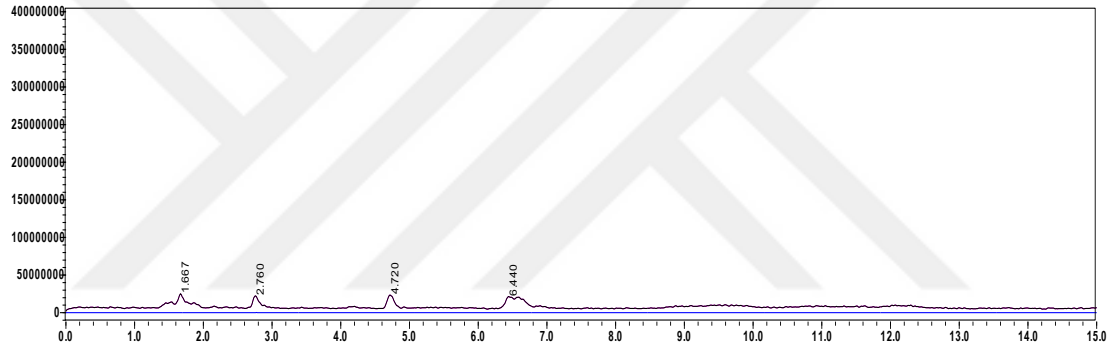
dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.14(a) ve 5.14(c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA ve HRMS dedektörleri kullanılarak kaydedilmiş kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.14(b) ve Şekil 5.14(d)'de verildiği gibidir. PDA kromatogramına bakıldığında 2,81; 3,42; 4,02; 4,31 ve 12,43 dakikalarında olmak üzere 5 adet safsızlık piki gözlenmiştir. Ancak yapılan HRMS analizlerinde 3,42; 4,02 ve 4,31. dakikalarda gözlenen üç pikin ise aynı molekül olduğu tespit edilmiştir. Burada 2,81 dk'ya ait pik m/z 499'dur. 3,42 dk'ya ait pik m/z 499 ve m/z 410 karışımı diğer 4,02 ve 4,31. dakikalarda gözlenen iki pik ise m/z 410'dur. Buradaki m/z 410 ve m/z 499 piklerinde ortaya çıkan yarılmamanın mekanizması kesin olarak karakterize edilememiştir. Ancak önceki tecrübelerle dayanarak bozunma çözeltisinin yüksek derişimde (%15, a/a) H₂O₂ içermesinden dolayı kolon içi etkileşim zayıflığı ve verimli ayırım yapılamamasının olduğu söylenebilir. Kolon verimli ayırım yapamadığı için de kütle dedektörüne maddeler bu şekilde geçiş yaptığı için benzer karışımli spektrumlar elde edilmiş olabilir.



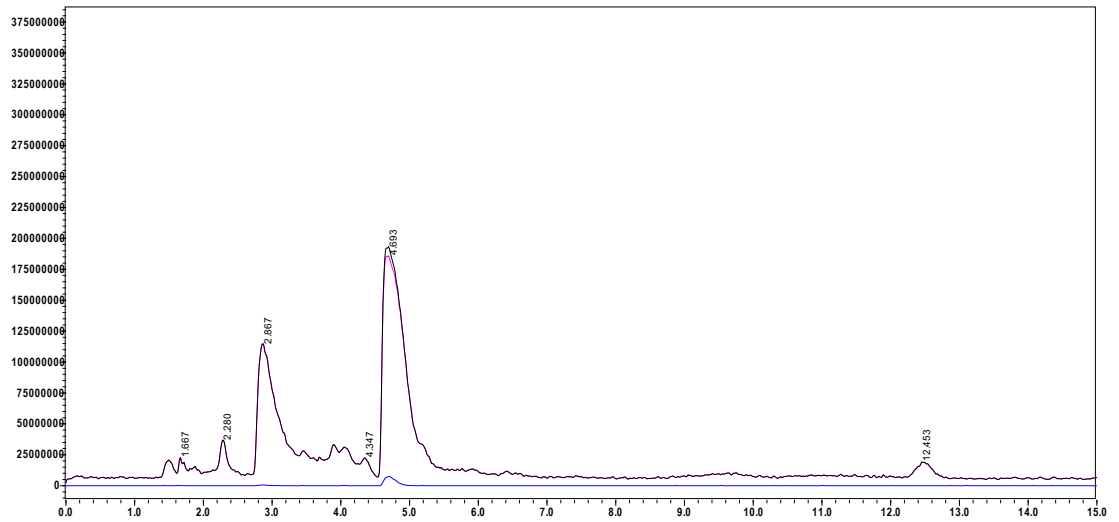
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 5.17. Oksidasyon koşullarında kör çözeltiye ait PDA kromatogramı (a) ve MS spektrumu (c) ve ALEK bozunma çözeltisine ait PDA kromatogramı (b) ve MS spektrumu (d)

Tablo 5.8. Pozitif iyon modunda LC-ESI-IT-TOF-MS kullanılarak ALEK bozunma ürünlerinin karakterizasyonu

Hızlı bozundurma koşulları	Bileşik	t _R (min)	Ölçülen m/z [M-H] ⁺	Tahmin edilen m/z [M-H] ⁺	Fark (mDa)	Fark (ppm)	İzotop Skor	λ _{max} (nm)	DBE (Çifte bağ eşdeğeri)	Molekül formülü	CAS Numarası
Oksit	Alektinib Morfolin Azot N-oksit	2,81	499,2719	499,2704	1,5	3,00	78,71	231	16,0	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₃	1256585-28-0
	Alektinib Morfolin Azot N-oksit	3,42	499,2716	499,2704	1,2	2,40	86,55	232	16,0	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₃	1256585-28-0
	Yeni bozunma ürünü 1	4,019	410,1880	410,1863	1,7	4,14	97,22	232	17,0	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₂	-
	Yeni bozunma ürünü 1	4,31	410,1871	410,1863	0,8	1,95	60,57	246	17,0	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₂	-
	Alektinib De-karboksilat safsızlığı	12,43	457,2992	457,2962	3,0	6,56	63,16	240	14,0	C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O	1820882-01-6
	Yeni bozunma ürünü 2	2,27	501,2891	501,2860	3,1	6,18	75,09	268	15,0	C ₃₀ H ₃₆ N ₄ O ₃	-
Alkali	Yeni bozunma ürünü 3	3,22	515,3046	515,3017	2,9	5,63	91,68	268	15,0	C ₃₁ H ₃₈ N ₄ O ₃	-
	Kuarternize ALEK	5,34	483,2775	483,2755	2,0	4,14	86,38	231	16,0	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₂	1256580-46-7
	Kuarternize ALEK	7,35	483,2773	483,2755	1,8	3,72	83,11	279	16,0	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₂	1256580-46-7
	Alektinib De-karboksilat safsızlığı	13,03	457,2985	457,2962	2,3	5,03	59,41	243	14,0	C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O	1820882-01-6
Sıcaklık	Kuarternize ALEK	5,93	483,2768	483,2755	1,3	2,69	84,68	262	16,0	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₂	1256580-46-7
	Alektinib De-karboksilat safsızlığı	12,40	457,2986	457,2962	2,4	5,25	60,81	240	14,0	C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O	1820882-01-6
Fotolitik	Alektinib De-karboksilat safsızlığı	12,37	457,2989	457,2962	2,7	5,90	58,65	242	14,0	C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O	1820882-01-6

LCMS-IT-TOF cihazının PDA dedektöründe gözlenen bozunma ürünlerine ait pikler IT-TOF kısmı ile yüksek çözünürlükte analiz edilmiş ve muhtemel yapıları ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen her bir bozunma ürününe ait pikin karakterizasyon bilgileri Tablo 5.4’de sunulmuştur. Bu kısma ait benzer çalışma Parmar vd. tarafından yapılmış ve oksidatif bozunma koşulları altında bozunma ürünleri tespit edilmiş ve LC-MS/MS ve NMR teknikleri ile karakterize edilmiştir (Parmar vd., 2021). Söz konusu bozunma ürünleri N-oksit safsızlığı, epoksit safsızlığı, N-hidroksi safsızlığı ve amid safsızlığıdır. N-oksit safsızlığı bu çalışma da da tespit edilmiş ve benzer şekilde oksidatif bozunma koşullarında gözlenmiştir. Ancak yazarlar elde ettikleri bozunma ürünlerini preparatif HPLC ile saflaştırarak NMR, FTIR ve LC-MS/MS ile karakterize edilmiştir. Elde edilen bozunma ürünlerinin saflaştırarak NMR ve FTIR ile karakterize edilememesi bu çalışmanın zayıf noktasıdır. Öte yandan bu çalışmada farklı olarak sadece oksidatif değil alkali, sıcaklık ve fotolitik şartlarda da bozunma ürünleri tespit edilmiştir. Bozunma ürünlerinin karakterizasyonu HRMS ile yapılmıştır. Bu moleküllerin muhtemel oluşum reaksiyonları mümkün olan koşullarda MS^n çalışmaları da yapılarak ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analysis\alec\alec173.lcd

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	2	3	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	4	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 15

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 25.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

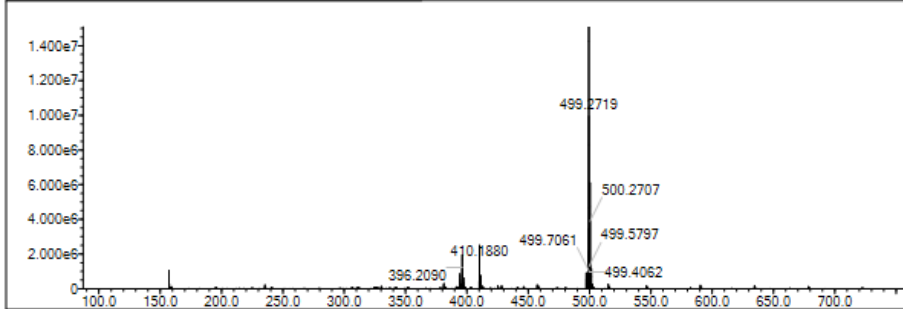
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

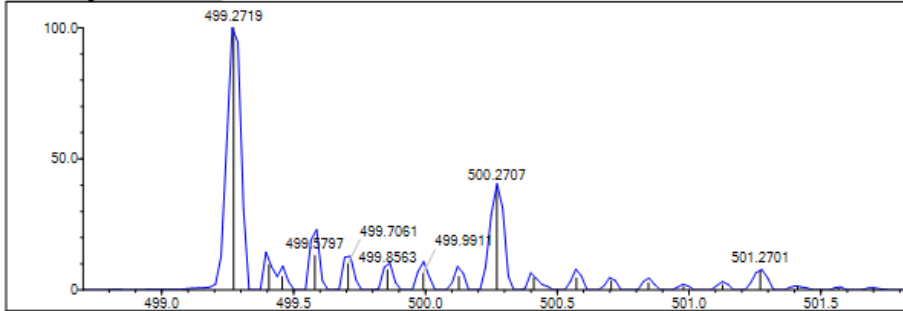
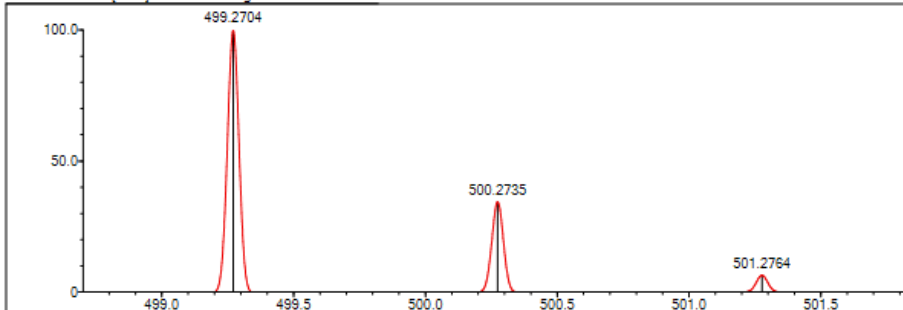
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 3.053 -> 3.427 Scan#: 459 -> 515

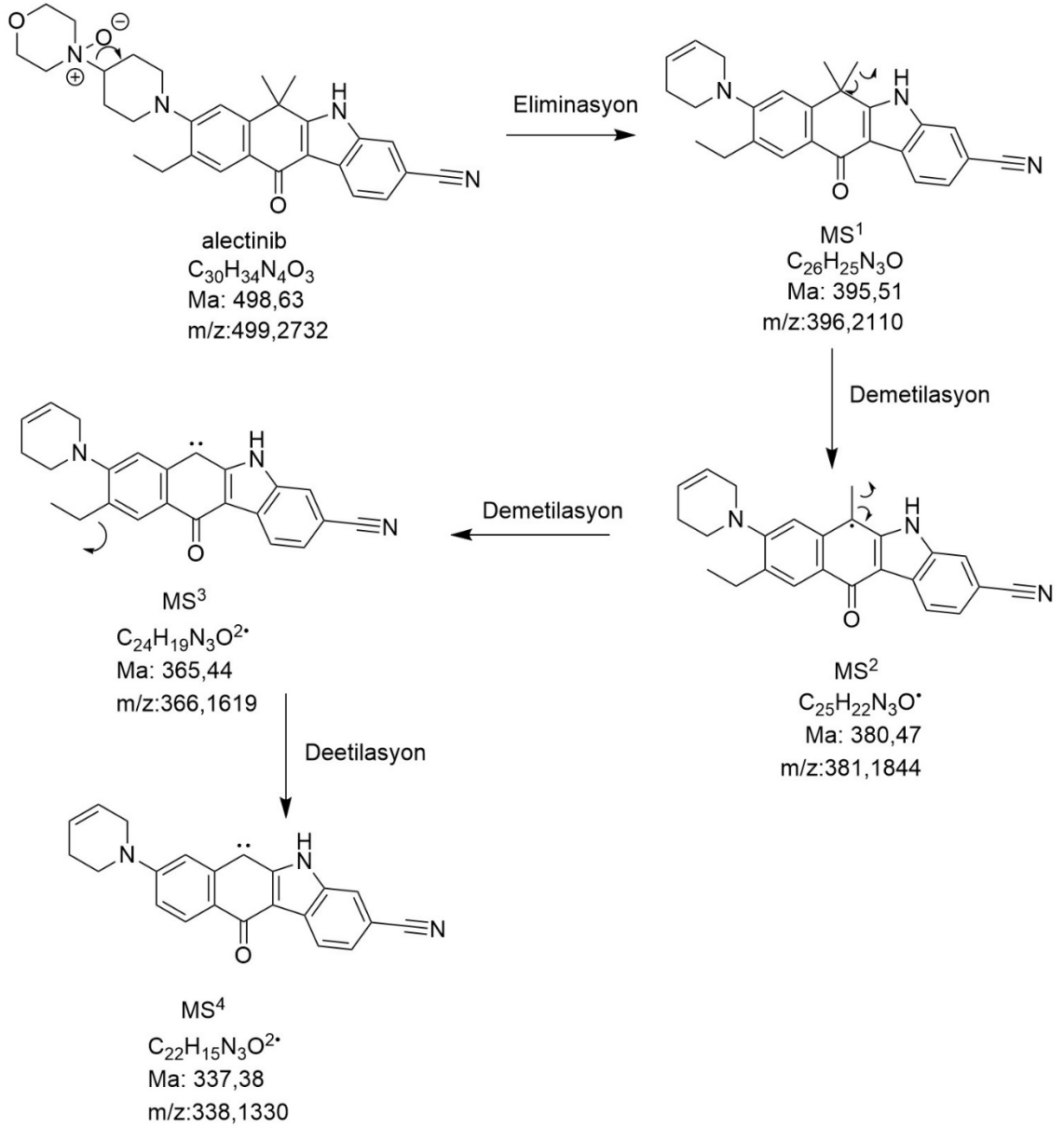


Measured region for 499.2719 m/z

C30 H34 N4 O3 [M+H]⁺: Predicted region for 499.2704 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	74.78	C30 H34 N4 O3	[M+H] ⁺	499.2719	499.2704	1.5	3.00	78.71	16.0

Şekil 5.18. Alektinib Morfolin N-oksit'e ait kütle atlası



Şekil 5.19. Alektinib Morfolin N-oksit'e ait bozunma mekanizması ve MSⁿ yolağı

ALEK maddesinin oksidatif koşullarda beklemesi sonrasında tespit edilen maddenin morfolin azotu üzerinden oluşan N-oksit safsızlığı olduğu düşünülmektedir. Parçalanma mekanizması ALEK standart maddesinin parçalanmasını birebir takip etmektedir. İlk aşamada standartta olduğu gibi piperidin halkasına yıkılan sigma bağı olmuştur. Ancak standartta gözlenen 87 m/z'lik eksilme, bozunma ürününde 103 olarak gözlemlenmiş bunun sebebi ise morfolinde gerçekleşen N-oksit katılımı olarak yorumlanmıştır. İkinci, üçüncü ve dördüncü basamaklarda standartta olduğu gibi sırasıyla metiller ve son olarak da etil grubu ayrılarak beklenen parçalanma ürünleri gözlemlenmiştir. Alektinib Morfolin N-oksit'e ait kütle atlası

Şekil 5.15’de ve muhtemel oluşum mekanizması ile MSⁿ çalışmaları Şekil 5.16’da verildiği gibidir.

Formula Predictor Report - alec173.lcd

Page 1 of 1

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\snr\alec\alec173.lcd

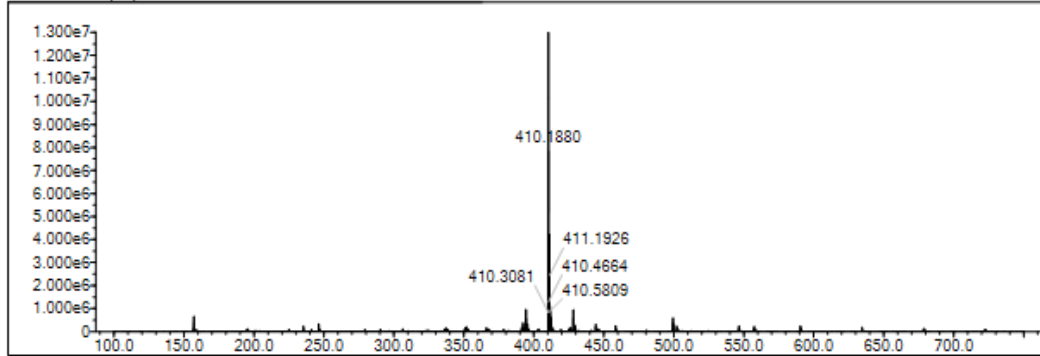
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	0	4	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	3	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

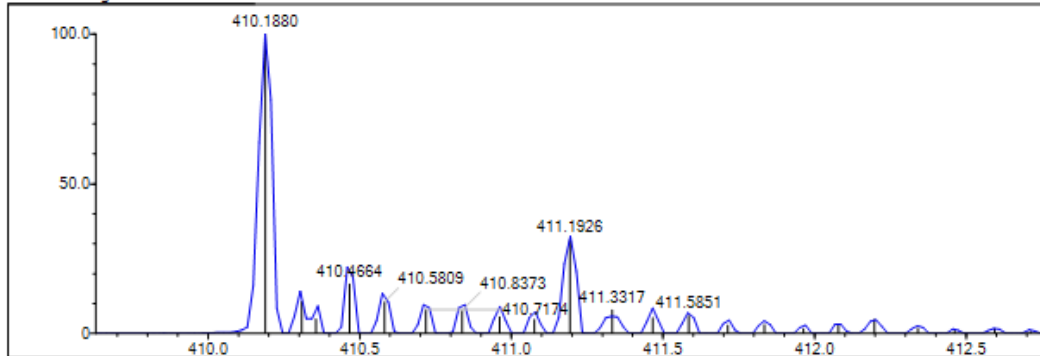
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

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

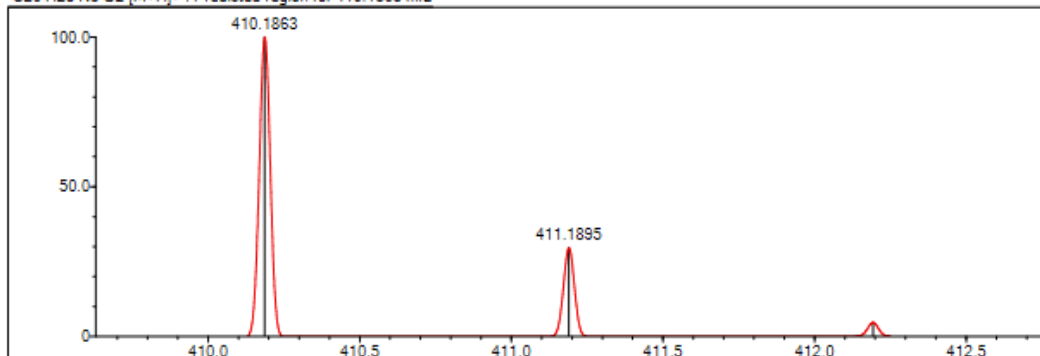
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.053 -> 4.160 Scan#: 609 -> 625



Measured region for 410.1880 m/z

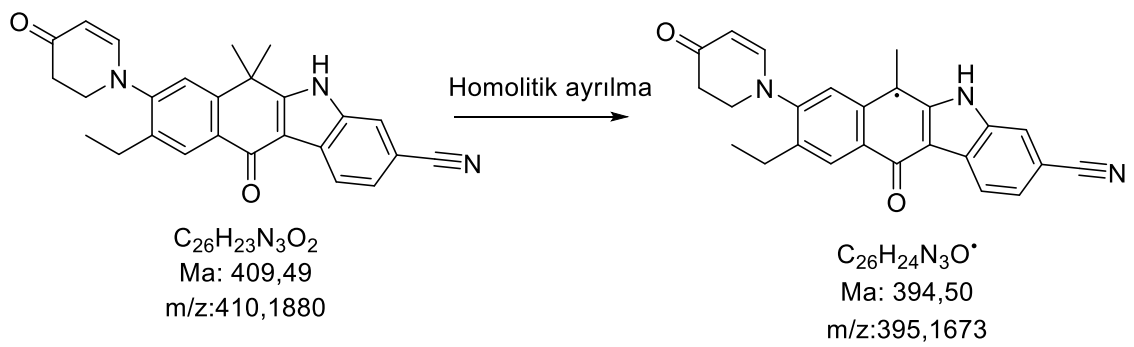


C26 H23 N3 O2 [M+H]⁺ : Predicted region for 410.1863 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	89.77	C26 H23 N3 O2	[M+H] ⁺	410.1880	410.1863	1.7	4.14	97.41	17.0

Şekil 5.20. YB1’e ait kütle atlası



Şekil 5.21. YB1'e ait bozunma yolağı

Oksidatif şartlarda oluşan bu safsızlık, morfolin halkasının koparak bu halkayı piperidin halkasına bağlayan sigma bağının piperidin halkasında bir pi bağı oluşması ve oluşan yeni halka üzerine katılan oksijenin karbonile dönüşmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. Oluşan safsızlık miktarı düşük olması sebebiyle yalnız MS¹ çalışması yapılabilmiş ve bu çalışma sonrasında alektinib ve N-oksit safsızlarında da görülen metil grubunun ayrılmasıyla 395 m/z'lik bir parçalanma ürünü oluşmuştur. YB1'e ait Şekil 5.17'de ve muhtemel oluşum mekanizması ile HRMS çalışmaları Şekil 5.18'da verildiği gibidir.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\sn\alec\alec176.lcd

Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	0	4	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	3	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 25.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

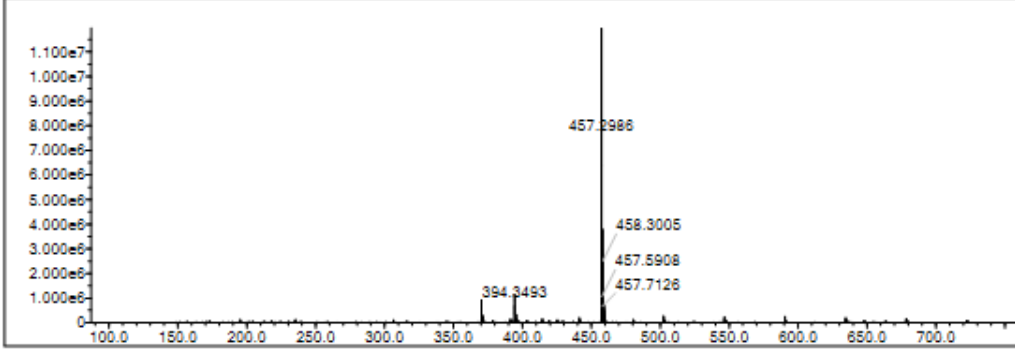
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

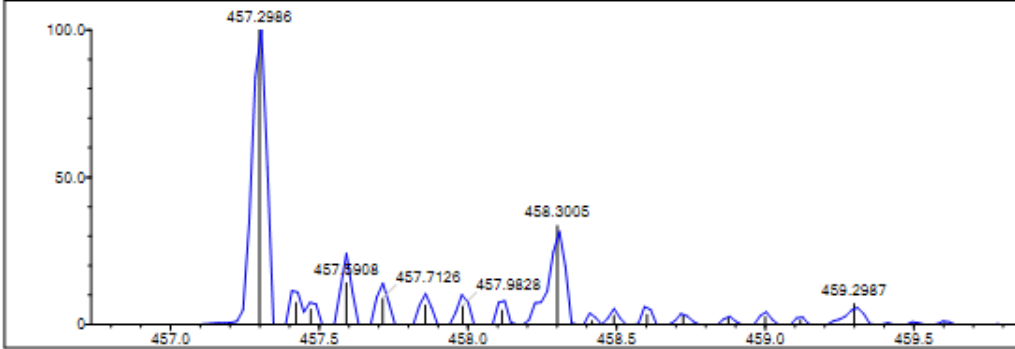
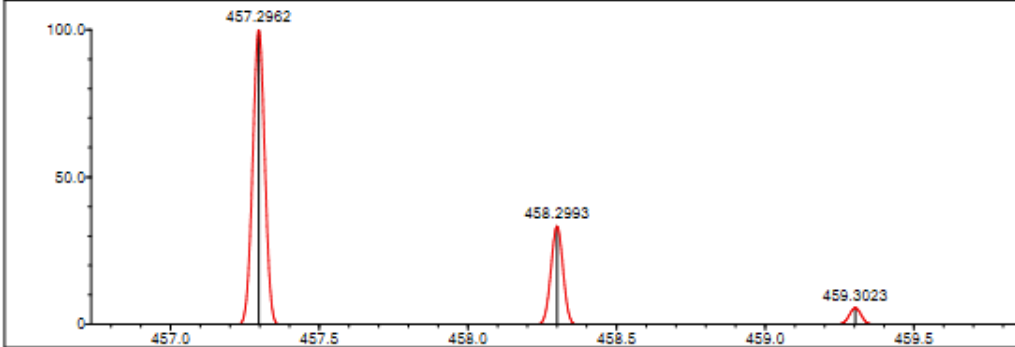
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 12.360 -> 12.520 Scan#: 1855 -> 1879

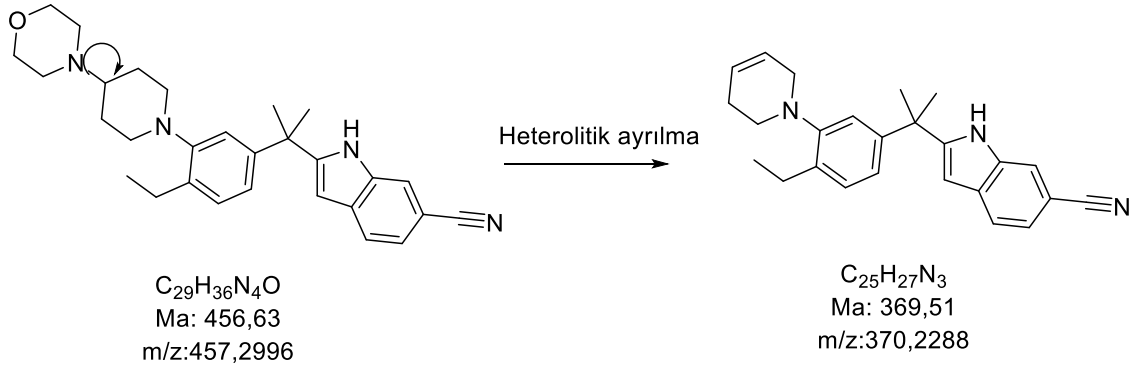


Measured region for 457.2986 m/z

C29 H36 N4 O [M+H]⁺ : Predicted region for 457.2962 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	53.21	C29 H36 N4 O	[M+H] ⁺	457.2986	457.2962	2.4	5.25	60.81	14.0

Şekil 5.22. Alektinib De-karboksilat safsızlığına ait kütle atlası



Şekil 5.23. Alektinib De-karboksilat safsızlığı

Farklı koşullarda görülen bu safsızlık ürünü halı hazırda literatürde de kayıtlı olan bir alektinib safsızlığıdır. Ana iskelette indol ve benzen halkasını birbirine bağlayan köprü karbonilin yıkılması sonucu oluşan bu safsızlığı HRMS çalışması yine madde miktarındaki azlık sebebiyle sadece bir basamak yapılabilmektedir. Parçalanma ürünü ise 87'lik bir eksilmeyle morfolin halkasının ayrılması ve piperidin halkasında oluşan bir çiftli bağı işaret etmektedir. Alektinib De-karboksilat safsızlığına ait Şekil 5.19'da ve muhtemel oluşum mekanizması ile HRMS çalışmaları Şekil 5.20'de verildiği gibidir.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\sn\alec\alec171.lcd

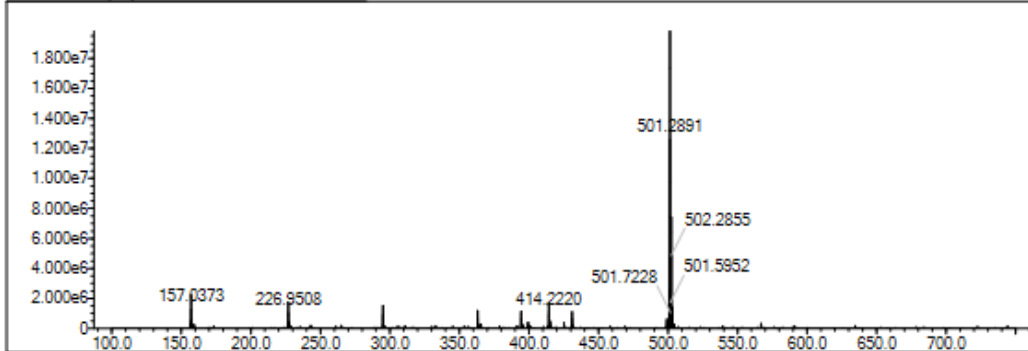
Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Elmt	Val	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	0	4	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	3	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

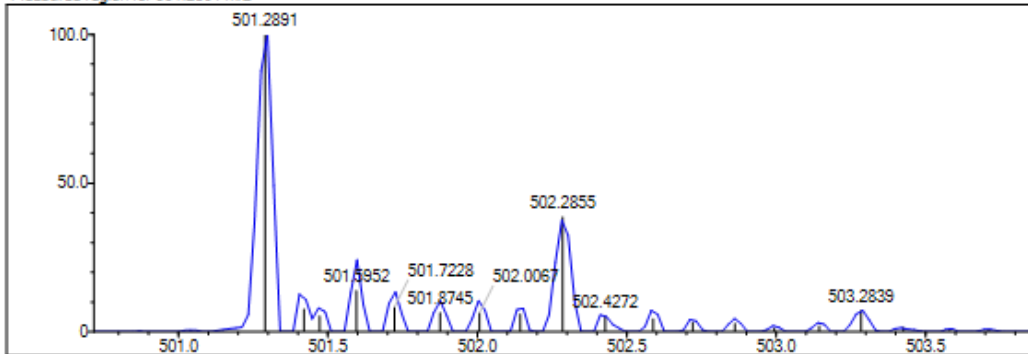
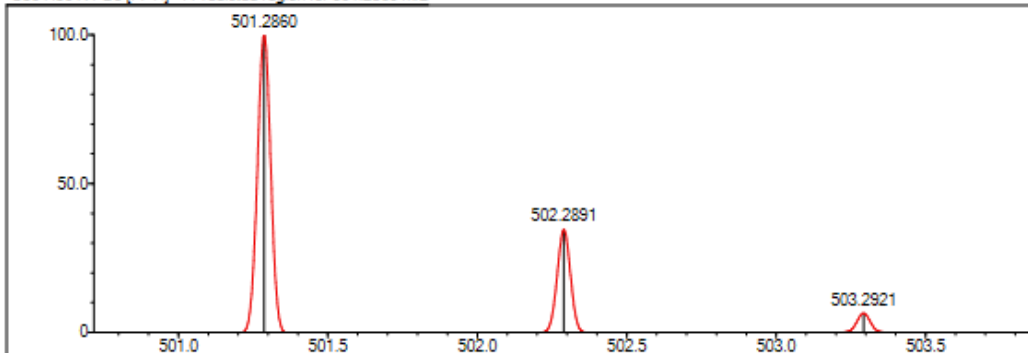
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

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

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 2.373 Scan#: 357

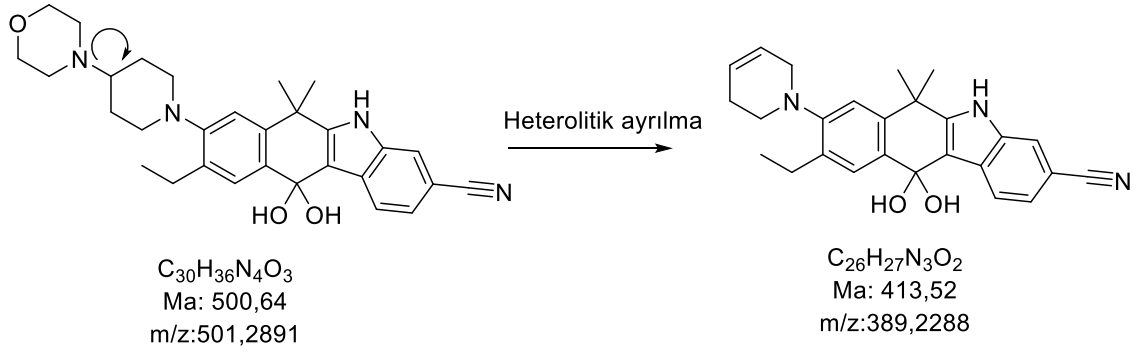


Measured region for 501.2891 m/z

C30 H36 N4 O3 [M+H]⁺ : Predicted region for 501.2860

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	58.72	C30 H36 N4 O3	[M+H] ⁺	501.2891	501.2860	3.1	6.18	75.09	15.0

Şekil 5.24. YB2'ye ait kütle atlası



Şekil 5.25. YB2'ye ait bozunma yolağı

Bazik ortamda oluşan bu bozunma ürünü ana iskelet üzerinde bulunan karbonil karbonuna katılan hidroksil sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Madde miktarı çok yüksek olmadığı için MS1 çalışılabilmiş ve burada da alektinib çalışmasındaki gibi morfolin halkasının yıkılmasıyla 87 m/z'lik bir kopuş görülmüştür. YB2 safsızlığına ait Şekil 5.21'de ve muhtemel oluşum mekanizması ile HRMS çalışmaları Şekil 5.22'de verildiği gibidir.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\snr\alec\alec171.lcd

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	54	O	2	0	4	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	0	36	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	3	7	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 10

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 5.0 - 25.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

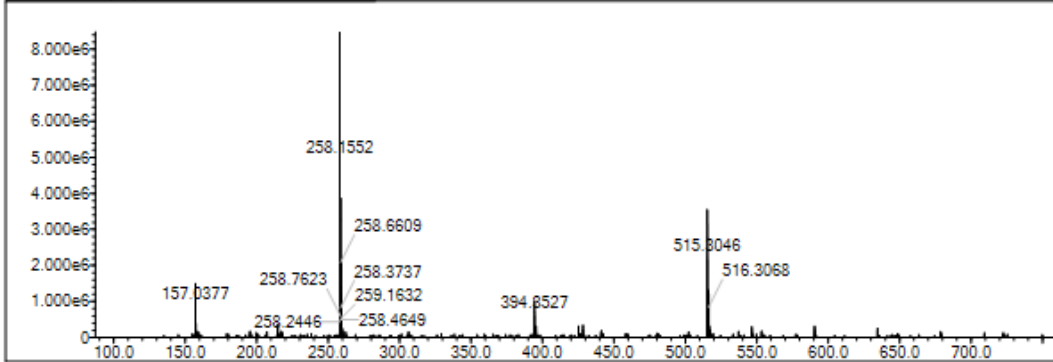
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

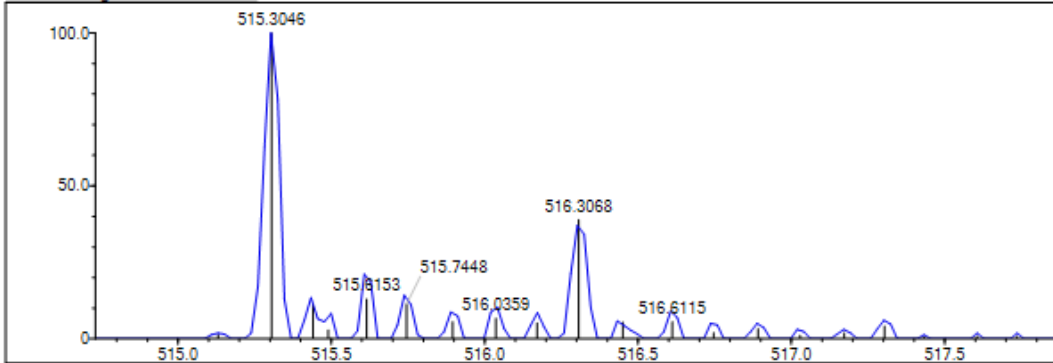
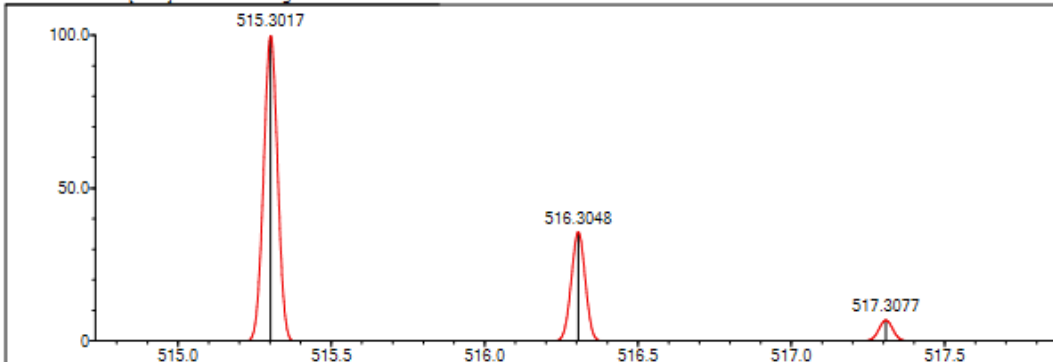
Isotope Res: 9000

Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 3.213 Scan#: 483

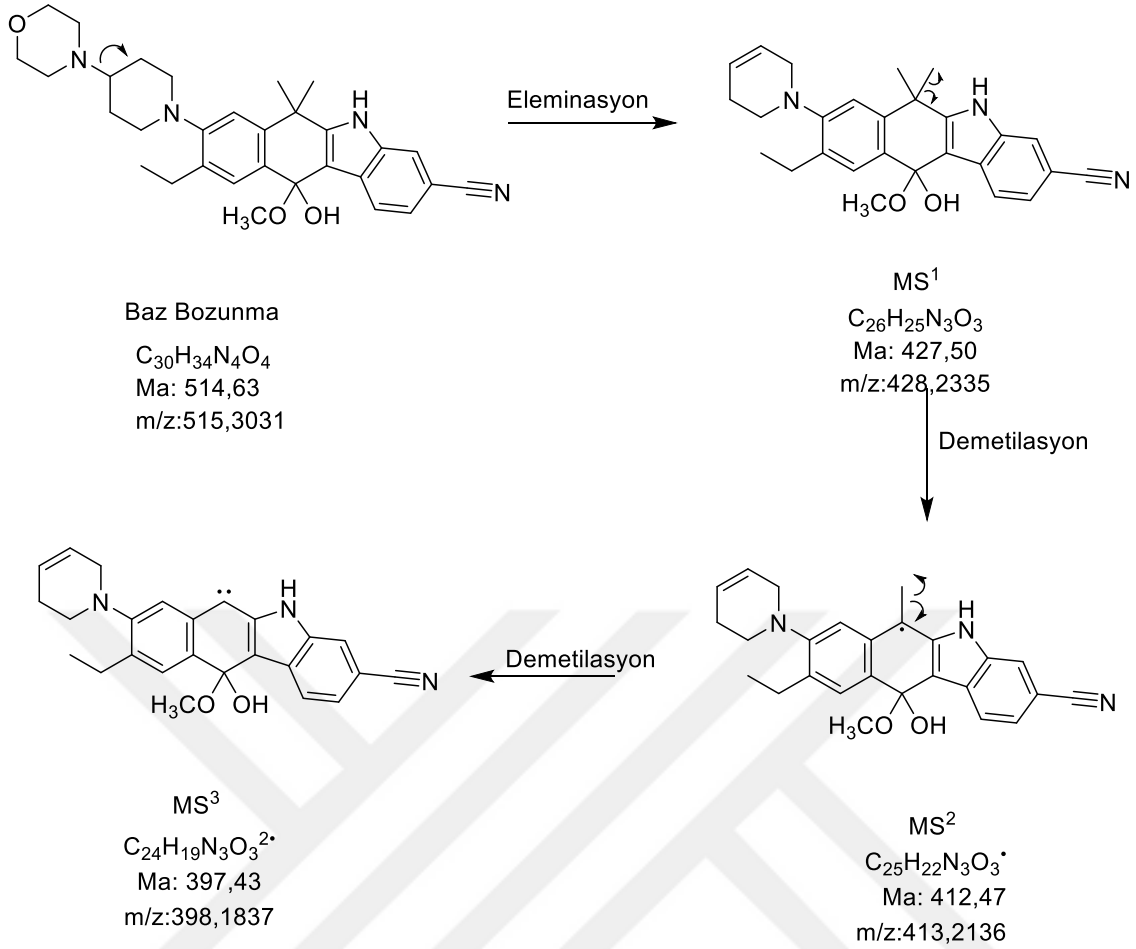


Measured region for 515.3046 m/z

C31 H38 N4 O3 [M+H]⁺ : Predicted region for 515.3017 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	76.74	C31 H38 N4 O3	[M+H] ⁺	515.3046	515.3017	2.9	5.63	91.68	15.0

Şekil 5.26. YB3 için kütle atlası



Şekil 5.27. YB3'e ait bozunma yolağı ve MSⁿ karakterizasyonu

ALEK maddesinin alkali koşullarda çözücü içerisinde beklemesi sonrasında tespit edilen maddenin ana iskelete yüksek olasılıkla da karbonil karbonuna atak eden metoksi grubunun yapıya katılmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Gerçeklesen parçalanma ürünleri ALEK standardını birebir taklit etmesi önerilen yapıyı doğrular niteliktedir. Birinci parçalamada 87'lik kopuş ayrılan morfolini işaret ederken, ikinci ve üçüncü parçalanmalardaki ayrılan 15'ler metil gruplarından kaynaklanmaktadır. Madde miktarının düşük olması sebebiyle beklenen etil kopuşu ise gözlemlenememiştir. Söz konusu YB3'ün kütle atlası Şekil 5.23'de oluşum mekanizması ve MSⁿ karakterizasyonu Şekil 5.24'de verilmiştir.

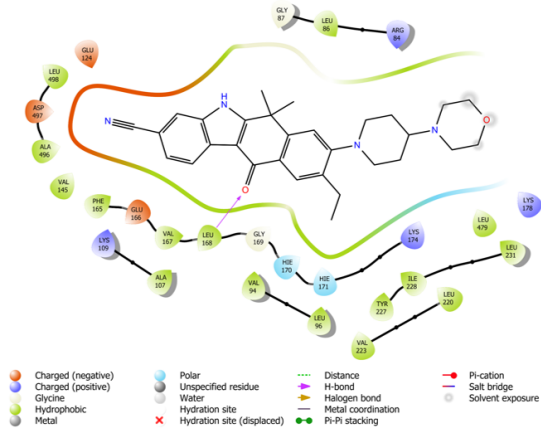
5.7. Bozunma Ürünlerine Ait Moleküler Docking Çalışmaları

Şekil 5.25 Alektinib ve bozunma ürünlerinin PDB ID:5XV7 ile etkileşimlerinin iki boyutlu görsellerini sunmaktadır. İlk olarak ALEK molekülü incelendiğinde bileşiğin karbonil grubunun Leu168 aminoasidi ile etkileştiği görülmektedir. Bu etkileşim enzim aktif bölgesi için

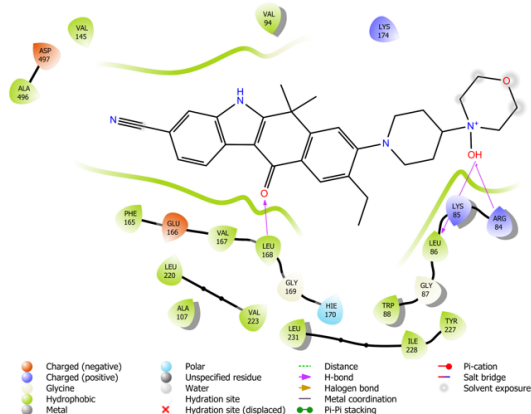
önemlidir. Alektinib morfolin N-oksit, YB-1 ve YB-2 için elde edilen pozlar incelendiğinde bu bozunma ürünlerinin de aynı etkileşimi verdiği görülmektedir. Bu durum bozunma ürünlerinde siklohekzen halkasının yapı bütünlüğünün bozulmaması durumunda enzim aktif bölgesinde benzer etkileşimler sergilediğini düşündürmektedir. Fakat siklohekzen yapısının korunduğu YB-3 bu etkileşimi göstermemiştir. Karbonil grubu yerine gelen iki hidroksil grubunda (YB-2) etkileşim kaybolmazken bu hidroksil gruplarının biri yerine gelen metoksi grubu etkileşim kaybına sebep olmuştur. Elde edilen bu bilgilerden yola çıkarak bu konuma getirilen bir karbon atomunun molekülde meydana getirdiği konformasyonel değişiklik etkileşim kaybına sebep olmuştur yorumu yapılabilir. Siklohekzan halkasının tamamen parçalandığı Alektinib De-karboksilat safsızlığı ise Leu168 aminoasidinden oldukça uzak bir yerleşim göstermiştir. Bileşiklerin enzim aktif bölgesindeki konumlarının daha net anlaşılması adına bozunma ürünleri ALEK ile üst üste çakıştırılarak üç boyutlu görseller hazırlanmıştır. Elde edilen üç boyutlu bu görseller Şekil 5.26-5.30'da sunulmuştur.

Şekil 5.26 Alektinib morfolin N-oksit ile ALEK molekülünün üst üste çakıştırılmış pozunu içermektedir. ALEK molekülü kırmızı, Alektinib morfolin N-oksit molekülü ise yeşil renk ile renklendirilmiştir. Burada Alektinib morfolin N-oksit ile ALEK molekülünün üst üste yerleştiği görülmektedir. İkisinin de karbonil grupları, Leu168 aminoasidinin amino grubu ile hidrojen bağı yapmıştır. Alektinib morfolin N-oksit ek olarak morfolin halkasına bağlı hidroksil grubu ile Leu86 aminoasidinin karbonil grubu ve Arg84 aminoasidinin amino grubu ile hidrojen bağı oluşturmuştur.

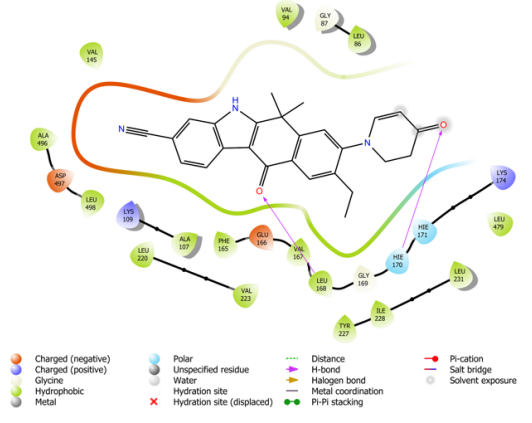
Şekil 5.27 YB-1 ile ALEK molekülünün üst üste çakıştırılmış pozunu içermektedir. ALEK molekülü kırmızı, YB-1 ise sarı renk ile renklendirilmiştir. Burada YB-1 ile ALEK molekülünün üst üste yerleştiği görülmektedir. İkisi de karbonil grupları Leu168 aminoasidinin amino grubu ile hidrojen bağı yapmıştır. YB-1 ek olarak morfolinin 4.konumunda bulunan karbonil grubu ve Hie170 aminoasidinin imidazol halkası arasında bir hidrojen bağı oluşturmuştur.



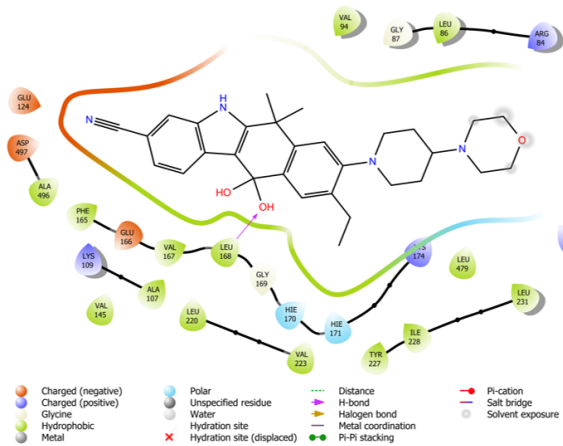
Alektinib



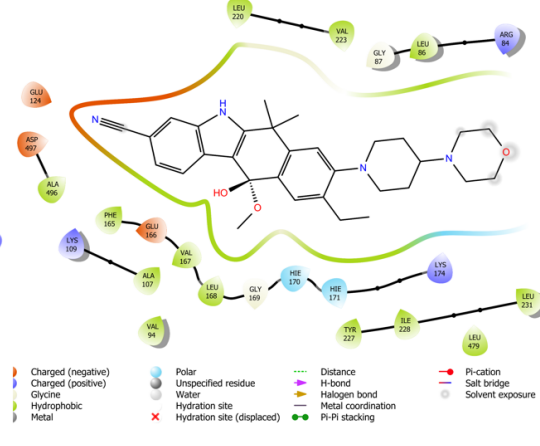
Alektinib morfolin N-oksiti



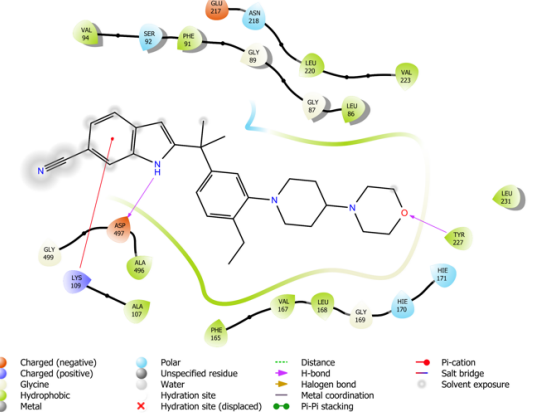
YB-1



YB-2

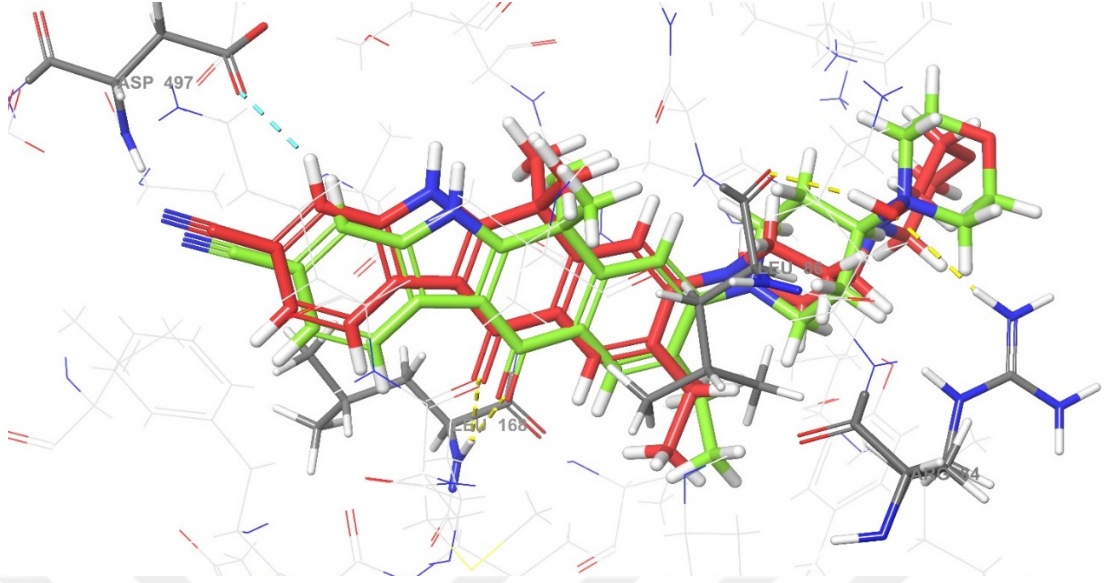


YB-3

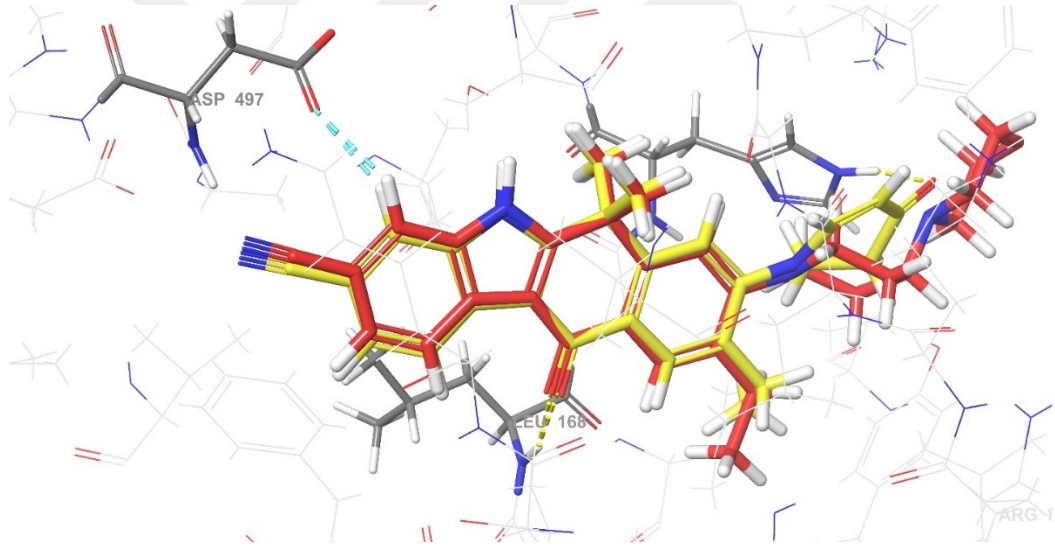


Alektinib De-karboksilat

Şekil 5.28. ALEK ve bozunma ürünlerinin PDB ID:5XV7 ile etkileşimlerinin iki boyutlu pozları

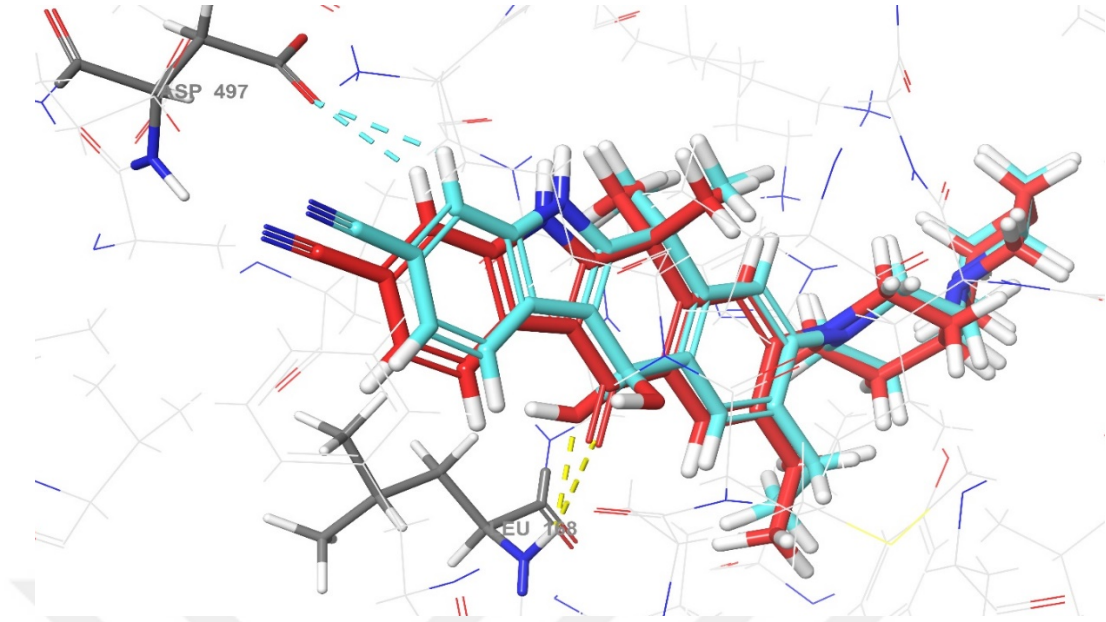


Şekil 5.29. ALEK ve Alektinib morfolin N-oksit moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu(PDB ID:5XV7)



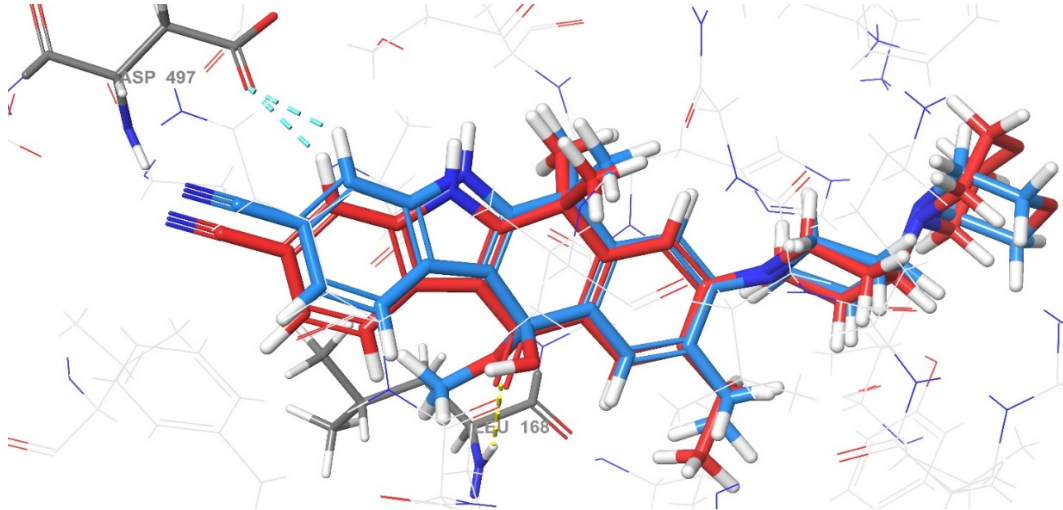
Şekil 5.30. ALEK ve YB-1moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozu(PDB ID:5XV7)

Şekil 5.28 YB-2 ile ALEK molekülünün üst üste çakıştırılmış pozunu içermektedir. ALEK molekülü kırmızı, YB-2 ise turkuaz renk ile renklendirilmiştir. Burada YB-2 ile ALEK molekülünün üst üste yerleştiği görülmektedir. ALEK molekülünün karbonil grubu ile YB-2 molekülünü hidroksil grupları, Leu168 aminoasidinin amino grubu ile hidrojen bağı yapmıştır.



Şekil 5.31. ALEK ve YB-2 moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozunu(PDB ID:5XV7)

Şekil 5.29 YB-3 ile ALEK molekülünün üst üste çakıştırılmış pozunu içermektedir. ALEK molekülü kırmızı, YB-3 ise mavi renk ile renklendirilmiştir. Burada YB-3 ile ALEK molekülünün üst üste yerleştiği görülmektedir. Fakat artık YB-3'ün Leu168 ile etkileşiminin kaybolduğu gözükmemektedir. Bunun sebebi metoksi grubunun oluşturduğu sterik engel olma olasılığı yüksektir.

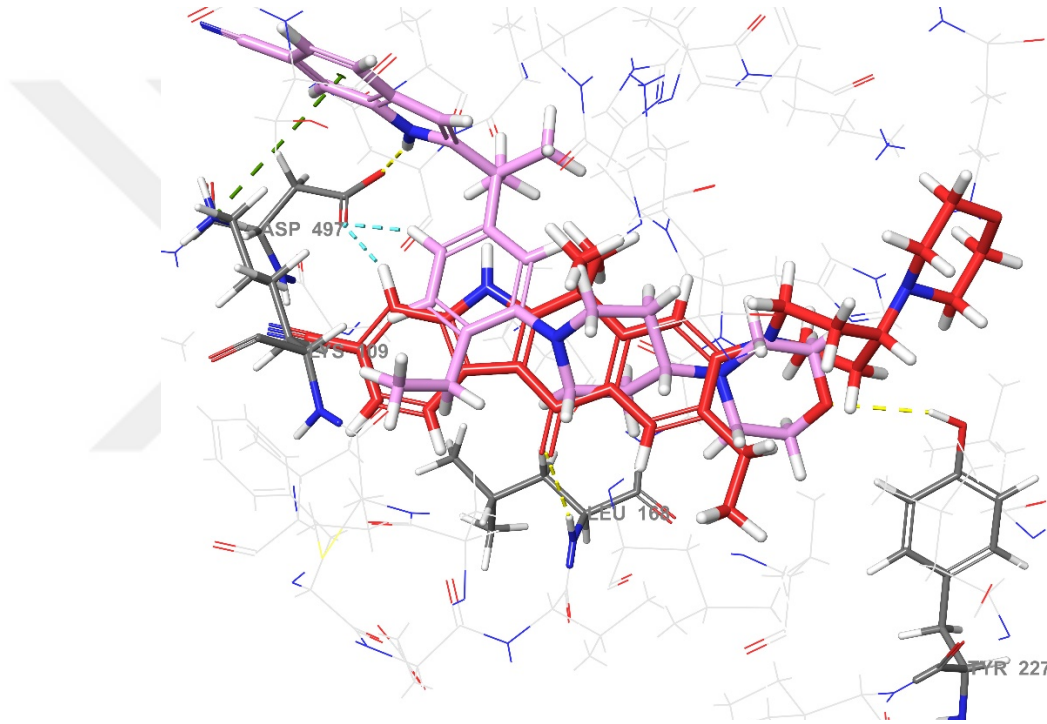


Şekil 5.32. ALEK ve YB-3 moleküllerinin üst üste çakıştırılmış pozunu(PDB ID:5XV7)

Şekil 5.30 Alektinib De-karboksilat ile ALEK molekülünün üst üste çakıştırılmış pozunu içermektedir. ALEK molekülü kırmızı, Alektinib De-karboksilat ise pembe renk ile renklendirilmiştir. Burada Alektinib De-karboksilat ile ALEK molekülünün oldukça farklı yerleşim gösterdikleri görülmektedir. Alektinib De-karboksilat ek olarak Asp497,

Lys109, Tyr227 aminoasidleri ile etkileşim göstermektedir. Fakat Leu168 aminoasidinden oldukça uzak konumlanmıştır. Siklohekzen halkasının parçalanması molekülün rijit yapısını bozduğu için molekülün indol kısmı enzim aktif bölgesinin dışına doğru bir yerleşim göstermiştir.

Sonuç olarak siklohekzen yapısının molekülün enzim aktif bölgesinde yerleşimi açısından oldukça önemli olduğu görülmektedir. Yine bu halkaya bağlı sübstituentlerin karbonil grubu ya da hidroksil grubu gibi küçük gruplar olması gerekmektedir. Bu sübstitüentin bir metoksi olması durumunda meydana gelen sterik engel Leu168 ile olan etkileşimi engellemektedir.



Şekil 5.33. ALEK ve Alektinib De-karboksilat moleküllerinin üst üste çakıştırılmış poz (PDB ID:5XV7)

5.8. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Geliştirilen sıvı kromatografisi yöntemi her iki dedektör içinde ayrı ayrı ICH Q2(R2) kılavuzuna göre tam olarak metot geçerliliği sağlanmıştır. Validasyon çalışmalarında her iki dedektörde elde edilen sinyale karşı (pik alanı) standart çözelti derişimi ile oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem elde olan imkanlar dahilinde HPLC cihazına taşınarak PDA dedektör için ara kesinlik çalışması yapılmış ve gerekli parametreler ayrıntılı olarak analiz edilmiştir.

Hem PDA hem MS dedektör metot kesinliği ve doğrusallığına ait veriler Tablo 5.7'de verildiği gibi hesaplanmıştır. Doğrusallık çalışması için düşük derişimlere

inilmeye çalışılmıştır. Yöntem seçiciliği için PDA dedektörde muhtemel bozunma ürünleri varlığında metot optimizasyonu sağlanmıştır. MS dedektörü içinse tandem MS tercih edilerek yüksek seçicilik elde edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca PDA dedektör için hızlı bozunma çözeltilerinde ALEK'e ait pikin saflığı hesaplanmış ve 0,99965 olarak bulunmuştur.

Tablo 5.9. ALEK için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	HPLC	LC-MS/MS
Doğrusal aralık	0,17-6,67 (µg/mL)	8,50-340,0 (ng/mL)
Eğim±SH^a (gün içi, n=8)	42324,4±603,4	2472,0±82,7
Kesim±SH^a (gün içi, n=8)	-4363,2±2206,6	11697,7±1015409,6
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=8)	0,99878	0,99334
Teşhis sınırı	56,7 ng/mL	944 pg/mL
Tayin sınırı	0,17 µg/mL	283 ng/mL
Eğim±SH^b (günler arası, k=3, n=24)	16853,0±95,04	2512,7±101,3
Kesim±SH^b (günler arası, k=3, n=24)	-6510,0±1453,0	19925,4±18879,5
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k=3, n=24)	0,99890	0,99035
ANOVA	F(2,16)=1,437 P=0,7542 (P>0,05)	F(2,21)=0,003 P=0,9966 (P>0,05)
Tekrarlanabilirlik (gün içi, ortalama, n=6)	141583,9	462331,8
Tekrarlanabilirlik (gün içi, SS^a, n=6)	699,7	5404,1
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c %, n=6)	%0,5	%1,17
Tekrarlanabilirlik (gün içi, OSH^d, n=6)	285,6	2042,6
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA^e, n=6)	559,9	4324,2
Tekrarlanabilirlik (günler arası, ortalama, n=18)	141125,6	458542,8
Tekrarlanabilirlik (günler arası, SS^a, n=18)	1000,6	6344,6
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c %, n=18)	0,71	1,38
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH^d, n=18)	235,8	2590,2
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA^e, n=18)	462,2	5076,8
ANOVA	F (2,15)=1,382 P=0,281 (P>0,05)	F (2,15)=1,7630 P=0,2053 (P>0,05)

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

Literatürde önerilen yöntemlere bakıldığında önerilen her iki yöntem doğrusal aralığı en düşük olanlardandır (Aikawa vd., 2016, Almutairi vd., 2023, Cheruku ve Bhikshapathi, 2021, Heinig vd., 2017, Huang vd., 2017, Kolasani vd., 2022, Kumar vd., 2023, Kumar vd., 2020, Lee vd., 2020, Maher vd., 2021, Morcos vd., 2017b, Prashanthi vd., 2018, Ryu vd., 2018, Saha vd., 2023, Sparidans vd., 2018, van Veelen vd., 2021) ve LC-MS/MS. Ancak literatürdeki yöntemler biyoanalitik amaçlı geliştirilmiş yöntemlerdir. API ve farmasötik formülasyon analizleri için kapsamlı bir metot yoktur.

Optimize sıvı kromatografisi metodunun doğrusallık ve kesinlik çalışmaları tamamlanınca doğruluk parametresinin çalışılmasına geçilmiştir. Bunun için geri kazanım deneyleri hazırlanmıştır. Geri kazanım çalışmaları API'nin piyasadaki farmasötik formülasyonu olan Alecense® kullanılmıştır. Alecense® çözeltilerine belirli miktarlarda (düşük, orta ve yüksek) olacak şekilde standart ALEK çözeltisi ilave edilmiştir. Çalışma 3 konsantrasyon seviyesinde 9 adet birbirinden bağımsız analiz ile yapılmıştır. Her iki dedektör içinde geri kazanım deneylerine ait sonuçlar Tablo 5.8'de verilmiştir. Hesaplanan hata oranlarına bakıldığında metodun süzme, seyreltme ve tartım gibi işlemlerden bağımsız şekilde matris ortamında yüksek doğruluk ve kesinlikte olduğu görülmektedir.

Tablo 5.10. Geri kazanım verileri

	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	SS	Kesinlik		Doğruluk	
				BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)	
HPLC	2,67	2,50±0,003	0,01	0,30	93,5	-6,5	
	3,33	3,22±0,01	0,02	0,63	97,2	-2,8	
	4,00	3,79±0,04	0,10	0,52	95,2	-4,8	
HPLC- 2	2,67	2,56±0,01	0,02	0,54	95,8	-4,2	
	3,33	3,20±0,01	0,01	0,53	96,2	-3,8	
	4,00	3,99±0,02	0,01	0,16	99,8	-0,2	
	Eklenen (ng/mL)	Bulunan (ng/mL)±GA*	SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)	
LC- MS/MS	136,0	132,4±0,72	0,97	0,74	94,1	-5,9	
	170,0	168,7±0,67	0,90	0,54	99,2	-0,8	
	204,0	197,0±0,68	0,92	0,47	96,6	-3,4	

*%95 Güven seviyesinde

HPLC yönteminin geçerliliği, Shimadzu marka Nexera XR Serisi LC-PDA cihazı kullanılarak laboratuvarlar arası karşılaştırmaların yapılmasını içeren ara kesinlik deneyleri ile doğrulanmıştır. Bunun için kalibrasyon çözümleri aynı yöntem koşulları kullanılarak LC-PDA sisteminde değerlendirilmiştir. Daha sonra aralarında kayda değer bir fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.9’da sunulmaktadır. Ayrıca HPLC yönteminin hassasiyetinin değerlendirilmesi amacıyla formüle edilen geri kazanım çözeltileri de LC-PDA sistemi kullanılarak analize tabi tutulmuştur. ALEK konsantrasyonu, HPLC yaklaşımından türetilen doğrusal regresyon denklemi kullanılarak LC-PDA sistemindeki pik alanlarının hesaplanmasıyla belirlenmiştir. İki cihazın konsantrasyon verileri, her konsantrasyon seviyesi için tek faktörlü ANOVA kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, çalışmanın yöntemin geliştiricisi tarafından gerçekleştirilmesi nedeniyle ara varyans (SI) değeri yerine tekrarlanabilirlik varyansı (Sr) olarak sunulmuştur. Üç konsantrasyon seviyesi için üç tekrarlı her iki cihazın analitik bulgularından elde edilen ortalama S_r değeri 0,3485 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, başarılı bir laboratuvarlar arası karşılaştırma araştırmasının göstergesi olarak tutarlı kabul edilebilir.

Tablo 5.11. Ara kesinlik verileri

Parametre	
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	0,17-6,67
Eğim $\pm$ SH (gün içi, n=6)	30662,5 $\pm$ 345,9
Kesim $\pm$ SH (gün içi, n=6)	-3113,1 $\pm$ 1264,7
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=6)	0,999524
ANOVA	F (1,16)=7860,3 P=0,09415 (P>0,05)

Yöntem sağlamlığı çalışmasında kromatografik koşullarla ilgili ana faktörler Tablo 5.10’da verildiği gibi değerlendirilmiştir. Sağlamlık testi, basit bir yanıt veya yöntemin doğasında bulunan bir dizi yanıt değerlendirilerek potansiyel olarak varyasyonlara maruz kalan kaynakları inceler. Bazı faktörler seçilir ve nispeten hafif değişiklikler üzerinde düşünülür. Sağlamlık parametresinde açıklanan metodoloji izlenerek, etkiler hesaplanmış ve RSD tarafından her yanıt ve tüm faktörler dikkate alınarak dönüştürülmüştür. Yapılan deney sonuçları incelendiğinde kolon yapısından kaynaklı olarak seçilen parametrelerdeki değişikliklerin kayda değer olduğu görülmüştür. Kolon partikül boyutu

küçük ve tanecikli olduğu için etkilenme kayda değerdir. Eğer monolitik yapıda kolon seçilseydi bu değişimlere tepki bu kadar fazla olamayabilirdi. Ancak yine elüsyona etki değeri yüksek olacak kromatografik parametrelerden olan akış hızı ve hareketli faz değişimlerinde bile tepki %20'den fazla olmadığı görülmektedir. Seçilen yanıt parametrelerinin sıvı kromatografisindeki değişikliklere en fazla tepki gösteren yanıtlardan olan alıkonma zamanı ve teorik tabaka sayısı olmasına rağmen sonuçlar kabul edilebilirdir. Ayrıca ara kesinlik çalışmalarının yapıldığı HPLC sisteminde ICH Q2(R2) kılavuzunda verifikasyon çalışmalarında sağlamlık parametresi önermediği için çalışılmamıştır.

Metanol-dimetilsülfoksit karışımında hazırlanan ALEK standart çözeltisinin stabilitesi, çeşitli koşullar altında depolamanın ardından hem HPLC hem de LC-MS/MS teknikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Kısa süreli stabiliteyi sağlamak için madde 24 ve 48 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. Uzun vadeli stabilite için, üç donma-çözülme döngüsü de dahil olmak üzere üç hafta süreyle -20 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Daha sonra her çözelti analize tabi tutulmuştur. Analizler üç kez gerçekleştirilmiş ve sonuçlar geri kazanım ve %BSS sonuçları açısından %95 güven düzeyi ile değerlendirilmiştir. Tablo 5.11'e göre ALEK çözümleri, belirtilen bu parametreler altında kararlılık göstermektedir.

Tablo 5.72. Metot sağlamlık çalışmaları (n=3)

Değiştirilen Parametre			Alıkonulm	%Fark	N	%Fark
			a zamanı	(ortalama±GA		(ortalama±GA
			(dk)	*)		*)
HPLC	Akış hızı (mL/dk)	0,50	7,95	-9,43±0,05	8772	-3,49±1,06
		0,40	9,83	12,03±0,05	8709	-7,14±0,55
	Hareketli faz	58,0	6,73	-23,40±0,03	7976	-13,04±0,26
		organik çözücü oranı				
	(%)	48,0	8,20	-6,58±0,32	22070	-4,58±0,20
		45,0	8,59	-2,40±0,03	8820	-0,73±0,41
	Kolon sıcaklığı (°C)	35,0	8,59	-2,19±0,07	8688	-1,83±0,95
		237	8,77	-0,03±0,17	9024	3,00±0,19
LC-MS/MS	Dalga boyu (nm)	227	8,78	-0,05±0,16	9036	0,17±0,17
		0,55	3,12	-8,92±0,02	6837	-1,72±0,55
	Akış hızı (mL/min)	0,45	3,80	10,86±0,05	7253	4,25±0,85
		Hareketli faz				
	organik çözücü oranı	80,0	3,16	-7,82±0,02	6860	-1,40±0,58
		(%)	70,0	3,83	11,78±0,09	8061
	Kolon sıcaklığı (°C)	45,0	3,37	1,63±0,01	7138	2,61±0,41
		35,0	3,49	-1,69±0,09	6832	-1,80±0,70

Tablo 5.83. ALEK standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)

	Eklenen derişim	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±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)
PDA (µg/mL)	3,33	3,30±0,01	99,0	3,35±0,01	100,7	3,36±0,01	100,9	3,36±0,03	100,9
MS (ng/mL)	170	168,7±0,67	99,4	168,6±0,55	99,0	168,7±0,66	99,3	168,2±0,19	99,0

*%95 Güven seviyesinde

5.9. Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

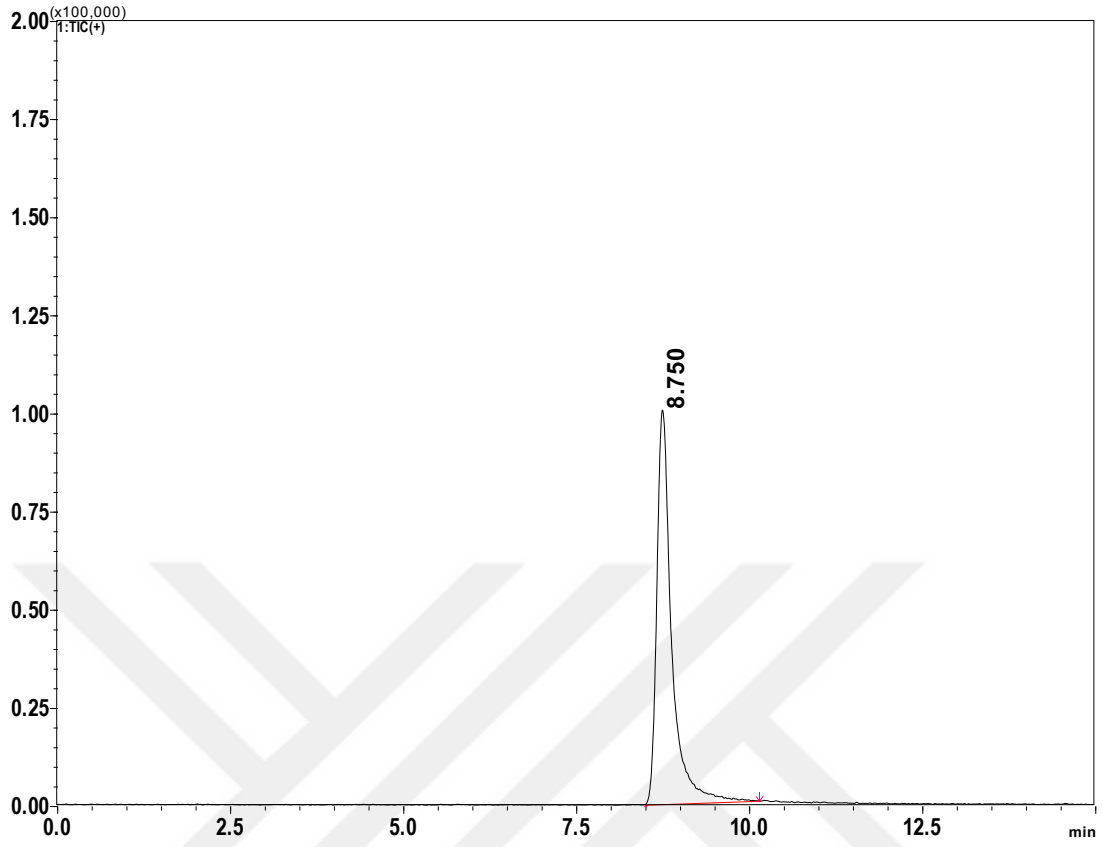
Klinik performans, kalite güvencesi veya ilaç düzenlemesi amaçları için pratik bir gösterge değildir. Tüm sistemin temel amacı klinik başarısızlıkları önlemektir. Bu nedenle, klinik performansı doğru bir şekilde temsil eden uygun ikamelerin bulunması gereklidir. Farmasötik kalite yerine "kullanıma uygunluk" kavramı önerilmiştir. Kullanıma uygun görülen bir ürün, önceden belirlenen kalite özelliklerini ve standartlarını karşılayan ve CGMP kanunlarına uygun olarak üretilmiş ürün olarak nitelendirilebilir. Bu tanım, kalite özelliklerinin kapsadığı ve kalite sisteminin klinik performans için hayati önem taşıyan faktörlerin değişkenliğini düzenlediği ölçüde doğru kabul edilebilir. Ancak bu ölçümler arasındaki korelasyonun boyutu nedir? Daha önce de belirtildiği gibi, kalite özelliklerine ilişkin sınırlar, klinikte incelenen serileri yakından yansıtan serilerin üretilmesini sağlamak için sıklıkla ampirik araçlarla belirlenir. Bununla birlikte, bu yöntem yalnızca bu sınırlar ile klinik sonuç arasındaki korelasyonun net bir şekilde anlaşılması durumunda sürekli klinik performansı garanti edecektir. Bu anlayışın yokluğunda sınırlar çok geniş, gereksiz derecede kısıtlayıcı veya klinik yeterlilik açısından tamamen önemsiz olabilir. Ayrıca, son derece önemli olan diğer özelliklerin tanınmaması, ölçülememesi ve yönetilememesi ihtimali de vardır. Ne yazık ki, klinik ilaç değerlendirmesi için kullanılan mevcut teknikler bu konulara ilişkin önemli bilgiler sağlamamaktadır. Bireysel değişkenliğin önemli etkisi, ciddi çözünme hataları veya içerikte önemli değişiklikler gibi önemli farklılıklar olmadığı sürece, tipik olarak ürün özelliklerine atfedilen her türlü etkiyi bastırır. Örneğin, çok sayıda ilaç söz konusu olduğunda, dozajdaki yüzde 50'lik bir artış, uygun boyuttaki bir karşılaştırmalı çalışmada güvenlik veya etkinlik üzerinde gözle görülür herhangi bir etki göstermeyebilir. Bununla birlikte, bireysel bir hasta bu değişiklikten hâlâ etkilenebilirken, bunun standart bir klinik çalışmada fark edilemeyeceğinin dikkate alınması önemlidir. Aynı bireylerde tekrarlayan çapraz çalışmalar yürütmek, klinik etkilere ilişkin içgörüler sunabilir. Ancak bu denemeler zordur ve zorlukla gerçekleştirilmektedir. Klinik açıdan bakıldığında bunlar gerekli değildir. Tanımlanan ilaç kalitesi özellikleri, klinik uygulama için genellikle yeterlidir, çünkü bunlar, değişkenlik seviyelerinin, ciddi bir araştırma yapılmadan hastalarda gözlemlenebilecek olandan çok daha hassas bir şekilde kontrol edilmesine olanak tanır. Ancak kalite özelliklerinin pratik önemine ilişkin kapsamlı bilginin bulunmaması, düzenleme ve üretim gereklilikleri açısından önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu, farklı kalite parametreleri ile klinik etkililik arasındaki korelasyona ilişkin

ilgili verilere erişilebildiği takdirde kolaylıkla çözülebilecek çok sayıda çatışmaya neden olabilir.

Ticari farmasötik tablet formülasyonu olan Alecense® içeriği analiz edilerek geliştirilen her iki metot aktif olarak kullanılmıştır. Elde edilen analiz sonuçları ise Tablo 5.8’de verildiği gibidir. Ayrıca Şekil 5.31’de her iki metot ile elde edilen kromatogramlar verilmiştir.

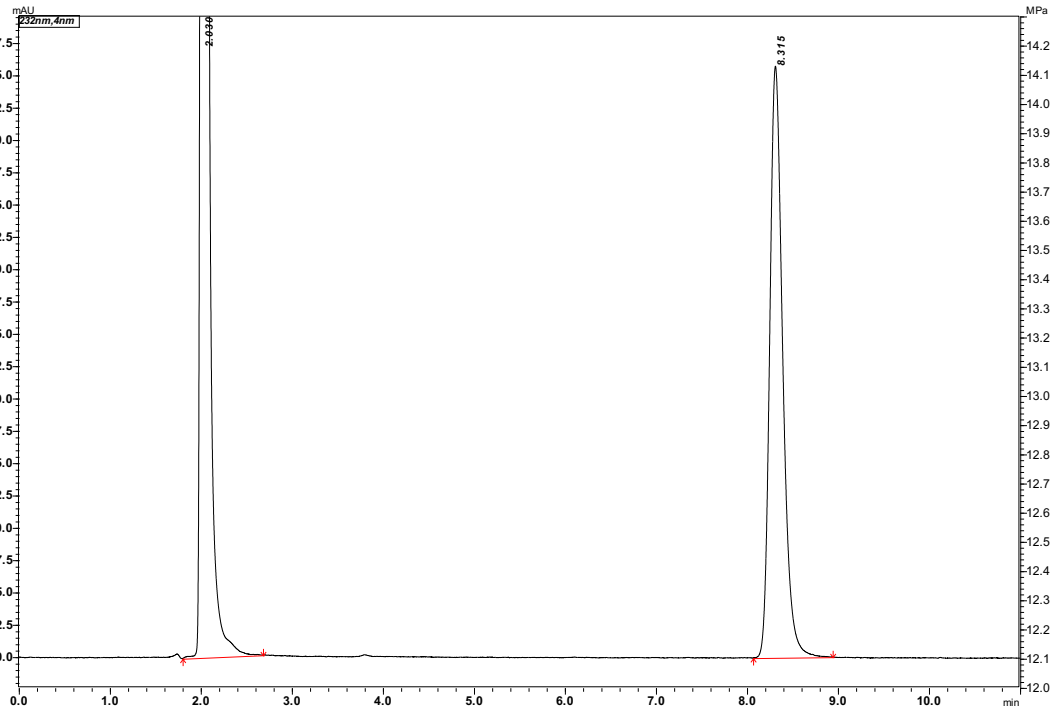
Tablo 5.94. *Alecense® formülasyonu sonuçları (n=6)*

	HPLC	LC-MS/MS
Ortalama (mg)	149,98	149,96
Minumum (mg)	148,99	148,75
Maksimum (mg)	150,1	150,2
Standart sapma (mg)	0,322	0,356
%BSS	0,532	0,626
OSH (mg)	0,748	0,532
%Bias	-0,020	-0,040
Güven aralığı	±0,131	±0,317



(a)

Datafile Name: ALC486.lcd
Sample Name: ALEC
Sample ID: PDA



(b)

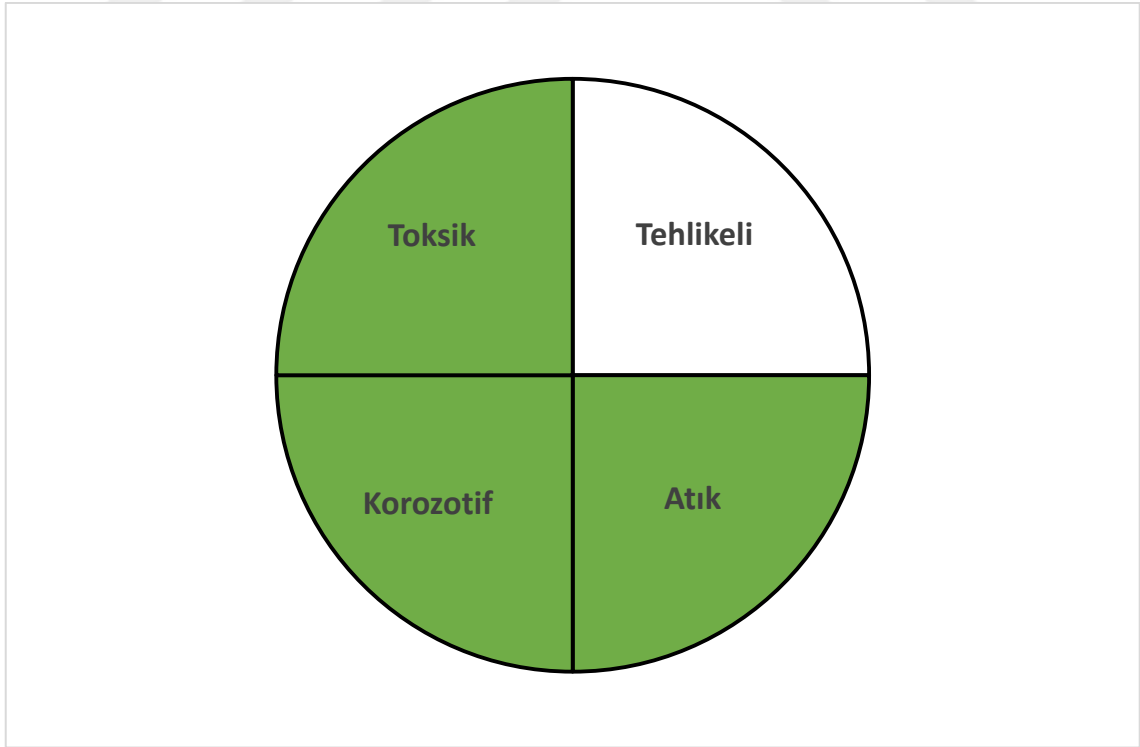
Şekil 5.34. LC-MS/MS (a) ve HPLC (b) ile alınan Alecense® numune çözeltisine ait kromatogramları

5.10. Geliştirilen Yöntemin Yeşillik Değerlendirilmesi

Önerilen sıvı kromatografisi metodunun yeşilliğini değerlendirmek için bu çalışmada analitik eko-ölçek, NEMI, GAPI ve AGREE olmak üzere dört yeşillik değerlendirme aracı uygulanmıştır.

5.10.1. Geliştirilen yöntemin ulusal çevresel yöntem endeksi: NEMI

NEMI piktogramı kalıcı biyobirikimli ve toksik (PBT), tehlikeli, aşındırıcı ve atık olmak üzere dört anahtar terimi içerir. Değerlendirilen yöntemle ilgili olarak, piktogramdaki her çeyreğin renk kodlaması, yöntemin söz konusu belirli çeyrek için tanımlanan seçim kriterlerini karşılaması durumunda yeşil olabilir veya çeyrek daire boşsa daha az yeşil olabilir (Keith vd., 2007). Geliştirilen yöntemin genel profili, toksik madde salınım envanteri (TRI) listesinde asetonitril ve amonyum formatın varlığı nedeniyle toksik kadran dışında piktogramdaki dört kadrandan üçünün yeşil renkli olduğunu gösterir. Bu çözücülerin TRI listesinde bulunması, önerilen yöntemin daha az yeşil olduğunu göstermektedir. Şekil 5.32’de NEMI piktogramı verilmiştir.



Şekil 5.35. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun NEMI piktogramı

5.10.2. Geliştirilen yöntemin analitik eko ölçeği

Analitik eko ölçek yarı niceliksel bir araçtır ve kimyasalların etkisine ve kimyasalların kullanımıyla ilişkili miktarlar ve tehlikeler, atık ve mesleki tehlikeler, cihazın enerji tüketimi, enerji üretimi dahil olmak üzere analitik yöntemde yer alan prosese dayalı olarak ceza puanları atanarak değerlendirilir. Analitik eko-puan, ideal bir yeşil Eko-Skala değeri olan 100 baz puandan ceza puanlarının toplamı çıkarılarak hesaplanır. Hesaplamanın sonucu, > 75 , > 50 ve < 50 puanlarının sırasıyla mükemmel, kabul edilebilir ve yetersiz yeşil analizi temsil ettiği bir ölçekte sıralanır (Gałuszka vd., 2012). Tablo 5.13’de gösterildiği gibi PDA dedektör için 90’lık analitik Eko-Skor, önerilen ve doğrulanan yöntemin yeşilliğini mükemmel olarak doğrulamaktadır. LC-MS/MS metodu içinse analitik eko skor hesabında tek fark numune başına LC-MS cihazındaki enerji sarfiyatıdır. Çünkü tek HPLC-PDA’da numune başına enerji sarfiyatı $\leq 1,5$ kWh iken LC-MS bu sarfiyatı $> 1,5$ kWh olmaktadır. Buna göre ceza puanı da 2 ye çıkmakta ve toplam ceza puanı 11 olarak hesaplanmıştır. Böylece eko skor hesabı 89 olmaktadır. Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin yeşillik skorunun çok iyi olduğu rahatlıkla söylenebilir.

Tablo 5.105. Geliştirilen LC-PDA yöntemin analitik eko ölçeği

Bileşen/Reaktif	Piktogram	Uyarı kelimesi	Uygulanan yöntemde kullanılan miktar	Ceza puanı
Asetonitril		Tehlike	<10 mL	4
Amonyum format		Uyarı	<10 mL	1
Ultra-saf su	-	-	<10 mL	0
Cihazlar				
HPLC-PDA	-	-	$\leq 1,5$ kWh /numune	1
Sonikatör	-	-	$\leq 0,1$ kWh /numune	0
Santrifüj	-	-	$\leq 1,5$ kWh /numune	1
İş tehlikesi				
Atık	-	-	<10 mL (g)/analiz	3
Atmosfere salınım	-	-	-	-
Toplam puan	-	-	-	$\Sigma 10$
Eko ölçek			100-Σ	90

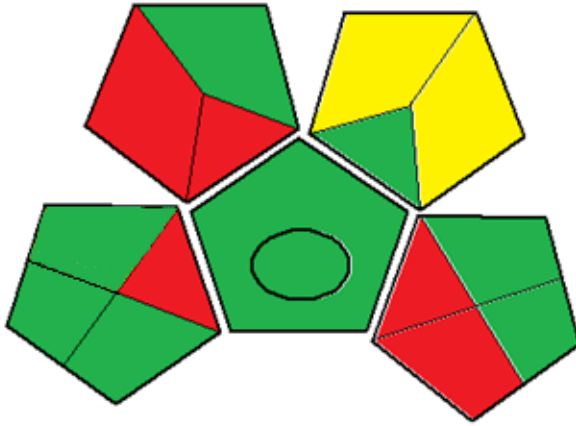
5.10.3. Metodun yeşil analitik prosedür endeksi: GAPI

GAPI aracı, numune toplama ve hazırlama aşamasından son belirleme adımına kadar ana temel hususları sistematik olarak kapsayan tüm analitik yöntemi kapsamlı bir şekilde değerlendirir. Bu ölçeklendirme sisteminde sayısal değerlendirme yerine analitik prosedürlerdeki en zayıf noktaları belirleyerek analitik yöntemin yalnızca niteliksel değerlendirmesini sunar. Bir GAPI piktogramı, sırasıyla düşük, orta ve yüksek çevresel etkiyi gösteren, yeşilden sarıya ve kırmızıya değişen renk kodlarına sahip beş pentagram olarak temsil edilir (Plotka-Wasyłka, 2018). Tablo 5.14’de gösterildiği gibi, geliştirilen sıvı kromatografisi yönteminin pentagramları, çevrimdışı numune toplama, ekstraksiyon türü, yeşil olmayan çözücü kullanımı ve atık arıtma eksikliği gibi özelliklerden dolayı olumsuz çevresel etkiyi ortaya koymaktadır; bu durumda ki parametreler kırmızı olarak kodlanmıştır.

Tablo 5.116. Geliştirilen yöntemin GAPI’si

No	Kategori	Yönteme uygulanan	Renk
Numune hazırlama			
1	Toplama	Çevrim dışı	Kırmızı
2	Koruma	Yok	Yeşil
3	Taşıma	Yok	Yeşil
4	Saklama	Yok	Yeşil
5	Metot türü	Süzme	Sarı
6	Ekstraksiyon ölçeği	Mikro	Kırmızı
7	Çözücü/reaktif kullanımı	Yeşil olmayan solventler/reaktifler	Kırmızı
8	Ek uygulamalar	Yok	Yeşil
Reaktif ve çözücüler			
9	Miktar	<10 mL	Yeşil
10	Sağlık tehlikesi	NPFA sağlık değeri ACN = 2	Sarı
11	Güvenlik tehlikesi	NPFA yanıcı değeri ACN = 3	Sarı
Enstrümantasyon			
12	Enerji	>1.5 kWh/numune	Kırmızı
13	Sağlık tehlikesi	Yok	Yeşil
14	Atık	<10 mL (10 g)	Yeşil
15	Atık yönetimi	Yok	Kırmızı

GAPI ölçeğinde hem PDA dedektör hem de MS dedektör için benzer parametreler söz konusu olduğu için ortak ölçek belirlenmesine karar verilmiştir. Yöntemde enerji kullanımı olarak fark söz konusu olduğu için her bir dedektör türünde aynı enerji kodu ile temsil edilmektedir. Yöntemin GAPI ölçeğine göre en zayıf yönlerinin çözücü kullanımı, ekstraksiyon ölçeği ve atık yönetiminin sunulmamasıdır. Ancak ilaç molekülleri apolarlığı yüksek moleküller oldukları için yeşil çözücülerin kullanılması imkansızdır. Üstelik ALEK sık kullanılan ve en çok tercih edilen asetonitril, metanol gibi çözücülerde çözünürlüğü çok düşük olduğu için bir miktar dimetilsülfoksit eklenerek çözünürlük sağlanmıştır. Ayrıca birçok hareketli faz bileşeni ve sabit faz türü denenmesine rağmen etanol gibi yeşil kimya çözücüsü ile verimli ayırım başırlanamamıştır. Ancak yöntemin kısa analiz süresi, basit numune hazırlama manipölasyonuna sahip olması ve daha az akış hızı gibi uygulanabilirlik avantajları mevcuttur. Oluşturulan GAPI piktogramı Şekil 5.33’de verildiği gibidir.



Şekil 5.36. Geliştirilen sıvı kromatografisi metodunun GAPI piktogramı

5.10.4. Geliştirilen metodun analitik yeşillik hesabı:AGREE

AGREE metriklerindeki nihai puan, otomatik olarak on iki bölüme ayrılmış bir sonraki piktogramı oluşturan AGREE yazılımı kullanılarak 0’dan 1’e kadar birliğin kesri olarak haritalanır. Piktogramın her bölümüne, her GAC ilkesinin performansına karşılık gelen, yeşil-sarı-kırmızı renk skalasıyla gösterilen özel bir renk kodu atanır. Nihai AGREE puanı piktogramın merkezinde gösterilir; bu durumda bir yöntem 0,6’nın üzerinde puan alırsa yeşil kabul edilir (Pena-Pereira vd., 2020). Şekil 5.34’de gösterilen

piktograma göre AGREE yönteminin genel puanı 0,77 ve önerilen yöntemi GAC'ın 12 temel ilkesi açısından yeşil olarak nitelendirmektedir. Yöntemde en düşük puanı alan ve kırmızı ile boyanan 3 numaralı bölge numune hazırlama prosedürünün çevrim dışı olup olmaması ile ilgilidir. Geliştirilen metotta numune hazırlama çevrim dışı olup analiz sürecinden ayrı olduğu için yeşil kabul edilmektedir. Bunun dışında 5, 9 ve 10 numaralı kısımlarda sarı renkte ifade edilmiştir. 5 numara kullanılan sistemin otomasyona sahip olması ve minyatürize numune hazırlama prosedürünün daha yeşil olması ile ilgilidir. 9 numaralı kriter enerji kullanımı ile ilgili olup sıvı kromatografisinin enerji kullanımı sarıdır. Son olarak 10 numaralı kriter ise kullanılan kimyasalların yenilebilir ve biyoakışkan olması ile ilgilidir. Ancak kullanılan çözücülerin analitin çözünme problemlerinden dolayı hayli apolar bileşen seçilmesi nedeniyle AGREE puanını düşürmüştür.



Şekil 5.37. Geliştirilen yöntemin AGREE piktogramı

Dört araç karşılaştırıldığında önerilen yöntem yeşil yöntem olarak nitelendirilmektedir. NEMI basitçe saf niteliksel bir ölçüm aracı olarak kabul edilir, ancak tüm analitik sürecin ayrıntılı bir görselleştirmesini sağlama konusundaki sınırlaması nedeniyle analitik yöntemin yeşilliğini değerlendirmek için en uygun araç olarak görülmez. Öte yandan, Eco-Scale, çalışılan analitik yöntemin çevre dostu olmayan ilgili prosedürlerinin ayrıntılı açıklamasından yoksun, yalnızca matematiksel bir değerlendirme sağlamıştır. Bununla birlikte GAPI ile AGREE arasında yeşil değerlendirmelerin sonuçları konusunda bir anlaşma vardır. Her iki araç da analitik prosedürün tamamı hakkında kapsamlı bir şekilde entegre bilgi sağlamaktadır ve önerilen

yöntemin tüm adımlarını kapsamlı bir şekilde değerlendirmektedir. GAPI ve AGREE araçlarına ilişkin olarak yöntemin daha yeşil olması için yerinde ölçümler yapılarak, atıkların ön arıtılmasıyla ve toksik reaktiflerin kullanımının ortadan kaldırılması ve bunların yeşil alternatifleriyle değiştirilmesiyle geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Yeşil kimyanın ve sürdürülebilir kalkınmanın insanlar için önemini vurgulamak iyi bir politik slogan anlamına gelmemelidir. Doğa yasaları ve çevrede gerçekleşen süreçler hakkında gerçekten daha çok ve daha iyi şeyler öğrenmemiz ve saygı duymamız gerekir. Çünkü Richard P. Feynman'ın Fizik Dersleri'nde söylediği gibi, "Doğa bizim ona ne dediğimizi umursamaz, sadece bildiğini yapmaya devam eder." (Koel ve Kaljurand, 2006). Analitik yöntemler hızla gelişmekte ve çevre, su ve gıda güvenliği konusunda endişe duyan güçlü bir itici güç oluşmaktadır. Ayrıca halkın kimyasal ürün ve süreçlerin güvenli olduğuna dair onaya ihtiyacı vardır. Çeşitli mikro teknikler ve hedef doğrultusunda hareket eden, ayırt eden sistemlerin geleneksel metodolojilerin yerini almaya çalışmakta olduğu aşikardır. Bu bakış açısı ve çaba kimyasal ve biyolojik proseslerin yürütülmesinde tamamen yeni yaklaşımlar geliştirmek için de kullanılabilir. Ancak burada cezbedici yüksek teknolojik yöntemlerin cazibesine kapılmayıp yeşil bilincine de sahip olmak gerekir. Bir analitik kimyacı bilgi, imkan ve kazanımlarına göre çok farklı teknikler geliştirip görüşler sunabilir. Ancak özellikle ilaç kimyasında kalite kontrol durmaksızın devam eden yığın ve formülasyon analizleri demektir. Bu süreçte atıkların önlenmesi, enerji verimliliği gibi parametreler uygun analitik yöntemi seçerken karar sürecinin bir parçası haline gelmeli; analiz yeşil bir şekilde gerçekleştirilmelidir. Bu konuda analizciler desteklenmeli süreç basit bir prosedür olarak görülmemelidir. Burada en önemli nokta analizcinin farkındalığı ve çabası olacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu doktora çalışması kapsamında kanser tedavisinde kullanılan ALEK bileşiğinin HPLC ve LCMS/MS cihazları kullanılarak miktarını tespit etmek için analitik yöntemler geliştirilmiş ve ICH rehberine göre bu yöntemlerin yöntem geçerlilik çalışmaları tamamlanmıştır. Yapılan çalışma, çeşitli stres koşullarında bileşiğin bozunma davranışlarının detaylı olarak incelendiği ikinci çalışma olarak dikkat çekici bir noktadadır. Daha önce yapılan oksidatif şartlarda oluşan bozunma ürünlerinin yapı karakterizasyonu tekrarlanmış, bunun yanında alkali, asidik, ısı ve fotolitik şartlara da maruz bırakılan maddeden oluşan bozunma ürünlerinin yapıları MSⁿ tekniği ile aydınlatılmıştır. Literatürde yer alan iki bozunma ürününün yanı sıra üç yeni bozunma ürünü tespit edilmiş ve yapıları ortaya konmuştur. Tüm bu bozunma ürünlerine ve ALEK bileşiğinin kendisine, uygun protein kristali kullanılarak docking çalışmaları yapılmıştır. Şimdiye kadar yapılmamış olan bu çalışma ile bileşiklerin aktif bölgedeki duruşları ve etkileşimleri *in silico* olarak incelenmesi ile biyolojik aktiviteleri hakkında fikir sahibi olmak amaçlanmıştır.

Geliştirilen yöntemler, deneysel tasarım yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu durum, ALEK bileşiği için literatürde ilk olma niteliği taşımaktadır. Ayrıca, yüksek doğrusal ilişki ve düşük teşhis ve tayin sınırları göstermekte olan yöntemlerden HPLC yöntemi, bozunma ürünleri varlığında tam yöntem geçerliliği yapılmış ilk çalışma olarak literatüre girecektir. Benzer şekilde, başka bir HPLC cihazına transfer edilerek yöntem tekrarlanabilirlik çalışmaları da literatürde yer almamaktadır. Literatürde LCMS/MS çalışmalarına bakıldığında birkaç farklı matrikste gerçekleştirilen çalışma olmasına rağmen, doğrudan ilaç endüstrisini hedefleyen kalite kontrol amaçlı bir metot eksikliği göze çarpmaktadır. Çalışma bünyesinde yapılan ve tam yöntem geçerliliği gerçekleştirilmiş LCMS/MS çalışması literatürdeki bu eksikliği giderme hüviyetindedir. Her iki yöntemle, ticari Alesence ürününün analizinin gerçekleştirilmesi kalite kontrol çalışmaları açısından da örnek teşkil edecek bir durum halindedir.

Son olarak artan nüfus ve gelişen teknoloji ile daha önemli hale gelen çevre duyarlılığının bir göstergesi olan yeşillik indekslerine bakılmıştır. Bu durum ALEK bileşiği için gerçekleştirilen çalışmalar arasında ilk olma özelliği taşımaktadır. Farklı indekslerde değerlendirilen yöntemlerin göstermiş olduğu yüksek yeşillik özellikleri çalışmayı, bu alandaki çalışmalar arasında bir adım öne çıkarmaktadır.

Bozunma ürünleri hakkında daha detaylı çalışmalar, bu çalışmanın devamı olarak kurgulanmaktadır. Önerilen yapıların doğrulanması ve ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları için maddelerin sıfırdan sentezlenmesi veya preparatif HPLC ile saflaştırılması gerekmektedir. Elde edilen maddeler ile tekil ve sinerjik biyolojik aktivitelerinin yanı sıra toksikolojik çalışmaların yapılması çalışma hakkında bütüncül bir fotoğraf sunacaktır.



KAYNAKÇA

- (2023a): Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. U.S. Food and Drug Administration.
- Abba, S., Usman, A., Selin, I. (2020). Simulation for response surface in the HPLC optimization method development using artificial intelligence models: A data-driven approach. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 201, 104007.
- Aboul-Enein, H.Y. (2000). Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. *Accreditation and Quality Assurance*, 5 (5), 180-181.
- Agency, E.M. (2018): Alecensa (alectinib): summary of product characteristics.
- Aikawa, H., Hayashi, M., Ryu, S., Yamashita, M., Ohtsuka, N., Nishidate, M., Fujiwara, Y., Hamada, A.J.S.R. (2016). Visualizing spatial distribution of alectinib in murine brain using quantitative mass spectrometry imaging. 6 (1), 23749.
- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J., Chen, B.J.M. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. 102 (8), e32899.
- Almutairi, H.S., Alanazi, M.M., Darwish, I.A., Bakheit, A.H., Alshehri, M.M., Darwish, H.W.J.M. (2023). Development of Novel Microwell-Based Spectrofluorimetry and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Methods and High Throughput for Quantitation of Alectinib in Bulk Powder and Urine Samples. 59 (3), 441.
- Anastas, P., Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39 (1), 301-312.
- Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M. (2002). Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Accounts of chemical research*, 35 (9), 686-694.
- Ando, K., Manabe, R., Kishino, Y., Kusumoto, S., Yamaoka, T., Tanaka, A., Ohmori, T., Sagara, H.J.I.J.o.M.S. (2023). Comparative efficacy of ALK inhibitors for treatment-naive ALK-positive advanced non-small cell lung cancer with central nervous system metastasis: a network meta-analysis. 24 (3), 2242.
- Bhoop, B.S., Raza, K., Beg, S. (2013). Developing “optimized” drug products employing “designed” experiments. *Chemical Industry Digest*, 23, 70-76.
- Blessy, M., Patel, R.D., Prajapati, P.N., Agrawal, Y. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 4 (3), 159-165.
- Candioti, L.V., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.
- Cappiello, A., Famigliini, G., Palma, P., Pierini, E., Termopoli, V., Trufelli, H. (2008). Overcoming matrix effects in liquid chromatography– mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80 (23), 9343-9348.
- Cheruku, S., Bhikshapathi, D.J.I.J.o.P.R. (2021). Validation Of A Specific Lc-Ms/Ms Method For The Quantification Of Anti-Cancer Alectinib In Biological Matrices. 13 (1)
- Chu, Q.S.J.T.a.i.m.o. (2020). Targeting non-small cell lung cancer: driver mutation beyond epidermal growth factor mutation and anaplastic lymphoma kinase fusion. 12, 1758835919895756.
- Cortese, M., Gigliobianco, M.R., Magnoni, F., Censi, R., Di Martino, P. (2020). Compensate for or minimize matrix effects? Strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: a tutorial review. *Molecules*, 25 (13), 3047.
- Daoud, N.E.-H., Borah, P., Deb, P.K., Venugopala, K.N., Hourani, W., Alzweiri, M., Bardaweel, S.K., Tiwari, V. (2021). ADMET profiling in drug discovery and

development: perspectives of in silico, in vitro and integrated approaches. *Current Drug Metabolism*, 22 (7), 503-522.

Darling, G.E., Maziak, D.E., Inculet, R.I., Gulenchyn, K.Y., Driedger, A.A., Ung, Y.C., Gu, C.-S., Kuruvilla, M.S., Cline, K.J., Julian, J.A.J.J.o.T.O. (2011). Positron emission tomography-computed tomography compared with invasive mediastinal staging in non-small cell lung cancer: results of mediastinal staging in the early lung positron emission tomography trial. 6 (8), 1367-1372.

de Marco, B.A., Rechelo, B.S., Tótolí, E.G., Kogawa, A.C., Salgado, H.R.N. (2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi pharmaceutical journal*, 27 (1), 1-8.

de Oliveira Melo, S.R., Homem-de-Mello, M., Silveira, D., Simeoni, L.A. (2014). Advice on degradation products in pharmaceuticals: a toxicological evaluation. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 68 (3), 221-238.

Del Castillo, E. (2007). *Process optimization: a statistical approach*. Springer Science & Business Media.

Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12 (4), 214-219.

Desai, A., Lovly, C.M.J.T.L.C.R. (2023). Strategies to overcome resistance to ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: a narrative review. 12 (3)

Deschamps, E., Calabrese, V., Schmitz, I., Hubert-Roux, M., Castagnos, D., Afonso, C. (2023). Advances in Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry for Pharmaceutical Analysis. *Molecules*, 28 (5), 2061.

Fekete, S., Fekete, J. (2011). Fast gradient screening of pharmaceuticals with 5 cm long, narrow bore reversed-phase columns packed with sub-3 μm core-shell and sub-2 μm totally porous particles. *Talanta*, 84 (2), 416-423.

Ferreira, S.C., Bruns, R., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J., Brandão, G., da Silva, E.P., Portugal, L., Dos Reis, P., Souza, A. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597 (2), 179-186.

Food, Administration, D. (2004). Guidance for industry, PAT-A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance.

<http://www.fda.gov/cder/guidance/published.html>,

Food, U., Administration, D. (2021): Pharmaceutical cGMPs for the 21st century—a risk-based approach. September 2004.

Fukui, T., Tachihara, M., Nagano, T., Kobayashi, K.J.C. (2022). Review of therapeutic strategies for anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer. 14 (5), 1184.

Gałaszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84.

Gałaszka, A., Migaszewski, Z.M., Konieczka, P., Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72.

Ganorkar, S.B., Vander Heyden, Y. (2022). Recent trends in pharmaceutical analysis to foster modern drug discovery by comparative in-silico profiling of drugs and related substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116747.

Géhin, C., Holman, S.W. (2021). Advances in high-resolution mass spectrometry applied to pharmaceuticals in 2020: A whole new age of information. *Analytical Science Advances*, 2 (3-4), 142-156.

Giddings, J.C. (1967). Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Analytical chemistry*, 39 (8), 1027-1028.

Guideline, I.H.T. (2005): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. pp. 11-12.

Hatcher, J.M., Wu, G., Zeng, C., Zhu, J., Meng, F., Patel, S., Wang, W., Ficarro, S.B., Leggett, A.L., Powell, C.E. (2018). SRPKIN-1: a covalent SRPK1/2 inhibitor that potently converts VEGF from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoform. *Cell chemical biology*, 25 (4), 460-470. e466.

Heinig, K., Herzog, D., Ferrari, L., Fraier, D., Miya, K., Morcos, P.N.J.B. (2017). LC–MS/MS determination of alectinib and its major human metabolite M4 in human urine: prevention of nonspecific binding. 9 (5), 459-468.

Herden, M., Waller, C.F.J.S.M.i.O. (2018). Alectinib. 247-256.

Holm, P., Allesø, M., Bryder, M.C., Holm, R. (2017). Q8 (R2) Pharmaceutical Development. *ICH quality guidelines: an implementation guide*, 535-577.

Hsu, J.C., Carnac, R., Henschel, V., Bogman, K., Martin-Facklam, M., Guerini, E., Balas, B., Zeaiter, A.H., Phipps, A., Morcos, P.N. (2016): Population pharmacokinetics (popPK) and exposure-response (ER) analyses to confirm alectinib 600 mg BID dose selection in a crizotinib-progressed or intolerant population. American Society of Clinical Oncology.

Huang, X.-X., Li, Y.-X., Li, X.-Y., Hu, X.-X., Tang, P.-F., Hu, G.-X.J.J.o.P., Analysis, B. (2017). An UPLC–MS/MS method for the quantitation of alectinib in rat plasma. 132, 227-231.

Huynh-Ba, K. (2009). *Pharmaceutical stability testing to support global markets*. Springer Science & Business Media.

information, G.I.A.a.U.p. (2017).

Kalinowska, K., Bystrzanowska, M., Tobiszewski, M. (2021). Chemometrics approaches to green analytical chemistry procedure development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 30, 100498.

Keith, L.H., Brass, H.J., Sullivan, D.J., Boiani, J.A., Alben, K.T. (2005): An introduction to the national environmental methods index. ACS Publications.

Keith, L.H., Gron, L.U., Young, J.L. (2007). Green analytical methodologies. *Chemical reviews*, 107 (6), 2695-2708.

Khetan, S.K., Collins, T.J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical reviews*, 107 (6), 2319-2364.

Kinoshita, K., Asoh, K., Furuichi, N., Ito, T., Kawada, H., Hara, S., Ohwada, J., Miyagi, T., Kobayashi, T., Takanashi, K.J.B., chemistry, m. (2012). Design and synthesis of a highly selective, orally active and potent anaplastic lymphoma kinase inhibitor (CH5424802). 20 (3), 1271-1280.

Kocher, F., Hilbe, W., Seeber, A., Pircher, A., Schmid, T., Greil, R., Auberger, J., Nevinsky-Stickel, M., Sterlacci, W., Tzankov, A.J.L.C. (2015). Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. 87 (2), 193-200.

Kodama, T., Hasegawa, M., Takanashi, K., Sakurai, Y., Kondoh, O., Sakamoto, H.J.C.c., pharmacology. (2014a). Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastases. 74, 1023-1028.

Kodama, T., Tsukaguchi, T., Satoh, Y., Yoshida, M., Watanabe, Y., Kondoh, O., Sakamoto, H.J.M.c.t. (2014b). Alectinib shows potent antitumor activity against RET-rearranged non-small cell lung cancer. 13 (12), 2910-2918.

Koel, M., Kaljurand, M. (2006). Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 78 (11), 1993-2002.

Kolasani, D.D., Desai, M., Patil, P., Channabasavaiah, J.P.J.I.J.o.P.E., Research. (2022). Evaluation of pH Dependent Solubility and Examination of Variation in Pharmacokinetic Properties of Alectinib: A Quantitative Study by Implementing Integrated Quality by Design Approach for RP-HPLC Method Development and Optimization. 56 (4), 1219-1225.

Kumar, H., Acharyya, S., Mondal, P., Patra, P., Sahu, S.J.C.C.L. (2023). Quantification of Alectinib in spiked rabbit plasma using liquid chromatography-electro spray ionization-tandem mass spectrophotometry: An application to pharmacokinetic study. 12 (2), 265-274.

Kumar, H., Sahu, S.K., Debata, J.J.I.J.o.P.I. (2020). A Novel Ultra Performance Liquid Chromatography-PDA Method Development and Validation for Alectinib in Bulk and its Application to Tablet Dosage Form. 10 (4)

Lee, H. (2005). Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 28 (7-8), 1161-1202.

Lee, K.-M., Gilmore, D.F. (2005). Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design. *Process Biochemistry*, 40 (1), 229-246.

Lee, S., Nath, C.E., Balzer, B.W., Lewis, C.R., Trahair, T.N., Anazodo, A.C., Shaw, P.J.J.A.C. (2020). An HPLC-PDA method for determination of alectinib concentrations in the plasma of an adolescent. 32 (3), 166-169.

Lengauer, T., Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6 (3), 402-406.

Liu, Z., Liu, Y., Zeng, G., Shao, B., Chen, M., Li, Z., Jiang, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Zhong, H. (2018). Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. *Chemosphere*, 203, 139-150.

Lucken, K., O'Regan, L., Choi, J., Sampson, J., Pashley, S.L., Bayliss, R., Khan, S., Fry, A.M.J.M.C.R. (2022). EML4-ALK variant 3 promotes mitotic errors and spindle assembly checkpoint deficiency leading to increased microtubule poison sensitivity. 20 (6), 854-866.

Maher, H.M., Almomen, A., Alzoman, N.Z., Shehata, S.M., Alanazi, A.A.J.J.o.p., analysis, b. (2021). Development and validation of UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of anaplastic lymphoma kinase inhibitors, alectinib, ceritinib, and crizotinib in Wistar rat plasma with application to bromelain-induced pharmacokinetic interaction. 204, 114276.

Molnár, I., Rieger, H.-J., Monks, K. (2010). Aspects of the "Design Space" in high pressure liquid chromatography method development. *Journal of Chromatography A*, 1217 (19), 3193-3200.

Morcos, P.N., Guerini, E., Parrott, N., Dall, G., Blotner, S., Bogman, K., Sturm, C., Balas, B., Martin-Facklam, M., Phipps, A.J.C.P.i.D.D. (2017a). Effect of food and esomeprazole on the pharmacokinetics of alectinib, a highly selective ALK inhibitor, in healthy subjects. 6 (4), 388-397.

Morcos, P.N., Yu, L., Bogman, K., Sato, M., Katsuki, H., Kawashima, K., Moore, D.J., Whayman, M., Nieforth, K., Heinig, K.J.X. (2017b). Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of the ALK inhibitor alectinib: results from an absolute bioavailability and mass balance study in healthy subjects. 47 (3), 217-229.

Morris, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K.G., Shapiro, D.N., Saltman, D.L., Look, A.T.J.S. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. 263 (5151), 1281-1284.

Muller, I.B., De Langen, A.J., Honeywell, R.J., Giovannetti, E., Peters, G.J.J.E.R.o.A.T. (2016). Overcoming crizotinib resistance in ALK-rearranged NSCLC with the second-generation ALK-inhibitor ceritinib. 16 (2), 147-157.

Nations, U. (2011). Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). *United Nations: New York, NY, USA*,

Niessen, W. (2011). Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30 (4), 626-663.

Niessen, W., Manini, P., Andreoli, R. (2006). Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 25 (6), 881-899.

Otto, M. (2016). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. John Wiley & Sons.

Paik, J., Dhillon, S.J.D. (2018). Alectinib: a review in advanced, ALK-positive NSCLC. 78, 1247-1257.

Parenti, M.D., Rastelli, G. (2012). Advances and applications of binding affinity prediction methods in drug discovery. *Biotechnology advances*, 30 (1), 244-250.

Parmar, R., Rajput, S., Mohan, A. (2021). Identification, isolation, and structure elucidation of novel forced degradation products of alectinib hydrochloride. *Separation Science Plus*, 4 (4), 174-184.

Parrott, N.J., Yu, L.J., Takano, R., Nakamura, M., Morcos, P.N.J.T.A.j. (2016). Physiologically based absorption modeling to explore the impact of food and gastric pH changes on the pharmacokinetics of alectinib. 18, 1464-1474.

Paul, B.D. (2008). A history of the concept of sustainable development: literature review. *The Annals of the University of Oradea, Economic Sciences Series*, 17 (2), 576-580.

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92 (14), 10076-10082.

Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165 (2-3), 216-224.

Peters, S., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Gadgeel, S., Ahn, J.S., Kim, D.-W., Ou, S.-H.I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R.J.N.E.J.o.M. (2017). Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. 377 (9), 829-838.

Pinzi, L., Rastelli, G. (2019). Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*, 20 (18), 4331.

Plotka-Wasyłka, J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181, 204-209.

Plotka-Wasyłka, J., Mohamed, H.M., Kurowska-Susdorf, A., Dewani, R., Fares, M.Y., Andruch, V. (2021). Green analytical chemistry as an integral part of sustainable education development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 31, 100508.

Plotka-Wasyłka, J., Kurowska-Susdorf, A., Sajid, M., de la Guardia, M., Namieśnik, J., Tobiszewski, M. (2018). Green chemistry in higher education: state of the art, challenges, and future trends. *ChemSusChem*, 11 (17), 2845-2858.

Prashanthi, Y., Rao, T.N., Srinivas, Y.J.A.J.o.P.A. (2018). Method Development and Validation of Alectinib Drug by RP-HPLC in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. 8 (4), 186-190.

Ramos-Esquivel, A.J.T. (2022). Immunotherapy in non-small-cell lung cancer: new data support its use, but some challenges remain. 77 (12), 1159-1160.

Rasche, F., Svatoš, A., Maddula, R.K., Böttcher, C., Böcker, S. (2011). Computing fragmentation trees from tandem mass spectrometry data. *Analytical Chemistry*, 83 (4), 1243-1251.

Rathore, A.S. (2016). Quality by design (QbD)-based process development for purification of a biotherapeutic. *Trends in biotechnology*, 34 (5), 358-370.

Rathore, A.S., Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, 27 (1), 26-34.

Rozet, E., Lebrun, P., Hubert, P., Debrus, B., Boulanger, B. (2013). Design spaces for analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 42, 157-167.

Ryu, S., Hayashi, M., Aikawa, H., Okamoto, I., Fujiwara, Y., Hamada, A.J.B.j.o.p. (2018). Heterogeneous distribution of alectinib in neuroblastoma xenografts revealed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging: a pilot study. 175 (1), 29-37.

Saha, S.K., Joshi, A., Singh, R., Jana, S., Dubey, K.J.J.o.D.D.S., Technology. (2023). An investigation into solubility and dissolution improvement of alectinib hydrochloride as a third-generation amorphous solid dispersion. 81, 104259.

Sahu, P.K., Ramiseti, N.R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C.S., Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 590-611.

Sajid, M., Płotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238, 123046.

Sakamoto, H., Tsukaguchi, T., Hiroshima, S., Kodama, T., Kobayashi, T., Fukami, T.A., Oikawa, N., Tsukuda, T., Ishii, N., Aoki, Y.J.C.c. (2011). CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. 19 (5), 679-690.

Schneider, J.L., Lin, J.J., Shaw, A.T.J.N.C. (2023). ALK-positive lung cancer: a moving target. 4 (3), 330-343.

Schrödinger, L. (2016a). Glide, version 7.1. *Schrödinger, LLC: New York, NY, USA*, Schrödinger, L. (2016b). New York, NY, USA, 2012. *LigPrep. version, 3*

Schrödinger, L. (2017). Schrödinger, LLC; New York, NY: 2017. *Schrödinger Suite, 2*, 2017-2011.

Shaikh, T. (2019). Impurities Characterization in Pharmaceuticals: A Review. *Available at SSRN 3958603*,

Shim, J., Brindle, L., Simon, M., George, S.J.F.p. (2014). A systematic review of symptomatic diagnosis of lung cancer. 31 (2), 137-148.

Singh, B., Kumar, R., Ahuja, N. (2005). Optimizing drug delivery systems using systematic" design of experiments." Part I: fundamental aspects. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22 (1)

Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S.-i., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H.J.N. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. 448 (7153), 561-566.

Solomon, B.J., Mok, T., Kim, D.-W., Wu, Y.-L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T.J.N.E.J.o.M. (2014). First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. 371 (23), 2167-2177.

Sparidans, R.W., Li, W., Schinkel, A.H., Schellens, J.H., Beijnen, J.H.J.J.o.p., analysis, b. (2018). Bioanalytical liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the quantification of the ALK inhibitors alectinib, brigatinib and lorlatinib in plasma and mouse tissue homogenates. 161, 136-143.

Sullivan, I., Planchard, D.J.T.a.i.m.o. (2016). ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. 8 (1), 32-47.

Swartz, M.E., Krull, I.S. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC Press.

Taylor, P.J. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry*, 38 (4), 328-334.

Thandra, K.C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J.S., Barsouk, A.J.C.O.W.O. (2021). Epidemiology of lung cancer. 25 (1), 45-52.

Tobiszewski, M. (2016). Metrics for green analytical chemistry. *Analytical methods*, 8 (15), 2993-2999.

Tobiszewski, M., Marć, M., Gałuszka, A., Namieśnik, J. (2015). Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*, 20 (6), 10928-10946.

Tokunaga, H., Shimada, M., Ishikawa, M., Yaegashi, N.J.J.j.o.c.o. (2019). TNM classification of gynaecological malignant tumours: changes between the seventh and eighth editions. 49 (4), 311-320.

Tome, T., Žigart, N., Časar, Z., Obreza, A. (2019). Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: Overview and recent advances. *Organic process research & development*, 23 (9), 1784-1802.

Tomar, V.S., Azim, A., Gupta N., Lahiri, S., Cabri, W. (2019). A process for preparing alectinib or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Patent No: WO2019/008520A1

Travis, W.D., Rekhtman, N., Riley, G.J., Geisinger, K.R., Asamura, H., Brambilla, E., Garg, K., Hirsch, F.R., Noguchi, M., Powell, C.A.J.J.o.t.o. (2010). Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. 5 (4), 411-414.

Tyteca, E., Veuthey, J.-L., Desmet, G., Guilleme, D., Fekete, S. (2016). Computer assisted liquid chromatographic method development for the separation of therapeutic proteins. *Analyst*, 141 (19), 5488-5501.

van Veelen, A., van Geel, R., Schoufs, R., de Beer, Y., Stolk, L.M., Hendriks, L.E., Croes, S.J.B.C. (2021). Development and validation of an HPLC–MS/MS method to simultaneously quantify alectinib, crizotinib, erlotinib, gefitinib and osimertinib in human plasma samples, using one assay run. 35 (12), e5224.

Wardencki, W., Curyło, J., Namieśnik, J. (2005). Green Chemistry--Current and Future Issues. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (4)

Yoshida, T., Oya, Y., Tanaka, K., Shimizu, J., Horio, Y., Kuroda, H., Sakao, Y., Hida, T., Yatabe, Y.J.L.C. (2016). Clinical impact of crizotinib on central nervous system progression in ALK-positive non-small lung cancer. 97, 43-47.

Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32, 243-259.

Zhang, K., Pellett, J.D., Narang, A.S., Wang, Y.J., Zhang, Y.T. (2018). Reactive impurities in large and small molecule pharmaceutical excipients—A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 101, 34-42.

Zhao, Z., Li, P., Han, Y., Yan, H.J.J.o.C.A. (2023). Honeycomb resin-based spin-column solid-phase extraction for efficient determination of alectinib and its metabolite in human urine. 1690, 463787.

Zhuang, X., Zhao, C., Li, J., Su, C., Chen, X., Ren, S., Li, X., Zhou, C.J.C.m. (2019). Clinical features and therapeutic options in non-small cell lung cancer patients with concomitant mutations of EGFR, ALK, ROS1, KRAS or BRAF. 8 (6), 2858-2866.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Serkan LEVENT

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans :Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (2014)

Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (2011)

Yabancı Diller : İngilizce

Mesleki Deneyim

Ocak 2015- Günümüz : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eskişehir/ Türkiye
Öğretim Görevlisi

Haziran 2014- Ocak 2015 : Pharmarge, Pharmactive İlaç, Tekirdağ/ Türkiye
Ar-Ge Analitik Geliştirme Uzman Yardımcısı

Eylül 2012- May 2013 : Perugia Üniversitesi, Perugia/ İtalya
Proje Asistanı

Mart 2011-Mayıs 2014 : Gazi University, Ankara/ Türkiye
Proje Asistanı

Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Bazı Makaleleri

- Sardella R., Levent S, Ianni F., Çalışkan B., Gerstmeier J., Pergola C., Werz O., Banoglu E., Natalini B., “Chromatographic separation and biological evaluation of benzimidazole derivative enantiomers as inhibitors of leukotriene biosynthesis” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 89, 15 February 2014, Pages 88-92 (SCI)
- Saniye Özcan, Serkan Levent, Aysun Geven, Nafiz Öncü Can, Yusuf Özkay, Stability-indicating LC-MS/MS and LC-DAD methods for robust determination of

- tasimelteon and high resolution mass spectrometric identification of a novel degradation product, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 113490.
- Saniye Özcan, Serkan Levent, Aysun Geven, Nafiz Öncü Can, A novel and sensitive LC-MS/MS method for the quantitation of ceftiofur in pharmaceutical preparations and milk samples, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 1386207323999200728121657.
 - Özcan S., Uzunoglu U. E., Levent S., Can N. Ö., “Liquid chromatographic determination of lumacaftor in the presence of ivacaftor and identification of five novel degradation products using high-performance liquid chromatography ion trap time-of-flight mass spectrometry” Journal of Separation Science , cilt.46, sa.17, 2023 (SCI-Expanded)
 - Geven A., Özcan S., Levent S., Can N. Ö. “A Different Perspective on the Characterization of a New Degradation Product of Flibanserin With HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn and Its Pharmaceutical Formulation Analysis With Inter-Laboratory Comparison” Journal of AOAC International , sa.5, ss.1145-1153, 2023 (SCI-Expanded).
 - Geven A., Özcan S., Levent S., Can N. Ö. “Development of a New, Fully Validated LC-MS/MS Method for the Analysis of Flibanserin in Pharmaceutical Preparations and Comparison of the Chromatographic Performance with Six Stationary Phase Types” Current Analytical Chemistry, cilt.19, sa.7, ss.541-549, 2023 (SCI-Expanded)
 - Özcan S., Levent S., Can N. Ö. Kozanli M., “A Novel HPLC Method for Simultaneous Determination of Methyl, Ethyl, n-propyl, Isopropyl, n-butyl, Isobutyl and Benzyl Paraben in Pharmaceuticals and Cosmetics” Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, cilt.24, sa.3, ss.352-365, 2021 (SCI-Expanded)

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Kongrelerde Sunulan Bildirileri

- 2019, *Sözlü Sunum bildirisi*, Aysun Geven, Serkan Levent, Saniye Özcan, Nafiz Öncü Can, *Flibanserin'in farmasötik preparatlardan tayini için hplc yönteminin geliştirilmesi ve bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile karakterizasyonu*, XVI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Ankara, Türkiye.

- 2019, *Poster bildiri*, Aysun Geven, Saniye Özcan, Serkan Levent, Nafiz Öncü Can, *Development of a new method for quantitative determination of lesinurad with HPLC in the presence of its degradation products*, Euroanalysis XX, İstanbul, Türkiye.
- 2019, Levent,S., Ozcan,S., Geven,A., Ozkay,Y., Can,NO., *Novel stability indicating LC methods for determination of tasimelteon*, Pharmaceutical chemistry conference, Amsterdam, Netherlands.
- 2019, Saniye ÖZCAN, Nazlı TURAN YÜCEL, Murat KOZANLI, Aysun GEVEN, *Effects of reboxetine on alterations of brain monoamine levels in diabetic rats*, 11th International Psychopharmacology Conference, Antalya, Türkiye.
- 2018, Ozcan,S., Levent,S., Geven, A., Can, NO., *A novel GC-MS method for simultaneous determination of seven paraben derivatives in pharmaceutical and cosmetic products consumed in Turkey*, 22th International Mass Spectrometry Conference, Florence, Italy.
- 2018, *Poster bildiri*, Geven, A., Ozcan, S., Levent, S., Can, NO., *Development and validation of a new hplc method for quantitative estimation of ceftiofur in veterinary suspensions*, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Türkiye.

Araştırma Projeleri

- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Piyasaya Yeni Sürülmüş İlaç Etken Maddelerinin Bozunma Ürünleri Varlığında Kantitatif Tayini ve Farmasötik Preparatlarının Analizi, 2020-2022.
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Gliserol fenil bütiratın sıvı kromatografisindeki ayırımına etki eden parametrelerinin incelenmesi, 2020-2021.
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Flibanserin Farmasötik Preparatlardan Tayini İçin HPLC ve LC-MS/MS Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Bozunma Ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile Karakterizasyonu, 2019-2020.
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Kozmetik Ürünlerde CI 45100 Bileşiğinin Miktar Tayini, 2019 -2020.
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Seftiofurun Süt Ürünlerinde Tayininde Matris Etkisinin İncelenmesi, 2019-2020
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Bazı Biyojenik Aminlerin ve Metabolitlerinin Yeni Nesil Kolon Tipleri Kullanılarak UPLC-ECD ile Analizi Üzerine Çalışmalar, 2018 –2019.

- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Yeni Piyasaya Sürülmüş Bazı İlaç Etken Maddelerinin Çeşitli Analitik Tekniklerle Karakterizasyonu ve Miktar Tayini Üzerine Çalışmalar, 2016 –2019.
- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Yeni Piyasaya Sürülmüş Bazı Aktif Farmasötik Bileşenlerin, Metabolitlerinin ve Bozunma Ürünlerinin Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar, 2016 –2019.

