



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ
YÖNTEMİ İLE APREPİTANT VE TAMOKSİFENİN
EŞZAMANLI TAYİNLERİ VE METOT VALİDASYONU**

GİZEM KUNAL ŞALLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Serap KARADERİ

2020-İSTANBUL

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program türü : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans
Tez Sahibi : Gizem KUNAL ŞALLI
Sınav Tarihi ve Saati : 03/02 /2020 , Saat 11:00
Tez Başlığı : Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Yöntemi İle
Aprepitant Ve Tamoksifenin Eşzamanlı Tayinleri Ve Metot Validasyonu

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvan, Adı-Soyadı (Kurum Adı)	İmza
Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Serap KARADERİ Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD	
Üye	Doç.Dr.Üyesi Dilek Bilgiç ALKAYA Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Duygu TAŞKIN Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD	

ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun19.02.2020.....tarih ve85.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

Gizem KUNAL ŞALLI

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, öneri ve desteğini hiç esirgemeyen, beni bilimsel anlamda yetiştiren değerli hocam Dr. Filiz ARIÖZ 'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca tüm desteklerinden dolayı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap KARADERİ'ye, tezin laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Nuray Yüктаş ve Prof. Dr. Türkan Yurdun'a, lisans ve lisans üstü eğitimim süresince bana emeği geçen değerli hocalarıma, ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, eşime ve desteklerinden dolayı arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Gizem KUNAL ŞALLI

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3.1. Giriş	3
3.2. Amaç	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. Aprepitant.....	4
4.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri	4
4.1.2. Farmakolojik özellikleri	4
4.1.3. Aprepitantın analiz çalışmaları	5
4.2. Tamoksifen	6
4.2.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri	6
4.2.2. Farmakolojik özellikleri	6
4.2.3. TMX'in analiz çalışmaları	7
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	8
5.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler	8
5.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	8
5.3. Çözeltiler	8
5.3.1. APT stok çözeltisi.....	8
5.5. Metot validasyonu	11
5.5.2. Doğrusallık.....	11
5.5.3. Tayin edilebilme sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD)	11
5.5.4. Kesinlik (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik)	11
5.5.5. İlaç etkin madde çözeltilerinin farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları	12
5.5.6. Doğruluk (Geri Kazanım).....	12
5.5.7. Yöntemin sağlamlığı	12
6. BULGULAR.....	13
6.1.Cihaz Optimizasyonun Belirlenmesi	13
6.1.1 Pozitif mod ve negatif mod değişiklikleri	16

6.1.2. Dedektör voltajı değişiklikleri	16
6.1.3 Quarray DC Parametresi Değişiklikleri.....	19
6.1.4. Püskürtme gazı (nebulizing gas) ve kurutma gazı (drying gas) parametreleri değişiklikleri	21
6.2.Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	24
6.2.1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının ve hareketli fazın pH'sinin belirlenmesi.....	24
6.2.2. Sabit fazın (kolonun) belirlenmesi.....	26
6.3. Metot Validasyonu	28
6.3.1. Seçicilik	28
6.3.4. Kesinlik (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik)	33
6.3.5. İlaç etkin madde çözeltilerinin farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları	33
6.3.6. Doğruluk (geri kazanım)	34
6.3.7. Yöntemin sağlamlığı	34
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
8.KAYNAKLAR	38
9. ÖZGEÇMİŞ	41

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

APT	: Aprepitant
A	: Pik Alanı
C	: Konsantrasyon
FDA	: The Food and Drug Administration
hf	: Hareketli faz
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
$\mu\text{g/mL}$	: Mikrogram / mililitre
ppm	: milyonda bir birim (mg çözünen / kg veya litre çözelti)
RSD	: Bağlı standart sapma
SD	: Standart sapma
TMX	: Tamoksifen
t_R	: Alıkonma zamanı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Aprepitantın açık kimyasal formülü.....	4
Şekil 2. Tamoksifenin açık kimyasal formülü.....	6
Şekil 3. Aprepitant ($m/z = 535,20$) ve Tamoksifenin ($m/z = 372,15$) MS spektrumları.....	13
Şekil 4. 10 ppm kolonsuz TMX SCAN taraması kromatogramı.....	13
Şekil 5. 1,0 ppm kolonlu TMX SCAN taraması kromatogramı.....	14
Şekil 6. 1,0 ppm kolonsuz APT SCAN taraması kromatogramı.....	14
Şekil 7. 10 ppm kolonlu APT SCAN taraması kromatogramı.....	15
Şekil 8. 1,0 ppm kolonlu APT (I) –TMX (II) karışımının SCAN taraması kromatogramı.....	15
Şekil 9. Negatif modda APT ve TMX spekturumu.....	16
Şekil 10. Pozitif modda APT ve TMX spekturumu	16
Şekil 11. Dedektör Voltajı : 1,1 iken APT ve TMX kromatogramı.....	17
Şekil 12. Dedektör Voltajı : 1,2 iken APT ve TMX kromatogramı.....	17
Şekil 13. Dedektör Voltajı : 1,25 iken APT ve TMX kromatogramı.....	18
Şekil 14. Dedektör Voltajı : 1,3 iken APT ve TMX kromatogramı.....	18
Şekil 15. Dedektör Voltajı : 1,35 iken APT ve TMX kromatogramı.....	19
Şekil 16. Quarray DC : -5 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	19
Şekil 17. Quarray DC : -6 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	20
Şekil 18. Quarray DC : +6 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	20
Şekil 19. Quarray DC : +5 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı	21
Şekil 20 Püskürtme gazı: 1 mL/ dak. Kurutma gazı: 10 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	22
Şekil 21. Püskürtme gazı: 1 mL/ dak., Kurutma gazı: 15 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	22
Şekil 22. Püskürtme gazı: 1,5 mL/ dak. Kurutma gazı: 10 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı	23
Şekil 23. Püskürtme gazı: 1,5 mL/ dak. Kurutma gazı: 15 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı.....	23

Şekil 24. pH=2,72’de 0,1 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çözeltisi ile) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak).....	24
Şekil 25. pH=2,52’de 0,10 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çözeltisi ile) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak.)	25
Şekil 26. pH=2,62’de 0,10 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çözeltisi ile) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak.).....	25
Şekil 27. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı=0,5 mL/dak., İnertsil-C18(50×2,1)3 µm).....	27
Şekil 28. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çöz.) 50/50(h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., Athena-C8(50 ×2,1)3 µm).....	27
Şekil 29. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., Athena-C8(100 ×2,1)3 µm).....	28
Şekil 30. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (pH=2,62 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak., Athena-C8(100 ×4,6)3 µm).....	28
Şekil 31. Hareketli faz (50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, pH=2,52) kromatogramı.....	29
Şekil 32. APT’nin 0,0025-1,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	32
Şekil 33. TMX’in 0,0031-0,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	32

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre TMX ve APT'nin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi.....	24
Tablo 2. TMX ve APT'nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları	26
Tablo 3. TMX ve APT'nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları.....	26
Tablo 4. APT ve TMX'in farklı kolonlardaki alıkonma zamanları.....	26
Tablo 5. APT'nin 0,0025-1,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait Alan değerleri ve istatistik veriler	30
Tablo 6. APT'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları.....	31
Tablo 7. TMX'nin 0,0031- 0,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait alan değerleri ve istatistik veriler.....	32
Tablo 8. TMX'in ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları.....	32
Tablo 9. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği.....	33
Tablo 10. APT ve TMX'in doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları	34
Tablo 11. Yöntemin sağlamlık parametreleri (pH'de yapılan küçük değişiklikler)....	34
Tablo 12. Yöntemin sağlamlık parametreleri (kolon sıcaklığı ve akış hızında	35
Tablo 13. Sistem uygunluk testi parametreleri.....	35

1. ÖZET

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Yöntemi İle Aprepitant ve Tamoksifenin Eşzamanlı Tayinleri ve Metot Validasyonu

Öğrencinin Adı : Gizem KUNAL ŞALLI

Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Serap KARADERİ

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Amaç: Bu çalışmanın amacı özellikle meme kanserinin tedavisinde kullanılan tamoksifen (TMX) ve kemoterapiye bağlı bulantı ve kusma şikayetlerinin giderilmesinde kullanılan aprepitant (APT) isimli ilaç etken maddelerinin bir arada analizleri için seçici, duyarlı, düşük tespit ve tayin sınırlı, hızlı, basit, ekonomik, çevreci bir analitik metot geliştirmek ve geliştirilen bu metodu valide etmektir. Bu amaçla önemli avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi cihazıyla çalışılmış yeni ve valide bir analitik metot geliştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Geliştirilen metotta, C₁₈ (20 mm x 2,0 mm, 5µm) ön kolon ve C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm) analitik kolon sabit fazı ve pH'si 2,52 (formik asit çöz.) asetronitril/su, 50/50 (h/h) karışımı hareketli fazı ile 0,5 mL/dak. akış hızında çalışıldı.

Bulgular: TMX ve APT için alıkonma zamanları sırasıyla 1,58 ve 2,10 dak. olarak bulunurken, aynı sırayla LOD değerleri 0,012 µg/ mL ve 0,00250 µg/mL ve LOQ değerleri 0,0037 µg/mL ve 0,070 µg/mL, doğrusal konsantrasyon aralıkları ise TMX için 0,0031-0,50 µg/ mL ve APT için 0,025-1,00 µg/mL olarak bulunmuştur. Geri kazanımın yüksek, doğruluk ve kesinliğin iyi olduğu görülmüştür.

Tartışma: Geliştirilen ve valide edilen bu metot seçici, hassas, kolay, hızlı ve tekrarlanabilir bir metottur. Her iki etkin maddenin ayrı ayrı ve birarada ilaç formülasyonlarından ve biyolojik materyalden analizlerinde güvenle kullanılabilir.

Anahtar Sözcükler: Aprepitant, tamoksifen, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi, eşzamanlı tayin.

2. SUMMARY

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique for Simultaneous Determination of Aprepitant and Tamoxifen and Method Validation

Student' s Name : Gizem KUNAL ŞALLI

Supervisor : Asst. Prof. Serap KARADERİ

Department : Analytical Chemistry

Objective: The aim of this study was to study TMX, which is used especially in the treatment of breast cancer and selective, sensitive, low-level, for a combination of APT drug active substances used to relieve chemotherapy-related nausea and vomiting complaints to develop a limited, fast, simple, economical, environmentally analytical method and to validate this method developed. For this aim, a new and valid analytical method has been developed with the widely used liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) device.

Material and methods :This method was carried out using guard column C₁₈ (20 mm x 2,0 mm, 5µm) and analytical column C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm) as stationary phase and a mobile phase composing of acetonitrile and water containing (50/50 pH=2,52) (formic acid), v/v) The flow rate was 0,5 mL/min monitored.

Results: The retention times of TMX and APT were 1,58 min, 2,10 min, LOD values were 0,012 µg/mL, 0,0025 µg/mL and LOQ values were 0,0012 µg/mL, 0,07 µg/mL, the linear ranges were 0,0031-0,50 µg/ mL and 0,025-1,00 µg/mL, respectively. The recovery, accuracy and precision values were acceptable.

Conclusion: This method has been a simple, sensitive, rapid and can be used for the analysis of TMX and APT in pharmaceutical forms and biological materials.

Keywords: Aprepitant, tamoxifen, liquid chromatography-mass spectrometry, simultaneous determination.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3.1. Giriş

APT özellikle kanser hastalarında kemoterapiye bağı bulantı-kusma şikayetlerinin giderilmesi için kullanılan nörokinin inhibitörü antiemetik bir ilaç etkin maddesidir (Gralla ve Ark, 2005). TMX ise meme kanserinde yaygın olarak kullanılan bir non-steroid, anti-östrojen ilaçtır.

Literatürde bu iki etkin maddenin ayrı ayrı biyolojik materyal ve ilaç formülasyonlarından analizi için geliştirilen analitik metotlar mevcuttur ancak bir arada (eşzamanlı) analizleri için herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3.2. Amaç

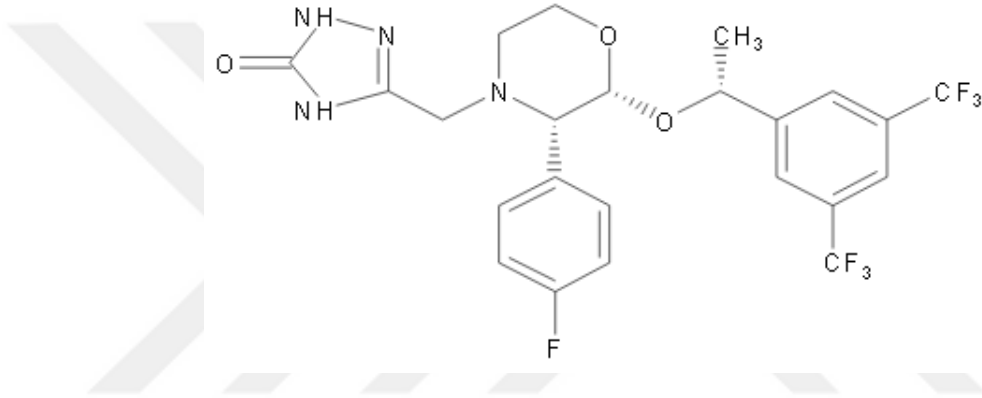
Bu çalışmanın amacı özellikle meme kanserinin tedavisinde kullanılan TMX ve kemoterapiye bağı bulantı ve kusma şikayetlerinin giderilmesinde kullanılan APT isimli ilaç etken maddelerinin eşzamanlı analizleri için seçici, duyarlı, düşük tespit ve tayin sınırlı, hızlı, basit, ekonomik, çevreci bir analitik metot geliştirmek ve geliştirilen bu metodu valide etmektir. Bu amaçla önemli avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) cihazıyla çalışılmış yeni ve valide bir analitik metot geliştirilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Aprepitant

APT insanda NK-1 reseptörlerine yüksek afiniteli antagonist bir moleküldür ve ilgili bölgelerdeki NK-1 reseptörlerini inhibe ederek kemoterapiye bağlı bulantı-kusma tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hesketh vd., 2003, Poli-bigelli vd., 2003, Rojas vd., 2014).

4.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 1. APT'nin açık kimyasal formülü

Kimyasal adı 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis (triflorometil) fenil] etoksi]-3-(4-florofenil)-4-mor-folinil] metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on olan APTın kapalı formülü $C_{23}H_{21}F_7N_4O_3$ olup molekül ağırlığı 534,43 g/mol, rengi kirli beyazdır. APT suda çözünmezken, etanol, izopropil asetat ve asetonitrilde az çözünür (https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/e/emend/emend_pi.pdf. Erişim Tarihi: 04 Ocak 2020).

4.1.2. Farmakolojik özellikleri

APT, insanda P maddesi nörokinin 1 (NK1) reseptörlerinin selektif, yüksek afiniteli bir antagonistidir. APT doğrusal olmayan farmakokinetik özellik göstermektedir. APT'nin ortalama oral biyoyararlanımı 80 mg kapsül için % 67 ve 125 mg kapsül için % 59'dur Dozun artırılması ile hem klerens hem de mutlak biyoyararlanım azalır.

APTnin ortalama maksimum plazma konsantrasyonuna (C_{max}) yaklaşık 4 saatte (t_{max}) ulaşılır.

APT geniş ölçüde metabolize olur. APT'nin plazma hacmi yaklaşık 60-72 ml/dak arasındadır. Terminal yarılanma ömrü yaklaşık 9-13 saat arasında değişir Metabolitleri idrarla ve safra yoluyla atılır. Değişmemiş ilaç böbrekler yoluyla atılmaz. (https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/e/emend/emend_pi.pdf Erişim : 04 Ocak 2020).

4.1.3. Aprepitantın analiz çalışmaları

Chaitanya ve arkadaşları, RP-HPLC C18 kolon, 50:50 (h/h) asetonitril ve tampon çözeltiden oluşan hareketli faz ile 1ml/dak. akış hızında, 210 nm dalgaboyunda APT'nin ilaç formülasyonunda tayinini yapmışlar ve alıkonma zamanını 4,86 dak., LOD ve LOQ değerlerini 0,28 µg/ml ve 0,84 µg/ml olarak bulunmuşlardır (Chaitanya ve ark., 2013).

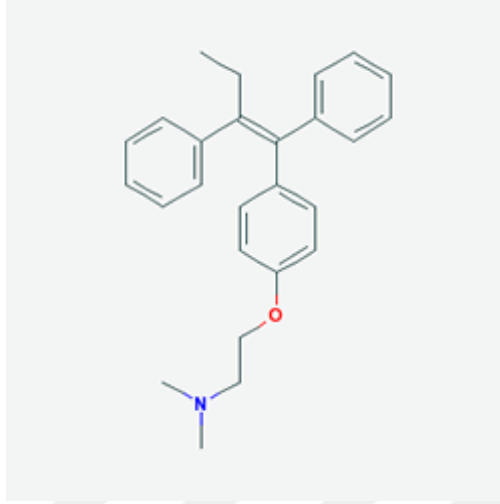
Ravi Prakash ve arkadaşları, LC-MS/MS, C18 kolon, 10:90 (h/h) amonyum asetat ve asetonitril hareketli fazı ile 0,9 ml/dak. akış hızında, APT'nin insan kanında tayinini yapmışlar, alıkonma zamanı 1,55 dak. ve konsantrasyon aralığı 10.004-5001.952 ng/ml olarak bulunmuşlardır (Ravi Prakash ve ark., 2013).

Chavez-Eng ve arkadaşları, LC-MS/MS, C8 kolon, 40:60 (h/h) asetonitril ve sudan oluşan hareketli faz ile, 0,5ml/dak. akış hızında, APT'nin ve iki metabolitinin insan kanında eş zamanlı tayinini yapmışlar doğrusal konsantrasyon aralıklarını 1. ve 2. metaboliti için sırasıyla 10–5000 ng/ml, 25–5000 ng/ml, LOQ değerlerini ise aynı sıra 10 ng/ml, and 25 ng/ml olarak bulmuşlardır (Chavez-Eng ve ark., 2004).

Sinha ve arkadaşları, HPLC-MS, RP-18 kolon, 970:40:4:0.5 (h/h/h) n-hekzan, izopropilalkol, metanol, trifloroasetikasit hareketli fazı ile, 0,5 ml/dak. akış hızı ve 210 nm dalga boyunda APT ve sekiz izomerinin ters ve normal faz HPLC ile tayinini yapmışlar LOD ve LOQ değerleri 0,14 µg/ml ve 0,41 µg/ml olarak bulmuşlardır (Sinha ve ark., 2013).

4.2. Tamoksifen

4.2.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri



Şekil 2. TMX'in açık kimyasal formülü

Kimyasal adı (Z) -2- [4- (1,2-Difenil-1-bütenil) fenoksi] -N, N-dimetil-etanamin-sitrat; 1-p-beta-Dimetilaminoetoksifenil-trans-1,2-difenilbüt-1-en sitrat olan TMX'in kapalı formülü $C_{26}H_{29}NO.C_6H_8O_7$ olup molekül ağırlığı 563,64 g/mol, rengi beyazdır. TMX suda az çözünür.

4.2.2. Farmakolojik özellikleri

TMX oral yolla kullanılabilen, seçici östrojen modülatörüdür. TMX östrojen karşıtı ve farklı dokularda östrojen karşıtına benzer etkileri olan non-steroidal, trifeniletilen yapısında ilaçtır. Meme kanserli hastalarda tümör seviyesinde östrojenin östrojen reseptörüne bağlanmasını önler.

TMX'in plazma seviyeleri bifazik (iki evreli) ve terminal yarı-ömrü yaklaşık 5 ila 7 gündür. Oral alım sonrası metabolize olur. N-desmetil tamoksinin plazmada bulunan en temel metabolitidir ve TMXe benzer biyolojik aktiviyete sahiptir. TMX hızlı absorbe olur ve 4-7 saat arasında maksimum konsantrasyonuna ulaşır. (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/021807s005lbl.pdf Erişim: 04 Ocak 2020).

4.2.3. TMX'in analiz çalışmaları

Antunes ve arkadaşları, sıvı sıvı ekstraksiyonu ile analize hazırladıkları insan kanı örneklerinde, HPLC, RP-18 kolon ve pH=3.3, 57:43 (h/h) trietilamonyum fosfat tamponu-asetonitril karışımından oluşan hareketli fazı kullanarak TMX ve metabolitlerinin tayinini yapmışlar ve TMX için tayin konsantrasyonunu 55,77 ng/ ml, alıkonma zamanını 13,5 dakika olarak bulmuşlardır (Antunes ve ark., 2013).

Binkhorst ve arkadaşları, sıvı kromatografi/üçlü-kuadrüpol kütle spektrometresi ve C18 1,7 µm 2.1 mm×100 mm kolon ile 0.2mM amonyum format çözeltisi ve asetonitril, (her iki çözücü içine 0.1% formik asit ilave edilmiş) hareketli fazında, 0,3 mL/ dak. akış hızında, insan kanında TMX ve metabolitlerinin tayinini yapmışlar ve TMX için tayin konsantrasyonunu 0,187 ng/ ml, alıkonma zamanını 1,78 dak. olarak bulmuşlardır (Binkhors ve ark., 2011).

Jager ve arkadaşları, LC/MS MS kullanarak TMX ve metabolitleri için iki metodun karşılaştırmasını yapmışlar ve karşılaştırdıkları her iki metodunda kullanılabilir olduğunu bulmuşlardır (Jager ve ark., 2012).

Shahbaz ve arkadaşları, HPLC, asetonitril ve 0,05 M amonyum fosfat tamponu 75: 25 (h/h) hareketli fazı ile, 35-65 yaş aralığı kadın hastaların kanında TMX'in maksimum konsantrasyon değerini $32 \pm 0,44$ ng/ ml olarak (6. saat) bulmuşlardır (Shahbaz ve ark., 2016).

Sri Teguh ve arkadaşları, sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrofotometresi ve C18 (100 mm×2.1 mm x 1.7 µm) kolon ile 40°C kolon sıcaklığı, %0,2 formik asitli asetonitril-su (70:30 h/h) karışımından oluşan hareketli faz ve 0,2 mL/ dak. akış hızında 30 adet beyaz dişi sıçan kanından TMX ve metaboliti olan 4-Hidroksitamoksifenin kinetik analizini yapmışlardır (Sri Teguh ve ark., 2018).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Gereçler

- LCMS Cihazı (Shimadzu-2020)
 - Pompa Sistemi (LC-20AD)
 - UV/Vis Dedektör (SPD-20A)
 - Otomatik Örnekleyici (SIL-20ACHT)
 - Kolon fırını (CTO-10ASVP)
 - Gaz Giderme Ünitesi (DGU-20A3R)
 - Yazılım versiyonu (Lab Solutions)
 - Analitik kolon Athena, C₁₈ (50 mm x 2,1 mm x 3µm)
 - Ön Kolon Athena, C₁₈ (20 mm x 4,0 mm x 5µm)
- pH metre (Mettler Toledo, MP 220)
- Terazı (Shimadzu, AEX-200G)
- Ultra Saf Su Cihazı (Millipore, Milli-Q-RG)
- Otomatik pipetler (Nichipet EX II)

5.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

APT (Merck), TMX (USP), asetonitril, metanol, formik asit HPLC Grade (Merck) ve bidistile su kullanılmıştır.

5.3. Çözeltiler

5.3.1. APT stok çözeltisi

1,00 mg/mL ($1,87 \times 10^{-3}$ M) stok APT çözeltisi asetonitril kullanılarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden asetonitril ile 0,10 ve 0,01 mg/mL'lik seyreltmeler yapıldı. Çözeltiler +4°C'de saklandı.

5.3.2. TMX stok çözeltisi

1,00 mg/mL ($2,7 \times 10^{-3}$ M) stok TMX çözeltisi metanol kullanılarak hazırlandı. Bu stok çözeltiden metanol ile 0,05 ve 0,01 mg/mL konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çözeltiler +4°C'de saklandı.

5.4. Analitik Metot Geliştirme Çalışmaları

5.4.1 Cihaz optimizasyonu

APT ve TMX için kütle/ yük (m/z) oranlarının literatür ışığında çalışılan cihazda da tespiti için 10 ppm konsantrasyonda kolonsuz ve 1 ppm konsantrasyonda kolonlu SCAN modunda kromatogramlar alındı. Alınan kromatogramlar Bölüm 6.1’de verilmiştir.

5.4.1.1 Pozitif mod ve negatif mod değişiklikleri

APT ve TMX için negatif ve pozitif modda yapılan değişiklikler Bölüm 6.1.1’de verilmiştir.

5.4.1.2 Dedektör voltajı değişiklikleri

APT ve TMX için m/z (TMX = 372,15 APT = 535,2), pozitif modda Quarray RF = 52 ve Quarray DC = -5 iken dedektör voltajı değeri 1,1, 1,2, 1,25, 1,30 ve 1,35 olacak şekilde değiştirildi ve kromatogramları alındı. Alınan kromatogramlar Bölüm 6.1.2’de verilmiştir.

5.4.1.3 Quarray DC parametresi değişiklikleri

APT ve TMX için optimizasyon koşulu olarak belirlenmiş pozitif modda Quarray RF, Quarray DC değeri için -6, +6, -5 ve +5 değişiklikleri yapılmıştır. İlgili kromatogramlar Bölüm 6.1.3.’de verilmiştir.

5.4.1.4. Püskürtme gazı (nebulizing gas) ve kurutma gazı (drying gas) parametreleri değişiklikleri

APT ve TMX için optimizasyon koşulu olarak belirlenmiş pozitif modda Quarray RF ve Quarray DC değerleri sabit iken püskürtme gazı değeri 1,5 mL/dak. ve 1,0 mL/dak.; kurutma gazı değeri için ise 15 mL/dak. ve 10 mL/dak., değişiklikleri yapılmıştır. İlgili kromatogramlar Bölüm 6.1.4.’de verilmiştir.

5.4.2. Kromatografik koşulların belirlenmesi

5.4.2.1. Hareketli faz bileşenleri ve oranları

APT ve TMX'in analizlerine ilişkin literatür çalışmaları göz önüne alınarak hareketli faz olarak asetonitril/su, asetonitril / %0,05 formik asit, asetonitril / %0,1 formik asit, asetonitril / %0,2 formik asit (farklı pH'lerde) gibi değişik çözücü sistemleri farklı karışım oranlarında C₁₈ (50 mm x 2,1mm), 3µm başlangıç kolonu kullanılarak denendi. Hareketli faz değişimine göre maddelerin alıkonma zamanlarını gösteren Tablo-1 Bölüm 6.2.2.'de verilmiştir

5.4.2.2 pH

Hareketli fazın pH'si formik asit konsantrasyonları %0,05 (pH=2,72), %0,1 (pH=2,62) ve %0,2 (pH= 2,52) olacak şekilde ayarlanarak 50/50 (h/h) asetonitril / su karışım çözücüsü içinde hareketli faz çözeltileri hazırlandı. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre maddelerin alıkonma zamanlarını gösteren Tablo-1 Bölüm 6.2.2.'de verilmiştir.

5.4.2.3 Sabit fazın (kolonun) belirlenmesi

Farklı marka, farklı uzunluk, farklı partikül büyüklüğüne sahip dolgu materyali içeren kolonlar denenerek ayrılmanın ve analiz süresinin en uygun bulunduğu kolon tespit edildi.

5.4.2.4 Kolon sıcaklığının belirlenmesi

Kolon sıcaklığı için 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50°C'ler denendi. Alıkonma zamanlarında önemli bir değişiklik olmadığı için kolon sıcaklığı 25°C olarak seçildi.

5.4.2.5 Akış hızının belirlenmesi

Alıkonma zamanında fazla gecikmeye neden olmayacak ama iyi bir ayrılmayı sağlayacak akış hızını bulmak için çalışmalar yapıldı ve en uygun akış hızının 0,5 mL/dak. olduğu görüldü.

5.5. Metot validasyonu

Geliştirilen analitik metodun validasyonu ICH kılavuzu Q2'ye göre yapıldı. Bu kılavuza göre aşağıdaki validasyon parametreleri incelendi.

5.5.1. Seçicilik

Etkin maddelerinin ve karışımlarının çözücüleri sisteme enjekte edildi ve çözücülerden kaynaklanan bir girişimin olup olmadığı araştırıldı.

5.5.2. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığı, her iki etkin madde için 6 farklı konsantrasyonda karışım çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden tespit edildi. Bu amaçla her bir maddeden 2 şer tartım alındı, alınan tartımdan 2 şer seyreltme yapıldı. Bu çözeltilerden her bir etken madde için üçer tekrar ile 2 farklı kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve bu kalibrasyon eğrilerinin ortalaması alındı.

5.5.3. Tayin edilebilme sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD)

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 6.3.3.'de verilmiştir.

$$LOD = 3 \times SD/m$$

$$LOQ = 10 \times SD/m$$

SD : Kalibrasyon doğrusunun y eksenini

5.5.4. Kesinlik (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik)

APT için 0,05 µg/mL, 0,10 µg/mL ve 1,0 µg/mL konsantrasyonlarda, TMX için 0,005 µg/mL, 0,05 µg/ml ve 0,50 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Gün içinde farklı zamanlarda ve farklı günlerde yapılan analizler ile elde edilen sonuçlar Tablo-9 Bölüm 6.3.4.'de verilmiştir.

5.5.5. İlaç etkin madde çözeltilerinin farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları

Çözelti kararlılığını belirlemek amacıyla APT ve TMX standart çözeltileri ve her ikisinin karışım çözeltisi oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat, +4°C’de 1 ay bekletildi. Ayrıca karışım çözeltisi otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletildi.

5.5.6. Doğruluk (Geri Kazanım)

Metodun doğruluğu için yapılan çalışmada APT için 0,05 µg/mL, 0,10 µg/mL ve 1,00 µg/mL ve TMX için 0,005 µg/mL, 0,05 µg/ml ve 0,50 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin ilgili kalibrasyon eğrisinden bulunan konsantrasyonları ile geri kazanım hesaplandı, % geri kazanım sonuçları Tablo-10 Bölüm 6.3.6.’da verilmiştir.

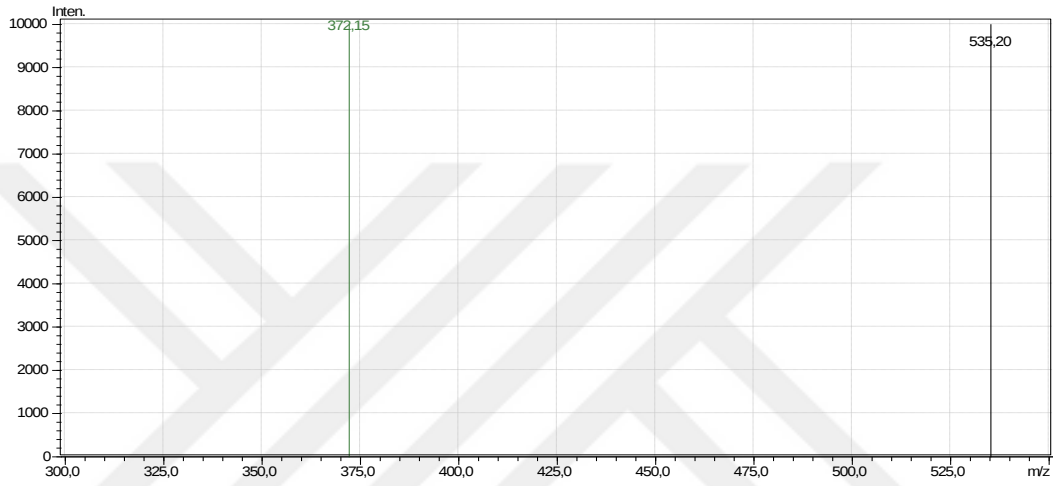
5.5.7. Yöntemin sağlamlığı

Geliştirilen metotta optimize edilen hareketli faz pH’si, hareketli faz bileşenlerinin oranları, kolon sıcaklığı ve akış hızı değerlerinde yapılan küçük değişiklikler ile yöntemin sağlamlığı araştırıldı. Sonuçları Bölüm 6.2.3.’de verilmiştir.

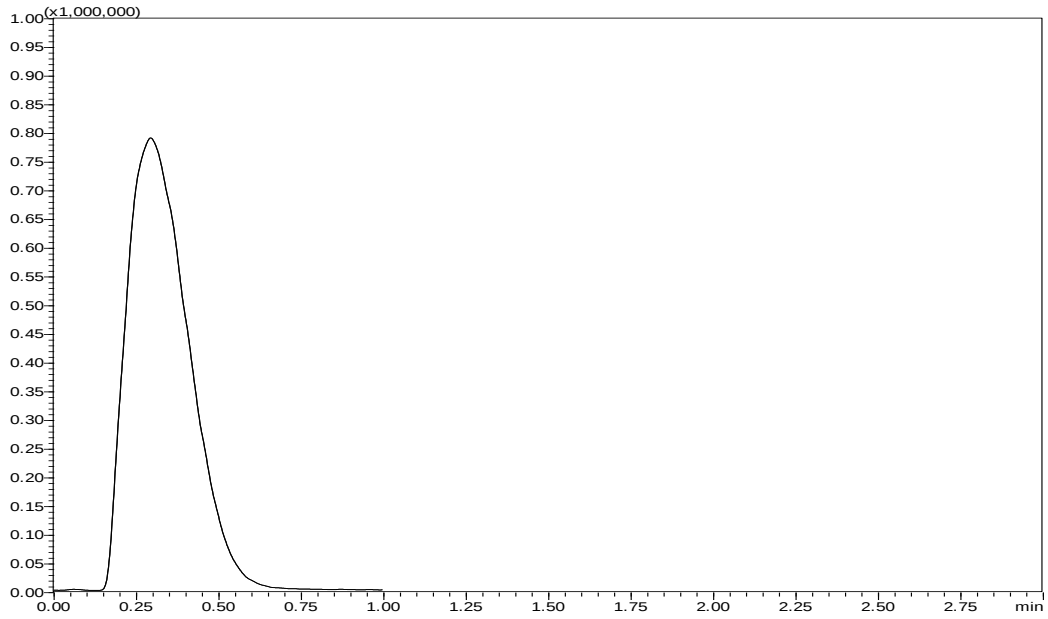
6. BULGULAR

6.1.Cihaz Optimizasyonun Belirlenmesi

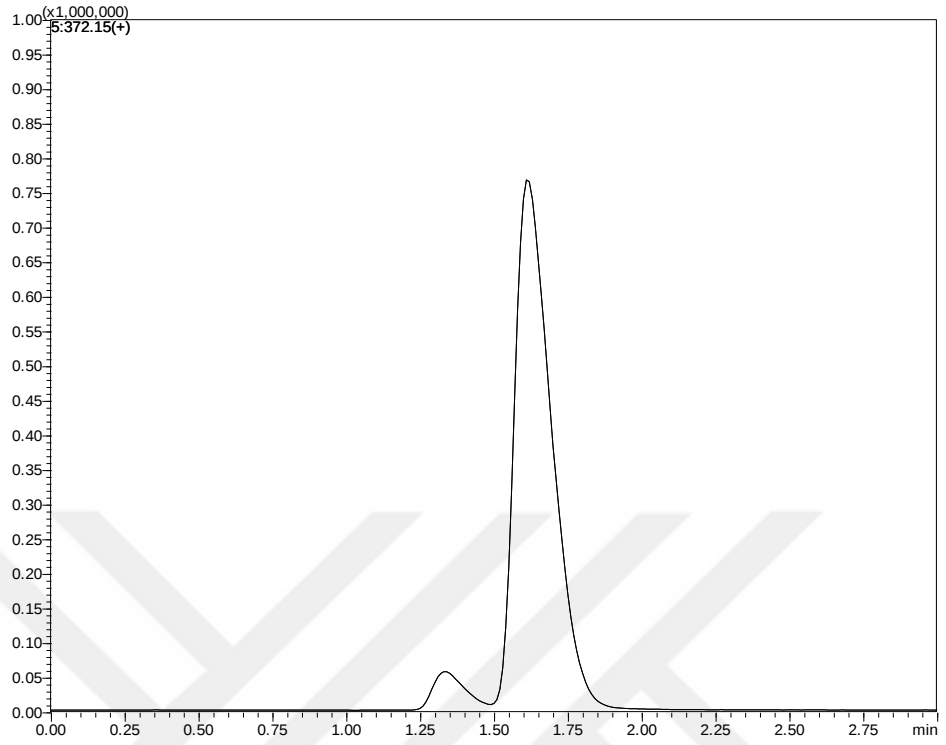
APT ve TMX için kütle/ yük (m/z) oranlarının (literatür ışığında) çalışılan cihazda da tespiti için 10,0 ppm konsantrasyonda kolonsuz ve 1,0 ppm konsantrasyonda kolonlu olarak SCAN modunda alınan kromatogramlar aşağıda verilmiştir.



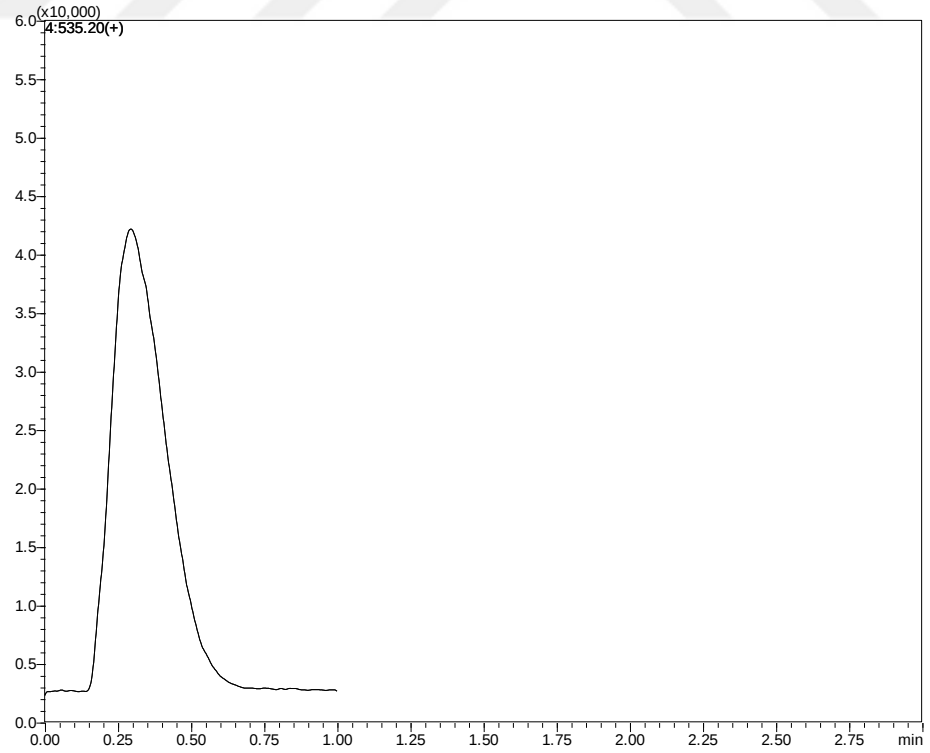
Şekil 3. APT ($m/z = 535,20$) ve TMX'in ($m/z = 372,15$) MS spektrumları



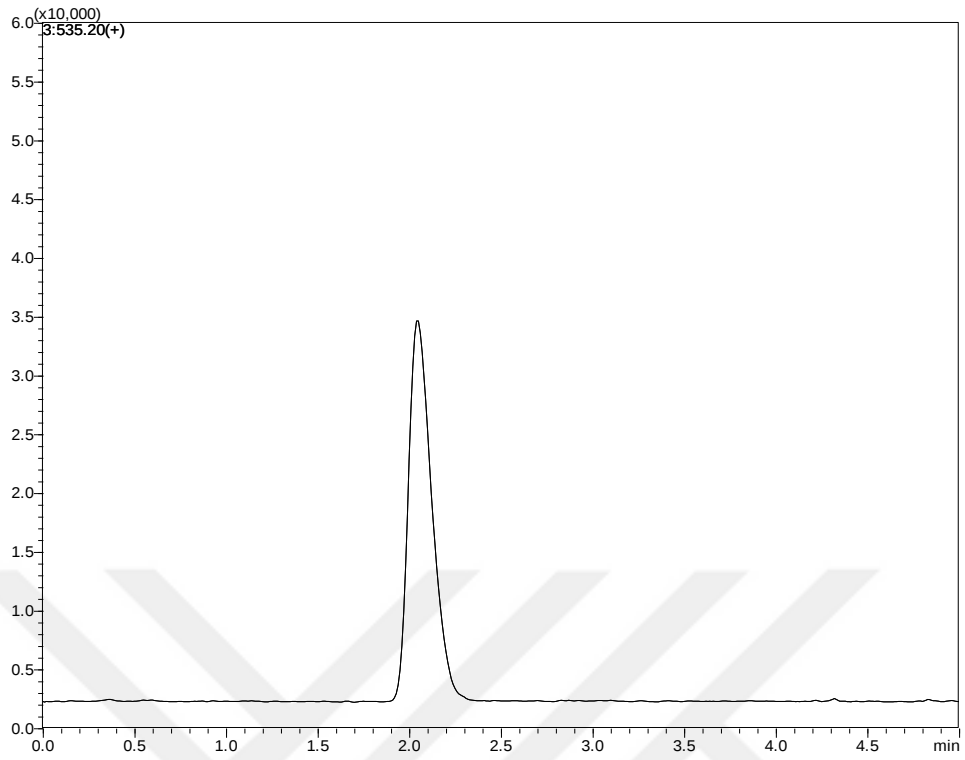
Şekil 4. 10,0 ppm kolonsuz TMX'in SCAN taraması kromatogramı



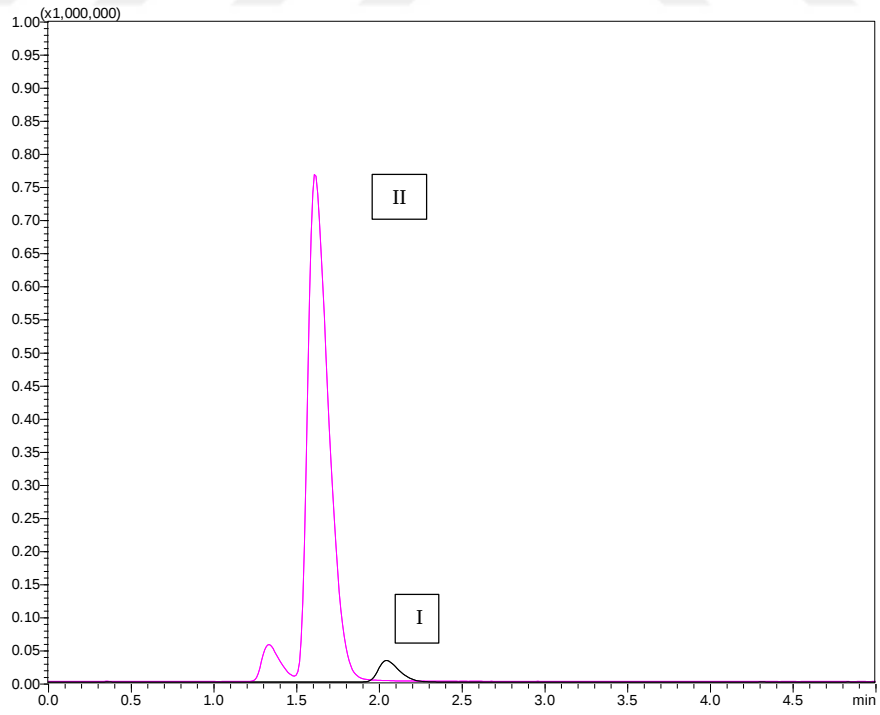
Şekil 5. 1,0 ppm kolonlu TMX'in SCAN taraması kromatogramı



Şekil 6. 1,0 ppm kolonsuz APT'nin SCAN taraması kromatogramı



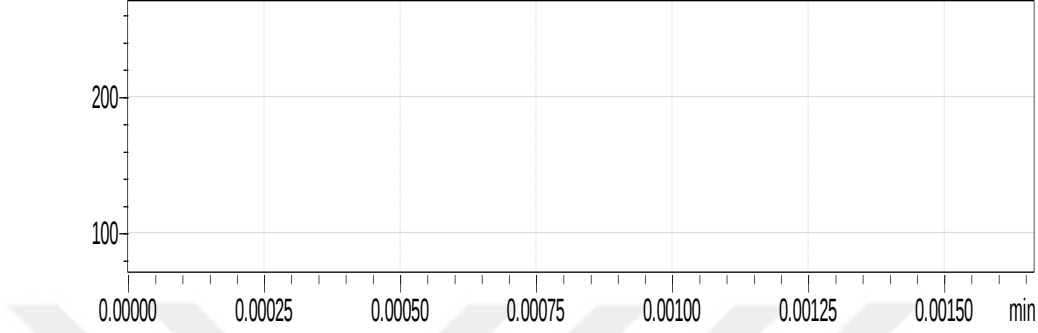
Şekil 7. 10,0 ppm kolonlu APT'nin SCAN taraması kromatogramı



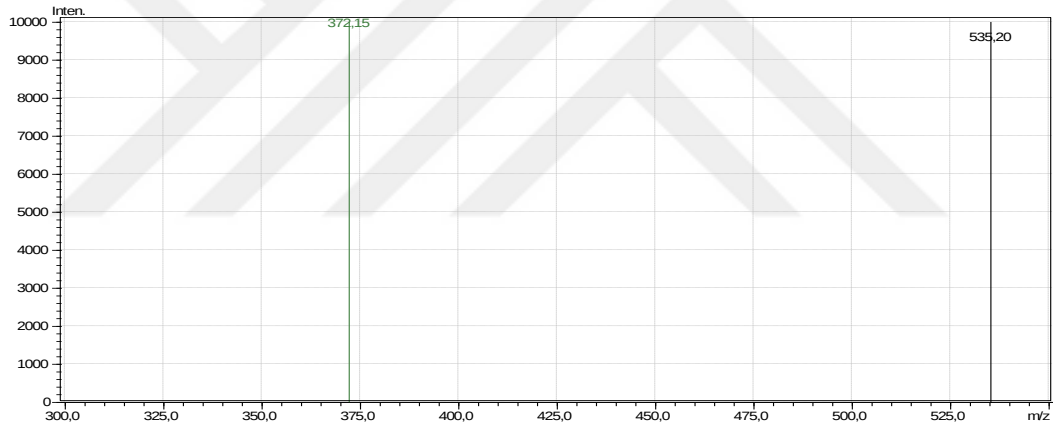
Şekil 8. 1,0 ppm kolonlu APT (I) –TMX (II) karışımının SCAN taraması kromatogramı

6.1.1 Pozitif mod ve negatif mod değişiklikleri

TMX ve APT için negatif ve pozitif modda yapılan değişiklikler sonucu elde edilen spektrumlar aşığıdaki verilmiştir.



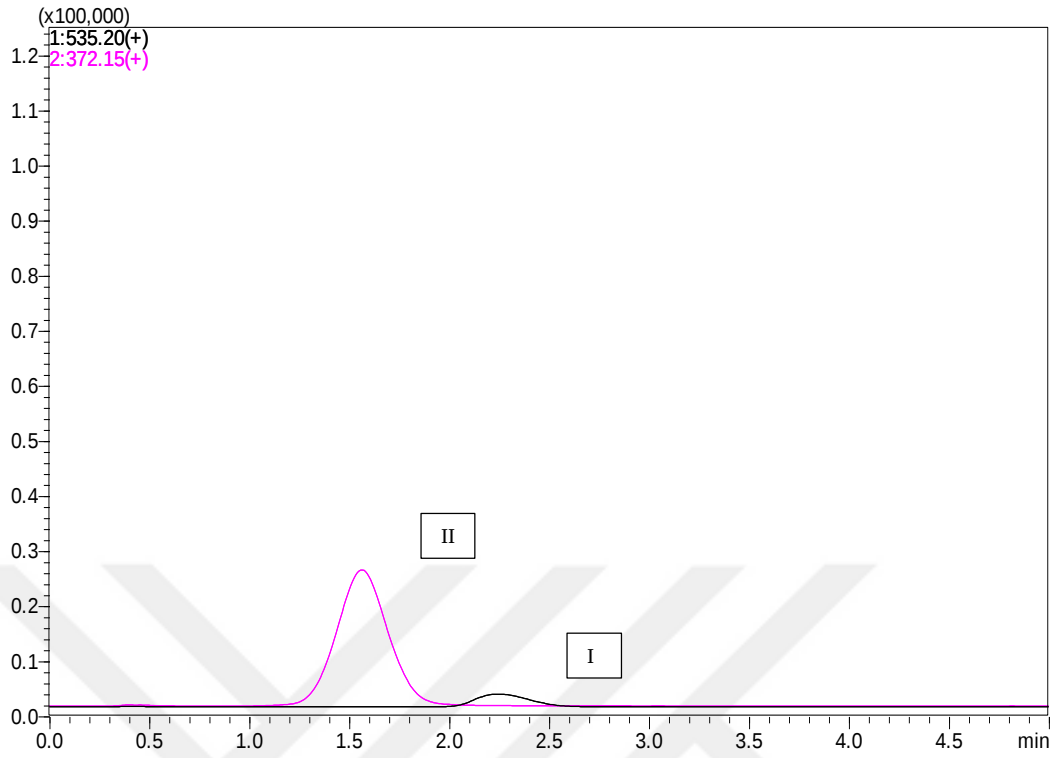
Şekil 9. Negatif modda APT ve TMX spektrumu



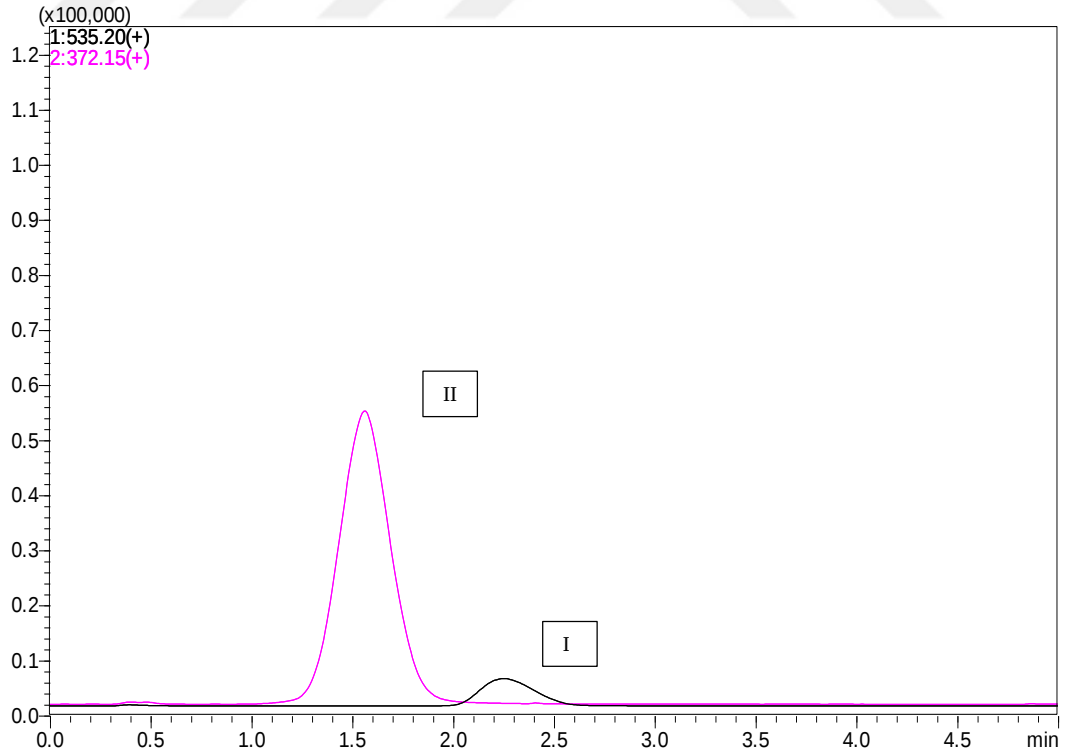
Şekil 10. Pozitif modda APT ve TMX spektrumu

6.1.2. Dedektör voltajı değişiklikleri

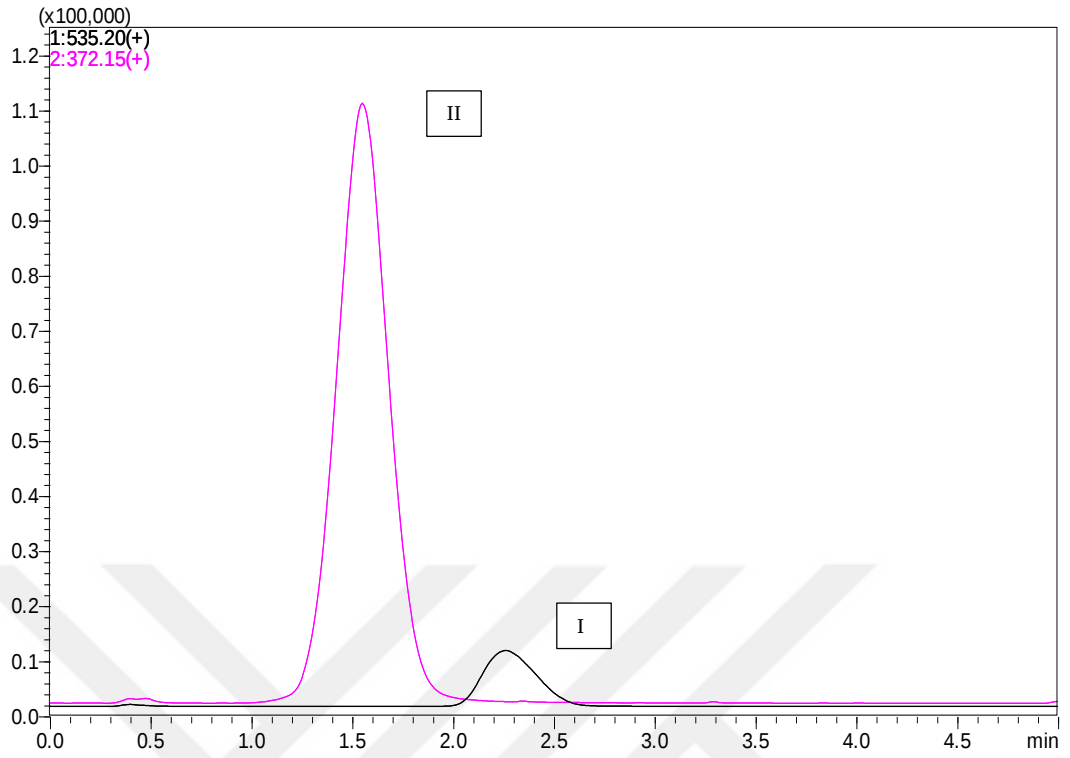
APT ve TMX için m/z (TMX = 372,15 APT = 535 2), pozitif modda Quarray RF = 52 ve Quarray DC = -5 iken yapılan voltaj değişiklikleri sonucu alınan kromatogramlar aşığıda verilmiştir.



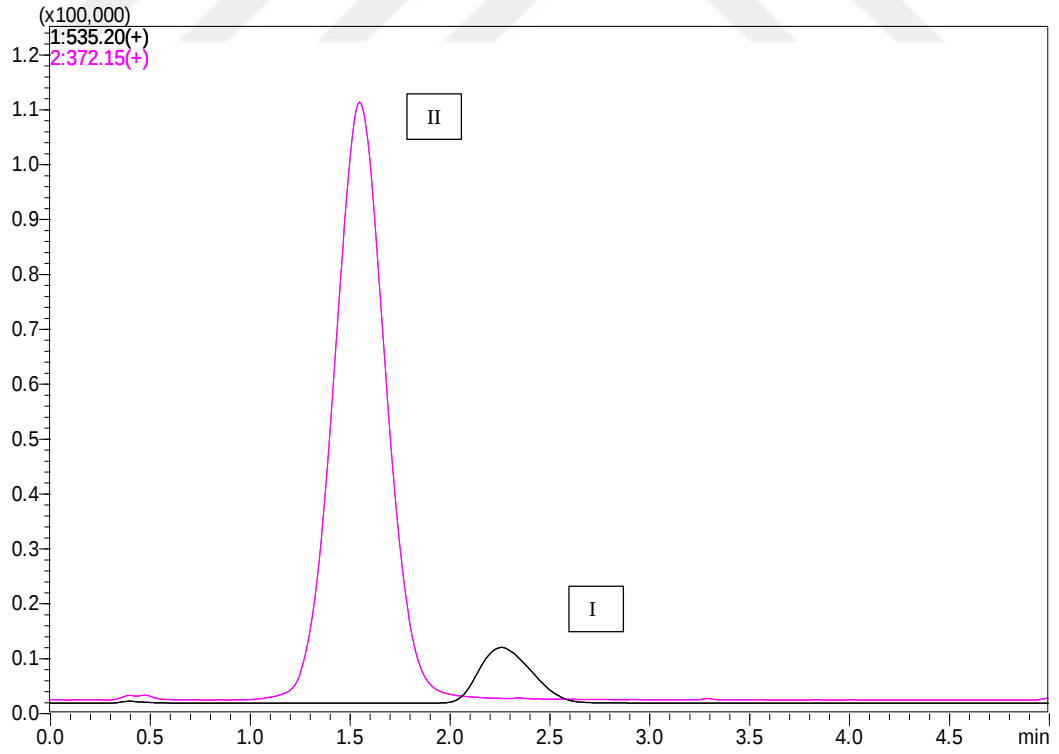
Şekil 11. Dedektör Voltajı : 1,1 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



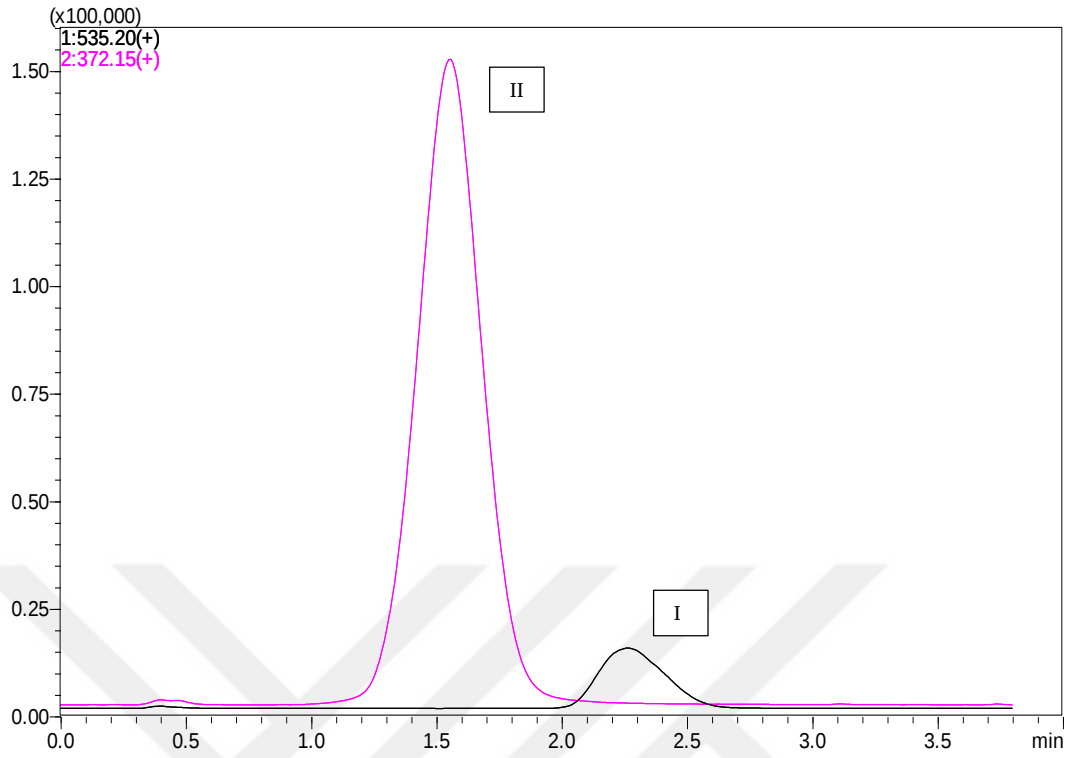
Şekil 12. Dedektör Voltajı : 1,2 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 13. Dedektör Voltajı : 1,25 iken APT (I)ve TMX /II)kromatogramı

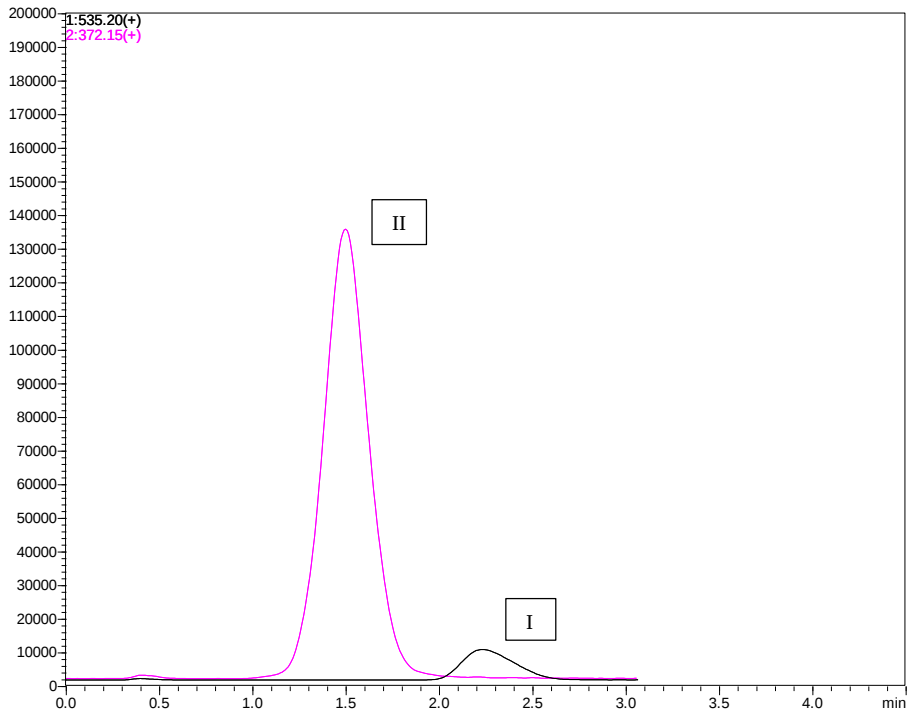


Şekil 14. Dedektör Voltajı : 1,3 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı

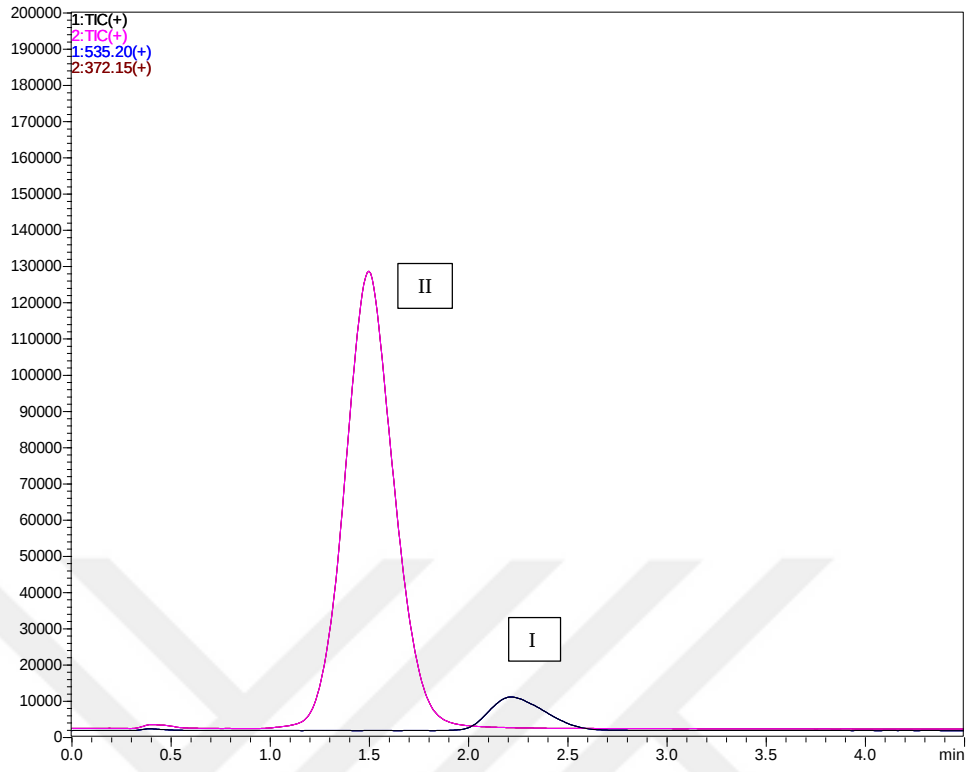


Şekil 15. Dedektör Voltajı : 1,35 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı

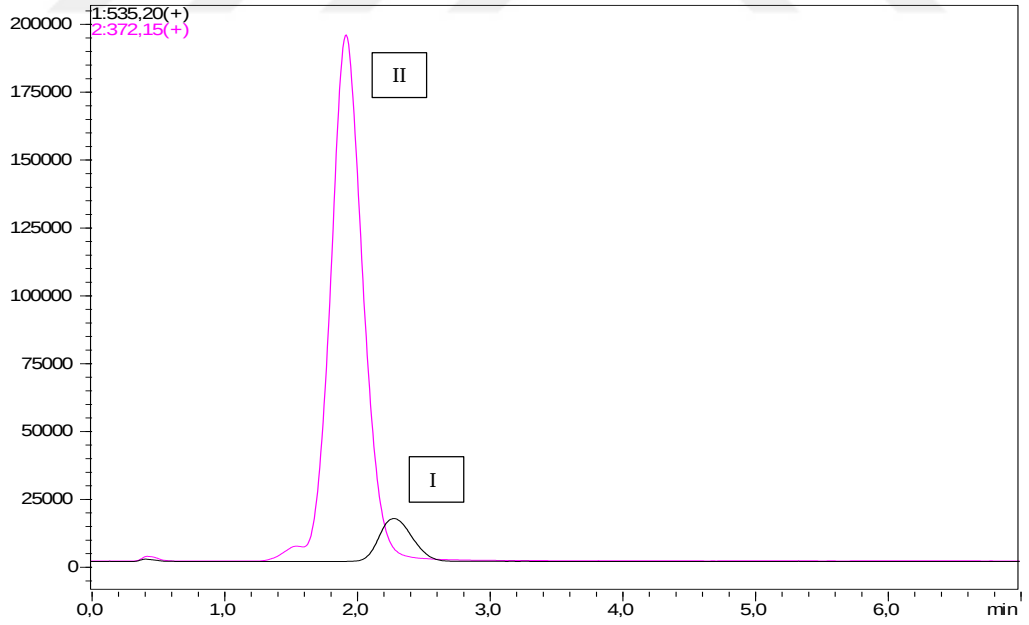
6.1.3 Quarray DC Parametresi Değişiklikleri



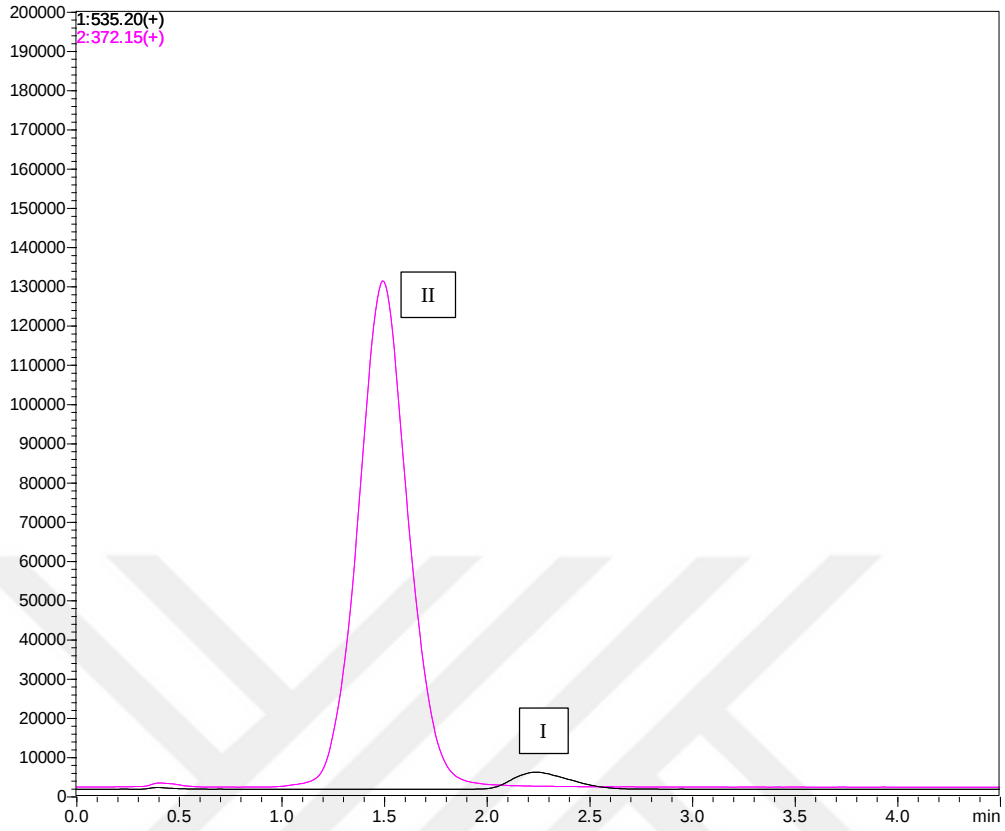
Şekil 16. Quarray DC : -5 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 17. Quarray DC : -6 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 18. Quarray DC : +6 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı

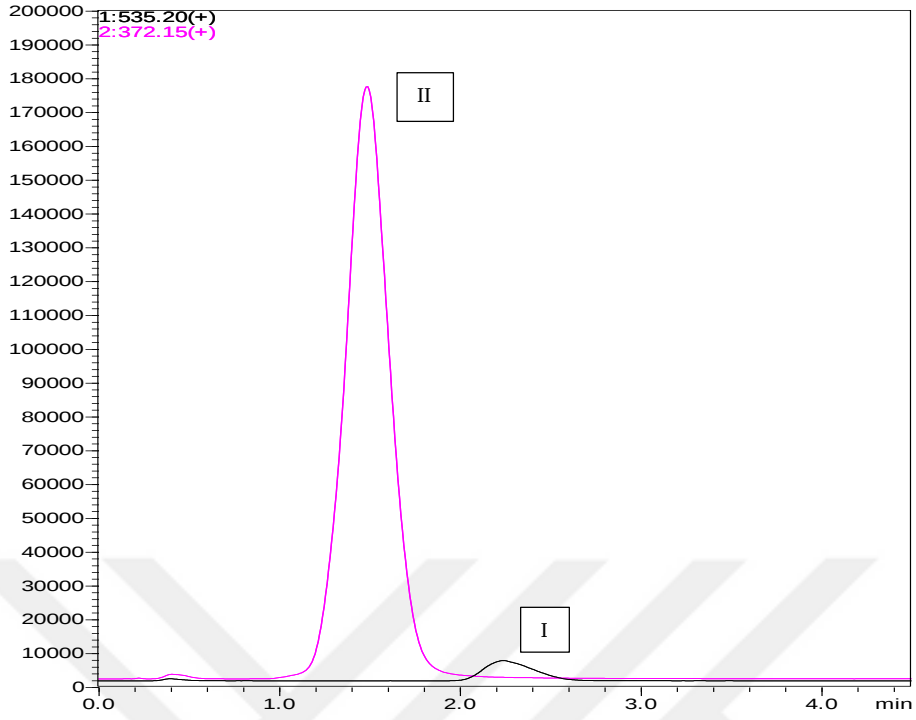


Şekil 19. Quarray DC : +5 iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı

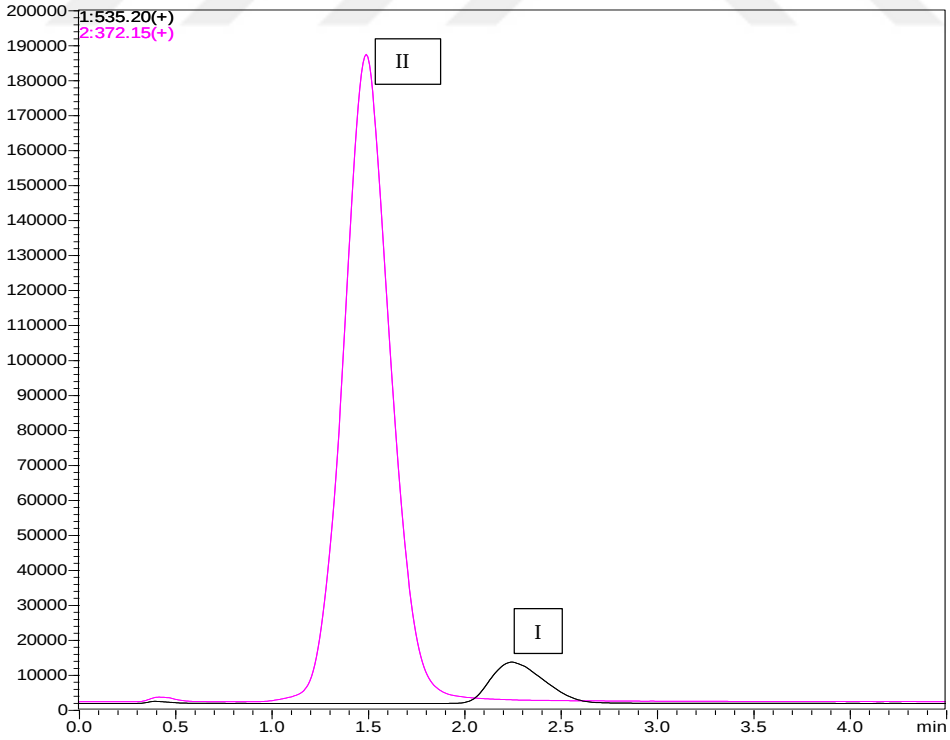
6.1.4. Püskürtme gazı (nebulizing gas) ve kurutma gazı (drying gas) parametreleri değişiklikleri

APT ve TMX için m/z (TMX = 372,15 Aprepitant = 535,2), pozitif modda Quarray RF = 52 ve Quarray DC = -5 iken püskürtme gazı ve kurutma gazı değişiklikleri sonucu alınan kromatogramlar aşağıda verilmiştir.

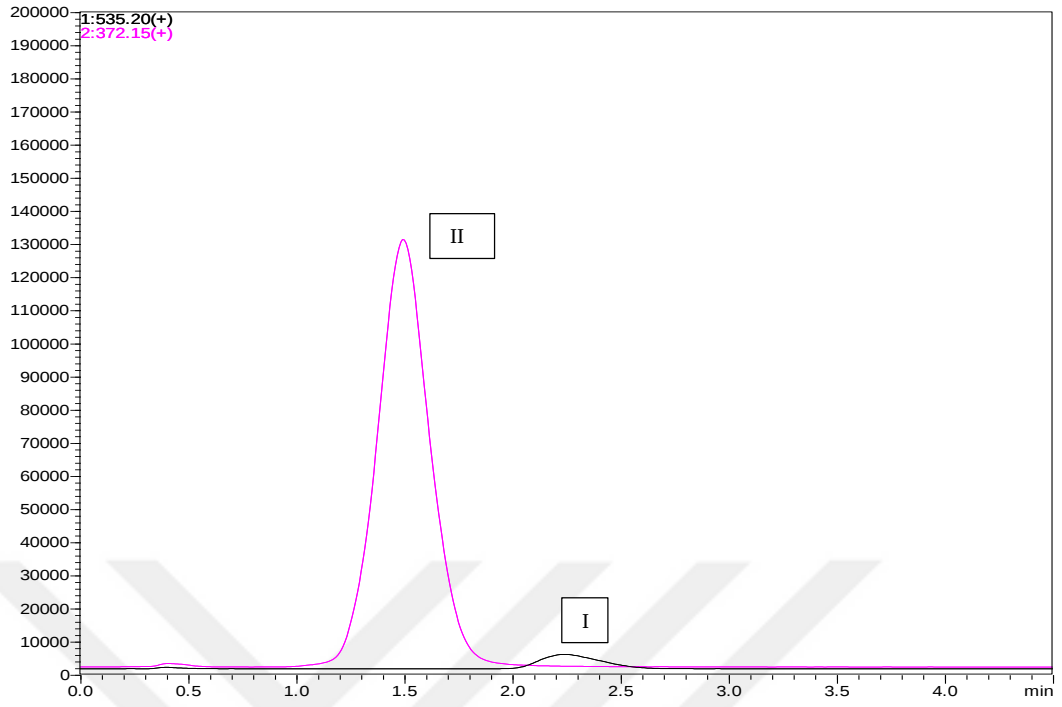
Püskürtme gazı değeri azaldıkça daha yavaş akış hızından dolayı daha fazla molekül parçalanmaktadır ve bu da daha yüksek duyarlılık ve yüksek pik alanı elde etmemizi sağlamaktadır. Fakat düşük püskürtme gazı değerinde çalışmak cihaz kirliliğine sebep olmaktadır. Bu nedenle yüksek duyarlılık ve yüksek pik alanından feragat edilerek püskürtme gazı değeri 1,5 mL/ dak. olarak seçilmiştir.



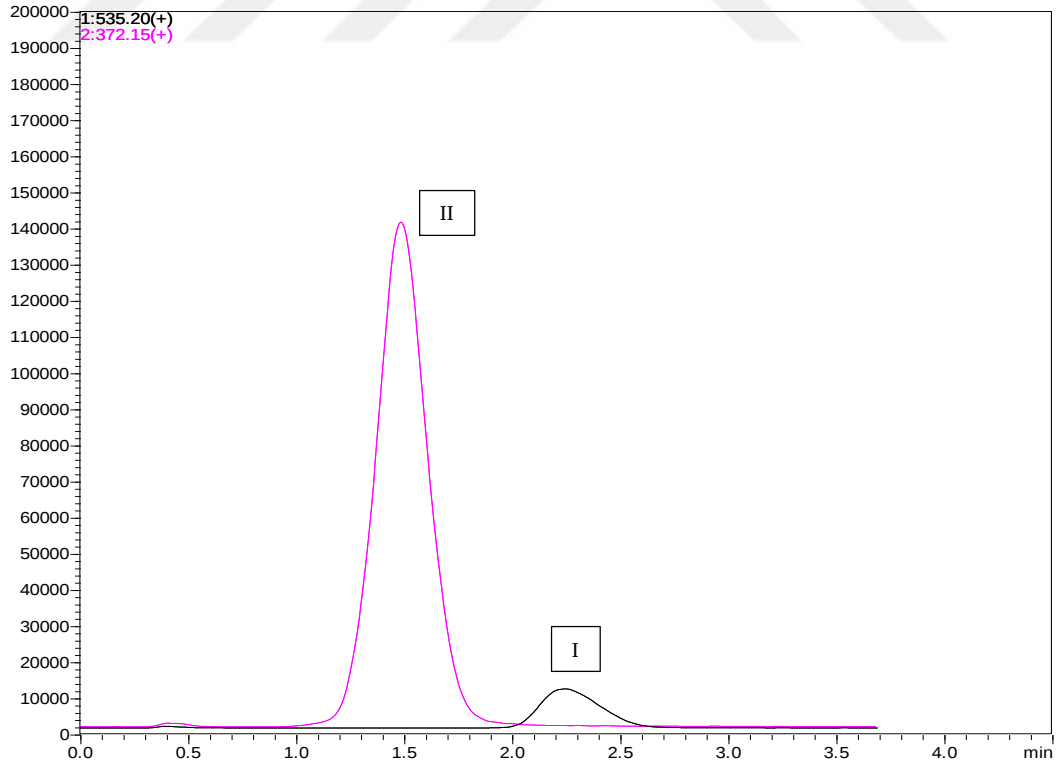
Şekil 20. Püskürtme gazı: 1 mL/ dak. Kurutma gazı: 10 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 21. Püskürtme gazı: 1 mL/ dak., Kurutma gazı : 15 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 22. Püskürtme gazı: 1,5 mL/ dak. Kurutma gazı: 10 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı



Şekil 23. Püskürtme gazı: 1,5 mL/ dak. Kurutma gazı: 15 mL/ dak. iken APT (I) ve TMX (II) kromatogramı

6.2.Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

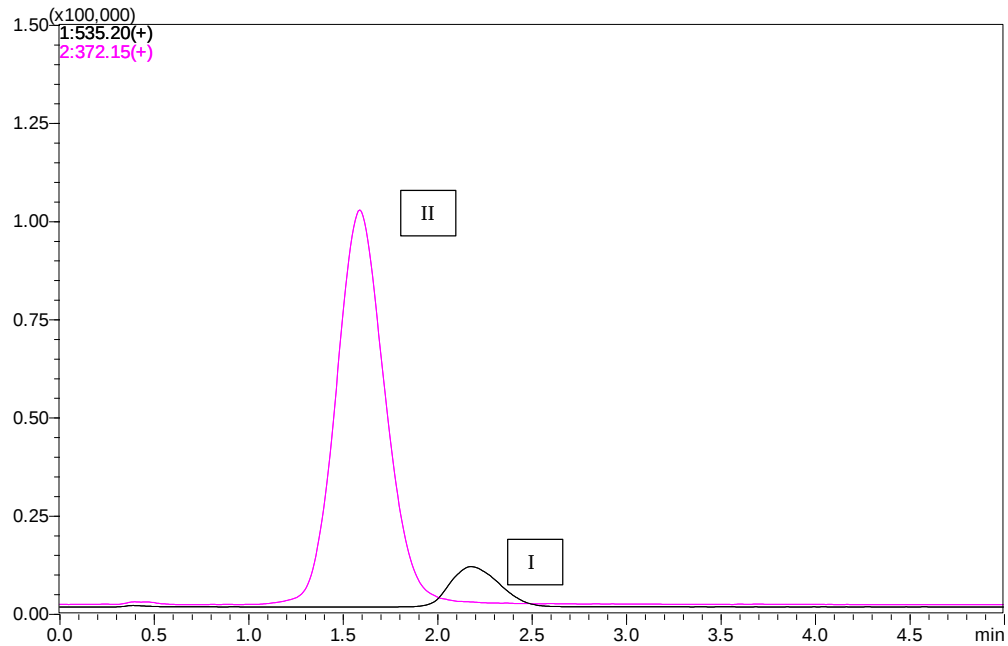
6.2.1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının ve hareketli fazın pH'sinin belirlenmesi

Denemeler sonucunda en uygun hareketli faz çözeltisi olarak asetonitril/su çözücü karışımı ve hareketli faz bileşenlerinin oranları değiştirilerek en uygun hareketli faz çözücü karışımı oranı 50/50 (h/h) asetonitril/su olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo-1'de verilmiştir.

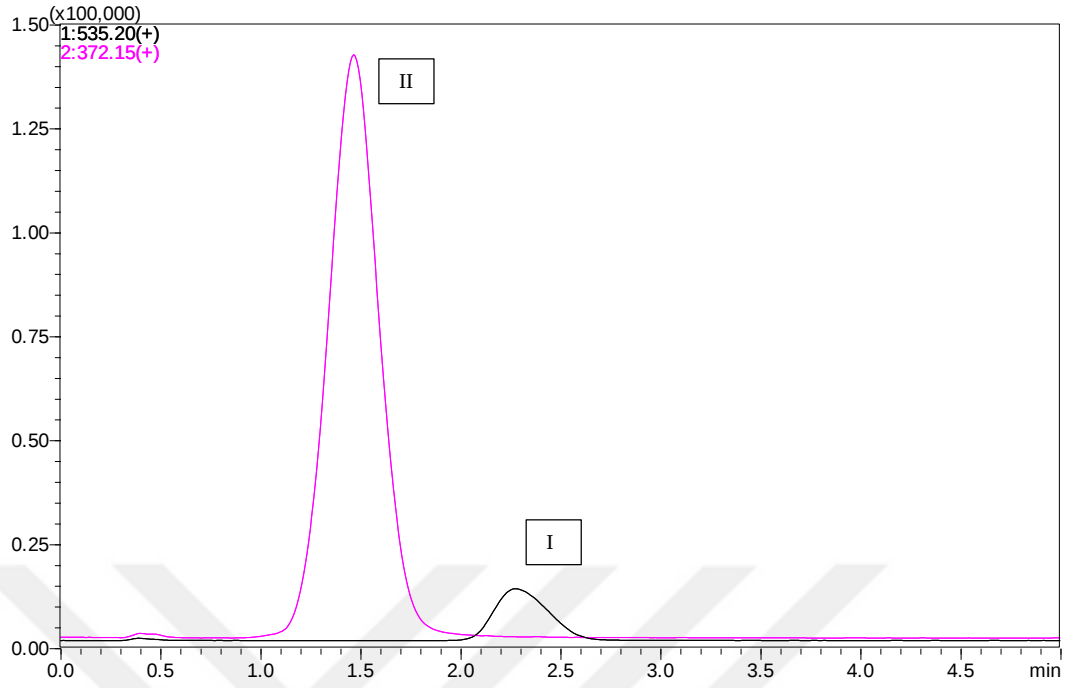
Şekil 24, 25 ve 26'daki kromatogramlar incelendiğinde de görüleceği gibi karışım içindeki ilaç etkin maddelerin ayırımının sağlandığı hareketli faz çözeltisinin pH değeri 2,52 (formik asit çözeltisi ile) olarak belirlendi.

Tablo 1. Hareketli faz bileşenlerinin oranlarının değişimine göre TMX ve APT'nin alıkonma zamanı değerlerinin değişimi

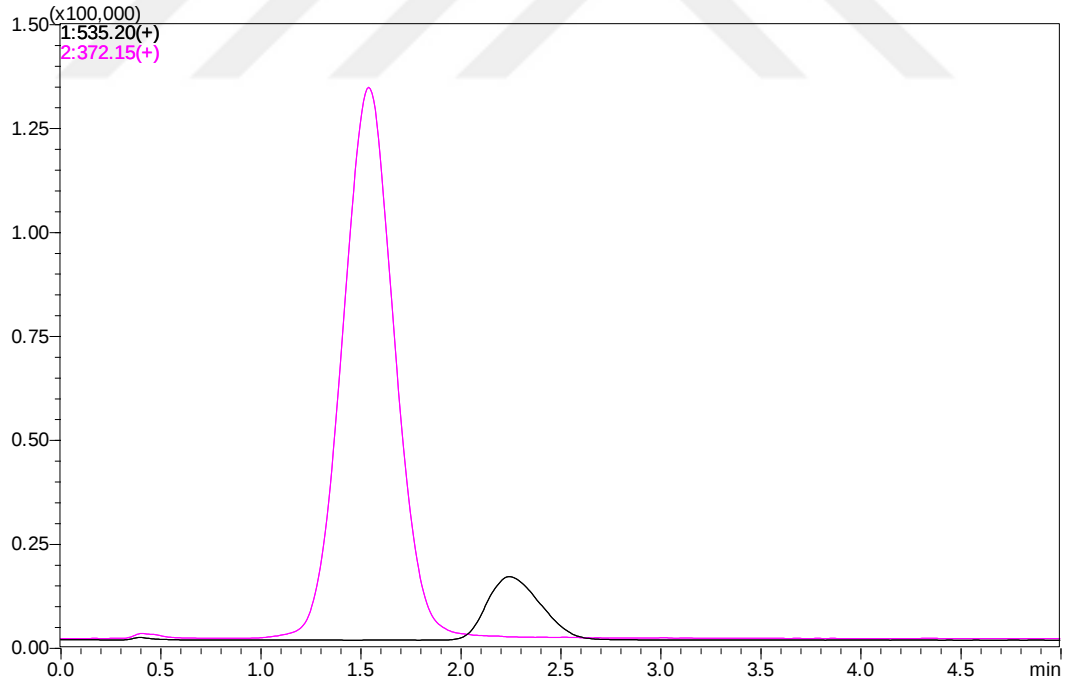
Asetonitril (%)	Su (pH=2,52) (%)	t _R (TMX) (dak.)	t _R (APT) (dak.)
55	45	3,70	2,60
50	50	1,58	2,10



Şekil 24. pH=2,72'de 0,1 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril /su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak.).



Şekil 25. pH=2,52'de 0,1 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril /su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak.).



Şekil 26. pH=2,62'de 0,1 µg/mL APT (I), 1,0 µg/mL TMX (II) çözelti karışımının kromatogramı (hf: pH=2,62 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril /su karışım çözeltisi, akış hızı =0,5 mL/dak.).

6.2.2. Sabit fazın (kolonun) belirlenmesi

Bölüm 6.2.1.'de belirlenen pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışımı hareketli faz olarak kullanıldı. Sabit faz olarak ise İnertsil C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm) kolonu en uygun kolon olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo 2., Tablo 3. ve Tablo 4.' de ve kromatogramlar Şekil 18, Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmiştir.

Tablo 2.TMX ve APT'nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları

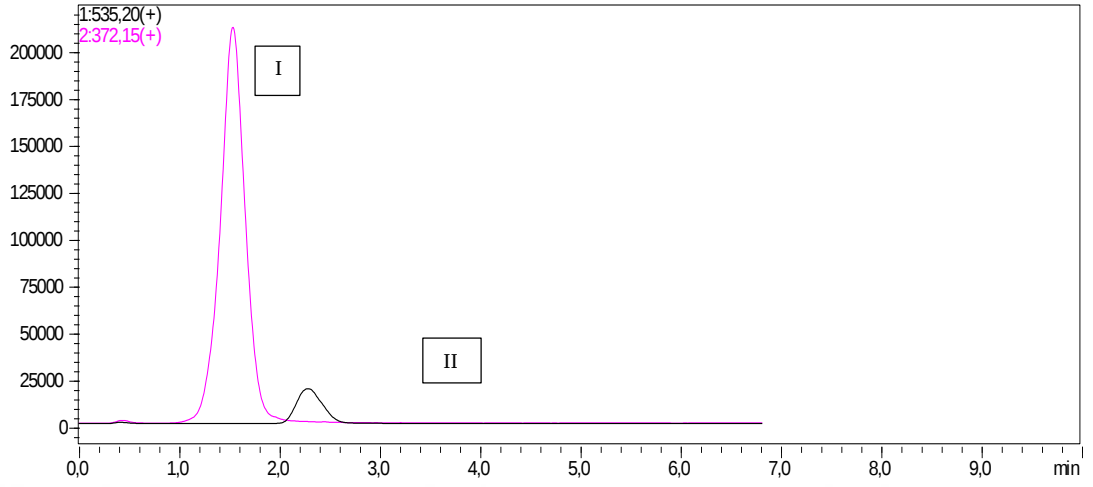
Sabit Faz (Kolon)	Alıkonma Zamanı (dak.)	
	APT	TMX
İnertsil C18(50 x 2,1) 3µm	2,10	1,58
Athena C8(50 x 2,1) 3µm	2,28	1,92

Tablo 3. TMX ve APT'nin farklı kolonlardaki alıkonma zamanları

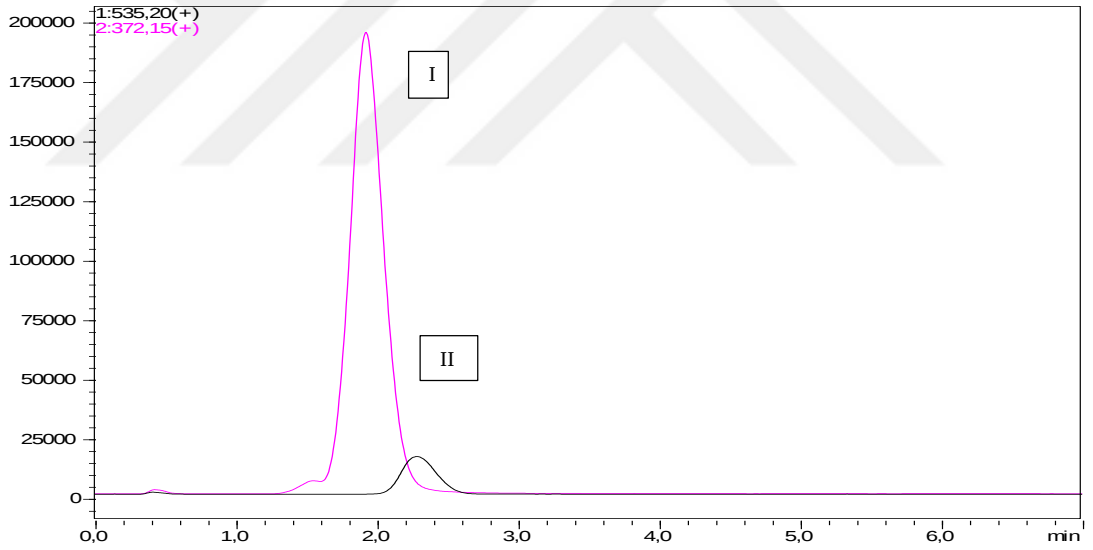
Sabit Faz (Kolon)	Alıkonma Zamanı (dak.)	
	APT	TMX
Athena C8(50 x 2,1) 3µm	2,28	1,92
Athena C8 (100 x 2,1) 3µm	3,86	3,32

Tablo 4. APT ve TMX'in farklı kolonlardaki zamanları

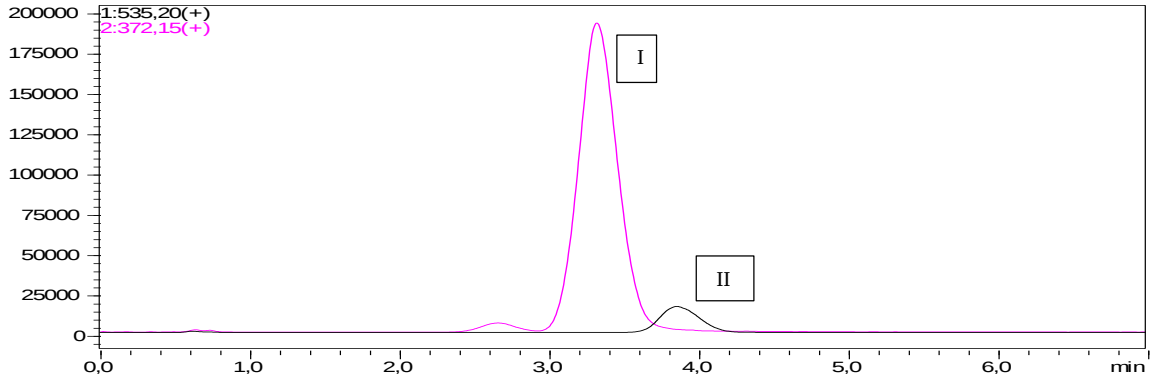
Sabit Faz (Kolon)	Alıkonma Zamanı (dak.)	
	APT	TMX
Athena C8(100*2,1) 3µm	3,86	3,32
Athena C8 (100*4,6) 3µm	15,02	12,05



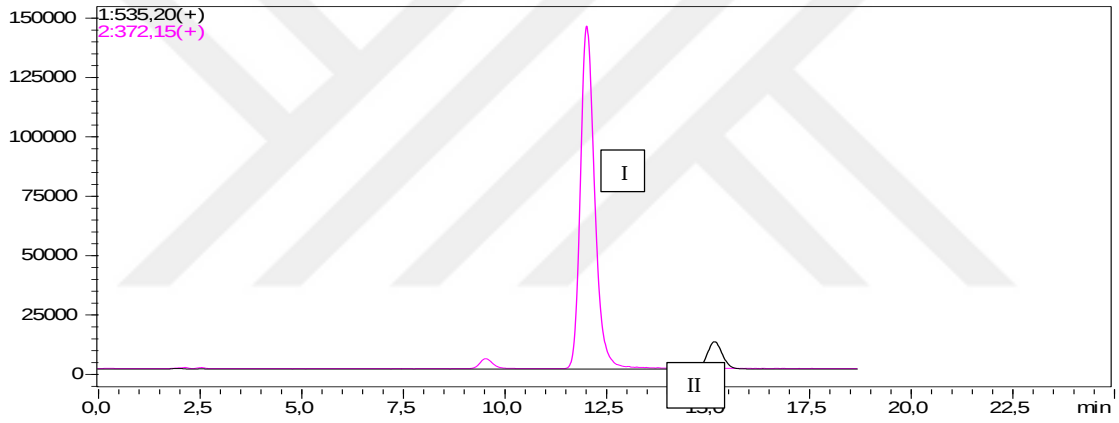
Şekil 27. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., İnertsil-C18(50 × 2,1)3 µm).



Şekil 28. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) asetonitril/su 50/50 (h/h) karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., Athena-C8(50 × 2,1)3 µm).



Şekil 29. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., Athena-C8(100 ×2,1) 3 µm).

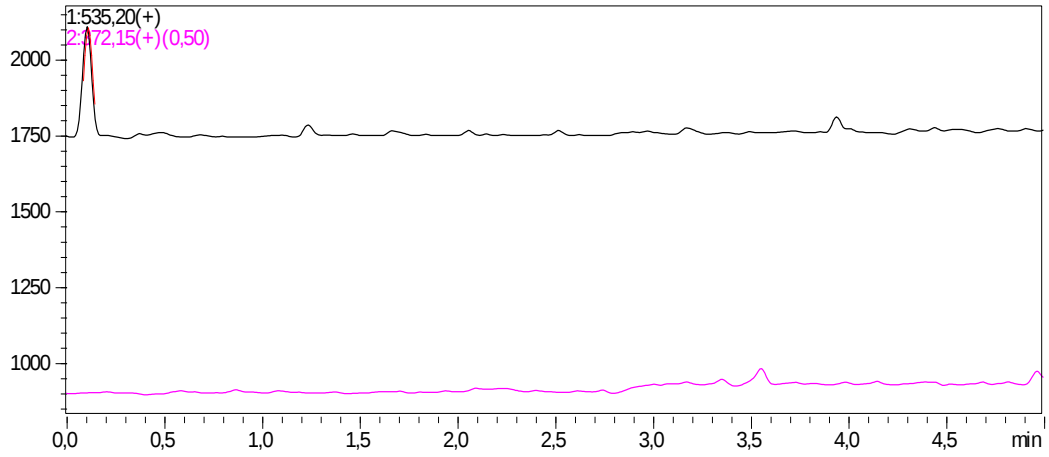


Şekil 30. 0,10 µg/mL TMX (I) ve 0,10 µg/mL APT (II) içeren çözelti karışımının geliştirilen metot koşullarında alınan kromatogramı (hf: pH=2,52 (formik asit çöz.) 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, akış hızı = 0,5 mL/dak., Athena-C8(100 ×4,6)3 µm)

6.3. Metot Validasyonu

6.3.1. Seçicilik

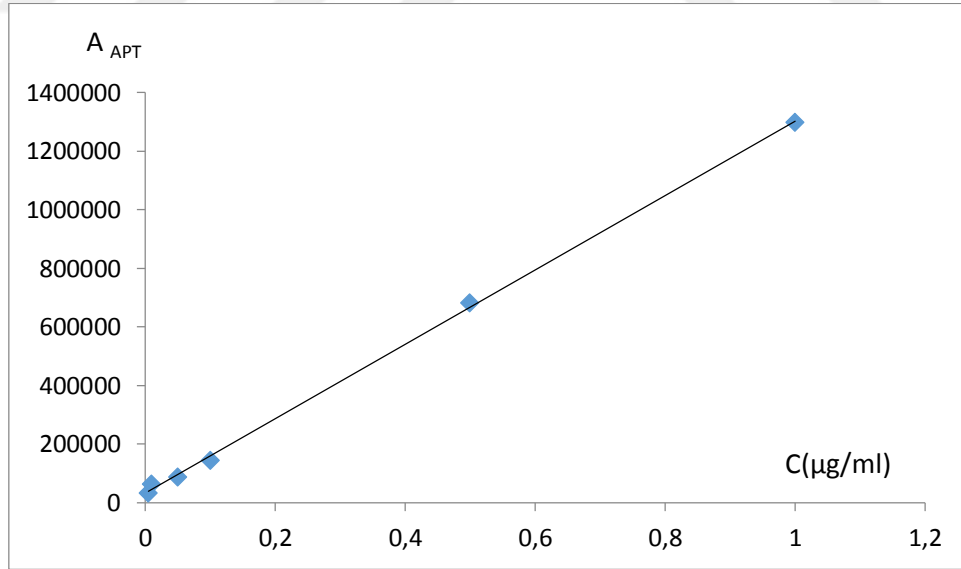
Şekil 31’de görüldüğü gibi geliştirilen sisteme hareketli faz çözeltisi enjekte edildi ve APT ve TMX piklerinin görüldüğü dakikalarda hareketli fazdan ileri gelen herhangi bir pik gözlenmedi.



Şekil 31. Hareketli faz (50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi, pH=2,52) kromatogramı

6.3.2. Doğrusallık

APT için 0,025-1,00 $\mu\text{g/mL}$ ve TMX için 0,0031-0,50 $\mu\text{g/mL}$ konstrasyon aralığındaki çözeltiler ile Bölüm 3.5.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak çizilen ölçü eğrileri Şekil 23 ve Şekil 24'de verilmiştir.



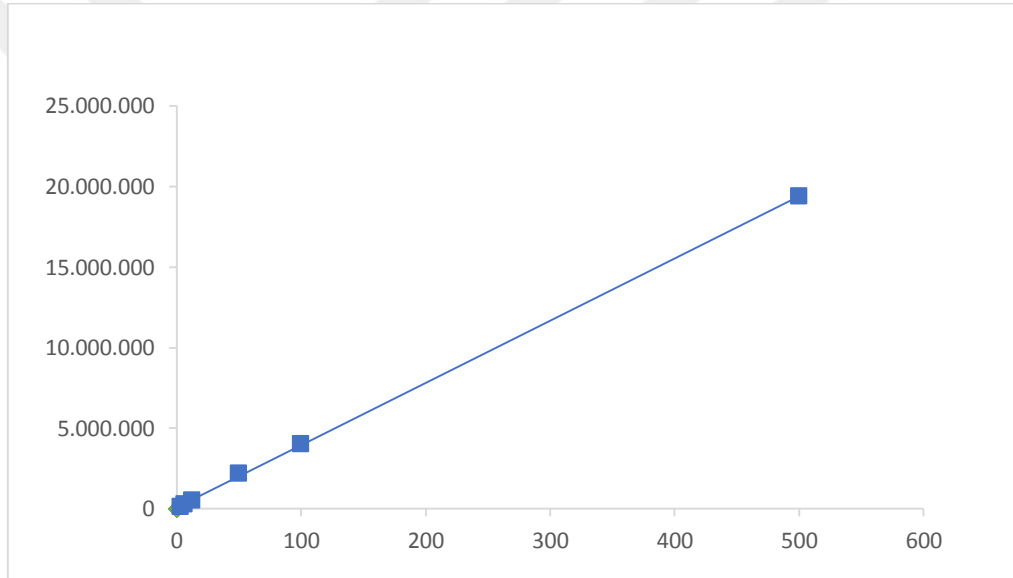
Şekil 32. APT'nin 0,025- 1,00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 5. APT'nin 0,025-1,00 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait alan değerleri ve istatistik veriler

A_{APT} \ C (µg/mL)	0,025	0,05	0,10	0,50	1,00
1	32659	64081	143172	650842	1297459
2	36812	66668	152514	685514	1368140
3	37130	68982	153255	702028	1436293
Ortalama	37262	65770	149647	679461	1367297
SD	637,10	451,76	5619,74	26124,27	69420,84
RSD (%)	1,71	3,68	3,76	3,84	5,08
A_{APT} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y = 13614x + 3995$ $R^2 = 0,9999$					

Tablo 6. APT'nin ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları

	1	2	3	Ortalama $\pm$ SD
m	12937	13627	14296	13614 $\pm$ 0,68
b	4258,4	5360,6	7265,0	3995 $\pm$ 1,5
r	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999 $\pm$ 0,00005



Şekil 33. TMX'in 0,0031-0,50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 7. TMX'in 0,0031- 0,50 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait alan değerleri ve istatistik veriler

C(µg/mL) A_{tmx}	0,0031	0,0063	0,0125	0,05	0,10	0,50
1	144293	277979	526676	2237599	4147237	19468882
2	129588	266 798	546325	2196582	3920898	19468882
3	132040	269 040	546000	2189383	4027511	19468882
Ortalama	135307	271272	539667	2207854	4031882	19389042
SD	8237,38	6952,46	494,27	26009,76	113232,80	155765,50
RSD (%)	6,09	2,53	0,09	1,18	2,81	0,80
A_{APT} değerlerinden hesaplanan doğru denklemi $y = 38626x + 103857$ $R^2 = 0,999$						

Tablo 8. TMX'in ölçü eğrilerinin regresyon analizi sonuçları

	1	2	3	Ortalama ± SD
m	38845	38768	38417	38626 ± 0,229
b	123 165	77368	49267	33634 ± 0,338
r	0,9997	0,9999	0,9994	0,9997 ±0,0003

6.3.3. Tayin edilebilme sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD)

Bölüm 3.5.3.'de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri TMX ve APT için sırasıyla 0,0012 µg/mL ve 0,0025 µg /mL olarak, LOQ değerleri ise TMX ve APT için sırasıyla 0,0037 µg/mL ve 0,070 µg /mL olarak bulunmuştur.

6.3.4. Kesinlik (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik)

TMX ve APT için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler ile Bölüm 3.5.4.'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Bu çözeltilerin gün içi ve farklı günlerde yapılan analizlerinin ölçü eğrilerinden bulunan sonuçları Tablo 9' da verilmiştir.

Tablo 9. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği

	Gün içi			Günler arası		
	Alınan Kons. (µg/mL)	Bulunan Kons. (µg/mL)	RSD (%) (n=3)	Alınan Kons. (µg/mL)	Bulunan Kons. (µg/mL)	RSD (%) (n=3)
APT	0,05	0,049	1,17	0,050	0,048	1,18
	0,10	0,09	0,63	0,10	0,99	0,58
	1,00	0,99	0,71	1,0	0,99	0,71
TMX	0,005	0,0051	0,0058	0,005	0,0049	0,0001
	0,05	0,051	0,0058	0,050	0,049	0,0012
	0,50	0,49	1,17	0,50	0,49	1,17

6.3.5. İlaç etkin madde çözeltilerinin farklı saklama koşullarındaki kararlılıkları

Çözelti kararlılığının saptanması amacıyla, C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm) kolonu, pH=2,52 (formik asit çözeltisi ile), 50/50 (h/h) asetronitril/su hareketli faz çözeltisi ve 0,5 mL/dak. akış hızı kullanılarak Bölüm 5.5.5' de anlatıldığı gibi çalışıldı. TMX ve APT çözeltilerinin kararlılığında bir değişim olmadığı gözlemlendi.

6.3.6. Doğruluk (geri kazanım)

Bölüm 5.5.6.'da anlatıldığı gibi çalışılan iki maddeye ait ölçü geri kazanım yüzdeleri Tablo-10' da verilmiştir.

Tablo 10. APT ve TMX'in doğruluk (geri kazanım) çalışması sonuçları

	Alınan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	SD (n=3)	Geri Kazanım (%) (ortalama $\pm$ SD)
APT	0,05	0,049	0,94	98,67 $\pm$ 0,94
	0,10	0,09	0,47	98,67 $\pm$ 0,47
	1,00	0,99	1,00	99 $\pm$ 1,00
TMX	0,005	0,0051	1,89	100,67 $\pm$ 1,89
	0,05	0,051	1,89	100,67 $\pm$ 1,89
	0,50	0,49	0,94	98,67 $\pm$ 0,94

6.3.7. Yöntemin sağlamlığı

Hareketli faz pH' sinde, kolon sıcaklığında ve akış hızında yapılan küçük değişiklikler sonucunda elde edilen alıkonma zamanlarındaki değişimler Tablo 11' de verilmiştir.

Tablo 11. Yöntemin sağlamlık parametreleri (pH değişikliği)

pH	t _R (APT) (dak.)	t _R (TMX) (dak.)
2,52	2,10	1,59
2,62	2,10	1,58
2,72	2,20	1,58

Tablo 12.Yöntemin sağlamlık parametreleri (kolon sıcaklığı ve akış hızı değişiklikleri)

Kolon Sıcaklığı (°C)		
25	2,10	1,58
30	2,19	1,58
34	2,20	1,58
40	2,21	1,58
45	2,23	1,57
50	2,24	1,57
Akış Hızı (mL/ dak.)		
0,25	4,42	2,88
0,35	3,10	2,1
0,45	2,51	1,65
0,55	2,10	1,36

Sistem uygunluk testi için önemli parametreler olan alıkonma zamanı (t_R), kuyruklanma faktörü (T), ayrılma faktörü (R_s) ve teorik plaka sayısı (N) değerleri Tablo-12’ de verilmiştir.

Tablo 13. Sistem uygunluk testi parametreleri

	Teorik Değerler	APT	TMX
Alıkonma Zamanı (t_R) (dak)	-	2,10	1,58
Teorik Plaka Sayısı (N)	> 2 000	4 653	2 776
Kuyruklanma Faktörü (T)	≤ 2	1,689	1,428
Ayrılma Faktörü (R_s)	$\geq 1,5$	4,6	3,2

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kromatografik yöntemler, özellikle GS-MS, LC-MS, LC-MS-MS teknikleri oldukça düşük miktarlarda maddelerin bir arada analizine olanak sağlaması ve düşük miktarda çözücü tüketimi ile çevreci analitik metotlar olarak giderek yaygınlaşmaktadır.

Biz de çalışmamızda bu avantajları göz önüne alarak LC-MS ile iki ilaç etken maddesinin bir arada düşük tespit ve tayin sınırlarında analizi için yeni, basit, ekonomik, çevreci ve bu iki ilacın rutin analizlerinde de kullanılabilecek bir LC-MS geliştirdik. Metot geliştirme ve validasyon kısmından oluşan bu çalışmamızda her iki madde için de en uygun kromatografik koşulun, C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm) kolon, pH'ı 2,52 (formik asit çözeltisi ile) olan 50/50 (h/h) asetonitril/su karışım çözeltisi hareketli fazı, 0,5 mL/dak akış hızı olduğu bulunmuştur. Bu şartlarda, alıkonma zamanları TMX için 1,58 ve APT için 2,10 dak. olarak bulunmuştur.

Geliştirilen yöntem seçicilik, doğrusallık, tayin sınırı (LOQ), tespit sınırı (LOD), doğruluk, tekrarlanabilirlik, çözelti kararlılığı, yöntemin sağlamlığı ve uygunluk testi parametreleri incelenerek valide edilmiştir. Çalışma sonucunda doğrusal konsantrasyon aralığı APT için 0,025-1,00 µg/ mL ve TMX için 0,0031-0,50 µg/mL, tespit sınırı değerleri APT ve TMX için sırasıyla 0,0025 µg/mL, 0,0012 µg/mL ve tayin sınırı değerleri ise sırasıyla 0,070 µg/mL, 0,0037 µg/mL olarak bulunmuştur. Etken madde çözeltilerinin her birinin stabilite çalışması sonucunda, APT ve TMX stok çözeltilerinin + 4°C'de ve - 20 °C' de en az 1 ay saklanabileceği saptanmıştır.

Geliştirilen LC-MS metodunun optimize edilmiş koşulları Tablo-12'de gösterilmektedir.

Bu tez çalışmasında geliştirilen ve valide edilen analitik metot, her iki etken maddenin gerek ilaç formülasyonlarından ve gerekse biyolojik materyalden ayrı ayrı ve birarada analizleri için güvenle kullanılabilecek basit, ekonomik ve çevreci bir metottur.

Tablo-12. Geliştirilen LC-MS metodunun optimize koşulları

Parametreler	Optimize Koşullar
LC-MS	Shimadzu – LC-MS 2020
Kolon	C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 3µm)
Hareketli Faz	(pH=2,52), Asetonitril / su ,50/50 (h/h)
Akış Hızı	0,5 mL/dak
Kolon sıcaklığı	25°C
Kolon sıcaklığı	25°C
Nebulising Gas	1,5 mL/ dak.
Drying Gas	15 mL/ dak.
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
MS	SQ MS Dedektör , ESI, Pozitif Mod
Ortam sıcaklığı	Oda sıcaklığı
Toplam Analiz Süresi	5 dak.

8.KAYNAKLAR

Ahsen N.V., Binder C., J. Brockmoller, Oellerich M., CYP2D6 and tamoxifen: pharmacogenetic reinvention of an established drug J. Lab. Med. 2009; 33(5):1-9.

Antunes M.V., Rosa D.D, Viana T.S., Andreolla H., Fontanive T.O. Linden R. Sensitivehplc–pda determination of tamoxifen and its metabolites N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in human plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013;76: 13-20

Arellano C¹, Allal B², Goubaa A³, Roché H⁴, Chatelut E2.An UPLC-MS/MS method for separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. 2014 Nov;100:254-261

Bjornsson T.D., Callaghan J.T., Einolf H. J., vd., The Conduct of In Vitro and In Vivo Drug-Drug Interaction Studies: A PhRMA Perspective. J. Clin. Pharmacol. 2003; 43(5):443-69.

Chavez-Eng C.M., Constanzer M.L., Matuszewski B.K. Simultaneous determination of Aprepitant and two metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2004;35: 1213-1229.

Hadir M. Maher Nourah Z. Alzoman Shereen M.Shehata Simultaneous determination of erlotinib and tamoxifen in rat plasma using UPLC-MS/MS: application to pharmacokinetic interaction studies 2016 ; S1570-0232(16)30346-4

Heath D.D., Flatt S.W., Wu A.H.B., Pruitt M.A., Rock C.L., Evaluation of Tamoxifen and metabolites by LC-MS/MS and HPLC Methods. Br J Biomed Sci. 2014; 71(1): 33–39.

Hesketh P.J., Grunberg S.M., Gralla R.J. The oral neurokinin-1 antagonists aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients receiving high-dose cisplatin. The aprepitant protocol 052 study group. *J Clin Oncol.* 2003;21: 4112-4119.

Jager N.G., Rosing H., Schellens J.H., Beijnen J.H. Determination of tamoxifen and endoxifen in dried blood sp. *Bioanalysis.* 2014;6(22):2999-3009.

Jager N.G., Rosing H., Schellens J.H., Beijnen J.H Importance of highly selective LC-MS/MS analysis for the accurate quantification of tamoxifen and its metabolites: focus on endoxifen and 4-hydroxytamoxifen. 2012 Jun;133(2):793-8

Krishna Chaitanya K., Gowri Sankar D., Samson Israel D., Narasimha kumar Ch. Validated RP-HPLC method for the quantification of aprepitant in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Der Pharma Chemica.* 2013;5(1): 39-46.

Malgorzata J.,Yumi K.,Myra F. B.,George R.,Robert J. D.,Chunli Y. Tamoxifen Metabolite Isomer Separation and Quantification by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry 2010; 82, 24, 10186-10193

Shahbaz K., Khan N.U., Javed I and Aslam B. Pharmgeonetic effect on plasma concentration of tamoxifen through hplc in female subjects of Pakistan 2016: 5 (3) : 1799-1808

Poli-Bigelli S., Rodrigues-Pereira J., Carides A.D. Addition of the neurokinin 1 antagonist aprepitant to standard antiemetic therapy improves control of chemotherapy-induced nausea and vomiting: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Latin America. *Cancer.* 2003;97: 3090-3098.

Ravi Prakash PVDLS., Sumadhuri B., Srikanth M. Determination of Aprepitant in Human Plasma by Using LC-MS/MS with Electrospray Ionization. *J Bioequiv Availab.* 2013;5(3): 110-116.

Rojas C., Raje M., Tsukamoto T., Slusher B.S. Molecular mechanisms of 5-HT(3) and NK(1) receptor antagonists in prevention of emesis. Eur J Pharmacol. 2014;722: 26-37.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gizem	Soyadı	KUNAL ŞALLI
Doğum Yeri	İZMİR	Doğum Tarihi	04.05.1988
Uyruğu	T.C	Tel	0 555 491 43 56
E-mail	gizemkunal@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ege Üniversitesi – Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1 Ar-Ge CMC Analisti	Santa Farma İlaç	2017-
2 Bursiyer	Tübitak 1003 İlaç Geliştirme Projesi	2014-2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
66	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	76	80	60

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Excel	Çok iyi
Microsoft Power Point	Çok iyi