



**TASARIM BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA DAYALI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE VAMOROLONUN BOZUNMA
ÜRÜNLERİ VARLIĞINDA FARMASÖTİK FORMÜLASYONDA ANALİZİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hazal AVCI

Eskişehir 2025

**TASARIM BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA DAYALI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE VAMOROLONUN BOZUNMA
ÜRÜNLERİ VARLIĞINDA FARMASÖTİK FORMÜLASYONDA ANALİZİ**

Hazal AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Saniye ÖZCAN

Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Haziran 2025
Eskişehir

*Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından desteklenmiştir. (Proje No: TYL-2024-2384)*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hazal AVCI'nın "Tasarım Bazlı Kalite Yaklaşımına Dayalı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Vamorolonun Tayini ve Bozunma Ürünlerinin Karakterizasyonu" başlıklı tezi 20.06.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç Dr. Saniye ÖZCAN	
Üye	: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN	
Üye	: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU	

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

TASARIM BAZLI KALİTE YAKLAŞIMINA DAYALI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ İLE VAMOROLONUN BOZUNMA ÜRÜNLERİ VARLIĞINDA FARMASÖTİK FORMÜLASYONDA ANALİZİ

Hazal AVCI

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2025

Danışman: Doç. Dr. Saniye ÖZCAN

Farmasötik ürünler gerekli kimlik ve saflık özelliklerine sahip olmalıdır. Bir farmasötik ürün belirlenmiş kalite standartlarını karşılamıyorsa, istenen terapötik etkiden yoksun, toksik ve olumsuz reaksiyonlara yol açabilir. İlaç ürününün kalitesi, ilk ham maddelerden, üretim sürecinden, paketlenmeden, taşımadan ve depolama koşullarında dahil olmak üzere her aşamada takip edilmelidir. Vamorolon Duchenne kas distrofisi tedavisi için geliştirilmiş düşük yan etki profiline sahip etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış oral kortikosteroid bir ajandır. Literatürde söz konusu ajan için farmasötik formülasyonlarda ve biyolojik sıvılarda geliştirilmiş ve doğrulama çalışmaları yapılmış herhangi bir yöntem mevcut değildir. Söz konusu bu çalışmada, Vamorolon'un farmasötik formülasyonlarda analizi için bir sıvı kromatografisi tekniği oluşturulmuştur. Analitik yöntem stabilite göstergeli olup optimizasyon çalışmaları bozunma ürünleri varlığında yürütülmüştür. Analitik yöntemin optimizasyon çalışmalarının tüm aşamaları tasarımda kalite yaklaşımı doğrultusunda risk analizi yapılarak; optimizasyonu anlamlı olarak etkileyecek parametreleri belirleyen tarama tasarımlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonun son aşaması ve optimize koşulların belirlenmesi için üç seviyeli Box-Behnken yanıt yüzeyi tasarımı kullanılmıştır. Optimize yöntemin koşulları hareketli faz olarak %0,1 asetik asit içeren su ve asetronitril (60:40; h/h), 0,5 mL/dk akış hızı, enjeksiyon hacmi 3 μ L, kolon fırını sıcaklığı $30^{\circ}\text{C} \pm 0,1$, dedeksiyon dalga boyu 241 nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen yöntemin ICH Q2(R2) kılavuzuna göre geçerliliği doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntemin sürdürülebilirlik ve pratiklik değerlendirmeleri yapılmıştır. Yeşillik değerlendirmesi NEMI, Analitik eko-ölçek (87), AGREE (0,63) kullanılarak değerlendirilmiştir. Pratiklik değerlendirmesinde BAGI (77,5) aracı kullanılmıştır. Son olarak yeşillik ve pratiklik değerlendirmelerinin ortak

ölçeklendirilebilmesi amacıyla yöntem RGB12 (92,9) metriği ile değerlendirilmiştir. Önerilen yöntem, her analitik laboratuvarında uygulanabilecek pratikliğe sahiptir.

Anahtar Sözcükler: VAM, HPLC, DoE, Stabilité



ABSTRACT

DETERMINATION OF VAMOROLONE IN PHARMACEUTICAL FORMULATION IN THE PRESENCE OF DEGRADATION PRODUCTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD BASED ON DESIGN-BASED QUALITY APPROACH

Hazal AVCI

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School, June 2025

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Saniye ÖZCAN

Pharmaceutical products must have the required identity and purity characteristics. If a pharmaceutical product does not meet the established quality standards, it may lack the desired therapeutic effect and cause toxic and adverse reactions. The quality of the drug product should be monitored at every stage, including the initial Active Pharmaceutical Ingredients manufacturing process, packaging, transportation, and storage conditions. Vamorolone is an oral corticosteroid agent with proven efficacy and reliability and a low side effect profile developed for the treatment of duchenne muscular dystrophy. There is no method developed and validated in pharmaceutical formulations and biological fluids for the agent in question in the literature. In this study, a liquid chromatography technique was established for the analysis of VAM in pharmaceutical formulations. The analytical technique has stability indicators, and optimization studies were conducted in the presence of degradation products. All stages of the optimization studies of the analytical method were carried out by performing risk analysis in line with the quality approach in design and using screening designs that determine the parameters that will significantly affect the optimization. A three-level Box-Behnken response surface design was used for the final stage of optimization and for determining the optimized conditions. The conditions of the optimized method were determined as water and acetonitrile (60:40; v/v) containing 0.1% acetic acid as the mobile phase, 0,5 mL/min flow rate, 3 µL injection volume, column oven temperature $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$, and detection wavelength 241 nm.

In addition, the validity of the developed method was verified according to the ICH Q2(R2) guideline. The sustainability and practicality of the developed method were evaluated. Greenness assessment was evaluated using NEMI, Analytical Eco-scale (87), and AGREE (0,62) The BAGI (77,52) tool was used in the practicality assessment.

Finally, the method was evaluated with the RGB12 (92,9) metric in order to provide a common scaling of greenness and practicality assessments. The proposed method has the practicality to be applied in every analytical laboratory.

Keywords: VAM, HPLC, DoE, Stability



20.06.2025

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 çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”nda tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkabilecek tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Hazal AVCI

TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım attığım ilk günden itibaren her koşulda yanımda olan, bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, birlikte çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum, öğrencisi olmaktan dolayı kendimi son derece şanslı hissettiğim, akademik duruşu ve insanlığıyla her zaman örnek aldığım değerli tez danışmanım Doç. Dr. Saniye ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bölüm içinde ve dışında her zaman destek olan, değerli bilgi ve görüşlerini paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen; ekibinde yer almaktan büyük onur ve gurur duyduğum, kendisinden çok şey öğrendiğim ve öğrenmeye devam edeceğim kıymetli hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a, saygı ve teşekkürlerimi sunarım

Çalışmaya başladığım ilk günden itibaren bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan; bilimsel açıdan gelişimime önemli katkılar sağlayan, değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Serkan LEVENT'e, teşekkürlerimi sunarım.

Her gün laboratuvarında yanımda olarak bana rehberlik eden, beni geliştiren desteği ve özverisiyle üzerimde büyük etkisi bulunan Dr. Kimyager Abeer ELRİŞ'e teşekkürlerimi sunarım. Kendisiyle çalışmak, öğrenmek ve bu süreci birlikte yürütmek benim için büyük bir şanstı. Emeklerine her zaman minnettar olacağım.

Analitik Kimya Anabilim Dalındaki kıymetli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimi süresince sağladığı maddi destek için TÜBİTAK 2210-Yurt içi Lisansüstü Burs Programına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

20.06.2025

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tez çalışmasının hazırlanması, yürütülmesi, verilerin analizi vb. aşamalarının herhangi birinde üretken yapay zekâ programlarından yararlanmadığımı beyan ederim.

Hazal AVCI



20.06.2025

DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE

I declare that I have not used generative artificial intelligence programs at any stage of the preparation, execution, data analysis, etc. of this study.

Hazal AVCI



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KAPAK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI	ix
DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1 Duchenne Müsküler Distrofisi (DMD)	3
2.2 DMD ve Tedavi Yöntemleri	4
2.3 Vamorolonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.4 Vamorolonun Etki Mekanizması.....	7
2.5 Vamorolonun Farmakokinetik Özellikleri	9
2.6 Vamorolonun Farmakodinamik Özellikleri	10
2.7 Vamorolonun Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler	10
2.8 Tasarımla Kalite.....	12
2.8.1 Tasarımla analitik kalite (AQbD).....	12
2.9 Kemometri ve Deney Tasarımı	14

2.9.1 Deney tasarımı kavramları	15
2.9.1.1 Deney tasarımı	15
2.9.1.2 Yanıt.....	15
2.9.1.3 Faktör	16
2.9.1.4 Faktörlerin seviyesi.....	16
2.9.1.5 Yanıt yüzey	16
2.9.1.6 Model	16
2.9.1.7 Etki.....	17
2.9.2 Deneysel tasarım türleri	17
2.9.2.1 Tarama tasarımları	17
2.9.2.2 Yanıt yüzey tasarımları.....	18
2.9.3 Modelleme.....	19
2.10 Analitik Yöntemlerin Sürdürülebilirlik ve Pratiklik Değerlendirmesi.....	21
2.10.1 Yeşil kimya.....	21
2.10.1.1 Yeşil analitik kimya için metrikler.....	23
2.10.1.1.1 Ulusal çevresel yöntem endeksi: NEMI	24
2.10.1.1.2 Analitik eko ölçek	25
2.10.1.1.3 Analitik yeşillik hesaplayıcı: AGREE.....	27
2.10.2 Analitik yöntemlerin pratiklik değerlendirme	28
2.10.2.1 Mavilik (pratiklik) değerlendirme ölçeği	29
2.10.3 Beyaz analitik kimya.....	30
2.10.3.1 Beyaz analitik kimya değerlendirme ölçekleri.....	31
2.10.3.1.1 Kırmızı-yeşil mavi (RGB) ölçeği	31
2.10.3.1.2 RGB 12 ölçeği.....	34
3 GEREÇLER.....	37
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	37
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	38

4 YÖNTEMLER	39
4.1 Deneysel Parametreler	39
4.1.1 Enstrümental parametreler	39
4.1.2 Standart çözeltilerinin hazırlanışı	39
4.1.3 Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı	39
4.1.4 Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı	40
4.1.5 Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı	41
4.1.6 DoE çalışmaları	41
4.1.7 Sonuçların değerlendirilmesi	48
4.1.8 Yöntem geçerliliğinin tespiti	48
4.1.8.1 Sistem uygunluk testleri	48
4.1.8.2 Seçicilik ve spesifiklik	50
4.1.8.3 Kararlılık	50
4.1.8.4 Doğrusallık	50
4.1.8.5 Doğruluk	51
4.1.8.6 Kesinlik	51
4.1.8.7 Teşhis ve tayin alt sınırı	52
4.1.8.8 Sağlamlık	52
5 BULGULAR	53
5.1 Vamorolonun UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi	53
5.2 Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme	53
5.3 DoE Çalışmaları	54
5.3.1 Faktöriyel çok seviyeli kategorik tasarım (FMLCD)	54
5.3.2 Kesirli faktöriyel tasarım	61
5.3.3 Box-Behnken tasarımı	65
5.4 VAM'ın Hızlı Bozundurma Koşullarındaki Davranışları	70

5.5 Yöntem Geçerliliğinin Tayini.....	76
5.6 Geliştirilen Yöntemin Sürdürülebilirlik ve Pratiklik değerlendirmesi.....	81
5.6.1 Yöntemin yeşillik değerlendirmesi	81
5.6.1.1 Geliştirilen yöntemin Analitik eko ölçeği	81
5.6.1.2 Geliştirilen yöntemin ulusal çevresel yöntem endeksi:	
NEMI	82
5.6.1.3 Geliştirilen metodun analitik yeşillik hesabı: AGREE	82
5.7 Yötemın Pratiklik Değerlendirmesi.....	84
5.8 Yöntemin Beyazlık Değerlendirmesi	84
6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER	86
KAYNAKÇA.....	89
ÖZGEÇMİŞ	95

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 DoE Uygulama Basamakları	13
Tablo 2.2 Tasarım Basamakları	15
Tablo 2.3 ANOVA Denklemleri.....	20
Tablo 2.4 Yaygın Kullanılan Reaktifler İçin PP	26
Tablo 2.5 Yaygın Kullanılan Alet ve Proseslerin Enerji Tüketimleri ve PP	27
Tablo 2.6 RGB Ölçeği ve Puan Atama Kriterleri ve İlgili Renkler.....	32
Tablo 2.7 12 WAC ilkesi	35
Tablo 4.1 AGAMREE® Formülasyonu	40
Tablo 4.2 Zorlu Bozma Koşulları	41
Tablo 4.3 ATP'den CMA Belirlenmesi ve Gerekçelendirilmesi.....	42
Tablo 4.4 CMP'ler için FMEA değerlendirmesi	45
Tablo 4.5 Sistem Uygunluk Parametreleri.....	49
Tablo 4.6 SUT Parametreleri Eşitlikleri	49
Tablo 5.1 FMLCD'de Yer Alan Deneyler ve Elde Edilen Yanıtlar	56
Tablo 5.2 Model ANOVA Sonuçları.....	58
Tablo 5.3 Yanıtlara Ait Uyum İstatistikleri	59
Tablo 5.4 Kesirli Faktöriyel Tasarım Matrisi	63
Tablo 5.5 Kesirli Faktöriyel Tasarım Yanıtları	63
Tablo 5.6 BBD İçin Oluşturulmuş Tasarım Matrisi	65

Tablo 5.7 Box-Behnken Tasarımının Varyans Analizi (ANOVA) Sonuçları.....	66
Tablo 5.8 Sistem Uygunluk Değerlendirmesi Sonuçları	70
Tablo 5.9 VAM Çözeltisi İçin Zorlu Bozunma Çalışması Sonuçları.....	76
Tablo 5.10 Kesinlik ve Doğrusallık Parametreleri	77
Tablo 5.11 VAM'a Ait Geri Kazanım Verileri	78
Tablo 5.12 Ara Kesinlik Verileri	79
Tablo 5.13 Sağlamlık Verileri	80
Tablo 5.14 Stabilitate Verileri	80
Tablo 5.15 Geliştirilen LC-PDA Yöntemin Analitik Eko Ölçeği	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 VAM'ın Molekül Şekli.....	7
Şekil 2.2 Standart DMD Tedavisinin VAM ile Karşılaştırılması	8
Şekil 2.3 Deney Tasarım Türleri	17
Şekil 2.4 GAC 12 ilkesi	22
Şekil 2.5 AGREE Ölçeğine Göre Puan Atama Kriterleri	27
Şekil 2.6 BAGI Metriği ve Puan Atama Kriterleri	29
Şekil 4.1 Riskler ile İlgili Ishikawa Diyagramı.....	43
Şekil 5.1 VAM'ın UV-Görünür Bölgedeki Spektrumu (50,0 µg/mL)	52
Şekil 5.2 FMLCD Optimum Koşulların Tanımlanması İçin 3D Şekiller	60
Şekil 5.3 Kesirli Faktöriyel Tasarıma Ait Pareto Kartları.....	63
Şekil 5.4 A, B ve C'nin Bir Fonksiyonu Olarak 3D Yüzey Grafikler	66
Şekil 5.5 A, B ve C için Genel İsteklilik (D) Etkileşim Grafikleri.	67
Şekil 5.6 Isı Uygulanmış VAM Çözeltisi	69
Şekil 5.7 Isı Uygulanmış Boş Çözelti	69
Şekil 5.8 UV ile İşlem Görmüş Boş Çözelti	70
Şekil 5.9 UV ile İşlem Görmüş VAM Çözeltisi	70
Şekil 5.10 Asitli Ortamda Boş Çözelti.....	70
Şekil 5.11 Asitli Ortamda VAM Çözeltisi	71
Şekil 5.12 Alkali Ortamda Boş Çözelti.....	72

Şekil 5.13 Alkali Ortamda VAM Çözeltisi	72
Şekil 5.14 Oksitdatif Ortamda VAM Çözeltisi	73
Şekil 5.15 Oksitdatif Ortamda VAM Çözeltisi	73
Şekil 5.16 Geliştirilen Sıvı Kromatografisi Metodunun NEMI Piktogram	82
Şekil 5.17 Geliştirilen Yöntemin AGREE Piktogramı	83
Şekil 5.18 Yöntemin BAGI Değerlendirmesi	84
Şekil 5.19 RGB12 Değerlendirmesi.....	85
Şekil 6.1 Optimizasyon Süreci İş Akış Şeması	88

KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik Faktörü
AGREE	: Analitik Yeşillik Hesaplama Metriği
ANOVA	: Varyans Analizi
ATP	: Analitik Hedef Profili
As	: Asimetri Faktörü
AUC:	: Eğri Altında Kalan Alan
AQbD	: Tasarımla Analitik Kalite
BAGI	: Mavi Uygulanabilirlik Derece İndeksi
BBD	: Box-Behnken Tasarımı
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CMA	: Kritik Yöntem Nitelikleri
CMP	: Kritik Yöntem Parametleri
C _{max}	: Maksimum Serum Konsantrasyonu
D	: İsteklilik Fonksiyonu
DMD	: Duchenne Kas Distrofisi
DoE	: Deney Tasarımı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FFD	: Parçalı Faktöriyel Tasarım
FMLCD	: Faktöriyel Çok Seviyeli Kategorik Tasarım
FMEA	: Hata Modu Risk Analizi
GA	: Güven Aralığı
GAC	: Yeşil Analitik Kimya
GR	: Glukokortikoid Reseptörü
GRE	: Glukokortikoid Yanıt Elementin
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSD11B1	: Hidroksisteroid 11-Beta Dehidrogenaz 1
HSD11B2	: Hidroksisteroid 11-Beta Dehidrogenaz 2
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
k'	: Kapasite Faktörü
LOD	: Tespit Sınırı
LOQ	: Miktar Belirleme Sınırı

MR	: Mineralokortikoid Reseptör
MS	: Karelerin Medyası
N	: Teorik Tabaka Sayısı
NEMI	: Ulusal Çevre Yöntemleri Endeksi
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa-B
OSH	: Ortalamanın Standart Hatası
PDA	: Foto Diyod Dizisi
PP	: Penaltı Puanı
PNR	: Risk Öncelik Numarası
QbD	: Tasarıma Göre Kalite
RGB	: Kırmızı Yeşil Beyaz
Rs	: Ayrım Gücü
SH	: Standart Hata
SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Parametreleri
T	: Kuyruklanma Faktörü
T _{max}	: İlacın Kanda Maksimuma Ulaştığı Süre
USP	: Amerikan Farmakopesi
VAM	: Vamorolone
WAC	: Beyaz Analitik Kimya

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Kromatografi, belirli bir numuneyi bileşenlerine ayırmak için kullanılan analitik bir tekniktir. Günümüzde kullanılan en yaygın kromatografisi biçimi, numune karışımını yüksek basınç altında sabit bir faza pompalayan yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). HPLC, genellikle ilaç endüstrisinde çok geniş kullanım alanına sahiptir, çünkü gereken kesin sonuçları sağlayabilir. Sonuçlar, üretim süreci sırasında bitmiş ilaç ürünlerini ve bileşenlerini niceliksel ve niteliksel olarak analiz etmek için, farmasötik formülasyonlardaki yapıyı aydınlatma ve safsızlık miktarlarını belirlemede kullanılır. Safsızlık ICH (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu) kılavuzlarına göre yeni ilaç ürününün, ilaç maddesi veya ilaç ürünündeki yardımcı madde dışındaki herhangi bir bileşen olarak tanımlanır. İlaçların kalitesini garantilemek için safsızlıklar dikkatlice izlenmelidir. Bir safsızlığın ne olduğunu anlamak ve bu tür safsızlıkların potansiyel kaynaklarını belirlemek önemlidir (Teasdale vd., 2017). Bunları izlemek için seçici analitik yöntemler geliştirilmelidir. Karşılaştırmalı amaçlar için bir ölçüt sağlamak amacıyla safsızlıkların profillerinin çıkarılması ürünün kalitesi için elzemdir. Hedef ilaç molekülü ilgili safsızlıkların aynı matriks içinde bulunması koşulunda analit ile diğer bileşenler arasında en uygun ayırımı elde etmek için planlı ve sistematik bir analitik çalışma yürütülmelidir. Tasarımla Kalite (QbD) ve bunun analitik süreçlerdeki karşılığı deney tasarımı (DoE) önceden tanımlanmış hedeflerle başlayan ve ürün ve süreç anlayışını ve nihayetinde süreç kontrolünü elde etmek için bilim ve risk yönetimi yaklaşımlarını kullanan ilaç geliştirmeye yönelik sistematik bir yaklaşımdır. DoE kavramı analitik yöntemlere uygulanabilir. DoE yöntem için bir hedef belirlenmesini zorunlu kılar ve optimum yöntem performansını elde etmek için sistematik bir şekilde alternatif yöntemlerin kapsamlı değerlendirilmesini ve araştırılmasını vurgular. Aday yöntemler daha sonra riskler açısından yapılandırılmış bir şekilde dikkatlice değerlendirilir. Bu çalışmaların sonucunda, yöntem performansı anlaşılabilir ve gerekirse iyileştirilebilir ve riski yönetmek ve yöntemin doğrulandığında ve dağıtıldığında istenildiği gibi performans göstermesini sağlamak için bir kontrol stratejisi tanımlanabilir (Vogt ve Kord, 2011). Süreç deneysel çalışmalara geçilmeden risk analizi, analitik hedef profilin belirlenmesi, optimizasyona etki edecek parametrelerin belirlenmesi ve parametrelerin etkilerinin izlendiği yanıtların seçimi desteklenmelidir. Analit ile ilgili bileşikler arasında optimum ayırımı sağlamak için parametrelerin

dikkatlice ayarlanması ve ardından çok değişkenli istatistiksel optimizasyon tekniklerinin kullanılması gerekir. HPLC analizinde, bir değişkenin etkisi diğer değişkenlere bağlıdır. Çok değişkenli bir strateji, ilaç analizlerini etkileyen potansiyel değişkenlerin etkileşim etkileriyle karşılaşmak için değişken seviyelerinin de aynı anda değiştirildiği ve bunların hem bireysel hem de etkileşim etkilerinin izlenebildiği sonuçlar oraya çıkmaktadır (Ganorkar ve Shirkhedkar, 2017).

X kromozomuna bağlı bir bozukluk olan Duchenne kas distrofisi (DMD), 5000 erkek çocuktan birinde görülür ve erken çocukluk döneminde proksimal kas güçsüzlüğü ile ortaya çıkar. Tedavi edilmeyen erkek çocuklar 12 yaşına geldiklerinde tekerlekli sandalyeye mahkûm olurlar ve geç ergenliklerinden 20'li yaşların başına kadar kardiyovasküler komplikasyonlardan ölürlere (Yiu ve Kornberg, 2015). DMD için henüz tam anlamıyla tedavi edici bir yöntem geliştirilmemiş olmakla birlikte kortikosterooidler semptomların tedavisi için onaylanmış altın standart tedavidir. Vamorolon (VAM), DMD tedavisi için geliştirilmiş oral, seçici, dissosiyatif bir kortikosteroittir (Keam, 2024).

İlaç stabilitesi terimi, bir ilaç maddesinin veya ürününün, belirtilen sınırlar içinde ve depolama ve kullanım süresi boyunca, üretildiği zaman sahip olduğu özellikleri ve karakteristikleri ne ölçüde koruduğunu ifade eder (Williams vd., 2019). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Avrupa İlaç Kurumu veya Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu gibi çeşitli otoriteler ilaç ürünlerinin kalitesini tüm raf ömrü boyunca garanti edilmesi amacıyla çeşitli uygulamalar getirmiş ve kılavuzlar yayınlamıştır. Ürünlerin stabilitesinin sağlanmasındaki en elzem husus üretimin her aşamasında sürdürülebilir kalite anlayışı ve kritik noktalarda kontroldür. Kontrol doğru ve kesin sonuçlar veren analizler ile yürütülmelidir. Bu sebepten ilaç analizleri literatürde kritik öneme sahiptir. Analizlerin kapsamı ve hedefi bu ihtiyaçları karşılayacak doğrultuda uygulanabilir, hızlı ve verimli olmalıdır. Literatürde VAM analizi için yapılan çalışmaları ilaçın onay almasından önce klinik süreçleri desteklemek için gerçekleştirilmiş karşılama amaçlı plazma analizleri ya da metabolit tayinleri olup farmakokinetik ve dinamik çalışmaların hedefini karşılamaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında yapılan çalışmada hedef VAM'ın farmasötik preparatlarda analizi için bozunma ürünleri varlığında tam olarak yöntem geçerliliği sağlanmış, hızlı, yüksek doğruluğa sahip rutin analizlerde kullanıma sunulacak sıvı kromatografisi metodu geliştirmektir. Geliştirilen yöntem rutin analiz ve kalite kontrol için uygun sürdürülebilir ve pratik olacaktır. Yöntemin validasyonu ICH yönergelerine göre yapılmıştır.

2 KAYNAK BİLGİSİ

2.1 Duchenne Müsküler Distrofisi (DMD)

X kromozomuna bağlı bir bozukluk olan ve en yaygın kas distrofisi olan DMD, 5000 erkek çocuktan birinde görülür ve erken çocukluk döneminde proksimal kas güçsüzlüğü ile ortaya çıkar (Moat vd., 2013). DMD X'e bağlı kalıtsal resesif bir geçiş gösterir ve ilk defa Fransız bir nöroloji uzmanı Guillaume Benjamin Amand Duchenne tarafından 1860'lı yıllarda tanısı konmuştur (Dooley vd., 2010). Dünya genelinde her yıl yaklaşık olarak 20.000 yeni vaka ile kas distrofileri arasında yüksek prevalansa sahiptir (Lisak vd., 2016). Kadınlar taşıyıcı özellikler sergilerken asemptomatik olarak hayatlarını sürdürürler (Soltanzadeh vd., 2010). Hastalığın tanılanması erken çocukluk çağında gerçekleştirilir tanı kan testi, kas biyopsileri ve son olarak genetik testlerin ışığında doğrulanır (Davis vd., 2015).

DMD'de belirtilerin başlama yaşı genellikle 3-5 yaş civarındadır. Vakaların çok az bir kısmına 2 yaşından önce tanı konulmakla birlikte genellikle hastaların %99-100 civarına 7-9 yaş arasında hastalık tanısı konmaktadır (Solway vd., 2001).

Erken çocukluk döneminde görülen ilk semptomlar tipik olarak hareket etme ve yürüme ile karakterizedir. Geç yürüme, kas güçsüzlükleri, kas tonusunda azalma, özellikle baldır kaslarında görülen pseudohipertrofi yani baldır kaslarının anormal derecede genişlemesi, Gower's belirtisi olarak adlandırılan hastanın kendini ayağa kaldırmak için elleri ile vücudundan destek alması ve kaba motor becerilerde defektlerle izlenmektedir. Erken ergenlik dönemlerinde hastalar alt ekstremitelerde seyreden aşırı güçsüzlük nedeniyle tekerlekli sandalyeye bağımlı hale gelirler. Hastaların bir bölümünde konuşma bozuklukları ve ek olarak mental problemler gözlenebilir (Emery, 2002; Flanigan, 2012). İleri yaşlara gelindiğinde kaslarda görülen şiddetli atrofi, ortopedik bozukluklar, solunum ve kardiovasküler sistemlerde meydana gelen bozukluklar ve ince motor becerilerde meydana gelen kayıplarla seyreder (Fox vd., 2020). 20'li yaşlarda vakaların 4'te 3'ü solunum sıkıntıları geri kalan kısmı ise kalp yetmezliği nedeni ile yaşamını kaybeder (Bushby vd., 2005).

DMD geni bilinen en büyük insan genlerinden biridir. N-terminusta bir aktin bağlayıcı alan, 24 spektrin benzeri tekrar birimi, asistein açısından zengin distroglikan bağlayıcı alan ve bir C-terminal alan içeren 79 ekzon içerir. Genin son derece büyük boyutu, 7.000 farklı mutasyon ve yüksek bir kendiliğinden mutasyon oranı ile karmaşık bir mutasyon

spektrumuna katkıda bulunur. Vakaların yaklaşık üçte ikisi anneden kalıtlıdır; kalan üçte biri kendiliğinden mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkar (Aartsma-Rus vd., 2006; Koenig vd., 1988). DMD'de X kromozomuna ait kısa kolun (p-kolu) 21.2 bölgesindeki 85 ekzosunda meydana gelen mutasyon nedeniyle bu bölge tarafından kodlanması gereken distrofin proteini işlevsel olarak üretilemez. DMD'de distrofin geninde meydana gelen bu mutasyon distrofinin ifadesinin tamamen ortadan kalkmasına ve işlevini kaybetmesine neden olur (Hoffman vd., 1987). Distrofin proteinini, kas hücrelerinin stabilitesi için kritik öneme sahip olmakla birlikte hücre iskeleti yapısına katılan gliko-protein kompleksinin bir parçasıdır. Kas membranı ve hücre zarı arasındaki bağlantı distrofin proteinini aracılığı ile sağlanır. Distrofin defektinde kas hücresi ve hücre iskeleti arasında haberleşme bozulur bunun sonucunda kas zayıflar ve yapısı bozulur ve işlevini kaybeder (Hoffman vd., 1987).

Hastalığın ana nedeni olan gen uzun yıllar önce izole edilmiş ve üzerinde çalışmalar devam ediyor olmasına rağmen distrofin defektinde kas dejenerasyonuna yol açan mekanizma henüz tam anlamıyla aydınlatılmış değildir. DMD gelişimi özetle kaslarda ifade edilen tek bir genin mutasyonundan kaynaklanıyor olsada çıkan patoloji karmaşık ve sistemiktir ve tek bir gen ürününün silinmesiyle tahmin edilenden daha geniş bir şekilde dengenin bozulması sonucunu doğurur (Tidball ve Wehling-Henricks, 2007).

2.2 DMD ve Tedavi Yöntemleri

Şu anda DMD için bir kesin tedavi yoktur. Mevcut tedavi stratejileri büyüme ve gelişmeyi optimize etmeye, dengeli beslenmeyi teşvik etmeye, fiziksel amaçlı aktivitelere katılmaya ve devam eden tıbbi ve psikososyal destek yoluyla ikincil komplikasyonların başlangıcını geciktirmeye odaklanır. Genetik tedavilerinde arasında bulunduğu çeşitli tedavi yöntemleri DMD için geliştirilmekte ve uygulanmaktadır.

Virüs vektörleri kullanılarak distrofin gen replasmanı DMD için gen terapisini geliştirme yönündeki girişimler, distrofin geninin muazzam boyutu nedeniyle karmaşık hale gelmiştir. DMD'de kusurlu genleri değiştirmek için rekombinant adeno-ilişkili virüsler ve daha etkili vektör iletim sistemi kullanan ek klinik çalışmalar şu anda devam etmektedir (Koenig vd., 1988).

Ekzon atlama, spesifik distrofin gen mutasyonlarını düzeltmek için sentetik antisens oligonükleotid dizilerinin kullanıldığı tedavilerde denenmektedir (Goemans vd., 2011).

DMD'nin yaklaşık %10-15'i erken durdurma kodonuna yol açan nokta mutasyonlarından kaynaklanır. Aminoglikozidler ve diğer anlamsız mutasyon baskılama ajanları ribozomal RNA alt birimlerine bağladığı ve erken durdurma kodonunun tanınmasını bozduğu, böylece modifiye edilmiş bir distrofin proteininin translasyonuna ve üretimine izin verdiği çalışmalarla gösterilmiştir. Ataluren erken anlamsız mutasyonların üstesinden gelmek için tasarlanmış oral olarak biyoyararlanımlı bir ilaçtır ve DMD hastalığında denenmektedir (Szabo vd., 2021).

Yukarıdaki tedavi yöntemlerine ek olarak DMD için kas öncü kök hücreleri ile tedavi seçenekleri; membran stabilizasyonu ve sitoskeletal proteinlerin up regülasyonu ile tedavi gibi yöntemler de denenmekte ve çalışmalar devam etmektedir (Briggs ve Morgan, 2013). Önde gelen uzmanların son yayınları, DMD'nin tanısı ve multidisipliner yönetimi hakkında kapsamlı kılavuzlar sunmuştur ve bu kılavuzlara kortikosteroidler de dahil edilmiştir. DMD tedavi seçeneklerine ilk kez 1974'te sistemik kortikosteroidler dahil edilmiştir (Drachman vd., 1974). Tarihsel olarak, kortikosteroidler, kas gücünü ve işlevini stabilize ederek, bağımsız yürümeyi uzatarak ve skolyozun ve kardiyomiyopatinin ilerlemesini geciktirerek DMD'li erkek çocuklarına fayda sağlamaktadır. Bağımsız yürüme kaybindan sonra tedaviye devam etmenin de faydalı olduğu gösterilmiştir (Mah, 2016).

Kortikosteroidler prednizon/prednizolon ve deflazakort, güçlü anti-inflamatuar etkileri nedeniyle DMD'de farmakolojik bakımın altın standardıdır ve her ikisi de motor fonksiyonu stabilize etmek, semptomları kontrol etmek ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak, yürüme kaybını ve solunum yetmezliğini birkaç yıl geciktirmek için kullanılır (Dang vd., 2020; Kourakis vd., 2021). Ancak uzun vadeli kortikosteroid kullanımı, kemik kırılabilirliği, metabolik bozukluk, bağışıklık baskılanması, bodur büyüme, aşırı kilo alımı ve davranış değişiklikleri dahil olmak üzere önemli sistemik yan etkilerle ilişkilidir (Kourakis vd., 2021). DMD'de kortikosteroid dozaj rejimlerinin standartlaşmış yan etkileri nedeni ile ve optimal rejim ve dozaj konusunda hala belirsizlikler vardır.

VAM (AGAMREE®) (VAM), ReveraGen BioPharma ve Santhera Pharmaceuticals tarafından kas distrofisi olan hastaların tedavisi için geliştirilen oral, seçici, dissosiyatif bir kortikosteroittir. VAM, Ekim 2023'te ABD'de 2 yaş ve üzeri hastalarda DMD tedavisi için onaylanmıştır ve Ekim 2023'te AB'de 4 yaş ve üzeri hastalarda DMD tedavisi için olumlu görüş almıştır (Keam, 2024). VAM, geleneksel glukokortikoidlerin terapötik

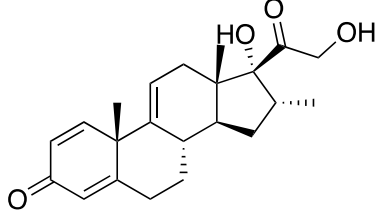
faydasını korumayı veya iyileştirmeyi ve aynı zamanda uzun vadeli uygulamaya bağlı ciddi yan etkileri azaltmayı amaçlayan yeni bir dissosiyatif steroid ilaçtır (Keam, 2024). VAM, diğer kortikosteroidlerle aynı reseptörlere bağlanır ancak farklı bir kimyasal yapıya sahiptir. Prednizon/prednizolon ve deflazakortun aksine VAM, steroidal C halkasında 11 β -hidroksil/karbonil kısmına sahip değildir, bu da yapı ve aktivite ilişkilerini değiştirir. Vücutta, tüm kortikosteroidleri aktif ve inaktif durumları arasındaki dengeyi sağlayan 2 enzim vardır. Bu enzimler, steroid omurgasının 11- β oksijen kısmına etki eder. Bu iki enzime 11- β hidroksisteroid dehidrogenazlar denir ve biri aktif hormon/ilâç ileri reaksiyonu gerçekleştirir (HSD11B1) ve diğer enzim ise ters reaksiyonu gerçekleştirir (HSD11B2). Bu enzimler, aktif ve inaktif kortikosteroid oranını sistemik olarak (dolaşım boyunca) ve ayrıca hücre farklılaşması ve onarımı bölgelerinde lokal olarak kontrol eder ve ayrıca kortikosterooidlerin olumsuz etkilerinde de sorumlulardır. VAM, bu enzimlerin modüle ettiği steroid omurgasının 11- β oksijen kısmını içermez. Bu nedenle, VAM, HSD11B1 veya HSD11B2'nin bir substratı değildir ve bu enzimler tarafından modüle edilemez. Bu şekilde, VAM sürekli olarak aktiftir ve bu modüle edici enzimler tarafından sistemik veya lokal olarak inaktive edilmez ve kortikosteroidle ilişkili olumsuz etkileri ile ilişkilendirilemez (Fenton vd., 2019; Keam, 2024).

2.3 Vamorolonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

VAM, kortikosteroid yapısındaki 11 β pozisyonunda eksik oksijen içeren ve burada kaybolmuş oksijen yerine bir karbon çift bağı (9-11 bağı) eklenmiş olan yeni nesil bir kortikosteroid ajandır bu nedenle VAM ve mineralokortikoid reseptör (MR) antagonistleri MR aktivasyonuna bağlı 11- β hidroksil gruplarından yoksundur ve 11 β -hidroksi eklenmesi bir bileşiğin MR agonist olarak işlev görmesi ile sonuçlanır. VAM, 11 β pozisyonunun bir karbon-karbon çift bağına sahip bir $\Delta^9,11$ steroid olmasından dolayı MR antagonisti olarak hareket eder. (X. Li vd., 2024). VAM'ın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir. 17 α ,21-dihidroksi-16 α -metilpregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dion veya 16 α -metil-9,11-dehidroprednizolon olup kimyasal formülü C₂₂H₂₈O₄ şeklindedir ve moleküler ağırlığı 356,50 g/mol'dür. Suda çözünürlüğü 0,0246 mg/mL olarak oldukça azdır. Dimetilsülfoksit içinde 2 mg/mL çözünürlüğe sahiptir. Beyaz toz halindeki VAM'ın pKa değeri 12,45 olarak ve logP değeri ise 3,36 olarak bildirilmiştir (https-1, 2025).

Şekil 2.1

VAM'ın Molekül Şekli



2.4 Vamorolonun Etki Mekanizması

VBP15 olarak da bilinen VAM, diğer kortikosteroidlere oranla daha az advers etki potansiyeline sahip bir ajandır. DMD’de glukokortikoidlerle mevcut tedavi rejimlerinin belirsiz moleküler faydaları ve sert yan etkileri bulunmaktadır. Büyüme ve gelişmenin hormonal olarak engellenmesini ve/veya immünosupresyonu önleyen tedavilerin daha fazla ya da daha az yararlı olup olmayacağı belirsizliğini korumaktadır. VAM, hormonal veya immünosupresif etkilerden bağımsız olarak anti-inflamatuar sinyal yolları ve membran stabilize edici mekanizmalar aracılığıyla etkinlik gösteren oral bir ajandır (Heier vd., 2019).

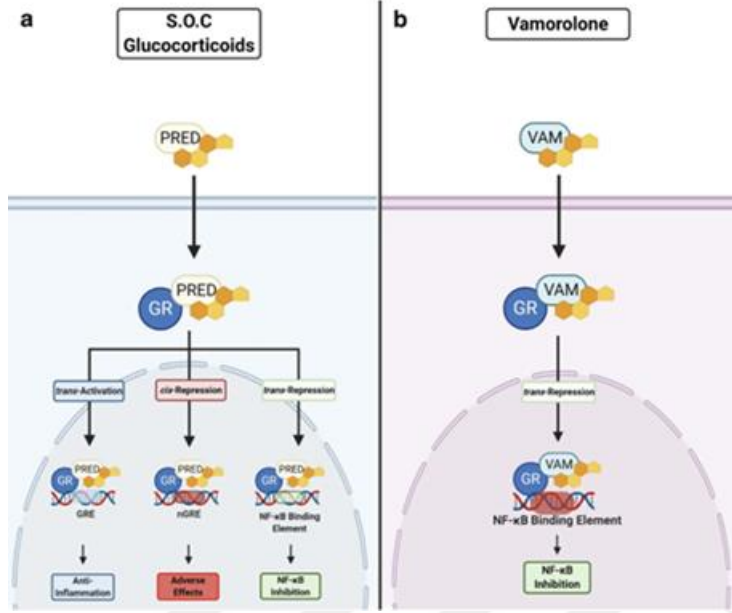
Nükleer faktör kappa-B (NF-κB) doğuştan ve adaptif bağışıklık işlevlerinin birçok yönünü düzenler ve inflammatuar yanıtların temel aracısı olarak görev yapar. Uyarılmamış hücrelerde, NF-κB inhibitör proteini (I-κB) ile etkileşerek inaktif durumda bulunur. NF-κB, sitokinler ve kemokinler kodlayanlar da dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar genlerin ekspresyonunu başlatır ve ayrıca inflamazom düzenlemesine katılır. Ek olarak, NF-κB, doğuştan bağışıklık hücrelerinin ve inflammatuar T hücrelerinin hayatta kalmasını, aktivasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemede kritik bir rol oynar. Sonuç olarak, düzensiz NF-κB aktivasyonu çeşitli inflammatuar hastalıkların patojenik süreçlerine katkıda bulunur (Liu vd., 2017). Farmakolojik glukokortikoidler, DMD’de standart bakım olarak kabul edilir ve birincil etki mekanizmalarının NF-κB yolları aracılığıyla anti-inflamatuar aktiviteler olduğu varsayılır (Heier vd., 2013).

VAM, glukokortikoid reseptörüne yüksek afiniteli bağlanma, mineralokortikoid reseptörüne yüksek afiniteli antagonizma ve membran stabilizasyon mekanizmaları aracılığı ile proinflammatuar NF-κB yollarını güçlü bir şekilde inhibe eden çok işlevli steroidajandır. VAM glukokortikoid reseptörüne güçlü bir şekilde bağlanır ve geleneksel glukokortikoid ilaçlara eş etkilere sahiptir. VAM, 11BHSD izoformları

tarafından metabolize edilemez ve bu nedenle aldosteron yanıtı hücrelerde daha fazla stabilite gösterir (Elhalag vd., 2023).

Şekil 2.2

Standart DMD Tedavisinin VAM ile Karşılaştırılması



Kaynak: Kourakis vd., 2021

Şekil 2.2’de ifade gösterildiği gibi **(a)** Prednizon gibi glukokortikoidler hücre zarından difüze olur, sitoplazmik nükleer hormon reseptörüne glukokortikoid reseptörü (GR) bağlanarak çekirdeğe taşınan bir reseptör-ligand kompleksi oluşturur. Bu kompleks dolaylı olarak glukokortikoid yanıt elementine (GRE) bağlanarak geniş spektrumlu anti-inflamasyonla (trans-aktivasyon) ilişkili hedef genleri ve NF-κB bağlayıcı elementi aktive ederek ana inflamatuvar düzenleyici NF-κB'nin transkripsiyonunu baskılar (trans-represyon). Bu mekanizmalar glukokortikoidlerin DMD'deki yararlı etkilerini ortaya çıkarır. Bunun aksine, olumsuz etkiler GR-ligand kompleksinin diğer hedef genlerdeki negatif GRE'ye doğrudan bağlanmasıyla aracılık edilir ve bu da transkripsiyonlarını baskılar (sis-baskılama). **(b)** Benzer şekilde, VAM GR'ye bağlanır ve standart tedavi glukokortikoidlerinin karakteristik anti-inflamatuvar etkilerini koruyarak, daha az olumsuz etki ortaya çıkarmak için neredeyse hiç transaktivasyon veya sis-baskılama olmadan transrepresyona neden olur (Kourakis vd., 2021). VAM, hücrelerde mitotik senkronizasyonun indüklenmesi yoluyla proinflamatuvar durumu azaltır. Bu mitotik senkronizasyon aktivitesi, kas distrofisi de dahil olmak üzere dokularda rejeneratif

senkronizasyona ve inflamasyonun azaltılmasına kadar uzanabilir. Son olarak, Vamorolonun miyojenik hücre zarlarına stabilite kazandırdığı gösterilmiştir (Elhalag vd., 2023).

2.5 Vamorolonun Farmakokinetik Özellikleri

VAM'ın farmakokinetiği, tek doz (0,1–20 mg/kg) veya çoklu doz (0,25–20 mg/kg) uygulamasından sonra doğrusal ve dozla orantılıdır; VAM, günde bir kez tekrarlanan uygulamadan sonra birikmez (Conklin vd., 2018). VAM'ın (2 mg/kg) yiyeceklerle birlikte uygulanması T_{max} 'ı yaklaşık 1 saat geciktirir (Hoffman vd., 2018). Günde bir kez 6 mg/kg VAM uygulanan 4-7 yaş arası DMD'li çocuklarda, 1. ve 14. günlerdeki ortalama C_{max} değerleri sırasıyla 856 ve 970 ng/mL ve ortalama AUC_{24} değerleri 3279 ve 3606 ng·h/mL olarak tespit edilmiştir (Conklin vd., 2018). 2-4 yaş aralığındaki DMD'li çocuklara günde bir kez 6 mg/kg VAM verildiğinde C_{max} ve AUC_{24} değerleri daha büyük çocuklardaki değerlere benzer bir şekilde gözlenmiştir. Popülasyon farmakokinetik analizine göre, 20 kg ağırlığındaki bir DMD hastasında yemekle birlikte VAM alındığında görünen sanal dağılım hacmi 162 L olarak belirtilmiştir. Ayrıca VAM'ın *in vitro* ortamda %88,1 oranında proteine bağlandığı ve kan-plazma oranının yaklaşık 0,87 olarak ifade edilmiştir. VAM, birden fazla faz I ve faz II metabolik yola (örn. glukuronidasyon, hidroksilasyon ve redüksiyon) aracılığıyla metabolize edilir ve metabolizma CYP3A4/5, CYP2C8, UGT1A3, UGT2B7 ve UGT2B17 aracılığıyla gerçekleşir (Keam, 2024). Bir popülasyon farmakokinetik analizine göre, 20 kg ağırlığındaki bir DMD hastası için VAM yiyeceklerle birlikte alındığında klirens 58 L/saat ve $t_{1/2}$ yaklaşık 2 saat şeklinde hesaplanmıştır (Keam, 2024). VAM, çoğunlukla idrarla metabolitleri halinde atılır ve dozun yaklaşık %30'u dışkıyla atılır (Keam, 2024).

Orta dereceli karaciğer yetmezliği olan deneklerde, VAM C_{max} ve AUC_{∞} , normal karaciğer fonksiyonu olan deneklere kıyasla sırasıyla yaklaşık 1,7 kat ve 2,6 kat arttığı bildirilmiştir. İtrakonazolün (güçlü bir CYP3A4 inhibitörü) çoklu dozlarından sonra VAM uygulanması, VAM C_{max} ve AUC 'yi sırasıyla %8 ve %44 oranında artırdığı bildirilmiştir (Keam, 2024). *In vitro* çalışmalarda, Vamorolonun CYP3A4'ü indüklediği, ancak klinik olarak ilgili konsantrasyonlarda CYP veya UGT izoenzimlerini inhibe etmediği bildirilmiştir (Keam, 2024).

2.6 Vamorolonun Farmakodinamik Özellikleri

VAM, GR için yüksek afinite, androjen reseptörü için çok düşük afinite gösterir ve östrojen ve progesteron reseptörlerine bağlanmaz (Heier vd., 2013). MR haberci hücre hattı analizleri, Vamorolonun, MR agonisti olan prednizolondan ve MR üzerinde agonist veya antagonist aktivitesi olmayan deflazakorttan farklı olarak, bir MR antagonisti olduğunu göstermektedir (Heier vd., 2019). *In vitro* ortamda, TNF α kaynaklı NF- κ B sinyalleşmesinin, VAM ve prednizolonun ≥ 1 nmol/L konsantrasyonlarında C2C12 kas hücrelerinde aynı ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir (Heier vd., 2013). DMD'li hastalarda yapılan klinik çalışmalarda, VAM uygulaması sabah kortizol seviyelerinde doza bağlı olarak bir azalma ve lökosit ve lenfosit sayımlarında doza bağlı bir artış ile ilişkilendirilmiştir (Guglieri vd., 2022; Hoffman vd., 2018).

VAM, 48 haftalık, randomize, çift kör, plasebo ve aktif kontrollü faz 2b DMD çalışmasında 4-7 yaş arası, henüz kortikosteroid tedavisi almamış DMD'li erkek çocukların tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Leinonen vd., 2023). Günde bir kez 6,0 mg/kg VAM ile tedavi edilen hastalarda sırtüstü pozisyondayken ayağa kalkma süresindeki başlangıç seviyesinden 24. haftaya kadarki değişim, plasebo alanlara göre önemli ölçüde daha fazla olduğu gözlenmiştir (Guglieri vd., 2022). VAM ile tedavi edilen 6 mg/kg/gün grubunda, sırtüstü pozisyondayken ayağa kalkma hızında plaseboya kıyasla önemli iyileşmeler 6. haftada görüldüğü bildirilmiştir ve 12. haftada iyileşmenin devam ettiği kanıtlanmıştır (Keam, 2024).

2.7 Vamorolonun Analizi için Geliştirilmiş Kromatografik Yöntemler

VAM'ın FDA onayını yeni almış olması ve farmasötik formülasyonu olan AGAMREE'nin henüz pazara girmiş olması nedeniyle, VAM'a ve bu formülasyona ait miktar tayini için literatürde mevcut bir yöntem bulunmamaktadır. Etkin maddeye ait analitik çalışmalar klinik süreçlerin izlenmesi, bu süreçlerde VAM'ın plazma konsantrasyonlarının belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Biyoanalitik yöntem kapsamında, VAM'ın plazma konsantrasyonları; spesifik ve valide edilmiş bir sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi yöntemiyle belirlenmiştir. Örnek işleme aşamasında 50,0 μ L'lik bir örnek hacmi kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde, sabit faz olarak 40 °C'de bir Waters Acquity BEH C18 kolonu (2,1 $\times$ 50 mm, 1,7 μ m) ve izokratik elüsyon yöntemi kullanılmıştır. Ultra performanslı sıvı kromatografisinde; hareketli faz A olarak suda %0,1 formik asit,

hareketli faz B olarak ise asetonitrilde %0,1 formik asit tercih edilmiştir. Ayrım, 0,80 mL/dk akış hızıyla gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi olarak, pozitif iyon modunda çalışacak şekilde turbo-iyon sprej kaynağı ile donatılmış üçlü dört kutuplu AB Sciex Triple Quad 5500 cihazı kullanılmıştır. Miktar tayini, VAM için m/z 357.3→147.1 ve martiksten kaynaklanabilecek etkileri azalmak için bir iç standart kullanılmış ve iç standart için 361.3→147.1 geçişlerinin çoklu reaksiyon izlemesine şeklinde yapılmıştır (Karbon 13 işaretli VAM). 2,00 ila 2000 ng/mL aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kesinlik %1,5 ila %4,4 arasında hesaplanmış. Miktar belirleme sınırı (LLOQ) 2,0 ng/mL olarak verilmiştir (Mavroudis vd., 2019).

Başka bir çalışma, VAM'ın insan karaciğer mikrozomlarında metabolik karakterizasyonunu belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Yöntemde tüm bileşikler sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi ile tespit edilmiş ve metabolit tanımlaması Compound Discoverer 3.3 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografi yönteminde, C18-PFP kolonu (150 mm × 2,1 mm, 3 µm) kullanılmış, kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak 5 mM amonyum format içeren sulu çözelti (A) ve metanol (B) seçilmiştir. Optimum ayırım için gradient elüsyon programı uygulanmıştır. Elüsyon programı, 0–1,5 dak %2 B, 1,5–3,0 dak %2–50 B, 3,0–9,0 dak %50–74 B, 9,0–12,0 dak %74–95 B, 12,0–15,0 dak %95 B ve 15,1–21,0 dak %2 B şeklinde ayarlanmıştır. Akış hızı 0,3 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresi sistemi; yüksek çözünürlüklü bir dedektör, ısıtılmış elektrosprej iyonizasyon kaynağı, 0,2 Pa çarpışma gazı basıncı (99,99% saf nitrojen), kılıf ve yardımcı gaz basınçları sırasıyla 35 ve 15 Pa olacak şekilde optimize edilmiştir. Buharlaştırıcı ve kılcal sıcaklıklar sırasıyla 350 °C ve 320 °C olarak ayarlanmış, sprej voltajı ise +3,8 kV olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, insan karaciğer mikrozomlarında 12 metabolit tanımlanmıştır; bunlardan 10'u faz I (M1–M8, iso-M1, iso-M3) ve 2'si faz II (M9–M10) metabolitidir. Ölçülen kütle sapmalarının teorik değerlerin 5 ppm içinde olduğu bildirilmiştir. VAM'ın alıkonma zamanı (RT) 12,36 dakika olarak belirlenmiş, metabolitlerin RT'lerinin ise 9 ila 14 dakika arasında değiştiği tespit edilmiştir (Z. Li vd., 2024).

2.8 Tasarımla Kalite

QbD, ilk olarak kalite öncüsü Dr. Juran tarafından geliştirilen bir kavramdır. Juran, kalitenin bir ürüne tasarlanması gerektiğine ve çoğu kalite krizinin ve sorununun, bir ürünün ilk etapta tasarlanma şekliyle ilgili olduğu fikrini öne sürmüştür (Juran, 1992).

Yeni, güvenli ve etkili tedaviler geliştirmek zaman alıcı, zorlu ve maliyetli bir süreçtir. Bu bağlamda, üretilen ürünlerin kalitesinin artırılması, maliyetlerin azaltılması ve ilaçların pazara ulaşma süresinin kısaltılması amacıyla QbD yaklaşımı ilaç endüstrisinde benimsenmiş ve uygulamada hızla yaygınlaşmıştır. Bu yaklaşım, kalitenin yalnızca son üründe test edilerek değil, ürün tasarımı aşamasında oluşturulması gerektiğini savunmaktadır (Buket, 2015). FDA, ilaç geliştirme, üretim ve regülasyon süreçlerinde risk tabanlı yaklaşımları ve QbD ilkelerinin benimsenmesini teşvik etmektedir. FDA'nın QbD'ye yaptığı vurgu, testlerin tek başına ürün kalitesini garanti etmediğinin anlaşılmasıyla başlamış ve kalite unsurunun ürünün içine tasarım yoluyla yerleştirilmesi gerektiği anlayışı bir gereklilik halini almıştır (Yu vd., 2014).

Yıllar içinde, farmasötik QbD, ICH Q8 (R2) (Peterson ve Lief, 2010), ICH Q9 (Elder ve Teasdale, 2017) ve ICH Q10'un (VanDuyse vd., 2021a, 2021b) yayınlanmasıyla evrim geçirmiş ve uygulama alanı genişlemiştir (Potter, 2009). Bu belgeler, QbD'nin farmasötik endüstrideki uygulamasına dair kapsamlı tanımlar ve üst düzey yönlendirmeler sunmaktadır.

2.8.1 Tasarımla analitik kalite (AQbD)

Analitik yöntemler, biyofarmasötik ve aşı endüstrilerinde araştırma-geliştirme faaliyetleri yürütmek, üretim girdilerini ve çıktılarını kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin, risk ve belirsizlikleri yönetirken karar verme süreçlerini destekleyecek şekilde sürekli ve güvenilir veri sağlaması gereklidir. Tasarım odaklı analitik kalite (Analytical Quality by Design – AQbD), doğrulanabilir, sağlam ve yaşam döngüsü boyunca sürdürülebilir bir test sistemine ulaşmak için sistematik bir çerçeve sunar. AQbD, Amerikan Farmakopesi (USP) 1220 ve ICH Q14 rehberleri aracılığıyla analitik alana adapte edilen ICH Q8 ve Q9 yönergelerine dayanmaktadır (Verch vd., 2022). AQbD yaklaşımı, analitik yöntemin, tanımlı çalışma alanı içerisinde faaliyet göstermesine olanak tanır. Analitik kimyada QbD ve DoE kavramları çoğunlukla birlikte anılır ve benzer yaklaşımın parçalarıdır. QbD, yöntemin sistematik ve bilimsel temellere

dayalı olarak geliştirilmesini hedefler. Analitik süreçlerinde temeli ve asıl çıktısı olan optimizasyon süreçlerinde DoE öne çıkarak QbD'nin yerini almıştır. Özellikle çok değişkenli optimizasyonun gerektiği durumlarda DoE, analitik yöntemin performansını doğrudan değerlendirme ve iyileştirme imkânı sunduğundan, pratikte QbD yerine geçen etkin bir araç haline gelmiştir.

DoE ile geliştirilen analitik yöntemler, bu çalışma alanı içerisindeki sağlamlıkları sayesinde, trend dışı veya spesifikasyon dışı sonuçların sıklığını azaltır. Risk yönetimi, farmasötik ürün geliştirme ve kalite sistemlerinin bir bileşeni olarak DoE yaklaşımının yöntem geliştirme süreçlerine entegrasyonu, farmasötik endüstride güncel bir eğilim haline gelmiştir (Verch vd., 2022). DoE, analitik yöntem gereksinimlerini ürün kalite gereksinimleriyle uyumlu hale getiren sistematik bir çerçeve sunar. Bu yaklaşım, yalnızca tek bir yöntem değil; birbirine bağlı ve optimize edilmiş çoklu yaklaşımın bir araya gelmesiyle hedeflenen kaliteye ulaşmayı amaçlayan bütüncül bir yapı olarak değerlendirilir (Hewitt vd., 2017). DoE uygulama basamakları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1

DoE Uygulama Basamakları

Yaklaşım	Uygulama
Gereksimlerin Belirlenmesi	Analitik hedef profili (ATP) belirlenmesi
Niteliklerin belirlenmesi	Kritik yöntem niteliklerinin (CMAs), belirlenmesi (Yöntem performansı ile ilgili nitelikler)
Kalite sınırlarının belirlenmesi	CMAs için kabul kriterlerinin belirlenmesi
Geliştirme ve tasarım	Teknoloji seçimi, yöntem parametrelerinin risks değerlendirme, kritik yöntem parametrelerinin (CMP'ler) taranması (Doe çalışmaları) ve optimizasyonu, yöntem işletilebilir tasarım bölgesi oluşturma analitik kontrol stratejisi geliştirme.
Kontrol parametreleri	CMP'lerin sistem uygunluğunun değerlendirilmesi
Doğrulama	Son yöntem performansının büyük ölçekli gösterimi; yöntem doğrulaması
Devam eden doğrulama	Devam eden yöntem performansı doğrulaması
Yaşam döngüsü	Onay sonrası değişiklik yönetimi protokolleri ve potansiyel olarak ICH
Yönetimi	Q12'ye göre yaşam döngüsü planları

Kaynak: Verch vd., 2022

2.9 Kemometri ve Deney Tasarımı

Kemometri deneysel çalışmalarda optimum koşulları sağlamak, seçmek ve bu koşullarla ölçümleri gerçekleştirmek için istatistik, matematik ve bilgisayar bilimleriyle bütünleşmiş bir şekilde çalışan kimya biliminin bir parçasıdır. Kemometrik yöntemlerin belirgin uygulaması analitik kimyasal verilerin işlenmesinden gelir. Modern analitik enstrümanların ürettiği veriler analitik kimyacıların kemometrik yöntemlerin uygulamalarını geliştirmesinin bir nedenidir (Otto, 2016).

Deney tasarımları deneylerden veri planlama, yürütme, analiz etme ve verilerin işlenmesi için geliştirilmiş istatistiksel tekniktir. Deneysel tasarım yöntemlerinin temelindeki yaklaşım, çok değişkenli verileri genellikle lineer veya daha yüksek derecede olan ve sistem hakkında öngörü sağlamak için kullanılabilen etkileşim terimlerine sahip deneysel bir fonksiyon geliştirilmesidir. İstatistiksel yaklaşım, fonksiyonun parametreleri hakkında bilgiyi en güvenilir seviyeye çıkarmak için verileri işlemek üzere her değişkenin değerlerini seçmek için kullanılır. Süreç boyunca gerçekleştirilecek deneylerin sırasını rastgele belirlenmesi, kontrol edilemeyen değişkenlerin (rneğin laboratuvarın sıcaklığı) tekrarlanabilirlik varyansına katkıda bulunmasını ve sonuçları sistematik bir şekilde etkilememesini sağlar (Hibbert, 2012).

Uzun yıllar boyunca analitik yöntemlerin geliştirilmesi, analistin uzmanlığı, deneyimi ve sezgisiyle şekillenen bir deneme-yanılma yaklaşımıyla yürütülmüştür. Bu geleneksel yaklaşım, yöntem optimizasyonu sırasında bir seferde yalnızca bir değişkenin değiştirilmesini ve diğer tüm değişkenlerin sabit tutulmasını esas alır. Bu yöntem, belirli bir ayrımı sağlamak açısından yeterli olabilir; ancak sistem üzerindeki değişkenlerin eş zamanlı etkileşimlerinin ve bu değişkenler arasındaki karşılıklı ilişkilerin değerlendirilmesi gerektiğinde yetersiz kalmaktadır. Gerçek optimum koşullara ulaşmak için tüm değişkenlerin sistem üzerindeki etkilerinin birlikte ele alınması gerekmektedir. Deneysel süreçteki tek bir koşulun değişmesi, süreçteki tüm etkili değişkenlerle ilgili yeterli bilgiyi ele alamaz. Bu zorluğun üstesinden gelmek için çok sayıda değişkenin dikkatlice tanımlanması, araştırılması ve kontrol edilmesi gerekir. Buna karşılık, deneysel değişkenler birbirine bağlıdır ve her birini tek tek ayarlamak çok fazla ham veri üretir ve bu da gerçek bir optimum sisteme ulaşmak için yorumlanması oldukça imkansızdır. Kemometrik bir deneysel tasarım, deneyleri sınırlı sayıda deneyle verilerin verimli bir şekilde modelleneceği şekilde planlayarak bu sorunun üstesinden gelebilir. Tasarımların

temel amacı genellikle değişkenlerin ve etkileşimlerinin süreç üzerindeki etkisini tahmin etmektir (Sahu vd., 2018).

Bir deneyi tasarlama ve uygulamaya geçirmek için, deneyde tam olarak neyin inceleneceği, verilerin nasıl toplanacağı ve bu verilerin nasıl analiz edileceği konusunun aydınlatılması gerekmektedir (Douglas, 2001). Deney tasarımı süresince izlenecek basamaklara Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2

Tasarım Basamakları

Deney Tasarlamak için Klavuzlar
1. Problemin tanınması ve ifade edilmesi
2. Yanıt değişkeninin seçimi ^a
3. Faktörlerin, seviyelerin ve aralıkların seçimi ^a
4. Deneysel tasarım seçimi
5. Deneyin gerçekleştirilmesi
6. Verilerin istatistiksel analizi
7. Sonuçlar ve öneriler
^a Uygulamada, 2. ve 3. adımlar genellikle aynı anda veya ters sırada yapılır

Kaynak: Douglas, 2001

2.9.1 Deney tasarımı kavramları

2.9.1.1 Deney tasarımı

DoE; optimum değerler için deneysel verileri tarama amacıyla, aynı anda farklı faktörlerin varyasyonuna izin veren, reaksiyon ve proses optimizasyonuna yönelik istatistiksel bir yaklaşımdır (Hibbert, 2012).

Analitik kimyada DoE, optimizasyonunu hızlandırmak ve pratikleştirmek için referans bir yöntem haline gelerek, az sayıda deneyde çok sayıda optimizasyon parametresinin değerlendirilmesine izin verir.

2.9.1.2 Yanıt

Çalışma veya optimizasyon konusu olan ölçülen veya gözlenen miktardır. Kromatografik çalışmalar için örneğin; pik alıkonma zamanı, teorik tabaka sayısı (N), kuyruklanma faktörü (Tf) pik alanı pik yüksekliği gibi analitik ölçümün kalitesini belirleyen çeşitli parametreler deneysel tasarımda yanıt değişkeni olarak nitelendirilebilir (Hibbert, 2012).

2.9.1.3 Faktör

Yanıtları etkileyerek değişim yaratan etkidir. Deneysel tasarımlar boyunca faktörler seviyelerinin ayarlanıp ayarlanamaması parametresine göre kontrollü ve kontrolsüz olarak sınıflandırılır. Yukarıda da bahsedildiği gibi deneylerin rastgele sıra ile yapılması kontrol edilemeyen faktörlerin yanıtın tekrarlanabilirlik varyansına katkıda bulunmasını sağlayabilir (Hibbert, 2012).

2.9.1.4 Faktörlerin seviyesi

Bir deneysel tasarımda öngörülen bir faktörün aldığı değerdir. Tasarımlar, bir faktör için seçilen seviye sayısına göre adlandırılır, örn. iki seviyeli, üç seviyeli tasarım; sıcaklık 20, 25, 30 °C; kolon: C8, C18 gibi (Hibbert, 2012).

2.9.1.5 Yanıt yüzeyi

Yanıt yüzeyi modellemesi yaygın olarak kullanılan bir deneysel optimizasyon stratejisidir. Bir veya daha fazla faktörün değerleri ile bir yanıtın ilişkisini ifade eder. Çoğu tepki yüzeyi modelinin parametreleri çok az deneyle belirlenebilir ve böylece geliştirme süresi ve optimizasyon maliyetleri önemli ölçüde azaltılabilir (Klein ve Rivera, 2000).

2.9.1.6 Model

Yanıt ve faktörler arasında ilişki kuran bir veya daha yüksek dereceli olabilen denklemlerdir. Faktörlerin polinomlarına dayanan ampirik modeller, polinomun sırasına göre tanımlanır, örneğin; birinci derece, ikinci derece. Krier ve vd., tarafından geliştirilmiş bir HPLC yönteminde yanıt kapasite faktörünün logaritması olarak belirlenmiş (k) başlangıçtaki izokratik adımın süresi (P), gradyanın başlangıcında ve sonundaki asetonitrilin kütle kesri (c_1 ve c_u) ve gradyanın (g) bir fonksiyonu olarak optimize edildimiş bir olarak model aşağıdaki denklemde verilmiştir (Hibbert, 2012; Lebrun vd., 2012).

$$\log(k) = \beta_0 + \beta_1 P + \beta_2 C_1 + \beta_3 C_1^2 + \beta_4 C_u + \beta_5 C_u^2 + \beta_6 g + \beta_7 g^2 + \beta_8 C_1 P + \beta_9 C_1 P^2 + \beta_{10} g P + \beta_{11} C_u P + \beta_{12} C_1 g + \beta_{13} C_u g \quad (2.1)$$

2.9.1.7 Etki

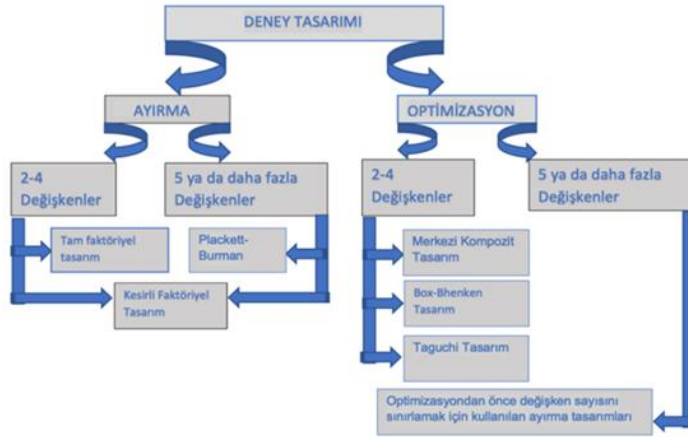
Bir modeldeki terimin katsayısıdır. Temel etki, bir faktörün birinci dereceden teriminin katsayısıdır. Etkileşim etkileri, doğrusal terimlerin ürünlerinin katsayılarıdır, örneğin; iki yönlü etkileşim, üç yönlü etkileşim. Yukarıdaki örnekte $\beta_1, \beta_2, \beta_4, \beta_6$ ara etkiler; $\beta_3, \beta_5, \beta_7$ ikinci dereceden etkileri ve β_8, β_{13} ikili etkileşimler ifade eder (Hibbert, 2012).

2.9.2 Deneysel tasarım türleri

Deney tasarımında bağımsız değişkenler olarak nitelendirilen faktörler x, bağımsız değişkenlerin etkileri ile değişen yanıtlarsa y ile sembolize edilir. Deney tasarımında bir değişkenin iki seviyesi kullanılıyorsa tasarım iki seviyeli olarak nitelendirilir ve değişkenin aldığı düşük değer -1, yüksek değer +1 ile sembolize edilir. Üç seviyenin yer aldığı bir deney tasarımında ise faktörün aldığı değerlerden düşük ve yüksek değerler sırasıyla -1 ve +1 kodları ortada kalan değer ise 0 ile ifade edilir (Hibbert vd., 2012). Şekil 2.3 deney tasarım türlerinin bir özetini göstermektedir.

Şekil 2.3

Deney Tasarım Türleri



Kaynak: Sahu vd., 2018

2.9.2.1 Tarama tasarımları

HPLC sürecini etkileyen çok sayıda unsur göz önünde bulundurulduğunda, etkisi ihmal edilebilir düzeyde olan faktörler analiz dışında bırakılmalıdır. En etkili faktörlerin taranması, deneysel tasarım kullanmanın temel amacı haline gelir. Bu tasarımlar, tüm olası faktörler arasında en önemli faktörleri ve bunların etkileşimlerini keşfetmeyi amaçlar. Nitel, nicel ve karışık ilişkili yönleri eş zamanlı olarak analiz etmek için oldukça

faydalıdır. Deney tasarımlarının temel taşı olan faktöriyel tasarımlar, tüm faktör seviyesi kombinasyonlarındaki çalışmaları belirler. k değişken boyunca L seviyelerinin L^k kombinasyonu vardır. Tam faktöriyel tasarımlarda tüm kombinasyonlar için deneyler yürütülürken, kesirli faktöriyel tasarımlarda, belirli model katsayılarının hesaplanmasını sağlamak için belirli bir alt küme yürütülür. Faktör taraması için genellikle iki seviyeli tasarımlar seçilir ve ana ve etkileşim etkileri öngörülebilir, ancak daha yüksek dereceli etkiler hakkında bilgi edinilemez. Fraksiyonlama, daha az sayıda denemeyle birincil etkiler üreten tasarımlar sağlar. İki seviyeli tasarımlarda etkileri değerlendirmek karmaşık değildir. İki seviye +1 ve -1 olarak gösterildiğinde, her faktörle ilişkili +1 ve -1 sütunları ilgili değerleriyle çarpılır (Hibbert, 2012).

2.9.2.2 Yanıt yüzey tasarımları

Tepki yüzeyi tasarımları iki türe ayrılır: simetrik tasarımlar ve asimetrik tasarımlar. Üç seviyeli faktöriyel tasarım, Merkezi Bileşik Tasarım, Box-Behnken Tasarımı (BBD), Taguchi Tasarımı ve Doehlert Tasarımları, deneysel hatayı değerlendirmek için merkezi bir nokta içeren simetrik bir alanı kapsar. D-optimal tasarımlar, asimetrik bir deneysel alanı analiz ederken asimetrik bir yapılandırma oluşturur (Sahu vd., 2018).

Bu tür tasarımlar ayrıca simetrik bir alan içinde simetrik bir yapılandırma sağlayabilir. ANOVA (Varyans analizi), sinyal-gürültü oranı ve aralık analizi, tepki yüzeyi tasarımları için temel istatistiksel analiz yaklaşımlarını sağlar. Aralık analizi, her değişkenin etkisini değerlendirmek ve çeşitli parametrelerin en iyi seviyelerini belirlemek için kullanılır. Bir faktör için ortalama aralığı, tüm seviyelerdeki maksimum ve minimum ortalamalar arasındaki farktır. En büyük ortalama aralığını gösteren faktör, sistem performansı üzerinde en önemli etkiyi uygular. Aralık analizi, çeşitli öğelerin ideal değerlerini belirleyebilir; ancak, bu yöntem bu yönlerin önemini nicelleştirmede ve açıkça tanımlamada başarısız olur. ANOVA'da, sonuçlar bir F testi kullanılarak değerlendirilir. Her bileşen için F değeri, o faktörün varyansının deneysel hatanın varyansına oranını belirtir. Her faktörün yüzdelik katkısı, o öğeye atfedilebilen karesel sapmaların toplamının, karesel sapmaların toplamının içindeki oranını temsil eder. Faktörün etkisini gösterir. Regresyon analizi, bir regresyon fonksiyonu aracılığıyla değişkenler arasındaki ilişkilerin tahmin edilmesini kolaylaştırır. Doğrusal birinci ve ikinci dereceden modeller yaygındır (Sahu vd., 2018).

BBD, üç seviyeli parçalı faktöriyel tasarımlara dayanan, dereceden tasarımlar sınıfıdır. Üç faktör için, grafiksel temsili iki şekilde görülebilir. BBD ile diğer tepki yüzeyi tasarımları (merkezi kompozit, Doehlert matrisi ve üç seviyeli tam faktöriyel tasarım) arasındaki karşılaştırma, BBD ve Doehlert matrislerinin merkezi kompozit tasarımdan biraz daha verimli olduğunu ancak bir deneysel tasarımın verimliliğinin üç seviyeli tam faktöriyel tasarımlardan çok daha verimli olduğunu göstermiştir. BBD'nin bir diğer avantajı da tüm faktörlerin aynı anda en yüksek veya en düşük seviyelerinde olduğu kombinasyonları içermemesidir. Bu nedenle, bu tasarımlar, tatmin edici olmayan sonuçların ortaya çıkabileceği aşırı koşullar altında gerçekleştirilen deneylerden kaçınmada faydalıdır (Ferreira vd., 2007). Sonuç olarak BBD, yanıt yüzeyi metodolojisi için iyi bir tasarımdır çünkü deneysel optimizasyon süresince şunlara izin verir: ikinci dereceden modelin parametrelerinin tahmini; ardışık tasarımların oluşturulması; modelin uyumsuzluğunun tespiti; ve blok kullanımı (Ferreira vd., 2007).

2.9.3 Modelleme

Model, bir yanıt değişkeni ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirtir. Matematiksel modeller deneysel veya teorik olarak sınıflandırılabilir. Bir deneysel model, faktörler ve yanıtlar arasındaki bağlantıyı belirler. Genellikle, belirli bir derecedeki polinomların bir kombinasyonudur. Aşağıdaki örnekte, deneylerden elde edilen verileri bir bağımsız değişken ve iki bağımlı bir değişken arasında matematiksel bir korelasyon kurarak karakterize eden üç değişkenli bir denklem verilmiştir (Brereton, 2003).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (2.2)$$

Modelde verilen y ifadesi yanıt terimine karşılık gelir, β_0 kesim noktasını ifade eder $\beta_1 x_1$, $\beta_2 x_2$, $\beta_3 x_3$ ifadeleri üç faktörün her birine bağımlı olan doğrusal terimlerdir. $\beta_{11} x_1^2$, $\beta_{22} x_2^2$, $\beta_{33} x_3^2$ ifadeleri ise yine üç faktöre bağımlı olarak değişen ikinci dereceden değerleri temsil eder. Modelde geri kalan ifadeler ise faktörler arası etkileşimler temsil eden değerlerdir. Yukarıdaki denklem oluşturulduktan sonra denklemde yer alan ampirik terimleri tahmin etmek için çeşitli yöntemler vardır. Modern bilgisayar paketleri ve e-tablolarla matrisleri kullanmak kolay ve mantıklıdır. Tasarım matrisi basitçe bir tanesidir satırlar deneylere atıfta bulunur ve sütunlar matematiksel modeldeki veya denklemdeki bireysel parametrelere atıfta bulunur yanıtı bireysel

faktörlerin değerlerine bağlar. Ampirik modelin çözümlenmesi için oluşturulmuş tipik bir tasarım matrisine ait şekil verilmiştir. Tasarım matrisleri hesaplanırken deneylerin sayısı, düzenlenmesi, tekrarlama dahil ve test edilecek matematiksel model dikkate alınması gereken iki önemli husus arasındadır (Brereton, 2003).

Fonksiyonu verilere uydurarak türetilen matematiksel model, bazen incelenen deneysel bölgeyi temsil etmede başarısız olabilir. Uydurulan modelin kalitesini değerlendirmek için en güvenilir yöntem, ANOVA uygulamasıdır.

ANOVA'nın temel kavramı, üretilen yanıtların ölçümüne özgü rastgele hatalardan kaynaklanan varyasyona karşı işleme atfedilen varyasyonu (değişken seviyelerinin birleşimindeki değişiklik) değerlendirmektir. Bu karşılaştırma, deneysel varyans kaynaklarını hesaba katarak, regresyonun yanıtları tahmin etmedeki öneminin değerlendirilmesine olanak tanır. ANOVA'da, veri kümesi varyasyonunun değerlendirilmesi, dağılımının analiz edilmesiyle gerçekleştirilir.

ANOVA'da, veri kümesi varyasyonunun değerlendirilmesi, dağılımının analiz edilmesiyle gerçekleştirilir. Her bir gözlemin (y_i) veya tekrarlarının (y_{ij}) ortalamaya ($\bar{y}$) göre gösterdiği sapmanın (d_i) değerlendirmesi veya daha spesifik olarak, bu sapmanın karesi, bir denklem ile gösterilir.

Toplam kareler toplamı (SS_{tot}), tüm gözlemlerin ortalamadan karelenmiş sapmalarının toplamını temsil eder. Bu, regresyon kareler toplamı (SS_{reg}) olarak bilinen, uydurulmuş matematiksel modele atfedilebilen kareler toplamına ve model tarafından üretilen artıklardan kaynaklanan kareler toplamına (SS_{res}) bölünebilir, bir denklemle ifade edilir gösterildiği gibidir. Merkez noktasının kopyalarını oluşturarak, tekrarlara bağlı içsel yanlışlık değerlendirilebilir. Sonuç olarak, artıkların karelerinin toplamı iki bileşene bölünebilir: saf hataya atfedilebilen karelerin toplamı (SS_{pe}) ve uyum eksikliğinden kaynaklanan karelerin toplamı (SS_{lof}), aşağıda gösterildiği gibidir. Sözü edilen tüm denklemler Tablo 2.3'te sunulmuştur.

Tablo 2.3

ANOVA Denklemleri

Denklem	Formül
Veri kümesi varyasyonu	$d_i^2 = (y_{ij} - \bar{y})^2$
Toplam kareler toplamı (SS_{tot})	$SS_{tot} = SS_{reg} + SS_{res}$
Sonuç olarak, artıkların karelerinin toplamı	$SS_{res} = SS_{pe} + SS_{lof}$

Her bir varyasyon kaynağı için karelerin toplamının (toplam, regresyon, kalıntı, uyumsuzluk ve saf hata) ilgili serbestlik derecesi sayılarına (d.f.) bölünmesiyle, karelerin medyası (MS) türetilir. Regresyonun anlamlılığı, regresyonun ortalama karelerinin artıkların ortalama karelerine oranıyla ve bu varyasyon kaynaklarının F testi kullanılarak karşılaştırılmasıyla, regresyon ve artık varyanslarının serbestlik dereceleri dikkate alınarak değerlendirilebilir.

Modelin tahmin yeteneğini belirlememize olanak sağlayan bir diğer parametrede uyum eksikliğidir. Matematiksel model deneysel verilere doğru bir şekilde uyuyorsa, MS_{lof} yalnızca sisteme özgü rastgele hataları temsil etmelidir. Dahası, MS_{pe} bu iki değer istatistiksel olarak ayırt edilemez olduğu varsayımıyla bu rastgele hataların bir tahmini olarak hizmet eder. F dağılımı, regresyon anlamlılığının doğrulanmasına benzer şekilde, bu iki ortalama arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını değerlendirmek için kullanılabilir (Bezerra vd., 2008). Ek olarak polinomal denklerimlerle iyi bir uyumu gösteren ve modelin tahmin yeteneğini kanıtlamaya yardımcı R-kare ve modifiye edilmiş R-kare değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olması gerekmektedir. $R > 0.8$ şeklinde olması model ile uygun veri eşleşmesini göstermektedir. Yüksek tahmin edilen R-kare değerleri, modelin ardışık tahminler için önemli tahmin doğruluğu gösterdiğini vurgular (Nassef vd., 2024). Deneyler tamamlandıktan sonra, tepki yüzeyinin kapsamlı bir matematiksel modeli geliştirilebilir. Optimizasyona ulaşmak için, konturlar veya üç boyutlu çizimler gibi yöntemleri kullanarak optimum noktanın yerini belirlemek faydalı olabilir (Brereton, 2003).

2.10 Analitik Yöntemlerin Sürdürülebilirlik ve Pratiklik Değerlendirmesi

2.10.1 Yeşil kimya

Analitik teknikler, doğruluk, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik gibi temel parametrelerin geliştirilmesini ve doğrulanmasını kapsar. Analitik yöntemler için basitlik, maliyet etkinliği, uyarlanabilirlik ve hız endüstriyel ölçekte önemli argümanlar arasındadır. Bununla birlikte, operatör güvenliği ve analitik prosedürlerin çevresel etkileriyle ilgili diğer faktörler sıklıkla göz ardı edilir. 1990'larda, çevresel örnekler de dahil olmak üzere çeşitli örnek türleri için tasarlanan analitik yöntemlerin yan etkileri nedeniyle paradoksal bir durum ortaya çıktı ve bu da önemli kimyasal atık üreterek önemli çevresel ve insani sonuçlara yol açtı. Bazı durumlarda, analizde kullanılan kimyasallar, tespit edilmesi hedeflenen kirleticilerden daha zararlı hale gelmiştir. Çevresel sorunlarla ilgili yaygın

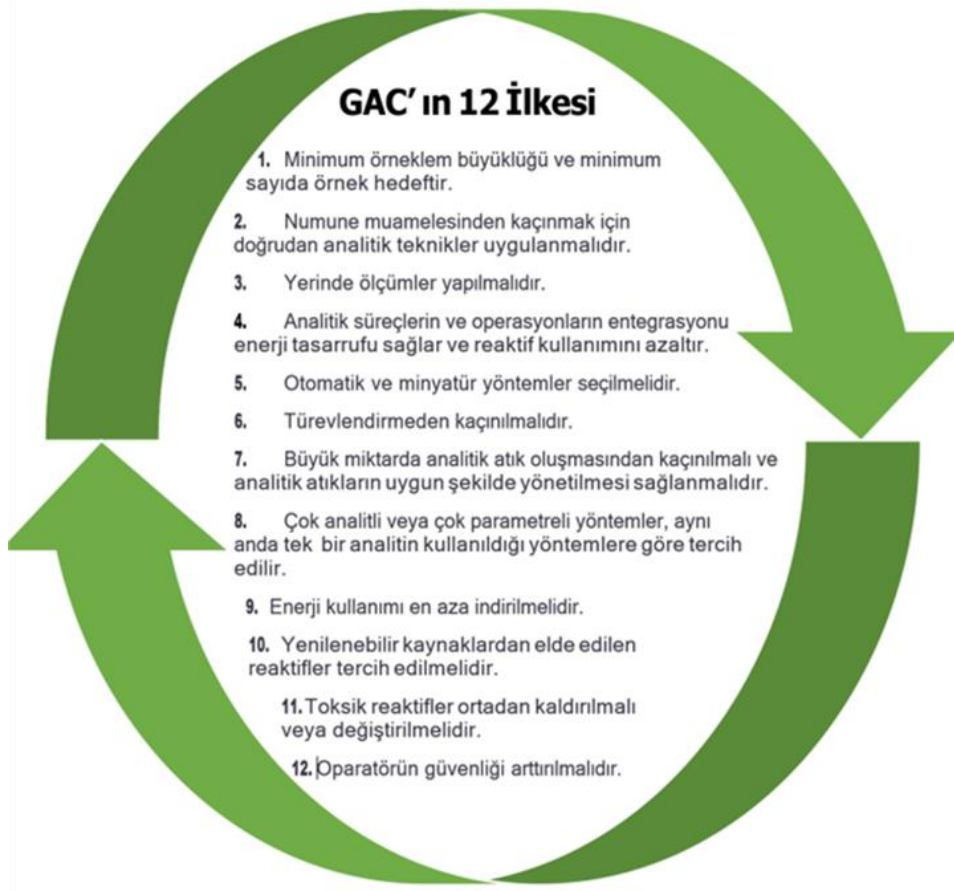
kamu endişesi göz önüne alındığında, çevresel analitik çalışmaların sıklığı ve bununla ilişkili toksik reaktifler ve çözücülerin kullanımı sürdürülemez bir düzeye ulaşmış ve çevreye duyarlı bir yaklaşım gerektirmiştir. Kimyanın, özellikle analitik kimyanın yan etkilerinin titizlikle incelenmesi gerekliliği, laboratuvarları su kirliliğini ve kentsel çöp deşarjını önlemek için atıkları yönetmeye ve kalıntıları toplamaya yöneltmiştir (Armenta vd., 2008).

Bu bağlamda, Yeşil Analitik Kimya (GAC), kirletici yöntemleri çevre dostu uygulamalarla değiştirmeyi amaçlayan, atık ve kalıntıların çevrimdışı yönetimi için uygulanabilir çözümler arayışı olarak başladı.

Tarihsel olarak 1987'de analitik kimyadaki paradigmalardaki değişiklikler hakkındaki fikirler sunuldu (Malissa ve Roth, 1987). On yıl sonra, İngiltere'deki Royal Society of Chemistry dergisinin The Analyst dergisi, analitik kimyaya bütünleşmiş bir yaklaşımda analitik uygulamaların bir modeli olarak çevresel analitik kimya konusunu önerdi ve analitik uygulamaların çevresel yan etkilerini de dikkate aldı (Armenta vd., 2023). GAC, analitik yöntemlerdeki numune tipleri, reaktif ve çözücü oranları, gelişmiş cihazların enerji tüketimi ve numune hazırlama ve analitik yöntemlerin çeşitli aşamalarından kaynaklanan laboratuvar atıkları ve emisyonları ile ilişkili analitik risklere daha yoğun bir şekilde odaklanan bir bölüm olarak ortaya çıktı (Armenta vd., 2008). 1998'de Anastas ve Warner yeşil kimyanın 12 ilkesini oluşturdu (Anastas ve Warner, 2000). Bu ilkeler sentetik kimyanın gereksinimlerini karşılamak için formüle edilmiş şekildedir ve yalnızca bir alt kümesi doğrudan analitik kimyaya uygulanabilir şekildedir. Yeşil kimyanın 12 ilkesi içinden hem sentetik hem de analitik amaçlar için geçerli kavramlar şunlardır: atıkların önlenmesi (ilke numarası 1); daha güvenli çözücüler ve yardımcı maddeler (ilke numarası 5); enerji verimliliği için tasarım (ilke numarası 6); ve; türevlendirmenin azaltılması (ilke numarası 8); Yeşil kimyanın 12 ilkesinin tümü için analitik kimya ile bağlantısının oluşturulması için çalışmalar yapılmış, ancak 12 ilkenin etrafıca analitik kimya kapsamında yetersiz kaldığı görülmüştür (Anastas ve Warner, 2000; Armenta vd., 2023). Bunu göz önünde bulundurarak, yeşil kimyanın 12 ilkesinin analitik kimyada tam uygulama bulmak için yenilenmiştir ve Gafuszka ve arkadaşları tarafından duyurulan Şekil 2.4'te verilen ilkeler analitik kimyayı etrafıca kapsamaktadır.

Şekil 2.4

GAC 12 ilkesi



Kaynak: Sajid ve Plotka-Wasyka, 2022

2.10.1.1 Yeşil analitik kimya için metrikler

Analitik kimya, kimyasal sentez, çevre bilimi, ekotoksikoloji, farmasötik analiz, farmakoloji ve ilaç toksikolojisi dahil olmak üzere çeşitli alanlarda faaliyet gösteren çok yönlü bir bilimdir. Analitik kimyada değerlendirilen örnek matrisleri, özellikle biyolojik malzemeler, giderek daha karmaşık hale gelmektedir ve analitik yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğüne yönelik talepler de önemli ölçüde artmaktadır. Bu bağlamda analitik yöntemlerin kapsamı ve uygulama alanları artmakta ve bunlarla doğru orantılı olarak numune hazırlama basamakları atık tüketimi ve cihaz kullanımı gibi önemli analitik süreçler karmaşıklaşmaktadır. Bu süreçleri nitel ve nicel olarak anlamlandırmak ve gerekli önlemleri almak için araştırmacılar çeşitli yeşil ve analitik metrikler geliştirmiştir. Bu metrikler şunlardır: Analitik Yöntem Hacim Yoğunluğu Yönetim Stratejileri için Kimyasal Tehlike Değerlendirmesi, Yeşil Analitik Prosedür Endeksi (GAPI), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - çevresel değerlendirme araçları, Yaşam Döngüsü

Değerlendirmesi, Ulusal Çevre Yöntemleri Endeksi (NEMI), Analitik Yeşillik Hesaplama Metriği (AGREE) şeklinde tercih sıralaması bulunmaktadır (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Bununla birlikte, Analitik Eko-Ölçek, NEMI ve AGREE ölçümleri çeşitli analitik metodolojilerdeki alakaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Yukarı sözü edilen birkaç gösterge uygulamada sadece belirli analitik metodolojilerle sınırlıdır. Analitik Eko-Ölçek, NEMI ve AGREE ölçümleri, Scopus veri yer alan önemli atıf sıklıklarıyla kanıtlandığı gibi akademik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

2.10.1.1.1 Ulusal çevresel yöntem endeksi: NEMI

NEMI ölçeklendirmesi, analitik yöntemlerin çevresel sürdürülebilirliğini değerlendirmek için kullanılan en eski araçlardan biridir. NEMI dört alana sahip bir daireselden oluşur. Her alan, analitik tekniği farklı bir perspektif ile inceler. Dairesel alan, belirli koşulları sağlaması halinde yeşil olarak değerlendirilir (Tobiszewski vd., 2015). İlk dilimi yeşil olarak belirlemek için, yöntemdeki bileşiklerin hiçbirinin kalıcı, biyo-birikimli ve tehlikeli maddeler listesine dahil edilmemesi gerekir. İkinci alanın yeşil olarak sınıflandırılması için, kullanılan kimyasalların hiçbirinin tehlikeli atık listeleri D, F, P veya U'ya dahil edilmemesi gerekir. Çalışılan numunenin pH'ı 2 ile 12 arasındaysa üçüncü alan yeşil olarak işaretlenebilir, böylece çok aşındırıcı koşullar önlenir. Oluşturulan çöp miktarı 50 g'ı geçmezse dördüncü alan yeşil olarak vurgulanır (Tobiszewski vd., 2015). NEMI'nin bir yeşil değerlendirme aracı olarak birincil avantajı, kullanıcı dostu süreç anlayışıdır. NEMI sembolünün genel bir görünümü, operasyonun çevresel etkileri hakkında temel bilgileri iletmek için yeterlidir. NEMI sembolünün iki temel dezavantajı, toplanan bilginin çok genel olması ve NEMI sembolünü doldurmanın zaman almasıdır. NEMI sembolü, her tehlikenin belirtilen bir eşiği aştığını veya altına düştüğünü belirtir. Sonuç olarak, yarı nicel olarak sınıflandırılmaz. İkinci dezavantaj, özellikle prosedürde birden fazla atipik kimyasal kullanıldığında, bir işaretin zahmetli hazırlanmasıyla ilgilidir. Alanlara kırmızı, sarı ve yeşil renklerin dahil edilmesi, NEMI aracının önemini ve niceliksellliğini artırmak için önerildi. Kırmızı renk, çevre dostu olmayan bir analitik yaklaşımı, sarı orta düzeyde olanı ve yeşil, zararsız, çevre dostu bir süreci belirtir (Yin vd., 2024).

2.10.1.1.2 Analitik eko ölçek

Analitik eko-ölçek kavramının temeli, ideal yeşil analizin 100 değerine sahip olmasıdır. Analitik prosedür parametrelerinin her biri için (reaktif miktarı, tehlikeler, enerji ve atık), ideal yeşil analizden saparsa ceza puanları atanır. Tehlikeli maddelerin etkisi miktarlarına bağlı olduğundan, toplam ceza puanlarının belirli bir miktar ve tehlike için ara toplam ceza puanlarının çarpılmasıyla hesaplanır (Gałuszka vd., 2012). Bu gereklilik, yalnızca doğrudan ölçümleri içeren ve numune taşıma, depolama, işleme veya hazırlamayı hariç tutan sınırlı sayıda işlemle karşılanabilir. Analitik prosedürlerdeki en zayıf noktaları açıkça ve belirgin bir şekilde göstermesi sayesinde Analitik Eko-Ölçeğin uygulanması, yeni, daha yeşil metodolojilerin araştırılması büyük bir öneme sahiptir. Analitik Eko-Ölçeği, laboratuvar uygulamaları ve eğitim amaçları için iyi bir yarı-kantitatif araçtır. Kullanımı basit ve hızlıdır, iyi tanımlanmış değerlendirme kriterlerine sahiptir ve bilinen ve yeni tüm metodolojilere uygulanabilir. Tüm bu özelliklerin sayesinde analitik Eko-Ölçeğin analitik laboratuvarlarda geniş bir şekilde uygulanma alanı bulmuştur.

Çözücüler veya reaktifler herhangi bir fiziksel, çevresel veya sağlık riski oluşturmaz; numune başına enerji tüketimi 0,1 kWh altındadır; atık oluşmaz kriterlerini karşılayan, bir yöntem "ideal yeşil analiz" olarak sınıflandırır (Gałuszka vd., 2012). Reaktiflere veya çözücülere ceza puanı verme yöntemi oldukça basittir. İşlem, bir kimyasal kabına veya şişesine iliştirilen tehlike piktogramlarıyla başlar. Her tehlike piktogramı bir ceza puanı getirir. Kimyasal "tehlike" terimiyle eşleştiriliyorsa, tehlike piktogramlarının sayısı iki katına çıkar; tersine, kimyasal "uyarı" terimiyle eşleştirilmişse, tehlike piktogramlarının sayısı değişmeden kalır (Gałuszka vd., 2012).

Tablo 2.4 analitik uygulamalarda yaygın kullanım alanına sahip solventler ve reaktifler için tehlike penaltı puanları (PP) hesaplamak için örnekler vermektedir.

Tablo 2.4*Yaygın Kullanılan Reaktifler İçin PP*

Kimyasal	Kimyasal	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	2	2	6
Etanol	2	2	4
Diklorometan	2	2	4
n-hekzan	4	2	8
CCl ₄	2	2	4
Nitrik asit	2	2	4
Benzoik asit	1	2	1

Kaynak: Galuzka vd.,2012

Analitik prosedür sırasında atmosfere bir gaz veya buhar salınması üç PP'nin atanmasıyla sonuçlanır. Ancak analitik süreçte gaz salınması kısıtlanırsa hiçbir PP ataması olmaz. Analitik teknik atık üretirse, PP'ler bu atığa miktarına göre aşağıdaki şekilde tahsis edilir: 1 mL veya 1 g: 1; 1-10 mL veya 1-10 g: 3; >10 mL veya 10 g = 5. Atık üretimi değerlendirilir ve arıtımı şu kriterlere göre değerlendirilir: geri dönüşüm :0, bozunma: 1, pasifleşme: 2, arıtılmamış: 3 olarak değerlendirilir (Galuzka vd., 2012).

Enerji kullanımına ilişkin performans puanlarının değerlendirmesi ise aşağıdaki kriterlere göre tahsis edilir: Numune başına $\leq 0,1$ kWh:0, numune başına $\leq 1,5$ kWh: 1, numune başına $\geq 1,5$ kWh: 2 olarak değerlendirilir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Tablo 2.5, enerji tüketim özellikleri ve ilişkili ceza puanları dahil olmak üzere sık kullanılan araçların ve prosedürlerin bir derlemesini sunar.

Tablo 2.5*Yaygın Kullanılan Alet ve Proseslerin Enerji Tüketimleri ve PP*

Araç/Süreç	Kullanılan enerji	PP'ler
FTIR, Titrasyon, UPLC, UV-VIS spektrometresi, İmmünoassay Spektrofluorometri, sıcak plaka çözücü buharlaştırma (<10 dakika), iğneli buharlaştırıcı, sonikatör	Numune başına	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

Kaynak: Galuzka vd.,2012

Son puan, toplam PP'lerin 100'den çıkarılmasıyla hesaplanır. 75'in üzerindeki bir puan “istisnai yeşil analiz” olarak kabul edilir. 50 ila 75 arasındaki bir puan “kabul edilebilir yeşil analiz” olarak kabul edilir. 50'nin altındaki bir puan “yetersiz yeşil analiz” olarak değerlendirilir (Sajid ve Plotka-Wasyłka, 2022).

2.10.1.1.3 Analitik yeşillik hesaplayıcı: AGREE

AGREE, GAC'nin 12 ilkesine doğrudan atıfta bulunan bir metrik ölçektir ve metrik araç, tam olarak karakterize edilmiş yeşil girdilerle yeterli sonuçlar verir. AGREE sisteminde, 12 ilke 0 ile 1 arasında değişen bir sonuç değerine dönüştürülür. Sonuç, renkli olarak gösterilen dairesel bir saat benzeri diyagram olarak gösterilir. AGREE yazılımı basittir ve bir analiz raporuyla otomatik olarak çizilmiş bir grafik üretir. Sonuç, genel puan ve renk açıklaması ortada bulunan bir saate benzeyen bir grafiktir ve her diliminin değerlendirmesini 12 prensipten alır. Her fikrin ağırlığı, ona uyan parçanın genişliği tarafından gösterilirken, her bir konudaki sürecin sonucu temel kırmızı-sarı-yeşil renk çizelgesi tarafından gösterilir. Ortadaki piktogram son notu gösterir ve en yeşil yöntem koyu yeşil renge sahiptir. Parçadaki her faktörün puanının rengi değerlendirme bölgelerini gösterir. AGREE yazılımı geniş, esnek ve yorumlanması ve çalıştırılması kolaydır. Ücretsiz yazılım değerlendirmeyi hızlandırır ve otomatikleştirir. Değerlendirme

birkaç saniye içinde gerçekleştirilebilir (Semysim vd., 2024). AGREE metriğine göre puan atama kriterleri ve sonuç çıktısı Şekil 2.5'te verilmiştir.

Şekil 2.5

AGREE Ölçeğine Göre Puan Atama Kriterleri



Kaynak: Semysim vd.,2024

2.10.2 Analitik yöntemlerin pratiklik değerlendirmesi

Yeşil kimya, ilk olarak 1990'larda Paul Anastasias ve John Warner tarafından kimyagerlerin bilgi, beceri ve yeteneklerinin her türlü kimyasal işlemde insan sağlığına ve çevreye yönelik tehditleri önlemek amacıyla kullanılabileceği bir yaklaşım olarak önerilmiştir (Anastas ve Warner, 2000). Yeşil Analitik Kimya, 2000 yılında yeşil kimya kavramından türeyen bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır ve analitik kimyagerlerin laboratuvar uygulamalarını daha çevre dostu hale getirmedeki rolüne odaklanmaktadır. GAC; kullanılan çözücü ve reaktiflerin güvenliği, toksik laboratuvar atıklarının azaltılması, analistlerin sağlığı ve enerji tüketimi gibi analitik yöntemlerin çeşitli yönlerini kapsar. Bu yaklaşım, analitik yöntemlerin yeniden tanımlanmasını ve çevresel etkilerinin yeniden değerlendirilmesini amaçlar. Günümüzde yeşil kimya ilkelerine uygunluk, sürdürülebilirliği sağlamak adına analitik yöntem geliştirmede temel bir gereklilik haline gelmiştir. Bir yöntemin çevresel performansını ve doğaya olan etkisini değerlendirmek üzere çeşitli yeşil ölçüm araçları önerilmiş ve bu araçlar uygulamaya konmuştur (Anastas ve Warner, 2000).

Yöntemlerin çevresel etkilerini değerlendirmeye yönelik geliştirilen araçlar, çoğu zaman rutin analiz laboratuvarlarında son derece önemli olan bir parametreyi, yani yöntemin pratikliğini yeterince dikkate almamaktadır. Bu eksiklik, 2021 yılında Nowak vd., tarafından ortaya konan Beyaz Analitik Kimya (WAC) kavramıyla giderilmeye çalışılmıştır. WAC yaklaşımı, yalnızca çevresel sürdürülebilirliği değil; aynı zamanda

analizlerin uygulanabilirliği, verimliliği ve laboratuvar koşullarına uygunluğunu da kapsamaktadır (Nowak vd., 2021). WAC, yeşil analitik kimyanın bir uzantısı ve tamamlayıcısı olarak hizmet eder ve kırmızı-yeşil-mavi (RGB) modeline göre bir analitik yöntemin ekolojik, analitik ve pratik perspektiflerini birleştirir. WAC'nin kırmızı rengi, yöntemin doğrulama kriterleri (doğruluk, hassasiyet, duyarlılık ve diğerleri) tarafından açıklanan analitik verimlilikle ilişkilidir; mavi ise yöntemin üretkenliğini ve pratik/ekonomik verimliliğini temsil eder. “Mavi” kategorisinin dört özelliği, maliyet etkinliği, zaman etkinliği, gereksinimler ve operasyonel basitliğe karşılık gelir (Manousi vd., 2023).

2.10.2.1 Mavilik (pratiklik) değerlendirme ölçeği

Yöntemlerin mavilik değerlendirmesi herhangi bir analitik yöntemin (örneğin, geleneksel, son teknoloji, yeni geliştirilen vb.) uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi için basit ve hızlı bir ölçüm aracı ola, mavi uygulanabilirlik derecesi endeksi (BAGI) geliştirilmiş ve önerilmiştir.

Mavi renk RGB modelinden esinlenmiştir ve önerilen endeks mevcut yeşil ölçüm araçlarına tamamlayıcı bir kavram olarak düşünülmektedir. Geliştirilmiş yeni aracın hedef kitlesi, analitik yöntem geliştiricileri ve akademi, endüstri ve rutin analiz laboratuvarlarından kullanıcıları kapsamaktadır ancak sadece bu kitle ile sınırlı değildir (Manousi vd., 2023) .

BAGI, bir analitik prosedürün uygulamasını ve kullanılabilirliğini gösteren bir piktogram ve sayısal bir değer sağlamak için 10 parametreyi hesaba katar. Sonuç, koyu mavi, mavi, açık mavi ve beyazın ayrı tonlarının sırasıyla belirtilen gerekliliklere göre yüksek, orta, zayıf ve uyumsuzluğu gösterdiği sıralı bir mavi renk ölçeğiyle temsil edilmiştir. Analitik prosedürün “pratik” olarak adlandırılabilmesi için üretilen toplam puan sayısının 60’dan büyük olması önerilir (Semysim vd., 2024).

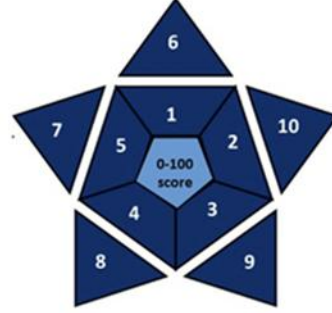
Bu araç, analiz türü, eş zamanlı olarak tespit edilen kimyasal sayısı, her saat değerlendirilebilecek test sayısı, prosedür tarafından kullanılan madde ve çözücü türleri, gerekli ekipman, eş zamanlı olarak işlenebilecek test sayısı, ön konsantrasyon ihtiyacı, otomatik süreçlerin derecesi, numune hazırlama türü ve numune miktarı ile ilgili on temel özelliği değerlendirir. Şekil 2.6, on parametreyi ve uygulanan tabloyu gösterir (Semysim vd., 2024) Niteliklerden 1-3 analitik belirleme adımına, nitelikler 4 ve 5 numune

hazırlama, nitelikler 6-10 ise her ikisine karşılık gelir. Değerlendirmede eşit ağırlıklara sahip dört ayrı puan kullanılır (Manousi vd., 2023).

Şekil 2.6

BAGI Metriği ve Puan Atama Kriterleri

1. Analiz türü.
2. Eş zamanlı olarak belirlenen analitlerin sayısı.
3. Analitik teknik ve gerekli analitik enstrümantasyon.
4. Eş zamanlı olarak işlenebilecek numune sayısı.
5. Numune hazırlama.
6. Saatte analiz edilebilecek numune sayısı.
7. Analitik yöntemde kullanılan reaktif ve malzemelerin türü.
8. Ön konsantrasyon gereksinimi.
9. Otomasyon derecesi.
10. Numune miktarı.



Kaynak: Semysim vd.,2024

2.10.3 Beyaz analitik kimya

GAC prensiplerinin kullanımıyla ilgili kritik bir endişe, yaklaşımın çevresel sürdürülebilirliğini potansiyel faydası ve işleyişiyle etkili bir şekilde dengeleme ve uyumlu hale getirme gerekliliğidir (Armenta vd., 2008). Bu unsurlar, kimi zaman birbirleriyle çelişebilmektedir. Yaklaşımın etkinliği, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık gibi doğrulama kriterleri ile birlikte analiz maliyeti, hızı ve yöntemin genel basitliği gibi pratik ve ekonomik faktörlere de bağlıdır. Bu bağlamda, çevre dostu bir yöntem ile diğer performans kriterleri arasında denge kurulmasına yönelik farklı bakış açıları ve yaklaşımlar mevcuttur. Yeşil kimyada temel yaklaşım, yöntem seçiminde çevresel sürdürülebilirliğe öncelik verilmesidir. Ancak, rutin analiz laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin diğer kriterler açısından kabul edilebilir düzeyde olması koşuluyla, sürdürülebilirlik ikinci aşamada ele alınabilmektedir. Dahası, daha sürdürülebilir teknolojilere geçiş, bu teknolojilerin geliştirilmesi, optimize edilmesi ve doğrulanması süreçlerine hâkim olacak şekilde operatörlerin eğitilmesini gerektirir ki bu da bazı durumlarda önemli bir zorluk oluşturabilir. Ayrıca, sürdürülebilir yöntemlere erişim; ekonomik, sosyal ve coğrafi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Sajid ve Płotka-Wasyłka, 2022).

Bazı araştırmacılara göre yöntemi sadece sürdürülebilirlik kriterleri ile ölçmek yeterli olmayıg, yöntemlerin etraflıca değerlendirilmesi gerekmektedir. Yöntemi tüm çıktılarıyla değerlendiren bir yaklaşımda güvenilir bir değerlendirme ile yöntemin gerekli sonuç

kalitesi (doğrulama kriterleri) ve kullanılabilirlik yoluyla sosyal talepleri karşılayıp karşılamadığı, ekonomik olup olmadığı, güvenli ve çevre dostu olup olmadığı gibi birçok faktörün dikkate alınmasını gerekir (Koel, 2016). Daha önce tartışılan yeşil değerlendirme araçlarının, yani Analitik eko-ölçek, NEMI, GAPI ve AGREE'nin yöntemlerin potansiyelini kapsamlı bir şekilde yakalamadığı yani yöntemleri bu çerçeveden değerlendirmede düşünülmemiştir. Ancak, yöntemlerin önce diğer parametreler (örneğin analitik ve pratik) açısından önceden seçilebileceğini ve ardından havuzu analitik ve pratik olarak kabul edilebilir yöntemlere daralttıktan sonra, bu tür yöntemlerin yeşilliğinin karşılaştırılıp zıtlştırılabilceğini yaklaşımı bazı araştırmacılar tarafından önerilmiştir (Nowak ve Kościelniak, 2019).

2.10.3.1 Beyaz analitik kimya değerlendirme ölçekleri

Alternatif bir yaklaşım, GAC ilkelerine uyumu ifade edenler de dahil olmak üzere tüm istenen kriterleri hesaba katan küresel bir değerlendirmeye izin veren algoritmalar kullanarak yöntemleri seçmek ve bu genel değerlendirme açısından en yüksek sıralamayı elde edenleri en uygun yöntemler olarak değerlendirmektir. Analitik yöntemlerin etrafı değerlendirilmeleri için mevcut algoritmalara genel bir bakış yakın zamanda yayınlanan bir makalede (Nowak ve Kościelniak, 2019) sağlanmıştır. Bu araçlardan biri, elektronikte yaygın olarak kullanılan renk modeline atıfta bulunan ve yeşil kimya kavramını diğer birincil renklere (Kırmızı ve Mavi) genişleten RGB modelidir (Nowak ve Kościelniak, 2019). Bir diğeri ise uygulama kolaylığı sağlayan RGB 12 modelidir (Nowak vd., 2021).

2.10.3.1.1 Kırmızı-yeşil mavi (RGB) ölçeği

RGB ölçeğinde renkler benzer şekilde, aracın adı olan üç ana rengin (Kırmızı, Yeşil, Mavi) baş harflerinden gelir; modelde bunlar herhangi bir analitik yöntemin üç ana niteliğine karşılık gelir: analitik performans tipik olarak klasik bir doğrulama süreciyle değerlendirilir (kesinlik doğruluk LOD ve LOQ) kırmızı ile simgelenir. GAC'nin yaygın olarak tartışılan yönlerini içeren güvenlik/çevre dostu olma, örneğin reaktifler ve atıklarla ilgili tehlikeler, mesleki riskler veya enerji tüketimi yeşil ile değerlendirilir; ve maliyet ve zaman etkinliği, numune imhasının kapsamı, metodolojik karmaşıklık, uygun personel eğitimiyle ilgili zaman ve maliyet gibi kriterleri içeren üretkenlik/pratik etkinlik, ve servis sıklığı veya rastgele arıza riski gibi bazı sıradan enstrüman işletimiyle ilgili hususlar ise mavi kısmı oluşturur.

Elektronik cihazlarda olduğu gibi, bu üç birincil ışık rengini karıştırmak beyazlık izlenimi yaratır, bu nedenle analitik bir yöntem tüm birincil niteliklere tatmin edici bir derecede sahipse beyaz olur. Bu tür bir beyaz yöntem böylece tam ve tutarlıdır. Başka bir benzetmeye göre, yalnızca iki birincil bileşeni karıştırmak ikincil renklerden birini verir. Sarı, macenta veya camgöbeği yöntemi iki nitelik açısından tatmin edicidir ancak kalan birincil renkten yoksundur, bu nedenle ne tam ne de tutarlıdır. Mantıksal olarak, yalnızca bir niteliğe sahipse ve diğer ikisinden yoksunsa bir yöntem kırmızı, yeşil veya mavidir. Bir yöntemin kırmızılık, yeşillik ve mavilik fikrine uyup uymadığı, %0 ile %100 arasında değişen bir Renk Puanı (RP) ile nicel olarak ölçülür. Karşılık gelen $RP \geq 66,6$ ise yöntemin bu temel renklerden birini kazandığını varsayılır; bu sınır değer beyazlık değerlendirmesi için "tatmin aralığı" adını alır. Belirli RP'si $\geq 33,3$ ise, "tolerans aralığı" olarak adlandırılır, yöntem bu birincil nitelik açısından renksizdir ve diğer iki nitelik açısından şeffaf/nötrdür.

Bu nedenle, bir RP tolere edilebilir ve diğer iki RP değeri tatmin ediciyse, yöntem macenta, sarı veya camgöbeğidir. İki RP değeri tolerans aralığında ve bir RP değeri tatmin edici aralıktaysa, yöntem kırmızı, yeşil veya mavidir. Üç RP değerinin hepsi tolere edilebilir ancak tatmin edici değilse, yöntem renksizdir (bu gri renkle gösterilir). Ancak, en az bir $RP < 33,3$ ise, yöntem siyah olur ve diğer nitelikler için şeffaf olmaz. Başka bir deyişle, diğer birincil renkler engellendiği için her zaman nihai olarak siyahtır.

Bu yaklaşım, en az bir birincil nitelik kabul edilemezse, yöntemin diğer olumlu özelliklerinin nihai derecelendirmede gölgede bırakılacağı mantıksal gerekçesiyle haklı çıkar. Önerilen renkler, temel niteliklerin renkleri ile eşleştirilmesi ve yöntemlerin sonuçlarına dair açıklama Tablo 2.6'da verilmiştir (Nowak ve Kościelniak, 2019).

Tablo 2.6

RGB Ölçeği ve Puan Atama Kriterleri ve İlgili Renkler

Renk Skoru (%)			Sonuç Yöntem Rengi	Açıklama
R	G	B		
$\geq 66,6$			Beyaz	Yöntem tüm uygulamalar için ideal adaydır
Yeterlilik				

Tablo 2.6 (Devam) RGB Ölçeği ve Puan Atama Kriterleri ve İlgili Renkler

≥ 66.6 (İdeal)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	≥ 66.6 (İdeal)	Magenta	Daha yeşil bir alternatif yoksa yöntem seçilebilir
≥ 66.6 (İdeal)	≥ 66.6 (İdeal)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	Sarı	Planlanan analiz sayısı az sayıda ise yöntem seçilebilir
<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	≥ 66.6 (İdeal)	≥ 66.6 (İdeal)	Siyan	Analitik sonuçların kalite gereklilikleri esnek ise yöntem seçilebilir
≥ 66.6 (İdeal)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	Kırmızı	Daha yeşil alternatif bir yöntem yoksa ve planlanan analiz sayısı az ise yöntem seçilebilir.
<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	≥ 66.6 (İdeal)	Mavi	Daha yeşil alternatif bir yöntem yoksa ve analitik sonuçların kalite gereklilikleri esnek ise yöntem seçilebilir
<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	≥ 66.6 (İdeal)	<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)	Yeşil	Planlanan analiz sayısı az sayıda ise ve analitik sonuçların kalite gereklilikleri esnek ise yöntem seçilebilir
<66.6 ≥ 33.3 (Tolere edilebilir)			Gri	Daha üstün bir yöntem yok ise yöntem seçilebilir

Tablo 2.6 (Devam) RGB Ölçeği ve Puan Atama Kriterleri ve İlgili Renkler

<33.3 Temel niteliklerden en az biri kabul edilebilir seviyede değil	Siyah	Uygun yöntem uygulaması şüpheli temel niteliklerde kusur var
--	-------	--

Kaynak: Nowak ve Koscielniak, 2019

2.10.3.1.2 RGB 12 ölçeği

Mevcut ölçeğin amacı, halihazırda bilinen RGB modelinden esinlenerek analitik kimyada Sürdürülebilir kalkınma prensiplerinin uygulanması için yeni bir bakış açısı sunmaktır. Bu fikir, GAC'nin bilinen 12 prensibine benzer şekilde Beyaz Analitik Kimyanın (WAC) 12 prensibinin formülasyonuna dayanmaktadır. Bu prensipler, yeşil ve diğer kalan kriterler dahil olmak üzere, istenen yöntem özelliklerine ilişkin tüm ana beklentileri resmi ve sistematik bir şekilde ifade etmeyi sağlar. Bir çalışma sayfası satırlar ve sütunlara ayrılır sütunlar, üç tamamlayıcı alana ayrılır: kırmızı (analitik verimlilik), yeşil (çevre dostu olma ve güvenlik) ve mavi (pratik ve ekonomik yönler). Tıpkı beyaz rengin kırmızı, yeşil ve mavi ışığın karıştırılmasıyla yaratılması gibi, analitik yöntem de her bir birincil renge ulaştığında beyaz ve dolayısıyla tamamlanmış olur (Nowak vd., 2021).

WAC, GAC'nin temel varsayımlarını içerirken aynı zamanda ek beklentileri de ele alır ve böylece değerlendirilen niteliklerden hiçbirine doğrudan öncelik vermeden çeşitli parametrelerin bütünlüğünü korumaya çalışır. Sürdürülebilir kalkınma için çabalamak, bu nedenle “beyaz” bir yöntem için çabalamaktır; bu nedenle, belirli bir uygulama için uygun dengeli bir analitik metodolojinin eşanlamlısı olarak “beyaz” teriminin kullanılmasını önerilmektedir. Aynı zamanda, WAC'nin varsayımlarıyla tamamen entegre olan RGB algoritmasının yeni bir versiyonunu olarak yeni geliştirilen RGB 12, ayrıca serbestçe erişilebilen bir Excel elektronik tablosuna dayanmaktadır ve önceki versiyona kıyasla önemli ölçüde basitleştirilmiştir. Bu yeni algoritma, önerilen 12 WAC ilkesinin her birine karşı yöntemlerin kolay ve hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar ve bu perspektiften yöntemin beyazlığını, yani sürdürülebilirlik derecesini değerlendirir (Nowak vd., 2021).

12 WAC ilkesini formüle etmek için, 12 bilinen GAC ilkesini, GAC'nin en önemli ve karşılıklı olarak bağımsız yönlerini kapsayan 4 kapsayıcı “yeşil” kurala indirgeniştir (G1-G4). Bu 4 ilke daha sonra, analitik verimlilik ve pratik/ekonomik kriterlerle ilgili 4 “kırmızı” ilke (R1-R4) ve 4 “mavi” ilke (B1-B4) ile birleştirilerek toplamda 12 WAC ilkesi oluşturulur (Semysim vd., 2024).

WAC konseptine göre, sürdürülebilirlik fikrini korumak için tüm renklerin ve ilkelerin eşit derecede önemli olduğunu vurgulanmaktadır. Ancak, bir yöntemin gerçek yararlılığı ve işlevselliği yalnızca belirli bir özel durumda ve ilgili koşullarda kritik olan belirli ilkelerle, örneğin LOD (Tespit sınırı) ve maliyet etkinliğiyle belirlenmektedir. Bu nedenle önerilen yaklaşımda her ilke yöntem değerlendirmesi sırasında dikkate alınmalıdır ve belirli bir uygulama için en önemli olanlar daha ciddi bir şekilde, gereksinimlere uygun şekilde değerlendirilmelidir. Yöntemin önerilen kurallara genel uyumu, yöntemin planlanan uygulamaya nasıl uyduğunun basitleştirilmiş ölçüsü olan “beyazlık” adı verilen nicel bir parametre ile ifade edilir (Nowak vd., 2021). WAC 12 ilke ve açıklaması Tablo 2.7’de gösterilmektedir.

Tablo 2.7

12 WAC ilkesi

Renk kodu	Kapsamı	Açıklaması
Kırmızı		
K-1	Uygulama kapsamı	Analitik yöntemler, eş zamanlı olarak belirlenen analitlerin sayısı, belirlemelerin doğrusallık aralığı, çeşitli numune tipleriyle uyumluluk ve olası girişimlerin varlığına karşı direnç olarak ifade edilen mümkün olan en geniş uygulanabilirlik aralığına sahip olmalıdır.
K-2	LOD ve LOQ	Analitik yöntemler, mümkün olan en düşük tespit ve kantifikasyon sınırlarına (LOD ve LOQ) sahip olmalıdır.
K-3	Kesinlik	Analitik yöntemler, sonuçların tekrarlanabilirliği ve yeniden üretilebilirliği olarak ifade edilen mümkün olan en iyi kesinlik ile karakterize edilmelidir.
K-4	Doğruluk	Analitik yöntemler mümkün olduğunca doğru olmalıdır (belirlemelerin minimum bağıl hatası ve mümkün olduğunca %100'e yakın geri kazanım).
Yeşil		
Y-1	Reaktiflerin toksisites	Analitik yöntemler, kullanılan reaktiflerin mümkün olan en düşük toksisitesi ve biyolojik olarak parçalanabilir/yenilenebilir reaktiflerin ve malzemelerin maksimum payı ile karakterize edilmelidir.
Y-2	Reaktiflerin ve atıkların sayısı ve miktarı	Analitik yöntemler, reaktiflerin mümkün olan en düşük tüketimi ve atık üretimi (ne kadar toksik olduklarına bakılmaksızın) ile karakterize edilmelidir.
Y-3	Enerji ve diğer ortamlar	Analitik yöntemler, mümkün olan en düşük elektrik ve diğer kamu hizmetleri tüketimi ile karakterize edilmelidir. Enerji tasarrufu için yerinde, otomatik ve yüksek verimli yöntemler tercih edilir.

Tablo 2.7 (Devam): 12 WAC İlkesi

Y-4	Doğrudan etkiler	Analitik yöntemlerin kullanımı insanları, hayvanları ve genetik doğallığı doğrudan etkilememelidir.
Mavi		
M-1	Maliyet etkinliği.	Analitik yöntemler mümkün olduğunca maliyet açısından verimli olmalıdır (toplam analiz maliyetinin aletleri, malzemeleri, medyayı ve personeli hesaba katması gerekir).
M-2	Zaman verimliliği	Analitik yöntemler mümkün olan en yüksek zaman verimliliği (analizin en kısa toplam süresi, yöntem geliştirme ve analitik iş akışının tüm aşamaları dahil) ile karakterize edilmelidir.
M-3	Gereksinimler.	Analitik yöntemler kullanılan numune miktarı, gelişmiş ekipmana erişim, personel nitelikleri ve laboratuvar altyapısı dahil olmak üzere asgari pratik gereksinimlerle karakterize edilmelidir.
M-4	Operasyonel basitlik	Analitik yöntemler mümkün olan en yüksek düzeyde minyatürleştirme, entegrasyon, otomasyon (çevrimiçi yöntemler, AI teknolojileri) ve taşınabilirlik (yerinde ölçümler) ile karakterize edilmelidir.

Kaynak: Nowak vd., 2021

Değerlendirmeyi tamamlamak için, RGB12 stiline ve kırmızı, yeşil ve mavi fikirlere bağlı olarak yöntem derecelendirme tabloları doldurulmalıdır; uygun değerler renkli sütunlara yerleştirilmelidir. Gerekli değerler girildikten sonra, değerlendirme sonuçları hesaplanır ve otomatik olarak tablolar şeklinde sunulur ve yorumlanır. Tekniğin belirli bir WAC kuralına ne kadar yakın uyduğu, belirli bir ana rengin doygunluk derecesiyle hesaplanır ve estetik olarak temsil edilir (0 değeri siyahı sembolize ederken, 100 ve üzeri tamamen doygunluğu singeler). Üç temel nitelik, R (%), G (%), ve B (%), her biri için belirli puanlar atanır ve matematiksel ortalama ile ortaya çıkan sonuç puan ve beyazlığın nihai derecesi (%) olarak verilir. Her bölüm için kusursuz yöntem %100 puanla eşleştirilir ve aldığı renk doygunluğa %100 olur. Tüm parametrelere tam uyumlu yöntem her renk için nihai doygunluk derecesini almıştır ve tamamen beyaz bir yöntem olarak sonuçlandırılır (Semysim vd., 2024).

3 GEREÇLER

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Ascentis® Express C8	: Merck, Almanya
Ascentis® Express C18	: Merck, Almanya
Ascentis® Express Phenyl Hexyl	: Merck, Almanya
Amonyum Asetat (%99,8, a/a)	: Merck, Almanya
Amonyum Asetat (%99,8, a/a)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetonitril (HPLC saflık)	: Merck, Almanya
Chromolith® Performance (100 × 4,6mm)	: Merck, Almanya
Chromolith® Performance (100 x 2mm)	: Merck, Almanya
Dimetil sülfoksit	: Merck, Almanya
Disodyum fosfat	: Merck, Almanya
Formik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidrojen peroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sitrik asit monohidrat	: Merck, Almanya
Sodyum Benzoat	: Merck, Almanya
Sükraloz	: Merck, Almanya
Vamrolone (%99,8, a/a)	: Angene, Hindistan

3.2 Kullanılan Cihazlar

CBM-20A iletişim veri yolu modülü	: Shimadzu, Japonya
CTO-10ASVP kolon fırını	: Shimadzu, Japonya
DGU-20A5R çevrimiçi gaz giderici	: Shimadzu, Japonya
Milli-Q® IQ 7000 Ultra saf su cihazı	: Merck, Almanya
Etüv	: Heraeus, Almanya
LC-20AT tandem çift pistonlu pompa	: Shimadzu, Japonya
Milli-Q® IQ 7000 Ultra saf su cihazı	: Merck, Almanya
RK 100 H model ultrasonik banyo	: Bandelin, Almanya
SevenMulti model pH metre	: Mettler Toledo İsviçre
SIL-20AC HT otomatik örnekleyici	: Shimadzu, Japonya
Stabilite kabini	: KRC Laboratory, Türkiye
SPD-M20A fotodiyot dizisi dedektörü	: Shimadzu, Japonya
Nexera-i LC-2040C 3D	: Shimadzu, Japonya
XPE-10Analitik terazi	: Mettler Toledo İsviçre

4 YÖNTEMLER

4.1 Deneysel Parametreler

4.1.1 Enstrümental parametreler

HPLC yöntemi için optimize edilen ayırma koşulları, izokratik modda çalışacak şekilde belirlenmiştir. Hareketli faz olarak %0,1 asetik asit içeren su ve asetonitril karışımı (60:40, v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolon fırını sıcaklığı $30,0 \pm 0,1$ °C olarak sabitlenmiştir. Standart çözelti ve numunelerin stabilitesini sağlamak amacıyla, otomatik örnekleyici sıcaklığı $15 \pm 0,1$ °C olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi ise 3 µL olarak optimize edilmiştir.

VAM'ın en yüksek absorbanı yaptığı dalga boyu 241 nm'de tespit edilmiştir. Enstrümanda foto diyot dizisi dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır. Ek olarak foto diyot dizisi dedektöründe spektrumlar 190 ve 800 nm arasında 40 Hz veri örnekleme frekansında ve 0,640 saniye zaman sabitinde kaydedilmiştir.

4.1.2 Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Referans standartların stok çözeltileri ve çalışma çözeltileri, VAM'ın çözünürlük problemi sebebiyle dimetilsülfoksit (DMSO) ve asetonitril (ACN) karışımı ile hazırlanmıştır. VAM'ın stok çözeltisinin hazırlanması amacıyla 3,40 mg VAM hassas terazide tartılmış ve bir miktar ACN içeren 5 mL balon jöjeye aktarılmıştır. Ardından karışıma 2 mL DMSO ilave edilerek tam çözünme gözlenene kadar vortekste karıştırılmıştır. Son olarak çözelti hacmi asetonitril ilavesiyle 5 mL'ye tamamlanmıştır. Çalışmanın devamında kullanılan çalışma çözeltilerinin tümü stok çözeltinin asetonitril ile uygun derişimde seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

4.1.3 Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

VAM için geri kazanım çalışmaları farmasötik preparatı olan AGAMREE® (40 mg/mL VAM içerir) üzerinde yapılması amaçlanmıştır. Ancak çalışma süresince öngörülemeyen sebepler (ürünün Türkiye piyasasında satışının olmaması ve yüksek maaliyeti) dolayısıyla piyasada onay almış tek müstahzar AGAMREE® satın alınamamıştır. Bu nedenle yardımcı maddelerin ilavesi ile formülasyon hazırlanmıştır ve geri kazanım çalışmaları bu çözelti kullanılarak yapılmıştır. VAM'ın farmasötik formülasyonu hazırlanması amacıyla yardımcı madde bilgisine ulaşılmış ancak yardımcı maddelerin net miktarları ile ilgili veri ilacı üretme ve münhasır haklar nedeniyle elde edilememiştir. Bu

amaçla ilgili yardımcı maddelerin farmasötik formülasyonlarda kullanılması önerilen miktarlar tespit edilip formülasyon çözeltisi bu şekilde hazırlanmıştır (Rowe vd., 2009) Elde hazırlanmış formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ve önerilen kullanım miktarlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Müstahzarın patentine dahil edilen yardımcı maddeler hassas teraziyle tartılmış içine 5mg VAM eklenmiş ve 10 mL hacme sahip balon jojeye ilave edilerek 5 mL ACN DMSO karşımı ile çözündürülmüş ardından su ile 10 mL tamamlanmıştır. Bu işlemin ardından vorteks ile 5 dakika karıştırılmış ve tam çözünmenin sağlanması amacıyla ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilmiştir. Tüm işlemlerin ardından heterojen çözelti şırınga ucu filtre yardımıyla süzölmüştür. Süzme işlemi için naylon, PES, PTFE ve PVDF tipte filtrelerinin tümü denenmiş ve en yüksek pik alanı PTFE (22/25 mm, 0,22 µm gözenek boyutu, Isolab, Almanya) ile elde edildiği için örnek bu filtre kullanılarak süzölmüştür. Homojen haldeki bu çözeltinin geri gerekli oranlarda seyreltilmesi ile kalibrasyon çözeltileri aralığında %80, %100 ve %120 oranlarına gelecek şekilde geri kazanım çözeltileri hazırlanmıştır.

Tablo 4.1

AGAMREE® Formülasyonu

Yardımcı madde	Önerilen kullanım miktarı
Sitrik asit monohidrat	Sıvı formülasyonlar için lezzet artırıcı: %0,3–2,0
Disodyum fosfat	Farmasötik formülasyonlarda bir tamponlama maddesi
Gliserin	Antimikrobiyal koruyucu: <%20
Sodyum Benzoat	Sulu çözelti için ayrıca antimikrobiyal bir koruyucu: 1 g/mL
Sükraloz	Tatlandırıcı madde %0.03–0.24
Portakal aroması	-
Su	-
HCl	pH ayarlanması için

4.1.4 Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

Çalışmalarda kromatografik ayırım izokratik modda yapılmıştır. Çalışmalar sırasında en uygun sistem uygunluk parametreleri (SUT) asetik asit ilavesi ile elde edildiği için hareketli fazın hem organik hem de sulu bileşeni asetik asit ilavesi ile hazırlanmıştır. Asetik asit ilavesinin bir diğer nedeni ise tespit edilen bozunma ürünlerinin asetik asit ilave edilmiş hareketli faz ortamında gözlenmiş olmasıdır. Bu amaçla apolar faz için seçilen asetonitrile %0,1 (h/h) oranında asetik asit ilave edilmiştir. Polar faz için seçilen

suya da aynı şekilde asetik asit ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan hareketli fazlar 22 µm'lik poliviniliden florür filtre ile süzölmüş ve 5 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edilmiştir. Kullanılan hareketli faz, su: asetonitril (60:40, *h/h*) çözeltisidir. Hareketli fazın hem polar bileşeninde hem de apolar bileşeninde %0,1 (*h/h*) asetik asit ilave edilmiştir. Söz konusu hareketli fazın pH'sının yaklaşık 3,1 olarak tespit edilmiştir.

4.1.5 Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı

VAM'ın için seçicilik çalışmaları ve VAM'a ait hızlı bozunma ürünlerinin eldesi amacıyla etkin madde hızlı bozundurma koşullarına tabii tutulmuştur. VAM'ın maruz bırakıldığı hızlı bozundurma için gerekli koşullar ICH Q1A(R2) kılavuzunda yer alan termolitik, asidik/bazik, hidrolitik ve oksidatif stres koşulları altında yapılmıştır. Bozunma çözeltileri stok etkin madde çözeltisinin 30 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde çeşitli stres ortamlarında hazırlanmıştır. Çalışmalar süresince uygulanan koşullar Tablo. 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2

Zorlu Bozma Koşulları

Bozunma koşulu	Uygulanış Biçimi	Açıklama
Sıcaklık	Çözelti	60 °C sabit sıcaklıkta analit çözeltisi 10 °C'lik artışlarla 2 saat bekletilip analizi yapılmıştır.
Nem	Katı	%75 oranındaki nemde 2 saat 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 DoE çalışmaları

Analitik yöntem geliştirmeden önce, DoE yaklaşımı ile geliştirilecek yöntemin analitik hedef profili (ATP), kritik yöntem parametreleri (CMP) ve kritik yöntem özellikleri (CMA) üzerindeki etkilerini araştırmak için bir kalite risk yönetimi yaklaşımı kullanıldı.

Yöntemdeki karakteristik elementlerden yola çıkarak ATP elde edildi. Performans elementleri muhtemel CMA'ları belirlemek için tanımlandı ve gerekçelendirildi. Bu ATP elementleriyle ilgili CMA'lar hakkında ayrıntılı bilgiler, karşılık gelen aralıkları ve ayarlamalarıyla birlikte bir tablo halinde düzenlenmiş ve Tablo 4.3'te sunulmuştur. Potansiyel faktörleri dört ana gruba ayırmak için bir Ishikawa diyagramı kullanıldı. Ishikawa diyagramı veya balık kılçığı diyagramı pratik olarak, bir sonuç ile sonuç üzerinde etki gösterebilen faktörler arasındaki bağlantının grafiksel bir temsidir. Diyagram belirli bir etkiyi üreten sebepler hakkında genel bir görüntü sunar. Ishikawa diyagramı bir süreç veya ekipmanın daha iyi anlaşılması, bir yenilik sürecinin başlatılması, daha az elverişli etkiler üretebilen faktörlerin daha iyi yönetilmesi, sonunda teknik normların geliştirilmesinin gerekliliğinin belirlenmesi gibi nedenlerle yıllar boyunca birçok bilimsel araştırma probleminin çözümünün analizinde kullanılmıştır (Botezatu, 2019). Analitik kimyada, bir ölçüm sürecindeki doğruluk ve kesinliği etkileyen risk faktörlerinin (cihaz kalibrasyon hataları, numune hazırlama koşulları, operatör hataları, çevresel değişkenler gibi) sistematik olarak analiz edilmesi için Ishikawa diyagramı etkili bir görsel araç sağlar. Potansiyel risk faktörleri yöntem, malzeme, ölçüm ve çevre olarak belirlendi ve bu ana grupların altında CMP'ler listelendi. Ishikawa diyagramı Şekil 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.3

ATP'den CMA Belirlenmesi ve Gerekçelendirilmesi

Analitik Hedef Profili		
Formülasyondaki VAM'ı, bozunma ürünleri arasında yüksek doğruluk, hassasiyet ve duyarlılıkla, müdahale olmaksızın tespit edebilen, diyot dizisi dedektörüyle birleştirilmiş ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminin geliştirilmesi		
Elementler	Kabul kriterleri	Gerekçelendirme
Performans unsurları		
Ayrırma tekniği	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	VAM, uçucu olmayan bir moleküldür ve bu da ilacı, bozunma ürünlerini ve matris bileşenlerini ayırmak için yüksek performanslı sıvı kromatografisini uygun hale getirir
Ayrım türü	Ters faz	Ters faz kromatografi teknikleri, ilaçları çeşitli matrislerden ve bunların bozunma ürünlerinden ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 4.3 (Devam): ATP'den CMA Belirlenmesi ve Gereçlendirilmesi

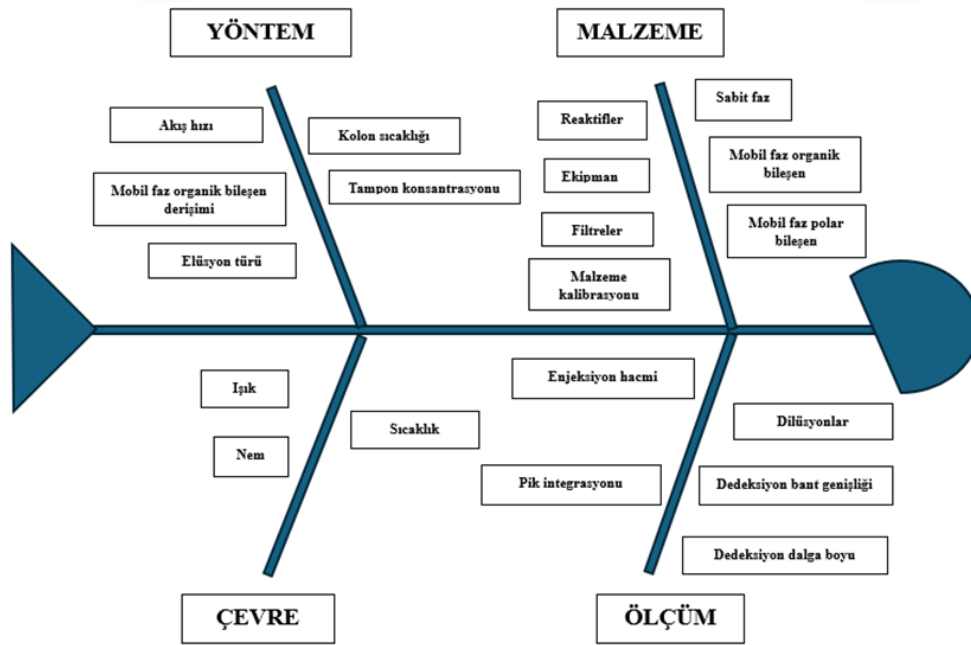
Dedeksiyon tekniği	Diode array dedektör	Kütle spektrometreleri UV-Vis'e göre daha fazla bilgi sağlarken, diyot dizili dedektörler laboratuvarlarda daha yaygın olarak bulunur.
Numune	Oral çözelti	Söz konusu teknik, oral solüsyonlarda kalite kontrolü göz önünde bulundurularak geliştirilmiştir.
Uygulama	Kararlılığının izlenmesi ve miktarlama	Yöntemin, bozunma ürünlerinin yokluğunda bile VAM'ı ölçme yeteneğine sahip olması gerekir.
Performans unsurları		
Ayrım	Rs VAM pik > 1.5	Bu parametre, VAM'ın kromatografik tepe noktası ile bitişik herhangi bir kromatografik tepe noktası arasında yeterli ayırma mesafesinin olduğunu gösterir.
	N VAM > 2000	VAM piki ile sabit faz ile hareketli faz arasında yeterli etkileşim dengesi gösterdiğini gösterir.
	Pik kuruklanması T < 2	Kromatografik piklerin kuyruk faktörünün 2'den küçük olması
	Son pik k'yi en aza indir	Son analitin kapasite faktörü ne kadar düşükse çalışma süresi o kadar kısadır.
	Saflık faktörü > %95 ile tepe sayılarını en üst düzeye çıkarın	Saflık faktörü > %95 ile piklerin saflığı en üst düzeyde olmalı
Miktar belirleme	Doğruluk 98-102% Kesinlik < 2%	Bu parametreler, yöntemin güvenilir tespitler sağlama kabiliyetiyle doğrudan ilişkili oldukları için, öncelikle analitik validasyon tarafından yönetilir.
	DP'lerin pik alanını maksimize edilmelidir	Bozunma ürünleri doğrudan ölçülmeyecek olsa da, kromatografik pik eş-elüsyonundan kaçınmak ve mevcut olduklarında görselleştirilmelerini sağlamak için bu bileşiklerin kapladığı alanı bilmek önemlidir.

Tablo 4.3 (Devam): ATP'den CMA Belirlenmesi ve Gereçlendirilmesi

S/N > 10 olan pik sayısını en üst düzeye çıkarın.	Piklerin tespit edilebileceğini ve nicelleştirilebileceğini gösterir.
Kromatografik piklerin sinyal yoğunluğunu en üst düzeye çıkarın.	Bozunma ürünlerini tespit edemeyen bir yöntem kararlılık göstergesi olarak kabul edilemez.
LOD ve LOQ VAMLOQ için daha düşük sınırlar, tekniğin daha fazla konsantrasyonunu en az	Ek olarak, daha yüksek sinyal-gürültü oranları ve LOD ve LOQ için daha düşük sınırlar, tekniğin daha fazla hassasiyete sahip olduğunu gösterir.
indirin	

Şekil 4.1

Riskler ile İlgili Ishikawa Diyagramı



Daha sonra, bu CMP'lerin yönetime olan kritikliğini hesaplamak için hata modu ve etki analizi (FMEA) kullanıldı. FMEA, çeşitli endüstrilerde ürün, süreç, yapı, sistem ve hizmetlerin güvenilirliğini ve emniyetini artırmak için kullanılan ileriye dönük bir risk yönetimi tekniğidir. Bu yaklaşım, beklenen koşulları yansıtmak için risk öncelik numarasına (RPN) ekleyerek çalışır, RPN hesaplamasında yönetime dayalı parametreler ciddiye (S), oluşum (O) ve tespit (D) özelliklerine göre farklı şekilde değerlendirilir (Lo ve Liou, 2018). FMEA Her parametrenin RPN değerini hesaplamak için kullanılan oluşum (O), şiddet (S) ve tespit (D) temelinde 0 ile 10 arasında bir puan aldı. Daha sonra bu parametreleri önceliklendirmek için RPN kullanıldı ve 1 ile 49 arasındaki değerler "önemsiz", 50 ile 124 arasındaki değerler "kabul edilebilir", 125 ile 174 arasındaki

değerler "değerlendirmeye ihtiyaç var", 175 ila 224 arasındaki değerler “kabul edilemez” ve 225'in üzerindeki değerler “yüksek riskli” olarak sınıflandırıldı (Sawhney vd., 2010). Sınıflandırma, sınıflandırmanın gerekçeleri ve PNR puanlarının ayrıntılı listesi Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4

CMP'ler için FMEA değerlendirmesi

Element	Ishikawa	CMP	Etki	O	S	D	RPN
Ayrım	Malzeme	Hareketli polar bileşen	faz Analitin hareketli faz ile etkileşimindeki değişim	2	10	2	40
	Malzeme	Sabit faz	Analitin sabit fazla etkileşimindeki değişim	3	10	6	180
	Malzeme	Hareketli organik bileşen	faz Analitin hareketli faz ile etkileşimindeki değişim	6	10	5	300
	Yöntem	Hareketli akış hızı	faz Pik alıkonma zamanı değişir	8	7	8	448
	Yöntem	Elüsyon türü	Pik alıkonma zamanı değişir	1	7	1	7
	Yöntem	Kolon sıcaklığı	Moleküller arası etkileşimdeki değişim	7	7	7	343
Ayrım/Ölçüm	Yöntem	Hareketli organik bileşen başlangıç derişimi	faz Pik alıkonma zamanı değişir	4	7	7	196
	Malzeme	Ekipman kalitesi	Analitik yöntem geliştirme üzerinde doğrudan etki	3	8	7	168
	Malzeme	Reaktiflerin kalitesi	Analitik yöntem geliştirme üzerinde doğrudan etki	2	9	3	54

Tablo 4.4 (Devam) CMP'ler için FMEA Değerlendirmesi

Yöntem	Hareketli yardımcı bileşen derişimi	faz	Hareketli elektriksel potansiyelindeki değişim, pik tutma süresinde değişikliğe neden olabilir	6	7	7	294
Malzeme	Filtrelerin kalitesi ve gözenek boyutu		Filtreleme işleminin verimliliğini etkiler	1	3	1	3
Malzeme	Pipetlerin cam malzemelerin kalibrasyonu	ve	Güvenilir olmayan sonuçlara neden olur.	4	9	4	144
Ölçüm	Saptama için dalga boyu	için	Sinyal yoğunluğu değişir	5	7	2	70
Ölçüm	Dedeksiyon bant genişliği		Gürültü ve pik yoğunluğundaki değişim	3	7	3	63
Ölçüm	Ölçüm	Pik integrasyonu	Pik alanında değişim	2	4	2	16
Ölçüm	Enjeksiyon hacmi		Sinyal yoğunluğunda ve pik genişliğinde değişiklik	6	7	8	336
Ölçüm	Seyreltmeler		Analitlerin çözündürölmesine etkisi	4	9	3	108
Çevre	Işık		Saklama süresince stabilite sorunu	4	6	3	72
Çevre	Nem		Saklama süresince stabilite sorunu	4	6	3	72
Çevre	Oda sıcaklığı		Saklama süresince stabilite sorunu	6	6	3	108

Risk değerlendirmesine dayanarak, yüksek riskli ve kabul edilemez faktörler yöntem optimizasyon çalışması için CMP olarak seçildi. DoE çalışmalarına başlamak için CMP'ler kategorik ve sürekli olarak ikiye ayrıldı. Kategorik CMP'lerin ilk seçimi, sürekli CMP'lerin seçimi ve optimizasyonu aşamasında sabit tutmak için gerçekleştirildi ve sonraki tasarımların deneysel boyutunu azaltmayı amaçladı. Değerlendirilen kategorik CMP'ler sabit faz, hareketli faz içeriğini kapsayacak şekilde ayarlandı. Kromatografik kolonlar çeşitli analit-sabit faz etkileşimlerini araştırmak için seçicilik ve hidrofobisiteye göre seçildi Değerlendirmede, Chromolith® Performance RP-18e, 100×4,6 mm, Chromolith® Performance RP-18e 100×2 mm, Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm), Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm) ve Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm) kullanıldı. Değerlendirme için polar hareketli faz bileşenleri asetat tamponu (20 mM pH 5,8), format tamponu (20 mM pH 3,8), %0,1 asetik asit içeren su, %0,1 formik asit içeren su ve sadece su belirlenmiştir. Metanol, aynı oranda kullanılan asetonitrile kıyasla daha yüksek viskoziteye sahip olduğu için kolonda daha yüksek sistem basınçlarına neden olmuş ve bu durum kromatografik çalışmayı sınırlamıştır. Ayrıca, aynı konsantrasyonda kullanıldığında, ACN genellikle daha iyi pik simetrisi sağladığı ve daha güçlü elüsyon gücüne sahip olduğu gözlenmiştir. Bu nedenlerle, apolar karakterdeki VAM'ın analizi için organik faz olarak yalnızca ACN tercih edilmiştir. Deneyler Design-Expert® yazılımı (cretsiz deneme version 13 sürümü) aracılığıyla "Genel faktöriyel" olarak da bilinen çok Düzeyli Kategorik seçeneği tasarımı ile yrlmştr. Bu tasarımda CMA'lar CMP'ler ile ilişkili olacak şekilde kapasite fakr, teorik tabaka sayısı, alan ayırım gücü ve alıkonusma zamanı olarak seçilmiştir seçilmiştir. Sürekli CMP'ler, birinci ve ikinci derece etkileri incelemeyi amaçlayan, V znrlkl parçalı faktöriyel tasarım 2^{5-1} ile değerlendirildi. Değerlendirilen CMP'ler arasında hareketli faz akış hızı (0,4-0,6 mL/dk), kolon fırın sıcaklığı (30 °C–40 °C), enjeksiyon hacmi (1–3 µL), asetik asit yüzdesi (nceki aşamadan seçilen içeriğin göre %0,5'lik değişimi) ve hareketli faz apolar bileşinin yüzdesi (%40-50) yer aldı. Değerlendirilen CMA'lar pik alanı, teorik plaka alıkonusma zamanı, kuyruklanma ve ayırım gücü olarak seçildi. Birinci etkiler, değerlendirildi ve önemsiz etkilere sahip parametreler sonraki aşamalardan hariç tutuldu. Pareto kartları etkilerin anlaşılmasına ve parçalı faktöriyel tasarımda önemli ve önemsiz parametreleri belirlemede kullanıldı. nemli bir etki gösteren değişkenler ($p<0,05$) tepki yüzeyi tasarımı için araştırma konusu olarak seçildi. Bu değerlendirme, CMA'ların yüksek verimli alanının öngörülen deneysel aralığın

dışında olup olmadığını ve potansiyel olarak bir yanıt-yüzey uygulamasını gerektirip gerektirmediğini belirlemesi amaçladı. Tanımlanan CMP'lere yanıt yüzeyi deneysel BBD uygulandı. Bu çok değişkenli optimizasyon prosesinde, üç CMP akış hızı (A), organik faz oranı (B) ve enjeksiyon hacmi (C) bağımsız değişkenler olarak tanımlanırken bu aşamada dahil edilen CMA'lar VAM'in için alan (yanıt 1), kapasite faktörü (yanıt 2), kuyruklanma faktörü (yanıt 3) ve teorik plaka sayısı (yanıt 4) yanıt olarak belirlenmiştir. Regresyon uyumu sırasında, polinom modelinin uyumunu optimize etmek için farklı katsayılar dahil edildi veya hariç tutuldu. Model değerlendirmesi, regresyon modelinin önemini ($p < 0,05$), uyum eksikliğinin yokluğunu ($p > 0,05$), belirleme katsayılarındaki (R^2), R^2 ayarlı, R^2 tahminli ve sinyal-gürültü oranını dikkate aldı.(Junkert vd., 2025).

4.1.7 Sonuçların değerlendirilmesi

Analizler sonucunda elde edilen yanıt, kromatogramda VAM'ın sinyal alanı olarak alınmıştır. Analiz sonuçlarında gruplar arasındaki uyum tek yönlü ANOVA kullanılarak ifade edilmiştir. Microsoft Excel programı istatistiksel hesaplamalar için kullanılmıştır.

4.1.8 Yöntem geçerliliğinin tespiti

Geliştirilen yöntem ICH kılavuzunun önerdiği gibi yöntem geçerliliğini sağlanmış ve analitik kriterleri sağladığı gösterilmiştir. Yöntem validasyonu amacıyla spesifiklik, kesinlik, doğrusalılık, doğruluk, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.8.1 Sistem uygunluk testleri

Çalışmalar sırasında optimum koşullarda yöntem validasyonu sağlanmış metodun aktarılabilir olması ve sistemin uygun çalışmasını sağlayacak sistem uygunluk parametreleri belirlenmiş ve izlenmiştir. Bu parametreler ayırım gücü (R_s), teorik tabaka sayısı (N), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), seçicilik faktörü (α) ve kapasite (k') kapsayacak şekilde seçilmiştir. Bu parametrelerin hesaplanması ve ilgili klavuzun belirttiği sınırlar dahilinde olması zorunludur.

Sistem uygunluk parametrelerinin kabul edilebilir limitleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5*Sistem Uygunluk Parametreleri*

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	$2 \leq T$
Ayrım gücü	$R_s > 1,5$
Pik asimetrisi	$0,95 \leq A_s \leq 2$
Pik alanın tekrar edilebilirliği	%BSS < 1,5 Genel ayrımlar

Yöntemin geliştirilmesi sırasında bu parametrelerin tümü Tablo 4.6’da gösterildiği şekilde USP’de yer alan eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır.

Tablo 4.6*SUT Parametreleri Eşitlikleri*

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \left[\frac{t_R}{w} \right]^2$	N: Teorik tabaka sayısı t_R : Alıkonma zamanı W: Pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0,05}}{2\alpha_{0,05}}$	T: kuyruklanma faktörü $W_{0,05}$: Pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0,05}$: Pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Asimetri faktörü	$A_s = \frac{B_{0,10}}{a_{0,10}}$	A_s : Asimetri faktörü $\beta_{0,10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0,10}$: Pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği

Tablo 4.6 (Devam): *SUT parametreleri Eşitlikleri*

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 : Alıkonma zamanı t_M : Ölü zaman

4.1.8.2 Seçicilik ve spesifiklik

Seçicilik, bir yöntemin, karışımdaki diğer bileşenlerin müdahalesi olmadan karmaşık bir matriksteki hedef bir analiti belirleyebilme derecesini ifade eder. Seçiciliğin en üst seviyesi olarak kabul edilen spesifiklik, analiti, mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında kesin olarak değerlendirme yeteneğidir. Tipik olarak bunlar safsızlıklar, bozunma ürünleri, matris vb. içerebilir (Swartz ve Krull, 2018).

Seçicilik ve spesifiklik parametrelerinin izlenmesi amacıyla VAM bilinen konsantrasyonlarda hızlı zorlu bozunma koşullarına tabi tutulup bozunma ürünleri elde edilmiş, kromatografik ayırım çalışmaları bu bileşenlerin varlığında gerçekleştirilmiş olup ve çalışmadan elde edilen bu sonuçlar elde edilen standart VAM çözeltisine ait kromatogramlar ile kıyaslanarak seçicilik ve spesifiklik parametreleri doğrulaması yapılmıştır.

4.1.8.3 Kararlılık

VAM'ın stok çözeltisi, asetonitrilde 70 µg/mL derişiminde olacak şekilde seyreltilmiş ve düzenli olarak (6, 12, 18, 24, 48 saat, üç hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü) çözelti ve hareketli faz kararlılığını incelemek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1.8.4 Doğrusallık

Bir analitik yöntem için doğrusallık, analitin derişimi ile doğru orantılı olan ya da bir tür matematiksel dönüşüm uygulamasının ardından doğrudan orantılı hale gelen ölçüm sonuçları karşılama kabiliyetidir. Doğrusallık, artan analit derişiminin bir fonksiyonu olarak kaydedilen enstrümental yanıtların (pik alan veya yükseklik) normal en küçük

kareler eğrisi ya da doğrusal regresyon eğrisi şeklinde ifade edilir. Doğrusallık eğrileri oluşturulurken pik yüksekliklerin kullanımına yerine pik alanların kullanılması tercih edilir (Yuwono ve Indrayanto, 2005).

Geliştirilmiş analitik yöntemin doğrusallığının tayini amacıyla VAM standart çözeltileri %5-200'üne karşılık gelen 3,5; 14,0; 35,0; 56,0; 70,0; 84,0; 105,0; ve 140,0 µg/mL 8 farklı derişimde asetonitrilde hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Analizler en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve hesaplamada analiz sonuçlarından alınan alanların ortalaması kullanılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olmak üzere üç tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir.

4.1.8.5 Doğruluk

Doğruluk, tekrarlanan ölçümlerle elde edilen deneysel değer ile kabul edilen referans değeri arasındaki uyum derecesidir. Doğruluğun herhangi bir analitik yöntemin ele alması gereken en önemli yön olduğu belirtilmiştir. Bu parametrenin belirlenmesi, sistematik hataların belirli bir yöntemi ne ölçüde etkilediğinin tahmin edilmesine olanak tanır (Swartz ve Krull, 2018).

Bir yöntemin doğruluğunun değerlendirmesi yöntem ile bilinen konsantrasyondaki bir numunenin değerlendirilmesini ve ardından ölçülen değerlerin gerçek değerlerle karşılaştırılmasını içerir.

Doğruluğun değerlendirilmesi amacıyla geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiş VAM süspansiyon çözeltileri düşük seviyede (56 µg/mL) orta seviyede (70 µg/mL) ve yüksek seviyede (84 µg/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her derişim seviyesi için 3 set hazırlanmış, analiz sonuçları standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

4.1.8.6 Kesinlik

Kesinlik ifadesi, belirtilen koşullar altında bir niceliğin tekrarlanan ölçümleriyle elde edilen nicelik değerleri arasındaki uyumun yakınlığı olarak tanımlanır. Bu parametrenin belirlenmesi, yöntem doğrulamasında tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik elde etme sürecindeki temel adımlardan biridir (Swartz ve Krull, 2018). Kesinliği tanımlamanın üç yolu vardır: Yeniden üretilebilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik. Gün içi kesinlik olarak da bilinen tekrarlanabilirliği değerlendirmek için, bir analistin

analizi tek bir iş günü içinde tamamlamak için belirli ekipmanları kullanması gerekir. Ara kesinlik, alternatif olarak, birden fazla analistin çeşitli ekipman, reaktif veya kolonlar kullanarak tek bir laboratuvarında günler veya haftalar boyunca çalışmayı yürütmesiyle elde edilen kesinlik olarak tanımlanabilir. Geliştirilen yöntem psödo formülasyon çözeltilerin %100 noktasına denk gelen konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak üç gün sırası ile 5, 3 ve 3 tekrarlı olmak üzere analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuç değerlerin standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları hesaplanmıştır.

4.1.8.7 Teşhis ve tayin alt sınırı

LOD, genellikle bir numunedeki güvenilir bir şekilde tespit edilebilen ancak belirli bir analitik yöntemle mutlaka miktarı belirlenemeyen en düşük analit miktarı olarak tanımlanır. LOQ, kabul edilebilir bir hassasiyet ve doğruluk seviyesiyle belirlenebilen en düşük analit konsantrasyonu veya miktarı olarak tanımlanır (Swartz ve Krul, 2018).

LOD ve LOQ benzer yaklaşımlar kullanılacak şekilde değerlendirilir. LOQ, LOD'nin yaklaşık üç katı olarak düşünülür. Bu parametrelerin tespiti için elde edilen sonuç değerlerin gürültü sinyalinin 3,3 katını veren derişim belirlenmiş ve bu derişimdeki çözeltilerin tekrarlı analizi yapılmıştır (n=6). Ardında tayin sınırı için sıvı kromatografisi cihazında elde edilen gürültünün 10 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltileri hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=6).

4.1.8.8 Sağlamlık

Bu parametre, akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi, hareketli faz bileşimi veya analiz yöntemine özgü herhangi bir diğer değişken gibi dahili faktörler kasıtlı olarak değiştirildiğinde sonuçların sabitliğini değerlendirir (Araujo, 2009). Sağlamlık değerlendirmesi amacıyla kalibrasyon eğrisinde konsantrasyon seviyesi %100'e karşılık gelen standart VAM çözeltileri hazırlanmış ve akış hızı ($\pm\%10$), ve hareketli fazın apolar bileşen yüzdesi ($\pm\%10$) ve çalışılan dalga boyunda (± 2 nm) değişiklik yapılarak çeşitli sistem uygunluk parametrelerindeki sapmalar hesaplanmıştır.

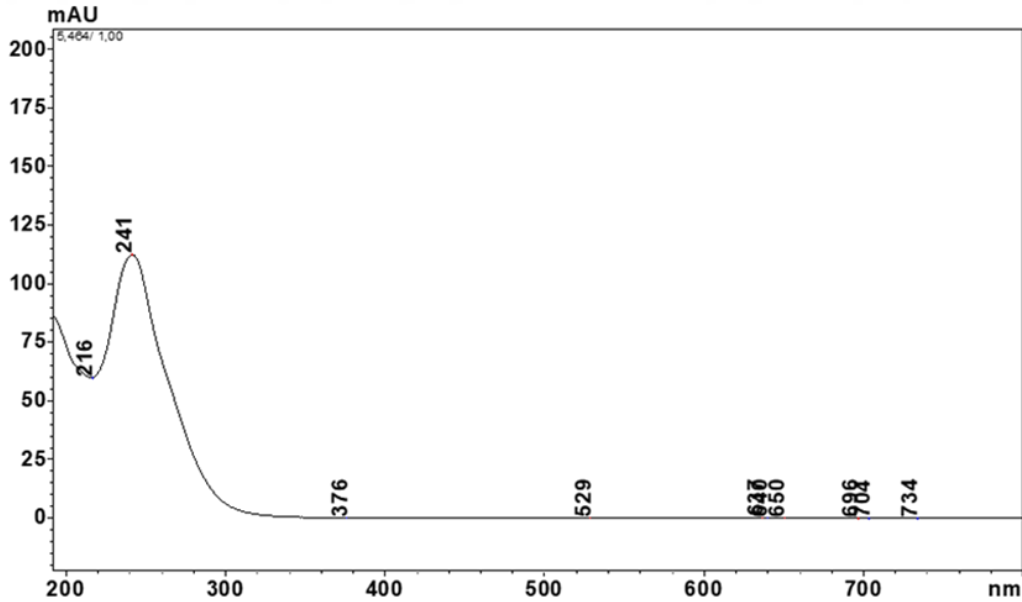
5 BULGULAR

5.1 Vamorolonun UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Kromatografik ve farmasötik formülasyonda ilgili ajanın tanımlanması çalışmaları amacıyla, VAM'ın UV-görünür bölgedeki spektroskopik karakteristikleri araştırıldı. Çalışmaların yürütülmesi amacıyla optimum kromatografik koşullarda VAM stok çözeltisinden 50,0 µg/mL derişiminde hazırlandı ve HPLC cihazına enjekte edilip, 190-800 nm aralığında tarandı. PDA dedektörde kaydedilen UV-görünür spektrum Şekil 5.1'de verilmiştir. Molekülün maksimum absorbans dalga boyu 241 nm olarak gözlemlendi. Ortam çözücüsü görece polar asetonytril ve çok az miktarda apolar dimetilsülfoksittir mobil faz içeriğinde asetonytril ve Moleküllerin UV abrobanslarını sağlayan elektronik geçişlere en katkı molekülün çözücüsü ve molekülün sahip olduğu fonksiyonel gruplardan sağlanmaktadır. VAM temelinde siklopentanoperhidrofenantren halkası ve buna bağlı -OH benzeri fonksiyonel gruplar içermektedir. 241 nm'de maksimum absorbansın kaynağı halkaya bağlı keto gruplarından ve halka içindeki $\pi \rightarrow \pi^*$ ve geçişlerinden ileri gelmektedir.

Şekil 5.1

VAM'ın UV-Görünür Bölgedeki Spektrumu (50,0 µg/mL)



5.2 Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

Birkaç değişken tarafından yönlendirilen HPLC analitik stratejilerindeki ilerlemeler, analitik ölçümler sırasında büyük miktarda veri sağlar. HPLC, çok çeşitli uygulamalara sahip çok yönlü bir ayırma tekniği olmasına rağmen, süreç bazen her bir çalışmadan önce

uygun şekilde ayarlanması gereken çok sayıda değişken nedeniyle kritik öneme sahiptir. Her kimyasal varlığın numune karışımından HPLC ile ayrılması, kolondaki veya hareketli fazdaki adsorban malzemeye karşı belirgin afinitesine dayanır ve çeşitli bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmesine ve ayrılmasına neden olur. HPLC ile ayırma ağırlıklı olarak hareketli fazın polaritesi, akış hızı, pH, bileşim ve numune matrisinin bazı içsel özellikleri ve bazı ayarlanabilir parametrelerine; sabit fazın türü ve doğasına, sıcaklık ve dedektör türü ve ayarları gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Sonuç olarak, bu tür yöntemlerin daha derin bir şekilde anlaşılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, HPLC yöntemlerinin optimizasyonu karmaşık süreçlerdir; çünkü, istenen ayrımlara ulaşmak için çeşitli değişkenler (hareketli faz pH'sı, tampon konsantrasyonu, akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyu, vb.) eş zamanlı olarak kontrol edilmelidir. Uygun istatistiksel analize sahip kemometrik araçlar, deney sayısındaki azalma ve daha düşük reaktif tüketimi ve daha az laboratuvar çalışması gibi birden fazla avantaja sahip olduğu için kromatografik yöntem geliştirmenin her adımın için popüler hale gelmiştir. Bu yaklaşımlar, değişkenlerin istenen kromatografik tepkiler üzerindeki etkilerinin istatistiksel önemini değerlendirme yeteneklerini destekleyen değerli, bilimsel bilgiler ekleyerek matematiksel modellerin geliştirilmesini kolaylaştırır. Bu çalışmada, kromatografik ayırmanın her aşaması kemometrik yaklaşımlar kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında kolon ve hareketli faz seçimi için faktöriyel çok seviyeli kategorik tasarım (FMLCD) ardından hangi CMP'lerin yöntem için önemli olup olmadığını belirlemek ve birkaç CMP taramak için kullanılan parçalı faktöriyel tasarım (FFD) uygulanmıştır. Çalışma için anlamlı olabilecek tüm parametreler belirlendikten sonra bu parametrelerin yüksek dereceli ilişkilerinin incelenmesi ve tüm yönleriyle değerlendirilebilmesi için bir yanıt yüzey tasarım modeli olan BBD çalışması yapılmıştır.

5.3 DoE Çalışmaları

5.3.1 Faktöriyel çok seviyeli kategorik tasarım (FMLCD)

Nitel ölçekte bir değişken olan ve nicel bir değeri olmayan, bir özelliğe göre sınıflandırılabilen değişkenler, basitçe kategorik değişken olarak tanımlanır. Bir formülasyon geliştirme çalışmasında formülasyon için aday olabilecek sürfaktan tipleri, analitik çalışmada ekstraksiyon adımında kullanılan sorbent çeşidi veya analitik çalışmalarda kullanılan kolon tipi kategorik değişken olarak kabul edilebilir. Her kolon tipi bir dizi kategoriye (C18, C8, HILIC, protein kolonları vb.) ayrılabilir. Aynı şekilde

hareketli faz tipleri de kategorik bir değişken olarak değerlendirilebilir (Chen vd., 2020; Elkanayati vd., 2024; Junkert vd., 2025).

Çok seviyeli kategorik tasarım (“genel faktöriyel” olarak da bilinir) araştırmacıların tüm olası faktör seviyeleri kombinasyonlarını içeren bir deneyde faktörleri birbirinden farklı sayıda seviyeye yerleştirmelerine olanak tanıyan özel bir tam faktöriyel tasarım türüdür (Elkanayati vd., 2024). Çok seviyeli kategorik işlemlerin basit karşılaştırmaları için faydalı bir deney tasarımıdır. FMLCD, öncelikle faktörlerin yöntem için önemli olup olmadığını belirlemek ve yöntemi etkileyebilecek birçok olasılıktan birkaç önemli faktörü taramak için kullanılan bir faktöriyel tasarım türüdür. Bu tasarım türünde birden fazla kategorik faktörün kategorikten sayısalı dönüştürölür, sistemin daha iyi bir perspektifini sağlayan yanıt yüzeyi grafikleri üretilerek optimum koşullara ulaşılmasına olanak sağlar (https-2, 2025). Montgomery'nin Deney Tasarımı ve Analizi çalışmasında yer alan bir örneğe göre (Douglas, 2001), bir bataryanın ömrünü uzatmaya yönelik optimum malzeme türünü belirleme sorusu gibi, kromatografik analizlerde de en uygun kolon ve hareketli faz türünü belirlemek için benzer bir yaklaşım benimsenmiştir. Bu bağlamda, en iyi sonuca ulaşmak amacıyla FMLCD yöntemine başvurulmuştur.

Önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak, hareketli fazda kullanılan apolar bileşen olarak metanolün sistem basıncı arttırması ve ACN'nin daha düzgün pik şekli göstermesi nedeniyle, ACN kullanılması uygun bulunmuştur. Bununla birlikte, kolon tipi ve hareketli fazdaki polar bileşen açısından pek çok seçenek mevcut olduğundan, bu değişkenlerin etkilerinin incelenebilmesi amacıyla faktöriyel çok seviyeli bir kategorik tasarım matrisi oluşturulmuştur. Mevcut çalışmada, Kolon tipi (A), hareketli faz apolar bileşen (B) kategorik CMP'ler olarak olarak seçilmiştir. Kolon tipleri: Chromolith® Performance RP-18e (100×4,6 mm), Chromolith® Performance RP-18e (100×2 mm), Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm), Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm) ve Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm) olacak şekilde 5 seviyede çalışılmış; hareketli fazın polar bileşeni ise %0,1 formik asit içeren su, %0,1 asetik asit içeren su, sadece su, 20 mM pH 5,8 amonyum asetat ve 20Mm pH 3,8 amonyum format tamponu olarak 5 seviye belirlenmiştir. CMP'lerin etkilediği yanıt bileşeni yani CMA'lar kromatografik performansı ifade eden veriler olarak, kapasite faktörü, ayırım gücü alıkonma zamanı pik alanı ve teorik tabaka sayısı olarak belirlenmiştir. Design-Expert® yazılımı aracılığı ile tüm kombinasyonları içeren toplam 25 çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların ve elde edile CMA sonuçlarının Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1*FMLCD’de Yer Alan Deneyler ve Elde Edilen Yanıtlar*

Deney	Faktör1 (A): Kolon	Faktör 2 (B): Hareketli faz polar bileşen	Yanıt 1 Kapasite faktörü	Yanıt 2 Ayrım gücü	Yanıt 3 Alıkonma zamanı	Yanıt 4 Pik alanı	Yanıt 5 Teorik tabaka sayısı
1	Chromolith® RP-18e (100×2 mm)	%0,1 Asetik asit içeren su	1,22	7,40	1,16	877307	2012
2	Chromolith® RP-18e (100-4.6 mm)	Amonyum asetat tamponu	1,23	16,40	6,30	841194	8903
3	Chromolith® RP-18e (100-4.6 mm)	Amonyum asetat tamponu	2,33	16,70	2,35	845081	6482
4	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Asetik asit içeren su	2,13	23,95	5,51	871729	13183
5	Chromolith® RP-18e (100-4.6 mm)	Su	1,28	15,57	6,19	843377	8425
6	Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm)	Su	2,16	27,80	5,38	858375	16223
7	Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Formik asit içeren su	2,13	24,99	5,40	868476	15887
8	Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Formik asit içeren su	2,30	17,70	2,33	865508	6701
9	Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum format tamponu	2,27	16,30	2,31	844498	6420
10	Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Formik asit içeren su	2,40	17,538	2,40	878804	6818

Tablo 5.1 (Devamı) FMLCD’de Yer Alan Deneyler ve Elde Edilen Yanıtları

11	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Su		2,09	23,34	5,40	861542	12097
12	Chromolith® RP-18e (100×2 mm)	Amonyum format tamponu		1,16	6,67	1,15	842355	1820
13	Chromolith® RP-18e (100-4.6 mm)	%0,1 Formik asit içeren su		1,19	16,35	6,21	889998	8316
14	Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6mm,2,7µm)	Amonyum format tamponu		2,18	28,40	5,42	854714	16612
15	Chromolith® RP-18e (100×2 mm)	Su		1,22	6,99	1,80	834416	1919
16	Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum format tamponu		2,35	16,80	2,36	824526	6382
17	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum format tamponu		2,06	22,42	5,28	859442	12649
18	Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Asetik asit içeren su		2,24	27,95	5,54	877120	16733
19	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Asetik asit içeren su		1,22	15,85	6,32	888211	8512
20	Chromolith® RP-18e (100×2 mm)	%0,1 Formik asit içeren su		1,21	7,78	1,16	871210	1974
21	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	%0,1 Formik asit içeren su		2,01	21,26	5,26	887510	13072
22	Chromolith® RP-18e (100×2 mm)	Amonyum asetat tamponu		1,19	6,80	1,16	841332	1893
23	Ascentis® Express C18 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum asetat tamponu		1,26	17,24	6,40	835292	8933
24	Ascentis® Express C8 (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum format tamponu		2,05	23,22	5,25	862742	12408
25	Ascentis® Express Phenly Hexly (100×4,6 mm, 2,7µm)	Amonyum asetat tamponu		2,17	28,41	5,42	850032	16585

Tablo 5.2*Model ANOVA Sonuçları*

Kaynak	Kareler Toplamı ($\times 10^6$)	df	Kareler Ortalaması ($\times 10^6$)	F Value	p-value
Model (kapasite faktörü)	5,95	8	0,07	824,09	<0.0001*
A-Kolon	5,94	4	1,48	1643,99	< 0.0001
B-Mobil faz polar bileşen	0,0151	4	0,004	4,19	0,0165
Model (Teorik tabaka sayısı)	622,10	8	77,76	958,90	< 0.0001*
A-Kolon	621,10	4	155,40	1916,10	< 0.0001*
B- Mobil faz polar bileşen	0,49	4	0,12	1,52	0,24
Model (Alan)	6786,10	8	848,30	9,91	<0.0001*
A-Kolon	928,40	4	232,10	2,71	0,0673
B- Mobil faz polar bileşen	5857,70	4	1464,40	1,5217,12	< 0.0001
Model (Alıkonma zamanı)	98,76	8	12,35	3870,69	<0.0001*
A-Kolon	98,72	4	24,68	7738,10	< 0.0001
B- Mobil faz polar bileşen	0,0417	4	0,02	3,27	0,0386
Model (Ayrım gücü)	1181,41	8	147,68	170,83	<0.0001*
A-Kolon	1178,89	4	294,72	340,94	< 0.0001
B- Mobil faz polar bileşen	2,53	4	0,63	0,73	0,5837

Tablo 5.2’de verilen ANOVA testi, seçilen bağımsız kategorik değişkenler için incelendiğinde oluşturulan modellerin seçilen yanıt faktörleri için anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. ($p < 0,0001$). Ancak bazı yanıt parametrelerinin ANOVA sonuçlarından da anlaşılacağı gibi kolon ve hareketli fazdan etkilenme derecesi farklıdır. Alıkonma zamanı, pik alanı ve kapasite faktörü yanıtları için her bağımsız değişken etkili iken teorik tabaka sayısı ve ayırım günü için sadece kolon faktörünün etkili olduğu ve etki değerinin F ve p değerlerinden de anlaşıldığı üzere oldukça yüksektir.

Tablo 5.3*Yanıtlara Ait Uyum İstatistikleri*

	Kapasite faktörü	Ayrım gücü	Alıkonma zamanı	Pik alanı	Teorik tabaka sayısı
R^2	0,9976	0,9884	0,9995	0,8321	0,9979
Ayarlanmış R^2	0,9964	0,9826	0,9992	0,7482	0,9969
Tahmini R^2	0,9941	0,9717	0,9987	0,5902	0,9949
Yeterlilik hassasiyeti	66,60	38,17	154,43	9,42	87,31

Her bir CMA için modelin performans kriterlerini belirten istatistiksel değerler olan uyum istatistikleri Tablo 5.3'te verilmiştir. R^2 modelin bağımlı değişkenlerini açıklama oranının bir göstergesidir ve 1'e ne kadar yakınsa model yanıtları açıklamada o derece başarılıdır. Çalışmada R^2 değerleri 1'e oldukça yakındır ve model tüm değişkenler için iyi uyum göstermektedir. Ayarlanmış R^2 , R^2 'nin düzeltilmiş versiyonudur ve bağımsız değişken sayısından etkilenir ve modelin bağımsız değişken sayısı ile birlikte gerçek performansı değerlendirir. Ayarlanmış R^2 değerleri de her bir yanıt faktörü için yeterli seviyededir. Tahmini R^2 modelin önceden işlenmemiş verilere karşı vereceği yanıt tahminlerinin ne derece iyi olduğunu gösteren bir ölçüttür. Tabloda gösterilen tahmini R^2 değerlerinin 1'e yakın olması modelin yeni verileri karşı ne kadar iyi çalıştığını gösterir. Tabloda verilen son uyum istatistiği parametresi olan yeterlilik hassasiyeti modelin sinyal/gürültü oranının ölçer bu değeri 4'ten büyük olması modelin iyi bir ayırt edicilik sergilediğini ifade eder.

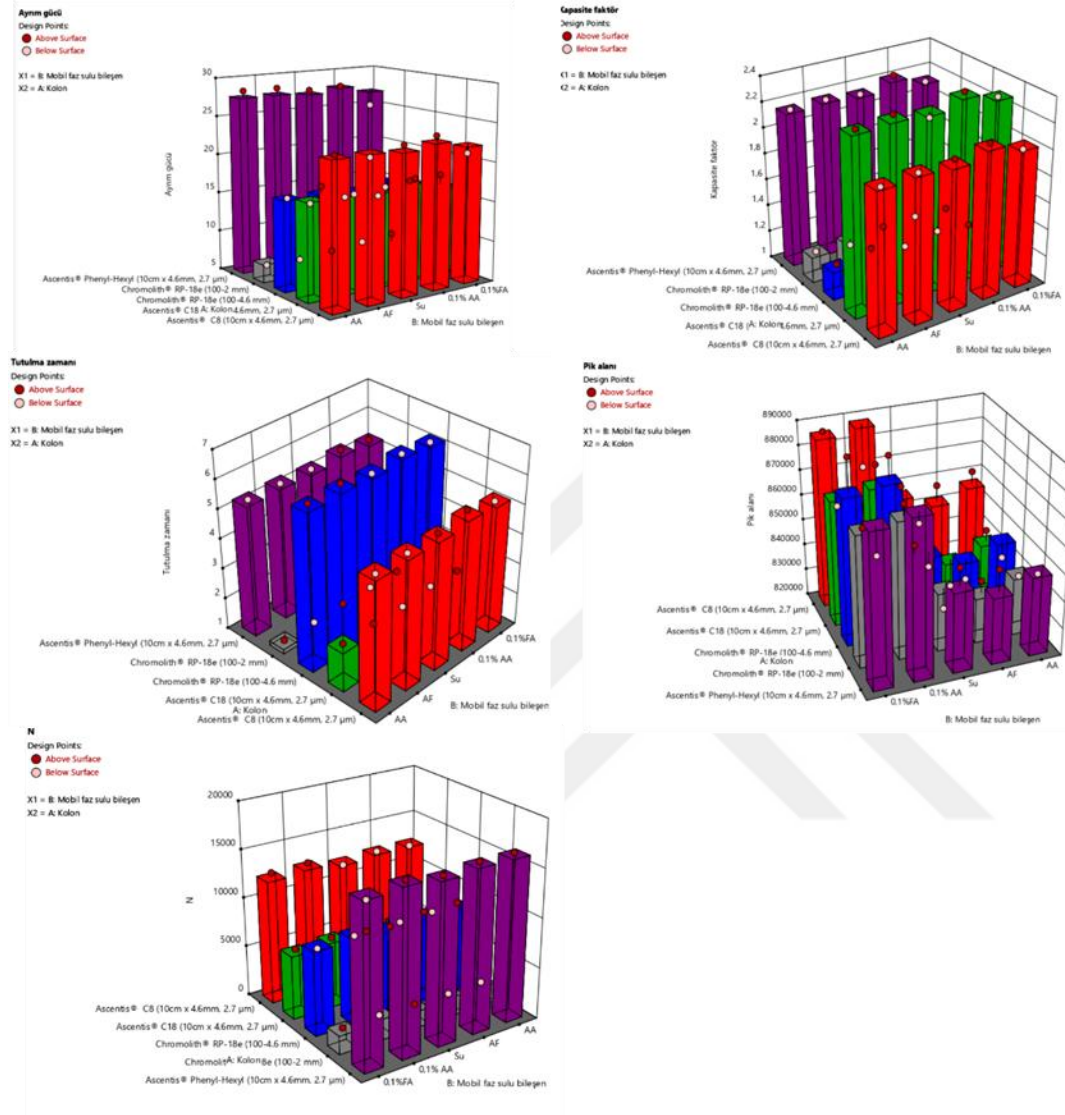
Model oluşturulmasının ardından sonra tasarım süreçlerinde ele alınan iki önemli husus vardır. İlk önemli husus, yukarıda da bahsedildiği üzere anlamlı model ortaya çıkarmak, ikincisi ise hedef yanıtları optimum şekilde karşılayan bağımsız değişkenleri seçebilmektir. Parametreler ve yanıtların sayısı az olduğunda, etkileşim grafikleri kullanılarak optimal yanıtlar belirlenebilir. Ancak bu durum her zaman geçerli olmayabilir. Parametre ve yanıt sayısının arttığı durumlarda, modelin yorumlanması daha karmaşık hale gelir ve sonuçların çıkarımı güçleşir.

1980 yılında Derringer tarafından bir araç önerilmiştir. Derringer tarafından önerilen çok kriterli bir karar verme yöntemi olan isteklilik fonksiyonu, farklı kromatografik performans hedeflerini optimize etmek için kullanılmaktadır (Derringer ve Suich, 1980).

Bu fonksiyon genel kalitenin bir ölçüsüdür ve HPLC ile elde edilen birkaç kromatogramı karşılaştırmak ve en çok arzu edilen özelliklere sahip ayrımı seçmek için kullanışlı bir araç sağlar. Ortaya atıldığı zamandan beri endüstride yaygın olarak kullanılan isteklilik fonksiyonunu geliştirelerek ilgili tüm parametrelerin istenilen kriterlerine uygunluğu sağlayan optimum koşullarını bulmak ve tüm yanıtların arzu edilen ortak değerinin veren tek bir koşulun ortaya konmasını sağlayan bir araç haline gelmiştir (Bourguignon ve Massart, 1991). İsteklilik fonksiyonu çalışmalardan elde edilmiş yanıtı, bir dizi eşitlik aracılığıyla bireysel isteklilik fonksiyonlarına dönüştürür. Sonuç isteklilik değerleri 0 ve 1 arasında değişir. 0 arzu edilmeyen değeri, 1 optimum değeri gösterir. Optimizasyon prosedüründe, çeşitli toplama D'yi maksimuma çıkarmayı gerektirir (Candioti vd., 2014). Çalışmada yanıt değişkenlerin olması gereken değerler ICH kılavuzunun önerdiği sınır değerler tercih edilmiştir. Program bu sınırları içeren D değerine uygun 23 çözüm önermiştir en yüksek D değerini veren kolon türü ve hareketli faza ait model seçilmiştir. Tüm parametreler için optimum yanıtı veren kolon ve hareketli faz sulu bileşeni seçiminde sonra çalışmanın sonraki adımına geçilmiştir. Şekil 5.2'de yanıtlara ait 3D etkileşim grafikleri verilmiştir. Grafiklerde her bir renk, farklı bir kolon türünü temsil etmektedir. Grafiklerin bütünsel ve ayrıntılı incelenmesi sonucunda, önerilen hareketli faz ve kolon kombinasyonunun, analiz için en uygun koşulları sağladığı belirlenmiştir.

Şekil 5.2

FMLCD Optimum Koşulların Tanımlanması İçin 3D Şekiller



5.3.2 Kesirli faktöriyel tasarım

Fisher tarafından 1935'te tanıtılan tüm faktör düzeylerinin kombinasyonlarını çalışmaya dahil ettiği ve deneysel araştırmayı daha kapsamlı hale getirdiği için yarar sağlamaktadır. Tam faktöriyel tasarımlar daha önce de belirtildiği gibi 2^k adet çalışmanın sonucunda bir tahmin yürütür ve k değişken sayısı arttıkça kaynak ve zaman verimi açısından bir dizi tasarım faktörlerinin tümünü inceleme ihtiyacı ikinci planda kalır. Tam faktöriyel tasarımların boyutunun küçültülmesi amacıyla kesirli faktöriyel tasarım geliştirilmiştir (Gunst ve Mason, 2009). Böyle bir deney, faktörlerin çoğunun veya tamamının yanıt değişkenindeki değişikliklere önemli katkıda bulunduğunu ve birlikte katkıda bulunduğunu varsayar; yani, bireysel faktör etkilerinin ve bunların etkileşimlerinin

istatistiksel olarak önemli ve anlamlı olduğunu varsayar. Bu tür bir bilgi nispeten kesin değilse, genellikle amacın yalnızca bir şeyi tanımlamak olduğu çok daha küçük bir deney yürütmek tercih edilir hedefe ulaşmak için tam bir faktöriyel deneye gerek yoktur. Tam faktöriyellerin küçük kesirleri olan tarama tasarımları kritik faktörleri tanımlama hedefini gerçekleştirmek için idealdir (Gunst ve Mason, 2009). Hareketli faz ve kolon parametlerinin ayarlanmasının ardından optimizasyonda etkili olabilecek geri kalan CMP'lerin taranması için kesirli faktöriyel tasarım uygulandı. Beş faktörün taranması için (2^{5-1}) iki seviyeli kesirli faktöriyel tasarım (Res V) oluşturuldu. Taranan CMP'ler akış hızı (0,4-0,6 mL/dk) kolon sıcaklığı (30-40 °C), hareketli faz organik içerik yüzdesi (%40-50) hareketli faz ilave ajan yüzdesi (%0,1-0,2) ve enjeksiyon hacmi (1-3 µL) olarak belirlendi. Tarama tasarımları seçilen CMP'lerin seviyelerine ön denemelerdeki aralıklar, kromatografik sistem kaynaklı sınırlandırmalar ve analiz zamanı gibi etkiler dikkate alınarak karar verilmiştir. Tasarım matrisi 16 deney ile gerçekleştirilmiştir. CMA'lar için elde edilen yanıtlar alıkonma zamanı, alan, kapasite faktörü, ayırım günü teorik tabaka sayısı ve kuyruklanma faktörü olarak kaydedildi. Matematiksel veri analizi, elde edilen deneysel verilerin, etkileşim terimini/terimlerini ortadan kaldırarak doğrusal polinom modeline uydurulmasıyla gerçekleştirildi. Tarama temel olarak faktör seyrekliği ilkesine dayandığından, her faktörün seçilen CMA üzerindeki etkisini nicel olarak belirlemek için ve pareto grafikleri kullanıldı. Pareto analizine dayalı olarak oluşturulan grafikler, farklı yanıt değişkenleri üzerinde etkili olan istatistiksel olarak en önemli faktörlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Grafikte gösterildiği üzere, t-sınır çizgisini aşan faktörler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen pareto grafikleri, organik değiştirici oranının, alıkonma zamanı, kapasite faktörü, ayırım gücü ve teorik tabaka sayısı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, akış hızının alıkonma zamanı ve pik alanı üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu, ayrıca enjeksiyon hacminin de pik alanı üzerinde belirgin bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Pareto sıralama analizinden elde edilen bulgular, hareketli fazın organik bileşen oranı, akış hızı ve enjeksiyon hacminin CMA'lar üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p<0,001$) ve bu faktörlerin optimizasyon sürecine dahil edilmesi gerektiğini ve optimizasyon aşamasına katkısı olmayan kolon fırını sıcaklığı ve asetik asit yüzdesinin sonraki tasarımlarda hariç tutulması gerektiğini göstermektedir. Öte yandan, hareketli fazdaki asetik asit oranının istatistiksel olarak anlamlı bir faktör olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, hareketli fazdan tamamen çıkarılması durumunda bozunma ürünlerinin

kromatogramda tespit edilememesi nedeniyle, asetik asit en düşük seviyede tutulacak şekilde hareketli faza dahil edilmiştir. Bu doğrultuda, ilerleyen çalışmalar da bu parametre dikkate alınarak yürütülmüştür. Kesirli faktöriyel tasarıma ait deney matrisi ve deney matrisinde elde edilen yanıtları Tablo 5.4 ve Tablo 5.5’te verilmiştir.

Tablo 5.4

Kesirli Faktöriyel Tasarım Matrisi

Deney No	Rt	Alan	k	Ayrı Gücü	N	Tf
1	7,002	433639	2,292	30,515	16975	1,122
2	4,703	291783	2,299	29,388	16916	1,144
3	4,224	430352	1,007	18,042	15309	1,243
4	2,853	287528	1,015	16,935	13825	1,242
5	6,883	434531	2,204	28,894	15858	1,114
6	4,614	293890	2,222	28,445	16643	1,111
7	4,173	428584	0,974	17,265	14646	1,224
8	2,792	290742	0,963	16,753	14092	1,213
9	6,946	1320633	2,299	24,464	13459	1,136
10	4,705	900985	2,306	23,985	13077	1,151
11	4,238	1326015	1,009	16,699	12021	1,255
12	2,838	887101	0,999	15,568	11187	1,245
13	6,833	1329157	2,208	22,954	12508	1,133
14	4,566	894914	2,199	23,669	12919	1,141
15	4,148	1320274	0,956	16,38	12156	1,174
16	2,8	886370	0,971	14,956	10831	1,236

Tablo 5.5

Kesirli Faktöriyel Tasarım Yanıtları

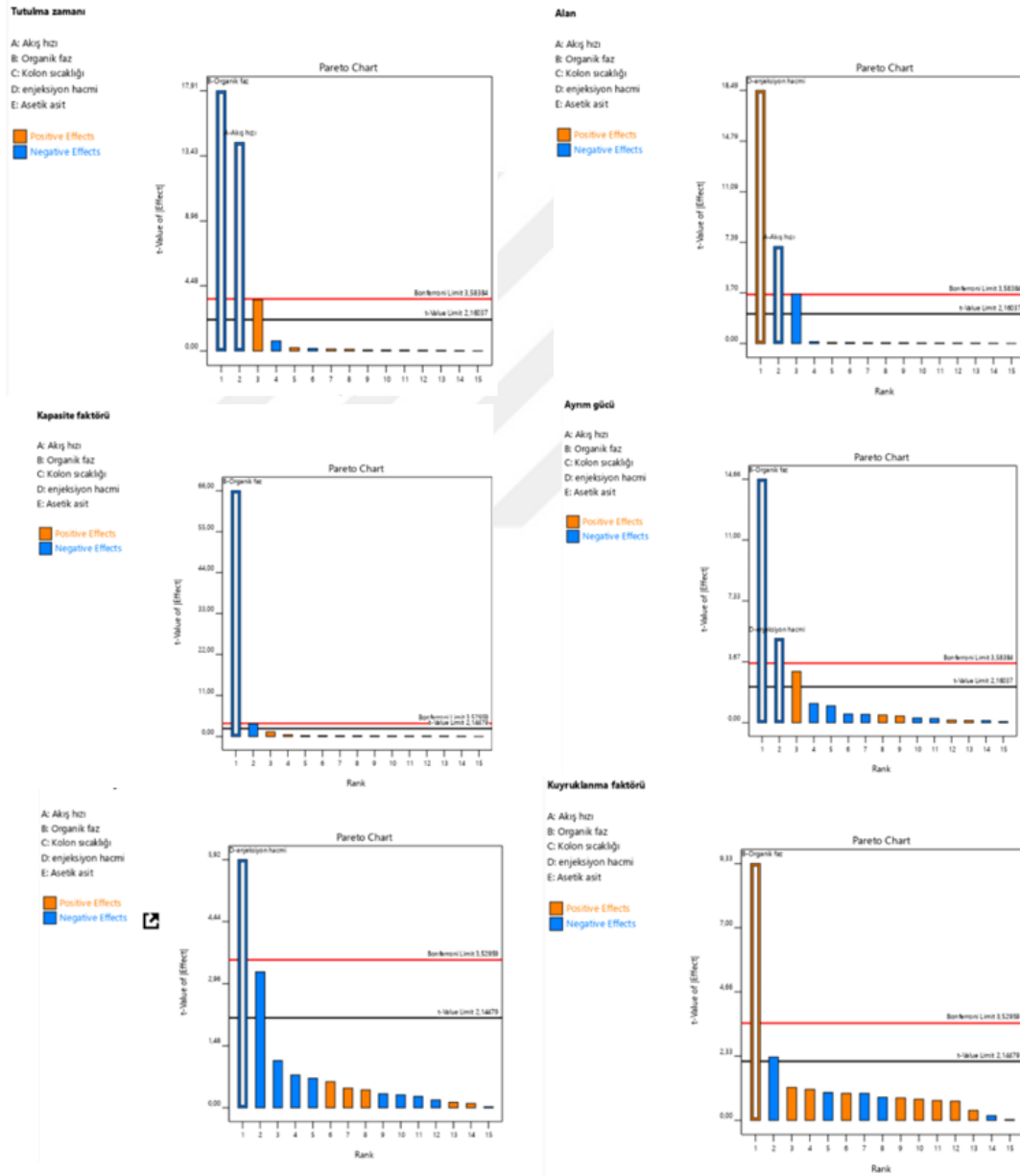
Deney No	Rt	Alan	k	Rs	N	Tf
1	7,002	433639	2,292	30,515	16975	1,122
2	4,703	291783	2,299	29,388	16916	1,144
3	4,224	430352	1,007	18,042	15309	1,243
4	2,853	287528	1,015	16,935	13825	1,242
5	6,883	434531	2,204	28,894	15858	1,114
6	4,614	293890	2,222	28,445	16643	1,111
7	4,173	428584	0,974	17,265	14646	1,224
8	2,792	290742	0,963	16,753	14092	1,213
9	6,946	1320633	2,299	24,464	13459	1,136
10	4,705	900985	2,306	23,985	13077	1,151
11	4,238	1326015	1,009	16,699	12021	1,255
12	2,838	887101	0,999	15,568	11187	1,245

Tablo 5.5 (Devamı) *Kesirli Faktöriyel Tasarım Yanıtları*

13	6,833	1329157	2,208	22,954	12508	1,133
14	4,566	894914	2,199	23,669	12919	1,141
15	4,148	1320274	0,956	16,38	12156	1,174
16	2,8	886370	0,971	14,956	10831	1,236

Şekil 5.3

Kesirli Faktöriyel Tasarıma Ait Pareto Kartları



5.3.3 Box-Behnken tasarımı

Optimizasyon konusu olacak CMP'lerin tarama tasarımlarıyla tanımlanmasının ardından Optimizasyon için, Box Behnken tasarımı seçildi Mevcut çalışmada, akış hızı (A), için 0,4-0,6 mL/dk, asetonitril oranı (B) için %40-50 ve enjeksiyon hacmi (C) 1-3 µL -1, 0, +1 olmak üzere 3 seviyede düzenlendi. Üç CMP ve merkez noktasında yapılan 3 tekrar ile 15 deney sayısı ile optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 20 µg/mL VAM içeren numune HPLC sistemine ejnekte edilmiş Oluşturulmuş tasarım matrisi Tablo 5.4'te sunulmuştur. ANOVA testi, seçilen CMP için modelin $p < 0,005$ ile anlamlı olduğunu göstermiştir. Yanıt yüzey analizi, CMP'ler ile modelde seçilen CMA'lar arasındaki etkileşimleri ortaya çıkarmıştır. Etki analizi, her CMP'nin etkisinin ve bunların CMA'lar üzerindeki etkileşimlerinin alan (yanıt 1), kapasite faktörü (yanıt 2), teorik tabaka sayısı (yanıt 3) ve kuyruklanma faktörü (yanıt 4) ile anlaşılmasına yardımcı olmuştur.

Tablo 5.6

BBD İçin Oluşturulmuş Tasarım Matrisi

Analiz	Faktör A: Organik faz yüzdesi	Faktör B: Akış hızı (mL/dk)	Faktör C: Enjeksiyon hacmi	Yanıt-1: Alan	Yanıt-2: Kapasite faktörü	Yanıt-3: Teorik tabaka sayısı	Yanıt-4: Kuyruklanma faktörü
1	45	0,6	3	645820	1,44	16000	1,19
2	45	0,4	3	824048	1,43	18498	1,11
3	40	0,4	2	559455	2,21	19453	1,08
4	45	0,6	1	275603	1,44	18024	1,14
5	45	0,5	2	530193	1,43	18095	1,17
6	45	0,4	1	385723	1,43	18971	1,14
7	40	0,5	3	662322	2,22	19042	1,08
8	45	0,5	2	540967	1,44	17909	1,17
9	40	0,5	1	302245	2,20	19887	1,10
10	50	0,5	1	290308	0,99	16811	1,19
11	50	0,5	3	659863	0,98	15894	1,21
12	45	0,5	2	553866	1,44	18103	1,15
13	50	0,6	2	559455	0,99	14242	1,28
14	40	0,6	2	420013	2,23	19058	1,10
15	50	0,4	2	596144	0,99	17488	1,19

ANOVA, CMP'lerden akış hızının (B) ve enjeksiyon hacminin(C) alan üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu ($p < 0,005$) göstermiştir Yanıtlardan kuyruklanma faktörünün ise akış hızı (B) ve organik faz yüzdesinden etkilendiği sonucuna varılmıştır. İki yanıt içinde model

1.dereceden ve doğrusaldır. Kapasite faktörü bir bileşiğin kolonda tutulma süresini hareketli fazda ne kadar süre geçirdiğiyle kıyaslayan bir kromatografik parametredir. Ayırışma verimliliğini belirlemek için kullanılır. DoE çalışmalarında kapasite faktörü denkleminde bakıldığında bağımsız değişkenler; bağımsız değişken A'nın yanıt üzerindeki etkisi daha anlamlıyken, B etkisinin olduğu ancak az anlamlı olduğu gözlenmiştir; C'nin bu yanıtı etkilemediği gösterilmektedir. A'nın yanıt üzerinde etkisi oldukça büyük ve negatiftir. Ters faz HPLC'de, hareketli fazdaki organik bileşen oranının artması, analitin sabit faz ile hidrofobik etkileşimini azaltarak daha hızlı elüsyona neden olur ve bu da kapasite faktörünün düşmesine yol açar. Denklemden B'nin kapasite faktörü üzerinde anlamlı negatif etkisi olduğu ancak bu etkileşimin oldukça zayıf olduğu gösterilmiştir. Teorik olarak kapasite faktörü ve akış hızı ters orantı göstermektedir ve bu parametre üzerinde oldukça etkilidir. Ancak BBD bağımsız değişkenleri etkileşimler varlığında değerlendirdiği için organik faz yüzdesinin düşük olduğu koşulda etken madde ile kolon arasında etkileşim yüksek iken akış hızı artışının etkisinin bu sonuca katkısının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Teorik tabaka sayısı, kolonun ayırma verimliliğini ölçen parametredir ve bileşiklerin kolonda ne derece etkin ayrıldığını ifade eder CMP'lerden üçüde teorik tabaka sayısı üzerinde anlamlı etkiye sahipti ($p < 0.05$) Akış hızındaki artma difüzyonun artmasına ve pik genişlemesine neden olduğu için teorik tabaka sayısında azalmaya neden olmuş olabilir. Aynı şekilde artmış organik faz yüzdesi piklerin keskinleşmesine teorik tabaka sayısında artış ile sonuçlanmıştır. Teorik tabaka sayısı ve kapasite faktörü için modeller kuadratik ve denklemler ikinci derecedendir. Tablo 5.7'de yanıtlara ait denklemler ve ANOVA sonuçları verilmiştir.

Tablo 5.7

Box-Behnken Tasarımının Varyans Analizi (ANOVA) Sonuçları

Yanıt türü	Denklem	F	p	Uyum eksikliği	R ²	Yeterli kesinlik
Yanıt 1	$Alan = 520402 - 580598,75B + 192271,75C$	57,91	<0,0001	0,0598	0,9405	22,382
Yanıt 2	$k' = 1,437 - 0,614125A + 0,003B - 0,01664A^2$	39620,0	<0,0001	0,1985	1	513,36

Tablo 5.7 (Devamı) *Box-Behnken Tasarımının Varyans Analizi (ANOVA) Sonuçları*

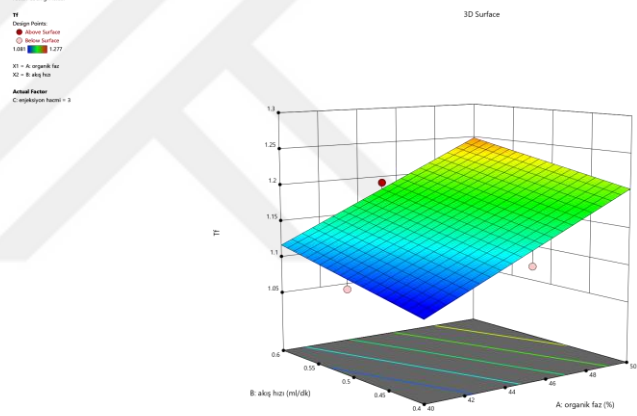
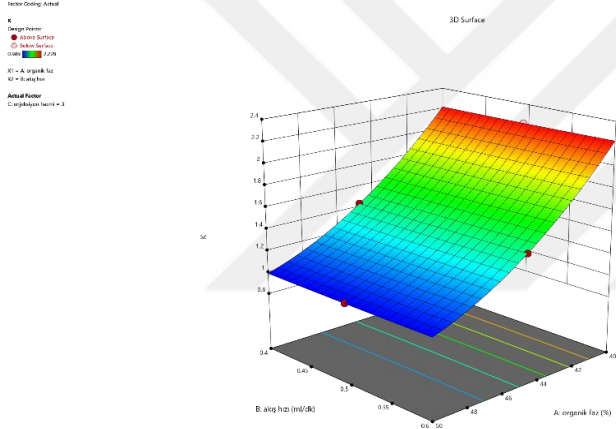
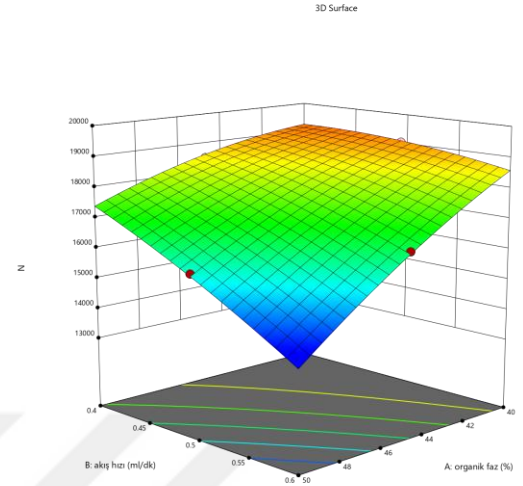
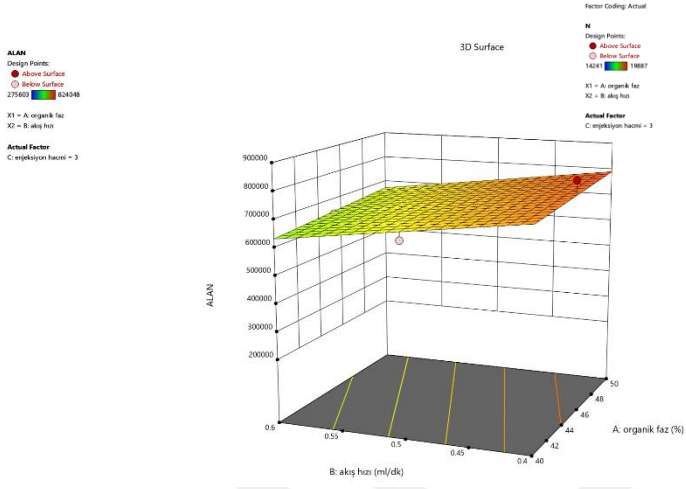
Yanıt 3	N=18035,7-1625,75A-810,875B- 457,375C-713AB-237,75BC- 295,208A ²	118,66	<0,0001	0,2391	0,9953	40,05
Yanıt 4	Tf=1,15493+0.066A+0.22875B	35,33	<0,0001	0,1186	0,9060	17,88

Derringer'in isteklilik fonksiyonu, optimizasyon prosedürü sırasında değerlendirilen tüm değişkenler için en uygun değere aynı anda ulaşmak için deneysel koşulları belirlemek için kullanılmıştır. Çalışmada seçilen yanıt değerleri için istenirlikler mümkün olan en küçük değerleri ICH kılavuzunun önerdiği sınır değerler olarak seçilmiştir. Program bu sınırları içeren D değerine uygun 18 çözüm sunmuştur. D değeri için 3D yüzey grafikleri Şekil 5.4'te ve genel etkileşim grafikleri Şekil 5.5'te verilmiştir. 3D yanıt yüzey grafiklerinde etkilerin anlaşılabilmesi amacıyla

D fonksiyonu ile optimizasyon başarısını tasarımda üretilen modellerin kalitesine bağlı olduğunu belirtmek gerekir. Bu yöntemi doğru bir şekilde uygulamak için, doğrulanmış modeller kullanılmalıdır; bu durumda, daha önce de belirtildiği gibi anlamlı ve uyum eksikliği olmayan bir model ile tamamlanabilir.

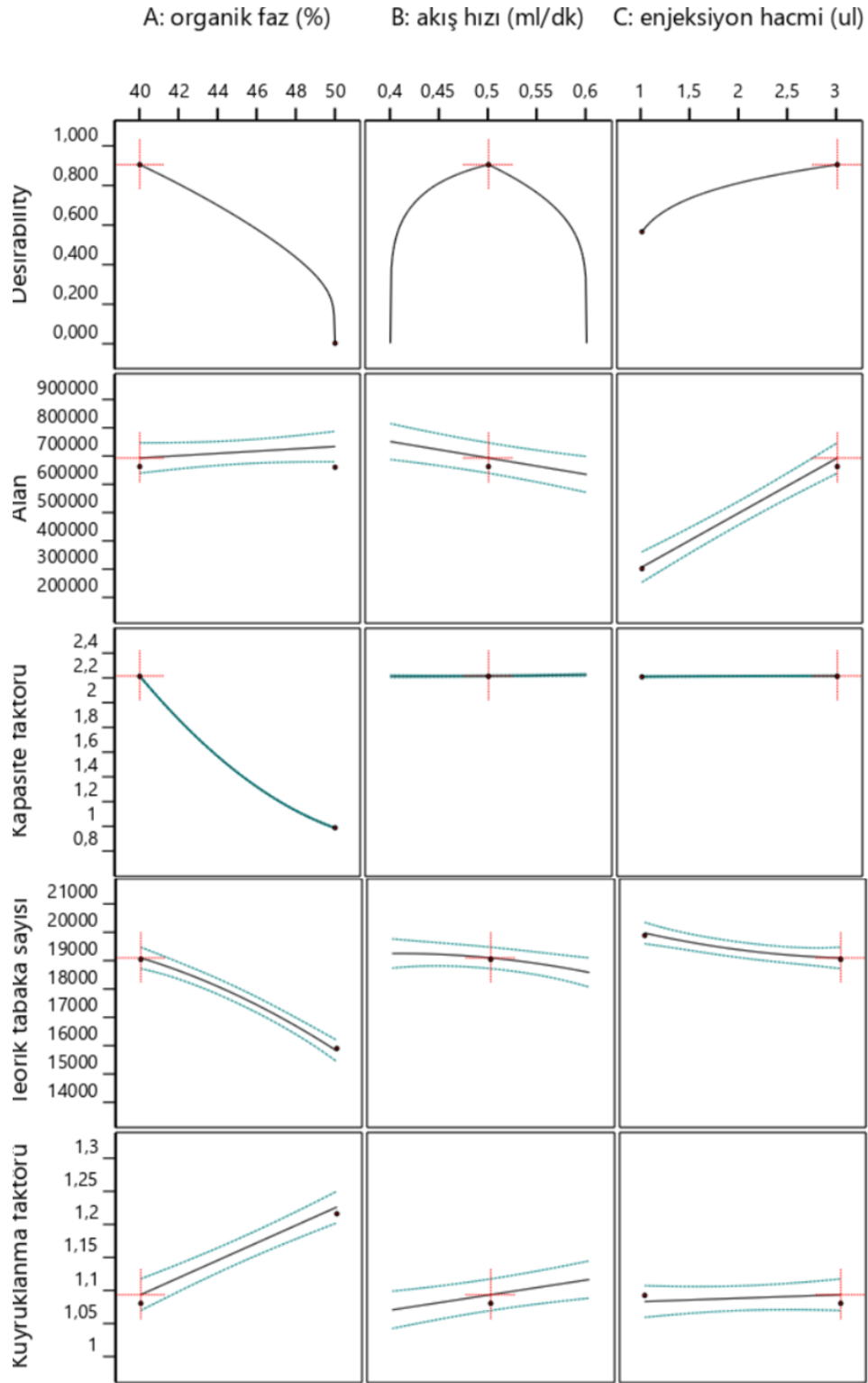
Şekil 5.4

A, B ve C'nin Bir Fonksiyonu Olarak 3D Yüzey Grafikler



Şekil 5.5

A, B ve C için Genel İsteklilik (D) Etkileşim Grafikleri.



Gerçekleştirilen BBD çalışmaları ile isteklilik değeri 0,904 olan koşul ile optimize edilmiş organik faz oranı %40 akış hızı 0,50 mL/dk, enjeksiyon hacmi 3 μ L olarak

belirlenmiştir. Diğer bileşenler kolon fırın sıcaklığı 30 °C ve hareketli faz sulu bileşen asetik asit yüzdesi %0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Optimize edilmiş yöntemin çalışmaları (n=6) gerçekleştirilmiştir. ICH Q2(R2) yönergelerine göre optimum koşullar altında SUT verileri hesaplanarak Tablo 5.8’te verilmiştir.

Tablo 5.8

Sistem Uygunluk Değerlendirmesi Sonuçları

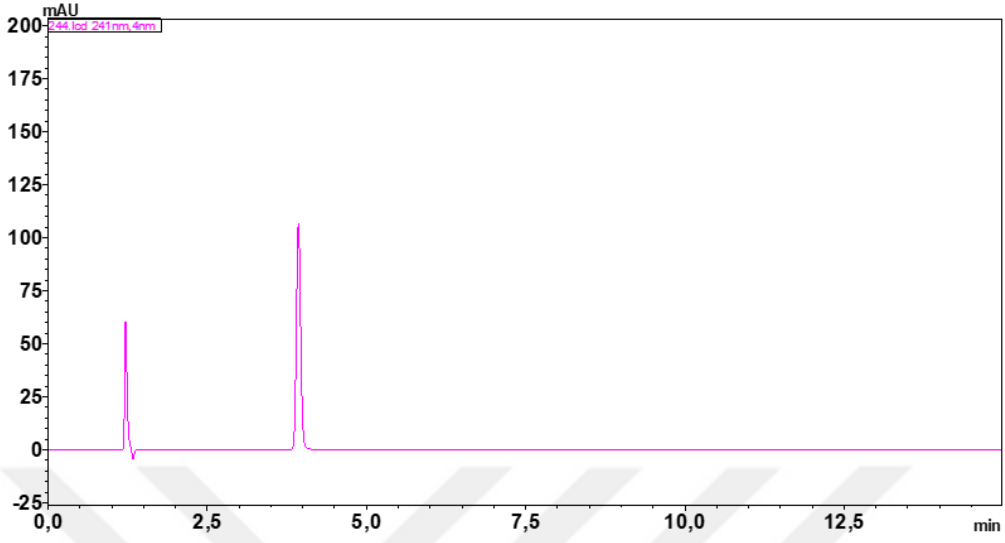
	Hesaplanan değer	Hesaplanan değer	Tavsiye değer
	HPLC-1	HPLC-2	edilen
Alıkonulma zamanı (dk)±GA	5,50±0,0006	5,82±0,0014	-
Alıkonulma zamanı için %BSS	0,01	0,02	BSS ≤ %1
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0,11	0,11	BSS ≤ %1
Enjeksiyon kesinliği için %BSS (n=6)	0,03	0,05	BSS ≤ %1
Kuyruklanma faktörü (T)	1,12	1,31	T ≤ 2
Kapasite faktörü (k)	2,24	1,71	2<k<10
Teorik tabaka sayısı (N)	14016	14046	N> 2000
USP Genişlik	0,19	0,366	≤1
HETP (USP)	10,8	11,2	-

5.4 VAM’ın Hızlı Bozundurma Koşullarındaki Davranışları

VAM’ın bozunma karakteristiğini belirlemek için etmek için farklı stres ortamlarında VAM hızlı bozunma çözeltileri muamele edilmiş ve bu sürecini hızlandırmak için 40 ve 60 °C’de kademeli kontrollü ısı uygulaması yapılmıştır. Sadece ısı ile kalan VAM standart çözeltisinden elde edilen PDA dedektöre ait kromatogram Şekil 5.6 (4,59 dk’da gelen ikinci pik VAM’a aittir) ve boş çözeltiye asit kromatogram şekil 5.7’de gösterilmektedir. Kromatogram incelendiğinde VAM’ın bu koşullarda herhangi bir bozunma ürünü vermediği ve stabil olduğu gözlenmiştir.

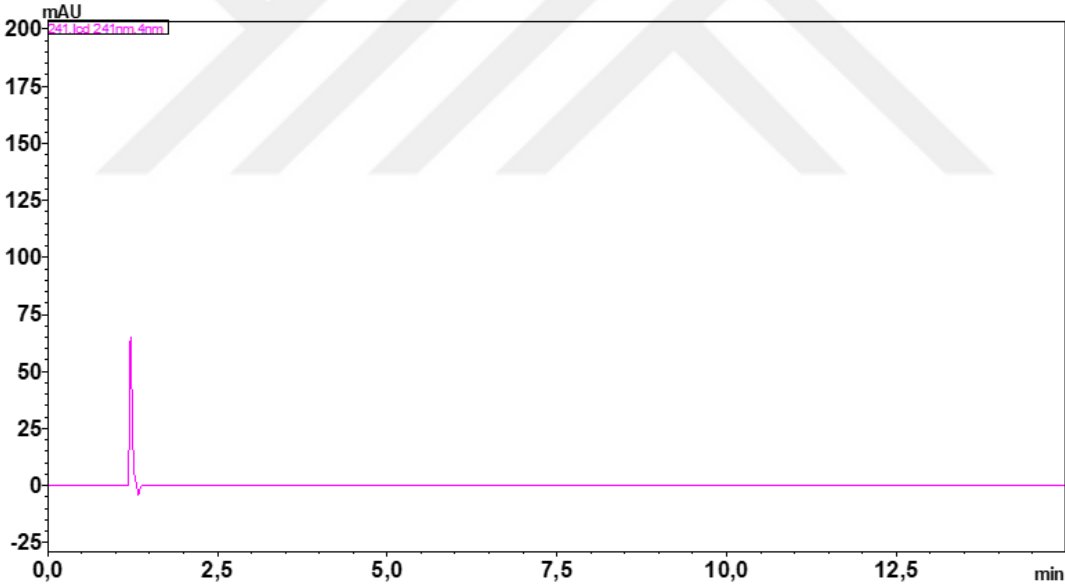
Şekil 5.6

Isı Uygulanmış VAM Çözeltisi



Şekil 5.7

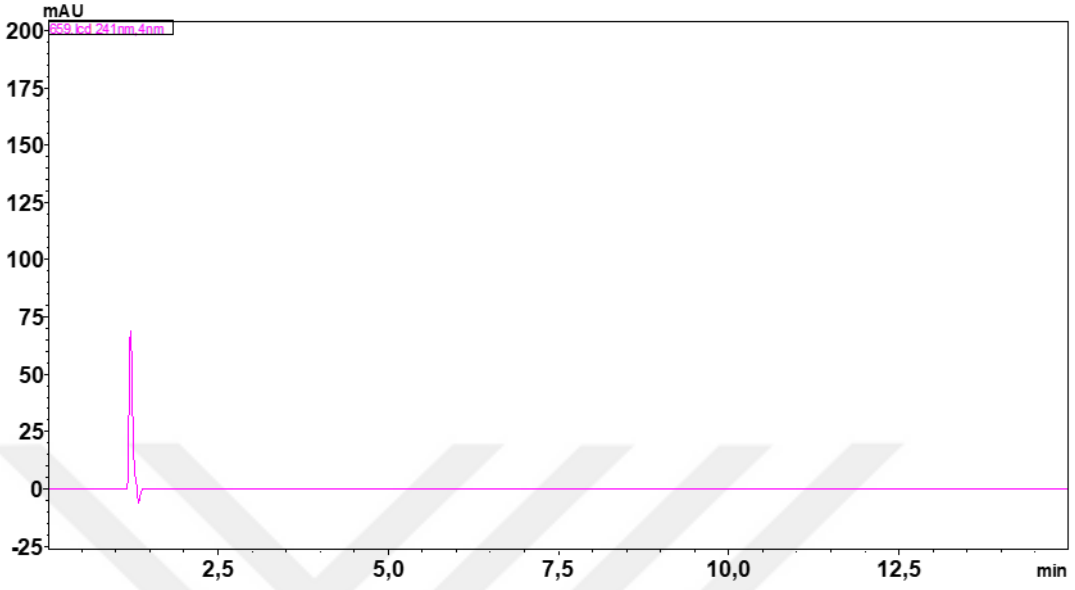
Isı Uygulanmış Boş Çözelti



VAM'ın fotolitik koşullarda hassasiyetinin değerlendirilmesi amacıyla asetonitril içindeki bir VAM çözeltisi 24 saat UV ışık ile muamele edilmiştir. PDA dedektöre ait incelenen VAM'a ait kromatogram, Şekil 5.9'da (4,59 dk'da gelen ikinci pik VAM'a aittir) ve boş çözeltiliye ait kromatogram Şekil 5.10'da verilmiştir. Fotolitik koşullar altında oda sıcaklığında ve 60 °C'de 3 saat ısıtılması koşullarında VAM incelendiğinde herhangi bir bozunma ürünü vermediği ve bu koşullarda dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

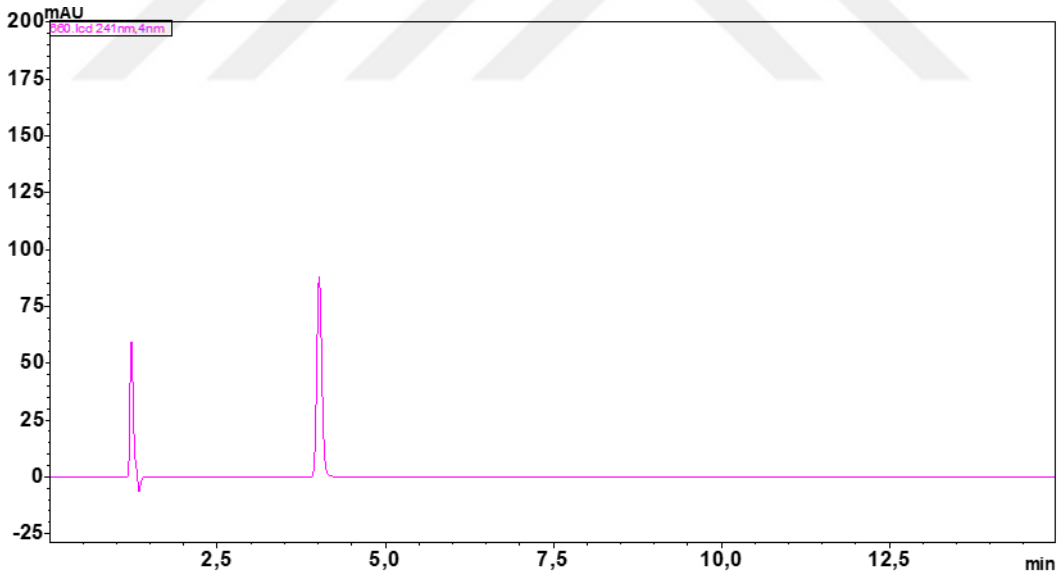
Şekil 5.8

UV ile İşlem Görmüş Boş Çözelti



Şekil 5.9

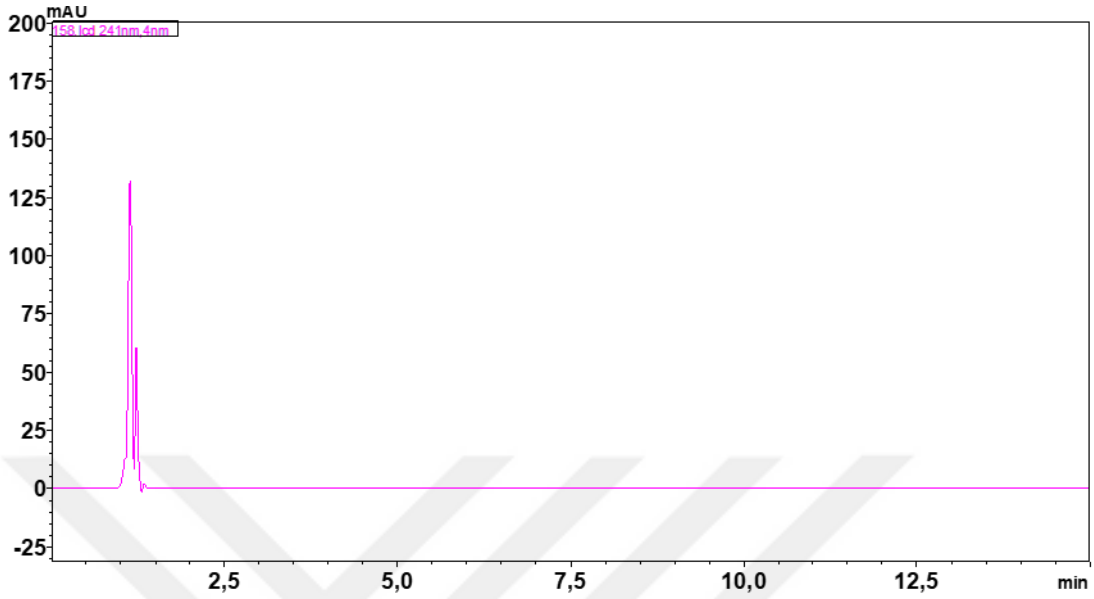
UV ile İşlem Görmüş VAM Çözeltisi



Zorlu bozunma koşullarından asidik strese maruz bırakılan VAM çözeltisi ve boş çözeltiliye ait kromatogramlar Şekil 5.11 (4,59 dk'da gelen ikinci pik VAM'a aittir) ve Şekil 5.10'da verilmiştir. Sonuçlar izlendiğinde VAM'ın oda koşullarında ve 60 °C'de ısıtılmış koşullarında asidik strese dayanıklı olduğu ve hiçbir bozunma ürünü vermediği tespit edilmiştir.

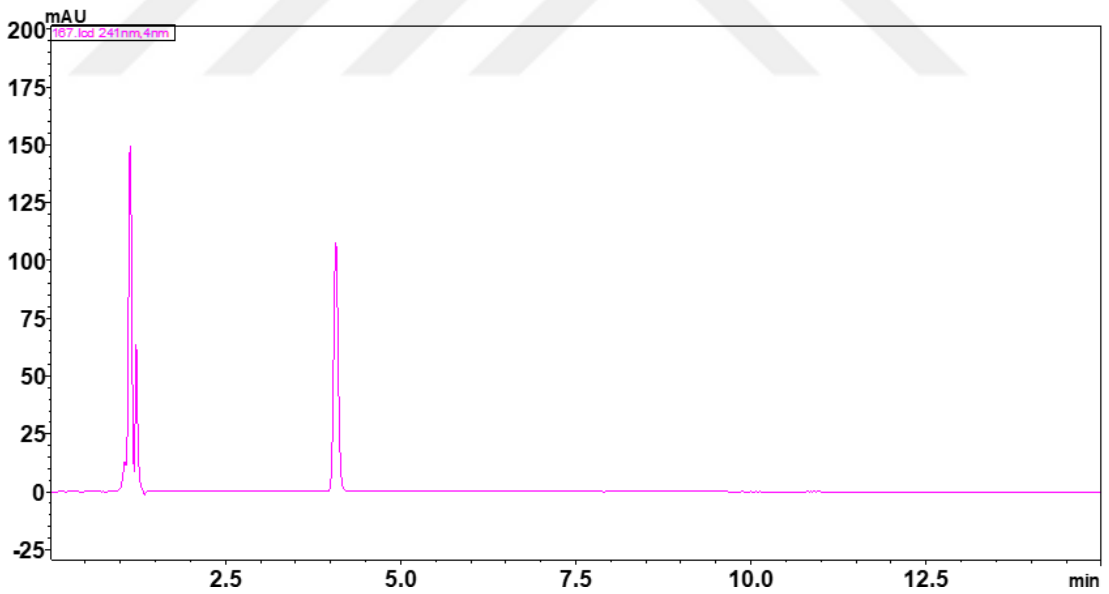
Şekil 5.10

Asitli Ortamda Boş Çözelti



Şekil 5.11

Asitli Ortamda VAM Çözeltisi

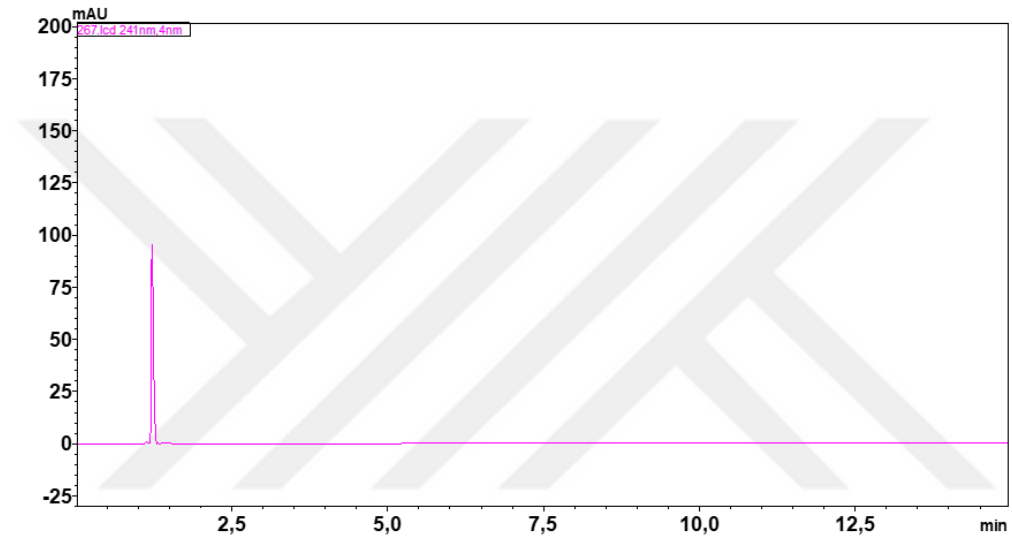


Bileşiği içermeyen alkali ortamda elde edilen boş çözeltiye ait PDA dedektörü kullanılarak kaydedilmiş kromatogram. Şekil 5.13 ve VAM bozunma çözeltisine ait PDA dedektörü kullanılarak kaydedilmiş kromatogram sırasıyla Şekil 5.12 (4,59 dk'da gelen ikinci pik VAM'a aittir) verildiği gibidir. Yapılan çalışmada VAM'nın bazik koşullara oldukça dayanaksız olduğu tespit edilmiştir. Alkali ortamda 2 adet safsızlık piki gözlenmiştir. VAM çözeltisi, önerilen koşullar altında (1N NaOH) işleme tabi

tutulduğunda, hızla bozunma göstererek etken maddenin çok kısa bir süre içerisinde (1 saat) tamamen tükenmesine neden olmuştur. Alkali koşullarda bozunma sürecinin izlenmesi, oldukça yavaş kontrollü bir ayrışma sağlanması ve yöntem geliştirilme sürecinin yürütülebilmesi amacıyla, daha düşük konsantrasyona sahip bir alkali çözeltisi (0,01 N NaOH) hazırlanmış bozunma ürünleri varlığında yöntem geliştirme çalışmaları yürütülmüştür.

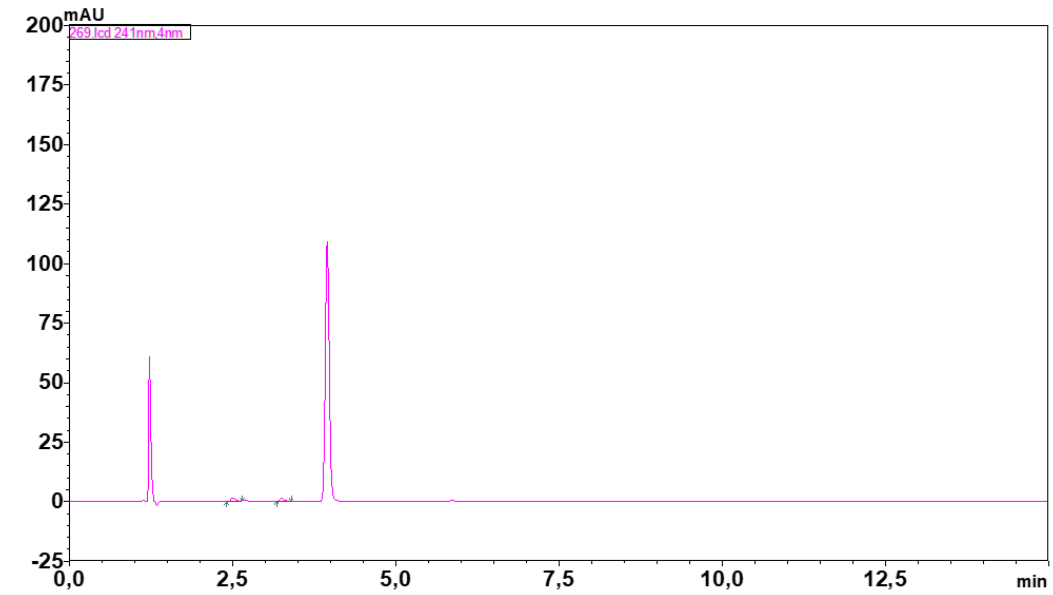
Şekil 5.12

Alkali Ortamda Boş Çözelti



Şekil 5.13

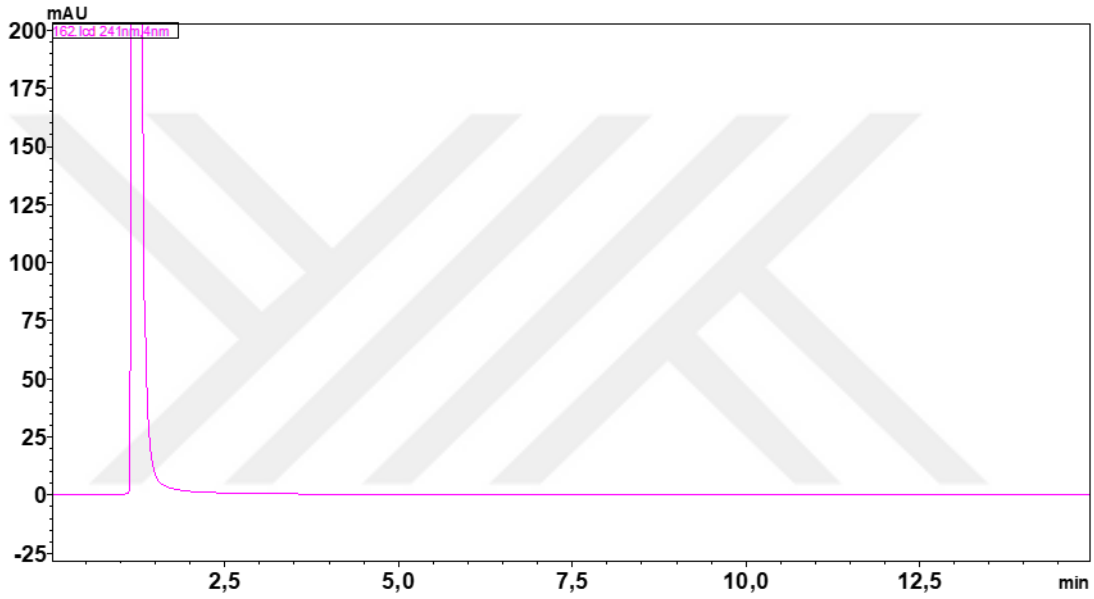
Alkali Ortamda VAM Çözeltisi



Sıcaklık uygulandığında ise yine benzer bozunma ürünlerinin oluştuğu ve uzun süreli sıcaklık uygulamasıyla VAM'ın tamamen bittiği gözlenmiştir. Test edilen diğer bir stres koşulu olan oksidasyon koşulları altında VAM'ın oldukça dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. VAM çözeltisine ve kör çözeltiliye ait kromatogramlar Şekil 5.14'te ve Şekil 5.15'te verilmiştir.

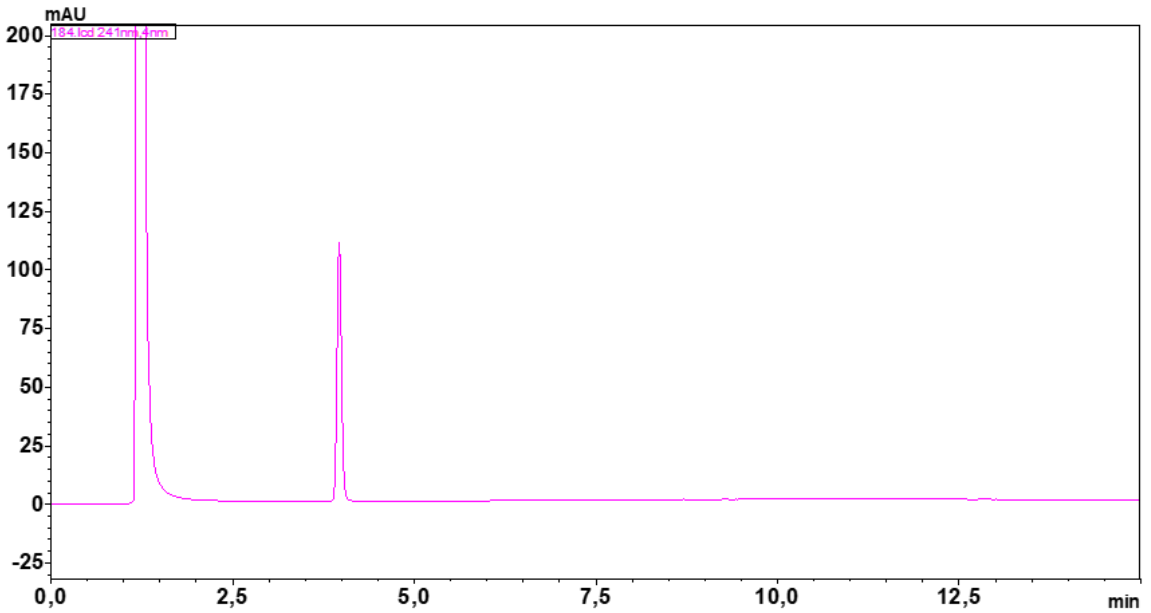
Şekil 5.14

Oksitdatif Ortamda VAM Çözeltisi



Şekil 5.15

Oksitdatif Ortamda VAM Çözeltisi



VAM'ın zorunlu bozunuma çalışmasının sonuçlarına göre, bazik stres ortamı koşulu diğer stresli koşullara göre daha fazla bozunmaya neden olur, ancak diğer koşullar bozunmaya neden olmaz. Zorlu bozunuma çalışmasının sonuçları, her stresli senaryoda VAM'ın kromatogramının son derece spesifik olduğunu göstermiştir. Koşullara ait yüzde ayrışma ve saflık bilgileri Tablo 5.7'de verilmiştir.

Tablo 5.9

VAM Çözeltisi İçin Zorlu Bozunma Çalışması Sonuçları

Bozunma Koşulu	% Değerlendirme	% Ayrışma	Kütle Dengesi	Saflık İndeksi
Asit	99,89	-	99,89	0,9965
Baz	87,63	11,83	99,46	0,9954
Oksit	99,93	-	98,93	0,9945
UV	98,59	-	98,59	0,9974
Termal	101,34	-	101,34	0,9941

5.5 Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Geliştirilen sıvı kromatografisi yöntemi için ICH Q2(R2) kılavuzuna göre tam olarak yöntem geçerliliğini sağlanmıştır. Validasyon çalışmaları dedektörde elde edilen sinyale karşı (pik alanı) standart çözelti konsantrasyonu ile oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem elde olan imkanlar dahilinde farklı HPLC cihazına taşınarak için ara kesinlik çalışması yapılmış ve gerekli parametreler ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Yöntem kesinliği ve doğrusallığına ait veriler Tablo 5.10'da verildiği gibi hesaplanmıştır. Yöntem seçiciliği için muhtemel bozunma ürünleri varlığında yöntem optimizasyonu sağlanmıştır. Ayrıca hızlı bozunma çözeltilerinde VAM'a ait pikin saflığı hesaplanmış ve 0,99 ve üzerinde bulunmuştur.

Tablo 5.10*Kesinlik ve Doğrusallık Parametreleri*

Parametreler	VAM
Doğrusal Aralık (µg/mL)	3,50-140,0
Eğim± SH ^a (gün içi, n =8)	15932,3±115,8
Kesim±SH ^a (gün içi n=8)	-10934,4±8887
Tanımlayıcılık katsayısı (gün içi, n = 8)	0,9997
Teşhis sınırı (µg/mL)	1,50
Tayin sınırı (µg/mL)	3,50
Eğim ±SH ^a (günler arası, n = 24)	15951,69±109,2
Intercept±SH ^a (günler arası, n =24)	-11495,7±8383,6
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası,n= 24)	0,9997
ANOVA	F=(2,6) =0,01 P=0,9895 (P>0.05)
Tekrarlanabilirlik (gün içi, ortalama, n=6)	1112651
Tekrarlanabilirlik (gün içi, SS ^b , n =6)	3671.7
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS ^c %, n =6)	0,14
Tekrarlanabilirlik (gün için, OSH ^d , n=6)	656,32
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA ^e , n =6)	1286,40
Tekrarlanabilirlik (günler arası, ortalama, n=18)	1113811,5
Tekrarlanabilirlik (günler arası, SS ^b , n =18)	2257,12
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS ^c % n=18)	0,20
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH ^d ,n=18)	921,5
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA ^e , n=18)	1806,1
ANOVA	F(2, 15) = 0,1500 P=0,8619 (P>0,05)
^a SH= Standart hata	
^b SS= Standart sapma	
^c BSS=Bağıl standart sapma	
^e GA=Güven aralığı 95%	

Yöntem validasyonu çalışmalarında doğrusallık ve kesinlik çalışmalarının ardından doğruluk parametresinin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Doğruluk parametresinin tayini geri kazanım çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Geri kazanım çalışmaları elde hazırlanmış AGAMREE® formülasyonu çözeltisine standart ekleme metodu ile VAM ilavesi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Formülasyon çözeltisine belirli derişimde (düşük, orta ve yüksek) standart VAM çözeltisi eklemesi yapılmıştır. Çalışma 3 derişimde ve 9 adet bağımsız analizlerle

gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım deneylerine ait veriler Tablo 5.11’de gösterilmektedir. Veriler incelendiğinde yöntemin süzme, dilüsyon ve tartım hata ve belirsizlik kaynağı olabilecek parametrelerden bağımsız şekilde formülasyon bileşenlerinin olduğu ortamda yüksek doğruluk ve kesinlik sergilediği gözlenmektedir.

Tablo 5.11

VAM’a Ait Geri Kazanım Verileri

		Kesinlik						
	Eklenen (µg/mL)	Bulunan ±GA	(µg/mL)	SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)	
HPLC	56,00	55,31±0,07		0,06	0,10	98,72	1,28	
	70,00	69,98±0,16		0,14	0,20	99,91	0,09	
	84,00	84,55±0,27		0,24	0,29	100,66	-0,66	
HPLC-2	56,00	54,50±0,36		0,32	0,58	98,08	1,92	
	70,00	68,67±0,38		0,34	0,49	98,11	1,86	
	84,00	83,25±0,04		0,04	0,05	99,10	0,90	

HPLC yönteminin geçerliliği çalışmalarında laboratuvarlar arası karşılaştırma Prominence conventional HPLC serisi Shimadzu (Japonya) (HPLC-2) marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihaz DGU-20A5R gaz giderici, LC-20At gradyan pompa, SIL-20AC HT 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 laboratuvarlar arası karşılaştırma ara kesinlik deneyleri ile doğrulanmıştır. Bunun için Bunun için kalibrasyon çözeltileri aynı yöntem koşulları kullanılarak LC-PDA sisteminde değerlendirilmiştir. Ardından aralarında anlamlı sayılabilecek bir fark olup olmadığının tayini amacıyla tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.12’de sunulmaktadır. Ek olarak geliştirilen yönteminin hassasiyetini belirlemek amacıyla geri kazanım çözeltileri de bu sistem de analiz edilmiştir. VAM derişimi, doğrusal regresyon yardımıyla pik alanları kullanılarak belirlenmiştir. Cihazların derişim verileri, her seviye için tek faktörlü ANOVA ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, çalışmanın yöntem geliştiricisi tarafından yürütülmesi sebebiyle ara varyans değeri yerine tekrarlanabilirlik varyansı olarak ifade edilmiştir. Çalışma aralığında %100 derişim seviyesine karşılık gelen çözelti için üç tekrarlı her iki cihazın analitik bulgularından elde edilen ortalama

tekrarlanabilirlik varyansı değeri 0,26 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, başarılı bir laboratuvarlar arası karşılaştırma araştırmasının göstergesi olarak tutarlı kabul edilebilir.

Tablo 5.12

Ara Kesinlik Verileri

Parametre	
Doğrusal aralık ($\mu\text{g/mL}$)	3,50-140
Eğim $\pm$ SH	15931,6 $\pm$ 472,8
Kesim $\pm$ SH (gün içi, n=8)	-8815,6 $\pm$ 36296,2
Tanımlayıcılık katsayısı (gün içi, n=8)	0,9947
ANOVA	F (1, 10) = 0,4644 P=0,5110 (P>0,05)

Yöntem sağlamlığı çalışmasında kromatografik koşullarla ilgili ana faktörler Tablo 5.13’de verildiği gibi değerlendirilmiştir. Bir analitik prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ancak kasıtlı değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğine dair bir gösterge sağlar. Sağlamlık testi, yöntem sağlamlığını değerlendirmek için kullanılan deneyler bütünüdür. Bir yöntemin başka bir laboratuvara veya cihaza aktarılması sırasında sonuçların etkilenmeme kapasitesini nicel olarak belirler. ICH yönergeleri ayrıca “Sağlamlığın değerlendirilmesinin bir sonucu, analitik prosedürün geçerliliğinin her kullanıldığında korunduğundan emin olmak için bir dizi sistem uygunluk parametresinin oluşturulması gerekir. Sağlamlık parametresinde açıklanan süreç izlenerek, bu işlemlerin etkileri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde hareketli faz organik yüzdesinde yapılan değişim yöntemi büyük ölçüde etkilediği gözlenmiştir. Hareketli fazın organik bileşenin yüzdesi, analitlerin sabit faza olan ilgisini direkt olarak etkiler, analiti sürekleme görevini üstlenir ve doğrudan alıkonma zamanı ayırma ve kapasite faktörü gibi parametrelerde büyük değişikliklere neden olur. Yöntem için kritik kromatografik parametreler arasında yer alan akış hızı ve hareketli faz kompozisyonundaki değişikliklerin etkisi değerlendirilmiştir. Akış hızında yapılan $\pm 10\%$ ’luk değişikliklerin alıkonma süresi üzerinde 25% ’i aşmayan bir değişime neden olduğu gözlemlenmiştir; bu da yöntemin bu parametreye karşı yeterli düzeyde sağlam olduğunu göstermektedir. Buna karşın, hareketli fazın organik bileşen yüzdesindeki küçük değişikliklerin alıkonma zamanını anlamlı ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Bu durum, yöntemin hareketli faz bileşimine karşı daha hassas olduğunu ve bu parametrede daha sıkı kontrol gerektirdiğini ortaya

koymaktadır. Seçilen yanıt parametrelerinin sıvı kromatografisindeki değişikliklere en fazla tepki gösteren yanıt olan alıkonma zamanıdır. Ek olarak ara kesinlik çalışmaları için ICH Q2(R2) kılavuzunda verifikasyon çalışmalarında sağlamlık parametresi önermediği için çalışılmamıştır.

Tablo 5.13

Sağlamlık Verileri

Değiştirilen Parametre	Değer	Alıkonma zamanı (dk)	%Fark (ortalama±GA)	N	%Fark (ortalama±GA)
Akış hızı (mL/dk)	0,4	6,83	24,42±0,002	14045	0,02±144,53
	0,6	4,60	16,38±0,0009	13661	0,97±127,95
Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	35	8,22	49,70±0,003	15314	-9,85±65,23
	45	4,13	-24,80±0,001067	12891	7,45±36,14
Dedeksiyon dalga boyu (nm)	239	5,49	0,04±0,003245	13686	1,19±77,78
	241	5,49	0,04±0,003	13688	1,17±78,57

ACN-DMSO karışımı ile hazırlanan VAM standart çözeltisinin stabilitesi, farklı koşullarda saklanması değerlendirilmiştir. Kısa süreli stabiliteyi değerlendirmesi için madde 24 ve 48 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Uzun dönem stabilite için, üç donma-çözülme döngüsü de dahil olmak üzere üç hafta süreyle -20 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Ardından her çözelti analiz edilmiştir. Analizler üç kez gerçekleştirilmiş ve sonuçlar geri kazanım sonuçları açısından %95 güven düzeyi ile değerlendirilmiştir. Tablo 5.14'e göre VAM çözümleri, belirtilen bu parametreler altında kararlılık göstermektedir.

Tablo 5.14

Stabilite Verileri

Derişim (µg/mL)	Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, oda sıcaklığı)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, -20°C)		Dondurma-Çözme kararlılığı (3 Döngü)	
	Bulunan- (Ortalama±GA*	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*	GK (%)
70	69,23±0,17	98,90	70,67±0,20	100,96	70,90±0,22	101,3	71,3±0,05	101,7

5.6 Geliştirilen Yöntemin Sürdürülebilirlik ve Pratiklik değerlendirilmesi

5.6.1 Yöntemin yeşillik değerlendirilmesi

Geliştirilen sıvı kromatografisi yönteminin yeşilliğini değerlendirmek için bu çalışmada analitik eko-ölçek, NEMI ve AGREE olmak üzere üç yeşillik ölçeklendirme metriği ile yöntemin sürdürülebilirliği değerlendirilmiştir.

5.6.1.1 Geliştirilen yöntemin Analitik eko ölçeği

Analitik eko-ölçeği, analitik yöntemlerin çevresel etkisini 100'lük bir temel puanla başlayıp ceza puanlarını çıkararak değerlendirir. Bu puanlar, kullanılan çözücülerin ve reaktiflerin türleri ve miktarları, enerji tüketimi, mesleki tehlikeler ve atık yönetimi uygulamaları gibi belirli faktörlere göre atanır. 100'e yakın daha yüksek bir nihai puan, daha çevre dostu ve sürdürülebilir bir yöntemi gösterirken, daha düşük bir puan daha büyük bir çevresel etkiyi gösterir. Analitik eko-ölçeği sonucu şu şekilde bir ölçekte kategorize edilir: mükemmel bir yeşil analiz 75 puanın üzerinde puan alır, kabul edilebilir bir yeşil analiz 50 puanın üzerinde puan alır ve yetersiz bir yeşil analiz 50 puanın altında puan alır Geliştirilen yöntem için Analitik-eko-ölçek puanı 87 olarak belirlenmiştir. Tablo 5.15'te yöntemin toplam puanı ve atanmış ceza puanları gösterilmektedir.

Tablo 5.15

Geliştirilen LC-PDA Yöntemin Analitik Eko Ölçeği

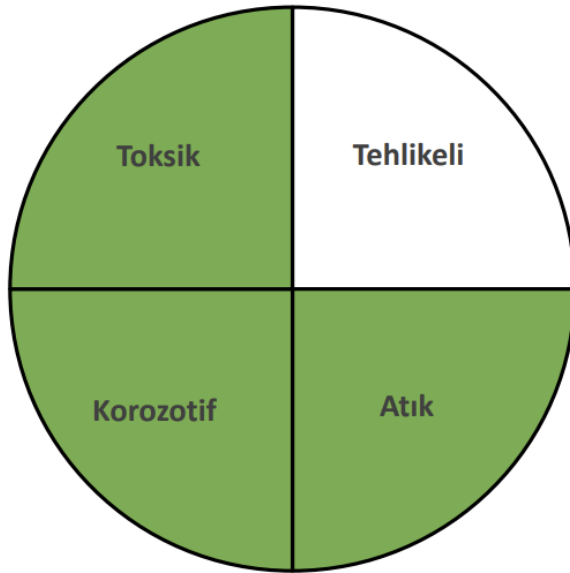
Bileşen/Reaktif	Piktogram	Uyarı kelimesi	Uygulanan yöntemde kullanılan miktar	Ceza paunu
Asetonitril		Tehlike	<10 mL (g)	4
Asetik asit		Tehlike	<10 mL (g)	4
Ultra-saf su	-	-	-	0
Cihazlar				
HPLC-PDA	-	-	≤1,5 kWh /numune	1
Sonikatör	-	-	≤0,1 kWh /numune	0
Santrifüj	-	-	≤1,5 kWh /numune	1
İş tehlikesi				
Atık	-	-	<10 mL (g)/analiz	3
Atmosfere salım				
Toplam puan	-	-	-	Σ13
Eko ölçek			100-Σ	87

5.6.1.2 Geliştirilen yöntemin ulusal çevresel yöntem endeksi: NEMI

NEMI, geliştirilmiş yöntemin sadece çevresel performansı değerlendirmek için bir araçtır. Bu endeks, çeşitli çevresel göstergeler kullanarak bir yöntemin çevresel performansının ölçülmesi amaçlanır. Bu göstergeler, su ve enerji tüketimi, atık yönetimi ve karbon ayak izi gibi çevresel etkileri ölçmek için kullanılabilir. NEMI, çevresel sürdürülebilirlik çabalarını değerlendirmek ve iyileştirmek için stratejik bir araç görevi görür. Çevresel etkiyi azaltmada ve çevre dostu uygulamaları teşvik etmede önemli bir rol oynar. Piktogramın oluşturulması şu koşullara göre yapılır: yöntemde kullanılan kimyasalların kalıcı, biyolojik birikimli ve toksik kimyasal maddeler listesinde yer alıp almaması; yöntemde kullanılan kimyasalların D, F, P ve U listelerinde yer alıp almaması; analizin aşındırıcı olup olmaması ($\text{pH} < 2$ veya > 12 aralığında olması önerilir); son olarak analizde süresince üretilen atık miktarının 50 g geçip geçmediğine göre değerlendirilmektedir. Geliştirilen yöntemin NEMI piktogramı Şekil 5.16’da verilmiştir. Piktogram incelendiğinde sadece ikinci kadranın asetonyitril ve asetik asit varlığı nedeniyle F listesine girdiği ve yeşil olarak işaretlenmediği bu kadranda dışında piktogramdaki dört kadrandan üçünün yeşil renkli olduğunu gösterilmiştir.

Şekil 5.16

Geliştirilen Sıvı Kromatografisi Metodunun NEMI Piktogram



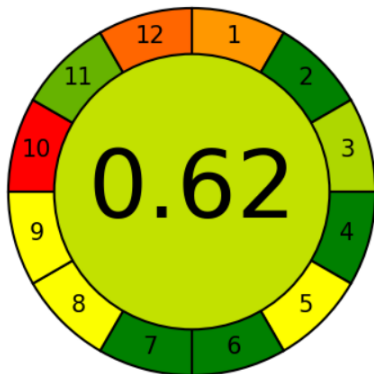
5.6.1.3 Geliştirilen metodun analitik yeşillik hesabı: AGREE

AGREE metriği GAC'ın doğrudan 12 ilkesinden puanlandırılır ve nihai yeşillik puanını şeklin ortasında sunan saat kadranı görünümlü bir piktogram ile temsil edilir. Piktogramın 12 parçasının her bir bölümüne, her GAC ilkesinin performansına karşılık

gelen, yeşil-sarı-kırmızı renk skalasıyla gösterilen özel bir renk kodu atanır. Nihai AGREE puanı 0,6'nın üzerinde puan alırsa yeşil kabul edilir (Pena-Pereira vd., 2020). Şekil 5.17'de gösterilen piktograma göre AGREE yönteminin genel puanı 0,62 olarak belirlenmiştir bu tespiti göre geliştirilen yöntem GAC'ın 12 ilkesinin perspektifinden yeşil olarak nitelendirilmektedir. Yöntemin yeşillik puanı detaylı olarak incelendiğinde 1 10 ve 12 numaralı bölümlerin kırmızı olduğu ve yöntemin en zayıf noktaları olarak değerlendirildiği görülmektedir. 1 numaralı kısım doğrudan analizle ilgili. Bu yöntem laboratuvarda ön işlem gerektirir (kimyasal kullanarak çözme, sonike etme vb.) ama az sayıda adım içerir. GAC'ın da aynı ilkesine göre analitler mümkün olduğu koşullarda doğrudan analiz edilmelidir. HPLC, GC gibi cihazlar ile gerçekleştirilen ölçümler numunelerin üretim sürecinden ayrıldıktan sonra laboratuvar ortamında birkaç işleme ile analiz edilmesi şeklinde yürütülür. Genellikle daha detaylı ve hassas ölçüm sağlamakla birlikte pH ve refraktometre gibi cihazlar uzaktan ve çok az fiziksel temasla ve bazen hiç örnek hazırlama adımı içermeyen analizleri gerçekleştirebilir. 10 numaralı kısımdan gelen negatif puanlandırma yöntem sırasında kullanılan reaktiflerin biyolojik temelli olup olmamasından kaynaklanır. 12 numaralı kısım kullanılan çözücülerin yarattığı riskler ile ilgilidir. HPLC'de uçucu, yanıcı çözücüler kullanıldığı için ölçeklendirme puanı düşük olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte 5,8,9 ve 11 numaralı kısımlar sarı olarak değerlendirilmiştir. 5 numara kullanılan sistemin otomasyona sahip olması ve minyatürize numune hazırlama prosedürünün daha yeşil olması ile ilgilidir; 8 numara yöntemin tek analizde kaç analitin ölçümünün gerçekleştirildiği ile ilgilidir; 9 numara yöntemin enerji tüketimiyle ilgilidir ve sıvı kromatografisi yöntemleri GAC'ın 12 ilkesine göre sarı olarak nitelendirilmiştir.

Şekil 5.17

Geliştirilen Yöntemin AGREE Piktogramı



5.7 Yöntemin Pratiklik Değerlendirmesi

Yöntem pratiklik çerçevesinde BAGI ölçeğiyle değerlendirilmiştir. Değerlendirilen yöntemin sonuç şekli, Şekil 5.18'de sunulmuştur. Şekilde görülen koyu mavi kısımlar yöntemin pratiklik açısından en güçlü yönlerini göstermek olup BAGI ölçeğine göre tam puan ile değerlendirilmiştir bunlar yöntemin düşük örnek hacmi gerektirmesi, analiz için numunelerin ön işleme ile derişimini artırma işlemine tabi tutulmasına gerek olmaması ve yöntem için kullanılan çözücü ve reaktifleri ticari olarak kolay ulaşılabilir olmasından kaynaklanır. Ölçeğe göre beyaz yani düşük puan alarak nitelendirilen kısımlar: yöntemin hedef aldığı tek bir analit olması ve eş zamanlı örnek hazırlanamamasında ileri gelmektedir. Yöntemin final pratiklik puanı 77,5 olarak atanmış olup bu skor pratik olarak değerlendirilmesi için yeterlidir.

Şekil 5.18

Yöntemin BAGI Değerlendirmesi



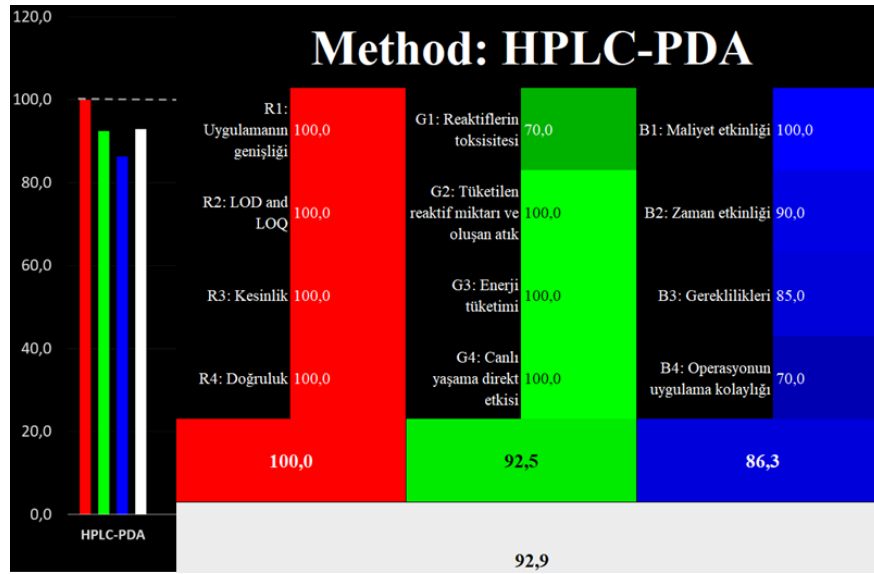
5.8 Yöntemin Beyazlık Değerlendirmesi

Beyaz analitik kimya (WAC), yeşil analitik kimyanın bir uzantısı olan analitik kimyada sürdürülebilir kalkınma kavramıdır. WAC, Nowak ve vd., tarafından 2021'de tasarlanıp geliştirilmişti. Nowak ve arkadaşları tarafından önerilen ve Microsoft Excel yazılımı yardımı ile hesaplama kolaylığı sağlayan RGB-12 ölçeğine göre yöntem tüm perpektiflerden değerlendirilmiştir. Önerilerin Excel hesaplamasında tablolada, her kritere

0 ile 100 arasında değişen bir puan değeri atanarak tamamlanmaktadır. 0 değeri en kötü sonucu, 100 ise yöntemin planlanan uygulamaya uygun olduğu anlamına gelir. Değerlendirmede her ana başlık yani Yeşillik kırmızılık ve mavilik ve bunlara bağlı başlıkların altında atanmış puanlar şekil 5.19'da verilmiştir. Yöntem 92,9 puan ile değerlendirilmiştir bu yöntemin tüm parametrelere için uygun ve tercih edilebilir olduğunun göstergesidir ve mükemmel beyaz yöntemeye aday olmaya oldukça yakındır.

Şekil 5.19

RGB12 Değerlendirmesi



6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

HPLC, ilaç endüstrisinde kritik bir analitik araçtır. Bileşikleri yüksek hassasiyet ve doğrulukla ayırma, tanımlama ve miktarlarını belirleme yeteneği, HPLC'yi ilaç geliştirme ve üretiminin çeşitli aşamalarında vazgeçilmez kılar. İlaç ürünlerinin kalitesini ve güvenliğini sağlamaktan araştırma ve düzenleyici uyumluluğu desteklemeye kadar, HPLC'nin uygulamaları çeşitli ve önemlidir. HPLC'nin ilaç geliştirmede yaygın olarak kullanılan birkaç uygulamasına örnek olarak şunlar verilebilir: İlaç adaylarının kimyasal bileşimini analiz ederek bunların özelliklerini ve davranışlarını anlamalarına yardımcı olur. HPLC, farklı bileşenlerin kararlılığını, çözünürlüğünü ve uyumluluğunu analiz ederek optimum formülasyonu belirlemeye yardımcı olur. Farmasötik ürünlerin kalitesinin sağlanması en önemli husustur ve HPLC'nin kalite kontrol ve güvence için altın standart olabileceği yerdir. HPLC, USP ve diğer test yöntemlerini izleyerek aktif farmasötik bileşenlerin, yardımcı maddelerin ve bitmiş ürünlerin kimliğini, saflığını ve gücünü doğrulamak için kullanılır. İlaç endüstrisinde, numunenin ham madde veya bitmiş ürün olmasına bağlı olarak doğruluk, hassasiyet, özgüllük ve sağlamlığı sağlamak ve göstermek için analiziniz yöntem geliştirme, doğrulama ve/veya geçerlilik gerektirir. Bu analizler için genellikle HPLC kullanılır. Stabilite testleri ile ilaçların zaman içinde etkinliğini, güvenliğini ve kalitesini koruduğundan emin olmak için HPLC çalışmaları yapılır. HPLC, sıcaklık, nem ve ışık gibi çeşitli çevresel koşullar altında oluşan bozunma ürünlerini analiz ederek stabilite çalışmaları yürütmek için kullanılır. Farmasötik ürünlerdeki safsızlıklar, güvenliklerini ve etkinliklerini etkileyebilir. HPLC, safsızlık profillemesi, Etkin maddelerde ve bitmiş ürünlerde safsızlıkları ve bozunma ürünlerini tanımlama ve ölçme için yaygın olarak kullanılır. HPLC, biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmaları sırasında kullanılır. Bir ilacın vücuttaki emilimini ve dağılımını karşılaştırır. Bu çalışmalar, jenerik ilaç onayı ve yeni ilaç farmakokinetiğinin anlaşılması için çok önemlidir.

HPLC ve PDA dedektör kombinasyonu çoğu Ar-Ge ve rutin analiz laboratuvarlarında bulunan ve ulaşılabilir olan bir kombinasyondur. HPLC-PDA dedektör, ekonomik ve enerji tüketimi sorunları nedeniyle saf formlarda ve/veya farmasötiklerde ilaç analizi için tercih edilen araçtır. Ayrıca, HPLC-PDA yönteminin hızı ve yeşilliği, farmasötiklerin günlük analizinde güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini önemli ölçüde artırır. HPLC-PDA, güvenilirliği ve etkinliği nedeniyle farmasötik formülasyonlarda safsızlıkların ve/veya bozunma ürünlerinin bir arada bulunması

durumunda ilaçların analizi için en kullanışlı kromatografik tekniktir. Literatürde VAM etken maddesi ile ilgili analitik açıdan çeşitli yığın ya da formülasyon analizlerini ortaya koyacak herhangi bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. Bu nedenle söz konusu bu çalışmada VAM'ın bozunma ürünleri varlığında farmasötik formülasyonlarda analizi için sıvı kromatografisi temelli sürdürülebilir (beyaz kimya), pratik (mavi kimya) çevreci (yeşil kimya) analitik kimya prensiplerine uygun ve kemometri yaklaşımıyla analitik yöntem çalışması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma, farklı stres koşullarında bileşiğin davranışlarının ayrıntılı olarak incelendiği ilk çalışma olarak dikkat çekici bir noktadadır. Çalışma yüksek doğrusal ilişki ve düşük teşhis ve tayin sınırları göstermekte, bozunma ürünleri varlığında tam yöntem geçerliliği ICH Q2(R2) kılavuzuna göre sağlanmıştır. Benzer şekilde, başka bir HPLC cihazına transfer edilerek yöntem tekrarlanabilirlik çalışmaları ile yöntem geçerliliğinin kanıtı güçlendirilmiştir. Çalışmada, VAM tayinine yönelik analitik yöntemin geliştirilmesi amacıyla sistematik deneysel tasarım stratejileri uygulanmıştır. Kolon tipi ve mobil faz kompozisyonu gibi kategorik değişkenler için çok seviyeli faktöriyel tasarım kullanılmış; sayısal değişkenler için ise kesirli faktöriyel tasarım yaklaşımı benimsenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, belirleyici parametrelerin etkileşimleri ve etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiş, optimize koşulların belirlenmesi amacıyla BBD ile son adım optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Uygulanan bu çok aşamalı tasarım yaklaşımı sayesinde, deney sayısı minimumda tutulurken metot geliştirme süreci hem zaman hem de kaynak açısından verimli hale getirilmiştir. Bu yönüyle çalışma, yalnızca rutin analizde değil, metot geliştirme sürecinde de yeşil kimya ilkelerine uygunluğuyla öne çıkmaktadır. Çok az sayıda deneyle başarılı bir optimizasyon sağlanmış, gereksiz kimyasal kullanımı ve atık üretimi azaltılmıştır. Elde edilen optimize koşullar altında, VAM'ın yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirlikle tayini mümkün olmuştur. Bu çalışma, analitik kimyada deneysel tasarımın gücünü ve yeşil analitik yaklaşımın metot geliştirme süreçlerine entegrasyonunun önemini ortaya koymaktadır. Optimizasyon sürecine ait iş akış şeması Şekil 6.1 'de verilmiştir

Şekil 6.1

Optimizasyon Süreci İş Akış Şeması



Sağlık Bakanlığının Kalkınma Planı kapsamında en çok vurguladığı noktalardan birisi ilaç ve tıbbi cihaz sektöründe yerli üretim sürecinin desteklenmesi ve bu amaçla uluslararası gereklilik ve yeterlilikte alt yapı, akreditasyon ve katma değer sağlanmasıdır. Yerli ilaç üretimin en önemli aşamalarından birisi etken madde analizinin hem Ar-Ge hem de kalite kontrol sürecinde yüksek doğruluk ve kesinlikte yapılmasıdır. Üretim sürecinin sağlıklı, kolay ve daha bilinçli sağlanmasında etken maddenin literatürde yer alan biyolojik numuneler ve farmasötik preparatlarda analizine dair kalite kontrol ya da stabilite göstergeli çalışmalar kritik öneme sahiptir. Bu yüzden bu çalışmanın literatüre sunduğu katkının yanında üretim süreçlerini aydınlatmak için ilaç endüstrisine ya da araştırma geliştirme çalışmalarına kılavuzluk yapacak analitik bakış açısıyla değerlendirilmiş bir çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J. C., Fokkema, I. F., Van Ommen, G. J. B., & Den Dunnen, J. T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electromyography and Clinical Neurophysiology*, 34(2), 135-144.
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (2000). *Green chemistry: theory and practice*. Oxford university press.
- Armenta, S., Esteve-Turrillas, F. A., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2023). Green Analytical Chemistry: Concepts, evolution, and recent developments. *Green Approaches for Chemical Analysis*, 1-37.
- Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2008). Green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(6), 497-511.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Botezatu, C., Condrea, I., Oroian, B., Hrițuc, A., Ețcu, M., & Slătineanu, L. (2019). Use of the Ishikawa diagram in the investigation of some industrial processes. *Materials Science and Engineering*, 681(1), 012012.
- Bourguignon, B., & Massart, D. (1991). Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *Journal of Chromatography A*, 586(1), 11-20.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons.
- Briggs, D., & Morgan, J. E. (2013). Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment—relevance for therapy. *The FEBS journal*, 280(17), 4281-4293.
- Buket, A. (2015). Quality By Design: QbD and Quality Risk Management. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19(1).
- Bushby, K., Bourke, J., Bullock, R., Eagle, M., Gibson, M., & Quinby, J. (2005). The multidisciplinary management of Duchenne muscular dystrophy. *Current Paediatrics*, 15(4), 292-300.
- 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.
- Chen, C.-H., Chung, W.-H., & Ding, W.-H. (2020). Determination of benzotriazole and benzothiazole derivatives in marketed fish by double-vortex-ultrasonic assisted matrix solid-phase dispersion and ultrahigh-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 333, 127516.
- Conklin, L. S., Damsker, J. M., Hoffman, E. P., Jusko, W. J., Mavroudis, P. D., Schwartz, B. D., Mengle-Gaw, L. J., Smith, E. C., Mah, J. K., & Guglieri, M. (2018). Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacological Research*, 136, 140-150.
- Dang, U. J., Ziemba, M., Clemens, P. R., Hathout, Y., Conklin, L. S., Investigators, C. V., & Hoffman, E. P. (2020). Serum biomarkers associated with baseline clinical severity in young steroid-naïve Duchenne muscular dystrophy boys. *Human Molecular Genetics*, 29(15), 2481-2495.

- Davis, J., Samuels, E., & Mullins, L. (2015). Nutrition considerations in Duchenne muscular dystrophy. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(4), 511-521.
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.
- Dooley, J., Gordon, K. E., Dodds, L., & MacSween, J. (2010). Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clinical pediatrics*, 49(2), 177-179.
- Douglas, C. M. (2001). Design and analysis of experiments.
- Drachman, D., Toyka, K., & Myer, E. (1974). Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *The Lancet*, 304(7894), 1409-1412.
- Elder, D., & Teasdale, A. (2017). ICH Q9 quality risk management. *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, 579-610.
- Elhalag, R. H., Motawea, K. R., Talat, N. E., Rouzan, S. S., & Shah, J. (2023). Efficacy of vamorolone in treatment of Duchene muscle dystrophy. A meta-analysis. *Frontiers in neurology*, 14, 1107474.
- Elkanayati, R. M., Omari, S., Youssef, A. A. A., Almutairi, M., Almotairy, A., Repka, M., & Ashour, E. A. (2024). Multilevel categoric factorial design for optimization of raloxifene hydrochloride solid dispersion in PVP K30 by hot-melt extrusion technology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 92, 105362.
- Emery, A. E. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359(9307), 687-695.
- Fenton, C., Doig, C., Fareed, S., Naylor, A., Morrell, A. P., Addison, O., Wehmeyer, C., Buckley, C., Cooper, M. S., & Lavery, G. (2019). 11 β -HSD1 plays a critical role in trabecular bone loss associated with systemic glucocorticoid therapy. *Arthritis Research & Therapy*, 21, 1-10.
- 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.
- Flanigan, K. M. (2012). The muscular dystrophies. *Seminars in Neurology*.
- Fox, H., Millington, L., Mahabeer, I., & van Ruiten, H. (2020). Duchenne muscular dystrophy. *Bmj*, 368.
- 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., & Shirkhedkar, A. A. (2017). Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: Analytics, applications, implications and future prospects. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3), 20160025.
- Goemans, N. M., Tulinius, M., van den Akker, J. T., Burm, B. E., Ekhardt, P. F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A. A., Platenburg, G. J., & Sipkens, J. A. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 364(16), 1513-1522.
- Guglieri, M., Clemens, P. R., Perlman, S. J., Smith, E. C., Horrocks, I., Finkel, R. S., Mah, J. K., Deconinck, N., Goemans, N., & Haberlova, J. (2022). Efficacy and safety of vamorolone vs placebo and prednisone among boys with Duchenne muscular dystrophy: a randomized clinical trial. *JAMA neurology*, 79(10), 1005-1014.

- Gunst, R. F., & Mason, R. L. (2009). Fractional factorial design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 1(2), 234-244.
- Heier, C. R., Damsker, J. M., Yu, Q., Dillingham, B. C., Huynh, T., Van der Meulen, J. H., Sali, A., Miller, B. K., Phadke, A., & Scheffer, L. (2013). VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO molecular medicine*, 5(10), 1569-1585.
- Heier, C. R., Yu, Q., Fiorillo, A. A., Tully, C. B., Tucker, A., Mazala, D. A., Uaesoontrachoon, K., Srinivassane, S., Damsker, J. M., & Hoffman, E. P. (2019). Vamorolone targets dual nuclear receptors to treat inflammation and dystrophic cardiomyopathy. *Life science alliance*, 2(1).
- Hewitt, H., Rignall, A., Trone, M., Jackson, P., Chatfield, M., Argentine, M., Wang, Q., Karmarkar, S., Pless, A., & Williams, Z. (2017). Evaluating progress in analytical quality by design. *Pharmaceutical Technology*, 41(4), 52-59
- Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of chromatography B*, 910, 2-13.
- Hoffman, E. P., Brown Jr, R. H., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919-928.
- Hoffman, E. P., Riddle, V., Siegler, M. A., Dickerson, D., Backonja, M., Kramer, W. G., Nagaraju, K., Gordish-Dressman, H., Damsker, J. M., & McCall, J. M. (2018). Phase 1 trial of vamorolone, a first-in-class steroid, shows improvements in side effects via biomarkers bridged to clinical outcomes. *Steroids*, 134, 43-52.
- https-1. (2025). Vamorolone. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vamorolone>
- https-2. (2025). Multilevel Categorical Treatment A Case Study on Battery Life. <https://www.statease.com/docs/v23.1/contents/getting-started/getting-started/>
- Junkert, A. M., Mieres, N. G., Domingues, K. Z. A., Ferreira, L. M., & Pontarolo, R. (2025). Development and Validation of a Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatography Method Coupled With a Diode Array Detector for Quantifying Haloperidol in Oral Solution Using the Analytical Quality-by-Design Approach. *Journal of Separation Science*, 48(1), e70067.
- Juran, J. M. (1992). *Juran on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services*. Simon and Schuster.
- Keam, S. J. (2024). Vamorolone: first approval. *Drugs*, 84(1), 111-117.
- Klein, E., & Rivera, S. (2000). A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations.
- Koel, M. (2016). Do we need green analytical chemistry? *Green chemistry*, 18(4), 923-931.
- Koenig, M., Monaco, A., & Kunkel, L. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2), 219-228.
- Kourakis, S., Timpani, C. A., Campelj, D. G., Hafner, P., Gueven, N., Fischer, D., & Rybalka, E. (2021). Standard of care versus new-wave corticosteroids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Can we do better? *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16, 1-9.
- Lebrun, P., Krier, F., Mantanus, J., Grohgan, H., Yang, M., Rozet, E., Boulanger, B., Evrard, B., Rantanen, J., & Hubert, P. (2012). Design space approach in the optimization of the spray-drying process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), 226-234.
- Leinonen, M., Hasham, S., Guglieri, M., Clemens, P., Perlman, S., Smith, E., Horrocks, I., Finkel, R., Mah, J., & Deconinck, N. (2023). Efficacy and safety of

- vamorolone during 48-week treatment in patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) in VBP15-004 study. *Conf Abstr Acta Myol* (Vol. 42, p. 96).
- Li, X., Sabbatini, D., Pegoraro, E., Bello, L., Clemens, P., Guglieri, M., van den Anker, J., Damsker, J., McCall, J., & Dang, U. J. (2024). Assessing Pharmacogenomic loci associated with the pharmacokinetics of Vamorolone in boys with Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 64(9), 1130-1140.
- Li, Z., Liu, B., Wang, Y., Yu, C., Xu, X., & Chen, P. (2024). Metabolic Characterization of Vamorolone in Human Liver Microsomes: Implications for Anti-Doping. *Drug Testing and Analysis*.
- Lisak, R. P., Truong, D. D., Carroll, W. M., & Bhidayasiri, R. (2016). *International neurology*. John Wiley & Sons.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
- Lo, H.-W., & Liou, J. J. (2018). A novel multiple-criteria decision-making-based FMEA model for risk assessment. *Applied soft computing*, 73, 684-696.
- Mah, J. K. (2016). Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 1795-1807.
- Malissa, H., & Roth, E. (1987). Euroanalysis VI: Reviews on Analytical Chemistry. In: E. Roth Les Editions de Physique, Les Ules, France.
- Manousi, N., Wojnowski, W., Płotka-Wasyłka, J., & Samanidou, V. (2023). Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality. *Green chemistry*, 25(19), 7598-7604.
- Mavroudis, P. D., van den Anker, J., Conklin, L. S., Damsker, J. M., Hoffman, E. P., Nagaraju, K., Clemens, P. R., & Jusko, W. J. (2019). Population pharmacokinetics of vamorolone (VBP15) in healthy men and boys with Duchenne muscular dystrophy. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(7), 979-988.
- Nassef, H. M., Ahmed, H. A., Bashal, A. H., El-Atawy, M. A., Alanazi, T. Y., Mahgoub, S. M., & Mohamed, M. A. (2024). A novel Six Sigma approach and eco-friendly RP-HPLC technique for determination of pimavanserin and its degraded products: Application of Box–Behnken design. *Reviews in Analytical Chemistry*, 43(1), 20230073.
- Nowak, P. M., & Kościelniak, P. (2019). What color is your method? Adaptation of the RGB additive color model to analytical method evaluation. *Analytical Chemistry*, 91(16), 10343-10352.
- Nowak, P. M., Wietecha-Posłuszny, R., & Pawliszyn, J. (2021). White analytical chemistry: an approach to reconcile the principles of green analytical chemistry and functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 138, 116223.
- Otto, M. (2016). *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Peterson, J. J., & Lief, K. (2010). The ICH Q8 definition of design space: A comparison of the overlapping means and the Bayesian predictive approaches. *Statistics in Biopharmaceutical Research*, 2(2), 249-259.
- Potter, C. (2009). PQLI application of science-and risk-based approaches (ICH Q8, Q9, and Q10) to existing products. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 4(1), 4-23.
- Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.

- Sahu, P. K., Ramisetty, 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.
- Sawhney, R., Subburaman, K., Sonntag, C., Rao Venkateswara Rao, P., & Capizzi, C. (2010). A modified FMEA approach to enhance reliability of lean systems. *International Journal of Quality & Reliability Management*, 27(7), 832-855.
- Semysim, F. A., Hussain, B. K., Hussien, M. A., Azooz, E. A., & Snigur, D. (2024). Assessing the greenness and environmental friendliness of analytical methods: modern approaches and recent computational programs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1-14.
- Soltanzadeh, P., Friez, M. J., Dunn, D., von Niederhausern, A., Gurvich, O. L., Swoboda, K. J., Sampson, J. B., Pestronk, A., Connolly, A. M., & Florence, J. M. (2010). Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of DMD mutations. *Neuromuscular Disorders*, 20(8), 499-504.
- Solway, S., Brooks, D., Lacasse, Y., & Thomas, S. (2001). A qualitative systematic overview of the measurement properties of functional walk tests used in the cardiorespiratory domain. *Chest*, 119(1), 256-270.
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC press.
- Szabo, S. M., Salhany, R. M., Deighton, A., Harwood, M., Mah, J., & Gooch, K. L. (2021). The clinical course of Duchenne muscular dystrophy in the corticosteroid treatment era: a systematic literature review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 237.
- Teasdale, A., Elder, D., Harvey, J., & Spanhaak, S. (2017). Impurities in New Drug Substances and New Drug Products: ICH Q3A/B: Key Guidelines in the General Impurity Management Process. *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, 167-198.
- Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *Journal of applied physiology*, 102(4), 1677-1686.
- Tobiszewski, M., Marć, M., Gałuszka, A., & Namieśnik, J. (2015). Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*, 20(6), 10928-10946.
- VanDuyse, S. A., Fulford, M. J., & Bartlett, M. G. (2021a). ICH Q10 pharmaceutical quality system guidance: understanding its impact on pharmaceutical quality. *The AAPS journal*, 23, 1-11.
- VanDuyse, S. A., Fulford, M. J., & Bartlett, M. G. (2021b). ICH Q10 pharmaceutical quality system guidance: understanding its impact on pharmaceutical quality. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 23, 1-11.
- Verch, T., Campa, C., Chéry, C. C., Frenkel, R., Graul, T., Jaya, N., Nakhle, B., Springall, J., Starkey, J., & Wypych, J. (2022). Analytical quality by design, life cycle management, and method control. *The AAPS Journal*, 24(1), 34.
- Vogt, F. G., & Kord, A. S. (2011). Development of quality-by-design analytical methods. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(3), 797-812.
- Williams, H., Bright, J., Roddy, E., Poulton, A., Cosgrove, S., Turner, F., Harrison, P., Brookes, A., MacDougall, E., & Abbott, A. (2019). A comparison of drug

- substance predicted chemical stability with ICH compliant stability studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(3), 379-386.
- Yin, L., Yu, L., Guo, Y., Wang, C., Ge, Y., Zheng, X., Zhang, N., You, J., Zhang, Y., & Shi, M. (2024). Green analytical chemistry metrics for evaluating the greenness of analytical procedures. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 101013.
- Yiu, E. M., & Kornberg, A. J. (2015). Duchenne muscular dystrophy. *Journal of paediatrics and child health*, 51(8), 759-764.
- Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* 16, 771-783.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Hazal AVCI
Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu:

İlk ve Orta Öğretim : Ortaca Cengiz Topel İlkokulu
Lise : Ortaca Anadolu Lisesi
Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD

Mesleki Deneyim

Kurum : Anadolu Üniversitesi
Birim : Eczacılık Fakültesi
Unvan : Araştırma Görevlisi

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Özcan, S., Avcı, H., Levent, S., Can, N. Ö., & Ergun, B. (2024). A quality by design paradigm, novel, and fast LC-MS/MS method to quantify vortioxetine in rat brain homogenate and its assessment of greenness, whiteness, and blueness tools. Microchemical Journal, 207, 112012.

Levent, S., Elriş, A., Avcı, H., Uzunoğlu, U. E., Özcan, S., & Can, N. O. (2025). LC-MS/MS and LC-PDA Methods for Robust Determination of Glycerol Phenylbutyrate in Biological Fluids and High-Resolution Mass Spectrometric Identification of Forced Degradation Product and Its Whiteness. ACS Omega 10(7), 17836–17846

Sertifikalar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (2024)