

**FLİBANSERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN TAYİNİ İÇİN HPLC
VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA
ÜRÜNLERİNİN LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Aysun GEVEN

Eskişehir 2020

**FLİBANSERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN TAYİNİ İÇİN HPLC
VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA
ÜRÜNLERİNİN LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU**

Ecz. Aysun GEVEN

YÜSEK LİSANS TEZİ
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ağustos 2020

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1906S118 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

FLİBANSERİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN TAYİNİ İÇİN HPLC VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN LCMS-IT-TOF İLE KARAKTERİZASYONU

Ecz. Aysun GEVEN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

2000’li yılların başında ortaya çıkan kadınlarda cinsel işlev bozukluğunun maddi boyutunun ve sağlığının fark edilmesi ilaç endüstrisinin en büyük değişimlerinden birisidir. Flibanserin öncelikle antidepresan ilaç olarak sentezlenmiş olup cinsel aktivitedeki etkileri sayesinde, 2000’li yılların başında bu endikasyon için tekrar denemeye alınmıştır. Çeşitli endikasyonları ve hastaların farklı durumlarda kullanacak olmaları nedeniyle FDA tarafından uzun süre reddedilse de çeşitli sivil toplum kuruluşlarının etkileri ile 2015’de onaylanmıştır.

Söz konusu bu çalışmada flibanserin farmasötik formülasyonlarının analizi için HPLC ve LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. HPLC metodu bozunma ürünleri varlığında optimize edilmiş ve oksidatif zorlu bozma koşullarında flibanserine ait yeni bir bozunma ürünü tespit edilmiştir. Bozunma ürününün kalitatif analizi LCMS-IT-TOF cihazı ile yapılmış ve oluşum mekanizması önerilmiştir.

Geliştirilen her iki metodun kromatografik ayrımı için çekirdek kabuk ve monolitik silika yapıda olmak üzere iki grup toplam 6 sabit faz denenmiştir. En başarılı ayırım Supelco Ascentis® Express model fenil hekzil fonksiyonel grubuna sahip (100×4,6 mm, ID 2,7µm) kolonda sağlanmıştır. Hareketli faz ise asetonitril su karışımı olup tampon olarak HPLC için 10 mM amonyum asetat (pH 5,4), LC-MS/MS için ise 20 mM amonyum format (pH 6,0) seçilmiştir. Akış hızı ve enjeksiyon hacmi ise her iki yöntem için aynı olup sırasıyla 0,5 mL/dk ve 1 µL’dir. Ayrıca HPLC yöntemi için başka bir HPLC cihazı ile laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışması yapılmış ve her iki yöntem için psödo Addyi® numune uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Flibanserin, Bozunma Ürünü, LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF, Farmasötik uygulama, HPLC.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE HPLC AND LC-MS/MS METHODS FOR THE
DETERMINATION OF FLIBANSERIN FROM PHARMACEUTICAL PREPARATIONS AND
CHARACTERIZATION OF THE DETERIORATION PRODUCTS WITH LCMS-IT-TOF

RPh. Aysun GEVEN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

One of the major changes in the pharmaceutical industry has been experienced by noticing the financial size and health of female sexual dysfunction that appeared in the early 2000s. Flibanserin was developed as an antidepressant drug, and because of its pro-sexual side effects, the drug was retried for this indication in the early 2000s. Due to various indications and the use of patients under different conditions, the FDA has been refused for a long time and approved in 2015 by not being able to withstand the pressures of various civil society organizations.

In this study, HPLC and LC-MS/MS methods were developed for the analysis of pharmaceutical formulations of flibanserin. HPLC method was optimized in the presence of degradation products, and a new degradation product of flibanserin was identified under oxidative forced degradation conditions. Qualitative analysis of the degradation product was done with LCMS-IT-TOF, and the formation mechanism was proposed.

For the two methods developed, two groups, in the core-shell and monolithic silica structure, have tried a total of 6 stationary phases for chromatographic separation. The most successful separation was achieved with Supelco Ascentis® Express phenyl hexyl (100×4.6 mm, ID 2.7 µm) column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-water, 10 mM ammonium acetate (pH 5.4) for HPLC, and 20 mM ammonium formate (pH 6.0) for LC-MS/MS. Flow rate and injection volume are the same for both methods and were 0.5 mL/min and 1 µL, respectively. Besides, an inter-laboratory comparison study between another HPLC instrument and HPLC method was performed, and pseudo Addyi® sample applications were carried out for both methods.

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

TEŞEKKÜR

Temmuz, 2020

Hazırlamış olduğum bu yüksek lisans tezimin her aşamasında sahip olduğu değerli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan, mezuniyet projemden bu yana onun ekibinde yer almaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum, bu süreçte kendimi tanıma imkanı veren, mesleki ve bilimsel birikimiyle bana yol gösteren, her yaptığım çalışmada bana hissettirdiği sonsuz güveni ve özverileriyle arkamda olan, mesleğimde ve hayatta çok şey öğrendiğim ve her zaman örnek alacağım, danışman hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a,

Lisans eğitiminden yüksek lisans eğitimine uzanan bu macerada laboratuvarda yan yana çalıştığım, çok şey öğrendiğim, hayatımdaki yeri benzersiz olan, bir hocadan ziyade bir abla gibi hayatımın her anında yanımda olan, beraber güldüğüm, eğlendiğim, zor zamanlarımda bana destek olan, hayattaki tecrübelerini dinleyip hayatıma yön vermemde yardımcı olan canım hocam Arş. Gör. Dr. Saniye ÖZCAN'a,

Laboratuvara girdiğim ilk günden itibaren bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bilimsel anlamda kendimi geliştirmemde büyük emekleri olan, onunla çalışmaktan zevk aldığım, beraber çok çalışıp çok işler başardığım, büyük sabrı ve özverisini örnek aldığım, hayatımın önemli kararlarını danıştığım sevgili hocam Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e,

Aynı ekipte yer aldığım, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, benden tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Öğr. Gör. Murat KOZANLI'ya,

Okulda her zorlu zamanlarımda yanına gidip dertleşebildiğim, çalışmalarımındaki başarıyı ve heyecanımı paylaşabildiğim, beni stresli anlarımda motive eden arkadaşım Öğr. Gör. Asaf Evrim EVREN'e,

Her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Ve her anımda sevgi ve güvenleriyle yanımda olan, aldığım her kararda beni maddi ve manevi destekleyen, sizin sayenizde dediğim güzel ailem, anneme, babama ve abime, En içten sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Flibanserin Gelişimi.....	4
2.2. Flibanserin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3. Flibanserin Etki Mekanizması.....	5
2.4. Flibanserin Farmakokinetik Özellikleri	6
2.5. Flibanserin Farmakolojik Özellikleri	7
2.6. Flibanserin Analizleri ile İlgili Çalışmalar	9
3. GEREÇLER	12
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler.....	12
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	12
3.3. Kullanılan Sabit Fazlar	13
4. YÖNTEMLER	14
4.1. Deneysel Parametreler.....	14
4.1.1. Enstrümental parametreler	14
4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı	15
4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı	15

4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı	16
4.1.5. Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı	16
4.1.6. Sonuçların değerlendirilmesi	17
4.1.7. Yöntem geçerliliğinin tespiti	17
4.1.8. Sistem uygunluk testleri	17
4.1.9. Seçicilik ve spesifiklik	19
4.1.10. Kararlılık	20
4.1.11. Doğrusallık.....	20
4.1.12. Doğruluk	20
4.1.13. Kesinlik	21
4.1.14. Teşhis ve tayin alt sınırı	21
4.1.15. Sağlamlık	21
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
5.1. FLB'nin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi	23
5.2. NMR spektroskopisi tekniği ile FLB'nin ¹ HNMR spektrumlarının tespiti.....	25
5.3. IR spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu	27
5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme	27
5.5. Kütle Dedektöründe FLB İyonlaşma Karakteristiği	34
5.6. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme	36
5.6.1. Bozunma davranışları	36
5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini.....	47
5.8. Geliştirilen Yöntemin Örneklerle Uygulanması.....	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
KAYNAKÇA.....	57
ÖZGEÇMİŞ	62

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Flibanserin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler.....	10
Tablo 3.1. Kullanılan sabit fazların özellikleri	13
Tablo 4.1. Optimize LC-MS/MS koşulları	14
Tablo 4.2. Addyi® formülasyonu [42]	15
Tablo 4.3. Zorlu bozma koşulları	17
Tablo 4.4. SUT parametrelerinin sınırları.....	18
Tablo 4.5. USP'ye SUT parametrelerinin formülleri	19
Tablo 5.1. Deneysel olarak sabit fazlardan elde edilen SUT verileri	29
Tablo 5.2. FLB analizi için elde edilen SUT verileri	33
Tablo 5.3. FLB'nin pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları	34
Tablo 5.4. FLB için doğrusallık ve kesinlik verileri.....	48
Tablo 5.5. Geri kazanım verileri.....	49
Tablo 5.6. Ara kesinlik verileri.....	50
Tablo 5.7. Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)	51
Tablo 5.8. FLB standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Flibanserin molekül yapısı	5
Şekil 2.2. Flibanserin önerilen hareket mekanizması [12]	6
Şekil 2.3. FLB'nin etki mekanizmasının grafiksel gösterimi	8
Şekil 5.1. FLB'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=17,5 µg/mL)	24
Şekil 5.2. FLB için alınmış ¹ H NMR spektrumu	26
Şekil 5.3. FLB için alınmış ¹³ C NMR spektrumu	26
Şekil 5.4. FLB için IR Spektrumu	27
Şekil 5.5. Standart FLB çözeltisinin farklı kolonlardan elde edilen LC-MS/MS kromatogramları	30
Şekil 5.6. FLB için ana iyon ve baskın parçalanma yolları	35
Şekil 5.7. FLB Sıcaklık uygulandığında elde edilen kromatogramı	37
Şekil 5.8. UV ışığında elde edilen FLB kromatogramı	37
Şekil 5.9. Asidik koşullarda kör çözelti (a) ve FLB çözeltisi (b) ile elde edilen kromatogram	38
Şekil 5.10. Alkali koşulda kör çözelti (a) ve FLB kromatogramı (b)	39
Şekil 5.11. Oksidasyon koşullarında kör (a) ve FLB çözeltisinden (b) elde edilen kromatogram	40
Şekil 5.12. FLB/B bozunma kinetiği	41
Şekil 5.13. Yeni bozunma ürünü için kütle atlası	44
Şekil 5.14. Yeni bozunma ürününün bozunma yolağı ve MS ⁿ karakterizasyonu	45
Şekil 5.15. Addyi® LC-MS/MS (a) ve HPLC (b) ile alınan psödo formülasyon kromatogramları	54

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: Serotonin
α	: Seçicilik Katsayısı
A_s	: Asimetri faktörü
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Konsantrasyon
CDL	: Curved Desolvation Line (Kavisli Desolvasyon Hattı)
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CID	: Çarpışma ile İndüklenen Ayrışma
C_8	: Oktildimetilsilan
C_{18}	: Oktadesilmetilsilan
DA	: Dopamin
DBE	: Double Bond Equivalent (Çift Bağ Eşdeğeri İndeksi)
DSM	: Diagnostic and Statistical Manual
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FLB	: Flibanserin
FSD	: Kadın Cinsel İşlev Bozukluğu
FSAD	: Kadın Cinsel Uyarılma Bozukluğu
FWHM	: Tam Genişlikte Yarı Maksimum
HETP	: Teorik Tabaka Yüksekliği
HPLC	: Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi
HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
HSDD	: Hipoaktif Cinsel İstek Bozukluğu
ICH	: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Uluslararası Uyum Komitesi)
IR	: Kızılötesi
ID	: İç çap
IT	: İyon Tuzağı
IT-TOF-MS	: İyon Tuzaklı Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
k	: Kapasite faktörü

LCMS-IT-TOF	: Sıvı Kromatografisi Hibrit İyon Tuzağı/Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi
LOD	: Teşhis Alt Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme Modu
MS	: Kütle Spektrometresi
<i>N</i>	: Teorik Plaka Sayısı
NE	: Norepinefrin
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	: Oktadesil Silika
RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
R_s	: Ayrım Gücü
S_1	: Ara Kesinlik Varyansı
S_r	: Tekrarlanabilirlik Varyansı
SS	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
<i>T</i>	: Kuyruklanma Faktörü
TOF	: Time of Flight (Uçuş Süresi)
TQ	: Triple Quadrapol (Üçlü Dört Kutuplu)
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan
Q	: Quadrapol (Dört Kutuplu)
USP	: United States Pharmacopeia (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınlardan %43'ü cinsel sorunlardan yaşamlarının bir döneminde etkilenmiş iken, yaklaşık %22'si ise cinsel ilişkiyle ilgili kişisel sıkıntı yaşadığını bildirmektedir [1]. Yaygın cinsel problemler arasında cinsel ağrı, uyarılma problemleri, orgazmik disfonksiyon ve düşük/eksik arzu bulunur. American Psychiatric Association's *Diagnostic and Statistical Manual (DSM)*'te tanımlandığı gibi hipoaktif cinsel istek bozukluğu (HSDD); cinsel fantezilerin eksikliği ve belirgin sıkıntısı ve/veya kişiler arası zorluğa neden olan, tıbbi (rekreasyon veya reçete), psikiyatrik (depresyon) veya diğer cinsel durumlar tarafından açıklanmayan cinsel aktivite arzusunda ki yetersizlik ile karakterize kadın cinsel işlev bozukluğudur [2, 3]. %10 ila %40 prevalansa sahiptir [4]. Epidemiyolojik çalışmalar ise, HSDD prevalansını kadınların %7 ila %14'ünde tahmin etmektedir, premenopozal ve geç postmenopozal kadınlar arasında ve cerrahi olarak doğal postmenopozal kadınlar arasında daha yüksek oranlar ve premenopozal veya erken postmenopozal kadınlar arasında dikkate değer bir pik noktası vardır [5]. Düşük cinsel istek, bir kadının sağlığını ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyebilir ve ilişki memnuniyetsizliğini artırabilir.

DSM'nin Beşinci Baskısında (DSM-5TM) uyarılma ve arzu bozukluklarının birleştirilmesi ile HSDD'nin yerini kadın cinsel ilgi/uyarılma bozukluğu almıştır. DSM-5TM'de HSDD, kadın cinsel uyarılma bozukluğu (FSAD) ile birleştirilir ve edinilmiş ve genelleştirilmiş ve durumsal FSIAD'a karşı yaşam boyu olarak farklılaşan kadın cinsel ilgi ve uyarılma bozukluğu olarak teşhis edilir [6]. DSM-5TM'de HSDD, kadın cinsel uyarılma bozukluğu (FSAD) ile birleştirilir ve durumsal FSAD'a karşı edinilmiş ve genelleştirilmiş, yaşam boyu olarak ayrılan kadın cinsel ilgi ve uyarılma bozukluğu (FSIAD) olarak teşhis edilir [1].

Söz konusu hastalığın semptomları kadın cinsel ilgisi/uyarılma bozukluğu için bir kriter olarak belirlenmiştir. Ancak Amerikan Kadın Doğum Uzmanları ve Jinekologlar Koleji HSDD'yi ayrı bir durum olarak tanımlar [7]. Dahası HSDD, erkeklerde bu bozukluğun bir açıklaması olarak DSM-5TM'te aynı şekilde kalmaya devam etmektedir [6]. Ek olarak, hem genel HSDD hem de FSAD için tanı ölçütleri, cinsel işlev bozukluklarını ilişki içindeki sorunlara, ilaçların etkilerine veya diğer tıbbi durumlara bağlayabilen kadınları içermez [1].

Mevcut durumda, kadın cinsel işlev bozukluğunun (FSD) tedavisi için mevcut terapötik müdahalelerin yetersiz olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır. Kadınlar

için cinsel deneyimi geliştirmeye odaklanan bazı araştırmacılar, tüm mesleki yaşamlarını kadın cinsiyet tepkisini incelemeye adanmışlardır. Kadınların cinsel tepkisini anlamak, cinsel deneyimi geliştirmek, tıbbileştirme stratejilerinin temelini oluşturacağı yadsınamaz bir gerçektir [8]. 2000 yılında yapılan bir çalışmada kadın cinsel tepkisinin daha çok yakınlık gereksinimlerinden (fizyolojik uyarılma için bir “ihtiyaçtan ziyade temasla aktive”) kaynaklandığı güçlü bir şekilde vurgulanmıştır [9]. Ardından da FSD’nin milyonlarca dolarlık bir iş haline geldiğine dikkat çekilmiştir [10]. Popülerliği bir dereceye kadar ekonomik motivasyon tarafından yönlendirilse de büyük ölçüde vajinal orgazm fikrine dayanır (bugüne kadar anatomik kanıtlarla desteklenmemiştir). Bu durumu tetikleyen en önemli faktörlerden birisi de kadınların cinsel performans ve motivasyonunun partner beklenti ve yönlendirmesinin etkisinde olmasıdır. HSDD’nin, spesifik bir tedaviye hazırlanmak için geliştirilen endüstri destekli bir durumun örneğini temsil ettiği yönünde öneriler de mevcuttur [11-13].

Cinsel isteksizlik, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Kadın Cinsel İşlev Bozukluğu (FSD) başlığı altında dört konudan en yaygın olarak kabul edilmiştir. Aslında, 2015 yılına kadar HSDD artık cinsel işlev bozukluğu kategorisi olarak mevcut değildi; HSDD ile FSAD birleştiren bir durum olan FSIAD tarafından DSM-5TM birleştirilmesi ve öncekilerden biraz daha titiz bir dizi tanı ölçütüne sahip olması ile daha da netleştirilmiştir. Hem HSDD hem de FSIAD, flibanserin (FLB) klinik çalışmalarının terimleriyle, seks yapmak istemediği erkeklerle uzun süreli ilişkide olan, genellikle beyaz, heteroseksüel trans olmayan kadınları etkileyen bir sorunu indekslemektedir [13].

Başlangıçta bir antidepresan olarak sentezlenen ve potansiyel olarak hızlı bir etki başlangıcı olan FLB, HSDD’nin DSM-5TM’den çıkarılmasına rağmen Ağustos 2015’te Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilacın özel bir risk yönetimi programı aracılığıyla dağıtılma uyarısı ile onaylanmıştır [14]. Bu süreç FDA’nın tarihinde önemli bir yere sahip olacak kadar uzun ve tartışmalı geçmiştir [15]. İlaç, edinilmiş, genelleştirilmiş HSDD’si olan premenopozal kadınların tedavisi için kayda değer ilk FDA onaylı ilaçtır. Hastalığın diğer mevcut tedavileri, genellikle onaylanmamış dozajlarda, yan etki riskini artıran çeşitli ilaçların psikolojik yaklaşımlarına veya “etiket dışı” kullanımına dayanmaktadır [1].

FLB ile ilgili tüm araştırmalar, DSM-IV’te tarif edildiği gibi edinilmiş, genelleştirilmiş HSDD tanısı konmuş hastalar üzerinde yapılmıştır; FLB, edinsel, jeneralize HSDD dışında bir tanı olan hastalar için önerilmez. HSDD’nin gerçek nedeni

bilinmemekle birlikte, normal kadınlara kıyasla HSDD erotik materyali görüntüleyen kadınların fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi taramaları, beyin limbik ve belirli kortikal bölgelerinde daha az aktivite gösterir, bu da kaynağın HSDD'nin kısmen beyindeki biyolojik bir işlev bozukluğu olduğunu göstermektedir. HSDD'nin cinsel isteği engelleyen aşırı serotonin (5-HT) aktivitesinin bir sonucu olduğu varsayılmıştır. Aşırı serotonin aktivitesine ek olarak, HSDD kısmen subnormal dopaminerjik ve noradrenerjik reseptör fonksiyonundan veya aktivitesinden kaynaklanabilir, çünkü dopamin (DA) ve norepinefrin (NE) cinsel uyarımda 'ana vericiler' olarak düşünülen cinsel heyecan modülatörlerindendir [4]. Özetlemek gerekirse, aşırı serotonin ve yetersiz dopaminerjik aktivitenin bir kombinasyonunun kadınlarda HSDD için temel oluşturması mümkündür; bu kanıt hayvanlar üzerindeki çalışmalardan ve beyindeki dopaminerjik ve serotonerjik sistemleri etkileyen ilaçların bilinen cinsel yan etkilerinden elde edilir. Kadınlarda en yaygın cinsel istek rahatsızlıklarından biri olan düşük cinsel istek şikayetleri şu anda tek FDA onaylı FLB ile tedavi edilmektedir [1]. FLB, hipoaktif cinsel istek bozukluğunu tedavi etmek için kullanılan bir serotonerjik bir ilaçtır. Tedavi sırasında düşük oranda minör serum aminotransferaz yükselmeleri ile ilişkilendirilmiştir, ancak klinik olarak belirgin akut karaciğer hasarı vakalarıyla ilişkili değildir.

Flibanserin hem eczacılık tarihinde önemli dönüm noktalarından biri olan etken madde olması hem de alanında öncülüğü nedeniyle üzerinde yapılan farmakolojik ve farmakokinetik çalışmalar günden güne artmaktadır. Bunun yanında yapılan analitik çalışmalara da FDA onayından itibaren başlandığı gözlenmiştir. Ancak yapılan çalışmalar farmakokinetik analizleri karşılama amaçlı plazma analizleri ya da metabolit tayinleri olup analitik hedeflerin bir kısmını karşılamaktadır. Bu nedenle bu tez kapsamında yapılan çalışmada hedefimiz FLB'nin farmasötik preparatlardan analizi için bozunma ürünleri varlığında tam olarak metot geçerliliği sağlanmış, hızlı, yüksek doğruluğa sahip rutin analizlerde kullanıma sunulacak sıvı kromatografisi metodu geliştirmektir. Ayrıca etken maddenin zorlu bozma koşullarına maruziyeti sonucu elde edilen bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF ile kalitatif olarak tayin edilmesidir. Geliştirilen yöntem rutin analiz ve kalite kontrol için uygun olacaktır. Yöntemin validasyonu Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre yapılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Flibanserin Gelişimi

FLB aslen Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Almanya) tarafından antidepresan ilaç olarak sentezlenmiş olup klinik çalışmalarda etkisini kanıtlayamaması sebebiyle çalışmalar durdurulmuştur. Cinsel aktivitedeki etkileri sayesinde, ilaç 2000'li yılların başında bu endikasyon için tekrar denenmiştir. Sprout Pharmaceuticals (Raleigh, NC, ABD) tarafından 2013'te FLB'nin yeniden uygulanması ile "cinsel arzunun eşzamanlı bir son nokta olarak değerlendirilmesi" çalışmasından yeni veriler FDA'ya sunulmuştur. Güvenlik endişeleri (hipotansiyon, senkop, uyku hali, yorgunluk, kanserojenik riski), kanıtların dayandığı çalışmaların kısa doğası ve şüpheli doğruluğu ve marjinal etkililik temelinde onay reddedilmiştir [12].

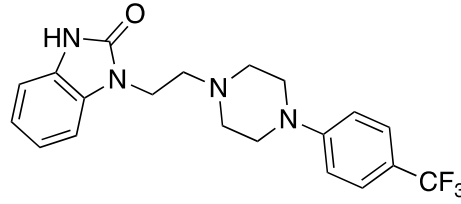
Önceki danışma komiteleri oy birliğiyle FLB'yi reddetmiş olmasına ve herhangi bir ek etkinlik verisi olmamasına rağmen, FDA danışma komitesi, FLB'yi Ağustos 2015'te 6 olumsuz oya karşı 18 olumlu oy ile HSDD için onay vermiştir. Bunda elbetteki kadın destekli sivil toplum kuruluşlarının baskısı çok önemli roller oynamıştır [16]. Bununla birlikte, onaylandıktan sonra, 18 olumlu oyun 15'i ilacın onayını kabul etmekte isteksiz olduklarını belirtmiştir. Bu kayda değer çekincelere rağmen, FLB, tartışmalı FDA onayından sonraki 48 saat içinde Valeant Pharmaceuticals'a (Laval, QC, Kanada) 1 milyar dolara yakın bir fiyata satılmış olup ve premenopozal kadınlarda HSDD için bir tedavi olarak reçete edilmeye devam etmektedir [12, 15].

FDA toplantısında danışma kurulu üyeleri, bunun bilim, politika ve savunuculuk keşişiminde alınan tartışmalı düzenleyici kararlardan biri olduğuna dikkat çekmiştir [14].

FLB bir ilaç olmaktan çok; eşitlik savunuculuğu kampanyası, değişen etkinlik son noktaları ve hasta tarafından bildirilen sonuç ölçüsünün kullanımı, incelenen popülasyondaki sürekli risk-fayda dengesi ve yaygın etiket dışı kullanım potansiyeli ve karşılanmamış bir tıbbi ihtiyaç anlamlarına da gelmektedir [17]. FDA için tamamen yabancı bir bölge değil, aynı anda ortaya çıktıklarında bir meydan okumayı temsil etmektedir. FLB için onay sürecini daha da benzersiz kılan şey ise FDA'nın tüm bu değiş tokuşların en iyi nasıl yönetilmesi gerektiğine karar vereceği politik olarak yüklü atmosfer ve dünyanın her geçen gün her alanda daha da farklı bir yer olduğudur.

2.2. Flibanserinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

FLB (Şekil 2.1.), IUPAC adlandırması 3-[2-[4-[3-(trifluorometil)fenil]piperazin-1-il]etil]-1H-benzimidazol-2-on olan amino protonun bir 3- (triflorometil) fenil grubu ile değiştirildiği 1- [2- (1,3-dihidro-2-oksobenzimidazol-1-il) etil] piperazin olan bir *N*-alkilpiperazindir. Benzimidazolonların bir üyesi, bir *N*-arilpiperazin, bir *N*-alkilpiperazin ve bir organoflorin bileşiğidir. CAS numarası 167933-07-5 olup molekül formülü $C_{20}H_{21}F_3N_4O$ şeklinde ve molekül ağırlığı 390,04 g/mol'dür.

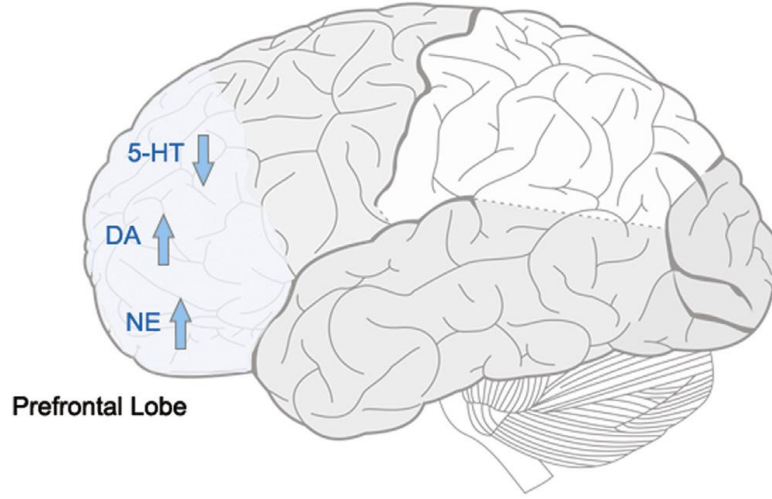


Şekil 2.1. Flibanserinin molekül yapısı

FLB oda sıcaklığı koşullarında toz halinde, kokusuz, beyaz renkte olup katı formdadır. Suda çözünürlüğü çok düşük 4,312 mg/L 25 °C'de olup asidik ortamda çözünürlüğü daha yüksektir (0,001 N HCl çözeltisinde 2,7 mg/mL). Ancak bazik ortama doğru gidildikçe çözünürlüğünde şiddetli azalmalar meydana gelir (pH 7,4 tamponunda 0,002 mg/mL). Metanol, etanol, asetonitril, toluen gibi organik çözücülerde ise az miktarda çözünür; asetonda çözülebilir; kloroform içinde serbestçe çözünür; metilen klorürde çok çözünür. Bileşik yapısından dolayı zayıf asidik olup pK_a değeri 5,9; Log K_{ow} değeri 3,4; Log P değeri 4,3 olarak belirlenmiştir [18, 19].

2.3. Flibanserinin Etki Mekanizması

FLB yeni bir, çok fonksiyonlu serotonin agonisti ve antagonistidir. Libido, sinaptik dopamin ve ayrıca norepinefrin, testosteron ve östrojenin etki ettiği diğer mikro devrelerle pozitif olarak düzenlenir. Libido, prolaktin ve serotoninin etki ettiği mikro devrelerle negatif olarak modüle edilir. Mikro devre dopamin ve norepinefrinin göreceli eksikliğini veya mikro devre serotoninin göreceli olarak fazlalığı cinsel ilgi ve arzu bozukluğuna yol açabilir [19, 20].



Şekil 2.2. Flibanserinin önerilen hareket mekanizması [12]

FLB, nöral mikro devrelerde iki temel farmakolojik etkiye sahiptir: postsinaptik 5HT_{1A} reseptörlerinde tam bir agonist ve postsinaptik 5HT_{2A} reseptörlerinde antagonist olarak davranır. Prefrontal korteksteki bu eylem Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi dopamin ve norepinefrinin aşağı yönde salınmasına ve serotoninin azalmasına neden olur, beyin sapı 5HT nöronları aynı zamanda seçici olarak beyin sapı norepinefrin ve dopamin nöronlarını inhibe eden piramidal nöronlar üzerinde, cinsel ilgisi ve arzusu azalmış hastalarda açıklanan anormal nöro görüntüleme alanlarıyla uyumludur [21].

2.4. Flibanserinin Farmakokinetik Özellikleri

FLB, tek bir oral doz (5-150 mg) ve çoklu oral dozlar (60 ila 300 mg arasında değişen toplam günlük doz) sonrasında lineer ve dozla orantılı kinetik gösterir [22]. %90 emilir ve ortalama yarı ömrü ~11 saattir. Hafif karaciğer yetmezliği ile yarılanma ömrü 26 saate çıkar. İlacın yiyeceklerle alınması emilimini artırır. Başta albümin olmak üzere %98 protein bağlanması vardır. Oral biyoyararlanımı %33'tür [20]. FLB'nin kararlı durumuna sadece 3 günlük dozlamadan sonra ulaşılır ve bu nedenle bu ilaca "kadın Viagra" demek yanlıştır çünkü Viagra gerektiğinde kullanılır [20, 23].

FLB, CYP3A4 ile ve daha az oranda CYP2D6 sitokrom P450 izoenzimleri ile oksidatif metabolizmaya uğrar. Eşzamanlı CYP3A4 inhibitörleri FLB maruziyetini artırabilir ve kontrendikedir. FLB, orta veya güçlü bir CYP3A4 inhibitörünün son dozundan 2 hafta sonra kullanılabilir. Son FLB dozundan 2 gün sonra orta veya güçlü bir CYP3A4 inhibitörü başlatılabilir. Güçlü CYP3A4 inhibitörleri arasında ketokonazol, itrakonazol, klaritromisin, nefazodon, ritonavir, indinavir ve konivaptan bulunur. Orta

CYP3A4 inhibitörleri arasında atazanavir, siprofloksasin, diltiazem, verapamil, eritromisin, flukonazol ve greyfurt suyu bulunur. Oral kontraseptif haplar, simetidin, fluoksetin, Ginkgo biloba ve ranitidin gibi zayıf CYP3A4 inhibitörleri, hipotansiyon, senkop ve merkezi sinir sistemi (CNS) depresyonu riskinde artış ile ilişkili olabilir. Ayrıca, CYP3A4 indükleyicileri FLB konsantrasyonlarını önemli ölçüde azaltabilir ve bununla birlikte önerilmez. Bunlar etravirin, karbamazepin, fenobarbital, fenitoin, rifampin ve St.John's wort'u içerir [20].

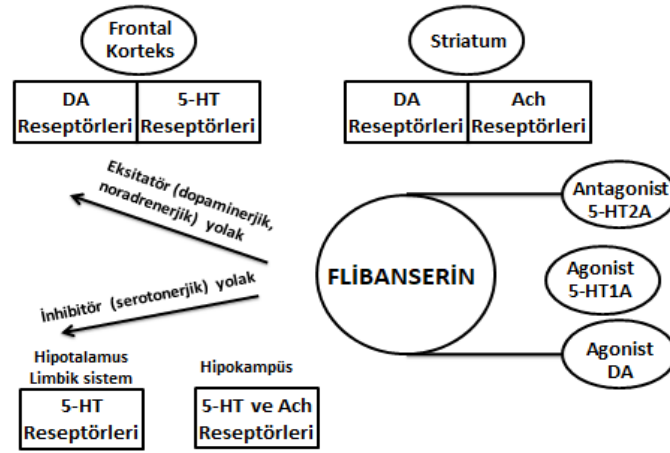
Faz 3 çalışmalarına dahil edilen premenopozal kadınların yarısından fazlası (% 58) eşzamanlı alkol tüketimi bildirmiştir, ancak klinik olarak hipotansiyon açısından anlamlı bir risk gözlenmemiştir [24].

CYP2C19 zayıf metabolizörleri olan hastalarda FLB kullanımı, FLB konsantrasyonlarının artmasına neden olur ve hipotansiyon ve senkop riskini artırabilir. Bu hastalar advers reaksiyonlar açısından yakından izlenmelidir. Bunlar, proton pompası inhibitörleri, seçici serotonin geri alım inhibitörleri, benzodiazepinler ve antifungaller gibi ilaçları içerir [25].

FLB, P-glikoproteini inhibe eder. Digoksin ve sirolimus gibi dar bir terapötik endekse sahip P-glikoprotein tarafından taşınan ilaç konsantrasyonlarının artmış etki yarattığı belirtilmiştir [25]. FLB çoğunlukla safra ve böbrekler yoluyla inaktif metabolitler olarak atılır [26].

2.5. Flibanserinin Farmakolojik Özellikleri

Flibanserinin farmakolojik etki mekanizması Şekil 2.3'de şematik olarak verilmiştir. Buna göre FLB, klonlanmış insan serotonin 5-HT_{1A} reseptörleri için klonlanmış insan D₄ (izoformlar 4,2; 4,4 ve 4,7) ve 5-HT_{2A} reseptörlerine kıyasla en yüksek afiniteyi gösterir. 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} reseptörlerine yönelik afinite, beyin dokusunda değerlendirildiğinde, bu afinite değerleri sırasıyla korunur. Bununla birlikte, FLB, klonlanmış hücrelerde 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} reseptörleri için serebral dokudan daha yüksek afinite gösterir. FLB ayrıca insan D_{2L} ve D₃ reseptörleri ve sıçan NE-alfa1 ve 5-HT₇ reseptörleri için bir miktar afinite gösterir. FLB sıçan (>10.000 nM) ve insan (305-785 nM) D₂ reseptörlerine farklı afiniteye sahiptir. 5-HT taşıyıcı dahil olmak üzere diğer tüm reseptörlerin afinitesi, düşük ya da çok düşük arasında değişmektedir [27]. FLB monoamin oksidaz aktivitesini inhibe etmez [28, 29].



Şekil 2.3. FLB'nin etki mekanizmasının grafiksel gösterimi

FLB, klonlanmış hücrelerde ve insan ve sıçan beyninin korteks ve hipokampusunda 5-HT_{1A} agonisti olarak davranır. Dorsal raphe'de FLB, ateşleme oranı sıçanlarda bir aktivite indeksi olarak alındığında bir agonist olarak davranır. Ancak insan dokusunda forskolin ile uyarılan cAMP ölçüldüğünde agonist aktiviteden yoksundur [29, 30].

FLB, dopamin D₄ reseptör yoğunluğu <450 fmol/mg protein olduğunda forskolin ile uyarılan cAMP'nin bir antagonisti veya FLB konsantrasyonları çok yüksek olduğunda (>30 μ M) tam bir agonist olarak davranır. FLB, dopamin D₄ Reseptör yoğunluğu >750 fmol/mg protein olduğunda kısmi bir agonist (mikrofizyometri ve GTP kayması) olarak ele alınmalıdır ki bu, insan beynindekinden (0.2-50 fmol/protein) daha yüksek demektir. Dopamin D₄ ligand nemonapridin bağlanması insan postmortem korteks ve striatumda araştırıldığında psikiyatri dışı deneklerin korteks ve kaudatumunda dopamin D₄ reseptörleri saptanmamıştır [27].

FLB, 5-HT_{2A} reseptör antagonisti olarak davranır. Aslında, fare korteksinde kendi başına PI devir hızını ve antagonize 5-HT ile uyarılmış devir hızını arttırmaz. 5-HT_{2A} reseptörleri (115-133 nM) ve K_i'nin 5-HT ile uyarılmış kısmı (113 nM) azaltmadaki afinite değerleri iyi bir uyum içindedir [31].

FLB (1 μ M'ye kadar) ileum içinde 5-HT₇ agonisti 5-karboksamidotriptamin tarafından indüklenen ve P maddesinin uygulanmasıyla kasılan gevşemeyi değiştirmez. Yüksek konsantrasyonlarda FLB, madde P kasılmalarını azaltır [27, 32].

2.6. Flibanserin Analizleri ile İlgili Çalışmalar

FLB terapötik endikasyonunda öncü bir etken madde olması nedeniyle oldukça dikkat çekmekte ve ümit vaat etmektedir. Ancak madde oldukça yeni FDA onayı alması nedeniyle analizi hakkında geliştirilen metotlar sınırlı sayıdadır. Bugüne kadar literatüre sunulmuş tüm metotların genel kapsamaları ve numune uygulamaları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tabloya bakıldığında FLB analizi için geliştirilen metotlar amaçlarına göre; FLB hakkında yapılan çeşitli klinik çalışmaların analizleri [33-37], geliştirilen yeni analiz metotlarının performansının gösterilmesi [38] ve FLB analizi hakkında metot geçerliliği sağlanmış analitik metot geliştirilmesi [34, 39, 40] olarak üç gruba ayrılabilir. Klinik çalışmaların analitik metotlarına yakından bakıldığında ayrıntılı bilgi verilmediği ayrıca metot koşullarının ayrıntılı incelenmediği izlenimi oluşmaktadır. Yüzeyi geliştirilmiş Raman spektroskopisi gibi yeni bir analiz yöntemi geliştirme amacıyla yapılan çalışmalar ise umut verici olmakla birlikte rutin analizlerde kullanıma şu an için uygun olmadığı görülmektedir. Odaklandığı nokta FLB analizi olan analitik metot geçerliliği sağlanmış yöntemlere bakıldığında ise baskın tekniğin LC-MS/MS olduğu dikkat çekmektedir. Bu çalışmalarda analiz yönteminin tüm parametreleri verilmiş olup yöntem etki eden faktörler açıklanmıştır.

Söz konusu geliştirilen metotlarda baskın teknik LC-MS/MS, en çok kullanılan sabit faz silika bazlı tanecikli yapıda C₁₈ fonksiyonel gruba sahip kolonlardır. Kullanılan kolonların hepsi günümüz teknoloji ile üretilmiş kısa, dar iç çapı olan ve küçük tanecikli yapıda kolonlardır. Kromatografik ayırım için kullanılan hareketli faz bileşenleri ise bir makale hariç [34] izokratik elüsyon modunda seçilmiştir. Analiz tekniklerin hemen hepsi kütle dedektöründe olduğu için formik asit, amonyum asetat ve amonyum format gibi bir iyonlaştırma ajanı kullanılmıştır. Hareketli fazların pH seçiminde ise herhangi bir nokta saptanmamıştır. LC-MS/MS yöntemlerin bir tanesi hariç [40] diğerlerinde iç standart kullanılmıştır. İç standart seçiminde dikkat çeken nokta sadece iki yöntemde döteryum formunda FLB seçilmiş [33, 35], diğerlerinde ise analit ile ortak özelliği bulunmayan bileşikler kullanılmış olup seçim amacı hakkında da herhangi bir açıklama verilmemiştir.

Tablo 2.1. *Flibanserin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler*

Analitik yöntem	İç standart	Kolon Kolon sıcaklığı	Hareketli faz Akış hızı	t _R (dk)	Enjeksiyon hacmi Dedektör, Dalga boyu	Mod m/z	Doğrusal aralık	LOD	LOQ	Numune	Kaynak
LC-DAD- CAD-MS-TOF	-	Hypersil GOLD C ₁₈ column (100 mm × 2,1 mm, 1,9 µm) 28 °C	İzokratik elüsyon Su:asetonitril:formi k asit (73:27:0,1, v/v/v) 0,6 mL/dk	3,7	10 µL DAD* 202-247 nm MS* CAD*	MRM ESI+ 391,1739→161 ,0712	0,08-500 µg/mL	0,025 µg/mL	0,08 µg/mL	Bitkisel ürün	[39]
							0,025-75 µg/mL	0,007 µg/mL	0,025 µg/mL		
							2-500 µg/mL	0,500 µg/mL	2,000 µg/mL		
UPLC-MS/MS	FLB d4	Kinetex C ₁₈ (2,6 µm, 2,1 × 50 mm) 40 °C	İzokratik elüsyon 20 mM amonyum asetat tampon (pH 4,5):asetonitril (50:50, v/v) 0,3 mL dk ⁻¹	1,09	3 µL	MRM ESI+ 391,1→161,1	5-1000 ng/mL	VE*	5 ng/mL	İnsan plazması	[33]
UPLC-MS/MS	Karbamazepi n	Agilent RRHD Eclipse Plus C ₁₈ (2,1 × 50 mm, 1,8 µm) 35 °C	Gradient elüsyon (%0,1 formik asit içeren su ve asetonitril ile) Lineer artış 0–1,0 dk 90% asetonitril, 1,0–2,6 dk 90% asetonitril, 2,6–3 dk lineer 20% asetonitrile azalış 0,4 mL/dk	2,51	2 µL	m/z 391,3 → 161,3	100-120,000 ng/mL	VE*	100 ng/mL	Sıçan plazması	[34]

Tablo 2.1. *Flibanserin analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler (devam)*

Yüzeyi geliştirilmiş Raman spektroskopisi	-	VE*	VE*	VE*	730 cm ⁻¹ , 993 cm ⁻¹ ve 1013 cm ⁻¹	-	1–100 µg mL ⁻¹	1 µg mL ⁻¹	VE*	Likör, bira ve üzüm şarabı	[38]
HPLC-MS/MS HPLC	FLB [D8] FLB analogu	Ters faz C ₁₈	İzokratik elüsyon	VE*	50 µL 210 nm	VE*	1-1000 ng/mL 2–1000 ng/mL	VE*	1 ng/mL 2 ng/mL	İnsan plazması	[35]
UPLC–MS/MS	Ketiapin	Waters Acquity UPLC BEH (2,1 × 100 mm, 1,7 µm) 40 °C	İzokratik elüsyon 10 mM amonyum format:asetonitril (30:70, v/v) 0,3 mL/dk	1,20	5 µL	m/z 391,13 → 161,04	0,22-555 ng/mL	VE*	0,22 ng/ml	Sıçan plazması	[36]
Üçüncü türev emisyon spektrofotometrik yöntem	-	VE*	VE*	VE*	329,2 nm	-	0,1–3 µg/mL	0,04 ng/mL	0,12 ng/mL	Veronex rin® tablet	[41]
UPLC-MS/MS	Aripiprazol	Poroshell 120 SB C ₁₈ (4,6 mm × 100 mm, 2,7 µm) 40 °C	Asetonitril:10 mM amonyum asetat:asetik asit (90:10:0,1, v/v/v) 0,4 mL/dk	3,60	5 µL	ESI-SIM 391,1741→161,0704	2,5-600 ng/mL 5-500 ng/mL	VE* VE*	2,5 ng/mL 5 ng/mL	Sıçan plazması Sıçan beyni	[37]
LC-MS/MS	-	Zorbax C ₁₈ (4,6 mm × 500 mm, 5 µm) Ortam sıcaklığı	Asetonitril:su, (15:85, v/v) 0,5 mL/dk	1,41	10 µL	ESI-MRM 390,95→161,0	1-25 ng/mL	0,5 ng/mL	1 ng/mL	Market formülasyonları	[40]

* Yüklü aerosol dedektörü (CAD), diyot dizi dedektörü (DAD) ve kütle spektrometresi (MS), yüzey destekli Raman spektroskopisi (SERS), Veri eksikliği (VE)

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler

Analitik dereceli kimyasallar; sodyum hidrojen fosfat (%99,8, *a/a*), fosforik asit (%86, *a/a*), sodyum hidroksit, hidroklorik asit, hidrojen peroksit, formik asit, trifloroasetik asit ve HPLC sınıfı çözücüler; asetonitril ve su Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. %99,9 (*a/a*) saflıkta FLB hidroklorür referans standardı TRC Company'den (Kanada) satın alınmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

HPLC analizleri için Shimadzu (Japonya) firmasına ait Nexera-i LC-2040C 3D cihazı kullanılmıştır. Sistemin yazılımı yine Shimadzu (Japonya) firmasına ait LabSolutions 5.81 yazılımıdır. Sistem ayrıca Windows 10 ile donatılmıştır.

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

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

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

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

3.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Çalışmalarda kromatografik ayırım için 6 adet sabit faz kullanılmıştır. Bu kullanılan sabit fazlardan üçü Sigma Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Supelco Ascentis® Express model fenil hekzil, C₁₈ ve pentaflorofenil (F₅) fonksiyonel gruplarına sahip (100×4,6 mm, ID, 2,7µm) ölçülerinde kolonlardır. Kullanılan diğer üç sabit faz ise Merck (Amerika Birleşik Devletleri) firmasına ait Chromolith® Performans RP-18e 100×4,6 mm, Chromolith® HR RP-18e 100×4,6 mm ve Chromolith® Performans RP-18e 100×2 mm kolonlardır. Bu çalışmalarda kullanılan sabit fazların özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Kullanılan sabit fazların özellikleri*

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

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneysel Parametreler

4.1.1. Enstrümental parametreler

HPLC analizlerinde sisteme gönderilen hareketli fazın akış hızı 0,5 mL/dk olup kolon fırın sıcaklığı $35,0 \pm 0,1$ °C olarak seçilmiştir. Otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı numune ve standart çözeltilerin stabilitesinin korunması amacıyla $15 \pm 0,1$ °C'ye sabitlenmiş olup enjeksiyon hacmi ise 1 µL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan tüm hareketli faz çözeltileri 0,22 µm CA filtre ile süzülmüştür.

FLB'nin maksimum absorbansı 204 nm'de tespit edildiği için HPLC sisteminde foto diyot dizisi dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayrıca dedektörde spektrumlar 190 ve 380 nm arasında 1,5625 Hz veri örnekleme frekansında ve 0,640 sn zaman sabitinde izlenmiştir.

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

Tablo 4.1. Optimize LC-MS/MS koşulları

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

İyon Tuzaklı- Uçuş Zamanlı (IT-TOF) kütle spektrometresi analizi, ESI arayüzlü (Shimadzu, Japonya) hibrit bir IT-TOF kütle spektrometresi kullanılarak yapılmıştır. Analiz koşulları; nebülize edici gaz akışı 1,5 L/dk; yüksek gerilim probu -3,5 kV; kurutma gazı basıncı 200 KPa, ısı bloğu sıcaklığı ve CDL sıcaklığı 200 °C olarak ayarlanmıştır. CID parametreleri çarpışma gazı parametresi için %50, CID enerjisi için %50 ve CID için argon gazı seçilmiştir. Ayrıca, TOF'un dedektör voltajı 1,6 kV'a ayarlanmıştır. IT-TOF sisteminin kalibrasyonu ise sodyum trifloroasetat çözeltisi ile yapılmıştır.

4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

Referans standartların tüm stok çözeltileri ve çalışma çözeltileri, FLB'nin çözünürlük sorunu nedeniyle metanol ile hazırlanmıştır. FLB'nin stok çözeltileri, HPLC için 50 µg/mL ve LC-MS/MS çözeltisi için 35,0 µg/mL elde etmek üzere ilk olarak metanol içinde 2,5 mg ve 3,5 mg FLB çözündürülerek hazırlandı. Kalibrasyon, LOD, LOQ ve QC çözeltileri için diğer dilüsyonlar LC-PDA ve LC-MS/MS için bu stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yine metanolde yapılarak hazırlanmıştır.

4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

FLB'nin geri kazanım çalışmaları farmasötik preparatı olan Addyi® (100 mg/tablet FLB içerir) içerisinde yapılması hedeflenmiştir. Ancak deneysel çalışmalar esnasında elde olmayan sebepler (ürünün ülkeye girişin yasak olması) nedeniyle piyasada onaylı tek farmasötik preparatı olan Addyi® satın alınamamıştır. Bu yüzden farmasötik formülasyonu hazırlanmıştır ve geri kazanım çalışmaları bu çözelti kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4.2. Addyi® formülasyonu [42]

Tablet Formülasyonu	Ağırlık (mg)
FLB Hidroklorür	50,00
Laktoz monohidrat	143,4
Mikrokristalin selüloz	47,81
HPMC (Hidroksipropil metil selüloz)	2,500
Karboksi metil selüloz sodyum	5,000
Magnezyum stearat	1,250
Makrogol	5,500
Toplam	255,5

Bu amaçla Tablo 4.2'de verilen ticari ürünün patentine dahil edilen yardımcı maddeler ultra hassas teraziyle tartılmış ve 100 mL hacme sahip balon jojeye ilave edilerek metanolde çözülmüştür. Ardından vortekste 5 dakika karıştırılmış ve ultrasonik banyoda çözünmesi için 15 dakika bekletilmiştir. Çözünmenin tamalanmasından sonra heterojen çözelti şırınga ucu filtrelerden süzülmüştür. Süzme işlemi için naylon, PES, PTFE ve PVDF tipte şırınga filtrelerinin hepsi denenmiş ve en yüksek pik alanı PTFE (22/25 mm, 0,22 µm gözenek boyutu, Isolab, Almanya) ile elde edildiği için numune

hazırlamada kullanılmıştır. Bu homojen çözelti 1/10 oranında ara stok olarak seyreltilip geri kazanım çözeltileri bu ara stoğun gerekli oranlarda seyreltilmesi ile kalibrasyon çözeltileri serisinde hem PDA hem de MS dedektör için %80, %100 ve %120 oranlarına gelecek şekilde hazırlanmıştır.

4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

HPLC çalışmalarında kromatografik ayırım izokratik elüsyon modunda yapılmıştır. Hareketli faz karışımı asetonitril: asetat tamponu (0,010 M, pH 5,4) olup (50:50, *h/h*) oranında kullanılmıştır. Tampon çözeltisi, 770,0 mg amonyum asetatın 1 L su içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti çözünmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından Sartorius firmasına steril olmayan selüloz asetat membran filtrelerden (47 mm ID, 0,45 µm gözenek boyutu, Almanya) süzülmüştür. Optimum kolon sıcaklığı 40,0±0,1 °C, otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı ise 15±0,1 °C olarak seçilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 1 µL olarak optimize edilmiştir. Ayrıca, HPLC'deki optimize edilmiş yöntem koşulları tam olarak laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için LC-MS/MS sisteminde ki PDA dedektöre aktarılmıştır.

FLB'nin LC-MS/MS çalışmalarında kromatografik ayırım da aynı şekilde izokratik elüsyon modunda yapılmıştır. Hareketli faz karışımı asetonitril: amonyum format (0,020 M, pH 6,0) olup (60:40, *h/h*) oranında kullanılmıştır. Tampon çözeltisi, 1260,0 mg amonyum formatın 1 L su içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan çözelti çözünmesi için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiş ve ardından Sartorius firmasına steril olmayan selüloz asetat membran filtrelerden (47 mm ID, 0,22 µm gözenek boyutu, Almanya) süzülmüştür. Optimum kolon sıcaklığı 40,0±0,1 °C, otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı ise 15±0,1 °C olarak seçilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 1 µL olarak optimize edilmiştir.

4.1.5. Bozunma çözeltilerinin hazırlanışı

Etken maddenin HPLC için seçicilik çalışmaları ve bozunma ürünlerinin LCMS-IT-TOF cihazında kalitatif analizi amacıyla etken madde zorlu bozma koşullarına maruz bırakılmıştır. Etken maddesinin maruz bırakıldığı zorlu bozma koşulları ICH Q2(R1) kılavuzunda belirtilen sunulan termolitik, asidik/bazik, hidrolitik ve oksidatif stres koşulları altında yapılmıştır [43]. Bozunma çözeltileri metanol içinde çözünmüş stok

etken madde çözeltisinin 17,5 µg/mL derişimde olacak şekilde farklı stres ortamlarında hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda incelenen parametreler Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. *Zorlu bozma koşulları*

Bozunma koşulu	Uygulanış biçimi	Açıklama
Sıcaklık	Çözelti	60 °C sabit sıcaklıkta analit çözeltisi 10 °C’lik artışlarla 1 saat süre ile bekletilip analizi yapılmıştır.
Nem	Katı	%75 oranındaki nemde 1 saat süre ile bekletilip maddenin çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.
Işık	Çözelti	Gün ışığında 6 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	%3 (h/h) oranında H ₂ O ₂ çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilmiştir.

4.1.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Hem MS dedektörü hem de PDA dedektör sistemi için analitik yanıt, elde edilen kromatogramda etken maddenin sinyalinin alanı olarak alınmıştır. Elde edilen sonuçların gruplar arası uyumu, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0 programı ile yapılmıştır.

4.1.7. Yöntem geçerliliğinin tespiti

Geliştirilen her iki yöntem de ICH kılavuzunun tavsiye ettiği şekilde metot geçerliliği sağlanmış ve analitik kriterleri sağladığı gösterilmiştir [44]. Yöntem geçerliliği için spesifiklik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri tam olarak yapılmıştır [44-46].

4.1.8. Sistem uygunluk testleri

Analizler esnasında mevcut sistemin metot geçerliliği sağlanmış sisteme aktarılabilirliğini ve sistemin düzgün çalışmasını sağlayacak ayrıca lüzumlu olmayan kromatografik verimlilik gerekliliğini önleyecek sistem uygunluk kriterleri

oluşturulmuştur. Bu kriterler genel olarak; teorik tabaka sayısı (N), ayırım gücü (R_s), kuyruklanma (T) ve asimetri faktörü (A_s), kapasite (k') ve seçicilik faktörü (α) gibi parametreler sistem uygunluk parametreleridir. Bu parametrelerin hesaplanması ve kabul edilebilirlik sınırları içerisinde olması gereklidir. Bu kabul edilebilirlik sınırları Tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. *SUT parametrelerinin sınırları*

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

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

Tablo 4.5. USP'ye SUT parametrelerinin formülleri

Parametre	Eşitlik	
Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	N: teorik tabaka sayısı t_R : alıkonulma zamanı W: pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0,05}}{2 \times \alpha_{0,05}}$	T: kuyruklanma faktörü $W_{0,05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0,05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Asimetri faktörü	$A_S = \frac{\beta_{0,10}}{\alpha_{0,10}}$	As: asimetri faktörü $\beta_{0,10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0,10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Ayrım gücü	$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}}$	t_1 : önceki pikin alıkonulma zamanı t_2 : pikin alıkonulma zamanı $W_{0,5}$: pik genişliği $W_{P0,5}$: önceki pikin genişliği
Kapasite faktörü	$k = \frac{t_R}{t_M} - 1 = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	k: kapasite faktörü t_R : alıkonulma zamanı t_M : ölü zaman

4.1.9. Seçicilik ve spesifiklik

Seçicilik; bir yöntemde hedeflenen bileşiğin sinyalinin, matrislerdeki girişim yapabilecek maddelerin varlığında tayin edilebilme yeteneğidir. Bir analit veya analit grubu için mükemmel seçici olan bir yöntem spesifiktir. Spesifiklik ise validasyon prosedürüdür ve yöntemin mevcut olabilecek diğer bileşenler (örneğin safsızlıklar, bozunma ürünleri ve matris bileşenleri) varlığında analiti kesin olarak değerlendirme yeteneğini teyit etmektir [47]. Bu amaçla etken madde FLB derişimi bilinen miktarda zorlu bozma koşullarına tabi tutularak bozunma ürünleri elde edilmiş, kromatografik ayırım bu bileşenlerin varlığında yapılmış ve elde edilen sonuçlar standart FLB çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca elde edilen bozunma ürünlerinin kalitatif tayini LCMS-IT-TOF ile yapılmış ve mekanizması MSⁿ çalışması yapılarak ayrıntılı incelenmiştir.

4.1.10. Kararlılık

FLB'nin stok çözeltisi, metanolde (50,0 µg/mL) uygun şekilde seyreltilmiş ve periyodik olarak (6, 12, 18, 24, 48 saat, üç hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü) olmak üzere çözelti ve hareketli faz kararlılığını incelemek için analizleri yapılmıştır.

4.1.11. Doğrusallık

Bir yöntemin doğrusallığı, analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan veya bir tür matematiksel dönüşümden sonra doğrudan orantılı olan ölçüm sonuçları sağlama yeteneği olarak tanımlanır. Doğrusallık genellikle, artan analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülen enstrümental tepkilerin (pik alan veya yükseklik) normal en küçük kareler eğrisi veya sadece doğrusal regresyon eğrisi olarak ifade edilir. Kalibrasyon eğrisinin yapılması için pik yüksekliklerin kullanımına kıyasla pik alanların kullanılması tercih edilir [48].

Geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için FLB standart çözeltileri %10-200'üne karşılık gelen (2,50; 6,25; 12,5; 20,0; 25,0; 30,0; 37,5; 12,1; ve 50,0 µg/mL) 8 konsantrasyon seviyesinde metanolde hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. LC-MS/MS için ise FLB çözeltileri %5-200'üne karşılık gelen 9 konsantrasyon seviyesini kapsayacak şekilde (2,625; 5,250; 13,125; 26,25; 42,0; 52,5; 63,0; 78,75, ve 105,0 ng/mL) seviyelerde çözeltiler hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Her iki dedektör sisteminde analizler en az üç tekrarlı olmak üzere yapılmış ve hesaplama elde edilen alanların ortalaması ile yapılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası olmak üzere üç tekrar ile çalışılmış ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir.

4.1.12. Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, elde edilen değerlerin gerçek değerden sapma derecesi ile verilir. Bir yöntemin doğruluğuna ilişkin bir tahmin yöntemlerinden birisi de bilinen bir konsantrasyonda bir numunenin analiz edilmesini ve daha sonra sonuçların ölçülen ve gerçek değer arasında karşılaştırılmasını içerir [48]. Bu amaçla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Her iki metot için elde hazırlanmış FLB tablet çözeltilerinden düşük seviyede (HPLC için 20,0 µg/mL; LC-MS/MS için 42 ng/mL) orta seviyede (HPLC için 25,0 µg/mL; LC-MS/MS için 52,5 ng/mL) ve yüksek seviyede (HPLC için 30,0 µg/mL; LC-MS/MS için 63 ng/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede (%80, %100 ve

%120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanmış, elde edilen sonuçların standart sapma (S), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

4.1.13. Kesinlik

Kesinliğin belirlenmesi tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik olmak üzere üç kategoriye ayrılır. Tekrarlanabilirlik veya gün içi kesinlik çalışması; belirli bir ekipman kullanılarak analizin, bir laboratuvarında bir analist tarafından ve bir iş günü içinde gerçekleştirildiğinde belirlenir. Ara kesinlik çalışması ise, analiz farklı analistler tarafından birkaç gün veya hafta boyunca tek bir laboratuvarında farklı ekipman, reaktifler ve kolonlar kullanılarak gerçekleştirildiğinde elde edilir [48].

Her iki metot için standart ve psödo formülasyon çözeltilerin %100 noktasına denk gelen (HPLC için 25,0 µg/mL; LC-MS/MS için 52,5 ng/mL) konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak üç gün sırası ile 5, 3 ve 3 tekrarlı olmak üzere analiz edilmiştir. Ayrıca HPLC metodu için ara kesinlik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar varyans analizi ile yorumlanmıştır. Sonuçlar, ortalama, ortalama standart hata, standart sapma, %BSS ve %95 güven seviyesi dahil olmak üzere istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

4.1.14. Teşhis ve tayin alt sınırı

Teşhis alt sınırı (LOD), kullanılacak analitik koşullar altında saptanabilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Analitlerin varlığı LOD ile görülebilir; bununla birlikte, bunların konsantrasyonları kantitatif olarak ölçülemez. Tayin alt sınırı (LOQ) ise analitik koşullar altında kabul edilebilir doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilen en düşük konsantrasyondur. Genel olarak LOQ, LOD'nin üç katı olarak tahmin edilebilir [48]. Bu amaçla her bir metot için dedektörde elde edilen gürültü sinyalinin 3,3 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=6). Buna göre tayin sınırı için çalışılan her bir sıvı kromatografisi cihazında elde edilen gürültünün 10 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=6).

4.1.15. Sağlamlık

Analitik bir yöntemin sağlamlığı, yöntemin, metot parametrelerindeki değişikliklerden etkilenmemesi yeteneğinin bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Metodun sağlamlığı yapılan kontrollü değişikliklerden anlamlı olarak etkilenmemesiyle

gösterilmiş olur. Bu nedenle parametre, normal kullanım sırasında yöntem güvenilirliğinin bir göstergesini sağlar. Bir yöntemin sağlamlığı, farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı aletler, farklı reaktifler, farklı günler, vb. gibi çeşitli koşullar altında aynı numunelerin analizi ile elde edilen test sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesidir [48]. Bu amaçla HPLC ve LC-MS/MS için konsantrasyon seviyesinde %100 karşılık gelen standart FLB çözeltileri hazırlanmış ve akış hızı ($\pm\%10$), kolon sıcaklığı ($\pm\%10$), ve hareketli fazın apolar bileşen yüzdesi ($\pm\%10$) ve çalışılan dalga boyunda değişiklik yapılarak çeşitli sistem uygunluk parametrelerindeki sapmalar hesaplanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

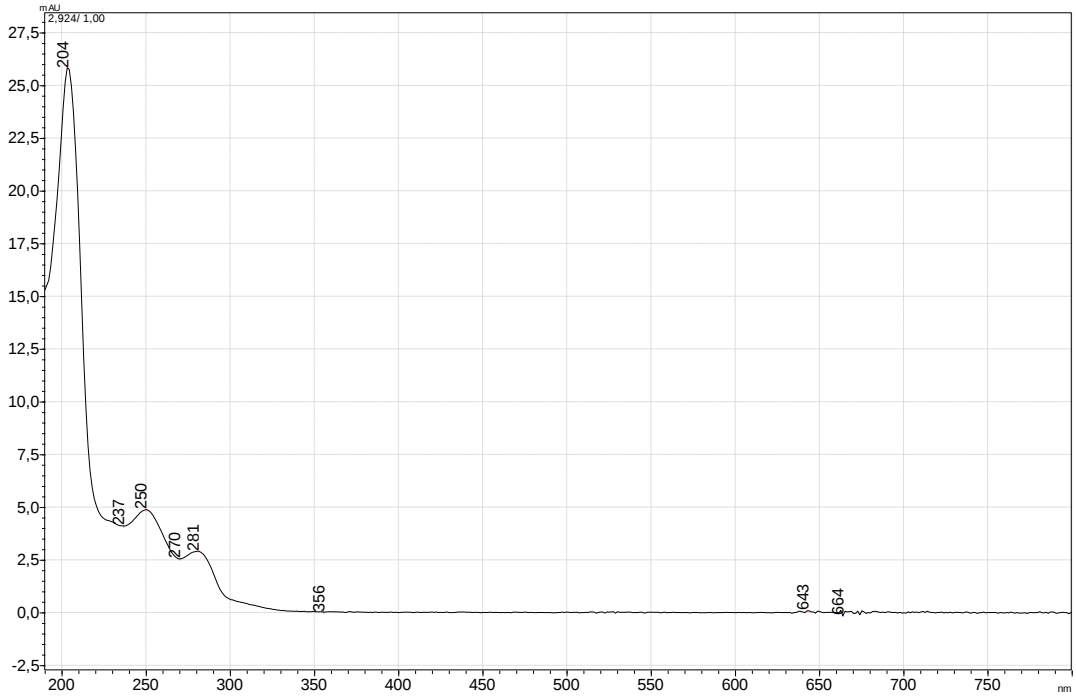
Söz konusu çalışmanın amacı FLB farmasötik preparatlarda analizi için otoritelerin önerdiği gereklilikleri sağlayan metot geliştirmektir. Günümüzde sıvı kromatografisi iyi bir ayırım gücü sağlayarak hedef bileşiğin analizinin yüksek doğruluk, tekrarlanabilirlik ve uygulanabilirlik sunması avantajıyla en tercih edilen tekniklerden birisidir. Gelişen teknolojik değişimler, yatırımlar ve dedektörlerle sağlanmaya çalışılan yüksek hassasiyet ile bu yaygın kullanımın daha da süreceği aşıkardır.

Çalışmada FLB'nin PDA ve MS dedektörlerde sıvı kromatografisi ile ayrımı sağlanarak analizi için uluslararası geçerliliğe sahip metot geliştirilmiştir. PDA dedektörde metodun seçici olması için etken madde zorlu bozma koşullarına maruz bırakılarak analizlerde karşılaşılabilecek tüm bozunma ürünleri elde edilmeye çalışılmıştır. Ardından dedektörde bu bozunma ürünleri varlığında FLB'nin kromatografik ayrımı ve analizi yapılmıştır. Elde edilen bozunma ürünlerinin yüksek çözünürlüklü kütle spektrometre (HRMS) özelliğine sahip LC/MS-IT-TOF cihazı ile kalitatif tayini yapılarak olası oluşum mekanizması tahmin edilmeye çalışılmıştır. Metodun tekrarlanabilirliğinin kanıtlanması amacıyla laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışması yapılmıştır. Bu amaçla elde bulunan ikinci sıvı kromatografisi cihazı olan ve bir PDA dedektöre sahip olan ve aynı zamanda kütle dedektör ile analiz çalışmalarının yapıldığı LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır.

Çalışmada geliştirilen diğer FLB analiz metodu ise LC-MS/MS metodudur. HPLC metodundan bağımsız olarak geliştirilen bu ikinci metot ile her türlü laboratuvarların var olan imkanlarına hitap edilmeye çalışılmıştır. Her iki yönteminde tam olarak metot geçerliliği sağlanmıştır. Ayrıca geliştirilen iki metot ile Türkiye piyasasında olmayan fakat dünyada onaylı tek farmasötik preparat olan Addyi®'nin analizi yapılmak istenmiştir. Ancak preparat bahsedilen sebeplerden dolayı elde edilemeyince var olan formülasyona göre elde hazırlanmış ve analizi yapılmıştır.

5.1. FLB'nin UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

HPLC çalışmalarının ilk adımı analitin UV-Vis spektroskopisi davranışlarının incelenmesidir. Bu amaçla FLB'nin UV-Vis spektrometresinde maksimum absorbans yaptığı dalga boyu tespit edilmiştir. Bunun için 17,5 µg/mL derişimde metanolde hazırlanmış FLB çözeltisinin 190-400 nm aralığında okuması yapılmıştır. Elde edilen spektrum Şekil 5.1'de verildiği gibidir.



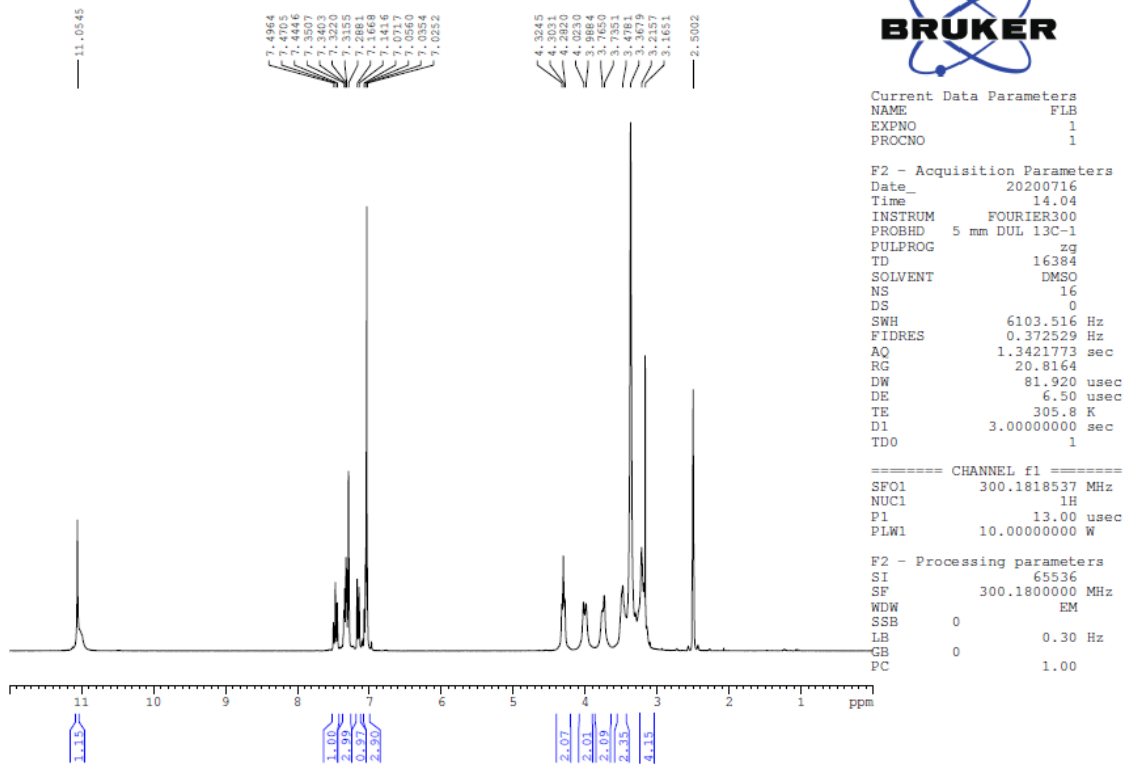
Şekil 5.1. FLB'nin UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=17,5 \mu\text{g/mL}$)

Moleküllerin UV absorbansları yapılarındaki elektronik geçişlerin enerjisinden kaynaklanır. Bu elektronik geçişlere en büyük etken yapıda var olan fonksiyonel grup türü ve ortamın çözücüsüdür. FLB'nin yapısına bakıldığında kromoforik gruplar benzen, piperazin, etilen diamin ve imidazolon olarak göze çarpmaktadır. Bu yapılardan kaynaklanan çeşitli dalga boylarındaki absorbansları Şekil 5.1'de verilmiştir. Buna göre yapının göze çarpan yüksek şiddetteki absorbansları 204 nm, 250 nm ve 281 nm olmak üzere üç tanedir. Piperazin ve etilendiamin kromofor gruplarının maksimum absorbansları yaklaşık olarak 195 nm- 200 nm civarında, imidazol grubunun ise 200-205 nm dalga boylarında gözlenir. Ortam çözücüsü olan metanol ise polar özellikte olduğu için genellikle kromofor grupların orbitallerinin enerjisini düşürerek batokromik kaymalara neden olmaktadır. Kaymanın asıl sebebi çözücünün n orbitalinin enerjisini π^* orbitalinden daha fazla düşürmesi olup özellikle kromofor grupların n orbitalleriyle yaptığı H-bağının enerjisi ile kontrol edilmektedir. FLB yapısında ise etilendiamin ile piperazin grubunun bir arada bulunması ile batokromik etkiye karşı bir direnç ortaya çıkarak 204 nm de maksimum absorbans gözlenmiş ve şiddeti de diğer dalga boylarına karşı oldukça yüksektir. Her iki kromofor grubun bir arada bulunması ve FLB'nin orta kısmında yer almaları korunaklı bir bölgede absorbans yapmalarını ve bu absorbans şiddetlerinin bir araya toplanmasını sağlamıştır. Böylelikle metanol çözücüsünün

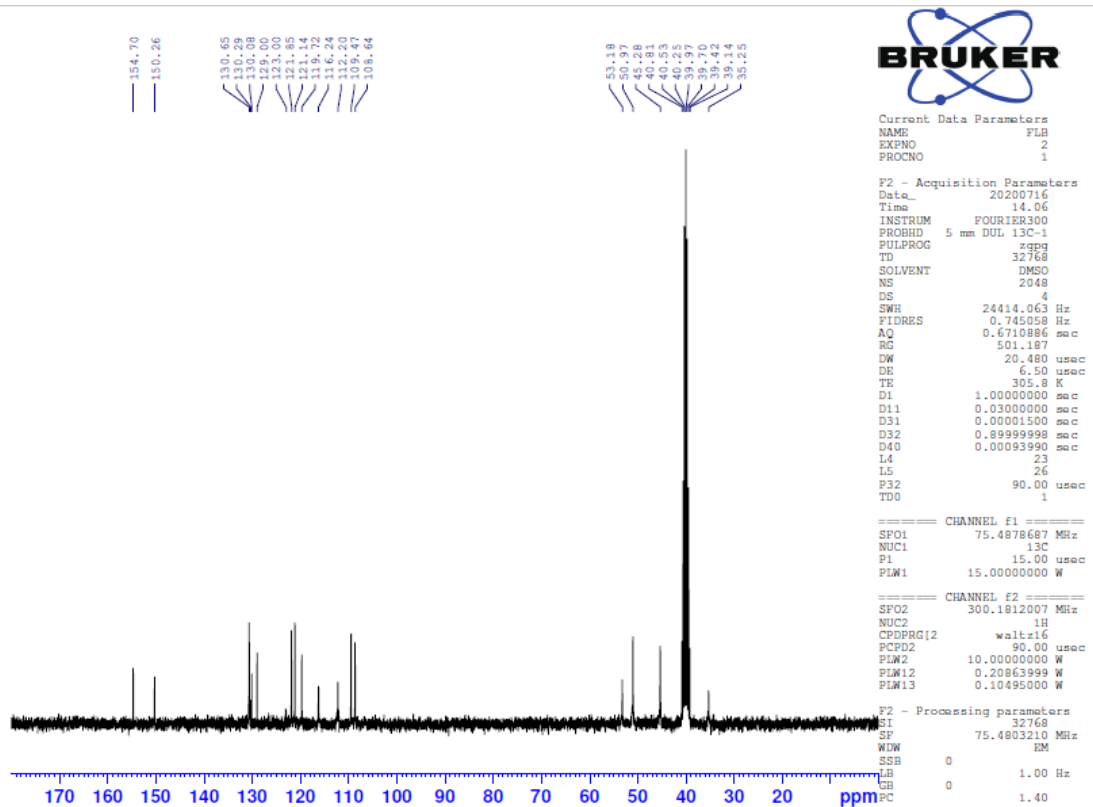
batokromik etkisinden kurtulmuş oldukça şiddetli 204 nm de absorbens gözlenmiştir. Bu absorbensin şiddetine katkı yapan diğer kromofor grubu ise yapı rijitliği ile etkileşimleri sınırlandırılan imidazolon grubudur. Diğer daha düşük dalga boylarında ve şiddetteki absorbenslerin ise yapıdaki karbonilin $n \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişiyle ortaya çıkan 274 nm dalga boyundaki absorbensin hipsokromik kaymaya uğrayarak 281 nm gelmesidir. Bunun dışında yapıda bulunan benzen gibi sahip olduğu diğer kromofor gruplarının yaptığı elektronik geçişlerden kaynaklanmaktadır.

5.2. NMR spektroskopisi tekniği ile FLB'nin ^1H NMR spektrumlarının tespiti

FLB etken maddesinin standardının spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla ^1H -NMR ve elde bulunan imkanlar dahilinde ^{13}C -NMR spektrumları alınmış ve yapının iskeleti gibi belirlenmiştir. Elde edilen ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.2'de ve ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 5.3'de verilmiştir. Proton spektrumu incelendiğinde 3 ppm dolaylarında 2 tane 4'er hidrojenlik yayvan piklerin piperazin halkasındaki CH_2 gruplarına ait olduğu söylenebilir. Yine yapıdaki diğer alifatik protonlar iki tane triplet pik vererek piperazin ve imidazolonu bağlayan etil köprüsüne aittir. Aromatik bölgede toplam 7 hidrojenlik pikler mevcut olup, 11 ppm'de benzimidazolon azotu üzerindeki protondan kaynaklı singlet pik gözlenmiştir. Karbon NMR'da ise alifatik bölgede 4 aromatik bölgede 14 adet pik gözlenmiştir. Triflorometil varlığından dolayı bazı pikler kuartet olarak gözlenmiştir.



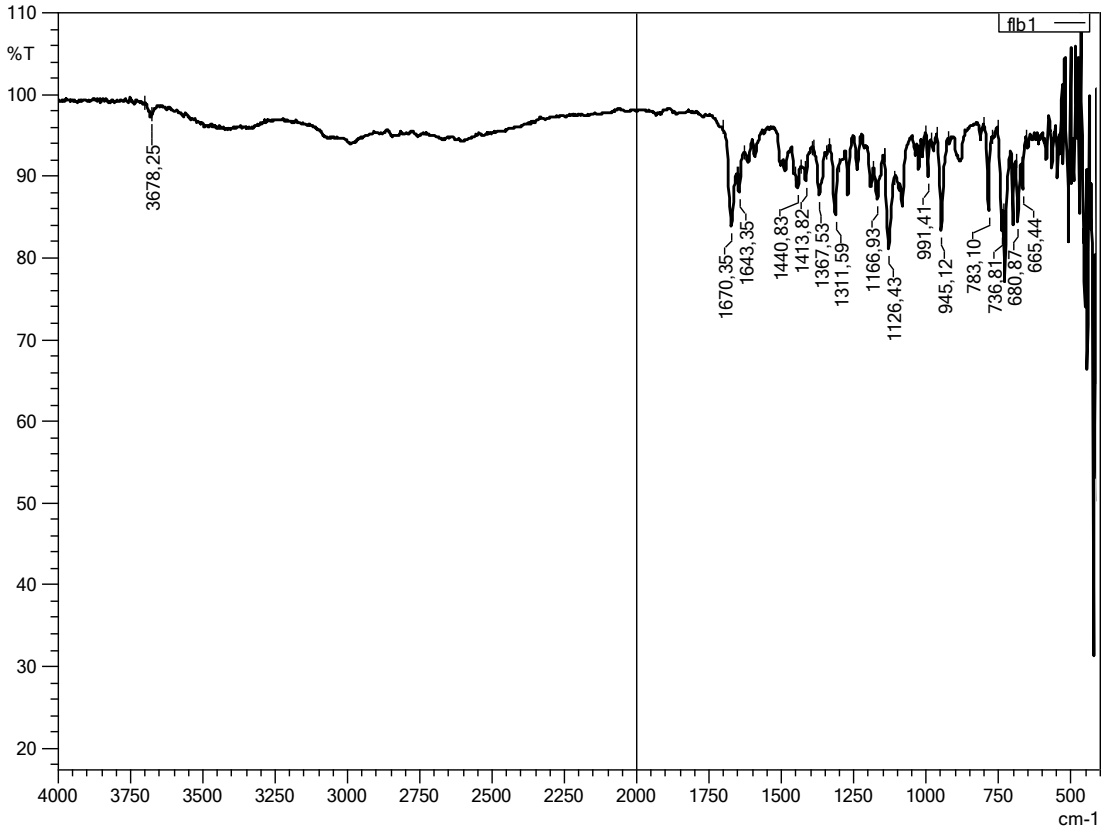
Şekil 5.2. FLB için alınmış ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.3. FLB için alınmış ^{13}C NMR spektrumu

5.3. IR spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu

FLB etken maddesinin standardının spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla IR spektrofotometresi ile analiz yapılmış ve yapıya özgü fonksiyonel gruplar Şekil 5.4'deki gibi belirlenmiştir. Yapıdaki benzimidazolun NH'ından kaynak bant 3678 cm^{-1} 'de yine aynı gruptaki karbonil ise 1670 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bunlar dışındaki parmak izi bölgesi bantlar beklendiği gibi gelmiştir.



Şekil 5.4. FLB için IR Spektrumu

5.4. Sıvı Kromatografisinde Yöntem Geliştirme

İlaç endüstrisinde ilaç analizlerinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte analizi için önerilen yöntemlerin başında sıvı kromatografisi gelmektedir. Sıvı kromatografinin başarısının iki kısmı vardır: sabit faz ve uygun dedektör. Özellikle bozunma ürünlerinin etken maddenin yapısına çok benzer olmaları nedeniyle bu tür bileşiklerin varlığında kromatografik ayırım oldukça zordur. Bu nedenle çalışmada yapı olarak tamamen farklı Ascentis Express® ve Chromolith® olmak üzere iki tip kolon türü denenmiştir. Ascentis

Express® tür kolonlar tamamen tanecik yapılı silikaya sahip iken Chromolith® serisi ise yekpare silikadan oluşan monolitik yapıdadır.

Kaynaşmış çekirdek teknolojisi ile yüzeysel olarak gözenekli silika jel geliştirilmesiyle kolon teknolojisi oldukça farklı bir noktaya yönelmiştir. Bu yapılar genel olarak, bu parçacıklar 0,5 µm kalınlığında dış gözenekli tabaka, 90 Å gözenek boyutu ve 150 m²/g yüzey alanına sahip toplam 2,7 ve 1,7 µm ve iç katı çekirdek çaplarına sahiptir. Yüzeysel olarak gözenekli parçacıklar C₈, C₁₈, RP Amid ve Hilic tipte mevcuttur. Partiküller üzerindeki dış tabaka, toplam hacmin %75'ini temsil eder ve böylece numune kapasitesi problemlerini sınırlar. Genel olarak, gözenekli parçacıklar, C₁₈ (oktadesildimetilsilan) veya C₈ (oktildimetilsilan) ile maksimum kapama ile yoğun bağlanmış bir fazda, 150 m²/g yüzey alanına sahip ultra saf tip B silikaya sahiptir. Normal koşullarda maksimum 400 barlık maksimum basınçta 2,0–9,0 geniş bir pH aralığında çalışabilirler. Gözenekli parçacıklarda parçacık boyutu küçüldükçe daha iyi bir difüzyon yoluna sahip olup ve bu da daha iyi bir performans demektir. Karakteristik özellikleri iyi ayırma, çözünürlük, hassasiyet, sağlamlık ve rekabetçi seçiciliklerdir. Asidik ve bazik bileşikler, aromatikler, boyalar, hormonlar, profenler, β-blokerler, peptitler, fenoller, antidepresanlar, doğal ürünler, fenolikler, bazlar, metabolitler ve polar bileşikler gibi bazı moleküllerin ayrılması ve tanımlanması için kullanılmaktadır [49].

2001 yılında Holloway tarafından icat edilmelerinden ve patentlenmesinden bu yana, monolitik silika kolonlar sürekli olarak geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Monolitik silika terimi, küçük silika parçacığı ile paketlenmemiş sünger gibi tek parça gözenekli silika materyali için kullanılır ve bu materyal, reaksiyon koşulları ve ön işlem süreçleri sayesinde poli (eter keton) ve kontrollü morfoloji gibi kaplanmış çeşitli karbon zincirleri ile kolayca işlevselleştirilebilir. Bu tip kolonları daha çok; geçirgenlik, düşük basınç, daha yüksek verim, seçicilik ve sağlamlık özellikleri vb. nedeniyle dikkat çekmektedir. Arz talebi dengesizliği nedeniyle, monolitik silika kolonların üretimi ve gelişimi devrimsel olarak devam etmiştir ve şimdi piyasadaki ikinci nesilleri kiral analiz, amino asitler, ayrıca virüs ayrımları ve özellikle kirli numuneler için etkili ve hız ayırma özelliklerine sahiptir. Bugün, nispeten daha küçük gözenekler (1,1-1,2 µm) ve iskelet boyutları (0,7-0,8 µm) ve azaltılmış dış gözeneklilik (0,56) nedeniyle, ikinci nesil C₁₈ monolitik silika kolonları, yani Chromolith Yüksek Çözünürlük serisi (Merck) 5-6 µm partiküllere eşdeğer bir geri basınç ile 2,0-2,5 µm partiküllere eşdeğer daha yüksek verim sağlar. Chromolith Yüksek Çözünürlük serisi (Merck) için kullanılan Phenomenex Onyx (100 ×

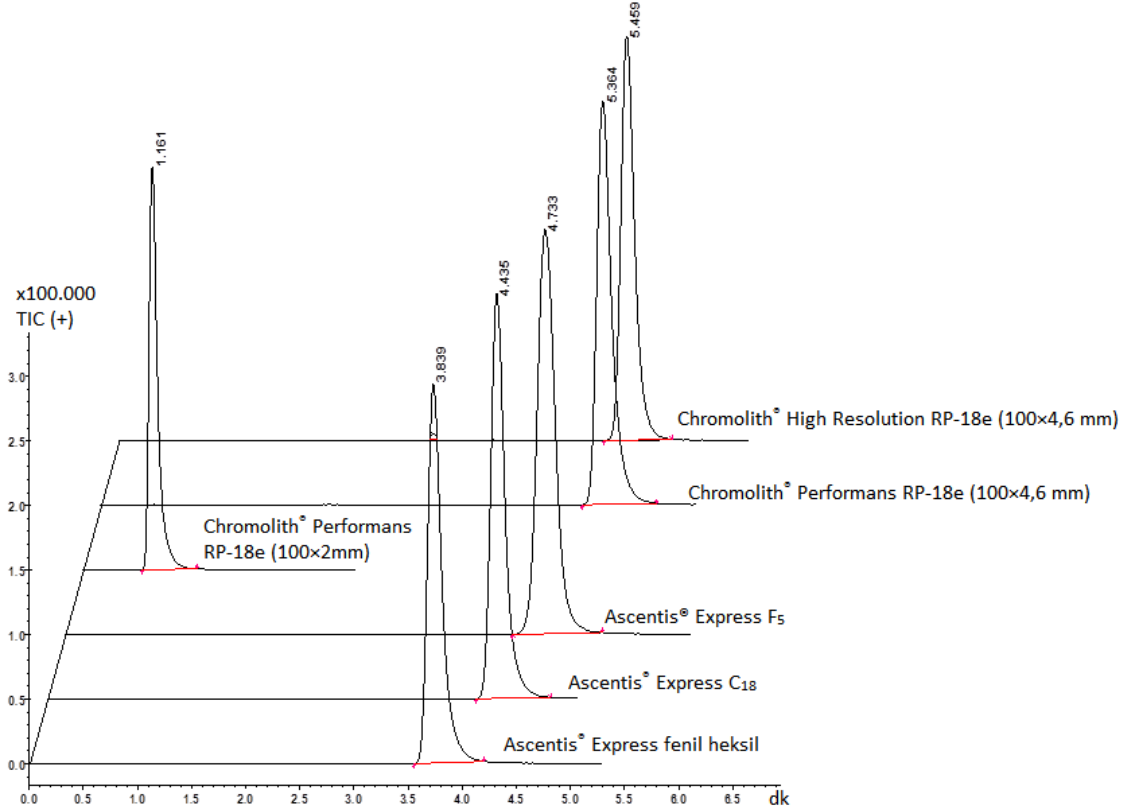
4.6 mm) ile daha da yüksek verimlilik $N = 190,720$ ve pik kapasite = 210 (gradyan süresi dakika başına pik kapasite birimi) elde edilmiştir. Daha az alıkonan çözünen maddeler için daha yüksek geçirgenlik ve daha yüksek verim ile ilgili olarak; monolitik silika kolonlar, özellikle çok küçük ekstra kolon etkileri olan cihazlarda, düşük basınçta yüksek hızlı ayırmalara izin verilmiştir. Monolitik silika kolonlar, kimyasal modifikasyon için bir kolondaki partikül kolonlardan ve sabit destek yapılarından daha yüksek (gözenek boyutu)/(iskelet boyutu) oranlarına sahiptir, bu da yüksek verimli kolonlar ve sabit fazlar ile sonuçlanır. Ayrıca, benzersiz bimodal yapısı sayesinde monolitik sorbentlerle dolu kolonların verimliliği azaltmadan basınç problemleri zahmetsizce yenerek geleceğin teknolojisini karşılıyor ve sorun yaratmıyor gibi görünmektedir [50].

Tablo 5.1. Deneyisel olarak sabit fazlardan elde edilen SUT verileri

Kolon türü	Alıkonulma zamanı (dk)	Pik alanı	Pik Yüksekliği	Kuyruklanma faktörü	USP Genişlik
Ascentis® Express fenil heksil (100×4,6 mm, 2,7µm)	3,84	30631189	455294	1,53	0,25
Ascentis® Express C ₁₈ (100×4,6 mm, 2,7µm)	4,44	2859677	434600	1,43	0,25
Ascentis® Express F ₅ (100×4,6 mm, 2,7µm)	4,73	2748839	435701	1,23	0,26
Chromolith® Performans RP-18e (100×4,6 mm)	5,36	3071014	315193	1,53	0,36
Chromolith® High Resolution RP-18e (100×4,6 mm)	5,46	2026313	227225	1,34	0,32
Chromolith® Performans RP-18e (100×2 mm)	1,16	1751577	316352	1,70	0,22

Yukarıda her iki kolon türünün kendi içinde avantajları ortaya konulmuş olup deneyisel olarak denenmiştir. Çalışmada kolon seçimi bozunma ürünleri varlığında yapılmış olup en kompleks kromatograma sahip olan ortam oksidatif bozunma koşullarının olduğu gözlenmiştir. Ancak bu ortamda bile FLB pikinin ayrılmasında herhangi bir zorluk çıkartacak bozunma ürünü tespit edilmemiştir. Bu nedenle

değerlendirilen 6 çeşit kolon türünün kıyaslamaları asetonitril:su (60:40, %h/h) koşullarında ve 0,5 mL/dk akış hızında kütle dedektöründe FLB analizi ile hesaplanan SUT parametrelerine göre yapılmış elde edilen veriler Tablo 5.1’de verilmiştir.



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

Elde edilen verilere kütle dedektöründe FLB analizi ile alınmış ve bunlara göre sabit fazlar monolitik ve tanecikli dolgu maddelerine göre iki kısımda değerlendirilebilir. Monolitik yapıdaki aynı boyuta sahip performans ve yüksek rezolüsyon model kolonlara bakıldığında alıkonulma zamanları arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen kuyruklanma faktörü, pik alan ve yüksekliklerindeki fark dikkat çekicidir. High resolution modelde kuyruklanma faktörü düşük olmasına rağmen pik alan ve yüksekliğindeki aynı derişime sahip FLB için daha düşük elde edilmiştir. Daha ince olan monolitik kolonda ise FLB çok erken elüsyon edilirken kuyruklanma oldukça fazladır. Genelde ise kolonda elüentlerin tutunma zamanı arttıkça kuyruklanma faktörünün arttığı gözlenir. Bu sonuçlarda görülüyor ki 2 mm iç çapa sahip monolitik kolondaki elüent etkileşimleri kromatografik ayırım sağlayacak yeterlilikte değildir. Diğer taraftan high

resolution 4 mm iç çapa sahip olan kolonda ise FLB pik alanı daha düşük çıkması nedeniyle kuyruklanma faktörü fazlalığı göz ardı edilmiştir. Aslında 4 mm her iki monolitik kolonda karbon yükleme ~%18 civarında ve benzer teknik özelliklere sahip olmasına rağmen high resolution, performans modelinin bir üst serisidir. Öte yandan değinmekte yarar vardır ki monolitik kolonlar kromatografik ayırma partiküllü kolonlara göre daha rijit ve tahmin edilebilir performans gösterirler. Ayırma başarıları hareketli fazla pek değişmez. Bu özellikleri ile metot sağlamlığı ve yüksek tekrarlanabilirlik ile avantaj ayırma etkinliğinde hareketli faz desteğini pek sağlamamaları ile de dezavantajı beraberinde getirmektedir. Tanecik yapılı olan Ascentis® Express serisinden elde edilen sonuçlara bakıldığında ise FLB elüsyonu her bir farklı fonksiyonel gruba sahip kolon için oldukça farklı SUT verileri bulunmaktadır. En yüksek pik alanı ve düşük kuyruklanma faktörü F₅ fonksiyonel grubu ile elde edilmesine rağmen alıkonulma süresi de diğer kolonlara göre en fazla olanıdır. FLB yapısında serbest fenil grupları, polar triflorometil içeren apolar bir bileşiktir. Bu nedenle fenil hekzil fonksiyonel grubuna sahip kolonda aromatik ve delokalize elektronların etkileşimleri nedeniyle en hızlı elüsyona uğrar. C₁₈ fonksiyonel gruba sahip kolonda ise apolar etkileşimler daha baskın ve molekülün logP değerinin fazla olması nedeniyle elüsyon daha yavaştır. Ancak FLB yapısındaki triflorometil grubuyla F₅ kolonunda ayrıca polar etkileşimlere uğraması nedeniyle en geç elüsyonu görülür. Sonuç olarak yapılan sabit faz denemelerin de en yüksek pik alanı ve uygun hızda elüsyon sağladığı için Ascentis® Express fenil hekzil sabit faz olarak seçilmiştir. Ayrıca tüm kolon tiplerinde bu veriler için elde edilen kromatogramların kıyaslaması da Şekil 5.5’de verilmiştir.

Sıvı kromatografisi çalışmaları da metot geliştirme çalışmalarında sabit fazın seçimi yapıldıktan sonra ayrıntılı olarak hareketli faz seçimi çalışmalarına geçilmiştir. Kromatografik ayırma en önemli nokta kolon olmasına rağmen, oldukça küçük tanecik boyutuna ve gözeneğe sahip sabit faz teknolojisi ile hareketli faz değişkenlerinden şaşırtıcı sonuçlar elde edilebilmektedir. Yukarıda da değinildiği gibi özellikle partiküllü yapıda kolonlar kullanıldığında bu inceleme daha da gereklidir. Bu nedenle hareketli fazın bileşenlerinin türlerinde ve oranlarındaki değişikliklerin ayrıntılı olarak incelenmesinde yarar görülmüştür. Çalışmada organik faz olarak asetonitril ve metanol üzerinde durulmuştur. Metanolün yapısında H-bağı etkileşimleri ve viskozite nedeniyle oldukça yüksek basınç elde edilmesinden dolayı asetonitril seçilmiştir. Ayrıca FLB’nin zayıf asidik olması nedeniyle elüsyonu için tampon olarak amonyum format ve asetat

tamponları ile iyonlaşmasının kontrolü sağlanmaya çalışılmıştır. Amonyum format konsantrasyonu arttıkça iyonlaşmada arttırdığı için FLB pik alanının arttığı gözlenmiştir. Ancak bu artış kütle dedektörüne önerilen sınırlar içinde bırakılarak 20 mM olarak seçilmiştir. Aynı derişime sahip yani 20 mM amonyum format (pH 6,1) ile 20 mM amonyum asetat (pH 5,1) kıyaslandığında ise pik alanında ~10 kat artış gözleendiği için amonyum format tercih edilmiştir. Ayrıca 0,5 mL/dk akış hızı ve 1 µL enjeksiyon hacmi de en uygun koşul olarak tespit edilmiştir.

HPLC çalışmalarında ise LC-MS/MS metot optimizasyon denemelerinde sabit faz türü ayrıntılı olarak incelendiği için tekrar incelenmemiş aynı kolon ile devam edilmiştir. Ancak hareketli fazın bileşeni, yüzdesi ve akış hızı ise ayrıntılı olarak bozunma ürünleri varlığında optimize edilmiştir. Bozunma ürünü sadece oksidatif ortam koşullarında elde edildiği için HPLC metot optimizasyonu bu koşullar altında yapılmıştır. Buna göre hareketli fazın organik faz bileşeni yukarıda bahsedilen benzer basınç sorunları nedeniyle asetonitril olarak seçilmiştir. Tampon seçimi için ise yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı kütle dedektöründeki gibi amonyum format ve amonyum asetat çeşitli derişimlerde ve pH'larda denenmiş ve SUT parametreleri hesaplanmıştır. Buna göre alıkonulma zamanı ve pik yüksekliğinin pH ve tampon derişiminden fazla etkilendiği pik alanının ise aynı kaldığı görülmüştür. Bu etkilenme amonyum formatın her 10 mM derişiminde ya da 1 birim pH artışında alıkonulma zamanında ~0,6 dk ve pik yüksekliğinde ise ~2000 Abs olmaktadır. Ancak amonyum asetatın derişim ve pH değışimlerin de ise zamanında ~0,07 dk ve pik yüksekliğinde ise ~1000 Abs olmaktadır. Sonuç olarak kütle dedektöründen farklı olarak SUT parametlerinin en uygun olduğu ve değışimine direncin daha iyi olduğu amonyum asetat 10 mM (pH 5,1) olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen ön çalışmalardan sonra metot geçerliliği çalışmalarının ilk adımı olan SUT parametreleri her üç cihaz için USP metoduna göre hesaplanmıştır. Elde edilen SUT analiz sonuçları Tablo 5.2'de verilmiştir.

Tablo 5.2. *FLB analizi için elde edilen SUT verileri*

Parametre	Hesaplanan Değer			Tavsiye Edilen Değer
	HPLC	LC-PDA	LC-MS\MS	
Alıkonulma zamanı (dk)±GA*	5,90±0,006	6,35±0,017	3,83±0,0071	-
Alıkonulma zamanı için %BSS	0,13	0,34	0,19	BSS ≤ %1
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0,28	0,78	0,13	BSS ≤ %1
Alıkonulma zamanı için enjeksiyon kesinliği %BSS (n=6)	0,006	0,010	0,012	BSS ≤ %1
Kuyruklanma faktörü (T)	1,13	1,13	1,51	$T \leq 2$
Kapasite faktörü (k)	2,45	2,47	-	$2 < k < 10$
Teorik tabaka sayısı (N)	15688	15255	9267	$N > 2000$
USP Genişlik	0,21	0,21	0,159	≤ 1
HETP (USP)	11,99	9,85	16,20	-

*%95 güven seviyesinde

5.5. Kütle Dedektöründe FLB İyonlaşma Karakteristiği

Çalışmada FLB analizi için metot geliştirilen diğer bir sıvı kromatografisi türü ise LC-MS/MS tekniğidir. Sistem günümüzde nispeten daha pahalı olması, kullanılan çözücü ve sarf malzemelerin yüksek saflık gerektirmesi gibi dezavantajları olsa da seçilen kütleye özgü sinyal yeteneği, düşük LOD ve LOQ gibi avantajları sayesinde vazgeçilmezdir. Ayrıca matris etkilerinin bozucu etkileri giderildiği takdirde sistem analizcilerin çalışma alanının çok büyük bir kısmını kapsayacaktır.

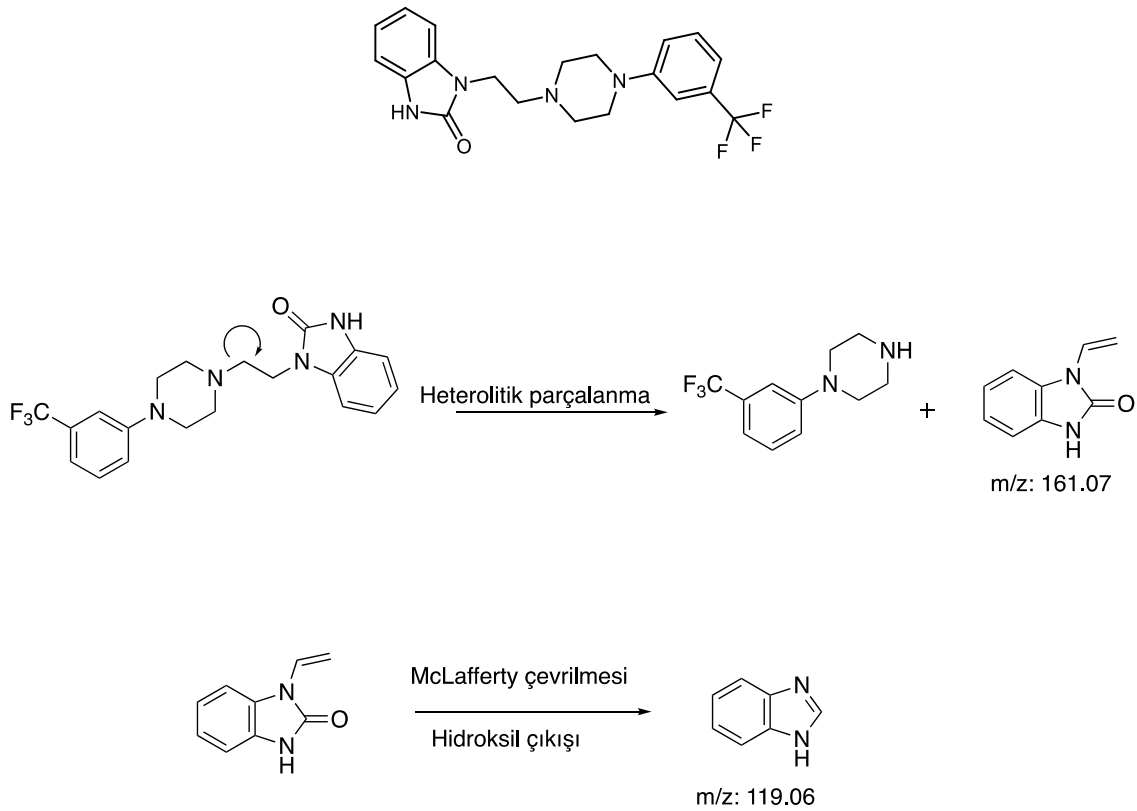
Kütle dedektöründe FLB analizi için daha yüksek seçicilik sunması nedeniyle tandem (MS/MS) tekniği tercih edilmiştir. Bu amaçla FLB 1 µg/mL derişimde metanolde hazırlanmış ve hangi iyonizasyona daha yatkın olduğu belirlenmiştir. Bileşik yapısındaki piperazin ve benzimidazol yapıları nedeniyle pozitif iyonlaşma beklenmiştir. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile çoklu reaksiyon görüntüleme pozitif modda daha yüksek şiddette sinyal elde edilmiştir. FLB çoklu reaksiyon izleme koşullarında elde edilen yavru iyonlar ve uygulanan enerjiler Tablo 5.3’de verilmiştir. Her bir iyon için tutma süresi 100 ms olarak seçilmiştir.

Tablo 5.3. FLB’nin pozitif modda çoklu reaksiyon izlemede ESI koşulları

Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
FLB	391,40	161,10	-19,0	-31,0	-16,0
		119,10	-27,0	-52,0	-21,0

Tandem bağlı kütle dedektörlerinde hedef molekülün parçalanmasında temelde McLafferty yarışı, yük göçü ve yük tutma olmak üzere üç tip mekanizma söz konusudur. Amerikalı kimyager Fred W. McLafferty, karbonil bileşikleri üzerinde gama pozisyonunda bir hidrojen bulunduğunda, bu karbonil bileşiklerinin, karbonilin nötr bir alken ve radikal katyona dönüştüğü spesifik bir yeniden düzenlemeye tabi tutulduğunu fark etmiştir ve bu McLafferty düzenlemesi olarak bilinir [51]. Bu düzenleme aslında molekül içinde yeniden kararlı hale gelme yarışıdır ve özellikle karbonil grubu içeren nispeten büyük moleküllü yapıların kütle dedektörü parçalanmalarında sıklıkla karşılaşılır. Ancak protonlanmış veya protonu giderilmiş moleküllerin (sırasıyla pozitif ve negatif modlar) parçalanması ise daha çok iki ana reaksiyon grubuna ayrılabilir: yük tutma parçalanmaları ve yük-göç parçalanmaları. Yük tutma parçalanmaları öncü iyonuna

özdeş yük bulunan yavru iyonların oluşması ile sonuçlanan reaksiyonlardır. Genellikle yükün bulunduğu yerden fiziksel olarak uzak ve mekanizmaya doğrudan katılımı olmayan yerde meydana gelen uzak alan parçalanmalarıdır. Diğer bir ifade ile reaksiyona etkisi ya çok az ya da hiç yoktur. Spesifik özelliği ise yükün bulunduğu yerde sabit olması ve reaksiyon bölgesine taşınmamasıdır. Yük göçü parçalanmaları ise başlangıçta nötr olarak bulunan bölgenin kaybıdır. Bu kayıp genellikle eliminasyon reaksiyonu ile olur ve ayrılan grubun stabilitesi reaksiyonun sonlanması için önemli bir parametredir [52].



Şekil 5.6. FLB için ana iyon ve baskın parçalanma yolları.

FLB yapısında piperazin ve benzimidazolon içeren flor, oksijen ve azot hetero atomlarına sahip bir organik moleküldür. Yapının moleküler ağırlığı 390 olup pozitif modda iyonlaşarak m/z değeri 391 olarak tespit edilmiştir. Ana iyonun en düşük enerjili parçalanmasının kararsızlığı en fazla olan piperazin ile imidazol gruplarının arasında yük göçü ile parçalanmadır. Bu parçalanma basit indüktif yarılmadır ve birbirine β konumunda olan iki grubun N atomları sayesinde kolaylıkla parçalanın iyonların kararlılığı sağlanır. Böylece m/z 161,07 elde edilir. Diğer bir parçalanma ise daha yüksek

enerjili olan ve yavru iyonun stabilitesinin birkaç adımda yarışmalı bir şekilde sağlanabildiği McLafferty yeniden düzenlenmesidir. Parçalanma ilk kısımda elde edilen yavru iyon basamağının devamı şeklindedir. McLafferty çevrilmesiyle ilk olarak eten çıkışı olmaktadır. Çevrilme sonrasında geride kalan benzimidazon ise 2-hidroksibenzimidazole çevrilmektedir. Buradan da ikinci konumdaki hidroksil çıkışı ile benzimidazol bileşiği elde edilmektedir. [39]. Oluşan yavru iyon m/z 119,06 sahiptir. m/z 119, yavru iyon oluşumu daha zor olduğu için spektrumda yüzdesi m/z 161,07 göre 10 kat daha düşüktür. Önerilen söz konusu ana iyon parçalanma mekanizmaları Şekil 5.6’da ayrıntılı olarak verilmiştir. FLB’nin elde edilen kütle spektrumuna göre yapısında yer alan diğer bir hetero grup ise triflorometil olup yapı çok kararlı ve bağlı olduğu fenil grubu ile elektronegativite desteklendiği için herhangi bir parçalanma reaksiyonuna maruz kalmadığı tahmin edilmektedir.

5.6. LCMS-IT-TOF Metot Geliştirme

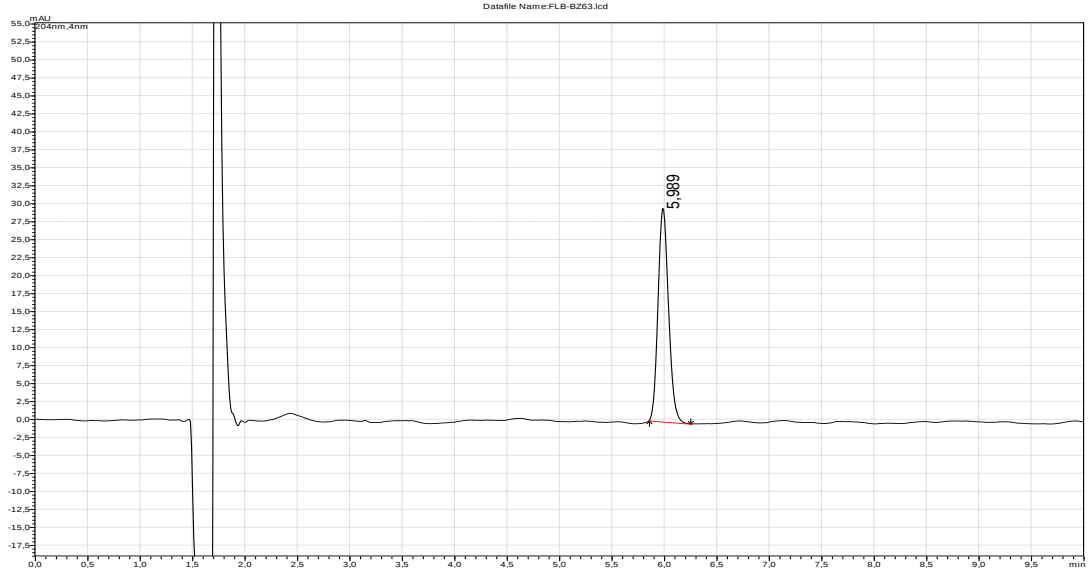
Günümüze gelene kadar moleküllerin kalitatif analizinde kullanılan iki yöntem mevcuttu: NMR ve IR spektroskopisi. Ancak gelişen kütle spektroskopisi teknolojisi bilim camiasına yeni tandem kütle analizörlerini sunarak İyon tuzaklı (IT)- uçuş zamanlı (TOF) kütle spektrometresini kullanıma almıştır. Mevcut cihaz sunduğu yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) ile 0,0000 ölçeğinde kütle vermektedir. Ayrıca MS^n tekniği ile seçilen yavru iyonlar dedektör tarafından tutulup daha küçük yavru iyonlar parçalanarak büyük moleküllerin açık formülleri yüksek doğrulukta ortaya konulabilmektedir. Bu kalitatif analiz için devrim niteliğinde yenilik anlamına gelir. Böylelikle kalitatif analiz saflaştırma ya da mg seviyesinde numune gerektiren geleneksel spektroskopik yöntemlerin etkisinden kurtulmuştur. Elbette ki geleneksel yöntemlerin yapı tayinindeki kesinlikleri yadsınamazdır.

Söz konusu çalışmada HPLC analizleri FLB bozunma ürünleri varlığında yapılmış ve oksidatif koşullarda bir adet bozunma ürünü tespit edilmiştir. Elde edilen bozunma ürünü HPLC koşullarının birebir LCMS-IT-TOF sistemine taşınması ile tespit edilmiş ve karakterize edilmiştir.

5.6.1. Bozunma davranışları

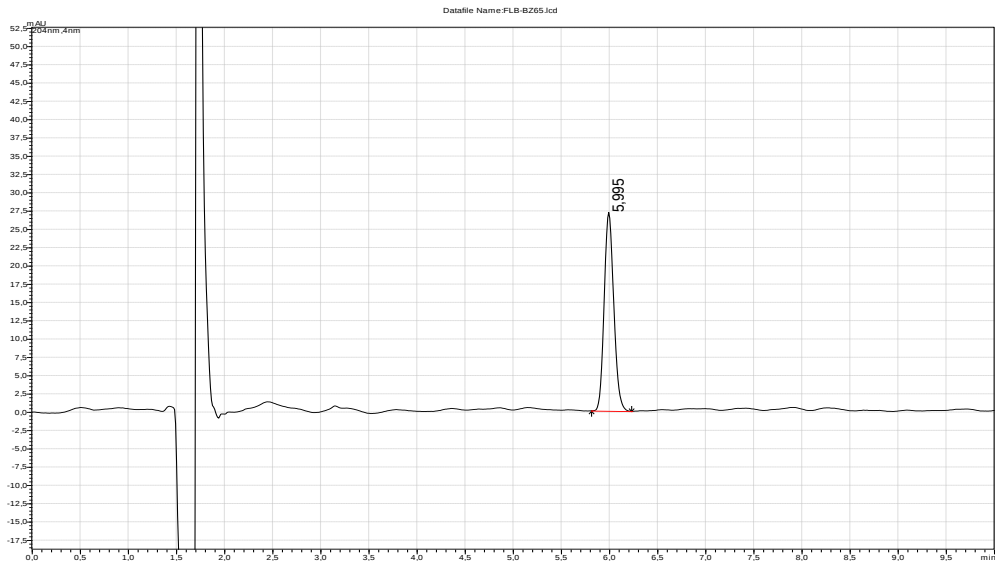
FLB’nin bozunma davranışlarının incelenmesi için çeşitli ortamlarda çözeltileri hazırlanmış ve bozunma sürecini hızlandırmak amacıyla aynı zamanda 60 °C’de

kontrollü ısı uygulaması yapılmıştır. Etken maddenin sadece sıcaklık uygulaması yapılan çözeltisinin elde edilen kromatogramı Şekil 5.7 incelendiğinde maddede herhangi bir bozunma gözlenmemiştir.



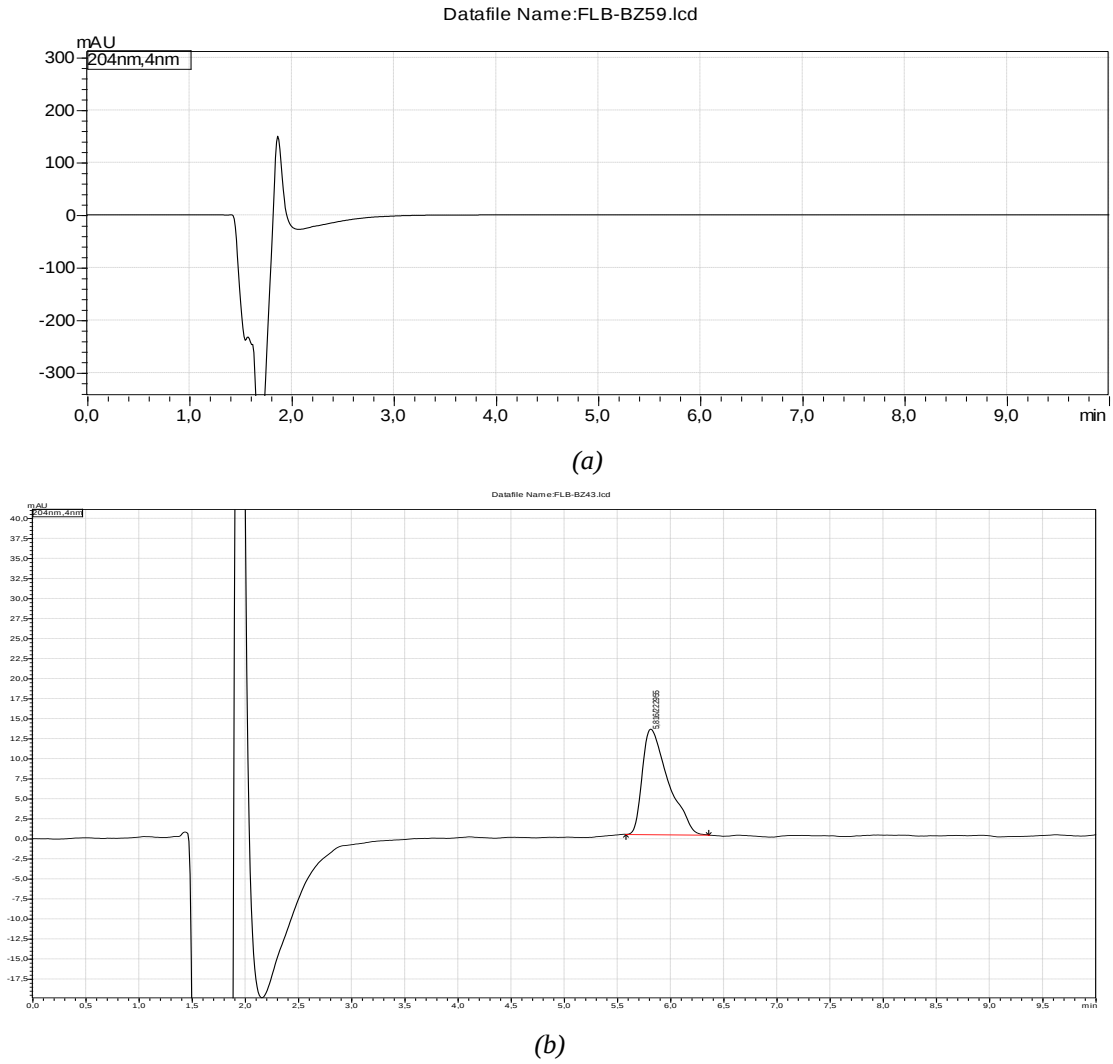
Şekil 5.7. FLB Sıcaklık uygulandığında elde edilen kromatogramı

FLB ışığa olan hassasiyetinin incelenmesi amacıyla metanolde hazırlanan çözeltisi 24 saat UV ışığına maruz bırakılmış ve HPLC ile analizi yapıldığında oldukça kararlı olduğu görülmüş herhangi bir bozunma ürünü gözlenmemiştir. Elde edilen söz konusu kromatogram Şekil 5.8’de verildiği gibidir.



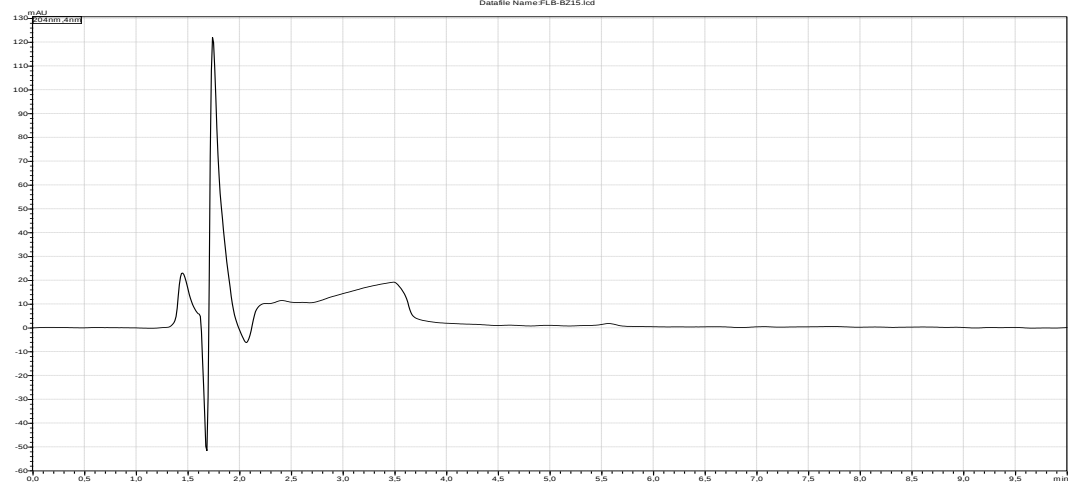
Şekil 5.8. UV ışığında elde edilen FLB kromatogramı

Etken maddenin zorlu bozma koşullarından asidik strese maruziyeti sonucu HPLC ile elde edilen kromatogramı (Şekil 5.9 a-b) incelendiğinde dayanıklılığı görülmektedir. Yapı herhangi bir bozunma ürünü vermemiştir.

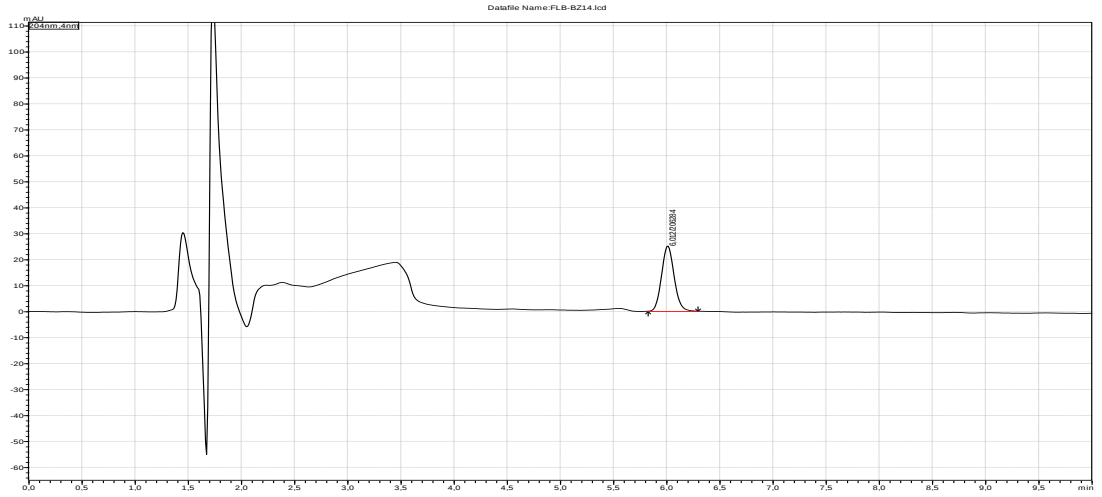


Şekil 5.9. Asidik koşullarda kör çözelti (a) ve FLB çözeltisi (b) ile elde edilen kromatogram

Bileşiği içermeyen alkali ortamda HPLC cihazı ile elde edilen kromatogram (Şekil 5.10a) ve bileşiğin alkali ortama maruz kalmış kromatogramı (Şekil 5.10b) ayrıntılı olarak incelenmiş, FLB'nin oldukça dayanıklı olduğu ve herhangi bir ayrışma reaksiyonuna girmediği görülmüştür.



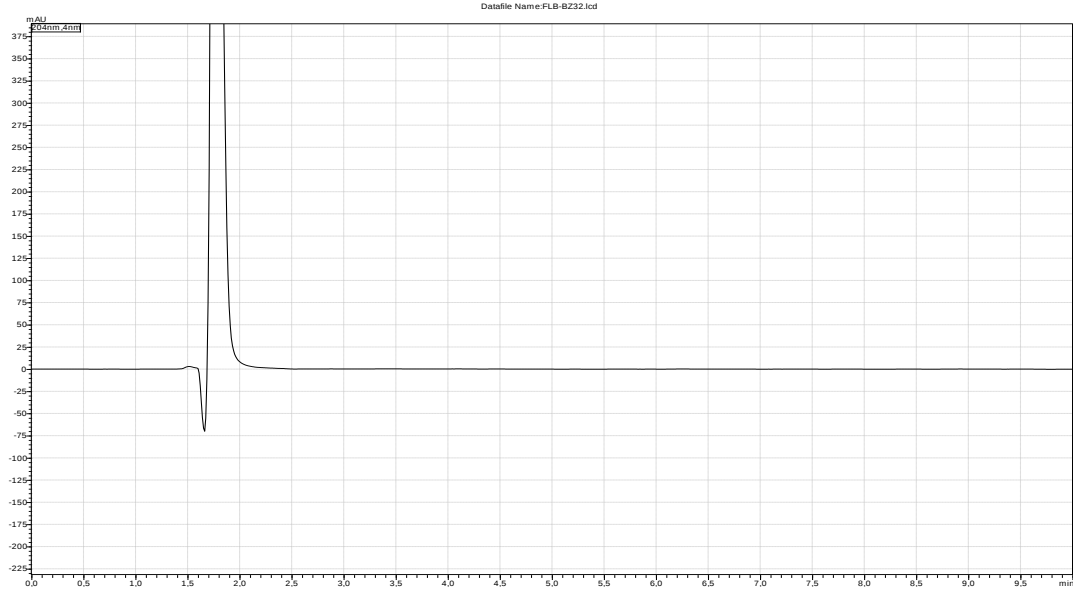
(a)



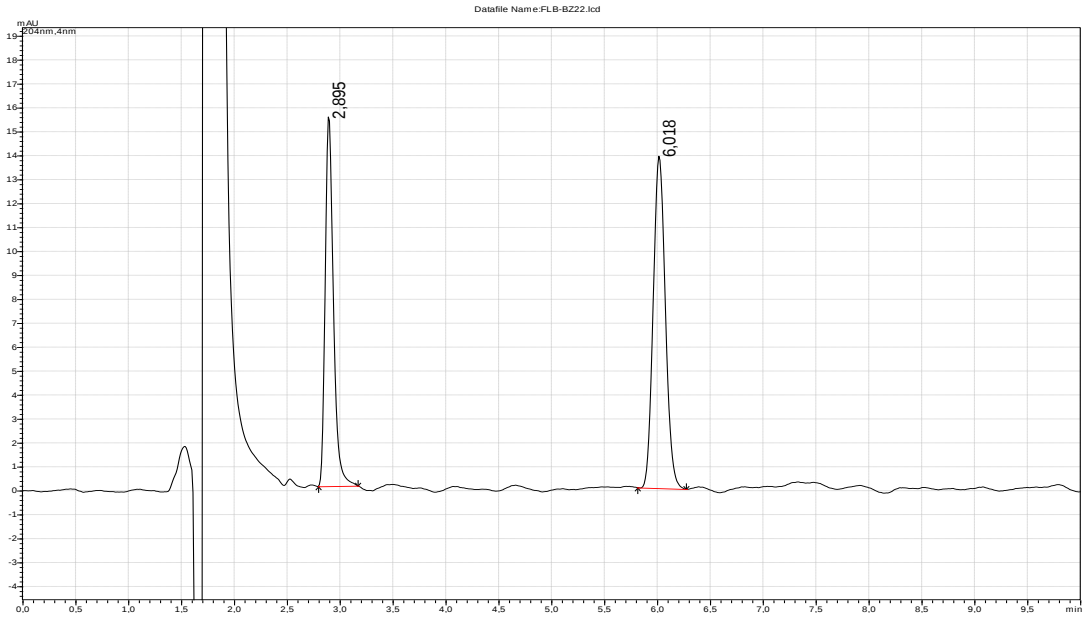
(b)

Şekil 5.10. Alkali koşulda kör çözelti (a) ve FLB kromatogramı (b)

Yapılan zorlu bozma koşulları analizinde FLB'nin oksidasyon koşullarında oldukça dayanıksız olduğu görülmüştür. Çalışmada maddenin sıcaklık uygulamasında herhangi bir reaksiyon vermeyip oksidasyon koşullarında ayrışması ise bu öngörüğü destekler niteliktedir. Dikkate değer bir nokta ise, FLB oda sıcaklığında oksidasyon koşullarında da aynı bozunma ürününe ayrışmıştır. Ancak oda sıcaklığında oksidatif koşullarda elde edilen bozunma ürünü miktarı sıcaklık uygulamasına göre yaklaşık 2 kat daha az olup, 2 saatlik maruziyet süresinde FLB ancak ~%20 oranında kaybı uğramıştır. Şekil 5.11a'da görülüşü gibi oksidasyon koşulların kör çözeltisinin kromatogramında herhangi bir pik gözlenemmiştir. Ancak Şekil 5.11b'deki etken maddenin 60 °C sıcaklık uygulanarak yapılan oksidatif ortamdaki zorlu bozma koşullarında maruziyetinden elde edilen kromatogramda bozunma ürünü açıkça görünmektedir.



(a)

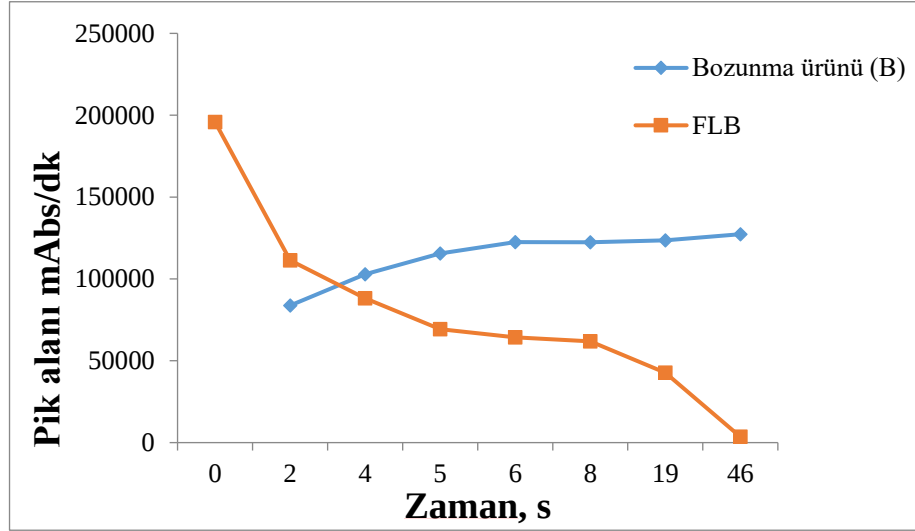


(b)

Şekil 5.11. Oksidasyon koşullarında kör (a) ve FLB çözeltisinden (b) elde edilen kromatogram

Oksidatif koşullarında elde edilen bozunma ürününün oluşum kinetiği ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Bu amaçla FLB oksidatif bozunma çözeltisinden ikişer saat zaman aralıklarında numune alınmış uygun seyreltme yapılarak HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramdan FLB ve bozunma ürününün pik alanlarının çözeltinin bozunma süresine göre değişimi Şekil 5.12’de verilmiştir. Bu grafiğe göre

FLB'nin oksidatif koşullarda 0-2 saat arasında %43,1'i ve 0-5 saat aralığında ise %64,6'sı bozunmuştur. Ardından FLB'nin bozunma hızı azalmaya başlamış ve 46 saatin sonunda ise ortamda sadece %1,8 oranında FLB kalmıştır.



Şekil 5.12. FLB/B bozunma kinetiği

FLB zorlu bozma çalışmalarında oksidatif koşullarda bozunma ürünü tespit edildiği için yukarıda bahsedildiği gibi HPLC metot koşulları tam olarak LCMS-IT-TOF cihazına transfer edilerek yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) ile kalitatif tayin yapılmıştır. “Yüksek çözünürlük” ve “yüksek kütle doğruluğu” terimleri, sırası ile >20.000 tam genişlikte yarı maksimum ve sırasıyla 5 ppm'in altındaki kütle doğruluğu elde edildiğinde kullanılır. Çözme gücü bir kütle spektrometresinin iki farklı m/z değeri olan iyonları ayırma yeteneğidir. Tam genişlikte yarı maksimum (FWHM) tanımı FT-ICR, Orbitrap, quadrapol, iyon tuzağı ve uçuş zamanlı analizörlere uygulanır. Bitişik tepeleri birbirinden ayırmak ve ölçüme yalnızca bir tür iyonun katkıda bulunmasını sağlamak için yüksek MS çözme gücü gereklidir. İyi hassasiyetle yüksek kütle doğruluğu elde etmek için çeşitli anahtar faktörler optimize edilmeli ve dikkate alınmalıdır. Bu faktörler arasında pik şekli, iyon bolluğu, çözme gücü ve kalibrasyon bulunmaktadır. Doğru kütle ölçümü elde etmek için pik sentroidin m/z ölçeğinde uygun şekilde atanması gerekir ve bu nedenle simetrik pikler gereklidir. Tepe şeklini etkileyen faktörlerden biri iyon bolluğudur, bu nedenle çok yoğun bir sinyal dedektörü doyurabilir; sinyal yeterince yoğun değilse zayıf tepe şekli oluşabilir. Matris ve ortak elüt analitlerinin karışmasını önlemek için iyon kromatogramlarının ekstraksiyonuna yeterince dar bir kütle penceresi

uygulanmalıdır. Bununla birlikte, yüksek çözünürlük doğru kütle ölçümü için bir ön koşul değildir ve uygun koşullar ve yazılımla daha önce bu amaç için uygun olmadığı düşünülen aletlerle yüksek kütle doğruluğu sağlanabilir (örneğin üçlü dörtlü MS-MS). Yüksek çözülme gücü, tepe sentroidin atamasını geliştiren ve belirsizliği azaltan daha dar tepeler üretir. m/z ölçeğinin kalibrasyonu, iyi kütle doğruluğu ve güvenilir kütle spektrumları elde etmek için hayati bir adımdır. Analitlerin tüm m/z aralığı, en azından analizden önce harici kalibrasyon ile kaplanmalıdır. Ancak, çoğu durumda optimum kütle doğruluğunu elde etmek için dahili kalibrasyon gereklidir. Doğru kütle ölçümü daha popüler olmasına rağmen günümüzde halen bu terminoloji standartlaştırılmamıştır [53].

Uçuş zamanlı analizörlerin doğru kütle ölçümlerine sağladığı avantajlar, harici bir sürekli kaynaktan, örneğin elektrosprey ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kapı iyonlarında yüksek verimliliğinin, aynı anda hızın düzeltilmesi, uzamsal dağılım ve geliştirilmiş kütle çözme gücüdür. Kütle doğruluğunu etkileyen en önemli faktörler iyon bolluğu, stabilite ve kütle ölçeği kalibrasyonudur. Modern TOF analizörleriyle elde edilen kütle doğruluğu en iyi ihtimalle 1-2 ppm'in altındadır. Dahası 1 ppm'in altındaki kütle doğruluğunun rutin olarak elde edilebilen çalışmalarda mevcuttur. Ticari tezgâh üstü cihazlarla elde edilebilen standart çözümleme gücü 10.000-20.000'dir (tam genişlikte yarı maksimum). Son zamanlarda yeni enstrümantal tasarımlar 40.000-50.000 arasında yüksek çözme gücü sağlamıştır. Sıvı kromatografisinde gelişen kolon teknolojisi ile birleştirilmesi daha dar kromatografik zirvelerden ve artan kromatografik çözünürlükten kaynaklanan ek seçicilik, hassasiyet ve hız nedeniyle ilgi uyandırmıştır [54].

Söz konusu sistem kütle spektral enstrümantasyon ve iyonizasyon tekniklerine ek olarak, doğru kütle ölçümleri, izotop-bolluk ölçümleri ve izotopik örüntü hesaplamaları, elementel kompozisyon belirleme, yüksek çözünürlüklü MS/MS verilerinden formül hesaplama algoritmaları, kütle spektral kütüphane araştırması, kütle spektrumlarının yorumlanması, tirelenmiş tekniklere yaklaşımlar ve kütle spektrumlarının elektronik verilerinin paylaşılması ve verilere bağlı kazanımları kapsar. Doğru kütle ölçümleri sırasında elektron kütlelerinin dahil edilmesinin veya hariç tutulmasının önemi otuz yıl önce tartışılmıştır ve elektron kütlelerinin MS-IT-TOF kütle doğruluğu üzerindeki etkisi son zamanlarda daha fazla vurgulanmıştır. Elektron kütleleri hesaplamalara dahil edilmezse, 3 ppm'e kadar bir kütle hatası bildirilmiştir. Bu hesaplama hatasından kaynaklanan kütle hatası, m/z 100'de 5 ppm kadar yüksek olabilir. Tek başına çok yüksek kütle doğruluğu (<1 ppm) bile, karmaşık elementel kompozisyonlara sahip ihtimalleri

elemek için yeterli değildir. İzotopik bolluk kalıplarının tek bir kısıtlama olarak kullanılması, yanlış ihtimallerin %95'inden fazlasını ortadan kaldırır. Bu dikey filtre binlerce ihtimali az sayıda moleküler formüle yoğunlaştırabilir. İyon türlerinin tamamen çözüldüğü varsayılarak, 3 ppm kütle doğruluğu ve izotopik bolluk paternleri için %2 hata yapabilen bir kütle spektrometresinin, 1 ppm'den az kütle doğruluğuna ve hatta 0,1 ppm kütle doğruluğuna sahip varsayımsal kütle spektrometrelerinden daha iyi performans gösterdiği hesaplanmıştır. Moleküler formüllerin hesaplanmasında izotop bilgilerini içermez. Temel bileşimi belirledikten sonra, en olası ve kimyasal olarak doğru moleküler formülleri seçmek için kurallar geliştirilmelidir. Bu amaçla ya yanlış olan ya da çok yüksek ya da düşük sayıda element içeren moleküler formüllerin otomatik olarak hariç tutulmasını sağlayan yedi sezgisel kural geliştirilmiştir. Özel hedef veri tabanları kullanıldığında, örneğin ilaçlar, bozunma ürünleri, metabolitler veya toksik maddeler için doğru tanımlama %98 kadar yüksek olabilir. Bu veri tabanlarına dahil edilmeyen yeni formüller için, doğru elementel kompozisyonun %65 olasılıkla ilk üç eşleme arasında olduğu bulunmuştur [54, 55].

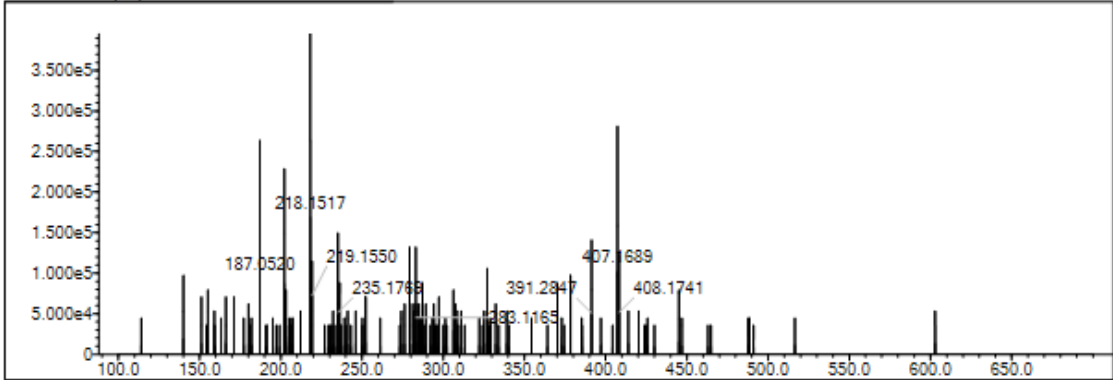
Oksidatif zorlu bozma koşullarının LCMS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumuna dayanarak, 406,41 g/mol moleküler ağırlığa sahip yeni bozunma ürünü m/z 407,1689 ile ana iyon ürünü olarak CID parçalanması ile tanımlanmıştır. Elde edilen kütle atlası Şekil 5.13'de verilmiştir.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\laysun\FLB\FLB-BZ17.lod

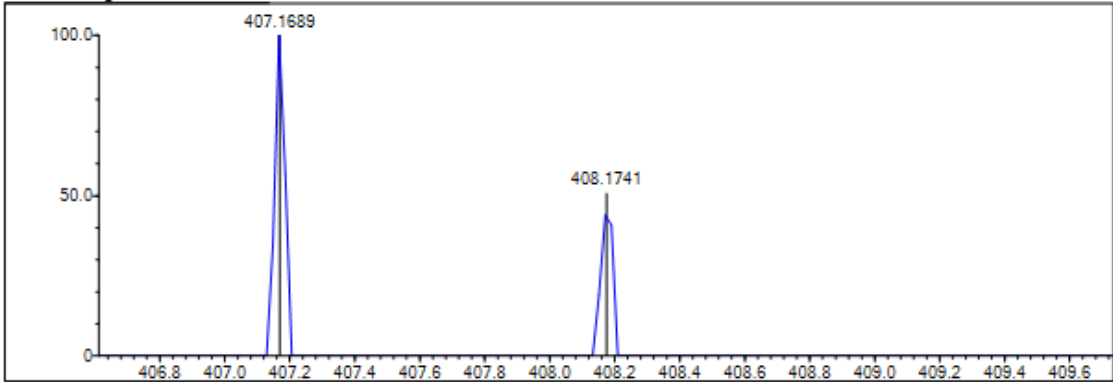
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	2	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	9	35	F	1	3	3	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	4	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5 DBE Range: 5.0 - 16.0 Electron Ions: both
 HC Ratio: unlimited Apply N Rule: yes Use MSn Info: yes
 Max Isotopes: 3 Isotope RI (%): 1.00 Isotope Res: 9000
 MSn Iso RI (%): 10.00 MSn Logic Mode: AND Max Results: 100

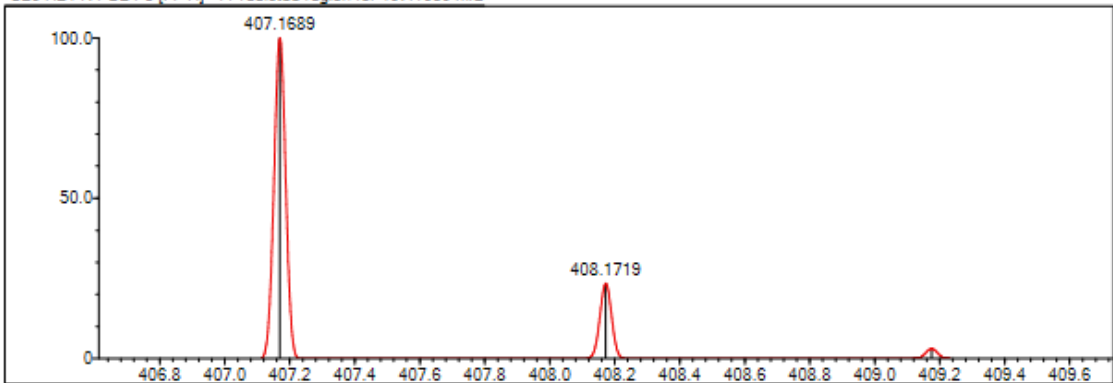
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 3.440 Scan#: 517



Measured region for 407.1689 m/z

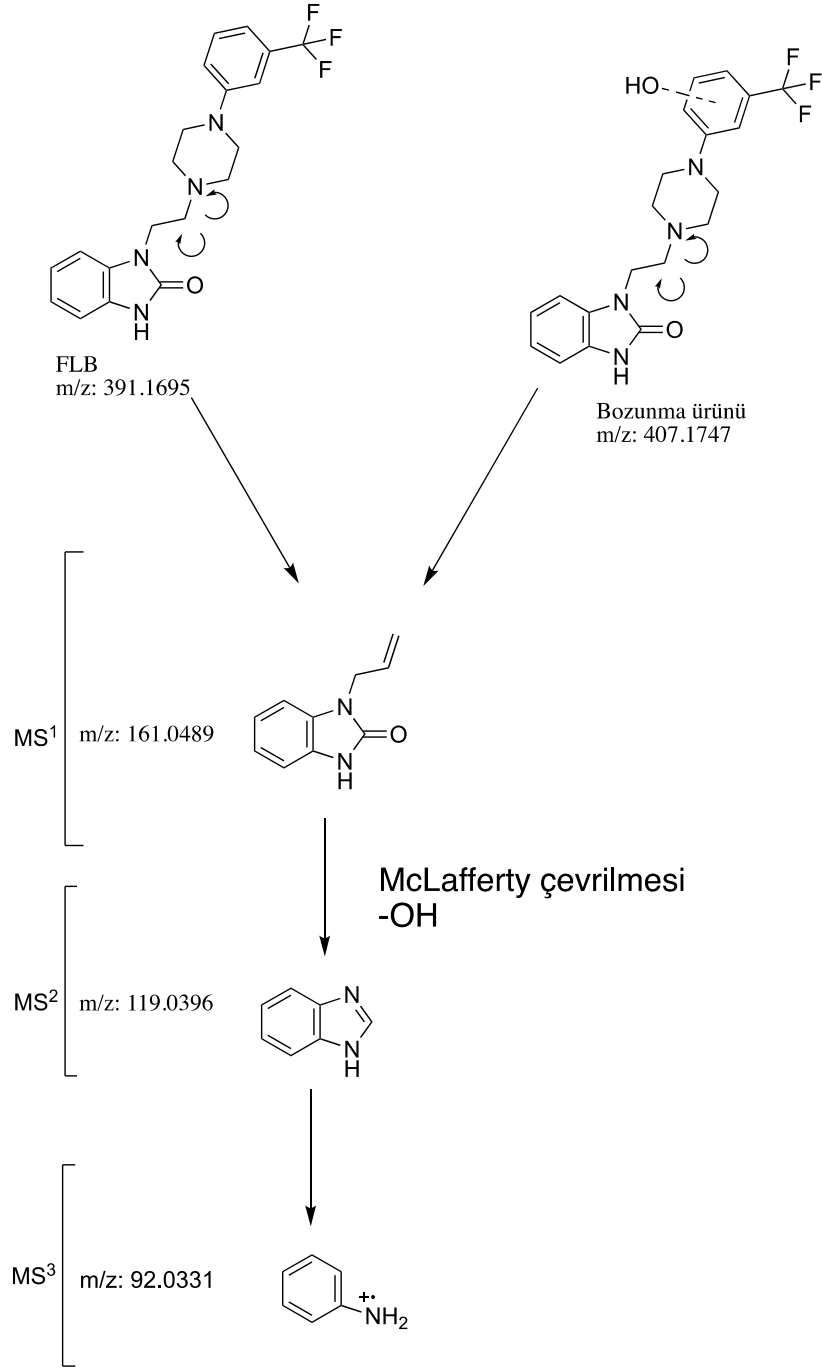


C20 H21 N4 O2 F3 [M+H]⁺: Predicted region for 407.1689 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	42.86	C20 H21 N4 O2 F3	[M+H] ⁺	407.1689	407.1689	-0.0	0.00	42.86	11.0

Şekil 5.13. Yeni bozunma ürünü için kütle atlası



Şekil 5.14. Yeni bozunma ürününün bozunma yolağı ve MSⁿ karakterizasyonu

Temel bileşimin tayininde doğru kütle iyonları (MSⁿ) kullanılabilir. Ürün iyonunun temel bileşiminin, düşük molekül fragmanlarından mümkün olmayan moleküler formülleri hariç tutarak tüm molekülün uygulanabilir temel bileşimlerini üretmek için birleştirilip birleştirilemeyeceğini analiz etmek için bir algoritma geliştirilmiştir. Bir bileşiğin yapısına dayalı fragmanlar oluşturmak için genel fragmentasyon kurallarını kullanan yazılım ürünleri fragmenter kullanarak HRMS ilaç taraması ile içindeki

karakteristik yavru iyonlar tanımlanır. Çalışma, büyük bir tam kütle veri tabanında ön standart tanımlama için, referans standartlara sahip olmaya gerek kalmayan pratik bir yaklaşımdır. Yapılan çeşitli kütle spektrometresinin metabolit ve safsızlık ürünlerini tarama özelliği; tespit, yapısal bilgiler, zaman tüketimi ve veri işleme dikkate alınarak yapılan karşılaştırmalarda MS-IT-TOF'in bu tip bileşiklerin tespitinde tek yaklaşım olduğu ve oluşum profillerini aydınlatmak içinse en uygun araç olduğu ve hibrit orbitrap teknolojisi ile de en düşük zaman tüketimine yol açtığı gösterilmiştir. Ancak; hibrit orbitrap yaklaşımı daha düşük algılama hassasiyeti ve yanlış negatiflerden muzdariptir; yavaş veri toplama nedeniyle daha yavaş kromatografi gerektirir. Üçlü dörtlü ve hibrit doğrusal iyon tuzağı MS³ ya da MS⁴ en yüksek miktarda yavru iyonu verisi sağlar, ancak birçok yanlış negatif ve özellikle MS³ ya da MS⁴ ile çok yüksek toplam zaman tüketiminden muzdariptir. Birim çözünürlük kütle spektrometrelerinde, metilasyon, asetilasyon ve glukuronidasyon dahil olmak üzere yaygın nötr kayıpları izlemek ve tanımlamak için kullanılabilir. Ortak biyotransformasyonlar ve buna karşılık gelen doğru kütleler çeşitli kaynaklarda gruplandırılmıştır. HRMS'de, kütle kusur filtresi kuralı uygulanabilir. Nominal kütle kayması ve birkaç mDa genişliğinde kütle kusur filtresinin kullanılmasıyla, matristen gelen sinyal, öngörülen ve deneysel MS/MS verileri ile yapıya dayalı mekanizma tahminindeki ilgili analitlerden ayrılabilir [56].

Buna göre oksidatif zorlu bozma koşullarında karakterize edilen bozunma ürününe ait tahmin edilen oluşum mekanizması ve yapılan MSⁿ karakterizasyonu Şekil 5.14'de verilmiştir. LCMS-IT-TOF'da bozunma ürünü incelendiğinde yapıdaki bir oksijenlik kütle fazlalığı dikkat çekicidir. Cihazın önerdiği kapalı formül beklenen hidroksilli ürünü karşılamaktadır. FLB peroksit varlığında, aromatik halka üzerinden hidroksilasyon olması genel organik kimya bilgisi ile beklenmektedir. Hidroksilasyonun muhtemel iki aromatik halkanın hangisinin üzerinden gerçekleştiğini tespit etmek için MSⁿ çalışması yapılmıştır. FLB standardı ve bozunma ürünü aynı şartlarda analiz edilmiştir. Buna göre her ikisinde de moleküler iyonlar ve bunlardan elde edilen yavru iyonlar üzerinde yapılan çalışmada maddenin olası parçalanma yolağı önerilmiştir. Parçalanma yolları bozunma ürünü ve etken madde için aynı olması sebebiyle hidroksilin triflorometilbenzen halkası üzerinde olduğunu tespit edilmiştir. MS¹'de piperazin azotu ile etilen karbonu arasındaki bağ heterolitik olarak kırılıp m/z 161 kütleli ürün elde edilmiştir. MS²'de McLafferty yeniden düzenlenmesi ve bir hidroksil çıkışı ile benzimidazol bileşiği m/z 119 kütlesi elde edilmiştir. Son olarak MS³'te ise halkanın açılması ile anilin bileşiği elde edilmiş ve

bozunma ürünü için tahmin edilen yapı desteklenmiştir. Böylece IUPAC adı 1-(2-(4-(3-hidroksi-5-(triflorometil)fenil)piperazin-1-il)etil)-1,3-dihidro-2H-benzo[d]imidazol-2-on ve kapalı formülü $C_{20}H_{21}F_3N_4O_2$ olan 0,00 ppm hata payı ile 407,1695 kütleli yeni bir bozunma ürünü olarak önerilmiştir. Önerilen bozunma ürünü hakkında literatüre bakıldığında FLB'nin aktivitesi tespit edildiğinde benzer aktiviteler gösterebileceği düşünülerek bileşiğin sentezlendiği ve patentinin alındığı bulunmuştur. Ancak bileşik FLB'nin bozunma ürünü olarak henüz kayıtlara geçmemiş olup tespiti ilk kez bu çalışmada yapılmıştır.

5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Geliştirilen her iki yöntemde analit derişimine karşı dedektörden elde edilen sinyaller hesaba katılmıştır. Kalibrasyon grafiği her bir standart çözelti derişimine karşılık gelen pik alanına göre oluşturulmuştur. Hem HPLC yöntemi hem de LC-MS/MS yönteminin tüm metot geçerliliği parametreleri tam olarak analiz edilmiştir. Ayrıca HPLC yöntemi laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla LC-PDA-MS/MS cihazına taşınmış ve gerekli tüm doğrulama parametreleri çalışılmıştır.

Her iki metodun hesaplanan doğrusallık ve kesinlik verileri Tablo 5.5'de verilmiştir. Metotların çalışma aralığı için inilebilecek en düşük FLB derişimleri hedeflenmiştir. HPLC yönteminde analitin sinyaline etki edebilecek muhtemel bozucu etkiler zorlu bozma koşullarında kromatografik ayrımın yapılması ve yöntemin optimizasyonu ile elimine edilmiştir. Ayrıca dedektörde pikin saflığı da 0,999887 olarak hesaplanıp mevcut piklerin sadece FLB'e ait olduğu tekrar kanıtlanmıştır. Böylece yöntemin spesifikliğı ve seçiciliğı sağlanmıştır.

Tablo 5.4. FLB için doğrusallık ve kesinlik verileri

Parametre	HPLC	LC-MS/MS
Doğrusal aralık	2,50-50,0 (µg/mL)	2,63-105,0 (ng/mL)
Eğim±SS^a (gün içi, n=8)	15279,9±84,33	21459,1±194,57
Kesim±SS^a (gün içi, n=8)	-4955,15±2315,8	18129,8±10487,4
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=8)	0,99982	0,99942
Teşhis sınırı	500 ng/mL	128 pg/mL
Tayin sınırı	1,50 µg/mL	384 pg/mL
Eğim±SH^b (günler arası, k=3, n=24)	15219,0±65,04	21343,48±514,79
Kesim±SH^b (günler arası, k=3, n=24)	-5510,0±1786,0	17221,34±27747,77
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k=3, n=24)	0,99960	0,985665
ANOVA	F(2,15)=1,437 P=0,268507 (P>0,05)	F(2,15)=0,554 P=0,585997 (P>0,05)
Tekrarlanabilirlik (gün içi, ortalama, n=6)	378364,97	1134121,67
Tekrarlanabilirlik (gün içi, SS^a, n=6)	370,42	15036,15
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c %, n=6)	%1,014	%1,33
Tekrarlanabilirlik (gün içi, OSH^d, n=6)	151,23	6138,48
Tekrarlanabilirlik (gün içi, GA^e, n=6)	296,401	12031,41
Tekrarlanabilirlik (günler arası, ortalama, n=18)	378578,90	1153115,58
Tekrarlanabilirlik (günler arası, SS^a, n=18)	765,66	33300,72
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c %, n=18)	2,09	2,89
Tekrarlanabilirlik (günler arası, OSH^d, n=18)	180,47	13594,96
Tekrarlanabilirlik (günler arası, GA^e, n=18)	353,72	26646,13
ANOVA	F (2,21)=0,000402 P=0,999598 (P>0,05)	F (2,24)=0,0899 P=0,914251 (P>0,05)

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

FLB analizi için optimize edilen LC-MS/MS ve HPLC yöntemlerinin doğrusallık ve kesinlik verilerinin hesaplanmasından sonra doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım deneyleri için elde hazırlanan Addyi[®] tablet formülasyonu çözeltisine standart ekleme metodu ile FLB ilavesi yapılmıştır. Çalışma 3 farklı konsantrasyonda 9 bağımsız analiz ile gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım deneylerinden elde edilen veriler Tablo 5.3’de sunulmuştur. Sonuçlara dikkatle göz gezdirildiğinde seyreltme, süzme gibi

işlemlerin yöntem doğruluğuna etkisinin kabul edilebilir sınırlar dahilinde olduğu görülmektedir.

Tablo 5.5. Geri kazanım verileri

				Kesinlik	Doğruluk	
	Eklenen	Bulunan	SS	BSS (%)	Geri kazanım	Hata (%)
	(µg/mL)	(µg/mL)±GA *			(%)	
HPLC	20,00	19, 15±0,12	0,11	0,57	96,10	-3,90
	25,00	25,10±0,42	0,37	1,47	98,91	-1,09
	30,00	29,86±0,15	0,13	0,44	99,64	-0,36
HPLC- 2	20,00	19,24±0,48	0,42	2,16	97,71	-2,29
	25,00	24,69±0,15	0,13	0,54	98,61	-1,39
	30,00	29,20±0,21	0,19	0,65	98,02	-1,98
	Eklenen	Bulunan	SS	BSS (%)	Geri kazanım	Hata (%)
	(ng/mL)	(ng/mL)±GA *			(%)	
LC- MS/MS	42,00	39,12±0,03	0,03	0,08	93,10	-6,90
	52,50	48,98±0,43	0,38	0,78	93,36	-6,64
	63,00	57,88±0,64	0,56	1,97	92,88	-7,12

*%95 Güven seviyesinde

Geliştirilen HPLC yöntemi, Shimadzu marka Nexera XR Serisi LC-PDAcihazı ile laboratuvarlar arası karşılaştırması yapılarak ara kesinlik çalışmaları ile teyit edilmiştir. Bu amaçla kalibrasyon çözeltileri aynı metot koşullarında LC-PDA sisteminde analizi yapılmış ve aralarında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.7'deki gibidir. Ayrıca HPLC metodunun doğruluk çalışmaları için hazırlanmış geri kazanım çözeltilerinin benzer şekilde LC-PDA sisteminde de analizleri yapılmıştır. LC-PDA sisteminde bulunan pik alanlarından FLB derişimi ise HPLC metodunun lineer regresyon denkleminde hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon seviyesi için bulunan iki cihazın derişim sonuçlarının varyans analizi ANOVA tek etken ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar çalışmanın metot geliştirici tarafından yapılması nedeniyle ara varyansı (S_1) değeri yerine tekrarlanabilirlik varyansı (S_r) olarak verilmiştir. Üç konsantrasyon seviyesi için üç tekrarlı her iki cihazdan elde edilen analiz sonuçlarından hesaplanan S_r ortalamaları 0,2486 olarak bulunmuştur. Sonuçların uyumlu olup laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışmasının başarılı olduğu söylenebilir.

Tablo 5.6. Ara kesinlik verileri

Parametre	
Doğrusal aralık (µg/mL)	2,50-50,0
Eğim±SH (gün içi, n=6)	16091,01±166,38
Kesim±SH (gün içi, n=6)	-9247,23±4568,87
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=6)	0,99936
ANOVA	F (1,14)=0,0128 P=0,911194 (P>0,05)

Yöntemin geçerliliğinin sağlanmasında diğer bir önemli basamak ise metot sağlamlığının ifade edilmesidir. Metot sağlamlığı çalışmalarının önemli iki noktası vardır. Bunlardan ilki söz konusu metodun bileşenlerinde meydana gelen ufak değişikliklere direnç gösterebilmesi diğeri de metodun sınırlarının bilinmesidir. Gelişen kolon teknolojisi daha iyi ayırım ve seçicilik sağlarken metotta meydana gelen değişimlerden daha fazla etkilenir hale gelmiştir. Bu nedenle günümüzde sağlamlık çalışmaları metodun dayanıklılık kabiliyetini kanıtlamaktan çok sınırlarını ifade etme ve buna göre analizcinin gereken hassasiyeti göstermesini zorunlu kılma anlamı taşımaktadır. Çalışmada geliştirilen her iki metot için sağlamlık çalışmaları yapılmış ve alıkonulma süresi, teorik plakaların sayısı ve kuyruklanma faktörü parametrelerindeki fark olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.7’de sunulmuştur.

FLB’nin metanol içinde hazırlanmış standart çözeltisinin stabilitesi farklı koşullar altında saklandıktan sonra hem HPLC hem de LC-MS/MS metodu ile analiz edilmiştir. Kısa süreli kararlılık için 24 saat ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında, uzun süreli kararlılığı değerlendirmek için -20 °C’de üç hafta boyunca ve üç donma-çözülme döngüsü yapılarak depolanmış ve ardından her bir çözeltinin analizleri yapılmıştır. Bu analizler üç kez tekrar edilip sonuçlar %95 güven seviyesinde geri kazanımları ve %BSS sonuçları olarak değerlendirilmiştir. Tablo 5.8 bu koşullar altında FLB çözeltilerinin stabil olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.7. *Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)*

Değiştirilen Parametre				Alıkonulma zamanı (dk)	%Fark (ortalama±GA*)	<i>N</i>	%Fark (ortalama±GA*)	<i>T</i>	%Fark (ortalama±GA*)
HPLC	Akış hızı (mL/dk)	0,55	5,45	-10,08±0,14	12323	-24,03±1,09	1,14	0,59±0,34	
		0,45	6,65	9,84±0,12	12979	-18,90±0,70	1,15	1,37±0,94	
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	55,0	4,50	-28,92±0,18	10288	-41,58±0,78	1,19	4,75±0,91	
		45,0	8,70	36,33±0,08	15976	1,81±0,44	1,12	-1,07±0,70	
	Kolon sıcaklığı (°C)	38,0	5,90	-2,19±0,06	13508	-14,94±0,29	1,15	0,12±0,04	
		32,0	6,06	0,55±0,09	12729	-20,83±0,14	1,16	1,29±0,41	
	Dalga boyu (nm)	206	5,99	-0,004±0,02	13564	-14,52±0,15	1,14	1,17±0,64	
		202	5,99	-0,53±0,12	13551	-14,62±0,27	1,14	1,20±0,90	
LC-MS/MS	Akış hızı (mL/min)	0,55	3,50	-9,21±0,05	8608	-7,457±0,62	1,49	-1,91±0,18	
		0,45	4,25	10,27±0,09	8703	-6,309±0,53	1,51	-0,14±0,46	
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	66,0	3,17	-18,99±0,02	6861	-29,84±0,61	1,58	4,32±0,44	
		54,0	5,02	26,90±0,06	11343	20,10±0,93	1,43	-5,86±0,61	
	Kolon sıcaklığı (°C)	44,0	3,84	-0,20±0,09	8671	-5,759±0,31	1,63	7,18±0,10	
		36,0	3,84	0,32±0,03	8751	-6,655±0,378	1,52	0,52±0,02	

Tablo 5.8. *FLB standart çözeltisinin kararlılık çalışmaları (n=6)*

	Eklenen derişim	Kısa dönem kararlılık (24 s, oda sıcaklığı)		Kısa dönem kararlılık (48 s, oda sıcaklığı)		Uzun dönem kararlılık (3 hafta, -20°C)		Dondurma çözme kararlılığı (3 tekrar)	
		Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*))	GK (%)	Bulunan (Ortalama±GA*)	GK (%)
PDA (µg/mL)	25,00	25,39±0,26	100,5	25,15±0,21	101,2	25,50±0,37	100,9	25,29±0,07	101,2
MS (ng/mL)	52,50	52,42±0,19	101,9	52,61±0,48	100,1	51,32±0,75	96,58	50,86±0,48	97,61

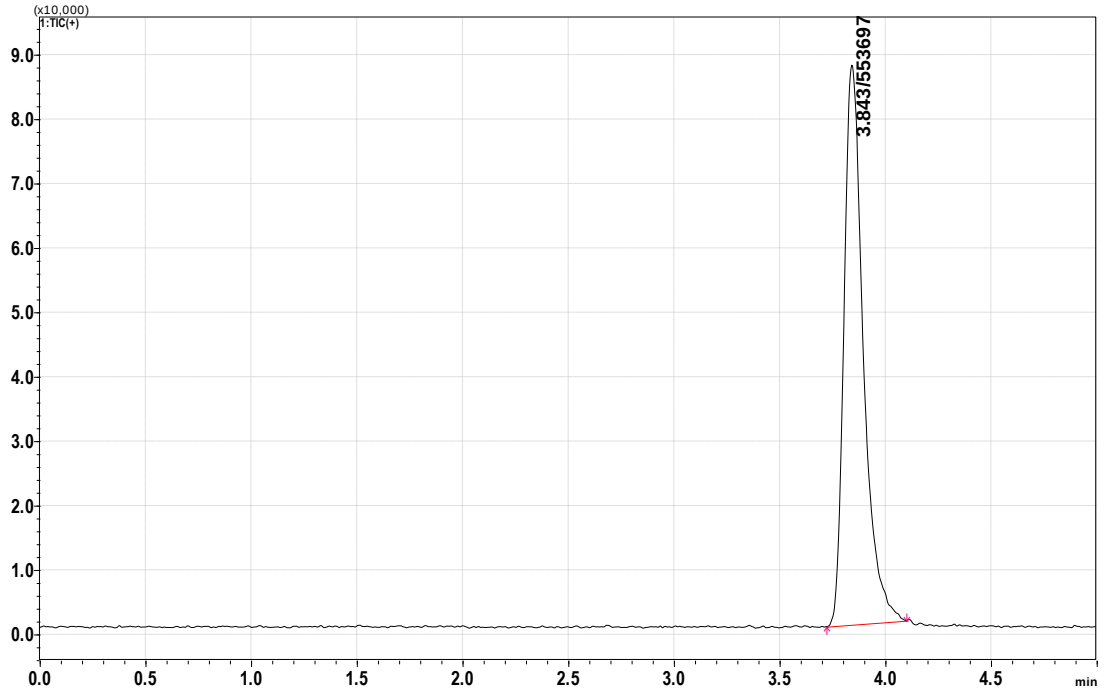
*%95 Güven seviyesinde

5.8. Geliştirilen Yöntemin Örneklere Uygulanması

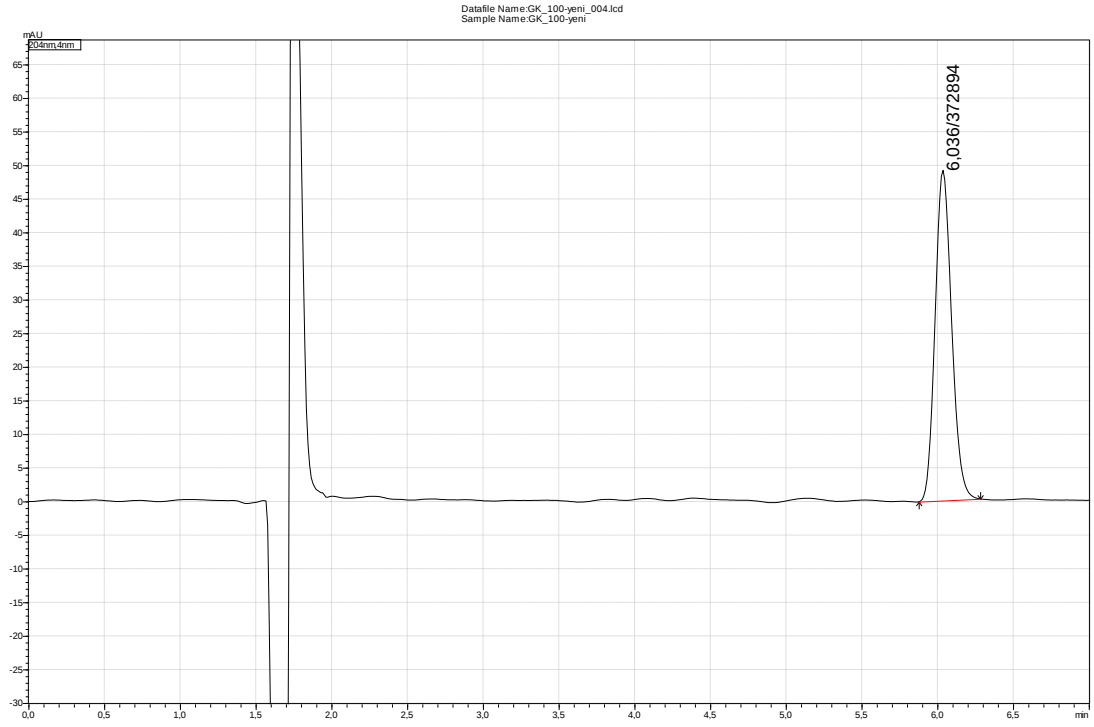
Analizciler için metot oluşturma sürecinin her basamağı çok büyük önem taşır ve kendinden sonra ki aşamada daha az soru işaretinin olmasını sağlar. Metot optimizasyonu aslında metot geçerliliğinin daha kolay sağlanmasına zemin oluştururken yöntemin zayıf noktalarının da keşfini sağlar. Metodun tam olarak geçerliliğinin sağlanması ise yöntemin tekrarlanabilir ve uygulanabilirliğinin daha kolay olması anlamına gelir. Ancak tüm bu süreçten sonra metot geliştiricinin elindeki imkanlar dahilinde numune uygulama çalışmaları yapması ise kullanıma sunulan yöntemin kendini bir kez daha ispatlaması demektir. Bu çalışmada bu anlayış benimsenerek imkanlar dahilinde FLB'nin ticari farmasötik tablet formülasyonu olan Addyi® psödo formülasyonu sadece geri kazanım çalışmaları için değil aynı zamanda numune uygulamaları içinde hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Bu analizler ile geliştirilen tam valide her iki metodunda uygulanabilirliği gösterilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları ise Tablo 5.8'de verildiği gibidir. Ayrıca Şekil 5.15'de her iki metot ile elde edilen kromatogramlar verilmiştir.

Tablo 5.9. Elde hazırlanmış Addyi® formülasyonu sonuçları (n=6)

	HPLC	LC-MS/MS
Ortalama (mg)	99,98	99,96
Minumum (mg)	98,99	98,75
Maksimum (mg)	100,1	100,2
Standart sapma (mg)	0,202	0,296
%BSS	0,202	0,296
OSH (mg)	0,308	0,295
%Bias	-0,020	-0,040
Güven aralığı	±0,161	±0,237



(a)



(b)

Şekil 5.15. Addyi® LC-MS/MS (a) ve HPLC (b) ile alınan psödo formülasyon kromatogramları

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sıvı kromatografisi ilaç endüstrisinde en baskın tekniktir. Bu sadece ilaç endüstrisi ile sınırlı kalmayıp tıp, çevre, gıda ve tarım gibi daha birçok alanda kalitatif ve kantitatif amaçlar için yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu ayırma tekniğinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte analiz yapılabilmesi için kullanılan sarf malzemelerin yüksek saflıkta olması gerekmekte ve ayrıca sabit faz seçimi de büyük önem taşımaktadır. Tekniği günümüzde bu kadar başarılı ve vazgeçilmez yapan en önemli unsurlarından birisi sürekli gelişen kolon teknolojisidir. Diğer bir teknolojik değişim ve yeniliğin noktası dedeksiyonun gerçekleştiği dedektör sistemidir. Dedektör sistemini belirleyen önemli unsur ise hedef bileşiğin kimyasal özellikleridir. Özellikle çoğu ilaç moleküllerinin kromofor gruplara sahip olmaları nedeniyle HPLC tekniğine başvuru çok fazladır. Ancak LC-MS/MS sistemlerinin sağladığı yüksek seçicilik, hassasiyet ve bunun sonucu olarak çok düşük tayin ve dedeksiyon limitlerine inebilme imkânı sunması da her iki cihazı birbirini tamamlayan ve ihtiyaç ile imkanlar dahilinde başvurulacak enstrümantasyon sistemleridir. Ayrıca her ikisinin kullanımı sınırlandıran diğer bir önemli faktör ise hedef bileşiğin sahip olduğu kromofor grup ya da iyonlaşma kabiliyetidir.

Sıvı kromatografisi bilindiği üzere temelde ayırma tekniği olsa da tarihte çıkış noktası kalitatif analiz ile olmuş ve hala ilk oluşturulan düzeneğinde yapılan çok ufak değişiklikler özellikle sentez kimyasının bir parçası haline gelmiştir. Ancak bu tekniğin günümüzde yaptığı en önemli atılım ise yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile kalitatif analize kantitatif boyutu getirerek kızıl ötesi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile aynı düzeye geçmesidir. Teknik kısmıyla tamamlanan analiz sonrası veri işleme yazılımı ile 0,0000 basamağında molekül kütlesi ile kalitatif veri sunar. Ayrıca seçilen bir iyonu daha alt yavru iyonlarına parçalayarak hedef molekülün açık formülü elde edilebilmektedir. Bu elbette diğer iki spektroskopi tekniğinin şu an için rakibi olduğu anlamına gelmez. Ancak bu iki tekniğin zayıf yönü olan saflaştırma zorunluluğunu ortadan kaldırarak kalitatif analiz tekniklerine yeni bir bakış açısı ve kolaylık getirdiği inkâr edilemezdir. Tekniğin şu an için benzer parçalanmış iyonlar üreten hidrokarbonları açık formüllerinin tespiti, optik ve geometrik izomerlerin tayini, aromatik halkadaki o-, m- ve p- dallanma pozisyonlarını birbirinden ayrılması ve analitin iyonlaşabilmesi gibi zayıf noktaları vardır. Ancak kalitatif analizlerde analizcinin

deneysel iş yükünü çok azaltıp operasyonel uzmanlığa ihtiyacını çok arttırması ile iki binli yılların analitik kimyasına yeni bir bakış açısı getirmiştir.

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

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

KAYNAKÇA

- [1] Dhanuka, I., Simon, J.A. (2015). Flibanserin for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in premenopausal women. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16 (16), 2523-2529.
- [2] Brotto, L.A. (2010). The DSM diagnostic criteria for hypoactive sexual desire disorder in women. *Archives of Sexual Behavior*, 39 (2), 221-239.
- [3] Association, A.P. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- [4] Graziottin, A., Koochaki, P.E., Rodenberg, C.A., Dennerstein, L. (2009). The prevalence of hypoactive sexual desire disorder in surgically menopausal women: an epidemiological study of women in four European countries. *The Journal of Sexual Medicine*, 6 (8), 2143-2153.
- [5] Simon, J.A., Derogatis, L., Portman, D., Brown, L., Yuan, J., Kissling, R. (2018). Flibanserin for hypoactive sexual desire disorder: An open-label safety study. *The journal of Sexual Medicine*, 15 (3), 387-395.
- [6] American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- [7] Obstetricians, A.C.o., Gynecologists. (2011). ACOG Practice Bulletin No. 119: female sexual dysfunction. *Obstetrics & Gynecology*, 117 (4), 996-1007.
- [8] Gelman, F., Atrio, J. (2017). Flibanserin for hypoactive sexual desire disorder: place in therapy. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 8 (1), 16-25.
- [9] Basson, R. (2000). The female sexual response: A different model. *Journal of Sex & Marital Therapy*, 26 (1), 51-65.
- [10] Puppo, G., Puppo, V. (2016). US Food and Drug Administration approval of Addyi (flibanserin) for treatment of hypoactive sexual desire disorder. *European Urology*, 69 (2), 379-380.
- [11] Meixel, A., Yanchar, E., Fugh-Berman, A. (2015). Hypoactive sexual desire disorder: inventing a disease to sell low libido. *Journal of Medical Ethics*, 41 (10), 859-862.
- [12] Anderson, R., Moffatt, C.E. (2018). Ignorance is not bliss: if we don't understand hypoactive sexual desire disorder, how can flibanserin treat it? Commentary. *The Journal of Sexual Medicine*, 15 (3), 273-283.

- [13] Segal, J.Z. (2018). Sex, drugs, and rhetoric: The case of flibanserin for ‘female sexual dysfunction’. *Social Studies of Science*, 48 (4), 459-482.
- [14] Gellad, W.F., Flynn, K.E., Alexander, G.C. (2015). Evaluation of flibanserin: science and advocacy at the FDA. *JAMA*, 314 (9), 869-870.
- [15] Joffe, H.V., Chang, C., Sewell, C., Easley, O., Nguyen, C., Dunn, S., Lehrfeld, K., Lee, L., Kim, M.-J., Slagle, A.F. (2016). FDA approval of flibanserin—treating hypoactive sexual desire disorder. *New England Journal of Medicine*, 374 (2), 101-104.
- [16] Pollack, A. “Viagra for women” gets push for FDA approval. The New York Times, (Erişim tarihi 10.07.2020).
- [17] Cooper, E.B., McBride, J., Levine, S. (2016). Does flibanserin have a future. *Psychiatric Times*, 33 (1).
- [18] Sieger, P., Cui, Y., Scheuerer, S. (2017). pH-dependent solubility and permeability profiles: A useful tool for prediction of oral bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 82-90.
- [19] Information., N.C.f.B. (2020): Flibanserin, CID=6918248. PubChem Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flibanserin#section=Drug-Warnings> (Erişim tarihi 10.07.2020).
- [20] Baid, R., Agarwal, R. (2018). Flibanserin: A controversial drug for female hypoactive sexual desire disorder. *Industrial Psychiatry Journal*, 27 (1), 154.
- [21] Stahl, S.M. (2015). Mechanism of action of flibanserin, a multifunctional serotonin agonist and antagonist (MSAA), in hypoactive sexual desire disorder. *CNS Spectrums*, 20 (1), 1-6.
- [22] Food, U., Administration, D. (2006). drugs@ FDA. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/> (Erişim tarihi 10.07.2020).
- [23] Sang, J.H., Kim, T.-H., Kim, S.A. (2016). Flibanserin for treating hypoactive sexual desire disorder. *Journal of Menopausal Medicine*, 22 (1), 9-13.
- [24] Stevens, D., Weems, J., Brown, L., Barbour, K., Stahl, S. (2017). The pharmacodynamic effects of combined administration of flibanserin and alcohol. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 42 (5), 598-606.
- [25] Robinson, K., Cutler, J.B., Carris, N.W. (2016). First pharmacological therapy for hypoactive sexual desire disorder in premenopausal women: flibanserin. *Annals of Pharmacotherapy*, 50 (2), 125-132.

- [26] Yu, J., Zhou, Z., Owens, K., Ritchie, T.K., Ragueneau-Majlessi, I. Detailed Evaluation of Pharmacokinetic-based Drug-drug Interaction Data Contained in New Drug and Biologic License Applications of Drugs Approved by the US FDA in 2015.
- [27] Borsini, F., Evans, K., Jason, K., Rohde, F., Alexander, B., Pollentier, S. (2002). Pharmacology of flibanserin. *CNS drug reviews*, 8 (2), 117-142.
- [28] Basson, R., Driscoll, M., Correia, S. (2015). Flibanserin for low sexual desire in women: A molecule from bench to bed? *EBioMedicine*, 2 (8), 772-773.
- [29] D'Aquila, P., Monleon, S., Borsini, F., Brain, P., Willner, P. (1997). Anti-anhedonic actions of the novel serotonergic agent flibanserin, a potential rapidly-acting antidepressant. *European Journal of Pharmacology*, 340 (2-3), 121-132.
- [30] Marazziti, D., Palego, L., Giromella, A., Rosa Mazzoni, M., Borsini, F., Mayer, N., Giuseppe Naccarato, A., Lucacchini, A., Battista Cassano, G. (2002). Region-dependent effects of flibanserin and buspirone on adenylyl cyclase activity in the human brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 5 (2), 131-140.
- [31] Borsini, F., Cesana, R. (2001). Mechanism of action of flibanserin in the learned helplessness paradigm in rats. *European Journal of Pharmacology*, 433 (1), 81-89.
- [32] Lucchelli, A., Santagostino-Barbone, M.G., D'Agostino, G., Masoero, E., Tonini, M. (2000). The interaction of antidepressant drugs with enteric 5-HT₇ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362 (3), 284-289.
- [33] Sultan, M.A., El-Eryan, R.T., Attia, A.K., Eissa, M.J. (2019). Development and validation of liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for determination of Flibanserin in human plasma: Application to pharmacokinetic study on healthy female volunteers. *Biomedical Chromatography*, 33 (8), e4545.
- [34] He, L., You, W., Wang, S., Jiang, T., Chen, C. (2019). A rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of flibanserin in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *BMC Chemistry*, 13 (1), 1-8.
- [35] Trocóniz, I.F., Boland, K., Staab, A. (2012). Population pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the sedative effects of flibanserin in healthy volunteers. *Pharmaceutical Research*, 29 (6), 1518-1529.
- [36] Iqbal, M., Ezzeldin, E., Rezk, N.L., Bajrai, A.A., Al-Rashood, K.A. (2018). A validated UPLC–MS/MS method for flibanserin in plasma and its pharmacokinetic interaction with bosentan in rats. *Bioanalysis*, 10 (14), 1087-1097.

- [37] Sharma, M.K., Rathod, R., Sengupta, P. (2020). Mass Spectrometry-Based Rapid Quantitative Bioanalysis of Flibanserin: Pharmacokinetic and Brain Tissue Distribution Study in Female Rats. *Journal of Analytical Toxicology*, 44 (6), 559-569.
- [38] Bao, Q., Zhao, H., Han, S., Zhang, C., Hasi, W. (2020). Surface-enhanced Raman spectroscopy for rapid identification and quantification of Flibanserin in different kinds of wine. *Analytical Methods*, 12, 3025-3031.
- [39] Poplawska, M., Blazewicz, A., Zolek, P., Fijalek, Z. (2014). Determination of flibanserin and tadalafil in supplements for women sexual desire enhancement using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometer, diode array detector and charged aerosol detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 45-53.
- [40] Murahari, M., Sundar, L., Chaki, S., Poongavanam, V., Bhat, P., Nayak, U.Y. (2019). *Conference on Drug Design and Discovery Technologies*. Royal Society of Chemistry.
- [41] Ahmed, R.M., Abdallah, I.A. (2020). Determination of flibanserin in the presence of confirmed degradation products by a third derivative emission spectrofluorometric method: Application to pharmaceutical formulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 225, 117491.
- [42] Brickl, R.S. Boni, J., Wagner, K.G. (2009). Formulations of Flibanserin. *Canadian Patent Application*, Patent No. WO 2009/100886 A3.
- [43] Guideline, I.H.T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1, 1-15.
- [44] Guideline, I.H.T. (2005): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. pp. 11-12.
- [45] Swartz, M.E., Krull, I.S. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC Press.
- [46] Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165 (2-3), 216-224.
- [47] Aboul-Enein, H.Y. (2000). Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. *Accreditation and Quality Assurance*, 5 (5), 180-181.
- [48] Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32, 243-259.

- [49] Ali, I., AL-Othman, Z.A., Al-Za'abi, M. (2012). Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations. *Biomedical Chromatography*, 26 (8), 1001-1008.
- [50] Ikegami, T., Tanaka, N. (2016). Recent progress in monolithic silica columns for high-speed and high-selectivity separations. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 9, 317-342.
- [51] Smith, J.S., McLafferty, D.F. (1971). Evidence for a stepwise mechanism for the γ -hydrogen rearrangement. *Organic Mass Spectrometry*, 5 (4), 483-485.
- [52] Demarque, D.P., Crotti, A.E., Vessecchi, R., Lopes, J.L., Lopes, N.P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*, 33 (3), 432-455.
- [53] Hernández, F., Sancho, J., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (5), 1251-1264.
- [54] Ojanperä, I., Kolmonen, M., Pelander, A. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (5), 1203-1220.
- [55] Davidson, J.T., Sasiene, Z.J., Jackson, G.P. (2020). Fragmentation pathways of odd-and even-electron N-alkylated synthetic cathinones. *International Journal of Mass Spectrometry*, 116354.
- [56] Pasin, D., Cawley, A., Bidny, S., Fu, S. (2017). Current applications of high-resolution mass spectrometry for the analysis of new psychoactive substances: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (25), 5821-5836.