

**ÇEŞİTLİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE İVAKAFTORUN
TAYİNİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Doktora Tezi

Saniye ÖZCAN

Eskişehir 2019

**ÇEŞİTLİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE İVAKAFTORUN
TAYİNİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

Saniye ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1606S551 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Saniye ÖZCAN'ın "Çeşitli Sıvı Kromatografisi Teknikleri ile İvakaftorun Tayini ve Bozunma Ürünlerinin Karakterizasyonu" başlıklı tezi 08.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>		<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN	
Üye :	Prof. Dr. Göksel ARLI	
Üye :	Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY	
Üye :	Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU	
Üye :	Doç. Dr. Ecir YILMAZ	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

ÇEŞİTLİ SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMLERİ İLE İVAKAFTORUN TAYİNİ VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

Saniye ÖZCAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Kistik fibrozis, akciğerlerde yaşamsal hasara neden olan genetik bir hastalıktır. Spesifik mutasyonların neden olduğu hastalığın altında yatan bozunmaları gidermeyi hedefleyen ilk ilaç olan İvakaftor hassas tıbbın potansiyelinin somut bir örneğidir. Klinik deneme çalışmaları, İvakaftor'un kistik fibrozis sonucu oluşan deformasyonları iyileştirdiğini ve hastaneye yatışları azalttığını göstermiştir. Söz konusu bu çalışmada, İvakaftor'un kantitatif tayini ve bozunma ürünlerinin kalitatif tayini için bir dizi yeni analitik yöntem geliştirilmiştir. İvakaftor'un kantitatif tayini LC-DAD ve LC-MS/MS, kalitatif tespitler ise LCMS-IT-TOF cihazı ile yapılmış ve ayrıca geliştirilen metodların ICH Q2(R1) kılavuzuna göre geçerliliği doğrulanmıştır. İvakaftor ve onun bozunma ürünlerinin ayrılması kromatografik koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir: Bu kapsamda, C₁₈ fonksiyonel gruba sahip çekirdek-kabuk yapıdaki Kinetex® (150 × 3 mm 2,6 µm, Phenomenex Co.) sabit faz ile ayırım başarılmıştır. Hareketli faz koşulları ise su içinde %0,1 (h/h) formik asit ve asetronitril içinde %0,1 (h/h) formik asit çözeltileri (27:63 (h/h), pH=2,5) olup; akış hızı tüm yöntemler için 0,25 mL/dk'dır. Önerilen yöntemde matris ile birebir uyumlu çözeltilerde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Genel bir değerlendirme olarak, yöntemlerin düşük maliyetli sarf malzemelerine ihtiyaç duydukları ve uygulamaları kolaydır. Hızlı bozundurma çalışmalarında, mevcut üç tanesi literatürde bugüne kadar hiç yer almamış, iki tanesi ise çeşitli amaçlar için sentezlenip CAS numarası alınmış olan toplamda beş adet bozunma ürünü tespit edilmiştir. Her bir ürünün yapısı LCMS-IT-TOF kullanılarak gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü kütle tarama analiziyle doğrulanmıştır. Önerilen protokoller, hemen hemen her analitik laboratuarda imkanlar dahilinde uygulanabilecek yöntemlerdir.

Anahtar Sözcükler: İvakaftor, YBSK, LC-DAD, LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF

ABSTRACT

ANALYSIS OF IVACAFTOR AND DETERMINATION ITS DEGRADATION PRODUCTS WITH USING VARIOUS LIQUID CHROMATOGRAPHY TECHNIQUES

Saniye ÖZCAN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Cystic fibrosis is a life-threatening genetic disease that causes serious damage to the lungs. Ivacaftor, the first drug to target the underlying defect of the disease caused by specific mutations, is a concrete example of the potential of sensitive medicine. Clinical trial and registration studies have shown that Ivacaftor improves outcomes and reduces hospitalizations. In this study, a number of new analytical methods have been developed and validated for quantitative determination of Ivacaftor and qualitative determination of degradation products. The quantitative determination of Ivacaftor was performed by LC-DAD and LC-MS/MS, and qualitative determinations were performed by LCMS-IT-TOF. The validation studies of the developed methods were performed according to ICH Q2(R1) regulations. Separation of Ivacaftor and its degradation products was performed using the same chromatographic conditions; where the separation was achieved with Kinetex® (150 × 3 mm 2.6 µm, Phenomenex Co.) stationary phase functionalized with C₁₈ group. The mobile phase conditions were 0.1% (v/v) formic acid in water and 0.1% (v/v) formic acid (27:63 (v/v) in acetonitrile, pH = 2.5; the flow rate 0.25 mL/min was used for the all methods. In the proposed method, recovery studies were performed in the solutions which are compatible with the matrix one to one. In the degradation studies, a total of five degradation products have been identified, three of which have never been reported in the literature up to date, and two of which have been synthesized for various purposes and obtained CAS number. Their structures were confirmed by high resolution mass scanning analysis using LCMS-IT-TOF. The proposed protocols are methods that can be implemented in almost any analytical laboratory.

Keywords: Ivacaftor, HPLC, LC-DAD, LC-MS/MS, LC/MS-IT-TOF

TEŞEKKÜR

Ağustos, 2019

Bu toprakların tüm yüregi yanık kadınlarına...

Hazırlamış olduğum doktora çalışmamın her aşamasında sahip olduğu değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, bilimsel anlamda gelişmem, pişmem için tüm imkanları sağlayan, sadece iyi bir bilim insanı olmamı değil aynı zamanda iyi bir eğitimci olmam için de her zaman bana her koşulda desteğini sunan, ne olursa olsun bir çınar gibi arkamda duran, sonsuz sabrını, hoşgörüsünü ve içtenliğini hiçbir zaman kaybetmeyen saygın duruşuyla her zaman örnek alacağım tez danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN'a;

Hayatımın en önemli yol ayrımlarından birine geldiğim anda karşıma çıkarak elimden tutan, yol gösteren, engin tecrübe ve öngörüsüyle her zaman bana destek olan çok Sevgili Hocam Prof. Dr. Göksel ARLI'ya;

Hayatımda geçirdiğim en zorlu ve çaresiz zamanlarımda güçlü duruşu, azmi, kararlılık ve olgunluğuyla örnek bir bilim kadını olan çok Sevgili Hocam Doç. Dr. Özgür Devrim CAN'a;

Doktora çalışmam boyunca yaptığım bilimsel çalışmalarda engin bilimsel görüşü ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY'a ve zor günlerimde bana her zaman destek olan, ne zaman bunalsam aklıma getirip örnek aldığım ender insanlardan olan çok sevgili eşi Hocam Doç. Dr. Ümide Demir ÖZKAY'a;

Akademik hayatta yolun başındayken en çaresiz olduğum zamanda karşıma çıkan, hiçbir beklentisi olmadan laboratuvarlarının kapılarını bana sonuna kadar açan, kendi öğrencileri gibi sahiplenen, destek olan, karşılaşılan olumsuzluklarda nasıl güçlü ve dik durmam gerektiğini bana öğreten Sayın Hocam Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU, çok sevgili eşi Hocam Prof. Dr. Aşen DEMİR MÜLAZIMOĞLU ve Sayın Hocam Doç. Dr. Ecir YILMAZ'a;

İşe başladığım ilk günden itibaren beni benimseyen, destek olan, zor zamanlarımda anlayış ve sağ duyu ile destek olan Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Hocalarıma ve kader ortağım Araş. Gör. Sakine ATİLA KARACA'ya;

Tez aslında bir ortaklıktır, her ne kadar tek isim olsada muhakkak en az çalışmayı yapan kadar arkada emek döken başkalarıda vardır... Bana bu süreçte her zaman sabır ve özveriyle yardımlarını esirgemeyen çok sevgili yoldaşlarım sevgili Öğr. Gör. Murat KOZANLI, Öğr. Gör. Serkan LEVENT ve Ecz. Aysun GEVEN'e;

Benim bu yola çıkmakta tereddüt ettiğim anlarda bile bana inanıp güvenen, destekleyen bu günlere gelmemde en büyük emek ve paya sahip olan sevgili annem Arife SAYGILI, canım babam Mehmet SAYGILI ve sevgili kardeşim Sadettin SAYGILI'ya;

Akademik hayatta umudumu yitirip defalarca dizlerinde ağlarken bile bana “sen birgün çok iyi bir bilim insanı olacaksın” demekten asla vazgeçmeyen, ben bıksamda asla bıkmayan, hayatımızın en zor zamanlarında bile güçlü duruşundan asla ödün vermeyen, bilimsel çalışmalarında engin bilgisiyle beni yönlendirip aydınlatan, evimizin ve çok sevgili oğlumuzun hem annesi hem babası olan hayat yoldaşım, canım, biricik eşim Vet. Hek. Hüseyin ÖZCAN'a;

Ve benim için en büyük fedakarlığı yapan, bebeklik haliyle beni anlayan, hiçbir zaman beni üzmeyen, bazen benden bile daha olgun davranan, laboratuvarlarda büyüyen, ikinci doktora tezim Batuhan ÖZCAN'a ve Sevgili Ayşeciği'ne;

En içten sonsuz şükran ve minnetlerimi sunuyorum...

Bu çalışmayı çok şey başarmak isteyip imkansızlıklara saplanıp kalmış bu toprakların bağıri yanık kadınlarına atfediyorum...

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.

Saniye ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	6
2.1. Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi Tekniğı	6
2.1.1. YBSK Türleri	16
2.1.2. Ters fazlı Sıvı Kromatografisi için Yöntem Geliştirme.....	18
2.2. Ayrımın Optimizasyonu	19
2.2.1. Nicel Analiz.....	22
2.2.1.1. Yöntem miktar tayini	22
2.3. Kütle Spektrometrisine Giriş.....	26
2.3.1. Aletler	27
2.3.2. Kütle spektrumu	27
2.3.3. Numunenin tanıtılması	27
2.3.4. Numune iyonizasyon yöntemleri.....	28
2.3.4.1. Elektrosparı İyonlaşma (ESI).....	28
2.3.4.2. Elektron Etkisi (EI)	28
2.3.4.3. Dörtlü analizör	28

2.3.5. Dedektörler	28
2.4. LC/MS-IT TOF	28
2.4.1. Doğru kütle ölçümleri	29
2.4.2. Parçalanma	30
2.4.3. IT-MS	30
2.4.4. LC-IT-TOF/MS	31
2.4.5. Kimyasal bileşenlerin incelenmesi	31
2.5. API Saflığı	32
2.5.1. Safsızlıklar	33
2.5.1.1. Süreç kirleri	33
2.5.1.2. Genotoksik safsızlıklar	33
2.5.1.3. Bozunma ürünleri	33
2.6. İvakaftor	34
2.6.1. Farmakolojik özellikleri	42
3. GEREÇLER	48
3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler	48
3.2. Kullanılan Cihazlar	48
3.3. Kullanılan Sabit Fazlar	49
4. YÖNTEMLER	50
4.1. Deneysel parametreler	50
4.1.1. Enstrümental parametreler	50
4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı	50
4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı	51
4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı	51
4.1.5. Bozundurma çözeltilerinin hazırlanışı	52
4.1.5.1. Hidroklorik asit çözeltisi (2 N)	52
4.1.5.2. NaOH çözeltisi (2 N)	52

4.1.5.3. H ₂ O ₂ çözeltisi (%6, h/h).....	52
4.1.6. Bozundurma Koşulları	52
4.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	53
4.1.8. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti	53
4.1.8.1. Kararlılık.....	53
4.1.8.2. Seçicilik	53
4.1.8.3. Doğrusallık ve Çalışma aralığı	54
4.1.8.4. Doğruluk.....	54
4.1.8.5. Kesinlik	54
4.1.8.6. Teşhis ve tayin alt sınırı.....	55
4.1.8.7. Sistem uygunluk testleri.....	55
4.1.8.8. Sağlamlık	55
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	56
5.1. IVA'nın UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi	56
5.2. NMR spektroskopisi tekniği ile IVA'nın ¹ HNMR spektrumlarının tespiti.....	57
5.3. IR spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu	59
5.4. Sıvı Kromatografisi Yöntem Geliştirme	60
5.5. MS/MS yöntem geliştirme	66
5.6. LC-MS-IT-TOF Metot Geliştirme.....	70
5.6.1. Bozunma Davranışları.....	71
5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini.....	84
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	90
ÖZGEÇMİŞ	98

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Ticari YBSK kolon geliştirmede bazı önemli noktalar [17]	13
Tablo 2.2. En sık kullanılan kolon dolgu materyalleri [17]	15
Tablo 2.3. En sık kullanılan çözücülerin genel özellikleri.....	17
Tablo 2.4. Ters ve normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin temel farkları	18
Tablo 2.5. Seçiciliği değiştirmek için kullanılan değişkenler	20
Tablo 2.6. YBSK yöntem geliştirmede ayırma hedefleri	21
Tablo 2.7. Kolon verimliğine etkisi olan deneysel parametreler.....	22
Tablo 2.8. SUT parametrelerinin sınırları	24
Tablo 2.9. IVA analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler	47
Tablo 3.1. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler	48
Tablo 3.2. Kullanılan sabit fazlar	49
Tablo 4.1. KALYDECO® formülasyonu.....	51
Tablo 4.2. Hızlandırılmış bozundurma koşulları.....	53
Tablo 5.1. IVA analizi için elde edilen SUT verileri.....	65
Tablo 5.2. IVA'nın çoklu reaksiyon izleme koşulları.....	66
Tablo 5.3. Çeşitli stres koşullarında IVA'nın elde edilen toplam bozunma ürünleri	71
Tablo 5.4. Pozitif iyon modunda LC-ESI-IT-TOF-MS kullanılarak IVA bozunma ürünlerinin karakterizasyonu	80
Tablo 5.5. IVA için doğrusallık ve kesinlik verileri	85
Tablo 5.6. Geri kazanım verileri.....	86
Tablo 5.7. Ara kesinlik verileri	86
Tablo 5.7. Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3).....	87
Tablo 5.8. 10,11 µg/mL IVA için kararlılık çalışmaları (n = 6)	89
Tablo 5.9. Elde hazırlanmış KALYDECO® formülasyonu analiz sonuçları (n = 6)	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kromatografik ayırımın temeli ve Mikhail Tswett	6
Şekil 2.2. YBSK sistemi	8
Şekil 2.3. Sabit faza bağlanan çeşitli fonksiyonel gruplar.....	9
Şekil 2.4. Kolon seçim akış şeması	11
Şekil 2.5. Genel kolon iskeleti [47].....	12
Şekil 2.6. Küresel tekdüze dolgu materyaline sahip kolonla tekdüze olmayan kolon arasındaki hareketli faz akışı farkı	12
Şekil 2.7. Metot geliştirme şeması	19
Şekil 2.8. Kromatografik sistem parametreleri arasındaki ilişki.....	23
Şekil 2.9. Doğmuş herhangi bir bebeğin KF olma olasılığı	36
Şekil 2.10. CFTR proteininde çeşitli mutasyonlar	37
Şekil 2.11. CFTR proteinin işlevi.....	38
Şekil 2.12. KF'den etkilenen organlar.....	38
Şekil 2.13. IVA etki mekanizması [45]	41
Şekil 2.14. IVA molekül yapısı	42
Şekil 2.15. IVA ait ana metabolit olan M1 ve M2 [65].....	43
Şekil 5.1. IVA'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu (C=10,1 µg/mL)	57
Şekil 5.2. IVA için alınmış ¹ HNMR spektrumu	58
Şekil 5.3. IVA için alınmış ¹³ CNMR spektrumu	59
Şekil 5.4. IVA için IR Spektrumu	60
Şekil 5.5. Oksidatif bozunma koşullarında Ascentis Express kolonda analiz (31.5 µg/mL IVA).....	63
Şekil 5.6. Oksidatif bozunma koşullarında Kinetex kolonda analiz (31.5 µg/mL IVA).....	63
Şekil 5.7. IVA için ana iyon ve baskın parçalanma yolları.	68
Şekil 5.8. IVA Sıcaklık uygulandığında elde edilen kromatogramı	71
Şekil 5.9. Gün ışığında elde edilen IVA kromatogramı	72
Şekil 5.10. Asidik koşullarda kör çözelti ile elde edilen kromatogram	72
Şekil 5.11. Asidik koşullarda IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram	72
Şekil 5.12. Oksidasyon koşullarında kör çözelti ile elde edilen kromatogram.....	73

Şekil 5.13. Oksidasyon koşullarında IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram.....	73
Şekil 5.14. Alkali koşullarda kör çözelti ile elde edilen kromatogram	73
Şekil 5.15. Alkali koşullarda IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram.....	74
Şekil 5.16. Yeni impürite 1 için kütle atlası	75
Şekil 5.17. Yeni impürite 2 için kütle atlası	76
Şekil 5.18. 3-Kinolin karboksamid, 1,4-dihidro-4-okso- için kütle atlası	77
Şekil 5.19. 3-Kinolin Karboksamid, N-[4-(1,1-dimetiletil)-3-hidroksifenil]-1,4-dihidro-4-okso- için kütle atlası	78
Şekil 5.20. Yeni impürite 5 için kütle atlası	79
Şekil 5.21. IVA'nın çeşitli ortamlarda meydana gelen bozunma reaksiyonlar	81

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik Katsayısı
A _s	: Pik Asimetrisi
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
APCI	: Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu
API	: Aktif Farmasötik Bileşen
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CFTR	: Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Düzenleyici
CID	: Çarpışma ile İndüklenen Ayrışma
DBE	: Double Bond Equivalent (Çift Bağ Eşdeğeri İndeksi)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EI	: Elektron Etkisi
EMA	: European Medicines Agency (Avrupa İlaç Komitesi)
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
HETP	: Teorik Tabaka Yüksekliği
HRMS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
ICH	: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (Uluslararası Uyum Komitesi)
IR	: Kızıl Ötesi
IT	: İyon Tuzağı
IVA	: İvakaftor
KF	: Kistik Fibroz
KFV	: Cystic Fibrosis Foundation (Kistik Fibroz Vakfı)
LC-IT-TOF-MS	: Sıvı Kromatografisi Hibrit İyon Tuzağı/Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi
MALDI	: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon
MS	: Kütle Spektrometresi
N	: Teorik Plak Sayısı
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ODS	: Oktadesil Silika

RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
R _s	: Ayrım Gücü
ss	: Standart Sapma
SUT	: Sistem Uygunluk Testi
T	: Kuyruklanma Faktörü
TOF	: Uçuş Süresi
TQ	: Üçlü Dört Kutuplu
TTC	: Thresholds of Toxicological Concern (Toksikolojik Kaygı Eşiği)
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Alan
Q	: Dört Kutuplu
USP	: (United States Pharmacopeia) Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
YBSK	: Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaç geliştirmedeki mevcut eğilimler, aktif farmasötik bileşik (API) adayı üretimini ve değerlendirmesini hızlandırmak için yüksek hacimli yaklaşımları vurgulamaktadır. Biyomoleküler taramayı ve kombinasyonel kimyayı içeren ilaç keşiflerine dayalı teknolojiler, daha kısa zaman dilimleri ve daha fazla ilaç adayı için daha fazla bilgi üretilmesini sağlamıştır. Özellikle analitik bilimlerde, genel ilaç geliştirme döngüsü üzerindeki etki, büyüme ve odaklanma için benzeri görülmemiş fırsatlar yaratarak önemli olmuştur.

Bu fırsatların belki de en büyük nedeni, numune üretim oranının numune analiz oranını çok aştığı gerçeğidir. Bu faktörü perspektife koymak için, kombinasyonel kimya ile ilgili etken madde sentez hızını göz önünde bulundurmakta fayda vardır. Kombinasyonel kimya teknolojilerinin ortaya çıkmasından önce, bir kimyagerinin sentez başarısına bağlı olarak yılda 50 nihai bileşik ortaya koyabilmekteyken günümüzde, kimyagerler çeşitli otomatik sentez teknolojilerini kullanarak yılda 2.000'in üzerinde bileşik üretebilmektedir. Bu analitik kimyacılara 40 katı iş yükü demektir.

Durumun gerçeğliği belirginleşmiş olup numune üretimi için yeni referanslara ayak uydurabilecek analitik araçlar olmadan, avantajlar tam olarak gerçeğleşmesinin imkânsız olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, numune üretimi ve analizi arasındaki ilişki ilaç endüstrisinde önemli bir konudur. Açıkçası, geleneksel analiz yaklaşımları, numune üretimindeki çarpıcı gelişmelerin yarattığı özel ihtiyaçları karşılayamamaktadır.

Yeni teknolojiler ilaç geliştirmenin başarısında önemli yere sahiptir ve farmasötik analiz faaliyetlerini doğrudan etkilemektedir. Kombinasyonel kimya gibi iş istasyonlarının numune üretim teknolojileri ile yakın zamandaki entegrasyonu gibi gelişmeler analiz için belirgin şekilde yeni gereksinimler yaratmıştır. Sentez ile analizin birbiri ile uyumlu olma gereksinimi hızlı, yüksek verimli, hassas ve seçici yöntemlerin geliştirilmesini ilaç analizleri için zorunlu hale getirmiştir. Ayrıca, izlenen karışımları analiz etme yeteneği, tarama yaklaşımlarıyla uyumlu bir araçsal yapılandırma kullanarak, önemli bir özellik olarak ortaya çıkmıştır.

Analiz gereklilikleri, hızlı bir şekilde numune üretimindeki bozulmalara uyum sağlamak için adapte edildiğinden, ilaç endüstrisinde maliyetleri düşürmeyi ve gelişmeyi hızlandırmayı hedefleyen yeni bir bilimsel ve ticari kültür geliştirilmiştir. Bu faktörler daha sık ve mümkün mertebe yeni analiz taleplerini üretmek için bir araya getirilmiştir. Bu talepler özellikle analitik enstrümantasyonun ve yeni analiz stratejilerinin

oluşturulmasının önemini ortaya koydu. Ortaya çıkan ihtiyaçlara ayak uydurmak için, ilaç analizine uygun yeni araçların ve uygulamaların zamanında değerlendirilmesi esastır. Değerlendirildiğinde, bu analiz araçlarının etkin entegrasyonun zamanında yapılması engelide aşılmıştır. Burada, analiz için yeni stratejilerin geliştirilmesi, yeni teknolojilerin tanıtılması ve düzene dayalı ilaç gelişimi için fırsatlar yaratılması için etkili bir yaklaşım olmuştur.

Bu son eğilimler, daha önce gerekenden daha hızlı ve ilaç geliştirme döngüsünün daha erken aşamalarında daha önce görülmemiş sayıda yapısal olarak farklı moleküllerin, moleküler ve fizikokimyasal özelliklerini belirleme veya öngörme ihtiyacı ile yönlendirilmiştir. Bu amaçla farmasötik özellikleri araştırmak için olası yöntemler ve büyük veri tabanlarını aramak için veri madenciliği tekniklerinden yararlanılmaktadır. Öteyandan, yeni deneysel yaklaşımlar tipik olarak oldukça karmaşık yoğun matrise sahip küçük miktarlarda analit içeren numuneler üretmektedir. Bu kombinasyonlarda, farmasötik analiz için mevcut metotlara daha büyük yükler getirmektedir.

Pek çok yeni sanayi girişimi, numune hazırlama ve analiz faaliyetlerinin entegrasyonuna odaklanmış ve aynı zamanda ilaçların keşfedilmesi, değerlendirilmesi ve geliştirilmesinde yeni paradigmlar ortaya çıkarmıştır. Bu girişimlerin temel fikri “daha azıyla daha fazlasını yapmak”tır. Her zaman, numune üretme ile ilgili faaliyetlere daha fazla kaynak verilme eğilimindeyken analiz için daha az kaynak aktarılmaktadır. Bu nedenle çok çeşitli analize dayalı uygulamalar hayata geçirilmiştir. Bu uygulamalar verimi ve verimliliği vurgular. Bu etkinliklerden üç ortak tema ortaya çıkmış olup bunlar;

- Bilginin daha erken kullanılabilir olması daha hızlı karar verilmesine yol açar.
- Enstrümantasyonun bilgi ağları ile entegrasyonu, yüksek verimli analitik bilgi üretimini ilaç aday taraması ile birleştirmek için popüler bir yaklaşımdır.
- Yazılım, analiz olaylarının koordinasyonu ve verilerin yönetimi ve görselleştirilmesi için güçlü bir kaynaktır.

Analiz yöntemlerinde hatırı sayılır bir büyüme ilaç gelişiminin hızlanması ile sonuçlanmıştır. Biyomoleküler tarama, kombinasyonel kimya ve genomik gibi teknolojilerle birleştirilen analiz için yeni araçlar ve stratejiler, ilaç endüstrisini keşif toplama ve geliştirme fırsatlarını üretme konusunda konumlandırmıştır.

Riordan ve ekibi 1989 yılında yaptıkları çalışma ile Kistik fibrozis (KF) adı verilen hastalığın sebebini bularak yüzyılın buluşlarından birini gerçekleştirmişlerdir [1]. KF, Kafkasyalılarda en sık görülen otozomal resesif hastalıktır ve Amerika Birleşik

Devletleri'nde yaklaşık 28.000 hastayı ve Avrupa'da yaklaşık 36.000 hastayı etkiler. Primer olarak akciğerleri etkileyen, kalın viskoz sekresyonlara ve tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonlarına ve ayrıca pankreas, hepatobiliyer sistem, üreme sistemi, gastrointestinal sistem ve kemikleri de neden olan multisistemik bir hastalıktır [2]. Ölüm genellikle enfeksiyonlardan, iltihaptan ve pulmoner hasardan kaynaklanır [3]. Bu kalıtsal hastalığın paleolitik dönemden beri var olduğunu gösteren çeşitli kanıtlar bulunmuştur [2].

Riordan'ın ekibi çalışmada örtüşen tamamlayıcı DNA klonları, kromozom 7 üzerindeki farazi KF lokusunun bir kısmını içeren genomik bir DNA segmentine sahip epitel hücre kütüphanelerinden izole edilmiştir. KF ile öngörülen protein, her biri membran birleşimi ile uyumlu özelliklere sahip bir alan ve ATP bağlanmasında yer aldığı inanılan bir alan içeren iki benzer motiften oluşmaktadır. KF hastalarında ise ilk öngörülen nükleotit bağlanma bölgesinin merkezinde fenilalanin kalıntısının atlanmasıyla sonuçlanan üç baz çiftinin silinmesi tespit etmişlerdir [1].

Genetik hastalıklar gen dizilimlerindeki herhangi bir eksik ya da yanlış dizilim sonucu ortaya çıkarlar. Bu hatalı gen ya da genler organizmada sorumlu oldukları yaşamsal işlevler için gerekli olan proteinleri ya hiç sentezleyemezler ya da bozuk yapıda sentezleyerek işe yaramamalarına sebep olurlar. Sonuç olarak organizmada çeşitli sorunlar baş gösterir. Bu bozuklukların sonuçları mutasyona uğramış gen diziliminin görevine göre canlıda embriyo halindeyken ölümüne neden olup hiç yaşam hakkı tanımadığı gibi uzun yıllar hayatını idame ettirmesine izin verebilir. Burada asıl önemli olan nokta gen modifikasyonunun organizmaya verdiği hasarın büyüklüğü ve bunun çeşitli yardımcı ya da tamamlayıcı tedaviler ile tolere edilip edilemediğidir.

Genetik hastalıkların en büyük tehlikesi kalıtsal olması ve çoğunun mutasyona neden olan genleri henüz keşfedilmemiş ya da mutasyonun sebep olan şeyin ne olduğunun henüz tam anlaşılamamış olmasıdır. Hastalıkların kalıtsal olması nedeniyle her zaman nesillere aktarım söz konusu olup artan nüfus ile bu mutasyonları taşıyanların sayısının artarak her yıl birçok bireyin dünyaya gelmesi anlamına gelmektedir.

Çok satan roman Jurassic Park'ta, International Genetics Incorporated'ın eksantrik kurucusu John Hammond birkaç yanlış hesaplama yapmıştır. Genetiği değiştirilmiş dinazorlarla dolu bir tema parkının yaratılması bunlardan sadece bir tanesidir. Hammond romanın bir yerinde lider genetikçi Henry Wu'ya "insanlık için yeni ilaçlar... Her türlü engelle karşı karşıya. Pazarda iş başında güçler var. Bir mucize ilaç yaptığımızı

varsayalım... Bin dolardan bir doz satmak istediğimizi varsayalım. Bunun sizin ayrıcalığınız olduğunu düşünebilirsiniz. Sonuçta, ilacı icat ettiniz, geliştirmek ve test etmek için para ödediniz; istediğin ücreti alabilmelisiniz. Fakat bir hükümetin bunu yapmamıza izin vereceğini düşünüyor musunuz?” diye sorar “Hasta insanlar minnettar olmayacaklar, kızacaklar” diye de ekler. Michael Crichton’un romanını yayınlamasından çeyrek yüzyıl sonra, Hammond’ın argümanı olacak ABD Gıda ve İlaç İdaresi KF için yeni “kıymetli” bir ilaç pazarlanmasını test edip ve onaylamıştır [4].

Tüm ırkları ve etnik kökenleri etkileyen KF, Amerika Birleşik Devletleri’nde yaklaşık 3.500 canlı doğumda yaklaşık 1’inde meydana gelen, yaşamı kısaltan en yaygın kalıtsal hastalıktır. KF kaynaklı morbidite ve mortalitenin çoğu, ilerleyen hava yolu tutulumunun sonucudur. Tarihsel olarak KF tedavisi, bozulmuş mukosilyer klirens, kronik enfeksiyon ve kronik enflamasyon gibi kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) işlev bozukluğunun etkilerine odaklanmıştır ve ilerleyen konvansiyonel tedaviler, hastaların tedavi süresini kademeli olarak iyileştirmiştir ve yaşam sürelerini 40 yıla kadar çıkartmıştır. Bu yetim ilacın ortaya çıkışı, CFTR işlev bozukluğunu düzeltmek için hassas ilaçlar, KF araştırmalarındaki en heyecan verici gelişmelerden biridir ve akciğer hastalıklarının seyrini derinden değiştirme potansiyeline sahiptir [5, 6].

ABD Gıda ve İlaç İdaresi onaylı oral ilaç ivakaftor (IVA) böyle bir ilaçtır. Arızalı gen ürününün, CFTR anyon kanalının işlevini geliştirmek için bir güçlendirici madde olarak görev yapar. Bu ilacın başlangıçta pulmoner alevlenmeleri azalttığı, ter klorür konsantrasyonlarını normalleştirdiği ve G551D mutasyonu olan hastalarda yaşam kalitesini ve akciğer kalitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [7]. Vertex Pharmaceuticals tarafından üretilen IVA, ABD’nde ilk kez yalnızca tüm hastaların kabaca %4’ünü oluşturan bu spesifik mutasyon ile KF’li hastaları tedavi etmek için lisans aldı. Bununla birlikte, KF topluluğu ilaca uygulanan aşırı fiyatla şaşırdı: yılda 300.000 dolardan fazlaydı [8]. Kitabın antagonisti tarafından düşünülen hap başına 1.000 dolar değil, ancak şu anda ABD pazarındaki en pahalı ilaçlardan biri olma özelliği taşımaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, endikatörler KF’li hastaların yaklaşık %10’unu kapsayacak şekilde genişlemiş olsa da, rekabetin olmaması nedeniyle IVA’nın maliyeti zaman içinde düşmemiştir [4, 9].

Vertex Pharmaceuticals, Kistik Fibroz Vakfı’ndan (Cystic Fibrosis Foundation, KFFV) araştırma fonu konusunda 75 milyon dolar yardım alarak IVA’yı üretmiştir. KFFV,

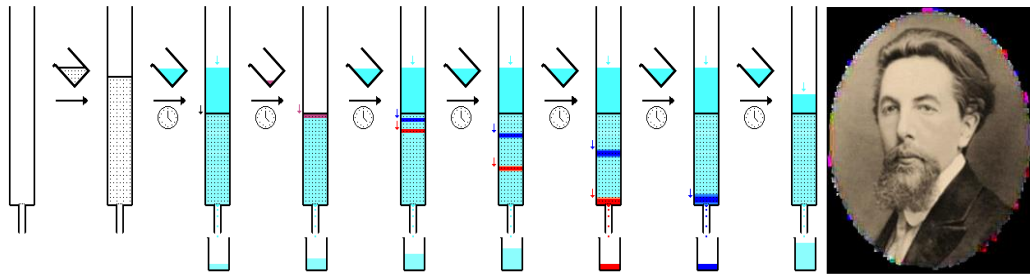
daha fazla KF araştırmasına yeniden yatırım yapmak istediğinden IVA satışından elde edilen telif haklarını paylaşmıştır [10]. IVA uygulama hızının, yüksek karşılanma ihtiyacı ve çoğu potansiyel hastanın teşhis sırasındaki gen testi ile tanımlanması gerçeği göz önüne alındığında yüksek tedavi maliyetine rağmen (hasta başına yıllık 294,000 ABD Doları) artması beklenmektedir. IVA'nın doğrudan bir rekabeti de yoktur ve bu nedenle analistlerin ticari potansiyelinden beklentileri yüksektir. Tahmini dünya çapındaki satışlar, 2012 yılında ~93 milyon\$ ile 145 milyon\$ arasında değişmekte olup, 2015 yılında 750 milyon ile 1,3 milyar\$'a yükselmiştir [4, 11].

İşte IVA böyle tartışmaların ortasında KF'li hastalar umut olmaya ve yaşam sürelerini uzatmaya deva etmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi ilacın rakibinin olmaması ve kalıtsal bir hastalık için oldukça başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle geleceğinin oldukça parlak olduğu aşikardır. Ancak ilaç piyasaya yeni sürülmüş bir bileşik olduğu için hakkında farmakolojik, farmakokinetik ve anaitik çalışmalar çok azdır. Özellikle ilacın çeşitli ortamlarda analizi ile ilgili tatmin edici bir yayın yoktur. Söz konusu bu çalışmanın hedefi ilacın kalıtsal bir hastalığı tedavi etmesi ve analizi ile ilgili tam olarak metot geçerliliği yapılmış herhangi bir çalışma olmamasından dolayı IVA'nın kapsamlı analizidir. Bu amaçla etken madde öce çeşitli ortamlarda hızlı bozundurma prosedürü uygulanarak bozunma ürünleri tespit edilip karakterizasyonları yapılmıştır. Ardından bozunma ürünleri varlığının çeşitli sıvı kromatografisi ile çeşitli dedektörlerde analizi için metot geliştirilmiştir. Oluşturulan bu yeni yöntem var olan tüm metot geçerliliği parametreleri incelenmiş ve ara kesinlik çalışmaları yapılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi Tekniği

Kromatografi temelde hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri bakımında birbirine çok benzeyen bileşiklerin birbirlerinden ve/veya bulundukları ortamdan ayrılmasını sağlayan tekniklerin bütünü olup birçok alandaki bilimsel çalışmaların vazgeçilmez parçası olmuştur. Esasında bir tespit tekniği olmamakla birlikte teknolojinin gelişmesi sayesinde birçok farklı alanda farklı amaç için kullanılan cihazların bir araya getirilmesi kromatografiyi de çok farklı boyutlara taşımıştır. Kromatografik analizlerin başarısında ve bu kadar sıklaşmasındaki en büyük pay gelişen dedektör ve kolon teknolojisine aittir. Kolon fiziksel ve kimyasal ayrımın kalbi dedektör ise tanıma merkezidir. Kolon teknolojinin basit haliyle temelini 1900’lü yılların başında bitki ekstraktlarındaki klorofilleri ayırma uğraşlarıyla Şekil 2.1’de verilen ünlü Rus botanikçi Mikhail Tswett atmıştır. Yaptığı çalışmalar günümüzde sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisinin temeli olarak nitelendirilebilir.



Şekil 2.1. Kromatografik ayrımın temeli ve Mikhail Tswett

Kromatografik ayrımlarda numune her zaman süperkritik akışkan, gaz ya da sıvı gibi bir akışkan olan hareketli faz tarafından taşınır. Kendisi ile birlikte bünyesine aldığı numune bileşenlerini de sürükleyen bu hareketli faz; katı ya da kolon gibi bir sisteme doldurulmuş hareketi kesinlikle mümkün olmayan durgun fazdan geçer. Numunedeki bileşenlerin ayrılması ise içinde sürüklendiği akışkan ile kesinlikle hareket etmeyen katı faz arasındaki etkileşimlerine bağlıdır. Burada söz konusu olan etkileşimlerse temel kimyasal ve fiziksel etkileşimler olarak bahsedilen elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, çözünürlük, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumları gibi olaylardır [12].

Kromatografik olayların matematiksel kimlik kazandırılması ve ayırmadan kantitatif analizlere geçişinde temelini atan bilim insanı Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter olmuştur [13]. Bir ayrımın fiziksel, kinetik ve termodinamik özelliklerini göz önüne

olarak kolunun birim uzunluğu başına varyansı doğrusal mobil faz hızına göre değıştirir. Bu özellikler kolon içindeki yolları (eksenel ve boyuna), difüzyonu, sabit ve hareketli fazlar arasında kütle transfer kinetiğini içerir. Kendi adını verdiği eşitlik aşağıdaki gibidir [14].

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad (2.1.)$$

Yukarıdaki denklemde;

H: Tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyon

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı,

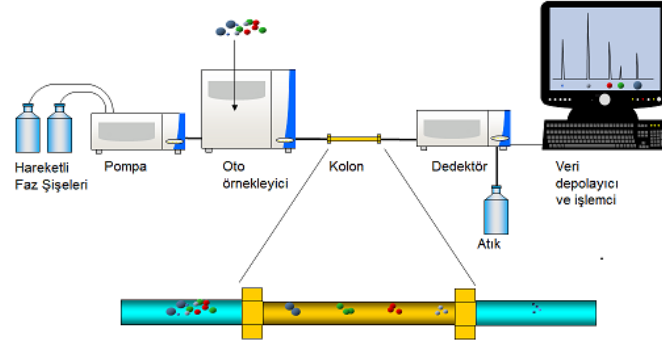
u: Çizgisel hızı ifade etmektedir.

Yaygın olarak sıvı kromatografisi olarak bilinen Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi (YBSK), saflık ve ayrıca ilaçlardaki yabancı maddelerin tespiti için en iyi tekniklerden biri olarak kabul edilir [15]. YBSK, farmasötik ilaçların analizi, ilaç izleme ve kalite güvencesi için önemli bir araçtır. Aşağıdaki avantajlar, cihazı özellikle ilaç analizleri çok uygun hale getirmiştir.

- Geliştirilmiş ayırım gücü (çok çeşitli sabit fazlar)
- Yeniden kullanılabilir kolonlar (analiz için birkaç kez kullanılabilir)
- Düşük uçuculuktaki maddeler için ideal
- Kolay numune alma, işleme ve hazırlama
- Kesinlik ve tekrar üretilebilirlik
- Analite bozucu etkisi olmayan

YBSK yönteminin amacı, çeşitli fiziksel, kimyasal ve fotokimyasal stres koşulları altında ilaç bileşiminin miktarını belirlemektir. Yöntemin ilaca özel uygun olabilmesi için ilaç pikinin tüm bozulma ürünü piklerinden ayrılması gerekir. Ayrıca, yöntemin doğrusallığı ve minimum miktar belirlemesi yapılmalıdır. Yöntemin mümkün olduğu kadar basit olması gerekir. Bazı durumlarda (örneğin, kiral ayırmalar), kolon öncesi türevlendirme ters faz YBSK'nin seçiciliğini artırabilir [16].

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi sıvı kromatografisi, mobil fazı yüksek basınçta hareket ettirmek için pompa, mobil faza numunenin sisteme girişini sağlamak için enjektör, ayırımı elde etmek için kolon, numune içerisindeki bileşenleri tespit etmek için detektör, veri toplama ve depolama için bir bilgisayar, entegratör veya kayıt cihazı gibi bir veri toplama cihazı bileşenlerini içerir.



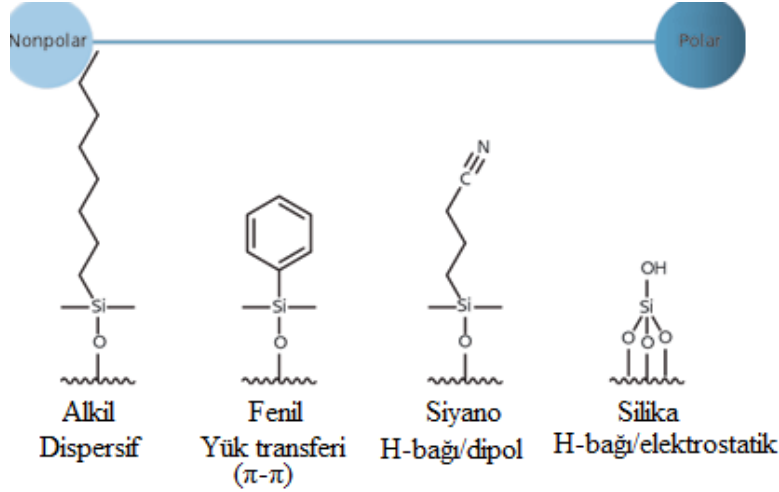
Şekil 2.2. YBSK sistemi

YBSK Pompasının ana işlevi, bir sıvıyı (mobil faz olarak da bilinir) belirli bir akış hızında, dakika başına mililitre (mL/dk) olarak ifade edilen birim cinsinden akışını sağlamaktır. Çözücü, yüksek basınç kullanılarak kolondan geçirilir. Pompalar, akış hızını ve yüksek basıncı korumaya yardımcı olduklarından, YBSK sistemlerinin hayati bir parçasıdır. Doğrudan gaz basıncı, şırınga tipi, pnömatik ve pistonlu sistemleri içeren çeşitli pompalama sistemleri mevcuttur.

YBSK pompalarının aşağıdaki koşulları sağlaması gerekir:

- 0,1 ila 10 mL/dk arasında değişen akış hızları sağlama
- %0,5'lik akış tekrarlanabilirliği
- Yüksek basınç üretmesi
- Çeşitli çözücüler tarafından korozyona dayanıklı

Analitik ayırmalar için kullanılan kolonlar genellikle 2 - 5 mm çapa ve 30 - 300 mm uzunluğa sahip olup dolgu malzemelerinin boyutları 3 ile 10 μ m arasında küçük parçacıklardır ve sabit faz olarak bilinir. Sabit fazın yapısındaki bir değişiklik (kolon tipi. Şekil 2.3), alıkonulma, seçicilik ve ayırmayı, buda analitin seçicilik ve ayırımını etkileyecektir. Kolon dolgu materyaline bağlı sabit fazlar, silika yüzeyindeki silanol gruplarının organo silanlarla reaksiyonu ile elde edilir. Şekil 2.3'de görüldüğü gibi kolon polaritesi, bağlı fonksiyonel grupların silis yüzeyine polaritesine bağlıdır. Kiral durağan fazları, rasematların enantiomerik ayrılmasında kullanılan özel tip durağan fazlardır [17].



Şekil 2.3. Sabit faza bağlanan çeşitli fonksiyonel gruplar

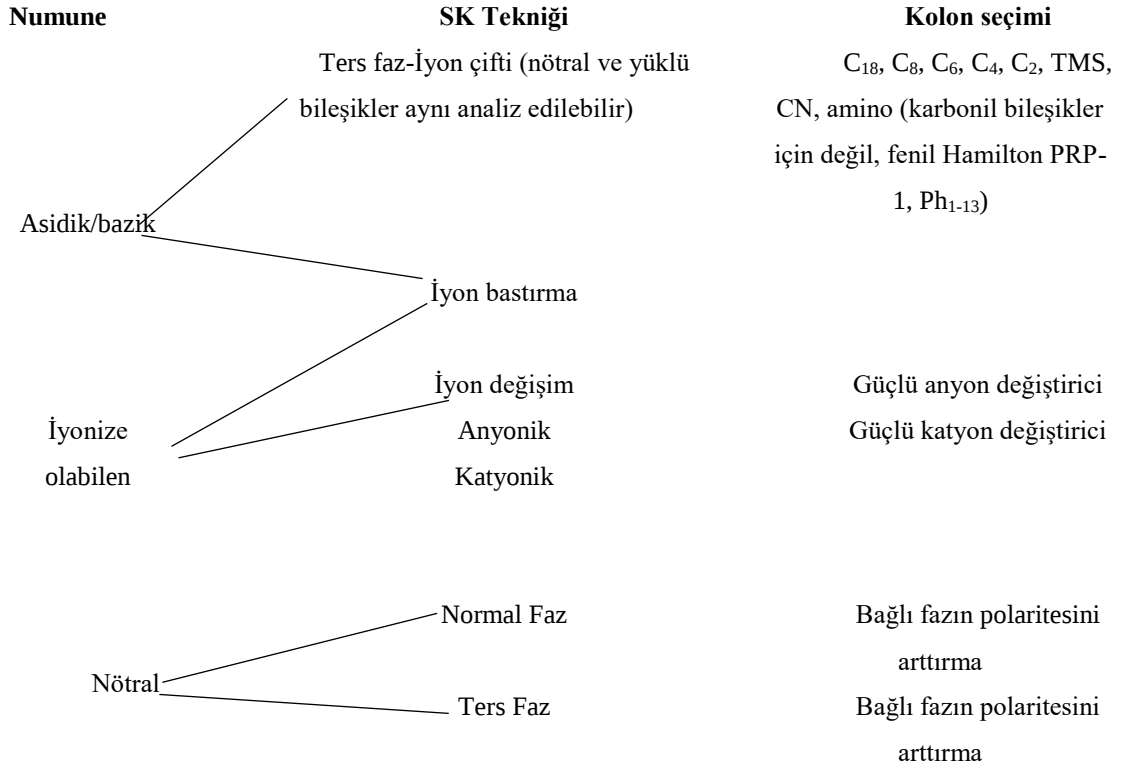
Yılda sadece birkaç kolon kullanan, kolon dolgu materyali sentezlemeyen, bir kolon üretme işine ilgisi olmayanlar için hazır kolonların satın alınması daha uygundur. Ancak günümüzde kolon üretim teknolojisi ile analizlerin yapılması daha doğrusu kolon kullanımı arasında uçurumlar vardır. Bu nedenle kolon üreticileri ile kullananları arasında yazılı garanti denilebilen bir haberleşme sistemi kurulmuştur. Bu kolon katalogları veya broşürleri beklenen performansı ve performansı ölçmek için kullanılan kromatografik koşulları açıklamaktadır. Çoğu kolon üreticisinin ürünün performansı önceden belirlenmiş olup belirtilen şartlar altında da garantili performansı sağlar. Teslim edilen kolon üzerinde çalışan gerçek bir test kromatogramı da buna dahil edilmiştir. Hatta bazı kolon üreticileri kolonla birlikte bir miktar test numunesi gönderir. Bu imkânı sağlayamayan firmaların ise gönderdikleri kolon test broşüründe yer alan kromatogramdaki test bileşenleri kullanıcının laboratuvarında sıkça bulunan basit bileşiklerdir. Nadiren, test bileşiği, kolon belirli bir ayırma için geliştirilen özel bir kolon (örneğin, sakarit kolon) olmadığı sürece, alıcının analiz edeceği ile aynıdır [18].

Firma tarafından gönderilen kromatogram, genellikle, kolon başına veya metre başına teorik plakalar (HETP), kromatografik test koşulları (izokratik ya da gradient akış hızı modu, mobil faz bileşimi ve akış hızı, test numunesi bileşenleri, kolon geri basıncı, test bileşenlerinin k değerleri, pik asimetrisi, seçicilik, enjeksiyon hacmi ve miktarı) gibi sistem uygunluk parametrelerini içerir. Kolon satın alındıktan sonra kolonun gönderildiği gibi olduğundan emin olmak için bu test kromatogramı tekrarlanabilir. Bu aynı zamanda kolonda analiz yapılırken herhangi bir rutin dışı değişiklik gözlemlendiğinde ya da kolon

beklemeye alındığında yapılması önerilir. Bazen, ölçülen kolon performansı verilen kromatogramınkiyle eşleşmiyorsa bu performans uyumsuzluğu;

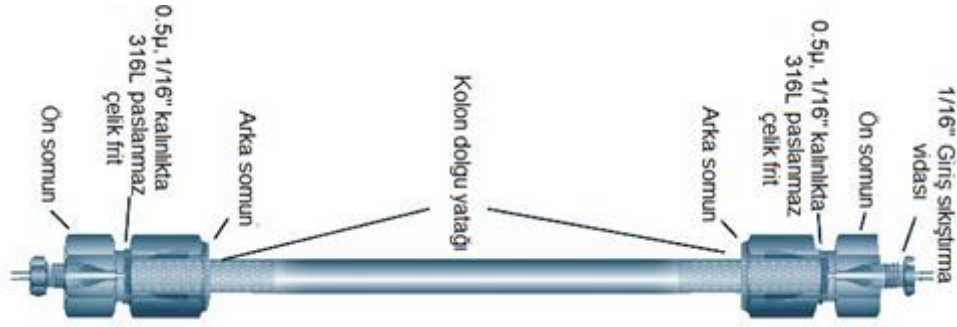
- Kolon sevkiyat sırasında hasar görmesi
- Kolon, orijinal test numunesi ile mevcut test numunesi arasında değişiklik (bağlı faz kaybı, aktivite değişikliği, çökme ...vb.)
- Alıcının laboratuvarında kolonu test etmek için kullanılan cihazın, üretici tarafından kullanılanlardan farklı olması (ölü hacim, band genişlemesi, dedektörün yavaş sinyal toplaması ...vb)
- Plakaların ölçümü, orijinal kromatogramda ve kullanıcının test kromatogramında farklı şekilde yapıldığını gösterebilir [18, 19].

YBSK yöntemi geliştirme sırasında en büyük zorluklardan biri istenen seçiciliği, tekrarlanabilirliği ve kararlılığı sağlayacak olan sabit faz seçmektir. Kolon seçimi, piyasada 600'den fazla ters faz sıvı kromatografisi (RP-LC) kolon markası bulunduğundan zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Kolonun seçiciliği ve enjekte edilen bileşiklerin pik şekilleri, kolonun özelliklerine büyük ölçüde bağlıdır. Sabit fazların en önemli özelliklerinin iyi anlaşılması, yöntem geliştirme sırasında ortaya çıkan kromatografik sorunların hızlı bir şekilde çözülmesini kolaylaştırır (örneğin kötü pik şekli veya zayıf çözünürlük). Kolon verimi, hidrofobiklik, silanol aktivitesi, iyon değişim kapasitesi, sterik seçicilik ve metal safsızlıklarının miktarı gibi özellikler oldukça basit kromatografik testlerle karakterize edilebilir. Testlerin temsili parametrelerinin hesaplanması, bir sabit fazları benzer veya farklı karakteristiklere sahip olarak sınıflandırmayı sağlar. Bir kolonun benzer bir seçicilik kolonu veya farklı bir sabit faz ile değiştirilmesi gerektiğinde, kromatografik faz sınıflarının dikkate alınması yararlı olabilir. Bu gibi kromatografik test prosedürleri, bir kolonun ömrünün herhangi bir zamanında performansını kontrol etmek için de kullanılabilir. Şekil 2.4'de analiz edilecek numunenin türüne göre seçilebilecek sıvı kromatografisi tekniği ve sabit faz seçimi ile ilgili sınıflandırma verilmiştir.



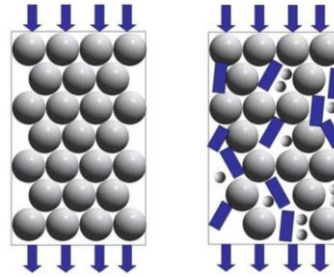
Şekil 2.4. Kolon seçim akış şeması

Günümüzde kolonlar her iki ucunda somun sistemine sahip olup dedektör ve enjeksiyon haznesine vidalama yöntemi ile bağlanır. Kolon gövdesi çoğu zaman paslanmaz çelikten yapılmış olup çok azı plastik materyaldir. Kolonun kromatografi sistemine bağlanması için genelde el mukavemeti yeterli olurken bazen anahtarla hafif bir sıkma işlemi de gerekebilir. Kolonun sisteme tam oturmasının pik morfolojisine etkisi doğrudandır. Şekil 2.5 de genel bir kolon iskeleti veriliştir. En yaygın kullanılan kolon dolgu malzemesi, dar gözenek boyutu, yüksek mekanik mukavemeti, yüksek verimi, bazik bileşiklerin ayrılması sırasında sorunlara neden olan çözücülerin ve yüzey asiditesindeki değişiklikler nedeniyle boyutlarda değişiklik göstermeyip (örneğin şişme) direnç sağlaması nedeniyle silika bazlı dolgu malzemesidir. Ayrıca daha düşük geri basınç oluşturur, daha geniş bir pH aralığına sahiptir ve ayrıca yüksek pH’da oldukça bazik çözünen maddeleri ayırmak için kullanılabilir. Şişen parçacıklar, gradient elüsyonunda daha belirgin olabilir [17].



Şekil 2.5. Genel kolon iskeleti [47]

Dolgu malzemesinin şekli küresel veya düzensizdir. Küresel şekil daha güçlü, dayanıklı, yüksek verimli ve YBSK için en uygun olanıdır, düzensiz şekil ise yüksek geri basınç ve pik asimetrisi üretir. Aynı zamanda kolon içinde kesintisiz düzenli hareketli faz akışı daha keskin piklere, yüksek verimli ve etkin ayrımlara olanak sağlar. Şekil 2.6'da küresel tekdüze dolgu materyaline sahip kolonla tekdüze olmadığı için düzenliliği sağlayamamış kolon arasındaki hareketli faz akışı farkı açıkça görülmektedir [20].



Şekil 2.6. Küresel tekdüze dolgu materyaline sahip kolonla tekdüze olmayan kolon arasındaki hareketli faz akışı farkı

1939'da Martin, küçük taneciklere sahip paketlerin artan ayırım verimliliği için gerekli olacağını ancak bu gibi kolonların çalışması için daha yüksek basınç gerektireceğini belirtmiştir. 1960'tan önce, kromatografi için partiküller genellikle ≥ 100 μm çapa sahipti ve polimerik kürelerden veya düzensiz silikadan (ezilmiş silika elenerek hazırlanır) oluşmaktadır. Polimerik malzemeler tipik olarak daha düşük plaka sayısı verdiğinden HPLC kolonları için inorganik oksitler (esas olarak silika) tercih edilmiştir. İlk önce HPLC kolonları, camla kaplanmış boncuklar (örneğin, Pellosil) veya gözenekli bir silika tabakası (örneğin, Zipax) ile kaplanmış tanecikler kullanılmıştır. Sabit fazın kalınlığını azalmış ve böylece sabit faz içindeki difüzyon mesafesini azalttığından daha yüksek tabaka sayıları elde edilebilmiştir. Ancak bu yüklenen numune miktarının azalmasına neden olmuştur. Dar boyutta bir aralıkta daha küçük, tamamen gözenekli

parçacıkların daha verimlilik (ayrıca üstün yüklenebilirlik) sağlaması beklenmiş, ancak bu tür parçacıklar elenerek üretilmemiştir. Ancak 1970 yıllarında Merck markasının 5-10 µm boyutlarında düzensiz silika taneciklerini piyasaya sürmesiyle kolon teknolojisinin önü açılmıştır. Sıvı kromatografisinin geliştirilmesi yeni kolonlara dayanmaktadır. Bu da yeni dolgu materyalleri, yeni sabit fazlar (kaplama) ve kolon paketleme prosedürler gerektirmektedir. 1994'ten önceki kolon gelişmeleri hakkında ayrıntılı bilgi olarak Tablo 2.1'de bu kolon yeniliklerinin birçoğu pazara giriş tarihleri ile birlikte özetlenmiştir [17, 21].

Tablo 2.1. Ticari YBSK kolon geliştirmede bazı önemli noktalar [17]

Tarih ^a	Kolon	Özellik	Marka
1967	Pellodil	Peliküler iyon değişim (40 µm)	Northgate
1969	Zipax	Gözenekli silika (40 µm)	DuPont
1971	MicroPak	Düzensiz gözenekli silika (5-10 µm)	Varian
1972	Zorbax	Küresel gözenekli silika (7 µm)	DuPont
1972	Permpase	Silan fazı (7 µm)	DuPont
1973	µ Boundapak C18	Silan fazı (10 µm)	Waters
1978	SynChropak GPC100	Jel geçirgenlik kolonu	SynChrom
1988	Rx-silica	B tipi silika	DuPont
1989	StableBond	Kararlı bağlı faz	DuPont
1994	Hypercarb	Gözenekli grafit karbon	Hypersil
1996	ZirChrom PBD	Zirkonyum parçacıklar	Keystone ^b
2000	SilicaRod	Monolitik kolonlar	Merck
1999	XTerra	Hibrit parçacıklar (3-5 µm)	Waters
2003	Rapid Resolution	Gözenekli silika (1,8 µm)	Agilent
2004	Acquity	Gözenekli silika (1,8 µm)	Waters
2007	Halo	Katı çekirdek içeren partiküller (2,7 µm)	AMT ^c

^aTanıtım yılı, ^bZirchrom tarafından üretilip, Keystone Scientific tarafından pazarlanmaktadır, ^cAdvanced Materials Technology.

Kolon dünyasında en çarpıcı gelişmelerden birisi ise Alman bilim insanı Werner Stöber ve ekibi tarafından 1968 yılında silika taneciklerinin 50-2000 nm aralığında tekdüze ve kontrollü şekilde sentezlenmesini keşfetmeleridir. Bu çalışma kolon dünyasına aynı zamanda core-shell ifadesiyle gözenekli, tekdüze ve istenilen boyutta silika nano parçacıklarını da kazandırmıştır. Bu bilim insanlarına silika nano taneciklerini kontrol etme kabiliyeti kazandırmış ve artık istenildiği gibi sentezlenmeye başlanmıştır.

Bu kolonlarda analitik başarıyı sağlayarak kromatografiyi kantitatif götüren diğer bir önemli adım olarak görülebilir. Çünkü gözenekli kolon dolgu materyali demek yüzey alanının artması ve dolayısı ile kolon içi etkileşimlerin diğer bir ifadeye adsorpsiyon için mevcut teorik plaka sayısını arttırması demektir. Bu nedenle günümüzde gözeneksiz dolgu yerine tercih edilmektedir. Bu tip kolonlarda aynı zamanda geri basınçta oldukça düşük olup daha sağlam oldukları için kan, idrar, beyin ...vb kompleks matrise sahip numunelerin analizinde hayat kurtarırlar [20, 22, 23].

Kolon dolgu materyali olan daha büyük parçacıklar düşük geri basınç yaratır ve daha uzun ömürlü oldukları için daha ekonomiktirler. Küçük parçacıklar daha verimlidir ve daha sivri pikler elde edilir. Partikül büyüklüğü 3-5 µm olan analitik kolonlar, çoğu YBSK ayırma yönteminin gereksinimlerini karşılar. Analitik kullanım için, bir kolon normal gözenek boyutları 70-120 Å arasındadır. Protein ve sentetik polimerlerin ayırımında, kolonun gözenek büyüklüğü daha fazla olup 300 Å, 500 Å, 1000 Å veya daha büyük olabilir.

Kolonun dolgu materyalindeki yüksek karbon içeriği güçlü tutma kabiliyetine neden olur, ancak üretim partileri arasındaki tekrar üretilebilirliğin korunması için karbon içeriği miktarında tutarlılık olmalıdır. %12 - %20 normal karbon içeriğidir.

Sıvı kromatografisinin geliştirilmesi yeni kolonlara dayanmaktadır. Buda, yeni dolgu materyalleri, yeni sabit fazlar (kaplama) ve kolon paketleme prosedürler gerektirmektedir [20]. Tablo 2.2’de bu kolon yeniliklerinin birçoğu pazara giriş tarihleri ile birlikte özetlenmiştir. Mono-fonksiyonel silan bağlanma reaktifi daha iyi tekrarlanabilirlik için yaygın olarak kullanılır. Silanol grubu, güçlü bir amin bileşiği absorplayıcısı olduğu için, yüzey üzerinde artık silanol grubu tutan modifiye silika jel (örneğin, ODS, C₈) gibi bileşikler korunur. Silika destek yüzeyinde kalan artık silanol gruplarının az miktarda silan ile tamamen reaksiyona sokulması işlemi yani trimetilklorosilan, dimetildiklorosilan, vb., son kapatma olarak adlandırılır ve bu artan silika kaplamasının çözünen maddeler ile istenmeyen etkileşimlerinin azaltılmasına yardımcı olur [24].

Tablo 2.2. *En sık kullanılan kolon dolgu materyalleri [17]*

Dolgu Materyali	Kimyasal Adı	Gayriresmi Kısaltması
Oktıl	Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C ₈
Oktadesil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Fenil	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Siyanopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
Aminopropil	Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	Si-(CH ₂) ₃ -OCH(OH)-CH ₂ -OH	-
Pentafloro fenil	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ F ₅	PFP

Pek çok karşılaştırmalı YBSK yöntemi, spektrofotometrik dedektörlerin kullanılmasını gerektirir. Böyle bir dedektör, kolonun ucuna monte edilmiş hücre içerisindeki bir akıştan oluşur. Bir ultraviyole ışınımı hücre içinden ve dedektörden geçer. Bileşikler kolondan ayrıldıkça hücre içerisinde geçerler ve radyasyonu absorplayarak ölçülebilir enerji seviyesi değişikliklerine neden olurlar. Sabit, değişken ve çok dalga boyu dedektörleri yaygın olarak bulunmaktadır. Sabit dalga boyu dedektörleri, düşük basınçlı bir cıva lambasıyla yayılan tek bir dalga boyunda, tipik olarak 254 nm’de çalışır. YBSK için ideal bir dedektörü;

- Kararlı ve tekrarlanabilir
- Yüksek derecede hassaslık
- Geniş bir aralıkta doğrusallık ve hızlı cevap
- Güvenilir, kolay tahrip olmayan ve kullanımı kolay
- Tüm analitlere benzer şekilde cevap verme veya bazı analitlere seçici olarak cevap verme özellikleri tanımlar.

Yansıtma optiği ile birlikte tarama spektrofotometresine sahip en yeni UV/Vis dedektörleri, tüm kromatogramı seçilen bir dalga boyunda görüntülenmesini sağlarlar. Bu dedektörler, yüksek hassasiyet (10⁻⁹ g/mL), az miktarda numune ile tespit etme yeteneği, geniş konsantrasyon aralıklarında doğrusallık, gradient ayrımlarda kullanılabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Sınırlamaları ise, seçilen dalgaboyu bölgesinde ışığı absorplamayan bileşikler tespit edememeleridir [25]. Bu tür absorplamayan yüklü bileşiklerin tespiti için, kolondan çıkan türlerin ve numunenin iletkenliğini ölçmek üzere iletkenlikteki değişikliği ölçen iletkenlik dedektörü kullanılabilir. Bu tip dedektörler özellikle iyon değişimi kromatografisi için en iyisidir, ancak etkinliği elektrokimyasal hücre kararsızlığı ile sınırlanmaktadır [26].

Refraktif indeks dedektörleri, kolon elüsyonundaki analite karşı referans mobil fazın kırılma indeksindeki farka bağlı olarak, kromatogramda pikleri ayrılmış bileşenlerin tespiti için kullanılır. Tüm çözünenlere cevap veren, güvenilir, akış hızından etkilenmeyen ve daha az hassas ancak sıcaklığa karşı oldukça hassas olan bir tekniktir. Ancak iz analizi için kullanışlı olmayıp, çalışma prensibi nedeniyle gradient elüsyonla da kullanılamaz ve pahalı bir detektördür [17].

Yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonuna giren bileşiklerin tayin ve tespit etmek için elektrokimyasal dedektörler kullanılabilir. 10^{-12} ile 10^{-13} g/mL arasında hassasiyet gösterirler. Yüksek hassasiyet, kullanım kolaylığı avantajlarından olmasına rağmen mobil fazın iletkenliği, oksijen, metal kirliliği ve halojenürlerden arındırılması gereklidir [26].

Elüsyon Modları:

- İzokratik elüsyon: Sabit bir hareketli faz kompozisyonunun kullanılması
- Gradient elüsyonu: Mobil faz bileşimi zamanla değişir

İzokratik Mod: Genellikle bir pompa kullanabilir. Tek tip çözücüler kullanılır. Karıştırma haznesi gerekli değildir. Çoğunlukla rutin analizler için kullanılır. Esnekliği sınırlı olduğu için araştırmalarda pek tercih edilmez. İzokratik elüsyonun dezavantajları:

- Çalışma süresini arttırır.
- Son çıkan piklerin hassasiyetini azaltır.

Gradient Mod: Çıkışta hepsini birden karıştırabilen çoklu pompalar kullanıldığı için çok değişken hareketli faz bileşimleri elde edilebilir. Genel olarak, kuaterner sistemler için ikili sistemler kullanılır. Polarite indeksi genellikle mobil fazın değişmesiyle değişir. Kolona takılan bileşenler en iyi bu mod ile ayrıştırılabilir. Ancak her analizden sonra kolonun başlangıç koşullarına tekrar dengelenmesi gerekmektedir. Gradient elüsyonunun dezavantajları:

- Her analizden sonra kolonun tekrar başlangıç koşullarına şartlanması gerekir.
- En az iki çözücü kapasitesine sahip pompa gerektirir
- Bazı dedektör türleri için uygun değildir (RI, EC)

2.1.1. YBSK Türleri

Sıvı kromatografisindeki ayırma modlarının geleneksel sınıflandırması otoriteler tarafından yapılmıştır.

Normal-faz kromatografisi, polar durgun fazın polar olmayan hareketli faz ile birlikte kullanılmasını gerektirir. Bu teknikte yaygın olarak kullanılan sabit fazlar, silika ve çeşitli polar-bağlı fazları (siyano, diol, amino) içerir. Burada tutma, sabit faz yüzeyinin aktif bölgeleri için çözünen ve çözücü moleküller arasındaki rekabetçi adsorpsiyonun sonucudur.

Ters-fazlı kromatografi de ise tam tersi mümkün olup, polar olmayan bir sabit faz ve bir polar hareketli fazın kullanılmasını gerektirir. Mobil faz su, metanol, asetonitril veya tetrahidrofuran olabilir. Modern ters fazlı sıvı kromatografi için sabit fazlar tipik olarak silikaya kimyasal olarak bağlanmış organik bir fazdan oluşur. Standart C₈, C₁₈ veya fenil kolonları normalde ters fazlı kromatografi kullanılarak bileşiklerin ayrılması için kullanılır. Hareketli faz hazırlanırken kullanılan bazı organik çözücüler ile fiziksel parametreleri Tablo 2.3’de verilmiştir [17].

Tablo 2.3. *En sık kullanılan çözücülerin genel özellikleri*

Çözücü	KI	UV Gözlenebilme (nm)	Viskozite (cP)	KN (°C)	P’
n-Hekzan	1,375	210	-	68,7	0
Diklorometan	1,424	245	0,44	41,0	3,4
Tetrahidrofuran	1,408	222	0,55	65,0	4,2
Asetonitril	1,344	210	0,37	80,1	6,2
İzopropanol	1,380	210	2,30	82,4	4,3
Etanol	1,361	210	1,20	78,5	5,2
Metanol	1,329	210	0,60	65,0	6,6
Etilen glikol	1,427	210	19,90	198,0	5,4
Asetik asit	1,372	251	1,26	118,5	6,2
Su	1,333	<190	1,00	100,0	9,0

KI: Kırılma indeksi; UV gözlenebilme: Bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz; KN: Kaynama noktası; P’: Polarite indeksi, Rohrschneider’s verileriyle hesaplanan.

Ters faz kromatografisinde tutma, adsorpsiyondan ziyade, bir bölümlleme prosesine tabi tutulur. Bu bölümlleme, çözünen maddenin durağan faz ile hareketli faz arasındaki kimyasal potansiyel farkı ile düzenlenir ve çözünen maddenin her iki fazdaki enerjisi de önemlidir. Ters ve normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin temel farkları Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4. Ters ve normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin temel farkları

İncelenen Özellik	Ters Faz	Normal Faz
Sabit faz polaritesi	Düşük	Yüksek
Hareketli faz polaritesi	Ortadan yükseğe	Düşükten ortaya
Kolonu terk etme sırası	En polar önce	En apolar önce
Hareketli fazın polarite artış etkisi	Elüsyon zamanını artırır	Elüsyon zamanını azaltır

İyon çifti kromatografisi, numune bileşenleri iyonize olduğunda kullanılır ve ayrıca bu bileşenler iyon çifti reaktifıyla etkileşime girebilir. Bu, alıkonulma ve ayırımın öncelikle mobil fazın pH, iyon-çift reaktif seçimi ve iyonik güç olarak konsantrasyonu özelliklerinden etkilendiği anlamına gelir. Burada kullanılan sabit fazlar, ters faz kromatografide kullanılanlardan bazılarıdır.

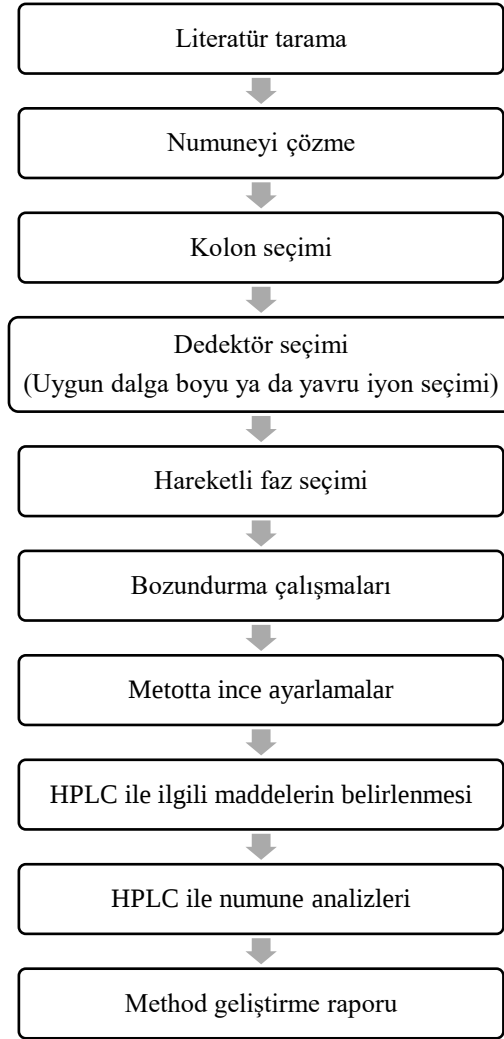
İyon değişimi kromatografisi, suda çözünür ve iyonlaşabilir bileşikler ayırmak için kullanılır. Katyon değişim reçineleri normal olarak aminler gibi bazik maddeleri ayırmak için kullanılırken, anyonik değişim reçineleri fosfat, sülfonat veya karboksilat grupları gibi bileşiklerin ayrılması için kullanılır.

İlaç etken maddelerinin insan ya da hayvan vücudunda hedef bölgelere varmak için en az birkaç membrandan geçmeleri gerekmektedir. Bu membranlara genelde fosfolipit, kolesterol, hidrofobik segment ...vb gibi yağ yapısında olan apolar bileşikler ihtiva ettiklerinden dolayı API'lerinde apolar yapıda olma zorunluluğu vardır. Bu ilaç etken bileşiğin kan, gıda gibi polar fazlarla pek etkileşmeden hedef membranlara yönelmesinde sağlar. Nitekim günümüzde etkinliği çok yüksek olan API'lere bakıldığında istisnalar hariç hemen hemen hepsi apolar yapıdadırlar. Bu nedenle ilaç analizlerinde çoğunlukla ters fazlı sıvı kromatografisi tercih edilir ve analizlerde oldukça başarılı olup günümüzde özellikle kütle dedektörü gibi gelişmiş teknikler sayesinde 250'den fazla kalıntının analizlerinin yapılabilirdiği çalışmalar ortaya çıkmaya başlamıştır [27].

2.1.2. Ters fazlı Sıvı Kromatografisi için Yöntem Geliştirme

Ters faz sıvı kromatografisinde sabit faz için genellikle C₁₈ ya da C₈ gibi apolar kolonlar seçilirken hareketli faz oldukça polar yapıda olup bileşenlerden biri muhakkak sudur. Bunun dışında hedef analitin apolar olması nedeniyle hareketli faz ile etkileşimin tamamen kopmaması, çokmelerin yaşanmaması için nispeten apolar özelliği olan ama su ile de karışabilen metanol, asetonitril gibi bir hareketli faz bileşeni daha seçilir. Asetonitril apolar özelliği fazla olması ama aynı zamanda suyla iyi karışabilmesi, belli oranda

tamponlarında taşıyabilmesi nedeniyle daha sık tercih edilir. Çünkü çoğu zaman metanol, apolarlığı nedeniyle kolonla fazla etkileşime girmiş analitleri uygun kromatografik ayırım süresinde çıkartamayabilmektedir. Metot geliştirme sürecinde yer alan adımlar Şekil 2.7'deki akış şemasında gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Metot geliştirme şeması

2.2. Ayrımın Optimizasyonu

Ters fazlı YBSK bir metodu optimize etmek için birden fazla parametre sunar. Tersine çevrilmiş faz YBSK ile ayrımı planlamak için analistin hem sabit faz hem de araştırılan analite uygun bir hareketli faz seçmesi gerekir. Ek olarak, analist, numune sabit faz kolonundan detektöre geçerken analit piklerinin keskinliğini koruyacak kromatografik koşulları da tanımlamalıdır. Ayrılmanın optimizasyonundaki ilk girişim,

ümit verici koşulların seçilmesini gerektirir. Bu koşullar, önerildiği gibi genel bir kümeden başlayarak, birkaç seçenek incelenerek elde edilebilir.

Çözücü kuvvetini optimize etmek için, muhtemelen çok güçlü olan bir hareketli faz ile başlamak ve art arda gelen işlemler arasında kapasite faktörünü (k) artırmak için çözücü kuvvetini azaltmaktır. Çözücü kuvveti numune için uygun şekilde ayarlandıktan sonra, araştırılabilecek bir sonraki ayırma parametresi seçiciliktir (α). Çoğu durumda, sadece değişen çözücü kuvveti ile tatmin edici bir ayırma elde etmekte mümkündür.

Bu genellikle daha az polar ve orta polar iyonik olmayan çözünen maddeler gibi basit ve kolayca çözülen numuneler için yeterlidir. Ancak iyonik ve iyonlaşabilir bileşikler içeren numuneler için, çözücü kuvvetindeki değişikliklerin yanı sıra, seçicilik, tutmayı veya pik şeklini optimize etmek için başka birkaç ayırma değişkeni de değiştirmek gerekebilir. Daha yaygın kullanılan değişkenlerin bazıları Tablo 2.5’de listelenmiştir.

Tablo 2.5. Seçiciliği değiştirmek için kullanılan değişkenler

Değişken	Yorum
Organik çözücü seçimi	Metanolden asetonitril veya THF’ye değişim sıklıkla ayrılmasında büyük değişikliklere neden olur.
Mobil faz pH	A’da bir değişiklik, iyonik veya iyonlaşabilen bileşikler içeren numuneler için pik ayrımı üzerinde büyük bir etkiye neden olabilir
Organik faz yüzdesi	Genellikle tutma ve ayrılmada önemli değişiklikler sağlar.
Kolon tipi	Bu, ters fazlı LC (C_{18} , C_8 , fenil, siyano, trimetil vb.) için birleşik faz seçimi anlamına gelir.
Hareketli faz katkı maddelerinin derişimi	En çok kullanılan katkı maddeleri arasında amin değiştiricileri, asit değiştiricileri, tamponlar ve tuzlar bulunur.
Sıcaklık	Sıcaklık, pik ayrımını kontrol etmek amacıyla 0 ila 70 °C arasında değişebilir; 25-60 °C sıcaklık ise daha yaygındır.

Seçicilik değişikliklerinde bazen bir organik çözücünün bir başkasıyla yer değiştirmesi istenebilir. Çözücü gücü monografi, ters fazın hareketli faz bileşenlerinde çözücünün bu şekilde değiştirilmesi için gerekli bilgileri sağlar.

Sabit faz optimizasyonu aynı zamanda ters faz içinde bir seçenektir. Ters faz ayırımlarda oktadesil ve oktil en yaygın kullanılan fazlardır ancak siyano, fenil kolonları da sıklıkla kullanılır. İstenilen ayırma elde etmek için test edilen her kolona mobil faz optimizasyon deneyleri yapılmalıdır.

Asidik veya bazik bileşikler içeren numuneler için alıkonulma, tamponun hem iyonik kuvvetine hem de pH'sına bağlı olarak değişebilir. pKa değerleri, ters faz kromatografi ile ayrılacak bir grup bileşik için bilinirse ve bu pKa değerleri farklıysa, o zaman ± 2 birime yakın bir pH değerinin, karışımın ortalama pKa değerinin iyi bir ayırma sağlaması muhtemeldir. Asit, baz veya tuz içeren numuneler durumunda ters fazlı hareketli faz için literatürde önerilen katkı maddelerinin ilavesi gerekebilir.

Ters fazlı sıvı kromatografisinde numune bileşenleri izin verdiği zaman 30-60 °C'lık bir sıcaklık uygun görünmektedir. Ortam koşullarına kıyasla bu sıcaklıklarda işlem, teorik plakalar açısından kolon verimini genellikle iki katına çıkarır.

Çözücü kuvvetini korumak için çeşitli organik çözücülerin farklı konsantrasyonları gerekebilir. Mobil faz pH'sının değişmesi, eğer numunedeki bileşenler asit veya baz ise, ters fazlı YBSK'de seçici olarak ayrımı büyük ölçüde değiştirebilir.

Hareketli fazda tamponlama veya pH ayarı, numune bileşenlerini iyonize olmayan bir formda tutarak pik genişlemesi azaltma amacıyla iyon baskılaması için kullanılır. Numune zayıf bir baz olduğunda, $pK_a < 8$, iyon bastırma tekniği asidik tampon ilave edilerek kullanılabilir. Bu etkisizse, alkil sülfonik asit gibi iyon çifti reaktifi eklenebilir. Diğer taraftan; güçlü bazlar için $pK_a > 8$, iyon çiftleri iyon baskılamasından daha etkilidir.

Mobil faz bileşimi, pikler genişlemesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olup diğer değişkenler o kadar güçlü etki yapamazlar. Bu nedenle maksimum değişiklik sağlayacak en az sayıda mobil faz denemek daha iyidir. Daha sonra, eğer gerekliyse, optimum k aralığını sağlamak için mobil fazlar harmanlanabilir. Numune pikleri için YBSK yöntemi geliştirmedeki ayırma hedefleri Tablo 2.6'da gösterilmektedir.

Tablo2.6. YBSK yöntem geliştirmede ayırma hedefleri

Ayırım gücü	Kesin ve sağlam kantitatif $R > 1,5$ gerektirir.
Ayırım süresi	Rutin prosedürler için <10-20 dakika ayırma süresi istenir.
Kantitatif	Miktar tayinleri $\leq 2\%$ (göreceli standart sapma); İz kirlilikler için $\leq 5\%$
Pik yüksekliği	Yüksek sinyal/gürültü oranı için dar pikler istenir.

Sıvı kromatografisinde ayırmanın yani kolonun verimliliği doğrudan numune bileşenlerinin kolondan geçiş sırasında yarattıkları pik genişlemesi ile ilgilidir. Bu nedenle pikgenişlemesini etkileyen her bir etmen ayırmanın verimini de etkiler. Numune bileşenleri kolondan geçişleri sırasında yukarıda değinildiği gibi birçok fiziksel ve

kimyasal olaylar yaratırlar. Bu olayların bazıları çeşitli parametrelerin değiştirilmesi ile kontrol edilebilirken bazılarının kontrolü ise pek mümkün değildir. Kolon verimliliğinin ölçüsü ise söz konusu kolonun plaka/metre sayısıdır. Ancak bu değerlerden bahsedilirken mutlaka akış hızının da belirtilmesi gerekir. Böylece kolon alıcısı aldığı ürün için beklenen performansı hakkında gerçekçi fikir edinebilir. Kolon verimliliği üzerinde etkisi olan deneysel parametreler Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7. *Kolon verimliliğine etkisi olan deneysel parametreler*

Parametre	Plaka sayısına etkisi
Çizgisel hız, u	Çizgisel hızın 0,05 cm/sn üzerinde olduğu düşük hızlar N değerini arttırır.
Partikül boyutu, d_p	Küçük tanecikler N değerini arttırır.
Kolon uzunluğu	N değeri L ile doğru orantılıdır.
Hareketli faz viskozitesi, η	Düşük viskoziteler N değerini arttırır.
Sıcaklık, T	Arttığında viskoziteyi azaltacağı için N değerini arttırır.
Çözünen kapasite faktörü	Düşük k (<2) N değerini azaltır; yüksek k (>2) değerinin N üzerine etkisi ise azdır.
Kolonun ölü hacmi	Pik genişliğini arttırdığı için band genişliğinin artmasını sağlayarak N değerini azaltır.
Numune miktarı ve boyutu	Sisteme büyük miktarlarda (mg) ya da büyük hacimlerde (100 μ L) numune yüklemesi N değerini azaltır.

2.2.1. Nicel Analiz

2.2.1.1. Yöntem miktar tayini

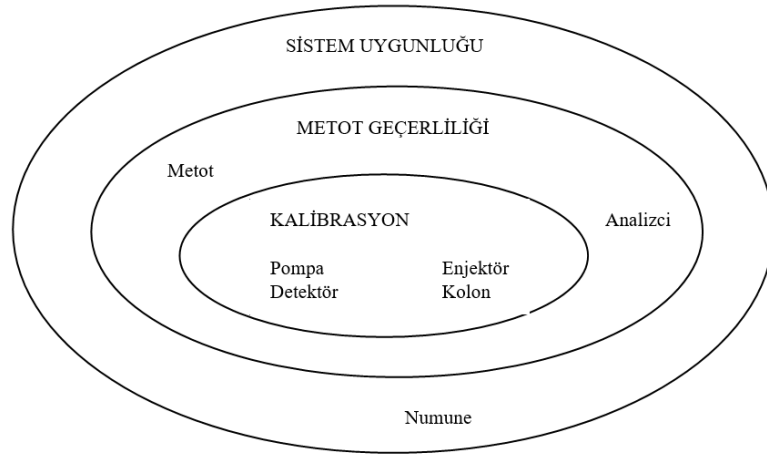
Elde edilen kromatogramlar bileşenlerin miktarının tahmini için kullanılabilir. İzlenen adımlar aşağıdadır:

- YBSK’ye enjekte etmeden önce numune alma ve numune hazırlama işlemleri
- Numune enjeksiyonu, kromatografik ayırma ve kromatogramı kaydetme
- Kromatogramlarda elde edilen piklerden verilerin yorumlanması

Analit derişimine karşı doğrusal tepkiye sahip bir dedektör için, herhangi bir noktada alınan yanıtı karşı numune bileşenlerin konsantrasyonu belirlenebilir. Bu amaçla genellikle, pik normalizasyonu, iç standart ekleme ve karşılaştırma metodu amaca göre kullanılmaktadır.

Kromatografik koşulları etkileyen parametreler sistem uygunluk testleri (SUT) çalışmaları altına toplanır ve incelenir. Sistem uygunluğu terimi genellikle kalibrasyon ve

onaylama ile birbirinin yerine kullanılır. Ancak, üç terim oldukça farklıdır ve ayrı ve farklı süreçleri temsil eder. Kalibrasyon (cihaz testi) sistemdeki her bir bileşenin düzgün çalışmasını sağlarken doğrulama, bir yöntemin kalıcılık özelliklerinin (doğruluk, hassasiyet, özgüllük, vb.) amaçlanan kullanımı için asgari gereklilikleri karşıladığının kanıtıdır. Toplam analitik sistemin belirli bir zamanda doğru bir şekilde çalışmasını sağlayan araç bu üç işlem arasındaki ilişki Şekil 2.8’de verilmiştir [28].



Şekil 2.8. Kromatografik sistem parametreleri arasındaki ilişki

Şekil 15’de görüldüğü gibi, her terim giderek daha fazla analitik alanını kapsamaktadır. Sistemin başlangıç noktası, bileşenlerin işlevselliğinin doğrulanması, yöntemin performansını ölçerken doğrulama sadece kalibre edilmiş bileşenlerde belirlenebilir. Düzgün bir şekilde tasarlanmışsa, sistem uygunluk testi, mevcut sistemin sisteme uyumlu olmasını sağlar ve onaylanmış sistem ve tüm sistem bileşenlerinin işlevselliğini doğrular. Bu amaçlı sistemi yansıtır ve uygunluk olarak kromatografik sistemde görev yapar. Genel sistem performansına erişmek için aşağıdaki değerlerin hesaplanması ve uygun aralıklarda olması gereklidir. Tablo 2.8’de sistem uygunluk parametreleri ve olması gereken değer aralıkları verilmiştir [29].

Tablo 2.8. *SUT parametrelerinin sınırları*

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

2.2.1.1.1. *Bağıl alıkonulma*

Bağıl alıkonulma, iki bileşenin alıkonulma zamanlarının birbirlerine oranlanmasıdır. Durgun ve hareketli faz sisteminin iki bileşik arasında ayırma kabiliyetini açıklar. Kolon konstrüksiyonundan (uzunluk, paketleme kalitesi) ve akış hızından bağımsızdır. Hareketli ve sabit fazların sıcaklığına ve özelliklerine bağlıdır. Analizi yapan bileşenlerden bağımsız olması nedeniyle özellikle karmaşık matrislere sahip numunelerin analizlerinde iç standart kullanılarak hesaplanır.

2.2.1.1.2. *Teorik plaka sayısı*

Teorik plakanın sayısı (N), kolon paketlemenin kalitesini ve kütle transfer fenomenlerini karakterize eder. Kolon verimliliğini ifade eden en önemli parametredir. Kolonun plaka sayısı analizi yapılan bileşenin cinsinden kolon dolgu materyalinin sentez koşullarına birçok etkene doğrudan bağlıdır. N büyüdükçe, daha karmaşık numune karışımları kolonla ayrılabilir.

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2 \quad (2.2.)$$

2.2.1.1.3. *Kapasite faktörü*

Analit sabit faz tarafından alıkonulur. t_R zamanı ifade eder ve t_M ise bileşenin hareketli fazdaki harcadığı zamanı temsil eder, bunların oranı bir değer verir. Bu değere kapasite oranı veya kapasite faktörü denir. Analit; durgun fazda hareketli fazdan daha fazla zaman geçirirse k değeri büyük olur. Bu durum bileşenin sabit fazla oldukça iyi etkileşime girdiğini gösterir. Ancak bileşen kolonda hiç tutunmadığı yani çözücü pikinden ayrılmadığında k değeri çok küçüktür.

$$k = \frac{t_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.3.)$$

2.2.1.1.4. *Seçicilik*

Daha çok numuneden birden fazla bileşen ayrıldığı ya da iç standart eklenerek yapılan ayrımlarda kromatografik etkinliğin ifadesi için kullanılır. Aslında her bir bileşen için kapasite faktörünün birbirine oranıdır. Seçicilik (α) kapasite faktörü gibi bileşenin sabit ve hareketli fazla olan etkileşimini ifade eder ve daima matematiksel ilişki nedeniyle 1'den büyük olur.

$$k' = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}} \quad (2.4.)$$

2.2.1.1.5. *Kuyruklanma faktörü*

Kuyruklanma faktörü (T), pik yüksekliğinden %5'e kadar ölçülür; burada A pikin ön tarafından maksimumuna olan mesafe ve B pikin arka tarafından maksimum uca olan mesafedir. Pikin eğriliği, herhangi bir tarafa dayalı olup olmadığı ve yeterli sivrilikte olup olmadığını ifade eder. Kolonların uzun süreli kullanımı, yüksek akış hızında ya da yüksek polar fazda ayırmanın yapılması gibi sert koşullar kolonun çok daha kısa sürede kuyruklu pikler vermeye başlar.

$$T = \frac{B}{A} \quad (2.5.)$$

2.2.1.1.6. *Ayrım gücü*

Ayrım gücü, iki bileşen arasındaki ayrılma derecesinin bir göstergesidir. Ortalama pik genişliğine bölünerek iki pik arasındaki alıkonulma süresindeki fark olarak tanımlanır. Bileşenin ayırımına hareketli faz ile sabit fazın ortak etkisini ifade eder.

$$R_S = \frac{1,18(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}} \quad (2.6.)$$

$$R_S = (1/4)\sqrt{N}x[(\alpha - 1)/\alpha]x[k_2(1 + k_2)] \quad (2.7.)$$

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1} \quad (2.8.)$$

Burada;

t_1 , öndeki pikin alıkonulma zamanı;

t_2 , arka pik noktasının tutma süresidir;

W_1 , ön pik genişliği

W_2 , arka pik genişliğidir.

2.2.1.1.7. *Pik asimetrisi*

Pik kuyruklanmasının, çatallaşmasının ya da herhangi bir omuz oluşturup oluşturmadığının diğer bir göstergesidir. Söz konusu pikin taban yüksekliğinin %10'u civarında ölçülür, burada A pikin ön tarafından maksimumuna olan mesafe ve B pikin arka tarafından maksimum uca olan mesafedir.

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (2.9.)$$

2.2.1.1.8. *Pik alanının tekrar edilebilirliği*

Kromatografik çalışmada analite ait görüntü olarak kabul edilen kromatogramdaki pikin alanı ya da yüksekliğinin ardıl enjeksiyonlarda aynı şartlar altında tekrar edilebilir olması gerekir. Bu aynı zamanda metodun kesinliğinin bir göstergesi olup metod geçerliliğinin doğrudan bir parametresi olarak kabul edilebilir. Pik alanın tekrarlanabilirliği çalışılan matris ve ayrılmak istenen bileşenin miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Analiti içeren numune çözeltisi sıvı kromatografi sistemine en az 5 kez verilerek analizi yapılır. Elde edilen kromatogramdan pik yüksekliği ya da alanının bağıl standart sapması (BSS) hesaplanır. Genel analizlerde iyi bir tekrarlanabilirlik için düşük BSS beklenirken karmaşık matrislerde değeri daha yüksek olup iz elementlerin analizinde ise oldukça geniş bir aralıkta büyük değerler alması normal kabul edilir.

2.3. Kütle Spektrometrisine Giriş

Kütle Spektrometresi, molekülün elektron bombardımanı ile üretilen pozitif ya da negatif iyonlarının analizi ile molekülün tanımlanması tekniğidir. Bu iyonların kütleleri kütle spektrometresinde kaydedilir. Bu iyonların birleşimini düşünerek puzzle gibi orijinal molekül yeniden oluşturulmuştur. Elektronlu bir molekülün bombardıman edilmesinde çoğunlukla tek yüklü pozitif iyonlar üretilir. Bu iyonlar kütle/yük oranına göre ayrıştırılır ve ardından tanımlanır. Bu teknik günümüzde çoğunlukla organik moleküllere uygulanır. Çok yüksek doğrulukta bağıl moleküler ağırlık kütle spektroskopisi ile elde edilebilir. Bu verilerden kesin moleküler formül çıkarılabilir. Ayrıca, molekül içindeki belirli gruplar tanımlanabilir.

Özellikle son yirmi yıl, kütle dedektörünün yapabilirliklerinde çarpıcı bir artış yaşanmıştır. Bu dönemin başında, hızlı atom bombardımanının keşfi özellikle biyolojik moleküller olmak üzere termal olarak kararsız moleküllerin daha kolay analizini sağlamıştır. Bu tekniğin, bu tür moleküllere uygulanabilen matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) gibi diğer

iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesinde katalizör görevi gördüğü söylenebilir. Sıvı kromatografik tekniklerin kütle spektrometresi (MS) ile kombinasyonu önemli bir gelişme olmuştur. Arayüzlerden 1 mL/dk'da akan tipik analitik kolonlardan analit tarafından üretilen MS iyonizasyonu vakumda 1 L/dk iyon potansiyeli ile akışı tekniği daha da vazgeçilmez hale getirmiştir.

LC-MS tekniği, YBSK'nin fiziksel ayırma yeteneklerini, kütle spektrometrisinin kütle analiz yetenekleriyle birleştirir. Avantajları çok yüksek hassasiyet ve özgüllük, hızlı analiz, karmaşık bir karışımdaki kimyasalların potansiyel olarak tanımlanması, sulu numunelerin doğrudan çalışması, ısıl bozulma olmaması, alıkonulma süreleri ve moleküler ağırlıklar sağlarken, dezavantajı ise türev olmamasıdır.

2.3.1. Aletler

Kütle spektrometresi, bir maddenin yaklaşık 70 eV enerjiye sahip olan bir elektron ışını ile bombalandığı bir cihazdır. Üretilen iyon yavruları vakkumdaki manyetik alandan geçerken ayrılır ve kütleleri bir spektrum olarak kaydedilir. Bombardıman için kullanılan enerji, moleküldeki bütün bağları kırmak için yeterlidir. İyon kütlelerinin bu kaydı, göreceli bolluklarına karşıdır ve buna kütle spektrumu denir. Yüklenmiş bir parçacık uygun bir şekilde yönlendirilmiş bir manyetik alanda hareket ettiğinde, iyon yolunun eğriliğinin yarıçapına kütlesi karar verir. Bu nedenle farklı kütlelerin iyonları manyetik alanda farklı yollarda hareket eder ve böylece ayrılırlar.

Numune taşıma sistemi, iyonlaşma odası, ivme odası, analiz tüpleri, mıknatıs, iyon toplayıcı, amplifikatör ve kaydedici, kütle spektrometresinin ana bileşenleridir.

2.3.2. Kütle spektrumu

Ana iyon daha küçük iyonlar vermek üzere parçalanır. Böylece çok sayıda yavru iyonlar oluşur ve bunların her biri daha küçük yavru iyonlara bölünebilir. Dedektöre ulaşmak ve bir pik olarak kaydedilmek için ana iyondan birkaçı bozulmadan kalabilir. Buradan, bileşiğin bir moleküler ağırlığı elde edilebilir.

2.3.3. Numunenin tanıtılması

Numunenin yerleştirilmesi doğrudan iyonizasyon kaynağına, sıvı veya gaz kromatografisi yoluyla yapılır ve daha sonra numunenin yüksek vakum altında kütle analizi cihazına ilerlemesine ve parçalanmasına izin verilir. Parçalanmış türlerin ve çözücü moleküllerinin, ortalama bir serbest yolda detektöre kadar geçmesine izin verilir, burada bileşen serileri sırayla analiz edilir.

2.3.4. Numune iyonizasyon yöntemleri

Kullanılacak olan tekniğin analiz edilecek numunenin türüne bağlı olduğu farklı iyonizasyon teknikleri mevcuttur.

2.3.4.1. Elektrosparı İyonlaşma (ESI)

Bu, atmosferik basınçta iyonizasyon tekniklerinden biridir ve polar moleküllerin analizine çok uygundur. Bu yöntem sırasında, numunenin uçucu çözücü içinde çözünmesine izin verilir. Kapiller ucuna yüksek voltaj 3 veya 4 kV uygulanır. Kullanılan azot gazı, yüklü iyonların delikten geçerek yüksek vakum içine geçmesi için sprey ucu ile kütle spektrometresine yönlendirilmesine yardımcı olur.

2.3.4.2. Elektron Etkisi (EI)

Düşük molekül ağırlıklı nötr organik moleküller için en uygun olanı budur. Bu teknikte numuneler termal olarak daha kararlı olmalıdır. Numunenin proton afinitesine bağlı olarak, iyonizasyon yöntemlerinin çoğunda hem pozitif hem de negatif yüklü numune iyonları yaratma olasılığı vardır. Analize başlamadan önce, pozitif veya negatif yüklü iyonların seçimine karar verilmelidir.

2.3.4.3. Dörtlü analizör

Bu en yaygın analizördür ve genellikle kütle filtreleri olarak adlandırılır. Kompakt boyut, hızlı tarama hızı, yüksek iletim verimliliği ve makul vakum gibi özellikler küçük ucuz cihazlar için idealdir. Kütle spektrometresinde, bir elektrik alan, kaynak bölgesinden çıkan iyonları dörtlü analizöre hızlandırır. İyon, dörtlü analizörde m/z değerlerine göre filtrelenir, böylece yalnızca bir m/z değeri iyon dedektöre çarpar. Seçilen m/z değerinin üstünde veya altında olan iyonlar dörtlü filtre tarafından reddedilir. Kütle spektrumunun tamamını toplamak için RF ve DC alanları taranır.

2.3.5. Dedektörler

İyonların tespiti yüklerine veya momentumlarına dayanır. Şu anda kullanılan dedektörler, bir foto çoğaltıcı tüp kullanarak iyon sinyalini yükseltir.

2.4. LC/MS-IT TOF

Son on yılda, LC-MS bilinen ve bilinmeyen bileşenlerin hızlı taranması ve karakterizasyonu için en seçici teknik haline gelmiştir. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu (APCI) ve elektrosprey iyonizasyonu (ESI) içeren arayüzler, analizler için uygun olan LC-MS konfigürasyonunda başarıyla kullanılmıştır. Üç tip kütle analiz cihazı vardır: dört kutuplu (Q), iyon tuzağı (IT) ve uçuş süresi (TOF). Amaçlı kombinasyonla,

üçlü dört kutuplu (TQ), Q-IT, IT-TOF, Q-TOF ve TOF-TOF ve ayrıca Fourier dönüşümü iyon siklotron rezonansı (FTICR) ve Orbitrap içeren 3D tuzaklar ticari olarak üretilmiş olup kullanımları yaygınlaşmaya başlamıştır.

TOF-MS 10.000 ya da daha fazla çözünürlüğe sahip olması nedeniyle oldukça güçlü ve umut vaat eden bir araçtır. TOF-MS, yüksek veri toplama hızına sahip olup tam tarama spektral hassasiyetinin yanı sıra, doğru kütle ölçümü (yeterli kalibrasyon aralığında <2 ppm kütle hassasiyeti sağlama olasılığı) sunar. Doğru kütle ölçümü, bilinmeyen türlerin tanımlanması için kullanılan ana ve yavru iyonlarının temel bileşimini ve izobarik türlerin daha büyük bir farklılaşmasını verir (aynı nominal kütleyle sahip iki farklı bileşik, aynı zamanda farklı kesin kütlelere sahip farklı temel bileşime sahip). Buna bağlı olarak, iyon tuzağı analizörleri özellikle çoklu parçalanma adımları (MS^n) için uygundur [30].

Doğrusal iyon tuzaklarında, salınımlı elektrik alanlarının yanı sıra, hiperbolik ve halka şeklindeki elektrotların özel bir düzenlemesi nedeniyle iyonlar izole edilir ve biriktirilir. Ardından iyonlar, çarpışma ile indüklenen ayrışma (CID) ile yukarıda tarif edildiği gibi benzer şekilde parçalanabilir. Bu işlem sıralı bir şekilde tekrarlanabilir, böylece izomerlerin farklılaştırılmasında kullanılabilecek değerli yapısal bilgiler elde edilir (aynı tam kütleyle ve temel bileşime sahip iki farklı bileşik).

Bu anlamda, deneysel formüller üretmek için LC/TOF-MS doğru kütle ölçümlerinin kombinasyonu ve yapı onayı için ek parçalanma verileri sağlayan LC/IT- MS^n , kompleks sistemlerin analizi için güçlü bir metodoloji sunar. Şu anda, bu strateji, çevresel kirlenici maddelerin, bitkisel ekstraktların, matrislerin ve diğer birçok girişimlerin varlığında analiz metotları başarıyla geliştirilmiştir ve uygulanmaktadır [31].

2.4.1. Doğru kütle ölçümleri

TOF cihazının ana özelliklerinden biri, ana ve yavru iyonlarının temel bileşimini veren ve bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması ve izobarik bileşiklerin farklılaşması için kullanılabilen kesin kütle ölçümüdür. 5 ppm'deki doğru kütlelerin ölçümü, elementel bileşimlerin doğrulanması için yaygın olarak kabul edilir. Bu kadar hassas kütle ölçümünü elde etmek için, spektrometrenin tam ayarlanması ve kalibrasyonunu gerektirir.

TOF-MS analizörüyle uyumlu olarak yazılım sistemine 'sistem içi kütüphane' (bileşenlerinin kimyasal bilgilerini içeren) bileşenlerin taranması için oluşturulmuştur. Sistem içi kütüphaneye kaydedilen hedef olmayan bileşikler için, tam element bileşimleri

genellikle birkaç aşamada çıkarılır. İlk olarak, düşük yavru iyon gerilimleri kullanılır ve TOF-MS yazılımı tarafından, doğru kütle ölçümlerine ve çift bağ eşdeğeri (DBE) indeksi, izotopik işlevi gibi farklı kriterlere göre olası moleküler bileşimi listelenir. İkincisi, en muhtemel moleküler formüller (kriterlere tekabül eden) seçilir ve kapsamlı sistem içi kimyasal kütüphaneye göre aranır. Sonunda, her kimyasal formüle göre kütüphane isabetleri kaydedilir. Bu strateji, hedef olmayan bileşenlerin taranmasını ve TOF-MS'in doğru kütle ölçümlerinin kolaylaştırır.

2.4.2. Parçalanma

Parçalama voltajı, MS^n yavrutasyonuna tekabül eden, CID kaynağından kaynaklanan MS spektrumunda karakteristik yavru iyonları sağlamak için çok önemlidir. Genellikle, parçalama voltajının ayarlanması gerekir çünkü numunedeki çeşitli bileşen tipleri, farklı parçalayıcı voltajlarında karakteristik parça iyonları üretir. Böylece, parçalayıcı voltajının dinamik olarak ayarlanmasıyla TOF-MS, temel bileşimleriyle birlikte çeşitli karakteristik parça iyonları üreterek önemli yapısal bilgiler sağlayabilir. Bununla birlikte, yavru iyonların ana iyonunun, özellikle karmaşık matris numuneleri analiz edilirken, onaylanması bu kadar kolay olmayabilir. Bu durum tespit ve onay sürecini zorlaştırabilir ve ilgilenilen analitler için parçalanma yollarının çıkarımını etkileyebilir. Neyse ki, IT-MS bu sorunu, aşağıdaki bölümde detaylı olarak anlatılacak olan kendi özellikleriyle kolayca çözmektedir [32].

2.4.3. IT-MS

Kantitatif çalışmalar yerine, özellikle çoklu parçalanma adımları (MS^n) için uygun olan iyon tuzağı analizöründe farklı bir süreç izlenir. Doğrusal iyon tuzaklarında iyonlar, hiperbolik ve halka şeklindeki elektrotların yanı sıra salınımlı elektrik alanlarının özel bir düzenlemesi sayesinde izole edilir ve biriktirilir. Daha sonra bu iyonlar, TOF-MS analizöründe yukarıda CID ile tarif edilene benzer bir şekilde parçalanabilir. Bu işlem gerektiğinde 12 aşamaya kadar tekrar edilebilmektedir. Böylece, hedef bileşiklerin yapıları, TOF-MS'nin hedef ana ve yavru iyonlarını kilitleyememesi problemini çözen MS^n işlemi uygulanarak geçici olarak açıklığa kavuşturulur. Bu özellik, IT-MS'i izomerlerin ve hatta bilinmeyen bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında farklılaşma için güçlü bir araç haline getirmiştir. Bununla birlikte, IT-MS yüksek çözünürlükte bilgi sağlayamaz ve öncül iyon seçiciliğinin iyi olmasını da sağlayamayabilir. Açıkça görünen odur ki; TOF-MS ve IT-MS kombinasyonu analiz prosedürleri sırasında kendi kusurlarını giderebilecek tamamlayıcı avantajlara sahiptir [33].

Yapı aydınlatması için LC-TOF-MS ve LC-IT-MS kombinasyonlarının prosedürleri; çok sayıda literatüre göre bu sistem gelecekte, hedef olmayan bileşiklerin tanımlanması ve doğrulanması için çoklu göreceli prosedürlere işaret etmektedir:

- 5 ppm içerisinde doğru kütle verileri, iyi eşleşen izotop profili ve DBE ile otantik moleküler formülü sağlar;
- Belirli koşullar altında, CID'nin kaynak içi parçalanmasından kaynaklanan yavru iyonları TOF-MS spektrum destekli yapı açıklamasında iş görür;
- Çok aşamalı analiz yapmak ve izomerlerin farklılaşması dahil olmak üzere hedef bileşiğin yavru iyonlarını onaylamak için IT-MS'den yararlanır.

Son olarak, sonuçların doğrulanması için referans standardı (varsa) kullanılabilir. Bu prosedürleri uygulayarak, çoklu bileşenlerin açıkça tanımlanması ve izobarik türlerin ve izomerlerin farklılaşması mümkün olacaktır.

2.4.4. LC-IT-TOF/MS

En yeni LC/MS enstrümantasyon tasarımlarından biri olarak, yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle birleştirilmiş hibrit iyon tuzağı/uçuş süresi kütle spektrometresi (LC-IT-TOF-MS) hem TOF hem de IT'den daha yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlar. Özellikle MSⁿ modlarında birden fazla doğal ürün taraması ve doğru kütle ölçümleri verilere bağlı olarak aynı anda gerçekleştirilebilir. Bu tandem kütle tekniği hem IT hem de TOF'nin avantajlarını birleştiren hem analitik hızda hem de doğrulukta numunelerin kalitatif analizini yeni bir boyuta çıkardı. Son zamanlarda, doğal numunelerin analizine de uygulanmış olup hem hedef olan hemde olmayan bileşiklerin tanımlanmasında çok güçlü bir araç olduğunu göstermiştir [30].

2.4.5. Kimyasal bileşenlerin incelenmesi

MS, IR (kızıl ötesi) spektroskopisine göre belirgin bir avantaja sahiptir, çünkü daha fazla yapısal bilginin belirlenmesi mümkündür, ancak kütle spektrumunda yer alan bilgilerin yorumlanması daha zordur. MS, daha hızlı gerçekleştirilebilmesi için NMR (Nükleer manyetik rezonans) spektroskopisine göre bir avantaja sahiptir. Bununla birlikte hem IR spektroskopisi hem de kütle spektroskopisi, çoklu fonksiyonel gruplara sahip bileşikler analiz edilirken belirgin bir dezavantaja sahiptir. Bu tip bileşikler için ve analistin nispeten saf bir bileşiğin mg miktarları olduğunda, NMR spektroskopisi genellikle en iyi analitik araçtır [34].

Bu avantaj ve dezavantajların bir sonucu olarak, normalde üç görevi gerçekleştirmek için kütle spektroskopisi kullanılır. İlki, küçük bir analit konsantrasyonu

olduğunda analitik kimyadadır. İkincisi, az sayıda fonksiyonel grup içeren bileşikleri tanımlamaktır. Bu endüstriyel sentezde ortak bir prosedürdür. Üçüncüsü, moleküler kütlelerin ve bazı yapısal bilgilerin belirlenmesi için yeni bir ürünün karmaşık bir sentezindeki aşamaları teyit etmektedir.

IT-MS ve TOF-MS stratejisiyle birleşmiş olan LC, özellikle bozuna ürünlerinin, metabolitlerin ve doğal ürünlerin kalitatif analizinde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Muazzam analitik potansiyeline rağmen, esasen tekniğin hala yüksek maliyeti nedeniyle, bozunma özellikle ürünlerinin analizine ilişkin henüz pek fazla makale yayınlanmamıştır. Ancak doğal ürünlerin analizinde LC-IT-TOF/MS kullanımının son iki yılda hızla artmış olduğu ve yakın gelecekte kalitatif analiz alanına hâkim olacağı bir gerçektir [35].

Bozunma ürünlerinin kalitatif analizi, hedef bileşenlerin onaylanmasını ve hedef olmayan bileşenlerin açıklanmasını ve bilinmeyen bileşiklerin tanımlanmasını içerir. Üstün hassasiyet ve yüksek kütle doğruluğu ile tam tarama kazanımlarını gerçekleştirmesini sağlayan TOF analizörü kullanmanın faydası, kompleks matrislerde bile kimyasal bileşenlerin kalitatif analizini daha kolay, daha hızlı ve daha doğru hale getirmesidir. Bunun nedeni, belirli bir analit kitlesini izlemenin veri toplamadan önce tanımlanması gerekmemesidir ve bu belirli bir numunede tekrarlı analiz olmadan kolay olmayan, sınırsız sayıda kimyasal bileşen bulunduğunu dörtlü kütle analizörlerinin (Q, TQ) ikincil iyon kütle (SIM) veya çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu ile tespit edilmesine izin vermektedir. Öte yandan, TOF-MS'nin CID kaynak parçalanması ile gerçekleştirilen yavru iyonu prosedürünün taranması sırasında, IT analizörü, hedef iyonların TOF-MS'den daha fazla seçiciliğe ve stabiliteye sahip olan MS/MS ve MSⁿ işlemleriyle ilgilenebilir. Bunun nedeni, bir halka elektrotu ve hiperbolik yüzeyli iki uçlu elektrottan oluşan (Q)-IT analizörünün ve "kütle seçici stabilite" çalışma modunda çalıştırılmasıdır. Bu modda, dört kutuplu bir kütle filtresinin çalışmasına benzer şekilde, halka elektroduna uygulanan rf ve dc voltajları, IT analizöründe m/z değerinde tek (artan) değerlerde stabilite ve böylece depolanmaya sağlamak için uygulanır [36, 37].

2.5. API Saflığı

Kimyasal saflık yabancı maddeden özgürlüğü ifade eder. Farmasötik kullanım için kimyasallardan talep edilen standartlar, imalatla bilinen tüm metotların bir sonucu olarak ortaya çıkacak kirliliği hesaba katan bir dizi faktör tarafından belirlenir. Temel kriter kullanımda güvenlidir. Maddenin genel kararlılığı da önemlidir. Olası kirliliklerin bir

listesi, kullanılan hammadde bilgisinden kolayca yapılabilir. İlaç maddelerinin sentetik yollarında ortaya çıkan safsızlıklar, işlemle ilgili safsızlıkları (ürünler, ara ürünler, genotoksik vb.) ve bozunma ürünlerini içerir.

2.5.1. Safsızlıklar

2.5.1.1. Süreç kirleri

Proses safsızlıkları, ilaç maddesinin imalat işlemi sırasında kullanılan ham malzemelerden kaynaklanmaktadır. Bunlara ürünler, ara ürünler, artık çözücüler, stereo kimyasal bileşikler ve genotoksik bileşikler dahildir.

2.5.1.2. Genotoksik safsızlıklar

Genotoksik bileşikler, genetik mutasyonları indükler ve kanserojen bileşikler olarak kabul edilir. İlaç maddelerindeki genotoksik safsızlıklardan kurtulma yolları Uluslararası Uyum Komitesi (ICH) ve Avrupa İlaç Komitesi (EMA) kılavuzları belirlemiştir [38, 39]. Sülfonatlar, alkil halojenürler, aminler, esterler, hidrazin ve epoksitler vb. gibi fonksiyonel gruplar içeren bileşiklerin, farmasötik maddeler söz konusu olduğunda genotoksik olduğu bilinmektedir. EMA kurallarına göre, genotoksik safsızlıklar için Eşik Toksikolojik Endişesi (TTC); 1,5 µg/gün olarak belirlenmiştir [40].

2.5.1.3. Bozunma ürünleri

İlaç maddelerinin üretimi ve depolanması sırasında ortaya çıkan bozunma maddelerinin belirlenmesi için normal olarak stres stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Bir ilacın safsızlıkları, ilacın farmakolojik ve toksikoloji yapısını değiştirerek ilacın hasta üzerindeki davranışını güçlü bir şekilde etkiler. Bu nedenle, bir ilaçta safsızlık ve bozulmaların belirlenmesi hastanın sağlığı ve ilaç etkinliğini anlama açısından önemlidir. Safsızlık profili oluşturma işlemi, farklı safsızlık tiplerinin tanımlanması için ilacın yapısal aydınlatmasını ve kantitatif analizini içerir. İzin verilen azami bozunma ürünü ya da safsızlık miktarı günde <2 g olan ilaç için ICH sınırı <0,1 ve günde >2 g verilen bir ilaç için 0,05'tir. Herhangi bir kirlilik ya da bozunma ürünü mevcutsa bunların bahsedilen yüzdeden daha büyük alınması ilacın hasta için zararlı veya olumsuz olduğu düşünülmelidir. İlaç molekülü ile yakından ilişkili bir yapı, farmasötik bir maddede istenmeyen bir bileşen olan bozunma ürünü olarak bilinir ve farmasötik madde bozunmasının kendisi veya formülasyondaki inaktif bileşen ya da bileşenlerle etkileşimi veya reaksiyonu ile oluşturulabilir. Stres testi, olası bozunma ürünlerini ortaya çıkarmak için belirlenmiş bir yöntemdir. Kararlılıkla ilgili sorunların tahmin edilmesi için çok

önemli bir araçtır. İlaç maddesinin stabilitesinin metodik bir şekilde anlaşılması iyi tasarlanmış stres testi çalışmaları sayesinde yapılır [41].

2.6. İvakaftor

IVA, CFTR geninde G551D mutasyonu olan 6 yaş ve üzeri hastalarda KF tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. CFTR’de genetik bozuklukların KF’nin nedeni olarak tanımlanmasından yirmi yıldan uzun bir süre sonra FDA, bu hastalığı hedef alan ilk ilaç olan IVA’yı onaylamıştır. Bu hastaların %4-5 oranında G551D-CFTR mutasyonu bulunmaktadır. KF’de genetik defektleri hedef alan ideal bir tedavinin uygulaması kolay; yan etkileri az ve çok uzun süre koruyuculuk; morbidite ve mortalitenin çoğunu ortaya çıkaran organ sistemini geliştirir, korur ve bebeklerde akciğer hasarını tamamen önlemek için kullanıma uygundur. IVA oral olarak biyoyararlanıma sahip olup birkaç yan etki göstermiştir. Solunum fonksiyonunu iyileştirir, önemli ağırlık artışı sağlar ve 6 yaşın üzerinde olan G551D-CFTR mutasyonu olan hastalarda ter klorür konsantrasyonunu normalleştirir. Ivacaftor’ın henüz bebekler için güvenli olduğu kanıtlanmamıştır. Yenidoğan taraması KF’den etkilenen bebeklerin %90’ından fazlasını tanımlayabilir. KF tedavisi için önemli olan hastaları erken tedavi etmek ve organ hasarını önlemektir. Bu nedenle, ideal ilaçlar doğum sonrası gelişime müdahale etmemelidir. Doğuma başlamak hali hazırda mevcut olan hasarı önlemeyecek (örneğin, vas deferens’in doğuştan bilateral yokluğu, bazı hastalarda akonyum ileus ve pankreas yetersizliği gibi) ancak ilaç plasentayı geçerse ve güvenli olduğu kanıtlanırsa bu komplikasyonlar bile hafifletilebilir. Hamilelik sırasında IVA 1 yıllık bir çalışma süresi boyunca güvende görünmektedir, ancak ideal ilaç bilindiği gibi ömür boyu güvenli olmalıdır [7, 42, 43].

Allele özgü tedavilerin genişletilmesi mümkündür. Hastalığa neden olabilecek 1,800’den fazla mutasyona uğramış CFTR formu bulunduğundan, spesifik aleller yerine (çoğu hastada bulunan $\Delta F508$ -CFTR hariç) tüm fonksiyonel CFTR mutasyon sınıflarını etkileyen ilaçlar geliştirmek önemlidir. Otoriteler, klinik denemelere dahil edilmemiş mutasyonlu hastaların ilaçları onaylamaları için temel oluşturabilecek geliştirme programları tasarlar. Aksi takdirde, fayda sağlayabilecek hastaların kapsama alanı reddedilecek ve mevcut fiyatlarla (IVA için yılda yaklaşık 300.000 ABD doları) etkin bir tedavi sağlanamayacaktır [43, 44].

Mutasyona uğramış CFTR formları beş fonksiyonel gruba ayrılır. Bunlar kesme mutasyonları, işlem mutasyonları, aktivasyon mutasyonları, kanal mutasyonları ve ek mutasyonlardır. Küçük molekülü ajan ataluren, trunkasyon mutasyonları için klinik

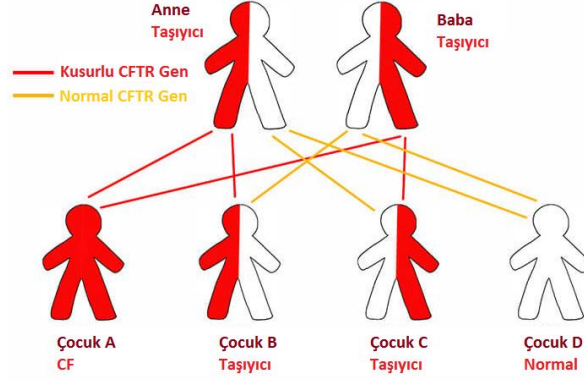
deneylerdedir. $\Delta F508$ -CFTR içeren işleme mutasyonları ve $\Delta F508$ -CFTR düzelticileri (örneğin VX809) klinik gelişimdedir. Ancak $\Delta F508$ -CFTR sadece endoplazmik retikulumda büyük ölçüde tahrip edilmeyip aynı zamanda hücre yüzeyine ulaşan kanallar normal olarak açılmadığı ve normal CFTR'den çok daha hızlı alındığından tamamen etkili olmayabilir. Bu nedenle, bu klinik sorunları çözmek için her birine yönelik ilaç kombinasyonları gerekebilir [45].

KF'li hastaların çoğu için alele özgü tedaviler artık ufuktur. Asıl umut, henüz şiddetli akciğer hastalığına yakalanmamış genç hastaların ona asla yakalanmayıp neredeyse normal yaşamlar yaşayabileceğidir. Ayrıca, IVA'nın ciddi hastalığı olan hastalarda bile akciğer fonksiyonlarını iyileştirmesi heyecan vericidir. Yapısal akciğer hasarının tersine çevrilmesi muhtemel olmasa da klorür taşıma kusurunun düzeltilmesi agresif semptomatik tedavinin daha etkili olmasına izin verebilir [43].

Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) KF'li 30.000 hasta vardır. Ocak 2012'de, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), 2 yaş ve üstü KF'li hastalarda, kistik fibroz transmembran iletkenlik düzenleyicisini kodlayan gende G551D mutasyonu ile birlikte IVA'yı (Kalydeco; Vertex Pharmaceuticals) onayladı (FDA onaylı bir genetik test tarafından onaylandığı gibi). Bu mutasyon hasta popülasyonunun ~%4'ünü oluşturmaktadır. Ancak IVA için hasta havuzu yakın gelecekte; potansiyel olarak KF popülasyonunun fayda sağlayabileceği başka mutasyonlar olduğu için yaklaşık %10'unu içerecek şekilde genişleyeceği öngörülmektedir. Vertex, bu tür mutasyonlu hastalarda olduğu gibi genç hastalarda da IVA kullanımını değerlendirmektedir; bu da karşılanmamış ihtiyacı olan pazarda ilacın daha fazla alımını kolaylaştıracaktır [46, 47].

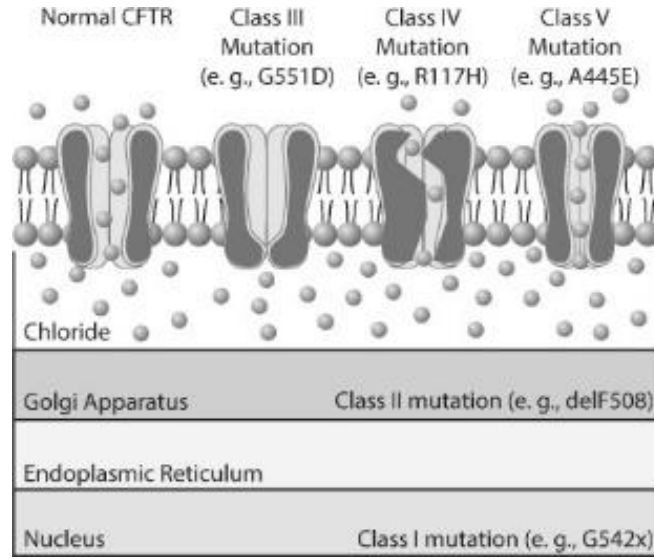
KF, hücre membranları arasında klorür ve sodyum iyonlarının taşınmasında rol oynayan iyon kanalı 1989 yılında keşfedilen CFTR proteini için gendeki çeşitli mutasyonlardan birinin neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır [3, 48, 49]. KF Batı Dünyasında hayatı tehdit eden en yaygın otozomal resesif rahatsızlıklardan biridir. Önceki araştırmacılar Paleolitik dönemden (50.000 yıl) beri KF'ye neden olan mutasyonların var olduğunu ve bunların Avrupa'dan türetilmiş nüfuslarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu kanıtlamışlardır [3]. Bu kalıtsal bir durum olduğu anlamına gelir ve herhangi bir semptom olmadan KF geninin bir kopyasını kişi taşıyabilir. KF ile doğması gereken bir kişi için Şekil 2.9'da görüldüğü gibi hem annelerinden hem de babalarından bir KF geni alması gerekir. Bebek, biri anneden diğeri babadan olmak üzere iki kromozom setini alır. Bu kromozomlar bebeğin büyümesi ve gelişmesi için tüm

genetik bilgileri içerir. Her iki ebeveyn de bir KF geninin taşıyıcısı ise, doğmuş herhangi bir bebeğin KF alabilmesi için 4'te 1 şansı vardır. Her iki ebeveyn de bir KF genini geçerse, bebekte KF hastalığı ortaya çıkar [50].



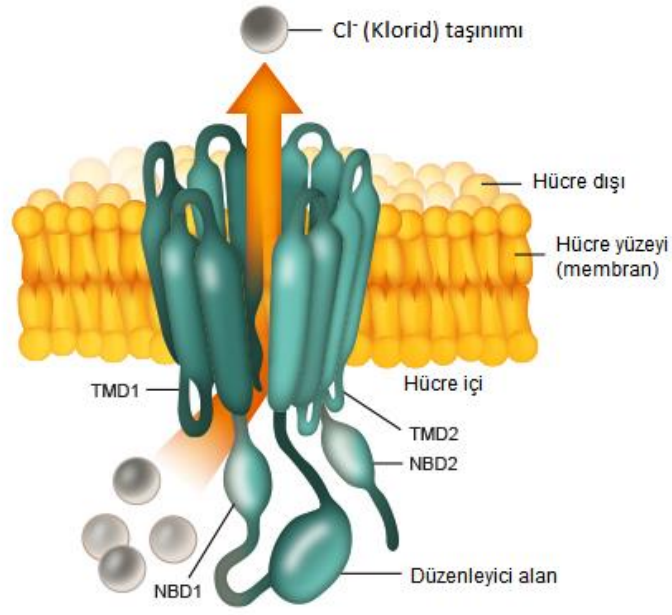
Şekil 2.9. Doğmuş herhangi bir bebeğin KF olma olasılığı

1900'den fazla tanımlanmış KF'ye neden olan mutasyonu tanımlamak için en az 5 KF mutasyon sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar Şekil 2.10'da gösterilmektedir. KF mutasyonları çoğunlukla hücre yüzeyinde bozulmuş kanal fonksiyonuna, hücre yüzeyinde CFTR kanallarının sayısında azalma veya her ikisine neden olur. Sınıf I kusurları kesilmiş protein translasyonuna neden olurken, Sınıf II hataları yanlış katlanmış CFTR ile sonuçlanır. Bu mutasyonların her ikisi de CFTR proteinlerinin hücre yüzeyine kötü bir şekilde verilmesine yol açmaktadır. Sınıf III ve IV defektleri hücre yüzeyine ulaşan ancak sırasıyla geçit defekti veya azalmış gözenek iletkenliği gösteren tam boy CFTR ile sonuçlanır. Sınıf V kusurları CFTR yüzey alanını azaltır [10].



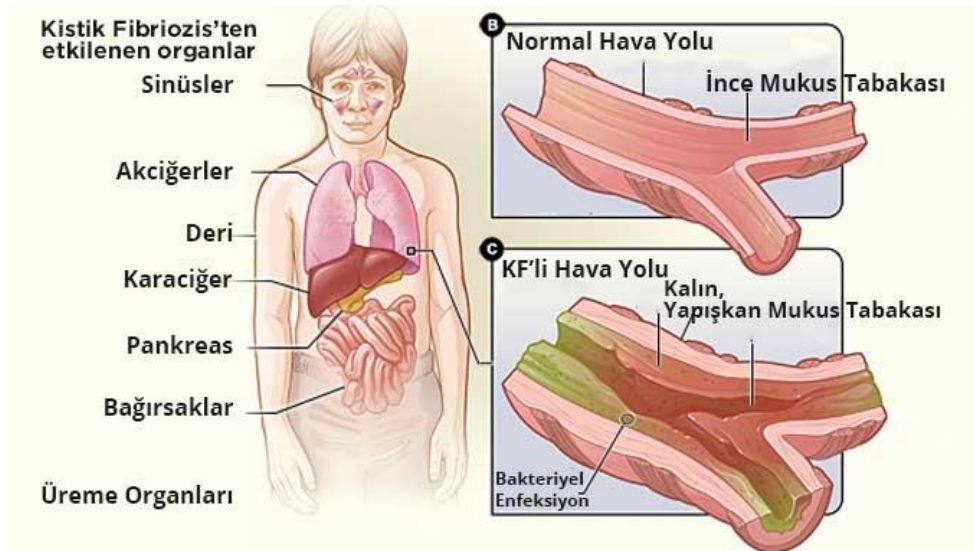
Şekil 2.10. CFTR proteininde çeşitli mutasyonlar

Şekil 2.11’da görüldüğü gibi CFTR geni, su ve tuzun (sodyum) genini, solunum, sindirim ve üreme sistemlerini kaplayan vücut hücreleri (epitel hücreleri olarak adlandırılır) boyunca geçiş şeklini kontrol eder. CFTR genindeki değişiklikler, proteinin değişmiş sentezi, yanlış katlanması veya fonksiyonu ve bunun sonucu olarak hücre zarları arasında anormal sıvı ve iyon taşınması gerçekleşir [51, 52]. KF’li bir kişide CFTR geni arızalıdır. CFTR proteini arızalı olduğunda, epitel hücreleri klorürün (sodyum klorür adı verilen tuzun bir kısmı) hücre zarlarından geçme şeklini düzenleyemez. Bu, akciğerler, pankreas ve diğer organlardaki geçitlerin normal bir ince sıvı ve mukus kaplamasını korumak için gereken temel tuz ve su dengesini bozar [53]. Sonuç, küçük hava yollarını, bağırsak kısımlarını ve pankreas ile bağırsak arasındaki küçük kanalları tıkayan kalın yapışkan mukozadır. Mukoza, üreme sistemini de etkileyebilir. Vücudun sodyum ve suyu vücut hücrelerine sokma konusundaki zorluğundan dolayı, KF’li bir kişinin terinde daha yüksek düzeyde tuz içerir ve bu nedenle kolayca dehidrasyon ortaya çıkar [54]



Şekil 2.11. CFTR proteinin işlevi

CFTR; pulmuner, pankreatik, hepatik, gastrointestinal ve üreme sistemi gibi organların epitel hücrelerinde aktiftir. Hastalığın anahtar klinik tezahürü kronik solunum yolu enfeksiyonu (özellikle pseudomonas aeruginosa ile) olup, şekil 2.12’de görüldüğü gibi akciğer fonksiyonunda azalmaya ve mortalitenin artmasına neden olur [2, 49, 55, 56].



Şekil 2.12. KF’den etkilenen organlar

IVA kullanımının hem KF semptomlarını iyileştirdiği hem de altta yatan hastalık patolojisini modüle ettiği gösterilmiştir [7]. Etken madde; CFTR proteininin kanal açıklığını (ya da kapağını) arttırma, bozuk katlanma mekanizmalarına sahip hastalarda ise güçlendirmek suretiyle tedaviyi başarmaktadır [57, 58]. Ayrıca; CFTR proteininin yanlış katlanmasını önleyerek işlev gören ve olgun proteinin hücre yüzeyine işlenmesini ve kanal açıklığını arttıran başka bir KF ilacı olan lumacaftordan da farklıdır [59].

Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, IVA ile tedavinin akciğer fonksiyonlarında iyileşme, pulmoner alevlenme yaşama şansının azalması, kilo alımında artış ve KF semptomlarında iyileşme ile sonuçlandığını göstermiştir. Çok çeşitli CFTR mutasyonları (yaklaşık 1800 mutasyon) KF fenotipiyle ve farklı hastalık şiddeti seviyeleri ile ilişkilidir [60]. Dünyada KF'li hastaların yaklaşık %70'ini etkileyen en yaygın mutasyon, 508 pozisyonundaki amino asit fenilalanindeki bir kopma olup CFTR proteininin üretimine neden olduğu F508del-CFTR veya delta-F508 (Δ -F508) olarak bilinir [51]. Böylece hücre zarlarında bulunan iyon taşıyıcı miktarında önemli bir azalmaya neden olur.

Ancak IVA monoterapi olarak başarı sağlayamamıştır. Bunun nedeni büyük olasılıkla Δ -F508 mutasyonlu hastalarda, ilacın etkileşimi ve güçlenmesi için hücre zarında yetersiz miktarda protein bulunmasıdır. Dünyadaki KF hastalarının %4-5'ini etkileyen bir sonraki en yaygın mutasyon olan G551D, hücre yüzeyinde yeterli miktarda protein bulunan ancak kanalın açma ve kapama mekanizmalarının yanlış değiştirildiği mutasyon olarak tanımlanır. IVA, CFTR proteinlerinin hücre zarı üzerindeki kanal açma yeteneğine bağlandığı ve kuvvetlendirdiği için, bu ikinci mutasyon tipindeki hastalardada endikedir. Her ne kadar IVA, Δ -F508 mutasyonu olan hastalarda anlamlı bir iyileşme göstermemiş olsa da diğer mutasyonlar için akciğer fonksiyonunda (>bazaldan FEV1'de >>%10 artış) önemli iyileşmeler göstermiştir. Bu mutasyonlar; E56K, P67L, R74W, D110E, D110H, R117C, R117H, G178R, E193K, L206W, R347H, R352Q, A455E, S549N, S549R, G551D, G551S, D579G, S945L, S977F, F10V, K1060T S1255P, D1270N ve G1349D. Bu liste Mayıs 2017'de FDA tarafından daha nadir mutasyonlara yer vermek için 10'dan 33'e çıkarılmıştır [61, 62].

1989'da KF'nin monogenetik bazının keşfi, gen terapisi yoluyla fonksiyonel CFTR'yi ya da endojen CFTR'nin fonksiyonunu restore etmeye çalışan terapötik stratejiler geliştirmenin temelini oluşturmuştur. Ayrıca CFTR'deki çeşitli nedensel mutasyonların, proteini farklı şekillerde etkilediği bulunmuştur. Hastaların yaklaşık üçte

ikisinde bulunan en yaygın CFTR mutasyonu olan Δ -F508 gibi bazı mutasyon tipleri, hücre içi süreci zayıflatır ve CFTR'nin hücre yüzeyine taşınmasını yapamaz. G551D gibi daha az yaygın olan diğer mutasyonlar, öncelikle hücre yüzeyindeki CFTR'nin açılma kabiliyetini zayıflatır. Bu durum ise, CFTR'nin hücre yüzeyindeki fonksiyonunu kuvvetlendirebilecek bileşik arayışına neden olarak ivacaftor'un ortaya çıkmasına yol açmıştır [3, 57].

28228.000 bileşikleri içeren bir kütüphane, CFTR kuvvetlendiricileri tanımlamak için tasarlanmış ve bu kütüphane yüksek verimli, hücre bazlı bir floresan membran potansiyel deneyi kullanılarak taranmıştır. Bu ekranda tanımlanan bir ana iskeleye dayanan çeşitli analog sentezleri, birden fazla CFTR formunu ve in vitro seçiciliğini kuvvetlendirme kabiliyeti, uygun prelinik farmakokinetik profil kriterleri de dahil olmak üzere seçilen hedef bileşik IVA olmuştur [43].

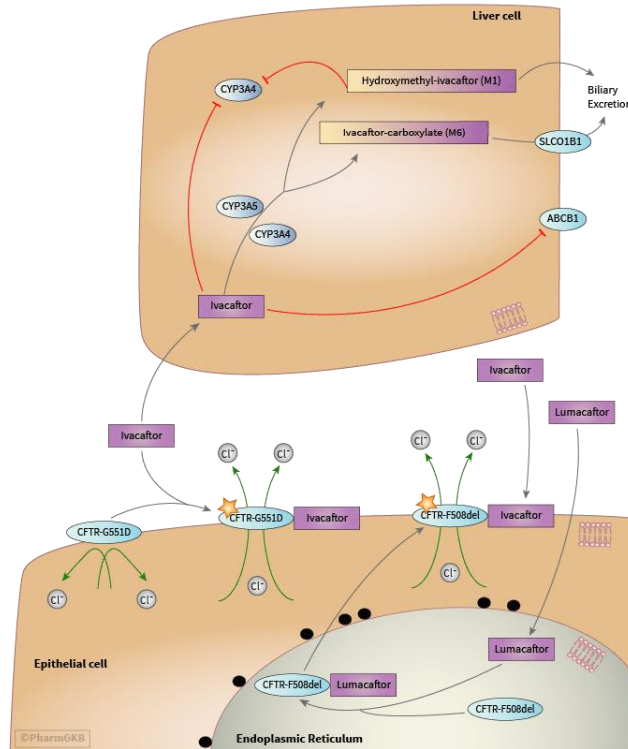
CFTR'de en az bir G551D mutasyonuna sahip KF hastalarında IVA'nın etkinliği ve güvenliği, klinik olarak stabil 213 hastayı içeren iki randomize, çift kör, kontrol kontrollü çalışma ile değerlendirilmiştir. Deneme 1, başlangıçta öngörülen FEV1'i (1 saniyede zorlu ekspiratuar volüm) %40 - %90 oranına sahip (ortalama: tahmin edilen %64 FEV1) 12 yaş ve üstü 161 hasta değerlendirilmiştir. Deneme 2 ise öngörülen FEV1 %40 - %105'i arasında (ortalama: öngörülen FEV1 % 84) yaşları 6 ile 11 arasında değişen 52 hasta ile yapılmıştır. Her iki denemede de hastalara 1:1 oranında 12 saat ara ile (yağ içeren besinlerle birlikte) IVA veya kontrol ile KF tedavi reçeteleri (tobramisin ve dornaz alfa gibi) 48 hafta verilmiştir. Deneylerde hipertonic salin solunum kullanımına izin verilmemiştir [7, 42, 43].

Her iki çalışmada da birincil etkinlik bitiş noktası, 24 haftalık tedaviden sonra doz öncesi FEV1'in tahmin edilen yüzdesindeki ortalama mutlak değişim ile belirlenen akciğer fonksiyonunda iyileşme olmuştur. Diğer gözlemler ise başlangıçtan 48 haftaya kadar mutlak ağırlık değişimi, hasta tarafından bildirilen KF semptomlarında iyileşme (öksürük ve zorluk gibi), ter klorür konsantrasyonunda (CFTR fonksiyonunun bir ölçüsü) değişim ve pulmoner alevlenmenin (sadece deneme 1'de) 48 hafta boyunca değerlendirilmesidir [7, 42, 43].

Her iki denemede de IVA ile tedavi sayesinde FEV1'de 24 haftada belirgin bir iyileşme sağlanmış ve bu değişiklikler 48 haftaya kadar devam etmiştir. FEV1'in başlangıçtan 24 haftaya kadar tahmin edilen yüzde ortalaması, deneme 1'de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ilaç grubunda 10,6 puan daha fazla, deneme 2 de ise 12,5

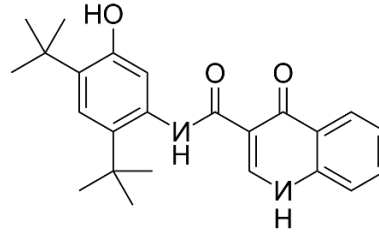
puan daha yüksek çıkmıştır. IVA tedavisi alan hastalar, her iki denemede de kontrol alanlara göre vücut ağırlığında anlamlı artışlar göstermiştir. 48 haftadaki gruplar arasındaki ortalama fark, deneme 1’de 2,7 kg ve deneme 2’de 2,8 kg olarak ölçülmüştür [42, 43]. Ayrıca ilaç alan hastalarda kontrol grubuna kıyasla KF semptomlarında istatistiksel olarak anlamlı iyileşmeler, pulmoner alevlenme geçirme olasılığı %55 daha az ve ter klorür konsantrasyonundaki değişim $-48,8 \text{ mmolL}^{-1}$ olarak ölçülmüştür [43].

IVA’nın, bu hastalarda önemli bir fark yarattığını göstermek için plazma membranına ulaşan az miktarda DF508-CFTR’yi aktive edip edemeyeceğini test etme amacıyla bir çalışma daha yapılmıştır. Üçüncü grup olan 12 yaş ve üzeri KF’li 140 hasta homozigot olan CFTR’deki Δ -F508 mutasyonuna sahip olup 1:4 oranda randomize $\%FEV1 \geq 40$ tahmin edilmiştir. Söz konusu gruba her 12 saatte bir 150 mg IVA ve KF reçete tedavisi uygulanmıştır. Bu çalışmada da yine kontrol grubu mevcuttur. IVA ile tedavi edilen hastalar kontrol grubu ile kıyaslandığında akciğer fonksiyonlarında iyileşme ile ilişkili tahmin edilen $\%FEV1$ değerinde primer son noktadaki kontrole göre herhangi bir iyileşme ile görülmemiştir. Ayrıca, IVA ile tedavi edilen hastalar ile kontrol grubu arasında KF semptomlarındaki ve ağırlıktaki değişimi içeren ikincil son noktalarda anlamlı bir fark gözlenmemiştir [42, 43].



Şekil 2.13. IVA etki mekanizması [45]

Şekil 2.13’de görüldüğü gibi aktivasyon mutasyonları G551D-CFTR’yi içerir ve kanal mutasyonları ile birlikte hücre yüzeyine ulaşırlar. Bu kanal mutasyonlarının bazıları, in vitro IVA tarafından da güçlendirilir, ancak bu mutasyonlara sahip hastalar klinik denemelere dahil edilmemiştir. Bu nedenle, IVA, KF popülasyonunun sadece %4-5’i için onaylanmış olmasına rağmen, hastaların %10-15’i için faydalı olabilir. İlacın kullanımını doğrulamak için tedaviye uygun hasta havuzunun genişletilmesi hayat kurtarabilir ve bu durum in vitro verilere veya in vivo ‘sadece biri’ (örneğin, bir sonuç ölçüsü olarak ter klorür konsantrasyonundaki azalma ile) çalışmalarına izin verilmesiyle sağlanabilir [43-45].

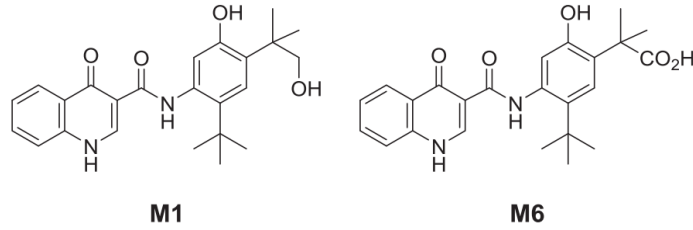


Şekil 2.14. IVA molekül yapısı

Şekil 2.14’de verilen IVA, kimyasal adı N-(2,4-di-ter-butyl-5-hidroksifenil)-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksiamide olan; karboksi grubunun, 5-amino-2,4-di-ter-butylfenolün amino grubu ile formal kondenzasyonu ile elde edilen bir aromatik amittir. Ticari formu Kalydeco® olup VX770 olarak Vertex Pharmaceuticals ve ABD’deki KfV tarafından geliştirilmiştir. Yapısı bir kinolon, bir fenol üyesi, bir aromatik amid ve bir monokarboksilik asit amitten oluşur. Molekül formülü $C_{24}H_{28}N_2O_3$ şeklinde olup molekül ağırlığı 392,499 g/mol, monoizotopik kütlesi ise 392,21 g/mol’dur. Elementel analiz değerleri C: %73,44; H: %7,19; N: %7,14 ve O: %12,23 şeklindedir. Polar yüzey alanı 82,19 Å² olup suda çözünürlüğü neredeyse hiç yoktur (<0,05 µg/mL). Ayrıca metanol, dimetilsülfoksit ve etil asetat da çözünürlüğü oldukça az olup asetonitrilde çözünürdür. Ivacaftorun asidik pKa değeri 1,15 ve bazik pKa değeri 11,08’dir. IVA log D değeri 3,13; log P değeri 5,08 ve 25 °C’de pH’sı 7,4’dür. Erime noktası yüksek olup 212-215 °C, buna istianeden kaynama noktası da 550,4 °C’dir. Renk dokusu mat beyaz olup toz haldedir.

2.6.1. Farmakolojik özellikleri

IVA, esas olarak alfa-1-asit glikoprotein, albümin ve plazma proteinlerine (%99) bağlıdır. Dağılımın hacmi sağlıklı gönüllüler ile KF'li hastalar arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir. İlaç karaciğerde metabolize edilir ve metabolizma öncelikle 3A familyasının CYP3A olarak bilinen A subfamilyasından CYPP450 yoluyla gerçekleşir. Şekilde 2.15'de görüldüğü gibi IVA'nın iki ana metaboliti vardır. Bunlar; farmakolojik olarak aktif olduğu düşünülen ve IVA potansiyelinin yaklaşık altıda biri olan M1 ile IVA potansiyelinin 1/50'sinden daha azı olan ve farmakolojik olarak aktif olmayan M6 metabolitleridir [63, 64].



Şekil 2.15. IVA ait ana metabolit olan M1 ve M2 [65]

IVA ve metaboliti M1, CYP3A ve P-glikoprotein 1 inhibitörlerine zayıftırlar. Ancak IVA, CYP2C8 ve CYP2C9 da dahil olmak üzere diğer CYPP450 izoenzimlerini inhibe edebilir. CYPP450 enzimlerinde indüksiyon yoktur. Bu nedenle IVA potansiyel ilaç-ilaç etkileşimlerine sahiptir ve CYPP450 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçların birlikte uygulanmasına özen gösterilmelidir. İlacın prospektüsünde potansiyel ortak ilaçların bir listesi ve önerilen dozaj ayarlamaları bulunur [10].

Karaciğerde dönüşümü takiben, ilacın %87,8'i M1 (%22) ve M6 (%43) iki ana metabolit tarafından feçesle atılır ve ana ilacın idrardan atılımı ihmal edilebilir seviyededir. Karaciğer fonksiyonunun hafif bozukluğu için doz ayarının gerekli olup olmadığı bilinmemektedir. Üretici paketinde şirket, Çocuk-Turcotte Pugh Sınıf B skoru ile belirlenen orta derecede karaciğer yetmezliği olan hastalar için C_{max} 'ın sağlıklı gönüllülere benzer olduğunu; ancak, IVA alanında $egri_{0-\infty}$ altında iki kat artış olduğunu belirtmiştir [65]. Bu nedenle, orta dereceli karaciğer yetmezliği ile kullanım için doz aralıklarında günlük 150 mg artış önerilmektedir. IVA veya metabolitlerinin böbrekler zararı olmaması nedeniyle, şiddetli böbrek yetmezliğinde ayarlama gerekip gerekmediği bilinmese de, hafif ila orta şiddette böbrek yetmezliği için doz ayarlaması önerilmez [10].

IVA çok iyi tolere edilebilirdir. Üst solunum yolu semptomları, kontrol grubuna kıyasla IVA alan deneklerde daha yaygın görülmektedir. IVA alan %8 veya daha fazla denekte orofaringeal ağrı, nazofarenjit, üst solunum yolu enfeksiyonu, otitis media, baş ağrısı, baş dönmesi, mide bulantısı, karın ağrısı, ishal veya döküntü ve kan eozinofilisi, kontrolya kıyasla IVA'yı alan deneklerde daha sık rapor edilmiştir. Faz çalışmalarında birkaç denekte karaciğer transaminazlarında yükselme görülmüş ve bunun üzerine tedaviye başlamadan önce, tedavinin ilk 12 ayında 3 ayda bir ve sonrasında yıllık olmak üzere karaciğer transaminaz seviyelerinin kontrol edilmesi tavsiye edilmiştir. Uzun dönem açık etiketli çalışmanın (PERSIST) edildiği deneyim, iki Faz III denemeleri ile benzer bir güvenlik profili ortaya koymuştur [66, 67].

Avrupa Komisyonu ilacı Temmuz 2012'de ve Avustralya'daki Terapötik Mallar İdaresi ilacı Temmuz 2013'te aynı endikasyon için onaylamışlardır. 21 Şubat 2014'te ABD FDA, CFTR'de eski isimleri G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P ve G1349D olan sekiz ek mutasyondan birine sahip olan KF'li ≥ 6 yaş kişiler için IVA'nın yeni bir ilaç olarak kullanım başvurusunu onaylamıştır [45].

Ayrıca IVA KF'li diğer sekiz farklı mutasyondan (G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P ve G1349D) birini taşıyan hastalara benzer yararlar sağladığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Diğer CFTR mutasyonlarını taşıyan hastalar için ilacın diğer tedavilerle kombinasyon halinde rolü henüz belirlenmemiştir. Ancak ilacın tolere edilebilirliği çok iyi olduğu kanıtlanmıştır [59, 66, 67].

IVA ile yapılan terapi, genetik mutasyonlara sahip KF'li hastalar için kişiye özgü tedavinin yeni habercisidir. IVA, yeni bir terapötik sınıfın ilki olup bir dizi genetik hastalıkla ilişkili anormal proteinlerin değiştiricileri olarak işlev gören oral biyoyararlanabilen terapötiklerin gelecek potansiyeline bir bakış sağlamaktadır. KF, ortaya çıkan tüm anormal proteinlerin kurtarılması/tadil edilmesi için bir dizi terapötik yaklaşım gerektirecektir. IVA kendi başına yalnızca küçük bir oranda kurtarabilir. Bununla birlikte diğer ilaçlarla kombinasyon halinde daha geniş bir uygulamaya sahip olabilir. $\Delta F508$ proteininin eşlenmesi ve kurtarılması için karmaşık yaklaşımların gerekli olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, IVA bu mutasyon ve diğerleri için kombinasyon terapisinde rol oynayabilir. Aminoglikozitlerin değişkenli G542X gibi saçma mutasyonları baskılayabildiği kabul edilir. Aminoglikozit maruziyeti insan bronş epitel hücre modelinde (G542X/F508del) CFTR'yi kurtarmayı başarmış ve IVA takviyesi

CFTR kanalının açıklık olasılığını arttırmıştır. Böylece genel etkinliği artırıp gelecekteki klinik gelişime yön verebilir durumdadır [57, 68].

G551D mutasyonu taşıyan beş hastada yapılan küçük bir pilot çalışmada hem oral hem de intravenöz glukoz tolerans testleri IVA tedavisi öncesi ve tedaviye başladıktan 1 ay sonrası yapılmıştır. İnsülin sekresyonu IVA kullanımıyla artmıştır. Her ne kadar CFTR'nin insülin sekresyonundaki rolü daha önce bilinmemiş olsa da çalışmada CFTR'nin insülin sekresyonunda rol oynayabileceğini öne sürülmüştür. IVA'nın vahşi tip CFTR'de kanal açılmasını arttırdığı göz önüne alındığında, yazarlar hem CFTR hem de IVA'nın Tip 2 diyabetteki terapötik potansiyelinin merak uyandırıcı olasılıklarını öne sürmüşlerdir. Bu halen çeşitli çalışmalarla belirlenmeye devam etmektedir [69, 70].

CFTR hava yolu disfonksiyonu tütün dumanına maruz kalmadan da elde edilebilir ve laboratuvar çalışmaları IVA'nın bu vahşi tip CFTR disfonksiyonunu kurtarabildiğini ve inhale tütün dumanına ikincil kronik obstrüktif hava yolları hastalığında potansiyel fayda sağlayabileceğini göstermiştir. Klinik potansiyeli ise henüz araştırılmamıştır

5 yıl içinde, IVA kullanımının daha fazla olması muhtemeldir. Artık fonksiyona sahip mutasyonlarda kullanımın incelenip KF'deki diğer terapötiklerle kombinasyon halinde kullanımın ortaya çıkması muhtemeldir. Ek olarak KF olmayan endikasyonlar için olası kullanım da araştırılmaya başlanabilir.

IVA için klinik potansiyel, en azından G551D mutasyonu veya başka mutasyonu taşıyan KF'li hastalar için önemli olsa da çok yüksek IVA maliyeti endişe vericidir. Maliyetler ülkeler arasında değişmekle birlikte, IVA için maliyet tahminleri yıllık 250.000 ABD Doları civarındadır. Toplumun bu terapi türüne erişimi nasıl sağlayacağı veya rasyonelleştireceği bilinmemektedir. Bu tip durumlarda karşılaşılan en önemli sorun, birçok genetik hastalığın az sayıda hastası olması ve ilaç şirketlerinin pazara ilaç geliştirmek için son derece büyük bütçelere ihtiyaç duymasındır. Geliştirme maliyetinin bir şekilde küçük bir pazardan iade edilmesi gerekmektedir. IVA için geliştirme maliyeti, bir dereceye kadar ilacın gelişimini destekleyen bir kurum olan KfV tarafından sağlanmıştır [71]. Bununla birlikte, ilacın maliyeti büyüktür ve küçük pazarlar için geliştirilen diğer ilaçlar da maliyetli olacaktır [72]. Akılcı yaklaşım, daha ağır hastalıklarda kullanımı tercih etme eğiliminde olacaktır. Ancak gerçekte uzun vadeli yarar; daha hafif hastalıkta olanlarda en fazla ve zamanla kaybedecek daha çok şey olacağı gerçeğidir. Kuşkusuz, 6 yaşından küçük bebeklerde ve küçük çocuklarda güvenlik ve etkinlik araştırması büyük ilgi çekmektedir. KF hastalarında farklı gen mutasyonları

boyunca tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde daha geniş kullanımın zamanla IVA fiyatını düşürmesi mümkündür. Muhtemelen, rekabeti sağlayacak olan başka CFTR güçleyicileri de geliştirilecektir. Bununla birlikte, KF dışı endikasyonlarda kullanım, maliyetleri azaltma potansiyeli olan daha geniş bir pazar sağlayabilir. Bunun en doğrusunu gelecek söyleyecektir [44, 73].

IVA analizleri ile ilgili ilk çalışmayı 2013 yılında Chhabda ve ark. yapmışlardır. IVA ayını için basit bir YBSK tekniğini Zorbax Eclipsed XDB C₈ kolon (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) sabit faz ve hareketli faz karışımı olarak izokratik akışta tampon (0,1% fosforik asit):asetonitril (30:70% *h/h*) kullanarak geliştirmişlerdir. Kolon sıcaklığı 30 °C, akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir [74].

2014 yılında yapılan bir çalışmada en az 3 ay boyunca Kalydeco® ile tedavi edilen hastalar tarafından 150 mg ivacaftor alımından 3-4 saat sonra serum örnekleri toplanmış ve ivacaftor serum konsantrasyonları kütle spektroskopik saptama (LC-MS-Q-TOF) ile doğrulanmış sıvı kromatografisi kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda 6 karaciğer hastasında karaciğer fonksiyon bozukluğu ve diğer CYP3 inhibitörlerinin birlikte uygulanması olmadan kan örneklerinde IVA gözlenmiştir. Ancak çalışmada herhangi başka analitiksel bir veri verilmemiştir [49].

2016 yılında ilk kez, IVA ve ana metabolitlerinin hidroksimetil-IVA M1 ve IVA-karboksilat M6'nın KF hastalarının plazma ve balgamında hızlı tespiti ve tayini için YBSK ve LC-MS yöntemleri geliştirilip ve metot geçerliliği doğrulanmıştır. Kromatografik ayırım için Waters C₈ kolon (5 µm, 3,9 × 50 mm i.d.) sabit faz ve asetonitril/su: %0,1 formik asit (60:40, *h/h*) ihtiva eden hareketli faz karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 5 µL, YBSK için 309 nm dalga boyunda çalışılmış ve sadece kalibrasyon eğrisi verilmiştir. Metot geçerliliği ve numune uygulamalarını sadece LC-MS/MS ile yapmışlardır. KALYDECO® (IVA 150 mg/12 saat) veya ORKAMBI® (200 mg/12 saat LUMA-125 mg/12 saat IVA) ile tedavi gören KF hastalarının plazma ve balgamındaki LUMA, IVA, M1 ve M6 konsantrasyonlarını ölçmek için kullanılmıştır. Çalışmaya göre KALYDECO® verilen hasta dozajdan 2,5 saat sonra 0,97 µg/mL'lik bir IVA plazma konsantrasyonu sergilemiştir. M1 ve M6 plazma konsantrasyonları ise 0,50 µg/mL ve 0,16 µg/mL bulunmuştur. ORKAMBI® ile tedavi edilen hastada çok düşük plazma konsantrasyonlarında IVA (0,06 µg/mL) ve M1 (0,07 µg/mL) olduğu bulunmuştur. M6 konsantrasyon seviyesi ise (0,15 g/mL), KALYDECO® hastasınıninkilerle karşılaştırılabilir durumda olduğu görülmüştür. Bununla birlikte,

yazarlar nispeten yüksek bir LUMA plazma konsantrasyonunu (4,42 µg/mL) gözlemlemişlerdir [75].

Akram ve Umamahesh geliştirdikleri YBSK metot ile tablette IVA ile lumacaftor analizini birlikte gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak Inertsil ODS kolon (4,6 × 250 mm, 5 µm) ve hareketli faz olarak %60 pH 3 tampon (%1 (h/h) orta fosforik asit), %30 asetonitril ve %10 metanol karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 25 °C ve 20 µL hacimde kolona enjeksiyon yapılmıştır [76].

IVA analizi için bugüne kadar geliştirilmiş literatürde var olan tüm metotların genel kapsamaları ve numune uygulamaları Tablo 2.9’da verilmiştir.

Tablo 2.9. IVA analizi için geliştirilen yöntemlere ait veriler

Doğrusal (µg/mL)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Dalga Boy	Mod - m/z	t _R (dk)	Yöntem	Numune	Kaynak
15 - 300	0,13	0,40	225 nm	-		YBSK	Tablet	[74]
0,01 - 10	2,50x10 ⁻³	7,57x10 ⁻³	-	MRM- 392,49→393	6,2	LC- MS/MS	Tükrük ve Plazma	[75]
1 -80	-	-	309 nm	-	6,2	YBSK	Plazma	
62,5– 312,5	-	-	254	-	3,1	YBSK	Tablet	[76]

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler ve Reaktifler

Yapılan deneysel çalışmalarda herhangi bir kirlilik ya da safsızlıklardan ileri gelen problemler oluşmaması için kullanılan tüm maddeler analitik ve/veya kütle dedektörüne uygun saflıkta tercih edilmiştir. Analizi yapılacak olan etken madde IVA Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada) firmasından satın alınmıştır.

Hareketli faz hazırlanması için seçilen organik çözücüler ve diğer deneysel işlemlerde kullanılan reaktiflerin temin edildiği firma ve saflıkları Tablo 3.1'deki gibidir.

Tablo 3.1. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Firma	Saflık
Asetonitril	J.T.Baker (Allentown/ABD)	LC/MS saflıkta
Metanol	Merck KGaA (Massachusetts, ABD)	LC/MS saflıkta
Formik asit	Fisher Chemicals (New Hampshire, ABD)	LC/MS saflıkta
Amonyum format	Fisher Chemicals (New Hampshire, ABD)	LC/MS saflıkta
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich (Missouri, ABD)	LC/MS saflıkta
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich (Missouri, ABD)	LC/MS saflıkta
Hidrojen peroksit	Sigma Aldrich (Missouri, ABD)	LC/MS saflıkta

3.2. Kullanılan Cihazlar

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

Kalitatif yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrik tayinleri, uçuş tuzağı spektrometresi Shimadzu (Kyoto, Japonya) firmasının ürünü LCMS-IT-TOF denilen, iyon tuzağı süresi kullanma prensibine göre çalışan cihaz ile gerçekleştirildi. Prominence serisi sıvı kromatografisinden oluşan sistemde DGU-20A3R 3 hatlı gaz giderme ünitesi, iki adet LC-20AD ikili gradient pompa, bir SIL-20A HT otomatik örnekleyici, bir CTO-10ASVP kolon fırını, bir CBM-20A iletişim ünitesi ve SPD-M20A fotodiyod dizi

detektörden oluşmaktadır. Ayrıca Shimadzu LC LabSolutions 3.43 SP1 veri analiz programı kullanılmıştır.

UV-spektrofotometrisi ile yapılan incelemelerde Shimadzu (Kyoto, Japonya) firmasının ürünü olan UV-2401PC model çift ışık yollu UV-spektrofotometresi kullanılmıştır. Veriler UV/PC Personal Spectroscopy Software Version 3.7 programı tarafından işlenmiştir.

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

3.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Tablo 3.2’de görüntüleme ve analiz aşamalarında kullanılan sabit fazlar listelenmiştir.

Tablo 3.2. *Kullanılan sabit fazlar*

Etiket	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Tanecik boyutu (Å)	Partikül Çapı (µm)	Fonksiyonel grup	Firma
Kinetex®	150	3	100	2,6	C ₁₈	Phenomenex (Kaliforniya, ABD)
Ascentis Express®	100	3	90	2,7	C ₁₈	Sigma Aldrich (Missouri, ABD)

4. YÖNTEMLER

4.1. Deneysel parametreler

4.1.1. Enstrümental parametreler

Sıvı kromatografisi çalışmalarında kullanılan mobil fazın akış hızı 0,25 mL/dk, kolon sıcaklığı $40,0 \pm 0,1$ °C'ye ve otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı $15 \pm 0,1$ °C'ye ayarlanmıştır. Numune enjeksiyon hacmi tüm sıvı kromatografisi cihazları için 1 µL olarak seçilmiştir. Tüm çözeltiler enjeksiyondan önce PVDF filtrelerden süzölmüştür.

LC-MS/MS sistemindeki kütle spektrometresi, pozitif modda (ESI+) elektrosprey iyonizasyonu kullanarak, m/z 100 ila m/z 800 arasında başlayan kütle aralığında çalıştırıldı. MS koşulları aşağıdaki gibi optimize edilmiştir: Kurutma gazı (azot) akış hızı: 15 L/dk; nebulize edici gaz (azot) akış hızı: 3,0 L/dk; çarpışma gazı: Argon; CDL sıcaklığı: 250 °C ve ısı bloğu sıcaklığı: 450 °C. Tüm analizlerde Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) modu kullanılmıştır.

LC-DAD sistemindeki diyot dizisi detektörü 247 nm dalga boyuna ayarlandı ve gerçek zamanlı spektrum 1,5625 Hz veri örnekleme frekansında 190 ve 380 nm arasında kaydedildi. Dedektör örnekleme hızı ve detektör zaman sabiti 640 msn'ye ayarlandı.

LCMS-IT-TOF sistemindeki kütle spektrometresi, pozitif iyon modunda çalışan ESI arayüzü ile donatılmıştır; enstrümantal parametrelerden yüksek gerilim probu potansiyeli -3,5 kV; nebulize edici gaz (Azot) akış hızı 1,5 L/dk; CDL sıcaklığı 200 °C; ısı bloğu sıcaklığı 200 °C ve kurutma gazı basıncı 200 KPa olarak seçilmiştir. CID parametreleri, CID enerjisi için %50, çarpışma gazı parametresi için %50 seçilmiş ve CID için argon gazı kullanılmıştır. TOF dedektör voltajı 1,6 kV olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda hassasiyet, çözünürlüğü ayarlamak ve kütle sayısı kalibrasyonu yapmak için (iyon kapanı ve TOF analizörü) standart numune olarak trifloroasetik asit çözeltisi kullanılmıştır.

4.1.2. Standart çözeltilerinin hazırlanışı

IVA'nın ilk stok çözeltisi (1011 µg/mL), 10,11 mg IVA'nın 10,0 mL asetonitril içinde çözölmüş ve tam çözönmeyi sağlamak için karıştırıcı ile 3 dakika karıştırılmıştır. Çalışmalar için gerekli kalite kontrol çözeltilerini hazırlamak için tüm seyreltmeler yine asetonitrilde yapılmış ve karıştırıcıda tam çözönmeyi sağlamak için 2 dakika tutulmuştur. Stok çözeltilerin kısa süreli (7 gün) ve uzun süreli (30 gün)

periyotlarda +4 °C’de, gün ışığından uzakta ve -20 °C’de tutulduğunda en az 3 ay boyunca stabil olduğu tespit edildi.

4.1.3. Geri kazanım çalışmaları için çözeltilerin hazırlanışı

IVA’nın ticari ürünü olan Kalydeco® ülkemizde henüz satışa sunulmamasından ve çeşitli faktörlerden dolayı yurt dışından elde edilememiştir. Bu nedenle söz konusu metodun güvenilirliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için gerekli geri kazanım çalışmaları elde hazırlanan pseudo formülasyonlarda yapılmıştır. Bunun için gerekli olan formülasyon ticari ürünün yayınlanmış olan patentinden alınmış ve birebir hazırlanmıştır [77]. Ticari ürünün içeriği Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. KALYDECO® formülasyonu

Tablet Formülasyonu	% Ağırlık	Ağırlık (mg)
Orta seviye F	34,09	187,5
Mikrokristalin selüloz	30,51	167,8
Laktoz	30,40	167,2
Sodyum kroskarmeloz	3,00	16,5
SLS	0,50	2,75
Kolloidal silikon dioksit	0,50	2,75
Magnezyum stearat	1,00	5,50
Toplam	100,00	550

Yukarıda verilen Tablo 4.1’deki miktarlarda inaktif bileşenler hazırlanmış ve içine 150 mg IVA ilave edilerek karıştırılmıştır. Toz halindeki bu karışım 100 mL balonjojeye aktarılmış ve asetonitrilde çözündürülmüştür. Bunun için karışım önce mekanik olarak 5 dakika karıştırılmış ve ardından ultrasonik banyoda 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından 0,22 µm’lik poliviniliden florür şırınga filtresi ile süzölmüştür. Bu süzöntüden geri kazanım çalışmaları için gerekli seyreltmeler yapılarak, üzerine asetontirilde hazırlanmış standart IVA çözeltisi ilave edilerek %80, %100 ve %120 olmak üzere üç seviyede çözeltiler hazırlanmıştır.

4.1.4. Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanışı

Sıvı kromatografisinde görüntüleme çalışmalarında hareketli fazın pH ayarlamaları için hem kütle dedektörü hem de foto diyot dizisi dedektörlerine uygunluğu sebebiyle formik asit ile çalışılmıştır. Bu amaçla apolar faz için seçilen metanol ve asetonitrile %0,1 (h/h) oranında formik asit ilave edilmiştir. Polar faz için seçilen suya da aynı şekilde

formika sit ilavesi yapılmıştır. Hareketli fazın optimizasyonu yapılırken polar faz olan suda her zaman %0,1 (h/h) oranında formik asit ilave edilirken apolar fazların formik asitsiz olarak denemeleri yapılmıştır. Hazırlanan mobil fazlar 22 µm'lik poliviniliden florür filtre ile süzölmüş ve 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek gaz giderimleri yapılmıştır.

Tüm sıvı kromatografisi çalışmaları boyunca optimum hareketli faz izokritik olarak seçilerek elüsyon yapılmıştır. Kullanılan hareketli faz, su:asetonitril (37:63, h/h) çözeltisidir. Hareketli fazın hem polar bileşeninde hem de apolar bileşeninde %0,1 (h/h) oranında formik asit ilave edilmiştir. Söz konusu mobil fazın pH'sının yaklaşık 2,6 olduğu belirlenmiştir.

4.1.5. Bozundurma çözeltilerinin hazırlanışı

4.1.5.1. Hidroklorik asit çözeltisi (2 N)

Stok hidroklorik asit çözeltisinden 16,6 mL alınıp içinde bir miktar su bulunan 100 mL balonjojeye ilave edilir. Ardından yavaş yavaş çalkalamak suretiyle su ilave edilerek hacmi tamamlanır. Etken maddenin 1 N HCl içinde hızlı bozundurulması için bu çözeltiden seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

4.1.5.2. NaOH çözeltisi (2 N)

8,0 g sodyum hidroksit peleti tartılarak içinde bir miktar su bulunan 100 mL balonjojeye ilave edilir. Ardından yavaş yavaş çalkalamak suretiyle su ilave edilerek hacmi tamamlanır. Etken maddenin 1 N NaOH içinde hızlı bozundurulması için bu çözeltiden seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

4.1.5.3. H₂O₂ çözeltisi (%6, h/h)

Stok %30 H₂O₂ (h/h) çözeltisinden 20 mL alınıp içinde bir miktar su bulunan 100 mL balonjojeye ilave edilir. Ardından yavaş yavaş çalkalamak suretiyle su ilave edilerek hacmi tamamlanır. Etken maddenin %3 H₂O₂ (h/h) içinde hızlı bozundurulması için bu çözeltiden seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

4.1.6. Bozundurma Koşulları

Hızlandırılmış bozunma çalışmaları kullanılarak etken maddenin hızlı bir biçimde bozunması sağlanır ve bu sayede safsızlıkların veya bozunma sonucu oluşan ürünlerin analize etkisi incelenir. Bu çalışmalarda incelenen parametreler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Hızlandırılmış bozundurma 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 M 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.

4.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sıvı kromatografisi çalışmalarında analitik yanıt elde edilen kromatogramlardaki her bir pikin alanı kabul edilmiştir. Kullanılan matris ortamı nedeniyle herhangi bir iç standart kullanılmamıştır. Elde edilen derişimlere karşılık gelen pik alanlarından yöntem geçerliliği çalışmaları kapsamlı olarak yapılmıştır.

4.1.8. Yöntem Geçerliliğinin Tespiti

ICH kılavuzunun tavsiye ettiği şekilde validasyon işlemleri geliştirilen yönteme uygulanmış ve yöntemin analitik açıdan kabul edilebilir veriler sağladığı gösterilmiştir [78]. Yöntemin validasyonu için ICH kılavuzunda da belirtildiği şekilde spesifiklik, kesinlik, doğruluk, doğrusallık, tayin alt sınırı, saptama sınırı ve sistem uygunluk testleri yapılmıştır [78-80].

4.1.8.1. Kararlılık

IVA'nın birincil stok çözeltisi, asetonitrilde (10,1 µg/mL) uygun şekilde seyreltildi ve periyodik olarak (6, 12, 18, 24, 48 saat, 2 hafta boyunca -20 °C ve üç donma-çözülme döngüsü) olmak üzere çözelti ve hareketli faz kararlılığını incelemek için analizler yapıldı.

4.1.8.2. Seçicilik

ICH Q2 (R1) kılavuzunda, deney testindeki safsızlıkları veya bozunma ürünlerini içerip içermediğini kontrol etmek için ikinci bir analitik prosedür denenmiştir [81, 82]. Kılavuzda belirtildiği şekilde IVA'ya nem, ışık, ısı, asidik, bazik ve okside ortamlarda hızlı bozundurma koşulları uygulanarak çözeltileri hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar spesifikliği belirlemek için kullanılmıştır. Pozitif veya negatif bir cevabın gözlenmediğini onaylamak için kromatogramlar ve ilgilenilen piklerde şüpheli ve belirsiz sinyallerle araştırılmıştır. Ayrıca, pik saflıkları fotodiyot dizilimi kullanılarak pik saflığı ve kütle detektörü ile de elde edilen piklerin sadece analite ait olup olmadığı görüntülenmiştir [83, 84].

4.1.8.3. Doğrusallık ve Çalışma aralığı

Doğrusallık için on konsantrasyon seviyesini kapsayan test çözeltilerinin tahmini konsantrasyonunun %1-200'üne karşılık gelen (0,10; 0,51; 1,01; 2,53; 5,06; 8,09; 10,11; 12,1; 15,2; ve 20,2 µg/mL) seviyelerde çözeltiler hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Her enjeksiyon en az üç kez tekrar edilmiş ve ortalama değerleri hesaplamaya katılmıştır. Doğrusallık, gün içi ve günler arası üç tekrar olmak üzere çalışılmış ve elde edilen lineer regresyon analizleri incelenmiştir. Eğim, kesim, tanımlayıcılık katsayısı, eğim ve kesim değerlerinin %95 güven seviyesindeki olası sınırları hesaplanmıştır. Bunların yanı sıra gruplar arası uyum, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

4.1.8.4. Doğruluk

Yöntem doğruluğunu belirlemek için geri kazanım deneyleri uygulanmıştır. Elde hazırlanmış olan pseudo tablet formülasyonu ile bilinen miktarlarda IVA çözeltileri ile düşük seviyede (8,09 µg/mL;) orta seviyede (10,1 µg/mL) ve yüksek seviyede (12,1 µg/mL) olmak üzere 3 farklı seviyede (%80, %100 ve %120) hazırlanarak analizleri yapılmıştır. Her seviye için 3 paralel set hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçların standart sapma (ss), bağıl standart sapma (%BSS) ve %95 güven seviyesinde güven sınırları ile ortalama geri kazanım hesaplanmıştır.

4.1.8.5. Kesinlik

Kesinlik çalışmaları gün içi ve günler arası deneyleri olmak üzere iki kısım içermektedir. Doğrusallık çalışmalarında kullanılan çözeltilerin %100'ne denk gelen 10,1 µg/mL derişime sahip standart ve pseudo tablet çözeltileri, aynı ve ardışık 3 günde önerilen yöntem kullanılarak 8 kez analiz edilerek yöntemin kesinliği yorumlanmıştır. Sonuçlar, ortalama, ortalama standart hata, standart sapma, %BSS ve %95 güven seviyesi

dahil olmak üzere istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Ayrıca günler arası gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü ANOVA ile incelenmiş ve istatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6.0b programı ile yapılmıştır.

4.1.8.6. Teşhis ve tayin alt sınırı

Yöntemin geçerliliği için diğer önemli parametreler olan LOD ve LOQ, ICH kılavuzuna göre hesaplanmıştır. Buna göre teşhis sınırı için çalışılan her bir sıvı kromatografisi cihazı için gürültünün 3,3 katını veren konsantrasyon belirlenmiş ve çözeltisi hazırlanarak analizi yapılmıştır (n=10). 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=10).

4.1.8.7. Sistem uygunluk testleri

Analizler sırasında kullanılan YPSK cihazının ve analiz kolonlarının performansını gösteren sistem uygunluk parametrelerinin hesaplanması yöntem geliştirme basamağında oldukça önemlidir. T, N, k ve USP genişlik gibi parametreler sistem uygunluk parametrelerini oluşturur. Analizler sırasında değişken hareketli faz ile elüsyon yapıldığından bu parametrelerden N hesaplanmamıştır. Yöntem geliştirme sırasında bu parametrelerin her biri tüm tatlandırıcı standart maddeleri için Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) metoduna göre Shimadzu LabSolution LCsolution v1.11 SP1 veri analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.1.8.8. Sağlamlık

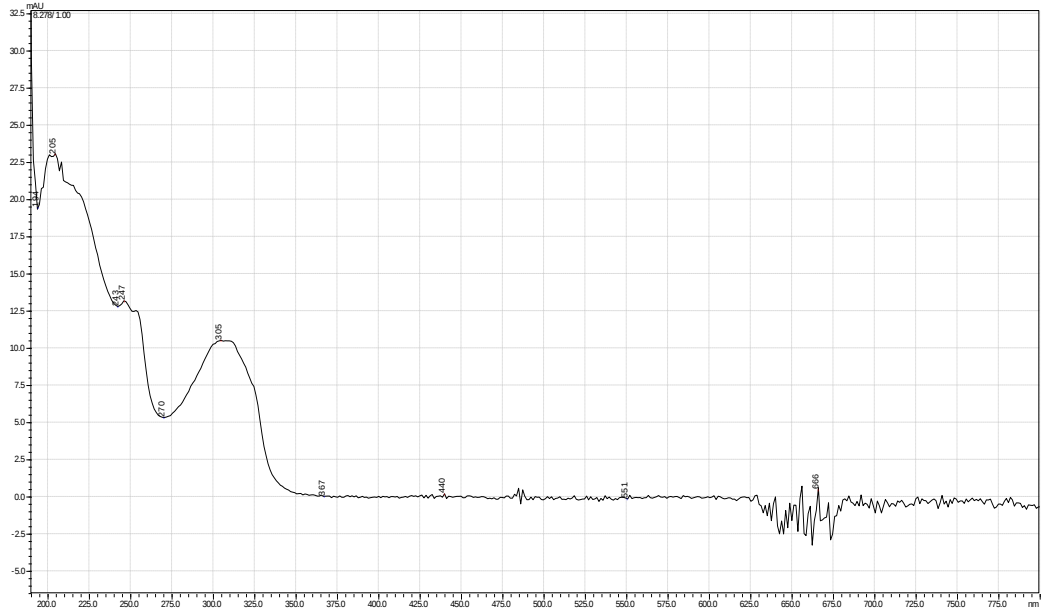
Bir analitik yöntemin sağlamlığı yöntem parametrelerindeki gözlenen küçük değişmelerin analitik yanıtı etkisinin kabul edilebilir düzeylerde olduğunun gösterilmesidir. Bu amaçla LC-DAD ve LC-MS/MS için 10.0 µg/mL derişimindeki IVA çözeltileri akış hızı (0,225 ve 0,275 mL/dk), kolon sıcaklığı (27 ve 33 °C) ve hareketli faz apolar bileşen yüzdesi (%56,7 ve %69,3) parametreleri değiştirilerek analiz edilmiş (n=3) ve %BSS değerleri hesaplanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

IVA analizinde yüksek doğruluk, tekrarlanabilirlik ve ayırma gücü ile daha düşük tayin ve tespit sınırlarına inme imkânı verdiğiinden dolayı sıvı kromatografisi ile ayırma yapıp ardından foto diyot dizisi ve kütle dedektör ile tayin ve tespiti yapılmıştır. Foto diyod dizisi dedektör için metot seçiciliğinin sağlanması amacıyla hızlı bozundurma koşulları uygulanmış ve bu girişimlerin varlığında maddenin tayini yapılmıştır. Metot geliştirme çalışmaları her iki tipteki dedektör için kullanılabilecek ortak metot olması amacıyla kütle dedektörüne uygun metot bileşenleri ile çalışılmıştır. Aynı zamanda çalışmada elde edilen bozunma ürünleri yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) özelliğine sahip LC/MS-IT-TOF cihazı ile tespit edilmiştir. Etken maddenin ayrıca hem ultraviyole görünür alan (UV-Vis) hem de kütle spektroskopisi özellikleri ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Metodun başka laboratuvarlarda da aynı koşullarda aynı parametrelerle uygulanabilir olduğunu göstermek amacıyla YBSK için laboratuvarlar arası karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca elde edilen metot çeşitli ekonomik sebeplerden tableti elde edilemeyen KALYDECO®'nun piyasaya sürülmüş olan patentine uygun olarak tablet formülasyonu hazırlanmış ve her bir ayrı cihazda analizleri yapılmıştır.

5.1. IVA'nın UV-Görünür Alan Bölgedeki Spektral Özelliklerinin İncelenmesi

Deneyisel çalışmaların bir basamağında foto diyod dizisi dedektör ile hedef API'nın tayin ve tespit işlemleri yapılacağından öncelikle UV-Vis spektroskopisinde bileşiğin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu analiz edilmiştir. Bunun için µg/mL derişimde asetonitrilde hazırlanmış IVA çözeltisinin 190-400 nm aralığında okuması yapılmıştır. Elde edilen spektrum Şekil 5.1'de verildiği gibidir.



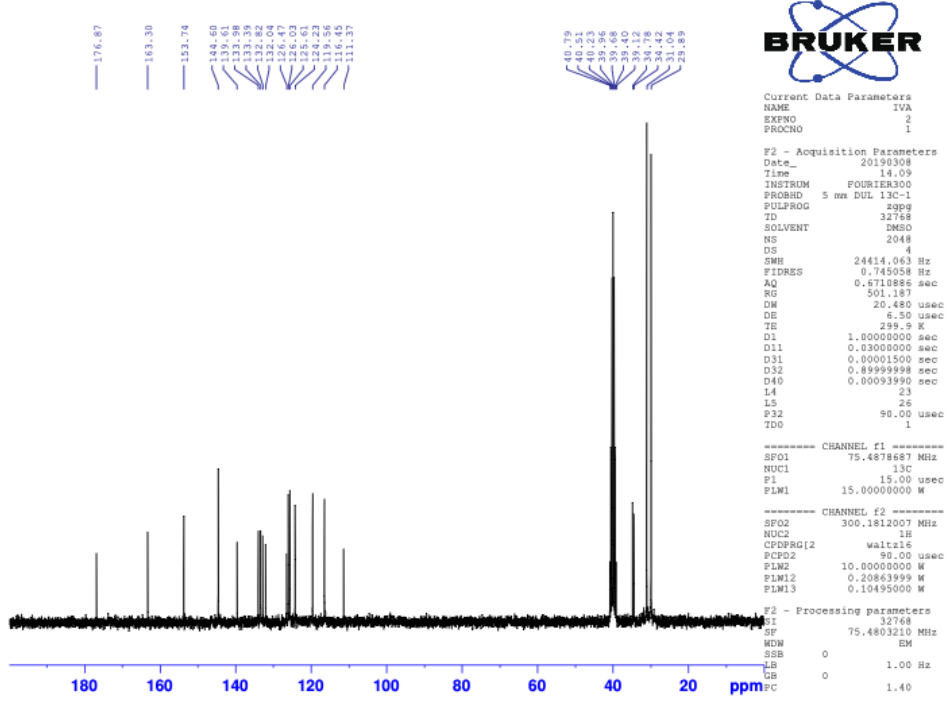
Şekil 5.1. IVA'nın UV-görünür bölgedeki spektrumu ($C=10,1 \mu\text{g/mL}$)

Bilindiği gibi maddelerin UV spektrumlarının incelenmesinde ortam çözücüsünün batokromik ya da hipsokromik etkilerinden dolayı elektroaktivite özelliklerinin etkisi çok yadsınamaz durumdadır. Çalışılan bileşik olan IVA için asetonitril çözücü olarak kullanıldığında birden çok dalga boyunda yüksek absorbanslar elde edilmiştir. Yapıda tahmin edilen elektronik geçişler sahip olduğu karboksik grubu, karboksiamid grubu ve benzen halkasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen bu dalga boylarının absorbans büyüklüklerine göre sıralandığında sırasına göre 202 nm, 221 nm, 247 nm ve 305 nm şeklindedir. Yapıda birden çok kromofor grup bulunması ve çok fazla elektronik geçişi söz konusu olduğu için bu absorbans profili normaldir. Ancak kantitatif çalışmalar da max absorbans ne kadar fazla olursa o kadar düşük LOD ve LOQ değerleri vermektedir. Çalışmada bu nedenle yüksek absorbans veren aynı zamanda düşük enerji ile uyarılma sağlayan ve kullanılan çözücülerin soğurma yapmadığı dalga boyu olan 247 nm seçilmiştir. 247 nm dalga boyunun yapıdaki karboksil fonksiyonel grubunun yaptığı $n \rightarrow \pi^*$ elektronik geçişinden, 305 nm absorbansın ise karboksiamid grubunun yaptığı $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Ancak çözücü etkisi ile ortalama 15 nm kadar batokromik kayma gözlenmiştir.

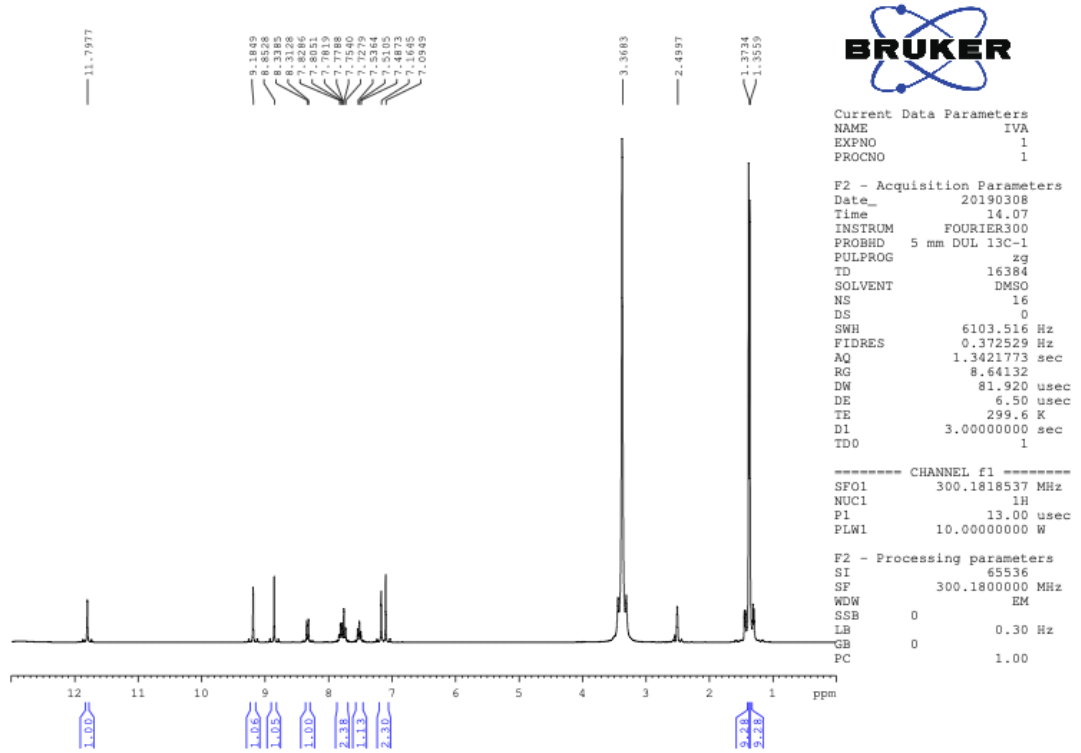
5.2. NMR spektroskopisi tekniği ile IVA'nın ^1H NMR spektrumlarının tespiti

IVA 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.



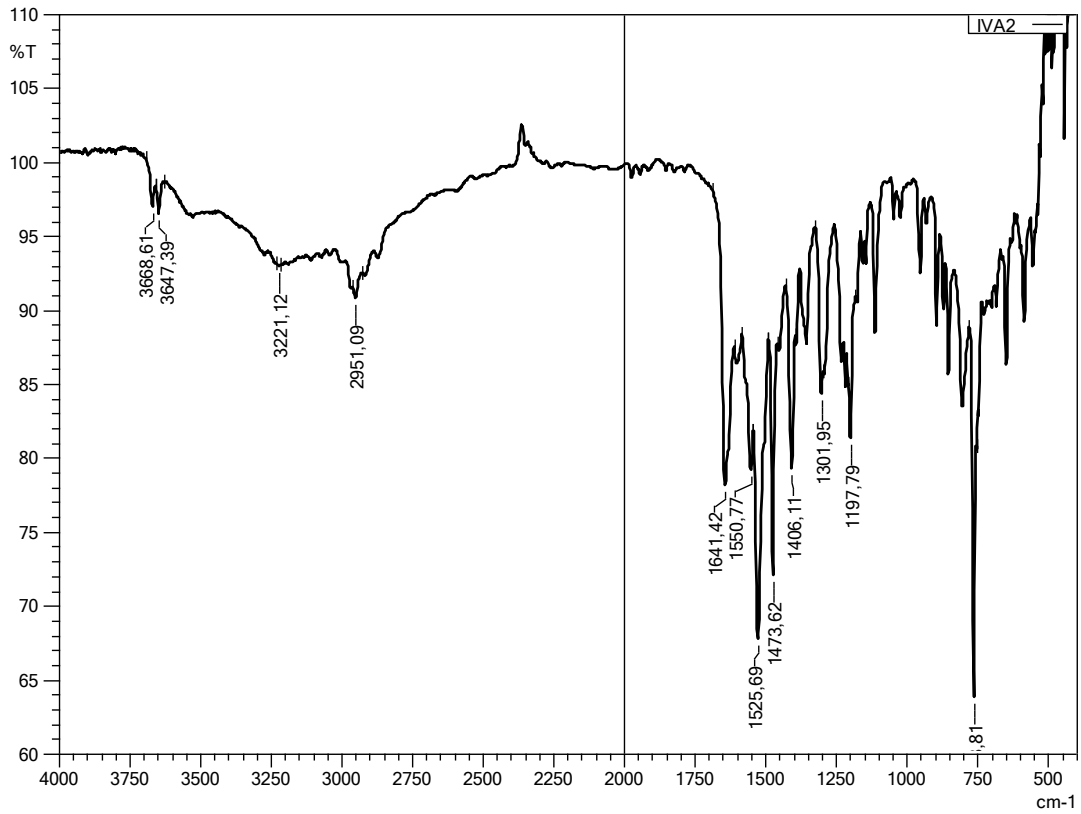
Şekil 5.2. IVA için alınmış ^1H NMR spektrumu



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

5.3. IR spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonu

IVA etken maddesinin standardının spektroskopik özelliklerinin incelenmesi amacıyla IR spektrofotometresi ile analiz yapılmış ve yapıya özgü fonksiyonel gruplar Şekil 5.4'deki gibi belirlenmiştir.



Şekil 5.4. IVA için IR Spektrumu

5.4. Sıvı Kromatografisi Yöntem Geliştirme

Metot geliştirme çalışmaları ilk olarak tüm deneylerde ve testlerde kullanılabilecek evrensel bir çözücü ortamı aranarak başlatılmıştır. IVA, yukarıda fiziksel ve kimyasal özelliklerinde bahsedildiği gibi polaritesi düşük olup apolar çözücülerde çözünme kabiliyeti daha iyi olan bir bileşiktir. Bu nedenle bileşik sadece asetontirilde çözülmüş herhangi bir polar fazla karışım yapılmamıştır. Çünkü maddenin ayırma çalışmaları yapılırken görüldü ki maddenin ayırma ancak yüksek oranda apolar çözücü içeren ortamda gerçekleşmektedir. Bundan dolayı faz ayırma, kolon iç dinamiklerinde farklılaşma olmaması ve çeşitli çökmelerin yaşanmaması için bileşik bozunma çalışmaları da sadece asetonnitril içinde çözünerek çalışmalar yapılmıştır.

Sunulan bu çalışmanın alt amaçlarından biri, detektörü değiştirerek hem çok benzer hem alet koşullarının uygulanabileceği nitelikli kromatografik yöntemler geliştirmek olup bu çok yönlülüğün kilit noktası olarak kabul edilmiştir. Buna göre, girişimsiz ayrılma ve tespit ile kabul edilebilir kromatografik tutunma IVA için amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için, bazı ortak kromatografik başlangıç noktaları değerlendirilmiş ve yöntem geliştirme sürecinde test edilmiştir. Asetik asit, amonyum format veya formik asit

gibi bir iyon baskılayıcı maddenin kullanımı çeşitli konsantrasyonlarda test edilmiştir; Mobil fazda %0,1 formik asit (*h/h*) kullanımının, kabul edilebilir pik şekli ve IVA'nın iyonlaşmasını sağladığı bulunmuştur. Yukarıda belirtildiği gibi IVA için oldukça yüksek asitlik ve bazlıkta olmak üzere iki pKa değeri mevcuttur. Çalışmada sabit faz olarak kolon dolgu maddesi silika olan kolonlarla çalışıldığı için mobil faz pH seçiminde en fazla nötr bölgeye kadar gidileceği bazik bölgeye doğru geçiş ise kesinlikle planlanmamıştır. API için tespit ve tayininde kütle dedektörünün kullanımı da düşünüldüğü için iyonlaştırıcı reaktiflerin eklentisi şart olmuştur. LC mobil fazında, özellikle formik asit ve amonyum formatta değişik konsantrasyonlarda katkı maddelerinin karboksiamid türevi bileşiklerin negatif iyon elektrosprey tepkisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi oldukça açıklayıcıdır [85]. En iyi yanıt formik asit kullanılarak elde edilmiştir. Amonyum format ise asidik bölgede formik asitle benzer aralıktaki tamponlama yapması ve formik asitle aynı oranda ilave edildiğinde kayda değer herhangi bir değişim gözlenmediğinden dolayı iyonlaştırıcı reaktif ve tampon olarak formik asit seçilmiştir. Bununla birlikte, bu koşul altında analitin tutulma süresi, tekrarlanan enjeksiyonlar üzerinde formik asidin hem organik hem de polar faza ilave edilmiş olmasının iyonlaşmaya herhangi bir efektif etkisi olduğu gözlenmemiştir. Bu nedenle, nadir görülen fikrin aksine, analitin pKa'sı ile tepkili ve tematik faz fazlarının pH'ı arasında basit bir öngörülebilir korelasyon yoktur. Öte yandan mobil faza ilave edilen formik asit oranı toplamda %0,1 (*h/h*) olduğu deneysel olarak belirlenmiştir. Ancak bu oranın hem organik hem de polar faza paylaştırılmış olarak ilave edilmesi elde edilen pikin kapasite faktörü için oldukça önemli olduğu görülmüştür. Bu durum nispeten yüksek asetronitril konsantrasyonunda bile analit için oldukça yüksek bir kapasite faktörü elde edilmesine büyük avantaj sağlamıştır.

Eş zamanlı olarak, asetronitril ve metanol başlangıçta mobil fazda suya tamamlayıcı organik değiştirici olarak test edilmiş; bunlar arasında asetronitril daha iyi ayırım vermiştir. Bu gözlem bileşiğin sadece asetronitrilde çözülmesinin de sebebi olmuştur. Çünkü maddenin ayırımında metanol kullanıldığında ne kadar yüksek oranda kullanılmış olursa olsun hep çok uzun alıkonulma süreleri elde edilmiştir. Metanolün IVA'yı kolondan çıkarmaya herhangi yeterli bir etki etmediği görülmüştür. Bu gözlem asetronitrilin UV bölgesinde düşük absorpsiyona ve düşük viskoziteye sahip olmasından dolayı da ayrıca sevindiricidir [86]. Bunlarında yanında IVA'nın çözünürlük probleminde daha iyi kütle aktarımı sağlaması ve daha iyi performans göstermesi de sıvı kromatografisi ayırımında hareketli faz uyumunu daha da verimli hale getirmiştir. Çalışmada temel mobil faz oranı

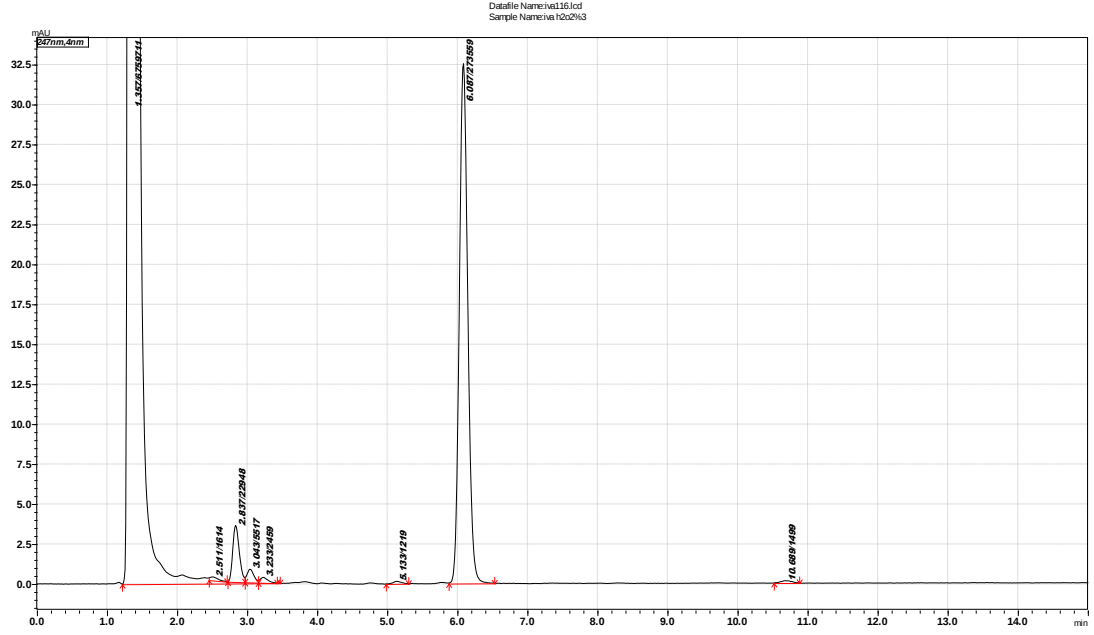
ve kompozisyonu inceleme analizlerinden sonra mobil faz su ve asetonitrilin ikisinde de hacimce %0,1 formik asit (h/h) olup apolar faz oranı (63:27, h/h) IVA'nın bozunma ürünleri varlığında ayrımı için en iyi seçenek olduğu bulunmuştur.

Mobil faz ile ilişkili faktörlere ek olarak, yöntemlerin toplam çok yönlülüğünü arttırmak için yüksek verimli ayırmalara izin verebilen verimli ve sağlam bir analitik kolonun kullanılması tercih edilmiştir. Bu açıdan elde var olan iki tip tek tip çekirdekli dolgu materyali silika olup C_{18} fonksiyonel gruba sahip iki tip sabit fazda denemeler yapılmıştır. Bu kolonlardan bir tanesi Supelco® marka Ascentis Express C_{18} fonksiyonel gruba, 90 Å por büyüklüğüne sahip 100 mm × 3,0 mm × 2,7 µm ölçülerine diğeri de Phenomenex marka Kinetex® C_{18} fonksiyonel gruba 100 Å por büyüklüğüne sahip 150 mm × 3,0 mm × 2,6 µm olan sabit fazdır.

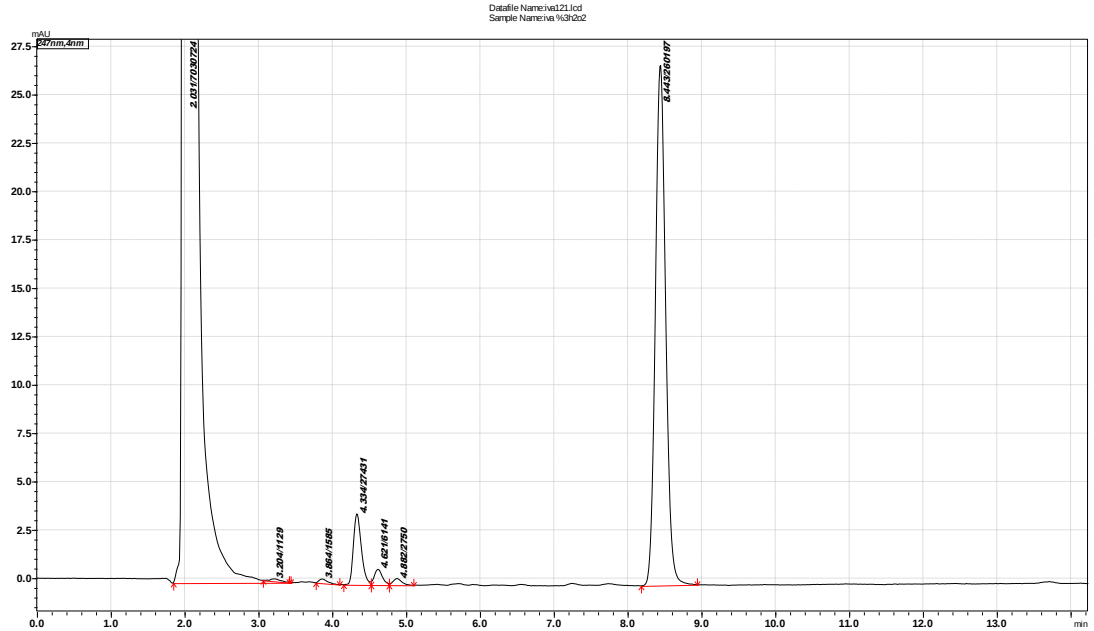
Kolon sıcaklığı çalışmaları 25-40 °C arasında yapılmıştır. 25 °C sıcaklıkta çalışıldığında elde edilen kromatogramlardan kromatografik sistemde gerçekleşen etkileşimlerin yetersiz olduğu ve bu nedenle kromatogramlarda ciddi şekilde bozulmalar ve yetersiz ayrımlar tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek viskoziteye bağlı olduğu tahmin edilen pik sinyallerinde azalmada mevcuttur. 30 °C ve 35 °C sıcaklıklarda ayırım çalışmaları yapıldığında ise yeterli kromatografik sistem etkileşimlerine ve düşük viskozite bağlı olarak oldukça iyi ayırım verimliliği, pik morfolojisinde ve pik simetrisinde toparlanmalar göze çarpmıştır. Bu iki sıcaklık değeri birbiri ile kıyaslandığında ise araların pek sistem uygunluğuna etki edecek fark olmasa da gürültü pikleri daha az gözlemlendiğinden dolayı verimliliği arttırmak ve viskoziteyi azaltmak için 30 °C'ye kolon fırını ayarlanmıştır. 40 °C'de çalışma yapıldığında ise gürültü sinyallerinde önemli ölçüde artış ve analit sinyallerine girişim görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan Kinetex® kolonun yapılan çalışmalarda; klasik tamamen gözenekli silika parçacıkları ile karşılaştırılmış ve kolonunun izokratik ayrımlarındaki istisnai performansının, eddy dispersiyonunda veya a teriminde azalma ve mobil ile sabit faz arasında daha düşük bir kütle transfer direnci nedeniyle olduğu düşünülmüştür. Kinetex C_{18} partiküllerinin küçük partikül büyüklüğü dağılımına bağlı olarak kısa mesafeli kanallar arası hız sapmaları da daha azdır [87]. Kolon oldukça başarılı bir ayırım yapmasına rağmen Supelco® etiketli kolonun kendinden 50 mm daha kısa olduğu düşünüldüğünde elde edilen sonuç şaşırtıcıdır. Her iki kolonda IVA'un oksidasyon koşulları altında gerçekleştirilen ayırma ait kromatogramlar Şekilde 5.5 ve 5.6'da verilmiştir. Her iki kolonun performanslarının tam olarak karşılaştırmalarının yapılması

için aynı kromatografik şartlar sağlanmıştır. Bu şartlar mobil faz su ve asetonitrilin ikisinde de hacimce %0,1 formik asit (*h/h*) olup apolar faz oranı (60:30, *h/h*), akış hızı 0,3 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 1 µL, kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Oksidasyon koşullarının seçilmesinin nedeni ise en fazla ayırım için analit içeren bu koşulların olmasıdır.



Şekil 5.5. Oksidatif bozunma koşullarında Ascentis Express kolonda analiz (31.5 µg/mL IVA)



Şekil 5.6. Oksidatif bozunma koşullarında Kinetex kolonda analiz (31.5 µg/mL IVA)

Diğer yandan, LC-DAD ve LC-MS/MS teknikleri için en uygun akış hızı olarak 0,25 mL/dk seçilmiştir. Kromatografik ayırım çalışmaları bozunma ürünleri varlığında yapıldığında yüksek apolar yüzdeye sahip mobil faz ve düşük akış hızı az yüzdeli apolar faz ve yüksek akış hızına oranla daha başarılı pikler elde edilmesine neden olmaktadır. Organik faz yüzdesi düştüğünde alıkonulma zamanı çok artmakta ancak bu durumun ayırım verimliliğine etkisi ise oldukça az olduğu görülmüştür. Akış hızının azaltılarak ayırımı yapılmak istenen bileşiklerin kolonda daha çok kalması ayırımı iyileştirme de daha çok yardımcı olmuş, pik morfolojilerinde, simetrilerinde ve tabanlarında ise etkili bir bozulma ya da artma gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmada organik faz yüzdesi arttırılıp akış hızının ise azaltılarak uygun sürede kromatografik ayırım başarılmıştır. LC-DAD yöntemi daha yüksek akış hızlarına izin vermesine rağmen, 0,25 mL/dk IVA ve mobil fazın MS/MS detektörüne sokulması için mümkün olan akış hızı aralığında yer almasıdır. Enjeksiyon hacmi her iki dedektör içinde 1,0 µL olması tercih edilmiştir. Bu miktar hem dedektörlerdeki tayin ve tespit sınırlarını oldukça düşürmüş hem de yeterli kolon doygunluğunu sağlayan hacim aralığında bulunmaktadır.

Kromatografik parametrelerin yanı sıra, LC-DAD analizleri için tespit parametreleri de incelenmiştir. Yukarıda belirtilen mobil faz koşulları altında IVA'nın absorpsiyon özellikleri, foto diyot dizisi detektörü kullanılarak UV ve görünür bölgede izlenmiş ve 247 nm, en yüksek absorpsiyon yaptığı dalga boyunda olarak belirlenmiştir. Akış hızı yüksek olmadığından 1,5625 Hz veri örnekleme frekansı yeterli olup dedektör örnekleme hızı ve zaman sabiti 640 ms'ye ayarlandı, bu da kromatografik bir pikin oluşması için en az 36 noktaya izin vermiştir.

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 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. IVA analizi için elde edilen SUT verileri

Parametre	Hesaplanan Değer			Tavsiye Edilen Değer
	LC-DAD	UPLC	LC-MS\MS	
Alıkonulma zamanı (dk) GA%95	8,297 ± 0,0061	8,251 ± 0,029	8,435 ± 0,0059	-
Alıkonulma zamanı için %BSS	0,0623	0,339	0,0671	BSS ≤ %1
Pik alanı kesinliği için %BSS (n=6)	0,621	0,839	0,431	BSS ≤ %1
Alıkonulma zamanı için enjeksiyon kesinliği %BSS (n=6)	0,069	0,810	0,0826	BSS ≤ %1
Kuyruklanma faktörü (T)	1,17	1,266	1,63	T ≤ 2
Kapasite faktörü (k)	2,65	2,099	-	2<k<10
Teorik tabaka sayısı (N)	16289	30025	11387	N > 2000
USP Genişlik	0,277	0,489	0,330	≤1
HETP (USP)	10,497	33,306	14,965	-

5.5. MS/MS yöntem geliştirme

Kütle dedektörü kullanılarak IVA'nın yüksek seçicilik ve düşük saptama sınırlarının elde edilmesi için MS/MS tekniği ile çalışması tercih edilmiştir. Bu amaçla, analitin yüksek derişimde çözeltisi hazırlanmış ve hangi iyonizasyon türünün desteklendiğini belirlemek için kütle dedektöründe genel taraması yapılmıştır. Yapı bu amaçla incelendiğinde yapısındaki karboksi amid grubu nedeniyle iyonlaşma olasılığının Mod+ daha yüksek olması beklenmiştir. Pozitif modda elde edilen maksimum iyonlaşma Q3 taramasında gözlenmiştir ve böylece MRM+ modu seçilmiştir. MRM+ tespit edilen ve miktar tayini için kullanılan yavru iyonları ve uygulanan optimum enerjileri Tablo 5.2'de verilmiştir. Her bir iyon için tutma süresi 100 ms olarak seçilmiştir.

Tablo 5.2. IVA'nın çoklu reaksiyon izleme koşulları

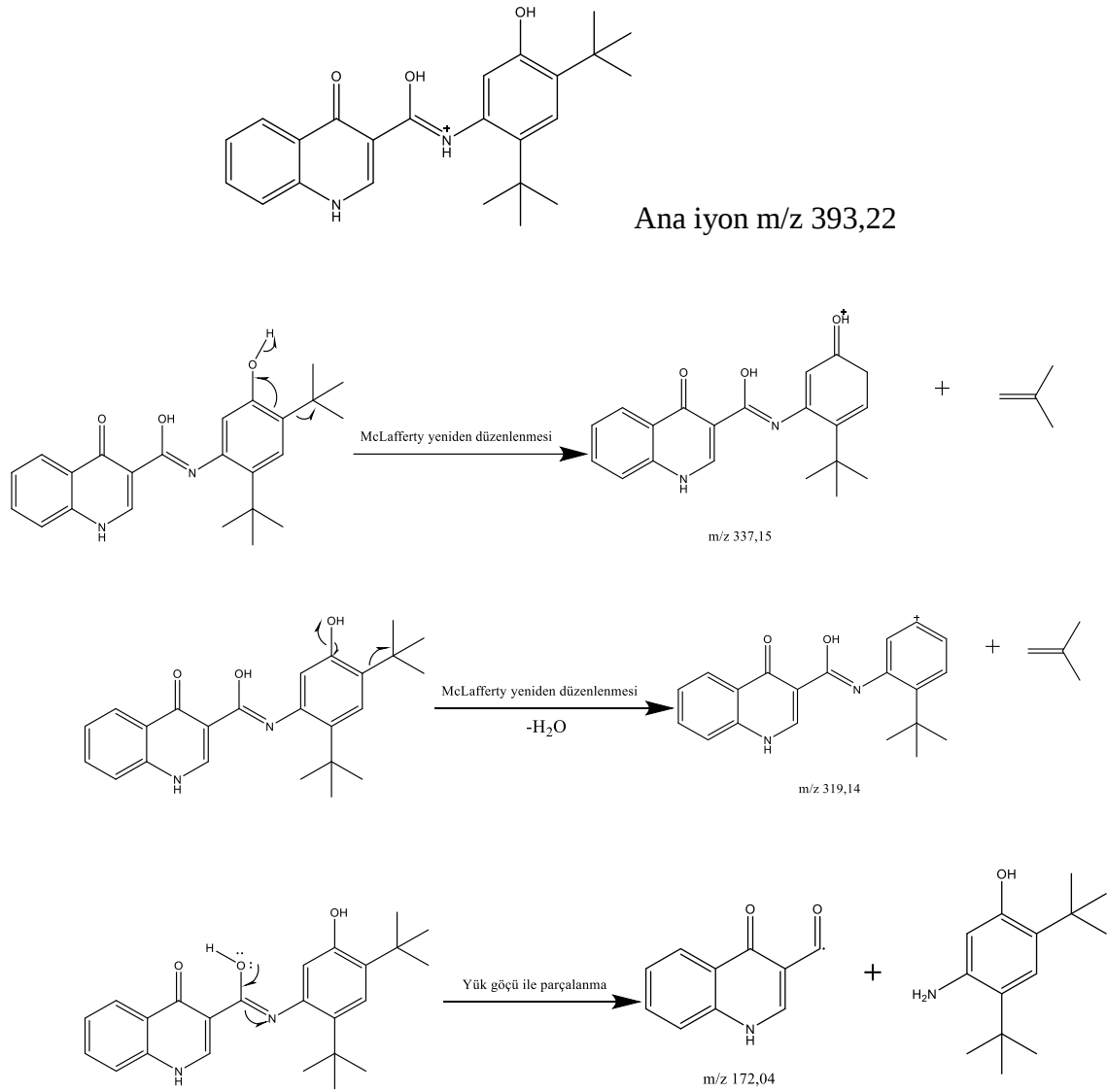
Bileşik	Ana İyon	Yavru İyon	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
Ivacaftor	393,10	337,10	-14,0	-16,0	-23,0
		319,15	-19,0	-29,0	-20,0
		172,05	-19,0	-30,0	-29,0

Protonlanmış veya parçalanmış moleküllerin parçalanması (sırasıyla pozitif ve negatif modlar) yük tutma ve yük göçü parçalanmaları olmak üzere iki ana reaksiyon grubuna ayrılabilir. Katyonize moleküller (ve diğer ilgili türler) normalde yük tutma parçalanma reaksiyonlarını takiben parçalanır. Çoğunluğu sülfat ve fosfat bileşikleriyle sınırlı olan birkaç yük göçü parçalanması örneği vardır. Bununla birlikte, katyonize türler için ana parçalanma reaksiyonları grubunun sınırlandırılması protonlu türlerden daha fazla yapı bilgisinin elde edilebileceğini göstermez (her iki reaksiyon grubunun olası oluşumuyla). Öncü iyon yapısı ve parçalanma reaksiyonları hakkında bilgi, sadece ESI-MS/MS'ye dayanan doğal ve sentetik bileşiklerin yapı aydınlatılmasında kilit bir rol oynar. Cihaz koşullarını ayarlarken beklendiği gibi, enerjiyi aktarma verimliliğinin momentumun korunma yasasına göre her gaz için farklı olması gerekir. Bu nedenle, uygulanan çarpışma gazı, MS/MS spektrumlarının karşılaştırmalı analizi için göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü farklı gazlar MS/MS spektrumunda iyon yoğunluğundaki farklılıklara neden olabilir [88].

Seçilen moleküller ESI koşulları altında bir elektronu kaybederek moleküler iyonlar (oddelektron iyonları)  retir. Ek olarak, belirli bileşikler için, ESI kaynağında üretilen çift elektron iyonları, CID koşulları altında homolitik bölünme yoluyla radikal katyonlar (tek elektron iyonları) da üretebilir. Radikal türlerin parçalanması, önerilen mekanizmanın başlatılması için önemli olan enerjiye ve radikal bölgeye bağlıdır. Yük bölgesi ve kök bölgesi arasında ayırım gösteren iyonlar distonik iyonlar (aynı molekül içindeki farklı atomlarda kök ve iyon yükleri içeren iyonlar) olarak etiketlenmiştir [88].

Hem ketonlar hem de aldehitler, belirgin M^+ pik ketonlarda daha belirgin olmasına rağmen, belirgin moleküler iyon piki değerleri verir. Bu kategorilerdeki bileşiklerin çoğu McLafferty yeniden düzenlemesi adı verilen önemli bir yeniden düzenlemeye tabi tutulur. Bu yeniden düzenleme, hidrojenin moleküler iyonun bir kısmından diğerine, tercihen altı üyeli bir siklik geçiş durumu yoluyla transferini içerir. Enerjik olarak tercih edilir, çünkü kopuk olduğu kadar çok bağ olur. McLafferty yeniden düzenlemesinde karbonil grubuna γ pozisyonunda olan hidrojen atomu içeren bileşiklerin nispi yoğun bir tepe noktası olduğu bulunmuştur. Bu durum yapıda muhtemelen nötr molekül kaybı ve ardından yeniden düzenlenmeye sebep olmaktadır. McLafferty'nin yeniden düzenlenmesi için, uygun şekilde yerleştirilmiş bir heteroatom ( rneğin oksijen), bir çift bağ ve γ pozisyonunda çekilebilir bir H olması gerekir. Bu yeniden düzenlemeye genellikle karbonil grubunun π sistemleri aracılık eder, ancak nitriller gibi diğer π sistemlerinde de oluşabilir [89].

IVA yapısında 3 konumunda hidroksi fenil, 1,4 konumunda dihidrokinolin, 3 konumunda karboksiamit fonksiyonel gruplarını içeren O ve N hetero atomlarına sahip bir organik moleküldür. Yapının ana m/z değeri 393,22 olup şiddetli kütle spektrumuna sahiptir. Ana iyonun iyonlaşması için proton yakalanmasını o atomuna göre daha elektropozitif atom olan N atomunun yaptığı düşünülmektedir. Yapıda karbonla yaptığı σ ve π bağı nedeniyle pozitivitesi düşük olan amit fonksiyonel grubu tarafından 1 proton yakalayarak iyonlaşmıştır.



Şekil 5.7. IVA için ana iyon ve baskın parçalanma yolları.

Kütle parçalanmalarında genellikle öncü ve aktif rol oynayan atomlar heteroatomlar ve doymamış bağlardır. IVA'nın parçalanma yolu, Şekil 5.7'de gösterilmiştir. IVA'nın yapısında kütle parçalanmasında aktif rol oynayan N ve O heteroatomlarıdır. İşlevsel gruplar göz önüne alındığında karboksiamit ve fenol grubu göze çarpmaktadır. Kütle parçalanmalarını inceleme amacıyla molekül MRM+ analiz edilmiştir. Ardından molekül parçalanmış ve üç adet m/z 337,10; m/z 319,15 ve m/z 173,05 sahip kantitatif tayinde kullanılabilecek yavru iyon ortaya çıkmıştır. Daha sonra bu iyonların eldesi için uygulanan enerjiler optimize edilmiştir. Elde edilen en yüksek m/z 337,10 sahip yavru iyon en düşük parçalanma enerjisine özellikle çarpışma enerjine sahip olmasına rağmen kantitatif olarak en yüksek miktarda oluşmuştur. Bu nedenle, ana iyon yapısının en dış

kısımında çeşitli sterik etkilerden uzak fenol yapısında MacLafferty yeniden düzenlenmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Şekil 23'deki mekanizma da görüldüğü gibi bu yeniden düzenlenme oluşurken alkol yapısı ketona dönüşmüş ve yapıdan propen kopmuştur.

Elde edilen ikinci büyük m/z değerine sahip olan yavru iyon m/z 319,14'tür. Bu iyonun parçalanma enerjisi m/z 337,10 sahip yavru iyondan oldukça yüksek özellikle çarpışma enerjisi neredeyse iki kat daha büyüktür. Pik kantitatif olarak diğer iki iyonla kıyasla en küçük miktara sahiptir. İyonun tahmin edilen oluşma mekanizması m/z 337,10 yavru iyonuna benzer olup MacLafferty yeniden düzenlenmesidir. Burada fenol yapısının ketona dönüşmediği ortamdaki asiditeden dolayı H₂O çıkışı ile yapıdan koptuğu düşünülmektedir. Bu teoriyi destekleyen en büyük kanıtlardan birisi fenil yapısının sahip olduğu çifte bağ konjugasyonun bileşiği bu aktif iyon formunda tutabilir olmasıdır. Ayrıca Q1 ve Q3 enerjilerinin m/z 337,10 sahip yavru iyonla birbirine yakın olup sadece çarpışma enerjilerinin arasında iki kat fark olması da bu su molekülünün yardımcı olduğu söylenebilir.

Yük göçü ile parçalanma, yükün öncül iyondan ayrıldığı parçalanma reaksiyonlarıdır. Genel olarak, negatif iyonların yük göçü ile parçalanma gaz fazı reaksiyonları, pozitif iyonlara benzer, çünkü yük bölgesinden uzak konumlarda meydana gelirler. Bununla birlikte, negatif iyonlardaki yük göçü ile parçalanma pozitif iyonlardan önemli ölçüde farklıdır. Pozitif iyonlarda, yük göçü ile parçalanma reaksiyonları genellikle yük bölgesinin başlangıçta nötr bir molekülün yeri olduğu bir ayrılma grubunu ortadan kaldırır. Bununla birlikte, negatif iyonlardan kaynaklanan nötr kayıp tipik olarak başlangıçta yüklü olan iyon yapısının bir kısmında meydana gelir. Endüktif yarılama, yalnız bir çift taşıyan bir heteroatomdan meydana gelen yavru iyonundaki yük bölgesine bitişik olduğunda oluşabilir. Bu heteroatom, karbon içindeki boş orbitalin π orbitalleriyle üst üste gelebilir, böylece yavru iyonunun yapısını stabilize eder [88, 90].

IVA molekülünün kütle parçalanması sonucu elde edilen son yavru iyon ise m/z 172,05 iyonudur. İyon en küçük m/z oranına, en büyük çarpışma enerjisine ve ikinci büyük kantitatif pike sahiptir. İyonun çarpışma enerjisi ile m/z 337,10 yavru iyonun çarpışma enerjisi birbirine çok yakındır. Ancak kantitatif miktarları arasındaki oran ise neredeyse 4 kattır. Bunun sebebinin ise parçalanma reaksiyonları ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir. m/z 172,05 iyonunun oluşum mekanizması yük göçü ile parçalanma prensibine dayanır. Ana iyon yapısında bulunan amit grubundaki O atomu ile N atomu

arasındaki asidik ortamın desteği ile gerçekleşen yük göçü ile parçalanma meydana gelir. Parçalanma sonucu α karbonundan yapısından N atomu, bağın protonlarını alarak kararlı halde ayrılır. Geride kalan C-O bağı kararlı kılmak için polar O atomu üzerindeki n orbitalinde yer alan elektronlar bağa saldırarak π bağı oluştururlar. Ortamdaki formik asidin desteği ile C-N bağı kopmuş olan C atomu radikalik yapıda kalır. Bu gaz fazı parçalanma reaksiyonunun mekanizması, E_1 ve SN_1 mekanizmalarının iyonlaşma aşamasına benzer. Bununla birlikte, bu duruma ve sonrasında yavru iyonu kararlı halde tutacak çözücü etkisi mevcut değildir. Bu nedenle, bu sınıf tip reaksiyonların ortaya çıkması, yavru iyonunun kararlılığına büyük ölçüde bağlıdır. Genellikle CO, H₂O veya ROH gruplarının basit endüktif yarılmalara ortadan kaldırılması, rezonans stabilize edilmiş alilik ve benzilik iyonları ile sonuçlandığında tercih edilebilir [88].

5.6. LC-MS-IT-TOF Metot Geliştirme

Bu cihazdaki yöntem geliştirme çalışmaları, LC-MS/MS cihazında geliştirilen mobil ve sabit fazın taşınması ile gerçekleştirilmiştir. Aletlerde, LC-MS/MS yöntemiyle ayrıştırılmış ayrışma tepe noktalarını daha önceden tanımlayan ürünler tanımlanmıştır. LC-MS/IT-TOF hem kantitatif hem de kalitatif belirlemeye izin verir. Bununla birlikte, mevcut enstrüman çok pahalı ve karmaşık bir cihaz olduğundan ve yapılan teknoloji 0.0000 kütle ölçeğine sahip olduğundan, çoğunlukla nitel araştırmalarda kullanılmaktadır.

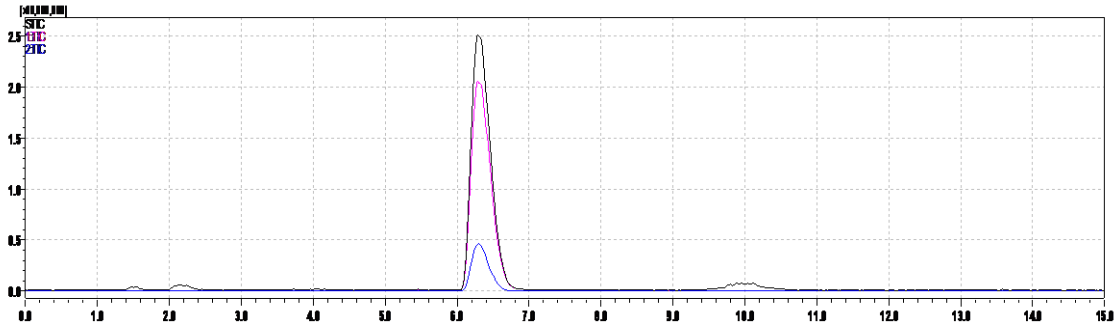
Bozundurma çalışmalarında iki adet bazik bozundurma üç tanede oksidasyon koşullarında olmak üzere toplam 5 adet bozunma ürünü tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin hepsi LC-MS/IT-TOF cihazının hassasiyeti sayesinde karakterize edilmiş, yapıları ve oluşum mekanizmaları aydınlatılmıştır. Bileşiklerden oksidasyon koşullarında tespit edilenlerden iki tanesi yapılan literatür taramasında çeşitli aktivite çalışmaları için sentezlendiği ve CAS numarasına sahip oldukları bulunmuştur. Diğer bir tanesi oksidasyon koşullarında ve alkali koşullarda elde edilen iki bileşiğin bu zamana kadar literatürde hiç var olmayan özgün bileşikler olduğu bulunmuştur. Karakterize edilen bileşikler ve elde edilen bozundurma koşulları Tablo 5.3'de verilmiştir.

Tablo 5.3. *Çeşitli stres koşullarında IVA'nın elde edilen toplam bozunma ürünleri*

Alkali Bozunma	Peroksit Bozunma
Yeni impürite 1	Yeni impürite 2
Yeni impürite 3	3-Kinolin Karboksamid, 1,4-dihidro-4-okso-
-	3-Kinolin Karboksamid, N-[4-(1,1-dimetiletil)-3-hidroksifenil]-1,4-dihidro-4-okso-

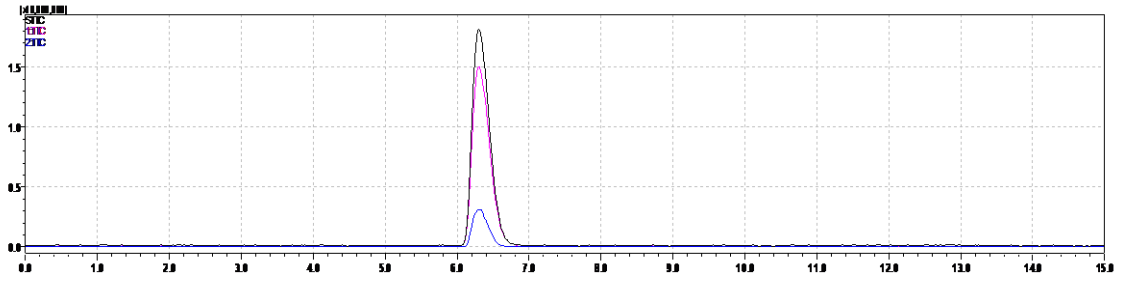
5.6.1. Bozunma Davranışları

IVA'nın bozundurma çalışmaları için çözeltiler oda sıcaklığında hazırlandı ve hızlandırılmış şekilde bozundurma ürünü elde etmek amacıyla 60 °C'de kontrollü ısı uygulaması yapılmıştır. Etken maddenin bozundurma çözeltilerinin ısı uygulaması yapılmadan 1 saat bekletilip analize verildiklerinde herhangi bir bozunma ürünü gözlenmemiştir. Sadece ısıtma ile analiz edilen bozulma davranışı için standart çözeltiliye doğrudan 60 °C sıcaklıkta ısıtılmıştır. Bu koşullar altında madde oldukça kararludur ve Şekil 5.8'de verilen kromatogramda görüldüğü gibi herhangi bir bozunma ürünü gözlemlenmemiştir.



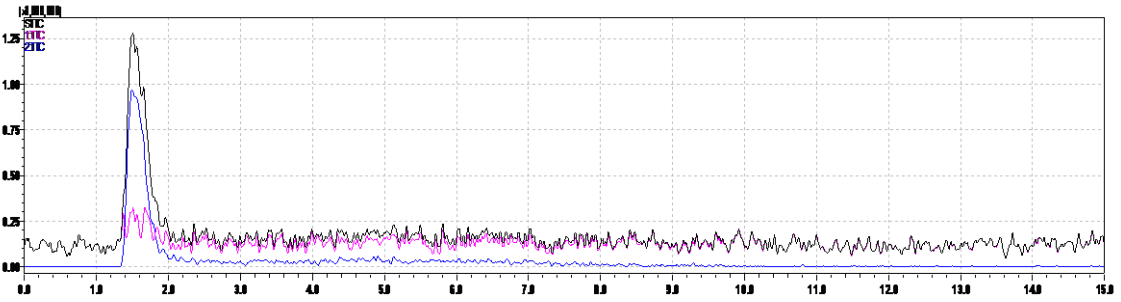
Şekil 5.8. *IVA Sıcaklık uygulandığında elde edilen kromatogramı*

Etken madde IVA ışığa olan dayanaklılığını testi amacıyla asetontrilde çözeltisi hazırlanmış ve 6 saat gün ışığına maruz bırakılmıştır. Daha sonra çözelti LC/MS-IT-TOF ile analizi yapıldığında oldukça kararlı olduğu görülmüş herhangi bir bozunma ürünü gözlenmemiştir. Elde edilen söz konusu kromatogram Şekil 5.9'da verildiği gibidir.

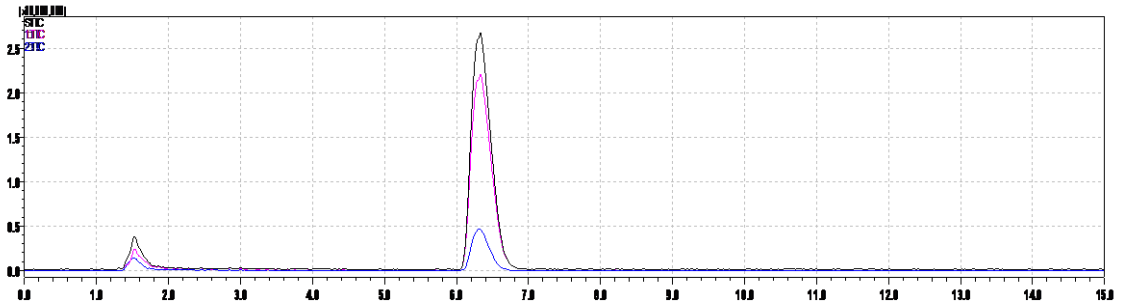


Şekil 5.9. Gün ışığında elde edilen IVA kromatogramı

Ayrıca madde asidik stres koşullarına oldukça dayanıklıdır. Oda sıcaklığında ve 60 °C’de 3 saat ısıtılmasına rağmen Şekil 5.10’da kör çözeltiden ve Şekil 5.11’de IVA içeren asidik bozundurma koşullarının kromatogramlarında görüldüğü gibi herhangi bir ayrışma reaksiyonu vermemiştir.

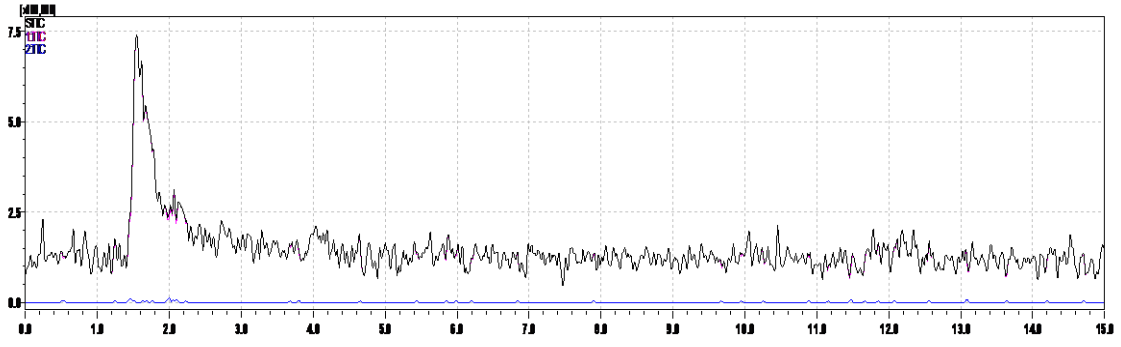


Şekil 5.10. Asidik koşullarda kör çözelti ile elde edilen kromatogram

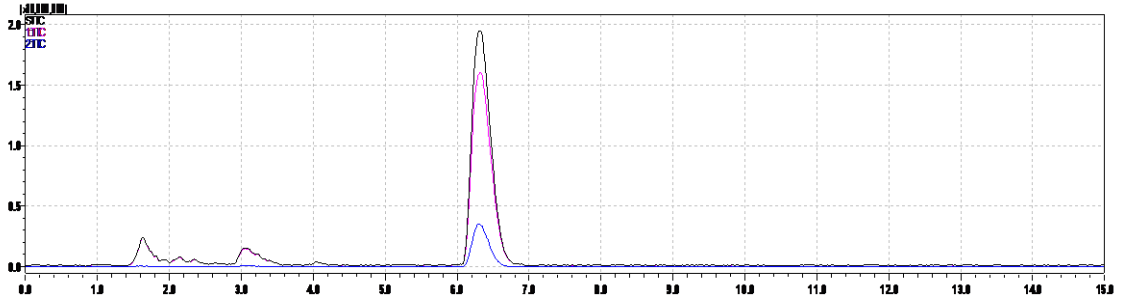


Şekil 5.11. Asidik koşullarda IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram

Etken maddenin oksidatif stres altında oda koşullarında bileşik oldukça kararlı olup herhangi bir oksitlenme reaksiyonu vermezken madde 60 °C’lik sıcaklığa ısıtıldığında madde reaksiyon vermiş ve üç adet bozunma ürünü tespit edilmiştir. Söz konusu koşullar için LC/MS-IT-TOF cihazı elde edilen kör çözeltinin kromatogramı Şekil 5.12’de, etken maddenin bozundurma kromatogramı Şekil 5.13’de verildiği gibidir.

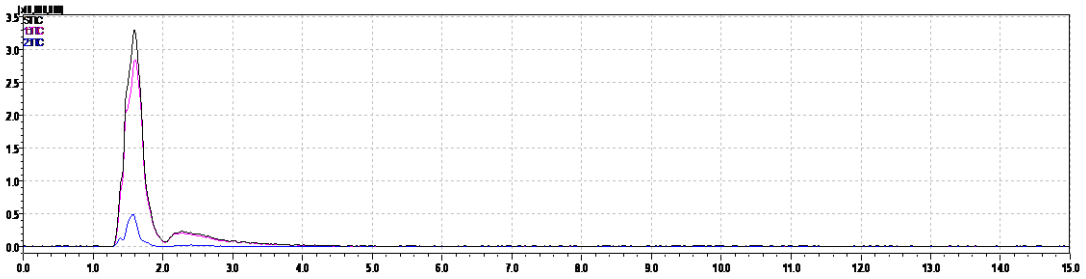


Şekil 5.12. Oksidasyon koşullarında kör çözelti ile elde edilen kromatogram

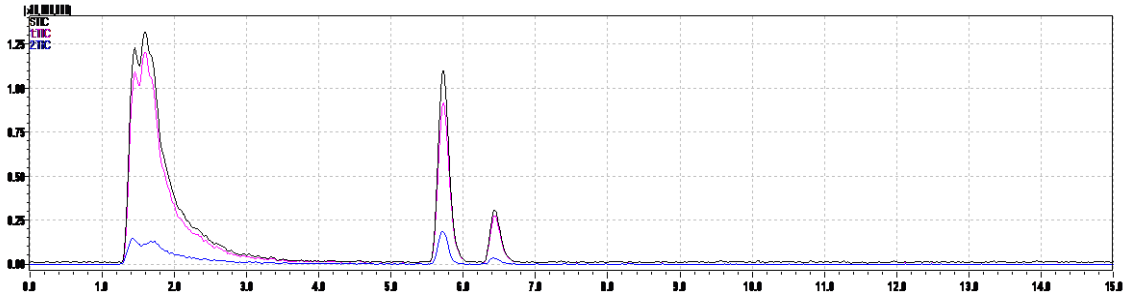


Şekil 5.13. Oksidasyon koşullarında IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram

IVA oda koşullarında 1 N NaOH çözeltisi içerisinde herhangi bir ayrışma reaksiyonu vermemiştir. Ancak 60 °C sıcaklık uygulandığında etken maddenin iki adet bozunma ürünü oluşturduğu görülmüştür. Çalışmanın kör çözeltisine ait kromatogram Şekil 5.14’de ve etken madde içeren bozunma koşullarına ait kromatogram ise Şekil 5.15’de verildiği gibidir.



Şekil 5.14. Alkali koşullarda kör çözelti ile elde edilen kromatogram



Şekil 5.15. Alkali koşullarda IVA çözeltisinden elde edilen kromatogram

Bozundurma çalışmalarında MS (ESI-IT-TOF) spektrumuna dayanarak, 351,13 g/mol moleküler ağırlığa sahip yeni bozunma ürünü yeni impürite 1 bazik ortamda m/z 351 ile ana iyon ürünü olarak CID parçalanması ile tanımlanmıştır. Elde edilen kütle atlası Şekil 5.16’da verilmiştir. Diğer yeni bozunma ürünlerinden birisi olan yeni impürite 2 m/z 367,12 g/mol molekül ağırlığına sahip olup oksidasyon bozundurma koşullarında CID parçalanması ile m/z 367 ana iyon olarak doğru bir şekilde tespit edilmiştir. Şekil 5.17 yeni impürite 2’ye ait olan kütle atlasına aittir. Oksidasyon koşullarında m/z 189 ana iyonuna sahip olan ikinci bileşiğin 189,06 g/mol molekül ağırlığına sahip olan 3-kinolinkarboksiamit,1,4-dihidro-4-okso olduğu tespit edilmiştir. Şekil 5.18 3-kinolinkarboksiamit,1,4-dihidro-4-okso bileşiğine ait olan kütle atlasını vermektedir. Ayrıca oksidasyon koşullarında 6,32 dak alıkonma zamanına sahip olan 3-kinolin karboksamid, n-[4-(1,1-dimetiletil)-3-hidroksifenil]-1,4-dihidro-4-okso- olduğu m/z 337 sahip ana iyon ile CID parçalanması ile tespit edilmiştir. Şekil 5.19’da n-[4-(1,1-dimetiletil)-3-hidroksifenil]-1,4-dihidro-4-okso- bileşiğine ait kütle atlası açık bir şekilde verilmiştir. Alkali koşullarda son tespit edilen bileşik 5,75 dak alıkonma zamanına sahip olan m/z 393 ana iyonuna sahip olan yeni impürite 3 bileşiğidir. Çaişmanın en ilginç noktasının bu bileşiğin keşfi olduğu düşünülmektedir. Çünkü yapı ana bileşik IVA ile aynı m/z değerine sahip olmasına rağmen alıkonma zamanı farklıdır. Bileşiğin 393,21 g/mol olan molekül ağırlığı CID parçalanması ile tespit edilmiştir. Tespit edilen yeni impürite 3 bileşiğine ait kütle atlası ise Şekil 5.20’de verilmiştir.

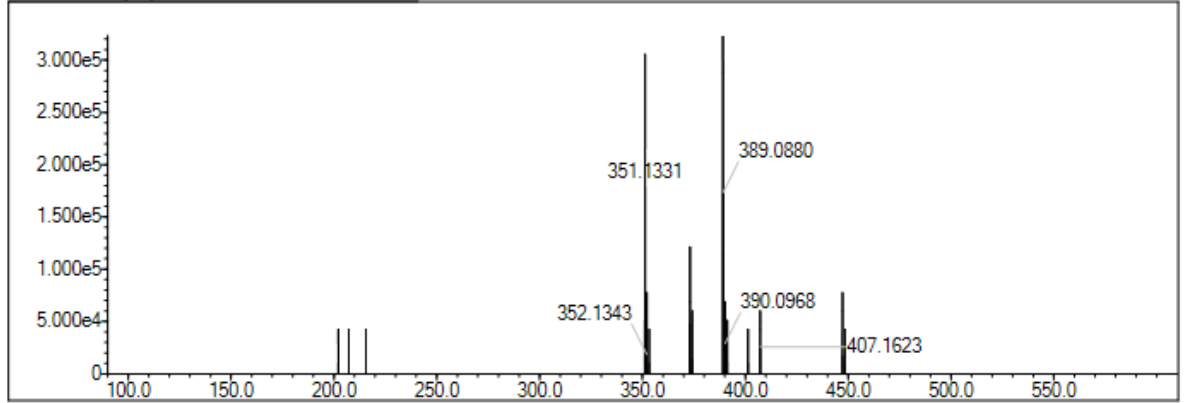
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	4	30	O	2	0	5	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	4	30	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

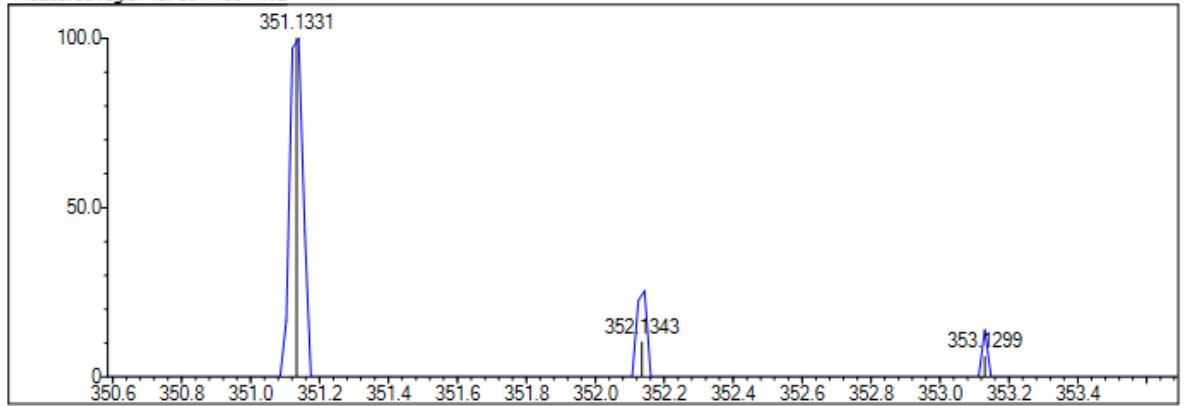
DBE Range: 9.0 - 13.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 500

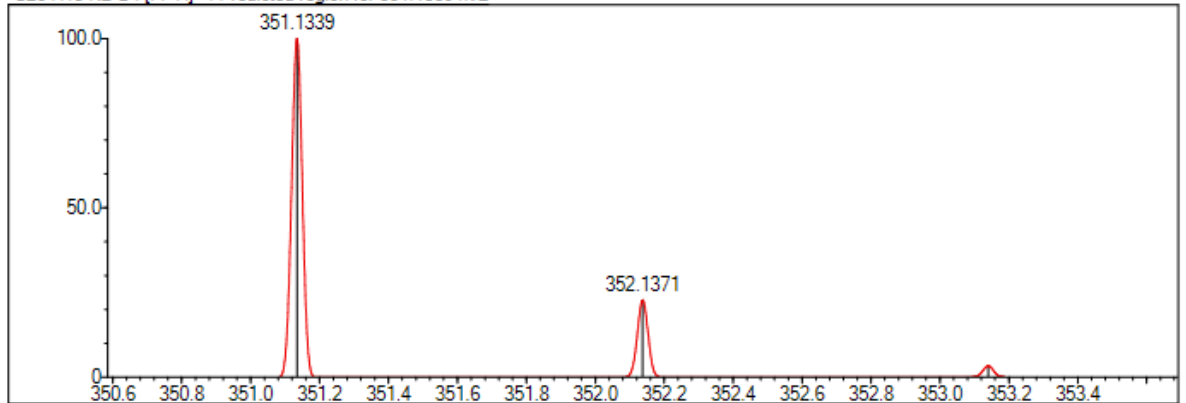
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 4.320 Scan# : 649



Measured region for 351.1331 m/z



C20 H18 N2 O4 [M+H]⁺ : Predicted region for 351.1339 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	61.68	C20 H18 N2 O4	[M+H] ⁺	351.1331	351.1339	-0.8	-2.28	63.71	13.0

Şekil 5.16. Yeni impürite 1 için kütle atlası

Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	4	30	O	2	0	5	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	4	30	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5

HC Ratio: unlimited

Max Isotopes: 3

MSn Iso RI (%): 10.00

DBE Range: 9.0 - 13.0

Apply N Rule: yes

Isotope RI (%): 1.00

MSn Logic Mode: AND

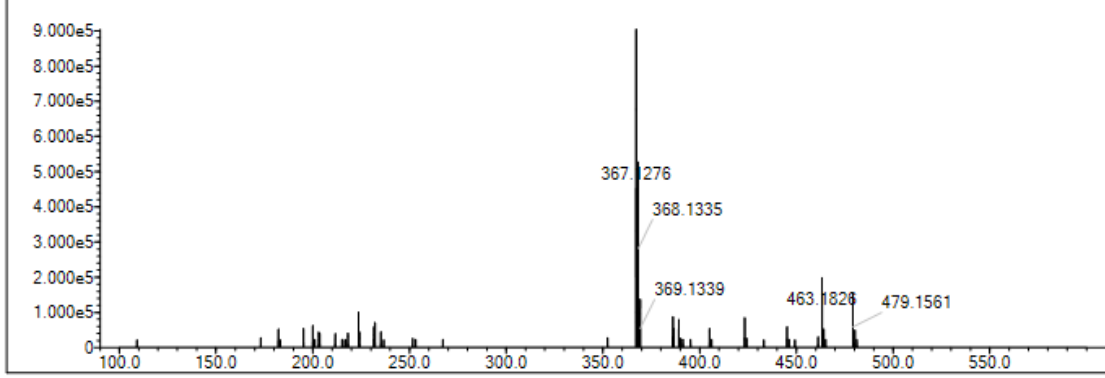
Electron Ions: both

Use MSn Info: yes

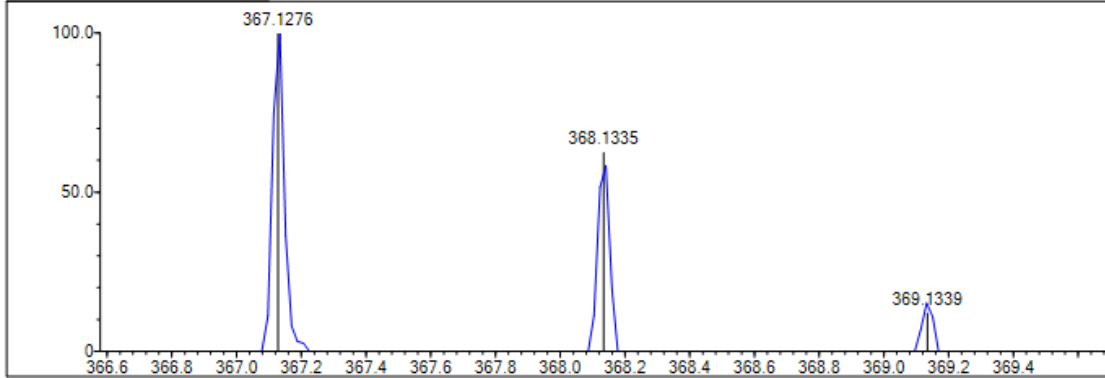
Isotope Res: 9000

Max Results: 500

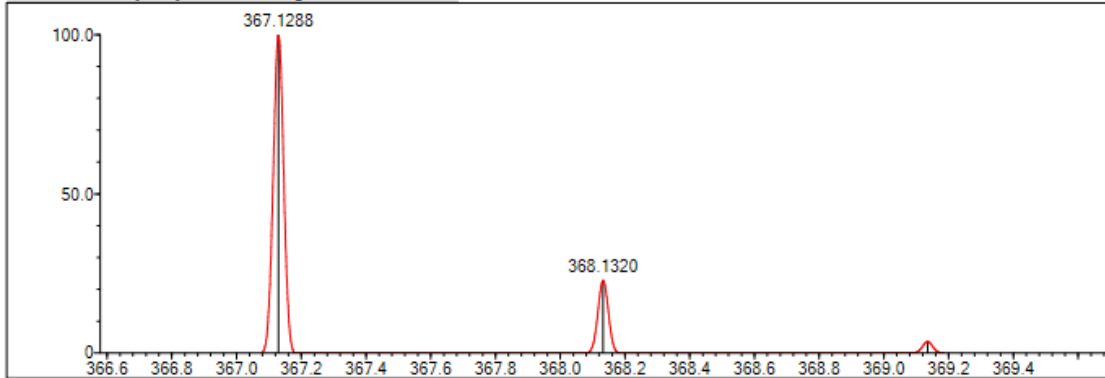
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 3.107 -> 3.120 Scan#: 467 -> 469



Measured region for 367.1276 m/z



C20 H18 N2 O5 [M+H]⁺ : Predicted region for 367.1288 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	47.16	C20 H18 N2 O5	[M+H] ⁺	367.1276	367.1288	-1.2	-3.27	50.00	13.0

Şekil 5.17. Yeni impürite 2 için kütle atlası

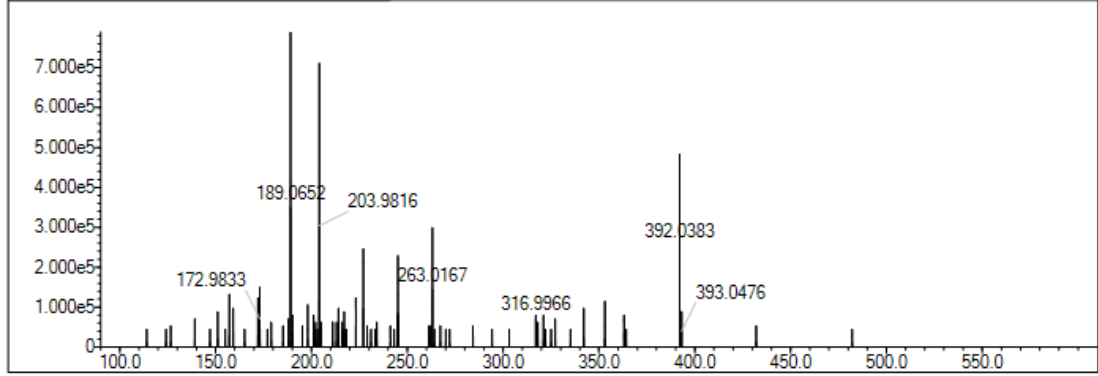
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	30	O	2	0	5	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	10	30	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	2	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

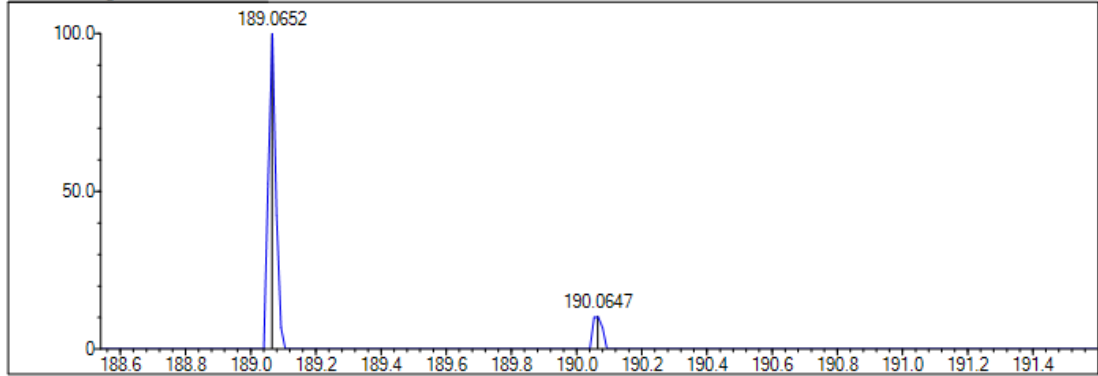
DBE Range: not fixed
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 500

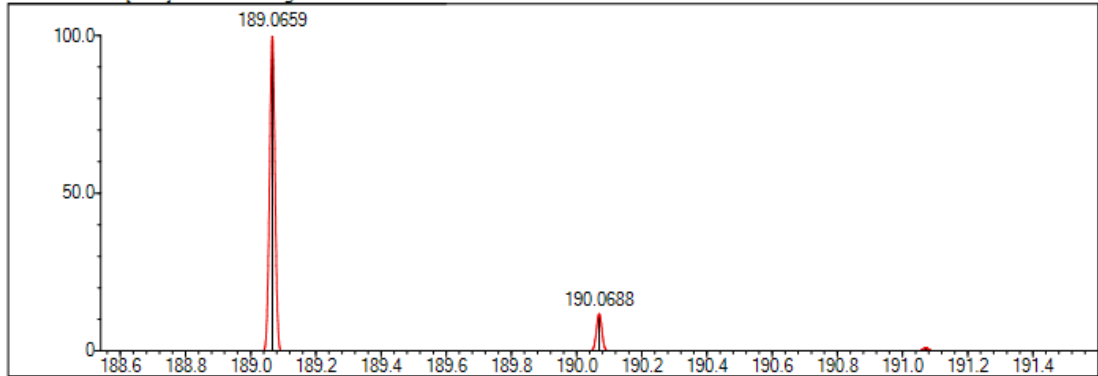
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 1.627 Scan#: 245



Measured region for 189.0652 m/z



C10 H8 N2 O2 [M+H]⁺ : Predicted region for 189.0659 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	69.53	C10 H8 N2 O2	[M+H] ⁺	189.0652	189.0659	-0.7	-3.70	74.56	8.0

Şekil 5.18. 3-Kinolin karboksamid, 1,4-dihidro-4-okso- için kütle atlası

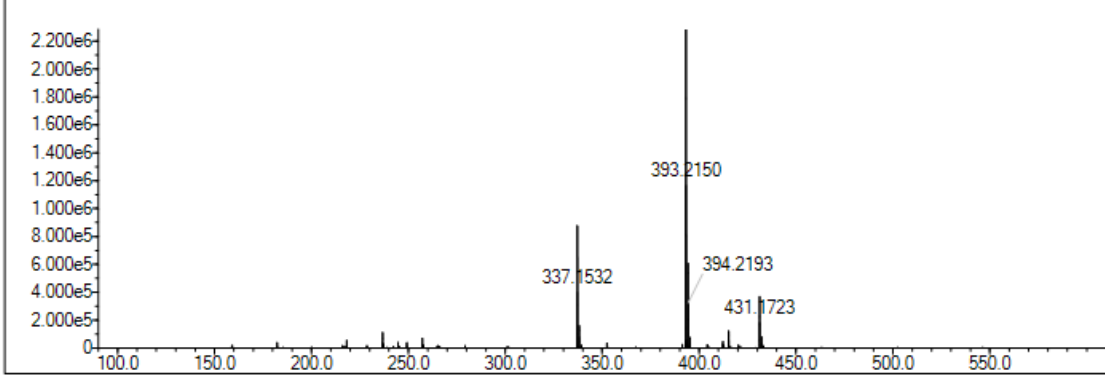
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	4	30	O	2	0	5	S	2	0	0	Ru	2	0	0	H
C	4	4	30	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	2	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 15
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

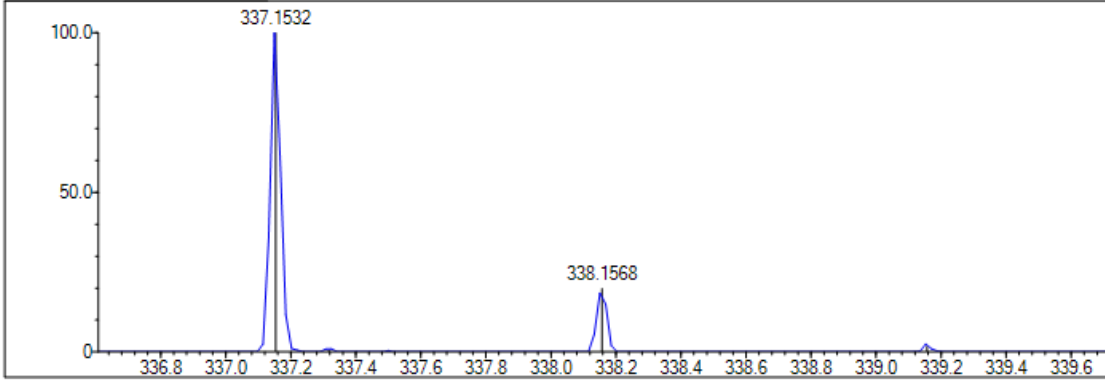
DBE Range: 9.0 - 40.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 500

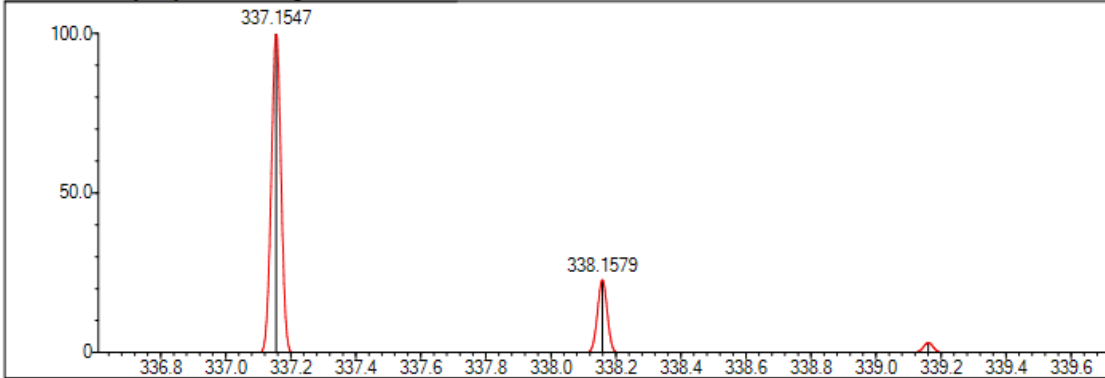
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.493->6.760 Scan#: 975->1015



Measured region for 337.1532 m/z

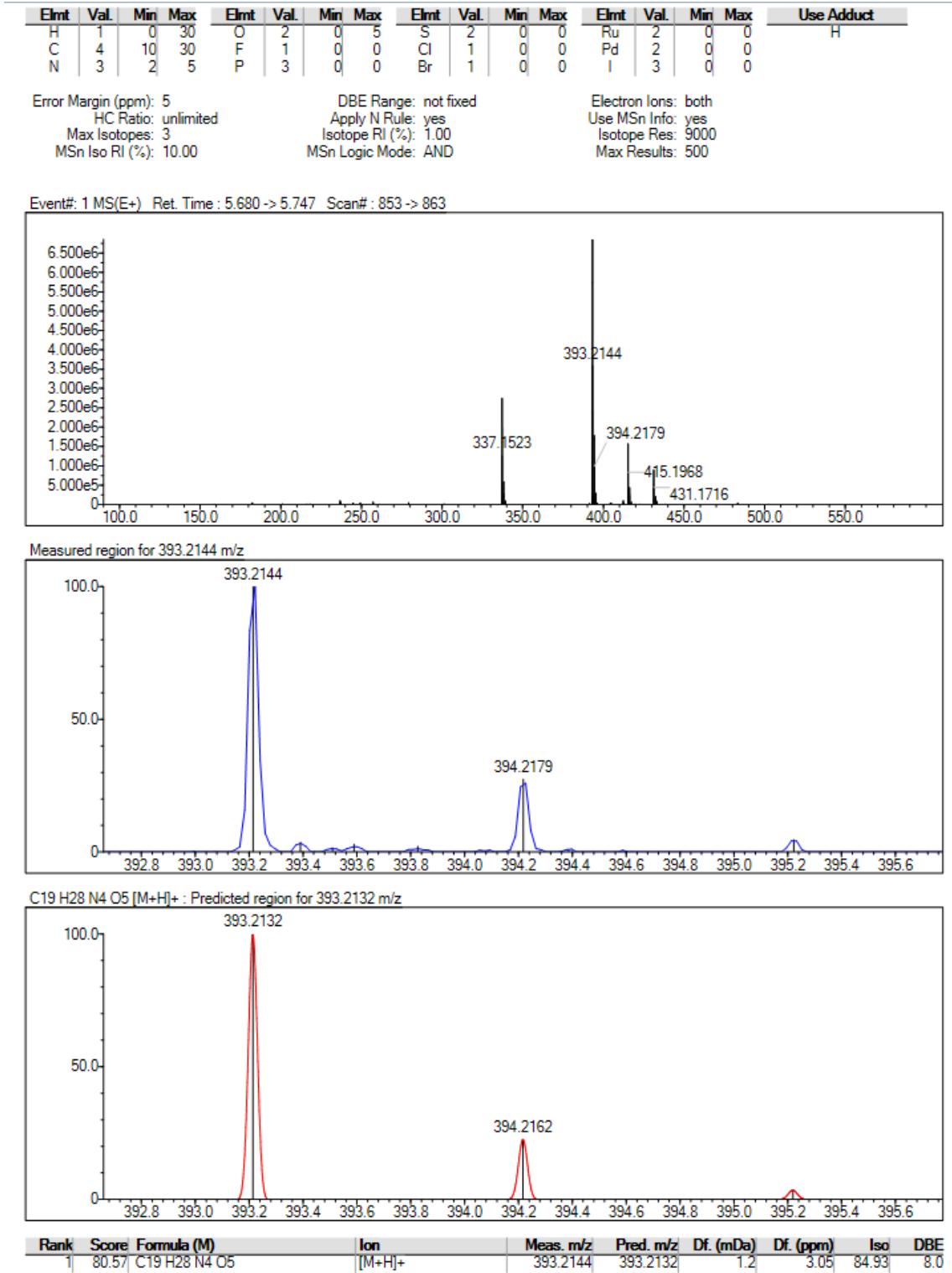


C20H20N2O3 [M+H]⁺ : Predicted region for 337.1547 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	53.77	C20H20N2O3	[M+H] ⁺	337.1532	337.1547	-1.5	-4.45	58.85	12.0

Şekil 5.19. 3-Kinolin Karboksamid, *N*-[4-(1,1-dimetiletil)-3-hidroksifenil]-1,4-dihidro-4-okso- için kütle atlası

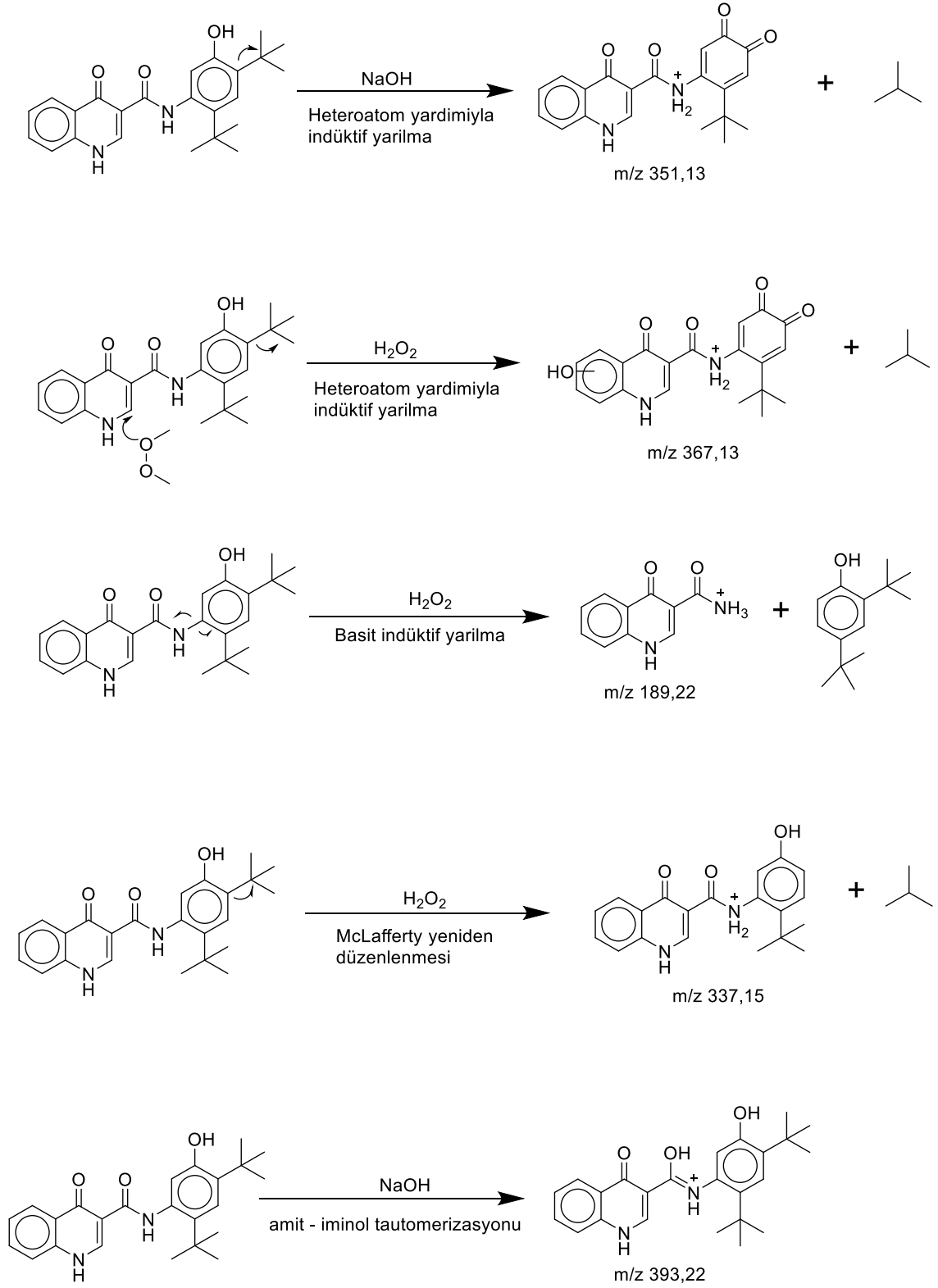


Şekil 5.20. Yeni impürite 5 için kütle atlası

Ayrıca tespit edilen bozunma ürünlerine ait tüm karakterizasyon bilgileri Tablo 5.4’de özetlenmiştir. Maddenin ısı koşullarında, asidik koşullarda herhangi bir bozunma ürünü elde edilememiştir. Bu durum yapının özellikle asidik koşullarda ve yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklı ve kararlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 5.4. Pozitif iyon modunda LC-ESI-IT-TOF-MS kullanılarak IVA bozunma ürünlerinin karakterizasyonu

Bileşik	t _R (min)	Ölçülen m/z [M-H] ⁺	Tahmin edilen m/z [M-H] ⁺	Fark (mDa)	Fark (ppm)	İzotop	Skor	λ _{max} (nm)	DBE (Çift bağ eşdeğeri)	Molekül formülü	CAS Numarası
Yeni impürite 1	4,30	351,1331	351,1339	0,8	-2,28	63,71	61,68		13,0	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	-
Yeni impürite 2	3,15	367,1276	367,1288	-1,2	-3,27	50,00	47,16		13,0	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	-
3-Kinolin Karboksamid, 1,4-dihidro-4-okso-	1,61	189,0652	189,0659	-0,7	-3.70	74,56	69,53		8,0	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂	103914-79-0
3-Kinolin Karboksamid, N-[4-(1,1-dimetiletıl)-3-hidroksifenıl]-1,4-dihidro-4-okso-	6,32	337,1532	337,1547	-1,5	-4,45	58,85	53,77		12,0	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	873054-39-8
Yeni impürite 3	5,75	393,2144	393,2132	+1,2	+3,05	84,93	80,57		8,0	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₅	-



Şekil 5.21. IVA'nın çeşitli ortamlarda meydana gelen bozunma reaksiyonlar

Yapılan bozundurma çalışmaları sonucu karakterize edilen bozunma ürünlerine ait tahmin edilen oluşum mekanizmaları Şekil 5.21'de verilmiştir.

Alkali bozundurma koşullarında elde yeni impürite 1 oluşumunun heteroatom yardımıyla meydana gelen indüktif yarılma olduğu tahmin edilmektedir. Bazik ortamda bulunan OH^- iyonunun halkaya bağlı bulunan bütıl gruplarına saldırmasıyla reaksiyon başlamıştır. Burda önemli nokta halkada orto ve para olmak üzere iki farklı konumda iki bütıl grubuna sahip olmasıdır. Ancak meydana gelen hidroksilasyon reaksiyonun β karbonunda meydana gelmiştir. β karbonu elektronegativitesi oldukça yüksek olan O atomuna komşu olması nedeniyle üzerindeki elektropozitiflik δ konumundaki C atomuna göre daha fazladır. Yük çekimi etkisi nedeniyle hidroksil iyonunun O atomu üzerindeki eşleşmemiş elektron çiftleri β karbonuna saldırarak halkadan bütıl grubunu kopartarak kendisi bağlanır. Ancak ortam bazik olması nedeniyle hidroksil iyonunda var olan asitliliği artmış H iyonu kendisinden kopartılarak halka ile üzerindeki serbest elektronlar π bağı yapmaya zorlanır. Böylece bazik ortamda kararlılığı sağlanmış olur. Ortamdan H_2O çıkışı meydana gelir.

Oksidasyon koşullarında elde edilen yeni impürite 2 bileşiğinin oluşum mekanizmasının aynı şekilde yeni impürite 1 bileşiğin bozunma reaksiyonuna benzer şekilde olduğu düşünülmektedir. Buna göre aynı şekilde halkanın β karbonuna saldırının gerçekleştiği ancak bu kez ortamın bazik olması nedeniyle eşleşmemiş elektronlara sahip O atomu kaynağı H_2O_2 molekülüdür. Halkaya saldıran H_2O_2 molekülündeki oksijenlerden biri σ ve π bağı oluşturarak halkanın elektron doygunluğunu sağlarken reaksiyon sonucu bir H_2O molekülü çıkışı olur. Bu yükseltgenme ortamında en dıştaki fenil halkada hidroksilasyon reaksiyonu gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Sterik engel nedeniyle molekülün diğer bölgelerinde herhangi bir OH grubu bağlanması beklenmemektedir.

Oksidasyon bozunma koşullarında gerçekleşen diğer bir reaksiyon ise 3-kinolin karboksamid, 1,4-dihidro-4-okso- bileşiğinin olduğu reaksiyondur. Burada gerçekleşen reaksiyon bileşiğin dayanıklı olmadığı bir ortama sokulması sonucu gerçekleşen homolitik kırılma. Kırılma iki aromatik bölgenin ortasında bir köprü gibi duran amit yapısındaki N atomunda meydana gelir. Kırılma sonucu yapıdan 2,4-di-*ter*-bütılfenol ayrılır.

Son oksidasyon bozunma koşullarında gerçekleşen mekanizma külte parçalanma reaksiyonlarında özellikle doğal moleküllerin külte haritaları oluşturulurken oldukça sık karşılaşılan McLafferty yeniden düzenlenmesidir. Bu düzenleme hidrojen metil yapısında varolan H atomunun komşu O atomunun eşleşmemiş elektronları tarafından çekilmesiyle

tetiklenir. Yapıdaki aromatiklikten dolayı bağlı bulunduğu hidroksil grubunda π bağı varyasyonu söz konusudur. Bu durumda bağlı benzen halkasına bağlı bulunan β karbonunda artan elektropozitiflik nedeniyle ortamda bulunan eşleşmemiş elektrona sahip H_2O_2 molekülünden gelecek saldırılara açık hale gelir. Saldırı sonucu yapıdan bütül sübsitüe olarak ayrılır. Bu ayrılma sonucu yapıdaki pozitif yüklü karbonil grubu tekrar eski hidroksil haline geri döner ve yapı kararlılığını korur.

Bazik ortamda gerçekleşen son reaksiyon ise yeni impürite 3 bileşiğini oluşturur. Bu bileşiğin oluşumu çalışmada karşılaşılan en ilginç olaydır. Bileşik IVA ile aynı m/z değerini vermiş ancak alıkonulma zamanı ise oldukça farklıdır. Elde edilen kütle atlası incelendiğinde safsızlığın bazik ortamda meydana gelen amit-iminol tautomerizasyonu sonucu olduğu tahmin edilmektedir. İminol yapısı, α pozisyonunda hidroksil grubu ve amino grubuna sahip vinil aminlerdir. Bu tip yapılar sekonder aminlerden oluşurlar. Amit yapısı ise primer aminlere katılmış aldehit veya keton yapılarından meydana gelirler. Tautomerizasyon α hidrojenin asitliliğinden kaynaklanır ve bu asitlik baz olmaksızın bile oldukça belirgindir. Bu birbirine dönüşen özel yapı izomerizasyonu çift bağı ve α hidrojenin yerinden kaynaklanır. İminol tautomerine göre amit tautomerlerinin stabilitesinin, üçüncül sistemlerde ve en azından birincil doymamış aminlerde daha büyük olduğu bilinmektedir, ancak birincil ve ikincil enaminlerin bile β -karbonunda uygun bir pozisyonda stabilize edilebileceği bilinmektedir [91]. Ayrıca polar çözücülerin iminlizasyonu desteklediği gösterilmiştir. Ama yapılan çalışmalarda tautomer çifti olan vinilamin/asetaldiminin tautomerler arasındaki enerji farkını 3,9 kcal/mol olarak imin lehine tahmin edilmiş; ortamın dielektrik sabitindeki değişiklikler için sadece küçük etkiler hesaplanmıştır [92]. Amit iminol karışımları, 3-alkoksikarbonilmetil-2-okso-1, 2,3,4-tetrahidrokinoksalinlerin ve 3-(arilhidrazono) metil-2-okso-1, 2-dihidrokinoksalinlerin, fakat iminol tautomerlerinin dimetil sülfoksit çözeltilerinde gözlenir. 3-alkoksikarbonilmetilen-2-okso-1, 2,3,4-tetrahidrokinoksalinlerin kloroform çözeltilerinde ağırlıklı olarak bulunur. Protonasyon, 3-alkoksikarbonilmetilen-2-okso-1, 2,3,4-tetrahidrokinoksalinler için amit totomeri stabilize eder, ancak 3-(arilhidrazono) metil-2-okso-1, 2-dihidrokinoksalinler için iminol tercih edilir [93]. İlgili bileşiklerde, iminol tautomeri, tüm çözücüler ve protonasyon yoluyla tercih edilir. Ancak söz konusu yapı bazik ortamla muamele edildiğinde iminol bileşiği yönüne doğru reaksiyonun kaydığı DBE ve kapalı formüle dayanılarak tahmin edilmektedir. Tautomerlik bileşiğin etkinliğini ve kimyasal özelliklerini etkileyebilir. Ayrıca oluşan yapı oldukça kararlı olup

ancak kuvvetli yükseltgenme ortamlarında C=N bağından reaksiyona girebilir. Ancak bu tarz reaksiyonlarda verimin oldukça düşük olduğu görülmüştür [94, 95].

5.7. Yöntem Geçerliliğinin Tayini

Doğrusallık çalışmalarında en yüksek alanların hesaplanması ile analit derişimine karşı elde edilen dedektör sinyalleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiğı, çözeltilerin kütle veya PDA detektöründeki karşılık gelen pik alanlarına karşı çeşitli konsantrasyonlarda çizilmesiyle elde edilmiştir. Doğrusallık, kesinlik gibi yöntem uygulanabilirlik parametrelerinin her iki detektör tipi için uygun aralıkta olduğu Tablo 5.5’de verilmiştir. Ek olarak, YBSK yöntemi UPLC cihazında laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla başka bir laboratuvarda tekrarlanmış ve gerekli tüm doğrulama parametreleri çalışılmıştır. Muhtemel bozucu etkilerin ortadan kaldırılması için yöntemin özgüllüğü ve seçiciliğı kanıtlanmıştır. Bu amaçla bozunma ürünlerin varlığında, her geliştirilen yöntem için yöntemin iyileştirilmesi ve pikin saflık derecesi belirlenerek mevcut piklerin sadece hedef bileşikten kaynaklandığı tekrar kanıtlanmıştır. Analit için en yüksek saflık, HPLC’de 0,999997 ve UPLC için 0,999998 olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 5.5. IVA için doğrusalılık ve kesinlik verileri

Parametre	LC-DAD	LC-MS/MS
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,55-20,22	0,11-20,22
Eğim ± SS (gün içi, n=6)	13541,7 ± 47,8808	1050831 ± 21020,79
Kesim ± SS (gün içi, n=6)	-214,744 ± 501,381	616418,5 ± 208823,21
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=6)	0,9999	0,9968
Teşhis sınırı	75,8 ng/mL	0,1 pg/ mL
Tayin sınırı	200 ng/ mL	1 pg/mL
Eğim ± SS (günler arası, k= 3, n=18)	13666,57 ± 40,1874	1045318 ± 20774,33
Kesim ± SS (günler arası, k= 3, n=18)	286,928 ± 399,227	559535,5 ± 206374,8
Tanımlayıcılık katsayısı (günler arası, k= 3, n=18)	0,9999	0,9968
ANOVA	F (1,8) = 1,044 P>0,05	F (1,8) = 1,576 P>0,05
Tekrarlanabilirlik ± SS (günler arası, ortalama, n = 6)	137912,1 ± 3095,079	11462880 ± 326933,5
Tekrarlanabilirlik (günler arası, BSS^c %, n = 6)	2,24424	2,852106
Tekrarlanabilirlik (günler arası, SEM^d, n = 6)	893,4725	94377,58
Tekrarlanabilirlik (günler arası, CI^e, n = 8)	1966,52	207723,6
Tekrarlanabilirlik ± SS (gün içi, ortalama, n = 6)	135270 ± 778,594	11334389 ± 387818,5
Tekrarlanabilirlik (gün içi, BSS^c %, n = 6)	0,57558	3,421609
Tekrarlanabilirlik (gün içi, SEM^d, n = 6)	317,8596	158326,2
Tekrarlanabilirlik (gün içi, CI^e, n = 8)	577,7657	406990,6
ANOVA	F (105,106) = 0,1287 P>0,05	F (1,106) = 1,200 P>0,05

Önerilen yöntemlerin, tablet analizleri için çalışma aralığında doğruluğu iki farklı yöntemle test edilmiştir. Geri kazanım deneyleri için standart ekleme metodu kullanılmış ve aralığı kapsayan 3 farklı konsantrasyonda 9 bağımsız tayin yapılmıştır. Bu amaçla KALYDECO® patent almış formülasyonu elde hazırlanmış ve bu tabletlere belirli miktarda IVA çözeltisi eklenerek geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bütünlüğe yakın olması nedeniyle oldukça başarılı bulunmuştur. Doğruluk çalışmalarından elde edilen veriler Tablo 5.6’da gösterilmektedir. Bileşiklerin gözlemlenen geri kazanımları, seyreltme, süzme gibi işlemelerin yönteminin tahlilin doğruluğunu azaltmadığını ortaya koymuştur.

Tablo 5.6. Geri kazanım verileri

	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	Kesinlik		Doğruluk	
			SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
YBSK	8,088	7,889 ± 0,094	0,075	0,956	97,55	-2,45
	10,11	9,892 ± 0,066	0,052	0,536	97,84	-2,16
	12,132	12,058 ± 0,067	0,054	0,448	99,39	-0,61
LC- MS/MS	8,088	8,20 ± 0,099	0,079	0,969	101,4	1,43
	10,11	10,46 ± 0,107	0,086	0,821	103,4	3,43
	12,132	13,45 ± 0,334	0,268	1,997	110,83	10,83

*%95 Güven seviyesinde

Söz konusu yöntemin teyidi amacıyla başka bir YBSK cihazında ara kesinlik çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla aynı kalibrasyon çözeltileri başka bir cihazda aynı metot koşulları, aynı tip dedektör ve aynı sabit faz ile yeniden analiz edilmiştir ve aralarında anlamlı bir fark olup olmadığı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.7’deki gibidir.

Tablo 5.7. Ara kesinlik verileri

Parametre	
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,1011-15,165
Eğim ± SS (gün içi, n=6)	12618,1 ± 305,08
Kesim ± SS (gün içi, n=6)	-632,40 ± 2352,8
Tanımlayıcılık katsayısı (intraday, n=6)	0,9965
Enjeksiyon kesinliği (SS)	0,013

Yöntemin sağlamlığı, organik mobil faz bileşimi, pH ve tampon konsantrasyonu, akış hızı, kolon fırın sıcaklığı ve dedektör dalga boyunda küçük değişiklikler (%10’u kadar değiştirme) yapılarak her iki dedektör için 10,11 µg/mL IVA çözeltilisinin enjeksiyonları ile hesaplanmıştır. Alıkonulma süresindeki fark, teorik plakaların sayısı ve kuyruklanma faktörü parametreleri bu koşullarda üç tekrardan sonra değerlendirilmiştir. Tablo 5.8’deki sonuçlar prosedürün sağlamlığını göstermektedir.

Tablo 5.7. Metot sağlamlık çalışmaları (n = 3)

Değiştirilen Parametre			Alıkonulma zamanı (dk)	Fark (ortalama GA*)	(%) ±	HETP	Geri kazanım (%)	Kuyruklanm a faktörü	Geri kazanım (%)
YBSK	Akış hızı (mL/dk)	0,275	8,289			10,818			
		0,225	7,605	-0,68±0,002		10,830	0,01 ± 0,168	1,196	0,26 ± 0,012
	Kolon sıcaklığı (°C)	33,0	9,164	0,88 ± 0,009		10,566	-0,252 ± 0,409	1,426	0,256 ± 0,585
		27,0	8,141	-0,148 ± 0,006		11,135	0,317 ± 0,074	1,166	-0,004 ± 0,020
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	69,3	8,371	0,82 ± 0,006		10,547	-0,271 ± 0,263	1,172	0,002 ± 0,001
		56,7	6,05	-2,235 ± 0,006		14,324	3,507 ± 0,174	1,276	0,106 ± 0,004
	Dalga boyu (nm)	249	12,59	4,31 ± 0,074		8,066	-2,752 ± 0,302	1,119	-0,051 ± 0,155
		245	8,285	-0,004 ± 0,015		10,556	-0,262 ± 0,098	1,184	0,014 ± 0,008
	Akış hızı (mL/min)	0,225	8,284	-0,005 ± 0,016		10,547	-0,271 ± 0,116	1,185	0,02 ± 0,018
		0,275	9,323	0,896 ± 0,007		14,320	-0,296 ± 0,75	1,556	-0,08 ± 0,094
LC-MS/MS	Kolon sıcaklığı (°C)	33	7,724	-0,703 ± 0,004		14,191	-0,425 ± 0,160	1,666	0,034 ± 0,083
		27	8,273	-0,154 ± 0,007		15,580	0,964 ± 0,610	1,698	0,066 ± 0,057
	Hareketli faz organik çözücü oranı (%)	69,3	8,505	0,078 ± 0,005		14,726	0,111 ± 0,775	1,667	0,0343 ± 0,044
		56,7	6,185	-2,242 ± 001		20,795	5,880 ± 0,645	1,852	0,226 ± 0,017
		56,7	12,738	4,311 ± 0,063		10,426	-3,733 ± 0,999	1,428	-,201 ± 0,092

IVA çözeltilerinin stabilitesi, farklı koşullar altında depolandıktan sonra 10 µg/mL derişime sahip çözeltilerin analizi ile araştırılmıştır. Bir set kısa süreli stabiliteyi değerlendirmek için 24 diğeri 48 saat boyunca oda sıcaklığında, diğeri uzun süreli stabiliteyi değerlendirmek için -20 ° C'de 3 hafta boyunca ve üçüncü ila üç donma-çözölme döngüsü yapılarak depolanmıştır. Tüm çözümler üç tekrar halinde analiz edilip elde edilen sonuçlar %95 güven seviyesinde geri kazanımları ve %BSS sonuçları değerlendirilmiştir. Tablo 5.8 bu koşullar altında IVA çözeltilerinin stabil olduğunu göstermektedir.

Çalışmada yapılan ikinci doğruluk çalışmasında ise elde hazırlanmış ve analizi yapılmış IVA içeren tablet çözeltileri gerekli oranlarda seyreltme yapıp standart çözeltilisinden tekrar ilave yapılarak çözeltiler tekrar analiz edilmiştir. Elde edilen geri kazanım çalışmaları Tablo 5.9'da verilmiştir.

Tablo 5.8. 10,11 µg/mL IVA için 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 kararlılığı (3 tekrar)		çözme
		Bulunan (Ortalama GA*)	BSS (%)	Bulunan (Ortalama GA*)	BSS (%)	Bulunan (Ortalama ± GA*)	BSS (%)	Bulunan (Ortalama ± GA*)	BSS (%)	
DAD (µg/mL)	10,11	10,08 ± 0,09	0,68	10,29 ± 0,11	0,86	9,86 ± 0,07	0,55	9,93 ± 0,10	0,85	
MS (µg/mL)	10,11	10,39 ± 0,19	0,45	10,09 ± 0,36	0,88	9,77 ± 0,33	0,69	9,68 ± 0,26	0,14	

*%95 Güven seviyesinde

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

	Eklenen (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)±GA*	Kesinlik		Doğruluk	
			SS	BSS (%)	Geri kazanım (%)	Hata (%)
	8,088	7,76 ± 0,044	0,358	0,462	95,94	-4,06
YBSK	10,11	9,64 ± 0,041	0,033	0,345	95,38	-4,62
	12,132	11,48 ± 0,054	0,044	0,380	94,67	-5,33
LC-	8,088	8,47 ± 0,082	0,066	0,781	104,73	4,73
MS/MS	10,11	11,22 ± 0,136	0,109	0,980	111,01	11,01
	12,132	12,57 ± 0,371	0,300	2,381	103,68	-3,68

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kantitatif ve kalitatif proses yaklaşımlarını içeren etkileyici bir LC-MS/MS bazlı metot çeşidi, artık ilaç gelişimini hızlandırmak için rutin olarak uygulanmaktadır. Sonuçlar önemlidir, yenilikçi tedavilerin ve sayısız yeni ilacın başarılı bir şekilde geliştirilmesine yol açar. LC/MS'nin numune hazırlama, analiz ve veri yönetimi için diğer teknolojilerle birlikte kullanılması, şu anda ayrılmaz bir şekilde bağlantılı ilaç geliştirme unsurudur.

Bu çalışmada yapılan LC uygulamaları, bu eşsiz teknolojinin temel olarak ilaç endüstrisinde analiz için nasıl değerli bir araç olarak kurulduğunu göstermektedir. İlaç endüstrisindeki genişletilmiş bir uygulama kapsamının gösterimi, analitik bir yöntemin beşinci aşaması, LC/MS'nin, ilaç geliştirmenin tüm aşamalarında farmasötik analiz için yaygın olarak kabul edilen ve rutin bir araç (altıncı aşama) oluşturduğunu göstermektedir. Araştırma ve geliştirme ihtiyaçları arasındaki dengenin yanı sıra akademi, enstrüman üreticileri ve endüstri araştırmacıları arasındaki ortaklığın, farmasötik endüstrisinde LC/MS teknolojilerinin sürekli kabul edilmesine ve ilerletilmesine izin vereceği muhtemel görünmektedir.

Bununla birlikte, ilaç endüstrisi analist odaklı değildir. Ancak, analiste bağımlıdır ve yeni teknolojiler gelişmeye devam ederken, LC/MS gibi bilgi bakımından zengin araçlara olan ihtiyaç artacaktır. En üst sıradaki işlerde sürekli bir değişim olması sonucun çok büyük bir odaklanma ile birleşmektedir. Ayrıca baskılar, veri üretme, laboratuvarı yönetme ve bilgileri kullanma sorumluluklarının artmasıyla birlikte, karar vericilerin teknoloji ve uygulamaları çok daha hızlı uygulamalarını anlamaları gerekecektir. Tabii ki, bu anlayışı işletme hedefleriyle ilişkilendirmek de eşit derecede önemli bir zorluktur.

Her ne kadar literatürlerde bahsedilen gelişmeler uygulamada çok görülmesede artık yol o kadar karanlık değildir. Etken madde sentezi dağları gün geçtikçe büyüdükçe üst düzey analitik yöntemlerin gerekliliği daha da ortaya çıkacaktır. Şu bir gerçektir ki ne kadar çok madde sentezlerse sentezlesinler o ilaç dağlarının otoritelere uygun yeterli analizleri ve karakterizasyonları yapılamadığı sürece bir adım dahi ileri gidemeyeceklerdir.

Analitik bir yöntemin yedi aşaması gibi, ilaç gelişimini etkileyen önemli sosyal olaylar olmuştur. Biz analitik kimyacıların babası sayılan Hollandalı Analitik kimyacı ve eğitimci Izaak Maurits Kolthoff (1894-1993) tarafından 1973 yılında yapılan anlayışlı ve güçlü ifadeyi biz analitik kimyacılara hatırlatmakta fayda vardır: “Biz analitik

kimyagerler artık diğ er kimyagerlerin hizmetçisi değıliz, sadece birlikte tüm kimya alanında daha fazla ilerlemeye katkıda bulunuyoruz” Umarım, uygulama anlayışının temelleri, strateji ve analizler karmaşıklışıp ilaç geliştirme ile daha bütünleşmiş hale geldikçe, yeni teknoloji, süreç ve işbirliğini anlama derinliğı gelişmeye devam edecektir.

Hızlandırılmış ilaç gelişimi için son zamanlarda LC/MS uygulamaları, ilaç endüstrisinde heyecan verici bir geleceğı göstermektedir. Birçok ihtiyaç, kaygı ve zaferle dolu olacaktır. Belki de önümüzdeki on yıl devrimler dolu geçecektir...

KAYNAKÇA

- [1] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-s., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245 (4922), 1066-1073.
- [2] Tizzano, E.F., Buchwald, M. (1995). CFTR expression and organ damage in cystic fibrosis. *Annals of internal medicine*, 123 (4), 305-308.
- [3] O'Sullivan, B.P., Flume, P. (2009): The clinical approach to lung disease in patients with cystic fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. © Thieme Medical Publishers, pp. 505-513.
- [4] Ferkol, T., Quinton, P. (2015): Precision medicine: at what price? American Thoracic Society.
- [5] Pittman, J.E., Ferkol, T.W. (2015). The evolution of cystic fibrosis care. *Chest*, 148 (2), 533-542.
- [6] Knapp, E.A., Fink, A.K., Goss, C.H., Sewall, A., Ostrenga, J., Dowd, C., Elbert, A., Petren, K.M., Marshall, B.C. (2016). The Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Design and methods of a national observational disease registry. *Annals of the American Thoracic Society*, 13 (7), 1173-1179.
- [7] Ramsey, B.W., Davies, J., McElvaney, N.G., Tullis, E., Bell, S.C., Dřevínek, P., Griesse, M., McKone, E.F., Wainwright, C.E., Konstan, M.W. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *New England Journal of Medicine*, 365 (18), 1663-1672.
- [8] Mohammad, S. (2016). From G551D to F508del: An Inquiry Into The Development Of Targeted Therapeutics For The Treatment Of Cystic Fibrosis.
- [9] Feng, L.B., Grosse, S.D., Green, R.F., Fink, A.K., Sawicki, G.S. (2018). Precision Medicine In Action: The Impact Of Ivacaftor On Cystic Fibrosis–Related Hospitalizations. *Health Affairs*, 37 (5), 773-779.
- [10] Condren, M.E., Bradshaw, M.D. (2013). Ivacaftor: a novel gene-based therapeutic approach for cystic fibrosis. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 18 (1), 8-13.
- [11] Cohen, D., Raftery, J. (2014). Paying twice: questions over high cost of cystic fibrosis drug developed with charitable funding. *Bmj*, 348, g1445.
- [12] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. (2012). *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons.
- [13] Knox, J.H., Scott, H.P. (1983). B and C terms in the van Deemter equation for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 282, 297-313.
- [14] Striegel, A. (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. *Fanali, S*, 193-223.
- [15] Goodman, L.S. (1996). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill New York.
- [16] Fanali, S., Haddad, P.R., Poole, C., Riekkola, M.-L. (2017). *Liquid Chromatography: Applications*. Elsevier.
- [17] Salvatore, F., Haddad, P., Poole, C., Schoenmakers, P., Lloyd, D. (2013): Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation. Elsevier Inc.
- [18] Majors, R.E. (2015). Twenty-five years of HPLC column development—a commercial perspective.

- [19] Majors, R.E. (2003). The cleaning and regeneration of reversed-phase HPLC columns. *LC GC NORTH AMERICA*, 21 (1), 19-27.
- [20] Gritti, F., Guiochon, G. (2012). The current revolution in column technology: how it began, where is it going? *Journal of Chromatography A*, 1228, 2-19.
- [21] Majors, R.E. (2015). Historical developments in HPLC and UHPLC column technology: the past 25 years.
- [22] Nozawa, K., Gailhanou, H., Raison, L., Panizza, P., Ushiki, H., Sellier, E., Delville, J., Delville, M. (2005). Smart control of monodisperse Stöber silica particles: effect of reactant addition rate on growth process. *Langmuir*, 21 (4), 1516-1523.
- [23] Unger, K.K., Liapis, A.I. (2012). Adsorbents and columns in analytical high-performance liquid chromatography: A perspective with regard to development and understanding. *Journal of separation science*, 35 (10-11), 1201-1212.
- [24] Cruz, E., Euerby, M., Johnson, C., Hackett, C. (1997). Chromatographic classification of commercially available reverse-phase HPLC columns. *Chromatographia*, 44 (3-4), 151-161.
- [25] Dorschel, C.A., Ekmanis, J.L., Oberholtzer, J.E., Warren Jr, F.V., Bidlingmeyer, B.A. (1989). LC detectors: evaluation and practical implications of linearity. *Analytical Chemistry*, 61 (17), 951A-968A.
- [26] Kissinger, P.T., Refshauge, C., Dreiling, R., Adams, R.-N. (1973). An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Analytical Letters*, 6 (5), 465-477.
- [27] Casado, J., Santillo, D., Johnston, P. (2018). Multi-residue analysis of pesticides in surface water by liquid chromatography quadrupole-Orbitrap high resolution tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 1024, 1-17.
- [28] Wiggins, D. (1991). System suitability in an optimized HPLC system. *Journal of liquid chromatography*, 14 (16-17), 3045-3060.
- [29] Ermer, J., Miller, J.H.M. (2006). *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. John Wiley & Sons.
- [30] Chen, X.-F., Wu, H.-T., Tan, G.-G., Zhu, Z.-Y., Chai, Y.-F. (2011). Liquid chromatography coupled with time-of-flight and ion trap mass spectrometry for qualitative analysis of herbal medicines. *Journal of pharmaceutical analysis*, 1 (4), 235-245.
- [31] Yang, P., Xu, F., Li, H.-F., Wang, Y., Li, F.-C., Shang, M.-Y., Liu, G.-X., Wang, X., Cai, S.-Q. (2016). Detection of 191 taxifolin metabolites and their distribution in rats using HPLC-ESI-IT-TOF-MSn. *Molecules*, 21 (9), 1209.
- [32] Lacorte, S., Fernandez-Alba, A.R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass spectrometry reviews*, 25 (6), 866-880.
- [33] Collings, B., Campbell, J., Mao, D., Douglas, D. (2001). A combined linear ion trap time-of-flight system with improved performance and MSn capabilities. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 (19), 1777-1795.
- [34] Pan, Z., Raftery, D. (2007). Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387 (2), 525-527.
- [35] Yener, İ., Ertaş, A., Yılmaz, M.A., Tokul Ölmez, Ö., Köseoğlu Yılmaz, P., Yeşil, Y., Kaplaner, E., Öztürk, M., Temel, H., Kolak, U. (2019). Characterization of the Chemical Profile of Euphorbia Species from Turkey by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), and Liquid Chromatography–Ion Trap–Time-of-

- Flight–Mass Spectrometry (LC-IT-TOF-MS) and Chemometric Analysis. *Analytical Letters*, 52 (7), 1031-1049.
- [36] Grace, M.H., Warlick, C.W., Neff, S.A., Lila, M.A. (2014). Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. *Food chemistry*, 158, 229-238.
- [37] Chen, X., Kong, L., Su, X., Pan, C., Ye, M., Zou, H. (2005). Integration of ion-exchange chromatography fractionation with reversed-phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometer and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for isolation and identification of compounds in *Psoralea corylifolia*. *Journal of chromatography A*, 1089 (1-2), 87-100.
- [38] Guideline, I.H.T. (2006). Impurities in new drug products. *Q3B (R2), current step*, 4, 1-5.
- [39] Humfrey, C.D. (2007). Recent developments in the risk assessment of potentially genotoxic impurities in pharmaceutical drug substances. *Toxicological sciences*, 100 (1), 24-28.
- [40] Jacobson-Kram, D., McGovern, T. (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced drug delivery reviews*, 59 (1), 38-42.
- [41] Guideline, I.H.T. (2006): Impurities in new drug substances Q3A (R2). Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland.
- [42] Food, U., Administration, D. (2012). FDA labeling information—Kalydeco. *FDA website*,
- [43] Davis, P.B., Yasothan, U., Kirkpatrick, P. (2012): Ivacaftor. Nature Publishing Group.
- [44] Barry, P.J., Donaldson, A.L., Jones, A.M. (2018). Ivacaftor for cystic fibrosis. *Bmj*, 361, k1783.
- [45] Fohner, A.E., McDonagh, E.M., Clancy, J.P., Carrillo, M.W., Altman, R.B., Klein, T.E. (2017). PharmGKB summary: ivacaftor pathway, pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics*, 27 (1), 39.
- [46] Bush, A., Simmonds, N.J. (2012): Hot off the breath: ‘I’ve a cost for’—the 64 million dollar question. BMJ Publishing Group Ltd.
- [47] Clancy, J., Rowe, S.M., Accurso, F.J., Aitken, M.L., Amin, R.S., Ashlock, M.A., Ballmann, M., Boyle, M.P., Bronsveld, I., Campbell, P.W. (2012). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*, 67 (1), 12-18.
- [48] White, R., Woodward, S., Leppert, M., O'Connell, P., Nakamura, Y., Hoff, M., Herbst, J., Lalouel, J.-M., Dean, M., Woude, G.V. (1986). A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*, 319 (6049), 160.
- [49] Trittler, R., Hug, M. (2014). PKP-017 monitoring of ivacaftor serum levels. *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice*, 21 (Suppl 1), A143-A144.
- [50] Kerem, B.-s., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.-C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245 (4922), 1073-1080.

- [51] Welsh, M.J., Smith, A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73 (7), 1251-1254.
- [52] Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R., Smith, A.E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63 (4), 827-834.
- [53] Quinton, P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 301 (5899), 421.
- [54] Moran, A., Dunitz, J., Nathan, B., Saeed, A., Holme, B., Thomas, W. (2009). Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes care*, 32 (9), 1626-1631.
- [55] Solomon, M. (2009). Cystic fibrosis-update on diagnosis and treatment from Cystic fibrosis etiology, diagnosis and treatments. *Treatments for Cystic fibrosis*, 5
- [56] Myers, L. (2009). The role of adherence, importance and burden from Cystic fibrosis etiology, diagnosis and treatments. *Treatments for Cystic fibrosis, Leatte PN (ed). Nova Biomedical: Hauppauge NY, USA*,
- [57] Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P.D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubert, J., Hazlewood, A. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (44), 18825-18830.
- [58] Eckford, P.D., Li, C., Ramjeesingh, M., Bear, C.E. (2012). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (44), 36639-36649.
- [59] Wainwright, C.E., Elborn, J.S., Ramsey, B.W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., Colombo, C., Davies, J.C., De Boeck, K., Flume, P.A. (2015). Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine*, 373 (3), 220-231.
- [60] Castellani, C., Cuppens, H., Macek Jr, M., Cassiman, J., Kerem, E., Durie, P., Tullis, E., Assael, B., Bombieri, C., Brown, A. (2008). Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of cystic fibrosis*, 7 (3), 179-196.
- [61] Durmowicz, A.G., Lim, R., Rogers, H., Rosebraugh, C.J., Chowdhury, B.A. (2018). The US Food and Drug Administration's experience with ivacaftor in cystic fibrosis. Establishing efficacy using in vitro data in lieu of a clinical trial. *Annals of the American Thoracic Society*, 15 (1), 1-2.
- [62] Fidler, M.C., Beusmans, J., Panorchan, P., Van Goor, F. (2017). Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16 (1), 41-44.
- [63] Ledford, H. (2012). Drug bests cystic-fibrosis mutation. *Nature News*, 482 (7384), 145.
- [64] Wainwright, C.E. (2014). Ivacaftor for patients with cystic fibrosis. *Expert review of respiratory medicine*, 8 (5), 533-538.
- [65] Harbeson, S.L., Morgan, A.J., Liu, J.F., Aslanian, A.M., Nguyen, S., Bridson, G.W., Brummel, C.L., Wu, L., Tung, R.D., Pilja, L. (2017). Altering metabolic profiles of drugs by precision deuteration 2: discovery of a deuterated analog of ivacaftor with differentiated pharmacokinetics for clinical development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 362 (2), 359-367.

- [66] Kapoor, H., Koolwal, A., Singh, A. (2014). Ivacaftor: a novel mutation modulating drug. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8 (11), SE01.
- [67] Lai, C.K., Song, T.V., Li, J.J. (2015). Ivacaftor (Kalydeco): A CFTR Potentiator for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Innovative Drug Synthesis*, 303-316.
- [68] Sachdeva, K., Saxena, R., Puri, R., Bijarnia, S., Kohli, S., Verma, I.C. (2012). Mutation analysis of the CFTR gene in 225 children: identification of five novel severe and seven reported severe mutations. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16 (7), 798-801.
- [69] Thomassen, J.C., Mueller, M.I., Alcazar, M.A.A., Rietschel, E., van Koningsbruggen-Rietschel, S. (2018). Effect of lumacaftor/ivacaftor on glucose metabolism and insulin secretion in Phe508del homozygous cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17 (2), 271-275.
- [70] Ode, K.L., Moran, A. (2013). New insights into cystic fibrosis-related diabetes in children. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 1 (1), 52-58.
- [71] Farrell, P.M., White, T.B., Ren, C.L., Hempstead, S.E., Accurso, F., Derichs, N., Howenstine, M., McColley, S.A., Rock, M., Rosenfeld, M. (2017). Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *The Journal of pediatrics*, 181, S4-S15. e11.
- [72] Dilokthornsakul, P., Hansen, R.N., Campbell, J.D. (2016). Forecasting US ivacaftor outcomes and cost in cystic fibrosis patients with the G551D mutation. *European Respiratory Journal*, 47 (6), 1697-1705.
- [73] Paranjape, S.M., Mogayzel Jr, P.J. (2018). Cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Paediatric respiratory reviews*, 25, 64-72.
- [74] Chhabda, J., Balaji, M.V. (2013). Development and Validation of a New and Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Ivacaftor in Presence of Degradant Products. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4), 607-613.
- [75] Schneider, E.K., Reyes-Ortega, F., Wilson, J.W., Kotsimbos, T., Keating, D., Li, J., Velkov, T. (2016). Development of HPLC and LC-MS/MS methods for the analysis of ivacaftor, its major metabolites and lumacaftor in plasma and sputum of cystic fibrosis patients treated with ORKAMBI or KALYDECO. *Journal of Chromatography B*, 1038, 57-62.
- [76] Akram, N., Umamahesh, M. (2017). A New Validated RP-HPLC Method for the Determination of Lumacaftor and Ivacaftor in its Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms. *Oriental Journal of Chemistry*, 33 (3), 1492-1501.
- [77] Kárpáti, R.B., Patyi, G., Basa-Dénes, O., ORDASI, B.S., Angi, E.R., Glavinas, H., Filipcsei, G. (2017): Pharmaceutical combination composition comprising complex formulations of ivacaftor and lumacaftor and their salts and derivatives, process for their preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them. Google Patents.
- [78] Guideline, I.H.T. (2005): Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Geneva, Switzerland. pp. 11-12.
- [79] Swartz, M.E., Krull, I.S. (2018). *Analytical method development and validation*. CRC Press.
- [80] Peters, F.T., Drummer, O.H., Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, 165 (2-3), 216-224.
- [81] Bakshi, M., Singh, B., Singh, A., Singh, S. (2001). The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability-

- indicating assay. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26 (5-6), 891-897.
- [82] Huynh-Ba, K., Zahn, M. (2009). Understanding ICH guidelines applicable to stability testing, *Handbook of stability testing in pharmaceutical development* içinde (s. 21-41). Springer.
- [83] Blessy, M., Patel, R.D., Prajapati, P.N., Agrawal, Y. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 4 (3), 159-165.
- [84] Ngwa, G. (2010). Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. *Drug delivery technology*, 10 (5), 56-59.
- [85] Brundle, C., Turner, D., Robin, M., Basch, H. (1969). Photoelectron spectroscopy of simple amides and carboxylic acids. *Chemical Physics Letters*, 3 (5), 292-296.
- [86] Koyuturk, S., Can, N.O., Atkosar, Z., Arli, G. (2014). A novel dilute and shoot HPLC assay method for quantification of irbesartan and hydrochlorothiazide in combination tablets and urine using second generation C18-bonded monolithic silica column with double gradient elution. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 97, 103-110.
- [87] Gritti, F., Leonardis, I., Shock, D., Stevenson, P., Shalliker, A., Guiochon, G. (2010). Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. *Journal of Chromatography A*, 1217 (10), 1589-1603.
- [88] 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.
- [89] McLafferty, F.W. (1959). Mass spectrometric analysis. Molecular rearrangements. *Analytical Chemistry*, 31 (1), 82-87.
- [90] McLafferty, F.W., Tureček, F., Turecek, F. (1993). *Interpretation of mass spectra*. University science books.
- [91] Lammertsma, K., Bharatam, P.V. (2000). Keto $\rightleftharpoons$ Enol, Imine $\rightleftharpoons$ Enamine, and Nitro $\rightleftharpoons$ a ci-Nitro Tautomerism and Their Interrelationship in Substituted Nitroethylenes. Keto, Imine, Nitro, and Vinyl Substituent Effects and the Importance of H-bonding. *The Journal of organic chemistry*, 65 (15), 4662-4670.
- [92] Kurasawa, Y., Ishikura, A., Ikeda, K., Hosaka, T., Matsumoto, Y., Takada, A., Kim, H.S., Okamoto, Y. (1994). NMR study on the tautomeric equilibria between the hydrazone imine and diazenyl enamine forms in side chained quinoxalines: Solvent effects and temperature dependence. *Journal of heterocyclic chemistry*, 31 (1), 233-238.
- [93] Kurasawa, Y., Takada, A. (1986). Characteristic tautomerism and isomerization in the quinoxaline chemistry. *Chemischer Informationsdienst*, 17 (52), no-no.
- [94] Rogers, M.T., Burdett, J.L. (1965). Keto–Enol Tautomerism in β -Dicarbonyls Studied by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: II. Solvent Effects on Proton Chemical Shifts and on Equilibrium Constants. *Canadian Journal of Chemistry*, 43 (5), 1516-1526.
- [95] Murthy, A., Balasubramanian, A., Rao, C., Kasturi, T. (1962). Spectroscopic studies of keto–enol equilibria: Part 1. Solvent effects. *Canadian Journal of Chemistry*, 40 (12), 2267-2271.