TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELTROMBOPAG VE RUXOLİTİNİB İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN VE İMPÜRİTELERİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE TANINMASI VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER İLE ANALİTİK METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Timur DEMİRHAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

ANKARA
2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELTROMBOPAG VE RUXOLİTİNİB İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN VE İMPÜRİTELERİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE TANINMASI VE KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER İLE ANALİTİK METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Timur DEMİRHAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Esen BELLUR ATİCİ

Bu araştırma 2244 Sanayi Doktora Programı dahilinde 118C088 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Eltrombopag ve Ruxolitinib İlaç Etken Maddelerinin ve İmpüritelerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanınması ve Kromatografik Yöntemler ile Analitik Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:
Tarih:
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
……..Anabilim Dalında
…… tarafından hazırlanan
"……." adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
……Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
……Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
…….Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
……..Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
…….Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Eltrombopag ve Ruxolitinib İlaç Etken Maddelerinin ve İmpüritelerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanınması ve Kromatografik Yöntemler ile Analitik Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu

Bilimin gelişmesi sayesinde, kanser ve birçok başka hastalığın sebebi ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkların birçoğu DNA üzerindeki bir bozukluktan dolayı meydana gelmektedir. DNA üzerindeki bir bozukluk, nesilden nesile aktarıldığı için, bu hastalıkların araştırılması büyük önem arz etmektedir. Fakat bu hastalıkların çözümü olan ilaç etken maddelerin ARGE süreçleri hem çok maliyetlidir hem de uzun süreli çalışma gerektirmektedir. Bu sebepler ise ilaç fiyatların artmasına ve ilaçlara ulaşımı zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı ülkelerin kendi ARGE çalışmalarını yürütüp, ilaç üretimini, saflaştırılmasını, analitik metot geliştirilmesi ve validasyon çalışmasını yapması çok önemlidir. Böylece, ilaç fiyatları düşürülüp, ilaca ulaşımı kolaylaştırılır. Bu amaçla DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanında sentezlenmiş olan Eltrombopag ve Ruxolitinib ilaç etken maddeleri ve safsızlıkları standardize edilmiştir. Bu kapsamda bu ilaç etken maddeleri karakterize edilip, kütle spektroskopisi ile kütleleri doğrulanmıştır. Standardize edilen Eltrombopag aktif ilaç etken maddesinin ilgili maddeler ve miktar tayini analitik yöntemleri geliştirilmiştir. Eltrombopag ilaç etken maddesinin ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemlerin kararlılığı bir bozundurma çalışması ile de ispatlanmıştır. Ayrıca Eltrombopag ilaç etken maddesinin bir başlangıç maddesi olan Eltro-1 ve 11 safsızlıkları birbirinden başarıyla ayıran ve tayin edebilen bir yöntem geliştirilmiştir. Bunu yanı sıra tez kapsamında çalışılan Ruxolitinib ilaç etken maddesi ile kiral safsızlığı olan (S)-Ruxolitinib'i seçici bir şekilde tayin edebilen bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen tüm yöntemler ICH Q2(R2) kılavuzuna göre valide edilip, seçici, doğru, kesin, hassas ve kararlı yöntemler olduklarını ispatlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Eltrombopag, İlaç Etken Madde, Kromatografi, Ruxolitinib, Validasyon

SUMMARY

Determination of Eltrombopag and Ruxolitinib Active Ingredients and Impurities by Spectroscopic Methods and Analyte Method Development and Validation by Chromatographic Methods

Thanks to the development of science, the cause of cancer and many other diseases is revealed. Many of these diseases are caused by a defect in DNA strings. Since a defect in DNA is passed on from generation to generation, it is of great importance to investigate these diseases. However, the R&D processes of active pharmaceutical ingredients, which are the solution to these diseases, are both very costly and require long-term work. These reasons, on the other hand, increase the prices of drugs and make access to drugs difficult. Therefore, it is very important for countries to carry out their own R&D studies, to produce and purify drugs, to develop analytical methods and to carry out validation studies. Thus, drug prices are reduced and access to drugs is facilitated For this purpose, the active ingredients and impurities of Eltrombopag and Ruxolitinib, synthesized in the API-R&D department of DEVA Holding A.Ş., have been standardized. In this context, these active pharmaceutical ingredients were characterized and their masses were confirmed by mass spectroscopy. Related substances and assay methods of Eltrombopag have been developed. The stability of the related substances and assay methods of Eltrombopag were also proven by a forced degradation study. In addition, a method has been developed that can successfully separate and determine Eltro-1 and its 11 impurities, which is a starting material of Eltrombopag. Also, a method that can selectively determine the active ingredient Ruxolitinib and its chiral impurity (S)-Ruxolitinib has been developed. All developed methods have been validated according to the ICH Q2(R2) guideline and have proven to be selective, accurate, precise, sensitive and stable methods.

Anahtar Sözcükler: Active Pharmaceutical Ingredient, Chromatography, Eltrombopag, Ruxolitinib, Validation

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul Ve Onay iii
Özet iv
Summary v
İçindekiler vi
Önsöz xi
Simgeler Ve Kısaltmalar xii
Şekiller xiv
Çizelgeler xvi

1. GİRİŞ 1
1.1. Giriş ve Amaç 1
1.2. Tez Kapsamında Çalışılan İlaç Etken Maddeleri 2
1.3. Kromatografik Yöntemler .7
1.3.1. Adsorpsiyon Kromatografisi 8
1.3.2. Dağılma Kromatografisi 9
1.4. İlaç Etken Maddelerindeki Safsızlıklar 9
1.5. İlaç Etken Maddelerin Analitik Yöntem Validasyonu 11
1.5.1. Seçicilik 11
1.5.2. Doğrusallık ve Aralık 11
1.5.3. Doğruluk 12
1.5.4. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS) 12
1.5.5. Kesinlik 12
1.5.5.1. Yöntem Kesinliği 12
1.5.5.2. Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvarlar Arası) 13
1.5.6. Sağlamlık 13
1.5.7. Çözelti Stabilitesi 13
1.6. Amaç 13

2. GEREÇ VE YÖNTEM 14
2.1. Gereç 14
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 14
2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Araçlar 14
2.1.3. Kullanılan Kolonlar 15
2.1.4. Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri 16
2.1.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 16
2.1.5.1. Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler 16
2.1.5.1.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler 16
2.1.5.1.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı 17
2.1.5.1.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı 17
2.1.5.1.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 18
2.1.5.1.5. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması 18
2.1.5.1.6. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 18
2.1.5.1.7. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 18
2.1.5.1.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 19
2.1.5.1.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 19

2.1.5.2. Eltrombopag Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler 19
2.1.5.2.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler 19
2.1.5.2.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı 20
2.1.5.2.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı 20
2.1.5.2.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 20
2.1.5.2.5. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması 20
2.1.5.2.6. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 21
2.1.5.2.7. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 21
2.1.5.2.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması 21
2.1.5.2.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 21
2.1.5.3. Eltrombopag Stres Testi Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler ve Numuneler 22
2.1.5.3.1. Asit Çözeltisi Olarak Araştırılan Çözeltiler 22
2.1.5.3.2. Baz Çözeltisi Olarak Araştırılan Çözeltiler 22
2.1.5.3.3. Oksitleyici Ajan Olarak Araştırılan Çözeltiler 23
2.1.5.3.4. İşlem Görmemiş Numune Çözeltisi Hazırlığı 24
2.1.5.3.5. Asit ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı 24
2.1.5.3.6. Baz ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı 25
2.1.5.3.7. Oksitleyici Ajan ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı 25
2.1.5.3.8. Su ve Isı ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı 25
2.1.5.3.9. Standart Çözeltisi Hazırlığı 26
2.1.5.4. Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler 26
2.1.5.4.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler 26
2.1.5.4.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı 27
2.1.5.4.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı 27
2.1.5.4.4. Stok Standart Çözeltisinin Hazırlanması 28
2.1.5.4.5. Standart Çözeltisinin Hazırlanması 28
2.1.5.4.6. Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 28
2.1.5.4.7. Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 28
2.1.5.4.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık (Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J) Stok Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 29
2.1.5.4.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 29
2.1.5.5. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler 29
2.1.5.5.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler 29
2.1.5.5.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı 30
2.1.5.5.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı 30
2.1.5.5.4. Ruxolitinib Stok Standart Çözeltinin Hazırlanması 30
2.1.5.5.5. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 30
2.1.5.5.6. (S)-Ruxolitinib stok standart çözeltisinin hazırlanması 30
2.1.5.5.7. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması 31
2.1.5.5.8. Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve Trifenilfosfin oksit (TPPO) Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 31

2.1.5.5.9. Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 31
2.1.5.5.10. (S)-Ruxolitinib, Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 32
2.1.5.5.11. (S)-Ruxolitinib, Ruxolitinib, Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması 32
2.1.5.5.12. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması 32
2.1.5.5.13. Spesifikasyon Limit Derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması 32
2.1.5.5.14.Spesifikasyon Limit Derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş Standart Çözeltisinin Hazırlanması 33
2.2. Yöntem 33
2.2.1. YPSK ile Yapılan Yöntemler 33
2.2.1.1. Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntemi 33
2.2.1.2. Eltrombopag Miktar Tayini Yöntemi 33
2.2.1.3. Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntemi 34
2.2.1.4. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntemi 34
2.2.2. Kütle Spektrometrisi 34
2.2.2.1. Eltrombopag Kütle Spektrometrisi Yöntemi 34
2.2.2.2. Eltro-1 Kütle Spektrometrisi Yöntemi 35
2.2.2.3. Ruxolitinib Kütle Spektrometrisi Yöntemi 35

3. BULGULAR 36
3.1. İlaç Etken Maddelerinin Safsızlık Profilinin Belirlenmesi 36
3.2. İlaç Etken Maddelerin ve Safsızlıklarının Spektroskopik İncelenmesi 39
3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon 39
3.3.1. Tüm Yöntemler İçin Genel Özellikler 39
3.3.2. Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu 40
3.3.2.1. Çözelti Derişimi Seçimi 40
3.3.2.2. Çözücü Sistemi Seçimi 40
3.3.2.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması 40
3.3.2.4. Yöntem Optimizasyonu 43
3.3.3. Eltrombopag Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu 44
3.3.3.1. Çözelti Derişimi Seçimi 44
3.3.3.2. Çözücü Sisteminin Seçimi 45
3.3.3.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi 45
3.3.3.4. Yöntem Optimizasyonu 45
3.3.4. Eltrombopag Stres Testi Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu 46
3.3.4.1. Su ve Isı ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi 46
3.3.4.2. Asit ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi 47
3.3.4.3. Baz ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi 47
3.3.4.4. Oksitleyici Ajan ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi 47
3.3.5. Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu 50
3.3.5.1. Çözelti Derişimi Seçimi 50
3.3.5.2. Çözücü Sistemi Seçimi 50
3.3.5.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması 50
3.3.5.4. Yöntem Optimizasyonu 56
3.3.6. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu 57
3.3.6.1. Çözelti Derişimi Seçimi 57

3.3.6.2. Çözücü Sisteminin Seçimi 57
3.3.6.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi 58
3.3.6.4. Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması 58
3.3.6.5. Yöntem Optimizasyonu 59
3.4. Validasyon Çalışmaları 61
3.4.1. Eltrombopag İlgili Maddeler Validasyon Çalışması 61
3.4.1.1. Sistem Uygunluk 61
3.4.1.2. Seçicilik 61
3.4.1.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 63
3.4.1.4. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS) 66
3.4.1.5. Doğruluk 66
3.4.1.6. Alan Düzeltme Faktörü (CRF) 67
3.4.1.7. Kesinlik 68
3.4.1.7.1. Yöntem Kesinliği 68
3.4.1.7.2. Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvarlar Arası) 68
3.4.1.8. Sağlamlık 68
3.4.1.9. Çözelti Stabilitesi 69
3.4.2. Eltrombopag Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları 70
3.4.2.1. Sistem Uygunluk 70
3.4.2.2. Seçicilik 70
3.4.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 71
3.4.2.4. Doğruluk 73
3.4.2.5. Kesinlik 74
3.4.2.5.1. Sistem Kesinliği 74
3.4.2.5.2. Yöntem Kesinliği 74
3.4.2.5.3. Tekrar Üretilebilirlik 75
3.4.2.6. Sağlamlık 75
3.4.2.7. Çözelti Stabilitesi 76
3.4.3. Eltro-1 İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları 77
3.4.3.1. Seçicilik 77
3.4.3.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 78
3.4.3.3. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS) 87
3.4.3.4. Doğruluk 88
3.4.3.5. Alan Düzeltme Faktörü (CRF) 89
3.4.3.6. Kesinlik 90
3.4.3.6.1. Yöntem Kesinliği 90
3.4.3.6.2. Tekrar Üretilebilirlik 90
3.4.3.7. Sağlamlık 91
3.4.3.8. Çözelti Stabilitesi 92
3.4.4. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Validasyon Çalışmaları 95
3.4.4.1. Sistem Uygunluk 95
3.4.4.2. Seçicilik 95
3.4.4.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 97
3.4.4.4. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS) 99
3.4.4.5. Doğruluk 100
3.4.4.6. Kesinlik 101
3.4.4.6.1. Yöntem Kesinliği 101
3.4.4.6.2. Tekrar Üretilebilirlik 101
3.4.4.7. Sağlamlık 102
3.4.4.8. Çözelti Stabilitesi 102
3.4.5. Eltrombopag Stres Testi Çalışması 103
3.4.5.1. Isı ile Bozundurma Çalışması 103
3.4.5.2. Gün Işığı ile Bozundurma Çalışması 104

3.4.5.3. UV ile Bozundurma Çalışması 105
3.4.5.4. Su ve Isı ile Bozundurma Çalışması 106
3.4.5.5. Asit ile Bozundurma Çalışması 107
3.4.5.6. Baz ile Bozundurma Çalışması 108
3.4.5.7. Oksitleyici Ajan ile Bozundurma Çalışması 110

4. TARTIŞMA 111
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 121
KAYNAKLAR 123
EKLER 128
ÖZGEÇMİŞ **Hata!**
Yer işareti tanımlanmamış.

ÖNSÖZ

Bilimin gelişmesi sayesinde, kanser ve birçok başka hastalığın sebebi ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkların birçoğu DNA üzerindeki bir bozukluktan dolayı meydana gelmektedir. DNA üzerindeki bir bozukluk, nesilden nesile aktarıldığı için, bu hastalıkların araştırılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanında sentezlenmiş olan Eltrombopag ve Ruxolitinib ilaç etken maddelerin karakterizasyonu yapılıp kütle spektroskopisi ile kütleleri doğrulanmıştır. Eltrombopag'ın ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri, Eltrombopag stres testi yöntemi, Eltrombopag'ın başlangıç maddesi Eltro-1'in ilgili maddeler yöntemi ve Ruxolitinib ilaç etken maddesinin kiral safsızlığı yöntemi geliştirilip, doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin hızlı, seçici, kesin, doğru ve kararlı oldukları ispatlandığından kalite kontrol laboratuvarlarında ve rutin analizlerde kullanılabilmektedir.

Doktora eğitimimde tanıştığım ve bu çalışmamın gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim ve yardımlarını hiç esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a sonsuz kez teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca bana desteği, bilgisi ve deneyimleri ile bana her zaman yardımcı olan saygıdeğer eşdanışmanım Doç. Dr. Esen BELLUR ATİCİ hocama da teşekkürü bir borç bilirim.

DEVA Holding A.Ş API sentez ve analitik bölümünde bana doktora çalışmamda yardımcı olan, dertlerime ortak olan tüm çalışma arkadaşlarıma, şeflerime ve müdürlerime, ama özellikle Yücel YAZAR'a sonsuz teşekkür ederim. Bana Tübitak 2244 projeye dahil olmama, aynı zamanda DEVA Holding A.Ş API analitik bölümünde çalışmama yardımcı olan ve aynı projeden mezun olan Dr. Melike Ceren MISER'e, doktora eğitimine ve Tübitak 2244 projeye benimle aynı zamanda dahil olan Merve UĞUR'a desteklerinden dolayı çok teşekkür etmek istiyorum. Bana maddi ve manevi destek olan babama Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN, anneme Filiz Nimet DEMİRHAN ve kardeşime Tanju DEMİRHAN'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Beni her zaman destekleyen ve sevgisini asla esirgemeyen canım eşim Fatma DEMİRHAN'a ve hayatımın anlamı, en büyük motivasyon kaynağım ve hayatımı renklendiren biricik oğlum Can Barkın DEMİRHAN'a sonsuz teşekkür etmek istiyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT	Protein kinaz B
API	Aktif farmasötik içerik
ATP	Adenozin trifosfat
BSS	Bağıl standart sapma
BU/BE	Biyouyarlanabilirlik ve biyoekvivalans
CRF	Alan düzeltme faktörü
Da	Dalton
dk	Dakika
EMA	Avrupa ilaç kurumu
EP	Avrupa farmakope
FDA	Birleşik devletler gıda ve ilaç dairesi
fL	Femtolitre
GAD	Günlük alım doz
ICH	Uluslararası harmonizasyon topluluğu
ITP	İmmün trombositopenik purpura
JAK	Kanus kinaz inhibitörü
L	Litre
m	Eğim
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Miligram
MK	Megakaryosit
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
N	Normal
nm	Nanometre
PDA	Photo diode array
PMF	Primer miyelofibroz
R	Korelasyon katsayısı
RRT	Bağıl alıkonma zamanı
RSD	Bağıl standart sapma
RSS	Artık kareler toplamı
RT	Alınkonma zamanı
SS	Standart sapma
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinlerinin aktivatörü

TAS	Tayin alt sınırı
TF-YPSK	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
TF-YPSK-FL	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi ve floresans dedektörü
TPO	Trombopoietin
TPO-R	Trombopoietin reseptör
TPO-RA	Trombopoietin reseptör agonist
TPPO	Trifenilfosfin oksit
TS	Teşhis sınırı
USP	Birleşik devletler farmakope
UV	Mor ötesi
UY	Uygulama yok
UYPSK	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi
VIS	Görünür bölge

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Eltrombopag'ın etki mekanizması 3
Şekil 1.2. Eltrombopag molekül şekli 3
Şekil 1.3. Ruxolitinib molekül şekli 6
Şekil 1.4. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması 8
Şekil 3.1. Eltromobopag için tanımlanan safsızlıklar 36
Şekil 3.2. Ruxolitinib için tanımlanan safsızlıklar 37
Şekil 3.3. Eltro-1 için tanımlanan safsızlıklar 38
Şekil 3.4. Eltrombopag kütle spektrumu 41
Şekil 3.5. Eltro-1 kütle spektrumu 42
Şekil 3.6. Eltro-2 kütle spektrumu 42
Şekil 3.7. Eltro-1 IMP-A kütle spektrumu 51
Şekil 3.8. Eltro-1 IMP-B kütle spektrumu 52
Şekil 3.9. Eltro-1 IMP-E kütle spektrumu 52
Şekil 3.10. Eltro-1 IMP-F kütle spektrumu 53
Şekil 3.11. Eltro-1 IMP-G kütle spektrumu 53
Şekil 3.12. Eltro-1 IMP-H kütle spektrumu 54
Şekil 3.13. Eltro-1 IMP-I kütle spektrumu 54
Şekil 3.14. Eltro-1 IMP-J kütle spektrumu 55
Şekil 3.15. Eltro-1 IMP-K kütle spektrumu 55
Şekil 3.16. Ruxolitinib kütle spektrumu 59
Şekil 3.17. Eltrombopag ilgili maddeler safsızlık eklenmiş numune çözelti kromatogramı 62
Şekil 3.18. Kör çözelti kromatogramı 62
Şekil 3.19. Eltrombopag standardı doğrusallık grafiği 64
Şekil 3.20. Eltro-1 standardı doğrusallık grafiği 64
Şekil 3.21. Eltro-2 standardı doğrusallık grafiği 65
Şekil 3.22. Eltrombopag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri 65
Şekil 3.23. Eltrombopag miktar tayini limit derişimde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi kromatogramı 71
Şekil 3.24. Eltrombopag miktar tayini Eltrombopag standardının doğrusallık grafiği 73
Şekil 3.25. Eltro-1 ilgili maddeler limit derişimindeki safsızlık eklenmiş numune çözelti kromatogramı 78
Şekil 3.26. Kör çözelti kromatogramı 78
Şekil 3.27. Eltro-1 standardı doğrusallık grafiği 80

Şekil 3.28. Eltro-1 IMP-A standardı doğrusallık grafiği 80
Şekil 3.29. Eltro-1 IMP-B standardı doğrusallık grafiği 81
Şekil 3.30. Eltro-1 IMP-C standardı doğrusallık grafiği 81
Şekil 3.31. Eltro-1 IMP-D standardı doğrusallık grafiği 82
Şekil 3.32. Eltro-1 IMP-E standardı doğrusallık grafiği 82
Şekil 3.33. Eltro-1 IMP-F standardı doğrusallık grafiği 83
Şekil 3.34. Eltro-1 IMP-G standardı doğrusallık grafiği 83
Şekil 3.35. Eltro-1 IMP-H standardı doğrusallık grafiği 84
Şekil 3.36. Eltro-1 IMP-I standardı doğrusallık grafiği 84
Şekil 3.37. Eltro-1 IMP-J standardı doğrusallık grafiği 85
Şekil 3.38. Eltro-1 IMP-K standardı doğrusallık grafiği 85
Şekil 3.39. Eltro-1 ilgili maddeler çakıştırılmış IMP-K dahil edilmemiş doğrusallık grafikleri 86
Şekil 3.40. Eltro-1 ilgili maddeler çakıştırılmış IMP-K dahil edilmiş doğrusallık grafikleri 86
Şekil 3.41. Ruxolitinib kiral safsızlık sistem uygunluk kromatogramı 95
Şekil 3.42. Ruxolitinib kiral safsızlık spesifikasyon limit derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş ruxolitinib çözeltisi kromatogramı 96
Şekil 3.43. Kör çözelti kromatogramı 96
Şekil 3.44. Ruxolitinib standardı doğrusallık grafiği 98
Şekil 3.45. (S)-Ruxolitinib standardı doğrusallık grafiği 99
Şekil 3.46. Ruxolitinib kiral safsızlık çakıştırılmış doğrusallık grafikleri 99
Şekil 3.47. İşlem görmemiş Eltrombopag örneği kromatogramı 104
Şekil 3.48. Isı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 104
Şekil 3.49. Gün ışığı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 105
Şekil 3.50. UV ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 106
Şekil 3.51. Su ve ısı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 107
Şekil 3.52. Asit ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 108
Şekil 3.53. Baz ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 109
Şekil 3.54. Oksitleyici ajan ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı 110

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. İlaç maddeleri için safsızlık eşik değerleri 10
Çizelge 1.2. İlaç ürünler için safsızlık eşik değerleri 10
Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler 14
Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar 15
Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan araç ve gereçler 15
Çizelge 2.4. Araştırılan kolonlar 15
Çizelge 3.1. Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolon 43
Çizelge 3.2.Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli fazlar 43
Çizelge 3.3. Eltrombopag ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri 44
Çizelge 3.4. Eltrombopag ilgili maddeler gradient programı 44
Çizelge 3.5. Eltrombopag miktar tayini en uygun yöntem parametreleri 46
Çizelge 3.6. Eltrombopag miktar tayini gradient programı 46
Çizelge 3.7. Eltrombopag stres testi ilgili maddeler yöntemi parametreleri 48
Çizelge 3.8. Eltrombopag stres testi ilgili maddeler yöntemi gradient programı 48
Çizelge 3.9. Eltrombopag stres testi miktar tayini yöntemi parametreleri 49
Çizelge 3.10. Eltrombopag stres testi miktar tayini yöntemi gradient programı 49
Çizelge 3.11. Eltrombopag stres testi çalışma planı 49
Çizelge 3.12. Eltro-1 ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolon 56
Çizelge 3.13. Eltro-1 ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli fazlar 56
Çizelge 3.14. Eltro-1 ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri 57
Çizelge 3.15. Eltro-1 ilgili maddeler gradient programı 57
Çizelge 3.16. Ruxolitinib kiral yönteminde kullanılan kolon 59
Çizelge 3.17. Ruxolitinib kiral safsızlık yönteminde kullanılan hareketli fazlar 59
Çizelge 3.18. Ruxolitinib kiral safsızlık en uygun yöntem parametreleri 60
Çizelge 3.19. Eltrombopag ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları 61
Çizelge 3.20. Eltrombopag ilgili maddeler seçicilik sonuçları. 62
Çizelge 3.21. Eltrombopag ilgili maddeler doğrusallık ve çalışma aralığı sonuçları. 63
Çizelge 3.22. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları 66
Çizelge 3.23. Doğruluk sonuçları çizelgesi 67
Çizelge 3.24. Eltrombopag ve safsızlıkların CRF sonuçları 67
Çizelge 3.25. Eltrombopag ilgili maddeler kesinlik sonuçları 68
Çizelge 3.26. Eltrombopag ilgili maddeler sağlamlık sonuçları 69
Çizelge 3.27. Eltrombopag ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları 70

Çizelge 3.28. Eltrombopag miktar tayini pik saflığı sonuçları 71
Çizelge 3.29. Eltrombopag miktar tayini doğrusallık sonuçları 72
Çizelge 3.30. Eltrombopag miktar tayini doğruluk sonuçları 74
Çizelge 3.31. Eltrombopag miktar tayini kesinlik sonuçları. 75
Çizelge 3.32. Eltrombopag miktar tayini sağlamlık sonuçları 76
Çizelge 3.33. Eltrombopag miktar tayini çözelti stabilitesi sonuçları 76
Çizelge 3.34. Eltro-1 ilgili maddeler seçicilik sonuçları. 77
Çizelge 3.35. Eltro-1 ilgili maddeler doğrusallık sonuçları. 79
Çizelge 3.36. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları 87
Çizelge 3.37. Doğruluk sonuçları çizelgesi 88
Çizelge 3.38. Eltro-1 ve safsızlıkların CRF so"nuçları 89
Çizelge 3.39. Eltro-1 ilgili maddeler kesinlik sonuçları 90
Çizelge 3.40. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları - 1 91
Çizelge 3.41. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları - 2 91
Çizelge 3.42. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları - 3 92
Çizelge 3.43. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 1 92
Çizelge 3.44. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 2 93
Çizelge 3.45. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 3 94
Çizelge 3.46. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 4 94
Çizelge 3.47. Ruxolitinib kiral safsızlık seçicilik sonuçları 96
Çizelge 3.48. Ruxolitinib kiral safsızlık doğrusallık sonuçları 98
Çizelge 3.49. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları 100
Çizelge 3.50. Doğruluk sonuçları çizelgesi 101
Çizelge 3.51. Ruxolitinib kiral safsızlık kesinlik sonuçları 101
Çizelge 3.52. Ruxolitinib kiral safsızlık sağlamlık sonuçları 102
Çizelge 3.53. Ruxolitinib kiral safsızlık çözelti stabilitesi sonuçları 103
Çizelge 3.54. Eltrombopag ısı ile bozundurma sonuçları 103
Çizelge 3.55. Eltrombopag gün ışığı ile bozundurma sonuçları 105
Çizelge 3.56. Eltrombopag UV ile bozundurma sonuçları 106
Çizelge 3.57. Eltrombopag su ve ısı ile bozundurma sonuçları 107
Çizelge 3.58. Eltrombopag asit ile bozundurma sonuçları 108
Çizelge 3.59. Eltrombopag asit ile bozundurma sonuçları 109
Çizelge 3.60. Eltrombopag örneğinin hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları 110
Çizelge 4.1. Eltrombopag ilgili maddeler deneme çalışması tablosu 113
Çizelge 4.2. Eltrombopag stres testi sonuçları 118

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

İnsan sağlığı ve hastalıkların tedavisi, tıbbi bilimlerin ve farmasötik araştırmaların merkezinde yer almaktadır. Sağlık sorunları, tüm dünya genelinde toplumları etkileyen ve bireylerin yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen birçok tehdidi beraberinde getirmektedir. Bu tehditler, bilim insanlarının, araştırmacıların ve ilaç geliştiricilerin sürekli olarak yeni ve etkili tedavi yöntemleri arayışına yönlendiren güçlü bir itici faktördür. İnsanların hastalıklara çare aramalarının altında yatan nedenler karmaşıktır ve pek çok farklı boyutu içerir.

Birçok hastalık, insanın genetik kodunu taşıyan DNA üzerindeki bir bozuklukla meydana gelmektedir. Bu hastalıklar da nesilden nesile aktarılmasıyla yayıldığı için, bunların araştırılması daha da önemli hale gelmiştir. Bu durum, tedavi ve iyileştirme yöntemlerine olan ihtiyacı artırmaktadır. İlaçlar, birçok hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynar ve bu nedenle yeni ilaçların geliştirilmesi ve mevcut ilaçların daha etkili hale getirilmesi büyük bir önem taşır.

Hastalıkların nedenleri ve mekanizmaları genellikle karmaşıktır. Modern tıp, bu karmaşıklıkları anlamaya ve çözümlemeye yönelik büyük bir çaba içindedir. Bilim insanları, hastalıkların moleküler düzeydeki nedenlerini anlamak ve bu nedenlere müdahale etmek için ileri teknolojileri kullanmaktadır. Bu, ilaç geliştirme süreçlerini daha karmaşık hale getirmekte ve daha fazla analiz ve karakterizasyon gerektirmektedir.

Bu noktada, aktif farmasötik içerik veya kısaca API kavramı devreye girer. API, bir ilacın temel etken maddesini temsil eder. İlaç, genellikle birçok farklı bileşeni içerebilir, ancak aktif farmasötik içerik, ilacın özünü oluşturur. Aktif farmasötik içerik 'nin kimyasal yapısı, istenilen terapötik etkinin sağlanmasında kilit bir rol oynar. Bu nedenle, aktif farmasötik içeriğinin doğru bir şekilde tanınması ve analiz edilmesi, ilaç geliştirme süreçlerinin temel bir bileşenidir. Yanlış tanımlanmış veya saf olmayan bir aktif farmasötik içerik, hastaların tedavi edilmesini güçleştirir ve sağlık risklerine yol açabilir.

Bu doktora tez çalışması, önemli iki aktif farmasötik içerik olan Eltrombopag ve Ruxolitinib'in karakterizasyonu, daha sonra kalite kontrol laboratuvarlarında ve rutin

analizlerde kullanmak için analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve validasyonunu amaçlamaktadır.

1.2. Tez Kapsamında Çalışılan İlaç Etken Maddeleri

- *Eltrombopag*

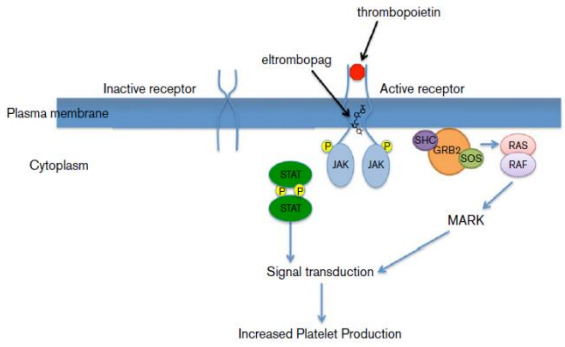
Kan, kan plazmasında asılı kan hücrelerinden oluşmaktadır. Birçok kan hücre tipi vardır: beyaz kan hücreleri (monositler, lenfositler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve makrofajlar), kırmızı kan hücreleri (eritrositler) ve trombositler (D'Alessandro vd., 2017). Trombositler en küçük kan hücreleridir ve disk şeklindedir. Boyutları yaklaşık 2,0-4,0 x 0,5 µm ve ortalama hacmi 7-11 fL'dir. Trombositler kanda en çok bulunan ikinci kan hücreleridir. Miktarları 150–450x109/L arasında değişmektedir. Küçük boyutlarına rağmen kritik bir role sahiptirler ve trombotik bozukluklara önemli katkıda bulunurlar. Trombositler, hemostaz ve tromboz içeren patofizyolojik süreçleri, pıhtı retraksiyonu, damar daralması ve onarımı, aterosklerozun desteklenmesi ve hatta tümör büyümesi/metastazı olaylarında büyük rol oynamaktadırlar (George, 2000; Harrison, 2005).

Kan hücreleri böyle büyük bir öneme sahipken, kan hastalıklarının çözümü önemlidir. Kan hastalıkları her yıl milyonlarca insanı etkilemektedir. Kalıtsal ve sonradan kazanılan hastalıklar arasında anemiler, venöz tromboembolizm, hemofili ve diğer kanama bozuklukları gibi durumlar bulunur. Bu hastalıklar kırmızı ve beyaz kan hücrelerini, trombositleri, kemik iliğini, damar endotelini veya plazma protezlerini etkileyebilir. Bu koşullar kan hücrelerinin anormal bir şekilde işlev görmesine neden olabilir ve bu da hastalığa yol açabilir veya genel sağlığı etkileyebilir (National Heart, Lung, and Blood Institute).

Trombositlerin büyük öneminin olduğu bir kan hastalığı ise immün trombositopenik purpura (ITP)'dir. Bu hastalık trombosit sayısında geçici veya kalıcı bir düşüş ile meydana gelmektedir. Hastalığın derecesine bağlı olarak artan bir kanama riski oluşmaktadır (Cooper ve Bussel, 2006). Trombosit azalması patojenik anti-trombosit otoantikorlar, T hücre aracılı trombosit yıkımı ve bozulmuş megakaryositlerden (MK) kaynaklanmaktadır (Zufferey vd., 2017).

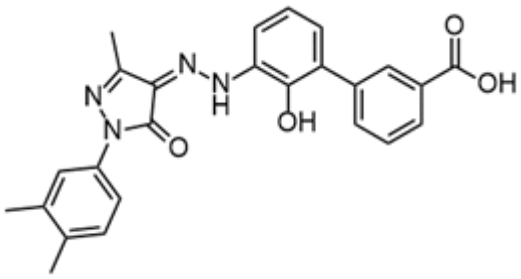
Eltrombopag, 2015 yılında FDA (U.S. Food and Drug Administration, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından ITP tedavisi için onaylanan, bir trombopoietin

reseptör agonistidir (TPO-RA) (Kim vd., 2018). Eltrombopag, trombopoietin reseptör (TPO-R)'nin ekstraselüler bölgesine bağlanan doğal TPO'nun aksine, TPO-R'nin transmembran bölgesi (H499) ile etkileşir (Provan vd., 2010). Bu nedenle, Janus kinaz/sinyal transdüser ve aktivatörü (JAK/STAT), protein kinaz B (AKT) ve mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) yolları üzerinden bir sinyal meydana gelir ve megakaryositopoezi uyarılır. Bu şekilde otoantikor oluşumu saptanmaz ve trombosit üretiminde artış olur (Kim vd., 2018; Gonzalez-Porras ve Bastida, 2018).



Şekil 1.1. Eltrombopag'ın etki mekanizması (Kim vd., 2018)

Eltrombopag'ın sistematik adı (Z)-3'-(2-(1-(3,4-Dimethylphenyl)-3-methyl-5-oxo-1H-pyrazol-4(5H)-ylidene)hydrazinyl)-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylic acid, molekül formülü $C_{25}H_{22}N_4O_4[C_2H_7NO]_2$, molekül ağırlığı ise 442,47 g/mol'dür. Eltrombopag koyu kırmızı renkte bir toz olarak bulunmaktadır. Eltrombopag ticari olarak ABD'de Promacta® adı altında, ABD dışındaki pazarlarda ise Revolade® adı altında satılmaktadır.



Şekil 1.2. Eltrombopag molekül şekli

- *Eltrombopag ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar*

2014 yılında, kan plazmasındaki Eltrombopag'ın analiz çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi kullanılarak yapılmıştır ve FDA

yönergesine göre valide edilmiştir. Sonuçlara göre geliştirilen yöntemin biyouyarlanabilirlik ve biyoekvivalans (BU/BE) çalışmaları için de kullanışlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Maddela vd., 2014).

Eltrombopag analiz yöntemleri ile ilgili sadece birkaç analitik yöntem yayınlanmıştır. 2018 yılında, tablet formülasyonundaki Eltrombopag'ın ilgili maddelerin analizi ile ilgili bir çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmada, Eltrombopag ve üç reaksiyon safsızlığı ile ilgili bir ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UYPSK) metodu geliştirilmiştir. Metot geştirildikten sonra Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) yönergesine göre başarıyla valide edilmiştir (Mohan vd., 2018)].

Tablet formülsayonunda bulunan Eltrombopag'ın miktar tayini yöntem çalışması 2020'de yapılmıştır. Bu metodun geliştirilmesinde bir ters faz YPSK kullanılmıştır. Geliştirilen metodun elüsyon programı ise izokratik seçilmiştir. Geliştirilen metot hem tablet formunda hem de API formundaki numuneler için kullanılabilmektedir. Metodun geliştirilmesi ve optimizasyonu sonucunda, doğrulaması ICH kılavuzuna göre başarıyla yapılmıştır (Ahir vd., 2020).

2022 yılında Eltrombopag ve yedi reaksiyon safsızlığı ve bozunma ürünlerinin analizi için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak bir çalışma yapılmıştır. Geliştirilen metot Birleşik Devletler Farmakope (USP), ICH ve Avrupa Farmakope (EP) yönergelerine göre valide edilmiştir. Validasyon sonuçlarına göre yöntemin özgün, hassas, doğru, doğrusal ve sağlam olduğu sonucuna varılmıştır (Dandabattina vd., 2023).

Eltrombopag'ın analiz yöntemleri genelde YPSK ve UYPSK metotları ile yapılırken, 2023 yılında yayınlanan bir çalışmada Eltrombopag Olamine'nin UV spektroskopi yöntemi miktar tayini yapılmıştır. Bu yöntemde Eltrombopag miktarı maksimum absorbansın olduğu dalga boyunda çalışılmıştır ve absorbans değerleri yardımıyla miktar tayini yapılmıştır. Metodun geliştirilmesi sonucunda doğrusallık, doğruluk, kesinlik, stabilite ve sağlamlık parametrelerini içeren bir validasyon çalışması başarıyla tamamlanmıştır (Sreelatha vd., 2023).

- *Ruxolitinib*

Çağımızın en büyük sağlık sorunlarından bir tanesi kanserdir. 2020 yılında 10 milyon ölüm ile en önde gelen ölüm nedenlerindendir. Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünüp, büyüyen ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Normalde insan hücreleri, yeni hücreler oluşturmak üzere büyür ve çoğalır. Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürler ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazen bu süreç bozulabilir ve anormal veya hasarlı hücreler büyümemeleri gerekirken çoğalabilir. Bu hücreler, doku topakları olan tümörler oluşturabilir. Tümörler kanserli veya kansersiz olabilir. Kanser vücudun neredeyse her tarafında ortaya çıkabilmektedir. Kanserli tümörler etrafındaki dokulara yayılabilir ve vücuttaki farklı yerlerde yeni tümörler oluşturabilir Her birinin kendine özgü nedenleri, risk faktörleri ve tedavileri olan 100'den fazla farklı kanser türü vardır (World Health Organization, 2021; National Cancer Institute, 2021).

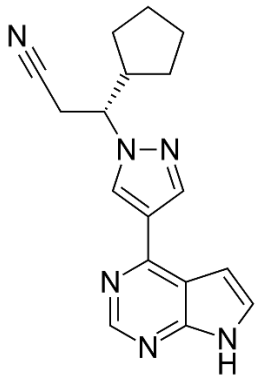
Bu kanser türlerinden bir tanesi primer miyelofibrozdur (PMF). PMF nadir görülen bir kemik iliği kan kanseridir (Harrison vd., 2021). JAK2 genindeki mutasyonlar, primer miyelofibroz ile ilişkilidir. JAK2 geni, kan hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini (çoğalmasını) sağlayan proteinlerin oluşması için komut verir. JAK2 genindeki mutasyonlar, JAK/STAT yolunun aşırı aktivasyonuna yol açar. JAK/STAT sinyalinin anormal etkinleşmesi, megakaryositlerin aşırı üretimine yol açar. Bu megakaryositler, kolajen meydana getirmek için başka bir hücre tipini uyarır. Bununla birlikte, PMF'de, fazla kollajen, kemik iliğinde yara dokusu oluşturmaktadır (Nangalia vd., 2013).

- *Ruxolitinib ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar*

2011 yılında PMF tedavisi için FDA tarafında onaylanan Ruxolitinib, janus kinaz inhibitörleri (JAK) olarak bilinen ilaç sınıfına girmektedir. Ruxolitinib JAK1 ve JAK2 protein kinazların adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı etkin bölgeleri inhibe etmektedir (Mascarenhas ve Hoffman, 2012). API'nin antikanser etkisi, JAK'ın inhibisyonuna yanı sıra, STAT3'ün JAK aracılı fosforilasyonu ile de ilgilidir. JAK-STAT yolunu düzenleyerek, Ruxolitinib miyeloproliferasyonu ve bu şekilde kemik iliğinde yara dokusunun oluşmasını inhibe etmektedir (Ostojic vd., 2011).

Ruxolitinib'in kimyasal adı, (*R*)-3-(4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)-3-cyclopentylpropanenitril. Molekül formülü $C_{17}H_{18}N_6$, molekül ağırlığı ise 306,37

g/mol'dür. Ruxolitinib pembemsi bir tozdur. Ruxolitinib ticari olarak ABD'de Jakafi® olarak, ABD dışındaki pazarlarda ise Jakavi® olarak satılmaktadır.



Şekil 1.3. Ruxolitinib molekül şekli

Literatürde Ruxolitinib için çok fazla analitik çalışma bulunmamakla birlikte, yapılan çalışmaların çoğu kan plazmasında, ilaç kapsülü veya tabletinde tabletindeki ilaç etken madde miktarının tayini için yapılmıştır.

2018 yılında yapılan bir çalışmada Ruxolitinib'in kan plazması örneklerindeki konsantrasyonunu ölçmek için ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi ve floresans dedektörlü (TF-YPSK-FL) bir yöntemi geliştirilip, Avrupa İlaç Kurumu (EMA) yönergesine göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem terapötik ilaç izleme ve olası yan etkileri en aza indirgemeyi amaçlamaktadır (Charlier vd., 2018).

Başka bir çalışmada, kan plazması örneğinde bulunan Ruxolitinib ve başka bir API'nin miktarını tayini gerçekleştirmek için TF-YPSK-FL'ye başvurulmuştur. Geliştirilen yöntem, her iki ilaç etken maddesinin miktar tayinini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedir. Çalışma, FDA yönergesine göre valide edilmiştir. Bu yöntemin klinik çalışmalarda güvenle kullanılabileceğini kanıtlanmıştır (Veeraraghavan vd., 2014).

2019 yılında tablet formunda olan Ruxolitinib için bir miktar tayini metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen metot başka metodun aksine izokratik olarak yürümektedir. Stresli koşullara dayanıklı olması ve olası degradasyon ürünlerini de birbirinden ayırması, bu metodu stabilite göstergeli olduğunu göstermektedir. Metot ICH yönergelerine göre valide edilip, rutin analitik ve kalite kontrol çalışmaları için güvenilir bulunmuştur (Biswal vd., 2019).

Ruxolitinib'in tablet ve kapsül formülasyondaki miktar tayini metodu 2020 yılında geliştrilmiştir. Metot ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile (TF-YPSK)'de geliştirilmiştir. Bunu yanı sıra Ruxolitinib'in kiral safsızlık metodu da TF-YPSK'da gelştirilmiştir. Metotlar ICH yönergesine göre valide edilmiştir. Validasyon sonuçları, Ruxolitinib içeren ilaçların kalite kontrol analizler için güvenilir ve uygun olduğunu göstermektedir (Di Michele vd., 2020).

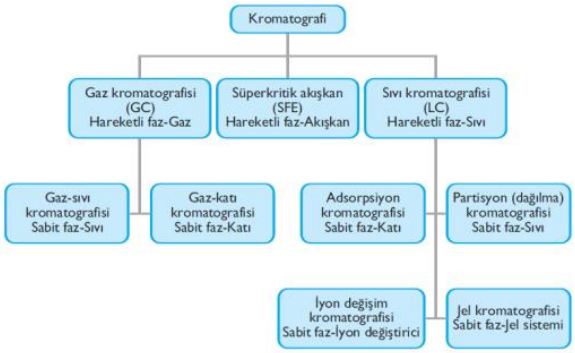
2021 yılında yayınlanan bir başka çalışmada Ruxolitinib'in stres çalışması yapılmıştır. Bu stres çalışmasında Ruxolitinib ısı, asit, baz, hidroliz ve oksidasyon ile bozulmuştur. Oluşan bozunma ürünleri kütle spektroskopi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Ruxolitinib oksidasyon, ısı ve hidrolize karşı yüksek bir stabilite gösterirken, asit ve baz ile bozunma sonunda dört bozunma ürünü oluşmaktadır. İlacın ve bozunma ürünlerinin ayrıştırılması için bir YPSK yöntemi geliştirilmiştir ve ICH Q2 kılavuzuna göre valide edilmiştir (Thakkar vd., 2022).

1.3. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, ilk kez 1900'lerin başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirildi. Tswett, bitki pigmentleri arasındaki ayrımı yapmak için, çözeltileri kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) içeren ince bir kolondan geçirerek bu yöntemi kullanmıştır. Ayrılmış pigment türleri, kolon üzerinde renkli bantlar halinde gözlemlendi, bu nedenle bu tekniğe "kromatografi" adı verildi. Yunanca'da "chroma" kelimesi renk anlamına gelirken, "graphein" kelimesi yazmak anlamına gelmektedir (Ettre, 2003).

Kromatografi, kimyasal karışımların tanımlanması, ölçülmesi ve ayrıştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Kromatografik yöntemler sayesinde hem kalitatif hem de kantitatif analizler gerçekleştirilebilir. Kromatografi, birçok farklı sistem ve teknikle uygulanabilir, bu nedenle kromatografinin net bir tanımı bazen zor olabilir. Ancak, tüm kromatografik yöntemlerin paylaştığı temel bir ilke vardır: Sabit faz ve hareketli fazın bulunması. Karışımdaki bileşenler, sabit fazın üzerinden akış halindeki sıvı veya gaz fazı ile geçirilir ve bu sırada bileşenlerin sabit faz üzerindeki hareket hızlarına göre ayrışırlar (Skoog vd., 1999). Kromatografi, kullanılan sabit ve hareketli faz türlerine ve bu fazlar arasındaki madde aktarım dengelerine dayalı olarak temel olarak üç farklı kategoriye ayrılabilir. Genel olarak, sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süperkritik akışkanlı kromatografi olarak sınıflandırılır. Bu üç kromatografi türünde, hareketli fazlar sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır.

Sıvı kromatografi, kolonlarla ve düzlemde uygulanabilen tek kromatografi türüdür. Diğer iki kromatografi türü ise yalnızca kolonlar kullanılarak gerçekleştirilir (Skoog vd., 1998; Ozkan ve Uslu, 2002).



Şekil 1.4. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması (Skoog vd., 1999)

1.3.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bileşenlerin seçici bir şekilde ayrılmasını sağlayan bu kromatografi türü, katı bir fazın yüzeyinde gerçekleşen tersinir adsorpsiyon prensibine dayanır. Bu süreçte, hareketli bir faz (genellikle sıvı veya gaz) adsorban yüzeyi üzerinde hareket eder. Bileşenler, katı yüzeye farklı derecelerde ilgi gösterdikleri için ayrılma meydana gelir. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşenler, yüzeyde daha uzun süre kalırken, denge sabiti düşük olanlar daha hızlı hareket ederler. Hiç adsorplanmayan bileşen ise kolon boyunca geciktirilmeden hareketli fazla taşınarak dışarı çıkar (Yücel, 2010).

Yüzeyde adsorplanan bileşenler, yüzey ile olan etkileşimlerine bağlı olarak farklı süreler boyunca kolonda kalır ve sonunda sırayla elde edilirler. Genellikle silika ve alüminyum gibi maddeler, en sık kullanılan adsorbanlar arasındadır. Sabit faz olarak genellikle polar katılar tercih edilir, bu nedenle hareketli faz olarak apolar veya düşük polariteye sahip sıvılar kullanılır. Örneğin, benzen, oktan ve kloroform gibi sıvılar sıklıkla tercih edilir. Ayrılacak bileşenlerin sabit fazla olan etkileşimi, moleküldeki fonksiyonel grupların türü ve sayısına bağlıdır. Polar bileşenlerin birbirinden ayrılması için polar sabit fazlar kullanılırken, apolar bileşenlerin ayrılması için ise apolar sabit fazlar tercih edilir (Adataş, 2010; ChemBam).

1.3.2. Dağılma Kromatografisi

Partisyon kromatografisi, analitlerin hareketli faz ve sabit faz arasındaki dağılmasına bağlı olarak ayrılmasını sağlayan bir kromatografi türüdür. Bu metotla, numunenin bileşenleri, bu iki faz arasında dağılma derecesi, analitlerin kimyasal özellikleri ve sabit ve hareketli fazların özellikleri tarafından etkilenir. Normal faz ile ters faz kromatografisi olmak üzere, ikiye ayrılmaktadır. Normal faz kromatografisinde, sabit faz polar bir yapıya sahiptir ve sıklıkla analitlerle hidrojen bağları oluşturabilir veya dipol etkileşimlerine girebilecek bölgeler içerir. Hareketli faz ise zayıf polar veya polar olmayan bir yapıya sahiptir ve genellikle organik bir çözücüdür. Normal faz kromatografisi, özellikle polar bileşikleri tutmak ve ayırmak için uygundur, ancak polar olmayan bileşiklerin ayrılmasında da kullanılabilir. Ters faz kromatografisinde, apolar sabit faz kullanır ve genellikle oktil (C8) veya oktadekil (C18) grupları içerir. Bu metotta hareketli faz genellikle su gibi polar bir çözücüdür. Bu "ters" polarite düzenlemesi, özellikle klinik örneklerdeki ilaçları analiz etmek için uygundur ve bu nedenle en çok kullanılan kromatografi türlerindendir (Hage, 2019; Harris, 2015).

1.4. İlaç Etken Maddelerindeki Safsızlıklar

İlaçlar, insan veya hayvan hastalıklarını iyileştirme veya önleme amaçlı, fizyolojik işlevleri etkilemeye yarayan veya hastalık tanısına olanak veren doğal, sentetik veya yarı-sentetik maddelerdir. İlaçlar, etken madde ile yardımcı maddeleri içermektedir. İlaçlardaki safsızlıkların varlığı, sentez süreci, başlangıç malzemeleri, ara ürünler veya çevresel faktörler dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan kaynaklanabilir.

İlaçların sentezi, üretimi ve depolanması esnasındaki süreçlerde bu safsızlıkların izlenmesi ve belli limitler altında tutulması gerekir. ICH, ilaç maddelerindeki safsızlıkları kontrol etmek ve yönetmek için kılavuzlar oluşturmuştur.

Bugünün ilaç endüstrisinde, ICH kılavuzlarına göre ilaç etken maddelerindeki safsızlık grupları şu şekildedir:

- ICH Q3A(R2): Bu kılavuz, ilaç etken maddelerinin safsızlık içeriğini, niteliğini ve güvenliğini düzenler.
- ICH Q3B(R2): Yeni ilaç ürünlerinin safsızlık profillerinin kabul edilebilir limitlerini belirler.

- ICH Q3C(R4): Bu rehber, kalıntı çözücülerin safsızlıklarının kontrolünü ve kabul edilebilir sınırlarını tanımlar.
- ICH Q3D: Metal safsızlıkların izlenmesi ve limitlerinin belirlenmesi için rehberlik yapar.
- ICH M7: Potansiyel karsinojenik riskin sınırlandırılması için ilaçlarda DNA reaktif (mutajenik) safsızlıkların değerlendirilmesi ve kontrolünü ele alır (ICH Q3A(R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006).

ICH Q3 kılavuzlarına göre, ilaçlarda genellikle organik, inorganik ve kalıntı çözücü olmak üzere üç tür safsızlık bulunmaktadır. Organik safsızlıklar, sentezde meydana safsızlıklar, başlangıç maddeler, ara ürünler, bozunma ürünleri veya saflaştırma ve depolama sırasında meydana gelen safsızlıklardan oluşmaktadır (Prabu ve Suriyaprakash, 2010).

Q3A ve Q3B kılavuzları, tanımlama, raporlama ve kalifikasyon eşiklerine dayalı olarak safsızlık sınırlarını belirlemektedir (Pokar vd., 2010).

Çizelge 1.1. İlaç maddeleri için safsızlık eşik değerleri (ICH Q3A(R2), 2006)

Maksimum Günlük Alım Dozu (GAD)	**Raporlama Eşiği**	**Tanımlama Eşiği**	**Kalifikasyon Eşiği**
≤2 g/gün	%0.05	%0.10 veya 1.0 mg/gün (hangisi daha düşükse)	%0.15 veya 1,0 mg/gün (hangisi daha düşükse)
s > 2 g/gün	%0.03	%0.05	%0.05

Çizelge 1.2. İlaç ürünler için safsızlık eşik değerleri (ICH Q3B(R2), 2006)

Eşik değerler	**Maksimum Günlük Alım Dozu**	**Değer**
Raporlama Eşiği	≤1 g	0.1%
	>1 g	0.05%
Tanımlama Eşiği	<1 mg	%1,0 veya 5 µg GAD
	1–10 mg	%0.5 veya 20 µg GAD
	>10 mg–2 g	%0.2 veya 2 mg GAD
	>2 g	%0.10
Kalifikasyon Eşiği	<10 mg	%1.0 veya 50 µg GAD
	10–100 mg	%0.5 veya 200 µg GAD
	>100 mg–2 g	%0.2 veya 3 mg GAD
	>2 g	%0.15

1.5. İlaç Etken Maddelerin Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, geliştirilen bir analitik yöntemin amaçlanan işlemine uygun olup olmadığını göstermek için yapılan bir işlemdir. Tüm analitik uygulamalar için sonuçların kalitesini ve güvenilirliğini sağlamak için temel bir gerekliliktir. Bu yüzden her yöntem geliştirilme ve optimizasyonun sonunda bir validasyon çalışması yapılmalıdır (Ermer vd., 2005; Patriarca, 1998).

Bir analitik metodun validasyon çalışması için birçok validasyon parametresi ele alınıp, sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilmelidir. Çalışılan validasyon parametreleri şu şekildedir (ICH Q2(R2), 2022):

- Seçicilik
- Doğrusallık ve Aralık
- Doğruluk
- Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)
- Kesinlik
- Sağlamlık
- Çözelti Stabilitesi

1.5.1. Seçicilik

Seçicilik parametresi çalışması analiz edilen maddenin yanında numuneden gelen başka maddeler veya kör analizden gelen maddelerle girişim yapmadığını göstermek için yapılır. Tüm piklerin alıkonma zamanlarında kör çözeltisinden gelen bir pik dahil, herhangi başka bir pik gelmemelidir. Bundan dolayı validasyon çalışmalarına seçicilik parametresi ile başlamakta fayda vardır. Bunu yanı sıra analiz edilen madde piki spektral olarak saf olmalıdır (ICH Q2(R2), 2022).

1.5.2. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, bir analitik yöntemin çalışma aralığı içindeki konsantrasyonlarda nasıl yanıt verdiğini belirlemek için kullanılır. Doğrusallık derecesini değerlendirmek için korelasyon katsayısı, y-kesişim noktası, eğim (m), kesim noktası (n), korelasyon katsayısı (r) ve artık kareler toplamı (RSS) gibi istatistiksel parametreler kullanılır. Doğrusallık grafiği y=mx+n denklemi ile gösterilir.

Elde edilen sonuçlardan bir diğer validasyon parametresi olan çalışma aralığı da belirlenebilir. Çalışma aralığı, bir analitik yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar verebileceği belirli bir konsantrasyon veya değer aralığı ifade eder. Çalışma aralığı, en düşük ölçülebilir konsantrasyondan (alt sınır) en yüksek ölçülebilir konsantrasyona (üst sınır) kadar olan konsantrasyon aralığını içermektedir (Ermer vd., 2005; ICH Q2(R2), 2022).

1.5.3. Doğruluk

Doğruluk validasyon parametresi, analiz sonrası elde edilen değerler ile gerçek ya da gerçek kabul edilen değerler arasındaki yakınlığı göstermektir. Doğruluk ölçütü olarak geri kazanım kullanılır. Geri kazanım değeri ise, numune matrisine eklenen analitin ne ölçüde geri kazanılabildiğini göstermektedir (ICH Q2(R2), 2022).

1.5.4. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

Tayin alt sınır (TAS) bir numunenin uygun kesinlikte ölçülebilen en düşük numune konsantrasyonudur. TAS, miktarı bilinen analit miktarının sinyal/gürültü oranı yardımıyla hesaplanır. Analitin sinyal/gürültü oranının 10:1 olacak şekilde hazırlanmasıyla bulunur. Teşhis sınırı (TS) ise kesinlik parametresine bakmaksızın tespit edilen en düşük numune konsantrasyonudur. TS, miktarı bilinen analit miktarının sinyal/gürültü oranı yardımıyla hesaplanır. Analitin sinyal/gürültü oranının 3:1 olacak şekilde hazırlanmasıyla bulunur.

1.5.5. Kesinlik

Kesinlik, bir dizi analit sonuçların birbirine olan yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlik çalışması, yöntem kesinliği ve tekrar üretilebilirlik olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır.

1.5.5.1. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliği, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesini ifade eder. Aynı koşullar altında yapılan tekrarlı ölçümlerde elde edilen sonuçların birbirine ne kadar yakın olduğunu ve gerçek değere ne kadar yaklaştığını değerlendirir.

1.5.5.2. Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvarlar Arası)

Tekrar üretilebilirlik farklı laboratuvarda, farklı analizci, farklı cihaz ve farklı kolon ile yapılan kesinlik çalışmasına denir.

1.5.6. Sağlamlık

Sağlamlık, analitik yöntemin çeşitli değişkenlere ve dış etmenlere karşı ne kadar dirençli olduğunu belirlemeyi amaçlar. Bu validasyon parametresi çalışmasında analitik yöntemin belirli parametreler değiştirilip, analitik yöntemin bu değişimlere ne kadar cevap verdiği belirlenir. Kolon akış hızı ve sıcaklığı, hareketli faz kompozisyonu, hareketli faz pH'sı gibi parametreler değiştirilmektedir.

1.5.7. Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesi validasyon parametresi çalışması bir maddenin kullanılan analiz metodu ne kadar süreyle kararlılık gösterdiğini belirlemeyi amaçlamaktadır. Bunun için madde belirli aralıklarla belirli bir süre enjekte edilir ve başlangıç enjeksiyon ile arasındaki fark kaydedilir (Ermer vd., 2005; Patriarca, 1998).

1.6. Amaç

Bu tez kapsamında, trombosit sayıların geçici veya kalıcı olarak düşmesi sonucu meydana gelen kanamalarına neden olan immun trombositopenik purpura hastalığın tedavisinde kullanılan Eltrombopag ve kemik iliğinde kolajen sentezin artışından dolayı bir yara dokusunun meydana gelmesine neden primer miyelofibroz hastlığın tedavisinde kullanılan Ruxolitinib maddeleri seçilmiştir. Eltrombopag ve Ruxolitinib ilaç etken maddeleri için spektroskopik yöntemler ile karakterizasyonu ve kromatografik yöntemler ile miktar tayini, ilgili bileşikler ve kiral safsızlık metotları geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmaktır. Ayrıca Eltrombopag ilaç etken maddesinin bozundurma çalışmaları yapılarak stabilite göstergeli olduklarını kanıtlanması amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve çözücüler **Çizelge 2.1.**'de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	**Firma**
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Asetonitril	J.T Baker
Tetrahidrofuran	SRL
o-Fosforik asit (%85)	Merck
Potasyum hidroksit	Merck
Hidroklorik asit (%37)	J.T Baker
Sodyum hidroksit	Merck
Metanol	J.T Baker
n-Hekzan	Iso-Lab
Etanol	Merck
Dietilamin	Acros
İzopropil alkol	Merck
Sülfürik asit	J.T Baker
Dimetilsülfoksit	Scharlau
Dimetilformamid	Scharlau
Formik asit	Merck
Hidrojen peroksit	J.T Baker

2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Araçlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve araçlar **Çizelge 2.2.** ve **Çizelge 2.3.**'te yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Hassas terazi	Sartorius ME 235S
pH-metre	Mettler Toledo
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
YPSK	Shimadzu LC-2030C Plus
UYPSK	Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS PDA Dedektör
Kütle spektrometresi	Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS QDa Dedektör
Saf su cihazı	Milli Q-Millipone
Ultrasonik su banyosu	Elma-transsonic digital
Karl Fischer	Mettler Toledo V30
Kül Fırını	
UV ve VIS Kabini	

Çizelge 2.3. Tez çalışmasında kullanılan araç ve gereçler

Araç ve Gereçler
Çeşitli hacimli otomatik pipetler (Eppendorf®,Türkiye)
Çeşitli hacimli cam pipetler
Farklı hacimlerde balon jojeler (kapaklı), cam beherler, çözelti saklama cam şişeleri
Vial
Mezür
YPSK ve UYPSK kolonları
Pipet puarları
Pastör pipeti
Diğer sarf malzemeler

2.1.3. Kullanılan Kolonlar

Analitik metotların geliştirilmesinde araştırılan kolonlar **Çizelge 2.4.**'te yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Araştırılan kolonlar

Kolon Türü	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Firma
Zorbax SB-Phenyl	150	4,6	3,5	Agilent
Chiralpak AD-H	250	4,6	5	Daicel
Chiralpak OD-H	250	4,6	5	Daicel
XBridge C18	150	4,6	3,5	Waters
XBridge C18	250	4,6	5	Waters
XBridge C8	150	4,6	3,5	Waters

2.1.4. Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri

Tez kapsamında kullanılan Eltrombopag ve Ruxolitinib ilaç etken maddeleri, standartları ve bunların safsızlık standartların bir kısmı DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı sentez laboratuvarında sentezlenmiştir. Diğer bir kısmı ise tedarikçi firmalardan temin edilmiştir.

Tüm maddeler DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı analitik laboratuvarında standardize edilmiştir.

2.1.5. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.1.5.1. Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.1.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz seyreltik o-fosforik asit (o-H_3PO_4) ile pH=3,20'ye ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz 0,1 N potasyum hidroksit (KOH) ile pH=6,80'e ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-1*

%100 asetonitril kullanılmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Hazırlanan tampondan 200 mL alınmıştır ve 1000,0 mL'ye asetonitril ile tamamlanmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz 0,1 N potasyum hidroksit (KOH) ile pH=6,80'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampondan 200 mL alınmıştır ve 1000,0 mL'ye asetonitril ile tamamlanmıştır.

2.1.5.1.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

Çözücü olarak hareketli faz A çözeltisi-1 ve asetonitril karışımı (30:70, h/h) kullanılmıştır.

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacime sahip balon jojeye tartılmıştır, az miktarda kendi çözücüsü ile ultrasonik su banyosunda çözünmüştür ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. ($C_{Eltrombopag}$=0,5 mg/mL)

2.1.5.1.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacime sahip balon jojeye tartılmıştır ve kendi çözücüsünde çözünmüştür. Hazırlanan safsızlıkları içeren stok çözeltisinden 0,5 mL bu çözeltiye eklenip, balon jojenin hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.1.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1,0 mL numune çözeltisi 100,0 mL hacime sahip balon jojede hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır. Bu balon jojeden 1,0 mL alınmıştır ve 10,0 mL hacime sahip balon jojede tamamlanmıştır. ($C_{Eltrombopag}$=0,5 µg/mL)

2.1.5.1.5. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Sistem uygun çözeltisi olarak standart çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.5.1.6. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

İlgili maddeler validasyonunda kullanılan safsızlıkların limitleri ICH Q3A(R2) kılavuzuna göre belirlenmiştir. Bilinen safsızlıkların limitleri %0,15, bilinmeyen tüm safsızlıkların limitleri %0,10'dur. Safsızlıkların derişimleri ilaç etken madde derişimlere göre ayarlanmıştır. Tüm safsızlık çözelti hazırlanmaları aynıdır.

Her bir safsızlık standardından 15,0 mg tartılmıştır ve 20,0 mL hacime sahip balon jojede çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 1,0 mL alınmıştır ve 10,0 mL hacime sahip balon jojelere aktarılmış. Balon jojeler hacimlerine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.1.7. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Safsızlık stok standartlarından 0,1 mL alınmıştır ve 10,0 mL hacimli balon jojelere kendi çözücüleri ile seyreltilip, hacimlerine tamamlanmıştır.

2.1.5.1.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanan safsızlıkların stok standart çözeltilerin ilk stoğundan (15,0 mg/20 mL) her birinden 1,0 mL alınıp 10,0 mL hacimli balon jojede çözücü ile seyreltilmiş ve hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.1.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Spesifikasyon limit derişimindeki safsızlık stok karışım çözeltisinden 0,1 mL alınmıştır ve 10,0 mL hacimli balon jojede kendi çözücüsü ile seyreltilmiş ve balon jojenin hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.2. Eltrombopag Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.2.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz 0,1 N potasyum hidroksit (KOH) ile pH=6,80'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampondan 800 mL alınmıştır ve 1000,0 mL'ye asetonitril ile tamamlanmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-1*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz 0,1 N potasyum hidroksit (KOH) ile pH=6,80'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampondan 200 mL alınmıştır ve 1000,0 mL'ye asetonitril ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

Çözücü olarak tampon çözeltisi, tetrahidrofuran ve asetonitril karışımı (1:1:2, h/h/h) kullanılmıştır. 1,36 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünmüştür. Çözünme sonrasında hareketli faz 0,1 N potasyum hidroksit (KOH) ile pH=6,80'e ayarlanmıştır. Bu hazırlanan tampon çözeltisi, tetrahidrofuran ve asetonitril ile karıştırılmıştır (1:1:2, h/h/h).

50,0 mg Eltrombopag örneği 100,0 mL hacimli balon jojeyde tartılmıştır, 20,0 mL kendi çözücüsünde ultrasonik su banyosunda çözünmüştür ve balon joje hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 5,0 mL alınmıştır ve 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, balon joje hacmine kendi çözücü ile tamamlanmıştır. ($C_{Eltrombopag}$=0,05 mg/mL)

2.1.5.2.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

50,0 mg Eltrombopag örneği 100,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır ve kendi çözücüsünde çözünmüştür. Hazırlanan çözeltiden 2,0 mL alınp, 20,0 mL hacime sahip bir balon joje içine aktarılır. Bu çözeltiye daha önce hazırlanan safsızlıkların stok çözeltisinden 4,0 mL eklenip, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.4. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

50,0 mg Eltrombopag standardı 100,0 mL'lik hacime sahip bir balon jojenin içine tartılmıştır, çözücü ile çözünmüştür ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 5,0 mL alınıp, 50,0 mL'ye tamamlanmıştır. ($C_{Eltrombopag}$=0,05 mg/mL)

2.1.5.2.5. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Sistem uygun çözeltisi olarak standart çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.5.2.6. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Eltro-1 standardından 10,0 mg, 10,0 mL'hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır ve çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır.

Eltro-2 standardından 10,0 mg, 10,0 mL hacimli balon jojeye tartılmıştır, çözücüsünde çözünüp, hacmine su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.7. Eltro-1 ve Eltro-2 Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Daha önce hazırlanan safsızlıkların stok standartlarından 1,0 mL alınmıştır ve 20,0 mL hacime sahip balon jojelere çözücü ile seyreltilip, hacimlerine tamamlanmıştır.

2.1.5.2.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması

50,0 mg Eltrombopag 100,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır ve çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 2,0 mL alınıp, 20,0 mL hacimli balon jojeye aktarılmıştır. Bu çözeltinin üzerine 1,0'er mL Eltro-1 ve Eltro-2 stok çözeltiler ilave edildi ve son hacmine çözücü ile tamamlandı.

2.1.5.2.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Spesifikasyon limit derişimindeki safsızlıkların stok çözeltilerin her birinden 1,0 mL alınıp 20,0 mL hacimli balon jojede çözücü ile seyreltilmiş ve son hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.3.Eltrombopag Stres Testi Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler ve Numuneler

2.1.5.3.1. Asit Çözeltisi Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Asit Çözeltisi – 1*

0,1 N HCl asit çözeltisi hazırlamak için 0,66 mL %37'lik HCl, 25 mL saf su içeren 100,0 mL'lik balon jojeye eklenmiştir ve hacmine saf su ile tamamlanmıştır.

- *Asit Çözeltisi - 2*

0,5 N HCl asit çözeltisi hazırlamak için 3,3 mL %37'lik HCl, 25 mL saf su içeren 100,0 mL hacimli balon jojeye eklenip, son hacime su ile tamamlanmıştır.

- *Asit Çözeltisi - 3*

1 N HCl asit çözeltisi hazırlamak için 6,6 mL %37'lik HCl, 25 mL saf su içeren 100,0 mL hacimli balon jojeye eklenmiştir ve son hacime saf su ile tamamlanmıştır.

- *Asit Çözeltisi - 4*

5 N HCl asit çözeltisi hazırlamak için 33,1 mL %37'lik HCl, 25 mL saf su içeren 100,0 mL hacimli balon jojeye eklenmiştir ve son hacime saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.2. Baz Çözeltisi Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Baz Çözeltisi – 1*

0,1 N NaOH baz çözeltisi hazırlamak için 0,4 g NaOH 100,0 mL'lik balon jojeye tartılıp, saf su ile çözülmüştür ve hacmine saf su ile tamamlanmıştır.

- *Baz Çözeltisi – 2*

0,5 N NaOH baz çözeltisi hazırlamak için 2,0 g NaOH 100,0 mL'lik balon jojeye tartılıp, saf su ile çözülmüştür ve hacmine saf su ile tamamlanmıştır.

- *Baz Çözeltisi – 3*

1 N NaOH baz çözeltisi hazırlamak için 4,0 g NaOH 100,0 mL'lik balon jojeye tartılıp, saf su ile çözülmüştür ve hacmine saf su ile tamamlanmıştır.

- *Baz Çözeltisi – 4*

5 N NaOH baz çözeltisi hazırlamak için 20,0 g NaOH 100,0 mL'lik balon jojeye tartılıp, saf su ile çözülmüştür ve hacmine saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.3. Oksitleyici Ajan Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Oksitleyici Ajan Çözeltisi – 1*

%5'lik H_2O_2 çözeltisi hazırlamak için 16,7 mL %30'luk H_2O_2 çözeltisi 100,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, saf su ile çözülmüştür ve saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

- *Oksitleyici Ajan Çözeltisi – 2*

%10'luk H_2O_2 çözeltisi hazırlamak için 33,3 mL %30'luk H_2O_2 çözeltisi 100,0 mL balon jojeye aktarılıp, saf su ile çözülmüştür ve saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

- *Oksitleyici Ajan Çözeltisi – 3*

%20'lik H_2O_2 çözeltisi hazırlamak için 66,7 mL %30'luk H_2O_2 çözeltisi 100,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, saf su ile çözülmüştür ve saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

- *Oksitleyici Ajan Çözeltisi – 4*

%30'luk H_2O_2 çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.5.3.4. İşlem Görmemiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Örneği*

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacimli balon jojenin içinde tartılıp, çözücü ile çözülmüştür ve son hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Örneği*

50,0 mg Eltrombopag örneği 100,0 mL hacimli bir balon jojeye tartılıp kendi çözücüsü ile çözülmüştür ve son hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 5,0 mL alınıp 50,0 mL hacime sahip balon jojeye aktarılmıştır ve son hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.5. Asit ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Örneği*

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılıp, üzerine 2,5 mL 1N HCl ilave edilmiştir ve bir saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bozundurmadan sonra 2,5mL 1N NaOH ilave edilip, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Örneği*

5,0 mL ilgili maddeler örneği 50,0 mL hacimli bir balon jojeye aktarılmıştır ve son hacmine miktar tayini çözücüsü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.6. Baz ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Örneği*

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılıp, üzerine 2,5 mL 1 N NaOH ilave edilmiştir ve bir saat süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bozundurma sonrası 2,5 mL 1 N HCl eklenmiştir ve son hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Örneği*

5,0 mL ilgili maddeler örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, son hacmine miktar tayini için kullanılan çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.7. Oksitleyici Ajan ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Örneği*

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacimli balon jojeye tartılıp, 2,5 mL %5'lik H_2O_2 ilave edilip, bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bozundurma sonrası hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Örneği*

5,0 mL ilgili maddeler örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, hacmine miktar tayini çözücüsü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.8. Su ve Isı ile Bozundurulmuş Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Örneği*

25,0 mg Eltrombopag örneği 50,0 mL hacimli balon jojeye tartılmıştır. Üzerine 2,5 mL su eklenip, bir saat boyunca 60 ºC'de ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Örneği*

5,0 mL ilgili maddeler örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye aktarılıp, hacmine miktar tayini çözücüsü ile tamamlanmıştır.

Her çalışma için yukarıda verilen numune hazırlama prosedürlerine göre ilaç etken maddesiz kör çözeltisi hazırlandı.

2.1.5.3.9. Standart Çözeltisi Hazırlığı

- *İlgili Maddeler Standart Çözeltisi*

1,0 mL işlem görmemiş numune çözeltisi 100,0 mL hacimli balon jojeye alınıp, hacmine ilgili maddeler çözücüsü ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 1,0 mL alınmıştır ve 10,0 mL'ye kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır.

- *Miktar Tayini Standart Çözeltisi*

50,0 mg Eltrombopag standardı 100,0 mL hacimli balon jojeye tartılıp, çözücüde çözülmüştür ve son hacmine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 5,0 mL alınmıştır ve 50,0 mL hacime sahip balon jojeye aktarılmıştır. Çözelti son hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.4.Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.4.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

1000 mL saf suya 1 mL o-H_3PO_4 eklenir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünür. Çözünme sonrasında hareketli faz seyreltik fosforik asit (o-H_3PO_4) ile pH=3,2'ye ayarlanmıştır

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) tuzu, 1000,0 mL saf suda çözünmüştür.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi*

Tüm yöntem geliştirme çalışmalarında hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır.

2.1.5.4.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

Eltro-1 ilgili maddeler yönteminde asetonitril:hareketli faz A (25:75, h/h) karışımı çözücü olarak kullanılmıştır.

50,0 mg Eltro-1 örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır, 12,5 mL asetonitril eklenip ve hacmine hareketli faz A ile tamamlanmıştır. ($C_{Eltro\text{-}1}$ =1.0 mg/mL).

2.1.5.4.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

50,0 mg Eltro-1 numune 50,0 mL hacime sahip balon jojeye tartılmıştır, 12,5 mL asetonitril eklendi ve bu çözeltiye Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J stok çözeltilerinden 1,5'er mL, Eltro-1K stok çözeltisinden 2,5 mL eklenip hacmine hareketli faz A ile tamamlanmıştır.

2.1.5.4.4. Stok Standart Çözeltisinin Hazırlanması

50,0 mg Eltro-1 standardı 50,0 mL hacimli balon jojeye tartılıp, 12,5 mL asetonitril eklenmiştir ve hacmine hareketli faz A ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 1,0 mL çözücüde 100,0 mL'lik hacime seyreltilmiştir

2.1.5.4.5. Standart Çözeltisinin Hazırlanması

1,0 mL daha öncededen hazırlanan stok standart alınmıştır ve 10,0 mL'lik hacime kendi çözücüsü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.4.6. Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

10,0 mg Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J 10,0 mL hacime sahip balon jojelere ayrı tartılmıştır, asetonitril ile çözülmüş ve hacmine asetonitril ile tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden 0,5'er mL alınmıştır ve 10,0 mL'lik hacimlere asetonitril ile seyreltilmiştir. 2,0 mg Eltro-1K 10,0 mL hacimli balon jojeye tartılmıştır, asetonitrilde çözülmüştür. Balon jojenin hacmine asetonitril ile tamamlanmıştır.

2.1.5.4.7. Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

10,0 mL'lik balon jojelere, Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J stok çözeltilerinden 0,3'er mL eklendi ve çözücü ile her biri hacmine tamamlandı. Eltro-1K safsızlık stok çözeltisinden 0,5 mL 10,0 mL hacimli balon jojeye eklenip, kendi çözücüsü ile hacmine tamamlanmıştır

2.1.5.4.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık (Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J) Stok Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

10,0 mg Eltro- Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J 10,0 mL'lik balon jojeye ayrı tartılmıştır, 2,5 mL asetonitril ile çözüldü ve hacmine hareketli faz A ile tamamlanmıştır. Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J çözeltilerinden 0,5'er mL, 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi.

2.1.5.4.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

10,0 mL'lik balon jojeye spesifikasyon limit derişiminde safsızlık stok karışım çözeltisinden 0,3 mL alındı, Eltro-1K stok çözeltisinden ise 0,5 mL alınmıştır ve Eltro-1K çözücüsü ile son hacime seyreltilmiştir.

2.1.5.5.Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.5.1. Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

  1000,0 mL %100 n-hekzan kullanılmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-1*

  1000,0 mL etanol üzerine 1,0 mL dietilamin eklenmiştir.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-2*

  1000,0 mL %100 etanol kullanılmıştır.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi-3*

1000,0 mL%100 metanol kullanılmıştır.

2.1.5.5.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

Çözücü olarak %100 metanol kullanılmıştır.

100,0 mg Ruxolitinib örneği 50,0 mL hacime sahip balon jojeye tartılmıp, 40,0 mL kendi çözücüsü eklenip, ultrasonik su banyosunda çözülmüştür. Balon joje hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. ($C_{Ruxolitinib}$=2,0 mg/mL)

2.1.5.5.3. Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlığı

100,0 mg Ruxolitinib örneği 50,0 mL hacimli balon jojeye tartılmıştır ve az miktarda metanol ile ultrasonik su banyosunda çözülmüştür. Üzerine safsızlık stok karışım çözeltisinden 1,5 mL eklenip, hacmine metanol ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.4. Ruxolitinib Stok Standart Çözeltinin Hazırlanması

100,0 mg Ruxolitinib standardı 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır ve az miktarda metanol ile ultrasonik su banyosunda çözünüp, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.5. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

0,75 mL Ruxolitinib numune çözeltisinden 10,0 mL hacimli balon jojeye eklenmiştir ve son hacmine kendi çözücüsü ile son hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 1,0 mL alınmıştır ve 50,0 mL hacime sahip balon jojede son hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.5.6. (S)-Ruxolitinib stok standart çözeltisinin hazırlanması

30,0 mg (S)-Ruxolitinib'e eşdeğer (rac)-ruxolitinib hemifumarat referans standardı, yani 75,0 mg, 20,0 mL hacimli balon jojeye tartılmıştır ve son hacmine kendi çözücüsü ile

tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1,0 mL, 10,0 mL hacime sahip balon jojeye alınıp, son hacmine seyreltilmiştir.

2.1.5.5.7. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

100,0 mg Ruxolitinib örneği 50,0 mL hacime sahipr bir balon jojeye tartılmıştır ve 20,0 mL çözücüde çözülmüştür. Bu çözeltiye 5,0 mL (S)-Ruxolitinib stok çözeltisinden ekleyip, hacmine su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.8. Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve Trifenilfosfin oksit (TPPO) Safsızlıkların Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

İlgili maddeler validasyonunda kullanılan safsızlıkların limitleri ICH Q3A(R2) kılavuzuna göre belirlenmiştir. Bilinen safsızlıkların limitleri %0,15, bilinmeyen tüm safsızlıkların limitleri %0,10'dur. Safsızlıkların derişimleri ilaç etken madde derişimlere göre ayarlanmıştır. Tüm safsızlık çözelti hazırlıkları aynıdır.

Her bir safsızlık standardından 5,0 mg, 20,0 mL hacime sahip bir balon jojede tartılmıştır ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 3,0 mL alınıp, 20,0 mL hacimli başka bir balon jojede hacmine seyreltilmiştir.

2.1.5.5.9. Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Safsızlık stok standartlarından 4,0 mL alınıp 50,0 mL hacime sahip balon jojelere eklenmiştir ve kendi çözücüleri ile hacimlerine tamamlanmıştır.

2.1.5.5.10. (S)-Ruxolitinib, Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Safsızlık stok standartlarından 4,0 mL ve 1,0 mL (S)-Ruxolitinib stok çözeltisinden alınmıştır ve 50,0 mL hacimli balon jojeye eklenmiştir. Balon jojenin son hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.11. (S)-Ruxolitinib, Ruxolitinib, Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-AMIDE, Ruxo-2, Ruxo-INT ve TPPO Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Safsızlık stok standartlarından 4,0 mL, (S)-Ruxolitinib stok çözeltisinden 1,0 mL ve 1,0 mL ruxolitinib stok çözeltisinden alınıp, 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye eklenmiştir ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.12. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanan safsızlıkların stok standart çözeltilerinden 4,0'er mL alınıp 50,0 mL'lik balon jojede çözücü ile seyreltilmiş ve hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.5.13. Spesifikasyon Limit Derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması

100,0 mg Ruxolitinib örneği 50,0 mL hacime sahip bir balon jojeye tartılmıştır ve 40,0 mL çözücüde ultrasonik su banyosunda çözülmüştür. Bu çözeltiye 1,0 mL (S)-Ruxolitinib stok standart çözeltisinden eklenmiştir ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.5.14. Spesifikasyon Limit Derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş Standart Çözeltisinin Hazırlanması

0,75 mL (S)-Ruxolitinib eklenmiş numune çözeltisinden 10,0 mL hacime sahip bir balon jojeye eklenmiştir ve son hacmine kendi çözücüsü ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 1,0 mL alınmıştır ve 50,0 mL hacimli balon jojede son hacmine seyreltilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. YPSK ile Yapılan Yöntemler

Eltrombopag miktar tayini yöntemi, ilgili maddeler yöntemi, Eltrombopag strest testi yöntemi, Eltro-1 ilgili maddeler yöntemi ve Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi YPSK'da geliştirilmiştir.

2.2.1.1.Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntemi

Eltrombopag ilgili maddeler yöntemi Shimadzu LC-2030C Plus cihazında geliştirilmiştir. Sabit faz olarak Agilent Zorbax SB-Phenyl kolonu (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk, örnekleyici bölümü sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 20°C, dalga boyu 250 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak seçilmiştir. Hareketli faz A olarak 10mM KH_2PO_4 (pH=3,20), hareketli faz B olarak ise 10mM KH_2PO_4 (pH=6,80):asetonitril (20:80, h/h) kullanılmıştır. Elüsyon programı olarak gradient program seçilip, gradient program şu şekildedir: 0-3 dk., %30-30 B; 3-12 dk., %30-70 B; 12-20 dk., %70-75 B; 20-25 dk., %75-90 B; 25-28 dk, %90-90 B; 28-29 dk, %90-30 B; 29-35 dk, %30-30 B.

2.2.1.2.Eltrombopag Miktar Tayini Yöntemi

Eltrombopag miktar tayini yöntemi Shimadzu LC-2030C Plus cihazında geliştirilmiştir. Sabit faz olarak Waters XBridge C18 kolonu (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1,2 mL/dk, örnekleyici bölümü sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 20°C, dalga boyu 250 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak seçilmiştir. Hareketli faz A olarak 10mM KH_2PO_4 (pH=6,80):asetonitril (80:20, h/h), hareketli faz B olarak ise 10mM KH_2PO_4 (pH=6,80):asetonitril (20:80, h/h) kullanılmıştır. Elüsyon programı olarak gradient program

seçilip, gradient program şu şekildedir: 0-6 dk., %0-100 B; 6-12 dk., %100-100 B; 12-15 dk., %100-0 B; 15-20 dk., %0-0 B.

2.2.1.3.Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntemi

Eltro-1 ilgili maddeler yöntemi Shimadzu LC-2030C Plus cihazında geliştirilmiştir. Sabit faz olarak Waters XBridge C18 kolonu (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk, örnekleyici bölümü sıcaklığı 15°C, kolon sıcaklığı 40°C, dalga boyu 220 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak seçilmiştir. Hareketli faz A olarak %0,1 o-H_3PO_4, hareketli faz B olarak ise %100 asetonitril kullanılmıştır. Elüsyon programı olarak gradient program seçilip, gradient program şu şekildedir: 0-35 dk., %0-70 B; 35-36 dk., %70-0 B; 36-40 dk., %0-0 B.

2.2.1.4.Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntemi

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi Shimadzu LC-2030C Plus cihazında geliştirilmiştir. Sabit faz olarak Chiralpak AD-H kolonu (250 x 4,6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk, örnekleyici bölümü sıcaklığı 15°C, kolon sıcaklığı 30°C, dalga boyu 254 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak seçilmiştir. Hareketli faz A olarak %100 n-hekzan, hareketli faz B olarak ise 1000 mL etanol +1,0 mL dietilamin kullanılmıştır. Elüsyon programı olarak izokratik program seçilmiştir. Analiz süresi 42 dk olup, %75 hareketli faz A : %25 hareketli faz B olarak yürütülmüştür.

2.2.2. Kütle Spektrometrisi

Tez çalışmasında kullanılan Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS Core sistemi kütle spektrometresi ile, ilaç etken maddeleri ve safsızlıklarının tespiti için ACQUITY PDA (fotodiyot dizisi) ve QDa (kuadrupol Dalton) dedektörleri birleştirilmiştir.

2.2.2.1.Eltrombopag Kütle Spektrometrisi Yöntemi

Eltrombopag için, 100-1000 Da aralığında 0,5 mL/dk akış hızında, 10,0 µL enjeksiyon hacminde bir gradient akış kullanılmıştır. Hareketli faz A olarak %0,1 formik asit ve hareketli faz B olarak da asetonitril kullanılmıştır. Örnekleyici ve kolonun sıcaklığı 20 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon olarak Agilent Zorbax SB-Phenyl (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılmıştır.

Gradient programı ise şöyledir: 0–30 dk, %20-80 B; 30–35 dk., %80–80 B; 35–37 dk., %80–20 B ve 37–45 dk., %20-20 B.

2.2.2.2.Eltro-1 Kütle Spektrometrisi Yöntemi

Eltro-1 safsızlıklar için, 100-1000 Da aralığında 0,5 mL/dk akış hızında, 10,0 µL enjeksiyon hacminde bir gradient akış kullanılmıştır. Hareketli faz A olarak %0,1 formik asit ve hareketli faz B olarak da asetonitril kullanılmıştır. Örnekleyici ve kolonun sıcaklığı 20 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon olarak Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kullanılmıştır. Gradient programı ise şöyledir: 0–8 dk, %30-70 B; 8–12 dk., %70–70 B; 12–13 dk., %70–30 B ve 13–15 dk., %30-30 B.

2.2.2.3.Ruxolitinib Kütle Spektrometrisi Yöntemi

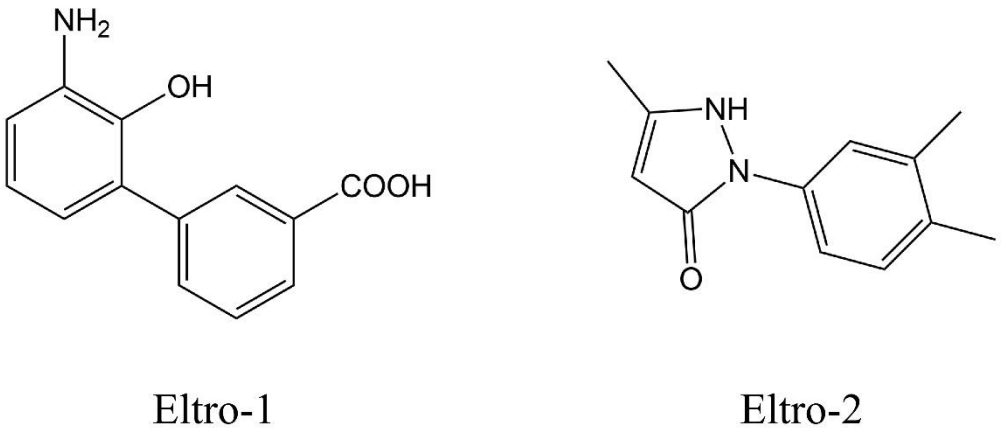
Ruxolitinib için, 100-1000 Da aralığında 0,3 mL/dk akış hızında, 10,0 µL enjeksiyon hacminde bir gradiyent akış kullanılmıştır. Hareketli faz A olarak %0,1 formik asit ve hareketli faz B olarak da asetonitril kullanılmıştır. Örnekleyici ve kolonun sıcaklığı sırasıyla 30 °C ve 15 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon olarak Waters Acquity BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) kullanılmıştır. Gradient programı ise şöyledir: 0–1 dk, %30-30 B; 1–8 dk., %30–50 B; 8–13 dk., %50–50 B, 13–14 dk., %50-30 B ve 14–18 dk., %30-30 B.

3. BULGULAR

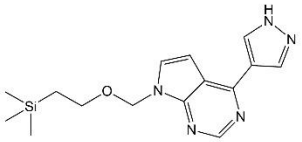
3.1. İlaç Etken Maddelerinin Safsızlık Profilinin Belirlenmesi

Eltrombopag ve Ruxolitinib ilaç etken maddelerinin sentezi ve analitik yöntemlerinin geliştirilmesi öncesinde safsızlık profillerinin belirlenmesi gerekmektedir. DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı sentez laboratuvarı tarafından tasarlanan sentez adımları temel alınarak potansiyel safsızlıklar belirlenmiştir. Bu safsızlıklar DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı sentez laboratuvarında sentezlenmiştir.

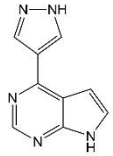
Eltrombopag, Eltro-1 ve Ruxolitinib maddeleri ile bunların potansiyel safsızlıkları için kütle spektrometrisi çalışmaları gerçekleştirilip elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri kullanılarak bileşenler teyit edildikten sonra diğer spektroskopik yöntemler de kullanılarak, literatürdeki bilgilerle karşılaştırılarak yapılar doğrulanmıştır. Daha sonra, ilaç etken maddeleri ile bilinen tüm safsızlıklar, DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı analitik laboratuvarında standardizasyonları ve maddelerin saflık yüzdesi veya diğer adı ile potensleri belirlenmiştir.



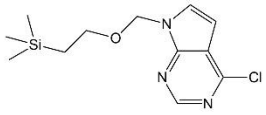
Şekil 3.1. Eltromobopag için tanımlanan safsızlıklar



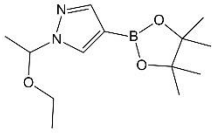
Ruxo-1



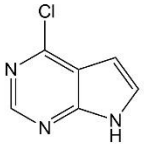
Ruxo-1A



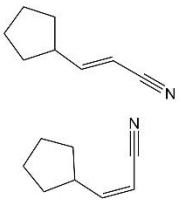
Ruxo-1B



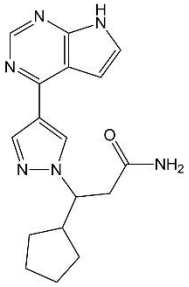
Ruxo-1C



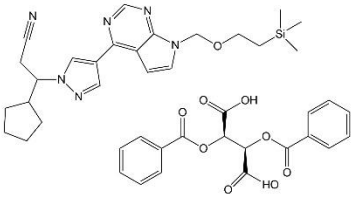
Ruxo-1D



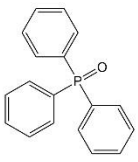
Ruxo-2



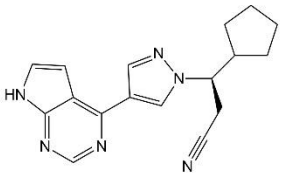
Ruxo-AMIDE



Ruxo-INT

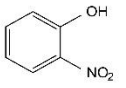


TPPO

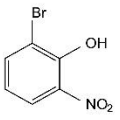


(S)-Ruxolitinib

Şekil 3.2. Ruxolitinib için tanımlanan safsızlıklar



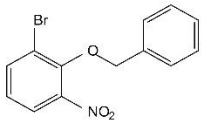
Eltro-1 IMP-A



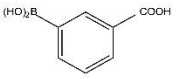
Eltro-1 IMP-B



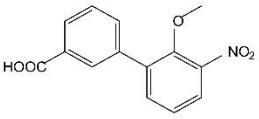
Eltro-1 IMP-C



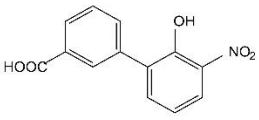
Eltro-1 IMP-D



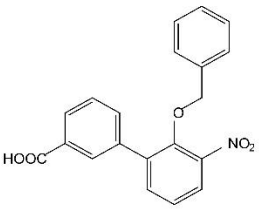
Eltro-1 IMP-E



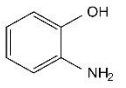
Eltro-1 IMP-F



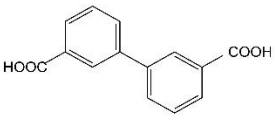
Eltro-1 IMP-G



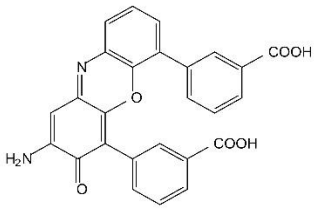
Eltro-1 IMP-H



Eltro-1 IMP-I



Eltro-1 IMP-J



Eltro-1 IMP-K

Şekil 3.3. Eltro-1 için tanımlanan safsızlıklar

3.2. İlaç Etken Maddelerin ve Safsızlıklarının Spektroskopik İncelenmesi

İlaç etken maddeler ve bunların safsızlıkları spektroskopik yöntemler ile, standardizasyon işlemleri esnasında tanınmıştır. Tez kapsamında kullanılan spektroskopik yöntem kütle spektroskopisi yöntemidir.

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon

Bu tez çalışması kapsamında Eltrombopag, Eltro-1 ve Ruxolitinib için toplamda beş farklı yöntem geliştirilmiştir ve optimize edilmiştir. Eltrombopag için miktar tayini ve ilgili maddeler yöntemi, Eltro-1 için ilgili maddeler yöntemi, Eltrombopag bozundurma çalışması yöntemi ve Ruxolitinib için ise kiral safsızlık tayini yöntemi geliştirilmiştir.

3.3.1. Tüm Yöntemler İçin Genel Özellikler

Yöntemler YPSK cihazlarında geliştirilmiştir. Bir tane yöntem haricinde çalışmalar ters faz kromatografisiyle gerçekleştirilmiştir. Ters faz kromatografisinde hareketli faz sabit fazdan daha polar, normal faz kromatografisinde ise sabit faz, hareketli fazdan daha polardır.

Yöntem geliştirme çalışmaları hem ilaç etken maddenin hem de safsızlıklar için uygun bir çözücü seçimi ile başlamaktadır. Çözücü maddeleri çözmesiyle kalmayıp, aynı zamanda hareketli faza uyum göstermelidir. Seçilen çözücü maddeler için iyi absorpsiyon göstermesi gerekir ve piklerin alıkonma zamanlarında girişim yapmamalıdır.

En uygun çalışma derişiminin seçilmesi, analizin doğruluğu ve güvenilirliği açısından önemli bir rol oynamaktadır. Kullanılan YPSK cihazının algılama sınırları, analizin hassasiyetini belirleyen temel faktörlerden biridir. YPSK cihazları, analiz edilen maddenin soğurma (absorbans) miktarını ölçmektedir. Elde edilen sonuç, yani cihazın dedektör yanıtı, analiz edilen numunenin derişimine bağlıdır. Sonuçlar, değişen derişimlerle doğrusal bir ilişki göstermesi gerekmektedir. Eğer yüksek derişimlerde çalışılırsa, cihazın algılama sınırının üzerinde analizler yapılırsa, soğurma şiddeti ile derişim arasındaki doğrusallıktan sapma meydana gelebilir. Bu durumda analiz sonuçları yanıltıcı olabilir.

Çözelti derişimi belirleme çalışması yapılırken, hem ilaç etken maddenin raporlama limit derişiminde (%0,05) sinyal/gürültü oranına bakılır, hem de ICH tarafından belirlenen safsızlık limitlerine göre safsızlık karışımı hazırlanır. Bu çalışmalarına sonuçlarına bakarak en uygun çözelti derişimi seçilmektedir.

Bunları yanı sıra yöntem geliştirmesi ve optimizasyonunda önemli bir parametre de çalışma dalga boyudur. Uygun dalga boyu seçimi için UV spektroskopisinde 190–400 nm aralığında, yani UV-GB bölgesinde bir dalga boyu taraması yapılır. Bu sonuçlara göre en uygun çalışma dalga boyu seçilmektedir.

3.3.2. Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.2.1.Çözelti Derişimi Seçimi

Eltrombopag ilaç etken maddesinin derişim seçimi için 0,5 ve 1,0 mg/mL derişimler denenmiştir. Deneme sonucunda 0,5 mg/mL uygun bulunmuştur. İlaç etken maddesinin derişimine göre Eltro-1 ve Eltro-2 derişimleri 0,75 µg/mL'dir. Bu değer %0,15'lik spesifikasyon limite göre hesaplanmıştır. Standart derişimi ise ilaç etken maddenin %0,1'ine göre belirlenmiştir. Çalışılan standart derişimi 0,5 µg/mL'dir.

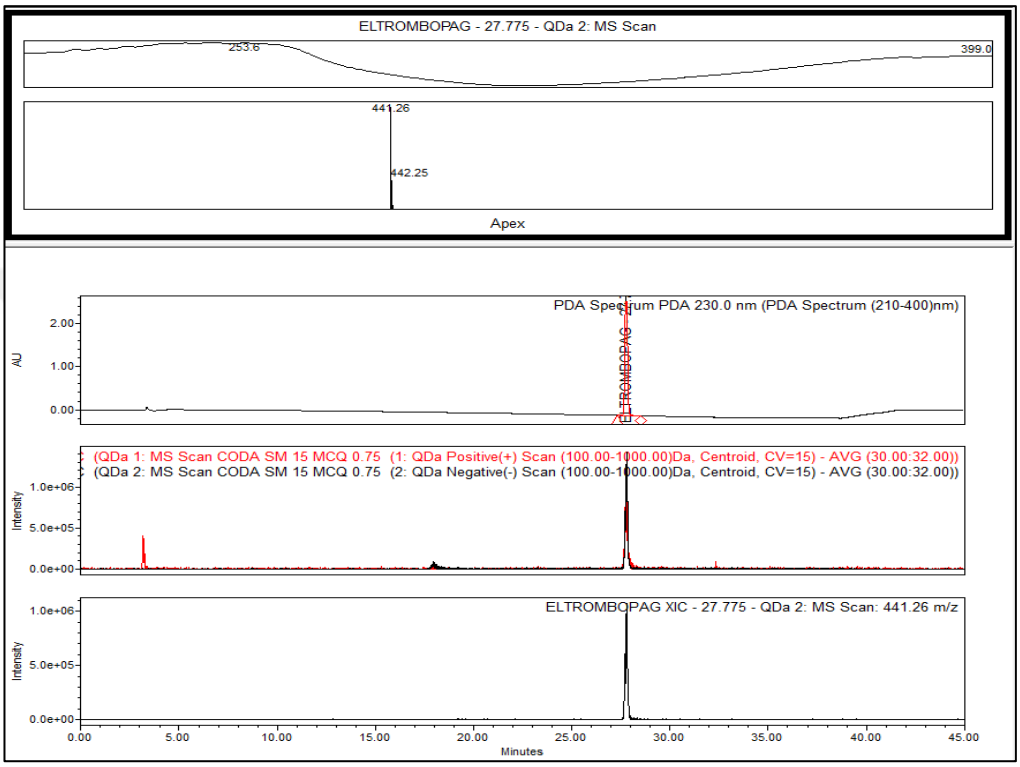
3.3.2.2.Çözücü Sistemi Seçimi

Eltrombopag ilgili maddeler yöntemin çözücü seçimi için düşük pH, düşük viskozite ve suyla iyi karışabilen bir çözücü seçilmiştir. Birçok çözücü denemesi sonucunda, aynı zamanda hareketli faz A olarak kullanılan 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2) çözücü olarak seçilmiştir. Eltrombopag ve safsızlıklar çözücüde ve ultrasonik banyosunda çözündükten sonra asetonitril ile hacmine tamamlanmıştır.

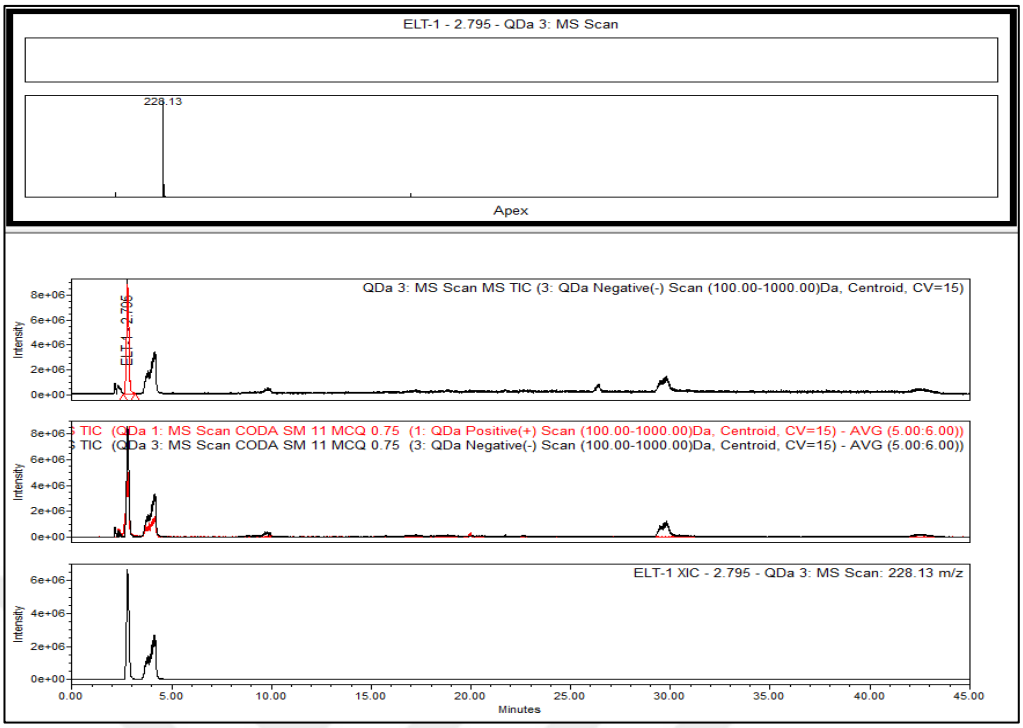
3.3.2.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması

Eltrombopag ilaç etken maddenin uygun çalışma dalga boyunu seçmek için Shimadzu LC-2030C Plus PDA dedektörü ile 190–400 nm dalga boyları arasında tarama yapılmıştır. Eltrombopag yanı sıra, aynı zamanda safsızlıklar da ayrı verilerek en uygun dalga boyu olarak 250 nm seçilmiştir.

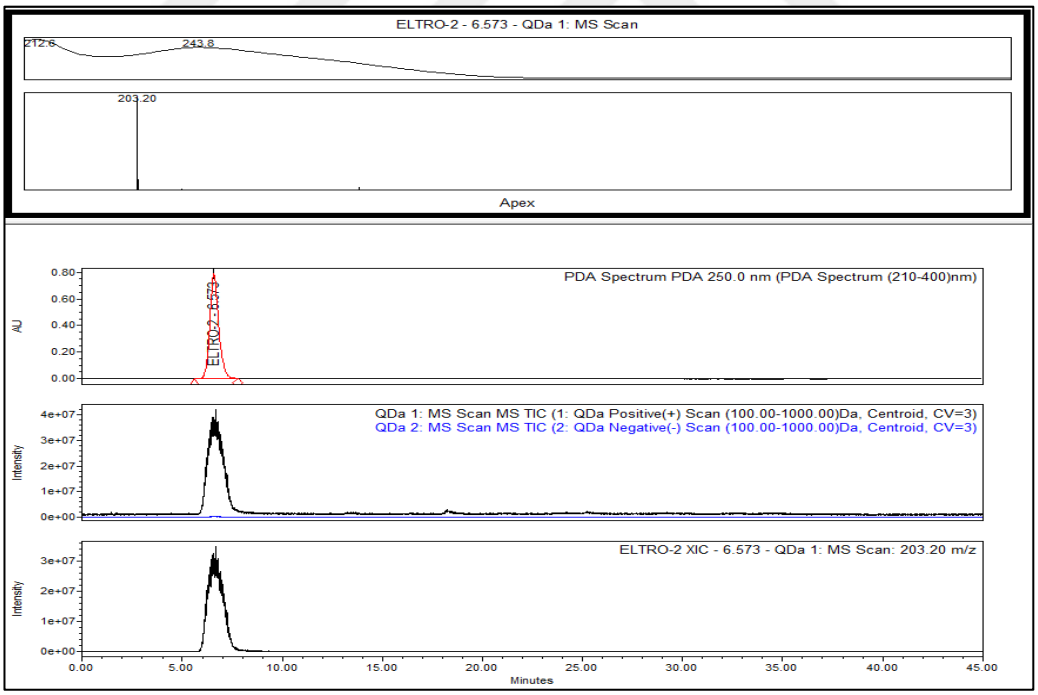
Maddelerin m/z değerlerini bulmak için Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS cihazı ile birlikte QDa dedektörü kullanılmıştır. 100-1000 Da aralığında bir kütle taraması yapılmıştır. Bu taramanın sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri şu şekildedir: Eltro-2 m/z (M+H)+ 203,2 (**Şekil 3.5.**) pozitif modda; Eltrombopag m/z (M-H)- 441,3 (**Şekil 3.3.**) ve Eltro-1 m/z (M-H)- 228,1 (**Şekil 3.4.**) negatif modda iyonlaşmıştır.



Şekil 3.4. Eltrombopag kütle spektrumu, UV spektrumu ve kromatogramı



Şekil 3.5. Eltro-1 kütle spektrumu, UV spektrumu ve kromatogramı



Şekil 3.6. Eltro-2 kütle spektrumu, UV spektrumu ve kromatogramı

3.3.2.4.Yöntem Optimizasyonu

Eltrombopag ilgili maddeler yöntem geliştirilmesi ve optimizasyonunda denemeler YPSK sisteminde yapılmıştır. Denemelerde birden fazla kolon ve hareketli fazlar kullanılmıştır (**Çizelge 3.1.** ve **Çizelge 3.2.**).

Çizelge 3.1. Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolonlar

Kolon Türü	Uzunluğu, mm	İç Çapı, mm	Partikül Çapı, µm	Firma
Zorbax SB-Phenyl	150	4,6	3,5	Agilent
XBridge C18	150	4,6	3,5	Waters
XBridge C8	150	3,0	3,5	Waters

Çizelge 3.2. Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli fazlar

Hareketli faz A	Hareketli faz B
10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)	%100 Asetonitril
10 mM KH_2PO_4	10 mM KH_2PO_4 : Asetonitril (20:80, h/h)
10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8)	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)

En uygun YPSK yöntemi bulabilmek için kolon ve hareketli faz denemeleri ile başlanmıştır. Agilent Zorbax SB-Phenyl (150 x 4,6mm, 3,5µm) kolonu denemesi sonrasında tüm piklerin şekillerin uygunluğu ve birbirinden ayrılması nedeniyle bu kolonun kullanılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz denemeleri, hareketli faz A olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2), hareketli faz B olarak ise 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (20:80, h/h) karışımı kullanılmıştır. Piklerin şekilleri ve maddelerin sistemden kolay elüe edilmesi için iki farklı pH değerine sahip olan A ve B olmak üzere iki farklı hareketli fazlar kullanılmıştır. Piklerin birbirinden iyi ayrılmasından dolayı ilave akış hızı ve kolon sıcaklığı denemeleri yapılmamıştır. En uygun yöntem parametreleri şu şekildedir: Oto-örnekleyici sıcaklığı 20°C, kolon sıcaklığı 20°C, dalga boyu 250 nm, 10,0 µL enjeksiyon hacmi, akış hızı 1,0 mL/dk. Gradient programı ise şu şekildedir: 0–3 dk., %30-30 B; 3-12 dk., %30–70 B; 12-20 dk., %70–75 B; 20-25 dk., %75-90 B; 25-28 dk., %90–90 B; 28-29 dk., %90–30 B; 29-35 dk., %30–30 B.

Çizelge 3.3. Eltrombopag ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Agilent
Kolon Tipi	Zorbax SB-Phenyl
Kolon Özellikleri	150 x 4,6 mm; 3,5 µm
Akış Hızı	1,0 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	20 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	20 ºC
Çalışma Dalga Boyu	250 nm
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	35 dk
Hareketli Faz A	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)
Hareketli Faz B	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (20:80, h/h)
Çözücü	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2):Asetonitril (30:70, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.4. Eltrombopag ilgili maddeler gradient programı

Zaman (dk)	**Hareketli Faz A (%)**	**Hareketli Faz B (%)**
0	70	30
3	70	30
12	30	70
20	25	75
25	10	90
28	10	90
29	70	30
35	70	30

3.3.3. Eltrombopag Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.3.1.Çözelti Derişimi Seçimi

Eltrombopag miktar tayini çalışması için numune derişimi Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan numune derişim %10'luk derişimi denenmiştir. Miktar tayini için kullanılan 0,05 mg/mL numune derişimi denemeler sonucunda elde edilen pik alanları ve yüksekliklerin uygun olduğu ve cihazın algılama sınırları içinde olduğu için, bu derişim çözelti derişimi olarak kullanılmıştır.

3.3.3.2.Çözücü Sisteminin Seçimi

Eltrombopag ilgili maddeler yöntemindeki çözücü seçimi denemelerinden elde edilen bilgilere göre Eltrombopag yükek pH'larda daha iyi çözünmektedir. Bundan dolayı ilk olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) çözeltisi çözücü olarak denenmiştir. Pik şeklinin daha keskin olabilmesi için Eltrombopag çözündükten sonra tetrahidrofuran (THF) eklenmiştir ve hacmine asetonitril ile tamamlanmıştır.

3.3.3.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi

Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde kullanılan dalga boyu ile aynı dalga boyu denemeleri yapılmıştır. 250 nm uygun bulunmuştur.

3.3.3.4.Yöntem Optimizasyonu

Eltrombopag miktar tayini yöntem geliştirilmesi için Eltrombopag ilgili maddeler yöntemi geliştirilmesinde elde edilen bilgilerden faydalanılmıştır. Bu yöntem optimizasyonda YPSK sistemi kullanılmıştır. Kolon olarak Waters XBridge C18 (150x4,6mm, 3,5 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz A olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (80:20, h/h) karışımı, hareketli faz B olarak ise Eltrombopag ilgili maddeler yöntemindeki gibi 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (20:80, h/h) karışımı kullanılmıştır. Yöntemi hızlandırmak için akış hızı olarak 1,2 mL/dk uygun görülmüştür.

Çizelge 3.5. Eltrombopag miktar tayini en uygun yöntem parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters
Kolon Tipi	XBridge C18
Kolon Özellikleri	150 x 4,6 mm; 3,5 µm
Akış Hızı	1,2 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	20 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	20 ºC
Çalışma Dalga Boyu	250 nm
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	20 dk
Hareketli Faz A	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (80:20, h/h)
Hareketli Faz B	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Asetonitril (20:80, h/h)
Çözücü	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):Tetrahidrofuran:Asetonitril (1:1:2, h/h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.6. Eltrombopag miktar tayini gradient programı

Zaman (dk)	**Hareketli Faz A (%)**	**Hareketli Faz B (%)**
0	100	0
6	0	100
12	0	100
15	100	0
20	100	0

3.3.4. Eltrombopag Stres Testi Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

Eltrombopag stres testi çalışmasında daha önceden Eltrombopag ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri kullanılacağı için yeni bir yöntem geliştirilmemiştir. Fakat Eltrombopag numunesinin bozundurulması için bozundurma şartları belirlenmiştir. Bozundurma şartları belirlenirken Eltrombopag'ın bozunma eşiği belirlemek istenir, fakat çok fazla bozundurmak istenmez.

3.3.4.1. Su ve Isı ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi

Eltrombopag su ve ısı ile bozundurma için numuneye su eklenip farklı sıcaklıklar ve sürelerde bekletilmiştir. Bekletilen sıcaklıklar 40°C, 50°C ve 60°C'dir, süreler ise bir saat, iki

saat, üç saattir. Eltrombopag hidrolize karşı dayanıklılık gösterdiği için su ve ile bozundurma testi şartı olarak bir saat 60°C'de karar verilmiştir.

3.3.4.2.Asit ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi

Eltrombopag asit ile bozundurma için numuneye farklı derişimlerde HCl eklenmiştir. Numune aynı zamanda farklı sürelerde bekletilmiştir. Denemesi yapılan derişimler 0,1N, 0,5N, 1N ve 5N'dir. Bekletilen süreler ise 15dk, 30dk, bir saat ve iki saattir. Eltrombopag 0,1N ve 0,5N asit derişimlerde yeterli bozunma göstermemiştir. Numune 5N HCl derişiminde ise fazla bozunma gösterdiği için 1N HCl derişimi, süre olarak bir saat seçilmiştir.

3.3.4.3.Baz ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi

Eltrombopag baz ile bozundurma için numuneye farklı derişimlerde NaOH eklenip, farklı sürelerde bekletilmiştir. 0,1N, 0,5N, 1N ve 5N derişimler denenmiştir. Bekletilen süreler ise 15dk, 30dk, bir saat ve iki saattir. Numune yine asit bozundurmadaki gibi 0,1N ve 0,5N derişimlerde yeterli bozunma göstermemiştir. Eltrombopag 1N NaOH derişiminde ise fazla bozunma gösterdiği için asit ile bozundurmaya benzer bir saat 1N NaOH baz ile bozundurma şartı olarak seçilmiştir.

3.3.4.4.Oksitleyici Ajan ile Bozundurma Şartları Belirlenmesi

Eltrombopag'ın oksitleyici ajan ile bozundurma testi için oksitleyici ajan olarak H_2O_2 kullanılmıştır. H_2O_2'nin farklı derişimleri denenmiştir. Denemesi yapılan H_2O_2 derişimleri şu şekildedir: %5, %10, %20 ve %30 H_2O_2. %10, %20 ve %30 H_2O_2 çok yüksek bozunma dereceleri göstermiştir. Karar verilen bozundurma şartı %5 H_2O_2'te iki saattir.

Çizelge 3.7. Eltrombopag stres testi ilgili maddeler yöntemi parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Agilent
Kolon Tipi	Zorbax SB-Phenyl
Kolon Özellikleri	150 x 4,6 mm; 3,5 µm
Akış Hızı	1,0 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	20 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	20 ºC
Çalışma Dalga Boyu	250 nm
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	35 dk
Hareketli Faz A	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)
Hareketli Faz B	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)
Çözücü	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2) : Asetonitril (30:70, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.8. Eltrombopag stres testi ilgili maddeler yöntemi gradient programı

Zaman (dk)	**Hareketli Faz A (%)**	**Hareketli Faz B (%)**
0	70	30
3	70	30
12	30	70
20	25	75
25	10	90
28	10	90
29	70	30
35	70	30

Çizelge 3.9. Eltrombopag stres testi miktar tayini yöntemi parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters
Kolon Tipi	XBridge C18
Kolon Özellikleri	150 x 4,6 mm; 3,5 µm
Akış Hızı	1,2 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	20 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	20 ºC
Çalışma Dalga Boyu	250 nm
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	20 dk
Hareketli Faz A	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (80:20, h/h)
Hareketli Faz B	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)
Çözücü	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Tetrahidrofuran : Asetonitril (1:1:2, h/h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.10. Eltrombopag stres testi miktar tayini yöntemi gradient programı

Zaman (dk)	**Hareketli Faz A (%)**	**Hareketli Faz B (%)**
0	100	0
6	0	100
12	0	100
15	100	0
20	100	0

Çizelge 3.11. Eltrombopag stres testi çalışma planı

Stres Parametreleri	**Stres Koşulları**	**Bekleme süresi**
Isı ile bozundurma	70°C	10 gün
Gün Işığı ile bozundurma	1,2 million lux/saat aydınlatmaya maruz bırakılır	30 gün (numune ile kinin ile arasındaki absorbans farkı 0,9 olana kadar)
UV Işığı ile bozundurma	En az 200 watt x saat/m^2'ye UV enerji	27 gün (numune ile kinin ile arasındaki absorbans farkı 0,9 olana kadar)
Su+Isı ile bozundurma	Su ile 60°C'de	1 saat
Asit ile bozundurma	1N HCI ile oda sıcaklığında	1 saat
Baz ile bozundurma	1N NaOH ile oda sıcaklığında	1 saat
Oksitleyici ajan ile bozundurma	%5' lik H_2O_2 oda sıcaklığı	2 saat

3.3.5. Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.5.1.Çözelti Derişimi Seçimi

Eltro-1 derişim seçimi için 1,0 mg/mL denemesiyle başlanmıştır. Deneme sonucu uygun bulunduğu için farklı denemeler yapılmamıştır. İlaç etken maddesinin derişimine göre Eltro-1A, Eltro-1-B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K derişimleri 1,5 µg/mL'dir. Bu değer %0,15'lik spesifikasyon limite göre hesaplanmıştır. Standart derişimi ise ilaç etken maddenin %0,1'ine göre belirlenmiştir. Çalışılan standart derişimi 1,0 µg/mL'dir.

3.3.5.2.Çözücü Sistemi Seçimi

Eltro-1 ilgili maddeler yöntemi için kullanılan kromatografi türü ters faz kromatografisidir. Ters faz kromatografi sistemi için polar bir çözücü seçmek gereklidir. Eltro-1 ile safsızlıkları çözen ortak çözücü asetonitrildir. Bundan dolayı çözücü olarak asetontril seçilmiştir. Eltro-1 ile safsızlıkların tartımı alındıktan sonra, maddeler balon jojenin %25'i kadar asetonitrilde çözünüp, hacimlerine hareketli faz A ile tamamlanmıştır. Eltro-1 IMP-K ise düşük çözünürlükten dolayı tamamen asetonitrilde çözünmüştür. Eltro-1 ve safsızlıkların ilk stok sonrası seyreltmeler ise asetonitril ve hareketli faz A karışımı (25:75, h/h) ile yapılmıştır.

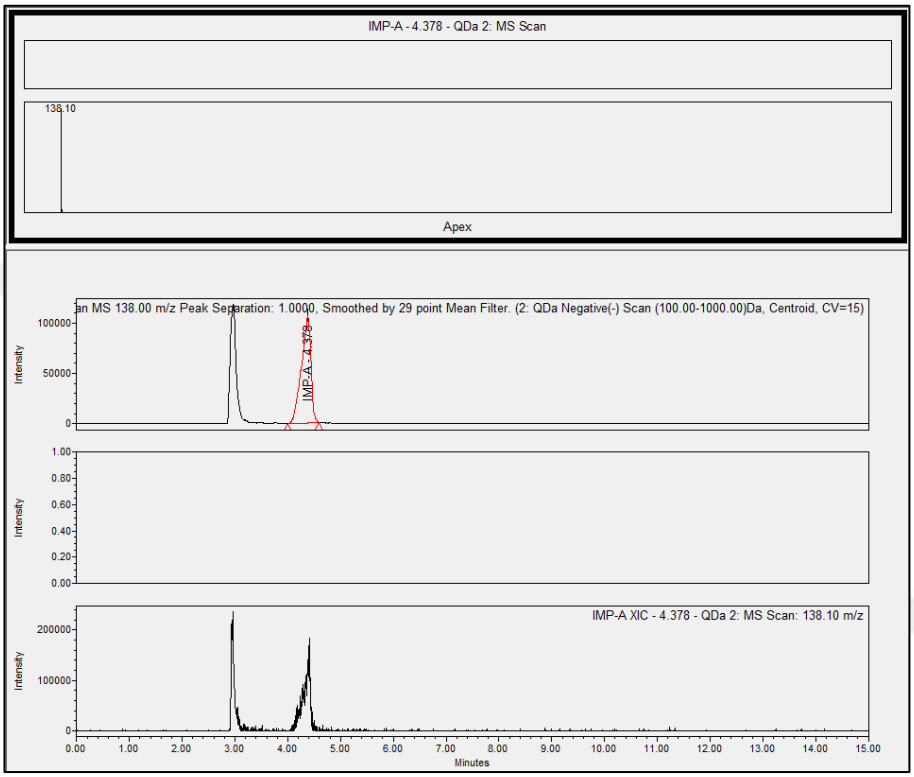
3.3.5.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması

Eltro-1'in uygun çalışma dalga boyunu seçmek için Shimadzu LC-2030C Plus PDA dedektörü ile 190–400 nm dalga boyları arasında tarama yapılmıştır. Eltro-1 ile safsızlıklar ayrı verilerek en uygun dalga boyu olarak 220 nm seçilmiştir.

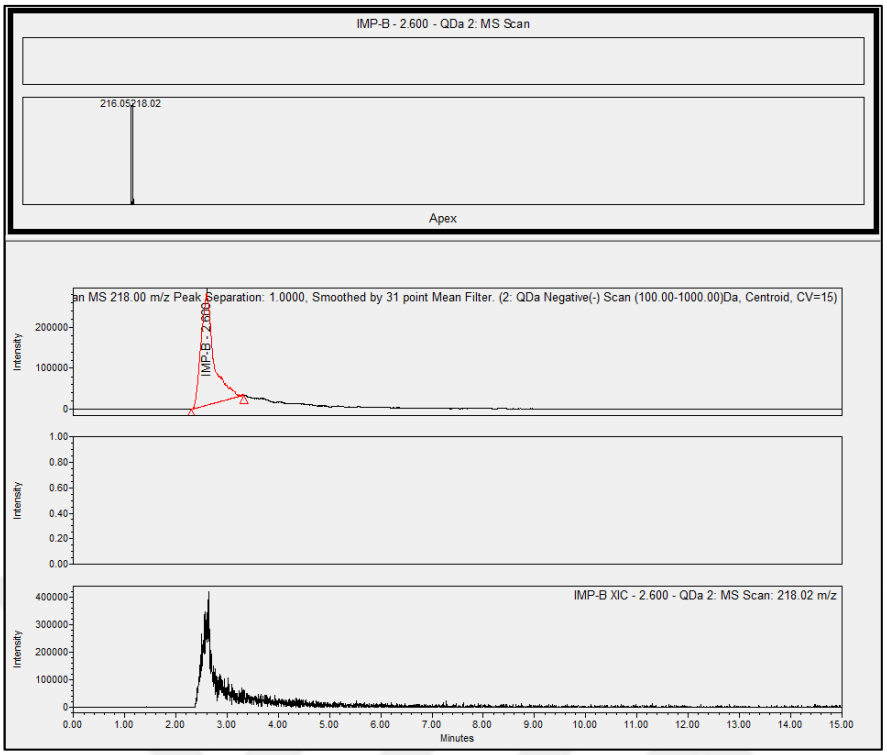
Maddelerin m/z değerlerini bulmak için Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS cihazı ile birlikte QDa dedektörü kullanılmıştır. 100-1000 Da aralığında bir kütle taraması yapılmıştır. Bu taramanın sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri şu şekildedir: Eltro-1I m/z (M+H)+ 110,0 (**Şekil 3.13.**), Eltro-1K m/z (M+H)+ 453,0 (**Şekil 3.15.**) pozitif modda, Eltro-1 m/z (M-H)- 228,1 (**Şekil 3.4.**), Eltro-1A m/z (M-H)- 138,1 (**Şekil 3.7.**); Eltro-1B m/z (M-H)- 216,0 (**Şekil 3.8.**), Eltro-1E m/z (M-H)- 165,1 (**Şekil 3.9.**), Eltro-1F m/z (M-H)- 272,2

(**Şekil 3.10.**), Eltro-1G m/z (M-H)- 258,2 (**Şekil 3.11.**), Eltro-1H m/z (M-H)- 348,2 (**Şekil 3.12.**) ve Eltro-1J (M-H)- m/z 241,2 (**Şekil 3.14.**) negatif modda iyonlaşmıştır.

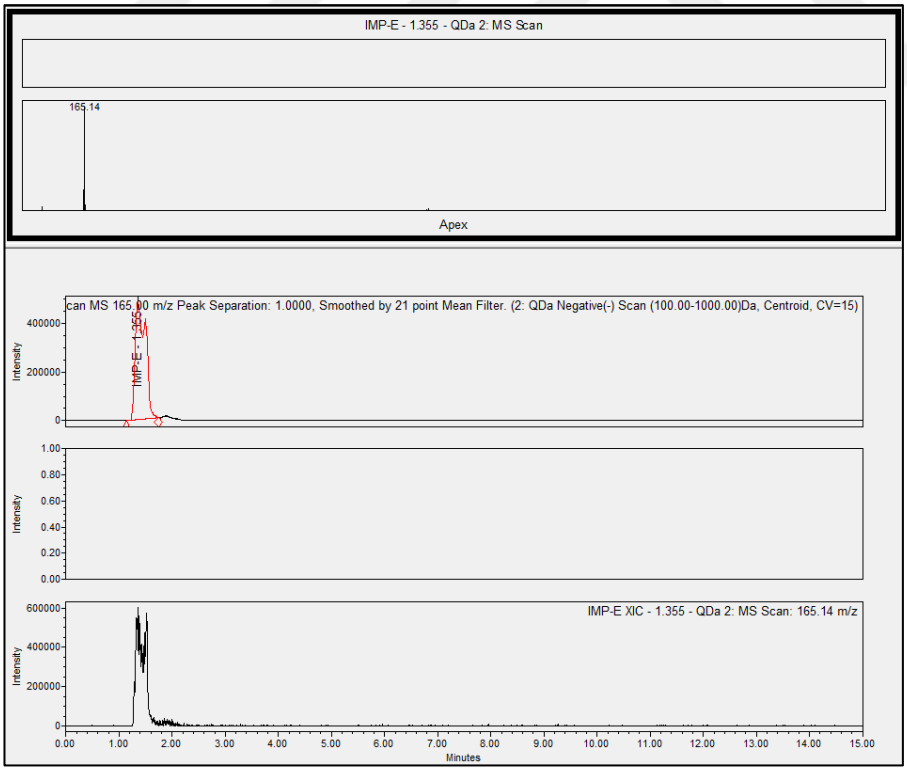
Eltro-1C ile Eltro-1D yapılarındaki NO_2 fonksiyonel grubundan dolayı iyonlaştırılamadığı için kütle spektrumu bulunmamaktadır.



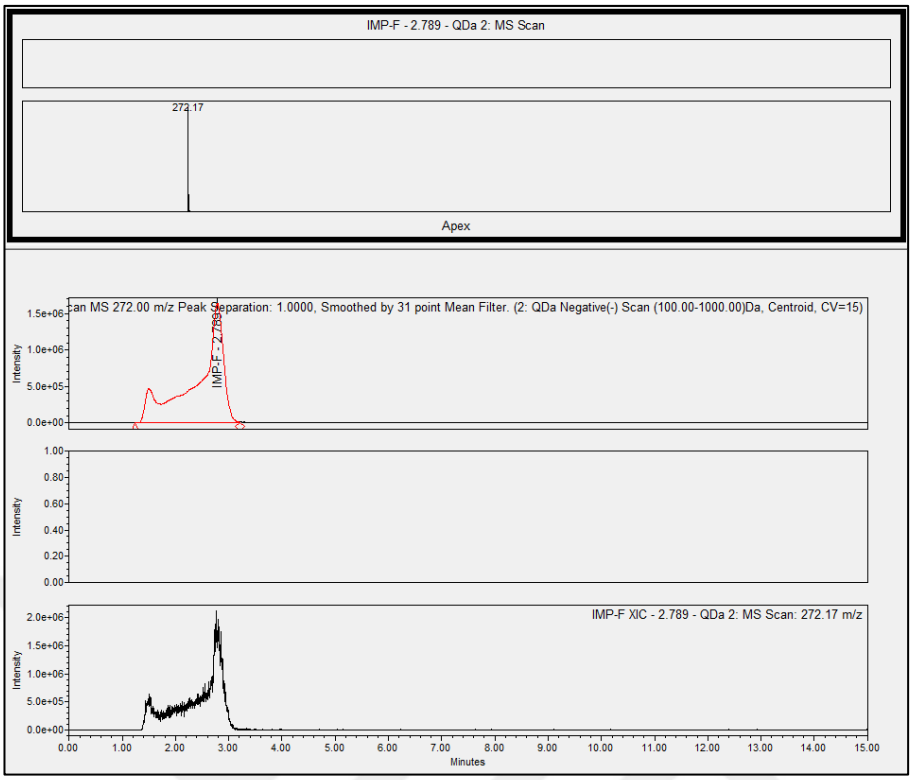
Şekil 3.7. Eltro-1A kütle spektrumu



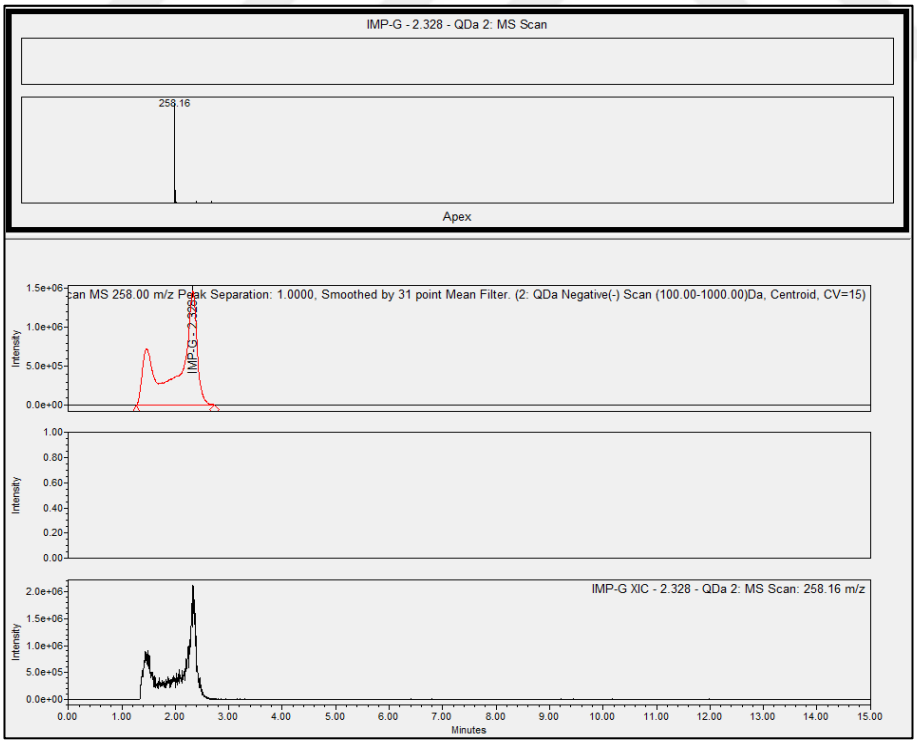
Şekil 3.8. Eltro-1B kütle spektrumu



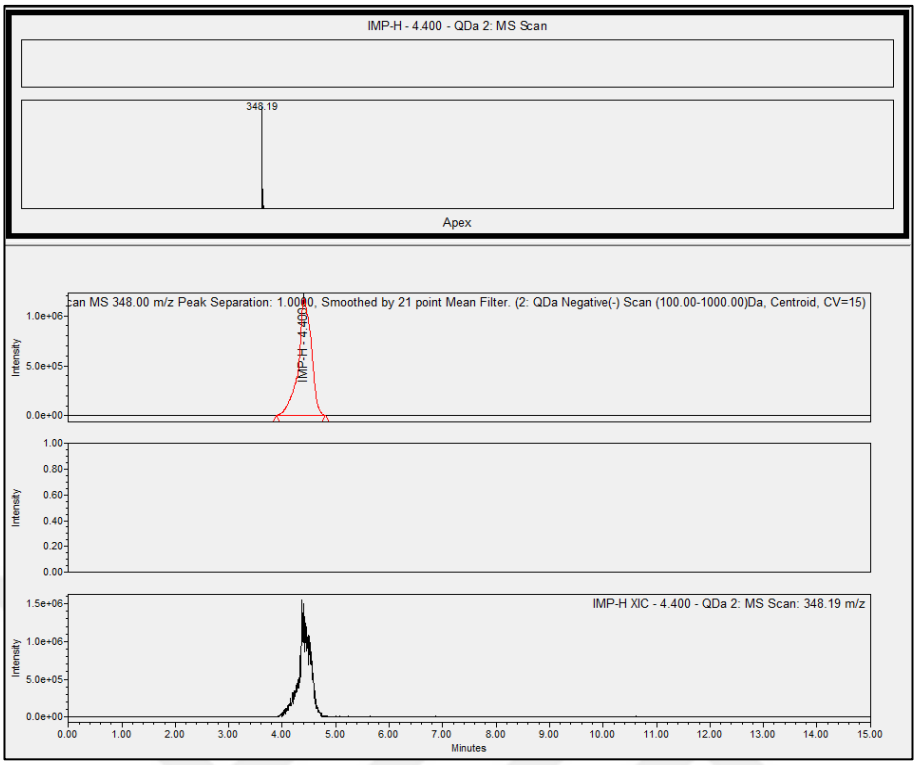
Şekil 3.9. Eltro-1E kütle spektrumu



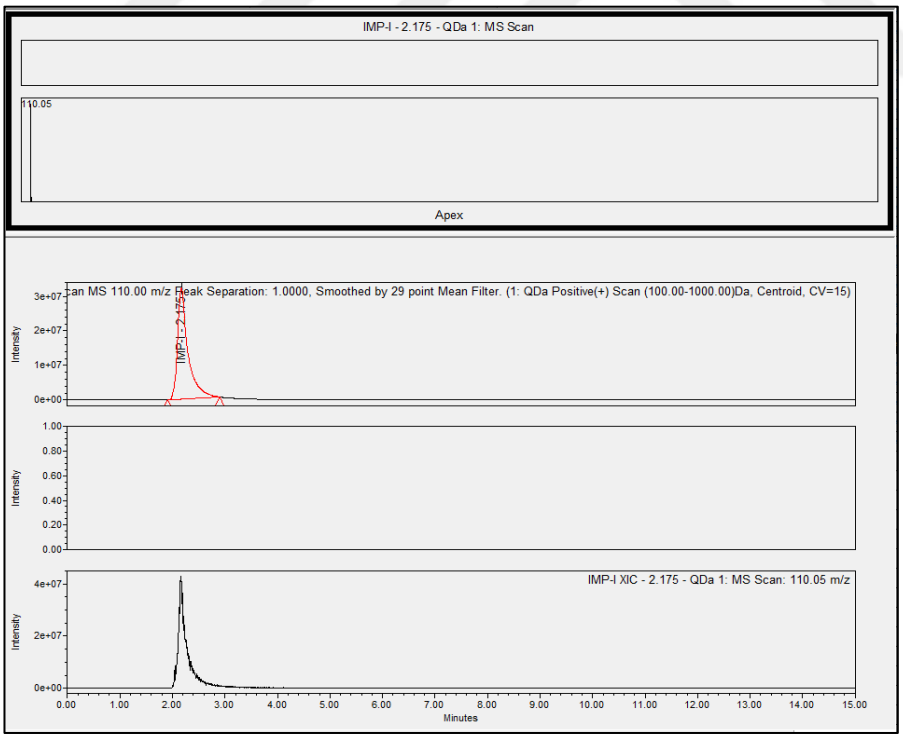
Şekil 3.10. Eltro-1F kütle spektrumu



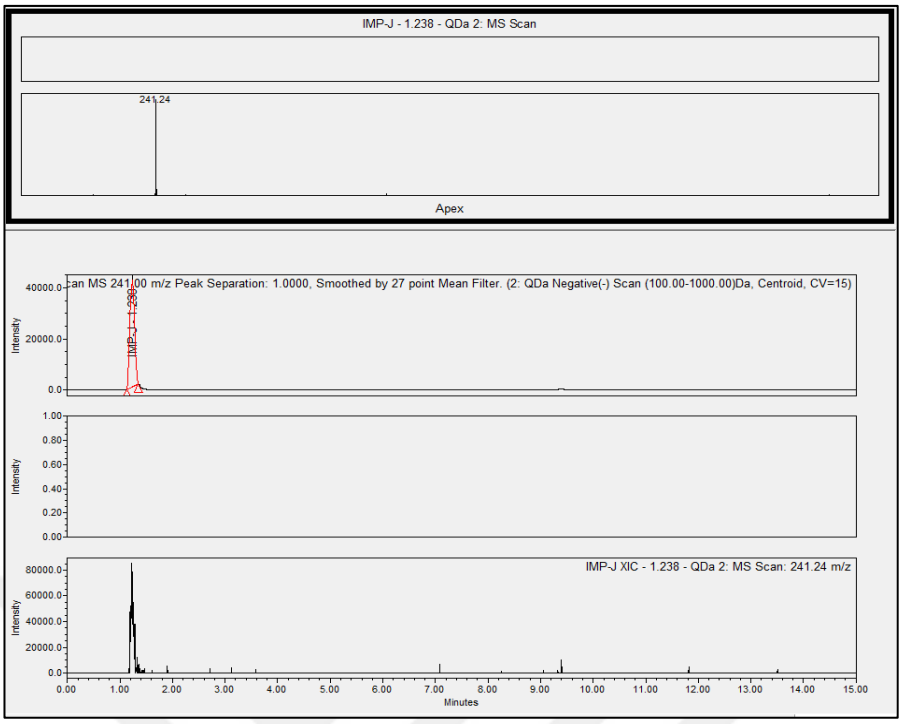
Şekil 3.11. Eltro-1G kütle spektrumu



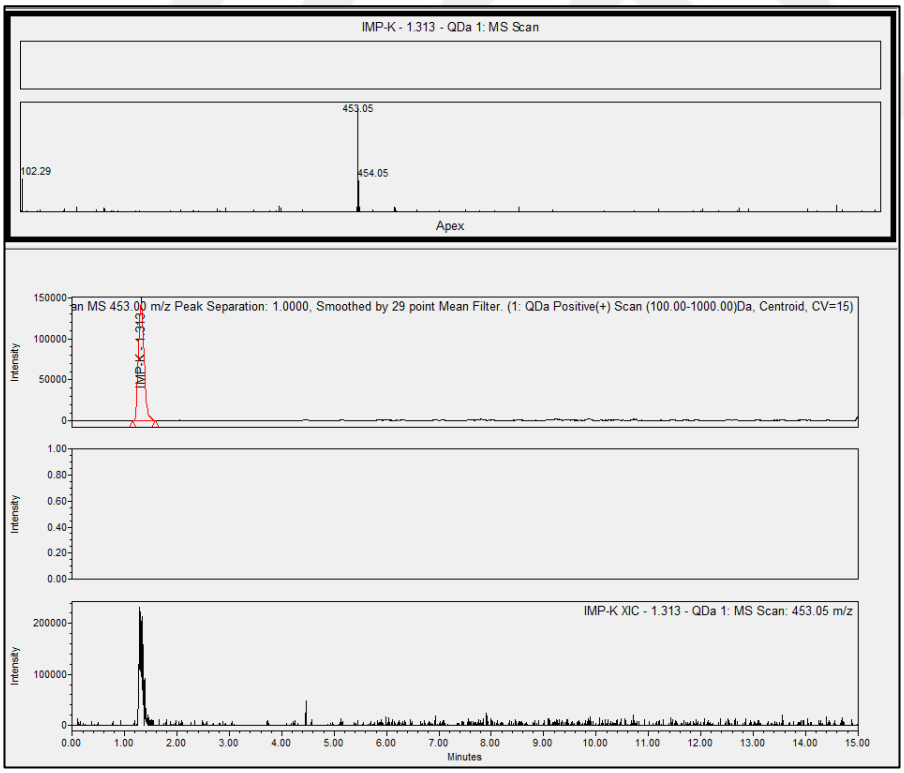
Şekil 3.12. Eltro-1H kütle spektrumu



Şekil 3.13. Eltro-1I kütle spektrumu



Şekil 3.14. Eltro-1J kütle spektrumu



Şekil 3.15. Eltro-1K kütle spektrumu

3.3.5.4.Yöntem Optimizasyonu

Eltro-1 ilgili maddeler yöntem geliştirilmesi ve optimizasyonunda sadece YPSK sistemi kullanılmıştır. Denemeler esnasında kullanılan kolon ve hareketli fazlar **Çizelge 3.12.** ve **Çizelge 3.13.**'te yer almaktadır.

Çizelge 3.12. Eltro-1 ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolon

Kolon Türü	Uzunluğu, mm	İç Çapı, mm	Partikül Çapı, µm	Firma
XBridge C18	150	4,6	3,5	Waters
XBridge C18	250	4,6	5	Waters
XBridge C8	150	4,6	3,5	Waters

Çizelge 3.13. Eltro-1 ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli fazlar

Hareketli faz A	Hareketli faz B
%0,1 o-H_3PO_4	%100 Asetonitril
10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)	
10 mM KH_2PO_4	

Bu yöntemin geliştirilmesinde birçok farklı parametre çalışması yapılmıştır. Safsızlıkların ve ilaç etken maddenin ortak en iyi absorbans değerini belirlemek için PDA taraması yapılmıştır. Akış denemeleri, 0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,2 mL/dk akış hızları kapsamaktadır. Kolon sıcaklığı denemeleri ise 20°C ile 40°C aralığında yapılmıştır. Bunları yanı sıra kolon türü denemeleri de yapılmıştır.

YPSK sisteminde yapılan tüm deneme çalışmalarında özellikle Eltro-1B, Eltro-1F ve Eltro-1G arasındaki ayırıcılık faktörleri dikkate alınmıştır. Bu özellik yanı sıra diğer piklerin alıkonma zamanları, pik şekilleri, pikler arasındaki ayırıcılık faktörü gibi özellikler göz önünde bulundurarak en uygun şartlar belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı yükseldikçe pikler arasındaki ayırıcılığı arttığı gözlenmiştir. Bundan dolayı 40°C kolon sıcaklığına karar verilmiştir. En uygun akış hızı 1,0 mL/dk olarak seçilmiştir. Artan hareketli faz pH'sı ile Eltro-1B, Eltro-1F ve Eltro-1G piklerin birbirine yaklaşmıştır. Bundan dolayı hareketli faz A olarak %0,1 o-H_3PO_4, hareketli faz B olarak ise %100 asetonitril uygun bulunmuştur. Bunlar yanı sıra en uygun diğer parametreler şu şekildedir: enjeksiyon hacmi 10,0 µL, çalışma dalga boyu 220 nm, oto-örnekleyici sıcaklığı 30°C ve kolon türü olarak ise Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm). Gradient programı ise, 0-35 dk., %0-70 B; 35-36 dk., %70-0 B; 36-40 dk., %0-0 B (**Çizelge 3.14.** ve **Çizelge 3.15.**).

Çizelge 3.14. Eltro-1 ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters
Kolon Tipi	XBridge C18
Kolon Özellikleri	150 x 4,6 mm; 3,5 µm
Akış Hızı	1,0 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	40 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	15 ºC
Çalışma Dalga Boyu	220 nm
Enjeksiyon Hacmi	10,0 µL
Analiz Süresi	40 dk
Hareketli Faz A	%0,1 o-H_3PO_4
Hareketli Faz B	%100 Asetonitril
Çözücü	Asetonitril:Hareketli faz A (25:75, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.15. Eltro-1 ilgili maddeler gradient programı

Zaman (dk)	**Hareketli Faz A (%)**	**Hareketli Faz B (%)**
0	100	0
35	30	70
36	100	0
40	100	0

3.3.6. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.6.1.Çözelti Derişimi Seçimi

Ruxolitinib kiral safsızlık metodu için 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL ve 2,0 mg/mL derişimler denenmiştir. Denemeler sonucunda elde edilen pik alanları ve yüksekliklerin uygun olduğu ve cihazın algılama sınırları içinde olduğu için, 2,0 mg/mL'lik bir derişim çözelti derişimi olarak kullanılmıştır.

3.3.6.2.Çözücü Sisteminin Seçimi

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi için kullanılan kromatografi türü normal faz kromatografisidir. Bu yüzden seçilecek çözücü su bazlı bir çözücü olmamalıdır. Ruxolitinib metanolde oldukça iyi çözünmektedir. Ruxolitinib yanı sıra, (rac)-ruxolitinib hemifumarat da metanolde için çözündüğü için çözücü olarak metanol seçilmiştir. Hem Ruxolitinib hem de

(rac)-ruxolitinib hemifumarat tartıldıktan sonra metanol ile çözünüp, balon jojenin hacmine metanol ile tamamlanmıştır. Bir sonraki seyreltme basamaklar da metanol ile yapılmıştır.

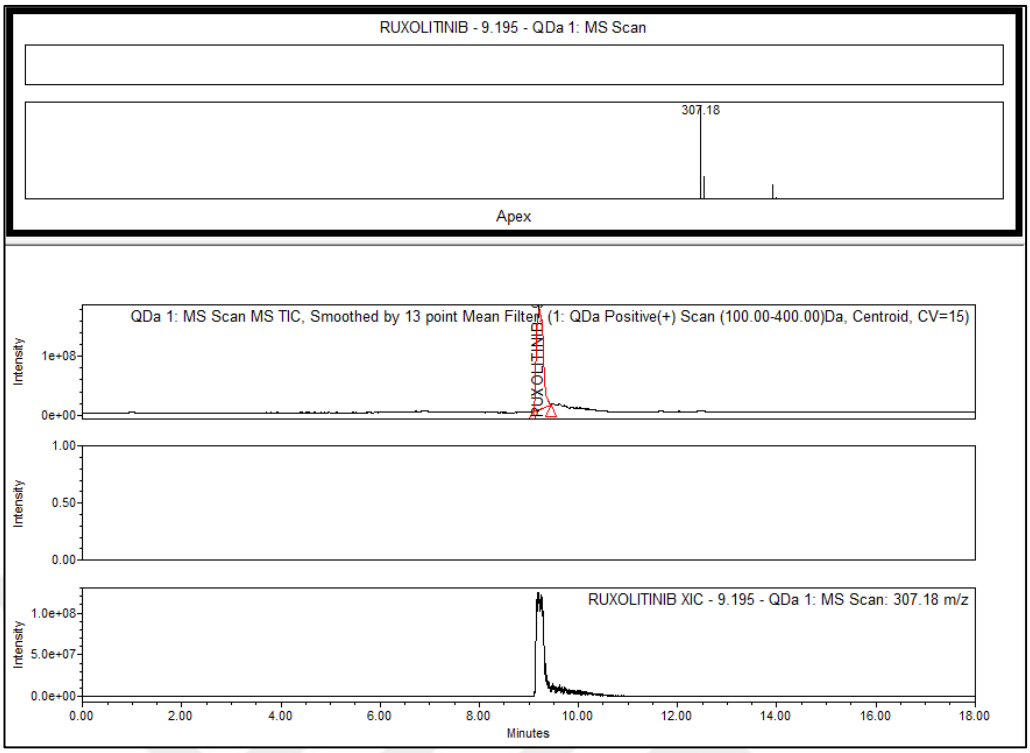
3.3.6.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi

Ruxolitinib ilaç etken madde ile (S)-Ruxolitinib kiral safsızlığın en uygun çalışma dalga boyunu seçmek Shimadzu Prominence-i LC- 2030 C Plus-SPD-M40 PDA dedektörlü cihaz ile 190–400 nm dalga boyları arasında tarama yapılmıştır. Ruxolitinib ile (S)-Ruxolitinib ayrı verilerek en uygun dalga boyu olarak 254 nm seçilmiştir.

3.3.6.4.Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması

Ruxolitinib ilaç etken maddenin uygun çalışma dalga boyunu seçmek Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS PDA dedektörü ile 190–400 nm dalga boyları arasında tarama yapılmıştır. Ruxolitinib ile safsızlıklar ayrı verilerek en uygun dalga boyu olarak 225 nm seçilmiştir.

Maddelerin m/z değerlerini bulmak için aynı cihazın QDa dedektörü ile 100-1000 Da aralığında bir kütle taraması yapılmıştır. Bu taramanın sonucunda elde edilen kütle/yük (m/z) değerleri şu şekildedir: Ruxolitinib m/z (M+H)+ 307,18 (**Şekil 3.16.**) pozitif modda iyonlaşmıştır.



Şekil 3.16. Ruxolitinib kütle spektrumu

3.3.6.5.Yöntem Optimizasyonu

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntem geliştirilmesi ve optimizasyonu için YPSK sistemi kullanılmıştır. Yöntem geliştirme esnasında kullanılan kolon ve hareketli fazlar **Çizelge 3.16.** ve **Çizelge 3.17.**'de yer almaktadır.

Yapılan tüm denemelerde hareketli faz A olarak n-Hekzan kullanılmıştır.

Çizelge 3.16. Ruxolitinib kiral yönteminde kullanılan kolon

Kolon Türü	Uzunluğu, mm	İç Çapı, mm	Partikül Çapı, µm	Firma
Chiralpak AD-H	250	4,6	5	Daicel
Chiralpak OD-H	250	4,6	5	Daicel

Çizelge 3.17. Ruxolitinib kiral safsızlık yönteminde kullanılan hareketli fazlar

Hareketli faz A	Hareketli faz B
n-Hekzan	1000 mL Etanol + 1,0 mL Dietilamin
	1000 mL Etanol
	1000 mL Metanol

Yöntem sadece YPSK'da denenmiştir ve metot geliştirilmesinde pik şekli, pikler arasındaki ayırıcılık ve alıkonma zamanları dikkate alınarak hareketli faz, kolon türü ve kolon sıcaklığı denemeleri yapılmıştır.

Elüsyon türü olarak izokratik elüsyon programı seçilmiştir. Bunun nedeni kiral kolonların şartlanma süresi oldukça uzun sürmesi ve (S)-Ruxolitinib dışında başka bir safsızlık sistemde olmamasıdır. (S)-Ruxolitinib ile Ruxolitinib pikin keskinliği için dietilamin hareketli faz B'ye eklenmiştir. Dietilamin eklenmesi sonucunda pik keskinliğinin arttığı görülmüştür. İki pik arasındaki ayırıcılığı artırmak için kolon sıcaklığı 25ºC, 30ºC ve 35ºC olmak üzere üç farklı sıcaklıklar denenmiştir. En iyi ayrıcılığı 30ºC'lik kolon sıcaklığı vermiştir.

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntem geliştirilmesinde Chiralpak AD-H (250 x 4,6 mm, 5µm) ile Chiralpak OD-H (250 x 4,6 mm, 5µm) olmak üzere iki farklı kolon denenmiştir. Chiralpak AD-H kolonu Chiralpak OD-H kolonuna göre daha yüksek bir ayırıcılık vermiştir. Bundan dolayı Chiralpak AD-H kolonundan yana karar kılındı.

Yöntem geliştirilmesinin en başından beri 1,0 mL/dk'lik bir akış hızı ile denemeler yapılmıştır ve uygun sonuçlar alındığı için 1,0 mL/dk'lık akış hızı ile devam edilmiştir. Bunlar yanı sıra en uygun diğer parametreler şu şekildedir: enjeksiyon hacmi 20,0 µL, çalışma dalga boyu 254 nm, oto-örnekleyici sıcaklığı 15°C'dır (**Çizelge 3.18.**).

Çizelge 3.18. Ruxolitinib kiral safsızlık en uygun yöntem parametreleri

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Daicel
Kolon Tipi	Chiralpak AD-H
Kolon Özellikleri	250 x 4,6 mm; 5 µm
Akış Hızı	1,0 mL/dak
Kolon Sıcaklığı	30 ºC
Oto-örnekleyici Sıcaklığı	15 ºC
Çalışma Dalga Boyu	254 nm
Enjeksiyon Hacmi	20,0 µL
Analiz Süresi	42 dk
Hareketli Faz A	n-Hekzan
Hareketli Faz B	1000 mL Etanol + 1,0 mL Dietilamin
Çözücü	%100 Methanol
Elüsyon	İzokratik (%75 Hareketli Faz A : %25 Hareketli Faz B)

3.4. Validasyon Çalışmaları

Eltrombopag ve Ruxolitinib için geliştirilen tüm yöntemler için ICH Q2(R2) kılavuzuna göre validasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1. Eltrombopag İlgili Maddeler Validasyon Çalışması

3.4.1.1. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk testi, validasyon çalışmalara başlamadan önce kullanılacak sistemin analizlere uygunluğu belirlemek için yapılan bir testtir. Eltrombopag ilgili maddeler yöntemi için sistem uygunluk testi olarak spesifikasyon limitinde safsızlıklar eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Teorik plaka sayısı, simetri faktör ve kapasite faktörü raporlanmıştır. Sistem uygunluk kabul kriteri ise Eltrombopag pikinin simetri faktörü 1,8'den küçük veya eşit olmalıdır. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 3.19.**'da verilmektedir.

Çizelge 3.19. Eltrombopag ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları

Pik ismi	Teorik plaka sayısı	Simetri faktör	Kapasite faktörü
Eltrombopag	91738	0,9	11,9
Eltro-1	5570	1,2	2,2
Eltro-2	1768	1,0	5,4

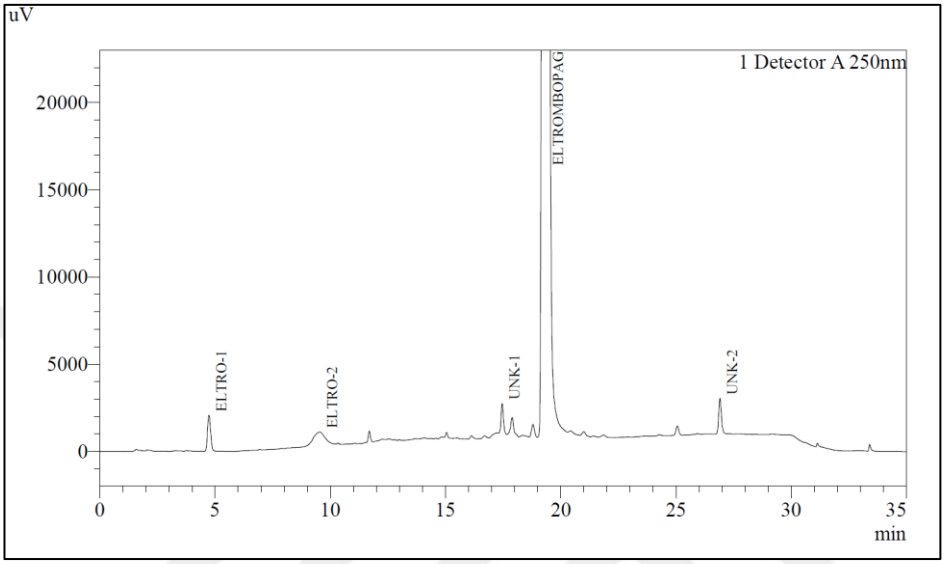
3.4.1.2. Seçicilik

Seçicilik parametresi için kör çözeltisi, 0,75 µg/mL spesifikasyon limit derişiminde her bir safsızlık ayrı ve karışım halinde, spesifikasyon limitinde safsızlık ilaveli numune çözeltisi, 0,5 µg/mL derişiminde standart çözeltisi ve 0,5 mg/mL derişiminde numune çözeltisi enjekte edilmiştir.

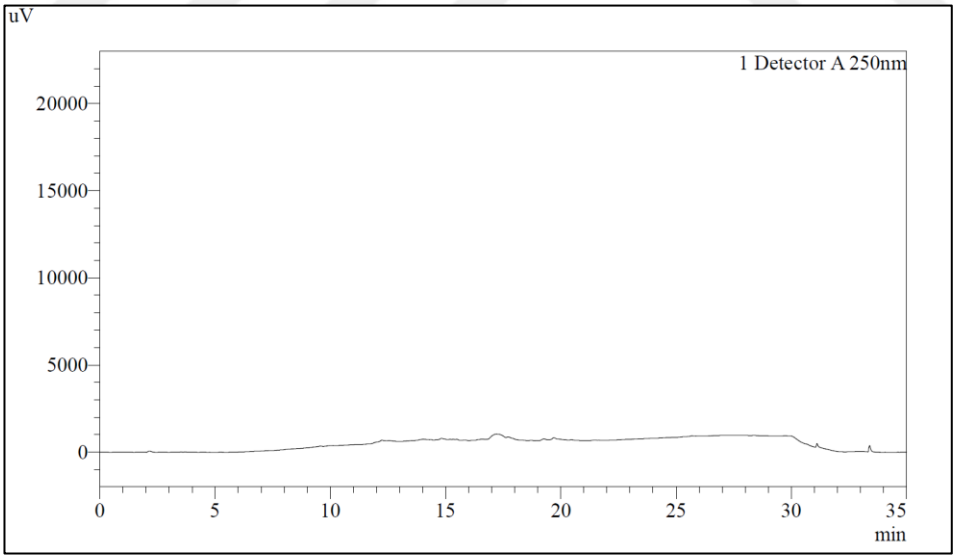
Bu çalışmanın sonunda Eltrombopag, Eltro-1 ve Eltro-2 piklerinin alıkonma zamanında kör çözeltiden gelen herhangi pik gözlemlenmemiştir. Bunu yanı sıra, çalışmanın sonucuna göre Eltrombopag ve safsızlık pikleri spektral olarak saf olduğu söylenebilir (**Çizelge 3.20.**).

Çizelge 3.20. Eltrombopag ilgili maddeler seçicilik sonuçları

Bileşik	RT, dk	RRT	Saflık Endeksi	Saflık Eşiği
Eltrombopag	19,29	1,00	1,000000	0,999996
Eltro-1	4,69	0,24	1,000000	0,984362
Eltro-2	9,49	0,49	0,999883	0,479908



Şekil 3.17. Eltrombopag ilgili maddeler safsızlık eklenmiş numune çözelti kromatogramı



Şekil 3.18. Kör çözelti kromatogramı

3.4.1.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bu parametrenin çalışması için yedi farklı derişimde çözeltiler hazırlanıp, en az 3'er kez analiz edilmiştir.

Eltrombopag, Eltro-1 ve Eltro-2 standartların kalibrasyon grafiğini çizmek için, tayin alt sınır (TAS) altı kez, %50, %80, %100, %120 ve %150 seviyeleri 3'er kez, %200 seviyesi ise altı kez enjekte edilmiştir.

İlgili maddeler yöntemi doğrusallık validasyon parametre kabul kriterlerine göre hem ilaç etken maddenin hem de safsızlıkların korelasyon katsayıları 0,99'dan az olmamalıdır, ayrıca regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanı ise %5'i geçmemelidir.

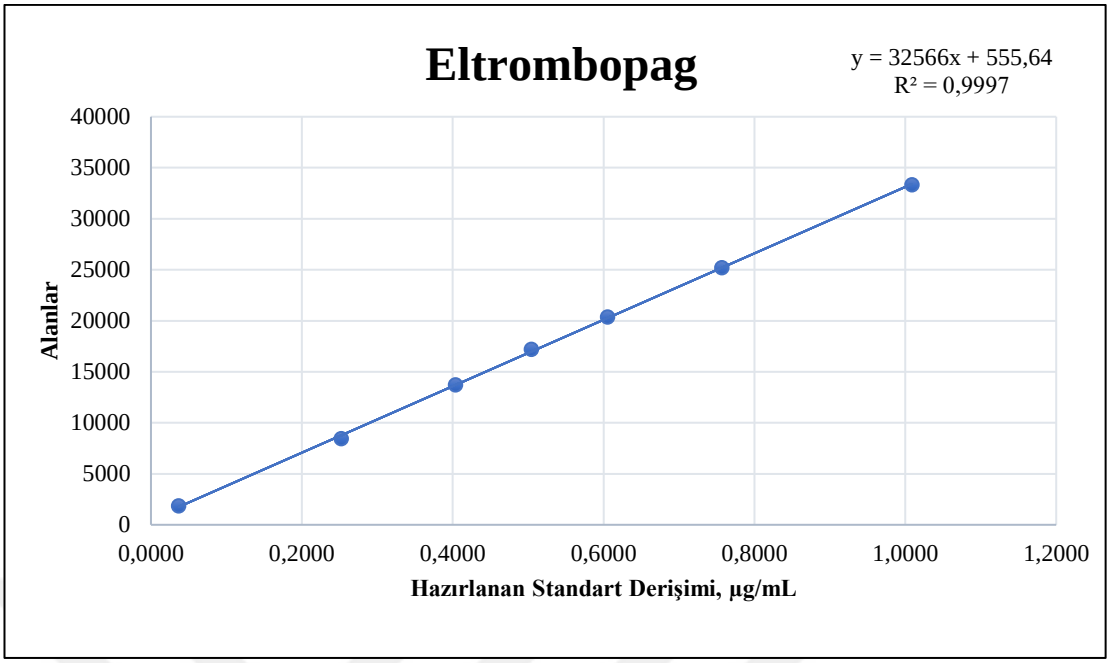
Çalışma aralığın kabul kriteri; minimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %10,0'dan fazla, maksimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması ise %5,0'dan fazla olmamalıdır.

Doğrusallık validasyon çalışması sonuçlarına göre kalibrasyon eğrileri çizilip, korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Eltrombopag TAS ile %200 arasındaki derişimlerle doğrusal sonuçlar verdiği bulunmuştur. Çalışma aralığı validasyon çalışmasına göre en düşük ölçülebilir konsantrasyonda, yani TAS'ta, bağıl standart sapması %10,0'den düşük, en yüksek ölçülebilir konsantrasyonda ise %5,0'dan düşük olduğu bulunmuştur (**Çizelge 3.21.**).

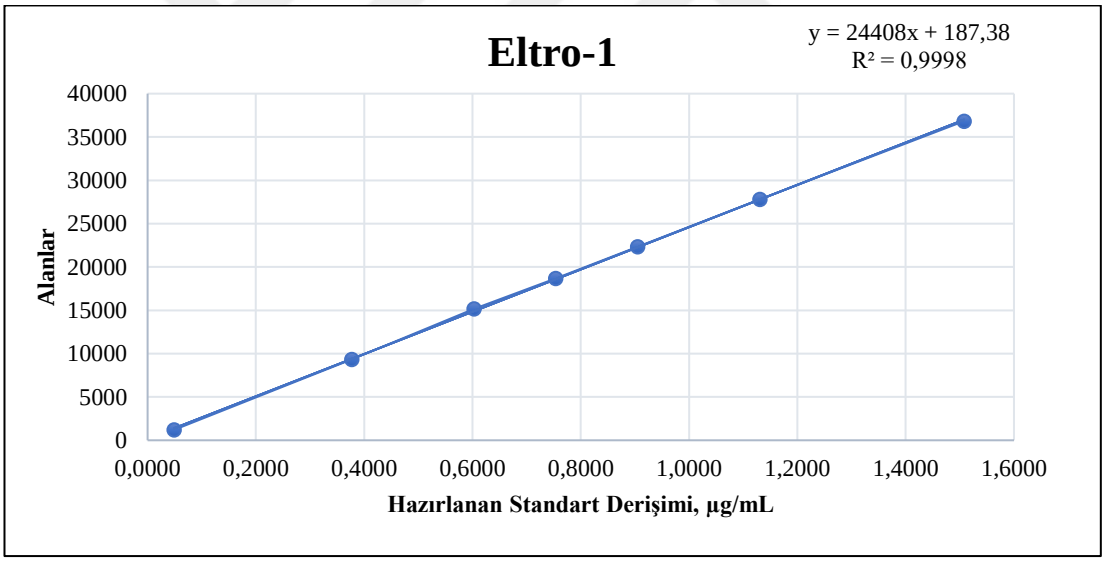
Çizelge 3.21. Eltrombopag ilgili maddeler doğrusallık ve çalışma aralığı sonuçları

Bileşik	**Derişim (µg/mL)**	**Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,99**	**Regresyon Denklemi**	**[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: ≤ 5,0%**	**Alan BSS, %**	
					Min. derişim	**Mak. derişim**
Eltrombopag	0,037-1,009	0,9999	y=32566x+555,64	2,2	4,0	0,1
Eltro-1	0,049–1,508	0,9999	y=24408x+187,38	1,0	3,2	0,6
Eltro-2	0,143–1,509	0,9995	y=35804x-1085,1	-4,1	2,1	0,8

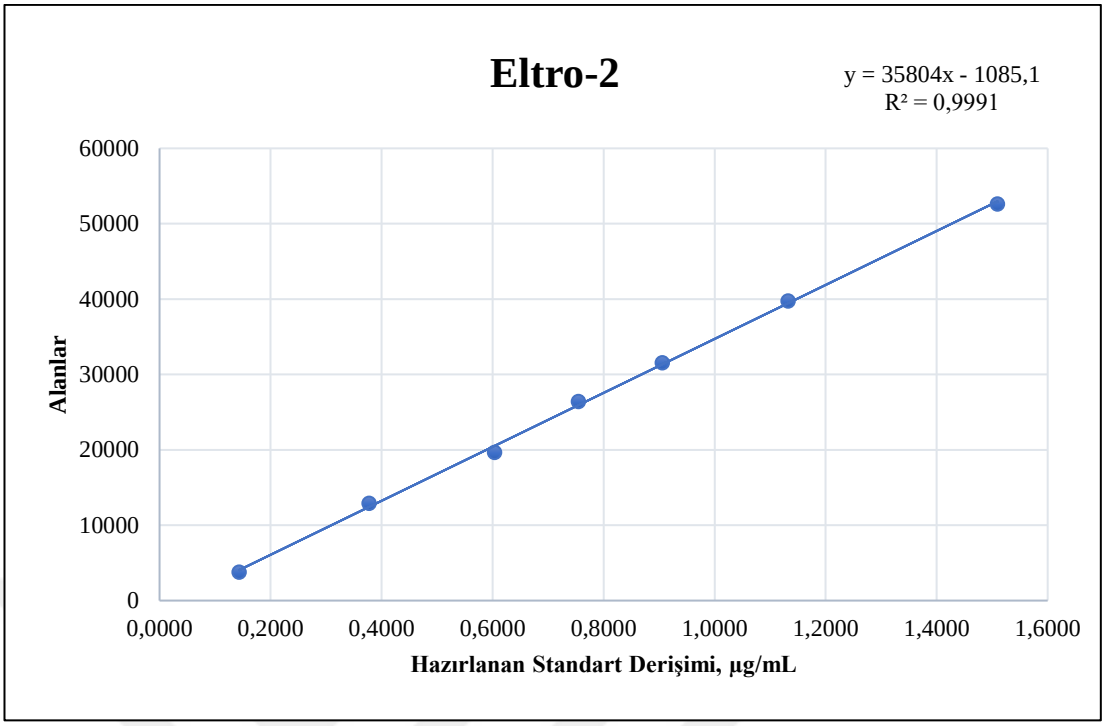
BSS: Bağıl standart sapma



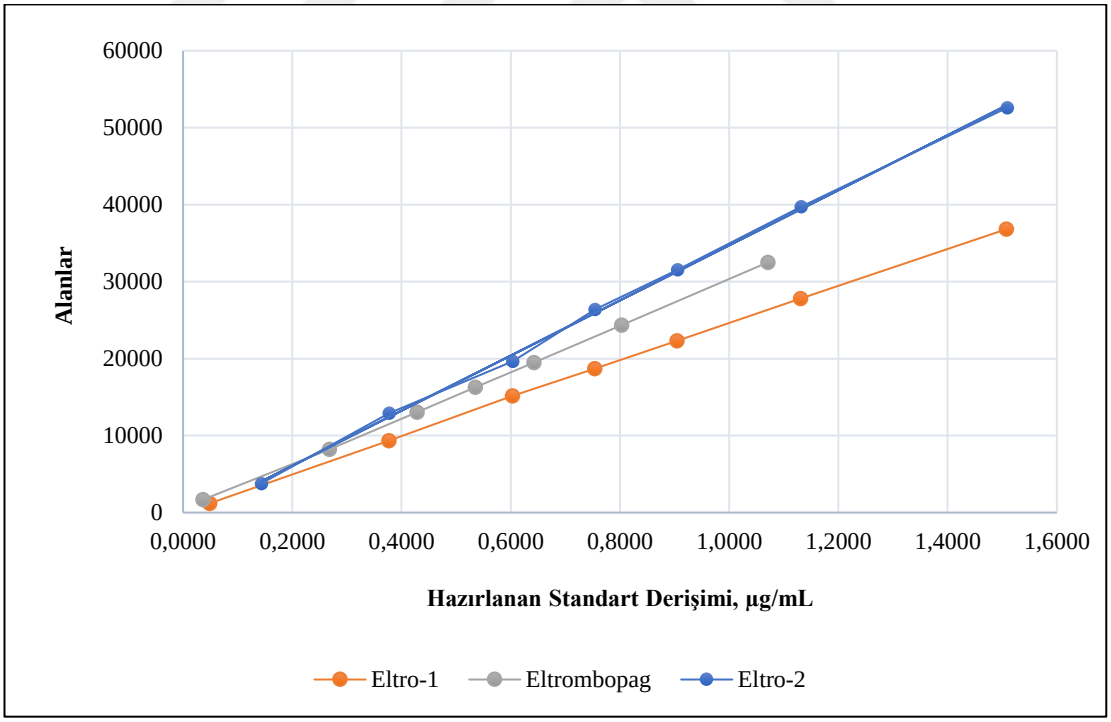
Şekil 3.19. Eltrombopag standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.20. Eltro-1 standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.21. Eltro-2 standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.22. Eltrombopag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri

3.4.1.4. Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

Bu validasyon çalışmasındaki TAS ve TS kabul kriterleri şu şekildedir: TAS derişiminde enjekte edilen tüm numunelerin %BSS'si 10,0'dan küçük olmalıdır. Aynı zamanda sinyal/gürültü oranları 10,0'a eşit veya büyük olmalıdır. TS derişiminde enjekte edilen numunelerin sinyal/gürültü oranları 3,0'a eşit veya büyük olmalıdır.

Bu validasyon çalışması için, Eltrombopag, Eltro-1 ve Eltro-2 standartları spesifikasyon derişimde 6'şar kez enjekte edilip, elde dilen sinyal/gürültü oranlarından TAS derişimleri hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre TAS çözeltilerin hazırlanışı için Eltrombopag stok standart çözeltisinden 0,073 mL, Eltro-1 stok standart çözeltisinden 0,065 mL ve Eltro-2 stok standart çözeltisinden 0,19 mL, 10,0 mL'lik balon jojeye eklenip hacmine çözücüyle tamamlanmıştır. TS çözeltisi hazırlanması için ise TAS çözeltisinden 3,0 mL alınıp 10,0 mL'lik balon jojede seyreltilmiştir. Sonuçlar **Çizelge 3.22.**'de verilmektedir.

Çizelge 3.22. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları

Bileşik	TS derişimleri		TAS derişimleri		S/N	
	µg/mL	%	µg/mL	%	TS Limit: ≥ 3	TAS Limit: ≥10
Eltrombopag	0,0104	0,002	0,0366	0,007	10	24
Eltro-1	0,0147	0,003	0,0490	0,010	5	17
Eltro-2	0,0430	0,009	0,1434	0,029	4	14

3.4.1.5. Doğruluk

Doğruluk çalışmasının kabul kriterleri şu şekildedir: Her bir ilaç etken maddenin ve safsızlığın geri kazanım değerleri %90,0–%110,0 arasında olmalıdır. TAS düzeyindeki geri kazanım değerleri geri kazanım %70,0–%130,0 arasında olması gerekmektedir.

Doğruluk validasyon parametresi çalışması için spesifikasyon limitinde safsızlıkların karışım çözeltisi altı kez ve iki paralel numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Ayrıca, TAS derişiminde ve spesifikasyon limitinin %50, %100 ve %150'sine karşılık gelen derişimlerde numuneye safsızlıklar eklendi. Her seviye için 3'er farklı numune hazırlanmıştır. Bu

numunelerin her biri bir kez enjekte edilmiştir. Alınan sonuçlar kabul kriterlerini sağlamaktadır (**Çizelge 3.23.**).

Çizelge 3.23. Doğruluk sonuçları çizelgesi

Bileşik	Doğruluk (n=3)				
	Seviyeler, %	Derişim, %	Bulunan Derişim (Ortalama±SS, %)	Bağıl Hata, %	Geri Kazanım, %
Eltro-1	TAS	0,011	0,012±0,000	0,0	100,0
	50	0,074	0,074±0,000	1,4	98,6
	100	0,147	0,147±0,002	0,7	99,3
	120	0,177	0,176±0,002	0,4	99,6
Eltro-2	TAS	0,027	0,025±0,001	7,4	92,6
	50	0,074	0,076±0,001	2,3	102,3
	100	0,150	0,150±0,002	0,7	100,7
	120	0,170	0,170±0,002	4,5	95,5

3.4.1.6. Alan Düzeltme Faktörü (CRF)

Alan düzeltme faktörü, farklı analitlere verilen dedektör tepkisindeki farklılıkları hesaba katmak için kullanılır. Bu faktör, farklı analitler arasındaki moleküler yapıları, absorbans özellikleri gibi farklılıklar nedeniyle dedektör tepkisindeki farklılıkların göz ardı edilmesine yardımcı olur.

CRF hesaplanması için spesifikasyon limitinde Eltrombopag ve safsızlık karışım çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Alınan CRF sonuçlar **Çizelge 3.24.**'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.24. Eltrombopag ve safsızlıkların CRF sonuçları

Bileşik	Derişim. (µg/mL)	Alan ortalamaları	CRF
Eltrombopag	0,53	14785	-
Eltro-1	0,75	16487	1,3
Eltro-2	0,75	24769	0,9

3.4.1.7.Kesinlik

3.4.1.7.1. Yöntem Kesinliği

Bu çalışma için safsızlık karışımı eklenmiş Eltrombopag numune çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Kabul kriterleri ise şu şekildedir: Her bir analizin geri kazanım sonucu %90,0–%110,0 arasında olması gerekir. Elde edilen geri kazanım sonuçların %BSS ise %10,0'a eşit veya küçük olmalıdır.

3.4.1.7.2. Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvarlar Arası)

İki kesinlik çalışmanın sonuçları arasındaki fark %10,0'a eşit veya az olmalıdır. Diğer kabul kriterleri ise yöntem kesinliği kabul kriterleri ile aynıdır. Bu çalışma için aynı Eltrombopag numune serisinde altı safsızlık karışımı eklenmiş Eltrombopag numune çözeltisi hazırlanıp enjekte edilmiştir. Sonuçlar ise **Çizelge 3.25.**'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Eltrombopag ilgili maddeler kesinlik sonuçları

Bileşik	**Yöntem Kesinliği (n=6)**		**Tekrar Üretilebilirlik (n=6)**		**Fark, %**
	Geri kazanım (Ortalama ±SS, %)	**BSS, %**	**Geri kazanım (Ortalama ±SS, %)**	**BSS, %**	
Eltro-1	97,29±1,12	1,15	98,04±0,93	0,95	0,7
Eltro-2	95,39±2,65	2,78	98,59±2,29	2,32	3,2

3.4.1.8. Sağlamlık

Sağlamlık parametresi çalışma için iki kör çözelti, altı standart çözelti ve spesifikasyon limitinde safsızlıklar eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Her bir parametre değişikliği için bu batch kullanılmıştır.

Çalışmanın kabul kriterleri ise şu şekildedir: Spesifikasyon limitinde safsızlıklar eklenmiş numune çözeltisi kromatogramında, Eltrombopag pikinin simetri faktörü 1,8'den küçük veya eşit olmalıdır.

Sağlamlık çalışmanın sonucuna göre Eltrombopag ilgili maddeler yöntemin, analiz parametrelerdeki küçük değişimlerden etkilenmediği söylenebilir (**Çizelge 3.26.**).

Çizelge 3.26. Eltrombopag ilgili maddeler sağlamlık sonuçları

Şartlar	Alıkonma Zamanı	Simetri Faktörü
Normal Şartlar	19,34	0,9
Kolon akışı: 0,9 mL/dk	20,24	0,9
Kolon akışı: 1,1 mL/dk	18,55	0,9
Kolon sıcaklığı: 17 ºC	19,46	1,0
Kolon sıcaklığı: 23 ºC	19,14	0,9
MF A pH 3,0	19,66	1,0
MF A pH 3,4	18,74	1,1
MF B pH 6,6	19,52	1,0
MF B pH 7,0	19,28	0,8

3.4.1.9. Çözelti Stabilitesi

Tez kapsamındaki bu çalışma için ilaç etken maddenin standart pik alanındaki değişim %5,0'dan küçük, safsızlıkların pik alanlarındaki değişim ise %10,0'dan küçük olmalıdır.

Bu çalışma için standart çözeltileri ve safsızlıklar ilave edilmiş örnek çözeltileri hazırlandı ve dört saatte bir 48 saat boyunca analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre numune çözeltisi sekiz saat kararlı oluğu söylenebilir (**Çizelge 3.37.**).

Çizelge 3.27. Eltrombopag ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları

Zaman	Eltrombopag Std		Eltro-1		Eltro-2	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	15173	-	17723	-	23505	-
4. Saat	15457	1.9	18149	2.4	22687	3.5
8. Saat	15428	1.7	18275	3.1	21716	7.6
12. Saat	15352	1.2	18439	4.0	21071	10.4
16. Saat	15684	3.4	18483	4.3	20791	11.5
20. Saat	15710	3.5	18695	5.5	20025	14.8
24. Saat	15125	0.3	18813	6.2	19227	18.2
28. Saat	14776	2.6	19044	7.5	19337	17.7
32. Saat	14543	4.2	19213	8.4	18550	21.1
36. Saat	14649	3.5	19260	8.7	17854	24.0
40. Saat	15422	1.6	19319	9.0	18138	22.8
44. Saat	15539	2.4	18972	7.0	17383	26.0
48. Saat	15443	1.8	18778	6.0	16908	28.1

3.4.2. Eltrombopag Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları

3.4.2.1. Sistem Uygunluk

Eltrombopag miktar tayini yöntem sistem uygunluk testi için altı standart çözeltisi enjeksiyonu verilmiştir. Sistem uygunluk testinin kabul edilmesi için bu altı enjeksiyondan elde edilen pik alanların arasındaki %BSS %0,85'ten küçük olmalıdır. Bunu yanı sıra standart çözeltisinin 6. enjeksiyonunda Eltrombopag pikinin simetri faktörü 1,8'den küçük veya eşit olmalıdır.

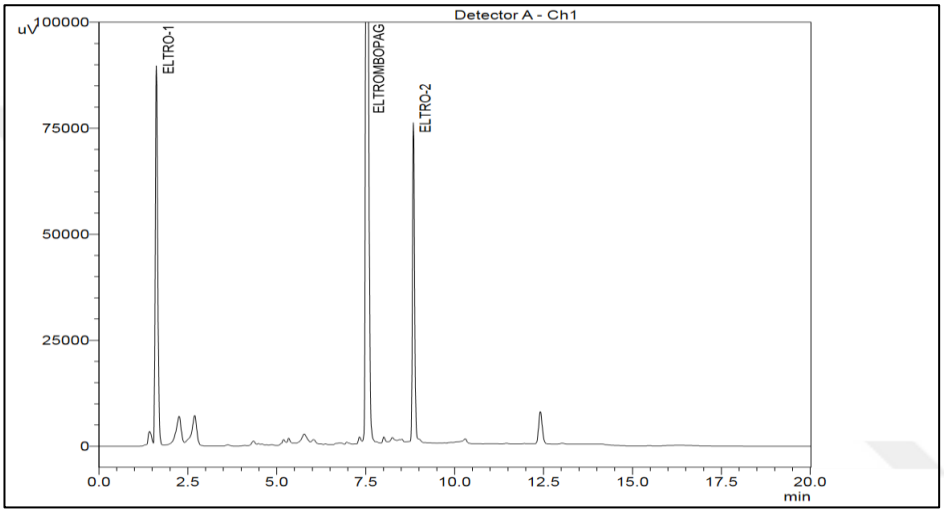
Çalışma sonucunda altı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Eltrombopag pik alanların arasındaki %BSS 0,65 (≤0,85) bulunmuştur. Elde edilen simetri faktörü 1,4 (≤1,8) bulunmuştur.

3.4.2.2.Seçicilik

Eltrombopag numune miktarı validasyon çalışması seçicilik parametresinin kabul kriterleri ilgili maddeler validasyonu seçicilik parametresine benzer olup, Eltrombopag pikinin geldiği alıkonma zamanında bir safsızlık piki ve kullanılan çözücüden herhangi bir pik gelmemelidir. Eltrombopag piki spektral olarak saf olmalıdır.

Bu çalışma için kör çözeltisi, standart çözeltisi, numune çözeltisi, safsızlık karışım çözeltisi ve safsızlık eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Spektral safsızlık için ise çalışmalar PDA dedektöründe 190-400 nm dalga boyu aralığında yapılmıştır.

Seçicilik çalışması sonuçlarına göre Eltrombopag pikinin alıkonma zamanında, kör ve safsızlık çözeltilerinden bir pik gözlemlenmemiştir. Bunu yanı sıra, Eltrombopag pikin spektral olarak saf olduğu denebilir (**Çizelge 3.28.**).



Şekil 3.23. Eltrombopag miktar tayini limit derişimde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi kromatogramı

Çizelge 3.28. Eltrombopag miktar tayini pik saflığı sonuçları

Bileşik	RT, dk	Saflık Endeksi	Saflık Eşiği
Eltrombopag	6,7	0,994685	0,994566
Eltro-1	1,6	-	-
Eltro-2	5,7	-	-

3.4.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Miktar tayini validasyon çalışmasındaki doğrusallık parametre kabul kriterleri ilgili maddeler validasyon çalışmasındakinden farklı olup şu şekildedir: korelasyon kat sayısı 0,997' dan yüksek olmalıdır. Regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanı ise %2'yi geçmemelidir. Bu çalışmada beş farklı derişimde çözeltiler hazırlanıp, en az 3'er kez analiz edilmiştir.

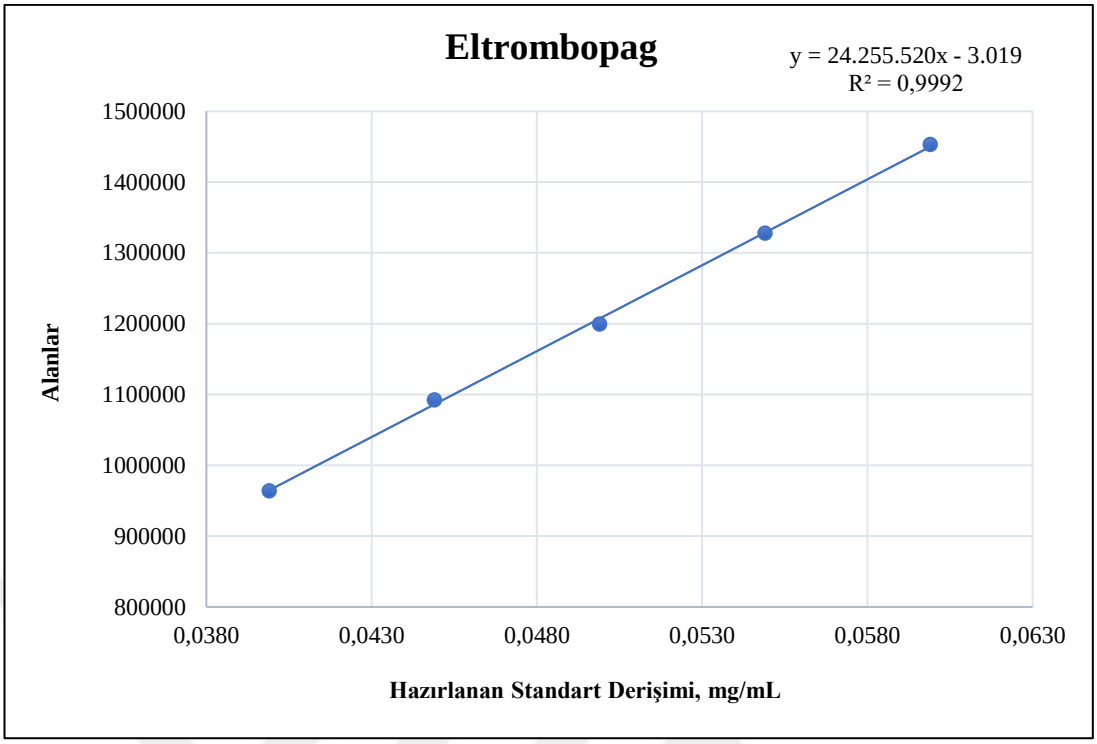
Eltrombopag standardın kalibrasyon grafiğini çizmek için, %90, %100 ve %110 3'er kez enjekte edilmiştir. Minimum (%80) ve maksimum (%120) seviyeleri ise 6'şar kez enjekte edilmiştir.

Çalışma aralığı çalışmasının kabul görmesi için ise minimum ve maksimum seviyede kaydedilen alanların %BSS'si %0,85'ten fazla olmamalıdır.

Hem doğrusallık hem de çalışma aralığı çalışması kabul kriterleri sağlamaktadır. Buna göre geliştirilen Eltrombopag miktar tayini yöntemi ile çalışıldığında Eltrombopag derişimleri ile dedektörün verdiği sinyalleri arasında lineer bir ilişki var olduğu söylenebilir. Ayrıca %100'lük standart derişimin %80'i ile %120'si aralığı doğrusallık çalışmasında elde edilen verilere göre Eltrombopag miktar tayini yöntemin çalışma aralığı olarak uygun bulunmuştur (**Çizelge 3.29.**).

Çizelge 3.29. Eltrombopag miktar tayini doğrusallık sonuçları

Seviye	**Derişim (mg/mL)**	**Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,999**	**Regresyon Denklemi**	**[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: ≤ 2,0%**	**Alan BSS (%)**	
					En düşük derişimi	**En yüksek derişimi**
%80	0,0399	0,9996	y=24255520x -3019	0,3	0,06	0,06
%90	0,0449					
%100	0,0499					
%110	0,0549					
%120	0,0599					



Şekil 3.24. Eltrombopag miktar tayini Eltrombopag standardının doğrusallık grafiği

3.4.2.4. Doğruluk

Doğruluk validasyon parametresi için Eltrombopag numune konsantrasyonun %80, %100 ve %120'si olmak üzere üç konsantrasyonda numune hazırlandı. Tüm seviyeler için 3'er numune hazırlandı. Her numuneden ise 2'şer enjeksiyon yapılmıştır.

Her bir seviyedeki geri kazanım değeri %98-%102 arasında olduğu takdirde bu çalışma kabul edilmiş olur. Çalışmanın sonucunda her seviyedeki geri kazanımlar %98-%102 aralığındadır (**Çizelge 3.30.**).

Çizelge 3.30. Eltrombopag miktar tayini doğruluk sonuçları

Seviye, %	Derişim, mg/mL	Hesaplanan Derişim, mg/mL	BSS, %	Geri Kazanım, %
%80	0,04000	0,03972	0,3	99,3
	0,04010	0,03969		99,0
	0,03990	0,03968		99,5
%100	0,05010	0,04969		99,2
	0,04990	0,04968		99,6
	0,05020	0,04964		98,9
%120	0,05980	0,05930		99,2
	0,05990	0,05946		99,3
	0,06010	0,05938		98,8

3.4.2.5. Kesinlik

3.4.2.5.1. Sistem Kesinliği

Sistem kesinliği için altı Eltrombopag standart çözeltisi enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanların %BSS'si ≤ 0,85 ve standart çözeltisinin altıncı enjeksiyonunda Eltrombopag pikinin simetri faktörü ≤1,8 olması gerekmektedir.

Altı standart çözelti enjeksiyonundan elde edilen %BSS 0,65, simetri faktörü ise 1,367 bulunmuştur.

3.4.2.5.2. Yöntem Kesinliği

Bu çalışma için altı numune çözeltisi 2'şer kez enjekte edilmiştir. Kabul kriterleri ise şu şekildedir: altı örnek enjeksiyonundan alınan sonuçların bağıl standart sapmaları (RSD) ≤ %0,85 olması gerekmektedir.

Altı numune çözelti enjeksiyonundan elde edilen %BSS 0,39 bulunmuştur.

3.4.2.5.3. Tekrar Üretilebilirlik

İki kesinlik çalışmanın sonuçları arasındaki fark %2,0'a eşit veya az olmalıdır. Diğer kabul kriterleri ise yöntem kesinliği kabul kriterleri ile aynıdır. Bu çalışma için aynı Eltrombopag numune serisinde altı Eltrombopag numune çözeltisi hazırlanıp enjekte edilmiştir.

Kesinlik çalışmaları kabul kriterlerine uygun bulunmuştur. Sonuçlar ise **Çizelge 3.31.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.31. Eltrombopag miktar tayini kesinlik sonuçları

	Bileşik	**Alıkonma Zamanı , dk**	**Eltrombopag miktarı,%**	
			Kromatografik	**Susuz ve solventsiz**
1. Çalışma	Eltrombopag	7,5	78,8	79,4
		BSS (%)	0,39	0,39
		%95 Güven Aralığı	78,5 – 79,1	79,1 – 79,7
2. Çalışma	Eltrombopag	7,5	78,6	79,2
		BSS (%)	0,15	0,15
		%95 Güven Aralığı	78,5 – 78,7	79,1 – 79,3
			Ortalama sonuçlar arası fark	0,2

3.4.2.6. Sağlamlık

Bu çalışma için iki kör çözelti ve altı standart çözelti enjeksiyonu verilmiştir. Her bir parametre değişikliği için bu batch kullanılmıştır.

Çalışmanın kabul kriterleri ise şu şekildedir: Standart çözeltisinin altı enjeksiyonundan alınan Eltrombopag pik alanları arasındaki % RSD 0,85'ten yüksek olmamalıdır.

Sağlamlık çalışmanın sonucuna göre Eltrombopag miktar tayini yöntemin, analiz parametrelerdeki küçük değişimlerden etkilenmediği söylenebilir (**Çizelge 3.32.**).

Çizelge 3.32. Eltrombopag miktar tayini sağlamlık sonuçları

Şartlar	RT	%BSS
Normal Şartlar	7,52	0,10
Akış hızı 1,1 mL/dk	7,78	0,32
Akış hızı 1,3 mL/dk	7,28	0,34
Kolon sıcaklığı 18 ºC	7,52	0,18
Kolon sıcaklığı 22 ºC	7,51	0,18
Hareketli A pH 6,5	6,44	0,21
Hareketli faz A pH 7,1	6,37	0,24

3.4.2.7. Çözelti Stabilitesi

Eltrombopag miktar tayini yöntemi için numune çözeltisinin başlangıç zamanında ve tüm zaman dilimlerinde elde edilen pik alanların arasındaki farklar % 2,0'ı geçmemelidir.

Bu çalışmada 48 saat boyunca numune çözeltisi analiz edilmiştir ve elde edilen sonuçlara göre numune çözeltisi 48 saat kararlı oluğu söylenebilir (**Çizelge 3.33.**).

Çizelge 3.33. Eltrombopag miktar tayini çözelti stabilitesi sonuçları

Zaman	Eltrombopag	
	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	1204515	UY
4. Saat	1204957	0,0
8. Saat	1208040	0,3
12. Saat	1211808	0,6
16. Saat	1214997	0,9
20. Saat	1216423	1,0
24. Saat	1218128	1,1
28. Saat	1221006	1,4
32. Saat	1224023	1,6
36. Saat	1226467	1,8
40. Saat	1230270	2,1
44. Saat	1233306	2,4
48. Saat	1235485	2,6

3.4.3. Eltro-1 İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları

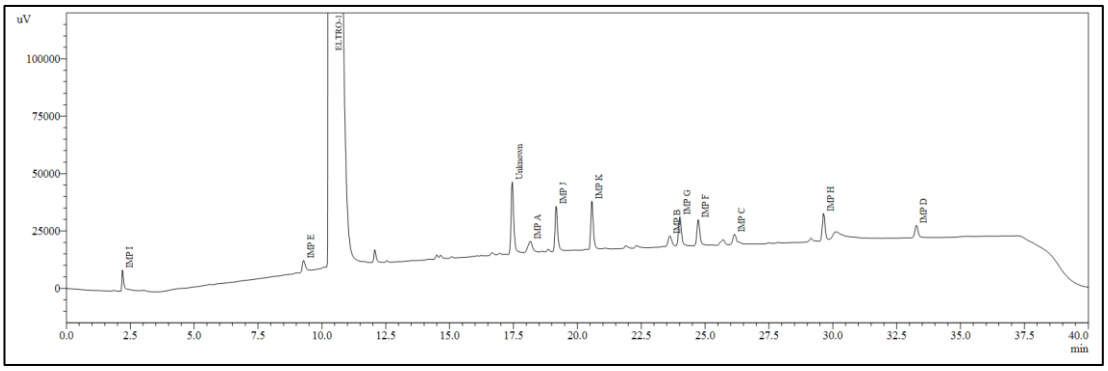
3.4.3.1. Seçicilik

Bu tez kapsamındaki seçicilik çalışması için kör çözeltisi, 1,5 µg/mL spesifikasyon limit derişiminde Eltro-1A, Eltro-1B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I ve Eltro-1J ayrı, 0,01 mg/mL spesifikasyon limit derişiminde Eltro-1K, tüm safsızlıklar karışım halinde, 1,0 µg/mL derişiminde standart çözeltisi, 1,0 mg/mL derişiminde numune çözeltisi, spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı eklenmiş standart çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir.

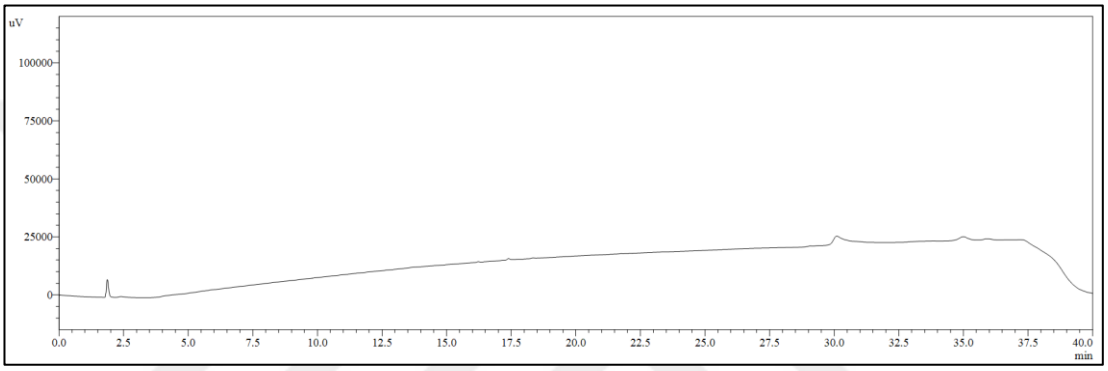
Seçicilik çalışması sonucunda Eltro-1 ve safsızlık piklerin alıkonma zamanında kör çözeltiden gelen herhangi pik gözlemlenmemiştir. Bunu yanı sıra, çalışmanın sonucuna göre Eltro-1 ve safsızlık pikleri spektral olarak saf olduğu söylenebilir (**Çizelge 3.34.**).

Çizelge 3.34. Eltro-1 ilgili maddeler seçicilik sonuçları

Bileşik	RT, dk	RRT	Saflık Endeksi	Saflık Eşiği
Eltro-1	10,6	1,00	1,000000	0,999996
Eltro-1A	18,2	1,72	1,000000	0,912208
Eltro-1B	23,6	2,23	0,999989	0,530929
Eltro-1C	26,2	2,47	0,999990	0,637916
Eltro-1D	33,3	3,14	0,999998	0,814803
Eltro-1E	9,3	0,88	1,000000	0,888389
Eltro-1F	24,7	2,33	0,999999	0,976024
Eltro-1G	24,0	2,26	0,999999	0,983262
Eltro-1H	29,6	2,79	0,999999	0,970677
Eltro-1I	2,3	0,22	0,950552	0,949431
Eltro-1J	19,2	1,81	0,999999	0,990939
Eltro-1K	20,6	1,94	0,999992	0,999981



Şekil 3.25. Eltro-1 ilgili maddeler limit derişimindeki safsızlık eklenmiş numune çözelti kromatogramı



Şekil 3.26. Kör çözelti kromatogramı

3.4.3.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bu parametrenin çalışması için yedi farklı derişimde çözeltiler hazırlanıp, en az 3'er kez analiz edilmiştir.

Eltro-1A, Eltro-1B, Eltro-1C, Eltro-1D, Eltro-1E, Eltro-1F, Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1I, Eltro-1J ve Eltro-1K standartların kalibrasyon grafiğini çizmek için, tayin alt sınır (TAS) altı kez, %50, %70, %100, %120 ve %150 seviyeleri 3'er kez, %200 seviyesi ise altı kez enjekte edilmiştir.

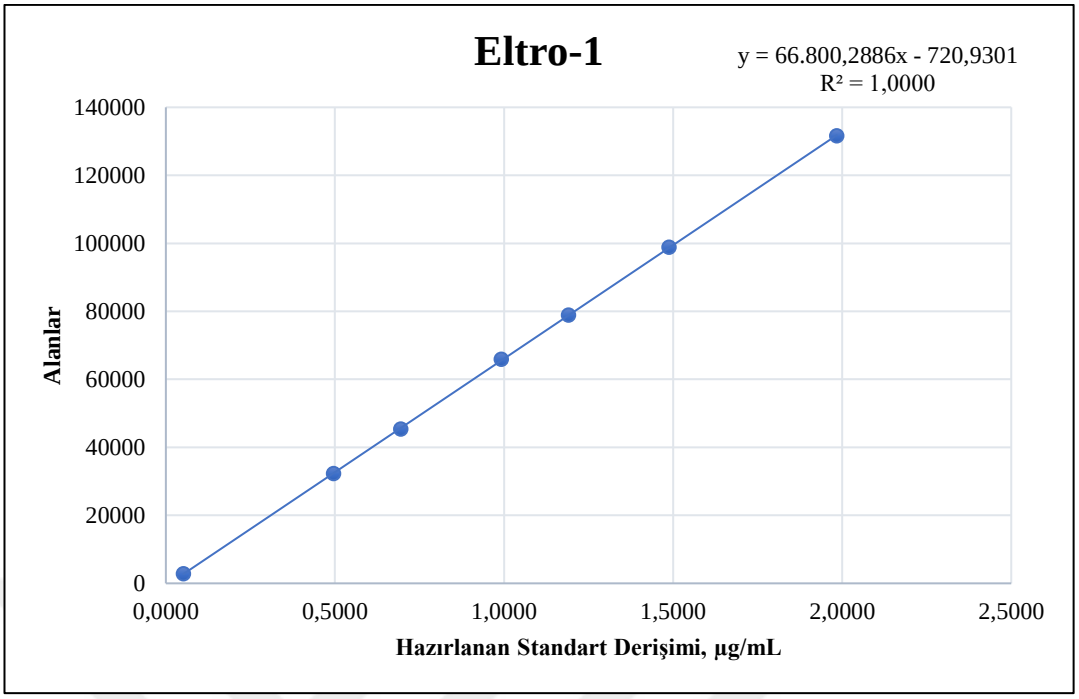
İlgili maddeler yöntemi doğrusallık validasyon parametre kabul kriterlerine göre hem ilaç etken maddenin hem de safsızlıkların korelasyon katsayıları 0,99'dan az olmamalıdır, ayrıca regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanı ise %5'i geçmemelidir.

Elde edilen sonuçlardan bir diğer validasyon parametresi olan çalışma aralığı da belirlenmiştir. Çalışma aralığın kabul kriteri; minimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %10,0'dan fazla, maksimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması ise %5,0'dan fazla olmamalıdır.

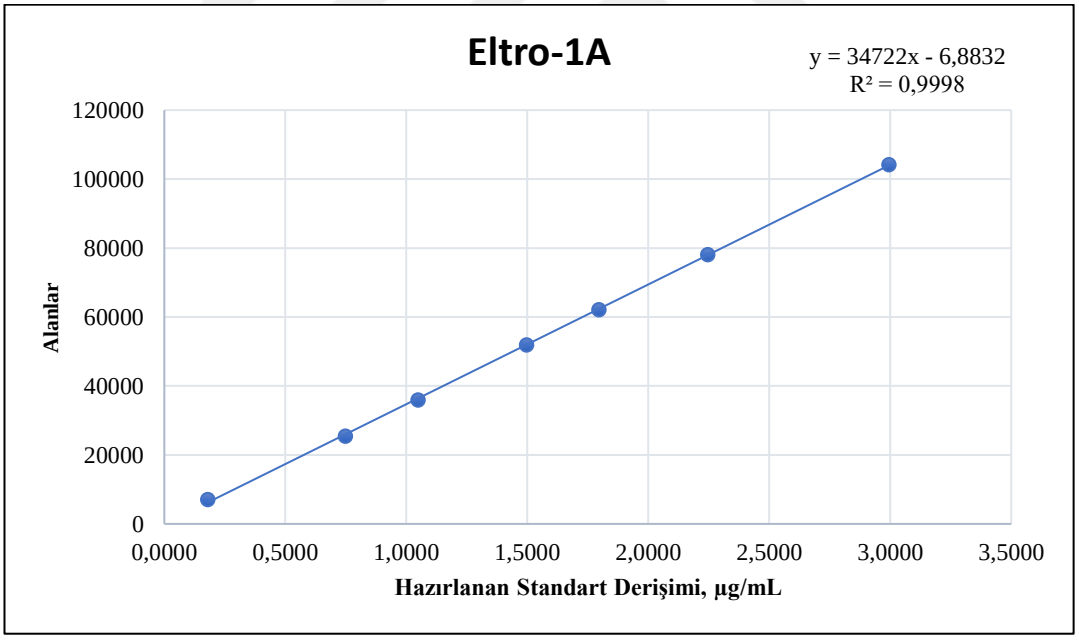
Doğrusallık validasyon çalışması sonuçlarına göre kalibrasyon eğrileri çizilip, korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Eltro-1 TAS ile %200 arasındaki derişimlerle doğrusal sonuçlar verdiği bulunmuştur. Çalışma aralığı validasyon çalışmasına göre en düşük ölçülebilir konsantrasyonda, yani TAS'ta, bağıl standart sapması %10,0'den düşük, en yüksek ölçülebilir konsantrasyonda ise %5,0'dan düşük olduğu bulunmuştur. Sonuçlar **Çizelge 3.35.**'te verilmektedir.

Çizelge 3.35. Eltro-1 ilgili maddeler doğrusallık sonuçları

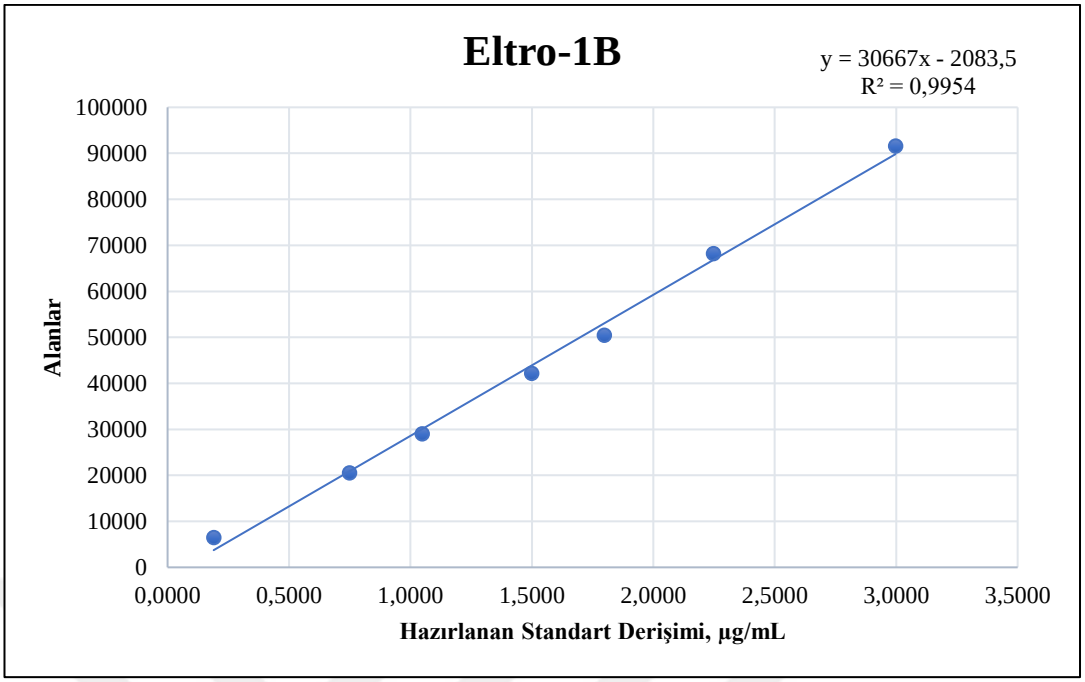
Bileşik	**Derişim (µg/mL)**	**Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,99**	**Regresyon Denklemi**	**[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: ≤ 5,0%**	**Alan BSS, %**	
					En düşük derişim	**En yüksek derişim**
Eltro-1	0,0516-1,9840	1,0000	y=66.800,2886x-720,9301	1,1	3,14	0,09
Eltro-1A	0,1796-2,9940	0,9999	y=34722x-6,8832	0,0	3,41	0,22
Eltro-1B	0,1898-2,9970	0,9977	y=30667x-2083,5	4,9	1,08	0,15
Eltro-1C	0,1898-2,9970	0,9999	y=31245x+2334,4	4,8	3,01	0,16
Eltro-1D	0,1473-2,9460	1,0000	y=34266x-768,1	1,5	3,83	0,38
Eltro-1E	0,1702-3,0028	0,9998	y=33703x+820,29	1,6	4,77	0,43
Eltro-1F	0,0798-2,9940	1,0000	y=63219x-733,98	0,8	1,73	0,13
Eltro-1G	0,0734-3,1438	0,9990	y=63539x-3156,6	3,3	1,65	0,14
Eltro-1H	0,0725-3,1060	0,9998	y=57259x-1488,7	1,7	1,70	0,75
Eltro-1I	0,0906-3,0202	0,9972	y=38991x-2629,5	4,8	2,24	0,75
Eltro-1J	0,0489-2,9310	1,0000	y=93842,5550x-676,3144	0,5	2,88	0,05
Eltro-1K	0,0503-20,1214	0,9999	y=66522x+5756	0,8	3,78	0,18



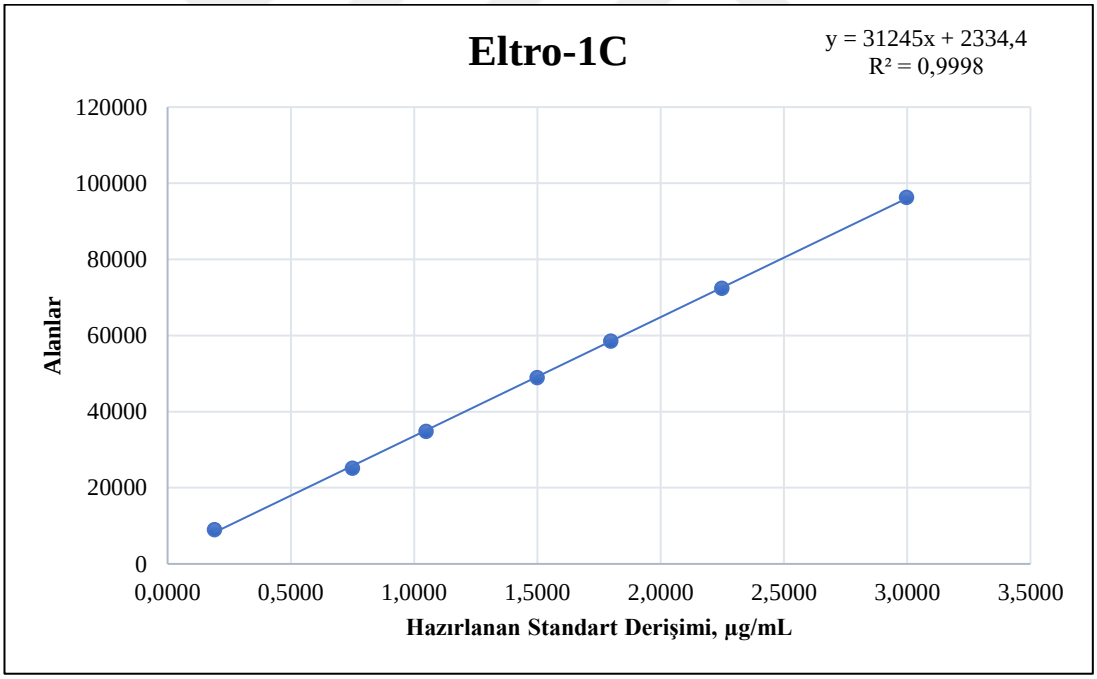
Şekil 3.27. Eltro-1 standardı doğrusallık grafiği



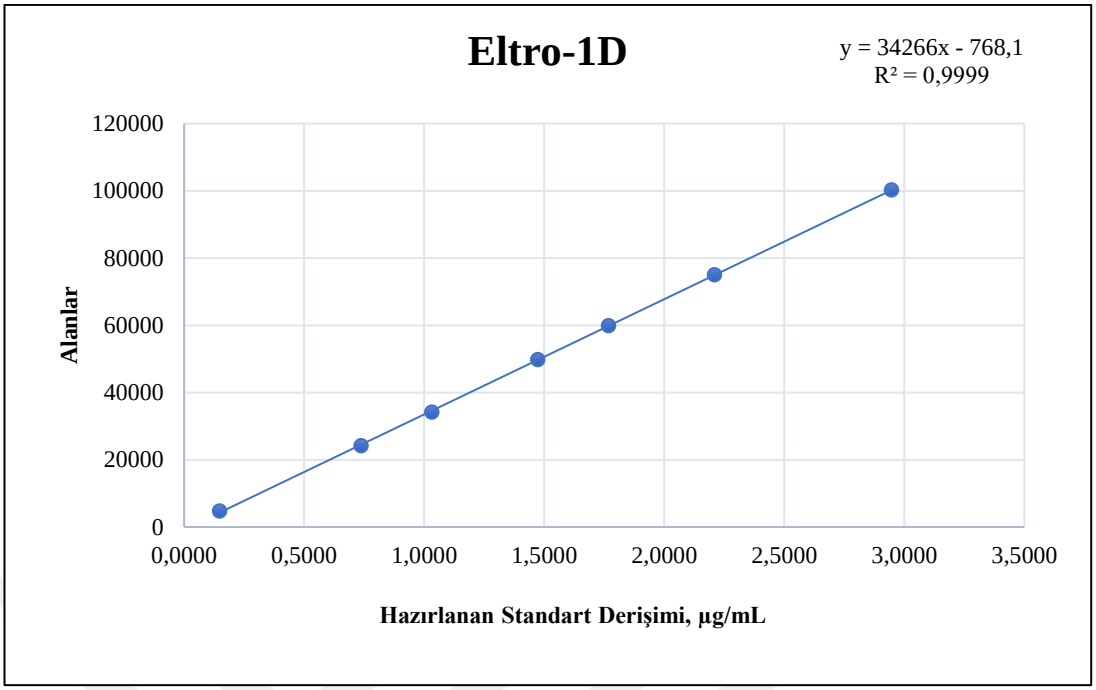
Şekil 3.28. Eltro-1A standardı doğrusallık grafiği



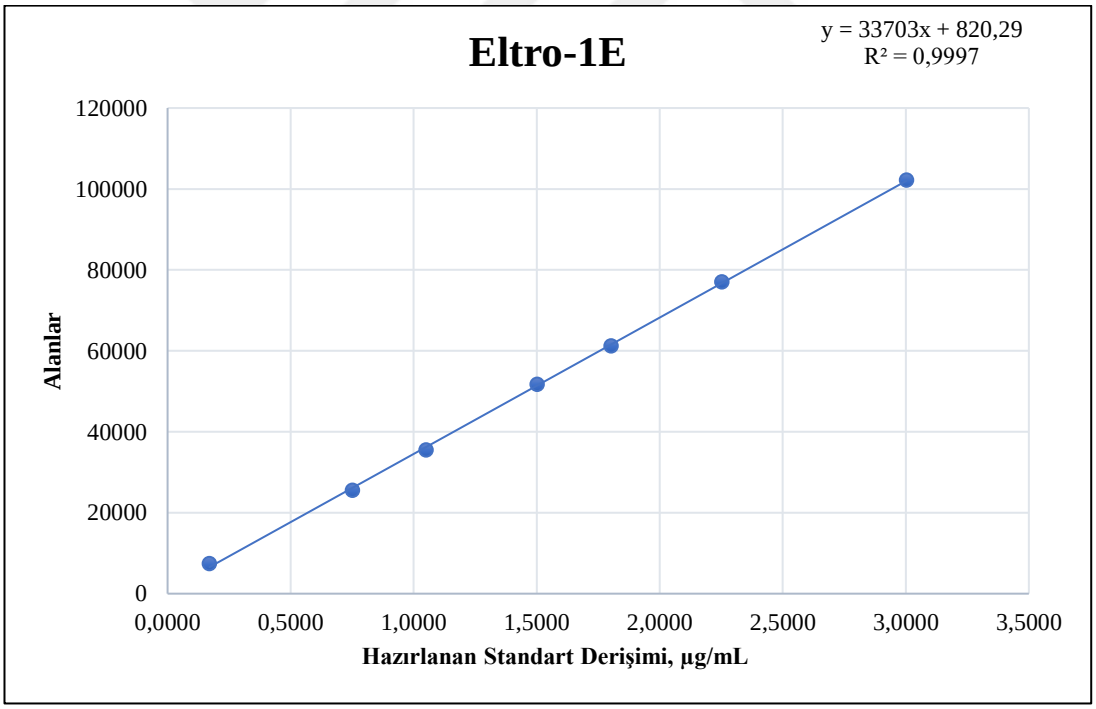
Şekil 3.29. Eltro-1B standardı doğrusallık grafiği



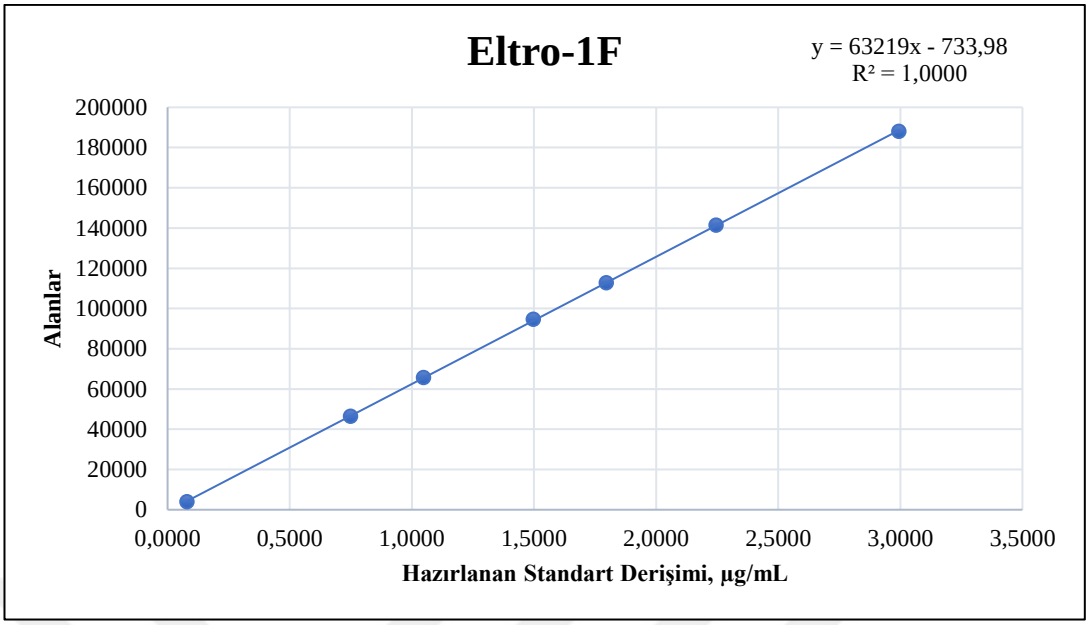
Şekil 3.30. Eltro-1C standardı doğrusallık grafiği



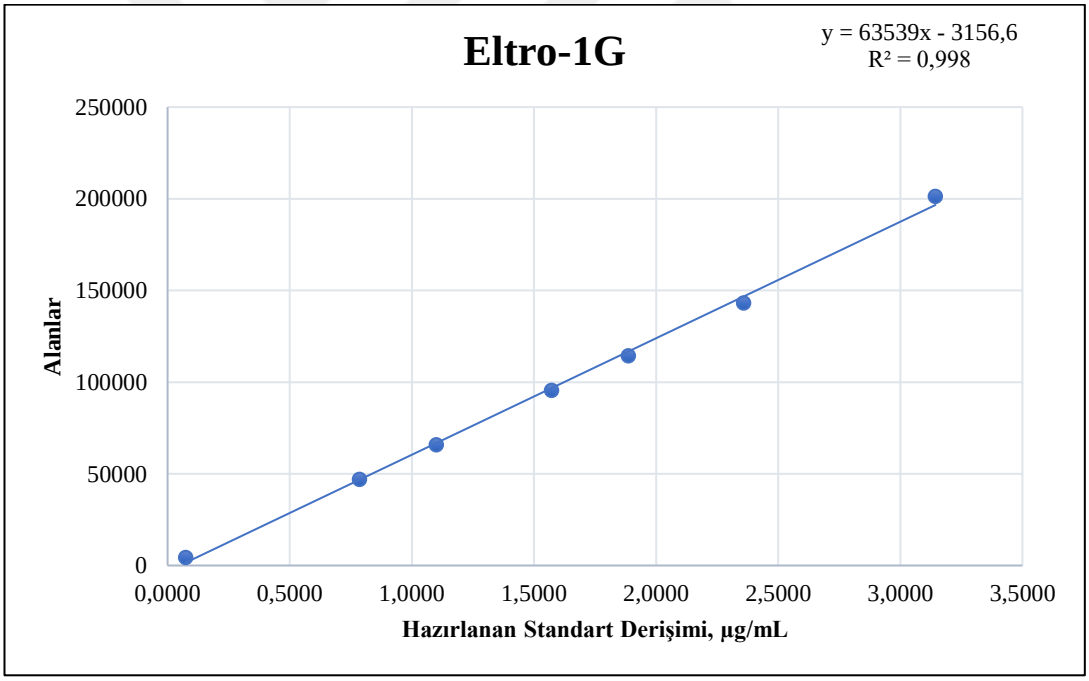
Şekil 3.31. Eltro-1D standardı doğrusallık grafiği



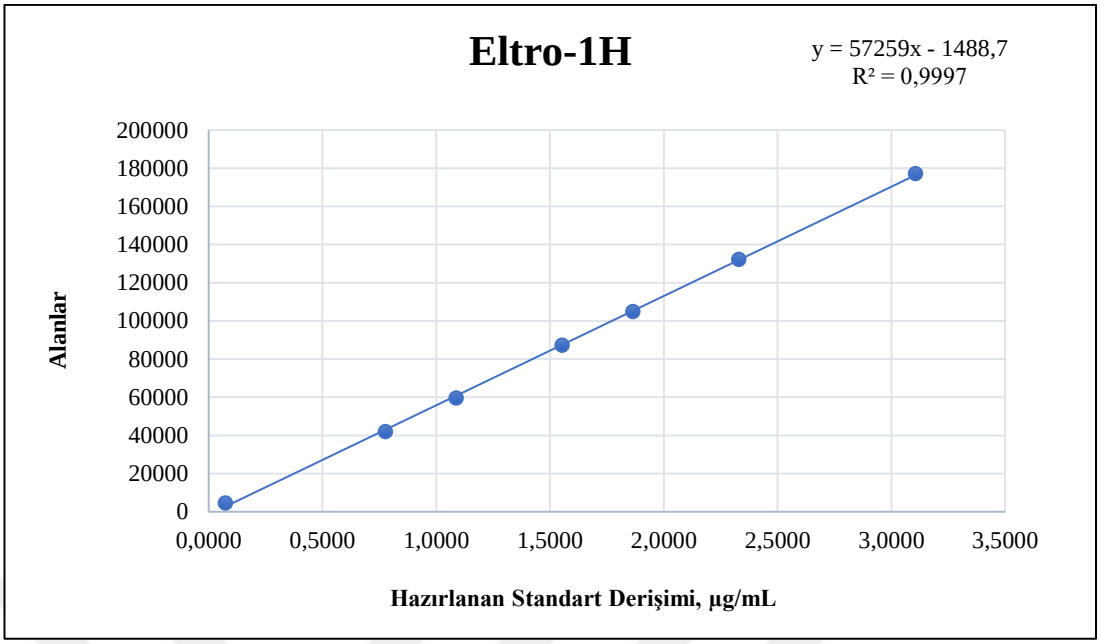
Şekil 3.32. Eltro-1E standardı doğrusallık grafiği



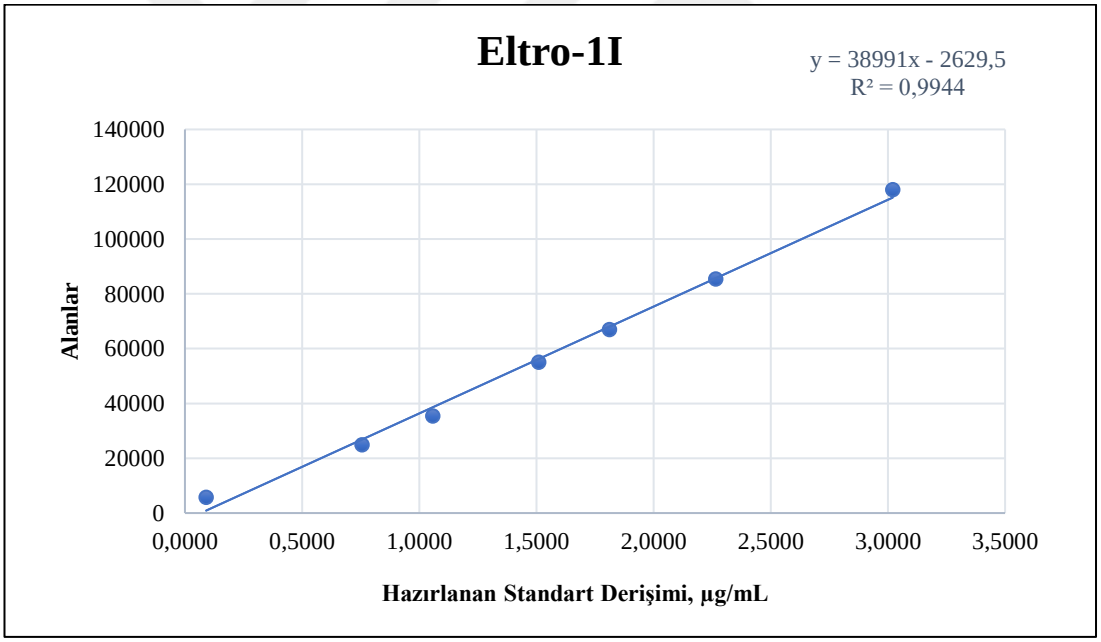
Şekil 3.33. Eltro-1F standardı doğrusallık grafiği



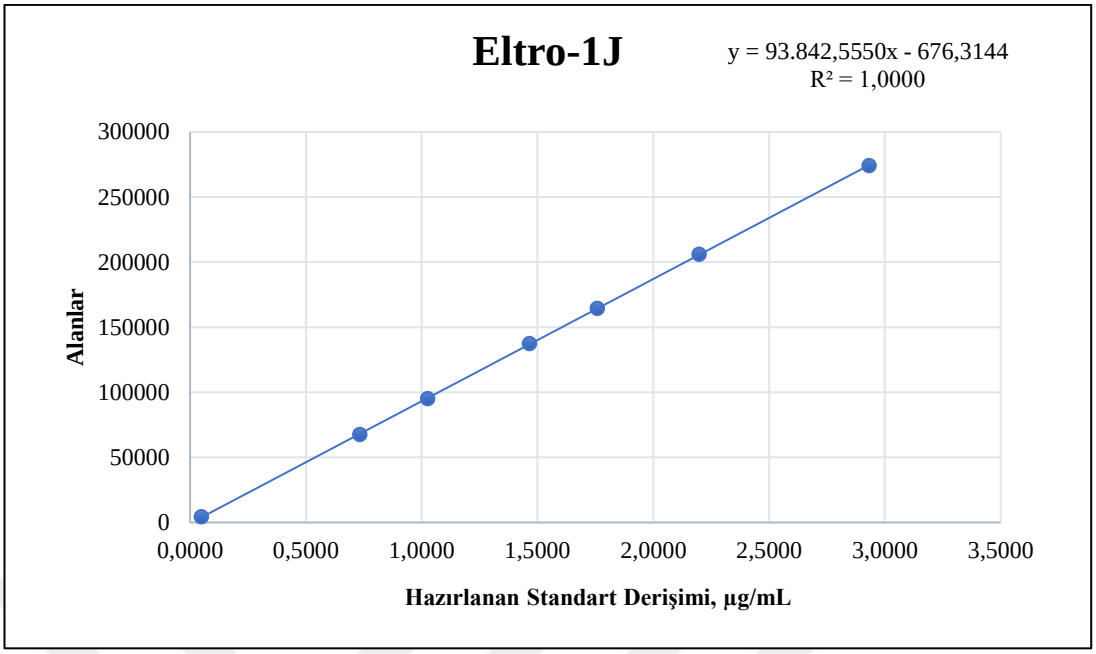
Şekil 3.34. Eltro-1G standardı doğrusallık grafiği



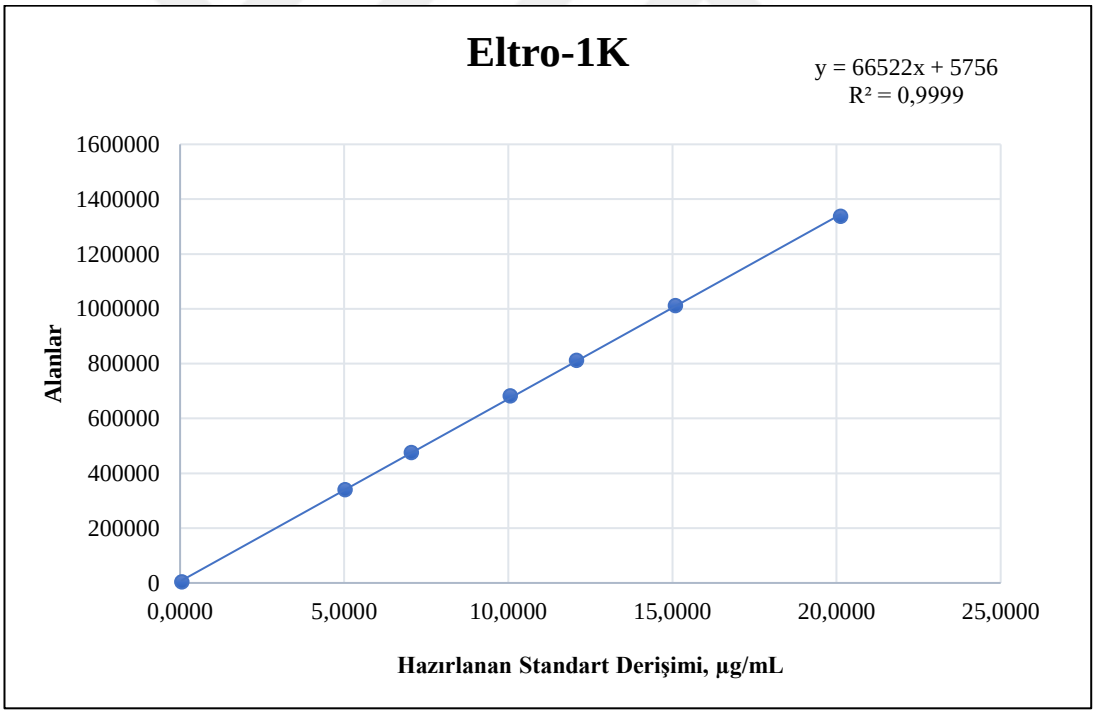
Şekil 3.35. Eltro-1H standardı doğrusallık grafiği



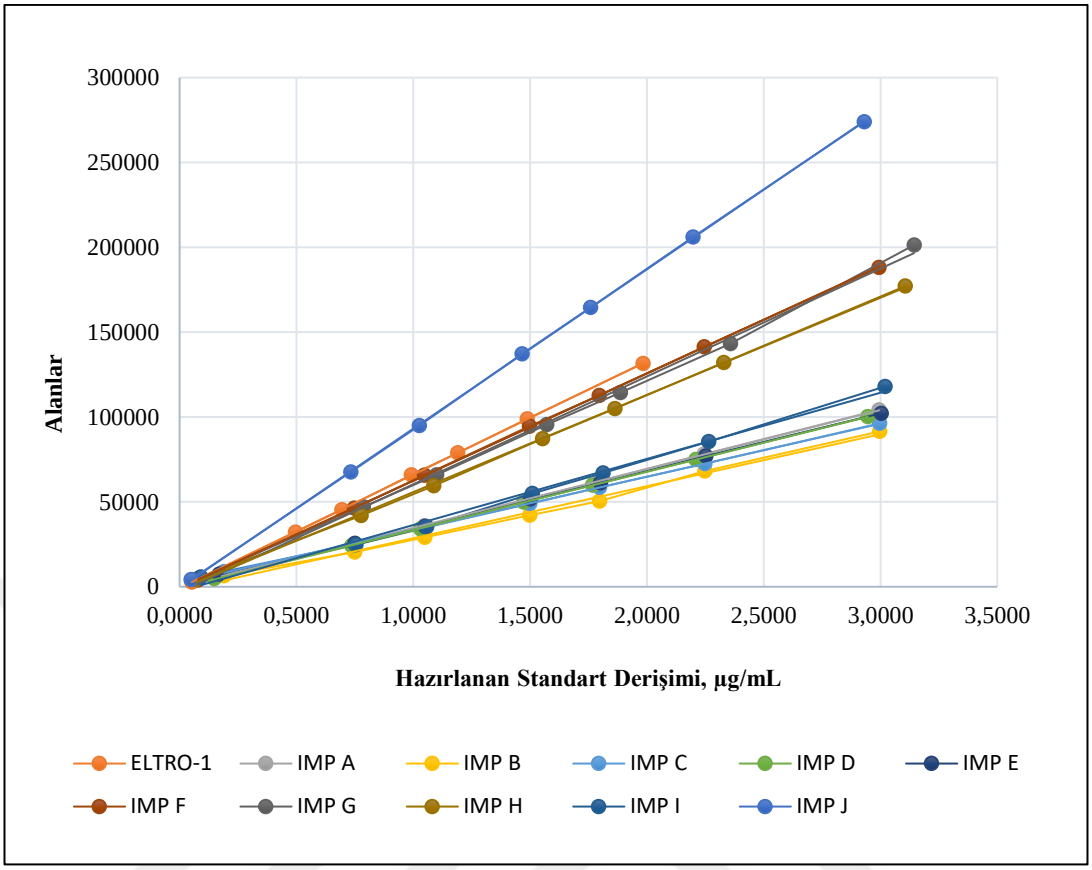
Şekil 3.36. Eltro-1I standardı doğrusallık grafiği



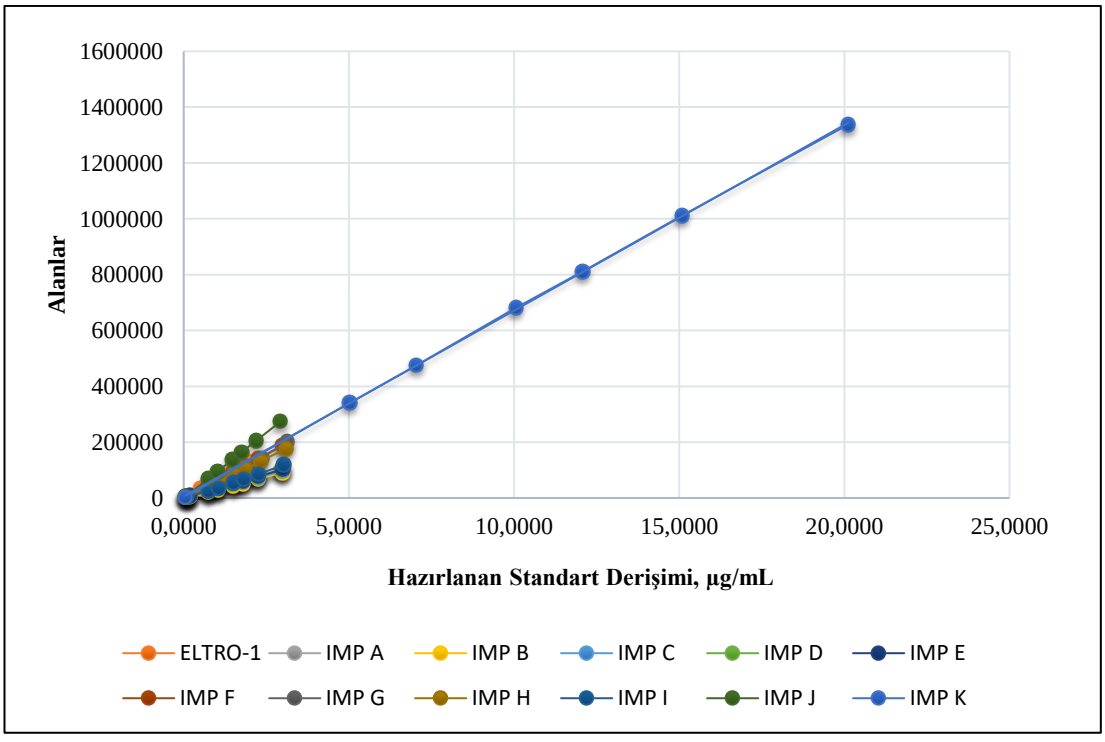
Şekil 3.37. Eltro-1J standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.38. Eltro-1K standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.39. Eltro-1 ilgili maddeler çakıştırılmış IMP-K dahil edilmemiş doğrusallık grafikleri



Şekil 3.40. Eltro-1 ilgili maddeler çakıştırılmış IMP-K dahil edilmiş doğrusallık grafikleri

3.4.3.3.Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

Eltro-1 ilgili maddeler yöntemin validasyon çalışmasındaki TAS ve TS kabul kriterlere göre, TAS derişiminde enjekte edilen tüm numunelerin %BSS'si 10,0'dan küçük olmalıdır. Aynı zamanda sinyal/gürültü oranları 10,0'a eşit veya büyük olmalıdır. TS derişiminde enjekte edilen numunelerin sinyal/gürültü oranları 3,0'a eşit veya büyük olmalıdır.

Bu validasyon çalışması için, spesifikasyon limit derişimde Eltro-1 ve safsızlık karışım çözeltisi 6'şar kez enjekte edilip, elde dilen sinyal/gürültü oranlarından TAS derişimleri hesaplanmıştır.

Sonuçlara göre TAS çözeltilerin hazırlanışı için her maddenin kendi stok çözeltisi kullanılmıştır. Eltro-1 stok çözeltisinden 0,5 mL, Eltro-1A 1,8 mL, Eltro-1B 1,9 mL, Eltro-1C 1,9 mL, Eltro-1D 1,5 mL, Eltro-1E 1,7 mL, Eltro-1F 0,8 mL, Eltro-1G 0,7 mL, Eltro-1H 0,7 mL, Eltro-1I 0,9 mL, Eltro-1J 0,5 mL ve Eltro-1K 0,5 mL, 100,0 mL hacime sahip bir balon jojeye eklenip hacmine çözücüyle tamamlanmıştır. TS çözeltisi hazırlanması için ise TAS çözeltisinden 3,0 mL alınıp 10,0 mL'lik balon jojede seyreltilmiştir. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 3.36.**'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.36. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları

Bileşik	TS derişimleri		TAS derişimleri		S/N	
	µg/mL	%	µg/mL	%	TS Limit: ≥ 3	TAS Limit: ≥10
Eltro-1	0,0155	0,002	0,0516	0,005	3	15
Eltro-1A	0,0539	0,005	0,1796	0,018	3	22
Eltro-1B	0,0569	0,006	0,1898	0,019	3	24
Eltro-1C	0,0569	0,006	0,1898	0,019	11	27
Eltro-1D	0,0442	0,005	0,1473	0,015	3	19
Eltro-1E	0,0511	0,005	0,1702	0,017	4	23
Eltro-1F	0,0239	0,002	0,0798	0,008	3	18
Eltro-1G	0,0220	0,002	0,0734	0,007	3	21
Eltro-1H	0,0218	0,002	0,0725	0,007	3	23
Eltro-1I	0,0272	0,003	0,0906	0,009	6	14
Eltro-1J	0,0147	0,002	0,0489	0,005	3	20
Eltro-1K	0,0151	0,002	0,0503	0,005	14	46

3.4.3.4.Doğruluk

Doğruluk çalışmanın kabul kriterlerine göre her bir ilaç etken maddenin ve safsızlığın geri kazanım değerleri %90,0–%110,0 arasında olmalıdır. TAS düzeyindeki geri kazanım değerleri geri kazanım %70,0–%130,0 arasında olması gerekmektedir.

Doğruluk validasyon parametresi çalışması için spesifikasyon limitinde safsızlıkların karışım çözeltisi altı kez ve iki paralel numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Ayrıca, TAS derişiminde ve spesifikasyon limitinin %50, %100 ve %120'lik derişimlerde numuneye safsızlıklar eklendi. Her seviye için üç farklı numune hazırlanmıştır ve her bir numune bir kez enjekte edilmiştir. Sonuçlar kabul kriterlerini sağlayıp, **Çizelge 3.37.**'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.37. Doğruluk sonuçları çizelgesi

Bileşik	**Doğruluk (n=3)**				
	Seviyeler, %	**Derişim, %**	**Bulunan Derişim (Ortalama±SS, %)**	**Bağıl Hata, %**	**Geri Kazanım, %**
Eltro-1A	TAS	0,018	0,022±0,000	22,2	122,2
	50	0,075	0,072±0,002	4,4	95,6
	100	0,150	0,145±0,000	3,5	96,5
	120	0,179	0,192±0,001	7,0	107,0
Eltro-1B	TAS	0,019	0,020±0,000	7,0	107,0
	50	0,075	0,081±0,001	8,0	108,0
	100	0,150	0,160±0,003	6,7	106,7
	120	0,180	0,196±0,000	9,1	109,1
Eltro-1C	TAS	0,019	0,022±0,000	15,8	115,8
	50	0,075	0,079±0,001	5,8	105,8
	100	0,150	0,154±0,001	2,9	102,9
	120	0,180	0,180±0,001	0,0	100,0
Eltro-1D	TAS	0,015	0,012±0,000	22,2	77,8
	50	0,074	0,075±0,004	1,8	101,8
	100	0,147	0,144±0,000	2,2	97,8
	120	0,176	0,173±0,000	1,7	98,3
Eltro-1E	TAS	0,017	0,021±0,000	21,5	121,5
	50	0,075	0,080±0,001	6,7	106,7
	100	0,150	0,160±0,002	6,4	106,4
	120	0,180	0,189±0,001	5,0	105,0
Eltro-1F	TAS	0,008	0,007±0,000	12,5	87,5
	50	0,075	0,072±0,000	3,6	96,4
	100	0,150	0,145±0,000	3,3	96,7

	120	0,179	0,175±0,000	2,2	97,8
Eltro-1G	50	0,113	0,131±0,001	8,6	108,6
	100	0,191	0,205±0,001	7,4	107,4
	120	0,222	0,241±0,001	8,3	108,3
Eltro-1H	50	0,115	0,129±0,001	7,8	107,8
	100	0,192	0,202±0,004	5,7	105,7
	120	0,223	0,219±0,000	1,9	98,1
Eltro-1I	TAS	0,009	0,011±0,000	22,2	122,2
	50	0,076	0,081±0,000	7,1	107,1
	100	0,151	0,164±0,001	8,6	108,6
	120	0,181	0,193±0,002	6,2	106,2
Eltro-1J	TAS	0,005	0,004±0,000	20,0	80,0
	50	0,073	0,079±0,000	8,2	108,2
	100	0,147	0,152±0,000	3,6	103,6
	120	0,176	0,180±0,001	2,3	102,3
Eltro-1K	50	0,505	0,540±0,001	6,9	106,9
	100	1,006	1,068±0,015	6,2	106,2
	120	1,210	1,284±0,013	6,1	106,1

3.4.3.5. Alan Düzeltme Faktörü (CRF)

CRF hesaplanması için spesifikasyon limitinde Eltro-1 ve safsızlık karışım çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Alınan CRF sonuçlar **Çizelge 3.38.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.38. Eltro-1 ve safsızlıkların CRF sonuçları

Bileşik	**Derişim. (µg/mL)**	**Alan ortalamaları**	**CRF**
Eltro-1	0,9920	73676	1,00
Eltro-1A	1,4970	49676	2,00
Eltro-1B	1,4985	44846	2,22
Eltro-1C	1,4985	42229	2,38
Eltro-1D	1,4730	48630	2,00
Eltro-1E	1,5014	45218	2,22
Eltro-1F	1,4970	90423	1,10
Eltro-1G	1,5719	100628	1,04
Eltro-1H	1,5530	88253	1,18
Eltro-1I	1,5101	58608	1,72
Eltro-1J	1,4655	132619	0,74
Eltro-1K	10,0607	670126	1,00

3.4.3.6.Kesinlik

3.4.3.6.1. Yöntem Kesinliği

Bu çalışma için Eltro-1 numune çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Kabul kriterleri ise şu şekildedir: Numunede olan safsızlık miktarı %0,1'den düşük ise %BSS dikkate alınmaz, numunede olan safsızlık miktarı %0,1'e eşit veya yüksek ise %BSS %10 veya daha düşük olmalıdır.

Numunede Eltro-1G, Eltro-1H, Eltro-1K, RRT 1,16, RRT 1,6 ve RRT 2,5 olmak üzere altı safsızlık vardır. Eltro-1G, Eltro-1H ve RRT 2,5 miktarları %0,1'den düşük oldukları için hesaba katılmamıştır. Eltro-1K miktarı %0,3, RRT 1,16 miktarı %0,1 ve RRT 1,6 miktarı %0,3 bulunmuştur.

3.4.3.6.2. Tekrar Üretilebilirlik

Numunedeki safsızlık miktarı %0,1'den düşük ise iki kesinlik çalışması arasındaki farkı dikkate alınmaz. Safsızlık miktarı %0,1-0,2 arasında ise fark 0,05'ten düşük olmalıdır. Safsızlık miktarı %0,2-0,5 arasında ise fark 0,1'ten düşük olmalıdır. Eğer numunede olan safsızlık miktarı %0,5-1,0'dan büyük ise iki kesinlik çalışmanın sonuçları arasındaki fark %0,20'den küçük olmalıdır.

Bu çalışma için aynı Eltro-1 numune serisinden altı numune çözeltisi hazırlanıp enjekte edilmiştir. Sonuçlar ise **Çizelge 3.39.**'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.39. Eltro-1 ilgili maddeler kesinlik sonuçları

Bileşik	**Yöntem Kesinliği (n=6)**		**Tekrar Üretilebilirlik (n=6)**		**Fark, %**
	Bulunan Miktar (Ortalama ±SS, %)	**BSS, %**	**Bulunan Miktar (Ortalama ±SS, %)**	**BSS, %**	
Eltro-1K	0,25±0,00	1,18	0,20±0,00	0,97	0,05
RRT 1,16	0,05±0,00	4,26	0,05±0,00	2,22	0,00
RRT 1,6	0,32±0,00	0,62	0,28±0,00	0,00	0,04

3.4.3.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında iki kör çözelti, altı standart çözelti ve spesifikasyon limitinde safsızlıklar eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Her bir parametre değişikliği için bu batch kullanılmıştır.

Çalışmanın kabul kriterleri ise şu şekildedir: Eltro-1 ile safsızlık pikler birbirinden ayrım göstermelidirler.

Sağlamlık çalışmasına göre yöntem parametrelerdeki küçük değişikliklere duyarlı değildir (**Çizelge 3.40.**, **Çizelge 3.41.** ve **Çizelge 3.42.**).

Çizelge 3.40. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları - 1

Şartlar	Eltro-1		Eltro-1A		Eltro-1B		Eltro-1C	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal Şartlar	10,84	0,5	18,42	1,7	23,88	2,2	26,43	2,4
Kolon akışı: 0,9 mL/dk	11,39	4,5	18,37	1,6	24,85	2,2	27,35	2,4
Kolon akışı: 1,1 mL/dk	10,39	4,5	17,12	1,6	23,03	2,2	25,59	2,5
Kolon sıcaklığı: 36 ºC	10,95	3,9	18,71	1,7	24,48	2,2	29,46	2,7
Kolon sıcaklığı: 44 ºC	10,71	3,5	18,10	1,7	23,56	2,2	26,13	2,4
MF A H_3PO_4 oranı: %0,09	10,60	0,5	18,64	1,8	23,66	2,2	26,20	2,5
MF A H_3PO_4 oranı: %1,1	10,58	0,5	18,11	1,7	23,60	2,2	26,15	2,5

Çizelge 3.41. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları - 2

Şartlar	Eltro-1D		Eltro-1E		Eltro-1F		Eltro-1G	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal Şartlar	33,46	3,1	9,53	0,9	24,98	2,3	24,26	2,3
Kolon akışı: 0,9 mL/dk	34,33	3,0	10,17	0,9	25,74	2,3	25,02	2,2
Kolon akışı: 1,1 mL/dk	32,70	3,2	8,98	0,9	24,32	2,3	23,60	2,3
Kolon sıcaklığı: 36 ºC	33,69	3,1	9,72	0,9	26,71	2,4	25,20	2,3
Kolon sıcaklığı: 44 ºC	33,23	3,1	9,33	0,9	24,75	2,3	24,04	2,2
MF A H_3PO_4 oranı: %0,09	33,33	3,2	9,29	0,9	24,77	2,3	24,05	2,3
MF A H_3PO_4 oranı: %1,1	33,31	3,2	9,24	0,9	24,74	2,3	24,02	2,3

Çizelge 3.42. Eltro-1 ilgili maddeler sağlamlık sonuçları- 3

Şartlar	Eltro-1H		Eltro-1I		Eltro-1J		Eltro-1K	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal Şartlar	29,84	2,8	2,26	0,2	19,41	1,8	20,81	1,9
Kolon akışı: 0,9 mL/dk	30,60	2,7	2,50	0,2	20,06	1,8	21,40	1,9
Kolon akışı: 1,1 mL/dk	29,18	2,8	2,07	0,2	18,86	1,9	20,32	2,0
Kolon sıcaklığı: 36 ºC	30,03	2,7	2,28	0,2	19,60	1,8	20,91	1,9
Kolon sıcaklığı: 44 ºC	29,65	2,8	2,25	0,2	19,22	1,8	20,70	1,9
MF A H_3PO_4 oranı: %0,09	29,69	2,8	2,20	0,2	19,20	1,8	20,60	1,9
MF A H_3PO_4 oranı: %1,1	29,67	2,8	2,20	0,2	19,18	1,8	20,61	1,9

3.4.3.8.Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesi validasyon çalışmasının kabulü için ilaç etken maddenin standart pik alanındaki değişim %5,0'dan küçük, safsızlıkların pik alanlarındaki değişim ise %10,0'dan küçük olmalıdır.

Standart ve safsızlık eklenmiş örnek çözeltileri hazırlanmıştır ve üç saatte bir 48 saat süreyle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre numune çözeltisi 48 saat kararlı oluğu söylenebilir (**Çizelge 3.43.**, **Çizelge 3.44.**, **Çizelge 3.45.** ve **Çizelge 3.46.**).

Çizelge 3.43. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 1

Zaman	Eltro-1		Eltro-1A		Eltro-1B	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	64098	-	41144	-	25810	-
3. Saat	63027	1,7	44601	8,4	25941	0,5
6. Saat	62460	2,6	41792	1,6	26534	2,8
9. Saat	62195	3,0	42840	4,1	26157	1,3
12. Saat	61850	3,5	41954	2,0	26309	1,9
15. Saat	62172	3,0	43789	6,4	26173	1,4
18. Saat	63081	1,6	41762	1,5	26276	1,8
21. Saat	62996	1,7	44467	8,1	25881	0,3
24. Saat	61749	3,7	43197	5,0	26122	1,2
27. Saat	63504	0,9	43765	6,4	27048	4,8
30. Saat	63967	0,2	44770	8,8	27209	5,4
33. Saat	64593	0,8	44964	9,3	27554	6,8
36. Saat	63715	0,6	41637	1,2	27910	8,1
39. Saat	62643	2,3	44938	9,2	23814	7,7
42. Saat	63020	1,7	44647	8,5	23879	7,5

45. Saat	63717	0,6	44040	7,0	26165	1,4
48. Saat	63141	1,5	44210	7,5	26649	3,3

Çizelge 3.44. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 2

Zaman	**Eltro-1C**		**Eltro-1D**		**Eltro-1E**	
	Alanlar	**Fark, %**	**Alanlar**	**Fark, %**	**Alanlar**	**Fark, %**
Başlangıç	111178	UY/NA	54258	UY/NA	52275	UY/NA
3. Saat	110986	0,2	55174	1,7	54406	4,1
6. Saat	109321	1,7	51938	4,3	52291	0,0
9. Saat	111483	0,3	54761	0,9	53750	2,8
12. Saat	110734	0,4	52295	3,6	50043	4,3
15. Saat	110981	0,2	52085	4,0	48332	7,5
18. Saat	112709	1,4	55007	1,4	54649	4,5
21. Saat	112498	1,2	55298	1,9	54170	3,6
24. Saat	113025	1,7	55619	2,5	53865	3,0
27. Saat	113708	2,3	55528	2,3	54200	3,7
30. Saat	114154	2,7	54999	1,4	54019	3,3
33. Saat	114652	3,1	56000	3,2	55134	5,5
36. Saat	114906	3,4	55369	2,0	56188	7,5
39. Saat	114479	3,0	56032	3,3	55861	6,9
42. Saat	113447	2,0	55364	2,0	55408	6,0
45. Saat	115346	3,7	55989	3,2	55527	6,2
48. Saat	114423	2,9	53260	1,8	52342	0,1

Çizelge 3.45. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 3

Zaman	Eltro-1F		Eltro-1G		Eltro-1H	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	100329	UY/NA	111178	UY/NA	95710	UY/NA
3. Saat	100106	0,2	110986	0,2	93556	2,3
6. Saat	96338	4,0	109321	1,7	94824	0,9
9. Saat	100256	0,1	111483	0,3	92903	2,9
12. Saat	99003	1,3	110734	0,4	95601	0,1
15. Saat	98090	2,2	110981	0,2	95067	0,7
18. Saat	100593	0,3	112709	1,4	92598	3,3
21. Saat	98057	2,3	112498	1,2	92506	3,3
24. Saat	100127	0,2	113025	1,7	93472	2,3
27. Saat	100559	0,2	113708	2,3	93567	2,2
30. Saat	100884	0,6	114154	2,7	92595	3,3
33. Saat	101180	0,8	114652	3,1	94144	1,6
36. Saat	97542	2,8	114906	3,4	92678	3,2
39. Saat	101155	0,8	114479	3,0	93270	2,5
42. Saat	100340	0,0	113447	2,0	94439	1,3
45. Saat	100241	0,1	115346	3,7	93399	2,4
48. Saat	100570	0,2	114423	2,9	95607	0,1

Çizelge 3.46. Eltro-1 ilgili maddeler çözelti stabilitesi sonuçları - 4

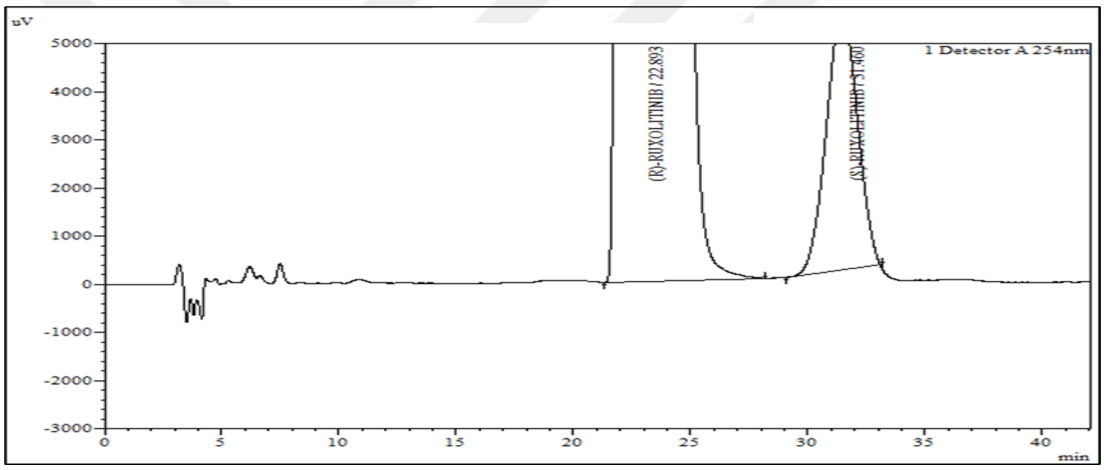
Zaman	Eltro-1I		Eltro-1J		Eltro-1K	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	28782	UY/NA	149459	UY/NA	787545	UY/NA
3. Saat	26131	9,2	150604	0,8	778117	1,2
6. Saat	26328	8,5	144161	3,5	772718	1,9
9. Saat	26246	8,8	150474	0,7	785432	0,3
12. Saat	26155	9,1	145886	2,4	787321	0,0
15. Saat	26719	7,2	145147	2,9	773769	1,7
18. Saat	26021	9,6	150001	0,4	774876	1,6
21. Saat	26822	6,8	149740	0,2	783525	0,5
24. Saat	30997	7,7	150091	0,4	787041	0,1
27. Saat	28124	2,3	150145	0,5	789268	0,2
30. Saat	30949	7,5	149772	0,2	782478	0,6
33. Saat	31103	8,1	150177	0,5	777319	1,3
36. Saat	31607	9,8	148491	0,6	779458	1,0
39. Saat	31580	9,7	148203	0,8	786079	0,2
42. Saat	31456	9,3	151592	1,4	778921	1,1
45. Saat	31328	8,8	151322	1,2	782548	0,6
48. Saat	30870	7,3	147281	1,5	788395	0,1

3.4.4. Ruxolitinib Kiral Safsızlık Validasyon Çalışmaları

3.4.4.1.Sistem Uygunluk

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi sistem uygunluk testi için sistem uygunluk çözeltisi enjekte edilmiştir. Sistem uygunluk testin kabul kriterleri şu şekildedir: (S)-Ruxolitinib ve Ruxolitinib arasındaki ayırıcılık faktörü en az 1,5 olmalıdır.

Sistem uygunluk testi sonucunda (S)-Ruxolitinib ile Ruxolitinib arasındaki ayırıcılık faktörü 3,5 bulunmuştur (**Şekil 3.41.**).



Şekil 3.41. Ruxolitinib kiral safsızlık sistem uygunluk kromatogramı

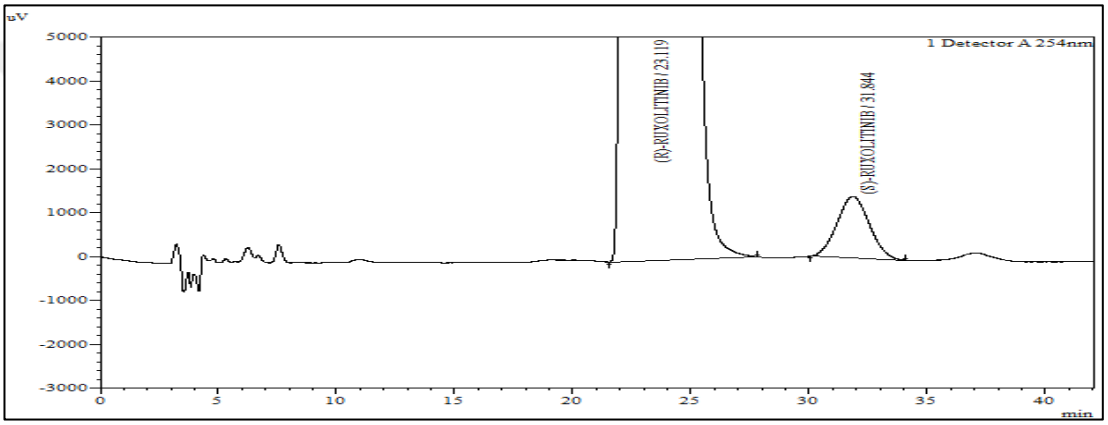
3.4.4.2.Seçicilik

Ruxolitinib kiral safsızlık seçicilik çalışması için kör çözeltisi, sistem uygunluk çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde Ruxolitinib safsızlıklar karışım halinde (Ruxo-1, Ruxo-1A, Ruxo-1B, Ruxo-1C, Ruxo-1D, Ruxo-2, Ruxo-Amide, Ruxo-INT ve TPPO), spesifikasyon limit derişiminde numune çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde (S)-Ruxolitinib çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde (S)-Ruxolitinib ve karışım halinde safsızlık çözeltisi, spesifikasyon limitinde (S)-Ruxolitinib ve safsızlık karışımı eklenmiş ruxolitinib çözeltisi, standart çözeltisi, numune çözeltisi, spesifikasyon limitinde (S)-Ruxolitinib eklenmiş standart çözeltisi ve spesifikasyon limitinde (S)-Ruxolitinib eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir.

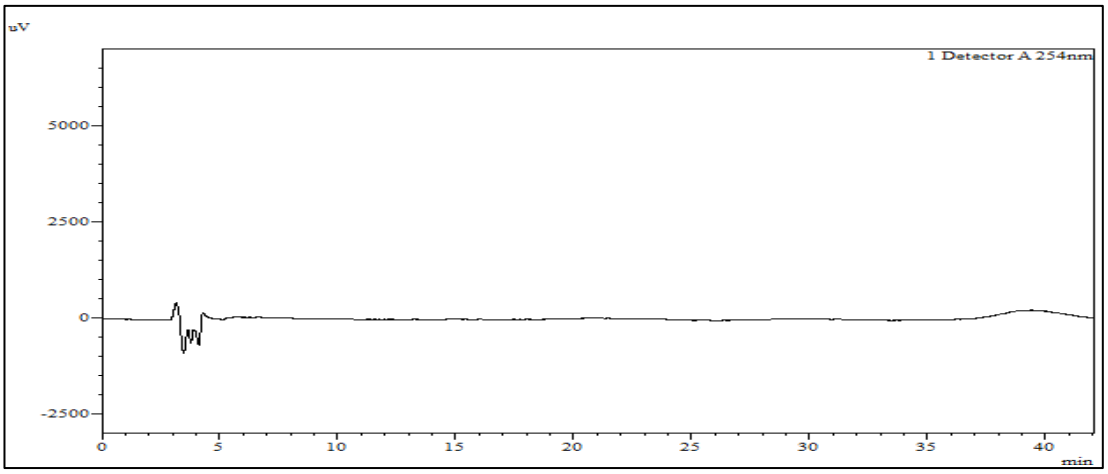
Seçicilik çalışması sonucunda Ruxolitinib ve (S)-Ruxolitinib piklerinin alıkonma zamanında kör çözeltiden gelen herhangi pik gözlemlenmemiştir. Ruxolitinib ve (S)-Ruxolitinib pikleri birbirinden ayrılıp, spektral olarak saf olduğu söylenebilir. Sonuçlar **Çizelge 3.47.**'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.47. Ruxolitinib kiral safsızlık seçicilik sonuçları

Bileşik	RT, dk	RRT	Saflık Endeksi	Saflık Eşiği
Ruxolitinib	24,05	-	0,999993	0,999904
(S)-Ruxolitinib	31,98	1,33	0,999994	0,999877



Şekil 3.42. Ruxolitinib kiral safsızlık spesifikasyon limit derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş ruxolitinib çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.43. Kör çözelti kromatogramı

3.4.4.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bu parametrenin çalışması için yedi farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanıp, en az 3'er kez analiz edilmiştir.

Ruxolitinib ve (S)-Ruxolitinib standartların kalibrasyon grafiğini çizmek için, tayin alt sınır (TAS) altı kez, %50, %75, %100, %125 ve %150 seviyeleri 3'er kez, %200 seviyesi ise altı kez enjekte edilmiştir.

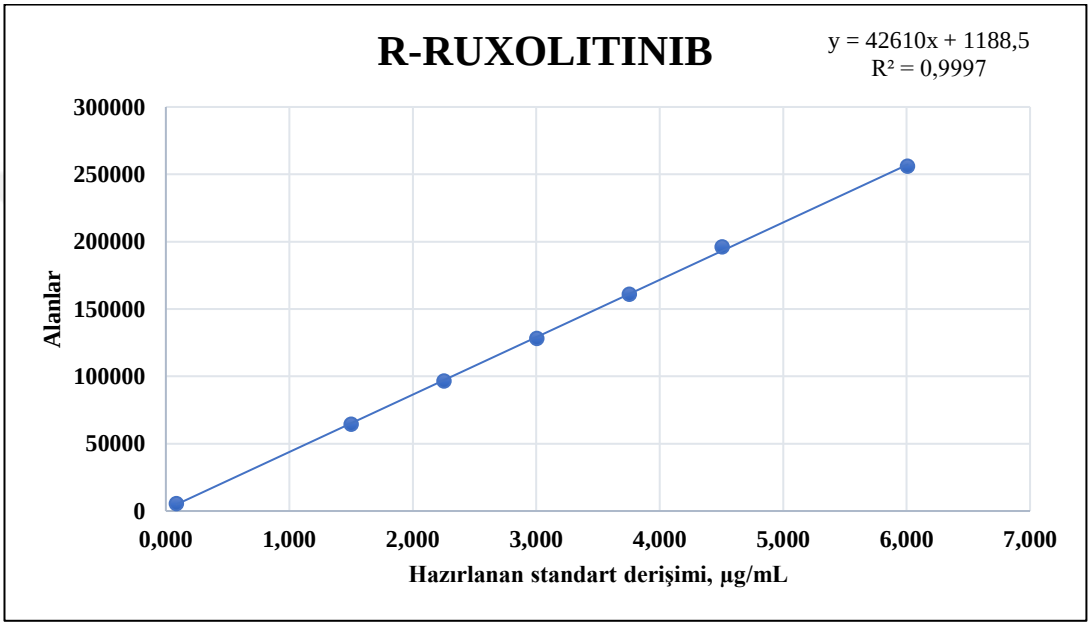
Kiral safsızlık yöntemi doğrusallık validasyon parametre kabul kriterlerine göre hem Ruxolitinib hem de (S)-Ruxolitinib'in korelasyon katsayıları 0,99'dan az olmamalıdır, ayrıca regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanı ise %5'i geçmemelidir.

Elde edilen sonuçlardan bir diğer validasyon parametresi olan çalışma aralığı da belirlenmiştir. Çalışma aralığın kabul kriteri; minimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %10,0'dan fazla, maksimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması ise %5,0'dan fazla olmamalıdır.

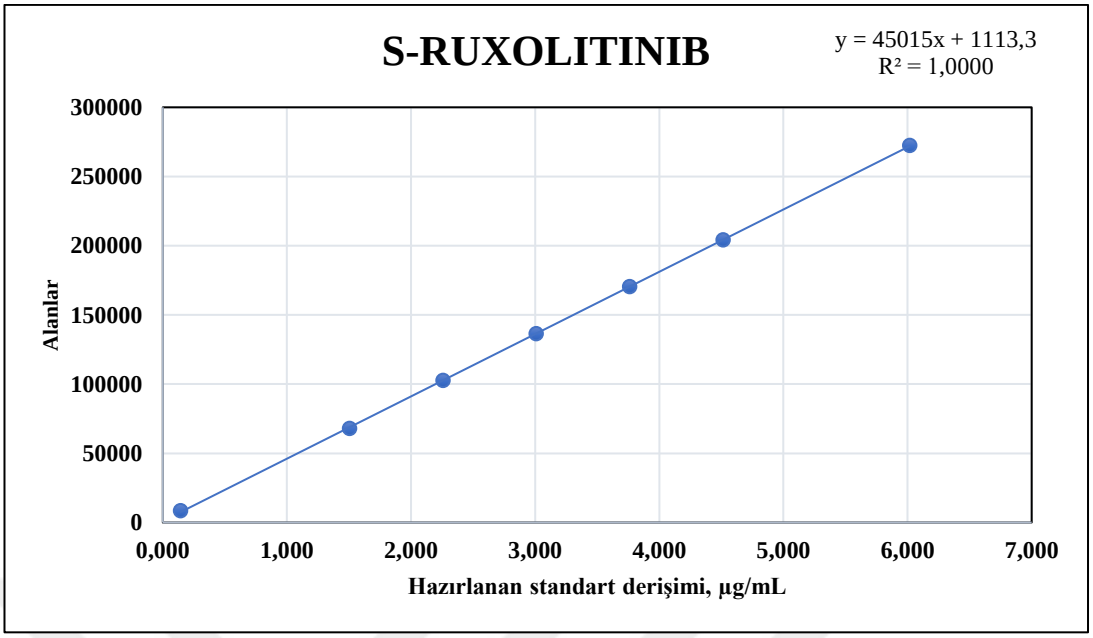
Doğrusallık validasyon çalışması sonuçlarına göre kalibrasyon eğrileri çizilip, korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Ruxolitinib ve (S)-Ruxolitinib, TAS ile %200 arasındaki seviyelerde doğrusal sonuçlar verdiği bulunmuştur. Çalışma aralığı validasyon çalışmasına göre en düşük ölçülebilir konsantrasyonda, yani TAS'ta, bağıl standart sapması %10,0'dan düşük, en yüksek ölçülebilir konsantrasyonda ise %5,0'dan düşük olduğu bulunmuştur (**Çizelge 3.48.**).

Çizelge 3.48. Ruxolitinib kiral safsızlık doğrusallık sonuçları

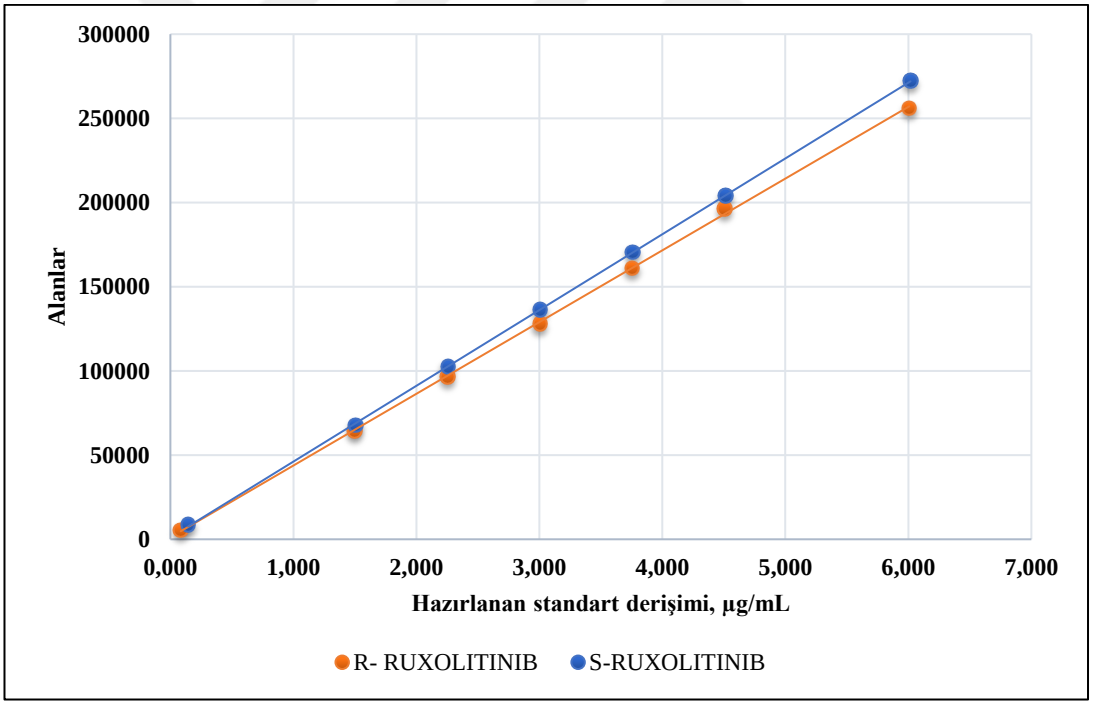
Bileşik	Derişim (µg/mL)	Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,99	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: ≤ 5,0%	Alan BSS, %	
					En yüksek derişim	En düşük derişim
Ruxolitinib	0,084–6,008	0,9998	y=42610x+1188,5	0,9	6,11	0,22
(S)-Ruxolitinib	0,144-6,018	1,0000	y=45015x+1113,3	0,8	6,39	0,17



Şekil 3.44. Ruxolitinib standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.45. (S)-Ruxolitinib standardı doğrusallık grafiği



Şekil 3.46. Ruxolitinib kiral safsızlık çakıştırılmış doğrusallık grafikleri

3.4.4.4.Teşhis Sınırı (TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS)

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemin bu validasyon çalışmasındaki TAS ve TS kabul kriterlere göre, TAS derişiminde enjekte edilen tüm numunelerin %BSS'si 10,0'dan küçük

olmalıdır. Aynı zamanda sinyal/gürültü oranları 10,0'a eşit veya büyük olmalıdır. TS derişiminde enjekte edilen numunelerin sinyal/gürültü oranları 3,0'a eşit veya büyük olmalıdır.

Bu validasyon çalışması için, Ruxolitinib ve (S)-Ruxolitinib standart çözeltileri spesifikasyon derişimde 6'şar kez enjekte edilip, elde dilen sinyal/gürültü oranlarından TAS derişimleri hesaplanmıştır.

Sonuçlara göre TAS çözeltilerin hazırlanışı için Ruxolitinib standart çözeltisinden 1,40 mL, ve (S)-Ruxolitinib standart çözeltisinden 2,40 mL, 50,0 mL'lik balon jojeye ekleyip hacmine çözücüyle tamamlanmıştır. TS çözeltisi hazırlanması için ise TAS çözeltisinden 3,0 mL alınıp 10,0 mL'lik balon jojede seyreltilmiştir.

Çizelge 3.49. Teşhis sınırı (TS) ve tayin alt sınırı (TAS) sonuçları

Bileşik	**TS derişimleri**		**TAS derişimleri**		**S/N**	
	µg/mL	**%**	**µg/mL**	**%**	**TS Limit: ≥ 3**	**TAS Limit: ≥10**
Ruxolitinib	0,0252	0,0012	0,084	0,004	7	14
(S)-Ruxolitinib	0,0432	0,0021	0,144	0,007	5	12

3.4.4.5. Doğruluk

Ruxolitinib kiral safsızlık çalışmanın kabul kriterleri şu şekildedir: Her bir ilaç etken maddenin ve safsızlığın geri kazanım değerleri %90,0–%110,0 arasında olmalıdır. TAS düzeyindeki geri kazanım değerleri geri kazanım %70,0–%130,0 arasında olması gerekmektedir.

Doğruluk validasyon parametresi çalışması için spesifikasyon limitinde (S)-Ruxolitinib ile Ruxolitinib karışım çözeltisi altı kez ve iki paralel numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Ayrıca, TAS derişiminde ve spesifikasyon limitinin %50, %100 ve %150'sine karşılık gelen derişimlerde numuneye (S)-Ruxolitinib eklendi. Her seviyeden 3 farklı numune hazırlanmıştır ve her bir numune bir kez enjekte edilmiştir.

Sonuçlara göre elde edilen geri kazanımlar %90,0-%110,0 aralığında olup, kabul kriterler sağlanmıştır (**Çizelge 3.50.**).

Çizelge 3.50. Doğruluk sonuçları çizelgesi

Bileşik	Doğruluk (n=3)				
	Seviyeler, %	Derişim, %	Bulunan Derişim (Ortalama±SS, %)	Bağıl Hata, %	Geri Kazanım, %
(S)-Ruxolitinib	TAS	0,007	0,007±0,000	0,0	100,0
	50	0,075	0,074±0,001	1,3	98,7
	100	0,150	0,145±0,001	3,1	96,9
	150	0,225	0,220±0,002	2,5	97,5

3.4.4.6.Kesinlik

3.4.4.6.1. Yöntem Kesinliği

Ruxolitinib kiral safsızlık metodu kesinlik validasyon parametresi çalışması için spesifikasyon limit derişiminde (S)-Ruxolitinib eklenmiş numune çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Kabul kriterleri ise şu şekildedir: Elde edilen geri kazanım değeri %90,0-%110,0 aralığında olması gerekmektedir. Geri kazanım değerler arasındaki %BSS %10,0'a eşit veya küçük olmalıdır.

3.4.4.6.2. Tekrar Üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik kesinlik çalışması kabulü için iki kesinlik çalışmanın sonuçları arasındaki fark %10,0'a eşit veya az olmalıdır. Diğer kabul kriterleri ise yöntem kesinliği kabul kriterleri ile aynıdır. Bu çalışma için altı (S)-Ruxolitinib eklenmiş Ruxolitinib numune çözeltisi hazırlanıp enjekte edilmiştir. Sonuçlar ise **Çizelge 3.51.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.51. Ruxolitinib kiral safsızlık kesinlik sonuçları

Bileşik	Yöntem Kesinliği (n=6)		Tekrar Üretilebilirlik (n=6)		Fark, %
	Geri kazanım (Ortalama ±SS, %)	BSS, %	Geri kazanım (Ortalama ±SS, %)	BSS, %	
(S)-Ruxolitinib	101,3±0,84	0,83	101,7±1,53	1,50	0,4

3.4.4.7.Sağlamlık

Bu çalışma için iki kör çözelti, bir sistem uygunluk çözeltisi ve spesifikasyon limitinde (S)-Ruxolitinib eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Her bir parametre değişikliği için bu batch kullanılmıştır.

Çalışmanın kabul kriterleri ise şu şekildedir: (S)-Ruxolitinib ve Ruxolitinib arasındaki ayırıcılık faktörü en az 1,5 olmalıdır.

Sağlamlık çalışmasına göre yöntem parametrelerdeki küçük değişikliklere duyarlı değildir. (**Çizelge 3.52.**).

Çizelge 3.52. Ruxolitinib kiral safsızlık sağlamlık sonuçları

Şartlar	Alıkonma Zamanı	Ayırıcılık Faktörü
Normal Şartlar	31,84	3,6
Kolon akışı: 0,9 mL/dk	35,71	3,7
Kolon akışı: 1,1 mL/dk	28,87	3,6
Kolon sıcaklığı: 27 ºC	35,25	3,7
Kolon sıcaklığı: 33 ºC	29,27	3,6

3.4.4.8.Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesi validasyon çalışmasının kabulü için ilaç etken maddenin standart pik alanındaki değişim %5,0'dan küçük, (S)-Ruxolitinib pik alanlarındaki değişim ise %10,0'dan küçük olmalıdır.

Standart ve (S)-Ruxolitinib eklenmiş örnek çözeltileri hazırlanıp, dört saatte bir 48 saat süreyle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre numune çözeltisi 48 saat kararlı oluğu söylenebilir (**Çizelge 3.53.**).

Çizelge 3.53. Ruxolitinib kiral safsızlık çözelti stabilitesi sonuçları

Zaman	Ruxolitinib		(S)-Ruxolitinib	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	128149	-	127138	-
4. Saat	126954	0,9	124668	1,9
8. Saat	127668	0,4	126272	0,7
12. Saat	128237	0,1	125512	1,3
16. Saat	128091	0,0	125910	1,0
20. Saat	128060	0,1	127036	0,1
24. Saat	128931	0,6	125243	1,5
28. Saat	128331	0,1	125532	1,3
32. Saat	128412	0,2	123762	2,7
36. Saat	128597	0,3	122931	3,3
40. Saat	128876	0,6	122454	3,7
44. Saat	128149	0,9	127138	1,9
48. Saat	126954	0,4	124668	0,7

3.4.5. Eltrombopag Stres Testi Çalışması

Eltrombopag için bir stres testi çalışması yapılmıştır. Stres testi kapsamında ısı ile bozundurma, gün ışığı ile bozundurma, mor ötesi ışını ile bozundurma, su ve ısı ile bozundurma, asit ile bozundurma, baz ile bozundurma ve oksitleyici ajan ile bozundurma olmak üzere yedi farklı şartlarda bozundurma çalışmaları yapılmıştır.

3.4.5.1. Isı ile Bozundurma Çalışması

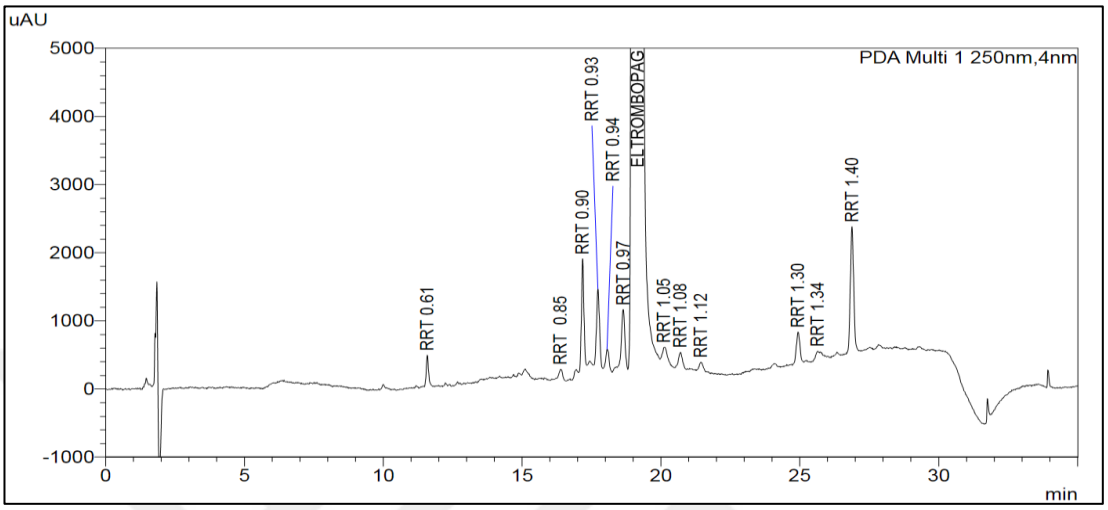
Eltrombopag örneği 10 gün boyunca 70°C sıcaklığa ayarlı etüv fırınında bekletildi.

Isı ile bozundurma çalışmasında hiçbir safsızlık oluşmamıştır. Bunu yanı sıra miktar tayini uygun çıkmıştır ve Eltrombopag piki spektral olarak saftır. Kütle dengesi de sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.54.**'te yer almaktadır.

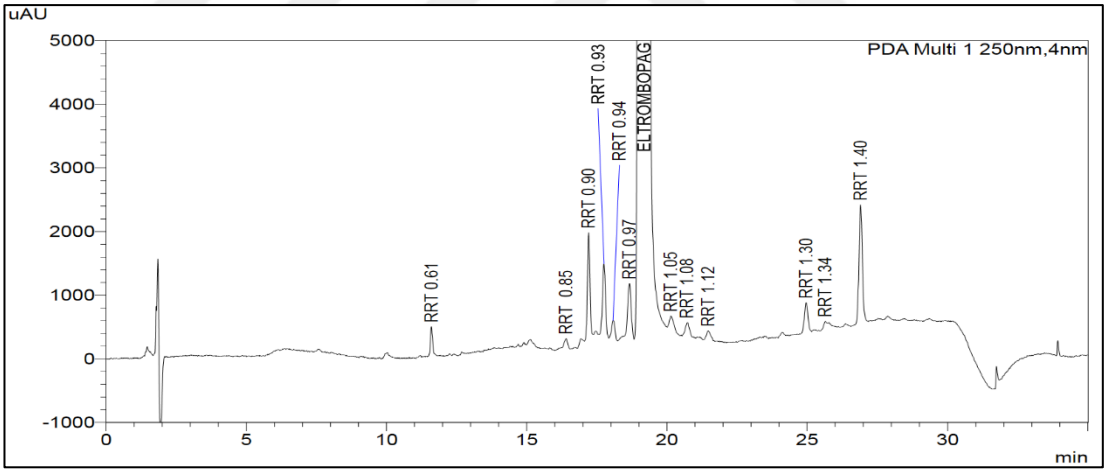
Çizelge 3.54. Eltrombopag ısı ile bozundurma sonuçları

TESTLER	Miktar (%)	
	Öncesi	Sonrası
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0.93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0.97)	0,05	<0,05
Bilinmeyen (RRT 1.40)	0,09	0,09

Total Safsızlık	0,20	0,14
MİKTAR (susuz)	99,6	99,8
KÜTLE DENGESİ	99,8	99,9
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



Şekil 3.47. İşlem görmemiş Eltrombopag örneği kromatogramı



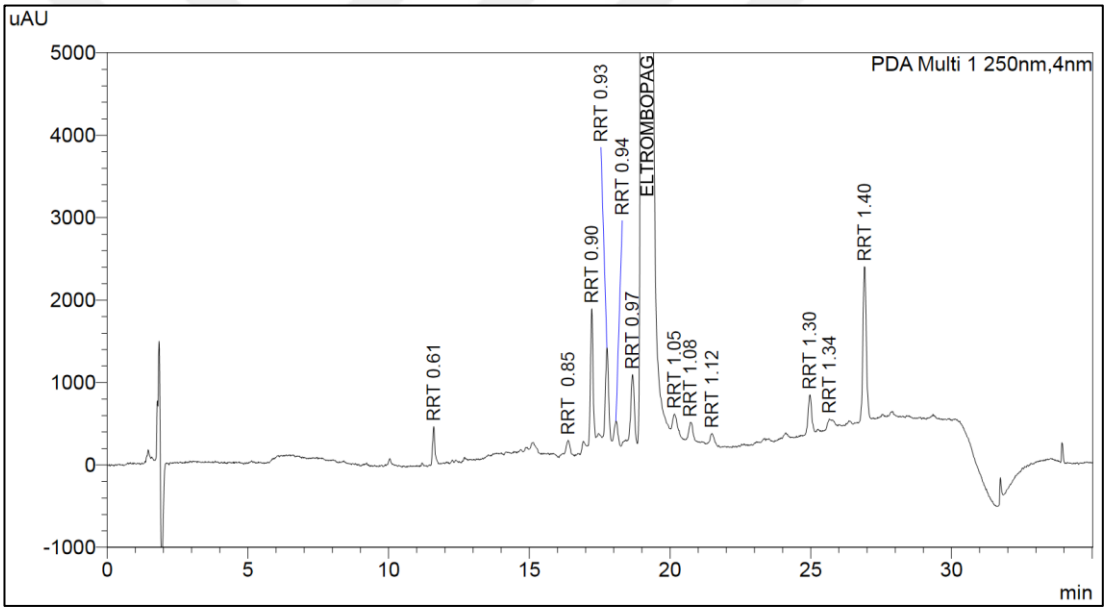
Şekil 3.48. Isı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

3.4.5.2.Gün Işığı ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği 30 gün boyunca fotostabilite kabininde bekletilmiştir. Gün ışığı ile bozundurma çalışmasında hiçbir safsızlık oluşmamıştır. Bunu yanı sıra miktar tayini uygun olup gün ışığı ile bozundurma önemli olmadığı söylenebilir. Numune piki spektral olarak saf bulunup kütle dengesi sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.55.**'te yer almaktadır.

Çizelge 3.55. Eltrombopag gün ışığı ile bozundurma sonuçları

TESTLER	Miktar (%)	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0.93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0.97)	0,05	<0,05
Bilinmeyen (RRT 1.40)	0,09	0,09
Total Safsızlık	0,20	0,14
MİKTAR (susuz)	99,6	99,6
KÜTLE DENGESİ	99,8	99,7
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



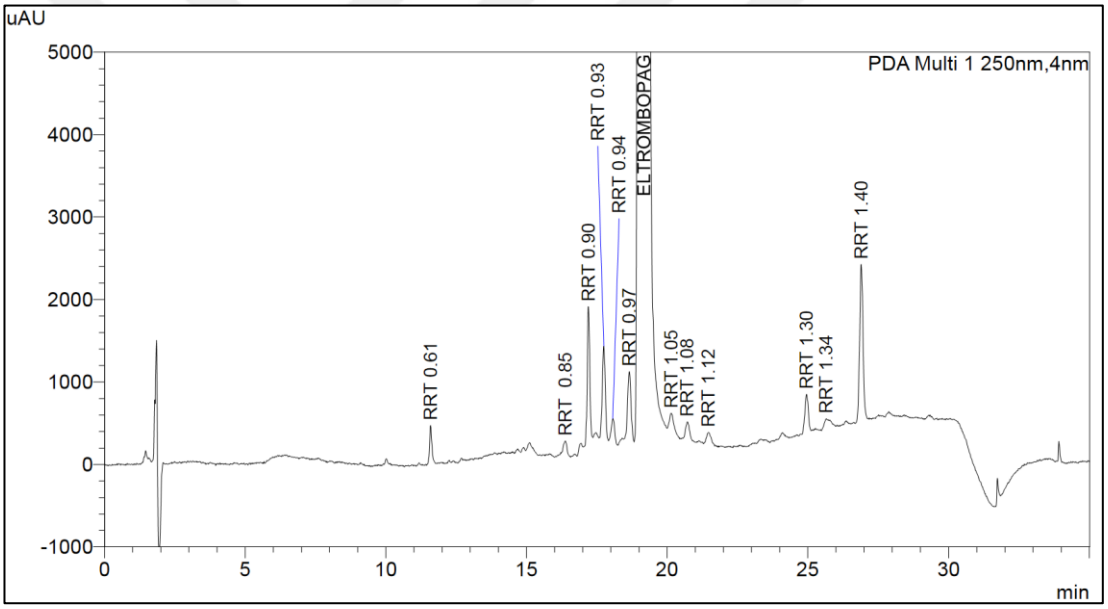
Şekil 3.49. Gün ışığı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

3.4.5.3.UV ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği 27 gün boyunca UV kabininde UV ışınlara maruz bırakılmıştır. UV ile bozundurma çalışmasında hiçbir safsızlık oluşumu olmamıştır. Bunu yanı sıra miktar tayini uygun olup UV ile bozundurma önemli olmadığı söylenebilir. Numune piki spektral olarak saf bulunup kütle dengesi sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.56.**'da verilmiştir.

Çizelge 3.56. Eltrombopag UV ile bozundurma sonuçları

TESTLER	Miktar (%)	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0.93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0.97)	0,05	0,05
Bilinmeyen (RRT 1.40)	0,09	0,09
Total Safsızlık	0,20	0,19
MİKTAR (susuz)	99,6	99,7
KÜTLE DENGESİ	99,8	99,9
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



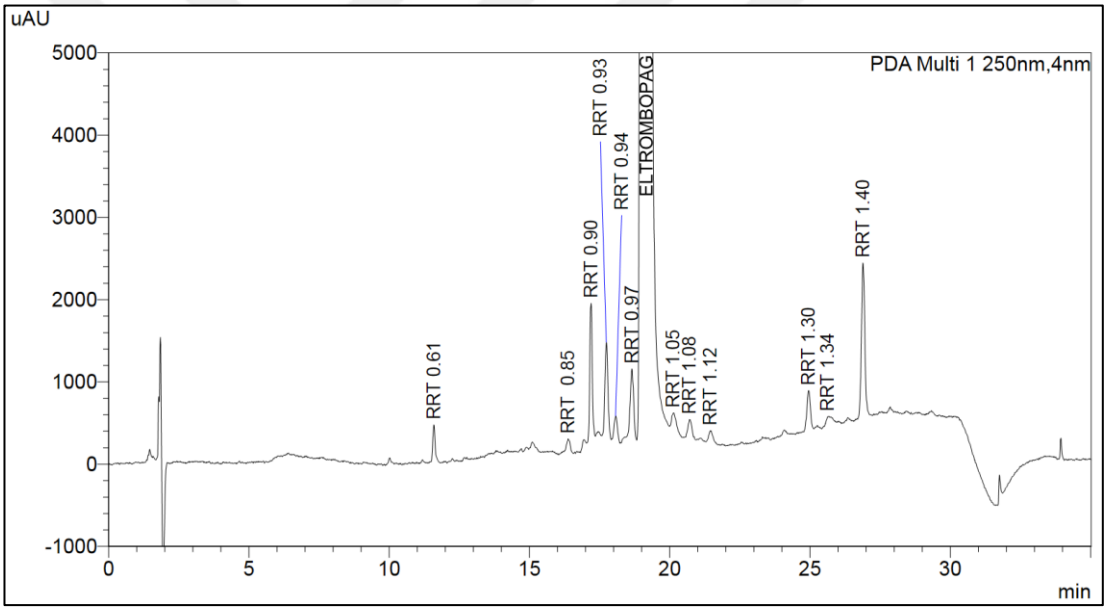
Şekil 3.50. UV ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

3.4.5.4.Su ve Isı ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği üzerine saf su eklenip, 60°C'de bir saat boyunca bekletilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda hiçbir safsızlık oluşmamıştır. Miktar tayini sonuçları uygun olup, Eltrombopag piki spektral olarak saf olduğu ortaya çıkmıştır. Kütle denkliği sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.57.**'de yer almaktadır.

Çizelge 3.57. Eltrombopag su ve ısı ile bozundurma sonuçları

TESTLER	Miktar (%)	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0.93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0.97)	0,05	0,05
Bilinmeyen (RRT 1.40)	0,09	0,09
Total Safsızlık	0,20	0,19
MİKTAR (susuz)	99,6	99,7
KÜTLE DENGESİ	99,8	99,9
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



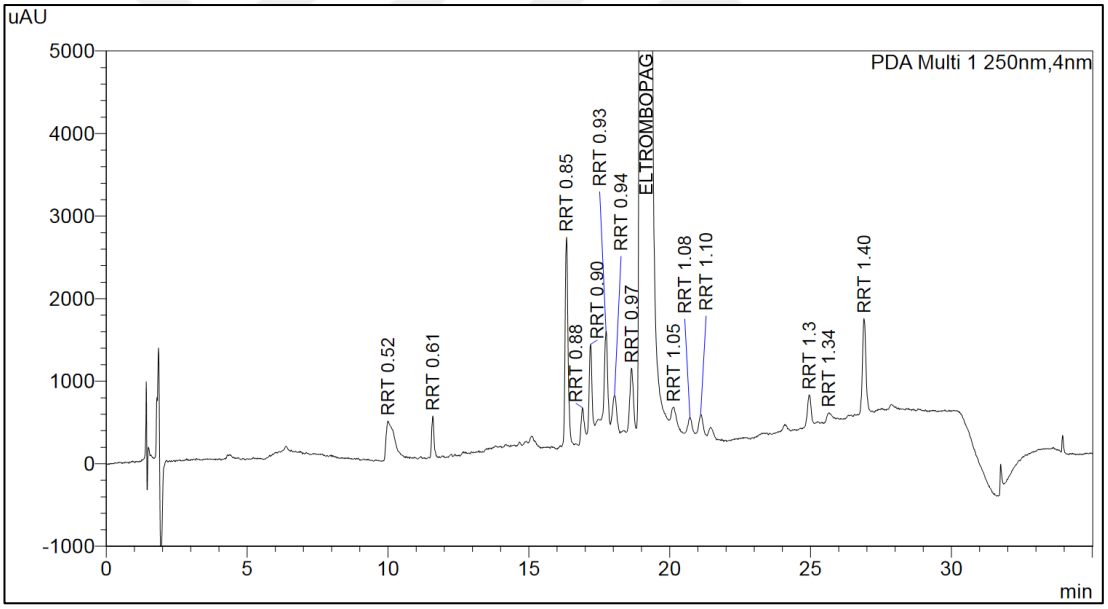
Şekil 3.51. Su ve ısı ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

3.4.5.5.Asit ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği üzerine 1N HCl eklenip, oda sıcaklığında bir saat boyunca bekletilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda RRT=0,52 ve RRT=0,85'de bilinmeyen iki safsızlık oluşmuştur. RRT=1,40'da gelen safsızlık azalmıştır. Miktar tayini sonuçları uygun olup, Eltrombopag piki spektral olarak saf olduğu ortaya çıkmıştır. Kütle denkliği sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.58.**'de yer almaktadır.

Çizelge 3.58. Eltrombopag asit ile bozundurma sonuçları

TESTLER	Miktar (%)	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0,52)	Tespit edilmedi	0,06
Bilinmeyen (RRT 0,85)	Tespit edilmedi	0,11
Bilinmeyen (RRT 0,93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0,97)	0,05	<0,05
Bilinmeyen (RRT 1,40)	0,09	0,06
Total Safsızlık	0,20	0,28
MİKTAR (susuz)	99,6	99,4
KÜTLE DENGESİ	99,8	99,7
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



Şekil 3.52. Asit ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

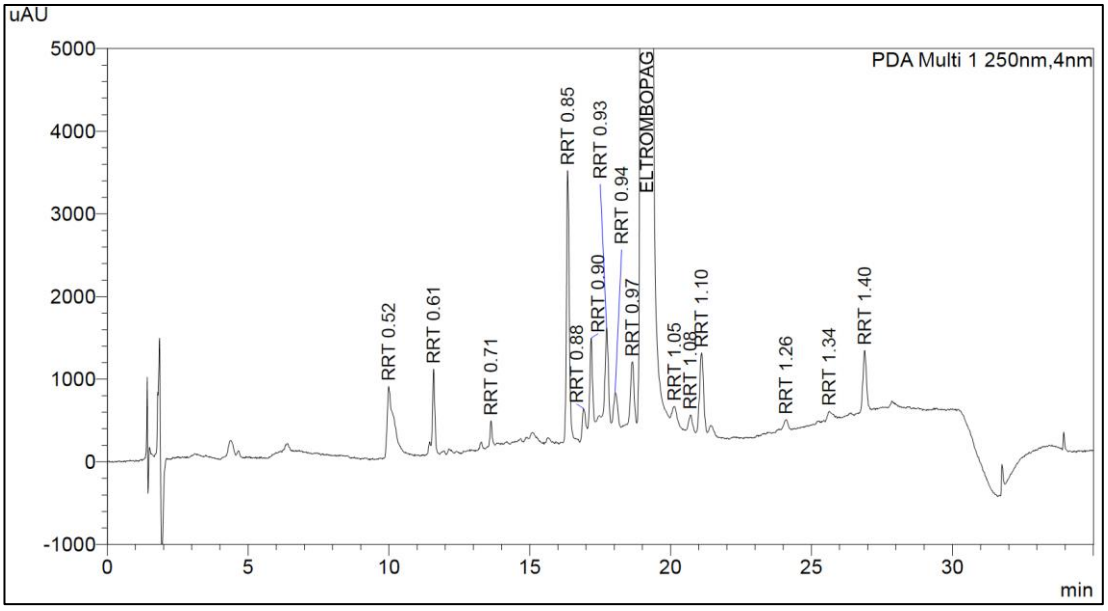
3.4.5.6.Baz ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği üzerine 1N NaOH eklenip, oda sıcaklığında bir saat boyunca bekletilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Baz ile bozundurma çalışmasında RRT=0,52, RRT=0,71, RRT=0,85 ve RRT=1,10'da bilinmeyen dört safsızlık oluşmuştur. RRT=1,40'ta gelen safsızlık azalmıştır. Miktar tayini sonuçları uygun olup, Eltrombopag piki spektral olarak

saf olduğu ortaya çıkmıştır. Kütle denkliği sağlanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.59.**'da yer almaktadır.

Çizelge 3.59. Eltrombopag asit ile bozundurma sonuçları

TESTLER	**Miktar (%)**	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0,52)	Tespit edilmedi	0,09
Bilinmeyen (RRT 0,71)	Tespit edilmedi	0,05
Bilinmeyen (RRT 0,85)	Tespit edilmedi	0,15
Bilinmeyen (RRT 0,93)	0,06	0,05
Bilinmeyen (RRT 0,97)	0,05	<0,05
Bilinmeyen (RRT 1,10)	<0,05	0,06
Bilinmeyen (RRT 1,40)	0,09	<0,05
Total Safsızlık	0,20	0,40
MİKTAR (susuz)	99,5	99,3
KÜTLE DENGESİ	99,7	99,7
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



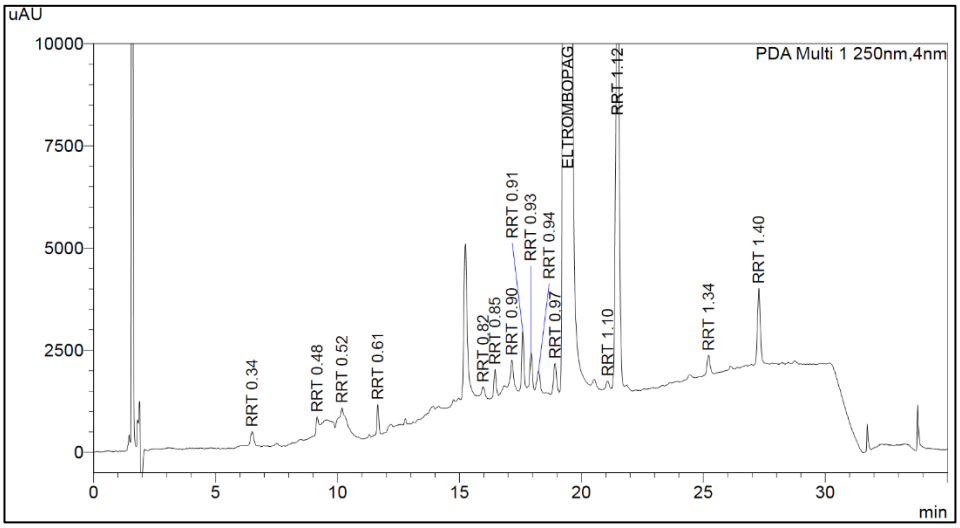
Şekil 3.53. Baz ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

3.4.5.7.Oksitleyici Ajan ile Bozundurma Çalışması

Eltrombopag örneği üzerine %5 H_2O_2 eklenip, oda sıcaklığında iki saat boyunca bekletilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda RRT=0,52' de bilinmeyen safsızlık oluşmuştur. RRT=1.12'de bilinmeyen safsızlık artmıştır. Miktar tayini sonucu da önemli bir bozulmanın meydana geldiği göstermektedir. Hidrojen peroksit ile bozundurma önemli olduğu söylenebilir. Eltrombopag piki spektral olarak saf olduğu ortaya çıkmıştır. Kütle denkliği sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar **Çizelge 3.60.**'da verilmiştir.

Çizelge 3.60. Eltrombopag örneğinin hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları

TESTLER	**Miktar (%)**	
	Öncesi	**Sonrası**
GÖRÜNÜŞ	Kahverengi – bordo toz	Kahverengi – bordo toz
İLGİLİ BİLEŞİKLER		
Eltro-1	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Eltro-2	Tespit edilmedi	Tespit edilmedi
Bilinmeyen (RRT 0,52)	Tespit edilmedi	0,07
Bilinmeyen (RRT 0,93)	0,06	<0,05
Bilinmeyen (RRT 0,97)	0,05	<0,05
Bilinmeyen (RRT 1,12)	<0,05	0,63
Bilinmeyen (RRT 1,40)	0,09	0,09
Total Safsızlık	0,20	0,79
MİKTAR (susuz)	99,3	98,6
KÜTLE DENGESİ	99,5	99,4
SAFLIK (ana pik için)	Uygun	Uygun



Şekil 3.54. Oksitleyici ajan ile bozundurulmuş Eltrombopag örneği kromatogramı

4. TARTIŞMA

- *Yöntem Optimizasyonu*

Kromatografik bir yöntem geliştirilirken dikkate alınması gereken birçok parametre vardır. Analit çözücü seçimi, hareketli faz, kolon türü ve sıcaklığı, akış hızı, dalga boyu vb. gibi parametrelerin optimizasyonu için analizi yapılacak maddelerin fizik ve kimyasal özellikleri bilmek gerekir. Maddenin polaritesi ve asit veya bazik oluşu hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir.

Yöntem geliştirilirken analizi yapılacak maddenin çözücü seçimi, kromatografide elde edilecek sonuçlar için önemlidir. Çözücü seçilirken, analitin tamamen çözünmesi istenir ve analitin degradasyon ürünü oluşturmasına neden olmaması gerekir. Fakat bunu yanı sıra çözücü ile YPSK'da kullanılacak hareketli faz arasındaki uyumu da göz önünde bulundurulması gerekir. Kullanılacak hareketli fazın elüsyon gücü, yani sabit fazda tutunan analitin kolonda ilerletme yeteneği, çözücünün elüsyon gücünden yüksek olmamalıdır. Elüsyon gücü ise polarite ile ilişkilidir. Polarite arttıkça elüsyon gücü de artmaktadır. Hareketli fazın elüsyon gücü, seçilecek çözücünün elüsyon gücünden küçük ise kromatogramdan elde edilecek piklerde yarılma, kuyruklanma veya genişleme meydana gelebilir. Bu yüzden seçilecek çözücünün elüsyon gücü hareketli fazın elüsyon gücünden düşük olmalıdır.

Yöntem geliştirme ve optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta ise hareketli faz seçimidir. Her maddenin bir pKa değeri vardır, yani her madde ya zayıf asidik ya da zayıf baziktir. Analiz edilecek maddenin pKa değerinin bilinmesi ve hareketli fazın pH değerini pKa değerine göre hazırlanması daha iyi pik ayrılmasıyla sonuçlanır. Asidik bir analit için pH pKa'dan büyük olduğunda analit iyonlaşır. pH pKa'dan düşük olduğunda ise analitte iyonlaşma meydana gelmez, yani nötr olur. Aynı şey baz için de geçerli ancak tersi olur. Seçilecek hareketli faz pH'sı analitin pKa'sından en az iki birim farklı olmasında yarar vardır. Bu şekilde, analit her zaman tek bir iyonizasyon durumunda olur ki, piklerin ayrılması küçük pH değişimlerinden etkilenmemiş olur. Çünkü analitin iyonizasyon durumu alıkonma zamanı etkilemektedir.

Dikkat edilmesi gereken bir diğer parametre ise kolon türü ve sıcaklığı. Kolon türü seçimi yaparken hem maddenin hem de kolonun polaritesi dikkate alınır. Ters faz

kromatografisinde sabit faz, yani kolon apolarken, düz kromatografisinde sabit faz polar özelliktedir. Kolon türü ve sıcaklığı hem pikin şeklini hem de alıkonma zamanını etkilemektedir. Kolon sıcaklığı özellikle iki veya daha fazla pikin birbirinden ayrılmasında çok etkili bir parametredir. Bunu yanı sıra akış hızı ve oto-örnekleyici sıcaklığı da piklerin alıkonma zamanlarında etkili parametrelerdir.

Analiz edilecek maddenin derişimi seçiminde cihazın algılama sınırlarına dikkat edilmelidir. Analitlerin pikleri cihazın algılama sınırın üzerindeyse pikler tümüyle görülmez, pikler cihazın algılama sınırın altında ise hiç görülmez. Bundan dolayı analitin çalışma derişimi diğer parametreler kadar önemlidir.

- *Eltrombopag İlgili Maddeler Yöntemi*

Eltrombopag ilgili maddeler yöntemi geliştirilmesinde en başta Eltrombopag'ın çözücü denemelerine başlanmıştır. İlk denemeler metanol, asetonitril, tetrahidrofuran denenmiştir, fakat çözünme meydana gelmemiştir. İlk hareketli faz denemeleri 10 mM KH_2PO_4 ile yapılması planlandığı için bir sonraki çözücü denemesi 10 mM KH_2PO_4 olmuştur. Eltrombopag bu çözücüde çözünebilmesi için beş dk ultrasonik banyosunda bırakılmıştır. Daha bazik çözücü denemelerinden sonra maddenin hemen çözündüğü görülmüştür. Eltrombopag'ın en iyi çözücüsü 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) olarak belirlenmiştir. Fakat çalışma kolaylığı açısından hem Eltrombopag hem de Eltro-1 ve Eltro-2'nin aynı çözücüde çözünmesi tercihtir. Çözücü denemesi sonucunda Eltro-1 ve Eltro-2 de 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8)'de çözünmüştür. Ancak analiz sonucunda Eltro-2 pikin çok geniş ve yayvan olduğu görülmüştür. Farklı çözücü pH denemeler sonucunda ortak en iyi çözücü 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2) olarak belirlenmiştir. Numuneler ilk önce çözücüde çözünmüştür daha sonra balon joje hacmine asetonitril ile tamamlanmıştır.

Çizelge 4.1. Eltrombopag ilgili maddeler deneme çalışması tablosu

Deneme	MFA	MFB	Kolon	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ, nm	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk
1	10 mM KH_2PO_4	ACN	Waters XBridge C8 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
2	10 mM KH_2PO_4	ACN	Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
3	10 mM KH_2PO_4	10 mM KH_2PO_4 : Asetonitril (20:80, h/h)	Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
4	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8)	10 mM KH_2PO_4 : Asetonitril (20:80, h/h)	Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
5	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8)	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)	Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
6	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)	Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0
7	10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2)	10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) : Asetonitril (20:80, h/h)	Agilent Zorbax SB-Phenyl (150 x 4,6 mm, 3,5µm)	20 ºC	20 ºC	250	10,0	1,0

İlk denemelere göre Eltro-1, Eltro-2 ve Eltrombopag maddelerin yapıları gereği bu maddelerin piklerinin birbirinden oldukça ayrı olduğu görülmüştür. Fakat bunlardan farklı olarak da Eltrombopag örneğinden gelen iki tanımlanmamış safsızlık vardır. İlk denemelerden sonra yapılan çalışmalar piklerin şekilleri ve piklerin birbirine karışmadan analiz süresini kısaltmaya yönelik olmuştur. En başta kullanılan Waters XBridge C8 (150 x 3,0mm, 3,5µm) kolon ile meydana gelen piklerin keskin olmamasından dolayı Waters XBridge C18 (150 x 4,6mm, 3,5µm) ile denemelere devam edilmiştir. Çalışma-2 sonrası sonuçlara göre Eltrombopag ve Eltro-1 pik şekilleri oldukça düzgün gelmiştir, fakat Eltro-2 pik şekli yayvandır. Hareketli faz B'de %100 asetonitril kullanıldığından, küçük bir gradient değişiminde pik alıkonma zamanlarında büyük değişimler meydana geldiğinden hareketli faz B'deki organik miktarını azaltmak için hareketli faz A ile asetonitril 20:80 oranında karıştırılmıştır. Piklerin yakınlaşması için ve bu sayede analiz süresinin kısaltılması için hareketli fazlarda pH denemeleri yapılmıştır. Hareketli faz A pH'sı bazik yapıldığında Eltro-1 ve Eltro-2'nin Eltrombopag ile arasındaki ayırıcılık azaldığından dolayı hareketli faz A asidik pH'da çalışılmıştır. Hareketli faz A'nın asidik bir pH'ya sahip olması Eltro-1 ve Eltro-2'nin kolonu erken terk etmesini sağlarken aynı zamanda çözücü ve hareketli faz uyumundan dolayı Eltro-2'nin pik şeklini biraz düzeltmiştir. Hareketli faz B ise bazik olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde gerekli gradient çalışmalar eşliğinde pikler birbirinden güzel bir şekilde ayrılmıştır. 12.dk'ya kadar 10mM KH_2PO_4 (pH 3,2) oranı daha yüksek seçilmiştir. Bu şekilde Eltro-1 ve Eltro-2 polaritelerinden dolayı kolonu erken terk etmişlerdir. Daha sonra ise hareketli faz B oranı artırılmıştır. Bu artıştan dolayı hem yüksek elüsyon gücüne sahip olan asetonitril miktarı hem de kolondan geçen hareketli faz pH'sı artırılmıştır. Hareketli faz B artışından dolayı Eltrombopag kolon keskin bir pik vererek kolonu terk etmiştir. Waters XBridge C18 (150 x 4,6mm, 3,5µm) kolonu Eltro-1 ve Eltrombopag piklerin şekilleri keskin olmalarına rağmen, Eltro-2'nin pik keskinliğini artırmak için Agilent Zorbax SB-Phenyl (150 x 4,6 mm, 3,5µm) kolonu kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda tüm pikler hem birbirinden güzel ayrılmıştır hem de pik şekilleri güzel gelmiştir.

- *Eltrombopag Miktar Tayini Yöntemi*

Miktar tayini yöntem optimizasyonunda Eltrombopag ilgili maddeler yönteminden elde edilen bilgilerden faydalanılmıştır. Bu yöntem ile çok küçük konsantrasyonlu maddelerin analizi yapılmadığı için Eltrombopag miktar tayini numune derişimi ilgili maddeler derişimin %10'u kadar seçilmiştir. Bu yöntemde sadece Eltrombopag ilaç etken maddenin piki dikkate alındığı için taban çizgisi veya baseline'nın bu şekilde daha az gürültülü olması yöntemin

geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Ancak çözelti derişimi daha düşük seçilseydi tekrarlanabilirlik tehlikeye atılabilirdi. Bunu yanı sıra bu çalışma derişimi ile çalışma sonucu elde edilen pik alanları ve yükseklikleri cihazın algılama sınırları içinde.

Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde denemeler sonunda Eltrombopag'ın en iyi çözücüsü 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) olduğu görülmüştür. Bundan dolayı miktar tayini yönteminde çözücü olarak bu tampon çözeltisi kullanılıp, çözücüye çözünme sonrasında çözeltiye pik şeklin daha keskin olması için tetrahidrofuran eklenmiştir ve balon joje hacmine asetonitril ile tamamlanmıştır.

Hareketli faz seçiminde de yine ilgili maddeler yönteminden faydalanılmıştır. Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde Eltrombopag ilaç etken maddesinin gradient programında 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8) oranı daha yüksek olduğu zamanda kolonu terk ettiği görülmüştür. Bu bilgilere dayanarak hareketli faz A olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):asetonitril (80:20, h/h) karışımı, hareketli faz B olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 6,8):asetonitril (20:80, h/h) karışımı seçilmiştir.

Kolon olarak Waters XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 3,5µm) seçilmiştir. İlgili maddeler yöntemindeki denemeler sonucunda Eltrombopag piki bu kolonda oldukça keskin ve uygun alıkonma zamanına sahip olduğu görülmüştür.

- *Eltro-1 İlgili Maddeler Yöntemi*

Çözücü denemeleri Eltrombopag ilgili maddeler yöntemi yapılan denemelere dayanarak yapılmıştır. Eltro-1'in iyi bir çözücüsü olan 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2) asidik bir çözücüdür. Fakat Eltro-1'in safsızlıkların bir kısmı bu çözücüde çözünmedikleri ve çalışma kolaylığı açısından ortak bir çözücü tercih edildiği için farklı çözücüler Eltro-1 ve safsızlıkların çözücüsü olarak denenmiştir. Denemeler sonucunda Eltro-1 ve diğer safsızlıkların asetonitrilde iyi çözündüğü görülmüştür. Tüm maddeler asetonitrilde çözünüp hareketli faz A ile balon joje hacimlerine tamamlanmıştır. Çözücü içerisinde hareketli faz A'nın kullanılmasının nedeni ise sistemde seçilen hareketli faz ile çözücü uyumundan dolayıdır. Çözücü içerisinde hareketli faz A yardımıyla çözücünün elüsyon gücü azaltılmıştır ve pikler bu sayede keskinleştirilmiştir.

Eltrombopag ilgili maddeler yönteminde edinen bilgilere göre Eltro-1'in hareketli faz bileşimi asidik olduğu zaman kolon terk etmektedir. Bu yüzden ilk başta 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,2) hareketli faz A olarak denendi. Fakat IMP-B, IMP-F ve IMP-G arasındaki ayırıcılık bu hareketli faz ile düşük olup, pikler birbirine çok yakınlaşmıştır. Bir diğer hareketli faz denemesi 10 mM KH_2PO_4 olmuştur ve piklerin bu hareketli faz ile daha da yaklaştığı görülmüştür. Yani, IMP-B, IMP-F ve IMP-G artan pH değeri ile birbirilerine yaklaştığı görülmüştür. Bu bilgiye dayanaraktan hareketli faz A olarak %0,1 o-H_3PO_4 seçilmiştir. Hareketli faz B olarak ise sadece %100 asetonitril ile çalışmıştır. Asetonitril hareketli faz B olarak kullanımı hem uygun alıkonma zamanları ile hem de düz bir taban çizgisi ile sonuçlanmıştır.

IMP-B, IMP-F ve IMP-G arasındaki ayırıcılığı artırmak için farklı kolon sıcakları denenmiştir. Kolon sıcaklığın artması ile pikler arasındaki ayırıcılık arttığı görülmüştür. 40 °C uygun kolon sıcaklığı olarak seçilmiştir. Piklerin arasındaki ayırıcılığı artırmak ve analiz süresini kısaltmak için farklı akış hızı denemeleri de yapılmıştır. 0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 1,2 mL/dk akış hızları denenmiştir. 1,2 mL/dk'lık akış hızı tüm pikleri birbirlerine çok yaklaştırırken, 0,8mL/dk'lık akış hızı da analiz süresini fazla uzatmıştır. En iyi akış hızı 1,0 mL/dk olarak seçilmiştir.

Kolon seçimi yapılırken temel amaç pikleri birbirinden güzel ayırıp, pik şeklini düzeltmek ve analiz süresini olabildiğince kısa tutmaktır. Bu hedefleri göz önünde bulundurarak Waters XBridge C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) ve Waters XBridge C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm ve 150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonları denenmiştir. Waters XBridge C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonu denemesi ile başlanmıştır. Fakat C8 kolonu kullanımı ile Eltrombopag ilgili maddeler yöntemindeki gibi piklerin şekli keskin olmamaktadır. Bundan dolayı Waters XBridge C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm ve 150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonları ile denemelere devam edilmiştir. Bu iki kolon arasından Waters XBridge (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonu daha iyi sonuçlar vermiştir. İki kolon arasındaki uzunluk farkı maddelerin alıkonma zamanın artmasıyla sonuçlanmıştır. Waters XBridge (150 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonu kullanımı ile hem pik şekilleri hem de analiz süresi açısından istenilen sonuçlar vermiştir.

- *Eltrombopag Stres Testi Yöntemi*

Stres testin amacı potansiyel bozunma ürünlerinin oluşumunu tespit etmek ve metodun potansiyel bozunma ürünlerinin ayrımı için uygunluğunu doğrulamaktır. Bu yüzden bu

çalışma için Eltrombopag ilgili maddeler ve Eltrombopag miktar tayini yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan hangi safsızlıkların ne kadar oluştuğunu ve bozundurma öncesi ve sonrası kütle dengesini doğrulamak istenir. Stres testi çalışması için Eltrombopag örneği UV ışını, gün ışığı, sıcaklık, su ve ısı, asit, baz ve oksitleyici ajan ile muamele edilerek bozundurulmaya çalışılmıştır. Bozundurma çalışmasında maddenin bozunma eşiği bulmak istenir. Çok yüksek bozunma derecesi hesaplanacak kütle dengesini bozma ihtimali vardır. Bu bilgilere dayanarak stres testi denemeleri yapılmıştır. Eltrombopag su ve ısı ile bozundurmaya karşı genel bir dayanklılık göstermiştir. Farklı denemeler sonucunda Eltrombopag örneğinin su ve ısı ile bozundurma çalışması için bir saat 60°C'de yürütülmüştür. Eltrombopag'ın su ve ısıya karşı dayanıklığı olduğu görülmüştür.

Asit ile bozundurma şartların belirlenmesi için numuneye farklı konsantrasyonda HCl eklenip farklı sürelerde asitte bekletilmiştir. Eltrombopag 0,1N ve 0,5N HCl muamele sonucunda bozunma meydana gelmeyip, 5N HCl muamelede ise bozunmanın derecesi çok yüksek olduğu görülmüştür. Asit konsantrasyonu ve muamele süreleri denemeleri sonucunda Eltrombopag örneği stres testi çalışması için en uygun ortamın bir saat 1N HCl olduğu karar verilmiştir. Baz ile bozundurma şartların belirlenmesi için asit ile bozundurmaya benzer bir yol izlenmiştir. Bu çalışma için bazik ortam olarak bir saat 1N NaOH'a karar verilmiştir. Oksidasyon ajanı ile bozundurma çalışması için H_2O_2 kullanılmıştır. %5, %10, %20 ve %30 oranlarında H_2O_2 ile muamele ile bozundurma denemeleri yapılmıştır. %10, %20 ve %30 H_2O_2 çözeltiler çok güçlü oksidasyon ajanları oldukları için numuneyi fazlasıyla degradasyona uğratmışlardır. Bundan dolayı oksitleyici ajan ile bozundurma ortamı olarak bir saat %5 H_2O_2 seçilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında numune miktarında en büyük bozunmanın %5 H_2O_2 ile olduğu söylenebilir. Miktar tayini sonucuna göre numune miktarı %99,3'ten %98,6 inerken, asit ve baz ile bozundurmada numune miktarı bu ölçüde azalmamıştır. Bu da H_2O_2 ile bozundurmanın önem arz ettiğini göstermektedir. Bunu yanı sıra hiçbir bozundurma çalışmasında bilinen bir safsızlık oluşmamıştır. Asit ile bozundurma sonucu RRT= 0,52 ve RRT=0,85'de bilinmeyen iki safsızlık oluşmuştur. RRT=1,40'da gelen bir safsızlık ise azalmıştır. Baz ile bozundurma çalışmasında RRT=0,52, RRT=0,71, RRT=0,85 ve RRT= 1,10'da bilinmeyen dört safsızlık oluşmuştur. Baz ile bozundurmada asit ile bozundurmaya benzer şekilde RRT=1,40'da gelen safsızlık azalmıştır. H_2O_2 ile bozundurma sonunca da ise RRT=0,52' de bilinmeyen safsızlık oluşmuştur. RRT=1.12'de bilinmeyen safsızlık ise artmış meydana gelmiştir.

Eltrombopag örneği aynı zamanda UV, gün ışığı ve sıcaklıkta bekletilmiştir. UV ve gün ışığı ile bozundurma çalışmalarında numune UV ışını 27 gün (kinin absorbans farkı 0,9 olana kadar), gün ışığı ile muamele için fotostabilite kabininde 30 gün (kinin absorbans farkı 0,9 olana kadar) ve sıcaklık çalışması için 70°C'ye ayarlanmış etüvde 10 gün boyunca bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Eltrombopag örneğinin UV, gün ışığı ve sıcaklığa karşı dayanıklılık gösterdiği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2. Eltrombopag stres testi sonuçları

Test	Safsızlık	Başlangıç	Isı	Işın		Hidroliz			Oksidasyon
				Gün	UV	Nötral	Asit	Baz	
İlgili Maddeler (%)	Eltro-1	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Eltro-2	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	RRT 0,52	TE	TE	TE	TE	TE	0,06	0,09	0,07
	RRT 0,85	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,11	0,15	<0,05
	RRT 0,93	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	<0,05
	RRT 0,97	0,05	<0,05	<0,05	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	RRT 1,10	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,06	<0,05
	RRT 1,12	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,63
	RRT 1,40	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,06	<0,05	0,09
	Total Safsızlık	0,20	0,14	0,14	0,19	0,14	0,28	0,40	0,79
Miktar Tayini (%)		**99,6**	**99,8**	**99,6**	**99,7**	**99,7**	**99,4**	**99,3**	**98,6**
Kütle Dengesi		**99,8**	**99,9**	**99,7**	**99,9**	**99,8**	**99,7**	**99,7**	**99,4**

Eltrombopag stres testi çalışmaların sonuçlarına göre Eltrombopag miktar tayini ve Eltrombopag ilgili maddeler yöntemlerin Eltrombopag ilaç etken maddesi için stabilite göstergeli yöntemler olduğunu göstermektedir.

- *Ruxolitinib Kiral Safsızlık Yöntemi*

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi geliştirirken bir normal faz kromatografi sistemi kullanılmıştır. Normal faz kromatografi sistemlerinde ters faz kromatografi sistemlerin aksine hareketli faz, sabit fazdan daha apolardır.

Kiral safsızlık yöntemin geliştirilmesindeki ilk basamak çözücü seçimidir. Çözücü seçimi yaparken çözücünün olabildiğince apolar olmasına dikkat edildi. Etanol denemesi

sonucunda Ruxolitinib ilaç etken maddesinin çöktüğü meydana gelmiştir. Bu bilgiye dayanarak denemeler sonucunda metanol uygun çözücü olarak kullanılmıştır. Ruxolitinib'in çalışma derişimini belirlemek için 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL ve 2,0 mg/mL olmak üzere dört farklı derişim denenmiştir. Düşük derişimlerdeki (S)-Ruxolitinib pik alanı düşük gelmektedir. Bunun nedeni ise, (rac)-Ruxolitinib hemifumarat içerisindeki düşük (S)-Ruxolitinib oranıdır. (S)-Ruxolitinib'in kabul edilebilir büyüklükteki bir pik elde edebilmek için çalışma derişimi olarak 2,0 mg/mL'ye karar verilmiştir.

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemin geliştirilmesinde iki farklı kolon denenmiştir. Biri selüloz bazlı Chiralpak OD-H (250 x 4,6 mm, 5µm), diğeri amiloz bazlı Chiralpak AD-H (250 x 4,6 mm, 5µm). Bu iki kolon kiral moleküller ayırmada en geniş spektrumu veren kolonlardandır. Denemeler sonucunda Chiralpak OD-H (250 x 4,6 mm, 5µm) kolonu Ruxolitinib ile (S)-Ruxolitinib molekülleri birbirinden tamamıyla ayıramamıştır. Chiralpak AD-H (250 x 4,6 mm, 5µm) kolon kullanımı sonucunda ise pikler arasındaki ayrılma sağlandığı için bu kolonla çalışmaya karar verilmiştir.

Hareketli faz seçimi yaparken yine çözücüde olduğu gibi suyun hareketli fazların içerisinde bulunmamasına dikkat edilmelidir. Hareketli faz denemelerinde hareketli faz A olarak sadece n-hekzan kullanılırken hareketli faz B olarak metanol ve etanol kullanılmıştır. Metanol ve etanol karşılaştırıldığında daha düşük polariteye sahip olan etanol Ruxolitinib ile (S)-Ruxolitinib piklerini ayıran en etkili hareketli faz B olduğu anlaşılmıştır. Ruxolitinib bazik bir moleküldür ve iki pik arasındaki ayırıcılığı daha da artırmak için bazik bir reaktif olan dietilamin eklenmiştir. Dietilamin eklenmesiyle iki pik arasındaki ayırıcılık artırılmıştır. Nedeni ise dietilaminin bazik Ruxolitinib'in iyonlaşmasını baskılamasıdır. Bu şekilde kolon üzerindeki hidrofobik gruplarla Ruxolitinib arasındaki etkileşim artırılmış oluyor. Kolon sıcaklığı denemeleri 20°C, 25°C ve 30°C'lerde yapılmıştır. Artan sıcaklık ile ayırıcılığın arttığı görülmüştür. Fakat daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığı takdirde kullanılan kolon tavsiye edilen sıcaklık aralığın sınırına yaklaşılacağı için daha yüksek sıcaklıklara çıkılamamıştır.

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemin elüsyon programı olarak izokratik elüsyon tercih edilmiştir. Nedeni ise kiral kolonların zor şartlanmalarıdır. Gradient elüsyon programı seçildiği takdirde her enjeksiyon sonunda başlangıç hareketli faz bileşimi ile uzun bir şartlanma süresi gerekli olup yöntemin tekrarlanabilirliği tehlikeye atılır. Bu kiral safsızlık yöntemi normal faz kromatografisi yönteminde geliştiriliği için hareketli faz bileşimi apolara yakın seçilmek istenmiştir. Bundan dolayı hareketli faz A olan n-hekzan oranı yüksek seçilip, hareketli faz B

olan etanol:dietilamin karışımı daha düşük seçilmiştir. Ancak hareketli faz B oranı çok düşük ayarlandığı takdirde Ruxolitinib ile (S)-Ruxolitinib arasındaki ayırıcılık da azaltılmış olur. Denemeler sonunda hareketli faz A:hareketli faz B (75:25) en uygun hareketli faz bileşimi olarak görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser ve birçok başka nadir hastalık, insanın genetik kodunu taşıyan DNA üzerindeki bir bozuklukla meydana gelmektedir. Bu hastalıklar da nesilden nesile aktarılmasıyla yayıldığı için, bunların araştırılması daha da önemli hale gelmiştir. Hastalıkların çözümü için ilaç etken maddeleri büyük önem arz etmektedir. Fakat, ilaç etken maddelerin AR-GE çalışmaları hem uzun sürmektedir hem de yüksek maliyetlidir. Bundan dolayı ilaç fiyatları çok yüksektir ve ilaçlara ulaşımı zorlaşmaktadır. Ülkelerin kendi ilaç etken maddelerini üretmesi bu yüzden önemlidir. Bu şekilde hem ilaçların fiyatı düşmekte hem de ilaçlara ulaşımı kolaylaşmaktadır.

Eltrombopag ITP kan hastalığın tedavisinde kullanılırken, Ruxolitinib, bir kanser türü olan PMF tedavisinde kullanılmaktadır. DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanında sentezlenmiş olan ve bu tez kapsamında analitik yöntem geliştirilmesi ve validasyonu yapılmış bu iki ilaç etken maddesi Türkiye'de bu hastalıklara sahip insanlar için daha ulaşılabilir bir ilaç piyasası sağlayacaktır.

DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanı tarafından sentezlenen Eltrombopag ile Ruxolitinib ilaç etken maddelerin olası safsızlıkları belirlendikten sonra ilaç etken maddeler ile safsızlıkları ayrı ayrı standardize edilmiştir. Standardizasyon işlemleri hem karakterizasyon işlemleri hem de saflığı belirleme çalışmaları kapsamaktadır. Bunlar yapıldıktan sonra tez kapsamında olan Eltrombopag ilaç etken maddenin ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemi, Eltro-1 ilgili maddeler yöntemi, Eltrombopag stres testi ve Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi olmak üzere beş farklı yöntem geliştirilip, ICH kılavuzuna göre valide edilmiştir.

Eltrombopag ve Eltro-1 için yöntemler ters faz YPSK kullanılarak geliştirilmiştir. Ters faz kromatografisinde kullanılan sabit faz, yani kolon, apolar yapıdayken, hareketli faz olarak polar reaktifler kullanılmaktadır. Ters faz YPSK'da ayırma maddelerin polaritesine bağlı olarak yapıldığı için ortamın pH'sı önemlidir. Ortamın pH'sı ise maddelerin pKa değerlerine göre ayarlamak gereklidir. Özellikle Eltrombopag ilgili maddeler yöntem geliştirilmesinde ilaç etken maddesi ile safsızlıkların birbirinden ayrılması için hareketli fazda farklı pH değerleri kullanılmıştır.

Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemi ise normal faz YPSK'da yapılmıştır. Normal faz sistemlerinde ters faz sistemlerin aksine sabit faz polar, hareketli faz apolardır. Sabit faz olarak

bir polisakkarit bazlı kiral kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak ise apolar reaktifler kullanıp, elüsyon programı olarak ise izokratik tercih edilmiştir. Tüm yöntem geliştirmelerinde numunelerin çözücülerini dikkate alınması gerekir. İyi bir hareketli faz çözücü uyumu piklerin şekillerini düzeltip, güvenilir bir sonuç alınmasını sağlamaktadır.

Yöntemlerde kullanılan derişimler, safsızlıkların ICH Q2B(R2) kılavuzuna göre belirlenen limitlere göre seçilmektedir. İlaç etken maddelerin içerisinde bulunan bilinen safsızlıklar %0,15, bilinmeyen safsızlıklar ise %0,10'u geçmemelidirler. Bu bilgilere ve safsızlıkların sinyal/gürültü oranlarına göre numune derişimleri belirlenmektedir.

Eltrombopag ilgili maddeler ve miktar tayini, Eltro-1 ilgili maddeler ve Ruxolitinib kiral safsızlık yöntemlerin geliştirme çalışmalarından sonra ICH Q2(R2) kılavuzuna göre seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık ve çözelti stabilitesi parametrelerini içeren validasyon çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. Geliştirilen ve validasyon çalışmalarıyla doğrulanan Eltrombopag yöntemlerle bozundurma çalışmaları da yapılmıştır. Eltrombopag gün ışığı, UV, ısı, su ve ısı, asit, baz ve oksitlendirici ajan ile bozundurulmuştur. Bozundurma çalışmaların analiz sonuçlarına göre; Eltrombopag pikinin saf olduğu, safsızlık piklerinin tam bir ayrım gösterdiği belirlenmiştir. Bu da miktar tayini ve ilgili maddeler metotlarının Eltrombopag için stabilite göstergeli metotlar olduğunu göstermektedir.

DEVA Holding A.Ş AR-GE bölümü API departmanında sentezlenen Eltrombopag, Eltro-1 ve Ruxolitinib ilaç etken maddelerinin ve safsızlıklar ile ilgili metotlar geliştirilmiştir. Ayrıca Eltrombopag için geliştirilen ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri bir bozundurma çalışması ile kararlı yöntemler oldukları ispatlanmıştır. Geliştirilen yöntemlerin hızlı, seçici, kesin, doğru ve kararlı oldukları için kalite kontrol laboratuvarlarında ve rutin analizlerde kullanılabilmektedir.

KAYNAKLAR

Adataş, C. (2010). *Parasetamol tablet preparatlarından etkin maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, K.K.T.C.

Ahir, K., Singh, S., Dharti, P., & Patel, M. (2020). Dissolution method validation with reverse phase chromatographic methods for determination of eltrombopag drug release in dissolution samples of tablets. *Int. J. Pharm. Biol. Arch*, 11, 182-189.

Biswal, S., Mondal, S., & Mondal, P. (2019). A New Stability Indicating High Performance Liquid Chromatography Method for the Estimation of Ruxolitinib in Bulk and Tablet Dosage Form. *Pharmaceutical Methods,* 10(2). https://doi.org/10.5530/phm.2019.2.10

Charlier, B., Marino, L., Dal Piaz, F., Pingeon, M., Coglianese, A., Izzo, B., Serio, B., Selleri, C., Filippelli, A., & Izzo, V. (2019). Development and validation of a reverse-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (RP-HPLC-FL) method to quantify ruxolitinib in plasma samples. *Analytical Letters,* 52(8), 1328-1339. https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1537283

ChemBam. Adsorption chromatography https://chembam.com/definitions/adsorption-chromatography/

Cooper, N., & Bussel, J. (2006). The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura. *British Journal of Haematology*, 133(4), 364-374. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06024.x

D'Alessandro, A., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., & Hansen, K. C. (2017). Red blood cell proteomics update: is there more to discover?. *Blood Transfusion,* 15(2), 182. https://doi.org/10.2450/2017.0293-16

Dandabattina, R., Subramanian, V. B., Merugu, K. S., SharathBabu, H., Katari, N. K., & Kowtharapu, L. P. (2023). Stability-Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for Eltrombopag Olamine in the Presence of Impurities and Degradation Products. Robustness by Design of Expert Software. *Journal of AOAC International,* 106(2), 267-275. https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac153

Di Michele, A., Schoubben, A., Varfaj, I., D'Arpino, A., Mercolini, L., Sardella, R., Ricci, M., &

Tiacci, E. (2020). Improved achiral and chiral HPLC-UV analysis of ruxolitinib in two different drug formulations. *Separations,* 7(3), 47. https://doi.org/10.3390/separations7030047

Ermer, J., Burgess, C., Kleinschmidt, G., & McB. Miller, J. H. (2005). Performance parameters, calculations and tests. *Method validation in pharmaceutical analysis: a guide to best practice,* 21-194. https://doi.org/10.1002/3527604685

Ettre, L. S. (2003). M.S. Tswett and the invention of chromatography: on the occasion of the centenary of the invention of chromatography, this month's "Milestones in Chromatography" column chronicles the life and activities of its inventor, his struggle for acceptance, and, finally, the triumph of his technique. (Milestone in Chromatography). LC-GC North America, 21(5), 458-467.

George, J.N. (2000). Platelets, *The Lancet*, 355, 1531–1539. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02175-9

Gonzalez-Porras, J. R., & Bastida, J. M. (2018). Eltrombopag in immune thrombocytopenia: efficacy review and update on drug safety. *Therapeutic Advances in Drug Safety,* 9(6), 263-285. https://doi.org/10.1177/2042098618769587

Hage, D.S. (2019). Chromatography and electrophoresis. In Contemporary practice in clinical chemistry. *Academic Press.* 135-137. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00008-9

Harrison, P. (2005). Platelet function analysis. *Blood Reviews*, 19(2), 111-123. https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002

Harrison, J. S., DesMarteau, P., Hamilton, B., & Patthoff, S. (2012). *Leukemia and lymphoma society.*

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2022). Genova. Q2(R2).

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2006). Genova. Q3A(R2).

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2006). Genova. Q3B(R2).

Kim, T. O., Despotovic, J., & Lambert, M. P. (2018). Eltrombopag for use in children with immune thrombocytopenia. *Blood Advances,* 2(4), 454-461. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017010660

Maddela, R., Gajula, R., Pilli, N. R., Siddiraju, S., Maddela, S., & Makula, A. (2014). Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for eltrombopag in 50 µL of human plasma: A pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 68-73. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.028

Mascarenhas, J., & Hoffman, R. (2012). Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clinical cancer research,* 18(11), 3008-3014. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3145

Mohan, T. S. S. J., Mukkanti, K., & Jogia, H. A. (2018). Stability Indicating UHPLC Method Development and Validation for Estimation of Eltrombopag and Its Related Impurities in Tablet Dosage Form. *Oriental Journal of Chemistry*, 34(2), 1098. http://doi.org/10.13005/ojc/340262

Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E. J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D., Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P., Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J.P., Harrison, C.N., Cross, N.C.P., Ron, D., Vannucchi, A.M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., & Green, A.R. (2013). Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. New England *Journal of Medicine,* 369(25), 2391-2405. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312542

National Cancer Institute (2021). What is cancer? https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer

National Heart, Lung, and Blood Institute. Blood Disorders and Blood Safety. https://www.nhlbi.nih.gov/science/blood-disorders-and-blood-safety

Ostojic, A., Vrhovac, R., & Verstovsek, S. (2011). Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future oncology,* 7(9), 1035-1043. https://doi.org/10.2217/fon.11.81

Ozkan, S.A., & Uslu, B. (2002). Rapid HPLC assay for lamivudine in pharmaceuticals and human serum. *Journal of liquid chromatography & related Technologies,* 25(9), 1447-1456. https://doi.org/10.1081/JLC-120004759

Patriarca, M. (1998). *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. Eurachem.

Pohl, C. (2019). *Ion chromatography columns. in chromatographic methods development.* Singapore: Jenny Stanford Publishing.

Pokar, D., Rajput, N., & Sengupta, P. (2020). Industrial approaches and consideration of clinical relevance in setting impurity level specification for drug substances and drug products. International *Journal of Pharmaceutics,* 576, 119018. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.119018

Prabu, S. L., & Suriyaprakash, T. N. K. (2010). Impurities and its importance in pharmacy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 3(2), 66-71.

Provan, D., Stasi, R., Newland, A. C., Blanchette, V. S., Bolton-Maggs, P., Bussel, J. B., Chong, B. H., Cines, D. B., Gernsheimer, T. B., Godeau, B., Grainger, J., Greer, I., Hunt, B. J., Imbach, P. A., Lyons, G., McMillan, R., Rodeghiero, F., Sanz, M. A., Tarantino, M., Watson, S., Young, J., & Kuter, D. J. (2010). International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood, *The Journal of the American Society of Hematology,* 115(2), 168-186. https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225565

Skoog D.A, Holler J., Nieman T.A (1998). *Enstrümantal analiz ilkeleri* (E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz, Çev.) Ankara: Bilim Yayıncılık.

Skoog D.A, West M.D, Holler J. (1999). *Analitik kimya temelleri* (E. Kılıç, F. Köseoğlu, Çev.) Ankara: Bilim Yayıncılık.

Sreelatha, G., RG, S. C., Harshana, T., Spandana, Y. D., & Reddy, Y. A. (2023). Development and validation of visible spectrophotometric method for estimation of eltrombopag olamine in bulk and tablet dosage form. *Journal of Advanced Scientific Research*, 14(08), 61-65. https://doi.org/10.55218/JASR.202314808

Thakkar, H., Sharma, K., Goyal, N., & Shah, R. P. (2022). LC-HRMS studies on ruxolitinib degradation: a comprehensive approach during drug development. *Analytical Methods*, 14(4), 480-490. https://doi.org/10.1039/D1AY01915E

Veeraraghavan, S., Thappali, S., Viswanadha, S., Chennupati, S., Nalla, S., Golla, M., Vakkalanka, S., & Rangasamy, M (2014). Simultaneous quantification of ruxolitinib and nilotinib in rat plasma by LC–MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, 125-131. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.040

Wenzel, T. J. (2011). Active learning materials for equilibrium chemistry and separation science. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(3), 637-641.

World Health Organization (WHO) (2021). Cancer. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer

Yücel, A. (2010). *Propellantlarin içindeki 2-nitro difenil amin'in kromatografik yöntemlerle analizi* (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, T.C.

Zufferey, A., Kapur, R., & Semple, J. W. (2017). Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP). *Journal of Clinical Medicine*, 6(2), 16. https://doi.org/10.3390/jcm6020016

EKLER