



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SELEXİPAG VE VİSMODEGİB İLAÇ ETKEN MADDELERİ
VE İMPÜRİTELERİNİN SPEKTROSKOPİK OLARAK
KARAKTERİZASYONU VE KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ
VE VALİDASYONU**

Melike Ceren MİSER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELEXİPAG VE VİSMODEGİB İLAÇ ETKEN MADDELERİ
VE İMPÜRİTELERİNİN SPEKTROSKOPİK OLARAK
KARAKTERİZASYONU VE KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLERLE ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ
VE VALİDASYONU**

Melike Ceren MİSER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Esen BELLUR ATICI

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

ANKARA

2023

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xvi

1. GİRİŞ	1
1.1.Giriş ve Amaç	1
1.2.Tez Kapsamında Çalışılan İlaç Etken Maddeleri	2
1.3.Kolon Kromatografisi	12
1.3.1.Adsorpsiyon Kromatografisi	13
1.3.2.Dağılma Kromatografisi	13
1.3.3.İyon Çifti Kromatografisi	15
1.4.İlaç Etken Maddelerindeki Safsızlıklar	16
1.5.X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD), Polimorfizm	19
1.6.Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)	19
1.7.Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi ve Kırmızı Ötesi Spektroskopisi (FTIR)	20

2.GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1.Gereç	23
2.1.1.Kullanılan Kimyasallar	23
2.1.2.Kullanılan Cihaz ve Araçlar	24
2.1.3.Tez Çalışmasında Araştırılan Kolonlar	25
2.1.4.Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri	25
2.1.5.Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	26
2.1.5.1.Selexipag İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler	26
2.1.5.2.Hareketli Faz Olarak Araştırılan Çözeltiler	26
2.1.5.2.1.Numune Çözeltisi Hazırlığı	28
2.1.5.2.2.Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlığı	28
2.1.5.2.3.Standart Çözeltilerin Hazırlanması	29
2.1.5.2.4.Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması	30
2.1.5.2.5.Selex-1, Selex-Asit ve Selex-Asetil Safsızlıklarının Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	30
2.1.5.2.6.Selex-1, Selex-asit, Selex-asetil Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	31
2.1.5.2.7.Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltisini Hazırlanması	31

2.1.5.2.8.Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması	32
2.1.5.3.Selexipag Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler	32
2.1.5.3.1.Hareketli Faz Çözeltileri	32
2.1.5.3.2.Numune Çözeltisi Hazırlığı	33
2.1.5.3.3.Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması	33
2.1.5.3.4.Standart Çözeltisinin Hazırlanması	34
2.1.5.3.5.Stok Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması	34
2.1.5.3.6.Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması	34
2.1.5.3.7.Selexipag İçerisinde Selex-2 Belirlenmesi	35
2.1.5.4.Vismodegib İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler	35
2.1.5.4.1.Hareketli Faz Çözeltileri	35
2.1.5.4.2.Numune Çözeltisinin Hazırlanması	37
2.1.5.4.3.Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması	37
2.1.5.4.4.Standart Çözeltisinin Hazırlanması	37
2.1.5.4.5.Sistem Uygunluğu Çözeltisinin Hazırlanması	38
2.1.5.4.6.Vismo-1 ve Vismo-2 Safsızlıklarının Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	38
2.1.5.4.7.Spesifikasyon Limit Derişiminde Vismo-1 ve Vismo-2 Safsızlıklarının Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	38
2.1.5.4.8.HBTU Safsızlık Standart Çözeltisinin Hazırlanması	38
2.1.5.4.9.Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltisinin Hazırlanması	39
2.1.5.4.10.Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması	39
2.1.5.5.Vismodegib Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler	39
2.1.5.5.1.Hareketli Faz Çözeltileri	39
2.1.5.5.2.Numune Çözeltisi Hazırlığı	41
2.1.5.5.3.Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması	41
2.1.5.5.4.Standart Çözeltisinin Hazırlanması	41
2.1.5.5.5.Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması	42
2.2.Yöntem	42
2.2.1.YPSK ile Yapılan Miktar Tayini Yöntemleri	42
2.2.1.1.Selexipag Miktar Tayini Yöntemi	42
2.2.1.2.Vismodegib Miktar Tayini Yöntemi	42
2.2.2.UYPSK ile Yapılan Yöntemler	43
2.2.2.1.Selexipag İlgili Maddeler Yöntemi	43
2.2.2.2.Vismodegib İlgili Maddeler Yöntemi	43
2.2.3.FTIR Spektroskopisi	44
2.2.4.NMR Spektroskopisi	44
2.2.5.Kütle Spektrometrisi	44
2.2.5.1.Selexipag Kütle Spektrometrisi Yöntemi	45
2.2.5.2.Vismodegib Kütle Spektrometrisi Yöntemi	45
2.2.6.Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)	45
2.2.7.Polimorfizm- XRD Difraktogramı	46

3.BULGULAR	47
3.1.İlaç Etken Maddelerinin Safsızlık Profilinin Belirlenmesi	47
3.2.İlaç Etken Maddelerin ve Safsızlıklarının Spektroskopik İncelenmesi	48
3.2.1.Selexipag	48
3.2.2. Vismodegib	59
3.3.Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon	65
3.3.1.Tüm Yöntemler İçin Genel Özellikler	65
3.3.2.Selexipag İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu	67
3.3.2.1.Çalışma Derişimi Seçimi	67
3.3.2.2.Çözücü Sisteminin Seçimi	67
3.3.2.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması	68
3.3.2.4.Yöntem Optimizasyonu	71
3.3.3.Selexipag Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu	73
3.3.3.1.Çalışma Derişimi Seçimi	73
3.3.3.2.Çözücü Sisteminin Seçimi	73
3.3.3.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi	74
3.3.3.4.Yöntem Optimizasyonu	74
3.3.4.Vismodegib İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu	76
3.3.4.1.Çalışma Derişimi Seçimi	76
3.3.4.2.Çözücü Sisteminin Seçimi	76
3.3.4.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması	77
3.3.4.4.Yöntem Optimizasyonu	79
3.3.5.Vismodegib Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu	81
3.3.5.1.Çalışma Derişimi Seçimi	81
3.3.5.2.Çözücü Sisteminin Seçimi	81
3.3.5.3.Çalışma Dalga Boyu Seçimi	82
3.3.5.4.Yöntem Optimizasyonu	82
3.4.Validasyon Çalışmaları	82
3.4.1.Selexipag İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları	83
3.4.1.1.Sistem Uygunluk Testi	83
3.4.1.2.Seçicilik	84
3.4.1.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	86
3.4.1.4.Teşhis Sınırı (TS/TS) ve Tayin Alt Sınırı (TAS/TAS)	90
3.4.1.5.Doğruluk	93
3.4.1.6.Kesinlik	95
3.4.1.6.1.Yöntem Kesinliği	95
3.4.1.6.2.Tekrar Üretilbilirlik (Laboratuvarlar Arası)	95
3.4.1.7.Sağlamlık	96
3.4.1.8.Çözelti Kararlılığı	97
3.4.2.Selexipag Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları	98
3.4.2.1.Sistem Uygunluk Testi	98
3.4.2.2.Seçicilik	99
3.4.2.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	100
3.4.2.4.Doğruluk	101
3.4.2.5.Kesinlik	102
3.4.2.5.1.Sistem Kesinliği	102
3.4.2.5.2.Yöntem Kesinliği	102
3.4.2.5.3.Tekrar Üretilbilirlik	103

3.4.2.6.Sağlamlık	103
3.4.2.7.Çözelti Kararlılığı	104
3.4.3.Vismodegib İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları	104
3.4.3.1.Sistem Uygunluk Testi	104
3.4.3.2.Seçicilik	105
3.4.3.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	109
3.4.3.4.Tespit Sınırı (TS) ve Nicelik Sınırı (TAS)	112
3.4.3.5.Doğruluk	114
3.4.3.6.Kesinlik	116
3.4.3.6.1.Yöntem Kesinliği	116
3.4.3.6.2.Tekrar Üretilirlik (Laboratuvarlar Arası)	116
3.4.3.7.Sağlamlık	117
3.4.3.8.Çözelti Kararlılığı	117
3.4.4.Vismodegib Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları	119
3.4.4.1.Sistem Uygunluk Testi	119
3.4.4.2.Seçicilik	119
3.4.4.3.Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	120
3.4.4.4.Doğruluk	121
3.4.4.5.Kesinlik	122
3.4.4.5.1.Sistem Kesinliği	122
3.4.4.5.2.Yöntem Kesinliği	122
3.4.4.5.3.Tekrar Üretilirlik	123
3.4.4.6.Sağlamlık	123
3.4.4.7.Çözelti Kararlılığı	124
4.TARTIŞMA	125
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	142
ÖZET	146
SUMMARY	147
KAYNAKLAR	148
ÖZGEÇMİŞ	154

ÖNSÖZ

Yeni ilaç üretiminin oldukça zahmetli, zaman alıcı ve maliyetli olmasına karşın eşdeğer ilaç üretimi maliyet ve zaman açısından daha ekonomiktir. Bu nedenle ülkemizde eşdeğer ilaç ile ilgili atılan her adım çok önemlidir. Bu tez kapsamında da DEVA Holding A.Ş.'de sentezlenen Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddelerinin spektroskopik olatakar karakterizasyonu yapılarak; hem ilgili maddeler hem de miktar tayini yöntemleri geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Ayrıca stres çalışmaları ile kararlılıkları, bozunma yolları ve bozunma ürünleri tespit edilmiştir. Böylece rutin kalite kontrol laboratuvarlarında üretim sonrası analizler için hızlı, kesin, doğru, kararlı, sağlam yöntemler elde edilmiştir.

Akademik hayatımın doktora eğitimimde tanıştığım, ilk günden itibaren bilgisine, çalışkanlığına, insanlığına, sabrına hayran kaldığım bir Cumhuriyet kadını olan saygıdeğer ve sevgili hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a içtenlikle şükranlarımı sunarım.

Proje kapsamında eş danışmanım olan; çalışkanlığı, zekası, hoşgörüsü ve her daim arkamızda olan çok değerli Doç. Dr. Esen BELLUR ATİCİ hocama da teşekkürü bir borç bilirim. Her iki danışmanım da hayatımda unutamayacağım güçlü kadınlar arasındadır.

Bu çalışmam sırasında DEVA Holding A.Ş. API sentez ve analitik bölümündeki tüm çalışma arkadaşlarıma, şeflerime ve müdürlerime sonsuz teşekkür ederim. Özellikle Selexipag çalışmam da bana büyük yardımları olan Kıdemli Uzman Damla YALDIZ'a, tez çalışmamda beni hep destekleyen ve desteğini hiç esirgemeyen 2244 doktora bursiyeri Merve UĞUR'a, bana hayvan sevgisini aşıl原因 arkadaşım Uzman Gamze YİĞİT'e ve Proje Grup Lideri Halil YILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca Öğr.Gör.Göksu ÖZÇELİKAY AKYILDIZ'a ve doktora öğrencisi Ahmet ÇETİNKAYA'ya bize verdikleri desteklerden ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

Beni her daim destekleyen, sonsuz sevgi beslediğim, canım ve biricik ailem; annem Fatma MİSER'e; babam Muharrem MİSER'e, ablam Ece MİSER SALİHOĞLU'na, eniştem ve aslında abim gibi olan Berkay SALİHOĞLU'na ve en kıymetlim canımın içi yeğenim Deniz SALİHOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenen 2244 Sanayi-Doktora programı dâhilinde, 118C088 no'lu ''İlaç Etken Maddeleri, Hammaddeler ve Ara Ürünler için Analitik Metot Geliştirme ve Validasyon'' adlı proje ile gerçekleşmiştir. TÜBİTAK'a biz öğrencilere doktora yapabilmemiz için sağladığı tüm destekler için teşekkür ederiz.



SİMGELER VE KISALTMALAR

AAG	Alfa-1-asit glikoproteini
API	İlaç etken maddesi
BCC	Metastatik BCC
BH	Bağlı hata
BSS	Bağlı standart sapma
Cp	Isı kapasitesi
dk	Dakika
DHh	Desert Hh
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetrisi
HBTU	N,N,N',N'-Tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)üronyum hekzaflorofosfat
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Food and Drug Administration / Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GB	Görünür bölge
GK	Gaz kromatografisi
GK-KS	Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
H	Entalpi
Hh	Hedgehod
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IHh	İndian Hh
KS	Kütle spektrometresi
L	Litre
M	Molar
m	Eğim
MBTH	3-Metil-2-benzotiazolinon-hidrazon hidroklorür
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
n	Kesişim noktası
N	Normal
PAH	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
Ptch	Patched 1
R	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayırıcılık faktörü
RSS	Artık kareler toplamı
Shh	Sonik Hh
SMO	Smoothened proteini
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
SUT	Sistem uygunluk testi
SK	Sıvı kromatografi

SK-KS/KS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile birleştirilen kütle spektrometresi
SS	Standart sapma
t	Zaman
Tc	Kristalleşme sıcaklığı
Td	Bozunma sıcaklığı
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
TAS	Nicelik alt sınırı
TEA	Trietilamin
TFA	Trifloroasetik asit
TS	Tespit sınırı
USP	United States Pharmacopeia / Amerikan Farmakopesi
UYPSK	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi
VIS	Mor ötesi
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
XRD	X-ışını kırınım yöntemi
α	Seçicilik

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hedgehod (Hh) sinyal yolağı.	4
Şekil 1.2. Vismodegib molekül şekli.	4
Şekil 1.3. Selexipag molekül şekli.	8
Şekil 1.4. ACT-333679 molekül şekli.	9
Şekil 1.5. Adsorpsiyon kromatografisi.	13
Şekil 1.6. Dağılma kromatografisi.	14
Şekil 1.7. İyon çifti kromatografisi.	15
Şekil 3.1. Selexipag için tanımlanan safsızlıklar.	47
Şekil 3.2. Vismodegib için tanımlanan safsızlıklar.	48
Şekil 3.3. Selexipag ilaç etken maddesinin kimyasal yapısı.	48
Şekil 3.4. Selexipag ¹ H-NMR spektrumu.	49
Şekil 3.5. Selexipag ¹³ C-NMR spektrumu.	50
Şekil 3.6. Selex-1'in kimyasal yapısı ve ¹ H-NMR spektrumu.	50
Şekil 3.7. Selex-1'in ¹³ C-NMR spektrumu.	51
Şekil 3.8. Selex-2'nin kimyasal yapısı ve ¹ H-NMR spektrumu.	52
Şekil 3.9. Selex-2'nin ¹³ C-NMR spektrumu.	52
Şekil 3.10. Selex-asit'in kimyasal yapısı ve ¹ H-NMR spektrumu.	53
Şekil 3.11. Selex-asit'in ¹³ C-NMR spektrumu.	53
Şekil 3.12. Selex-asetil'in kimyasal yapısı ve ¹ H-NMR spektrumu.	54
Şekil 3.13. Selex-asetil'in ¹³ C-NMR spektrumu.	55
Şekil 3.14. Selexipag FTIR spekturumu.	56
Şekil 3.15. Selex-1 FTIR spekturumu.	57
Şekil 3.16. Selex-2 FTIR spekturumu.	57
Şekil 3.17. Selex-asit FTIR spekturumu.	58
Şekil 3.18. Selex-asetil FTIR spekturumu.	59
Şekil 3.19. Vismodegib kimyasal yapısı.	59
Şekil 3.20. Vismodegib ¹ H-NMR spektrumu.	60
Şekil 3.21. Vismodegib ¹³ C-NMR spektrumu.	61
Şekil 3.22. Vismo-1'in kimyasal yapısı ve ¹ H-NMR spektrumu.	61

Şekil 3.23. Vismo-1 ^{13}C -NMR spektrumu.	62
Şekil 3.24. Vismo-2'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.	62
Şekil 3.25. Vismo-2 ^{13}C -NMR spektrumu.	63
Şekil 3.26. Vismodegib FTIR spekturumu.	64
Şekil 3.27. Vismo-1 FTIR spekturumu.	64
Şekil 3.28. Vismo-2 FTIR spekturumu.	65
Şekil 3.29. Selexipag kütle spektrumu.	69
Şekil 3.30. Selex-1 kütle spektrumu.	69
Şekil 3.31. Selex-asit kütle spektrumu.	70
Şekil 3.32. Selex-asetil kütle spektrumu.	70
Şekil 3.33. Selex-2 kütle spektrumu.	71
Şekil 3.34. Vismodegib kütle spektrumu.	78
Şekil 3.35. Vismo-1 kütle spektrumu.	78
Şekil 3.36. Vismo-2 kütle spektrumu.	79
Şekil 3.37. Selexipag ilgili maddeler sistem uygunluk kromatogramı	83
Şekil 3.38. Selexipag ilgili maddeler Selexipag ve safsızlık standartlarının limit derişimdeki karışım çözeltisinin kromatogramı.	85
Şekil 3.39. Kör çözelti kromatogramı	86
Şekil 3.40. Selex-1 standardı doğrusallık grafiğı.	88
Şekil 3.41. Selex-asit standardı doğrusallık grafiğı.	88
Şekil 3.42. Selexipag standardı doğrusallık grafiğı.	89
Şekil 3.43. Selex-asetil standardı doğrusallık grafiğı.	89
Şekil 3.44. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri.	89
Şekil 3.45. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları-a.	89
Şekil 3.46. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları-b.	90
Şekil 3.47. Selexipag ilgili maddeler TS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış kromatogramı-a.	91
Şekil 3.48. Selexipag ilgili maddeler TS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış yakın kromatogramı-b.	92
Şekil 3.49. Selexipag ilgili maddeler TAS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış	

kromatogramı-a.	92
Şekil 3.50. Selexipag ilgili maddeler TAS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış yakın kromatogramı-b.	92
Şekil 3.51. Selexipag ilgili maddeler TAS, TS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış kromatogramı-a.	92
Şekil 3.52. Selexipag ilgili maddeler TAS, TS ve kör çözeltilerin çakıştırılmış yakın kromatogramı-b.	93
Şekil 3.53. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve kör çözeltilerin çakıştırılmış kromatogramı-a.	94
Şekil 3.54. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve kör çözeltilerin çakıştırılmış yakın kromatogramı-b.	94
Şekil 3.55. Selexipag miktar tayini sistem uygunluk kromatogramı.	98
Şekil 3.56. Selexipag miktar tayini limit derişimde safsızlık standartlarının karışım çözeltisi.	99
Şekil 3.57. Selexipag miktar tayini Selexipag standardının doğrusallık grafiğı.	101
Şekil 3.58. Selexipag miktar tayini çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları.	101
Şekil 3.59. Vismo-3 ve Vismo-4 molekül şekli.	106
Şekil 3.60. Vismo-3 kütle spektrumu.	106
Şekil 3.61. Vismo-4 kütle spektrumu.	107
Şekil 3.62. Vismodegib ilgili maddeler eklenilmiş numune ve kör çözeltisi çakıştırılmış kromatogramları.	108
Şekil 3.63. Vismodegib ilgili maddeler limit derişiminde Vismodegib ve safsızlıklarının karışım standart çözeltisi kromatogramı.	108
Şekil 3.64. Vismodegib ilgili maddeler seçicilik kör çözeltisi.	108
Şekil 3.65. Vismodegib ilgili maddeler pik saflığı kromatografı.	109
Şekil 3.66. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-1 standardının doğrusallık grafiğı.	110
Şekil 3.67. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-2 standardının doğrusallık grafiğı.	110
Şekil 3.68. Vismodegib ilgili maddeler Vismodegib standardının doğrusallık grafiğı.	111
Şekil 3.69. Vismodegib ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri.	111

Şekil 3.70. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış doğrusallık kromatogramları.	112
Şekil 3.71. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış doğrusallık yakın kromatogramları.	112
Şekil 3.72. Vismodegib ilgili maddeler TS kromatogramı.	113
Şekil 3.73. Vismodegib ilgili maddeler TAS kromatogramı.	114
Şekil 3.74. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış TS ve TAS kromatogramları.	114
Şekil 3.75. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış doğruluk kromatogramları.	116
Şekil 3.76. Vismodegib miktar tayini Vismodegib ve safsızlıklarının karışım kromatogramı.	120
Şekil 4.1. Selexipag form-II'nin ışık bozundurması ve normal şartlardaki karşılaştırılmış XRD difraktogramı.	136
Şekil 4.2. Selexipag form-P'nin ışık bozundurması ve normal şartlardaki karşılaştırılmış XRD difraktogramı.	136
Şekil 4.3. Selexipag form-IV XRD difraktogramı.	137
Şekil 4.4. Selexipag form-IV için termal çalışmadan sonraki DSC grafiği.	137
Şekil 4.5. Selexipag form-P DSC grafiği.	138
Şekil 4.6. Selexipag form-P 180 gün XRD difraktogramı.	139

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Selexipag etken maddesinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.	49
Çizelge 3.2. Selex-1 safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.	51
Çizelge 3.3. Selex-2 safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.	52
Çizelge 3.4. Selex-asit safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.	54
Çizelge 3.5. Selex-asetil safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.	55
Çizelge 3.6. Selexipag FTIR spekturum tablosu.	56
Çizelge 3.7. Selex-1 FTIR spekturum tablosu.	56
Çizelge 3.8. Selex-2 FTIR spekturum tablosu.	57
Çizelge 3.9. Selex-asit FTIR spekturum tablosu.	58
Çizelge 3.10. Selex-asetil FTIR spekturum tablosu.	58
Çizelge 3.11. Vismodegib etken maddesinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.	60
Çizelge 3.12. Vismo-1 ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.	62
Çizelge 3.13. Vismo-2 ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.	63
Çizelge 3.14. Vismodegib FTIR spekturum tablosu.	63
Çizelge 3.15. Vismo-1 FTIR spekturum tablosu.	64
Çizelge 3.16. Vismo-2 FTIR spekturum tablosu.	65
Çizelge 3.17. Selexipag ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolonlar.	72
Çizelge 3.18. Selexipag ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli faz A'lar.	72
Çizelge 3.19. Selexipag ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri.	73
Çizelge 3.20. Selexipag ilgili maddeler gradient programı.	73
Çizelge 3.21. Selexipag miktar tayini en uygun yöntem parametreleri.	75
Çizelge 3.22. Selexipag miktar tayini gradient programı.	75
Çizelge 3.23. Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolonlar.	79
Çizelge 3.24. Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli faz A.	80
Çizelge 3.25. Vismodegib ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri.	81
Çizelge 3.26. Vismodegib ilgili maddeler gradient programı.	81
Çizelge 3.27. Vismodegib miktar tayini yöntemi.	82

Çizelge 3.28. Selexipag ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları.	84
Çizelge 3.29. Selexipag ilgili maddeler seçicilik sonuçları.	85
Çizelge 3.30. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve çalışma aralığı sonuçları.	87
Çizelge 3.31. Tespit sınırı (TS) ve nicelik sınırı (TAS) sonuçları.	91
Çizelge 3.32. Doğruluk sonuçları çizelgesi.	94
Çizelge 3.33. Selexipag ilgili maddeler kesinlik sonuçları.	96
Çizelge 3.34. Selexipag ilgili maddeler kesinlik sonuçları.	96
Çizelge 3.35. Selexipag ilgili maddeler sağlamlık analizi sonuçları.	97
Çizelge 3.36. Selexipag ilgili maddeler çözelti kararlılığı sonuçları.	97
Çizelge 3.37. Selexipag miktar tayini pik saflığı sonuçları.	99
Çizelge 3.38. Selexipag miktar tayini doğrusallık sonuçları.	100
Çizelge 3.39. Selexipag miktar tayini doğruluk sonuçları.	102
Çizelge 3.40. Selexipag miktar tayini kesinlik sonuçları.	103
Çizelge 3.41. Selexipag miktar tayini sağlamlık sonuçları.	103
Çizelge 3.42. Selexipag miktar tayini çözelti kararlılığı sonuçları.	104
Çizelge 3.43. Vismodegib ilgili maddeler sistem uygunluk %BSS sonucu.	105
Çizelge 3.44. Vismodegib ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları.	105
Çizelge 3.45. Vismodegib ilgili maddeler seçicilik çalışması sonuçları.	107
Çizelge 3.46. Vismodegib ilgili maddeler doğrusallık sonuçları.	110
Çizelge 3.47. Vismodegib ilgili maddeler TS ve TAS sonuçları.	113
Çizelge 3.48. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-1 için doğruluk sonuçları.	115
Çizelge 3.49. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-2 için doğruluk sonuçları.	115
Çizelge 3.50. Vismodegib ilgili maddeler kesinlik sonuçları.	117
Çizelge 3.51. Vismodegib ilgili maddeler sağlamlık sonuçları-1.	117
Çizelge 3.52. Vismodegib ilgili maddeler sağlamlık sonuçları-2.	118
Çizelge 3.53. Vismodegib ilgili maddeler çözelti kararlılığı sonuçları.	118
Çizelge 3.54. Vismodegib miktar tayini sistem uygunluk sonuçları.	119
Çizelge 3.55. Vismodegib miktar tayini pik saflığı sonuçları.	120
Çizelge 3.56. Vismodegib miktar tayini doğrusallık sonuçları.	121
Çizelge 3.57. Vismodegib miktar tayini doğruluk sonuçları.	122
Çizelge 3.58. Vismodegib miktar tayini kesinlik sonuçları.	123

Çizelge 3.59. Vismodegib miktar tayini sağlamlık sonuçları.	123
Çizelge 3.60. Vismodegib miktar tayini çözelti kararlılığı sonuçları.	124
Çizelge 4.1. Selexipag ilgili maddeler deneme çalışması tablosu.	127
Çizelge 4.2. Selexipag stres test sonuçları.	140
Çizelge 4.3. Vismodegib stres test sonuçları.	141



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

İnsanoğlunun hayatta kalma içgüdüğü, hem hastalıklara çare bulmasına hem de nedenini araştırmasına yönlendirmiştir. Özellikle DNA'nın keşfi sayesinde de birçok hastalığın gerçek nedeni bulunmaya ve buna yönelik çalışmaların yapılmasına neden olmuştur. Günümüzde DNA üzerine çalışmaların daha fazla olması, DNA'nın daha çok özelliğinin keşfedilmesiyle; hedefe yönelik, daha iyileştirici tedaviler ve ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Özellikle; bazı ilaçların yan etkisine bakıldığında, hedefe yönelik, sadece hastalıklı bölgeye etki edecek birçok ilaç için araştırma geliştirme (Ar-Ge) çalışması yapılmaya başlanmıştır.

Canlı organizmalarda meydana gelen herhangi bir hastalığın tanısında, iyileştirilmesinde, önlenmesinde veya geriletilmesinde kullanılan; biyolojik olarak aktif bir ilacın bileşeni olan ve kimyasal yapısı, özellikleri belirlenmiş maddelere ilaç etken maddesi (API) denir. Yeni geliştirilen ilaç etken madde ile piyasaya sürülen ilaçlara da orijinal ilaç denir. Bulunan bu yeni ilaç etken maddeleri ile yapılan orijinal ilaçlar sayesinde, tedavi yöntemleri değişmekte ve yenilenmektedir. Yeni ilaç çalışmalarının Ar-Ge süreci uzun, meşakkatli ve oldukça maliyetlidir. Bu nedenle orijinal ilaçlar belli bir patent süresi altında korunmaktadır. Patent süresi biten ve orijinal ilaç ile aynı etken madde ve etkiye sahip ilaçların piyasaya çıkmasıyla üretilen ilaçlara ise eşdeğer (jenerik) ilaç denmektedir (Konca ve ark., 2015).

Patent, her ne kadar fikri mülkiyet hakkı da olsa; özellikle sağlık alanında, bir ilacın patentinin bir kuruluş veya kişi/kişilerin tekeline olması, o ilacın piyasa değerini arttırmaktadır. Sonuç olarak hastaların ilaçlara ulaşması zorlaşmaktadır. Bu nedenle; patent sürelerinin dolması ile eşdeğer ilaç üretimine ve dolayısıyla ilaç etken madde üretimine geçilmesi, hem Ar-Ge maliyetlerini azaltır hem de rekabet ortamı sağlar. İlaç fiyatlarının piyasa değeri azalırken, öncelikli olarak hastaların ilaca ulaşımı kolaylaşır ve de o ülkenin ekonomisine katkı sağlanmış olur. İlaç etken maddesini ve

bunun eşdeğer ilacını, en iyi şekilde üretebilmek için ise uluslararası kabul görmüş kriterler gözetilerek; sentezi, saflaştırılması, analitik yöntem geliştirilmesi ve validasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Tez kapsamında, eşdeğer ilaç üretiminde kullanılmak üzere üretilen Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddelerinin spektroskopik olarak tanımlanması, ilgili maddeler ve miktar tayini analitik yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

1.2.Tez Kapsamında Çalışılan İlaç Etken Maddeleri

- *Vismodegib*

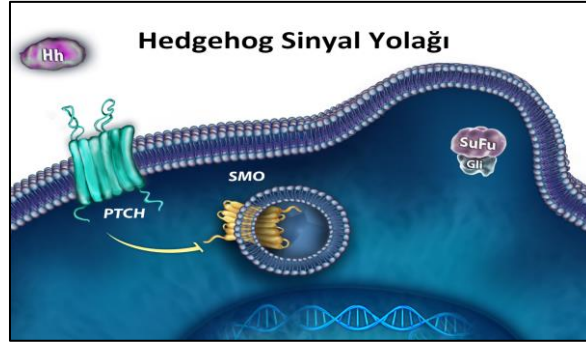
Geçmişten beri insanoğlunun en büyük sağlık sorunu olan kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ile ortaya çıkan, mortalite oranı yüksek bir hastalıktır. Nedeni; hem çevresel hem de genetik olabilmektedir. Şu an bilinen 100'den fazla kanser türü vardır. Kanser belli bir standarda göre tedavi de edilse; bu durum kanser türlerine ve kişiden kişiye değişiklik göstermektedir. En sık karşılaşılan kanser türlerinden birisi, vücudumuzun iskelet sisteminden sonraki en geniş organı olan cilttir. Kronik güneş maruziyeti, açık tenli olmak, ileri yaşa sahip olmak, kişisel veya ailesel kanser öyküsüne sahip olmak, bağışıklığı baskılayan ilaçlar kullanmak ve kalıtsal sendromlar gibi etkenler cilt kanserine sebep olmaktadır. Bazal hücreli karsinomu (BCC), skuamöz hücreli karsinom ve melanom olarak üç farklı cilt kanseri türü bulunmaktadır (Fellner, 2012).

Vismodegib (GDC-0449; Erivedge®, Genentech), 30 Ocak 2012'de Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan lokal ve metastatik BCC tedavisinde, ameliyattan sonra, cerrahi işlem veya radyasyona uygun olmayan ilerlemiş BCC tedavisinde kullanılan ilk Hedgehod (Hh) inhibitörüdür (Cirrone ve Harris, 2012). Ayrıca diğer kemoterapi ajanlarıyla kombinasyonlarında medulloblastoma, küçük akciğer kanseri, metastatik pankreas kanseri, metastatik

prostat kanseri, akut miyeloid lösemi kanser türleri için klinik çalışmalar yürütülmektedir (Sarı ve ark., 2018).

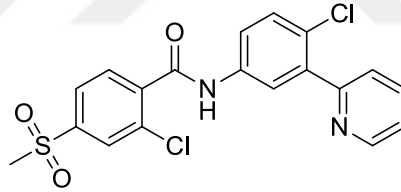
Hh sinyal yolağı, embriyonik gelişim sırasında organ oluşumunda önemli bir rol oynar. Evrimsel olarak yetişkinlerde bu sinyal yolağı korunmuştur ancak; anlamlı derecede aktivasyonu azalmıştır. Hh sinyal yolağındaki anormallikler sonucunda kansere yatkınlık meydana gelir. Örneğin; deri, meme, prostat, beyin, akciğer, pankreas gibi organlardaki kanser oluşumunda düzensiz Hh sinyal aktivitesinin rol oynadığı belirlenmiştir (Avcı, 2012).

Hh sinyal yolağı ve kanser arasındaki ilişki, sinyal yolağında bulunan genlerin mutasyonundan kaynaklı olarak ortaya çıkar. Omurgalılarda üç tane bilinen Hh ligandı vardır: Sonik Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) ve Desert Hh (Dhh). Bu ligantlar hedef hücrede bulunan bir transmembran proteini (reseptörü) olan Patched1'e (Ptch) bağlanır. Bu ligantların yokluğunda Ptch proteini, reseptör benzeri başka bir protein olan Smoothened'e (SMO) bağlanarak, SMO aktivasyonunu engeller ve bu molekülü hücre dışına taşır. Ancak; Hh ligantlarının bağlanmasıyla Ptch aktivitesi yok olur ve Ptch'nin SMO üzerindeki inhibisyon fonksiyonu baskılanır. SMO aktifleşerek Hh sinyalini stoplazmaya iletir. 1996 yılında yapılan çalışmalarda Ptch'in tümör baskılayıcı özellikte olduğu (Johnson ve ark., 1996); 1998'de yapılan diğer bir çalışmada ise SMO'nun onkogen olduğu Hh'un kanser ile olan bağlantısını göstermiştir (Carpenter ve ark., 1998). Yani Ptch veya SMO'de meydana gelen mutasyon sonucu sinyal iletiminin kesilmemesi sonucu hücre kontrolsüz büyümeye başlar ve tümöre neden olur. Vismodegib, bu SMO aktivasyonunu engeller ve böylece sinyal iletimini baskılayarak tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder. Bunun yanında normal hücrelerin çoğalmasını engellemez (Kartal ve Bayramgürler, 2016; Pazarbaşı ve ark., 2011; Avcı, 2012; An ve ark., 2013).



Şekil 1.1. Hedgehod (Hh) sinyal yolağı.

Vismodegib'in kimyasal adı 2-Kloro-N-(4-kloro-3-piridin-2-ilfenil)-4-metilsülfonilbenzamid'tir. Molekül formülü $C_{19}H_{14}Cl_2N_2O_3S$, molekül ağırlığı 421,30 g/mol'dür. FDA verilerine göre ten renginde toz olarak bulunmakta ve pH'ya bağlı çözünürlüğü değişmektedir. pH 7'de 0,1 µg/mL çözünürlüğe sahipken; pH 1'de 0,99 mg/mL çözünürlüğe sahiptir. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi kapsamında sınıf iki molekül olarak sınıflandırılmıştır. Günlük önerilen doz 150 mg kapsül halinde bir kez oral olarak alınmasıdır (Erivedge® Prescribing Information, 2020).



Şekil 1.2. Vismodegib molekül şekli.

Literatürde Vismodegib için yapılan çalışmaların çoğu klinik çalışmalarda, rutin kontrol analizlerinde kullanılabilecek biyoanalitik yöntemlerdir.

Vismodegib'in kandaki miktarının belirlenmesi onun; plazmada bulunan proteine bağlanıp bağlanmamasına dayanır. Kandaki yani; plazmada bulunan alfa-1-asit glikoproteinine (AAG) Vismodegib ilaç etken maddesi yüksek oranda bağlandığından ve hastalarda doğrusal olmayan farmakokinetiğe uyduğundan; AAG'ye bağlanma, toplam Vismodegib plazma derişimlerinin önemli bir belirleyicisi olarak görülür ve ölçülür.

Bir çalışmada, faz I ve faz II klinik çalışmalarda insan plazmasındaki Vismodegib derişiminini belirleyebilmek için bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiştir. Numuneler katı-sıvı ekstraksiyonu (SPE) ile hazırlanmış ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile birleştirilen kütle spektrometresi (SK-KS/KS) cihazı ile ölçülmüş, ardından yöntem valide edilmiştir. Bu yöntem ile faz I çalışmaları başarıyla yapılmış. Ayrıca düşük ve yüksek derişimde kalite kontrol numuneleriyle, Vismodegib'in insan plazmasındaki kararlılığı incelenmiştir. Bu amaçla, donma-çözünme, oda sıcaklığı, reenjeksiyon ve uzun dönem kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Vismodegib'in insan plazmasındaki derişiminin beş donma-çözünme döngüsünden sonra kararlı olduğu; ekstraksiyondan önce de altı saat boyunca oda sıcaklığında saklandıktan sonra kararlı kaldığı belirlenmiştir. Daha sonra ekstrakte edilen bu Vismodegib numuneleri, oto-örnekleyicide 117 saat oda sıcaklığında saklanmış ve yapılan ölçümlere göre tekrar kararlı bulunmuştur. Uzun süreli kararlılık çalışmalarında ise numune dondurucuda -60 °C ile -80 °C'de, 315 gün saklanmıştır. Taze hazırlanan numunelerden elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre, bekletilen numuneler değerlendirilmiştir. Buna göre; Vismodegib derişimi, bu saklama koşulları altında 315 gün boyunca insan plazmasında kararlı kalmıştır. Bu biyoanalitik çalışmalar; yeterli bir süre boyunca farmakokinetik çalışmalarda kullanılmak üzere klinik dozlarda insan plazmasındaki Vismodegib derişiminin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Bu amaçla; molekülün farmakokinetik davranışının belirlenmesi için, ilk kez sağlıklı ve gönüllü çocuk doğurma potansiyeli olmayan üç sağlıklı kadında açık etiketli, tek dozlu faz I çalışmalarına başlanmıştır (Ding ve ark., 2010).

İnsan plazmasında bağlanmamış Vismodegib miktarının ölçümü için yapılan başka bir çalışmada; örnekler diyaliz ve ardından protein çöktürme yöntemleri ile kıyaslandığında; daha iyi, temiz ve ucuz bir yöntem olan SPE yöntemi yapılarak hazırlanmıştır. Çalışma; küçük plazma hacimlerinde, diyaliz testinin günlük işlemlerde tekrarlanabilir bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır. Katı faz ekstraksiyonu ile saflaştırılan numuneler için ise SK-KS/KS cihazı kullanarak bir analitik yöntem geliştirilip, valide edilerek; doğrusal olmayan farmakokinetik çalışmalarda başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Valide her iki yöntem, çoklu klinik çalışmalardan elde edilen insan plazma örneklerinin analizinde kullanılmıştır (Deng ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada benzer şekilde, diyaliz ve katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmış. Analitik yöntem SK-KS/KS cihazı kullanılarak geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu analitik yöntem, gönüllü ve sağlıklı farmakokinetik çalışmaları da dâhil olmak üzere, kanser hastaları için doz artışı ve Vismodegib dozlama rejimi optimize çalışmaları gibi çok sayıda klinik çalışmalar da kullanılmıştır. Sonuç olarak; hızlı, basit, kesin ve doğru bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatogramı (YPSK) yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntemin tablet dozaj formlarında ve dökme/yığın (bulk) ilaç rutin analizlerinde kullanılabileceği de öngörülmüştür (Lakshmi ve Reddy, 2012).

Yeni tirozin kinaz inhibitörü olan dokuz ilaç etken maddesinin, Alektinib, Kobimetinib, Lenvatinib, Nintedanib, Osimertinib, Palbociclib, Ribociclib, Vismodegib ve Vorinostat'ın, eş zamanlı ilaç düzey izlemi için, pozitif iyon modunda ters faz SK-KS/KS kullanılarak bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından biyoanalitik yöntemlere ilişkin rehberlere göre valide edilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere rutin yatan hastaların K₂EDTA'lı tam kan örnekleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda; Osimertinib dışında tüm analitlerin K₂EDTA'lı plazmasında ve oda sıcaklığında, dört saatten daha uzun süre kararlı kaldığı bulunmuştur. Bu da yöntemin terapötik ilaç düzey izlemini kolaylaştırmak için uygun olduğunu göstermiştir (Janssen ve ark., 2019).

Diğer bir analitik çalışmada, yığın veya farmasötik dozaj formunda Vismodegib miktarının belirlenmesine yönelik ters faz ultra yüksek performanslı sıvı kromatogramı (UYPSK) yöntemi geliştirilerek, valide edilmiştir. Valide yöntem ile stres çalışmaları yapılmış ve geri kazanım sonuçları %92 ile %97 aralığında bulunmuştur. Bozunma sonrası oluşan piklerin, kromatografik olarak girişim yapmadığı yani; yöntemin seçici olduğu görülmüştür. Sonuçta; yöntemin endüstride kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizlerde kullanılabileceği öngörülmüş (Goud ve ark., 2021).

Kanser hastalarının tedavisi için verilen kemoterapi kürleri, birden fazla ilaç içerebilmektedir. Ancak; bu tür tedaviler sırasında, ölümle bile sonuçlanabilecek ilaç-

ilaç etkileşimleri meydana gelmektedir. Bu nedenle; hasta plazmasında her bir ilaç etken maddesinin derişiminin bilinmesi çok önemlidir. Eş zamanlı her bir ilaç etken maddesinin plazmada belirlenmesine terapötik ilaç izleme denir. İlk kez Vismodegib, Ruksolitinib, Olaparib ve Pazopanib ile tedavi gören hastalarda terapötik ilaç izleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için SK-KS/KS cihazı kullanılarak basit, hızlı bir biyoanalitik yöntem geliştirilip, valide edilmiş ve bu ilaçları alan hastaların takibinde klinik olarak kullanılmıştır (Pressiat ve ark., 2018).

2019 yılında Pulusu ve Kommarajula tarafından, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) ve FDA yönergelerine göre düşük maliyetli analitik yöntem ile kısa analiz süresine sahip miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu sağlam ve doğru ters faz YPSK yöntemlerinin, yığın ve farmasötik dozaj formunda Vismodegib miktarının belirlenmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür. Validasyon parametreleri olarak; sistem uygunluğu, yöntem kesinliği, ara kesinlik, doğrusallık, doğruluk, sağlamlık parametreleri ve stres çalışmaları ile seçicilik parametresi çalışılmıştır. Geliştirilen miktar tayini yöntemi hassas ve kesin olarak bulunmuştur. Stres çalışmaları asidik, bazik, termal, fotolitik, peroksit ve hidroliz koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Bozundurma ile oluşan ve girişim yapabilecek safsızlıklar, valide bu yöntem ile ayrılarak, tespit edilebilmiştir (Pulusu ve Kommarajula, 2019).

2021 yılında Dorababu ve Abdulmueed tarafından yapılan bir analitik çalışmada; yığın dozaj formlarında Vismodegib miktar tayini analizinde kullanılabilecek, hassas ve sağlam bir ters faz YPSK yöntemi geliştirilerek, FDA ve ICH rehberine göre valide edilmiştir. Ayrıca Vismodegib ilaç etken maddesi asidik, alkali, oksidasyon, termal, UV-GB (mor ötesi-görünür bölge) ve nötr bozunma koşullarına maruz bırakılarak stres çalışmaları yapılmış. Her koşulda saflık eşiği, saflık açısından daha yüksek ve kabul edilebilir aralık içinde bulunmuştur (Dorababu ve Abdulmueed, 2021).

- *Selexipag*

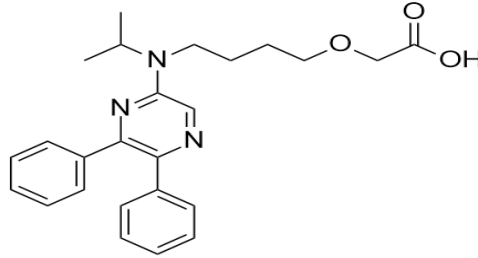
Nadir hastalıklar nüfusun küçük bir bölümünü etkileyen ve daha çok genetik olan, ilerleyici ve bazılarının ölümcül olabileceği hastalıklardır. Bunlardan biri de

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), bilinen hipertansiyon rahatsızlığından farklıdır. Normal pulmoner arter basınç ortalama 14 mmHg civarındır. PH, dinlenme sırasında 25 mmHg veya egzersiz sırasında 30 mmHg'ye eşit veya daha yüksek ortalama basınç olarak tanımlanır. Normal yapılan nabız ölçümü ile teşhis konulamaz. PAH tedavi edilmezse kalp yetmezliğine ve ölüme neden olabilir (PAHSSc, 2018).

CC(C)N(CCCCOCC(=O)NS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1)c2nc(C3=CC=CC=C3)c(C4=CC=CC=C4)n2

Selexipag, karboksilesteraz tarafından hidrolize edilerek, yaklaşık 37 kat daha kuvvetli aktif metaboliti olan ACT-333679'a dönüşür. Selexipag ve metaboliti doğrudan IP reseptörüne bağlanırken, diğer prostasiklin reseptörlerine bağlanmaz.

Yani IP reseptörlerine karşı seçicidir (Uptravi European Medicines Agency, 2016). PAH hastaları üzerinde yapılan bir randomize kontrollü çalışmada Selexipag tedavisi ile 17 hafta sonra pulmoner vasküler dirençte düşüş olduğu gözlenmiştir (Galiè ve ark., 2016).



Şekil 1.4. ACT-333679 molekül şekli.

Selexipag'ın kimyasal adı 2-[4-[(5,6-Difenilpirazin-2-il)-propan-2-il-amino]bütoksi]-N-metilsülfonilasetamit'tir. $C_{26}H_{32}N_4O_4S$ moleküler formülüne ve 496,62 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Suda pratik olarak çözünmeyen, sarı kristal tozdur. Katı halde çok kararludur. Higroskopik değildir ve ışığa karşı duyarlı değildir (UPTRAVİ® Prescribing Information, 2017).

Çeşitli biyolojik matrislerdeki analitlerin tanımlanması ve derişimi için biyoanalitik yöntemler gerçekleştirilir. Literatürde Selexipag ile ilgili analitik çalışmaların çoğu, bu yöntemlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu kanıtlayan, hasta takip ve validasyon çalışmalarında kullanılabilecek biyoanalitik yöntemlerdir. 2019 yılında Bhadrue ve arkadaşları tarafından yapılan bir biyoanalitik çalışmada, SK-KS/KS yönteminde ilk kez Selexipag'ın döteryumlu izotopu (Selexipag-d6) kullanılmıştır. Etken madde, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile insan plazmasından izole edilmiş ve geliştirilen yöntemle valide edilmiştir. Araştırmaya göre; geliştirilen SK-KS/KS yöntemi ile hem numune hazırlama süresi kısa sürmüştür hem de insan plazmasındaki Selexipag miktarı kısa ve hızlı bir şekilde belirlenebilmiştir (Bhadrue ve ark., 2019).

Literatürde ilk kez, UYPSK-KS/KS yöntemine dayalı seçici, hassas ve hızlı bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiş ve fare plazmasında hem Selexipag hem de

metaboliti ACT-333679'un derişimini, aynı anda ölçmek için valide edilmiştir. Valide edilen bu analitik yöntemle yapılan farmakokinetik çalışmaların sonucunda, 6,0 mg/kg Selexipag ile tedavi edilen sıçanların plazmasındaki Selexipag ve metabolit ACT-333679 derişim seviyeleri başarıyla ölçülmüştür (Xie ve ark., 2020).

2020 yılında yapılan başka bir çalışmada; SK-KS/KS kullanılarak; sıçan, tavşan ve insan plazması ile bunların idrarlarındaki yüzde Selexipag miktarlarının karşılaştırmalı ölçümü için yöntem geliştirilmiştir. Araştırmada en iyi numune hazırlığı protein çöktürme ile ve en iyi geri kazanım sıçan plazmasında bulunmuş. Bu doğrultuda bir biyoanalitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Valide yöntem kullanılarak yapılan farmakokinetik çalışmalarda; sıçan vücuduna aç karnına 800 µg Selexipag enjekte edilmiş ve belirli aralıklarla örnekler alınmıştır. Bu örnekler protein çöktürme numune tekniği ile hazırlanmış ve geliştirilen SK-KS/KS yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak; Selexipag'ın düşük derişimlerde tespiti ve vücutta takibi için hızlı, duyarlı ve seçici bir SK-KS/KS yöntemi geliştirilmiştir (Babu ve ark., 2020).

Yine başka biyoanalitik bir çalışmada sıçan plazması kullanılarak SK-KS/KS yöntemi geliştirilmiştir. Valide edilen bu yöntemin farmakokinetik çalışmalarda kullanılabileceğini; vücut sıvılarında Selexipag ve safsızlık derişimlerinin tayini için hızlı, sağlam ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu görülmüştür (Rao ve ark., 2021).

İç standart olarak Selexipag-D7 kullanılan bir çalışmada, biyolojik materyal olarak insan plazması kullanılmıştır. Selexipag miktarı ölçümü için; basit, doğru ve sağlam bir YPSK-KS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu yöntemin farmakokinetik ve terapötik ilaç düzeyi izleme çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmüştür (Satheshkumar ve Muruganatham, 2021).

İlaç etken maddesi olarak ve farmasötik dozaj formunda, sadece aktif madde Selexipag'ın tespit edildiği az sayıda kromatografik çalışma vardır. Bu amaçla 2017 yılında Damireddy ve arkadaşları tarafından, Selexipag analizi için ters fazlı YPSK yöntemi ile bir yöntem geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. ICH yönergeleri Q2(R1)'e göre validasyon ve stres çalışmaları sonucunda yöntemin basit, hızlı, doğru, verimli ve

tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır. Böylece ilaç etken madde ve farmasötik dozaj formunda sadece etken maddenin tespit edilebildiği bir yöntem geliştirilmiştir (Damireddy ve ark., 2017). Başka bir ters fazlı YPSK çalışmasında, bir farmasötik tablet dozaj formundaki Selexipag miktarının rutin analizi için tekrarlanabilir, sağlam ve ekonomik bir yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir (Santosh ve Devi, 2021). Bir çalışmada da farmasötik dozaj formunda Selexipag için basit, ekonomik, hızlı, hassas, sağlam ve kararlı bir ters faz YPSK tahlil yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin seçiciliği stres testi ile ortaya konmuştur. Yöntem, ICH yönergelerine göre valide edilmiş, rutin analizler ve yığın ile farmasötik formülasyon kalite kontrolü için uygun bulunmuştur (Joshil ve Patel, 2020).

Literatürde YPSK ve SK-KS/KS gibi kromatografik yöntemlere ek olarak spektrofotometrik yöntemler de geliştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Selexipag'ın ilaç etken maddesi ve yığın dozaj formunda nicel olarak belirlenmesi için UV-GB spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Valide edilen bu yöntemin basit, doğru, kesin, tekrarlanabilir, kesin, kullanışlı ve uygun maliyetli olduğu gösterilmiştir (Kotwal ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, yığın ve tablet formdaki ilaçlarda Selexipag'ın nicel tayini ve rutin kalite kontrol analizleri için; GB spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde kullanılmak üzere; alkali ortamda p-nitroanilin ile diazolama kenetleme reaksiyonuna sokulan Selexipag'ın, suda çözünen yeşil renkli bir azo boyar maddesi oluşturulmuştur. Ayrıca bu spektrofotometrik yöntem ICH kılavuzlarına göre valide edilmiştir. Bu çalışma; tehlikeli, toksik ve pahalı organik çözücüler kullanmadan; basit, doğru, hızlı, tekrarlanabilir ve ucuz bir yöntem ile Selexipag'ın nicel belirlenebileceğini göstermiştir (Gorumutchu ve Ratnakaram, 2018a). Yığın ilaç ve farmasötik dozaj formunda Selexipag'ın tayini için yapılan başka bir GB spektrofotometrik çalışmasında, MBTH (3-Metil-2-benzotiazolinon hidrazon hidroklorür hidrat) ve $FeCl_3$ ile Selexipag'ın asidik ortamda oksidasyon kenetlenme reaksiyonu sonucunda mavimsi yeşil bir kompleks oluşturulmuştur. Selexipag tayini için oluşturulan bu kompleks, 600 nm'de karakteristik maksimum absorpsiyonu vermiş ve yöntem valide edilmiştir. Sonuç olarak Selexipag için kalite kontrol laboratuvarlarında rutin tayinlerde YPSK ve SK-KS/KS yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilecek basit bir yöntem daha geliştirilmiştir (Gorumutchu ve Ratnakaram,

2018b).

Spektrofotometrik başka bir çalışmada, Selexipag miktarının belirlenmesi için UV spektrofotometrik yöntem geliştirilip, ICH kılavuzlarına göre valide edilmiştir. Bu çalışmada dört farklı tampon çözeltisi kullanılmış, UV spektrumları alınmış ve yazılım yardımıyla ölçümler birinci dereceden türevine dönüştürülmüştür. Bu yöntem, her bir tampon çözeltisi için tablet çalışmalarında Selexipag tayininde uygulanmıştır. Tüm çalışmalardan oldukça iyi geri kazanımlar elde edilmiş. Böylece farklı tampon çözeltiler için farmasötik dozaj formlarında Selexipag tayininde uygulanabilecek basit, doğru ve kesin bir yöntem elde edilmiştir (Prathyusha ve ark., 2020).

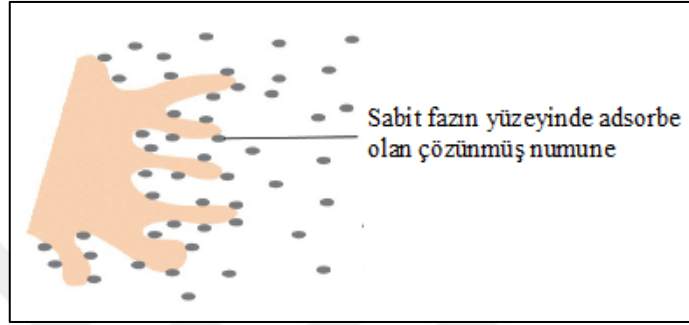
1.3.Kolon Kromatografisi

Kromatografi, renkli bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla ilk kez 1903'te bir Rus botanikçi olan Michael Tsvett tarafından icat edilmiştir. Yunanca renk anlamında '*chroma*' ile yazmak anlamında '*graphein*' kelimelerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur. Günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Bu aletli analiz yöntemi sayesinde bir karışımda bulunan her bir bileşeni nitel olarak ayırıp, tanımlayabilmek mümkün kılınmıştır (Ettre, 2003).

Kromatografi; sabit bir faz üzerinden hareketli bir faz geçirilerek, numune içerisinde bulunan maddelerin dağılma veya adsorpsiyon yoluyla birbirlerinden belirli bir sürede ayrılmasını sağlar. Bu yaklaşıma göre kromatografi tekniğinin temelini sabit faz, hareketli faz ve ayrılan maddenin özelliği oluşturur. Kromatik yöntemler sabit faza göre kolon ve düzlemsel kromatografi olarak; hareketli fazın çeşidine göre sıvı, gaz ve süperkritik akışkanlı kromatografi olarak; ayrılan maddenin sabit ve hareketli faz ile olan etkileşimi sonucundaki ayrılma mekanizmasına göre de adsorpsiyon, dağılma, iyon değiştirme, afinite gibi kromatografi olarak gruplandırılır (Çoşkun, 2016).

1.3.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu kromatografide sabit faz katı; hareketli faz sıvı veya gaz halindedir. Ayrımında fiziksel adsorbsiyon kuvveti etkilidir. Maddenin sabit faza yani kolona tutunması zayıf Van Der Waals kuvvetleriyle, elektrostatik çekimlerle veya dipol–dipol etkileşimler ile gerçekleşir ve tersinir adsorbsiyon meydana gelir (Ahuja ve Alsante, 2004).



Şekil 1.5. Adsorpsiyon kromatografisi.

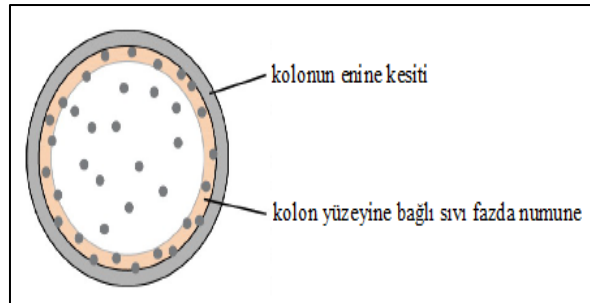
Hareketli faz ve ayrılacak madde, sabit fazın yüzeyine tutunmak için yarış halindedir. İyi bir ayırım isteniyorsa bu yarışta maddenin sabit fazda daha fazla tutunması gerekir. Bu nedenle; benzer benzeri çeker ilkesine göre ayırımı istenen maddenin polaritesi veya apolaritesi, sabit fazla benzer olmalıdır. Bunun yanında, hareketli fazın da aksi özellikte olması gerekir ki; sabit faza ilgi gösteremesin ve kolondan kolaylıkla ayrılabilсин. Nötr organik maddelerin ayırımı için genellikle YPSK için bu katı-sıvı kromatografisi kullanılır. Sabit faz olarak silikajel (SiO_2), talk veya alümina (Al_2O_3) kullanılır (Skoog ve ark., 2017).

1.3.2. Dağılma Kromatografisi

Sıvı-sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır. Madde, sıvı sabit faz ve sıvı hareketli faz arasında dağılma eğilimine göre ayrılır. Sabit faz da dolgu maddesi olarak silikajel ve polimerler kullanılır. Bu dolgu maddeleri su veya çeşitli uygun organik çözücüler ile kaplanır. Hareketli faz olarak çözücü veya çözücü sistemi kullanılır. Burada da benzer benzeri çeker ilkesi geçerlidir. Çünkü ayrılacak maddenin kolonda

yani; sabit fazda daha çok dağılması için benzer polaritede olması gerekir. Sabit fazın ve hareketli fazın polarite türüne göre normal faz ve ters faz kromatografi olarak ikiye ayrılır. Normal fazda sabit faz polar özellikte, hareketli faz apolar özelliktedir. Sabit faz dolgu maddesi olan silikajel veya alüminanın üzeri; fonksiyonel grup olan -CN, -NO₂ veya -NH₂ ile kaplanarak polar özellik katılır. Hareketli faz olarak da hekzan, kloroform gibi çözücü veya çözücü sistemleri kullanılır. Bu kromatografi yüksek polar özellikteki maddelerin ayrımı için kullanılır. Polar bileşikler kolonda daha çok tutunacağı için daha geç çıkar (Ahuja ve Alsante, 2004).

Ters faz da ise tam tersi; sabit faz yani kolon apolar; hareketli faz polar özelliktedir. Bu kromatografi çeşitinde; apolar maddelerin, zayıf polar maddelerin ve iyonik yapıdaki maddelerin ayrımı yapılır. Kolon dolgu maddesi silikajel üzerine kovalent bağlı polar olmayan çoğunlukla alkil grubu veya fenil grubu bağlanır. Bu grupların bağlanmasından sonra sabit fazın kararlılığını daha da arttırmak için, silika üzerindeki serbest silanol grupları da kapatılır. Böylece kolonun polaritesi azaltılmış olur (Skoog ve ark., 2017).

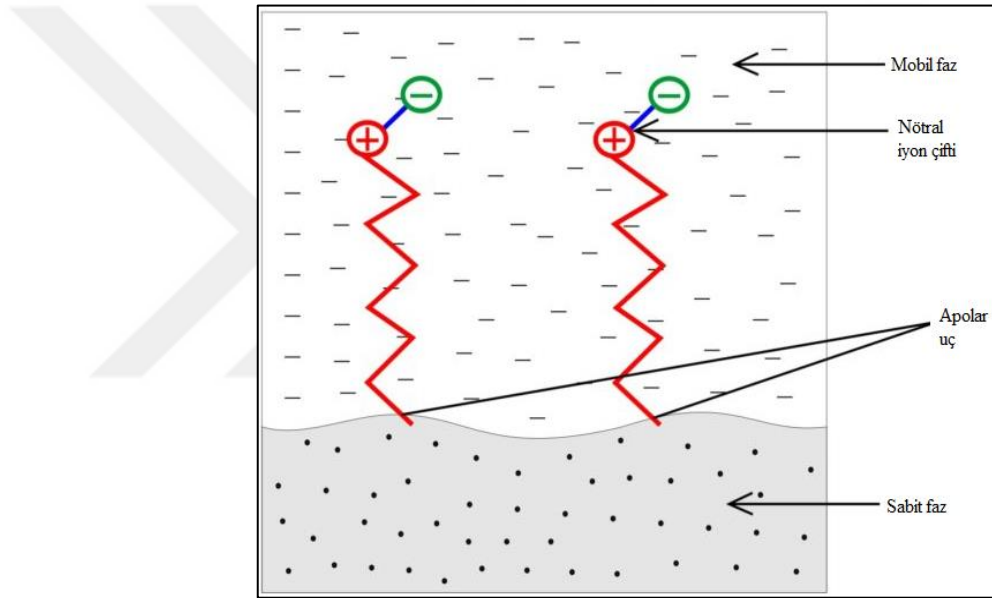


Şekil 1.6. Dağılma kromatografisi.

Alkil grubu olarak karbon sayısı bir ile otuz arasındaki grupla kullanılabilir. Günümüzde en yaygın olarak C8 ve C18 kullanılmaktadır. Bunun yanında fenil türevlerinin dolgu maddesine bağlanmasıyla oluşan fenil kolonları da çoğunlukla kullanılmaktadır. Buradaki ayrım hidrofobik etkileşime yani Van Der Waals kuvvetlerine dayanır. Burada da apolar maddeler kolonda daha çok tutunacağı için daha geç çıkar (Ahuja ve Alsante, 2004).

1.3.3. İyon Çifti Kromatografisi

İyonik özellikteki maddelerin ayrılabilmesi için geliştirilen ters faz kromatografisidir. Çözücü sisteminde su kullanıldığı için bu maddelerin suda çözünmesi gerekir. Hareketli faz olarak; asetonitril (ACN) gibi bir organik çözücü içeren sulu tampon çözücüler ve ayrımı sağlayacak olan, iyonik maddenin zıt yükünde bir iyon çifti reaktifi eklenerek elde edilir. Kuaterner veya tersiyer aminler, trifloroasetik asit (TFA) ile alkil sülfonik asitler iyon çifti reaktifi olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.7. İyon çifti kromatografisi.

Hareketli fazdaki bu reaktifin hidrofobik yeri, aynı özellikteki hidrofobik sabit faza adsorplanır. Maddeler de bu yüksüz hale gelmiş reaktif ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılırlar. Yani; buradaki ayırım iyon çifti reaktifinin polaritesine bağlıdır. Uzun zincirli bir reaktifin polaritesi daha az olacağı için kolonda tutunması artar ve maddelerin de dolayısıyla alıkonma zamanı artar. Ayrıca kolon üzerindeki serbest silanol grupların kapatılması sayesinde pik kuyruklanmasının önüne geçilir ve daha dar, keskin pikler elde edilir (Skoog ve ark., 2017).

1.4.İlaç Etken Maddelerindeki Safsızlıklar

İlaç, hücreler üzerinde etki gösteren, tedavi ve teşhis için kullanılan maddelerdir. Doğal, yarı sentetik veya tamamen sentetik ilaç etken maddesi/maddeleri içerir ve hastalığa göre günlük alım dozu ayarlanarak formülize edilir. DSÖ’ye göre ise “fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları, alanın faydası için değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılan veya kullanılması öngörülen bir madde ya da ürün” olarak tanımlar.

İlaçların sadece sentez ve üretiminde değil; en son kullanıldığı yere kadar ilaç güvenliğinin sağlanması gerekir. Bunun için ilaç güvenliğini tehlikeye sokacak durumlar öngörülüp, önlemler alınmalıdır.

ICH’e göre yeni ilaç maddelerindeki safsızlıklar “Yeni ilaç maddesi olarak tanımlanan kimyasal madde dışında, yeni ilaç maddesinin içinde yer alan herhangi bir bileşen” olarak tanımlanmıştır [ICH Q3A(R2), 2006]. Yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar için ise “Yeni ilaç ürünü içinde yer alan ilaç maddesi ve yardımcı madde dışında kalan herhangi bir bileşen” şeklinde tanımlanmıştır [ICH Q3B(R2), 2006]. Bu safsızlıkların herhangi bir yararı yoktur aksine; çoğu zaman küçük miktarlarda bile risk yaratmaktadırlar (Kram ve McGovern, 2007). Bu nedenle; ilaç etken maddesinin ve onun vücutta atıl veya yararlı özellikte bile olsa; tüm safsızlık profillerinin yapılması, toksikolojik özellikler dâhil tüm özelliklerin incelenmesi ve kontrolü yapılması gerekir [ICH Q3A(R2), 2006]. Bu nedenle; uluslararası ortak bir kılavuz çerçevesinde ilerlemek için “İnsanda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin ICH” kurulmuştur. ICH’in kurulma maksatı; yeni ilaç ruhsatlandırmasında gecikmeyi ve testlerde, araştırmalarda gereksiz gönüllü insan, deney hayvanı ya da test materyali kullanımını ve tekrarları azaltmak amacıyla ABD, Avrupa Birliği ve Japonya’nın düzenleyici makamları ve İlaç Endüstrisi Federasyonlarının katılımı ile kurulmuştur. Bu üç ülkenin ICH kurması rastlantı değildir; çünkü dünyada ruhsatlandırma başvurusu yapılan yeni ilaçların hemen hemen tamamı bu ülkelerde keşfedilmiştir. ICH yapısının diğer bir özelliği, düzenleyici makamların ve ilaç endüstrisinin eşit oranda temsil edilmesidir.

ICH kılavuzları dört ana başlık altında toplanır: Kalite (Q), kalite ile ilgili kılavuzlar farmasötik ve kimyasal kalite güvencesine ait olup başlıca; safsızlıklar, spesifikasyonlar ve kararlılık testleri ile ilgilidir. Emniyet(S), karsinojenisite, genoksisite, akut ve kronik toksisite çalışmalarına ilişkin, yani in vitro ve in vivo klinik öncesi çalışmalara ait kılavuzlar sayılabilir. Etkinlik (E), insanlarda yapılan klinik araştırmalarla ilgili kılavuzlardır. Multidisipliner (M), bu üç başlıktan birine tam olarak oturmayan, ya da birden fazla başlığa girebilen konuları kapsar (Topaloğlu, 2014).

Günümüzde ICH'e göre safsızlıklar ise şöyledir: Q3A(R2), yeni ilaç etken maddelerinde safsızlıklar; Q3B(R2), yeni ilaç ürünlerinde safsızlıklar; Q3C(R4), safsızlıklar: kalıntı çözücüler için rehber; Q3D, safsızlıklar: metal safsızlıklar için rehber; M7, potansiyel karsinojenik riskin sınırlandırılması için ilaçlarda DNA reaktif (mutajenik) safsızlıkların değerlendirilmesi ve kontrolü ICH Q3A(R2), yeni ilaç etken maddelerindeki safsızlıkların içeriği, nitelikleri ve güvenliği ile ilgili rehberlik sağlar. Bu ICH rehberi öncesinde hiç ruhsat almamış, kimyasal olarak sentezlenen ve üretilen yeni ilaç etken maddeleri için geçerlidir. ICH Q3B(R2) rehberi; yeni ilaç ürünlerinde bulunan; bozundurma ürünleri, ilaç etken maddesinden kaynaklı olabilecek safsızlıklar, formülasyonda kullanılan yardımcı madde veya saklama sırasında kullanılan materyallerden gelebilecek safsızlıklar için rehberlik yapar. Bu rehberler; klinik çalışmalarda ilaç geliştirmeye yönelik değil; safsızlıkların raporlanması, tanımlanması ve kalifikasyonu için toksikolojik eşik değerlerini tanımlaması amacıyla oluşturulmuştur. Buna göre; günlük doz alımı iki gramdan az olan yeni ilaç etken maddelerinde, %0,05 üzerindeki tüm safsızlıklar raporlanmalı, %0,05 üzerindikiler tanımlanmalı, %0,15'ten fazlaysa kalifikasyonu (nitelendirme) yapılmalıdır. Eğer günlük alım dozu iki gramdan fazlaysa %0,03 üzerindeki tüm safsızlıklar raporlanmalı, %0,05 üzerindikiler tanımlanmalı, %0,05 üzerindikiler kalifikasyonu yapılmalıdır (Pokar ve ark., 2020) . Aynı şekilde, günlük alım dozlarına göre yeni ilaç ürünlerinde de safsızlık limit değerleri belirtilmektedir.

ICH rehberlerinin yanında EMA, FDA, USP gibi birçok kuruluş ve literatür çalışmalarında da; ilaç etken maddesi veya ilaç ürünlerinde bulunan safsızlıklar için

eşik değerler bildirilmektedir. Ancak çoğu zaman bu kuruluşlar ICH kurallarını benimsemektedir.

İlaç etken maddelerinden gelen safsızlıkların birçok kaynağı olabilir. Sentezin ilk basamağında kullanılan başlangıç maddeleri ve safsızlıkları, sentezde oluşan ara ürünler ile tamamlanmamış tepkimelere bağlı oluşan ürünler, tepkimelerin uzun süre devam etmesi, kullanılan çözücüler ve tüm kimyasal maddeler, enantiyometrik safsızlıklar, saflaştırmada kristalizasyon, damıtma, kurutma koşulları, saklama koşulları, çözücü kalıntıları, polimorfizm, farklı sentez yollarının izlenmesi gibi pek çok kaynak sayılabilir. İlaç ürünlerindeki ise; ilaç etken maddesinin bozunma ürünlerinden, yardımcı maddelerden, saklama sisteminde kullanılan materyaller ile olan etkileşmelerden kaynaklı safsızlıklar gelebilir (Acartürk, 2004).

ICH'e göre genel olarak ilaçta safsızlıklar üç başlık altında sınıflandırmıştır: Organik safsızlıklar, inorganik safsızlıklar ve kalıntı çözücüler.

Organik safsızlıklar ilaç etken madde sentezi, formülasyon ve ilaç depolanması sırasında oluşabilir. Kimyasal yapıları her zaman kolaylıkla belirlenemez. Organik safsızlıkların kaynağı; sentez başlangıç maddeleri, tepkime sonunda kalan maddeler, aşırı tepkime ürünleri, yan ürünler sayılabilir. İnorganik safsızlıkların kaynağı olarak da kullanılan ligandlar, katalizörler, ağır metaller, saflaştırma sırasında kullanılan filtre, absorbans gibi malzemeler sayılabilir. Sentez basamaklarında ve saflaştırma aşamasında çözücüler kullanıldığı için kalıntı çözücüler her zaman safsızlık olarak gözlenir (Ahuja ve Alsante, 2004).

Bunun dışında oluşabilecek diğer bir safsızlık genotoksik safsızlıklardır. Bu safsızlıkların düşük dozları bile DNA'da kalıcı hasara neden olarak; insanlarda mutajenik ve karsinojenik etkilere yol açabilme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle bu safsızlıklar, güvenlik risklerinin oldukça yüksek olması nedeni ile safsızlık konusu içerisinde özel bir yer tutmaktadır. Bu amaçla; ICH, FDA, EMA gibi düzenleyici kuruluşlar bu safsızlıklar ile ilgili rehberler hazırlayarak ilaç endüstrisine yönelik özel düzenlemeler getirmektedirler. Bu düzenlemelerde, ilaç etken madde ve ilaç

ürünlerinde safsızlık profillerinin belirlenmesi ile birlikte, başta genotoksisite olmak üzere toksikolojik değerlendirmelerin yapılması gerektiği belirtilmektedir (Kleinman ve ark., 2015).

1.5. X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD), Polimorfizm

Polimorfizm, ilaç geliştirme ve kalite kontrol analizlerinde kullanılan oldukça önemli ve temel bir tekniktir. İlaç etken maddelerinin çoğu katı haldedir. Amorf, kristal veya her iki katı halde de olabilmektedir. Kristal halde olan ilaç etken maddelerinin de birden fazla kristal formu bulunabilmektedir. Sentez veya üretim sırasında kullanılan herhangi bir kimyasal veya farklı ortamın (ısınma, soğuma gibi) meydana gelmesi, asıl kullanılacak kristal formda değişikliğe neden olabilmektedir. Bu nedenle; ilaç etken maddesinin kristal form takibi oldukça önemlidir. Eğer ilaç etken maddesinde polimorfizm değişikliği varsa; ilaç dozaj formlarının üretiminde, kalitesinde, biyoyararlanımında ve ilaç kararlılığında dolayısıyla raf ömründe doğrudan etki gösterir. Bu nedenle; ilaç etken maddesinin kristal yapısının takibi XRD ile yapılmaktadır.

Cihazın temel çalışma ilkesi X-ışınları kırınımıdır (Bragg yasası). Kısa dalga boyundaki elektromanyetik dalgalardan oluşan X-ışını demeti, örnek üzerine gönderilir. Örneğe çarpan X-ışını demeti, farklı açılarda ve şiddette yansır. Kristal fazların kendine has atomik dizilimi nedeniyle; her maddenin XRD difraktogramı kendine has olmaktadır. Ek olarak da bu yöntem örneklerle zarar vermez ve az miktarda bile analize olanak sağlar (Chauhan ve Chauhan, 2014).

1.6. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), en popüler termal analiz tekniğidir. Nispeten yeni bir teknik olan DSC; ilk kez 1963 yılında Perkin-Elmer tarafından DSC-1 adı altında pazara sürülmüştür. Bu tekniğin ana uygulamaları polimer ve farmasötik alanlardadır, ancak inorganik ve organik kimyada da DSC bigilerinden

önemli ölçüde yararlanmaktadır.

DSC; bir maddenin hem fiziksel hem de termodinamik özellikleri hakkında ayrıntılı bilgi verir. Bu sayede; katı, sıvı veya jel özellikte bir maddelerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklığı (T_m), kristalleşme sıcaklığı (T_c), bozunma sıcaklığı (T_d), entalpi (H) ve ısı kapasitesi (C_p) gibi termodinamik bilgiler nicel olarak belirlenebilir.

Cihaz, iki bölmeli bir konfigürasyondan yani; örnek ve referans bölümünden oluşur. Numune ve referans malzeme üzerine, önceden programlanmış doğrusal ve kontrollü bir ısı verilir. Numune ile referans arasında, numunedeki faz değişikliğinden dolayı bir sıcaklık farkı tespit edilirse, bu fark bir eşik değerinin altına düşene kadar enerji verilir. Sistem, birim zaman başına enerji girişi, sıcaklığın veya zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

Farmasötik alanda hem ilaç etken maddelerinin hem de ilaç ürününün geliştirilmesinde; termal olarak yapılan stres çalışmalarında, nasıl tepki verdiği DSC cihazı ile takip edilebilmektedir. Bu sayede ilaç geliştirme aşamalarında oluşan yeni bir kimyasal maddenin kolay tespiti yapılabilmektedir. Bunun yanında düşük miktarda numune kullanımı, istenilen sıcaklık programları ile dakikalar veya saatler içerisinde analiz yapılabilmesi, analiz sonuçlarının doğru ve kesin olması ve de edinilen bilgilerin spektroskopik yöntemlerle elde edilen bilgiler ile harmanlanabilmesi oldukça önemlidir (Menczel ve Prime, 2009).

1.7. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi ve Kırmızı Ötesi Spektroskopisi (FTIR)

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, moleküldeki atomların güçlü bir manyetik alanda radyofrekans aralığındaki elektromanyetik ışığı soğurması olayına dayanır.

Spin kuantum sayısı sıfırdan farklı tüm atom çekirdeklerinin bir manyetik

momenti vardır. Bu nedenle mıknatıs gibi davranırlar ve manyetik momentleri her yöne yönelir. Bu atom çekirdekleri güçlü bir manyetik alana konursa manyetik alan ile aynı yönde yönelenerek düşük enerji seviyesini; manyetik alanla zıt yönde yönelenerek yüksek enerji seviyesini oluştururlar. Ayrıca bu atomlar hem manyetik alan etrafında hem de yerçekimi etkisiyle kendi etrafında salınım yaparak presesyon hareketi yaparlar. İşte bu presesyon frekansına eşit bir radyofrekans ışıması atom tarafından soğurulursa düşük enerji seviyesinden yüksek enerji seviyesine geçer. Bu soğurmaya nükleer manyetik rezonans denir. Bu soğurmaya karşılık sinyal ise bir pik olarak gözlenir.

^1H ve ^{13}C NMR'ye göre standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılır. Bu bileşik keskin bir pik verir ve kimyasal kayması sıfır ppm kabul edilerek diğer bileşiklerin kimyasal kayması buna göre hesaplanır.

Her zaman doğru olmasa da genel olarak bir proton komşu karbondaki proton sayısının (n) bir fazlası şeklinde spin yarılmaya uğrar. Eğer çevresinde farklı karbonlara bağlı protonlar varsa; $(n_x+1)(n_y+1)$ sayıda spin yarılması gösterir. Ama bu yarılmaların çoğu, protonların eşdeğer olmasından dolayı, üst üste çakışır ve olması gerektiğinden daha az sayıda çoklu pik verebilir.

FTIR, kırmızı ötesi ışıma moleküllerin titreşme ve dönme düzeylerini etkiler. Bu titreşimler, moleküllerdeki bağların dipol momentlerini değiştirdiklerinde kırmızı ötesi bandı olarak gözlenir. Bu molekül titreşimleri gerilme ve eğilme titreşimleri olarak iki türdedir. FTIR analizinde maddelerin yapısında bir değişiklik olmaz. Bu analiz sayesinde organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonlu grupların varlığı veya yokluğu belirlenir.

FTIR spektrumları kırmızı ötesi ışığın yoğunluğuna karşı birimi cm^{-1} olan dalga sayısına karşı grafik olarak elde edilir. Bu grafikler, $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yani; kırmızı ötesi ışık bölgesindedir. Burada $4000-1500 \text{ cm}^{-1}$ arası fonksiyonlu grup bölgesi; $1500-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığı ise parmak izi bölgesidir. Parmak izi bölgesi molekülün tümünün titreşmesi ile ilgilidir (Erdik, 2007).

Bu tez kapsamında; Deva Holding A.Ş. Çerkezköy-2 tesislerinde üretilen ve eşdeğer ilaç üretiminde kullanılabilecek Vismodegib ile Selexipag ilaç etken maddeleri çalışılmıştır. Literatürde bu ilaç etken maddeleri için geliştirilen analitik yöntemler, biyolojik matrislerde sadece ilaç etken maddesinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesine yönelik biyoanalitik yöntemlerdir. Bu analitik yöntemler, daha çok rutin hasta takibi için geliştirilmiş ve ICH yönergelerine göre valide edilmiştir. Klinik çalışmalar için kullanılan bu biyoanalitik çalışmaların bazılarının endüstride kullanılabileceği öngörülmüş ama uygulanmamıştır. Ayrıca; ilaç etken maddelerinin safsızlık profillerinin belirlendiği herhangi bir ilgili maddeler yöntemi de literatürde detaylı olarak geliştirilmemiştir. Dolayısıyla; endüstriye yönelik, üretim sırasında ve sonrasında yapılan rutin kalite kontrol analizlerinde kullanılacak uygun yöntemler bulunmamaktadır. Bu nedenle; tez kapsamında bu amaca yönelik her iki ilaç etken maddesi için hem ilgili maddeler hem de miktar tayini yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak her iki ilaç etken madde için safsızlık profil çalışması yapılarak, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FTIR, XRD gibi spektroskopik yöntemler ile hem ilaç etken maddeleri hem de safsızlıkları karakterize edilecektir. Ardından UYPSK ve YPSK cihazları ile ilgili maddeler ve miktar tayini analitik yöntemleri geliştirilip, ICH yönergelerine göre validasyon çalışmaları yapılacaktır. Stres testi çalışmaları ile de hem yöntem kararlılığı test edilecek hem de ilaç etken maddeleri için olası bozunma yolları belirlenecektir. Bu sayede üretim sonrası stabilite çalışmaları ve raf ömrü için bilgi edinilmiş olacaktır. Tüm bu çalışmalar hem Selexipag hem de Vismodegib ilaç etken maddeleri için ayrı ayrı yapılacağından, toplamda dört analitik yöntem geliştirilip, valide edilecektir.

Bu çalışmalar sonucunda üretimi yapılacak bu ilaç etken maddelerinin rutin kalite kontrol analizlerinde kullanılabilecek; uluslararası standartlara uygun seçici, tekrarlanabilen, doğru, kesin, kararlı ve sağlam ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri geliştirilmiş olacaktır. Bunun yanında, eşdeğer ilaç üretiminde kullanılabilecek analitik yöntemler için önemli bir çalışma olacaktır. Üretime yönelik yapılan bu analitik çalışmalardan dolayı, bu tez çalışması özgün olacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar, reaktifler ve çözücüler analitik saflıkta ve farklı kimya şirketlerinden sağlanmıştır. Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Madde	Firma
Etil asetat	Scharlau
İzopropil alkol	Merck
n-Butil asetat	Merck
Asetik asit	Merck
Hidroklorik asit (%37)	J.T Baker
Sülfürik asit	J.T Baker
o-Fosforik asit (%85)	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Asetonitril	J.T Baker
N,N-Dimetilformamit	Scharlau
Metanol	J.T Baker
Susuz metanol	J.T Baker
Trifloroasetik asit	Riedel-de Haen
Aquagent complet 5	Scharlau
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck
%30’ luk peroksit	J.T Baker
n-Hekzan	Merck
Tetrahidrofuran	SRL
Trifloroasetik asit	Merck
Toluen	BDH
Benzen	Merck
Diklormetan	Merck
Etanol	Merck
Trietilamin	Sigma Aldrich
Dimetil sülfoksit	SRL

2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Araçlar

Tez kapsamında kullanılan cihaz ve araçlar çizelge 2.2 ve çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tez kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Marka
Hassas terazi	Sartorius ME 235S
pH-metre	Mettler Toledo
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
Etüv	Thermo Electron Corporation Heraeus Vacuotherm
YPSK	Shimadzu LC-2030C Plus
UYPSK	Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS PDA Dedektör
GC	Agilent G1888 ve Shimadzu AOC-5000
¹ H NMR	NMR Spectrometer JEOL-400 MHz
¹³ C NMR	NMR Spectrometer JEOL-400 MHz
FTIR	Shimadzu FTIR Spectrometer IR Spirit
XRD	Labx XRD 6100 Shimadzu
DSC	Waters, TA enstrümanlar DSC 2500
TGA	Waters, TA enstrümanlar TGA 550
PSD	Malvern Mastersizer 3000
Kütle spektrometresi	Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS QDa Dedektör
SK-KS	Shimadzu Nexis GC 2030
Saf su cihazı	Miili Q-Millipore
Ultrasonik su banyosu	Elma-transsonic digital
Karl Fischer	Mettler Toledo V30
Kül Fırını	
UV ve VIS Kabini	

Çizelge 2.3. Tez kapsamında 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 ve saklama cam şişeleri
Vial
Mezur (farklı ölçülerde)
Vezin kabı (platin ve seramik)
Platin kroze
Desikatör
YPSK, UYPSK ve SK kolonları
Pipet puarları
Pastör pipeti
Diğer sarf malzemeler

2.1.3. Tez Çalışmasında Araştırılan Kolonlar

Yöntem geliştirilmesinde çalışılan tüm kolonlar Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Çalışılan kolon listesi.

Kolon Türü	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Firma
Acquity BEH C8	100	2,1	1,7	Waters
Acquity BEH C8	150	4,6	3,5	Waters
Acquity BEH C18	150	2,1	1,7	Waters
XBridge C8	150	3,0	3,5	Waters
XBridge C18	150	4,6	3,5	Waters
Symmetry C18	150	4,6	5,0	Waters
Symmetry C18	250	4,6	5,0	Waters
BDS Hypersil C18	250	4,6	3,0	Thermo Scientifi
BDS Hypersil C18	250	4,6	5,0	Thermo Scientifi
Zorbax SB-Phenyl	250	4,6	5,0	Agilent
Zorbax NH2	250	4,6	5,0	Agilent

2.1.4. Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri

Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri Deva Holding A.Ş API Ar-Ge sentez laboratuvarında veya ticari olarak Deva Holding A.Ş'de sentezlenen serilerden elde edilmiştir.

Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmalarında kullanılacak Selexipag, Vismodegib standartları ile bu ilaç etken maddelerin safsızlık standartlarının bir kısmı Deva Holding A.Ş API Ar-Ge sentez laboratuvarında sentezlenmiştir. Bir kısmı da tedarikçi firmalardan temin edilmiştir.

Her iki durumda da tüm maddeler, Deva Holding A.Ş API Ar-Ge analitik laboratuvarında standardize edilmiştir.

2.1.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.1.5.1. Selexipag İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.2. 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 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik orta fosforik asit ($\text{o-H}_3\text{PO}_4$) çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) tuzu ve 1,0 g tetra-n-bütil amonyum hidrojen sülfat ($\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$) tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür.

Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,38 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tuzu ve 1,0 g $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$ tuzu 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-4*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuzu ve 1,0 g $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$ tuzu 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-5*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu ve 1,0 g $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$ tuzu 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $4,0 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-6*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzun tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $6,0 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-7*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzun tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır. Bu tampon çözeltiden 900 mL alınarak başka bir hareketli faz şişesine aktarılmış ve üzerine 100 mL asetonitril eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-8*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1000 mL'lik saf su içerisine 1,0 mL TFA eklenmiştir.

- *Hareketli Faz B Çözeltisi*

Tüm yöntem geliştirme çalışmalarında hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır.

2.1.5.2.1. Numune Çözeltisi Hazırlığı

- *0,25 mg/mL Derişimde Numune Hazırlığı*

25,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır.

- *0,50 mg/mL Derişimde Numune Hazırlığı*

50,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.2. Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlığı

- *0,25 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Eklenilmiş Numune Hazırlığı*

25,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra üzerine safsızlık stok karışım çözeltisinden 1,0 mL eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

- *0,50 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Eklenilmiş Numune Hazırlığı*

50,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL’lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra üzerine safsızlık stok karışım çözeltisinden 2,0 mL eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.2.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Çözücü olarak asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h) kullanılmıştır.

- *0,25 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Standart Hazırlığı*

20 mL’lik balon jojeye, 10,0 mg Selexipag standardı tartılmıştır. 8,0 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Ardından saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 20 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden de 1,0 mL alınarak 100 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi yine çözücü ile tamamlanmıştır.

- *0,50 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Standart Hazırlığı*

20 mL’lik balon jojeye, 20,0 mg Selexipag standardı tartılmıştır. 8,0 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Ardından saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 20 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden de 1,0 mL alınarak 100 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi yine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.4. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Sistem uygunluk çözeltisi için 100 mL’lik balon jøjeye 25,0 mg Selexipag numunesi tartılmıştır. Üzerine 1,0 mL 1 N HCl ilave edilerek 70 °C’de 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakika sonra ısıtıcıdan alınarak 1,0 mL 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir. Ultrasonik su banyosunda bir miktar asetonitril ile çözünmüş ve yine asetonitril ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1,25 mL alınarak 50 mL’lik balon jøjeye aktarılmış ve çözücü [asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h)] ile hacmine tamamlanmıştır..

2.1.5.2.5. Selex-1, Selex-Asit ve Selex-Asetil Safsızlıklarının Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Validasyon çalışmaları ICH rehberlerine göre yapılmıştır. İlgili maddeler yöntem geliştirilmesinde ilaç etken maddeleri ve safsızlıklarının limitleri ICH Q3A(R2) rehberine göre belirlenmiştir. Literatür bölümünde bahsedildiği gibi, ICH Q3A(R2) rehberine göre günlük alım dozu iki gram ve altı olan ilaçlar için bilinen safsızlıkların limiti %0,15 ve bilinmeyen safsızlıkların limiti %0,10’dur. Selexipag için de belirlenen günlük doz; günde iki kez olmak üzere 200–1600 µg aralığındadır.

İlgili maddeler validasyon çalışmasında kullanılmak üzere tanımlı tüm safsızlık standartları kullanılacak etken madde derişime göre hazırlanmıştır. Her safsızlık için aynı şekilde numune hazırlığı yapılmıştır.

Kullanılan referans standartların saflıkları şu şekildedir: Selex-1 %98,6; Selex-asit %97,4; Selexipag %99,7’dir.

- *0,25 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Safsızlık Standartlarının Stok Hazırlığı*

Her bir safsızlık standardından 15,0 mg 20 mL’lik balon jojelere tartılmıştır. Üzerlerine 8,0 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda her biri homojen bir şekilde çözünmüş ve hacimleri saf su ile tamamlanmıştır.

Bu çözeltilerden de 1,0 mL alınarak 20 mL’lik balon jojelere aktarılmış ve hacimleri çözücü ile tamamlanmıştır.

- *0,50 mg/mL İlaç Etken Derişimine Göre Safsızlık Standartlarının Ana Stok Hazırlığı*

Her bir safsızlık standardından 30,0 mg 20 mL’lik balon jojelere tartılmıştır. Üzerlerine 8,0 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda her biri homojen bir şekilde çözünmüş ve hacimleri saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden de 1,0 mL alınarak 20 mL’lik balon jojelere aktarılmış ve hacimleri çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.2.6. Selex-1, Selex-asit, Selex-asetil Safsızlıklarının Spesifikasyon Limit Derişiminde Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Safsızlık stok standartlarından 1,0 mL alınarak 100 mL’lik balon jojelere çözücü ile seyreltilmiş ve hacimlerine tamamlanmıştır.

2.1.5.2.7. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltilisinin Hazırlanması

Bölüm 2.1.5.2.5.’de hazırlanan her bir stok safsızlık standardın ilk stoğundan

(15,0 mg/20 mL) 1,0 mL alınarak tek bir 20 mL' lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir. Her iki derişim için bu şekilde hazırlanmıştır.

2.1.5.2.8. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltilisinin Hazırlanması

Spesifikasyon limit derişiminde safsızlık stok karışım çözeltilisinden 1,0 mL alınarak 100 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.3. Selexipag Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

Numune, eklenilmiş numune, standart, sistem uygunluk ve safsızlıklar hazırlanırken çözücü olarak asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h) kullanılmıştır.

2.1.5.3.1. Hareketli Faz Çözeltileri

- *Hareketli Faz A Çözeltilisi-1*

Bir litrelik hareketli faz çözeltilisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu ve 1,0 g $C_{16}H_{37}NO_4S$ tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik NaOH çözeltilisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltilisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltilisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu ve 1 g $C_{16}H_{37}NO_4S$ tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tuzların tamamen çözünmesinden sonra hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik NaOH çözeltilisi ile ayarlanmıştır. Bu tampon

çözeltiden 900 mL alınarak başka bir hareketli faz şişesine aktarılmış ve üzerine 100 mL asetonitril eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1000 mL'lik saf su içerisine 1,0 mL TFA eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-4*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik orta fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisi ile ayarlanmıştır. Bu tampon çözeltiden 900 mL alınarak başka bir hareketli faz şişesine aktarılmış ve üzerine 100 mL asetonitril eklenmiştir.

2.1.5.3.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

25,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.3. Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması

25,0 mg Selexipag numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Üzerine bölüm 2.1.5.2.5.'deki, her bir safsızlığın ilk stoğundan (15 mg/20 mL) 3,3 mL eklenmiştir. Ardından saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

Bu çözeltiden de 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.3.4. Standart Çözeltisinin Hazırlanması

25,0 mg Selexipag standardı 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 40,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Maddenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır.

Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi çözücü ile tamamlanmıştır.

2.1.5.3.5. Stok Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Stok sistem uygunluk çözeltisi için 25,0 mg Selexipag numunesi 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine 1,0 mL 5 N HCl ilave edilerek, 70 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. 30 dakika sonunda ısıtıcıdan alınarak 1,0 mL 5 N NaOH ile nötralize edilmiştir. Üzerine 40,0 mL asetonitril eklenerek ultrasonik su banyosunda çözünmüş ve saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak da 10 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.3.6. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

100 mL'lik balon jojeye 25,0 mg Selexipag standardı tekrardan tartılmıştır. Üzerine 40,0 mL asetonitril eklenerek ultrasonik su banyosunda çözünmüş ve saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

Bu çözeltiden de 1,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve üzerine 2.1.5.3.5'teki sistem uygunluk stok çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. Çözücü ile de

hacmine tamamlanmıştır.

2.1.5.3.7. Selexipag İçerisinde Selex-2 Belirlenmesi

Genotoksik özellikteki kimyasallar DNA ve genomlarda hasara ve mutasyona sebep olur. Bu nedenle; ilaç etken maddeleri içerisinde sentez prosesinden gelen veya bozunma sonucunda oluşabilecek genotoksik safsızlıklarının limiti, diğer safsızlık limitlerinden daha düşük tutulur.

Selexipag başlangıç maddelerinden Selex-2 de genotoksik bir safsızlıktır. Bu nedenle Selexipag içerisinde olup olmadığının kesin olarak ispat edilmesi gerekir. Bu amaçla; Selex-2 için ayrı bir yöntem oluşturulmuştur.

Belirtilen en düşük derişimin altında olup olmadığına bakılmak üzere limit test yapılmıştır.

Sonuç olarak; Selexipag içerisinde genotoksik Selex-2'nin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Bu çalışma tez kapsamında bulunmadığından, yöntem parametreleri verilmemiştir.

2.1.5.4. Vismodegib İlgili Maddeler Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.4.1. Hareketli Faz Çözeltileri

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

1,0 mL o-H₃PO₄ (%85) 1000 mL saf suya eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $6,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $7,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik NaOH çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-4*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g KH_2PO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $4,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır. Aynı şekilde pH'ı 4,0 ve 3,0 olan KH_2PO_4 tampon çözeltileri de hazırlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-5*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1000 mL'lik saf su içerisine 1,0 mL TFA eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-6*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g KH_2PO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür.

Tamamen çözünme sonrasında üzerine 2,0 mL trietilamin (TEA) eklenmiştir. Ardından hareketli fazın pH'ı $2,2 \pm 0,05$ 'e seyreltik o-H₃PO₄ çözeltisi ile ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-7*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 2 gram amonyum format (NH₄HCO₂) tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür.

Tamamen çözünme sonrasında üzerine 2,0 mL TEA eklenmiştir. Ardından hareketli fazın pH'ı $4,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik o-H₃PO₄ çözeltisi ile ayarlanmıştır.

2.1.5.4.2. Numune Çözeltisinin Hazırlanması

50,0 mg Vismodegib numunesi, 50 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 25,0 mL metanol ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.4.3. Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması

50,0 mg Vismodegib numunesi, 50 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 25,0 mL metanol ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, üzerine 2.1.5.4.6.'daki safsızlık stok karışım çözeltisinden (20 mg/mL) 1,0 mL eklenmiş ve hacmi saf su ile tamamlanmıştır.

2.1.5.4.4. Standart Çözeltisinin Hazırlanması

20,0 mg Vismodegib standardı 20 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 10,0 mL metanol ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Maddenin tamamen

özünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır. Bu özeltiden 1,0 mL alınarak 20 mL’lik balon jojeye aktarılmış ve hacmi çözücü [metanol ve su karışımı (50:50, h/h)] ile tamamlanmıştır. Bu özeltiden de 1,0 mL alınarak 50 mL’lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.4.5. Sistem Uygunluğu özeltisinin Hazırlanması

Sistem uygunluğu çözeltisi olarak Vismodegib standart çözeltisi kullanılmıştır.

2.1.5.4.6. Vismo-1 ve Vismo-2 Safsızlıklarının Stok Standart özeltilerinin Hazırlanması

Her bir safsızlık standardından 20,0 mg, 20 mL’lik balon jojelere tartılmıştır. Üzerine 10,0 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda her biri homojen bir şekilde çözünmüş ve hacimleri saf su ile tamamlanmıştır. Bu özeltilerden de 1,5 mL alınarak 20 mL’lik balon jojelere aktarılmış ve hacimleri çözücü ile tamamlanmıştır.

Kullanılan referans standartların saflıkları şu şekildedir: Vismo-1 %99,8; Vismo-2 %97,9’dur.

2.1.5.4.7. Spesifikasyon Limit Derişiminde Vismo-1 ve Vismo-2 Safsızlıklarının Standart özeltilerinin Hazırlanması

2.1.5.4.6.’daki safsızlık stok standartlarından 1,0 mL alınarak 50 mL’lik balon jojelere çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.4.8. HBTU Safsızlık Standart özeltisinin Hazırlanması

20,0 mg N,N,N’,N’-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hekzafloro

fosfat (HBTU) standardı 20 mL’lik balon jojeye tartılmıştır. Üzerine 10,0 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda her biri homojen bir şekilde çözünmüş ve hacimi saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden de 1,5 mL alınarak 20 mL’lik balon jojelere aktarılmış ve hacmi çözücü ile tamamlanmıştır. Ardından bu çözeltiden de 10,0 mL alınarak 50 mL’lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.4.9. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Stok Karışım Çözeltilisinin Hazırlanması

Bölüm 2.1.5.4.6’daki 20 mL’lik balon jojelere 20,0 mg tartılan her bir safsızlık standardından 1,5 mL alınarak tek bir 20 mL’lik balon jojeye çözücü ile seyreltili.

2.1.5.4.10. Spesifikasyon Limit Derişiminde Safsızlık Karışım Çözeltilisinin Hazırlanması

2.1.5.4.6.’daki safsızlık stok standartlarından 1,0 mL alınarak 50 mL’lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.5. Vismodegib Miktar Tayini Yöntem Optimizasyonu İçin Hazırlanan Çözeltiler

2.1.5.5.1. Hareketli Faz Çözeltileri

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-1*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,36 g KH_2PO_4 , 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH’ı $3,0 \pm 0,05$ ’e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanmıştır. Aynı şekilde pH’ı 4,0; 4,5; 6,5 ve 7,5 olan

KH_2PO_4 tampon çözeltileri de hazırlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-2*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1000 mL'lik saf su içerisine 1,0 mL TFA eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-3*

1,0 mL o- H_3PO_4 (%85) 1000 mL saf suya eklenmiştir.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-4*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında hareketli fazın pH'ı $4,5 \pm 0,05$ 'e seyreltik o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlandı.

Aynı şekilde seyreltik NaOH çözeltisi ile pH'ı 6,5 olan K_2HPO_4 tampon çözeltisi de hazırlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-5*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 1,74 g K_2HPO_4 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında üzerine 2,0 mL TEA eklenerek, pH'ı $2,2 \pm 0,05$ 'e ayarlanmıştır.

- *Hareketli Faz A Çözeltisi-6*

Bir litrelik hareketli faz çözeltisi için; 2 gram NH_4HCO_2 tuzu, 1000 mL saf suda çözünmüştür. Tamamen çözünme sonrasında üzerine 1,0 mL TEA eklenmiştir.

2.1.5.5.2. Numune Çözeltisi Hazırlığı

25,0 mg Vismodegib numunesi 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 50,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 20 mL'lik balon jojeye çözücü [asetonitril:su (50:50, h/h)] ile seyreltilmiştir.

2.1.5.5.3. Eklenilmiş Numune Çözeltisinin Hazırlanması

25,0 mg Vismodegib numunesi, 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 50,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Numunenin tamamen çözünmesinden sonra, üzerine 2.1.5.4.6.'daki safsızlık stok karışım çözeltisinden (20 mg/20 mL) 1,0 mL eklenmiş ve hacmi saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden de 2,0 mL alınarak 20 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.5.4. Standart Çözeltisinin Hazırlanması

25,0 mg Vismodegib standardı 100 mL'lik balon jojeye tartılmıştır. 50,0 mL asetonitril ilave edilmiş ve ultrasonik su banyosunda çözünmüştür. Maddenin tamamen çözünmesinden sonra, hacmi saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 20 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

2.1.5.5.5. Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanması

Sistem uygunluk çözeltisi olarak Vismodegib standart çözeltisi kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. YPSK ile Yapılan Miktar Tayini Yöntemleri

YPSK ile hem Selexipag hem de Vismodegib için miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir.

2.2.1.1. Selexipag Miktar Tayini Yöntemi

Selexipagın kromatografik miktar tayini yöntemi, Shimadzu Prominence-i LC-2030 C Plus-SPD-40 cihazında yapılmış ve LabSolution sürüm 6.108 ile kaydedilmiştir. Sabit faz olarak, Waters Symmetry C8 kolonu (4,6 mm x 150 mm; 3,5 µm) kullanılmıştır. Oto-örnekleyici ve kolon sıcaklığı sırasıyla 25 °C ve 40 °C; dalga boyu 300 nm, 20,0 µL enjeksiyon hacmi, akış hızı 1,2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Hareketli faz A için 10 mM K₂HPO₄ (pH 7,5):asetonitril (90:10, h/h) çözelti karışımı, hareketli faz B için ise asetonitril kullanılmıştır. Toplam alıkonma zamanı 12 dakika olan bir gradient sistemi düzenlenmiştir. Gradient programı şu şekildedir: 0–4 dk., %40–40 B; 4–5 dk., %40–70 B; 5–8 dk., %70–70 B; 8–8,5 dk., %70–40 B ve 8–12 dk., %40–40 B.

2.2.1.2. Vismodegib Miktar Tayini Yöntemi

Vismodegib'in kromatografik miktar tayini yöntemi, Shimadzu Prominence-i LC-2030 C Plus-SPD-40 cihazında yapılmış ve LabSolution sürüm 6.108 ile kaydedilmiştir. Sabit faz olarak, Waters Symmetry C18 kolonu (4,6 mm x 150 mm;

5,0 µm) kullanılmıştır. Oto-örnekleyici ve kolon sıcaklığı sırasıyla 15 °C ve 30 °C; dalga boyu 254 nm, enjeksiyon hacmi 20,0 µL, akış hızı 1,0 mL/dk olarak belirlenmiştir. Hareketli faz A için %0,1'lik o-H₃PO₄ çözeltisi, hareketli faz B için ise asetonyitril kullanılmıştır. Toplam alıkonma zamanı sekiz dakika olan bir izokratik sistem düzenlenmiştir. İzokratik program; %60 hareketli faz A ve %40 hareketli faz B olarak belirlenmiştir.

2.2.2. UYPSK ile Yapılan Yöntemler

UYPSK ile hem Selexipag hem de Vismodegib için ilgili maddeler yöntemi geliştirilmiştir.

2.2.2.1. Selexipag İlgili Maddeler Yöntemi

Selexipag ilgili maddeler kromatografik yöntemi, Waters TUV detektörü ve Empower-pro veri işleme sistemi (UYPSK Waters Corporation, Milford, MA, ABD) ile birleştirilmiş Waters Acquity sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak Acquity BEH C18 kolonu (2,1 mm x 150 mm; 1,7 µm) kullanılmıştır. Oto-örnekleyici ve kolon sıcaklığı sırasıyla 15 °C ve 30 °C; dalga boyu 300 nm, enjeksiyon hacmi 2,0 µL, akış hızı 0,33 mL/dk olarak belirlenmiştir. Hareketli faz A için %0,1 TFA asit, hareketli faz B için ise asetonyitril kullanılmıştır. Toplam alıkonma zamanı 17 dakika olan bir gradient sistemi düzenlenmiştir. Gradient programı şu şekildedir: 0–5 dk., %40-65 B; 5–12 dk., %65–65 B; 12–13 dk., %65–40 B; ve 13–17 dk., %40-40 B.

2.2.2.2. Vismodegib İlgili Maddeler Yöntemi

Vismodegib ilgili maddeler kromatografik yöntemi, Waters TUV detektörü ve Empower-pro veri işleme sistemi (UYPSK Waters Corporation, Milford, MA, ABD) ile birleştirilmiş Waters Acquity sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sabit faz olarak Waters Acquity BEH Phenyl (2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm) kullanılmıştır. Oto-

örnekleyici ve kolon sıcaklığı sırasıyla 15 °C ve 30 °C; dalga boyu 230 nm, enjeksiyon hacmi 3,0 µL, akış hızı 0,3 mL/dk olarak belirlenmiştir. Hareketli faz A için %0,1 TFA asit, hareketli faz B için ise asetonitril kullanılmıştır. Toplam alıkonma zamanı 18 dakika olan bir gradient sistemi düzenlenmiştir. Gradient programı şu şekildedir: 0–12 dk., %15-70 B; 12–14 dk., %70–70 B; 14–14,5 dk., %70–15 B; ve 14,5–18 dk., %15-15 B.

2.2.3. FTIR Spektroskopisi

Numuneler, Shimadzu FTIR Spektrometre IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) üzerinde ATR (Attenuated Total Reflectance) ile 600 – 4000 cm⁻¹ aralığında, 20 tarama ve 45 tarama ile iki cm⁻¹ çözünürlükle ölçülmüştür.

2.2.4. NMR Spektroskopisi

300 MHz ve 400 MHz NMR spektrometreleri (Varian NMR Cihazları, Oxford, UK ve JEOL Ltd., Tokyo, Japonya) ile çözücü olarak döteryumlu su (D₂O), döteryumlu dimetilsülfoksit (DMSO-d₆) ve döteryumlu kloroform (CDCl₃) ile iç standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılarak ¹H ve ¹³C NMR analizleri yapılmıştır.

2.2.5. Kütle Spektrometrisi

Tez kapsamında çalışılan ilaç etken maddelerinin ve safsızlıklarının tanımlanması için ACQUITY PDA (fotodiyot dizisi) ve QDa (kuadropol Dalton) dedektörü ile birleştirilmiş Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS Core System kütle spektrometresi kullanılmış ve tüm veriler Empower 3 yazılımına kaydedilmiştir.

2.2.5.1. Selexipag Kütle Spektrometrisi Yöntemi

Selexipag için, 50-1000 Da aralığında 0,5 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 asetronitril belirlenmiştir. Oto-örnekleyici ve kolonun sıcaklığı sırasıyla 25 °C ve 30 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon olarak Waters XBridge C8 (3,0 mm x 150 mm; 3,5 µm) kullanılmıştır. Gradient programı ise şöyledir: 0–2 dk, %80-80 B; 2–8 dk., %80–40 B; 8–15,0 dk., %40–40 B; 15–16 dk., %40-80 B ve 16–20 dk., %80-80 B. Toplam çalışma süresi 20 dakikadır.

2.2.5.2. Vismodegib Kütle Spektrometrisi Yöntemi

Vismodegib için, 50-1000 Da aralığında 0,5 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 asetronitril belirlenmiştir. Oto-örnekleyici ve kolonun sıcaklığı sırasıyla 25 °C ve 30 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon olarak Waters XBridge C8 (3,0 mm x 150 mm; 3,5 µm) kullanılmıştır. Gradient programı ise şöyledir: 0–2 dk., %80-80 B; 2–8 dk., %80–40 B; 8–15 dk., %40–40 B; 15–16 dk., %40-80 B ve 16–20 dk., %80-80 B. Toplam çalışma süresi 20 dakikadır.

2.2.6. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC)

Tez kapsamında tüm örneklerin DSC ölçümü TA marka DSC 250 model cihaz ile yapılmıştır. Numuneler hermetik kaplara 3-5 mg arası tartılarak preslenmiştir. Oda sıcaklığından 350 °C'ye kadar 10 °C/dakika hızla çıkılacak şekilde bir programla, azot ortamında çalışılmıştır.

2.2.7. Polimorfizm- XRD Difraktogramı

Tez kapsamında Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddelerinin kristal yapılarının analizi için, yüksek hassasiyetli θ - 2θ (theta/2theta) gonyometreli XRD-6100 Shimadzu X-Işını Difraktometresi kullanılmıştır. Tüm veriler Windows işletim sistemine kaydedilmiştir.

Örnekler oda sıcaklığında hazırlanmıştır. XRD difraktogramları, X- ışını tüpü (bakır radyasyonu) Cu ($1,54060 \text{ \AA}$), 40,0 kV ve 30,0 mA ile alınmıştır. Tarama işlemi $3,00\text{--}40,00^\circ$ aralığında, $0,02^\circ$ 'lik adımlarla, $2,0^\circ/\text{dk}$ tarama hızında yapılmıştır.

Yöntemin tüm parametreleri Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. XRD cihaz parametreleri.

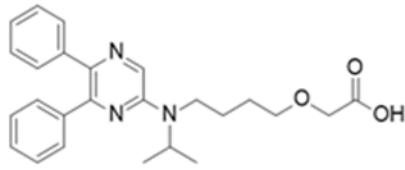
Cihaz XRD-6100 Shimadzu X-Işını Difraktometresi			
X-ışını tüpü	Cu ($1,54060 \text{ \AA}$)	Divergence slit:	$1,0^\circ$
Voltaaj	40,0 kV	Scatter slit:	$1,0^\circ$
Akım	30,0 mA	Receiving slit:	0,30 mm
Tarama aralığı	$3,00 - 40,00^\circ$	Drive axis:	Theta-2Theta
Adım Boyutu:	$0,02^\circ$	Tarama modu:	Continuous scan
Ölçüm Süresi:	0,60 s	Tarama hızı:	$2,0^\circ/\text{min}$

3. BULGULAR

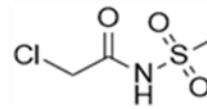
3.1. İlaç Etken Maddelerinin Safsızlık Profilinin Belirlenmesi

Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddelerin sentezi ve analitik yöntemleri geliştirilmeden önce safsızlık profilinin yapılması gereklidir. Bu amaçla; farmakopelerde yer alan bilgiler ve tasarlanan sentez basamakları göz önüne alınarak, oluşabilecek safsızlıklar belirlenmiştir. Bu amaçla; ön görülen safsızlıkların bir kısmı temin edilmiş bir kısmı Deva Holding A.Ş API Ar-Ge sentez laboratuvarında sentezlenmiştir.

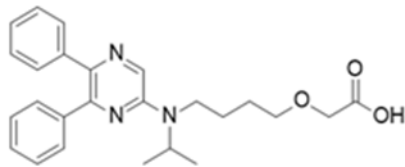
Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri ile bunların ön görülen safsızlıkları için ilk olarak kütle spektrometrisi çalışması yapılmıştır. Bulunan kütle/yük (m/z) değerlerine göre maddeler teyit edilmiştir. Diğer spektroskopik yöntemlerle de yapıların tanınmaları desteklenmiştir. Ardından Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri ve bilinen tüm safsızlıkları, Deva Holding A.Ş API Ar-Ge analitik laboratuvarında standardize edilmiştir ve maddelerin yüzde saflıkları (potensleri) bulunmuştur.



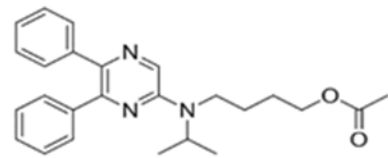
Selex-1



Selex-2

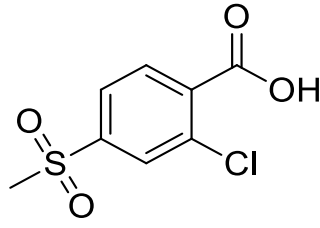


Selex-asit

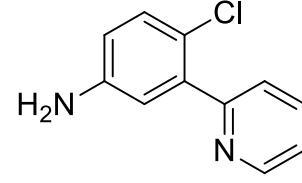


Selex-asetil

Şekil 3.1. Selexipag için tanımlanan safsızlıklar.



Vismo-1



Vismo-2

Şekil 3.2. Vismodegib için tanımlanan safsızlıklar.

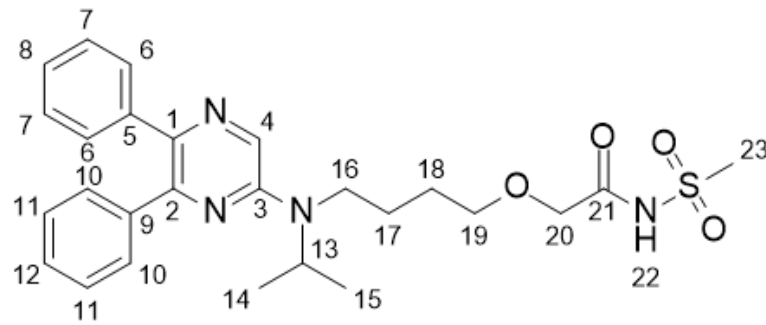
3.2. İlaç Etken Maddelerin ve Safsızlıklarının Spektroskopik İncelenmesi

Spektroskopik olarak maddelerin tanınması için ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FTIR, DSC, XRD analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Selexipag

- ^1H NMR ve ^{13}C NMR

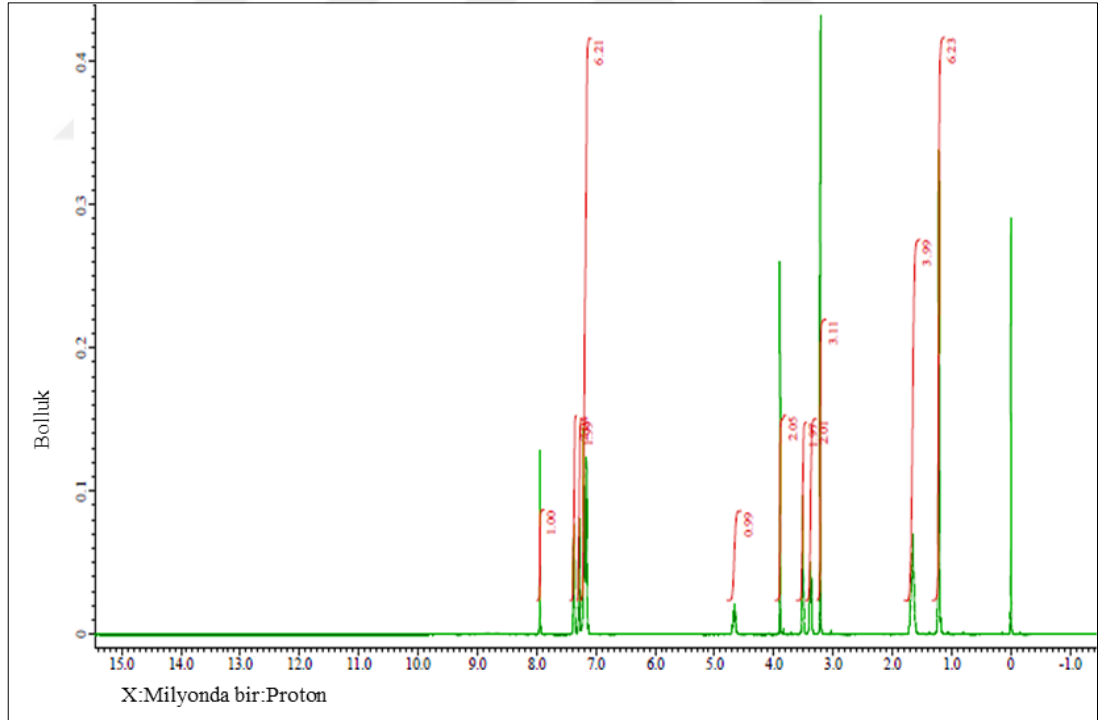
Selexipag'ın yapısı, ^1H ve ^{13}C NMR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Şekil 3.3'te verilen Selexipag yapısı üzerinde verilen etiketlere göre ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.4'te ^1H -NMR spektrumu ve Şekil 3.5'te ^{13}C -NMR spektrumu verilmiştir.



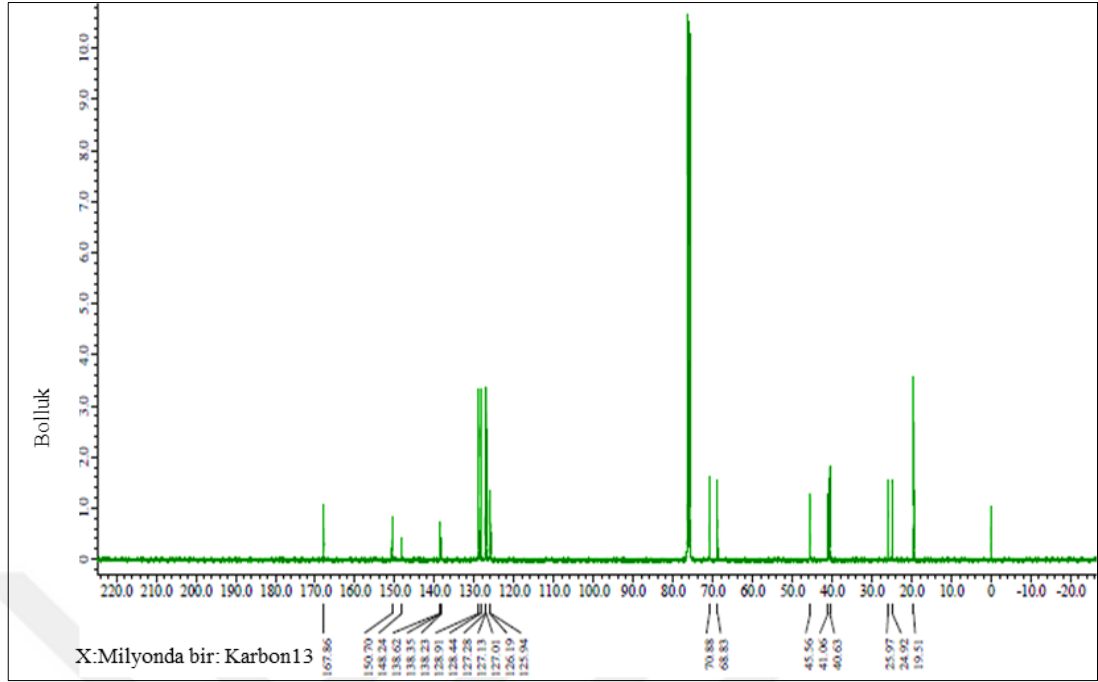
Şekil 3.3. Selexipag ilaç etken maddesinin kimyasal yapısı.

Çizelge 3.1. Selexipag etken maddesinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.

Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H -NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C -NMR, δ ppm
14, 15	1,22 (ikili, $J = 8,0$ Hz, 6 H)	19,5 ($2 \times \text{CH}_3$)
17	1,62 – 1,68 (çoklu, 4 H)	24,9 (CH_2)
18		25,9 (CH_2)
23		40,6 (CH_3)
19	3,38 (üçlü, $J = 8,0$ Hz, 2 H)	68,8 (CH_2)
16	3,52 (üçlü, $J = 8,0$ Hz, 2 H)	41,1 (CH_2)
20	3,89 (tekli, 2 H)	70,9 (CH_2)
13	4,67 (yedili, $J = 6,0$ Hz, 1 H)	45,6 (CH)
6	7,16 – 7,21 (çoklu, 6 H)	128,4 (CH)
8		125,9 (CH)
10		128,9 (CH)
12		126,2 (CH)
7	7,28 (ikili, $J = 4,0$ Hz, 2 H)	127,0 (CH)
11	7,37 (ikili, $J = 4,0$ Hz, 2 H)	127,1 (CH)
4	7,95 (tekli, 1H)	127,3 (CH)
5	-	138,2 (C)
9		138,4 (C)
1		138,6 (C)
2		148,2 (C)
3		150,7 (C)
21		167,8 (C=O)

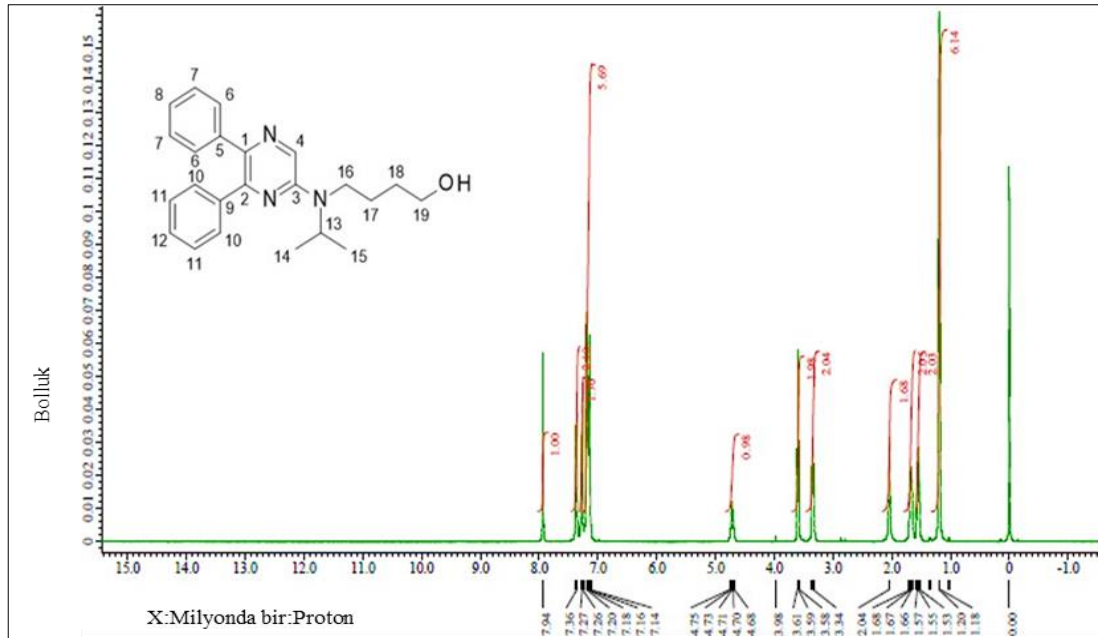


Şekil 3.4. Selexipag ^1H -NMR spektrumu.

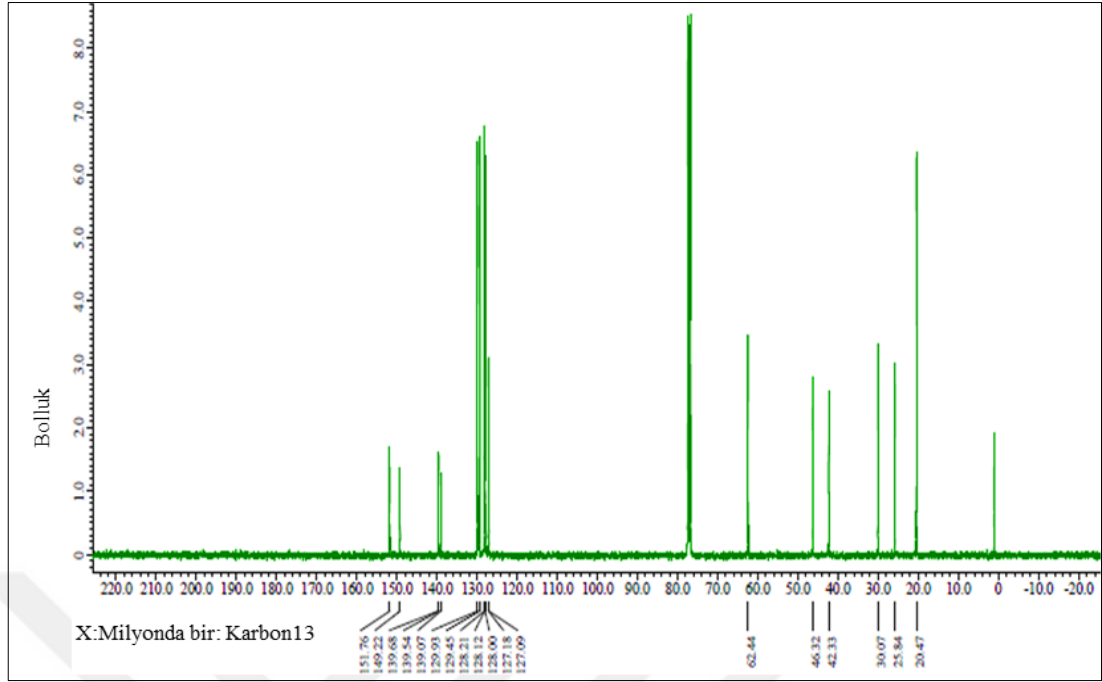


Şekil 3.5. Selexipag ^{13}C -NMR spektrumu.

Selex-1'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.6'da; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.7'de ve sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.6. Selex-1'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.

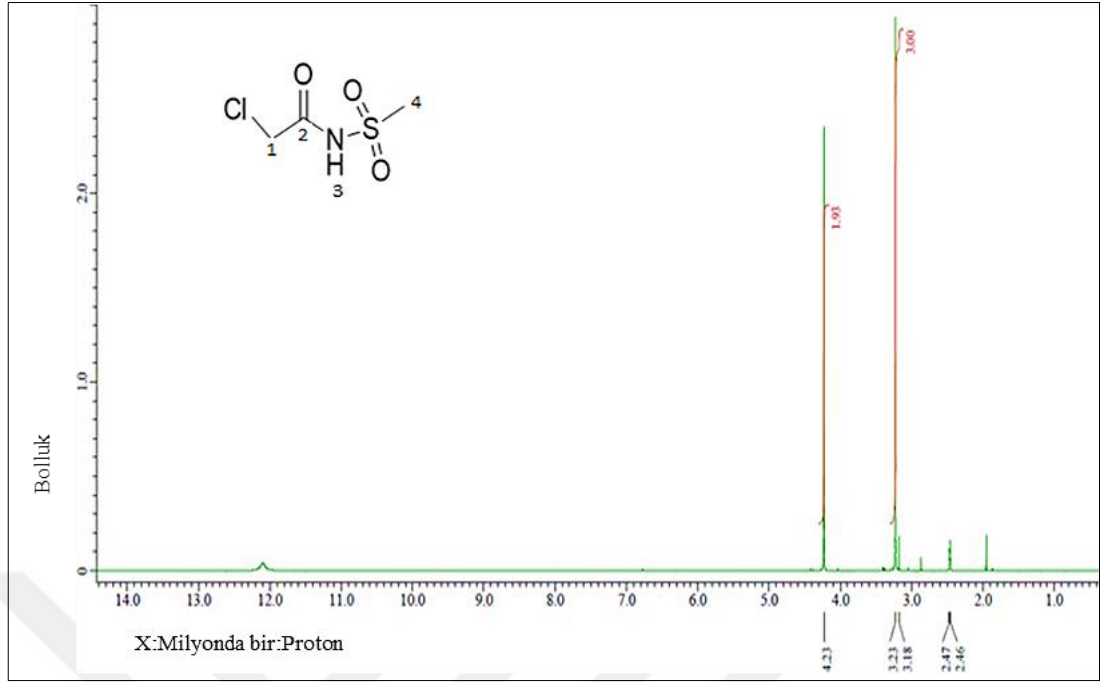


Şekil 3.7. Selex-1'in ^{13}C -NMR spektrumu.

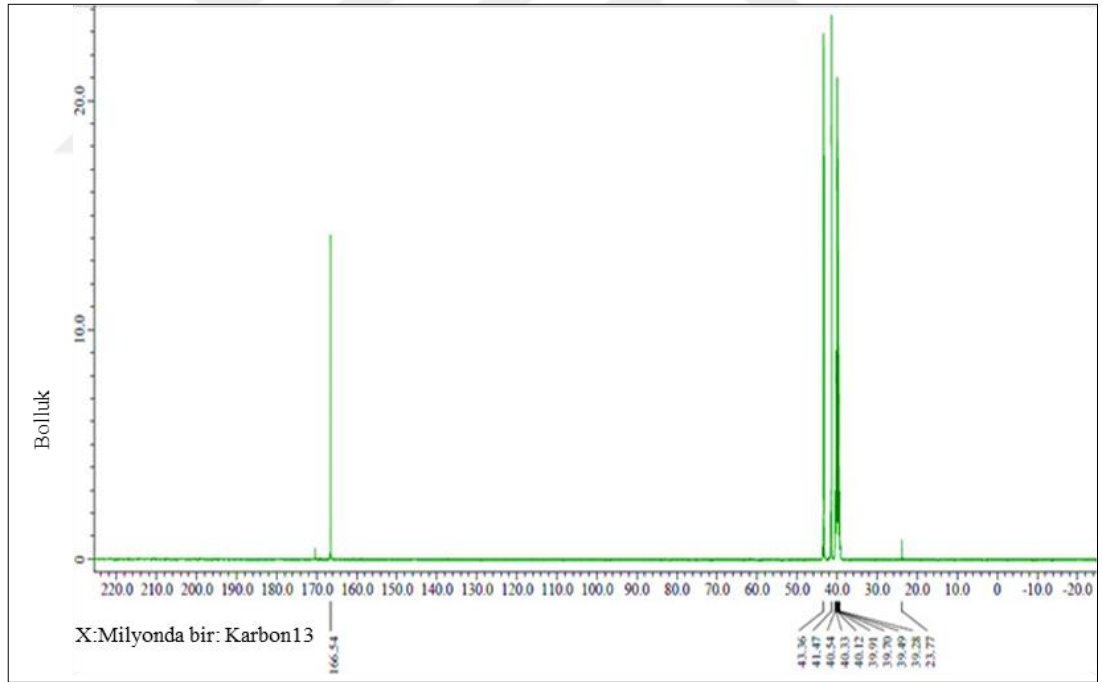
Çizelge 3.2. Selex-1 safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.

Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H -NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C -NMR, δ ppm
14, 15	1,19 (ikili, 6 H)	20,5 ($2 \times \text{CH}_3$)
17	1,53 – 1,68 (çoklu, 4 H)	25,8 (CH_2)
18		30,1 (CH_2)
19	3,34 (üçlü, 2 H)	62,4 (CH_2)
16	3,59 (üçlü, 2 H)	42,3 (CH_2)
13	4,71 (yedili, 1 H)	46,3 (CH)
6	7,26 – 7,14 (çoklu, 6 H)	129,5 (CH)
8		127,1 (CH)
10		129,9 (CH)
12		127,2 (CH)
7	7,27 (ikili, 2 H)	128,0 (CH)
11	7,36 (ikili, 2 H)	128,1 (CH)
4	7,94 (tekli, 1H)	129,5 (CH)
5	—	139,1 (C)
9		139,5 (C)
1		139,7 (C)
2		149,2 (C)
3		151,8 (C)

Selex-2'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.8'de; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.9'da ve sonuçlar Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.8. Selex-2'nin kimyasal yapısı ve ¹H-NMR spektrumu.

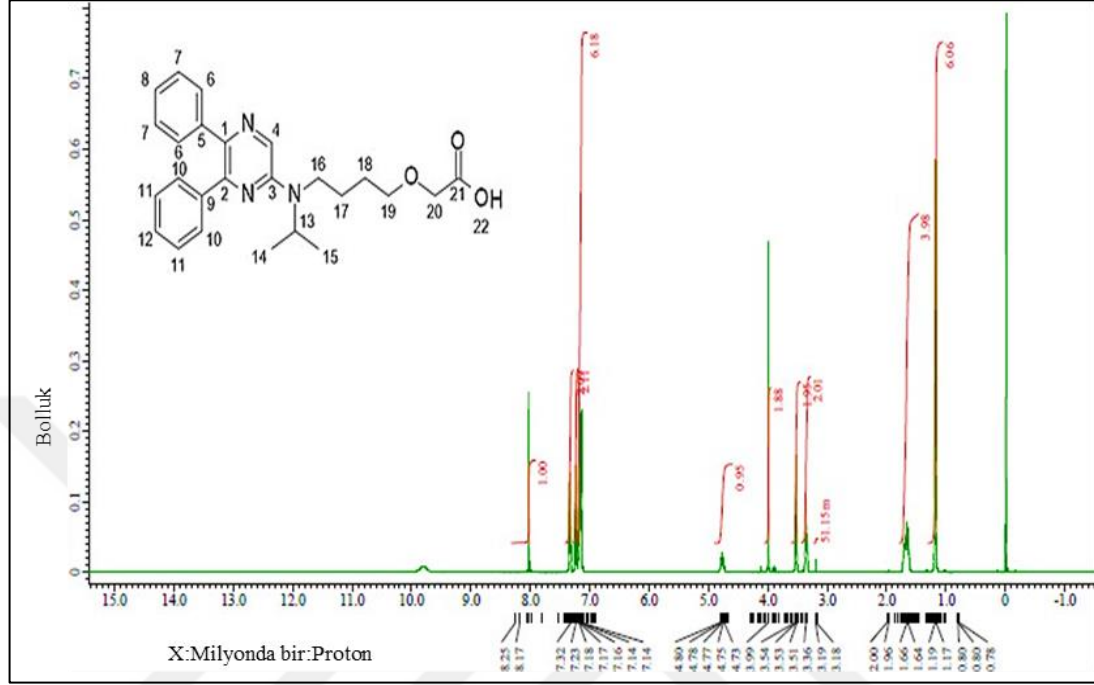


Şekil 3.9. Selex-2'nin ¹³C-NMR spektrumu.

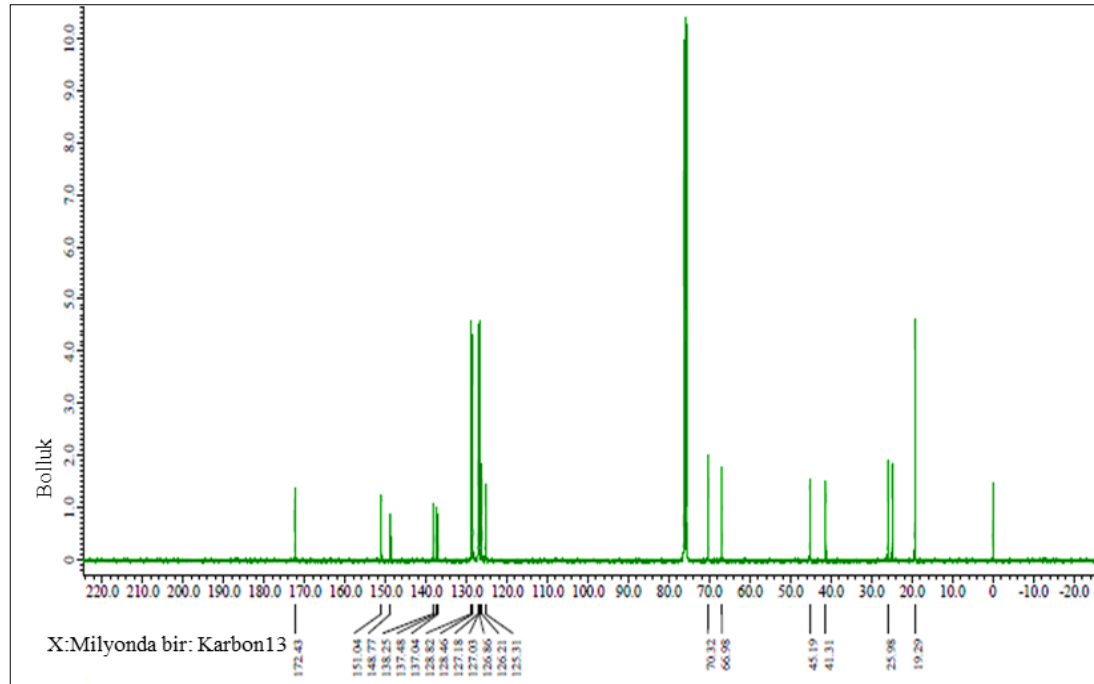
Çizelge 3.3. Selex-2 safsızlığının ¹H-NMR ve ¹³C-NMR çizelgesi.

Pozisyon	CDCl ₃ içerisinde ¹ H-NMR, δ ppm	CDCl ₃ içerisinde ¹³ C-NMR, δ ppm
4	3,23 (tekli, 3 H)	40,1 (CH ₃)
1	4,23 (tekli, 2 H)	23,8 (CH ₂)
2	-	166,5 (C=O)

Selex-asit'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.10'da; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.11'de ve sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir.



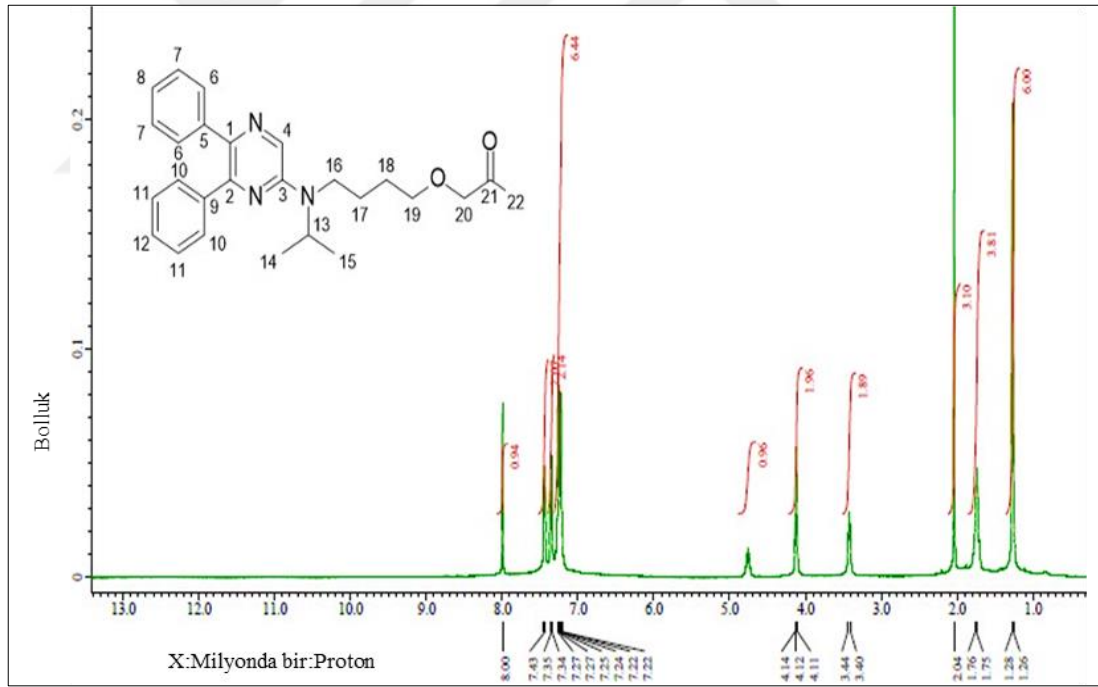
Şekil 3.10. Selex-asit'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.



Şekil 3.11. Selex-asit'in ^{13}C -NMR spektrumu.

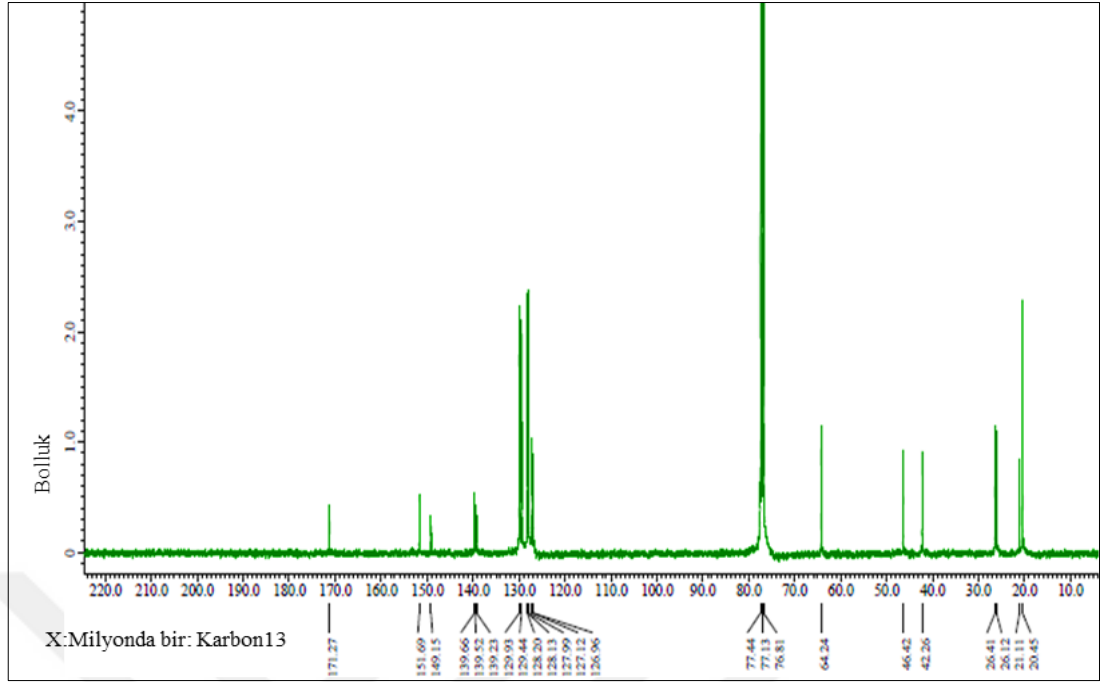
Çizelge 3.4. Selex-asit safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.

Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H -NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C -NMR, δ ppm
14, 15	1,18 (ikili, 6 H)	19,3 ($2 \times \text{CH}_3$)
17	1,64-1,66 (çoklu, 4 H)	25,96 (CH_2)
18		25,98 (CH_2)
19		67,0 (CH_2)
16	3,36 (üçlü, 2 H)	41,3 (CH_2)
20	3,99 (tekli, 2 H)	70,3 (CH_2)
13	4,77 (yedili, 1 H)	45,2 (CH)
6	7,14 – 7,18 (çoklu, 6 H)	128,5 (CH)
8		125,3 (CH)
10		128,8 (CH)
12		126,2 (CH)
7		126,9 (CH)
11	7,32 (ikili, 2 H)	127,0 (CH)
4	8,17 (tekli, 1H)	127,2 (CH)
5	—	137,0 (C)
9	—	137,5 (C)
1		138,3 (C)
2		148,8 (C)
3		151,0 (C)
21		172,4 (C=O)



Şekil 3.12. Selex-asetil'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.

Selex-asetil'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.12'de; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.13'te ve sonuçlar Çizelge 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Selex-asetil'in ^{13}C -NMR spektrumu.

Çizelge 3.5. Selex-asetil safsızlığının ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çizelgesi.

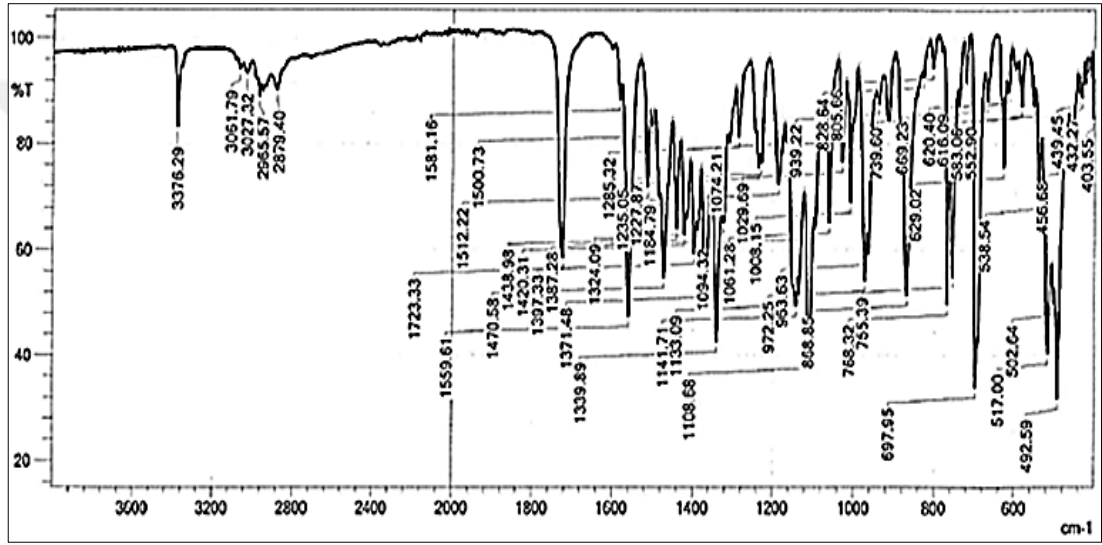
Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H -NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C -NMR, δ ppm
14, 15	1,27 (ikili, 6 H)	20,45 ve 21,11 ($2 \times \text{CH}_3$)
17	1,75 – 1,76 (çoklu, 4 H)	26,1 (CH_2)
18		26,4 (CH_2)
19	3,47 (üçlü, 2 H)	64,3 (CH_2)
16	4,12 (üçlü, 2 H)	42,3 (CH_2)
20	3,89 (tekli, 2 H)	77,1 (CH_2)
13	4,8 (yedili, 1 H)	46,4 (CH)
6	7,22 – 7,27 (çoklu, 6 H)	129,4 (CH)
8		127,0 (CH)
10		130,0 (CH)
12		127,1 (CH)
7	7,35 (ikili, 2 H)	128,0 (CH)
11	7,43 (ikili, 2 H)	128,1 (CH)
4	8,0 (tekli, 1H)	128,2 (CH)
5	–	139,2 (C)
9		139,5 (C)
1		139,7 (C)
2		149,2 (C)
3		151,7 (C)
21		171,27 ($\text{C}=\text{O}$)

- *FTIR Spektrum:*

Selexipag fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.6. Selexipag FTIR spekturum tablosu.

ν (cm ⁻¹)	Bağ
3376	N-H gerilme titreşimi
3061, 3027, 2966, 2879	C-H gerilme titreşimi
1723	C=O gerilme titreşimi
1560	Aromatik C-C gerilme titreşimi
1471	C-H bükme
1340	S=O gerilme titreşimi
1142	C-N gerilme titreşimi
1109	C-O gerilme titreşimi
972, 869	C=C bükme
768, 755, 698	Aromatik C-H bükme

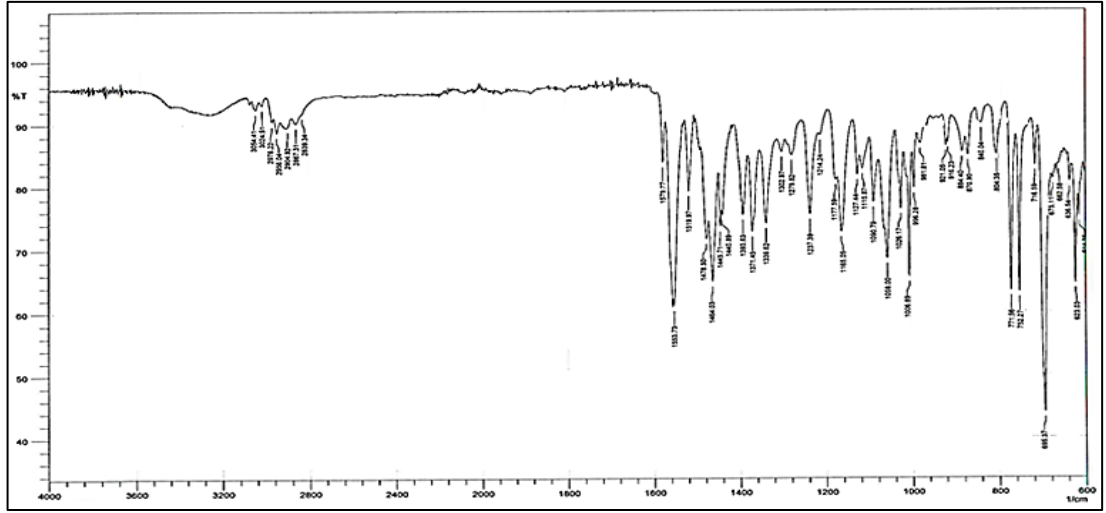


Şekil 3.14. Selexipag FTIR spekturumu.

Selex-1 fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. Selex-1 FTIR spekturum tablosu.

ν (cm ⁻¹)	Bağ
3054, 3023, 2978, 2867	C-H gerilme titreşimi
1554	Aromatik C-C gerilme titreşimi
1464	C-H bükme
1165	C-N gerilme titreşimi
1058	C-O gerilme titreşimi
1058, 1007	C=C bükme
777, 752, 695	Aromatik C-H bükme

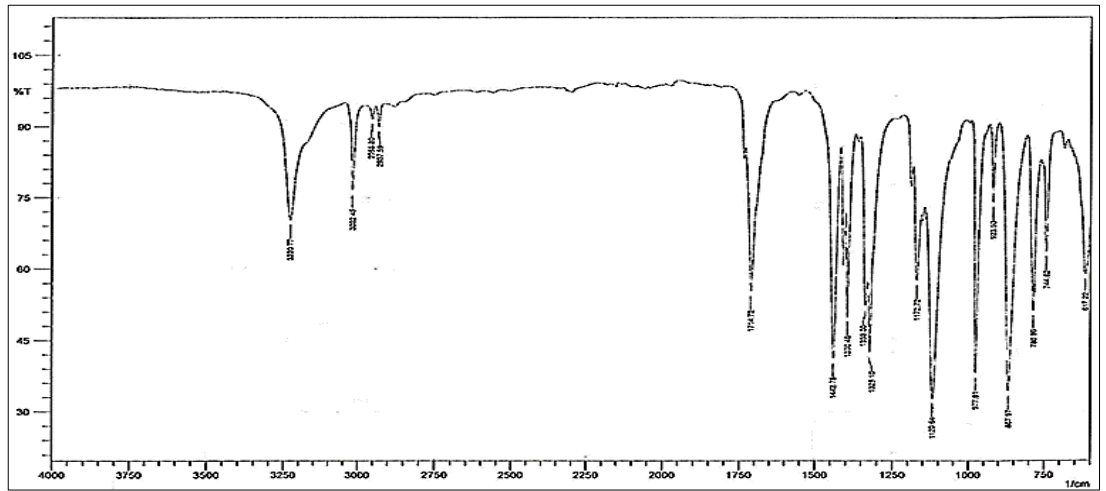


Şekil 3.15. Selex-1 FTIR spekturumu.

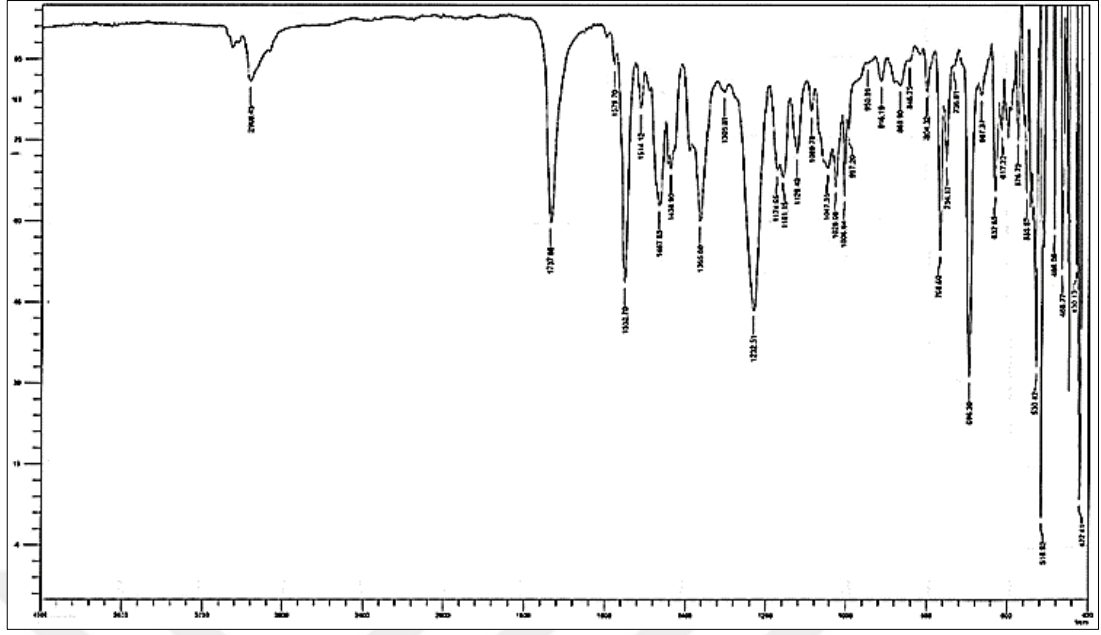
Selex-2 fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.8. Selex-2 FTIR spekturum tablosu.

ν (cm ⁻¹)	Bağ
3221	N-H gerilme titreşimi
3022, 2959, 2938	C-H gerilme titreşimi
1746	C=O gerilme titreşimi
1443	C-H bükme
1339	S=O gerilme titreşimi
1143	C-N gerilme titreşimi
1120	C-O gerilme titreşimi
868	C-Cl gerilme titreşimi



Şekil 3.16. Selex-2 FTIR spekturumu.

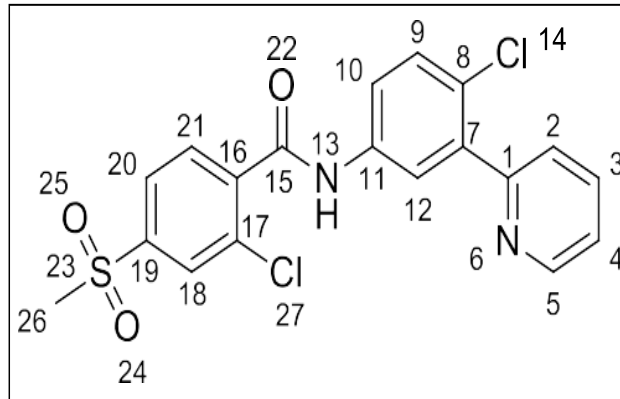


Şekil 3.18. Selex-asetil FTIR spekturumu.

3.2.2. Vismodegib

- ^1H NMR ve ^{13}C NMR

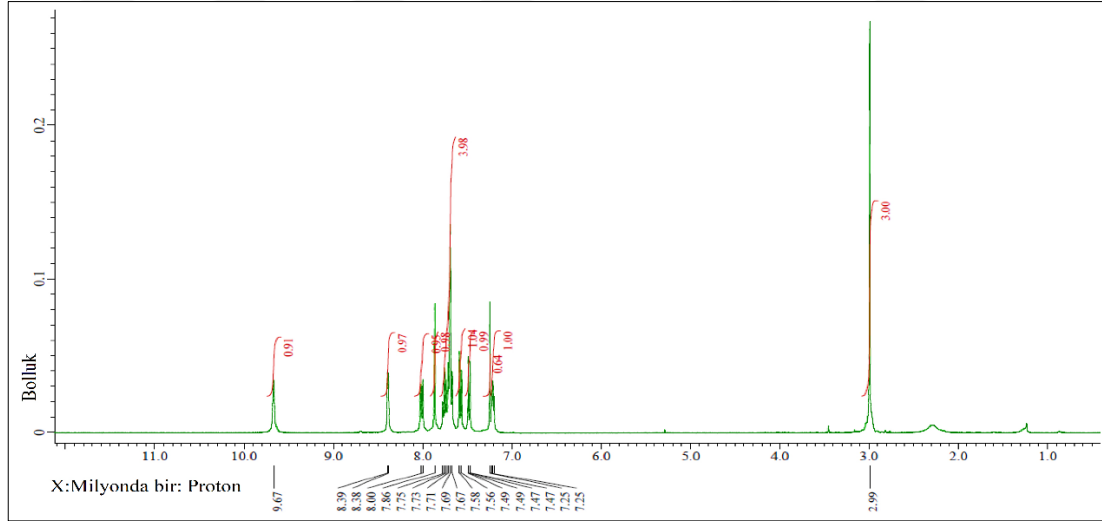
Vismodegib'in yapısı, ^1H ve ^{13}C NMR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Şekil 3.19'de verilen Vismodegib yapısı üzerinde verilen etiketlere göre ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu Çizelge 3.11'de gösterilmiştir. Şekil 3.20'de ^1H -NMR spekturumu ve Şekil 3.21'de ^{13}C -NMR spekturumu verilmiştir.



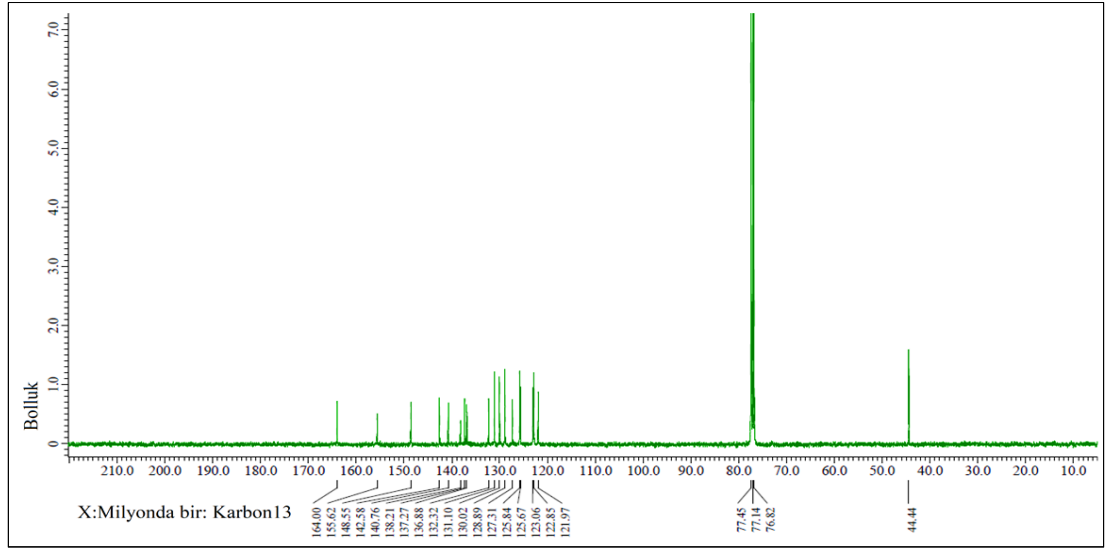
Şekil 3.19. Vismodegib kimyasal yapısı.

Çizelge 3.11. Vismodegib etken maddesinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.

Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C NMR, δ ppm
1	—	155,6 (C)
2	7,57 (ikili, $J = 7,6$ Hz, 1 H)	121,9 (CH)
3	7,69 (üçlü, $J = 9,0$ Hz, 1 H)	136,9 (CH)
4	7,21 (üçlü, $J = 6,4$ Hz, 1 H)	123,1 (CH)
5	8,38 (ikili, $J = 4,8$ Hz, 1 H)	148,6 (CH)
7	—	137,3 (C)
8	—	127,3 (C)
9	7,69 (iklinin ikilisi, $J = 9,2$; 8,8 Hz, 1 H)	130,0 (CH)
10	7,53 (iklinin ikilisi, $J = 8,0$; 7,6 Hz, 1 H)	125,7 (CH)
11	—	138,2 (C)
12	7,86 (tekli, 1 H)	122,8 (CH)
13	9,66 (tekli, NH)	—
15	—	164,0 (C=O)
16	—	140,8 (C)
17	—	132,3 (C)
18	7,69 (tekli, 1 H)	128,9 (CH)
19	—	142,6 (C)
20	7,47 (ikili, $J = 8,8$ Hz, 1 H)	125,8 (CH)
21	8,01 (ikili, $J = 8,8$ Hz, 1 H)	131,1 (CH)
26	2,99 (tekli, 3 H)	44,4 (CH ₃)

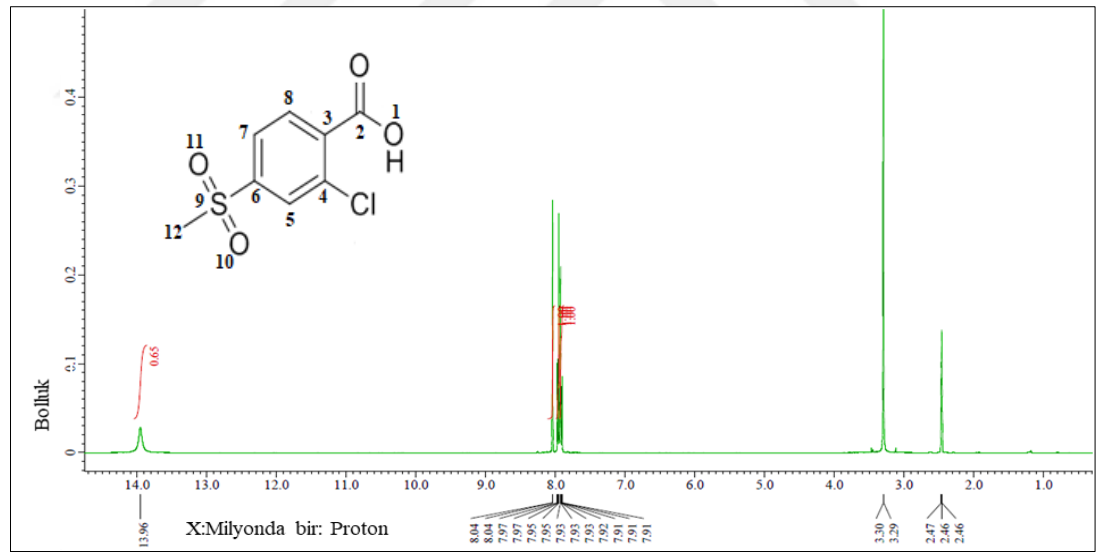


Şekil 3.20. Vismodegib ^1H -NMR spektrumu.

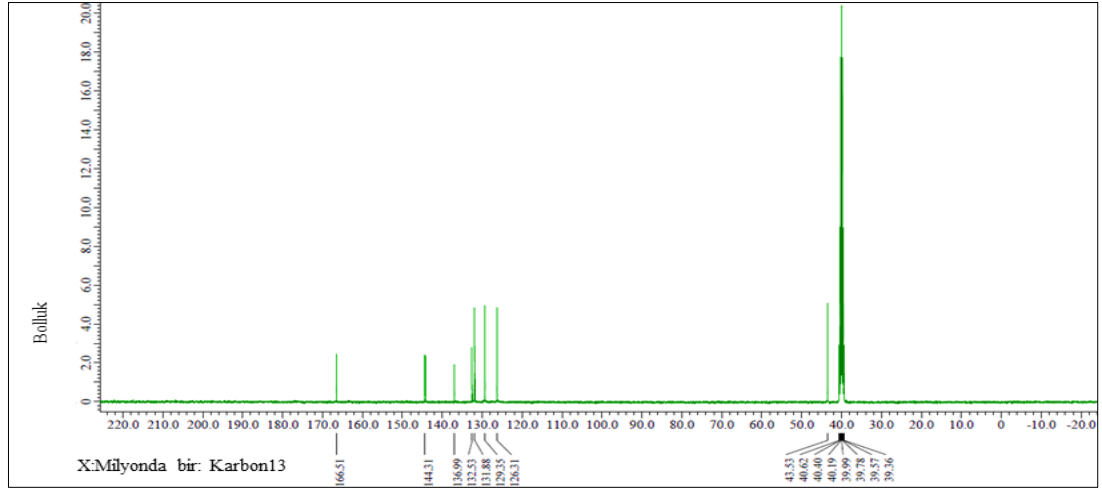


Şekil 3.21. Vismodegib ^{13}C -NMR spektrumu.

Vismo-1'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.22'de; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.23'te ve sonuçlar Çizelge 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.22. Vismo-1'in kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.

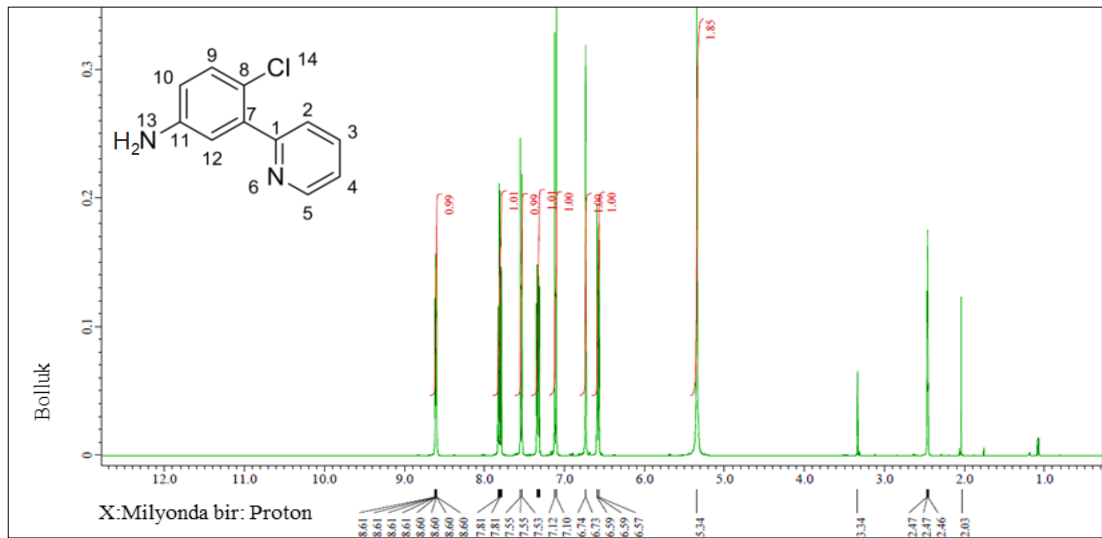


Şekil 3.23. Vismo-1 ^{13}C -NMR spektrumu.

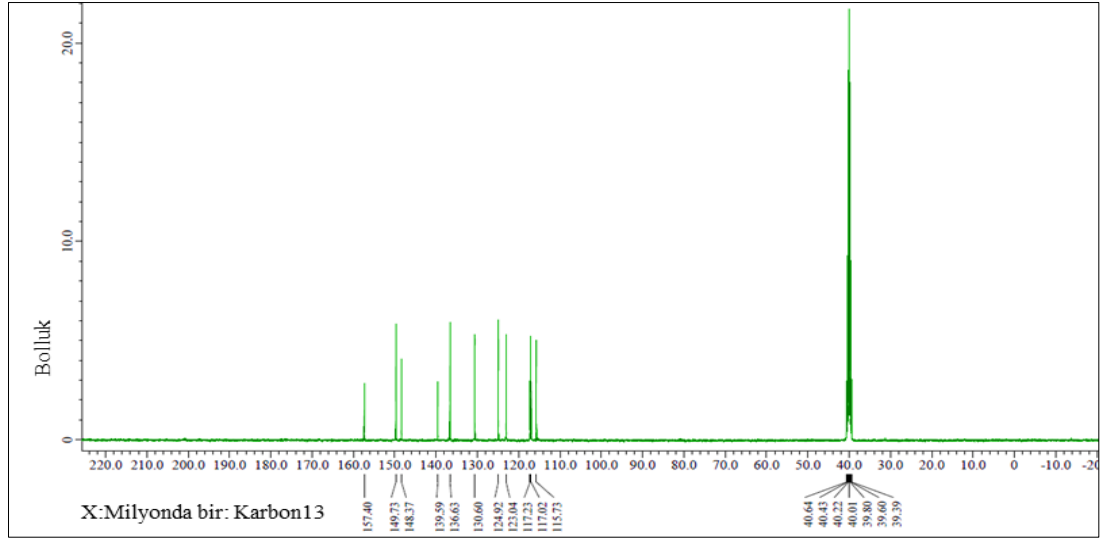
Çizelge 3.12. Vismo-1 ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.

Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C NMR, δ ppm
12	2,46 (tekli, 3H)	43,5 (CH ₃)
7	7,91–7,95 (çoklu, 4H)	126,3(CH)
8	8,38 (ikili, 1H)	131,9 (CH)
5	7,97 (tekli, H)	129,4 (CH)
4		132,5 (C)
3		137,0 (C)
6		144,3 (C)
2	7,86 (tekli, H)	166,5 (C=O)

Vismo-2'nin kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 3.24'te; ^{13}C -NMR spektrumu Şekil 3.25'te ve sonuçlar Çizelge 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.24. Vismo-2'nin kimyasal yapısı ve ^1H -NMR spektrumu.



Şekil 3.25. Vismo-2 ^{13}C -NMR spektrumu.

Çizelge 3.13. Vismo-2 ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR tablosu.

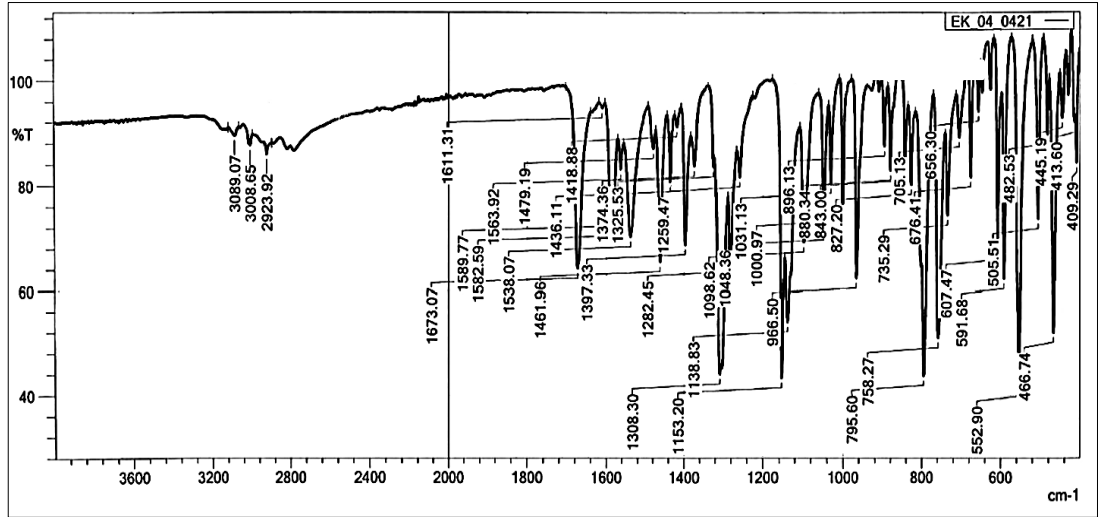
Pozisyon	CDCl_3 içerisinde ^1H NMR, δ ppm	CDCl_3 içerisinde ^{13}C NMR, δ ppm
2	5,34 (ikili, 1H)	115,7 (CH)
12	8,61 (ikili, 1H)	117,0 (CH)
4	7,81 (ikili, 1H)	117,2 (CH)
10	7,53–7,55 (çoklu, 4H)	123,0 (CH)
9		124,9 (CH)
8	–	130,6 (C)
7	–	136,6 (C)
11	–	137,3(C)
3	7,11 (iklinin ikilisi, 1H)	139,6 (CH)
5	6,59 (üçlü, 1H)	149,7 (CH)
1	–	157,4 (C)

- *FTIR Spektrumu*

Vismodegib fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.14. Vismodegib FTIR spekturum tablosu.

ν (cm^{-1})	Bağ
3089, 3008	Aromatik C–H gerilme titreşimi
2924	Alifatik C–H gerilme titreşimi
1673	C=O gerilme titreşimi
1538	C=N gerilme titreşimi
1461	Aromatik C–C gerilme titreşimi
1308	C–N gerilme titreşimi
795, 758	C–Cl gerilme titreşimi

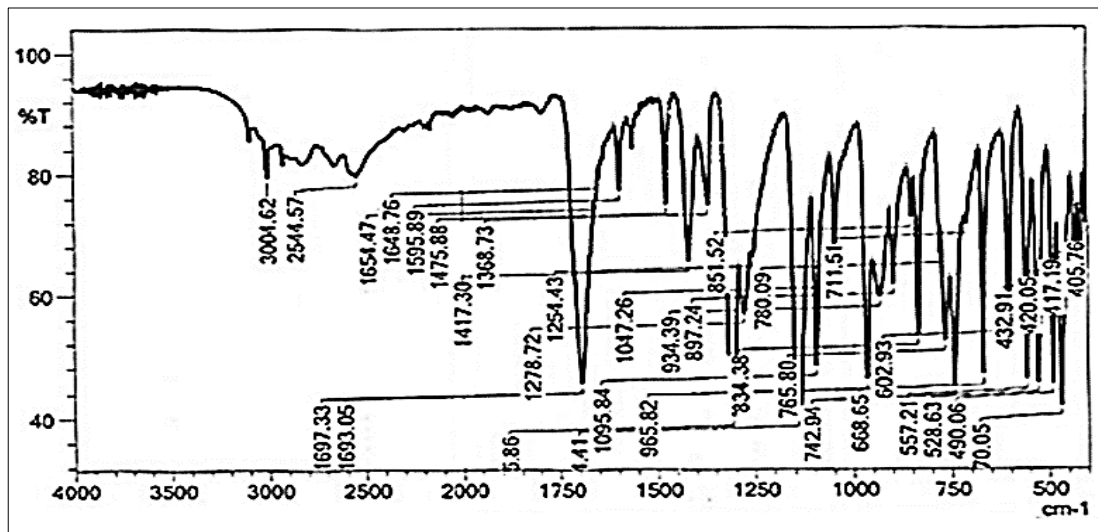


Şekil 3.26. Vismodegib FTIR spekturumu.

Vismo-1 fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.15. Vismo-1 FTIR spekturum tablosu.

ν (cm ⁻¹)	Bağ
3004	O-H gerilme titreşimi
2544	Alifatik C-H gerilme titreşimi
1697	C=O gerilme titreşimi
1475	C=N gerilme titreşimi
1417	Aromatik C-C gerilme titreşimi
765, 743	C-Cl gerilme titreşimi

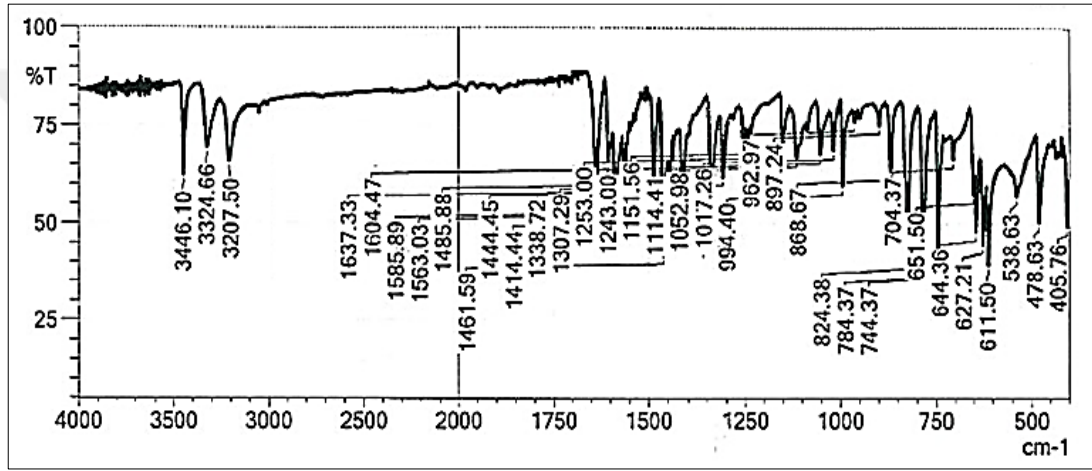


Şekil 3.27. Vismo-1 FTIR spekturumu.

Vismo-2 fonksiyonlu grupların gerilme titreşimi beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir.

Çizelge 3.16. Vismo-2 FTIR spekturum tablosu.

ν (cm ⁻¹)	Bağ
3446	N-H gerilme titreşimi
1637	C=O gerilme titreşimi
1563	C=N gerilme titreşimi
1461	Aromatik C-C gerilme titreşimi
1307	C-N gerilme titreşimi
784, 744	C-Cl gerilme titreşimi



Şekil 3.28. Vismo-2 FTIR spekturumu.

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon

Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri için ayrı ayrı ilgili maddeler ve miktar tayini olmak üzere toplamda dört farklı yöntem geliştirilmiş ve optimizasyonu yapılmıştır. Tüm yöntem geliştirilmesi sırasında aynı çalışma yol haritası izlenmiştir.

3.3.1. Tüm Yöntemler İçin Genel Özellikler

Tüm yöntemler için ters faz kromatografisi çalışılmıştır. Bu kromatografide sabit faz apolar, hareketli faz polar özelliktedir.

Standardizasyon ve kromatografik yöntem analizlerinin optimizasyonunda çözücü seçimi çok önemlidir. Seçilen çözücünün, hareketli faza benzer özellikte olması ve analizi yapılan tüm maddeler için iyi bir çözen olması gerekir. Bu doğrultuda etken madde ve safsızlıkları için ortak en iyi absorpsiyonu verecek ve piklerin geldiği yerde girişim yapmayacak bir çözücü sistemi seçilmiştir.

Yöntem geliştirmede en uygun çalışma derişimin seçilmesi önemli bir noktadır. Burada kullanılan cihazların algılama sınırları belirleyici rol oynamaktadır. Çalışma ortamı çözelti olduğu için cihazın soğurma (absorbans) miktarı (AU), ışıma yolu ve sisteme verilen çözeltinin derişimine bağlıdır. Cihaz dedektör yanıtının, değişen derişimlerle doğrusal olarak cevap vermesi (soğurma) gerekir ki; bilinmeyen numunelerin derişimleri güvenilir bir şekilde ölçülebilsin. Eğer cihazın algılama sınırı üzerindeki yüksek derişimlerde çalışılırsa, soğurma şiddeti ile derişim arasındaki doğrusallıktan sapma başlar. Bu nedenle analizi yapılan çözeltilerin soğurma biriminin, AU'nun, en fazla 1,5 ve altı olduğu derişimler çalışılmalıdır.

Ayrıca minimum gözlenebilecek soğurma şiddeti için ilaç etken madde raporlama limit derişiminde (%0,05) sisteme verilerek, siyal/gürültü oranları bulunur. Bu sayede numunenin nitel olarak tespit edilebildiği en düşük derişimde, tanımlı ve tanımsız safsızlıkların da nitel olarak gözlenip gözlenmeyeceği araştırılır.

Bu çalışmaya ek olarak; derişimi belirlenen ilaç etken maddenin, ICH limitlerine göre hazırlanan safsızlıklar ile olan karışım çözeltisi de sisteme verilerek en uygun derişim tespit edilmelidir.

Çalışma derişimi belirlenen etken maddeye göre safsızlıkların çalışma derişimleri ise ICH Q3A(R2) Yönergesi esas alınarak hesaplanır. Bu yönergeye göre, tanımlanan organik safsızlıklar (potansiyel prosesle ilgili ve/veya bozunma safsızlıkları) için limit en fazla etken madde derişiminin %0,15'i kadar; diğer tanımlanmamış herhangi bir bireysel safsızlık için ise en fazla etken madde derişiminin %0,10'u kadar olmalıdır.

Standardizasyon ve yöntem geliştirilmesi sırasında yapılması gereken önemli diğer bir parametre ise en uygun çalışma dalga boyunun belirlenmesidir. Bu amaçla önce UV-GB bölgesinde tarama yapılmıştır ve en uygun çalışma dalga boyu seçilmiştir.

3.3.2. Selexipag İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.2.1. Çalışma Derişimi Seçimi

Selexipag etken maddesi için belirtilen koşullara göre 0,5 ve 0,25 mg/mL’de denemeler yapılmıştır. Deneme analizlerinin sonuçlarına göre 0,25 mg/mL derişim daha uygun bulunmuştur. Buna göre bilinen safsızlıklar, Selex-1, Selex-asit ve Selex-asetil için spesifikasyon limit derişimi 0,0375 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Tek tek safsızlık, safsızlık karışımı ve eklenilmiş numune olarak bu derişimde analiz sonuçlarının alanları yakın gelmiştir. Standart derişimi ise etken madde derişiminin 1/1000 katı, 0,00025 mg/mL, olarak çalışılmıştır.

3.3.2.2. Çözücü Sisteminin Seçimi

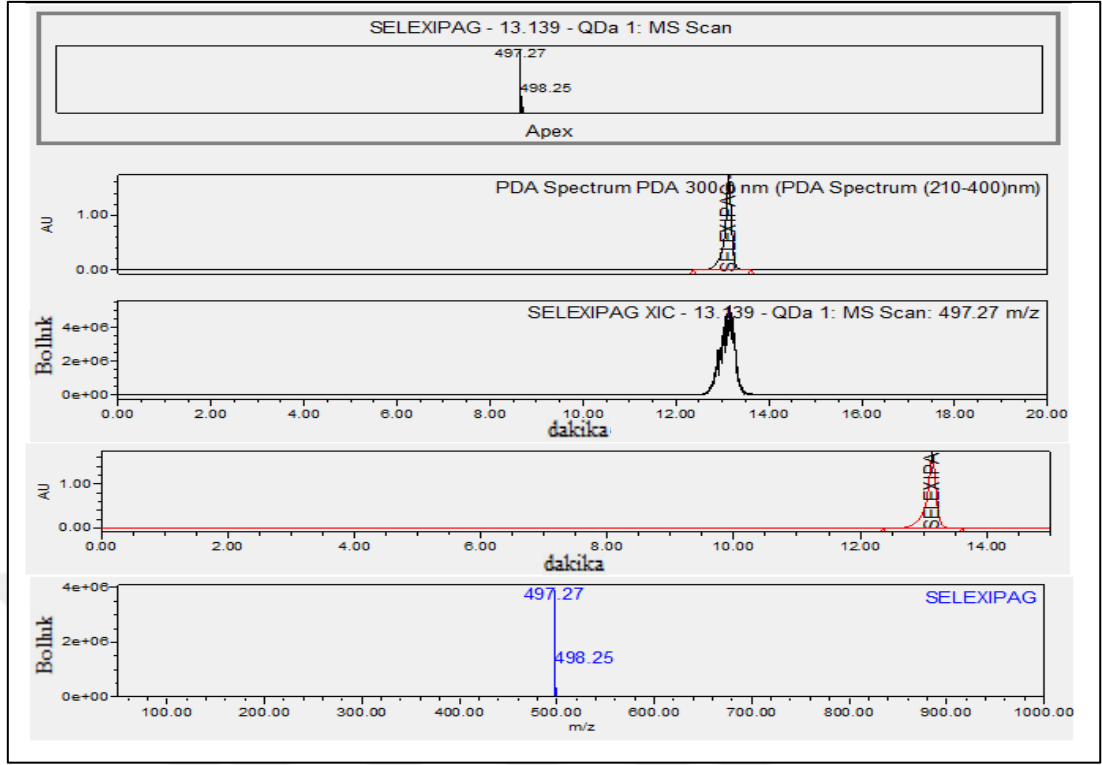
Selexipag ilgili maddeler yöntemi için ters faz kromatografide en çok tercih edilen; orta polarlıkta, düşük viskozitede ve suyla çok iyi karışabilecek bir organik çözücü olan asetonitril seçilmiştir. Selexipag ilaç etken maddesi ve safsızlıkları %100 asetonitril içerisinde çözünmüştür. Çözücü sistemi olarak asetonitril ve su karışımları kullanılmıştır. Çalışılan tüm maddelerin en iyi şekilde çözünmesini sağlamak için, çözücü sisteminde belirlenen asetonitril miktarı öncelikle tartımı alınmış maddeler ile muamele edilmiş, ultrasonik su banyosunda iyice çözünmeleri sağlanmıştır. Ardından su ile hacimleri tamamlanmıştır. Ortak en iyi çözücü sistemi asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h) olarak bulunmuştur.

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

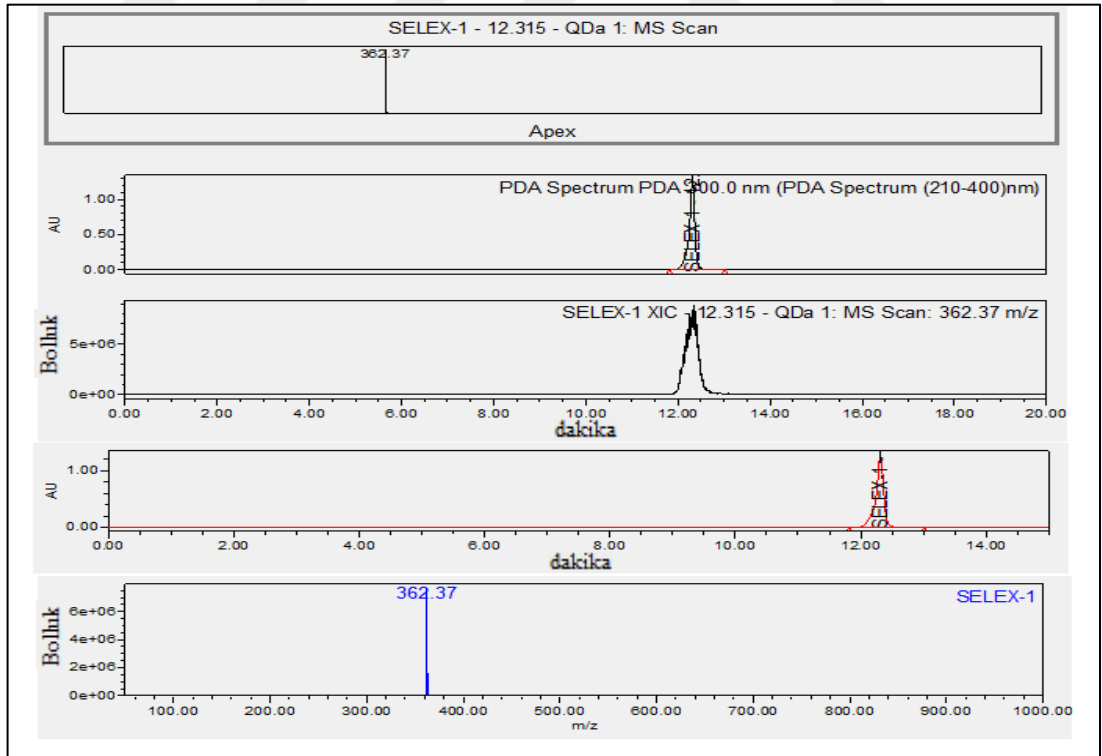
Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS marka PDA dedektörlü cihaz ile UV-Görünür bölgede 210-400 nm dalga boyu aralığında, her madde sisteme ayrı ayrı verilerek bir tarama yapılmıştır. Bu marka UYPSK cihazı aynı zamanda QDa dedektörü ile birleştirildiğinde, eş zamanlı olarak kütle çalışması yapılmıştır ve m/z değerleri belirlenmiştir. Buradaki çalışmalar için kullanılan kolon, hareketli fazlar, çözücüler, yöntem parametreleri gibi tüm çalışma koşulları bölüm 2.2.5 ve 2.2.5.1’de verilmiştir.

Çalışma dalga boyu için yapılan 200-400 nm aralığındaki UV taraması sonucunda; Selex-2 hariç tüm maddeler için ortak en iyi absorpsiyon 300 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Selex-2 bu koşullarda ve bu dalga boyunda absorpsiyon göstermemiştir. Bu nedenle, Selexipag içerisinde Selex-2 safsızlığının belirlenebilmesi için ayrı çalışma yapılmıştır. Bu çalışma tez kapsamı dışındadır.

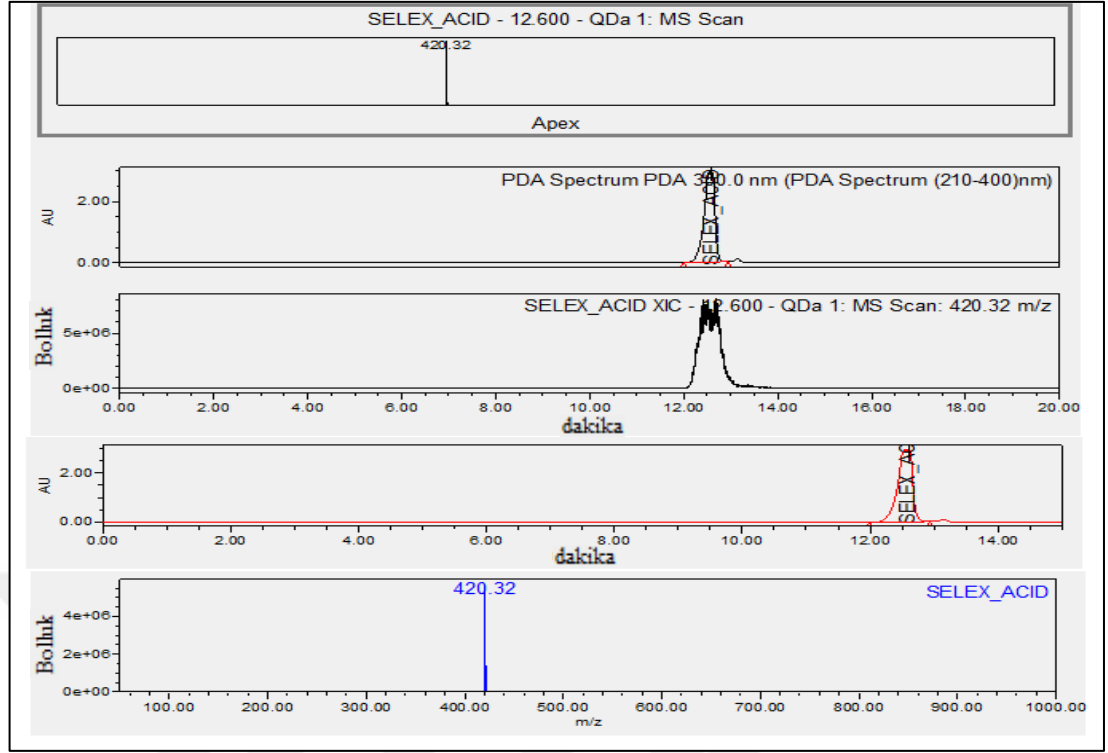
Kütle spektroskopisi çalışmalarında, 50–1000 Da arasındaki kütle taraması sonucunda bulunan kütle/yük (m/z) değerleri ise şu şekildedir: Selex-1 m/z (M+H)+ 362,37 (Şekil 3.30); Selex-asit m/z (M+H)+ 420,32 (Şekil 3.31); Selex-asetil m/z (M+H)+ 404 (Şekil 3.32); Selexipag m/z (M+H)+ 497,27 (Şekil 3.29) yapılarına göre bir protonu kolaylıkla bağlayabildiği için pozitif modda; Selex-2 (M-H)- m/z 170 (Şekil 3.33) negatif modda iyonize olmuştur.



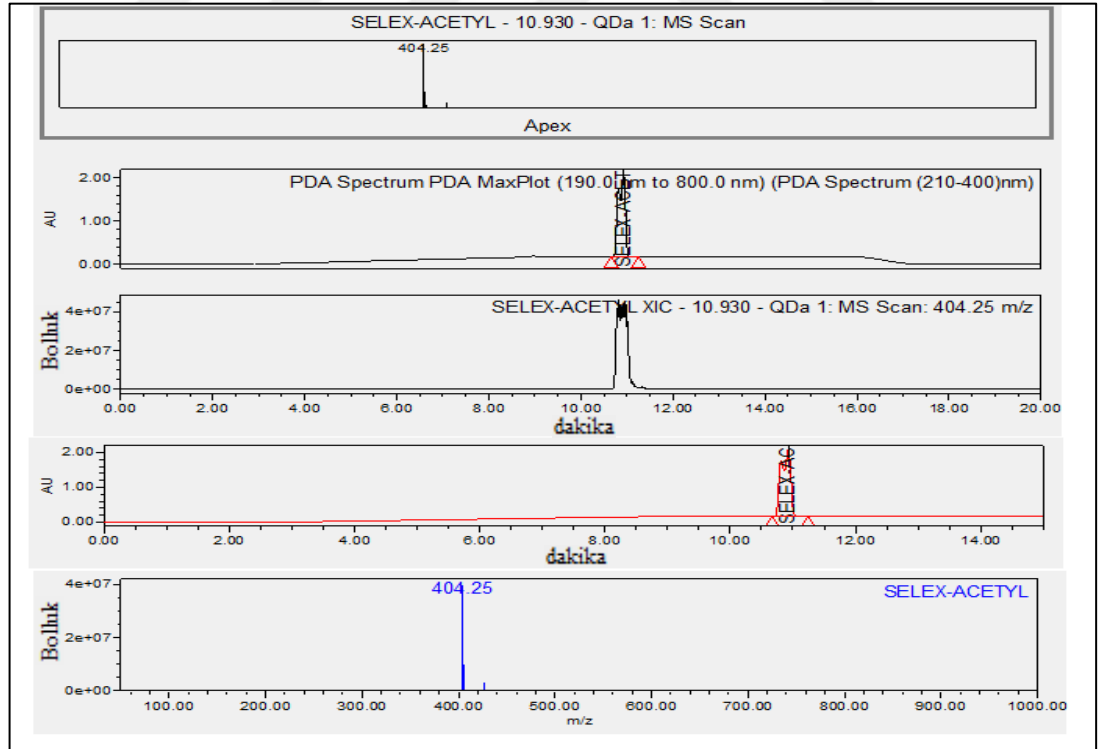
Şekil 3.29. Selexipag kütle spektrumu.



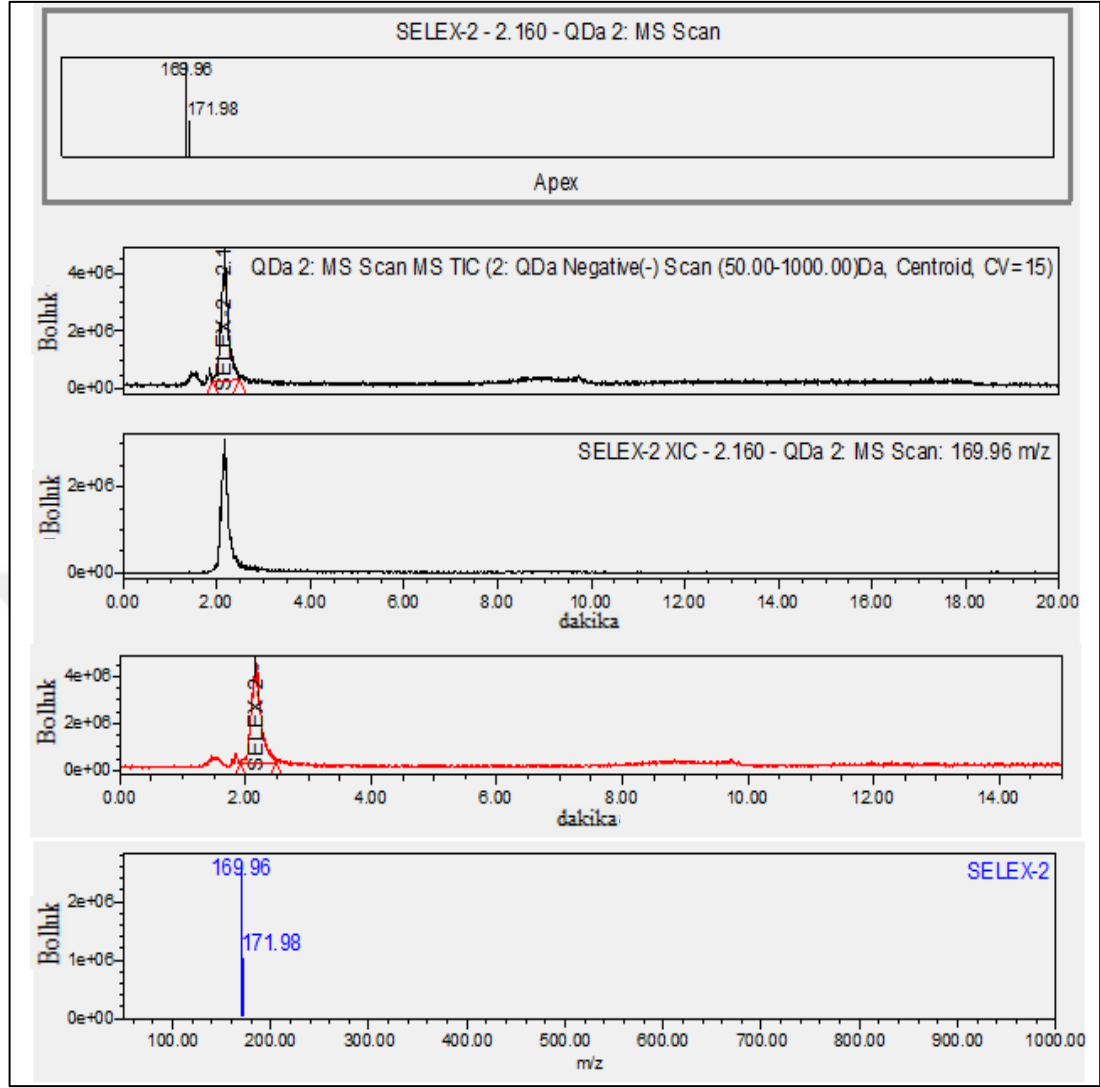
Şekil 3.30. Selex-1 kütle spektrumu.



Şekil 3.31. Selex-asit kütle spektrumu.



Şekil 3.32. Selex-asetil kütle spektrumu.



Şekil 3.33. Selex-2 kütle spektrumu.

3.3.2.4. Yöntem Optimizasyonu

Yöntem geliştirilmesi sırasında piklerin birbirinden ayrımı ve pik şekillerinin daha iyi olması için farklı kolonlar, farklı pH'larda tampon çözeltileri ve iyon çifti reaktifi içeren hareketli fazlar, kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıkları, enjeksiyon hacmi, akış hızı ve dalga boyları da denenmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.17'deki kolonlar, Çizelge 3.18'deki hareketli faz A çözeltileri kullanılmıştır.

Tüm denemelerde hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır.

Çizelge 3.17. Selexipag ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolonlar.

Kolon Türü	Uzunluğu, mm	İç Çapı, mm	Partikül Çapı, µm	Firma
Acquity BEH C18	100	2,1	1,7	Waters
Acquity BEH C8	100	2,1	1,7	Waters
Acquity BEH C18	150	2,1	1,7	Waters
XBridge C8	150	3,0	3,5	Waters
Symmetry C8	150	4,6	3,5	Waters
BDS Hypersil C18	250	4,6	3,0	Thermo Scientific
BDS Hypersil C18	250	4,6	5,0	Thermo Scientific

Çizelge 3.18. Selexipag ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli faz A'lar.

	Hareketli faz A
1	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5)
2	10 mM K ₂ HPO ₄ ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)
3	10 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)
4	20 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)
5	10 mM K ₂ HPO ₄ ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 4,0)
6	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,0)
7	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,5) : asetonitril (90:10, h/h)
8	%0,1'lik trifloroasetik asit

En uygun yöntem koşullarını bulabilmek için hem YPSK hem de UYPSK cihazlarında denemeler yapılmıştır. Her iki cihaz için 25 °C, 30 °C ve 40 °C'de kolon sıcaklığı denemeleri yapılmıştır. Bunun yanında YPSK çalışmalarında 25 °C oto-örnekleyici sıcaklığı, 235 nm ve 300 nm dalga boyları; 10,0 µL enjeksiyon hacmi; 0,7 mL/dk, 0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk ve 2,0 mL/dk akış hızları çalışılmıştır.

Waters TUV detektörü ve Empower-pro veri işleme sistemi (Waters Corporation, Milford, MA, ABD) ile birleştirilmiş Waters Acquity UYPSK cihazında ise 15 °C ve 25 °C oto-örnekleyici sıcaklıkları, 300 nm dalga boyu; 2,0 µL; 3,0 µL; 5,0 µL enjeksiyon hacimleri; 0,3 mL/dk ve 0,33 mL/dk akış hızları çalışılmıştır. Yapılan deneme çalışmalarında en iyi ve kısa süreli ayırım bu cihazda bulunmuştur. Hareketli faz A olarak iyon çifti reaktifi %0,1 TFA çözeltisi; hareketli faz B olarak asetonitril kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı Selex-1 ve sağındaki safsızlık pikinin ayırımına göre yapılmıştır. Çünkü diğer pikler kolon sıcaklığından çok etkilenmezken; Selex-1 ve safsızlık piki ayırımı etkilenmektedir. Denemeler sonucu en iyi sonuç 30 °C'de çıkmıştır. Bunun yanında en iyi sonuçlar şu parametreler ile elde edilmiştir: Oto-örnekleyici sıcaklığı 15 °C, dalga boyu 300 nm, 2,0 µL enjeksiyon hacmi, akış hızı 0,33 mL/dk. Gradient programı ise şu şekildedir: 0–5 dk., %40-65 B; 5-12 dk., %65–65 B; 12-13 dk., %65–40 B; 13-17 dk., %40-40 B. Çalışma sonucunda tüm pik şekilleri

oldukça güzel gelmiştir ve birbirinden iyi bir şekilde ayrılmıştır.

Çizelge 3.19. Selexipag ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri.

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters Acquity
Kolon Tipi	BEH C18
Kolon Uzunluğu, Çapı, Partikül Boyutu	150 x 2,1 mm; 1,7 µm
Akış Hızı	0,33 mL /dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Numune Sıcaklığı	15 °C
Çalışma Dalga Boyu	300 nm
Enjeksiyon Hacmi	2 µL
Analiz Süresi	17 dk
Cihaz	UYPSK
Hareketli faz A	0,1% trifloroasetik asit
Hareketli faz B	Asetonitril
Çözücü	Asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.20. Selexipag ilgili maddeler gradient programı.

Zaman, dk	Hareketli faz A, %	Hareketli faz B, %
0	60	40
5	35	65
12	35	65
13	60	40
17	60	40

3.3.3. Selexipag Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.3.1. Çalışma Derişimi Seçimi

Selexipag miktar tayini yöntemi için ilk olarak 0,05 mg/mL çalışma derişiminde analiz denemeleri yapılmıştır. Bu derişimdeki etken madde pik alanı cihaz sınırları içerisinde çıkmıştır. Ancak daha düşük derişim için de denemeler yapılmıştır. Bu amaçla 0,025 mg/mL derişimde de aynı analizler yapılmıştır. Bu derişimdeki pik alanları ve yükseklikler de cihazın algılama sınırına girdiği ve daha az madde kullanıldığı için çalışma derişimi olarak seçilmiştir.

3.3.3.2. Çözücü Sisteminin Seçimi

İlgili maddeler yöntem geliştirmesi sırasında bulunan en iyi çözücü sistemi

asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h), bu yöntem parametrelerinde de denenmiştir ve iyi sonuç verdiği için bu çözücü karışımı kullanılarak analizler yapılmıştır.

3.3.3.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi

Aynı şekilde 300 nm dalga boyunda denemeler yapılmıştır. Sonuçlara göre, miktar tayini yöntem parametreleri ile çalışıldığında bu dalga boyu uygun bulunmuştur.

3.3.3.4. Yöntem Optimizasyonu

Miktar tayini yöntemi için hem UYPSK hem de YPSK cihaz denemeleri yapılmıştır. İlk olarak ilgili maddeler yöntemine dayanarak UYPSK cihazında denmelere başlanmıştır. Bu amaçla hareketli faz A olarak; pH'ı 7,5 olan K_2HPO_4 ve $C_{16}H_{37}NO_4S$ karışımı bir tampon çözeltisi ile bu tampon çözeltinin 90:10 oranında asetonitril karışımı, %0,1'lik TFA çözeltisi, K_2HPO_4 ve asetonitril karışımı çözeltiler denenmiştir. Sabit faz olarak Waters Acquity BEH C8 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) ve Waters Acquity BEH, C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) kolonları çalışılmıştır.

İlk olarak pH'ı 7,5 olan K_2HPO_4 ve $C_{16}H_{37}NO_4S$ karışımı bir tampon çözeltisi ve Waters Acquity BEH C8 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m) kolonu ile yapılan 0,05 mg/mL çalışma derişiminde analiz denemeleri yapılmıştır. Bu derişimdeki etken madde pik alanı yaklaşık olarak bir milyon olarak gözlenmiştir. Standart ve kontrol standart arasındaki benzerlik faktörü de %97,6-%100,4 aralığında bulunmuştur. Pik alanı yüksek geldiği için derişim azaltılarak, 0,025 mg/mL, derişimde numuneler analiz edilmiştir. Bu derişimde cihazın algılama sınırına girdiği ve daha az madde kullanıldığı için çalışma derişimi olarak seçilmiştir. UYPSK ile yapılan denemelerde elüsyon programları, hareketli fazlar ve kolon değişikliği de yapılsa ayırım iyi gelmemiştir ve taşıma piki gözlenmiştir. Bu nedenle YPSK cihazına geçilmiştir. Bu cihazda da hareketli faz olarak K_2HPO_4 ve asetonitril karışımı çözelti kullanılmıştır. Kolon olarak

Waters Symmetry, C8 (150 x 4,6 mm; 3,5 µm) kullanılmış ve denemeler yapılmıştır. Tüm UYPSK denemelerinde akış hızı 0,3 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 2,0 µL alınmıştır. YPSK yönteminde ise akış hızları her zaman 1,2 mL/dk olarak çalışılmıştır. Enjeksiyon hacmi, cihazın algılama sınırına göre 10 µL ve 20 µL olarak denenmiş ve en uygun olarak 20 µL seçilmiştir.

YPSK ve UYPSK cihaz denemeleri için çalışma dalga boyu, kolon sıcaklığı, oto-örnekleyici, hareketli faz B ve çözücü ortaktır.

Tüm denemelere göre Shimadzu Prominence-i LC-2030 C Plus-SPD-40 marka YPSK cihazı için en uygun miktar tayini yöntemi oluşturulmuş ve LabSolution sürüm 6.108 ile kaydedilmiştir. Tüm parametreler Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.22’de verilmiştir.

Çizelge 3.21. Selexipag miktar tayini en uygun yöntem parametreleri.

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters
Kolon Tipi	Symmetry, C8
Kolon Uzunluğu, Çapı, Partikül Boyutu	150 x 4,6 mm; 3,5µm
Akış hızı	1,2 mL/dk
Kolon sıcaklığı	40 °C
Numune sıcaklığı	25 °C
Çalışma dalga boyu	300 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Analiz süresi	12 dk
Cihaz	YPSK
Hareketli faz A	10 mM K ₂ HPO ₄ :asetonitril (90:10, h/h).
Hareketli faz B	Asetonitril
Çözücü	Asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.22. Selexipag miktar tayini gradient programı.

Zaman, dk	Hareketli faz A, %	Hareketli faz B, %
0	60	40
4	60	40
5	30	70
8	30	70
8,5	60	40
12	60	40

3.3.4. Vismodegib İlgili Maddeler Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.4.1. Çalışma Derişimi Seçimi

Vismodegib ilgili maddeler için 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 1,0 mg/mL'deki derişimler denenmiştir. YPSK ve UYPSK cihazlarında yapılan denemelerde ilk olarak YPSK cihazına göre 0,1 mg/mL'de çalışmalar yapılmıştır. Tüm safsızlık piklerinin daha iyi görülebilmesi için sonradan etken madde derişimi arttırılarak 0,5 mg/mL olarak devam edilmiştir. Çalışma sonucunda cihazın detektöründen kaynaklı bir zemin gürültüsü olduğu ve bertaraf edilemediği için UYPSK cihazı denemelerine geçilmiştir. Cihaz algılama sınırına göre ve girişim yapan herhangi bir pikin varlığını daha iyi görmek için 1,0 mg/mL derişimde denemeler yapılmıştır.

Neticede 1,0 mg/mL, Vismodegib etken maddesi çalışma derişimi olarak uygun bulunmuştur.

Bilinen safsızlıkların spesifikasyon limiti %0,15 için Vismo-1 ve Vismo-2 safsızlıklarının derişimleri 0,0015 mg/mL olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar uygun bulunmuştur. Ancak HBTU bilinen safsızlığı 0,0015 mg/mL'de iyi bir absorpsiyon göstermemiştir. Bu nedenle; bu en uygun yöntem parametrelerinde en iyi absorpsiyon gösterdiği derişiminde, spesifikasyon limitinin 10 katı 0,015 mg/mL'de HBTU çalışılmıştır.

3.3.4.2. Çözücü Sisteminin Seçimi

İlk olarak asetonitril ve su karışımı (20:80, h/h) çözücü sistemi olarak denenmiştir. Denemelerde safsızlıklar için iyi bir çözücü olmasına karşın, Vismodegib etken maddesi bu organik çözücü ve su oranlarında çökmüştür. Organik oranı arttırıldığında ise çözünme artmıştır. Bir de ikinci en çok kullanılan organik çözücü metanolde denenmiştir. Çözücü sistemi olarak tüm maddeler için en iyi metanol ve su

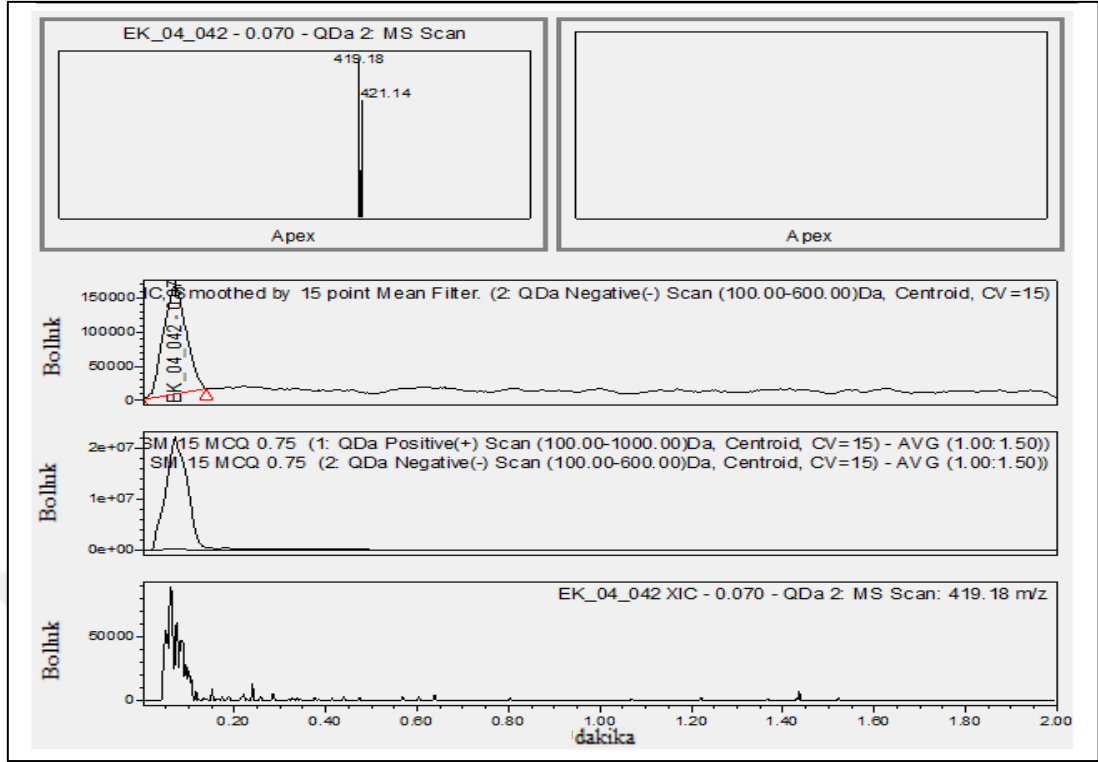
karışımı oranı (50:50, h/h) olarak bulunmuştur.

Yöntem parametrelerine göre; metanol ve su karışımı oranı (50:50, h/h) çözücü sistemi olarak belirlenmiştir. Numuneler hazırlanırken tartılan maddeler üzerine belirtilen metanol oranı eklenerek, ultrasonik su banyosunda çözündürülmüştür. Ardından hacmine su ile tamamlanmıştır.

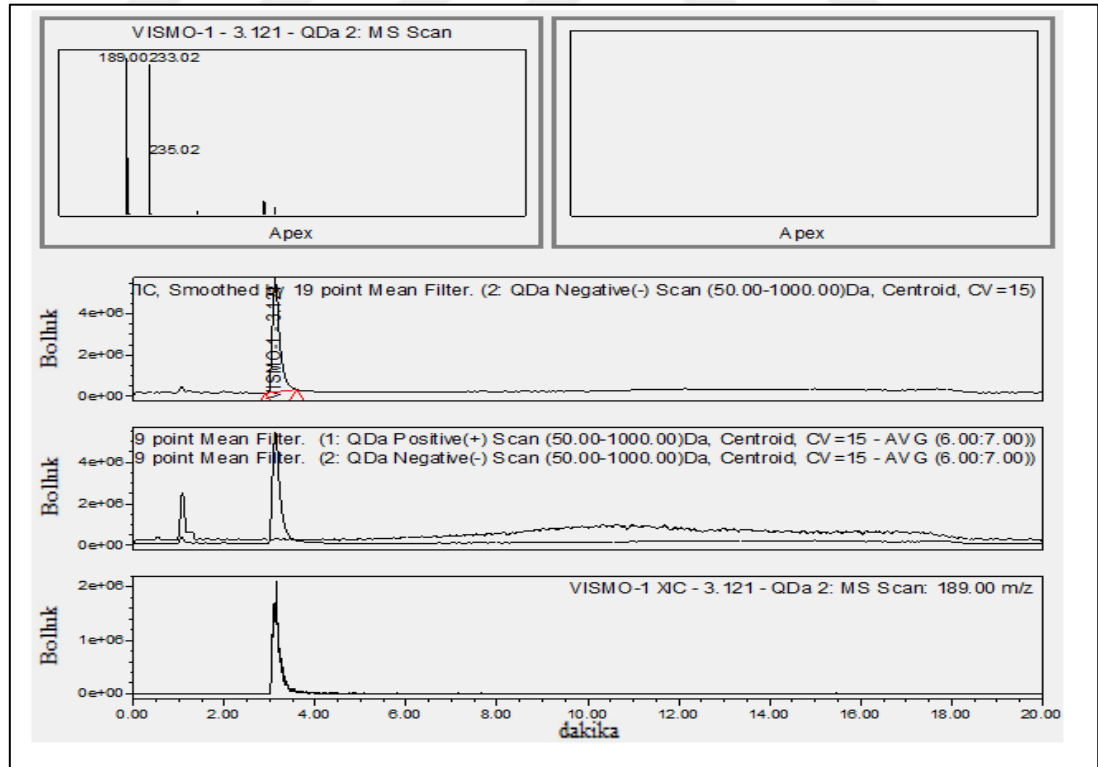
3.3.4.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi ve m/z Değerlerinin Bulunması

Waters ACQUITY UYPSK H-Class PLUS marka PDA dedektörlü cihaz ile UV-Görünür bölgede 210-400 nm dalga boyu aralığında, her madde sisteme ayrı ayrı verilerek bir tarama yapılmıştır. QDa dedektörü ile de eş zamanlı olarak kütle çalışması yapılmıştır ve m/z değerleri belirlenmiştir. Çalışmaya göre tüm maddeler için en uygun absorpsiyon 230 nm olarak belirlenmiştir.

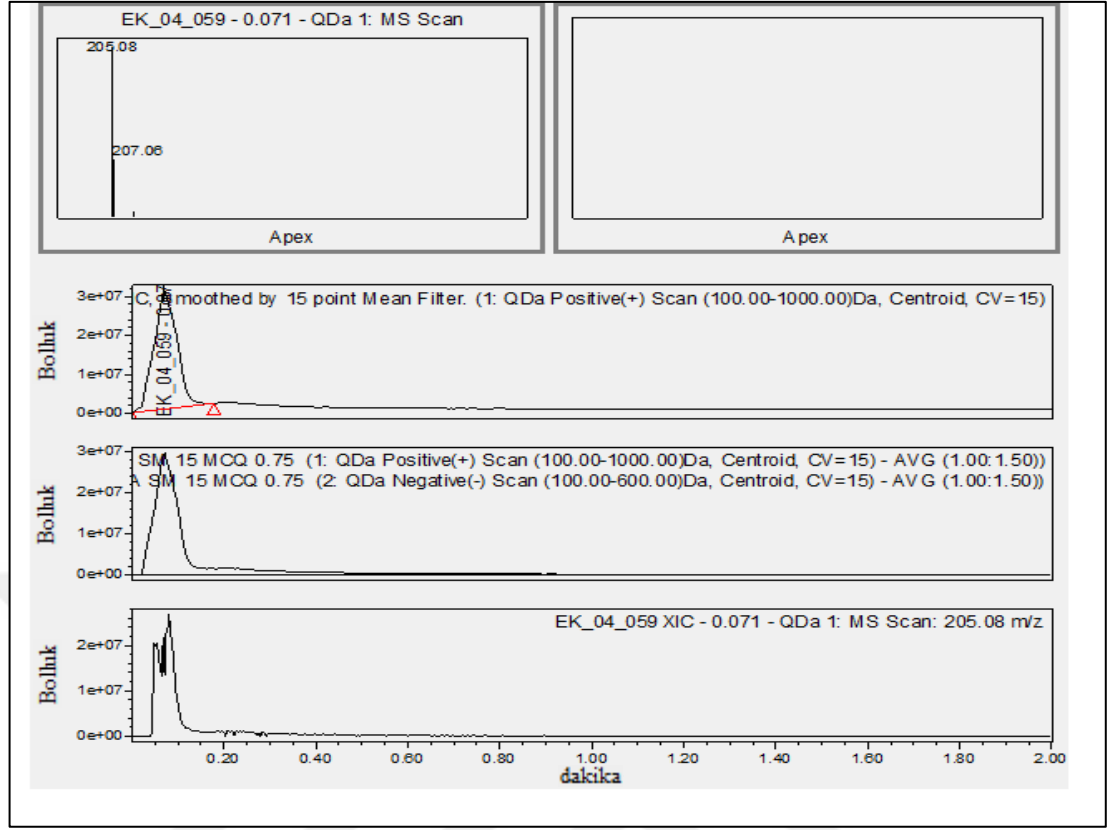
Kütle spektroskopisi çalışmalarında, 400–900 Da arasındaki kütle taraması sonucunda bulunan kütle/yük (m/z) değerleri ise şu şekildedir: Vismodegib m/z (M-H)- 419,18 (%100) ve 421,14 (%68,6) (Şekil 3.34) ve Vismo-1 (M-H)- m/z 233,09 (Şekil 3.35) negatif modda iyonize olmuştur. Vismo-2 m/z (M+H)+ 205,08 (Şekil 3.36) yapısına göre bir protonu kolaylıkla bağlayabildiği için pozitif modda iyonize olmuştur.



Şekil 3.34. Vismodegib kütle spektrumu.



Şekil 3.35. Vismo-1 kütle spektrumu.



Şekil 3.36. Vismo-2 kütle spektrumu.

3.3.4.4. Yöntem Optimizasyonu

Vismodegib ilgili maddeler yöntem geliştirilmesinde de hem YPSK hem de UYPSK cihazlarında deneme yapılmıştır. Bu çalışmalarda Çizelge 3.23'teki kolonlar ve Çizelge 3.24'teki hareketli faz A çözeltileri kullanılmıştır.

Çizelge 3.23. Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan kolonlar.

Kolon Türü	Uzunluğu, mm	İç Çapı, mm	Partikül Çapı, µm	Firma
Acquity BEH Phenyl	100	2,1	1,7	Waters
XBridge C8	150	3,0	3,5	Waters
Symmetry C8	150	4,6	3,5	Waters
Symmetry C18	250	4,6	3,5	Waters
Symmetry C18	250	4,6	5	Waters
Zorbax SB Phenyl	250	4,6	5	Agilent

Çizelge 3.24. Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli faz A.

Hareketli faz A (YPSK)	Hareketli faz A(UYPSK)
%0,1 o-H ₃ PO ₄	10 mM K ₂ HPO ₄ + 2,0 mL trietilamin (pH=2,2)
10 mM K ₂ HPO ₄ (pH=6,5)	2 g amonyum format (NH ₄ HCO ₂) +1,0 mL trietilamin (pH=4,5)
10 mM K ₂ HPO ₄ (pH=7,5)	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH=3,0)
10 mM KH ₂ PO ₄ (pH=4,5)	
10 mM KH ₂ PO ₄ (pH=4,0)	
10 mM KH ₂ PO ₄ (pH=3,0)	

Hem YPSK hem de UYPSK cihazında belli pH'larda fosfat tamponları ve farklı çözeltiler hareketli faz A olarak çalışılmıştır. Vismodegib, Vismo-1 ve Vismo-2 pK_a değerlerine göre tampon çözeltilerin pH'sı 3,0; 4,0 ve 4,5 olarak hazırlanmıştır. Hareketli faz B olarak hem asetonitril hem de metanol denenmiştir. Kolon seçiminde hidrofobik etkileşimin yanında, maddelerin özellikleri de göz önüne alınmıştır. Kolon sıcaklığı olarak 25 °C, 30 °C ve 40 °C; oto-örnekleyici olarak da 10 °C ve 15 °C sıcaklıkları denenmiştir. 200-400 nm arasındaki taramalarda 230 nm ve 254 nm dalga boylarındaki absorpsiyonlar en uygun gözlenmiştir. Etken madde derişimi 0,1 mg/mL; 0,5 mg/mL ve 1,0 mg/mL olarak denenmiştir.

Deneme çalışmalarında C8 ve C18 kolonlarına göre en iyi ayırım fenil kolon ile gözlenmiştir. pH'ı 3,0 olan 10 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi ile %0,1 o-H₃PO₄ çözeltisi en uygun hareketli faz A bulunmuştur. Ancak hazırlanma kolaylığı ve tampon çözeltinin iğnede çökme ihtimaline karşın hareketli faz A olarak %0,1 o-H₃PO₄ seçilmiştir.

Hareketli faz B için asetonitril ve metanol çalışılmış; zeminin daha iyi geldiği asetonitril seçilmiştir. Kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıklarından etkilenmediği için cihazın en sabit kalabileceği 30 °C ve 15 °C seçilmiştir.

YPSK cihazındaki analiz süresi uzun sürdüğü için UYPSK cihazında daha kısa bir gradient ile 0,3 mL/dk akış hızı ve 3,0 µL enjeksiyon hacmi ile parametreler optimize edilmiştir.

Tüm piklerin en iyi görüldüğü ve cihaz algılama sınırında 1,0 mg/mL

derişiminde Vismodegib etken maddesi ve 0,0015 mg/mL derişiminde Vismo-1 ile Vimo-2 ile çalışılmıştır. Yöntem parametreleri Çizelge 3.25 ve Çizelge 3.26'dadır.

Çizelge 3.25. Vismodegib ilgili maddeler en uygun yöntem parametreleri.

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters Acquity
Kolon Tipi	BEH Phenyl
Kolon Uzunluğu, Çapı, Partikül Boyutu	100 x 2,1 mm; 1,7µm
Akış hızı	0,3 mL/dk
Kolon sıcaklığı	30 °C
Numune sıcaklığı	15 °C
Çalışma dalga boyu	230 nm
Enjeksiyon Hacmi	3,0 µL
Analiz süresi	18 dk
Cihaz	UYPSK
Hareketli faz A	%0,1 o-H ₃ PO ₄
Hareketli faz B	Asetonitril
Çözücü	Metanol ve su karışımı (50:50, h/h)
Elüsyon	Gradient

Çizelge 3.26. Vismodegib ilgili maddeler gradient programı.

Zaman, dk	Hareketli faz A, %	Hareketli faz B, %
0	85	15
12	30	70
14	30	70
14.50	85	15
18	85	15

3.3.5. Vismodegib Miktar Tayini Yöntem Geliştirme ve Optimizasyonu

3.3.5.1. Çalışma Derişimi Seçimi

Vismodegib ilgili maddeler yöntem geliştirilmesi sırasında elde edilen verilen ışığında hareket edilmiştir. Miktar tayininde amaç sadece etken maddenin saf olarak diğer piklerden ayrılmasıdır. Bu nedenle; 0,025 mg/mL derişimdeki sonuçlar miktar tayini yöntemi için yeterli olmuştur.

3.3.5.2. Çözücü Sisteminin Seçimi

Çözücü sistemi olarak yöntem parametrelerine göre asetonitril ve su karışımı (50:50, h/h) seçilmiştir.

3.3.5.3. Çalışma Dalga Boyu Seçimi

Daha önceki yapılan 200-400 nm arası çalışmalarına göre 254 nm ve 230 nm en uygun dalga boyu olarak gözlenmişti. Miktar tayini yönteminde 254 nm daha iyi sonuçlar verdiği için çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir.

3.3.5.4. Yöntem Optimizasyonu

Vismodegib miktar tayini Waters Symmetry C18 (150 x 4.6 mm; 5µm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan %0,1 o-H₃PO₄ hareketli faz A; asetonitril de hareketli faz B olarak seçilmiştir. Kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıkları da aynı şekilde sırasıyla 30 °C ve 15 °C seçilmiştir. Elüsyon programı denemelerinde izokratik program ile ayırım sağlanabilmiştir. Buna göre yöntem parametreleri Çizelge 3.27'deki gibi bulunmuştur.

Çizelge 3.27. Vismodegib miktar tayini yöntemi.

Kromatografik Şartlar	
Kolon Markası	Waters Symmetry
Kolon Tipi	C18
Kolon Uzunluğu, Çapı, Partikül Boyutu	150 x 4,6 mm, 5,0µm
Akış hızı	1,0 mL/dk
Kolon sıcaklığı	30 °C
Numune sıcaklığı	15 °C
Çalışma dalga boyu	254 nm
Enjeksiyon Hacmi	20,0 mL
Analiz süresi	8 dk
Cihaz	YPSK
Hareketli faz A	%0,1 o-H ₃ PO ₄
Hareketli faz B	Asetonitril
Çözücü	Asetonitril ve su karışımı (50:50, h/h)
Elüsyon	İzokratik ; %60 hareketli faz A ve %40 hareketli faz B

3.4. Validasyon Çalışmaları

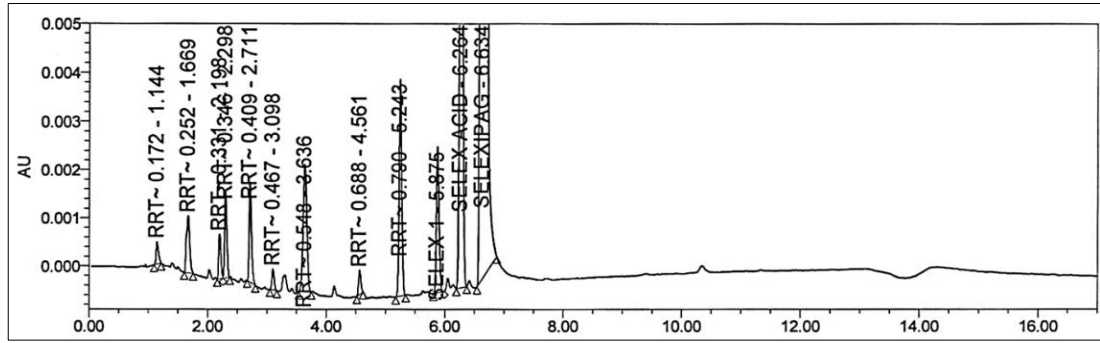
Optimize edilen tüm yöntemler için validasyon çalışmaları, ICH Q2(R1) kılavuzu rehber alınarak yapılmıştır.

3.4.1. Selexipag İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları

3.4.1.1. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi (SUT), kullanımdan önce kromatografik sistemin uygunluğunu ve geçerliliğini belirlemek için yapılan bir testtir. Bu amaçla; 0,25 mg/mL derişimde hazırlanan sistem uygunluk çözeltisi bir kez enjekte edilmiştir. Taşıma ihtimaline karşın sistem uygunluk çözeltisinden sonra iki kör çözeltisi daha enjekte edilmiştir. Daha sonra 0,25 mg/mL derişiminde Selexipag standart çözeltisinden altı enjeksiyon verilmiştir. Kabul kriterleri ise şu şekilde belirlenmiştir. Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramında Selexipag ve Selex-asit pikleri arasındaki ayırıcılık faktörü en az 2,5 olmalıdır ve altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Selexipag pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması %2,0'e eşit veya küçük olmalıdır.

Çalışma sonucunda sistem uygunluk çözeltisinde; Selex-asit ile Selexipag arasındaki ayırıcılık faktörü 4,3 ($\geq 2,5$) bulunmuştur (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. Selexipag ilgili maddeler sistem uygunluk kromatogramı

Altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Selexipag yüzde bağıl standart sapma (BSS) 1,1 ($\leq 2,0$) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.28).

Çizelge 3.28. Selexipag ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları.

Enjeksiyon No	Alanlar	Ayrıcılık Faktörü
1	3636	4,3
2	3515	
3	3555	
4	3555	
5	3567	
6	3561	
Ortalama	3565	
Standart Sapma	39,4	
%BSS	1,1	

3.4.1.2. Seçicilik

Bir yöntemin seçici olması için sistem uygunluk parametreleri sağlanmalı; ilaç etken maddesinin ve safsızlıkların pikleri kromatografik olarak birbirinden ayrılmalı ve de alıkonma zamanlarında kör çözeltiden herhangi bir pik gelmemelidir. Ek olarak, ilaç etken maddesi ve safsızlıkların pikleri spektral olarak da saf olmalıdır.

Deneyde yöntemin seçiciliği için kör çözeltisi, sistem uygunluk çözeltisi, 0,375 µg/mL spesifikasyon limit derişiminde tek tek safsızlıklar, spesifikasyon limit derişiminde safsızlık karışım çözeltisi, 0,25 µg/mL standart çözeltisi ve 0,25 mg/mL derişiminde numune çözeltisi verilmiştir.

Seçicilik validasyon parametresi sonuçlarına göre; kör çözeltisinden gelen herhangi bir pik, Selexipag ve safsızlık piklerinin alıkonma zamanında gözlenmemiştir. Selexipag ve safsızlık pikleri birbirinden kromatografik olarak tamamen ayrılmıştır.

Ayrıca Selexipag, Selex-1, Selex-asit ve Selex-asetil piklerinin saflık açıları, pik saflık eşiğinden düşük gözleendiği için spektral olarak da saf bulunmuştur. Bu nedenle geliştirilen Selexipag ilgili maddeler yöntemi seçici bulunmuştur.

Çizelge 3.29. Selexipag ilgili maddeler seçicilik sonuçları.

Bileşik	Limit, mak. %	RT, dk	RRT	R _s	N	k	α	Safılık Açısı	Safılık Eşiği
Selex-1	0,15	5,96	0,91	-	174261	4,96	-	1,875	2,617
Selex-asit	0,15	6,16	0,95	3,6	186778	5,16	1,04	2,293	3,199
Selexipag	–	6,52	1,00	5,9	168899	5,52	1,07	3,419	4,915
Selex-asetil	0,15	10,10	1,69	36,2	89679	9,09	1,65	0,520	1,138
Bilinmeyen Safsızlıklar	0,10	–	–	–	–	–	–	–	–
Toplam Safsızlık	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–

RT: Alıkonma zaman

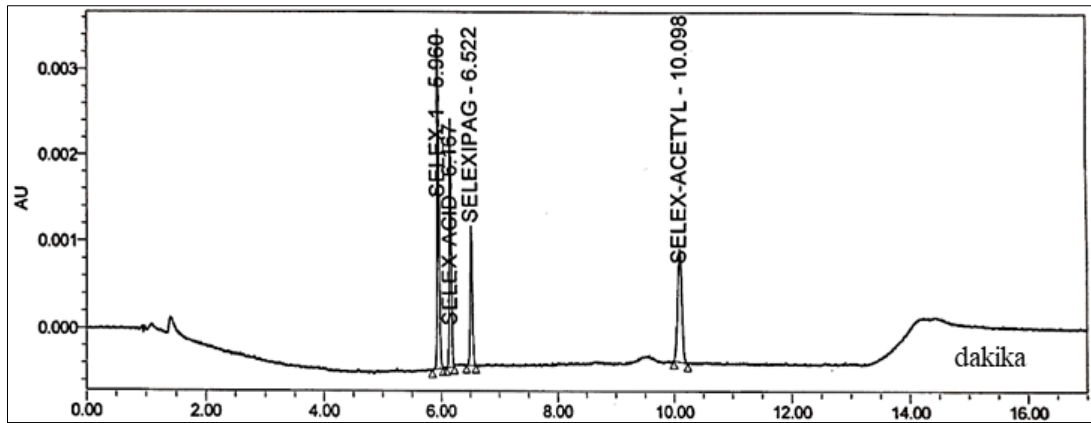
RRT: Bağlı Alıkonma Zamanı

R_s: Ayırıcılık faktörü

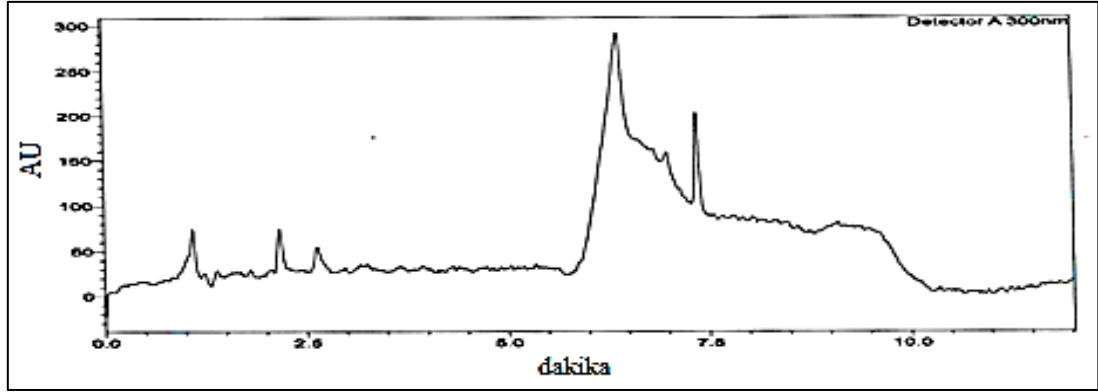
N: Teorik Tabaka Sayısı

k: Kapasite Faktörü

α : Seçicilik Faktörü



Şekil 3.38. Selexipag ilgili maddeler Selexipag ve safsızlık standartlarının limit derişimdeki karışım çözeltisinin kromatogramı.



Şekil 3.39. Kör çözelti kromatogramı.

3.4.1.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Doğrusallık, dedektörün analit derişimine verdiği tepkinin, doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafik üzerinde noktaların çizgi üzerinde veya çizgiye yakın konumlanmasıdır. Eğim (m), kesişim noktası (n), korelasyon katsayısı (r) ve artık kareler toplamı (RSS) doğrusallığı veren parametrelerdir.

Bu parametreler, ölçülen değerlere karşı analit derişiminin regresyon analizleriyle matematiksel olarak hesaplanır ve $y = mx + n$ denkleminde yerine yazılır.

İlgili maddeler yönteminde hem ilaç etken maddesinin ve hem de safsızlıklar için hesaplanan korelasyon katsayısı 0,99 ve üzerinde olmalıdır. Böylece cevap değerleri çizilen doğru üzerindedir ve doğrusallık sağlanmış olur.

Doğrusallığı belirlemek için stok çözeltiden en az beş farklı derişim hazırlanmalı ve analiz edilmelidir. Bu 5 değer ile doğrusallığı belirleme işlemi en az üç kez tekrarlanmalıdır. Ayrıca, regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %5'inden fazla olmamalıdır.

Selexipag, Selex-1, Selex-asit ve Selex-asetil referans standartlarının kalibrasyon eğrisini çizmek için; TAS ile spesifikasyon limitinin %50, %75, %100, %150, %200'üne karşılık gelen altı farklı derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır.

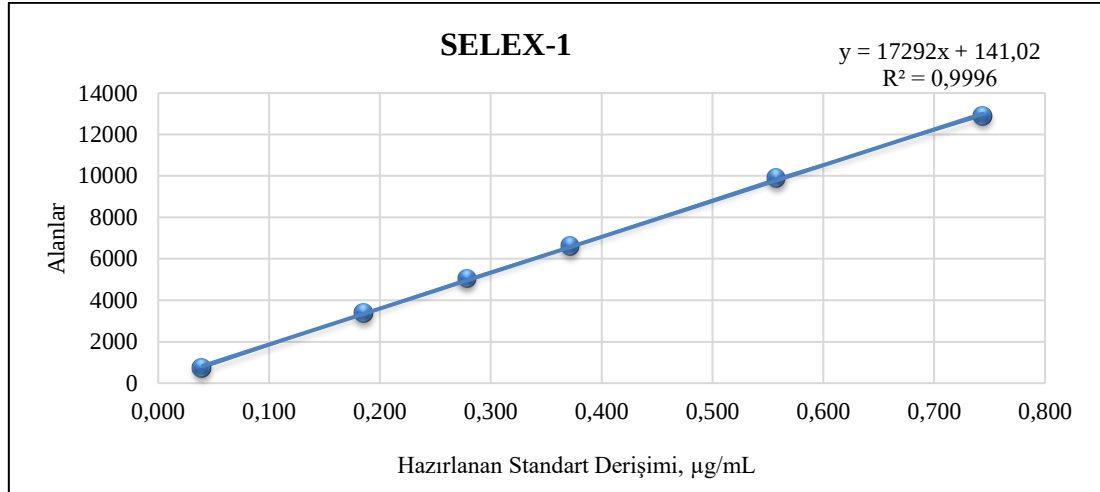
Her bir standart çözeltiden üçer enjeksiyon, minimum (TAS) ve maksimum (%200) seviyelerde altışar enjeksiyon verilmiştir.

Diğer bir validasyon parametresi çalışma aralığı, kalibrasyon eğrisinde belirlenebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan saptığı derişime kadar olan derişim aralığını kapsar. Çalışma aralığının kabul kriterlerine göre; minimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %10,0'dan fazla olmamalı; maksimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %5,0'den fazla olmamalıdır. Selexipag çalışma aralığı için doğrusallık çalışmasının minimum ve maksimum derişim alanları kullanılmıştır.

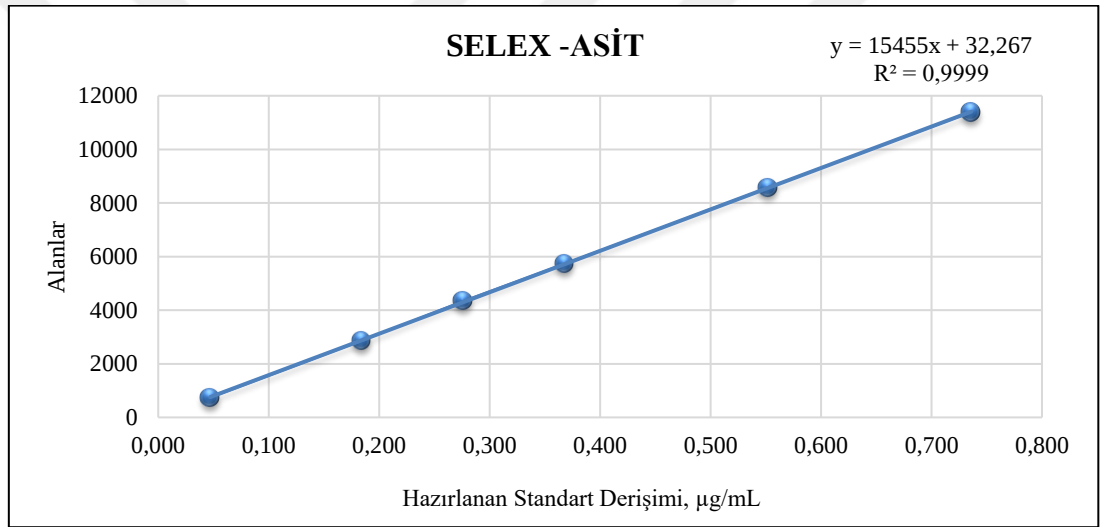
Doğrusallık için Microsoft Excel programı kullanılarak her derişime karşılık ortalama pik alanı ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir, korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çalışmaya göre; ilaç etken maddesi ve safsızlıklar için, derişime karşı dedektör yanıtının doğrusal olduğu bulunmuştur. Çalışma aralığı sonuçları; ilaç etken maddesi ve safsızlıklar için minimum derişim seviyelerindeki alanların bağıl standart sapması (BSS) %10,0'dan az; maksimum derişim seviyelerindeki alanların bağıl standart sapması (BSS) %5,0'den az bulunmuştur (Çizelge 3.30)

Çizelge 3.30. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve çalışma aralığı sonuçları.

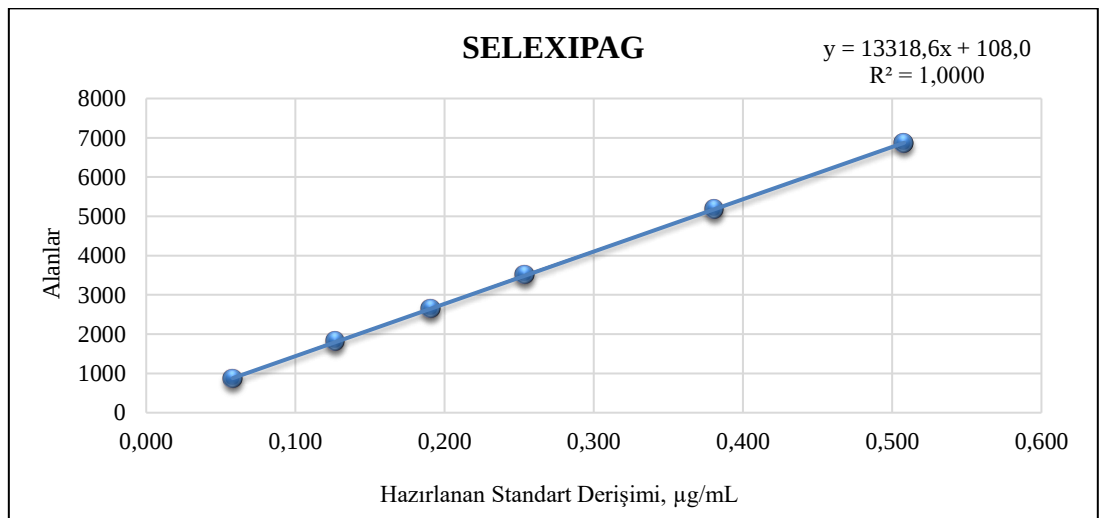
Bileşik	Derişim (µg/mL)	Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,99	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: ≤ 5,0%	Alan BSS, %	
					Min. derişim	Mak. derişim
Selexipag	0,058 - 0,508	1,0000	$y = 13319x + 108$	3,1	5,9	0,6
Selex-1	0,040 - 0,744	0,9996	$y = 17292x + 141$	2,1	5,0	0,2
Selex-asit	0,047 - 0,736	0,9999	$y = 15455x + 32$	0,6	6,5	0,2
Selex-asetil	0,109 - 0,764	0,9998	$y = 15606x + 56$	0,9	5,9	0,7



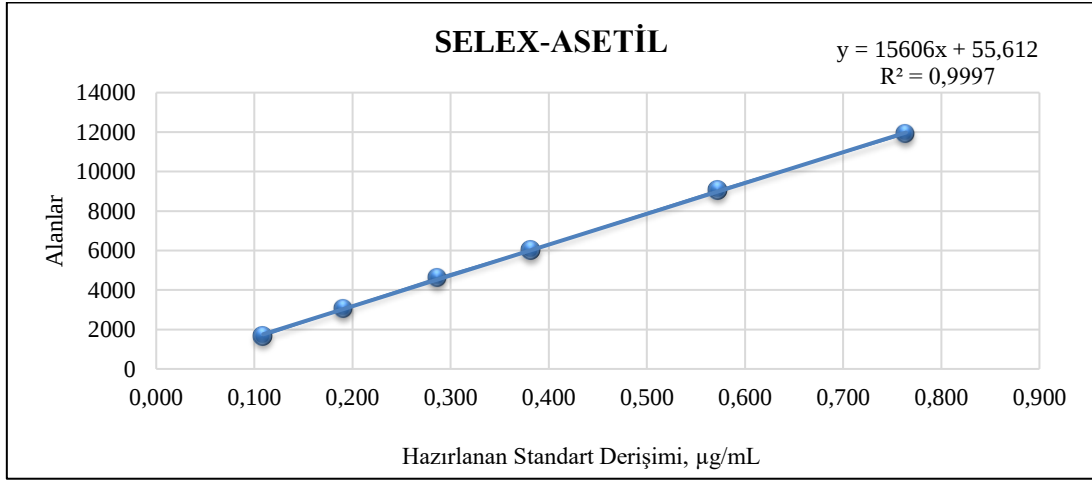
Şekil 3.40. Selex-1 standardı doğrusallık grafiği.



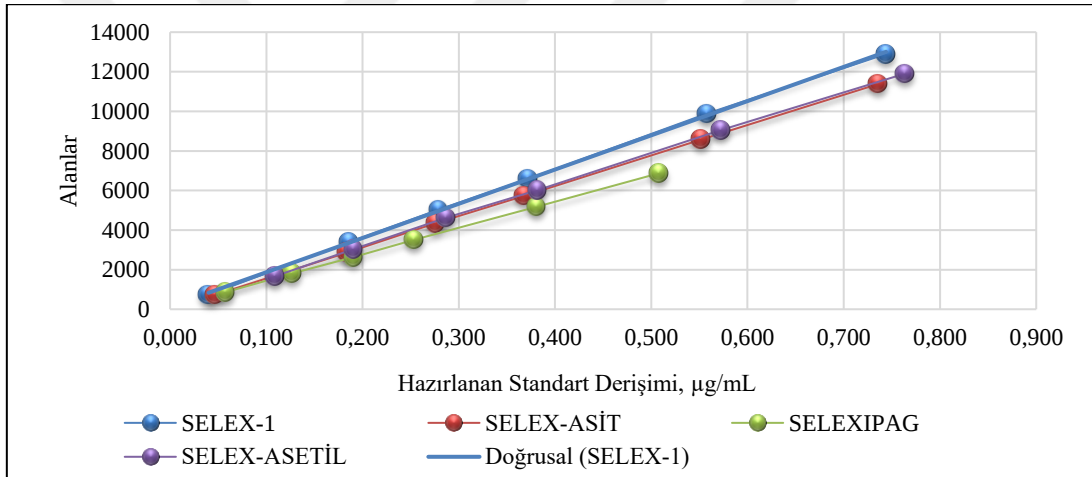
Şekil 3.41. Selex-asit standardı doğrusallık grafiği.



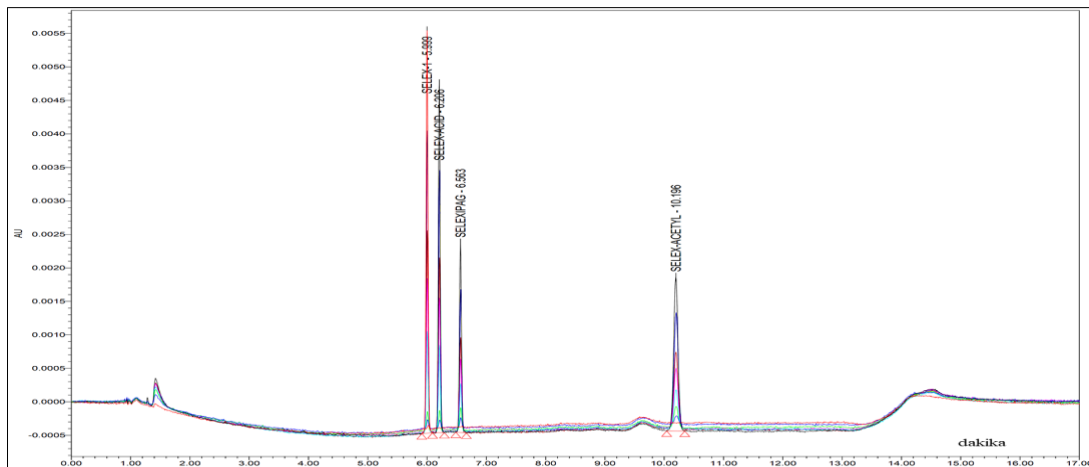
Şekil 3.42. Selexipag standardı doğrusallık grafiği.



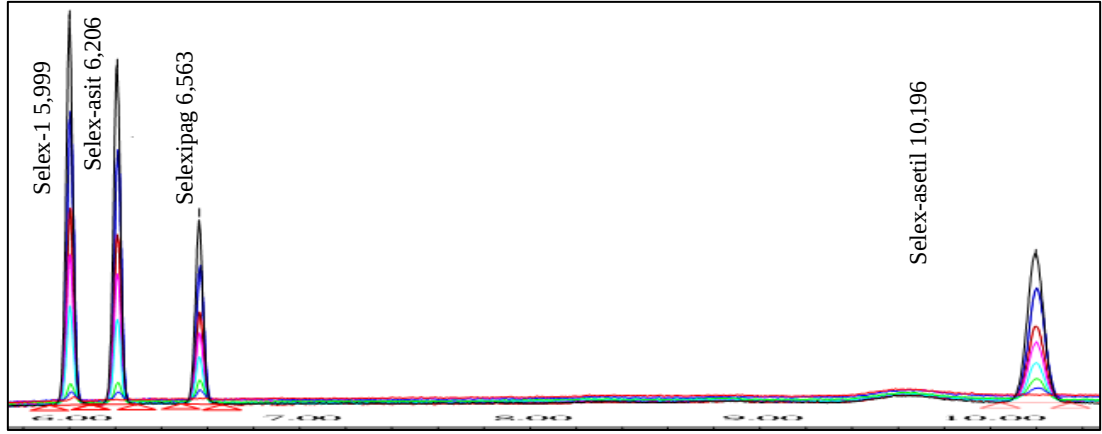
Şekil 3.43. Selex-asetil standardı doğrusallık grafiği.



Şekil 3.44. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri.



Şekil 3.45. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları-a.



Şekil 3.46. Selexipag ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları-b.

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

TAS, doğrusallık sınırları içinde kalmayan veya analiz edilen numunenin kabul edilebilir bir kesinlik ve doğruluk düzeyiyle ölçülebildiği en düşük doğrusallık derişimini oluşturan seviyedir. Doğrudan deneylerden veya hesaplama yoluyla bulunabilir. TS, analiz edilen numunenin görüldüğü; ancak nicel limitler dâhilinde olmadığı en düşük derişimdir. Doğrudan deneylerden veya hesaplama yoluyla bulunabilir.

Tez kapsamında TAS ve TS için kabul kriterleri şu şekildedir: TAS tüm safsızlıklar için raporlama seviyesinden büyük olmamalıdır. TAS derişiminde altı tekrarlı enjeksiyon için alanların %BSS'si 10 ve altında olmalıdır. TAS derişimde sinyal/gürültü oranı da 10 ve üzerinde; TS derişimde sinyal/gürültü oranı ise üç ve üzerinde olmalıdır.

Bu çalışmada, TAS ve TS derişimindeki standart çözeltileri, doğrudan deneylerden gözlemlenip, hesaplanmıştır. ICH Q2(R1)'e göre TAS için sinyal/gürültü oranının 10:1 olması gerekir. Bunun için; spesifikasyon derişiminde Selexipag ilaç etken maddesi standardı ve spesifikasyon limit derişiminde Selex-1, Selex-asit ve Selex-asetil safsızlıklarının standartlarını içeren karışım çözeltisi hazırlanmış ve altı kez enjekte edilmiştir. Böylece bilinen bir derişimdeki sinyal/gürültü oranından TAS

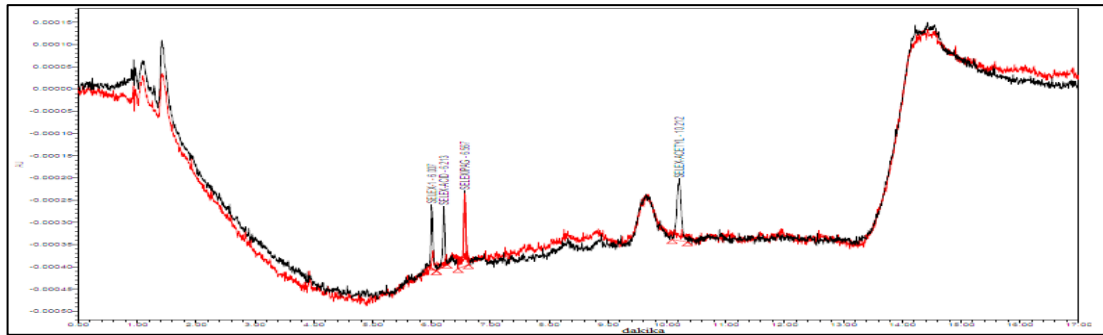
için gerekli 10:1 oranındaki derişim hesaplanmıştır [ICH Q2(R1)].

Hesaplamalar sonrasında TAS çözeltisini hazırlamak için 20 mL’lik balon jojeye 460,0 µL stok Selexipag standart çözeltisi, 215,0 µL stok Selex-1 standart çözeltisi, 255,0 µL stok Selex-asit standart çözeltisi, 570,0 µL stok Selex-asetil standart çözeltisi eklenmiştir. Ardından hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltisinden 0,5 mL alınarak 100 mL’lik baon jojeye seyreltilmiş ve çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. TS çözeltisi için de TAS çözeltisi 3,0 mL alınarak 10 mL’lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir. Çünkü ICH Q2(R1) rehberine göre TS çözeltisi derişimindeki sinyal/gürültü oranı 3:1 olmalıdır.

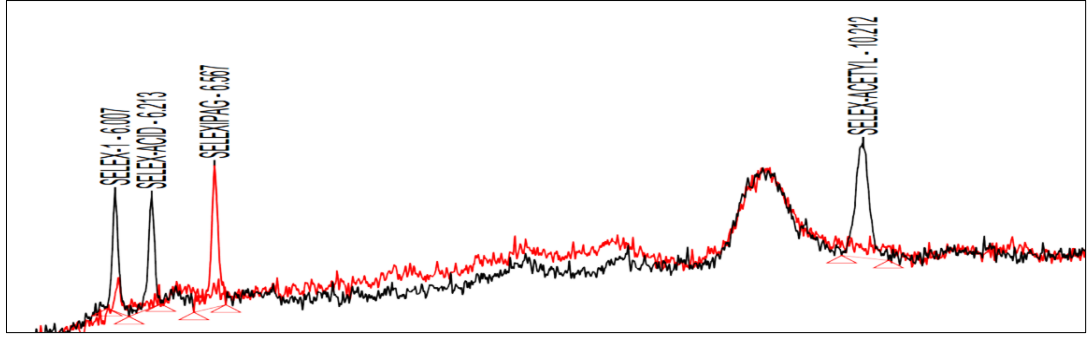
Tespit sınırı (TS) ve nicelik sınırı (TAS) sonuçları Çizelge 3.31’de verilmiştir.

Çizelge 3.31. Tespit sınırı (TS) ve nicelik sınırı (TAS) sonuçları.

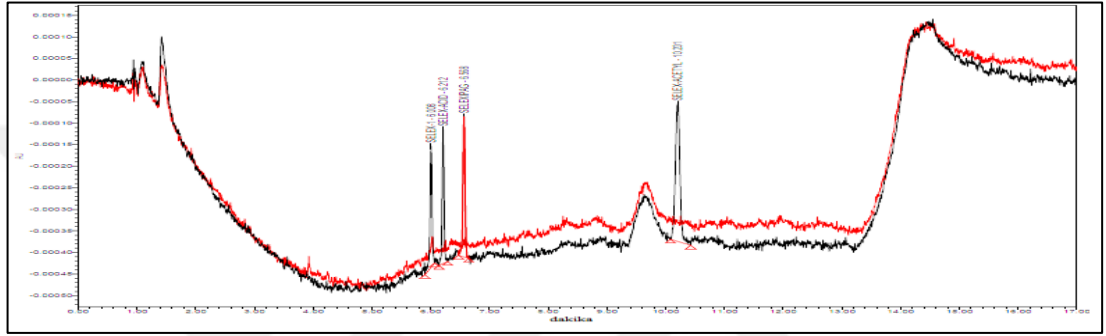
Bileşik	TS derişimleri		TAS derişimleri		S/N		RRF	Bağıl Alan Faktörü CRF
	µg/mL	%	µg/mL	%	TS Limit: ≥ 3	TAS Limit: ≥ 10		
Selexipag	0,0174	0,0048	0,058	0,0232	4	10	1,0	1,0
Selex-1	0,0120	0,0056	0,040	0,0160	4	10	1,5	0,68
Selex-asit	0,0141	0,0070	0,047	0,0188	5	11	1,1	0,92
Selex-asetil	0,0327	0,0131	0,109	0,0436	4	10	1,1	0,88



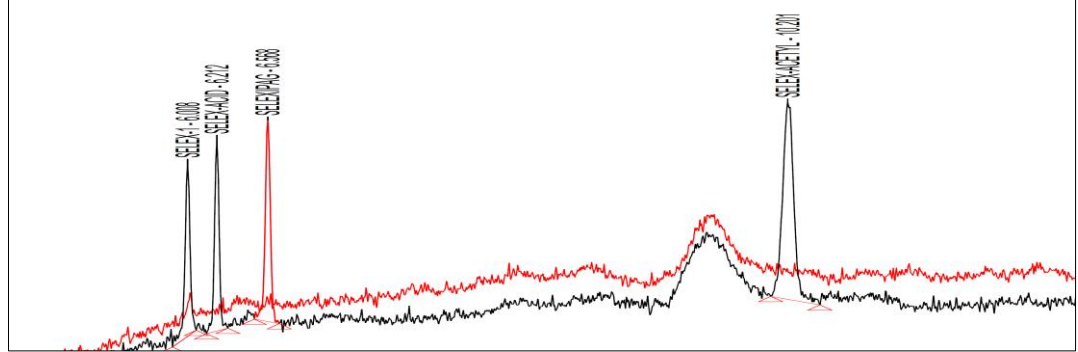
Şekil 3.47. Selexipag ilgili maddeler TS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış kromatogramı-a.



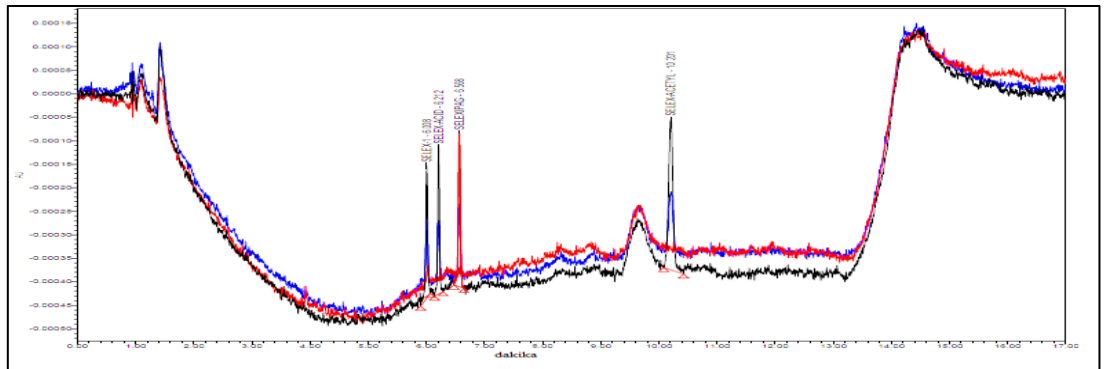
Şekil 3.48. Selexipag ilgili maddeler TS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış yakın kromatogramı-b.



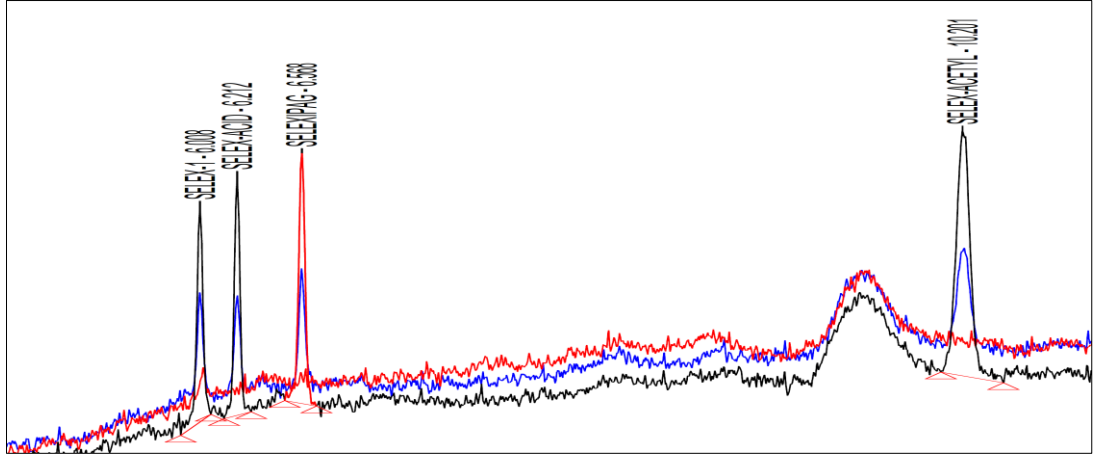
Şekil 3.49. Selexipag ilgili maddeler TAS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış kromatogramı-a.



Şekil 3.50. Selexipag ilgili maddeler TAS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış yakın kromatogramı-b.



Şekil 3.51. Selexipag ilgili maddeler TAS, TS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış kromatogramı-a.



Şekil 3.52. Selexipag ilgili maddeler TAS, TS ve kör çözeltilerin karşılaştırılmış yakın kromatogramı-b.

3.4.1.5. Doğruluk

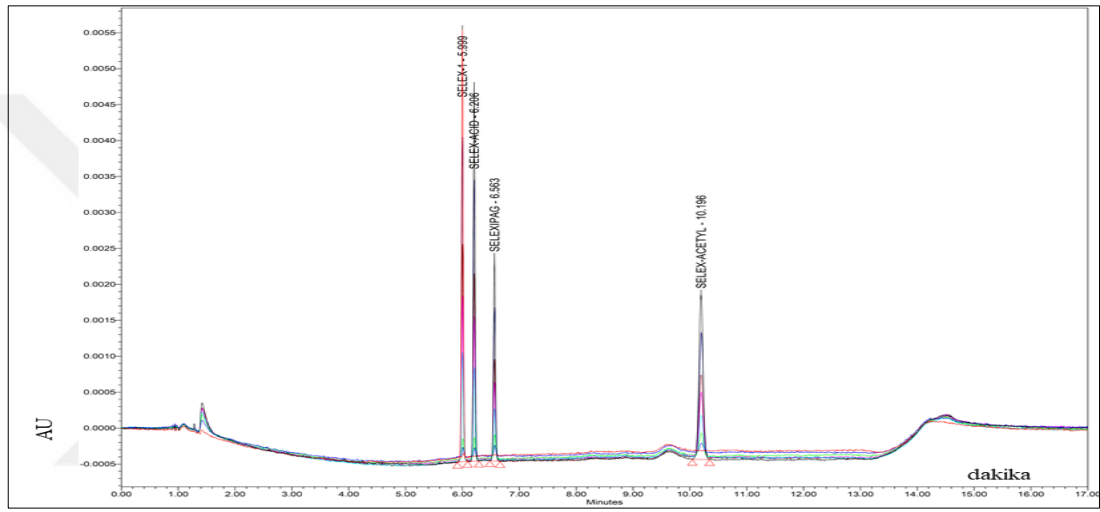
Analitik bir yöntemin doğruluğu, ölçülen değerin gerçek değere yakınlığını gösterir. Doğruluk yüzde geri kazanım olarak ifade edilir. Diğer bir deyişle, ortama eklenen analitin analiz edilen ortamdan ne ölçüde geri kazanılabileceğini gösterir. Bu doğrulama için kabul kriteri, ilaç etken maddenin ve her bir safsızlığın geri kazanımının %90,0 ile %110,0 arasında; TAS düzeyinde ise %70,0 ile %130,0 arasında olmasıdır.

Doğruluk çalışması için 2 numune çözeltisi ve spesifikasyon limit derişiminde hazırlanan safsızlık karışım çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Spesifikasyon limit derişimine göre %50, %100 ve %150 derişimlerinde olacak şekilde, safsızlıklar numuneye ilave edilmiştir. Her seviye için 3 numune hazırlanmış ve her birinden birer kez enjeksiyon verilmiştir. Numune TAS seviyesinden daha fazla Selex-1 ve Selex-asit içerdiğinden, bu safsızlıklar numuneye TAS derişiminde ekilmemiştir.

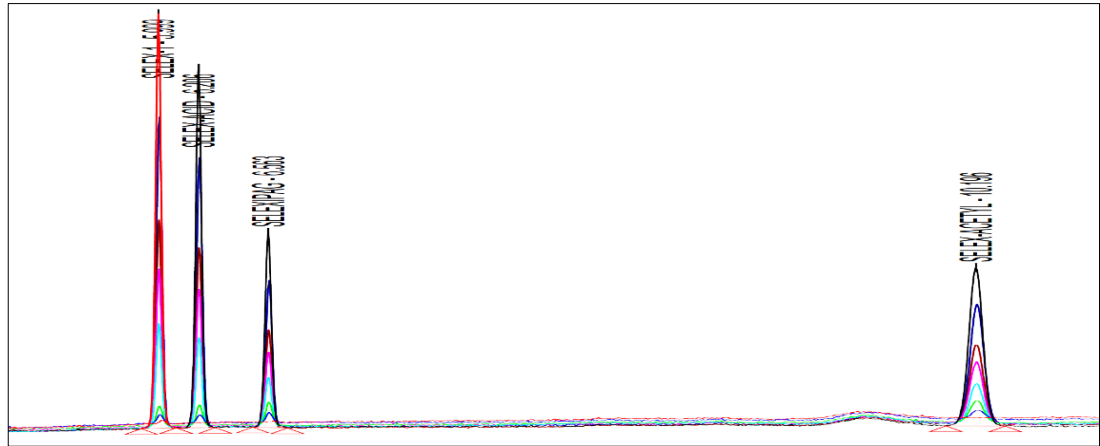
Doğruluk sonuçlarına göre geri kazanımların hepsi %90,0 ile %110,0 arasında bulunmuştur (Çizelge 3.32).

Çizelge 3.32. Doğruluk sonuçları çizelgesi.

Bileşik	Doğruluk (n=3)				
	Seviyeler, %	Derişim, %	Bulunan Derişim (Ortalama±SS, %)	BSS, %	Geri Kazanım, %
Selex-1	50	0,71	0,068±0,0006	0,88	96,3
	100	0,146	0,143±0,0006	0,42	98,1
	150	0,219	0,216±0,0006	0,28	98,8
Selex-asit	100	0,142	0,139±0,0000	0,00	97,9
	150	0,215	0,211±0,0006	0,28	98,1
Selex-asetil	TAS	0,057	0,057±0,0010	1,75	100,0
	50	0,074	0,074±0,0020	2,70	100,0
	100	0,152	0,152±0,0006	0,39	100,0
	150	0,226	0,225±0,0006	0,27	99,87



Şekil 3.53. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve kör çözeltilerin çakıştırılmış kromatogramı-a.



Şekil 3.54. Selexipag ilgili maddeler doğrusallık ve kör çözeltilerin çakıştırılmış yakın kromatogramı-b.

3.4.1.6. Kesinlik

Kesinlik, belirli koşullar altında aynı homojen numuneden birden fazla alınan ve gerçekleştirilen bir dizi ölçüm sonucunun arasındaki tutarlılıktır. Tez çalışmasında yöntem kesinliği ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır.

3.4.1.6.1. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliği için kabul kriterleri şu şekildedir: Numunedeki safsızlık oranı %0,1'den az ise %BSS' si değerlendirilmez. Safsızlık oranı %0,1 veya daha yüksek ise %BSS değeri 10'dan küçük olmalıdır. İkinci kabul kriteri için ise %95 güven aralığı hesaplanır.

Yöntem kesinliği çalışmasında numunede, Selex-1 ve Selex-asit miktarı yaklaşık %0,1 olarak bulunmuştur ve %BSS değerleri 10'un altında hesaplanmıştır. Numunede Selex-asetil miktarı %0,1'den ($>0,015$) az olduğu için %BSS değeri hesaplanmamıştır. Kabul kriterlerine göre değerlendirilmemiştir. Selex-1 ve Selex-asit için %BSS sırasıyla 1,79 (<10) ve 2,86 (<10) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.34).

3.4.1.6.2. Tekrar Üretilirlik (Laboratuvarlar Arası)

Tekrar üretilebilirlik, aynı yöntemde, farklı bir laboratuvar, farklı bir cihazda, farklı bir kolonda ve farklı günlerde yapılan bir kesinlik çalışmasıdır. Bu parametre için yöntem kesinliğinde kullanılan aynı Selexipag şarjından altı farklı numune hazırlanmıştır. Yöntem kesinliği kabul kriterlerini karşılamalıdır ve iki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki fark raporlanmalıdır (Çizelge 3.33). Kabul kriterleri ICH Q2(R1) yönergesi esas alınarak, Deva Holding A.Ş. Ar-Ge tarafından düzenlenen SOP (Standart Operasyon Prosedürü)' den alınmıştır.

Çizelge 3.33. Selexipag ilgili maddeler kesinlik sonuçları.

İki kesinlik çalışmasının ortalama arası farkı	%BSS
0,1<	Değerlendirilmez
0,10-0,20	$\leq \pm 0,05$
0,20-0,50	$\leq \pm 0,10$
0,50-1,0	$\leq \pm 0,20$

Tekrar üretilebilirlik sonuçları kabul kriterlerine uygun bulunmuştur (Çizelge 3.34).

Çizelge 3.34. Selexipag ilgili maddeler kesinlik sonuçları.

Bileşik	Yöntem Kesinliği (n=6)		Tekrar Üretilebilirlik (n=6)		Fark, %
	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	
Selex-1	0,06 $\pm$ 0,001	1,79	0,05 $\pm$ 0,020	3,70	0,002
Selex-asit	0,07 $\pm$ 0,002	2,86	0,06 $\pm$ 0,001	1,67	0,010

3.4.1.7. Sağlamlık

Bu validasyon parametresinde; yöntem parametrelerinde planlı, küçük ve önemli değişiklikler yapılır. Böylece yöntemin bu değişikliklere duyarlılığı test edilir. Bu sayede analiz sonucunu etkileyebilecek parametreler ve en uygun yöntem koşulları belirlenir. Bunun için farklı kolon kullanımı, akış hızının ± 10 değişimi, kolon sıcaklığında ± 10 °C değişim ve hareketli fazda pH ayarlama varsa ± 10 pH değişimi gibi değişiklikler yapılabilir.

Bu çalışmadaki kabul kriteri; sistem uygunluk kabul kriterleridir. Sağlamlık validasyon parametresi için sisteme; sistem uygunluk çözeltisi, yine taşıma ihtimaline karşılık iki kör çözeltisi, standart çözeltisi ve spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Her değişiklik parametresi için aynı batch oluşturulmuş ve analiz edilmiştir.

Sağlamlık çalışmalarına göre yöntem küçük değişikliklerden etkilenmemiştir (Çizelge 3.35).

Çizelge 3.35. Selexipag ilgili maddeler sağlamlık analizi sonuçları.

Şartlar	Ayırıcılık Faktörü	%BSS
Normal Şartlar	5,5	2,07
Kolon Akışı : 0,31 mL/dk	5,7	1,67
Kolon Akışı : 0,35 mL/dk	5,3	1,14
Kolon Sıcaklığı: 27 °C	5,6	2,07
Kolon Sıcaklığı: 33 °C	5,5	1,8

3.4.1.8. Çözelti Kararlılığı

Doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için numunelerin ve standartların kararlılığının belirli bir süre muhafaza edilmesi gerekir. Bunun için optimize edilmiş bir yöntemle farklı zaman dilimlerinde kararlılık çalışmaları yapılmalıdır. Kararlılık çalışması için kabul kriterleri şu şekildedir: Başlangıç koşullarındaki alanlara göre, standart alanın değışimi %5'ten; numunedeki safsızlık pik alanlarındaki değışiklik %10'dan fazla olmamalıdır.

Sisteme; spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren standart çözeltisi ve numune çözeltisi verildi. 48 saat boyunca farklı zaman aralıklarında analiz edilmiştir.

Kararlılık çalışması sonucu standart çözeltisi 48 saat kararlıdır ve pik alanları arasındaki fark %0,2–9,9 ($\leq$ %5,0) aralığında bulunmuştur. Numune çözeltisi de 48 saat kararlı ve numune içindeki safsızlıkların pik alanları arasındaki fark $<$ %10,0 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.36).

Çizelge 3.36. Selexipag ilgili maddeler çözelti kararlılığı sonuçları.

Zaman	Selex-1		Selex-asit		Selex-asetil		Selexipag Std.	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	9506	-	8855	-	6688	-	3615	-
2. Saat	9493	0,1	8889	0,4	6803	1,3	3732	3,2
4. Saat	9469	0,4	8854	0,0	6838	1,7	3731	3,2
6. Saat	9435	0,7	8888	0,4	6868	2,0	3653	1,1
8. Saat	9448	0,6	8923	0,8	6785	1,1	3624	0,2
10. Saat	9415	1,0	8921	0,7	6838	1,7	3593	0,6
14. Saat	9477	0,3	8912	0,6	6666	0,2	3475	3,9
18. Saat	9447	0,6	8949	1,1	6789	1,1	3366	6,9
20. Saat	9446	0,6	8920	0,7	6826	1,6	3434	5,0
24. Saat	9434	0,8	8932	0,9	6687	0,0	3431	5,1
30. Saat	9377	1,4	8883	0,3	6710	0,2	3401	5,9
36. Saat	9436	0,7	8996	1,6	6718	0,3	3325	8,0
40. Saat	9494	0,1	8997	1,6	6861	2,0	3257	9,9
48. Saat	9494	0,1	9103	2,8	6742	0,6	3297	8,8

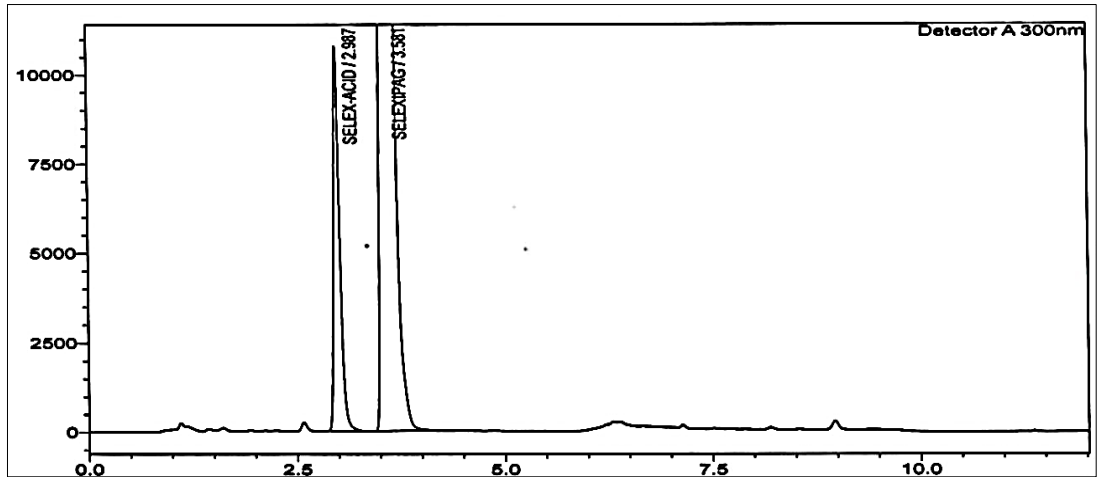
3.4.2. Selexipag Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları

3.4.2.1. Sistem Uygunluk Testi

Miktar tayini için sistem uygunluk validasyon çalışmasının kabul kriterleri şu şekildedir: Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramındaki Selexipag ve Selex-asite bağlı pikler arasındaki ayırıcılık faktörü en az 2,5 olmalıdır. Altı enjeksiyon tekrarlı standart çözeltisinden elde edilen Selexipag pik alanlarının %BSS' si $\leq 0,85$ olmalıdır.

Sisteme belirlenen 0,25 mg/mL derişiminde sistem uygunluk çözeltisi bir kez enjekte edilmiştir. Taşıma ihtimaline karşın sonrasında sisteme iki kör çözeltisi verilmiştir. Ardından 0,25 µg/mL derişiminde Selexipag standart çözeltisi altı tekrarlı şekilde enjekte edilmiştir.

Sistem uygunluk sonucunda, çözeltisinin kromatogramında Selex-1 piki ile Selexipag piki arasındaki ayırıcılık faktörü 3,8 ($\geq 2,5$) bulunmuştur. Altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Selexipag pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) 0,01 ($\leq 0,85$) olarak bulunmuştur.



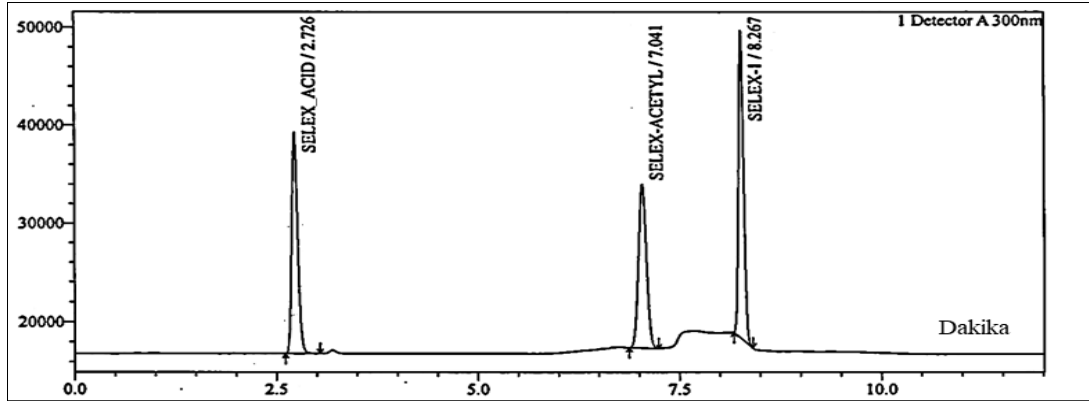
Şekil 3.55. Selexipag miktar tayini sistem uygunluk kromatogramı.

3.4.2.2. Seçicilik

Bir yöntemin seçici olması için ilgili maddelerde de belirtildiği gibi hem kromatografik hem spektral açıdan saf olması gerekir. Bu nedenle; ilaç etken maddenin kromatografik olarak ayrılması ve alıkonma zamanı boyunca kör çözeltiden veya herhangi bir safsızlıktan altında pik gelmemesi gerekir. Ayrıca; ilaç etken maddesi spektral olarak da saf olmalıdır.

Yöntemin seçiciliği için kör çözeltisi, sistem uygunluk çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde safsızlık karışım çözeltisi, standart çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Spektral safsızlık için PDA dedektöründe 200-400 nm arasında çalışma yapılmıştır.

Seçicilikte, Selexipag'ın alıkonma zamanında, kör çözeltiden ve safsızlıklardan herhangi bir pik etken pikinin altında gözlenmemiştir. Saflık açısı değeri, saflık eşiği değerinden daha küçük bulunmuştur. Bu nedenle; Selexipag miktar tayini yöntemi spektral olarak da seçici bulunmuştur.



Şekil 3.56. Selexipag miktar tayini limit derişimde safsızlık standartlarının karışım çözeltisi.

Çizelge 3.37. Selexipag miktar tayini pik saflığı sonuçları.

Bileşik	RT, dk	RRT	R _s	Saflık Açısı	Saflık Eşği
Selex-asit	2,71	0,85	–	–	–
Selexipag	3,19	1,00	3,4	0,999998	0,993733
Selex-asetil	7,04	2,21	25,2	–	–
Selex-1	8,26	2,59	7,5	–	–
Diğer safsızlıklar	–	–	–	–	–
Toplam bilinmeyen safsızlıklar	–	–	–	–	–

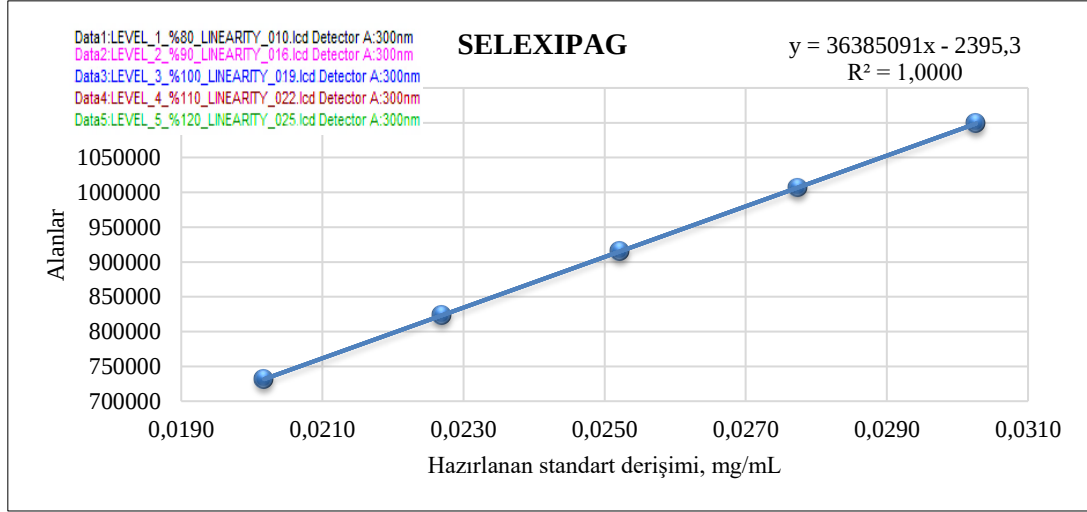
3.4.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Miktar tayini yönteminde eğer korelasyon katsayısı (r) 0,999 ve üzerinde ise cevap değerleri çizilen doğru üzerindedir ve doğrusallık sağlanmıştır. Ayrıca regresyon çizgisinin kesişimi (n), %100 seviyedeki standart derişiminden elde edilen alanın %2'den fazla olmamalıdır. Doğrusallık validasyon parametresi için, 0,025 mg/mL numune çözeltisi derişiminde standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu standart çözeltiden %80 seviyesi için 16,0 µL, %90 seviyesi için 18,0 µL, %100 seviyesi için 20,0 µL, %110 seviyesi için 22,0 µL, %120 seviyesi için 24,0 µL sisteme enjeksiyon verilmiştir. Her seviyeden üçer enjeksiyon, minimum (%80) ve maksimum (%120) seviyelerden de altışar enjeksiyon yapılmıştır.

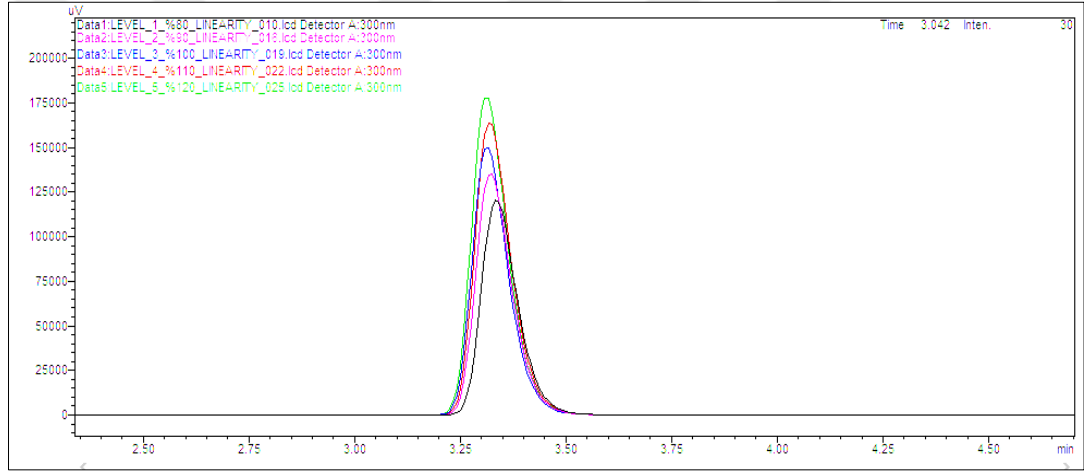
Doğrusallık çalışmasının sonucuna göre Selexipag derişimleri ile dedektör sinyalleri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Çalışma aralığının kabul kriterleri ve minimum ve maksimum derişim seviyelerinde alanların yüzde bağıl standart sapması (%BSS) 2,0'den az bulunmuştur. Çalışma aralığı için, doğrusallık çalışmasında kullanılan minimum ve maksimum derişimlere sahip standart çözeltileri kullanılmıştır. Doğrusallık çalışmasından elde edilen verilere göre, numune derişiminin %80 ile %120 aralığı, Selexipag için nicel çalışma aralığı olarak uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.38. Selexipag miktar tayini doğrusallık sonuçları.

Seviye	Derişim (µg/mL)	Korelasyon Katsayısı (r) Limit: $\geq 0,999$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan) (%) Limit: $\leq 2,0\%$	Alan BSS (%)	
					Min. derişimi	Mak. derişimi
%80	0,02018	1,0000	$y=36385091x - 2395,3$	0,26	0,034	0,015
%90	0,02270					
%100	0,02522					
%110	0,02774					
%120	0,03026					



Şekil 3.57. Selexipag miktar tayini Selexipag standardının doğrusallık grafiğı.



Şekil 3.58. Selexipag miktar tayini çıkıştırılmış doğrusallık kromatogramları.

3.4.2.4. Doğruluk

Doğruluk çalışması için numune derişimine karşılık gelen %80, %100 ve %120 seviyelerinde Selexipag çözeltilileri hazırlanmıştır. Her seviye için üç ayrı numune hazırlanmış ve her birinden ikişer kez enjeksiyon verilmiştir. Kabul kriteri; her bir geri kazanımın %98,0 - %102,0 arasında olmasıdır.

Doğruluk çalışmalarında her bir geri kazanım, istenilen %98,0 ve %102,0 geri kazanım aralığında bulunmuştur.

Çizelge 3.39. Selexipag miktar tayini doğruluk sonuçları.

Seviye, %	Derişim, mg/mL	Hesaplanan Derişim, mg/mL	BSS, %	Geri Kazanım, %	Bağıl Hata
80	0,01994	0,01988	0,14	99,7	0,3
	0,01984	0,01981		99,8	0,2
	0,01994	0,01986		99,6	0,4
100	0,02493	0,02478		99,4	0,6
	0,02483	0,02469		99,5	0,5
	0,02483	0,02466		99,3	0,7
120	0,02971	0,02983		100,4	0,4
	0,03001	0,02982		99,4	0,6
	0,02991	0,02979		99,6	0,4

3.4.2.5. Kesinlik

3.4.2.5.1. Sistem Kesinliği

Bu kesinlik parametresinde, Selexipag standart çözeltisinin altı tekrarlı enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır. Bu nedenle; %100 derişimindeki standart çözeltisinden altı tekrarlı enjeksiyon verilmiştir.

3.4.2.5.2. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliğinin kabul kriterleri için; numunelerin altı tekrarlı enjeksiyonundan elde edilen sonuçların yüzde bağıl standart sapması da (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır ve %95 güven aralığı hesaplanmalıdır.

Yöntem kesinliği için system kesinliğinde kullanılan aynı Selexipag şarjından altı farklı numune hazırlanmıştır. Her birinden de ikişer enjeksiyon yapılmıştır.

3.4.2.5.3. Tekrar Üretilirlik

Bu kesinlik parametresi için kabul kriterleri şu şekilde olmalıdır: Altı tekrarlı enjeksiyon numunesi sonucunun yüzde bağıl standart sapması (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır ve %95 güven aralığı hesaplanmalıdır. Ayrıca, iki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki farkın da 2,0'den az olması gerekir.

Tüm kesinlik sonuçları istenilen kabul kriterlerine uygun bulunmuştur (Çizelge 3.40).

Çizelge 3.40. Selexipag miktar tayini kesinlik sonuçları.

Bileşik	Alıkonma Zamanı, dk	Selexipag miktarı, %	
		Kromatografik	Susuz ve solventsiz
Selexipag	3,300	102,9	103,3
BSS (%)		0,9	0,9
%95 Güven Aralığı		101,2-103,1	101,5-103,4

3.4.2.6. Sağlamlık

Bu parametre için sisteme; sistem uygunluk çözeltisi ve yine taşıma ihtimaline karşın iki tekrarlı kör çözeltisi enjekte edilmiştir. Ardından standart çözeltisinden altı tekrarlı enjeksiyon verilmiştir. Kabul kriteri olarak sistem uygunluk şartları sağlanmalıdır.

Sağlamlık çalışmalarına göre, yöntem küçük değişikliklerden etkilenmemiştir.

Çizelge 3.41. Selexipag miktar tayini sağlamlık sonuçları.

ŞARTLAR	RT	%BSS	Ayrıcılık faktörü
Normal Şartlar	2,968	0,69	2,7
Kolon sıcaklığı 44 °C	2,944	0,09	2,5
Kolon sıcaklığı 36 °C	2,924	0,11	2,5
Kolon akışı 1,3 mL/dk	3,210	0,39	2,5
Kolon akışı 1,1 mL/dk	2,727	0,67	2,7
pH 7,4	3,293	0,07	2,9
pH 7,6	3,171	0,13	2,9

3.4.2.7. Çözelti Kararlılığı

Çözelti kararlılığı için numune çözeltisi hazırlandı ve 25 °C’de 48 saat analiz edilmiştir. Bu validasyon parametresi için ilk numune alanı ile farklı zaman periyotlardaki numune alanları arasındaki farkın %2’den fazla olmaması kabul kriteridir.

Kararlılık sonucuna göre de standart ve numune çözeltileri 48 saat kararlıdır.

Çizelge 3.42. Selexipag miktar tayini çözelti kararlılığı sonuçları.

Zaman	SELEXIPAG	
	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	934582	-
2. Saat	937086	0,3
4. Saat	934966	0,0
6. Saat	936828	0,2
8.Saat	936830	0,2
10.Saat	938220	0,4
12.Saat	939651	0,5
20.Saat	942053	0,8
28.Saat	944474	1,1
36.Saat	952192	1,9
44.Saat	949893	1,6
48.Saat	951300	1,8

3.4.3. Vismodegib İlgili Maddeler Validasyon Çalışmaları

3.4.3.1. Sistem Uygunluk Testi

Altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Vismodegib pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması %2,0’e eşit veya küçük olmalıdır. Bunun yanında iyi bir ayırım için ve kolon verimliliğinin ölçüsü için teorik tabaka sayısının (N)’nin en az 2000 olması gerekir.

Sistem uygunluk çalışması için verilen altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Vismodegib yüzde bağıl standart sapma (BSS) 0,44 ($\leq$

2,0) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.43).

Çizelge 3.43. Vismodegib ilgili maddeler sistem uygunluk %BSS sonucu.

Enjeksiyon No	Alanlar
1	32127
2	31937
3	31884
4	32005
5	31798
6	32157
Ortalama	31985
Standart Sapma	139,73
%BSS	0,44

Çizelge 3.44. Vismodegib ilgili maddeler sistem uygunluk sonuçları.

Bileşik	Limit, mak. %	RT, dk	RRT	R _s	N	α
Vismodegib	-	6,377	-	2,36	57662	1,051
Vismo-2	0,15	1,604	0,25	-	14286	-
Vismo-1	0,15	2,960	0,46	20,14	23036	3,242
Vismo-3	0,15	11,26	1,77	43,79	310347	1,913
Vismo-4	0,15	12,61	1,98	16,32	314220	1,133
Bilinmeyen Safsızlıklar	0,10	6,095	0,959	40,33	106526	2,596
Toplam Safsızlık	0,5	-	-	-	-	-

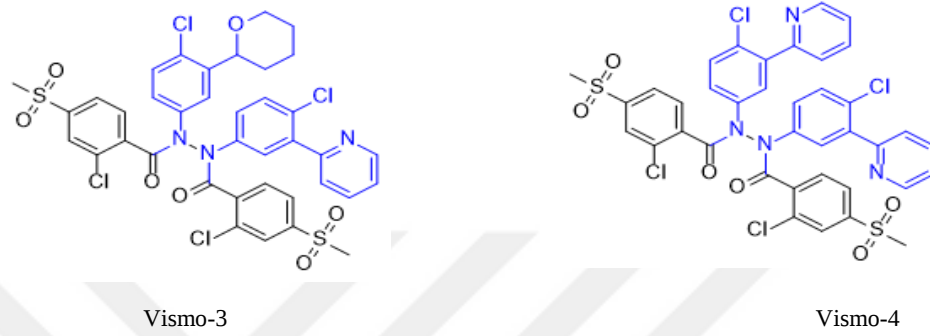
3.4.3.2. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için kör çözeltisi, 1,5 µg/mL spesifikasyon limit derişiminde Vismo-1 ve Vismo-2, 15 µg/mL HBTU; bu derişimlerde safsızlık karışım çözeltisi, 1,0 µg/mL standart çözeltisi, 1,0 µg/mL derişiminde numune çözeltisi, spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı ilaveli standart çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı ilaveli numune çözeltisi enjekte edilmiştir.

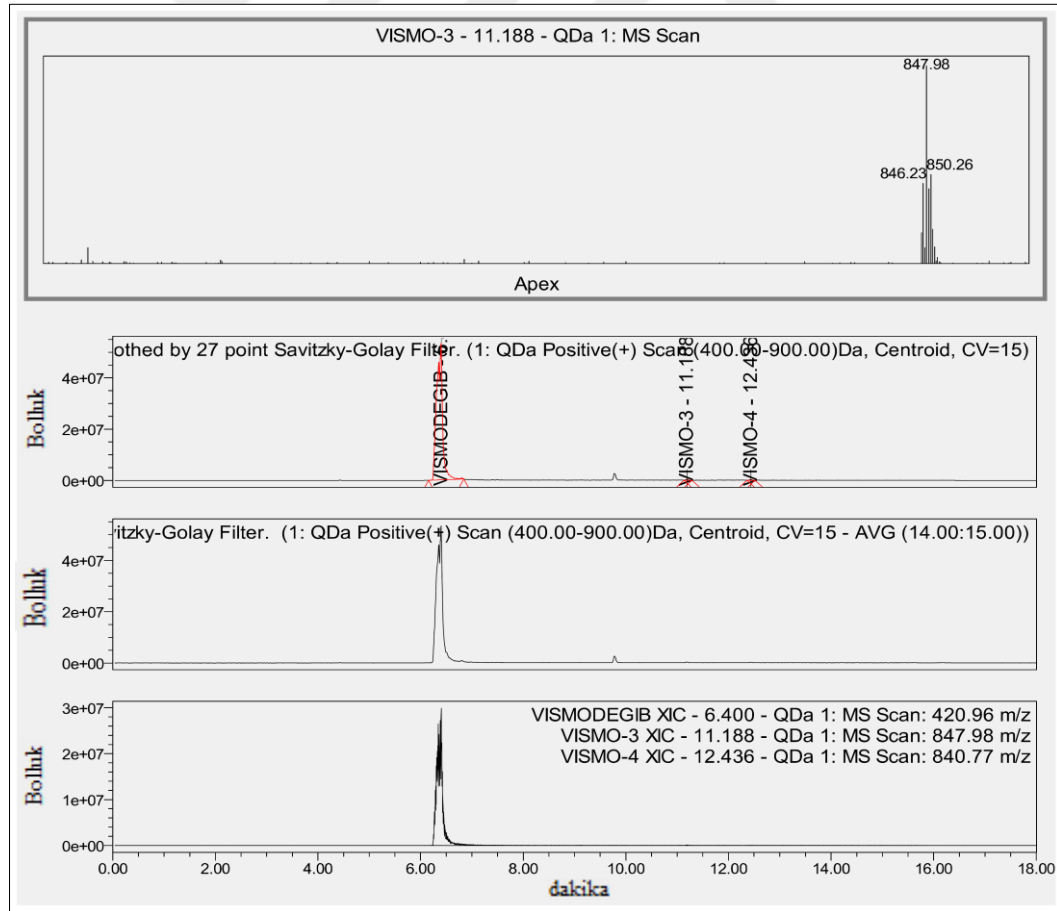
Seçicilik validasyon parametresi sonuçlarına göre; kör çözeltisinden gelen herhangi bir pik, Vismodegib ve safsızlık piklerinin alıkonma zamanında gözlenmemiştir. Vismodegib ve safsızlık pikleri birbirinden kromatografik olarak tamamen ayrılmıştır. Ayrıca Vismodegib, Vismo-1 ve Vismo-2 piklerinin saflık açıları, pik saflık eşliğinden düşük gözlendiği için spektral olarak da saf bulunmuştur. Bu nedenle geliştirilen Vismodegib ilgili maddeler yöntemi seçici bulunmuştur.

Kromatogramın sonunda bilinmeyen iki pik gelmiştir. Bu pikleri tanımlamak

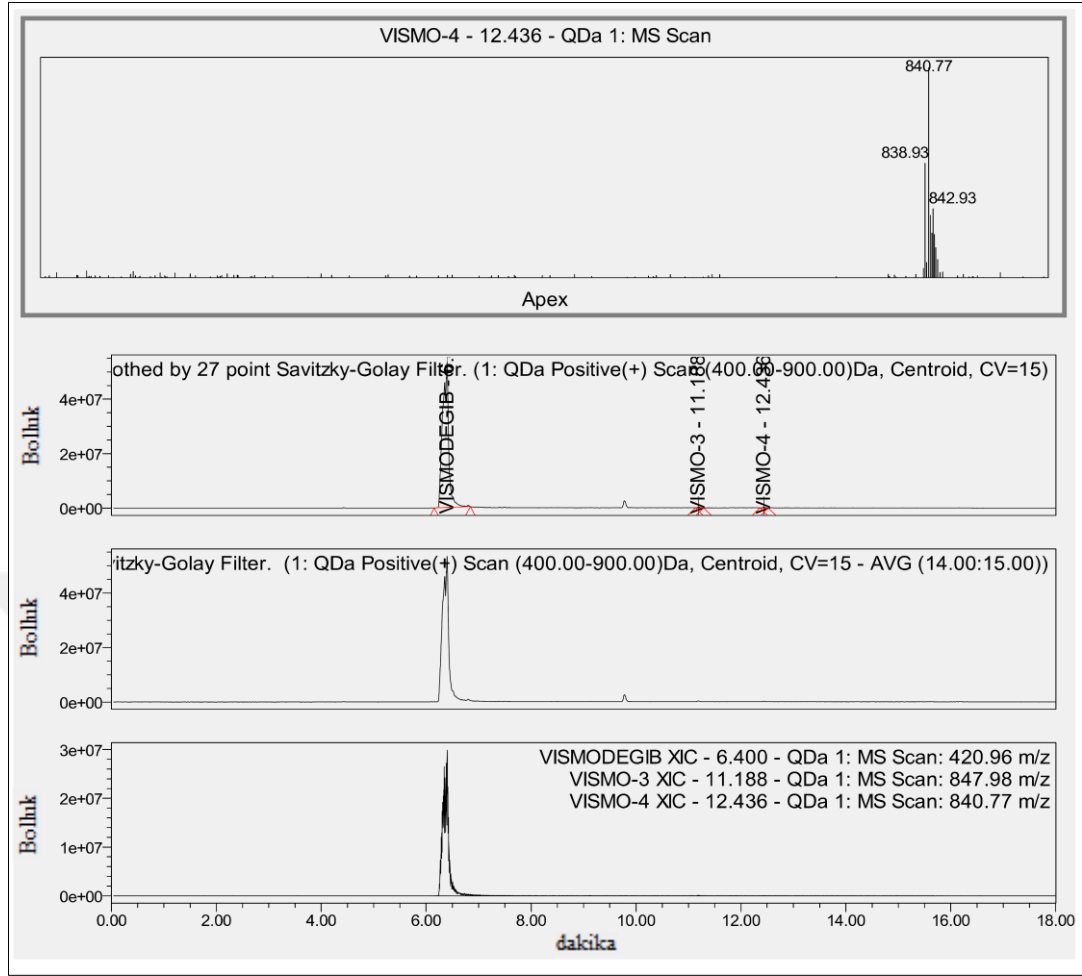
için tekrardan kütle spektroskopisi çalışması yapılmıştır. Piklerin alıkonma zamanında gelen m/z değerlerine bakıldığında (Şekil 3.60 ve Şekil 3.61) etken maddenin dimerleşmesi sonucu oluşan safsızlıklar olduğu görülmüştür. Bu safsızlıklara Vismo-3 ve Vismo-4 ismi verilmiştir (Şekil 3.59). Bu piklerde hem kromatografik hem de spektral olarak saf bulunmuştur.



Şekil 3.59. Vismo-3 ve Vismo-4 molekül şekli.



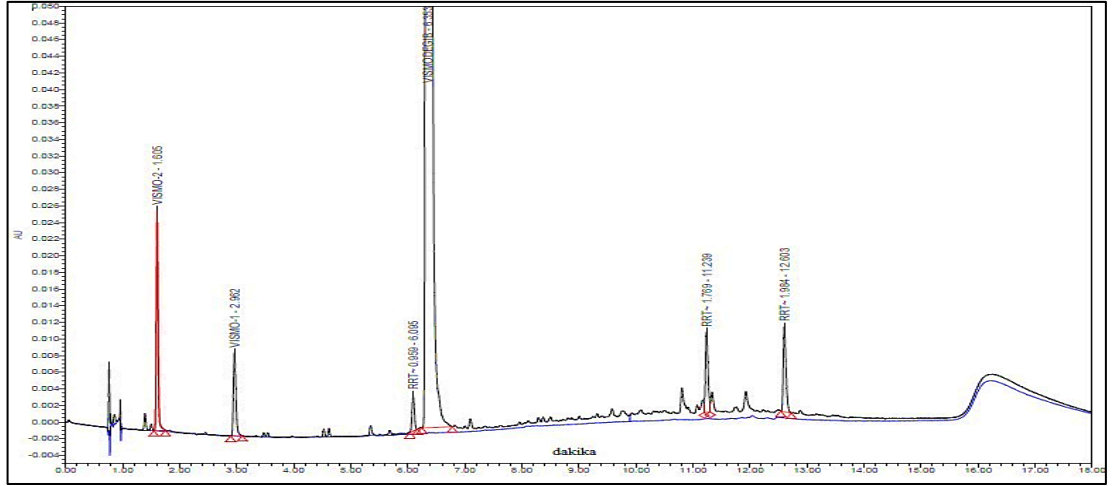
Şekil 3.60. Vismo-3 kütle spektrumu.



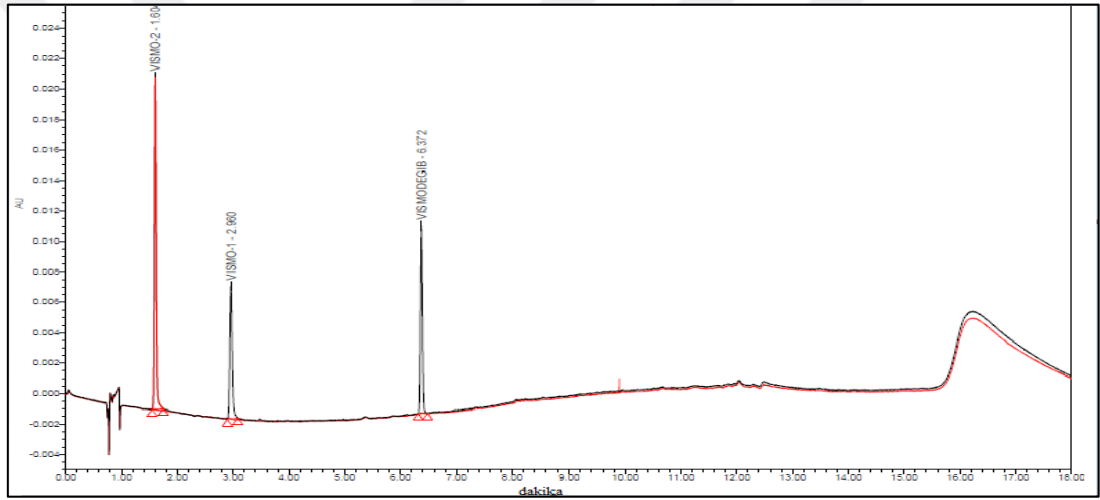
Şekil 3.61. Vismo-4 kütle spektrumu.

Çizelge 3.45. Vismodegib ilgili maddeler seçicilik çalışması sonuçları.

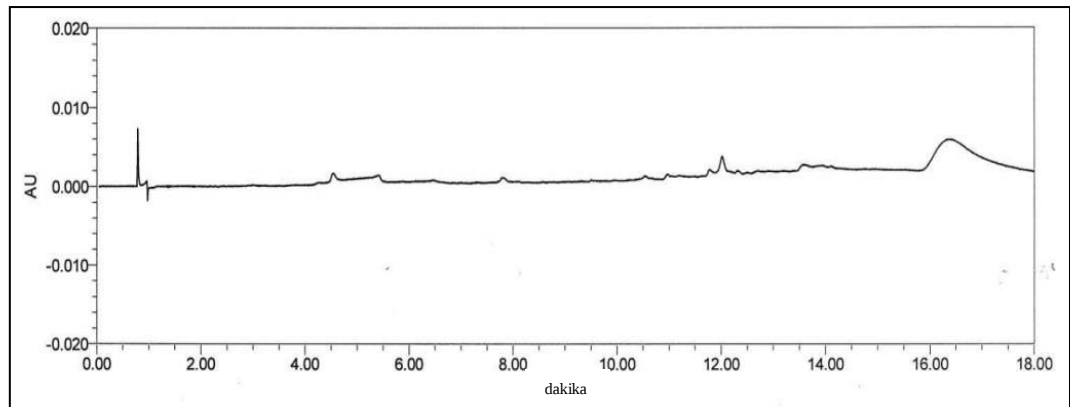
Bileşik	Limit, mak. %	RT, dk	RRT	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
Vismodegib	-	6,377	-	0,247	0,747
Vismo-2	0,15	1,604	0,25	1,385	2,284
Vismo-1	0,15	2,960	0,46	4,736	6,680
Vismo-3	0,15	11,26	1,77	2,434	3,653
Vismo-4	0,15	12,61	1,98	2,451	2,848
Bilinmeyen Safsızlıklar	0,10	6,095	0,959	-	-
Toplam Safsızlık	0,5	-	-	-	-



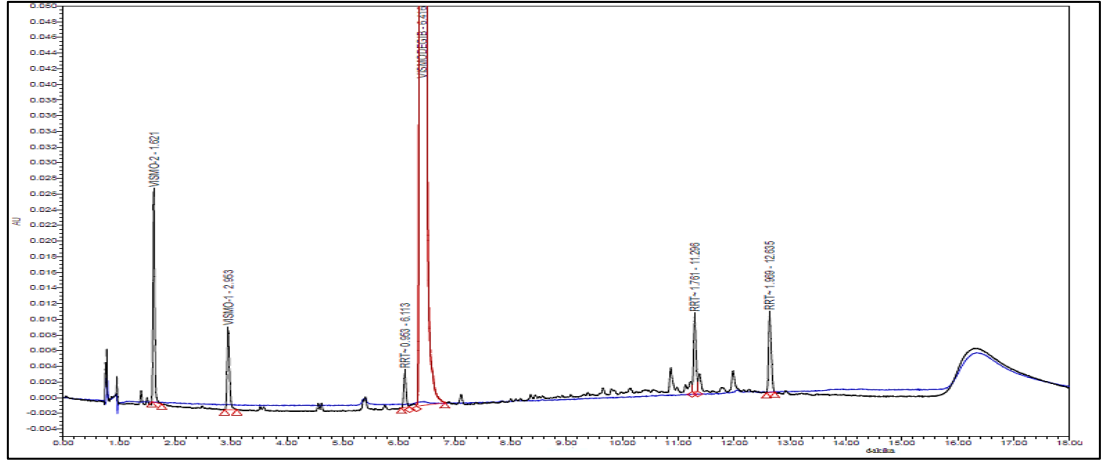
Şekil 3.62. Vismodegib ilgili maddeler eklenilmiş numune ve kör çözeltisi çakıştırılmış kromatogramları.



Şekil 3.63. Vismodegib ilgili maddeler limit derişiminde Vismodegib ve safsızlıklarının karışım standart çözeltisi kromatogramı.



Şekil 3.64. Vismodegib ilgili maddeler seçicilik kör çözeltisi.



Şekil 3.65. Vismodegib ilgili maddeler pik saflığı kromatografisi.

3.4.3.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

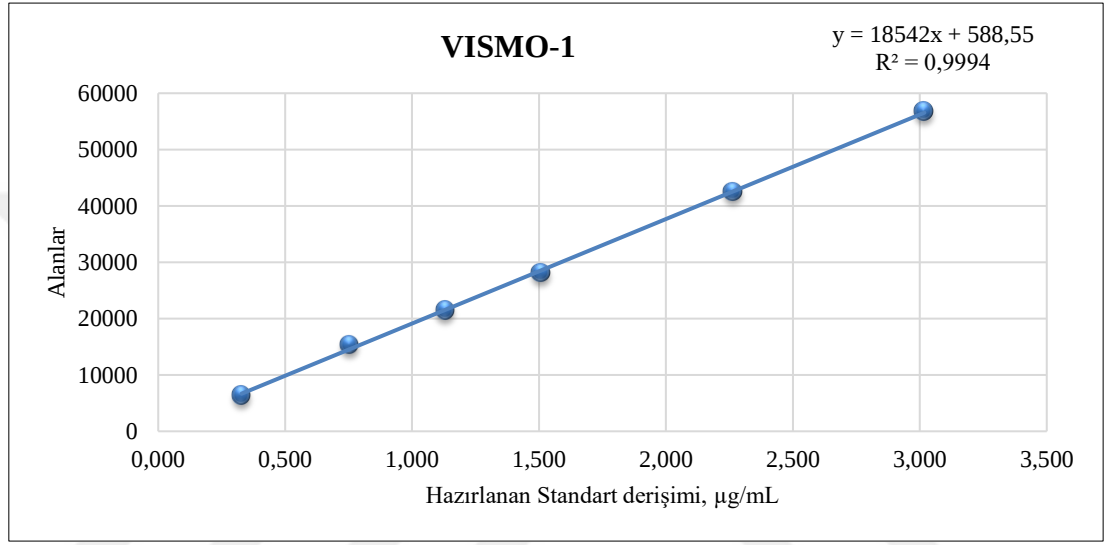
Doğrusallığı belirlemek için stok çözeltiden en az beş farklı derişim hazırlanmalı ve analiz edilmelidir. Bu beş değer ile doğrusallığı belirleme işlemi en az üç kez tekrarlanmalıdır. Ayrıca, regresyon çizgisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %5'inden fazla olmamalıdır.

Vismodegip, Vismo-1 ve Vismo-2 referans standartlarının kalibrasyon eğrisini çizmek için; TAS ile spesifikasyon limitinin %50, %75, %100, %150, %200'üne karşılık gelen altı farklı derişimde standart çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir standart çözeltiden üçer enjeksiyon, minimum (TAS) ve maksimum (%200) seviyelerde altışar enjeksiyon verilmiştir.

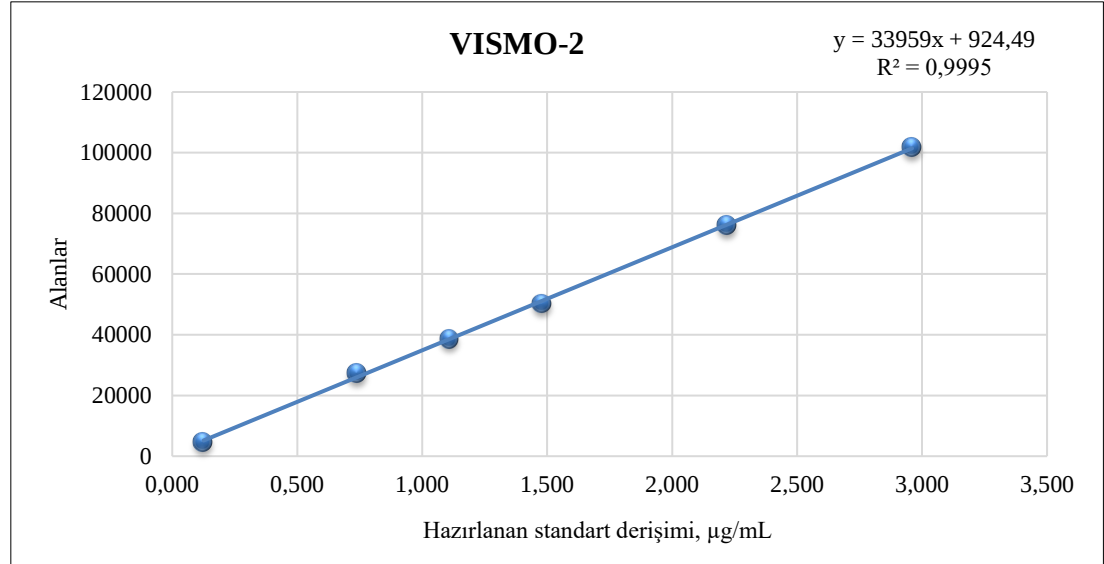
Çalışma aralığının kabul kriterlerine göre de minimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %10,0'dan fazla olmamalı; maksimum seviyedeki alanların bağıl standart sapması %5,0'den fazla olmamalıdır. Vismodegib çalışma aralığı için doğrusallık çalışmasının minimum ve maksimum derişim alanları kullanılmıştır. Buna göre; ilaç etken maddesi ve safsızlıklar için minimum derişim seviyelerindeki alanların bağıl standart sapması (BSS) %10,0'dan az; maksimum derişim seviyelerindeki alanların bağıl standart sapması (BSS) %5,0'den az bulunmuştur.

Çizelge 3.46. Vismodegib ilgili maddeler doğrusallık sonuçları.

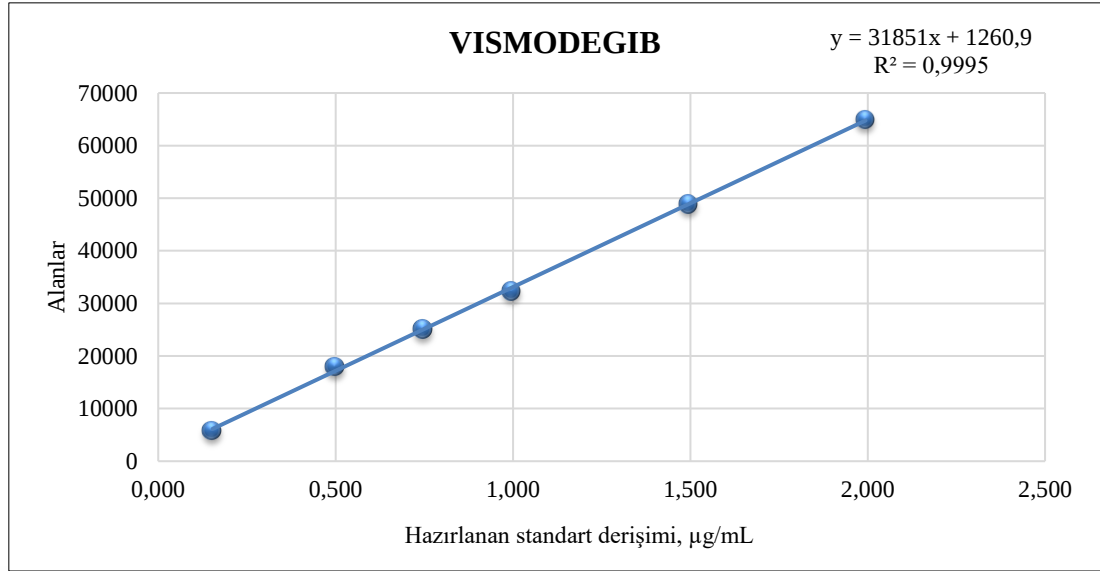
Bileşik	Derişim (µg/mL)	Korelasyon Katsayısı (r) Limit: ≥ 0,99	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan) (%) Limit: ≤ 5,0%	Alan BSS (%)	
					Min. derişimi	Mak. derişimi
Vismodegib	0,153-1,994	0,9998	$y = 31851x + 1260,9$	3,9	1,48	0,37
Vismo-1	0,328-3,018	0,9997	$y = 18542x + 588,55$	2,1	1,02	0,42
Vismo-2	0,125-2,960	0,9998	$y = 33959x + 924,49$	1,8	1,9	0,3



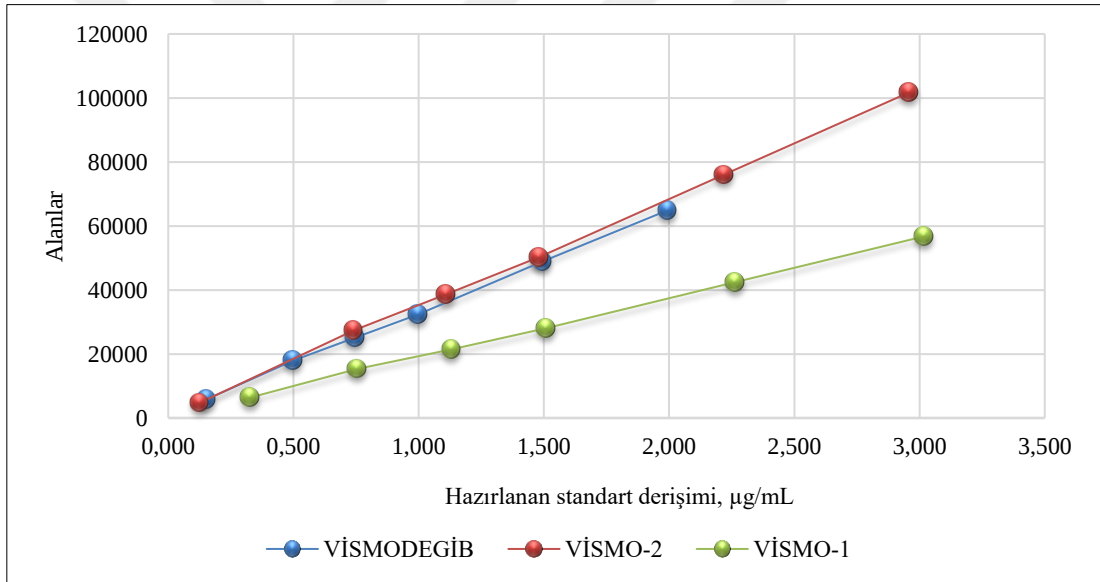
Şekil 3.66. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-1 standardının doğrusallık grafiğı.



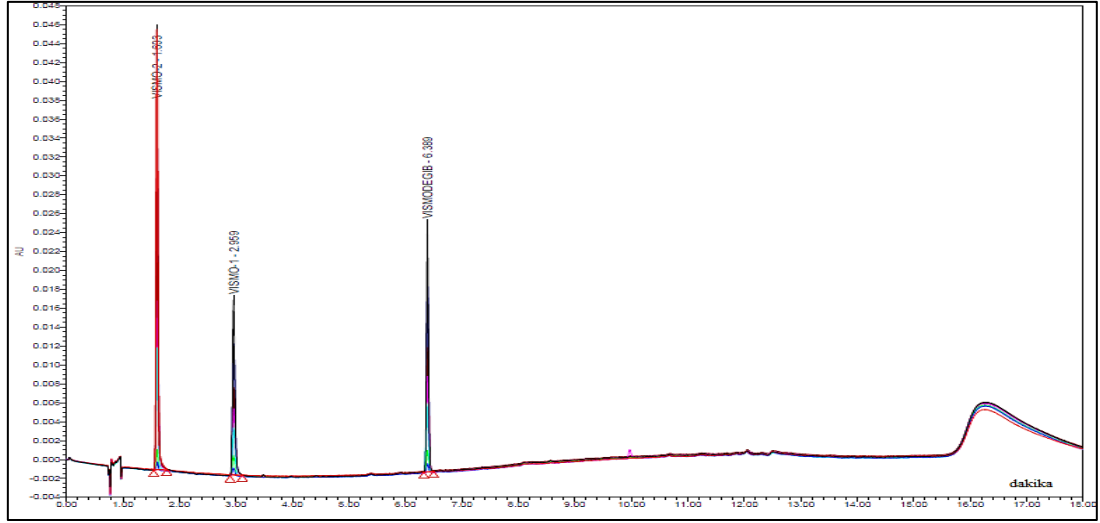
Şekil 3.67. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-2 standardının doğrusallık grafiğı.



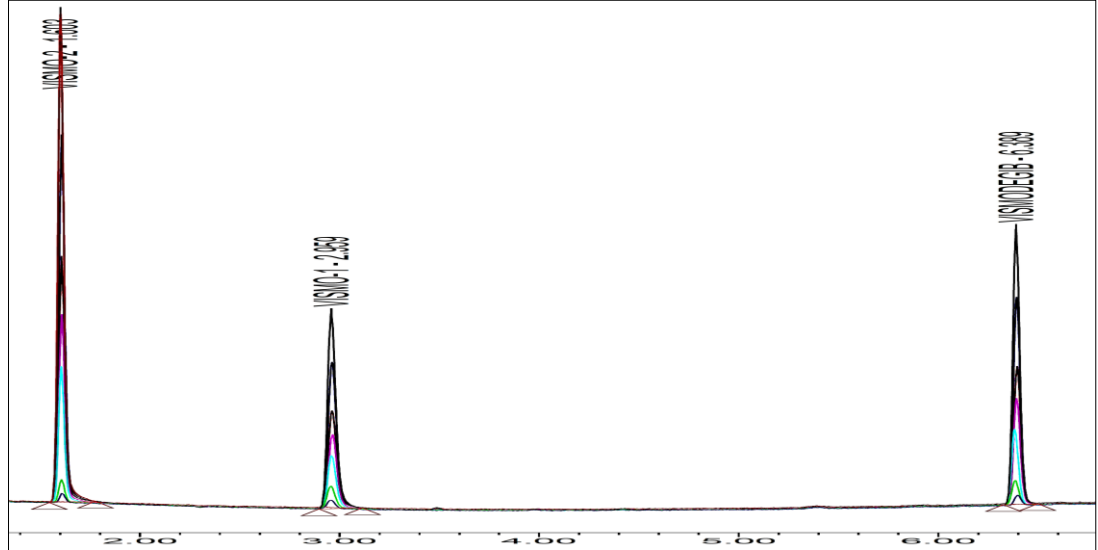
Şekil 3.68. Vismodegib ilgili maddeler Vismodegib standardının doğrusallık grafiğı.



Şekil 3.69. Vismodegib ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık grafikleri.



Şekil 3.70. Vismodegib ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık kromatogramları.



Şekil 3.71. Vismodegib ilgili maddeler çakıştırılmış doğrusallık yakın kromatogramları.

3.4.3.4. Tespit Sınırı (TS) ve Nicelik Sınırı (TAS)

TAS ve TS için kabul kriterleri şu şekildedir: TAS tüm safsızlıklar için raporlama seviyesinden büyük olmamalıdır. TAS derişiminde altı tekrarlı enjeksiyon için alanların %BSS'si 10 ve altında olmalıdır. TAS derişimde sinyal/gürültü oranı da 10 ve üzerinde; TS derişimde sinyal/gürültü oranı ise üç ve üzerinde olmalıdır.

TAS ve TS derişimindeki standart çözeltileri, Selexipag'ta olduğu gibi doğrudan

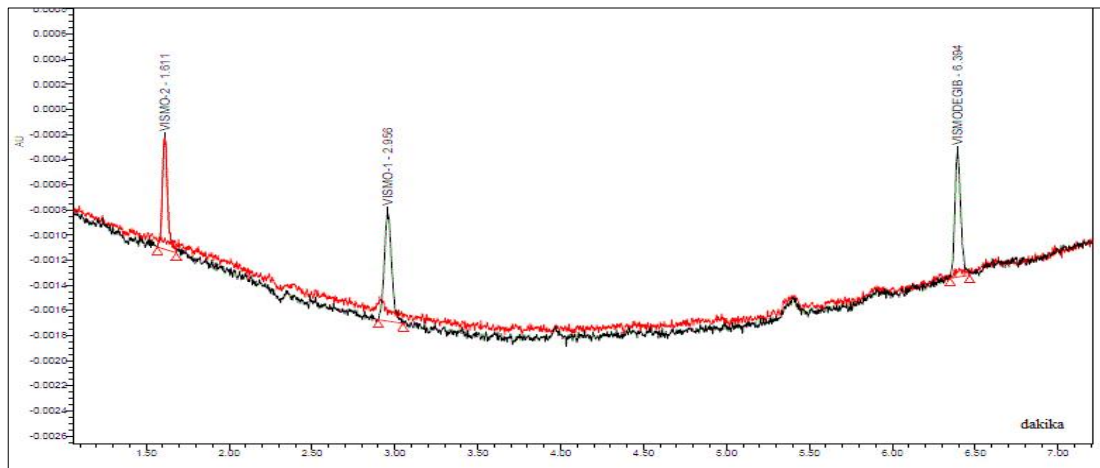
deneylerden gözlemlenip, hesaplanmıştır. Bunun için; spesifikasyon derişiminde Vismodegib ilaç etken maddesi standardı ve spesifikasyon limit derişiminde Vismo-1 ve Vismo-2 safsızlıklarının standartlarını içeren karışım çözeltisi hazırlanmış ve altı kez enjekte edilmiştir. Sonuçlara göre standart derişimindeki sinyal/gürültü oranlarından her bir safsızlık ve etken madde için TAS derişimleri hesaplanmıştır.

Hesaplamalar sonrasında TAS çözeltisini hazırlamak için 50 mL' lik balon jojeye 384,0 µL stok Vismodegib standart çözeltisi, 815,0 µL stok Vismo-1 standart çözeltisi, 317,0 µL stok Vismo-2 standart çözeltisi eklenmiştir. Ardından hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 50 mL'lik baon jojeye seyreltilmiş ve çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. TS çözeltisi için de TAS çözeltisi 3,0 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye çözücü ile seyreltilmiştir.

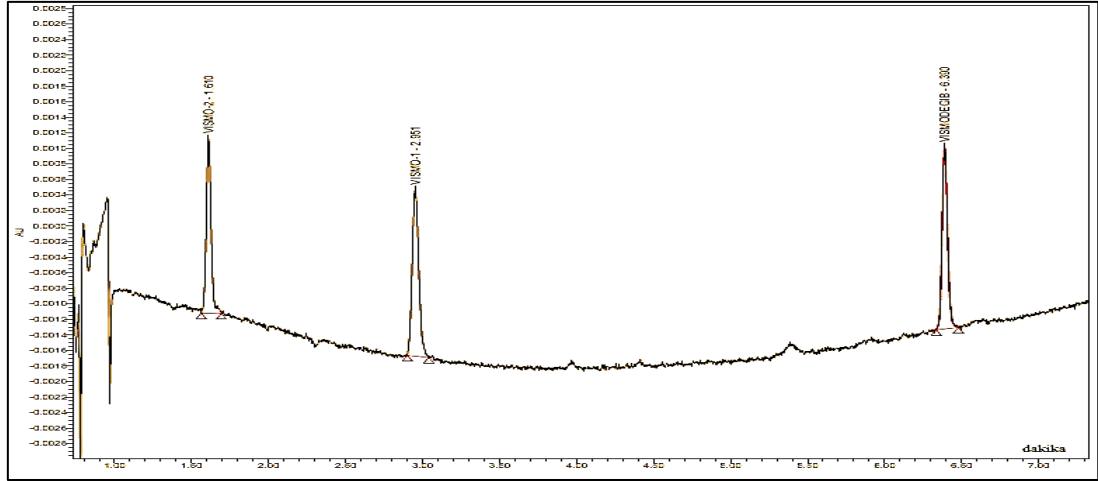
Tespit sınırı (TS) ve nicelik sınırı (TAS) sonuçları Çizelge 3.47'de verilmiştir.

Çizelge 3.47. Vismodegib ilgili maddeler TS ve TAS sonuçları.

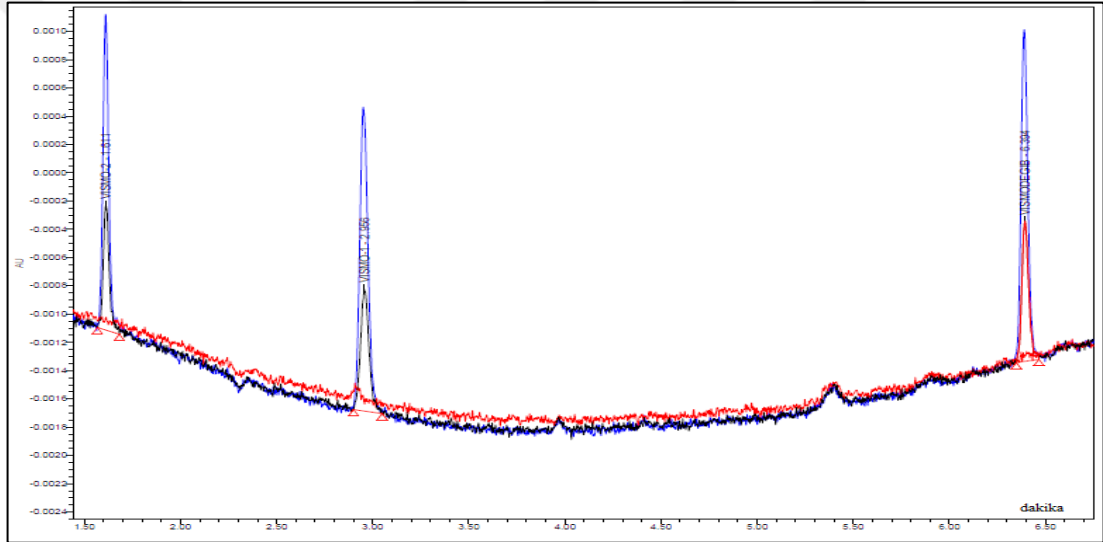
Bileşik	TS derişimleri		TAS derişimleri		S/N		RRF	Bağıl Alan Faktörü CRF
	µg/mL	%	µg/mL	%	TS Limit: ≥ 3	TAS Limit: ≥ 10		
Vismo-1	0,0984	0,0098	0,328	0,0328	4	10	0,6	1,8
Vismo-2	0,0375	0,0038	0,125	0,0125	5	11	1,0	1,0
Vismodegib	0,0459	0,0046	0,153	0,0153	5	11	-	-



Şekil 3.72. Vismodegib ilgili maddeler TS kromatogramı.



Şekil 3.73. Vismodegib ilgili maddeler TAS kromatogramı.



Şekil 3.74. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış TS ve TAS kromatogramları.

3.4.3.5. Doğruluk

Doğruluk kabul kriteri, ilaç etken maddenin ve her bir safsızlığın geri kazanımının %90,0 ile %110,0 arasında olmasıdır. TAS düzeyinde ise %70,0 ile %130,0 arasında olmasıdır.

Doğruluk çalışması için iki numune çözeltisi ve spesifikasyon limit derişiminde hazırlanan safsızlık karışım çözeltisi altı kez enjekte edilmiştir. Spesifikasyon limit derişimine göre %50, %100 ve %150 derişimlerinde olacak şekilde, safsızlıklar

numuneye ilave edilmiştir. Her seviye için üç numune hazırlanmış ve her birinden birer kez enjeksiyon verilmiştir. Numune, TAS seviyesinde Vismo-2 safsızlığı içerdiğinden dolayı TAS seviyesinde bu safsızlıktan ekleme yapılmamıştır.

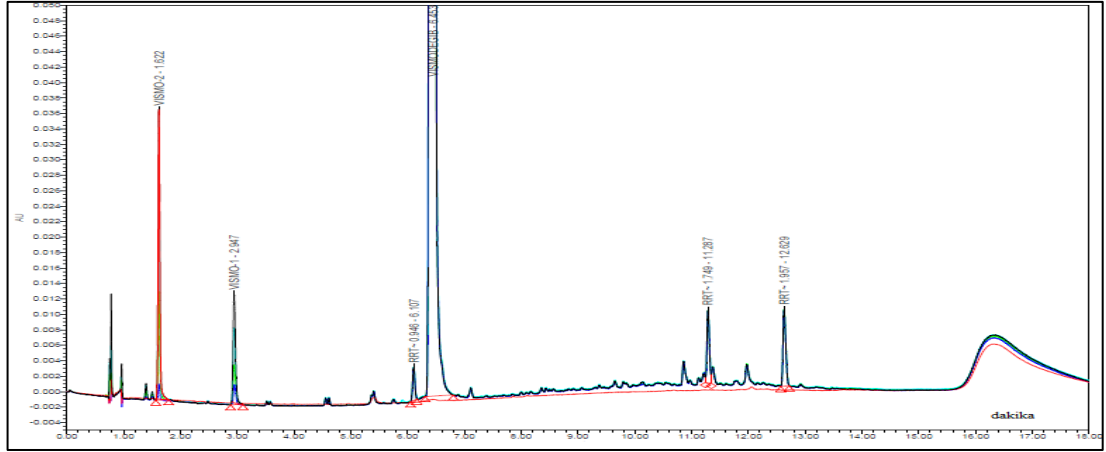
Doğruluk sonuçlarına göre geri kazanımların hepsi %90,0 ile %110,0 arasında bulunmuştur (Çizelge 3.48 ve Çizelge 3.49).

Çizelge 3.48. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-1 için doğruluk sonuçları.

Numune Vismo-1	Eklenen Derişim (mg/mL)	Numune Alanı	Numune Ağırlığı (mg)	Teorik (%)	Deneyssel (%)	Bağıl Hata (%)	Geri Kazanım (%)
TAS	0,000330	8202	50,0	0,042	0,044	4,8	104,8
		8092	50,1	0,042	0,043	2,4	102,4
		8281	50,1	0,042	0,044	4,8	104,8
50%	0,000756	15965	49,9	0,085	0,085	0,0	100,0
		15942	49,9	0,085	0,085	0,0	100,0
		16091	49,9	0,085	0,086	1,2	101,2
100%	0,001512	30094	50,2	0,160	0,159	0,6	99,4
		30059	50,2	0,160	0,159	0,6	99,4
		30308	50,0	0,160	0,161	0,6	100,6
150%	0,002268	44413	50,0	0,236	0,236	0,0	100,0
		44038	50,0	0,236	0,234	0,8	99,2
		43950	50,1	0,235	0,233	0,9	99,1
Standart derişimi, mg/mL						0,001512	
Standart alanı, AU						28483	
Numunedeki miktar, %						0,009	

Çizelge 3.49. Vismodegib ilgili maddeler Vismo-2 için doğruluk sonuçları.

Numune Vismo-2	Eklenen Derişim (mg/mL)	Numune Alanı	Numune Ağırlığı (mg)	Teorik (%)	Deneysel (%)	Bağlı Hata (%)	Geri Kazanım (%)
50%	0,000738	29836	49,9	0,087	0,086	1,1	98,9
		30100	49,9	0,087	0,087	0,0	100,0
		30325	49,9	0,087	0,088	1,1	101,1
100%	0,001476	56028	50,2	0,160	0,161	0,6	100,6
		56103	50,2	0,160	0,161	0,6	100,6
		56071	50,0	0,161	0,162	0,6	100,6
150%	0,002214	82432	50,0	0,234	0,238	1,7	101,7
		82396	50,0	0,234	0,238	1,7	101,7
		82157	50,1	0,234	0,237	1,3	101,3
Standart derişimi, mg/mL						0,001476	
Standart alanı, AU						51147	
Numunedeki miktar, %						0,013	



Şekil 3.75. Vismodegib ilgili maddeler karşılaştırılmış doğruluk kromatogramları.

3.4.3.6. Kesinlik

3.4.3.6.1. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliği için kabul kriterleri şu şekildedir: Numunedeki safsızlık oranı %0,1'den az ise %BSS'si değerlendirilmez. Safsızlık oranı %0,1 veya daha yüksek ise %BSS değeri 10'dan küçük olmalıdır. İkinci kabul kriteri için ise %95 güven aralığı hesaplanır.

Yöntem kesinliği çalışmasında numunede, Vismo-1 ve Vismo-2 miktarı yaklaşık %0,1 olarak bulunmuştur. Vismo-1 ve Vismo-2 için %BSS sırasıyla 10,00 ve 0,00 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.50).

3.4.3.6.2. Tekrar Üretilirlik (Laboratuvarlar Arası)

Kabul kriteri şu şekildedir: İki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki fark raporlanmalıdır. Bu fark her safsızlığın her iki kesinlik çalışmaları sonucu 0,1'den azsa %BSS değerlendirilmez. Eğer fark 0,10 ile 0,20 arasında ise $\%BSS \leq \pm 0,05$; 0,20 ile 0,50 arasında ise $\%BSS \leq \pm 0,10$; 0,50 ile 1,0 arasında ise

%BSS $\leq \pm 0,20$ olmalıdır. Bu parametre için yöntem kesinliğinde kullanılan aynı Vismodegib şarjından altı farklı numune hazırlandı.

Tekrar üretilebilirlik için de sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur (Çizelge 3.50).

Çizelge 3.50. Vismodegib ilgili maddeler kesinlik sonuçları.

Bileşik	Yöntem Kesinliği (n=6)		Tekrar Üretilebilirlik (n=6)		Fark, %
	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	
Vismo-1	0,010 $\pm$ 0,001	10,00	0,009 $\pm$ 0,001	11,111	0,001
Vismo-2	0,014 $\pm$ 0,000	0,00	0,012 $\pm$ 0,00	0,00	0,002

3.4.3.7. Sağlamlık

Kabul kriteri; sistem uygunluk kabul kriterleridir. Sağlamlık validasyon parametresi için sisteme; kör çözeltisi, standart çözeltisi ve spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Her değışiklik parametresi için aynı batch oluşturulmuş ve analiz edilmiştir.

Sağlamlık çalışmalarına göre yöntem küçük değışikliklerden etkilenmemiştir.

Çizelge 3.51. Vismodegib ilgili maddeler sağlamlık sonuçları-1.

ŞARTLAR	Vismodegib	Vismo-1		Vismo-2		Vismo-3 (RRT 1.77)		Vismo-4 (RRT 1.98)	
	RT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal şartlar	6,375	2,961	0,464	2,961	0,464	11,261	1,766	12,620	1,980
Kolon akışı: 0,27 mL/dk	6,805	3,281	0,482	3,281	0,482	11,659	1,713	13,025	1,913
Kolon akışı: 0,33 mL/dk	6,039	2,693	0,446	2,693	0,446	10,908	1,806	12,263	2,031
Kolon sıcaklığı: 27 °C	6,383	2,954	0,463	2,954	0,463	11,266	1,765	12,624	1,978

3.4.3.8. Çözelti Kararlılığı

Kararlılık çalışması için kabul kriterleri şu şekildedir: Başlangıç koşullarındaki alanlara göre, standart alanın değışimi %5'ten; numunedeki safsızlık pik alanlarındaki

değişiklik %10'dan fazla olmamalıdır.

Sisteme; kör çözeltisi, standart çözeltisi ve spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren numune çözeltisi verilmiştir. 48 saat boyunca farklı zaman aralıklarında analiz edilmiştir.

Kararlılık çalışması sonucu standart çözeltisi 48 saat kararlıdır ve pik alanları arasındaki fark %0,0–1,7 ($\leq$ %5,0) aralığında bulunmuştur.

Çizelge 3.52. Vismodegib ilgili maddeler sağlamlık sonuçları-2.

Zaman	VISMODEGİB	
	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	34832	-
4. Saat	35379	1,6
8. Saat	34969	0,4
12. Saat	34838	0,0
16. Saat	34956	0,4
20. Saat	34871	0,1
24. Saat	34975	0,4
32. Saat	35202	1,1
40. Saat	35172	1,0
48. Saat	35419	1,7

Numune çözeltisi de 40 saat kararlı ve numune içindeki safsızlıkların pik alanları arasındaki fark $<$ %10.0 olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.53. Vismodegib ilgili maddeler çözelti kararlılığı sonuçları.

Zaman	Vismo-1		Vismo-2		Vismo-3 (RRT 1.77)		Vismo-4 (RRT 1.98)	
	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	31575	-	58508	-	27769	-	34157	-
4. Saat	31571	0,0	58178	0,6	27178	2,1	33882	0,8
8. Saat	31711	0,4	58332	0,3	29120	4,9	34669	1,5
12. Saat	31698	0,4	58620	0,2	29899	7,7	34030	0,4
16. Saat	31643	0,2	58862	0,6	29941	7,8	33449	2,1
20. Saat	31822	0,8	58647	0,2	27188	2,1	33536	1,8
24. Saat	31980	1,3	58468	0,1	26338	5,2	32879	3,7
32. Saat	32628	3,3	58669	0,3	28353	2,1	30977	9,3
40. Saat	32044	1,5	58634	0,2	24661	11,2	30005	12,2
48. Saat	32346	2,4	58698	0,3	24823	10,6	29118	14,8

3.4.4. Vismodegib Miktar Tayini Validasyon Çalışmaları

3.4.4.1. Sistem Uygunluk Testi

Altı enjeksiyon tekrarlı standart çözeltisinden elde edilen Vismodegib pik alanlarının %BSS'si $\leq 0,85$ olmalıdır. Sisteme kör çözeltisi 0,025 µg/mL derişiminde Vismodegib standart çözeltisi altı tekrarlı şekilde enjekte edilmiştir.

Altı tekrarlı standart çözeltisi enjeksiyonundan elde edilen Vismodegib pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) 0,05 ($\leq 0,85$) olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.54. Vismodegib miktar tayini sistem uygunluk sonuçları.

Enjeksiyon No	Alanlar
1	1440840
2	1439636
3	1438922
4	1440156
5	1440919
6	1439637
Ortalama	1440018
Standart Sapma	774,4
%BSS	0,05

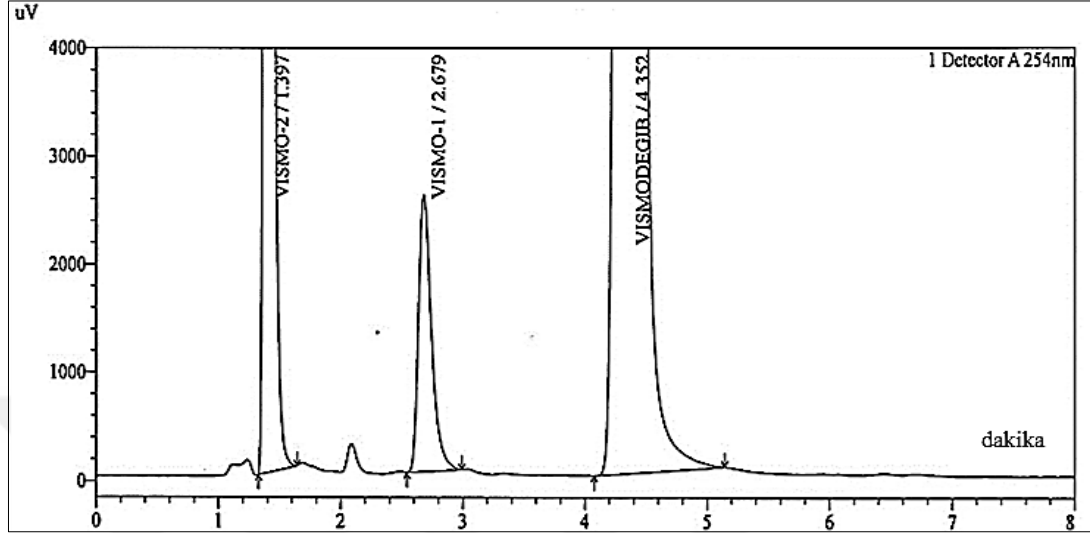
3.4.4.2. Seçicilik

Seçicilik kabul kriterleri şu şekildedir: Etken madde pikinin kromatografik ve spektral açıdan saf olması gerekir.

Yöntemin seçiciliği için kör çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde safsızlık karışım çözeltisi, standart çözeltisi, spesifikasyon limit derişiminde safsızlık içeren numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Spektral safsızlık için PDA dedektöründe 200-400 nm arasında çalışma yapılmıştır.

Seçicilikte, Vismodegib'in alıkonma zamanında, kör çözeltiden ve safsızlıklardan herhangi bir pik etken pikinin altında gözlenmemiştir. Saflık açısı

değeri, saflık eşiği değerinden daha küçük bulunmuştur. Bu nedenle; Vismodegib miktar tayini yöntemi spektral olarak da seçici bulunmuştur.



Şekil 3.76. Vismodegib miktar tayini Vismodegib ve safsızlıklarının karışım kromatogramı.

Çizelge 3.55. Vismodegib miktar tayini pik saflığı sonuçları.

Bileşik	RT, dk	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
Vismo-1	2,68	-	-
Vismo-2	1,40	-	-
Vismodegib	4,45	0,999896	4,45
Diğer Safsızlıklar	-	-	-
Toplam Bilinmeyen Safsızlıklar	-	-	-

3.4.4.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Selexipag miktar tayini yönteminde geçerli olan kabul kriterleri, Vismodegib miktar tayini doğrusallık çalışması için de geçerlidir.

Doğrusallık validasyon parametresi için, 0,025 mg/mL numune çözeltisi derişiminde standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu standart çözeltiden %80 seviyesi için 16,0 µL, %90 seviyesi için 18,0 µL, %100 seviyesi için 20,0 µL, %110 seviyesi için 22,0 µL, %120 seviyesi için 24,0 µL sisteme enjeksiyon verilmiştir. Her seviyeden üçer enjeksiyon, minimum (%80) ve maksimum (%120) seviyelerden de altışar enjeksiyon yapılmıştır.

Doğrusallık çalışmasının sonucuna göre Vismodegib derişimleri ile dedektör sinyalleri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Çalışma aralığının kabul kriterleri ve minimum ve maksimum derişim seviyelerinde alanların yüzde bağıl standart sapması (%BSS) 2,0'den az bulunmuştur. Çalışma aralığı için, doğrusallık çalışmasında kullanılan minimum ve maksimum derişimlere sahip standart çözeltileri kullanılmıştır. Doğrusallık çalışmasından elde edilen verilere göre, numune derişiminin %80 ile %120 aralığı, Vismodegib için nicel çalışma aralığı olarak uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.56. Vismodegib miktar tayini doğrusallık sonuçları.

Seviye	Derişim (µg/mL)	Korelasyon Katsayısı (r) Limit: $\geq 0,999$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x100 / % seviyedeki alan) (%) Limit: $\leq 2,0\%$	Alan BSS (%)	
					Min. derişimi	Mak. derişimi
%80	0,02008	1,0000	$y = 36385091x - 2395,3$	0,16	0,185	0,066
%90	0,02259					
%100	0,02510					
%110	0,02761					
%120	0,03012					

3.4.4.4. Doğruluk

Doğruluk çalışması için numune derişimine karşılık gelen %80, %100 ve %120 seviyelerinde Selexipag çözeltileri hazırlanmıştır. Her seviye için üçer ayrı numune hazırlanmış ve her birinden ikişer kez enjeksiyon verilmiştir. Kabul kriteri; her bir geri kazanımın %98,0 - %102,0 arasında olmasıdır.

Doğruluk çalışmalarında her bir geri kazanım, istenilen %98,0 ve %102,0 geri kazanım aralığında bulunmuştur.

Çizelge 3.57. Vismodegib miktar tayini doğruluk sonuçları.

Seviye	Numune Alanı	Numune tartımı (mg)	Teorik miktar (mg/mL)	Deneysel miktar (mg/mL)	Geri kazanım (%)	Bağıl Hata (%)
80%	1133465	19,8	0,01962	0,0198	100,9	0,9
	1134286	19,9	0,01972	0,0198	100,5	0,5
	1137849	20,0	0,01982	0,0199	100,3	0,3
100%	1437879	25,0	0,02478	0,0251	101,4	1,4
	1429645	24,9	0,02468	0,0250	101,2	1,2
	1436223	24,9	0,02468	0,0251	101,7	1,7
120%	1697897	29,8	0,02953	0,0297	100,5	0,5
	1694030	29,7	0,02943	0,0296	100,6	0,6
	1696754	29,9	0,02963	0,0297	100,1	0,1
Ortalama					100,8	0,8
SS					0,55	0,54
%BSS					0,06	68,10
Ortalama Standart Alanları					1423444	1423444
Standart Derişimi mg/mL					0,0249	0,024874

3.4.4.5. Kesinlik

3.4.4.5.1. Sistem Kesinliği

Bu kesinlik parametresinde, Vismodegib standart çözeltisinin altı tekrarlı enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarının yüzde bağıl standart sapması (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır. Bu nedenle; %100 derişimindeki standart çözeltisinden altı tekrarlı enjeksiyon verilmiştir.

3.4.4.5.2. Yöntem Kesinliği

Yöntem kesinliğinin kabul kriterleri için; numunelerin altı tekrarlı enjeksiyonundan elde edilen sonuçların yüzde bağıl standart sapması da (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır ve %95 güven aralığı hesaplanmalıdır. Bu amaçla, yöntem kesinliğinde kullanılan aynı Selexipag şarjından altı farklı numune hazırlanmıştır. Her biri için de ikişer enjeksiyon yapılmıştır.

3.4.4.5.3. Tekrar Üretilirlik

Bu kesinlik parametresi için kabul kriterleri şu şekilde olmalıdır: Altı tekrarlı enjeksiyon numunesi sonucunun yüzde bağıl standart sapması (%BSS) $\leq 2,0$ olmalıdır ve %95 güven aralığı hesaplanmalıdır. Ayrıca, iki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki farkın da 2,0'den az olması gerekir.

Tüm kesinlik sonuçları istenilen kabul kriterlerine uygun bulunmuştur (Çizelge 3.58).

Çizelge 3.58. Vismodegib miktar tayini kesinlik sonuçları.

Bileşik	Alıkonma Zamanı (dk)	Vismodegib miktarı, %	
		Kromatografik	Susuz ve solventsiz
Vismodegib	4,45	100,4	100,8
BSS (%)		0,2	0,2
95% Confidence interval		100.1 – 100.6	100.5 – 101.0

3.4.4.6. Sağlamlık

Bu parametre için sisteme; kör çözeltisi ve standart çözeltisinden altı tekrarlı enjeksiyon verilmiştir. Kabul kriteri olarak sistem uygunluk şartları sağlanmalıdır.

Sağlamlık çalışmalarına göre, yöntem küçük değişikliklerden etkilenmemiştir.

Çizelge 3.59. Vismodegib miktar tayini sağlamlık sonuçları.

ŞARTLAR	RT	%BSS
Normal Şartlar	4,839	0,24
Kolon sıcaklığı 33 C°	4,349	0,17
Kolon sıcaklığı 27 C°	4,354	0,20
Kolon sıcaklığı 1,1 mL/dk	3,961	0,03
Kolon akışı 0,9 mL/dk	4,839	0,15

3.4.4.7. Çözelti Kararlılığı

Çözelti kararlılığı için numune çözeltisi hazırlandı ve 15 °C’de 48 saat analiz edilmiştir. Bu validasyon parametresi için ilk numune alanı ile farklı zaman periyotlardaki numune alanları arasındaki farkın %2’den fazla olmaması kabul kriteridir.

Kararlılık sonucuna göre de standart ve numune çözeltileri 48 saat kararlıdır.

Çizelge 3.60. Vismodegib miktar tayini çözelti kararlılığı sonuçları.

Zaman	VİSMODEGİB	
	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	1440034	-
1. Saat	1445317	0,4
2. Saat	1448451	0,6
4. Saat	1451124	0,8
8.Saat	1453237	0,9
12.Saat	1453869	1,0
16.Saat	1447651	0,5
20.Saat	1447334	0,5
24.Saat	1448193	0,6
30.Saat	1449882	0,7
36.Saat	1450202	0,7
40.Saat	1447212	0,5
44.Saat	1447237	0,5
48.Saat	1447705	0,5

4. TARTIŞMA

- *Yöntem Optimizasyonu*

Kromatografik yöntem geliştirmeye başlanmadan önce analizi yapılan maddelerin hem kimyasal hem de fiziksel özelliklerinin bilinmesi gerekir.

Organik olan birçok ilaç etken maddesi ve ilaç ürünleri ya zayıf asidik ya da zayıf bazik özelliktedir. Bu özellikleri dolayısıyla suda çözünmeleri daha çok sistemin pH'ına bağlıdır ki pH değeri de analizi yapılan maddenin pK_a değeriyle doğrudan ilişkilidir. Örneğin; zayıf asidik bir madde için, pK_a değerinin üzerindeki pH değerlerinde çözünürlüğü daha fazladır.

Genel olarak kromatografik sistemlerde hareketli fazlar ve çözücüler su-organik karışımı olarak hazırlanır. Hareketli fazın pK_a değeri, içerisindeki organik miktarına göre değişmektedir. Dolayısıyla pH ayarlamalarında organik miktarı oldukça önemlidir. Bir hareketli fazda organik oranı arttıkça pK_a değerleri de artar. Örneğin; asetonitril-su karışımı olan bir çözücü sisteminde asetonitril oranı arttıkça pK_a değeri artar. Çünkü asetonitrilin dielektrik sabiti sudan daha düşüktür ve buna doğru orantılı olarak da pK_a değeri değişir.

Çalışma derişimi belirlenirken özellikle cihaza verilen maddelerden en yüksek ve en düşük yükseklikteki veya alandaki pikler göz önüne alınır. Belirlenen derişimdeki etken maddenin ve yönergeye göre hesaplanan derişimdeki safsızlıkların absorpsiyonu sonucu oluşan pik yükseklikleri, cihazın algılama sınırı üzerindeyse nicel, altındaysa hem nicel hem nitel analizi yapılamaz. Bu nedenle tüm pikler için çalışılabilecek uygun bir derişimin bulunması elzemdir.

İlaç etken maddelerinin geneli apolar özellikte olduğundan ve ters faz ile ayırım sağlandığından, sabit fazın da apolar özellikte olması beklenir. Bu nedenle C8, C18, fenil gibi hidrofobilitesi yüksek kolonlarla ayırım daha iyi olmaktadır. Bunun yanında

kolon ve oto-örnekleyici sıcaklığı da ayrımda önemli rol oynamaktadır.

Bir yöntem geliştirmede her zaman en kolay ve hızlı değiştirilebilen parametreden başlanmalıdır. Bunun için en kolay değişiklik elüsyon programlarında ve oranlarında olmaktadır.

- *Selexipag İlgili Maddeler*

Selexipag için çözücü sistemi seçiminde ilk olarak asetonitril:su (20:80, h/h) karışımı çözücü sistemi kullanılmıştır. Tüm maddelere %20 oranında asetonitril eklenmiştir ve ultrasonik su banyosunda iyice çözünmeleri sağlanmıştır. Ardından su ile hacimleri tamamlandığında, Selex-1 hariç tüm maddeler için berrak bir çözelti elde edilebilmiştir. Selex-1 de ise su ilavesiyle bulanma yani; çökme olmuştur. Yani bu orandaki çözücü sistemi, Selex-1'in çözünmesine yeterli pH'a sahip değildir. Bu nedenle organik çözücü miktarı arttırılmıştır.

İkinci olarak çözücü sistemi asetonitril:su (40:60, h/h) olarak belirlenmiş ve bir önceki denemede olduğu gibi numune hazırlığı yolları izlenmiştir. Selex-1 de dâhil, asetonitril:su (40:60, h/h) çözücü sisteminde maddeler iyi bir şekilde çözünmüştür.

Çizelge 4.1. Selexipag ilgili maddeler deneme çalışması tablosu.

Deneme Çalışması	MFA	MFB	Kolon	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk
1	10 mM KH ₂ PO ₄ pH=3,5	ACN	Waters Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	30	25	300	3,0	0,3
2	10 mM K ₂ HPO ₄ ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)	ACN	Waters Acquity BEH C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	40	25	300	5	0,3
3	10 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)	ACN	Waters Acquity BEH, C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	40	25	300	5	3,0
4	20 mM NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O ve 1,0 g C ₁₆ H ₃₇ NO ₄ S karışımı (pH 7,5)	ACN	Waters Acquity BEH, C8 (100 x 2,1 mm, 1,7µm)	40	25	300	5	3,0
5	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5)	ACN	BDS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 3,0 µm)	40	25	300	10	1,0
6	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,5)	ACN	Thermo Scientific BDS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm)	40	25	300	10	1,0
7	10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 4,0)	ACN	Thermo Scientific BDS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm)	40	25	300	10	2,0
8	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,0)	ACN	Waters Symmetry C8 (150x 4,6 mm, 3,5 µm)	25	25	235	10	1,0
9	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,0)	ACN	Waters XBridge C8 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm)	40	25	235	10	0,8
10	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,0)	ACN	Thermo Scientific BDS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 3,0 µm)	30	25	300	10	0,8
11	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 6,0)	ACN	Waters XBridge C8 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm)	30	25	300	10	0,8
12	%0,1 TFA	ACN	Waters XBridge C8 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm)	40	25	200-400	10	0,7
13	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,5)	ACN	Waters Acquity BEH C8 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm)	40	25	300	3	0,3
14	10 mM K ₂ HPO ₄ (pH 7,5):asetonitril (90:10, h/h)	ACN	Waters Acquity BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 µm)	25	25	300	2	0,33
15	%0,1 TFA	ACN	Waters Acquity BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 µm)	30	15	300	2	0,33

Yöntem parametrelerinin optimizasyonu için UYPSK cihazında yapılan deneme çalışması-1’de Selexipag ve Selex-1 arasındaki ayırıcılık faktörü 1,3 olarak bulunmuştur yani; tam bir ayırım gözlenmemiştir. Bir sonraki deneme çalışması-2’de, Selex-1 pikinin, Selexipag pikinden iyi bir şekilde ayrılması için iyon çifti reaktif

kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla bir litre saf su içinde 1,74 g (10 mM) K_2HPO_4 ve 1,0 g pozitif yüklü iyon çifti reaktifi $C_{16}H_{37}NO_4S$ içeren hareketli faz A hazırlanmıştır. pH'ı seyreltik NaOH ile 7,5'e ayarlanmıştır. Bu pozitif yüklü iyon çifti reaktifinin bu pH'ta kullanılmasının amacı; Selex-1 safsızlığından bir protonun koparılarak negatif iyon haline gelmesidir. Bu durumda, hareketli fazda bulunan pozitif yüklü iyon çifti reaktifi ile etkileşime girebilecek ve polar olmayan sabit fazda ayrılabilen, daha fazla tutunabilen, nötr kompleks haline gelebilecektir. Kısaca iyon çifti reaktifi içeren bir hareketli faz kullanmak, iyonik numunelerin kolona tutulmasını arttırır, neticede alıkonma süresini arttırarak ayırımın daha iyi olmasını sağlayabilir. Bunun yanında pik şekillerini de iyileştirir. Dahası numuneden kaynaklı olarak iğneye tutunan asidik, bazik veya iyonik bileşenlerin de tutunmasını engelleyerek, taşıma pikinin oluşmasını da engeller. Nitekim deneme çalışması-2 sonucunda Selex-1 ile Selexipag arasındaki ayırıcılık faktörü 2,5 olarak bulunmuştur; ancak zemin gürültülü gelmiştir. Pik ayırımının daha olabilmesi için deneme çalışması-3 de farklı bir tuz, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, ile tampon çözeltisi denenerek ayırıcılık faktörünün daha da iyi çıkması hedeflenmiştir; ancak piklerde yarımla gözlenmiştir. Bu pik yarımlarının önüne geçilmesi amacıyla deneme çalışması-4'te farklı bir kolonla ve deneme çalışması-2'deki tampon çözeltisine geçilmiştir. Buradaki tuz oranı arttırılarak da pik şekillerinin daha dik ve dar hale gelmesi amaçlanmıştır. Fakat etken madde piki dışındaki piklerde tekrardan yarımla görülmüştür. Deneme çalışması-5'de YPSK cihazı için denemelere geçilmiştir. Pik şekli ve ayırıcılık faktörü olarak daha iyi sonuç veren deneme çalışması-2'deki hareketli fazlar ve oranlar kullanıldı. Ayırımın daha iyi olması için C18 özellikte daha uzun bir kolona geçilmiştir. Böylece analitler sabit fazda daha çok tutunacak ve birbirlerinden ayrımları daha iyi olacaktır. Ancak bu çalışmada etken madde pikiinde yarımla gözlenmiştir. Deneme çalışması-6'da aynı özellikte; ama partikül boyutu daha yüksek bir kolon kullanılarak deneme yapıldı. Sonuçta, Selex-1 ile Selexipag arasındaki ayırıcılık faktörü 2,5 üzerinde olmasına rağmen, pik şekilleri gene kötü gelmiştir. Deneme çalışması-7'de pik şeklinin düzelmesi için hareketli faz A'nın pH'sı 4,0 yapılmıştır. pH'ın düşürülmesiyle kolondaki silanol gruplarının iyonlaşması inhibe edilir. Silanollerin bu şekilde protonlu halde tutulması da polar bileşikler ile etkileşimini en aza indirir. Bu sayede de pik şekilleri daha iyi çıkabilir. Denemede de pik şekilleri bir önceki çalışmaya göre

daha iyi gelmiştir; ama Selex-asit ile Selexipag arasındaki ayırıcılık faktörü istenilen gibi bulunmamıştır ve Selex-1 piki gözlenmemiştir.

Deneme çalışması-8 ve Deneme çalışması-9'da ise ikinci en iyi çalışma dalga boyu 235 nm'de çalışılmıştır. Deneme çalışması-8'de Selex-asit piki, Selexipag pikine girişim yapmıştır. Deneme çalışması-9'da ise tüm pikler iyi bir şekilde ayrılmıştır; ancak sistemde taşıma piki olabilecek bir pik görülmüştür. Zemin de gürültülü geldiği için bunun gerçekten taşıma piki olup olmadığı konusunda kesin yargıya varılamamıştır. Bu nedenle deneme çalışması-10'da tekrardan 300 nm çalışma dalga boyuna geçilmiştir. Başka bir kolon denenerek pik şekillerinin düzelmesi hedeflenmiştir. Zemin gürültüsü bu dalga boyunda daha az gelmiştir. Birkaç enjeksiyonda bir gradient programından veya detektör kaynaklı olabilecek bir taşıma piki gözlenmiştir. Bunun yanında Selex-asit pikine, hemen solunda gelen bilinmeyen bir safsızlık piki girişim yapmıştır. Raporlama limitinde olabileceği düşünülen bilinmeyen bir safsızlık pikinde ise omuz gözlenmiştir. Deneme çalışması-11'de de ayırıcılık faktörleri iyi gelmemiştir. Kolon değişikliği piklerin ayrılmasına etki etmediği için deneme çalışması-12 için kolon sıcaklığı artırılıp, akış hızı düşürülmüştür. Böylece kolonda tutunma süresi artırılarak analitteki bileşik piklerinin daha iyi ayrılacağı düşünülmüştür. Bunun yanında geçmiş denemelerin sonuçlarına bakıldığında, iyon çifti reaktifi ile pik ayrımının ve şekillerinin çoğu denemelere göre daha iyi olduğu ve taşıma piki oluşumunun önlenebileceği düşünülmüştür. Bu parametrelerde de en iyi çalışma dalga boyu 300 nm olarak gözlenmiştir. Sonuçlarda bu dalga boyunda değerlendirilmiştir. Tek tek verilen safsızlıklar ve etken madde pik şekilleri incelendiğinde gerçekten daha keskin ve dar pikler gelmiştir. Ancak tüm safsızlıkların ve etken maddenin karışım halindeki çözeltisi sisteme verildiğinde; Selex-1 pikinin solunda bilinmeyen ve ayrımı iyi olmayan bir safsızlık piki gelmiştir. Tek tek safsızlık ve etken madde kromatogramıyla karşılaştırıldığında bu pikin herhangi bir maddenin safsızlığı olmadığı; karışım halinde maddelerin etkileşiminden kaynaklı olabileceği düşündürmüştür. Bunun yanında iyon çifti reaktifi kullanılması taşıma pikini engellemiştir. Deneme çalışmaları-5 ile 12'de dâhil arasındaki çalışmalar YPSK cihazında yapılmıştır. Pik ayrımının optimizasyonu için tekrardan cihaz değiştirilmiştir ve UYPSK cihazında denemelere devam edilmiştir. Deneme çalışması-

13'te kolon olarak Waters Acquity BEH, C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm); hareketli faz A olarak pH=7,5'de 10 mM K₂HPO₄ çözeltisi (o-H₃PO₄ ile ayarlanarak) kullanılmıştır. Ultra yüksek basınçta çalışıldığı için de enjeksiyon hacmi 3,0 µL, akış hızı 0,3 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Gradient programı değiştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda etken madde pikinin altında bir safsızlık piki ve ayrıca tekrardan bir taşıma piki gözlenmiştir. Bunun üzerine C18 özellikte bir emniyet kolonu kullanılmıştır. Böylece etken maddenin altında gelen safsızlığın bertaraf edilmesi amaçlanmıştır ki gerçekten, pikler daha çok kolonda tutunduğu için bu safsızlık piki ile etken piki arasındaki ayırıcılık faktörü daha iyi gelmiştir. Yalnız taşıma piki tekrardan gözlenmiş ve tüm piklerin alıkonma zamanı arttığı için pikler daha sağda çıkmıştır. Bu çalışmada C18 kolonunun daha iyi ayırım göstermesinden kaynaklı deneme çalışması-14 için C18 kolonu kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 2,0 µL ve akış hızı 0,33 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Hareketli faz A olarak organik oranı arttırılmış ve 10 mM K₂HPO₄ pH=7,5: ACN karışım (90:10, h/h) çözeltisi tercih edilmiştir. Böylece numune içerisindeki hidrofobisitesi yüksek olan bileşenler kolonda daha çok tutunacak ve daha iyi bir ayırım sağlanabilecektir. Ayrıca; kolon sıcaklığı 25 °C'ye düşürülerek de alıkonma zamanının artırılması amaçlanmıştır. Gradient programı tekrar düzenlenmiştir. Bu değişen parametrelere göre de pik şekilleri iyi olmasına rağmen; Selex-1 ve solunda gelen safsızlık pikinin ayırımı iyi değildir. Bu nedenle deneme çalışması-15'te hareketli faz A olarak tekrardan iyon çifti reaktifi, %0,1 TFA çözeltisine dönmüştür. Kolon sıcaklığı Selex-1 ve sağındaki safsızlık pikinin ayırımına göre yapılmıştır. Çünkü diğer pikler kolon sıcaklığından çok etkilenmezken; Selex-1 ve safsızlık piki ayırımı etkilenmektedir. Bu nedenle kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Dalga boyu 300 nm, oto-örnekleyici sıcaklığı 15 °C, enjeksiyon hacmi 2,0 µL ve akış hızı 0,33 mL/dk en uygun koşullara ulaşılmıştır. Çalışma sonucunda tüm pik şekilleri oldukça güzel gelmiştir ve birbirinden iyi bir şekilde ayrılmıştır.

- *Selexipag Miktar Tayini*

Miktar tayini çalışmalarında, Selexipag ilgili maddeler çalışmaları üzerinden yapıldığı için daha kolay yöntem optimizasyonu gerçekleşmiştir. İlgili maddelerde deneme çalışması-14'deki parametrelerle denemelere başlanmıştır. Çalışmalar 0,025

mg/mL derişimde yapılmıştır.

İlk olarak UYPSK cihazında; hareketli faz A 10 mM K₂HPO₄ pH=7,5 ve ACN karışım (90:10, h/h) çözeltisi, hareketli faz B asetonitril çözücüsü ve C18 kolonu ile 300 nm’de, kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıkları sırasıyla 40 °C ve 25 °C olduğu, 0,3 mL/dk akış hızında ve 2,0 µL enjeksiyon hacminde çalışılmıştır. Yüksek organik oranında bir gradient programları ile ayırım sağlanmaya çalışılmıştır. Sonuçta; etken maddenin altında pik gözlenmiştir. Ayrıca bu gradient programlarında etken piki erken gelmiştir. Bu nedenle hareketli faz A olarak %0,1’lik TFA çözeltisi denenmiştir. Bu hareketli faz ile C8 ve C18 kolonunda 0,3 mL/dk ile 0,35 mL/dk akış hızında farklı gradient programları denemeleri yapılsa da istenilen sonuca varılamamıştır. Bir de bu son hareketli fazlarla, C8 kolonu ile 0,3 mL/dk akış hızında bir izokratik program denemesi yapılmıştır; ancak bu denemede de istenilen ayırım olmamıştır.

Denemelere YPSK cihazında devam edilmiştir. Yöntem parametresi olarak sadece cihaz özelliklerinden dolayı akış hızı ve enjeksiyon hacmi değiştirilip, hareketli faz A tekrardan 10 mM K₂HPO₄ pH=7,5 ve ACN karışım (90:10, h/h) çözeltisi seçilerek yeni bir gradient programı düzenlenmiştir. Buna göre akış hızı 1,2 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10,0 µL olarak belirlenmiştir. Bu denemelerde etken piki diğer safsızlık piklerinden ayrılmıştır. Tek tek verildiğinde de safsızlıklar gözlenebilmiştir. Etken pik alanının daha iyi gözlenebilmesi için daha sonra enjeksiyon hacmi 20,0 µL yapılmıştır. Bu çalışma sonucu nicel analiz için en uygun olarak gözlenmiştir.

- *Vismodegib İlgili Maddeler*

Denemelere YPSK cihazında başlanmıştır. İlk denemede hareketli faz A olarak %0,1 o-H₃PO₄ çözeltisi ve Waters Symmetry C8 (150 X 4,6 mm 3,5 µm) kolonu kullanıldı. En uygun çalışma dalga boyunu bulmak için 200-400 nm arasında tarama yapıldı. Tüm safsızlıklar asetonitril ve su karışımında (20:80, h/h) ve 0,1 mg/mL olarak sisteme verildi. Ancak C8 kolonda çalışıldığında pik kuyruklanması gözlenmiştir. Bunun nedeni; yanlış kolon seçiminden, enjeksiyonun yetersizliğinden, ortam pH’nın uygun olmamasından, ters faz çalışmalarda çözücünün fazla polar

olmasından dolayı apolar kolon üzerinde bir tabaka gibi analitin tutunması gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle önce kolon değişikliğine ardından hareketli faz değişikliğine gidilmiştir. Değişiklik yapılırken her zaman çözüm odaklı ve en kolay değiştirilebilen parametrelerden başlanmıştır. Bir sonraki denemede de tüm parametreler aynı olacak şekilde Waters Symmetry, C18 (250 X 4,6 mm; 5,0 μ m) kolonu ile analiz yapılmıştır. Ancak pik şekilleri istenilen şekilde gelmemiştir. Bu nedenle pik şekillerinin daha dar ve keskin gelmesi için hareketli faz A 10 mM K_2HPO_4 (pH=6,5) tampon çözeltisi ile değiştirilmiştir. Nitekim pik şekilleri biraz daha iyi gelmiştir. Fakat piklerin erken gelmesi nedeniyle ve bundan dolayı kör çözücünden gelen piklerle girişim olmaması için gradient programında değişikliğe gidilmiştir. Bu sayede pikler biraz sağa kaymıştır. Kromatogramı daha da iyileştirmek için hareketli faz A olarak pH 3,0; 4,0 ve 4,5'te 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri de denenmiştir. Farklı pH'ların denenme nedeni her madde için uygun pH'da ortak tampon çözeltisi bulabilmektir.

Vismodegib, Vismo-1 ve Vismo-2 pK_a değerleri sırasıyla 3,8; 2,09 ve 4,24'tür. pK_a değerlerine göre bakıldığında maddeler zayıf asidik özelliktedirler. Dolayısıyla en ufak pH değişikliklerinden etkilenmektedir. Bunun önüne geçmek ve iyi bir kromatografik ayırım yapmak için hareketli faz olarak tampon çözeltiler kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin seçiminde de ayırımı yapılacak maddelerin pK_a değeri önemlidir. Tampon kapasitesini en üst düzeyde kullanılması için de ayrılacak analitin pK_a ile tampon çözeltisinin pH'ı yakın olmalıdır. Handerson-Hasselbalch denkleminde göre; ortamın pH değeri maddenin pK_a değerinin ± 2 aralığında olmalıdır. Bu aralıkta maddenin çoğu ya iyonlaşır ya da non-iyonize halde olur. Bu da kullanılacak kolona göre ayırımı dolayısıyla; geri kazanımı etkiler. Denemelerde pH 3,0'teki 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisinde daha iyi kromatogram elde edilmiştir.

Pik şekillerinin ve ayırımın daha iyi olduğu pH 3,0'teki 10 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi ve %0,1 o- H_3PO_4 çözeltisi için denemeler, kolon değişikliği yapılarak devam edilmiştir.

Hareketli faz A için kullanılan diğer %0,1 trifloroasetik asit, amonyum format

ve trietilamin (pH=4,5) karışımı ile 10 mM KH₂PO₄ ve trietilamin (pH=2,2) karışım çalışmalarında kromatogram şekilleri kötü gelmiştir.

Çözücü olarak ilk kullanılan asetonitril ve su karışımında (20:80, h/h) Vismodegib etken maddesinde çökmüştür. Asetonitril oranı arttıkça çözünme artmıştır. 50:50 oranında bir karışımında tüm maddeler de çözünme gerçekleşmiştir. Yine de farklı bir çözücü sistemi çalışmaları devam etmiştir. Bu amaçla metanol ve su karışımları denenmiştir. Tüm maddeler için en uygun metanol ve su karışımı (50:50, h/h) bulunmuştur. Yöntem parametrelerine göre bu çözücü sisteminde sonuçlar daha iyi gözlenmiştir.

Hareketli faz B seçiminde ilk olarak asetonitril tercih edilmiştir. Bunun yanında çözücü olarak metanol ve su karışımı (50:50, h/h) kullanıldığı ve hareketli fazın da benzer özellikte olması gerektiğinden metanol de denenmiştir. Ancak metanol kaynaklı zemin gürültüsü daha çok geldiği ve ileride validasyonda TAS ve TS çalışmalarında yanıltıcı sonuçların çıkmaması için; asetonitril hareketli faz B olarak belirlenmiştir. Dahası asetonitril ile metanol benzer polaritede bulunan organik çözücüler olduğu için pik ayrımı üzerinde büyük bir değişiklik olmamıştır.

Denemelerde önce 0,1 mg/mL derişimde başlanılan çalışmalarda bilinmeyen safsızlıkların daha iyi gözlenebilmesi için de etken madde derişimi 0,5 mg/mL ve safsızlıklar da 0,00075 mg/mL olarak devam edilmiştir. Kromatogramın sonuna bilinmeyen iki pik gelmiştir. Bu piklerin tanımlamak için tekrardan kütle spektroskopisi çalışması yapılmıştır. Piklerin alıkonma zamanında gelen m/z değerlerine bakıldığında etken maddenin dimerleşmesi sonucu oluşan safsızlıklar olduğu görülmüştür. Bu safsızlıklara Vismo-3 ve Vismo-4 ismi verilmiştir.

C8 yerine C18 kolonu ile çalışıldığında piklerin alıkonma zamanı uzamıştır. Çünkü, C18 kolonun alkil zincir sayısı daha fazladır dolayısıyla çok güçlü hidrofobiktir. Bu da çoğunlukla apolar özellikte olan ilaç maddelerinin kolonda tutunmasını arttırmıştır. Ayrımın daha iyi olması için fenil kolon denemeleri de yapılmıştır. Bu kolonlar C8 kolonlarına benzer güçlü hidrofobik özelliktedir ama; C18

ve C8 kolonlarından daha iyi ayrım gösterir. Bunun nedeni, fenil kolonu ile aromatik gruplar veya doymamış bağlar içeren bileşikler arasındaki $\pi - \pi^*$ etkileşimin de devreye girmesidir. Hidrofobik etkileşim yanında, elektronegatif grup veya bir atom içeren aromatik bir gruptaki bu etkileşim ile kolonda tutunma artacak ve ayrım daha iyi olacaktır. Görüldüğü gibi analitin ayrılmasında sadece hidrofobik etkileşimler değil, farklı etkileşimler de görev almaktadır.

Tüm bu çalışmalar 200-400 nm UV-GB bölgesi aralığında yapılmıştır. Bu aralıkta 254 nm ve 230 nm dalga boyları tüm maddeler için en uygun olarak görülmüştür. Bu nedenle kolon ve hareketli faz belirlerken her iki dalga boyunda da sonuçlara bakılmıştır. İkisi arasında zemin şekli ve gürültüsü en iyi 254 nm’de gözlenmiştir; ancak bu dalga boyunda Vismo-1 alanı düşük gelmiştir. Bu nedenle enjeksiyon hacmi iki katına çıkarılmıştır.

Kolon ve hareketli faz seçiminden sonra yöntemin en iyi hale gelmesi için farklı gradient programları, akış hızları, enjeksiyon hacimleri, kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıkları denenmiştir. Akış hızı ve enjeksiyon hacmi tüm pikler için zemin gürültüsünden ayrımı yapılabilecek, etken ve bilinen safsızlıklar için ek olarak nicel olarak tayin edilecek ve cihazın algılama sınırını geçmeyecek şekilde belirlenmiştir. Ancak yapılan tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde en iyi ayrım uzun bir gradient programı ile elde edilebilmiştir. Vismodegib ilgili maddeler yönteminin üretimde ve kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılacağı göz önünde tutularak, analiz süresinin azaltılmasına yönelik çalışmalara geçilmiştir. Bu amaçla UYPSK cihazında denemeler yapılmıştır. Belirlenen hareketli fazlar ve fenil kolonu ile yöntem parametrelerinde değişiklikler yapılarak ilerlenmiştir. Hareketli faz A olarak hazırlanışının daha rahat olması ve cihazda tuz gibi bir birikme yapmamasından dolayı %0,1 o-H₃PO₄; hareketli faz B olarak da asetonitril kesin olarak belirlenmiştir. Daha önce Vismo-1 alanı için enjeksiyon hacminin arttırılması yerine 230 nm dalga boyunda denemeler yapılmıştır. Çünkü enjeksiyon hacminin arttırılmasından kaynaklı kolonda fazla madde yüklenebilir ve pik kuyruklanması oluşabilmektedir. Tüm analiz edilecek piklerin daha iyi gözlenmesi için de Vismodegib etken maddesi 1,0 mg/mL derişimde çalışılmıştır. Çalışmalarda kolon sıcaklığı 25 °C, 30 °C, 40 °C ve oto-örnekleyicinin 10 °C ve 15

°C olduğu şartlar çalışılmıştır. Benzer sonuçlar olduğu için cihazın en rahat sabit kaldığı 30 °C ve 15 °C seçilmiştir.

Vismo-1, Vismo-2 ve Vismodegib pKa değerlerine göre %0,1 o-H₃PO₄ çözeltisinin pH değeri (pH=2) uygun gözükmebilir; ancak gradient programında organik miktarının arttırılmasıyla uygun pH değerine gelinebilir. Bu nedenle de gradient programındaki organik oranında ve akış hızında değişiklikler yapılarak yöntem optimize edilmiştir.

- *Vismodegib Miktar Tayini*

Vismodegib ilgili maddeler için yapılan yöntem optimizasyonunda fenil kolondan sonra en iyi C18 kolonunda ayırım gerçekleşmişti. Burada sadece etkenin saf olarak ayrılması gerektiğinden Waters Symmetry C18 (150 x 4,6 mm; 5,0 µm) kolonu ile tercih edilmiştir. Ayrıca Vismodegib ilgili maddeler yönteminde kullanılan hareketli fazlar ve sıcaklıklar seçilmiştir. Elüsyon programı denemelerinde gradient yerine izokratik program ile ayırım kısa sürede istenilen şekilde sağlanabilmiştir.

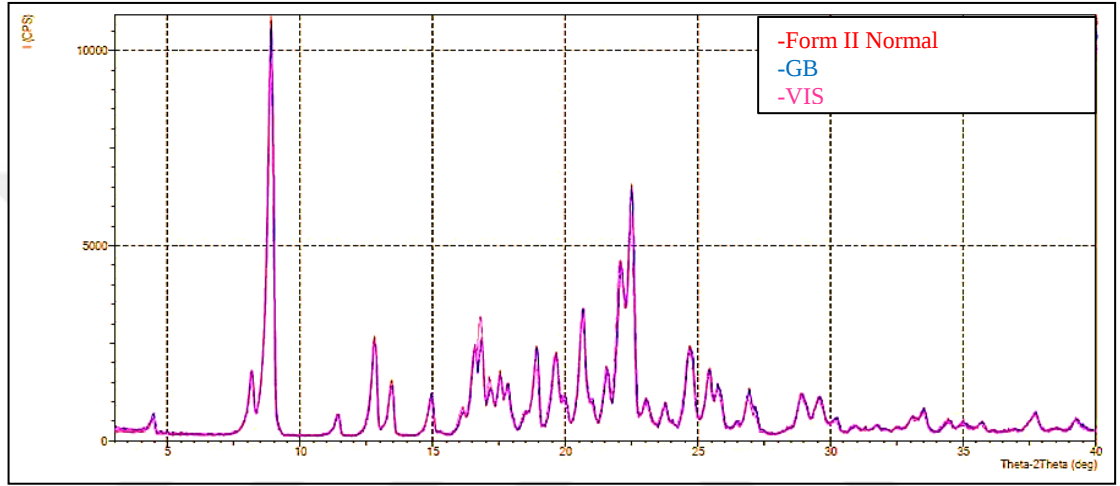
- *Stres ve Kararlılık Çalışmaları*

Stres çalışmaları, ilaç etken maddesinin olası bozunma yollarının ve potansiyel bozunma ürünlerinin bulunması, moleküler kararlılığın belirlenmesi ve kullanılan analitik yöntemlerin uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılır. Bu maksatla; ilaç etken maddesinin hidroliz, oksidasyon, fotoliz, termoliz gibi en zor koşullarda bozunması sağlanır. Bu çalışmanın amacı ilaç etken maddeyi tamamen parçalamak değil, genellikle ilaç etken maddenin %5-15 oranında bozunmasına neden olmaktır. Yani bozundurma ana fikri bozundurma ürünlerinin ortaya çıkabileceği; ancak ikincil ürünlerin oluşamayacağı şekilde yeterli ortamın sağlanmasıdır.

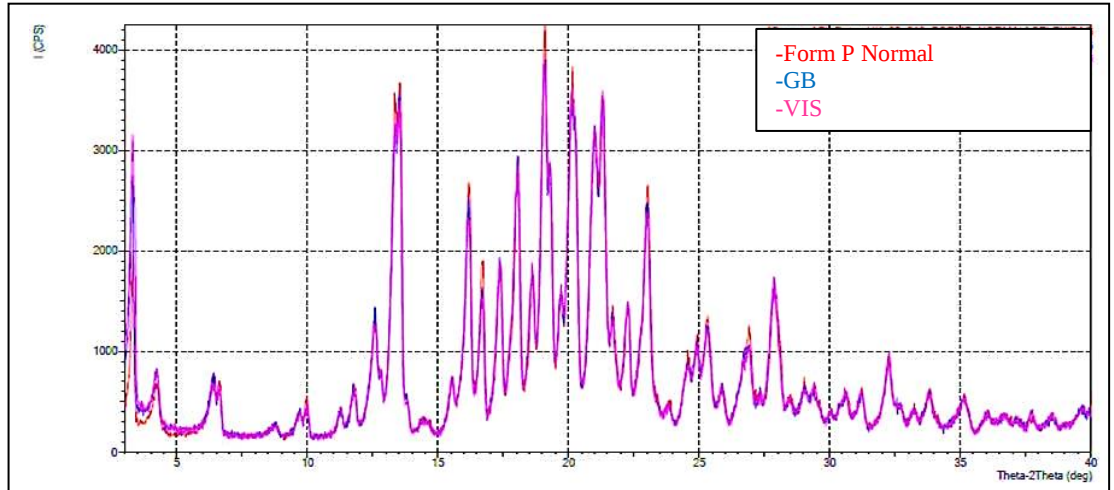
Selexipag ve Vismodegib numuneleri asit, alkali, peroksit, termal, hidroliz, UV ve GB ile muamele edildi ve ilgili maddeler ve miktar tayini analitik yöntemlerine göre

eş zamanlı olarak analiz edildi.

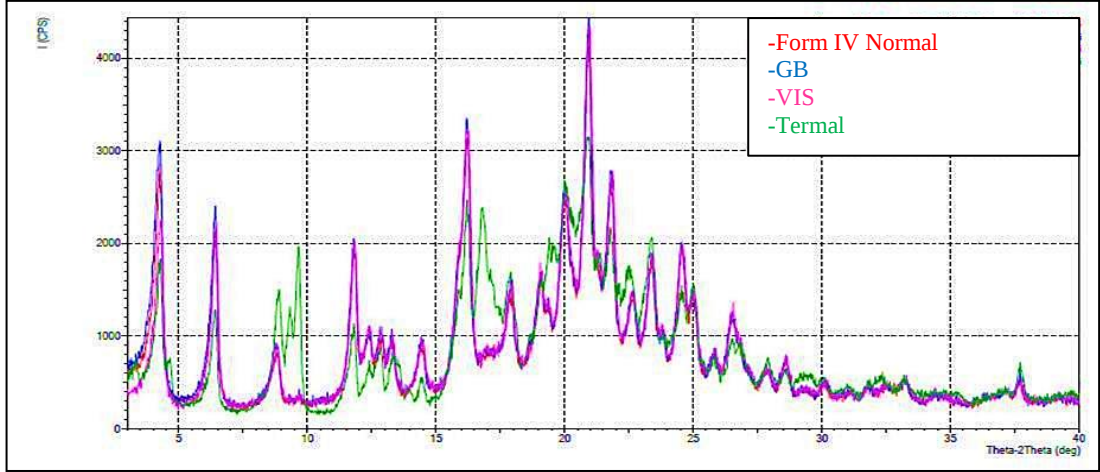
Termal koşullarda Selexipag'ın I, II (Şekil 4.1), III ve P (Şekil 4.2) formları polimorfik olarak kararlı bulundu. Ancak, form IV'ün kimyasal olarak kararlı olmasına rağmen polimorfik olarak kararlı olmadığı ve bir miktar Form I' e dönüştüğü görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Selexipag form-II'nin ışık bozundurması ve normal şartlardaki çakıştırılmış XRD difragtogramı.

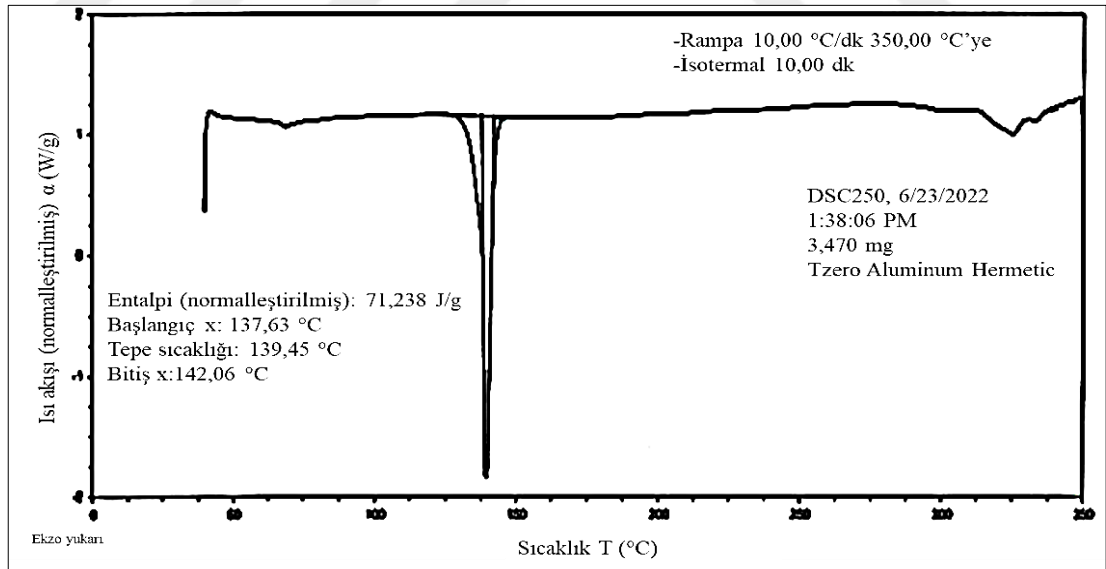


Şekil 4.2. Selexipag form-P'nin ışık bozundurması ve normal şartlardaki çakıştırılmış XRD difragtogramı.

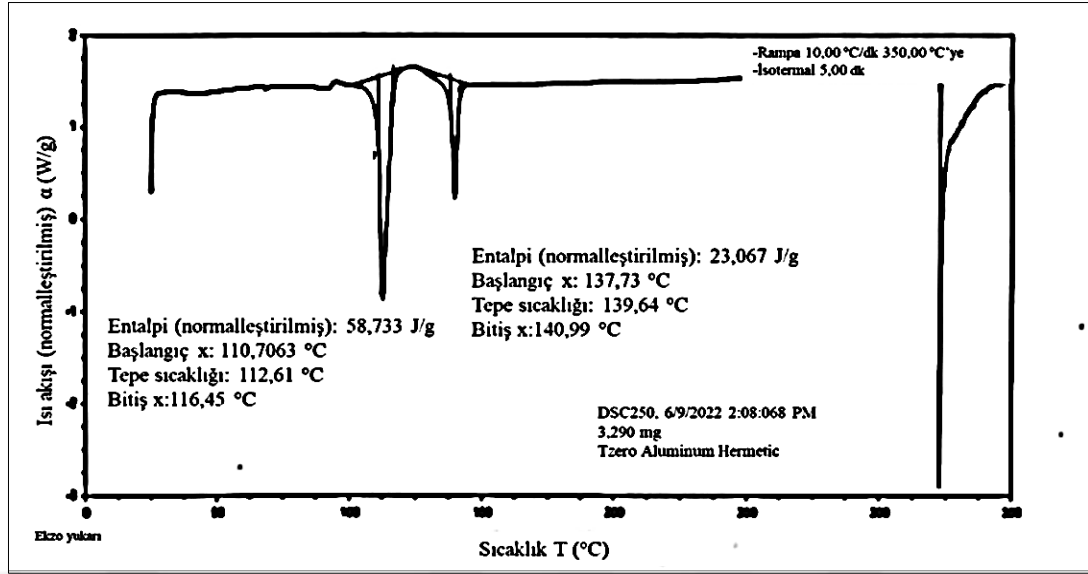


Şekil 4.3. Selexipag form-IV XRD difraktogramı.

XRD ve DSC çalışmaları incelendiğinde form IV, 105 °C’de 14 gün, 125 °C’de 16 saat tutulduğunda tamamen form I’e dönüşmüştür (Şekil 4.4). Ayrıca P formunun DSC grafiğinde, erime noktasından sonra form I’in erime noktasıyla örtüşen bir endotermik pik gözlemlendi. Bu da P formunun erime noktası sıcaklığından sonra termal etki nedeniyle I formuna dönüştüğünü düşündürmektedir (Şekil 4.5).

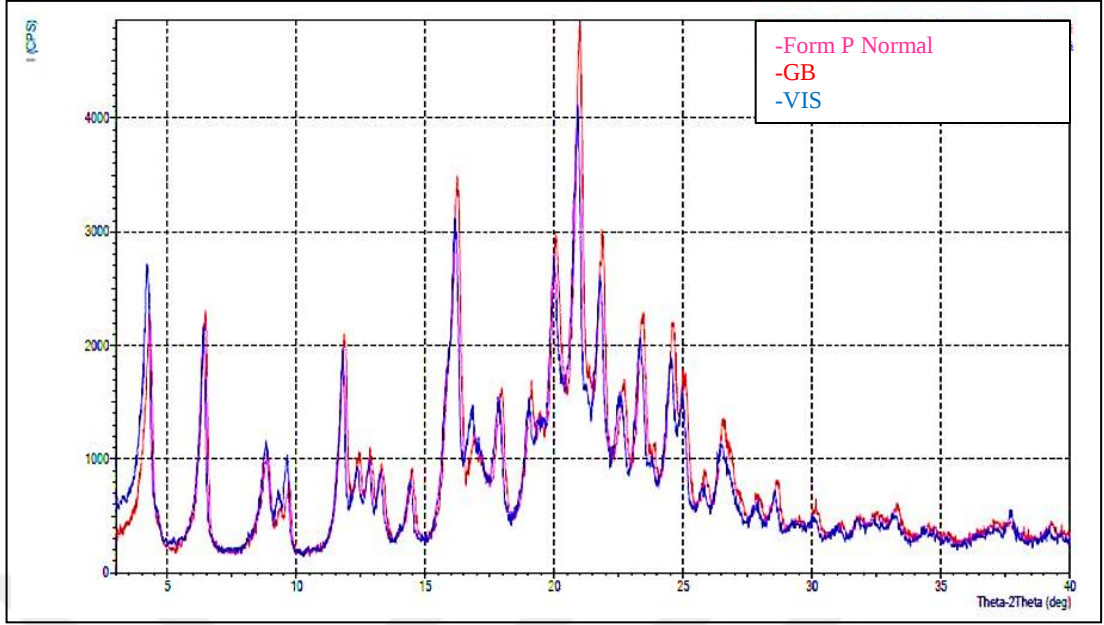


Şekil 4.4. Selexipag form-IV için termal çalışmadan sonraki DSC grafiği.



Şekil 4.5. Selexipag form-P DSC grafiği.

Tüm formlar, ışık koşullarında, hem UV hem de VIS’de değerlendirildi. I, II, III ve P formları benzer kararlılık gösterdi. Bu yüzden; form P, form IV ile karşılaştırmalarda örnek olarak kullanıldı. Form P ve diğerleri, her koşulda hem kimyasal hem de polimorfik olarak bozunmazken, Form IV, ışık koşullarında hem kimyasal hem de polimorfik olarak bozunma eğilimindedir. Ek olarak; LDPE, HDPE ve PE-ALU ambalajların sırasıyla içten dışa doğru sıkıca kapatıldığı ve LDPE ile HDPE poşetler arasına silika jel konulan paketleme sistemi ile Form IV’ün polimorfik olarak 180 gün kararlı kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Selexipag form-P 180 gün XRD difragtogramı.

P formunun; asit, alkali ve oksidasyon bozundurma çalışmaları sonucu Selex-asit safsızlığı arttı; ayrıca oksidasyon çalışmasında bilinmeyen safsızlıklar da ortaya çıktı. Asit ve alkali bozundurma çalışmaların nicel sonuçlarına göre önemli bir bozunma olduğu görülmektedir. Oksidasyon için de nicel uygun bulundu.

Tüm çalışmalarda kütle dengesi sağlandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Selexipag stres test sonuçları.

Test	Safsızlık	Başlangıç	Isı	Oksidasyon		Hidroliz			Işık ile bozundurma		
				%10 H ₂ O ₂	%30 H ₂ O ₂	Nötral	Asit	Baz	Başlangıç	GB	UV
İlgili maddeler (%)	Selex-1	0,06	0,06	0,10	0,07	0,07	0,09	0,09	0,04	0,04	0,04
	Selex-asit	0,08	0,16	0,80	0,74	3,44	15,51	14,89	0,06	0,06	0,06
	Bilinmeyen safsızlık (RRT 0,438)	TE	TE	TE	0,08	TE	TE	TE	<%0,05	<%0,05	<%0,05
	Bilinmeyen safsızlık / (RRT 0,579)	TE	TE	TE	0,08	TE	TE	TE	TE	0,07	0,06
	Bilinmeyen safsızlık / (RRT 0,585)	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Bilinmeyen safsızlık / (RRT 0,741)	TE	TE	0,07	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Bilinmeyen safsızlık / (RRT 0,788)	<%0,05	TE	0,09	0,14	<%0,05	TE	TE	<%0,05	<%0,05	<%0,05
	Bilinmeyen safsızlık / (RRT 0,893)	0,07	<%0,05	0,09	0,11	0,07	<%0,05	TE	<%0,05	<%0,05	<%0,05
	Bilinmeyen safsızlık (RRT 0,962)	TE	<%0,05	<%0,05	0,05	0,05	TE	TE	<%0,05	<%0,05	<%0,05
	Toplam safsızlık	0,21	0,22	1,15	1,27	3,63	15,60	14,98	0,10	0,17	0,16
Miktar tayini, %		99,33	100,97	98,22	98,94	94,81	82,27	86,35	99,86	99,48	99,03
Kütle dengesi		99,5	101,2	99,4	100,2	98,4	97,9	101,3	100,0	99,6	99,2

Vismodegib için stres sonucunda form değişikliği gözlenmemiştir. Tüm çalışmalarda kütle dengeliği sağlanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. Vismodegib stres test sonuçları.

Test	Safsızlık	Başlangıç	Isı	Oksidasyon		Hidroliz			Işık ile bozundurma	
				%10 H ₂ O ₂	% 30 H ₂ O ₂	Nötral	Asit	Baz	Gün ışığı	UV ışığı
İlgili maddeler (%)	Vismo-1	TE	TE	<%0,05	<%0,05	TE	4,92	0,40	TE	TE
	Vismo-2	TE	TE	TE	TE	TE	4,08	0,32	TE	TE
	Vismo-3 (RRT~1,77)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08
	Vismo-4 (RRT~1,98)	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,06	0,07	0,07	0,07
	Toplam safsızlık	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	9,13	0,87	0,15	0,15
Miktar tayini, %		100,50	100,25	99,86	99,71	100,72	91,01	99,60	100,15	100,71
Kütle dengesi		100,7	100,4	100,0	99,9	100,9	100,1	100,5	100,3	100,9

Vismodegib ve Selexipag sonuçlarına için; ilaç etken madde pikinin, tüm safsızlık ve bozundurma piklerinden iyi bir şekilde ayrıldığı yani ilaç etken madde pikinin saf olduğu bulundu. Dolayısıyla; Selexipag'ın ve Vismodegib'in ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri, ilaç etken maddeleri için kararlılık gösteren yöntemlerdir.

Selexipag form P'nin ve Vismodegib'in kısa süreli hızlandırılmış kararlılığını belirlemek için oda sıcaklığında (25 °C / %60 sıcaklık / bağıl nem) ve 40 ± 2 °C / %75 ± 5 sıcaklık / bağıl nem ortamında stabilite kabinlerinde 6 ay boyunca saklandı. Çalışma aralıkları 0, 3 ve 6 ay olarak belirlendi. Numunelerin kimyasal bozundurma ve fiziksel özelliklerindeki değişimler altı ay boyunca kontrol edildi. Stabilite çalışmalarında ilaç etken maddelerinin miktar tayinine göre; Selexipag ve Vismodegib miktarlarının zaman içinde fazla değişmediği ve fiziksel bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Orijinal ilaç üretimi zaman alıcı, zor ve maaliyetli olduğu için; üretilen bir ilacın ilaç pazarında yerinin büyük olması istenir. Kanseri ilaçlarında ve pazar oranı düşük olduğu nadir hastalıklarında ilaç fiyatları çok yüksektir. Bu nedenle ilaç etken madde üretimi ve akabinde eşdeğer ilaç üretimi, hem hastaların ilaca kolay ve ekonomik ulaşması, hem de ülke ekonomisine olan katkısı nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

Tez kapsamında çalışılan ve DEVA Holding A.Ş.'de eşdeğer ilaç üretiminde kullanılmak üzere üretilen Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri ilaç pazarında önemli yere sahiptir. Selexipag ilaç etken maddesi PAH gibi nadir hastalıkların tedavisinde; Vismodegib ilaç etken maddesi BCC tedavisinde kullanılmaktadır.

İlk olarak, sentezlenen ilaç etken maddelerinin farmakopelerde yer alan bilgilere ve sentez basamaklarına göre safsızlık profili çıkarılmıştır. Ardından hem ilaç etken maddeleri hem de safsızlıklar ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve FTIR spektroskopik yöntemler ile karakterize edilmiştir. Kütle spektroskopisiyle elde edilen m/z değerlerine göre de maddeler kesin olarak belirlenmiştir. Tanımlamalardan sonra maddeler standardize edilmiştir. Ardından her iki ilaç etken maddesi için hem ilgili maddeler hem de miktar tayini olmak üzere toplamda dört tane yöntem geliştirilmiştir ve optimize edilmiştir. Her bir optimize yöntem ICH yönergelerine göre valide edilmiştir.

Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri apolar yapıda olduklarından ters faz kromatografisi çalışılmıştır. Bu kromatografide sabit faz, kolon, apolar özelliktedir ve ayırım bu fazın yüzeyinde gerçekleşir. Kolon boyunca çözünmüş maddenin sürüklenmesini sağlayan hareketli faz da polar özelliktedir. Benzer benzeri çeker ilkesine göre bir madde ne kadar apolarsa kolona ilgisi artar ve kolona daha çok tutunacağı için farklı polar yapıdaki diğer maddelerden ayrılmış olur. Bu nedenle; analitik yöntem geliştirirken kullanılan çözücülerin, sabit ve hareketli fazın, ilaç etken maddelerinin polarite özellikleri bilinmelidir.

Bu yöntemler, kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizlerde kullanılacağı için; yöntemin kısa, hızlı, kesin ve doğru olması çok önemlidir. Bu amaçla, en uygun olacak şekilde cihaz seçimleri yapılmıştır. Hem YPSK hem de UYPSK cihazlarında en uygun yöntem için denemeler yapılmıştır.

Her iki etken madde için yöntem geliştirilirken öncelikle çözünme testleri yapılmıştır. Bu amaçla orta polarlıkta ve düşük vizkosite de asetonitril, metanol gibi organik çözücüler ve bunların suyla belli oranda karışmış çözücü sistemleri kullanılmıştır. Her iki madde, belirlenen tartım ve hacimde %100 metanol ve asetonitril ile çözünmüştür.

Organik ilaç etken maddelerinin elektronik geçişleri, $n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$, UV bölgesine denk gelmektedir. Bu nedenle 200-400 nm arası çalışılmaktadır. Bu aralıkta, yöntemin seçici olması için çözücünün bu bölgede az absorpsiyon yapması ya da hiç absorpsiyon yapmaması gerekir. Bu nedenle bu kromatografik çalışmalarda organik çözücüler ve su hem çözücü olarak hem de hareketli faz olarak kullanılır.

Maddelerin ayrımının en iyi olması için; hidrofobilitesi çok yüksek kolonlar kullanılmıştır. Hareketli faz seçiminde maddelerin pK_a değerleri dikkate alınarak, hareketli faz pH'ı hesaplanmıştır. Bunun için tampon çözelti kullanılmış veya elüsyon programında organik miktarıyla oynanmıştır.

Limitler ICH Q3B(R2) rehberine göre belirlenir; bu limitlere göre derişimler de kullanılan cihazın algılama sınırına göre hesaplanır. Buna göre; ilaç etken madde içerisinde bilinen bir safsızlık en fazla %0,15; bilinmeyen bir safsızlık ise en fazla %0,10 oranında olmalıdır.

Selexipag ilgili maddeler yöntemi için en uygun çözücü sistemi asetonitril ve su karışımı (40:60, h/h) olarak bulunmuştur. UYPSK cihazı ile yapılan çalışmalarda etken madde ve safsızlıklar için en uygun absorpsiyon 300 nm olarak gözlenmiştir. Buna göre etken madde derişimi 0,25 mg/mL olarak; bilinen safsızlık derişimleri de 0,375

$\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Selex-2 ise bud alga boyunda gözlenmemiştir. Genotoksik olduğu için ayrı bir yöntemle takip edilmiştir. Selexipag ilaç etken maddesi içinde bulunmamıştır.

Vismodegib ilgili maddeler validasyon yöntemi optimizasyonu için de aynı çalışmalar yapılmıştır. Etken madde derişimi $1,0 \text{ mg/mL}$ olarak ve bilinen safsızlık derişimi buna göre $1,5 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. En iyi absorpsiyon 230 nm 'de gözlenmiştir. En iyi ayırım fenil kolonda bulunmuştur. Her iki ilgili maddeler validasyon yöntemi; safsızlıkları ve etkeni tek tek ayırabilmiştir.

Miktar tayini validasyon yöntemi için safsızlık piklerinin spektral ve kromatografik olarak diğer piklerden ayrılmasına gerek yoktur. Önemli olan etken maddenin diğer piklerden hem spektral hem de kromatografik ayrılmasıdır. Doğru bir nicel analiz için çok hassas ölçümler yapılarak çalışılmalıdır.

Sistem sıcaklıklarındaki veya akış hızındaki artış veya azalış maddelerin alıkonma zamanında etkilidir. Sıcaklık aynı zamanda maddenin bozunmasına da neden olabilmektedir. Bu nedenle tüm yöntemlerde; maddelerin bozulmadığı, en iyi ayırımın olduğu kolon ve oto-örnekleyici sıcaklıkları seçilmiştir. Pik alanı ve yüksekliklere göre de enjeksiyon hacmi belirlenmiştir.

Tüm validasyon yöntemleri ICH Q2(R1) rehberine göre doğrulanmıştır. İlaç etken maddelerinin stres çalışmaları da bu yöntemler ile yapılmıştır. Maddeler asit, alkali, ısı, ışık, peroksit gibi ortamda zorla bozundurularak, olası bozunma yolları ve potansiyel bozunma ürünleri ile moleküler kararlılığı belirlenmiştir. Selexipag ilaç etken maddesinin formları arasında form IV'ün ısı ve ışıktan etkilendiği görülmüştür. Sentezlenen Selexipag formu ise bozundurma koşullarına karşı kararlıdır. Aynı şekilde Vismodegib de stres testlerine göre kararlıdır. Her iki etken maddenin altı aylık hızlandırılmış stabilite sonuçlarına göre de fiziksel ve kimyasal değişiklik olmamıştır.

Literatürde bu ilaç etken maddeleri için yapılan çoğu analitik çalışma

biyoanalitiktir. Daha çok klinik çalışmalar ve rutin hasta takibi için, sadece etken maddenin biyolojik örneklerdeki takibi ve miktar ölçümü amaçlanmıştır. İlaç etken maddelerin üretim sırasında ve sonrasındaki rutin kalite kontrol analizlerine yönelik bu şekilde kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca raf ömrü için tüm safsızlıkların içinde bulunduğu bir stabilite çalışması da literatürde yapılmamıştır. Bu çalışmada ise her iki ilaç etken madde için hem ilgili maddeler hem de miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Stres çalışmalarıyla da olası bozunma yolları gösterilmiştir ve yöntem kararlılığı ispatlanmıştır. Üretim sonrası Selexipag ve Vismodegib için yapılan hızlandırılmış altı aylık stabilite sonuçları da gösteriyor ki hem ilgili maddeler hem de miktar tayini yöntemleri seçici, kesin, doğru, kararlı ve sağlamdır.



ÖZET

Selexipag ve Vismodegib İlaç Etken Maddeleri ve İmpüritelerinin Spektroskopik Olarak Karakterizasyonu ve Kromatografik Yöntemlerle Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Selexipag ilaç etken maddesi, nadir bir hastalık olan pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmaktadır. Vismodegib ise bir cilt kanseri türü olan bazal hücreli karsinom tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu amaçla tez kapsamında eşdeğer olarak üretilen Selexipag ve Vismodegib ilaç etken maddeleri için ICH rehberi baz alınarak, ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır.

İlaç etken maddelerinin apolar özellikte olmasından kaynaklı ters faz kromatografisi çalışılmıştır. ICH rehberine göre etken madde ve safsızlıkların limitleri belirlendikten sonra, maddeler spektroskopik olarak; $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, kütle spektrometreleri ile tanımlanmıştır.

Tanımlanan maddelerin standardizasyonları yapılmış ve üretim şarjlarından alınan ilaç etken maddeleri için ilgili maddeler ve miktar tayinleri yapılmıştır. Yöntemler ICH Q2(R1) rehberine göre başarıyla valide edilmiştir. Böylece; kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizler için kullanılabilecek kesin, doğru, kararlı, seçici yöntemler elde edilmiştir. Ardından ilaç etken maddelerinin stabilite ve raf ömrü çalışmaları için zorlu bozundurma koşullarına tabi tutularak, valide edilen ilgili maddeler ve miktar tayini yöntemleri ile eş zamanlı analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda iki ilaç etken maddenin bu koşullarda kararlı olduğunu göstermiştir. Hızlandırılmış altı aylık stabilite sonuçları arasında da önemli bir fark gözlenmemiştir.

Anahtar Sözcükler Selexipag, UYPSK, Validasyon, Vismodegib, YPSK

SUMMARY

Spectroscopic Characterization of Selexipag and Vismodegib Active Pharmaceutical Ingredients and Impurities, and Analytical Method Development and Validation by Chromatographic Methods

Selexipag drug active ingredient is used in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH), a rare disease. Vismodegib is used in the treatment of basal cell carcinoma, a type of skin cancer.

For this purpose, based on the ICH guideline for the generically produced Selexipag and Vismodegib pharmaceutical active ingredients, the relevant substances and the quantification method were developed and validated.

Reverse-phase chromatography was studied due to the apolar nature of drug active ingredients. After determining the limits of active substances and impurities according to the ICH guide, the substances are spectroscopically; It was identified by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FTIR, mass spectrometers.

Standardization of the defined substances has been made and related compounds and quantifications have been made for the active pharmaceutical ingredients taken from the production batches. The methods have been successfully validated according to the ICH Q2(R1) guidelines. Thus; precise, accurate, stable and selective methods that can be used for routine analyzes in quality control laboratories have been obtained. Active pharmaceutical ingredients were subjected to harsh degradation conditions for stability and shelf life studies and analyzed simultaneously with validated related compounds and quantification methods. As a result of the study, two drugs showed that the active substance was stable under these conditions. No significant difference was observed between the accelerated six-month stability results either.

Keywords HPLC, Selexipag, UPLC, Validation, Vismodegib

KAYNAKLAR

- ACARTÜRK F (2004). Etken madde ve ilaç şekilleri açısından impüritenin önemi. *TÜFTAD*, **11** (3): 14-17.
- AHUJA S, ALSANTE K (2004). Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals. Academic basımevi, p: 231-248.
- AN SM, DING QP, LI LS (2013). Stem cell signaling as a target for novel drug discovery: recent progress in the WNT and Hh pathways. *Acta Pharmacologica Sinica*, **34**: 777-783.
- AVCI O (2012). Hedgehog. *Turk J Dermatol*, **6** (4): 162-167.
- BABU NLA, KOGANTI K, PALAKEETI B, SRINIVAS KSV, RAO KP (2020). Bioanalytical LC-MS/MS method for determination and comparison of Selexipag assay in various biological materials and its application to pharmacokinetics studies in rat plasma. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, **11** (2): 2210-2220.
- BHADRU B, RAOB VV, VIDHYADHARAB S (2019). Development and validation of bioanalytical method for the quantitative estimation of Selexipag in biological matrices using LC-MS/ MS. *J. Pharm. Sci. & Res.*, **11** (7): 2722-2727.
- CARPENTER D, STONE DM, BRUSH J, RYAN A, ARMANINI M, FRANTZ G, & SAUVAGE FJ DE (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate Hh protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** (23): 13630-13634.
- CHAUHAN A, CHAUHAN J (2014). Powder XRD technique and its applications in science and technology. *J Anal Bioanal Tech.*, **5** (5): 1-5.
- CIRRONE F, HARRIS CS (2012). Vismodegib and the Hh pathway: A new treatment for basal cell carcinoma. *Clinical therapeutics*, **34** (10): 2039-2050.
- ÇOŞKUN Ö (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, **3** (2): 156-160.
- DAMIREDDY S, PRAVALIKA K, PRAVEEN M, SATHISH G, ANUSHA M (2017). Method development and validation of Selexipag in its bulk and dosage form by RP- HPLC. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **7** (4): 84-92.

- DENG Y, WONG H, GRAHAM RA, LIU W, SHEN HS, SHI Y, WANG L, MENG M, MALHI V, DING X, DEAN B (2011). Determination of unbound vismodegib (GDC- 0449) concentration in human plasma using rapid equilibrium dialysis followed by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **879** (22): 2119-2126.
- DING X, CHOU B, GRAHAM RA, CHEETI S, PERCEY S, MATASSA LC, REUSCHEL SA, MENG M, LIU S, VOELKER T, LUM BL, RUDEWICZ PJ, Hop C (2010). Determination of GDC-0449, a small-molecule inhibitor of the Hh signaling pathway, in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **15** (878): 785-790.
- DORABABU N, ABDULMUEED YK (2021). Analytical method development and validated stability for the estimation of Vismodegib in bulk dosage forms by RP-HPLC method. *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, **8** (6): 4017-4031).
- ERDİK E (2007). Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler. 4. Baskı, Gazi kitabevi.
- ERIVEDGE® Prescribing Information (2020). Erişim Adresi: [https://www.gene.com/download/pdf/erivedge_prescribing.pdf].
- ETTRE LS (2003). M.S. Tswett and the invention of chromatography. *LCGC North America*, **21** (5): 458-467.
- FELLNER C (2012). Vismodegib (Erivedge) for advanced basal cell carcinoma. *Pharmacy and Therapeutics*, **37** (12): 670-682.
- GALIÈ N, CORRIS PLA, FROST A, GIRGIS RE, GRANTON J, JING ZC, KLEPETKO W, MCGOON MD, MCLAUGHLIN VV, PRESTON IR, RUBIN LJ, SANDOVAL J, SEEGER W, KEOGH A (2014). Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Arch Turk Soc Cardiol.*, **42**: 78-94.
- GALIÈ N, HUMBERT M, VACHIER Y JL, GIBBS S, LANG I, TORBICKI A, SIMONNEAU G, PEACOCK A, NOORDEGRAAF AV, BEGHETTI M, GHOFrani A, SANCHEZ MAG, HANSMANN G, KLEPETKO W, LANCELLOTTI P, MATUCCI M, MCDONAGH T, PIERARD LA, TRINDADE PT, ZOMPATORI M, HOEPER M (2016). 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the european society of cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International society for heart and lung

transplantation (ISHLT). *European Heart Journal.*, **37** (1): 67-119.

GOUD VM, HARINI M, DEVI CHBP, GOUD MM (2021). Quantification and stability indicating method development and validation of Vismodegib in bulk and pharmaceutical dosage form by ultra performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Research International*, **33** (59A): 858-866.

GORUMUTCHU GP, RATNAKARAM VN (2018a). Diazo coupling for the determination of Selexipag by visible spectrophotometry. *International Journal of Green Pharmacy*, **12** (4): 822-828.

GORUMUTCHU GP, RATNAKARAM VN (2018b). Oxidative coupling: A tranquil approach for determination of Selexipag by visible spectrophotometry. *Orient. J. Chem.*, **34** (6): 3112-3117.

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Geneva. Q2A(R1).

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Geneva. Q2B(R1).

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

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

JANSSENA JM, VRIESA ND, VENEKAMPA N, ROSINGA H, HUITEMAA ADR, BEIJNENA JH (2019). Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for nine oral anticancer drugs in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **174**: 561-566.

JOHNSON RL, ROTHMAN AL, XIE J, GOODRICH LV, BARE JW, BONIFAS JM, QUINN AG, MYERS RM, COX DR, JR EHE, SCOTT MP (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, **272** (5268):1668-1671.

JOSHIL MSA, PATEL CN (2020). Stability indicating assay method development and validation for Selexipag in pharmaceutical dosage form. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **9** (4): 293-304.

KARTAL SP, BAYRAMGÜRLER D (2016). Bazal hücreli kanser patogenezi. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, **1** (1): 18-23.

- KLEINMAN MH, ELDER D, TEASDALE A, MOWERY MD, MCKEOWN AP, BAERTSCHI SW (2015). Strategies To Address Mutagenic Impurities Derived from Degradation in Drug Substances and Drug Products. *Organic Process Research & Development*, **19**, 11:1447–1457.
- KONCA M, ÖZER Ö, UĞURLUOĞLU Ö (2015). Product development in pharmaceutical sector, the importance of supplementary protection certificate and the situation in Turkey. *Balıkesir health sciences journal*, **4** (3): 187-197.
- KOTWAL TS, PATWARDHAN DM, AMRUTKAR SS, WAGH MP (2017). Development and validation of simple UV spectrophotometric method for the determination of Selexipag in API and its bulk dosage form. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, **7** (5): 8578-8586.
- KRAM DJ, MCGOVERN T (2007). Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Adv Drug Deliv Rev.*, **59** (1): 38-42.
- LAKSHMI B, REDDY TV (2012). RP-HPLC method for the quantification of Vismodegib in formulations. *Research Desk*, **1** (2): 50-59.
- MENCZEL JD, PRIME RB (2009). Thermal analysis of polymers: Fundamentals and Applications. Wilwy yayıncılık, Amerika.
- ÖZTÜRK Ö, AKKAYA A (2008). Pulmoner arteriyel hipertansiyon: Patogenez, derleme. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, **15** (4): 46-53.
- PAZARBAŞI A, KASAP M, KASAP H (2011). Kanser Yolakları. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **20** (4): 187-229.
- PAHSSc (2018). <https://www.pahssc.org.tr/hastaliklar/4/pulmoner-arteriyel-hipertansiyon-pah>.
- 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): 1-10.
- PRATHYUSHA SM, DEEPTI CA, NAIK RR, ANNAPURNA MM (2020). Development and validated of spectrophotometric methods for the determination of Selexipag (An anti- hypertensive agent). *Research J. Pharm. and Tech.*, **13** (3): 1346-1350.
- PRESSIAT C, HUYNH HH, PLÉ A, SAUVAGEON H, MADELAINE I, CHOUGNET C, MAIGNAN CL, MOURAH S, GOLDWIRT L (2018). Development and validation of a simultaneous quantification method of

Ruxolitinib, Vismodegib, Olaparib, and Pazopanib in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit*, **40** (3): 337-343.

PULUSU VS, KOMMARAJULA P (2019). Development and validation of a new chromatographic method for the estimation of Vismodegib by RP-HPLC. *J Chromatogr Sep Tech*, **10** (2): 1-6.

RAO KP, BABU NL, KOGANTI K, PALAKEETI B, KSV SRINIVAS (2021). Related substances method development and validation of an LCMS/MS method for quantification of Selexipag and its related impurities in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *SN Applied Sciences*, **3** (321).

RIMKUS TK, CARPENTER RL, QASEM S, CHAN M, LO HW (2016). Targeting the sonic Hh signaling pathway: review of smoothened and gli inhibitors. *Cancers*, **8** (2) 22: 1-23.

RUDIN CM (2012). Vismodegib. *Clinical Cancer Research*, **18** (12): 3218-3222.

SANTOSH SS, DEVI NK (2021). Stability indicating method development and validation of Selexipag in bulk and pharmaceutical dosage form by using RP-HPLC. *Pharm Res.*, **5** (2) 000239: 1-15.

SARI IN, PHI LTH, JUN N, WIJAYA YT, LEE S, KWON HY (2018). Hh signaling in cancer: A prospective therapeutic target for eradicating cancer stem cells. *Cells*, **7** (11) 208: 1-33.

SATHESHKUMAR S, MURUGANANTHAM V (2021). Rabbit method for quantification of Selexipag in human plasma using high performance liquid chromatography with electron spray ionization tandem mass spectrometry. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, **25** (4): 5689-5707.

SIMONNEAU G, GATZOULIS MA, ADATIA I, CELERMAJER D, DENTON C, GHOFrani A, SANCHEZ MAG, KUMAR RK, LANDZBERG M, MACHADO RF, OLSCHESKI H, ROBBINS IM, SOUZA R (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, **62** (25) D: 34-41.

SIMONNEAU G, GATZOULIS MA, ADATIA I, CELERMAJER D, DENTON C, GHOFrani A, SANCHEZ MAG, KUMAR RK, LANDZBERG M, MACHADO RF, OLSCHESKI H, ROBBINS IM, SOUZA R (2014). Pulmoner arter hipertansiyonunun güncel klinik sınıflandırılması. *Türk Kardiyol Dern Arş.*, **42** (1): 45- 54.

SKOOG DA, HOLLER FJ, CROUCH SR (2017) Principal of Instrumental

Analysis. 7th Edition, Sunder College Publisher, New York, p:695-782.

TOPALOĞLU H (2014). International conference on harmonisation (ICH) nedir? Ne değildir? *İKU Dergisi*, **6**: 7-11.

UPTRAVI® Prescribing Information (2017). Erişim Adresi: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/207947s005lbl.pdf].

UPTRAVI European Medicines Agency (2016). Değerlendirme raporu. Erişim Adresi: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/uptravi-epar-public-assessment-report_en.pdf].

XIE S, SHI L, CHEN J, XU R, YE X (2020). Simultaneous quantification and pharmacokinetic investigation of Selexipag and its main metabolite ACT-333679 in rat plasma by UPLC-MS/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **190** (113496): 1-6.