



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**LENVATİNİB VE LİFİTEGRAST İLAÇ ETKEN
MADDELERİ İÇİN MİKTAR TAYİNİ VE SAFSIZLIK TAYİN
YÖNTEMLERİNİN İNCELENMESİ VE VALİDASYONU**

Merve UĞUR

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**ANKARA
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LENVATİNİB VE LİFİTEGRAST İLAÇ ETKEN
MADDELERİ İÇİN MİKTAR TAYİNİ VE SAFSIZLIK TAYİN
YÖNTEMLERİNİN İNCELENMESİ VE VALİDASYONU

Merve UĞUR

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

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Lenvatinib ve Lifitegrast İlaç Etkin Maddeleri için Miktar Tayini ve Safsızlık Tayin Yöntemlerinin İncelenmesi ve Validasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve Uğur

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya.Anabilim Dalında

Merve Uğur tarafından hazırlanan

“Lenvatinib ve Lifitegrast İlaç Etken Maddeleri için Miktar Tayini ve Safsızlık Tayin Yöntemlerinin
İncelenmesi ve Validasyonu” adlı

tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

.....Üniversitesi

Üye

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

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Kabul ve Onay Sayfası Yüksek Lisans ve Doktora tez savunması jüri sayılarına uygun şekilde düzenlenmelidir.*

ÖZET

Lenvatinib ve Lifitegrast İlaç Etken Maddeleri için Miktar Tayini ve Safsızlık Tayin Yöntemlerinin İncelenmesi ve Validasyonu

Tekrar eden veya vücuda yayılmış olan radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisinde kullanılan Lenvatinib ile T hücre aktivasyonunu ardından sitokin salınımını inhibe ederek kuru göz sendromunda hem semptom giderici hem de tedavi edici olarak kullanılan Lifitegrast ilaç etken maddeleri bu tez kapsamında incelenmek üzere belirlenmiştir. Jenerik olarak üretilen bu etken maddeler için safsızlık ve miktar tayini yöntemlerinin incelenmesi ve uluslararası standartlara göre validasyonlarının tamamlanması amaçlanmıştır. Bu sebeple incelenen moleküllerin doğasına ve yapılacak analizin türüne göre uygun olan kromatografik yöntemler belirlenmiştir. Lenvatinib ilaç etken maddesinin üçü genotoksik olmak üzere yedi adet safsızlığı için limit değerleri ICHQ3A(R2), ICH Q3B(R2), ICHQ6A ve ICH M7(R1) kılavuzlarına göre hesaplanmıştır. Genotoksik olarak belirlenen limit değeri, 400 ppm, ICH kılavuzlarından daha düşük tutularak metodun daha hassas miktarları tayin edebilmesi mümkün kılınmıştır. Geliştirilen metot sayesinde genotoksik, sentez kaynaklı ve bozunmaya bağlı oluşan safsızlıklar tek bir metot kullanılarak analiz edilebilmiştir. Miktar tayini için geliştirilen metot ise yine ters faz kromatografisi kullanılarak tamamlanmıştır. Lifitegrast ilaç etken maddesi için safsızlık tayin metodu ve miktar tayini metodunun yanında kiral saflık metodu geliştirilmiştir. Safsızlık limit değerleri yine uluslararası değerlendirmelere uygun olması açısından ICHQ3A(R2), ICH Q3B(R2), ICHQ6A kılavuzlarına göre belirlenmiştir. S enantiyomerinin tedavi etme özelliği bulunurken şu ana kadar yapılan çalışmalarda R enantiyomerinin bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Ancak ICH kurallarına göre bütün enantiyomerler safsızlık olarak değerlendirilir ve ayrı bir metotta kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kiral saflık metodu normal faz kullanılarak R-enantiyomerinin tayin metodu geliştirilmiş ve validasyonu sağlanmıştır. Lifitegrastın diğer dört safsızlığı için ters faz kromatografisi kullanılarak ayrı bir metot geliştirilmiş olup validasyonu sağlanmıştır. Miktar tayini metodu için ise ters faz kromatografisi kullanılmıştır.

Bütün metotlar yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak optimize edilmiştir. Metotların validasyonları ICH Q2(R1)'e göre belirlenen bütün sistem uygunluk kriterlerini sağlayarak başarı ile tamamlanmıştır. Literatürde ve farmakopelerde henüz bulunmayan Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddeleri için ilk defa kararlı, sağlam, kesin, lineer, seçici ve spesifik metotlar geliştirilmiş ve literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Genotoksik, Kiral Lenvatinib, Lifitegrast, HPLC

SUMMARY

Investigation and Validation of Assay and Impurity Determination Methods for Lenvatinib and Lifitegrast Active Pharmaceutical Ingredients

Lenvatinib, which is used in the treatment of differentiated thyroid cancer resistant to radioactive iodine treatment that recurs or has spread throughout the body, and Lifitegrast, which is used as both symptomatic and therapeutic in dry eye syndrome by inhibiting T cell activation followed by cytokine release, were selected to be examined within the scope of this thesis. The purpose of this study is to examine the impurity and assay methods and to complete their validation according to international standards for these generically produced active pharmaceutical ingredients. For this reason, appropriate chromatographic methods were determined according to the nature of the molecules and the type of analysis to be performed. Limit values for seven impurities of the active substance lenvatinib, three of which were genotoxic, were calculated according to ICHQ3A(R2), ICH Q3B(R2), ICHQ6A and ICH M7(R1) guidelines. The limit value determined for genotoxic impurities, 400 ppm, was kept lower than the ICH guidelines, enabling the method to determine more sensitive amounts. Through the developed method, both genotoxic and degradation impurities can be analysed using a single method. The method developed for assay was also completed using reverse phase chromatography. A chiral purity method has been developed for the active substance Lifitegrast, in addition to the impurity determination method and quantification method. Impurity limits have been established according to ICH Q3A(R2), ICH Q3B(R2), ICH Q6A guidelines in order to comply with international evaluations. While the *S* enantiomer has a therapeutic properties, studies so far have reported that the *R* enantiomer has no effect. However, according to ICH rules, all enantiomers are considered as impurities and should be controlled in a separate method. For this purpose, a method for the determination of the *R*-enantiomer in the chiral purity method using normal phase was developed and validated. For the other four impurities of Lifitegrast, an impurity method was developed and validated using reverse phase chromatography. Reverse phase chromatography was also used for the assay method.

All methods were optimised using high performance liquid chromatography. The validation of the methods was successfully completed by fulfilling all system suitability criteria according to ICH Q2(R1). For the first time, stable, robust, precise, linear, selective and specific methods have been developed and introduced into the literature for the active ingredients Lenvatinib and Lifitegrast, which are not yet available in the literature or pharmacopoeias.

Keywords: Genotoxic, Chiral, Lenvatinib, Lifitegrast, HPLC

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. İlaç Etken Maddelerinde Safsızlıklar	3
1.2.1. Organik Safsızlıklar	4
1.2.2. İnorganik Safsızlıklar	5
1.2.3. Enantiyomerik Safsızlıklar	5
1.2.4. Genotoksik Safsızlıklar	6
1.3. Kromatografi	8
1.3.1. Kromatografik yöntemlerde sistem uygunluk parametreleri	12
1.4. Analitik Validasyon Parametreleri	13
1.5. Tez Kapsamında incelenen İlaç Etken Maddeleri	16
1.5.1. Lenvatinib	16
1.5.2. Lifitegrast	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Standartlar	20
2.2. Kullanılan Cihazlar	20
2.3. Kullanılan Diğer Gereçler	22
2.4. Kullanılan Standartlar	22
2.5. Kullanılan Çözeltiler	26
2.5.1. Hareketli Faz Çözeltileri	26
2.5.1.1. Lenvatinib ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan hareketli faz çözeltileri	26
2.5.1.2. Lifitegrast ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan hareketli Faz çözeltileri	27
2.5.1.3. Lifitegrast Enantiyomerik Saflık Metodu için Kullanılan Hareketli Faz Çözeltileri	27
2.5.2. Çözücüler	28
2.5.2.1. Lenvatinib ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan çözücüler	28
2.5.2.2. Lifitegrast ilgili bileşikler, kiral saflık ve miktar tayini metotlarında kullanılan çözücüler	28
2.5.3. Etken madde ve safsızlık ve validasyon çözeltileri	28
2.5.3.1. Lenvatinib miktar tayini	29
2.5.3.1.1. Lenvatinib miktar tayini metot validasyonu doğrusallık çözeltilerinin hazırlanması	29
2.5.3.1.2 Lenvatinib miktar tayini metot validasyonu doğruluk çözeltilerinin hazırlanması	30
2.5.3.2. Lenvatinib ilgili bileşikler	30
2.5.3.2.1 Lenvatinib ilgili bileşikler spesifiklik parametresinde kullanılan çözücüler	31
2.5.3.2.2 Lenvatinib ilgili bileşikler doğrusallık parametresinde kullanılan çözeltiler	33

2.5.3.2.3. Lenvatinib ilgili bileşikler doğruluk parametresinde kullanılan çözeltiler	34
2.5.3.3 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu için hazırlanan çözeltiler	35
2.5.3.3.1 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu seçicilik parametresi için hazırlanan çözeltiler	35
2.5.3.3.2 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu doğrusalılık parametresinde kullanılan çözeltiler	37
2.5.3.3.3 Lifitegrast enantiyomerik saflık doğruluk çözeltilerinin hazırlanması	38
2.5.3.4 Lifitegrast ilgili bileşikler çözeltilerinin hazırlanması	39
2.5.3.4.1 Lifitegrast ilgili bileşikler doğrusalılık çözeltilerinin hazırlanması	39
2.5.3.4.2. Lifitegrast ilgili bileşikler doğruluk çözeltilerinin hazırlanması	41
2.5.3.5 Lifitegrast miktar tayini çözeltilerinin hazırlanması	41
2.5.3.5.1 Lifitegrast miktar tayini metodu doğrusalılık çözeltilerinin hazırlanması	42
2.5.3.5.2 Lifitegrast miktar tayini metodu doğruluk çözeltilerinin hazırlanması	42
3. BULGULAR	43
3.1. Kullanılan Standartların ve Etken Maddelerin Saflığı	43
3.2. Lenvatinib için geliştirilen metotların optimizasyonları	43
3.2.1. Lenvatinib ilgili bileşikler	43
3.2.1.1. Çözücü seçimi	43
3.2.1.2. Hareketli faz seçimi	44
3.2.1.3. Kolon seçimi	45
3.2.1.4. Numune derişimi seçimi	45
3.2.1.5. Dalga boyu seçimi	46
3.2.1.6. Yöntem Optimizasyonu	46
3.2.2. Lenvatinib Miktar Tayini	53
3.2.2.1. Yöntem Optimizasyonu	53
3.3. Lifitegrast için geliştirilen metotların optimizasyonu	55
3.3.1. Lifitegrast ilgili bileşikler	55
3.3.1.1. Çözücü Seçimi	55
3.3.1.2. Yöntem optimizasyonu	55
3.3.2. Lifitegrast enantiyomerik saflık	57
3.3.2.1. Çözücü Seçimi	57
3.3.2.2. Yöntem optimizasyonu	57
3.3.3. Lifitegrast miktar tayini	68
3.3.3.1. Çözücü Seçimi	68
3.3.3.2. Yöntem optimizasyonu	68
3.4. Metot Validasyonları	71
3.4.1. Lenvatinib İlgili Bileşikler	71
3.4.1.1. Seçicilik ve Spesifiklik	72
3.4.1.2. Sistem Uygunluk	70
3.4.1.3. Bağlı Yanıt (RRF) ve Yanıt Düzeltme Faktörü (CRF)	74
3.4.1.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	74
3.4.1.5. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı	79
3.4.1.6. Doğruluk	80
3.4.1.7. Kesinlik	81
3.4.1.8. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	82
3.4.1.9. Sağlamlık	82
3.4.1.10. Kararlılık	85
3.4.2. Lenvatinib Miktar Tayini	87
3.4.2.1. Seçicilik ve Spesifiklik	87
3.4.2.2. Sistem Uygunluk	87
3.4.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	88
3.4.2.4. Doğruluk	89

3.4.2.5. Kesinlik	89
3.4.2.6. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	90
3.4.2.7. Sağlamlık	90
3.4.2.8. Kararlılık	91
3.4.3. Lifitegrast İlgili Bileşikler	91
3.4.3.1. Seçicilik ve Spesifiklik	92
3.4.3.2. Sistem Uygunluk	93
3.4.3.3. Bağlı Yanıt (RRF) ve Yanıt Düzeltme Faktörü (CRF)	93
3.4.3.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	94
3.4.3.5. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı	97
3.4.3.6. Doğruluk	97
3.4.3.7. Kesinlik	98
3.4.3.8. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	99
3.4.3.9. Sağlamlık	99
3.4.3.10. Kararlılık	100
3.4.4. Lifitegrast Enantiyomerik Saflık Tayini	101
3.4.4.1. Seçicilik ve Spesifiklik	101
3.4.4.2. Sistem Uygunluk	102
3.4.4.3. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı	102
3.4.4.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	103
3.4.4.5. Doğruluk	103
3.4.4.6. Kesinlik	103
3.4.4.7. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	103
3.4.4.8. Sağlamlık	105
3.4.4.9. Kararlılık	105
3.4.5. Lifitegrast Miktar Tayini	106
3.4.5.1. Seçicilik ve Spesifiklik	106
3.4.5.2. Sistem Uygunluk	106
3.4.5.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	107
3.4.5.4. Doğruluk	108
3.4.2.5. Kesinlik	108
3.4.2.6. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik	109
3.4.2.7. Sağlamlık	109
3.4.2.8. Kararlılık	110
4. TARTIŞMA	111
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
KAYNAKLAR	114
EKLER	118
ÖZGEÇMİŞ	119

ÖNSÖZ

İlaç geliştirme sürecindeki zorluklar, sadece bilimsel araştırma ve teknolojik yeniliklerle sınırlı değildir; sıkı düzenlemeler, yüksek maliyetler ve belirsizlikler de bu zorluklara dahildir. Eşdeğer ilaçlar, bu süreçte önemli bir role sahiptir, çünkü daha uygun fiyatlarla tedaviye erişimi sağlar ve orijinal ilaçlarla aynı standartlara sahiptir. İlaç ürünleri ve etken maddeler üretilirken ve sonrasında yapılan analizler, geçmişte yaşanan ilaç kaynaklı faciaların tekrarlanmaması için hayati önem taşır. Bu nedenle, analitik çalışmaların hassas, doğru, sağlam ve kararlı olması gerekmektedir. Bu tez kapsamında da DEVA Holding A.Ş.'de sentezlenen Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddelerinin hem ilgili maddeler hem de miktar tayini yöntemleri, uluslararası kriterlere uygun olarak, genotoksik ve enantiyomerik safsızlıkları göz önünde bulundurularak, geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Tezim ve projem süresinde her konuda ilgi ve desteğini gördüğüm, engin bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Sibel Ayşıl Özkan'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, her alanda engin bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen ve desteğini hem tezimde hem çalışmalarımda hem de yaşamda her zaman hissettiğim, değerli eş danışmanım Doç. Dr. Esen Bellur Atıcı'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda sabırla, yardımını esirgemeyen ve tezimin bir kısmında büyük katkısı olan çalışma arkadaşım, şefim Özgür Genç'e teşekkür ederim. Bilgi ve deneyim birikimiyle yardımına başvurduğum şefim Nurten Rıdvanoğlu'na desteği için teşekkür ederim. DEVA Holding A.Ş. API sentez bölümü çalışma arkadaşlarımdan Özgür Kaya'ya, Dr. Okşan Soyer Can'a ve Merve Canyurt'a sentezleri ile katkılarından ötürü teşekkür ederim. Tezim süresince her türlü desteği sağlayan DEVA Holding A.Ş.'ye, 2244 bursiyeri olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Doktora sürecimde yanımda olan DEVA Holding A.Ş. API bölümünde çalışan müdür yardımcılarım, sentez ve analitik birimindeki bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

2244 projesini haber vererek sürecime vesile olan F. Gözde Aydın'a ayrıca teşekkür ederim. Benimle aynı zamanda doktora başlayan ve aynı yolda her zaman destek olan arkadaşım Timur Demirhan'a teşekkür ederim. 2244 doktora bursiyeri olan diğer arkadaşlarıma da yol arkadaşlıkları için teşekkür ederim. Doktora ve proje sürecim boyunca Ankara'dan yardımına her zaman yetişen Dr. Ahmet Çetinkaya'ya ve Öğr. Gör. Dr. Göksu Özçelikay Akyıldız'a desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, yardımını, bilgisini, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli dostum Ar. Gör. Pınar Kapçı'ya teşekkür ederim.

Desteğiyle ve bilgisiyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Kıdemli Uzman Damla Yıldız'a ve beni hiç yalnız bırakmayan değerli arkadaşım Kimya Mühendisi Zeliha Yılmaz'a ve desteğini esirgemeyen Berna Baş Yiğit'e teşekkür ederim.

Bugüne gelmemde büyük emeği olan sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim. Hayatımdaki en büyük şansım kardeşim Av. Sefa Uğur'a ve varlığını hiçbir şeye değişmeyeceğim ikinci en büyük şansım Av. Şeyma Cansu Yeşil Uğur'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik
API	İlaç etken maddesi
BSS	Bağıl standart sapma
dk	Dakika
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FA	Formik asit
FDA	Food and Drug Administration Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
KS	Kütle spektrometri
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Nicelik sınırı
m	Eğim
SUT	Sistem Uygunluk Testi
R	Regresyon katsayısı
r	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayrışma faktörü
RSS	Artık kareler toplamı
SS	Standart sapma
TFA	Trifloroasetik asit
TDI	Günlük alım dozu
TTC	Toksikolojik kaygı eşiği
USP	United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatogramı
XRD	X-ışını kırınım yöntemi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Pik şekli örneği	13
Şekil 1.2. Validasyon parametreleri	14
Şekil 1.3. Lenvatinib ilaç etken maddesinin molekül formülü	15
Şekil 1.4. S-Lifitegrast ve R-Lifitegrast molekül formülü	18
Şekil.2.1. Kullanılan kimyasallar	21
Şekil 2.2. Kullanılan cihazlar	21
Şekil 3.1. Çizelge 3.1. deneme 21 ile analiz edilen safsızlık eklenmiş numune kromatogramı	48
Şekil 3.2. Çizelge 3.1. deneme 23 ile analiz edilen standart (lenva-1) kromatogramı	48
Şekil 3.3. Çizelge 3.2 deneme 6 'da verilen metodun kromatogramı	53
Şekil 3.4. Çizelge 3.3. deneme 7 kromatogramı	57
Şekil 3.5. Lifitegrast spesifikasyon limitinde R-Lif eklenmiş numune kromatogramı	68
Şekil 3.6 Deneme 5'te uygun görülen metodun kromatogramı	69
Şekil 3.7. Spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune kromatogramı	73
Şekil 3.8. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-2- okso)	76
Şekil 3.9. Kalibrasyon eğrisi (4-amino-3-klorofenol)	76
Şekil 3.10. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-1)	77
Şekil 3.11. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-2)	77
Şekil 3.12. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dessiklopropil)	78
Şekil 3.13. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dessiklopropilamid)	78
Şekil 3.14. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dimer üre)	79
Şekil 3.15. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-karbamoil)	79
Şekil 3.16. Kalibrasyon eğrisi (Lenvatinib)	89
Şekil 3.17. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast)	95
Şekil 3.18. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-A)	95
Şekil 3.19. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-B)	96
Şekil 3.20. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-C)	96
Şekil 3.21. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-D)	96
Şekil 3.22. Kalibrasyon eğrisi (R-Lif)	103
Şekil 3.23. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast)	108

ÇİZELGELER

Çizelge1.1. Safsızlıkların sınıflandırılması	3
Çizelge1.2. İlaç etken maddelerinde safsızlıkların değerlendirilmesi	4
Çizelge 1.3. Yapısal değerlendirme sonucu safsızlıkların genotoksik sınıflandırılması	7
Çizelge 1.4. Genotoksik bir safsızlık için kabul edilebilir günlük alım dozu	8
Çizelge 1.5. Genotoksik bir safsızlıklar için toplam kabul edilebilir günlük alım dozu	8
Çizelge1.6. Kolon kromatografisinde kullanılan yöntemlerin sınıflandırılması	10
Çizelge 2.1. Lenvatinib ve safsızlıklarının özellikleri	22
Çizelge2.2. Lifitegrast ve safsızlıklarının özellikleri	25
Çizelge 3.1. Lenvatinib ilgili bileşikler optimizasyon denemeleri	49
Çizelge 3.2. Lenvatinib miktar tayini metot denemeleri	54
Çizelge 3.3. Lifitegrast ilgili bileşikler optimizasyon denemeleri	56
Çizelge 3.4. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak OD-H (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri	59
Çizelge 3.5. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak IB (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri	61
Çizelge 3.6. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak IC (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri	63
Çizelge 3.7. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak AD-H (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri	65
Çizelge 3.8. Lifitegrast miktar tayini metot denemeleri	70
Çizelge 3.9. Numune gradient elüsyon programı	71
Çizelge 3.10. Standart gradient elüsyon programı	71
Çizelge 3.11. Bilinen, bilinmeyen ve genotoksik safsızlıklar için limit değerleri	72
Çizelge 3.12. Lenvatinib ilgili bileşikler metodu seçicilik ve spesiflik sonuçları	72
Çizelge 3.13. Sistem uygunluk sonuçları	73
Çizelge 3.14. Bağlı yanıt ve yanıt düzeltme faktörü sonuçları	74
Çizelge 3.15. Lenvatinib ilgili bileşikler regresyon analizi sonuçları	75
Çizelge 3.16. Minimum ve maksimum derişimdeki çözeltilerin analizlerinin %BSS değerleri	75
Çizelge 3.17. Tayin alt sınırı (TAS) ve teşhis sınırına (TS) ait sonuçlar	80

Çizelge 3.18. Lenva- okso için geri kazanım sonuçları	80
Çizelge 3.19. 4-amino-3-klorofenol için geri kazanım sonuçları	80
Çizelge 3.20. Lenva-1 için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.21. Lenva-2 için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.22. Lenva-dessiklopropil için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.23. Lenva-dessiklopropilamid için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.24. Lenva-dimer üre için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.25. Lenva-karbamoil için geri kazanım sonuçları	81
Çizelge 3.26. Lenva dimer üre için kesinlik sonuçları	82
Çizelge 3.27. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	83
Çizelge 3.28. Sağlamlık parametresi sonuçları	84
Çizelge 3.29. Standardın kararlılık sonuçları	85
Çizelge 3.30. Numunenin kararlılık sonuçları	86
Çizelge 3.31. Gradient elüsyon programı	87
Çizelge 3.32. Lenvatinib miktar tayini metodu seçicilik sonuçları	87
Çizelge 3.33. Sistem uygunluk sonuçları	88
Çizelge 3.34. Lenvatinib miktar tayini regresyon analizi sonuçları	88
Çizelge 3.35. Lenvatinib için geri kazanım sonuçları	89
Çizelge 3.36. Lenvatinib için kesinlik sonuçları	90
Çizelge 3.37. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	90
Çizelge 3.38. Numunenin kararlılık sonuçları	91
Çizelge 3.39. Gradient elüsyon programı	92
Çizelge 3.40. Bilinen, bilinmeyen ve genotoksik safsızlıklar için limit değerleri	92
Çizelge 3.41. Lifitegrast ilgili bileşikler metodu seçicilik ve spesifiklik sonuçları	93
Çizelge 3.42. Sistem uygunluk sonuçları	93
Çizelge 3.43. Bağlı yanıt ve yanıt düzeltme faktörü sonuçları	94
Çizelge 3.44. Lifitegrast ilgili bileşikler regresyon analizi sonuçları	94
Çizelge 3.45. Minimum ve maksimum derişimdeki çözeltilerin analizlerinin %BSS değerleri	95
Çizelge 3.46. Tayin alt sınırı (TAS) ve teşhis sınırına (TS) ait sonuçlar	97
Çizelge 3.47. Lifitegrast-A için geri kazanım sonuçları	97

Çizelge 3.48. Lifitegrast-B için geri kazanım sonuçları	98
Çizelge 3.49. Lifitegrast-C için geri kazanım sonuçları	98
Çizelge 3.50. Lifitegrast-D için geri kazanım sonuçları	98
Çizelge 3.51. Lif- safsızlık A için kesinlik sonuçları	99
Çizelge 3.52. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	99
Çizelge 3.53. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	100
Çizelge 3.54. Standardın kararlılık sonuçları	100
Çizelge 3.55. Standardın kararlılık sonuçları	101
Çizelge 3.56. Lifitegrast enantiyomerik saflık tayini metodu seçicilik sonuçları	102
Çizelge 3.57. Sistem uygunluk sonuçları	102
Çizelge 3.58. R-Lif miktar tayini regresyon analizi sonuçları	103
Çizelge 3.59. R-Lif için geri kazanım sonuçları	104
Çizelge 3.60. Lenvatinib için kesinlik sonuçları	104
Çizelge 3.61. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	105
Çizelge 3.62. Kararlılık sonuçları	105
Çizelge 3.63. Lifitegrast miktar tayini metodu seçicilik sonuçları	106
Çizelge 3.64. Sistem uygunluk sonuçları	107
Çizelge 3.65. Lifitegrast miktar tayini regresyon analizi sonuçları	107
Çizelge 3.66. Lifitegrast için geri kazanım sonuçları	108
Çizelge 3.67. Lifitegrast için kesinlik sonuçları	109
Çizelge 3.68. Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları	110
Çizelge 3.69. Numunenin kararlılık sonuçları	110

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Tarihinin en eski zamanlarından bu yana insanlar tedavi amaçlı yöntemler bulmak için çeşitli çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Dünyanın bilinen en eski tedavi reçetelerine Mezopotamya’da rastlanmıştır. İlerleyen dönemde Yunan, Mısır, Arap, Hint ve Roma medeniyetlerinde kültürel etkileşimler ile farmasötik biliminin gelişimi devam etmiştir. (Higby ve Urick, 2020) Sanayi devriminden sonra ancak 20. Yüzyıla gelindiğinde farmasötik endüstrisinden söz edilebilmiştir.

Sanayi devrimini takiben bilim insanları canlılarda oluşan ya da genetik olarak aktarılan farklı hastalıkların iyileştirilmesi, yavaşlatılması ya da daha oluşmadan engellenmesi için atalarının bitkilerden elde ettikleri ilaçları kimyasalları kullanarak daha yüksek miktarda yarar sağlanabilir hale getirmek için çalışmalar yapmıştır. Elde ettikleri farklı moleküllerle daha öncesinde tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın tedavisini mümkün kılmışlardır.

Kimyasal özellikleri, üretim süreçleri, safsızlık analizleri, kontrol analizleri ile bütün özellikleri belirlenen moleküller, hayvan testleri, klinik çalışmaları ve biyoyararlanımları incelenip, kanıtlandıktan sonra ilaç etken maddesi olarak adlandırılmaktadır. Bütün çalışmaları bittikten sonra bu moleküller, ulusal ve uluslararası patentler ile koruma altına alınmaktadır. Patentlenen bu moleküllerin tedavi protokollerinde kullanılmaları ile ilaç etken maddeleri olarak isimlendirilirler. Bu moleküllerin patent süreleri bittiğinde patentlere uygun şekilde veya farklı sentez yolları ile elde edilmesi sonucunda elde edilen moleküllere ise jenerik ürün adı verilmektedir. Jenerik ürün tanımı ilaç etken maddeleri ve formülasyonlar için kullanılmaktadır. Jenerik ürünler aynı kimyasal özelliklere sahip olmakla birlikte kimyasal ve üretimsel bütün süreçleri kontrol edilmektedir. Ancak hayvan testleri, klinik çalışmalar ya da biyoyararlanım analizleri aranmamaktadır. Bunun yerine biyoeşdeğerlik çalışması yapılır ve bu çalışma ile referans ürünün hayvan testleri, klinik ve biyoyararlanım analizlerinin karşılaştırılması yapılarak, uygun bulunması halinde piyasaya çıkması sağlanır. Jenerik ilaçların, daha kısa sürede piyasada olması ve farklı şirketler tarafından da üretilibilmeleri sebebiyle, piyasada daha fazla ürün olmasına imkan sağlamaktadır. Ülkeler, yeni ilaç çalışmalarının yanında jenerik ilaç etken maddelerinin ve ilaçlarının üretimlerine de yatırım yaptıklarında, yerli sermayenin kullanılması ile dışa bağımlılığı azalttıklarından, ülke

ekonomisine de büyük katkı sağlamaktadırlar. Tekrarlanmayan biyolojik çalışmaların maliyeti düşürmesi, yerli sermaye kullanılarak üretilen maddelerin dışa bağımlılığı azaltması ile ülke ekonomisine katkısı ve hastaların ilaçlara erişimini kolaylaştırdığından, jenerik ilaçların üretimi önem arz eden bir konudur.(Håkonsen ve Toverud, 2006; Milne ve Cabanilla, 2006)

Sağlık alanında tedavi yöntemleri, hastaya maksimum fayda sağlarken, hiç zarar vermemesi veya minimum zarar vermesi üzerine kuruludur. Bu ilkedен yola çıkarak ilaçların etken moleküllerinin saf olması ve istenmeyen ürünlerin belirlenmesi ve giderilmesi, giderilemeyen ya da raf sürecinde oluşabilen ürünlerin ise aynı ilkeye bağlı kalarak günlük alım limitlerine göre analiz edilmesi ve raporlaması insan sağlığının korunması açısından hayati öneme sahiptir.

Günümüzde, bütün dünyada ilaçların başlangıç maddelerinden ticari forma geldiği sürece ve sonrasına kadar her noktada ICH kurallarına, FDA ve EMEA ve ülkelerin sağlık bakanlıkları gibi otoritelerce belirlenen kurallara göre analiz edilmesi gerekmektedir (European Pharmacopeia, 2005; Håkonsen ve Toverud, 2006). Bu analizler analitik kimyanın gelişmeye başladığı ilk zamanlardan bu yana ilaç endüstrisine en iyi şekilde uyumlanması ve hatta rutin analizler haline gelebilmesiyle mümkün olmuştur. İlaç analizlerinde kullanılan bu yöntemler titrimetrik, spektroskopik, elektrokimyasal yöntemler olmakla birlikte, kinetik, elektroforetik metotlar ile gelişmiş ve farklı yöntemlerin kombinasyonu olabilmektedir. İlaç analizlerinde doğru, tekrarlanabilir, uygulanması kolay, kararlı ve güvenilebilir olan yöntemlerden en önemlisi kromatografik yöntemlerdir. Kromatografik yöntemler günümüzde dünya çapında farmasötik endüstrisinde ilaç analizleri konusunda bir temel yapıtaşdır (Fanali ve ark., 2013; Siddiqui ve ark., 2017).

Bu tez kapsamında, tekrar eden veya vücuda yayılmış olan radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisinde kullanılan Lenvatinib ile T hücre aktivasyonunu ardından sitokin salınımını inhibe ederek kuru göz sendromunda hem semptom giderici hem de tedavi edici olarak kullanılan Lifitegrast ilaç etken maddeleri seçilmiştir. Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddeleri için literatürde bulunan çalışmalar az olmakla birlikte biyo-analitik çalışmalar büyük bir kısmını kapsamaktadır. Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddeleri için kromatografik olarak geliştirilen miktar tayini ve ilgili bileşikler metotları hem literatüre hem de endüstriye katkı sağlaması amaçlanmıştır.

1.2. İlaç Etken Maddelerinde Safsızlıklar

İlaç etken maddelerinde etken molekül dışında farklı olarak bulunan her madde ICH'e göre safsızlık olarak nitelendirilmektedir.

Safsızlıklar, sentezin doğasından kaynaklanabileceği gibi başlangıç maddelerinden ve üretim için kullanılan malzemelerden de kaynaklanabilmektedir. İlaç etken maddelerinin sentezi sırasında ve sonrasında oluşabilecek bütün safsızlıkların haritalanması, kontrol edilecek safsızlıkların belirlenmesi, tanımlanması ve tayininin yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda oluşabilecek safsızlıklar için insan sağlığını tehlikeye sokmayacak limitlerin belirlenmesi ve bu limitlerle kontrol edilmesi önem arz etmektedir. Oluşabilecek safsızlıklar **Çizelge 1.1**'de belirtildiği gibi kategorilere ayrılmıştır. Safsızlıklar için uygulanacak limitler ise **Çizelge 1.2** 'de verilmiştir (ICH Q3A (R2), 2006; ICH Q3B(R2), 2006):

Çizelge1.1. Safsızlıkların sınıflandırılması

Safsızlık Tipi	Örnek	Kaynak
Organik	Başlangıç maddeleri Ara ürünler Reaktifler	Sentez proses sırasında oluşabilir.
	Bozunma ürünleri	Bozunma ürünleri hem ilaç etken maddesinden hem de son üründen kaynaklı olabilir.
	Yardımcı madde safsızlıkları	Yardımcı maddeden kaynaklı safsızlıklar meydana gelebilir.
İnorganik	Reaktifler Katalizörler Kalıntı metaller İnorganik tuzlar Filtreye yardımcı maddeler	Sentetik proses sırasında kullanılan ekipmanlardan, filtre gibi proses yardımcılarında kaynaklanabilir.
	Yardımcı madde safsızlıkları	Yardımcı maddeden kaynaklı safsızlıklar meydana gelebilir.
Çözücüler	Reaksiyon çözücüler İzolasyon çözücüler	İlaç sentezi ve üretimi sırasında kullanılan çözücülerden kalıntı olarak bulunabilir.
Yapısal	Polimorfik formlar Enantiyomerik formlar	İlaç etken maddesi sentezi sırasında oluşabilir.
Genotoksik	Başlangıç maddeleri Ara ürünler Reaktifler	Sentez proses sırasında oluşabilir.
	Bozunma ürünleri	Bozunma ürünleri hem ilaç etken maddesinden hem de son üründen kaynaklı olabilir.
	Yardımcı madde safsızlıkları	Yardımcı maddeden kaynaklı safsızlıklar meydana gelebilir.

Çizelge1.2. İlaç etken maddelerinde safsızlıkların değerlendirilmesi

Raporlama Limitleri	
Maksimum günlük doz	Limit
≤ 1 g	% 0,1
> 1 g	% 0,05
Tanımlama Limitleri	
Maksimum günlük doz	Limit
<1 mg	%1,0 ya da 5 µg TDI, hangisi daha düşükse
1 mg- 10 mg	%0,5 ya da 20 µg TDI, hangisi daha düşükse
>10 mg- 2 g	% 0,2 ya da 2 mg TDI, hangisi daha düşükse
> 2 g	% 0,10
Hesaplama Limitleri	
Maksimum günlük doz	Limit
<10 mg	% 1,0 ya da 50 µg TDI, hangisi daha düşükse
10 mg- 100 mg	% 0,5 ya da 200 µg TDI, hangisi daha düşükse
>100 mg- 2 g	% 0,2 ya da 3 mg TDI, hangisi daha düşükse
> 2 g	% 0,15

1.2.1 Organik Safsızlıklar

Sentez sırasında reaksiyon ortamında kalan ve reaksiyona girmeden kalan başlangıç maddeleri, saf olmayan başlangıç maddelerinden gelen organik safsızlıklar, kullanılan çözücülerin reaksiyona girmesiyle oluşabilecek yan ürünler, reaksiyon sırasında oluşabilecek yan ürünler, sentez ara ürünlerinin ortamda kalması, oluşan ürünlerin sentez ortamında kararlı kalamamalarından kaynaklı bozunma ürünleri, saklanma koşulları altında oluşabilecek bozunma ürünleri organik safsızlıklar olarak incelenmektedir. Tanımlanmış veya tanımlanamayan, uçucu olan veya olmayan organik safsızlıklar kısaca aşağıdaki başlıklarda ifade edilebilir:

- Başlangıç maddeleri
- Yan ürünler
- Ara ürünler
- Bozunma ürünleri
- Reaktifler, ligandlar ve katalizörler

Bu safsızlıklar sıvı, gaz kromatografisi, kütle spektrometresi, indüktif eşleşmiş plazma spektroskopisi gibi tekniklerle tayin edilebilir.

1.2.2 İnorganik Safsızlıklar

İnorganik safsızlıklar çoğunlukla sentez/ üretim sürecinden kaynaklanmaktadır. Sentez sırasında kullanılan katalizörler, metal içeren ligandlar sentez aşamalarında karşılaşılan inorganik safsızlıklara örnek olarak verilebilir. Bundan farklı olarak ürünlerin eldesi sırasında kullanılan metal reaktörler gibi üretim ekipmanları da safsızlıklara sebep olabilmektedir. İstenmeyen bu gibi durumlar uygun üretim ekipmanları ve üretim elemanları ile giderilmektedir. Bilinen ve tanımlanan safsızlıklar olarak incelenen bu safsızlıklar şunları içermektedir:

- Reaktifler, ligandlar ve katalizörler
- Ağır metaller veya diğer artık metaller
- İnorganik tuzlar
- Diğer malzemeler (örn. filtre yardımcıları, aktif karbon)

1.2.3 Enantiyomerik Safsızlıklar

Enantiyomerler, kiral merkeze sahip bir bileşiğin ayna görüntüsünün kendi görüntüsü ile çakışmaması yoluyla belirlenen *R* ve *S* formuna sahip moleküllerdir. Enantiyomerlerden birinin teröpatik etkisi varken diğer enantiyomerin tam tersi canlı dokulara zararlı etkileri olabilmektedir. Bu sebeple etken formların enantiyomerlerinden ayrılması gerekmektedir. Literatürde çarpıcı örnekleri bulunan kiral ilaç etken maddelerinin ve ürünlerinin saf olması hayati önem arz etmektedir. Talidomit vakası bu durumun öneminin anlaşılması bakımından iyi bir örnektir. Talidomit'in *R* formu gebeler için sabahları karşılaşılan mide bulantısını önleme özelliğine sahipken, *S* formu teratojenik etkisi sebebi ile dünyada 10000'den fazla bebeği etkileyen doğum kusuru krizine sebep olmuştur (Vargesson, 2015). Bu olaydan sonra kiral ilaç hammaddelerinin incelenmesinin önemi fark edilmiştir.

Enantiyomerik safsızlıklar ve rasemik karışımlar mercek altına alınıp limitler belirlenmiş ve uluslararası otoritelerce değerlendirilmesi zorunlu kılınmıştır. Etkin formun dışındaki kiral moleküller, enantiyomerik safsızlık olarak isimlendirilmekte, bütün analizleri yapılmakta ve zararlı olsun olmasın diğer safsızlıklar gibi değerlendirilmektedir (ICH Q6A,2000)

1.2.4 Genotoksik Safsızlıklar

Genotoksik safsızlıklar, gen mutasyonlarına, kromozom kırılmalarına sebep olarak veya yeniden düzenlenmelerine engel olarak, hücrel genetik materyal üzerinde zararlı etkiye sebep olan safsızlıklardır.

İlaç hammadresi veya ürününde, sentez sürecinde veya sonrasında bozunma ile oluşan kimyasallar, doğrudan DNA ile etkileşime girerek (örn. alkilleme ajanları) veya dolaylı olarak DNA dışı hedeflere etki ederek (örn. mitotik iğ zehirleri, topoizomera inhibitörleri vb.) DNA hasarına neden olabilir. Reaktif oksijen türleri, DNA içerisindeki bazların (örn. adenin, timin, guanin) oksitlenmesine sebep olarak mutasyona sebep olmaktadır. Alkilleme ve arilleme ajanlarının DNA’da yer alan bazlara geri dönüşümsüz olarak bağlanması, DNA’nın doğru bir şekilde kopyalanması ve replikasyonunu önleyerek direkt ya da dolaylı olarak mutasyon oluşturabilmektedir. (World Health Organization, 2020)

İlaç maddelerinin içerisinde %0,05 üzerinde olan safsızlıkların tanımlanması %0,1 üzerinde olan safsızlıkların ise hem tanımlanması hem kontrol edilmesi gerekmektedir (ICH Q3A (R2), 2006; ICH Q3B (R2), 2006; ICH M7 (R1), 2007). Kılavuzlara göre, tanımlama limitinin altındaki veya ona eşit seviyelerde safsızlıkların tanımlanmasının gerekli olmamasına rağmen, tanımlama limitinden yüksek olmayan seviyede ancak toksik ve farmakolojik etkiler üretebilecek, tümör hücrelerini iki katına çıkarma hızı yüksek potansiyel safsızlıklar için analitik prosedürlerin geliştirilmesi gerektiğini belirtmektedir. ICH kılavuzları, safsızlıkların potansiyel genotoksitesini hakkında daha doğru bilgi sağlamak için; reaktifleri, ara ürünleri, başlangıç malzemelerini ve kolayca tahmin edilen yan maddeleri belirlemek amacıyla kimyasal reaksiyonlar ve koşullarla birlikte sentetik yolun kapsamlı bir şekilde değerlendirmesinin yapılmasını önermektedir. TTC ile kontrol edilebilecek tüm potansiyel safsızlıklar teorik olarak tanımlanıp listelendikten sonra, genotoksitesine ilişkin ilk değerlendirme, bilimsel bir uzman tarafından (QSAR) ve bilgi tabanı uzman sistemleri gibi bilgisayar araçları kullanılarak gerçekleştirilir. Bir dizi ara ürün ve reaktif sıklıkla genotoksitesine veya karsinogenitesine analizlerinde test edildiğinden kapsamlı bir literatür ve dahili arşiv (varsa) araştırmasının da tamamlanması gerekir. Güvenilir deneysel verilerin yazılımlar tarafından verilen tahminleri geçersiz kıldığını söylemeye gerek yok. Bir API’de mevcut olabilecek potansiyel genotoksik safsızlıklar **Çizelge 1.3’**deki gibi beş sınıfa ayrılır ve burada amaç, yüksek risk oluşturan ve çok düşük konsantrasyonlarla sınırlandırılması gereken safsızlıkları açıkça tanımlamaktır.

Çizelge 1.3. Yapısal değerlendirme sonucu safsızlıkların genotoksik sınıflandırılması

Sınıf	Açıklama	Kontrol yöntemi
1	Bilinen mutajenik karsinojenler	Bileşiğe özgü kabul edilebilir limitte veya altında kontrol edilir
2	Kanserojen potansiyeli bilinmeyen mutajen olduğu bilinen yapı (bakteriyel mutajenite pozitif, kemirgen karsinojenite verileri yok)	TTC'ye göre kabul edilebilir limitlerde veya altında kontrol edilir
3	İlaç maddesinin yapısıyla ilgisi olmayan uyarıcı yapı; mutajenite verisi olmayan yapı	TTC'ye göre kabul edilebilir limitlerde veya altında kontrol. Bakteriyel mutajenite analizi yapılır; Mutajenik değilse = Sınıf 5, Mutajenikse = Sınıf 2'ye göre değerlendirilir.
4	Uyarıcı yapı, test edilmiş ve mutajenik olmayan ilaç maddesinde veya ilaç maddesiyle ilgili bileşiklerde (örn. proses ara maddeleri) aynı uyarı geçerli	Mutajenik olmayan safsızlık olarak değerlendirilir
5	Mutajenik veya kanserojenlik olmadığını gösterecek yeterli veri içeren yapısal uyarı veya uyarı yapısı olmayan maddeler	Mutajenik olmayan safsızlık olarak değerlendirilir

DNA reaktif genotoksinlerin, genetik hasarı tetikleme mekanizmasının değerlendirilebilmesi tek bir modelle mümkün değildir. Bu sebeple doğrusal eşiksiz model (LNT) (Zakir, 1997; Teasdale, 2009) olarak adlandırılan bir model takip edilir ve kanser oluşum mekanizması için bir eşik değer olmadığı varsayılmaktadır. Öte yandan, DNA ile doğrudan etkileşime girmeyen moleküllerin, genetik hasar oluşumunu tetiklemesi için bir limit konsantrasyonunun varlığı genel olarak kabul edilmektedir (Giordani ve ark., 2011). Limitler veya izin verilen günlük dozlar (PDE.), hayvan çalışmalarında elde edilen gözlenmeyen etki seviyesi (NOEL) verilerinin yüksek hassasiyetli dönüştürme faktörleri kullanılarak insan kullanımı için limitlerin belirlenmesi ile hesaplanır. Bu hesap sonucu elde edilen veriler için toksikolojik kaygı eşiği (TTC) kavramı geliştirilmiştir. Limitle ilgili bir etki mekanizmasına dair yeterli kanıtı sahip olmayan genotoksik safsızlıklara uygulanması gerektiğini önerilmektedir. (ICH M7(R2), 2023). Toksikolojik Kaygı Eşiği (TTC) kavramı, ihmal edilebilir kanserojenlik veya diğer toksik etkiler riski taşıyan, incelenmemiş herhangi bir kimyasalın kabul edilebilir alımını tanımlamak için geliştirilmiştir. Ortalama toksik etki (TD^{50}) veren dozdan 10^6 'da 1'lik bir görülme olasılığına kadar doğrusal bir ekstrapolasyon içerir. En hassas türler ve en hassas tümör indüksiyon bölgesi için TD^{50} verileri kullanılır. Belirlenen referans değerler, yapısında ICH M7(R2) kılavuzunda bulunan ya da klinik çalışmalar sonucu mutajenik etki verebilecek moleküller için TTC 0,15 µg/gün olarak belirlenmiştir ve **Çizelge 1.4** verileri uygulanmaktadır.

Çizelge 1.4. Genotoksik bir safsızlık için kabul edilebilir günlük alım dozu

Tedavi süresi	≤1 ay	>1 – 12 ay	>1 – 10 yıl	>10 yıl- yaşam boyu
Günlük alım miktarı (µg/gün)	120	20	10	1.5

İlaç maddelerinin sentezi genellikle nihai ilaç maddesi elde edilene kadar alkilasyon, konjugasyon, oksidasyon ve indirgeme adımlarını içerir. Bu adımların, genotoksik potansiyele sahip yalnızca bir değil birden fazla ara ürün veya yan ürünün nihai ürüne taşınması anlamına gelebileceği anlaşılabilir bir durumdur. Bu nedenle, ilaç maddeleri ve ilaç ürünlerindeki genotoksik safsızlıklara ilişkin herhangi bir risk değerlendirmesinin, çeşitli genotoksik safsızlıkların sinerjistik olarak hareket edip edemeyeceği sorununun ele alması gerekebilir. Böyle durumlarda ortamdaki bütün genotoksik safsızlıklar **Çizelge 1.5**'teki miktarlara göre değerlendirilir.

Çizelge 1.5. Genotoksik bir safsızlıklar için toplam kabul edilebilir günlük alım dozu

Tedavi süresi	≤1 ay	>1 – 12 ay	>1 – 10 yıl	>10 yıl- yaşam boyu
Günlük alım miktarı (µg/gün)	120	60	30	5

2018 yılının ortalarında ilaçların pazardan sarten ilaç etken maddesini içeren ilaçların çekilmesiyle sonuçlanan nitrözamin krizi sonrası nitrözamin olarak isimlendirilen yapılara dikkat çekmiştir. Bu yapısal grupların, TTC' nin altındaki alımların bile önemli bir yüksek kanserojen risk potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yüksek potansiyelli mutajenik kanserojen grubu, aflatoksin benzeri, N-nitroso- ve alkil-azoksi bileşiklerini içermektedir. Yapılan incelemelerde daha hassas limitlerle kontrol edilmesine karar verilmiştir. Bu yapılar için de diğer safsızlıklarda olduğu gibi değerlendirmelerin ve safsızlık profillerinin çıkarılması önemlidir (ICH M7(R2), 2023; Bercu ve ark., (2021).

1.3. Kromatografi

Kromatografi, bileşenlerin farklı fazların içerisinde, farklı etkilerle veya etkileşimlerle, birbirlerinden farklı hızlarla ayrılması anlamına gelmektedir. Tswett, kalsiyum karbonat dolu bir cam kolondan bitkilerden elde ettiği pigment çözeltilisini geçirerek klorofil ve ksantofili ayırıştırarak 1906 yılında kromatografi bilimsel olarak kullanan ilk bilim insanı olarak tarihe geçmiştir ve kromatografinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Sonrasında farklı moleküllerin ayrımı ve farklı tekniklerin geliştirilmesi ile süreç devam etmiştir. 1948 yılında Boldingh ters-faz kromatografisini keşfetmiştir. Bu keşif ile başlayan süreç, 1952

yılında A.J.P Martin ve R.L. M Syngé'nin çalışmalarında dağılım kromatografisini keşifleri için Nobel ödölüne layık görölmüşlerdir (Fanalı ve ark., 2013).

Bütün kromatografik yöntemlerde ayırım yapılması planlanan numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkan olan hareketli fazda taşınır ve sistemde hareketli faz ile birbirine karışmayan bir sabit faz içinden geçerek ayırımı zorlanır.

Kromatografi temelde düzlemsel kromatografi ve kolon kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Düzlemsel kromatografi, sabit fazın bir plaka üzerine veya kağıt üzerine tutturularak hareketli faz yardımıyla kapiler etkisi sayesinde numunelerin birbirinden ayrılması esasına dayanır. Kolon kromatografisinde ise sabit faz ince bir kolona tutturularak hareketli faz ile örneklerin birinden ayrılmasıdır. Hareketli faz ve sabit fazın türüne göre gaz, sıvı ve süperkritik akışkan kromatografisi olarak **Çizelge 1.6**'daki gibi sınıflandırılırlar. Sıvı kromatografisinde moleküller sistem içerisinde adsorpsiyon, dağılma, molekül büyüklüğü ya da iyonik yük yoğunluğu özelliklerindeki farklılıklar sebebiyle birbirlerinde ayrılırlar. (Skoog ve ark., 2017)

Çizelge1.6. Kolon kromatografisinde kullanılan yöntemlerin sınıflandırılması

Sınıflandırma	Yöntem	Hareketli Faz	Sabit Faz	Ayrım Türü
Sıvı kromatografi	Sıvı- sıvı (Dağılma)		Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı- katı (Bağlı faz)		Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı- katı (Adsorpsiyon)	Sıvı	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi		İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme		Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz kromatografi	Gaz-sıvı		Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz- katı (bağlı faz)	Gaz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Gaz- katı		Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik akışkan kromatografi	-Sıvı (süperkritik)- katı (bağlı faz)	Süperkritik sıvı	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Sıvı kromatografisinin gelişimi sırasında bilim insanlarının tanecik boyutunun küçültülmesi sayesinde kolon veriminin artacağını ve ayırımı da iyileştirebileceklerini keşfetmeleri sonucu daha yüksek basınçta çalışılabilen sistemler geliştirilmiştir. Bütün kromatografik ayırım tekniklerinin içerisinde YPSK en sık kullanılan analiz tekniğidir ve ilaç analizlerinin de temel yapıtaşdırı denilebilir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi,

- Amerika Farmakopesinde 1. (2004) ve Avrupa Farmakopesinde (2002) en çok kullanılan tekniktir.
- Seçicilik, doğruluk, kesinlik parametrelerinde üstünlüğe sahiptir. Ancak sistem uygunluk parametrelerinin sağlanması gereklidir.

- Farklı dedektörler, kolonlar, hareketli fazlar kullanılarak küçük boyutlu moleküllerden şeker gibi büyük moleküllere çok fazla ürünün analizi mümkündür.
- Bu teknikle tek madde analizi yapılabileceği gibi birçok farklı ürünün analizi de aynı anda gerçekleştirilebilir.

YPSK ile karışımların hızlı bir şekilde ayrılması sağlanabilmektedir. Geliştirilen kolonlar 4-10mm çapında ve kullanılan dolgu materyalleri 2-25µm çapında olmakla birlikte 150-300mm uzunluğundadır. Aynı zamanda 5000 psi basıncı sağlayabilen pompalar geliştirilmiştir (Fanali ve ark., 2013).

YPSK'da kullanılan kolonlar katı ya da katı taneciklerin üzerine ince bir tabaka halinde sıvı yoğunluğu yüksek polimerlerin kimyasal olarak bağlanması ile elde edilen bağlı faz kolonlarıdır. Bağlı faz kolonlarında sıvı yoğunluğu yüksek polimerler ile birbirine karışmayan bir hareketli faz arasında ilerleyen moleküllerin ayrımı sağlanmaktadır. Bu ayırmada sıvı-sıvı ekstraksiyonu şeklinde ayırım gerçekleştirilir ve temeli dağılma (partisyon) kromatografisidir. Seçilen sabit faz ile hareketli faz arasında polarite farkı bulunmalıdır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi hareketli ve sabit fazın polarite farkına göre, ters faz ve normal faz kromatografisi olarak ikiye ayrılmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin çeşitleri

- *Ters Faz Kromatografisi:* Sabit faz apolar hareketli fazın polar olduğu ayırım tekniğidir. Kullanılan sabit fazlar uzun karbon zincirleri içermektedir (C_8 ve C_{18} gibi).
- Bu yöntemde kullanılan hareketli fazın polaritesi yüksek olmalıdır ve genellikle su, metanol veya asetonitril ya da farklı pH değerlerinde hazırlanmış tampon çözeltileri kullanılmaktadır. Bu teknikle yapılan ayırmada daha polar moleküllerin daha önce apolar olanların ise daha sonra ayrılmaları sağlanır. Bunun sebebi apolar moleküllerin kolona daha fazla tutulmalarıdır. Polar moleküller ise hareketli faz ile ilerleyerek daha erken kolonu terk etmektedirler.
- *Normal Faz Kromatografisi:* Sabit faz polar hareketli faz apolar olduğunda apolar moleküller hareketli fazla daha fazla kısmen daha fazla dağıldığı için daha önce

kolonu terk ederler ve polar olan moleküller onlara kıyasla kolonda daha çok tutuldukları için daha geç terk ederler. Kullanılan kolonlar silikaya bağlı siyano, diol, amino gibi daha polar yapılardır. Hareketli faz olarak ise hekzan, heptan gibi daha apolar yapılar tercih edilir, hareketli fazın polaritesini değiştirebilmek için farklı alkoller ile kombinasyonları gerçekleştirilebilir ya da asit ve baz eklenebilmektedir (Skoog ve ark., 2017)

1.3.1. Kromatografik yöntemlerde sistem uygunluk parametreleri

YPSK'da ayırımın gerçekleşmesi kinetik ve termodinamik modellerle ve eşitliklerle açıklanmaktadır. Kinetik ayırımın açıklanmasının başında ayırım faktörünün (R_s) açıklandığı Purnell eşitliği (1) gelmektedir. Burada N tabaka sayısını, k kapasite faktörünü ve α ise seçicilik faktörünü göstermektedir.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} + \left(\frac{k}{k+1} \right) + \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (1)$$

Burada tabaka sayısı kolon verimliliğini gösteren bir parametre olmakla birlikte aşağıdaki gibi hesaplanır (2). Burada t_R bir molekülün alıkonma zamanını, w ise bu pikin genişliğini ifade etmektedir. Daha basit bir formülle R_s (3),

$$N = \left[\frac{t_R}{w} \right]^2 \quad (2)$$

$$R_s = \frac{2(t_{R1} - t_{R2})}{w_1 - w_2} \quad (3)$$

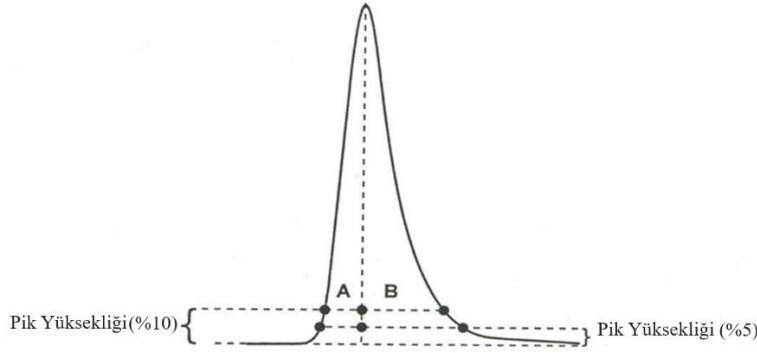
Kapasite faktörü her bir bileşen için ayrı ayrı hesaplanmaktadır (4). Hareketli fazın kolondan çıktığı ve dedektöre ulaştığı ilk zamanı gösteren ifade t_0 'dır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

Seçicilik faktörü (5) iki pikin birbirlerinden ayrılma derecelerini gösterir ve bağıl alıkonma olarak da ifade edilir.

$$\alpha = \frac{t_{R2}-t_0}{t_{R1}-t_0} \quad (5)$$

Kuyruklanma faktörü pik simetrisi ile ilgili bir değerdir. Kromatografik sistemlerde elde edilen piklerin *Gaussian* eğrileri olması beklendiğinden piklerin simetrik olması gerekmektedir. Kuyruklanma değeri **Şekil 1.2'** teki gibi pik yüksekliğinin %5,0'i kullanılarak hesaplanır (6).



Şekil 1.2. Pik şekli örneği

$$T = \frac{A+B}{C} \quad (6)$$

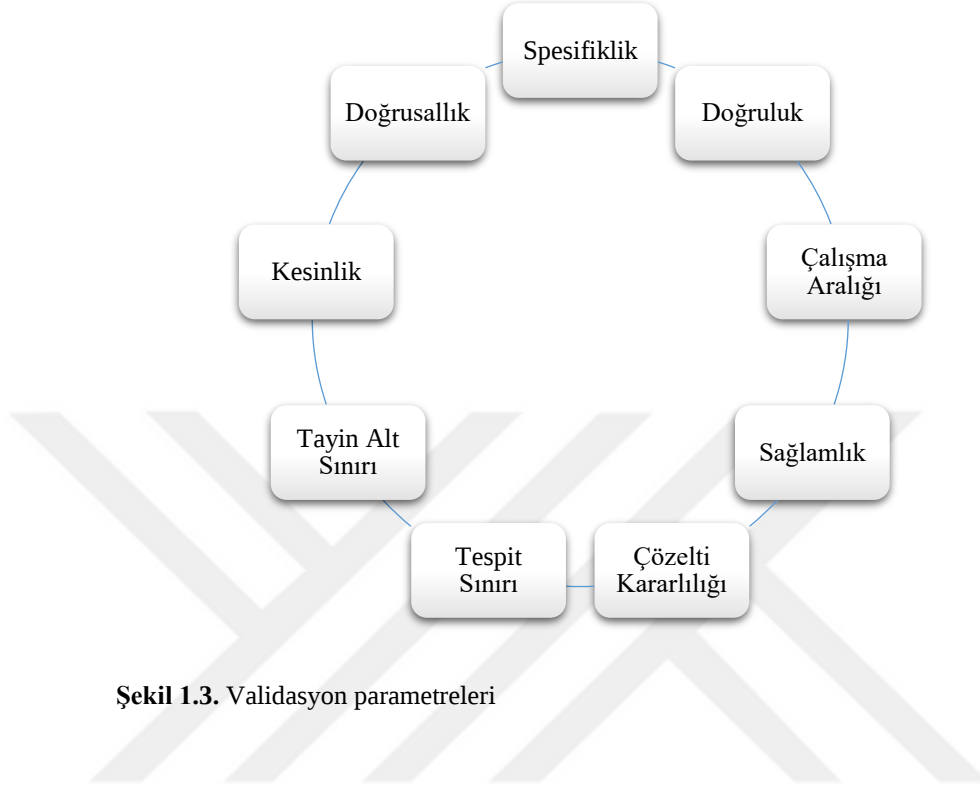
1.4. Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Analitik yöntem validasyonu, analitik olarak geliştirilen prosedürlerin amaçlanan kullanıma uygun olduğunu gösterme sürecidir. Daha spesifik olarak, bir analitik yöntemin validasyonu, geliştirilen yöntemin, bir ürünü tanımlanmış özelliklerine göre değerlendiren doğru test sonuçlarını tutarlı bir şekilde sağlayacağına dair yüksek derecede güvence sağlayan belgelenmiş bir kanıt elde etme meselesidir. İlaç ürünleri için geliştirilen ve **Şekil 1.3'**te verilen analitik metotların validasyon parametreleri ICH Q2 kılavuzunda detaylı bir şekilde anlatılmıştır (ICH Q2(R1), 1995).

Spesifiklik

Yöntemin çalışılan maddeye özgür olmasını gerektirir. Yöntemde, ortamda bulunan başka maddelerin ilgili madde veya maddelere girişim yapmadığının ve birbirlerinden ayrı olarak tanımlamasının gerçekleştirilebileceğinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu maddenin

tanımlanmasını, saflık testlerini ve eğer miktar tayini metodu ise ilgilenilen maddenin saflık miktarının doğru olarak hesaplandığının gösterilmesi gerekmektedir.



Şekil 1.3. Validasyon parametreleri

Doğruluk

İlgilenilen madde ya da maddelerin yapılan analizlerin sonucunda doğru olarak kabul edilen değere olan yakınlığını ifade etmektedir.

Doğrusallık

Belirlenen çalışma aralığı içinde elde edilen analiz sonuçlarının cihaz yanıtı ile doğrusal bir ilişkide olduğunun göstergesidir.

Çalışma Aralığı

Geliştirilen yöntemin geçerli olduğu en düşük ve en yüksek derişim değerlerinin belirlenmesini ifade etmektedir.

Kesinlik

Analitik bir prosedürün kesinliği, belirlenen koşullar altında aynı homojen numunenin birden fazla numunesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığını (dağılım derecesi) ifade eder.

Kesinlik üç düzeyde düşünülebilir: tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik.

- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı koşullar altında kısa süre içerisinde tekrar edilen çalışmaların kesinliğini ifade eder.
- **Ara Kesinlik:** Farklı günler, farklı analistler, farklı ekipmanlar ve varyasyonlarının kesinliği olarak ifade edilir.
- **Tekrar üretilebilirlik:** Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder.

Tespit sınırı

Bir analitik prosedürün tespit limiti, bir numunede tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak ölçülmesinin gerekmediği en düşük analit miktarıdır.

Tayin Alt sınırı

Bireysel bir analitik prosedürün kantitasyon limiti, bir numunedeki uygun hassasiyet ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebildiği en düşük analit miktarıdır.

Sağlamlık

Bir analitik prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ama kasıtlı değişikliklerden etkilenmeden kalma kapasitesinin ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir.

Çözelti Stabilitesi

Numunenin kullanılan metot içerisinde kararlılığını ifade eden parametredir.

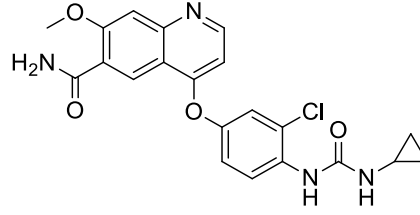
1.5. Tez Kapsamında İncelenen İlaç Etken Maddeleri

1.5.1. Lenvatinib

Bilim insanları, kanser için tedavi yöntemlerine her geçen gün yenilerinin eklendiği günümüzde ameliyatla ya da radyo terapi ile tedavi edilemeyen hastalar için farklı tedavi yöntemleri araştırmaktadır (Yildizhan ve ark., 2018). Bunlardan en dikkat çeken moleküler hedefli ajanlar, tirozin kinaz inhibitörleri olarak görev alan küçük moleküllerdir (Kannaiyan ve Mahadevan, 2018)

Tirozin kinazlar (TK), hücre biyolojisinin regülasyonunda dönüşümlü fosforilasyon yoluyla metabolizmayı, hücre siklusunu, hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü, farklılaşma ve onarım gibi pek çok yaşamsal faaliyeti kontrol eden sinyal yollarına etki eden enzimlerdir. Bunlarla birlikte patojenik anjiyogenez, lenf anjiyogenez, tümör gelişimi ve kanser ilerlemesinde de görev alırlar. Kanser hücrelerinde artmış fosforilasyon aktivitesini inhibe ederek hücre sağ kalımını, proliferasyonu ve kanser gelişimiyle ilişkili migrasyonu engellemek için tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) ilaçlar geliştirilmiştir. Yeni nesil olarak sınıflandırılan, TKİ ilaçların çoğu ise çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmak amacıyla seçici olmayan multikinaz (çoklu) olarak tasarlanmışlardır (Roskoski, 2019). Çoklu kinaz inhibitörleri, kısmen de olsa vasküler endetoryal büyüme faktörü alıcısı VEGFR'nin TK aktivitesini inhibe ederek anti-tümör aktivitesi göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda, VEGFR'ye karşı monoklonal antikor, metastatik renal hücreli karsinom hastalarında ilerlemeyen sağ kalımı önemli ölçüde uzattığı gözlenmiştir (Kannaiyan ve Mahadevan, 2018; Günaydın A.A., 2020).

Lenvatinib, tekrar eden veya vücuda yayılmış olan ve radyoaktif iyot tedavisine dirençli diferansiye tiroid kanseri tedavisi için 2015 yılında FDA onayı almıştır. Hedeflediği tirozin kinazlar ile anjiyogenez işlemlerine müdahale ederek tedavi sağlamaktadır (Scott, 2015) Lenvatinib, vasküler endetoryal büyüme faktörü (VEGFR) inhibitörü olarak sınıflandırılmasının yanında fibroblast büyüme faktörü reseptörlerini ve onkogenlerini de inhibe ederek tümör hücre proliferasyonunu kontrol edebilen bir çoklu tirozin kinaz inhibitörüdür (TKİ) (Schlumberger, 2015). Lenvatinib'in FDA tarafından onaylanmış diğer endikasyonları, ilerlemiş renal hücreli karsinoma, anrezektabl hepatoselüler karsinoma ve endometriyal karsinomadır. (U.S, FDA,2015; Schlumberger ve ark., 2015, Scott, 2015)



Şekil 1.4. Lenvatinib ilaç etken maddesinin molekül formülü

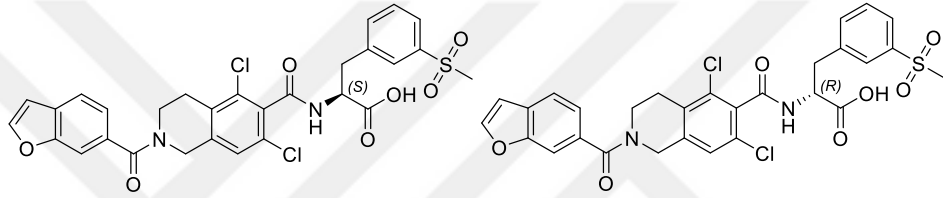
Lenvatinib, kinolin karboksamit ailesinden olmakla birlikte 4-(3-kloro-4- [(siklopropil karbamoil) amino] fenoksi)-7-metoksikinolin-6-karboksamit olarak isimlendirilir. Literatür incelendiğinde, ulusal çalışmalar içinde Lenvatinibin tedavi sürecinden sonra bilinen kardiyo toksisite etkisi üzerine çalışılan bir tez bulunmuştur (Günaydın A.A., 2020) Ancak tayin yöntemleri ile ilgili hazırlanan bir teze rastlanmamıştır.

Lenvatinib ilaç etken maddesi için ilgili maddeler hakkında uluslararası literatür incelendiğinde genellikle miktar tayini ve biyoanalitik çalışmalar görülmektedir. Farmakokinetik, klinik ve biyoanalitik araştırmaları için yapılan çalışmalarda LC-MS\ MS ile kan serumunda ve idrar örneklerinde Lenvatinib tayini gerçekleştirilmiştir (Dubbelman ve ark., 2012; Mano ve Kusano, 2015) Farklı anti-kanser ilaçların LC-MS\ MS kullanılarak kan plazmasında aynı anda ayrı ayrı tayin edildiği bir çalışma da mevcuttur (Janssen ve ark., 2019). Biyoanalitik analiz amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada kan serumu içerisinde Lenvatinib tayini amaçlanmıştır. Bu çalışmada kolon olarak Zodiasil C18 (150 mm × 4,6 mm, 5µm) seçilmiştir. Geri kazanım %94,758 olarak tespit edilmiştir. Yöntemin 28-1120 ng/mL ($r^2 = 0,999$) konsantrasyon aralığı arasında doğrusal olduğu bulunmuştur. Bu yöntemle insan plazmasında bulunabilecek muhtemel en düşük ilaç düzeyi 28 ng/mL olarak saptanmıştır (Veni, Ajitha ve Abbulu, 2020) Lenvatinib mesilatın bulk ve dozaj formu içinde Lenvatinib tayini hedeflenen bir çalışma HPLC-DAD, Kromasil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0,01 M amonyum asetat (NH_4OAc) ve Metanol (MeOH) (30:70, h/h) kullanılarak, izokratik elüsyon ile 1,0 mL/dk. akış hızında 309 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Analiz süresi 5,0 dk. olan metot ile Lenvatinib'in alıkonma süresi 3,73 dk. olarak tespit edilmiştir. Lenvatinib için doğrusallık 10-125µg/ml aralığında, korelasyon katsayısı ($r^2=0,999$) ile kurulmuştur. Geri kazanım yüzdesi ise %100,3 ile %100,6 arasındadır. Lenvatinib için LOD değeri 1,2µg/mL, LOQ değeri 3,8µg/mL bulunmuştur (Panigrahy ve Reddy, 2015). Farklı bozunma şartları ile altında Lenvatinib Mesilat bulk ve dozaj form içerisinde Lenvatinib tayini için yapılan bir metotta ise %0,1'lik sulu ortofosforik asit ($\text{o-H}_3\text{PO}_4$) çözeltisi ve asetronitril (ACN) (50:50, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır.

UPLC HSS C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm) kolonu ile 0,3 mL/dk. izokratik akışta 240 nm dalga boyunda analiz gerçekleştirilerek, Lenvatinib için alıkonma süresi 1,24 dk. olarak tespit edilmiştir. Yöntem, 0,9996 korelasyon katsayısı ile 2,5–15 µg/mL konsantrasyon aralığında Beer yasasına uyduğu görülmüştür. Geri kazanım %99,66–100,30 olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğru, kesin, spesifik, doğrusal ve sağlam olduğu bulunmuş. İlacın asidik, bazik, peroksit, nötr, fotolitik ve termal koşullar gibi çeşitli stres koşullarına maruz bırakılmasıyla zorunlu bozunma çalışmaları yapılmıştır. Miktar tayini ile değerlendirilen net bozunmanın limit içinde olduğu tespit edilmiştir (Bandla ve Ganapaty, 2018). Aynı analiz için gerçekleştirilen başka bir UPLC çalışmasında ise hareketli faz olarak %0,1'lik o-H₃PO₄ çözeltisi ve ACN (60:40, h/h) ve Acquity BEH C18 (50mm × 3,00mm., 1,7µm) kolonu kullanılmış ve 15 dakikalık metot için Lenvatinib'in alıkonma süresi 1,19 olarak saptanmıştır. Doğrusallık için korelasyon katsayısı 0,994 ve geri kazanım yüzdesi %100,8 olarak bulunmuştur. Peroksit, fotolitik, asit, alkali ve termal bozunma çalışmaları da yapılmış ve elde edilen sonuç kabul değerinin altında olan %1,0 'den az olmuştur (Prassana ve ark., 2019). Lenvatinib'in bulk ve dozaj formu içerisindeki kantitatif tayini için gerçekleştirilen bir çalışma için ODS kolon (250mm × 4,6mm, 5µm) ve 0,01 M NH₄OAc ve ACN (90:10, h/h) ile 367 nm dalga boyu seçilmiştir. Lenvatinib için alıkonma süresi 1,15 dk. olarak tespit edilen bu metodun doğrusallık çalışması sonucu korelasyon katsayısı 0,9998 olarak bulunmuştur (Kanth M ve Kamal B, 2019). Lenvatinibin sülfamerazin ve salisilik asit birleşik tuzlarının sentezlenmesine ve kristal yapılarının incelenmesine odaklanılan bir başka makalede ise Lenvatinib tayini için ters faz kromatografisi Shiseido CAPCELL PAK C18 (250 mm × 4.6 mm) kolonu ve asetonitril ve su karışımı (60:40, h/h) kullanılarak 1.0 mL/dk'da kolon sıcaklığı 35°C'de 10 dakikalık bir metotta kullanılmıştır (Hong ve ark., 2021). Lenvatinib stres testi sonucunda oluşan safsızlıkların tanımlanması için UPLC/KS metodu kullanılan bir yayında 40°C'de, 10 mM amonyum asetat içerisinde %0,1 formik asit hareketli faz A ve metanol içerisinde %0,1 formik asit: asetonitril karışımı (80:20, h/h) hareketli faz B olarak belirlenmiş. 0.3 mL/dk akış hızında 18 dakikada 246 nm'de analiz edilmiştir. Validasyonu yapılan bu metotta çalışma aralığı 80–120 µg/mL (80–120%) olarak belirlenmiştir ve metot kabul kriterlerini sağlamaktadır. Stres testi olarak hidroliz, sıcaklık ve gün ışığı ile UV ışık altında oluşan safsızlıkların kütleleri üzerinden karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Debasish ve ark., 2023)

1.5.2. Lifitegrast

Lifitegrast, hücreler arası adezyon molekülü ve fonksiyonel lenfosit antijeni arasındaki etkileşimi bloke eden, T hücre adezyonunu, göçünü, aktivasyonunu ardından sitokin salınımını inhibe eden ve böylece T hücre aracılığıyla gelişen inflamasyonu azaltan 2016 yılında FDA onayı almış, %5,0 oftalmik çözelti halinde uygulanan küçük moleküllü bir integrin antagonistidir. Yapılan klinik çalışmalarda hem kuru göz tedavisinde hem semptom giderici hem de tedavi edici olması ile ümit verici olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte kuru göz sendromuna bağlı olarak gelişen kornea ülseri gibi kornea üzerindeki rahatsızlıklar üzerinde iyileşme gözlenmiştir (Tauber ve ark., 2015).



Şekil 1.5. S-Lifitegrast ve R-Lifitegrast molekül formülü

Kuru göz sendromu (KGS), gözlerde kuruluk, kaşıntı, yanma gibi rahatsızlık hissi ve ağrı ile tespit edilen bir oküler yüzey iltihabı hastalığıdır. Tedavi edilmeyen ya da ilerlemiş hastalarda görme bozukluğu ve tedaviye dirençli hale gelen bir hastalıktır. KGS'nin patolojisi tam olarak açıklanmamıştır, ancak T hücre aracılı inflamasyonun hastalıkta merkezi rol oynadığına dair kanıtlar mevcuttur. Önerilen mekanizma kısaca, oküler yüzeyde T hücrelerinin oluşumu ve bu hücrelerin konjonktival stromaya alınması sonrası T hücrelerinin aktivasyonu sonrası T hücreleri iltihaplı dokulara tutunması ve oto-reaktif T hücrelerin kornea epiteli ve konjonktival hücrelerde hasara neden olmasıdır. KGS'deki geleneksel tedavi yaklaşımları gözyaşı takviyeleri, kayganlaştırıcı jeller ve merhemler, besin takviyeleri, topikal siklosporin (sistemik immünomodülatör), kortikosteroidler ve punktal tıkaçları olarak sıralanabilmektedir (Tauber ve ark., 2015).

Fenilalanin türevi olan Lifitegrast, (S)- 2- (2 -(benzofuran- 6- karbonil)- 5, 7- dikloro-1, 2, 3, 4- tetrahidroizokinolin-6- karboksamido)- 3- (3- (metil sülfonil) fenil) propanoik asit olarak isimlendirilir (U.S. FDA, 2016). Lifitegrast için ilgili maddeler, kiral ayırım için çalışma bulunamamıştır. Bir adet etken ve dozaj form içerisinde Lifitegrast için miktar tayini çalışması mevcuttur. Bu çalışmada MeOH: ACN: Su 20:60:20 (h/h) (pH:2,3, o-H₃PO₄

kullanılarak ayarlanmıştır) hareketli faz olarak kullanılmış ve pik şekli için %0,1 trietilamin hareketli faza eklenmiştir. WATERS Sunfire C18 kolonu (4,6 mm × 250 mm, 5 µm) 0,8 mL/dk izokratik elüsyon ile 260 nm’de analiz gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada UV-spektrofotometresi ile de analiz gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık, UV yönteminde ($r^2=0,9995$) 0,5-30,0 µg/mL, HPLC yönteminde ($r^2=0,999$) 2,0-12,0 µg/mL konsantrasyon aralığında bulunmuştur. UV yöntemi ile LOD ve LOQ sırasıyla 0,77 µg/mL ve 2,33 µg/mL olarak bulundu. HPLC yöntemi ile LOD ve LOQ sırasıyla 0,50 µg/mL ve 1,52 µg/mL olarak bulundu (Pannu, Bhatia ve Kumar, 2022) Lifitegrastın sentez çalışmasını iyileştirmek üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Lifitegrast sentezi sırasında karşılaşılan rasemik karışımdan kurtulmak üzere sentez yolları araştırılmıştır. Bu çalışma süresince *R*-lifitegrastın artmasının sebebinin oligomer oluşumu olduğu tespit edilmiş ve istenmeyen bu safsızlığı değil de bu safsızlığı oluşturan ve başlangıç maddesi olarak kullanılan amino asit üzerinden tayin etmek için YMC Triart C18 (250x 4,6cm) 3µm kolon kullanılmıştır. Burada hareketli faz olarak o-H₃PO₄ çözeltisi (1:1000, h/h) ve asetonitril kullanılmıştır. Yapılan denemelerde lifitegrast etken form ve amino asit safsızlığı ile izlenen diğer safsızlıklar değerlendirilmiştir (Madarabonia ve ark., 2023).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Standartlar

Kimyasal	Marka
n-Hekzan, 2-propanol, o-Fosforik asit (%85) , Asetik asit, Formik asit, Trifloroasetik asit ,Sodyum hidroksit, Potasyum hidroksit, Potasyum dihidrojen fosfat, Etanol, Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck
Hidroklorik asit, asetonitril, metanol	J.T Baker
N, N-Dimetilformamit	Scharlau
Dimetil sülfoksit, tetrahidrofuran	SRL
Trifloroasetik asit	Riedel de Haen

Şekil 2.1. Kullanılan kimyasallar

2.2. Kullanılan Cihazlar

pH-metre (Mettler Toledo)	Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001 K)	YPSK (Shimadzu LC-2030C Plus)	Saf su cihazı (Miili Q- Millipone)	
Hassas terazi (Sartorius ME 235S)	KF (Mettler Toledo V30)	YPSK-KS (Waters)	Ultrasonik banyo (Elma- transsonic digital)	Kül Fırını

Şekil 2.2. Kullanılan cihazlar

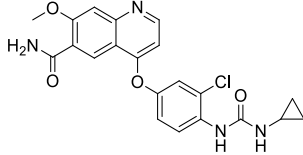
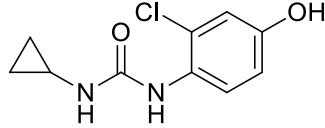
2.3. Kullanılan Diğer Gereçler

Tez çalışması sırasında çeşitli hacimli pipetler, farklı hacimlerde balon jojeler, cam beherler ve saklama şişeleri, vialler, mezürler HPLC, pipet parları ve pastör pipetler ihtiyaç halinde kullanılmıştır.

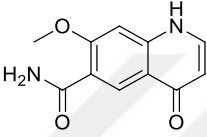
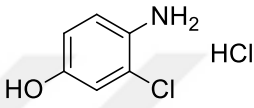
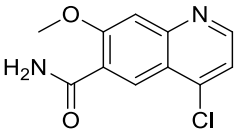
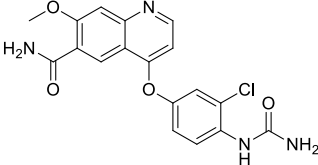
Yapılan denemelerde (4,6x250) mm 5,0µm özelliklerinde Water Symmetry C18, Agilent Zorbax C8, Thermo Scientific Hypersil BDS C18, Troyasil C8, Chiralpak AD-H, Chiralpak OD-H, Chiralpak IB, Chiralpak IC kolonları ve (4,6x150)mm 3,5 µm Water Symmetry C18 kolonları kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan Standartlar

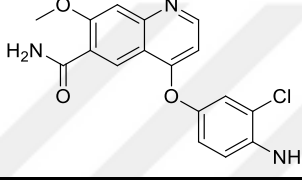
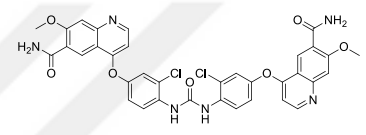
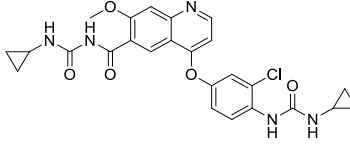
Çizelge 2.1. Lenvatinib ve safsızlıklarının özellikleri

	Lenvatinib	Lenva-1
Safılık, %	98,3	99,6
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	4-(3-kloro-4-(3-siklopropilürido) fenoksi)-7-metoksikinolin-6-karboksamid	1-(2-kloro-4-hidroksifenil)-3-siklopropilüre
Kapalı Formülü	C ₂₁ H ₁₉ ClN ₄ O ₄	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₂ O ₂
Molekül Ağırlığı (g/mol)	426,11 g/mol	226,05 g/mol
Molekül yapısı		

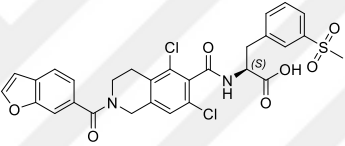
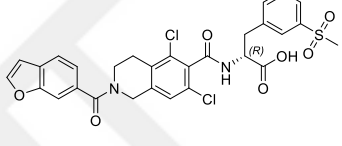
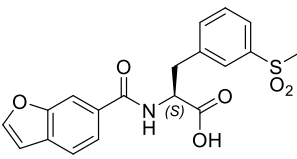
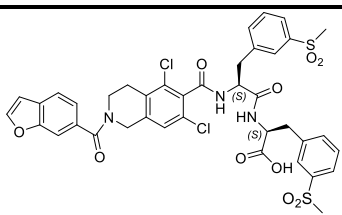
Çizelge 2.1 Devam

	Lenva-2-okso	4-amino-3-klorofenol
Safılık, %	98,0	79,3
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	7-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-6-karboksamid	4-amino-3-klorofenol hidroklorür
Kapalı Formülü	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃	C ₆ H ₆ ClNO
Molekül Ağırlığı (g/mol)	218,07 g/mol	180,03 g/mol
Molekül yapısı		
	Lenva-2	Lenva-dessiklopropil
Safılık, %	99,6	94,0
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	4-kloro-7-metoksikinolin-6-karboksamid	4-(3-kloro-4-üroidofenoksi)-7-metoksikinolin- 6- karboksamid
Kapalı Formülü	C ₁₁ H ₉ ClN ₂ O ₂	C ₁₈ H ₁₅ ClN ₄ O ₄
Molekül Ağırlığı (g/mol)	236,65 g/mol	386,79 g/mol
Molekül yapısı		

Çizelge 2.1 Devam

	Lenva-dessiklopropilamit	Lenva-dimer üre
Saflık, %	97,0	90,2
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	4-(4-amino-3-klorofenoksi)-7-metoksikinolin- 6- karboksamid	4,4'-(((karbonilbis(azanedil)) bis (3-kloro-4,1-fenilen))bis(oksi))bis(7-metoksikinolin-6-karboksamid)
Kapalı Formülü	C ₁₃ H ₁₅ FN ₂ O ₂	C ₃₅ H ₂₆ Cl ₂ N ₆ O ₇
Molekül Ağırlığı (g/mol)	343,76 g/mol	712,12 g/mol
Molekül yapısı		
	Lenva-karbamoil	Lenva-sistem uygunluk
Saflık, %	84,0	%2 oranında lenva-dessiklopropilamit içerir
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	4-(3-kloro-4-(3-ciklopropilüreido) fenoksi)-N-(siklopropilkarbamoil)-7-metoksikinolin-6-karboksamid	-
Kapalı Formülü	C ₂₅ H ₂₄ ClN ₅ O ₅	-
Molekül Ağırlığı (g/mol)	509,94 g/mol	-
Molekül yapısı		-

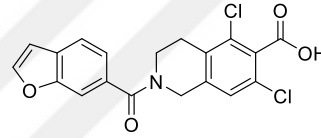
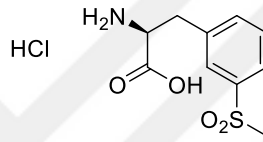
Çizelge 2.2. Lifitegrast ve safsızlıklarının özellikleri

	S-Lifitegrast	R-Lifitegrast
Saflık, %	97,2	98,7
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	(S)-2-(2-(benzofuran-6-karbonil)-5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksamido)-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanoik asit	(R)- 2-(2-(benzofuran-6-karbonil)-5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksamido)-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanoik asit
Kapalı Formülü	C ₂₉ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₇ S	C ₂₉ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₇ S
Molekül Ağırlığı (g/mol)	615,48	615,48
Molekül yapısı		
	Lif-safsızlık-A	Lif-safsızlık-B
Saflık, %	89,3	89,9
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	(S)-2-(benzofuran-6-karboksamido)-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanoik asit	(S)-2-((S)-2-(2-(benzofuran-6-karbonil)-5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksamido)-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanamido)-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanoik asit
Kapalı Formül	C ₁₉ H ₁₇ NO ₆ S	C ₃₉ H ₃₅ Cl ₂ N ₃ O ₁₀ S ₂
Molekül Ağırlığı (g/mol)	387,41	840,74
Molekül yapısı		

Çizelge 2.2. Devam

	Lif-safsızlık-C	Lif-safsızlık-D
Safılık, %	99,8	97,8
Kaynak	DEVA	DEVA
IUPAC Adı	(S)-2-amino-3-(3-(metilsülfonil) fenil) propanoik asit hidroklorür	2-(benzofuran-6-karbonil)-5,7-dikloro-1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-6-karboksilik asit
Kapalı Formül	C ₁₀ H ₁₄ NO ₄ SCl	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ NO ₄
Molekül Ağırlığı (g/mol)	279,74	390,22

Molekül yapısı



2.5.Kullanılan Çözeltiler

2.5.1. Hareketli Faz Çözeltileri

2.5.1.1. Lenvatinib ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan hareketli faz çözeltileri

Hareketli Faz A Çözeltisi-1: 1,0 litre 10 mM KH₂PO₄ tamponu KH₂PO₄ tuzu ile, pH değeri 4,5± 0,05 olacak şekilde %10,0'luk o-H₃PO₄ çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-2: 1,0 litre 10 mM KH₂PO₄ tamponu KH₂PO₄ tuzu ile, pH değeri 6,0± 0,05 olacak şekilde %10,0'luk KOH çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-3: 1,0 litre 10 mM K₂HPO₄ tamponu K₂HPO₄ tuzu ile, pH değeri 4,5± 0,05 olacak şekilde %10,0'luk o-H₃PO₄ çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-4: 1,0 L hareketli faz şişesi içerisine 1,0 L saf su eklendi ve üzerine 1,0 mL o-H₃PO₄ eklenip karıştırılarak çözelti hazırlandı.

Hareketli Faz B: Metot geliştirme denemelerinde %100,0 asetonitril ve %100,0 metanol kullanıldı.

2.5.1.2. Lifitegrast ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan hareketli faz çözeltileri

Hareketli Faz A Çözeltisi-1: 1,0 litre 10 mM KH_2PO_4 tamponu KH_2PO_4 tuzu ile, pH değeri $4,5 \pm 0,05$ olacak şekilde %10,0'luk o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-2: 1,0 litre 10 mM KH_2PO_4 tamponu KH_2PO_4 tuzu ile, pH değeri $4,0 \pm 0,05$ olacak şekilde %10,0'luk o- H_3PO_4 çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-3: 1,0 litre 10 mM KH_2PO_4 tamponu KH_2PO_4 tuzu ile, pH değeri $5,0 \pm 0,05$ olacak şekilde %10,0'luk KOH çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz A Çözeltisi-4: 1,0 litre 10 mM KH_2PO_4 tamponu KH_2PO_4 tuzu ile, pH değeri $6,0 \pm 0,05$ olacak şekilde %10,0'luk KOH çözeltisi ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

Hareketli Faz B Çözeltisi-1: Tüm denemelerde asetonitril kullanılmıştır.

2.5.1.3. Lifitegrast Enantiyomerik Safılık Metodu için Kullanılan Hareketli Faz Çözeltileri

Hareketli Faz Çözeltisi-1: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL hekzan üzerine 500,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı üzerine 1,0 mL formik asit eklenerek tamamen karıştırıldı.

Hareketli Faz Çözeltisi-2: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL hekzan üzerine 500,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı üzerine 2,0 mL formik asit eklenerek tamamen karıştırıldı.

Hareketli Faz Çözeltisi-3: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL hekzan üzerine 500,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

Hareketli Faz Çözeltisi-4: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 600,0 mL hekzan üzerine 400,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

Hareketli Faz Çözeltisi-5: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL hekzan üzerine 500,0 mL etanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

Hareketli Faz Çözeltisi-6: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL hekzan üzerine 500,0 mL metanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

Hareketli Faz Çözeltisi-7: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 600,0 mL heptan üzerine 400,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

Hareketli Faz Çözeltisi-8: 1,0 litre hareketli faz şişesi içerisine 500,0 mL heptan üzerine 500,0 mL 2-propanol eklenerek iyice karışması sağlandı.

2.5.2. Çözücüler

2.5.2.1. Lenvatinib ilgili bileşikler ve miktar tayini metotlarında kullanılan çözücüler

Çözücü-1: 1,0 mL o-fosforik asit (%85,0'lik) 1,0 L saf suya eklenir ve karıştırılır.

Çözücü-2 (son çözücü): Metanol & Çözücü-1 & N, N dimetilformamit (400:600:1, h/h/h)

Çözücü-3: Metanol & Çözücü-1 (40:60, h/h)

2.5.2.2. Lifitegrast ilgili bileşikler, kiral saflık ve miktar tayini metotlarında kullanılan çözücüler

Bütün sistemlerde çözücü olarak metanol kullanılmıştır.

2.5.3. Etken madde ve safsızlık ve validasyon çözeltileri

2.5.3.1. Lenvatinib miktar tayini

Standart çözeltisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib standardı tartıldı, önce üzerine 20,0 mL metanol eklendi ve ultrasonik banyoda çözündü, daha sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden 1,0 mL alınarak 20,0 mL'ye çözücü-3 ile derişimi ayarlandı. ($C_{\text{lenvatinib}} = 0,01 \text{ mg/mL}$).

Stok Numune çözeltisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce 20,0 mL metanol eklendi ve ultrasonik banyoda çözündü ve sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

Numune çözeltisinin hazırlanması: 1,0 mL stok numune çözeltisinden alındı ve 20,0 mL'ye çözücü-3 ile derişimi ayarlandı. ($C_{\text{lenvatinib}} = 0,01 \text{ mg/mL}$).

2.5.3.1.1. Lenvatinib miktar tayini metot validasyonu doğrusallık çözeltilerinin hazırlanması

Doğrusallık Seviye –1 (%80) Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 0,80 mL stok numune çözeltisinden alınarak çözücü-3 ile seyreltilmesi sağlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,008 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –2 (%90) Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 0,90 mL stok numune çözeltisinden alınarak çözücü-3 ile seyreltilmesi sağlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,009 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –3 (%100) Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 1,0 mL stok numune çözeltisinden alınarak çözücü-3 ile seyreltilmesi sağlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,01 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –4 (%110) Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 1,1 mL stok numune çözeltisinden alınarak çözücü-3 ile seyreltilmesi sağlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,011 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –5 (%120) Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 1,2 mL stok numune çözeltisinden alınarak çözücü-3 ile seyreltilmesi sağlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,012 \text{ mg/mL}$).

2.5.3.1.2 Lenvatinib miktar tayini metot validasyonu doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

%80'lik doğruluk çözeltilisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 8,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce 20,0 mL metanol eklendi ve ultrasonik banyoda çözüldü ve sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden ,0 mL alınarak 20,0 mL'ye çözücü-3 ile derişimi ayarlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,008 \text{ mg/mL}$).

%100'lük doğruluk çözeltilisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce 20,0 mL metanol eklendi ve ultrasonik banyoda çözüldü ve sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden ,0 mL alınarak 20,0 mL'ye çözücü-3 ile derişimi ayarlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,01 \text{ mg/mL}$).

%120'lik doğruluk çözeltilisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon joje içine 12,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce 20,0 mL metanol eklendi ve ultrasonik banyoda çözüldü ve sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden ,0 mL alınarak 20,0 mL'ye çözücü-3 ile derişimi ayarlandı. ($C_{\text{Lenvatinib}} = 0,012 \text{ mg/mL}$).

2.5.3.2. Lenvatinib ilgili bileşikler

Sistem uygunluk çözeltisi: 25,0 mL hacimli balon jojeye 5,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, 10,0 mL metanol ve 25,0 μL DMF eklendi ve ultrasonik banyoda iki dakika çözüldü ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

Numune çözeltilisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce üzerine 20,0 mL metanol ve 50,0 μL DMF eklendi ve ultrasonik banyoda iki dakika çözüldü sonra hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

Lenva-1 Stok Çözeltilisinin Hazırlanması: 20,0 mL hacimli balon jojeye 7,5 mg Lenva-1 standardı tartıldı, metanol ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilinin 1,0 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı

Standart çözeltisi: Lenva-1 stok çözeltilisinin 1,0 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı ($d_{\text{Lenva-1}} = 0,3 \mu\text{g/mL}$).

2.5.3.2.1 Lenvatinib ilgili bileşikler spesifiklik parametresinde kullanılan çözücüler

Stok Safsızlık Çözeltilerinin Hazırlanması

Lenva-2-okso stok çözeltisi: 5,0 mL hacimli balon joje içine 2,58 mg Lenva-2-okso, tartıldı metanol ile çözündürülüp hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

4-amino-3-klorofenol stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içine 5,00 mg 4-amino-3-klorofenol tartıldı metanol ile çözünüp hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,25 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-2 stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içerisine 4,16 mg Lenva-2 tartıldı metanol ile çözünüp hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,25 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-dessiklopropil stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içerisine 5,44 mg Lenva-dessiklopropil tartıldı üzerine 5,0 mL DMF eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı ve sonra asetonitril ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-dessiklopropilamit stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içerisine 4,28 mg Lenva-dessiklopropilamit tartıldı metanol ile çözünüp hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,25 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-dimer-üre stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içine 5,10 mg Lenva-dimer-üre tartıldı önce üzerine 5,0 mL DMF eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı ve sonra asetonitril ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-karbamoil stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içerisine 5,70 mg Lenva-karbamoil tartıldı önce üzerine 5,0 mL DMF eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlandı

ve sonra asetonitril ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenva-1 stok çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon jojeye 5,02 mg Lenva-1 standardı tartıldı metanol ile çözünüp hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 25,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Lenvatinib stok çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce üzerine 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklenerek ultrasonik banyoda iki dakika çözündürüldü ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 20,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlık çözeltilerinin hazırlanması: Her bir stok safsızlık çözeltisinden (Lenva-2-okso, 4-amino-3-klorofenol, Lenva-1, Lenva-2, Lenva-dessiklopropil, Lenva-dessiklopropilamit, Lenva-dimer üre, Lenva-karbamoil) 1,0'er mL alındı ve her biri ayrı ayrı 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Spesifikasyon limitinde Lenva-1 içermeyen Lenvatinib safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: Lenva-1 dışındaki her bir safsızlık stok çözeltisinden (Lenva-2-okso, 4-amino-3-klorofenol Lenvatinib, Lenva-2, Lenva-dessiklopropil, Lenva-dessiklopropilamit, Lenva-dimer üre, Lenva-karbamoil) 1,0'er mL alındı ve tek bir balon jojede 50,0 mL'ye derişimi ayarlandı.

Spesifikasyon limitinde Lenvatinib safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: Her bir stok safsızlık çözeltisinden (Lenva-2-okso, 4-amino-3-klorofenol, Lenva-1, Lenva-2, Lenva-dessiklopropil, Lenva- dessiklopropilamit, Lenva-dimer üre, Lenva-karbamoil) 1,0'er mL alındı ve tek bir balon jojede 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlıkların eklendiği Lenvatinib numune çözeltisinin hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce üzerine 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklenerek ultrasonik banyoda iki dakika çözünmesi sağlandı, üzerine her bir safsızlık stok çözeltisinden 1,0'er mL eklendi ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

2.5.3.2.2 Lenvatinib ilgili bileşikler doğrusallık parametresinde kullanılan çözeltiler

Doğrusallık Stok Çözeltisinin Hazırlanması: 0,25 mL 4-amino-3-klorofenol, Lenva-2 ve Lenva-dessiklopropilamit stok çözeltilerinden ve 0,75 mL from Lenva-2-okso, Lenva-1, Lenva-dessiklopropil, Lenva-dimer üre ve Lenva-karbamoil stok çözeltilerinden ayrı ayrı alınarak tek bir balon jojede 25,0 mL'ye derişimi ayarlandı.

TAS Stok Çözeltisinin Hazırlanması: 50,0 µL Lenva-2-okso, 130,0 µL 4-amino-3-klorofenol, 270,0 µL Lenva-1, 84,5 µL Lenva-2, 56,0 µL Lenva-dessiklopropil, 130,0 µL Lenva-dessiklopropilamit, 138,0 µL Lenva-dimer üre ve 125,0 µL Lenva-karbamoil stok çözeltilerinden alınarak 100,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye –1 (TAS) Çözeltisi: LOQ stok çözeltisinin 1,0 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-2 (50%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 0,5 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-3 (80%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 0,8 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-4 (100%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,0 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-5 (120%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,2 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-6 (150%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,5 mL'si 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

Doğrusallık Seviye-7 (200%) Çözeltisi: 2,0 mL doğrusallık stok çözeltisi 50,0 mL'ye çözücü-2 ile derişimi ayarlandı.

2.5.3.2.3. Lenvatinib ilgili bileşikler doğruluk parametresinde kullanılan çözeltiler

% 50,0' lik doğruluk seviyesi için stok karışım çözeltisi: 0,375 mL from Lenva-2-okso ve Lenva-1, 0,125 mL 4-amino-3-klorofenol ve Lenva-2, 181,0 µL Lenva-dessiklopropil, 49,0 µL Lenva- dessiklopropilamit, 70,0 µL Lenva-karbamoil stok çözeltilerinden alındı ve tek bir balon jojede 25,0 mL 'ye çözücü-2 ile tamamlandı.

%100,0' lük doğruluk seviyesi için stok karışım çözeltisi: 0,750 mL from Lenva-2-okso ve Lenva-1, 0,250 mL 4-amino-3-klorofenol ve Lenva-2, 0,555 mL Lenva-dessiklopropil, 0,174 mL Lenva-dessiklopropilamit, 0,170 mL Lenva-dimer üre, 0,444 µL Lenva-karbamoil stok çözeltilerinden alındı ve tek bir balon jojede 25,0 mL 'ye çözücü-2 ile tamamlandı.

%150,0' lik doğruluk seviyesi için stok karışım çözeltisi: 1,125 mL from Lenva-2-okso ve Lenva-1, 0,375 mL 4-amino-3- klorofenol ve Lenva-2, 0,931 mL Lenva-dessiklopropil, 0,299 mL Lenva-dessiklopropilamit, 0,546 mL Lenva-dimer üre, 0,820 µL Lenva-karbamoil stok çözeltilerinden alındı ve tek bir balon jojede 25,0 mL 'ye çözücü-2 ile seyreltildi.

Doğruluk için TAS çözeltisi hazırlığı: 130,0 µL 4-amino-3-klorofenol stok çözeltisinden alındı ve tek bir balon jojede 25,0 mL 'ye çözücü-2 ile seyreltildi.

TAS doğruluk seviyesi çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon joje içine 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklenerek ultrasonik banyoda iki dakika çözüldü, sonra üzerine doğruluk için hazırlanan LOQ stok çözeltisinden 1.0'er mL eklendi ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

%50,0' lik doğruluk çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklendi ve ultrasonik banyoda iki dakika çözüldü, sonra üzerine %50'lik doğruluk stok karışım çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

%100,0' lük doğruluk çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, önce üzerine 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklendi ve ultrasonik

banyoda iki dakika çözüldü, sonra üzerine %100'lik doğruluk stok karışım çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

%150,0' lik doğruluk çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon joje içine 10,0 mg lenvatinib numunesi tartıldı, 20,0 mL metanol ve 50,0 µL DMF eklenerek ultrasonik banyoda iki dakika çözüldü, sonra üzerine %150'lik doğruluk stok karışım çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve hacmine çözücü-1 ile tamamlandı.

2.5.3.3 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu için hazırlanan çözeltiler

Numune Çözeltisi: 20,0 mL hacimli balon joje içine 10,0 mg S-Lifitegrast numunesi tartıldı, metanol ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,5 \text{ mg/mL}$)

Standart Stok Çözeltisi: 10,0 mL hacimli balon joje içerisine 5,0 mg R-Lifitegrast standardı tartıldı, çözücü ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltili. Bu çözeltiden 2,0 mL alındı ve 10,0 mL'ye çözücü varlığında seyreltili.

Standart Çözeltisi: Standart stok çözeltisinin 2,0 mL'si 20,0 mL'ye çözücü ile seyreltili. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,00075 \text{ mg/mL}$)

Spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi hazırlanması: 20,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartıldı 5,0 mL çözücü ile çözüldü ve R-Lifitegrast stok çözeltisinden 2,0 mL üzerine eklenip sonra hacmine çözücü ile tamamlandı.

Sistem uygunluk çözeltisinin hazırlanması: 20,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg S-Lifitegrast standardı tartıldı 3,0 mL çözücü ile çözüldü ve üzerine R-Lifitegrast stok çözeltisinin 2,0 mL'si eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

2.5.3.3.1 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu seçicilik parametresi için hazırlanan çözeltiler

Safsızlık stok çözeltilerinin hazırlanması: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 5,0 mg S-Lifitegrast standardı tartıldı, çözüldü ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,2 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi.

R- Lifitegrast: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 5,0 mg R-Lifitegrast standardı tartıldı, çözücü ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 2,0 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi.

Lifitegrast safsızlık- A: 10,0 mL'lik balon joje içine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-A standardı tartıldı, çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi.

Lifitegrast safsızlık- B: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık B standardı tartıldı, çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilir.

Lifitegrast safsızlık- C: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık C standardı tartıldı, çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilir.

Lifitegrast safsızlık- D: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık D standardı tartıldı, çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,75 mL'si 10,0 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilir.

Stok safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mL'lik balon joje içine, Lifitegrast safsızlık A, B, C ve D stok çözeltilerinden 1,0 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlık çözeltilerinin hazırlanması

R-Lifitegrast: R-Lifitegrast çözeltisinin 2,0 mL'si 20,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,00075 \text{ mg/mL}$)

Spesifikasyon limitinde safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: 20,0 mL’lik balon joje içine, stok safsızlık karışım çözeltisinden 2,0 mL eklendi, hacmine çözücü ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde standart ve safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: 20,0 mL’lik balon joje içine, stok safsızlık çözeltisinden 2,0 mL ve S-Lifitegrast stok çözeltisinden 1,0 mL eklendi, hacmine çözücü ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde standard ve safsızlık ilaveli numune çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mg numune 20,0 mL’lik balon joje içine tartıldı, 3,0 mL çözücü ile çözüldü, üzerine R-Lifitegrast ve safsızlık stok çözeltilerinden 2,0’şer mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

2.5.3.3.2 Lifitegrast enantiyomerik saflık metodu doğrusallık parametresinde kullanılan çözeltiler

Doğrusallık Stok Çözeltisinin Hazırlanması: R-Lifitegrast stok standart çözeltisi kullanılır.

TAS Stok Çözeltisinin Hazırlanması: R-Lifitegrast stok çözeltisinden 366,0 µL alınarak 100,0 mL’ye seyreltildi. Hazırlanan çözeltinin 2,0 mL’si 10.0 mL’ye çözücü ile tamamlandı.

Doğrusallık Seviye –1 (TAS) Çözeltisi: LOQ stok çözeltisinden 2,0 mL’si 20,0 mL’ye seyreltildi.

Doğrusallık Seviye-2 (50%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,0 mL’si 20,0 mL’ye seyreltildi.

Doğrusallık Seviye-3 (80%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,6 mL’si 20,0 mL’ye seyreltildi.

Doğrusallık Seviye-4 (100%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 2,0 mL’si 20,0 mL’ye seyreltildi.

Doğrusallık Seviye-5 (120%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 2,4 mL’si 20,0 mL’ye seyreltildi.

Doğrusallık Seviye-6 (150%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 3,0 mL'si 20,0 mL'ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-7 (200%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 4,0 mL'si 20,0 mL'ye seyreltilti.

2.5.3.3 Lifitegrast enantiyomerik saflık doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

Doğruluk TAS çözeltisi: 20,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg numune tartıldı, 3,0 mL çözücü ile çözüldü, üzerine *R*-Lifitegrast LOQ stok çözeltisinden 2,0 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

%50,0' lik doğruluk çözeltisi: 20,0 mL hacimli balon joje içine 10,0 mg numune tartıldı, 3,0 mL çözücü ile çözüldü, üzerine *R*-Lifitegrast stok çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

%100,0' lük doğruluk çözeltisi: 20,0 mL hacimli balon joje içine 10,0 mg numune tartıldı, 3,0 mL çözücü ile çözüldü, üzerine *R*-Lifitegrast ve safsızlık stok çözeltisinden 2,0 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

%150,0' lik doğruluk çözeltisi: 20,0 mL hacimli balon joje içerisine 10,0 mg numune tartıldı, 3,0 mL çözücü ile çözüldü, üzerine *R*-Lifitegrast ve safsızlık stok çözeltisinden 3,0 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

2.5.3.4 Lifitegrast ilgili bileşikler çözeltilerinin hazırlanması

Numune Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon jojeye 13,00 mg *S*-Lifitegrast numunesi tartıldı, metanol ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,25 \text{ mg/mL}$)

Standart Stok Çözeltisi: 50,0 mL hacimli balon joje içine 13,01 mg *S*-Lifitegrast standardı tartıldı, metanol ile çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 0,5 mL'si 20,00 mL'ye metanol ile seyreltilti. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,25 \text{ mg/mL}$)

Standart Çözeltisi: Standart stok çözeltisinin 1,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltilti. ($C_{\text{Lifitegrast}} = 0,000375 \text{ mg/mL}$)

Lifitegrast safsızlık- A: 10,0 mL'lik balon joje içine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-A standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- B: 10,0 mL'lik balon joje içine 9,95 mg Lifitegrast safsızlık-B standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- C: 10,0 mL'lik balon joje içine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-C standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- D: 10,0 mL'lik balon joje içine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-D standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Stok safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mL'lik balon jojeye, Lifitegrast safsızlık A, B, C ve D stok çözeltilerinden 0,21 mL eklendi, hacmine metanol ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş standart çözeltisi hazırlanması: Stok standart ve stok safsızlık çözeltisinden 50,0 mL'lik balon jojeye 1,0'er mL eklendi ve hacmine metanol ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi hazırlanması: 50,0 mL hacimli balon jojeye 13,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartılır 20,0 mL çözücü ile çözünür üzerine stok safsızlık çözeltisinden 1,0 mL eklenir ve hacmine çözücü ile tamamlanır.

Safsızlık Standart çözeltilerinin hazırlanması: Her bir safsızlıktan önce ayrı ayrı 0,21 mL alınarak 10,0 mL'ye metanol ile seyreltilir. Sonra her bir safsızlığa özel hazırlanan çözeltilerden 1,0'er mL alınarak 50,0 mL'ye metanol ile seyreltilir.

2.5.3.4.1 Lifitegrast ilgili bileşikler doğrusallık çözeltilerinin hazırlanması

Lifitegrast safsızlık- A: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-A standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- B: 10,0 mL'lik balon joje içerisine 9,95 mg Lifitegrast safsızlık-B standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- C: 10,0 mL’lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-C standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Lifitegrast safsızlık- D: 10,0 mL’lik balon joje içerisine 10,0 mg Lifitegrast safsızlık-D standardı tartıldı, çözündü ve hacmine tamamlandı.

Stok safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon joje içine, Lifitegrast safsızlık A, B, C ve D stok çözeltilerinden 0,21 mL eklendi, hacmine metanol ile tamamlandı.

TAS Stok Çözeltisinin Hazırlanması: Lifitegrast stok standart çözeltisinden 65,0 µL, lifitegrast-A çözeltisinden 60,0 µL, lifitegrast B stok çözeltisinden 65 µL, lifitegrast C stok çözeltisinden 175 µL ve lifitegrast D stok çözeltisinden 30 µL alınarak 100,0 mL’ye metanol ile seyreltilti.

Doğrusallık Seviye –1 (TAS) Çözeltisi: LOQ stok çözeltisinin 1,0 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-2 (50%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 0,5 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-3 (80%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 0,8 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-4 (100%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,0 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-5 (120%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,2 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-6 (150%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 1,5 mL’si 50,0 mL’ye seyreltilti.

Doğrusallık Seviye-7 (200%) Çözeltisi: Doğrusallık stok çözeltisinin 2,0 mL'si 50,0 mL'ye seyreltildi.

2.5.3.4.2. Lifitegrast ilgili bileşikler doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

TAS Stok Çözeltisi: Stok lifitegrast C çözeltisinden 175,0 µL, lifitegrast D stok çözeltisinden 30,0 µL alınarak çözücü ile 100,0 mL'ye seyreltildi.

Doğruluk TAS Seviyesi: 50.0 mL hacimli balon joje içine 13,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartıldı ve önce 20,0 mL çözücü ile çözüldü üzerine stok LOQ çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve sonra hacmine çözücü ile tamamlandı.

%50,0' lik doğruluk çözeltisi: 50.0 mL hacimli balon joje içine 13,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartıldı ve önce 20,0 mL çözücü ile çözüldü üzerine stok safsızlık çözeltisinden 0,5 mL eklendi ve üzeri çözücü ile tamamlandı.

%100,0' lük doğruluk çözeltisi: 50.0 mL hacimli balon joje içine 13,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartıldı ve önce 20,0 mL çözücü ile çözüldü üzerine stok safsızlık çözeltisinden 1,0 mL eklendi ve üzeri çözücü ile tamamlandı.

%150,0' lik doğruluk çözeltisi: 50.0 mL hacimli balon joje içine 13,0 mg S- Lifitegrast numunesi tartıldı ve önce 20,0 mL çözücü ile çözüldü üzerine stok safsızlık çözeltisinden 1,5 mL eklendi ve üzeri çözücü ile tamamlandı.

2.5.3.5 Lifitegrast miktar tayini çözeltilerinin hazırlanması

Standart çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon jojeye 5,15 mg lifitegrast standardı tartıldı, üzerine 5,0 mL metanol eklendi çözüldü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltildi. ($C_{\text{lifitegrast}} = 0,05 \text{ mg/mL}$).

Stok Numune çözeltisinin hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon jojeye 5,15 mg lifitegrast standardı tartıldı, üzerine 5,0 mL metanol eklendi çözüldü ve hacmine tamamlandı.

Numune çözeltisinin hazırlanması: Hazırlanan stok çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C_{\text{lifitegrast}} = 0,05 \text{ mg/mL}$).

2.5.3.5.1 Lifitegrast miktar tayini metodu doğrusallık çözeltilerinin hazırlanması

Doğrusallık Seviye –1 (%80) Çözeltisi: Stok numune çözeltisinin 0,80 mL'si alınarak 50,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C = 0,008 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –2 (%90) Çözeltisi: Stok numune çözeltisinin 0,90 mL'si alınarak 50,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C = 0,009 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –3 (%100) Çözeltisi: Stok numune çözeltisinin 1,0 mL'si alınarak 50,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C = 0,01 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –4 (%110) Çözeltisi: Stok numune çözeltisinin 1,1 mL'si alınarak 50,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C = 0,011 \text{ mg/mL}$).

Doğrusallık Seviye –5 (%120) Çözeltisi: Stok numune çözeltisinin 1,2 mL'si alınarak 50,0 mL'ye çözücü ile seyreltilti. ($C = 0,012 \text{ mg/mL}$).

2.5.3.5.2 Lifitegrast miktar tayini metodu doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

%80,0' lik Doğruluk Çözeltisinin Hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon jojeye 4,12 mg lifitegrast standardı tartıldı, üzerine 5,0 mL metanol eklendi çözündü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilti. ($C_{\text{lifitegrast}} = 0,04 \text{ mg/mL}$).

%100,0' lük Doğruluk Çözeltisinin Hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon jojeye 5,15 mg lifitegrast standardı tartıldı, üzerine 5,0 mL metanol eklendi çözündü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilti. ($C_{\text{lifitegrast}} = 0,05 \text{ mg/mL}$).

%120,0' lik Doğruluk Çözeltisinin Hazırlanması: 10,0 mL hacimli balon jojeye 6,18 mg lifitegrast standardı tartıldı, üzerine 5,0 mL metanol eklendi çözündü ve hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin 1,0 mL'si 10,0 mL'ye seyreltilti. ($C_{\text{lifitegrast}} = 0,06 \text{ mg/mL}$).

3. BULGULAR

3.1. Kullanılan Standartların ve Etken Maddelerin Saflığı

İlaç etken maddeleri geliştirilirken safsızlık profillerinin sentez çalışmasının başlaması ile paralel olarak yürütülmesi gerekmektedir. Sentez ve analiz birlikte ilerleyen süreçlerdir. Bu sebeple bu tez çalışmasında da kullanılan etken maddeler sentez süreçlerinin başından itibaren detaylı bir safsızlık profili incelemesinden geçirildi. Öncelikle sentez sırasında oluşabilecek, ortamda kalabilecek ve başlangıç maddelerinin içerisinde ortamda var olabilecek safsızlıklar belirlendi. Sonrasında hızlı bozundurma testleri uygulanarak saklama koşullarında ve zor koşullarda ortamda oluşabilecek safsızlıklar belirlendi. Bir molekülün standart olarak kullanılabilmesi için kimyasal olarak yapısının karakterize edilmesi ve kantitatif olarak analizlerinin tamamlanarak tam bir saflık değerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple YPSK-KS, GC, FT-IR, C-NMR, H-NMR, DSC, XRD, voltametrik nem tayini cihazı ve inorganik madde tayini yöntemleri kullanıldı. Bu çalışmalar sonunda onaylanan yapıların öncelikle karakterizasyonları ve sonrasında analizleri tamamlanarak % saflık değerleri elde edildi. Standartlar **2. Bölüm Çizelge 2.1** ve **Çizelge 2.2**'de verilmiştir. Etken maddeler ve belirlenen safsızlıklar DEVA Holding A.Ş API Ar-Ge sentez bölümünde sentezlendi ve analizleri DEVA Holding A.Ş API Ar-Ge analitik bölümü tarafından tamamlandı ve standart olarak onaylandı.

3.2. Lenvatinib için geliştirilen metotların optimizasyonları

3.2.1. Lenvatinib ilgili bileşikler

3.2.1.1. Çözücü seçimi

Çözücü seçimi için gerekli literatür araştırılması yapıldıktan sonra, lenvatinib molekülünün farklı organik çözücüler içerisindeki karışımları gözlemlendi ve dimetil sülfoksit ve metanolde iyi çözünme gözlenirken asetonitril varlığında daha çok bir dağılma gözlemlendi. Polar bir molekül olan lenvatinib için dimetil sülfoksit, metanol, asetonitril ve su karışımları denendi ancak suyun polaritesinin yeterli olmadığı görüldü. Bu sebeple asidik bir katkıya ihtiyaç olduğu tespit edildi. Bunun için su yerine o-fosforik asit çözeltisi (1:1000, h/h) kullanıldı. Hem lenvatinib molekülünün daha iyi çözünmesi hem de hareketli faza uyumunun

olması için düşük organik yüksek su karışımı amaç olacak şekilde farklı oranlarda (80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80) metanol ve o-H₃PO₄ çözeltisi karışımları denendi. Bu denemelerin sonunda metanol ve o-H₃PO₄ çözeltisi karışımı (40:60, h/h) *en uygun çözücü* olarak tespit edildi. Lenvatinib molekülünün yanında diğer safsızlıkların çözünmeleri de incelendi. Bütün safsızlıkların stok çözeltilerinde metanol kullanıldı. Ancak lenvadeksiklopropil, lenva- dimer üre ve lenva- karbamoil safsızlıklarının çözünmesi için DMF ve asetonitril karışımlarının gerekliliği tespit edildi. Bu safsızlıkların lenvatinib içerisinde bulunma ihtimallerine ve standart çözeltisine uyumlu olması için çözücü ortamına düşük oranda olması amaç olacak şekilde çözücü karışımı için denemeler yapıldı. Bu denemelerde DMF ve uygun bulunan çözücü karışımı (0,5:100, 1:100 ve 2:1000, h/h) olarak denendi. Bu denemelerin sonucunda ise hem 0,5:1000 oranında eklemenin yetersiz olduğu gözlemlendiğinden 1:1000 oranında kullanıldığında kromatografik olarak yeterli geldiğinden tercih edildi. 2:1000 oranı daha fazla YPSK sistemini kirletmemesi açısından tercih edilmedi. Bu denemeler ile sonuçta metanol, o-H₃PO₄ çözeltisi ve DMF karışımının (400:600:1, h/h/h) çözücü olarak kullanılmasına karar verildi.

3.2.1.2. Hareketli faz seçimi

Lenvatinib ilgili bileşikler sistemi için **Çizelge 3.1**'de verildiği gibi ilk olarak o-H₃PO₄ çözeltisi ve metanol hareketli faz olarak kullanıldı (deneme 1-8). Bu denemelerde lenvatinibin bütün safsızlıklarının gözlenmesi için yeterli bulunmadığından farklı hareketli fazlarla denemeler gerçekleştirildi. Bu denemeler fosfat tamponları kullanılarak yapıldı. Hareketli fazların pH değerleri incelenecek moleküllerin pKa değerlerinden ± 1 farkla hazırlandığında daha iyi ayrımlar gözlenmektedir. **Çizelge 3.1** deneme 9-22'de görüldüğü gibi farklı pH'larda (3,5-6,0) ve derişimlerde (10mM, 20mM) ve farklı tuzlarla KH₂PO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄ hazırlanan çözeltiler hareketli faz A olarak denendi. Hareketli faz B olarak metanol yerine asetonitril kullanıldı. **Çizelge 3.1** deneme 1-2'de verilen metodlar incelendiğinde çözücü sisteminde metanol tercih edilmesinden dolayı hareketli faz olarak asetonitrilin kullanılması piklerin şeklini düzelttiği gözlenmiştir. Tampon derişiminin değişmesinin çok büyük bir fark yaratmamasından 10 mM tercih edildi. Aynı çizelgede deneme 22 de tuz değişikliğinin etkisi incelendiğinde KH₂PO₄ kullanımının safsızlıklar arasında daha iyi ayrımı sağladığı gözlemlendi. Aynı çizelgede pH 4,5 üzeri olduğunda polar bölgedeki safsızlıkların tamamen ayrılmadığı görüldüğünden deneme 22'de görüldüğü gibi pH 4,5 değerine sabitlenen 10 mM KH₂PO₄ tamponu hareketli faz A olarak belirlendi.

3.2.1.3. Kolon seçimi

YPSK sistemi kullanılarak yapılan metotta ters faz YPSK kolonları denemelerde kullanılmıştır. **Çizelge 3.1'** de verilen denemelerde kullanılan kolonlar (4,6x250)mm 5,0µm ve 3,0 µm özelliklerinde farklı dolgu materyalleri ve dolgu yöntemleri ile hazırlanmış, Waters Symmetry C18 (deneme 1), Thermo scientific Hypersil BDS C18 (deneme 2-17) ve Agilent Zorbax SB-C8 (deneme 18-22) kolon ile denemeler yapıldı. Waters symmetry C18 kolonu bütün safsızlıkları ayırmada yeterli olmadığından 3,0 µm tanecik boyutlu C18 kolonu olarak Thermo scientific Hypersil BDS C18 kolonu ile denemeler yapıldı. Ancak uzun süreli denemelerde kimyasal dayanımının iyi olmadığı görüldüğünden farklı marka ve daha polar olan 4-amino-3-klorofenol molekülünün ayrılması için de C8 kolonu denendi. Son olarak Agilent Zorbax SB-C8 kullanılmasına karar verildi.

3.2.1.4. Numune derişimi seçimi

Lenvatinib etken madde derişimi için 2,0 mg/ mL, 0,5 mg/ mL ve 0,2 mg/ mL' de denemeler **Çizelge 3.1** de sunulmuştur. Bu derişimlere göre safsızlıkların spesifikasyon limitlerinde standart ve safsızlık eklenmiş numuneler ile denemeler yapıldı. 2,0mg/ mL (deneme 1-10)- 0,5 mg/mL (deneme 11-16) genotoksik safsızlıkların pik yüksekliklerinin kontrol edilmesi için denendi. Ancak 0,2 mg/ mL'de yeterli yüksekliğe ve S/N oranına ulaştığı görüldüğünden 0,2 mg/ mL çalışma derişimi olarak belirlendi (deneme 17-22). İlgili bileşikler metodunda safsızlıkların limit değerleri ICH Q3A kılavuzunda açıkça belirtilmiştir ((ICH Q3A, 2006)) . ≤ 2 g/ gün maksimum günlük alım dozu bulunan moleküller için bilinen safsızlık (%0,15) bilinmeyen safsızlık için (%0,1) uygulanan limitlerdir. Bu kılavuza göre %0,05 üzerindeki bütün pikler raporlanmalı ve %0.1 üzerinde olan bütün pikler tanımlanmalıdır((ICH Q3A, 2006; ICH Q3B, 2006)). Safsızlıkların derişimleri 0,2 mg/mL numune derişimine göre, 0,3µg/mL (%0,15), genotoksik safsızlıklar için 0,08µg/mL (400 ppm), lenvatinib standart derişimi ise 0,2µg/mL olarak belirlendi.

Genotoksik safsızlıklıklar için uygulanacak limit değerleri ICH M7 kılavuzunda açıkça belirtilmiştir ((ICH, 2017)) . Genotoksik bir safsızlık için ve birden fazla genotoksik safsızlık varlığındaki limit değerleri farklıdır. Bu metotta lenvatinib içerisindeki genotoksik safsızlıklar için lenvatinibin günlük alım dozu (24mg/gün) üzerinden 1-10 yıllık kullanım için 10 µg/gün üzerinden hesaplandığında (Mano ve Kusano, 2015) ve 416,7 ppm bulunmuştur. Bu limitin yerine daha düşük bir limit olarak 400 ppm kullanılması kararlaştırılmıştır (EMA,

2015). Bütün genotoksikler ayrı ayrı 400 ppm limit değeri ile kontrol edildi. Birden fazla genotoksik safsızlık varlığında hepsinin toplam olarak bulunma limiti kullanım süresine ve miktarına göre hesaplanır ve değerlendirilir. Bu hesap için 1-10 yıllık kullanım süresine göre 30 µg/ gün değeri kullanılarak hesaplandığında 1250 ppm bulunur. Bu değer ise toplam genotoksik safsızlık limiti olarak kullanılır. Ancak burada belirlenen genotoksik safsızlık limiti 1200 ppm'dir Bu metotta belirlenen genotoksik safsızlık limitleri ayrı ayrı ve toplamda ICH M7 kılavuzunda belirlenen limit değerlerinden daha düşüktür.

3.2.1.5. Dalga boyu seçimi

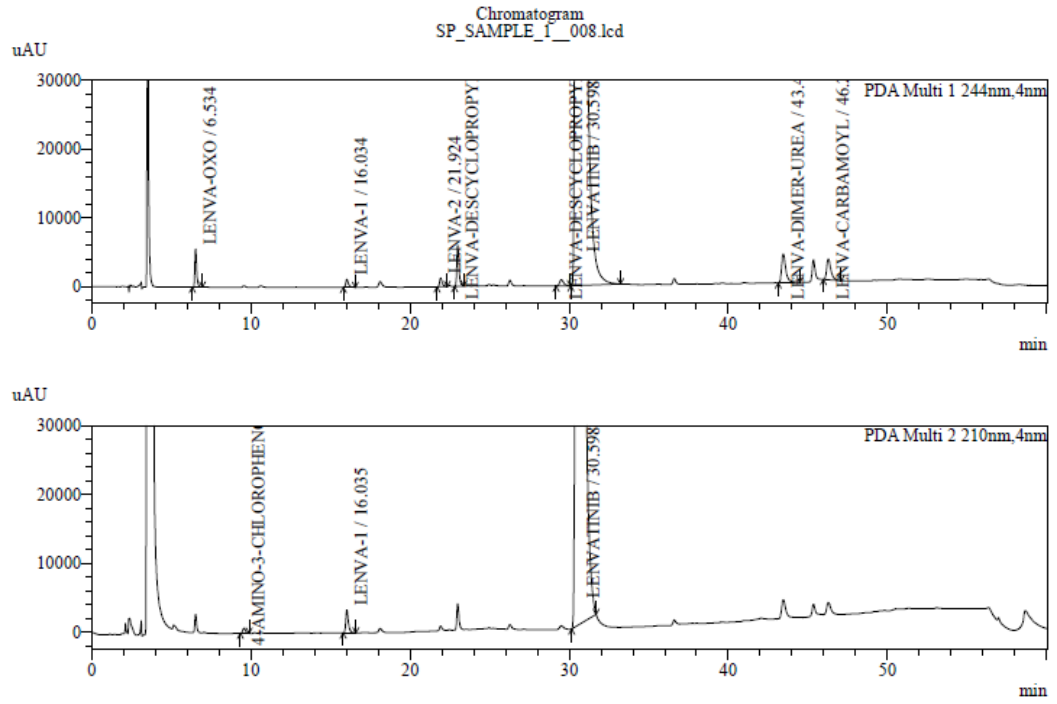
Shimadzu SK sisteminde geliştirilen yöntemde **Çizelge 3.1**'de görüldüğü gibi öncelikle bütün safsızlıkların ve lenvatinibin ve diğer safsızlıkların dalga boyu taraması PDA ile gerçekleştirilmiştir (deneme 1-2). 4-amino-3-klorofenol için 210 nm, diğer safsızlıklar ve lenvatinib için 244 nm'de maksimum absorpsiyonlar gözlemlendi. 4-amino-3-klorofenol safsızlığının 244 nm'de absorpsiyonu bulunmadığından metodun çift dalga boyu ile valide edilmesi ve 210 nm'nin sadece 4-amino-3-klorofenol için kullanılması uygun bulundu (deneme 3-22).

3.2.1.6. Yöntem Optimizasyonu

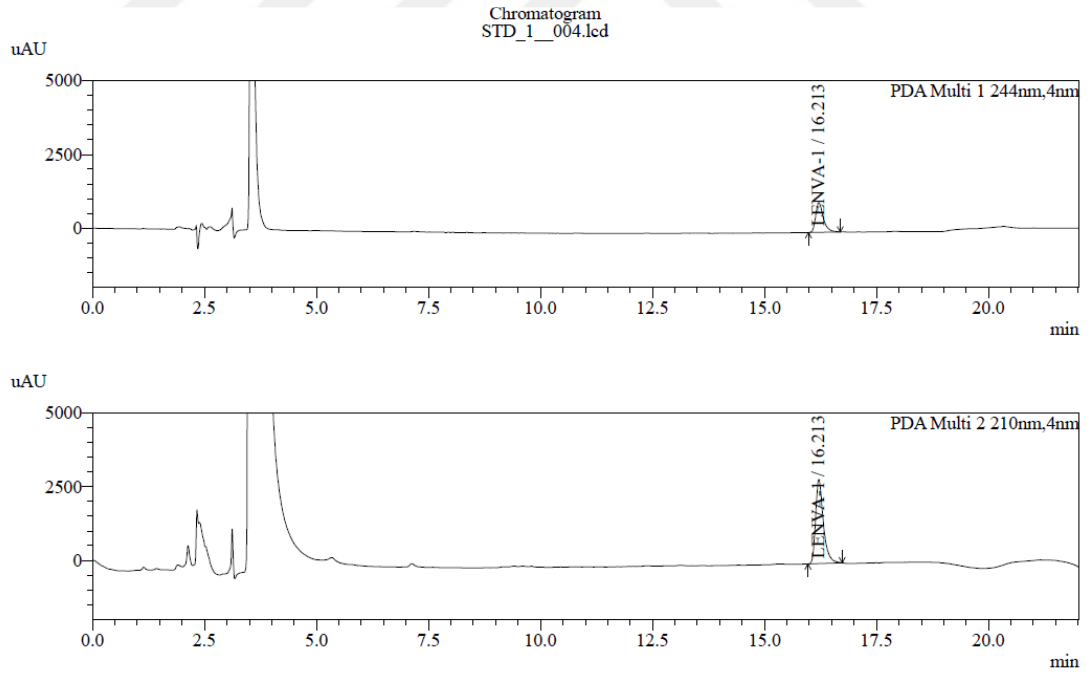
Lenvatinib ilgili bileşikler yöntemi ters faz kromatografisi ve gradient ayırım yöntemi ile geliştirilmiştir. Burada üç genotoksik olmak üzere yedi adet safsızlık ve ana molekülün ayrılması için tek bir metod kullanılması amaçlandı. Ana molekülün pKa değeri metod geliştirme için yol gösterici olsa da yeterli değildir. Bunun sebebi ilgili bileşikler metodunda sadece ana molekül ile ilgilenmiyor oluşumuzdur. Gradient programlar geniş bir aralıkta hareketli faz A ve B karışımları ile bütün moleküllerin ayrılmasına imkan veren karışımlarla kolon ve mobil faz etkileşimlerini değiştirebildiğimizden uygun bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Sadece gradient program da iyi bir ayırım elde edilmesi için de tek başına yeterli değildir. Ayırma bütün diğer parametrelerin (sıcaklık, akış hızı vb.) etkisi bulunmaktadır. Bu moleküllerin hem ayrılması hem de tayin edilmesi için hassas bir gradient program oluşturulması gereklidir. Bunun için farklı sıcaklıklarda farklı mobil fazlarda ve farklı gradient programlar uygulanarak hem spesifikasyon limitinde safsızlık karışım çözeltisi hem de spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune ve numune çözeltileri kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. **Çizelge 3.1**'de görüldüğü gibi 25°C ile 50° C kolon sıcaklığı aralığında ve 0,8 mL/dk ile 2,0 mL/dak aralığında akış hızları denendi.

Lenavatinib öncesi bölgede hareketli faz B olarak kullanılan asetonitrilin her bir pik için optimize değeri hesaplanarak kontrollü bir gradient programı oluşturuldu. **Çizelge 3.1**'de deneme 21'de lenvatinib molekülünden çok sonra gelen lenva-dimer üre ve lenva karbamoil safsızlıklarının görülebilmesi için organik miktarının arttırılmasından sonra bu moleküllerin de dahil edildiği gradient programı optimize edilmiş oldu. Kolon sıcaklarının değişimi pH ve organik karışımlarının etkisiyle hareket eden piklerin ayırımını yani lenvatinib öncesi gelen piklerin ayırımını çok etkilemediği ancak lenva-dimer üre ve lenva karbamoil piklerinin ayırımını olumlu yönde etkilediği görüldüğünden yüksek sıcaklık yerine daha düşük sıcaklık (30°C) tercih edildi (**Çizelge 3.1, deneme 1,2,17,18,21,22**).

Hayalet pik sistemlerde birçok farklı sebepten karşılaşılabilen bir durumdur. Bu pikleri tanımlamak kolay olmamakla birlikte sistemsel taşıma, mobil faz karışımı ve metot parametreleri ilk akla gelen sebeplerdir. Bunlardan farklı olarak sistemsel parçalardan kullanılan çözücülerden sistemsel parçaların materyallerinden bile kaynaklanabilmektedir. Bu sistemde ana pikin (lenvatinib) altında gelen bir pik gözlemlendi. Bu pik hem kör çözeltisinde hem de sadece hareketli faz enjeksiyonu analiz edildiğinde de gözlemlendi. Bu piki hem tanımlayabilmek hem de temizlemek için farklı kolonlar, farklı tuzlarla hazırlanan farklı pH değerlerindeki hareketli faz A ve hareketli faz B karışımları farklı gradientlerde denenmiştir. Farklı cihazlar kullanılarak denemeler tekrar edilmiştir. Sadece kör çözeltisi ve numune değil aynı zamanda sadece gradient karışımının analizleri de yapılmıştır. **Çizelge 3.1** deneme 22'de incelenen bu durum yapılan değişimlerle de kaybolmadığı gözlemlendiğinden sistemsel bir pik olduğuna kanaat getirildi. Bu sebeple lenvatinib standardının standart olarak kullanılmasından vazgeçildi ve yerine CRF değeri (lenvatinibe göre) 1,00'den farklı olan ve aynı sorunun yaşanmadığı lenva-1 standardının ilgili bileşikler metodu için standart olarak kullanılmasına karar verildi. Bu standart değişikliği ile metodun kısaltılması mümkün oldu ve standart analizleri için daha kısa 22 dakikalık bir metot uygun bulundu (**Çizelge 3.1, deneme 23**). Bu kullanım sonrası yapılan hesaplamalarda lenvatinib ve lenva-1 arasında bir dönüşüm faktörü ($RRF_{lenva-1}$) hesaplamaya eklenerek lenva-1 standardı üzerinden doğru bir hesaplama yapılması sağlandı. Yapılan optimizasyon denemeleri **Çizelge 3.1** 'de özetlenmiştir. Burada yapılan çalışmalar sonucunda deneme 21 ve 23 metotları validasyon çalışmaları için uygun bulunmuştur. Optimize edilen parametrelerin numune için kullanılacak olan deneme 21 kromatogramı **Şekil 3.1**'de standart olarak belirlenen Lenva-1 için uygun bulunan metot deneme 23'ün kromatogramı **Şekil 3.2**'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çizelge 3.1. deneme 21 ile analiz edilen safsızlık eklenmiş numune kromatogramı



Şekil 3.2. Çizelge 3.1. deneme 23 ile analiz edilen standart (lenva-1) kromatogramı

Çizelge 3.1. Lenvatinib ilgili bileşikler optimizasyon denemeleri

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	Metanol	Waters Symmetry C18 (4,6x250)mm 5,0µm	30	15	200-400	20	0,8-1,2	2,0	31
2	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	30	15	200-400	20	0,8	2,0	31
3	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	0,8	2,0	35
4	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35
5	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35
6	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35

Çizelge 3.1. Devam

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
7	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35
8	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35
9	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	35-50
10	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 3,5	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	2,0	51
11	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 3,5	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	0,8	0,5	45
12	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 3,5	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,2	0,5	45

Çizelge 3.1. Devam

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
13	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 3,5	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	0,7	0,5	45-55
14	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	0,7	0,5	45-55
15	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	0,8	0,5	45-55
16	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	15	244-210	20	1,0	0,5	45-55
17	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Thermo Scientific Hypersil BDS C18 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244-210	20	0,8	0,2	65
18	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	244-210	20	0,8	0,2	65

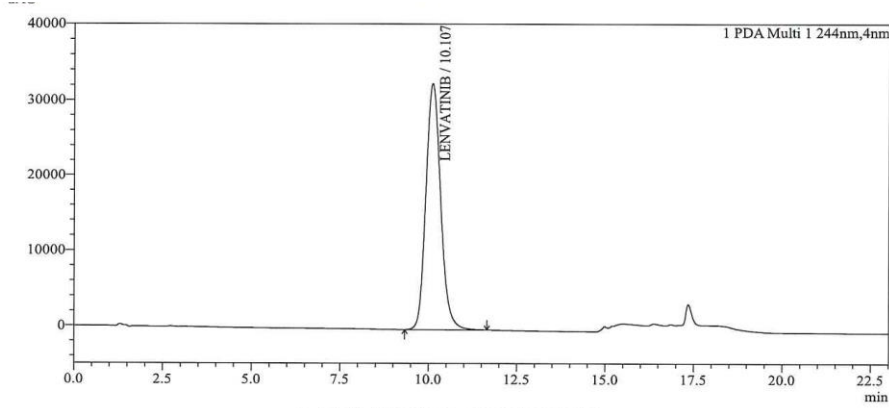
Çizelge 3.1. Devam

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
19	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244-210	20	0,8-1,2	0,2	65
20	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244-210	20	1,2	0,2	65
21	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	244-210	20	1,2	0,2	65
22	10 mM-20 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , pH 3,5-6,0,	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30-50	5	244-210	20	0,8	0,2	65
23	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	244-210	20	1,2	0,2	22

3.2.2. Lenvatinib Miktar Tayini

3.2.2.1. Yöntem Optimizasyonu

Lenvatinib miktar tayini metodunun geliştirilme çalışmalarına ilgili bileşikler metodu baz alınarak başlanmıştır. Yapılan denemeler **Çizelge 3.2**'de açıkça verilmiştir. Burada lenvatinib ilgili bileşikler metodunda yapılan denemeler sonucunda elde edilen ilk karışım metanol ve $\text{o-H}_3\text{PO}_4$ çözeltisi karışımı (40:60, h/h) en uygun çözücü olarak kullanılmıştır. **Çizelge 3.2**'deki deneme 1 ve 2'de görüldüğü gibi lenvatinib etken madde derişimi için 0,02 mg/ mL ve 0,01 mg/ mL' de çalışmalar yapılmıştır. Bu derişimlerde yapılan incelemelerde düşük derişimde elde edilen alanların ve pik yüksekliklerinin yeterli görülmesi sebebi ile 0,01 mg/ mL ile çalışılması uygun bulundu. Lenvatinib etken maddesi için yapılan dalga boyu taraması sonucu 244 nm dalga boyunda maksimum UV absorbandsının olduğu ilgili bileşikler metodunda tespit edilmişti (**Çizelge 3.2**, deneme 1-2). Bu sebeple 244 nm dalga boyu bu metot için tercih edilmiştir. Burada gradient elüsyon programı ve akış hızı değiştirilerek lenvatinib pikinin kuyruklanma faktörü incelendiğinde akış hızı 2,0 olduğunda en iyi sonuçların alındığı görüldüğünden deneme 6' daki metodun kullanılması uygun bulunmuştur. Aynı çizelgede verilen deneme 7 ve 8'de akış hızı arttığında lenvatinib pikinin elüsyonun ilk zamanlarında çıkması ve düşük akış hızında olduğu gibi pikin şeklinin bozulması sebebiyle 2.0 mL/dak olan akış hızının optimum olduğuna karar verilmiştir. Belirlenen metodun kromatogramı **Şekil 3.3**' de verilmiştir.



Şekil 3.3. Çizelge 3.2 deneme 6 'da verilen metodun kromatogramı

Çizelge 3.2. Lenvatinib miktar tayini metot denemeleri

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	1,2	0,02	23
2	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	1,3	0,01	23
3	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	1,4	0,01	23
4	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	1,5	0,01	23
5	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	1,8	0,01	23
6	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	2,0	0,01	23
7	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	2,1	0,01	23
8	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Agilent Zorbax SB-C8 (4,6x250)mm 5,0µm	40	5	244	20	2,0	0,01	23

3.3. Lifitegrast için geliştirilen metotların optimizasyonu

3.3.1.Lifitegrast ilgili bileşikler

3.3.1.1.Çözücü Seçimi

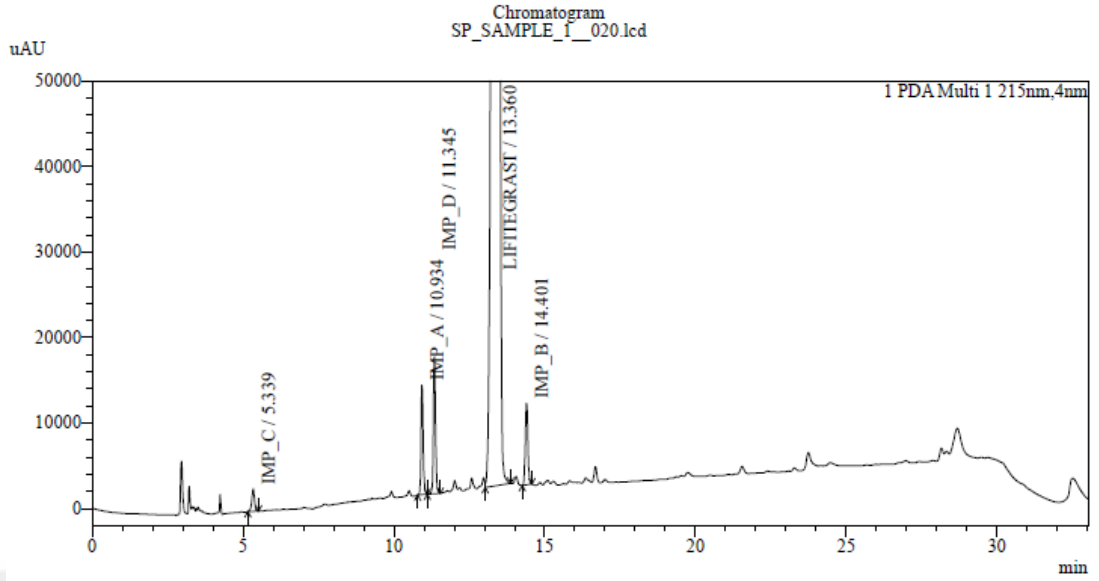
Yapılan denemelerde Lifitegrastın metanol, asetonitril ve sulu karışımları ile yapılan çözünürlük denemelerinde metanolde daha iyi çözündüğü görüldüğünden bu metot için de kullanılmaya devam edilmiştir.

3.3.1.2.Yöntem optimizasyonu

Lifitegrast ilgili bileşikler metodu için **Çizelge 3.3** deneme 1- 3' de görüldüğü gibi o- H_3PO_4 çözeltisi denenmiş ancak safsızlık C görülemediğinden ve diğer piklerin ayırımı tam olmadığından tampon çözelti kullanımına karar verilmiştir. **Çizelge 3.3**'te görüldüğü gibi deneme 4-8'de 10 mM KH_2PO_4 tamponu farklı pH aralıklarında denenmiştir. Aynı çizelgede deneme 1 'de görüldüğü gibi Waters symmetry C18 kolonu ile denemeler başlasa da sonrasında polar bir molekül olan safsızlık C'nin görülebilmesi için deneme 2'de görüldüğü gibi C8 kolonu denendi. Bütün piklerin ayrıldığı ve safsızlık C'nin gözlenemediği en uygun kolon Troyasil C8 kolonu oldu. **Çizelge 3.3** deneme 1-3' de yapılan çalışmalarla dalga boyunun belirlenmesi de sağlanmıştır. Hem lifitegrast erken maddesi hem de diğer dört adet safsızlığı için yapılan dalga boyu taramasında safsızlık C'nin UV maksimum absorbansına yakın değerde diğer moleküllerin de absorbanslarının yeterli olduğu görüldüğünden 215 nm dalga boyu seçilmiştir. Ters faz kromatografisi kullanılarak yapılan bu analizde gradient elüsyon tercih edildi. Yapılan gradient programlarında hem safsızlık C'nin gözlenmesi hem de safsızlıkların birbirlerinden uygun uzaklıklarda ayrılmaları ve gerekli pik yüksekliklerine ve alanlarına sahip olmaları amaçlandı. Bu doğrultuda seçilen hareketli fazlar ve kolon ile farklı programlar oluşturularak bütün piklerin tayin edilebileceği bir metot oluşturulmuştur. Lifitegrast safsızlıkları için **Çizelge 3.3**'te deneme 6'da belirtildiği gibi 0,25 -1,0 mg/mL aralığında yapılan çalışmalarda en uygun pik yüksekliğine ve sinyal/gürültü değerine ulaşıldığından, 0,25 mg/ mL numune derişimi olarak belirlendi. Bu metotta kontrol edilecek safsızlıkların derişimleri ICH Q3A'da belirtildiği gibi %0,15 limit değeri ile 0,75µg/ mL olarak belirlendi. Optimize edilen metodun parametreleri **Çizelge 3.3**'te deneme 7 de ve kromatogramı ise **Şekil 3.4**'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Lifitegrast ilgili bileşikler optimizasyon denemeleri

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	Metanol	Waters Symmetry C18 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	200-400	20	0,8-1,2	0,5	40
2	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Waters Symmetry C18 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	200-400	20	1,0	0,5	40
3	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	200-400	20	1,0	0,5-1,0	35
4	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	30	5	215	20	1,0	0,5	35
5	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 4,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	215	20	1,0	0,5	33
6	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	215	20	0,8-1,2	0,25-1,0	33
7	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	215	20	1,0	0,25	33
8	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	215	20	1,0	0,25	33



Şekil 3.4. Çizelge 3.3. deneme 7 kromatogramı

3.3.2. Lifitegrast enantiyomerik saflık

3.3.2.1. Çözücü Seçimi

Lifitegrast etken maddesi için metanol, asetonitril gibi organik çözücülerle denemeler yapıldı. Bu denemelerde metanolün lifitegrast için en iyi çözücü olduğuna karar verildi.

3.3.2.2. Yöntem optimizasyonu

Tüm kiral HPLC yöntemi geliştirme deneyleri normal faz koşulları altında gerçekleştirildi. Polisakkarit kolonların enantiyomerleri ayırma yetenekleri geniş olduğundan burada tercih edilmiştir. Bu nedenle Daicel Chiralpak OD-H, IB, IC ve AD-H kolonları gibi amiloz ve selüloz bazlı kolonlar araştırıldı. İzokratik normal faz sistemlerinde apolar ya da polaritesi yine başka bir organik çözücü ile değiştirilen hareketli fazlar kullanılmaktadır. Hareketli faz için, metanol, etanol ve 2-propanol polar çözücüler olarak ve n-hekzan polar olmayan çözücü olarak kullanılan hareketli faz karışımlarının incelemeleri **Çizelge 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7**'de paylaşılmıştır. Farklı kolonların farklı hareketli faz karışımları ve sıcaklık etkisi 25-40 °C arasında incelenmiş ve çizelgelerde paylaşılmıştır. Lifitegrast etken maddesi için yapılan dalga boyu taramasında maximum UV absorbansının 260 nm olduğu tespit edildiğinden bu dalga boyunda validasyon yapılmasına karar verildi. **Çizelge 3.4**' de sunulan Chiralpak OD-H kolonu ile yapılan çalışmalarda deneme 33 ve 34 hariç pik gözlenmemiştir.

Deneme 33 ve 34 umut vaadedici olsa da pik şekilleri düzgün olmadığından farklı kolon denemeleri yapılmıştır. **Çizelge 3.5'** te paylaşılan Chiralpak IB ve **Çizelge 3.6'**da paylaşılan Chiralpak IC kolonları ile yapılan çalışmalarda hiç pik gözlenmemiştir. Buna karşın **Çizelge 3.7'**de sunulan Chiralpak AD-H kolonu ile yapılan denemelerde hareketli faz karışımında hekzan/ etanol ve hekzan/ metanol kullanıldığında hiç pik gözlenmemiştir. Ancak 2- propanol kullanıldığında bir ayırım elde edildiğinden (**Çizelge 3.7** deneme 21-28) ilerleyen denemelerde n-hekzan/ 2-propanol karışımları ile devam edilmiştir. Ancak yine de bu karışımın yeterli olmadığı görülmüştür. Bunu iyileştirmek amacıyla mobil faz katkı maddeleri araştırıldı. Mobil faz katkı maddeleri, iyonlaşabilen kiral analitlerin iyonizasyon durumunu kontrol etmek için enantiyomerik ayırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla **Çizelge 3.7'**de deneme 32'de formik asit, deneme 34'te asetik asit ve deneme 33'te trifloroasetik asit etkisi araştırıldı. En iyi pik ayrımı ve şekli formik asit kullanıldığında elde edildi ve bu nedenle ileri yöntem optimizasyonu için seçildi. Formik asit miktarı için yapılan araştırmalar **Çizelge 3.7'**deki deneme 32 ve deneme 35'te verilmiştir. Chiralpak AD-H kolonu, mobil faz olarak n-hekzan/2-propanol/formik asit (500/500/2) kullanıldığında iyi bir pik ayrımı gösterdiğinden hareketli faz karışımı olarak tercih edildi. **Çizelge 3.7** deneme 35-38'de sıcaklık etkisi incelendiğinde ise yüksek sıcaklıkta daha iyi bir ayırımın gözlenmesi sebebiyle ideal sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Akış hızı **Çizelge 3.7** deneme 38-46'da paylaşıldığı gibi denenmiş olup 1,0 mL/dk. olarak belirlenmiştir. Ayırımın kontrol edilmesi amacı ile enjeksiyon hacmi incelemeleri **Çizelge 3.7'**de deneme 48,50,51'de sunulmuş olup optimum ayırım 20 µL kullanıldığında gözlenmiştir.

Lifitegrast etken maddesi ve enantiyomerik saflığı R-Lifitegrast için 2,0 mg/ mL ile 0,5 mg/mL aralığında numune derişimlerinde **Çizelge 3.7'**de deneme 47-49'da verilen denemeler yapıldı. Numune derişimi daha az madde harcanması ve ayırımın sağlanması sebebiyle 0,5 mg/mL olarak belirlendi. Günlük maksimum alım dozun 5'er mg her bir göze olmak üzere 10 mg/gün lifitegrastın ICH Q3A 'ya göre safsızlık limitleri %0,15 olarak belirlendi. Spesifikasyon limiti %0,15 olan R-Lifitegrastın gözlenebilmesi ve ana pikin gözlenme sınırının üstüne çıkmadığı görüldü ve daha az numuneye ihtiyaç duyulan 0,5 mg/mL derişimi kullanılmaya uygun bulundu.

n-Heptanın daha az toksik olması sebebiyle n-hekzana alternatif olarak düşünülmüştür. Belirlenen optimum parametreler n-heptan kullanılarak denenmiştir. Ancak n-heptanın daha viskoz olması sebebiyle kolon verimini düşürdüğü düşünülmektedir. Dolayısıyla çalışmalarda n-heptan tercih edilmemiştir.

Çizelge 3.4. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak OD-H (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi, µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	n-hekzan/ metanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
2		30						
3		35						
4		40						
5	n-hekzan/ metanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
6		30						
7		35						
8		40						
9	n-hekzan/ etanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
10		30						
11		35						
12		40						
13	n-hekzan/ etanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
14		30						
15		35						
16		40						
17	n-hekzan/ 2-propanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
18		30						
19		35						

20

40

Çizelge 3.4. Devam

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi, μL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
21		25						
22	n-hekzan/ 2-propanol (50:50, h/h)	30	5	200-400	20	1,0	2,0	30
23		35						
24		40						
25		25						
26	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:1, h/h/)	30	5	200-400	20	1,0	2,0	30
27		35						
28		40						
29		25						
30	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/)	30	5	200-400	20	1,0	2,0	30
31		35						
32		40						
33	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/)	40	5	200-400	20	1,0	2,0	45
34	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/)	40	5	200-400	20	2,0	2,0	45

Çizelge 3.5. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak IB (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi, µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	n-hekzan/ metanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
2		30						
3		35						
4		40						
5	n-hekzan/ metanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
6		30						
7		35						
8		40						
9	n-hekzan/ etanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
10		30						
11		35						
12		40						
13	n-hekzan/ etanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
14		30						
15		35						
16		40						
17	n-hekzan/ 2-propanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
18		30						
19		35						
20		40						

Çizelge 3.5. Devam

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi, μ L	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
21	n-hekzan/ 2-propanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
22		30						
23		35						
24		40						
25	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:1, h/h/)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
26		30						
27		35						
28		40						
29	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30

Çizelge 3.6. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak IC (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	n-hekzan/ metanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
2		30						
3		35						
4		40						
5	n-hekzan/ metanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
6		30						
7		35						
8		40						
9	n-hekzan/ etanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
10		30						
11		35						
12		40						
13	n-hekzan/ etanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
14		30						
15		35						
16		40						
17	n-hekzan/ 2-propanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
18		30						
19		35						
20		40						

Çizelge 3.6. Devam

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi μL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
21	n-hekzan/ 2-propanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
22		30						
23		35						
24		40						
25	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:1, h/h/)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
26		30						
27		35						
28		40						
29	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30

Çizelge 3.7. Lifitegrast kiral saflık metot optimizasyonu için Daicel Chiralpak AD-H (4,6x250)mm 5,0µm kolonu denemeleri

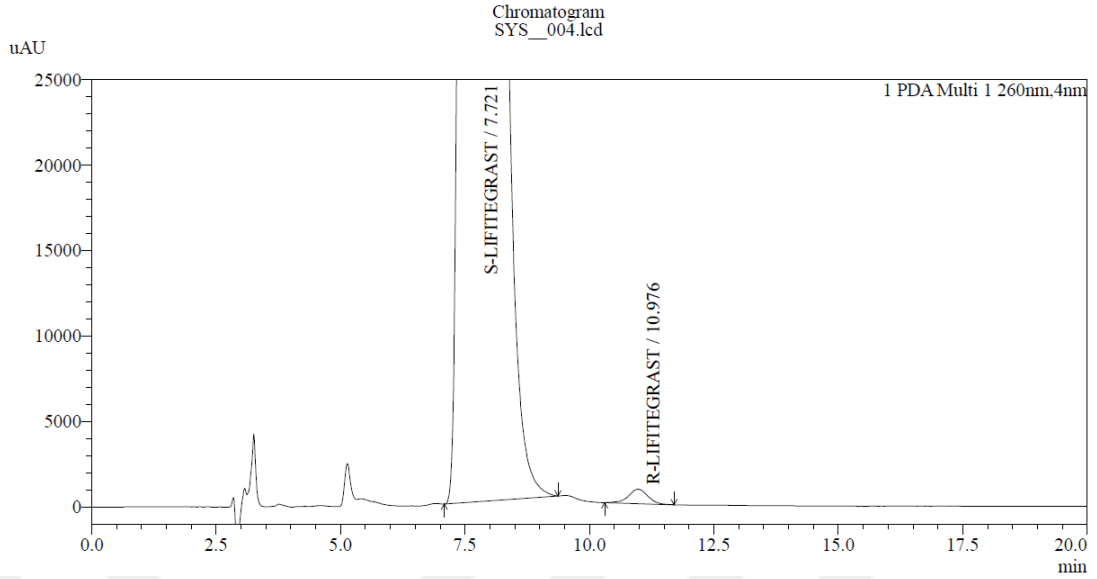
Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	n-hekzan/ metanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
2		30						
3		35						
4		40						
5	n-hekzan/ metanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
6		30						
7		35						
8		40						
9	n-hekzan/ etanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
10		30						
11		35						
12		40						
13	n-hekzan/ etanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
14		30						
15		35						
16		40						
17	n-hekzan/ 2-propanol (80:20, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
18		30						
19		35						

Çizelge 3.7. Devam

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi μL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
20	n-hekzan/ 2-propanol (80:20, h/h)	40	5	200-400	20	1,0	2,0	30
21	n-hekzan/ 2-propanol (60:40, h/h)	40	5	200-400	20	1,0	2,0	30
22	n-hekzan/ 2-propanol (50:50, h/h)	25	5	200-400	20	1,0	2,0	30
23		30						
24		35						
25		40						
26								
27		40	5	260	20	0,8	2,0	30
28						1,5		
29	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:1, h/h/)	25	5	260	20	1,0	2,0	30
30		30						
31		35						
32		40						
33	n-hekzan/ 2-propanol/ TFA (500:500:1, h/h/)	40	5	260	20	1,0	2,0	30
34	n-hekzan/ 2-propanol/ asetik asit (500:500:1, h/h/)	40	5	260	20	1,0	2,0	30

Çizelge 3.7. Devam

Deneme	Hareketli Faz	Kolon Sıc. °C	Oto-Örnek. Sıc. °C	Dalga Boy λ	Enj. Hacmi μL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak		
35	n-hekzan/ 2-propanol/ formik asit (500:500:2, h/h/)	25	5	260	20	1,0	2,0	30		
36		30								
37		35								
38		40								
39									0,5	
40		40	5	260	20	0,6	2,0	45		
41						0,7				
42						0,8				
43						1,1				
44						1,2				
45		40	5	260	20	1,3	2,0	20		
46							1,5			
47							1,5			
48		40	5	260	20	1,0	0,5	30		
49							1,0			
50							10	1,0	0,5	20
51		40	5	260	30					



Şekil 3.5. Lifitegrast spesifikasyon limitinde R-Lif eklenmiş numune kromatogramı

3.3.3.Lifitegrast miktar tayini

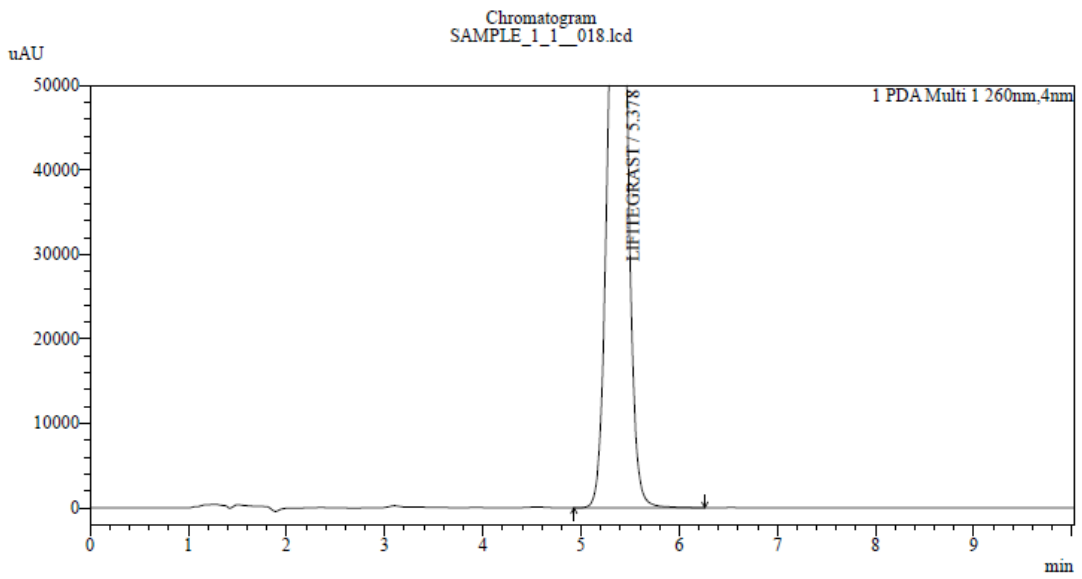
3.3.3.1.Çözücü Seçimi

İlgili bileşikler metodunda yapılan denemelerden yola çıkılarak metanol çözücü olarak kullanılmıştır.

3.3.3.2.Yöntem optimizasyonu

Miktar tayini metodu için ilgili bileşikler metodundan yola çıkılmıştır. Lifitegrast etken maddesinin miktar tayini için geliştirilen bu metotta maksimum UV absorbansına 260 nm’de ulaşıldığından çalışma dalga boyu olarak kullanılmıştır. Burada tercih edilen pH 4,5 tamponu ile **Çizelge 3.8** deneme-1’ de görüldüğü gibi aynı kolonda daha kısa analiz süresinde denendi. Ancak burada lifitegrast pikinin simetrisinin bozulduğu önden kuyruklanma yaptığı görüldü. Bu sebeple sabit faz ve hareketli fazın değiştirilmesine karar verildi. Burada Waters symmetry kolonu denenmesi düşünüldü. **Çizelge 3.8** deneme 3’ de görüldüğü gibi Waters symmetry C8 (150x4,6) 5,0µm özelliğindeki daha kısa bir kolon kullanılması metodun kısaltıldığında lifitegrast pikinin şeklini bozmadığından Tryoasil C8 kolonu yerine tercih edildi. İlgili bileşikler metodunda kararlaştırılan tampon çözeltisi **Çizelge 3.8** deneme 1-2’de görüldüğü gibi metot kısaltma denemelerinde kullanıldığında, Lifitegrast pikinin pik şeklinin yayıldığı görüldü. Daha öncesinde gerçekleştirilen denemelerden yola çıkılarak o-H₃PO₄

çözeltisi **Çizelge 3.8** deneme 3' de hareketli faz A olarak denenmiştir ve hem baseline düzeldiği hem de lifitegrast pikinin simetrisinin düzeldiği gözlenmiştir. **Çizelge 3.8** deneme 1-3'de incelendiği gibi ilgili bileşikler derişimi kullanıldığında pik yüksekliğinin çok yüksek olması sebebiyle daha düşük derişimler denendi. Burada 0,25-0,05 mg/mL aralığında numune derişimleri denendikten sonra düşük derişimde sistem uygunluk kıstasını sağladığı görülen ve daha az numune harcanan 0,05 mg/mL tercih edilmiştir. **Çizelge 3.8** deneme 3-6'da sıcaklık akış hızı ve enjeksiyon hacminin etkisi incelenmiştir. Lifitegrast pik simetrisinin, kuyruklanma faktörünün en uygun olduğu deneme-5 **Çizelge 3.8** ve **Şekil 3.6**'da verilmiştir.



Şekil 3.6 **Çizelge 3.8** deneme 5'te uygun görülen metodun kromatogramı

Çizelge 3.8. Lifitegrast miktar tayini metot denemeleri

Deneme	Hareketli Faz A	Hareketli Faz B	Kolon	Kolon Sic. °C	Oto-Örnek. Sic. °C	Dalga Boyu λ	Enj. Hacmi µL	Akış Hızı mL/dk	Derişim mg/mL	Analiz Süresi, dak
1	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	260	20	1,2	0,05-0,25	15
2	10 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,5	ACN	Troyasil 100 C8 (4,6x250)mm 5,0µm	35	5	260	20	1,5	0,05-0,25	12
3	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Waters symmetry C8 (4,6x150)mm 5,0µm	35	5	260	20	1,5	0,05-0,25	15
4	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Waters symmetry C8 (4,6x150)mm 5,0µm	30-35	5	260	20	1,0	0,05	15
5	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Waters symmetry C8 (4,6x150)mm 5,0µm	35	5	260	20	1,2	0,05	10
6	%0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi	ACN	Waters symmetry C8 (4,6x150)mm 5,0µm	35	5	260	30-10	1,5	0,05	10

3.4. Analitik Yöntemlere ait Validasyon Çalışmaları

3.4.1. Lenvatinib İlgili Bileşikler

Validasyon için **Bölüm 3.2.1**'de kullanılacak metot belirlenmiştir. Seçilen bu metot YPSK metodu olmakla birlikte, metodun 244 ve 210 nm olmak üzere çift dalga boyu bulunmaktadır. Metot Agilent marka Zorbax SB-C8 (250 mm × 4,6 mm) 5 µm kolon kullanılarak akış hızı 1,2 mL/ dk, kolon sıcaklığı 30 °C örneklem bölmesi sıcaklığı ise 5°C parametre değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak pH değeri 4,5± 0,05 olarak ayarlanmış 10 mM KH₂PO₄ kullanılmıştır. Hareketli faz B olarak %100 asetonitril kullanılmıştır. Standart çözeltilerinin analizleri **Çizelge 3.10**'daki standart gradient elüsyon programı kullanılarak analiz edilmiştir. Standart çözeltisi dışındaki bütün analizler **Çizelge 3.9**'daki numune gradient metodu ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.9. Numune gradient elüsyon programı

Süre (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	90	10
10	80	20
16	76	24
22	65	35
29	65	35
49	30	70
54	30	70
55	90	10
60	90	10

Çizelge 3.10. Standart gradient elüsyon programı

Süre (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	90	10
10	80	20
16	76	24
17	90	10
22	90	10

Metot içerisinde kullanılacak olan safsızlıkların günlük alım dozları üzerinden ICH Q3 A, B ve ICH M7 kılavuzlarına hesaplanan spesifikasyon limitleri **Çizelge 3.11**'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Bilinen, bilinmeyen ve genotoksik safsızlıklar için limit değerleri

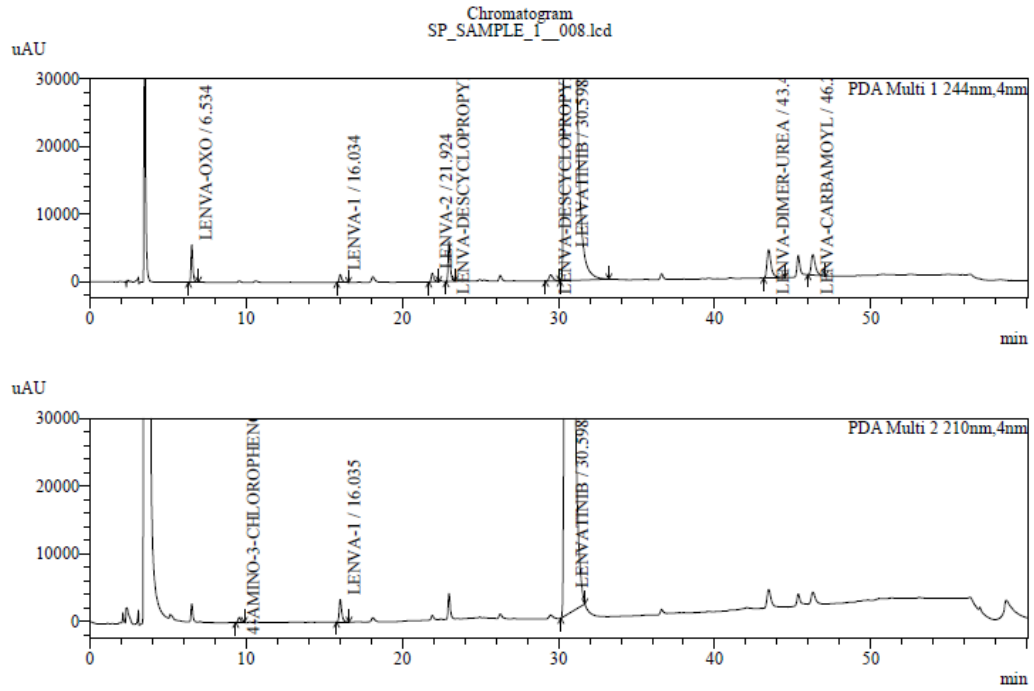
Lenva-2-okso	En fazla 0.15%
4-amino-3-klorofenol	En fazla 400 ppm
Lenva-1	En fazla 0.15%
Lenva-2	En fazla 400 ppm
Lenva-dessiklopropil	En fazla 0.15%
Lenva- dessiklopropilamit	En fazla 400 ppm
Lenva-dimer üre	En fazla 0.15%
Lenva-karbamoil	En fazla 0.15%
Bilinmeyen safsızlıkların her biri	En fazla 0.10%
Toplam genotoksik safsızlık	En fazla 1200 ppm
Toplam safsızlık	En fazla 1.0%

3.4.1.1.Seçicilik ve Spesifiklik

Metodun seçicilik ve spesifiklik kontrolü için kör çözeltisi, standart çözeltisi, her bir safsızlığın spesifikasyon limitinde hazırlanan standart çözeltileri, spesifikasyon limitinde safsızlıkların karışım çözeltisi, spesifikasyon limitinde Lenva-1 içermeyen safsızlıkların karışım çözeltisi, numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi analiz edilmiştir. Bu analizde PDA dedektörü kullanılarak 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Seçicilik ve spesifiklik parametresinde kör çözeltisinden safsızlıkların altında pik gelmemesi birbirlerinden ve ana pikten ayrılmış olmaları aynı zamanda saflık eşiğinin pik saflık endeksinden küçük olması gerekmektedir. Bunun sağlandığı **Çizelge 3.12'** de görülmektedir. Yapılan analizler sonucunda **Şekil 3.7'**da örnek olarak verilen kromatogramda piklerin birbirlerinden ve ana pikten ayrıldığı görülmektedir. 210 nm'de sadece 4-amino-3-klorofenol, Lenva-1 ve Lenvatinib kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.12. Lenvatinib ilgili bileşikler metodu seçicilik ve spesifiklik sonuçları

Safsızlık	Alıkonma Zamanı (AK)	Bağlı Alıkonma Zamanı (BAK)	Pik saflık endeksi	Saflık Eşiği
Lenvatinib (244nm)	30,69	-	1,000000	0,995263
Lenva-2-okso	6,55	0,21	1,000000	0,999612
Lenva-1	16,04	0,52	1,000000	0,997795
Lenva-2	21,92	0,71	0,999999	0,987648
Lenva-dessiklopropil	22,99	0,75	1,000000	0,999306
Lenva- dessiklopropilamit	22,52	0,73	0,999999	0,967583
Lenva-dimer üre	43,45	1,42	1,000000	0,997543
Lenva-karbamoil	46,27	1,51	1,000000	0,996290
Lenvatinib (210nm)	30,69	1,00	0,999999	0,995181
4-amino-3-klorofenol (210nm)	9,58	0,31	0,999997	0,966042
Lenva-1 (210nm)	16,04	1,67	1,000000	0,997801



Şekil 3.7. Spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune kromatogramı

3.4.1.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk parametresi olarak kontrol edilmesine karar verilen (1) ardışık altı Lenva-1 standart enjeksiyonundan elde edilen alanların ortalamasının %BSS değeri $1.1 \leq \%5,0$ bulunmuştur. Ayrıca (2) sistem uygunluk çözeltisi kromatogramında Lenva-dessiklopropilamid ile Lenvatinib arasındaki kolon ayırıcılık gücü $2,4 > 1,5$ elde edilmiştir. Bu değerlerin kabul kriterlerini (1 ve 2) sağladığı görülmüştür.

Çizelge 3.13. Sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon Sırası	Standart Alanları (Lenva-1)	Lenvatinib Ayırım Faktörü
1	12012	2,4
2	12010	
3	12002	
4	11943	
5	11770	
6	11710	
Ortalama	11908	
SS	133,8	
%BSS	1,1	

3.4.1.3. Bağıl Yanıt (RRF)ve Yanıt Düzeltme Faktörü (CRF)

Bağıl yanıt faktörü ve yanıt düzeltme faktörünün hesaplanması için spesifikasyon limitinde Lenva-2-okso, 4-amino-3-klorofenol, Lenva-1, Lenva-2, Lenva-dessiklopropil, Lenva-dessiklopropilamid, Lenva-dimer üre, Lenva-karbamoil karışım çözeltisi 6 kere enjekte edilmiştir. Elde edilen RRF ve CRF değerleri **Çizelge 3.14**'te verilmiş olup hesaplamalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.14. Bağıl yanıt ve yanıt düzeltme faktörü sonuçları

Safsızlık	Derişim, µg/mL	Ortalama pik alanları	RRF	CRF
Lenvatinib (244nm)	0.206	27974	-	-
Lenva-2-okso	0.303	41233	1.00	1.00
Lenva-1	0.300	10730	0.26	3.80
Lenva-2	0.083	11458	1.02	0.98
Lenva-dessiklopropil	0.307	42869	1.03	0.97
Lenva-dessiklopropilamid	0.083	12605	1.12	0.89
Lenva-dimer üre	0.276	36049	0.96	1.04
Lenva-karbamoil	0.287	38227	0.98	1.02
Lenvatinib (210nm)	0.206	17439	-	-
4-amino-3-klorofenol (210nm)	0.079	7065	1.05	0.95
Lenva-1 (210 nm)	0.300	30577	1.20	0.83

3.4.1.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

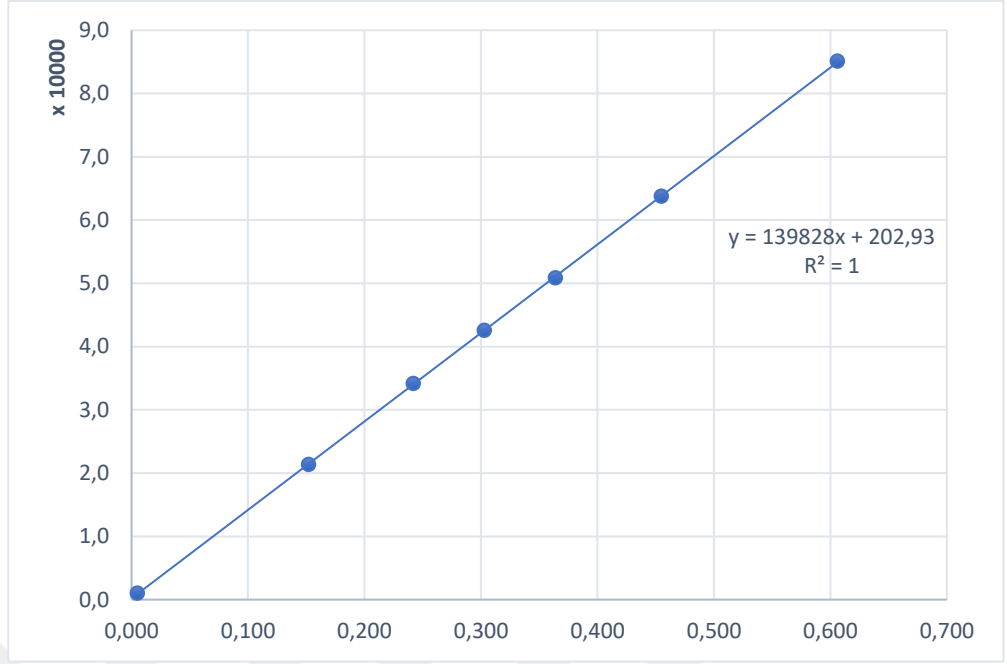
Cihaz yanıtı ile cihaz derişiminin doğrusallığı regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla yedi farklı derişim aralığında (TAS, 50%, 80%, 100%, 120%, 150% ve 200%) çözeltiler en az üçer kere analiz edilmiştir. Minimum (TAS) ve maksimum seviyelerdeki çözeltiler ise altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen Regresyon eğrisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %5'inden fazla olmaması burada önemli bir kriterdir. Korelasyon katsayısının ise 0,99'dan az olmaması gerekmektedir. Bununla birlikte minimum alanların (TAS) % BSS değerleri <%10 bulunmuştur. Maksimum alanların %BSS değerleri ise <%5,0 bulunmuştur. Kabul kriterlerinin sağlandığı bu sonuçlar **Çizelge 3.15 ve 3.16**'te verilmiştir. **Şekil 3.8-15** aralığında verilen grafiklerde safsızlıklar için elde edilen regresyon grafikleri görülmektedir.

Çizelge 3.15. Lenvatinib ilgili bileşikler regresyon analizi sonuçları

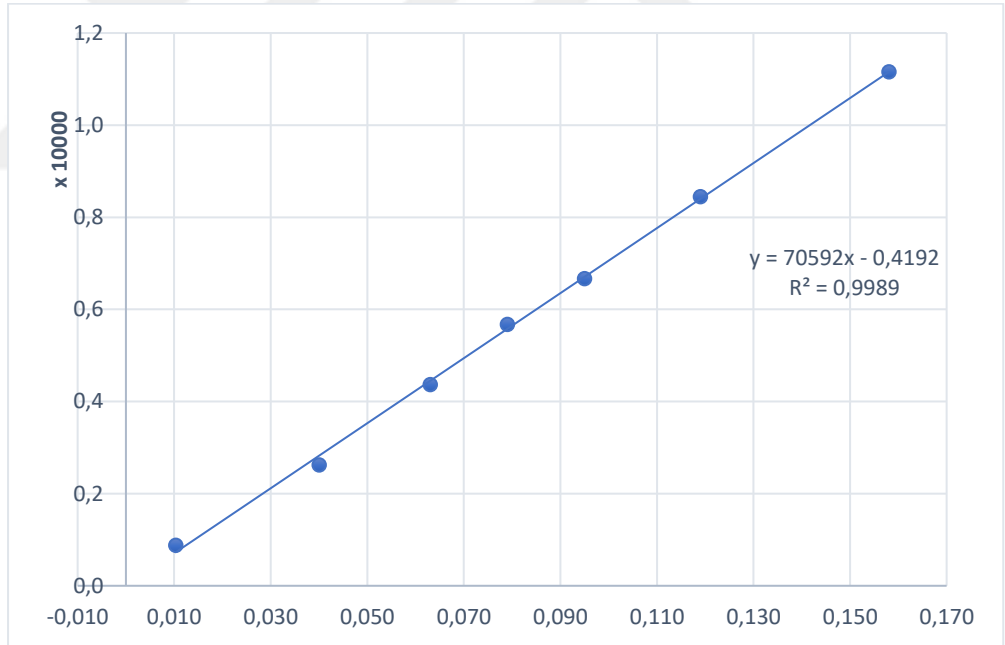
Safsızlık	Derişim (µg/mL)	Korelasyo n katsayısı r, Limit: ≥ 0,99	Regresyon Denklemleri	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan) (%) Limit: ≤ 5,0%
Lenva-2-okso	0,0051- 0,606	1,0000	y = 139828x + 202,9	0,5
4-amino-3-klorofenol	0,0103- 0,158	0,9994	y = 70592x - 0,4192	0,1
Lenva-1	0,0270- 0,600	0,9999	y = 33673x + 267,4	2,6
Lenva-2	0,0070- 0,166	0,9994	y = 125707x + 242,5	2,3
Lenva-dessiklopropil	0,0057- 0,614	1,0000	y = 134951x + 5,56	0,1
Lenva-dessiklopropilamit	0,0108- 0,166	0,9999	y = 149521x - 89,31	0,7
Lenva-dimer üre	0,0131- 0,572	1,0000	y = 128823x - 22,044	0,1
Lenva-karbamoil	0,0120- 0,574	0,9998	y = 120947x - 734,39	2,2

Çizelge 3.16. Minimum ve maksimum derişimdeki çözeltilerin analizlerinin %BSS değerleri

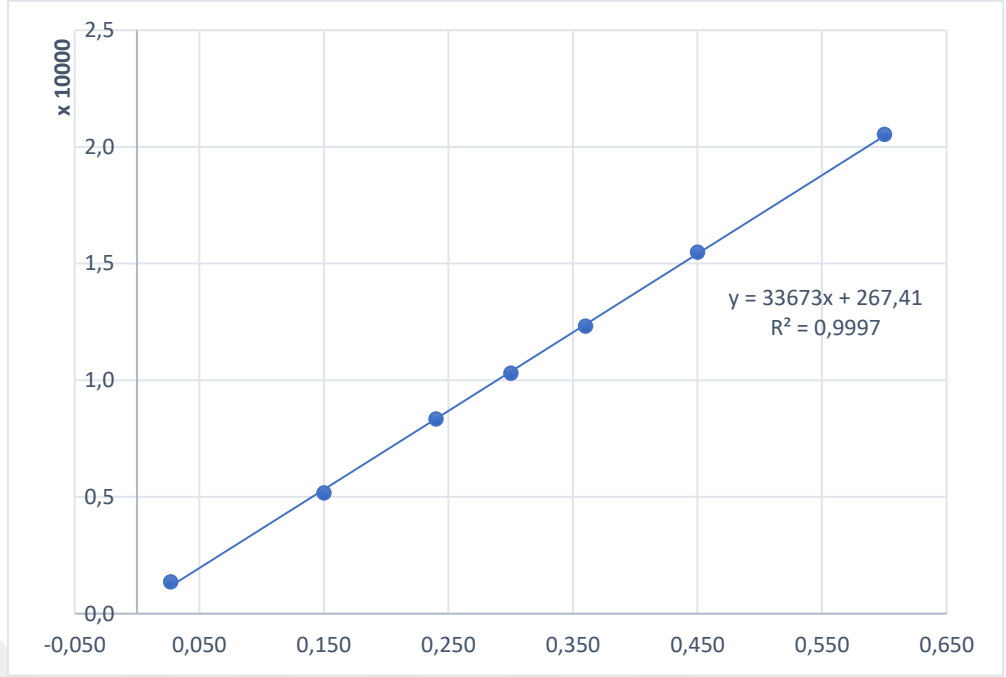
Safsızlık	Safsızlık alanlarının %BSS değerleri	
	Minimum	Maksimum
Lenva-2-okso	4,3	0,1
4-amino-3-klorofenol	4,0	1,2
Lenva-1	4,0	0,1
Lenva-2	4,4	0,5
Lenva-dessiklopropil	3,8	0,1
Lenva-dessiklopropilamit	6,7	0,3
Lenva-dimer üre	4,9	0,2
Lenva-karbamoil	6,9	0,1



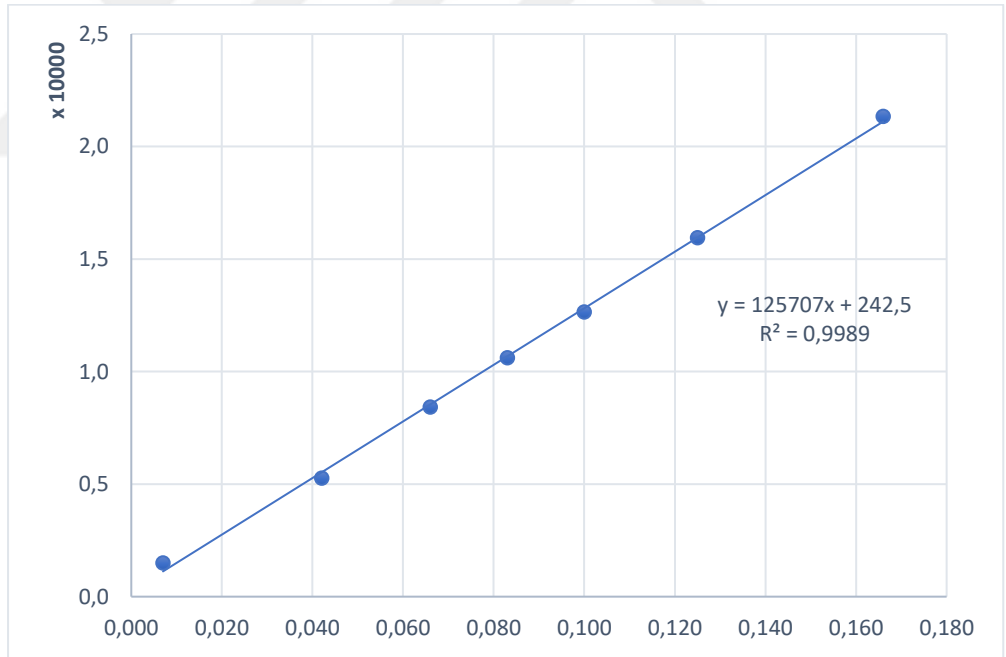
Şekil 3.8. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-2-okso)



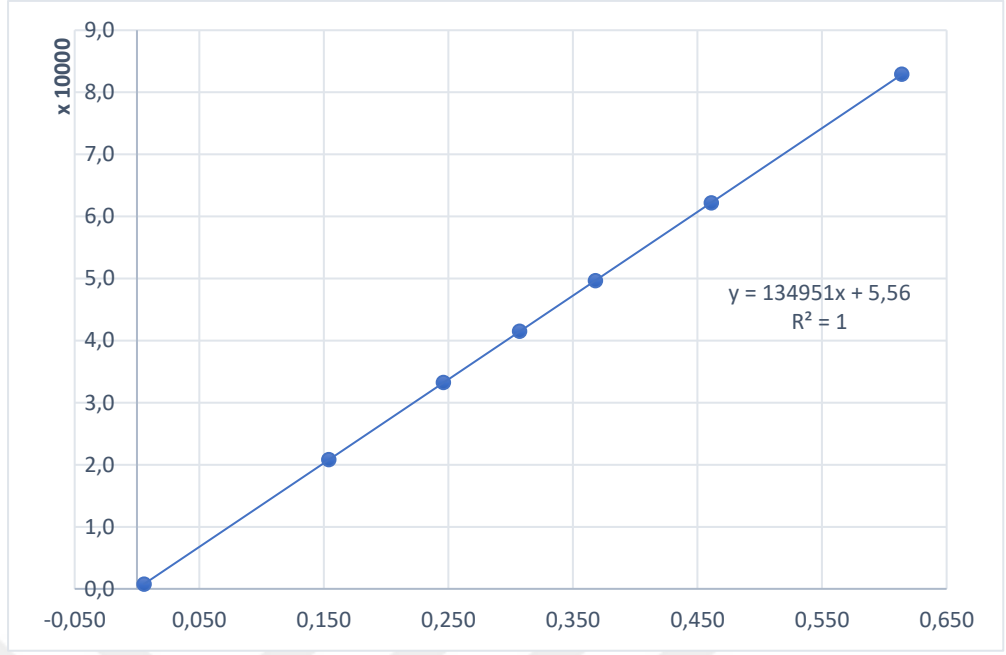
Şekil 3.9. Kalibrasyon eğrisi (4-amino-3-klorofenol)



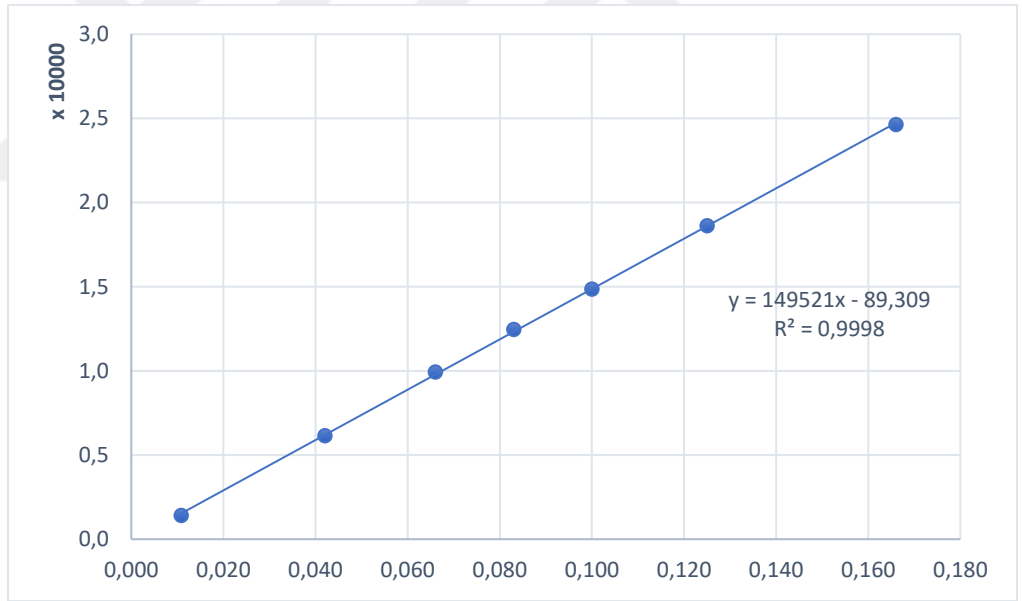
Şekil 3.10. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-1)



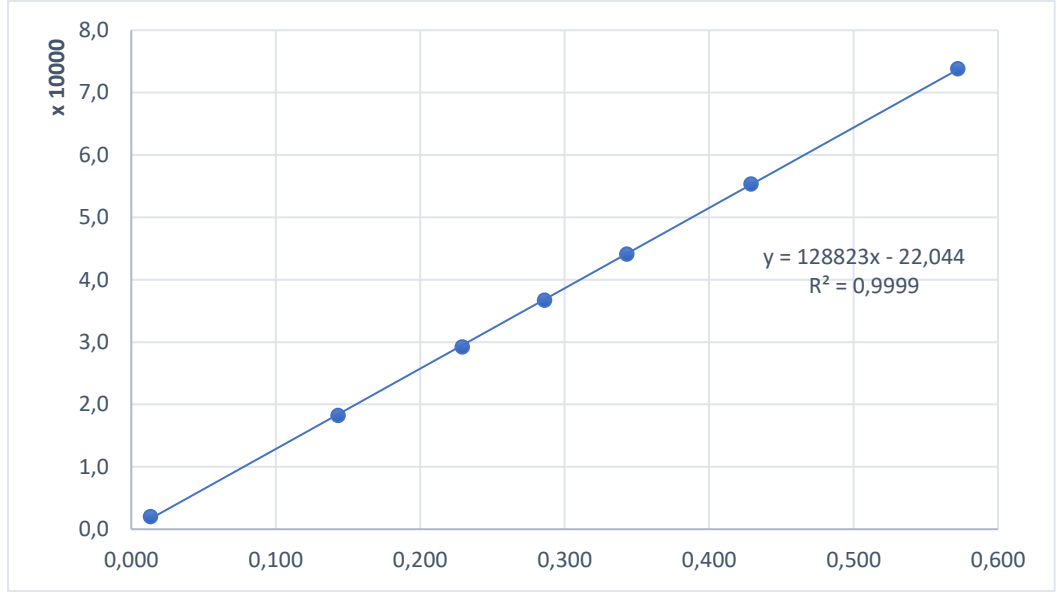
Şekil 3.11. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-2)



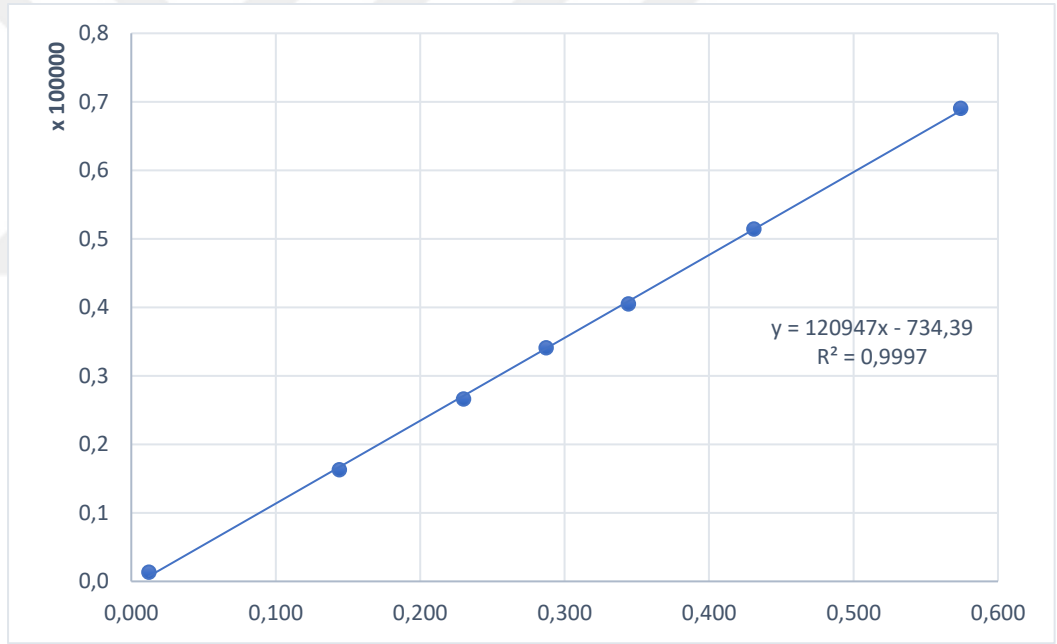
Şekil 3.12. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dessiklopropil)



Şekil 3.13. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dessiklopropilamid)



Şekil 3.14. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-dimer üre)



Şekil 3.15. Kalibrasyon eğrisi (Lenva-karbamoil)

3.4.1.5. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı

Bir metot içerisinde tayin edilebilecek en düşük derişim olan tayin alt sınırının sinyal/gürültü oranı ondan, tespit edilebilecek en düşük derişim olan teşhis sınırının ise üçten büyük olması gerekmektedir. TAS'nin ve teşhis sınırındaki derişimlerin ise raporlama limitlerinden büyük olmaması gerekmektedir. Çizelge 3.17'da paylaşılan sonuçlar bütün safsızlıklar için kriterlerin sağlandığını göstermektedir.

Çizelge 3.17. Tayin alt sınırı (TAS) ve teşhis sınırına (TS) ait sonuçlar

Standart	Teşhis Sınırı		Tayin Alt Sınırı		S/N	
	µg/mL	%, ppm	µg/mL	%, ppm	TS	TAS
Lenva-2-okso	0,002	%0,0008	0,0051	%0,0026	6	15
4-amino-3-klorofenol	0,003	15,4ppm	0,0103	51,5ppm	8	18
Lenva-1	0,008	%0,0041	0,0270	%0,0135	3	11
Lenva-2	0,002	10,5ppm	0,0070	35,0 ppm	8	17
Lenva-dessiklopropil	0,002	%0,0009	0,0057	%0,0029	9	19
Lenva-dessiklopropilamid	0,003	16,2ppm	0,0108	54,0 ppm	6	12
Lenva-dimer üre	0,004	%0,0020	0,0131	%0,0066	6	15
Lenva-karbamoil	0,004	%0,0018	0,0120	%0,0060	4	11

3.4.1.6. Doğruluk

Doğruluk çalışması için safsızlıkların geri kazanım analizleri yapılmıştır. Bu amaçla safsızlıkların spesifikasyon limitlerinin TAS, %50, %100 ve %150'sine karşılık gelecek şekilde eklenmiş numuneler hazırlanmış ve üçer enjeksiyonundan elde edilen verilere göre geri kazanımları hesaplanmıştır. Her bir enjeksiyon taze hazırlanmıştır. Numune TAS seviyesinin üzerinde Lenva-2-okso, Lenva-1, Lenva-2, Lenva-dessiklopropil, Lenva-dessiklopropilamid ve Lenva-karbamoil içerdiğinden TAS seviyesinde eklenmemiştir. Ek olarak numune %50 seviyesinin üzerinde Lenva-dimer üre içerdiğinden TAS veya %50 seviyesinde eklenmemiştir. **Çizelge 3.19'**de geri kazanım değerinin TAS seviyesi için 113,3 (limit: %70-%130) bulunduğu görülmüştür. **Çizelge 3.18-25'**te ise diğer seviyeler için geri kazanımların kabul sınırları (%90-%110) aralığında bulunduğu görülmektedir.

Çizelge 3.18. Lenva- okso için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim ±SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,080	0,081±0,06	101,3	1,2
100	0,153	0,152±0,00	99,3	0,0
150	0,219	0,217±0,252	99,1	0,5

Çizelge 3.19. 4-amino-3-klorofenol için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim ±SS	Geri Kazanım, %	% BSS
TAS	0,005	0,006±0,06	113,3	10,2
50	0,02	0,019±0,06	96,7	3,0
100	0,039	0,041±0,10	104,2	1,4
150	0,057	0,061±0,15	105,8	1,9

Çizelge 3.20. Lenva-1 için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,088	0,092 $\pm$ 0,35	104,2	3,8
100	0,163	0,167 $\pm$ 0,27	102,4	1,6
150	0,23	0,236 $\pm$ 0,35	102,8	1,9

Çizelge 3.21. Lenva-2 için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,024	0,024 $\pm$ 0,00	100,0	0,0
100	0,044	0,044 $\pm$ 0,00	99,3	1,3
150	0,063	0,063 $\pm$ 0,10	99,5	0,9

Çizelge 3.22. Lenva-dessiklopropil için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,076	0,071 $\pm$ 0,06	93,8	0,8
100	0,152	0,149 $\pm$ 0,10	97,8	0,8
150	0,223	0,217 $\pm$ 0,36	97,5	0,3

Çizelge 3.23. Lenva-dessiklopropilamid için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,021	0,021 $\pm$ 0,00	100,0	0,0
100	0,042	0,042 $\pm$ 0,00	100,0	0,0
150	0,061	0,06 $\pm$ 0,15	98,4	1,7

Çizelge 3.24. Lenva-dimer üre için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
100	0,149	0,154 $\pm$ 0,21	103,1	1,4
150	0,217	0,233 $\pm$ 0,35	107,1	0,9

Çizelge 3.25. Lenva-karbamoil için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,075	0,069 $\pm$ 0,06	92,4	0,8
100	0,152	0,151 $\pm$ 0,15	99,1	1,0
150	0,223	0,228 $\pm$ 0,23	102,1	0,2

3.4.1.7. Kesinlik

Numune içerisinde raporlama limitinin üzerinde safsızlık bulunduğu durumlarda yöntem kesinliği şu şekilde kontrol edilir: Numunedeki safsızlık oranı %0,1'den az ise

%BSS'si değerlendirilmez. Eğer safsızlık oranı $\geq 0,1$ ise %BSS < 10 olmalıdır. Diğer bir kabul kriteri olarak %95 güven aralığı hesaplanır ve bulunan sonuçlar değerlendirilir. **Çizelge 3.26**'da görüldüğü gibi hem %BSS değerleri kabul kriterlerini sağlamaktadır. Bulunan derişimler ise %95 güven aralığı içerisinde.

Çizelge 3.26. Lenva dimer üre için kesinlik sonuçları

Parametre	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	Fark, %	%95 Güven Aralığı	
Yöntem kesinliği	0,111 $\pm$ 0,004	3,6	-	0,107	0,115
Tekrar edilebilirlik	0,107 $\pm$ 0,009	0,9	0,004	0,106	0,108

3.4.1.8. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Bu işlemlerin sağlanabilmesi için belirlenen metot hem laboratuvar içi farklı gün, farklı analist, farklı cihaz ve farklı kolon ile gerçekleştirildi. Tekrar üretilebilirlik çalışması için de iki farklı laboratuvar da aynı değişen şartlar altında analizler tekrarlanmıştır. Analizler aynı Lenvatinib şarjından hazırlanıp yine taze enjeksiyon verilerek yürütülmüştür. Karşılaştırılan bu denemelerde kabul kriteri şu şekildedir: İki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki fark raporlanmalıdır. Bu fark her safsızlığın her iki kesinlik çalışmaları sonucu $0,1 < \%BSS$ 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. **Çizelge 3.26**'te sonuçlar görüldüğü gibi kabul kriterlerine uygundur.

3.4.1.9. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında metodun ufak değişimlerden etkilenmediğinin göstergesi olarak sistem uygunluk parametreleri **Çizelge 3.27**'de kontrol edilmiş ve **Çizelge 3.28**'de ise safsızlıkların alıkonma zamanları (AZ) ile bağlı alıkonma zamanları (BAZ) incelenmiştir. Sonuçta metodun küçük değişimlerden etkilenmediği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.27.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Lenva-1		Lenvatinib ayırım faktörü
	Ortalama Alanlar	%BSS	
Normal koşullar	11772	1,71	2,8
Akış hızı 1,1 mL/dk	13181	0,66	2,6
Akış hızı 1,3 mL/dk	11192	0,89	2,8
Kolon sıcaklığı 27 °C	11410	3,17	2,3
Kolon sıcaklığı 33 °C	11858	0,70	3,1
Hareketli Faz A pH: 4,4	12382	0,83	4,1
Hareketli Faz A pH: 4,6	11940	2,95	1,6

Çizelge 3.28.Sağlamlık parametresi sonuçları

Koşullar	Lenva-2- okso		4-amino-3- klorofenol		Lenva-1		Lenva-2		Lenva- dessiklopropil		Lenva- dessiklopropil- amid		Lenva-dimer- üre		Lenva- karbamoil	
	AZ	BA	AZ	BA	AZ	BA	AZ	BAZ	AZ	BAZ	AZ	BAZ	AZ	BAZ	AZ	BAZ
Normal koşullar	6,5	0,22	9,55	0,32	16,0	0,53	21,88	0,73	22,83	0,76	29,28	0,98	43,36	1,45	46,24	1,54
Akış hızı 1,1 mL/dk	7,0	0,22	10,8	0,34	16,9	0,54	22,64	0,72	23,38	0,74	30,38	0,96	44,05	1,39	47,11	1,49
Akış hızı 1,3 mL/dk	6,1	0,21	9,71	0,33	15,2	0,52	21,22	0,72	22,34	0,76	28,38	0,96	42,74	1,45	45,47	1,54
Kolon sıcaklığı 27 °C	6,7	0,22	9,75	0,32	16,2	0,53	22,20	0,72	23,06	0,75	29,72	0,96	43,71	1,42	46,84	1,52
Kolon sıcaklığı 33 °C	6,2	0,21	9,30	0,31	15,7	0,52	21,57	0,72	22,64	0,75	28,83	0,98	43,00	1,43	45,67	1,52
Hareketli Faz A pH: 4,4	6,7	0,22	9,11	0,30	16,3	0,54	22,14	0,73	22,62	0,75	28,62	0,94	43,38	1,43	46,52	1,53
Hareketli Faz A pH: 4,6	6,4	0,21	9,62	0,31	15,8	0,51	21,90	0,71	23,30	0,75	30,45	0,98	43,57	1,41	46,25	1,49

3.4.1.10. Kararlılık

Bu parametrede numunenin çözelti içerisindeki kararlılığı araştırılmıştır. Başlangıç koşullarında elde edilen alanlara göre, standart alanının değişimi %5'ten; numunedeki safsızlık pik alanlarındaki değişiklik ise %10'dan fazla olmadığında çözelti kararlılığından söz edilebilmektedir. Bu amaçla standart ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş iki paralel numune 48 saat boyunca 5 °C'de analiz edilmiştir. **Çizelge 3.29**'de görüldüğü gibi standart 48 saat kararlı bulunurken **Çizelge 3.30**'da görüldüğü gibi numune 4 saat kararlı bulunmuştur.

Çizelge 3.29. Standartın kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	12079	UY
4.saat	12465	3,2
8.saat	12235	1,3
12.saat	12174	0,8
16.saat	12186	0,9
20.saat	12079	0,0
24.saat	12079	0,0
28.saat	12168	0,7
32.saat	12123	0,4
40.saat	12160	0,7
48.saat	12156	0,6

Çizelge 3.30. Numunenin kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Lenva-2-okso		4-amino-3-klorofenol		Lenva-1		Lenva-2		Lenva-dessiklopropil		Lenva-dessiklopropilamit		Lenva-dimer-üre		Lenva-karbamoil	
	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %
Başlangıç	40052	-	5915	-	1322	-	1313	-	4426	-	1266	-	43282	-	3973	-
4. saat	41348	3,2	5534	6,4	1426	7,4	1315	0,1	4466	0,9	1263	0,2	42822	1,1	3946	0,7
8. saat	42733	6,7	5929	0,2	1516	14,7	1317	0,3	4492	1,5	1288	1,7	42594	1,6	3894	2,0

3.4.2.Lenvatinib Miktar Tayini

Validasyon için Bölüm 3.2.2’de kullanılacak metot belirlenmiştir. Seçilen bu metot YPSK metodu olmakla birlikte, metodun 244 nm’de Agilent marka Zorbax SB-C8 (250 mm × 4,6 mm) 5 µm kolon kullanılarak akış hızı 2,0 mL/ dk, kolon sıcaklığı 40 °C örneklem bölmesi sıcaklığı ise 5°C parametre değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak pH değeri 4,5± 0,05 olarak ayarlanmış 10 mM KH₂PO₄ kullanılmıştır. Hareketli faz B olarak %100 asetonitril kullanılmıştır. **Çizelge 3.31**’daki gradient elüsyon programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Çizelge 3.31. Gradient elüsyon programı

Süre (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	68	32
13	68	32
14	30	70
17	30	70
18	68	32
23	68	32

3.4.2.1.Seçicilik ve Spesifiklik

Metodun seçicilik ve spesifiklik kontrolü için kör çözeltisi, standart çözeltisi ve numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi analiz edilmiştir. Bu analizde PDA dedektörü kullanılarak 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Seçicilik ve spesifiklik parametresinde kör çözeltisinden ve safsızlıklardan pik gelmemesi ana pikten ayrılmış olmaları aynı zamanda saflık eşiğinin pik saflık endeksinden küçük olması gerekmektedir. Bunun sağlandığı **Çizelge 3.32**’de görülmektedir.

Çizelge 3.32. Lenvatinib miktar tayini metodu seçicilik sonuçları

Alıkonma zamanı (dk)	Pik Saflığı indeksi	Pik saflığı eşiği
10.1	1,000000	0,999966

3.4.2.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk parametresi olarak kontrol edilmesine karar verilen (1) Lenvatinib standardının ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen alanların ortalamasının %BSS değeri 0,1≤ %0,85 bulunmuştur. Ayrıca (2) Lenvatinib numune çözeltisi kromatogramında

Lenvatinib alanının kuyruklanma faktörü $1,2 \leq 1,8$ elde edilmiştir. Bu değerlerin kabul kriterlerini (1 ve 2) sağladığı görülmüştür.

Çizelge 3.33. Sistem uygunluk sonuçları

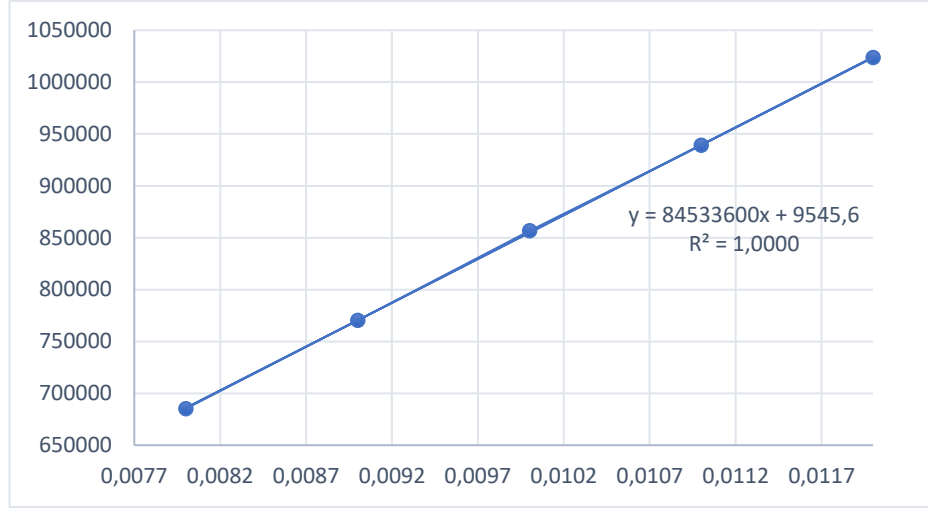
Enjeksiyon sırası	Alanlar	Kuyruklanma Faktörü
1	952006	1,20
2	950889	1,20
3	951301	1,20
4	950028	1,20
5	950655	1,19
6	949435	1,19
Ortalama	950719	1,20
SS	911,5	0,0
%BSS	0.10	0,00

3.4.2.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Cihaz yanıtı ile cihaz derişiminin doğrusallığı regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla beş farklı derişim aralığında (%80, %90, %100, %110, %110) çözeltiler en az üçer kere analiz edilmiştir. Minimum ve maksimum seviyelerdeki çözeltiler ise altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen Regresyon eğrisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %2'siinden fazla olmaması burada önemli bir kriterdir. Korelasyon katsayısının ise 0,999'dan az olmaması gerekmektedir. Bununla birlikte minimum ve maksimum alanların % BSS değerleri (0,10- 0,17) $< \%0,85$ kabul kriterlerini sağlamıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.34'** te verilmiştir. **Şekil 3.16'te** elde edilen regresyon grafiği görülmektedir.

Çizelge 3.34. Lenvatinib miktar tayini regresyon analizi sonuçları

Derişim ($\mu\text{g/ml}$)	Korelasyon katsayısı r, Limit: $\geq 0,999$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: $\leq 2,0\%$	En düşük ve en yüksek alanların % BSS değerleri Limit: $< \%0,85$	
				Min.	Maks.
0,0080- 0,0120	1,0000	$y = 84533600x + 9545,6$	1,11	0,17	0,10



Şekil 3.16. Kalibrasyon eğrisi (Lenvatinib)

3.4.2.4. Doğruluk

Doğruluk çalışması için safsızlıkların geri kazanım analizleri yapılmıştır. Bu amaçla %50, %100 ve %150'lik numuneler hazırlanmış üçer enjeksiyonundan elde edilen verilere göre geri kazanımları hesaplanmıştır. **Çizelge 3.35'**te geri kazanımların kabul sınırları (%98-%102) aralığında bulunduğu görülmektedir. Güven aralığı ise 99,5 ve 100,1 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.35. Lenvatinib için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS,%	Geri Kazanım, %	% BSS
80	0,00794	0,00793 $\pm$ 0,004	99,8	0,12
100	0,01006	0,01003 $\pm$ 0,003	99,7	0,31
120	0,01191	0,01187 $\pm$ 0,013	99,7	0,69

3.4.2.5. Kesinlik

Sistem kesinliği için lenvatinib standart çözeltisinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen standart alanlarının %BSS değeri 2'den küçük olmalıdır. Bu sistemde bu değer 0,1 olarak bulunmuştur.

Metot kesinliği için ardışık altı numune enjeksiyonunun analizinden elde edilen alanların % BSS değeri de yine aynı şekilde 2'den küçük olmalıdır. **Çizelge 3.36'**te sonuçlar

paylaşılmıştır. Metot kesinliğinde %95 güven aralığı kromatografik lenvatinib için 99,5-100,1 ve susuz solventsiz miktar için ise 100,1-100,7 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.36. Lenvatinib için kesinlik sonuçları

Yöntem Kesinliği	Lenvatinib Miktarı	
	Kromatografik	Susuz ve solventsiz
	99,8	100,4
Tekrar üretilebilirlik	99,7	100,3
Fark	0,1	0,1

3.4.2.6. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik

Bu işlemlerin sağlanabilmesi için belirlenen metot hem laboratuvar içi farklı gün, farklı analist, farklı cihaz ve farklı kolon ile gerçekleştirildi. Analizler aynı Lenvatinib şarjından hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada %95 güven aralığı kromatografik miktar için 99,2-100,2 ve susuz solventsiz miktar için 99,8-100,8 bulunmuştur. İki çalışmanın arasında fark olmadığının göstergesi farkın en az 2 olmasıdır. **Çizelge 3.36**'te paylaşıldığı gibi kabul kriterleri sağlanmıştır.

3.4.2.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında metodun ufak değişimlerden etkilenmediğinin göstergesi olarak sistem uygunluk parametreleri ve safsızlıkların alıkonma zamanları (AZ) **Çizelge 3.37**'da incelenmiştir. Sonuçta metodun küçük değişimlerden etkilenmediği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.37.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Alıkonma zamanı	%BSS	Kuyruklanma faktörü
Normal şartlar	10,1	0,08	1,26
Akış hızı 1,8 mL/dk	11,0	0,08	1,26
Akış hızı 2,2 mL/dk	9,1	0,27	1,29
Kolon sıcaklığı 36 °C	10,2	0,18	1,26
Kolon sıcaklığı 44 °C	9,5	0,08	1,26
Hareketli faz A pH 4,05	8,5	0,08	1,17
Hareketli faz A pH 4,95	4,2	0,08	1,22

3.4.2.8. Kararlılık

Bu parametrede numunenin çözelti içerisindeki kararlılığı araştırılmıştır. Başlangıç koşullarında elde edilen alanlara göre, numune alanlarının değişimi %2'den fazla olmadığında çözelti kararlılığından söz edilebilmektedir. Bu amaçla iki paralel numune 48 saat boyunca 5 °C'de analiz edilmiştir. **Çizelge 3.38**'de görüldüğü gibi standart 44 saat kararlı bulunmuştur.

Çizelge 3.38. Numunenin kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	908448	-
4. saat	907032	0.16
8. saat	905828	0.29
12. saat	905413	0.37
16. saat	904555	0.43
20. saat	903765	0.52
24. saat	903643	0.53
28. saat	903632	0.53
32. saat	902589	0.65
36. saat	903105	0.59
40. saat	902192	0.69
44. saat	900686	0.85

3.4.3.Lifitegrast İlgili Bileşikler

Validasyon için **Bölüm 3.3.1**'de kullanılacak metot belirlenmiştir. Seçilen bu metot YPSK metodu olmakla birlikte, metodun 215 nm'de Troyasil C8 (250 mm × 4,6 mm) 5 µm kolon kullanılarak akış hızı 1,0 mL/ dk, kolon sıcaklığı 30 °C örneklem bölmesi sıcaklığı ise 5°C parametre değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak pH değeri 5,5± 0,05 olarak ayarlanmış 10 mM KH₂PO₄ kullanılmıştır. Hareketli faz B olarak %100 asetonitril kullanılmıştır. Standart çözeltilerinin analizleri **Çizelge 3.39**' deki gradient elüsyon programı ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.39. Gradient elüsyon programı

Süre (dk)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	95	5
10	60	40
25	30	70
27	30	70
28	95	5
33	95	5

Metot içerisinde kullanılacak olan safsızlıkların günlük alım dozları üzerinden ICH Q3 A, B kılavuzlarına hesaplanan spesifikasyon limitleri **Çizelge 3.40'** de verilmiştir.

Çizelge 3.40. Bilinen, bilinmeyen ve genotoksik safsızlıklar için limit değerleri

Safsızlık	Limit Değeri
Lif-safsızlık-A	%En fazla 0.15
Lif-safsızlık-B	%En fazla 0.15
Lif-safsızlık-C	%En fazla 0.15
Lif-safsızlık-D	%En fazla 0.15
Bilinmeyen safsızlıkların her biri	%En fazla 0.10
Toplam safsızlık	%En fazla 1.0

3.4.3.1.Seçicilik ve Spesifiklik

Metodun seçicilik ve spesifiklik kontrolü için kör çözeltisi, standart çözeltisi, her bir safsızlığın spesifikasyon limitinde hazırlanan standart çözeltileri, spesifikasyon limitinde safsızlıkların karışım çözeltisi, numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi analiz edilmiştir. Bu analizde PDA dedektörü kullanılarak 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Seçicilik ve spesifiklik parametresinde kör çözeltisinden safsızlıkların altında pik gelmemesi birbirlerinden ve ana pikten ayrılmış olmaları aynı zamanda saflık eşiğinin pik saflık endeksinden küçük olması gerekmektedir. Bunun sağlandığı **Çizelge 3.41'** da görülmektedir.

Çizelge 3.41. Lifitegrast ilgili bileşikler metodu seçicilik ve spesifiklik sonuçları

Safsızlık	Alıkonma Zamanı (AK)	Bağlı Alıkonma Zamanı (BAK)	Pik saflık endeksi	Saflık Eşiği
Lifitegrast	13,2	-	1,0000000	0,962518
Lif-safsızlık-A	10,79	0,817	1,0000000	0,987753
Lif-safsızlık-B	14,21	1,077	1,0000000	0,982900
Lif-safsızlık-C	5,35	0,405	1,0000000	0,919250
Lif-safsızlık-D	11,18	0,847	1,0000000	0,995137

3.4.3.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk parametresi olarak kontrol edilmesine karar verilen (1) ardışık altı standart enjeksiyonundan elde edilen alanların ortalamasının %BSS değeri $0,24 \leq \%5,0$ bulunmuştur. Ayrıca (2) spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune kromatogramında Lif- safsızlık D'nin kolon ayırıcılık gücü $2,8 > 1,5$ elde edilmiştir. **Çizelge 3.42'**de verilen bu değerlerin kabul kriterlerini (1 ve 2) sağladığı görülmüştür.

Çizelge 3.42. Sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon Sırası	Standart Alanları	Lif-safsızlık-D Kolon ayırıcılık gücü
1	30720	
2	30672	
3	30771	
4	30636	
5	30583	2,8
6	30753	
Ortalama	30689	
SS	72,27	
%BSS	0,24	

3.4.3.3. Bağlı Yanıt (RRF)ve Yanıt Düzeltme Faktörü (CRF)

Bağlı yanıt faktörü ve yanıt düzeltme faktörünün hesaplanması için spesifikasyon limitinde karışım çözeltisi 6 kere enjekte edilmiştir. Elde edilen RRF ve CRF değerleri **Çizelge 3.43'**te verilmiş olup hesaplamalarda kullanılmıştır.

Çizelge 3.43. Bağlı yanıt ve yanıt düzeltme faktörü sonuçları

Safsızlık	Derişim, µg/mL	Ortalama pik alanları	RRF	CRF
Lifitegrast	0,243	31961	-	-
Lif-safsızlık-A	0,375	42156	0,9	1,17
Lif-safsızlık-B	0,378	50749	1,0	0,98
Lif-safsızlık-C	0,375	17974	0,4	2,74
Lif-safsızlık-D	0,376	80369	1,6	0,62

3.4.3.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

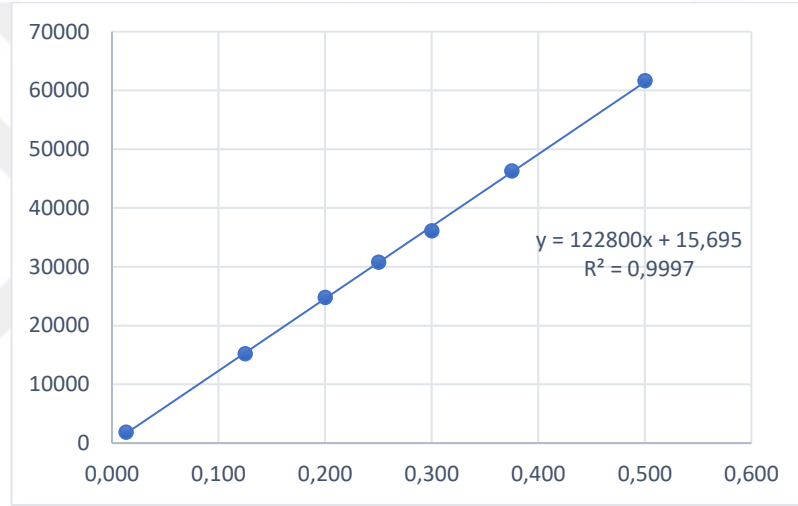
Cihaz yanıtı ile cihaz derişiminin doğrusallığı regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla yedi farklı derişim aralığında (TAS, 50%, 80%, 100%, 120%, 150% ve 200%) çözeltiler en az üçer kere analiz edilmiştir. Minimum (TAS) ve maksimum seviyelerdeki çözeltiler ise altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen Regresyon eğrisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %5'inden fazla olmaması burada önemli bir kriterdir. Korelasyon katsayısının ise 0,99'dan az olmaması gerekmektedir. Bununla birlikte minimum alanların (TAS) % BSS değerleri <%10 bulunmuştur. Maksimum alanların %BSS değerleri ise <%5,0 bulunmuştur. Kabul kriterlerinin sağlandığı bu sonuçlar **Çizelge 3.44 ve 3.45**'te verilmiştir. **Şekil 3.17-21** aralığında verilen grafiklerde safsızlıklar için elde edilen regresyon grafikleri görülmektedir.

Çizelge 3.44. Lifitegrast ilgili bileşikler regresyon analizi sonuçları

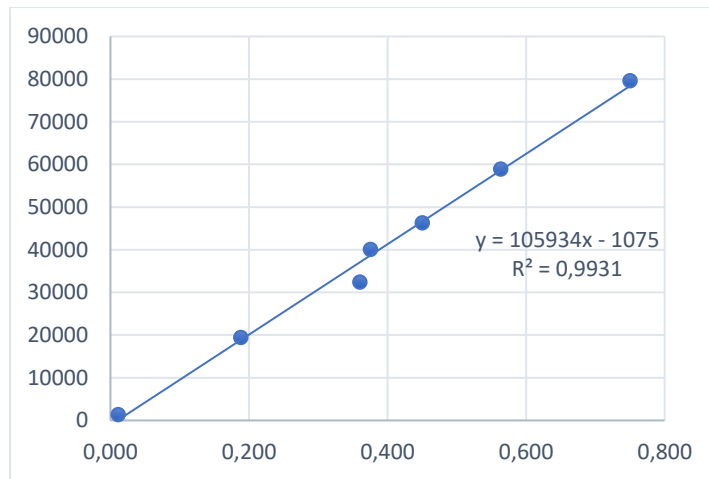
Safsızlık	Derişim (µg/ml)	Korelasyon katsayısı r, Limit: $\geq 0,99$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: $\leq 5,0\%$
Lifitegrast	0,013-0,500	0,9998	$y = 122800x + 15,695$	0,1
Lif-safsızlık-A	0,011-0,750	0,9966	$y = 105934x - 1075$	2,7
Lif-safsızlık-B	0,012-0,756	0,9945	$y = 123664x + 392,68$	1,5
Lif-safsızlık-C	0,035-0,690	0,9967	$y = 48084x + 118,36$	4,2
Lif-safsızlık-D	0,006-0,752	0,9995	$y = 196039x + 1205,5$	1,6

Çizelge 3.45. Minimum ve maksimum derişimdeki çözeltilerin analizlerinin %BSS değeri

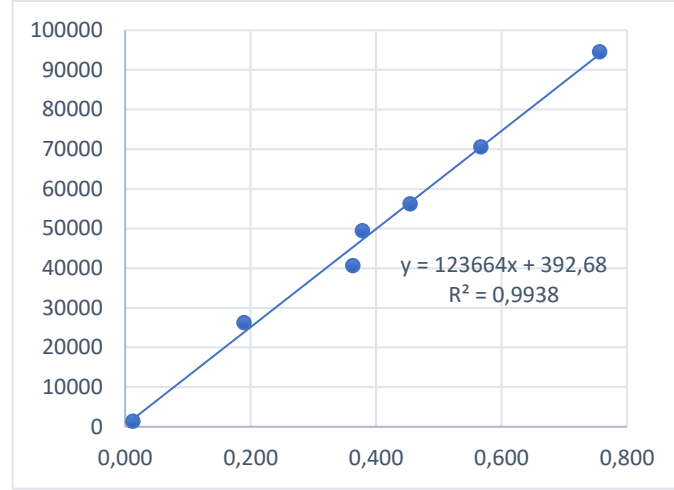
Safsızlık	Safsızlık alanlarının %BSS değeri	
	Minimum	Maksimum
Lifitegrast	1,5	0,1
Lif-safsızlık-A	5,9	0,1
Lif-safsızlık-B	5,2	0,2
Lif-safsızlık-C	5,1	0,2
Lif-safsızlık-D	3,4	0,1



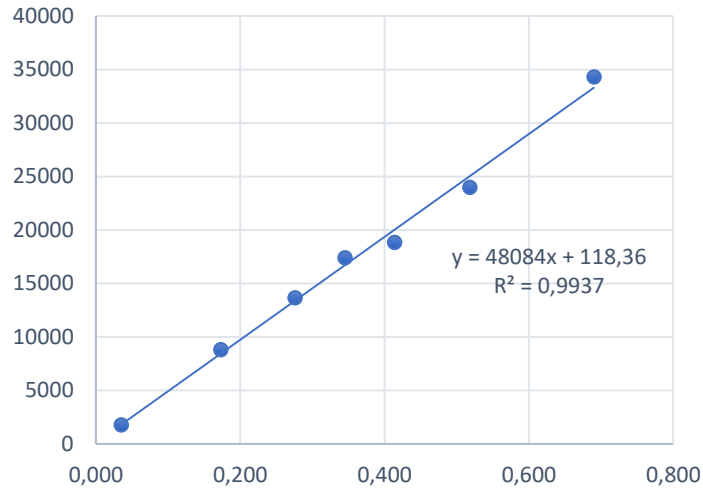
Şekil 3.17. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast)



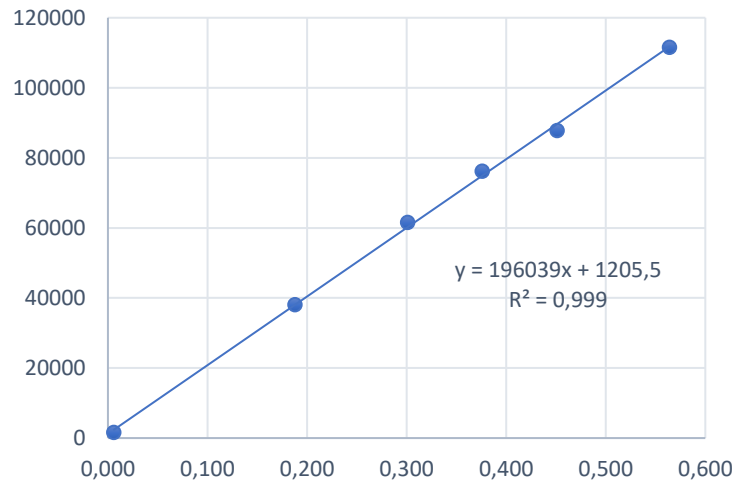
Şekil 3.18. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-A)



Şekil 3.19. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-B)



Şekil 3.20. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-C)



Şekil 3.21. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast-D)

3.4.3.5. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı

Bir metot içerisinde tayin edilebilecek en düşük derişim olan tayin alt sınırının sinyal/gürültü oranı ondan, tespit edilebilecek en düşük derişim olan teşhis sınırının ise üçten büyük olması gerekmektedir. TAS'nin ve teşhis sınırındaki derişimlerin ise raporlama limitlerinden büyük olmaması gerekmektedir. **Çizelge 3.46**'te paylaşılan sonuçlar bütün safsızlıklar için kriterlerin sağlandığını göstermektedir.

Çizelge 3.46. Tayin alt sınırı (TAS) ve teşhis sınırına (TS) ait sonuçlar

Standart	Teşhis Sınırı		Tayin Alt Sınırı		S/N	
	µg/mL	%, ppm	µg/mL	%, ppm	TS	TAS
Lifitegrast	0,0039	0,0016	0,013	0,0053	6	17
Lif-safsızlık-A	0,0033	0,0013	0,011	0,0044	7	15
Lif-safsızlık-B	0,0036	0,0014	0,012	0,0048	4	27
Lif-safsızlık-C	0,0105	0,0042	0,035	0,0140	8	16
Lif-safsızlık-D	0,0018	0,0007	0,006	0,0024	8	17

3.4.3.6. Doğruluk

Doğruluk çalışması için safsızlıkların geri kazanım analizleri yapılmıştır. Bu amaçla safsızlıkların spesifikasyon limitlerinin TAS, %50, %100 ve %150'sine karşılık gelecek şekilde eklenmiş numuneler hazırlanmış üçer enjeksiyonundan elde edilen verilere göre geri kazanımları hesaplanmıştır. Numune TAS seviyesinin üzerinde Lif-safsızlık-A ve Lif-safsızlık B içerdiğinden TAS seviyesinde eklenmemiştir. **Çizelge 3.47 ve 3.48**'da geri kazanım değerlerinin TAS seviyesi için Lif-safsızlık C için 110,3 Lif safsızlık D için ise 99,5 (limit: %70-%130) bulunduğu görülmüştür. **Çizelge 3.47-50** da ise diğer seviyeler için geri kazanımların kabul sınırları (%90-%110) aralığında bulunduğu görülmektedir.

Çizelge 3.47. Lifitegrast-A için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS, %	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,148	0,145 $\pm$ 0,26	97,8	0,8
100	0,218	0,204 $\pm$ 0,35	93,6	0,5
150	0,300	0,280 $\pm$ 0,21	93,4	0,4

Çizelge 3.48. Lifitegrast-B için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS, %	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,111	0,100 $\pm$ 0,17	90,1	0,2
100	0,182	0,165 $\pm$ 0,31	91,0	0,7
150	0,263	0,237 $\pm$ 0,15	90,0	0,5

Çizelge 3.49. Lifitegrast-C için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS, %	Geri Kazanım, %	% BSS
TAS	0,013	0,014 $\pm$ 0,06	110,3	4,0
50	0,076	0,081 $\pm$ 0,23	106,6	1,1
100	0,146	0,137 $\pm$ 0,96	93,6	4,8
150	0,228	0,215 $\pm$ 0,26	94,3	1,2

Çizelge 3.50. Lifitegrast-D için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS, %	Geri Kazanım, %	% BSS
TAS	0,006	0,006 $\pm$ 0,01	99,5	0,9
50	0,077	0,071 $\pm$ 0,12	91,8	0,6
100	0,152	0,152 $\pm$ 0,62	100,2	2,6
150	0,221	0,201 $\pm$ 0,23	90,8	0,2

3.4.3.7. Kesinlik

Numune içerisinde raporlama limitinin üzerinde safsızlık bulunduğu durumlarda yöntem kesinliği şu şekilde kontrol edilir: Numunedeki safsızlık oranı %0,1'den az ise %BSS'si değerlendirilmez. Eğer safsızlık oranı $\geq$ %0,1 ise %BSS <10 olmalıdır. Diğer bir kabul kriteri olarak %95 güven aralığı hesaplanır ve bulunan sonuçlar değerlendirilir. **Çizelge 3.51'**de görüldüğü gibi hem %BSS değerleri kabul kriterlerini sağlamaktadır. Bulunan derişimler ise %95 güven aralığı içerisinde.

Çizelge 3.51. Lif- safsızlık A için kesinlik sonuçları

Parametre	Bulunan Derişim (Ortalama± SS, %)	BSS, %	Fark, %	%95 Güven Aralığı
Yöntem kesinliği	0,080±0,05	0,6	-	0,079 0,081
Tekrar edilebilirlik	0,076±0,15	1,9	0,004	0,074 0,078

3.4.3.8. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Bu işlemlerin sağlanabilmesi için belirlenen metot hem laboratuvar içi farklı gün, farklı analist, farklı cihaz ve farklı kolon ile gerçekleştirildi. Tekrar üretilebilirlik çalışması için de iki farklı laboratuvarda aynı değişen şartlar altında analizler tekrarlanmıştır. Analizler aynı Lifitegrast şarjından hazırlanıp yine taze enjeksiyon verilerek yürütülmüştür. Karşılaştırılan bu denemelerde kabul kriteri şu şekildedir: İki kesinlik çalışmasının ortalama sonuçları arasındaki fark raporlanmalıdır. Bu fark her safsızlığın her iki kesinlik çalışmaları sonucu $0,1 < \%BSS$ 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. **Çizelge 3.51**'de sonuçlar görüldüğü gibi kabul kriterlerine uygundur.

3.4.3.9. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında metodun ufak değişimlerden etkilenmediğinin göstergesi olarak sistem uygunluk parametreleri **Çizelge 3.52**'de kontrol edilmiş ve **Çizelge 3.53**'te ise safsızlıkların alıkonma zamanları (AZ) ile bağlı alıkonma zamanları (BAZ) incelenmiştir. Sonuçta metodun küçük değişimlerden etkilenmediği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.52.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Standart		Lif-safsızlık D kolon ayırıcılık gücü
	Ortalama Alanlar	%BSS	
Normal koşullar	30604	0,35	1,8
Akış hızı 0,9 mL/dk	32031	0,81	1,6
Akış hızı 1,1 mL/dk	28796	0,90	1,6
Kolon sıcaklığı 33 °C	31361	0,31	2,3
Kolon sıcaklığı 38 °C	32646	0,78	2,6
Hareketli Faz A pH: 5,3	33964	0,42	1,6
Hareketli Faz A pH: 5,7	31776	0,86	2,7

Çizelge 3.53.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Lif-safsızlık-A		Lif-safsızlık-B		Lif-safsızlık-C		Lif-safsızlık-D	
	AZ	BAZ	AZ	BAZ	AZ	BAZ	AZ	BAZ
Normal koşullar	10,79	0,82	14,21	1,08	5,35	0,41	11,18	0,85
Akış hızı 0,9 mL/dk	11,40	0,83	14,80	1,07	5,90	0,43	11,79	0,86
Akış hızı 1,1 mL/dk	10,28	0,81	13,71	1,07	4,87	0,38	10,68	0,84
Kolon sıcaklığı 33 °C	11,00	0,83	14,20	1,08	5,77	0,44	11,39	0,86
Kolon sıcaklığı 38 °C	10,83	0,83	14,08	1,08	5,62	0,43	11,26	0,86
Hareketli Faz A pH: 5,3	11,33	0,82	14,93	1,07	5,44	0,39	11,56	0,83
Hareketli Faz A pH: 5,7	10,94	0,83	14,06	1,07	5,79	0,44	11,36	0,87

3.4.3.10. Kararlılık

Bu parametrede numunenin çözelti içerisindeki kararlılığı araştırılmıştır. Başlangıç koşullarında elde edilen alanlara göre, standart alanının değişimi %5'ten; numunedeki safsızlık pik alanlarındaki değişiklik ise %10'dan fazla olmadığında çözelti kararlılığından söz edilebilmektedir. Bu amaçla standart ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş iki paralel numune 48 saat boyunca 5 °C'de analiz edilmiştir. **Çizelge 3.54 ve 3.55'**de görüldüğü gibi standart ve numune çözeltisi 48 saat kararlı bulunmuştur.

Çizelge 3.54. Standartın kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Alanlar	Fark, %
Başlangıç	33138	-
4.saat	33402	0,8
8.saat	33384	0,7
12.saat	33360	0,7
16.saat	33633	1,5
20.saat	33419	0,8
24.saat	33365	0,7
28.saat	33439	0,9
32.saat	33397	0,8
40.saat	33502	1,1
44.saat	33573	1,3
48.saat	33523	1,2

Çizelge 3.55. Standardın kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Lif-Safsızlık-A		Lif-Safsızlık-B		Lif-Safsızlık-C		Lif-Safsızlık-D	
	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %	Alan	Fark, %
Başlangıç	63013	-	63297	-	16840	-	83075	-
4.saat	62847	0,3	62987	0,5	17874	6,1	82696	0,5
8.saat	62828	0,3	62774	0,8	17807	5,7	82531	0,7
12.saat	62592	0,7	62459	1,3	18138	7,7	82167	1,1
16.saat	62464	0,9	62201	1,7	17928	6,5	81908	1,4
20.saat	62236	1,2	61860	2,3	17750	5,4	81385	2,0
24.saat	61920	1,7	61481	2,9	17481	3,8	81024	2,5
28.saat	61953	1,7	61273	3,2	17102	1,6	80860	2,7
32.saat	61988	1,6	60886	3,8	17010	1,0	80436	3,2
40.saat	61579	2,3	60529	4,4	17103	1,6	80138	3,5
44.saat	61560	2,3	60132	5,0	16883	0,3	79662	4,1
48.saat	61628	2,2	59797	5,5	16782	0,3	79662	4,1

3.4.4.Lifitegrast Enantiyomerik Saflık Tayini

Validasyon için Bölüm 3.3.2’de kullanılacak metot belirlenmiştir. Seçilen bu metot YPSK metodu olmakla birlikte, metodun 260 nm’de Chiralpak AD-H, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm kolon kullanılarak akış hızı 1,0 mL/ dk, kolon sıcaklığı 40 °C örneklem bölmesi sıcaklığı ise 15°C parametre değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak n-Hekzan, 2-propanol ve formik asit karışımı (500:500:1, h/h/h) kullanılarak izokratik elüsyon programı ile 20 dakika analiz süresiyle validasyon analizleri yapılmıştır.

3.4.4.1.Seçicilik ve Spesifiklik

Metodun seçicilik ve spesifiklik kontrolü için kör çözeltisi, standart çözeltisi ve numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi analiz edilmiştir. Bu analizde PDA dedektörü kullanılarak 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Seçicilik ve spesifiklik parametresinde kör çözeltisinden ve safsızlıklardan pik gelmemesi ana pikten ayrılmış olmaları aynı zamanda saflık eşiğinin pik saflık endeksinden küçük olması gerekmektedir. Bunun sağlandığı **Çizelge 3.56’** te görülmektedir.

Çizelge 3.56. Lifitegrast enantiyomerik saflık tayini metodu seçicilik sonuçları

Molekül	Alıkonma zamanı (dk)	Pik Saflığı indeksi	Pik saflığı eşiği
R-Lif	10,97	0,999985	0,999086
S-Lif	7,72	0,999913	0,996417

3.4.4.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk parametresi olarak kontrol edilmesine karar verilen (1) ardışık altı Lifitegrast standart enjeksiyonundan elde edilen alanların ortalamasının %BSS değeri $0,1 \leq \%5,0$ bulunmuştur. Ayrıca (2) Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramında kolon ayırıcılık gücü (≥ 4.0), kapasite faktörü ($k, \geq 2.0$), seçicilik faktörü ($\alpha, \geq 1.0$), kuyruklanma faktörü (≤ 2.0), teorik plaka sayısının (≥ 2000) kontrol edilmesi sağlanmıştır. Bu değerlerin kabul kriterlerini (1 ve 2) sağladığı görülmüştür. **Çizelge 3.57'**de sistem uygunluk kriterlerinin sağlandığı görülmektedir.

Çizelge 3.57. Sistem uygunluk sonuçları

	S-Lif	R-Lif
Kolon ayırıcılık gücü	-	4.2
Teorik plaka sayısı	3509	4353
Kapasite faktörü (k)	1.78	3.0
Seçicilik faktörü (α)	–	1.7
Kuyruklanma faktörü	1.4	1.0

3.4.4.3. Tayin Alt Sınırı ve Teşhis Sınırı

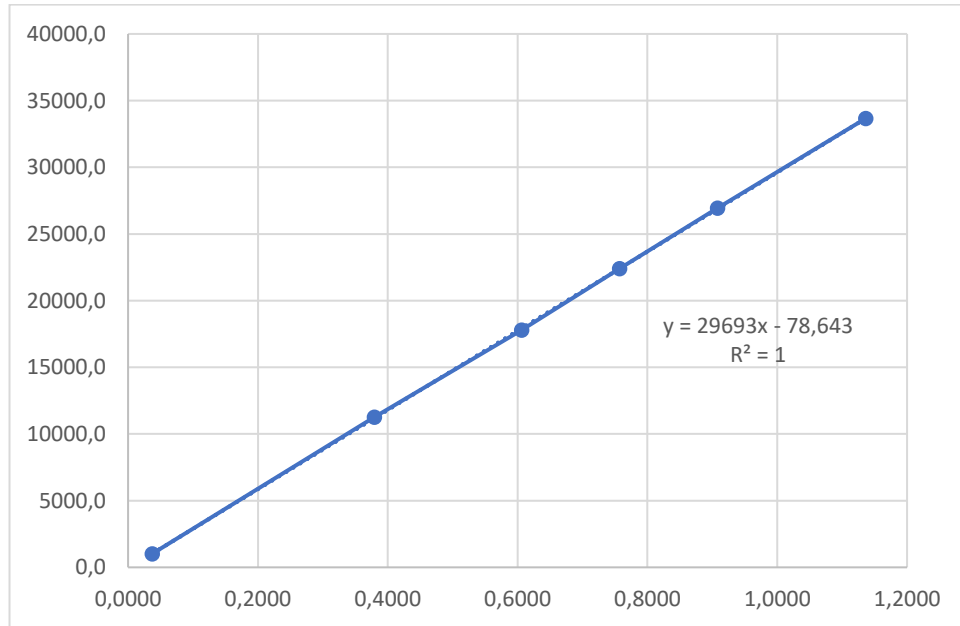
Bir metot içerisinde tayin edilebilecek en düşük derişim olan tayin alt sınırının sinyal/gürültü oranı ondan, tespit edilebilecek en düşük derişim olan teşhis sınırının ise üçten büyük olması gerekmektedir. TAS'nin ve teşhis sınırındaki derişimlerin ise raporlama limitlerinden büyük olmaması gerekmektedir. R-Lif için TAS 0,0369 $\mu\text{g/mL}$ ve %0,024 ve TS 0,011 $\mu\text{g/mL}$ ile %0,0072'dir. Sinyal/gürültü değerleri ise sıraasıyla 11 ve üç bulunmuştur.

3.4.4.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Cihaz yanıtı ile cihaz derişiminin doğrusallığı regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla altı farklı derişim aralığında (TAS, %50, %80, %100, %120, %150 ve %200) çözeltiler en az üçer kere analiz edilmiştir. Minimum ve maksimum seviyelerdeki çözeltiler ise altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen regresyon eğrisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %5'inden fazla olmaması burada önemli bir kriterdir. Korelasyon katsayısının ise 0,99'dan az olmaması gerekmektedir. Bununla birlikte minimum % BSS değerleri <%10,0 ve maksimum alanların % BSS değerleri <%5,0 kabul kriterlerini sağlamıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.58'** te verilmiştir. **Şekil 3.22'**te elde edilen regresyon grafiği görülmektedir.

Çizelge 3.58. R-Lif miktar tayini regresyon analizi sonuçları

Derişim (µg/ml)	Korelasyon katsayısı r, Limit: $\geq 0,99$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: $\leq 2,0\%$	Minimum ve Maksimum alanların % BSS değerleri Limit: $< \%0,85$	
				Min.	Maks.
0,0369- 1,816	1,000	$y = 29693x - 78,643$	0,4	4,38	1,57



Şekil 3.22. Kalibrasyon eğrisi (R-Lif)

3.4.4.5. Doğruluk

Doğruluk çalışması için safsızlıkların geri kazanım analizleri yapılmıştır. Bu amaçla %50, %100 ve %150'lik numuneler hazırlanmış üçer enjeksiyonundan elde edilen verilere göre geri kazanımları hesaplanmıştır. **Çizelge 3.59'**da TAS seviyesinde (%70-%130) ve diğer seviyelerde (%90-%110) geri kazanımların kabul sınırları aralığında bulunduğu görülmektedir. Güven aralığı ise 95,6 ve 102,8 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.59. R-Lif için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS,%	Geri Kazanım, %	% BSS
TAS	0,007	$0,007 \pm 0,000$	100,0	0,00
50	0,075	$0,071 \pm 0,0012$	96,0	1,69
100	0,151	$0,152 \pm 0,0026$	100,9	1,71
150	0,226	$0,229 \pm 0,0015$	101,5	0,66

3.4.4.6. Kesinlik

Sistem kesinliği için R-Lif standart çözeltisinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen standart alanlarının %BSS değeri 5,0'den küçük olmalıdır. Bu sistemde bu değer 0,3 olarak bulunmuştur.

Metot kesinliği için ardışık altı spesifikasyon limitinde standart eklenmiş numune enjeksiyonunun analizinden elde edilen R-Lif alanların % BSS değeri de yine aynı şekilde 5'ten küçük olmalıdır. **Çizelge 3.60'**da sonuçlar paylaşılmıştır.

Çizelge 3.60. R-Lif için kesinlik sonuçları

Parametre	Bulunan Derişim (Ortalama $\pm$ SS, %)	BSS, %	Fark, %	%95 Güven Aralığı
Yöntem kesinliği	0.152 ± 0.001	0,4	-	0,151 0,152
Tekrar Edilebilirlik	0.151 ± 0.005	3,1	0,001	0,146 0,156

3.4.4.7. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilirlik

Bu işlemlerin sağlanabilmesi için belirlenen metot hem laboratuvar içi farklı gün, farklı analist, farklı cihaz ve farklı kolon ile gerçekleştirildi. Analizler aynı Lifitegrast şarjından hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. İki çalışmanın arasında fark olmadığının göstergesi farkın en az 5 olmasıdır. **Çizelge 3.59'**te paylaşıldığı gibi kabul kriterleri sağlanmıştır.

3.4.4.8. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında metodun ufak değişimlerden etkilenmediğinin göstergesi olarak sistem uygunluk parametreleri ve safsızlıkların alıkonma zamanları (AZ) **Çizelge 3.61**'de incelenmiştir. Sonuçta metodun küçük değişimlerden etkilenmediği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.61.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Alıkonma zamanı	%BSS	Kuyruklanma faktörü
Normal Şartlar	10,97	0,3	4,2
Akış hızı 0,9 ml/dk	12,40	3,84	4,4
Akış hızı 1,1 ml/dk	10,10	2,91	4,0
Kolon sıcaklığı 36 C°	12,10	2,85	4,0
Kolon sıcaklığı 44 C°	10,20	3,12	4,5

3.4.4.9. Kararlılık

Bu parametrede numunenin çözelti içerisindeki kararlılığı araştırılmıştır. Başlangıç koşullarında elde edilen alanlara göre, standart alanlarının değişimi %5,0'den fazla ve numune alanlarının değişimi % !0'dan fazla olmadığında çözelti kararlılığından söz edilebilmektedir. Bu amaçla iki paralel numune 48 saat boyunca 5 °C'de analiz edilmiştir. **Çizelge 3.62**'de görüldüğü gibi standart 48 saat kararlı bulunmuştur.

Çizelge 3.62. Kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Standart		Numune	
	Alanlar	Fark (%)	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	22077	-	22000	-
8. saat	21932	0,7	21859	0,6
16. saat	21918	0,7	21415	2,7
20. saat	21941	0,0	21690	1,4
24. saat	22012	0,3	21389	2,8
32. saat	21948	0,1	21295	3,2
40. saat	21958	0,5	21006	4,5
48. saat	22072	0,6	21095	4,1

3.4.5.Lifitegrast Miktar Tayini

Validasyon için Bölüm 3.3.3'te kullanılacak metot belirlenmiştir. Seçilen bu metot YPSK metodu olmakla birlikte, metodun 260 nm'de Waters symmetry C8 (150 mm × 4.6 mm) 5 µm kolon kullanılarak akış 1,2 mL/ dk, kolon sıcaklığı 35 °C örneklem bölmesi sıcaklığı ise 5°C parametre değerleri ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz fosforik asit özeltisi ve asetonitril karışımı (60:40, h/h) olarak kullanılmıştır. Metot izokratik elüsyonla 10 dakikada gerçekleştirilmiştir.

3.4.5.1.Seçicilik ve Spesifiklik

Metodun seçicilik ve spesifiklik kontrolü için kör çözeltisi, standart çözeltisi ve numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi analiz edilmiştir. Bu analizde PDA dedektörü kullanılarak 200-400 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Seçicilik ve spesifiklik parametresinde kör çözeltisinden ve safsızlıklardan pik gelmemesi ana pikten ayrılmış olmaları aynı zamanda saflık eşiğinin pik saflık endeksinden küçük olması gerekmektedir. Bunun sağlandığı **Çizelge 3.63'** de görülmektedir.

Çizelge 3.63. Lifitegrast miktar tayini metodu seçicilik sonuçları

Alıkonma zamanı (dk)	Pik Saflığı indeksi	Pik saflığı eşiği
5,4	1,000000	0,999971

3.4.5.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluk parametresi olarak kontrol edilmesine karar verilen (1) ardışık altı Lifitegrast standart enjeksiyonundan elde edilen alanların ortalamasının %BSS değeri $0,23 \leq 0,85$ bulunmuştur. Ayrıca (2) Lifitegrast numune çözeltisi kromatogramında Lifitegrast alanının kuyruklanma faktörü $1,0 \leq 1,8$ elde edilmiştir. Bu değerlerin kabul kriterlerini (1 ve 2) sağladığı görülmüştür. Sonuçlar **Çizelge 3.64'** de verilmiştir.

Çizelge 3.64. Sistem uygunluk sonuçları

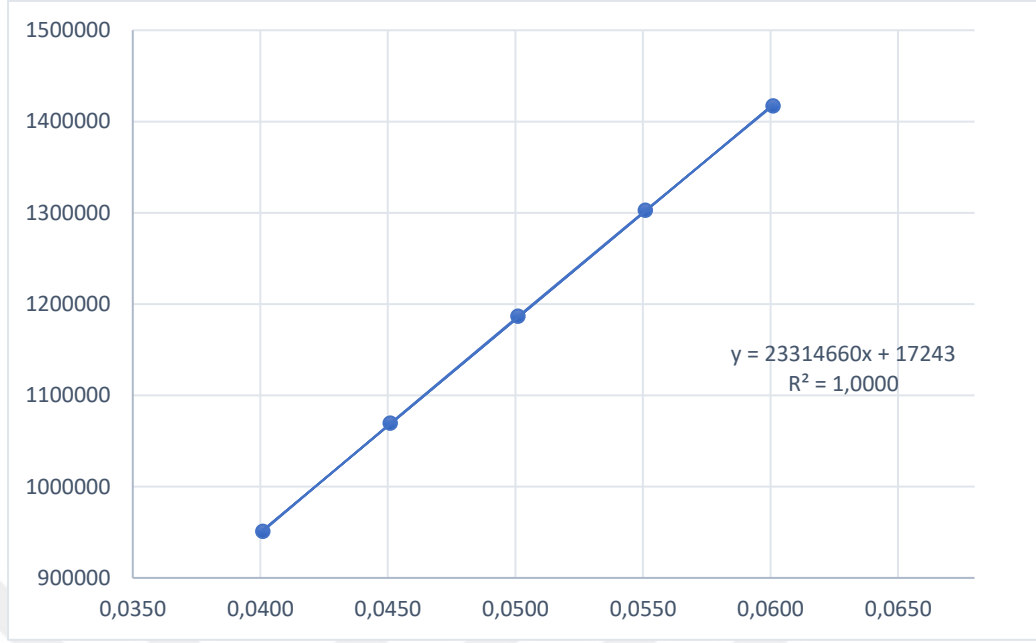
Enjeksiyon sırası	Alanlar	Kuyruklanma Faktörü
1	1164778	1,00
2	1167537	1,00
3	1167465	1,00
4	1167533	1,00
5	1165360	1,00
6	1172256	1,00
Ortalama	1167488	1,00
SS	2631,0	0,0
%BSS	0,23	0,00

3.4.5.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Cihaz yanıtı ile cihaz derişiminin doğrusallığı regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla beş farklı derişim aralığında (%80, %90, %100, %110, %120) çözeltiler en az üçer kere analiz edilmiştir. Minimum ve maksimum seviyelerdeki çözeltiler ise altışar kez analiz edilmiştir. Elde edilen regresyon eğrisinin kesim noktası, standart derişiminin %100 seviyesinden elde edilen alanın %2'sinden fazla olmaması burada önemli bir kriterdir. Korelasyon katsayısının ise 0,999'dan az olmaması gerekmektedir. Bununla birlikte minimum ve maksimum alanların % BSS değerleri %0,85'ten küçük bulunmuştur ve kabul kriterlerini sağlamıştır. Sonuçlar **Çizelge 3.65'** te verilmiştir. **Şekil 3.23'te** elde edilen regresyon grafiği görülmektedir.

Çizelge 3.65. Lifitegrast miktar tayini regresyon analizi sonuçları

Derişim (µg/ml)	Korelasyon katsayısı r, Limit: $\geq 0,999$	Regresyon Denklemi	[(y-kesim noktası x 100 / % seviyedeki alan] (%) Limit: $\leq 2,0\%$	Minimum ve Maksimum alanların % BSS değerleri Limit: $< \%0,85$	
				Min.	Maks.
0,0401- 0,0601	1,0000	$y = 23314660, x + 17243$	1,45	0,11	0,14



Şekil 3.23. Kalibrasyon eğrisi (Lifitegrast)

3.4.5.4. Doğruluk

Doğruluk çalışması için safsızlıkların geri kazanım analizleri yapılmıştır. Bu amaçla %50, %100 ve %150'lik numuneler hazırlanmış üçer enjeksiyonundan elde edilen verilere göre geri kazanımları hesaplanmıştır. Çizelge 3.66' da geri kazanımların kabul sınırları (%98-%102) aralığında bulunduğu görülmektedir. Güven aralığı ise 99,3 ve 101,1 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.66. Lifitegrast için geri kazanım sonuçları

Eklenen miktar, %	Derişim, %	Bulunan derişim $\pm$ SS, %	Geri Kazanım, %	% BSS
50	0,0400	0,0398 $\pm$ 0,03	99,4	0,50
100	0,0500	0,0498 $\pm$ 0,04	99,7	0,60
150	0,0603	0,0612 $\pm$ 0,03	101,6	0,30

3.4.2.5. Kesinlik

Sistem kesinliği için lifitegrast standart çözeltisinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen standart alanlarının %BSS değeri 2'den küçük olmalıdır. Bu sistemde bu değer 0,15 olarak bulunmuştur.

Metot kesinliği için ardışık altı numune enjeksiyonunun analizinden elde edilen alanların % BSS değeri de yine aynı şekilde 2’den küçük olmalıdır. **Çizelge 3.67**’de sonuçlar paylaşılmıştır. Metot kesinliğinde %95,0 güven aralığı kromatografik lifitegrast için %96,4-97,0 ve susuz solventsiz miktar için ise %98,9-99,5 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.67. Lifitegrast için kesinlik sonuçları

Yöntem Kesinliği	Lifitegrast Miktarı	
	Kromatografik	Susuz ve solventsiz
	96,7	99,2
Tekrar üretilebilirlik	96,6	99,1
Fark	0,1	0,1

3.4.2.6. Tekrar Edilebilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik

Bu işlemlerin sağlanabilmesi için belirlenen metot hem laboratuvar içi farklı gün, farklı analist, farklı cihaz ve farklı kolon ile gerçekleştirildi. Analizler aynı Lenvatinib şarjından hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada %95 güven aralığı kromatografik miktar için 96,0-97,2 ve susuz solventsiz miktar için 98,5-99,7 bulunmuştur. İki çalışmanın arasında fark olmadığının göstergesi farkın en az 2 olmasıdır. **Çizelge 3.67**’de paylaşıldığı gibi kabul kriterleri sağlanmıştır.

3.4.2.7. Sağlamlık

Sağlamlık çalışmasında metodun ufak değişimlerden etkilenmediğinin göstergesi olarak sistem uygunluk parametreleri ve lifitegrastın alıkonma zamanları (AZ) **Çizelge 3.68**’da incelenmiştir. Sonuçta metodun küçük değişimlerden etkilenmediği ispatlanmıştır.

Çizelge 3.68.Sağlamlık parametresi sistem uygunluk sonuçları

Koşullar	Alıkonma zamanı	%BSS	Kuyruklanma faktörü
Normal şartlar	5,4	0,23	1,00
Kolon akışı 1,1 mL/dk	5,0	0,29	1,00
Kolon akışı 1,3 mL/dk	5,9	0,30	0,99
Kolon sıcaklığı 32 °C	5,2	0,28	1,00
Kolon sıcaklığı 38 °C	5,6	0,29	0,98
Hareketli faz (64:36, h/h)	8,2	0,38	0,97
Hareketli faz (56:44, h/h)	3,9	0,35	1,04

3.4.2.8. Kararlılık

Bu parametrede numunenin çözelti içerisindeki kararlılığı araştırılmıştır. Başlangıç koşullarında elde edilen alanlara göre, numune alanlarının değişimi %2,0'den fazla olmadığında çözelti kararlılığından söz edilebilmektedir. Bu amaçla iki paralel numune 48 saat boyunca 5 °C'de analiz edilmiştir. **Çizelge 3.69'**de görüldüğü gibi standart 32 saat kararlı bulunmuştur.

Çizelge 3.69. Numunenin kararlılık sonuçları

Geçen Süre	Alanlar	Fark (%)
0.saat	1195425	U.Y.
1.saat	1192459	0,25
2.saat	1190016	0,46
3.saat	1187652	0,65
4.saat	1186902	0,72
6.saat	1185577	0,83
8.saat	1185174	0,86
10.saat	1183733	0,98
12.saat	1182594	1,07
16.saat	1180814	1,22
20.saat	1179735	1,32
24.saat	1178309	1,43
28.saat	1176488	1,59
32.saat	1174021	1,79
40.saat	1169188	2,19

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddeleri için safsızlık ve miktar tayini metotlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen metotların validasyonları ICH Q2A kılavuzuna göre tamamlanmıştır.

Lenvatinib molekülü için literatürde yapılan çalışmalar **Bölüm 1.5.1**'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar biyoanalitik, farmakokinetik çalışmalar olmakla birlikte çoğunlukla Lenvatinib miktar tayini metotlarının bulunduğu dikkat çekmektedir. Çalışmaların içinde safsızlıkların analizi için validasyonu gerçekleştirilen bir metot bulunmaktadır. Lenvatinib molekülünün bozunma ve sentez kaynaklı safsızlıklarının içinde genotoksik safsızlıkların varlığı düşük limitlerde analiz metotlarına gereksinim doğurmaktadır. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları **Bölüm 3.2.1, Çizelge 3.1**'de detaylı olarak incelenmiştir. Belirlenen metodun validasyonu ise başarıyla tamamlanmış ve bütün parametre analizleri **Bölüm 3.4.1**'de paylaşılmıştır. İlgili bileşikler metodu tek bir metot içerisinde üç adet genotoksik olmak üzere yedi adet safsızlık için **Çizelge 3.15**'te verildiği gibi 0,0051-0,614 µg/mL derişim aralığında analizi mümkün kılan; sağlam doğru ve kararlı bir validasyon metodu olduğu gösterilmiştir. Miktar tayini analizlerinin optimizasyonu ise **Bölüm 3.2.2, Çizelge 3.2**'de detaylı olarak incelenmiştir. Validasyonu tamamlanan bu metodun bütün parametreleri sağladığı **Bölüm 3.4.2**'de görülmektedir. Bu metot ise 0,0080- 0,0120 µg/mL'de analize imkan tanımaktadır. Düşük düzeylerde bile analize imkan veren bu valide metotların YPSK gibi daha kolay erişilebilen bir sistemde gerçekleştirilmesi literatüre ve endüstriye katkı sağlamaktadır.

Lifitegrast molekülü için literatür **Bölüm 1.5.2**'de incelendiğinde Lenvatinib molekülünden daha az analitik çalışmaya rastlandığı görülmektedir. Bulunan çalışmalar Lifitegrast'ın biyolojik sıvılar içerisinde tayinine odaklanmakla birlikte enantiyomerik safsızlığının tespiti için metotlar olsa da hem enantiyomerik hem de ilgili bileşikler için geliştirilen metotların validasyonlarına rastlanmamıştır. Bu amaçla optimizasyon çalışmaları **Bölüm 3.3.1**'de detaylı olarak incelenmiştir. Belirlenen metodun validasyonu ise başarıyla tamamlanmış ve bütün parametre analizleri **Bölüm 3.4.3**'te paylaşılmıştır. İlgili bileşikler metodu **Çizelge 3.44**'te verildiği gibi 0,006-0,752 µg/mL derişim aralığında analizi mümkün kılan; sağlam doğru ve kararlı bir validasyon metodu olduğu gösterilmiştir. Enantiyomerik safsızlık için ayrı bir metot geliştirilmiş ve optimizasyonu **Bölüm 3.3.2**' de detaylı olarak incelenmiştir. Enantiyomerik saflık metodunun validasyon sonuçları ise **Bölüm 3.4.4**'de

detaylı olarak paylaşılmıştır. Miktar tayini analizlerinin optimizasyonu ise **Bölüm 3.3.3**, **Çizelge 3.8**'de detaylı olarak incelenmiştir. Validasyonu tamamlanan bu metodun bütün parametreleri sağladığı **Bölüm 3.4.5**'te görülmektedir. Bu metot ise 0,0401- 0,06 µg/mL'de analize imkan tanımaktadır. Düşük düzeylerde bile analize imkan veren bu valide metotların YPSK gibi daha kolay erişilebilen bir sistemde gerçekleştirilmesi literatüre ve endüstriye katkı sağlamaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eşdeğer ilaç üretimlerinin maliyeti düşürmesi, piyasada hastaların erişebileceği ilaç miktarını arttırması sebebiyle önemlidir. Hem halk sağlığına katkısı hem de ülke ekonomilerine katkısı yadsınamaz bir gerçektir. İlaç etken maddelerinin üretimi ise maliyeti düşürdüğünden yine erişimi kolaylaştırması ve ülke ekonomilerine katkıları bakımından önemlidir. Hem ilaç ürünü hem de etken maddeler üretilirken ve sonrasında bütün analizlerinin tamamlanması geçmişte yaşanan ilaç kaynaklı faciaların tekrarlanmaması için önemlidir. Analitik çalışmaların hassas, doğru, sağlam ve kararlı olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında eşdeğer ilaç üretiminde kullanılmak üzere DEVA Holding A.Ş' de sentezlenen Lenvatinib ve Lifitegrast ilaç etken maddeleri için safsızlık ve miktar tayini metotlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle moleküller incelenmiş ve safsızlıkları belirlenmiştir. Safsızlıklar da yine aynı şekilde DEVA Holding A.Ş tarafından sentezlenerek karakterizasyonları literatüre uygun olduğu kanıtlandıktan sonra analizleri tamamlanarak tez çalışmasında kullanılmak üzere sağlanmıştır. Belirlenen moleküller için uygun olan ayırma yöntemleri değerlendirilmiştir. Safsızlıklar ve etken madde analizleri için YPSK tekniğinin kullanılması uygun bulunmuştur. Bunun sebebi YPSK ile kararlı, doğru, sağlam metotların geliştirilmesine ve geniş bir yelpazede moleküllerin hem ayrı ayrı hem de aynı anda ayırmasına imkan vermesidir. Bununla birlikte YPSK ulaşılabilir bir analiz tekniği olması sebebiyle hem literatüre katkı sağlaması hem de endüstriye kolay uygulanabilmesi açısından tercih edilmiştir. İlaç etken maddeleri ve belirlenen safsızlıklar literatür, ICH Q3A, ICH Q3B ve ICH M7'ye göre değerlendirilmiş ve safsızlık limitleri belirlenmiştir. Geliştirilen metotların validasyonları ICH Q2A kılavuzuna göre tamamlanmıştır.

Lenvatinib ilaç etken maddesi için; belirlenen üçü genotoksik olmak üzere yedi safsızlık için bir YPSK metodu, etken madde miktar tayini için bir adet olmak üzere toplamda iki adet metot geliştirilmiştir. Lifitegrast maddesi için bir enantiyomerik, bir miktar tayini belirlenen dört safsızlığı için de bir adet metot olmak üzere üç adet metot geliştirilmiştir. Farmakopelerde bulunmayan ve literatürde az bir çalışmaya sahip olan bu iki ilaç etken maddesi için hassas, doğru sağlam ve kararlı validasyon metotları hem literatüre hem de endüstriye katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Approval Package for Lenvima (Lenvatinib Mesilate), U.S. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Approval Date: 15 February 2015, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206947Orig1s000Approv.pdf, Eriřim Tarihi: 07.03.2024
- Approval Package for Xiidra (Lifitegrast ophthalmic solution 5%), U.S. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Approval Date: 22 January 2016, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208073Orig1s000OtherR.pdf, Eriřim Tarihi: 07.03.2024
- Assessment report. Lenvima: Lenvatinib mesilate, European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA/CHMP/ 250082/2015, 24 March 2015, https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/lenvima-epar-public-assessment-report_en.pdf, Eriřim Tarihi: 07.03.2024
- Bandla, J., & Ganapaty, S. (2018). New stability-indicating ultra performance liquid chromatography method development and validation of lenvatinib mesylate in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(9), 140–143. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i9.26766>
- Bercu, J. P., Masuda-Herrera, M., Johnson, G., Czich, A., Glowienke, S., Kenyon, M., ... & Rodrigues, M. A. C. (2021). Use of less-than-lifetime (LTL) durational limits for nitrosamines: Case study of N-Nitrosodiethylamine (NDEA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 123, 104926. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.104926>
- Çağatay G. ve Çobanoğlu Z., (1997) Risk İletişimi ve Risk Yönetimi, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 47, Sağlık Bakanlığı
- Debasish Swain, Narendra Kumar Nagendla, Mohana Krishna Reddy Mudiam. (2023). Identification and characterization of the forced degradation products of lenvatinib mesylate by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 191(108888). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108888>
- Dubbelman, A. C., Rosing, H., Thijssen, B., Gebretensae, A., Lucas, L., Chen, H., Shumaker, R., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2012). Development and validation of LC-MS/MS assays for the quantification of E7080 and metabolites in various human biological matrices. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 887–888, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.004>

- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2005) European Pharmacopeia- 5.10 Control of Impurities in Substances for Pharmaceutical Use. *Eur. Pharmacopoeia*, **5.0**: 559–561.
- Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., & Lloyd, D. (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation* (pp. 1–504). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68614-7>
- Giordani, A., Kobel, W., Gally, H. U. (2011). Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.004>
- Günaydın Akyıldız, A. (2020). Antineoplastik İlaç Lenvatinib Kaynaklı Kardiyotoksitenin Moleküler Etki Mekanizmaları Açısından İn Vitro İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. (Doktora Tezi)
- Håkonsen, H., & Toverud, E. L. (2019). Generic Drug Policies. *Encyclopedia of Pharmacy Practice and Clinical Pharmacy: Volumes 1-3*, 1–3, V2-130-V2-138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812735-3.00319-8>
- Higby, G. J., & Urick, B. Y. (2020). History of pharmacy. İçinde *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820007-0.00001-5>
- Hong, M., Li, S., Ji, W., Qi, M. H., & Ren, G. Bin. (2021). Cocrystals of lenvatinib with sulfamerazine and salicylic acid: Crystal structure, equilibrium solubility, stability study, and anti-hepatoma activity. *Crystal Growth and Design*, 21(7), 3714–3727. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00022>
- ICH Guideline M7 (R2), Step 5, Guideline on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, European Medicines Agency, EMA/CHMP/ICH/83812/2013, July 2023.
- ICH Guideline Q2 (R1), Step 5, Validation of analytical procedures: Text and methodology, European Medicines Agency, CPMP/ICH/381/95, June 1995.
- ICH Guideline Q3A (R2), Step 5, Impurities in new drug substances, European Medicines Agency, CPMP/ICH/2737/99, October 2006.
- ICH Guideline Q3B (R2), Step 5, Impurities in new drug products, European Medicines Agency, CPMP/ICH/2738/99, June 2006.
- ICH, Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria, European Medicines Agency, CPMP/ICH/2738/99, May 2000.

- Janssen, J. M., de Vries, N., Venekamp, N., Rosing, H., Huitema, A. D. R., & Beijnen, J. H. (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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.034>
- Kannaiyan, R., & Mahadevan, D. (2018). A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert review of anticancer therapy*, 18(12), 1249-1270. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>
- Lakshmi Kanth M, Raj Kamal B (2019). RP-HPLC Method Development and Validation for Estimation of Lenvatinib In Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *American Journal of PharmTech Research*, 9(3), 123–132. <https://doi.org/10.46624/ajptr.2019.v9.i3.008>
- Madaraboina, M., Reddy, B. S., Kumar Boddupalli, V. S., Reddy, P. S., Anireddy, J. S., Budhdev, R. R., Bandichhor, R., & Achanta, S. (2023). Development of a Practical and Scalable Process for Lifitegrast. *Organic Process Research and Development*, 27(11), 2035–2044. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00228>
- Mano, Y., & Kusano, K. (2015). A validated LC-MS/MS method of total and unbound lenvatinib quantification in human serum for protein binding studies by equilibrium dialysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.008>
- Milne, C. P., & Cabanilla, L. A. (2006). Orphan drugs and generics. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 1, 655–680. <https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00024-9>
- Prasanna S.A, Kumar M. S., R. V. V. K. and S. M. (2019). Stability Indicating UPLC Method Development and Validation of Lenvatinib. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences-*, 9(3), 605–614. <https://doi.org/10.46624/ajptr.2019.v9.i1.007>
- Panigrahy, U. P., & Reddy, A. S. K. (2015). A novel validated RP-HPLC-DAD method for the estimation of Lenvatinib Mesylate in bulk and pharmaceutical dosage form. *J Chem Pharm Res*, 7(9), 872-881.
- Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*, 144(March), 19–50. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>
- Pannu, S., Bhatia, R., & Kumar, B. (2022). A validated method developed for estimation of Lifitegrast in bulk and pharmaceutical dosage form by UV-Spectrophotometer and RP-HPLC. *Austin J. Anal. Pharm. Chem*, 9(1), 1140.
- Schlumberger, M., Tahara M., Wirth L. J., Robinson B., Brose M.S., Elisei R., Habra M.A. et al.

- "Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer." *New England Journal of Medicine* 372, no. 7 (2015): 621-630. DOI: 10.1056/NEJMoa1406470
- Scott, L. J. (2015). Lenvatinib: First global approval. *Drugs*, 75(5), 553–560. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0383-0>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Siddiqui, M. R., Al Othman, Z. A., Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409–S1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>
- Tauber, J., Karpecki, P., Latkany, R., Luchs, J., Martel, J., Sall, K., Raychaudhuri, A., Smith, V., & Semba, C. P. (2015). Lifitegrast ophthalmic solution 5.0% versus placebo for treatment of dry eye disease results of the randomized phase III OPUS-2 study. *Ophthalmology*, 122(12), 2423–2431. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2015.08.001>
- Teasdale, A. (2009). Genotoxic Impurities. İçinde *Organic Process Research & Development* (C. 13, Sayı 3). <https://doi.org/10.1021/op900098m>
- World Health Organization. (2020). *Hazard identification and characterization: Toxicological and human studies (Section 4.5 Genotoxicity, Second Edition)* (pp. 1–121). Retrieved from https://cdn.who.int/media/docs/default-source/food-safety/publications/section4-5-genotoxicity.pdf?sfvrsn=8ec3434_2
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 105(2), 140–156. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21096>
- Veni, G. K., Ajitha, A., & Abbulu, K. (2020). Bioanalytical method development and validation of lenvatinib by rp-hplc method. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 27, 3313-3319.
- Yildizhan, H., Barkan, N. P., Turan, S. K., Demiralp, Ö., Demiralp, F. D. Ö., Uslu, B., & Özkan, S. A. (2018). Treatment strategies in cancer from past to present. In *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (pp. 1–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00001-X>

EKLER

