T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

KABOZANTİNİB VE İLGİLİ BİLEŞİKLERİNİN AKTİF İLAÇ ETKEN MADDESİNDE TAYİNİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRMESİ VE VALİDASYONU

ÇAĞAN AĞTAŞ

1.DANIŞMAN
DOÇ. DR. PELİN KÖSEOĞLU YILMAZ
2. DANIŞMAN
DOÇ. DR. ESEN BELLUR ATİCİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2025

TEZ ONAYI

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çağan AĞTAŞ

(İmza)

İTHAF

Bu çalışmayı, sevgileri ve destekleriyle her zaman yanımda olan, bana cesaret ve ilham veren sevdiklerime adıyorum.

Canım oğlum **Toprak Ağtaş**, hayatıma neşe ve anlam katıyorsun. Ailemizin temel taşı, her anımda yanımda olan sevgili eşim **Hayal Ağtaş**, varlığın en büyük desteğim. Ailemizin en değerli armağanı, sevgili kızımız **Ada Ağtaş**, seninle birlikte hayatımız daha da güzelleşecek. Değerli rehberlerim, sevgili annem **İpek Ağtaş** ve babam **Celal Ağtaş**, verdiğiniz sevgi, emek ve öğretiler için minnettarım.

Bu tez, sizin desteklerinizle gerçekleşti ve sizlere adandı. Sizleri seviyorum ve sonsuz teşekkür ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen Tez Danışmanlarım Doç.Dr. Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ ve Doç.Dr. Esen BELLUR ATİCİ'ye, bilgisi ve yönlendirmeleriyle çalışmalara ışık tutan, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmalar süresince laboratuvar olanaklarından yararlandığım Deva Holding'e, destekleriyle ilerlememi sağlayan Pelin KAYGU'ya teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İ
İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Renal Hücreli Karsinom ve Farklılaşmış Tiroid Kanseri ve Tedavisi 4
2.1.1. Renal Hücreli Karsinom 4
2.1.2. Tedavisi 4
2.1.3. Farklılaşmış Tiroid Kanseri 5
2.1.4. Tedavisi 6
2.2. Klinik Farmakolojisi 6
2.2.1. Etki mekanizması 6
2.2.2. Farmakokinetiği 7
2.2.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 7
2.3. ICH Kalite Klavuzları 7
2.3.1. ICH M7 8
2.3.2. ICH Q3 10
2.4. Kromatografik Yöntemler 11
2.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi 11
2.4.2. Kolon Kromatografisi 12
2.4.3. Sıvı Kromatografisi 12
2.4.4. Gaz Kromatografisi 13
2.4.5. Süper kritik akışkan kromatografisi 14

2.5. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler 14
3. GEREÇ VE YÖNTEM 17
3.1. Referans Standartlar 17
3.1.1. NMR 17
3.1.2. IR 17
3.1.3. UPLC-PDA-QDA 18
3.2. Aletler ve Diğer Gereçler 19
3.3. Kimyasal Reaktifler 21
3.4. Kullanılan standartlar 22
3.5. Çözeltiler 26
3.5.1. İlgili Bileşikler için Hareketli Fazlar, Standartlar ve Numunenin Hazırlığı 26
3.5.2. Miktar Tayini için Hareketli Fazlar, Standartlar ve Numunenin Hazırlığı 30
3.6. Bozundurma Çalışmaları 30
3.7. Geliştirme Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Analitik Yöntemler 31
3.7.1. İlgili Bileşikler 31
3.7.2. Miktar Tayini 36
3.8. Metot Validasyon Yöntemi 38
3.8.1. İlgili Bileşikler Validasyon Yöntemi 38
3.8.1.1. Sistem Uygunluk Testi 38
3.8.1.2. Seçicilik 39
3.8.1.3. Nicelik ve Nitelik Sınırları (LOQ ve LOD) 42
3.8.1.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 43
3.8.1.5. Geri Kazanım (Doğruluk) 48
3.8.1.6. Metot Kesinliği ve Laboratuvarlar Arası Kesinlik 53
3.8.1.7. Çözelti Stabilitesi 54
3.8.1.8. Sağlamlık 54
3.8.1.9. Bağıl Alan Faktörü 55
3.8.2. Miktar Tayini Validasyon Yöntemi 55
3.8.2.1. Seçicilik 55
3.8.2.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 56
3.8.2.3. Doğruluk 57
3.8.2.4. Sistem kesinliği – Metot kesinliği – Laboratuvarlar arası kesinlik 58
3.8.2.5. Sağlamlık 58

3.8.3. Bozundurma Çalışması 59
4. BULGULAR 63
4.1. Metot Geliştirme 64
4.1.1. Detektör Seçimi 64
4.1.2. Kolon seçimi 65
4.1.3. Hareketli faz ve pH seçimi 66
4.1.4. Organik faz seçimi 67
4.1.5. Akış hızı ile kolon ve numune sıcaklığının seçimi: 67
4.1.6. Gradient seçimi 67
4.2. İlgili Bileşikler Validasyon Yöntemi 68
4.2.1. Sistem uygunluk testi 68
4.2.2. Seçicilik 70
4.2.3. Nicelik ve Nitelik Sınırları (LOQ ve LOD) 73
4.2.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 79
4.2.5. Geri Kazanım (Doğruluk) 94
4.2.6. Metot kesinliği ve Laboratuvarlar arası kesinlik 105
4.2.7. Çözelti Stabilitesi 108
4.2.8. Sağlamlık 111
4.2.9. Bağıl Alan Faktörü 113
4.3. Miktar Tayini Validasyon Yöntemi 113
4.3.1. Seçicilik 113
4.3.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı 114
4.3.3. Doğruluk 115
4.3.4. Sistem kesinliği – Metot kesinliği – Laboratuvarlar arası kesinlik 116
4.3.5. Sağlamlık 118
4.4. Bozundurma Çalışması 118
5. TARTIŞMA 125
KAYNAKÇA 131
HAM VERİLER 136
İNTİHAL RAPOR FORMU 162

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: İlaç etken maddesindeki organik safsızlıkların raporlama, tanımlama ve limit hesaplama kriterleri 10

Tablo 3-1: Kabozantinib ve safsızlıklarının kimyasal yapıları ve bilgileri 22

Tablo 3-2: Bozundurma şartları ve maruziyet süreleri 31

Tablo 3-3: İlgili bileşikler için validasyon çalışmasında kullanılan kabul değerleri 36

Tablo 3-4: Sistem uygunluk testi için hazırlanan enjeksiyon tablosu 38

Tablo 4-1: Sistem uygunluk sonuçları 70

Tablo 4-2: İlgili bileşikler yöntemi için seçicilik parametresine ait sonuçlar 71

Tablo 4-3: Tüm safsızlıkların limit seviyede derişimlerinden elde edilen sinyal-gürültü (S/N) oranları 75

Tablo 4-4: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları 75

Tablo 4-5: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları 76

Tablo 4-6: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları 76

Tablo 4-7: Nitellik ve Nicellik bulguları 77

Tablo 4-8: Kabo-1 için doğrusallık sonucu. 79

Tablo 4-9: Kabo-Asit için doğrusallık sonucu. 80

Tablo 4-10: Kabo-2 için doğrusallık sonucu. 81

Tablo 4-11: Kabo-1-dimetil için doğrusallık sonucu. 82

Tablo 4-12: Kabo-1-dietil için doğrusallık sonucu. 83

Tablo 4-13: Kabo-N-Oksit için doğrusallık sonucu. 84

Tablo 4-14: Kabo-Metilester için doğrusallık sonucu. 85

Tablo 4-15: Kabo-Dimer için doğrusallık sonucu. 86

Tablo 4-16: Kabo-desfloro için doğrusallık sonucu. 87

Tablo 4-17: Kabo-1-Dimer için doğrusallık sonucu. 88

Tablo 4-18: Bis(kabo)fenoksiamit için doğrusallık sonucu. 89

Tablo 4-19: Kabozantinib için doğrusallık sonucu. 90

Tablo 4-20: Kabo-1 ve Kabo-Asit için aralık bulguları 91

Tablo 4-21: Kabo-1-dimetil ve Kabo-1-dietil için aralık bulguları 92

Tablo 4-22: Kabo-N-Oksit ve Kabo-Metilester için aralık bulguları 92

Tablo 4-23: Kabo-Dimer ve Kabo-desfloro için aralık bulguları 93

Tablo 4-24: Kabozantinib ve Kabo-1-dimer için aralık bulguları 93

Tablo 4-25: Bis(kabo)fenoksiamit ve Kabo-2 için aralık bulguları 94

Tablo 4-26: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1 safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 95

Tablo 4-27: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Asit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 96

Tablo 4-28: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimetil safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 97

Tablo 4-29: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dietil safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 98

Tablo 4-30: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-N-Oksit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 99

Tablo 4-31: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dimer safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 100

Tablo 4-32: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimer safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları 101

Tablo 4-33: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-desfloro safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları 102

Tablo 4-34: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Metilester safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 103

Tablo 4-35: İlgili bileşikler yönteminde Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 104

Tablo 4-36: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-2 safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları. 105

Tablo 4-37: Kabo-1-Dimer için kesinlik ve laboratuvarlar arası kesinlik bulguları. 106

Tablo 4-38: Kabo-2 için kesinlik ve laboratuvarlar arası kesinlik bulguları. 107

Tablo 4-39: Standart çözeltisi için stabilite bulguları. 108

Tablo 4-40: Kabo-1 ve Kabo-Asit çözeltisi için stabilite bulguları. 108

Tablo 4-41: Kabo-1-dimetil ve Kabo-1-dietil çözeltisi için stabilite bulguları. 109

Tablo 4-42: Kabo-N-Oksit ve Kabo-Metilester çözeltisi için stabilite bulguları. 109

Tablo 4-43: Kabo-Dimer ve Kabo-desfloro çözeltisi için stabilite bulguları. 110

Tablo 4-44: Kabo-1-Dimer ve Bis(kabo)fenoksiamit çözeltisi için stabilite bulguları. 110

Tablo 4-45: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları ve sistem uygunluk değerleri. 111

Tablo 4-46: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları. 111

Tablo 4-47: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları. 112

Tablo 4-48: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları. 112

Tablo 4-49. Bağıl alan faktörü ve alan düzeltme faktörü sonuçları. 113

Tablo 4-50. Kabozantinib için seçicilik verisi. 114

Tablo 4-51. Kabozantinib miktar tayini yöntemi için doğrusallık verileri. 114

Tablo 4-52. Kabozantinib miktar tayini yöntemi için doğruluk verileri 115

Tablo 4-53. Kabozantinib miktar tayini sistem kesinliği verileri 116

Tablo 4-54. Kabozantinib miktar tayini metot ve laboratuvarlar arası kesinlik verileri 117

Tablo 4-55. Sağlamlık verileri 118

Tablo 4-56. Numune çözeltisi için çözelti stabilitesi bulguları. 118

Tablo 4-57. Kabozantinib'in bozundurma çalışmasına ait miktar tayini ve safsızlık sonuçları (Sonuçlar % olarak verilmiştir). 119

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1-1: Kabozantinib'in kimyasal yapısı 2

Şekil 2-2-1: Kabozantinib'in etki mekanizması 5

Şekil 3-1: Waters UPLC-PDA-QDA (MS) sistemi 18

Şekil 4-1: UV detektör ile elde edilmiş örnek kromatogram 64

Şekil 4-2: MS detektör ile elde edilmiş örnek kromatogram 65

Şekil 4-3: Acquity HSS T3 ile elde edilmiş kromatogram 66

Şekil 4-4: Sistem uygunluk kromatogramı 68

Şekil 4-5: Kabozantinib standart kromatogramı 69

Şekil 4-6: Kabo-2 standart kromatogramı 69

Şekil 4-7: Tek tek tüm safsızlıkların blank ile çakıştırılmış kromatogramı 72

Şekil 4-8: 10 bilinen safsızlık ve kabozantinib'in limit derişimdeki kromatogramı. 73

Şekil 4-9: Kabo-2 hariç diğer bilinen safsızlıklar ve kabozantinib'e ait nitellik (LOD) kromatogramı 77

Şekil 4-10: Kabo-2 hariç diğer bilinen safsızlıklar ve kabozantinib'e ait nicellik (LOQ) kromatogramı 78

Şekil 4-11: Kabo-2 nitellik (LOD) kromatogramı 78

Şekil 4-12: Kabo-2 nicellik (LOQ) kromatogramı 79

Şekil 4-13: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1 safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 80

Şekil 4-14: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Asit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 81

Şekil 4-15: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-2 safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 82

Şekil 4-16: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dimetil safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 83

Şekil 4-17: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dietil safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 84

Şekil 4-18: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-N-Oksit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 85

Şekil 4-19: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Metilester safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 86

Şekil 4-20: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimer safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 87

Şekil 4-21: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-desfloro safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 88

Şekil 4-22: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-Dimer safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 89

Şekil 4-23: İlgili bileşikler yönteminde Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 90

Şekil 4-24: İlgili bileşikler yönteminde Kabozantinib safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu. 91

Şekil 4-25: Miktar tayini için seçicilik kromatogramı 113

Şekil 4-26: Kabozantinib'in kalibrasyon doğrusu 115

Şekil 4-27: Kabozantinib'in hidroliz ve oksidasyon bozundurması şeması 120

Şekil 4-28: Kabozantinib'in bozundurmaya uğramamış numune kromatogramı 121

Şekil 4-29: Kabozantinib'in asit ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı .. 121

Şekil 4-30: Kabozantinib'in baz ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı. . 122

Şekil 4-31: Kabozantinib'in ısı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı. ... 122

Şekil 4-32: Kabozantinib'in H_2O_2 ile hazırlanmış blank kromatogramı 122

Şekil 4-33: Kabozantinib'in H_2O_2 ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı. 123

Şekil 4-34: Kabozantinib'in su ve ısı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı. 123

Şekil 4-35: Kabozantinib'in görünür bölge ışık ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı 123

Şekil 4-36: Kabozantinib'in UV ışığı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı 124

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Kabozantinib: KBZ

MeOH: Metanol

ACN: Asetonitril

RHK: Renal Hücreli Karsinom

RAI: Radyoaktif İyot

TKİ: Tirozin Kinaz İnhibitörü

HSK: Hepatoselüler Karsinom

MET: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü

VEGFR2: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

FTK: Farklılaşmış Tiroid Kanseri

EMA: Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı

EP: Avrupa Farmakopesi

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

USP: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (United States Pharmacopeia)

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

UPLC: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

XIC: Seçilmiş iyonizasyon Kromatogramı (Extracted Ion Chromatogram)

LC-MS: Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografisi

LOD: Gözlenebilme sınırı

Kf: Kuyruklanma Faktörü

LOQ: Tayin Sınırı

Sys: Sistem uygunluk

Rs: Ayrım gücü

s/n: sinyal / gürültü oranı

BSS: Bağıl Standart Sapma

tR: Alıkonma Zamanı

SS: Standart Sapma

ÖZET

Ağtaş, Ç. (2025). Kabozantinib ve ilgili bileşiklerinin aktif ilaç etken maddesinde tayini için stabilite göstergeli analitik yöntem geliştirmesi ve validasyonu İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kabozantinib, medüller tiroid kanseri ve renal hücreli karsinomu tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. Bu doktora tezi çalışmasının amacı, aktif maddenin üretim prosesi, stres ve stabilite testi koşulları altında kabozantinib'in bozunmasının araştırılmasıdır. Bu kapsamda stabilite gösteren, spesifik, hassas ve doğru bir UPLC-UV-MS sıralı metodu geliştirildi ve valide edildi. Kabozantinib'in ilgili maddelerinin analizleri için Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (150 × 2,1 mm, 1,7 µm) kolonu kullanıldı ve analizler 20°C numune ve 30°C kolon sıcaklıklarında 2 µL enjeksiyon hacmiyle gerçekleştirildi. Kabozantinib'in miktar tayini analizleri için Waters Acquity UPLC BEH C_8 (100 × 2,1 mm, 1,7 µm) kolonu kullanıldı ve analizler 20°C numune ve 35°C kolon sıcaklıklarında 2 µL enjeksiyon hacmiyle gerçekleştirildi. Her iki yöntemde de hareketli faz A: 30 mM amonyum format çözeltisi (suda, pH 4,5) ve B: asetonitril olmak üzere iki bileşenli bir mobil faz kullanıldı. İlgili maddelerin analizi için, 240 nm dedeksiyon dalga boyunda 20 dakika boyunca 0,3 mL/dak akış hızında bir gradient elüsyon sistemi uygulanırken, miktar tayini analizi için; 240 nm dedeksiyon dalga boyunda 6 dakika boyunca 0,4 mL/dak akış hızında izokratik elüsyon uygulandı. Kalibrasyon eğrileri, her bir bileşik için yüksek R-kare (R^2) değerleri ile mükemmel doğrusallık gösterdi. Stres ve fotostabilite çalışmaları, kabozantinib'in yüksek sıcaklık (80°C, 13 gün), gün ışığı ve UV radyasyonuna karşı dayanıklı olduğunu ve tüm hidroliz ve oksidasyon koşulları altında önemli bozulma gösterdiğini ortaya koydu. Bu çalışmada bildirilen ilgili maddeler, UPLC-UV-MS yöntemi ile analiz edilmiş olup, potansiyel genotoksik safsızlık Kabo-2, ICH M7'ye göre sınıf 2 olarak kabul edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kabozantinib, bozunma, UPLC-UV-MS tandem, stabilite göstergeli yöntemler, validasyon, stres testi çalışmaları.

ABSTRACT

Ağtaş, Ç. (2025). Development and Validation of a Stability-Indicating Analytical Method for the Determination of Cabozantinib and Its Related Compounds in Active Pharmaceutical Ingredients. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Doctorate Thesis. Istanbul.

Cabozantinib is a drug used to treat medullary thyroid cancer and renal cell carcinoma. This doctoral thesis aims to investigate the degradation of cabozantinib under active pharmaceutical ingredient manufacturing, stress, and stability test conditions. A stability-indicating, specific, sensitive, and accurate UPLC-UV-MS tandem method was developed and validated. For the analysis of related substances, a Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (150 × 2.1 mm, 1.7 µm) column was used with a sample temperature of 20°C, column temperature of 30°C, and injection volume of 2 µL. For assay analysis, a BEH C_8 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm) column was used at 20°C sample and 35°C column temperatures with a 2 µL injection volume. Both methods used a mobile phase: A (30 mM ammonium formate in water, pH 4.5) and B (acetonitrile). Related substances were analyzed using a gradient elution at 0.3 mL/min for 20 minutes at 240 nm, while assay analysis used isocratic elution at 0.4 mL/min for 6 minutes at the same wavelength. Calibration curves showed excellent linearity with high R^2 values for each compound. Stress and photostability studies revealed that cabozantinib is stable under high temperature (80°C, 13 days), daylight, and UV radiation, and showed significant degradation under all hydrolytic and oxidative conditions. The related substances identified in this study were analyzed using the UPLC-UV-MS method. The potential genotoxic impurity Kabo-2 was classified as Class 2 according to ICH M7.

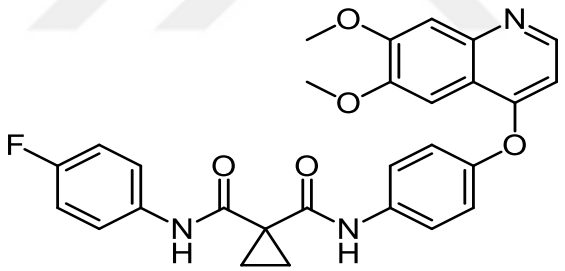
Keywords: Cabozantinib, degradation, UPLC-UV-MS tandem, stability-indicating methods, validation, stress testing studies.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve metastazlarla vücudun çeşitli bölgelerine yayılmasıyla ölümcül sonuçlara yol açan bir hastalıktır. Böbrek kanseri, dünya genelinde kanser vakalarının yalnızca %2'sini oluşturmasına rağmen, en yaygın tür olan Renal Hücreli Karsinom (RHK), tüm böbrek kanseri vakalarının %80 ila %85'ini temsil etmektedir [1]. Bu türün çoğunluğu, şeffaf hücreli tip olup, tanı konan hastaların çeyreği ise maalesef metastatik aşamada tespit edilmektedir. VHL genindeki mutasyonlar, anjiogenezin hızlanmasıyla ilişkilendirilerek ortaya çıkan bu tümör, bilhassa karmaşık bir biyolojik sürecin ürünüdür [2,3]. Erkeklerde en sık görülen 9. kadınlarda ise 14. sırada yer alan RHK, özellikle gelişmiş ülkelerde daha yüksek bir insidans oranına sahiptir, bir anlamda modern yaşamın gölgesinde yükselmektedir [4,5]. Bu coğrafi farklılık, risk faktörlerinin yaygınlığı ve görüntüleme tekniklerinin daha fazla kullanımıyla açıklanabilir. Örneğin, trikloretilen, kadmiyum, arsenik, radon ve nitrat gibi çevresel ve mesleki kanserojen maddelere daha fazla maruz kalınması, gelişmiş ülkelerde RHK vakalarının daha sık görülmesine sebep olmaktadır [6]. RHK vakalarının görülme sıklığı yaşla birlikte artarak 70 yaşına kadar tüm ırk gruplarında en yüksek düzeye ulaşır. Erkeklerde kadınlara göre RHK gelişme olasılığı daha yüksektir ve genel olarak insidans oranı 2:1'dir [7]. RHK'nin bu yaygınlığına rağmen, son yıllarda hastaların iyileşme şansı önemli ölçüde artmıştır. Özellikle metastatik renal hücreli karsinom (mRHK) hastalarının medyan genel sağ kalım süresi son 13 yıl içinde yaklaşık 12 aydan 30 aya çıkmıştır. Bu gelişmenin arkasındaki başlıca neden, dolaşımdaki vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) ve VEGF reseptörlerini hedef alan monoklonal antikorlar ve tirozin-kinaz inhibitörleri gibi antianjiyojenik ajanların kullanımına dayanmaktadır. Hastalığın tedavi evrimi ilginç bir seyir izlemiştir. 1980'lerde sitokin bazlı tedavilere yönelik yaklaşımlar ön plandayken, 2007'ye gelindiğinde tirozin kinaz inhibitörleri sahneye çıkmış ve tedavi stratejilerinde önemli bir değişiklik yaratmıştır. Bevasizumab, sunitinib, pazopanib, kabozantinib, lenvatinib ve axitinib gibi ilaçlar bu tedavi sürecinde önemli rol oynamaktadır [8,9].

Bu bağlamda, aktif farmasötik içerik (API) kavramı büyük önem taşır. API, bir ilacın etkili bileşenini temsil eder ve ilacın terapötik etkisini sağlar. Bu nedenle, API'nin doğru şekilde tanımlanması ve analiz edilmesi, ilaç geliştirme süreçlerinin kritik bir parçasıdır. Yanlış belirlenmiş veya saf olmayan bir API, hastalar için ciddi sağlık riskleri oluşturabilir.

Kabozantinib, Exelixis adlı öncü bir Amerikan biyoteknoloji şirketi tarafından pazara sunulan, fenilamin kökenli ve bir siklopropilüre parçasını içeren bir kinaz inhibitörüdür. Molekül yapısı, antikanser etkisiyle öne çıkan bir fenoksi grubunu barındıran kinolin halkası ile karakterizedir (Şekil 1.1). Bu özel bileşen, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından farklılaşmış tiroid kanseri (FTK), ilerlemiş renal hücreli karsinom (RHK), ve hepatoselüler karsinom (HSK) tedavisi için onaylanmıştır [3]. Tedavi süreçlerinde kullanılan ilaç, FTK için Cometriq® kapsül formunda, RHK ve HSK için ise Cabometyx® tablet formunda piyasada bulunmaktadır. Her iki formülasyonun günlük maksimum alım dozları, biyoyararlanımlarındaki farklılıklardan dolayı değişiklik göstermektedir. Cometriq® kapsül için günlük maksimum doz 140 mg, Cabometyx® tablet için ise 60 mg olarak belirlenmiştir [10].



Şekil 1-1: Kabozantinib'in kimyasal yapısı

Bu doktora tez çalışmasının temel hedefi, kabozantinib etken maddesinin miktar tayinini gerçekleştirmek ve bu etken maddeye ait bileşiklerin hassas analizlerini gerçekleştirmektir. Günümüzde farmasötik bilim dallarında giderek daha fazla önem kazanan bu tür analizler, özellikle kabozantinib gibi karmaşık yapıdaki moleküllerin içerdiği safsızlıkların belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu tez çalışması, kabozantinib'in aktif maddesine yönelik yeni, seçici ve son derece hassas bir UPLC-UV-MS sıralı analiz yönteminin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu yöntem, ilgili bileşiklerin belirlenmesinde yüksek çözünürlük ve doğruluk sağlayarak, ilaç geliştirme ve üretim süreçlerinde önemli bir katkı sunacaktır. Ayrıca, bu yöntem sayesinde

kabozantinib'in stabilitesi, saflığı ve bozunma ürünleri gibi farmasötik kalite kontrol süreçlerinde hayati öneme sahip parametrelerin değerlendirilmesi mümkün olacaktır. Ek olarak kabozantinib'in sentezi sırasında oluşabilecek proses safsızlıklarının ve stres koşulları altında (asidik, bazik, nötral hidroliz, UV ışığı, termal ve oksidatif stres gibi) ortaya çıkabilecek bozunma ürünlerinin kromatografik olarak ayrılması ve tanımlanması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, geliştirilen analitik yöntemlerin validasyonu yapılarak, yöntemlerin tekrarlanabilirliği, doğruluğu ve hassasiyeti gibi parametrelerin uluslararası standartlara uygunluğu sağlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Renal Hücreli Karsinom ve Farklılaşmış Tiroid Kanseri ve Tedavisi

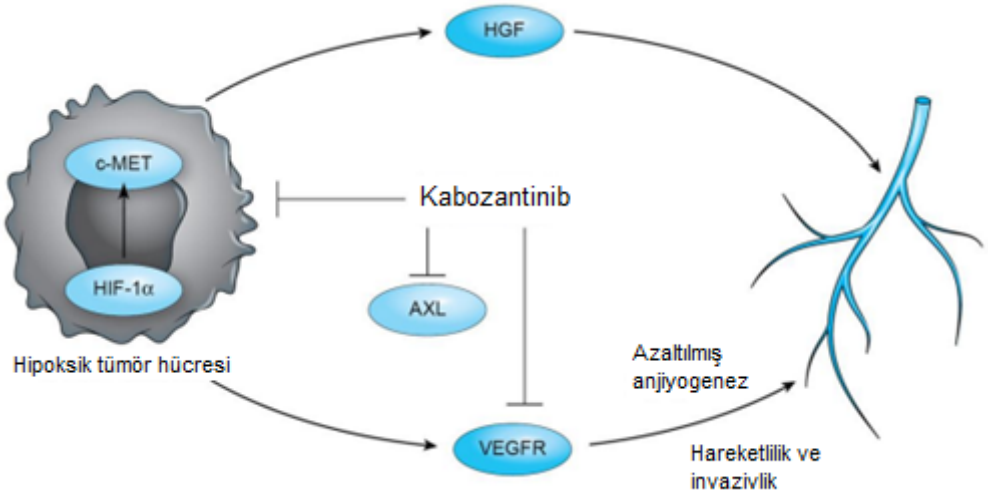
2.1.1. Renal Hücreli Karsinom

Böbrek kanseri, özellikle Batı ülkelerinde sağlık sistemlerine önemli bir yük getiren yaygın bir ürolojik malignitedir [11]. 2018 yılında Avrupa'da 99.000'den fazla yeni vaka ve 39.000 ölüm gerçekleşmiştir [12]. Kuzey ve Batı Avrupa'da son otuz yılda ölüm oranlarında bir düşüş görülse de, Avrupa Birliği'nin bazı bölgelerinde ölüm oranları artış göstermektedir [13]. Hastaların yaklaşık %25-30'u metastatik hastalıkla başvurmaktadır ve bu hastaların hayatta kalma süreleri sınırlı olabilmektedir [14]. Sigara, obezite ve hipertansiyon böbrek kanseri için iyi bilinen risk faktörleridir. Alkol tüketimi ve diyabetin risk faktörleri olup olmadığı ise tartışmalıdır. Bu risk faktörlerinin böbrek kanseri ölüm oranları üzerindeki etkisi de bilinmemektedir. Bununla birlikte, birçok risk faktörü yaşam tarzı değişiklikleriyle modifiye edilebilmekte ve bu durum önleyici tedbirlerin sağlık açısından faydalar sağlayabileceğini göstermektedir [15,16].

2.1.2. Tedavisi

Bu kombinasyon, CheckMate 9ER (ileri evre renal hücreli karsinom tedavisi için yürütülen önemli bir faz 3 klinik çalışması) faz 3 çalışmasında ileri evre RHK tedavisinde standart tedavi olan sunitinib ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, kabozantinib ve nivolumab kombinasyonunun genel sağkalım (OS), progresyonsuz sağkalım (PFS) ve objektif yanıt oranı (OYO) gibi temel klinik sonuçlarda sunitinib'den daha üstün olduğunu göstermiştir. Üç yıllık takipte, kombinasyon tedavisi gören hastalarda genel sağkalım süresi 49,5 ay iken, sunitinib grubunda bu süre 35,5 aydır. Bu, kabozantinib'in özellikle metastatik RHK hastalarında immünoterapi ile birlikte kullanıldığında sağkalımı önemli ölçüde uzattığını göstermektedir [17].

Ek olarak, bu kombinasyonun hastalarda daha yüksek tam yanıt oranlarına ve tümör boyutunda anlamlı küçülmelere yol açtığı bildirilmiştir (%55,7). Sunitinib grubunda ise yanıt oranı %28,4 olarak belirlenmiştir. Kabozantinib'in VEGF ve MET gibi farklı yolları hedeflemesi, tümörün beslenme ve büyüme süreçlerini daha etkili bir şekilde durdurmasını sağlamaktadır bkz Şekil 2-2-1. Ayrıca, bu kombinasyonun yan etkileri yönetilebilir düzeydedir; en sık karşılaşılan yan etkiler arasında karaciğer enzimlerinde yükselme, ishal ve el-ayak sendromu yer alır [3,18].



Şekil 2-2-1: Kabozantinib'in etki mekanizması

2.1.3. Farklılaşmış Tiroid Kanseri

Farklılaşmış tiroit kanseri (FTK), en yaygın tiroit kanseri türlerinden biri olup, papiller ve folliküler tiroit kanserlerini kapsar. Tiroit bezinin foliküler hücrelerinden kaynaklanan bu kanser türleri, genellikle yavaş ilerler ve iyi prognoz gösterir. FTK, dünya genelinde tiroit kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur ve özellikle kadınlarda daha sık görülür. Bu kanser türü, tiroit hücrelerinin normal fonksiyonlarını büyük ölçüde koruduğu ve bu nedenle radyoaktif iyot tedavisine yanıt verebildiği için diğer tiroit kanserlerine kıyasla daha iyi tedavi edilebilir.

Farklılaşmış tiroit kanserleri genellikle boyunda ağrısız bir kitle veya nodül ile kendini gösterir. Lenf nodu metastazları yaygın olup, vakaların yaklaşık %30-50'sinde görülür. Folliküler tiroit kanseri genellikle kan yoluyla akciğerler ve kemik gibi uzak organlara metastaz yaparken, papiller tiroit kanseri daha çok lokal lenf nodlarına yayılır [19].

2.1.4. Tedavisi

Farklılaşmış tiroit kanseri (FTK), erken evrelerde genellikle cerrahi ve radyoaktif iyot (RAI) tedavisi ile tedavi edilebilmektedir. Ancak ileri evre, metastatik ya da RAI'ye dirençli durumlarda ilaçlı tedavi seçenekleri ön plana çıkmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) bu tedavi seçeneklerinin temelini oluşturur ve FTK'nin moleküler hedeflerine yönelerek tümör gelişimini baskılar.

Kabozantinib, ileri evre tiroit kanseri tedavisinde kullanılan etkili bir tirozin kinaz inhibitörüdür. MET, VEGFR2 ve RET gibi çeşitli tirozin kinazları inhibe ederek, tümör büyümesini, metastazı ve anjiyogenezi (yeni kan damarlarının oluşumu) baskılar [20].

Yapılan klinik çalışmalarda, kabozantinib tedavisi, radyoaktif iyot tedavisine dirençli ve ilerlemiş FTK vakalarında progresyonsuz sağkalım süresini anlamlı derecede uzatmıştır. Bu ilacın kullanımı, özellikle metastatik FTK tedavisinde önemli bir seçenek haline gelmiştir. Ayrıca, BRAF veya RET mutasyonları gibi spesifik genetik profillerle ilişkili kanserlerde de etkinliği araştırılmaktadır [21].

Kabozantinib'in yanı sıra, farklılaşmış tiroit kanserinde kullanılan diğer TKİ'ler arasında Sorafenib ve Lenvatinib de bulunmaktadır. Sorafenib, ilk geliştirilen TKİ'lerden biri olup, hem tümör hücre proliferasyonunu hem de anjiyogenezi inhibe eder. Lenvatinib ise sorafenib'e alternatif olarak kullanılan etkili bir ilaçtır ve ilerlemiş FTK vakalarında kanserin progresyonunu durdurmada etkilidir [22].

Sonuç olarak, kabozantinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörleri, özellikle radyoaktif iyot tedavisine dirençli ve ileri evre FTK vakalarında yeni tedavi seçenekleri sunmaktadır. Bu ilaçlar, hastalığın progresyonunu yavaşlatmak ve sağkalımı uzatmak için etkili bir tedavi yöntemi olup, hastalığın biyolojik ve genetik özelliklerine göre kişiye özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

2.2. Klinik Farmakolojisi

2.2.1. Etki mekanizması

Kabozantinib, çeşitli tirozin kinaz reseptörlerini inhibe ederek tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastaz süreçlerini engelleyen bir inhibitördür. Özellikle MET (hepatosit büyüme faktörü reseptörü) ve VEGFR2 (vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2) gibi hedeflere bağlanarak, tümör hücre proliferasyonunu azaltır ve apoptotik hücre ölümünü teşvik eder [18].

2.2.2. Farmakokinetiği

kabozantinib oral yoldan alındığında yüksek plazma proteinlerine bağlanma oranına sahiptir (≥%99,7). İlacın biyotransformasyonu karaciğerde CYP3A4 enzimi tarafından gerçekleştirilir. kabozantinib'in eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 110 saattir. İlacın %54'ü feçes, %27'si ise idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır [23].

2.2.3. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kabozantinib'in kimyasal adı N-(4-((6,7-Dimetoksiokinolin-4-il)oksi)fenil)-N'-(4-florofenil)siklopropan-1,1-dikarboksamid'dir. Moleküler formülü $C_{28}H_{24}FN_3O_5$ ve moleküler ağırlığı 501,514 g/mol'dür. Fiziksel özellikleri arasında düşük suda çözünürlük ve yüksek lipofiliklik bulunmaktadır. Bu özellikler, biyoyararlanımını etkileyerek farmakokinetik davranışlarını belirler.

2.3. ICH Kalite Klavuzları

İlaç etken maddeleri ve farmasötik formlarının stabilite testleri, ilacın çevresel etkilere karşı dayanıklılığını belirlemek ve güvenli kullanım sürelerini tespit etmek açısından büyük önem taşır. Bu çalışmalarda, ICH Q1A ve Q1B kılavuzları standart oluşturur. ICH Q1A, ilaçların stabilite izlemi için kapsamlı bir çerçeve sunarken, ICH Q1B ise fotostabilite testlerinin detaylarını tanımlar. Ayrıca, ICH Q3 kılavuzu, ilaçlarda bulunabilecek safsızlıkların kabul edilebilir sınırlarını belirleyerek, ürün kalitesi ve güvenliği açısından önemli bir rehberlik sağlar. ICH M7 kılavuzu ise, ilaçlardaki potansiyel genotoksik safsızlıkların değerlendirilmesi ve kontrol altına alınması için gereken yöntemleri tanımlar. Stabilite testlerinin temel amacı, bir ilacın zaman içinde sıcaklık, nem ve ışık gibi faktörlerle nasıl bir değişim geçirdiğine dair bilimsel veriler sağlamaktır. Bu süreç, aynı zamanda ilaçların raf ömrünü ve uygun saklama koşullarını belirleme açısından kritik rol oynar.

Oda koşullarında saklanması gereken ürünlerde hızlandırılmış stabilite testleri, 6 ay boyunca 40 °C±2 °C sıcaklık ve %75±%5 bağıl nemde yapılır ve belirli aralıklarla örnek alınarak analiz edilir. Uzun dönem stabilite çalışmaları ise daha düşük sıcaklık ve nem seviyelerinde, daha geniş zaman dilimleri içinde gerçekleştirilir. Bu süreçte belirlenen analiz kriterleri doğrultusunda ürünlerin kalitesinde bozulma olup olmadığı değerlendirilir. Soğuk zincir gerektiren ürünlerde ise 25 °C±2 °C sıcaklık ve %60±%5 bağıl nem koşullarında hızlandırılmış 6 aylık çalışma, 5 °C±3 °C sıcaklık koşullarında 12 aylık uzun dönem stabilite takibinin yapılması gerekmektedir. Stabilite verileri, ilaçların

piyasaya sunulma öncesinde ve sonrasında düzenli olarak gözden geçirilerek raf ömrü tahminlerinin doğruluğunu sağlamak amacıyla izlenir. ICH Q3A ve M7 kılavuzları, bu süreçte ürün kalitesi ve güvenliği açısından ek bir güvence sağlayarak, ilaçların etkinliğini ve güvenilirliğini artırır [24-26].

İlaç etken maddelerinin (API) üretimi sırasında veya depolama koşullarında oluşabilecek safsızlıklar, sürecin kendisinden ya da bozunmalardan kaynaklanabilir [27-30]. Bu safsızlıkların miktarı, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) tarafından belirlenen kılavuzlar çerçevesinde kontrol edilerek güvenli seviyelerde tutulur. ICH kılavuzları, yeni bilimsel bulgular ve teknolojik gelişmelere göre sürekli güncellenir. API kalitesini belirlemede önemli olan saflık analizleri, bu analizlerin nasıl doğrulanacağı (validasyon) ve safsızlıkların hangi sınırlarla izleneceği ICH kılavuzlarında detaylı olarak açıklanır [31-33]. Özellikle mutajenik ve kanserojen potansiyel taşıyan safsızlıklar, ICH M7 bölümünde sınıflandırılır ve bu risk durumuna göre kontrol limitleri belirlenir. Hastaların güvenliğini sağlamak amacıyla, potansiyel kanserojen bileşikler için bir toksikolojik endişe eşiği (TTC) belirlenmiş olup, kısa vadeli kullanımlarda (1 aydan az kullanım) 120 µg/gün, orta vadeli kullanımlarda (1-10 yıl arası kullanım) 10 µg/gün ve uzun vadeli kullanımlarda (10 yıldan fazla kullanım) 1,5 µg/gün olarak kabul edilmiştir [34].

2.3.1. ICH M7

ICH M7, ilaç geliştirme süresince oluşabilecek potansiyel mutajenik safsızlıkları değerlendirmek ve kontrol altına almak amacıyla geliştirilmiş bir kılavuzdur. Bu süreç, DNA'ya zarar vererek kanser riski oluşturabilecek maddelerin saptanmasına odaklanır [35].

ICH M7, bakteriyel mutajenite (Ames) testleri, literatürler ve veri tabanları aracılığıyla elde edilen bilgileri kullanarak bir bileşiğin mutajenik riskini belirlemeyi amaçlar. Ayrıca yapı-aktivite İlişkileri (SAR) değerlendirmeleri ve benzeri yöntemlerle, mutajenik potansiyeli olmayan veya düşük olan bileşikleri sınıflandırmayı hedefler [36]

Bu kılavuzunda belirtilen sınıflandırma, bir safsızlığın mutajenik potansiyeline dayanmaktadır ve 5 sınıfta değerlendirilir [37].

Yüksek Risk (Sınıf-1): Bilinen mutajenik karsinojenler,

Bu gruptaki safsızlıklar, güçlü mutajenik özellikler taşıyıp genellikle kanserojen etki gösterebilir. Bu tür maddelerin kullanımı ve bunlara maruz kalma durumu titizlikle denetlenmelidir.

Orta Risk (Sınıf-2): Karsinojen riski bilinmeyen mutajenler,

Bu grup, belirli koşullar altında mutajenik özellikler gösterebilen safsızlıkları kapsamaktadır. Bu safsızlıkların Ames test sonuçları pozitifken, kanserojenlikleri hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu sebeple, bu tür maddelerin daha titiz bir şekilde değerlendirilmesi ve kontrol altında tutulması önem arz etmektedir.

Düşük Risk (Sınıf-3): Etken maddenin yapısı ile ilgili olmayan tehlikeli yapılar,

Bu gruptaki safsızlıkların büyük bir kısmı genellikle mutajenite verileriyle kanıtlanmamaktadır. Eğer Ames testi pozitif sonuç verirse, bu durumda sınıf 2 olarak sınıflandırılır; negatif sonuç alındığında ise sınıf 5 olarak değerlendirilir.

Küçük İnceleme ile Yönetim Gerektiren (Sınıf-4): Etken maddenin yapısı ile benzer tehlikeli yapılar

Bu kategori, ilaç etken maddesiyle kimyasal olarak benzerlik gösteren ve mutajenite testlerinden negatif sonuç alan safsızlıkları içerir. Bu safsızlıklar, mutajenik olmayan olarak sınıflandırılır.

İstenmeyen (Sınıf-5): Tehlikeli yapı barındırmayan

Bu kategori, ilaç etken maddesiyle kimyasal olarak benzerlik gösteren ve mutajenite testlerinden negatif sonuç alan safsızlıkları içerir. Bu safsızlıklar, mutajenik olmayan olarak sınıflandırılır.

Mutajenik ve karsinojenik özellikli bilinen genotoksik safsızlıkların kontrol limitleri maruziyet süresi ile değişmektedir.Bölüm 2.3.'de bu safsızlıklar için kontrol limitleri verilmiştir.

Genotoksik safsızlıklarının limit hesaplamalarında bu değerlerden yararlanılır. Kabo-2 için izin verilen alım limit 10 yıldan az kullanıldığı için 10 µg/gün seçilir.

Kabozantinib'in günlük maksimum alım dozu 140 mg dır [10]. Kabozantinib içerisindeki Kabo-2 safsızlık limiti aşağıdaki şekilde hesaplanabilir:

$$\frac{10\ \mu g/gün}{0{,}140\ g/gün} = 71\ ppm$$

Yukardaki hesaba göre kabozantinib içerisinde Kabo-2 safsızlığı en fazla 71 ppm yani %0,0071 oranında bulunabilir. Bu değerin üzerinde ise hasta sağlığı açısından tehlike oluşturabilir [37].

2.3.2. ICH Q3

Organik safsızlıklar, organik reaksiyonların tam verimle gerçekleşmemesi nedeniyle ortaya çıkabilir. Bu durumda, reaksiyona girmeyen başlangıç maddeleri ürün içerisinde kalıntı olarak bulunabilir. Bu tür kalıntılar, genellikle beklenen safsızlıklar olarak kabul edilir. Özellikle çok basamaklı reaksiyonlarda, ilk basamakta kullanılan başlangıç maddelerinin kalıntıları, reaksiyonun ilerleyen aşamalarında farklı bir safsızlığa dönüşerek nihai üründe yer alabilir. Ayrıca, ilaç etken maddelerinin ürün formuna dönüştürülmesi sırasında kullanılan yardımcı maddelerle etkileşim sonucu da yeni safsızlıklar oluşabilir. Bu nedenle, safsızlıkların kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ve sınıflandırılması büyük önem taşır. [38]

Organik safsızlıklar kategorisinde; izomerler, yan ürünler, başlangıç maddeleri, bu maddelerin ileri reaksiyon ürünleri ve bozunma ürünleri gibi çeşitli safsızlık türleri yer alır. İlaç etken maddesi içerisinde izin verilen organik safsızlık limitleri Tablo 2-1'de, belirtilmiştir.

Tablo 2-1: İlaç etken maddesindeki organik safsızlıkların raporlama, tanımlama ve limit hesaplama kriterleri

Maksimum Günlük Alım Dozu	Raporlama Eşiği	Tanımlama Eşiği	Hesaplama Eşiği
≤2 g/gün	%0,05	%0,10 veya 1,0 mg/gün (hangisi daha küçükse)	%0,15 veya 1,0 mg/gün (hangisi daha küçükse)
>2 g/gün	%0,03	%0,05	%0,05

2.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, ilk kez 1903 yılında Michael Tsvett tarafından keşfedilmiş bir yöntem olup, çeşitli karışımların bileşenlerini ayırmak için farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Zamanla teknolojinin ilerlemesiyle bu teknik de gelişmiş ve analitik kimyanın birçok farklı alanında uygulama bulmuştur [39]. Yunanca'dan gelen "renk" ve "yazmak" anlamına gelen kromatografi terimi, karışım bileşenlerinin, hareketli bir fazda sabit bir yüzey üzerinden geçerken adsorpsiyon temelli olarak ayrılması sürecini tanımlar. Kromatografi, özellikle ilaç etken maddelerinin ve farmasötik formların geliştirilmesinde, kalite kontrolü, doz hesaplamaları ve safsızlık tayininde önemli bir rol oynar. Yöntem, uygulama şekline ve hareketli fazın türüne göre farklı kategorilere ayrılır ve organik kimya laboratuvarlarında reaksiyon takibi ve saflaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılır.

Kromatografik yöntemler, kullanım alanına göre farklı türlere ayrılmaktadır. İnce tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi, özellikle organik kimya laboratuvarlarında sentetik reaksiyonların izlenmesi ve saflaştırma işlemlerinde sıkça tercih edilir. Bu yöntemler, ayrılmak istenen bileşenlerin hareketli fazın türüne bağlı olarak sıvı, gaz veya süper kritik akışkan kromatografisi gibi farklı sistemlerde uygulanmasına olanak tanır [40].

2.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK), bileşenlerin ayrılması için kullanılan basit ve etkili bir analitik tekniktir. Bu yöntemde, taşıyıcı malzeme olarak genellikle cam veya alüminyum plaka kullanılır. Plakanın yüzeyi, sabit faz olarak görev yapan ince bir adsorban tabakasıyla kaplanır. Çözünmüş analit, hareketli faz olarak bilinen bir çözücü sisteminde uygulanır ve bu fazla etkileşime girer. Farklı bileşenlerin hareketli fazda sürüklenme hızları, polarlık ve diğer fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişir. Bu farklı hızlar sayesinde analit bileşenleri, plaka üzerinde spotlar halinde ayrılır [41].

İnce tabaka kromatografisi, organik kimya, gıda bilimi, boya analizi ve tarım gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, özellikle düşük maliyetli ve hızlı sonuçlar elde etme avantajı sunar. İTK, genellikle kalitatif analiz için tercih edilse de, nicel analizler için de kullanılabilir [42].

2.4.2. Kolon Kromatografisi

Kolon Kromatografisi, sabit fazın bir kolon içerisinde yerleştirildiği ve analitleri içeren hareketli fazın bu sabit fazdan geçirilerek ayrıldığı bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir. Bu yöntem, karışım halindeki birçok bileşeni etkili bir şekilde birbirinden ayırma imkanı sunar. Kolondaki sabit fazın özellikleri ve kolonun uzunluğu değiştirildiğinde, ayrım gücü artırılabilir. Genellikle bu yöntem, numunelerin saflaştırılması ve bileşenlerin izolasyonu için tercih edilir. Bunun yanı sıra, bileşenlerin kimyasal bileşimlerinin belirlenmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Kromatografik teknikler, hareketli fazın türüne göre üç ana gruba ayrılır: sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süper kritik akışkan kromatografisi. Bu teknikler, gıda, ilaç, boya, otomotiv ve madencilik gibi çeşitli endüstrilerde analitik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Her bir yöntem, spesifik analitik ihtiyaçlara yönelik özelleştirilmiş ayırma çözümleri sunar. Sonuç olarak, kromatografik yöntemler, endüstriyel uygulamalarda etkili ve güvenilir ayırma çözümleri sağlamak için önemli bir araçtır [43].

2.4.3. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi, çeşitli bileşenlerin ayrılması ve analizi için kullanılan etkili bir teknik olup, birçok bilimsel ve endüstriyel alanda yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu yöntem, genellikle karmaşık karışımlardaki bileşenlerin ayrılmasını sağlamak için kullanılır ve özellikle ilaç, gıda ve çevre analizlerinde önemli bir rol oynamaktadır.

Sıvı kromatografisi, iki ana fazın etkileşimi üzerine kuruludur: hareketli faz ve sabit faz. Sabit faz, genellikle polar veya apolar özelliklere sahip bir malzeme olarak kolon içinde bulunurken, hareketli faz bir çözücü veya çözücü karışımıdır. Analiz sırasında, karışımdaki bileşenler sabit faz ile etkileşime geçer ve farklı hızlarla kolon boyunca ilerler. Bu farklı hareket hızları, bileşenlerin ayrılmasına olanak tanır.

Sıvı kromatografisi, normal faz ve ters faz olarak iki türe ayrılır. Normal fazda, polar sabit faz kullanılırken apolar hareketli faz kullanılır; ters fazda ise apolar sabit faz ve polar hareketli faz uygulanır. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi modern sistemler, analitik hassasiyeti artırmak için farklı dedektörler ve kolon seçenekleri sunar. HPLC, mobil fazın kolona iletilmesinde yüksek basınçlar kullanarak daha hızlı ve verimli analizler yapılmasını sağlar [44,45].

Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC), zaman ve kimyasal madde tasarrufu sağlamaya yönelik geliştirilmiş bir teknolojidir ve yüksek çözünürlük sunar. HPLC sistemleri, UV, elektrokimyasal ve kütle dedektörleri gibi çeşitli dedektörlerle desteklenerek, farklı bileşenlerin tespiti ve analizi için esneklik sağlar. Bu özellikler, sıvı kromatografisini günümüz laboratuvarlarında vazgeçilmez bir araç haline getirir [46,47].

2.4.4. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi, karmaşık karışımlardaki bileşenlerin ayrılması ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, gaz halindeki analitler, sabit faz olarak görev yapan kapiler kolon üzerinden taşınan hareketli bir gaz ile ayrılır. Gaz kromatografisinde, analiz edilen bileşenlerin buharlaşabilen formda olması gerekmektedir; bu sayede, bu bileşenler farklı sıcaklık ve akış koşullarında kolon içerisinde birbirlerinden ayrılır.

Kapiler kolon teknolojisinin gelişimi, gaz kromatografisinde çok düşük konsantrasyonların tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Analiz sırasında, buharlaşabilen bileşenler, azot veya helyum gibi gazlarla kolon boyunca sürüklenir. Ayrılan bileşenler, uygun bir dedektör kullanılarak ölçülen sinyallere dönüştürülür ve standartlarla karşılaştırılarak analizin doğruluğu sağlanır [48,49].

Gaz kromatografisinde çeşitli dedektör türleri kullanılmaktadır; bunlar arasında alev iyonlaştırıcı dedektör, elektron yakalama dedektörü, termal iletkenlik dedektörü ve kütle dedektörü yer alır. Her dedektör, belirli uygulama alanları için optimize edilmiş olup, numune türü ve analit özelliklerine göre en uygun dedektör seçilerek analiz gerçekleştirilir [50].

Örnek içindeki analit dışındaki bileşenlerin etkisini azaltmak ve daha net bir kromatogram elde etmek amacıyla, numuneler belirli bir sıcaklıkta ısıtılarak buharlaştırılır. Buhar fazındaki numune, kolona enjekte edilirken, bu tür enjeksiyonlar, numuneden kaynaklanan gürültüyü azaltarak daha düşük gözlenebilirlik sınırlarına ulaşılmasına olanak tanır. Gaz kromatografisi, bu özellikleri sayesinde birçok endüstriyel ve bilimsel uygulamada güvenilir ve etkili bir analiz aracı olarak kullanılmaktadır [51]

2.4.5. Süper kritik akışkan kromatografisi

Son dönemlerde geliştirilen sistemlerde, hareketli faz olarak kritik sıcaklık ve basınçta bulunan karbondioksit kullanılmaktadır. Apolar bir özellik gösteren karbondioksit, polar sabit faz sistemleri ile birleştirilerek normal faz sıvı kromatografisine benzer analizler yapma imkanı sağlamaktadır. Süper kritik akışkan kromatografisi (SFC) sistemleri, kiral merkez içeren ilaç etken maddelerindeki potansiyel enantiyomerik safsızlıkların ayrılmasına yönelik yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Normal faz HPLC sistemlerinde yapılan enantiyomerik ayrımlar, pik keskinliği ve ayrım performansı açısından ters faz HPLC sistemlerindeki kadar etkili değildir. Ancak, normal fazda gerçekleştirilen enantiyomerik ayrımlar, gelişmiş kolon teknolojileri ve SFC sistemlerinin entegrasyonu ile artık ters faz HPLC sistemleriyle benzer düzeyde ayrım performansı sunabilmektedir. UPLC sistemine entegre edilen bir SFC sistemi, düşük akış hızlarında karbondioksit tüketimi sağlayarak hem hareketli faz kullanımını hem de maliyetleri önemli ölçüde azaltmıştır. Bu yenilikler, analitik süreçlerin verimliliğini artırarak modern laboratuvar uygulamalarında önemli avantajlar sunmaktadır [52,53].

2.5. Geliştirilmiş Analitik Yöntemler

Literatür araştırmasında, kabozantinibin analitik metotları tarandığında büyük çoğunluğun biyoanalitik yöntemler olduğu bununla beraber aktif maddenin analizine yönelik metotlar çok sınırlı ve yetersiz olduğu saptandı. Aşağıda belirtilen çalışmalara ait özet bilgiler mevcuttur.

Kuna ve arkadaşları (2019) [54], kabozantinib'in aktif farmasötik bileşenleri ve farmasötik dozaj formlarında kantitatif analizini gerçekleştirmek için yeni bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmiştir. Çalışmada, BDS C18 kolonu kullanılarak potasyum dihidrojen fosfat ve asetonitril (55:45) mobil faz oranıyla ayrım yapılmıştır. Mobil fazın akış hızı 1,0 mL/dakika ve tespit dalga boyu 210 nm olarak belirlenmiştir. Kabozantinib'in alıkonma zamanı 2,932 dakika, doğrusallık aralığı 5-30 µg/mL ve korelasyon katsayısı 0,9998 olarak saptanmıştır. Yöntem, ICH kılavuzlarına uygun olarak sistem uygunluğu, doğrusal aralık, doğruluk, kesinlik, saptama ve miktar belirleme sınırları ile validasyon edilmiştir. Kesinlik, gün içi ve günler arası %BSS değerinin 0,2 olmasıyla gösterilirken, doğruluk oranları %98,98 ile %100,49 arasında bulunmuştur. Ayrıca, LOD değeri 0,03 µg/mL ve miktar LOQ değeri 0,10 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Wu ve arkadaşları, (2014) [55], tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kabozantinib'in stres koşullarındaki bozunma kinetiği incelenmiştir. Bu çalışmada, ters fazlı HPLC sistemi ve TOF-MS ve MS/MS detektörleri kullanılarak analizler yapılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril 20mM amonyum asetat karışımından oluşmaktadır (57:43, h/h/). C18 (250mm, 4,6mm, 5µm) kolonu kullanılarak ayrım gerçekleştirilmiş ve mobil fazın akış hızı 1,0 mL/dakika ve tespit dalga boyu 243 nm olarak belirlenmiştir. Kabozantinib'in alıkonma zamanı 11,15 dakika, doğrusallık aralığı 0,05-60 µg/mL ve korelasyon katsayısı 0,9999 olarak saptanmıştır. Ayrıca, LOD değeri 0,01 µg/mL ve LOQ değeri 0,05 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Venkateshwarlu ve Patel (2022) [56], tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kabozantinibin LC-MS/MS ile tayini üzerine metot geliştirilmiştir. Bu çalışmada, ters fazlı HPLC sistemi ve MS/MS detektörleri kullanılarak analizler yapılmıştır. Mobil faz olarak %0,2 formik asit ve asetonitril karışımından oluşmaktadır (40:60, h/h/). C18 X-Bridge (150 mm, 2,1 mm, 3,5µm) kolonu kullanılarak ayrım gerçekleştirilmiş ve mobil fazın akış hızı 0,12 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 µL olarak belirlenmiştir. Kabozantinib'in alıkonma zamanı 1,34 dakika, doğrusallık aralığı 5-75 ng/mL ve korelasyon katsayısı 0,999 olarak saptanmıştır. Ayrıca, LOD değeri 1,5 ng/mL ve LOQ değeri 5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Ashok ve Mondal (2018) [57], kabozantinib'in farmasötik dozaj formlarında stabiliteye duyarlı bir kantitatif analiz gerçekleştirmek için ultra-performanslı sıvı kromatografi (UPLC) yöntemi geliştirmiştir. Çalışmada, Acquity UPLC Hibar C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) kolon kullanılarak %0,1 ortofosforik asit ve asetonitril (55:45 h/h) mobil faz oranında izokratik modda ayrım sağlanmıştır. Mobil fazın akış hızı 0,3 mL/dakika, kolon sıcaklığı 30°C ve tespit dalga boyu 244 nm olarak belirlenmiştir. Kabozantinib'in alıkonma zamanı 1,3 dakika olup, doğrusal aralığı 20-120 µg/mL ve korelasyon katsayısı 0,9997 olarak saptanmıştır. Yöntem, ICH kılavuzlarına uygun olarak kesinlik (%BSS 0,3), doğruluk (%99,57-99,91 geri kazanım), seçicilik, sağlamlık ve çözelti stabilitesi açısından valide edilmiştir. Zorlayıcı bozunma çalışmaları ise kabozantinib'in çeşitli stres koşullarında stabil olduğunu göstermiştir.

Alam ve arkadaşları (2021) [58], farmasötik dozaj formlarında bulunan kabozantinib'in kantitatif analizini gerçekleştirmek için çevreci bir ters faz yüksek performanslı ince tabaka kromatografi (RP-HPTLC) ve normal faz yüksek performanslı ince tabaka kromatografi (NP-HPTLC) yöntemi geliştirmiştir. Çalışmada, RP-HPTLC analizinde mobil faz olarak asetone/su (%85:15) kullanılırken, NP-HPTLC analizinde etil asetat/etanol (%97,5:2,5) mobil faz oranı tercih edilmiştir. Her iki yöntemde de analiz, λmax = 247 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kabozantinib'in retansiyon faktörü (Rf) RP-HPTLC için 0,41 ve NP-HPTLC için 0,20 olarak bulunmuştur. Yöntem, ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak doğrusal aralık (10–1000 ng/bant ve 50–600 ng/bant), kesinlik (%0,73-2,59 CV) ve doğruluk (%97,60-103,24) gibi parametreler açısından valide edilmiştir. RP-HPTLC yöntemi, NP-HPTLC yöntemine kıyasla daha yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlamıştır ve rutin analizlerde kullanılabilecek bir yöntem olarak önerilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması boyunca yöntem geliştirme ve doğrulama çalışmaları için kullanılan standart maddeler, DEVA Holding A.Ş. (Tekirdağ, Türkiye) AR-GE laboratuvarlarında sentezlenmiş ve nükleer manyetik rezonans (NMR), kütle spektrometrisi (MS) ve kızılötesi spektroskopi (IR) gibi tekniklerle analiz edilmiştir. Kabozantinib ve ilgili safsızlıkların 1H, 13C NMR, IR ve MS verileri Ham Veriler bölümünde yer almaktadır. Bu tez çalışması Deva Holding A.Ş çerkezköy üretim fabrikası API&ARGE laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Referans Standartlar

Kabozantinib, Kabo-2, Kabo-1, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Desfloro-kabo, Kabo-1-dimer ve Bis(kabo)fenoksiamit referans standartlarının yapıları, kimyasal isimleri, molekül ağırlıkları ve %saflık bilgileri Tablo 3-1'de verilmiştir. Yapı tayininde kullanılan teknikler, cihaz bilgileri ve reaktifler bölüm 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

3.1.1. NMR

Kabozantinib, Kabo-2, Kabo-1, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-1-dimer ve Bis(kabo)fenoksiamit standartlarının NMR karakterizasyonları 400 MHz (JEOL Ltd, Tokyo, Japanya), sistemlerinde gerçekleştirilmiştir. NMR çözücüleri olarak protonize su (D_2O, protonize dimetil sülfoksit (DMSO-d6) ve protonize kloroform (CDCl3) (Merck, KGaA, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada Bis(kabo)fenoksiamit standardı ilk kez sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır

3.1.2. IR

Referans standartların IR spektrumları katı numune ölçümü ile 600 – 4000 cm^{-1} aralığında ATR FT-IR, (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) spektroskopisinde yapılmıştır.

3.1.3. UPLC-PDA-QDA

Sentezlenen referans standartlardan kabozantinib, Kabo-2, Kabo-1, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer ve Kabo-1-dimer için kütle doğrulamaları Waters Acquity QDA LC-MS (Waters Corporation, Milford, MA, Amerika) sisteminde ESI (+) modunda gerçekleştirilmiştir. Bis(kabo)fenoksiamit ise ESI (–) modunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-1: Waters UPLC-PDA-QDA (MS) sistemi

3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1) UPLC Cihazı (Waters Corporation, Milford, MA, ABD):

ACQ PDA Dedektör Ünitesi

ACQ QDA MS Detektör Ünitesi

ACQ FTN Kolon Isıtma Ünitesi

ACQ QSM Pompa Ünitesi

Empower 3 UPLC Yazılımı (2002 - 2019, BN 3771, Waters Corporation, Milford, MA, BD).

MS Windows 10 Professional Edition

2) Yazılımlar:

MS Office 2010 Excel

MS Office 2010 Word

Cambridge ChemDraw programı (Cambridge, ABD)

3) UPLC Kolonları:

Waters Acquity BEH C18 (150 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) (Waters, Dublin, Ireland)

Waters Acquity BEH C8 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) (Waters, Dublin, Ireland)

Waters Acquity HSS T3 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm) (Waters, Dublin, Ireland)

4) Millipore Gradiyent Su Saflaştırma Sistemi (Massachusetts, ABD)

5) Millipore numune süzme filtresi 0,45 µm (Massachusetts, ABD)

6) Atlas Suntest CPS (+) Fotostabilite Kabini (Chicago, ABD)

7) Mettler-Toledo seven easy pH metre (Greifensee, İsviçre)

8) Karıştırıcılar:

Heidolph Manyetik Karıştırıcı MR 3001 (Schwabach, Almanya)

9) Analitik Teraziler

Sartorius LA 200 Terazi (Goettingen, Almanya)

Sartorius Genius Terazi (Goettingen, Almanya)

10) Eppendorf Otomatik Pipetler (Hamburg, Almanya)

20-200 µl

100-1000 µl

500-5000 µl arasında

11) Elma Ultrasonik Banyo (Singen, Almanya)

12) Waters Vida kapaklı HPLC Vialleri 2 ml (Massachusetts, ABD)

13) Cam Malzemeler:

Isolab Balonjoje (5, 10, 20, 50, 100 mL) (Wertheim, Almanya)

Isolab Mezür (500 ml, 1000 mL) (Wertheim, Almanya)

3.3. Kimyasal Reaktifler

Validasyon çalışmalarında kullanılan reaktifler aşağıda listelenmiştir.

Amonyum format (HPLC saflıkta) (Merck KGaA, Almanya)

Hidrojen peroksit (Merck KGaA, Almanya)

Formik asit (HPLC saflıkta) (Merck KGaA, Almanya)

Dimetilsülfoksit (HPLC saflıkta) (Merck KGaA, Almanya)

Sodyum hidroksi (HPLC saflıkta) (Merck KGaA, Almanya)

Hidroklorik asit (%37 lik) (HPLC saflıkta) (Merck KGaA, Almanya)

Asetonitril (J.T.Baker, Phillipsburg, Amerika)

Metanol (J.T.Baker, Phillipsburg, Amerika)

Yüksek saflıkta su (Millipore, Bedford, MA, Amerika)

Kabo-Asit safsızlığı (SD-Labs, Amerika)

Kabo-N-Oksit safsızlığı (SD-Labs, Amerika)

Kabo-desfloro safsızlığı (SD-Labs, Amerika)

Kabozantinib referans standart (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-2 safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-1 safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-1-dimetil safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-1-dietil safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-Metilester safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

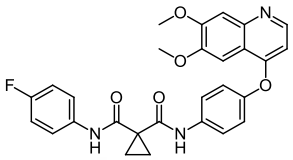
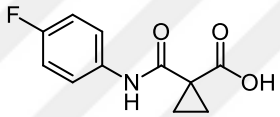
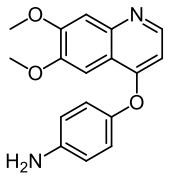
Kabo-Dimer safsızlığı (Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

Kabo-1-dimer safsızlığı(Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

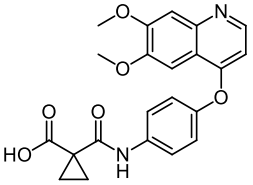
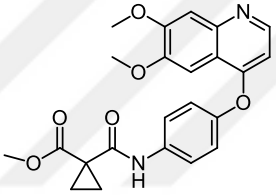
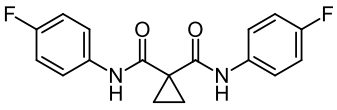
Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı(Deva Holding A.Ş, Tekirdağ, Türkiye)

3.4. Kullanılan standartlar

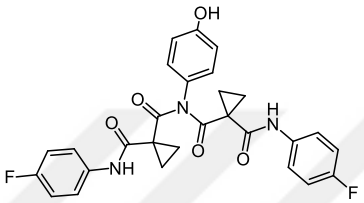
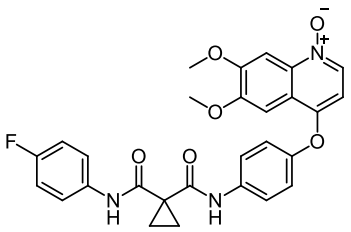
Tablo 3-1: Kabozantinib ve safsızlıklarının kimyasal yapıları ve bilgileri

Standart Adı	**Kabozantinib**
Kimyasal adı	N-(4-((6,7-Dimetoksikinolin-4-il)oksi)fenil)-N-(4-florofenil)siklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	501,51
CAS No	849217-68-1
%Saflık	98,8
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-1**
Kimyasal adı	1-((4-Florofenil)karbamoil)siklopropankarbonik asit
Mol kütlesi (g/mol)	223,20
CAS No	849217-48-7
%Saflık	100,0
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-2**
Kimyasal adı	4-((6,7-Dimetoksikinolin-4-il)oksi)anilin
Mol kütlesi (g/mol)	296,32
CAS No	190728-25-7
%Saflık	98,2
Yapısı	

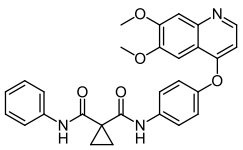
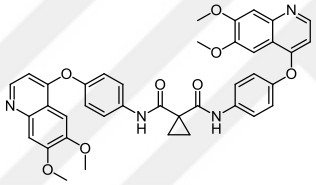
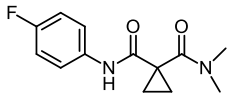
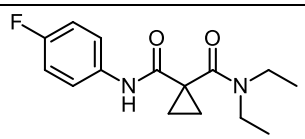
Tablo 3-1: (Devamı) Kabozantinib ve safsızlıklarının kimyasal yapıları ve bilgileri

Standart Adı	**Kabo-Asit**
Kimyasal adı	1-((4-((6,7-Dimetoksikinolin-4-il)oksi)fenil)karbamoyl)siklopropankarbonik asit
Mol kütlesi (g/mol)	408,40
CAS No	UY
%Saflık	99,4
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-Metilester**
Kimyasal adı	Metil 1-((4-((6,7-dimetoksikinolin-4-il)oksi)fenil)karbamoyl)siklopropankarbonat
Mol kütlesi (g/mol)	422,43
CAS No	1584696-82-1
%Saflık	99,1
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-1-Dimer**
Kimyasal adı	N,N'-bis(4-florofenil)siklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	316,30
CAS No	1431468-36-8
%Saflık	89,5
Yapısı	

Tablo 3-1: (Devamı) Kabozantinib ve safsızlıklarının kimyasal yapıları ve bilgileri

Standart Adı	**Bis(kabo)fenoksiamit**
Kimyasal adı	N-(4-florofenil)-N-(1-((4-florofenil)karbamoyl)siklopropankarbonil)-N-(4-hidroksifenil)siklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	519,50
CAS No	UY
%Saflık	77,6
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-N-Oksit**
Kimyasal adı	4-(4-(1-((4 florofenil)karbamoyl)siklopropankarbonamido)fenoksi)-6,7-dimetoksikinolin 1-oksit
Mol kütlesi (g/mol)	517,51
CAS No	UY
%Saflık	96,4
Yapısı	

Tablo 3-1: (Devamı) Kabozantinib ve safsızlıklarının kimyasal yapıları ve bilgileri

Standart Adı	**Kabo-desfloro**
Kimyasal adı	N-(4-((6,7-Dimetoksikinolin-4-il)oksi)fenil)-N-fenilsiklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	483,52
CAS No	UY
%Saflık	92,0
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-Dimer**
Kimyasal adı	N,N'-bis(4-((6,7-Dimetoksikinolin-4-il)oksi)fenil)siklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	686,71
CAS No	2439164-91-5
%Saflık	95,4
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-Dimetil**
Kimyasal adı	N-(4-florofenil)-N,N-dimetilsiklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	250,27
CAS No	UY
%Saflık	99,1
Yapısı	
Standart Adı	**Kabo-Dietil**
Kimyasal adı	N,N-dietil-N-(4-florofenil)siklopropan-1,1-dikarboksamit
Mol kütlesi (g/mol)	278,32
CAS No	1906853-77-7
%Saflık	98,9
Yapısı	

3.5. Çözeltiler

3.5.1. İlgili Bileşikler için Hareketli Fazlar, Standartlar ve Numunenin Hazırlığı

Tampon çözeltisi

2,0 g amonyum format 1000 mL saf suya eklendi ve karıştırıldı. Bu çözeltinin pH'ı 4,5 ± 0,05'e seyreltik formik asit çözeltisi (10,0 mL formik asit ve 10,0 mL su karışımı) ile ayarlandı ve üzerine 10,0 mL asetonitril ilave edip karıştırıldı.

Hareketli faz A: Hazırlanan pH 4,5 tampon çözeltisi 0,45 µm filtreden süzülüp degaze edilerek hareketli faz A olarak kullanıldı.

Hareketli faz B: Asetonitril

Çözücü-1: Dimetil sülfoksit

Çözücü-2: Saf Su ve asetonitril hacimsel yüzde olarak 70 : 30 oranında karıştırıldı ve degaze edildi.

Kabo-1-dimer çözeltisi

6,0 mg Kabo-1-dimer standardı 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile çözüldü ve asetonitril ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Sistem uygunluk çözeltisi hazırlanması

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 2,0 mL Kabo-1-dimer çözeltisi ve 50,0 µL formik asit eklenerek çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Kabo-2 stok standart çözeltisi

27,5 mg Kabo-2 standardı 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve asetonitril ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si alınarak 100,0 mL'ye asetonitril ile seyreltildi. Bu çözeltinin 2,0 mL'si alınarak çözücü-2 ile 10,0 mL'ye seyreltilir.

Kabozantinib stok standart çözeltisi

10,0 mg kabozantinib standardı 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı, 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü. ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si çözücü-2 ile 50,0 mL'ye seyreltildi.

Standart çözelti hazırlanması

1,0'er mL Kabo-2 stok çözeltisi ve kabozantinib stok standart çözeltisinden 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı, 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 50 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Numune çözeltisinin hazırlanması

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü ve 5,0 mL çözücü-2 eklenerek karıştırıldı. 50 µL formik asit ile çözüldü ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Safsızlıkların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Kabo-1 Stok Çözeltisi

6,03 mg Kabo-1, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Asit Stok Çözeltisi

6,26 mg Kabo-Asit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-2 Stok Çözeltisi

27,9 mg Kabo-2, 100,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak asetonitril ile 100,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak çözücü-2 ile 10,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimetil Stok Çözeltisi

6,01 mg Kabo-1-dimetil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dietil Stok Çözeltisi

6,13 mg Kabo-1-dietil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-N-oksit Stok Çözeltisi

6,37 mg Kabo-N-oksit , 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-metilester Stok Çözeltisi

6,11 mg Kabo-metilester, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Dimer Stok Çözeltisi

6,32 mg Kabo-Dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-desfloro Stok Çözeltisi

6,48 mg Kabo-desfloro, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimer Stok Çözeltisi

6,64 mg Kabo-1-dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Bis(kabo)fenoksiamit Stok Çözeltisi

7,76 mg Bis(kabo)fenoksiamit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve hacim asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabozantinib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

10,18 mg Kabozantinib, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü, 5.0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 50,0 µL formik asit eklendi ve hacim çözücü-2 ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 50,0 mL'ye seyreltildi.

Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Çözeltilerinin Hazırlanması

Her bir safsızlıktan (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) 1,0 mL stok çözeltileri, 20,0 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında balonjojelere 50,0 µL formik asit eklendi ve hacimlerine çözücü-2 ile tamamlandı.

Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Her bir safsızlık (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) stok çözeltilerinden 1,0 mL, 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında 50,0 µL formik asit eklendi ve hacim çözücü-2 ile tamamlandı.

Spesifikasyon Limitinde Standart ve Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Her bir safsızlık (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) stok çözeltilerinden ve kabozantinib stok çözeltisinden 1,0 mL, 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında 50,0 µL formik asit eklendi ve hacim çözücü-2 ile tamamlandı

3.5.2. Miktar Tayini için Hareketli Fazlar, Standartlar ve Numunenin Hazırlığı

Tampon çözeltisi

2,0 g amonyum format 1000 mL saf suya eklendi ve karıştırıldı. Bu çözeltinin pH'ı 4,5 ± 0,05'e seyreltik formik asit çözeltisi (10,0 mL formik asit ve 10,0 mL su karışımı) ile ayarlandı ve üzerine 10,0 mL asetonitril ilave edilip karıştırıldı.

Mobil faz A: Tampon çözeltisi

Mobil faz B: Asetonitril

Çözücü: Saf su & asetonitril karışımı (40:60, h/h)

Standart çözeltisi hazırlanması (2 adet hazırlanır)

19,0 mg kabozantinib 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 60,0 mL çözücü eklendi, ultrasonik banyoda çözüldü ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2,0 mL'si çözücü ile 10,0 mL'ye seyreltildi. ($C_{Kabozantinib}$= 38 µg/mL).

Numune çözeltisi hazırlanması (2 adet hazırlanır)

19,0 mg numune 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 60,0 mL çözücü eklendi, ultrasonik banyoda çözüldü ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2,0 mL'si çözücü ile 10,0 mL'ye seyreltildi. ($C_{Kabozantinib}$ = 38 µg/mL).

3.6. Bozundurma Çalışmaları

Bozundurma çalışmalarında ısı, gün ışığı, ultraviole ışık, asidik, bazik, hidroliz ve peroksit gibi bileşenlerin kabozantinib'e olan etkisi incelendi. Katı şartlarda yapılan ısı ve ışık bozundurma şartlarında bölüm 3.5.1. ve 3.5.2.'de verilen ilgili bileşikler ve miktar tayini numuneleri hazırlandı ve farklı cihazlarda aynı anda analiz edildi. Islak şartlarda hazırlanan asidik, bazik ve nötral hidroliz ile peroksit oksidasyonu numunelerinde ise safsızlık derişiminde bozundurma numunesi hazırlandı, bozundurulan numunenin seyreltilmesiyle miktar tayini numunesi hazırlandı. Her bir parametre için bozundurma şartları Tablo 3-2'da verilmiş olup numune hazırlıkları Bölüm 3.8.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Bozundurma şartları ve maruziyet süreleri

KABOZANTİNİB		
Bozundurma parametreleri	**Bozundurma şartları**	**Maruziyet süresi**
Isı Bozundurması	80 °C	13 Gün
Gün ışığı bozundurması	En az 1,2 milyon lux saat	60 gün (Quinine absorbans farkı 0,9'dan büyük olana dek)
Ultraviole ışık bozundurması	En az 200 watt saat / m2	60 gün (Quinine absorbans farkı 0,9'dan büyük olana dek)
Nötral hidroliz	70 °C	3 saat
Asidik hidroliz	5M HCl, Oda sıcaklığı	24 saat
Bazik hidroliz	5 M NaOH Oda sıcaklığı	24 saat
Oksidasyon bozundurması	30% H2O2 Oda sıcaklığı	24 saat

3.7. Geliştirme Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Analitik Yöntemler

3.7.1. İlgili Bileşikler

İlgili bileşiklerin analizi, ters faz UPLC-UV-MS sıralı sisteminde aşağıdaki kromatografik koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, kalite kontrol laboratuvarlarında aktif maddenin serbest bırakılma ve stabilite analizlerinde safsızlık miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Standart ve test çözeltilerinin hazırlanması, hesaplama yöntemi, sistem uygunluk parametreleri ve validasyon çalışmasının sınırları aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

Kromatografik şartlar

Kolon	**:** Waters Acquity BEH C_{18} 150 x 2,1 mm, 1,7 µm
Akış hızı	**:** 0,3 mL/dk
Kolon sıcaklığı	**:** 30 ºC
Numune sıcaklığı	**:** 20 ºC
Dalga boyu	**:** 240 nm
Enjeksiyon Hacmi	**:** 2 µL
Analiz süresi	**:** 20 dk.
İyonizasyon	**:** ESI-Pozitif
Dedekte edilen iyon m/z (SIR)	:297,0 Da (Kabo-2)
QDA başlangıç zamanı	:2 dk
QDA bitiş zamanı	:6 dk
QDA data alma hızı	:5
Prob sıcaklığı	:600 °C
Kone voltajı	:15V
Kapiler Voltajı	:0,8 kV
Gain	:1

UPLC Gradient Programı

Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	75	25
2	75	25
5	50	50
10	50	50
11	35	65
15	35	65
15,50	75	25
20	75	25

QDA valf gradient programı (Kabo-2 için)

Zaman (dk)	Olay	Aksiyon
0,01	Switch	Off / Flow to Waste
1,45	Switch	Off / Flow to Waste
1,46	Switch	On / Flow to QDa
6,00	Switch	On / Flow to QDa
6,10	Switch	Off / Flow to Waste
20,00	Switch	Off / Flow to Waste

Tampon çözeltisi: 2,0 g amonyum format 1000 mL saf suya eklendi ve karıştırıldı. Bu çözeltinin pH'ı 4,5 ± 0,05'e seyreltik formik asit çözeltisi (10,0 mL formik asit ve 10,0 mL su karışımı) ile ayarlandı ve üzerine 10,0 mL asetonitril ilave edip karıştırıldı

Hareketli faz A: Hazırlanan pH 4,5 tampon çözeltisi 0,45 µm filtreden süzülüp degaze edilerek hareketli faz A olarak kullanıldı.

Hareketli faz B : Asetonitril

Çözücü-1: Saf Su ve asetonitril hacimsel yüzde olarak 50 : 50 oranında karıştırıldı ve degaze edildi.

Çözücü-2: Dimetil sülfoksit

Çözücü-3: Saf Su ve asetonitril hacimsel yüzde olarak 70 : 30 oranında karıştırıldı ve degaze edildi.

Kabo-1-dimer çözeltisi

6,0 mg Kabo-1-dimer standardı 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 6,0 mL asetonitril ile çözüldü ve asetonitril ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si çözücü-1 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Sistem uygunluk çözeltisi hazırlanması

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-2 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-3 eklendi ve karıştırıldı. 2,0 mL Kabo-1-dimer çözeltisi ve 50,0 µL formik asit eklenerek çözücü-3 ile hacmine tamamlandı.

Kabo-2 stok standart çözeltisi

27,5 mg Kabo-2 standardı 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü ve asetonitril ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si alınarak 100,0 mL'ye asetonitril ile seyreltildi. Bu çözeltinin 2,0 mL'si alınarak çözücü-1 ile 10,0 mL'ye seyreltildi.

Kabozantinib stok standart çözeltisi

10,0 mg kabozantinib standardı 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı, 0,5 mL çözücü-2 ile çözüldü. 5,0 mL çözücü-3 eklendi ve karıştırıldı. 50,0 µL formik asit eklendi ve çözücü-3 ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 1,0 mL'si çözücü-1 ile 50,0 mL'ye seyreltildi.

Standart çözelti hazırlanması

1,0'er mL Kabo-2 stok çözeltisi ve kabozantinib stok standart çözeltisinden 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı, 0,5 mL çözücü-2 ve 5,0 mL çözücü-3 eklendi ve karıştırıldı. 50 µL formik asit eklendi ve çözücü-3 ile hacmine tamamlandı.

Numune çözeltisinin hazırlanması

10,0 mg numune 20,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-2 ile çözüldü ve 5,0 mL çözücü-3 eklenerek karıştırıldı. 50 µL formik asit ile çözüldü ve çözücü-3 ile hacmine tamamlandı.

Kabul kriterleri

Standart çözelti'nin 6 enjeksiyondan elde edilen kabozantinib pik alanları arasındaki %BSS en fazla 5,0, Kabo-2 pik alanları arasındaki %BSS en fazla 20,0 olmalıdır.

Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramında, Kabozantinib ile Kabo-1-dimer arasındaki rezolüsyon ≥ 2,5 olmalıdır.

Hesaplamalar

Tanımlanmış safsızlık miktarı

$$\frac{A_{İMP}}{A_{STD}} \text{ x } \frac{W_{STD}}{20} \text{ x } \frac{1.0}{50} \text{ x } \frac{1.0}{20} \text{ x } \frac{P}{100} \text{ x } \frac{20}{W_{NUM}} \text{ x CRF x } 100 \qquad (3\text{-}1)$$

Tanımlanmamış safsızlık miktarı

$$\frac{A_{İMP}}{A_{STD}} \text{ x } \frac{W_{STD}}{20} \text{ x } \frac{1.0}{50} \text{ x } \frac{1.0}{20} \text{ x } \frac{P}{100} \text{ x } \frac{20}{W_{NUM}} \text{ x } \frac{100}{(100-W)} \text{ x } 100 \qquad (3\text{-}2)$$

Aimp : Numune çözeltisi kromatogramı ile elde edilen safsızlık pik alanı

Astd : Standart çözelti kromatogramı ile elde edilen kabozantinib pik alanlarının ortalaması

Wstd : Kabozantinib standart tartımı, mg

Wnum : Numune tartımı, mg

P : Kabozantinib standartının potensi, %

CRF : Alan düzeltme faktörü

W : Su + çözücü miktarı

Kabo-2 safsızlık miktarı, ppm

$$\frac{A_{NUM}}{A_{STD}} \text{ x } \frac{W_{STD}}{100} \text{ x } \frac{1.0}{100} \text{ x } \frac{2.0}{10} \text{ x } \frac{1.0}{20} \text{x} \frac{P}{100} \text{ x } \frac{20}{W_{NUM}} \text{ x } \frac{100}{(100-W)} \text{ x } 1000 \qquad (3\text{-}3)$$

A_{num} : Numune çözeltisi kromatogramı ile elde edilen Kabo-2 pik alanı

A_{std} : Standart çözelti kromatogramı ile elde edilen Kabo-2 pik alanlarının ortalaması

W_{std} : Kabo-2 standart tartımı, mg

W_{num} : Numune tartımı, g

P : Kabo-2 standartının potensi, %

W :Su + çözücü miktarı

Hesaplama sonucu elde edilen değerler % cinsinden hesaplanır ve noktadan sonra iki basamak olarak raporlanır. Kabo-2'nin değerleri ppm cinsinden hesaplanır dijitsiz olarak raporlanır. Sonuç belirtilmesinde iki basamak olarak verilmesi yeterlidir. Ancak validasyon çalışmalarında daha detaylı incelemeler için sonuçlar virgülden sonra üç basamak olarak verilmiştir. İlgili bileşikler metot validasyon çalışmalasın kullanılan limitler Tablo 3-3'de belirtilmiştir.

Tablo 3-3: İlgili bileşikler için validasyon çalışmasında kullanılan kabul değerleri

Safsızlıklar	Limit
Kabo-2	En fazla 71 ppm
Kabo-1	En fazla 0,15%
Kabo-Asit	En fazla 0,15%
Kabo-1-dimetil	En fazla 0,15%
Kabo-1-dietil	En fazla 0,15%
Kabo-N-Oksit	En fazla 0,15%
Kabo-Metilester	En fazla 0,15%
Kabo-Dimer	En fazla 0,15%
Kabo-desfloro	En fazla 0,15%
Kabo-1-dimer	En fazla 0,15%
Bis(kabo)fenoksiamit	En fazla 0,15%
Bilinmeyen Safsızlık	En fazla 0,10%
Toplam Safsızlık	En fazla 1,0%

3.7.2. Miktar Tayini

Miktar tayini, ters faz UPLC sistemi kullanılarak belirli kromatografik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, kalite kontrol laboratuvarlarında aktif madde serbest bırakma ve stabilite analizlerinde aktif madde saflığını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Aşağıda, bu analiz için gerekli olan standart ve numune çözeltilerinin hazırlanışı, hesaplama formülü, sistem uygunluk parametreleri ve validasyon çalışma limitleri detaylı olarak sunulmuştur.

Kromatografik şartlar

Kolon : Waters Acquity BEH C8 100 x 2,1 mm, 1,7 µm
Akış hızı : 0,4 mL/dk
Kolon sıcaklığı : 35 ºC
Numune sıcaklığı : 20 ºC
Dalga boyu : 240 nm
Enjeksiyon Hacmi : 2 µL
Analiz süresi : 6 dk.
Elüsyon :İzokratik (%55 mobil faz A: %45 mobil faz B)

Tampon çözeltisi: 2,0 g amonyum format 1000 mL saf suya eklendi ve karıştırıldı. Bu çözeltinin pH'ı 4,5 ± 0,05'e seyreltik formik asit çözeltisi (10,0 mL formik asit ve 10,0 mL su karışımı) ile ayarlandı ve üzerine 10,0 mL asetonitril ilave edilip karıştırıldı.

Mobil faz A: Tampon çözeltisi

Mobil faz B: Asetonitril

Çözücü: Saf su & asetonitril karışımı (40:60, h/h)

Standart çözeltisi hazırlanması (2 adet hazırlanır)

19,0 mg kabozantinib 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 60,0 mL çözücü eklendi, ultrasonik banyoda çözüldü ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2,0 mL'si çözücü ile 10,0 mL'ye seyreltildi. ($C_{kabozantinib}$= 38 µg/mL).

Numune çözeltisi hazırlanması (2 adet hazırlanır)

19,0 mg numune 100,0 mL'lik balon jojeye tartıldı. 60,0 mL çözücü eklendi, ultrasonik banyoda çözüldü ve çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin 2,0 mL'si çözücü ile 10,0 mL'ye seyreltildi. ($C_{kabozantinib}$ = 38 µg/mL).

Kabul kriterleri

- Standart çözeltisi-1'in ardışık 6 enjeksiyonu için BSS ≤ %0,85 olmalıdır.
- Numune çözeltisi kromatogramında, kabozantinib pikinin simetri faktörü ≤ 1,5 olmalıdır.

Sonuçların hesaplanması ve raporlanması

$$\textbf{Kabozantinib}\ (\%) = \frac{A_{NUM}}{A_{STD}} \times \frac{W_{STD}}{W_{NUM}} \times P \times \frac{100}{(100-W)} \qquad (3\text{-}4)$$

Anum : Numune çözeltisi kromatogramında kabozantinib pik alanı

Astd : Standart çözeltisi kromatogramında kabozantinib pik alanı

Wstd : Kabozantinib standart tartımı

Wnum : Kabozantinib numune tartımı

P : Kabozantinib standartının potensi

W : Su + çözücü miktarı

3.8. Metot Validasyon Yöntemi

Analitik metot geliştirme işlemleri tamamlandıktan sonra validasyonlar ICH kılavuzu Q2 ye göre yapıldı [59].

3.8.1. İlgili Bileşikler Validasyon Yöntemi

3.8.1.1. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi, birçok analitik yöntemin temel bir bileşenidir. Bu test, cihazın, elektronik aksamının ve analitik yöntemlerin bir uyum içinde çalışarak analiz edilecek numuneyi doğru bir şekilde belirleyebildiğini gösterir [59]

Sistem uygunluğunu belirleye bilmek için bölüm 3.7.1' de detaylı bir şekilde hazırlığı anlatılan *sistem uygunluk* çözeltisi ve *standart çözeltisi* kullanılır.

Tablo 3-4: Sistem uygunluk testi için hazırlanan enjeksiyon tablosu

Sıra	Çözelti adı	Açıklama	Enjeksiyon sayısı	Enjeksiyon Hacmi
1	Blank	Boş çözelti	2 kez	2 µl
2	Sistem uygunluk çözeltisi	Kabo-1-Dimer ile Kabozantinib arasındaki ayrım faktörü hesabı için	1 kez	2 µl
3	Standart çözeltisi	Kabo-2 ve kabozantinibin %BSS değerinin hesabı için	6 kez	2 µl

Kabul Kriteri:

*Kabozantinib pik alanlarının 6 tekrarlı standart çözelti enjeksiyonundan elde edilen BSS değeri ≤ %5,0, Kabo-2 pik alanlarının 6 tekrarlı standart çözelti enjeksiyonundan elde edilen BSS değeri ≤ %20,0 olmalıdır.

*Sistem uygunluk çözeltisinin kromatogramında kabozantinib ve Kabo-1-dimer'e bağlı pikler arasındaki ayrım min. 2,5 olmalıdır.

3.8.1.2. Seçicilik

Kabozantinib ve Kabo-2 piklerinin, çözücü, bilinen safsızlıklar ve bozunmadan kaynaklı gelen piklerden ayrılmasını göstermek amacıyla sırasıyla blank enjeksiyonu, tek tek bilinen safsızlıkların ve bozunma numunelerinin enjeksiyonları yapılır. Bu sayede ana etkin madde ile safsızlıkların birbirinden ayrıldığı kanıtlanır. Ayrıca, safsızlıklar arasında veya safsızlıklar ile ana etken madde arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığını belirlemek için, safsızlıklar hem tek tek hem de karışım halinde numuneye eklenerek enjeksiyon yapılır ve pik alanları karşılaştırılır. Spesifik bir metodun olması için, bu alanlarda herhangi bir değişiklik olmaması gerekmektedir. Çözelti hazırlıkları aşağıda anlatılmıştır.

Safsızlıkların stok çözeltilerinin hazırlanması

Kabo-1 Stok Çözeltisi

6,03 mg Kabo-1, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Asit Stok Çözeltisi

6,26 mg Kabo-Asit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-2 Stok Çözeltisi

27,9 mg Kabo-2, 100,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak asetonitril ile 100,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak çözücü-2 ile 10,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimetil Stok Çözeltisi

6,01 mg Kabo-1-dimetil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dietil Stok Çözeltisi

6,13 mg Kabo-1-dietil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-N-Oksit Stok Çözeltisi

6,37 mg Kabo-N-Oksit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Metilester Stok Çözeltisi

6,11 mg Kabo-Metilester, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Dimer Stok Çözeltisi

6,32 mg Kabo-Dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-desfloro Stok Çözeltisi

6,48 mg Kabo-desfloro, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimer Stok Çözeltisi

6,64 mg Kabo-1-dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Bis(kabo)fenoksiamit Stok Çözeltisi

7,76 mg Bis(kabo)fenoksiamit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabozantinib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

10,18 mg kabozantinib, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 50,0 µL formik asit eklendi ve hacmine çözücü-2 ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 50,0 mL'ye seyreltildi.

Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Çözeltilerinin Hazırlanması

Her bir safsızlık (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) stok çözeltilerinin 1,0 mL'si, 20,0 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Son olarak, 50,0 µL formik asit eklendi ve hacimlerine çözücü-2 ile tamamlandı.

Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

Her bir safsızlık (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) stok çözeltilerinden 1,0 mL, 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Son olarak, 50,0 µL formik asit eklendi ve hacmi çözücü-2 ile tamamlandı.

Spesifikasyon Limitinde Standart ve Safsızlık Karışım Çözeltisinin Hazırlanması

1,0 mL her bir safsızlık (Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) stok çözeltilerinden ve 1,0 mL kabozantinib stok çözeltisinden, 20,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve 0,5 mL çözücü-1 eklendi, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 50,0 µL formik asit eklendi ve hacim çözücü-2 ile tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde safsızlıklar eklenmiş numune çözeltisinin hazırlanması

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL volumetrik balona tartılmış, 0,5 mL çözücü-1 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı, üzerine 1,0 mL Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit safsızlık stok çözeltilerinin her birinden eklendi. Son olarak 50,0 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde Kabo-2 ile spike edilmiş numune çözeltisinin hazırlanması

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL volumetrik balona tartıldı, 0,5 mL çözücü-2 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı, 1,0 mL Kabo-2 stok çözeltisi eklendi. 50,0 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Enjeksiyon tablosu

- Çözücü enjekte edildi.
- Sisteme uygunluk çözeltisi enjekte edildi.
- Çözücü iki kez enjekte edildi.
- Standart çözelti 6 kez enjekte edildi.
- Her bir safsızlık çözeltisi tek tek enjekte edildi.
- Safsızlıkların karışım çözeltisi enjekte edildi.
- Spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı ile spike edilmiş standart çözelti enjekte edildi.
- Numune çözeltisi enjekte edildi.
- Spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı ile spike edilmiş numune çözeltisi enjekte edildi.
- Spesifikasyon limitinde Kabo-2 spike edilmiş numune çözeltisi enjekte edildi.

3.8.1.3. Nicelik ve Nitelik Sınırları (LOQ ve LOD)

Bir metodun nitelik sınırı, kantitatif olarak ölçülmesi gerekmeyen, ancak metot ile tespit edilebilen en düşük konsantrasyondur. Nicelik sınırı ise, uygun hassasiyet ve geri kazanım sağlanarak bir analiz işleminin gerçekleştirilebildiği en düşük konsantrasyondur.

Bu konsantrasyonların belirlenmesi için konsantrasyonu bilinen miktarda madde içeren standart çözeltileri enjekte edilerek elde edilen sinyal yüksekliğinin detektörün sahip olduğu gürültüye oranlanması ile standartların s/n oranları hesaplandı Nitelik sınırı için genellikle 3 veya 2 değeri yeterlidir. Nicelik değerinin belirlenmesi için yine bilinen konsantrasyonda madde içeren numune çözeltisinin enjeksiyonlarından elde edilen kromatogramdaki sinyallerin detektör gürültüsüne oranının yaklaşık 10 olması beklendi.

Elde edilen sonuçlar belirli geri kazanım ve hassasiyet kriterlerini karşıladı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3 de gösterilmiştir.

Kabul Kriterleri:

Nitelik sınırı (LOD) olarak belirlenen konsantrasyonda maddeler içeren çözeltinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogramda piklerin rahatça tespit edilebilmesi ve bu piklerin sinyal-gürültü oranının yaklaşık 2 veya 3 olması gerekmektedir.

Nicelik sınırı (LOQ) olarak belirlenen konsantrasyonlarda maddeler içeren çözeltinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogramda, pikler gerekli hassasiyet ve geri kazanım kriterleri içinde belirlenebilir olmalı ve bu piklerin sinyal-gürültü oranının yaklaşık 10 olması gerekmektedir.

Nicelik sınırı (LOQ) olarak belirlenen konsantrasyonlarda maddeler içeren çözeltinin ardışık 6 enjeksiyonu ile elde edilen kromatogramlarda, pik alanları arasındaki %BSS değeri 20,0'den fazla olmamalıdır.

3.8.1.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bir analitik metodun doğrusallığı, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonuna karşı dedektör sinyali arasında elde edilen grafiğin, elde edilen test sonucunun belirli bir aralık dahilinde doğrusal olması olarak açıklanır [59].

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için kabozantinib ve safsızlıklarını 6 farklı konsantrasyonda içeren çözeltiler hazırlandı ve her çözeltiden üçer enjeksiyon yapılarak elde edilen kromatogram bilgilerine göre doğrusalllık grafiği çizildi. Kabozantinib için kalibrasyon aralığı 0,0251 µg/mL ile 1,006 µg/mL arasındaki 6 farklı konsantrasyondur. Tanımlı safsızlıklar için kalibrasyon aralığı, Kabo-1 için 0,0415 – 1,508 µg/mL, Kabo-2 için 0,000370 – 0,0555 µg/mL, Kabo-Asit için 0,0311 – 1,556 µg/mL, Kabo-1-dimetil için 0,0856 – 1,488 µg/mL, Kabo-1-dietil için 0,0568 – 1,516 µg/mL, Kabo-N-Oksit için 0,0192 – 1,536 µg/mL, Kabo-Metilester için 0,0189 – 1,514 µg/mL, Kabo-Dimer için 0,0301 – 1,508 µg/mL, Kabo-desfloro için 0,0261 – 1,490 µg/mL, Kabo-1-dimer için 0,0646 – 1,486 µg/mL ve Bis(kabo)fenoksiamit için 0,0414 – 1,506 µg/mL sırası şeklinde dir. Sonuçlar Bölüm 4.2.4 de gösterilmiştir.

Bir diğer validasyon parametresi de analitik yöntem için çalışma aralığıdır. Çalışma aralığı, yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar üretebildiği belirli bir konsantrasyon veya değer aralığını ifade eder. Bu aralık, ölçülebilecek en düşük konsantrasyonla en yüksek konsantrasyon arasındaki değerleri kapsar [59].

Kabul Kriteri: Tüm pikler için korelasyon katsayısı (r) 0,99 dan az olmamalıdır.

Regresyon çizgisinin kesişimi (y-intercept), Standart konsantrasyon seviyesinin %100'ünden elde edilen alanın kabozantinib ve safsızlıklar için %5'inden ve Kabo-2 için %10'undan fazla olmamalıdır.

Prosedür

LOQ çözeltisi, kabozantinib ve spesifikasyon limitindeki safsızlık karışımı çözeltisinden 1,0 µL, 1,5 µL, 2,0 µL, 3,0 µL ve 4,0 µL (spesifikasyon limitinin %50, %75, %100, %150 ve %200'üne karşılık gelen miktar) enjekte edilmiştir. Minimum (LOQ) ve maksimum seviyelerdeki (%200) standart çözeltiler altı kez, diğer seviyeler ise üç kez enjekte edilmiştir.

Safsızlıkların stok çözeltilerinin hazırlanması

Kabo-1 Stok Çözeltisi

6,03 mg Kabo-1, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Asit Stok Çözeltisi

6,26 mg Kabo-Asit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-2 Stok Çözeltisi

27,9 mg Kabo-2, 100,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak asetonitril ile 100,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak çözücü-2 ile 10,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimetil Stok Çözeltisi

6,01 mg Kabo-1-dimetil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dietil Stok Çözeltisi

6,13 mg Kabo-1-dietil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-N-Oksit Stok Çözeltisi

6,37 mg Kabo-N-Oksit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Metilester Stok Çözeltisi

6,11 mg Kabo-Metilester, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-Dimer Stok Çözeltisi

6,32 mg Kabo-Dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-desfloro Stok Çözeltisi

6,48 mg Kabo-desfloro, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimer Stok Çözeltisi

6,64 mg Kabo-1-dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Bis(kabo)fenoksiamit Stok Çözeltisi

7,76 mg Bis(kabo)fenoksiamit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Kabozantinib Stok Çözeltisinin Hazırlanması

10,18 mg Kabozantinib, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 0.5 mL çözücü-1 ile çözüldü, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. 50,0 µL formik asit eklendi ve hacmine çözücü-2 ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 50,0 mL'ye seyreltildi.

Spesifikasyon limitinde Kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinin hazırlanması

1,0 mL safsızlık stok çözeltileri (Kabo-1, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer, Bis(kabo)fenoksiamit) ve 1,0 mL kabozantinib stok çözeltisi 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı, 0,5 mL çözücü-1, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Son olarak 50 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Spesifikasyon limitinde Kabo-2 çözeltisinin hazırlanması

Kabo-2 stok çözeltisinden 1,0 mL, 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı, 0,5 mL çözücü-1 eklendi, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. sonrasında 50 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacminde tamamlandı.

Nicellik (LOQ) çözeltisinin hazırlanması

20,0 µL kabozantinib, 55,0 µL Kabo-1, 40,0 µL Kabo-Asit, 115,0 µL Kabo-1-dimetil, 75,0 µL Kabo-1-dietil, 25,0 µL Kabo-N-Oksit, 25,0 µL Kabo-Metilester, 40,0 µL Kabo-Dimer, 35,0 µL Desfloro-kabo, 87,0 µL Kabo-1-dimer ve 55,0 µL Bis(kabo)fenoksiamit stok standart çözeltileri 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü-2 ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Ardından 0,5 mL çözücü-1 ve 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Son olarak, 50 µL formik asit eklendi ve hacmi çözücü-2 ile tamamlandı.

Nitellik (LOD) çözeltisinin hazırlanması

Nicellik çözeltisinden 3,0 mL alınıp 10 mL ye çözücü-2 ile tamamlanarak nitellik çözeltisi hazırlanmıştır.

Kabo-2 için nicellik (LOQ) çözeltisinin hazırlanması

Kabo-2 stok çözeltisinden 1,33 mL, 100,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı, 0,5 mL çözücü-1, 5,0 mL çözücü-2 eklendi ve karıştırıldı. Son olarak 50 µL formik asit eklendi ve çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Kabo-2 için nitellik (LOD) çözeltisinin hazırlanması

Nicellik çözeltisinden 3,0 mL alınıp 10 mL ye çözücü-2 ile tamamlanarak nitellik çözeltisi hazırlanmıştır.

Doğrusallık çözeltilerinin hazırlanması

Seviye-1-(LOQ): LOQ çözeltisinden 2,0 µL enjekte edildi.

Seviye-1-(Kabo-2 LOQ): Kabo-2 için LOQ çözeltisinden 2,0 µL enjekte edildi.

Seviye-2-(%50): Spesifikasyon limitindeki kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinden 1,0 µL enjekte edildi.

Seviye-2-(Kabo-2 %50): Spesifikasyon limitindeki Kabo-2 çözeltisinden 1,0 µL enjekte edildi.

Seviye-3-(%75): Spesifikasyon limitindeki kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinden 1,5 µL enjekte edildi.

Seviye-3-(Kabo-2 %75): Spesifikasyon limitindeki Kabo-2 çözeltisinden 1,5 µL enjekte edildi.

Seviye-4-(%100): Spesifikasyon limitindeki kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinden 2,0 µL enjekte edildi.

Seviye-4-(Kabo-2 %100): Spesifikasyon limitindeki Kabo-2 çözeltisinden 2,0 µL enjekte edildi.

Seviye-5-(%150): Spesifikasyon limitindeki kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinden 3,0 µL enjekte edildi.

Seviye-5-(Kabo-2 %150): Spesifikasyon limitindeki Kabo-2 çözeltisinden 3,0 µL enjekte edildi.

Seviye-6-(%200): Spesifikasyon limitindeki kabozantinib ve safsızlık karışım çözeltisinden 4,0 µL enjekte edildi.

Seviye-6-(Kabo-2 %200): Spesifikasyon limitindeki Kabo-2 çözeltisinden 4,0 µL enjekte edildi.

3.8.1.5. Geri Kazanım (Doğruluk)

Analitik metot için doğruluk, referans değerin, hesaplanan değere olan yakınlığıdır [59].

Hesaplanan deneysel derişimlerin (Denklem 3-6) teorik derişimlere (Denklem 3-5) bölümü sonucu ortaya çıkan yüzde geri kazanımlar (Denklem 3-7) aşağıdaki formüllere göre hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.5 de gösterilmiştir.

$$\textbf{Teorik miktar}\ (\%) = \left(C_{\text{Eklenen}}\ \text{x}\ \frac{D}{W_{\text{Test}}}\ \text{x}\ 100\right) + \text{Numunedeki miktar}\ (\%) \qquad (3\text{-}5)$$

$$\textbf{Deneysel miktar}\ (\%) = \frac{A_{\text{Safsızlık}}}{A_{\text{Standart}}}\ \text{x}\ C_{STD}\ \text{x}\ \frac{D}{W_{\text{Test}}}\ \text{x}\ 100 \qquad (3\text{-}6)$$

$$\textbf{Geri kazanım}\ (\%) = \frac{\text{Deneysel miktar}}{\text{Teorik miktar}}\ \text{x}\ 100 \qquad (3\text{-}7)$$

Burada;

$C_{eklenen}$: Numune içerisine eklenen safsızlık derişimi, mg/mL

D: Seyreltme (20,0 mL)

W_{test}: Numune tartımı, mg

$A_{safsızık}$: Numune çözeltisi kromatogramında ilgili safsızlık alanı

$A_{standart}$: Standart çözeltisi kromatogramlarındaki ilgili safsızlık alan ortalaması

C_{std}: Standart çözeltisindeki ilgili safsızlık derişimi, mg/mL olarak verilmektedir

Kabo-2 için hesaplama yöntemi

$$\textbf{Teorik miktar (ppm)} = \left(C_{Eklenen} \text{ x } \frac{D}{W_{Test}} \text{ x } 100\right) + \text{Numunedeki miktar (ppm)} \quad (3\text{-}8)$$

$$\textbf{Deneysel miktar (ppm)} = \frac{A_{Safsızlık}}{A_{Standart}} \text{ x } C_{STD} \text{ x } \frac{D}{W_{Test}} \text{ x } 100 \quad (3\text{-}9)$$

$$\textbf{Geri kazanım } (\%) = \frac{\text{Deneysel miktar}}{\text{Teorik miktar}} \text{ x } 100 \quad (3\text{-}10)$$

Burada;

$C_{eklenen}$: Numune içerisine eklenen Kabo-2 derişimi, µg/mL

D: Seyreltme (20 mL)

W_{test}: Numune tartımı, g

$A_{safsızık}$: Numune çözeltisi kromatogramındaki Kabo-2 alanı

$A_{standart}$: Standart çözeltisi kromatogramlarındaki Kabo-2 alan ortalaması

C_{std}: Standart çözeltisindeki Kabo-2 derişimi, µg/mL olarak verilmektedir

0,5 mg/mL lik kabozantinib numunesine sırasyla Kabo-1, Kabo-2 ve Kabo-Dimer safsızlıklarından (%50, %100 ve %150), Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-oksit , Kabo-Metilester, Kabo-desfloro, ve Bis(kabo)fenoksiamit safsızlıklarından (LOQ, %50, %100 ve %150) ayrıca Kabo-1-dimer safsızlığından (%100 ve %150) seviyelerinde ekleme yapıldı, sonrasında her bir safsızlık kendi standardına göre hesaplanarak % geri kazanımlar hesaplanmıştır.

Kabul Kriteri: Her bir geri kazanım, safsızlıklar için %90,0 - %110,0 ve Kabo-2 için %80,0 - %120,0 arasında olmalıdır.

LOQ seviyesinde geri kazanım %70,0 - %130,0 arasında olmalıdır.

Doğruluk parametresi için işlemler:

- Safsızlık karışımı çözeltisi 6 tekrar olarak sisteme enjekte edilmiştir.
- 2 paralel numune çözeltisi enjekte edilmiş ve numune içerisindeki safsızlık miktarları belirlenmiştir.
- LOQ, %50, %100 ve %150 seviyelerde safsızlıklar nunume içerisine eklenerek her bir seviyeden 3'er çözelti hazırlanmış ve her bir safsızlık standart çözeltideki kendi pik alanına göre hesaplanmıştır.

Doğruluk parametresi için gerekli çözelti hazırlıkları aşağıda verilmiştir:

Safsızlıkların stok çözeltilerinin hazırlanması

Kabo-1 Stok Çözeltisi

6,04 mg Kabo-1, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-Asit Stok Çözeltisi

6,24 mg Kabo-Asit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-2 Stok Çözeltisi

28,18 mg Kabo-2, 100,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı. 30,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak asetonitril ile 100,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltiden 2,0 mL alınarak çözücü-2 ile 10,0 mL'ye seyreltildi.

Kabo-1-dimetil Stok Çözeltisi

6,00 mg Kabo-1-dimetil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-1-dietil Stok Çözeltisi

6,12 mg Kabo-1-dietil, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-N-oksit Stok Çözeltisi

6,37 mg Kabo-N-oksit , 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-metilester Stok Çözeltisi

6,12 mg Kabo-metilester, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-Dimer Stok Çözeltisi

6,34 mg Kabo-Dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-desfloro Stok Çözeltisi

6,50 mg Kabo-desfloro, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Kabo-1-dimer Stok Çözeltisi

6,62 mg Kabo-1-dimer, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak çözücü-2 ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

Bis(kabo)fenoksiamit Stok Çözeltisi

7,78 mg Bis(kabo)fenoksiamit, 20,0 mL'lik bir balon jojeye tartıldı, 6,0 mL asetonitril ile ultrasonik banyoda çözüldü, hacmine asetonitril ile tamamlandı.

Stok safsızlık karışım çözeltisi hazırlığı

Her bir safsızlık stok çözeltisinden (Kabo-1, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Bis(kabo)fenoksiamit) 1,0 mL alınıp 20 mL lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü-2 ile tamamlandı.

Safsızlık karışım çözeltisi hazırlığı

1,0 mL stok safsızlık karışım çözeltisi ve 1,0 mL Kabo-1-dimer stok çözeltisi 20 mL lik balonjojeye aktarıldı üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5 mLçözücü-2 ve 50 µL formik asit eklendikten sonra hacmine çözücü-2 ile tamamlandı.

LOQ stok çözeltisi hazırlığı

40,0 µL Kabo-Asit, 115,0 µL Kabo-1-dimetil, 75,0 µL Kabo-1-dietil, 25,0 µL Kabo-N-Oksit, 25,0 µL Kabo-Metilester, 35,0 µL Desfloro-kabo ve 55,0 µL Bis(kabo)fenoksiamit stok standart çözeltileri 20,0 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Sonra çözücü-2 ile hacmine tamamlandı.

Doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

Doğruluk Çözeltisi Seviye-1 (LOQ)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 1,0 mL LOQ stok çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Doğruluk Çözeltisi Seviye-2 (%50)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 0,5 mL stok safsızlık karışım çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Kabo-2 Safsızlığı için Doğruluk Çözeltisi Seviye-2 (%50)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 0,5 mL stok Kabo-2 çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Doğruluk Çözeltisi Seviye-3 (%100)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 1,0 mL stok safsızlık karışım çözeltisi, 160 µL Kabo-1-dimer stok çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Kabo-2 Safsızlığı için Doğruluk Çözeltisi Seviye-3 (%100)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 1,0 mL stok Kabo-2 çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Doğruluk Çözeltisi Seviye-4 (%150)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 1,5 mL stok safsızlık karışım çözeltisi, 660 µL Kabo-1-dimer stok çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

Kabo-2 Safsızlığı için Doğruluk Çözeltisi Seviye-4 (%150)

10 mg numune 20 mL lik balonjojeye tartılır ve üzerine 0,5 mL çözücü-1, 5mL çözücü-2 ilave edilip karıştırılır daha sonra üzerine 1,5 mL stok Kabo-2 çözeltisi ile 50 µL formik asit eklenip hacmine çözücü-2 ile tamamlanır.

3.8.1.6. Metot Kesinliği ve Laboratuvarlar Arası Kesinlik

Metodun kesinliği, aynı gün içerisinde aynı numuneden alınan veya hazırlanan çok sayıda örnekten elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı olarak tanımlanır [59].

Kabozantinib numunesinde belirli miktarda bulunan Kabo-1-dimer ve Kabo-2 safsızlık sonuçları arasındaki % BSS değerleri tespit edilerek metodun kabozantinib safsızlık tayini açısından kesinliği belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 0,5 mg/mL kabozantinib içeren numune çözeltisinin bağımsız 6 adet sonucunun arasındaki % BSS değeri değerlendirildi. Metodun kesinliğini belirlemek amacıyla çalışma, farklı günlerde, farklı cihazlar ve analistler tarafından tekrarlandı. Safsızlık çalışması, arka arkaya 6 kez yapılarak numunedeki sonuçları hesaplandı. Bu sonuçlar, daha önce elde edilen 6 sonuçla birlikte değerlendirilerek % BSS değerleri hesaplandı. Sonuçlar, Bölüm4.2.6'da Tablo 4-37 ve Tablo 4-38 sunulmuştur.

Kabul Kriteri: Numune sonuçlarının bağıl standart sapması (BSS) aşağıdaki gibi olmalıdır.

% Her bir safsızlık ve toplam safsızlık	%BSS
< 0,10	**not evaluated**
≥ 0,10	**10**

İki çalışmanın ortalama değerleri arasındaki farklar aşağıdaki gibi olmalıdır

% Her bir safsızlık ve toplam safsızlık	Fark
<0,10	**Değerlendirilmez**
0,10-0,20	**≤±0,05**
>0,20-0,50	**≤±0,10**
>0,50-1,0	**≤±0,20**

Altı numune çözelti sonucundan elde edilen Kabo-2 miktarının BSS'si ≤ %20,0 olmalıdır.

Kabo-2 için iki çalışmanın sonuçlarının ortalaması arasındaki % Farklar ≤20,0 olmalıdır.

3.8.1.7. Çözelti Stabilitesi

Hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin oda sıcaklığında zamanla ne kadar stabil kaldığının belirlenmesi, analiz sonuçlarının doğruluğu açısından önemlidir ve bu nedenle incelenmelidir. Bu sebeple, numune ve standart çözeltileri 48 saat boyunca analiz edilerek, zaman içerisindeki alan değişiklikleri gözlemlendi. Bu değişikliklere dayanarak çözeltilerin stabil kaldığı süreler belirlendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.7'de sunulmuştur. Başlangıç ve 48. saat sonunda yapılan enjeksiyonların alan değerlendirilmesi, Denklem 3-11'e göre gerçekleştirilmiştir.

Zaman noktaları arasında yüzdesel farkın hesaplanması.

$$\textbf{\% Fark} = \left|\frac{A_X - A_b}{A_b}\right| \textbf{ x 100} \qquad (3\text{-}11)$$

A_x: X saat sonraki değer
A_b: Başlangıç noktasındaki değer-

Kabul Kriteri:

Başlangıç alanlarından değişim kabozantinib standart alanı için %5'ten ve Kabo-2 standart alanı için %20'den fazla olmamalıdır.

- Numunedeki safsızlık pik alanlarının başlangıç alanlarına göre değişimi %10'dan fazla olmamalıdır.

- Numunedeki Kabo-2 pik alanlarının başlangıç alanlarına göre değişimi %20'den fazla olmamalıdır.

3.8.1.8. Sağlamlık

Analitik yöntemlerin, yöntemin parametrelerinde yapılan kasıtlı küçük değişikliklere karşı dayanıklı olması gerekmektedir [59]. Hareketli fazın pH değeri, akış hızı, kolon fırınının sıcaklığı ve hareketli faz oranları gibi parametrelerin makul ölçülerde (± %10) değiştirilmesiyle elde edilen sonuçlar, normal koşullarda elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak yöntem sağlamlığı değerlendirildi.

Analiz normal koşullar altında yapıldı. Hareketli fazın pH değeri 4,5 değeri yerine ± 0,1 değişimlerle 4,4 ve 4,6 ya ayarlanarak çalışıldı. Hareketli fazın akış hızı 0,3 mL/dakika yerine ± % 10 değişimlerle 0,27 mL/dakika ve 0,33 mL/dakika hızlarında çalışıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30°C yerine ± % 10 değişimlerle 27°C ve 33°C kolon fırın sıcaklıklarında çalışıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.8 de verilmiştir.

3.8.1.9. Bağıl Alan Faktörü

Bağıl alan faktörü diğer adıyla alan düzeltme faktörü, kabozantinib etken maddesinde validasyonu yapılan 10 (Kabo-2 hariç) bilinen safsızlığın miktarını her defasında doğru bir şekilde hesaplamak için kabozantinib standardına göre belirleme işlemidir. Bu sebeple her defasında kabozantinib deki bilinen safsızlıkları hesaplamak için safsızlıkları tek tek verme külfetinden kurtulunur. Bu işlem yapılırken kabozantinib ve diğer 10 safsızlık limit derişimde 6 defa sisteme verilir ve kabozantinibe göre aşağıdaki formüle göre hesap yapılır. Sonuçlar Bölüm 4.2.9 da verilmiştir.

CRF (Alan düzeltme faktörü) = $\frac{A_{Kabozantinib}}{A_{Safsızlık}} x \frac{C_{Safsızlık}}{C_{Kabozantinib}}$ **Denklem 3-1**

$A_{Safsızlık}$	:	Safsızlık pikinin alanı
$A_{Kabozantinib}$	:	Kabozantinib standart pik alanı
$C_{Kabozantinib}$	:	Kabozantinib standart derişimi, µg/mL
$C_{Safsızlık}$	:	Safsızlık derişimi, µg/mL
CRF	:	Alan düzeltme faktörü

3.8.2. Miktar Tayini Validasyon Yöntemi

Geliştirilen miktar tayini yöntemlerin kromatografik şartları, standart, numune çözeltisi ve hareketli faz hazırlıkları, hesap yöntemleri ve kabul kriterleri takip eden bölümlerde verilmiştir.

3.8.2.1. Seçicilik

Analitin, sistematik girişimler veya gözlenebilecek diğer bileşenler (safsızlıklar, bozunma ürünleri, mobil faz veya çözücü gibi) bulunduğunda bile saf ve net bir şekilde tespit edilebileceğini ve doğru şekilde ölçülebileceğini ifade eder. Sonuçlar Bölüm 4-2-1 de verilmiştir.

Kabul Kriteri:

- Kabozantinib pikinin alıkonma zamanında çözücü, mobil faz, safsızlık veya girişime sebep olacak pikler gözlenmemelidir.
- Kabozantinib piki spektral olarak saf olmalıdır.

3.8.2.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bir analitik metodun doğrusallığı, numune çözeltisindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonuna karşı dedektör sinyali arasında elde edilen grafiğin, elde edilen test sonucunun belirli bir aralık dahilinde doğrusal olması olarak açıklanır [59]. Sonuçlar 4.3.2 de verilmiştir.

Kabul Kriteri:

- Regresyon doğrusunun korelasyon katsayısı 0,999'dan az olmamalıdır.
- Regresyon doğrusunun eğimi raporlanmalıdır.
- Regresyon doğrusunun kesişme noktası (y-intercept), Standart konsantrasyon seviyesinin %100'ünden elde edilen alanın %2'sinden fazla olmamalıdır.
- Minimum ve maksimum konsantrasyon seviyesindeki alanların bağıl standart sapması %2,0'den az olmalıdır.
- Artık kareler toplamı (RSS) rapor edilmelidir.

Prosedür

Test konsantrasyonunun (0,05 mg/mL) %80, %90, %100, %110 ve %120'sine karşılık gelen standart çözeltiler hazırlanmıştır. Her standart çözelti 3 kez, minimum (%80) ve maksimum seviyelerde (%120) altı kez enjekte edilmiştir.

Doğrusallık çözeltisinin hazırlanması

Kabozantinib'in stok standart çözeltisi

19,15 mg Kabozantinib referans standardı 50,0 mL balonjojeye tartıldı ve çözücü ile çözüldü ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

Seviye 1 (%80): 1,6 mL Kabozantinib stok standart çözeltisi çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltilmiştir ($C_{Kabozantinib}$= 30,272 µg/mL).

Seviye 2 (%90): 1,8 mL Kabozantinib stok standart çözeltisi çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltilmiştir ($C_{Kabozantinib}$= 34,056 µg/mL).

Seviye 3 (%100): 2,0 mL Kabozantinib stok standart çözeltisi çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltilmiştir ($C_{Kabozantinib}$= 37,840 µg/mL).

Seviye 4 (%110): 2,2 mL Kabozantinib stok standart çözeltisi çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltilmiştir ($C_{Kabozantinib}$= 41,624 µg/mL).

Seviye 5 (%120): 2,4 mL Kabozantinib stok standart çözeltisi çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltilmiştir ($C_{Kabozantinib}$= 45,408 µg/mL).

3.8.2.3. Doğruluk

Analiz sonucunda elde edilen değerin, gerçek veya kabul edilen değere ne kadar yakın olduğunu belirler. Başka bir deyişle, yöntemin doğruluğu, teorik olarak hesaplanan değer ile analizle edilen numune çözeltilerinin deneysel sonuçları arasındaki tutarlılığı ve yakınlığı ifade eder. Bu doğruluk, genellikle mutlak hata veya bağıl hata cinsinden belirtilir [59].

Analitik yöntemin doğruluğunu incelemek için kabozantinib test konsantrasyonunun %80, %100 ve %120'si olmak üzere 3 konsantrasyon seviyesinde, her seviye için 3 numune hazırlanarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Her numune iki kez enjekte edilmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.3.3, Tablo 4-52de verilmiştir.

Kabul Kriteri:

Her bir geri kazanım %98,0 - %102,0 aralığında olmalıdır.

Doğruluk çözeltilerinin hazırlanması

%80 konsantrasyon seviyesinde örnek çözelti

Sırasıyla 15,22 mg, 15,20 mg ve 15,22 mg mg kabozantinib standardını 50,0'şar mL'lik balonjojelere tartıldı. Çözücü ile çözüldü ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltilerin 2,0 mL'si çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

%100 konsantrasyon seviyesinde örnek çözelti

Sırasıyla 18,92 mg, 18,87 mg ve 18,85 mg mg kabozantinib standardı 50,0'şar mL'lik balonjojelere tartıldı. Çözücü ile çözüldü ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltilerin 2,0 mL'si çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

%120 konsantrasyon seviyesinde örnek çözelti

Sırasıyla 22,89 mg, 22,81 mg ve 22,77 mg mg kabozantinib standardı 50,0'şar mL'lik balonjojelere tartıldı. Çözücü ile çözüldü ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltilerin 2,0 mL'si çözücü ile 20,0 mL'ye seyreltildi.

3.8.2.4. Sistem kesinliği – Metot kesinliği – Laboratuvarlar arası kesinlik

Bir yöntemin kesinliği, test çözeltisinden ardışık enjeksiyonlarla elde edilen sonuçların tutarlılığına bağlıdır. Bu, homojen bir karışımdan alınan birden fazla numunenin sonuçlarının birbirine yakın olması anlamına gelir. Analitik bir yöntemin kesinliği, ardışık ölçümler arasındaki standart sapma veya varyasyon katsayısı ile belirlenir. Validasyon sırasında, sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvarlar arası kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4-3-4 de verilmiştir.

Kabul Kriteri:

- Sistem kesinliğinde altı ardışık standart enjeksiyonunun bağıl standart sapması (BSS) %2,0'den fazla olmamalıdır.
- Metod kesinliğinde ve laboratuvarlar arası kesinlikte altı adet numune enjeksiyonunun relatif standart sapması (BSS) %2,0'den fazla olmamalıdır.
- Metod kesinliği ve laboratuvarlar arası kesinlik çalışmalarının sonuç ortalamaları arasındaki fark %2,0'den fazla olmamalıdır.

Standart ve numune hazırlıkları bölüm 3.7.2 de detaylıca anlatılmıştır.

3.8.2.5. Sağlamlık

Analitik metodun güvenilirliğini kanıtlamanın bir yolu, metod parametreleri üzerinde planlı küçük değişiklikler yapmaktır. Bu, kolon sıcaklığı, mobil faz pH'ı ve akış hızı gibi değişkenlerde yapılan küçük değişikliklerle yöntemin sağlamlığının belirlenmesini içerir. Yöntemin bu değişikliklerden etkilenmemesi, metodun güvenilirliğini ve sağlamlığını kanıtlar. Sonuçlar Bölüm 4.3.5'de verilmiştir.

Miktar tayini yönteminde sağlamlık parametresini değerlendirmek amacıyla sisteme standart ve çözücü çözeltisi enjekte edilir.

Sağlamlık analizi için metotta kullanılan akış hızı ±0,04 mL/dk, kolon sıcaklığı ±3 ℃ ve mobil faz A pH'sı ±0,5 olarak değiştirilmiştir. Bu değişiklikler yapılarak kör ve standart çözeltisi sisteme uygulanarak sistem uygunluk parametreleri kontrol edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4-55'te verilmiştir.

Kabul Kriteri:

Sistem uygunluk şartları sağlanmalıdır.

Sağlamlık parametresi altında incelenen çözelti stabilitesi, miktar tayini yöntemi için hazırlanan numune çözeltisinin 20 ℃ sıcaklıkta bozulmadan ne kadar süre kararlı kaldığını ölçmeyi amaçlayan bir çalışmadır. Bu çalışmada hazırlanan numune çözeltisi 48 saat boyunca belirli aralıkta sisteme enjekte edilerek pik alanlarındaki değişiklikler takip edilmiştir. Çözelti stabilitesine dair sonuçlar Bölüm 4.3.5, Tablo 4-56'ta yer almaktadır.

3.8.3. Bozundurma Çalışması

Kabozantinib örnekleri, Tablo 3-2'de belirtilen şartlar ve süreler doğrultusunda bozundurulmuş, ardından numuneler aşağıda anlatılan yöntemle hazırlanarak hem miktar analizi hem de ilgili bileşiklerin incelemeleri yapılmıştır. İki farklı analiz sistemi kullanılarak, hem miktar hem de safsızlık oranları hesaplanmış, olası bozunmalar ile miktardaki azalmalar kütle dengesi ve verim açısından Denklem 3-16 ve Denklem 3-17' ye göre değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4-57'de verilmiştir.

Bozundurulmamış numunelerin hazırlanması

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 0,5 mL çözücü-2 ile çözülür ve hacmine çözücü-3 ile tamamlanır ($C_{Kabozantinib}$= 0,5 mg/mL).

Miktar tayini testi için

2,0 mL ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Isı ile bozundurma numunelerin hazırlanması

2 g kabozantinib numunesi vezin kabı içerisine alınıp 80 ℃'ye ayarlanmış etüvde kapağı açık olarak 14 gün boyunca bekletilmiş ve bu numune ile ilgili bileşikler ve miktar tayini testleri için çözeltiler hazırlanmıştır.

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg ısı ile bozundurulmuş kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 0,5 mL çözücü-2 ile çözülür ve hacmine çözücü-3 ile tamamlanır ($C_{Kabozantinib}$= 0,5 mg/mL).

Miktar tayini testi için

2,0 mL ısı ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır.

Gün ışığı ile bozundurma numunelerin hazırlanması

2,0 g kabozantinib numunesi vezin kabı içerisine alınıp kapağı kapalı olarak fotostabilite kabininde 60 gün boyunca gün ışığına maruz bırakılmış ve bu numune ile ilgili bileşikler ve miktar tayini testleri için çözeltiler hazırlanmıştır.

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg gün ışığı ile bozundurulmuş kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 0,5 mL çözücü-2 ile çözülür ve hacmine çözücü-3 ile tamamlanır ($C_{Kabozantinib}$= 0,5 mg/mL).

Miktar tayini testi için

2,0 mL günışığı ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Uv ışığı ile bozundurma numunelerin hazırlanması

2 g kabozantinib numunesi vezin kabı içerisine alınıp kapağı kapalı olarak fotostabilite kabininde 60 gün boyunca ultraviole ışığa maruz bırakılmış ve bu numune ile ilgili bileşikler ve miktar tayini testleri için çözeltiler hazırlanmıştır.

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg ultraviole ışığı ile bozundurulmuş kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 0,5 mL çözücü-2 ile çözülür ve hacmine çözücü-3 ile tamamlanır ($C_{Kabozantinib}$= 0,5 mg/mL).

Miktar tayini testi için

2,0 mL ultraviole ışığı ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Nötral hidroliz ile bozundurma numunelerin hazırlanması

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 5,0 mL su eklenerek 3 saat süresince 70 ℃ su banyosunda tutulur. 3 saat sonunda soğutulur ve üzerine 0,5 mL çözücü-2 ilave edilip hacmine çözücü-3 ile tamamlanır.

Miktar tayini testi için

2,0 mL nötral hidroliz ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır.

Asidik hidroliz ile bozundurma numunelerin hazırlanması

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 1,0 mL 5M HCl çözeltisi eklenerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilir. 24 saatin sonunda nötürleştirme amacıyla 1,0 mL 5M NaOH eklenir ve üzerine 0,5 mL çözücü-2 ilave edilip hacmine çözücü-3 ile tamamlanır.

Miktar tayini testi için

2,0 mL asidik hidroliz ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Bazik hidroliz ile bozundurma numunelerin hazırlanması

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 1,0 mL 5M NaOH çözeltisi eklenerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilir. 24 saatin sonunda nötürleştirme amacıyla 1,0 mL 5M HCl eklenir ve üzerine 0,5 mL çözücü-2 ilave edilip hacmine çözücü-3 ile tamamlanır.

Miktar tayini testi için

2,0 mL bazik hidroliz ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Oksidasyon ile bozundurma numunelerin hazırlanması

İlgili bileşikler testi için

10,0 mg kabozantinib numunesi 20,0 mL'lik balon jojeye tartılır, 5,0 mL %30 H_2O_2 çözeltisi eklenerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilir. 24 saatin sonunda üzerine 0,5 mL çözücü-2 ilave edilip hacmine çözücü-3 ile tamamlanır.

Miktar tayini testi için

2,0 mL oksidasyon ile bozundurulmuş ilgili bileşikler numunesi 20,0 mL ye miktar tayini çözücü ile tamamlanır

Kütle denkliği = Miktar tayini (%) + Toplam safsızlık (%) **Denklem 3-2**

$$\text{Verim (\%)} = \frac{Kütle\ denkliği_{işlem\ görmüş\ numune}}{Kütle\ denkliği_{işlem\ görmemiş\ numune}}$$ **Denklem 3-3**

4. BULGULAR

Kabozantinibin etken maddesinin sentez sürecinde, safsızlık profillerinin sentez aşamasıyla birlikte değerlendirilmesi büyük önem taşır. Sentez ve analitik incelemeler, birbirini tamamlayan süreçler olarak paralel bir şekilde yürütülmelidir. Bu çalışmada, ele alınan etken maddelerin safsızlık profili, sentez sürecinin başlangıcından itibaren detaylı olarak incelenmiştir. İlk olarak, sentez sırasında ortaya çıkabilecek safsızlıklar, başlangıç maddelerinden kaynaklanan veya reaksiyon ortamında kalabilecek yan ürünler belirlenmiştir. Ardından, farklı stres testleri uygulanarak bozunma süreçlerinde oluşabilecek safsızlıklar tespit edilmiştir.

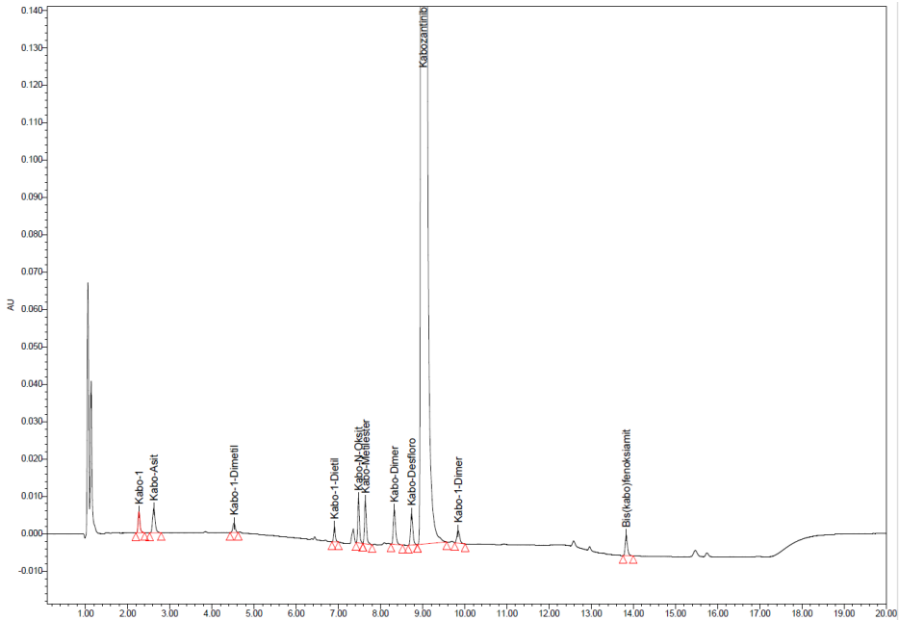
Bir molekülün standart olarak kabul edilebilmesi için yapısal karakterizasyonunun tam olarak yapılması ve kantitatif analizlerin eksiksiz tamamlanması gereklidir. Bu amaçla, HPLC, GC, FT-IR, C-NMR, H-NMR, nem tayini ve inorganik madde analizi gibi çeşitli analitik teknikler kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda, sentezlenen yapıların karakterizasyonu doğrulanmış ve saflık seviyeleri belirlenmiştir. **Ham datalar** bölümünde karakterizasyon dataları sunulmuştur. Tez kapsamında incelenen etken maddeler ve tespit edilen safsızlıklar, DEVA Holding A.Ş. API Ar-Ge sentez ekibi tarafından sentezlenmiş olup, analitik incelemeler DEVA Holding A.Ş. API Ar-Ge analitik ekibi tarafından gerçekleştirilerek standart olarak onaylanmıştır. Validasyon çalışmalarında kullanılan referans standartların yapı ve saflık bilgileri Tablo 3-1'de verilmiştir.

Metot geliştirme, ilgili bileşikler ve miktar tayini yöntemlerindeki validasyon bulguları ek olarak bozundurma çalışmalarına ait bulgular Bölüm 4.1, Bölüm 4.2, Bölüm 4.3 ve Bölüm 4.4'te sunulmuştur.

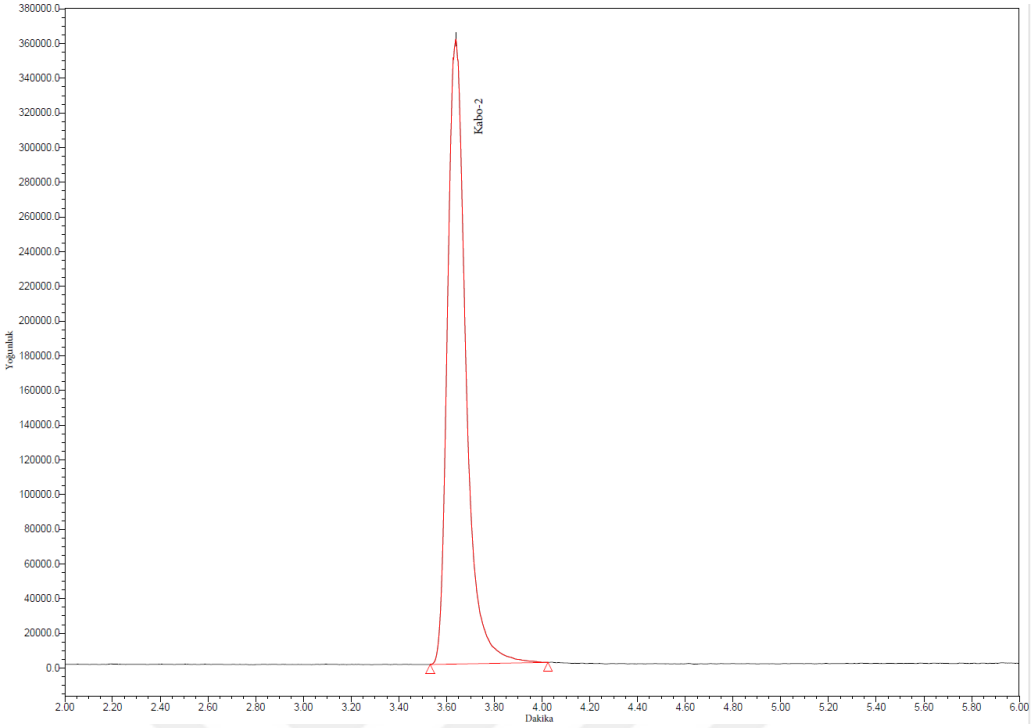
4.1. Metot Geliştirme

4.1.1. Detektör Seçimi

Metot geliştirme bölümünde dedektör seçimi, analiz yöntemimin başarısını doğrudan etkileyen kritik bir unsurdur. Bu çalışmada, UPLC-UV-MS sıralı sistemini kullanarak kabozantinib'in genotoksik safsızlığı olan Kabo-2' nin tespiti için MS dedektör tercih edilmiştir. Kabo-2, hem kabozantinib'in başlangıç maddesi olması hem de bozunma safsızlığı niteliği taşıması nedeniyle rutin kontrolü hayati önem taşımaktadır. Genotoksik safsızlıkların insan sağlığı üzerindeki potansiyel riskleri göz önüne alındığında, 71 ppm gibi düşük bir limitin tespiti, yüksek hassasiyet gerektirmektedir. UV dedektörler birçok analitik uygulamada yeterli olabilirken, Kabo-2' nin safsızlık düzeyindeki genotoksik bileşenlerin güvenilir ve kesin bir şekilde saptanabilmesi için MS dedektörünün üstün hassasiyetine ihtiyaç duyulmaktadır. MS dedektör, düşük konsantrasyonlardaki bileşenleri tespit etme kabiliyeti ile bu çalışmada optimal seçim olmuştur. Bu nedenle, Kabo-2' nin safsızlık analizinde doğru ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için MS dedektör kullanımı tercih edilmiştir. Dedektör optimizasyonu yapılırken Cone voltajı 15V, Prop sıcaklığı 600 °C ve kapiler voltajı 0,8 kV olarak belirlendi. Geriye kalan diğer tüm safsızlıklar için UV dedektör uygun bulunmuştur. UV detektör ile safsızlıkların yanı sıra kabozantinibin miktar tayinini de mümkün kılar. Çalışmalar kabozantinib'in maksimum dalga boyunda 240 nm de gerçekleştirilmiştir. Şekil 4-1, Şekil 4-2.



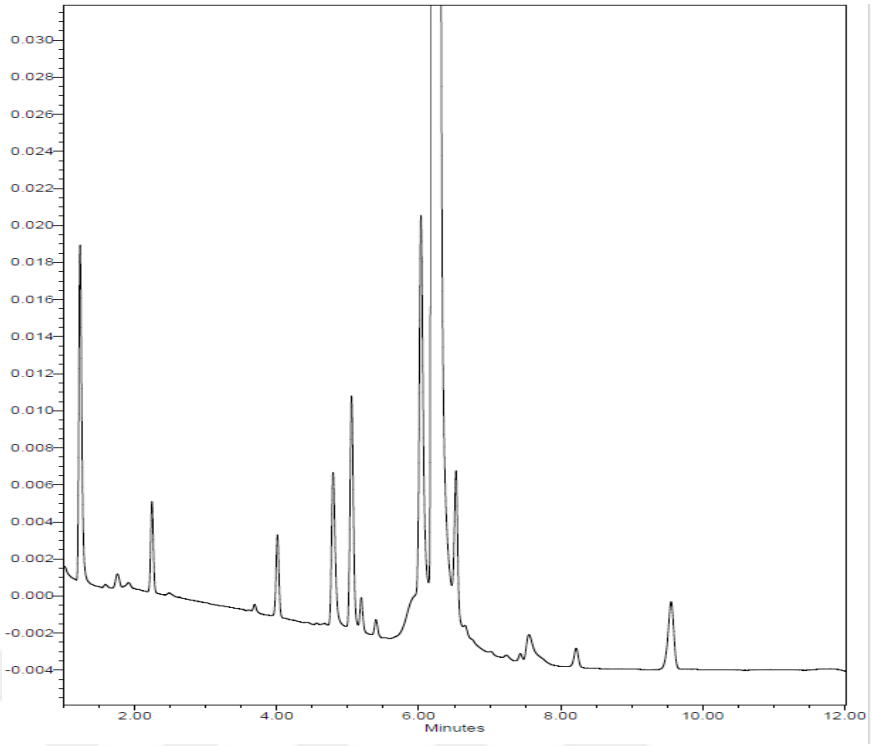
Şekil 4-1: UV detektör ile elde edilmiş örnek kromatogram



Şekil 4-2: MS detektör ile elde edilmiş örnek kromatogram

4.1.2. Kolon seçimi

Miktar tayini yönteminde, kabozantinib sinyalinin diğer safsızlıklardan ve çözücü sinyalinden ayrıştırılması hedeflenmiştir. Bu nedenle, sistemdeki safsızlıkların kolonda tutulması dikkate alınmamış, yalnızca kabozantinib sinyaline odaklanılmıştır. Sabit faz seçimi de bu doğrultuda yapılmış olup, kabozantinibin en kısa sürede elüe olduğu ve diğer safsızlık piklerinden net bir şekilde ayrıldığı kolon olarak Acquity BEH C_8 (100 mm, 2.1 mm, 1.7 µm) seçilmiştir. Diğer taraftan, ilgili bileşikler yöntemi için Acquity HSS T3 sabit faz kolonuyla yapılan denemelerde Kabo-1 ve Kabo-Asit safsızlıklarının birbirinden ayrılamadığı, Kabo-desfloro ile kabozantinib arasında yeterli bir ayrım sağlanamadığı gözlemlenmiştir (bkz. Şekil 4-3). Benzer şekilde, Acquity BEH C_8 kolonuyla yapılan çalışmalarda da Kabo-1 ve Kabo-Asit yeterince ayrılamamış, ayrıca Kabo-N-Oksit ve Kabo-Metilester pikleri birbirine karışmıştır. Ancak, gradient akış sırasında organik faz oranı ayarlandığında, Acquity BEH C_{18} kolonu ile ideal alıkonma süresi ve kabozantinibin diğer safsızlıklardan başarılı bir şekilde ayrımı elde edilmiştir (bkz. Şekil 4-1).



Şekil 4-3: Acquity HSS T3 ile elde edilmiş kromatogram

4.1.3. Hareketli faz ve pH seçimi

Hareketli faz seçimi yapılırken kütle dedektörünün kullanılacak olması, fazın uçucu özellikte olmasını zorunlu kılmış ve bu doğrultuda amonyum format tercih edilmiştir. Çalışmada, Kabo-1 yapısındaki karboksilik asit grubu ve Kabo-2 yapısındaki amin grubu, mobil faz pH'sındaki değişimlere karşı yüksek hassasiyet göstermiştir. Bu durum, hareketli faz pH'sının sistem performansı üzerinde kritik bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Asidik karaktere sahip olan Kabo-1, düşük pH koşullarında protonlanarak daha az polar bir özellik kazanır ve alıkonma zamanı artar. Buna karşılık, yüksek pH değerlerinde iyonlaşarak daha polar hale gelir ve alıkonma zamanı azalır. Bazik karakterdeki Kabo-2 ise tam tersi davranış sergiler; düşük pH'da iyonlaşarak polaritesi artar ve alıkonma zamanı kısalırken, yüksek pH koşullarında proton kaybederek daha az polar hale gelir ve alıkonma zamanı uzar.

Hem asidik hem de bazik karaktere sahip bu safsızlıkların optimum ayrımının sağlandığı ve Kabo-2'nin pik şeklinin bozulmadan, kütle dedektöründe en etkin iyonlaşmanın gerçekleştiği pH değeri 4.5 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, hareketli fazın pH optimizasyonunun, hem pik kalitesi hem de dedektör performansı açısından kritik bir parametre olduğunu göstermektedir.

4.1.4. Organik faz seçimi

Organik çözücü taramaları sırasında metanol ve asetonitril, hem seyreltici hem de mobil faz sistemleri için değerlendirilmiştir. Yapılan incelemelerde, asetonitrilin metanole kıyasla daha keskin pikler, üstün pik şekilleri ve özellikle numunelerde daha yüksek stabilite sağladığı belirlenmiştir. Bu nedenle, organik çözücü olarak her iki sistemde de asetonitril tercih edilmiştir. Ayrıca metanole kıyasla daha düşük kolon basıncı oluşturarak kolonun kullanım ömrünü artırmıştır.

4.1.5. Akış hızı ile kolon ve numune sıcaklığının seçimi:

Akış hızındaki küçük değişimlerin pikler arasındaki ayrım faktörü üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kolon basıncı, alıkonma süreleri ve mobil faz tüketimi gibi parametreler dikkate alınarak akış hızı 0.3 mL/dk olarak optimize edilmiştir. Analiz süresini kısaltmak ve verimliliği artırmak amacıyla kolon sıcaklığı 30°C'de sabitlenmiştir. Numune stabilitesinin analiz boyunca korunması için ise numune sıcaklığı 20°C olarak ayarlanmıştır.

4.1.6. Gradient seçimi

Metot geliştirme sürecinde, gradient programının belirlenmesi, ayırma gücünü artıran en kritik adımlardan biridir. Gradient elüsyon, özellikle karmaşık karışımları analiz ederken, bileşenlerin kolon içindeki retansiyon sürelerini etkileyerek ayırma kapasitesini önemli ölçüde artırır. Bu çalışmada, gradient programı belirlenirken çeşitli başlangıç ve sonlanış koşulları, basamak uzunlukları ve eğim değişimleri gibi parametreler detaylı bir şekilde optimize edilmiştir.

İlk olarak, hareketli fazın bileşimi %A (su içeren faz) ve %B (organik faz) arasında değişen başlangıç koşulları belirlenmiştir. Daha sonra, hedef molekül ve safsızlıkların maksimum ayrımı sağlayacak şekilde gradient eğimleri ve süreleri sistematik bir yaklaşımla test edilmiştir. Denemelerde, lineer gradient uygulamaları tercih edilmiş ve %A'nın %5-50 arasında değişim gösterdiği farklı programlar oluşturulmuştur.

Bu süreçte UV ve MS dedektörlerden elde edilen veriler, her bir gradient programının etkinliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Özellikle, hedef analit olan kabozantinib ve ilgili safsızlıkların pik çözünürlükleri (Rs), retansiyon süreleri (Rt), pik simetrisi ve pik genişliği gibi analitik parametreler değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerin sonunda, zamana karşı mobil faz-A daki değişim (%): 0/75, 2/75, 5/50, 10/50,

11/35, 15/35, 15,5/75 ve 20/75 olacak şekilde programın oluşturulması en uygun sonuçları vermiştir.

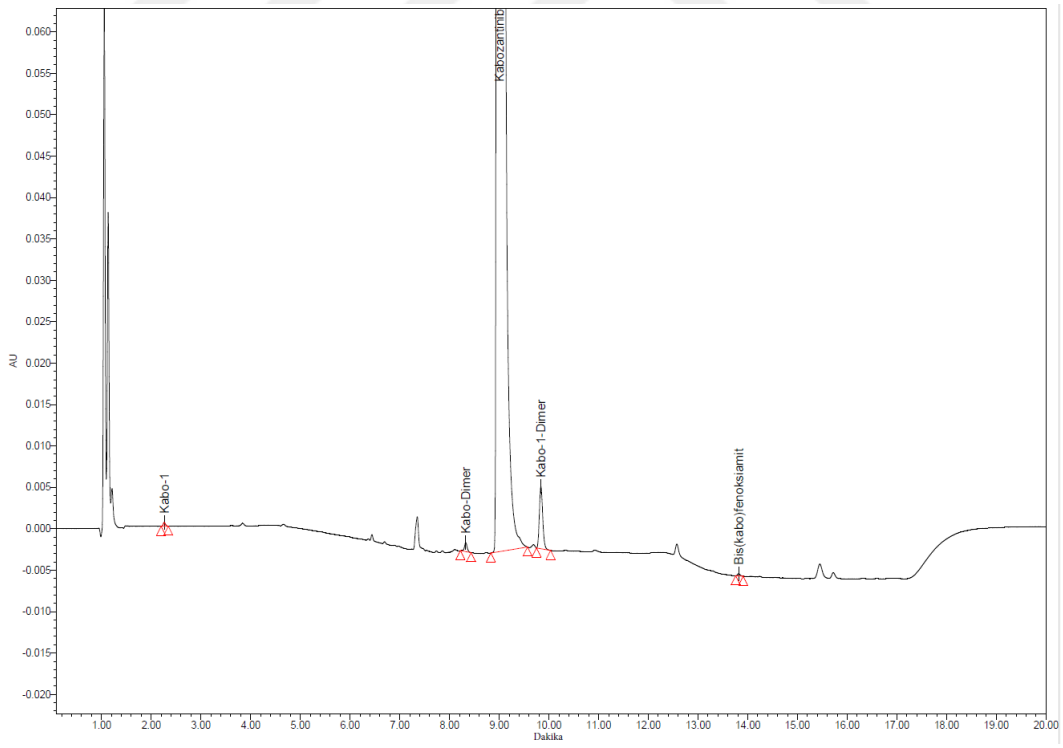
Bu seçimin temel avantajı, hem hedef molekülün hem de oluşan safsızlıkların çözünürlük değerlerinin yeterince yüksek olmasıdır. Ayrıca, bu program, analiz süresinin kısa tutulmasını sağlarken, aynı zamanda baseline stabilitesini de koruyarak tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmesine olanak tanımıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada gradient programının optimize edilmesi, analitik metot geliştirme sürecinde ayırma gücünü artırmış ve hassasiyeti yüksek bir metodoloji oluşturulmasını sağlamıştır. Bu, özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunan genotoksik safsızlık olan Kabo-2 nin tespiti için kritik bir adımdır.

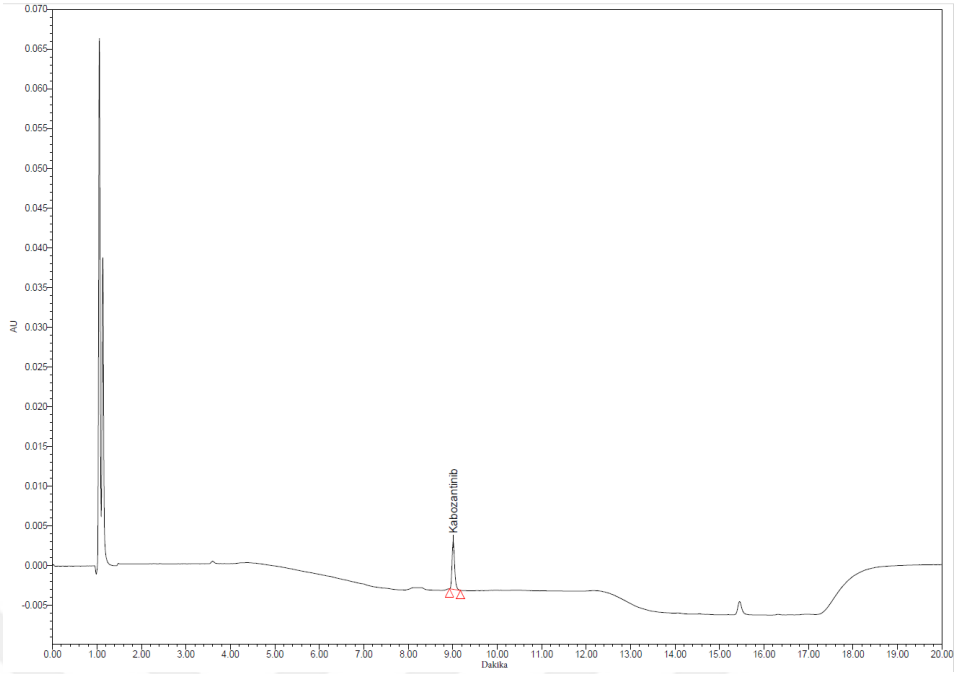
4.2. İlgili Bileşikler Validasyon Yöntemi

4.2.1. Sistem uygunluk testi

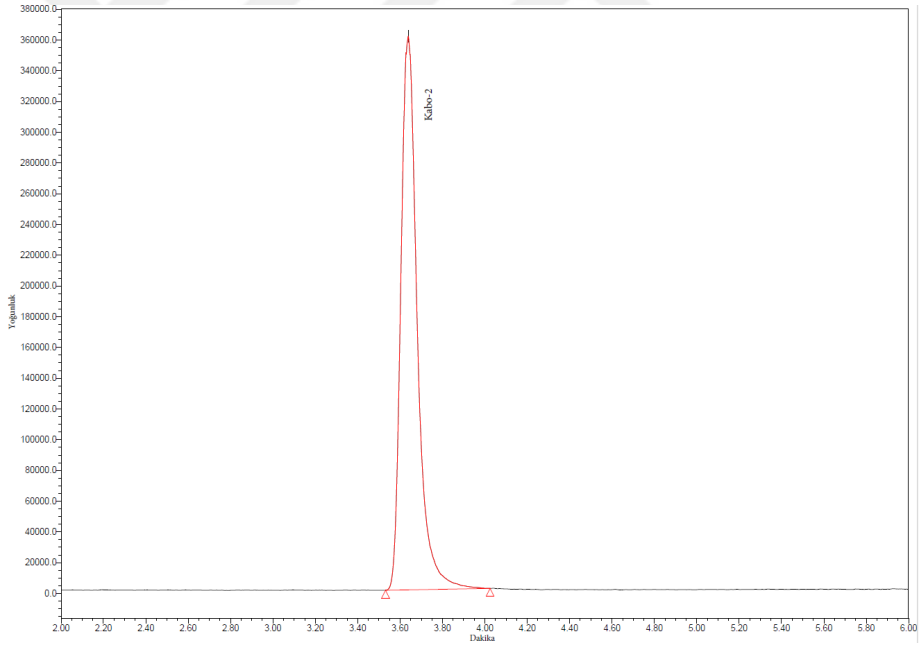
Sistem uygunluğu için verilen sistem uygunluk ve standart çözeltilerine ait kromatogramlar Şekil 4-4 ile Şekil 4-6 arasında verilmiştir.



Şekil 4-4: Sistem uygunluk kromatogramı



Şekil 4-5: Kabozantinib standart kromatogramı



Şekil 4-6: Kabo-2 standart kromatogramı

Tablo 4-1: Sistem uygunluk sonuçları

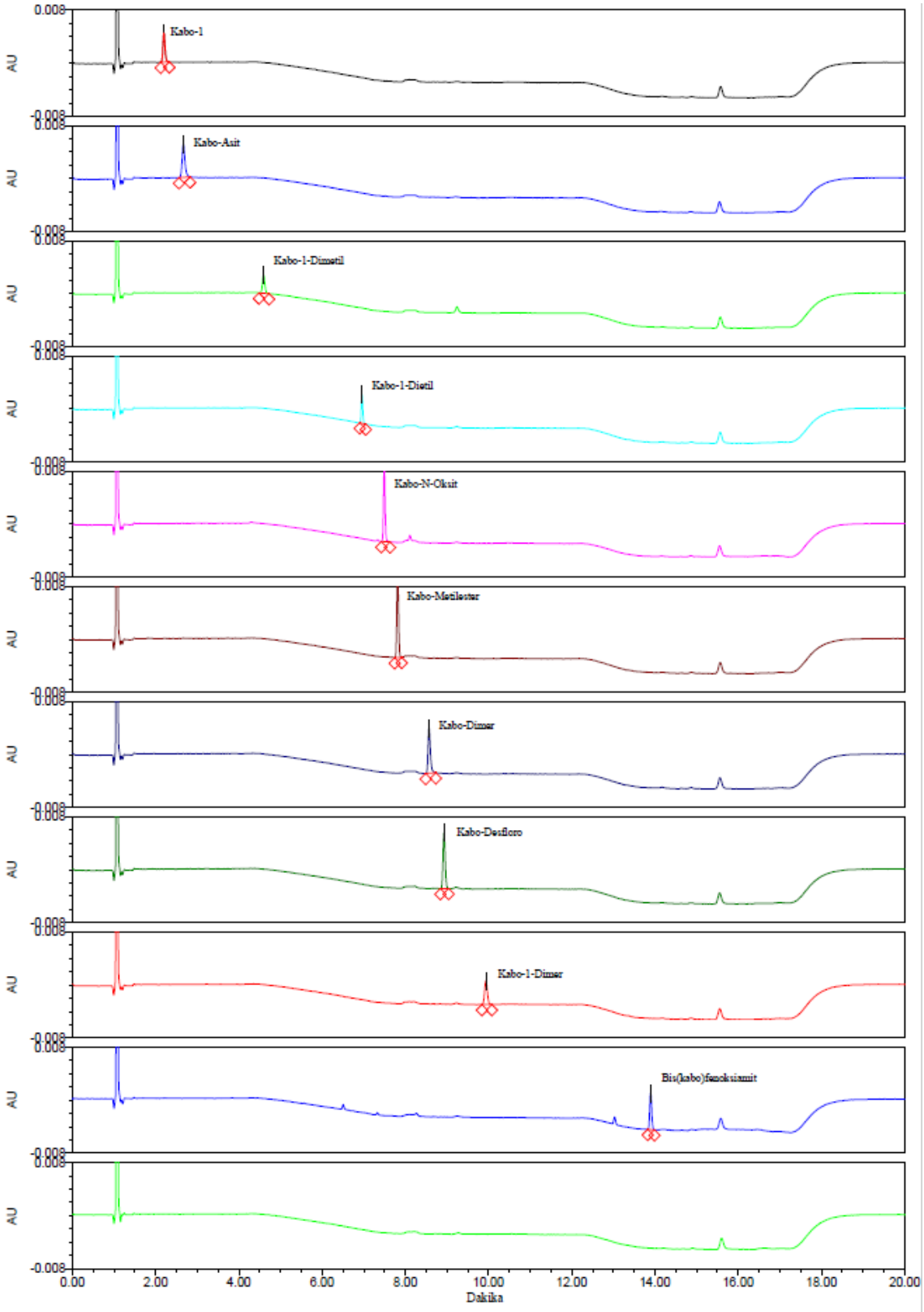
Enjeksiyon Numarası	Alanlar		Ayrım Faktörü
	Kabozantinib	Kabo-2	
1	24381	2417197	
2	24748	2425754	
3	24665	2416399	
4	24264	2388237	
5	24616	2389371	7,5
6	24222	2460482	
Average	24483	2416240	
SD	222,5	26664,3	
% BSS	0,91	1,10	

4.2.2. Seçicilik

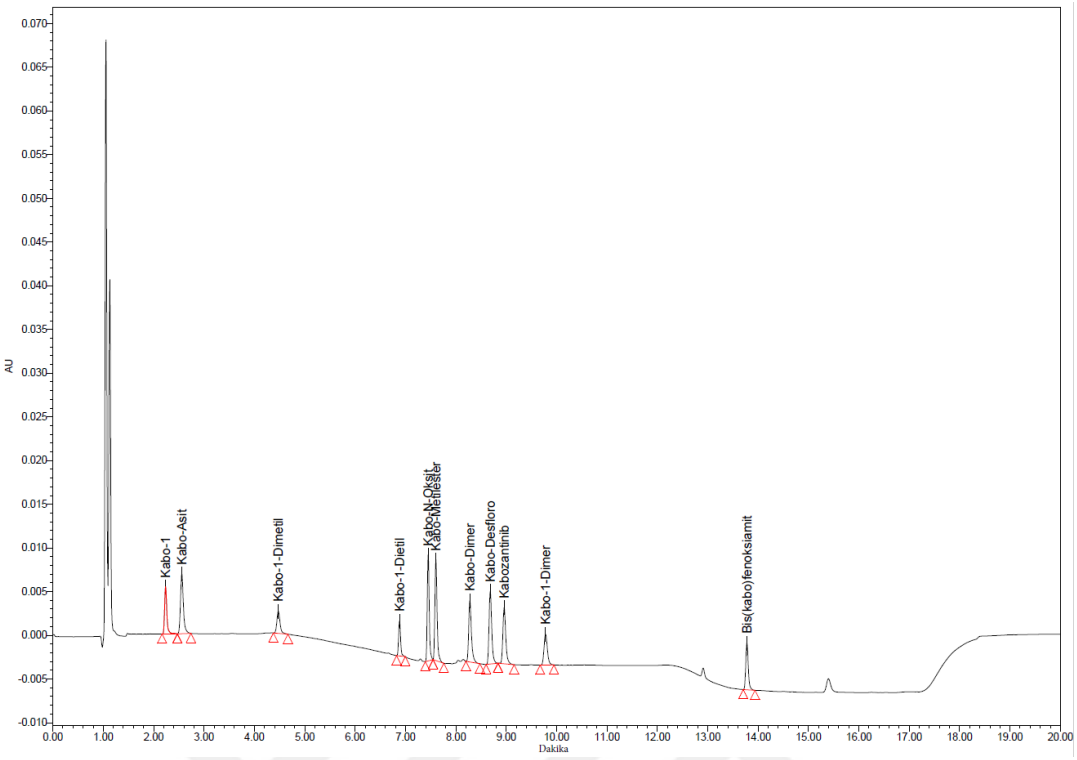
Seçicilik, kromatogramdaki piklerin incelenmesiyle etken madde ve safsızlıkların ayrışma dereceleri ve bunlar arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir. Kabozantinib ve Tablo 3.1'de listelenen olası safsızlıklara ait sinyaller üç boyutlu olarak taranmış ve her bir bileşenin kromatografik saflığı detaylı olarak analiz edilmiştir. Bu analiz sonuçlarına dair bulgular Tablo 4.2'de sunulmuş olup, kromatogramın görsel Şekil 4.7'de yer almaktadır.

Tablo 4-2: İlgili bileşikler yöntemi için seçicilik parametresine ait sonuçlar

Safsızlık	Alıkonma zamanı (dk)	Bağıl alıkonma zamanı	Ayrım (R_s)	Pik saflık açısı	Saflık eşiği
Kabozantinib	8,97	NA	2,9	0,719	1,167
Kabo-1	2,25	0,25	-	0,745	1,258
Kabo-Asit	2,58	0,29	3,9	0,505	0,890
Kabo-2	3,59	0,40	-	NA	NA
Kabo-1-dimetil	4,49	0,50	18,4	1,891	2,538
Kabo-1-dietil	6,89	0,77	28,1	0,783	1,426
Kabo-N-Oksit	7,46	0,83	8,6	0,416	0,782
Kabo-Metilester	7,61	0,85	2,5	0,691	0,786
Kabo-Dimer	8,29	0,92	8,4	0,645	1,047
Kabo-desfloro	8,70	0,97	4,4	0,614	0,912
Kabo-1-dimer	9,79	1,09	7,5	1,031	1,684
Bis(kabo)fenoksiamit	13,78	1,54	40,6	0,723	1,201



Şekil 4-7: Tek tek tüm safsızlıkların blank ile çakıştırılmış kromatogramı

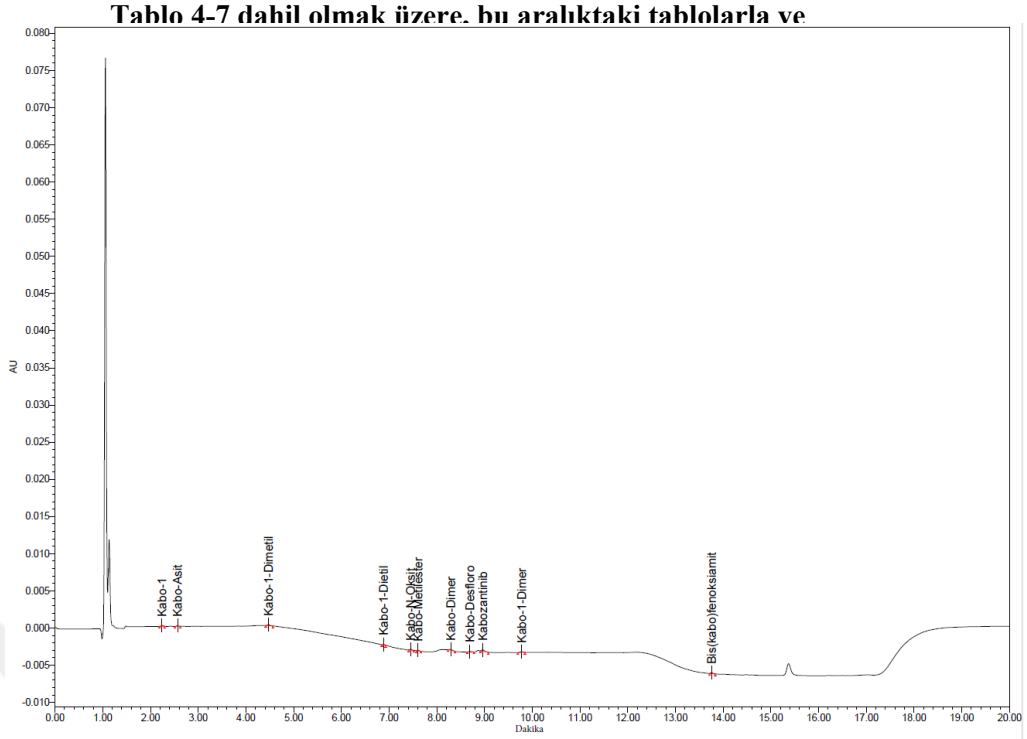


Şekil 4-8: 10 bilinen safsızlık ve kabozantinib'in limit derişimdeki kromatogramı.

4.2.3. Nicelik ve Nitelik Sınırları (LOQ ve LOD)

Bölüm 3.8.1.4 e göre belirli konsantrasyonlarda hazırlanan safsızlık standart çözeltileri enjekte edildi ve elde edilen sinyal/gürültü oranlarına göre nitelik ve nicelik sınır değer derişimleri hesaplanıp sisteme verildi. Piklerin durumu incelendi, nitelik sınırı için s/n oranının 3 civarında nicelik sınırı için ise 10 civarında olduğu tespit edildi. Ayrıca nicelik konsantrasyonlarının güvenilir sonuçlar verip vermediğinin anlaşılması için bu konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler 6 kez ardışık olarak enjekte edilerek alanlarının bağıl standart sapmaları hesaplandı. Tüm sonuçlar, Tablo 4-3 ve

Tablo 4-7 dahil olmak üzere, bu aralıktaki tablolarla ve



Şekil 4-9 ve Şekil 4-12 dahil olmak üzere bu aralıktaki kromatogramlarda gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Tüm safsızlıkların limit seviyede derişimlerinden elde edilen sinyal-gürültü (S/N) oranları

Safsızlıklar	Derişim, ng/mL	Ortalama S/N oranı
Kabozantinib	0,503	211
Kabo-1	0,754	179
Kabo-Asit	0,778	248
Kabo-1-dimetil	0,744	86
Kabo-1-dietil	0,758	133
Kabo-N-Oksit	0,768	399
Kabo-Metilester	0,757	379
Kabo-Dimer	0,754	239
Kabo-desfloro	0,745	272
Kabo-1-dimer	0,743	115
Bis(kabo)fenoksiamit	0,753	177
Kabo-2	0,02775	751

Tablo 4-4: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları

Enjeksiyon No	Kabozantinib	Kabo-1	Kabo-Asit	Kabo-2
1	**1661**	**1092**	**1167**	**36650**
2	**1754**	**1160**	**1184**	**33084**
3	**1782**	**1134**	**1173**	**30969**
4	**1758**	**1146**	**1134**	**34091**
5	**1601**	**1144**	**1142**	**34216**
6	**1736**	**1122**	**1169**	**35953**
Ortalama	**1715**	**1133**	**1162**	**34161**
SS	**69,6**	**23,8**	**19,3**	**2037,8**
%BSS	**4,1**	**2,1**	**1,7**	**6,0**

Tablo 4-5: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları

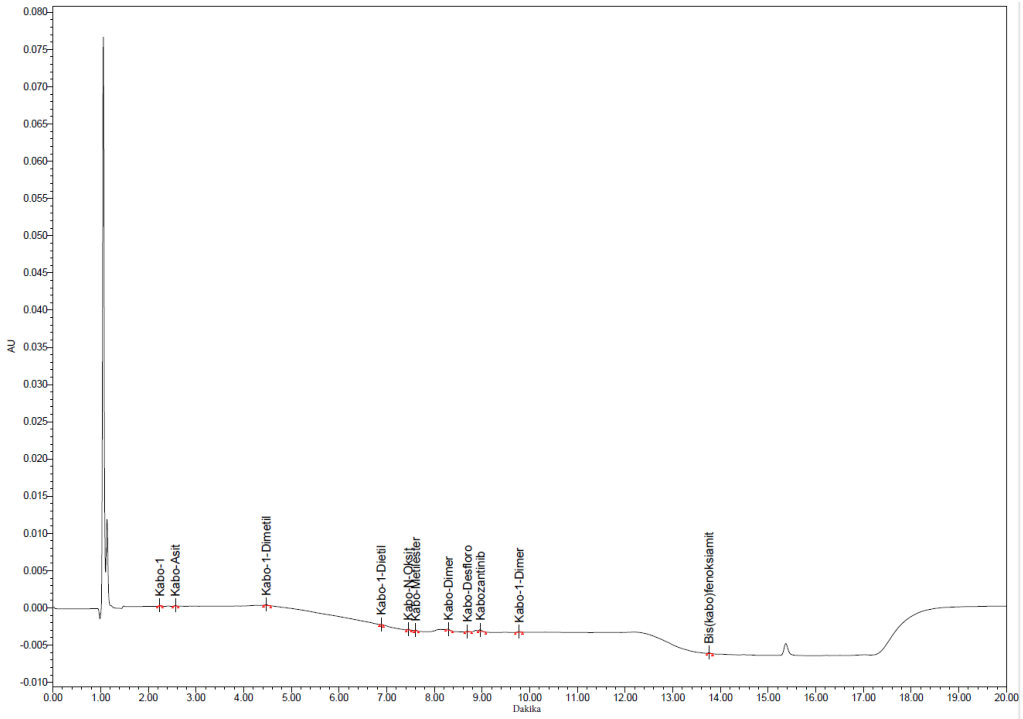
Enjeksiyon No	Kabo-1-dimetil	Kabo-1-dietil	Kabo-N-Oksit	Kabo-Metilester
1	1681	1081	1231	1065
2	1690	1050	1185	1088
3	1694	1077	1221	1033
4	1659	1090	1221	1117
5	1597	1035	1213	1108
6	1639	1039	1248	1032
Ortalama	1660	1062	1220	1074
SS	37,2	23,5	20,9	36,7
%BSS	2,2	2,2	1,7	3,4

Tablo 4-6: Bilinen safsızlıkların nicellik seviyesindeki (LOQ) derişimindeki çözeltisinin 6 tekrar enjeksiyonunden elde edilen alanları

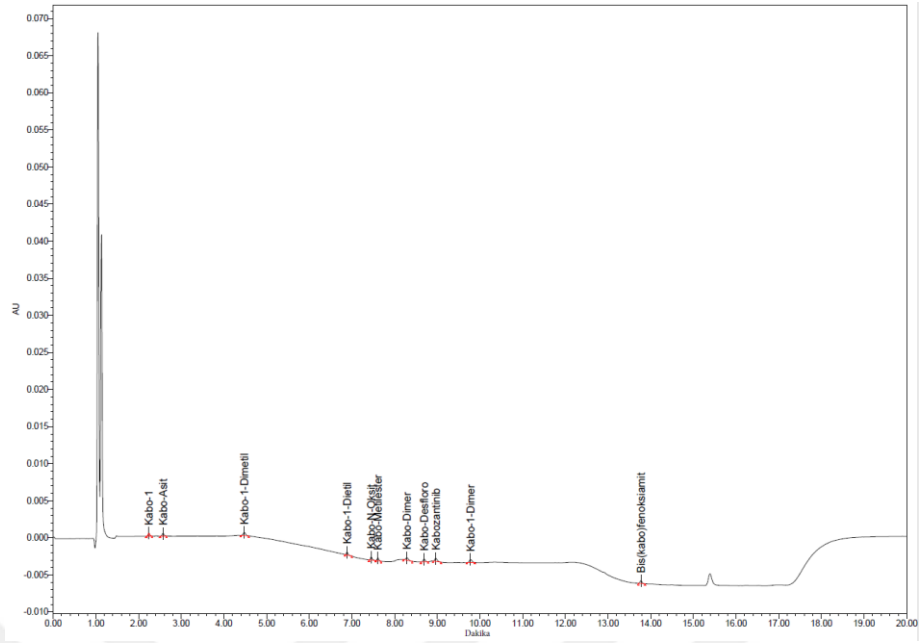
Enjeksiyon No	Kabo-Dimer	Desfloro-kabo	Kabo-1-dimer	Bis(kabo)fenoksiamit
1	1469	1381	1669	1294
2	1422	1358	1720	1306
3	1323	1392	1759	1279
4	1397	1343	1763	1242
5	1332	1387	1774	1297
6	1357	1338	1739	1347
Ortalama	1383	1367	1737	1294
SS	56,5	23,3	38,6	34,3
%BSS	4,1	1,7	2,2	2,7

Tablo 4-7: Nitellik ve Nicellik bulguları

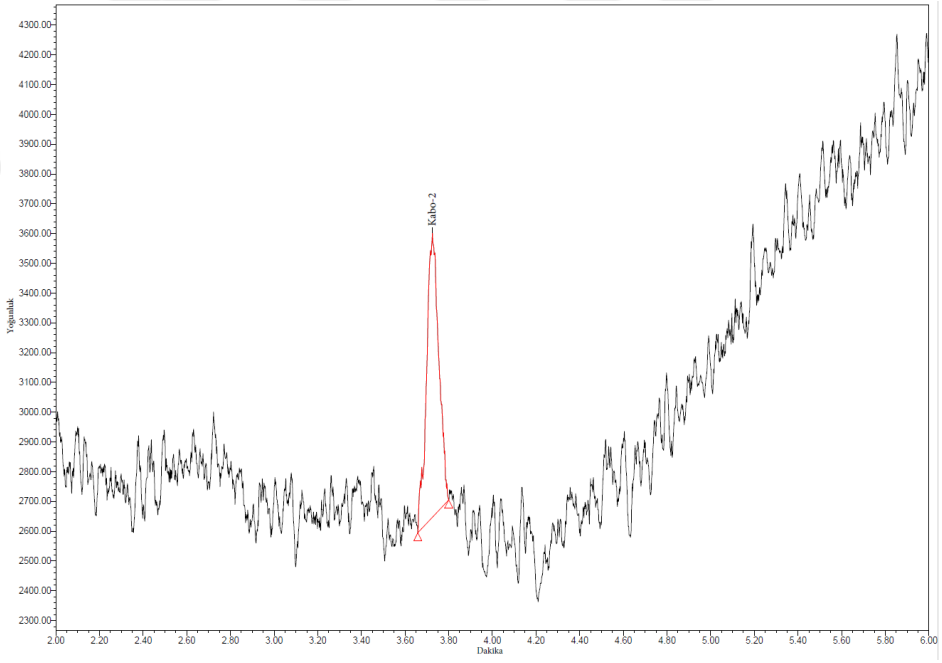
Safsızlıklar	Nitellik (LOD)		Nicellik (LOQ)		S/N	
	ng/mL	%	ng/mL	%	LOD	LOQ
Kabozantinib	7,53	0,0015	25,10	0,0050	8	13
Kabo-1	12,45	0,0025	41,50	0,0083	4	12
Kabo-Asit	9,33	0,0019	31,10	0,0062	4	11
Kabo-1-dimetil	25,68	0,0051	85,60	0,0171	5	13
Kabo-1-dietil	17,04	0,0034	56,80	0,0114	4	12
Kabo-N-Oksit	5,76	0,0011	19,20	0,0038	5	13
Kabo-Metilester	5,67	0,0011	18,90	0,0038	4	12
Kabo-Dimer	9,03	0,0018	30,10	0,0060	4	10
Kabo-desfloro	7,83	0,0016	26,10	0,0052	4	12
Kabo-1-dimer	19,38	0,0039	64,60	0,0129	4	12
Bis(kabo)fenoksiamit	12,42	0,0025	41,40	0,0083	5	12
Kabo-2	0,111	0,000030	0,37	0,0001	3	11



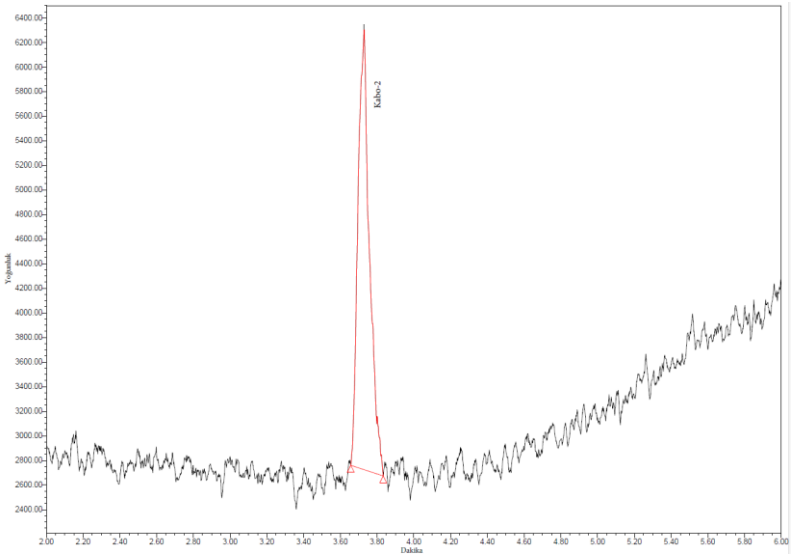
Şekil 4-9: Kabo-2 hariç diğer bilinen safsızlıklar ve kabozantinib'e ait nitellik (LOD) kromatogramı



Şekil 4-10: Kabo-2 hariç diğer bilinen safsızlıklar ve kabozantinib'e ait nicellik (LOQ) kromatogramı



Şekil 4-11: Kabo-2 nitellik (LOD) kromatogramı



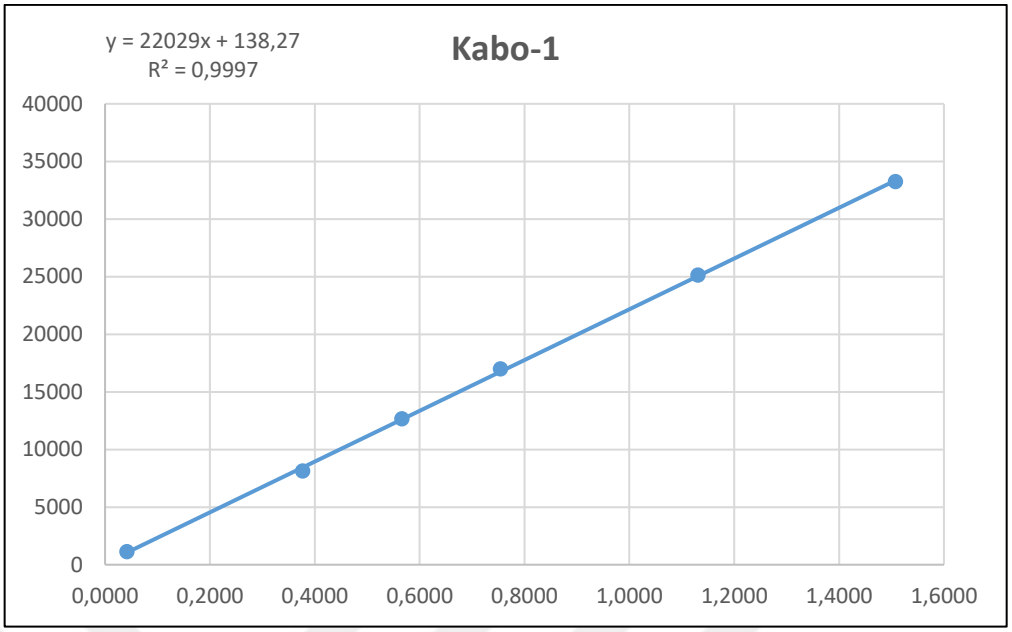
Şekil 4-12: Kabo-2 nicellik (LOQ) kromatogramı

4.2.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bölüm 3.8.1.4 deki çözelti hazırlıklarına göre yapılmış olan doğrusallık ve çalışma aralığı çalışmasına ait tüm sonuçlar aşağıdaki tablo (Tablo 4-8, Tablo 4-25) ve şekillerde (Şekil 4-13, Şekil 4-24) özetlenmiştir.

Tablo 4-8: Kabo-1 için doğrusallık sonucu.

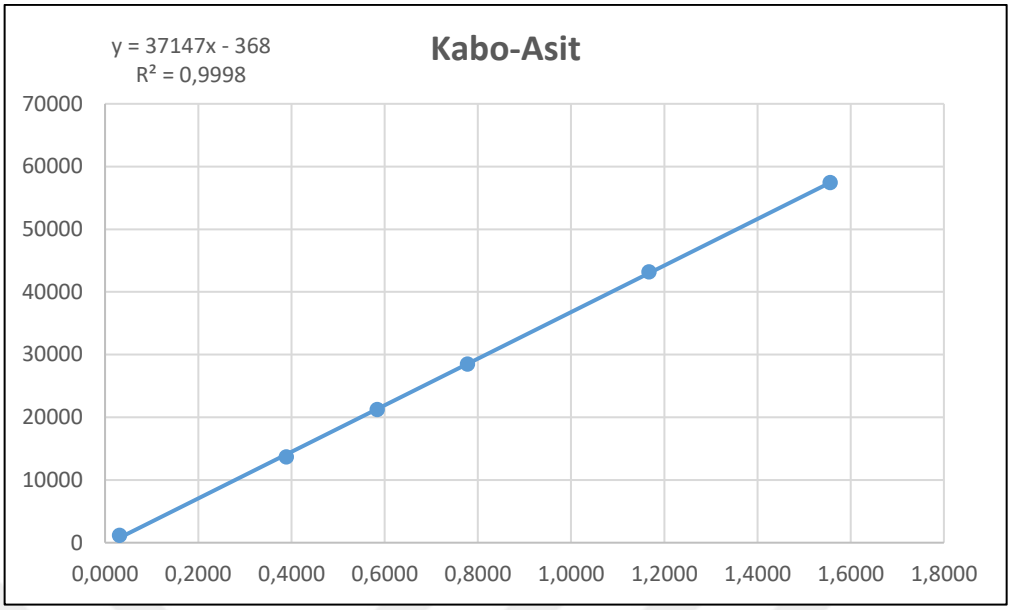
Kabo-1				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0415**	**1133**	**1052**	**6561**
%50	**0,377**	**8120**	**8443**	**104329**
%75	**0,566**	**12650**	**12607**	**1849**
%100	**0,754**	**16989**	**16748**	**58081**
%150	**1,131**	**25120**	**25053**	**4489**
%200	**1,508**	**33250**	**33358**	**11664**
			Artıkların kareleri toplamı	**186973**
			Korelasyon katsayısı	**0,9999**
			Eğim	**22029**
			y-kesim noktası	**138,269**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,8**



Şekil 4-13: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1 safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-9: Kabo-Asit için doğrusallık sonucu.

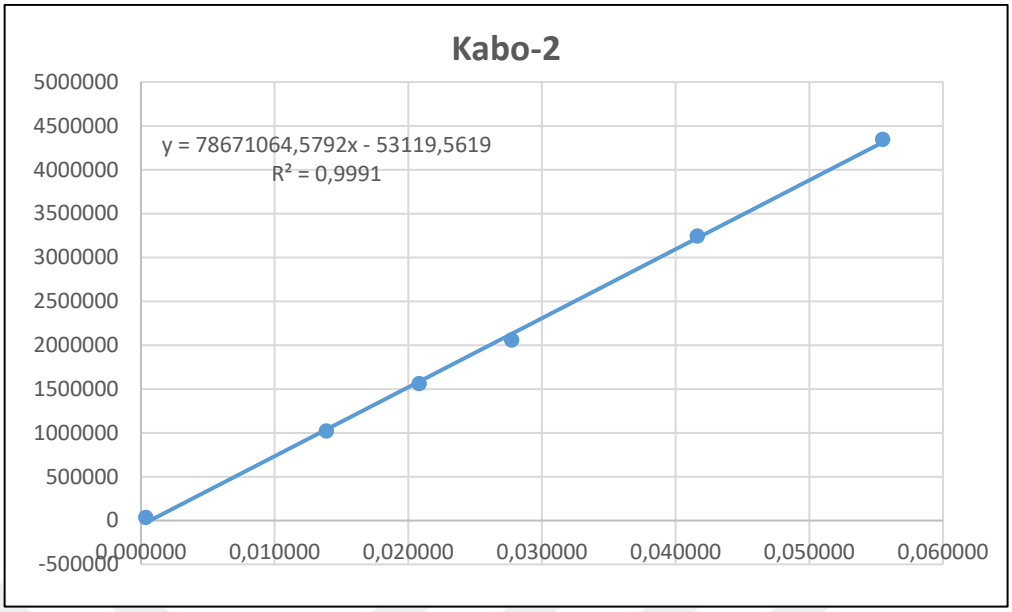
Kabo-Asit				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi $(Y1-Y2)^2$**
LOQ	**0,0311**	**1162**	**787**	**140625**
%50	**0,389**	**13652**	**14082**	**184900**
%75	**0,584**	**21236**	**21326**	**8100**
%100	**0,778**	**28456**	**28532**	**5776**
%150	**1,167**	**43179**	**42983**	**38416**
%200	**1,556**	**57456**	**57433**	**529**
			Artıkların kareleri toplamı	**378346**
			Korelasyon katsayısı	**0,9999**
			Eğim	**37147**
			y-kesim noktası	**-368,002**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**1,3**



Şekil 4-14: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Asit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-10: Kabo-2 için doğrusallık sonucu.

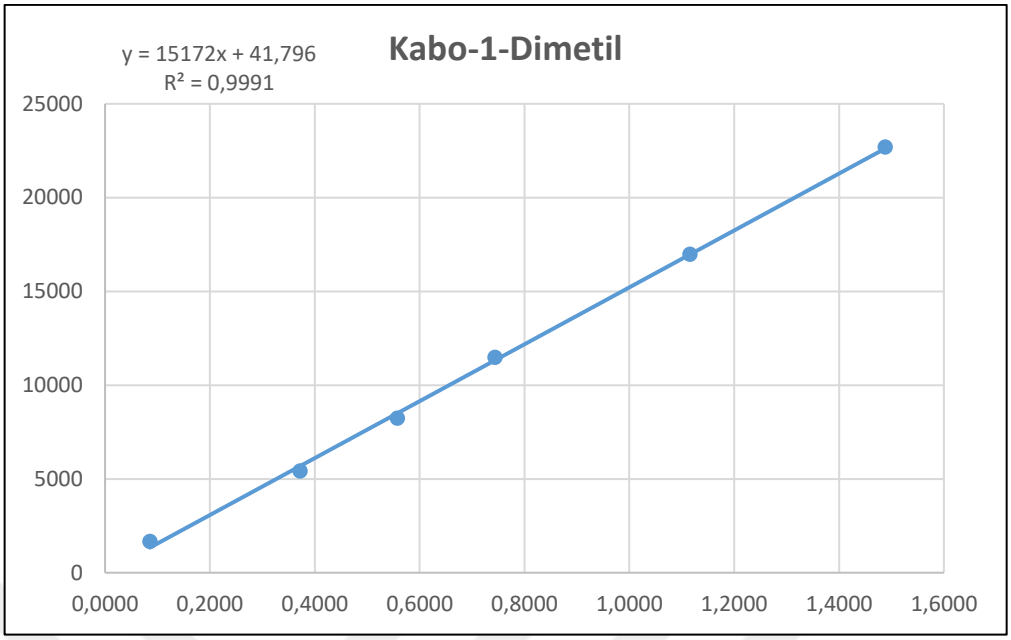
Kabo-2				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi $(Y1-Y2)^2$**
LOQ	**0,000370**	**34161**	**-24011**	**3383981584**
%50	**0,013875**	**1021473**	**1038441**	**287913024**
%75	**0,020813**	**1562325**	**1584261**	**481188096**
%100	**0,027750**	**2056098**	**2130002**	**5461801216**
%150	**0,041625**	**3243980**	**3221564**	**502477056**
%200	**0,055500**	**4345345**	**4313125**	**1038128400**
			Artıkların kareleri toplamı	**11155489376**
			Korelasyon katsayısı	**0,9995**
			Eğim	**78671065**
			y-kesim noktası	**-53119,562**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**2,6**



Şekil 4-15: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-2 safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-11: Kabo-1-dimetil için doğrusallık sonucu.

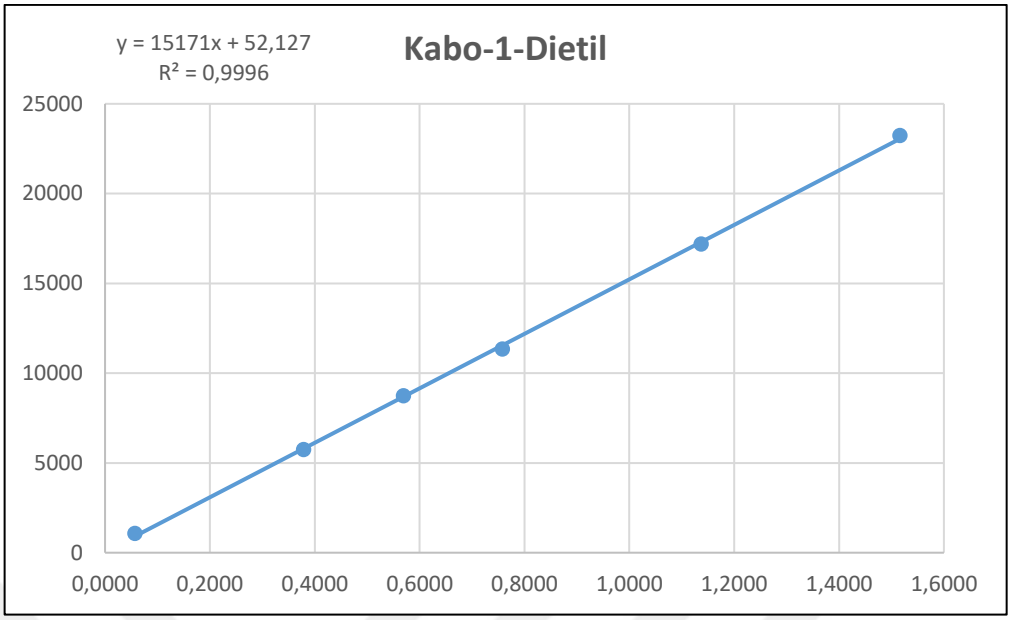
Kabo-1-dimetil				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0856**	**1660**	**1341**	**101761**
%50	**0,372**	**5412**	**5686**	**75076**
%75	**0,558**	**8236**	**8508**	**73984**
%100	**0,744**	**11479**	**11330**	**22201**
%150	**1,116**	**16970**	**16974**	**16**
%200	**1,488**	**22697**	**22618**	**6241**
			Artıkların kareleri toplamı	**279279**
			Korelasyon katsayısı	**0,9995**
			Eğim	**15172**
			y-kesim noktası	**41,796**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,4**



Şekil 4-16: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dimetil safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-12: Kabo-1-dietil için doğrusallık sonucu.

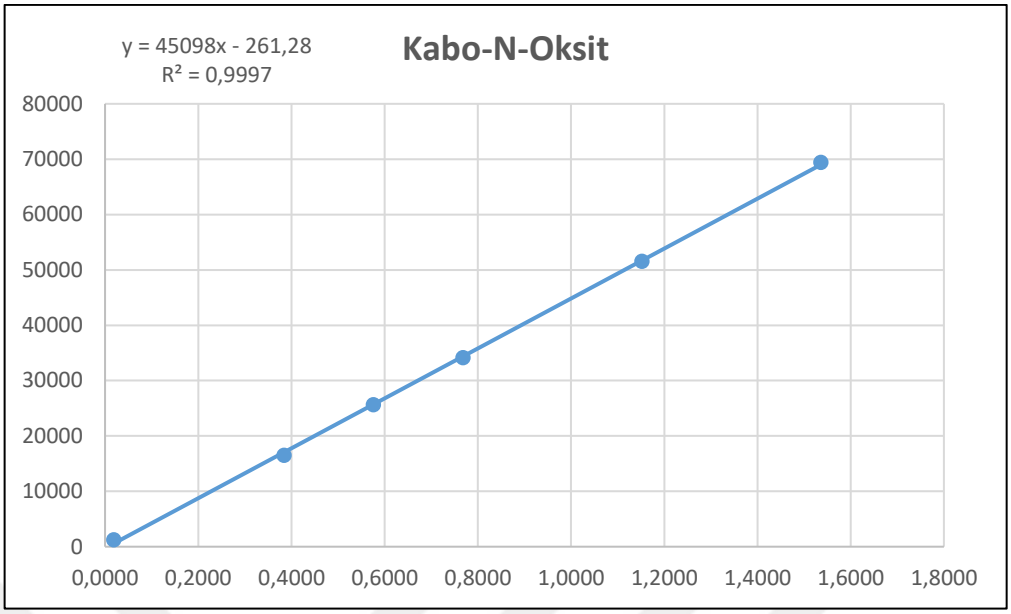
Kabo-1-dietil				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0568**	**1062**	**914**	**21904**
%50	**0,379**	**5741**	**5802**	**3721**
%75	**0,569**	**8745**	**8684**	**3721**
%100	**0,758**	**11341**	**11552**	**44521**
%150	**1,137**	**17183**	**17302**	**14161**
%200	**1,516**	**23232**	**23051**	**32761**
			Artıkların kareleri toplamı	**120789**
			Korelasyon katsayısı	**0,9998**
			Eğim	**15171**
			y-kesim noktası	**52,127**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,5**



Şekil 4-17: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dietil safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-13: Kabo-N-Oksit için doğrusallık sonucu.

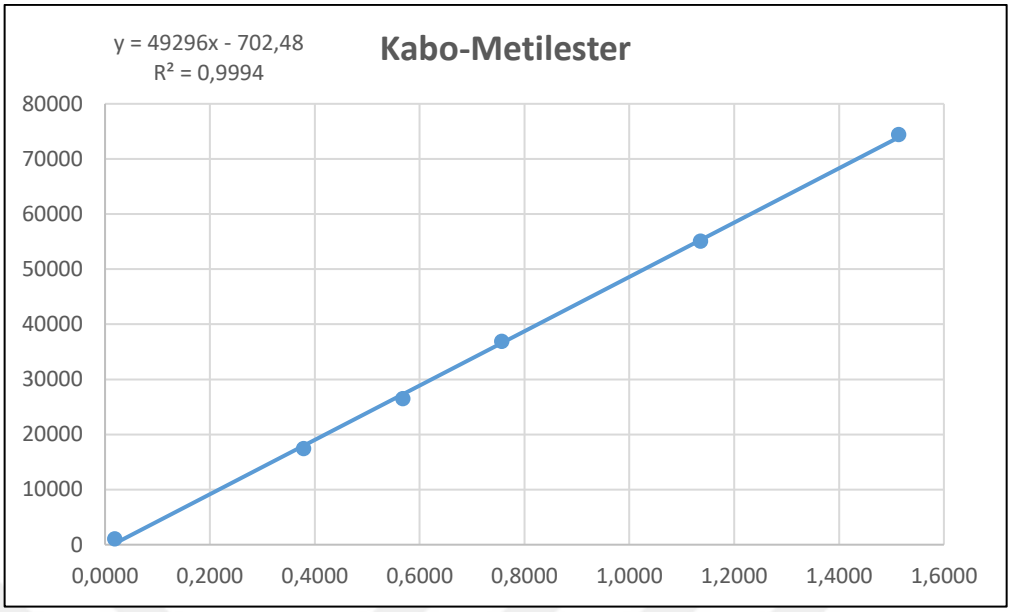
Kabo-N-Oksit				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0192**	**1220**	**605**	**378225**
%50	**0,384**	**16523**	**17056**	**284089**
%75	**0,576**	**25646**	**25715**	**4761**
%100	**0,768**	**34124**	**34374**	**62500**
%150	**1,152**	**51535**	**51692**	**24649**
%200	**1,536**	**69404**	**69009**	**156025**
			Artıkların kareleri toplamı	**910249**
			Korelasyon katsayısı	**0,9998**
			Eğim	**45098**
			y-kesim noktası	**-261,276**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,8**



Şekil 4-18: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-N-Oksit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-14: Kabo-Metilester için doğrusallık sonucu.

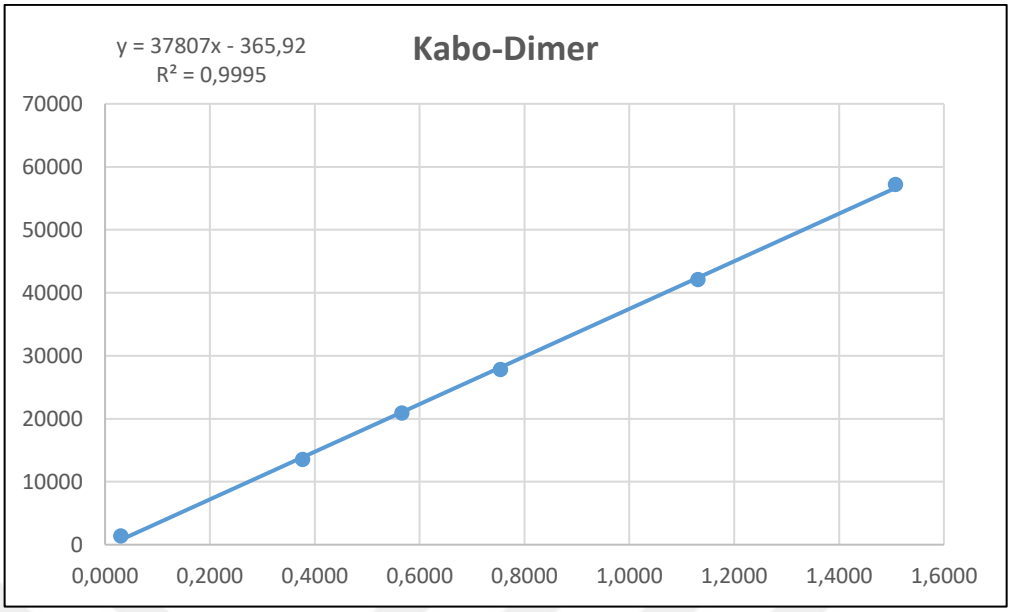
Kabo-Metilester				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0189**	**1074**	**229**	**714025**
%50	**0,379**	**17452**	**17981**	**279841**
%75	**0,568**	**26478**	**27298**	**672400**
%100	**0,757**	**36874**	**36615**	**67081**
%150	**1,136**	**55075**	**55298**	**49729**
%200	**1,514**	**74398**	**73932**	**217156**
			Artıkların kareleri toplamı	**2000232**
			Korelasyon katsayısı	**0,9997**
			Eğim	**49296**
			y-kesim noktası	**-702,475**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**1,9**



Şekil 4-19: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Metilester safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-15: Kabo-Dimer için doğrusallık sonucu.

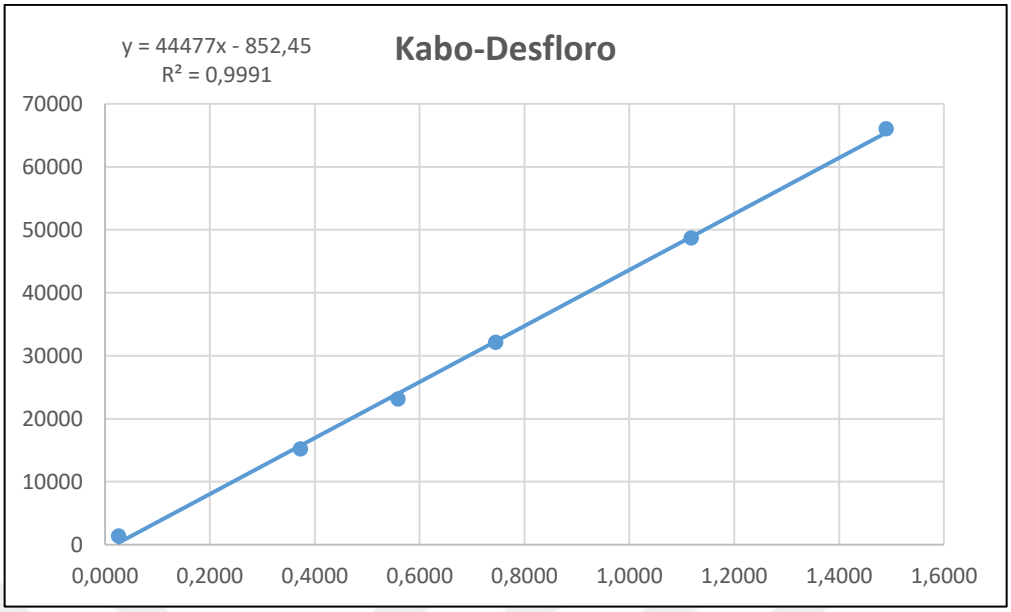
Kabo-Dimer				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0301**	**1383**	**772**	**373321**
%50	**0,377**	**13541**	**13887**	**119716**
%75	**0,566**	**20879**	**21033**	**23716**
%100	**0,754**	**27812**	**28141**	**108241**
%150	**1,131**	**42081**	**42394**	**97969**
%200	**1,508**	**57179**	**56648**	**281961**
			Artıkların kareleri toplamı	**1004924**
			Korelasyon katsayısı	**0,9998**
			Eğim	**37807,31639**
			y-kesim noktası	**-365,921**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**1,3**



Şekil 4-20: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimer safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-16: Kabo-desfloro için doğrusallık sonucu.

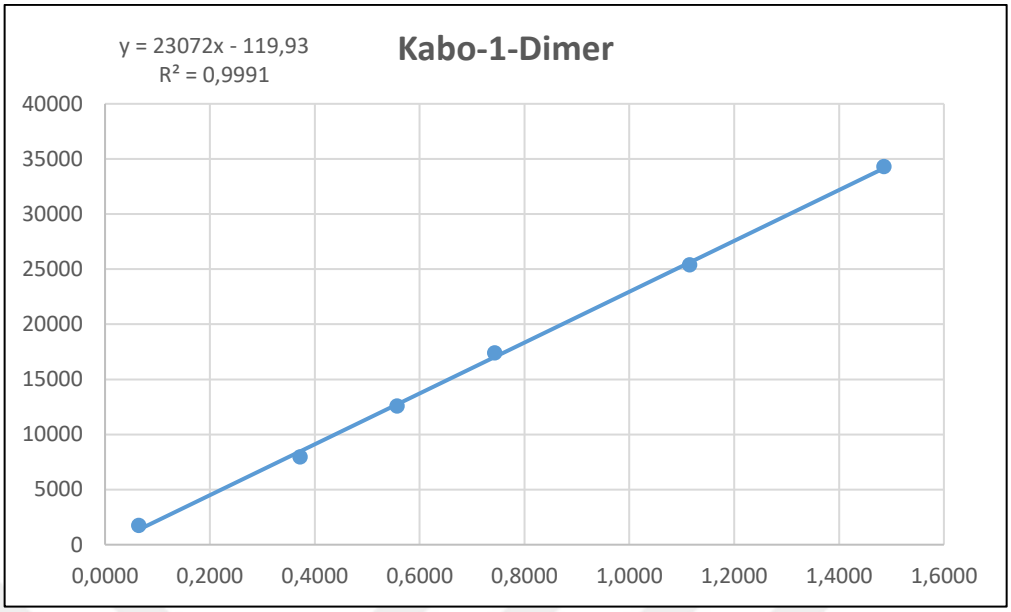
Kabo-desfloro				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0261**	**1367**	**308**	**1121481**
%50	**0,373**	**15214**	**15737**	**273529**
%75	**0,559**	**23145**	**24010**	**748225**
%100	**0,745**	**32148**	**32283**	**18225**
%150	**1,118**	**48713**	**48873**	**25600**
%200	**1,490**	**66042**	**65418**	**389376**
			Artıkların kareleri toplamı	**2576436**
			Korelasyon katsayısı	**0,9995**
			Eğim	**44477**
			y-kesim noktası	**-852,452**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**2,7**



Şekil 4-21: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-desfloro safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-17: Kabo-1-Dimer için doğrusallık sonucu.

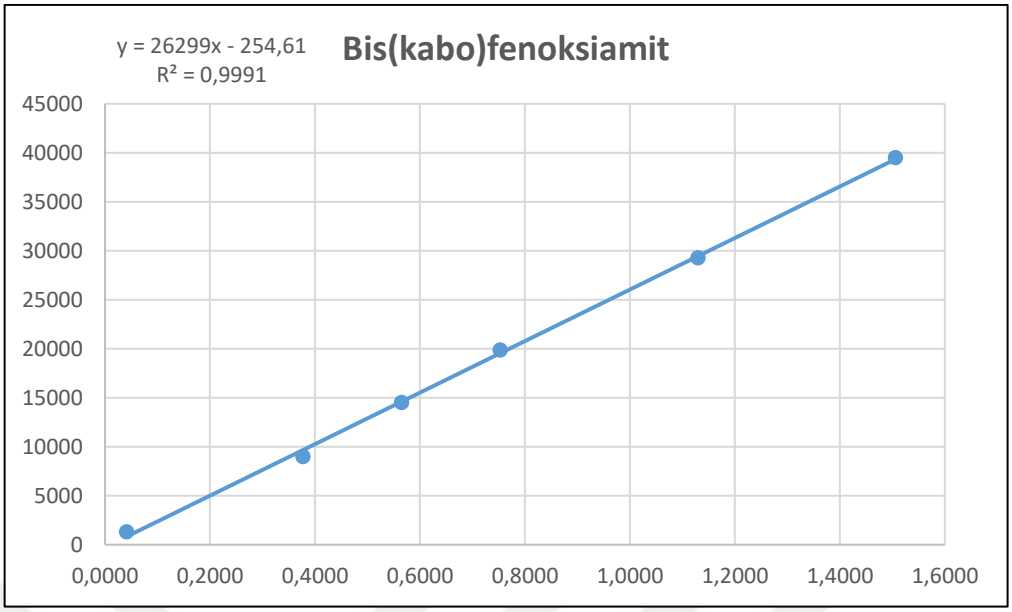
Kabo-1-Dimer				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0646**	**1737**	**1371**	**133956**
%50	**0,372**	**7945**	**8463**	**268324**
%75	**0,557**	**12569**	**12731**	**26244**
%100	**0,743**	**17411**	**17023**	**150544**
%150	**1,115**	**25385**	**25605**	**48400**
%200	**1,486**	**34311**	**34165**	**21316**
			Artıkların kareleri toplamı	**648784**
			Korelasyon katsayısı	**0,9995**
			Eğim	**23072**
			y-kesim noktası	**-119,928**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,7**



Şekil 4-22: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-Dimer safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-18: Bis(kabo)fenoksiamit için doğrusallık sonucu.

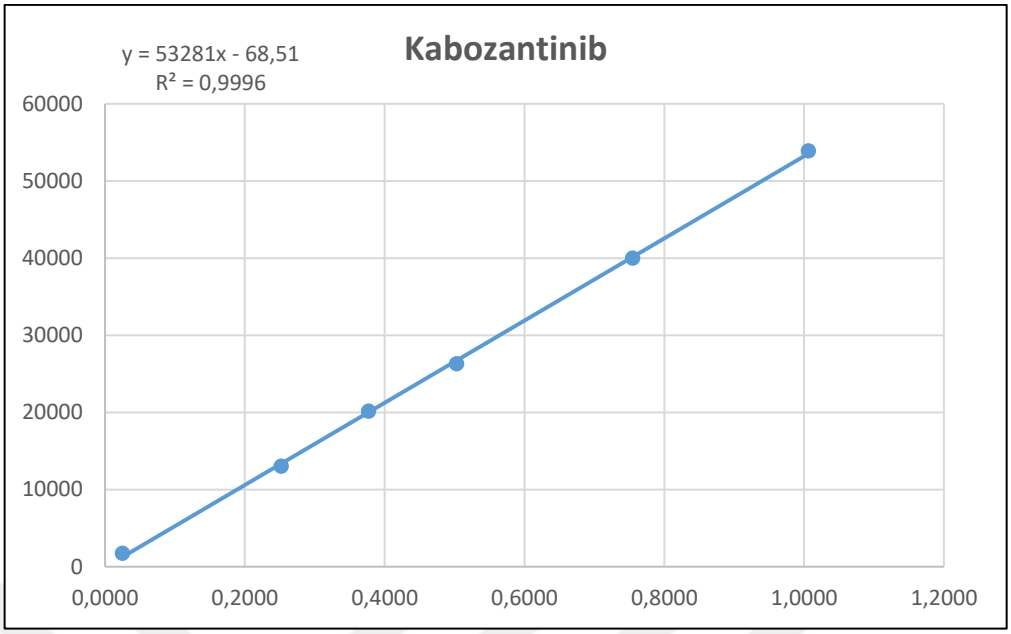
Bis(kabo)fenoksiamit				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0414**	**1294**	**834**	**211600**
%50	**0,377**	**8978**	**9660**	**465124**
%75	**0,565**	**14514**	**14604**	**8100**
%100	**0,753**	**19874**	**19549**	**105625**
%150	**1,130**	**29292**	**29463**	**29241**
%200	**1,506**	**39508**	**39352**	**24336**
			Artıkların kareleri toplamı	**844026**
			Korelasyon katsayısı	**0,9996**
			Eğim	**26299**
			y-kesim noktası	**-254,606**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**1,3**



Şekil 4-23: İlgili bileşikler yönteminde Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-19: Kabozantinib için doğrusallık sonucu.

Kabozantinib				
Seviyeler	**Teorik Derişim (µg/mL)**	**Alanlar Y1 (AU)**	**Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)**	**Farkların Karesi (Y1-Y2)2**
LOQ	**0,0251**	**1715**	**1269**	**198916**
%50	**0,252**	**13012**	**13358**	**119716**
%75	**0,377**	**20146**	**20018**	**16384**
%100	**0,503**	**26300**	**26732**	**186624**
%150	**0,755**	**40002**	**40159**	**24649**
%200	**1,006**	**53894**	**53532**	**131044**
			Artıkların kareleri toplamı	**677333**
			Korelasyon katsayısı	**0,9998**
			Eğim	**53281**
			y-kesim noktası	**-68,510**
			y-kesim noktası x100/% seviye alanı	**0,3**



Şekil 4-24: İlgili bileşikler yönteminde Kabozantinib safsızlığı için derişime karşı pik alanı kalibrasyon doğrusu.

Tablo 4-20: Kabo-1 ve Kabo-Asit için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Kabo-1		Kabo-Asit	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1092	33987	1167	57631
2	1160	33124	1184	57249
3	1134	34012	1173	57685
4	1146	33265	1134	57390
5	1144	33888	1142	57435
6	1122	32842	1169	57348
Ortalama	1133	33520	1162	57456
SS	22	461	19	169
%BSS	1,9	1,4	1,6	0,3

Tablo 4-21: Kabo-1-dimetil ve Kabo-1-dietil için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Kabo-1-dimetil		Kabo-1-dietil	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1681	22600	1081	23175
2	1690	22824	1050	23261
3	1694	22730	1077	23311
4	1659	22663	1090	23153
5	1597	22728	1035	23270
6	1639	22637	1039	23222
Ortalama	1660	22697	1062	23232
SS	37	80	24	60
%BSS	2,2	0,4	2,3	0,3

Tablo 4-22: Kabo-N-Oksit ve Kabo-Metilester için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Kabo-N-Oksit		Kabo-Metilester	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1231	69191	1065	74253
2	1185	69531	1088	74535
3	1221	69390	1033	74375
4	1221	69423	1117	74418
5	1213	69511	1108	74494
6	1248	69378	1032	74314
Ortalama	1220	69404	1074	74398
SS	21	122	37	107
%BSS	1,7	0,2	3,4	0,1

Tablo 4-23: Kabo-Dimer ve Kabo-desfloro için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Kabo-Dimer		Kabo-desfloro	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1469	57131	1381	65960
2	1422	57299	1358	66067
3	1323	57094	1392	65906
4	1397	57180	1343	66102
5	1332	57220	1387	66021
6	1357	57151	1338	66196
Ortalama	1383	57179	1367	66042
SS	57	73	23	104
%BSS	4,1	0,1	1,7	0,2

Tablo 4-24: Kabozantinib ve Kabo-1-dimer için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Kabozantinib		Kabo-1-dimer	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1661	53712	1669	34329
2	1754	53895	1720	34333
3	1782	54002	1759	34292
4	1758	53947	1763	34281
5	1601	53932	1774	34324
6	1736	53878	1739	34305
Ortalama	1715	53894	1737	34311
SS	69,6	99,3	38,6	21,3
%BSS	4,1	0,2	2,2	0,1

Tablo 4-25: Bis(kabo)fenoksiamit ve Kabo-2 için aralık bulguları

Enjeksiyon No	Bis(kabo)fenoksiamit		Kabo-2	
	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları	LOQ seviyesi alanları	%200 seviyesi alanları
1	1294	39464	36650	4210694
2	1306	39542	33084	4578028
3	1279	39603	30969	4342275
4	1242	39445	34091	4271969
5	1297	39461	34216	4602543
6	1347	39532	35953	4066563
Ortalama	1294	39508	34161	4345345
SS	34,3	61,4	2038	210493
%BSS	2,7	0,2	6,0	4,8

4.2.5. Geri Kazanım (Doğruluk)

Bölüm 3.6.1.5. de anlatıldığı gibi hazırlanan doğruluk çalışmasında elde edilen veriler aşağıda tablolarda gösterilmiştir (Tablo 4-26, Tablo 4-36).

Tablo 4-26: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1 safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-1				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		9274	**10,08**	**0,087**	**0,085**	**97,7**
%50	**0,378**	**9330**	**10,09**	**0,087**	**0,085**	**97,7**
		9352	**10,02**	**0,087**	**0,086**	**98,9**
		17458	**10,03**	**0,163**	**0,161**	**98,8**
%100	**0,755**	**17349**	**10,01**	**0,163**	**0,160**	**98,2**
		17568	**10,10**	**0,162**	**0,161**	**99,4**
		25928	**10,10**	**0,238**	**0,237**	**99,6**
%150	**1,133**	**25946**	**10.00**	**0,240**	**0,240**	**100,0**
		26030	**10,01**	**0,240**	**0,240**	**100,0**
Numunedeki miktar (%)						**0,011**
Standart derişimi, µg/mL						**0,755**
Standart alan ortalaması						**16514**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-27: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Asit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

Kabo-Asit						
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		1020	**10,11**	**0,006**	**0,006**	**100,0**
LOQ	**0,0311**	**1101**	**10,04**	**0,006**	**0,006**	**100,0**
		997	**10,02**	**0,006**	**0,006**	**100,0**
		13820	**10,08**	**0,078**	**0,077**	**98,7**
%50	**0,388**	**14062**	**10,09**	**0,078**	**0,078**	**100,0**
		13936	**10,02**	**0,078**	**0,078**	**100,0**
		27870	**10,03**	**0,156**	**0,156**	**100,0**
%100	**0,775**	**27941**	**10,01**	**0,156**	**0,157**	**100,6**
		28132	**10,10**	**0,155**	**0,157**	**101,3**
		42397	**10,10**	**0,233**	**0,236**	**101,3**
%150	**1,163**	**42488**	**10.00**	**0,235**	**0,239**	**101,7**
		42215	**10,01**	**0,235**	**0,237**	**100,9**
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,775**
Standart alan ortalaması						**27851**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-28: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimetil safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-Dimetil				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		1142	**10,11**	**0,017**	**0,016**	**94,1**
LOQ	**0,0856**	**1189**	**10,04**	**0,017**	**0,016**	**94,1**
		1150	**10,02**	**0,017**	**0,016**	**94,1**
		4988	**10,08**	**0,074**	**0,069**	**93,2**
%50	**0,3715**	**5091**	**10,09**	**0,074**	**0,070**	**94,6**
		5144	**10,02**	**0,075**	**0,071**	**94,7**
		10065	**10,03**	**0,150**	**0,140**	**93,3**
%100	**0,743**	**10084**	**10,01**	**0,150**	**0,140**	**93,3**
		10224	**10,10**	**0,149**	**0,141**	**94,6**
		15349	**10,10**	**0,223**	**0,212**	**95,1**
%150	**1,115**	**15379**	**10,00**	**0,225**	**0,214**	**95,1**
		15285	**10,01**	**0,225**	**0,213**	**94,7**
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,743**
Standart alan ortalaması						**10781**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-29: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dietil safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-Dietil				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		812	**10,11**	**0,011**	**0,011**	**100,0**
LOQ	**0,0568**	**825**	**10,04**	**0,011**	**0,011**	**100,0**
		802	**10,02**	**0,011**	**0,011**	**100,0**
		5774	**10,08**	**0,076**	**0,080**	**105,3**
%50	**0,379**	**5729**	**10,09**	**0,076**	**0,079**	**103,9**
		5920	**10,02**	**0,076**	**0,082**	**107,9**
		11156	**10,03**	**0,152**	**0,155**	**102,0**
%100	**0,757**	**11292**	**10,01**	**0,153**	**0,157**	**102,6**
		11403	**10,1**	**0,151**	**0,157**	**104,0**
		16756	**10,1**	**0,227**	**0,231**	**101,8**
%150	**1,136**	**16821**	**10**	**0,229**	**0,234**	**102,2**
		16808	**10,01**	**0,229**	**0,234**	**102,2**
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,757**
Standart alan ortalaması						**10982**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-30: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-N-Oksit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

Kabo-N-Oksit						
Seviyeler	**Eklenen Derişim (mg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		714	10,11	0,004	0,004	100,0
LOQ	0,0192	745	10,04	0,004	0,004	100,0
		729	10,02	0,004	0,004	100,0
		16583	10,08	0,077	0,082	106,5
%50	0,384	16587	10,09	0,077	0,082	106,5
		16681	10,02	0,077	0,083	107,8
		33497	10,03	0,155	0,167	107,7
%100	0,768	33410	10,01	0,155	0,167	107,7
		33619	10,1	0,154	0,166	107,8
		50532	10,1	0,230	0,250	108,7
%150	1,152	50609	10	0,233	0,253	108,6
		50586	10,01	0,232	0,253	109,1
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,768**
Standart alan ortalaması						**31044**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-31: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-1-dimer safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-1-dimer				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		15514	**10,03**	**0,151**	**0,141**	**93,4**
%100	**0,11850**	**15483**	**10,01**	**0,151**	**0,141**	**93,4**
		15659	**10,10**	**0,151**	**0,141**	**93,4**
		23904	**10,10**	**0,225**	**0,216**	**96,0**
%150	**0,489**	**23904**	**10,00**	**0,226**	**0,218**	**96,5**
		23904	**10,01**	**0,226**	**0,218**	**96,5**
Numunedeki miktar (%)						**0,127**
Standart derişimi, µg/mL						**0,741**
Standart alan ortalaması						**16403**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-32: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Dimer safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları

		Kabo-Dimer				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		19269	**10,08**	**0,097**	**0,097**	**100,0**
%50	**0,378**	**19279**	**10,09**	**0,097**	**0,097**	**100,0**
		19293	**10,02**	**0,097**	**0,098**	**101,0**
		34377	**10,03**	**0,173**	**0,174**	**100,6**
%100	**0,756**	**34504**	**10,01**	**0,174**	**0,175**	**100,6**
		34593	**10,10**	**0,172**	**0,174**	**101,2**
		50324	**10,10**	**0,248**	**0,253**	**102,0**
%150	**1,134**	**50399**	**10,00**	**0,250**	**0,256**	**102,4**
		50282	**10,01**	**0,250**	**0,255**	**102,0**
Numunedeki miktar (%)						**0,021**
Standart derişimi, µg/mL						**0,756**
Standart alan ortalaması						**30117,0**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-33: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-desfloro safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları

		Kabo-desfloro				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		1467	**10,11**	**0,007**	**0,007**	**100,0**
LOQ	**0,0261**	**1438**	**10,04**	**0,007**	**0,007**	**100,0**
		1483	**10,02**	**0,007**	**0,007**	**100,0**
		16178	**10,08**	**0,077**	**0,077**	**100,0**
%50	**0,374**	**16087**	**10,09**	**0,077**	**0,077**	**100,0**
		16173	**10,02**	**0,077**	**0,078**	**101,3**
		31945	**10,03**	**0,153**	**0,154**	**100,7**
%100	**0,748**	**31845**	**10,01**	**0,153**	**0,154**	**100,7**
		32135	**10,10**	**0,152**	**0,154**	**101,3**
		48258	**10,10**	**0,226**	**0,231**	**102,2**
%150	**1,122**	**48382**	**10,00**	**0,229**	**0,234**	**102,2**
		48286	**10,01**	**0,228**	**0,233**	**102,2**
Numunedeki miktar (%)						**0,002**
Standart derişimi, µg/mL						**0,748**
Standart alan ortalaması						**31292**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-34: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-Metilester safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-Metilester				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		878	**10,11**	**0,004**	**0,004**	**100,0**
LOQ	**0,0189**	**912**	**10,04**	**0,004**	**0,004**	**100,0**
		862	**10,02**	**0,004**	**0,004**	**100,0**
		18353	**10,08**	**0,076**	**0,077**	**101,3**
%50	**0,379**	**18222**	**10,09**	**0,076**	**0,076**	**100,0**
		18445	**10,02**	**0,076**	**0,078**	**102,6**
		36442	**10,03**	**0,153**	**0,154**	**100,7**
%100	**0,758**	**36373**	**10,01**	**0,153**	**0,154**	**100,7**
		36505	**10,10**	**0,152**	**0,153**	**100,7**
		54911	**10,10**	**0,227**	**0,230**	**101,3**
%150	**1,137**	**54998**	**10,00**	**0,230**	**0,232**	**100,9**
		55002	**10,01**	**0,229**	**0,232**	**101,3**
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,758**
Standart alan ortalaması						**36222**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-35: İlgili bileşikler yönteminde Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Bis(kabo)fenoksiamit				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (mV)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		1945	**10,11**	**0,016**	**0,015**	**93,8**
LOQ	**0,0414**	**2020**	**10,04**	**0,016**	**0,016**	**100,0**
		1990	**10,02**	**0,016**	**0,016**	**100,0**
		10450	**10,08**	**0,084**	**0,083**	**98,8**
%50	**0,378**	**10561**	**10,09**	**0,084**	**0,084**	**100,0**
		10868	**10,02**	**0,084**	**0,087**	**103,6**
		19898	**10,03**	**0,160**	**0,160**	**100,0**
%100	**0,755**	**20039**	**10,01**	**0,160**	**0,161**	**100,6**
		19996	**10,10**	**0,159**	**0,159**	**100,0**
		29585	**10,10**	**0,235**	**0,236**	**100,4**
%150	**1,133**	**29649**	**10,00**	**0,237**	**0,238**	**100,4**
		29659	**10,01**	**0,237**	**0,238**	**100,4**
Numunedeki miktar (%)						**TE**
Standart derişimi, µg/mL						**0,755**
Standart alan ortalaması						**18776**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

Tablo 4-36: İlgili bileşikler yönteminde Kabo-2 safsızlığı için elde edilen geri kazanım sonuçları.

		Kabo-2				
Seviyeler	**Eklenen Derişim (µg/mL)**	**Numune Alanı (I*)**	**Numune Tartımı (mg)**	**Teorik Miktar (%)**	**Deneysel Miktar (%)**	**Geri kazanım (%)**
		1107584	**0,01007**	**34,9**	**34,6**	**99,1**
%50	**0,01383**	**1120269**	**0,01008**	**34,9**	**34,9**	**100,0**
		1172956	**0,01006**	**35,0**	**36,6**	**104,6**
		2065343	**0,01009**	**62,6**	**64,3**	**102,7**
%100	**0,02765**	**2014612**	**0,01000**	**63,1**	**63,3**	**100,3**
		2134038	**0,01002**	**62,9**	**66,9**	**106,4**
		2989233	**0,01013**	**90,0**	**92,7**	**103,0**
%150	**0,04150**	**3110857**	**0,01005**	**90,6**	**97,2**	**107,3**
		3022198	**0,01006**	**90,5**	**94,4**	**104,3**
Numunedeki miktar (ppm)						**7,2**
Standart derişimi, µg/mL						**0,027673**
Standart alan ortalaması						**1779407**
Su ve kalıntı çözücü miktarı (%)						**1,2861**

*: I: Yoğunluk

4.2.6. Metot kesinliği ve Laboratuvarlar arası kesinlik

Kesinlik ve laboratuvarlar arası kesinlik sonuçlarına ait veriler aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 4-37 ve Tablo 4-38).

Tablo 4-37: Kabo-1-Dimer için kesinlik ve laboratuvarlar arası kesinlik bulguları.

Numune	Alan (mV)	1. Çalışma Numune tartımı, mg	Numunedeki miktar, %
1	13637	10,09	0,132
2	13981	10,07	0,135
3	13635	10,17	0,131
4	13698	10,08	0,133
5	13689	10,15	0,132
6	14011	10,12	0,135
Ortalama			0,133
SS			0,002
%BSS			1,50
%95 Güven aralığı			0,131 – 0,135
Standart derişimi, mg/mL			0,00050289
Standart alanı			24483
Numune	Alan (mV)	2. Çalışma Numune tartımı, mg	Numunedeki miktar, %
1	16182	10,20	0,144
2	16002	10,24	0,142
3	15909	10,09	0,143
4	16025	10,22	0,142
5	15849	10,25	0,140
6	15743	10,23	0,140
Ortalama			0,142
SS			0,002
%BSS			1,41
%95 Güven aralığı			0,140 – 0,144
Standart derişimi, mg/mL			0,00049548
Standart alanı			25941
Düzeltme faktörü			2,35
Ortalama sonuçlar arasındaki fark			0,01

Tablo 4-38: Kabo-2 için kesinlik ve laboratuvarlar arası kesinlik bulguları.

Numune	Alan (I)	1. Çalışma Numune tartımı, mg	Numunedeki miktar, %
1	415521	0,01009	9,43
2	408327	0,01007	9,29
3	412978	0,01017	9,30
4	403735	0,01008	9,18
5	408524	0,01015	9,22
6	404034	0,01012	9,15
Ortalama			9,26
SS			0,101
%BSS			1,10
%95 Güven aralığı			9,15 – 9,37
Standart derişimi, mg/mL			0,00002740
Standart alanı			2416240
Numune	Alan (I)	2. Çalışma Numune tartımı, mg	Numunedeki miktar, %
1	256260	0,01020	10,68
2	283184	0,01024	11,75
3	281046	0,01009	11,84
4	240181	0,01022	9,99
5	264777	0,01025	10,98
6	267177	0,01023	11,10
Ortalama			11,06
SS			0,690
%BSS			6,24
%95 Güven aralığı			10,34 – 11,78
Standart derişimi, mg/mL			0,00049548
Standart alanı			0,000027005
Düzeltme faktörü			1283629
Ortalama sonuçlar arasındaki fark			19,4

4.2.7. Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesi sonuçlarına ait veriler aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 4-39, Tablo 4-44).

Tablo 4-39: Standart çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabozantinib pik alanı		Kabo-2 pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	25651	NA	2263884	NA
2.saat	26660	3,9	2323621	2,6
4.saat	26445	3,1	2318999	2,4
8.saat	26126	1,9	2258679	0,2
12.saat	26029	1,5	2354567	4,0
18.saat	26037	1,5	2289077	1,1
24.saat	26053	1,6	2385152	5,4
30.saat	26127	1,9	2288068	1,1
36.saat	26511	3,4	2213276	2,2
42.saat	26427	3,0	2347514	3,7
48.saat	26448	3,1	2344027	3,5

Tablo 4-40: Kabo-1 ve Kabo-Asit çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabo-1 pik alanı		Kabo-Asit pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	17587	NA	25544	NA
2.saat	17297	1,6	25939	1,5
4.saat	17428	0,9	25852	1,2
8.saat	17664	0,4	25908	1,4
12.saat	17707	0,7	25884	1,3
18.saat	17798	1,2	25952	1,6
24.saat	17467	0,7	26031	1,9
30.saat	17746	0,9	26048	2,0
36.saat	18020	2,5	26178	2,5
42.saat	17986	2,3	26310	3,0
48.saat	18199	3,5	26620	4,2

Tablo 4-41: Kabo-1-dimetil ve Kabo-1-dietil çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabo-1-dimetil pik alanı		Kabo-1-dietil pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	10199	NA	10994	NA
2.saat	10220	0,2	11016	0,2
4.saat	10238	0,4	11032	0,3
8.saat	10266	0,7	11018	0,2
12.saat	10222	0,2	11007	0,1
18.saat	10275	0,7	11019	0,2
24.saat	10280	0,8	11095	0,9
30.saat	10267	0,7	11086	0,8
36.saat	10272	0,7	11110	1,1
42.saat	10270	0,7	11110	1,1
48.saat	10348	1,5	11119	1,1

Tablo 4-42: Kabo-N-Oksit ve Kabo-Metilester çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabo-N-Oksit pik alanı		Kabo-Metilester pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	22688	NA	34963	NA
2.saat	22772	0,4	35038	0,2
4.saat	22823	0,6	35110	0,4
8.saat	22851	0,7	35139	0,5
12.saat	22536	0,7	35039	0,2
18.saat	22806	0,5	35179	0,6
24.saat	23010	1,4	35389	1,2
30.saat	22950	1,2	35390	1,2
36.saat	23114	1,9	35525	1,6
42.saat	23092	1,8	35507	1,6
48.saat	23024	1,5	35569	1,7

Tablo 4-43: Kabo-Dimer ve Kabo-desfloro çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabo-Dimer pik alanı		Kabo-desfloro pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	34095	NA	30615	NA
2.saat	34084	0,0	30600	0,0
4.saat	34293	0,6	30714	0,3
8.saat	34286	0,6	30738	0,4
12.saat	34308	0,6	30651	0,1
18.saat	34354	0,8	30729	0,4
24.saat	34479	1,1	30946	1,1
30.saat	34636	1,6	31012	1,3
36.saat	34591	1,5	31036	1,4
42.saat	34689	1,7	31136	1,7
48.saat	34751	1,9	31156	1,8

Tablo 4-44: Kabo-1-Dimer ve Bis(kabo)fenoksiamit çözeltisi için stabilite bulguları.

Zaman	Kabo-Dimer pik alanı		Bis(kabo)fenoksiamit pik alanı	
	Alan	% değişim	Alan	% değişim
Başlangıç	19120	NA	19775	NA
2.saat	19189	0,4	19924	0,8
4.saat	19348	1,2	20126	1,8
8.saat	19327	1,1	21119	6,8
12.saat	19286	0,9	20127	1,8
18.saat	19354	1,2	20150	1,9
24.saat	19336	1,1	20108	1,7
30.saat	19378	1,3	20203	2,2
36.saat	19203	0,4	20040	1,3
42.saat	19260	0,7	20090	1,6
48.saat	19562	2,3	20861	5,5

4.2.8. Sağlamlık

Tablo 4-45: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları ve sistem uygunluk değerleri.

Şartlar	Kabozantinib		Kabo-2		Ayrım (Rs) Kabozantinib Kabo-1-Dimer
	RT	%BSS	RT	%BSS	
Normal şartlar	9,06	0,33	3,70	6,36	6,7
Akış hızı 0,27 mL/dk	9,58	0,71	4,06	7,57	7,2
Akış hızı 0,33 mL/dk	8,63	0,38	3,40	1,66	5,9
Kolon sıcaklığı 27 ℃	9,11	0,71	3,74	7,57	7,2
Kolon sıcaklığı 33 ℃	9,05	0,51	3,71	3,09	5,6
Mobil faz A pH 4,4	9,04	0,48	3,64	5,26	6,7
Mobil faz A pH 4,6	9,23	0,74	3,89	0,88	5,0

Tablo 4-46: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları.

Şartlar	Kabo-1		Kabo-Asit		Kabo-1 Dimethyl		Kabo-1-dietil	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal şartlar	2,25	0,25	2,62	0,29	4,53	0,50	6,92	0,76
Akış hızı 1,1 mL/dk	2,48	0,26	2,84	0,30	4,94	0,52	7,31	0,76
Akış hızı 1,3 mL/dk	2,05	0,24	2,42	0,28	4,15	0,48	6,58	0,76
Kolon sıcaklığı 36 ℃	2,31	0,25	2,65	0,29	4,60	0,50	6,96	0,76
Kolon sıcaklığı 44 ℃	2,20	0,24	2,62	0,29	4,49	0,50	6,90	0,76
Mobil faz A pH 2,7	2,30	0,25	2,63	0,29	4,55	0,50	6,93	0,77
Mobil faz A pH 3,3	2,18	0,24	2,65	0,29	4,55	0,49	6,93	0,75

Tablo 4-47: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları.

Şartlar	Kabo-N-Oksit		Kabo-Metilester		Kabo-Dimer		Kabo-desfloro	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal şartlar	7,50	0,83	7,68	0,85	8,39	0,93	8,79	0,97
Akış hızı 1,1 mL/dk	7,85	0,82	8,08	0,84	8,80	0,92	9,28	0,97
Akış hızı 1,3 mL/dk	7,19	0,83	7,33	0,85	8,04	0,93	8,38	0,97
Kolon sıcaklığı 36 ℃	7,54	0,83	7,69	0,84	8,37	0,92	8,34	0,92
Kolon sıcaklığı 44 ℃	7,47	0,83	7,68	0,85	8,43	0,93	8,78	0,97
Mobil faz A pH 2,7	7,51	0,83	7,63	0,84	8,30	0,92	8,74	0,97
Mobil faz A pH 3,3	7,50	0,81	7,79	0,84	8,6	0,93	8,93	0,97

Tablo 4-48: İlgili bileşikler yöntemindeki değişiklikler sonucu elde edilen alıkonma zamanları/bağıl alıkonma zamanları.

Şartlar	Kabo-1-Dimer		Bis(kabo)fenoksiamit		Kabo-2	
	RT	RRT	RT	RRT	RT	RRT
Normal şartlar	9,89	1,09	13,86	1,53	3,70	NA
Akış hızı 1,1 mL/dk	10,55	1,10	14,36	1,50	4,06	NA
Akış hızı 1,3 mL/dk	9,33	1,08	13,43	1,56	3,40	NA
Kolon sıcaklığı 36 ℃	10,07	1,11	13,99	1,54	3,74	NA
Kolon sıcaklığı 44 ℃	9,75	1,08	13,76	1,52	3,71	NA
Mobil faz A pH 2,7	9,91	1,10	13,87	1,53	3,64	NA
Mobil faz A pH 3,3	9,91	1,07	13,87	1,50	3,89	NA

4.2.9. Bağıl Alan Faktörü

Bağıl alan faktörü verileri Tablo 4-49' da gösterilmiştir.

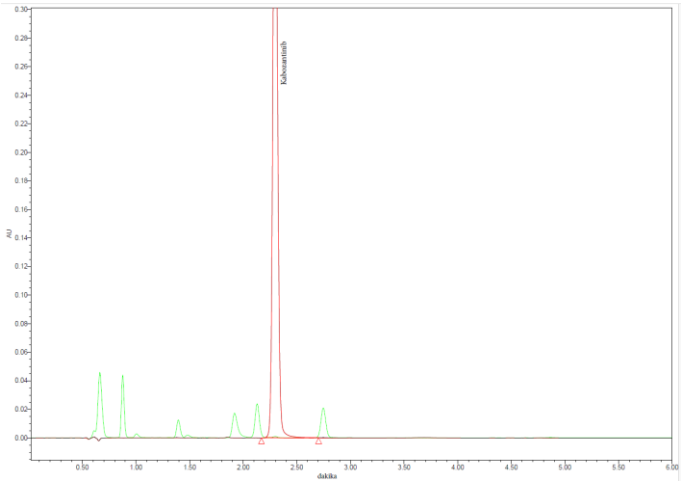
Tablo 4-49. Bağıl alan faktörü ve alan düzeltme faktörü sonuçları.

Safsızlıklar	Derişim, µg/mL	Ortalama alan	RRF	CRF
Kabozantinib	**0,503**	**25842**	**NA**	**NA**
Kabo-1	**0,754**	**16645**	**0,4**	**2,33**
Kabo-Asit	**0,778**	**27561**	**0,7**	**1,45**
Kabo-1-dimetil	**0,744**	**10796**	**0,3**	**3,54**
Kabo-1-dietil	**0,758**	**11029**	**0,3**	**3,53**
Kabo-N-Oksit	**0,768**	**33310**	**0,8**	**1,18**
Kabo-Metilester	**0,757**	**35394**	**0,9**	**1,10**
Kabo-Dimer	**0,754**	**27557**	**0,7**	**1,41**
Kabo-desfloro	**0,745**	**30897**	**0,8**	**1,24**
Kabo-1-dimer	**0,743**	**16259**	**0,4**	**2,35**
Bis(kabo)fenoksiamit	**0,753**	**18703**	**0,5**	**2,07**

4.3. Miktar Tayini Validasyon Yöntemi

4.3.1. Seçicilik

Kabozantinib pikinin altında herhangi bir girişim olmadığını ispatlamak için blank, diğer tüm bilinen safsızlıklarla birlikte çakıştırılmış hali Şekil 4-25 de gösterilmiş ve seçicilik verisi Tablo 4-50 de gösterilmiştir.



Şekil 4-25: Miktar tayini için seçicilik kromatogramı

Tablo 4-50. Kabozantinib için seçicilik verisi.

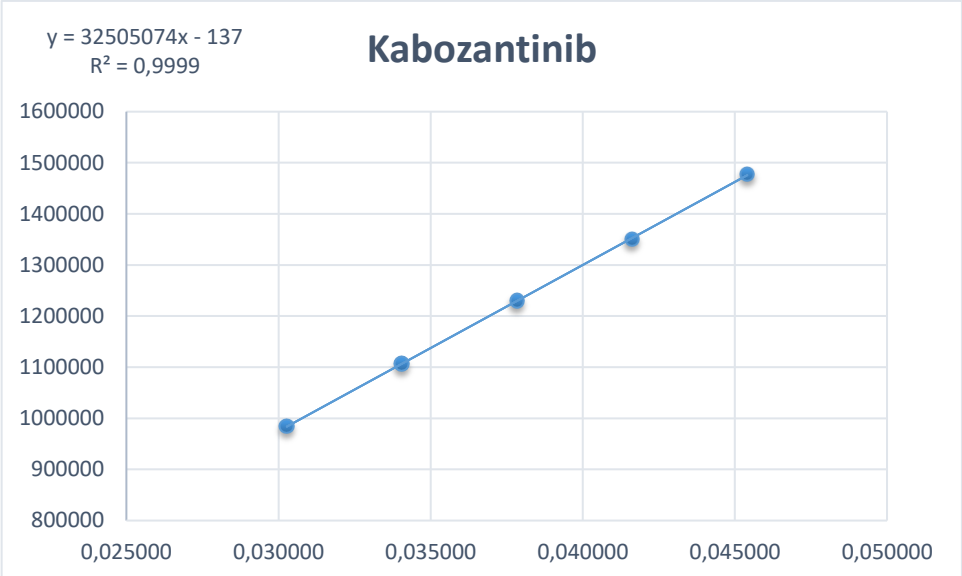
	Alıkonma zamanı, dk	Pik saflık açısı	Pik saflık eşiği
Kabozantinib	**2,29**	**0,026**	**0,253-**

4.3.2. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Doğrusallık parametresine ait bulgular Tablo 4-51'de, bu bulgulardan elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği ise Şekil 4-26'da verilmiştir.

Tablo 4-51. Kabozantinib miktar tayini yöntemi için doğrusallık verileri.

Seviyeler	Teorik Konsantrasyon (mg/mL)	Alanlar Y1 (AU)	Hesaplanan Alanlar Y2 (AU)	Farkların Karesi $(Y1-Y2)^2$
%80	**0,030272**	**984550**	**983856**	**480988**
%90	**0,034056**	**1106920**	**1106856**	**4182**
%100	**0,037840**	**1229510**	**1229855**	**118933**
%110	**0,041624**	**1350576**	**1352854**	**5191107**
%120	**0,045408**	**1477718**	**1475853**	**3478474**
Artıkların kareleri toplamı				**9273684**
Korelasyon katsayısı				**0,9999**
Eğim				**32505074,0**
y-kesim noktası				**-137**
y-kesim noktası x100/% seviye alanı				**0,01**



Şekil 4-26: Kabozantinib'in kalibrasyon doğrusu

4.3.3. Doğruluk

Kabozantinibe ait doğruluk verileri Tablo 4-52 de sunulmuştur.

Tablo 4-52. Kabozantinib miktar tayini yöntemi için doğruluk verileri

Seviyeler	Numune Alanı (mV)	Numune tartımı (mg)	Teorik miktar (%)	Deneysel miktar (%)	Geri kazanım (%)
	981457	15,2	0,0300	0,0298	99,3
%80	989635	15,3	0,0302	0,0301	99,5
	984125	15,2	0,0300	0,0299	99,6
	1229634	18,8	0,0371	0,0374	100,6
%100	1223741	18,9	0,0373	0,0372	99,6
	1231621	19,1	0,0377	0,0374	99,2
	1468231	22,6	0,0447	0,0446	99,9
%120	1475645	22,8	0,0451	0,0448	99,5
	1486541	22,8	0,0451	0,0452	100,3
Ortalama					99,7
SS					0,46
%BSS					0,46
Standart derişimi, mg/mL					0,037295
Standart alan ortalaması					1227451

4.3.4. Sistem kesinliği – Metot kesinliği – Laboratuvarlar arası kesinlik

Sistem kesinliği, sistem uygunluk kriterlerinin karşılandığını göstermektedir. Miktar belirleme yönteminde sistem uygunluğu, standart çözeltinin 6 defa enjekte edilmesiyle elde edilen kabozantinib pik alanlarının %BSS oranları ve standart çözeltideki kabozantinib pikinin simetri faktörü dikkate alınarak değerlendirilmektedir. Sistem kesinliğine ilişkin bulgular Tablo 4-53'de metot kesinliği ve laboratuvarlar arası kesinlik verileri Tablo 4-54'de sunulmuştur.

Tablo 4-53. Kabozantinib miktar tayini sistem kesinliği verileri

Enjeksiyon No	Kabozantinib pik alanı	Kabozantinib piki için simetri faktörü
1	**1232896**	**1,2**
2	**1231256**	**1,2**
3	**1242756**	**1,2**
4	**1236983**	**1,2**
5	**1235478**	**1,2**
6	**1235739**	**1,2**
Ortalama	**1227451**	**1,2**
SS	**3973,9**	**0,0**
%BSS	**0,32**	**0,0**

Tablo 4-54. Kabozantinib miktar tayini metot ve laboratuvarlar arası kesinlik verileri

1. Çalışma				
Numune	Kabozantinib pik alanı (mV)	Numune tartımı, mg	Kabozantinib miktarı %, as-is	Kabozantinib miktarı %, susuz ve çözücüsüz baz
1	1212399	19,24	96,73	99,2
2	1211987	19,10	97,40	99,9
3	1217324	19,05	98,09	100,6
4	1222711	19,21	97,70	100,2
5	1218623	19,23	97,27	99,8
6	1221821	19,06	98,40	100,9
Ortalama			97,6	100,1
SS			0,60	0,61
%BSS			0,61	0,61
%95 Güven aralığı			97,0 – 98,2	99,4 – 100,7
Standart tartımı, mg			19,07	
Standart alanı			1227451,0	

2. Çalışma				
Numune	Kabozantinib pik alanı (mV)	Numune tartımı, mg	Kabozantinib miktarı %, as-is	Kabozantinib miktarı %, susuz ve çözücüsüz baz
1	1244121	19,21	97,08	99,5
2	1238751	19,20	96,71	99,2
3	1246019	19,16	97,48	100,0
4	1250980	19,18	97,76	100,3
5	1246782	19,12	97,74	100,2
6	1250982	19,13	98,02	100,5
Ortalama			97,5	99,9
SS			0,49	0,50
%BSS			0,50	0,50
%95 Güven aralığı			97,0 – 98,0	99,4 – 100,5
Standart tartımı, mg			19,08	
Standart alanı			1257646,5	
Su miktarı, %			0,75	
Kalıntı çözücüler miktarı, %			1,74	
Ortalama sonuçlar arasındaki fark,%			0 1	0 2

4.3.5. Sağlamlık

Metodun, küçük değişimlerden etkilenmediği Tablo 4-55'de, çözeltilerin 48 saat boyunca 20 ℃ de stabil olduğu Tablo 4-56'da sunulmuştur.

Tablo 4-55. Sağlamlık verileri

Şartlar	%BSS	Simetri faktörü	Kabozantinib alıkonma zamanı, dk
Normal şartlar	**0,54**	**1,1**	**2,29**
Akış hızı 0,36 mL/dk	**0,53**	**1,1**	**2,52**
Akış hızı 0,44 mL/dk	**0,66**	**1,1**	**2,09**
Kolon sıcaklığı 27 ℃	**0,49**	**1,1**	**2,31**
Kolon sıcaklığı 33 ℃	**0,40**	**1,1**	**2,27**
Mobil faz A pH 2,7	**0,19**	**1,1**	**1,95**
Mobil faz A pH 3,3	**0,20**	**1,1**	**2,60**

Tablo 4-56. Numune çözeltisi için çözelti stabilitesi bulguları.

Zaman	Kabozantinib pik alanı	
	Alan	% değişim
Başlangıç	**1238224**	**NA**
2. saat	**1240679**	**0,2**
6. saat	**1239928**	**0,1**
12. saat	**1243691**	**0,4**
18. saat	**1244781**	**0,5**
24. saat	**1249244**	**0,9**
30. saat	**1251676**	**1,1**
36. saat	**1252321**	**1,1**
42. saat	**1254491**	**1,3**
48. saat	**1261541**	**1,9**

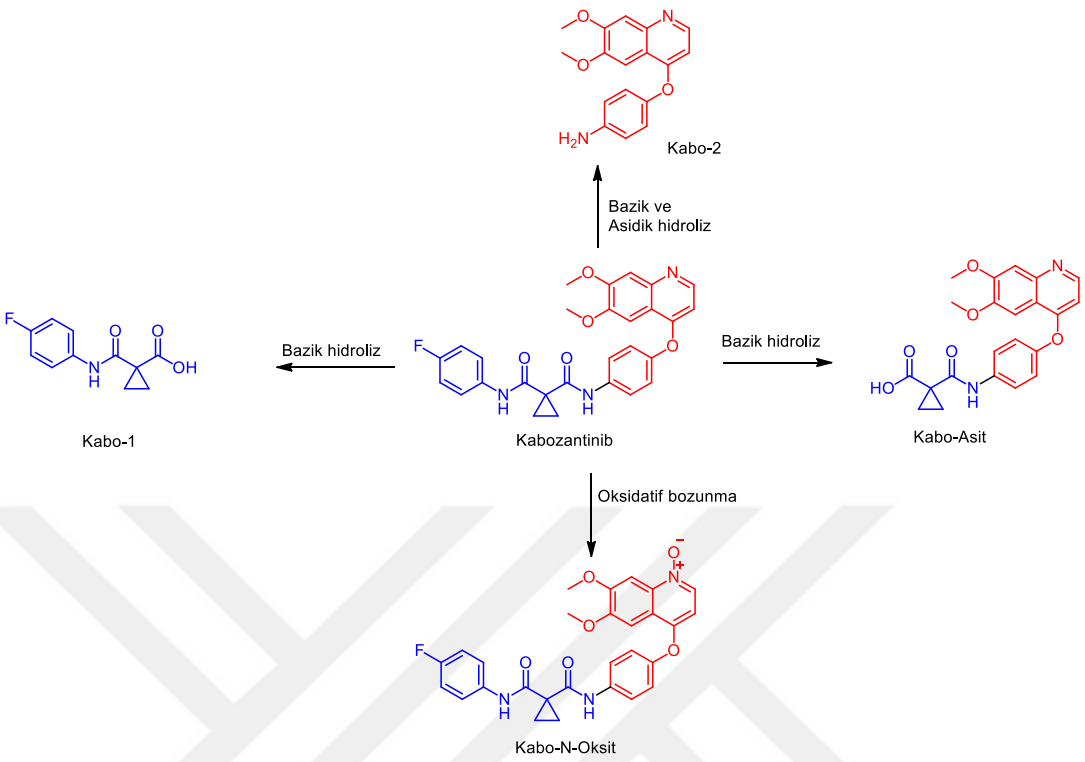
4.4. Bozundurma Çalışması

Bölüm 3.8.3 de kabozantinib'e ait bozundurma çalışması sonuçları aşağıda Tablo 4-57 de ve hidroliz bozundurmalarına ait şema Şekil 4-27'de detaylıca verilmiştir.

Tablo 4-57. Kabozantinib'in bozundurma çalışmasına ait miktar tayini ve safsızlık sonuçları (Sonuçlar % olarak verilmiştir).

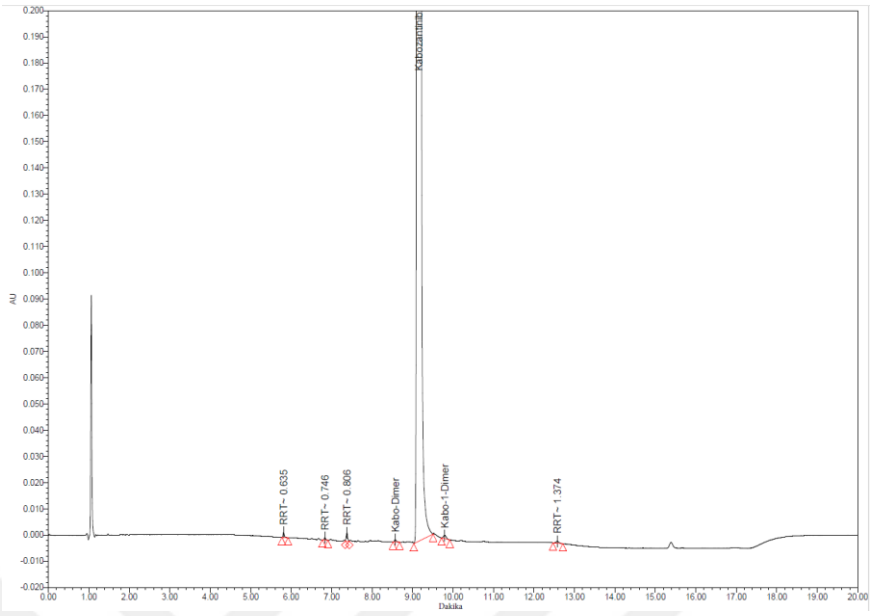
Şartlar / Safsızlıklar	İşlem görmemiş numune	Isı ile bozundurma, 80 °C, 13 gün	Gün ışığı, 60 gün	UV ışığı, 60 gün	Hidroliz: Nötral, 70 °C, 3 saat	Hidroliz: Asidik, 5N HCl, 25 °C, 24 saat.	Hidroliz: Bazik, 5N NaOH, 25 °C, 24 saat	Oksidasyon, %30 H_2O_2, 25 °C, 24 saat
Kabo-2	6,0 ppm	15,0 ppm	4,6 ppm	6,3 ppm	19,2 ppm	238,4 ppm	2782,6 ppm	36,1 ppm
Kabo-1	TE	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,13	< 0,05
Kabo-Asit	TE	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,35	< 0,05
Kabo-1-dimetil	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kabo-1-dietil	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kabo-N-Oksit	TE	< 0,05	< 0,05	< 0,05	TE	TE	TE	0,10
Kabo-Metilester	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kabo-Dimer	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Kabo-desfloro	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kabo-1-dimer	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	< 0,05	< 0,05	0,05
Bis(kabo)fenoksiamit	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
DP-1 (RRT 0,64)	< 0,05	0,07	< 0,05	< 0,05	< 0,05	TE	TE	< 0,05
DP-2 (RRT 0,73)	TE	TE	< 0,05	TE	< 0,05	TE	TE	0,05
DP-3 (RRT 0,75)	< 0,05	0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
DP-4 (RRT 0,87)	TE	TE	< 0,05	< 0,05	TE	TE	TE	0,05
Toplam safsızlık	0,05	0,17	0,05	0,05	0,05	< 0,05	0,76	0,25
Miktar tayini	99,8	100,2	99,9	100,4	99,5	99,8	99,5	99,0
Kütle denkliği, %	99,9	100,4	100,0	100,5	99,6	99,8	100,3	99,3
Verim, (%)	NA	100,5	100,1	100,6	99,7	99,9	100,4	99,4

TE: Tespit edilemedi, DP: Bozunma ürünü

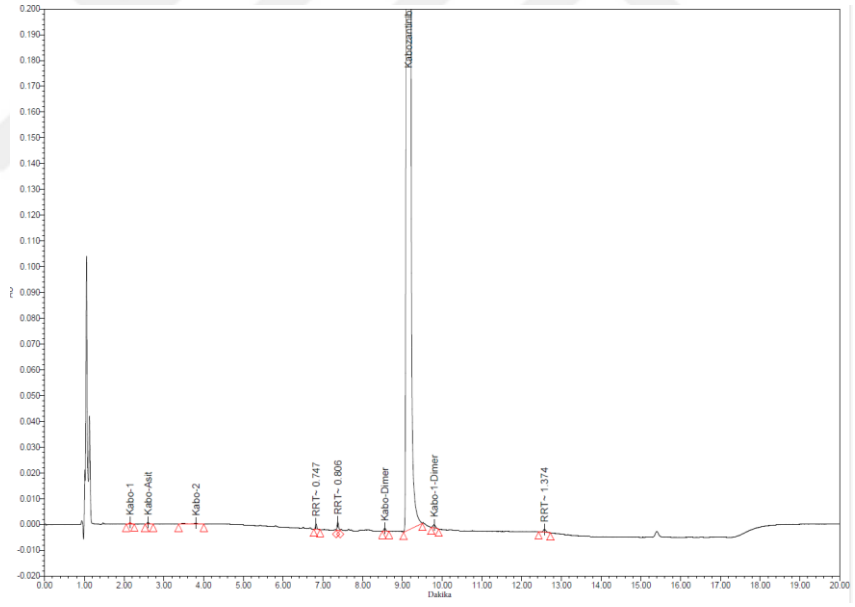


Şekil 4-27: Kabozantinib'in hidroliz ve oksidasyon bozundurması şeması

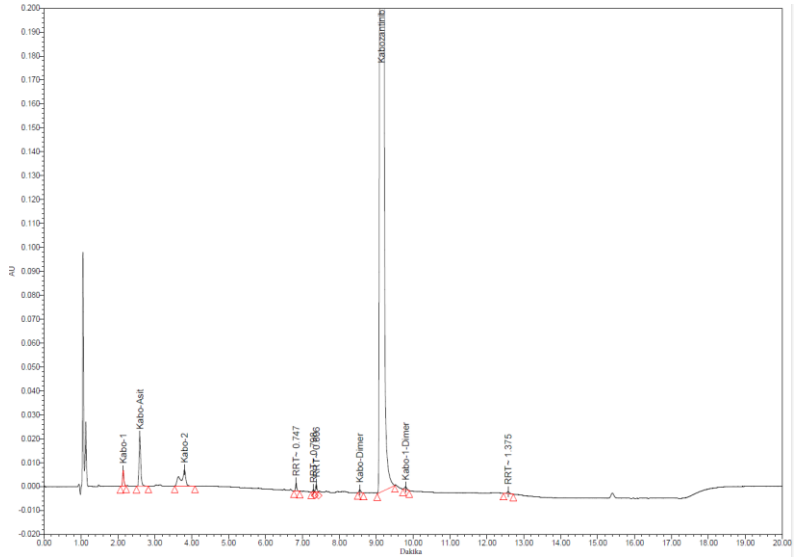
Tablo 4.57'e göre kabozantinib için esas bozunma ürünü Kabo-1 ve Kabo-2 olarak görülmektedir. Genel olarak asidik ve bazik hidroliz şartlarında ana molekül kendini oluşturan iki parçaya kolaylıkla hidroliz olmaktadır (Şekil 4.27). Etken madde ısıl olarak dayanıklı olup 80 ℃'de 13 gün bekletildiğinde genotoksik safsızlıkta oluşan artış limitin çok altındadır, RRT 0,64 de bilinmeyen safsızlık oluşumu gözlenmektedir. Uv/Vis ışığı altında madde dayanıklı olup 60 gün bekletildiğinde dahi herhangi bir bozunma ürünü oluşumu gözlenmemiştir. H_2O_2 ile oksidasyon bozundurmasında ise Kabo-N-Oksit safsızlık oluşumu tesbit edilmiştir. Bununla beraber H_2O_2 bozundurmasında raporlama seviyesinde (%0,05) RRT 0,73 ve RRT 0,87 olan iki yeni safsızlık oluşmuştur.



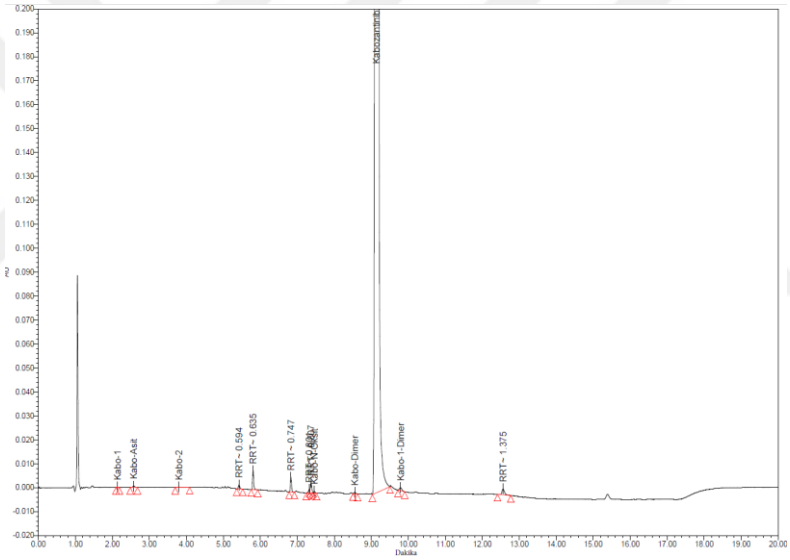
Şekil 4-28: Kabozantinib'in bozundurmaya uğramamış numune kromatogramı



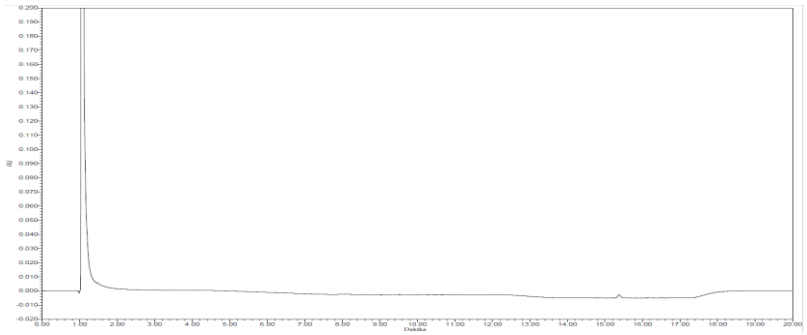
Şekil 4-29: Kabozantinib'in asit ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı



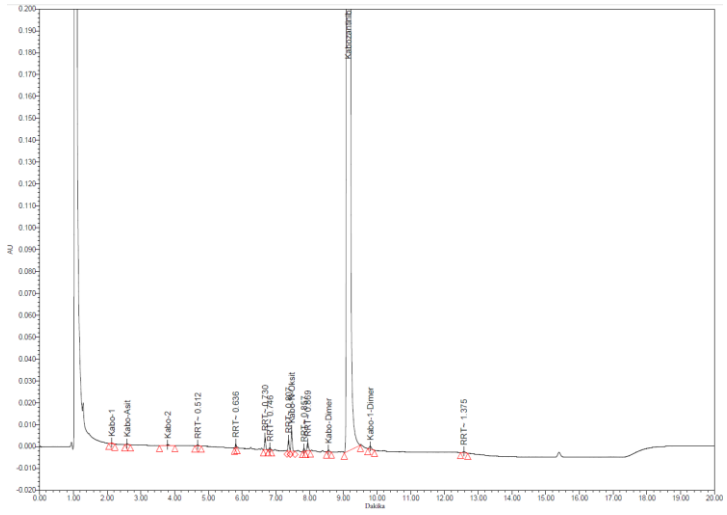
Şekil 4-30: Kabozantinib'in baz ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı.



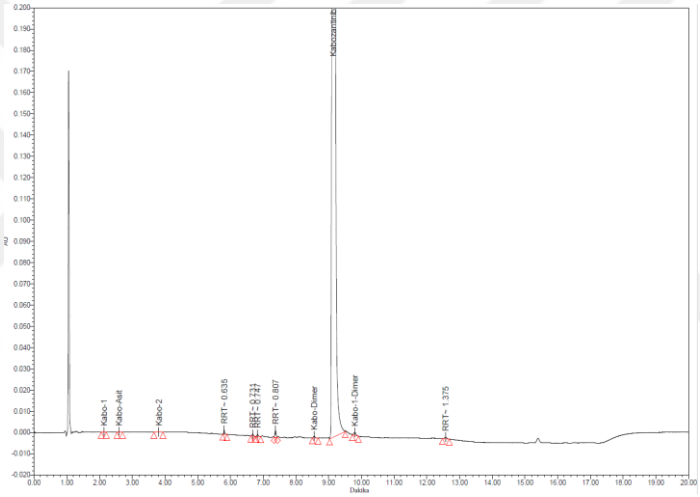
Şekil 4-31: Kabozantinib'in ısı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı.



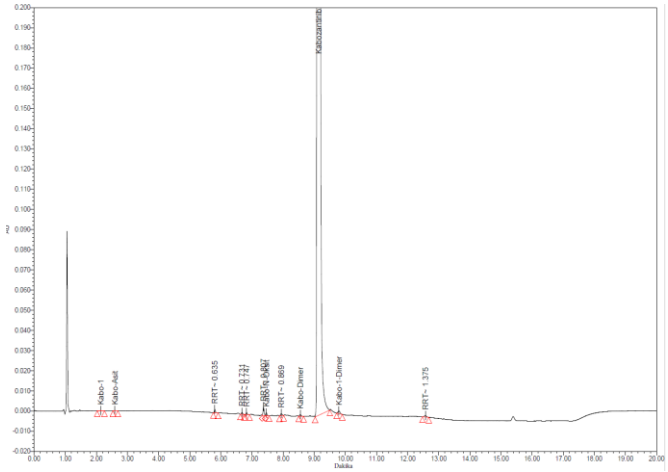
Şekil 4-32: Kabozantinib'in H_2O_2 ile hazırlanmış blank kromatogramı



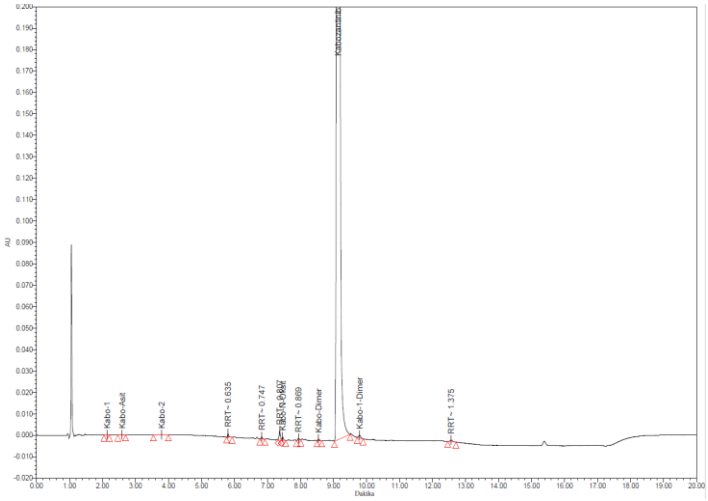
Şekil 4-33: Kabozantinib'in H_2O_2 ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı.



Şekil 4-34: Kabozantinib'in su ve ısı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı.



Şekil 4-35: Kabozantinib'in görünür bölge ışık ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı



Şekil 4-36: Kabozantinib'in UV ışığı ile bozundurmaya uğramış numune kromatogramı

5. TARTIŞMA

Günümüz ilaç endüstrisi, kanser gibi kompleks hastalıkların tedavisinde etkili ve güvenli çözümler sunma gereksinimiyle sürekli gelişim halindedir. İlaç formülasyonunda yer alan API'nin saflığı ve doğruluğu, tedavi başarısını doğrudan etkileyen faktörlerdendir. Örneğin, kabozantinib, hastalıklı hücrelerin büyümesini kontrol altına almak için kinazları hedef alan bir inhibitördür ve renal hücreli karsinom gibi tedavisi zor kanser türlerinde umut vadetmektedir. API'nin üretim sürecinde yada depolanması esnasında oluşabilecek herhangi bir safsızlık, yalnızca ilacın etkinliğini değil, aynı zamanda güvenliğini de riske atabilir. Bu nedenle, API'lerin doğru analiz yöntemleri ile izlenmesi, ilacın klinik güvenilirliğini sağlamak açısından hayati önem taşır.

Bu çalışmada kabozantinib etken maddesinin, ilgili safsızlıkları olan Kabo-1, Kabo-2, Kabo-Asit, Kabo-1-dimetil, Kabo-1-dietil, Kabo-N-Oksit, Kabo-Metilester, Kabo-Dimer, Kabo-desfloro, Kabo-1-dimer ve Bis(kabo)fenoksiamit'in hassas ve doğru bir şekilde tespit edilmesi ve stabilite göstergeli bir metot ile analiz edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, kabozantinibin genotoksik özelliğe sahip Kabo-2 safsızlığının 71 ppm gibi düşük bir limitte bile güvenilir bir şekilde tespiti için UV ile beraber MS dedektörünün kullanılması tercih edilmiştir. Çalışmada 240 nm dalga boyunda elde edilen kromatografik piklerin ayrımı, metot hassasiyetinin artırılması amacıyla optimize edilmiştir. Miktar tayini analizleri sırasında, kalite kontrol sürecinin kolaylaştırılması ve analiz süresin daha kısa olması için kabozantinib ve safsızlıkların tespiti için kullanılan kolon (C_{18} ,150 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) yerine, daha kısa ve farklı özelliklere sahip kolon (C_8 ,100 mm x 2,1 mm x 1,7 µm) kullanılmıştır. Bu değişiklik, miktar tayininde daha hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Kabozantinib ve bilinen ya da bilinmeyen tüm safsızlıkları, UV/Vis bölgede absorpsiyon gösterebilme özelliğine sahiptir. Safsızlıklardan biri olan Kabo-2, UV/Vis bölgede absorpsiyon gösterse de, genotoksik bir safsızlık olması nedeniyle yalnızca 71 ppm gibi düşük bir limit ile kontrol edilmelidir. Bu nedenle, daha düşük konsantrasyonların analizini sağlamak amacıyla UPLC-UV sistemine MS dedektörü eklenmiştir. Literatürde kabozantinib için çeşitli analitik yöntemler bulunmasına rağmen, bu yöntemlerin hiçbiri hem bozunma hem de proses kaynaklı safsızlıkları aynı anda yeterince ayrıştıracak yetkinlikte değildir [54-58].

Tez çalışması esnasında, kolon ve hareketli faz bileşenlerinin seçiminde farklı yaklaşımlar denenmiş ve en uygun kombinasyon tespit edilmiştir. UPLC sisteminde C18 150 x 2,1 mm boyutlarında, 1,7 µm tanecik büyüklüğünde bir kolon tercih edilmiş; bu kolon ile en yakın iki pik arasında 2,0'in üzerinde ayrılma faktörü (Rs) ve 0,8-1,5 arasında kuyruklanma faktörü sağlanmıştır. Hareketli fazın tampon kısmında ise, kolay buharlaşabilen ve kalıntı bırakmadığı için detektörde girişim yapma olasılığı olmayan amonyum format tuzu kullanılmıştır. Çalışmalar, pH 4,5'in en uygun sonuçları verdiğini göstermiştir. Hareketli fazın bir diğer bileşeni olarak asetonitril ve metanol değerlendirilmiş; asetonitril, daha iyi sonuçlar sağlamıştır. Ayrıca, farklı gradiyent programları test edilmiş; ana pikteki kuyruklanma ve zayıf ayrım faktörü sorunları üzerine yoğunlaşılmış ve en uygun gradiyent elde edilmiştir.

MS dedektörden tam verim alabilmek için voltaj iyileştirmeleri yapılmış; 5, 10 ve 15 cone voltaj değerleri test edilmiş ve en güçlü sinyalin 15 cone voltaj şartında sağlandığı tespit edilmiştir.

Metot geliştirme çalışmaları sonucu ortaya çıkan analitik yöntem valide edilmiş ve sonuçlar başarılı bulunmuştur. Seçicilik çalışmasında kabozantinib ve safsızlıklarının birbirleri ile veya çözücüden gelen pikler ile girişim yapmadığı tespit edilmiştir. Bozunma ürünlerinin oluşması ve elde edilen kromatogramların tespit edilmesi için bazı bozunma çalışmaları yapılmış (oksidasyon, hidrolize etme, UV ve günışığı şartlarına maruz bırakma, toz halde etüvde 80°C de bekletme) ve sonuçlar elde edilmiştir. Tablo 4-57'e göre kabozantinib için esas bozunma ürünü Kabo-1 ve Kabo-2 olarak görülmektedir. Genel olarak asidik ve bazik hidroliz şartlarında ana molekül kendini oluşturan iki parçaya kolaylıkla hidroliz olmaktadır (Şekil 4-27). Etken madde ısıl olarak dayanıklı olup 80 ℃'de 13 gün bekletildiğinde genotoksik safsızlıkta oluşan artış limitin çok altındadır, RRT 0,64 de bilinmeyen safsızlık oluşumu gözlenmektedir. Uv/Vis ışığı altında madde dayanıklı olup 60 gün bekletildiğinde dahi herhangi bir bozunma ürünü oluşumu gözlenmemiştir. H_2O_2 ile oksidasyon bozundurmasında ise Kabo-N-Oksit safsızlık oluşumu tesbit edilmiştir. Bununla beraber H_2O_2 bozundurmasında raporlama seviyesinde (%0,05) RRT 0,73 ve RRT 0,87 olan iki yeni safsızlık oluşmuştur.

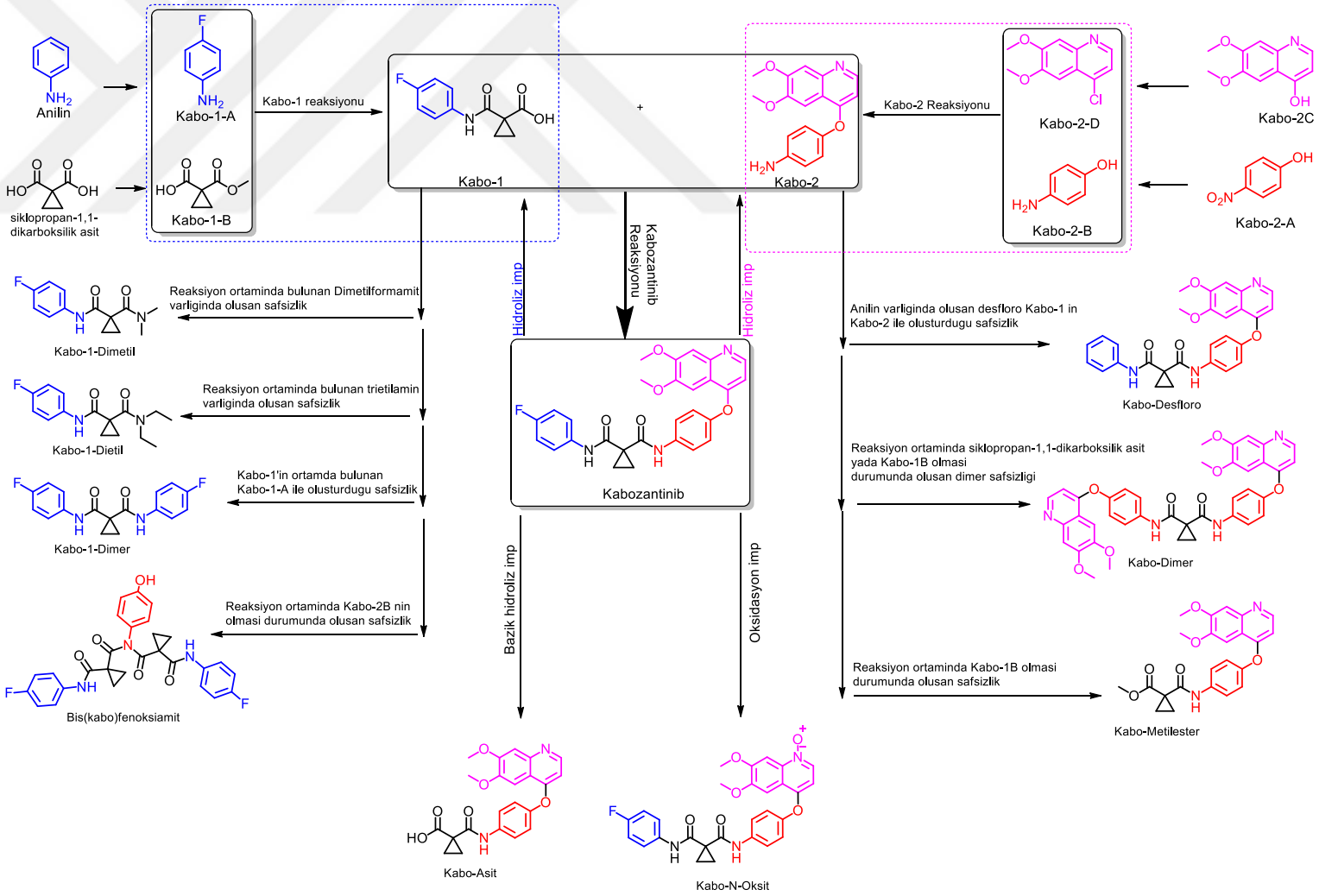
Validasyon sürecinde kullanılan bileşiklerde tespit edilen safsızlıkların oluşum mekanizmaları, Şekil 5-1'de şematik olarak gösterilmiştir. Hazırlanan bu şemada, her bir safsızlığın hangi koşullar altında ortaya çıktığı, sentez, depolama veya analiz süreçleriyle

olan ilişkisi detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Bu bilgiler, safsızlık profili değerlendirmelerinde ve yöntem geliştirme çalışmalarında rehber niteliği taşımaktadır.

Kabozantinib etken maddesinde, hem başlangıç maddesi olmaları hem de hidroliz safsızlıkları olmaları nedeniyle Kabo-1 ve Kabo-2'nin kontrol edilmesi büyük önem arz etmektedir. Kabo-1 ve Kabo-2 reaksiyonu sırasında ortamda trietilamin bulunması durumunda Kabo-1-dietil safsızlığı oluşmaktadır. Bununla birlikte, reaksiyon ortamında N,N-Dimetilformamit olması durumunda, Kabo-1-dimetil safsızlığı da meydana gelmektedir. Reaksiyon ortamında Kabo-1 içerisinde başlangıç maddesi olan Kabo-1A bulunması durumunda, Kabo-1-Dimer olarak adlandırılan safsızlık oluşmaktadır. Ayrıca, Kabo-2B'nin bulunması durumunda ise Bis(kabo)fenoksiamit safsızlığı ortaya çıkmaktadır. Bu safsızlık, reaksiyon ortamında keşfedildikten sonra sentezlenerek referans standart haline getirilmiş ve validasyon sürecine dahil edilmiştir.

Kabo-1 içerisinde başlangıç maddesi olan anilin kalıntısı bulunması durumunda, Kabo-desfloro safsızlığı oluşmaktadır. Ek olarak, diğer bir başlangıç maddesi olan siklopropan-1,1-dikarboksilik asit bulunması durumunda, Kabo-Dimer olarak adlandırılan safsızlık meydana gelmektedir. Kabo-1-B'nin bulunması durumunda ise Kabo-Metilester safsızlığı oluşmaktadır. Son olarak, bazik hidroliz sürecinde Kabo-Asit, Kabo-1, Kabo-2 ve oksidatif bozunma sürecinde ise Kabo-N-Oksit safsızlıkları ortaya çıkmaktadır.

Bu detaylı mekanizmalar, kabozantinib etken maddesinin üretim ve analiz süreçlerinde karşılaşılabilecek safsızlıkların anlaşılması ve kontrol altına alınması açısından kritik öneme sahiptir.



Şekil 5-1: Tez çalışmasında kullanılan safsızlıkların oluşum kaynakları.

Geliştirme ve metot iyileştirme çalışmaları sonrasında son şekli verilen metotlarda ICH kılavuzu ile belirlenen sınırlarda validasyon çalışması yapılmıştır. Yöntem, metotta belirtilen bütün bileşikler için seçici ve stabilite göstergelidir. Yapılan doğrusallık çalışmalarında Kabo-1 için 0,0415 – 1,508 µg/mL, Kabo-2 için 0,000370 – 0,0555 µg/mL, Kabo-Asit için 0,0311 – 1,556 µg/mL, Kabo-1-dimetil için 0,0856 – 1,488 µg/mL, Kabo-1-dietil için 0,0568 – 1,516 µg/mL, Kabo-N-Oksit için 0,0192 – 1,536 µg/mL, Kabo-Metilester için 0,0189 – 1,514 µg/mL, Kabo-Dimer için 0,0301 – 1,508 µg/mL, Kabo-desfloro için 0,0261 – 1,490 µg/mL, Kabo-1-dimer için 0,0646 – 1,486 µg/mL ve Bis(kabo)fenoksiamit için 0,0414 – 1,506 µg/mL derişim aralığında dedektör yanıtı ile derişim arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Miktar tayininde kabozantinib %80 ile %120 arasında hazırlanan 5 noktada doğrusal olup R^2 değeri 0,9999 olarak bulunmuştur.

Doğruluk parametresi çalışması sırasında metotda belirtildiği şekilde hazır edilen doğruluk numunelerinde geri kazanım oranları miktar tayinin de % 98-%102 aralığında elde edilmiştir. Safsızlıklarda, Kabo-1 için %97,7 – %100,0, Kabo-2 için %99,1 – %107,3, Kabo-Asit için %83,3 – %101,7, Kabo-1-dimetil için %88,2 – %95,1, Kabo-1-dietil için %107,9 – %118,2, Kabo-N-Oksit için %75,0 - %109,1, Kabo-Metilester için %75,0 – %102,6, Kabo-Dimer için %100,0 – %102,4, Kabo-desfloro için %100,0 - %102,2, Kabo-1-dimer için %93,4 – %96,5 ve Bis(kabo)fenoksiamit için %93,8 - %103,6 aralığında bulunmuştur.

Kesinlik çalışmalarında, kabozantinib etken madde miktarı bölüm 3.7.2'de anlatıldığı üzere numuneler hazırlanmış ve bölüm 3.8.2.4 de kabul kriteri verilmiş olup sonuçların kendi arasındaki % BSS etken madde miktar tayini için % 2,0'den daha düşük olarak elde edilmiştir. Safsızlıkların kesin parametresi çalışılırken numune içerisinde var olan Kabo-1-dimer ve Kabo-2 nin 6 ardışık numune içerisindeki miktarları arasındaki BSS'si hesaplanmıştır. Sonuçlar % 10 değerinin altındadır.

Sonuç olarak, bu çalışma kabozantinib ve safsızlıklarının analizinde, özellikle proses ve bozunma kaynaklı safsızlıkların kapsamlı bir şekilde incelenmesine yönelik olarak, literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Çalışmada geliştirilen analitik yöntem, safsızlıkların doğru ve hassas bir şekilde izlenmesine olanak sağlarken, genotoksik özellik gösteren Kabo-2 safsızlığının güvenilir bir şekilde tespit edilmesi gibi kritik bir katkı sunmaktadır. Mevcut literatürde, özellikle genotoksik risk taşıyan Kabo-

2’nin 71 ppm gibi düşük bir seviyede izlenmesi üzerine yoğunlaşan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan, kullanılan metodoloji yalnızca kabozantinibin stabilitesini değil, aynı zamanda güvenlik profilini artırarak klinik kullanımda daha güvenilir sonuçlar elde edilmesine olanak tanımaktadır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, kabozantinib ve türevi safsızlıkların izlenmesi için gelecekteki araştırmalar ve kalite kontrol prosedürleri açısından yeni bir referans noktası oluşturmakta ve yöntem, ileri düzey analitik ihtiyaçlara yanıt verecek şekilde sağlam bir temel sunmaktadır.

KAYNAKÇA

1. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal - cell carcinoma. *New Engl J Med* 1996; **12** :865-75.
2. Choueiri TK, Motzer RJ. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma . *New Engl J Med* 2017; **60**: 354-376.
3. McGregor BA, Lalani AA, Xie W, Steinharter JA, Bakouny ZE, Martini DJ ve ark. Activity of cabozantinib after immune checkpoint blockade in metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *European journal of cancer* 2020; **135**: 203-210.
4. Medina-Rico M, Lopez-Ramos H, Lobo M, Romo J, Guillermo Prada J. Epidemiology of renal cancer in developing countries. *Canadian Urological Association Journal* 2017; **12**(3): E154-6.
5. Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma. *BMJ* 2014; 349, g4797.
6. Wong MC, Goggins WB, Yib BH, Fung FD, Leung C, Fang Y ve ark. Incidence and mortality of kidney cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries. *Sci. Rep* 2017; **7**(1): 15698.
7. Canino C, Perrone L, Bosco E, Saltalamacchia G, Mosca A, Rizzo M ve ark. Targeting angiogenesis in metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticanc* 2019; **19**(3): 245-257.
8. Rodriguez-Vida A, Hutson TE, Bellmunt J, Strijbos MH. New treatment options for metastatic renal cell carcinoma. *ESMO Open* 2017; **2**(2): e000185.
9. Motzer R, Alekseev B, Rha SY, Porta C, Eto M, Powles T ve ark. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for advanced renal cell carcinoma. *New Engl J Med* 2021; **384**(14): 1289-1300.
10. Exelixis Inc. (2020). Cometriq® (cabozantinib) capsules and Cabometyx® (cabozantinib) tablets: Prescribing information. U.S. Food and Drug Administration. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208692s012lbl.pdf (Erişim tarihi: 15 Kasım 2024).
11. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA-Cancer J Clin* 2018; **68**: 394-424.
12. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018; **87**: 103-356.
13. Levi F, Ferlay J, Galeone C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* 2008; **58**: 101-949.

14. Grupta K, Miller JD, Li JZ, Russel MW. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A literature review. *Cancer Treat Rev* 2008; **3**(34): 193-205.

15. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 2010; **7**: 245-257.

16. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y. European association of urology guidelines on renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2019; **5**(75): 799-810.

17. Motzer RJ, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon MT, Shah AY ve ark. Nivolumab plus cabozantinib versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma (CheckMate 9ER): long-term follow-up results from an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2022; **7**(23): 888-898.

18. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini IB. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; **17**: 917-927.

19. Schneider DF, Chen H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA-Cancer J Clin* 2013; **6**(63): 373-394.

20. Ly NS, Li J, Faggioni R, Roskos LK, Brose MS. Population Pharmacokinetics and Exposure–Response Analysis for the Phase 3 COSMIC-311 Trial of Cabozantinib for Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer. *Clin Pharmacokinet* 2023; **62**: 587-598.

21. Naoum GE, Morkos M, Kim B, Arafat W. Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers. *Molecular Cancer* 2018; 17-51.

22. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R ve ark. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *New Engl J Med* 2015, **2**(372), 621-630.

23. Yakes FM, Chen J, Tan J. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 2298-2308.

24. Colgan S, Timpano RJ, Roberts M, Weaver R, Ryan K, Fields KW ve ark. Opportunities for lean stability strategies. *J Pharm Innov* 2014; 259-271.

25. Ipul AV, Devesh S. Stability testing of active pharmaceutical ingredient (API). Medicine, Chemistry 2012; **4**: 52-65.

26. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2023, 02, 06). ICH Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Produsts, Erişim: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf] , Erişim Tarihi: 14 Aralık 2024.

27. Atici EB ve Karliğa B. Identification, synthesis and characterization of process related impurities of benidipine hydrochloride, stress-testing/stability studies and HPLC/UPLC method validations. *J Pharmaceut Biomed* 2015; 256-268.

28. Atici EB, Yazar Y, Ağtaş Ç, Rıdvanoğlu N, Karlığa B. Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and assay analyses of amoxicillin and potassium clavulanate mixtures. *J Pharmaceut Biomed* 2017; 1-9.

29. Atici EB, Ağtaş Ç, Yazar Y, Rıdvanoğlu N. Synthesis and characterization of oxitropium bromide related substances and novel stability indicating HPLC methods. *J Pharmaceut Biomed* 2020; 113145.

30. Yao K, Wang H, Xie X, Li J, You R, Li Y ve ark. HPLC separation, synthesis, isolation and characterization of process related and degradation impurities in larotaxel including method development and validation. *J Pharmaceut Biomed* 2023; 115435.

31. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2006, 10, 25). ICH Q3A Impurities in New Drug Substances, Erişim: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf] , Erişim Tarihi: 19 Aralık 2024

32. Medina-Rico M, Lopez-Ramos H, Lobo M, Romo J, Guillermo Prada J. Epidemiology of renal cancer in developing countries. *Can Urol Assoc J* 2017; **12**(3): E154-6.

33. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2023, 02, 06). ICH Q1B Photostability Testing of New Drug Substances and Produsts, Erişim: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf], Erişim Tarihi: 19 Aralık 2024.

34. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2023, 04, 03). ICH M7(R2) Assesment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potantial Carcinogenic Risk, Erişim: [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf], Erişim Tarihi: 19 Aralık 2024.

35. Barber C, Amberg A, Custer L, Doba KL, Glowienke S, Gompel JV ve ark. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharm* 2015; 367-377.

36. Amberg A, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cross KP ve ark. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharm* 2016; 13-24.

37. Yazar Y, Özel FGA, Atici EB, Yılmaz E, Narin İ. Investigation of aclidinium bromide degradation by stability-indicating HPLC methods, characterization of impurities by NMR, and identification of degradation products by LC-MS. *J Pharmaceut Biomed* 2024; **20**: 238: 115845.

38. Dhangar KR, Jagtap RB, Surana SJ, Shirkhedkar AA. Review article impurity profiling of drugs towards safety and efficacy: Theory and practice. *J Chil Chem Soc* 2017; **62**(2): 3543-3557.

39. Ettre LS. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. *Milestones in Chromatography* 2003; 458-467.

40. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul* 2016; **3**(2): 156–60

41. Poole CF. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *J Chromatogr A* 2003; 963-984.

42. Santiago M ve Strobel S. Thin layer chromatography. *Method Enzymol* 2013; **533**: 303–324.

43. Gunawan S, Ismadji S, Ju YH. Desing and operation of modified silica gel column chromatography. *J Chin Inst Chem Eng* 2008; 625-633.

44. Claessens HA, van Straten MA, Cramers CA, Jezierska M, Buszewski B. Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 1998; **826**(2): 135-156.

45. Cruz E, Euerby MR, Johnson CM, Hackett CA. Choromatographic classification of commercially avaliable reverse-phase columns. *Chromatographia* 1997; 151-161.

46. Swartz ME. UPLC: An introduction and review. *J Liq Chromatogr R T* 2005; **28**(7–8): 1253–1263.

47. Hanai T. *HPLC: A Practical Guide*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999.

48. Grob RL, Barry EF. *Modern Practice of Gas Chromatography*. New Jersey: Wiley-Interscience; 2004.

49. McNair HM, Miller JM, Snow NH. *Basic Gas Chromatography*. New Jersey: Wiley; 2019.

50. Hartmann CH. Gas chromatography detectors. *Analytical Chemistry* 1971; 113-125.

51. Kolb B, Ettre LS. *Static Headspace-Gas Chromatography*. New Jersey: Wiley; 2006.

52. Caroline W. Current trends in supercritical fluid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2018; 6441-6457.

53. Gere DR. Supercritical Fluid Chromatography. *Science* 1983; 253-259.

54. Kuna AK, Seru G, Radha GV. A Novel RP-HPLC method for the quantification of cabozantinib in active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical dosage forms. *IJPSR* 2019; **8**(10), 3963-3969.

55. Wu C, Xu X, Feng C, Shi Y, Liu W, Zhu X ve ark. Degradation kinetics study of cabozantinib by a novelstability-indicating LC method and identification of its majordegradation products by LC/TOF-MS and LC–MS/MS. *J Pharmaceut Biomed* 2014; **98**: 356-363.

56. Venkateshwarlu P, Patel MM. Method development and validation of cabozantinib by LC-MS/MS. Pharmacia 2022; **2**(69): 407-413.

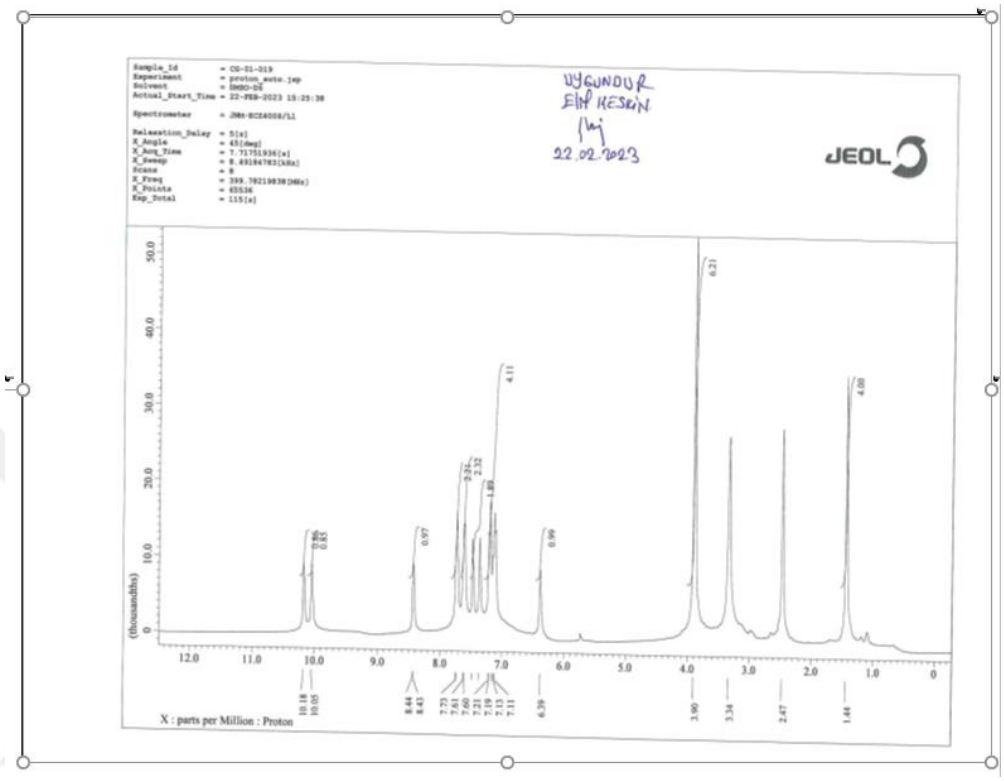
57. Ashok G, Mondal S. Stability-indicating method development and validation for the estimation of cabozantinib in pharmaceutical dosage forms by ultra-performance liquid chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2018; **10**(11): 238-241.

58. Alam P, Salem-Bekhit MM, Al-Joufi FA, Alqarni MH, Shakeel F. Quantitative analysis of cabozantinib in pharmaceutical dosage forms using green RP-HPTLC and green NP-HPTLC methods: A comparative evaluation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 2021; 21: 100413.

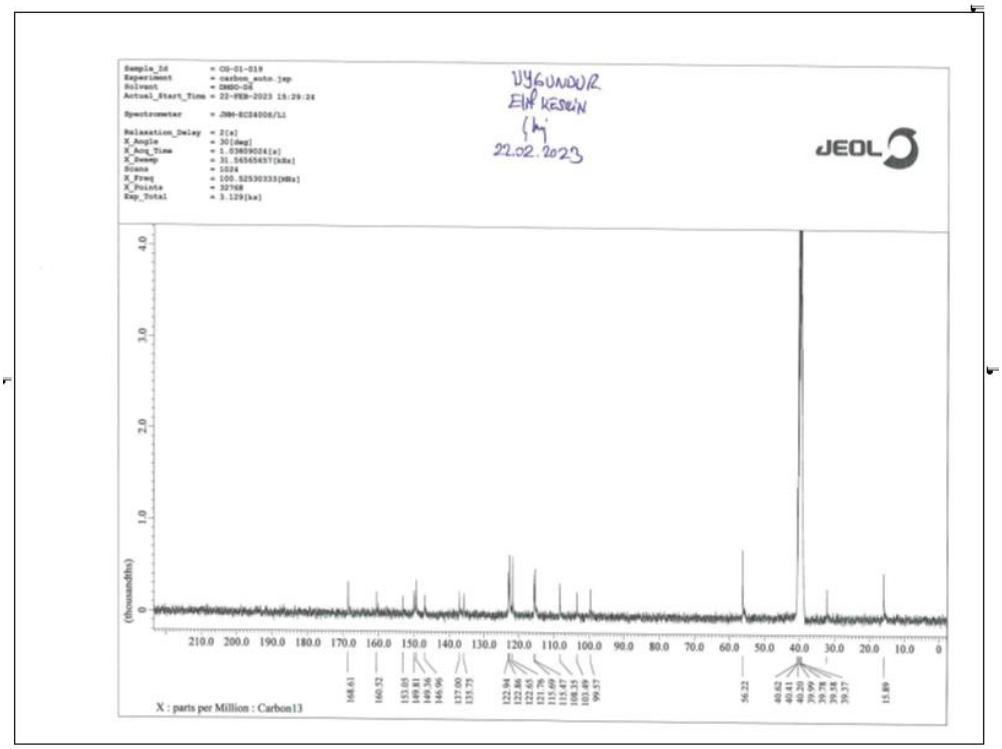
59. European Medicines Agency. (2023, 12 14). ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures. Erişim: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf], Erişim Tarihi: 28 Aralık 2024.

HAM VERİLER

Kabozantinib referans standart ^{1}H NMR spectrumu

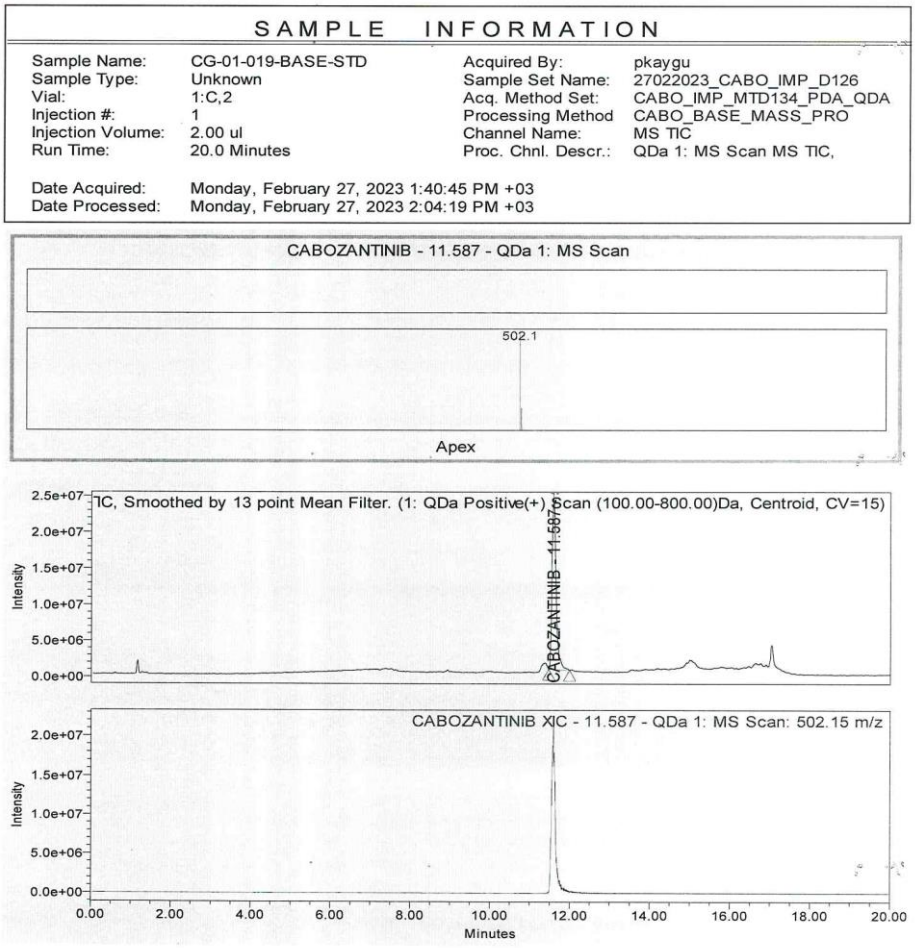


Kabozantinib referans standart ^{1}H NMR spectrumu

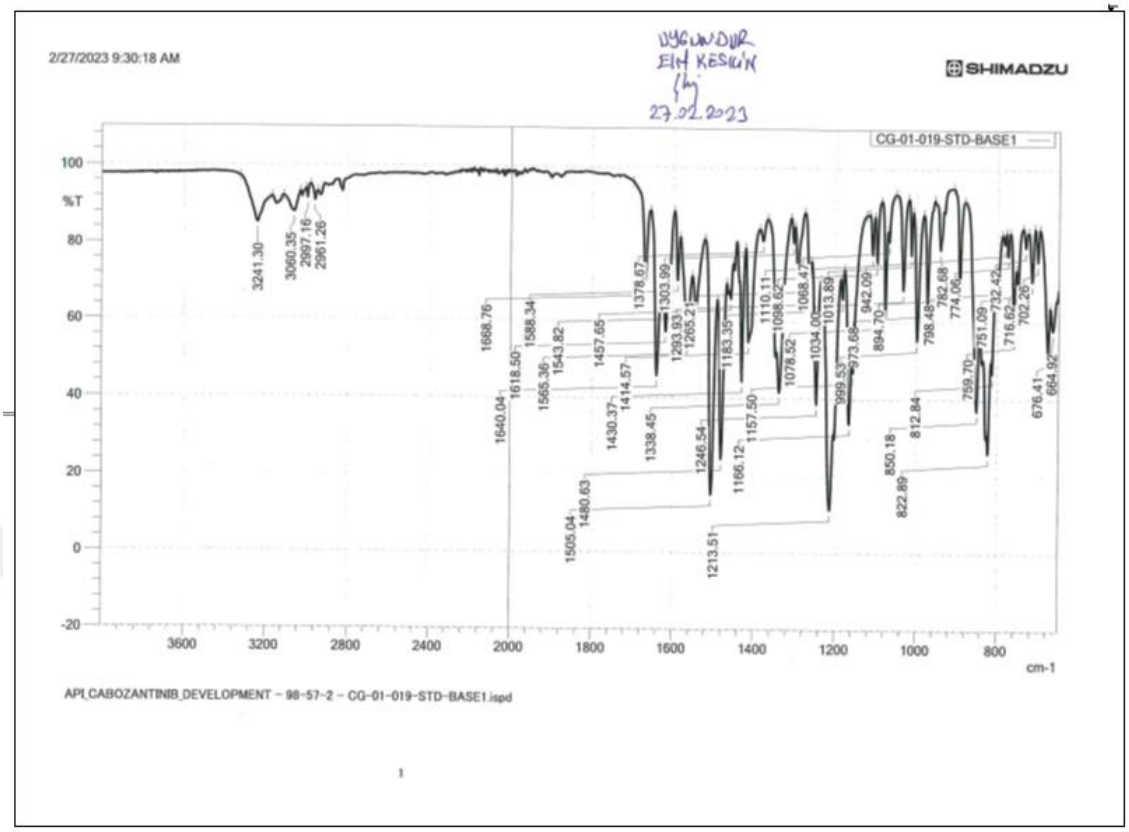


Kabozantinib referans standart MS (ESI+) spectrum

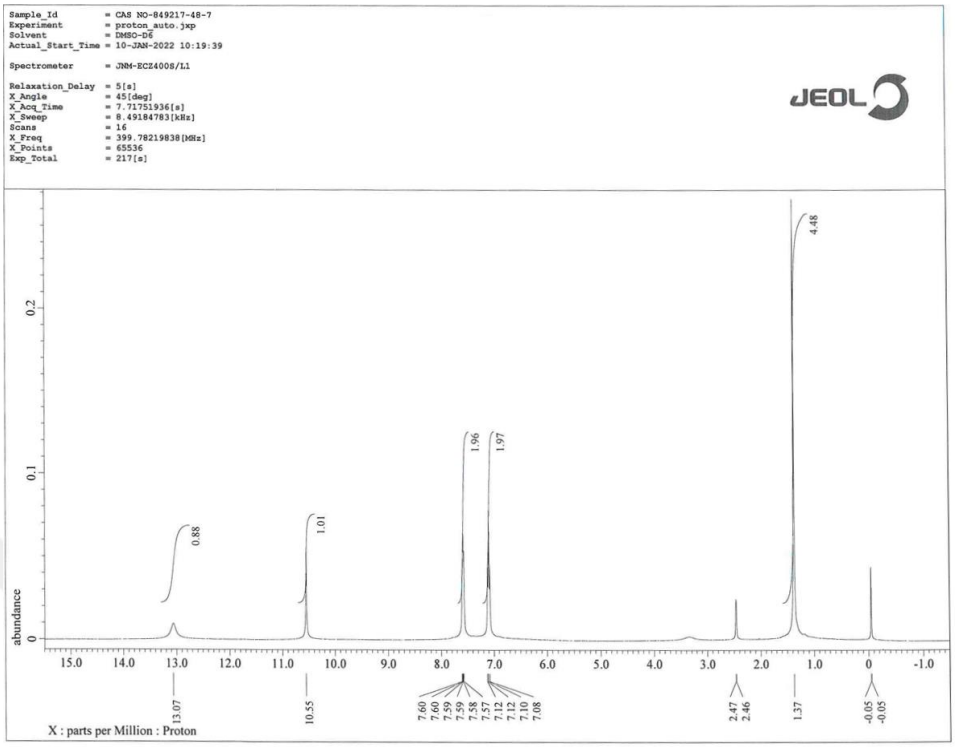
$[M+H]^+$ $[C_{28}H_{25}FN_3O_5]^+$ *m/z*: 502.18; Bulunan *m/z*: 502.1



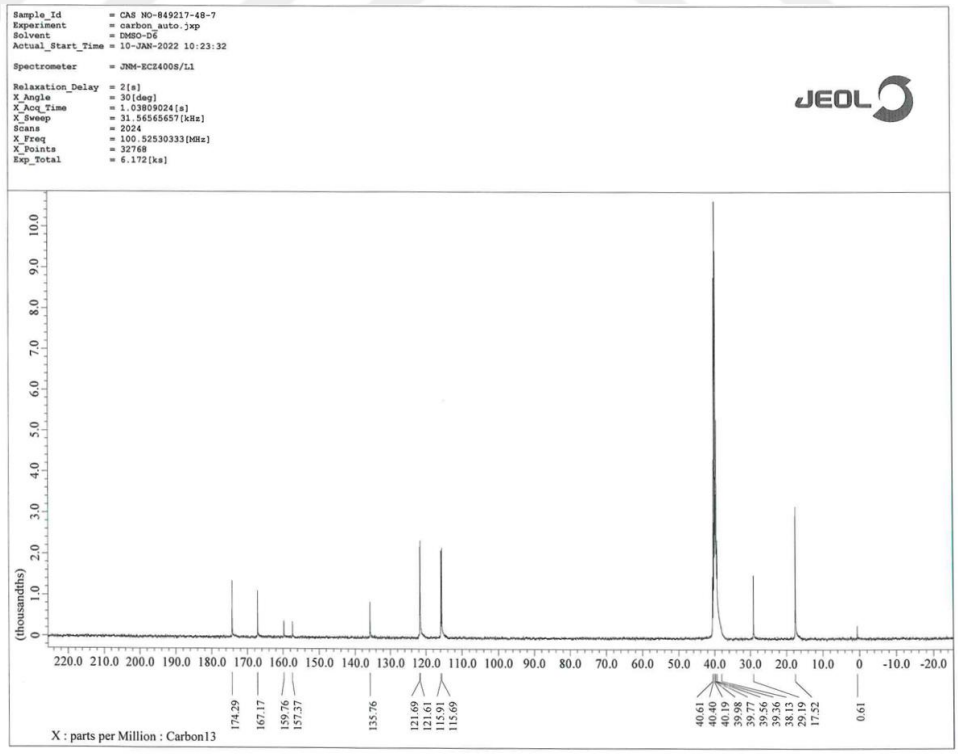
Kabozantinib referans standart IR spectrum



Kabo-1 referans standart ^{1}H NMR spectrumu

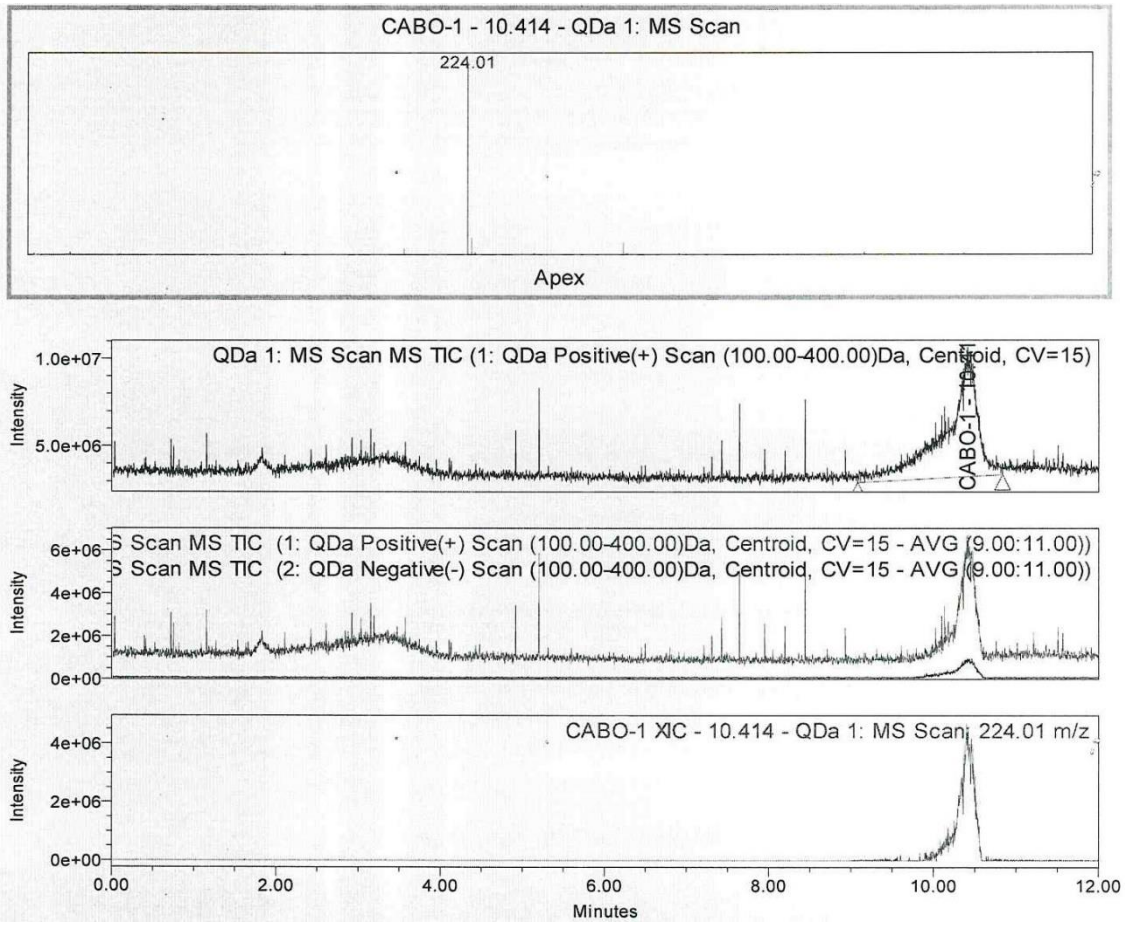


Kabo-1 referans standart ^{13}C NMR spectrumu

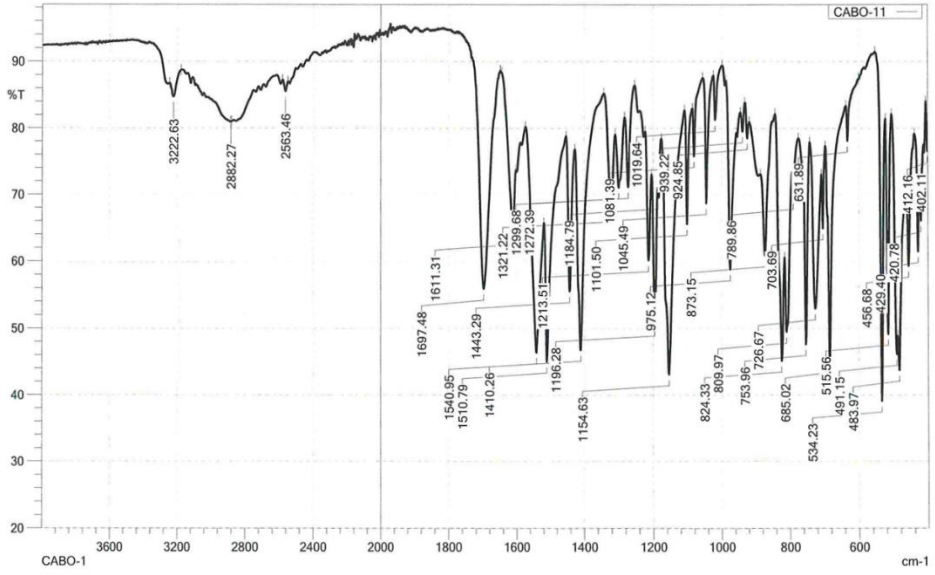


Kabo-1 referans standart MS (ESI+) spectrum

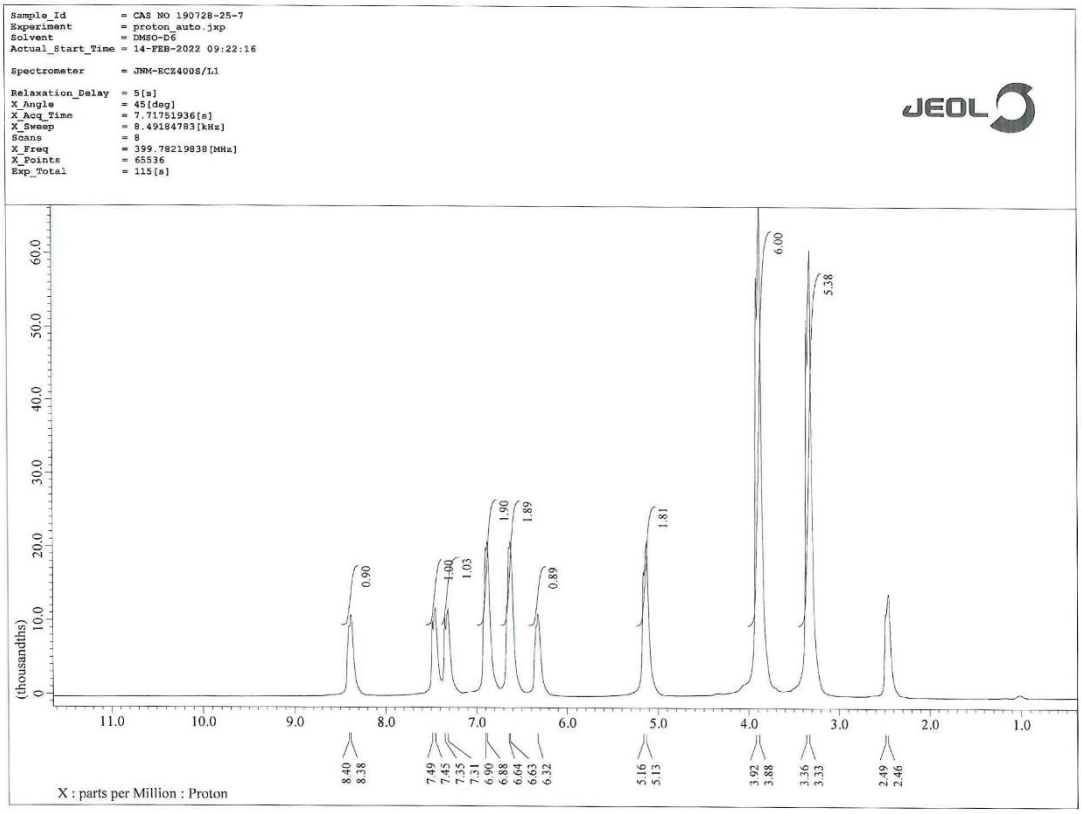
$[M+H]^+$ $[C_{11}H_{11}FNO_3]^+$ *m/z*: 224.07; Bulunan *m/z*: 224.01



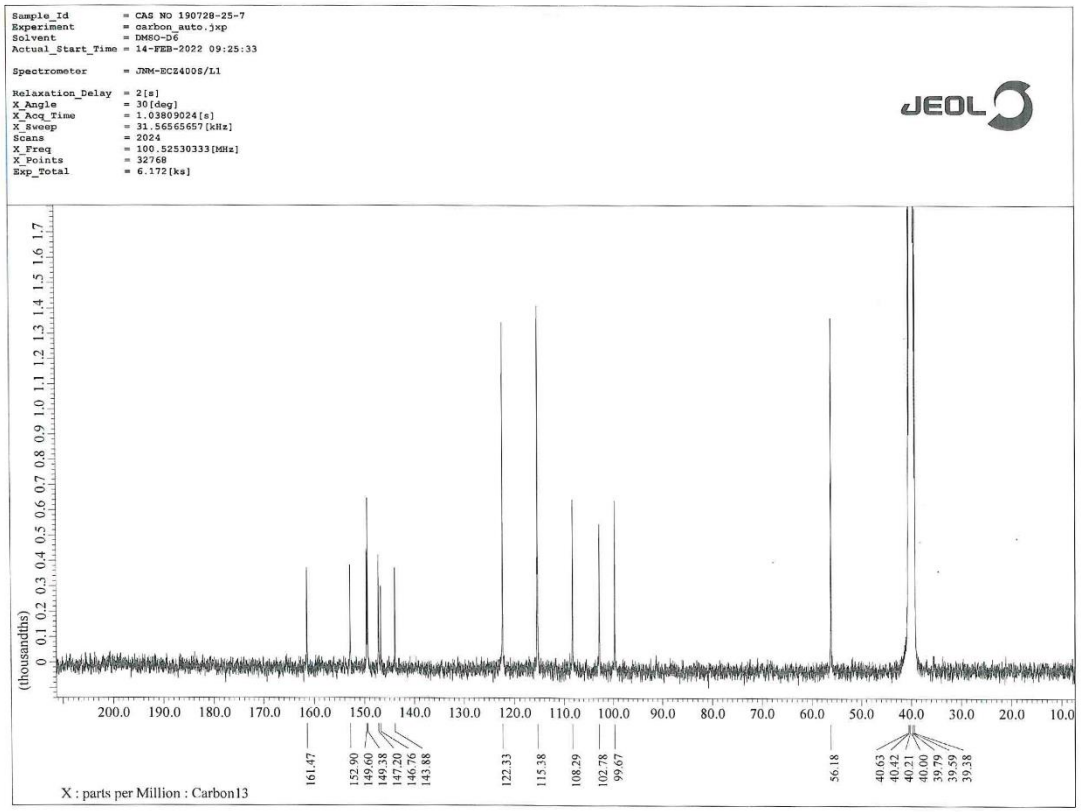
Kabo-1 referans standart IR spectrum



Kabo-2 referans standart ^{1}H NMR spectrumu

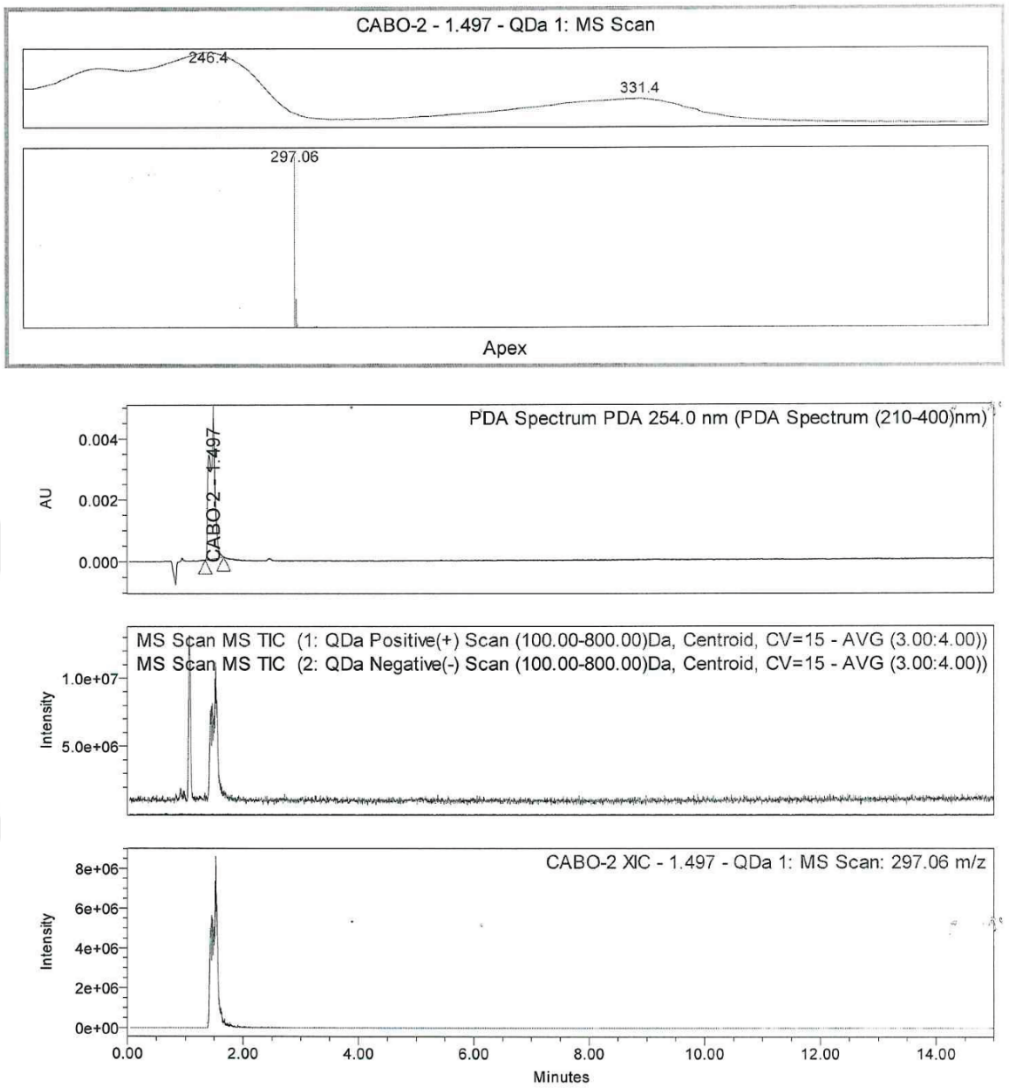


Kabo-2 referans standart ^{13}C NMR spectrumu

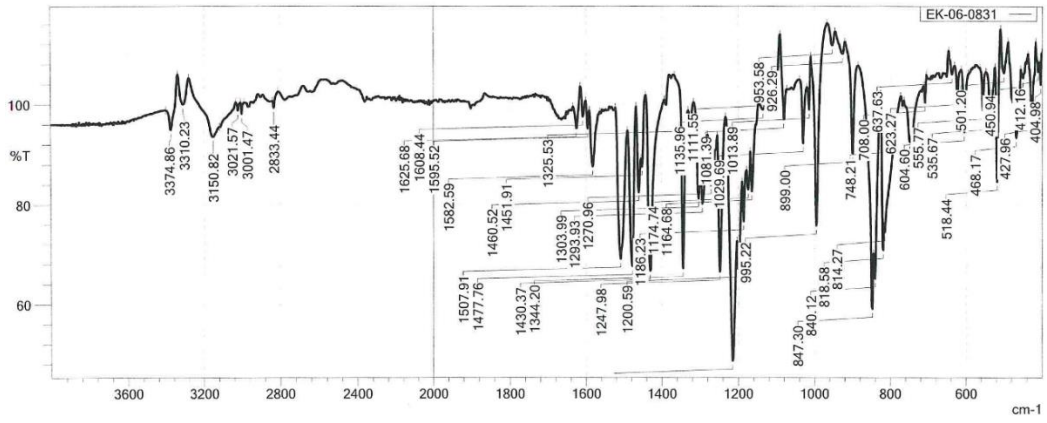


Kabo-2 referans standart MS (ESI+) spectrum

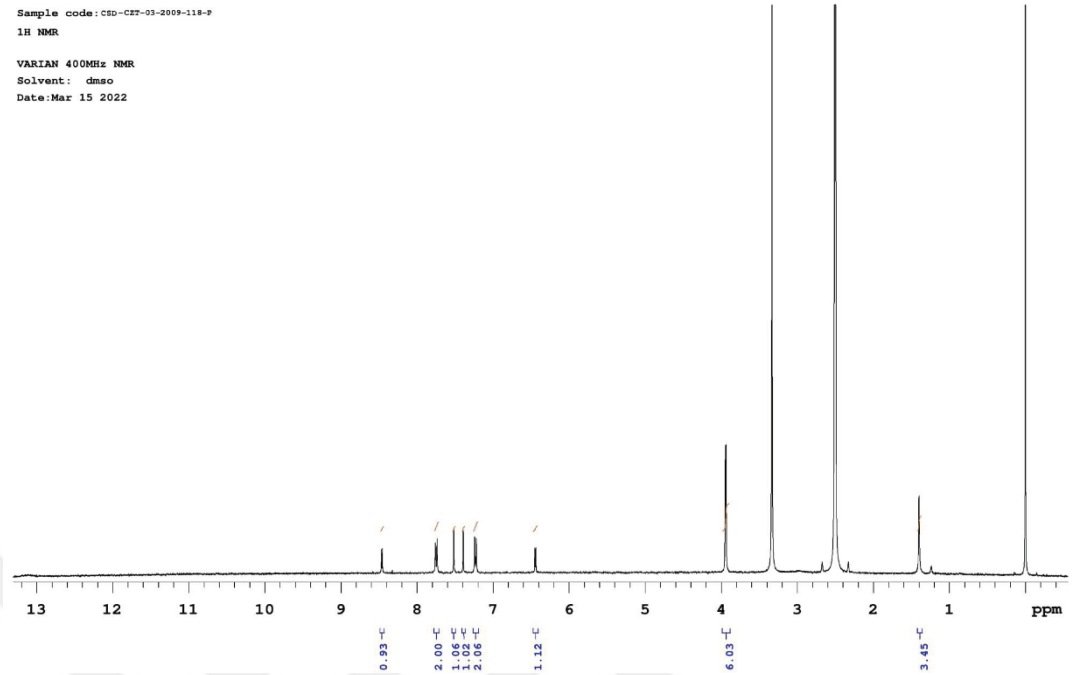
$[M+H]^+$ $[C_{17}H_{17}N_2O_3]^+$ *m/z*: 297.12; Bulunan *m/z*: 297.06



Kabo-2 referans standart IR spectrum

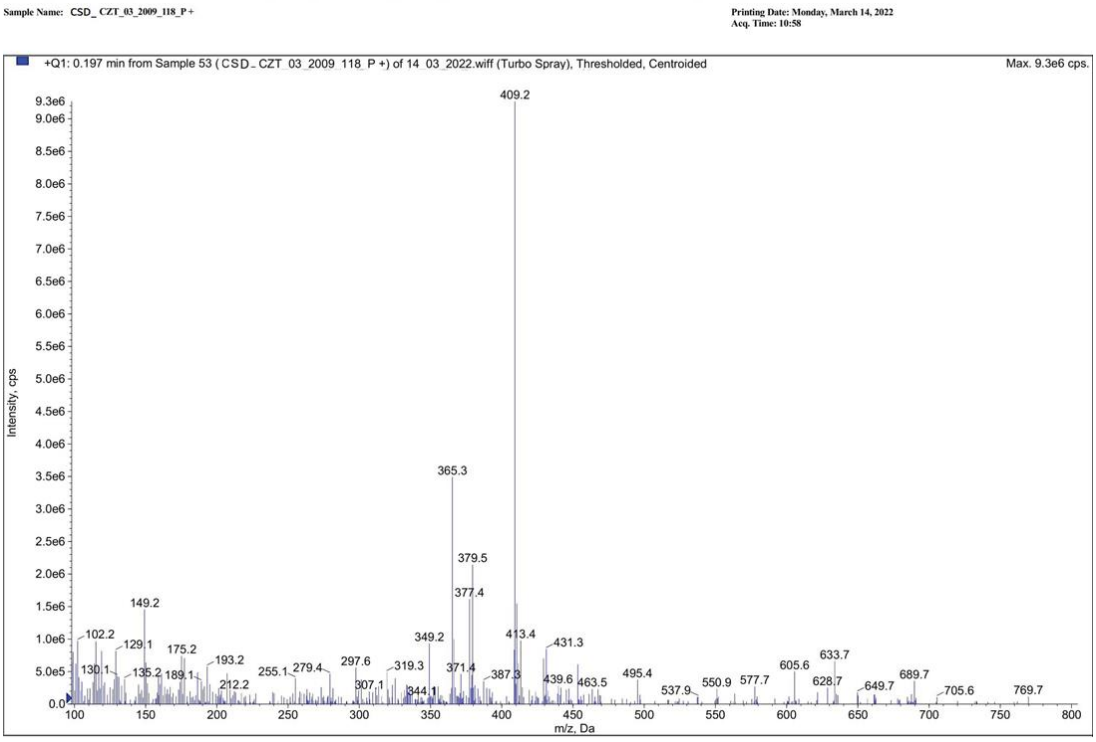


Kabo-Asit referans standart ^{1}H NMR spectrumu

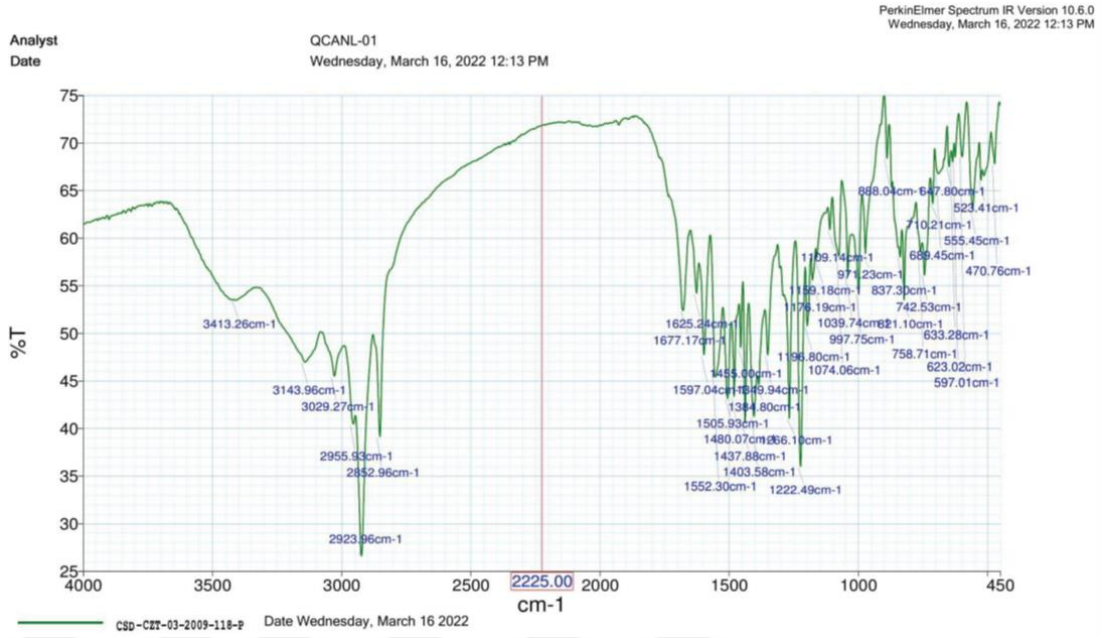


Kabo-Asit referans standart MS (ESI+) spectrum

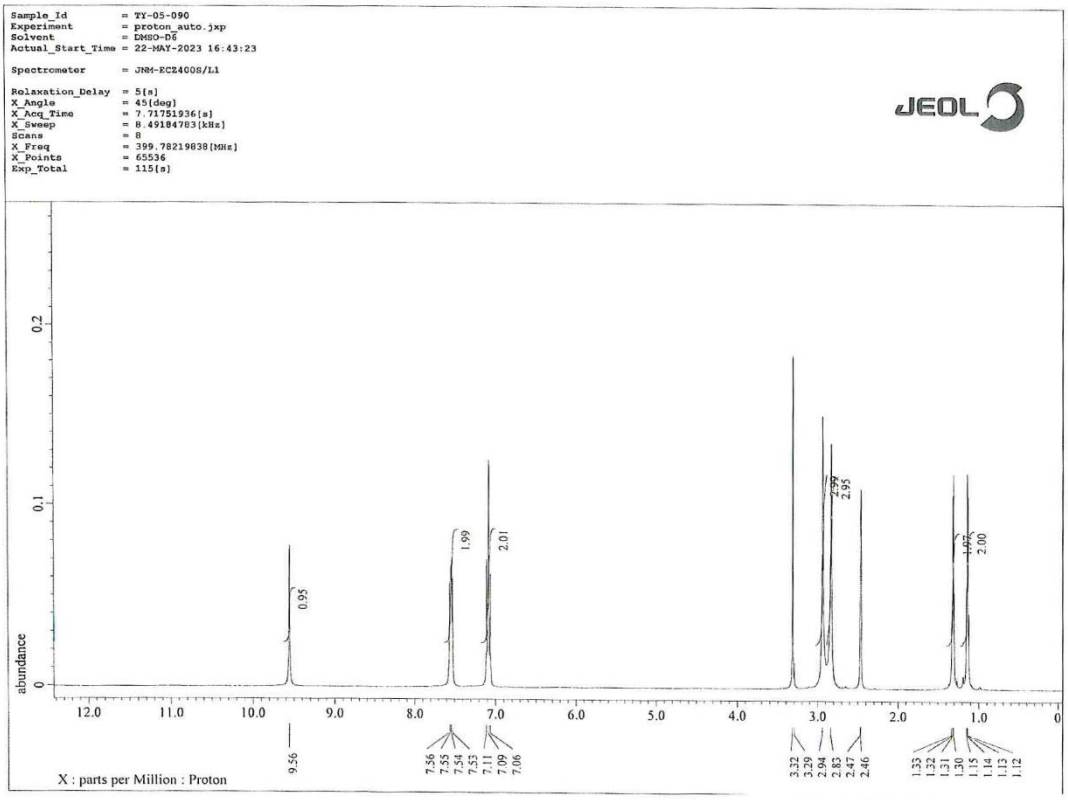
$[M+H]^+$ $[C_{22}H_{21}N_2O_6]^+$ *m/z*: 409.14; Bulunan *m/z*: 409.2



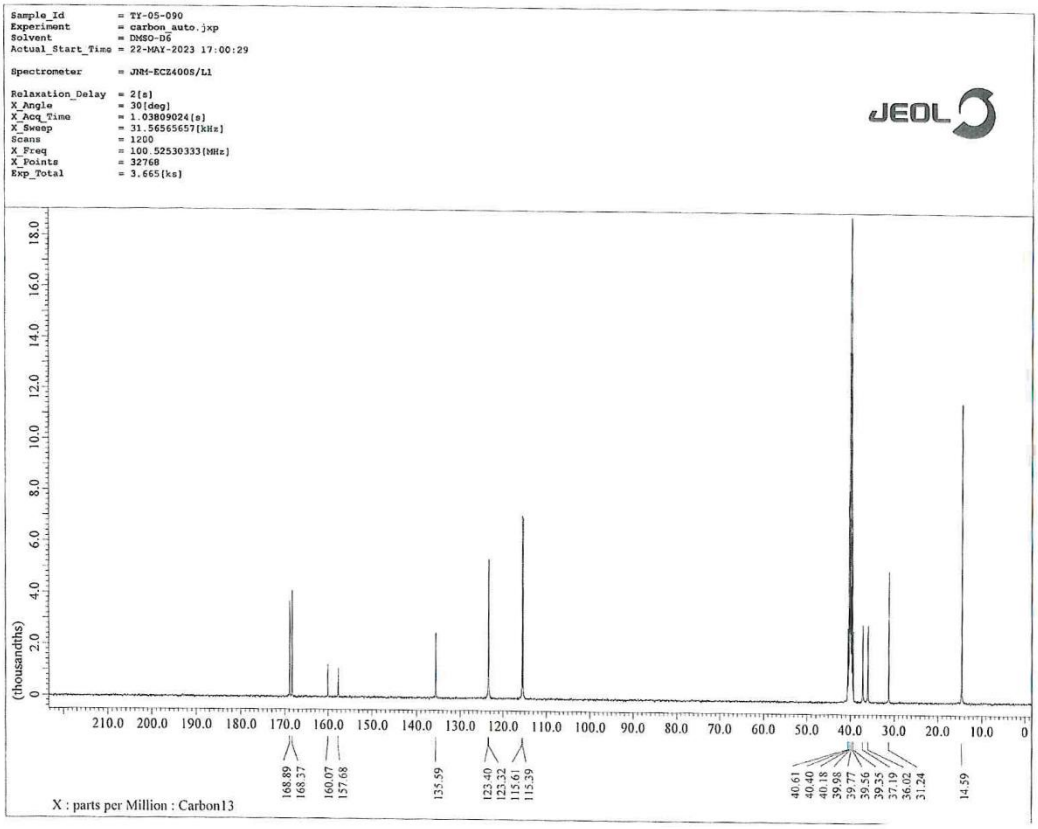
Kabo-Asit referans standart IR spectrum



Kabo-1-dimetil referans standart ^{1}H NMR spectrumu

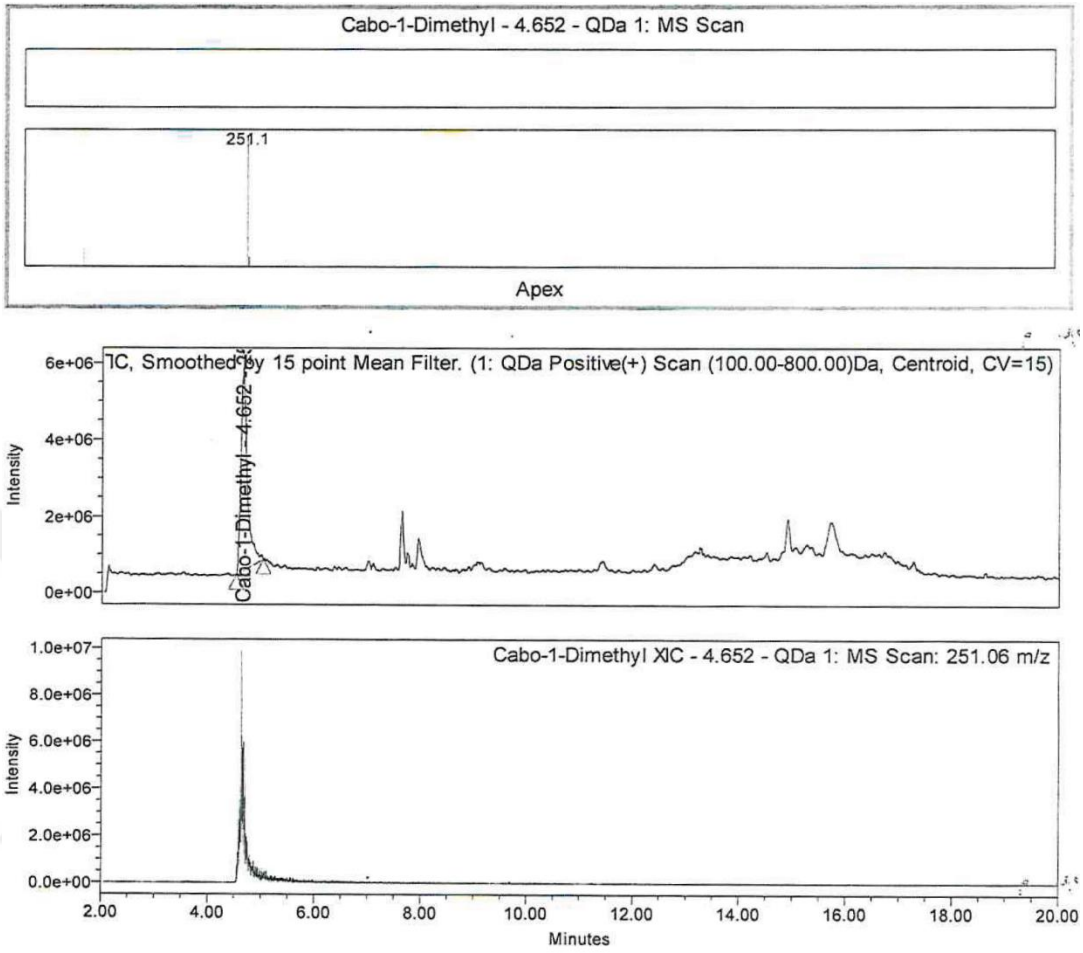


Kabo-1-dimetil referans standart ^{13}C NMR spectrumu

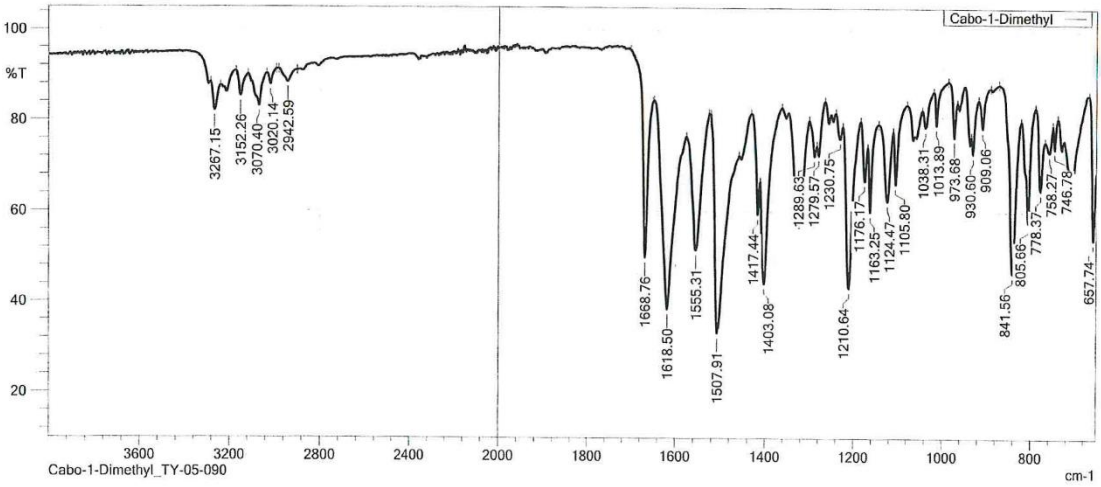


Kabo-1-dimetil referans standart MS (ESI+) spectrum

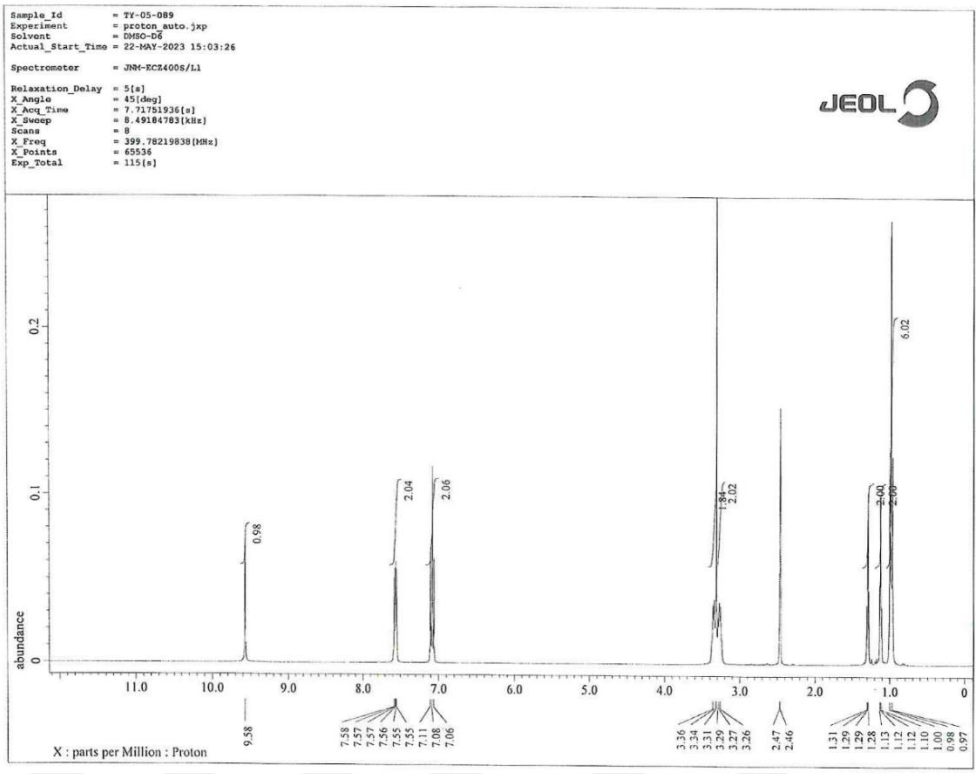
$[M+H]^+$ $[C_{13}H_{16}FN_2O_2]^+$ *m/z*: 251.12; Bulunan *m/z*: 251.06



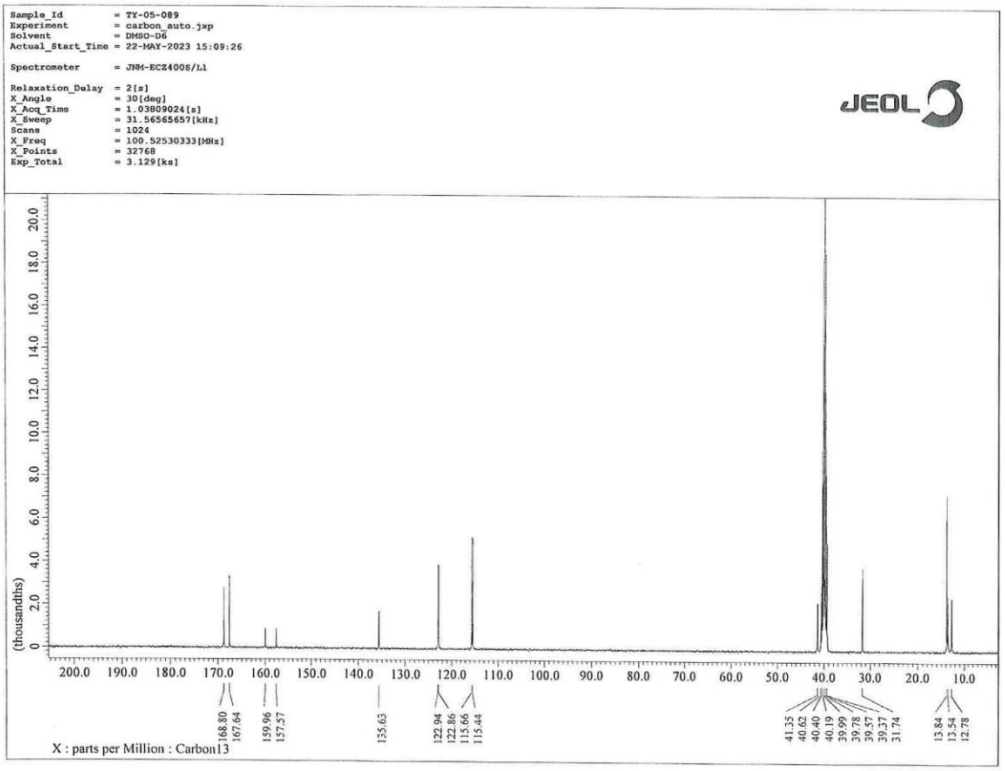
Kabo-1-dimetil referans standart IR spectrum



Kabo-1-dietil referans standart ^{1}H NMR spectrumu

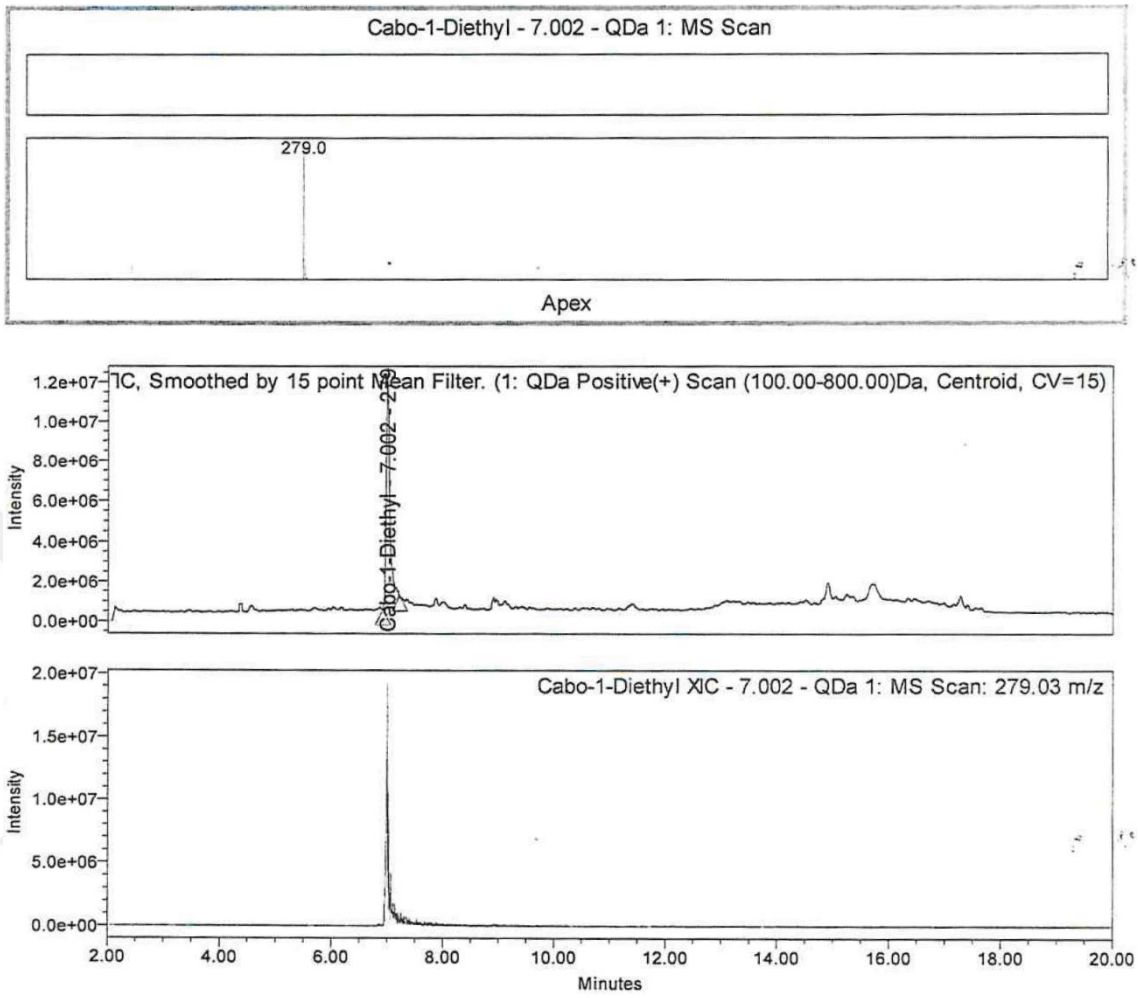


Kabo-1-dietil referans standart ^{13}C NMR spectrumu

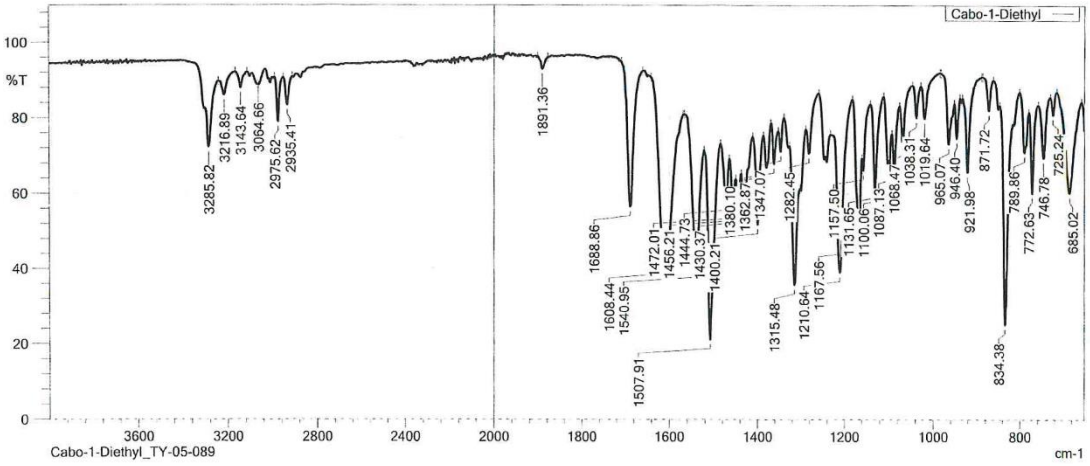


Kabo-1-dietil referans standart MS (ESI+) spectrum

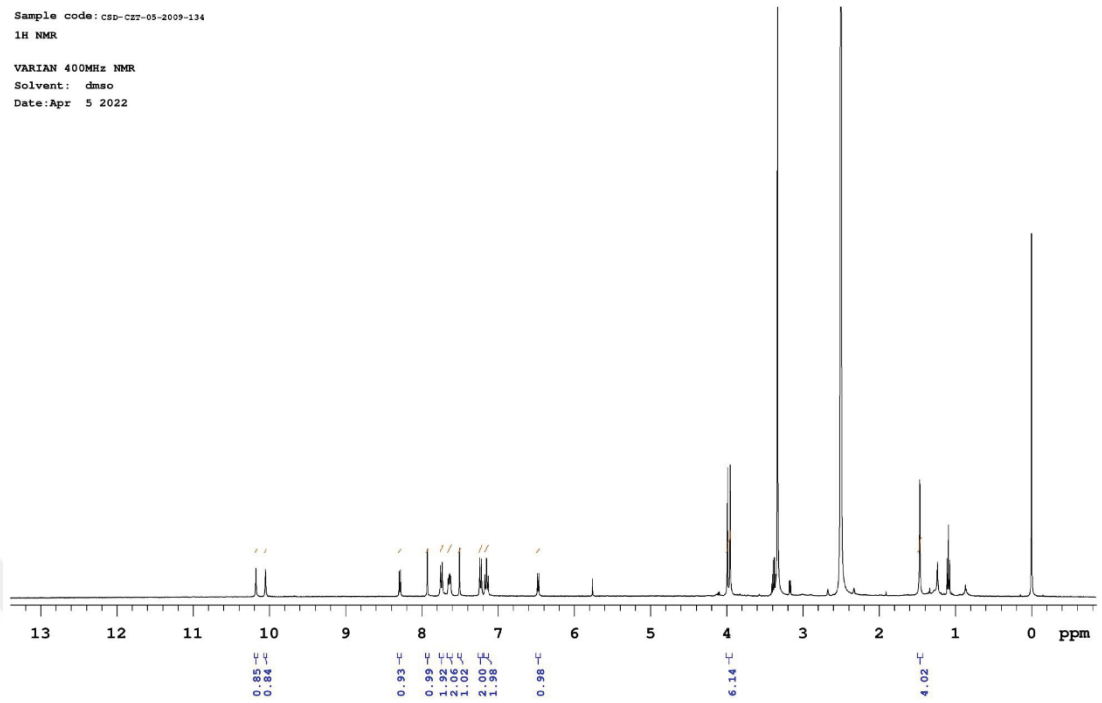
$[M+H]^+$ $[C_{15}H_{20}FN_2O_2]^+$ *m/z*: 279.15; Bulunan *m/z*: 279.03



Kabo-1-dietil referans standart IR spectrum

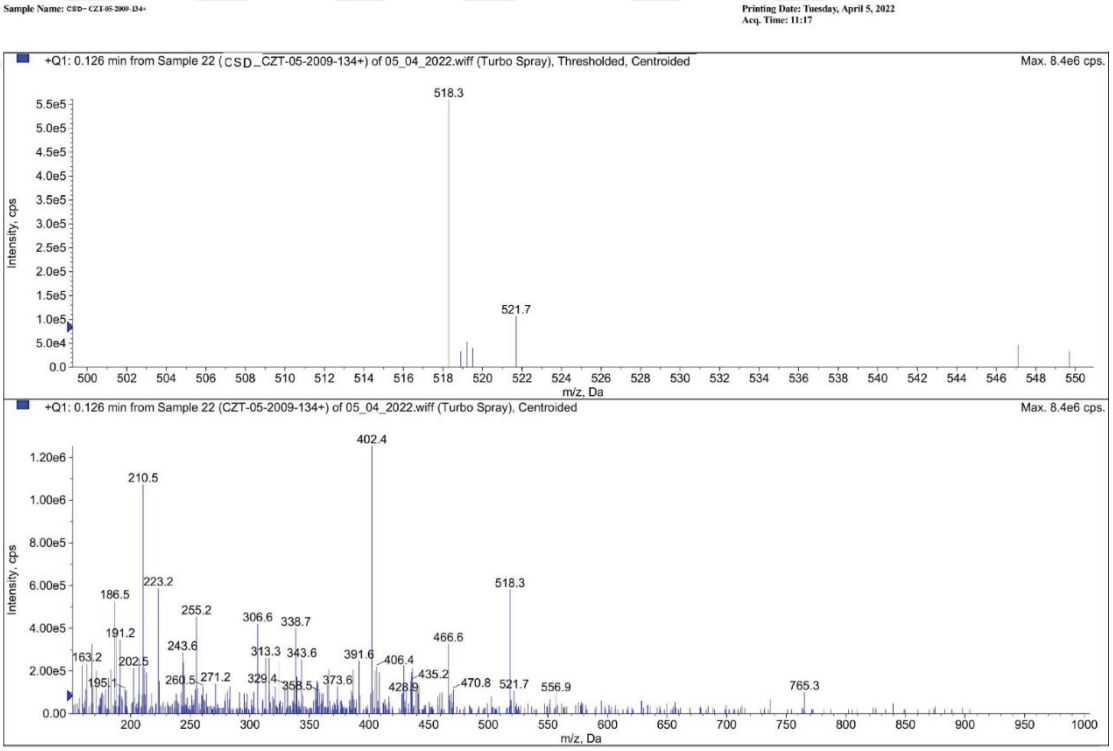


Kabo-N-Oksit referans standart ^{1}H NMR spectrumu

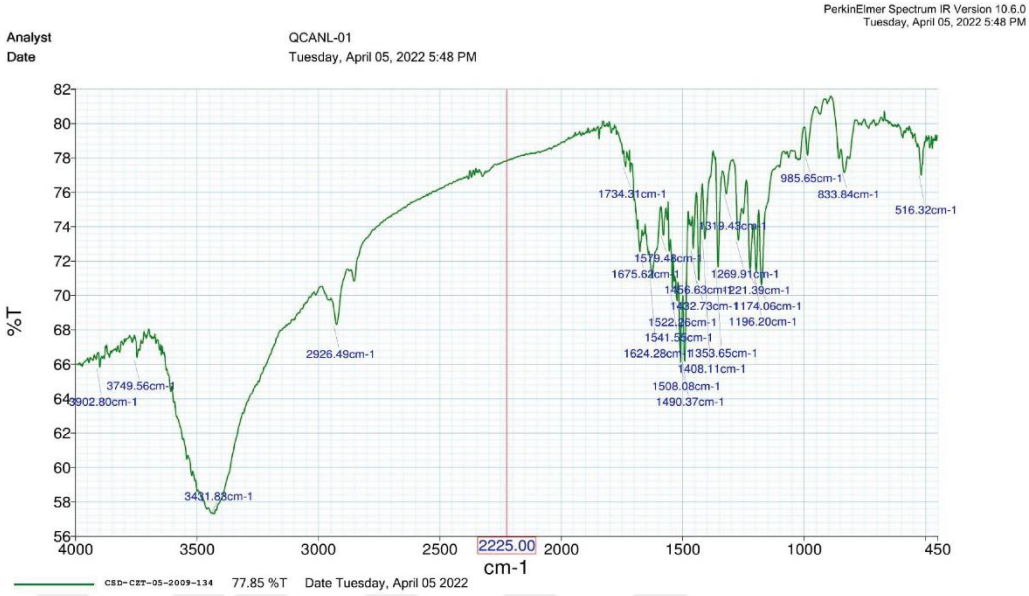


Kabo-N-Oksit referans standart MS (ESI+) spectrum

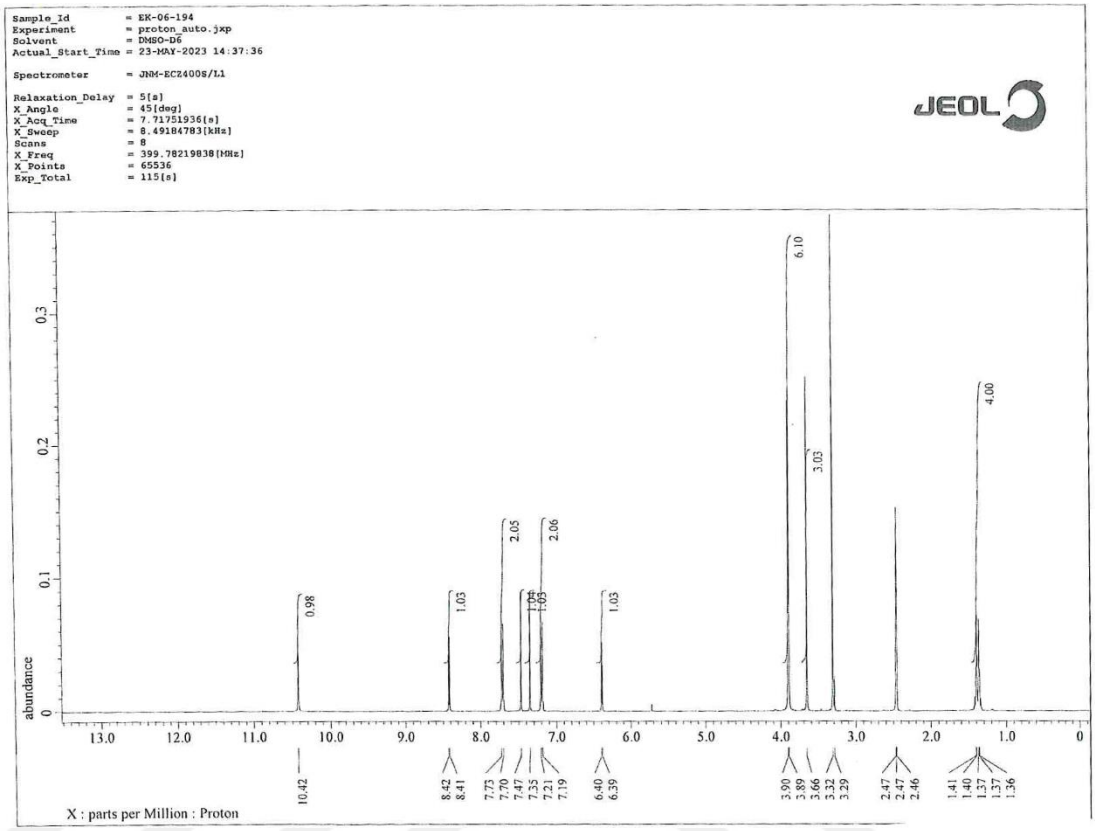
$[M+H]^+$ $[C_{28}H_{25}FN_3O_6]^+$ *m/z*: 518.17; Bulunan *m/z*: 518.3



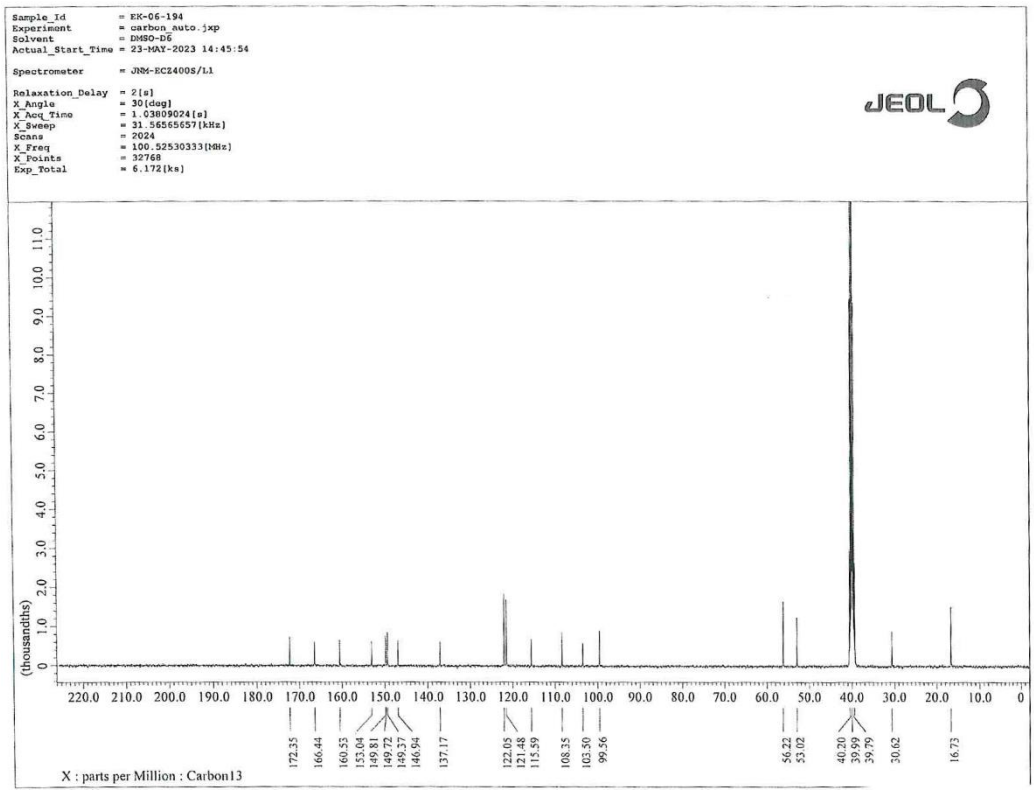
Kabo-N-Oksit referans standart IR spectrum



Kabo-Metilester referans standart ^{1}H NMR spectrumu

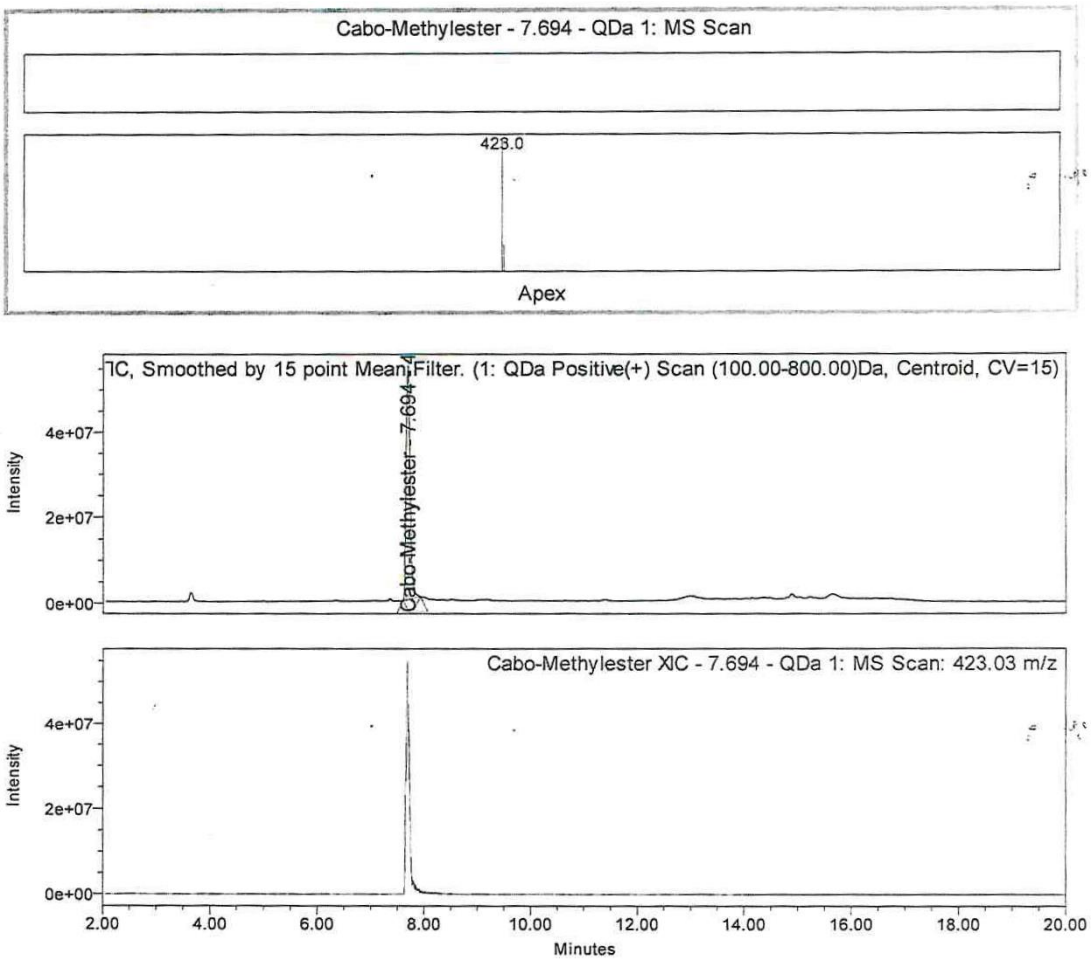


Kabo-Metilester referans standart ^{13}C NMR spectrumu

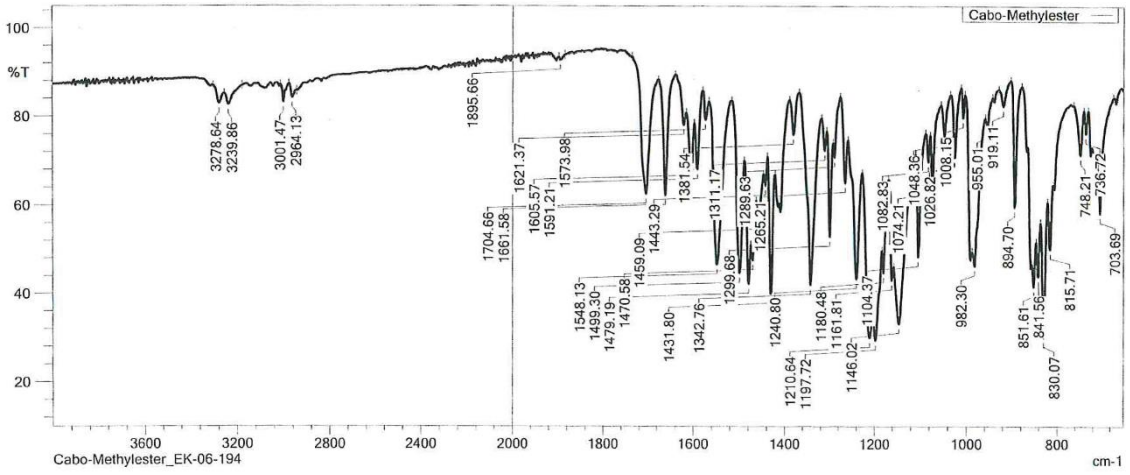


Kabo-Metilester referans standart MS (ESI+) spectrum

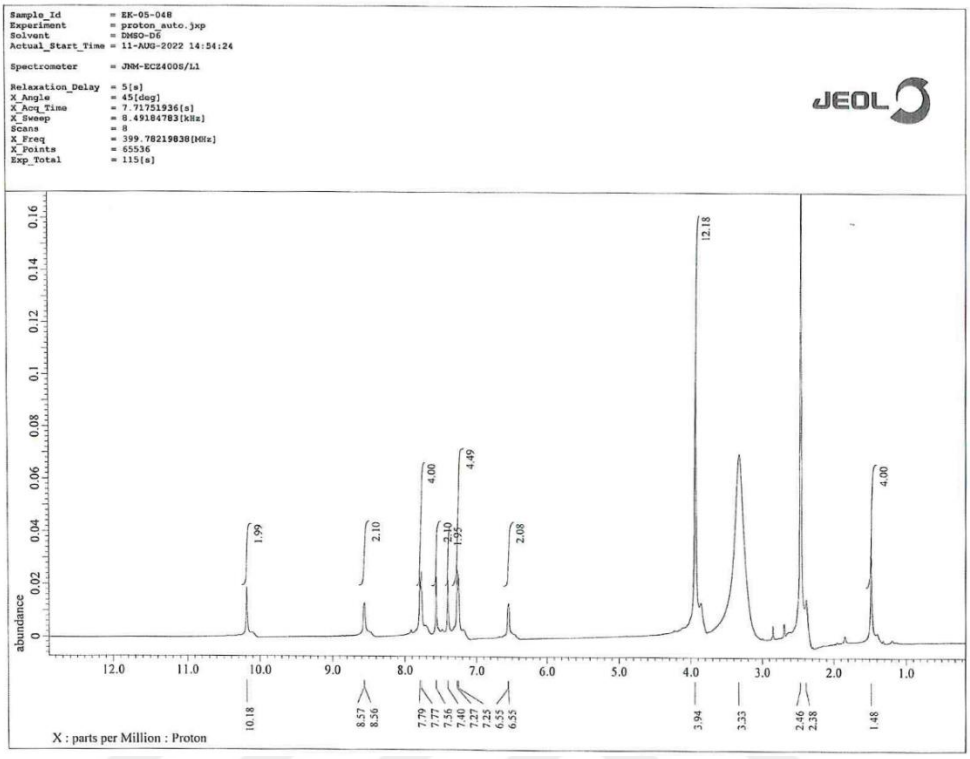
$[M+H]^+$ $[C_{23}H_{23}N_2O_6]^+$ *m/z*: 423.16; Bulunan *m/z*: 423.03



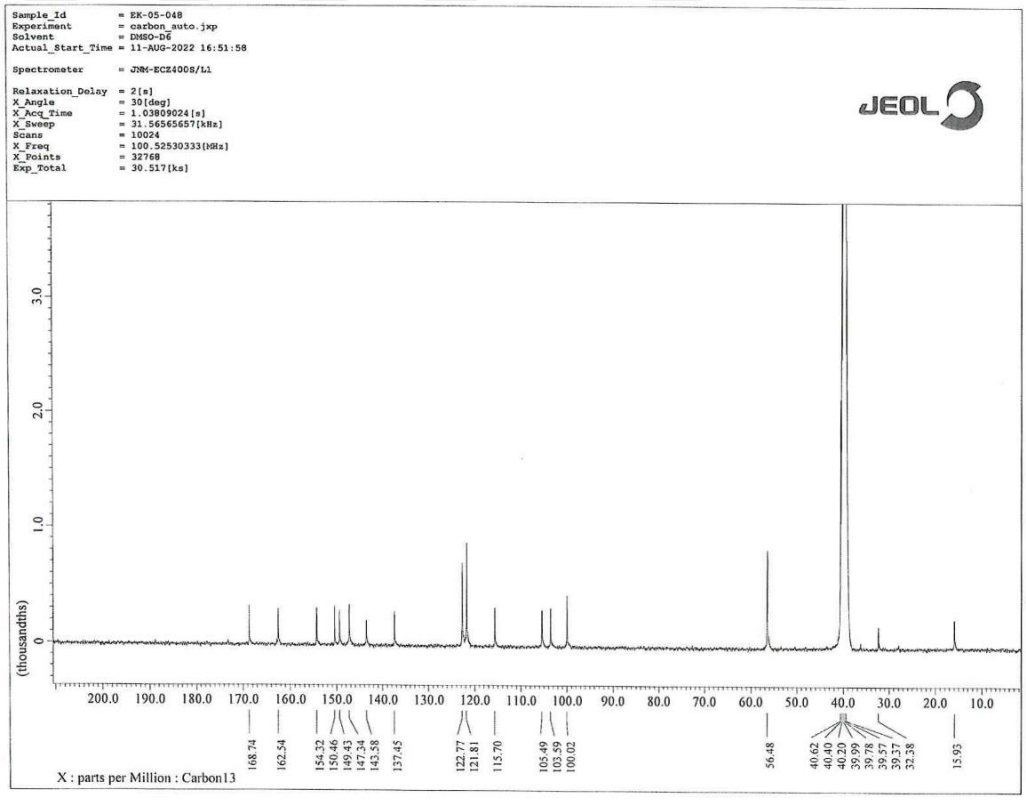
Kabo-Metilester referans standart IR spectrum



Kabo-Dimer referans standart ^{1}H NMR spectrumu

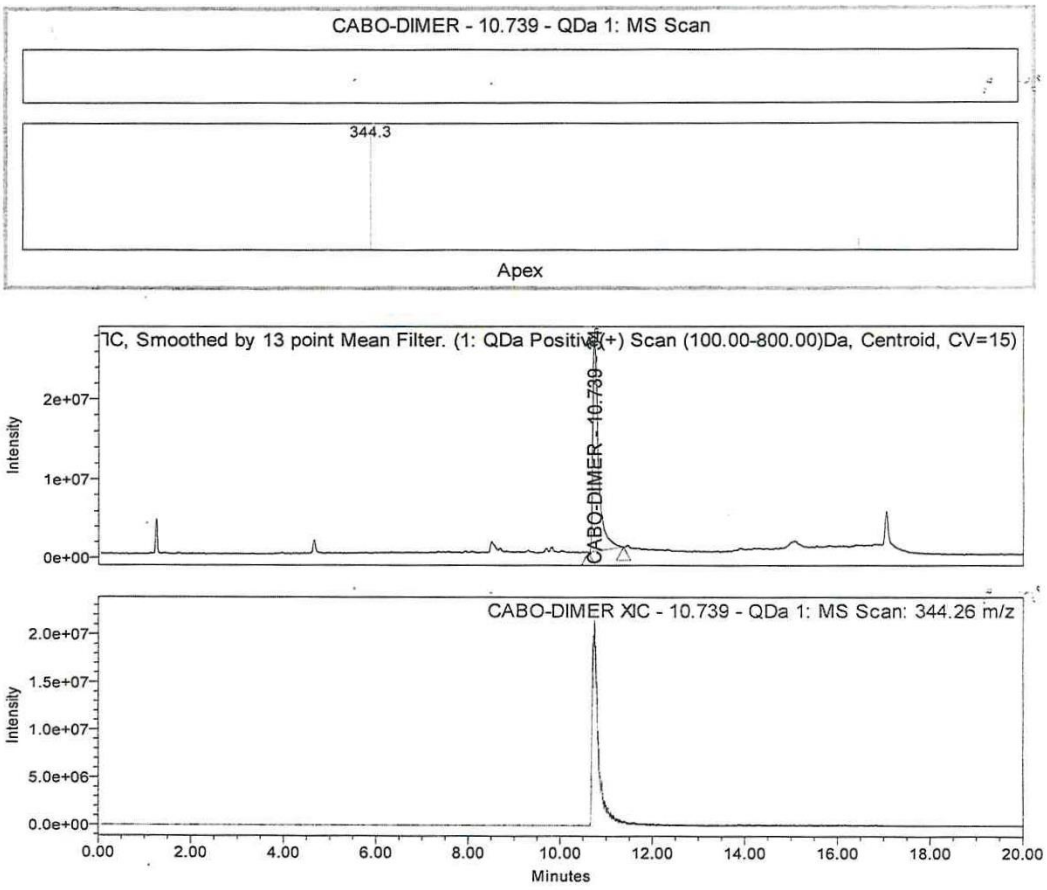


Kabo-Dimer referans standart ^{13}C NMR spectrumu

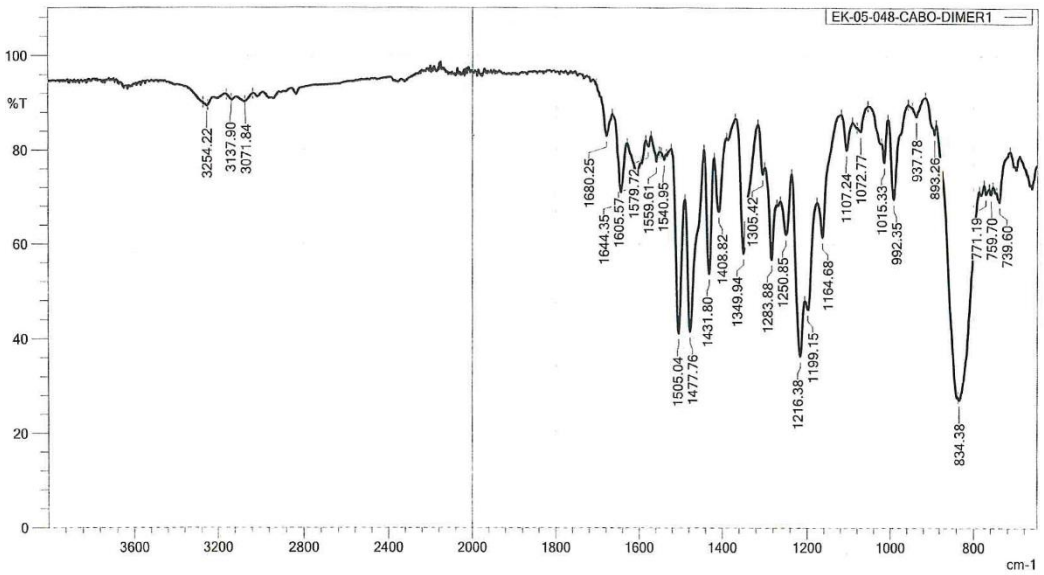


Kabo-Dimer referans standart MS (ESI+) spectrum

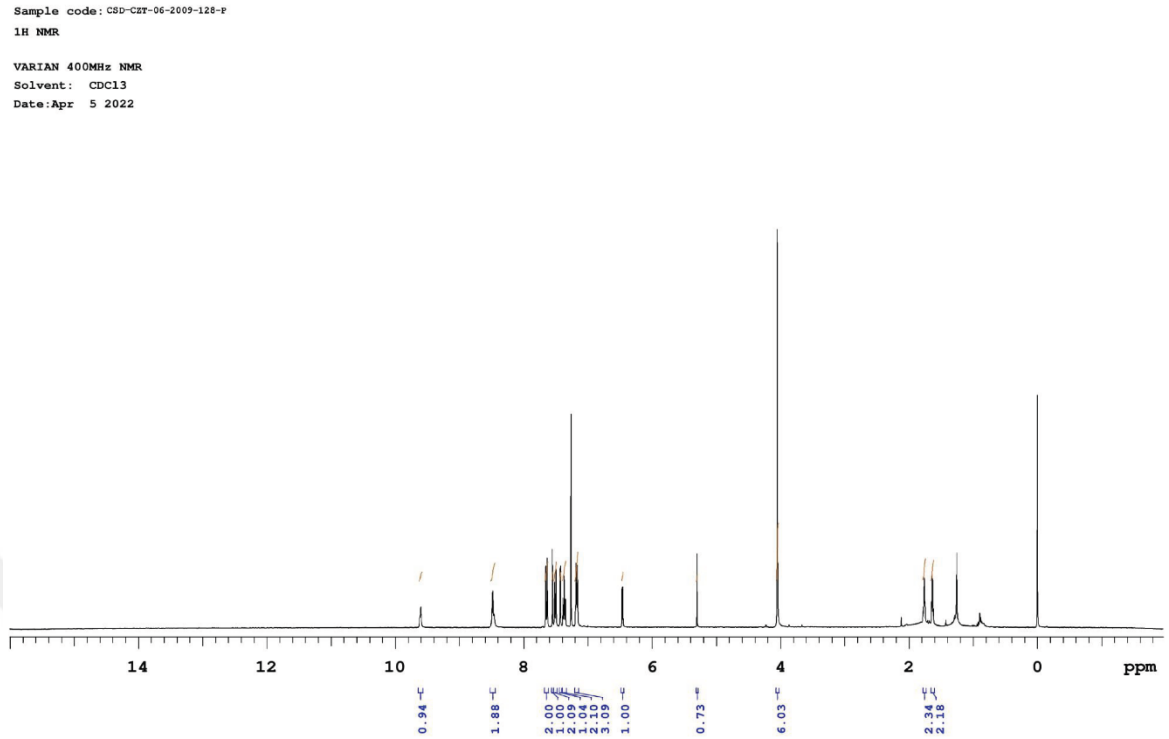
$[(M+2H)/2]^+$ $[C_{39}H_{36}N_4O_8/2]^+$ *m/z*: 344.12; Bulunan *m/z*: 344.26



Kabo-Dimer referans standart IR spectrum

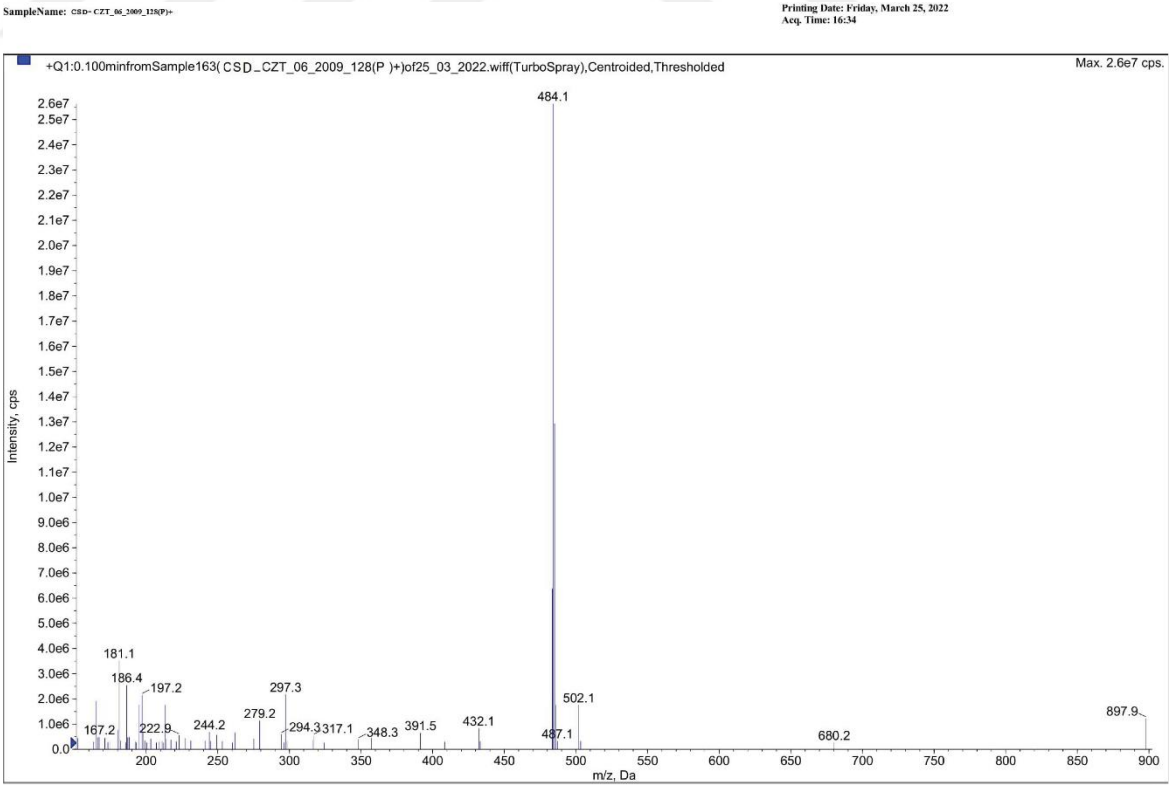


Kabo-desfloro referans standart ^{1}H NMR spectrumu

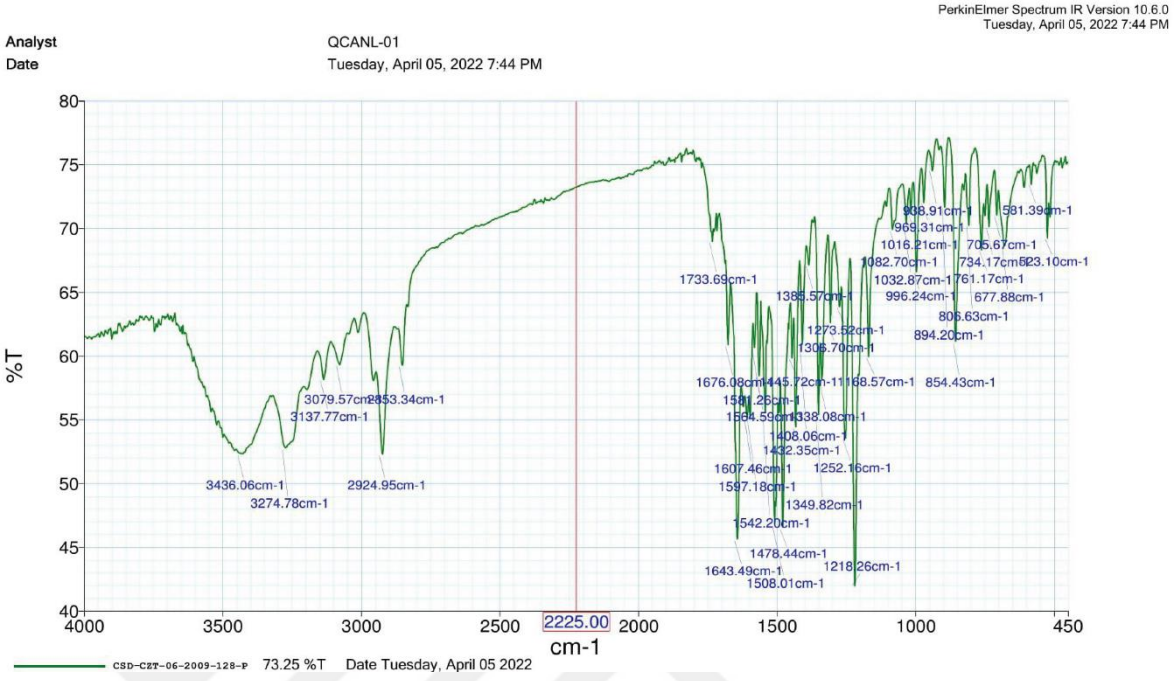


Kabo-desfloro referans standart MS (ESI+) spectrum

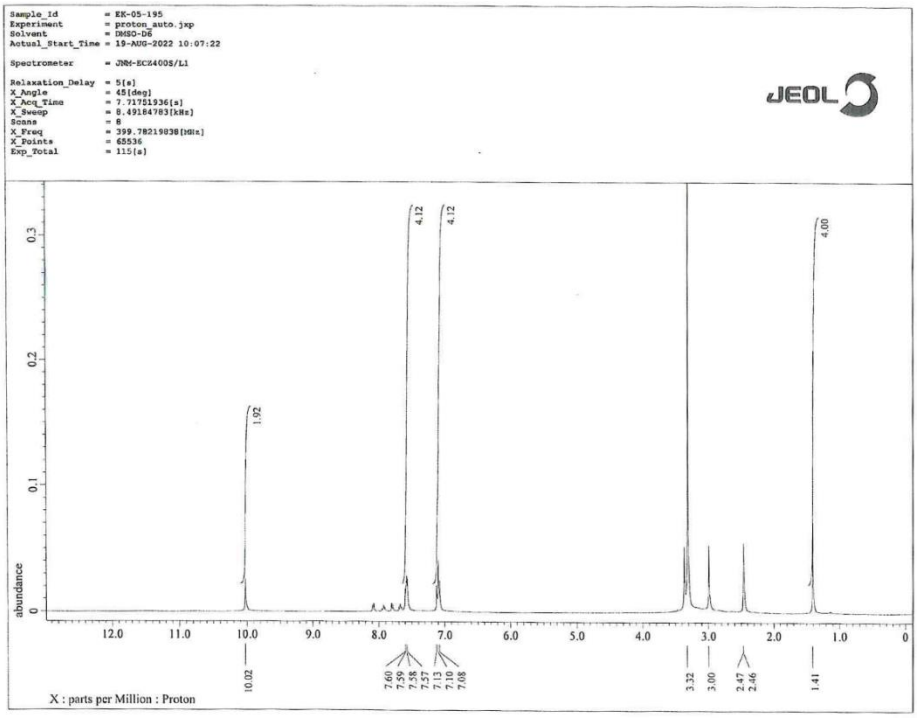
$[M+H]^+$ $[C_{28}H_{26}N_3O_5]^+$ *m/z*: 484.19; Bulunan *m/z*: 484.1



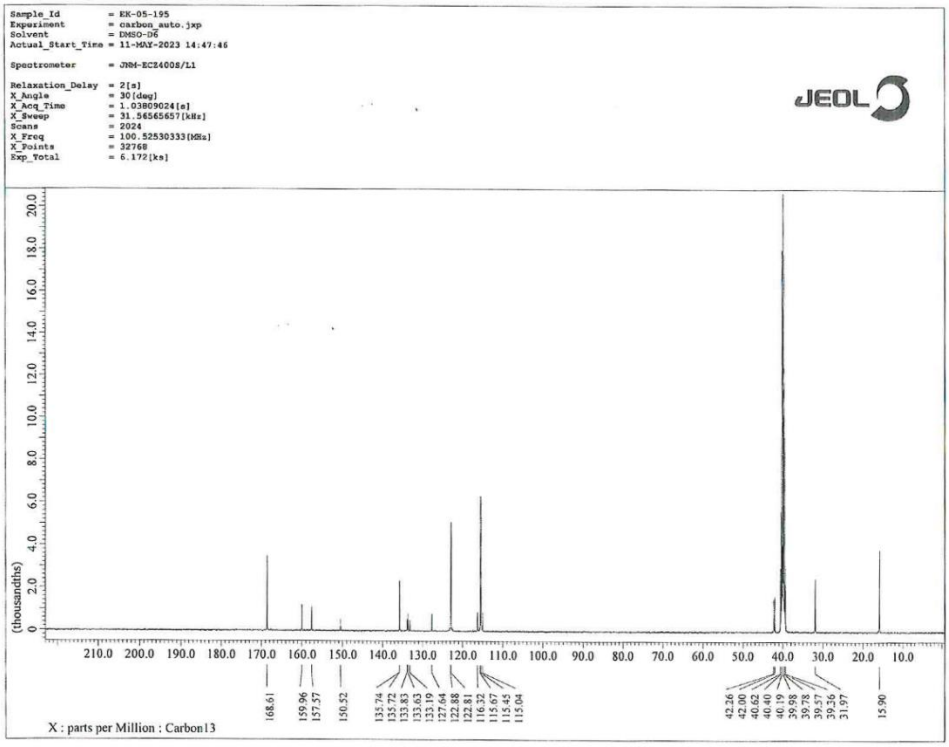
Kabo-desfloro referans standart IR spectrum



Kabo-1-Dimer referans standart ^{1}H NMR spectrumu

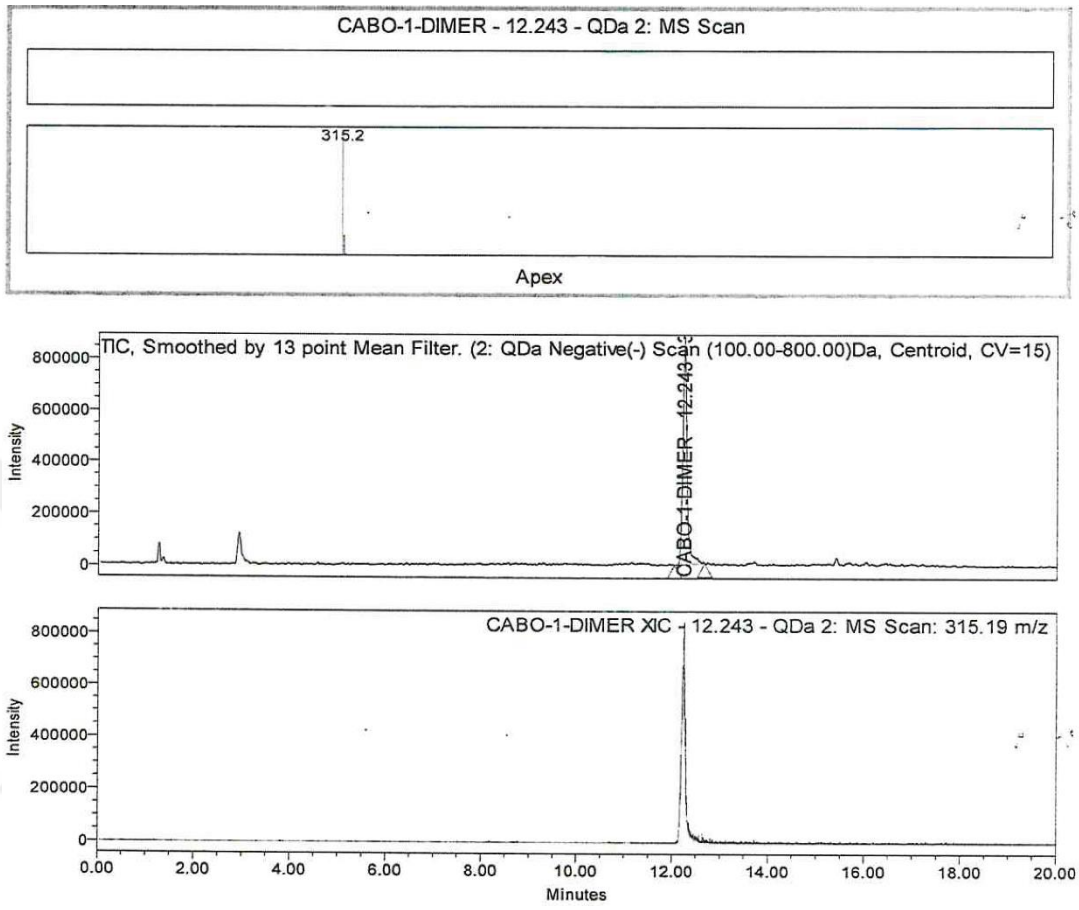


Kabo-1-Dimer referans standart ^{13}C NMR spectrumu

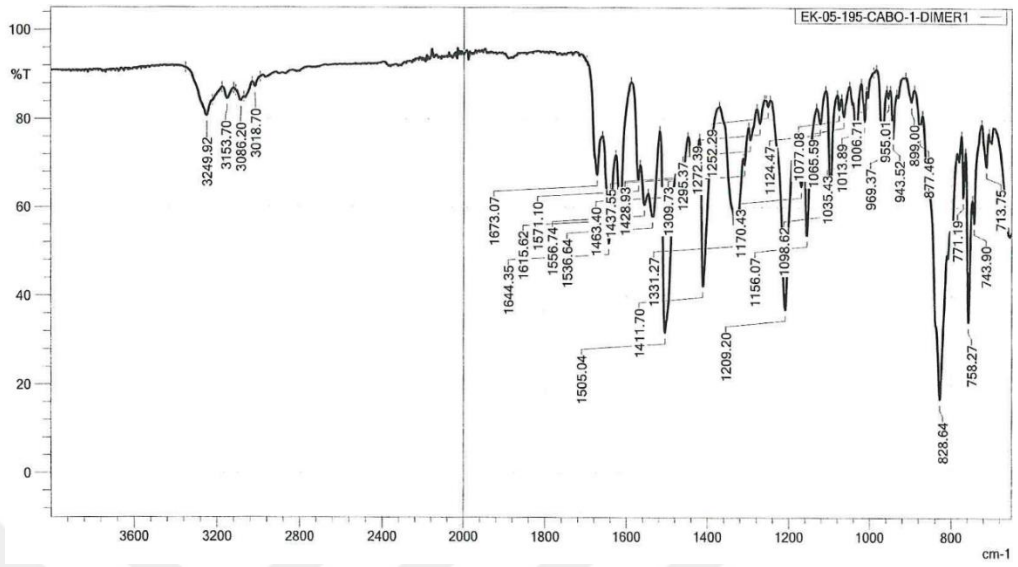


Kabo-1-Dimer referans standart MS (ESI-) spectrum

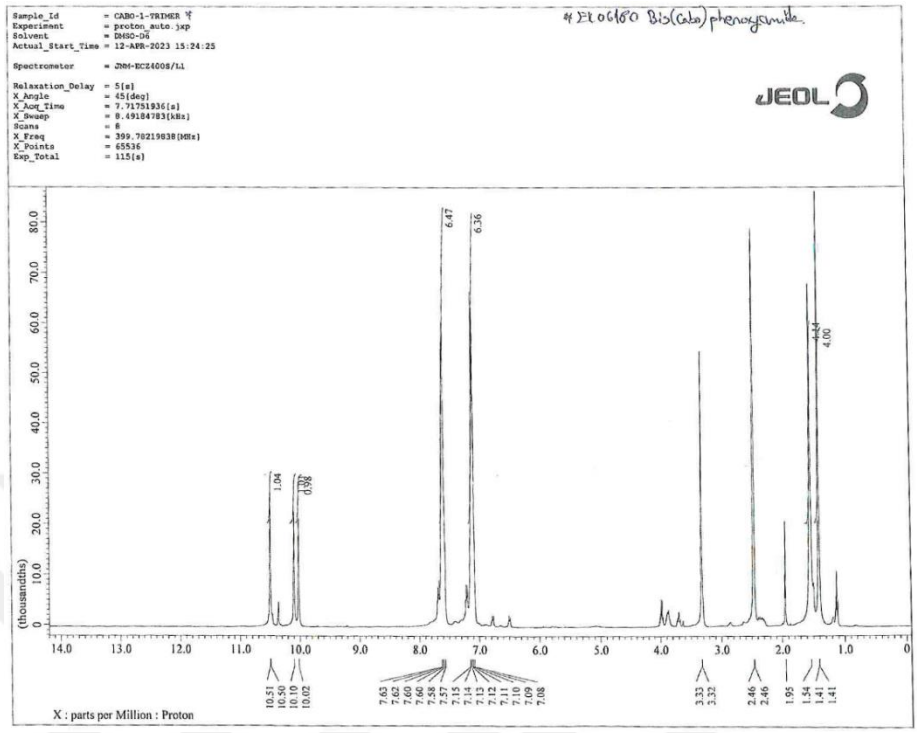
$[M–H]^-$ $[C_{17}H_{13}F_2N_2O_2]^-$ *m/z*: 315.09; Bulunan *m/z*: 315.19



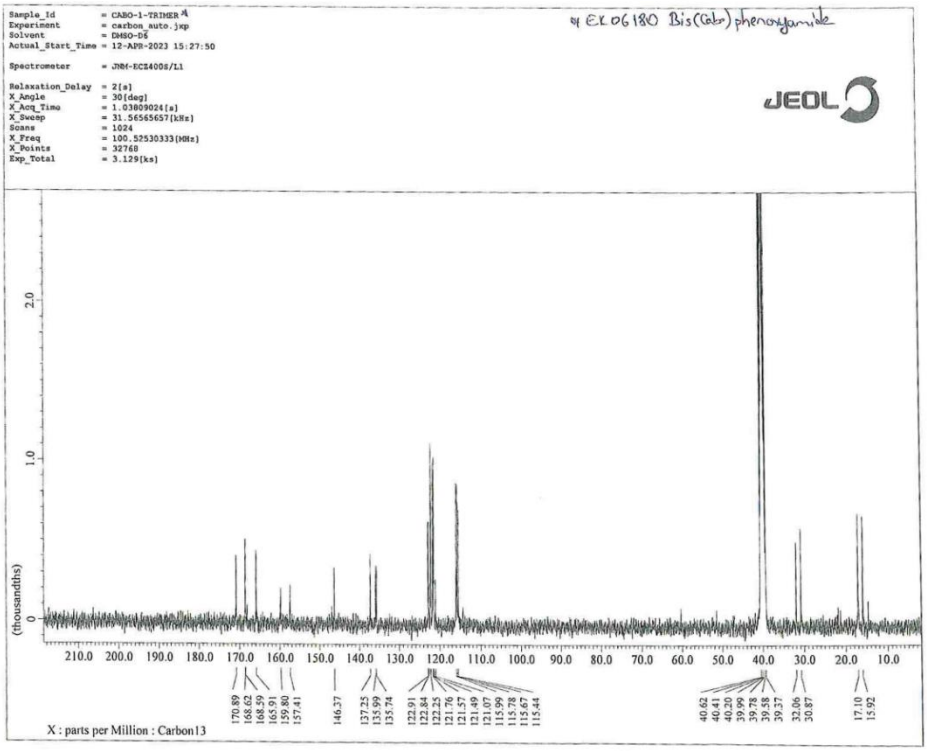
Kabo-1-Dimer referans standart IR spectrum



Bis(kabo)fenoksiamit referans standart ^{1}H NMR spectrum

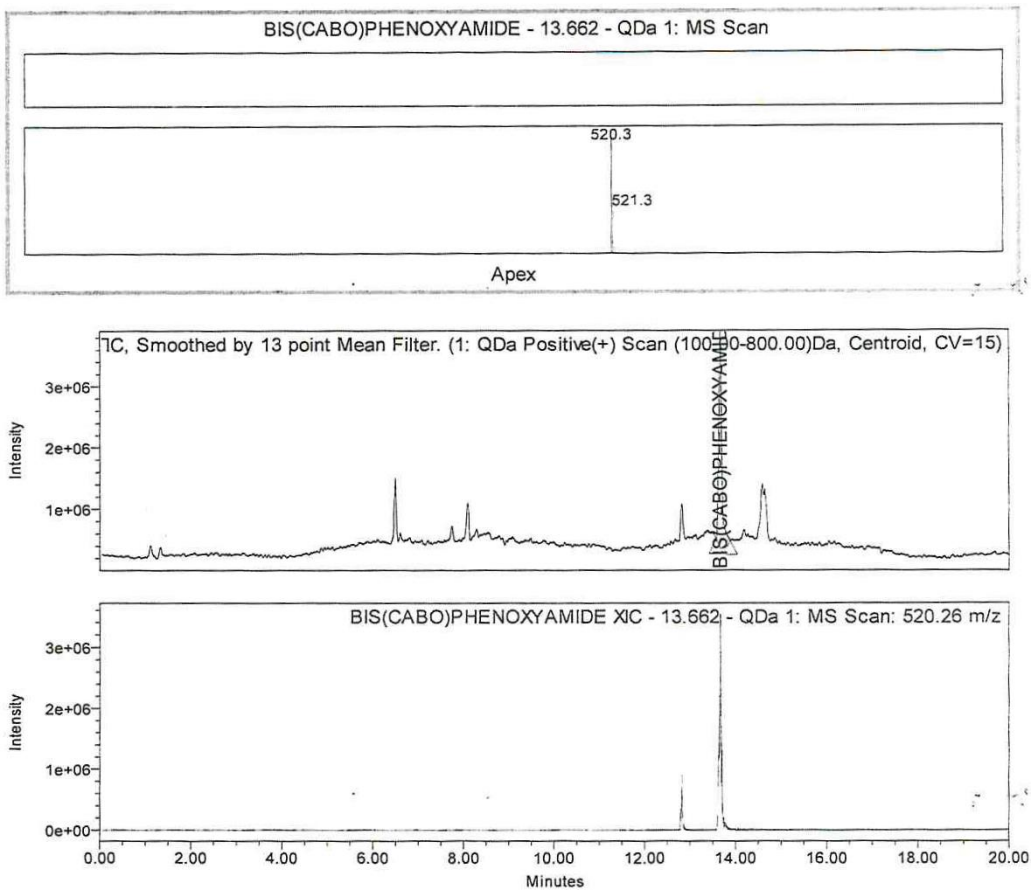


Bis(kabo)fenoksiamit referans standart ^{13}C NMR spectrumu

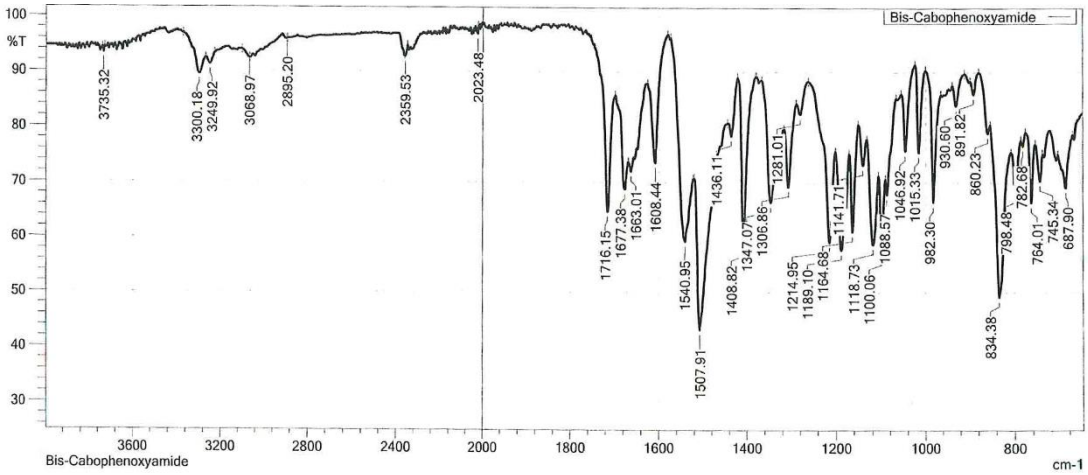


Bis(kabo)fenoksiamit referans standart MS (ESI-) spectrum

$[M–H]^-$ $[C_{28}H_{24}F_2N_3O_5]^-$ *m/z*: 520.17; Bulunan *m/z*: 520.26



Bis(kabo)fenoksiamit referans standart IR spectrum



İNTİHAL RAPOR FORMU

KABOZANTİNİB VE İLGİLİ BİLEŞİKLERİNİN AKTİF İLAÇ ETKEN MADDESİNDE TAYİNİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRMESİ VE VALİDASYONU

ORİJİNALLİK RAPORU

%14	%13	%6	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%3
3	kimya.medeniyet.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Çağan Ağtaş, Esen Bellur Atici, Serap Ayaz Seyhan, Dilek Bilgic Alkaya. "Development and validation of stability indicating UPLC methods for related substances and assay analyses of ricobendazole hydrochloride", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2023 Yayın	<%1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
6	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1