

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

PAZOPANİB VE İLGİLİ STRES BOZUNMA BİLEŞİKLERİNİN İNCELENMESİ
VE TAYİNİ İÇİN METOD OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜLEYMAN GÖKCE

AĞUSTOS 2015

UŞAK

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

PAZOPANİB VE İLGİLİ STRES BOZUNMA BİLEŞİKLERİNİN İNCELENMESİ
VE TAYİNİ İÇİN METOD OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜLEYMAN GÖKCE

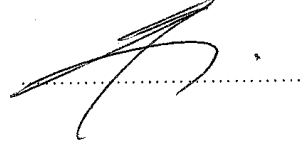
UŞAK 2015

Kabul ve Onay Sayfası

Süleyman GÖKÇE tarafından hazırlanan "Pazopanib ve İlgili Stres Bozunma Bileşiklerinin İncelenmesi ve Tayini İçin Metot Optimizasyonu" adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı



Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

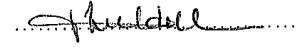
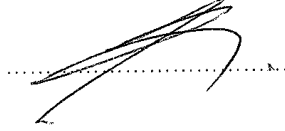
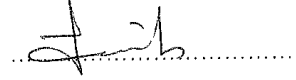
Analitik Kimya ABD, Süleyman Demirel Üniversitesi

Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK

Kimya ABD, Uşak Üniversitesi



Tarih : 03 /08 / 2015

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Lütfullah TÜRKMEN



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

SÜLEYMAN GÖKCE



**PAZOPANİB VE İLGİLİ STRES BOZUNMA BİLEŞİKLERİNİN İNCELENMESİ
VE TAYİNİ İÇİN METOD OPTİMİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

SÜLEYMAN GÖKCE

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2015

ÖZET

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastas yapması ile kendini gösteren öldürücü bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sıradaki ölüm nedenidir. Halen tüm dünyada görülen kanseri vakalarının % 2'sini, böbreklerdeki tümörlerin ise % 80 – 85'ini oluşturan böbrek kanseri, gelişmiş ülkelerde daha çok görülmektedir. Hızlı ilerleyen renal kanser, üroloji tümörleri içinde en yüksek mortalite oranına sahip hastalık olarak değerlendirilmektedir.

Renal hücreli karsinom (RHK)'un moleküler biyolojisinin son yıllarda daha iyi anlaşılması ile ileri evre/metastatik RHK'lı hastalarının tedavisinde hedef alınabilecek birçok moleküler yol belirlenmiştir. Sonuç olarak RHK tedavisi son yıllarda dramatik olarak değişmiş ve hedefe yönelik tedaviler ile hızla değişmeye devam etmiştir. Protein kinaz inhibitörleri grubundan olan pazopanib, 2009 Ekim ayında FDA tarafından onaylanmış, hedefe yönelik tedavi ajanıdır. Biyolojik tedaviler sonrasında progresyon gelişmiş (ilerleme görülmüş) ileri evredeki veya diğer organlara yayılma evresindeki böbrek kanseri tedavisinde kullanılır. Bu ilaç etkisini kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasında etkili olan proteinlerin aktivitelerini önleyerek göstermektedir.

Bir ilaç maddesinin safsızlık profili ve kararlılığı güvenlik değerlendirmesi ve üretim sürecinde çok önemlidir. Stress testleri, etkin maddelerin zorlanmış koşullardaki parçalanma ürünleri ve parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için yapılır. Bu konu ile ilgili literatürler ve kaynaklar incelendiğinde Pazopanib ve ilgili bozunma ürünlerinin analitik tespiti ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden Pazopanib ve ilgili bileşiklerin tayini için güvenilir ve kullanışlı bir yöntemin geliştirilmesi gereklidir.

Bu tez kapsamında, kanser hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan ve yurdumuzda da görülen renal kanserin tedavisinde yer alan pazopanib ve bozunma ürünleri, LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla etken maddenin asidik, bazik, oksidative, termal ve fotolitik koşullarda stres testleri yapılmıştır. LC-MS yöntemi ile elde edilecek m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak, ilacın olası bozunma ürünlerinin ne olduğu önerilmiştir. Ayrıca, Pazopanib ve iç standart olarak seçilen Erlotinibin ikili karışımlarının LC tekniği ile analizleri için gerekli parametreler saptanmış ve bu parametreler kullanılarak da analizleri yapılmıştır. Bu amaçla değişik kolon, akış hızı, sıcaklık, pH, dalga boyu ve hareketli faz kullanılarak en iyi koşullar saptanmıştır. Saptanan bu en iyi koşullarda da HPLC yöntemi ile aynı anda hızlı, duyarlı ve tamamen valide edilmiş, miktar tayini çalışmalarının yapılmış ve geliştirilen bu yöntemin farmasötik dozaj formlarına ve biyolojik numunelere uygulanmıştır.

Bilim Kodu : 405.03.00.

Anahtar Kelimeler : Renal Kanser, LC-MS, Bozunma Ürünleri, Pazopanib, Protein Kinaz İnhibitörleri

Sayfa Adedi : 91

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

**INVESTIGATION AND METHOD OPTIMIZATION FOR THE
DETERMINATION OF PAZOPANIB AND RELATED STRESS DEGRADATION
COMPOUNDS
(MASTERS THESIS)**

SÜLEYMAN GÖKCE

**UŞAK UNIVERSITY
SCIENCE INSTITUTE**

August 2015

ABSTRACT

Cancer is a class of fatal diseases in which a group of cells display the traits of uncontrolled growth, invasion (intrusion on and destruction of adjacent tissues), and sometimes metastasis. It is the second cause of death after heart and vascular diseases in death statistics of developed countries. Renal-cell carcinoma accounts for 2 percent of all cancers and accounts for 80 to 85 percent of malignant kidney tumors, with the highest rates in developed countries. Renal-cell carcinoma which is rapidly progressive, are considered to be the highest mortality rate of the disease among urological tumors.

With better understandings on molecular biology of renal cell carcinoma (RCC) in recent years, a lot of ways of molecular therapy in late phase/metastasis cases are discovered. Consequently, RCC therapy evolved dramatically in recent years and targeted therapies are evolving too, rapidly. Pazopanib, is one of the inhibitors of protein kinase, is a therapy agent approved by FDA in October 2009. It is used in progressive biologic therapies or in late phase and metastatic renal cancer therapies. This medicine shows its effect by prohibiting activities of proteins causing enlargement and metastasis of cancer cells.

Impurity profile and study of a drug substance is very important for safety assessment and manufacturing process. Stress tests are carried out for being informed about decomposition products in forced conditions. No such kinds of works related to analytical determination of degradation products of pazopanib are found in the literature. Therefore a reliable and useful method is needed for pazopanib and other corresponding compounds.

In this study, pazopanib used is in treatment of renal cancer, which is serious among cancer tips and obverted in our country, and its degradation products will be determined using LC-MS/MS methods. For this purpose, stress tests are performed under acidic, basic, oxidative, thermal and photolytic conditions for the studied substance. Based on the m/z values and ionization particles, degradation mechanism can be proposed from LC-MS method and products will be determined quantitatively. Moreover, determination of parameters required for the analyses of binary mixtures of pazopanib and internal standard by LC method and performing analyses using these parameters were also performed. Optimization of the analysis conditions varying from the column flow rate of mobile phase, temperature, pH, wavelength and mobile phase composition are performed. It was also aimed performing quantitative analyses using rapid, sensitive HPLC method in order to validate the LC method and application of the method to be developed to pharmaceutical dosage forms.

Science Code : 405.03.00.

Key Words : Renal Cancer, LC-MS, Degradation Products, Pazopanib, Protein Kinase Inhibitors

Page Number : 91

Adviser : Associate Professor, Nurullah ŞANLI

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumu seçmemde bana yardımcı olan, tezimin her aşamasında bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Nurullah ŞANLI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmasının gerçekleştirildiği ve çalışmanı olduğum Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 114 Z 135 numaralı proje kapsamında yapılmıştır. Katkılarından dolayısıyla TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Bana her türlü imkânı sağlayan ilgi ve emeklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen çok değerli Aileme sonsuz teşekkür ederim.

Süleyman GÖKCE
Kimyager

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
ÇİZELGELER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser Nedir	2
1.1.1. Normal Bir Hücre Nasıl Kansere Dönüşür	2
1.1.2. Kanser Tedavisi.....	4
1.2. Böbrek Kanseri	4
1.2.1. Risk Faktörleri.....	5
1.2.2. Belirtiler	5
1.2.3. Tanı.....	6
1.2.4. Tedavi.....	6
1.2.4.1. Cerrahi	6
1.2.4.2. Radyoterapi.....	7
1.2.4.3. Kemoterapi	7
1.2.4.4. Biyolojik Tedavi (immünoterapi):.....	7

1.2.4.5. Hormon Tedavisi	8
1.2.4.6. Hedefe Yönelik Tedaviler	8
1.2.5. Yan Etkiler	9
1.3. Pazopanib Tedavisi	8
2. KURAMSAL TEMELLER	11
2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	13
2.1.1. HPLC'nin Kapsamı	14
2.1.2. HPLC'nin Çalışma Prensipleri	15
2.1.3. HPLC'de Kolon	16
2.1.4. HPLC'nin Çözücü Haznesi ve Çözücü Sistemi	17
2.1.5. HPLC'de Pompa Sistemi	19
2.1.5.1. Doğrudan Gaz Basınç Pompaları	20
2.1.5.2. Pnömatik Hızlandırıcı Pompalar	20
2.1.5.3. Pistonlu Pompalar	20
2.1.5.4. Şırınga Tipi Pompalar.....	21
2.1.6. Çözücü Programlamalı Sistem	21
2.1.7. HPLC'de Numune Enjeksiyonu	21
2.1.7.1. Septum Enjeksiyonları	22
2.1.7.2. Valf Enjeksiyonları	22
2.1.7.3. Oto-Enjektörler	23
2.1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Dedektörleri	23
2.1.8.1. Bir Dedektörde Bulunması Gerekli Önemli Karakteristikler	23
2.1.8.2. Genel ve Seçici Dedektörler	24
2.1.8.3. HPLC'de En Çok Kullanılan Dedektör Türleri.....	24
2.1.8.4. Kütle Spektrometrisi Dedektörü.....	24

2.1.9. HPLC'nin Yaygın Uygulamaları	25
2.2. Metodun Geçerli Kılınması (Validasyon Parametreleri)	26
2.3. Sistem Uygunluk Testi Parametrelerinin Tayini	27
2.3.1. Doğruluk	27
2.3.2. Kesinlik	27
2.3.3. Seçicilik.....	28
2.3.4. Teşhis Sınırı (LOD).....	28
2.3.5. Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	28
2.3.6. Doğrusallık	29
2.3.7. Aralık.....	29
2.3.8. Duyarlılık	29
2.3.9. Sağlamlık.....	29
2.3.10. Tutarlılık.....	29
2.3.11. Kararlılık	30
2.4. Kütle Spektrometresi (MS).....	30
2.4.1. Tarihçe:.....	31
2.4.2. Kütle Spektrometresinin Bölümleri	31
2.4.3. Kromatografi Cihazından Gelen Numuneyi Alma Bölümü.....	32
2.4.4. Kütle Spektrometresi İyonlaştırma Kısmı.....	33
2.4.5. Kütle Spektrometresi Analizörler.....	34
2.4.6. Kütle Spektrometresi Dedektörler.....	35
2.4.7. Kütle Spektrometresi Vakum Sistemi	35
2.5. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrofotometresi (LC-MS).....	36
2.6. Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS/MS).....	36
2.7. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı.....	37
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	39

3.1. Protein Kinaz İnhibitörleri ve Pazopanib ile Yapılan Çalışmalar.....	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmakolojik, Farmokinetik Özellikleri.....	40
3.2.1. Pazopanib	40
3.2.2. Fiziksel Özellikleri	41
3.2.3 Farmakolojik Özellikler	41
3.2.4. Farmokinetik Özellikler	41
3.2.5. Metabolizma.....	41
3.2.6. Eliminasyon.....	42
3.2.7. Erlotinib İnternal Standart.....	42
3.2.8. Fiziksel Özellikleri	43
3.2.9. Farmakolojik Özellikler	43
3.2.10. Farmokinetik Özellikler	43
4. MATERYAL VE YÖNTEM	45
4.1. Genel Bilgi.....	45
4.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	45
4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
4.1.3. Kullanılan Çözeltiler	48
4.2. Yöntem.....	48
4.2.1. HPLC Optimizasyon Çalışmaları.....	48
4.2.2. Sabit Fazın Belirlenmesi	49
4.2.3. Hareketli Fazın Hızının Belirlenmesi.....	49
4.2.4. İç Standardın Belirlenmesi	49
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	50
5.1. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	50
5.2. Pazopanibin HPLC-DAD Yöntemi ile Analizinde Validasyon Parametreleri	51

5.3. Kalibrasyon alan oranları.....	54
5.4. Duyarlılık ve Doğrusallık	56
5.5. Doğruluk ve Kesinlik.....	56
5.6. Yöntemin Gerçek Numuneye Uygulanması	61
5.6.1. İdrar numunesi kalibrasyon grafiği	64
5.6.2. Duyarlılık ve Doğrusallık.....	65
5.6.3. Doğruluk ve Kesinlik	66
5.7. Tablet analizi ve geri kazanım oranları.....	69
5.8. Tablet Geri Kazanım Çalışmaları	73
5.9. Pazopanib Katkılı İdrar Numunesinin HPLC Yöntemiyle Analizi ve Geri Kazanım Oranları	74
5.10. Bozunma Çalışmaları.....	77
5.10.1. LC-MS/MS Yönteminin Optimizasyonu	77
5.11. Standart Maddelerin Saflık Kontrolü.....	79
5.12. MS bozunurluk çalışmaları	80
5.13. Pazopanibin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi Deneyleleri.....	80
5.13.1. Pazopanibin Asidik Koşullar Altındaki MS Spektrumu Ve Bozunurluk Ürünleri	81
5.13.2. Pazopanibin Bazik Koşullar Altındaki MS Spektrumu Ve Bozunurluk Ürünleri	82
5.13.3. Pazopanibin Oksidatif Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri	84
5.13.4. Pazopanibin Termal Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri	86
5.13.5. Pazopanibin Ultraviyole Işık Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri	88
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	90

KAYNAKLAR.....	92
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kağıt kromatografi düzeneği.....	11
Şekil 2.2. Kromatografi kolonu	12
Şekil 2.3. Kromatografi kolonunda örneğin ayrılması	15
Şekil 2.4. HPLC cihazı diyagramı	16
Şekil 2.5. HPLC kolonları	16
Şekil 2.6. HPLC kolonunun iç yapısı	17
Şekil 2.7. HPLC sistemi	17
Şekil 2.8. İsookratik ve gradient çalışma örneği	18
Şekil 2.9. HPLC çözücü karıştırma valfi.....	19
Şekil 2.10. HPLC pistonlu pompa.....	21
Şekil 2.11. Kütle spektrometresi.....	30
Şekil 2.12. Kütle spektrometresi iç yapısı	32
Şekil 2.13. MS numune alma kısmı.....	32
Şekil 2.14. MS iyonlaştırma bölümü	34
Şekil 2.15. MS analizör	34
Şekil 2.16. MS diyagramı	36
Şekil 2.17. LC-MSMS cihazı	38
Şekil 3.1. Pazopanib molekülü	40
Şekil 3.2. Erlotinib molekülü.....	42
Şekil 5.1. 0,5-1-3-5-10-20 ppm Pazopanib ve 5 ppm Erlotinib (IS) HPLC kromatogramı	54
Şekil 5.2. Kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 5.3. İdrar numunesi 0,5-1-3-5-10-20 ppm Pazopanib ve 10 ppm Erlotinib (IS).....	62
Şekil 5.4. İdrar numunesi kalibrasyon grafiği	65
Şekil 5.5. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen kromatogram.....	70

Şekil 5.6. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen katkılı ve katkısız kromatogram.....	70
Şekil 5.7. Pazopanib ve Erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen kromatogram	74
Şekil 5.8. Pazopanib ve Erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen katkılı kromatogram.....	75
Şekil 5.9. Pazopanib ve Erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen katkılı ve katkısız kromatogram.....	75
Şekil 5.10. Pazopanib için IR spektrumu	79
Şekil 5.11. Pazopanib 1M HCl içersindeki MS spektrumu	81
Şekil 5.12. Pazopanibin asidik koşullar altındaki parçalanma ürünleri.....	82
Şekil 5.13. Pazopanib 1M NaOH içersindeki MS spektrumu	83
Şekil 5.14. Pazopanibin bazik koşullar altındaki parçalanma ürünleri.....	83
Şekil 5.15. Pazopanib %3 H ₂ O ₂ içersindeki MS spektrumu	84
Şekil 5.16. Pazopanib %30 H ₂ O ₂ içersindeki MS spektrumu	84
Şekil 5.17. Pazopanibin oksidatif koşullar altındaki parçalanma ürünleri	85
Şekil 5.18. Pazopanib 6 saat 100 C ⁰ termal şartlardaki MS spektrumu	86
Şekil 5.19. Pazopanib 24 Saat 100 C ⁰ termal şartlardaki MS spektrumu.....	86
Şekil 5.20. Pazopanibin termal koşullar altındaki parçalanma ürünleri	87
Şekil 5.21. Pazopanib 6 saat UV 254 nm ışık altında şartlardaki MS spektrumu.....	88
Şekil 5.22. Pazopanib 24 saat UV 254 nm ışık altında şartlardaki MS spektrumu....	88
Şekil 5.23. Pazopanibin UV koşullar altındaki parçalanma ürünleri	89

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 4.1. Kullanılan cihazlar ve gereçler.....	45
Çizelge 4.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri.....	47
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	47
Çizelge 5.1. Pazopanib ve Erlotinib (IS) alıkonma zamanları	50
Çizelge 5.2. Çalışılan bileşikler için elde edilen alıkonma zamanları, kapsite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı değerleri.....	51
Çizelge 5.3. Pazopanib ve Erlotinibin kalibrasyon alan oranları	52
Çizelge 5.4. Kalibrasyon alan ve oranları.....	55
Çizelge 5.5. Doğrusallık ve duyarlılık parametreleri	56
Çizelge 5.6. Gün içi geri kazanım değerleri n:7	57
Çizelge 5.7. Gün içi geri kazanım hesaplamaçizelgesi	58
Çizelge 5.8. Günler arası geri kazanım değerleri n:7	59
Çizelge 5.9. Günler arası geri kazanım hesaplamaçizelgesi.....	60
Çizelge 5.10. Pazopanibin HPLC yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları	61
Çizelge 5.11. Pazopanib ve Erlotinibin (IS) alan oranları (idrar numunesi).....	62
Çizelge 5.12. Kalibrasyonda kullanılan alan oranları (idrar numunesi).....	64
Çizelge 5.13. İdrar numunesi doğrusallık ve duyarlılık parametreleri	66
Çizelge 5.14. İdrar numunesi gün içi geri kazanım alan ve oranları n:5.....	67
Çizelge 5.15. İdrar numunesi gün içi geri kazanım hesaplama	67
Çizelge 5.16. Pazopanib ve 5 ppm Erlotinib alan ve oranları n:5	68
Çizelge 5.17. İdrar numunesi günler arası geri kazanım hesaplama	68
Çizelge5.18. Pazopanibin idrar numunesine enjeksiyonunun HPLC yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları	69

Çizelge 5.19. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen alan ve oranları n:10.....	71
Çizelge 5.20. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen geri kazanım hesaplama çizelgesi	71
Çizelge 5.21. Pazopanibin katkıli tablet numunesinin HPLC yöntemi ile analizine ait geri kazanım bulguları	72
Çizelge 5.22. Pazopanibin ilaç formülasyonu ve geri kazanım sonuçlarına ait veriler	73
Çizelge 5.23. Pazopanib ve erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen alan ve oranları n:5	76
Çizelge 5.24. Pazopanib ve erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen geri kazanım hesaplama çizelgesi	76
Çizelge 5.25. Pazopanib katkıli idrar numunesinin HPLC yöntemi ile analizine ait geri kazanım bulguları	77
Çizelge 5.26. MS çalışma koşulları	78
Çizelge 5.27. Pazopanibe uygulanan stres koşulları.....	80

SİMGELER ve KISALTMALAR

FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
LC	Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometresi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DNA	Deoksiribonükleik asit
VEGFR	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
PDGFR	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü
μm	Mikrometre
atm	Atmosfer Basıncı
r^2	Tanımlayıcılık katsayısı
SS	Standart sapma
BSS	Bağıl standart sapma
t_R	Alınma zamanı
DAD	Diode Array Dedektör
IR	Kızıl Ötesi
DMSO	Dimetilsülfoksit
ACN	Asetonitril

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastas yapması ile kendini gösteren öldürücü bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sıradaki ölüm nedenidir. Halen tüm dünyada görülen kanser vakalarının % 2'sini, böbreklerdeki tümörlerin ise % 80 – 85'ini oluşturan böbrek kanseri, gelişmiş ülkelerde daha çok görülmektedir. Hızlı ilerleyen renal kanser, üroloji tümörleri içinde en yüksek mortalite oranına sahip hastalık olarak değerlendirilmektedir [1].

Türkiye'de öngörülen yıllık insidansı 8 bin ve bu vakalardan 2000 ölüm gerçekleşmektedir. Erkek/kadın insidansı 3/2 iken, en sık 50-60'lı yaşlarda görülür ve iki taraflı olma oranı % 2-5'dir. Hastaların yaklaşık %15-20'si tanı anında metastatiktir. En çok akciğerlere yayılım görülmektedir. Ayrıca karaciğer, kemik, lenf bezleri ve hatta beyin metastazı ile karşımıza çıkabilir. Hastaların %20-40'ı da ameliyat sonrası zaman içinde metastatik hale gelmektedir. Erken evrede teşhis konulanlarda 5 yıllık sağkalım %95 iken, uzak metastazı olanlarda bu oran %20'lere düşmektedir [2].

Renal hücreli karsinom (RHK)'un moleküler biyolojisinin son yıllarda daha iyi anlaşılması ile ileri evre/metastatik RHK'lı hastaların tedavisinde hedef alınabilecek birçok moleküler yol belirlenmiştir. Sonuç olarak RHK tedavisi son yıllarda dramatik olarak değişmiş ve hedefe yönelik tedaviler ile hızla değişmeye devam etmektedir. Protein kinaz inhibitörleri grubundan olan Pazopanib, 2009 Ekim ayında FDA tarafından onaylanmış, hedefe yönelik tedavi ajanıdır [3-4]. Biyolojik tedaviler sonrasında progresyon gelişmiş (ilerleme görülmüş) ileri evredeki veya diğer organlara yayılma evresindeki böbrek kanseri tedavisinde kullanılır. Bu ilaç etkisini kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasında etkili olan proteinlerin aktivitelerini önleyerek göstermektedir.

İlaç preparatlarında ve biyolojik örneklerde safsızlık oranları ve *in vivo–in vitro* ortamlardaki stres koşullarındaki oluşan ürünlerin tayini günümüz teknolojisindeki cihazlarla belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu tür ilaçların analizinde yaygın olarak kullanılan analiz yöntemleri spektroskopik, kromatografik ve elektrokimyasal yöntemlerden oluşmaktadır.

Bu konu ile ilgili literatürler ve kaynaklar incelendiğinde Pazopanib ve ilgili bozunma ürünlerinin analitik tespiti ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden Pazopanib ve ilgili bileşiklerin tayini için güvenilir ve kullanışlı bir yöntemin geliştirilmesi gereklidir.

Bu tez kapsamında, kanser hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan ve yurdumuzda da görülen renal kanserin tedavisinde yer alan pazopanib ve bozunma ürünleri, LC ve LC-MS/MS yöntemleri ile tayin edilmiştir. Bu amaçla etken maddenin asidik, bazik, oksidative, termal ve fotolitik koşullarda stres testleri yapılmıştır. LC-MS yöntemi ile elde edilecek m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak, ilacın olası bozunma mekanizmaları ve bozunma ürünlerinin ne olduğu önerilmiştir. Ayrıca, Pazopanib ve iç standart olarak seçilen Erlotinib'in ikili karışımlarının analizleri için gerekli parametrelerin saptanması ve bu parametreler kullanılarak da analizlerinin yapılabilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle değişik kolon, akış hızı, sıcaklık, pH, dalga boyu ve hareketli faz kullanılarak en iyi koşullar saptanmıştır. Saptanan bu koşullarda da HPLC yöntemi ile aynı anda hızlı, duyarlı ve tamamen valide edilmiş miktar tayini çalışmaları yapılmış ve geliştirilen bu yöntem farmasötik dozaj formlarına ve biyolojik numunelere uygulanmıştır.

1.1. Kanser Nedir?

Kanser terimi, tıbbın babası olarak bilinen Yunan Hippocrates (MÖ 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hippocrates carcinos ve carcinoma terimlerini ilk olarak ülser oluşturan ve ülser oluşturmeyen tümörler için kullanmıştır. [2]

1.1.1. Normal Bir Hücre Nasıl Kansere Dönüşür?

Bütün kanser tipleri vücudun temel yaşam ünitesi olan hücrelerimizden gelişirler. Kanseri anlamak için normal hücrelerin nasıl kansere dönüştüğünü bilmek faydalı olacaktır.

Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak, kas ve sinir hücrelerinde bu özellik bulunmaz. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Yaşamın ilk yıllarında hücreler daha hızlı bölünürken, erişkin yaşlarda bu hız yavaşlar. Fakat hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır,

sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne kadar bölüneceğini bilir ve gerektiğinde ölmesini de bilir. Buna apoptosis yani hücrenin programlı ölümü denir. Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve daha çok hücre üretmesine gereksinim vardır. Bazen buna rağmen süreç doğru yoldan sapar, yeni hücrelere gerek olmadan hücreler bölünmeye devam eder. Bilincini kaybetmiş kanser hücreleri, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Fazla hücrelerin kütleleri bir büyüklük veya tümör oluştururlar.

Hücrelerin merkezinde çekirdek içinde hücrenin ve organizmanın genetik bilgisinin saklandığı elektron mikroskopu ile de görüntülenebilen DNA olarak adlandırılan mikroskopik iplikçikler mevcuttur. DNA hücrenin normal fonksiyonlarını görmesi için gereklidir. Kanserli hücreler bu DNA iplikçisindeki hasardan dolayı oluşur. Hücrenin normal yaşam siklusunda DNA hasarı olsa da hücre ya bunu onarır ya da ölür. Kanserli hücrelerde hasarlanmış DNA onarılamaz ve kontrolsüz çoğalma başlar. DNA çevresel etkenler (kimyasallar, virüsler, tütün ürünleri veya aşırı güneş ışını vs. gibi) nedeniyle hasar görebilir.

Kanser hücreleri birikerek tümörleri oluştururlar. Tümörler iyi huylu veya kötü huylu olabilirler. İyi huylu tümörler kanser değildir. Bunlar sıklıkla alınır ve çoğu zaman tekrarlamazlar. İyi huylu tümörlerdeki hücreler vücudun diğer taraflarına yayılmazlar. En önemlisi iyi huylu tümörler nadiren hayatı tehdit ederler. Kötü huylu tümörler kanserdir. Kötü huylu tümörlerdeki hücreler anormaldirler ve kontrolsüz ve düzensiz bölünürler. Bu tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir [5].

1.1.2. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisi bölümler arasında çok yakın bir işbirliği gerektiren takım oyununa benzer. Tanı aşamasında görüntüleme, patoloji ve biyokimya uzmanları ile endoskopistlerin de dahil olduğu bu takımda tedavi aşamasına gelindiğinde aşağıdaki 3 faktör başrolü oynar;

- 1) Hastalıklı dokuları cerrahi müdahalelerle vücuttan uzaklaştıran cerrahlar ve girişimsel tedaviler uygulayan uzman hekimler,
- 2) Kanser hücrelerini çok çeşitli sınıftan ilaçlarla yok eden ve bağışıklık artırıcı ilaçları uygulayan medikal tıbbi onkologlar,
- 3) Hastalıklı dokuları radyoaktif ışınlarla yok eden radyasyon onkologlar.

Bu tedavilerin alanlarında uzmanlaşmış hekimlerce yapılması yaşamsal öneme sahiptir. Hastalar, kendilerine tedavi ve kanser ilaçları uygulayan hekimlerin medikal onkolog olup olmadıklarını mutlaka sorgulamalıdır. [6]

1.2. Böbrek Kanseri

Böbrekler kırmızı-kahverengi renkte ince bir kapsülle örtülü fasulye biçimindeki iki organdır. Bu organlar karın üst bölgesinin arka kısmında bulunurlar. Sırt adaleleri ve alt kaburga kemiklerince dış etkilere karşı korunurlar. Böbrekler kandan artık ve zehirli maddeleri, fazla mineralleri ve suyu süzerek vücuttan dışarı çıkarırlar. İdrar böbrekler ile kandan süzülüp oluştuktan sonra üreter olarak adlandırılan içi boş idrar borusu vasıtası ile mesaneye (idrar torbası) ulaşır. Mesanede toplanan idrar üretra adı verilen diğer bir içi boş idrar borusu aracılığıyla vücut dışına atılır.

Böbrek tümörleri iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere iki gruba ayrılır. Böbrekte en sık görülen tümör basit böbrek kistleridir. Böbrek kisti iyi huylu bir kitle olup kanserden tamamen farklıdır. Çoğu zaman tesadüfi olarak ortaya çıkan böbrek kistleri insan yaşamını hiçbir zaman tehdit etmez. Böbrek kistleri çoğu zaman tedavi bile gerektirmezler, yalnızca izlemek yeterli olur. Böbrek kanseri (renal hücreli kanser) böbrekten kaynaklanan kötü huylu tümöre verilen isimdir. Renal hücreli kanser en sık rastlanan böbrek kanseri türüdür. Böbrek kanseri genellikle ileri yaşlarda (60 yaş üzeri) ortaya çıkar. Bazı ailesel geçişli

türlerinde erken yaşlarda da görülebilir. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülür. Erken teşhis edilip cerrahi olarak çıkarılırsa (nefrektomi) tamamen iyileşme şansı çok yüksektir. Kanser büyüdükçe etrafında yer alan lenf bezleri, karaciğer, kalın bağırsak ve pankreasa yayılabilir. Bunun yanında kanser kan ve lenf yolu ile yayılarak vücudun diğer alanlarına (kemik, akciğer) yerleşebilir. Böbrekte daha az sıklıkla da değişici (transisyonel) hücreli tümörler görülür. Değişici hücreli tümörler mesane gibi idrar yollarının diğer kısımlarında da izlenir ve benzer şekilde tedavi edilir [7].

1.2.1. Risk Faktörleri

Diğer pek çok kanser türünde olduğu gibi böbrek kanserinin nedeni de henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Böbrek kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda bazı faktörlerin risk oluşturabileceği gösterilmiştir. Yüksek tansiyon (hipertansiyon), aşırı kilolu olmak, uzun süre diyaliz tedavisi görüyor olmak gibi faktörlerin böbrek kanserli hastalarda görülebildiği bildirilmiştir. Böbrek kanseri riski sigara içenlerde içmeyenlere göre iki kat fazladır. Sigara bırakılması ile risk zamanla azalır. Ayrıca ailede böbrek kanserli bir akrabanın olması böbrek kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Mesleki risk faktörü olarak çelik endüstrisi, kurşun endüstrisi, petrol ve gemi sanayi (asbest) çalışanlarında böbrek kanseri riski artmaktadır. Son olarak yüksek yağ ve kalorili diyet riski artırmaktadır. [7]

1.2.2. Belirtiler

Tümör küçükken erken dönemlerinde böbrek kanseri çok belirgin bir şikayete neden olmayabilir. Teşhis edilebilirse hastalık bu dönemde genellikle tedavi edilebilir. Bir başka deyimle erken tanı konulduğunda tedavi hem daha kolay olmakta, hem de kanserden tamamen kurtulma olasılığı artmaktadır. Genelde şikayete neden olduğu zaman tümör çok büyük boyutlara ulaşmıştır ve tümör büyüdükçe ve yayıldıkça tedavi olasılıkları azalmaktadır. Böbrek bölgesinde kitle ve ağrı, kanlı idrar gibi böbrek kanseriyle ilişkili olabilecek şikayetler yanında diğer kanserlerde de gelişebilen iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, tekrarlayan ateş gibi belirtiler de olabilir. Bu yakınmalar böbrek kanserinin belirtisi olabileceği gibi enfeksiyon gibi başka problemlerden de kaynaklanabilir. Kanser

yayılmışsa yayıldığı organla ilgili bulgular görülebilir. Örneğin akciğerlere yayıldıysa öksürük, nefes darlığı olabildiği gibi kemik yayılımı olan hastalarda kemik ağrıları, beyin yayılımı olanlarda baş ağrısı, felç gibi bulgular olabilir [7].

1.2.3. Tanı

Tanı sıklıkla başka nedenlerle yapılan radyolojik tarama sonucu tesadüfen böbrek kitlesinin saptanması ile konulmaktadır. Ancak tümörün iyi ya da kötü huylu olduğunu ayırt ettirecek bir yöntem henüz mevcut değildir. Dolayısıyla aksi ispat edilene kadar böbrekte saptanan her kitle kanser kabul edilerek ileri incelemelere gidilmelidir. Nadiren her iki böbrekte birden fazla kitle olarak kendini gösterebilir. Hastanın yakınmaları, öyküsü ve doktorun ilk değerlendirme bulguları daha sonra yapılacak araştırmaları belirlemek için çok önemlidir. Tanıda kan ve idrar tetkikleri yapılabilir. İdrar tetkikinde idrar rengini değiştirmeyecek kadar az miktarda da olsa kırmızı kan hücreleri (alyuvarlar veya eritrositler) saptanabilir. Hastalığın komşu yapılarla ilişkisi ve uzak yayılımını değerlendirmek için tanı anında görüntüleme yöntemleri olarak akciğer grafisi, intravenöz piyelografi (IVP), ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans, kemik sintigrafisi, pozitron emisyon tomografisi yapılabilir [7].

1.2.4. Tedavi

Böbrek tümörünün tedavisi hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve kanserin yaygınlığına göre düzenlenir. Böbrek kanserlerinde uygulanan çeşitli tedavi yöntemleri vardır. Erken evre kanserlerde tümörün cerrahi olarak çıkarılması altın standarttır. [7]

1.2.4.1. Cerrahi

Ameliyat ile böbreğin çıkarılması nefrektomi olarak adlandırılır ve böbrek kanserlerinde standart tedavi yöntemlerindedir. Kanserin evresi, büyüklüğü ve sayısına göre değişmek üzere ya böbrek, böbrek üstü bezi ve etrafındaki tabakaları ile birlikte tamamen çıkartılır (radikal nefrektomi) ya da kısmi olarak yalnızca tümörün çıkarılması (parsiyel nefrektomi)

uygulanabilir. Diğer böbrek sağlıklı ise hastalıklı böbreğin alınması hastanın sağlığı açısından herhangi bir sorun yaratmaz. Nefrektomi klasik olarak açık ameliyatla yapılır. Ancak son yıllarda kapalı yöntem denen laparoskopi kullanılarak da nefrektomi yapılabilmektedir. Çıkarılan örnekler patolojik olarak incelenir ve tümörün cinsi, karakteri ve yayılım derecesi belirlenir. Bu, hem tanıyı kesinleştirir hem de yayılım hakkında bilgi verir. Erken evrede kanser böbreği saran kılıf içinde sınırlıdır. Bu durumda başka ek bir tedaviye gerek kalmaz. Eğer tümör böbrek kılıfının dışına çıkmışsa ya da başka yerde de mevcutsa cerrahi sonrası ek bir tedavi gerekecektir [7].

1.2.4.2. Radyoterapi (Işın tedavisi)

Vücut dışından gelen yüksek enerjili ışınlar ile kanser hücrelerinin öldürülmesi amaçlanan bir tedavi yöntemidir. Bölgesel bir tedavi yöntemidir. Işın tedavisi böbrek kanseri tedavisinde sınırlı role sahiptir, ilk tedavi olarak önerilmez. İleri böbrek kanserli bazı hastalarda radyoterapi kemik tutulumuna bağlı ağrı gibi diğer bulguları gidermeye yönelik olarak uygulanabilmektedir [7].

1.2.4.3. Kemoterapi

Kanser hücrelerini öldürmek için kullanılan ilaçlardan bir kısmına verilen isimdir. Tek ilaç veya birkaç ilaç birlikte kullanılır. Böbrek kanserlerinde kemoterapinin etkisi sınırlı ve tartışmalıdır. Yaygın ve uzak yayılımı olan hastalarda kullanılabilir [7].

1.2.4.4. Biyolojik Tedavi (immünoterapi):

Kansere karşı hastanın bağışıklık sistemini kullanan tedavi yöntemidir. İnterferon ve interlökin-2 adlı ilaçlar dışarıdan vücuda verilmek suretiyle vücudun savunma sisteminin güçlendirilmesi amaçlanmaktadır. Yan etki olarak kas ağrısı, halsizlik, dikkat kaybı, ateş, kusma ve ishale neden olabilir. Hastalar genelde kendilerini çok yorgun hissederler. Bazılarında deri dökülmesi olur. Bu problemler çok ciddi olabilir ama tedavi bitiminde bu etkiler kaybolur [7].

1.2.4.5. Hormon Tedavisi

İlerlemiş böbrek kanserlerinde kullanılır. Progesteron böbrek kanserinde en sık kullanılan hormondur. Tedavi edici değil sıklıkla yakınmaları geçici olarak azaltmak için kullanılır. Kilo değişiklikleri, terleme ve su kaybı görülen yan etkilerdir [7].

1.2.4.6. Hedefe Yönelik Tedaviler

Son yıllarda popüler olan bir tedavi yöntemidir. Sadece yaygın böbrek kanserli hastalarda kullanılabilir. Kanserli hücreler özellikle hedef alınmakta ve diğer hücrelere zarar verilmemektedir. Kanser hücresinin büyümesi ve çoğalmasını tetikleyen mekanizmalar vardır. Bu mekanizmaların tamamı bilinmemektedir. Ancak bilindiği kadarı ile kanserleşmeye sebep olan moleküllerin susturulmasına yönelik ilaçlar geliştirilmiştir. Bu moleküller hücre içi haberleşmeden sorumlu sinyal proteinleri ve büyüme faktörleridir. Hedefe yönelik tedavilerden Sunitinib ve Sorafenib dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların etkinliği halen piyasada bulunan ve kullanılan interferon ve interlökin-2 gibi biyolojik ilaçlardan daha iyidir. Ayrıca tümöre özgü yeni küçük damar oluşumunun (anjiojenesis) engellenmesi sağlanarak tümörün öldürülmesi amaçlanmaktadır. Kanser yaşaması ve büyümesi için yeni damar gelişimi önemlidir. Bevasizumab denilen bir ilaç sayesinde tümörün yeni damar yapması engellenerek beslenme bozukluğu sonucu kanserin küçülebildiği gösterilmiştir. Standart tedavilere cevapsız ve yaşam süresi bakımından ümitsiz hastalarda deneysel tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Aşı tedavisi hastalara tümöre karşı oluşan bağışıklık sistemini uyarıcı bir madde verilmesi esasına dayanan yöntemdir. Yine temelde hasta kişinin bağışıklık sistemini aktif hale getirme prensibi söz konusudur. Ayrıca başka bir kişiden (allojeneik) kemik iliği nakli ile başarı elde edilmiş hastalar vardır. Ancak bu yöntem henüz yaygın kabul ve kullanım alanı bulamamıştır [7].

1.2.5. Yan Etkiler

Tedavinin yan etkileri Kanser tedavisinin yan etkileri tedavinin cinsine, süresine ve hasta ile ilgili kişisel faktörlere göre değişir. Nefrektomi büyük bir cerrahi operasyondur. Operasyondan sonra hasta ağrı ve rahatsızlık duyulabilir. Ancak erken evrelerde yakalanan hastalarda tam şifa elde edilebilmesi nedeni ile olası rahatsızlıklar göze alınabilir. Biyolojik tedavinin yan etkileri türüne göre değişir. Bu tedaviler grip benzeri şikayetler, kas ağrısı, halsizlik, dikkat kaybı, ateş, kusma ve ishale neden olabilir. Hastalar genelde kendilerini çok yorgun hissederler. Bu problemler çok ciddi olabilir ama tedavi bitince bu etkiler kaybolur. Kemoterapinin yan etkileri verilen ilaçlara göre değişir. Genelde kanser ilaçları hızla büyüyen kan hücrelerini etkiler ve saç dökülmesine sebep olur. Diğer ciddi yan etkileri arasında halsizlik, yorgunluk, bulantı, kusma, bağışıklık sisteminin bozulması, kan hücreleri üzerine olan yan etkileri sayılabilir. Bazı hastalarda iştahsızlık, bulantı, kusma, ağız yaraları ve tat değişikliği kilo kaybına neden olabilir [7].

1.3. Pazopanib Tedavisi

Böbrek kanserine bağlı tek bir bölgede metastaz varsa, cerrahi girişim ile bu kitlenin çıkartılması uygun bir seçenektir. Genel durumu iyi olan hastalarda, metastazların varlığına rağmen böbreğin alınması önerilmektedir. Yaygın metastazlı hastalıkta ise hedefe yönelik tedaviler, yeni damar gelişmesini engelleyen antianjiyogenik tedaviler ve immunoterapiler uygulanmaktadır. Metastatik böbrek kanseri tedavisinde hormon tedavisi ya da sistemik kemoterapi etkili değildir. Birçok çalışma sonuçlarına göre, kemoterapiye cevap oranı %6 kadardır.

Metastazlı böbrek kanserlerinin tedavisinde yüksek doz interlökin-2 gibi bağışıklık sistemini uyaran ilaçlar, uzun süre tek etkin tedavi olarak kullanılmıştır. Bu tedavinin yanıt oranı %15 kadardır ve genellikle uzun sürelidir. Ortalama yanıt süresi 54 aydır. Ancak yan etkileri oldukça fazladır ve ancak deneyimli merkezlerde kullanılması önerilmektedir.

Titremeye yükselen ateşe ve sepsis benzeri sendroma yol açabilir. Bu nedenle interlökin-2 bazen daha düşük dozlarla da kullanılabilir. Bağışıklık sistemi üzerinden etki gösteren diğer bir ilaç interferondur. İnterferon uygulanması ile %10 kadar cevap elde

edilebilir. Yüksek ateş, halsizlik, titreme, iştahsızlık ve depresyon gibi yan etkilere yol açabilir.

Günümüzde böbrek kanserinin tedavisinde biyolojik tedaviler yoğun ve etkili bir biçimde kullanılmaktadır. Hücrenin moleküler özellikleri anlaşıldıkça, hücre içi ileti yolları tanımlanmış, bunları bloke eden multikinaz inhibitörleri kullanıma girmiştir. Bunlardan kullanılan 4 tanesi metastatik böbrek kanserinin birinci basamak tedavisi için onay almıştır. Bunlar Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib ve Temsirolimus 'dur.

Sunitinib ile genel sağkalım süresi 26,4 aya kadar uzamaktadır. Sorafenib ile plaseboya göre yaşam oranında artış sağlanmaktadır. Progresyonsuz sağkalım 12 haftadan 24 haftaya kadar artış göstermektedir. Pazopanib ile ortalama cevap oranları %30 kadardır Bu ilaçlar, ağız yoluyla kullanılmakta ve hem sinyal ileti yollarını bozmakta hem de yeni damar gelişmesini engelleyerek etkili olmaktadır.

Pazopanib VEGFR, PDGFR ve c-Kit'i inhibe eden oral bir tirozin kinaz inhibitörüdür. İleri evre RHK'lı hastalarda birincil tedavi olarak kullanımı FDA tarafından Ekim 2009'da onaylanmıştır. Önceden sitokin tedavisi almış veya hiç tedavi almamış lokal ileri ve/ veya metastatik RHK'lı hastalarda randomize, çift körlü, plasebo kontrollü faz 3 çalışmada Pazopanibin etkinliği araştırılmıştır. Hastalar oral Pazopanib (800 mg/ gün) (n=290) veya plasebo (n=145) gruplarına randomize edilmişlerdir.

Metastatik böbrek kanseri tedavisinde son yıllarda birçok ilaç kullanıma girmiştir. Bu ilaçlarla hem hastalısız sağkalım hem de genel sağkalım uzamaktadır. Tedaviye bağlı halsizlik, tiroid fonksiyonlarında yavaşlama, el-ayak sendromu, çeşitli cilt reaksiyonları, bulantı, ishal, iştahsızlık, hipertansiyon gibi yan etkiler ortaya çıksa da semptom kontrolü sağlanmakta ve yaşam kalitesi artmaktadır. Bu yan etkiler, geçicidir ve bazen de ilaç dozunu azaltmakla ya da tedaviye ara vermekle düzelmektedir.

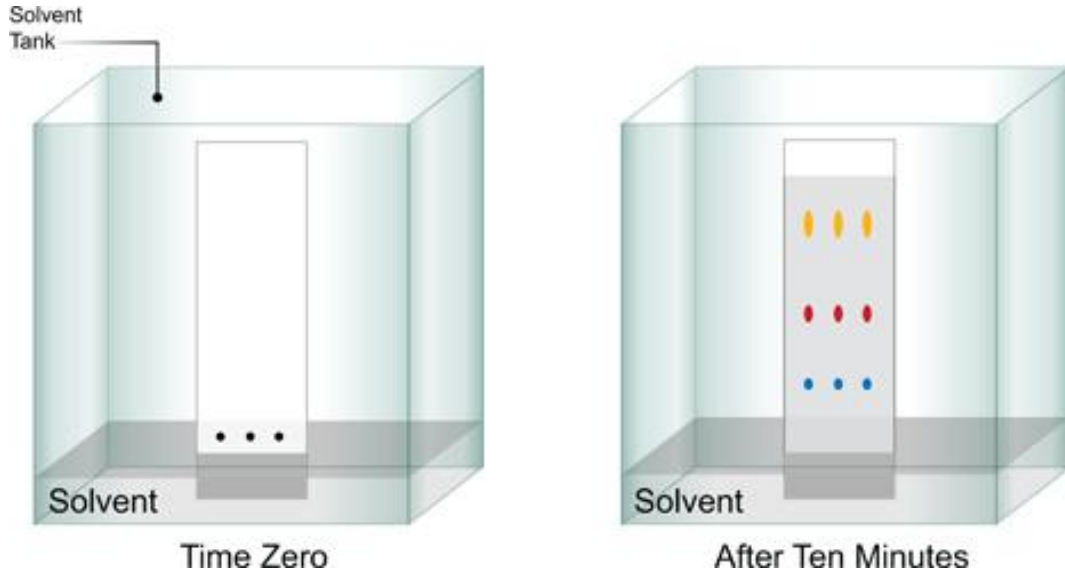
Böbrek kanseri gibi kemoterapiye dirençli olan bir hastalıkta, tedavi seçenekleri artmıştır ve böylelikle hastaların daha uzun ve kaliteli yaşamları sağlanmaktadır. Ancak, seçilen ilaçların iyi etkileri kadar yan etkileri konusunda da hastalara düzgün bilgi verilmesi şarttır. Bu iki seri tedaviye rağmen tekrarlayan hastalar için yeni moleküller üzerinde çalışmalar devam etmektedir [8].

2. KURAMSAL TEMELLER

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tswett (1903) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Tswett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar olduğundan, bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir.

Bir parça kağıt şeridin aşağı hizasından 1 cm kadar yukarısına bir damla siyah mürekkep damlatınız. Kağıt şeridi, mürekkep damlattığınız kısım su hizasının üstünde kalacak şekilde su tankına batırınız ve dik bir şekilde tutunuz. Su, kapiler etkisiyle kağıt üzerinde yukarı doğru yürürken mürekkebi çözer ve sürüklemeye başlar. Mürekkebin içindeki bileşenler kağıt üzerinde farklı hızlarda ilerleyerek ayrılmış olur. (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Kağıt kromatografi düzeneği

Kromatografi çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. (Şekil 2.2.)

Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zaman veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine **kromatogram** denir [9].



Şekil 2.2. Kromatografi kolonu

Kromatografi'nin Sınıflandırılması

- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- Uygulama Biçimine Göre
- Faz Tiplerine Göre sınıflandırılır. [9].

Ayrılma mekanizmalarına göre

Adsorpsiyon kromatografisi

Partisyon kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi

Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi

İyon çifti kromatografisi

Afinite kromatografisi olarak sınıflandırılır. [9].

Uygulama Biçimine Göre

Düzlemsel kromatografi

Kağıt kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Kolon kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak sınıflandırılır. [9].

Faz Tiplerine Göre

Sıvı kromatografisi

Sıvı-Katı kromatografisi

Sıvı-Sıvı kromatografisi

Gaz kromatografisi

Gaz-Katı kromatografisi

Gaz-Sıvı kromatografisi olarak sınıflandırılır. [9].

2.1. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Tswett'in çalışmalarında ilk sıvı kromatografi, çapı 1-5 cm ve uzunluğu 50-500 cm olan cam kolonlara uygulanmıştır. Uygun akış hızları temin etmek için, katı durgun fazı oluşturan partiküllerin çapı, genellikle 150 ila 200 μm aralığındaydı. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü ve analitin kolondaki ilerleme hızı dakikada milimetrenin birkaç ondalık kesri kadar oluyordu. Böylece, ayırma zamanları çok uzundu ve çoğu zaman birkaç saat alıyordu. Bu klasik kromatografi işlemlerini hızlandırmak için vakum veya basınç uygulama girişimleri de pek yararlı olmadı; çünkü akış hızı arttıkça, teorik tabaka

yüksekliği, akış hızı-tabaka yüksekliği eğrisindeki minimum noktasının ötesinde yükseklik artışlarına yol açıyor, sonuçta ayırma verimi düşüyordu.

Sıvı kromatografisinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin, dolguda kullanılan taneciklerinin boyutunun azaltılması ile önemli ölçüde artacağını fark ettiler. Ancak tanecik çapı 3-10 µm kadar küçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisini gelişmesi ve kullanılması 1960'lı yılların son dönemlerine kadar başarısızdı. Bu teknoloji, klasik yerçekimi akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermiştir. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), preparatif amaçla halen kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaktadır [9].

2.1.1. HPLC'nin Kapsamı

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi bütün analitik ayırma teknikleri arasında, bir milyar dolara yaklaşan yıllık satışıyla, en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadara yaygın kullanılmasının sebepleri;

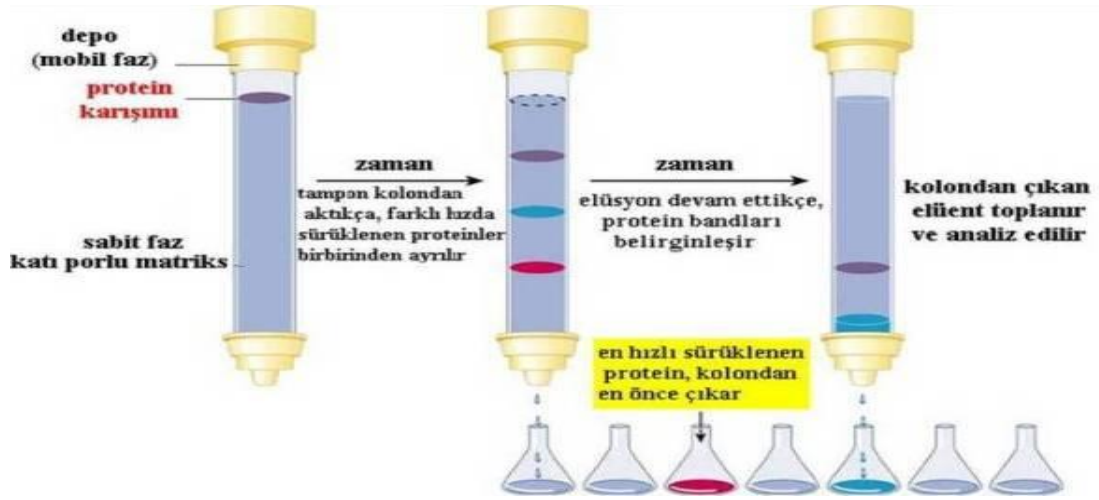
Duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin ve birçok bilim dalının birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir [9].

Örneğin mol kütlesi 10000'den daha büyük maddeler için, her ne kadar şimdilerde bu gibi maddeleri ters-faz dağılma kromatografi ile incelemek mümkünse de, eleme kromatografi daha çok kullanılır. Küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler, en iyi dağılma yöntemleri ile incelenebilir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. Adsorbsiyon kromatografi çoğu zaman, polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir.

Aminoasitler, proteinler, nükleikasitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, antibiyotikler, pestisitler, metal-organik bileşikler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir [10].

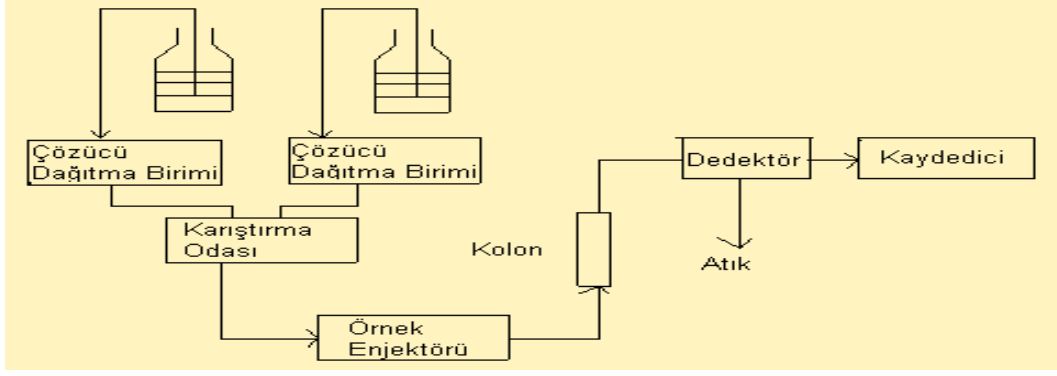
2.1.2. HPLC'nin Çalışma Prensibi

Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 2-10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak HPLC için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır [10].



Şekil 2.3. Kromatografi kolonunda örneğin ayrılması

HPLC temelde Kolon Kromatografinin oldukça geliştirilmiş şeklidir. Çözücünün bir kolondan yerçekiminin etkisiyle akması yerine, 400 atm üzerinde basınç altında geçmeye zorlanır. Bu sayede çok daha hızlı olması sağlanır. (Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. HPLC cihazı diyagramı

2.1.3. HPLC’de Kolon

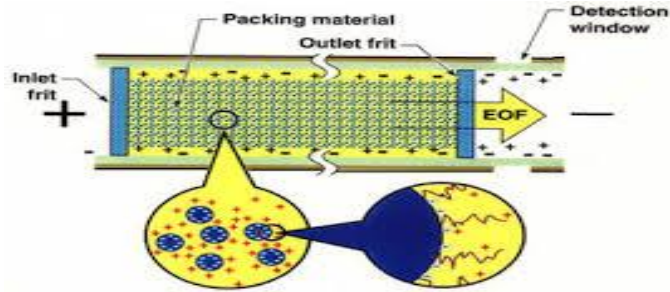
HPLC’de kullanılan kolonların uzunlukları ve çapları yapılacak olan işlerin cinsine göre değişir. Tipik bir HPLC kolonun çapı 3-4 mm, uzunluğu 10-40 cm kadardır ve kolon paslanmaz çelikten yapılır. Kolon tanecik büyüklüğü 5-10 olan μm çok küçük silika tanecikleri ile doldurulur. (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5 HPLC kolonları

Son zamanlarda çapları 1-4,6 mm, dolgu maddeleri çapları 3-5 μm , boyları 5-7,7 cm olan kolonlarda yapılmaktadır, (Şekil 2.6.). Böyle kolonlarda tabaka sayısı 100,000’e kadar çıkabilmektedir. Bunlarda hem az çözücü kullanılmakta hem de işler daha kısa sürede

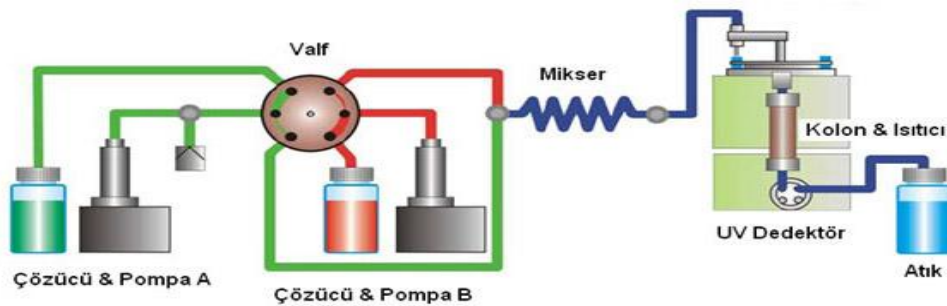
tamamlanmaktadır. Az çözücü kullanılması son derece önemlidir. Çünkü, Kromatografi’de kullanılan çözücüler çok saf ve çok pahalıdır [9].



Şekil 2.6. HPLC kolonun iç yapısı

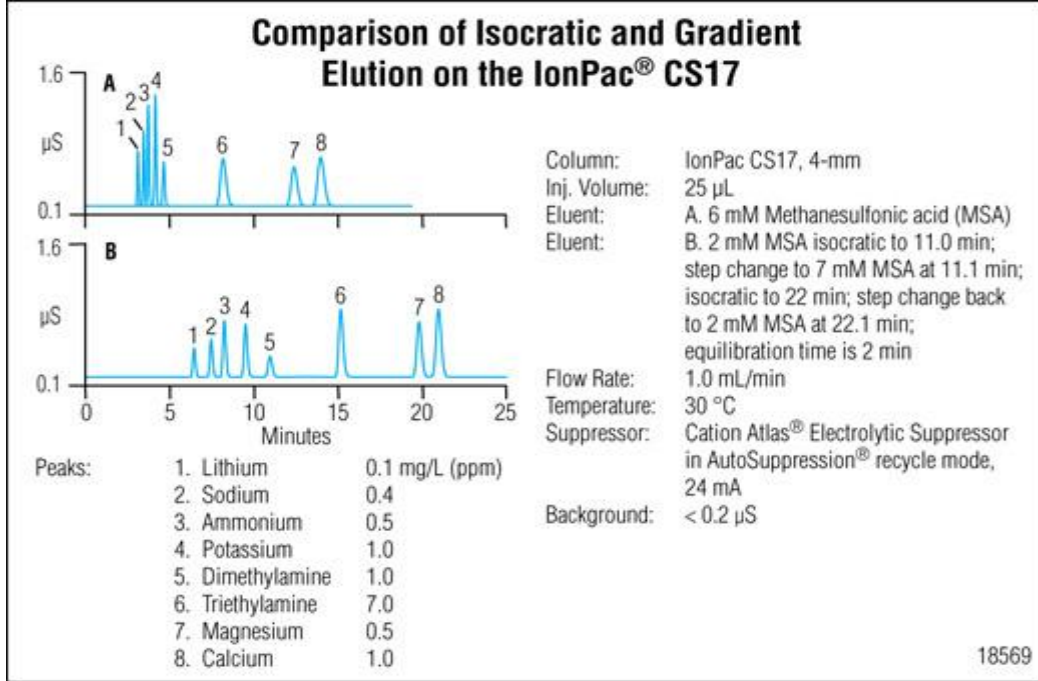
2.1.4. HPLC’nin Çözücü Haznesi ve Çözücü Sistemi

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-100 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. (Şekil 2.7.) Bu hazneler çoğu zaman kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesi için degazzör denilen bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine; ayrıca çoğu zaman dedektörün performansında bozucu etkilere sebep olurlar.



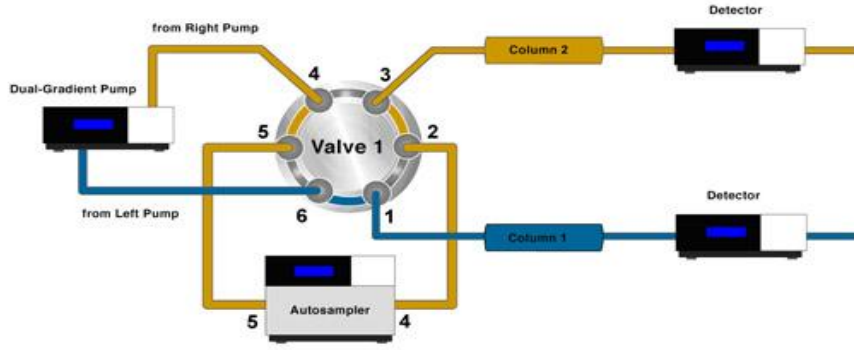
Şekil 2.7. HPLC sistemi

Bir numunenin bileşenlerine ayrılması sadece bir çözücü kullanılarak yapılırsa, (örneğin: hacimce %50 etanol %50 su) buna izokratik elüsyon, farklı polaritede iki veya daha fazla çözücü kullanılarak yapılırsa buna gradient(dereceli) elüsyon denir. (Şekil 2.8.)



Şekil 2.8. İzokratik ve Gradient çalışma örneği

Burada polariteleri önemli ölçüde birbirinden farklı, iki veya üç çözücü istemi kullanılır. (Şekil 2.9.) Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazende bir seri basamaklar halinde çözücülerin oranı değiştirilir. HPLC ekipmanları çoğu zaman, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır [10].



Şekil 2.9. HPLC çözücü karıştırma valfi

2.1.5. HPLC’de Pompa Sistemi

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha öncede belirtildiği gibi kolon giriş çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır.

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıklıdır ve şunları içermektedir. (1) 400 atm’ye kadar basınç üretimi, (2) puls içermeyen basınç çıkışı, (3) 0,1-10 mL/dak. aralığında akış hızı, (4) %0,05 veya daha iyi bağıl tekrarlanabilirlik, (5) korozyona dayanıklı parçalar.

Ticari olarak satılan HPLC sistemlerinin yaklaşık %90’ında pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri geri hareketiyle çözünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir [10].

HPLC’de doğrudan gaz basınç pompaları, pnömatik hızlandırıcı pompalar, pistonlu pompalar ve şırınga tipi pompalar kullanılmaktadır.

2.1.5.1. Doğrudan Gaz Basınç Pompaları

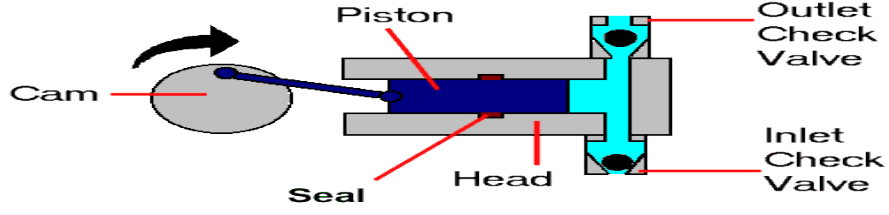
Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanması, genellikle azot veya helyum gazının kullanılmasıyla olur. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır. Bu sistem sınırlı bir hacme sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır [9].

2.1.5.2. Pnömatik Hızlandırıcı Pompalar

Pnömatik (havalı) pompalar da gaz basıncıyla çalışır. Gaz basıncı küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonla etki eder. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır. Sıvının pompayı terk etme hızı, çözücünün viskozitesine, pompa çıkışındaki akışın direncine ve kolon dolgu maddesiyle olan etkileşimine bağlıdır [9].

2.1.5.3. Pistonlu Pompalar

Pistonlu (sabit akış) pompaları iki modeldir. Birinde piston, pompalanan hareketli sıvı faz ile doğrudan temas halindedir. Diyafram pompaları olarak adlandırılan diğerinde ise, piston hareketi hidrolik sistem yoluyla esnek paslanmaz çelik membrana iletilir.(Şekil 2.10.) Bu pompaların piston hareketi nedeniyle çözücü, sabit akış hızında, havalı pompalardan daha seri pulslarla dağıtılır. Çözücünün pulslu akışı ile dakikada 25 -100 piston hareketi (strok) üretilir. Pompalardaki sıvı akışı genellikle 10 mL/dakikaya kadardır [9].



Şekil 2.10. HPLC pistonlu pompa

2.1.5.4. Şırınga Tipi Pompalar

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulsulu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır [9].

2.1.6. Çözücü Programlamalı Sistem

Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki hareketli faz için, iki yüksek basınç pompasına sahiptir. Bu amaçla kullanılacak iki hareketli fazın tamamen karışabilir olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar [10].

2.1.7. HPLC'de Numune Enjeksiyonu

Hareketli faz akışı olurken; Septum yoluyla kolon başına mikroşırınga ile enjeksiyon,

- Hareketli faz akışının durdurulmasıyla septum yoluyla enjeksiyon,
- Kolonun hemen başında hareket eden faza septum yoluyla enjeksiyon.
- Dış ilmek subabı (valfi) yoluyla enjeksiyon.

2.1.7.1. Septum Enjeksiyonları

Şırınga enjeksiyonları, iç hacmi mümkün olduğunca küçük olması gereken bir septum enjektörü vasıtasıyla yapılabilir. Bu basit alet, dolgu maddesine yapılan (kolon üzeri enjeksiyon) ve akışı durdurarak yapılan enjeksiyonlar (stop-flow) için iyi sonuçlar verir. Kolon üstü septum enjeksiyonu yapılırken alınması gereken önlem, iğnenin kolon dolgu maddesine temas etmemesidir.

Örnek, hareketli faz kolona girmeden önce de enjekte edilir. Bu yöntem kolon dolgu maddesinin herhangi bir zarar görmesinin önüne geçer. Fakat bu yöntemde, pompa basıncın atmosferik basınca düşmesi için kapatılır, sonra örnek enjekte edilir ve pompa tekrar çalıştırılır. Bu yüzden alıkonma zamanında belirsizlik yaratabilir. Septum enjeksiyon teknikleri, küçük hacimli örnekler kullanıldığında uygulanır [9].

2.1.7.2. Valf Enjeksiyonları

Bölme kullanılmaksızın, 5000 psi dan yüksek basınçta çalışacak şekilde dizayn edilmiş, ince borulu ilmek (loop) lerdir. Bunlar, hareketli faz, by-pass yoluyla kolona pompalanırken, örnek ilmeğinin doldurulması yoluyla çalışırlar. Örnek ilmeği, 10-500 mL 'lik bir hacim aralığında, ya dıştan ve değiştirilebilir, ya da içten ve sabit hacim ilmeği olabilir.

Nicel analiz için valf enjeksiyon aletleri, septum enjektörlere göre bazı avantajlara sahiptir:

- Yüksek tekrarlanabilirlikle, geniş bir aralıktaki örnek hacimlerini enjekte etme yeteneği,
- Çözücü akışını durdurmaksızın yüksek basınçta (5000 psi) enjeksiyon olanağı,
- Kolon tıkanmasına neden olan septumun bulunmaması,
- Örnekleme sistemi için otomasyon [9].

2.1.7.3. Oto-Enjektörler

2 tip oto-enjektör mevcuttur. Bunlar XY tipi ve carousel tipidir. XY tipinde enjektör hareketli olup belirtilen koordinatlara giderek örneği şişesinden çekmekte ve loop vasıtasıyla mobil faza enjekte etmektedir. Bunun için seçilen örneklere ait bilgilerin, gerekli yazılım kullanılarak, önceden bilgi işlemciye girilmesi gerekmektedir. Carousel tipinde ise örnekler dönen, dairesel şekilli bir taşıyıcı vasıtasıyla sabit bir enjektörün altına taşınmaktadır [9].

2.1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Dedektörleri

Dedektör yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, aletin en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur.

2.1.8.1 Bir Dedektörde Bulunması Gerekli Önemli Karakteristikler

- Duyarlılık
- Doğrusallık
- Üniversal ve seçici cevap
- Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme
- Numuneyi tahrip etmeme
- Ucuzluk ve kolay kullanım

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler
2. Seçici dedektörler [9].

2.1.8.2. Genel ve Seçici Dedektörler

Genel dedektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer. Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlılık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik dedektörleri verilebilir. Seçici dedektörler, genel dedektörlerine göre yaklaşık 1000 kat daha duyarlıdır. Dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre farklılandırılabilir [9].

2.1.8.3. HPLC’de En Çok Kullanılan Dedektör Türleri

- Ultraviyole/görünür bölge dedektörü (ultraviolet/visible dedector-UV/VIS)
- Fotodiyot array dedektörü (photodiode array dedector-DAD)
- Floresans dedektörü (fluorescence dedector-FLD)
- İletkenlik dedektörü (conductivity dedector-CDD)
- Refraktif indeks dedektörü (refractive index dedector-RID)
- Elektrokimyasal dedektör (electrochemical dedector-ECD)
- Evaporatif ışık dağıtıcı dedektör (evaporative light scattering dedector-EL)
- Kütle dedektörü (mass dedector-MS) [9].

2.1.8.4. Kütle Spektrometrisi Dedektörü

Kütle spektrometrisi dedektörü sıvı kromatografi piklerinin online kalitatif analizi için en iyi araçtır. Ayırım sonrasında molekül, iyon kaynağı tarafından iyonize edilir. İyonizasyon sonrasında moleküldeki zayıf bağlar kırılır ve bir seri iyonize olmuş fragmanlar oluşur. Bu fragmanlar kütle spektrometresi tarafından spektrum üretmek üzere ayrılır. İyonlar dört yol boyunca hızlandırılır ve yollara hem ters hem de doğru akım uygulanır. Uygulanan

gerilimler fragmanların yönünü değiştirir. Bu yollar bir kütle filtresi gibi hareket eder. Devamında ölçülen her bir kütle nin yoğunluğundan kütle spektrumu çizilir.

Avantajları:

- Kütle spektrometresi kalitatif analiz için en iyi araçtır.
- Son derece hassastır ve seçimlidir.
- Son yıllarda daha da geliştirilen (LC-MS/MS) detektörleri de kullanılmaktadır.

Dezavantajları

- Yüksek maliyetlidir
- Yüksek moleköl ağırlı bileşikler detektörün kütle aralığının ötesinde fragmanlar oluşturabilirler. Düşük moleköl ağırlıklı bileşikler ara yüzeyde kaybolabilirler [9].

2.1.9. HPLC'nin Yaygın Uygulamaları

- Fizyolojik örneklerdeki bazı aminoasit, nükleik asit ve protein miktarlarının tayini
- İlaç aktif maddelerinin, sentetik biyoürünlerin yada farmasötik ilaçlardaki bozunma ürünlerinin tayini
- Pestisit ve insektisit ve diğer çevresel örneklerin tayini
- Karışımlardaki bileşenlerin ayrılması
- Kalite kontrolü
- Bir karışımdaki polimerlerin moleköler ağırlık dağılımının belirlenmesidir.

HPLC tekniği ne kadar gelişmiş ve yaygın bir teknik olsada bazı sınırlamaları vardır:

- Bileşenlerin tanımlanması, bazı durumlarda kütle spektrometresi ile kombine edilmemiş olan HPLC kullanıldığında yeterli olmayabilmektedir.
- Karmaşık örneklerde iyi çözünürlük sağlamak zor olabilmektedir.
- Aynı anda sadece bir örnek analizlenebilmektedir. [10]

2.2. Metodun Geçerli Kılınması (Validasyon Parametreleri)

Metodun geçerli kılınması, metodun validasyonu, metodun performans özelliklerinin anlaşılması ve metodun bilimsel olarak her şart altında uygulanabileceğinin garanti altına alınması için yapılan kontrollerdir veya diğer bir ifadeyle belirli şartların, yasal gerekler, üretim (proses) gereklilikleri, istenilen değerler için objektif delillerin ortaya konmasıyla ve deneylerle ispatlanmasıdır [11]. Validasyon sürecinin en önemli adımlarından biri metodun performans parametrelerinin belirlenmesidir ki bunlar aşağıda verilmiştir:

- Spesifiklik (Specificity) ve Seçicilik(Selectivity),
- Kesinlik (Precision),
- Tekrarlanabilirlik (Repeatibility),
- Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility),
- Doğruluk (Accuracy),
- Lineerlik (Linearity),
- Ölçüm aralığı (Range),
- Referans standartlar ile karşılaştırma (Comparison with the reference standards),
- Kararlılık(stability),
- Tutarlılık(consistency),
- Tayin Limiti (Limit of Detection,LOD),

- Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation, LOQ),
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness), [11]

2.3. Sistem Uygunluk Testi Parametrelerinin Tayini

Cihazın validasyonu ve geliştirilen analitik yöntemin diğer validasyon parametrelerinin hesaplanmasından önce en başta yapılabilmek üzere bulunulması gereken değerlerdir.

2.3.1. Doğruluk

Analizler sonucu elde edilen değerlerin doğru veya gerçek değere yakınlığının ölçüsü doğruluk olarak tanımlanır. Doğruluk herhangi bir sistemik hata veya geliştirilen yöntemle elde edilen değerlerin doğru değerden sapmaları hakkında fikir verir. Doğruluk, numunenin hazırlanışının etkisini ölçer. Geri kazanımın hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon eşitliğinin, esas analizde doğrusallık olarak verilen eşitlikle aynı olması gereklidir. Ortama ilave edilen analitin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir [12].

2.3.2. Kesinlik

Analiz için geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Analizi yapılan ilaç etken maddesinin geliştirilen sıvı kromatografik yöntemle elde edilen sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar %BSS veya %VK (validasyon katsayısı) olarak ifade edilirler.

Ölçüm yapılan her bir derişim düzeyi için en az 5-6 tayin yapılmalıdır. Elde edilen sonuçların en az 5 tanesinin sonucunun %BSS'sı teorik değerinin %15'inden daha fazla sapmamalıdır. Kesinlik üç kısımda hesaplanır.

Tekrarlanabilirlik (enjeksiyon arası): Kısa zaman dilimindeki aynı işlem koşulları altındaki (aynı anda hazırlanmış çözelti, hareketli faz, kolon şartları vb.) kesinliği ifade eder.

Orta kesinlik: Aynı günde, farklı çözeltiler hazırlanıp analiz edilerek saptanan bir kesinlik derecesidir.

Tekrar edilebilirlik: Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir [12].

2.3.3. Seçicilik

Sıvı kromatografik bir yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek diğer bileşenlerin yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir. Seçiciliği olmadığı veya yeterli olmadığı bir kromatografik analiz yönteminin diğer performans parametreleri de anlamsızdır [12].

2.3.4. Teşhis sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişimidir. Birkaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül eşitlik de verilmiştir [12].

$$LOD = (3.3 \times "SD") / m$$

2.3.5. Tayin alt sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyidir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül eşitlik de verilmiştir [12].

$$LOQ = (10 \times "SD") / m$$

2.3.6. Doğrusallık

Derişime karşı analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değişmesi ve çizilen grafikte cevabın düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon (r) ve tayin (r^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Değişik derişimdeki analitin kromatogramlarından elde edilen cevap değerlerine karşı derişim miktarları regresyon analizi ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık analit cevap değerleri çizilen doğru üzerinde ne kadar yer alıyorsa ve r veya r^2 değerleri 1'e ne kadar yakınsa sağlanmış demektir [12].

2.3.7. Aralık

Aralık yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır [12].

2.3.8. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir [12].

2.3.9. Sağlamlık

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler, hareketli faz kompozisyonunda bulunabilen organik çözücünün yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık vb. etkenlerdir [12].

2.3.10. Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin bir ölçüsüdür. Bunun için geliştirilen bir çalışmanın, aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından, farklı laboratuvarında benzer cihazlarda, reaktif ve çözücülerin markaları değiştirilerek, farklı günlerde, farklı sıcaklıklarda yapılması gibi normal test parametrelerinin değiştirilmesi, HPLC yönteminde kolon değişimi ile deneylerin tekrarlanması sonucunda saptanır [12].

2.3.11. Kararlılık

Kararlılık, Amerikan Farmakopisi tarafından yapılması zorunlu bir validasyon parametresi olarak tanımlanmakla birlikte, tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için tavsiye edilen bir validasyon basamağıdır. Kararlılıklarını belirli bir süre koruyabilen numune, standart madde ve çözücülerle tekrarlanabilen, doğru ve kesin sonuçlar elde edilir. Kararlılık çalışması için ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa (1 gün, 1 hafta, 1 ay, 1 yıl) o kadar süre içerisinde gerçekleştirilmelidir [12].

2.4. KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MS)

Bir numuneyi özel bir düzenele gaz halinde yüklü ve hareketli bileşenlerine dönüştürerek, bunları kütle/yük oranlarına göre ayırma ve ayırmadan yararlanarak da numuneyi teşhis ve tayin etme metodlarına kütle spektrometrisi, bu amaçla kullanılan cihazlara da kütle spektrometresi denir.(Şekil 2.11.) Kütle/yük oranı genel olarak m/z şeklinde gösterilir. Burada m yüklü bir taneciğin kütlesi z ise yüküdür.

Bir numuneden m/z oranları birbirinden farklı birçok tanecik meydana gelebilir. Cihaz, m/z değerleri aynı olan tanecik demetleri için birer pik çizer. Kütle spektroskopisinin veya kütle spektral yoldan ölçülmesinin prensibini anlamak kolay ama bu amaçla kullanılan cihazı anlamak bir hayli güçtür. Çünkü cihaz elektronik, manyetik ve mekanik bir çok parçalardan meydana gelir [9-13]



Şekil 2.11. Kütle Spektrometresi

2.4.1. Tarihçe:

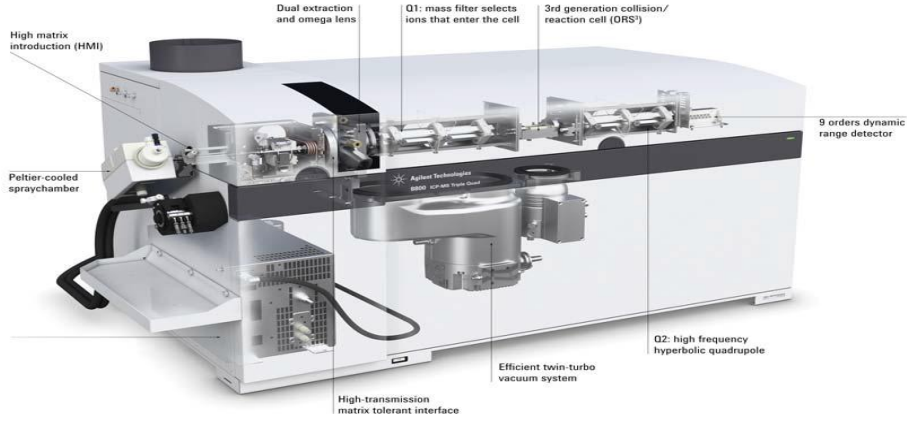
Kütle spektrometrisi eskiden beri bilinen analiz metodlarından birisidir. İlk defa 1913 yılında Thomson tarafından kullanılmış ve neonun iki izotopunun olduğu bulunmuştur. Metod 1920'li yıllarda Aston (UK) ve Demster (USA) tarafından geliştirilmiştir. Geliştirilen bu cihaz sayesinde izotopların hem kütleleri hemde yüzdeleri gerçeğe yakın bir şekilde tayin edilmiştir. Ayrıca izotopların kütlelerinin daha iyi tayin edilmeleri sonucu elementlerin atom kütleleri çizelgeları da yeniden düzenlenmiştir. Bu çalışmalar sonucu atom kütlelerinin tam sayılar olmadığı gerçeği ortaya çıkmıştır. Ticari kütle spektrometreleri 1942 yılında piyasaya çıkarılmış ve ilk olarak petrol bileşiklerinin analizlerinde kullanılmıştır.

Arthur J Dempster'in 1918 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve Francis Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri üzerindeki çalışmaları ile kütle spektrometresinde gelişmeler kaydedilmiştir. Kütle spektrometresi ticari amaçla ilk defa 1940'lı yıllarda petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Holmes ve Morrell isimli araştırmacılar 1957 yılında ilk defa gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) sistemini oluşturmuşlardır [14].

2.4.2. Kütle Spektrometresinin Bölümleri

Kütle Spektrometresi başlıca 5 kısımdan meydana gelir.(Şekil 2.12.)

- 1-Numuneyi cihaza alma kısmı
- 2-Numuneyi iyonlaştırma kısmı
- 3-Analizör,m/z oranlarına göre iyonları demetlere ayırma kısmı
- 4-Dedektör
- 5-İlk dört kısmı içine alan yüksek vakum kısmı



Şekil 2.12. Kütle spektrometresi iç yapısı

2.4.3. Kromatografi Cihazından Gelen Numuneyi Alma Bölümü

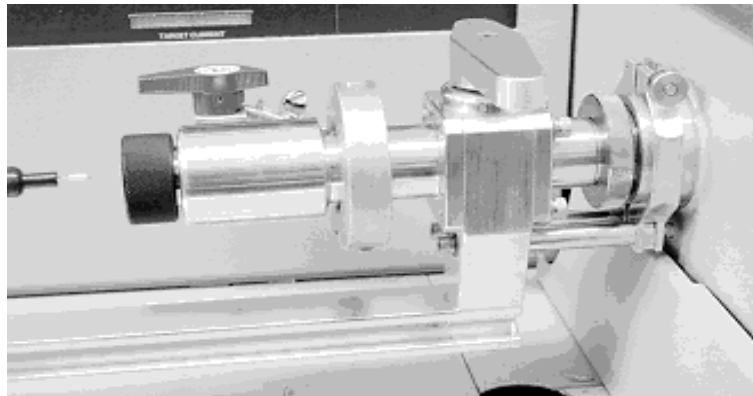
Kompleks maddelerin veya sistemlerin gaz veya HPLC'den gelen fraksiyonlar, doğrudan kütle spektrometresinin numune alma kısmına bağlanır. (Şekil 2.13.)

Numuneyi cihaza alma kısmından bir kısım numune cihaza alınır. Bu kısım vakum altında bulunur ve numune alma esnasında vakum düşmez. Numunenin cihaza ulaşması başlıca üç şekilde yapılır.

1-Buharlaştırarak

2-Doğrudan

3-Kromatografi düzeneğinden geldiği gibi [9].



Şekil 2.13. MS numune alma kısmı

2.4.4. Kütle Spektrometresi İyonlaştırma Kısmı

Numune sisteme girdikten sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırma olayıdır. İyon kaynağı incelenecek maddenin türüne ve çalışmada istenilen bilgilere göre değişmektedir. İyon kaynağı ne türde olursa olsun yüksek iyon verimi ve olabildiğince küçük enerji dağılımı sağlayacak özelliklerde olması istenir. İyonlaştırma işlemi çeşitli kaynaklarla sağlanabilir. İyon kaynaklarını başlıca gaz faz iyon kaynakları ve desorpsiyon iyon kaynakları olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Gaz faz iyon kaynaklarında numune önce buharlaştırılır ve daha sonra iyonize edilir. Desorpsiyon kaynaklarında ise numune sıvı veya katı halden direkt gaz iyonlara dönüştürülür. Isıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşiklere kolaylıkla uygulanabilir olması desorpsiyon kaynaklarının avantajıdır. Gaz faz kaynaklar ise genellikle kaynama noktası 500 °C'nin altındaki ısıya dayanıklı numunelere uygulanmaktadır [15]. Gaz faz iyon kaynaklarından elektron iyonizasyon (EI) [16] ve kimyasal iyonizasyon (CI) [17, 18] teknikleri en sık kullanılanlardır. Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; hızlı atom bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılmaktadır [19]. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır [20]. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ise yeni bir iyonizasyon yöntemi olup özellikle peptitlerin analizinde kullanılmaktadır [21-22].

Cihazda numuneyi içeri alma ve iyonlaştırma kısımları birbirine çok yakın adeta iç içe girmiş halde bulunur. (Şekil 2.14.) İyonlaştırma bölgesine gelen her 1000 molekülden ancak bir tanesi elektronla çarpışarak molekül iyonu haline geçer.

İyon haline getirme

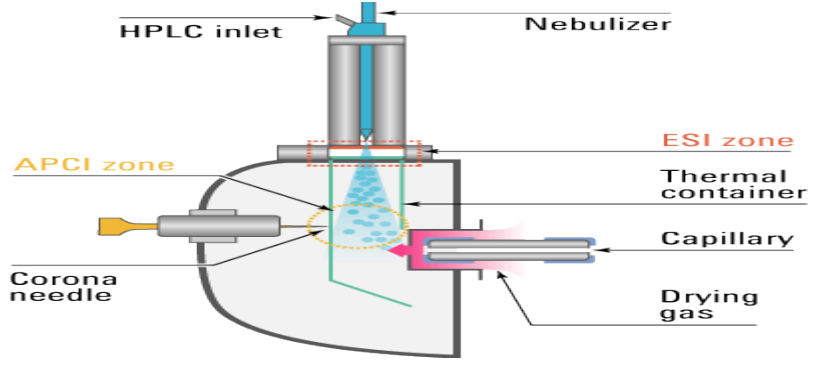
1-elektronlarla

2-fotonlarla

3-moleküllerle bombardıman suretiyle

4-elektrikle ısıtma

5-alevle ısıtma olabilir [9].



Şekil 2.14. MS iyonlaştırma bölümü

2.4.5. Kütle Spektrometresi Analizörler

Analizörler, iyonlaştırma kısmından gelen iyonları kütle/yük(m/z) oranlarına göre demetlere ayırıp kollektöre gönderen sistemlerdir. Kütle analizörleri çok küçük kütleleri de fark edebilir.

Bunlar genelde iki tanecik arasındaki en küçük kütle/yük oranlarını tespit edecek şekilde tasarlanırlar ve imal edilirler. Ayrıca bunların ölçülebilecek sayıda gaz iyonu dedektöre göndermeye elverişli çapta bir boru sistemine sahip olması gerekir. (Şekil 2.15.) Aksi halde dedektörde ölçülebilecek şiddette bir akım meydana gelmez.



Şekil 2.15. MS analizör

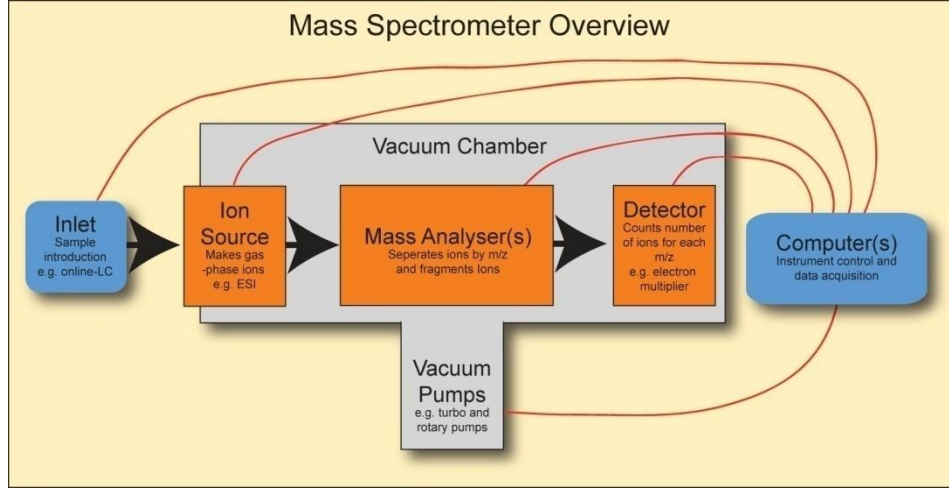
Bir cihazın ayırma gücü, uygulamanın türüne bağlıdır. Örneğin; kütleleri 28 olan $C_2H_4^+$ ve CH_2N^+ iyonları atomik kütle birimlerine göre ayrılmak istenirse ayırma gücü (R) birkaç bin olan bir cihaza ihtiyaç vardır çünkü bunların kütleleri sırasıyla 28,0313 ve 28,0187 dalton dur. Öte yandan kütleleri tam sayılı NH_3^+ (m=17) ve CH_4^+ (m=16) tanecikleri için ayırma gücü (R) 50 olan bir cihaz bile yeterlidir [9].

2.4.6. Kütle Spektrometresi Dedektörleri

Kütle ayırma kısmından, m/z oranlarına göre demetler halinde ayrılan iyon tanecikler dedektöre gelir. Böyle bir dedektör iyon halindeki taneciklerin enerjilerini elektrik enerjisine çevirir. Elektrik enerjisi haline çevrilen enerji cihazda bulunan bilgisayarın hafızasına kaydedilir [9].

2.4.7. Kütle Spektrometresi Vakum Sistemi

Kütle spektrometresi ile çalışmalarda sistemin vakum altına tutulması gerekir; (Şekil 2.16.) bunun temel nedeni ortalama serbest yolu yükseltmektir. Ortalama mesafe, iyonize moleküllerin, diğer iyon ve moleküllerle çarpışmalarından önceki yolculuğu olarak tanımlanır; yüksek bir ortalama-serbest yol, tekrarlanabilir fragmantasyon sağlar ki bu da yüksek hassasiyet ve güvenilir bir kütle analizi yapılmasına olanak verir. Ortalama-serbest yol, iyonizasyon kaynağı ve iyon dedektörü arasındaki mesafeden daha büyük olmalıdır. Vakum, iki kademeli vakum sistemiyle sağlanır: Birincisi, bir rotary pompadır; bu kaba veya ön pompadır; 10^{-2} - 10^{-4} torr vakum sağlar. İkinci pompa bir turbomoleküler veya bir difüzyon pompası olabilir; vakum 10^{-5} torr değere ulaşır. Bu pompalar kompresörler gibi çalışır [9].



Şekil 2.16. MS diyagramı

2.5. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrofotometresi (LC-MS)

Karışımların kütle spektrometrisiyle analizi yapılabilmektedir. Ancak, bunun için karışımların önce bileşenlerine ayrılması gerekir. Aksi halde numune spektrumunda sayısız pik meydana gelir. Bunların içinden çıkmak çoğu zaman mümkün olmaz. Bu nedenle, karışımlar önce ayrı bir metotla bileşenlerine ayrılır. Ayrılan bileşenlerinde tek tek kütle spektrumlarının alınması gerekir.

Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) geniş bir kimyasal yelpazede kalitatif ve kantitatif analitik çalışmalara imkan sağlayan bir tekniktir. HPLC sistemlerinde Kütle spektrometrisinin (MS) dedektör olarak kullanılmasıyla oluşturulmuş analitik cihazlar olarak uygulanır [10].

2.6. Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS/MS)

Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS/MS) seçimliliği yükseltmek ve teşhis limitlerini artırmak için MS'den önce numunenin ekstraksiyon, türevlendirme, kromatografik ayrıştırılmalar gibi bazı ön işlemlerden geçirilmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi, iki veya daha fazla analitik tekniğin ardışık olarak bağlanmasıdır.

Ardışık MS/MS'de karışım birinci MS'nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine ait iyonlarının oluşmasını sağlar. Bunlara ana iyonlar denir. Bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Bu incelenecek olan bileşiği karışımın içindeki diğer bileşenlerinden ayırır. Birinci MS'de ayrılmış olan ana iyon ikinci MS analizöre gönderilir ve burada parçalanarak ikincil iyon fragmentlerine ayrılır. Bunlara ikincil iyon denir. Bu şekilde ana iyon ile ikincil iyonun birlikte taranması bileşiğin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve karışımdaki diğer bileşenlerden tamamen ayrılmasını sağlar [23].

Özet olarak birinci MS bir karışımdan tek bir bileşiği ayırmak için kullanılır. Bu işlem GC-MS sistemindeki GC nin fonksiyonu yerine geçer ancak arada çok önemli bir hız farkı vardır. GC-MS ile saatte 4-6 örnek analiz edilebilirken, tandem MS/MS ile saatte 60 örneğe kadar çıkılabilir. Böylece analiz hızı artılmış ve örnek başına birim maliyet düşürülmüş olmaktadır. Örnek ekstraksiyonu ve türevlendirme aşamaları son derece azaltılmış ve hatta bazen gerekmemektedir [24-25-26-27].

2.7. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı

MS; Günümüzde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Yüksek hassasiyeti ve güvenilirliği, analiz süresinin kısa olması ve bilgisayar kontrollü programlar sayesinde kütle spektrometreleri artık birçok hastalığın tanısına yaklaşımda son derece kuvvetli bir analitik teknik haline gelmiştir. Günümüzde ardışık MS/MS sisteminin en yaygın kullanım alanı metabolik hastalıkların tanısı [28] olmakla birlikte artık proteinler [29-30], lipitler [31-32], karbonhidratlar [33] ve DNA analizi [34] gibi birçok bileşiğin analizinde kullanılmakta ve bunlara sürekli yenileri eklenmektedir. Ardışık MS/MS ile yapılan açilkaritin ve aminoasit analizi ile metabolik hastalıkların tanımlanması son zamanlarda oldukça yaygınlaşmıştır [35-36]. Ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde ardışık MS/MS spektrometresi ile yenidoğan tarama programları yürütülmektedir.

Başka bir hibrit kütle spektrometresi de, iki kütle spektrometresini art arda uygulamaktır. Birinci MS karışımda bulunan moleküler iyonları ayırıp farklı zamanlarda ikinciye gönderir. İkincide her moleküler iyon için bir spektrum alır. Çünkü, moleküler iyonlar parçalanarak bir takım parçalanma ürünleri meydana getirirler.

Bu ikili sistemdeki birinci spektrometre, LC-MS sistemindeki LC düzeneğine benzer. (Şekil 2.17.) Birinci spektrometre karışımdaki bileşenlerin moleküler iyonlarını art arda ikinci spektrometreye gönderir. Kısaca söylemek gerekirse, kromatografik ayırmayla spektrometreye moleküller, birinci spektrometreden ikinciye de moleküler iyonlar gönderilir ve sistemin hassasiyeti artırılmış olur [9].



Şekil 2.17. LC-MSMS cihazı

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

3.1. Protein Kinaz İnhibitörleri ve Pazopanib ile Yapılan Çalışmalar

Asadulla Khan ve arkadaşları, UPLC tekniğiyle; XTerra C18 kolon (250×4,6 mm- 5µ) , asetonitril-su (50:50 v/v) mobil faz sistemi ve gradient olarak çalışarak, akış hızı 1mL/dakika olacak şekilde ve 267 nm dalga boyunda çalışarak Pazopanibi 7,392 dakikada tablet formundan geri kazanım çalışması yapmışlardır. Çalışma sonucunda %99,49 geri kazanım elde etmişlerdir. [37]

Mukul Minocha ve arkadaşları, LC-MS/MS tekniğiyle fare kanı ve beyin dokusundan alınan örneklerden Pazopanib'i tayin etmişlerdir. XTerra C18 kolon (50×4,6 mm- 5µ), asetonitril-su (70:30, v/v) %0,1 formik asit içeren mobil faz sistemi, akış hızı 0,25 mL/dakika LC şartlarında, MRM (multiple reaction mode), pozitif iyon modu, MS koşullarında 3,9-1000 ng/mL aralığında kalibrasyon doğrultusunda parçalanma ürünlerini 357.2 g/mol olarak hassas bir şekilde hesaplamışlardır. [38]

Rolf W. Sparidans ve arkadaşları, LC-MS/MS tekniğiyle pazopanibi insan kanında belirleyip izlemişlerdir. Plazma örnekleri tedavi öncesinde alınarak asetonitril ve iç standart ile karıştırılmıştır. 1/9 oranında su ile seyreltikten sonra 2 µm oktadesil silika kolonda izokrotik çalışmayla %0,005 formik asit, asetonitril-su (24:76 v/v) mobil faz sistemiyle triple quadrapole MS/MS ile 0,1-100 µg/mL kalibrasyon aralığında tayin edilmiştir. [39]

Nierka p. Van Erp ve arkadaşları, insan kanından 6 tirozin kinaz inhibitörünü LC-MS/MS tekniğiyle aynı anda gözlemlemişlerdir. İmatinib, Sunitinib, Nilotinib, Dasatinib, Pazopanib, Regorafenib ve iki iç standart tedavi öncesi insan serumuna metanolle beraber enjekte edilmiştir. Acquity BEH C18 kolon (100×2,1 mm- 1,7 µm) MRM ve pozitif iyon modunda çalışılarak tüm bileşikler aynı anda tayin edilmiştir. [40]

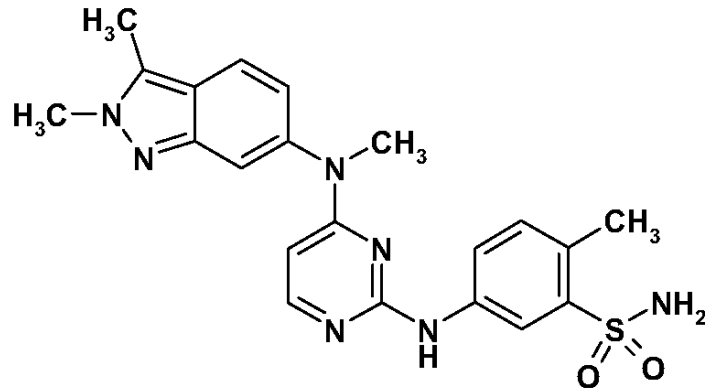
Yan Li ve arkadaşları, Pazopanibin, analitik işlemlerle kirliliğini LC-MS/MS tekniğiyle belirlemişlerdir. XTerra C18 kolon (150×4,6 mm- 3,5µm) Q-TOF kütle spektrometresi şartları ise pozitif iyon ve MRM modda çalışılmıştır. [41]

Marek ve arkadaşları, HPLC-DAD metodu ile farklı protein kinaz inhibitörlerini insan serumundan tayin etmişlerdir. 7 farklı protein kinaz inhibitörü (vatalanib, bosutinib, canertinib, tandutinib, pazopanib, dasatinib ve iç standart erlotinib) iyi bir şekilde ayırıp kantitatif olarak belirlemişlerdir. Bu metotta LiChrosper 100-5 RP8 (250 mm×4mm) kolon, 30 °C sıcaklık, mobil faz olarak 0,005 M H₃PO₄/KH₂PO₄ (pH=3) asetonitril (7/3, v/v), akış hızında 0,7 mL/dakika sistemi kullanılmıştır. [42]

3.2. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmakolojik, Farmokinetik Özellikleri

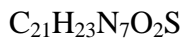
3.2.1. Pazopanib

Formül:



Şekil 3.1. Pazopanibin kimyasal formülü

Kapalı formül:



Sistematik adı:

5-[[4-[(2,3-Dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methylbenzolsulfonamide [43].

3.2.2. Fiziksel Özellikleri:

Pazopanib beyaz veya beyaza yakın renkte bir tozdur. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. En iyi çözünürlüğü dimetilsülfooksit'te 8,3 mg/mL dir. -20 C° 'de ağız kapalı ışık geçirmeyen kaplarda saklanmalı ve nemden korunmalıdır. Erime noktası 301-313 C° ve mol kütlesi 437,52 g/mol dür.

3.2.3. Farmakolojik Özellikler:

Pazopanib oral yolla uygulanıma yönelik, sırasıyla 10, 30, 47, 71, 84 ve 74 nM'lik IC50 değerleri ile Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörleri (VEGFR)-1, -2 ve -3, platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGFR)-a ve -0, ve kök hücre faktör reseptörünün (c-KIT) potent çok hedefli tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI). Klinik dışı deneylerde pazopanib hücrelerde VEGFR-2, c-Kit ve PDGFR-0 reseptörlerin ligand kaynaklı oto-fosforilasyonunu doza bağlı şekilde inhibe etmiştir. İn-vivo, pazopanib fare akciğerlerinde VEGF-kaynaklı VEGFR-2 fosforilasyonu, çeşitli hayvan modellerinde anjiyogenezi ve farelerde çoklu insan tümör ksenogreftlerinin büyümesini inhibe etmiştir [44].

3.2.4. Farmokinetik Özellikler:

800 mg tek doz pazopanibin solid tümörlü hastalara oral yoldan uygulanmasını takiben, ortalama 3,5 saat sonra (1,0 ila 11,9 saat aralığında) yaklaşık 19 ± 13 g/mL'lik maksimum plazma konsantrasyonu (Cmax) ve yaklaşık 650 ± 500 µg/mL'lik EEA, elde edilmiştir. Günlük dozlama EAA'da 1.23- ila 4-kat artışa neden olmaktadır.

3.2.5. Metabolizma

EAA veya Cmaks değerlerinde 800 mg'ın üstündeki pazopanib dozlarında tutarlı artış mevcut değildir. Pazopanib için sistemik maruziyet gıdalarla birlikte uygulandığında

artmaktadır. Yüksek oranda veya düşük oranda yağ içeren öğünlerle birlikte pazopanib uygulanımı EAA ve Cmaks değerlerinde yaklaşık 2 kat artışa neden olmuştur. Bu nedenle pazopanib öğünlerden en az 1 saat önce veya 2 saat sonra uygulanmalıdır.

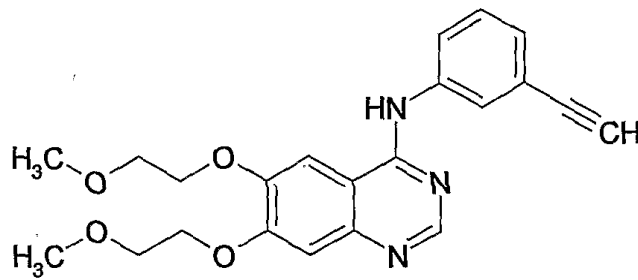
3.2.6. Eliminasyon

Bütün olarak uygulanan tablet ile kıyaslandığında, parçalanmış bir pazopanib 400 mg tabletin uygulanması, EAA(0-72)'yi %46 ve Cmax'ı yaklaşık 2 kat artırmış ve tmax'ı yaklaşık 2 saat azaltmıştır. Bu sonuçlar, tabletlerin bütün uygulanmasına kıyasla tabletlerin parçalanarak uygulanmasının ardından biyoyararlanımın ve pazopanibin oral absorpsiyon hızının arttığını göstermektedir [44]

Pazopanibin insan plazma proteinine in vivo dağılımı %99'un üstünde olup 10-100 µg/mL aralığında konsantrasyona bağlı değildir. İn vitro çalışmalar pazopanibin P-glikoprotein (Pgp) ve meme kanseri dirençli protein (BCRP) için bir substrat olduğunu düşündürmektedir [44]

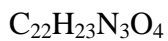
3.2.7. Erlotinib (iç standart):

Formül:



Şekil 3.2. Erlotinibin kimyasal formülü

Kapalı Formül:



Sistematik adı:

N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy) quinazolin-4-amine [45].

3.2.8. Fiziksel Özellikleri:

Erlotinib beyaz veya beyaza yakın renkte bir tozudur. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. En iyi çözünürlüğü DMSO'da 18 mg/ml. -20 C° 'de ağız kapalı ışık geçirmeyen kaplarda saklanmalı ve nemden korunmalıdır. Erime noktası 215-227 C° ve mol kütlesi 429,90 g/mol dür.

3.2.9. Farmokolojik Özellikler:

Erlotinib epidermal büyüme faktör reseptörü/insan epidermal büyüme faktör tip 1 reseptörünün (EGFR/HER1) tirozin kinaz inhibitörüdür. EGFR'ın intrasellüler fosforilasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder. EGFR/HER1 normal hücre ve kanser hücrelerinin hücre yüzeylerinde eksprese edilir. Klinik dışı modellerde, EGFR/HER1 fosfotirozinin inhibisyonu hücre stazı ve/veya ölümü ile sonlanmaktadır [45].

3.2.10. Farmokinetik Özellikler:**Emilim**

Oral erlotinib iyi emilir ve gecikmiş absorpsiyon süresine bağlı olarak ortalama doruk plazma düzeylerine oral dozdan yaklaşık 4 saat sonra ulaşılır. Normal sağlıklı gönüllülerdeki bir çalışmada yaklaşık %59'luk bir biyoyararlanım elde edilmiştir. Bir oral doz sonrasındaki biyoyararlanım, yiyeceklerle birlikte artırılabilir.

Ortalama maksimum plazma konsantrasyonları 1,995 ng/mL'ye ulaşır. 24. saatteki bir sonraki doza kadar, ortalama minimum plazma konsantrasyonları 1,238 ng/mL olur. Dozlama aralığında, kararlılık durumunda elde edilen ortalama eğri altı alan (EAA) 41,300 mcgsaat/mL'dir.

İlacın emilimini takiben, kanda erlotinibin, %95'i birincil olarak plazma proteinleri (albümin ve alfa-1 asit glikoprotein [AAG]) olmak üzere kan bileşenlerine bağlanırken, yaklaşık %5'lik bir kısmı serbest fraksiyon olarak bulunur [45].

Dağılım

Erlotinib, 232 L'lik ortalama sanal dağılım hacmine sahiptir ve insan tümör dokularına dağılır. Günlük 150 mg oral Tarceva dozu almakta olan 4 hastada yapılan bir çalışmada, tedavinin 9. günündeki cerrahi eksizyonlardan alınan tümör örnekleri, tümördeki erlotinib konsantrasyonlarının ortalama 1,185 ng/g doku olduğunu ortaya koymuştur. Bu da kararlı durumda gözlenen doruk plazma konsantrasyonlarının genel ortalamasının %63'üne karşılık gelmektedir. Birincil metabolitler tümörde ortalama 160 ng/g doku konsantrasyonunda saptanmış olup, bu kararlı durumda gözlenen doruk plazma konsantrasyonlarının genel ortalamasının %113'üne karşılık gelmektedir [45].

Metabolizma

Erlotinib insanlarda hepatic sitokrom P450 enzimleri tarafından, birincil olarak CYP3A4 ve daha az ölçüde CYP1A2 tarafından metabolize edilmektedir. CYP4A4'ün bağırsaktaki, CYP1A1'in akciğerdeki, CYP1B1'in tümör dokusundaki ekstrahepatik metabolizması erlotinibin metabolik klerensine potansiyel olarak yardım eder.

İn vitro çalışmalar erlotinib metabolizmasının yaklaşık %80-95'inin CYP3A4 enzimi ile olduğunu göstermektedir. Tespit edilen 3 ana yol mevcuttur: 1) yan zincirlerden biri veya her ikisinin O-demetilasyonu ve bunu takiben karboksilik aside oksidasyon; 2) asetilen kısmının oksidasyonu ve takiben aril karboksilik aside hidrolizi; ve 3) fenil-asetilen kısmının aromatik hidroksilasyonu. Yan zincirlerden birinin O-demetilasyonu ile oluşan birincil erlotinib metabolitleri prelinik in vitro deneyler ve in vivo tümör modellerindeki erlotinib ile karşılaştırılabilir etkiye sahiptir. Bunlar plazmada erlotinibin < %10'u oranında mevcut bulunup, erlotinib ile benzer farmakokinetik gösterirler [45].

Eliminasyon

Metabolitleri ve eser miktarda erlotinib birincil olarak feçes ile atılırken (>%90), renal eliminasyon bir oral dozun yalnızca küçük bir miktarına karşılık gelir [45].

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Genel Bilgi

Bu bölümde Pazopanibin HPLC optimizasyonunu ve bozunma ürünlerinin tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

4.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çizelge 4.1'de çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan cihazlar ve gereçler

Adı	Kullanım Amacı	Açıklama
HPLC Cihazı	LC kısmının optimizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır	Agilent Technologies 1200 Infinity
HPLC Kolonu	LC kısmının optimizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır	ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (2,1 × 50mm, 1,8µ)
HPLC Dedektör	LC kısmının optimizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.	DAD
Ultrasonik Banyo	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.	Bandelin SONOREX
Vortex	Çözeltilerin homojenizasyonunda kullanılmıştır	İKA Genius 3

Hassas Terazi	Katı maddelerin ölçümünde kullanılmıştır.	Mettler Toledo
Saf su cihazı	Kullanılacak saf suyun temini için kullanılmıştır.	Millipore Direct-Q 3UV (0,22µm)
Etüv	Sıcaklık ile bozundurma çalışmalarında	Memmert
UV kabini	UV ile bozundurma çalışmalarında	Prowhite Light Box II M
LC-MS/MS Cihazı	Bozunma ürünleri tayininde kullanılmıştır.	Agilent 6460 Triple Quad.
LC-MS/MS Kolonu	Bozunma ürünleri tayininde kullanılmıştır.	ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (2,1 × 50mm, 1,8µ)

4.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safliktadır. Bu çalışmada kullanılan bileşikler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri

Bileşik özellikleri	Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu	Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı
Pazopanib (Sigma)	UV@ 270 nm	C ₂₁ H ₂₃ N ₇ O ₂ S	437.517 g/mol
Erlotinib (Sigma)	UV@ 247 nm	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₄	393.436 g/mol

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum hidroksit	Bazik ortam bozundurması çalışmasında	Merck, analitik saflıkta
Hidroklorik asit	Asidik ortam bozundurması çalışmasında	Merck, analitik saflıkta
Hidrojen peroksit	Peroksit ile bozundurma çalışmasında	Tekkim, analitik saflıkta
Asetonitril HPLC grade	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam, hareketli faz.	Merck, HPLC saflığında
Asetonitril LC-MS grade	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam, hareketli faz.	Merck, LC-MS saflığında
Formik asit	LC-MS/MS çalışmalarında	Merck, Analitik Saflıkta

4.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışılan bileşiklerden Pazopanib 0,0050 g tartıldı, 5 mL DMSO'da çözülerek 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Erlotinib ise 0,001 g alınıp 5 mL dimetilsülfoksitte çözülüp 200 ppm stok çözeltisi hazırlanmış +4°C'de muhafaza edilmiştir. Her bir stok çözeltiden istenilen derişimde hareketli faz ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çalışma çözeltilerinden 1 µL sıvı kromatografi cihazına enjeksiyonu yapılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. HPLC Optimizasyon Çalışmaları

HPLC sistemine bileşikler enjekte edilmeden önce sistemin oturması ve kolonun şartlanması için 6 saat boyunca mobil faz cihaza verilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarından yola çıkılarak deneme yoluyla yapılan optimizasyon çalışmalarında en uygun şartlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu denemeler sonucunda mobil fazın içeriği, kolon sıcaklığı akış hızı, maximum absorbands yaptığı dalga boyu optimize edilip Kütle spektrometresi analizine geçilmeden önce tekniğin HPLC tarafı uygun hale getirilmiştir.

Bu optimizasyon çalışmalarında izokratik yöntem uygulanmış ve en uygun mobil faz seçimi; %0,1 Formik Asit ortamında %20 ACN-%80 H₂O, sıcaklık 40 C⁰ olarak belirlenmiştir, akış hızı 0,8 mL/dakika, ve maximum abrosbansı; Pazopanib 270 nm, İç standart olarak kullanılan Erlotinibin ise 247 nm olarak belirlenmiştir. Sistem optimize edilip Kütle Spektrometrisiyle çalışılmaya uygun hale getirilmiştir.

Kantitatif çalışmada iç standart yöntemi uygulanıp alıkonma zamanı ve pik şekilleri dikkate alınarak olan Erlotinib seçilmiştir.

Formik asit ise MS'de iyonlaştırıcı fonksiyon aldığı için HPLC ortam şartlarında farklılık oluşturmaması için kullanılmıştır.

Gün içi ve günler arası geri kazanım değerleri ve idrar numunesi örnekleri elde ettiğimiz kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplanmıştır.

4.2.2. Sabit Fazın Belirlenmesi

Çalışmada Ascentis RP Amide kolon, Gemini C-18, YMC-Pack ODS-AM, X-Terra C-18 ve ZORBAX Eclipse Plus C-18 kolonları kullanılmıştır. ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (2,1 × 50mm, 1,8µ), silika yüzeyinde serbest silanol grupları ile bazik analitlerin polar gruplarının etkileşimini engellemek için polar karbamat grubu içeren organosilan sübstientlerden oluşmuştur. Klasik silika-bazlı kolonlara göre daha geniş pH ve sıcaklık kararlılığına sahiptir. Bu kolonun avantajları; bazik analitler için önemli bir problem olan pik şeklinde düzelleme ve buna bağlı olarak kuyruklanma faktöründe azalma ve yüksek pH kararlılığı (2-9) arasındadır. Bütün bunlar dikkate alındığında en iyi ayırımı sağlamak için bu kolon tercih edilmiştir.

4.2.3. Hareketli Fazın Hızının Belirlenmesi

Hareketli faz kombinasyonu optimize edildikten sonra, akış hızının etkisi incelenmiştir. Bunun için 0,5-0,6-0,7-0,8-0,9 mL/dakika akış hızlarında elde edilen kromatogramlardaki pik şekilleri incelenmiştir. Analiz süresi ve ayırma gücü değerleri dikkate alındığında en uygun akış hızı 0,8 mL/dakika olduğu belirlenmiş ve çalışmalar boyunca 0,8 mL/dakika akış hızı kullanılmıştır.

4.2.4. İç Standardın Belirlenmesi

Pazopanib analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için, Bosutinib, Erlotinib, Canertinib denenmiştir. Seçicilik ve analiz süresi göz önüne alındığında iç standart olarak Erlotinibin kullanılması uygun görülmüştür.

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

5.1. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları

Geliştirilen analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri; Pazopanib ve Erlotinibin hazırlanan standartlarından HPLC-DAD sistemine 1 µL enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri % 20 (v/v) asetonitril-su; %0,1 formik asit, akış hızı 0,8 mL/dakika ve kolon sıcaklığının 40 °C olduğu koşullarda Çizelge 5.1. ve Çizelge 5.2.'de verilmektedir.

Çizelge 5.1. Pazopanib ve Erlotinibin (IS) alıkonma zamanları

	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
0,5pmm PZP	1,75	1,75	1,75	1,75
5ppmERLO	3,27	3,27	3,28	3,27
	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
1pmmPZP	1,757	1,76	1,762	1,76
5ppmERLO	3,26	3,29	3,29	3,29
	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
3pmmPZP	1,75	1,76	1,76	1,76
5ppmERLO	3,29	3,30	3,31	3,30
	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
5pmmPZP	1,76	1,76	1,76	1,76
5ppmERLO	3,30	3,31	3,31	3,31

	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
10ppmPZP	1,75	1,75	1,75	1,75
5ppmERLO	3,31	3,32	3,32	3,32
	(t _R)	(t _R)	(t _R)	t _{ort}
20ppmPZP	1,73	1,73	1,73	1,73
5ppmERLO	3,32	3,32	3,33	3,32

Çizelge 5.2. Çalışılan bileşikler için elde edilen alıkonma zamanları, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı değerleri

Bileşikler	t _R	k	T	N
Pazopanib	1,75	8,16	1,15	10465
Erlotinib	3,32	16,38	1,18	9585

5.2. Pazopanibin HPLC-DAD Yöntemi ile Analizinde Validasyon Parametreleri

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır [46-47-48-49-50]. Amerikan Farmakopesine göre validasyon, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, doğruluğunu, duyarlılığını, tekrarlanabilirliğini ve sağlamlığını belirtmektedir.

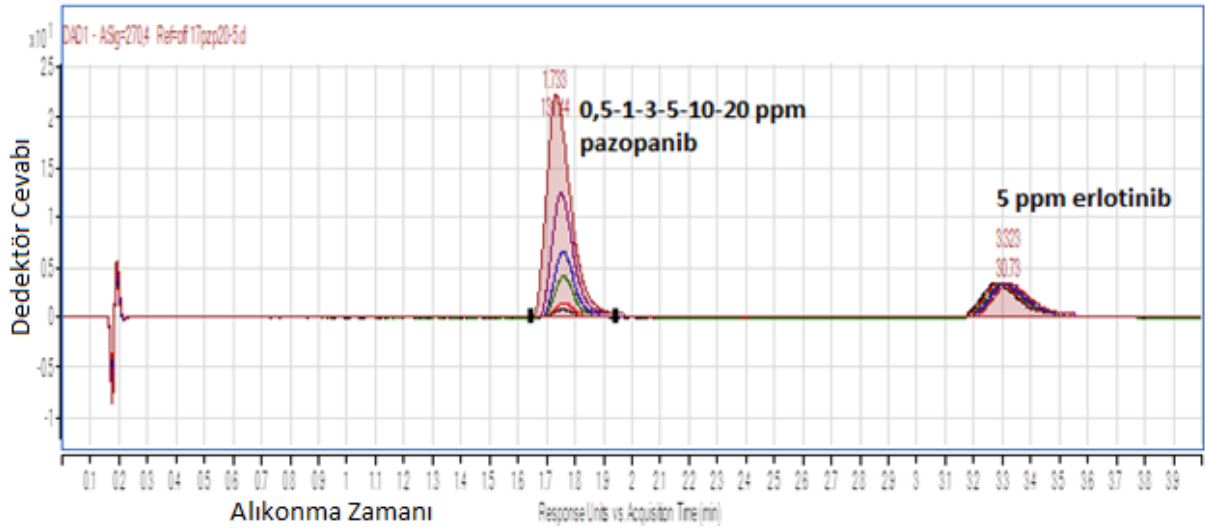
Pazopanibin HPLC yöntemi ile analizinde sabit faz olarak 40 °C’de ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (2,1 × 50mm, 1,8 µ) kolon, hareketli faz olarak asetronitril kullanılmıştır. Akış hızı 0,8 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin görüntülenmesinde Diode Array Dedektör (DAD) kullanılmıştır. Pazopanib için 270 nm ve erlotinib için 247 nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir. Bu koşullarda pazopanib ve

erlotinibin alıkonma zamanları sırasıyla 1,75 ve 3,33 dakikadır ve toplam analiz yaklaşık 4 dakikada tamamlanmaktadır. Çizelge 5.3.'te kalibrasyon alan oranları ve Şekil 5.1.'de alanları gösterir kromatogram verilmiştir.

Çizelge 5.3. Pazopanib ve Erlotinibin (IS) Kalibrasyon Alan Ve Oranları

0,5 ppm pazopanib+5ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	oran
0,5 ppm pazopanib	3,1	3,13	3,15	3,126667	0,097
5 ppm erlotinib	32	32,2	32,08	32,09333	
Ort	0,097	0,097	0,098	0,097	
1 ppm pazopanib+5 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	Ort	
1 ppm pazopanib	6,01	6,27	6,17	6,15	0,194
5 ppm erlotinib	31,71	31,58	31,69	31,66	
Ort	0,189	0,198	0,195	0,194	
3 ppm pazopanib+5 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
3 ppm pazopanib	19,5	18,56	18,52	18,86	0,597
5 ppm erlotinib	31,58	31,6	31,59	31,59	
Ort	0,617	0,587	0,586	0,597	

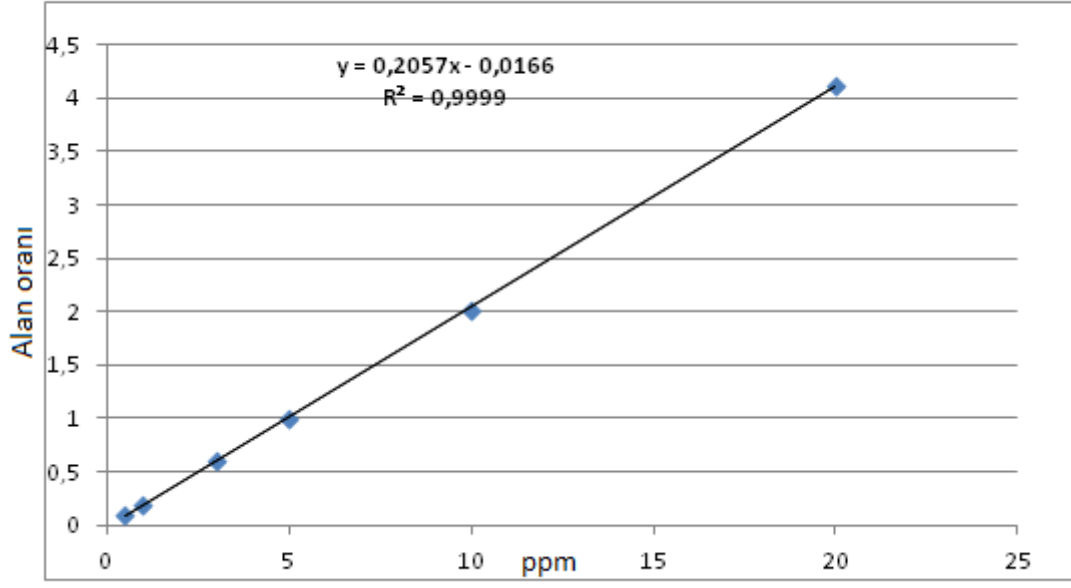
5 ppm pazopanib+5 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
5 ppm pazopanib	31,45	30,61	31,18	31,08	1,008
5 ppm erlotinib	30,9	30,8	30,79	30,83	
Ort	1,018	0,994	1,0127	1,008	
10 ppm pazopanib+5 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
10 ppm pazopanib	63,51	63,03	63,59	63,38	2,021
5 ppm erlotinib	31,37	31,36	31,35	31,36	
Ort	2,024	2,009	2,028	2,021	
20 ppm pazopanib+5 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
20 ppm pazopanib	128,37	128,46	128,81	128,55	4,108
5 ppm erlotinib	31,09	31,48	31,3	31,29	
Ort	4,129	4,081	4,115	4,108	



Şekil 5.1. 0,5-1-3-5-10-20 ppm Pazopanib ve 5 ppm Erlotinib (IS) HPLC Alan Oranı Kromatogramı

5.3. Kalibrasyon Alan Oranları

Pazopanib ve erlotinibin HPLC ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve kalibrasyon doğrusunun saptanmasında 0,5 ppm ile 20 ppm arasında farklı konsantrasyonlarda çözeltiler mobil faz ile hazırlanmış ve en az üç kez enjekte edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu, her bir derişim değeri için elde edilen alan oranlarının, derişim değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminde çalışılan bileşikler için 0,5 ppm ile 20 ppm derişimleri arasında doğrusallık saptanmıştır. Pazopanib analizi için optimize edilen HPLC yönteminde kalibrasyon fonksiyonu $y = 0,2057 x + 0,0166$; $R^2 = 0,9999$ Çizelge 5.4. alan oranları kullanılarak Şekil 5.2 kalibrasyon grafiğinde gösterilmiştir.



Şekil 5.2 Kalibrasyon Grafiği

Çizelge 5.4. Kalibrasyon Alan ve Oranları

derisim	oran	derisim	oran
0,5	0,09	0,5	0,09
1	0,19	1	0,19
3	0,59	3	0,59
5	1,01	5	1,01
10	2,02	10	2,02
20	4,10	20	4,11

5.4. Duyarlılık ve Doğrusallık

Pazopanibin HPLC-DAD yöntemi ile analizinde gözlenebilme sınırı (LOD) 0,0283 ppm ve tayin limiti (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (<%2) 0,0857 ppm olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 5.5.)

Çizelge 5.5. Doğrusallık Ve Duyarlılık Parametreleri

Regresyon Denklemi*	$y = 0,2057x - 0,0166$
Regresyon Katsayısı (R^2)	0,9999
Kalibrasyon Aralığı (ppm)	0,5-20
Eğimin Standart Hatası	0,0008
Kesimin Standart Hatası	0,0074
Teşhis Sınırı (ppm)	0,0283
Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,0857

* $y = ax + b$; x : (ppm) biriminde derişim, y: pazopanib alan oran değerleri, a : eğim, b :kesişim.

5.5. Doğruluk ve Kesinlik

Bileşiklerin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; 1, 5 ve 10 ppm konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=7) değerlendirme sonuçları Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Gün içi çalışmaları üç farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise yine üç farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 5.6. Gün İçi Geri Kazanım Değerleri n:7

1 ppm pzp	5 ppm erlo	oran	5 ppm pzp	5 ppm erlo	oran	10 ppm pzp	5 ppm erlo	oran
5,96	31,39	0,189	31,93	31,21	2,04	63,62	30,78	1,04
5,91	31,39	0,187	31,78	31,15	2,04	63,65	30,72	1,04
5,91	31,24	0,188	30,59	31,24	2,03	63,39	30,72	0,99
5,91	31,29	0,188	30,71	31,31	2,04	63,72	30,7	1,01
5,96	31,25	0,191	31,28	31,62	2,01	63,62	30,78	1,01
5,95	31,28	0,190	30,66	31,32	2,04	63,91	30,74	0,99
5,97	31,26	0,191	30,94	31,36	2,04	63,88	30,72	1,01

Çizelge 5.7. Gün İçi Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

GÜN İÇİ								
	1ppm		5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
0,189	1,00	100,37	1,04	5,12	102,47	2,04	9,99	99,91
0,187	0,99	99,44	1,04	5,11	102,19	2,04	10,01	100,1429
0,188	0,99	99,88	0,99	4,92	98,43	2,03	9,96	99,57
0,188	0,99	99,89	1,01	4,94	98,87	2,04	9,97	99,74
0,191	1,01	100,78	1,01	5,02	100,42	2,01	9,86	98,62
0,190	1,01	100,54	0,99	4,93	98,58	2,04	10,00	100,01
0,191	1,01	100,91	1,01	4,97	99,53	2,04	9,98	99,83
Std sapma	0,01	Ort. 100,26	Std sapma	0,08	Ort. 100,08	Std sapma	0,05	Ort. 99,69

Çizelge 5.8. Günler Arası Geri Kazanım Değerleri n:7

1 ppm pzp	5 ppm erlo	oran	5 ppm pzp	5 ppm erlo	oran	10 ppm pzp	5 ppm erlo	oran
5,89	30,94	0,19	31,83	30,72	1,04	63,34	31,25	2,03
5,89	31,08	0,18	31,16	30,59	1,02	63,33	31,17	2,03
5,90	31,06	0,18	31,35	30,71	1,02	63,36	30,94	2,05
5,92	31,23	0,18	30,99	30,62	1,01	63,85	31,41	2,03
5,91	31,09	0,19	31,08	30,68	1,01	63,67	31,33	2,03
5,90	31,05	0,19	31,50	30,81	1,02	63,57	31,05	2,05
5,94	31,15	0,19	31,26	30,9	1,01	63,59	31,16	2,04

Çizelge 5.9. Günler Arası Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

GÜN ARASI								
	1ppm		5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
0,19	1,01	100,62	1,04	5,12	102,36	2,03	9,93	99,34
0,18	1,01	100,19	1,02	5,03	100,65	2,03	9,96	99,58
0,18	1,00	100,42	1,02	5,04	100,87	2,05	10,03	100,36
0,18	1,00	100,22	1,01	5,00	100,02	2,03	9,96	99,63
0,19	1,00	100,48	1,01	5,01	100,11	2,03	9,96	99,60
0,19	1,00	100,45	1,02	5,05	101,02	2,05	10,03	100,34
0,19	1,01	100,77	1,01	4,99	99,98	2,04	10,00	100,02
Std sapma	0,002	Ort. 100,45	Std sapma	0,04	Ort. 100,72	Std sapma	0,04	Ort. 99,84

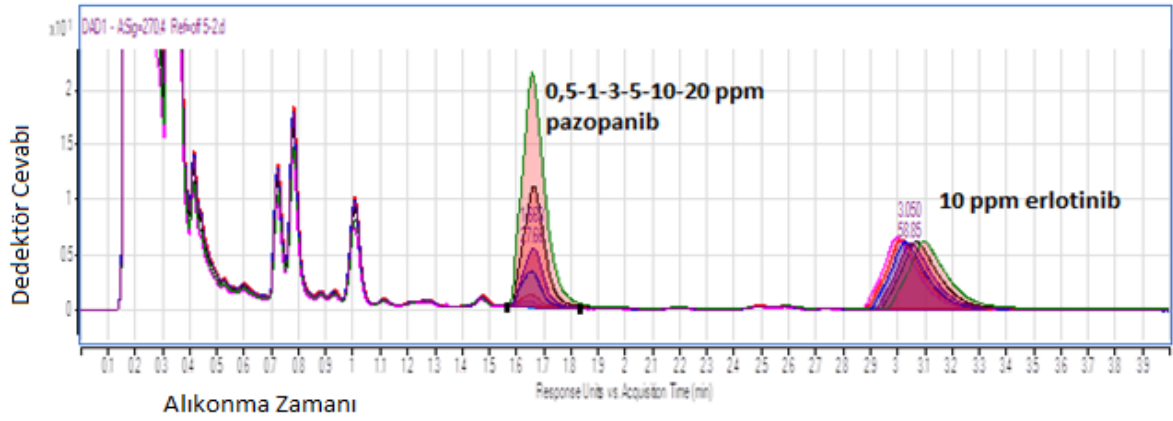
Çizelge 5.10. Pazopanibin HPLC Yöntemi İle Analizine Ait Gün İçi ve Günler Arası Bulguları

Çalışılan bileşiklerin derişimleri ($\mu\text{g/ml}$)	Gün içi		Günler arası	
	% Ortalama Kazanım \pm SS	Geri	% Ortalama Kazanım \pm SS	Geri
Pazopanib 1ppm	100.2 \pm 0.5		100.4 \pm 0.2	
5ppm	100.1 \pm 1.6		100.4 \pm 0.4	
10ppm	99.7 \pm 0.5		99.8 \pm 0.4	

5.6. Yöntemin Gerçek Numuneye Uygulanması (idrar numunesi)

Geliştirilen HPLC-DAD yöntemi Pazopanibin idrar numunesinden tayini için standart ilave yöntemi kullanılmıştır. Geri kazanım çalışmalarında, saf pazopanib katkısı yapılan idrar numunelerinin analizi yapılmıştır. İdrar numuneleri sağlıklı bireylerden günlük olarak alındı. Alınan idrar numuneleri 0,45 μm PTFE filtrelerden süzülerek herhangi bir çöktürme işlemi uygulanmadan direkt olarak kullanılmıştır. İç standart olarak kullanılan Erlotinibin derişimi 10 ppm'de sabit tutulmuştur. 5 ppm kullanılmasının sebebi idrar numunesindeki elde edilen alanların yeterli düzeyde olmamasıdır. Elde edilen piklerin alan değerleri, ilgili kalibrasyon fonksiyonlarında yerine konularak geri kazanım miktarları hesaplanmıştır.

Geliştirilen yöntemle elde edilen kromatogram 0,5-1-3-5-10-20 ppm Pazopanib ve 10 ppm Erlotinib(IS); Şekil 5.3'te, analiz sonuçları ise Çizelge 5.11'de verilmiştir.



Şekil 5.3. İdrar numunesinde 0,5-1-3-5-10-20 ppm Pazopanib ve 10 ppm Erlotinib (IS) katkılı kromatogram

Çizelge 5.11. Pazopanib ve Erlotinibin (IS) alan oranları (İdrar numunesi)

0,5 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	oran
0,5 ppm pazopanib	2,16	2,15	2,12	2,14	0,03
10 ppm erlotinib	62,12	61,51	61,29	61,63	
Ort	0,03	0,03	0,03	0,03	
1 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
1 ppm pazopanib	5,96	5,77	5,65	5,79	0,09
10 ppm erlotinib	59,55	59,83	60,18	59,85	
Ort	0,10	0,09	0,09	0,09	

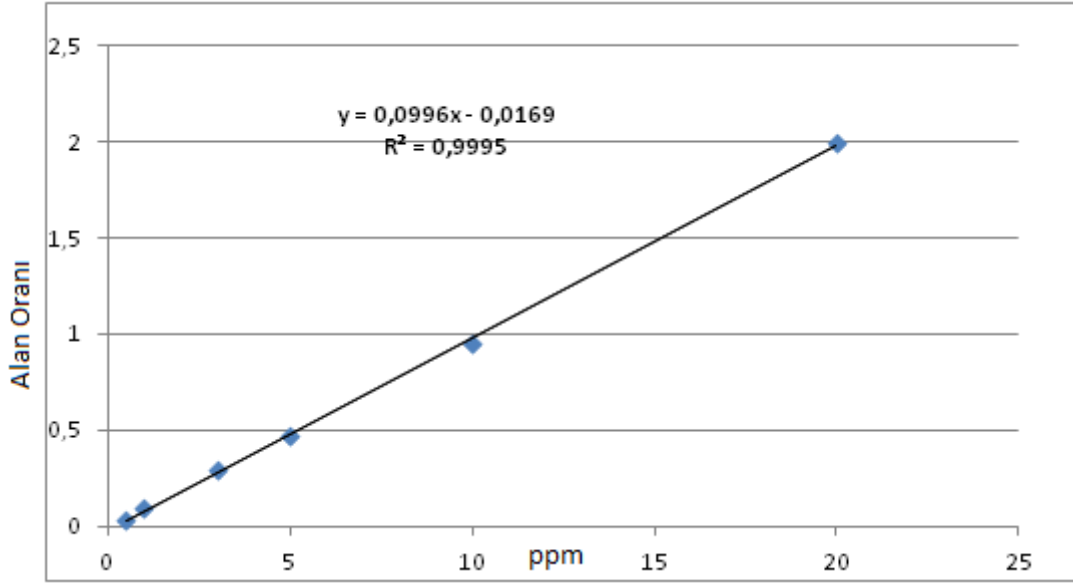
3 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
3 ppm pazopanib	17,2	17,03	17,05	17,09	0,29
10 ppm erlotinib	58,73	58,49	58,79	58,67	
Ort	0,29	0,29	0,29	0,29	
5 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
5 ppm pazopanib	27,28	27,66	27,58	27,50	0,46
10 ppm erlotinib	58,94	58,85	58,98	58,92	
Ort	0,46	0,47	0,46	0,46	
10 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
10 ppm pazopanib	58	57,79	57,86	57,88	0,95
10 ppm erlotinib	60,64	60,66	60,83	60,71	
Ort	0,95	0,95	0,95	0,95	
20 ppm pazopanib+10 ppm erlotinib					
	Alan	Alan	Alan	ort	
20 ppm pazopanib	120,46	121	120,92	120,79	1,98
10 ppm erlotinib	60,6	60,91	60,68	60,73	
Ort	1,98	1,98	1,99	1,98	

5.6.1. İdrar Numunesi Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon doğrusu, her bir derişim değeri için elde edilen pik alan oranlarının, derişim değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminde çalışılan bileşikler için 0,5 ppm ile 20 ppm derişimleri arasında doğrusallık saptanmıştır. Pazopanibin idrara ilavesi ile yapılan analizi için optimize edilen HPLC yönteminde kalibrasyon fonksiyonu $y = 0,0996 x + 0,0169$; $R^2 = 0,9995$ olarak saptanmıştır. Çizelge 5.12. alan oranları kullanılarak Şekil 5.4. kalibrasyon grafiğinde gösterilmiştir.

Çizelge 5.12. Kalibrasyonda kullanılan alan oranları (idrar numunesi)

derişim	oran	derişim	Oran
0,5	0,03	0,5	0,03
1	0,09	1	0,09
3	0,29	3	0,03
5	0,46	5	0,46
10	0,95	10	0,95
20	1,98	20	1,99



Şekil 5.4. İdrar Numunesi Kalibrasyon Grafiği

5.6.2. Duyarlılık ve Doğrusallık

Pazopanibin idrar numunesi HPLC-DAD yöntemi ile analizinde gözlenebilme sınırı (LOD) 0,0832 ppm ve tayin limiti (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (<%2) 0,2521 ppm olarak hesaplanmıştır. Çizelge 5.13.

Çizelge 5.13. İdrar Numunesi Doğrusallık ve Duyarlılık Parametreleri

Regresyon Denklemi*	$y = 0,0996x - 0,0169$
Regresyon Katsayısı (R^2)	0,9995
Kalibrasyon Aralığı (ppm)	0,5-20
Eğimin Standart Hatası	0,0011
Kesimin Standart Hatası	0,0105
Teşhis Sınırı (ppm)	0,0832
Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,2521

* $y = ax + b$; x : ppm biriminde derişim, y: pazopanibin alan oran değerleri, a : eğim, b :kesişim.

5.6.3. Doğruluk ve Kesinlik

Gün içi çalışmaları üç farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise yine üç farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 5.14. İdrar numunesi gün iç geri kazanım alan ve oranları n:5

1 ppm pzp	10 ppm erlo	oran	5 ppm pzp	10 ppm erlo	oran	10 ppm pzp	10 ppm erlo	oran
6,17	58,54	0,11	28,39	59,29	0,94	56,56	60,35	0,47
6,09	58,29	0,10	28,09	59,08	0,94	57,02	60,67	0,47
6,10	58,02	0,11	28,17	58,98	0,94	57,03	60,50	0,48
6,42	57,98	0,11	28,19	59,06	0,94	57,02	60,50	0,48
6,21	58,08	0,11				56,94	60,59	0,48

Çizelge 5.15. İdrar Numunesi Gün İçi Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

GÜN İÇİ								
	1ppm		5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
58,54	1,23	122,79	0,47	4,98	99,54	0,94	9,56	95,79
58,29	1,22	121,87	0,47	4,94	98,87	0,94	9,61	96,06
58,02	1,23	122,53	0,48	4,97	99,30	0,94	9,63	96,34
57,98	1,28	128,14	0,48	4,96	99,24	0,94	9,64	96,35
58,08	1,24	124,32	0,48	4,94	98,84	0,94	9,61	96,05
Std Sapma	0,025206	Ort. 123,93	Std Sapma	0,02	Ort. 99,16	Std Sapma	0,02	Ort. 96,12

Çizelge 5.16. İdrar Numunesi Günler Arası Geri Kazanım Alan ve Oranları n:5

1 ppm pzp	10 ppm erlo	oran	5 ppm pzp	10ppm erlo	Oran	10 ppm pzp	10 ppm erlo	oran
6,65	59,35	0,11	28,11	59,58	0,47	56,48	60,93	0,93
6,01	58,33	0,10	28,17	59,87	0,47	56,4	60,78	0,93
5,87	58,41	0,10	28,15	59,44	0,47	56,91	60,82	0,94
5,94	58,81	0,10	28,09	59,62	0,47	56,33	60,99	0,92
5,95	58,86	0,10	27,94	59,39	0,47	56,2	60,91	0,92

Çizelge 5.17. İdrar Numunesi Günler Arası Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

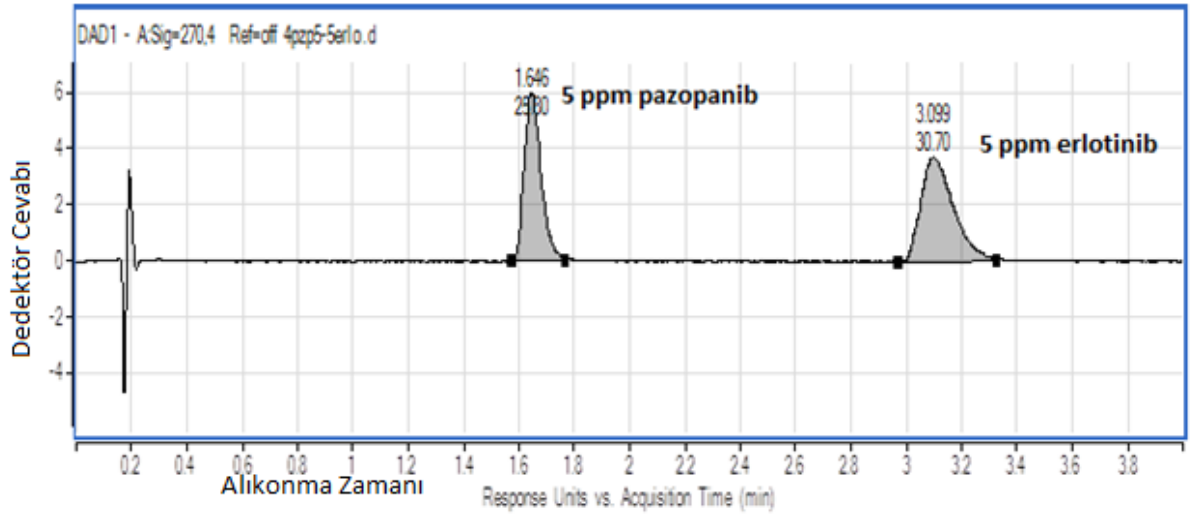
GÜN ARASI								
	1ppm		5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
0,11	1,29	129,47	0,47	4,91	98,13	0,93	9,48	94,77
0,10	1,20	120,42	0,47	4,89	97,88	0,93	9,49	94,86
0,10	1,18	117,87	0,47	4,92	98,49	0,94	9,56	95,64
0,10	1,18	118,38	0,47	4,90	98,00	0,92	9,44	94,42
0,10	1,18	118,46	0,47	4,89	97,86	0,92	9,43	94,33
Std Sapma	0,05	Ort. 120,92	Std Sapma	0,01	Ort. 98,07	Std Sapma	0,05	Ort. 94,81

Çizelge 5.18. Pazopanibin İdrar Numunesine Enjeksiyonunun HPLC Yöntemi İle Analizine Ait Gün İçi ve Günler Arası Bulguları

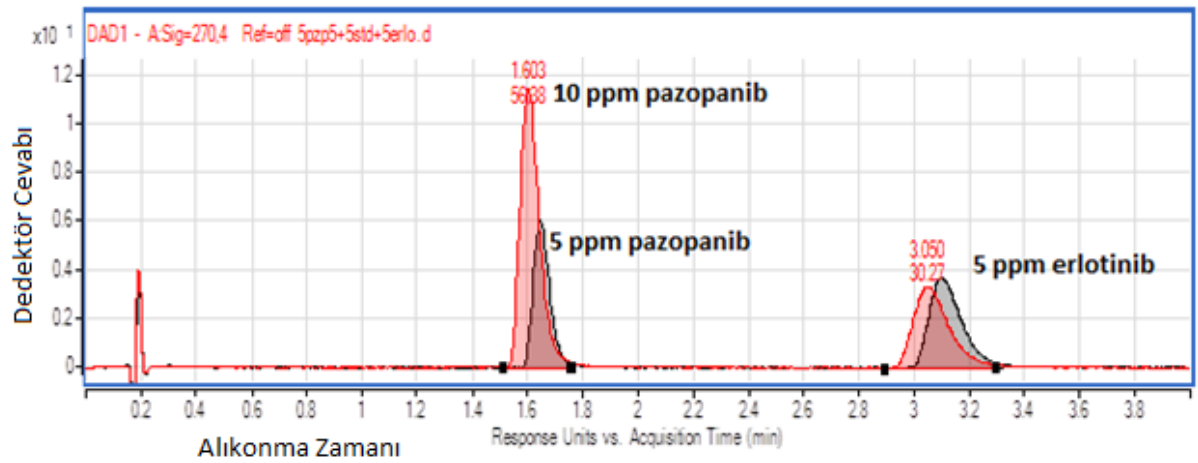
Çalışılan bileşiklerin derişimleri ($\mu\text{g/ml}$)	Gün içi		Günler arası
	% Ortalama Kazanım \pm SS	Geri	% Ortalama Geri Kazanım \pm SS
Pazopanib 1ppm	123,93 \pm 0,02		120,92 \pm 0,05
5ppm	99.16 \pm 0,02		98,07 \pm 0,01
10ppm	96,12 \pm 0,02		94,81 \pm 0,05

5.7. Tablet Analizi Ve Geri Kazanım Oranları

İlaç formülasyonu içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bilinen miktarda hazırlanan Pazopanib içeren ilaç formülasyon numunelerinin üzerine, yine bilinen miktarda saf Pazopanib ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda mobil fazda seyreltilmiş örneklerin % geri kazanım değerleri bulunmuştur. Geri kazanım çalışmalarında elde edilen kromotogram Şekil 5.5.-5.6'da verilmiş, çıktılar ve hesaplamalar Çizelge 5.19-5.20.'de ve sonuçlar Çizelge 5.21'de verilmiştir.



Şekil 5.5. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen kromatogram



Şekil 5.6. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen katkılı ve katkısız kromatogram

Çizelge 5.19. Pazopanib ve Erlotinib İçeren Tablet Numunesinden Elde Edilen Alan ve Oranları n:10

5 ppm pzp	5 ppm erlo		10 ppm pzp	5 pp merlo	
26,94	27,87	0,97	56,53	27,71	2,04
26,84	27,37	0,98	56,69	27,74	2,04
26,84	27,63	0,97	56,59	27,69	2,04
26,88	27,73	0,97	56,36	27,71	2,03
26,86	27,92	0,96	56,44	27,78	2,03
26,78	27,95	0,96	56,3	27,7	2,03
26,84	27,84	0,96	56,21	27,77	2,02
26,84	27,8	0,97	56,4	27,72	2,03
26,88	27,77	0,97	56,16	27,76	2,02
26,83	27,72	0,97	56,33	27,84	2,02

Çizelge 5.20. Pazopanib ve Erlotinib İçeren Tablet Numunesinden Elde Edilen Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

Tablet Numunesi					
5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
0,97	4,78	95,59	2,04	9,99	99,98
0,98	4,85	96,96	2,04	10,02	100,16

0,97	4,80	96,06	2,04	10,02	100,16
0,97	4,79	95,86	2,03	9,97	99,69
0,96	4,76	95,15	2,03	9,96	99,58
0,96	4,74	94,7	2,03	9,92	99,21
0,96	4,77	95,35	2,02	9,92	99,21
0,97	4,77	95,49	2,03	9,97	99,72
0,97	4,79	95,73	2,02	9,92	99,16
0,97	4,79	95,72	2,02	9,92	99,17
Std		Ort.	Std		
Sapma	0,03	95,67	Sapma	0,04	Ort. 99,60

Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve on bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise yine iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 5.21. Pazopanib Katkılı Tablet Numunesinin HPLC Yöntemi İle Analizine Ait Geri Kazanım Bulguları

Çalışılan bileşiklerin derişimleri ($\mu\text{g/ml}$)	Geri kazanım	
	% Ortalama Geri Kazanım \pm SS	
Pazopanib 5 ppm	95,67 \pm 0,03	
10 ppm	99,60 \pm 0,04	

5.8. Tablet - Geri Kazanım Çalışmaları

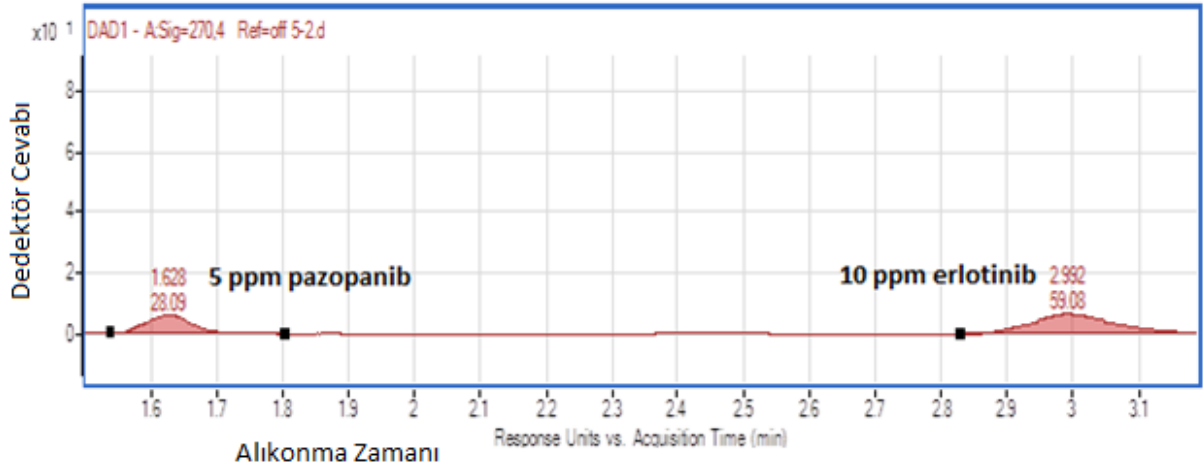
Pazopanib tayini için geliştirilen HPLC-DAD yöntemi piyasa preparatlarına uygunlanmıştır. İlaç formülasyonu katkı maddelerinin yõteme bir etkisinin olup olmadığını anlamak için de geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Pazopanib etken maddesini içeren ilaç formülasyonunun miktar tayini yapabilmek amacı ile GLAXO SMITHKLINE firmasından temin edilen Votrient® isimli ilaçtan 20 adet blisterlik paketteki ilaç formülasyonu alınarak tartılmıştır. Ortalama bir tabletin ağırlığı tartılarak tablet çözeltileri hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında, Pazopanib içeren ilaç formülasyon çözeltilerinin analizi yapılmıştır. Elde edilen piklerin alan değerleri, ilgili kalibrasyon fonksiyonlarında yerine konularak tabletlerin içerdiği Pazopanib miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle elde edilen Çizelge 5.22’de verilmiştir.

Çizelge 5.22. Pazopanibin İlaç Formülasyonu Ve Geri Kazanım Sonuçlarına Ait Veriler

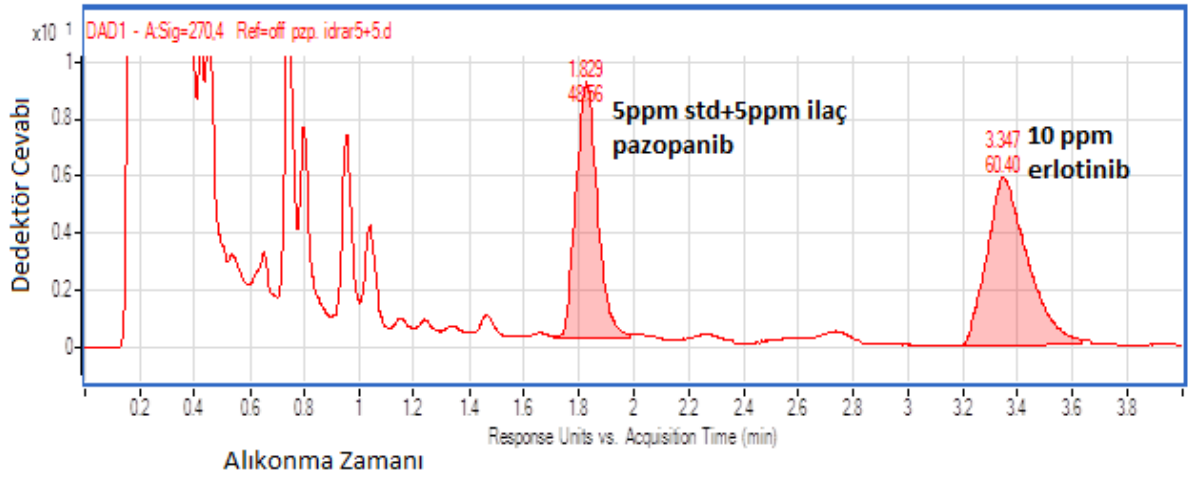
	Pazopanib
Konulduğu belirtilen miktar (mg)	200
Bulunan miktar (mg)	199,2
% Bağlı standart sapma (BSS)	0,41
% Hata	0,04
Eklene (mg)	200
Bulunan (mg)	400,12
% Geri kazanım	100,03
% Bağlı standart sapması (BSS)	0,393
% Hata	0,394

5.9. Pazopanib katkılı idrar numunesinin HPLC yöntemi ile analizi ve geri kazanım oranları

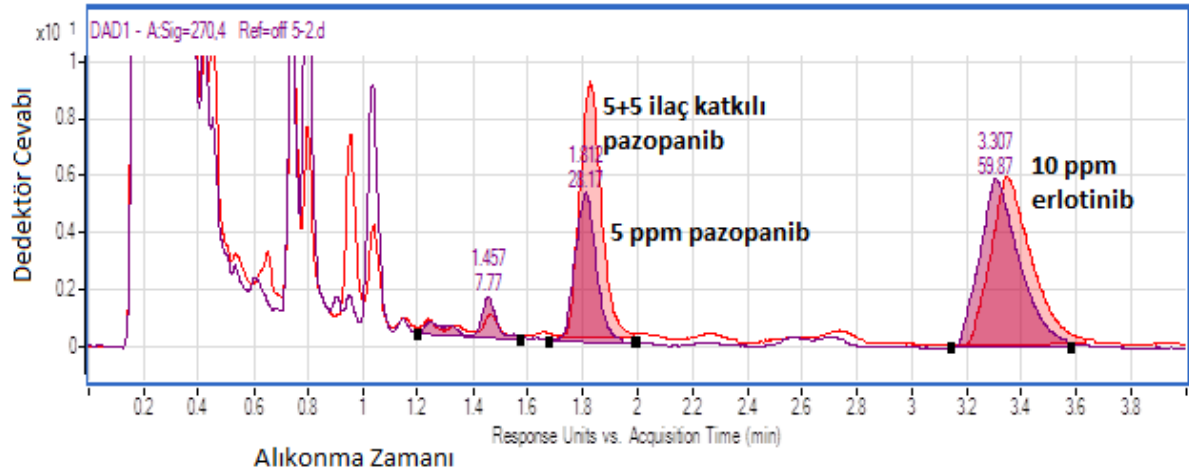
Bilinen miktarda hazırlanan Pazopanib içeren idrar numuneleri üzerine, yine bilinen miktarda saf Pazopanib ilave edilmiş ve gerekli hesaplamalar sonucunda seyreltilmiş idrar örneklerin % geri kazanım değerleri bulunmuştur. Geri kazanım çalışmalarında elde edilen kromatogram Şekil 5.7.-5.8.-5.9.'da verilmiş, çıktılar ve hesaplamalar Çizelge 5.23-5.24.'de sonuçlar Çizelge 5.25'de verilmiştir.



Şekil 5.7. Pazopanib ve Erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen kromatogram



Şekil 5.8. Pazopanib ve Erlotinib içeren idrar numunesinden elde edilen katkılı kromatogram



Şekil 5.9. Pazopanib ve Erlotinib içeren tablet numunesinden elde edilen katkılı ve katkısız kromatogram

Çizelge 5.23. Pazopanib ve Erlotinib İçeren İdrar Numunesinden Elde Edilen Alan ve Oranları n:5

5 ppm pzp	10 ppm erlo	Alan oranı	10 ppm pzp	10 ppm erlo	Alan oranı
28,16	59,65	0,47	56,6	60,85	0,93
28,19	59,89	0,47	56,86	60,75	0,94
28,89	59,54	0,49	56,96	60,81	0,93
28,12	59,76	0,47	56,66	60,96	0,92
28,96	59,48	0,49	56,75	60,91	0,93

Çizelge 5.24. Pazopanib ve Erlotinib İçeren İdrar Numunesinden Elde Edilen Geri Kazanım Hesaplama Çizelgesi

5ppm			10ppm		
Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100	Alan oranı	Hesaplanan Değer	Derişim ×100
0,47	4,91	98,19	0,93	9,51	95,08
0,47	4,8955	97,91	0,94	9,57	95,67
0,49	5,04	100,82	0,94	9,57	95,74
0,49	5,06	101,17	0,92	9,44	94,43
0,47	4,89	97,88	0,93	9,52	95,24
Std sapma	0,08	Ort. 99,19	Std sapma	0,05	Ort. 95,23

Çizelge 5.25. Pazopanib Katkılı İdrar Numunesinin HPLC Yöntemi İle Analizine Ait Geri Kazanım Bulguları

Çalışılan bileşiklerin derişimleri ($\mu\text{g/ml}$)	Geri kazanım	
	% Ortalama Geri Kazanım \pm SS	
Pazopanib 5 ppm	99,19 \pm 0,08	
10 ppm	95,23 \pm 0,05	

5.10. Bozunma Çalışmaları

5.10.1. LC-MS/MS Yönteminin Optimizasyonu

LC optimizasyonu

Kullanılan cihaza ait optimize edilmiş analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Enjeksiyon hacmi : 1 μL

Akış hızı : 0,8 mL/dakika

Süre : 4 dakika

Pazopanibin bozunma ürünleri tayin deneyleri için optimum LC-MS/MS koşulları saptanmıştır. Bu amaçla izokratik yöntem denenmiş, sıcaklık 40 °C, akış hızı 0,8 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Hareketli faz olarak ACN-su karışımı kullanılmış ve bu çözeltiye MS iyonlaşmasını sağlayabilmek için %0,1 (v/v) oranında formik asit eklenmiştir.

Öncelikle mobil faz olarak %50 ACN-su çözeltisi denenmiştir fakat Pazopanib kolondan çok kısa sürede elüe olduğu için %30 ve %20 ACN-su çözeltisinde çalışmalar yapılmıştır. Mobil faz olarak %20 ACN-su çözeltisi tercih edilmiştir.

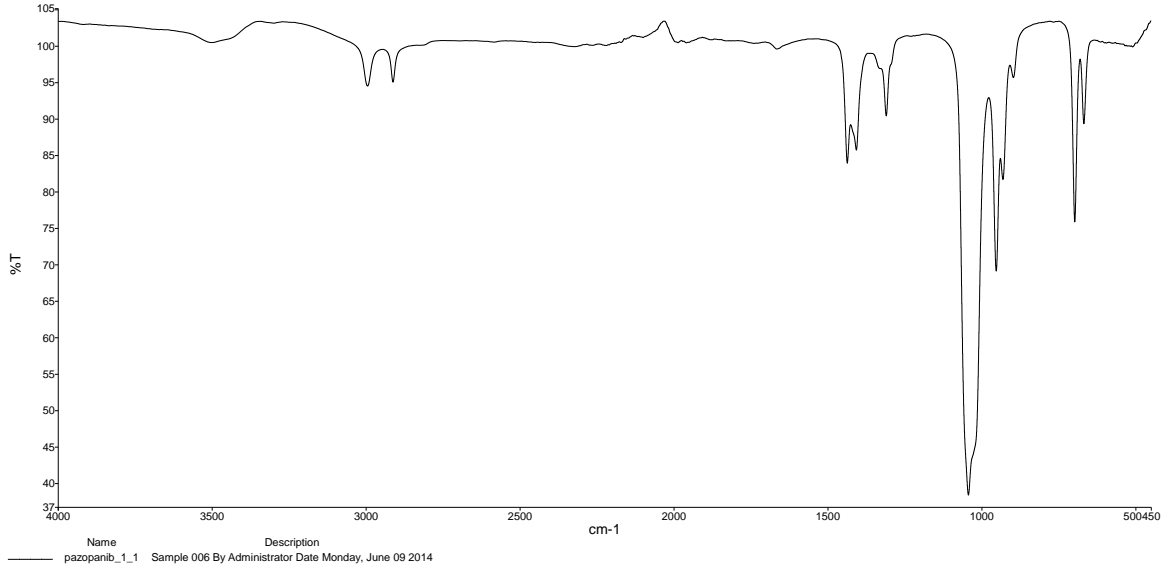
Pazopanibin bozunma ürünlerinin tayini için madde; asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik ortamlarda stres testlerine tabi tutulmuştur. LC-MS/MS cihazı MS kısım şartları Çizelge 5.26.'de verilmiştir.

Çizelge 5.26. MS çalışma koşulları

Gaz Sıcaklığı (°C)	325
Gaz Flow (L/min)	11
Nebulizer (psi)	45
Sheat Gaz Heater (°C)	400
Sheat Gaz Flow (l/min)	12
Capillary (V)	3000
V Charging (V)	500
İyon Source	AJS-ESI
İyon Mod	ESI POZİTİF JET STREAM
Scan Type	MS2 SCAN

5.11. Standart maddelerin saflık kontrolü

Deneyleerde kullanılan standart maddeler analitik saflıktadır. Ancak, bu maddelerin çabuk bozunması (ışıkta, havadan vs) nedeniyle saflık kontrolleri IR spektrumları alınarak yapılmıştır. Pazopanib için elde edilen infrared spektrumu incelendiğinde 690-760 ve 1030-1070 cm^{-1} aralığında çıkan pikler aromatik grubun düzlem dışı eğilmesi 1380-1450 cm^{-1} aralığında çıkan pikler alifatik C-H düzlem dışı eğilmesi, 2500-3000 cm^{-1} aralığında O-H gerilmesine ait olan piklerdir. Bu sonuçlardan Pazopanibin bu çalışmayı etkileyebilecek herhangi bir safsızlık içermediği sonucuna varılmıştır. Pazopanibin IR spektrumu şekil 5.10. de verilmiştir.



Şekil 5.10. Pazopanib için IR spektrumu

5.12. MS bozunurluk çalışmaları

Pazopanibin LC-MS/MS yöntemi ile olası bozunma ürünlerinin önerilmesi amacıyla tabi tutuldukları stres koşulları ICH Guideline klavuzuna göre yapılmıştır. Çizelge 5.27. 'de verilmiştir [51].

Çizelge 5.27. Pazopanibe uygulanan stres koşulları

Uygulanan Stres Koşulu	Bekleme Süresi
1M HCl	30 dk (100 ⁰ C'de)
1M NaOH	30 dk (100 ⁰ C'de)
%3-%30 H ₂ O ₂	30 dk (100 ⁰ C'de)
Termal	6-24 saat (100 ⁰ C'de)
UV 254 nm	6-24 saat oda şartlarında

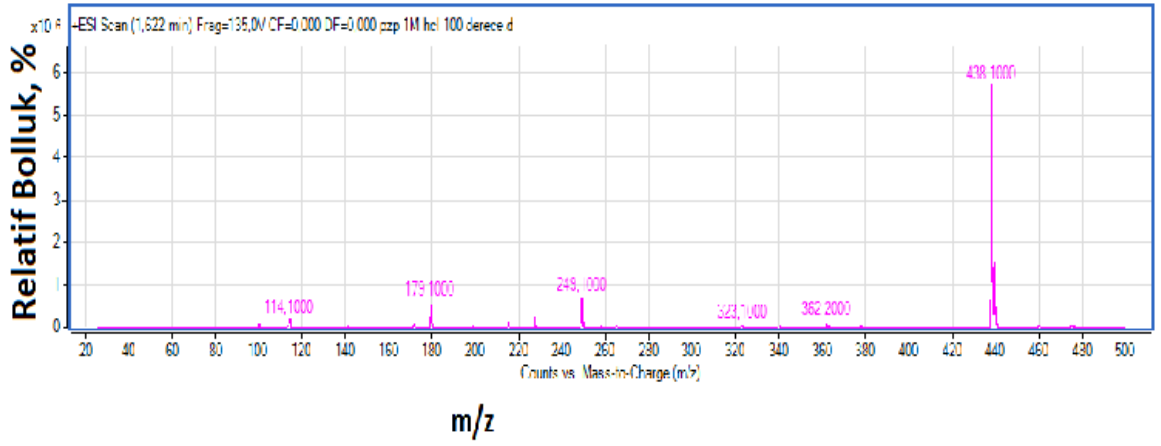
5.13. Pazopanibin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi Deneyleri

Pazopanibin bozunma ürünlerinin tayini için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla etken madde asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullarda stres testlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla 1000 ppm etken madde mobil faz ile 10 ppm'e seyreltilmiştir. Deneyler sonucunda pazopanibin asidik, bazik, termal ve ultraviole ışık altındaki stres koşullarında oldukça kararlı olduğu ve stabil kaldığı gözlenmiş ancak oksidatif bozunmaya daha hassas olduğu belirlenmiştir.

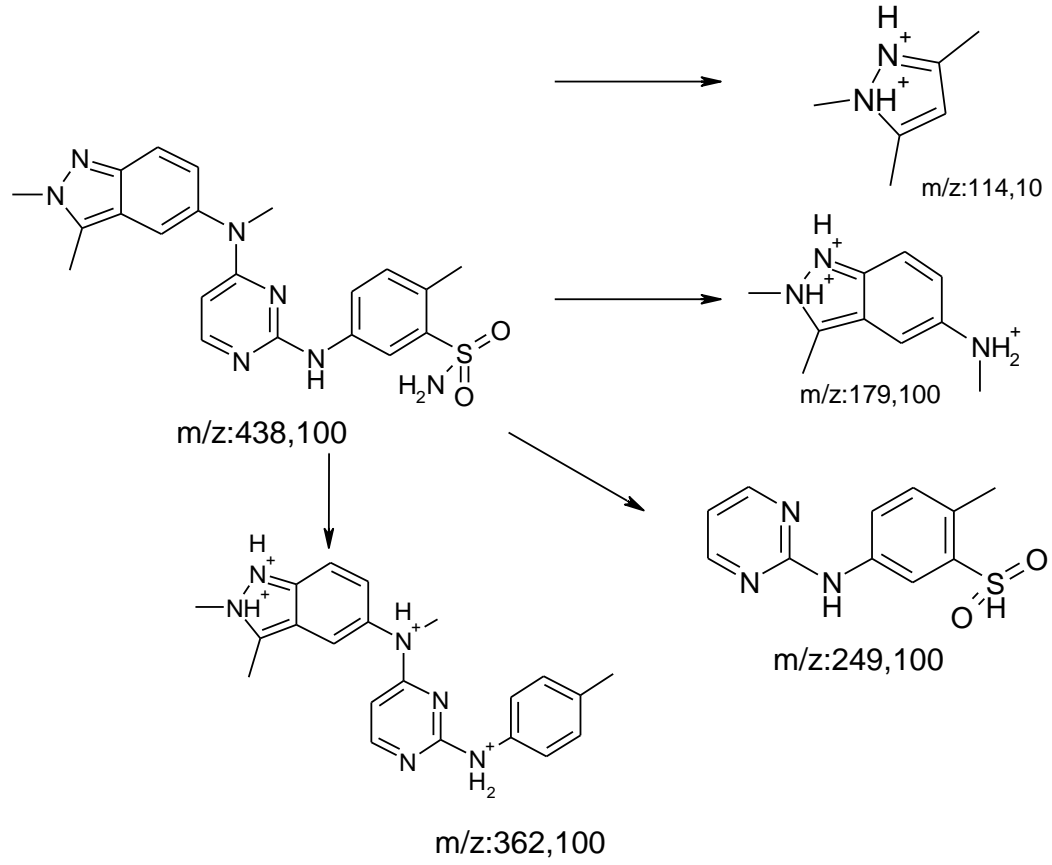
Normal koşullardaki ve stres koşullarındaki spektrumlar karşılaştırıldığında bu durum belirgin bir şekilde görülmektedir.

5.13.1. Pazopanibin Asidik Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri

Asidik koşullar altındaki bozunurluk ürünleri stok çözeltiden 1 N HCl ile 10 ppm'e seyreltme yapılarak elde edilmiştir. Yapılan testte Pazopanibin asidik koşullar altında stabil kaldığı tükenmediği görülmüştür Şekil 5.11. Bozunma ürünü olarak 4 majör pik değerlendirilmiş ve şematize edilmiştir. Şekil 5.12.



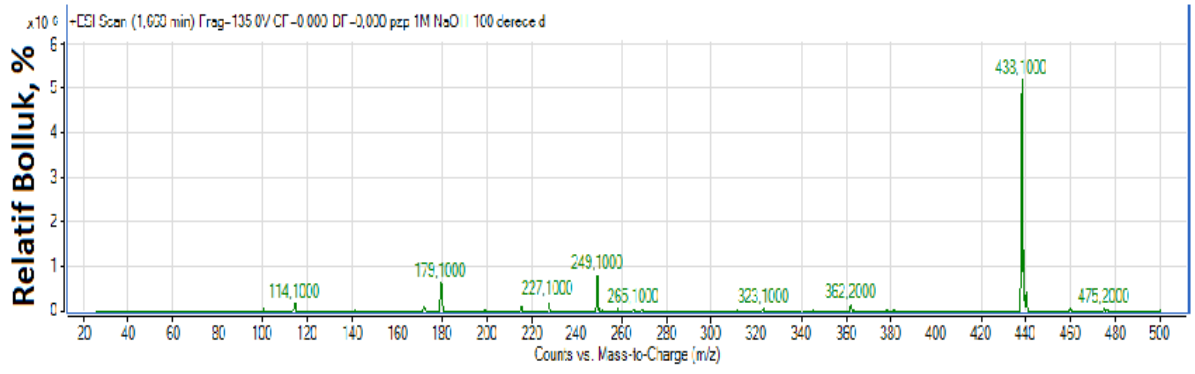
Şekil 5.11. Pazopanibin 1M HCl çözeltisindeki MS spektrumu



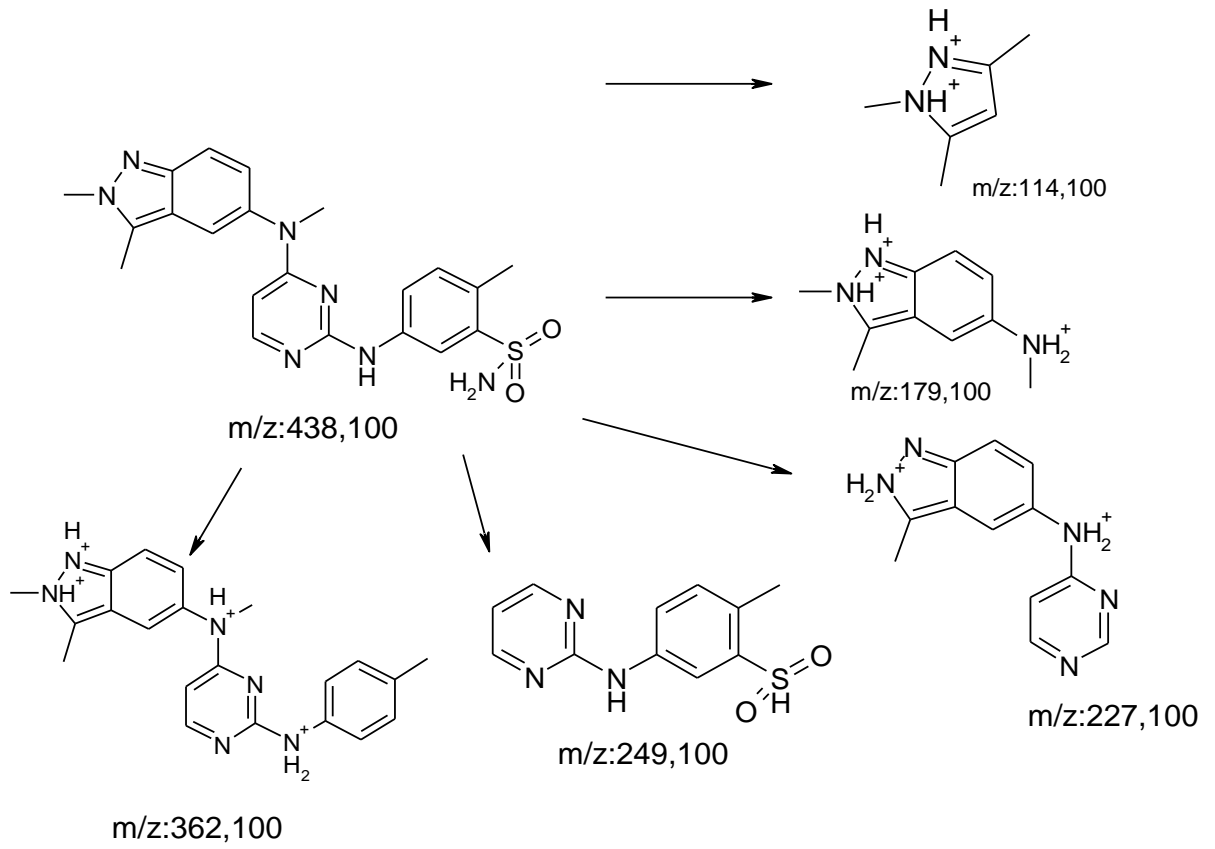
Şekil 5.12. Pazopanibin asidik koşullar altındaki parçalanma ürünleri

5.13.2. Pazopanibin Bazik Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri

Bazik koşullar altındaki bozunurluk ürünleri stok çözeltilerden 1 N NaOH ile 10 ppm'e seyreltme yapılarak elde edilmiştir. Yapılan testte Pazopanibin bazik koşullar altında stabil kaldığı tükenmediği görülmüştür Şekil 5.13. Bozunma ürünü olarak 5 majör pik değerlendirilmiş ve şematize edilmiştir. Şekil 5.14.



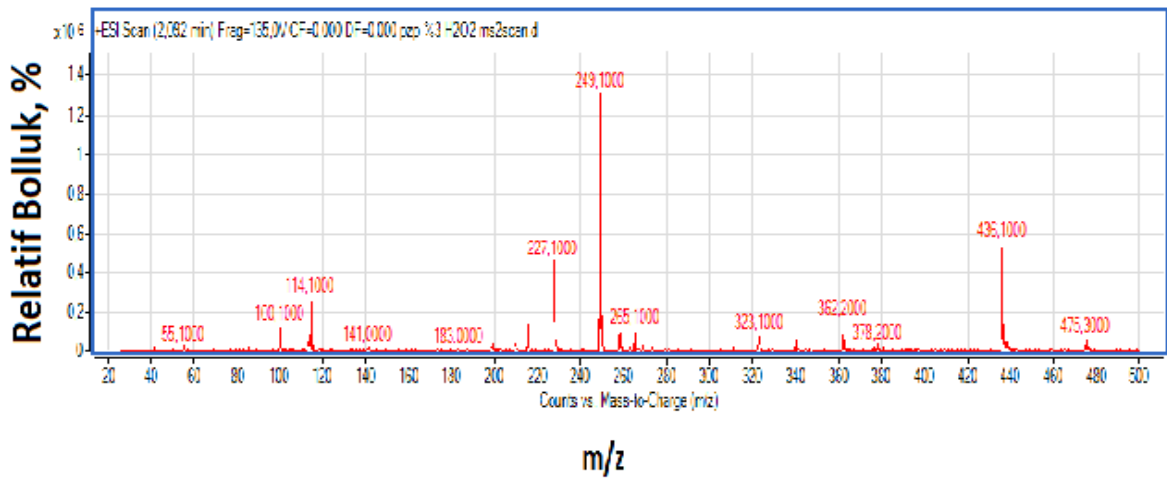
Şekil 5.13. Pazopanib 1M NaOH çözeltisindeki MS spektrumu



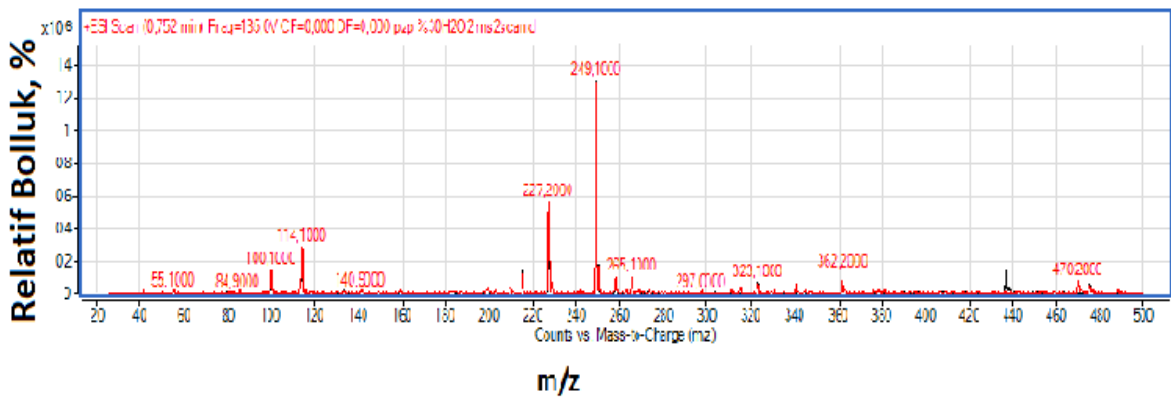
Şekil 5.14. Pazopanibin bazik koşullar altındaki parçalanma ürünleri

5.13.3. Pazopanib Oksidatif Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri

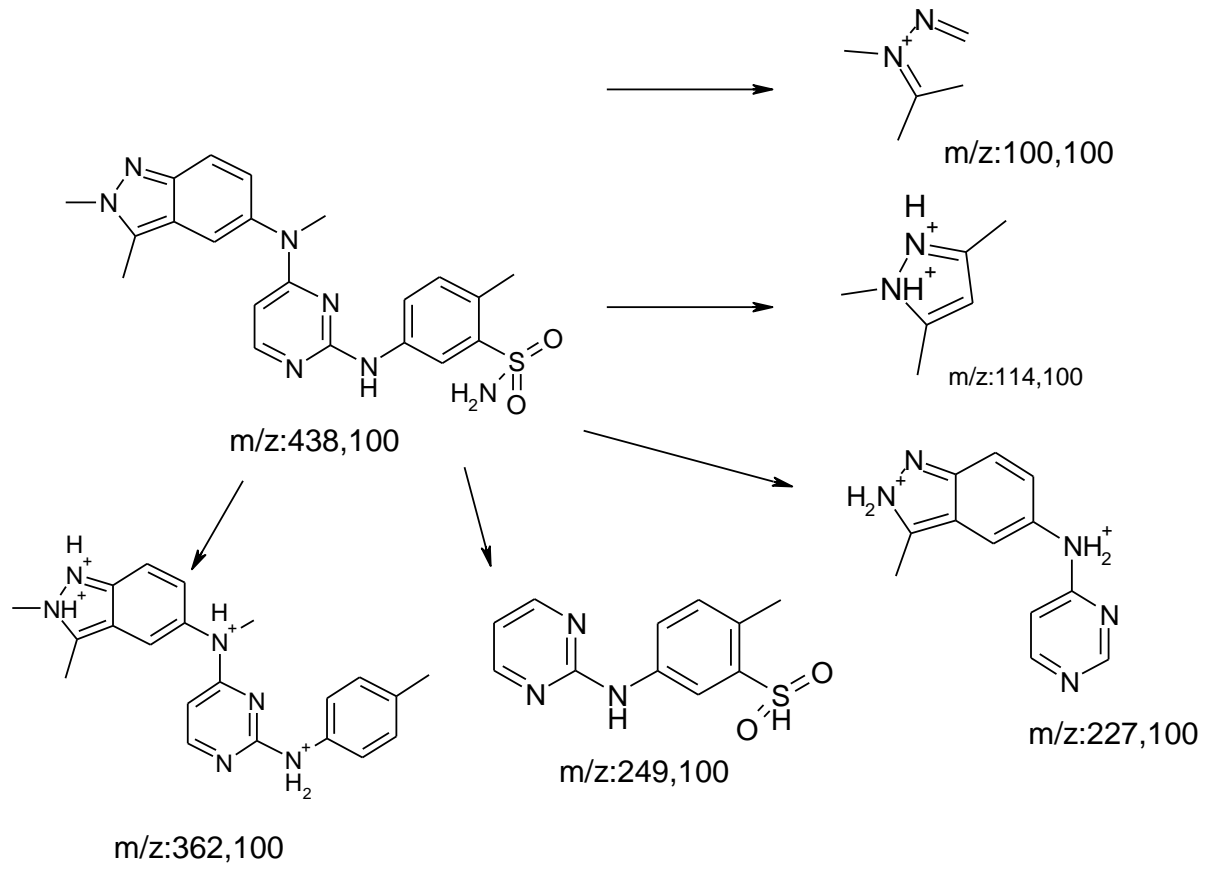
Oksidatif koşullar altındaki bozunurluk ürünleri stok çözeltiden %30 H₂O₂ ve %3 H₂O₂ ile 10 ppm'e seyreltme yapılarak elde edilmiştir. Yapılan testte Pazopanib özellikle %30 H₂O₂ koşulları altında stabil kalmadığı ve tamamen tükendiği görülmüştür Şekil 5.16. Bozunma ürünü olarak 5 majör pik değerlendirilmiş ve şematize edilmiştir. Şekil 5.17.



Şekil 5.15. Pazopanib %3 peroksit çözeltisindeki MS spektrumu



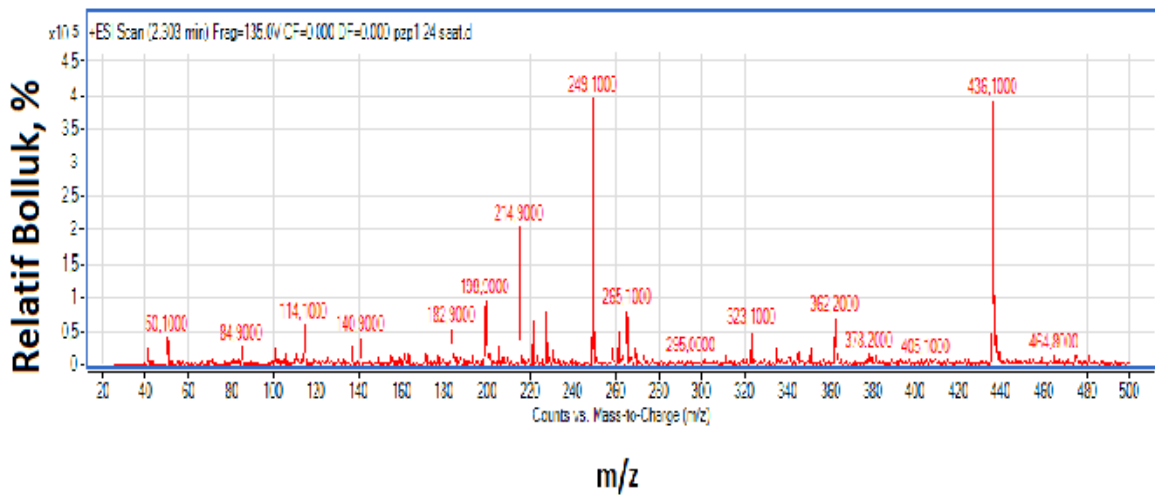
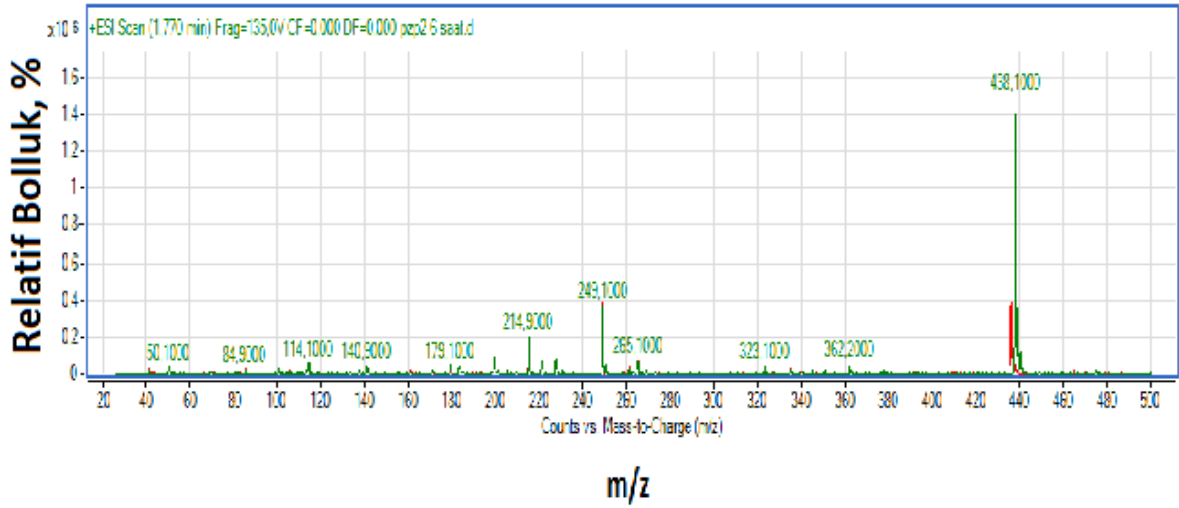
Şekil 5.16. Pazopanib %30 peroksit çözeltisindeki MS spektrumu

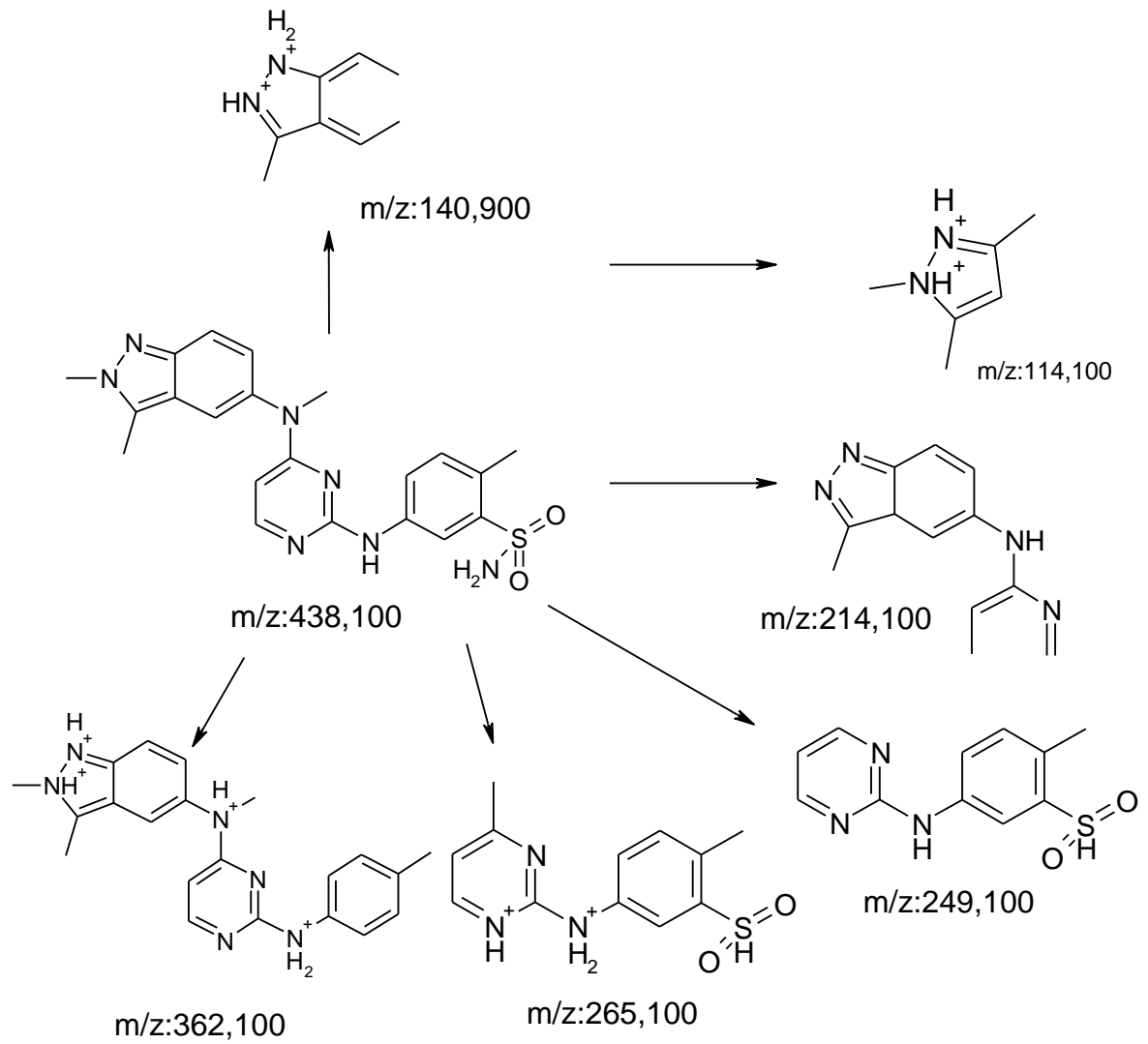


Şekil 5.17. Pazopanibin oksidatif koşullar altındaki parçalanma ürünleri

5.13.4. Pazopanibin Termal Koşullar Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri

Termal koşullar altındaki bozunurluk ürünleri stok çözeltiden mobil faz ile 10 ppm'e seyreltme yapılarak elde edilmiştir. 6 ve 24 saat 100 C⁰'de yapılan testlerde Pazopanib özellikle 24 saat termal şart altında stabil kalmadığı ve tamamen tükendiği görülmüştür Şekil 5.19. Bozunma ürünü olarak 6 majör pik değerlendirilmiş ve şematize edilmiştir. Şekil 5.20.

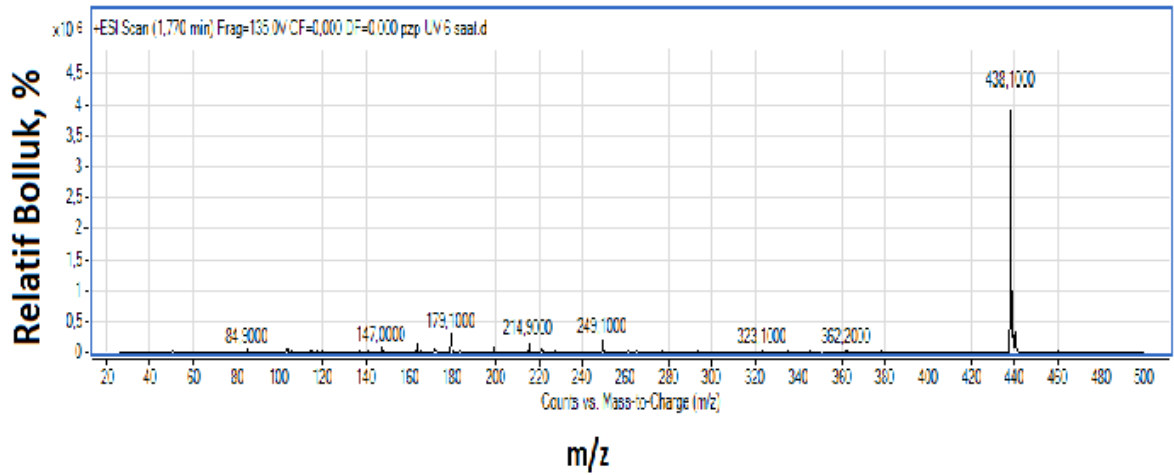




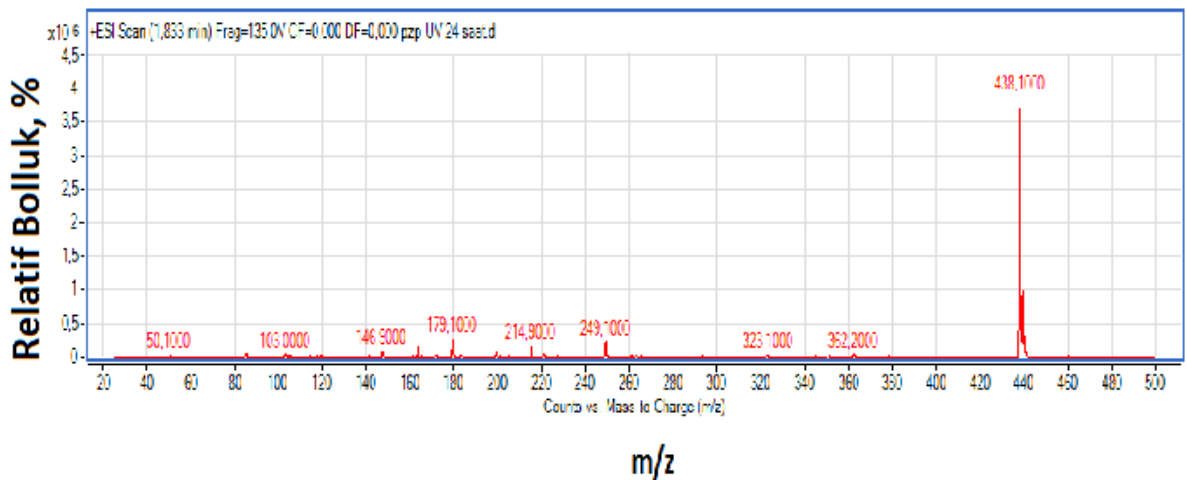
Şekil 5.20. Pazopanibin termal koşullar altındaki parçalanma ürünleri

5.3.5. Pazopanib Ultraviole Işık Altındaki MS Spektrumu ve Bozunurluk Ürünleri

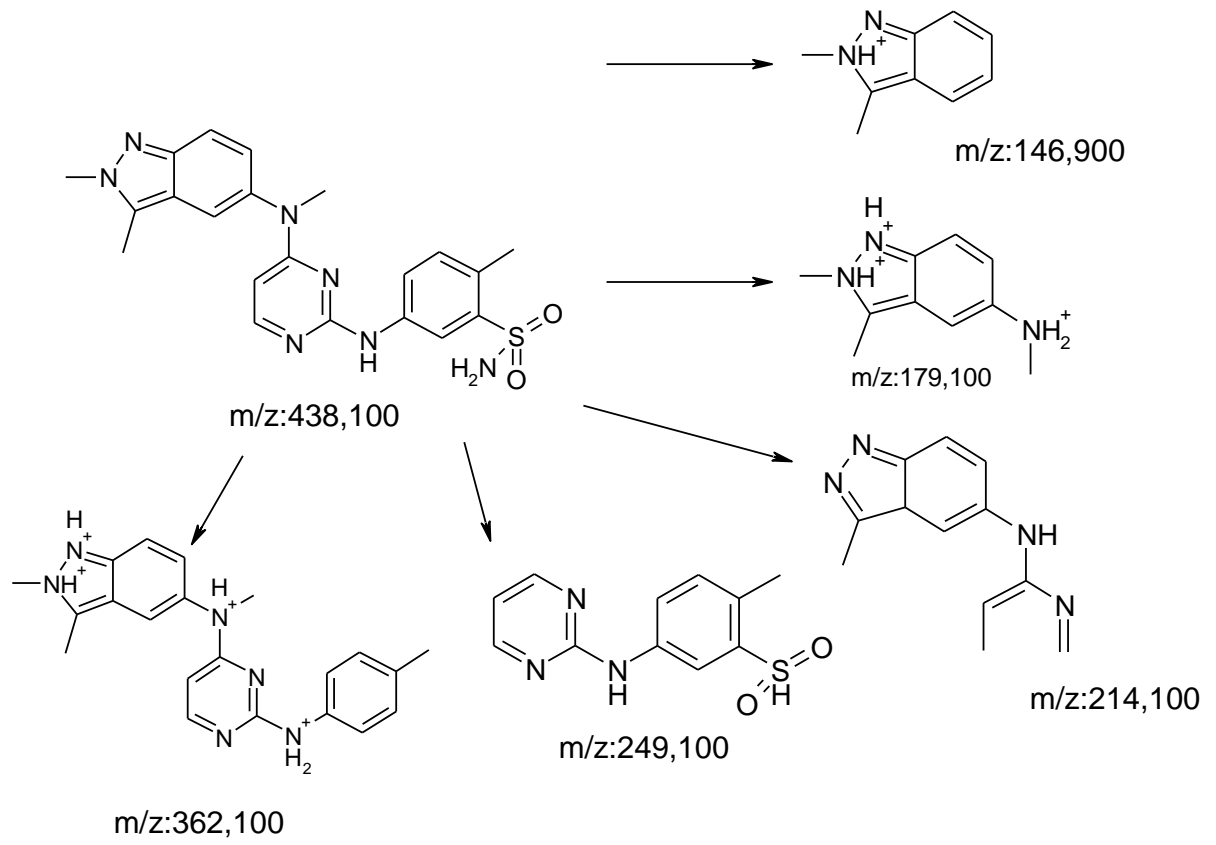
Ultraviole Işık Altındaki altındaki bozunurluk ürünleri stok çözeltiden mobil faz ile 10 ppm'e seyreltme yapılarak elde edilmiştir. 6 ve 24 saat 254 nm UV ışık altında bekletilerek tamamlanan teste; Pazopanibin 6-24 saat UV stres testlerinde stabil kaldığı ve tamamen tükenmediği görülmüştür Şekil 5.21, Şekil 5.22. Bozunma ürünü olarak 5 majör pik değerlendirilmiş ve şematize edilmiştir. Şekil 5.23.



Şekil 5.21. Pazopanib 6 saat UV 254 nm ışık altındaki şartlarda MS spektrumu



Şekil 5.22. Pazopanib 24 saat UV 254 nm ışık altındaki şartlarda MS spektrumu



Şekil 5.23. Pazopanibin UV koşullar altındaki parçalanma ürünleri

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın ilk aşamasında, pazopanib ve erlotinib (IS) ikili karışımının ters faz sıvı kromatografik yöntem ile analizleri için gerekli parametreler saptanmış ve bu parametreler kullanılarak da analizleri yapılmıştır. Bu amaçla değişik kolon, akış hızı, sıcaklık, pH, dalga boyu ve hareketli faz kullanılarak en iyi koşullar saptanmıştır. Hızlı, duyarlı ve tamamen validasyonu yapılmış olan bu yöntemi kullanarak farmasötik dozaj formlarından ve gerçek numune olarak insan idrarına katkı yapılarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Bu yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla validasyon çalışmalarında; doğrusal aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca idrar numunesi içerisinde yer alan bileşiklerin ve safsızlıkların da analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Deneylere başlamadan önce pazopanib standart maddesinin saflığını araştırmak amacı ile FTIR spektrumları alınmıştır. Sonuçta elde edilen bulgulara göre çalışılan maddenin bu çalışmayı etkileyecek herhangi bir safsızlık içermediği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, bu ilaçların analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi

geliştirilmiş ve piyasa preparatlarından ve idrar numunelerinden bu maddelerin aynı anda analizine başarılı bir şekilde uygulanabildiği istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Bir ilaç maddesinin safsızlık profili ve kararlılığı, güvenlik değerlendirmesi ve üretim sürecinde çok önemlidir. Bu konu ile ilgili literatürler ve kaynaklar incelendiğinde Pazopanib ve ilgili bozunma ürünlerinin analitik tespiti ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden proje kapsamında yer alan Pazopanib ve bozunma ürünleriyle ilgili elde edilen bilgiler, ilacın farklı metabolik biyokimyasal dönüşüm mekanizmaları ve davranışları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır.

Deneyle sonuçunda pazopanibin asidik, bazik, termal ve ultraviyole ışık altındaki stres koşullarında oldukça kararlı olduğu ve stabil kaldığı gözlemlenmiş ancak oksidatif bozunmaya daha hassas olduğu belirlenmiştir. Özellikle 24 saat 100 °C ve %30 H₂O₂ koşullarında bozunma ürünlerinin arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumlarında m/z değerleri kullanılarak majör pikler değerlendirilmiş ve yapıdan olası koptuğu şekilde çizilerek Şekillerde sunulmuştur. Bu bozunurluk ürünleri özellikle kemoterapi ilaçlarında ciddi yan etkiler ve yaşam kalitesindeki düşüş gibi genellikle olumsuz sonuçlar meydana getirebilmektedir.

Tez çalışması sonuçları, yalnızca tıp ve kimya alanında çalışan araştırmacıların değil aynı zamanda biyokimya ve eczacılık alanında çalışmalar yapan araştırmacıları da ilgilendirmektedir. Ayrıca, kanser hastalığı ve kanser tedavisi günümüzün önemli konuları olması nedeniyle bilgi birikimi oluşmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Motzer R.J, Bander NH, Nanus DM. 1996 "Renal – cell carcinoma." *N Engl J Med*; 335 (12): 865 – 75.

[2] Yıldız R. "Renal Hücreli Kanserde Tirozin Kinaz İnhibitörleri Kullanımı." *Onkoloji Bulteni*, 2015, <http://onkobulten.org/onkobulten/index.php/component/content/article/51-06-soeyle-/97-06-soeyle-> Son erişim tarihi: 02 Ocak 2014.

[3] "FDA Approves GlaxoSmithKline's Votrient For Advanced Renal Cell Cancer". *Medical News Today*. 20 October 2009. Retrieved 8 June 2010. <http://www.medicalnewstoday.com/releases/167910.php> Son erişim tarihi: 02 Ocak 2014.

[4] Sleijfer, S. Ray-Coquard, I. Papai, Z. Le Cesne, A. Scurr, M. Schöffski, P. Collin, F. Pandite, L. Marraud, S. De Brauwere, A. Van Glabbeke, M. Verweij, J. Blay, J. Y. 2009. "Pazopanib, a Multikinase Angiogenesis Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Phase II Study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC Study 62043)". *Journal of Clinical Oncology* 27 (19): 3126–3132. doi:10.1200/JCO.2008.21.3223.

[6] Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı İnternet: 2015, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html> (2013)

[7] Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı İnternet: 2015, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html> (2013)

[8] Amerikan Hastanesi 2015

İnternet: <http://www.amerikanhastanesi.org/SubDetail.aspx?subId=215>

[9] Gündüz T. "İnstrümental Analiz" *Ankara 2005 Gazi Kitapevi*

[10] Skoog, Holler, Nieman "Ensrümental Analiz İlkeleri", Çeviri Editörleri, E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz, *1998 Saunders College Publishing, Harcourt Brace Company*

[11] Eurochem Working Groups, 1998. The Fitness for purpose of analitical metods a laboratory guide to metod validation and related topic.

[12] Doğrukol D, Doç. Dr. Lütfi Genç. "*Kromatografik Yöntemler*", , *BİBAM Yayınları, Eskişehir, 1-132.*

[13] A. A. Özdemir, "İdrarda Etil Glukuronidin (EtG), LC-MS/MS Sistemi ile Tayini", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü* 2012, İstanbul

[14] Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. "Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism". *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56:236-42.

[15] Kiser RW, Sullivan RE. Mass spectrometry. *Anal Chem* 1968; 40: 273.

[16] Dougherty RC, Roberts JD, Biros FJ. Positive and negative chemical ionization mass spectra of some aromatic chlorinated pesticides. *Anal Chem* 1975; 47: 54-9.

[17] Dougherty RC. Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry. *Biomed Mass Spectrom* 1981; 8 : 283-92.

- [18] Di Donato GC, Busch KL. Derivatization of ketosteroids for fast atom bombardment mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1985; 12:364-6.
- [19] Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 35: 939-52.
- [20] Kirpekar F, Nordhoff E, Larsen LK, Kristiansen K, Roepstorff P, Hillenkamp F. "DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry." *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2554-9.
- [21] Meng CK, Fenn JB. Analyzing organic molecules with electrospray mass spectrometry *Am Biotechnol Lab* 1990; 8: 54-60.
- [22] Çavuş F., "Fentanil ve Metaboliti Norfentanilin İdrardan Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Yan Yana Tayini", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü*, İstanbul 2012
- [23] Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. In principles of instrumental analysis. Molecular mass spectrometry. *Philadelphia: Saunders College Publishing*, 1998; 498-534.
- [24] Cooks RG, Busch KL, Glish GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science* 1983; 21:222(4621):273-91.
- [25] Kiser RW, Sullivan RE. Mass spectrometry. *Anal Chem* 1968; 40: 273.

[26] . Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. “Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry.” *Pediatric Research* 1995; 38: 324-31.

[27] M.Çelik, “Plazma/Serumda Toplam Homosistein Miktarının ESI-LC-MS/MS Yöntemiyle Ölçülmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze, 2009

[28] Belov ME, Gorshkov MV, Udseth HR, Anderson GA, Smith RD. “Zeptomole-sensitivity electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of proteins.” *Anal Chem* 2000; 72: 2271-9.

[29] Lacey JM, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, O’Brien JF. “A method for the rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography–mass spectrometry.” *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 178.

[30] Clayton PT. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 1998; 78:185-9.

[31] Mayatepek E, Zelezny R, Lehmann WD, Hammond JW, Hoffmann GF. “Defects in the synthesis of cysteinyl leukotrienes: a new group of inborn errors of metabolism.” *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 404-8.

[32] . Berry GT, Nissim I, Lin Z, Mazur AT, Gibson JB, Segal S. “Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia.” *Lancet* 1995; 346: 1073-4.

[33] Banks JF, Jr, Shen S, Whitehouse CM, Fenn JB. "Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest." *Anal Chem* 1994; 66: 406-14

[34] Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. "Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays." *Clin Chem* 1999; 45: 1269-77.

[35] Naylor EW, Chace DH. "Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid and amino acid metabolism." *J Child Neurol* 1999; 14: 4-8.

[36] . Zytkevich TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. "Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the new england newborn screening program." *Clin Chem* 2001; 47: 1945- 55

[37] Asadulla Khan, j. Venkateswara Rao, Ravi Pratap Pulla, Suresh Kumar Sudam, K. Sujana, "Estimation of Pazopanib Hydrochloride in Tablet Dosage Forms by RP-HPLC" *IJAPA Vol. 3 Issue 1* (2013) 24-24

[38] Mukul Minocha, Varun Khurana, Ashim K. Mitra. "Determination of Pazopanib (GW-786034) in Mouse Plasma and Brain Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC/MS-MS)", *Journal of Chromatography B*, 901 (2012) 85-92

- [39] Rolf W. Sparidans, Tahani T.A. Ahmed, Eline W. Muilwijk, Marieke E.B. Welzen, Jan H.M. Schellens, Jos H. Beijnen, “Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for Therapeutic Drug Monitoring of the Tyrosine Kinase Inhibitor Pazopanib in Human Plasma”, *Journal of Chromatography B*, 905 (2012) 137-40
- [40] Nielka P. van Erp, Djoeke de Wit, Henk-Jan Guchelaar, Han Gelderblom, Trees J. Hensing, Jan den Harting, “A Validated Assay for the Simultaneous Quantification of Six Tyrosine Kinase Inhibitors and Two Active Metabolites in Human Serum Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, 937 (2013) 33-43
- [41] Yan Li, David Q. Liu, Shawn Yang, Ravinder Sudini, Michael A. McGuire, Dharmesh S. Bhanushali, Alireza S. Kord, “Analytical Control of Process Impurities in Pazopanib Hydrochloride by Impurity Fate Mapping”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52 (2010) 493-507
- [42] Marek Dziadosz, Rüdiger Lessig, Heidemarie Bartels, “HPLC-DAD Protein Kinase Inhibitor Analysis in Human Serum”, *Journal of Chromatography B*, 893-894 (2012) 77-81
- [43] Center for Drug Evaluation and Research, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Reviews*, Application number 22-465
- [44] VOTRIENT™ 200 mg film kaplı tablet, Pazopanib Prospectus, 2015, İnternet: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/022465s-010S-012lbl.pdf

[45] Erlotinib, 2015

Internet: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021743s0101bl.pdf

[46] Riley, C.M., Rosanke, T.W. “Development and Validation of Analytical Methods”, *Elsevier Science Ltd.*, Newyork, 1996

[47] Swarts. M.E., Krul, I.S., Anaytical method development and validation, Marcel Dekker, New York. 1997

[48] Snyder. L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Practical HPLC Method Development, *2nd Ed.*, *John Wiley and Sons Inc.*, New York. 1997

[49] Ahuya, S. ScypInskI, S. , “Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis”, *Academic Press*, New York. 2001

[50] Lunte, S.M., Radzik, D.M., “Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis”, *Elsevier Science Ltd*, New York. 1996

[51] ICH guidline analytical prosedure, 2015

Internet: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : SÜLEYMAN GÖKCE
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 30.07.1984 UŞAK
Medeni hali : BEKAR
e-mail : suleyman.gokce@usak.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ	2008
Lise	UŞAK ORHAN DENGİZ ANADOLU LİSESİ	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011	AKSARAY ÜNİVERSİTESİ	KİMYAGER
2012	UŞAK ÜNİVERSİTESİ	KİMYAGER

Yabancı Dil

İNGİLİZCE