MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİLOTİNİB'İN PROSES VE BOZUNMA SAFSIZLIKLARININ BELİRLENMESİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE METOT VALİDASYONU

PINAR CEYHAN DAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2023

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİLOTİNİB'İN PROSES VE BOZUNMA SAFSIZLIKLARININ BELİRLENMESİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE METOT VALİDASYONU

PINAR CEYHAN DAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Soner ÇUBUK

İSTANBUL, 2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı FEN-C- FYL-2022-10564 numaralı proje ile destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

..

…

…

…

…. sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER/

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER/ ii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR v
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
TABLOLAR LİSTESİ viii
ÖZET ix
SUMMARRY x
1. GİRİŞ 1
1.1. Lösemi ve Türleri 1
1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML) 1
1.2.1. KML tedavisinde kullanılan moleküller 3
1.2.1.1. İmatinib 3
1.2.1.2. Dasatinib 3
1.2.1.3. Bosutinib 3
1.2.1.4. Ponatinib 3
1.2.1.5. Nilotinib 3
1.3. Nilotinib Hidroklorür ve özellikleri 4
1.3.1. Nilotinib Hidroklorür Eldesi 5
1.3.2. Nilotinib Hidroklorür Safsızlıkları 6
1.4. İlaç Etken Maddelerinde ve Ürünlerde Safsızlığın Tanımı 8
1.4.1. Safsızlığın Sınıflandırılması 8
1.4.2. Safsızlık Kaynakları 8
1.5. Zorla Bozundurma Çalışmaları 9
1.6. Analitik Yöntem Validasyonu 10
1.5.1. Validasyon Tanımı ve Amacı 10
1.5.2. Analitik Yöntem Validasyon parametreleri 10
1.5.2.1. Seçicilik 10
1.5.2.2. Sistem uygunluk 11
1.5.2.3. Tespit Limiti 11
1.5.2.4. Hesaplanabilirlik Limiti 11
1.5.2.5. Raporlama Seviyesi 11

1.5.2.6. Doğrusallık 12
1.5.2.7. Uygulama Aralığı 12
1.5.3.8. Doğruluk 13
1.5.3.9. Kesinlik 13
1.5.3.10. Sağlamlık 13
1.6. Stabilite Göstergeli Analitik Yöntem Geliştirme 13
1.7. Literatürde Nilotinib Analiz Yöntemlerinin Yeri 14
2. MATERYAL VE YÖNTEM 16
2.1. Materyal 16
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Reaktifler 16
2.1.2. Kullanılan Gereçler 16
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler 17
2.2. Yöntem 24
2.2.1. Yöntem Geliştirme 24
2.2.2. Validasyon çalışmasındaki kromatografik koşullar 24
2.3.3. Validasyon Parametreleri 25
2.2.3.1. Seçicilik 25
2.2.3.2. Taşınma Etkisi 25
2.2.3.3. Filtre 25
2.2.3.4. Sistem Uygunluk 25
2.2.3.5. Tespit Limiti (LOQ) 26
2.2.3.6. Hesaplanabilirlik Limiti (LOD) 26
2.2.3.7. Raporlama Seviyesi 26
2.2.3.8 Doğrusallık 26
2.2.3.9. Uygulama aralığı 27
2.2.3.10. Doğruluk 27
2.2.3.11. Kesinlik 27
2.2.3.12. Sağlamlık 27
2.2.3.13. Stabilite 28
2.2.4. Bozundurma Çalışmaları 28
2.2.4.1. Işığa Maruz Bırakma 28
2.2.4.2. Asit İle Bozundurma 29
2.2.4.3. Baz İle Bozundurma 29
2.2.4.4. Oksidasyon İle Bozundurma 29
2.2.4.5. Sıcaklık İle Bozundurma 29
3. BULGULAR VE TARTIŞMA 30

3.1. Yöntem Geliştirme 38
3.2. Validasyon Prametreleri 38
3.2.1. Seçicilik 38
3.2.1.1. Taşıma Etkisi 44
3.2.1.2. Filtre Etkisi 44
3.2.2 Sistem Uygunluk 45
3.2.3. Tespit Limiti 46
3.2.4. Hesaplanabilirlik Limiti 47
3.2.5. Raporlama Seviyesi 47
3.2.6. Doğrusallık 48
3.2.7. Uygulama Aralığı 55
3.2.8. Doğruluk 55
3.2.9. Kesinlik 57
3.2.9.1. Tekrarlanabilirlik 57
3.2.9.2. Ara Kesinlik 58
3.2.10. Sağlamlık 60
3.2.10.1. Yöntemin stabilitesi 60
3.2.10.2. Çözelti stabilitesi 61
3.3. Bozundurma Çalışmaları 63
3.3.1. Işığa Maruz Bırakma 63
3.3.2. Asit İle Bozundurma 64
3.3.3. Baz İle Bozundurma 64
3.3.4. Oksidasyon İle Bozundurma 65
3.3.5. Sıcaklık İle Bozundurma 65
4. SONUÇLAR 66
5. REFERANSLAR 67

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myleoid lösemi
AP	: Hızlandırılmış faz
API	: Aktif farmasötik bileşen
BC	: Blastik faz
DF	: Düzeltme faktörü
dk	: Dakika
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	: Güven aralığı
HCL	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	: Ulaslar arası uyumlaştırma konferansı
IND	: Araştırma onaylı yeni ilaç başvurusu
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Hesaplanabilirlik limiti
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
N	: Gürültü
NDA	: Yeni ilaç uygulamaları
nm	: Nanometre
NY	: Naylon
PB	: Periferik kan
PDA	: Fotodiyot array dedektörü
Ph	: Philadelphia kromozomu

PTFE : Politetrafloroetilen (hidrofobik)
R : Korelasyon katsayısı
RC : Rejenere selüloz
RFF : Bağıl yanıt faktörü
RRT : Bağıl Alıkonma Zamanı
RSD : Rölatif standart sapma
RSS : Artık kareler toplamı
RT : Alıkonma zamanı
S : Sinyal
SD : Standart sapma
SP : Kronik faz
TKI : Trozin kinaz inhibitörü
UV : Ultraviyole Işık
WBC : Beyaz kan hücresi
WHO : Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Philadelphia kromozomu 2
Şekil 1.2. Nilotinib hidroklorür molekül yapısı. 4
Şekil 1.3. Nilotinib hidroklorür eldesi 5
Şekil 1.4. Safsızlık A molekül yapısı. 6
Şekil 1.5. Safsızlık B molekül yapısı 6
Şekil 1.6. Safsızlık C molekül yapısı. 6
Şekil 1.7. Safsızlık D molekül yapısı. 7
Şekil 1.8. Safsızlık NLT C molekül yapısı. 7
Şekil 1.9. Safsızlık N-oksit molekül yapısı. 8
Şekil 1.10. Safsızlık konsantrasyon hesaplama kriterleri 12
Şekil 3.1. Nilotinib hcl F-TIR spektrumu. 30
Şekil 3.2. Nilotinib HCl UV spekturumu. 31
Şekil 3.3. Safsızlık A F-TIR spektrumu. 31
Şekil 3.4. Safsızlık B için F-TIR spekrumu 32
Şekil 3.5. Safsızlık C için F-TIR spekrumu 33
Şekil 3.6. Safsızlık D (NLT-2) için F-TIR spekrumu 35
Şekil 3.7. Safsızlık NLTC için F-TIR spekrumu. 37
Şekil 3.8. Blank kromatogramı 40
Şekil 3.9. Plasebo kromatogramı 40
Şekil 3.10. Nilotinib standart kromatogramı 40
Şekil 3.11. İlgili bileşikler numune kromatogramı 41
Şekil 3.12. Spike numune kromatogramı 41
Şekil 3.13. Safsızlık NLT-1 kromatogramı 41
Şekil 3.14. Safsızlık B kromatogramı 42
Şekil 3.15. Safsızlık C kromatogramı 42
Şekil 3.16. Safsızlık NLTC kromatogramı 43
Şekil 3.17. Safsızlık NLT-2 kromatogramı 43
Şekil 3.18. Safsızlık N-Oksit kromatogramı 43
Şekil 3.19. Nilotinib İçin doğrusallık grafiği 49
Şekil 3.20. Safsızlık NLT-2 için doğrusallık grafiği 51
Şekil 3.21. Safsızlık N-Oksit için doğrusallık grafiği 53

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Gradient programı..... 24
Tablo 3.1. Nilotinib HCl için Karakteristik IR bantlarının belirlenmesi. 30
Tablo 3.2. Safsızlık A için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi. 32
Tablo 3.3. Safsızlık B için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi. 33
Tablo 3.4. Safsızlık C için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi 34
Tablo 3.5. Safsızlık D (NLT-2) için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi. 36
Tablo 3.6. Safsızlık NLTC için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi..... 38
Tablo 3.7. Pik tanımlaması 38
Tablo 3.8. Taşınma etkisi..... 44
Tablo 3.9. Filtre etkisi sonuçları 44
Tablo 3.10. Sistem uygunluk sonuçları..... 46
Tablo 3.11. Tespit limiti sonuçları..... 47
Tablo 3.12. Hesaplanabilirlik limiti..... 47
Tablo 3.13. Raporlama seviyesi sonuçları 48
Tablo 3.14. Nilotinib doğrusallık sonuçları 48
Tablo 3.15. Nilotinib regresyon sonuçları 49
Tablo 3.16. Safsızlık NLT-2 için doğrusallık sonuçları 50
Tablo 3.17. Safsızlık NLT-2 regresyon sonuçları..... 52
Tablo 3.18. Safsızlık N-Oksit doğrusallık sonuçları..... 53
Tablo 3.19. Safsızlık N-oxide regresyon sonuçları..... 54
Tablo 3.20. Uygulama aralığı tablosu..... 55
Tablo 3.21. Nilotinib geri kazanım sonuçları 56
Tablo 3.22. Safsızlık NLT-2 geri kazanım sonuçları..... 56
Tablo 3.23. Safsızlık N-Oksit geri kazanım sonuçları..... 57
Tablo 3.24. Tekrarlanabilirlik sonuçları 57
Tablo 3.25. Ara kesinlik sonuçları..... 59
Tablo 3.26. Analist 1 ve 2'nin kesinlik çalışması ortalama sonuçları 59
Tablo 3.27. Ortalamalar arasındaki fark 60
Tablo 3.28. Dalga boyu değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları 60
Tablo 3.29. Akış hızı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları..... 61
Tablo 3.30. Kolon sıcaklığı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları..... 61
Tablo 3.31. Standart çözeltisi stabilite sonuçları 62
Tablo 3.32. Numune çözeltisi stabilite sonuçları..... 62
Tablo 3.33. Işık ile bozundurma sonuçları 63
Tablo 3.34. Asit ile bozdundurma sonuçları..... 64
Tablo 3.35. Baz ile bozundurma sonuçları 64
Tablo 3.36. Oksidasyon ile bozundurma sonuçları..... 65
Tablo 3.37. Sıcaklık ile bozundurma sonuçları 65

ÖZET

NİLOTİNİB'İN PROSES VE BOZUNMA SAFSIZLIKLARININ BELİRLENMESİ İÇİN STABİLİTE GÖSTERGELİ BİR HPLC YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE METOT VALİDASYONU

Bu çalışmada, nilotinib etken maddesi proses ve bozunma safsızlıklarının bir arada analizi için stabilite göstergeli HPLC yöntemi geliştirildi. Bu yöntemde YMC-Pack ODS-AQ, 150 mm x 4,6 mm, 3,0 µm kolon kullanılmıştır. Potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve asetonitril hareketli fazı, gradient elüsyon ile 1,0 mL/dk akış hızında ayarlanarak maddelerin ayrılması gerçekleştirilmiş ve deteksiyon dalga boyu 265 nm'ye ayarlanmıştır. Çözücü olarak saf su ve etanol 50:50 (h:h) karışımı kullanılmıştır. Yöntemin analitik yöntem validasyonu yapıldı. Seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, çözelti stabilitesi, tanıma sınırı ve tayin sınırı parametreleri incelendi. Nilotinib etken maddesi ve bozunma safsızlıkları için yapılan doğrusallık çalışmasında 0,997'den büyük korelasyon katsayısı elde edildi. Yöntem kesinliği için aynı gün içinde yapılan analizlerde 0,63 ile 1,41, farklı günlerde yapılan analizlerde 0,67 ile 1,39 arasında değişen %RSD değerleri elde edildi. Yöntem doğruluğu için Nilotinib için ortalama 100,75 ve bozunma safsızlıkları için ise 87,66 ile 99,26 arasında değişen %geri kazanım elde edildi. Tespit limit sınırı 2,4 – 3,0 ng/mL arasında; hesaplanabilirlik limiti 8,0 – 10,0 ng/mL arasında bulundu. Çözeltilerin 15 °C 'de 48 saat stabil olduğu stabil olduğu görüldü. Yöntemin sağlamlığı için bazı çalışmalar yapıldı ve kromatografik koşullardaki değişikliklerin yöntem performansını etkilemediği görüldü. İlaç kapsülü için zorla bozundurma çalışmaları (asidik, bazik, oksidatif, ışık ve ısı) yapıldı. Kütle denklikleri yapılarak %95,43 -%101,40 arasında değişen verim elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Nilotinib, validasyon, safsızlıklar.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF STABILITY INDICATING AN HPLC METHOD FOR NILOTINIB FOR THE DETERMİNATION AND VALIDATION OF PROCESS-RELATED AND DEGRADATION IMPURITIES

In this study, the HPLC method with stability indicator was developed for the combined analysis of nilotinib active ingredient, process and degradation impurities. In this method, YMC-Pack ODS-AQ, 150 mm x 4.6 mm, 3.0 µm column was used. The separation of substances was achieved by adjusting the potassium dihydrogen phosphate buffer and acetonitrile mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min by gradient elution, and the detection wavelength was adjusted to 265 nm. A 50:50 (v:v) mixture of distilled water and ethanol was used as the solvent. Analytical method validation of the method was performed. Selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness, solution stability, limit of dedection and limit quantitation parameters were examined. A correlation coefficient greater than 0.997 was obtained in the linearity study for the active ingredient nilotinib and its degradation impurities. For the precision of the method, % RSD values ranging from 0.63 to 1.41 were obtained in the analyzes performed on the same day, and from 0.67 to 1.39 in the analyzes performed on different days. An average recovery rate of 100.75% was obtained for Nilotinib for method accuracy and between 87.66 and 99.26% for degradation impurities. The limit of dedection was found between 2.4 – 3.0 ng/mL; the limit of quantitation was found between 8.0 – 10.0 ng/mL. The solutions were found to be stable for 48 hours at 15 °C. Some studies were carried out for the robustness of the method and it was seen that changes in chromatographic conditions did not affect the method performance. Forced degradation studies (acidic, basic, oxidative, light and heat) were performed for the drug capsule. By making mass equivalences, efficiency ranging between 95.43% -101.40% was obtained.

Keywords: Nilotinib, validation, impurities.

1. GİRİŞ

1.1. Lösemi ve Türleri

1844'te, Fransız doktor Alfred François Donné, daha sonra ölen splenomegalisi olan bir hastadan periferik kan (PB) örneğinde alışılmadık derecede yüksek miktarda beyaz kan hücresinin (WBC) gözlendiği patolojik bir durumu tanımlayan ilk kişiydi [1, 2]. Bununla birlikte, bu ufuk açıcı gözlem, periferik kanda artan olgunlaşmamış beyaz kan hücresinin sayısıyla ilişkili bozuklukların keşfi ve anlaşılmasına rağmen, bir vaka raporu yayınlayan İskoç patolog John Hughes Bennett'e akredite edilmiştir [2]. Alman patolog Rudolph Virchow, ilk olarak "Beyaz kan" terimini ortaya attı ve ardından hastalığa Yunancadan türetilen ve beyaz kan anlamına gelen "Leukämie" adını verdi [2]. Günümüzde löseminin, kemik iliğinde kan oluşumunu etkileyen ve hematopoetik kök hücrelerde veya öncü hücrelerde edinilmiş genetik sapmaların neden olduğu, örtüşen semptomlarla da olsa birkaç alt gruptan oluşan heterojen bir kötü huylu bozukluk olduğu bilinmektedir [3]. Anormal, kötü huylu hücreler kemik iliğinde, genellikle de periferik kanda birikir ve normal kan hücrelerini baskılayarak anemi, trombositopeni ve olgun fonksiyonel beyaz kan hücresi eksikliğine neden olur.

Lösemiler genel olarak 4 temel alt kategoride incelenir:

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Akut Myeloid Lösemi (AML)

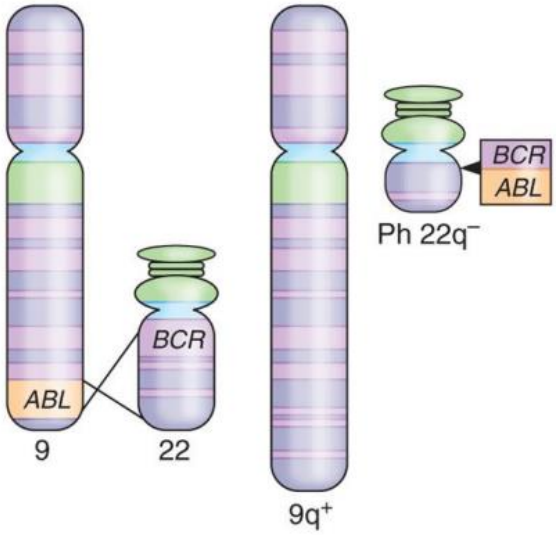
Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Kronik Myeloid Lösemi (KML)

1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre KML, “anormal bir pluripotent kemik iliği kök hücresinden kaynaklanan ve Ph kromozomunda bulunan BCR-ABL_1 füzyon geni ile ilişkili hematolojik bir neoplazidir” [4].

KML, BCR-ABL füzyon proteinini veren "Philadelphia kromozomu" (Ph) ile sonuçlanan 22 ve 9. kromozomlar arasındaki karşılıklı translokasyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar [5].



Şekil 1.1. Philadelphia kromozomu

BCR-ABL1 geni, tirozin kinaz adı verilen, ancak kusurlu bir biçimde olan bir protein üretir. Normalde tirozin kinaz, hücre üretimini artırmak için hücrelere mesajlar gönderir ve ayrıca hücre üretiminin durması talimatını verebilir [6, 7]. Bununla birlikte, BCR-ABL1 geni tarafından üretilen kusurlu tirozin kinaz, normal olarak hücre üretimini ve hücre ölümünü düzenleyemez ve kemik iliği, Philadelphia kromozomunu içeren anormal beyaz kan hücreleriyle dolar. Bu aynı zamanda diğer hücrelerin normal şekilde çalışamayacağı anlamına gelir. KML gelişiminde gen translokasyonunun nedeni belirlenememiştir [7]. Bununla birlikte, atom bombasından sağ kurtulanları inceleyen çalışmalar, önceki radyasyon maruziyeti ile artan KML riski arasında net bir bağlantı olduğunu göstermiştir [8, 9]. Kohort çalışmalarının bir meta-analizi, mesleki olarak benzene maruz kalma ile artmış bir KML riski bulmuştur [10]. HIV ve Crohn hastalığı olan hastalarda artmış risk de rapor edilmiştir, ancak bu tesadüfi olabilir [11]. Ek olarak, bu bulguyu doğrulamak için daha büyük kohort çalışmalarına ihtiyaç duyulsa da, katı organ nakli sonrası hastalarda KML riskinde artış bildirilmiştir [12]. Son olarak, bazı çalışmalar sigara içen veya obez olanlarda KML gelişme riskinin arttığını göstermektedir [13]. KML'nin doğal seyri üç faza ayrılır: kronik faz (SP), hızlandırılmış faz (AP) ve blastik faz (BC). Tanı anında, tüm KML hastalarının %90'ından fazlasına SP tanısı konur [14]. Başvuru anında yaygın semptomlar yorgunluk, ağrı, anemi, kilo kaybı ve genişlemiş dalaktır [15]. Hızlandırılmış ve blastik fazlarda semptomlar daha şiddetli hale gelir ve tedavi değiştirilir ve/veya yoğunlaştırılır [16].

1.2.1. KML tedavisinde kullanılan moleküller

1.2.1.1. İmatinib

İmatinib, BCR-ABL1 molekülü üzerindeki ATP bağlanma bölgesine bağlanarak çalışır ve böylece ATP'nin bölgeye bağlanmasını önler. Bu, tirozinin fosforilasyonunu engeller ve böylece farklı sinyal yollarını bloke ederek BCR-ABL1 pozitif hücrelerin proliferasyonunun azalmasına neden olur [17].

1.2.1.2. Dasatinib

Dasatinib, 2006 yılında piyasaya sürülen ilk ikinci nesil TKI idi. BCR-ABL1 ve diğer tirozin kinazları bloke ederek çalışır. In vitro analizler, dasatinib'in imatinib'den 300 kat daha güçlü olduğunu göstermiştir [18].

1.2.1.3. Bosutinib

Bosutinib, diğer tirozin kinazların yanı sıra bir BCR-ABL1 inhibitörüdür. Bosutinib, T315I mutasyonunu değil, diğer birçok mutasyonu inhibe eder [19].

1.2.1.4. Ponatinib

Ponatinib, 2013 yılında KML hastalarında tedavi için tescil edilen en son TKI'dir ve üçüncü nesil TKI olarak adlandırılır. Ponatinib, T315I mutasyonuna karşı aktiviteye sahip tek TKI'dir [20].

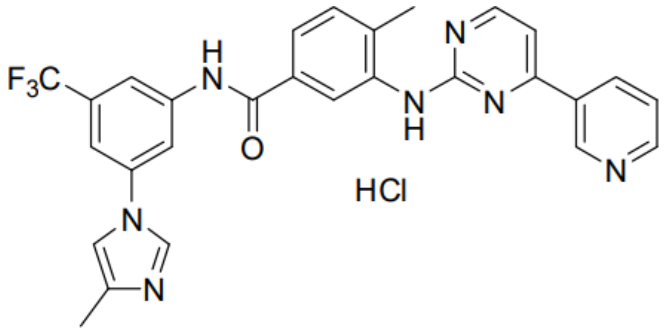
1.2.1.5. Nilotinib

Nilotinib 2007 yılında piyasaya sürüldü ve ikinci nesil bir TKI'dir. Dasatinib ile olduğu gibi nilotinib de BCR-ABL1 ve diğer tirozin kinazları inhibe eder. Nilotinib, imatinib ile karşılaştırıldığında 25 kat daha fazla in vitro potansiyele sahiptir ve T315I mutasyonu dışında bilinen birçok BCR-ABL1 mutasyonunu inhibe eder [18].
Nilotinib, ENESTnd çalışmasında imatinib ile karşılaştırıldı (Klinik Çalışmalarda Nilotinib Etkinliği ve Güvenliğinin Değerlendirilmesi – yeni teşhis edilen hastalar). Nilotinib ile 12 ve 24 aylık tedaviden sonra, sitogenetik tam yanıt oranı imatinibe kıyasla

anlamlı derecede yüksekti (%80'e karşı %68 ve %87'ye karşı %77) [21, 22].
Tahmini 5 yıllık genel hayatta kalma, nilotinib için %93,7 ve imatinib için %91,7 idi ve her iki tedavide de hızlandırılmış faz ve blastik faza ilerleme düşüktü [23]. Nilotinib, kronik faz ve hızlandırılmış faz KML tedavisi için tescil edilmiştir. Standart doz günde iki kez 300 mg'dır ve günde iki kez 400 mg'a çıkarılabilir. Yan etkiler deri döküntüleri, baş ağrısı, hipertansiyon ve kardiyovasküler olayları içerir [23].

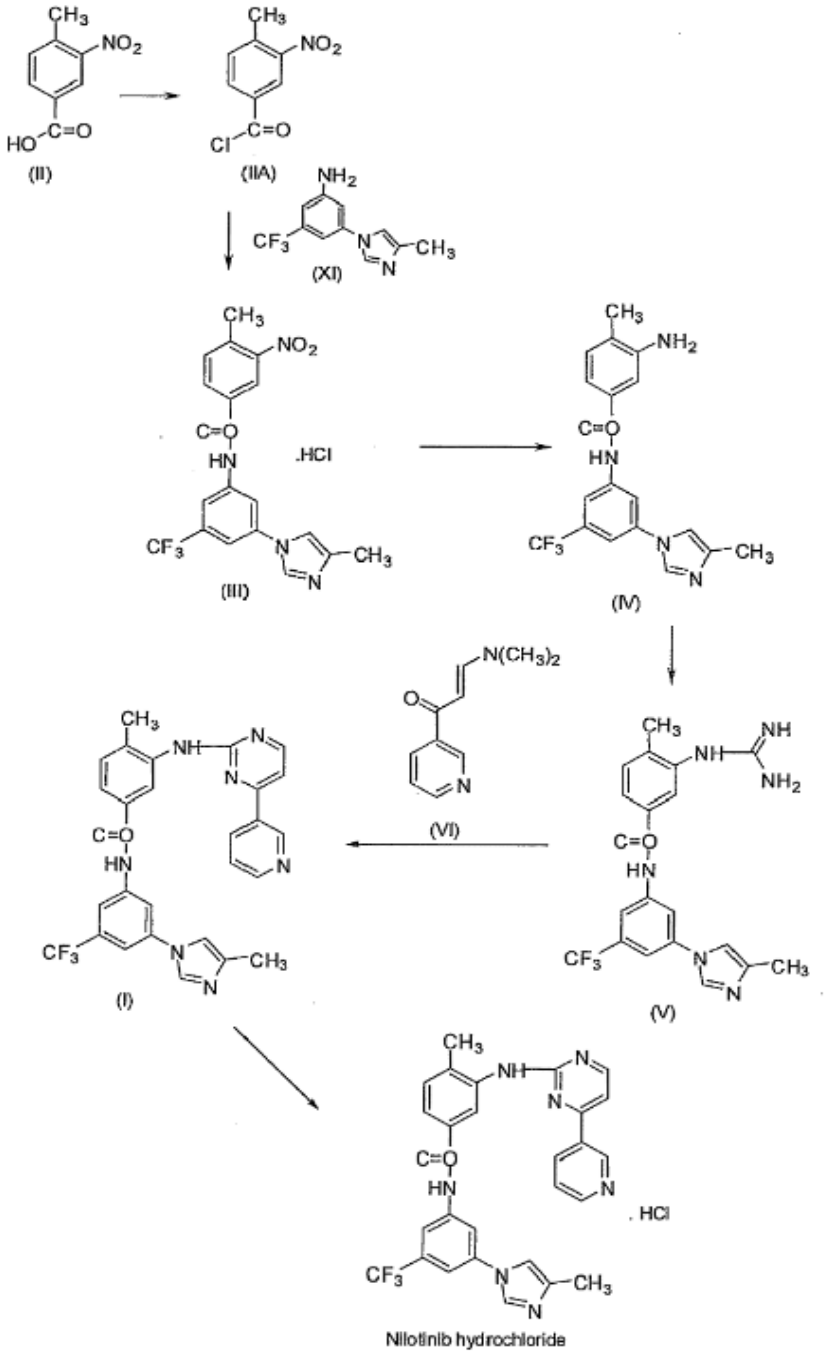
1.3. Nilotinib Hidroklorür ve özellikleri

Nilotinib (NLT) kimyasal olarak 4-methyl – N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-benzamide hydrochloride, moleküler formülü $C_{28}H_{22}F_3N_7O.HCl$ olan ve moleküler ağırlığı 566,0 olan beyaz ila hafif sarımsı veya hafif yeşilimsi sarı bir tozdur [24]. BCR-ABL proteininin imatinib-dirençli mutantlarına karşı etkililik sergileyen yeni inhibitörlerin rasyonel tasarımı, imatinib-ABL kompleksinin kristal yapısına dayalı olarak araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir ve Nilotinib, yeni, seçici bir BCR-ABL inhibitörüdür ve böylece BCR-ABL proteinine uyacak şekilde tasarlanmıştır [25].



Şekil 1.2. Nilotinib hidroklorür molekül yapısı.

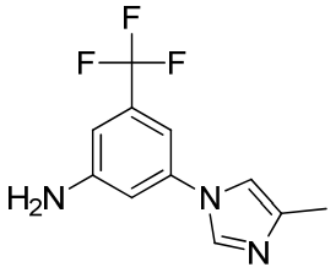
1.3.1. Nilotinib Hidroklorür Eldesi



Şekil 1.3. Nilotinib hidroklorür eldesi

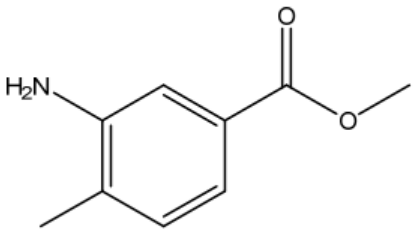
1.3.2. Nilotinib Hidroklorür Safsızlıkları

Safsızlık A (NLT-1), 3-(triflorometil)-5-(4-metil-1-Himidazol-1-il)benzenamin ve molekül ağırlığı 241,22'dir.



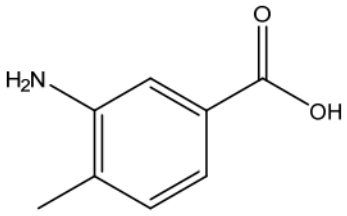
Şekil 1.4. Safsızlık A molekül yapısı.

Safsızlık B, metil 3-amino-4-metilbenzoat, molekül ağırlığı 165,19'dur.



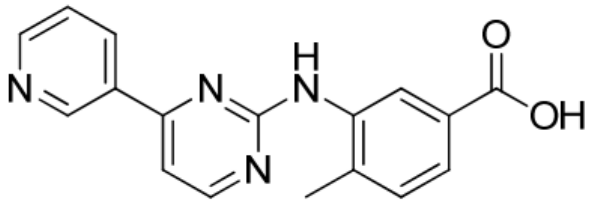
Şekil 1.5. Safsızlık B molekül yapısı

Safsızlık C, metil 3-amino-4-metilbenzik asit, molekül ağırlığı 151,17'dir.



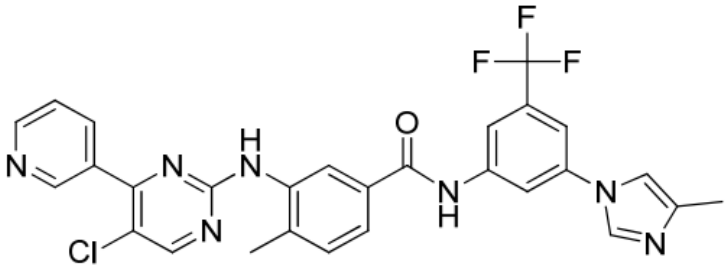
Şekil 1.6. Safsızlık C molekül yapısı.

Safsızlık D (NLT-2), 4-metil-3-(4-(piridin-3-il)pirimidin-2 ilamino)benzoik asit, molekül ağırlığı 306,33'dür.



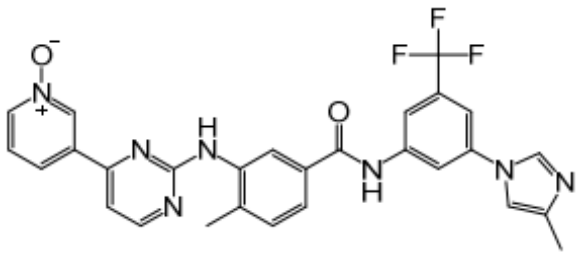
Şekil 1.7. Safsızlık D molekül yapısı.

Safsızlık NLT C, 3-((5-kloro-4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il)amino)-4-metil-N-(3-(4-metil-1Himidazol-1 -il)-5 (triflorometil)fenil)benzamid, molekül ağırlığı 563,97'dir.



Şekil 1.8. Safsızlık NLT C molekül yapısı.

Safsızlık N-oksit, 3-(2-((2-metil-5-((3-(4-metil-1H-imidazol-1 -il)-5-(triflorometil)fenil)karbamoil)fenil)amino)pirimidin-4-il)piridin 1-oksit, molekül ağırlığı 545,52'dir.



Şekil 1.9. Safsızlık N-oksit molekül yapısı.

1.4. İlaç Etken Maddelerinde ve Ürünlerde Safsızlığın Tanımı

Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) yönergelerine göre "Safsızlıklar, üründe bulunan ve Aktif Farmasötik Bileşenlerin (API) kendisi veya onu üretmek için kullanılan yardımcı maddedir". Kısaca safsızlık, başlangıç maddesi veya ara ürünler gibi orijinal ilaçla bir arada bulunan veya herhangi bir yan reaksiyon nedeniyle oluşan herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Safsızlık profili, ilaç ürünlerinde bulunan tanımlanmış ve tanımlanamayan safsızlıkların bir tanımıdır.

1.4.1. Safsızlığın Sınıflandırılması

ICH safsızlıkları şu şekilde adlandırmıştır:

- Organik safsızlıklar
- İnorganik safsızlıklar
- Artık çözücüler

1.4.2. Safsızlık Kaynakları

- Kristalleşme ile ilgili safsızlıklar
- Stereokimya ile ilgili safsızlıklar

- Kalıntı solventler
- Sentetik ara ürünler ve yan ürünler
- Formülasyonla ilgili safsızlıklar
- Depolama sırasında ortaya çıkan safsızlıklar
- Yöntemle ilgili safsızlık
- Malzemeler arasında karşılıklı etkileşim
- İşlevsel grupla ilgili tipik bozulma

Degredant: Yukarıdaki safsızlık kaynakları arasında, farmasötik aktif kısmın kendisi, bozunma yoluyla ana kaynak olarak hareket eder, ayrışma, degredantlar olarak adlandırılan safsızlıklar üretir. Bir degredant, farmasötik bir maddedeki en basit istenmeyen bileşenlerdir; farmasötik ajanın kendisinin bozunmasıyla veya bir formülasyondaki aktif bileşenin bir dozaj formundaki diğer bileşenlerden biriyle etkileşimi veya reaksiyonu yoluyla oluşturulabilir ve genellikle yapısal olarak ilaç molekülü ile yakından ilişkilidir. Karşılaşılan en yaygın bozunma yolları, ilaç molekülüne yönelik termal stresle veya termal stres olmadan oksidasyon veya hidrolizi içerir. Degredant, ilaç tedavisi gören hastalarda farmakolojik veya toksikolojik herhangi bir olumsuz tepkiye neden olabilir. Bu nedenle, hasta güvenliğini sağlamak için, toplu ilaçlar ve farmasötik formülasyonlardaki bozunma ürünlerinin saptanması, tanımlanması veya yapısının aydınlatması ve nicel olarak belirlenmesini amaçlayan bir grup analitik faaliyetler olarak tanımlanabilecek bozunma profili oluşturma çok önemlidir.

1.5. Zorla Bozundurma Çalışmaları

Zorla bozunma çalışmalarının, potansiyel bozunmuş ürünlerin tanımlanması, bozunma yolu ve ilaç molekülünün içsel stabilitesi ile bağlantılı olarak büyük miktarda veri üretmesi beklenir [26]. Zorla bozunma çalışmaları etken maddeyi ve ilacı hidrolitik, oksidasyon, fotolitik ve termal koşullara maruz bırakarak gerçekleştirilir [26, 27]. Hidrolitik çalışma asidik ve bazik koşullar altında gerçekleştirilir. Oksidasyon koşullarında, hidrojen peroksitler kapsamlı bir şekilde uygulanır. İlaç maddelerinin oksidatif bozunması, reaktif anyonlar ve katyonlar oluşturmak için bir elektron transfer mekanizmasını içerir [28]. Benzilik karbon, alilik karbon ve tersiyer karbon veya hetero

atoma göre α-konumları gibi kararsız hidrojene sahip fonksiyonel grup, oksidasyonlara eğilimlidir. Foto stabilite çalışmaları, UV veya floresan koşullarına maruz bırakılarak ilaç maddelerinin esas olarak birincil degredantlarını oluşturmak için yapılır. İlaç maddeleri minimum 1,2 milyon lux ve 200 Wh/m^2 ışığa maruz bırakılır. Fonksiyonel gruplardan bazıları, yani karboniller, nitro aromatik, N-oksit, alkenler, aril klorürler, zayıf C-H ve O-H bağları, sülfürler ve polienler ışığa duyarlıdır. Termal bozulmalar, ilacın kuru ısıya ve ıslak ısıya maruz bırakılmasıyla incelenir. Sıcaklığı daha kısa süre için artırarak termal bozunma gerçekleştirmek mümkün olabilir. Kararlılık gösteren yöntemde yer alan adımlar arasında örnek oluşturma, yöntem geliştirme ve optimizasyon, yöntem doğrulama yer alır [27].

1.6. Analitik Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu, belirli bir test için kullanılan analitik prosedürün amaçlanan kullanıma uygun olduğunu doğrulamak için kullanılan süreçtir.

1.5.1. Validasyon Tanımı ve Amacı

Analitik yöntem geliştirildikten sonra, analitik yöntemin validasyonunun gerçekleştirilmesi önemlidir. ICH Q1B, analitik prosedürlerin doğrulanmasına ilişkin yönergeler sağlar. Yöntem validasyonu, geliştirilen analitik yöntemin amaçlanan amacına uygun olmasını sağlar. Doğrulama parametreleri birden fazla parametre içerir[29].

1.5.2. Analitik Yöntem Validasyon parametreleri

1.5.2.1. Seçicilik

ICH'e göre, tanımlama testlerin doğrulanması, safsızlıkların belirlenmesi sırasında özgüllük araştırması yapmak gerekir. Özgüllüğü göstermek için kullanılan metotlar, analitik metodun amaçlanan amacına bağlı olmalıdır. Etken piki ve safsızlık pikleri birbirinden ayrılmalıdır. Analit içermeyen numuneler ve analit içeren numunelerin alıkonma süreleri birbiriyle kıyaslanarak tanımlamalar yapılmalıdır. Safsızlık testi için, ayrım, etkin maddeye veya ilaç ürününe uygun safsızlık seviyeleri eklenerek ve bu

safsızlıkların ayrı ayrı numune matrisindeki diğer bileşenlerden ayrıldığının gösterilmesiyle sağlanabilir.

1.5.2.2. Sistem uygunluk

Analitik metotların kesin ve doğru neticeler vermesine katkıda bulunan spesifik testler sistem uygunluk testleri olarak bilinmektedir. Bu testlere ait olan yöntemler, uygulanan testlerin metotları, kullanılan ekipmanlar ve analizi yapılacak olan maddelere bağlı olarak hazırlanmak ve bu şekilde değerlendirilmek durumundadır.

1.5.2.3. Tespit Limiti

Sinyal-gürültü oranının belirlenmesi, bilinen düşük analit derişimlerine sahip örneklerden alınan ölçülen sinyallerin boş örneklerinkilerle karşılaştırılmasıyla ve analitin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği en düşük derişimin belirlenmesiyle ortaya koyulur. Genellikle sinyal-gürültü oranı 3 olarak, tespit limitini tahmin etmek için genellikle kabul edilir.

1.5.2.4. Hesaplanabilirlik Limiti

Sinyal-gürültü oranının belirlenmesi, bilinen düşük analit derişimlerine sahip örneklerden alınan ölçülen sinyallerin boş örneklerinkilerle karşılaştırılmasıyla ve analitin güvenilir bir şekilde ölçülebildiği en düşük konsantrasyonun belirlenmesiyle gerçekleştirilir. Sinyal-gürültü oranı 10:1 olmalıdır.

1.5.2.5. Raporlama Seviyesi

ICH el kitabına göre üründeki her bir safsızlık için ve ürünün günlük alımına ait maksimum doz için bir raporlama seviyesi hesaplanmaktadır. Bu raporlama seviyesi değerinden fazla olan safsızlıklar uygun analitik metoda göre analizlenmelidir.

Attachment 1: Thresholds for Degradation Products in New Drug Products

Reporting Thresholds

Maximum Daily Dose[1]	Threshold[2,3]
≤ 1 g	0.1%
> 1 g	0.05%

Identification Thresholds

Maximum Daily Dose[1]	Threshold[2, 3]
< 1 mg	1.0% or 5 µg TDI, whichever is lower
1 mg - 10 mg	0.5% or 20 µg TDI, whichever is lower
>10 mg - 2 g	0.2% or 2 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.10%

Qualification Thresholds

Maximum Daily Dose[1]	Threshold[2,3]
< 10 mg	1.0% or 50 µg TDI, whichever is lower
10 mg - 100 mg	0.5% or 200 µg TDI, whichever is lower
>100 mg - 2 g	0.2% or 3 mg TDI, whichever is lower
> 2 g	0.15%

Şekil 1.10. Safsızlık konsantrasyon hesaplama kriterleri

1.5.2.6. Doğrusallık

Bir analitik yönteme ait doğruluk, numunede bulunan ve analizi yapılacak olan maddenin hazırlanan bir konsantrasyonu ile o maddenin tayin edilmesi sonucunda bulunan konsantrasyonunun birbiriyle uyum yakınlığı olarak tanımlanır. Doğrusallığın oluşturulması için minimum beş konsantrasyon önerilmektedir.

1.5.2.7. Uygulama Aralığı

Yönteme ait belirtilen uygulama aralığı normal şartlarda doğrusallık çalışmalarından türetilmektedir. Bununla beraber yöntemin hedeflenen uygulamasına da bağlıdır. Analitik metodun belirtilen aralığı içinde veya bu aralığın uç noktalarında analit miktarları içeren numunelere uygulandığında analitik prosedürün kabul edilebilir bir doğruluk sağladığı teyit ederek belirlenir.

1.5.3.8. Doğruluk

Bir analitik yönteme ait doğruluk, bulunan değer ile kabul edilen bir referans değer olarak kabul edilen değer veya geleneksel bir gerçek değer ile arasındaki uyumunu ifade eder. Doğruluk, analitik yöntemin belirtilen aralığında belirlenmelidir. Doğruluk, bilinen miktarlarda safsızlık eklenen ilaç madde/ilaç ürünü gibi örnekler üzerinde incelenmelidir.

1.5.3.9. Kesinlik

Analitik yönteme ait kesinlik, aynı homojen bir numuneden yapılan artarda örneklemelerden elde edilen ölçüm serileri arasındaki saçınım derecesi olarak ifade edilmektedir. Kesinlik parametresi, homojen bir örnekle yapılmalıdır. Eğer homojen örneğe ulaşılamıyorsa yapay olarak hazırlanmalıdır.
Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik olara 3 düzeyde değerlendirilebilir.

1.5.3.10. Sağlamlık

Bir metota ait değişkenlerinin bilinerek yapılan küçük değişimlerden etkilenmeden kalabildiğinin ölçüsü analitik metodun sağlamlığı olarak bilinmektedir.

1.6. Stabilite Göstergeli Analitik Yöntem Geliştirme

İlaçların stabilite testi, bozunma ürünlerinden, proses safsızlıklarından ve diğer potansiyel safsızlıklardan etkilenmeden aktif farmasötik bileşenleri (API) ölçen doğru bir analitik yöntem gerektirir. Stabilite göstergeli HPLC yöntemleri ilaçlar için tasarlanmıştır. Stabilite göstergeli analitik yöntem, API'yi, bozunma ürünlerini ve diğer ilgili bileşenleri müdahale olmadan doğru bir şekilde test edebilen doğrulanmış, spesifik ve kantitatif analitik yöntemdir. Stabilite göstergeli yöntem, ilaç maddesinin ve ilaç ürününün kimyasal, fiziksel veya mikrobiyolojik özelliklerinde zamanla meydana gelen değişiklikleri tespit etmek için kullanılır. Bir ilaç ürününün kalitesi API'nin kalitesine bağlıdır. API'nin kendisindeki değişiklikler ve ilgili safsızlıklar, ilaç ömrü boyunca incelenmelidir. İdeal durum, API'nin ve tüm safsızlıkların tek bir yöntemle doğru bir şekilde ölçülebilmesidir. Bununla birlikte, tüm bileşenleri aynı anda incelemek için tek bir yönteme ulaşılamadığında ikincil doğrulanmış tamamlayıcı yöntem de kullanılabilir.

İlaçların stabilite testi, bozunma ürünleri, proses safsızlıkları ve diğer potansiyel safsızlıklardan etkilenmeden aktif farmasötik bileşenleri (API) ölçen doğru bir analitik yöntem gerektirir. Stabilite gösteren HPLC yöntemleri ilaçlar için tasarlanmıştır. Kararlılık gösteren analitik yöntem, API'yi, bozunma ürünlerini ve diğer ilgili bileşenleri müdahale olmadan doğru bir şekilde test edebilen doğrulanmış, spesifik ve kantitatif analitik yöntemdir. Stabilite belirleme yöntemi, ilaç maddesinin ve ilaç ürününün kimyasal, fiziksel veya mikrobiyolojik özelliklerinde zamanla meydana gelen değişiklikleri saptamak için kullanılır. Bir ilaç ürününün kalitesi API'nin kalitesine bağlıdır. API'nin kendisindeki değişiklikler ve ilgili safsızlıklar, ilaç ömrü boyunca incelenmelidir. İdeal bir durum, API'nin ve tüm safsızlıkların tek bir yöntemle doğru bir şekilde ölçülebilmesidir. Bununla birlikte, tüm bileşenleri aynı anda incelemek için tek bir yöntemin elde edilemediği durumlarda ikincil doğrulanmış tamlanmış yöntem de kullanılabilir. Stabilite bilgileri, IND (Araştırma Amaçlı Yeni İlaç Başvurusu) ve NDA (Yeni İlaç Uygulamaları) gibi düzenleyici başvurular için ve API veya ilaç ürünü için son kullanma tarihlerini belirlemek için gereklidir.

1.7. Literatürde Nilotinib Analiz Yöntemlerinin Yeri

Literatürde nilotinib için sıvı kromatografi (LC), sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS), tandem sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) vb. cihazların kullanıldığı plazma, biyolojik sıvılar, toplu ve farmasötik dozaj formlarında nilotinibin belirlenmesi için mevcut analitik yöntemler bulunmaktadır [30, 31].

Bouchet S. ve arkadaşları, nilotinib, benzer yapıya sahip 8 ilacın belirlenmesi için UPLC/MS-MS cihazının kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem katı faz ekstraksiyonu basamağı içermekte olup nilotinib için doğrusal aralık 10-500 ppb olarak belirlenmiştir [32].

Kralj E. ve arkadaşları, kan örneklerinde nilotinibin ve 2 farklı tirozin kinaz inhibitörü (TKI) ilacın birbiri yanında tayini için HPLC-MS/MS kullanmışlardır. Nilotinib doğrusal aralığı 50-5000 ppb olarak bulunmuştur [33].

Periferal tek çekirdekli kan hücrelerindeki Nilotinib ve 2 farklı ilacın birlikte tayin edilmesi için D'Avolio A. ve arkadaşları, HPLC-MS kullanılan bir yöntemi geliştirmiş olup yönteme ait olan tayin sınırı 0,25 ng olarak belirlenmiştir [34].

İnsan plazması ve serumdaki nilotinib tayini için Parise RA. ve arkadaşları tarafından

geliştirilen yöntemde LC-MS kullanılmakta olup doğrusal aralık 5-5000 ppb'dir [35].
Haouala A. ve arkadaşlarının LC-MS/MS kullanılan ve insan plazmasındaki nilotinib yanında 6 farklı ilacın tayini için geliştirdikleri yönteme ait olan tayin sınırı 1-10 ppb olarak bulunmuştur [31].
Yukarıda bahsedilen yöntemler oldukça nitelikli personele ve oldukça titiz bir numune hazırlık sürecine sahiptir. Bununla birlikte bu yöntemler her ne kadar geniş doğrusal aralığa ve düşük tespit limitlerine sahip olsalar da laboratuvar için pahalı ve gelişmiş cihazlar gerektirmektedir. Ayrıca numunenin analize hazırlık aşaması da bir hata kaynağı olabilmektedir. Özellikle, LC–MS/MS yöntemiyle birden fazla tirozin kinaz inhibitörü ve bunların metabolitlerini aynı anda tayin edilebilir. Ancak, LC–MS/MS'nin yüksek satın alma ve yüksek bakım maliyetine ilave olarak işletme maliyetleri de araştırma laboratuvarlarında erişilebilirliği sınırlamaktadır. Ayrıca yöntemlerin bazısı zaman alıcı olan katı faz ekstraksiyonu basamağını içermektedir. Analitik cihazların maliyetlerini ve kullanılabilirliğini göz önünde bulundurmak önemli olduğundan, HPLC ile yapılacak olan bir tayinin en büyük yararlarından biri, LC-MS/MS cihazının yüksek maliyetine kıyasla küçük laboratuvarlarda kullanılabilirliğidir [36].
Tez kapsamında toplu ve farmasötik dozaj formlarında nilotinib hidroklorür ve bununla ilgili safsızlıkların belirlenmesi için basit, kesin, doğru, sağlam ve kararlılık gösteren bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve ardından mevcut duruma göre yöntem doğrulaması yapılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Nilotinib hidroklorür çalışma standardı, Safsızlık A (NLT-1) standardı, Nltc safsızlık standardı ve Safsızlık D (NLT-2) standardı Pliva Croatia firmasından, Safsızlık B standardı ve Safsızlık C standardı European Pharmacopoeia'dan, N-Oksit safsızlık standardı Simson Pharma firmasından satın alınmıştır. Nilotinib 50 mg Film Kaplı Tablet Tobio Novelfarma formülasyon laboratuvarında üretilmiştir.

Su : HPLC kalitede
Etanol: J.T. Baker, Lot: 2108901810
Potasyum Dihidrojen Fosfat: Merck , Lot: K52128763
Fosforik Asit: J.T. Baker, Lot:1710301861

2.1.2. Kullanılan Gereçler

Hassas Terazi, Mettler Toledo / MS205DU
Manyetik Karıştırıcı, Heidoplh / Mr Hei Standart
pH metre, Mettler Toledo / S400-Bio
Ultrasonik Banyo, Çalışkan
Vortex Cihazı, Heidolph / Reaxtop
Santrifüj Cihazı,
Ultra Saf Su Cihazı,
HPLC Sistemi, Waters / e2695
HPLC UV Dedektör, Waters
HPLC PDA Dedektör, Waters
HPLC kolonu, YMC-PACK ODS-AQ, 150 mm x 4,6 mm, 3,0 µm
FTIR, Shimadzu
DSC-60 Plus, Shimadzu

Analizlerin tümü TOBIO Pharmaceuticals firması analitik laboratuvarında yapılmıştır.

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Tampon Çözelti Hazırlığı: 1,36 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 mL saf su içerisine aktarılır ve karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Çözeltinin pH'sı 3,0 ± 0,05'e fosforik asit ile ayarlanır. 0,45 µm NY filtreden süzülür, degaze edilir.

Hareketli Faz A Hazırlığı: Tampon çözeltisi Hareketli Faz A olarak kullanılır.

Hareketli Faz B Hazırlığı: Asetonitril Hareketli Faz B olarak kullanılır.

Çözücü Hazırlığı: Etanol ve Saf su (50:50, h:h) oranında karıştırılır.

Plasebo Çözeltisi Hazırlığı: Yaklaşık 20,0 mg Nilotinib içermeyen kapsül plasebosu 200 mL'lik balonjojeye tartılır. Üstüne bir miktar çözücü eklenip 5 dakika ultrasonik banyoda bekletilir ve etanol:su (50:50) ile 200 mL'ye tamamlanır. Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra 0,45 µm RC filtre kullanılırak süzülür ve ardından viallenir.

İlgili Bileşikler Numune Çözeltisi Hazırlanması

10 adet Nilotinib 50 mg Kapsül havanda ezilerek toz haline getirilir. Bu tozdan 40,0 mg (20 mg Nilotinib içerir) alınır, 200 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır ve etanol:su (50:50) ile 200 mL'ye tamamlanır. Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzülür ve ardından viallenir. ($C_{Nilotinib}$: 100 µg mL^{-1})

Stok Nilotinib Standart Çözeltilerini Hazırlanması: 20 mg Nilotinib'e eşdeğer olacak şekilde yaklaşık 21,37 mg Nilotinib HCl, 100 mL'lik bir balonjoje içerisine hassas bir şekilde tartıldıktan sonra üzerine bir miktar çözücü eklenir ve 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Elde edilen çözelti çözücüyle 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltiden alınan 1,0 mL, son hacmi 100 mL'ye çözücü ile tamamlanır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,002 mg mL^{-1})

Nilotinib Standart Çözeltisi Hazırlanması: Stok olarak hazırlanan Nilotinib standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım 1 son hacmi 100 mL'ye çözücü ile tamamlanır. .

Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzülür ve ardından viallenir. ($C_{Nilotinib}$: 0,0002 mg mL^{-1})

Stok NLT-1 Standart Çözeltisi: 1,0 mg NLT-1 standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır ve 25 mL'ye çözücü ile tamamlanır, karıştırılır.
(C_{NLT-1}: 0,04 mg mL^{-1})

Stok Safsızlık B Standart Çözeltisi: 1,0 mg Safsızlık B standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır ve 25 mL'ye çözücü ile tamamlanır, karıştırılır. ($C_{Safsızlık\ B}$: 0,04 mg mL^{-1})

Stok Safsızlık C Standart Çözeltisi: Safsızlık C standardından alınan 1,0 mg'lık kısım 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır ve 25 mL'ye çözücü ile tamamlanır, karıştırılır. ($C_{Safsızlık\ C}$: 0,04 mg mL^{-1})

Stok NLTC Standart Çözeltisi: 1,0 mg NLTC standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Asetonitril ile 25 mL'ye tamamlanır.
(C_{NLTC}: 0,04 mg mL^{-1})

Stok NLT-2 Standart Çözeltisi: 1,0 mg NLT-2 standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Asetonitril ile son hacme tamamlanır, karıştırılır.
(C_{NLT-2}: 0,04 mg mL^{-1})

NLT-2 Standart Çözeltisi: Stok NLT-2 standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir ve karıştırılır.
(C_{NLT-2}: 0,002 mg mL^{-1})

Stok N-Oksit Standart Çözeltisi: 1,0 mg Nilotinib N-Oksit standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Asetonitril ile son hacme tamamlanır, karıştırılır.
($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,04 mg mL^{-1})

N-Oksit Standart Çözeltisi: Stok N-Oksit standart çözeltisinden 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir ve karıştırılır.
($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,002 mg mL^{-1})

Spike Numune Çözeltisi: 10 adet Nilotinib 50 mg Film Kaplı Tablet havanda ezilerek toz haline getirilir. Bu tozdan 40,0 mg (20,0 mg Nilotinib içerir) alınır, 200 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır. Bu çözeltiye Stok NLT-1, Safsızlık B, Safsızlık C, NLTC , NLT-2, N-OKSİT standart çözeltilerinden 1' er mL ilave edilir Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra 0,45 µm RC filtre kullanılarak süzülür ve ardından viallenir. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,1 $mgmL^{-1}$, $C_{NLT\text{-}1}$: 0,0002mg mL^{-1}, $C_{İMPB}$: 0,0002 $mgmL^{-1}$, $C_{İMPC}$: 0,0002 $mgmL^{-1}$; C_{NLTC}: 0,0002mg mL^{-1} ; $C_{NLT\text{-}2}$: 0,0002 $mgmL^{-1}$; $C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,0002 $mgmL^{-1}$).

Limit Konsantrasyonunda NLT-1 Çözeltisi: Stok NLT-1 standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir ve karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1 mL'lik kısım çözücü ile bu defa 10 mL'ye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. ($C_{NLT\text{-}1}$: 0,0002 mg mL^{-1})

Limit Konsantrasyonunda Safsızlık B Çözeltisi: Stok Safsızlık B standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir ve karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1 mL'lik kısım çözücü ile bu defa 10 mL'ye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. ($C_{Safsızlık\ B}$: 0,0002 mg mL^{-1})

Limit Konsantrasyonunda Safsızlık C Çözeltisi: Stok Safsızlık C standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile

seyreltilir ve karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1 mL'lik kısım çözücü ile bu defa 10 mL'ye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. ($C_{Safsızlık\ C}$: 0,0002 mg mL^{-1})

Limit Konsantrasyonunda NLTC Çözeltisi: Stok NLTC standart çözeltisinden alınan 1,0 mL'lik kısım son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir ve karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1 mL'lik kısım çözücü ile bu defa 10 mL'ye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. (C_{NLTC}: 0,0002 mg mL^{-1})

Limit Konsantrasyonunda NLT-2 Çözeltisi: NLT-2 standart çözeltisinden alınan 1 mL'lik hacim, 10 mL'lik çözücü ile tamamlanır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. (C_{NLT-2}: 0,0002 mg/ mL)

Limit Konsantrasyonunda N-OKSİT Çözeltisi: N-Oksit standart çözeltisinden alınan 1 mL'lik hacim, 10 mL'lik çözücü ile tamamlanır ve 0,45 µm RC filtreden süzülerek viallenir. ($C_{NİLOTİNİB\ N\text{-}OKSİT}$: 0,0002 mg/ mL)

Tespit Limiti Nilotinib Numune Hazırlığı: 20 mg Nilotinib'e eşdeğer olacak şekilde yaklaşık 21,37 mg Nilotinib HCl çalışma standardı 100 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartıldıktan sonra üzerine bir miktar çözücü ekledir ve 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutularak çözünmesi sağlanır ve 100 mL'ye çözücü ile tamamlanır, karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1,0 mL kısım, 100 mL'ye çözücü ile tamamlanır, karıştırılır. Elde edilen çözeltiden 1,0 mL'lik hacmin çözücü ile 10 mL son hacme tamamlanmasıyla ikinci seyreltilmiş çözelti hazırlanır. Son hazırlanan çözeltiden alınan 1 mL'lik kısım alınarak 25 mL son hacme çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır. Üçüncü seyreltme sonucu elde edilen çözeltiden 3,0 mL alınır ve 10 mL'ye çözücü ile tamamlanır ve karıştırılır.
($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0000024 mg mL^{-1})

Tespit Limiti NLT-2 Numune Hazırlığı: Yaklaşık 1,0 mg NLT-2 standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanır ve asetonitril ile 25 mL'ye tamamlanır, karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1,0 mL, son hacmi 20 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir. Ele geçen çözeltiden 1,0 mL'lik bir hacim alınır ve çözücü ile 10 mL'ye

tamamlanır ve karıştırılır. İkinci seyreltme sonucu elde edilen çözeltiden 1 mL'lik bir hacim alınır ve çözücü ile 20 mL'ye seyreltilir. En son ele geçen çözeltiden 3,0 mL alınır ve 10 mL'ye çözücü ile tamamlanır. (C_{NLT-2}: 0,000003 mg mL^{-1})

Tespit Limiti N-Oksit Numune Hazırlığı: Yaklaşık 1,0 mg Nilotinib N-Oksit standardı 25 mL'lik balonjojeye hassas bir şekilde tartılır. Bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanır ve asetonitril ile 25 mL'ye tamamlanır, karıştırılır. Bu çözeltiden alınan 1,0 mL, son hacmi 25 mL olacak şekilde çözücü ile seyreltilir. Ele geçen çözeltiden 1,0 mL'lik bir hacim alınır ve çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. İkinci seyrelte sonucu elde edilen çözeltidem 1 mL'lik bir hacim alınır ve çözücü ile 20 mL'ye seyreltilir. En son ele geçen çözeltiden 3,0 mL alınır ve 10 mL'ye çözücü ile tamamlanır ($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,000003 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 1 (LOQ): Stok Nilotinib standart çözeltisinden alınan 1,0 mL, 10 mL'ye çözücü ile seyreltilir. Bu çözeltiden 1 mL alınır ve çözücü ile 25 mL'ye tamamlanır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,000008 mg mL^{-1})
Standart NLT- çözeltisinden alınan 1,0 mL, 10 mL'ye çözücü ile seyreltilir. Bu çözeltiden 1 mL alınır ve çözücü ile 20 mL'ye tamamlanır. (C_{NLT-2}: 0,00001 mg mL^{-1})
Standart N-Oksit çözeltisinden alınan 1,0 mL, 10 mL'ye çözücü ile seyreltilir. Bu çözeltiden 1 mL alınır ve çözücü ile 25 mL'ye tamamlanır.
($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,00001 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 2 (%10): Stok Nilotinib standart çözeltisinden 0,1 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,00002 mg mL^{-1})

Standart NLT-2 çözeltisinden 0,1 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,00002 mg mL^{-1})
Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 0,1 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,00002 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 3 (%20): Stok Nilotinib standart çözeltisinden 0,2 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,00004 mg mL^{-1})

Standart NLT-2 çözeltisinden 0,2 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,00004 mg mL^{-1})
Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 0, mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N-OKSİT}$: 0,00004 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 4 (%50) (Nilotinib ve Bilinen İmpüriteler için Raporlama Seviyesi):
Stok Nilotinib standart çözeltisinden 0,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0001 mg mL^{-1})
Standart NLT-2 çözeltisinden 0,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,0001 mg mL^{-1})
Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 0,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N-OKSİT}$: 0,0001 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 5 (%80): Stok Nilotinib standart çözeltisinden 0,8 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,00016 mg mL^{-1})
Standart NLT-2 çözeltisinden 0,8 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,00016 mg mL^{-1})
Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 0,8 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N-OKSİT}$: 0,00016 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 7 (%120): Stok Nilotinib standart çözeltisinden 1,2 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,00024 mg mL^{-1})
Standart NLT-2 çözeltisinden 1,2 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,00024 mg mL^{-1})
Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 1,2 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N-OKSİT}$: 0,00024 mg mL^{-1})

Standart Çözelti 8 (%150): Stok Nilotinib standart çözeltisinden 1,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0003 mg mL^{-1})
Standart NLT-2 çözeltisinden 1,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır. (C_{NLT-2}: 0,0003 mg mL^{-1})

Standart Nilotinib N-Oksit çözeltisinden 1,5 mL'lik kısım çözücü ile 10 mL'ye tamamlanır ve karıştırılır ($C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,0003 mg mL^{-1})

Stok-1 Nilotinib Standart Çözeltisi: Son hacmi 100 mL olacak şekilde 20 mg Nilotinib'e eşdeğer olan yaklaşık 21,37 mg Nilotinib HCl çalışma standardı tartıldıktan sonra bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutularak çözülür ve ardından çözücü ile son hacme seyreltilir. Bu çözeltiden alınan 5,0 mL'lik kısım çözücü ile 50 mL'ye seyreltilir ve karıştırılır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,02 mg mL^{-1})

Stok-2 Nilotinib Standart Çözeltisi: 4 mL alınan Stok-1 Nilotinib standart çözeltisi çözücü ile 100 mL'ye tamamlanır. ($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0008 mg mL^{-1})

Doğruluk Numunesi %LOQ seviyesi: 100 mL'lik balonjojeye tartılan 10 mg Nilotinib 50 mg Kapsül plasebosu üzerine bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Bu balonjojeye Stok-2 Nilotinib standart çözeltisinden 1,0 mL, Standart NLT-2 çözeltisinden 0,5 mL, Standart N-Oksit çözeltisinden 0,5 mL alınır ve çözücü ile son hacme tamamlanır, karıştırılır ve RC filtreden (0,45 µm) süzülerek viallenir.
($C_{NİLOTİNİB}$: 0,008 µg mL^{-1}, $C_{NLT\text{-}2}$: 0,00001 mg mL^{-1}, $C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,00001 mg mL^{-1})

Doğruluk Numunesi %100'lük seviye: 100 mL'lik balonjojeye tartılan 10 mg Nilotinib 50 mg Kapsül plasebosu üzerine bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur Bu balonjojeye Stok-1 Nilotinib standart çözeltisinden 1,0 mL, stok NLT-2 standart çözeltisinden 0,5 mL, Standart N-Oksit çözeltisinden 0,5 mL alınır ve çözücü ile son hacme tamamlanır, karıştırılır ve RC filtreden (0,45 µm) süzülerek viallenir.
($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0002 mg mL^{-1}, $C_{NLT\text{-}2}$: 0,0002 mg mL^{-1}, $C_{N\text{-}OKSİT}$: 0,0002 mg mL^{-1})

Doğruluk Numunesi %150'lik seviye: 100 mL'lik balonjojeye tartılan 10 mg Nilotinib 50 mg Kapsül plasebosu üzerine bir miktar çözücü eklendikten sonra 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Bu balonjojeye Stok-1 Nilotinib standart çözeltisinden 1,5 mL, stok NLT-2 standart çözeltisinden 0,75 mL, Standart N-Oksit çözeltisinden 0,75 mL alınır ve çözücü ile son hacme tamamlanır, karıştırılır ve RC filtreden (0,45 µm) süzülerek

viallenir.

($C_{NİLOTİNİB}$: 0,0003 mg mL^{-1}, C_{NLT-2}: 0,0003 mg mL^{-1}, $C_{N-OKSİT}$: 0,0003 mg mL^{-1})

2.2. Yöntem

2.2.1. Yöntem Geliştirme

2.2.2. Validasyon çalışmasındaki kromatografik koşullar

Kolon : YMC-PACK ODS-AQ, 150 mm x 4,6 mm, 3,0 µm

Akış hızı : 1,0 ml/dk

Dalga Boyu : 265 nm

Enjeksiyon hacmi : 20 µl

Kolon sıcaklığı : 40 ^{o}C

Tray sıcaklığı : 15 ^{o}C

Analiz süresi : 40 dakika

Akış türü : Gradient

Seal wash : Asetonitril – Su (20:80, h/ h) (HPLC kalitede) karıştırılır.

Needle wash : Etanol (%100) (HPLC kalitede) kullanılır.

Tablo 2.1. Gradient programı

Zaman (dakika)	Hareketli Faz- A (%)	Hareketli Faz- B (%)
0,0	75	25
10,0	75	25
30,0	50	50
35,0	50	50
36,0	75	25
40,0	75	25

2.3.3. Validasyon Parametreleri

2.2.3.1. Seçicilik

Nilotinib HCl etken maddesi ve proses ve bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabilite göstergeli analitik yöntemin uygunluğunu incelemek için, 2.1.3'de hazırlanan şekilde blank(çözücü), plasebo çözeltisi, Nilotinib standart çözeltisi, ilgili bileşikler numune çözeltisi, limit seviyesinde NLT-1, Safsızlık B, Safsızlık C, NLTC, NLT-2 ve N-Oksit çözeltileri, Spike numune çözeltisi PDA dedektörlü HPLC cihazına enjekte edildi. Tarama 190 nm-400 nm arasında yapıldı. Saflık açısı ve safsızlık eşik değerleri hesaplandı. Sonuçlar 3.2.1'de verilmiştir.

2.2.3.2. Taşınma Etkisi

Seçicilik parametresi için hazırlanan ilgili bileşikler numune çözeltisinden 1 tane vial hazırlandı. Numune çözeltisi enjeksiyonu ve sonrasında blank (çözücü) çözeltisi enjekte edildikten sonra carry-over (taşınma) miktarına bakıldı. Sonuçlar 3.2.1.1'de verilmiştir.

2.2.3.3. Filtre

Seçicilik parametresi için hazırlanan ilgili bileşikler numune çözeltisi santrifüj yapılarak filtesiz bir şekilde ve farklı filtre tipleri ile ilk akıtma, 1 mL akıtma ve 2 mL akıtma yapılarak viale alındı ve cihaza enjekte edildi. Alanları filtresiz çözelti ile karşılaştırılarak filtre uygunluğu değerlendirildi. Sonuçlar 3.2.1.2.'de verilmiştir.

2.2.3.4. Sistem Uygunluk

Nilotinib HCl etken maddesi ve proses ve bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabilite göstergeli analitik yöntemin sistem uygunluğu için 2.1.3'de hazırlandığı gibi Nilotinib etken maddesi 6 ardışık enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar 3.2.2'de verilmiştir.

2.2.3.5. Tespit Limiti (LOQ)

Nilotinib, NLT-2 ve N-Oksit standart çözeltilerinin tespit limiti konsantrasyonu bulunduktan sonra sinyal / gürültü (S/N) oranı ≥ 3,0 olan çözelti derişimi tespit limiti olarak belirlendi. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. Sonuçlar 3.2.4'de verilmiştir.

2.2.3.6. Hesaplanabilirlik Limiti (LOD)

Farklı düşük konsantrasyonlardaki nilotinib çözeltileri, bozunma safsızlıkları olan NLT-2 ve N-Oksit çözeltilerini de içerecek şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler cihaza enjekte edilmiştir. S/N oranı ≥ 10,0 olan çözelti konsantrasyonuna hesaplanabilirlik limiti olarak karar verilmiştir. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. Sonuçlar 3.2.3.de verilmiştir.

2.2.3.7. Raporlama Seviyesi

Nilotinib'in maksimum günlük alım dozu 1 g'ın altındadır. ICH Guideline'de 1 g'ın altındaki günlük alım dozlarında safsızlıklar için Raporlama seviyesi % 0,1, 1 g'ın üstündeki günlük alım dozlarında safsızlıklar için Raporlama seviyesi % 0,05 olarak verilmiştir. Nilotinib için günlük alım dozu 1 g'ın altında olduğundan ve % 0,1 seviyesinde hazırlanan çözeltiler 3 defa enjekte edildi. Raporlama seviyesi Standart çözeltisi 4 (%50) seviyesindedir. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. Sonuçlar 3.2.5'de verilmiştir.

2.2.3.8 Doğrusallık

Nilotinib HCl etken maddesi ve bozunma safsızlıklarının HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabilite göstergeli analitik yöntemin doğrusallığını incelemek ve bozunma safsızlıklarının miktarını hesaplamada gerekli olan RFF ve DF değerini bulmak için, tespit limiti seviyesi (LOQ), standart çözeltisi 2 (%10), Standart çözeltisi 3 (%20), Standart çözeltisi 4 (%50)(raporlama seviyesi), Standart çözeltisi 5 (%80), Nilotinib standart çözeltisi (%100), NLT-2 standart çözeltisi(%100), N-Oksit standart çözeltisi (%100), Standart çözeltisi 7 (%120), Standart çözeltisi 8 (%150)'inden HPLC cihazına enjekte edildi. Pik alanlarına karşı konsantrasyonlara göre doğrusallık grafikleri oluşturuldu. Regresyon veri çözümleme analizi yapıldı. NLT-2 ve N-Oksit safsızları için

RRF ve DF değerleri hesaplandı. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. Sonuçlar 3.2.6'da verilmiştir.

2.2.3.9. Uygulama aralığı

Doğrusallık çalışmasının üst ve alt derişimindeki (LOQ seviyesi ile %150) çözeltilerden 3 kez enjeksiyon yapıldı ve kabul kriterine uygunluğu kontrol edildi. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. Sonuçlar 3.2.7'de verilmiştir.

2.2.3.10. Doğruluk

Nilotinib HCl etken maddesi ve bozunma safsızlıkları NLT-2 ve N-Oksit HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabilite göstergeli analitik yöntemin, doğruluğunu tetkik etmek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde tespit limiti, %100 ve %150 seviyesi çözeltileri hazırlandı. Çözelti hazırlıkları 2.1.3'de verilmiştir. İlgili standart grafiklerinden yüzde geri kazanımları hesaplandı. Sonuçlar 3.2.8'de verilmiştir.

2.2.3.11. Kesinlik

Nilotinib HCl etken maddesi ve bozunma safsızlıkları NLT-2 ve N-Oksit HPLC yöntemi ile bir arada analizi için geliştirilen stabilite göstergeli analitik yöntemin tekrarlanabilirliği için 2.1.3'de hazırlandığı gibi Nilotonib 50 mg kapsül farmasötik ürünü kullanılarak 6 farklı spike test çözeltisi hazırlandı. Ara kesinlik için, Nilotinib 50 mg Kapsül farmosötik ürünü kullanılarak 6 farklı spike test çözeltisi hazırlanıp aynı laboratuvarda, farklı bir cihazda, aynı markaya ait olan ve farklı bir seri numaraya sahip kolon kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen değerlere ait ortalama, standart ve relatif standart sapmalar (sırasıyla, SD ve RSD), güven aralığı (%95), yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik ortalamaları arasındaki fark hesaplandı. Sonuçlar 3.2.9'da verilmiştir.

2.2.3.12. Sağlamlık

Nilotinib HCl etken maddesi sağlamlığını incelemek amacı ile kromatografik koşullardaki bazı değişikliklerin yöntem performansını nasıl etkilediği araştırıldı.

2.1.3'de hazırlandığı şekilde standart Nilotinib çözeltisi hazırlandı. Dalga Boyu, 265 ± 2 nm olarak değiştirildi. Dalga Boyu, 263 nm ve 267 nm olarak 3'er standart nilotinib çözeltisi enjeksiyonu yapıldı. Akış Hızı 1,0 mL iken, Akış Hızı, dakikada 0,9 mL ve 1,1 mL olacak şekilde 3'er standart enjeksiyonu yapıldı. Kolon Sıcaklığı, 40±5 °C olarak değiştirilmiş olup kolon sıcaklığı, 35 °C ve 45 °C olacak şekilde 3'er enjeksiyon yapıldı. Sonuçlar normal parametrelere göre, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı ve alıkonma zamanı olarak kıyaslandı ve uygunluğu değerlendirildi. Sonuçlar 3.2.10.1'de verilmiştir.

2.2.3.13. Stabilite

Nilotinib standart çözeltisi ve ilgili bileşikler numune çözeltisi 2.1.3'de anlatılan yönteme göre hazırlanarak 48 saat boyunca belli sürelerde analiz edildi. Belirtilen stabilite süresinde etkin pikinin ve safsızlık piklerinin yüzde değişimi incelendi. Sonuçlar 3.2.10.2'de verilmiştir.

2.2.4. Bozundurma Çalışmaları

Bozundurma çalışmalarında belirlenen stres tiplerine göre ilgili bileşikler, miktar tayini, blank çözeltisi ve ürün için yapılan plasebo için bozunma çözeltileri hazırlanmıştır. Hplc sistemine verilerek bozunma oranlarına ve miktar değişimlerine bakılmıştır. Çıkan sonuçlar blank çözeltileriyle kıyaslanmıştır. Piklerin saflıkları değerlendirilmiştir.

2.2.4.1. Işığa Maruz Bırakma

Yeterli miktarda etken numune ICH guideline Q1B'ye göre 2 döngü boyunca güneş ışığı kabininde bekletilmiş ve 1,2 milyon lüks saat aydınlatmaya maruz bırakılmıştır.
İlgili bileşikler hazırlığı: 20 mg etken madde alınarak 200 ml'ye tartılarak çözücüsü ile çözüldü. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanıldı. Sonuçlar 3.3.1'de verilmiştir.

2.2.4.2. Asit İle Bozundurma

200 mL'lik balon jojeye, 20 mg etken madde alınarak 1 mL etanol eklendi. Üstüne 1 ml 5 M HCL eklenip 1 saat boyunca 60 °C'de bekletildi. Sonra nötralize etmek için 5 M NaOH eklenerek çözücüsü ile hacmine tamamlandı. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanıldı. Blank çözeltisi hazırlığında, 200 ml'lik boş balon jojeye 1 mL etanol ve 1 mL 5 M HCl eklenerek 1 saat boyunca 60 °C'de bekletildi. Aynı şekilde 5 M NaOH eklenerek çözücü ile hacmine tamamlandı. Sonuçlar 3.3.2'de verilmiştir.

2.2.4.3. Baz İle Bozundurma

200 mL'lik balon jojeye, 20 mg etken madde alınarak 1 mL etanol eklendi. Üstüne 1 mL 1 M NaOH eklenip 1 saat boyunca 70 °C'de bekletildi. Sonra nötralize etmek için 1 M HCl eklenerek çözücüsü ile hacmine tamamlandı. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanıldı. Blank çözeltisi hazırlığında, 200 mL'lik boş balon jojeye 1 ml etanol ve1 ml 1 M NaOH eklenip 1 saat boyunca 70 °C'de bekletildi. Aynı şekilde 1 M HCl eklenerek çözücü ile hacmine tamamlandı. Sonuçlar 3.3.3 'de verilmiştir.

2.2.4.4. Oksidasyon İle Bozundurma

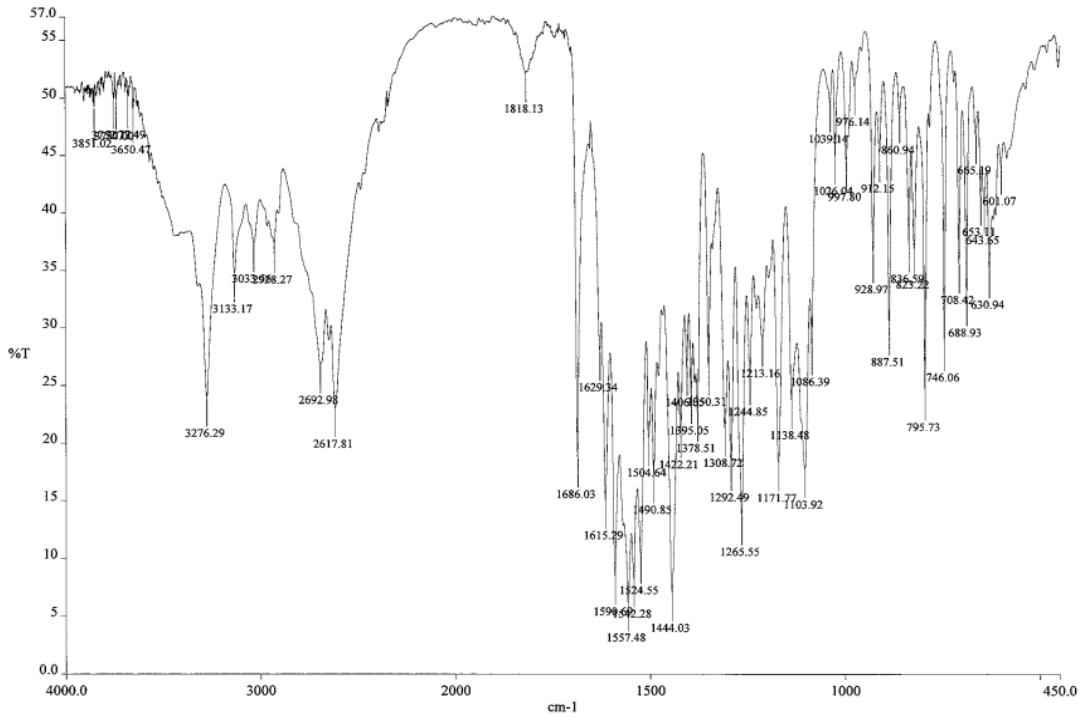
200 mL'lik balon jojeye, 20 mg etken madde alınarak 1 mL etanol eklendi. Üstüne 1 mL H_2O_2 eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Sonra çözücüsü ile hacmine tamamlandı. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanıldı. Blank çözeltisi hazırlığında, 200 mL'lik boş balon jojeye 1 mL etanol ve 1 mL H_2O_2 eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığın bekletildi. Aynı şekilde çözücü ile hacmine tamamlandı. Sonuçlar 3.3.4. 'de verilmiştir.

2.2.4.5. Sıcaklık İle Bozundurma

Belirli miktarda etken madde 8 gün boyunca 70 °C sıcaklıkta bekletildi. 20 mg'lık etken madde alınarak çözücü ile 200 mL son hacme tamamlandı. Bu çözelti hem safsızlık için hem de miktar tayini için kullanıldı. Sonuçlar 3.3.5.'de verilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

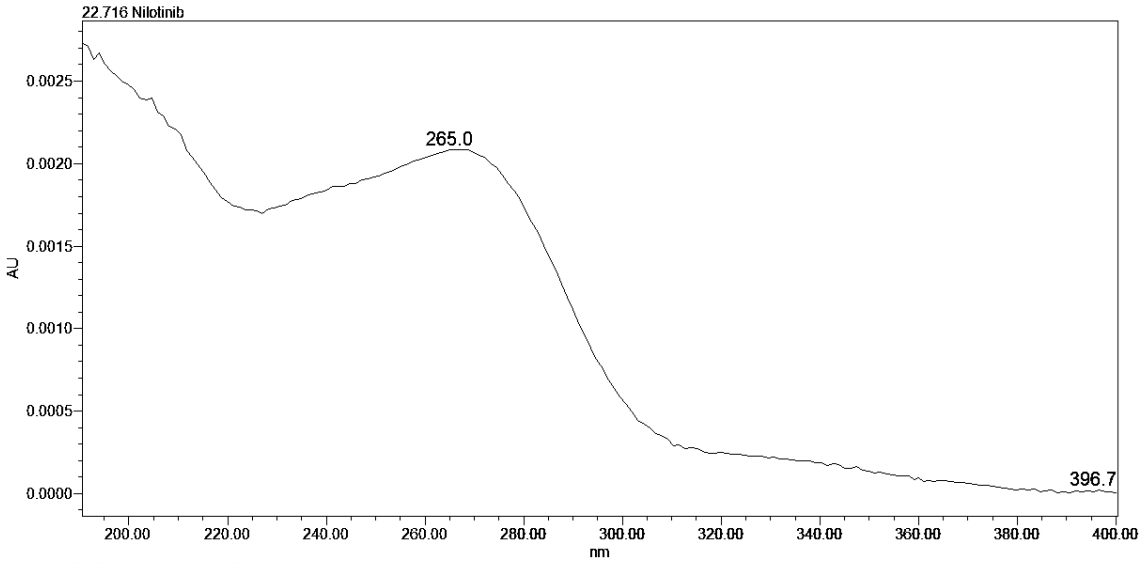
Nilotinib HCl ve safsızlıkları için karakterizasyon çalışmaları FT-IR ve morötesi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.1- Şekil 3.7'de verilmiştir.



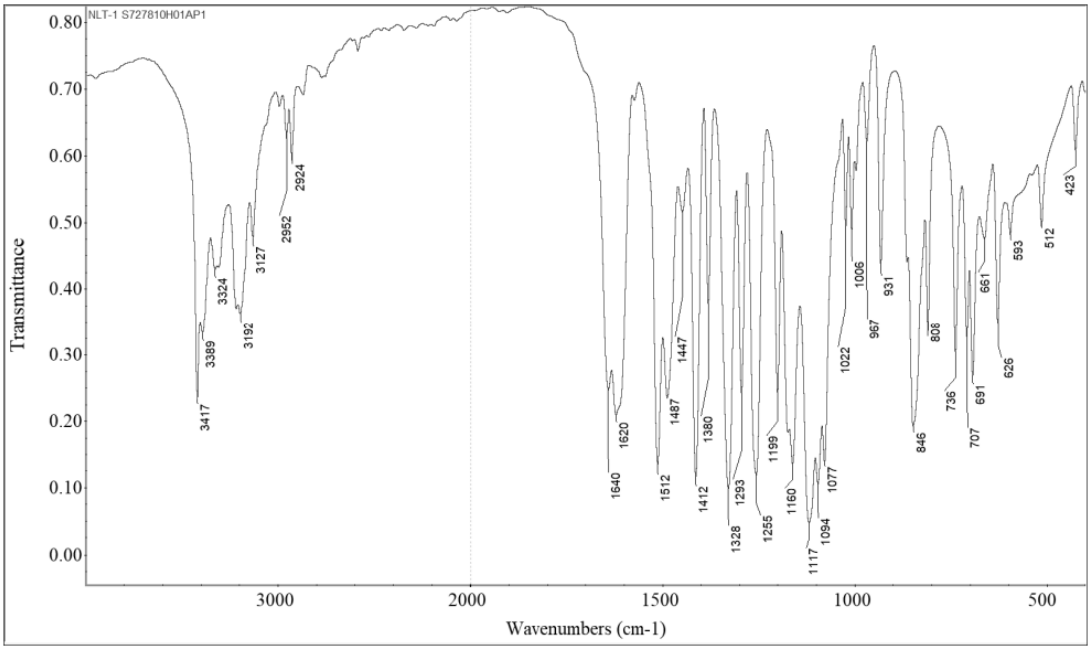
Şekil 3.1. Nilotinib hcl F-TIR spektrumu.

Tablo 3.1. Nilotinib Hcl için Karakteristik IR bantlarının belirlenmesi.

Bant / cm^{-1}	Belirleme
3276 cm^{-1}	N-H
2693, 2618 cm^{-1}	C-H
1686, 1615, 1590, 1557 cm^{-1}	C=O, C=N
1490, 1444, 1422 cm^{-1}	Car=Car



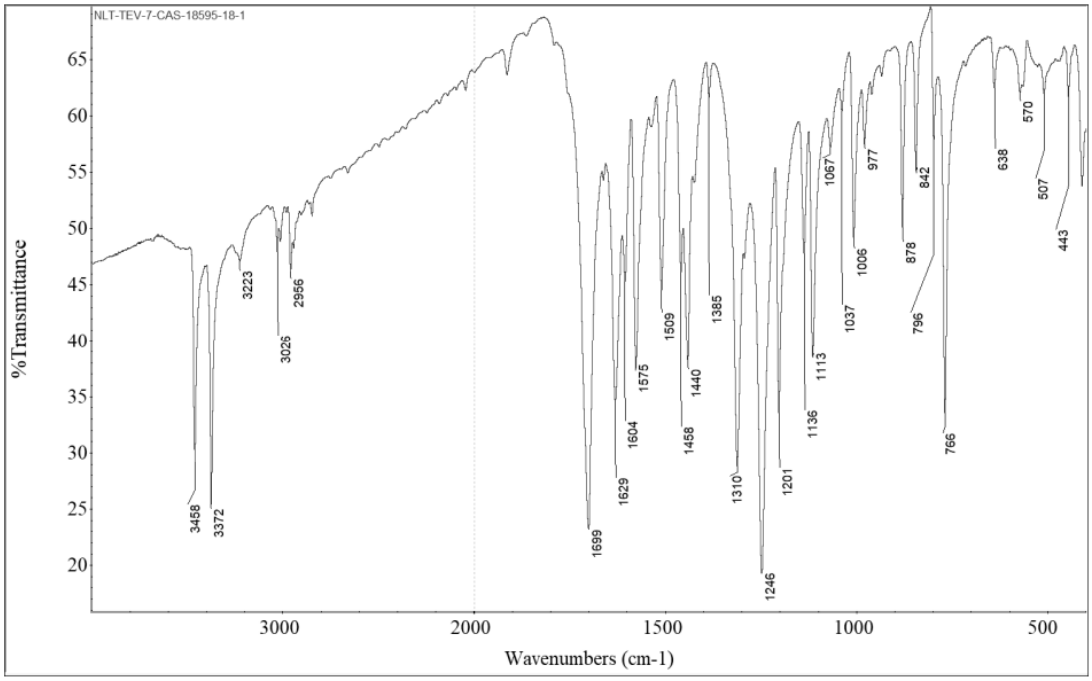
Şekil 3.2. Nilotinib HCl UV spekturumu.



Şekil 3.3. Safsızlık A F-TIR spektrumu.

Tablo 3.2. Safsızlık A için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi.

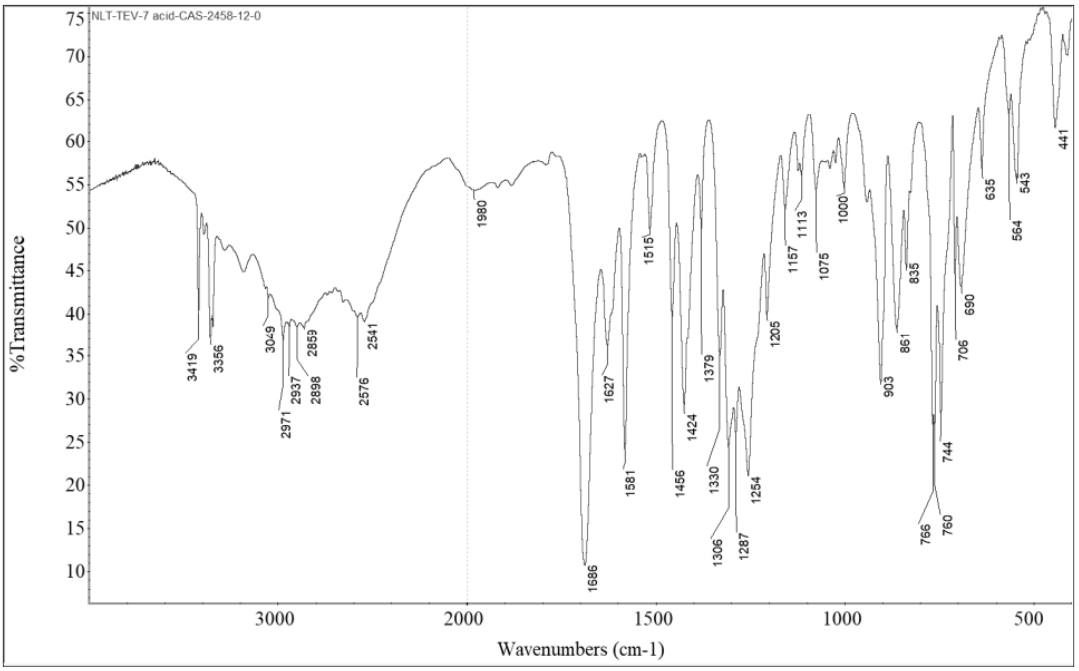
Bant / cm^{-1}	Belirleme
3127 cm^{-1}	N-H
2952, 2924 cm^{-1}	C-H
1640, 1620 cm^{-1}	Ar-NH_2
1640 cm-1, 1620 cm-1, 1512 cm^{-1}, 1487 cm^{-1}, 1447 cm^{-1}, 1412 cm^{-1}, 1380 cm^{-1}, 1006 cm^{-1}, 967 cm^{-1}	Ar C=C + imidazol C=C ve C=N
1328 cm^{-1}	Ar-NH_2 C-N
1293 cm^{-1}, 1160 cm^{-1}, 1117 cm^{-1}	Ar-CF_3 C-F
1077 cm^{-1}	1,3,5-üçlü. Ar C-H düzlem içinde
846 cm-1	1,3,5-üçlü. Ar C-H düzlem dışında
707 cm^{-1}, 691 cm^{-1}	Ar-NH_2 N-H düzlem dışında eğilme
691 cm^{-1}, 626 cm^{-1}, 512 cm^{-1}	Ar- CF_3 C-F titreşimi
626 cm^{-1}	İmidazol titreşimi
512 cm^{-1}	1,3,5-üçlü. Ar düzlem dışı halka



Şekil 3.4. Safsızlık B için F-TIR spekrumu.

Tablo 3.3. Safsızlık B için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi.

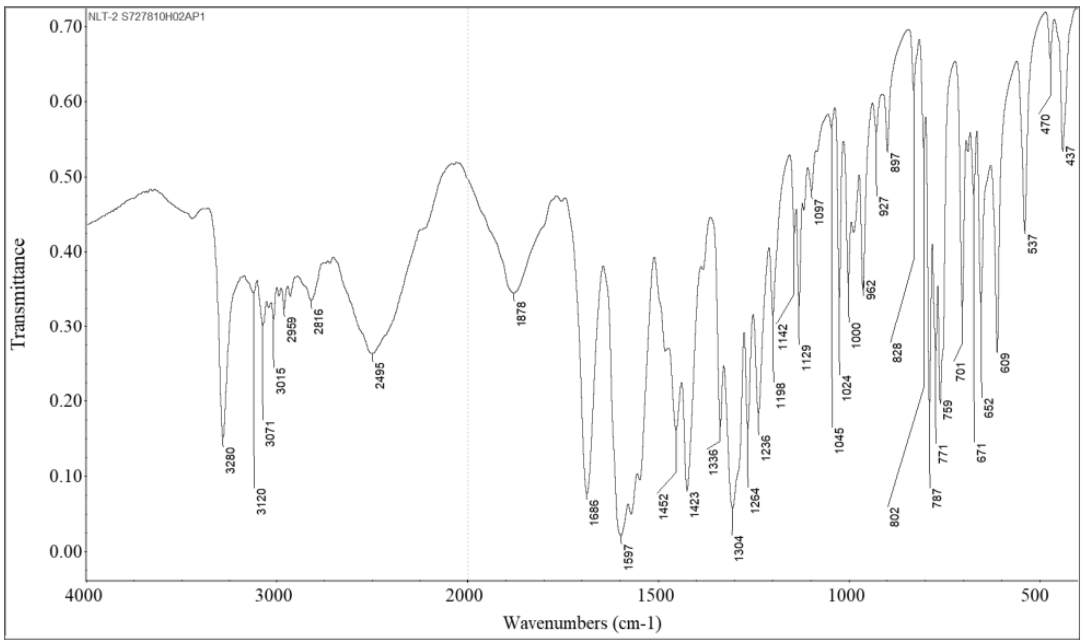
Bant / cm^{-1}	Belirleme
3458 cm^{-1}, 3372 cm^{-1}	N-H
3026 cm^{-1}, 2956 cm^{-1}	C-H
1699 cm^{-1}	Ester C=O
1629 cm^{-1}, 1604 cm^{-1}, 1575 cm^{-1}, 1509 cm^{-1}, 1458 cm^{-1}	Ar C=C
1575 cm^{-1}	Ar-NH_2 N-H
1458 cm^{-1}, 1440 cm^{-1}	O=CH_3
1310 cm^{-1}	Ar-NH_2 C-N
1246 cm^{-1}	Ester C-O-C
1201 cm^{-1}, 1136 cm^{-1}	O-CH_3 sallanma
1113 cm^{-1}	Ester C-O-C
1067 cm^{-1}	Ar-CH_3 + Ar-NH_2 kırılması/sallanması
1037 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem içi
878 cm^{-1}, 842 cm^{-1} , 766 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem dışı
443 cm^{-1}	Ar-NH_2 düzlem içi



Şekil 3.5. Safsızlık C için F-TIR spekrumu.

Tablo 3.4. Safsızlık C için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi

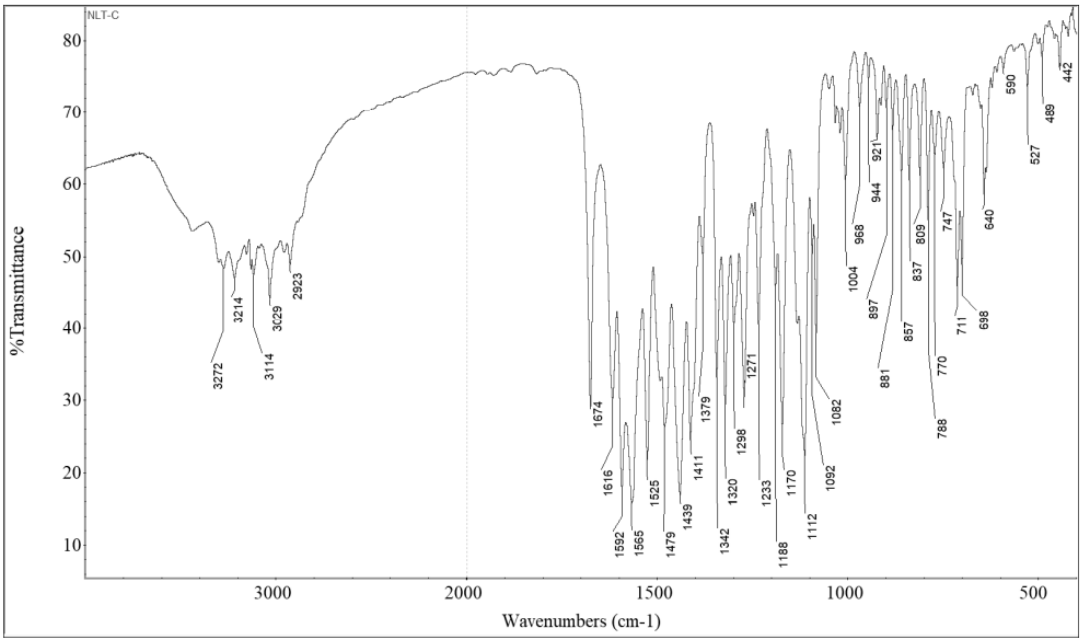
Bant / cm^{-1}	Belirleme
3419 cm^{-1}, 3356 cm^{-1}	N-H
3300-2500 cm^{-1}, 2576 cm^{-1}, 2541 cm^{-1}	asit bağı O-H
3049 cm^{-1}, 2859 cm^{-1}	C-H
1686 cm^{-1}	Ar-asit C=O
1627 cm^{-1}, 1581 cm^{-1}, 1515 cm^{-1}, 1456 cm^{-1}	Ar C=C
1581 cm^{-1}	Ar-NH_2 N-H
1306 cm^{-1}	Ar-NH_2 C-N
1287 cm^{-1}, 1254 cm^{-1}	asit C-O
1205 cm^{-1}, 1157 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem içi
1075 cm^{-1}	Ar-CH_3 sallanması + Ar-NH_2 kıvrılması/sallanması
903 cm^{-1}	asit O-H---O düzlem dışı
861 cm^{-1}, 835 cm^{-1}, 766 cm^{-1}, 760 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem dışı
766 cm^{-1}, 744 cm^{-1}	asit O-H
706 cm^{-1}	asit CO_2 düzlem içi
690 cm^{-1}	asit C-O
543 cm^{-1}	Asit C-O düzlem dışı sallanma
441 cm^{-1}	Ar-NH_2 düzlem içi+ asit sallanma titreşimi



Şekil 3.6. Safsızlık D (NLT-2) için F-TIR spekrumu.

Tablo 3.5. Safsızlık D (NLT-2) için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi.

Bant / cm-1	Belirleme
3280 cm^{-1}	N-H
3120 cm^{-1}, 2816 cm^{-1}	C-H
1674 cm^{-1}	Amid I
2495 cm^{-1}	ikiz yüklü NH^{+}
1686 cm^{-1}	ikiz yüklü CO_2^{-}
1597, cm^{-1} 1452 cm^{-1}, 1336 cm^{-1}, 1264 cm^{-1}, 1045 cm^{-1}, 1000 cm^{-1}, 962 cm^{-1}, 787 cm^{-1}	Ar C=C + piridin ve pirimidin C=C ve C=N
1423 cm^{-1}	ikiz yüklü CO_2^{-}
1381 cm^{-1}	Ar-CH_3
1304 cm^{-1}, 1236 cm^{-1}	Ar-NH C-N
1024 cm^{-1}	Ar-CH_3 sallanma
927 cm^{-1}, 828 cm^{-1}	2-ikameli piridin C-H düzlem dışı
897 cm^{-1}, 771 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem dışı
787 cm^{-1}	Ar C-H düzlem dışı (2H)
759 cm^{-1}	Ar-NH sallama
701 cm^{-1}, 437 cm^{-1}	2-ikameli düzlem dışı piridin halka
537 cm^{-1}	2-ikameli düzlem içi piridin halka
437 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar düzlem dışı halka



Şekil 3.7. Safsızlık NLTC için F-TIR spekrumu.

Tablo 3.6. Safsızlık NLTC için karakteristik IR bantlarının belirlenmesi.

Bant / cm-1	Belirleme
3272 cm^{-1}, 3214 cm^{-1}	N-H
3111 cm^{-1}, 2923	C-H
1674 cm^{-1}	amid I
1616 cm^{-1}, 1592 cm^{-1}, 1565 cm^{-1}, 1525 cm^{-1}, 1479 cm^{-1}, 1439 cm^{-1}, 1004 cm^{-1}, 968 cm^{-1}, 788 cm^{-1}	Ar C=C + piridin, pirimidin ve imidazol C=C ve C=N
1320 cm^{-1}, 1233 cm^{-1}	Ar-NH C-N
1271 cm^{-1}, 1170 cm^{-1}, 1112 cm^{-1}	Ar-CF_3 C-F
1233 cm^{-1}	amid III
1082 cm^{-1}	1,3,5-üçlü. Ar C-H düzlem içinde + Ar-Cl halkası ve C-Cl kombini
921 cm^{-1}, 837 cm^{-1}	2-ikameli piridin C-H düzlem dışında
897 cm^{-1}, 770 cm^{-1}	1,2,4-üçlü. Ar C-H düzlem dışında
857 cm^{-1}	1,3,5-üçlü. Ar C-H düzlem dışında
788 cm^{-1}	Ar C-H düzlem dışında (2H)

3.1. Y

öntem Geliştirme

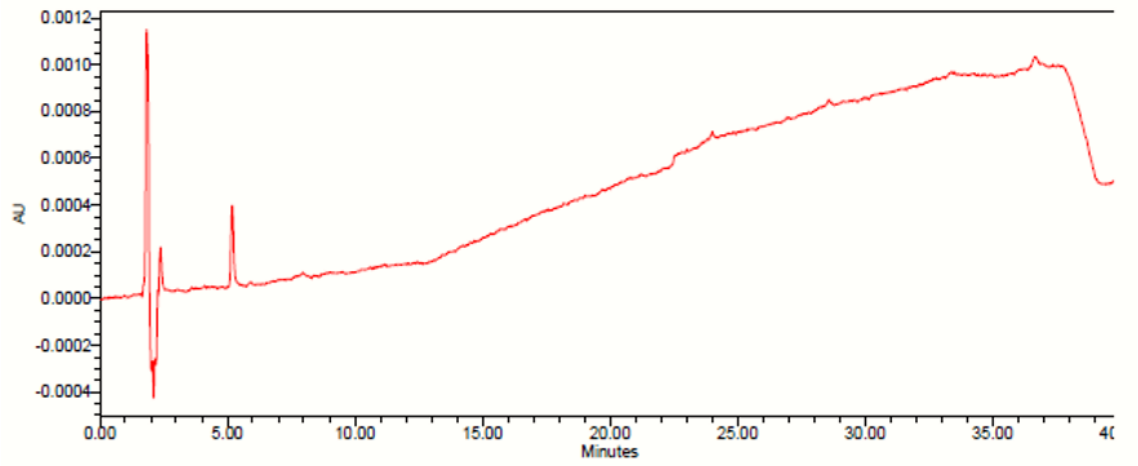
3.2. Validasyon Prametreleri

3.2.1. Seçicilik

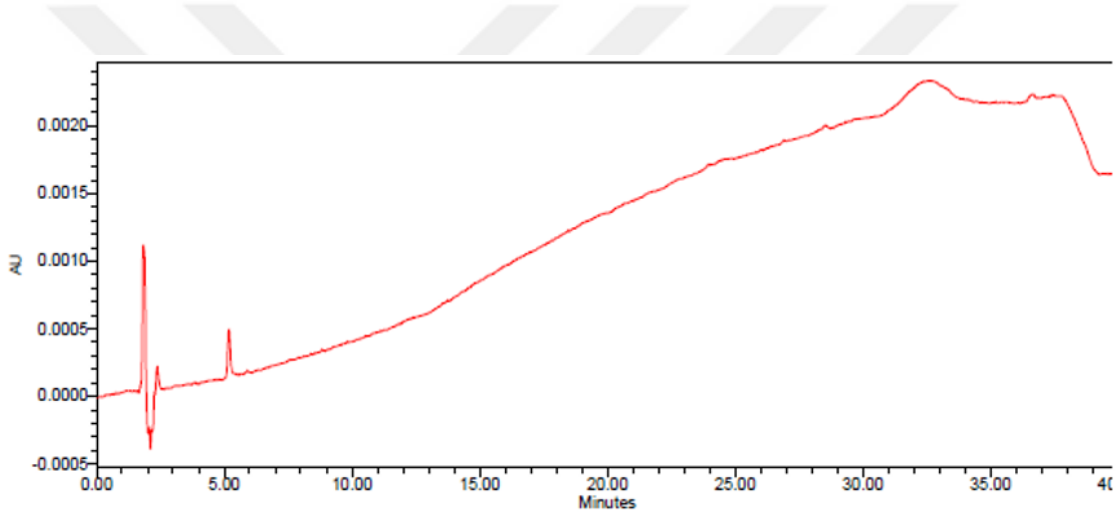
Geliştirilen stabilite göstergeli HPLC yönteminin Seçiciliğini ve Sistem Uygunluğunu incelemek amacıyla Bölüm 2.2.3.1'de bahsedildiği şekilde yapılan çalışmalara ait sonuçlar Tablo 3.7'de yer almaktadır.

Tablo 3.7. Pik tanımlaması

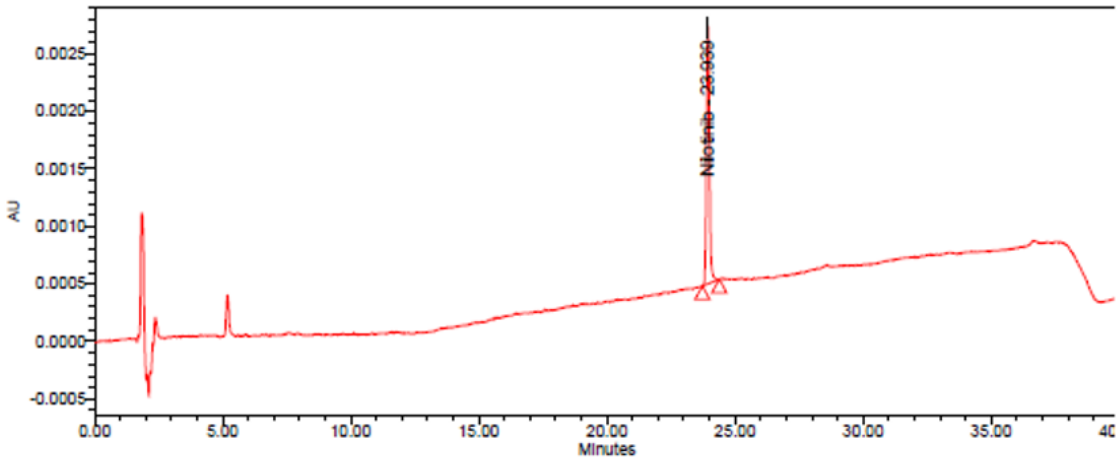
Numune adı	Etken madde/ Safsızlık	RT	RRT	Saflık Açısı	Saflık Eşik Değeri
Çözücü çözeltisi	Nilotinib	-	-	-	-
Plasebo çözeltisi		-	-	-	-
Standart çözeltisi		23,939	-	0,177	0,483
Test çözeltisi		23,864	-	0,057	0,285
Safsızlık NLT-1 çözeltisi	Safsızlık NLT-1	3,957	0,17	0,946	0,969
Safsızlık B çözeltisi	Safsızlık B	8,159	0,34	0,395	1,341
Safsızlık C çözeltisi	Safsızlık C	3,243	0,14	0,447	0,648
Safsızlık NLTC çözeltisi	Safsızlık NLTC	28,175	1,18	0,169	0,439
Safsızlık NLT-2 çözeltisi	Safsızlık NLT-2	10,303	0,43	0,218	0,708
Nilotinib N-Oksit	Nilotinib N-Oksit	15,852	0,66	0,260	0,734
Spike test çözeltisi	Nilotinib	23,838	-	0,050	0,281
	Safsızlık NLT-1	3,941	0,17	0,239	0,777
	Safsızlık B	8,160	0,34	0,478	0,918
	Safsızlık C	3,238	0,14	0,286	0,575
	Safsızlık NLTC	28,163	1,18	0,128	0,406
	Safsızlık NLT-2	10,389	0,44	0,267	0,582
	Nilotinib N-Oksit	15,837	0,66	0,172	0,512



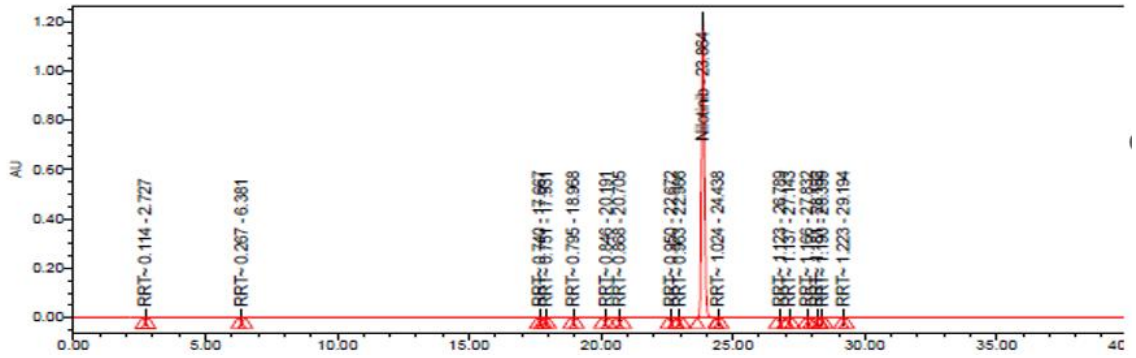
Şekil 3.8. Blank kromatogramı



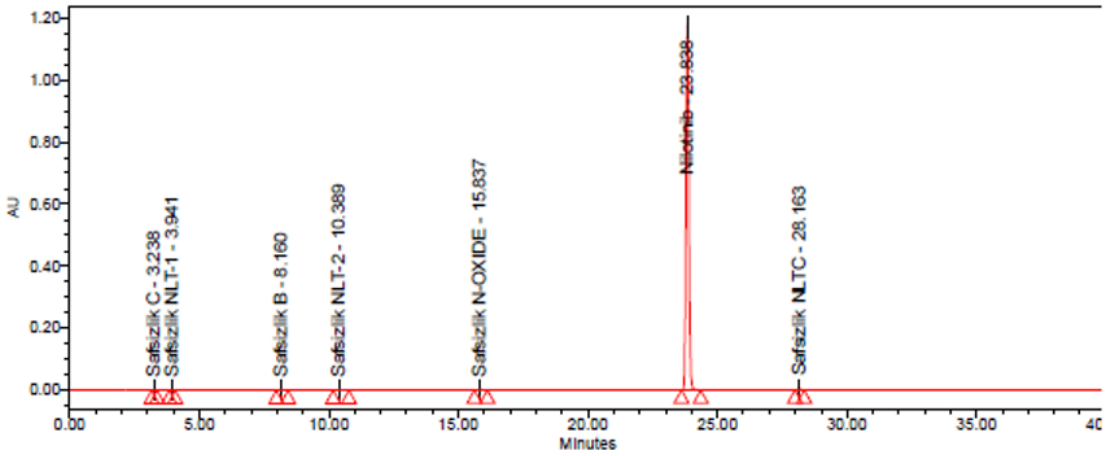
Şekil 3.9. Plasebo kromatogramı



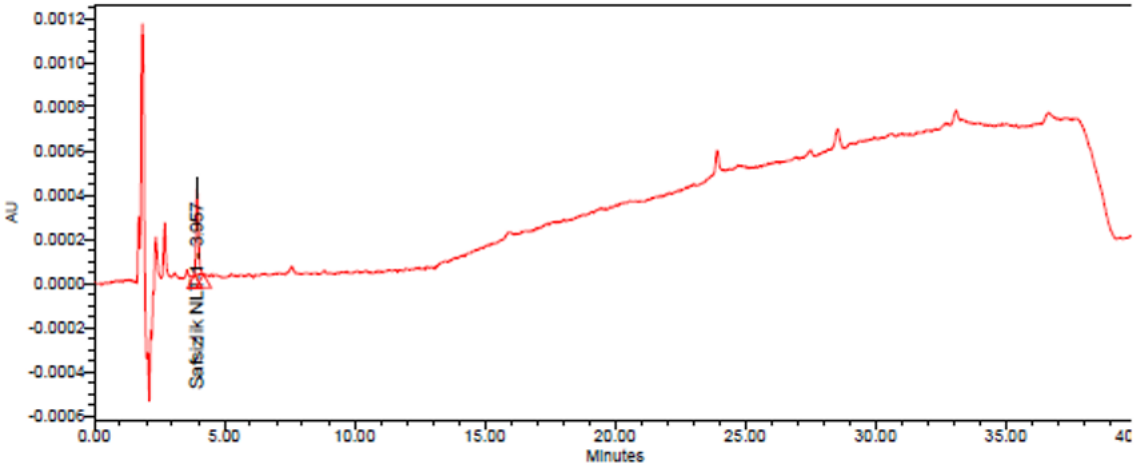
Şekil 3.10. Nilotinib standart kromatogramı



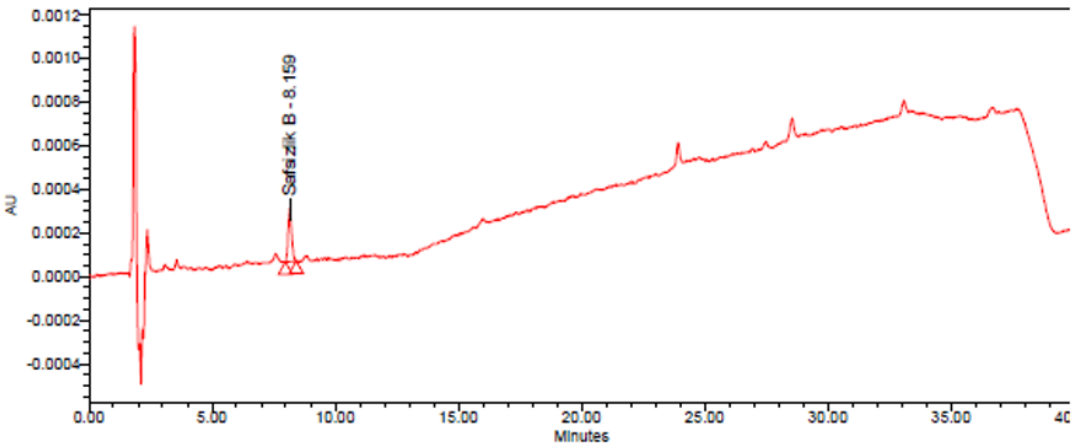
Şekil 3.11. İlgili bileşikler numune kromatogramı



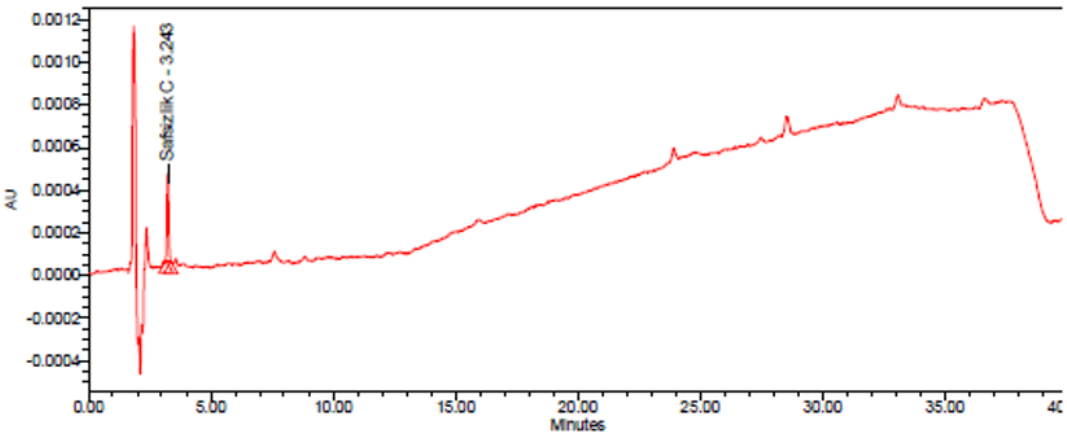
Şekil 3.12. Spike numune kromatogramı



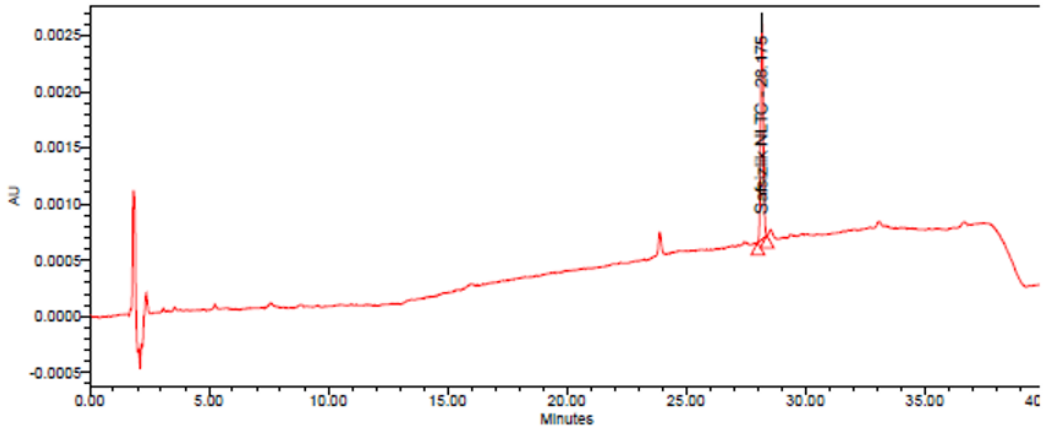
Şekil 3.13. Safsızlık NLT-1 kromatogramı



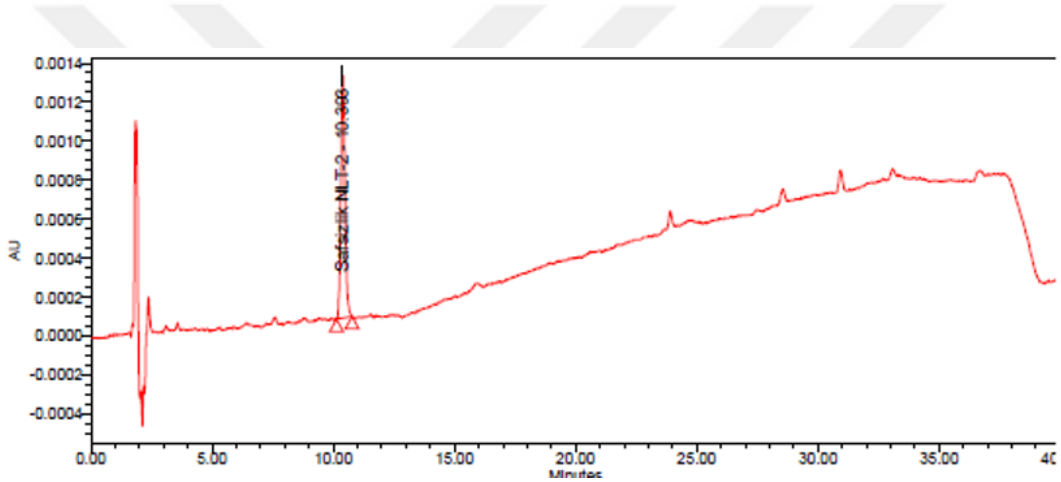
Şekil 3.14. Safsızlık B kromatogramı



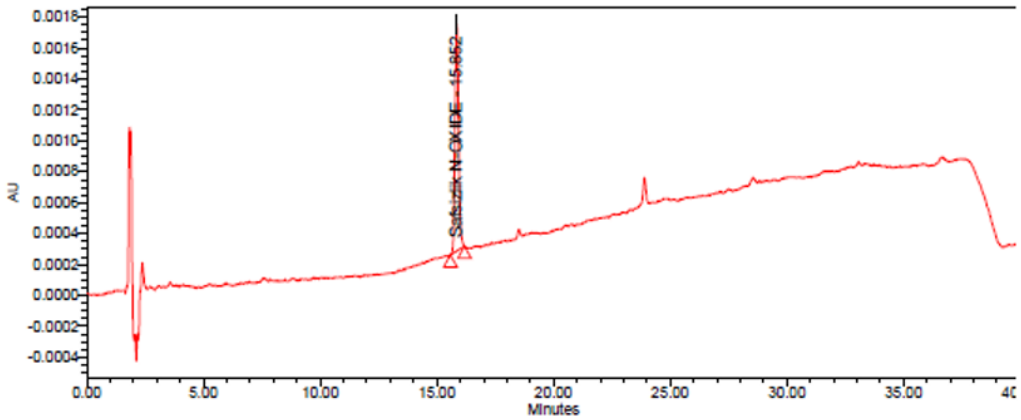
Şekil 3.15. Safsızlık C kromatogramı



Şekil 3.16. Safsızlık NLTC kromatogramı



Şekil 3.17. Safsızlık NLT-2 kromatogramı



Şekil 3.18. Safsızlık N-Oksit kromatogramı

Sonuçların Değerlendirilmesi: Blank ve plasebo kromatogramı incelendiğinde etkin maddeye ve bilinen safsızlıklara ait alı konma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmedi. Etkin madde ve bilinen safsızlıklar için saflık açısı saflık eşik değerinden küçük bulunmuştur. Safsızlık pikleri etkin maddeden ayrılmıştır.

3.2.1.1. Taşıma Etkisi

Seçicilik parametresi için hazırlanan numune çözeltisinden 1 adet vial Bölüm 2.2.3.2'de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Her numune çözeltisi enjeksiyonundan sonra blank çözeltisi cihaza verildi ve taşınma miktarına kontrol edildi. Tablo 3.8'de bulunan sonuçlar görülmektedir.

Tablo 3.8. Taşınma etkisi

	ALAN	**ALAN**	**% FARK**
Etken Madde	**Standart Çözeltisi**	**Blank Çözeltisi**	
Nilotinib	9044897	0	0,0

3.2.1.2. Filtre Etkisi

Standart çözeltisi ve numune çözeltisi yönteme uygun şekilde hazırlandı. Bölüm 2.2.3.3'de anlatılmıştır. Bu çözeltiler değişik filtre tipleri ile viale alındı ve analiz edilerek % fark hesaplandı.

Fark/% Difference = $\left|(AS - AF) / AS)\right| \times 100$

AS : Filtre edilmemiş çözeltiden elde edilen etkin madde pikinin alan

AF : Filtre edilmiş çözeltiden elde edilen etkin madde pikinin alan

Bulunan sonuçlar Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9. Filtre etkisi sonuçları

Filtre Etkisi	**Filtre Tipi**	**Alan**	**% Fark**
Standart	Filtresiz	19981	-
	0,45 µm RC 0 ml	19774	1,04
	0,45 µm RC 1 ml	19716	1,33
	0,45 µm RC 2 ml	20164	0,92

	0,45 µm NY 0 ml	14670	26,58
	0,45 µm NY 1 ml	18684	6,49
	0,45 µm NY 2 ml	19297	3,42
	0,45 µm PTFE 0 ml	19690	1,46
	0,45 µm PTFE 1 ml	19634	1,74
	0,45 µm PTFE 2 ml	19502	2,39
Numune	Filtresiz	9012425	-
	0,45 µm RC 0 ml	8686493	3,62
	0,45 µm RC 1 ml	9065134	0,58
	0,45 µm RC 2 ml	8995010	0,19
	0,45 µm NY 0 ml	8253367	8,42
	0,45 µm NY 1 ml	8934713	0,86
	0,45 µm NY 2 ml	8952214	0,67
	0,45 µm PTFE 0 ml	8977099	0,39
	0,45 µm PTFE 1 ml	8974830	0,42
	0,45 µm PTFE 2 ml	8988907	0,26

Kabul Kriteri: Filtrelenmiş ve filtrelenmemiş standart ve numune çözeltilerinden elde edilen etkin madde piklerinin alanları arasındaki % fark ≤ 5,0 olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Filtre etkisi incelendiğinde standart ve numune çözeltilerindeki etkin madde piklerinin alanları filtresiz ve filtreli örneklerin yüzde farkının ≤ 5,0 olduğu görülmüştür. 0,45 µm RC filtre kullanılmaya karar verilmiştir.

3.2.2 Sistem Uygunluk

Bölüm 2.2.3.4'de bahsedildiği gibi hazırlanan standart çözeltisi analiz edilip kabul kriterlerine uygunluğu test edildi. Bulunan sonuçlar Tablo 3.10'da görülmektedir.

Tablo 3.10. Sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Standart Çözeltisi Alanı	Alıkonma Zamanı
1	20997	22,653
2	21129	22,658
3	20995	22,642
4	21147	22,635
5	20933	22,629
6	21087	22,632
Ortalama	21048	22,641
SD	85,46	0,01
% RSD	0,41	0,05

Kabul Kriterleri:

1. Altı ardışık standart çözeltisi enjeksiyonu için RSD değeri %5,0'den büyük olmamalıdır.

2. Standart enjeksiyonu için kuyruklanma faktörü 2,0'den büyük olmamalıdır.

3. Standart enjeksiyonu için teorik plaka sayısı 2000'den küçük olmamalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Altı ardışık enjeksiyon için RSD değeri %0,41'dir. Standart enjeksiyonu için kuyruklanma faktörü 1,07 ve teorik plaka sayısı 250496 olarak bulunmuştur.

3.2.3. Tespit Limiti

Bölüm 2.2.3.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan, Nilotinib standardı,Safsızlık NLT-2 ve Safsızlık N-Oksit enjekte edildi ve sinyal / gürültü oranı ≥ 3,0 olan çözelti derişimi tespit limiti olarak belirlendi. Tablo 3.11 ilgili sonuçları içermektedir.

Tablo 3.11. Tespit limiti sonuçları

	Konsantrasyon (mg/mL)	**S/N**
Nilotinib	0,0000024	4,6
Safsızlık NLT-2	0,000003	3,1
Nilotinib N-Oksit	0,000003	3,7

Değerlendirilme: Sonuçların uygunluğu kabul edilmiştir.

3.2.4. Hesaplanabilirlik Limiti

Bölüm 2.2.3.5'de bahsedilidği gibi hazırlanan, Nilotinib standardı, Safsızlık NLT-2 ve Safsızlık N-Oksit standardı enjekte edildikten sonra bulunan sonuçlar Tablo 3.12'de görülmektedir

Tablo 3.12. Hesaplanabilirlik limiti

	Konsantrasyon (mg/ml)	**S/N**
Nilotinib	0,000008	14,3
Safsızlık NLT-2	0,00001	11,0
Nilotinib N-Oksit	0,00001	12,7

Değerlendirilme: Sonuçların uygunluğu kabul edilmiştir.

3.2.5. Raporlama Seviyesi

Bölüm 2.2.3.7'de bahsedildiği gibi hazırlanan Nilotinib standardı, Safsızlık NLT-2 ve Safsızlık N-Oksit standardı 3 defa enjekte edildi. Bulunan sonuçlar Tablo 3.13.'de verilmiştir.

Tablo 3.13. Raporlama seviyesi sonuçları

	Konsantrasyon (mg/ml)	S/N	Test Konsantrasyonuna göre %
Nilotinib	0,0001	462,0	0,001
Safsızlık NLT-2	0,0001	239,2	0,001
Nilotinib N-Oksit	0,0001	115,4	0,001

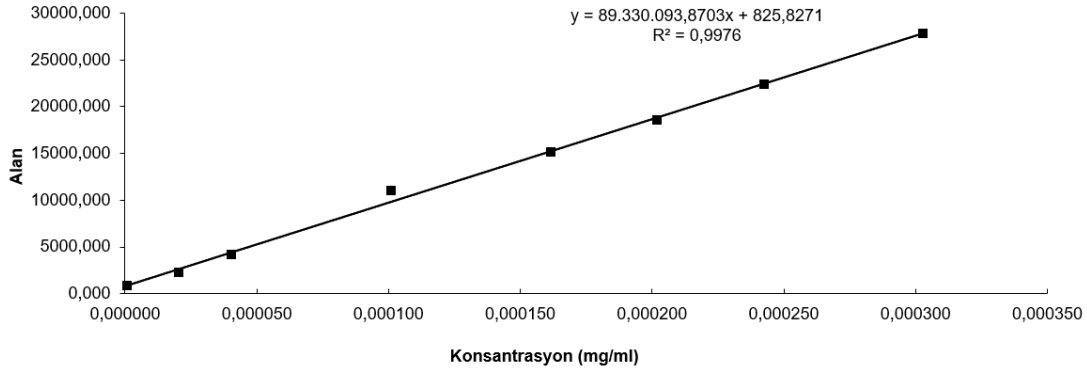
Kabul Kriteri: Raporlama seviyesi konsantrasyonu ≥ LOQ konsantrasyonu olmalıdır.
Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu görülmüştür.

3.2.6. Doğrusallık

Bölüm 2.2.3.8'de bahsedildiği gibi hazırlanan belirli seviyelerde Nilotinib standartları, Safsızlık NLT-2 ve Safsızlık N-Oksit standartları Tespit limiti seviyesinde 3 kez, %10 seviyesinde 1 kez, %20 seviyesinde 1 kez, Raporlama seviyesi için 3 kez, %80 seviyesinde 1 kez, %100 Limit Seviyesinde 6 kez, %120 seviyesinde 1 kez, %150 seviyesinde 3 kez enjeksiyon yapıldı. Bulunan sonuçlar Tablo 3.14. ve Tablo 3.19 arasında verilmiştir.

Tablo 3.14. Nilotinib doğrusallık sonuçları

Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Konsantrasyon (mg/ml) (x)	Alan Ortalaması (y)	Hesaplanan Alan Ortalaması (y_{cal})	($y-y_{cal}$)	($y-y_{cal}$)^2
LOQ	0,000000808	866,099	898,0058	-31,9065	1018
%10	0,00002019	2273,035	2629,4017	-356,3667	126997
%20	0,00004038	4167,283	4432,9763	-265,6933	70593
%50 (RS)	0,00010094	11002,791	9842,8068	1159,9842	1345563
%80	0,0001615	15126,062	15252,6373	-126,5753	16021
%100 (Limit)	0,00020188	18544,827	18859,7865	-314,9593	99199
%120	0,00024250	22415,209	22488,3749	-73,1659	5353
%150	0,00030282	27885,449	27876,7662	8,6828	75
				RSS	1664821



Şekil 3.19. Nilotinib İçin doğrusallık grafiği

Tablo 3.15. Nilotinib regresyon sonuçları

Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,9987919					
R Kare	0,9975852					
Ayarlı R Kare	0,9971827					
Standart Hata	526,75435					
Gözlem	8					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	687758761	687758761,2	2478,67664	4,4044E-09	
Fark	6	1664820,85	277470,1424			
Toplam	7	689423582				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	825,82713	303,949923	2,716984162	0,03478181	82,0884581	1569,565798
X Değişkeni 1	89330094	1794270,24	49,7863098	4,4044E-09	84939672,8	93720514,98
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*	*Standart Farklar*			
1	849,11436	-156,357364	-0,562786723			
2	1560,0155	-82,4045315	-0,296603722			
3	2981,8179	-33,700866	-0,121301609			
4	7247,363	30,7696777	0,110751202			
5	11512,908	177,517888	0,638951103			
6	14356,513	579,028552	2,084133247			
7	17200,117	-195,49645	-0,703662452			
8	21465,663	-319,356906	-1,149481046			

Kabul Kriterleri:

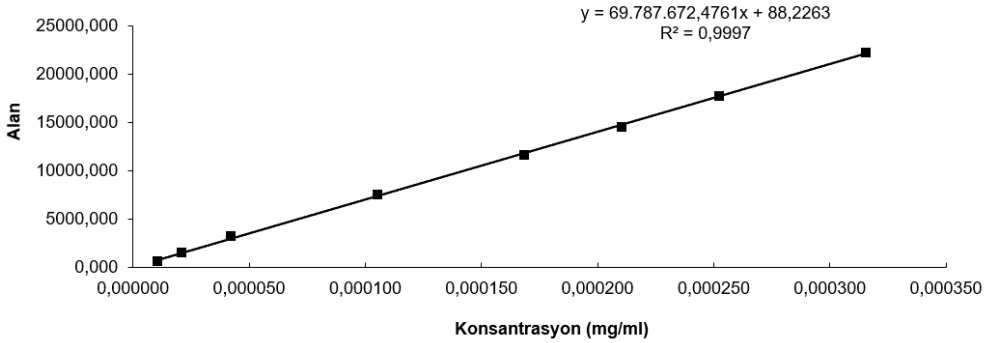
1. $R \geq 0{,}995$
2. Artık kareler toplamı raporlanır.
3. $\frac{\text{Yint}}{\%100\text{'lük standart alanı}} \text{x}100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

1. R = 0,998792
2. Artık kareler toplamı = 1664821
3. $\frac{825{,}8271}{18544{,}827} \times 100 = 4{,}4531$

Tablo 3.16. Safsızlık NLT-2 için doğrusallık sonuçları

Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Konsantrasyon (mg/ml) (x)	Alan Ortalaması (y)	Hesaplanan Alan Ortalaması (y_{cal})	$(y-y_{cal})$	$(y-y_{cal})^2$
LOQ	0,00001052	688,648	822,3926	-133,7443	17888
%10	0,00002104	1535,857	1556,5589	-20,7019	429
%20	0,00004208	3249,717	3024,8916	224,8254	50546
%50 (RS)	0,00010519	7526,823	7429,1916	97,6314	9532
%80	0,00016831	11717,272	11834,1895	-116,9175	13670
%100 (Limit)	0,00021038	14591,313	14770,1569	-178,8444	31985
%120	0,00025246	17721,081	17706,8221	14,2589	203
%150	0,00031558	22225,312	22111,8200	113,4923	12881
				RSS	137133



Şekil 3.20. Safsızlık NLT-2 için doğrusallık grafiği

Tablo 3.17. Safsızlık NLT-2 regresyon sonuçları

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,9998452					
R Kare	0,9996905					
Ayarlı R Kare	0,9996389					
Standart Hata	151,18052					
Gözlem	8					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	442922118	442922117,7	19379,1936	9,2671E-12	
Fark	6	137133,297	22855,54947			
Toplam	7	443059251				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	88,226317	88,4973613	0,996937259	0,35728663	-128,31893	304,771559
X Değişkeni 1	69787672	501315,189	139,2091721	9,2671E-12	68560998,4	71014346,6
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*	*Standart Farklar*			
1	713,08494	-117,097936	-0,578551077			
2	3196,1686	3,19439817	0,015782708			
3	6299,97	-156,042707	-0,770967273			
4	15611,374	113,165643	0,559122619			
5	24922,779	216,887327	1,071585041			
6	31130,382	78,471449	0,387707443			
7	37337,984	224,886571	1,111107272			
8	46649,389	-363,464745	-1,795786732			

Kabul Kriterleri:

1. $R \geq 0{,}995$

2. Artık kareler toplamı raporlanır.

3. $\frac{\text{Yint}}{\%100\text{'lük standart alanı}} \text{x}100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

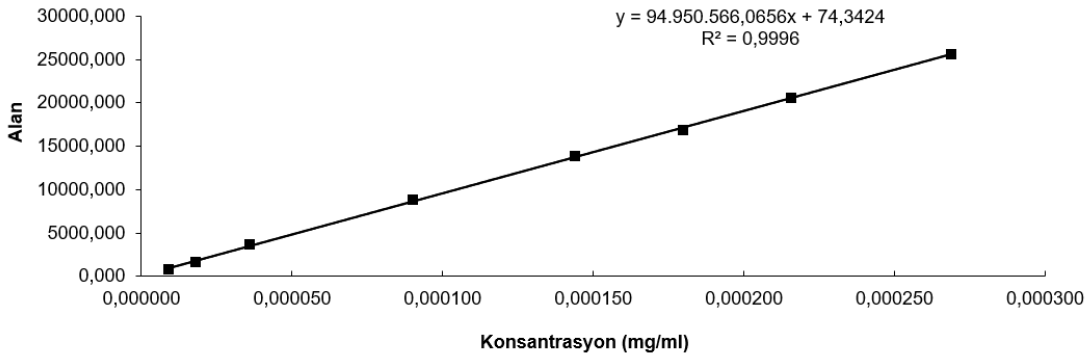
1. $R = 0{,}999845$

2. Artık kareler toplamı = 137133

3. $\frac{88{,}2263}{14591{,}313} \times 100 = 0{,}6046$

Tablo 3.18. Safsızlık N-Oksit doğrusallık sonuçları

Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Konsantrasyon (mg/ml) (x)	Alan Ortalaması (y)	Hesaplanan Alan Ortalaması (y_{cal})	$(y-y_{cal})$	$(y-y_{cal})^2$
LOQ	0,00000899	770,275	927,9480	-157,6730	24861
%10	0,00001798	1667,547	1781,5536	-114,0066	12998
%20	0,00003596	3660,059	3488,7648	171,2942	29342
%50 (RS)	0,00008990	8820,760	8610,3983	210,3620	44252
%80	0,00014385	13876,259	13732,9814	143,2776	20528
%100 (Limit)	0,00017981	16827,595	17147,4037	-319,8084	102277
%120	0,00021577	20610,881	20561,8261	49,0549	2406
%150	0,00026891	25624,998	25607,4991	17,4992	306
				RSS	236971



Şekil 3.21. Safsızlık N-Oksit için doğrusallık grafiği

Tablo 3.19. Safsızlık N-oxide regresyon sonuçları

ÖZET ÇIKIŞI						
Regresyon İstatistikleri						
Çoklu R	0,999801512					
R Kare	0,999603063					
Ayarlı R Kare	0,999536907					
Standart Hata	198,7337679					
Gözlem	8					
ANOVA						
	df	*SS*	*MS*	*F*	*Anlamlılık F*	
Regresyon	1	596761262	596761262,2	15109,7504	1,9547E-11	
Fark	6	236970,663	39495,11049			
Toplam	7	596998233				
	Katsayılar	*Standart Hata*	*t Stat*	*P-değeri*	*Düşük %95*	*Yüksek %95*
Kesişim	74,34242684	116,404315	0,638656968	0,54663598	-210,48867	359,173525
X Değişkeni 1	94950566,07	772447,395	122,9217248	1,9547E-11	93060455,4	96840676,8
FARK ÇIKIŞI						
Gözlem	*Öngörülen Y*	*Farklar*	*Standart Farklar*			
1	439,1781038	270,18123	1,42776263			
2	3316,756396	98,2326039	0,519106531			
3	6913,832757	-231,07109	-1,221086556			
4	17704,64786	-112,074858	-0,592255404			
5	28495,60095	-231,768952	-1,224774382			
6	35689,61568	-50,4466794	-0,266583596			
7	42883,49241	208,447587	1,101533497			
8	53674,44551	48,5001588	0,25629728			

Kabul Kriterleri:

1. $R \geq 0{,}995$
2. Artık kareler toplamı raporlanır.
3. $\frac{\text{Yint}}{\%100\text{'lük standart alanı}} \text{x}100$ raporlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi:

1. R = 0,999801
2. Artık kareler toplamı = 236971
3. $\frac{74{,}3424}{16827{,}595} \times 100 = 0{,}44179$

3.2.7. Uygulama Aralığı

Doğrusallık çalışmasında alt ve üst konsantrasyondaki (LOQ ve %150) çözeltilerden 3 defa enjeksiyon yapılarak cihaza verilmiş olup Tablo 3.20'de elde edilen sonuçlar verilmektedir.

Tablo 3.20. Uygulama aralığı tablosu

Enjeksiyon Sayısı	**Nilotinib (Alan)**		**Safsızlık NLT-2 (Alan)**		**Safsızlık N-Oksit (Alan)**	
	Min. (LOQ)	**Max. (%150)**	**Min. (LOQ)**	**Max. (%150)**	**Min. (LOQ)**	**Max. (%150)**
1	891	27979	690	22290	758	25714
2	839	27896	668	22142	773	25564
3	869	27781	707	22243	779	25597
Ortalama	866	27885	668	22225	770	25714
SD	26,10	99,43	19,55	75,62	10,82	78,82
%RSD	3,01	0,36	2,84	0,34	1,40	0,31

Kabul Kriterleri:

1. En düşük seviyede üç ardışık enjeksiyon için % RSD ≤ %15,0 olmalıdır.

2. En yüksek seviyede üç ardışık enjeksiyon için % RSD ≤ %5,0 olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçlar uygun bulunmuştur.

3.2.8. Doğruluk

Numune çözeltisi; LOQ, spesifikasyon limitinin %100 ve %150'si seviyelerinde olacak şekilde üçer numune hazırlanıp cihaza verildi. Sonuçlar, LOQ, SD ile RSD hesaplandı.Sonuçlar Tablo 3.21, 3.22, 3.23'de verilmiştir.

Tablo 3.21. Nilotinib geri kazanım sonuçları

Seviye (%)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	100,561	98,98	1,74	1,76
	99,263			
	97,111			
%100	104,701	102,60	1,82	1,78
	101,563			
	101,521			
%150	100,145	100,69	0,72	0,72
	101,512			
	100,412			
	Ortalama (%)	100,76		
	SD	1,81		
	RSD (%)	1,80		

Tablo 3.22. Safsızlık NLT-2 geri kazanım sonuçları

Seviye (%)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	85,793	87,66	1,67	1,90
	88,187			
	89,011			
%100	99,896	99,26	0,73	0,73
	98,465			
	99,415			
%150	97,599	98,66	1,02	1,03
	99,624			
	98,743			
	Ortalama (%)	95,19		
	SD	6,53		
	RSD (%)	6,86		

Tablo 3.23. Safsızlık N-Oksit geri kazanım sonuçları

Seviye (%)	Geri kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	95,751	91,72	3,62	3,94
	88,752			
	90,659			
%100	95,741	97,15	1,22	1,26
	97,802			
	97,906			
%150	95,919	97,13	1,06	1,09
	97,600			
	97,884			
	Ortalama (%)	95,33		
	SD	3,13		
	RSD (%)	3,28		

Sonuçların Değerlendirilmesi: Elde edilen sonuçlar, hesaplanabilirlik seviyesinde %80-%120 ve diğer seviyeler için %90-%110 arasında olma kriterine sahiptir. Sonuç olarak doğruluk parametresi valide olmuştur.

3.2.9. Kesinlik

3.2.9.1. Tekrarlanabilirlik

Nilotinib 50 mg Kapsül farmasötik ürünü yöntemde belirtildiği şekilde, 6 farklı spike test çözeltisi hazırlanarak cihaza verildi. Tablo 3.24 ilgili sonuçları içermektedir.

Tablo 3.24. Tekrarlanabilirlik sonuçları

Cihaz	Kolon	Enjeksiyon Sayısı	Bilinmeyen En Büyük Safsızlık (%)	Safsızlık NLT-2 (%)	Nilotinib N-Oksit (%)	Toplam Safsızlık (%)
Waters / e2695/ 7	YMC-PACK ODS-AQ, 150 mm x 4,6 mm, 3,0 µm SN: 110YB00275	1	0,036	0,185	0,160	0,474
		2	0,037	0,186	0,162	0,478
		3	0,037	0,187	0,161	0,48
		4	0,037	0,186	0,159	0,477
		5	0,036	0,187	0,161	0,478
		6	0,037	0,189	0,163	0,483
Analist 1		**Ortalama**	0,037	0,187	0,161	0,478
		SD	0,0005	0,001	0,001	0,003
		RSD	1,41	0,73	0,88	0,63
		%95 güven aralığı	0,037 ± 0,001	0,187 ± 0,001	0,161 ± 0,001	0,478 ± 0,003

Kabul Kriteri: % RSD ≤ %5,0 olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu görülmektedir.

3.2.9.2. Ara Kesinlik

Farklı bir günde, aynı laboratuvarda olmak üzere farklı bir analist tarafından Nilotinib 50 mg Kapsül farmasötik ürünü metota uygun bir şekilde 6 adet spike test çözeltisi hazırlanıp farklı bir cihazda analiz edildi. Sonuçlar Tablo 3.25 ve 3.26'de verilmiştir.

Tablo 3.25. Ara kesinlik sonuçları

Cihaz	Kolon	Enjeksiyon Sayısı	Bilinmeyen En Büyük Safsızlık (%)	Safsızlık NLT-2 (%)	Nilotinib N-Oksit (%)	Toplam Safsızlık (%)
Waters / e2695/ 2	YMC-PACK ODS-AQ, 150 mm x 4,6 mm, 3,0 µm SN: 110YB00274	1	0,050	0,202	0,169	0,526
		2	0,050	0,205	0,169	0,532
		3	0,050	0,203	0,168	0,529
		4	0,049	0,209	0,170	0,536
		5	0,050	0,204	0,171	0,533
		6	0,049	0,201	0,171	0,529
Analist 2		**Ortalama**	0,05	0,204	0,170	0,531
		SD	0,0005	0,003	0,001	0,004
		RSD	1,04	1,39	0,71	0,67
		95 % güven aralığı	0,005 ± 0,001	0,204 ± 0,003	0,170 ± 0,001	0,531 ± 0,004

Tablo 3.26. Analist 1 ve 2'nin kesinlik çalışması ortalama sonuçları

Analist	Cihaz	Bilinmeyen En Büyük Safsızlık (%)	Safsızlık NLT-2 (%)	Nilotinib N-Oksit (%)	Toplam Safsızlık (%)
1	Waters / e2695/ 7	0,037	0,187	0,161	0,478
2	Waters / e2695/ 2	0,050	0,204	0,170	0,531
	Ortalama Sonuçlar Arası %Fark	0,013	0,017	0,009	0,053

Kabul Kriterleri:

1. % RSD ≤ %5,0 olmalıdır.

2. Ortalamalar arasındaki fark;

Tablo 3.27. Ortalamalar arasındaki fark

% Tek tek safsızlık ve Toplam safsızlık	Fark
<0,1	Değerlendirilmez
0,10 – 0,20	≤ ±0,05
>0,20 – 0,50	≤ ±0,10
>0,50 – 1,0	≤ ±0,20
>1,0	≤ ±20%

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu görülmüştür.

3.2.10. Sağlamlık

3.2.10.1. Yöntemin stabilitesi

Sonuçlar Tablo 3.28, 3.29, 3.30'da verilmiştir.

Dalga Boyu Değişikliği

Tablo 3.28. Dalga boyu değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Dalga Boyu Değişikliği	263 nm	265 nm	267 nm
Kuyruklanma Faktörü	1,08	1,09	1,07
Teorik Plaka Sayısı	262351	265993	257482
Alıkonma Zamanı (dk)	23,287	23,252	23,271

Akış Hızı Değişikliği:

Tablo 3.29. Akış hızı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Akış Hızı Değişikliği	0,9 mL/dk	1,0 mL/dk	1,1 mL/dk
Kuyruklanma Faktörü	1,08	1,09	1,06
Teorik Plaka Sayısı	273124	265993	243956
Alıkonma Zamanı (dk)	24,128	23,252	22,382

Kolon Sıcaklığı Değişikliği:

Tablo 3.30. Kolon sıcaklığı değişikliği standart çözeltisi analiz sonuçları

Kolon Sıcaklığı Değişikliği	35 °C	40 °C	45 °C
Kuyruklanma Faktörü	1,07	1,09	1,02
Teorik Plaka Sayısı	261763	265993	218964
Alıkonma Zamanı (dk)	23,198	23,252	23,285

Kabul Kriterleri:

1. Sistem uygunluk kriterleri sağlanmalıdır.

2. Alıkonma zamanlarındaki değişiklik raporlanır ve sonuçlar yorumlanır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Sonuçlara göre metot dalga boyu değişikliğine, akış hızı değişikliğine ve kolon sıcaklığı değişikliğine dayanıklıdır.

3.2.10.2. Çözelti stabilitesi

Hazırlanmış olan standart ve numune çözeltileri 15 °C sıcaklıkta en az 48 saat süresince bekletilip belli aralıkla analizlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.31 ve 3.32'te verilmiştir.

Tablo 3.31. Standart çözeltisi stabilite sonuçları

Süre (saat)	Nilotinib Alan	Değişiklik (%)
0	19886	-
2	19558	0,30
4	19649	1,52
6	19519	0,76
8	19613	0,78
12	20183	1,07
18	20770	1,62
24	20758	2,89
30	20199	3,40
36	20280	1,98
42	20415	2,66
48	20285	2,01

Tablo 3.32. Numune çözeltisi stabilite sonuçları

Süre (saat)	Bilinmeyen En Büyük Safsızlık	Değişiklik (%)	Toplam Safsızlık	Değişiklik (%)
0	3880	-	12921	-
2	3860	0,52	12958	0,29
4	3831	1,26	13033	0,87
6	3839	1,06	13273	2,72
8	3824	1,44	13314	3,04
12	3819	1,57	12890	0,24
18	3889	0,23	13018	0,75
24	3768	2,89	12469	3,49
30	3706	4,48	13056	1,04
36	3746	3,45	12927	0,05
42	3754	3,25	13236	2,44
48	3741	3,58	13730	6,26

Kabul Kriteri: Belirtilen stabilite süresinde, standart çözeltisindeki etkin piki % alan değişimi en fazla 5, numune çözeltisindeki safsızlık pikleri % alan değişimi en fazla 10 olmalıdır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: Elde edilen sonuçlar 15 °C'de standart çözeltisi ve numune çözeltisi 48 saat stabildir.

3.3. Bozundurma Çalışmaları

3.3.1. Işığa Maruz Bırakma

Tablo 3.33. Işık ile bozundurma sonuçları

	Bozundurma Öncesi (%)	Bozundurma Sonrası (%)
Safsızlık A	TE	TE
Safsızlık B	TE	TE
Safsızlık C	TE	TE
Safsızlık NLTC	TE	TE
Safsızlık D (NLT-2)	TE	TE
Safsızlık N-Oxide	TE	TE
Bilinmeyen en büyük safsızlık	0,03	0,03
Toplam Safsızlık	0,11	0,12
Total kütle	100,57	100,76
%Verim		100,19

3.3.2. Asit İle Bozundurma

Tablo 3.34. Asit ile bozdundurma sonuçları

	Bozundurma Öncesi (%)	Bozundurma Sonrası (%)
Safsızlık A	TE	0,46
Safsızlık B	TE	TE
Safsızlık C	TE	TE
Safsızlık NLTC	TE	0,02
Safsızlık D (NLT-2)	TE	2,09
Safsızlık N-Oxide	TE	TE
Bilinmeyen en büyük safsızlık	0,03	0,82
Toplam Safsızlık	0,11	4,45
Total kütle	100,57	100,66
%Verim		100,08

3.3.3. Baz İle Bozundurma

Tablo 3.35. Baz ile bozundurma sonuçları

	Bozundurma Öncesi (%)	Bozundurma Sonrası (%)
Safsızlık A	TE	1,04
Safsızlık B	TE	TE
Safsızlık C	TE	TE
Safsızlık NLTC	TE	TE
Safsızlık D (NLT-2)	TE	6,69
Safsızlık N-Oxide	TE	TE
Bilinmeyen en büyük safsızlık	0,04	0,76
Toplam Safsızlık	0,10	8,64
Total kütle	99,98	95,41
%Verim		95,43

3.3.4. Oksidasyon İle Bozundurma

Tablo 3.36. Oksidasyon ile bozundurma sonuçları

	Bozundurma Öncesi (%)	Bozundurma Sonrası (%)
Safsızlık A	TE	TE
Safsızlık B	TE	TE
Safsızlık C	TE	0,03
Safsızlık NLTC	TE	1,58
Safsızlık D (NLT-2)	TE	0,03
Safsızlık N-Oxide	TE	0,14
Bilinmeyen en büyük safsızlık	0,03	0,79
Toplam safsızlık	0,11	6,02
Total kütle	100,57	96,12
%Verim		95,59

3.3.5. Sıcaklık İle Bozundurma

Tablo 3.37. Sıcaklık ile bozundurma sonuçları

	Bozundurma Öncesi (%)	Bozundurma Sonrası (%)
Safsızlık A	TE	TE
Safsızlık B	TE	TE
Safsızlık C	TE	TE
Safsızlık NLTC	TE	0,04
Safsızlık D (NLT-2)	TE	0,005
Safsızlık N-Oxide	TE	TE
Bilinmeyen en büyük safsızlık	0,03	0,02
Toplam safsızlık	0,11	0,10
Total kütle	100,57	101,98
%Verim		101,40

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada nilotinib etken maddesi, proses ve bozunma safsızlıklarının bir arada analizi için stabilite göstergeli HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem validasyon çalışmalarında ICH tarafından belirlenen kabul aralığı içinde değerler elde edilmiş, kromatografik analizin performansını gösteren teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametreler de kabul edilebilir değerlerde bulunmuştur.

Plasebo çözeltisinin kromatogramında Nilotinib, proses ve bozunma safsızlıklarının alıkonma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Örnek çözeltilerinde Nilotinib, proses ve bozunma safsızlık pikleri için pik saflığı değerinin, saflık eşik değerinden büyük bulunması piklerin saf olduğunu ve aynı alıkonma zamanında bilinmeyen safsızlık, blank veya plasebo çözeltisine ait herhangi bir pikin olmadığını göstermiştir ve bu da yöntemin stabilite göstergeli olduğunu gösteren önemli bir ölçüt olmuştur. Bozundurma çalışmalarında asit, baz veya peroksit miktarının en önemli faktör olduğu ışık ve nem faktörlerinin bozundurma yüzdesine pek etkisinin olmadığı görülmüştür. Tek başına sıcaklık faktörününde bozunmaya etkisi olmadığı görülmüştür.

Kapsülün zorla bozundurma çalışmalarında bilinen safsızlıklarından A, B, C, NLTC, D, N-Oksit tespit edilebilinmiştir. Ancak safsızlık B hiç bir bozundurma koşulunda tayin sınırının üzerinde oluşmamıştır ve bununla beraber bazı bilinmeyen safsızlıklar oluşmuştur.

Bozundurma sonucu, bozunan nilotinib, oluşan bilinen safsızlıkları (A, C, NLTC, D, N-Oksit safsızlığı) ve oluşan bilinmeyen safsızlıklar için pik saflığı bakılmış ve piklerin saf olduğu tespit edilmiştir.

Bozundurulmuş ve bozundurulmamış kapsül içeriğindeki nilotinib miktarı karşılaştırılmıştır. Nilotinibin Oksidatif bozundurmasında, %95,59 verim elde edilmiştir. Baz ile bozundurma için, %95,43 verim elde edilmiştir. Asit ile bozundurmada, %100,08 verim elde edilmiştir. Bununla birlikte kritik değer olan %85'in üzerinde elde edilen verimler geliştirilen yöntemin stabilite göstergeli olduğunun kanıtıdır.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında nilotinib, proses ve bozunma safsızlıklarının bir arada tayini için geliştirilen ve geçerliliği kanıtlanan stabilite göstergeli HPLC yönteminin, kalite kontrol ve arge laboratuvarlarında duyarlı, hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

5. REFERANSLAR

1. Thorburn, A.L., Alfred François Donné, 1801-1878, discoverer of Trichomonas vaginalis and of leukaemia. Br J Vener Dis, 1974. 50(5): p. 377-80.
2. Piller, G., Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol, 2001. 112(2): p. 282-92.
3. Pui, C.-H., Childhood leukemias. 2012: cambridge university press.
4. Campo, E., et al., The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood, 2011. 117(19): p. 5019-32.
5. Goldman, J.M. and J.V. Melo, Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 2001. 344(14): p. 1084-6.
6. Frazer, R., A.E. Irvine, and M.F. McMullin, Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. Ulster Med J, 2007. 76(1): p. 8-17.
7. Hehlmann, R., et al., Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. Blood, 1994. 84(12): p. 4064-77.
8. Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J.L. Belsky, Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. J Radiat Res, 1978. 19(3): p. 262-82.
9. Ichimaru, M., et al., Atomic bomb and leukemia. J Radiat Res, 1991. 32 Suppl 2: p. 14-9.
10. Vlaanderen, J., et al., Occupational benzene exposure and the risk of lymphoma subtypes: a meta-analysis of cohort studies incorporating three study quality dimensions. Environ Health Perspect, 2011. 119(2): p. 159-67.
11. Climent, N. and M. Plana, Immunomodulatory Activity of Tyrosine Kinase Inhibitors to Elicit Cytotoxicity Against Cancer and Viral Infection. Front Pharmacol, 2019. 10: p. 1232.
12. Dhanarajan, A., et al., Elevated incidence of chronic myeloid leukaemia in immunosuppressed solid organ transplant recipients. Br J Haematol, 2014. 166(4): p. 619-21.
13. Musselman, J.R., et al., Risk of adult acute and chronic myeloid leukemia with cigarette smoking and cessation. Cancer Epidemiol, 2013. 37(4): p. 410-6.
14. Höglund, M., et al., Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. Blood, 2013. 122(7): p. 1284-92.
15. Howell, D.A., et al., Time-to-diagnosis and symptoms of myeloma, lymphomas and leukaemias: a report from the Haematological Malignancy Research Network. BMC Hematol, 2013. 13(1): p. 9.
16. Baccarani, M., et al., European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood, 2013. 122(6): p. 872-84.
17. Gambacorti-Passerini, C., et al., Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells Mol Dis, 1997. 23(3): p. 380-94.
18. O'Hare, T., et al., In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-

354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. Cancer Res, 2005. 65(11): p. 4500-5.
19. Redaelli, S., et al., Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. J Clin Oncol, 2009. 27(3): p. 469-71.
20. Cortes, J.E., et al., Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med, 2012. 367(22): p. 2075-88.
21. Saglio, G., et al., Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 2010. 362(24): p. 2251-9.
22. Kantarjian, H.M., et al., Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. Lancet Oncol, 2011. 12(9): p. 841-51.
23. Hochhaus, A., et al., Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. Leukemia, 2016. 30(5): p. 1044-54.
24. Manley, P.W., et al., Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib. Biochim Biophys Acta, 2010. 1804(3): p. 445-53.
25. Weisberg, E., et al., AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. Br J Cancer, 2006. 94(12): p. 1765-9.
26. Guideline, I.H.T.; Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Q6A. International Conference onHarmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1999.
27. Anonymous ICH Harmonized Tripartite GuidelineQ2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization (ICH). 1996.
28. Anonymous ICH Harmonized Tripartite GuidelineQ1B, Stability Testing: Photo-stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization (ICH).1996.
29. Gustavo González, A. and M. Ángeles Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. 26(3): p. 227-238.
30. Dziadosz, M., et al., HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ULTRAVIOLET DETECTION AND PROTEIN PRECIPITATION AS A WAY OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF NILOTINIB WITH AND WITHOUT INTERNAL STANDARD. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2012. 35(17): p. 2503-2510.
31. Haouala, A., et al., Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. 877(22): p. 1982-96.
32. Bouchet, S., et al., Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. Clin Chim Acta, 2011. 412(11-12): p. 1060-7.
33. Kralj, E., et al., Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. 903: p. 150-6.

34. D'Avolio, A., et al., HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). J Pharm Biomed Anal, 2012. 59: p. 109-16.
35. Parise, R.A., et al., A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantitation of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib in human plasma and serum. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. 877(20-21): p. 1894-900.
36. Miura, M. and N. Takahashi, Routine therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors by HPLC-UV or LC-MS/MS methods. Drug Metab Pharmacokinet, 2016. 31(1): p. 12-20.