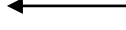


İBRAHİM DANIŞ



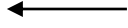
Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak. Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak.

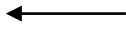


DOKTORA TEZİ



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2023



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

NİTROZAMİN GRUBU İMPÜRİTELERİN FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN KROMATOĞRAFİK MİKTAR
TAYİNİ

İBRAHİM DANIŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. DURİŞEHVAR ÜNAL

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

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

İbrahim DANIŞ

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan, Prof. Dr. Sezgin Bakırdere ve Doç. Dr. Pelin Köseoğlu Yılmaz’a, çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Durişehvar Ünal’a, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Analitik Kimya Anabilim Dalının tüm Öğretim Üyelerine, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma ve İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. N-nitrozo Bileşikleri	4
2.2. Nitrozaminler	4
2.2.1. N-nitrozodimetilamin (NDMA).....	6
2.2.2. N-nitrozodietilamin (NDEA)	6
2.2.3. N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA)	7
2.2.4. N-nitrozodiizopropilamin (NDIPA).....	7
2.2.5. N-nitrozometilamino Bütirik Asit (NMBA)	7
2.2.6. N-metil-N-nitrozopiperazin (MeNP)	7
2.2.7. N-nitrozodibutilamin (NDBA).....	7
2.2.8. N-nitrozometilfenilamin (NMPA)	8
2.3. Nitrozaminlerin Mutajenitesi ve Kanserojenliği.....	8
2.4. İlaç Ürünlerinde Nitrozamin Safsızlıklarının Varlığının Genel Nedenleri.....	10
2.4.1. Nitrozamin Oluşumuna Yol Açan Genel Koşullar	10
2.4.2. Nitrozamin Oluşturabilen İkincil, Üçüncül ve Dördüncül Amin Kaynakları ...	11
2.4.3. Tedarikçi Kaynaklı Hammaddelerde Kontaminasyon	12
2.4.4. Kirlenme Kaynakları Olarak Geri Kazanılan Çözücüler, Katalizörler ve Reaktifler.....	12
2.4.5. Nitrozamin Kirlenme Kaynağı Olarak Söndürme Süreci	13
2.4.6. Süreç Optimizasyonu ve Kontrolü Eksikliği	14

2.4.7. İlaç Ürünlerinde Etken Madde Kontaminasyonu Dışındaki Kaynaklardan Gelen Nitrozamin Safsızlıkları	14
2.5. Nitrozamin Bileşiklerinin Belirlenen Günlük Alım Limitleri	14
2.6. Nitrozaminler İçin Literatürdeki Analiz Yöntemleri	16
2.6.1. LC-MS/MS ile Yapılmış Çalışmalar.....	16
2.6.2. GC MS ile Yapılan Analizler.....	21
2.6.3. HPLC-UV ve HPLC-FLD ile Yapılan Analizler.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller.....	26
3.1.1. Referans Standartlar	26
3.1.2. Ekipmanlar	26
3.1.3. Destek Ekipmanlar	27
3.1.4. Kimyasallar	28
3.2. Çözeltilerin Hazırlanması	28
3.2.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	28
3.2.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması	28
3.2.2.1. Nitrozamin Ana Stok 1 Çözeltilerinin Hazırlanması	28
3.2.2.2. Nitrozamin Seyreltik Stok 1 Çözeltilerinin Hazırlanması	29
3.2.2.3. Nitrozamin Seyreltik Stok 2 Çözeltilerinin Hazırlanması	30
3.2.2.4. Nitrozamin Seyreltik Stok 3 Çözeltilerinin Hazırlanması	31
3.2.3. Kalibrasyon Standartlarının ve Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması..	31
3.2.3.1. Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması	31
3.2.3.2. Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması	33
3.3. Yöntem Geliştirme ile İlgili Çalışmalar.....	34
3.3.1. LC-MS/MS Sisteminin Analiz için Hazırlanması	34
3.3.2. Hareketli Faz Sisteminin Seçimi.....	35
3.3.3. Moleküllere Ait Kütle Dedektörü Parametrelerinin Belirlenmesi	36
3.3.3.1. Ana İyon (Precursor Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
3.3.3.2. Parçalayıcı Voltaj (Fragmentor Voltage, FV) Değerlerinin Belirlenmesi ...	37
3.3.3.3. Parçalanma İyonu (Product Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi.....	37
3.3.3.4. Çarpışma Enerjisi (Collision Energy, CE) Değerlerinin Belirlenmesi	38
3.3.3.5. LC-MS/MS Sistemi Ortak Kaynak (Source) Parametrelerinin Belirlenmesi	38

3.3.4. Kromatografi Kolonu Seçimi.....	39
3.3.5. Yöntem Geliştirme Çalışmaları Sonucunda Belirlenen Analitik Yöntem	40
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	41
3.4.1. Seçicilik.....	41
3.4.2. Taşınma Etkisi.....	41
3.4.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	41
3.4.4. Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusal Çalışma Aralığı	42
3.4.5. Doğruluk	43
3.4.6. Kesinlik	44
3.4.7. Matriks Etkisi	44
3.4.8. Stabilitate	45
3.4.9. Sistem Uygunluk Testi.....	46
3.5. Farmasötik Preparatlara Uygulama.....	46
3.5.1. Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi	46
3.5.2. Uygulama Yapılacak Farmasötik Preparatlar	48
4. BULGULAR.....	51
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular	51
4.1.1. Ana İyon (Precursor Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi.....	51
4.1.2. Parçalayıcı Voltaj (Fragmentor Voltage, FV) Değerlerinin Belirlenmesi	54
4.1.3. Parçalanma İyonu (Product Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi.....	57
4.1.4. Çarpışma Enerjisi (Collision Energy, CE) Değerlerinin Belirlenmesi	61
4.1.5. LC-MS/MS Sistemi Ortak Kaynak (Source) Parametrelerinin Belirlenmesi Çalışmaları ile İlgili Bulgular	64
4.1.5.1. Gaz Sıcaklığının Belirlenmesi.....	65
4.1.5.2. Gaz Akış Hızının Belirlenmesi	65
4.1.5.3. Nebulizer Basıncının Belirlenmesi	66
4.1.5.4. Sheath Gaz Sıcaklığının Belirlenmesi.....	67
4.1.5.5. Sheath Gaz Akış Hızının Belirlenmesi	67
4.1.5.6. Kapiler Voltaj Değerinin Belirlenmesi	68
4.1.5.7. Nozzle Voltaj Değerinin Belirlenmesi	69
4.1.6. Hareketli Faz Sisteminin Belirlenmesi	69
4.1.7. Kromatografik Kolon Seçimi.....	70
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu	70

4.2.1. Seçicilik.....	70
4.2.2. Taşınma Etkisi.....	72
4.2.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	73
4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi – Doğrusal Çalışma Aralığı	74
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	80
4.2.6. Stabilitate	86
4.2.7. Sistem Uygunluk Testi.....	87
4.3. Farmasötik Preparatlara Uygulama ile İlgili Bulgular	87
4.3.1. Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi	87
4.3.2. Uygulama Yapılan Farmasötik Preparatlar	88
5. TARTIŞMA	91
KAYNAKLAR	98
HAM VERİLER	104
FORMLAR	105
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	106

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Nitrozamin bileşikleri	5
Tablo 2-2: Nitrozaminler için CPDB'de bulunan TD50 değerleri	9
Tablo 2-3: Nitrozaminlerin kabul edilebilir günlük alım dozları.	15
Tablo 2-4: LC-MS/MS cihazı ile farmasötik preparatlarda yapılmış çalışmalar.....	20
Tablo 3-1: Referans standartlar	26
Tablo 3-2: Ekipmanlar	27
Tablo 3-3: Destek ekipmanları	27
Tablo 3-4: Kimyasallar	28
Tablo 3-5: Nitrozamin ana stok 1 çözeltilerinin hazırlanışı	29
Tablo 3-6: Nitrozamin seyreltik stok 1 çözeltilerinin hazırlanışı	30
Tablo 3-7: Nitrozamin seyreltik stok 2 çözeltilerinin hazırlanışı	31
Tablo 3-8: Nitrozamin seyreltik stok 3 çözeltilerinin hazırlanışı	31
Tablo 3-9: Kalibrasyon standartlarının hazırlanılışı	32
Tablo 3-10: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanılışı	34
Tablo 3-11: Hareketli faz seçiminde kullanılan çözeltiler.....	36
Tablo 3-12: Nitrozamin moleküllerinin ana iyon m/z değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri	36
Tablo 3-13: Nitrozamin moleküllerinin parçalanma iyonu m/z değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri	37
Tablo 3-14: Nitrozamin moleküllerinin çarpışma enerjisi değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri	38
Tablo 3-15: Nitrozamin moleküllerinin ortak kaynak parametrelerinin belirlenmesi için tarama parametreleri	39
Tablo 3-16: Kolon seçimi çalışmalarında kullanılan kolonlarının özellikleri	39
Tablo 3-17: Nitrozaminlere ait kütle parametreleri	40
Tablo 3-18: Sistem uygunluk testi kabul limitleri	46
Tablo 3-19: Uygulama yapılan farmasötik preparatlar	48
Tablo 4-1: Tarama Sonucu belirlenen ana iyon m/z değerleri ve polariteler	51
Tablo 4-2: Nitrozaminler için belirlenen parçalayıcı voltaj değerleri	55
Tablo 4-3: Nitrozaminler için belirlenen parçalanma iyonu m/z değerleri.....	57

Tablo 4-4: Nitrozaminler için belirlenen çarpışma enerjisi değerleri.....	62
Tablo 4-5: LOD ve LOQ çalışmalarından elde edilen sonuçlar	73
Tablo 4-6: Nitrozaminlerin çalışma aralıkları ve korelasyon katsayıları (r^2)	74
Tablo 4-7: NDMA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3).....	77
Tablo 4-8: NDEA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3).....	78
Tablo 4-9: NEIPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)	78
Tablo 4-10: NDIPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3).....	78
Tablo 4-11: NMBA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3).....	79
Tablo 4-12: MeNP kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)	79
Tablo 4-13: NDBA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)	79
Tablo 4-14: NMPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)	80
Tablo 4-15: NDMA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)	80
Tablo 4-16: NDEA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6).....	81
Tablo 4-17: NEIPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6).....	81
Tablo 4-18: NDIPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)	82
Tablo 4-19: NMBA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6).....	82
Tablo 4-20: MeNP için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)	83
Tablo 4-21: NDBA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)	83
Tablo 4-22: NMPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)	84
Tablo 4-23: NDMA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18).....	84
Tablo 4-24: NDEA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18).....	84
Tablo 4-25: NEIPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)	85
Tablo 4-26: NDIPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18).....	85
Tablo 4-27: NMBA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18).....	85
Tablo 4-28: MeNP için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)	85
Tablo 4-29: NDBA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18).....	86
Tablo 4-30: NMPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)	86
Tablo 4-31: Stabilité sonuçları.....	86
Tablo 4-32: Sistem uygunluk testi sonuçları	87
Tablo 4-33: Ekstraksiyon yöntemlerinin matriks etkisi sonuçları	88
Tablo 4-34: Farmasötik preparatların matriks etkileri (%ME)	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: N-nitrozo bileşiklerinin genel molekül yapısı.....	4
Şekil 2-2: Nitrozamin oluşum reaksiyonu.....	5
Şekil 2-3: N,N-Dimetilformamidden NDMA oluşumu.....	11
Şekil 4-1: NDMA'nın kütle spektrumu.....	52
Şekil 4-2: NDEA'nın kütle spektrumu.....	52
Şekil 4-3: NEIPA'nın kütle spektrumu.....	52
Şekil 4-4: NDIPA'nın kütle spektrumu.....	53
Şekil 4-5: NMBA'nın kütle spektrumu.....	53
Şekil 4-6: MeNP'nın kütle spektrumu.....	53
Şekil 4-7: NDBA'nın kütle spektrumu.....	54
Şekil 4-8: NMPA'nın kütle spektrumu.....	54
Şekil 4-9: NDMA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	55
Şekil 4-10: NDEA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	55
Şekil 4-11: NEIPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	56
Şekil 4-12: NDIPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	56
Şekil 4-13: NMBA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	56
Şekil 4-14: MeNP'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	56
Şekil 4-15: NDBA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	57
Şekil 4-16: NMPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum.....	57
Şekil 4-17: NDMA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	58
Şekil 4-18: NDEA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	58
Şekil 4-19: NEIPA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	59
Şekil 4-20: NDIPA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	59
Şekil 4-21: NMBA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	60
Şekil 4-22: MeNP'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	60
Şekil 4-23: NDBA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	61
Şekil 4-24: NMPA'nın parçalanma iyonu spektrumu.....	61
Şekil 4-25: NDMA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı.....	62
Şekil 4-26: NDEA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı.....	62
Şekil 4-27: NEIPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı.....	63
Şekil 4-28: NDIPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı.....	63

Şekil 4-29: NMBA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı	63
Şekil 4-30: MeNP'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı	64
Şekil 4-31: NDBA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı.....	64
Şekil 4-32: NMPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı	64
Şekil 4-33: Değişen gaz sıcaklık değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.	65
Şekil 4-34: Değişen gaz akış hızlarının dedektör cevabı üzerine etkisi.	66
Şekil 4-35: Değişen nebulizer basınç değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.	66
Şekil 4-36: Değişen sheath gaz sıcaklıklarının dedektör cevabı üzerine etkisi.	67
Şekil 4-37: Değişen sheath gaz akış hızlarının dedektör cevabı üzerine etkisi.	68
Şekil 4-38: Değişen kapiler voltaj değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.	68
Şekil 4-39: Değişen nozzle voltaj değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.	69
Şekil 4-40: Hareketli faz sistemlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.	70
Şekil 4-41: Boş çözücüye ait kromatogram	71
Şekil 4-42: Nitrozaminlere ait kromatogram	72
Şekil 4-43: En yüksek standart enjeksiyonundan sonraki boş çözücü kromatogramı	73
Şekil 4-44: NDMA'ya ait kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 4-45: NDEA'ya ait kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 4-46: NEIPA'ya ait kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 4-47: NDIPA'ya ait kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 4-48: NMBA'ya ait kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 4-49: MeNP'ya ait kalibrasyon eğrisi.....	76
Şekil 4-50: NDBA'ya ait kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 4-51: NMPA'ya ait kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil 4-52: Tablet 1 ürünündeki NEIPA çözücü ve plasebo kalibrasyon eğrisi.....	90
Şekil 4-53: Tablet 1 ürünündeki MeNP çözücü ve plasebo kalibrasyon eğrisi	90

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACN: Asetonitril

AI: Kabul edilebilir günlük alım dozu

APCI: Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon

API: Aktif farmasötik bileşen

ARB: Anjiyotensin II reseptör blokerleri

AS: Ana stok

CAS: Kimyasal Özet Hizmeti

CE: Çarpışma enerjisi

CPDB: Kanserojen Etki Veri Tabanı

CV: Varyasyon katsayısı

C18: Oktadesil silan

DICM: Dispersif inklüzyon kompleks mikro ekstraksiyon

dk: Dakika

DLLME: Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

ESI: Elektrosprey iyonizasyon

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

FLD: Floresans dedektör

FV: Parçalayıcı voltaj

g: Gram

GC-MS/MS: Gaz Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi

HLOQ: En yüksek tayin sınırı

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HS-GC/MS: Headspace Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

k': Alıkonma faktörü

KK: Kalite kontrol

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi–Tandem Kütle Spektrometrisi

LLOQ: En düşük tayin sınırı

LOD: Tespit sınırı

LOQ: Tayin sınırı

MDD: Maksimum günlük doz

ME: Matriks etkisi

mg: Miligram

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MRM: Çoklu reaksiyon izleme

MS: Kütle spektrometrisi

m/z: Kütle/yük

M⁺: Moleküler iyon

N: Teorik tabaka sayısı

ng: Nanogram

nm: Nanometre

NDMA: N-nitrozodimetilamin

NDEA: N-nitrozodietilamin

NEIPA: N-nitrozoetilizopropilamin

NDIPA: N-nitrozodiizopropilamin

NMBA: N-nitrozometilamino bütirik asit

MeNP: N-metil-N-nitrozopiperazin

NDBA: N-nitrozodibutilamin

NMPA: N-nitrozometilfenilamin

ppm: Milyonda bir kısım

ppb: Milyarda bir kısım

psi: İnçkare başına libre

Rs: Ayırma gücü

RSD: Bağlı standart sapma

S/N: Sinyal/gürültü oranı

SALLE: Salting-out sıvı-sıvı ekstraksiyonu

SD: Standart sapma

SIM: Seçilmiş iyon izleme

SS: Seyreltik stok

ST: Standart

SUT: Sistem uygunluk testi

T: Kuyruklanma faktörü

TD50: Hayvanların yüzde 50'sinde kansere neden olan doz

TRC: Toronto Araştırma Kimyasalları

T0 : Başlangıç noktasında pik alanı

T1 : T zaman noktasındaki pik alanı

UV: Ultraviyole

v: Hacim

V: Volt

VAL: Validasyon

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

ÖZET

Daniş İ. Nitrozamin Grubu İmpüritelerin Farmasötik Preparatlardan Kromatografik Miktar Tayini. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul. 2023.

Nitrozaminler, bir amine bağlı bir nitrozo grubunun kimyasal yapısına sahip bileşiklerdir. Nitrozamin bileşikleri, aminler ve nitroz asit arasındaki reaksiyonla oluşur. Son zamanlarda bazı ilaç ürünlerinde nitrozamin safsızlıklarının varlığı tespit edilmiştir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA), bazı ilaç sınıflarında nitrozamin safsızlıklarının bulunduğunu duyurmuştur. ICH M7 (R1), nitrozamin safsızlıklarını hem kemirgen kanserojenliği hem de mutajenite verilerine dayalı olarak mutajenik ve kanserojen olarak bilinen Sınıf 1 olarak sınıflandırır. Nitrozaminler kanserojen etki gösteren maddelerdir ve bu nedenle ilaç ürünlerindeki bu safsızlıkların miktarlarının çok düşük seviyelerde tayin edilmesi gerekir. Kromatografik ayırma, bir Inertsil ODS-3 (4,6 x 250 mm, 5µm) kolon üzerinde gerçekleştirildi. Tespit, elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile donatılmış üçlü dört kutuplu bir kütle detektörü tarafından gerçekleştirildi. Miktar belirleme, çoklu reaksiyon izleme (MRM) kullanılarak yapıldı. Geçiş iyonları NDMA için (75,1>43,1), NDEA için (103,1>75,2), NEIPA için (117>75,1), NDIPA için (131,1>43,2), NMBA için (147>117), MeNP için (130,1>58,2), NDBA için (159,2>57,2) ve NMPA için (137>66,1)'dir. Kalibrasyon eğrileri 6 derişim seviyesinden oluşur. LOQ değerleri NDMA için 2 ng/mL, NDEA için 0,4 ng/mL, NEIPA için 0,5 ng/mL, NDIPA için 0,2 ng/mL, NMBA için 2 ng/mL, MeNP için 0,8 ng/mL, NDBA için 0,4 ng/mL ve NMPA için 0,1 ng/mL'dir. Kalite kontrol numunelerinin derişim seviyeleri 3, 15, 50 ng/mL'dir. Yöntemin kesinliği bağıl standart sapmanın yüzdesi olarak, yöntemin doğruluğu ise yüzde doğruluk olarak gösterildi. Sonuçlar, yöntemin iyi bir kesinliğe ve doğruluğa sahip olduğunu ve kesinlik ve doğruluk için kabul limiti içinde olduğunu göstermektedir. Geliştirilen yöntem farklı farmasötik preparatlara başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nitrozamin, safsızlık, farmasötik preparat, kromatografi, kütle spektrometrisi.

ABSTRACT

Daniş İ. Chromatographic Determination of Nitrosamine Impurities from Pharmaceutical Preparations. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Doctorate Thesis. İstanbul. 2023.

Nitrosamines are compounds have the chemical structure of a nitroso group bonded to an amine. Nitrosamine compounds are formed by reaction between amines and nitrous acid. The presence of nitrosamine impurities has been detected recently in some drug products. The Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) announced that nitrosamine impurities were found in some classes of the drugs. ICH M7 (R1) classifies nitrosamine impurities as Class 1 known to be mutagenic and carcinogenic based on both rodent carcinogenicity and mutagenicity data. Nitrosamine impurities are carcinogenic and therefore, it is required to quantify nitrosamine impurities in drug products at very low levels. Separation was carried out on a Inertsil ODS-3 (4.6 x 250 mm, 5µm) column. Detection was carried out by a triple quadrupole mass detector fitted with electrospray ionization (ESI). Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM). Transition ions are 75.1>43.1 for NDMA, 103.1>75.2 for NDEA, 117>75.1 for NEIPA, 131.1>43.2 for NDIPA, 147>117 for NMBA, 130.1>58.2 for MeNP, 159.2>57.2 for NDBA, 137>66.1 for NMPA. The calibration curves consist of 6 concentration levels. LOQ values are 2 ng/mL for NDMA, 0.4 ng/mL for NDEA, 0.5 ng/mL for NEIPA, 0.2 ng/mL for NDIPA, 2 ng/mL for NMBA, 0.8 ng/mL for MeNP, 0.4 ng/mL for NDBA and 0.1 ng/mL for NMPA. The concentration levels of the quality control samples are 3, 15, 50 ng/mL. The precision of the method was showed as the percentage of relative standard deviation and the accuracy of the method was showed in terms of percentage of error. The results indicate that the method has good precision and accuracy which are within the acceptance limit for precision and accuracy. The developed method has been successfully applied to different pharmaceutical preparations.

Key Words: Nitrosamine, impurity, pharmaceutical preparation, chromatography, mass spectrometry.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada endüstrinin gelişmesi ve teknolojiadaki ilerlemelerin insanlığa sağladığı faydaların artmasının yanında çevreye verdiği zararların da artmasına yol açmıştır. Dünyada hızla artan nüfus ile birlikte üretim ve tüketimdeki artış da hız kazanmıştır. İnsanlığın ihtiyaç duyduğu hammadde, ilaç ve gıda gibi temel ihtiyaçların üretimindeki prosesler artan talep ve teknolojiyle birlikte değişmiştir. Teknolojideki bu değişim ile birlikte kullanılan kimyasal maddelerin çeşitliliğinin, sayısının ve kullanım alanlarının çoğalması, bu kimyasal maddelerin bağlantılı olduğu kanserojenik ve mutajenik etkilerin görülme sıklığını artırmıştır.

Kanser oluşumuna neden olan çeşitli etkenler vardır ve kanserojen kimyasal maddeler bu etkenlerin büyük bir kısmını oluşturur. N-nitrozo bileşikleri ise bu kanserojen kimyasal maddelerin önemli bir kısmını kapsamaktadır. N-nitrozo bileşikleri, kimya literatüründe ilk kez 100 yıldan daha uzun bir süre önce tanımlanmasına rağmen 1950'li yıllara kadar çok fazla ilgi görmemiştir. N-nitrozo bileşikleri 1930'lu yıllardan sonra endüstride çözücü olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu bileşiklerin zararlı etkilerinin gözlenmesine rağmen o yıllarda endüstride çözücü olarak kullanılmaya devam edilmiştir.

1954'de Magee ve Barnes tarafından yayınlanan bir araştırma makalesinde, büyük bir endüstriyel kuruluşunun araştırma laboratuvarında çalışan üç erkek arasında karaciğer sirozu olan iki vakanın ortaya çıkması, nedensel olarak nitrozodimetilaminden şüphelenilmesine neden olmuştur. Nitrozodimetilamin, ilk siroz vakası keşfedilmeden yaklaşık 10 ay önce laboratuvara çözücü olarak alındığı gözlenmiştir (1). 1956'da Magee ve Barnes, rutin bir kanserojen madde taraması sırasında, nitrozodimetilaminin farelerde kanserojen etkisini rapor etmesiyle (2), N-nitrozo bileşiklerinin toksik etkilerinin araştırılması hız kazanmıştır. O zamandan beri test edilen 300 civarında N-nitrozo bileşiğinin yaklaşık %90'ının en az 39 farklı türde ve birçok farklı organda yapılan deneysel çalışmalarda güçlü kanserojen etkiler gösterdiği bulunmuştur (3,4). Bu keşifler, bilim insanlarının diğer N-nitrozo bileşiklerinin kanserojen özelliklerini araştırmasına neden olmuştur.

Kanserin nedenlerine ilişkin yapılan incelemelerde, epidemiyolojik gözlemlere dayalı olarak kanserin sebebinin alınan gıdalarla olan ilişkisi önemli bir roledir (%60)

(5). 1960'ların başlarında, Norveç'te bazı koyunların sodyum nitrit ile işlenmiş balık unu ile beslendikten sonra karaciğer toksisitesinden öldüğü gözlenlenmiştir (6,7). Nitrit ve nitratların sodyum ve potasyum tuzları; peynir, balık ve et gibi hayvansal gıdalara tat ve renk vermek ve raf ömrünü uzatmak için katılan kürleme ajanlarıdır. Bu maddeler hayvansal ürünlerdeki aminlerle reaksiyona girerek toksik n-nitrozo bileşiklerini oluşturur. Bu yıllarda kanserojen nitrozaminlerin gıda maddelerinde olduğu keşfedilmesiyle gıda maddelerinin nitrozaminler yönünden taranması çalışmaları başlamıştır (8-11).

Nitrozaminler suda iyi çözünme özellikleri nedeniyle yeryüzü sularının kirlenmesinde önemli bir risk oluşturmaktadır. Sularda nitrozodimetilaminin varlığını belgeleyen ilk raporlar 1970'lerde ortaya çıkmıştır. Nitrozodimetilamin, Baltimore yakınlarındaki bir fabrikanın çevresinde havada ve suda tespit edilmiştir (12). Bununla birlikte, sulardaki en önemli tehlike içme sularının kloraminlerle veya diğer dezenfektanlarla dezenfekte edilmesi sırasında nitrozaminlerin oluşmasıdır (13). İçme sularının nihai dezenfeksiyonu, nitrozaminlerin ana kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. Böylece, nitrozodimetilamin oluşumu için kloraminasyon suçlanmıştır. Bu ironikti, çünkü kloraminlemenin diğer dezenfektanlardan daha az sayıda dezenfeksiyon yan ürünü ürettiği düşünülüyordu. Bununla birlikte klorlu yüzme havuzu sularında da nitrozaminler bulunduğundan, bu maddeler ile insan teması içme suyuyla sınırlı değildir (14).

Nitrozamin safsızlıklarının varlığı, son 5 yıldır çeşitli ilaç etken maddelerinde ve ilaç ürünlerinde tespit edilmiştir. Bu keşif, bu safsızlıkların gıda, su ve çevre gibi alanlardaki ilgisini ilaç alanına da kaydırmıştır. Gıda ve ilaç idaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) Temmuz 2018'de hipertansiyon (yüksek tansiyon) ve kalp yetmezliği olan hastaları tedavi etmek için kullanılan anjiyotensin II reseptör blokerleri (ARB'ler) veya 'Sartans' sınıfı ilaçlarda kanserojen safsızlıklar olan N-nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-nitrozodietilamin (NDEA) bulunduğunu duyurmuştur. Eylül 2019'da, bazı yaygın mide ekşimesi ürünlerinin (ranitidin ve nizatidin) kabul edilemez seviyelerde NDMA içerdiği tespit edilmiştir. Aralık 2019'da FDA, diğer ülkelerdeki bazı metformin içeren diyabet ilaçlarının NDMA içerdiği bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında FDA, NDMA'yı test etmek için metformin numuneleri almıştır. Mayıs 2020'de yapılan testler belirli lotlarda, kabul edilebilir alım sınırının üzerinde NDMA içerdiğini

ortaya koymuştur. Uluslararası otoriteler API (aktif farmasötik bileşen) sentezinde yaygın aminleri kullanan süreçleri değerlendirmiştir ve yaygın sentetik yolların NDMA'nın yanı sıra diğer nitrozamin safsızlıklarını da ortaya çıkarabileceğini tespit etmiştir (15,16).

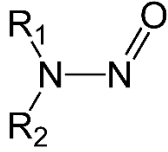
ICH M7 (R1) nitrozamin safsızlıklarını, hem kanserojen hem de mutajenite verilerine dayanarak mutajenik ve kanserojen olduğu bilinen Sınıf 1 olarak sınıflandırır (17). Bu nitrozamin safsızlıkları, kromozomal kırılmalar, yeniden düzenlemeler, kovalent bağlanma veya replikasyon sırasında DNA'ya girme yoluyla mutasyonlara neden olarak genetik materyali etkiler. Nitrozamin safsızlıklarının çok düşük seviyelerine maruz kalmanın neden olduğu genetik materyallerdeki bu değişiklikler kansere yol açabilir. Bu nedenle, halk sağlığı güvenliğini sağlamak için ilaçlardaki nitrozamin safsızlıklarını çok düşük seviyelerde belirlemek önemlidir.

Bazı ilaçlarda olası kanserojenleri olan nitrozamin safsızlıklarının yakın zamanda beklenmedik bu bulgusu, FDA ve EMA gibi uluslararası düzenleyicileri API'ler ve ilaç ürünlerindeki bu safsızlıkların ayrıntılı bir analizini yapmaya yönlendirmiştir. İlk başta az sayıda nitrozamin bileşiği için incelemeler yapılırken daha sonra gözlem altına alınan nitrozamin bileşiklerinin sayısı da artmıştır. Bu tez kapsamında yaygın olarak ilaç ürünlerinde görülen 8 adet nitrozaminin (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, MeNP, NDBA ve NMPA) farmasötik preparatlardan analizi için etkin, hassas ve seçici bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemin bu preparatlara uygulaması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. N-nitrozo Bileşikleri

N-nitrozo bileşikleri alkil, açıl ve aril gruplarının NO grubu azotuna bağlı karbonil grubuna sahip bileşiklerdir. N-nitrozo bileşiklerinin genel formülü Şekil 2-1’de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: N-nitrozo bileşiklerinin genel molekül yapısı.

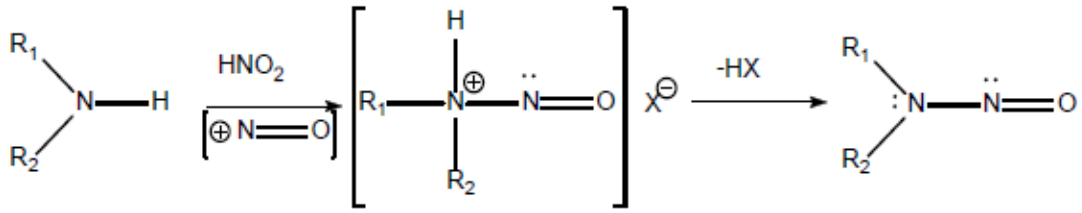
N-nitrozo bileşikleri genel olarak 2 gruba ayrılır.

-Nitrozamidler; R1 alkil veya aril grubu, R2 ise açıl grubudur. NO grubu taşıyan azota bağlı bir karbonil grubuna sahip olan maddelerdir. Bu bileşikler kararsız bileşiklerdir. Bileşiklerin kararsızlığı, iki çok elektropozitif fonksiyonel grubun (NNO ve CO) birleşmesinden kaynaklanır. Kararsız bileşikler olmaları ve doğada pek fazla bulunmamaları sebebiyle birkaç madde haricinde kanserojen araştırmaların pek konusu olmamıştır.

-Nitrozaminler; R1 ve R2 gruplarının her ikisinde alkil veya aril gruplarıdır. Bu bileşikler oldukça kararlı bileşiklerdir. Doğada fazlaca bulunmaları ve kararlı bileşikler olmaları sebebiyle n-nitrozo bileşikleri genelde nitrozaminler olarak adlandırılırlar (18,19).

2.2. Nitrozaminler

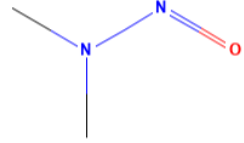
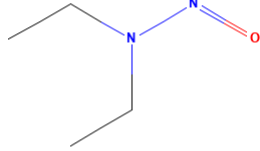
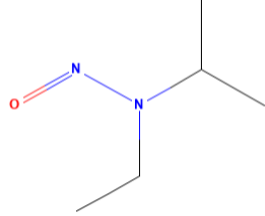
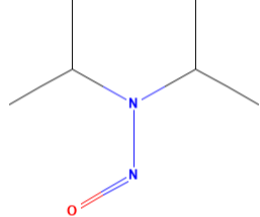
Nitrozamin terimi, bir amine bağlı bir nitrozo grubunun kimyasal yapısına sahip bileşikler sınıfını tanımlar ($R_1N(R_2)-N=O$). Nitrozaminler amin türevidirler, genellikle uçucudurlar ve kimyasal olarak stabildirler. Nitrozamin bileşikleri, aminler (ikincil, üçüncül veya dördüncül aminler) ve nitroz asit (asidik koşullar altında nitrit tuzları) arasında bir nitrozlama reaksiyonu ile oluşabilir (Şekil 2-2) (15).



Şekil 2-2: Nitrozamin oluşum reaksiyonu.

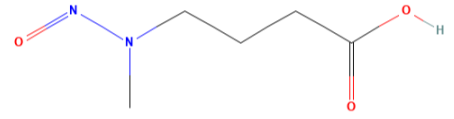
İlaç ürünlerinde ortaya çıkması muhtemel ve bu tez kapsamında çalışılan 8 adet nitrozamin (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, MeNP, NDBA ve NMPA) bileşiği Tablo 2-1’de sunulmuş ve genel fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda açıklanmıştır (20, 21).

Tablo 2-1: Nitrozamin bileşikler

Tam İsmi	Kısa İsmi	CAS Numarası	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Molekül Yapısı
N-nitrozodimetilamin	NDMA	62-75-9	74,08	
N-nitrozodietilamin	NDEA	55-18-5	102,14	
N-nitrozoetilizopropilamin	NEIPA	16339-04-1	116,16	
N-nitrozodiizopropilamin	NDIPA	601-77-4	130,19	

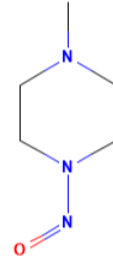
N-nitrozometilamino
bütirik asit

NMBA 61445-55-4 146,14



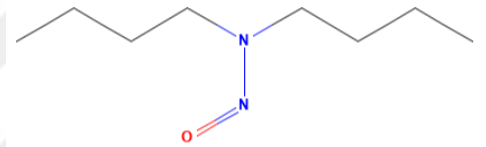
N-metil-N-
nitrozopiperazin

MeNP 16339-07-4 129,16



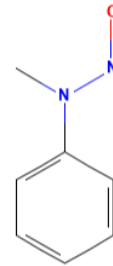
N-nitrozodibutilamin

NDBA 924-16-3 158,24



N-nitrozometilfenilamin

NMPA 614-00-6 136,15



2.2.1. N-nitrozodimetilamin (NDMA)

Kısaca NDMA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N,N-dimetilnitröz amid'dir. CAS numarası 62-75-9'dur. Molekül ağırlığı 74,08 g/mol'dür. Molekül formülü $C_2H_6N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozodimetilamin hafif karakteristik bir kokusu olan sarı yağlı bir sıvıdır. Kaynama noktası 151-153 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 13,50 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür. IARC (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) kanserojen sınıfı Grup 2A'dır.

2.2.2. N-nitrozodietilamin (NDEA)

Kısaca NDEA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N,N-dietilnitröz amid'dir. CAS numarası 55-18-5'dir. Molekül ağırlığı 102,14 g/mol'dür. Molekül formülü $C_4H_{10}N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozodietilamin berrak

hafif sarı bir sıvıdır. Kaynama noktası 175-177 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 1,04 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür. IARC (Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı) kanserojen sınıfı Grup 2A'dır.

2.2.3. N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA)

Kısaca NEIPA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N-etil-N-propan-2-il nitrozamid'dir. CAS numarası 16339-04-1'dir. Molekül ağırlığı 116,16 g/mol'dür. Molekül formülü $C_5H_{12}N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozoetilizopropilamin renksiz-açık sarı bir yağdır. Sudaki çözünürlüğü 0,20 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür.

2.2.4. N-nitrozodiizopropilamin (NDIPA)

Kısaca NDIPA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N,N-di(propan-2-il) nitrozamid'dir. CAS numarası 601-77-4'dür. Molekül ağırlığı 130,19 g/mol'dür. Molekül formülü $C_6H_{14}N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozodiizopropilamin beyaz-soluk sarı bir katıdır. Kaynama noktası 194,5 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 0,10 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür.

2.2.5. N-nitrozometilamino Bütirik Asit (NMBA)

Kısaca NMBA olarak adlandırılır. IUPAC ismi 4-[metil(nitrozo)amino]bütanoik asit'dir. CAS numarası 61445-55-4'dür. Molekül ağırlığı 146,14 g/mol'dür. Molekül formülü $C_5H_{10}N_2O_3$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozometilamino bütirik asit renksiz bir sıvıdır. Sudaki çözünürlüğü 2,29 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür.

2.2.6. N-metil-N-nitrozopiperazin (MeNP)

Kısaca MeNP olarak adlandırılır. IUPAC ismi 1-metil-4-nitrozopiperazin'dir. CAS numarası 16339-07-4'dür. Molekül ağırlığı 129,16 g/mol'dür. Molekül formülü $C_5H_{11}N_3O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-Metil-N-nitrozopiperazin, berrak açık sarı bir yağdır. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür.

2.2.7. N-nitrozodibutilamin (NDBA)

Kısaca NDBA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N,N-dibütil nitrozamid'dir. CAS numarası 924-16-3'dür. Molekül ağırlığı 158,24 g/mol'dür. Molekül formülü, $C_8H_{18}N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-

nitrozodibutilamin berrak renksiz-açık sarı bir yağdır. Kaynama noktası 253 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 0,01 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür. IARC (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) kanserojen sınıfı Grup 2B'dir.

2.2.8. N-nitrozometilfenilamin (NMPA)

Kısaca NMPA olarak adlandırılır. IUPAC ismi N-metil-N-fenil nitroz amid'dir. CAS numarası 614-00-6'dır. Molekül ağırlığı 136,15 g/mol'dür. Molekül formülü $C_7H_8N_2O$ olarak gösterilir. Molekül yapısı Tablo 2-1'de gösterilmiştir. N-nitrozometilfenilamin sarı katıdır. Kaynama noktası 225 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 0,05 mol/L'dir. Çoğu yaygın organik çözücünde çözünür.

2.3. Nitrozaminlerin Mutajenitesi ve Kanserojenliği

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), hayvan verileri mevcut olanları grup 2A veya 2B olarak sınıflandırmıştır. Şu anda, maddeye özgü yeterli insan verisi olmamasına rağmen, yalnızca tütünle ilgili bazı nitrozaminler grup 1 olarak sınıflandırılmaktadır (örn. 4-(metilnitrozoamino)-1-(3 piridil)-1-bütanon-NNK ve N-nitrozonornikotin-NNN). Hayvanlardan elde edilen veriler yetersiz olanlar grup 3 olarak sınıflandırılır (22). NDMA ve NDEA'nın karsinojenitesi, başta CYP2E1 olmak üzere mikrozomal karaciğer enzimleri yoluyla ilgili alkil diazonyum iyonlarına biyotransformasyonlarından kaynaklanır. Bu iyonlar DNA ile reaksiyona girer ve endojen DNA hasarına neden olan DNA eklentileri oluşturur (23, 24).

Yaşam boyu biyotahlillerde üretilen hayvan verileri, kimyasalların kanserojenliği ve insanlarla ilgisi hakkında sonuca varmak için en güvenilir kaynaktır. Çoğu kimyasal için güvenilir insan verileri şu anda mevcut değildir ve ayrıca nitrozaminler için de eksiktir. Hayvan verilerine dayalı olarak kanserojen etkinin karakterizasyonu ve sıralaması zordur ve yalnızca sınırlı bir şekilde mümkündür. Hayvan karsinojenisite verileri için en kapsamlı kaynak kanserojen etki veri tabanıdır (CPDB). Bu veri tabanı için 1547 kimyasalın 6540 uzun süreli hayvan kanseri araştırması değerlendirilmiş ve hayvanların yüzde 50'sinde kansere neden olan doz (TD50) matematiksel bir modelle hesaplanmıştır. Burada bahsedilen nitrozaminler için, CPDB'de bulunan ve mevcut olan TD50 değerleri, azalan kanserojen potansiyellerine (harmonik ortalama TD50) göre sıralanmış olarak Tablo 2-2'de listelenmiştir (25).

Tablo 2-2: Nitrozaminler için CPDB'de bulunan TD50 değerleri

Nitrozamin ismi	Kısaltma	IARC Grubu	TD50 [mg/kg/gün] harmonik ortalama, CPDB	Mutajenisite
N-nitrozodietilamin	NDEA	2A	0,026	Ames Testi Pozitif (CPDB)
N-nitrozodimetilamin	NDMA	2A	0,096	Ames Testi Pozitif (CPDB)
N-nitrozometilfenilamin	NMPA		0,142	hisG428 Salmonella suşu TA104'te pozitif
N-nitrozodibutilamin	NDBA	2B	0,691	Ames Testi Pozitif (CPDB)
N-nitrozometilamino bütirik asit	NMBA		0,982	Ames Testi negatif (CPDB) Ames Testi pozitif, Inami ve diğerleri 2013 (26)
N-nitrozoetilizopropilamin	NEIPA			
N-nitrozodiizopropilamin	NDIPA			
N-metil-N-nitrozopiperazin	MeNP			

TD50'nin doğruluğu büyük ölçüde çalışma kalitesine ve boyutuna bağlıdır. Sadece bir veya iki doz grubu ile yapılmış çalışmalardan elde edilen TD50 değerlerinin güven aralıkları, daha fazla doz grubu ile yapılan çalışmalara göre daha yüksektir. Bununla birlikte, dört veya daha fazla doz grubuyla yapılan çalışmalar istisnadır. Sadece NDMA ve NDEA durumunda, aynı sıçan suşunda aynı sayıda doz grubuyla karşılaştırılabilir çalışmalar mevcuttur. CPDB, her pozitif çalışmanın en hassas tümör hedefinin TD50 değerlerini kullanarak TD50'nin her bir kimyasal türe özgü harmonik ortalamalarını rapor eder. CPDB'de rapor edilen nitrozamin çalışmalarının çoğu, bildirilen harmonik ortalama TD50'ye dahil edilen yalnızca bir veya iki doz grubuna sahiptir. Bu yaklaşım bir yandan birkaç doz grubuyla yapılan çalışmalara ağırlık verirken diğer yandan farklı kemirgen suşlarının değişken hassasiyetini içerir. Bu nedenle, ne çalışmaya özgü TD50 değerleri ne de harmonik ortalama TD50 değerleri, gerçek güç için doğru bir ölçüm sağlamaz. Yalnızca NDMA ve NDEA için yapılan en

kapsamlı sıçan karsinogenisite çalışması kullanıldığında, (27) karaciğer tümörleri için TD50, NDMA için 42 µg/kg/gün ve NDEA için 50 µg/kg/gün'dür. CPDB veri tabanındaki tüm sıçan çalışmaları kullanılarak hesaplanan harmonik ortalama TD50, sırasıyla NDMA için 96 µg/kg/gün ve NDEA için 26,5 µg/kg/gün'dür. Yaşam boyu kemirgen karsinogenisite çalışmalarının verileri kullanılarak nitrozaminlerin kanserojen etkilerine göre sıralaması, kullanılan yöntemle bağılıdır ve değişiklik gösterir. Bununla birlikte, birden fazla doz grubu ve yeterli sayıda hayvanla yapılan çalışmalar mevcut olduğunda, etki sıralaması nispeten güvenilir görünmektedir. Aynı zamanda, çoğu uçucu olmayan nitrozaminin kanserojen etki bakımından daha az endişe verici olduğu görülmektedir. Hayvanlarda oral nitrozamin maruziyeti için başlıca hedef organlar karaciğer (sıçan, maymun), yemekborusu (sıçan), akciğer (sıçan) ve mesane (sıçan) en çok etkilenen organlardır. Şu anda insanlardan yeterli veri bulunmamasına rağmen, bu organlar aynı zamanda insanla ilgili hedefler olarak kabul edilebilir (16).

2.4. İlaç Ürünlerinde Nitrozamin Safsızlıklarının Varlığının Genel Nedenleri

İlaç ürünlerinde nitrozamin safsızlıklarının varlığının genel nedenleri aşağıda açıklanmıştır (15,16).

2.4.1. Nitrozamin Oluşumuna Yol Açan Genel Koşullar

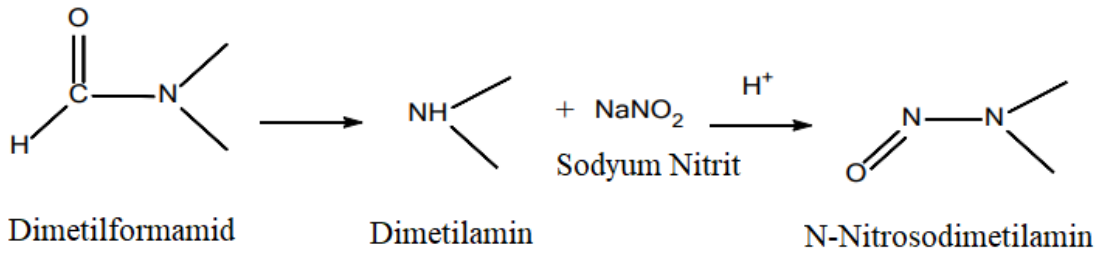
Nitrozaminlerin oluşumu, asidik reaksiyon koşulları altında ikincil, üçüncül veya dördüncül aminler ve nitrit tuzlarının varlığında mümkündür. Bu koşullar altında, nitrit tuzları, bir nitrozamin oluşturmak için bir amin ile reaksiyona girebilen nitroz asit oluşturabilir (Şekil 2-2). Öncü aminlerin mevcudiyetinde kalıntı aziti (tetrazol halka oluşumunda veya azid fonksiyonel grubunun bir moleküle eklenmesinde yaygın olarak kullanılan bir reaktif) gidermek için nitroz asit kullanılırsa, nitrozamin oluşumu için daha büyük bir risk vardır.

Bir aşamada reaktif olarak kullanılan nitritler, saflaştırma işlemlerine rağmen sonraki aşamalara geçebilir ve nitrozamin safsızlıkları oluşturmak için aminlerle reaksiyona girebilir. Bu nedenle, nitrit tuzları mevcut olduğunda, sonraki adımlara geçiş göz ardı edilemez. Genel olarak, ikincil, üçüncül veya dördüncül aminlerin varlığında nitritleri kullanan işlemler, nitrozamin safsızlıkları oluşturma riski altındadır.

2.4.2. Nitrozamin Oluşturabilen İkincil, Üçüncül ve Dördüncül Amin Kaynakları

Aminler, çeşitli nedenlerle bir üretim sürecinde mevcut olabilir. İlaç etken maddesi, ara ürünler veya başlangıç malzemeleri, ikincil veya üçüncül amin fonksiyonel grupları içerebilir. Üçüncül ve dördüncül aminler de reaktifler veya katalizörler olarak kasıtlı olarak eklenebilir. Bu tür aminlerin tümü, nitrozaminler oluşturmak için nitroz asit veya diğer nitroza edici ajanlarla reaksiyona girebilir.

Belirli reaksiyon koşulları altında bozunmaya duyarlı olan amid çözücüler, ikincil aminlerin başka bir kaynağıdır. Örneğin, uzun bir reaksiyon periyodu için yüksek reaksiyon sıcaklıkları altında, N,N-dimetilformamid, NDMA oluşturmak üzere nitroz asit ile reaksiyona girebilen dimetilamine bozunabilir (Şekil 2-3). N-metilpirrolidon, N,N-dimetilasetamid ve N,N-diethylasetamid de nitrozamin safsızlıkları oluşturmak üzere nitroz asit ile reaksiyona girebilen ikincil aminler oluşturmak için benzer bozunma yollarına sahiptir. İkincil aminler, amid çözücülerde safsızlıklar olarak da mevcut olabilir. Örneğin, NDMA oluşturmak üzere nitroz asit ile reaksiyona girebilen dimetilamin, N,N-dimetilformamid içinde bir safsızlık olarak mevcut olabilir.



Şekil 2-3: N,N-Dimetilformamidden NDMA oluşumu

İlaç etken maddelerinin sentezinde reaktifler olarak kullanılan üçüncül ve dördüncül aminler, diğer amin safsızlıklarını içerebilir. Trietilamin gibi üçüncül aminlerin, düşük seviyelerde diğer ikincil aminleri (dipropilamin ve izopropiletilamin gibi) içerdiği gösterilmiştir. İkincil ve üçüncül aminler, dördüncül aminlerin dealkilasyonu ile oluşturulan safsızlıklar veya bozunduruş maddeleri olarak mevcut olabilir. Örneğin, yaygın bir faz transfer katalizörü olan tetrabutylamonyum bromür, tributil- ve dibutilamin safsızlıklarını içerebilir.

2.4.3. Tedarikçi Kaynaklı Hammaddelerde Kontaminasyon

Başlangıç malzemeleri ve hammaddeler dahil olmak üzere tedarikçi kaynaklı malzemeler kontamine olduğunda nitrozamin safsızlıkları ortaya çıkabilir. FDA, bu temel nedenden dolayı aşağıdaki kontaminasyonları gözlemlemiştir:

- Nitrozamin kontaminasyonu, tedarikçilerden sevkiyat sırasında taze çözücülerin (orto-ksilen, toluen ve metilen klorür) depolama kapları arasındaki transferi sırasında kontamine olduğunda meydana gelmiştir.

- Sodyum nitrit, bazı başlangıç malzemelerinde (sodyum azid gibi) bilinen bir safsızlıktır ve mevcut olduğunda nitrozaminler oluşturmak üzere asidik koşullar altında aminlerle reaksiyona girebilir. Potasyum nitrat gibi nitrat içeren ham maddeler nitrit safsızlıkları içerebilir.

- İkincil veya üçüncül aminler, bazı ham maddelerde ve toluen gibi taze çözücülerde safsızlıklar olarak rapor edilmiştir.

- Başlangıç malzemeleri veya dışarıdan temin edilen ara ürünler, diğer işlemlerde nitrozamin safsızlıklarının üretildiği yerlerde üretiliyorsa çapraz kontaminasyon nedeniyle risk altında olabilir.

Hammadde tedarik zincirinin bilinmesi, kontaminasyonun önlenmesinde önemli bir faktördür. Örneğin, etken madde üreticileri, tedarikçilerden temin ettikleri ham veya başlangıç maddelerindeki nitrozamin kontaminasyonunun farkında olmayabilirler; üretim süreci normalde nitrozamin oluşumuna elverişli olmayan bir üretici, tedarikçi kaynaklı malzemeye üretim veya nakliye sırasında safsızlıklar girmiş olabileceğini fark etmeyebilir.

2.4.4. Kirlenme Kaynakları Olarak Geri Kazanılan Çözücüler, Katalizörler ve Reaktifler

Çözücüler, reaktifler ve katalizörler gibi geri kazanılmış malzemeler, kalıntı aminlerin (trimetilamin veya diizopropiletilamin gibi) varlığı nedeniyle nitrozamin safsızlıkları riski oluşturabilir. Geri kazanım işlemi bir söndürme aşamasını içeriyorsa (yani, kalıntı aziti ayrıştırmak için kullanılan nitröz asit), çözücü geri kazanımı sırasında nitrozaminler oluşabilir. Bu nitrozaminler, geri kazanımın ve akabinde saflaştırmanın nasıl gerçekleştiğine (örneğin sulu yıkamalar veya damıtma) bağlı olarak, geri kazanılan malzemelerin içine katılabilirler. Bu, malzeme geri kazanımında kontaminasyon riskini

daha da artırır. Bu nedenlerle, belirli "düşük" riskli süreçlerle üretilen ilaç etken maddelerini kullanan bazı ilaç ürünlerinin kontamine olduğu tespit edilmiştir. FDA, bu temel nedenden dolayı aşağıdaki kontaminasyonları gözlemlemiştir:

- Bir üretim tesisi, ortak çözücüler kullanan birden fazla sentetik işlemle aynı etken maddeyi üretebilir. Bu sentetik işlemlerden herhangi biri nitrozamin ürettiyorsa veya öncü aminler içeriyorsa, geri kazanım için gönderilen çözücüler risk altındadır. Kontrol ve izleme olmaksızın farklı proseslerden veya üretim hatlarından gelen geri kazanılmış çözücülerin kullanımı nitrozamin safsızlıklarına neden olabilir. Geri kazanılan bir çözücü bu şekilde kirlenirse ve daha sonra bir etken madde üretmek için kullanılırsa, etken madde, sentetik yol normalde nitrozamin oluşumuna duyarlı olmasa bile kontamine olacaktır.

- Hammaddelerin (örneğin çözücüler, reaktifler ve katalizörler) geri kazanımı genellikle üçüncü taraf yüklenicilere fason yaptırılır. Üçüncü taraf geri kazanım tesisi, işledikleri malzemelerin içeriği hakkında yeterli bilgi almazsa ve yalnızca rutin geri kazanım süreçlerini kullanırsa, bu durum bir risk oluşturabilir.

- Müşteriler arasında veya farklı malzemeler arasında ekipmanın yeterli temizliğinin yapılmaması veya ilgili her bir kirliliği ortadan kaldıracı bir şekilde doğrulanmaması durumunda ham maddeler kontamine olabilir. Yetersiz temizlik ve farklı müşteriler arasında ortak depolama ekipmanlarının kullanılması nedeniyle ortoksilen ve toluenin geri kazanım sırasında kontamine olduğu bildirilmiştir. Farklı müşterilerden alınan malzemeler geri kazanım için birleştirilmeden önce nitrozamin kontaminasyonunu önleyecek önlemler alınmazsa, yetersiz ve doğrulanmamış temizleme prosedürleri çapraz kontaminasyona da yol açabilir. Örneğin, katalizör tri-N-bütilkalay klorür (tri-N-bütilkalay azid kaynağı olarak kullanılır), farklı müşterilerden gelen bu katalizörün birleştirilmesi nedeniyle bir üçüncü taraf yüklenici tesisinde kontamine olmuştur.

2.4.5. Nitrozamin Kirlenme Kaynağı Olarak Söndürme Süreci

Doğrudan ana reaksiyon karışımında bir söndürme adımı gerçekleştirildiğinde (yani, kalıntı aziti ayrıştırmak için reaksiyon karışımına nitroz asit eklendiğinde) nitrozamin oluşumu riski vardır. Bu, nitroz asidin üretim sürecinde kullanılan ham maddelerdeki artık aminlerle doğrudan temas etmesine izin verir. Nitrozamin safsızlıkları, yerinde yeterli uzaklaştırma veya saflaştırma işlemleri yoksa veya işlemler

ilgili belirli safsızlıkları ortadan kaldırmak için optimize edilmemişse sonraki adımlara taşınabilir. Bu, tüm aşağı akış sürecini kirletebilir. Söndürme işlemi, ana reaksiyon karışımının dışında yürütülse bile, ana sürece kontamine geri kazanılmış malzemelerin dahil edilmesi riski vardır.

2.4.6. Süreç Optimizasyonu ve Kontrolü Eksikliği

Nitrozamin safsızlıklarının oluşumunun bir başka potansiyel kaynağı, sıcaklık, pH veya reaktiflerin, ara maddelerin veya çözücülerin eklenmesi sırası gibi reaksiyon koşulları uygun olmadığında veya yetersiz kontrol edildiğinde etken maddeler için üretim prosesinin optimizasyonunun olmamasıdır. FDA, aynı etken madde için aynı tesisteki partiler arasında ve hatta farklı işleme ekipmanları arasında reaksiyon koşullarının büyük ölçüde değiştiği örnekleri görmüştür.

2.4.7. İlaç Ürünlerinde Etken Madde Kontaminasyonu Dışındaki Kaynaklardan Gelen Nitrozamin Safsızlıkları

Nitritler, birçok yardımcı maddede ppm seviyelerinde rapor edilmiş yaygın nitrozlayıcı safsızlıklardır. Nitrit safsızlıkları, yaygın olarak kullanılan bir dizi yardımcı maddede bulunur ve bu, ilaç ürünü imalat süreci ve raf ömrü saklama süresi sırasında ilaç ürünlerinde nitrozamin safsızlıklarının oluşmasına neden olabilir. İlaç ürünü üreticileri, içme suyunda nitrit ve nitrozamin safsızlıklarının bulunabileceğinin de farkında olmalıdır. Bazı ilaç ürünleri, nitrozamin safsızlıkları oluşturan bozunma yollarına maruz kalabilir; bu potansiyel olarak ilaç ürününün depolanması sırasında ortaya çıkabilir.

2.5. Nitrozamin Bileşiklerinin Belirlenen Günlük Alım Limitleri

Nitrozaminlerin limitlerinin hesaplanması için medyan toksik doz TD50 (%50 vakada toksisite gösterir) kullanılır. TD50, ICH M7 (R1) tarafından mutajenik ve kanserojen safsızlıklar için kabul edilebilir alımı (AI) hesaplamak için kabul edilebilir aşırı riskin hesaplanmasında iyi kabul görmüştür ve iyi tanınan bir uluslararası standarttır.

NDMA için bildirilen TD50 değeri, en hassas tür olan sıçan için 0,096 mg/kg/gün'dür. Kanser için aşırı risk düzeyine yönelik ekstrapolasyon, TD50'yi 50.000'e (%50 veya 0.5×100.000) bölerek teorik olarak 1:100.000 riske neden olan doza doğrusal geri ekstrapolasyon ile hesaplanır. NDMA için bu, 1,92 ng/kg/gün dozu

anlamına gelir. Vücut ağırlığı 50 kg olan bir kişi için bu, 96 ng/gün (50 x 1,92 ng) AI (Kabul edilebilir alım) düzeyi ile sonuçlanacaktır. Benzer şekilde NDEA için de 26,5 ng/gün olarak hesaplanır. 8 adet nitrozamin için kabul edilebilir günlük alım dozları Tablo 2-3’de gösterilmiştir (15,16,23).

Tablo 2-3: Nitrozaminlerin kabul edilebilir günlük alım dozları.

Nitrozamin	CAS Numarası	Kabul edilebilir Günlük Alım Dozu (ng/gün)
N-nitrozodimetilamin (NDMA)	62-75-9	96,0
N-nitrozodietilamin (NDEA)	55-18-5	26,5
N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA)	16339-04-1	26,5
N-nitrozodiiizopropilamin (NDIPA)	601-77-4	26,5
N-nitrozometilamino bütirik asit (NMBA)	61445-55-4	96,0
N-metil-N-nitrozopiperazin (MeNP)	16339-07-4	26,5
N-nitrozodibutilamin (NDBA)	924-16-3	26,5
N-nitrozometilfenilamin (NMPA)	614-00-6	34,3

Günde nanogram cinsinden kabul edilebilir alım (AI)'ler ve ilaç etiketindeki günlük miligram cinsinden ilaç maddesinin maksimum günlük dozu (MDD), Denklem 2-1 kullanılarak bireysel ilaç ürünleri için ppm cinsinden maksimum nitrozamin konsantrasyon sınırlarını hesaplamak için kullanılabilir.

Nitrozaminlere maruz kalma ilacın MDD'si ile ilgili olduğundan, değerlendirilen her ilaç ürünü için farklı nitrozamin konsantrasyonları kabul edilebilir. İlaç ürünlerindeki kabul edilebilir konsantrasyon Denklem 2-1 kullanılarak hesaplanabilir.

$$\text{Kabul edilebilir maksimum alım limiti (ppm)} = \frac{\text{Kabul edilebilir günlük alım (AI, ng/gün)}}{\text{İlaç ürününün maksimum günlük dozu (MDD, mg/gün)}} \quad (2-1)$$

Örneğin, maksimum günlük dozu 300 mg olan bir ilaç ürünü için NDMA hesaplaması şu şekilde olacaktır:

$$96 \text{ ng (FDA ve EMA tarafından tanımlandığı gibi) / 300 mg (maksimum günlük doz) = 0,32 ppm}$$

Referans olarak, günde 96 nanograma veya bu örnekteki ilaca özgü 0,32 ppm'e kadar NDMA tüketilmesi, ömür boyu maruz kalmaya dayalı olarak insan alımı için makul ölçüde güvenli kabul edilir.

Bir ilaç ürününde 2 ya da daha fazla nitrozamin tespit edilirse toplam nitrozamin limitinin hesaplanması gerekir. Bu limit en güçlü nitrozamin kullanılarak elde edilen limitden daha fazla olamaz. MDD'si 300 mg olan bir ilaç ürününde NDMA ve NDEA tespit edildiğini varsayarsak toplam safsızlık limiti şu şekilde hesaplanacaktır:

Toplam Safsızlıklar Limiti (ppm cinsinden) = en güçlü nitrozaminin AI'si (yani 26,5) / MDD (300 mg)

Toplam Safsızlıklar Limiti (ppm) = $26,5/300 = 0,088$ ppm

Bitmiş ilaç ürünü ve hammaddelerde nitrozaminler Denklem 2-2 ile hesaplanır.

C: Numune analizi sonucu cihazdan elde edilen konsantrasyon

V: Numune hazırlanırken kullanılan çözücü hacmi

W: Tartım alınan numunedeki etkin madde ağırlığı

$$\text{ppm} = \frac{C \times V}{W} \quad (2-2)$$

2.6. Nitrozaminler İçin Literatürdeki Analiz Yöntemleri

2.6.1. LC-MS/MS ile Yapılmış Çalışmalar

Chang SH. ve arkadaşları sarten ilaçlarında (valsartan, losartan, irbesartan, olmesartan ve kandesartan) N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodipropilamin (NDPA), N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA), N-nitrozodiizopropilamin (NDiPA), N-nitrozodietanolamin (NDELA), N-nitrozomorfolin (NMOR), N-nitrozopirrolidin (NPYR), N-nitrozopiperidin (NPIP), N-nitrozodiizopropanolamin (NDiPLA), N-nitrozo-N-metil-4-aminobütirik asit (NMBA), N-nitrozometiletilamin (NMEA) gibi 12 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su içinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve asetronitril:metanol (2:8) içinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanarak gradiyent akış ile bir Xselect HSS T3 kolonunda (15 cm x 3 mm, 3,5 µm) elde etmişlerdir. 12 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırlarını (LOQ) sırasıyla 20 ng/g ve 50 ng/g olarak

bulmuşlardır. 12 nitrozamin için doğruluk değerlerini %80-120 arasında, kesinlik değerlerini %20 bulmuşlardır (28).

Khorolskiy M. ve arkadaşları sartan ilaçlarında (valsartan, losartan ve irbesartan) N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozometilamino bütirik asit (NMBA) ve N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA) gibi 4 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı 10 mM amonyum format sulu çözeltisinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanarak gradiyent akış ile 0,4 mL/dk akış hızında Poroshell 120 EC-C18 (50 x 3,0 mm, 2,7 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 4 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırlarını (LOQ) sırasıyla 0,2 ng/mL ve 0,4 ng/mL olarak bulmuşlardır. 4 nitrozamin için doğruluk değerlerini %90,3 ile %101,1 arasında, kesinlik değerlerini %1,86 ile %6,87 arasında bulmuşlardır (29).

James M. ve arkadaşları valsartan ilacında N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA), N-nitrozo-diizopropilamin (NDIPA), N-nitrozo-N-metil-4-aminobütirik asit (NMBA), N-nitrozodibutilamin (NDBA), N-nitrozometilfenilamin (NMPA), N-nitrozodipropilamin (NDPA) gibi 8 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir QTRAP 6500+ HPLC-MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı sulu çözeltide %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanarak gradiyent akış ile 0,5 mL/dk akış hızında Avantor ACE UltraCore C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 8 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırlarını (LOQ) sırasıyla 0,001-0,040 ng/mL ve 0,004-0,134 ng/mL olarak bulmuşlardır. 8 nitrozamin için doğruluk değerlerini %94,18 ile %105,92 arasında, kesinlik değerlerini %0,38 ile %7,57 arasında bulmuşlardır (30).

Luo F. ve arkadaşları antikor ilaçlarında (monoklonal antikor) NDMA, NDEA, NDIPA, NMPA, NDBA, NMOR, NDPA, NPIP, NPYR, NDIBA, MeNP, NMBA ve NEIPA gibi 13 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (APCI) yöntemiyle birleştirilmiş bir salting-out sıvı-sıvı ekstraksiyonu (SALLE) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su çözeltisinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanarak gradiyent akış ile 0,4 mL/dk akış hızında ZORAX Eclipse Plus C18

(3,0 x 100 mm, 1,8 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 13 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 0,005-0,050 µg/L ve 0,5 µg/L'dir. 13 nitrozamin için doğruluk değerlerini %75,4-114,7 arasında, kesinlik değerleri %13,2'den küçük bulmuşlardır (31).

Baksam VK. ve arkadaşları bir antikoagülan ilacında (Rivaroxaban) N-(2-hidroksietil)-N-fenilnitroz amid nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir UHPLC–MS/MS (ESI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su çözeltisinde %0,1 formik asit ve metanolden oluşan isokratik akış ile 0,6 mL/dk akış hızında VDSpher100 C18 E (150 mm x 4,6 mm, 3 µm) kolonunda elde etmişlerdir. Nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırlarını (LOQ) sırasıyla 0,045 ng/mL ve 0,15 ng/mL'dir. Nitrozamin için doğruluk değerlerini %97,5 ile %100,2 arasında, kesinlik değerlerini %5'den daha az bulmuşlardır (32).

Yin M. ve arkadaşları metronidazol benzoat farmasötiklerinde NDMA, NMBA, NDBA, NDIPA, NEIPA ve NDEA gibi 6 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su çözeltisinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile 0,5 mL/dk akış hızında bir CQUITY HPLC HSS T3 (100 x 3,0 mm, 1,8 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 6 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 0,22-0,80 ng/ml ve 0,33-1,20 ng/ml'dir. 6 nitrozamin için doğruluk değerlerini %84 ile %97 arasında, kesinlik değerlerini %1,7 ile %4,2 arasında bulmuşlardır (33).

Tay KSJ. ve arkadaşları tıbbi ürünlerde (valsartan, losartan ve ranitidine) N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodiizopropilamin (NDIPA), N-etil-N-nitrozoisopropilamin (NEIPA) ve N-nitrozo-di-n-butilamin (NDBA) gibi 5 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir UPLC-MS/MS (APCI) yöntemi ile birleştirilmiş yeni bir dispersif inklüzyon kompleks mikro ekstraksiyon (DICM) yaklaşımı geliştirmişlerdir. DICM prosedürleri, nitrozaminleri ekstrakte etmek için bir inklüzyon kompleksi ajanı olarak siklodekstrin kullanan bir dispersif sıvı faz mikro ekstraksiyon adımlarından oluşur. Kromatografik ayırmayı suda 2 mM amonyum format ile %0.1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde 2 mM amonyum format ile %0.1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) kolonunda

elde etmişlerdir. 5 nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 0,011–0,200 ng/mL ve 0,036–0,500 ng/mL'dir. 5 nitrozamin için doğruluk değerlerini %96 ile %105 arasında, kesinlik değerlerini %0,5 ile %5,8 arasında bulmuşlardır (34).

Xie B ve arkadaşları sartan ilaçlarında (kandesartan, olmesartan, irbesartan ve valsartan) n-nitrozo-n-metil-4-aminobütirik asit (NMBA) nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su çözeltisinde %0,2 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanol:asetonitril (20:80) karışımından oluşan mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile Kromasil C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm) kolonunda elde etmişlerdir. nitrozamin için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 0,9 ng/mL ve 3 ng/mL'dir. Nitrozamin için doğruluk değerlerini %89,9 ile %115,7 arasında, kesinlik değerlerini %5,0'in altında bulmuşlardır (35).

Gopireddy RR. ve arkadaşları sartan ilaçlarında (azilsartan, valsartan, telmisartan, olmesartan, losartan ve irbesartan) N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozoetilizopropilamin (NIPEA), N-nitrozo-nmetil-4-aminobütirik asit (NMBA) N-nitrozo-diizopropilamino (NDIPA) ve N-nitrozodibütüilamin (NDBA) gibi 6 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC–MS/MS (APCI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su çözeltisinde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolde %0,1 formik asit ile hazırlanmış mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile 0,5 mL/dk akış hızında Poroshell HPH-C18 (150 x 4,6 mm, 2,7 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 0,003 ppm'den daha düşük bir ölçüm limiti ile altı nitrozamin safsızlığının tümü için regresyon katsayısı > 0,999 olan 0,009-0,045 ppm'lik iyi bir doğrusallık aralığıyla iyi S/N oranları verdiğini bulmuşlardır. Yöntem geri kazanımlarını üç aşamalı numune hazırlama kullanılarak %80-120 arasında bulmuşlardır (36).

Wang Z. ve arkadaşları sitagliptin fosfat monohidrat aktif farmasötik bileşeninde 7-nitrozo-3-(triflorometil)-5,6,7,8-tetrahidro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin (NTPP) nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir HPLC-MS/MS (ESI) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmaı 10 mM amonyum format sulu çözeltisinden oluşan mobil faz A ve asetonitrilden oluşan mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile 0,4 mL/dk akış hızında ZORBAX SB-C18 (150 x 4,6 mm, 1,8 µm)

kolonunda elde etmişlerdir. NTTP için tespit sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) sırasıyla 0,037 ppm ve 0,098 ppm'dir. NTTP için doğruluk değerlerini %80,83 ile %107,81 arasında, kesinlik değerlerini %0,28 ile %3,89 arasında bulmuşlardır (37).

Mavis ME. ve arkadaşları sartan ilaçlarında (valsartan ve irbesartan) N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodiizopropilamin (DIPNA), N-nitrozoetilizopropilamin (EIPNA), N-nitrozometilfenilamin (NMPhA), N-nitrozodibutilamin (NDBA), N-nitrozo-N-metil-4 aminobütirik asit (NMBA), N-nitrozoetilmetilamin (NMEA), N-izopropilmetilnitrozamin (NMIPA), N-nitrozopiperidin (NPIP), N-nitrozopirrolidin (NPyR) gibi 11 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kaynaklı eşleştirilmiş sıvı kromatografi tandem kütle spektrometresi (LC-APCI-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı su içinde %0,2 formik asit ile hazırlanmış mobil faz A ve metanolden oluşan mobil faz B'nin karışımı kullanılarak gradiyent akış ile 0,6 mL/dk akış hızında bir poroshell HPH C18 (4,6 x 150 mm, 2,7 µm) kolonunda elde etmişlerdir. 11 nitrozamin için tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 0,001-0,008 ppm ve 0,008-0,05 ppm arasında idi. 11 nitrozamin için doğruluk değerlerini API'ler için %73,1-115,2 arasında, bitmiş ürünler için %80,2-128,5 arasında, kesinlik değerlerini API'ler için %11,3'den küçük, bitmiş ürünler için %10,6'dan küçük bulmuşlardır (38).

Literatürde LC-MS/MS cihazı ile farmasötik preparatlarda yapılmış çalışmalar Tablo 2-4'de özetlenmiştir.

Tablo 2-4: LC-MS/MS cihazı ile farmasötik preparatlarda yapılmış çalışmalar

Kaynak No	Cihaz	Farmasötik Preparat	Nitrozamin	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
28	HPLC-MS/MS (APCI)	Valsartan Losartan İrbesartan Olmesartan Candesartan	NDEA, NDMA, NDPA, NEIPA, NDiPA, NDELA, NMOR, NPYR, NPIP, NDiPLA, NMBA, NMEA	20	50
29	HPLC-MS/MS (APCI)	Valsartan Losartan İrbesartan	NDMA, NDEA, NMBA NEIPA	0,2	0,4
30	QTRAP HPLC-MS/MS (APCI)	Valsartan	NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, NDBA, NMPA, NDPA	0,001-0,040	0,66-1,33

31	(SALLE) HPLC-MS/MS (APCI)	Antikor ilaç (monoklonal antikor)	NDMA, NDEA, NDIPA, NMPA, NDBA, NMOR, NDPA, NPIP, NPYR, NDIBA, MeNP, NMBA, NEIPA	0,005-0,050	0,5
32	UHPLC- MS/MS (ESI)	Antikoagülan ilaç (Rivaroxaban)	N-(2-hidroksietil)-N- fenilnitroz amid	0,045	0,15
33	HPLC-MS/MS (APCI)	Metronidazol benzoat	NDMA, NMBA, NDBA, NDIPA, NEIPA, NDEA	0,22-0,80	0,33-1,20
34	(DICM) UPLC-MS/MS (APCI)	Valsartan, Losartan Ranitidine	NDMA, NDEA, NDIPA, NEIPA, NDBA	0,011-0,200	0,036- 0,500
35	HPLC-MS/MS (APCI)	Kandesartan Olmesartan İrbesartan Valsartan	NMBA	0,9	3
36	HPLC-MS/MS (APCI)	Azilsartan Valsartan Telmisartan Olmesartan Losartan İrbesartan	NDMA, NDEA, NIPEA, NMBA, NDIPA, NDBA	3	9
37	HPLC-MS/MS (ESI)	Sitagliptin fosfat monohidrat aktif farmasötik bileşeninde	NTTP	37	98
38	HPLC-MS/MS (APCI)	Valsartan İrbesartan	NDMA, NDEA, DIPNA, EIPNA, NMPhA, NDBA, NMBA, NMEA, NMIPA, NPIP, NPyR	1-8	8-50

2.6.2. GC MS ile Yapılan Analizler

Lim HH. ve arkadaşları sartan (valsartan, irbesartan, fimasartan, rosartan potasyum, olmesartan ve kandesartan), metformin ve ranitidin ilaçlarında N-nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-nitrozodietilamin'in (NDEA) gibi 2 nitrozamin safsızlığını tayin etmek için bir gaz kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (GC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir DB-624 kapiler kolon (60 m x 0,25 mm iç çap ve 1,4 µm film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum

gazının 1,2 mL/dakikalık sabit akışında splitless modunda enjekte edilerek, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 38°C'de 3 dakika tutulup daha sonra dakika da 15°C artışla 230°C'ye getirilip bu sıcaklıkta 10 dakika tutularak elde etmişlerdir. Nitrozaminler için LOD ve LOQ sırasıyla 0,3-0,07 µg/kg ve 0,9-0,3 µg/kg idi. Nitrozaminler için doğruluk değerlerini %93,6–105 arasında, kesinlik değerlerini %0,4–4,2 arasında bulmuşlardır (39).

Liu J. ve arkadaşları sartan ilaçlarında (candesartan cilexetil, olmesartan medoxomi, irbesartan ve valsartan) N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodibutilamin (NDBA) ve N-nitrozodiizopropilamin (NDIPA) gibi 4 nitrozaminin safsızlığını eşzamanlı olarak belirlenmesi için çoklu reaksiyon izleme modu ile bir GC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir Agilent VF-Wax ultra inert kapiler kolon (30 m x 0,25 mm iç çap ve 1 µm film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum gazının 1 mL/dakikalık sabit akışında splitless modunda 1 µL enjekte edilerek, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 40°C'de 0,5 dakika tutulup daha sonra dakika da 20°C artışla 200°C'ye getirilip ve sonunda dakika da 40°C artışla 240°C'ye getirilip bu sıcaklıkta 3 dakika tutularak elde etmişlerdir. 4 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 0,002-0,150 ppm ve 0,008-0,500 ppm idi. 4 nitrozamin için doğruluk değerlerini %87,68–123,76 arasında, kesinlik değerlerini %9,15'den az olarak bulmuşlardır (40).

Chang S. ve arkadaşları sartan ilaçlarında (azilsartan medoxomil, kandesartan cilexetil, irbesartan, losartan, olmesartan medoxomil, telmisartan ve valsartan) N-nitrozodibütilamin (NDBA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodipropilamin (NDPA), N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA), N-nitrozodiizopropilamin (NDiPA), N-nitrozomorfolin (NMOR), N-nitrozodifenilamin (NDPhA), N-nitrozopiperidin (NPIP), N-nitrozodiizobütilamin (NDiBA), N-nitrozodisikloheksilamin (NDCHA), N-nitrozodiisononilamin (NDiNA) ve N-nitrozometiletilamin (NMEA) gibi 13 nitrozamin safsızlığını eş zamanlı tayin etmek için bir GC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir DB-Wax ultra inert kapiler kolonu (30 m x 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum gazının 1 mL/dakikalık sabit akışında splitless modunda 2 µL enjekte edilerek, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 80°C'de 3 dakika tutulup daha sonra dakika da 20°C artışla 250°C'ye getirilip bu sıcaklıkta 3 dakika tutularak

elde etmişlerdir. 13 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 15-250 ng/g ve 50-250 ng/g idi. 13 nitrozamin için doğruluk değerlerini %91,4–104,8 arasında, kesinlik değerlerini %0,5–12,2 arasında bulmuşlardır (41).

Gimenez-Campillo C. ve arkadaşları ranitidin ilaçlarında (150 mg ve 300 mg) N-nitrozodi-n-bütilamin (NDBA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodifenilamin (NDPhA), N-nitrozodi-n-propilamin (NDPA), N-nitrozometiletilamin (NMEA), N-nitrozomorfolin (NMOR), N-nitrozopiperidin (NPIP) ve N-nitrozopirrolidin (NPYR) gibi 9 nitrozamin safsızlığını eş zamanlı tayin etmek için bir Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (DLLME GC-MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir HP-5MS ultra inert kapiler kolonu (30 m x 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum gazının 1 mL/dakikalık sabit akışında splitless modunda 2 µL enjekte edilerek, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 50°C’de 3 dakika tutulup daha sonra dakika da 20°C artışla 80°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 2 dakika tutulup daha sonra dakika da 5°C artışla 100°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 2 dakika tutulup ve son olarak dakika da 35°C artışla 280°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 2,36 dakika tutulup elde etmişlerdir. 9 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 0,07-6,6 ng/g ve 0,21-21 ng/g idi. 9 nitrozamin için doğruluk değerlerini en düşük seviye için %80,2-102 (n=36) ve en yüksek seviye için %94,7–105 (n=36) arasında, kesinlik değerlerini %3,7–12 arasında bulmuşlardır (42).

Lee DH. ve arkadaşları 3 çeşit ilaç da (ranitidine, nizatidine ve metformin) N-nitrozodimetilamin (NDMA) safsızlığını tayin etmek için bir çözücü içermeyen bir headspace gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (SF-HS-GC/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. NDMA için LOQ 5 ng/g idi. NDMA için doğruluk değerlerini %92,77–106,54 arasında, kesinlik değerlerini %5,94’ün altında bulmuşlardır (43).

Wichitnithad W. ve arkadaşları losartan potasyum aktif farmasötik bileşeninde N-nitrozodimetilamin (NDMA), N-nitrozodietilamin (NDEA), N-nitrozodiizopropilamin (DIPNA) ve N-nitrozoetilizopropilamin (EIPNA) gibi 4 nitrozamin safsızlığını eş zamanlı tayin etmek için bir Headspace gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (HS-GC/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir SH-Rtx-Wax kolonu (30 m x 0,32 mm iç çap ve 1 µm film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum gazının 2 mL/dakikalık sabit akışında split modunda (3:1) 1 µL

enjekte edilerek, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 40°C’de 2 dakika tutulup daha sonra dakika da 20°C artışla 240°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 3,5 dakika tutularak elde etmişlerdir. 4 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 5-25 ppb ve 25-50 ppb idi. 4 nitrozamin için doğruluk sapma değerlerini %-7,04 ile 7,25 arasında, kesinlik değerlerini %0,4 ile 11,5 arasında bulmuşlardır (44).

Witkowska AB. ve arkadaşları aktif farmasötik bileşenlerde (silostazol, sunitinib malat ve olmesartan medoksomil) NDMA, NMEA, NDEA, NDBA, NMOR, NPYR, NPIP, NDPA ve N-methyl-npz gibi 9 nitrozamin safsızlığını eş zamanlı tayin etmek için elektron iyonizasyonu ve mikro ekstraksiyon ile bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı bir Agilent VF-WAXms polietilen glikol kolonu (30 m x 0,32 mm iç çap, 1,0 um film kalınlığı) üzerinde taşıyıcı gaz olarak helyum gazının 2,1 mL/dakikalık sabit akışında splitless modunda, GC fırın sıcaklık programının başlangıçta 75°C’de 2 dakika tutulup daha sonra dakika da 9°C artışla 200°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 2 dakika tutulup son olarak dakika da 15°C artışla 240°C’ye getirilip bu sıcaklıkta 3 dakika tutulup elde etmişlerdir. 9 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 0,15–1,00 ng/mL ve 21,6 ng/mL idi. 9 nitrozamin için doğruluk değerlerini %94,09-111,22 arasında, kesinlik değerlerini $\leq$ %7,65 olarak bulmuşlardır (45).

2.6.3. HPLC-UV ve HPLC-FLD ile Yapılan Analizler

Boczar D. ve arkadaşları enalapril maleat aktif farmasötik bileşeninde N-nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-nitrozodietilamin (NDEA) gibi 2 nitrozamin safsızlığını türevlendirme yoluyla (dansil klorür veya florenilmetoksikarbonil klorür) yarı kantitatif tayini için bir florimetrik dedektöre sahip HPLC-FLD yöntemi geliştirmişlerdir. Nitrozaminler için LOQ NDMA için 0,038 µg/g ve NDEA için 0,050 µg/g’dir. Nitrozaminler için doğruluk değerlerini NDMA için %74,2 $\pm$ %4,2 ile %101,6 $\pm$ %16,1 ve NDEA için %90,6 $\pm$ %2,9 ile %125,4 $\pm$ %7,4 aralığında, kesinlik değerlerini %10’un altında bulmuşlardır (46).

Tsanaktsidou E. ve arkadaşları lisinopril aktif farmasötik bileşeninde N-nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-nitrozodietilamin (NDEA) gibi 2 nitrozamin safsızlığını kolon öncesi denitrozasyon ve türev prosedürü kullanılarak (dansil klorür) tayini için florimetrik dedektöre sahip bir HPLC-FLD yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı 20 mM pH 2,8 fosfat tamponu ve asetonitrilin (55/45 v/v) karışımı kullanılarak 1 mL/dk akış hızında LC-C18 DB (250 x 4,6 mm 5,0 µm)

kolonunda HPLC-FLD ($\lambda_{em}/\lambda_{em} = 340/530$) kullanarak elde etmişlerdir. 2 nitrozamin için LOD ve LOQ sırasıyla 4,7-40 ng/mL ve 14,4-130 ng/mL'dir. 2 nitrozamin için doğruluk değerlerini %90,3 ile %108,4 arasında, kesinlik değerlerini %1,4 ile %13,4 arasında bulmuşlardır (47).

Abd El-Hay SS. ve arkadaşları losartan ve valsartan ilaçlarında N-nitrozodietilamin'in (NDEA) uygun maliyetli, yeşil HPLC tayini için bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmayı 20 mM pH 7,2 amonyum asetat tamponu ve etanolün gradiyent elüsyonu ile 0,8 mL/dk akış hızında bir RP-C18 kolonunda 230 nm UV dalga boyunda elde etmişlerdir. NDEA için LOD ve LOQ sırasıyla 0,2 ve 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. NDEA için doğruluk değerlerini %98,8 ile %102,2 arasında, kesinlik değerlerini %100,4 ile %101,9 arasında bulmuşlardır (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2021 ve 2023 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya anabilim dalı araştırma laboratuvarında ve İstanbul Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi biyoanalitik laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

3.1.1. Referans Standartlar

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında aşağıda listelenen referans standartlar kullanılmıştır. Kullanılan referans standartlara ait detaylı bilgiler Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Referans standartlar

Referans Standartlar	Üretici	Kullanım Amacı	Saklama Koşulları
N-nitrozodimetilamin (NDMA)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozodietilamin (NDEA)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozoetilizopropilamin (NEIPA)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozodiizopropilamin (NDIPA)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozometilamino bütirik asit (NMBA)	TRC	Analit	-20 °C
N-metil-N-nitrozopiperazin (MeNP)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozodibutilamin (NDBA)	TRC	Analit	-20 °C
N-nitrozometilfenilamin (NMPA)	TRC	Analit	-20 °C

3.1.2. Ekipmanlar

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan ekipmanlar Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Ekipmanlar

Ekipman	Üretici - Model
Kütle Dedektörü	Agilent Triple Quad 6460 QQQ
HPLC	Agilent 1260 Infinity
Bilgisayar Yazılımı	Mass Hunter B.06.00
Analitik Kolon	Inertsil ODS-3 5µm 4,6x250mm

3.1.3. Destek Ekipmanlar

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan destek ekipmanları Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Destek ekipmanları

Destek Ekipmanı	Üretici - Model
Hassas Terazı	Ohaus Explorer EX224
Saf Su Sistemi	Merck Milli-Q Integral 3
Ultrasonik Banyo	Jeitech Lab Companion
Santrifüj Cihazı	Sigma 3-16KL
Vorteks Cihazı	IKA MS3 basic
Otomatik Pipetler	Eppendorf 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 0,5-5 mL
Pipet Uçları	Diamond-D5000, D1000, D200
Polipropilen Tüp ve Kapakları	IsoLab, 10 mL
Balon Joje	IsoLab 3.3 Borosilikat
Şırınga	Hayat
Şırınga Ucu Filtre	Nagel MC 0,22 µm
Otoörnekleyici Vialleri, Insertleri ve Kapakları	Agilent

3.1.4. Kimyasallar

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılan kimyasallar Tablo 3-4’de gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Kimyasallar

Kimyasallar	Marka	Lot No
Asetonitril LC-MS	ISOLAB	SS0203312ALQ
Metanol LC-MS	ISOLAB	AR0900501AKQ
Asetik Asit %99,8-100,5	Sigma Aldrich	STBJ6236
Formik Asit %98-100	Sigma Aldrich	STBJ5931

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

%0,1’lik Asetik Asit Çözeltisi: 500 mL’lik balon jojede bir miktar saf su üzerine 500 µL asetik asit ilave edilir. Vortekslenerek saf su ile 500 mL’ye tamamlanır. Mobil faz şişesine aktarılır, 10 dakika ultrasonik banyoda degaze edilir ve sisteme bağlanır.

%0,1’lik Formik Asit Çözeltisi: 500 mL’lik balon jojede bir miktar saf su üzerine 500 µL formik asit ilave edilir. Vortekslenerek saf su ile 500 mL’ye tamamlanır. Mobil faz şişesine aktarılır, 10 dakika ultrasonik banyoda degaze edilir ve sisteme bağlanır.

Asetonitril ve Metanol: 1000 mL asetonitril ve metanol mobil faz şişelerine alınır, 10 dakika ultrasonik banyoda degaze edilir ve sisteme bağlanır.

3.2.2. Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.2.1. Nitrozamin Ana Stok 1 Çözeltilerinin Hazırlanması

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılmak üzere ana stok 1 çözeltileri, nitrozamin standart çözeltilerinin, asetonitril ile aşağıdaki Tablo 3-5’de belirtilen oranlarda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Tablo 3-5: Nitrozamin ana stok 1 çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	Standart Konsantrasyonu	Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
NDMA-AS1	5000 µg/mL	50 µL	50 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NDEA-AS1	5000 µg/mL	50 µL	50 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NEIPA-AS1	10000 µg/mL	50 µL	100 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NDIPA-AS1	5000 µg/mL	50 µL	50 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NMBA-AS1	1000 µg/mL	50 µL	10 µg/mL	5 mL	+ 4°C
MeNP-AS1	10000 µg/mL	50 µL	100 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NDBA-AS1	2000 µg/mL	50 µL	20 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NMPA-AS1	25000 µg/mL	50 µL	250 µg/mL	5 mL	+ 4°C

3.2.2.2. Nitrozamin Seyreltik Stok 1 Çözeltilerinin Hazırlanması

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılmak üzere seyreltik stok 1 çözeltileri, nitrozamin ana stok 1 çözeltilerinin, asetonitril ile aşağıdaki Tablo 3-6'da belirtilen oranlarda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Tablo 3-6: Nitrozamin seyreltik stok 1 çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	Ana Stok 1 Konsantrasyonu	Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
NDMA–SS1	50 µg/mL	50 µL	0,5 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NDEA–SS1	50 µg/mL	50 µL	0,5 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NEIPA–SS1	100 µg/mL	500 µL	10 µg/mL	5 mL	+ 4°C
	10 µg/mL	250 µL	0,5 µg/mL		
NDIPA–SS1	50 µg/mL	50 µL	0,5 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NMBA–SS1	10 µg/mL	250 µL	0,5 µg/mL	5 mL	+ 4°C
MeNP–SS1	100 µg/mL	500 µL	10 µg/mL	5 mL	+ 4°C
	10 µg/mL	250 µL	0,5 µg/mL		
NDBA–SS1	20 µg/mL	125 µL	0,5 µg/mL	5 mL	+ 4°C
NMPA–SS1	250 µg/mL	200 µL	10 µg/mL	5 mL	+ 4°C
	10 µg/mL	250 µL	0,5 µg/mL		

3.2.2.3. Nitrozamin Seyreltik Stok 2 Çözeltilerinin Hazırlanması

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılmak üzere seyreltik stok 2 çözeltileri, nitrozamin seyreltik stok 1 çözeltilerinin, asetonitril ile aşağıdaki Tablo 3-7’de belirtilen oranlarda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Tablo 3-7: Nitrozamin seyreltik stok 2 çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	Seyreltik Stok 1 Konsantrasyonu	Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
NDMA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NDEA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NEIPA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NDIPA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NMBA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
MeNP–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NDBA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NMPA–SS2	0,5 µg/mL	500 µL	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C

3.2.2.4. Nitrozamin Seyreltik Stok 3 Çözeltilerinin Hazırlanması

Metot geliştirme ve validasyon çalışmaları sırasında kullanılmak üzere seyreltik stok 3 çözeltileri, nitrozamin seyreltik stok 2 çözeltilerinin, asetonitril ile aşağıdaki Tablo 3-8’de belirtilen oranlarda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Tablo 3-8: Nitrozamin seyreltik stok 3 çözeltilerinin hazırlanışı

Çözelti Adı	Seyreltik Stok 2 Konsantrasyonu	Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
NDIPA–SS3	50 ng/mL	500 µL	5 ng/mL	5 mL	+ 4°C
NMPA–SS3	50 ng/mL	500 µL	5 ng/mL	5 mL	+ 4°C

3.2.3. Kalibrasyon Standartlarının ve Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması

3.2.3.1. Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması

Kalibrasyon eğrisi, incelenecek konsantrasyon aralığını kapsayan 6 kalibrasyon noktasından oluşmaktadır. Kalibrasyon standartları, asetonitril içerisine nitrozamin çalışma çözeltilerinin aşağıdaki Tablo 3-9’da belirtilen hedef konsantrasyonları sağlayacak miktarda katılmasıyla hazırlanmıştır.

Tablo 3-9: Kalibrasyon standartlarının hazırlanılışı

Standart Adı	Çözelti Adı	Stok Konsantrasyonu	Stoktan Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
ST1	NEIPA	50 ng/mL	50 µl	0,5 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDIPA	5 ng/mL	200 µl	0,2 ng/mL		
	MeNP	50 ng/mL	80 µl	0,8 ng/mL		
	NMPA	5 ng/mL	100 µl	0,1 ng/mL		
	NDBA NDEA	50 ng/mL	40 µl	0,4 ng/mL		
	NDMA NMBA	50 ng/mL	200 µl	2 ng/mL		
ST2	NDIPA NMPA	50 ng/mL	50 µl	0,5 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDBA NDEA NEIPA MeNP	50 ng/mL	100 µl	1 ng/mL		
	NDMA NMBA	500 ng/mL	40 µl	4 ng/mL		
	NDIPA NMPA	50 ng/mL	100 µl	1 ng/mL		
ST3	NDBA NDEA NEIPA MeNP	50 ng/mL	200 µl	2 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDMA NMBA	500 ng/mL	50 µl	5 ng/mL		
	NDIPA NMPA	50 ng/mL	100 µl	1 ng/mL		
	NDBA NDEA NEIPA MeNP	50 ng/mL	200 µl	2 ng/mL		

Tablo 3-9 Devamı:

ST4	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA	500 ng/mL	50 µl	5 ng/mL		
	MeNP					
	NDBA				5 mL	+ 4°C
	NMPA					
	NMBA					
ST5	NDMA	500 ng/mL	80 µl	8 ng/mL		
	NDMA					
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA	500 ng/mL	100 µl	10 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NMBA					
	MeNP					
ST6	NDBA					
	NMPA					
	NDMA					
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA	500 ng/mL	500 µl	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NMBA					
	MeNP					
	NDBA					
	NMPA					
	NDMA					
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA					

3.2.3.2. Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması

Kalite Kontrol numuneleri metodun kesinliğini ve doğruluğunu tayin etmek için kullanılır. Kalite kontrol numuneleri, asetonitril içerisine nitrozamin çalışma çözeltilerinin aşağıdaki Tablo 3-10'da belirtilen hedef konsantrasyonları sağlayacak miktarda katılmasıyla hazırlanmıştır.

Tablo 3-10: Kalite kontrol numunelerinin hazırlanılışı

Standart Adı	Çözelti Adı	Stok Konsantrasyonu	Stoktan Alınan Hacim	Final Konsantrasyonu	Final Hacim	Saklama Koşulu
KK1	NDMA	50 ng/mL	300 µl	3 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA					
	NMBA					
	MeNP					
	NDBA					
	NMPA					
KK2	NDMA	500 ng/mL	150 µl	15 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA					
	NMBA					
	MeNP					
	NDBA					
	NMPA					
KK3	NDMA	500 ng/mL	500 µl	50 ng/mL	5 mL	+ 4°C
	NDEA					
	NEIPA					
	NDIPA					
	NMBA					
	MeNP					
	NDBA					
	NMPA					

3.3. Yöntem Geliştirme ile İlgili Çalışmalar

3.3.1. LC-MS/MS Sisteminin Analiz için Hazırlanması

- LC-MS/MS yüksek vakumda çalışmaktadır ve arıza ya da periyodik bakım-onarım zamanı haricinde kapatılmayan bir sistemdir. Herhangi bir analiz olmadığı durumlarda bekleme modunda bırakılır.

- Bekleme modundaki sistem bilgisayar arayüzündeki cihazın yazılımı üzerinden analist adı ve şifre girilerek açılır.
- Sistem bekleme modundan çıkarılır ve kon (cone) bölümü sıcaklıkları ve gaz akış hızları düşürülür.
- Sistemin spreyci bölümü açılarak kon bölümü, cihaza özel bir bez ve izopropil alkol ile kon üzerinde önceki analizlerden kalmış kalıntılar temizlenir.
- Kon bölümündeki temizleme işlemi bittikten sonra bölüm kapatılarak yazılım üzerinden sıcaklık ve gaz akış değerleri eski haline getirilir.
- Sistemin kaba vakum pompa ve turbo moleküler pompa vakum değerleri ile azot gazının basıncı kontrol edilir.
- Hazırlanan hareketli faz çözeltileri uygun hatlara bağlanarak purge işlemi yapılır.
- Analiz edilecek olan bileşiklere özgü ana iyon m/z değerleri (precursor ion), parçalayıcı voltajlar (FV), parçalanma iyonu m/z değerleri (product ion) ve çarpışma enerji değerleri (CE) analitlerin standart çözeltiler ile belirlenir. Bu aşamada analitik kolon kullanılmaz, bunun yerine kromatografi sistemi ile kütle dedektörü arasında bir ara bağlantı kullanılır.

3.3.2. Hareketli Faz Sisteminin Seçimi

Analitlerin iyonlaşmasını sağlayarak en yüksek dedektör cevabının elde edilmesi için ve kütle dedektör sisteminde kalıntı oluşturmeyen hareketli fazın belirlenebilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada nitrozaminlerin 100 ng/mL lik standart karışım çözeltisi kullanılmıştır. Denemelerde LC-MS/MS sistemlerinde organik faz olarak yaygın kullanılan asetonitril ve metanol; sulu faz olarak yaygın kullanılan asetik asit ve formik asit çözeltileri kullanılmıştır. Tablo 3-11’de gösterilen hareketli faz çözeltileri hazırlanarak nitrozamin çözeltisi analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalarda akış hızı 0,6 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 10 μ L, kütle aralığı 40 ile 200 arası seçilerek tarama yapılmıştır. Tablo 3-11’de verilen hareketli faz A ve B’nin 70:30 oranında karışımı kullanılarak kolonsuz olarak nitrozaminlerin standart karışımının dedektör cevabı incelenmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.1.6.’da gösterilmiştir.

Tablo 3-11: Hareketli faz seçiminde kullanılan çözeltiler

Hareketli faz	A çözeltisi	B çözeltisi	Oran (h/h)
1	Metanol	%0,1 Asetik Asit	(70:30, 80:20, 90:10)
2	Metanol	%0,1 Formik Asit	(70:30, 80:20, 90:10)
3	Asetonitril	%0,1 Asetik Asit	(70:30, 80:20, 90:10)
4	Asetonitril	%0,1 Formik Asit	(70:30, 80:20, 90:10)

3.3.3. Moleküllere Ait Kütle Dedektörü Parametrelerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin kütle parametrelerinin belirlenmesi için tarama analizlerinde; her bir nitrozamin molekülü için ayrı ayrı 1,0 µg/mL standart çözeltileri kullanılmıştır. Akış hızı 0,6 mL/dk, enjeksiyon hacmi 25 µL olarak sisteme verilmiştir.

3.3.3.1. Ana İyon (Precursor Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin ana iyon m/z değerlerinin ve polaritesinin belirlenebilmesi için Tablo 3-12’de verilen parametreler kullanılarak tarama yapılmıştır. Kütle spektrumları Bölüm 4.1.1.’de verilmektedir.

Tablo 3-12: Nitrozamin moleküllerinin ana iyon m/z değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri

Molekül	Molekül Ağırlığı (g/mol)	Başlangıç (m/z)	Bitiş (m/z)	Polarite
NDMA	74,08	60	100	Pozitif (+), Negatif (-)
NDEA	102,14	60	120	Pozitif (+), Negatif (-)
NEIPA	116,16	95	125	Pozitif (+), Negatif (-)
NDIPA	130,19	50	155	Pozitif (+), Negatif (-)
NMBA	146,14	120	160	Pozitif (+), Negatif (-)

MeNP	129,16	110	140	Pozitif (+), Negatif (-)
NDBA	158,24	100	200	Pozitif (+), Negatif (-)
NMPA	136,15	120	140	Pozitif (+), Negatif (-)

3.3.3.2. Parçalayıcı Voltaj (Fragmentor Voltage, FV) Değerlerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin ana iyonlarının m/z değerleri ve polariteleri belirlendikten sonra, parçalayıcı voltaj değerlerinin belirlenebilmesi için her bir nitrozamin molekülünün belirlenen ana iyonlarına karşı 0-180 volt arasında belirli aralıklarla değişen voltaj değerleri sistem yazılımına girilerek analiz edilmiştir ve elde edilen spektrumlardaki sinyal şiddetleri ölçülmüştür. En yüksek sinyal şiddetinin alındığı voltaj değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.'de verilmektedir.

3.3.3.3. Parçalanma İyonu (Product Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin parçalayıcı voltaj değerleri tespit edildikten sonra, parçalanma iyonlarının m/z değerlerinin belirlenebilmesi için Tablo 3-13'de gösterilen tarama aralıkları kullanılmıştır. Elde edilen spektrumlar, Bölüm 4.1.3.'de verilmektedir.

Tablo 3-13: Nitrozamin moleküllerinin parçalanma iyonu m/z değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri

Molekül	Ana İyon (m/z)	Parçalayıcı Voltaj (V)	Başlangıç (m/z)	Bitiş (m/z)	Polarite
NDMA	75,1	25 V	25	100	Pozitif (+)
NDEA	103,1	55 V	25	110	Pozitif (+)
NEIPA	117	50 V	25	125	Pozitif (+)
NDIPA	131,1	90 V	30	140	Pozitif (+)
NMBA	147	50 V	25	150	Pozitif (+)
MeNP	130,1	50 V	25	150	Pozitif (+)
NDBA	159,2	95 V	25	170	Pozitif (+)
NMPA	137	100 V	25	150	Pozitif (+)

3.3.3.4. Çarpışma Enerjisi (Collision Energy, CE) Değerlerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin parçalanma iyonları belirlendikten sonra Tablo 3-14’de gösterilen değerler kullanılarak 0-39 volt arasında değişen voltaj değerleri kullanılarak elde edilen spektrumlar incelenmiştir. En kararlı parçalanma iyonu ve en yüksek sinyal şiddetinin alındığı voltaj değerleri belirlenmiştir. Elde edilen spektrumlar Bölüm 4.1.4.’de verilmektedir.

Tablo 3-14: Nitrozamin moleküllerinin çarpışma enerjisi değerlerinin belirlenmesi için tarama parametreleri

Molekül	Ana İyon (m/z)	Parçalayıcı Voltaj (V)	Parçalanma İyonu (m/z)	Başlangıç Voltaj	Bitiş Voltaj	Polarite
NDMA	75,1	25 V	43,1	0	39	Pozitif (+)
NDEA	103,1	55 V	75,2	0	39	Pozitif (+)
NEIPA	117	50 V	75,1	0	39	Pozitif (+)
NDIPA	131,1	90 V	43,2	0	39	Pozitif (+)
NMBA	147	50 V	117	0	39	Pozitif (+)
MeNP	130,1	50 V	58,2	0	39	Pozitif (+)
NDBA	159,2	95 V	57,2	0	39	Pozitif (+)
NMPA	137	100 V	66,1	0	39	Pozitif (+)

3.3.3.5. LC-MS/MS Sistemi Ortak Kaynak (Source) Parametrelerinin Belirlenmesi

Nitrozamin moleküllerinin analizlerinde ortak kaynak parametrelerinin belirlenebilmesi amacıyla; bu parametreler üzerine analizler yapılmıştır. İncelenen parametreler Tablo 3-15’de gösterilmektedir. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.5.’de verilmektedir.

Tablo 3-15: Nitrozamin moleküllerinin ortak kaynak parametrelerinin belirlenmesi için tarama parametreleri

Parametre	Başlangıç Değeri	Bitiş Değeri
Gaz Sıcaklığı	200°C	350°C
Gaz Akış Hızı	1 L/dk	13 L/dk
Nebulizer	10 psi	60 psi
Sheath Gaz Sıcaklığı	200°C	400°C
Sheath Gaz Akış Hızı	5 L/dk	12 L/dk
Capillary Voltaj	1000 V	6000 V
Nozzle Voltaj	500 V	2000 V

3.3.4. Kromatografi Kolonu Seçimi

Tablo 3-16’da verilen kromatografi kolonları ve Bölüm 3.2.1.’de verilen hareketli faz kullanılarak, nitrozamin çözeltileri analiz edilmiştir. Rutin analizlere en uygun kromatografi kolonu belirlenmiştir.

Tablo 3-16: Kolon seçimi çalışmalarında kullanılan kolonlarının özellikleri

Kolon	Uzunluk (mm)	Çap (mm)	Tanecik Büyüklüğü (µm)	Gözenek çapı (Å)	İç yüzey alanı (m ² /g)	Uç Kapatma
Sepax BR- C18	250	4,6	5,0	120	350	Var
Kinetex F5	150	4,6	2,6	100		Var
Inertsil ODS3-C18	250	4,6	5,0	100	450	Var

3.3.5. Yöntem Geliştirme Çalışmaları Sonucunda Belirlenen Analitik Yöntem

Kromatografik Şartlar

Kolon	: Inertsil ODS-3 5µm 4,6x250mm
Otoörnekleyici Sıcaklığı	: 20,0°C
Enjeksiyon Hacmi	: 50 µL
Akış hızı	: 0,4 mL/dk (İzokratik akış)
Hareketli faz	: (A:B) (90:10, h/h) A çözeltisi: Asetonitril B çözeltisi: %0,1 Formik asit/Su
Analiz süresi	: 12,0 dk
Kolon sıcaklığı	: 40,0 °C

MS/MS Parametreleri

Tablo 3-17: Nitrozaminlere ait kütle parametreleri

Molekül	Ana İyon (m/z)	Parçalayıcı Voltaj (V)	Parçalanma İyonu (m/z)	Çarpışma Enerjisi	Polarite
NDMA	75,1	25 V	43,1	14	Pozitif (+)
NDEA	103,1	55 V	75,2	6	Pozitif (+)
NEIPA	117	50 V	75,1	5	Pozitif (+)
NDIPA	131,1	90 V	43,2	10	Pozitif (+)
NMBA	147	50 V	117	1	Pozitif (+)
MeNP	130,1	50 V	58,2	15	Pozitif (+)
NDBA	159,2	95 V	57,2	9	Pozitif (+)
NMPA	137	100 V	66,1	18	Pozitif (+)

MS/MS Ortak Kaynak Parametreleri

İyon Kaynağı	: ESI (Elektrosprey İyonizasyon)
Gaz Sıcaklığı	: 350°C
Gaz Akış Hızı	: 12 L/dk
Nebulizer Gazı	: Azot
Nebulizer Basıncı	: 60 psi
Sheath Gaz Sıcaklığı	: 200°C
Sheath Gaz Akış Hızı	: 8 L/dk
Kapiler Voltaj Değeri	: 2000 Volt
Nozzle Voltaj Değeri	: 1000 Volt

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Validasyon, analitik işlemlerin araştıracının gerçekleştirdiği analizdeki amacına uygun, kabul edilebilir olduğunu gösterme, doğrulama işlemidir. Yöntem geliştirme çalışmaları tamamlandıktan sonra en son ICH Kılavuzu Q2 (R1)'e göre validasyonu yapıldı (49).

3.4.1. Seçicilik

Seçicilik, yöntemin analizde herhangi bir girişim oluşturabilecek diğer bileşenlerin var olduğu durumlarda analiti bu girişimlerden ayırabilme ve doğru olarak tanımlayabilme yeteneği olarak tanımlanır.

Validasyon sırasında seçicilik, çözücü ve plasebo numunelerinin enjekte edilmesiyle kontrol edilir. Çözücü ve plasebo kromatogramında ilgili analitin alıkonma zamanında gelen herhangi bir girişim gözlenmemelidir. Eğer varsa bu girişim pikleri ilgili analitden ayrılmış olmalıdır. Elde edilen bulgular Bölüm 4.2.1.'de verilmiştir.

3.4.2. Taşınma Etkisi

Taşınma, yöntem geliştirme çalışmaları sırasında tanımlanmalı ve varsa giderilmeli ya da en aza indirilmelidir. Validasyon esnasında taşınma etkisi, plasebo ve analitin eklendiği örnek sonrası, kalibrasyon standartları ve kalite kontrol örnekleri aralarında enjekte edilen çözücü ile kontrol edilir.

En yüksek standart çözeltisi enjeksiyonunun ardından çözücü enjekte edilerek eğer varsa taşınma miktarına bakılır. Çözücü enjeksiyonundaki taşınma bilinen analitlerin alan olarak %1'ini geçmemelidir. Elde edilen bulgular Bölüm 4.2.2.'de verilmiştir.

3.4.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Tespit sınırı, analit sinyalinin gözlemlendiği fakat kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik değeri vermeyen, analitin tayin sınırları içerisine girmeyen en düşük konsantrasyondur. Tayin sınırı ise, analitin kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlikte miktarının tayin edilebileceği genelde kalibrasyon eğrisinin en alt noktasını oluşturan konsantrasyondur.

Uluslararası Uyumlulaştırma Komitesi (ICH) Q2 (R1)'in 6. ve 7. bölümlerinde, LOD ve LOQ'nun belirlenmesi için üç farklı yöntem listelenmiştir.

1. Görsel değerlendirmeye dayalı yöntem
2. Sinyalden gürültüye dayalı yöntem
3. Yanıtın ve eğimin standart sapmasına dayalı yöntem

1. yöntemin yalnızca daha nicel bir yaklaşımla (ikinci iki yöntemden biri) doğru kararı verdiğinizizi doğrulamak için kullanılması önerilir.

2. yöntem olan sinyalden gürültüye dayalı yöntemde LOD sinyal/gürültü oranının 2 ya da 3:1 olduğu konsantrasyon değeri olarak da karşımıza çıkarken, LOQ sinyal/gürültü oranının 10:1 olduğu analit konsantrasyonu olarak kabul edilir.

3. yöntem LOD ve LOQ'nun kalibrasyon eğrisinden hesaplanması olarak bilinir. Bu yöntemde, yanıtın standart sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanılarak aşağıdaki Denklem 3-1 ve Denklem 3-2 kullanılarak LOD ve LOQ hesaplanır.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}}{m} \quad (3-1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}}{m} \quad (3-2)$$

0,05-50 ng/mL arasındaki konsantrasyonlarda ilgili analitleri içeren çözeltiler hazırlanarak enjekte edilir. Elde edilen dedektör cevabına göre her nitrozamin için kalibrasyon eğrisi çizdirilir. Yukarıda açıklanan 3 yöntem de değerlendirilir. Tayini limiti kalibrasyon eğrisinin ilk seviyesi olarak kullanılır. Elde edilen bulgular Bölüm 4.2.3.'de verilmiştir.

3.4.4. Kalibrasyon Eğrisi, Doğrusal Çalışma Aralığı

Azalan konsantrasyonlara karşı dedektör cevabının doğrusal olması araştırılır. Her bir analitin azalan konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen dedektör cevapları ile çizilen eğrinin korelasyon katsayısı ve ordinat-kesim noktası ile eğimi hesaplanarak kalibrasyon eğrisi denklemi elde edilir. Analitik metodun

validasyonuna başlamadan önce beklenen çalışma aralığı bilinmelidir. Kalibrasyon eğrisinin en alt seviyesi olan en düşük tayin sınırı (LLOQ) ve en yüksek seviyesi olan en yüksek tayin sınırı (HLOQ) olan bu aralık yöntemin doğrusal olduğu çalışma aralığıdır.

İlgili analitlerin en az 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi analiz edilecek ve dedektör yanıtına göre konsantrasyon/dedektör cevabı grafiği çizilerek kabul kriterlerine uygunluğu test edilecektir. En düşük konsantrasyon için doğruluk limitleri $\pm$ %20, diğerleri için $\pm$ %15 olarak alınır. Her validasyon serisinde kalibrasyon standartlarının %75'i kriterleri sağlamalıdır, 6 noktadan en az 5 tanesi limit içi değerde olmalıdır. Kalibrasyon eğrisi değerlerinde korelasyon katsayısı $r^2 \geq 0,99$ olmalıdır. Ortalama değerler limit içi olmalıdır. Elde edilen bulgular Bölüm 4.2.4.'de verilmiştir.

3.4.5. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, ilgili analitin teorik konsantrasyonu ile tayin sonucu bulunan deneysel konsantrasyonunun birbiri ile olan yakınlığı olarak tarif edilir. Doğruluk, %Geri kazanım ya da %Doğruluk ile ifade edilir.

Doğruluk, ilgili analitlerin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan kalite kontrol (KK) örnekleri analiz edilerek değerlendirilir. KK örnekleri kalibrasyon standartlarından ayrı olarak stok çözeltiler kullanılarak hazırlanır. KK örnekleri analiz edilerek elde edilen dedektör cevapları kalibrasyon eğrisine karşı hesaplanır ve elde edilen konsantrasyonlar teorik konsantrasyonlarla karşılaştırılır. Doğruluk hem gün içi hem de günler arası yapılan çalışmalarla hesaplanır. Gün içi doğruluk çalışmasında kalibrasyon eğrisi aralığını kapsayan 3 farklı konsantrasyon seviyesinde ve her seviyede 6 farklı numune hazırlanarak analiz edilecek ve kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilecektir. Günler arası doğruluk çalışmasında art arda 3 gün, gün içi yapılan çalışma tekrar edilip sonuçlar değerlendirilecek.

En küçük konsantrasyon için doğruluk $\pm$ %20, diğerleri için $\pm$ %15 olarak alınır. Her validasyon serisinde kalite kontrol örneklerinin en az %75'i kriterleri sağlamalıdır. Her bir seviye için hesaplanan deneysel konsantrasyonların ortalaması ve standart sapma (SD) değerleri raporlanır. Doğruluğun ifadesi olarak %Doğruluk hesaplanır. %Doğruluk Denklem 3-3 ile hesaplanır.

$$\%Doğruluk = (\text{DeneySEL Miktar} / \text{Teorik Miktar}) * 100$$

(3-3)

3.4.6. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, ilgili analitin aynı konsantrasyonunun ardışık analizlerinden elde edilen sonuçların birbiri ile olan yakınlığı olarak tarif edilir. Kesinlik, bağıl standart sapma (%RSD) ya da varyasyon katsayısı (%CV) ile ifade edilir.

Kesinlik parametresi, hazırlanan kalite kontrol örnekleri ile yapılmalıdır. 3 farklı kalite kontrol noktası 6 kez hazırlanarak ardışık olarak analiz edilir. Gün içi ve günler arası çalışılır. Her bir seviye için hesaplanan deneysel konsantrasyonların ortalaması ve standart sapma (SD) değerleri raporlanır. Kesinliğin ifadesi olarak bağıl standart sapma (%RSD) ya da varyasyon katsayısı (%CV) hesaplanır. %RSD Denklem 3-4 ile hesaplanır. Altı ardışık enjeksiyon için %RSD ya da %CV değeri %10,0'dan büyük olmamalıdır.

$$\%RSD = (\text{Standart Sapma} / \text{Ortalama}) * 100$$

(3-4)

3.4.7. Matriks Etkisi

Matriks etkisi, standart analitin idrar, plazma ve serum gibi bir biyolojik matriksteki veya çeşitli kimyasal maddeler içeren plasebodaki aynı analite karşı dedektör cevabının farklılığını ifade eder. Matriks etkisi genellikle hedef analitlerin iyonizasyonunu ve kromatografik davranışlarını etkileyebilen matriks ortamında bulunan analit harici bileşenlerden kaynaklanır, bu durum iyon baskılanması veya iyon artırımı ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, matriks etkisinin belirlenmesi gerekir. Matriks etkisi iyonizasyon türüne, numune hazırlama tekniğine ve matrikse ortamına göre değişir. Tamamen ortadan kaldırılamasa bile, bazı önlemler ile en aza indirilebilir.

Aynı konsantrasyondaki standart çözelti ile aynı konsantrasyondaki plaseboya eklenmiş standart çözeltinin pik alanlarından hesaplanır. Matriks etkisi Denklem 3-5 ile hesaplanır.

$$\% ME = \frac{\text{ANALITIN STANDART PİK ALANI} - \text{ANALITIN ÖRNEK PİK ALANI}}{\text{ANALITIN STANDART PİK ALANI}} \times 100 \quad (3-5)$$

Hesaplanan Matriks etkisi, eğer %ME = 0 ise matriks etkisi yoktur, %ME > 0 ise iyon baskılanma vardır, %ME < 0 ise iyon artırımı vardır. İyon baskılanma veya artırımı değerleri %50 den yüksek olmamalıdır (50, 51).

3.4.8. Stabilité

Örnek hazırlama ve analizi sırasında saklama veya ortam koşullarının analit konsantrasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi için stabilité çalışması gerçekleştirilir. Çözelti stabilitesi hazırlanan numune ve standart çözeltilerinin alanlarındaki değişimlerin laboratuvar şartları değiştirilmeden ne kadar sürede, belirli bir aralıkta kalabileceğinin belirlenmesi çalışmasıdır.

Stabilité çalışmaları için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanmış olan kalite kontrol örnekleri kullanılır. Bu kalite kontrol örneklerinin başlangıç zamanında ve T zaman sonraki analizlerinden elde edilen pik alanları kaydedilir ve stabilité aşağıdaki Denklem 3-6 ile ifade edilir. Enjeksiyonu verilen tüm çözeltiler için başlangıç alanlarına göre %Hata $\pm$ %10.0 olan çözeltileri stabil sayılmıştır.

$$\% \text{ Hata} = \frac{T1 - T0}{T0} \times 100 \quad (3-6)$$

T0 : Başlangıç noktasında pik alanı

T1 : T zaman noktasındaki pik alanı

Stabilité için 3 farklı çalışma gerçekleştirildi.

1. Stok çözeltilerin stabilitesi; Bu çalışma stok çözeltilerin buzdolabı saklama koşullarında belirli günler boyunca ne kadar stabil kaldığını belirlemek için gerçekleştirilir. Bu çalışmada seyreltik stok 2 çözeltileri 1 gün buzdolabı koşullarında bekletilerek analiz edilir ve ilk gün ve 1 gün sonraki analizler arasında %Hata hesaplanır.

2. Kısa dönem stabilitesi; Bu çalışma kalite kontrol çözeltilerinin laboratuvar koşullarında numune hazırlama süresi dikkate alınarak belirli bir süre boyunca ne kadar

stabil kaldığını belirlemek için gerçekleştirilir. Bu çalışmada kalite kontrol numunesi 6 saat laboratuvar koşullarında bekletilerek analiz edilir ve 0. ve 6. Saat analizleri arasında %Hata hesaplanır.

3. Otoörnekleyici stabilitesi; Bu çalışma toplam analiz süresi dikkate alınarak kalite kontrol numunelerinin otoörnekleyici koşullarında ne kadar stabil kaldığını belirlemek için gerçekleştirilir. Bu çalışmada kalite kontrol numunesi 24 saat otoörnekleyicide bekletilip tekrar analiz edilerek aralarındaki %Hata hesaplanır.

3.4.9. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi, analitik yöntemin doğru ve kesin sonuçlar vermesine katkıda bulunan spesifik testlerdir. Bu testler, ekipmana ve analiz edilecek analitlere bağlı olarak hazırlanmalı ve değerlendirilmelidir.

Sistem uygunluk testlerinin amacı kromatografik uygunluğu (Ayırma Gücü, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı ve kapasite faktörü) kontrol etmek ve sistemin stabil (enjeksiyon kesinliği) çalışıp çalışmadığını değerlendirmektir (52).

Analitik yönetime göre hazırlanan Sistem uygunluk çözeltisi (KK2, Orta konsantrasyon) analiz edilip kabul kriterlerine uygunluğu test edilecektir. Sistem uygunluk parametreleri, her bir nitrozamin impüritesinin peşpeşe 6 enjeksiyonunu ile belirlenir ve kabul kriterleri (Tablo 3-18) ile değerlendirilir.

Tablo 3-18: Sistem uygunluk testi kabul limitleri

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon Kesinliği	$RSD < 2$, $n \geq 5$
Ayırma Gücü	$R_s > 1,5$
Kuyruklanma Faktörü	$T < 2$
Teorik Plaka Sayısı	$N > 2000$

3.5. Farmasötik Preparatlara Uygulama

3.5.1. Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi

Geliştirilen yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması için aşağıda verilen farklı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Bu ekstraksiyon yöntemlerinin matriks etkisine olan artırıcı ya da azaltıcı etkisinin incelenmesi için bir numune (irbesartan +

hidroklorotiyazid) plasebosu üzerinde uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aynı yöntemle plasebo olmadan hazırlanan standart nitrozamin çözeltilerinin sonuçları ile karşılaştırılarak matriks etkisi hesaplanmıştır.

Yöntem 1:

100 mg plasebo
↓
50 ng/mL standart nitrozamin çözeltisinden 50 µL
↓
1 mL Asetonitril
↓
1 dakika vorteks
↓
25°C, 10 dk, 5000 rpm santrifüj
↓
Üstteki sıvı faz 0,22 mikron filtreden süzülür ve viallenir
↓
LC-MS/MS analizi

Yöntem 2:

100 mg plasebo
↓
50 ng/mL standart nitrozamin çözeltisinden 50 µL
↓
1 mL Metanol
↓
1 dakika vorteks
↓
25°C, 10 dk, 5000 rpm santrifüj
↓
Üstteki sıvı faz 0,22 mikron filtreden süzülür ve viallenir
↓
LC-MS/MS analizi

Yöntem 3:

100 mg plasebo
↓
50 ng/mL standart nitrozamin çözeltisinden 50 µL
↓
1 mL n-hekzan
↓
1 dakika vorteks
↓

25°C, 10 dk, 5000 rpm santrifüj



Üstteki sıvı faz 0,22 mikron filtreden süzülür ve viallenir



LC-MS/MS analizi

Yöntem 4:

100 mg plasebo



50 ng/mL standart nitrozamin çözeltisinden 50 µL



1 mL n-hekzan



1 dakika vorteks



25°C, 10 dk, 5000 rpm santrifüj



Üstteki sıvı faz 0,22 mikron filtreden süzülür



Süzüntü ile asetonitril 1 e 1 oranında karıştırılır



1 dakika vorteks



Alt fazda kalan asetonitril ve üst fazda kalan n-hekzan ayrı ayrı viallenir

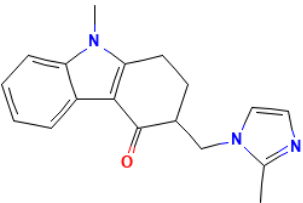


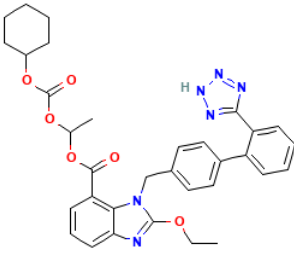
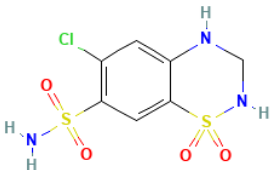
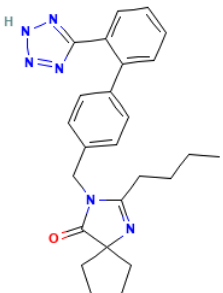
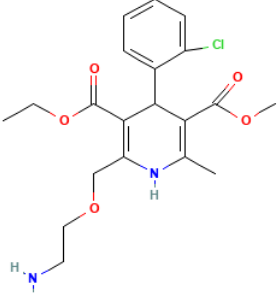
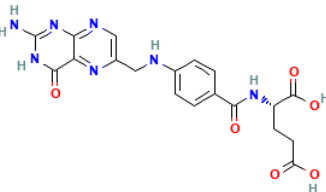
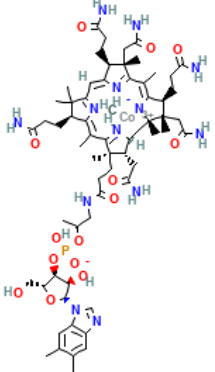
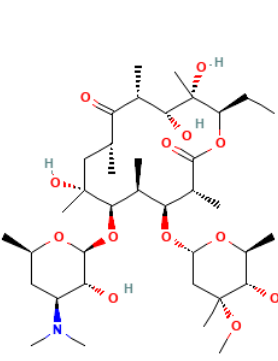
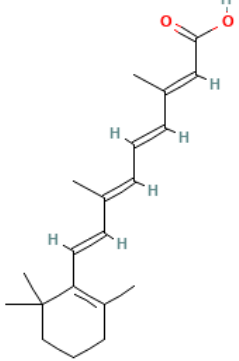
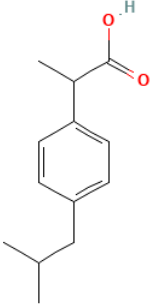
LC-MS/MS analizi

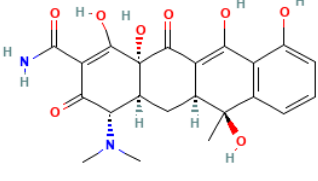
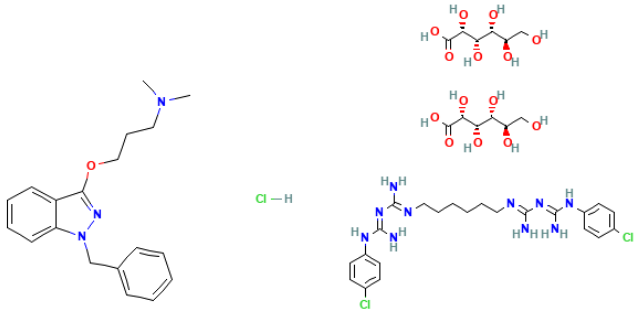
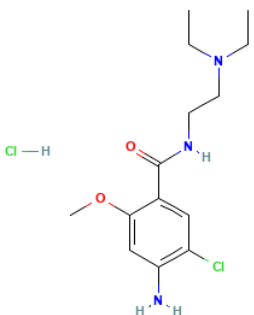
3.5.2. Uygulama Yapılacak Farmasötik Preparatlar

Belirlenen ekstraksiyon yönteminin farklı farmasötik preparatlara uygulaması yapılmıştır. Bu farmasötik preparatlar Tablo 3-19'da gösterilmiştir.

Tablo 3-19: Uygulama yapılan farmasötik preparatlar

Ürün Türü	Etkin Madde	Molekül Şekilleri
Tablet 1	4 mg Ondansetron	

Tablet 2	32 mg Kandesartan sileksetil + 12,5 mg Hidroklorotiyazid	 
Tablet 3	300 mg İrbesartan + 10 mg Amlodipin + 12,5 mg Hidroklorotiyazid	 
Kapsül	100 mg Fe ⁺² + 0,5 mg Folik Asit + 2,5 mcg B12 Vitamini (Metilkobalamin)	 
Jel	%4 Eritromisin + %0,025 Tretinoin	 
Krem	%5 İbuprofen	

Merhem	%3 Tetrasiklin HCl	 <chem>Cl[H]</chem>
Sprey	%0,15 Benzidamin HCl + %0,12 Klorheksidin glukonat	 <chem>Cl[H]</chem>
Gargara	%0,15 Benzidamin HCl + %0,12 Klorheksidin diglukonat	
Enjeksiyonluk Çözelti	10 mg/2 ml Metoklopramid HCl	 <chem>Cl[H]</chem>

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Bulgular

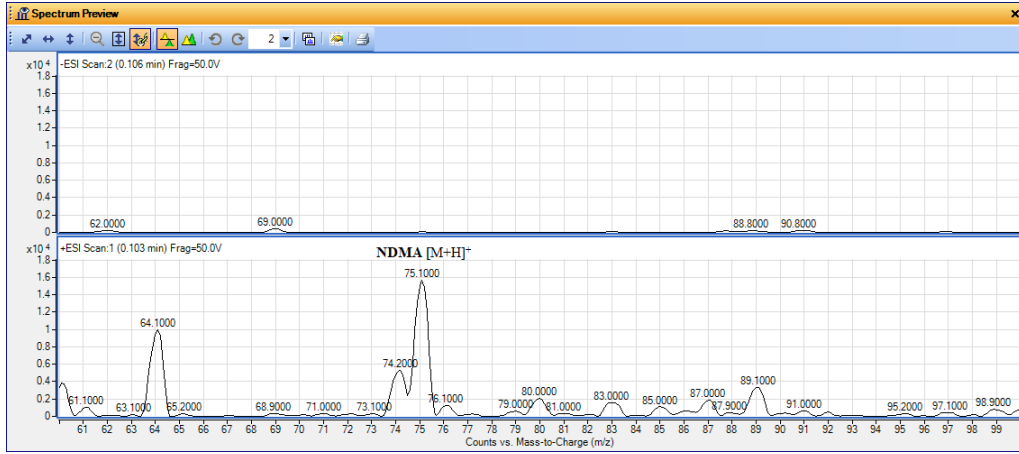
4.1.1. Ana İyon (Precursor Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3.3.1.'de anlatıldığı gibi her biri ayrı ayrı hazırlanan 1,0 µg/mL konsantrasyona sahip nitrozamin standart çözeltileri ile belirli m/z kütle aralıklarında tarama yapılmıştır.

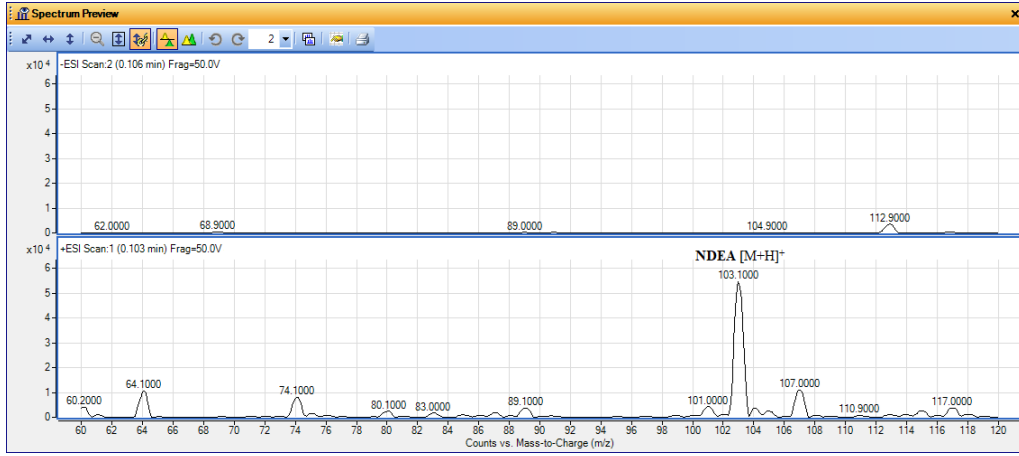
Çalışma sonucunda elde edilen nitrozaminlere ait ana iyon (M^+) m/z değerleri ve polarite değerleri Tablo 4-1'de listelenmiş ve nitrozaminlere ait kütle spektrumları aşağıda Şekil 4-1'den Şekil 4-8'e kadar verilmiştir.

Tablo 4-1: Tarama Sonucu belirlenen ana iyon m/z değerleri ve polariteler

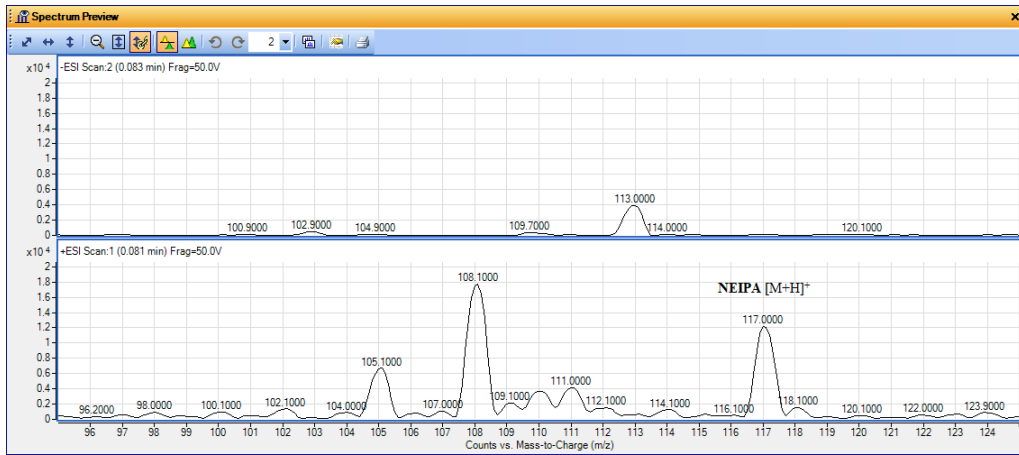
Molekül	Ana İyon (m/z)	Polarite
NDMA	75,1	Pozitif (+)
NDEA	103,1	Pozitif (+)
NEIPA	117	Pozitif (+)
NDIPA	131,1	Pozitif (+)
NMBA	147	Pozitif (+)
MeNP	130,1	Pozitif (+)
NDBA	159,2	Pozitif (+)
NMPA	137	Pozitif (+)



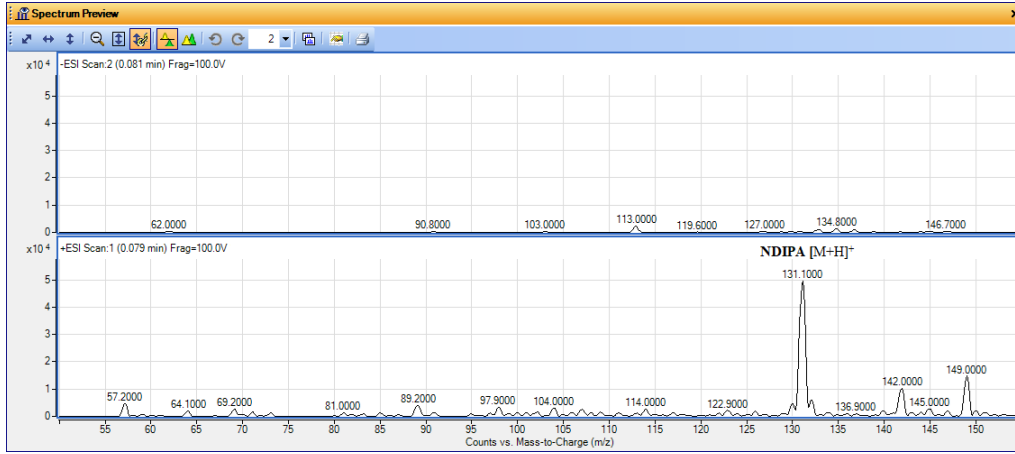
Şekil 4-1: NDMA'nın kütle spektrumu



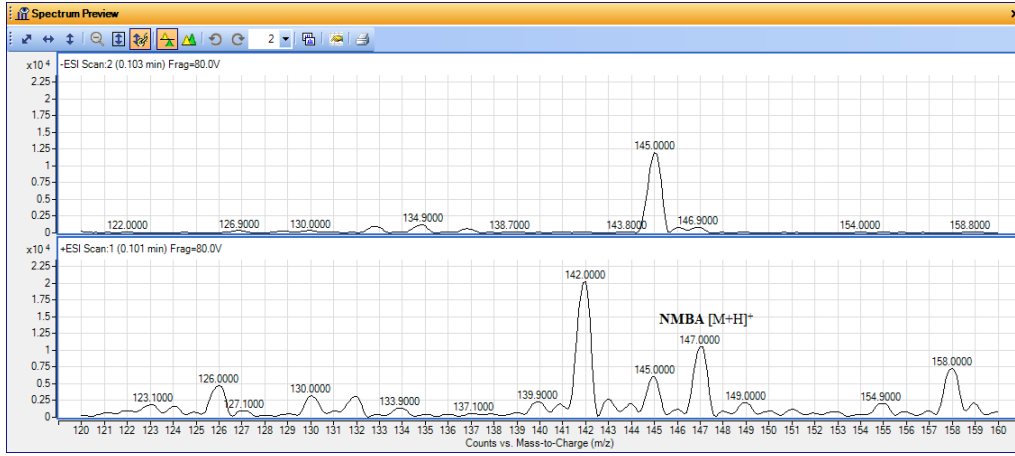
Şekil 4-2: NDEA'nın kütle spektrumu



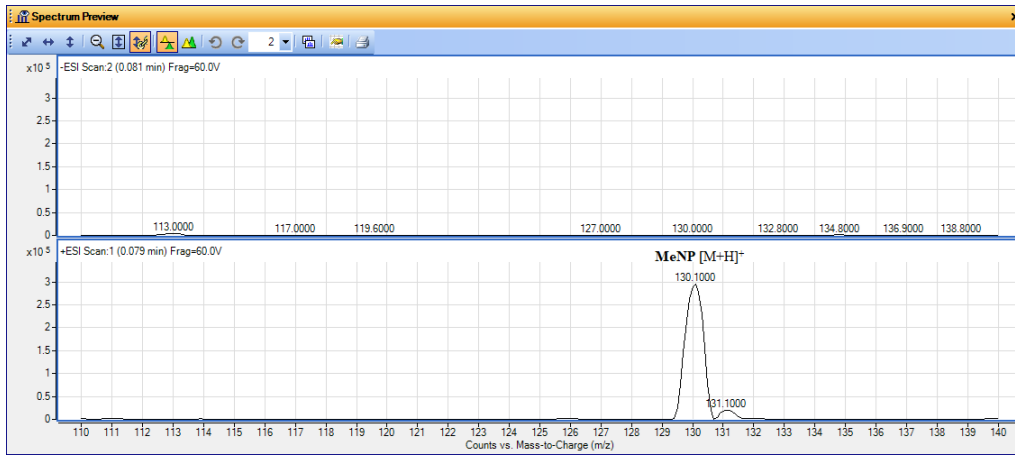
Şekil 4-3: NEIPA'nın kütle spektrumu



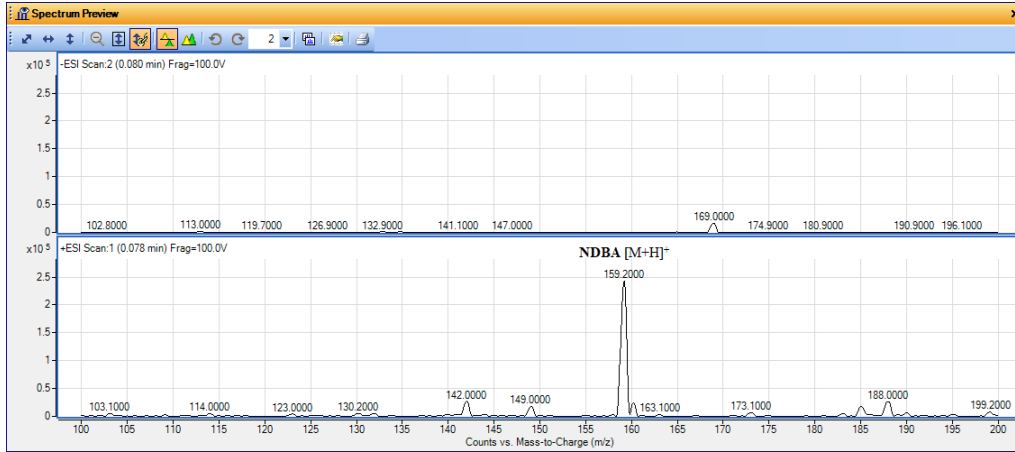
Şekil 4-4: NDIPA'nın kütle spektrumu



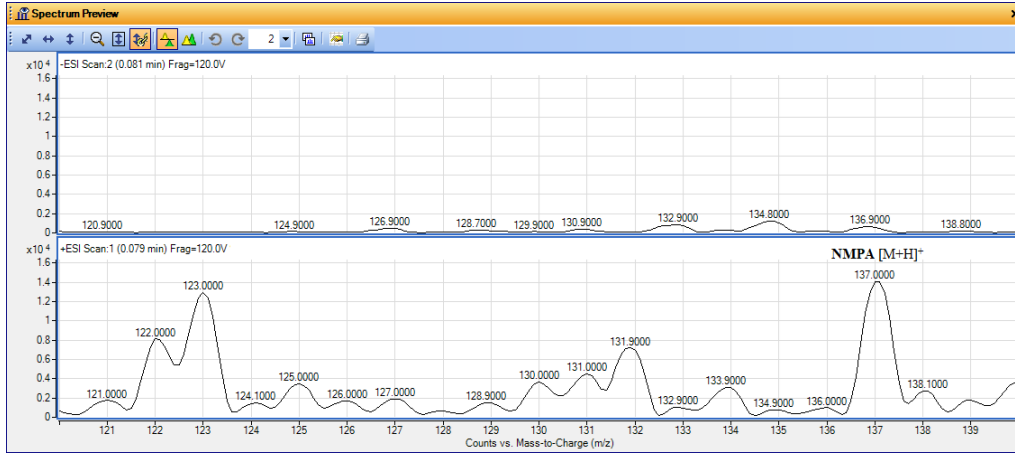
Şekil 4-5: NMBA'nın kütle spektrumu



Şekil 4-6: MeNP'nın kütle spektrumu



Şekil 4-7: NDBA'nın kütle spektrumu



Şekil 4-8: NMPA'nın kütle spektrumu

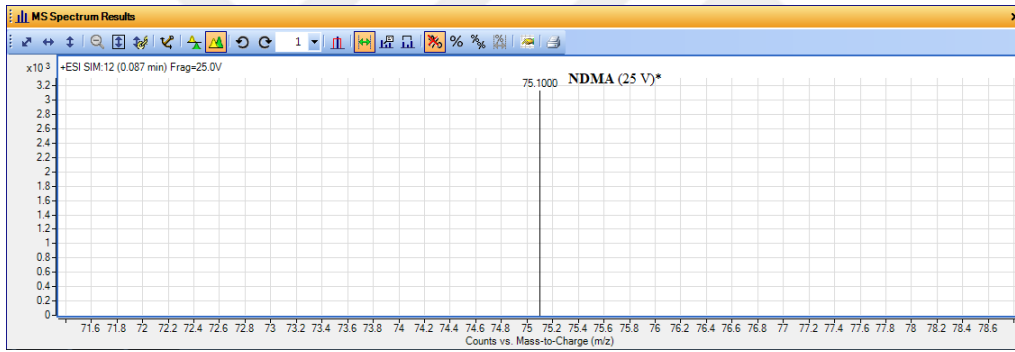
4.1.2. Parçalayıcı Voltaj (Fragmentor Voltage, FV) Değerlerinin Belirlenmesi

Bölüm 4.1.1.'de belirlenen ana iyonlara ait m/z değerlerini ve polarite değerlerini kullanarak seçilmiş iyon izleme (SIM) modunda, 0-180 volt aralığında 5'er volt artacak şekilde analizler gerçekleştirilmiştir. En yüksek sinyal şiddetinin alındığı voltaj değerleri belirlenmiştir.

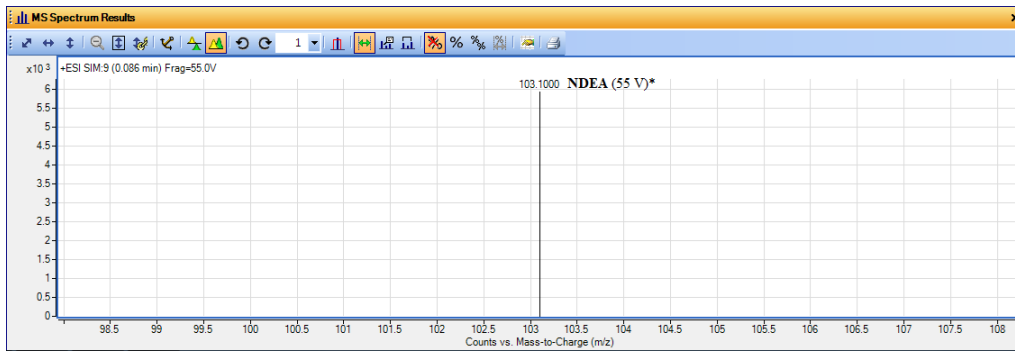
Çalışma sonucu elde edilen nitrozaminlere ait parçalayıcı voltaj değerleri Tablo 4-2'de listelenmiş ve bu sinyallere ait spektrumlar aşağıda Şekil 4-9'dan Şekil 4-16'a kadar verilmiştir.

Tablo 4-2: Nitrozaminler için belirlenen parçalayıcı voltaj değerleri

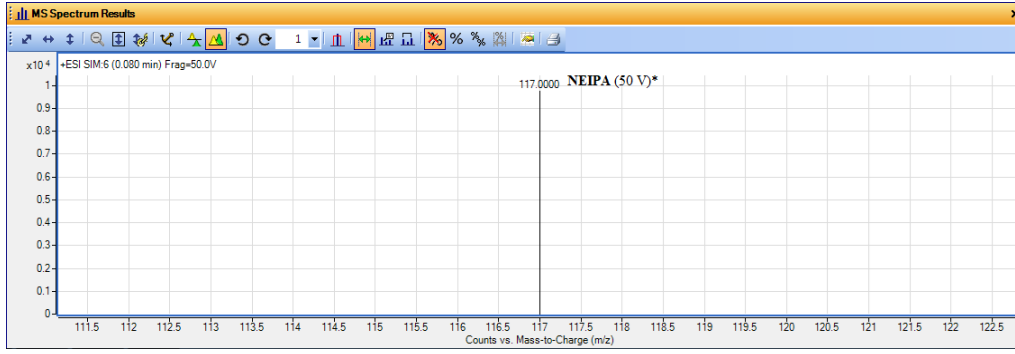
Molekül	Parçalayıcı Voltaj (V)
NDMA	25 V
NDEA	55 V
NEIPA	50 V
NDIPA	90 V
NMBA	50 V
MeNP	50 V
NDBA	95 V
NMPA	100 V



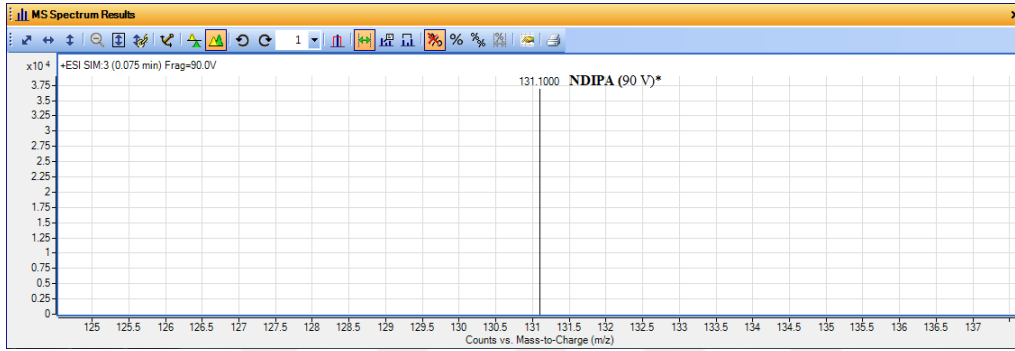
Şekil 4-9: NDMA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



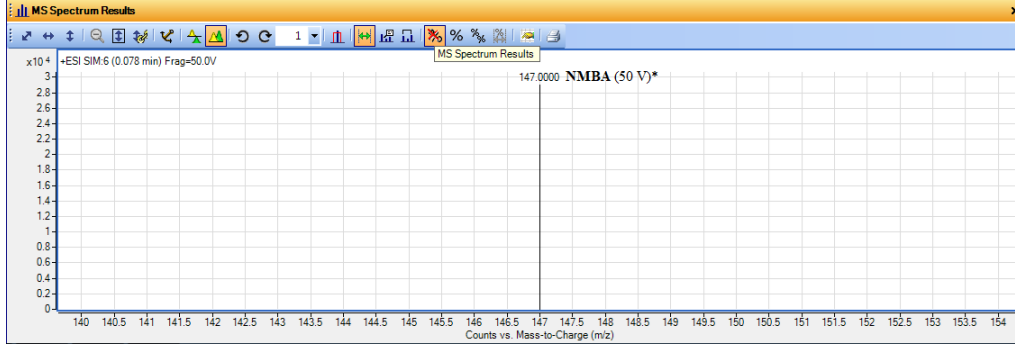
Şekil 4-10: NDEA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



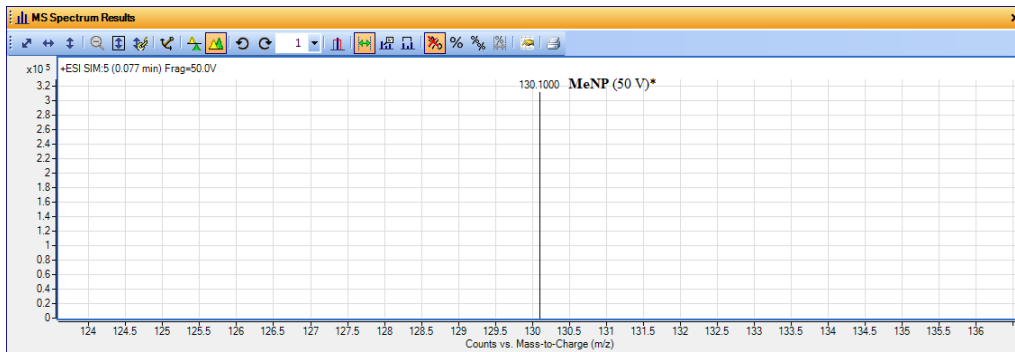
Şekil 4-11: NEIPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



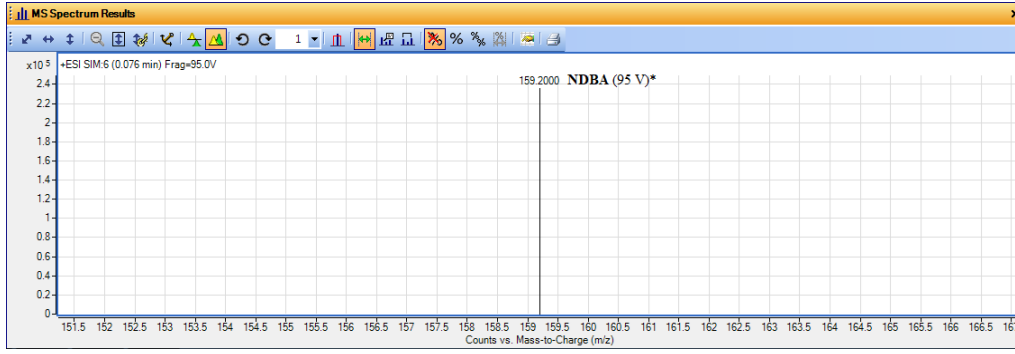
Şekil 4-12: NDIPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



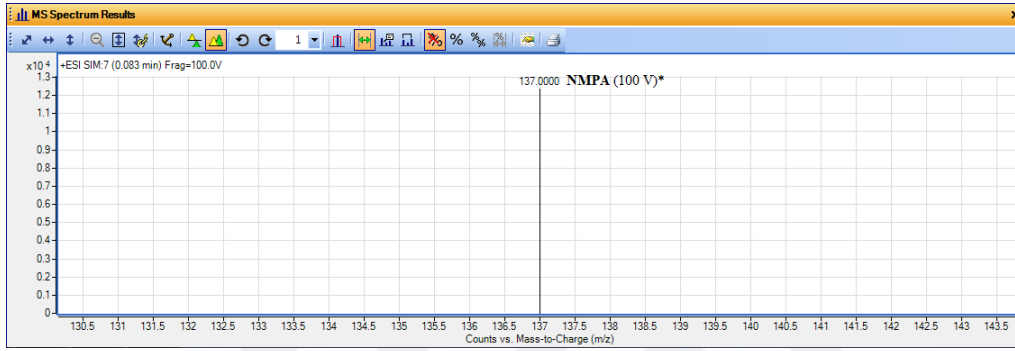
Şekil 4-13: NMBA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



Şekil 4-14: MeNP'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



Şekil 4-15: NDBA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum



Şekil 4-16: NMPA'nın parçalayıcı voltaj değerine ait spektrum

4.1.3. Parçalanma İyonu (Product Ion) m/z Değerlerinin Belirlenmesi

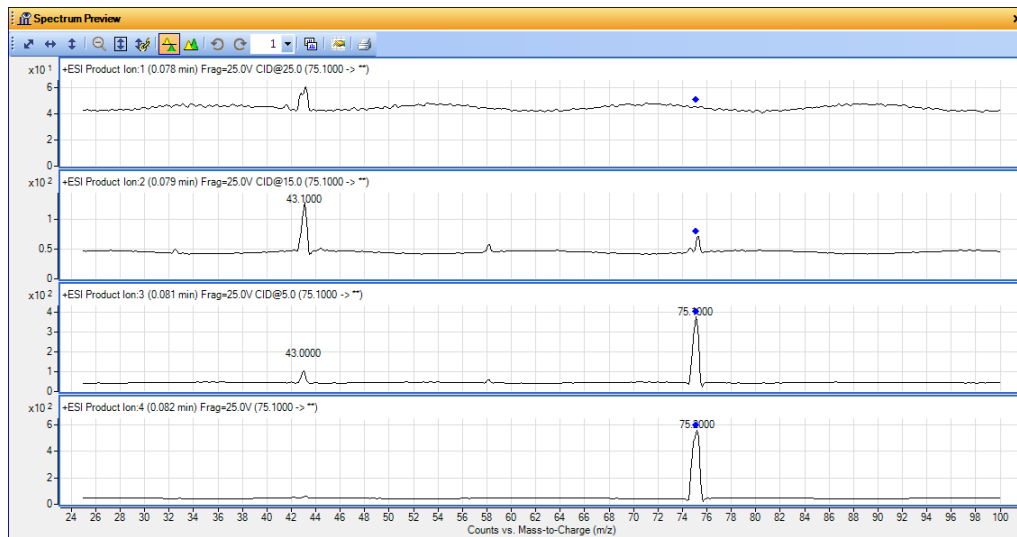
Parçalanma iyonlarını belirleme çalışmasında, Bölüm 4.1.1. ve Bölüm 4.1.2.'de belirlenen değerler kullanılıp, belirli m/z değerleri arasında tarama yapılarak, en kararlı parçalanma iyonları belirlenmiştir.

Çalışma sonucu elde edilen nitrozaminlere ait parçalanma iyonu m/z değerleri Tablo 4-3'de listelenmiş ve nitrozaminlere ait kütle spektrumları aşağıda Şekil 4-17'den Şekil 4-24'e kadar verilmiştir.

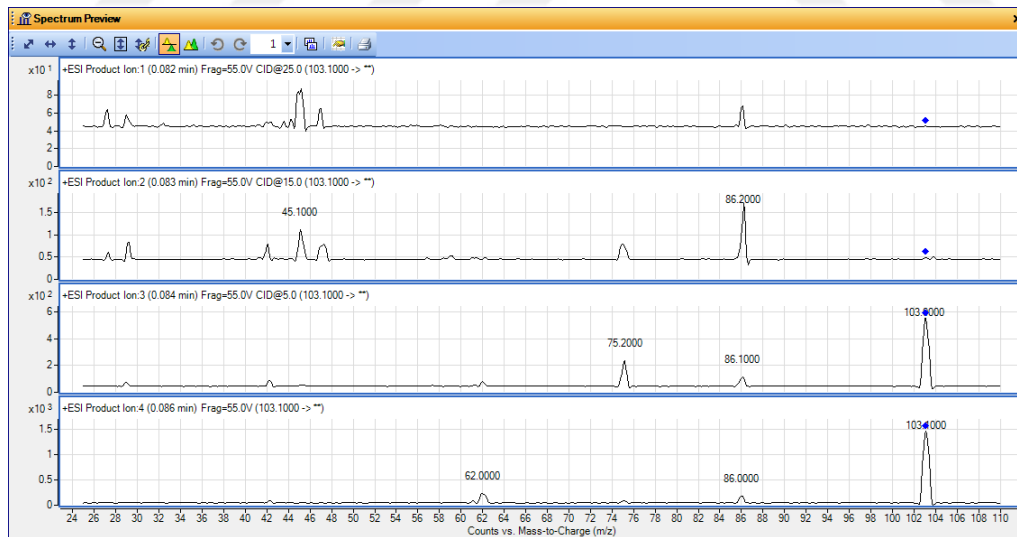
Tablo 4-3: Nitrozaminler için belirlenen parçalanma iyonu m/z değerleri

Molekül	Ana İyon (m/z)	Parçalanma İyonu (m/z)
NDMA	75,1	43,1
NDEA	103,1	75,2
NEIPA	117	75,1
NDIPA	131,1	43,2
NMBA	147	117

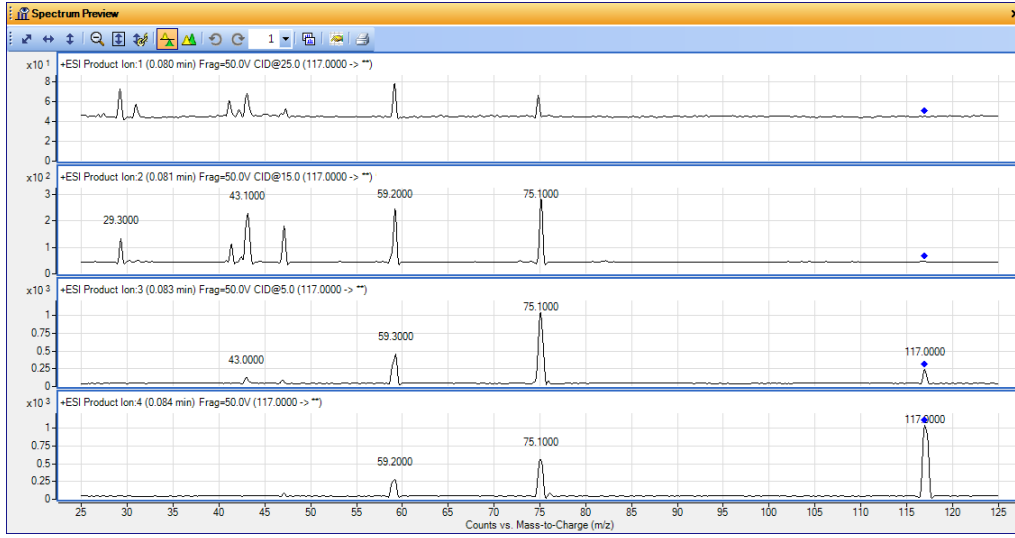
MeNP	130,1	58,2
NDBA	159,2	57,2
NMPA	137	66,1



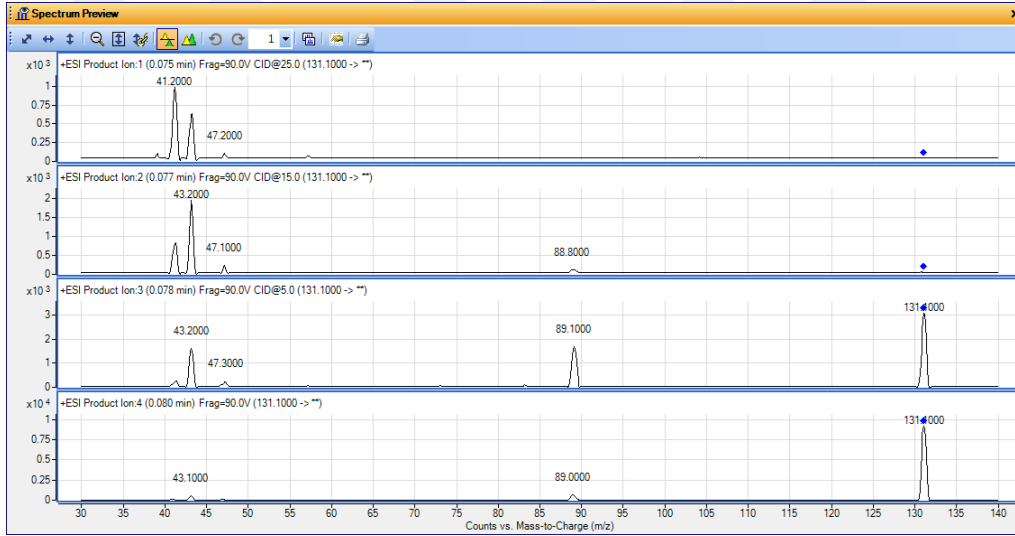
Şekil 4-17: NDMA'nın parçalanma iyonu spektrumu



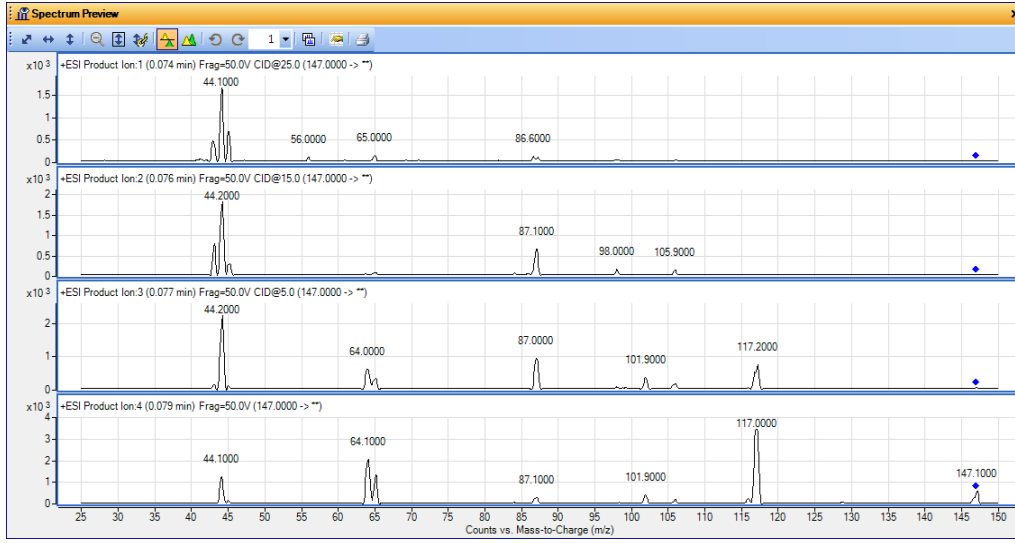
Şekil 4-18: NDEA'nın parçalanma iyonu spektrumu



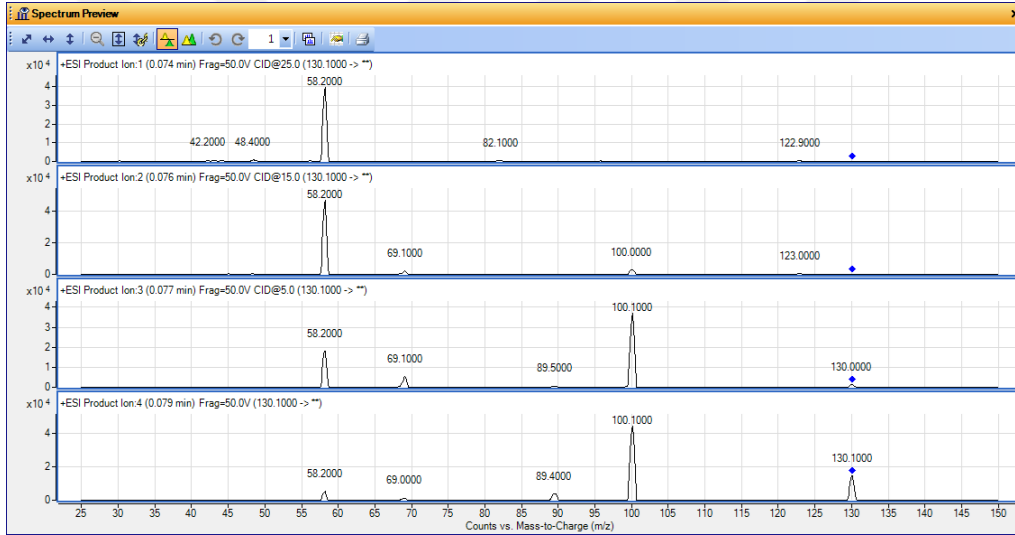
Şekil 4-19: NEIPA'nın parçalanma iyonu spektrumu



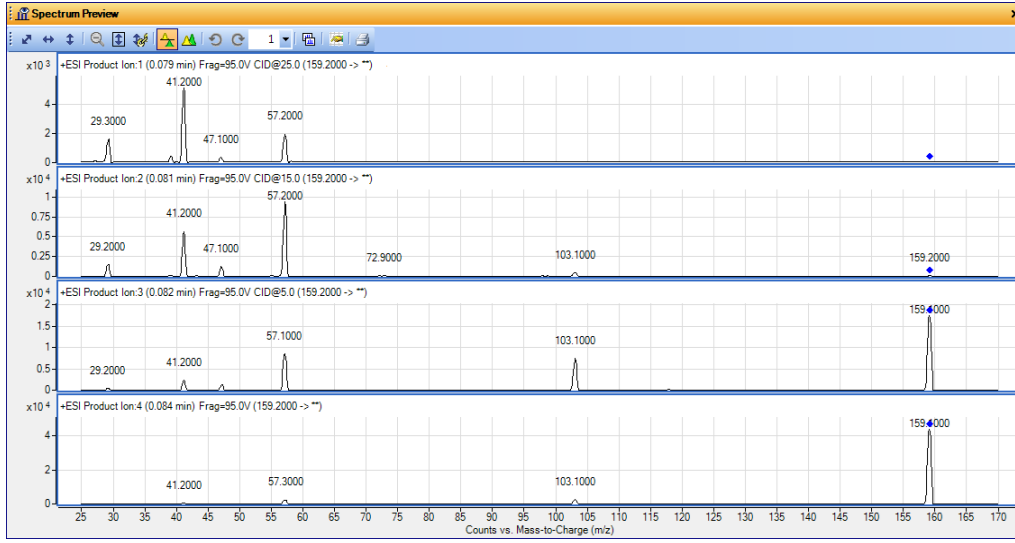
Şekil 4-20: NDIPA'nın parçalanma iyonu spektrumu



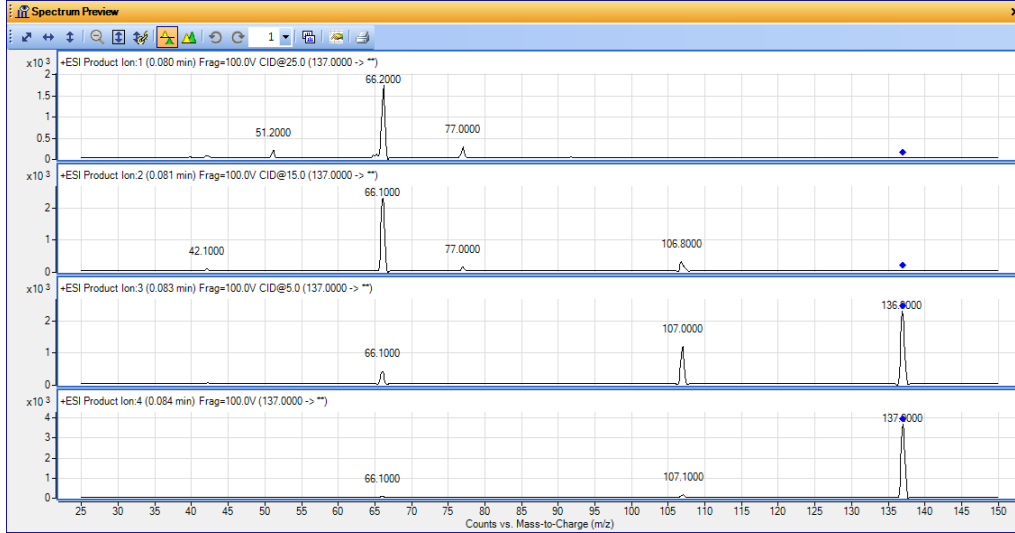
Şekil 4-21: NMBA'nın parçalanma iyonu spektrumu



Şekil 4-22: MeNP'nın parçalanma iyonu spektrumu



Şekil 4-23: NDBA'nın parçalanma iyonu spektrumu



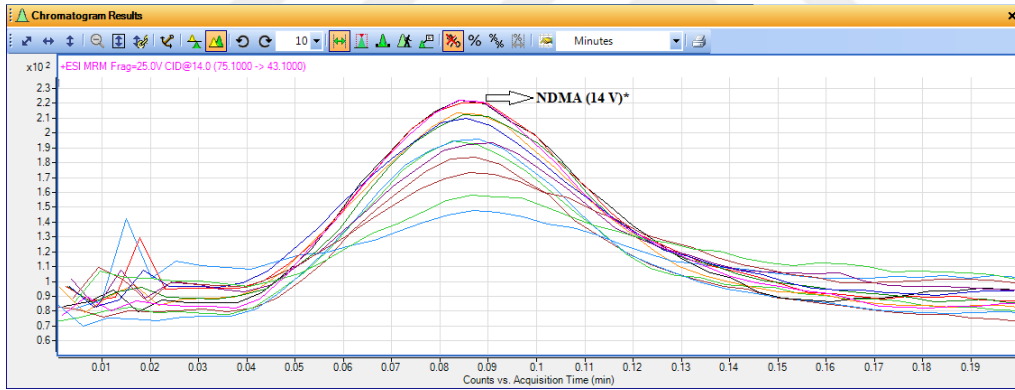
Şekil 4-24: NMPA'nın parçalanma iyonu spektrumu

4.1.4. Çarpışma Enerjisi (Collision Energy, CE) Değerlerinin Belirlenmesi

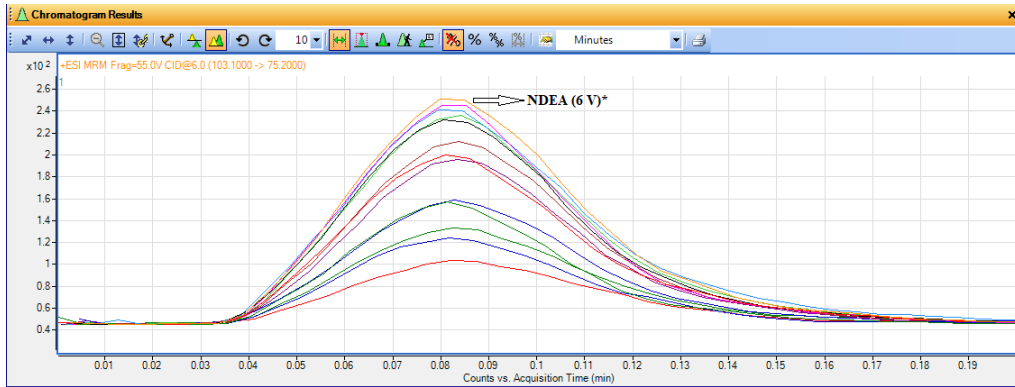
Bölüm 4.1.1., Bölüm 4.1.2. ve Bölüm 4.1.3.'de belirlenen değerler kullanılıp çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda, 0-39 volt aralığında analizler gerçekleştirilmiştir. En yüksek sinyal şiddetinin alındığı voltaj değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen nitrozaminlere ait çarpışma enerjisi değerleri Tablo 4-4'de listelenmiş ve bu sinyallere ait spektrumlar aşağıda Şekil 4-25'den Şekil 4-32'e kadar verilmiştir.

Tablo 4-4: Nitrozaminler için belirlenen çarpışma enerjisi değerleri

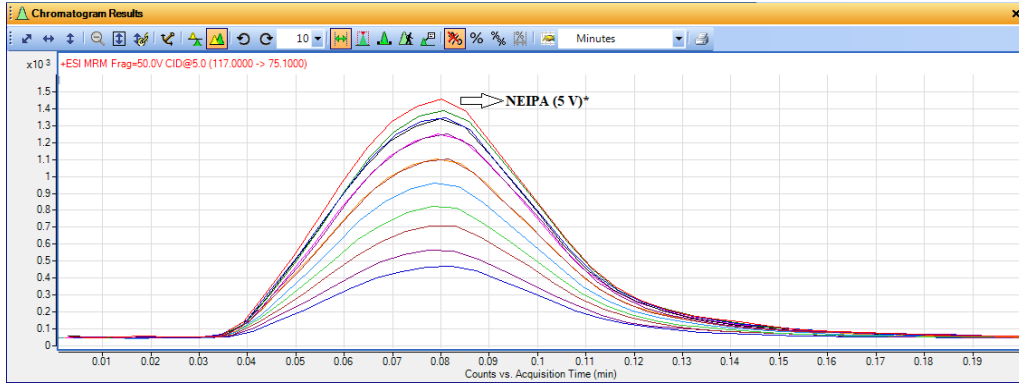
Molekül	Çarpışma Enerjisi (V)
NDMA	14 V
NDEA	06 V
NEIPA	05 V
NDIPA	10 V
NMBA	01 V
MeNP	15 V
NDBA	09 V
NMPA	18 V



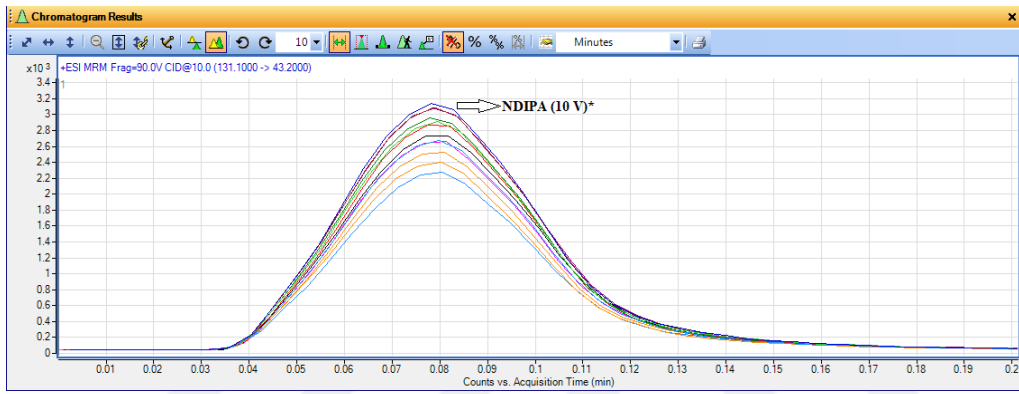
Şekil 4-25: NDMA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



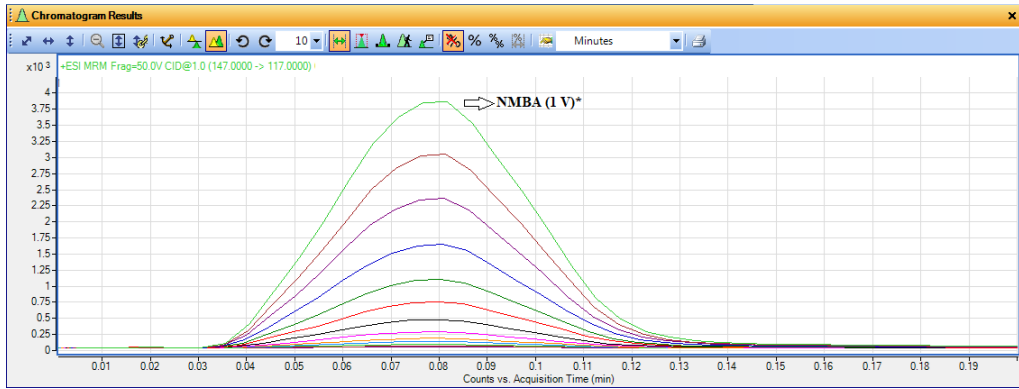
Şekil 4-26: NDEA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



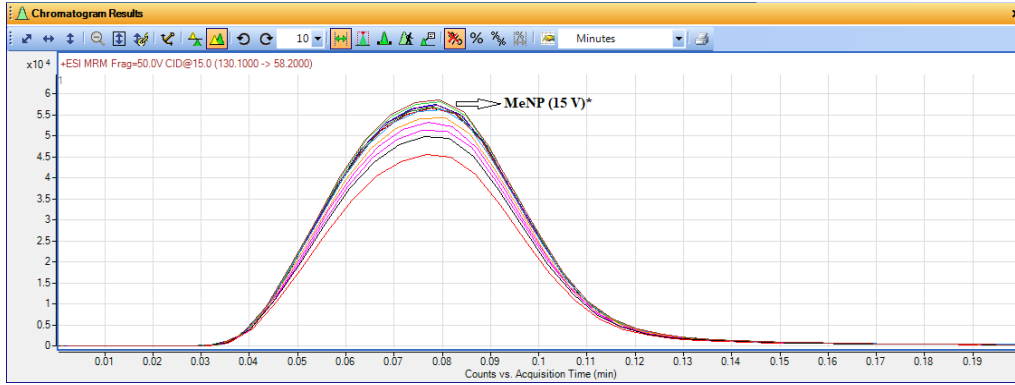
Şekil 4-27: NEIPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



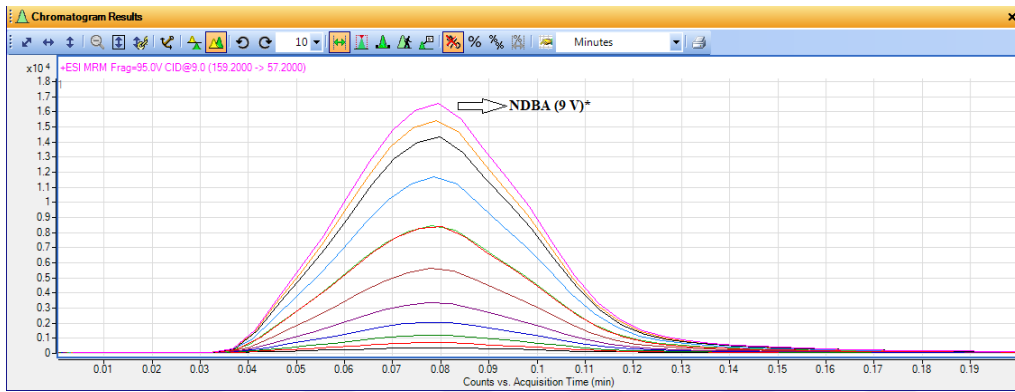
Şekil 4-28: NDIPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



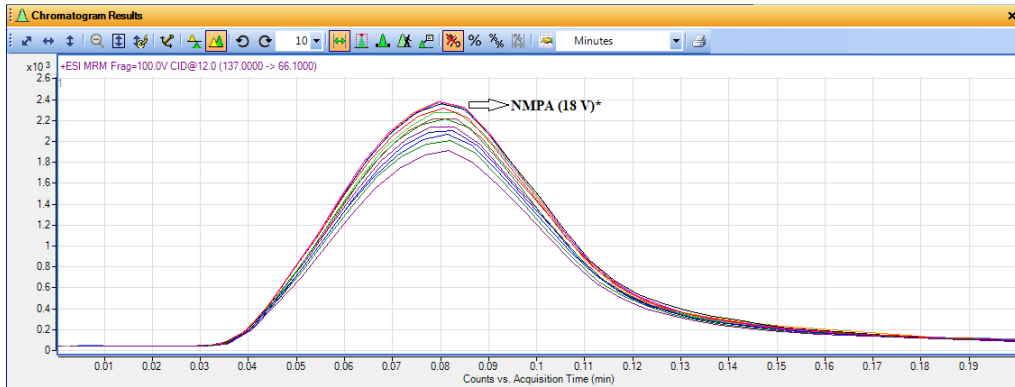
Şekil 4-29: NMBA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



Şekil 4-30: MeNP'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



Şekil 4-31: NDBA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı



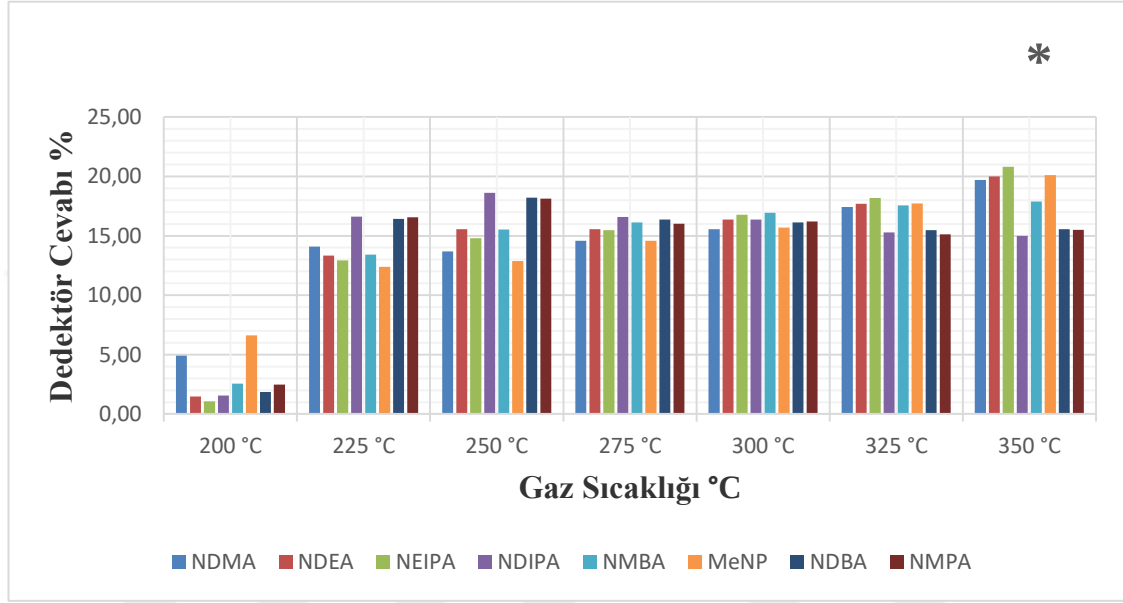
Şekil 4-32: NMPA'nın çarpışma enerjisi belirlenmesine ait kromatogramı

4.1.5. LC-MS/MS Sistemi Ortak Kaynak (Source) Parametrelerinin Belirlenmesi Çalışmaları ile İlgili Bulgular

Bölüm 3.3.3.5.'de verilen aralıklarda 100 ng/mL standart karışım çözeltisi ile çalışılmıştır. Bu ortak parametreler belirlenirken nitrozaminlerin çoğunluğunun iyi olduğu değerler belirlenmiştir.

4.1.5.1. Gaz Sıcaklığının Belirlenmesi

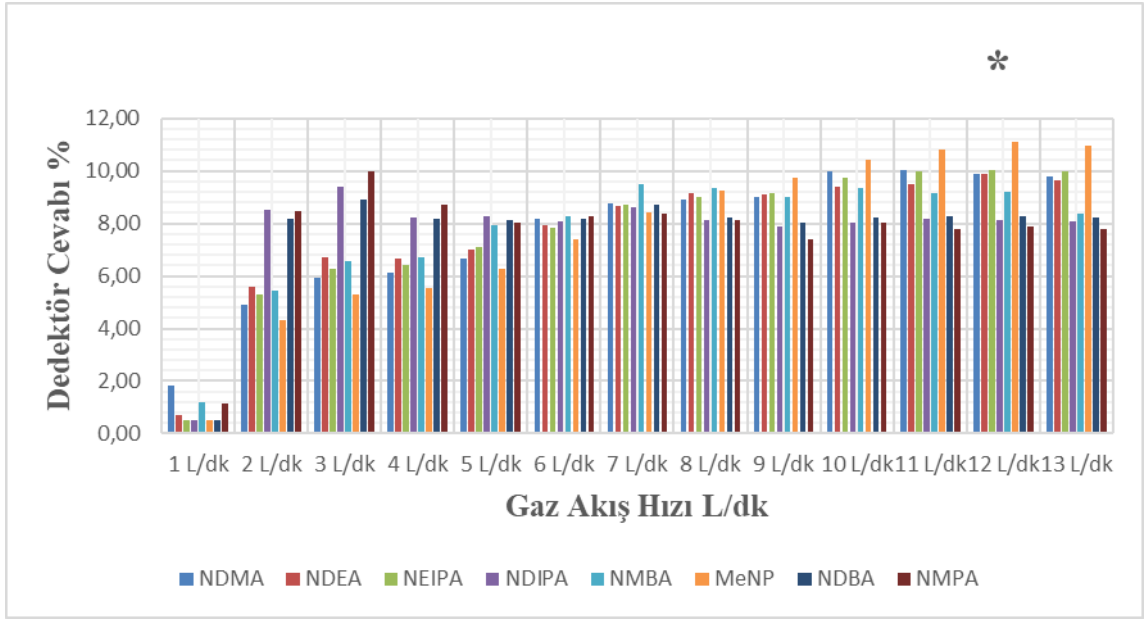
200, 225, 250, 275, 300, 325 ve 350°C değerlerindeki sıcaklıklar çalışılmıştır. Şekil 4-33’de her bir nitrozamin için değişen gaz sıcaklığı değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak gaz sıcaklığı 350°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-33: Değişen gaz sıcaklık değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.2. Gaz Akış Hızının Belirlenmesi

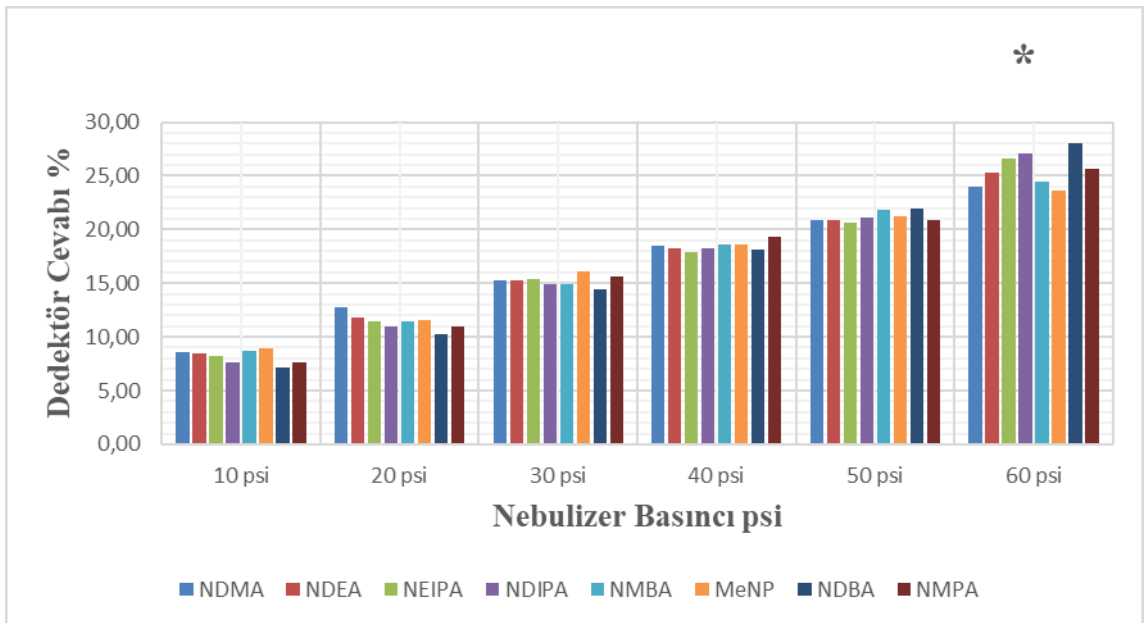
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 L/dk değerlerindeki gaz akış hızları çalışılmıştır. Şekil 4-34’de her bir nitrozamin için değişen gaz akış hızı değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak gaz akış hızı 12 L/dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-34: Değişen gaz akış hızlarının dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.3. Nebulizer Basıncının Belirlenmesi

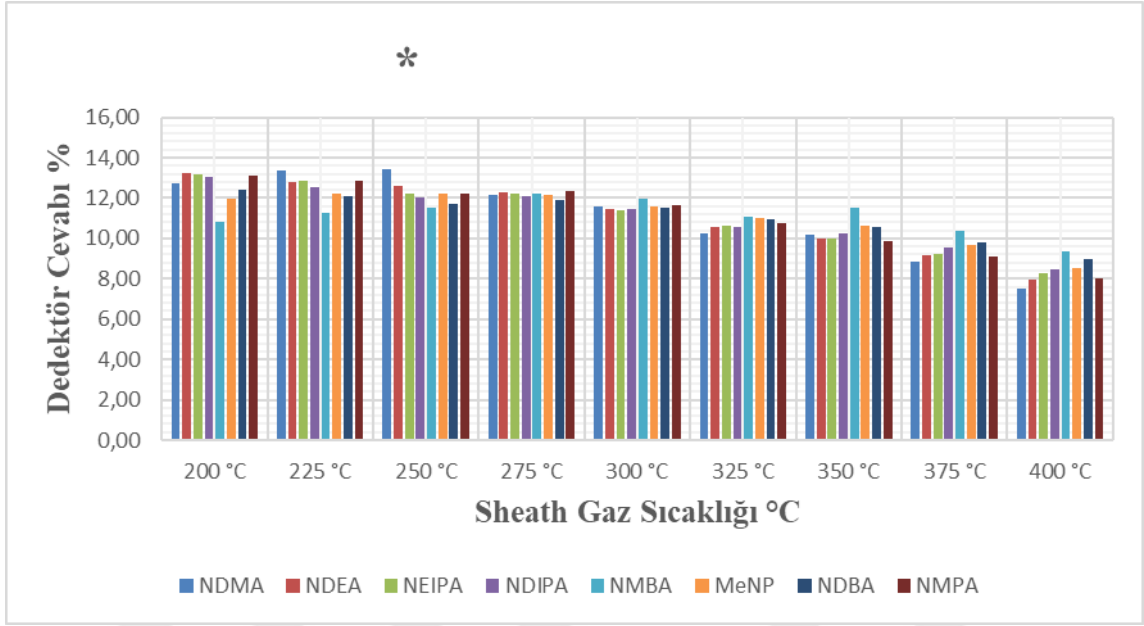
10, 20, 30, 40, 50 ve 60 psi basınç değerlerinde nebulizer basınçları çalışılmıştır. Şekil 4-35’de her bir nitrozamin için değişen nebulizer basıncı değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak nebulizer basınç değeri 60 psi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-35: Değişen nebulizer basınç değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.4. Sheath Gaz Sıcaklığının Belirlenmesi

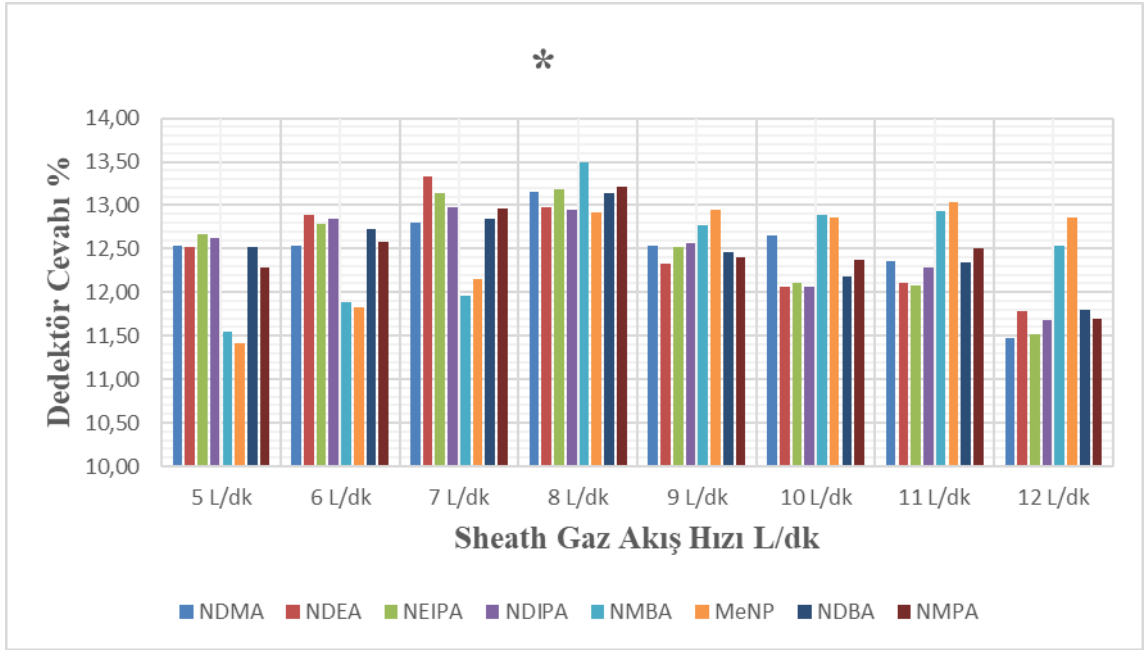
200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 ve 400°C değerlerindeki sheath gaz sıcaklıkları çalışılmıştır. Şekil 4-36'da her bir nitrozamin için değişen sheath gaz sıcaklığı değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak sheath gaz sıcaklığı 250°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-36: Değişen sheath gaz sıcaklıklarının dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.5. Sheath Gaz Akış Hızının Belirlenmesi

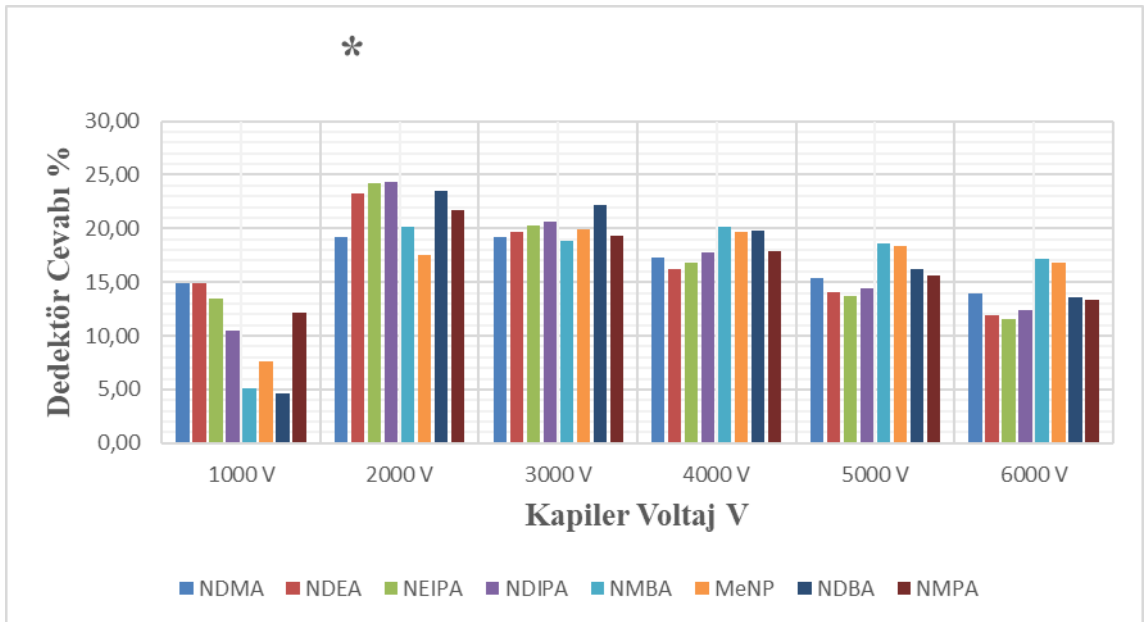
5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 L/dk değerlerindeki sheath gaz akış hızları çalışılmıştır. Şekil 4-37'de her bir nitrozamin için değişen sheath gaz akış hızı değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak sheath gaz akış hızı 8 L/dk olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-37: Değişen sheath gaz akış hızlarının dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.6. Kapiler Voltaj Değerinin Belirlenmesi

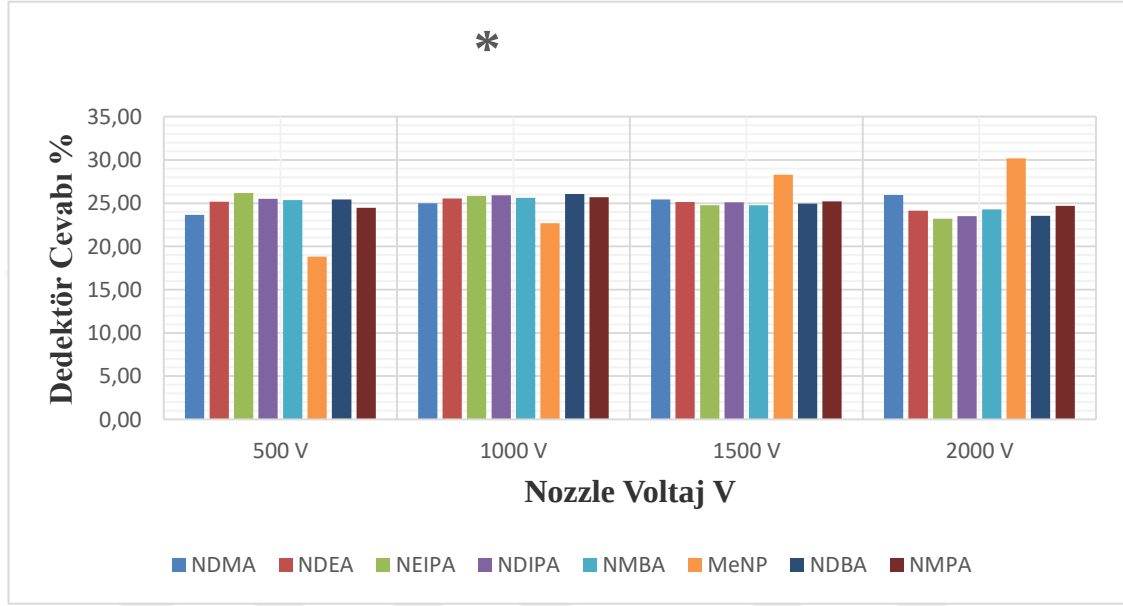
1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ve 6000 volt değerlerindeki kapiler voltajlar çalışılmıştır. Şekil 4-38’de her bir nitrozamin için değişen kapiler voltaj değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak kapiler voltaj değeri 2000 Volt olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-38: Değişen kapiler voltaj değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.5.7. Nozzle Voltaj Değerinin Belirlenmesi

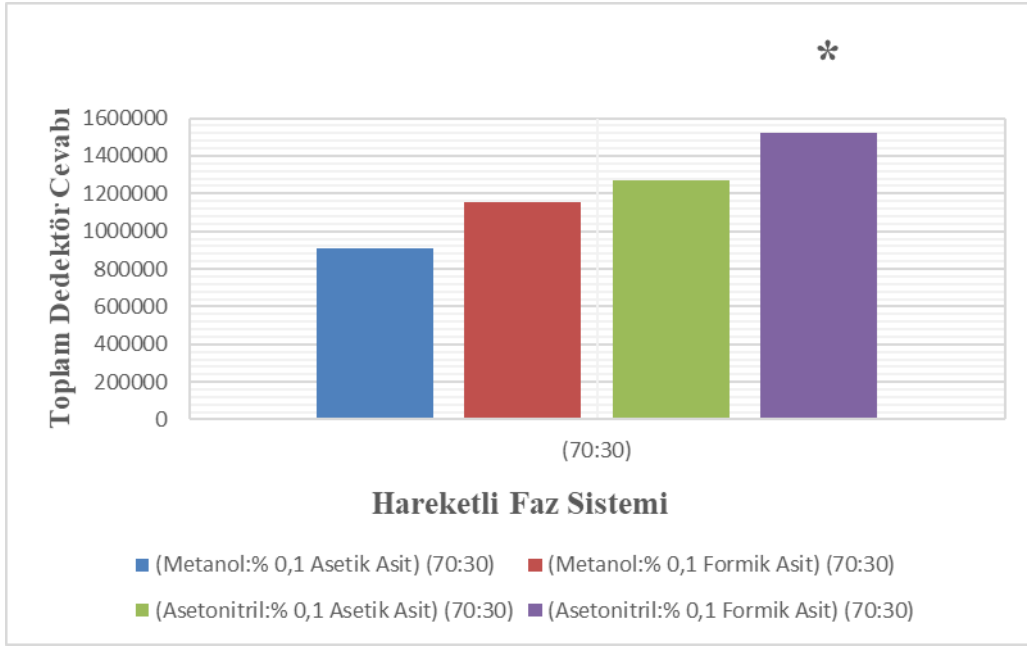
0, 500, 1000 ve 1500 volt değerlerindeki nozzle voltaj enerjileri çalışılmıştır. Şekil 4-39’da her bir nitrozamin için değişen nozzle voltaj değerlerinde dedektör cevabı gösterilmektedir. Nitrozaminler için en ideal ortak nozzle voltaj değeri 1000 Volt olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-39: Değişen nozzle voltaj değerlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.

4.1.6. Hareketli Faz Sisteminin Seçilmesi

Organik faz olarak LC-MS saflığında asetonyitril ve metanol; sulu faz olarak %0,1 formik asit ve %0,1 asetik asit’in sulu çözeltileri izokratik şartlar altında incelenmiştir. Kolonsuz olarak 70’e 30 oranında yapılan denemelerde nitrozaminlerin standart karışımı tarama modunda beklenen ana iyonların m/z kütle değerlerini kapsayacak bir kütle aralığında tarama yapılmıştır. Asetonyitril ve formik asit sisteminin diğer sistemlere göre dedektör cevabının daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4-40).



Şekil 4-40: Hareketli faz sistemlerinin dedektör cevabı üzerine etkisi.

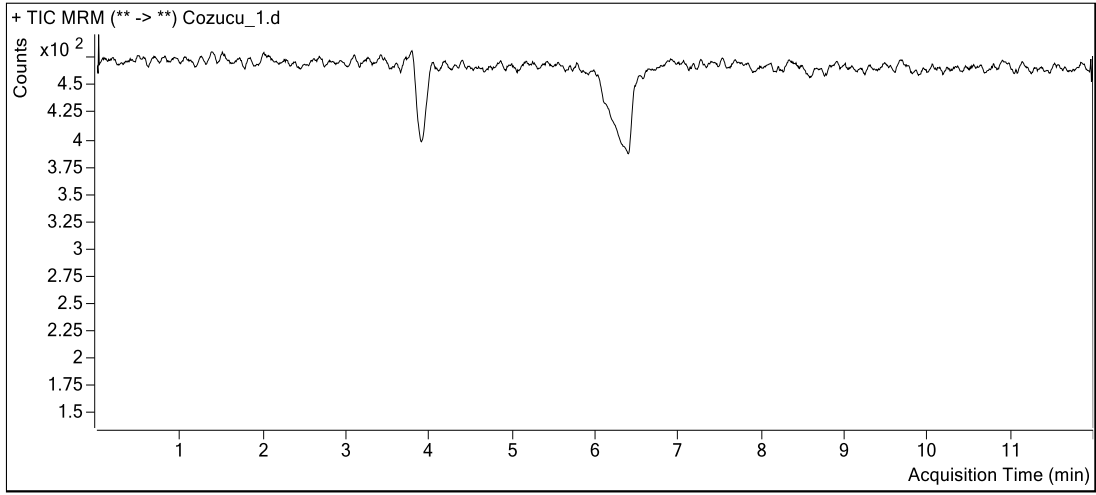
4.1.7. Kromatografik Kolon Seçimi

100 ng/mL nitrozamin karışım çözeltisi ile Bölüm 3.3.4’de belirtilen analitik kolonlar kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda nitrozaminlere ait pikler incelenerek çalışmada kullanılacak kromatografi kolonu; Inertsil ODS3-C18 olarak seçilmiştir. Kolon denemeleri sırasında mobil faz oranları da tekrar değerlendirildi. Asetonitril:%0,1 formik asit sistemi ile belirli karışım oranlarında denemeler yapılmıştır ve 90’a 10 asetonitril:%0,1 formik asit/dH₂O oranı uygun olduğu belirlenmiştir.

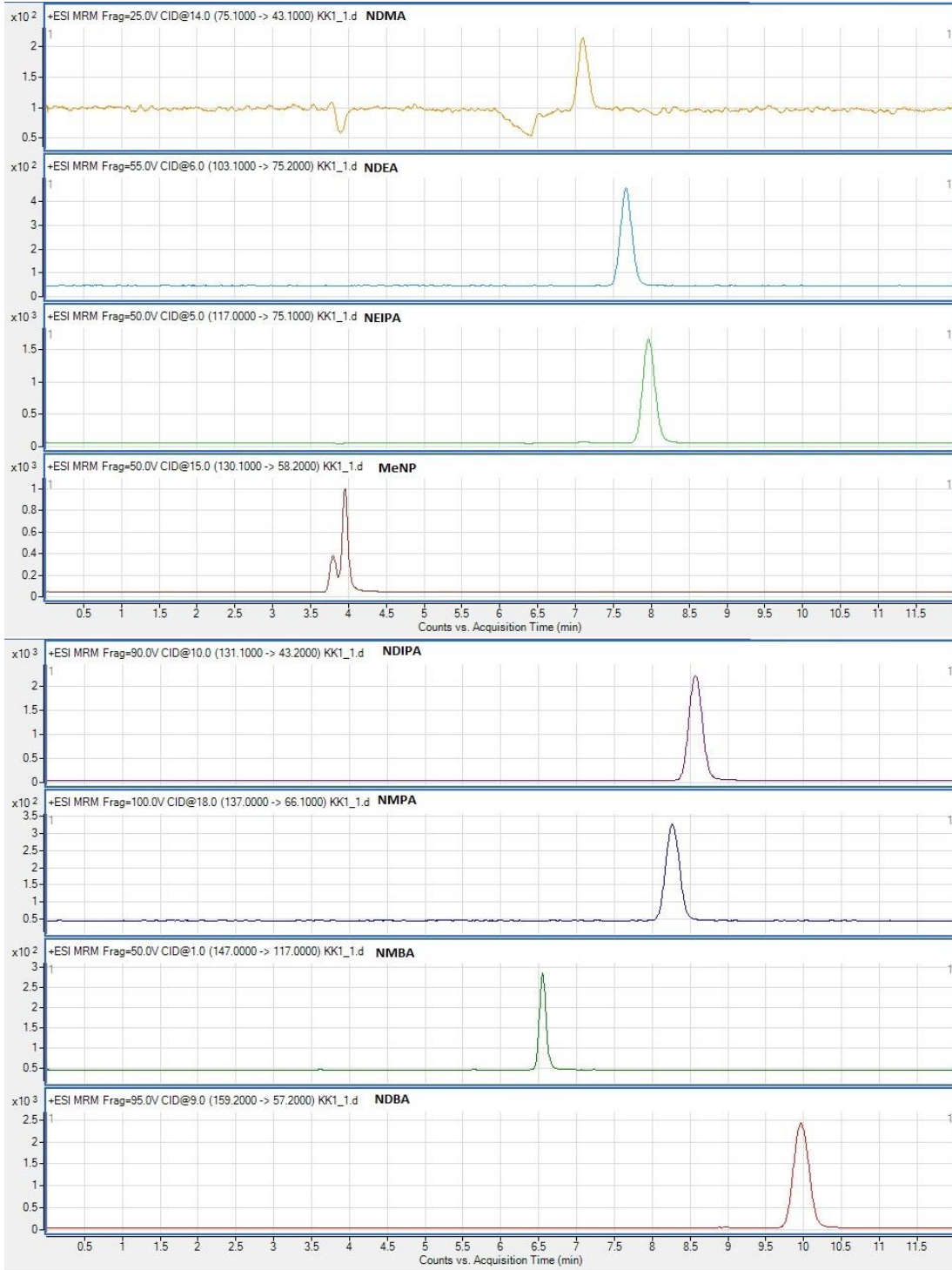
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için kör matriks yani boş çözücü kullanılmıştır. Boş çözücü örneklerinin kromatogramları incelenerek değerlendirilmiştir. Nitrozaminlerin alıkonma zamanında girişim olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, analitler ile aynı alıkonma zamanında herhangi bir girişim gözlemlenmemiştir. Boş çözücüye ait bir kromatogram Şekil 4-41’de ve nitrozaminlere ait kromatogramlar Şekil 4-42’de verilmiştir.



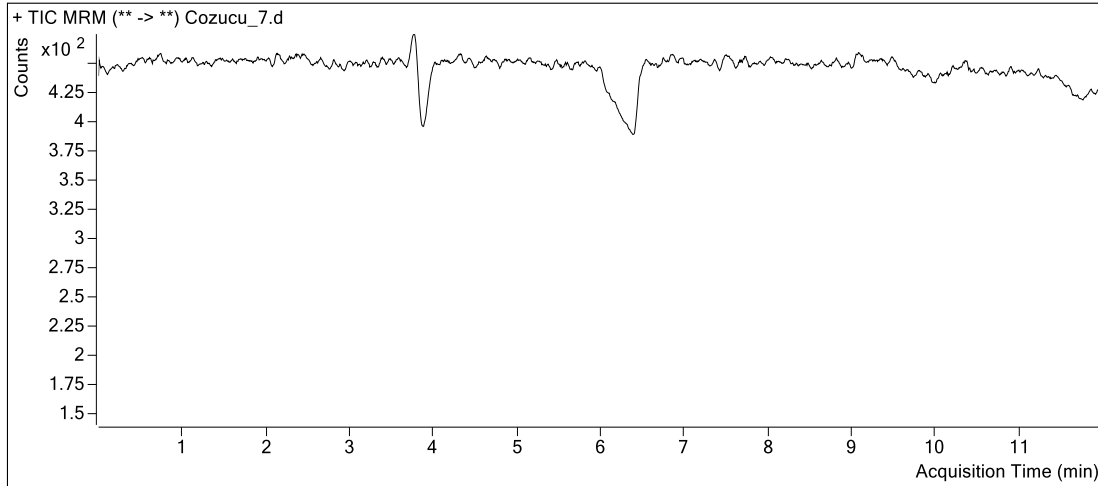
Şekil 4-41: Boş çözücüye ait kromatogram



Şekil 4-42: Nitrozaminlere ait kromatogram

4.2.2. Taşınma Etkisi

Taşınma, en yüksek kalibrasyon standardı (HLOQ) analizinden sonra boş çözücü analiz edilerek test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde taşınma olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4-43).



Şekil 4-43: En yüksek standart enjeksiyonundan sonraki boş çözücü kromatogramı

4.2.3. Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Tespit Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ) belirleme Bölüm 3.4.3.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Her bir nitrozaminin 0,05 ile 50 ng/mL arasında değişen konsantrasyonlarda içinde bulunduğu karışım çözeltileri analiz edildi. Elde edilen dedektör cevabına göre kalibrasyon eğrileri çizildi. LOD ve LOQ' u belirlemek için hem sinyal/gürültü yöntemi hem de yanıtın ve eğimin standart sapmasına dayalı yöntem için değerlendirme yapıldı. Fakat LOD ve LOQ için nihai karar bu eğrilerden elde edilen doğrusallık ve doğruluk değerlerine göre belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-5'de verilmiştir.

Tablo 4-5: LOD ve LOQ çalışmalarından elde edilen sonuçlar

Molekül	LOD ^a (ng/mL)	LOQ ^a (ng/mL)	LOD ^b (ng/mL)	LOQ ^b (ng/mL)	LOD ^b için S/N	LOQ ^b için S/N
NDMA	0,61	1,84	0,8	2,0	4,63	11,05
NDEA	0,35	1,05	0,05	0,4	4,87	35,46
NEIPA	0,31	0,94	0,2	0,5	6,26	12,14
NDIPA	0,17	0,52	0,05	0,2	14,51	34,59
NMBA	0,77	2,33	0,05	2,0	5,74	90,77
MeNP	1,12	3,40	0,05	0,8	8,70	97,94
NDBA	0,24	0,73	0,05	0,4	4,74	24,36

NMPA	0,13	0,40	0,05	0,1	6,66	12,78
------	------	------	------	-----	------	-------

a: Yanıtın ve eğimin standart sapmasına göre hesaplanan LOD ve LOQ değerleri

b: Nihai olarak belirlenen LOD ve LOQ değerleri

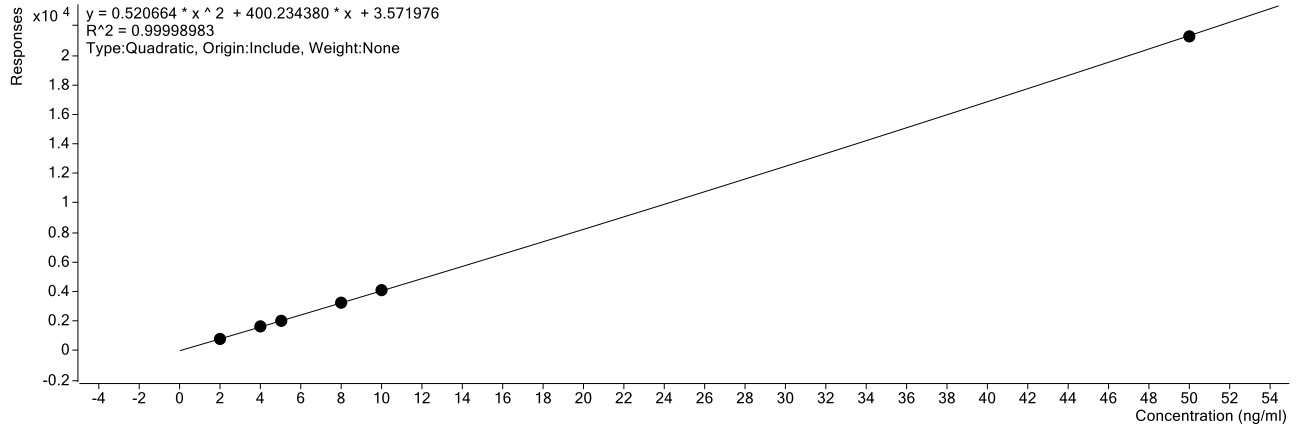
4.2.4. Kalibrasyon Eğrisi – Doğrusal Çalışma Aralığı

Doğrusallık çalışmaları Bölüm 3.4.4.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Tandem kütle dedektörünün kullanılması neticesinde en düşük konsantrasyonlara kadar düşülmesi hedeflenerek çalışmalar yapılmıştır. Her bir nitrozamin için 6 noktadan oluşan doğrusal bir çalışma aralığı belirlenmiştir. Bu çalışma aralıkları Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Analiz sonucu elde edilen dedektör cevapları cihaz programı vasıtasıyla konsantrasyona karşı grafiği çizilerek her analit için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4-44'den Şekil 4-51'e kadar verilmiştir. Kalibrasyon noktalarının doğruluk ve kesinlik hesaplamaları Tablo 4-7'den Tablo 4-14'e kadar verilmiştir. Elde edilen korelasyon katsayıları (r^2), kalibrasyon eğrisi seviyelerinin doğruluk ve kesinlik sonuçları uygun bulunmuştur.

Tablo 4-6: Nitrozaminlerin çalışma aralıkları ve korelasyon katsayıları (r^2)

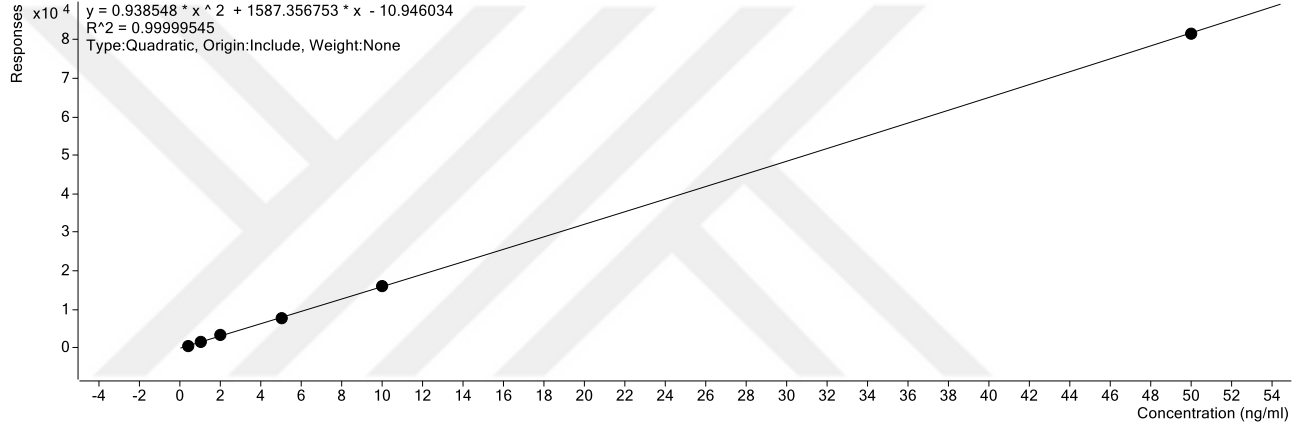
Molekül	Çalışma Aralığı (ng/mL)	Korelasyon Katsayısı (r^2)
NDMA	2,0 - 50	>0,999
NDEA	0,4 - 50	>0,999
NEIPA	0,5 - 50	>0,999
NDIPA	0,2 - 50	>0,999
NMBA	2,0 - 50	>0,999
MeNP	0,8 - 50	>0,999
NDBA	0,4 - 50	>0,999
NMPA	0,1 - 50	>0,999

NDMA - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 0 QCs
 $y = 0.520664 * x^2 + 400.234380 * x + 3.571976$
 $R^2 = 0.99998983$
 Type:Quadratic, Origin:Include, Weight:None



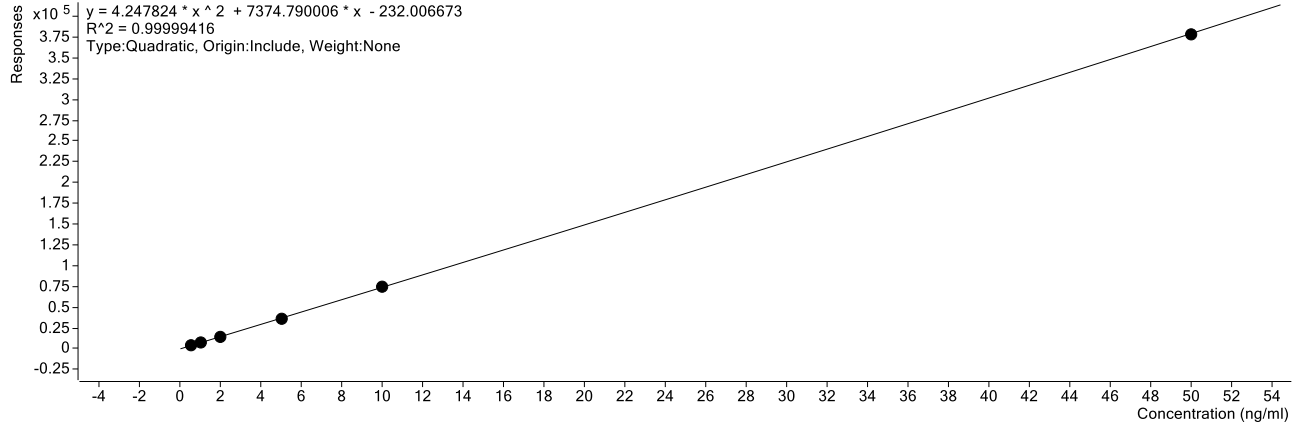
Şekil 4-44: NDMA'ya ait kalibrasyon eğrisi

NDEA - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 0 QCs
 $y = 0.938548 * x^2 + 1587.356753 * x - 10.946034$
 $R^2 = 0.99999545$
 Type:Quadratic, Origin:Include, Weight:None

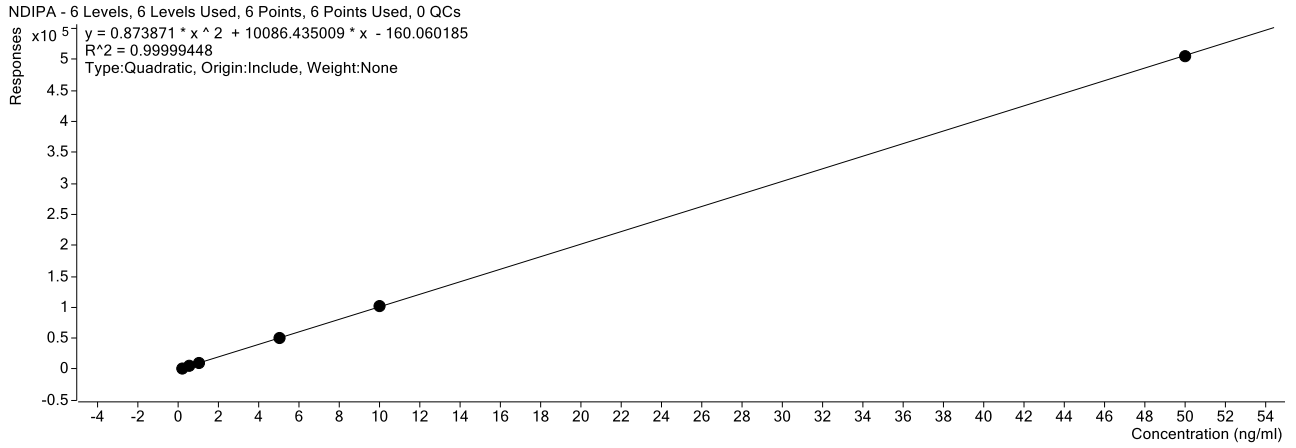


Şekil 4-45: NDEA'ya ait kalibrasyon eğrisi

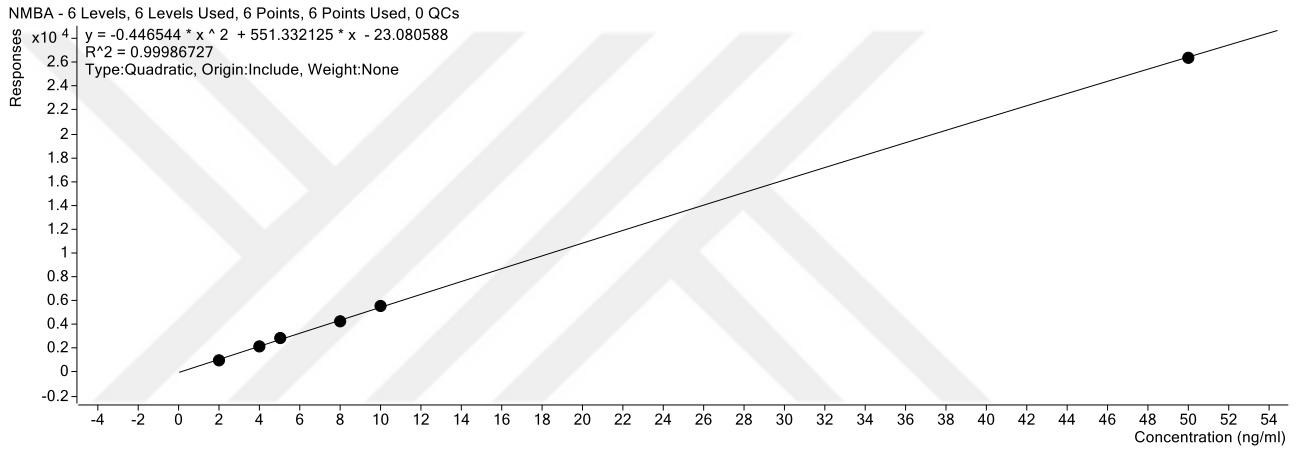
NEIPA - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 0 QCs
 $y = 4.247824 * x^2 + 7374.790006 * x - 232.006673$
 $R^2 = 0.99999416$
 Type:Quadratic, Origin:Include, Weight:None



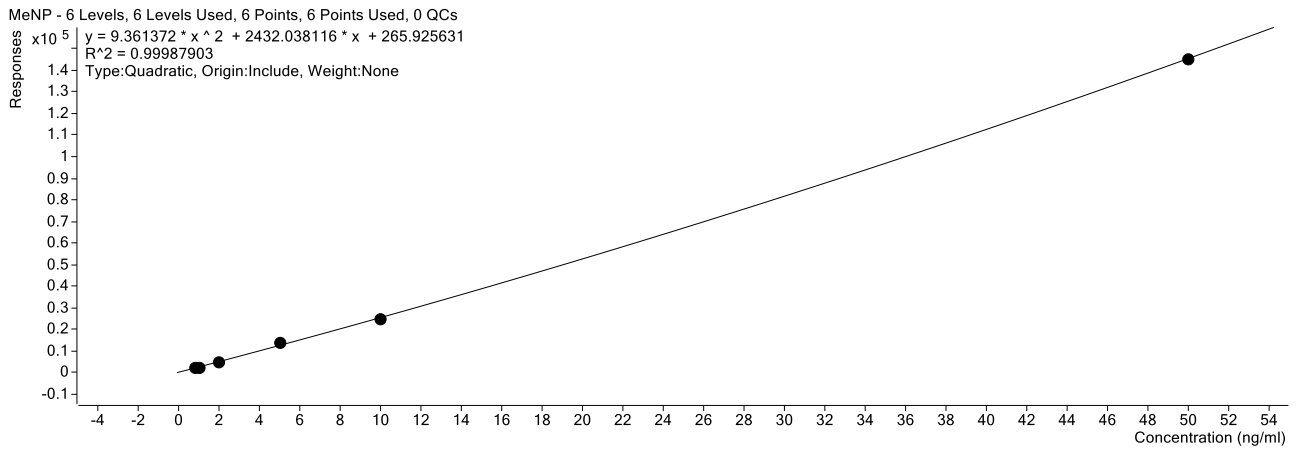
Şekil 4-46: NEIPA'ya ait kalibrasyon eğrisi



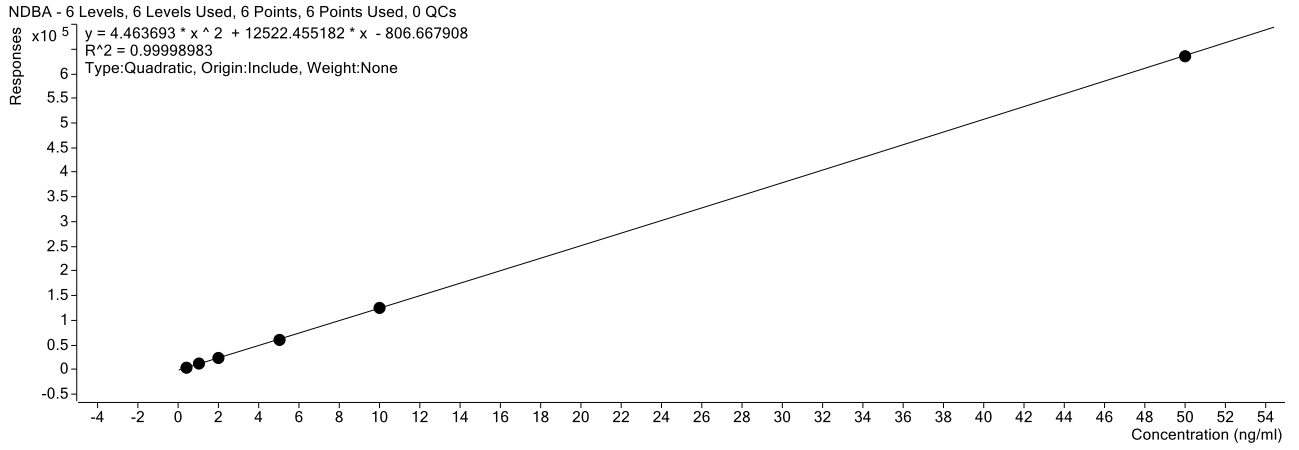
Şekil 4-47: NDIPA'ya ait kalibrasyon eğrisi



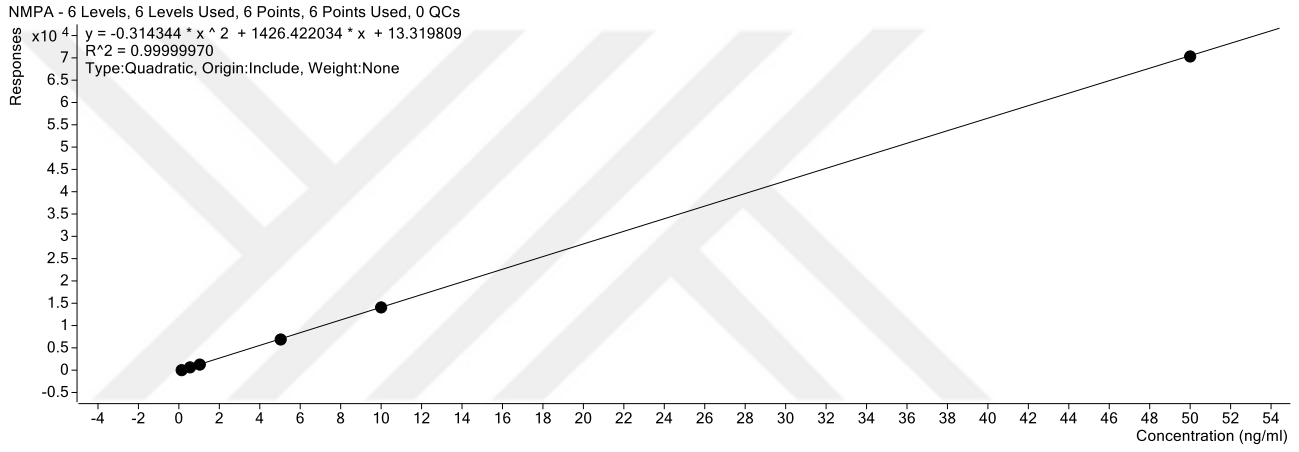
Şekil 4-48: NMBA'ya ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-49: MeNP'ya ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-50: NDBA'ya ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-51: NMPA'ya ait kalibrasyon eğrisi

Tablo 4-7: NDMA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) ± Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	2	1,98 ± 0,03	99,13	1,69
	4	4,14 ± 0,06	103,38	1,55
	5	4,95 ± 0,12	98,91	2,38
	8	8,15 ± 0,12	101,83	1,52
	10	9,85 ± 0,14	98,50	1,38
	50	50,00 ± 0,002	100,00	0,004

Tablo 4-8: NDEA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,4	0,40 $\pm$ 0,01	99,07	1,87
	1	1,00 $\pm$ 0,03	100,46	3,38
	2	2,07 $\pm$ 0,01	103,34	0,61
	5	4,94 $\pm$ 0,03	98,87	0,64
	10	10,02 $\pm$ 0,01	100,15	0,14
	50	50,00 $\pm$ 0,0003	100,00	0,001

Tablo 4-9: NEIPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,5	0,50 $\pm$ 0,01	100,46	1,76
	1	1,01 $\pm$ 0,02	100,67	1,62
	2	1,98 $\pm$ 0,03	99,23	1,71
	5	5,02 $\pm$ 0,13	100,41	2,56
	10	9,99 $\pm$ 0,07	99,91	0,66
	50	50,00 $\pm$ 0,001	100,0003	0,003

Tablo 4-10: NDIPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,2	0,21 $\pm$ 0,004	105,67	1,66
	0,5	0,50 $\pm$ 0,01	100,21	1,46
	1	1,01 $\pm$ 0,01	101,08	0,54
	5	4,92 $\pm$ 0,01	98,36	0,26
	10	10,04 $\pm$ 0,01	100,44	0,07
	50	50,00 $\pm$ 0,0002	100,00	0,0004

Tablo 4-11: NMBA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	2	1,85 $\pm$ 0,09	92,72	4,80
	4	4,08 $\pm$ 0,09	102,11	2,11
	5	5,25 $\pm$ 0,11	105,07	2,17
	8	7,80 $\pm$ 0,27	97,44	3,43
	10	9,94 $\pm$ 0,13	99,37	1,27
	50	50,09 $\pm$ 0,15	100,17	0,29

Tablo 4-12: MeNP kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,8	0,93 $\pm$ 0,04	116,60	3,79
	1	0,93 $\pm$ 0,07	93,31	7,15
	2	1,84 $\pm$ 0,11	91,94	6,21
	5	5,45 $\pm$ 0,05	109,05	0,89
	10	9,79 $\pm$ 0,01	97,89	0,06
	50	50,00 $\pm$ 0,001	100,01	0,001

Tablo 4-13: NDBA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,4	0,45 $\pm$ 0,02	113,01	4,77
	1	0,97 $\pm$ 0,05	97,43	5,05
	2	1,93 $\pm$ 0,05	96,54	2,42
	5	4,91 $\pm$ 0,06	98,10	1,31
	10	10,07 $\pm$ 0,03	100,70	0,29
	50	50,00 $\pm$ 0,001	100,00	0,001

Tablo 4-14: NMPA kalibrasyon eğrisi için doğruluk ve kesinlik çalışmaları (n=3)

Validasyon Serisi	Kalibrasyon Eğrisi Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	0,1	0,10 $\pm$ 0,01	97,70	7,30
	0,5	0,50 $\pm$ 0,01	99,87	1,72
	1	1,00 $\pm$ 0,01	100,31	0,81
	5	5,03 $\pm$ 0,06	100,63	1,21
	10	9,98 $\pm$ 0,03	99,82	0,33
	50	50,00 $\pm$ 0,001	100,00	0,002

4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik için yapılan çalışmalar Bölüm 3.4.5. ve 3.4.6.'da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

8 adet nitrozaminin her biri için ayrı ayrı Tablo 4-15'den Tablo 4-22'e kadar üç validasyon serisinde, her biri altı tekrarlı ve üç farklı konsantrasyon seviyesinde kalite kontrol örnekleri için gün içi ortalama konsantrasyon, %doğruluk, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) hesaplamaları gösterilmektedir. Tablo 4-23'den Tablo 4-30'a kadar üç validasyon serisinin günler arası ortalama konsantrasyon, %doğruluk, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) hesaplamaları gösterilmektedir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre yöntemin doğruluğu ve kesinliği uygun bulunmuştur.

Tablo 4-15: NDMA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	2,95 $\pm$ 0,04	98,21	1,44
	15	14,44 $\pm$ 0,52	96,29	3,57
	50	50,48 $\pm$ 1,57	100,96	3,12
VAL 2	3	3,29 $\pm$ 0,23	109,57	6,88
	15	15,21 $\pm$ 0,17	101,42	1,10
	50	49,73 $\pm$ 1,87	99,45	3,76

	3	3,14 ± 0,25	104,75	7,81
VAL 3	15	15,76 ± 0,44	105,07	2,79
	50	52,80 ± 1,87	105,60	3,54

Tablo 4-16: NDEA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) ± Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
	3	2,99 ± 0,08	99,60	2,61
VAL 1	15	15,35 ± 0,45	102,34	2,91
	50	50,05 ± 0,75	100,10	1,51
	3	3,14 ± 0,06	104,75	1,78
VAL 2	15	14,87 ± 0,08	99,12	0,56
	50	48,83 ± 0,76	97,66	1,55
	3	3,00 ± 0,10	99,87	3,25
VAL 3	15	15,03 ± 0,27	100,17	1,83
	50	50,09 ± 1,31	100,18	2,61

Tablo 4-17: NEIPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) ± Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
	3	2,95 ± 0,09	98,45	3,02
VAL 1	15	15,53 ± 0,78	103,54	5,01
	50	52,22 ± 1,46	104,44	2,80
	3	3,16 ± 0,07	105,22	2,08
VAL 2	15	14,85 ± 0,20	99,03	1,35
	50	49,12 ± 1,03	98,24	2,11
	3	2,98 ± 0,11	99,35	3,59
VAL 3	15	15,17 ± 0,39	101,16	2,60

50	51,02 ± 1,58	102,04	3,10
----	--------------	--------	------

Tablo 4-18: NDIPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) ± Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	3,00 ± 0,02	99,87	0,78
	15	15,45 ± 0,32	103,02	2,05
	50	50,08 ± 0,66	100,15	1,32
VAL 2	3	2,98 ± 0,02	99,27	0,62
	15	14,78 ± 0,04	98,52	0,30
	50	49,05 ± 0,16	98,10	0,32
VAL 3	3	2,97 ± 0,06	99,15	2,03
	15	14,77 ± 0,15	98,44	1,00
	50	49,72 ± 0,60	99,45	1,20

Tablo 4-19: NMBA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) ± Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	2,59 ± 0,15	86,38	5,73
	15	15,22 ± 0,50	101,48	3,27
	50	51,45 ± 1,39	102,89	2,71
VAL 2	3	3,13 ± 0,11	104,21	3,67
	15	15,80 ± 0,40	105,36	2,53
	50	51,44 ± 1,89	102,88	3,67
VAL 3	3	2,95 ± 0,12	98,26	4,22
	15	15,65 ± 0,54	104,35	3,44
	50	52,60 ± 2,17	105,20	4,13

Tablo 4-20: MeNP için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	3,33 $\pm$ 0,26	111,00	7,74
	15	12,75 $\pm$ 0,61	85,01	4,76
	50	55,12 $\pm$ 3,52	110,23	6,39
VAL 2	3	3,32 $\pm$ 0,21	110,72	6,36
	15	13,06 $\pm$ 0,45	87,07	3,46
	50	48,10 $\pm$ 3,18	96,19	6,60
VAL 3	3	3,26 $\pm$ 0,17	108,67	5,25
	15	13,98 $\pm$ 0,36	93,18	2,58
	50	50,59 $\pm$ 1,71	101,18	3,38

Tablo 4-21: NDBA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	2,80 $\pm$ 0,18	93,30	6,49
	15	14,38 $\pm$ 0,66	95,87	4,62
	50	46,22 $\pm$ 3,03	92,43	6,55
VAL 2	3	2,88 $\pm$ 0,13	96,12	4,40
	15	14,38 $\pm$ 0,49	95,85	3,38
	50	45,75 $\pm$ 2,13	91,49	4,65
VAL 3	3	2,87 $\pm$ 0,12	95,78	4,20
	15	14,17 $\pm$ 0,58	94,46	4,07
	50	46,87 $\pm$ 1,85	93,75	3,94

Tablo 4-22: NMPA için gün içi doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=6)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1	3	2,98 $\pm$ 0,07	99,33	2,40
	15	15,20 $\pm$ 0,34	101,30	2,24
	50	51,19 $\pm$ 1,00	102,38	1,95
VAL 2	3	2,99 $\pm$ 0,04	99,69	1,50
	15	14,55 $\pm$ 0,06	96,99	0,40
	50	48,22 $\pm$ 0,64	96,44	1,33
VAL 3	3	2,91 $\pm$ 0,09	96,92	2,93
	15	14,38 $\pm$ 0,10	95,88	0,68
	50	49,21 $\pm$ 0,54	98,41	1,10

Tablo 4-23: NDMA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	3,13 $\pm$ 0,23	104,18	7,43
	15	15,14 $\pm$ 0,67	100,92	4,44
	50	51,00 $\pm$ 2,14	102,01	4,20

Tablo 4-24: NDEA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	3,04 $\pm$ 0,10	101,41	3,42
	15	15,08 $\pm$ 0,35	100,54	2,35
	50	49,66 $\pm$ 1,10	99,31	2,21

Tablo 4-25: NEIPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	3,03 $\pm$ 0,12	101,01	4,12
	15	15,19 $\pm$ 0,56	101,24	3,70
	50	50,79 $\pm$ 1,84	101,57	3,63

Tablo 4-26: NDIPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	2,98 $\pm$ 0,04	99,43	1,26
	15	15,00 $\pm$ 0,38	99,99	2,55
	50	49,62 $\pm$ 0,66	99,23	1,32

Tablo 4-27: NMBA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	2,89 $\pm$ 0,26	96,28	8,98
	15	15,56 $\pm$ 0,52	103,73	3,33
	50	51,83 $\pm$ 1,82	103,66	3,52

Tablo 4-28: MeNP için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	3,30 $\pm$ 0,21	110,13	6,22
	15	13,26 $\pm$ 0,70	88,42	5,30
	50	51,27 $\pm$ 4,05	102,54	7,90

Tablo 4-29: NDBA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	2,85 $\pm$ 0,14	95,07	4,99
	15	14,31 $\pm$ 0,55	95,40	3,87
	50	46,28 $\pm$ 2,29	92,56	4,96

Tablo 4-30: NMPA için günler arası doğruluk ve kesinlik hesaplamaları (n=18)

Validasyon Serisi	KK Konsantrasyonu (ng/mL)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (ng/mL) $\pm$ Standart Sapma	%Doğruluk	%RSD
VAL 1-3	3	2,96 $\pm$ 0,08	98,65	2,54
	15	14,71 $\pm$ 0,41	98,06	2,79
	50	49,54 $\pm$ 1,46	99,08	2,94

4.2.6. Stabilité

Stabilité çalışmaları Bölüm 3.4.8’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar uygun bulunmuştur ve Tablo 4-31’de verilmiştir.

Tablo 4-31: Stabilité sonuçları

Molekül	Stok Çözelti Stabilitesi %Hata (1 Gün)	Kısa Dönem Stabilitesi %Hata (6 Saat)	Otoörnekleyici Stabilitesi %Hata (24 Saat)
NDMA	-4,07	0,81	-7,61
NDEA	-3,54	-0,48	-3,18
NEIPA	-0,44	-1,17	-1,11
NDIPA	-3,41	-0,01	-2,57
NMBA	-2,13	1,78	-5,76
MeNP	-0,46	0,07	-3,21

NDBA	-1,82	-2,53	1,16
NMPA	-3,65	0,88	-3,17

4.2.7. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluğu için yapılan çalışmalar Bölüm 3.4.9’da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar uygun bulunmuştur ve Tablo 4-32’de verilmiştir.

Tablo 4-32: Sistem uygunluk testi sonuçları

Analit	Alıkonma Zamanı (dk)	Teorik Plaka Sayısı (N)	Ayrırma Gücü (Rs)	Kapasite Faktörü (k')	Kuyruklanma Faktörü (T)	Enjeksiyon Kesinliği (RSD)
NDMA	7,11	13102	57,2	70,1	1,1	1,23
NDEA	7,67	11797	54,3	75,7	1,1	1,25
NEIPA	7,97	10930	52,3	78,7	1,1	1,76
NDIPA	8,57	11320	53,2	84,7	1,1	0,20
NMBA	6,55	29056	85,2	64,5	1,1	1,70
MeNP	3,80	8951	47,3	37,0	1,0	1,57
NDBA	9,97	13061	57,1	98,7	1,1	0,64
NMPA	8,27	9726	49,3	81,7	1,1	0,90

4.3. Farmasötik Preparatlara Uygulama ile İlgili Bulgular

4.3.1. Ekstraksiyon Yönteminin Geliştirilmesi

Ekstraksiyon yönteminin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar Bölüm 3.5.1.’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. 4 farklı ekstraksiyon yöntemi ile yapılan denemelerden elde edilen dedektör cevapları ile standart nitrozamin çözeltilerinden elde edilen dedektör cevaplarının karşılaştırılması ile matriks etkileri Denklem 3-5 ile hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre matriks etkisinin en az olduğu ekstraksiyon yöntemi yöntem 4 olarak görülmektedir. Yöntem 4’de n-hekzan ve asetonitrilin 1 e 1 oranında karıştırılması ve asetonitril ve n-hekzanın ayrı ayrı viallenip analiz edilmesiyle

nitrozaminlerin asetonitrile geçme oranı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-33’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre ekstraksiyon yöntemi olarak Yöntem 4 seçilmiştir.

Tablo 4-33: Ekstraksiyon yöntemlerinin matriks etkisi sonuçları

Analit	Yöntem 1 %ME (ACN)	Yöntem 2 %ME (MeOH)	Yöntem 3 %ME (n-hekzan)	Yöntem 4 %ME (ACN/n-hekzan 1:1)	Yöntem 4’de nitrozaminlerin n- hekzandan ACN’ye geçme yüzdesi (%)
NDMA	-87,2	85,2	6,2	-9,7	90,4
NDEA	-26,2	-14,8	14,1	10,4	90,9
NEIPA	-27,2	-3,8	27,8	-13,8	84,5
NDIPA	18,4	25,3	20,1	0,7	88,9
NMBA	68,9	95,7	2,4	2,1	90,9
MeNP	50,3	67,2	-14,6	-16,0	92,8
NDBA	3,5	3,9	-8,7	-4,3	83,1
NMPA	15,8	30,3	0,5	7,1	91,3

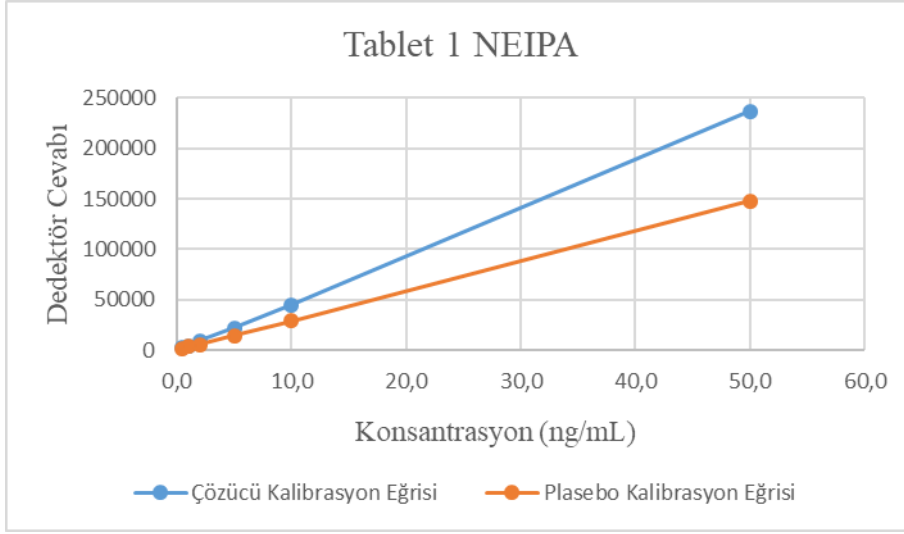
4.3.2. Uygulama Yapılan Farmasötik Preparatlar

Geliştirilen yöntemle bir çok farklı türde farmasötik preparat üzerinde uygulama yapılmıştır. Bu preparatlar; 3 farklı tablet, kapsül, jel, krem, merhem, sprey, gargara ve enjeksiyonluk çözelti üründür. Farmasötik preparatlar çalışılırken hem çözücüde hazırlanmış nitrozamin kalibrasyon standartları ve kalite kontrol örnekleri hemde farmasötik ürüne ait plasebo içinde hazırlanmış nitrozamin kalibrasyon standartları ve kalite kontrol örnekleri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Çözücü ve plaseboda hazırlanan bu numunelerin sonuçlarıyla matriks etkileri Denklem 3-5 ile hesaplanmıştır. Elde edilen %Me sonuçları uygun bulunmuştur ve Tablo 4-34’de verilmiştir.

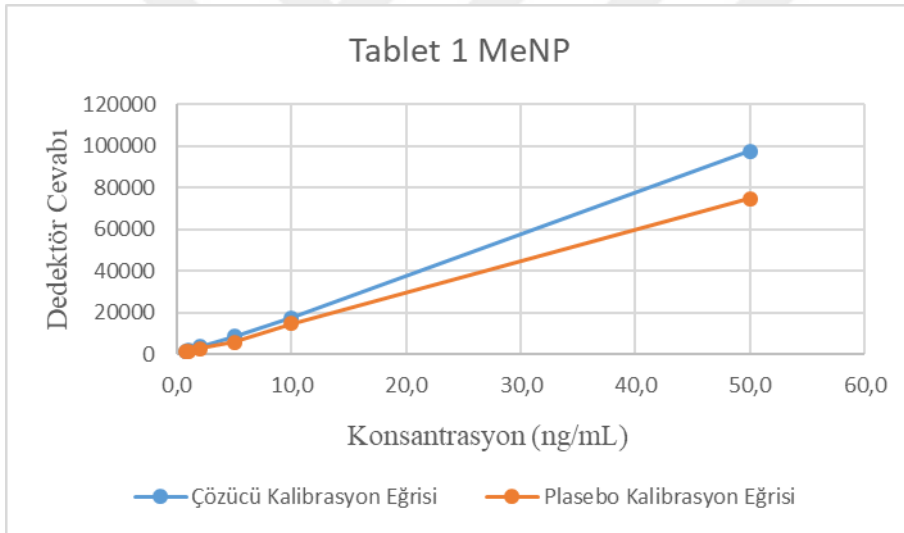
Tablo 4-34: Farmasötik preparatların matriks etkileri (%ME)

Ürün	NDMA	NDEA	NEIPA	NDIPA	NMBA	MeNP	NDBA	NMPA
Tablet 1	26,1	20,2	32,4	17,0	12,4	19,3	7,8	3,2
Tablet 2	35,7	19,2	13,1	0,2	12,1	40,7	17,3	13,5
Tablet 3	31,2	15,4	23,9	6,8	44,5	28,5	5,5	0,1
Kapsül	12,6	31,1	34,8	11,9	20,5	31,4	17,4	27,7
Jel	35,2	47,8	46,9	43,6	11,2	14,5	49,0	40,5
Krem	22,7	15,8	20,8	20,2	12,1	14,1	3,0	2,2
Merhem	0,6	9,3	11,5	13,1	1,5	8,2	7,0	0,2
Sprey	1,3	10,2	15,9	7,8	13,8	8,3	8,7	7,0
Gargara	22,3	6,1	10,0	9,8	8,4	2,3	10,0	7,6
Enjeksiyonluk Çözelti	6,7	11,6	14,4	12,8	2,6	18,9	8,4	6,6

Çözücüde ve plaseboda hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinin bazıları aşağıda Şekil 4-52 ve Şekil 4-53’de gösterilmiştir. Çalışılan numunelerin hiçbirinde nitrozamin tespit edilmemiştir.



Şekil 4-52: Tablet 1 ürünündeki NEIPA çözücü ve plasebo kalibrasyon eğrisi



Şekil 4-53: Tablet 1 ürünündeki MeNP çözücü ve plasebo kalibrasyon eğrisi

5. TARTIŞMA

2018'den beri birçok ilaçta kabul edilemez seviyelerde nitrozamin içerdiği bulunmuştur. Yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan sartan grubu, mide asidi üretimini azaltmak için kullanılan ranitidin, tip 2 diyabet tedavisi için kullanılan metformin, tüberküloz tedavisinde kullanılan rifampin ve nikotin bağımlılığı tedavisinde kullanılan vareniklin gibi ilaçlarda kanserojen etkileri olan nitrozamin safsızlıklarının yakın zamanda beklenmedik bulgusu, FDA ve EMA gibi uluslararası düzenleyicileri, etkilenen API'ler ve ilaç ürünlerindeki bu safsızlıkların ayrıntılı bir analizini yapmaya yönlendirmiştir. Sadece bazı ilaç ürünlerinde nitrozamin safsızlıkları bulunmasına ve bu safsızlıkların kabul edilemez seviyeleri olduğunda bu ürünlerin partileri geri çağırılmasına rağmen, nitrozamin safsızlıkları üretebilecek hassas süreçlerin ve malzemelerin kullanımı nedeniyle diğer API'lerde ve ilaç ürünlerinde de nitrozamin safsızlıkları bulunabileceği gerçeğini ortaya koymuştur. Nitrozamin safsızlıkları yüksek derecede mutajenik ve kanserojen özelliklerde olduğundan, API'lerde ve ilaç ürünlerinde sınırlar kabul edilebilir olmalıdır. FDA ve EMA gibi düzenleyici otoriteler, bu safsızlıkları kabul edilebilir seviyelerde kontrol etmek ve analiz etmek için ilaç üretimine rehberlik edecek çeşitli bildirimler yayınlamışlardır. Uluslararası otoriteler tarafından ilk başta az sayıda nitrozamin bileşiği için incelemeler yapılırken daha sonra gözlem altına alınan nitrozamin bileşiklerinin sayısı da artmıştır. Nitrozamin safsızlıklarının çok düşük seviyelerine maruz kalmanın neden olduğu genetik materyallerdeki değişiklikler kansere yol açabilir. Kanser, dünyada kalp-damar ölümlerinden sonra en çok görülen ikinci ölüm nedenidir (53). Dünyada her 6 ölümden biri, ülkemizde her 5 ölümden biri kanser nedeniyledir (54). Bu nedenle, halk sağlığı güvenliğini sağlamak için ilaçlardaki nitrozamin safsızlıklarını çok düşük seviyelerde belirlemek önemlidir. Nitrozamin safsızlıklarında belirleme için en çok kullanılan analitik yöntemler, LC-MSMS ve GC-MSMS teknikleridir. LC-MSMS yöntemleri, ilaç ürünleri ve ilaç maddelerinden nitrozamin safsızlıklarının belirlenmesi için en güvenilir tekniktir.

Yapılan literatür araştırmalarında, farmasötik preparat örneklerinde nitrozaminlerin miktar tayini için LC-MS/MS (28-38), GC-MS/MS (39-45), HPLC-FLD (46, 47) ve HPLC-UV (48) yayınları mevcuttur. LC-MS/MS yayınlarına

bakıldığında bu yayınların birçoğunda elde edilmiş LOQ değerlerinin, bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin LOQ değeri olan 0,1 ng/mL'den yüksek olduğu görülmektedir (28-33, 35-38). Tay ve arkadaşlarının çalışmasında (34) 5 nitrozamin çalışılmış ve 0,036 ng/mL LOQ değeri elde edilmiştir. Bu çalışmada mikro ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında, ilaç ürünlerinde görülen 8 adet nitrozaminin (NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NMBA, MeNP, NDBA ve NMPA) farmasötik preparatlarda (3 adet tablet, kapsül, jel, krem, merhem, spre, gargara ve enjeksiyonluk çözelti) miktar tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir ve bu preparatlara uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri ve literatür ile kıyaslandığında farklı tür ilaç ürünlerine uygulanabilirliği yöntemin özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Geliştirilen bu yöntem, artan nitrozamin sayısına göre modifiye edilebilir. Bu çalışma, birçok farmasötik preparatda yapılacak nitrozamin analizlerine öncülük edecektir.

Son zamanlarda Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS), yüksek hassasiyet, sağlam, düşük tespit limiti, karmaşık matriks numunelerinde çeşitli polaritelere sahip küçük ya da büyük molekülleri ve termal olarak değişken ve uçucu olmayan molekülleri analiz etme yeteneği nedeniyle analizlerde kullanılan en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Kütle spektrometresi manyetik bir alanda hareket eden yüklü molekülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırt ederek ölçme esasına göre çalışan bir cihazdır. Yüklü molekülleri oluşturmak için farklı iyon kaynakları vardır. Analizi yapılacak numunelerin özelliklerine göre elektrosprey iyonizasyon (ESI) veya atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) teknikleri kullanılabilir. Genel olarak aminler, peptidler ve proteinler gibi polar bileşiklerin analizi ESI tekniği ile, steroidler gibi apolar bileşikler ise APCI tekniği ile analiz edilir (55, 56). Her iki teknik de yumuşak iyonizasyon teknikleridir ve uçucu hareketli fazlar ile uyumludurlar. Bu çalışmada kullanılan elektrosprey iyonizasyon (ESI), LC-MS/MS için kullanılan en popüler iyonizasyon tekniklerinden biridir. Başarılı bir LC-MS/MS analizinin ve optimum sinyal yanıtının anahtarı, başarılı iyonizasyon işlemidir. Analitin maksimum iyonlaşmasını sağlamak için analitin moleküler yapısı, analitin pKa değeri, mobil fazın pH'ı, HPLC akış hızları, kapiler voltaj, püskürtücü konumu, nebulizasyon gazı ve kurutma gazı ayarları gibi birkaç faktör dikkate alınmalıdır. Mobil fazın pH değeri ve analitin pKa değeri, ESI'de iyon oluşumu için oldukça önemli parametrelerdir. LC-MS/MS analizi için mobil faz seçimi, HPLC mobil faz seçiminden farklıdır.

HPLC'de kromatografik ayırma, uygun bir mobil faz ve tamponları seçmenin ana hedefidir, LC-MS/MS için ana hedef ise, ayırmaları ve asimetric pikleri kaybetmeden iyonlaşmayı desteklemektir (57).

Bir çözücünün uçuculuğu ve proton verme yeteneği ESI'de önemlidir. ESI'de uçucu olmayan mobil fazların kullanılmasından kaçınılmalıdır. Fosfat (PO_4^{3-}), Na^+ , K^+ ve sitrat gibi uçucu olmayan tamponlar ve tuzlar kütle spektrometrisi ile uyumsuzdur. LC-MS arayüzünün işlevlerinden biri hareketli fazı buharlaştırmak olduğundan, mobil faz mutlaka uçucu olmalıdır. ESI'de büyük miktarda tampon geçirildiğinde MS'de büyük miktarlarda tuz oluşur ve bunun sürekli birikmesi kütle spektrometresi iyon kaynağının kirlenmesine ve sinyalizasyon da azalmaya neden olur. ESI iyon kaynağına sahip LC-MS cihazlarında genellikle uçucu özelliğe sahip metanol, asetonitril gibi organik çözücüler ve formik asit, asetik asit, amonyum format ve amonyum asetat'ın belli konsantrasyonlara kadarki sulu çözeltileri kullanılır. Formik asit, asetik asit ile kıyaslandığında, formik asitin genellikle asetik asite kıyasla daha düşük kontaminasyon seviyelerine sahip olduğu, formik asitin moleküllerin pik şeklini iyileştirmek için kullanıldığı ve formik asitin $[\text{M}+\text{H}]^+$ iyonları üreterek pozitif iyonizasyon modunda LC-MS analizi için protonlar veren RP-HPLC'nin yaygın olarak kullanılan bir bileşeni olduğu bilinmektedir (58, 59).

Analitlerin iyonlaşmasını sağlayarak en yüksek sinyal şiddetinin alınabilmesi ve kütle dedektör sisteminin kaynak bölümünde kalıntı oluşturmayacak bir hareketli fazın belirlenebilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Nitrozamin molekülleri ortaklanmamış elektronu olan oksijen ve azot atomlarına sahiptir. Bu durum nitrozamin moleküllerinin pozitif iyonlaşmasına oldukça uygundur. Nitrozamin moleküllerine iyon kaynağına gelmeden hareketli faz içerisinde iyonlaşmayı başlatmak amacıyla hareketli faz karışımına formik asit ya da asetik asit gibi proton verici maddelerin ilave edilmesi düşünülmüştür. Denemelerde LC-MS/MS sistemlerinde yaygın olarak kullanılan organik faz olarak asetonitril ve metanol; sulu faz olarak asetik asit ve formik asit çözeltileri Bölüm 3.3.2.'de belirtildiği gibi kullanılmıştır ve bu hareketli faz kombinasyonlarından elde edilen dedektör cevabı incelenmiştir. Bölüm 4.1.6.'da ve Şekil 4-40'da gösterildiği gibi bu çalışmada hareketli faz olarak kütle dedektöründe kalıntı oluşturmada iyonlaşmayı kolaylaştıran ve yüksek sinyalizasyon sağlayan asetonitril ve saf su içinde %0,1 formik asitten oluşan (h/h) karışım belirlenmiştir.

Nitrozaminlerin rutin analizlerinde kullanılması planlanan kromatografi kolonunun seçimi Bölüm 3.3.4.'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Sepax BR-C18, Kinetex F5 ve Inertsil ODS3-C18 ile yapılan ön denemelerde, piklerin alıkonma zamanları, şekilleri ve şiddetleri değerlendirilmiş; kolon etkinliği parametreleri incelenerek sonuçların istenilen seviyede olduğu Inertsil ODS3-C18 kromatografi kolonu seçilmiştir (Tablo 4-32). GL Sciences Inertsil ODS3-C18; temel malzemesi yüksek saflıkta silika jel, fonksiyonel grubu oktadesildir ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$). 5 μm tanecik büyüklüğüne, 4,6 mm iç çapına ve 250 mm uzunluğa sahiptir. İç yüzey alanı 450 m^2/g ve gözenek çapı 100Å (10 nm), pH aralığı 2-7,5'dir. Hareketli faz sistemi belirleme ve kolon seçimi çalışmaları sonucunda hareketli faz; asetonitril ve saf su içinde %0,1 formik asit (h/h) (90:10, h/h), (pH: 3,45) karışımı 0,4 mL/dk akış hızında izokratik olarak belirlenmiştir.

LC-MS/MS sisteminde nitrozaminlerin etkin bir analizi için en uygun parametrelerin belirlenmesi gerekmektedir. Öncelikle nitrozamin moleküllerinin ayrı ayrı standart çözeltilerin asidik hareketli faz yardımıyla analiz edilmesiyle pozitif modda ana iyonları $[\text{M}+\text{H}]^+$, parçalayıcı voltajları, parçalanma iyonları ve çarpışma enerjileri belirlenmiştir. Daha sonra nitrozamin moleküllerinin ortak standart çözeltilsinin analiz edilmesiyle ortak kaynak parametreleri olan gaz sıcaklığı, gaz akış hızı, nebulizer basıncı, kapiler voltaj ve nozzle voltaj değerleri belirlenmiştir. Elde edilen kütle geçiş değerleri her biri pozitif modda NDMA için (75,1>43,1), NDEA için (103,1>75,2), NEIPA için (117>75,1), NDIPA için (131,1>43,2), NMBA için (147>117), MeNP için (130,1>58,2), NDBA için (159,2>57,2) ve NMPA için (137>66,1) literatürle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek seçicilik ve hassasiyette analitlerin tespit edilmesi için MRM modu kullanılmıştır. Parçalanma iyonlarının belirlenmesinde, en kararlı parçalanma iyonları seçilmiştir. MRM modunda gerçekleştirilen analizlerde, en yüksek hassasiyeti elde etmek için tüm parametreler her analit için optimize edilmiştir. Analizler sonucu elde edilen veriler Bölüm 4.1'de Şekil 4-1'den Şekil 4-40'a kadar ve Tablo 4-1'den Tablo 4-4'e kadar gösterilmiştir. Yöntem geliştirme çalışmaları sonucunda elde edilen yöntem Bölüm 3.3.5.'de özetlenmiştir.

Yöntem geliştirme çalışmaları tamamlandıktan sonra en son ICH Kılavuzu Q2 (R1)'e göre validasyonu yapılmıştır.

Seçicilik çalışmalarında boş çözücü analiz edilmiştir ve hiçbir nitrozamin analitinin alıkonma zamanında herhangi bir girişim gözlenmemiştir (Şekil 4-41). Taşınma etkisi çalışmalarında ise boş çözücü en yüksek kalibrasyon standardından sonra analiz edilmiştir ve herhangi bir taşınma olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4-43).

Yapılan LOD ve LOQ belirleme çalışmalarında Bölüm 3.4.3.'de belirtildiği gibi 3 farklı yaklaşım ele alınmıştır. Bu çalışmalar 0,05-50 ng/mL arasındaki 14 konsantrasyon seviyesinde ilgili 8 nitrozamini içeren ortak karışım standartları analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. LOD ve LOQ yanıtın ve eğimin standart sapmasına dayalı yöntemle göre hesaplandığında 8 nitrozamin için LOD^a ve LOQ^a değerleri sırasıyla 0,13-1,12 ng/mL ve 0,40-3,40 ng/mL aralıklarındadır. Sinyal/gürültü oranına dayalı yöntem incelendiğinde her bir nitrozamin için elde edilen sinyal/gürültü oranları ve doğruluk değerleri değerlendirildiğinde 8 nitrozamin için nihai LOD^b ve LOQ^b değerleri sırasıyla 0,05-0,8 ng/mL ve 0,1-2,0 ng/mL aralıklarında belirlenmiştir. Nihai olarak belirlenen LOD^b için S/N ve LOQ^b için S/N değerlerine bakıldığında bazı nitrozamin için S/N değerleri LOD için 3:1 oranı LOQ için 10:1 oranları ile uyumlu gözükürken bazı nitrozaminler için S/N değerleri bu oranlardan daha yüksek gözükmemektedir. Bazı nitrozaminlerde düşük konsantrasyon seviyelerine düşüldükçe doğrusallıktan ve geri kazanım doğruluk değerlerindeki sapmadan dolayı daha düşük S/N değerlerine inilmemiştir. Belirlenen LOQ değeri kılavuzların nitrozaminler için belirlediği günlük alım limitleri ile uyumluluk göstermektedir. LOD ve LOQ belirleme çalışmalarında elde edilen tüm sonuçlar Tablo 4-5'de özetlenmiştir.

Validasyon çalışmaları öncesi sistemin ve kromatografik şartların, analizlerin gerçekleştirilebilmesine uygun olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu kapsamda sistem uygunluk testi Bölüm 3.4.9.'da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Herbir nitrozamin için elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları Tablo 4-32'de özetlenmiştir. Sonuçların limitler dahilinde olduğu belirlenmiş ve sistemin uygunluğu kanıtlanmıştır.

Doğrusallık çalışmalarında 6 konsantrasyon seviyesinden oluşan kalibrasyon eğrileri LOQ'nun 0,1-2,0 ng/mL arasında ve en yüksek kalibrasyon eğrisi seviyesinin 50 ng/mL olduğu çalışma aralığında, her bir nitrozamin için korelasyon katsayısı (r^2) >0,999 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarla analit konsantrasyonu ve dedektör cevabı arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar verilen sınırlar içinde olduğu görülmüş ve Tablo 4-6'da özetlenmiştir. Herbir nitrozamin için

kalibrasyon eğrileri konsantrasyon seviyelerinin doğruluk değerleri %91,94-116,60 arasında, kesinlik değerleri %0,0004-7,30 arasında değişmektedir. Elde edilen doğruluk ve kesinlik sonuçları verilen sınırlar içinde olduğu görülmüş ve Tablo 4-7'den Tablo 4-14'e kadar özetlenmiştir.

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları, ilgili analitlerin düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda oluşturulan kalite kontrol örnekleri (3, 15, 50 ng/mL) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir nitrozamin için gün içi doğruluk değerleri %85,01-111,00 aralığında, kesinlik değerleri %0,30-7,81 arasında değişmektedir. Her bir nitrozamin için günler arası doğruluk değerleri %88,42-110,13 aralığında, kesinlik değerleri %1,26-8,98 arasında değişmektedir. Elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik sonuçları verilen sınırlar içinde olduğu görülmüş ve Tablo 4-15'den Tablo 4-30'a kadar özetlenmiştir.

Stabilite çalışmaları, numunelerin hazırlanma ve analizlerinin gerçekleştirilmesi sırasındaki aşamalarda ve kullanılan saklama koşullarında analitlerin konsantrasyonunun ne kadar etkilendiğini göstermek için yapılmıştır. Stabilite çalışması, her bir nitrozamin için stok çözeltilerin buzdolabı saklama koşullarındaki stabilitesi, çalışma çözeltilerinin kısa dönem laboratuvar koşullarında numune hazırlama süresindeki stabilitesi ve çalışma çözeltilerinin otoörnekleyici koşullarında analiz süresindeki stabilitesini kapsamaktadır. Her bir nitrozamin için stok çözelti stabilitesi %Hata değerleri %-0,44 ile -4,07 arasında, kısa dönem stabilitesi %Hata değerleri %1,78 ile -2,53 arasında ve otoörnekleyici stabilitesi %Hata değerleri %1,16 ile -7,61 arasında değişmektedir. Elde edilen stabilite çalışmaları %Hata sonuçları verilen sınırlar içinde olduğu görülmüş ve Tablo 4-31'de özetlenmiştir.

Farmasötik preparatlarla yapılan çalışmalarda öncelikle ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi için bir tablet ürününün (irbesartan + hidroklorotiyazid) plasebosu üzerinde farklı ekstraksiyon yöntemleri çalışılarak matriks etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde asetonitril ve metanol ile yapılan ekstraksiyon yöntemlerinde n-hekzanla yapılan ekstraksiyon yöntemlerine göre bir çok nitrozaminde daha yüksek matriks etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Kullanılan bu 3 organik çözücünün polarlıkları karşılaştırıldığında MeOH>ACN>N-hekzan şeklinde sıralanmaktadır. N-hekzanın nanopolar bir çözücü olması, bir çok yardımcı maddeye sahip farklı türde farmasötik preparatlarla çalışırken bu yardımcı maddelerin bir kısmının organik faza

geçmediği ve dolayısıyla matriks etkisinin daha düşük olduğu görülmektedir. Yöntem 3 ve Yöntem 4 ile yapılan ekstraksiyonlarda n-hekzanın kullanılması Yöntem 1’de asetonitril ve yöntem 2’de metanol ile yapılan ekstraksiyonlara göre matriks etkisinin daha düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Yöntem 4’de elde edilen n-hekzan ekstresinin asetonitril ile 1 e 1 oranında karıştırılmasıyla nitrozaminlerin yaklaşık %90 oranında n-hekzandan asetonitrile geçtiği yapılan çalışmayla tespit edildi. Sonuç olarak Yöntem 4’ün ekstraksiyon için kullanılması uygun bulunmuştur.

Uygulama yapılan farmasötik preparatlar tablet, kapsül, jel, krem, merhem, sprey, gargara ve enjeksiyonluk çözelti ilaç ürünlerinde geliştirilen yöntemle birlikte analiz edilmiştir. Bu ilaç ürünlerine özgü hesaplanan matriks etkisi yüzdeleri %50’nin altındadır. İlaç ürünlerinde tespit edilen nitrozaminler ürüne ait plaseboda hazırlanan kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplamaları yapılarak matriks etkisi en aza indirilmiş ve doğru sonuçların elde edilmesine katkı sağlamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, analitlerin (3,80 6,55 7,11 7,67 7,97 8,27 8,57 9,97 dk) alıkonma süreleri zarfında herhangi bir girişimin olmaması, LOQ düzeylerinin kılavuzlarda verilen limitlerle uyumlu olması, kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olması, yöntemin doğruluk ve kesinlik değerlerinin uygun olması, stabilite çalışmalarında ve sistem uygunluğu testi çalışmalarında elde edilen sonuçların uygun olması ve geliştirilen ekstraksiyon yönteminin birçok farmasötik preparatda kabul edilebilir matriks etkisi değerleri vermesi nedeniyle; seçici, doğru, kesin ve yüksek hassasiyette, nitrozamin analizleri için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Bu yöntem farklı türde farmasötik preparatların nitrozamin analizlerinde kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Barnes JM, Magee PN. Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *Br J Ind Med* 1954; **11**: 167-174.
2. Magee PN, Barnes JM. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer* 1956; **10**: 114-122.
3. Lijinsky W. *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds*. Cambridge, UK: Cambridge Univ Pres; 1992.
4. Preussmann R, Stewart BW. N-nitroso Carcinogens. İçinde Searle CE, editor. *Chemical Carcinogens*. Washington DC: American Chemical Society; 1984. pp. 643-828.
5. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; **66**: 1191-1308.
6. Koppang N. An outbreak of toxic liver injury in ruminants. *Nord Vet Med* 1964; **16**: 305-322.
7. Ender F, Favre G, Helgebostad A, Koppang N, Madsen R, Ceh L. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften* 1964; **51**: 637-638.
8. Lijinsky W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 1999; **443**: 129-138.
9. Candan T, Bağdatlı A. Et ürünlerinde nitrit/nitrat azaltılmasına yönelik doğal uygulamalar. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg* 2018; **24**: 1382-1387.
10. Ekici K, Alişarlı M, Sancak YC. Peynir çeşitlerinde nitrit ve nitrozaminler. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg* 2008; **19**: 71-72.
11. Çakmak Ö, İşleyen A, Usca A. N-nitrozo bileşikleri ve halk sağlığına etkileri. *TAF Preventive Medicine Bulletin* 2009; **8**: 521-526.
12. Nawrocki J, Andrzejewski P. Nitrosamines and water. *J Hazard Mater* 2011; **189**: 1-18.
13. Zhao YY, Boyd JM, Woodbeck M, Andrews RC, Qin F, Hrudey SE, ve ark. Formation of N-nitrosamines from eleven disinfection treatments of seven different surface waters. *Environ Sci Technol* 2008; **42**: 4857-4862.
14. Walse SS, Mitch WA. Nitrosamine carcinogens also swim in chlorinated pools. *Environ Sci Technol* 2008; **42**: 1032-1037.

15. FDA. *Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs*. FDA (İnternette) 2021, 24 Şubat. Erişim 11.02.2023, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>.
16. EMA. *Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products*. EMA (İnternette) 2020, 25 Haziran. Erişim 11.02.2023, <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>.
17. EMA. *ICH Guideline M7 (R1) on Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk*. EMA (İnternette) 2015, 25 Ağustos. Erişim 11.02.2023, <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>.
18. Gökalp HY. N-nitrozo bileşikleri, kanserojenik etkileri, çeşitli gıdaların N-nitrozamin içerikleri ve çeşitli kaynaklardan bünyeye alınan N-nitrozamin miktarları. *Gıda* 1984; **9**: 317-324.
19. Loeppky RN. Nitrosamine and N-nitroso compound chemistry and biochemistry: advances and perspectives. İçinde Loeppky RN, Michejda CJ, editor. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds*. Washington DC: American Chemical Society; 1994. pp. 1-18.
20. Pubchem National Library of Medicine. Erişim 11.02.2023, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
21. Toronto Research Chemicals. Erişim 11.02.2023, <https://www.trc-canada.com/>
22. Agents Classified by the IARC (International Agency for Research on Cancer) Monographs, Volumes 1-132. Erişim 11.02.2023, <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>
23. Shaikh T, Gosar A, Sayyed H. Nitrosamine impurities in drug substances and drug products. *J Adv Pharm Pract* 2020; **2**: 48-57.
24. Sedlo I, Kolonić T, Tomić S. Presence of nitrosamine impurities in medicinal products. *Arh Hig Rada Toksikol* 2021; **72**: 1-5.
25. The Carcinogenic Potency Database (CPDB). Erişim 11.02.2023, <https://files.toxplanet.com/cpdb/index.html>

26. Inami K, Yasui H, Tsugumi H, Ishikawa S, Mochizuki M. Oxidation of N-alkyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamines by iron porphyrin and oxidant forms alkylating mutagens. *Genes and Environment* 2013; **35**: 99-104.
27. Peto R, Gray R, Brantom P, Grasso P. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* 1991; **51**: 6415-6451.
28. Chang SH, Chang CC, Wang LJ, Chen WC, Fan SY, Zang CZ ve ark. A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of nitrosamines in sartans. *J Food Drug Anal* 2020; **28**: 292-301.
29. Khorolskiy M, Ramenskaya G, Vlasov A, Perederyaev O, Maslennikova N. Development and validation of four nitrosamine impurities determination method in medicines of valsartan, losartan, and irbesartan with HPLC-MS/MS (APCI). *Iran J Pharm Res* 2021; **20**: 541-552.
30. James M, Edge T. Low-level determination of mutagenic nitrosamine impurities in drug substances by LC–MS/MS. *LCGC Europe* 2021; **34**: 267-76.
31. Luo F, Liu Y, Xie Y, Hou W, Zhang L, Zhang Z. Simultaneous determination of 13 nitrosamine impurities in biological medicines using salting-out liquid-liquid extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2022; **218**: 114867.
32. Baksam VK, Saritha N, Devineni SR, Jain M, Kumar P, Shandilya S ve ark. A critical n-nitrosamine impurity of anticoagulant drug, rivaroxaban: synthesis, characterization, development of LC–MS/MS method for nanogram level quantification. *Chromatographia* 2022; **85**: 73-82.
33. Yin M, Hu Y, Fan H, Wang Q, Wang M, Wang W ve ark. Method for trace determination of N-nitrosamines impurities in metronidazole benzoate using high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric-pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2023; **46**: e2200225.
34. Tay KSJ, Breadmore MC, Soh ES, See HH. Development of dispersive inclusion complex microextraction for the analysis of nitrosamines in medicinal products. *J Chromatogr A* 2022; **1685**: 463605.

35. Xie B, Guo D, Mai B, Fan J. Determination of genotoxic impurity N-nitroso-n-methyl-4-aminobutyric acid in four sartan substances through using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules* 2022; **27**: 7498.
36. Gopireddy RR, Maruthapillai A, Mahapatra S. A multi-analyte LC–MS/MS method for determination and quantification of six nitrosamine impurities in sartans like azilsartan, valsartan, telmisartan, olmesartan, losartan and irbesartan. *J Chromatogr Sci* 2022; 1-21.
37. Wang Z, Hu S, Wu X, He Z, Ke C, Hu M. A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination and quantification of a recently identified N-nitrosamine impurity in the sitagliptin phosphate monohydrate active pharmaceutical ingredient. *Anal Methods* 2023; **15**: 256-260.
38. Mavis ME, Goksu Gursu G, Ular Cagatay N. Development of a sensitive LC-APCI-MS/MS method for simultaneous determination of eleven nitrosamines in valsartan and irbesartan with a simple extraction approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2023; **1216**: 123593.
39. Lim HH, Oh YS, Shin HS. Determination of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylethylamine in drug substances and products of sartans, metformin and ranitidine by precipitation and solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2020; **189**: 113460.
40. Liu J, Xie B, Mai B, Cai Q, He R, Guo D ve ark. Development of a sensitive and stable GC-MS/MS method for simultaneous determination of four N-nitrosamine genotoxic impurities in sartan substances. *J Anal Sci Tech* 2021; **12**: 1-8.
41. Chang S, Ho H, Zang C, Hsu Y, Lin M, Tseng S ve ark. Screening of nitrosamine impurities in sartan pharmaceuticals by GC-MS/MS. *MSL* 2021; **12**: 31-40.
42. Giménez-Campillo C, Pastor-Belda M, Campillo N, Hernández-Córdoba M, Viñas P. Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2021; **223**: 121659.

43. Lee DH, Hwang SH, Park S, Lee J, Oh HB, Han SB ve ark. A solvent-free headspace GC/MS method for sensitive screening of N-nitrosodimethylamine in drug products. *Anal Methods* 2021; **13**: 3402-3409.
44. Wichitnithad W, Sudtanon O, Srisunak P, Cheewatanakornkool K, Nantaphol S, Rojsitthisak P. Development of a sensitive headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of nitrosamines in losartan active pharmaceutical ingredients. *ACS Omega* 2021; **6**: 11048-11058.
45. Witkowska AB, Giebułtowicz J, Dąbrowska M, Stolarczyk EU. Development of a sensitive screening method for simultaneous determination of nine genotoxic nitrosamines in active pharmaceutical ingredients by GC-MS. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 12125.
46. Boczar D, Wyszomirska E, Zabrzewska B, Chyła A, Michalska K. Development and validation of a method for the semi-quantitative determination of n-nitrosamines in active pharmaceutical ingredient enalapril maleate by means of derivatisation and detection by hplc with fluorimetric detector. *Applied Sciences* 2021; **11**: 7590.
47. Tsanaktsidou E, Kanata L, Almpani S, Zacharis CK, Markopoulou CK. Development and validation of an HPLC-FLD method for the determination of NDMA and NDEA nitrosamines in lisinopril using pre-column denitrosation and derivatization procedure. *Separations* 2022; **9**: 347.
48. Abd El-Hay SS, Elhenawee M, Maged K, Ibrahim AE. Cost-effective, green HPLC determination of losartan, valsartan and their nitrosodiethylamine impurity: application to pharmaceutical dosage forms. *R Soc Open Sci* 2022; **9**: 220250.
49. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* (İnternette) 2005, Kasım. Erişim 01.04.2023, https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
50. EMA. *Guideline on bioanalytical method validation*. Committee for Medicinal Products for Human Use (İnternette) 2011, 21 Temmuz. Erişim 01.04.2023,

- https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
51. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation* (İnternette) 2018, Mayıs. Erişim 01.04.2023, <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.
 52. Ravisankar P, Navya N, Pravallika D, Sri ND. A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR Journal of Pharmacy* 2015; 5: 7-19.
 53. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.Baskı. Ankara, TR: Hacettepe Taş; 2005.
 54. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. *Türkiye Kanseri İstatistikleri 2016*. Ankara: 2019. Erişim 17.02.2021 https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2016.pdf.
 55. Eser B, Sepici Dinçel A. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *JOHSE* 2018; 2: 51-57.
 56. Biberoglu G. Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003, 23: 491-498.
 57. Kafeenah HIS, Osman R, Bakar NKA. Effect of mobile phase ph on the electrospray ionization efficiency and qualitative analysis of pharmaceuticals in ESI + LC-MS/MS. *J Chromatogr Sci* 2019; 57: 847-854.
 58. Hao C, March RE, Croley TR, Smith JC, Rafferty SP. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions. Part 1 - Investigations of alkali metal chloride and sodium salt cluster ions. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 79-96.
 59. Hao C, March RE. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions. Part 2 – Salts of polyatomic acid groups and of multivalent metals. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 509-521.

HAM VERİLER

FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NİTROZAMİN GRUBU İMPÜRİTELERİN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN KROMATOĞRAFİK MİKTAR TAYİNİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 10	% 4	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	% 1
3	patentscope.wipo.int İnternet Kaynağı	<% 1
4	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.eurolab.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Nigde University Öğrenci Ödevi	<% 1

www.turkiyeklinikleri.com