



**FARMASÖTİK PREPARATLARDA PLASTİK KATKI
MADDELERİNİN LC-MS/MS İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRME VE VALİDASYON: EXTRACTABLES VE
LEACHABLES ÇALIŞMALARINA UYGULAMA**

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU

Doktora Tezi

Prof. Dr. Alptuğ ATİLA

Kimya Ana Bilim Dalı

Organik Kimya Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**FARMASÖTİK PREPARATLARDA PLASTİK KATKI MADDELERİNİN LC-
MS/MS İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALİDASYON:
EXTRACTABLES VE LEACHABLES ÇALIŞMALARINA UYGULAMA**

(Method Development and Validation for Determination of Plastic Additives in
Pharmaceutical Preparations by LC-MS/MS: Application to Extractables and Leachables
Studies)

DOKTORA TEZİ

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Alptuğ ATİLA

Erzurum
Aralık, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU tarafından hazırlanan “**Farmasötik Preparatlarda Plastik Katkı Maddelerinin LC-MS/MS ile Tayini için Yöntem Geliştirme ve Validasyon: Extractables ve Leachables Çalışmalarına Uygulama**” başlıklı çalışması 15/12/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda **başarılı** bulunarak jürimiz tarafından **Kimya** Ana Bilim Dalı, **Organik Kimya** Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Duri Şehvar ÜNAL <i>İstanbul Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Danışman:	Prof. Dr. Alptuğ ATİLA <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Serdar BURMAOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL <i>İnönü Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../...
tarih ve ... sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır.

Bu çalışma TÜBİTAK 2244-Sanayi Doktora Projesi ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

TÜBİTAK Proje No:119C134

BAP No: TDK-2022-10732

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Alptuğ ATİLA danışmanlığında sunulan “**Farmasötik Preparatlarda Plastik Katkı Maddelerinin LC-MS/MS İle Tayini İçin Yöntem Geliştirme ve Validasyon: Extractables Ve Leachables Çalışmalarına Uygulama**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	12	30
Kuramsal Temeller	19	30
Materyal ve Yöntem	7	35
Araştırma Bulguları	8	20
Tartışma ve Sonuç	0	20
Tezin Geneli	9	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU	Prof. Dr. Alptuğ ATİLA
26.12.2023	26.12.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, TÜBİTAK (Proje No: 119C137) tarafından desteklenmiş olup Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

BİDEB 2244-Sanayi Doktora Burs Programı ve 2250-Lisanüstü Bursları Performans Programı ile sağladıkları maddi desteklerden dolayı TÜBİTAK'a, Polifarma İlaç San. ve Tic. A.Ş.'ye, Atatürk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne (Proje No: TDK-2022-10732) ve çalışmamı yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'a teşekkür ederim.

Bu çalışma esnasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımın her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve birikimlerinden yararlandığım, danışmanım Sayın Prof. Dr. Alptuğ ATİLA'ya ve sanayi danışmanım Sayın Dr. Levent KANDEMİR'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Kendileriyle birlikte aynı ortamda çalışmaktan mutluluk duyduğum laboratuvar arkadaşlarım Dr. Oğuzhan DALKILIÇ ve Dr. Muhammed Halid MAVALDİ'ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Saffet ÇELİK, Öğr. Gör. Dr. Hasan CAN, Öğr. Gör. Dr. Osman Nuri ASLAN ve Doç. Dr. Hülya TÜRK'e teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU ve Prof. Dr. Serdar BURMAOĞLU ile, tez savunma sınavı jürisinde yer alan Prof. Dr. Duri Şehvar ÜNAL ve Prof. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL'e değerlendirme ve önerileri için teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan arkadaşlarım Yunus TAŞKESENLİGİL'e, Dr. Rüstem EBİRİ'ye, Ziya DAĞALAN'a, Muhammet TURGUT'a ve Dr. Kübra SOLAK'a, ayrıca Kimya Bölümündeki hocalarıma teşekkür ederim.

Son olarak beni her zaman destekleyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK PREPARATLARDA PLASTİK KATKI MADDELERİNİN LC-MS/MS İLE TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRME VE VALİDASYON: EXTRACTABLES VE LEACHABLES ÇALIŞMALARINA UYGULAMA

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Alptuğ ATİLA

Amaç: İlaç endüstrisinde bir ilacın üretim aşamasından başlayıp, raf ömrünün sonuna kadar izlenmesi gereken süreçte ilaca kontamine olabilecek plastik katkı maddelerinin analizi için LC-MS/MS metodu geliştirip, geliştirilen yöntemi valide etmektir. Valide edilmiş olan LC-MS/MS metodu ile Extractables ve Leachables çalışmalarında plastik katkı maddelerinin analizini yapmaktır.

Yöntem: İlaç endüstrisinde kullanılan ambalaj malzemelerinde sıkça karşılaşılan ve European Pharmacopoeia’ da belirtilen 27 adet plastik katkı maddesi bulunmaktadır. Bu tez kapsamında 27 adet plastik katkı maddesinden 15 adeti LC-MS/MS sisteminde çalışılmıştır. Bu çalışmada iç standart olarak Difenil ftalat kullanılmıştır. LC-MS/MS sisteminde iyonlaştırma kaynağı olarak Elektrosprey iyonizasyon yapılmıştır. Kromatografik ayırmada sabit faz olarak ters faz C₁₈ kolon, hareketli faz olarak 5 mmol Amonyum asetat içeren su ve metanol karışımı ile gradient ayırım gerçekleştirilmiştir. Gerçek numunelerde Extractables ve Leachables çalışmaları için çeşitli ekstraksiyon teknikleri kullanılarak LC-MS/MS sisteminde analizleri yapılmıştır.

Bulgular: İç standart yardımıyla 15 adet plastik katkı maddesinin analizi için LC-MS/MS metodu geliştirilip, alınarak ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1)’e göre validasyonu yapılmıştır. Optimize edilen kromatografik ve spektroskopik şartlarda her bir plastik katkı maddesi ve iç standart için moleküler iyon ve parçalanma iyon pikleri belirlenmiştir. 15 adet plastik katkı maddeleri için doğrusal olduğu aralıklar belirlenerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin en alt noktası bütün plastik katkı maddelerinde en düşük miktar tayin alt limiti (LLOQ) 50 ng/ml (PA 20 için 150 ng/ml) olarak belirlenmiştir. Çalışılan her bir plastik katkı maddesi için gün içi ve günler arası kesinlik, doğruluk, tekrarlanabilirlik, sistem uygunluk ve stabilite analizleri yapılarak geliştirilen LC-MS/MS metodunun uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Kesinlik yüzde bağıl standart sapmayla (%BSS) ve doğruluk yüzde bağıl hatayla (%BH) verilmiştir. Sırasıyla; kesinlik %6,91’den, doğruluk %9,89’dan küçük olarak bulunmuştur.

Sonuç: Plastik ambalaj malzemesinden farmasötik preparata geçebilecek olan 15 adet plastik katkı maddesini belirlemek için hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve güvenilir olan yeni bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen metod alınarak ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1)’e göre valide edildi. Bu yeni metod ile ilaç endüstrisinde son yıllarda büyük önem kazanan Extractables ve Leachables çalışmaları için ihtiyaç duyulan plastik katkı maddelerinin analizi yapılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Extractables, Leachables, Plastik Katkı Maddesi, LC-MS/MS, Farmasötik Preparat, Metod Validasyon

Aralık 2023, 150 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR DETERMINATION OF PLASTIC ADDITIVES IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY LC-MS/MS: APPLICATION TO EXTRACTABLES AND LEACHABLES STUDIES

İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU

Supervisor: Prof. Dr. Alptuğ ATİLA

Purpose: Our aim is to develop the LC-MS/MS method for the analysis of plastic additives that may contaminate the drug in the pharmaceutical industry, starting from the production phase of a drug until the end of its shelf life, and to validate the developed method. To analyze plastic additives in Extractables and Leachables studies with the validated LC-MS/MS method.

Method: There are 27 plastic additives frequently encountered in packaging materials used in the pharmaceutical industry and specified in the European Pharmacopoeia. Within the scope of this thesis, 15 of the 27 plastic additives were studied in LC-MS/MS system. Diphenyl phthalate was used as internal standard in this study. Electrospray ionization was used as ionization source in LC-MS/MS system. In chromatographic separation, reverse phase C₁₈ column was used as stationary phase and gradient separation was performed with a mixture of water and methanol containing 5 mmol Ammonium acetate as mobile phase. Real samples were analyzed in LC-MS/MS system using various extraction techniques for Extractables and Leachables studies.

Findings: LC-MS/MS method was developed for the analysis of 15 plastic additives using an internal standard and validated according to ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1)). Molecular ion and fragmentation ion peaks were determined for each plastic additive and internal standard under optimized chromatographic and spectroscopic conditions. For 15 plastic additives, calibration curves were drawn by determining the ranges in which they are linear. The lowest point of the calibration curve was determined as the lower limit of quantification (LLOQ) 50 ng/ml (150 ng/ml for PA 20) for all plastic additives. Intra-day and inter-day precision, accuracy, repeatability, system availability and stability analyses were performed for each plastic additive studied and the developed LC-MS/MS method was shown to be applicable. Precision is given in percent relative standard deviation (%RSD) and accuracy in percent relative error (%RE). The precision and accuracy were found to be less than 6.91% and 9.89%, respectively.

Results: A new rapid, sensitive, reproducible and reliable LC-MS/MS method was developed to identify 15 plastic additives that can migrate from plastic packaging material to pharmaceutical preparation. The method was validated according to ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1)). With this new method, it will be possible to analyze the plastic additives needed for Ekstractables and Leachables studies, which have gained great importance in the pharmaceutical industry in recent years.

Keywords: Extractables, Leachables, Plastic Additive, LC-MS/MS, Pharmaceutical Preparation, Method Validation

December 2023, 150 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xiv
GİRİŞ.....	1
Safsızlıkların Kaynağı: Plastik Malzemeler.....	3
İlaç Kapları ve Modern İlaç Taşıma Sistemlerinde Kullanılan Plastik Malzemeler.....	4
Plastik.....	5
Polivinil Klorür (PVC).....	5
Polietilen	6
Polipropilen	7
Polietilen tereftalat	8
Poliamid (Naylon).....	9
Polikarbonat	9
Poli (etilen-vinil asetat).....	10
Elastomer.....	10
Kauçuk Kapaklar.....	11
Bromobütıl Kauçuk.....	12
E&L Çalışmasının Planlaması	12
İlaç Sektöründe E&L Çalışmaları	12
Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi	16
KURAMSAL TEMELLER.....	17
Spektroskopik Yöntemler.....	23
Kütle Spektroskopisi (MS).....	24
Numune Giriş Sistemi	26
İyon Kaynağı.....	26
Dedektör.....	29
Vakum Sistemleri.....	29

Kütle Analizörü.....	30
Kromatografik Yöntemler.....	30
Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	31
Adsorpsiyon Kromatografisi.....	32
Dağılma Kromatografisi.....	32
İyon Değiştirme Kromatografisi	33
Boyut-Eleme (Jel-Filtrasyon) Kromatografisi	33
İyon Çifti Kromatografisi.....	33
Afinite (Etkileşim) Kromatografisi	34
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS).....	34
LC-MS/MS Sistemlerinin Avantajları	36
LC-MS/MS Kullanım Alanları	37
Ekstraksiyon.....	37
Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (Çözücü Ekstraksiyonu).....	38
Katı-Sıvı Ekstraksiyonu (Soxhlet Ekstraksiyonu)	39
Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	41
Modern Ekstraksiyon Yöntemleri	42
Validasyon	43
Spesifiklik, Seçicilik (Specificity/Selectivity)	43
Doğruluk (Accuracy)	44
Keskinlik (Precision).....	44
Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)	44
Hassasiyet (Sensitivity).....	45
Tekrar üretilebilirlik, Tekrarlanabilirlik (Reproducibility, repeatability)	45
Sağlamlık /Tutarlılık (Robustness/Ruggedness)	45
Geri Kazanım (Recovery)	46
Kararlılık (Stability)	46
MATERYAL ve METOT	47
Kullanılan Referans Standartlar, Reaktifler ve Cihazlar.....	47
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Yöntemi	49
Plastik Katkı Maddeleri Referans Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması.....	50
Extractables Çalışmalarının Hazırlanması	50
Leachables Çalışmalarının Hazırlanması.....	51
ARAŞTIRMA BULGULARI	52

Plastik Katkı Maddeleri İçin Geliştirilen LC-MS/MS Yönteminin Validasyonu.....	72
Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	72
En Düşük Miktar Tayin Alt Limiti (LLOQ)	86
Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik.....	86
Kararlılık (Stabilite)	101
Sistem Uygunluk.....	117
Farmasötik Preparatlarda E&L Çalışmaları: Plastik Katkı Maddelerinin Tayini	118
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	123
KAYNAKLAR.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	132



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan plastik katkı maddeleri referans standartları.....	47
Tablo 2. Kullanılan reaktifler.....	48
Tablo 3. Kullanılan cihazlar.....	48
Tablo 4. LC-MS/MS sistemine ait bilgiler	49
Tablo 5. LC-MS/MS sistemine ait gradient ayırım bilgileri.....	49
Tablo 6. 15 adet Plastik katkı maddesi ve IS'a ait kütle şartları.....	53
Tablo 7. DEHP'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	72
Tablo 8. BHT'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	73
Tablo 9. Hostanox 03'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	74
Tablo 10. Irganox 1010'un kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	75
Tablo 11. Irganox 1330'un kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	76
Tablo 12. Irganox 1076'nın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	77
Tablo 13. Irgafos 168'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	78
Tablo 14. Irganox 3114'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	79
Tablo 15. Irganox PS 800'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	80
Tablo 16. Irganox PS 802'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	81
Tablo 17. Stearik asit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	82
Tablo 18. Oleamit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	83
Tablo 19. Erukamit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	84
Tablo 20. BTC'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	85
Tablo 21. TEHM'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri	86
Tablo 22. DEHP için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	87
Tablo 23. BHT için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	88
Tablo 24. Hostanox 03 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	89
Tablo 25. Irganox 1010 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	90
Tablo 26. Irganox 1330 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	91
Tablo 27. Irganox 1076 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	92

Tablo 28. Irgafos 168 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	93
Tablo 29. Irganox 3114 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	94
Tablo 30. Irganox PS 800 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	95
Tablo 31. Irganox PS 802 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	96
Tablo 32. Stearik asit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	97
Tablo 33. Oleamit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	98
Tablo 34. Erukamit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	99
Tablo 35. BTC için LC-MS/MS yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	100
Tablo 36. TEHM için LC-MS/MS yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri	101
Tablo 37. DEHP için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	102
Tablo 38. BHT için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	103
Tablo 39. Hostanox 03 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	104
Tablo 40. Irganox 1010 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	105
Tablo 41. Irganox 1330 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	106
Tablo 42. Irganox 1076 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	107
Tablo 43. Irgafos 176 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	108
Tablo 44. Irganox 3114 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri.....	109
Tablo 45. Irganox PS 800 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	110
Tablo 46. Irganox PS 802 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	111
Tablo 47. Stearik asit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	112
Tablo 48. Oleamit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	113
Tablo 49. Erukamit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri	114
Tablo 50. BTC için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	115
Tablo 51. TEHM için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	116
Tablo 52. Plastik katkı maddeleri için LC-MS/MS sisteminde elde edilen sistem uygunluk analiz sonuçları	117

Tablo 53. Polipropilen torbaya uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları.....	118
Tablo 54. Tek kullanımlık göz damlasına uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları.....	119
Tablo 55. LDPE plastik flakona uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları.....	120
Tablo 56. Bromobütil tıpayı uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları.....	121
Tablo 57. Gerçek numunelerde plastik katkı maddelerinin Leachables analiz sonuçları.....	122



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. E&L analizi için bilinen bazı zararlı maddeler	2
Şekil 2. E&L çalışmalarında kullanılan temel analitik yöntemler	3
Şekil 3. İlaç kapları ve modern ilaç taşıma sistemleri	4
Şekil 4. EPREX (Cilag,İsviçre) adlı ürün.....	14
Şekil 5. EP’de belirlenen plastik katkı maddeleri (Plastic Additive)	19
Şekil 6. Spektroskopik yöntemler	23
Şekil 7. Kütle Spektroskopisi cihazının şematik gösterimi	26
Şekil 8. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) kütle analizörü şematik gösterimi	27
Şekil 9. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kütle analizörü şematik gösterimi	28
Şekil 10. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	31
Şekil 11. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi cihazının şematik gösterimi	35
Şekil 12. Soxhlet ekstraksiyon düzeneği	40
Şekil 13. A: DEHP’e ait kütle spektrumu B: DEHP’in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	54
Şekil 14. A: BHT’ye ait kütle spektrumu B: BHT’nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	55
Şekil 15. A: Hostanox 03’e ait kütle spektrumu B: Hostanox 03’ün parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	56
Şekil 16. A: Irganox 1010’a ait kütle spektrumu B: Irganox 1010’un parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	57
Şekil 17. A: Irganox 1330’a ait kütle spektrumu B: Irganox 1330’un parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	58
Şekil 18. A: Irganox 1076’ya ait kütle spektrumu B: Irganox 1076’nın parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	59
Şekil 19. A: Irgafos 168’e ait kütle spektrumu B: Irgafos 168’in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	60
Şekil 20. A: Irganox 3114’e ait kütle spektrumu B: Irganox 3114’ün parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	61
Şekil 22. A: Irganox PS 800’e ait kütle spektrumu B: Irganox PS 800’e parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	62
Şekil 23. A: Irganox PS 802’ye ait kütle spektrumu B: Irganox PS 802’nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	63
Şekil 24. A: Stearik asite ait kütle spektrumu B: Stearik asitin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	64

Şekil 25. A: Oleamit'e ait kütle spektrumu B: Oleamit'in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	65
Şekil 26. A: Erukamit'e ait kütle spektrumu B: Erukamit'in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	66
Şekil 27. A: BTC'ye ait kütle spektrumu B: BTC'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	67
Şekil 28. A: TEHM'ye ait kütle spektrumu B: TEHM'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	68
Şekil 29. A: Difenil ftalat (IS)'a ait kütle spektrumu B: Difenil ftalat (IS)'ın parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar	69
Şekil 30. Plastik Katkı Maddelerine ait total iyon kromatogramı	70
Şekil 31. Plastik Katkı Maddelerine ait total iyon kromatogramı	71
Şekil 32. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan DEHP'in kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 33. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan BHT'nin kalibrasyon eğrisi	73
Şekil 34. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Hostanox 03'ün kalibrasyon eğrisi	74
Şekil 35. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1010'un kalibrasyon eğrisi	75
Şekil 36. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1330'un kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 37. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1076'nın kalibrasyon eğrisi	77
Şekil 38. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irgafos 168'in kalibrasyon eğrisi	78
Şekil 39. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 3114'ün kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 40. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox PS 800'ün kalibrasyon eğrisi	80
Şekil 41. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox PS 802'nin kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 42. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Stearik asit'in kalibrasyon eğrisi	82
Şekil 43. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Oleamit'in kalibrasyon eğrisi	83
Şekil 44. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Erukamit'in kalibrasyon eğrisi	84
Şekil 45. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan BTC'nin kalibrasyon eğrisi	85
Şekil 46. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan TEHM'nin kalibrasyon eğrisi	86

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AA	: Amonyum Asetat
ACN	: Asetonitril
Akb	: Atomik kütle birimi
APCI	: Atmosferik Basıncılı Kimyasal İyonizasyon (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
BH	: Bağlı Hata
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen (Butylated Hydroxytoluene)
BSS	: Bağlı Standart Sapma
BTC	: Bütiril triheksil sitrat (Butyryl trihexyl citrate)
cGMP	: Güncel İyi Üretim Uygulamaları (Current Good Manufacturing Practice)
DEHP	: Di (2-etilheksil) ftalat (di(2-ethylhexyl) phthalate)
DDF	: Difenil ftalat (Diphenyl phthalate)
dk.	: Dakika
E&L	: Extractables & Leachables
EDQM	: Avrupa İlaç Kalite ve Sağlık Hizmetleri Direktörlüğü (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare)
EMA	: Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı (European Medicines Agency)
EP	: Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)
ELSO	: Epoksitlenmiş keten tohumu yağı (Epoxidized linseed oil)
ESBO	: Epoksitlenmiş soya yağı (Epoxidized soy bean oil)
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon (Electrospray Ionization)
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
g	: Gram
h	: Hafta
h/h	: Hacim/Hacim
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma - Kütle Spektrometresi (Inductively coupled plasma mass spectrometry)
IR	: Kızılötesi (Infrared)
IS	: İç standart (Internal Standard)
İPA	: İzopropil alkol

L	: Litre
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
LDPE	: Düşük yoğunluklu polietilen
LLOQ	: En Düşük Miktar Tayin Alt Limiti (Lower Limit of Quantitation)
LOD	: Teşhis Limiti (Limit of Detection)
LOQ	: Miktar Tayin Alt Limiti (Limit of Quantitation)
m/z	: kütle/yük
MALDI	: Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MS	: Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)
ng	: Nanogram
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PA	: Plastik Katkı Maddesi (Plastic Additive)
PE	: Polietilen
PET	: Polietilen Tereftalat
PIC/S	: Uluslararası İlaç Denetim Birliği (Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme)
PP	: Polipropilen
PQRI	: Ürün Kalitesi Araştırma Enstitüsü (Product Quality Research Institute)
PVC	: Polivinil Klorür
QTOF/LC-MS	: Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
s	: Saat
SCT	: Güvenlik Kaygı Eşiği (Safety Concern Threshold)
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
TEHM	: Tri(2-etilheksil) trimellitat (Tris(2-ethylhexyl) trimellitate)
THF	: Tetrahidrofuran
TİTCK	: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-Layer Chromatography)
UPLC-MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy)

USP	: Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (United States Pharmacopoeia)
USS	: Ultra saf su
UV	: Ultra Viyole
UV-Vis	: Ultraviyole-Görünür Bölge



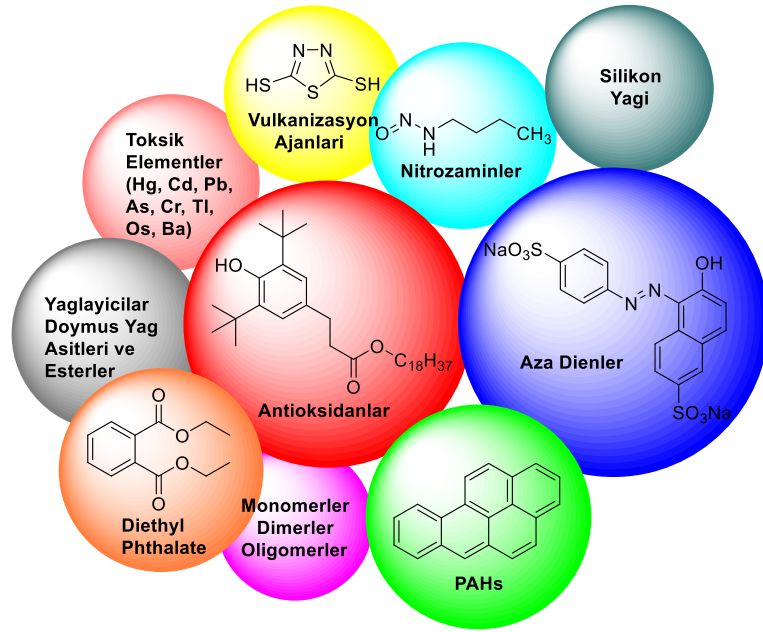
GİRİŞ

Hayatımızın her alanında yer alan plastikler, gittikçe artan çevre koruma bilinci ve insan sağlığına etkileri ile en çok sorgulanan malzemelerin başında gelmektedir. Plastik malzemelerin üretimleri aşamasında katkı maddeleri kullanılmaktadır. Çünkü polimerlerden oluşan plastikler kullanım amaçlarına göre katkı malzemelerine ihtiyaç duyarlar. Tek başına fonksiyonel olmayan plastikler eklenen bu katkı ve dolgu malzemeleri ile insan sağlığına zarar verebilecek zararlı plastiklere dönüşebilirler. İlaç sektöründe de plastikler yaygın bir şekilde ambalaj malzemesi olarak kullanılmaktadır. Kullanılan plastik malzemeler farmasötik preparat ile etkileşime girebilir ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle kullanılan plastik maddeler ile farmasötik ürünün temasından kaynaklı olarak, farmasötik preparat kontamine olabilir. Kontamine olabilecek olan farmasötik preparat için ilaç sektöründe Extractables ve Leachables (E&L) çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulur (Jenke 2018; Wakankar *et al.* 2010).

Extractables, bir kaptan veya bileşen malzemesinden (örneğin plastik, elastomerik, cam veya metal bileşenler) farmasötik preparata, biyolojik ürüne ya da gıda ürününe ekstrakte edilebilen ve kontamine olabilen çeşitli potansiyel sorunlara neden olan organik ve inorganik kimyasal türlerdir.

Leachables, normal kullanım koşulları altında farmasötik preparatın, biyolojik ürünlerin ya da gıdaların üretiminde ve depolanmasında kullanılan bileşenlerin yüzeylerinden salınabilen organik ve inorganik kimyasal türlerdir. Leachables, esas olarak normal kullanım koşulları altında formülasyon ile doğrudan temasın bir sonucudur.

E&L testleri, genellikle malzeme çeşidine, kullanım amacına ve endüstri gereksinimlerine bağlı olarak farklılık gösterebilir. E&L analizi, ürün güvenliği ve kalitesi açısından kritik bir öneme sahiptir, bu nedenle endüstri standartları ve regülasyonlara uygunluğu sağlamak adına düzenli olarak uygulanır. E&L analizlerinde belirlenen ve sıklıkla karşılaşılan bazı zararlı maddeler aşağıda verilmektedir (Şekil 1).

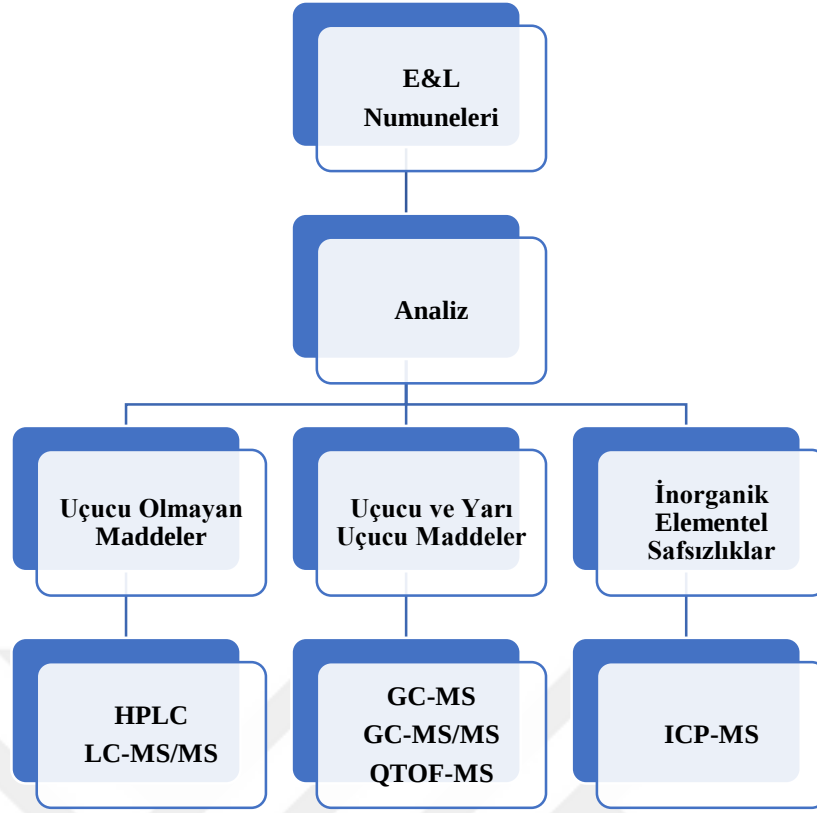


Şekil 1. E&L analizi için bilinen bazı zararlı maddeler

İlaç sektöründe E&L riskini değerlendirmede iyi planlanmış bir E&L çalışması çok önemlidir. E&L çalışması için genel bir metot bulunmamakta olup, organik ve inorganik numunenin fiziksel ve kimyasal özelliğine göre yeni bir E&L metodunun geliştirilmesi gerekebilir (Norword *et al.* 2009; Jenke 2007; Jenke 2014; Vandenburg *et al.* 1997).

E&L çalışmaları, farmasötik ürünleri kontamine eden farmasötik kap-kapatma sistemlerinden, tıbbi cihazlardan, tıbbi cihaz ambalajlarından, proses ekipmanı ve ambalajlarından geçebilecek potansiyel olarak zararlı leachables safsızlıkların tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kritik öneme sahiptir. Bu işlem, hastanın sağlığına risk oluşturabilecek ve önemli sorunlara neden olabilecek durumları belirlemek için önemlidir (Jenke 2007; Jenke 2014)

E&L çalışmalarında çeşitli analitik sistemler kullanılmaktadır. Çalışılması planlanan tüm numuneleri analiz etmek için valide edilmiş analitik yöntemler gereklidir ve her iki çalışma için de kullanılabilir. Analizi yapılacak olan analitin türüne göre aşağıda kullanılan temel analitik yöntemler gösterilmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. E&L çalışmalarında kullanılan temel analitik yöntemler

Safsızlıkların Kaynağı: Plastik Malzemeler

E&L analizlerinin temel araştırma konularından biri plastik ve elastomerik bileşenlerdir. Bunlar monomerler, polimerik başlatıcılar, plastikleştiriciler, antioksidanlar, mürekkep ve yapıştırıcılar (etiket), bozunma ürünleri (sentez, saklama ve sterilizasyon şartlarından kaynaklı) olarak karşımıza çıkmaktadır.

Plastiklerde kullanılan katkı maddeleri ise antioksidanlar, stabilizörler, yüzey aktif katkı maddeleri, statik ve antistatik (elektrostatik) yük katkı maddeleri, buğu önleyici (antifogging) maddeler, antiblokaj maddeler, çekirdekleştirici maddeler, yağlayıcılar, etki değiştiriciler, işlem yardımcıları, biyositler, plastikleştiriciler, köpürtücü maddeler, organik peroksitler, alev geciktiriciler, dolgu maddeleri ve renklendiricilerden oluşmaktadır (Subramanian 2013).

Antioksidanlar, plastikleştiriciler, renklendiriciler, metal katalizörler, polimer ve bozunma ürünleri gibi potansiyel leachables kaynaklarını belirlemek için extractables çalışmaları ile ekstrakte edilebilir bileşenlerin profili elde edilmelidir. Farmasötik paketleme, ilaç dağıtım sistemleri ve implante edilebilir tıbbi cihazlar, kullanılan plastik, polimer, kauçuk veya cam malzeme karışımları, basılı yüzeyler ve kaplamalardan dolayı çok fazla farmasötik preparatlarda istenmeyen girişim kaynağı bulunmaktadır. E&L çalışmalarını yürütürken özel olarak farmasötik preparatın içinde bulunduğu ambalaj ve üretim koşulları dikkate alınarak çalışmanın planlanması kritik önem taşımaktadır (Marturano *et al.* 2017)

İlaç Kapları ve Modern İlaç Taşıma Sistemlerinde Kullanılan Plastik Malzemeler

İlaç kapları ve modern ilaç taşıma sistemleri, her ne kadar ilacı korumak amacıyla kullanılsalar da aslında kendileri de ilaçlar için potansiyel safsızlık kaynağı olabilirler (Şekil 3) (Agilent Technologies).

Farmasötik kullanıma yönelik kapların imalatında çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemelerin kullanımı aynı zamanda tıbbi ve cerrahi amaçlarla kullanılan nesnelerin bir kısmının veya tamamının imalatında da düşünülebilir. Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia, EP) 'inde açıklananların dışında kullanılan malzemeler ve polimerler de yetkili kurumların onayına tabi olarak kullanılabilir (EP 2019).



Şekil 3. İlaç kapları ve modern ilaç taşıma sistemleri

Son yıllarda, gelişen teknoloji ve farkındalıklar doğrultusunda karşılaşılan sıkıntılara istinaden; Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı (EMA) otoriteleri tarafından, farmasötik ilaç ürünlerindeki E&L maddeler ile ilgili artan endişeler sonucunda regülasyon çalışmaları için yeni zorunluluklar ortaya çıkmıştır. Bu endişenin en büyük nedeni sıvı ilaç ürünleri için sürekli olarak ambalaj ile etkileşimi sonucu ilaca sızabilecek (Leachables) veya etkileşime girebilecek olan ambalaj ekstrakte maddelerinin (Extractables) toksikolojik etkileridir (Chang *et al.* 2016; EMA 2005; US FDA 1999).

İlaç ambalajlarında kullanılan plastik, polimer, kauçuk veya cam malzeme karışımları, baskılı yüzeyler ve kaplamalar ilaçların özelliklerine göre seçilmelidir. E&L ilaç ürünlerinin kontaminasyonuna yol açabilecek yabancı maddeleri tanımlasa da bunların karakterizasyonunu ve aynı zamanda ikisi arasındaki farkı anlamak önemlidir (CDER 21CFR211.94; CDER 2011).

Plastik

Plastikler, polimer adı verilen büyük molekül zincirlerinden oluşan sentetik veya yarı sentetik malzemelerin genel adıdır. Bu polimer zincirleri, monomer adı verilen küçük moleküllerin birleşmesiyle oluşur. Plastikler doğada hazır olarak bulunmazlar. Plastikler, belli sıcaklık ve basınç altında, katalizör kullanılarak monomerlerin reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Plastikler ilk üretildiğinde toz, reçine veya granül şeklinde bulunmaktadır. Plastikler temel olarak 2 ana başlıkta incelenirler.

Termoplastikler, ısı uygulandığında yumuşayabilen ve soğutulduğunda tekrar sertleşebilen malzemelerdir. Termosetting plastikler ise bir kez ısıtıldıktan sonra sertleşen ve bu durumu değişmeyen malzemelerdir.

Plastik türlerinin yanı sıra günümüzde artan plastik kirliliğini önlemek için doğada güneş ışığı ve mikroorganizmalar tarafından parçalanabilen Biyobozunur plastik türevleride üretilmeye başlanmıştır.

Plastiklerin geniş kullanım alanları ve çeşitliliği, onları endüstriyel üretimde, tüketim malzemelerinde ve bir dizi diğer uygulamada önemli kılmıştır. Ancak, plastik atıkların yönetimi ve çevresel etkileri konusundaki endişeler, plastik kullanımının sürdürülebilirliği konusunda tartışmalara neden olmuştur. Bu nedenle, geri dönüşüm ve çevre dostu plastik alternatiflerine yönelik araştırmalar devam etmektedir (Anonim 2023a).

Plastikler, çeşitli türlerde bulunabilirler ve her biri farklı özelliklere ve uygulama alanlarına sahiptir. Bazı yaygın plastik türleri sırasıyla verilmiştir.

Polivinil Klorür (PVC)

Polivinil klorür (PVC), klor ve etilenin polimerizasyonu ile elde edilen bir termoplastik polimerdir. Polietilen ve polipropilenden sonra dünyada en çok üretilen üçüncü sentetik plastik polimerdir. PVC, geniş bir kullanım alanına sahip olan ve endüstriyel olarak büyük ölçüde üretilen bir plastiktir. PVC, esnek ve mukavemetli bir malzemedir. Bu özellikleri, PVC'nin çeşitli uygulamalarda kullanılmasını sağlar. PVC, kimyasallara, aşınmaya ve çeşitli hava koşullarına karşı dayanıklıdır. Bu özellik, dış mekân uygulamaları için uygun olmasını sağlar. PVC, doğal olarak alev geciktirici özelliklere sahiptir, bu da yangına karşı dirençli olduğu anlamına gelir. PVC, elektrik yalıtım malzemesi olarak kullanılabilir. Bu özelliği, kablo ve teller gibi uygulamalarda tercih edilmesini sağlar. PVC hafif bir malzemedir, bu da taşınabilirlik ve işlenme kolaylığı sağlar. PVC, farklı şekil ve boyutlarda üretilebilir. Ekstrüzyon, enjeksiyon kalıplama ve döküm gibi çeşitli işleme yöntemleri ile şekillendirilebilir. PVC'nin birçok uygulama alanı vardır, bunlar arasında inşaat malzemeleri (borular, paneller, pencere profilleri),

tıp sektöründe kullanılan malzemeler, elektrik kabloları, otomotiv iç donanımlar, giyim ve ayakkabı gibi sektörler bulunmaktadır. PVC, geri dönüşüme uygun bir malzemedir ve geri dönüşüm tesislerinde işlenebilir. Bu, sürdürülebilirlik açısından önemli bir özelliktir. Ancak, PVC üretiminde kullanılan bazı kimyasalların çevresel etkileri ve PVC'nin yanma sırasında zehirli gazlar açığa çıkarması gibi çevresel endişeler de bulunmaktadır. Bu nedenle, PVC'nin kullanımı ve imalatında çevresel etkileri azaltmak için çeşitli önlemler alınmaktadır (Anonim 2023f).

Polivinilklorürde kullanılan plastik katkı maddelerinin (PA, plastic additives) maksimum 3 farklı türde kullanılmak şartıyla her bir plastik katkı maddesi için limitleri aşağıda sırasıyla verilmiştir (EP 2019).

Di (2-etilheksil) ftalat (di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP, PA 01): maksimum yüzde 40;

PA 02: maksimum yüzde 1;

PA 03: maksimum yüzde 1;

Epoksitlenmiş soya yağı (Epoxidized soy bean oil, ESBO, PA 04) ve Epoksitlenmiş keten tohumu yağı (Epoxidized linseed oil, ELSO, PA 05): ikisinin toplamı maksimum yüzde 10.

Polietilen

Polietilen, dünyanın her yerinde kullanılan plastik ailesinin en büyük ve en önemli termoplastiktir. Polietilenin moleküler zinciri CH_2 -'den oluşur. Plastik endüstrisinde genelde ismi kısaca PE'dir. PE, özellikle ambalajlamada (plastik torbalar, plastik filmler, plastik şişeler gibi jeomembranlar) kullanılan bir termoplastiktir.

Polietilen, etilenin polimerizasyonu ile üretilir. Radikalik, anyonik, iyon koordinasyon ve katyonik polimerizasyon metotları ile farklı tipte polietilen üretimi yapılmaktadır. Polietilen yoğunluk ve kimyasal özelliklerine göre farklı formlarda bulunabilir. Bu formlar sırasıyla aşağıda verilmiştir;

UHMWPE (ultra yüksek moleküler ağırlıklı PE)

HDPE (yüksek yoğunluklu PE)

HDXLPE (yüksek yoğunluklu çapraz bağlı PE)

PEX (çapraz bağlı PE)

MDPE (orta yoğunluklu PE)

LDPE (düşük yoğunluklu PE)

LLDPE (lineer bağılı düşük yoğunluklu PE)

VLDPE (çok düşük yoğunluklu PE)

Farklı formlarda üretilselerde genel olarak polietilenler dış ortam koşullarına ve neme karşı iyi direnç gösterirler. Polietilenler esneklik, zayıf mekaniksel kuvvet, üstün kimyasal direnç, düşük maliyet ve kullanışlı oldukları için birçok yerde kullanılırlar (Anonim 2023b).

Polietilenlerde kullanılan plastik katkı maddelerinin maksimum 3 farklı türde kullanılmak şartıyla her bir plastik katkı maddesi için limitleri aşağıda sırasıyla verilmiştir (EP 2019).

Bütillenmiş Hidroksitoluen (Butylated Hydroxytoluene, BHT,PA 07): maksimum yüzde 0.125;

Hostanox 03 (PA 08): maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1010 (PA 09): maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1330 (PA 10): maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1076 (PA 11): maksimum yüzde 0.3;

Irgafos 168 (PA 12): maksimum yüzde 0.3;

Irganox 3114 (PA 13): maksimum yüzde 0.3;

PA 14: maksimum yüzde 0.3;

PA 15: maksimum yüzde 0.3;

Irganox PS 800 (PA 16): maksimum yüzde 0.3;

Irganox PS 802 (PA 17): maksimum yüzde 0.3;

Stearik asit (PA 19): maksimum yüzde 0.5;

Oleamit (PA 20): maksimum yüzde 0.5;

Erukamit (PA 21): maksimum yüzde 0.5;

Polipropilen

Polipropilen, doğrusal hidrokarbon zincirlerinden oluşur ve özellikleri birçok açıdan polietilene benzer. İyi yüzey sertliği, çizilmelere ve aşınmalara karşı direnç, mükemmel elektriksel özellikler gibi özelliklere sahiptir. Polipropilen, düşük yoğunluk, yüksek yumuşama noktası, iyi esneme ömrü ve sterilize edilebilirliği gibi özelliklere sahip olduğu için küresel tüketimi artmıştır. Endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasallara karşı inertliği, elyafların boyanmasını, filmlerin basılmasını ve boyanabilirliği gibi özellikleri,

bazı endüstriyel uygulamalarda kullanımını engeller. UV ışınına dayanımının az olması, yüksek termal genleşme, boya ve kaplaması zor olması, dış hava şartlarına dayanımının az olması, oksitlenme ve yanıcılık dezavantajları arasında yer alır. Polipropilen, yüksek oranda kristalleşebilen, düşük maliyetli ve denge mukavemetli bir polimerdir. Bu özellikleri, kompozit imalatlar alanında ve mühendislik uygulamalarında potansiyel uygulamalar sunmaktadır (Anonim 2023c).

Polipropilenlerde kullanılan plastik katkı maddelerinin maksimum 3 farklı türde kullanılmak şartıyla her bir plastik katkı maddesi için limitleri aşağıda sırasıyla verilmiştir (EP 2019).

BHT: maksimum yüzde 0.125;

Hostanox 03: maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1010: maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1330: maksimum yüzde 0.3;

Irganox 1076: maksimum yüzde 0.3;

Irgafos 168: maksimum yüzde 0.3;

Irganox 3114: maksimum yüzde 0.3;

PA 14: maksimum yüzde 0.3;

PA 15: maksimum yüzde 0.3;

Irganox PS 800: maksimum yüzde 0.3;

Irganox PS 802: maksimum yüzde 0.3;

Stearik asit: maksimum yüzde 0.5;

Oleamit: maksimum yüzde 0.5;

Erukamit: maksimum yüzde 0.5;

Polietilen tereftalat

Poli(etilen tereftalat) (PET), meşrubat şişeleri gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir mühendislik plastiğidir. PET ilk olarak elyaf oluşturan bir malzeme olarak tanıtılmıştır. Üretilen en yüksek hacimli poliesterdir ve filmler, elyaflar ve ambalajlar gibi çok sayıda uygulamada kullanılır. PET, tereftalik asit veya dimetil tereftalatın etilen glikol ile polimerizasyonu sonucu elde edilir. PET, poliester ailesinden termoplastik polimerdir. PET ayrıca şeffaflığı, termal stabilitesi, kimyasal direnci ve mükemmel bariyer özellikleri nedeniyle

enjeksiyon kalıplamada tek kullanımlık şişeler için büyük önem taşıyan bir malzeme olarak kullanılır. Ayrıca gıda, süt ürünleri vb. ambalajlarında da kullanılması PET pazarının büyümesine yol açmıştır. PET, dünya polimer üretiminin yaklaşık %18'ini oluşturur ve polietilen (PE), polipropilen (PP) ve polivinil klorür'den (PVC) sonra en fazla üretilen dördüncü polimerdir. PET monomer etilen tereftalatın tekrarlayan polikondenzasyon metoduyla üretilir.

PET' in en önemli özelliği tamamen geri dönüşebilmesidir. Diğer plastiklerden farklı olarak polimer zincirleri sonraki kullanımlar içinde eski hâlini alır. İşlenmemiş haliyle PET renksiz, yarı kristal bir yapıdadır. İşlenme şekline bağlı olarak PET sert ve dayanıklıdır. PET, kloroform ve toluen gibi bazı çözücülere maruz kaldığında beyazlaşmaktadır (Anonim 2023d).

Poliamid (Naylon)

Naylonlar, mühendislik termoplastikler arasında yaygın olarak kullanılan bir türdür. Ancak saf naylonların mekanik özelliklerinde sınırlamalar, düşük ısıl bozulma sıcaklığı, yüksek su emme ve boyut kararsızlığı gibi sorunlara yol açabilir. Poliamid, ticari olarak kaprolaktamın anyonik halka açma polimerizasyonu ile üretilen bir mühendislik termoplastiğidir. Bu üretim yöntemi, naylonun belirli özelliklerini belirler. Naylonlar, diş fırçaları, giysi filamentleri, otomobil endüstrisinde kendinden yağlamalı dişliler ve rulmanlar gibi birçok uygulamada kullanılır. Naylon 6, yüksek mekanik mukavemete ve yüksek sıcaklığa karşı daha iyi dirence sahiptir. Naylon, omurgası boyunca amid gruplarının varlığı nedeniyle moleküler düzeyde hidrojen bağlarına sahiptir. Su, asit ve alkali çözeltileri tarafından etkili bir şekilde emilse de, birçok organik çözücünün taşınması için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Naylon, asitler ve alkali çözeltilerle hidrolize uğrayabilir. Çevresel etkilere maruz kalma durumunda renk bozulması, çekme mukavemetinde ve molekül ağırlığında azalma gibi değişikliklere neden olabilir. Naylon, güneş ışığına karşı dayanıklıdır ve kısa dalga boylu güneş UV ışınımını absorbe edebilir. Naylon, 1938'den bu yana tekstil elyafları, endüstriyel kartlar, mühendislik uygulamaları, halı, plastik dişli ve burç, elektrikli parçalar, olta ve halat üretimi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonim 2023e).

Polikarbonat

Polikarbonat, ticari açıdan önemli bir mühendislik termoplastiği olup, şeffaflık, boyutsal stabilite, alev direnci, yüksek ısıl bozunma sıcaklığı, yüksek darbe dayanımı ve neme karşı duyarlılık gibi bir dizi farklı özelliğe sahiptir. Polikarbonat, şeffaflık ve darbe dayanımı gerektiren birçok uygulamada yaygın olarak kullanılır. Örnek uygulamalar arasında ön camlar, kanopiler, görüş blokları, yüz siperlikleri, gözlükler ve lensler bulunmaktadır.

Bisfenol-A bazlı poliestere olan polikarbonat, şeffaflık, dayanıklılık, termal stabilite ve boyutsal stabilite gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Bu özellikler, çeşitli uygulamalarda faydalıdır. Polikarbonatın özellikleri, kompakt diskler, isyan kalkanları, vandalizme dayanıklı camlar, bebek biberonları, elektrikli bileşenler, güvenlik kaskları ve far mercekle gibi birçok alanda kullanılmasını mümkün kılar. Polikarbonatın yüksek erime viskozitesi, işlemin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesini gerektirir. Bu polimer, mekanik özelliklerin ve iyi ısı stabilitesinin çekici bir kombinasyonunu sunar. Polikarbonat, endüstriyel ve laboratuvar uygulamalarının yanı sıra ev eşyalarında da yaygın olarak kullanılır. Örneğin, kırılmayan veya ışığı yansıtan pencereler, gözlük ve güneş gözlüğü camları, CD'ler ve otomobil far camları gibi ürünlerde bulunabilir (Anonim 2023g).

Poli (etilen-vinil asetat)

Poli(etilen-vinil asetat), etilen ve vinil asetat karışımlarının kopolimerizasyonu ile elde edilir. Poli(etilen-vinil asetat), toplam parenteral beslenme preparatları için kaplar ve tüplerin imalatında kullanılabilir. Ancak, kullanımında belirli içerik sınırlamaları vardır. Örneğin, vinil asetatın içeriği kaplar için yüzde 25'i, borular için yüzde 30'u aşmamalıdır.

Polimerin işlenmesini veya özelliklerini optimize etmek için katkı maddeleri içerebilir. Ancak, bu katkı maddelerinin kullanımında belirli sınırlamalar vardır. Örneğin, belirli antioksidanlardan her bir madde için maksimum yüzde 0.125 ila 0.5 arasında değişen limitlere sahiptir. Belirli plastik katkı maddelerinin (BHT için yüzde 0.125, Irganox 1010, Irganox 1330, Irganox 1076 ve Irgafos 168 için yüzde 0.2, Stearik Asit, Oleamit, Erukamit için maksimum limit yüzde 0.5'tir) maksimum yüzde limitleri verilmiştir. Bu bilgiler, poli(etilen-vinil asetat) polimerinin üretiminde, kullanımında ve içerdiği katkı maddelerinin limitlerinde uygulanacak standartları ve sınırlamaları belirtir (EP 2019).

Elastomer

Elastomer, elastik özelliklere sahip bir polimer malzeme türüdür. Bu malzeme, doğal veya sentetik olarak üretilir ve genellikle esnek, yumuşak, elastik ve şekil değiştirebilir özelliklere sahiptir. Elastomerler, sıcaklık, basınç ve diğer çevresel etkenlere karşı direnç gösteren, gerilip çekilebilen ve orijinal şekline dönebilen malzemelerdir.

Elastomerlerin özellikleri şunlardır:

1. Uygulanan gerilme veya deformasyon sonrasında orijinal şekillerine geri dönebilen elastik özelliklere sahiptir.

2. Genellikle esnek ve yumuşak malzemelerdir, bu nedenle çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.
3. Kimyasal etkenlere, aşınmaya ve çeşitli çevresel faktörlere karşı direnç gösteren özelliklere sahiptir.
4. Elektriksel ve termal izolasyon özellikleri, elastomerleri elektronik ve elektrik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan bir malzeme yaptı.
5. Doğal elastomerler, kauçuk gibi bitkisel kaynaklardan elde edilebileceği gibi, sentetik elastomerler de özel uygulamalara yönelik olarak tasarlanabilir.

Elastomerler, otomotiv endüstrisinden tıbbi ekipmanlara kadar birçok farklı uygulama alanında kullanılır. Örnekler arasında lastikler, conta malzemeleri, esnek kaplamalar, conta elemanları ve diğer birçok ürün bulunmaktadır. Elastomerlerin özellikleri, kullanım amacına ve uygulama gereksinimlerine bağlı olarak değişebilir (EP 2019).

Kauçuk Kapaklar

Kauçuk kapaklar, makromoleküler organik maddelerin uygun katkı maddeleri kullanılarak vulkanizasyon yoluyla elde edilen elastomer malzemelerden yapılmıştır. Bu malzemeler, kimyasal sentez yoluyla elde edilen doğal kökenli polimerlerdir. Flakonlar için tıplar, sızdırmazlık diskleri, kartuşlar için piston tıparları, şırıngalar için kauçuk uç kapakları, iğne koruyucuları ve piston tıparları gibi çeşitli kauçuk kapakları kapsar. Elastomerlerin ve çeşitli katkı maddelerinin seçimi, bitmiş ürün için gereken özelliklere bağlıdır. Bu katkı maddeleri arasında vulkanizatörler, hızlandırıcılar, stabilizatörler ve pigmentler bulunmaktadır. Spesifikasyonlar, farklı türdeki kauçuk kapakları kapsar. Bu türler arasında kaplamalı kapaklar, iki katmanlı contalar ve yağlanmış kapaklar yer almaktadır. Her bir tür, belirli özellikleri karşılamak amacıyla tasarlanmıştır.

Kauçuk kapaklar, tip I ve tip II olmak üzere iki tipe ayrılır. Tip I kapaklar daha sıkı gereksinimleri karşılar ve genellikle tercih edilirken, tip II kapaklar özel kullanımlara uygun mekanik özelliklere sahiptir, ancak tip I kadar ağır gereksinimleri karşılayamaz.

Kauçuk kapaklar elastik, yarı saydam veya opaktır. Genellikle belirgin bir renge sahip değildir. Kimyasal özellikleri nedeniyle tetrahidrofuran içinde çözünmezler. Kauçuk kapaklar homojendir ve genellikle parlama ve yabancı maddelerden arındırılmıştır. Bu bilgiler, sulu parenteral preparatlar için kullanılan kauçuk kapakların üretim süreci, özellikleri ve farklı tipleri hakkında genel bir anlayış sağlar (EP 2019).

Bromobütil Kauçuk

Bromobütil kauçuktan yapılmış bir tıpa veya kapak anlamına gelmektedir. Bu tür tıpalar, özellikle farmasötik ve biyoteknoloji endüstrilerinde ilaç şişelerinin ve kaplarının kapatılması için kullanılır.

Bromobütil kauçuk, bütül kauçuk türlerinden biridir ve özellikle iyi bir sızdırmazlık özelliğine sahiptir. Bu özellik, özellikle hassas ilaçların, özellikle biyolojik ilaçların korunması için önemlidir. Bromobütil tıpalar, ilacın dış etkenlere karşı korunmasını ve ürünün hijyenik koşullarda saklanmasını sağlamak amacıyla kullanılır.

Bu tür kapaklar, farmasötik üreticilerin ve ilaç paketleme tesislerinin üretim süreçlerinde yaygın olarak kullanılır. Elastik özelliklere sahip olmaları, tıpaların şişelerin ağızlarına sıkıca oturmasını sağlar, böylece ilacın kontamine olmasını önler. Aynı zamanda, bu tıpalar, ilaçların oksijen, nem ve diğer dış etkenlere maruz kalmadan daha uzun süre dayanmasına yardımcı olabilir.

Bromobütil tıpalar, genellikle ilaç paketleme endüstrisinde kalite kontrol ve güvenlik standartlarına uyumlu bir şekilde üretilir. Bu tür tıpaların kullanılması, ilaç ürünlerinin kalitesini ve stabilitesini korumak için önemli bir unsurdur (Anonymous, 2023a).

E&L Çalışmasının Planlaması

E&L çalışmasının planlaması yapılırken aşağıdaki adımlar izlenmektedir.

1. İlacın üretim sürecinde kullanılan sistemlerin malzeme özelliği ve ambalaj için kullanılan malzeme hakkında bilgi toplanması,
2. Numune alımı, numune hazırlamak için ekstraksiyon ve analizler için uygun olan analitik değerlendirmeleri içeren bir çalışma protokolünün belirlenmesi,
3. Yapılan analizlerin sonucunda tayin edilen, bilinen veya yeni bileşiklerin değerlendirilmesinin yapılması
4. Leachables'ın tespiti, tanımlanması, miktarının tayini ve toksikolojik sınır değerinin belirlenmesi

İlaç Sektöründe E&L Çalışmaları

Bir ilacın üretim aşamasından başlayıp, paketleme sisteminden farmasötik ürünlere geçebilecek olan sızıntıların, ürünün raf ömrü boyunca tanımlanması ve izlenmesi gerekmektedir. Elde edilen tüm verilerin sonucuna göre toksikolojik bir değerlendirme yapılması gerekmektedir. Bu işlem hasta güvenliğini sağlamak için kritik öneme sahiptir.

E&L alışmaları, genel olarak sıvı ilaç ürünlerin üretiminde kullanılan; filtrelerden başlayarak tek kullanımlık torbalar, hortumlar, metal yüzeyler, bağlantı parçaları, vial kapakları, şınga pistonları vb., ürünle temas eden tüm parçaların her birinden ürüne kontamine olabilecek safsızlıkları belirlemek için yapılmaktadır. Bu nedenle sıvı ilaç üretim aşamasında kullanılan filtreler dahil olmak üzere, ürünün temas ettiği tüm parçaların çok dikkatli bir şekilde seçilmesi gerekmektedir.

Özellikle enjeksiyonluk ürünler, oftalmik ürünler ve inhalasyon ürünleri gibi sıvı ürünlere kontamine olabilecek safsızlıklar, hasta sağlığı açısından çok büyük riskler oluşturabilmektedir. Bu riskler yerel ve uluslararası otoriteler tarafından ciddi bir şekilde incelenmektedir.

İlaç endüstrisinde, farmasötik preparatın temas ettiği yüzeyler ve üretim aşamasından kaynaklı safsızlıklar ile ilgili yaşanan sorunlara ilk olarak, kauçuğun tıpa olarak kullanılmaya başlandığı 1920'lerin başına dayanmaktadır. Bu yıllarda üretilen ürünlerin içeriğindeki koruyucu ve stabilizör maddelerin plastik ile teması ciddi oranda azaldığı belirlenmiş ve bu durum 1950'lere kadar süren ciddi kaygılara neden olmuştur.

1950'lerden itibaren analitik teknolojilerin gelişmesi, endüstride kullanılan ürünlerin kalitesinin arttırılmasına ve güvenilirliğinin sağlanmasına yönelik önemli bir adım olmuştur. Analitik teknikler, özellikle ilaç endüstrisinde ürün kalitesini kontrol etmek ve geliştirmek için kullanılmıştır. Bu dönemde, ürünlerde görülen görsel deformasyonların kaynağının ürüne sızan safsızlıklar olduğunun anlaşılması, üretim süreçlerindeki kontrolün artmasına ve kalite yönetiminin daha etkin bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanı mıştır. Özellikle, 1970'lere kadar olan süreçte, "Leachables" olarak adlandırılan, üründen çözünen veya geçen maddelerin neden olduğu sorunlar raporlan mıştır. Bu safsızlıkların sebep olduğu problemler arasında stearat içeren keltirler ve aktivitesi düşen penisilin gibi istenmeyen durumlar ne çıkmıştır.

Sıvı ilaç retiminde E&L konusu, özellikle filtre kartuşları gibi üretim ekipmanlarının kullanımında önemli bir endişe kaynağıdır. 1970'lerin ortalarında yapılan araştırmalar, özellikle reçinelerin kullanımının kritik bir Leachables kaynağı olduğu tespit edil miştir. Bu dönemde, filtre kartuşları genellikle reçinelerle birleştiril mişti ve bu durum ürünlerde istenmeyen maddelerin oluşmasına neden olabiliyordu. Bu sorunu çözmek için, önce eritme yöntemi kullanımı ve daha sonra ultrasonikasyon ile parçaların birbirine kaynatılması gibi yeni üretim teknikleri geliştiril miştir. Bu yöntemlerle, filtre kartuşlarının üretiminde kullanılan malzemeler arasındaki teması azaltmak ve dolayısıyla Leachables oluşumunu en aza indirmek amalan mıştır. Günümüzde, E&L konusunda bilinç ve anlayış artmış durumda ve farmasötik endüstrisi, bu tür potansiyel kontaminasyonları kontrol etmek ve minimize etmek için çeşitli

stratejiler geliştirilmiştir. Ancak, malzeme teknolojisinin hızla gelişmesi ve sürekli olarak yeni ürün ve üretim yöntemlerinin ortaya çıkması, bu konuda sürekli bir dikkat gerektirmektedir. Günümüzde, bu alanda yapılan araştırmalar ve geliştirmelerle birlikte, E&L konusundaki sorunlarla mücadele etmek için daha etkili stratejiler ve teknikler geliştirilmektedir.

Geçtiğimiz yıllarda yaşanan olaylar önemli bir sağlık sorununa neden olmuştur. EPREX (Janssen-Cilag, İsviçre) adlı anemi tedavisinde kullanılan bir biyolojik üründe yaşanan sorun, ürün formülasyonunda yapılan bir değişiklik sonrasında ortaya çıkmıştır (Şekil 4). 2002 yılında, ürünün formülasyonunda bir değişiklik yapılmış ve bu değişiklik sonucunda şırınga kaynaklı bir kimyasal safsızlık meydana gelmiştir. Bu safsızlık sonucunda, hastalarda ciddi böbrek sorunlarına yol açmıştır. İleri derecede böbrek yetmezliği, bu durumla ilişkilendirilen en ciddi sağlık sorunlarından biri olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4. EPREX (Cilag,İsviçre) adlı ürün

Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) verilerine göre 2012-2014 yılları arasında gerçekleşen 2061 ürün geri çağırma vakası, E&L konusundaki endişelerin somut bir göstergesidir. Bu vakaların sayısındaki artış, bu tür kontaminasyon olaylarının ciddiyetini vurgulamaktadır. Geri çağırma vakaları, ilaç ürünlerindeki güvenilirlik ve kalite kontrolü konularının ne kadar kritik olduğunu göstermektedir. Bu tür veriler, ilaç endüstrisinin sürekli olarak üretim süreçlerini gözden geçirmesi, yeni teknolojilere ve güncel regülasyonlara uyum sağlaması gerektiğini ortaya koymaktadır. E&L konusundaki bilinç ve önlemler, ürün güvenliği ve hastaların sağlığı açısından büyük öneme sahiptir. Bu nedenle ilaç endüstrisi, E&L konusundaki riskleri azaltmak için sürekli olarak araştırmalar yapmakta ve önleyici stratejiler geliştirmektedir.

İlaç endüstrisinde risk değerlendirmesi, ilaç üretiminin karmaşıklığı ve teknolojik gelişmelerin hızla ilerlemesi nedeniyle çok önemli bir kontrol mekanizması haline gelmiştir. İlaç endüstrisindeki süreçlerin yönetimi ve kalite güvencesi, Ar-Ge, üretim, kalite kontrol, mühendislik gibi farklı departmanların bir araya gelip iş birliği yapmasını gerektiren bütünleşmiş bir yaklaşımı içerir. Bu noktada, departman temsilcileri arasındaki iş birliği ve iletişim, potansiyel riskleri belirleme ve ele alma sürecinde kritik bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmalar sonucunda, ürün ile temas eden parçaların (konteynerler, kaplar, filtreler, vb.) üreticisinden alınan Extractables değerleri, ürün güvenliği ve kalitesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Extractables, malzemenin ürünle teması sonucu çözünen veya geçen maddeleri ifade eder. Bu maddeler, ürünün içine geçebilir ve Leachables olarak bilinen istenmeyen maddelerin oluşmasına neden olabilmektedir (Anonim, 2023h).

Harmanlanan verilerin toplanması ve sonuçlara göre toksikolojik bir değerlendirme yapılması, olası riskleri belirlemek ve bunlara karşı önlemler almak kritik bir süreçtir. Bu süreç, ürünün raf ömrü boyunca karşılaşılabileceği çeşitli koşulları ve olası kontaminasyonları değerlendirmeyi amaçlar.

Bunun anahtarı, araştırılan ürün için güvenlik kaygı eşiği (Safety Concern Threshold (SCT)) belirlenmesidir. Ürün Kalitesi Araştırma Enstitüsü (Product Quality Research Institute (PQRI)) tarafından E&L çalışmaları için risk tablosu tanıtılmıştır ve bu tablonun altında tek bir karsinojenik veya başka bir şekilde bir güvenlik endişesi oluşturabilecek etkileri olan maddeler ortaya çıkarılmıştır.

SCT'yi önemli ölçüde etkileyen iki faktör vardır. Bunlar uygulama yolu ve ürün ambalajı ile temasın derecesidir. İncelenmekte olan farmasötik ürüne sızabilir türlerden risk atamak için aşağıdaki matris geliştirilmiştir.

Aerosoller ve enjektatlar gibi ürünler en yüksek ilişkili riske sahipken, oral tabletler ve kapsüller en düşük riske sahiptir.

PQRI, düşük riskli SCT'nin 0.15 µg / gün olarak belirlenmesini, yüksek riskli SCT'nin ise 1,5 µg/gün olarak belirlenmesini tavsiye etmiştir. Her ikisi de toksikolojik ve güvenlik açısından gerekçelendirilmiştir.

Kısa süreli maruz kalma veya yaşamı tehdit eden bir durumun tedavisi gibi belirli koşullar altında, SCT'nin 1,5 µg/gün'ün üzerine çıkarılabilir (Ball *et al.* 2007; Leachables, PQRI 2006).

Analitik Değerlendirme Eşiği (Analytical Evaluation Threshold (AET)): SCT'yi temel alır. Bir kimyagerin belirli süzülebilir veya ekstrakte edilebilir maddeyi tanımlamaya başlaması ve potansiyel toksikolojik değerlendirme için raporlaması gereken eşik değeridir. AET, sızıntı yöntemleri için gereken minimum hassasiyeti gösteren bir kılavuz görevi görür (Paskiet *et al.* 2013).

Araştırmanın Önemi ve Gerekçesi

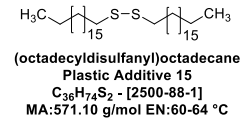
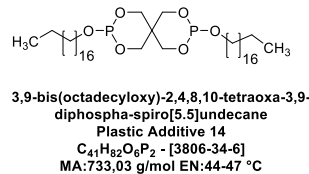
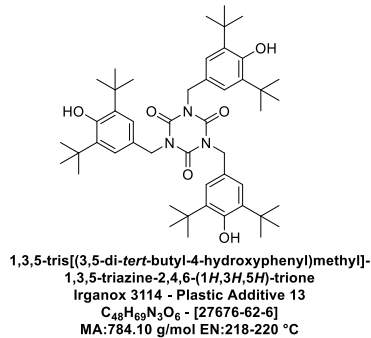
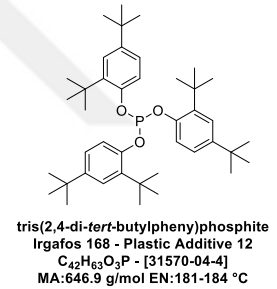
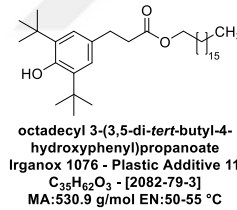
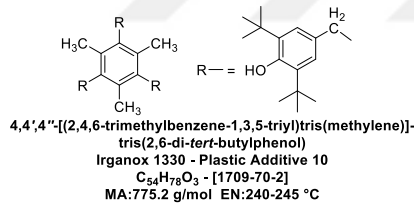
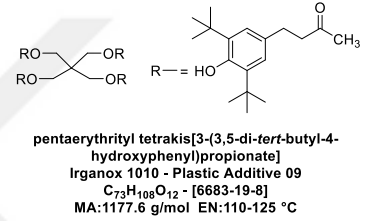
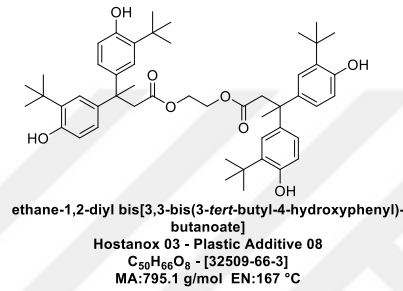
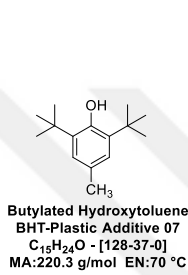
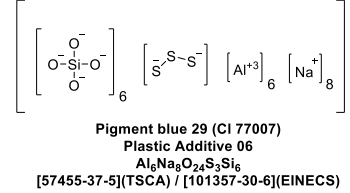
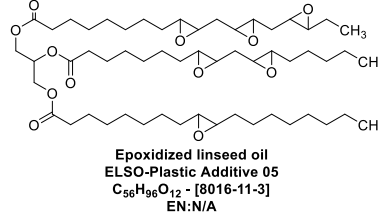
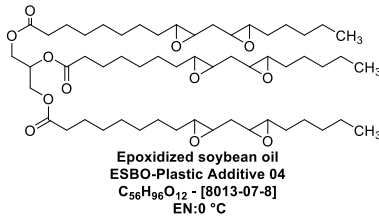
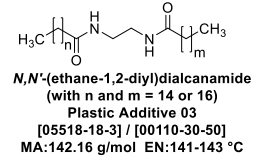
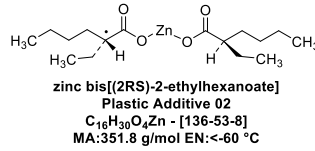
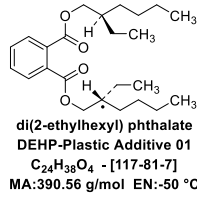
İlaç sektörü, E&L çalışmaları için yöntem geliştirme, validasyon, gerçek numunelere yöntemin uygulanması ve sonuçların yorumlanması konusunda bilgi birikimine ve tecrübeye sahip nitelikli insan gücüne ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla E&L çalışmalarında çok önemli bir yeri olan “Farmasötik Preparatlarda Plastik Katkı Maddelerinin LC-MS/MS ile Tayini için Yöntem Geliştirme ve Validasyon: Extractables ve Leachables Çalışmalarına Uygulanması” başlıklı tez konusu belirlenmiştir. Bu tez kapsamında ilaç sektöründe karşılaşılan problemlerden olan, insan sağlığına risk oluşturabilecek ve önemli sorunlara neden olabilecek plastik katkı maddelerinin sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi/ kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile tayini için yeni bir metot geliştirilmesi, validasyonu ve E&L analizleri hedeflenmektedir.



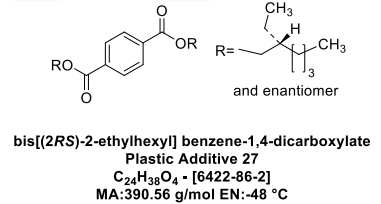
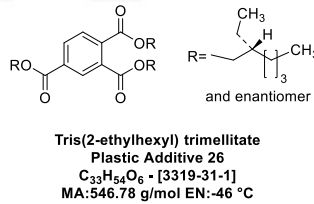
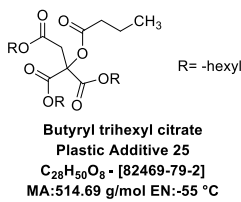
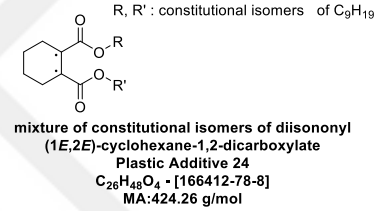
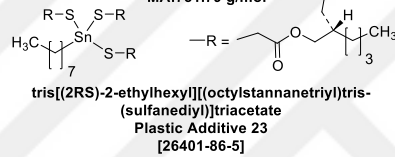
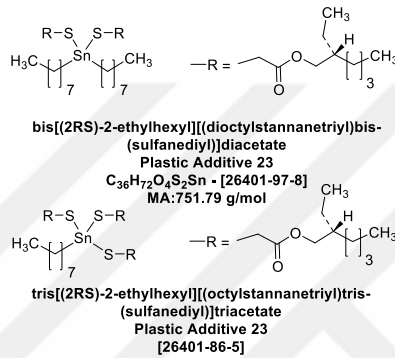
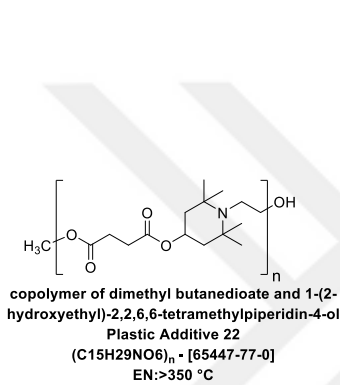
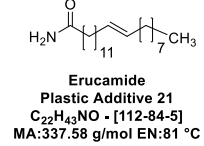
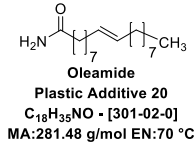
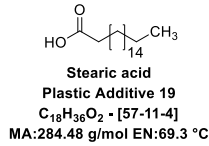
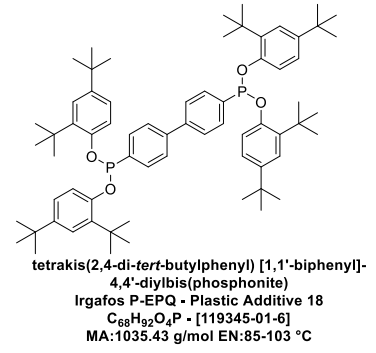
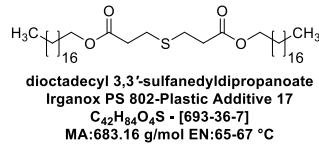
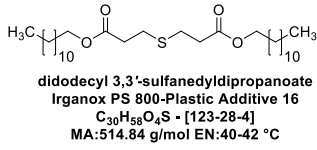
KURAMSAL TEMELLER

Ülkemiz, 1 Ocak 2018 tarihinde Uluslararası İlaç Denetim Birliğine (PIC/S) tam üye olmuştur. Bu tam üyelik, Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından yapılan denetimlerin uluslararası geçerlilik kazanmasını sağlamış ve ülkemizde üretilen ilaçların kalite ve güvenlik tescilinin önündeki tüm engelleri ortadan kaldırmıştır. Böylelikle, yerli ilaç sektörünün uluslararası pazarlara girmesinin önü açılmıştır. Bu amaçla sanayi E&L analizlerinde deneyimli, yapılan bu analizleri yorumlayabilecek eleman ihtiyacı duymaktadır. Bu tez konusu ile ülkenin ihtiyacı olan eleman yetiştirilecek ve sanayide alanında yetkin kişiler istihdam edilecektir.

Son yıllarda gelişen teknoloji ve farkındalıklara istinaden birçok otorite tarafından E&L çalışmaları hızlandırılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda farmasötik preparatlarda belirlenen plastik katkı maddeleri de incelenmiştir. Literatürde birçok plastik katkı maddesinin olduğu bilinmektedir. İlaç endüstrisinde karşılaşılan EP’de belirlenen insan sağlığı için tehdit unsuru olabilecek 27 adet plastik katkı maddesi (PA, Plastic Additive) tespit edilmiştir. 27 adet plastik katkı maddesi için aşağıda fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir (EP 2019) (Şekil 5).



Şekil 5. EP’de belirlenen plastik katkı maddeleri (Plastic Additive)



Şekil 5. EP'de belirlenen plastik katkı maddeleri (Plastic Additive) (devam)

Yapılan literatür taramalarında plastik katkı maddelerinin analizine yönelik birçok çalışmaya ulaşılmıştır.

C. Block ve arkadaşları 20 adet plastik katkı maddesinin analizini LC-MS ile yapmışlardır. LC-MS sistemi kullanılarak farklı deneysel şartlarda plastik katkı maddelerinin kütle spektrumlarının kütüphanesini oluşturmuşlardır. Atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) iyonlaştırma kaynağı kullanılarak pozitif ve negatif tarama modlarında çalışmışlardır. Kromatografik ayırımları ters faz C₁₈ kolon kullanmışlardır. LDPE (Düşük yoğunluklu polietilen) filmlerinin ekstraktları ve farklı plastik katkı maddelerinin karışımı bilinmeyen olarak analiz edilmiştir. 20 adet plastik katkı maddesinden 15'i %100 kesinlikle tanımlanmışlardır (Block *et al.* 2006).

Gagandeep Singh ve arkadaşları, kütle sistemleri kullanılarak oftalmik ilaçta sızabilir safsızlıkların tanımlanması için plastik katkı maddesi olan Irganox 1010 (PA 09)' un farmasötik preparatta varlığını tespit etmişlerdir. Irganox 1010, kap kapatma sistemlerinde poliolefin malzemelerin üretiminde kullanılan yaygın bir ticari antioksidandır ve plastik katkı maddesidir. Çalışmalarında, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ve gaz kromatografisi- kütle spektrometresi (LC-MS ve GC-MS) yöntemlerini kullanarak depolama sırasında bir oftalmik ilaç ürününde Irganox1010 ile ilgili iki sızabilir safsızlık belirlenmiştir. LC-MS/MS metodunda iki farklı safsızlık için iki farklı metod oluşturmuşlardır. İlk metotta ters faz C₁₈ kolon kullanılarak 0.4 ml/dk akış hızı ile ters faz gradient ayırım gerçekleştirmişlerdir. Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) kaynağı kullanılarak negatif modda tarama yapmışlardır. Diğer metotta ise yine ters faz C₁₈ kolon kullanılarak 0.4 ml/dk akış hızı ile ters faz izokratik ayırım gerçekleştirmişlerdir. APCI iyonlaştırma kaynağı kullanılarak pozitif modda tarama yapmışlardır. Her iki metotta da uygun voltaj uygulanarak moleküler iyon pikleri ve parçalanma iyon pikleri belirlenerek safsızlıklar belirlenmiştir (Singh *et al.* 2018)

Rainer Buchalla ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada Polietilen tereftalat (PET) içeren bir numunenin LC-MS ile karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Gama ışınları ile ışınlanmış polietilen tereftalatın düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerini APCI iyonlaştırma kaynağı kullanarak HPLC-MS sistemi ile analiz etmişlerdir. Çalışmalarında ters faz C₈ kolon kullanarak 0.5 ml/dk akış hızı ile ters faz gradient ayırım gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon işlemleri sonucu yapılan analizlerde PET içerisinde uçucu olamayan düşük molekül kütleli parçalanma ürünlerini tespit etmişlerdir. LDPE, polipropilen ve polistiren gibi polimerlerde tanımlanan parçalanma ürünleri (aldehitler, ketonlar, alkoller ve karboksilik asitler) radyasyonun neden olduğu oksidasyon ürünleri olarak PET 'de de belirlemişlerdir (Buchalla and Begley 2006).

Sarah Trimpin ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada polimer ve polimer katkı maddelerinin tanımlanması için hızlı bir yöntem olan Matriks destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon (MALDI) iyonlaştırma kaynağı kullanılarak analizler yapmışlardır. Polimerlerin hızlı analizi için üç MS yöntemini tartışmışlardır. Çok örnekli MALDI-MS düşük molekül ağırlıklı polimerlerin hızlı analizine olanak sağlayarak, atmosferik basınç (AP) altında katı numunelerin analizini doğrudan katkı maddesi analizi için probe MS kullanmışlardır. Polimerlerin tanımlanması için APPy MS kullanmışlardır. Sonraki yöntemlerde polimerik malzemenin bileşimine veya moleküler ağırlığına bakılmaksızın bilgi sağladığını belirtmişlerdir (Trimpin *et al.* 2009).

Peter J. Lee ve arkadaşları, yaygın olarak bilinen polimer katkı maddelerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada APCI iyonlaştırma kaynağı ile pozitif ve negatif modda tarama yaparak UPLC-MS/MS sisteminde 25 adet plastik katkı maddesinin analizlerini yapmışlardır. Geliştirdikleri metotta ters faz Fenil kolon kullanılarak 0.8 ml/dk akış hızı ile gradient ayırım gerçekleştirmişlerdir. Her bir polimer katkı maddesi için uygun voltaj uygulanarak moleküler iyon ve parçalanma iyonlarını belirlemişlerdir (Lee and Gioia 2008).

Cristina Moreta ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada ambalaj malzemesinde bulunan plastik katkı maddelerini belirlemek için uygun ekstraksiyon prosedürü oluşturarak yüksek çözünürlüklü kütle sistemleri ile ambalajdan gelen plastik katkı maddelerini tespit etmişlerdir. UPLC-MS/TOF sisteminde APCI ve ESI iyonlaştırma kaynağında pozitif ve negatif modda tarama yapmışlardır. Kromatografik ayırımları ters faz C₁₈ kolon kullanarak 0.4 ml/dk akış hızı ile gradient ayırım yaparak gerçekleştirmişlerdir. Geliştirmiş oldukları metod ile yapılan analiz sonucunda ambalaj malzemesinden gelen erucamide, Irgafos 168, oksitlenmiş Irgafos 168, Irganox 1076 ve Irganox 1010 tespit ettikten sonra kantitatif olarak değerlendirmişlerdir (Moreta and Tena 2015).

John D. Vargo ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmada LC-MS ile plastiklerin içerisinde bulunan antioksidanları ve UV ışık stabilizörlerini belirlemişlerdir. LC-MS sisteminde kimyasal iyonlaştırma kaynağı kullanılarak yapılan analizde iki ayrı metod kullanmışlardır. Araştırmacılar kullanmış oldukları iki ayrı LC-MS metodunda 0.2 ml/dk akış hızında gradient ve izokratik ayırım gerçekleştirmişlerdir (Vargo and Olson 1985).

Ana Ballesteros-Gomez ve arkadaşları, plastiklerin içerisinde bulunan katkı maddelerini farklı numune hazırlama ve analiz metodları kullanılarak Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (Q-TOF/LC-MS) ile belirlemişlerdir. Farklı iyonlaştırma kaynakları kullanmışlardır. Kromatografik ayırım ters faz C₁₈ kolon kullanarak 0.3 ml/dk akış hızı ile gradient elüsyonla yapmışlardır. Çalışılan her bir plastik katkı maddesi için uygun voltaj

uygulanmış moleküler iyon ve parçalanma iyonları tespit etmişlerdir. Plastiklerin içerisinde çeşitli antioksidanlar, ışık stabilizatörleri, plastikleştiriciler ve alev geciktiricileri tespit etmişlerdir (Ballesteros-Gómez *et al.* 2016).

Jesus Simal-Gandara ve arkadaşları gıda ambalaj malzemelerinden geçebilecek safsızlıkların tespiti için yaptıkları derlemede, çeşitli analitik sistemler ve metodlar kullanıldığını göstermişlerdir. Geliştirilen metodlar ile ambalaj malzemelerinden gıdalara geçen plastik katkı maddelerinin analizlerini araştırmışlardır. Yapmış oldukları bu derlemede plastik katkı maddelerinin günümüzde ve gelecekte insan sağlığına verebileceği zararlara dikkat çekmişlerdir (Simal-Gándara *et al.* 2002)

Gabino Bolívar-Subirats ve arkadaşları, fabrikaların çok olduğu bir bölgede bulunan nehir suyundan alınan numune içerisinde plastik katkı maddelerinin çok yüksek miktarda var olduğunu HPLC-MS/MS ile tespit etmişlerdir. Çalışmada 21 adet plastik katkı maddesinin tespiti için HPLC-MS/MS sisteminde ters faz C₁₈ kolon kullanılarak 0.4 ml/dk akış hızı ile gradient ayırım gerçekleştirmişlerdir. ESI iyonlaştırma kaynağı kullanılarak pozitif ve negatif modda tarama yapmışlardır. Her bir plastik katkı maddesi için uygun voltaj uygulanarak moleküler iyon ve parçalanma iyonları belirlenmiş olup atık sularda miktarları tespit etmişlerdir (Bolívar-Subirats *et al.* 2020).

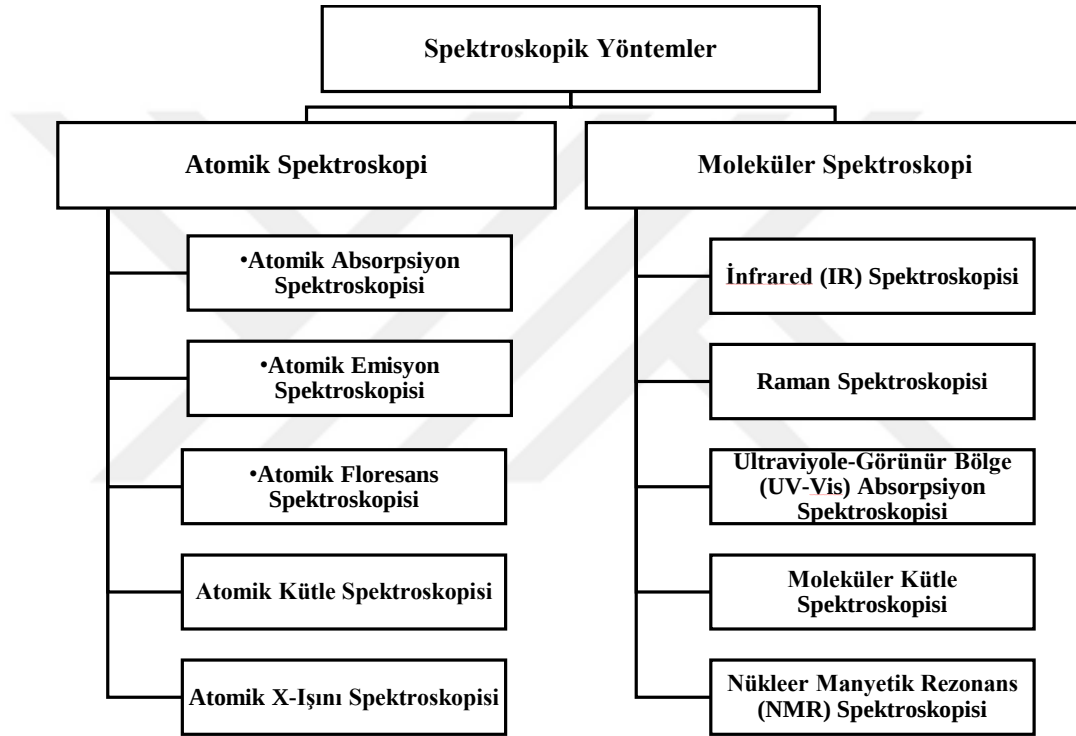
Ito ve arkadaşları, LC-MS/MS sistemini kullanarak PVC borulardan ilaçlara mono- ve di(2-etilheksil) ftalat geçişini yüksek geri kazanımlarla belirlemişlerdir. Turbo Ionspray iyonlaştırma kaynağı kullanmışlardır. Kromatografik ayırımlar RP-18 GP kolon kullanılarak 0.2 ml/dk akış hızı ile gradient ayırım gerçekleştirmişlerdir. Mono- ve di(2-etilheksil) ftalat'a ait moleküler iyon ve parçalanma iyonları belirlemişlerdir. PVC ambalaj malzemesi içeren ilaç kaplarından sızan mono- ve di(2-etilheksil) ftalat'ın kantitatif analizini yapmışlardır (Ito *et al.* 2005).

Jenke ve arkadaşları, parenteral ve oftalmik ilaç ürünlerine kap-kapatma sistemlerinden sızabilen safsızlıkları tespit etmek için kullanılan çeşitli analitik teknolojileri göstermek için derleme yapmışlardır. Analizi yapılan kap kapatma sistemi, LDPE, polipropilen kapaktan, elastomerik kapaktan, yapışkan etiketten (etiketleme) ve bir folyo üst torbadan (ikincil kap) oluşmuştur. Yapılan bu çalışmada kullanılan ambalaj malzemesine yönelik çeşitli ekstraksiyon metodları sonucu (asidik, bazik ve organik çözücü şartlarında) elde edilen uçucu, yarı uçucu ve uçucu olmayan ekstratlar için İndüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi (ICP-MS), LC-MS/MS ve GC-MS ile organik ve inorganik safsızlıkların analizleri yapılmışlardır. Analizler sonucunda ambalaj malzemelerinden gelen safsızlıkların miktarlarını tespit etmişlerdir (Jenke *et al.* 2017).

Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopi, elektromanyetik ışınlarla maddenin etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu etkileşim, atom, molekül veya iyonların enerji seviyeleri arasındaki geçişleri sırasında absorbe edilen veya yayılan elektromanyetik radyasyonu içerir.

Spektroskopik yöntemler, maddelerin özelliklerini analiz etmek ve tanımlamak amacıyla kullanılır. Bu yöntemler, çeşitli dalga boylarındaki elektromanyetik radyasyonun kullanılmasıyla farklı bilgiler sağlar. Spektroskopi, çeşitli disiplinlerde önemli bir araştırma ve analiz aracıdır. Fiziksel kimyadan biyokimyaya, malzeme biliminden astrofizik ve çevre bilimine kadar birçok alanda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (Şekil 6).



Şekil 6. Spektroskopik yöntemler

Spektroskopik yöntemler çeşitli dalga boylarında çalışarak maddenin yapısını ve özelliklerini analiz etmektedir. Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi, 110-1000 nm çalışma aralığında elektron geçişleri ile ilgilenir. Organik bileşenlerin yapısal özelliklerini ve renklerini belirlemede kullanılır. İnfrared (IR) Spektroskopisi 2500-25000 nm çalışma aralığında moleküler bağ titreşimlerini inceleyerek, organik ve inorganik bileşenlerin moleküler yapılarını, fonksiyonel grupları ve stereo kimyasal özellikleri belirlemede kullanılır. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi, radyo dalgaları ile çalışır. Atomik çekirdeklerin magnetik özelliklerini inceleyerek, moleküler yapılarını belirlemede ve organik bileşenlerin atomik düzenlemeleri, konformasyonları ve çözeltideki moleküler etkileşimlerin araştırılmasında kullanılır (Skoog *et al.* 1998, pp. 116-140; Gündüz 2002).

Kütle Spektroskopisi (MS)

Kütle spektrometrisinin temel prensipleri, diğer enstrümantal tekniklerden önce gelir. Temel prensipler, J. J. Thomson'ın elektronun kütlesine karşı yük oranını belirlediği 1890'ların sonlarına ve Wien'in anot ışınlarının manyetik sapmasını incelediği ve ışınların pozitif yüklü olduğunu belirlediği döneme dayanmaktadır. Her iki bilim adamı da çabaları için Nobel Ödülü ile onurlandırıldı (Thomson 1906'da ve Wien 1911'de). 1912-1913 yıllarında J. J. Thomson atmosferik gazların kütle spektrumlarını inceledi ve bir kütle spektrumu kullanarak neon-20 örneğinde neon-22'nin varlığını göstererek elementlerin izotopları olabileceğini kanıtladı. Bugünkü bilgiye göre, kütle spektrometresi, A. J. Dempster tarafından 1918 yılında inşa edilen en erken haliyle ortaya çıktı. Ancak kütle spektrometrisi yöntemi, yaklaşık 50 yıl önce ucuz ve güvenilir enstrümanların kullanılabilir hale gelmesiyle yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

1980'ler ve 1990'larda yüksek moleküler ağırlıklı (MA) bileşikler ve biyolojik örnekler için örnek girişi ve iyonlaştırma tekniklerinin geliştirilmesi, kütle spektrometrisini yeni bir araştırmacı topluluğuna tanıttı. Bakımı kolay, düşük maliyetli ticari enstrümanların tanıtılması, kütle spektrometrisini Thomson ve Wien'in laboratuvarlarından uzak birçok alanda vazgeçilmez bir teknik haline getirdi.

Bugün, biyoteknoloji endüstrisi kütle spektrometrisini proteinleri, oligonükleotitleri ve polisakkaritleri analiz etmek ve sıralamak için kullanırken, ilaç endüstrisi kurşun bileşiği keşfinden başlayarak yapısal analiz, sentetik gelişim ve kombinatoriyal kimya, farmakokinetik ve ilaç metabolizması aşamalarında kütle spektrometrisini kullanmaktadır. Dünya genelindeki sağlık kliniklerinde, kütle spektrometrisi kan ve idrarı belirli hastalık durumları, birçok kanser dahil olmak üzere belirli bileşiklerin varlığı ve seviyeleri açısından test etmek için kullanılmaktadır. Çevre bilimcileri, su ve hava kalitesini izlemek için kütle spektrometrisine güvenirken, jeologlar kütle spektrometrisini petrol rezervlerinin kalitesini test etmek için kullanmaktadır. Kütle spektrometrisi ayrıca havaalanı güvenlik taramalarında ve adli soruşturmalarda patlayıcı kalıntıların tespiti için rutin olarak kullanılmaktadır.

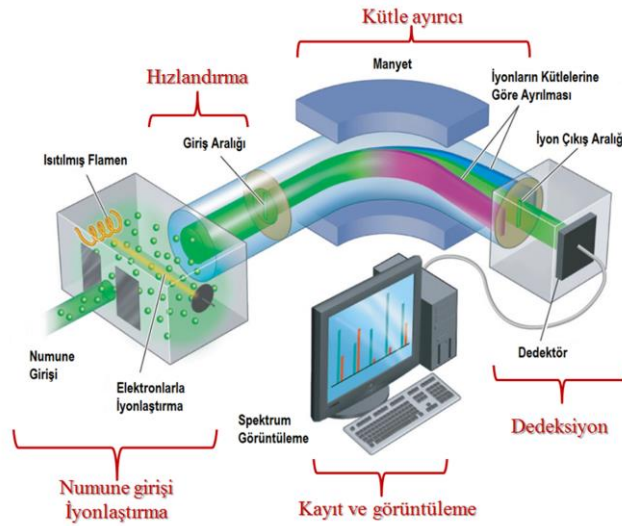
Bugüne kadar, kütle spektrometrisi ile doğrudan ilişkili çalışmalara dayanan en az beş Nobel Ödülü verilmiştir: J. J. Thomson (Fizik, 1906) "gazların elektrik iletilmesi üzerine teorik ve deneysel araştırmalar"; F. W. Aston (Kimya, 1922) "bir kütle spektrografi aracılığıyla, birçok radyoaktif olmayan elementte izotopların keşfi"; W. Paul (Fizik, 1989) "iyon tuzağı tekniğinin geliştirilmesi"; ve en son J. B. Fenn ve K. Tanaka (Kimya, 2002) "biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometrik analizleri için yumuşak desorpsiyon iyonlaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi" (Roškar and Lušin 2012).

Kütle spektrumlarında en yüksek bağıl çokluğa sahip pike temel pik denir. Asıl molekülün radikalik formuna ait pike de moleküler iyon piki denir. Genellikle moleküler iyon piki molekülün ağırlığıyla aynıdır. Kütle spektroskopisi, maddelerin yapılarını, bileşenlerini ve özelliklerini incelemek için önemli bir analitik tekniktir. Bu yöntem, bir maddenin moleküler veya atomik özelliklerini belirlemede kullanılır ve geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kütle spektroskopisi, bir maddenin kütle spektrumunu oluşturarak çalışır. Bu spektrum, maddenin bileşenlerinin kütlelerini ve bu bileşenlerin belirli koşullar altında nasıl davrandığını gösterir. Bu teknik; elementel bileşimin belirlenmesinde, moleküler ve atomik yapıların aydınlatılmasında, kalitatif ve kantitatif analizlerde, katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında ve atomların izotop oranlarının belirlenmesinde önemli bir rol oynar (Skoog et al. 1998, pp. 498-518).

En basit formuyla, kütle spektrometresinin beş bileşeni vardır. Kütle spektrometresinin ilk bileşeni örnek giriştir. Bu bileşen örneği laboratuvar ortamından (1 atm) kütle spektrometresinin basıncına getirir. Kütle spektrometresinin içindeki basınçlar, bir kimyasal iyonizasyon kaynağında birkaç milimetre cıva basınca kadar, enstrümanın kütle analizörü ve dedektör bölgelerinde ise birkaç mikrometre cıva basınca kadar değişir. Örnek girişi iyon kaynağına yönlendirilir, burada örnek molekülleri gaz fazı iyonlarına dönüştürülür. Örnek girişi ve iyon kaynağını ambiyans koşulları altında birleştiren ve bu sayede örnek hazırlama işlemini büyük ölçüde basitleştiren bazı enstrümanlar son zamanlarda geliştirilmiştir. İyonlar daha sonra elektromanyetik bir alan tarafından hızlandırılır. Daha sonra kütle analizörü, örnek iyonlarını kütlelerine göre ayırıştırır. İyonlar daha sonra dedektör tarafından sayılır ve sinyal genellikle bir kişisel bilgisayar olan veri sistemi tarafından kaydedilir ve işlenir. Veri sisteminin çıkışı kütle spektrumu, iyonların m/z oranlarına göre tespit edilen sayısının bir fonksiyonu olarak gösterilen bir grafikdir.

Kütle Spektrometrisi temel kısımları sırasıyla aşağıda verilmiştir (Şekil 7);

1. Numune giriş sistemi
2. İyon kaynağı
3. Dedektör
4. Vakum Sistemi
5. Kütle analizörü



Şekil 7. Kütle Spektroskopisi cihazının şematik gösterimi

Numune Giriş Sistemi

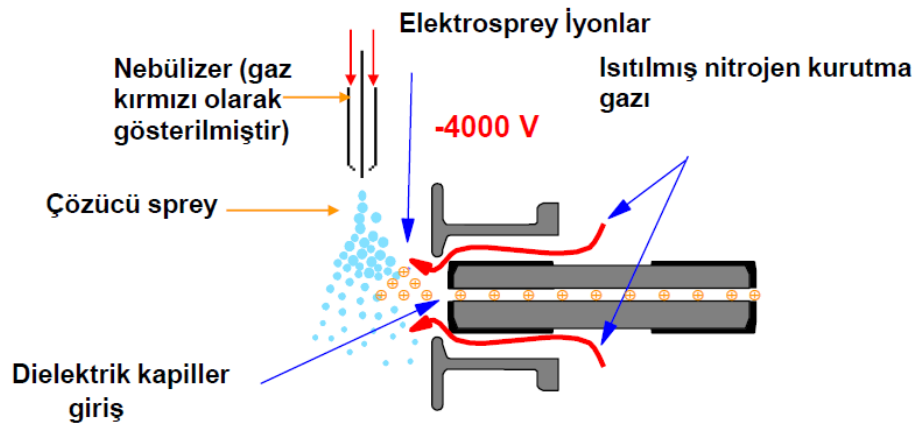
Numune giriş sistemi, örneklerin enjekte edildiği, ön hazırlıkların yapıldığı ve analiz için optimize edildiği bir sistemdir. Numune giriş sistemi, analiz edilecek örneğin kütle spektrometrisi için uygun hale getirilmesini sağlar. Gaz, sıvı veya katı olabilen örnek, önce buharlaştırılmalıdır çünkü iyonizasyon odasına girebilmek için iyonizasyonun gerçekleştiği yerde iyonlara dönüştürülmelidir. Gazlar için basit bir giriş sistemi kullanılabilir, çünkü gazlar zaten buhar halindedir. Ancak, sıvılar veya katılar için daha karmaşık bir sistem gerekebilir. Bu durumda, örneği buhar basıncını artırmak için ısıtılabilen bir fırın içine yerleştirilen bir sistem kullanılabilir. Ancak, örneği bozmadan ısıtma sürecine dikkat edilmelidir (Roškar and Lušin 2012).

İyon Kaynağı

İyon kaynağı, sıvı kromatografi eluentinden çözücüyü uzaklaştırmanın yanı sıra analitin gaz fazı iyonlarını üretme görevini de üstlenir. Atmosferik Basınç İyonizasyon (API) yöntemlerinin uygulanması, LC-MS sistemlerini çığır açan ve analitik tekniklerin öncüsü haline getirmiştir. Bazı iyon kaynakları, API gibi atmosfer basıncında çalışırken, diğerleri Elektron etki (EI) veya kimyasal iyonizasyon (CI) gibi vakumda çalışır. Özellikle Elektrosprey gibi yumuşak API arabirimleri, minimal parçalanma ile moleküler iyonlar üretirken, yüksek enerjili kaynaklar olan EI çoğunlukla parçalanma iyonları oluşturur. API teknikleri, atmosfer basıncında çalışma yeteneği, ters faz kromatografi ile uyumluluk ve çok yüksek duyarlılıkta bütün molekül iyonlarını üretebilme özellikleri nedeniyle genellikle metabolit tespiti, tanımlama ve nicelendirme için kullanılır. Elektrosprey iyonizasyonu (ESI), Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI) ve Atmosferik Basınç Fotoiyonizasyon (APPI) gibi üç API tekniği birbirini tamamlamaktadır (Roškar and Lušin 2012).

Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

Elektrosprey iyonizasyonu, metabolit tanımlama ve nicelendirme için tercih edilen en iyi yöntemlerden biridir. Bu yöntem, molekülleri gaz fazına enjekte etmek için en evrensel tekniktir ve en nazik olduğu için muhtemelen sağlam moleküler iyonlar üretebilir. ESI, özellikle glukuronitler ve diğer faz II metabolitler gibi ilaç metabolitleri gibi polar, iyonik ve termal olarak labil bileşikler için idealdir. Bu teknik, analitlerin iyon kaynağına girişinden önce çözelti içinde iyonlaştırılmasını gerektirir ve bu nedenle oldukça bazik veya asidik bileşikler için en iyi çalışır. Voltajın polaritesine bağlı olarak, iyonlaştırılmış analiti hapsetmiş sıçratılmış damlacıklar pozitif veya negatif olarak şarjlanacaktır. Çözücünün buharlaşmasıyla meydana gelen boyut küçülmesi, damlacığın içindeki yük yoğunluğundaki artışa neden olur ve bu, yükler arasındaki itme kuvvetleri, damlacığın tutkal kuvvetini aştığında patlamasına yol açar. Bu süreç, gaz fazı iyonları üretilene kadar tekrarlanır. Çözeltideki iyonlar, ısı uygulanmadan gaz fazına yayılır, bu da ESI'nın termal olarak labil bileşiklerin analizi için uygun olmasını sağlar. Birçok parametre, analit ve çözelti özellikleri: pKa, analit konsantrasyonu, çözeltideki diğer elektrolitler, çözeltinin dielektrik sabiti, iyon oluşumu sürecini etkiler. İyonizasyon verimliliği üzerinde birçok hareketli faz katkısının etkileri gözden geçirilmiştir. Bir analitin kimyasal yapısına bağlı olarak, çoklu şarjlı moleküler iyonlar oluşturulabilir, bu da biyolojik makromoleküllerin (örneğin, proteinler) analizi için optimaldir. ESI'nın birçok avantajına rağmen, yüksek konsantrasyonlardaki tampon, tuzlar ve matris çözeltilerindeki diğer endojen bileşiklerin neden olduğu iyon bastırma etkilerine duyarlıdır (Şekil 8) (Roškar and Lušin 2012).



Şekil 8. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI) kütle analizörü şematik gösterimi

Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI)

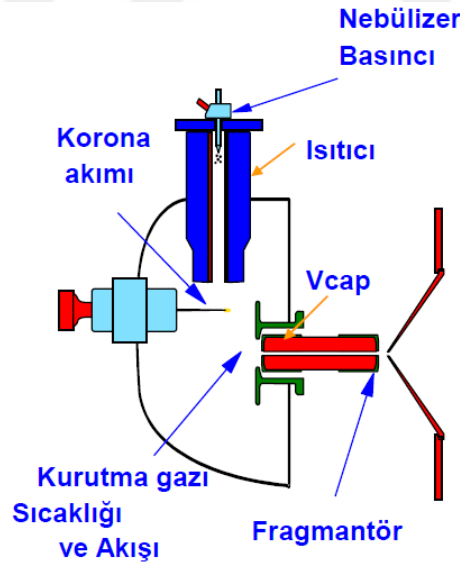
Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI), daha az polar bileşikler için daha uygundur. Ağır halojenli analoglar ve yüksek aromatik bileşikler gibi belirli bileşik sınıfları, APCI üzerinde hemen çalışırken ESI'da hiç veya zayıf bir yanıt verir. APCI, ESI gibi,

Atmosferik Basınç İyonizasyon (API) stratejisine dayanan iyonlar üretir, ancak tamamen farklı bir süreçle gerçekleşir.

APCI'da sıvı eluant, ısınmış bir odada (450-550°C) püskürtülür. Burada nebulizatör gaz akışının yüksek sıcaklığı çözücü ve analitin anında buharlaşmasına neden olur. Uygulanan sıcaklıkta uçuculuk kadar, analitin termal kararlılığı da APCI'nın başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için gereklidir (örneğin, glukuronidler parçalanabilir ve protonlanmış aglikon formunda görünebilir).

Analitlerin iyonizasyonu, yüksek elektron akışı nedeniyle gaz fazında gerçekleşir; burada korona deşarj iğnesinden gelen elektronlarla çözücü molekülleri başlangıçta elektronlarla reaksiyona girer ve ikincil reaksiyonlar aracılığıyla protonlanmış çözücü iyonları üretir. Bu protonlanmış çözücü iyonları daha sonra bir proton transfer ederek protonlanmış analitleri oluşturur. Verimli iyonizasyon için kullanılan hareketli faz, uçucu olmalı ve ayrıca gaz fazında asit-baz reaksiyonlarına uygun olmalıdır.

APCI tekniği, çoğunlukla gaz fazında gerçekleşen iyonizasyon nedeniyle ESI'ye göre daha az iyon bastırma eğilimindedir ve daha geniş bir dinamik tespit aralığı sağlar. Ayrıca, genellikle APCI'da daha yüksek bir akış hızı kullanılır (1-2 ml/dk.), bu da geleneksel ESI'dan (0.1-0.5 ml/dk) daha yüksektir (Şekil 9) (Roškar and Lušin 2012).



Şekil 9. Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) kütle analizörü şematik gösterimi

Atmosferik Basınç Fotoiyonizasyon (APPI)

Atmosferik Basınç Fotoiyonizasyon (APPI), nispeten yeni bir iyonizasyon yöntemidir. Bu teknik, ESI ve APCI tarafından kolayca iyonlaştırılmayan analitlerin iyonlaştırılması için kullanılabilir. APPI'nin APCI ile benzer uygulama alanı vardır ancak biraz daha genişletilmiştir ve nonpolar bileşiklere doğru hafifçe genişletilmiştir. APPI iyon kaynağı, APCI kaynağına çok

benzer, ancak APCI korona deşarj iğnesi fotoiyonizasyon lambası ile değiştirilmiştir. Analitin hareketli fazın bileşimine göre proton afinitesine bağlı olarak, radikal moleküler iyon (genellikle nonpolar bileşikler için) veya protonlanmış moleküler iyon (genellikle polar bileşikler için) elde edilir. APPI, ilaç metabolitlerinin analizi için potansiyele sahiptir ancak iyonizasyon verimliliğini etkileyen önemli parametreleri ve faktörleri tam anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Roşkar and Lušin 2012).

Dedektör

Kütle analizöründen geçen iyonlar elektron çoğaltıcısı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcısında çarpışmayla oluşan akım öncelikle analog voltaja, daha sonra dijital sinyale dönüştürülür. Alınan sinyaller bilgisayara aktarımı sağlanmakta ve veri değerlendirilmesi yapılabilmektedir.

Kütle spektrometrisi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır:

1. **Toplam iyon taraması (TIC):** Analizin belirli bir kütle aralığındaki tüm iyonların taranmasıyla gerçekleşir. Genellikle 10-800 akb gibi geniş bir kütle aralığını içerebilir. Bu yöntem, bir numunedeki tüm iyonların toplam kütle spektrumunu sağlar, bu da numunenin genel bileşimini gösterir.
2. **Seçili iyon taraması (SIM):** Analizi yapılacak belirli bir bileşiğin en kararlı, karakteristik kütle/yük (m/z) oranlarına göre seçilerek taranmasıdır. Bu yöntem, belirli bileşikler hassas bir şekilde izlemek için kullanılır. Seçili iyon tarama süresi (dwell time), analist tarafından belirlenir ve belirli iyonların daha detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanır.
3. **Tek iyon taraması:** Bir numunedeki belirli bir iyonun taranmasıyla gerçekleşir. Tanımlaması kesin olmayabilir, ancak belirli bir iyonun varlığını doğrulamak veya izlemek için kullanılabilir.

Vakum Sistemleri

MS sistemleri yaklaşık 10^{-6} - 10^{-8} torr'da çalışmaktadırlar. MS sistemlerinde vakum sisteminin gerekliliği şu şekilde sıralanabilir.

1. Basınç artışıyla yüksek voltaj kırılmalarına neden olabilir.
2. Kütle spektrometrisinde iyon kaynağında mevcut olan gaz, spektral geri zemine katılabilir.
3. Flaman yüksek basınçta oksijenle ısıtılırsa yükseltgenerek yanabilir.
3. Yüksek basınçla spektrum elde etmek ve değerlendirmek zordur.
4. Basınç artışı olduğunda iyon kaynağına gelen elektron akımında düzeltmeler zorlaşır.

5. Kütle spektrometrisinde iyonların arasındaki çarpışmayı en aza indirmek için düşük basınç sağlayarak analiz yapılmasıdır.

6. Yüksek basınçta iyon kaynağı, analizör ve lensler daha hızlı kirlenmektedir.

MS sistemlerinde cihaz içerisindeki basıncı yaklaşık 10^{-6} torr'da tutmak için farklı pompalar kullanılmaktadır. Bu pompalar; turbo moleküler pompalar ve difüzyon pompalarıdır.

Kütle Analizörü

Kütle analizörünün işlevi, iyonizasyon kaynağında oluşturulan iyonları farklı kütle-yük (m/z) oranlarına göre ayırmaktır. Kütle ayırımının kalitesi, kütle analizöründe yakın m/z değerlerinin ne kadar etkili bir şekilde ayrılabilirdiği ile karakterizedir. Kütle analizörleri çözünürlük açısından düşük ve yüksek çözünürlükteki cihazlara göre sınıflandırılır. Başka bir önemli parametre olan kütle doğruluğu ile ilişkilidir ve bunun sonucunda belirli bir analitin elementel formülünün belirlenmesine olanak tanır. Uygun analizörün seçimi, analizin amacı ve cihazın performansı tarafından yönlendirilir, ancak aynı zamanda cihazın uygunluğu ve maliyet etkinliğine bağlıdır. Üçlü kuadropol cihazlar (Triple quadrupole instruments, QQQ), İyon tuzak cihazlar (Ion trap instruments, IT), Üçlü kuadropol-lineer iyon tuzaklı cihazlar (Triple quadrupole-linear ion traps, QTrap), Uçuş zamanlı cihazlar (Time of flight, TOF), Üçlü kuadropol-uçuş zamanı (Triple quadrupole-time of flight, QTOF), Orbitrap ve Fourier dönüşüm-iyon siklotron rezonansı (Fourier transform-ion cyclotron resonance, FT-ICR) olmak üzere birçok kütle analizör cihaz bulunmaktadır (Roškar and Lušin 2012).

Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, sabit ve hareketli iki faza sahip olacak şekilde ayrılması ve analiz edilmesi yöntemidir. Bu terim, Yunanca "chroma" (renk) ve "graphein" (yazmak) kelimelerinin birleşiminden türetilmiştir ve ilk kez 1903 yılında Rus botanikçi Michael Tsvett tarafından renkli bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla kullanılmıştır.

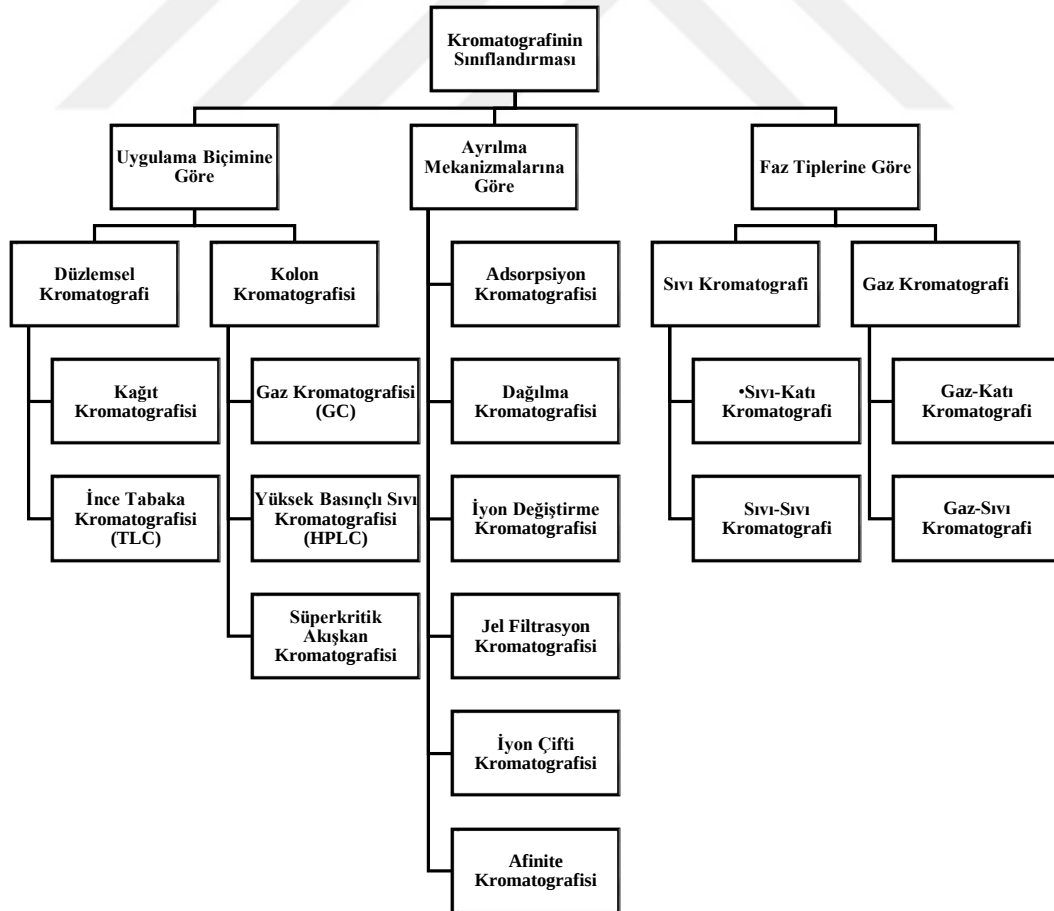
Kromatografik yöntemler, diğer analitik yöntemlere kıyasla daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kromatografide hareketli faz (mobil faz) analitik sistemin içinden geçen ve ayırma işlemine katılan sıvı veya gaz fazıdır. Örneğin, sıvı kromatografisinde (LC), hareketli faz sıvı bir çözelti olabilir. Gaz kromatografisinde (GC) ise, hareketli faz genellikle inert bir taşıyıcı gazdır. Hareketli faz, analitik kolonun içinden geçerken örnek bileşenleri ile etkileşime girer. Sabit faz (durgun veya statik faz) genellikle bir katı kolon dolgu maddesini veya vizkoz haldeki sıvı kolon materyalini ifade eder. Analitik kolon veya tabaka üzerinde bulunur ve örnek bileşenlerinin hareketli faz ile etkileşimini sağlar. Bu etkileşim, bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmelerine ve dolayısıyla ayrılmasına neden olur.

Kromatografik bir ayırmada kolana verilen akışkana elüent (geri alma çözeltisi), kolondan çıkan akışkana ise elüat (geri alınan çözelti) adı verilir. Hareketli faz olarak sıvı ya da gazın kolondan geçme süresine elüsyon (geri alma) denir. Dedektör yanıtını elüsyon süresinin fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmesine kromatogram denir. Kromatogramda her bir bileşenin kolona enjeksiyonundan dedektöre ulaşınca kadar geçen süreye alıkonma süresi, çözünenin kolondan geri alınabilmesi için harcanan hareketli fazın hacmine ise alıkonma hacmi denir (Harris 2010).

Kromatografi, karışımdaki bileşenlerin hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve boyut eleme gibi özelliklere göre sabit fazdan ayrılması esasına dayanır (Skoog *et al.* 1998, pp. 674-777).

Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, farklı prensiplere dayanan ve çeşitli uygulama alanlarına sahip olan bir dizi tekniği içerir. Bu yöntemler; uygulama biçimine göre, ayrılma mekanizmalarına göre ve faz tiplerine göre olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma aşağıda Şekil 10'de gösterilmiştir (Skoog *et al.* 1998, pp. 675-777; Gündüz 2002).



Şekil 10. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografik yöntemler; Adsorpsiyon Kromatografisi, Dağılma Kromatografisi, İyon Değişirme Kromatografisi, Boyut-Elme (Jel-Filtrasyon) Kromatografisi, İyon Çifti Kromatografisi ve Afinite Kromatografisi olmak üzere sınıflandırılır (Skoog *et al.* 1998, pp. 725-764; Gündüz 2002).

Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi, bir maddenin bir yüzey üzerine tutunma özelliği olan adsorpsiyon prensibine dayanan bir kromatografi tekniğidir. Adsorpsiyon, bir maddenin yüzeyine başka bir madde tarafından bağlanması anlamına gelir. Bu bağlanma, adsorban (sabit faz) ve analit (örnek) arasındaki etkileşimlere dayanır. Adsorpsiyon kromatografisi genellikle inorganik ve organik bileşenleri ayırmak, saflaştırmak veya analiz etmek amacıyla kullanılır. Adsorban (sabit faz) genellikle katı bir malzemedir ve bu malzemenin yüzeyi analit molekülleri tarafından adsorpsiyon için seçilen özelliklere sahiptir. Örneğin, silika jel, alumina veya başka bir malzeme kullanılabilir. Analit, analiz edilen maddeyi temsil eder. Bu madde, adsorban yüzeyine bağlanabilir ve bu bağlanma, moleküler etkileşimler, hidrojen bağları veya van der Waals kuvvetleri gibi çeşitli adsorpsiyon mekanizmalarına dayanabilir. Hareketli faz adsorbanın üzerinden geçen sıvı fazdır. Analit, eluatın içinde çözünür ve adsorban yüzeyine bağlandıktan sonra, analitlerin desorpsiyonu ve ayrılması için farklı elüsyon koşulları kullanılabilir. Adsorpsiyon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (TLC) veya kolon kromatografisi gibi farklı varyasyonlarda uygulanabilir. Ayırma ve analiz işlemleri genellikle adsorbanın özelliklerine, analit özelliklerine ve uygulanan koşullara bağlı olarak değişir.

Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi, bir maddeyi taşıyan fazın iki veya daha fazla faz arasında dağılımına dayanan bir kromatografi tekniğidir. Bu tekniğin temel prensibi, analit moleküllerinin durgun fazın (adsorbanın) yüzeyine adsorbe olmaktan ziyade, hareketli fazın içinde çözünmeleridir. Bu çözünme ve çözünme dengesi, analitlerin hareketli faz ve durgun faz arasında sürekli olarak dağılımını sağlar. Dağılma kromatografisinde, bir kolon içindeki durgun fazın tanecikleri genellikle organik çözücü gibi sıvılarla kaplanır. Analit molekülleri, bu kaplama içinde çözünerek taşınırlar. Dağılma kromatografisinin başlıca özelliklerinden biri, analitlerin bir noktadan diğerine hızla dağılabilmeleridir. Bu teknik genellikle sıvı-sıvı kromatografisi veya sıvı-gaz kromatografisi gibi farklı form ve varyasyonlarda uygulanabilir. İki faz arasındaki çözünme dengesi ve bu dengenin kontrol edilmesi, analitlerin ayrılmasını ve tanımlanmasını sağlar. Dağılma kromatografisi, genellikle analitlerin polarite, moleküler boyut, çözünürlük ve diğer özelliklerine bağlı olarak uygulanır. Bu yöntem, organik bileşenlerin

analizi, ilaç geliştirme süreçlerinde kullanılabilirlik çalışmaları, doğal ürün analizleri ve çevresel analizler gibi birçok analizde kullanılmaktadır.

İyon Değiştirme Kromatografisi

İyon değiştirme kromatografisi, özellikle iyonik bileşenleri ayırmak ve analiz etmek için kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Sabit faz, özel bir reçine veya materyal içerir ve bu materyal, iyonların değiş tokuşunu gerçekleştirebilecek özel gruplar içerir. Negatif yüklü iyonları tutan bir sabit faz cinsi "katyon değiştirme reçinesi," pozitif yüklü iyonları tutan bir sabit faz cinsi ise "anyon değiştirme reçinesi" olarak adlandırılır. Hareketli faz, iyonların durgun faz içindeki değiş tokuşunu sağlar. Bu, özel bir çözelti içinde çözünmüş olan iyonları içerebilir. Analit örneği, iyon değiştirme reçinesine uygulandığında, iyonlar durgun faz ile değiştirilir. Bu değiştirme süreci, iyonların özelliklerine (yük, boyut, kimyasal özellikler) bağlı olarak gerçekleşir. İyonların durgun faz ile değiş tokuşu, farklı iyonların farklı hızlarda hareket etmesine ve dolayısıyla ayrılmasına olanak tanır. İyon değiştirme kromatografisi; su analizi, gıda ve içecek endüstrisinde mineral analizleri, biyokimyasal uygulamalar, ilaç geliştirme süreçlerinde kullanılabilirlik çalışmaları gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır.

Boyut-Elme (Jel-Filtrasyon) Kromatografisi

Boyut elme kromatografisi, aynı zamanda jel filtrasyon kromatografisi veya moleküler dışlama kromatografisi olarak da bilinen bir kromatografi tekniğidir. Bu teknik, bir maddenin moleküler boyutuna dayanarak partikülleri ayırmak için kullanılır. Genellikle polimerler, proteinler ve diğer büyük moleküler ağırlıklı bileşenlerin analizi için uygundur. Durgun faz genellikle gözenekli bir jel veya diğer malzemelerden oluşur. Bu gözenekli yapı, küçük moleküllerin içine nüfuz etmesine izin verir. Hareketli faz genellikle bir çözücüdür. Analit, bu çözücü içinde çözünür ve durgun fazın gözeneklerine nüfuz eder. Analitlerin ayrılması, moleküler boyutlarına bağlıdır. Küçük moleküller, durgun fazın içindeki gözeneklere nüfuz edebilirken, büyük moleküller gözeneklerin içine nüfuz edemez ve daha hızlı bir şekilde hareket eder. Bu nedenle, küçük moleküller daha uzun bir yol kat eder ve daha geç ayrılır. Boyut dışlama kromatografisi, polimerlerin dağılım profillerini, proteinlerin moleküler kütlelerini ve diğer büyük moleküler ağırlıklı bileşenlerin analizini belirlemek için sıkça kullanılır. Bu teknik, malzeme bilimi, biyokimya, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisi gibi birçok uygulama alanında önemli bir araçtır. Genellikle proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir.

İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi, iyonik bileşenleri, özellikle iyonik organik bileşenleri ve tuzları ayırmak ve analiz etmek için kullanılır. Analitler, çözeltideki iyonlarla çiftler oluşturmak

üzere bir iyon çifti reaktanı ile karıştırılır. Genellikle bu reaktan, ters fazlı bir sıvı kromatografi kolonunda kullanılan organik bir çözücü içinde bulunur. İyon çiftleri oluştuktan sonra, analitler çiftler halinde hareket ederler ve ayrıca bir kolon içinden geçerler. Bu süreç, analitlerin büyüklüklerine, polaritelerine ve iyon çifti oluşturma kapasitelerine bağlı olarak değişir. Elüsyon işlemi, analitlerin ayırt edici bir şekilde kolondan geçmelerini sağlar. Ayırma işleminden sonra, ayrılan analitler bir detektörle algılanır. UV-Visible spektrofotometre, floresans dedektörü veya kütle spektrometresi gibi çeşitli dedektörler kullanılabilir. İyon çifti kromatografisi, özellikle farmasötik, biyokimya ve çevresel analiz gibi alanlarda kullanılır. Bu yöntem, iyonlar arasındaki etkileşimleri kullanarak, özellikle iyonik bileşenlerin daha etkili bir şekilde ayrılmasına ve tespit edilmesine olanak tanır (Harris 2010).

Afinite (Etkileşim) Kromatografisi

Afinite kromatografisi, bir molekül veya bir grup molekülün özel bir hedefe (örneğin, bir protein veya bir enzim) karşı spesifik bir bağlanma özelliğini kullanarak ayırma ve analiz yapmak için kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Bu yöntem genellikle biyokimya, moleküler biyoloji ve ilaç geliştirme alanlarında yaygın olarak kullanılır. Durgun faz, özel bir bağlanma özelliğine sahip bir madde içerir. Bu madde, genellikle hedef molekülle spesifik bir etkileşime girebilen bir ligandı içerebilir. Ligand, bir reseptörün (örneğin, protein) özel bir bölgesine bağlanabilir. Ayırmak istediğiniz hedef molekül içeren bir örneği içerir. Bu hedef molekül, durgun fazdaki özel ligand ile spesifik bir şekilde etkileşime girebilir. Hareketli faz, örnek içindeki diğer bileşenleri taşımak ve analiti durgun fazdan çıkarmak için kullanılır. Analit içindeki hedef molekül, durgun fazın içindeki ligand ile spesifik bir etkileşim kurar. Bu etkileşim, diğer bileşenlerden ayrılmasını sağlar. Sonrasında, analit durgun fazdan elüe edilerek ayrılır ve analiz için hazır hale gelir. Afinite kromatografisi, özellikle proteinlerin, enzimlerin ve diğer biyolojik moleküllerin saflaştırılması ve analizi için güçlü bir araçtır. Bu teknik, hedef moleküllerle özel bir bağlanma yeteneğine sahip ligandların seçilmesi ile spesifiklik sağlar (Harris 2010).

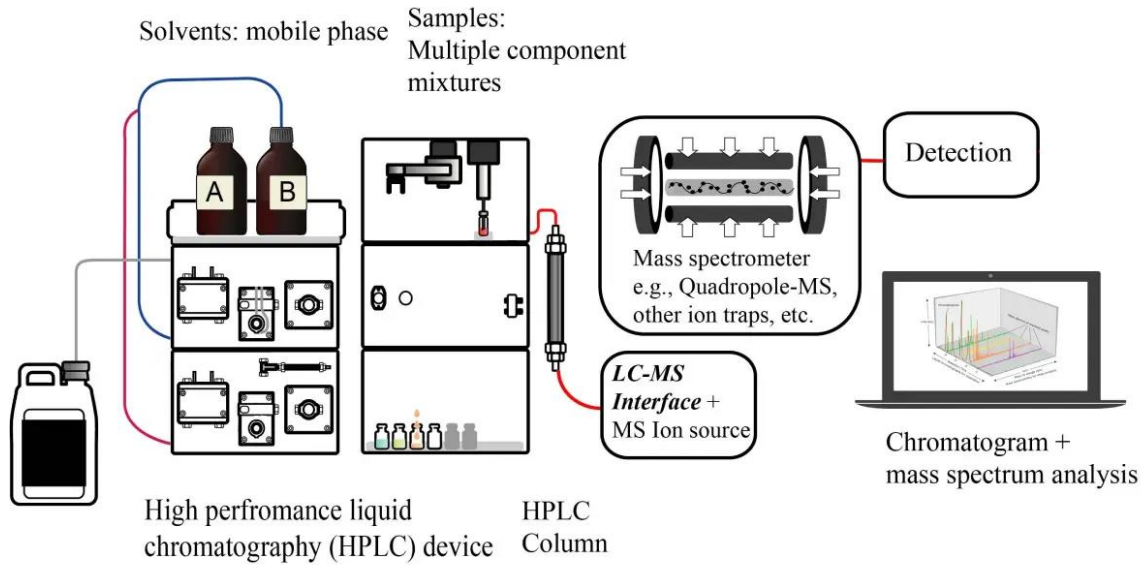
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS), sıvı kromatografisi prensiplerine dayanan ve kütle dedektörünün sunduğu çalışma kolaylığı, keskinlik gibi özelliklerle birleştirilen bir yöntem ve cihazdır. Bu sistemler, birçok analizde en çok tercih edilenler arasında yer alır. LC-MS, yüksek seçicilik ve hassasiyet sağlayan güçlü bir teknolojidir. Genellikle belirli bir karışımdaki bir maddenin miktar analizi için kullanılır. LC-MS sistemi, yüksek duyarlılık ve özgüllük sunan bir tekniktir. Her molekül için belirli bir retansiyon zamanı

ve bir m/z değeri vardır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekül olabilir, ancak aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada oldukça düşüktür (1/10000). Bu nedenle LC-MS sistemi, çok düşük konsantrasyonlardaki maddelerin miktarını belirleme yeteneği sağlar (Skoog *et al.* 1998, pp. 725-764; Gündüz 2002) (Şekil 11).

LC-MS/MS sisteminin ana bileşenleri sırasıyla aşağıda verilmiştir.

1. Pompa sistemi
2. Analitik kolon
3. İyon kaynağı
4. Vakum sistemi
5. Lensler
6. Analizör
7. Dedektör
8. Yazılım



Şekil 11. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi cihazının şematik gösterimi

30 yıldan fazla bir süredir sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) araştırması, bir dizi farklı arayüzün ortaya çıkmasına neden olmuştur. Çeşitli LC-MS arayüzleri, çeşitli araştırma laboratuvarlarında önerilmiş ve inşa edilmiştir. Bunlardan bazıları enstrüman üreticileri tarafından benimsenmiş ve ticari olarak kullanılabilir hale gelmiştir. 1990'ların başlarında API'a dayalı arayüzlerin ortaya çıkmasıyla birlikte, bu arayüzlerin çoğu zamanla eskimiştir. Kapiler giriş arayüzü ile sıvı kromatografi (LC) sütunu ile kütle spektrometresi (MS) iyon kaynağı arasında bir bağlantı sağlanmıştır. Bu arayüz, LC ve MS'nin

birleştirilmesinde bir geçiş noktası olarak görev yapar. LC-MS/MS sisteminde;

Pompa Sistemi: Örnekleri sabit bir akış hızında analitik kolon üzerinden geçirerek ayırma işlemini gerçekleştirir.

Analitik Kolon: Örnek içindeki bileşenleri kromatografik olarak ayırmak için kullanılır. Kullanılan analitik kolon ayırımı gerçekleştirilecek olan örneğin yapısına uygun olarak seçilir.

İyon Kaynağı: LC-MS/MS sisteminde analizi yapılacak örneği iyonize eder ve bu iyonları kütle analizine hazır hale getirir.

Vakum Sistemi: MS analizleri için düşük basınç sağlanarak iyonların kütle spektrometresine iletilmesi sağlanır.

Lensler: İyonların kütle spektrometresine daha etkili bir şekilde iletilmesini sağlamak için kullanılan elektrostatik malzemelerdir.

Analizör: İyonların kütle/yük oranını (m/z) ölçen bölümdür. Farklı analizör tipleri kullanılabilir. Örneğin, kuadropol, time-of-flight (TOF), veya ion trap.

Dedektör: Kütle spektrometresindeki analizörden geçen iyonların algılandığı bölümdür. Bu bilgiler, örnekteki bileşenlerin kütle spektrumunun oluşturulmasında kullanılır.

Yazılım: Elde edilen verileri işleyen ve yorumlayan bilgisayar yazılımıdır. Kütle spektrometresi ile elde edilen sonuçları analiz ederek örnek bileşenlerini belirlemek için kullanılır.

LC-MS/MS Sistemlerinin Avantajları

1. Yüksek Hassasiyet
2. Yüksek Seçicilik
3. Çoklu Analit Tespiti
4. Düşük Dedeksiyon Limiti
5. Yüksek Çözünürlük
6. Yüksek Hız ve Verimlilik
7. Matris Etkisi Azalması
8. Kalitatif ve Kantitatif Analiz Yeteneği
9. Farklı Çözücülerle Uyumlu (Sweetman 2001; Bartlett *et al.* 1997).

LC-MS/MS Kullanım Alanları

LC-MS/MS sistemi kullanılarak birçok analiz yapılmaktadır.

İlaç Analizi: Farmasötik ve biyomedikal alanlarda ilaçlar ve ilgili bileşenlerin analizi için yaygın olarak kullanılır. İlaç metabolitleri, biyotransformasyon ürünleri ve biyosupresyon ürünleri gibi bileşenlerin belirlenmesi için etkili bir araçtır.

Klinik Analizler ve Biyomedikal Araştırmalar: Biyolojik sıvılardan (kan, serum, idrar) biyomoleküllerin analizi için LC-MS/MS kullanılır. Protein, peptid, hormon, vitamin, steroid ve diğer biyomoleküler bileşenlerin tespiti ve nicel analizi yapılmaktadır.

Gıda ve İçecek Analizi: Gıda ve içecek örneklerinden çeşitli analitlerin (pestisitler, ilaç kalıntıları, mikotoksinler, vitaminler) tespiti ve nicel analizi için LC-MS/MS sıkça kullanılır. Gıda güvenliği ve kalite kontrolü uygulamalarında önemli bir araçtır.

Çevresel Analiz: Çevresel örneklerden (toprak, su, hava) organik kirleticilerin (pestisitler, PCB'ler, PAH'lar) belirlenmesi ve izlenmesi için kullanılır.

Nükleik Asit Analizi: Nükleik asitlerin (DNA, RNA) belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılabilir. Özellikle DNA ve RNA fragmanlarının belirlenmesi amacıyla uygulamalarda kullanılır.

Metabolomiks ve Proteomiks Araştırmalar: LC-MS/MS, metabolomiks ve proteomiks araştırmalarda kullanılarak biyolojik sistemlerdeki küçük moleküllerin ve proteinlerin tespiti ve karakterizasyonu için etkili bir araçtır.

Toksin Analizi: Çeşitli toksinlerin (mikrobiyal toksinler, bitkisel toksinler, deniz ürünleri toksinleri) belirlenmesi için kullanılır. Gıda güvenliği ve çevresel analizlerde toksin tespiti amacıyla sıkça kullanılır.

Biyoanaliz ve Farmakokinetik Çalışmalar: Biyolojik matrislerdeki ilaçlar ve metabolitlerin belirlenmesi için biyolojik analiz ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılır.

Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, bir çözelti ya da süspansiyon içindeki bir maddenin, genellikle bir çözücü kullanılarak, diğer bileşenlerden ayrılma işlemidir. Bu kimyasal işlem, belirli bir maddeyi hedef olarak diğer bileşenleri geride bırakmayı amaçlar. Ekstraksiyon, çeşitli endüstrilerde ve laboratuvar ortamlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. İşlemin temel amacı, çözelti içindeki bir maddenin belirli bir çözücü ile çözünerek çözeltiden ayrılmasıdır. Bu çözelti içindeki hedeflenen madde, çözücü ile çözünerek bir çözelti oluşturur. Daha sonra bu çözelti,

genellikle bir ayrılma işlemiyle, hedeflenen maddeyi içeren çözelti ve diğer bileşenleri içeren çözelti olarak ayrılır.

Ekstraksiyonun örnekleri arasında organik kimyada bir bileşiği bir çözeltilerden çıkarma, bitki özlerinden yağları çıkarma veya farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılan etken maddeleri izole etme bulunabilir. Bu teknik, özellikle bir bileşenin seçici bir şekilde izole edilmesi gerektiğinde ve diğer bileşenlerden ayrılması zorunlu olduğunda önemlidir. Ayrıca, çözelti içindeki konsantrasyonu artırma veya bir maddeyi diğerinden ayırarak saflaştırma amaçlarıyla da kullanılabilir. Genel olarak ekstraksiyon sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı-sıvı ekstraksiyonu olarak ikiye ayrılır. Bunlara ek olarak katı-faz ekstraksiyonunu da ekleyebiliriz (Feilden 2011).

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu (Çözücü Ekstraksiyonu)

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bir çözeltilerde bulunan bir bileşiğin, başka bir sıvı çözeltiliye transfer edilmesi işlemidir. Bu yöntem, bir maddeyi bir çözeltilerden ayırma veya izole etme amacıyla kullanılır. Genellikle organik bileşiklerin veya metal iyonlarının çıkartılması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır. Bu işlem genellikle yoğunlukları farklı, birbirini içinde karışmayan iki ayrı sıvı faz arasında gerçekleşir ve Nernst kanununa göre açıklanır. İlk adım, çıkarılacak bileşiği içeren çözeltinin bir çözücü ile karıştırılmasıdır. Daha sonra, çözelti içindeki hedef bileşiği çözen bir diğer çözücü eklenir. Bu iki çözelti, iki farklı faz oluşturur: üstte yoğunluğu daha az olan organik faz ve altta ise çıkarılan bileşiği içeren su fazı bulunur. Genel olarak su içindeki organik maddeyi, organik çözücü fazına alabilmek hedeflenir. Bu adım birkaç kez tekrarlanabilir, böylece çıkarılan bileşik miktarını artırabilirsiniz.

Hidrofilik bileşikler, polar sulu fazı tercih ederken, hidrofobik bileşikler organik çözücüyü tercih eder. Organik faz içine ekstrakte edilen analitler, çözücünün buharlaştırılmasıyla nispeten kolay bir şekilde elde edilebilir. Ekstraksiyon verimliliği, çözücü seçimi, çözücü hacmi, pH ve çözeltilerden çöktürme etkisi kullanılarak artırılabilir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, biyokimya, analitik kimya, organik kimya ve biyoteknoloji gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, özellikle bir çözeltilerdeki bileşiklerin seçici bir şekilde izole edilmesi veya konsantre edilmesi gerektiği durumlarda etkilidir (Feilden 2011). Çözücülerle yapılan diğer ekstraksiyon metodları ise aşağıda verilmiştir (Zhang et al. 2018).

1. Maserasyon
2. Dimaserasyon

3. Dekoksiyon
4. İnfüzyon
5. Perdesens
6. Dijestiyon
7. Perkolasyon

Katı-Sıvı Ekstraksiyonu (Soxhlet Ekstraksiyonu)

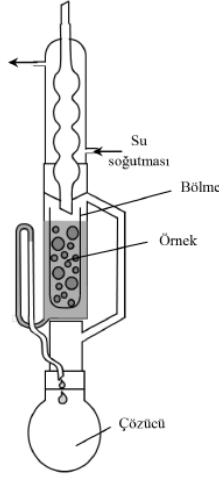
Soxhlet ekstraksiyonu, katı örneklerden bileşenlerin çıkarılması için kullanılan en yaygın tekniklerden biridir ve bir yüzyıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Başlangıçta sütteki yağın belirlenmesi için kullanılmıştır. Bu nedenle, genellikle diğer tüm ekstraksiyon teknikleri, genellikle Soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırılır (Feilden 2011).

Soxhlet ekstraktörü, katı veya yarı-katı numunelerden organik bileşiklerin çıkarılması için kullanılan eski bir ekstraksiyon sistemidir. Cihaz, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör ve ısıtma sisteminden oluşur (Şekil 12).

Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesine yerleştirilir. Altındaki solvent şişesine konulan solvent, kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır. Kaynayan solvent buharları kondansatöre taşınır, yoğunlaşır ve örneğe doğru damlar. Solvent, örneği ıslatır ve sonra sifonun tepesine ulaştığında, tüm örnek bölmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlar. Bu şekilde sıcak solvent birkaç kez örnek içinde dolaşır. Ekstrakte olan analitler, solvent şişesinde kalırken, temiz solvent buharlaştığından her döngüde taze solvent kullanılır.

Soxhlet ekstraksiyonu genellikle organik bileşiklerin katı örneklerden çıkarılmasında kullanılır. Bu bileşikler, solventin kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Ekstraksiyon süreleri genellikle 6 ila 24 saat arasında değişir ve büyük solvent hacimleri gerektirebilir. Ekstraksiyon solventleri genellikle saf organik solventler veya karışımlardır.

Soxhlet cihazı, düşük maliyetle temin edilebilen bir cihaz olup, eşzamanlı ekstraksiyona izin verir. Ancak, örnek bölmesinin temizliği kullanım sırasında karşılaşılan potansiyel bir problem olabilir. Bu nedenle, kullanımdan önce temiz bir solventle ekstraksiyon yaparak temizlenmesi önerilir (Büyüktuncel 2012).



Şekil 12. Soxhlet ekstraksiyon düzeneği

Soxhlet ekstraksiyonu avantajları;

1. Soxhlet ekstraksiyonu, sürekli bir ekstraksiyon işlemidir. Bu sürekli döngü, çözücünün tekrar tekrar kullanılmasını sağlar, bu da işlemi verimli hale getirir ve uzun süreli ekstraksiyonlarda etkili olabilir.
2. Özellikle organik bileşenlerin çıkarılması için kullanılan bu yöntem, belirli bileşenlerin seçici olarak ekstraksiyonunu sağlayabilir.
3. Soxhlet sistemi, çözücü miktarını otomatik olarak kontrol edebilir. Bu, çözücünün dengeli bir şekilde geri dönmesini sağlayarak ekstraksiyonun verimliliğini artırabilir.
4. Yöntem, çözücünün geri kazanılmasını ve tekrar kullanılmasını sağlar. Bu da maliyet tasarrufu sağlayabilir.
5. Soxhlet sistemi, uzun süreli ekstraksiyonlar için ideal olabilir. Sürekli döngü, bileşenlerin tam olarak çözücüye geçmesini sağlar.

Soxhlet ekstraksiyonu dezavantajları;

1. Uzun süre gerektirmesi,
2. Fazla miktarda organik çözücü kullanması,
3. Isı aldığı zaman kararsız olan hedef türlerin bozunmasına yol açabilmesi,
4. Büyük miktarlarda çözücü kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağının zorunlu olması,
5. Çözücü seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur.

Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

Katı faz ekstraksiyonu (SPE); farmasötik, klinik, gıda ve çevre analizi alanlarında örnek temizleme ve eser element zenginleştirme için tercih edilen bir teknik haline gelmiştir. Gerçektende, diğer örnek hazırlama tekniklerine göre daha çok yönlülük ve seçicilik sunar. Sıvı-sıvı ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında daha hızlıdır, çok daha az çözücü gerektirir, olası emülsiyon oluşumunu önler, örnek hacimleri daha küçük olabilir ve otomasyona çok daha elverişlidir (Verette 2010).

SPE genellikle sıvı örnekleri hazırlamak ve yarı uçucu veya uçucu olmayan analitleri çıkarmak için kullanılır. Ancak önceden çözücülere çekilen katılarla da kullanılabilir. SPE ürünleri örnek çıkarma, konsantrasyon ve temizlik için mükemmel olanaklar sunar. Genellikle dört çok geniş uygulama sınıfında kullanılır:

1. Biyolojik örnekler ve doğal ürünlerde
2. İlaçlarda
3. Yiyecek ve içeceklerde
4. Çevresel örnekler ve kirliliklerde

SPE için iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Birinci olarak, ilgilenilen analit tutulabilir ve matris interferansları yıkanabilir. İkinci olarak ise, ilgilenilen analit yıkanır ve matris interferansları tutulur.

SPE metodunda maddelerin birbirinden ayrılması, analizi yapılacak maddenin molekülleri ile tutucu maddedeki etkin gruplar arasındaki moleküller arası etkileşimler sayesinde açıklanır. Analizi yapılacak madde molekülleri tutucu maddelerdeki etkin gruplara iyonik, hidrojen, dipol-dipol, dipol-indüklenmiş dipol ve indüklenmiş dipol-indüklenmiş dipol (Van der Waals) bağları ile bağlanır. Bu şekilde aranan madde, matristeki istenmeyen bileşikler ve çözücüler birbirinden ayrılmış olur (Yavuz ve Aksoy 2006).

SPE kartuşları, geniş bir kimyasal çeşitlilik, adsorban ve boyut yelpazesi içinde bulunmaktadır. Her uygulama ve örnek için en uygun ürünü seçmek oldukça önemli olabilir. SPE’de genel olarak fazlar ilgi duyulan analit ile başlıca etkileşim mekanizması tarafından kategorize edilir:

1. Ters faz (sulu matris içinden hidrofobik analit çıkarma)
2. Normal faz (non-polar organik çözücülerden polar analit çıkarma)
3. İyon değişimi (Anyonik ve katyonik değişim)

4. Birleşik çoklu etkileşim mekanizmalarına sahip fazlar (karışık mod fazları) (Feilden 2011).

SPE metodunun avantajları

1. SPE, belirli bileşenlerin seçici olarak tutulmasına ve diğer istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılmasına olanak tanır. Bu, analizlerin hassasiyetini artırabilir ve arka plan gürültüsünü azaltabilir.
2. Örneklerin temizlenmesi, SPE'nin önemli bir avantajıdır. İstenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması, araştırma veya analiz sırasında örneklerin daha net ve doğru sonuçlar vermesini sağlar.
3. SPE, belirli bileşenlerin konsantre edilmesi için kullanılabilir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda bulunan bileşenlerin analiz edilmesi gerektiğinde bu avantaj çok önemlidir.
4. Örnek matrisinin etkilerini azaltmak için SPE kullanılabilir. Matris içindeki bileşenler, tutucu malzeme ile etkileşime girerek matrisin değişmesini sağlar ve analiz edilecek bileşenlerin daha net bir şekilde incelenmesini sağlar.
5. SPE, belirli çözücülerle çalışabilir ve bu çözücülerin daha verimli kullanılmasına olanak tanır. Örnek içindeki bileşenler, çözücü tarafından daha etkin bir şekilde elde edilebilir.
6. SPE, farklı bileşenlerin çıkarılması, temizlenmesi veya yoğunlaştırılması için geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Farklı tutucu maddeler veya farklı koşullar kullanılarak çeşitli analitlerin işlenmesini sağlar (Yavuz ve Aksoy 2006).

Modern Ekstraksiyon Yöntemleri

Günümüzde klasik ekstraksiyon teknikleri dışında gelişen teknolojiyle paralel olarak yeni ekstraksiyon yöntemleri de geliştirilmiştir. Geliştirilen modern ekstraksiyon yöntemleri aşağıda sırasıyla verilmiştir.

1. Vurgulu Elektrik Alanı Yardımlı Ekstraksiyon
2. Enzim Destekli Ekstraksiyon
3. Mikrodalga Yardımlı Ekstraksiyon
4. Basınçlı Sıvı Ekstraksiyonu
5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
6. Ultrasonik Yardımlı Ekstraksiyon (Şengül ve Topdaş 2019)

Validasyon

Analitik metot validasyonu, bir analitik yöntemin belirli bir matris içindeki konsantrasyonu doğru bir şekilde tespit edebilme yeteneğini değerlendirmek için gerçekleştirilen bir dizi işlemi içerir. Metot validasyonu, özellikle analitik kimya, biyokimya ve diğer laboratuvar alanlarında, belirli bir analitik yöntemin kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini belirlemek için önemlidir. Bu, özellikle endüstriyel üretim, ilaç geliştirme, gıda güvenliği ve çevre analizleri gibi alanlarda doğru kararlar almak için temel bir gerekliliktir. Analitik ölçümler, genellikle bilimsel ve endüstriyel kararlar almak için temel veriler sağlar. Ancak, bu ölçümlerin güvenilirliği, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği, kararların doğruluğunu etkileyen kritik unsurlardır. Bu nedenle, bir analitik yöntemin doğru ve güvenilir sonuçlar üretebilme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılan metot validasyonu, analitik sonuçlara olan güveni artırmak ve bu verilere dayalı kararların doğruluğunu sağlamak için önemlidir. Metot validasyonu süreci, bir analitik yöntemin belirli kriterlere uygunluğunu değerlendirir. Bu kriterler arasında hassasiyet, spesifite, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve belirli bir analitik uygulama bağlamında performans gibi faktörler bulunabilir. Bu değerlendirme süreci, analitik yöntemin bir dizi kontrol ve kalite güvence adımını içerir (ICH 1995).

Uluslararası kabul edilen çeşitli validasyon kriterleri mevcuttur. ICH, FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş olan validasyon parametreleri aşağıdaki sırasıyla verilmiştir.

1. Spesifiklik, Seçicilik (Specificity/Selectivity)
2. Doğruluk (Accuracy)
3. Kesinlik (Precision)
4. Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)
5. Hassasiyet (Sensitivity) (Teşhis ve Tayin Sınırı)
6. Tekrar üretilebilirlik, Tekrarlanabilirlik (Reproducibility, repeatability)
7. Sağlamlık/Tutarlılık (Robustness/Ruggedness)
8. Geri kazanım (Recovery)
9. Kararlılık (Stability)

Spesifiklik, Seçicilik (Specificity/Selectivity)

Spesifiklik, mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında analitin kesin olarak değerlendirilmesi yeteneğidir. Tipik olarak bunlar safsızlıkları, parçalayıcıları, matrisi vb.

içerebilir. Bir analitik prosedürün spesifiklik eksikliği, diğer destekleyici analitik prosedür(ler) tarafından telafi edilebilir.

Doğruluk (Accuracy)

Analitik bir prosedürün doğruluğu, kabul edilen geleneksel bir gerçek değer veya kabul edilen referans değeri ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder. Doğruluk, geri kazanım ve bağıl hata olmak üzere iki şekilde elde edilir.

Kesinlik (Precision)

Bir analitik prosedürün kesinliği, aynı homojen örnekten yapılan çoklu örnekleme ile elde edilen ölçümler arasındaki sonuçların yakınlığını ifade eder. Kesinlik üç şekilde değerlendirilebilir: tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı laboratuvar, aynı ekipman ve aynı analiz prosedürü altında yapılan tekrarlı ölçümlerin derecesini ifade eder. Bu, bir analitik yöntemin ölçüm sonuçlarının aynı koşullar altında ne kadar tutarlı olduğunu gösterir. Tekrarlanabilirlik, analizin güvenilirliği ve hassasiyeti hakkında bilgi sağlar. Ölçümler arasındaki tutarlılık ne kadar yüksekse, analitik yöntemin tekrarlanabilirliği o kadar iyidir. Tekrarlanabilirlik genellikle standart sapma veya varyans gibi istatistiksel ölçümlerle değerlendirilir.

Ara kesinlik; laboratuvar içindeki değişkenlikleri ifade eder. Farklı günler, farklı analistler, farklı ekipmanlar ile yapılan analizlerin birbiriyle yakınlığıdır. % BSS (bağıl standart sapma) değeriyle verilir.

Yenilenebilirlik; bir analitik prosedürün farklı laboratuvarlarda (genellikle metodolojinin standardizasyonu bağlamında) tekrarlanabilirliğini ifade eder. % BSS (bağıl standart sapma) değeriyle verilir.

Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı (Range)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin, analitik miktar ile ölçülen sinyal arasında doğrusal bir ilişki gösterme yeteneğini ifade eder. Yani, analitin konsantrasyonu arttıkça veya azaldıkça, ölçülen sinyal de benzer şekilde doğrusal bir şekilde değişmelidir. Doğrusallık, genellikle bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak değerlendirilir. Bu eğri, farklı analit derişimlerinde ölçülen sinyalleri içerir. Bu noktalar bir doğruya (lineer regresyon) uyduğunda, doğrusallık gösterildiği kabul edilir. Kalibrasyon eğrisi, korelasyon katsayısı ve standart eğrinin doğru denklemiyle elde edilir. Doğrusallık değerlendirmesi genellikle regresyon analizi kullanılarak yapılır. En küçük kareler yöntemiyle elde edilen regresyon katsayısı, $r^2 > 0,95$ olmalıdır. Standart eğri ise, 5-8 standart nokta içermeli ve tekrarlanabilir olmalıdır.

Çalışma aralığı, bir analitik yöntemin geçerli olduğu veya kullanılabileceği derişim aralığını ifade eder. Bu aralık, yöntemin hassasiyeti, doğrusallığı ve ölçüm aralığı gibi özelliklere bağılı olarak belirlenir. Çalışma aralığı, analizin yeterli doğruluk ve tekrarlanabilirlikle gerçekleştirilebileceğı bir derişim aralığını kapsar.

Hassasiyet (Sensitivity)

Hassasiyet (sensitivity), bir analitik yöntemin miktarındaki küçük değışikliklere karşı nasıl yanıt verdiğini ve bu değışikliklerin ölçülen sinyaldeki değışiklikleri ne kadar etkilediğini ifade eder. Hassasiyet, bir analiz yönteminin ölçüm aralığı içinde küçük konsantrasyon değışikliklerini algılayabilme ve ayırt edebilme yeteneğini belirler. Genellikle bir analitik yöntemin kalibrasyon eğrisindeki eğim ile değıerlendirilir. Bu eğim, analit konsantrasyonundaki bir birimlik değışiklikle ölçülen sinyaldeki bir birimlik değışikliği temsil eder.

a. Teşhis (Gözlenebilme) Sınırı (Limit of Detection, LOD): Bir numune içerisinde incelenen bileşimin belirlenen en düşük miktarına teşhis (gözlenebilme) sınırı denir. Belirlenen konsantrasyon kantitatif analiz için kesin değıer değıildir. Kromatografik çalışmalarda LOD değıeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 3 olduğı konsantrasyon olarak kabul edilir.

b. Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ): Bir numune içerisindeki bileşimin, uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebileceğı en düşük konsantrasyon olarak tanımlanabilir. Kromatografik çalışmalarda LOQ değıerleri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının 10 olduğı konsantrasyon olarak kabul edilir.

c. En Düşük Tayin Alt Sınırı (Lower Limit of Quantitation, LLOQ): Analitin ölçülebilir olduğı en düşük konsantrasyonu ifade eder ve bu konsantrasyonun ötesindeki miktarlarda analitin belirli bir güvenilirlik düzeyinde ölçülemeyeceğı anlamına gelir. Kromatografik çalışmalarda sinyal/gürültü oranının 5:1 olduğı değıer olarak kabul edilir.

Tekrar üretilebilirlik, Tekrarlanabilirlik (Reproducibility, repeatability)

Tekrar üretilebilirlik (reproducibility) ve tekrarlanabilirlik (repeatability), analitik ve deneysel bilimlerde sıkça kullanılan iki önemli terimdir. İki kavram arasındaki temel fark, tekrarlanabilirliğin aynı laboratuvar veya deneme koşullarında yapılan ölçümlerin tutarlılığına odaklanırken, tekrar üretilebilirliğin farklı laboratuvarlarda veya denemelerde benzer sonuçların elde edilebilirliğine odaklanmasıdır.

Sağlamlık /Tutarlılık (Robustness/Ruggedness)

Sağlamlık (Robustness), bir analitik yöntemin, çeşitli faktörlerde (örneğin, ekipman

varyasyonları, reaktan kalitesi, sıcaklık değişimleri vb.) maruz kaldığında ne kadar dirençli olduğunu ve bu değişkenlere karşı ne kadar istikrarlı sonuçlar üretebildiğini ifade eder. Sağlamlık, genellikle bir analitik yöntemin geliştirme aşamasında değerlendirilir ve yöntemin dayanıklılığı ve genelleme yeteneği hakkında bilgi sağlar.

Tutarlılık (Ruggedness), bir analitik yöntemin, çeşitli değişkenlere maruz kaldığında nasıl performans gösterdiğini değerlendiren bir kavramdır. Bu değişkenler arasında farklı analizciler, farklı cihazlar, farklı seri numaralarına sahip reaktanlar, farklı günler ve sıcaklık değişimleri gibi faktörler bulunur. Tutarlılık testleri, bir analitik yöntemin gerçek numuneye uygulandığı koşullarda ne kadar uyarlı ve istikrarlı olduğunu belirlemek için yapılır.

Geri Kazanım (Recovery)

Geri kazanım, bir analiz sürecinde kullanılan yöntemin ne kadar etkili olduğunu belirlemek için kullanılır. Bu, analitik bir yöntemle ölçülen bir analitin, bilinen bir miktarının numune matrisi içinde ne kadar doğru bir şekilde belirlenebildiğini değerlendirir. Belirli bir analitik yöntemle analiz edilen numunelerin içine bilinen miktarlarda analit eklenir. Daha sonra bu numuneler, normal analiz prosedürüne tabi tutularak elde edilen sonuçlar, eklenen bilinen miktarlarla karşılaştırılır. Bilinen derişimdeki standart çözeltiler, numunelere eklenir ve bir ayırma metodu kullanılarak işlem görerek geri kazanılır. Geri kazanılan miktar, analitik sonuçlarla karşılaştırılarak bir hata oranı hesaplanır. İdeal olarak, geri kazanım oranı %100 olmalıdır, ancak pratikte %75 civarı kabul edilebilir bir seviyedir. %60 veya daha düşük geri kazanım oranları, analiz sürecinde sistemsel sorunları veya hataları gösterebilir ve bu durumda numune hazırlığı veya analiz prosedürü revize edilmelidir.

Kararlılık (Stability)

Kararlılık (stabilite), bir madde veya çözeltinin belirli koşullar altında ne kadar süre boyunca kimyasal, fiziksel ve analitik özelliklerini koruyabildiğini ifade eder. Bir çözelti içindeki analitin kimyasal özelliklerinin, belirli saklama koşulları altında değişmeden kalma kabiliyetidir. Bu kavram, analitik yöntemlerle yapılan ölçümlerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği açısından önemlidir. Kararlılık çalışmaları, gerçek numune hazırlama ve analizi sırasında karşılaşılmaması muhtemel durumları yansıtmalıdır. Çalışılan madde veya çözelti, belirli koşullar altında ve istenilen saklama süresinin sonunda, cihaz tepkisinin yeni hazırlanmış olan madde veya çözeltinin tepkisi ile karşılaştırılarak tespit edilmelidir (ICH 1995; EMA 2011; U.S. FDA 2013).

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Referans Standartlar, Reaktifler ve Cihazlar

Tablo 1. Kullanılan plastik katkı maddeleri referans standartları

Standart	Firma	Lot No	Son Kullanma Tarihi
DEHP	EDQM	P2155001	Batch 2.0 (Güncel)
BHT	EDQM	B1215000	Batch 3.0 (Güncel)
Hostanox 03	EDQM	P2155008	Batch 4.0 (Güncel)
Irganox 1010	EDQM	P2155009	Batch 4.0 (Güncel)
Irganox 1330	EDQM	P2155010	Batch 3.0 (Güncel)
Irganox 1076	EDQM	P2155011	Batch 3.0 (Güncel)
Irgafos 168	EDQM	P2155012	Batch 4.0 (Güncel)
Irganox 3114	EDQM	P2155013	Batch 3.0 (Güncel)
Irganox PS 800	EDQM	P2155016	Batch 2.0 (Güncel)
Irganox PS 802	EDQM	P2155017	Batch 3.0 (Güncel)
Stearik asit	EDQM	S1340000	Batch 4.0 (Güncel)
Oleamit	EDQM	O0140000	Batch 1.0 (Güncel)
Erukamit	EDQM	E1260000	Batch 1.0 (Güncel)
BTC	EDQM	Y0002025	Batch 1.0 (Güncel)
TEHM	EDQM	Y0002023	Batch 1.0 (Güncel)
Difenil Ftalat (IS)	Sigma Aldrich	MKBW2819V	(Güncel)

*Plastik katkı maddelerinin son kullanma tarihleri güncel Batch numaraları üzerinden verildi.

Tablo 2. Kullanılan reaktifler

Reaktif	Firma	Lot No	Son Kullanma Tarihi
Tetrahidrofuran	Sigma Aldrich	BCCG55863	Mart 2025
Asetonitril	J.T.Baker	2109605852	Nisan 2024
Metanol	Honeywell	K3430S	16.05.2025
İzopropil Alkol	Fisher Chemical	2225524	27.05.2027
Ultra Saf Su (USS)	Merck	Z0772733148	30.11.2024
Amonyum Asetat (AA)	Fluka		

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Ekipman Adı	Marka	Model
LC-MS/MS	Agilent Technologies	6460Triple Quad
Ultra Saf Su Sistemi	Millipore	Direct-Q 8UV
Mikropipet (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)	Eppendorf	Research® Plus
Kolon	GL Sciences	Inert Sustain Phenyl
Hassas Terazı	Shimadzu	ATX224
Etüv	Binder	115LT-ED115
Ultrasonik Banyo	Isolab	6 L
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph	MR HEI Standart
Vorteks Karıştırıcı	Heidolph	Reax Control
Santrifüj	Beckman Coulter	Allegra X-30 R
Membran Filtre	Fisherbrand™	0.45 µm
Vial	Agilent Technologies	2 ml renksiz vial

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Yöntemi

LC-MS/MS sistemine ait kromatografik ve spektroskopik şartlar Tablo 4 ve Tablo 5’de verildi.

Tablo 4. LC-MS/MS sistemine ait bilgiler

Sabit Faz	Inert Sustain Phenyl (3.9 x 150mm, 4µm)
Hareketli faz	USS (5 mM AA)- MeOH (5 mM AA) (75-25, h/h)
Akış hızı	0,7 ml/dk
Kolon sıcaklığı	35 °C
Enjeksiyon hacmi	5 µl
Analiz süresi	15 dk.
İyonizasyon	ESI
Gaz sıcaklığı	275 °C
Buharlaştırıcı sıcaklığı	375 °C
Gaz akışı	10/dk
Nebülizör gaz basıncı	40 psi
Kapiler voltajı	4000 V- 4500 V
İyonlaştırma Modu	ESI (Electrospray Ionization)
	+ESI: DEHP, Irgafos 168, Irganox PS 800, Irganox PS 802, Oleamit, Erukamit, BTC, TEHM, DFF
	-ESI: BHT, Hostanox 03, Irganox 1010, Irganox 1330, Irganox 1076, Irganox 3114, Stearik asit

Tablo 5. LC-MS/MS sistemine ait gradient ayırım bilgileri

Zaman (dk.)	Akış (ml/dk.)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
1.0	0.7	75.0	25.0
3.0	0.7	2.0	98.0
11.0	0.7	2.0	98.0
11.10	0.7	75.0	25.0
15.00	0.7	75.0	25.0

Plastik Katkı Maddeleri Referans Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Her bir referans standart plastik katkı maddesinden ve IS’ dan 1 mg hassas terazide tartıldıktan sonra 1 ml Asetonitril-tetrahidrofuran (%50:50; h/h) karışımında çözülerek 1000 µg/ml derişiminde stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp hareketli faz ile seyreltilerek 1, 5, 10, 20 ve 50 µg/ml derişimlerinde referans standart

stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp hareketli faz ile seyreltilerek 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/ml derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere 100 ng/ml IS olarak Difenil ftalat (DFF) çözeltisi eklendi ve elde edilen çözeltiler LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları alındı. Stok çözeltiler çalışma yapılana kadar +4 °C’de saklandı. Ayrıca, plastik katkı maddelerinin referans standartları +4 °C’de muhafaza edildi.

Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması

Hareketli Faz A Çözeltisi: Analitik saflıkta 385,41 mg Amonyum asetat hassas terazi ile tartılarak son hacim ultra saf su ile 1 L’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda 10 dk. degaze edildi.

Hareketli Faz B Çözeltisi: Analitik saflıkta 385,41 mg Amonyum asetat hassas terazi ile tartılarak son hacim metanol (kromatografik saflıkta) ile 1 L’ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda 10 dk. degaze edildi. Hareketli fazlar her analizden önce yeni hazırlandı.

Extractables Çalışmalarının Hazırlanması

Çalışılacak olan plastik ambalaj malzemesinden 1×1 cm boyutunda kesildikten sonra son ağırlıkları 5,0 g olacak şekilde numuneler alındı. Üzerine 200 ml ml İzopropil alkol: ultra saf su (İPA:USS) (%50:50; h/h) karışımı eklendi. Farklı ekstraksiyon metodları kullanılarak extractables çalışmaları için uygun extractables profili oluşturuldu. Uygulanan ekstraksiyon işlemleri aşağıda sırasıyla verildi.

Reflüx Metodu: 250 ml şilifli balona 1×1 cm boyutunda kesildikten sonra son ağırlıkları 5,0 g olacak şekilde numuneler alındı. Örnek üzerine 200 ml İPA:USS (50:50; h/h) çözeltisi eklendi ve 100 °C’de geri soğutucu altında 90 dk. kaynatıldı. Kaynatıldıktan sonra bu çözelti ortam sıcaklığına kadar soğutuldu ve son olarak 0.45 µm gözenek boyutuna sahip filtreden süzüldü. Aynı ekstraksiyon prosedürü blank çözeltisi için de uygulandı.

Soxhlet Metodu: 250 ml şilifli balona 1×1 cm boyutunda kesildikten sonra son ağırlıkları 5,0 g olacak şekilde numuneler alındı. Örnek üzerine 200 ml İPA:USS (50:50; h/h) çözeltisi eklendi ve 100 °C’de soxhlet düzeneği altında 24 s kaynatıldı. Kaynatıldıktan sonra bu çözelti ortam sıcaklığına kadar soğutuldu ve son olarak 0.45 µm gözenek boyutuna sahip filtreden süzüldü. Aynı ekstraksiyon prosedürü blank çözeltisi için de uygulandı.

Etüv Metodu: 250 ml mavi vida kapaklı cam şişeye (otoklav şişesi) 1×1 cm boyutunda kesildikten sonra son ağırlıkları 5,0 g olacak şekilde numuneler alındı. Örnek üzerine 200 ml İPA:USS (50:50; h/h) çözeltisi eklendi ve 55 °C’de etüvde 3 gün bekletildi. Etüvden çıkarılarak

ortam sıcaklığına kadar soğutuldu ve son olarak 0.45 µm gözenek boyutuna sahip filtreden süzüldü. Aynı ekstraksiyon prosedürü blank çözeltisi için de uygulandı.

Ultrasonik Metodu: 250 ml erlene 1×1 cm boyutunda kesildikten sonra son ağırlıkları 5,0 g olacak şekilde numuneler alındı. Örnek üzerine 200 ml İPA:USS (50:50; h/h) çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyoda 1 s bırakıldı. Daha sonra 0.45 µm gözenek boyutuna sahip filtreden süzüldü. Aynı ekstraksiyon prosedürü blank çözeltisi için de uygulandı.

Her bir ekstraksiyon işlemi sonucu hazırlanan çözeltiler 0.45 mikron filtreden geçirildikten sonra 0.9 ml alındı ve üzerine 0.1 ml Difenil ftalat (DFF) eklendi. Daha sonra vortekslenerek LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Leachables Çalışmalarının Hazırlanması

Çalışılacak olan her bir gerçek numune 0.45 µm gözenek boyutuna sahip filtreden geçirildikten sonra 0.9 ml alındı. Üzerine 0.1 ml IS eklendikten sonra vortekslenerek LC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

ARAşTIRMA BULGULARI

15 adet plastik katkı maddesinin bazıları pozitif, bazıları ise negatif modda iyonlaşmaktadır. Bu çalışmada plastik katkı maddeleri aynı anda hem pozitif hem de negatif modda çalışıldı. Kütle sistemi parametreleri denenerek, moleküler iyon ve parçalanma iyonlarının maksimum bolluğunu elde etmek için metot optimize edildi. 15 adet plastik katkı maddesi ve DFF için uygun voltaj uygulanarak moleküler iyon ve parçalanma iyonları belirlendi. 15 adet plastik katkı maddesi ve IS'a ait moleküler iyonu, parçalanma iyonu, dwell, fragmentor voltaj, çarpışma enerjisi ve hücre hızlandırıcı değerleri Tablo 6'da verildi.

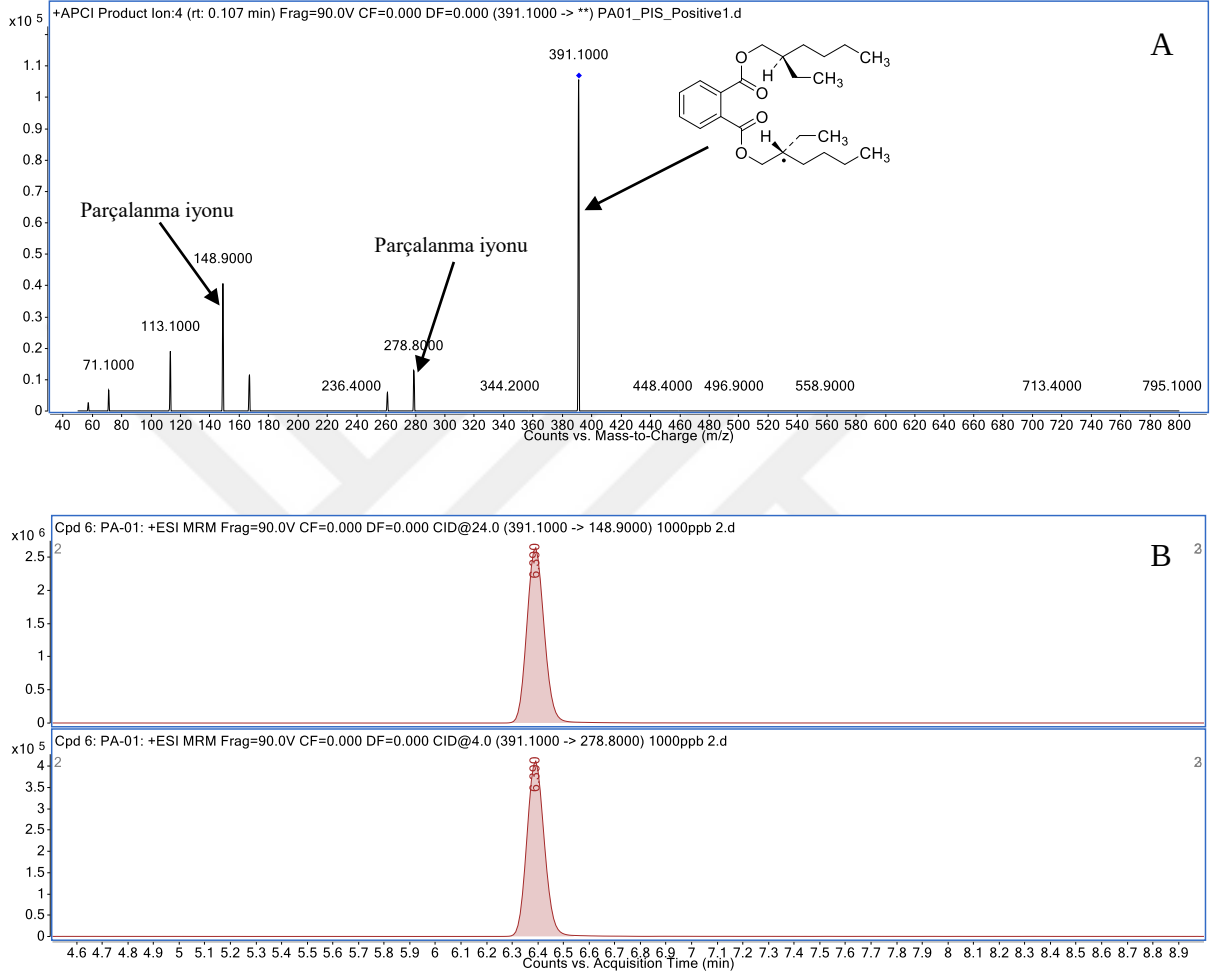


Tablo 6. 15 adet Plastik katkı maddesi ve IS'a ait kütle şartları

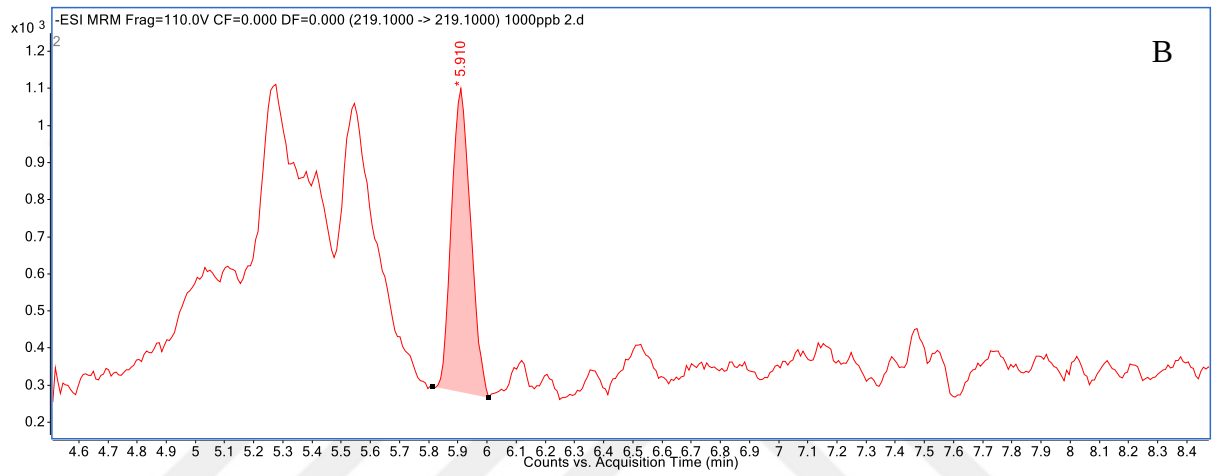
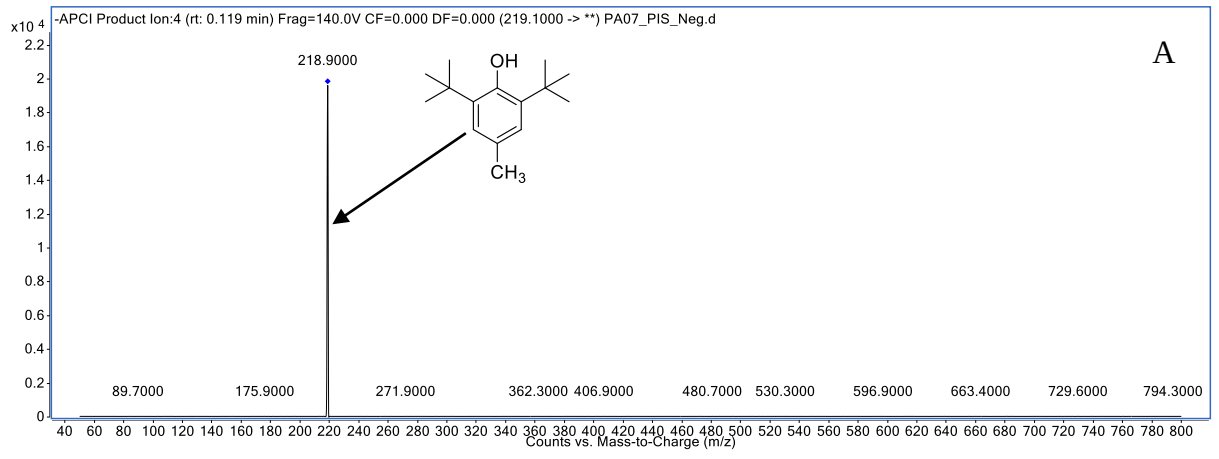
Plastik Katkı Maddeleri	Moleküler İyonu	MRM Geçişleri (m/z)	Dwell	FV (V)	CE (V)	CA (V)	Polarite
DEHP	391.1	278.8 ^b 148.9 ^a	10	90	4/24	4	Pozitif
BHT	219.1	219.1 ^a	10	140	2	4	Negatif
Hostanox 03	793.2	642.7 ^a 492.1 ^b 322.8 ^b	10	140	30 36 40	4	Negatif
Irganox 1010	1175.4	957.0 ^a 738.9 ^b 520.8 ^b	10	280	40 40 40	4	Negatif
Irganox 1330	773.5	717.0 ^a 205.0 ^b	10	370	40 40	4	Negatif
Irganox 1076	529.3	267.0 ^a	10	170	40	4	Negatif
Irgafos 168	647.2	347.0 ^b 147.0 ^b 57.3 ^a	10	180	38 40 40	4	Pozitif
Irganox 3114	564.0	345.7 ^a 85.0 ^b	10	150	30 32	4	Negatif
Irganox PS 800	515.3	329.0 ^a 142.9 ^b	10	90	10 18	4	Pozitif
Irganox PS 802	683.9	142.5 ^a	10	90	18	4	Pozitif
Stearik asit	283.2	283.2 ^a	10	90	2	4	Negatif
Oleamit	282.1	265.0 ^a 247.1 ^b	10	120	6 6	4	Pozitif
Erukamit	338.1	321.1 ^a 303.1 ^b	10	100	10 14	4	Pozitif
BTC	515.0	412.9 ^a 212.9 ^b 128.7 ^b	10	90	4 18 26	4	Pozitif
TEHM	547.1	305.0 ^a 192.5 ^b 71.2 ^b	10	70	16 40 16	4	Pozitif
DFF	319.0	224.9 ^a 77.1 ^b	10	80	8 40	4	Pozitif

^a Kantitatif iyon, ^b Kalitatif iyon, FV: Fragmentor voltaj, CE: Çarpışma enerjisi, CA: Hücre hızlandırıcı

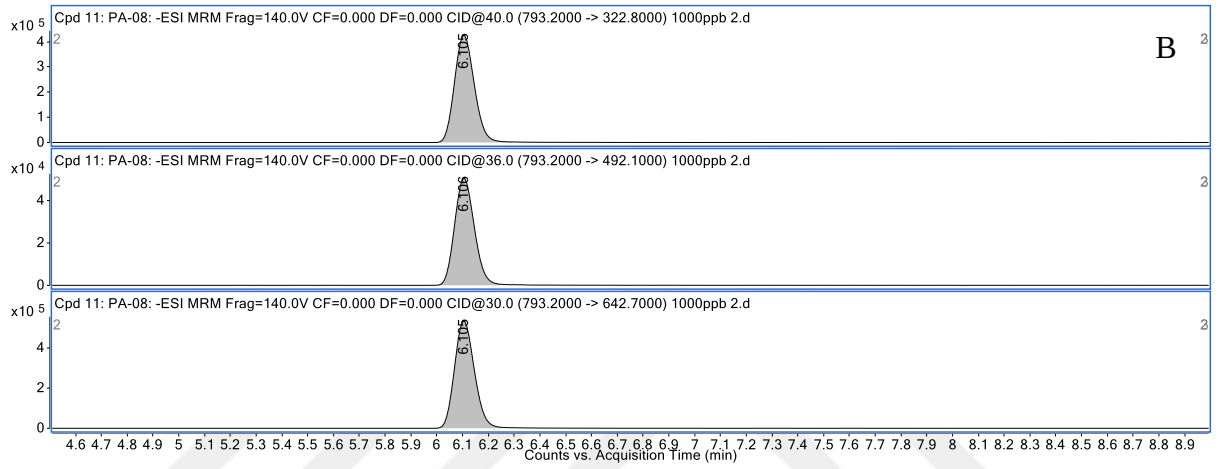
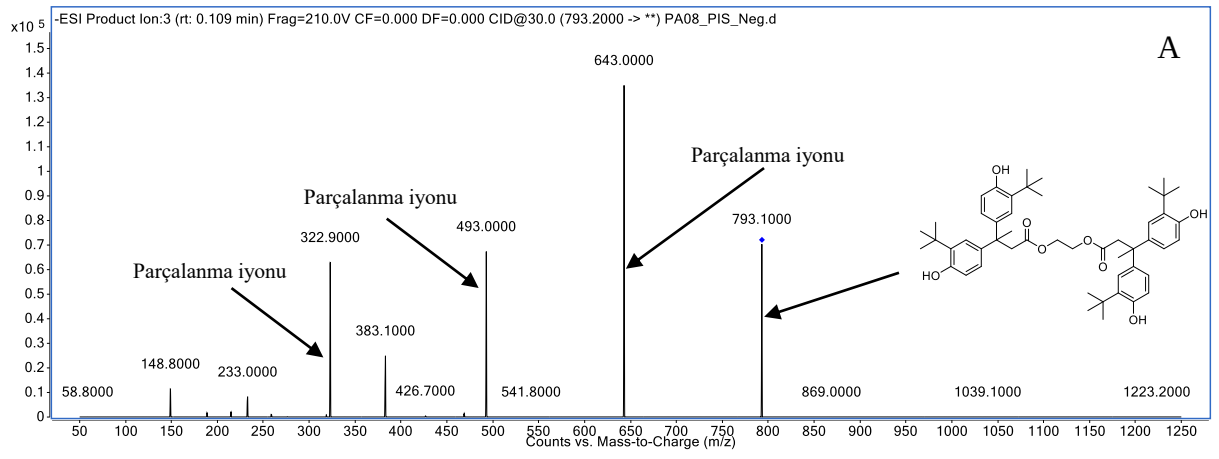
LC-MS/MS sisteminde geliştirilen metod ile çalışılan 15 adet plastik katkı maddesi referans standartlarına ve IS'a ait moleküler iyon pikleri, parçalanma iyon pikleri ve kromatogramlar aşağıda sırasıyla verildi.



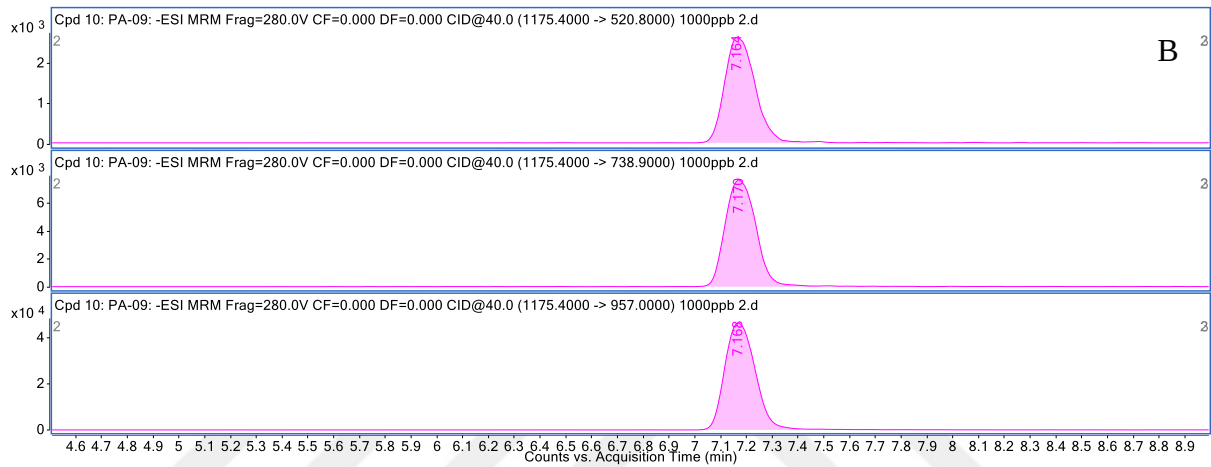
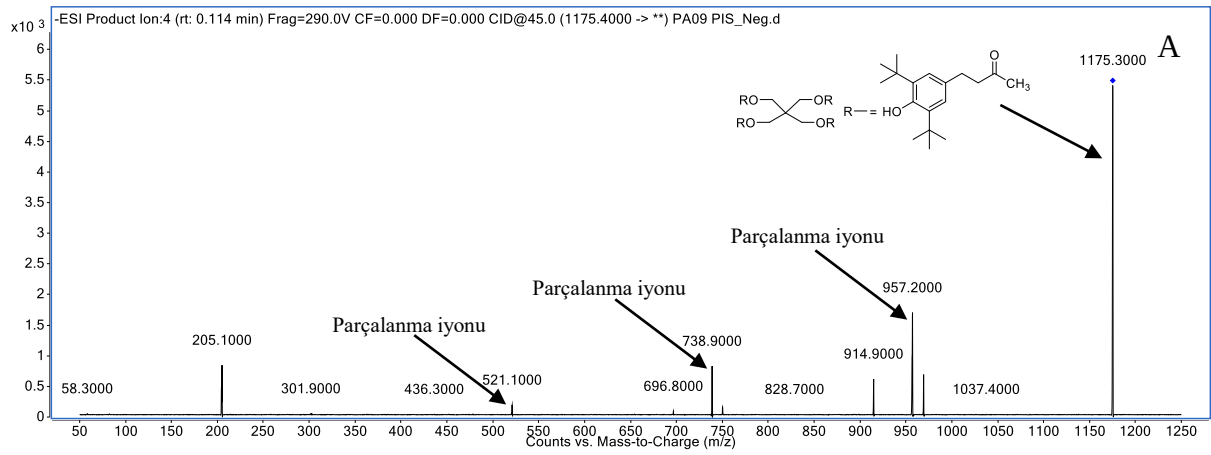
Şekil 13. A: DEHP'e ait kütle spektrumu B: DEHP'in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



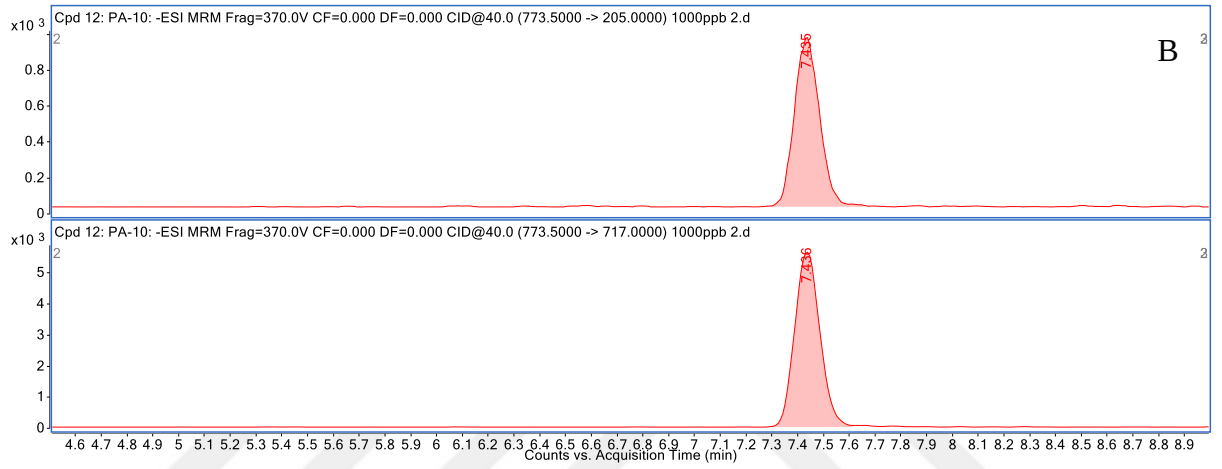
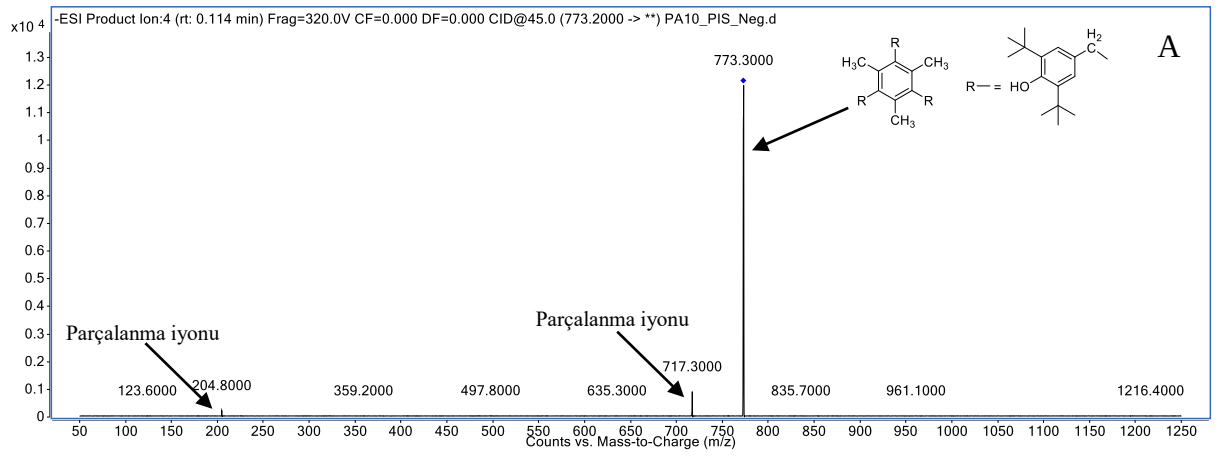
Şekil 14. A: BHT'ye ait kütle spektrumu B: BHT'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



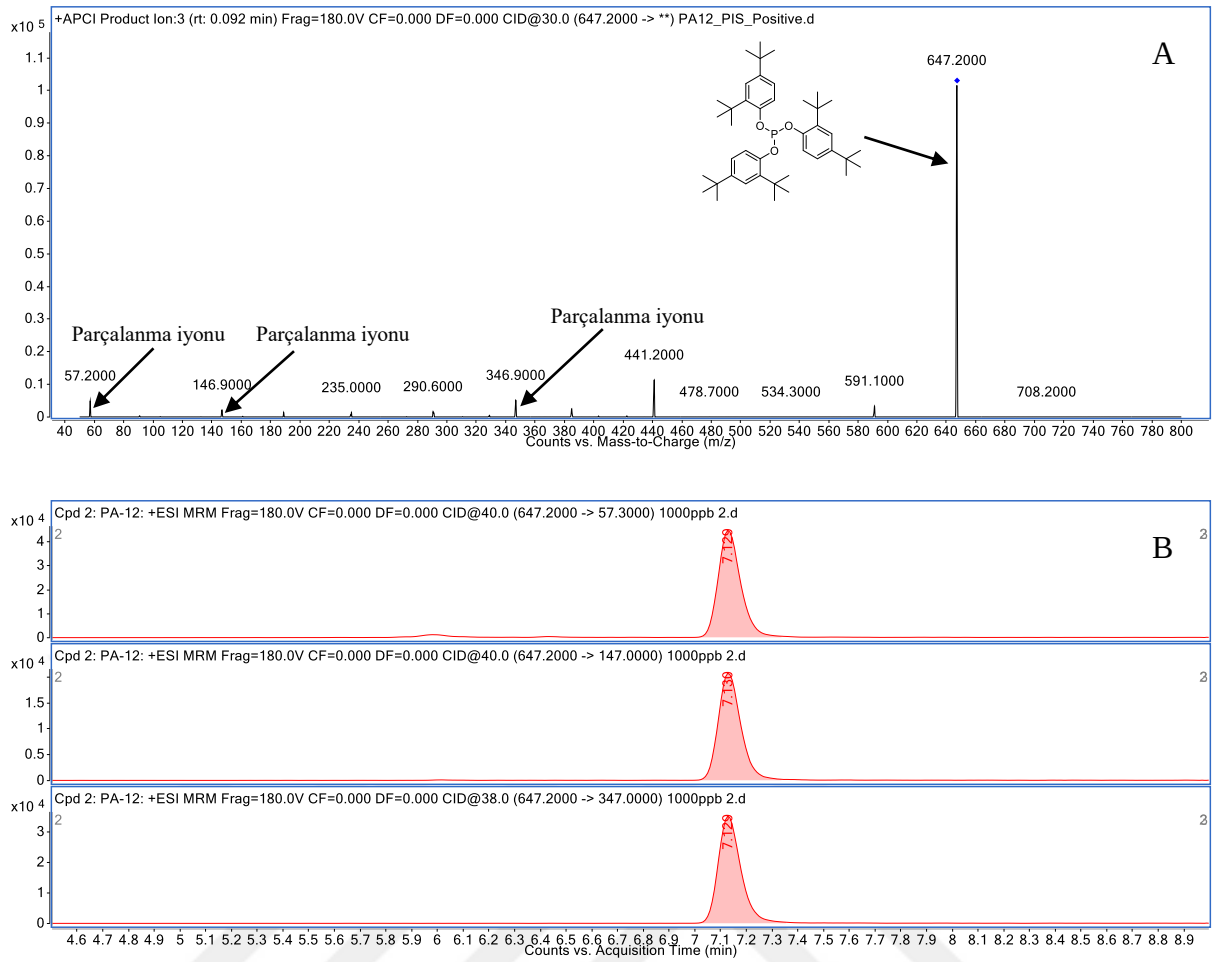
Şekil 15. A: Hostanox 03'e ait kütle spektrumu B: Hostanox 03'ün parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



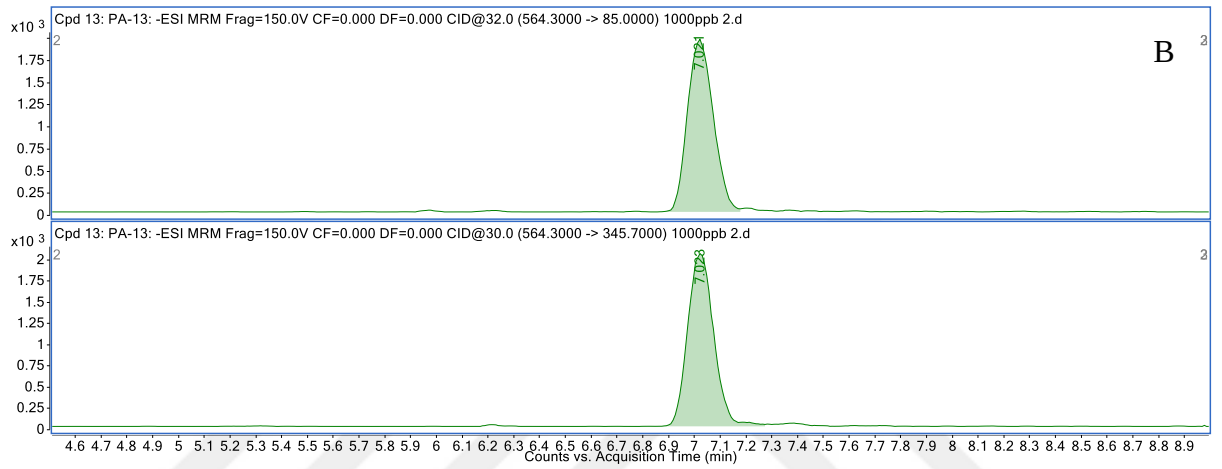
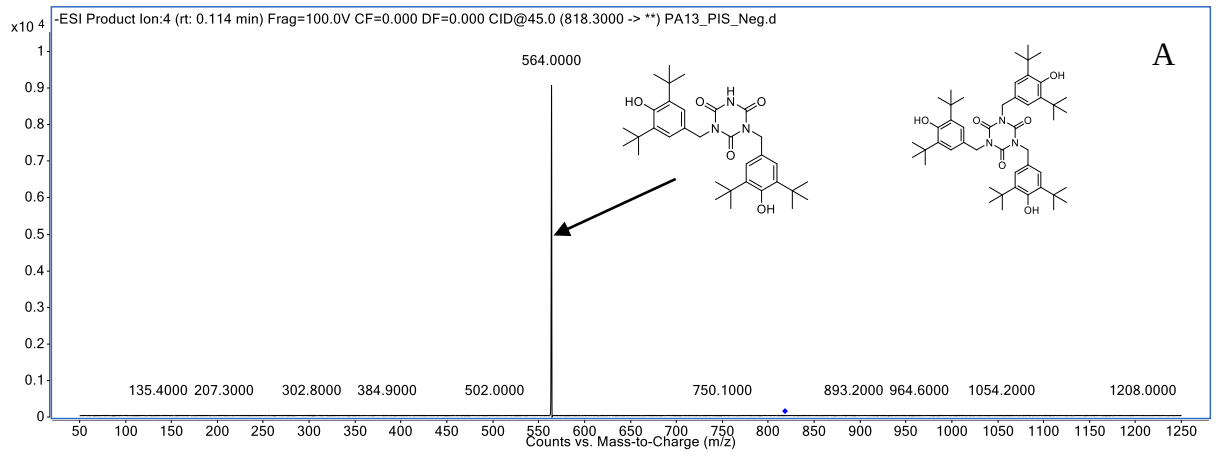
Şekil 16. A: Irganox 1010'a ait kütle spektrumu B: Irganox 1010'un parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



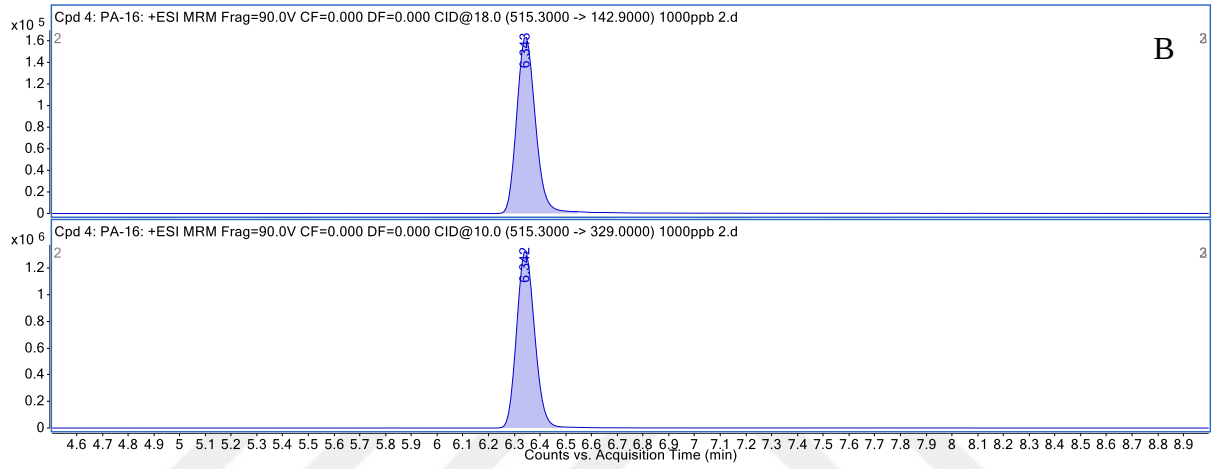
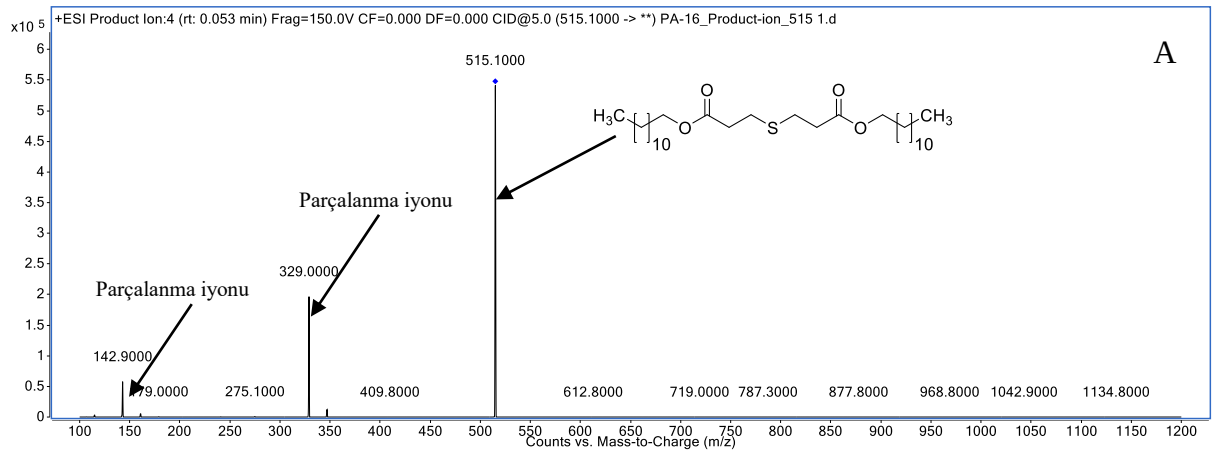
Şekil 17. A: Irganox 1330'a ait kütle spektrumu B: Irganox 1330'un parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



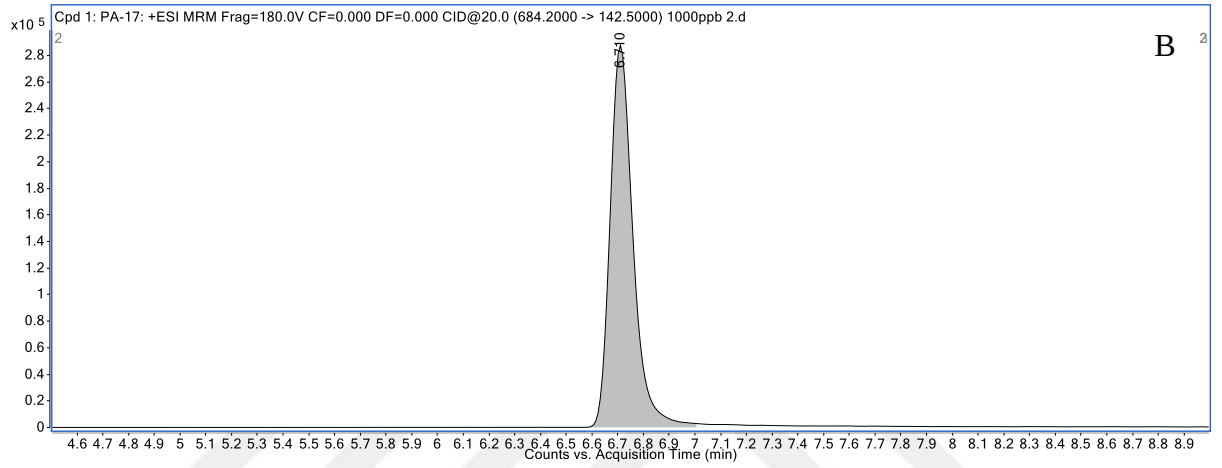
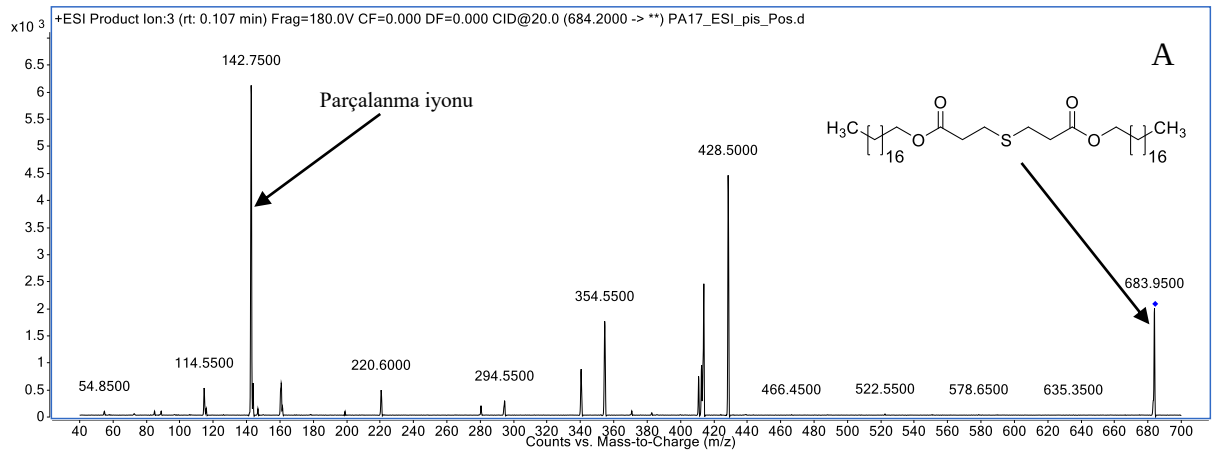
Şekil 19. A: Irgafos 168'e ait kütle spektrumu **B:** Irgafos 168'in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



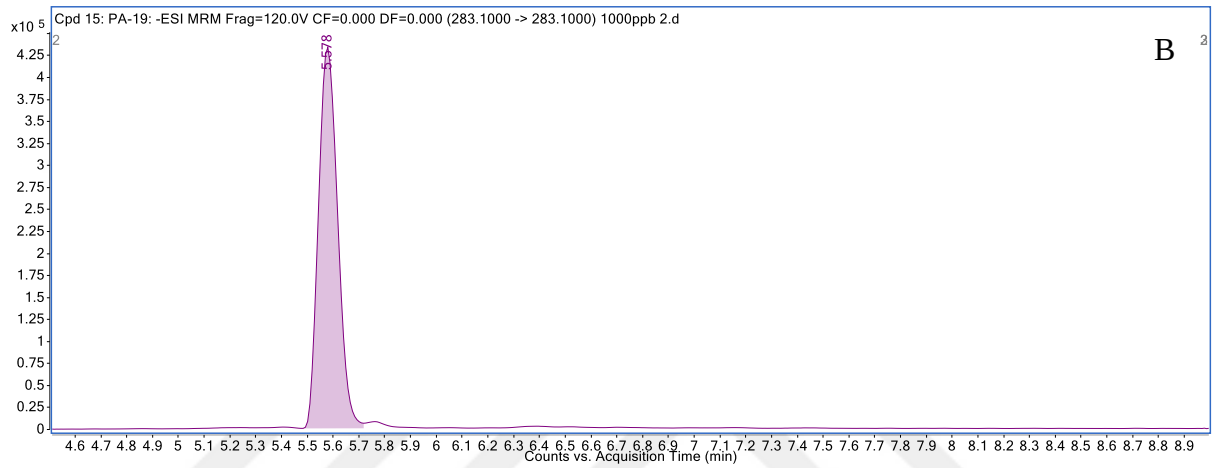
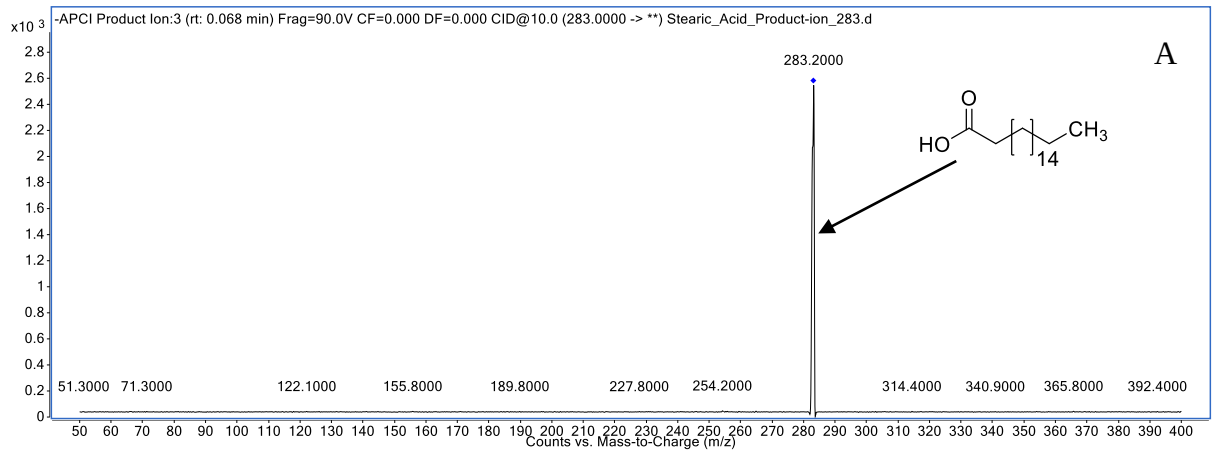
Şekil 20. A: Irganox 3114'e ait kütle spektrumu B: Irganox 3114'ün parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



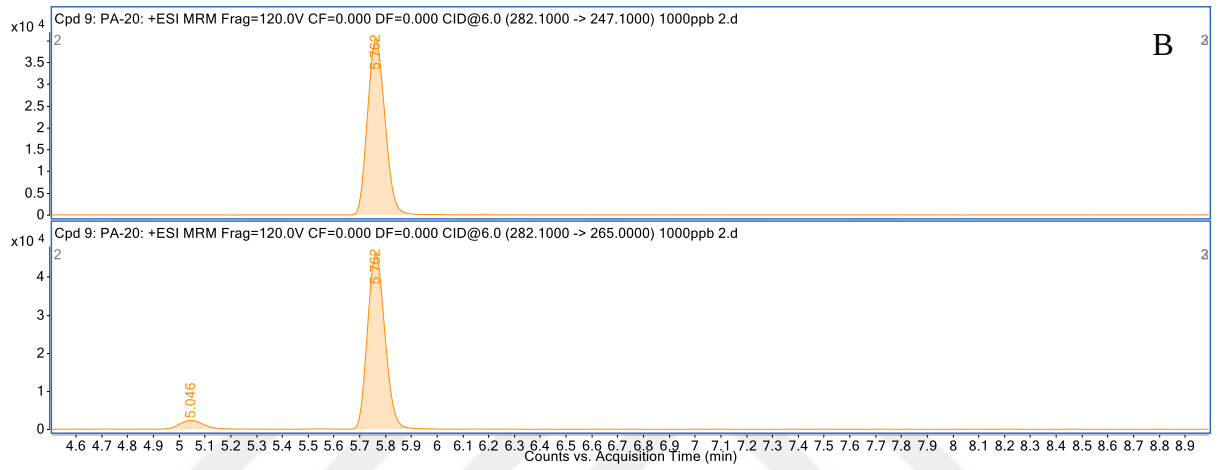
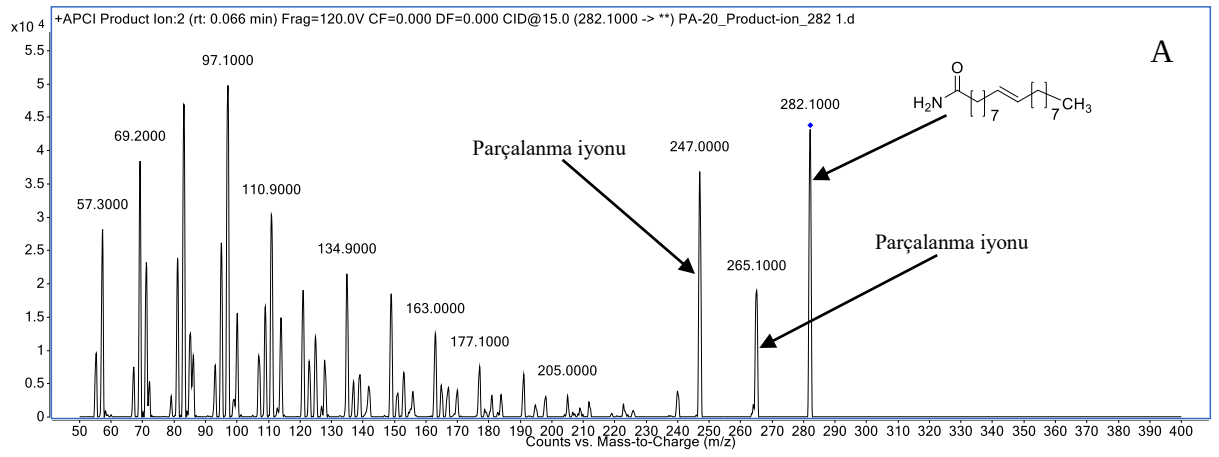
Şekil 21. A: Irganox PS 800'e ait kütle spektrumu B: Irganox PS 800'e parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



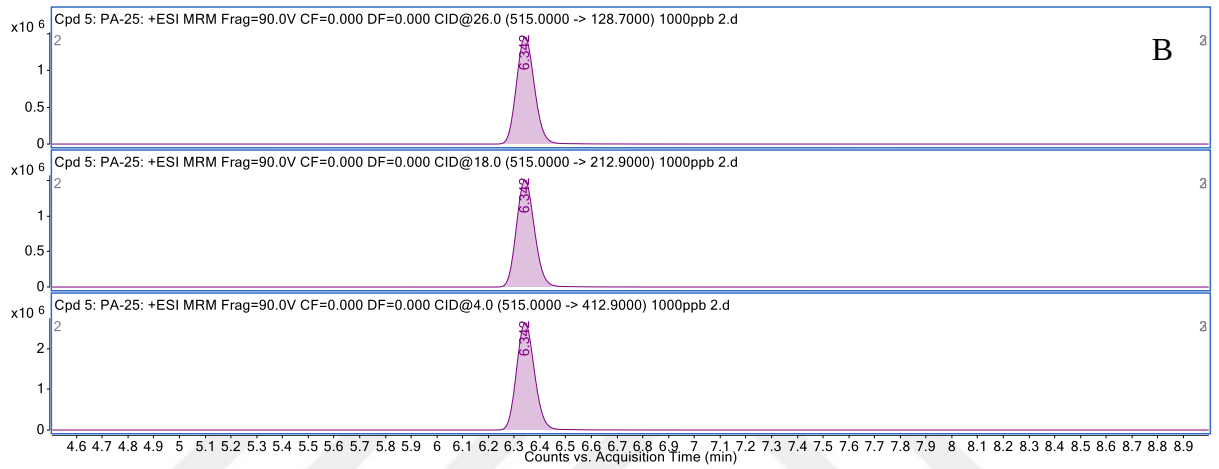
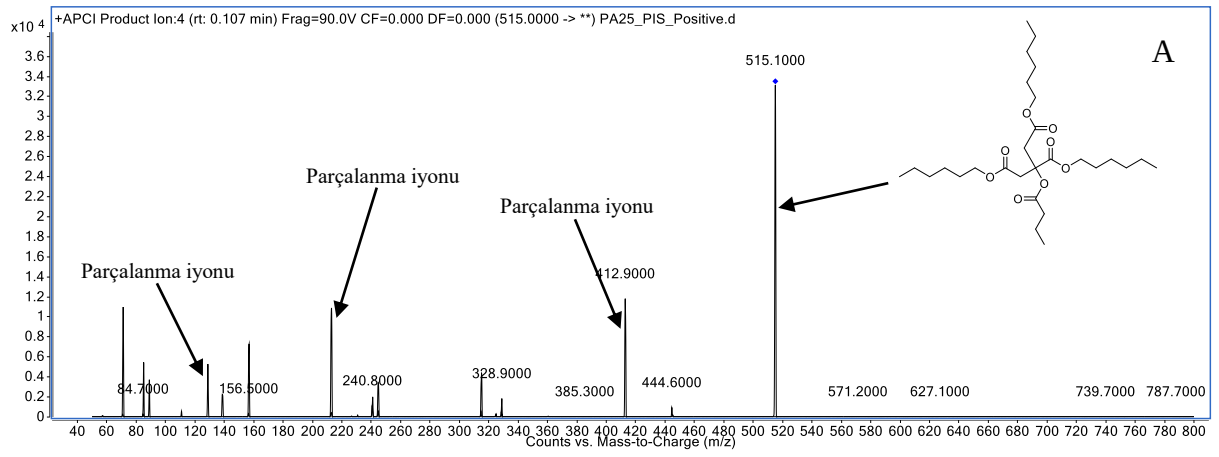
Şekil 22. A: Irganox PS 802'ye ait kütle spektrumu B: Irganox PS 802'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



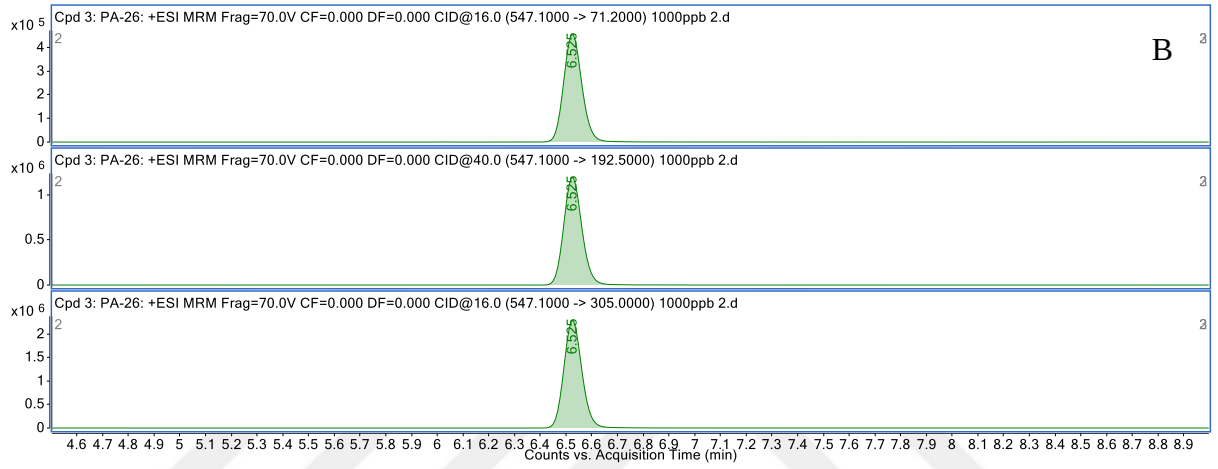
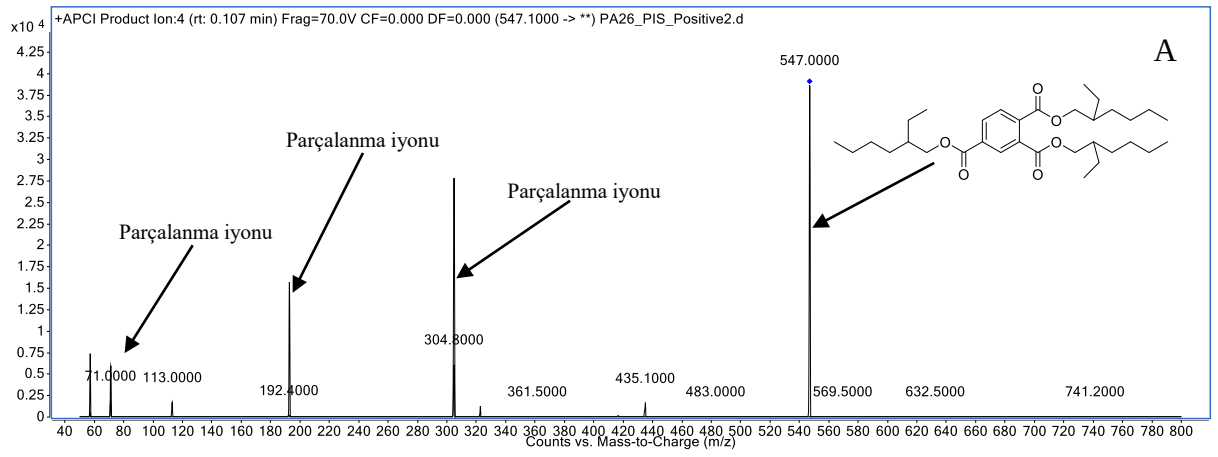
Şekil 23. A: Stearik asite ait kütle spektrumu B: Stearik asitin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



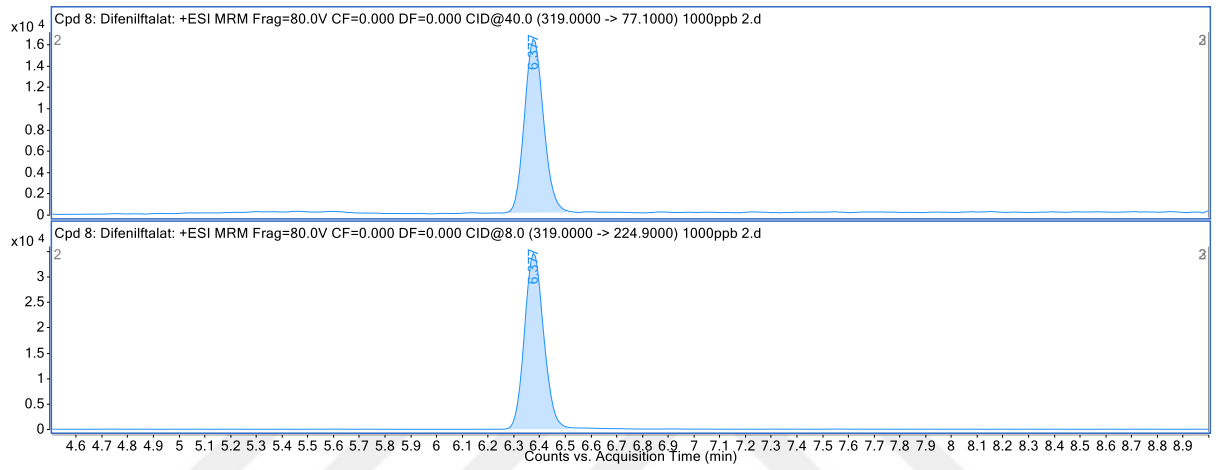
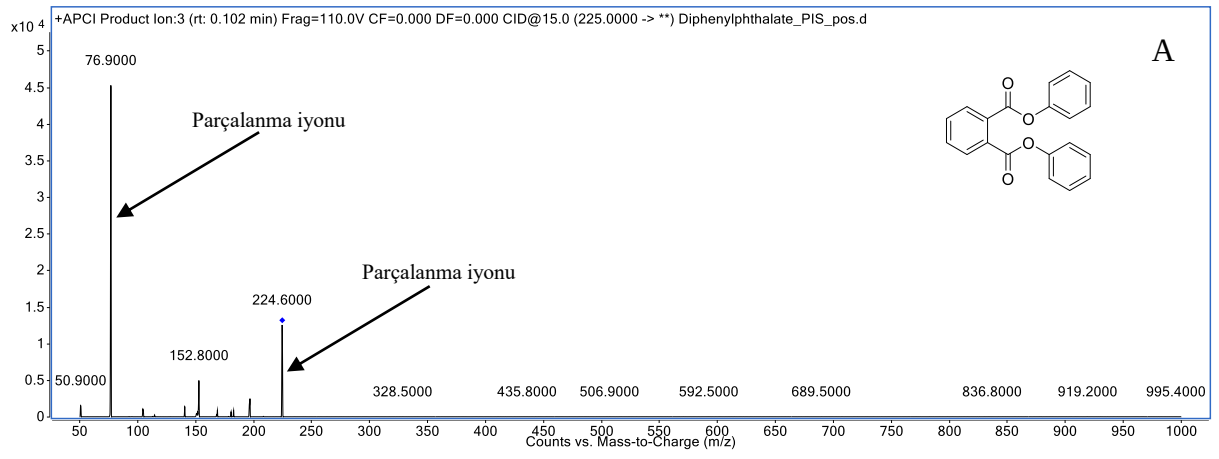
Şekil 24. A: Oleamit'e ait kütle spektrumu B: Oleamit'in parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



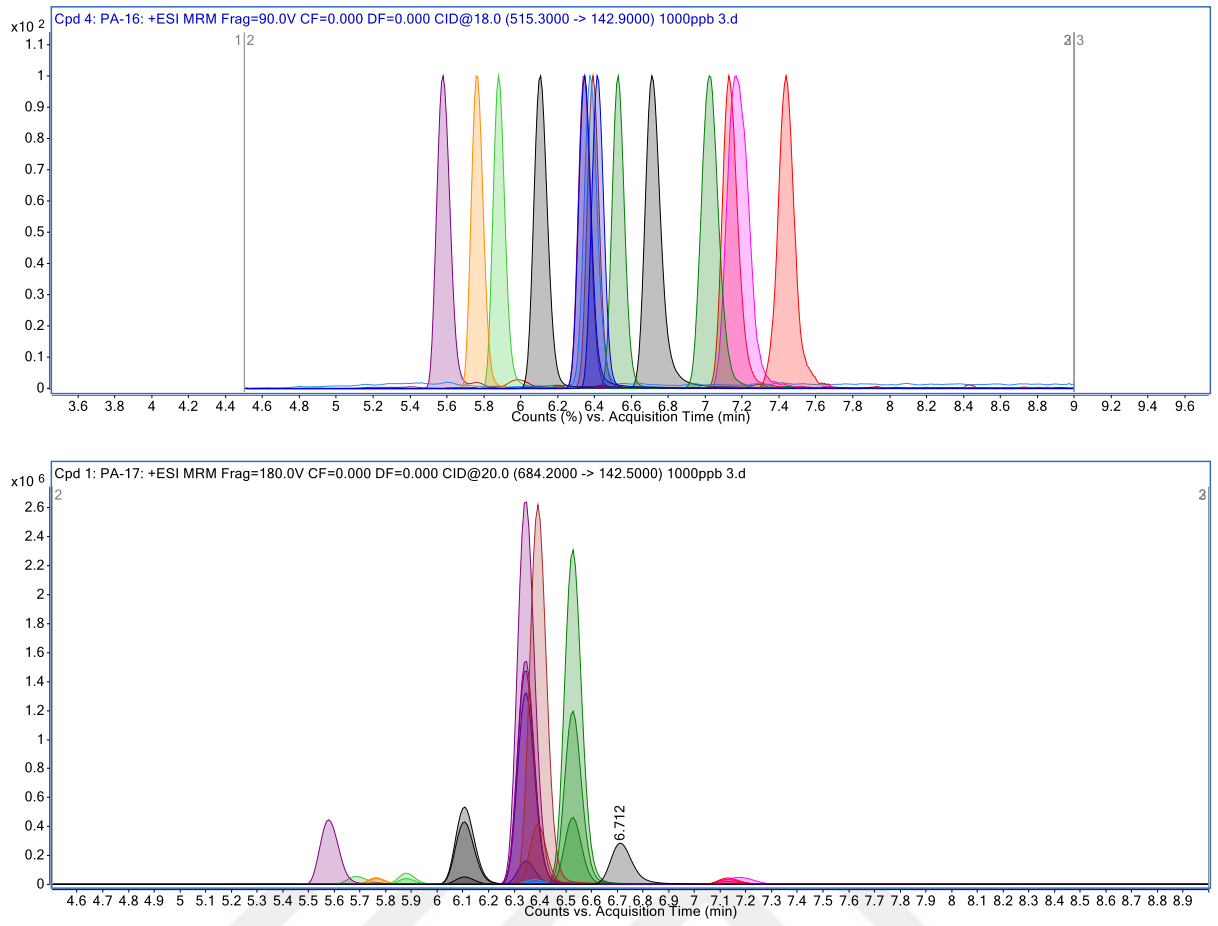
Şekil 26. A: BTC'ye ait kütle spektrumu B: BTC'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



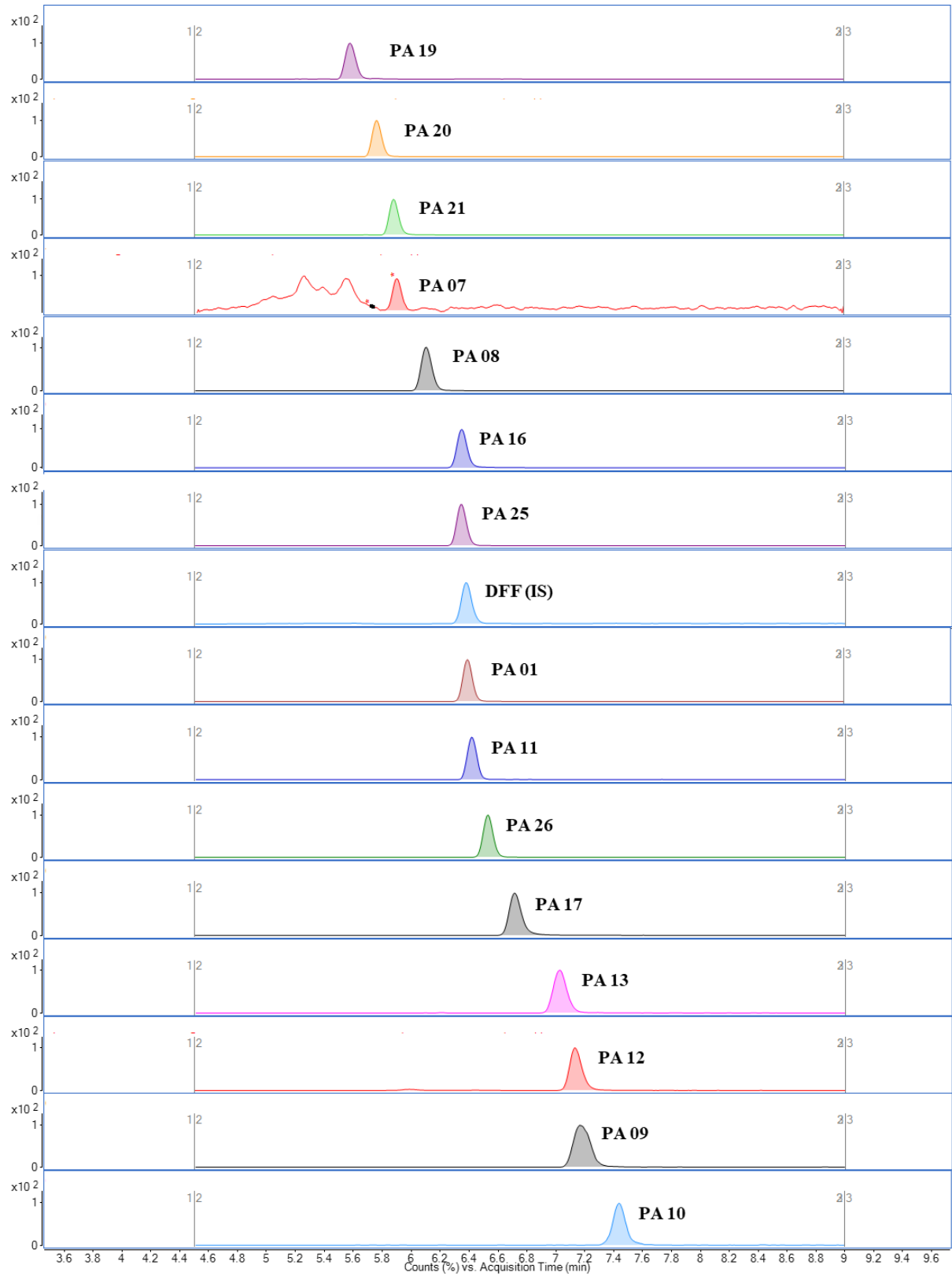
Şekil 27. A: TEHM'ye ait kütle spektrumu B: TEHM'nin parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



Şekil 28. A: Difenil ftalat (IS)'a ait kütle spektrumu B: Difenil ftalat (IS)'ın parçalanma iyonlarına ait kromatogramlar



Şekil 29. Plastik Katkı Maddelerine ait total iyon kromatogramı



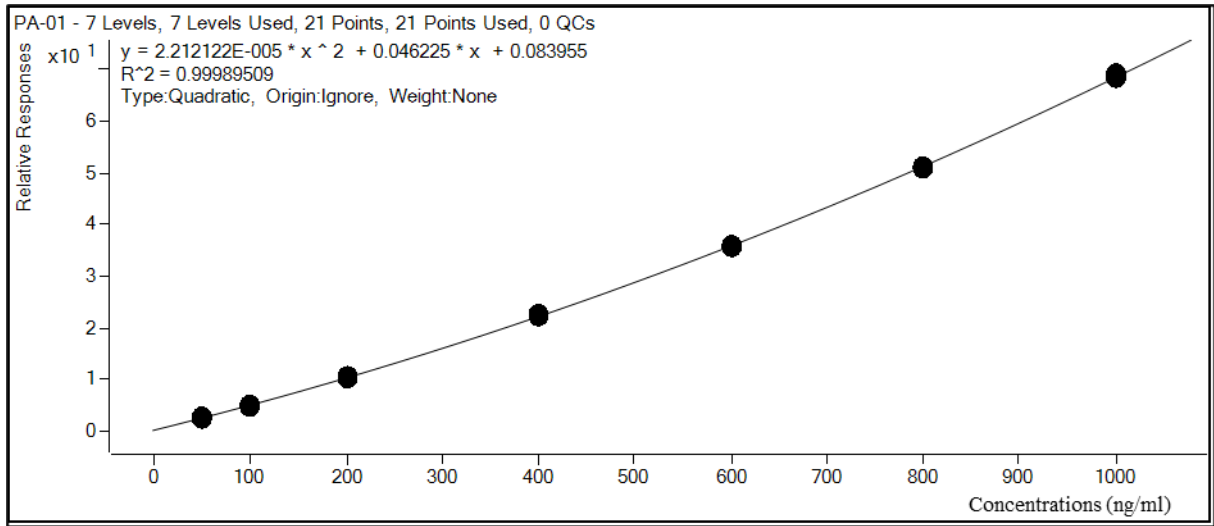
Şekil 30. Plastik Katkı Maddelerine ait total iyon kromatogramı

Plastik Katkı Maddeleri İçin Geliştirilen LC-MS/MS Yönteminin Validasyonu

Geliştirilen LC-MS/MS metodu kesinlik, doğruluk, doğrusallık, hassasiyet (LLOQ), sistem uygunluk ve stabilite parametreleri dikkate alınarak ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1) göre tam valide edildi.

Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

LC-MS/MS çalışmasında, 50-1000 ng/ml (50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/ml) derişim aralığında plastik katkı maddelerinin pik alanlarının IS'ın (100 ng/ml) pik alanına oranlanmasıyla kalibrasyon eğrileri kuadratik olarak elde edildi. Sadece Oleamit için 150-1000 ng/ml (150, 200, 400, 600, 700, 800 ve 1000 ng/ml) derişim aralığında çalışıldı. Kalibrasyon eğrisi Oleamit'in pik alanının IS'ın pik alanına oranlanmasıyla lineer olarak elde edildi.

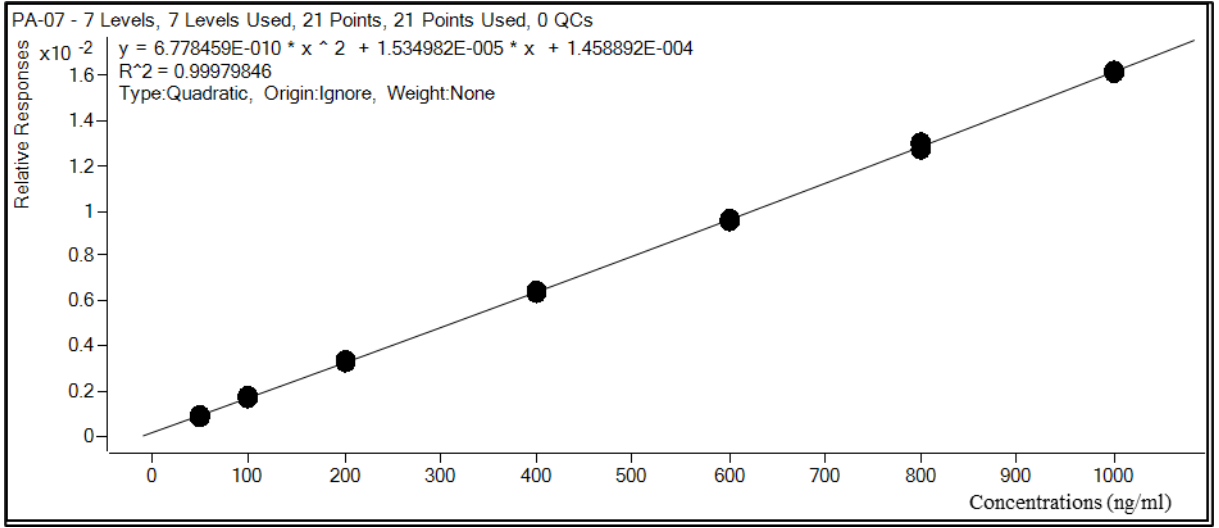


Şekil 31. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan DEHP'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde DEHP'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. DEHP'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 2.212122E^{-005}x^2 + 0.046225x + 0.083955$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

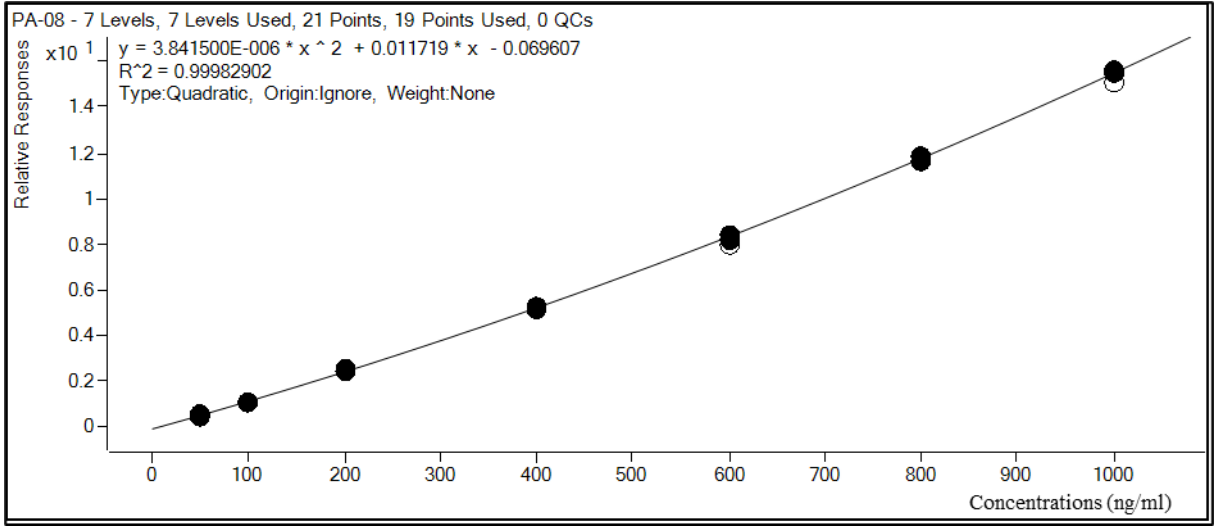


Şekil 32. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan BHT'nin kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde BHT'ye ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 8'de verildi.

Tablo 8. BHT'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 6.778459E^{-010}x^2 + 1.534982E^{-005}x + 1.458892E^{-004}$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998

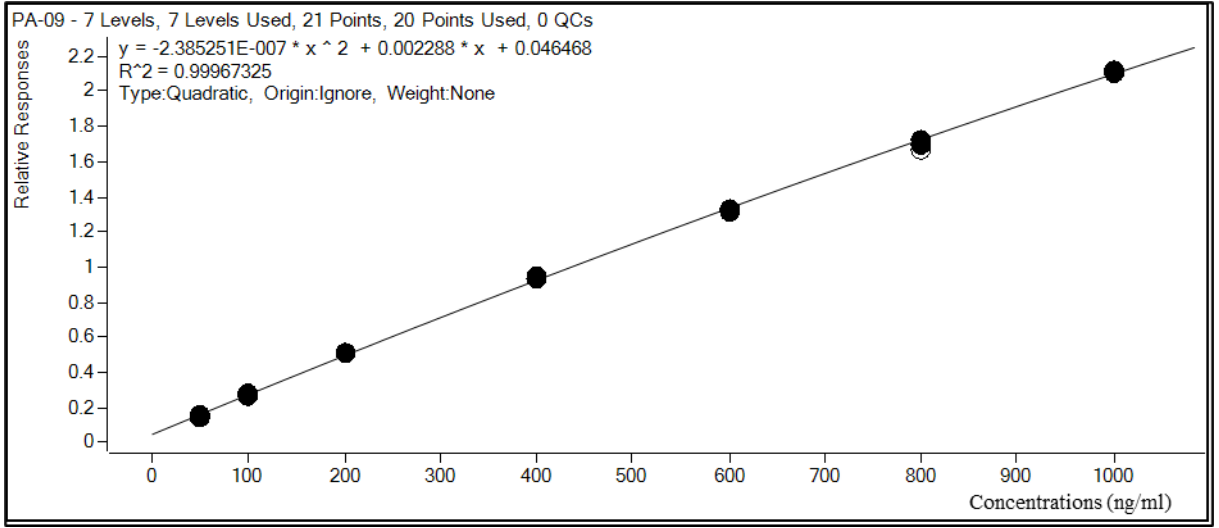


Şekil 33. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Hostanox 03'ün kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Hostanox 03'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. Hostanox 03'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 3.841500E-006x^2 + 0.011719x - 0.069607$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998

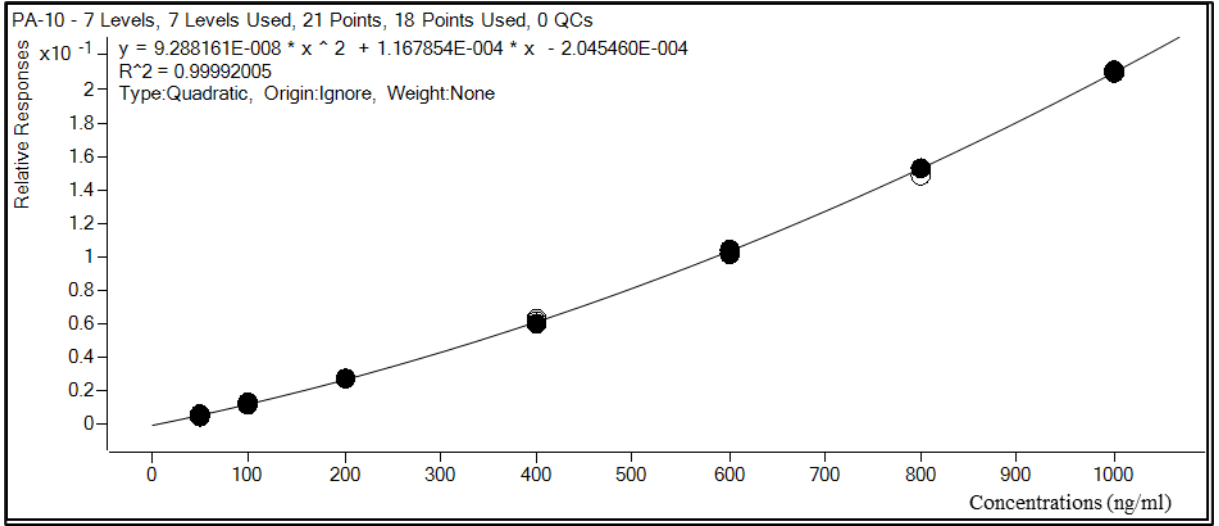


Şekil 34. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1010'un kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox 1010'a ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Irganox 1010'un kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = -2.385251E^{-007}x^2 + 0.002288x + 0.046468$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9997

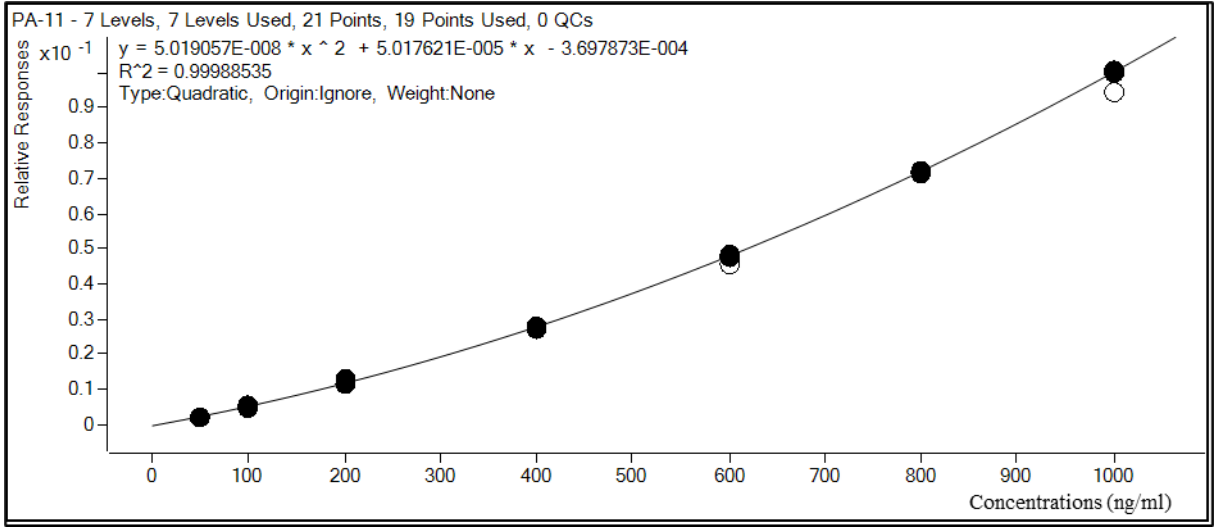


Şekil 35. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1330'un kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox 1330'a ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 11'de verildi.

Tablo 11. Irganox 1330'un kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 9.288161E^{-008}x^2 + 1.167854E^{-004}x - 2.045460E^{-004}$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

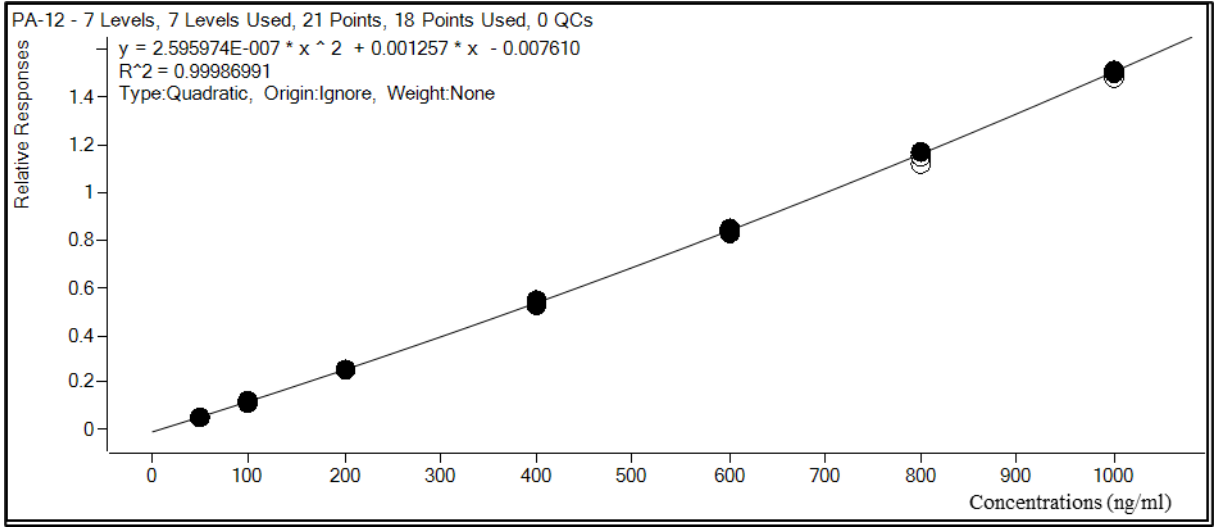


Şekil 36. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 1076'nın kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox 1076'ya ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Irganox 1076'nın kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 5.019057E^{-008}x^2 + 5.017621E^{-005}x - 3.697873E^{-004}$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

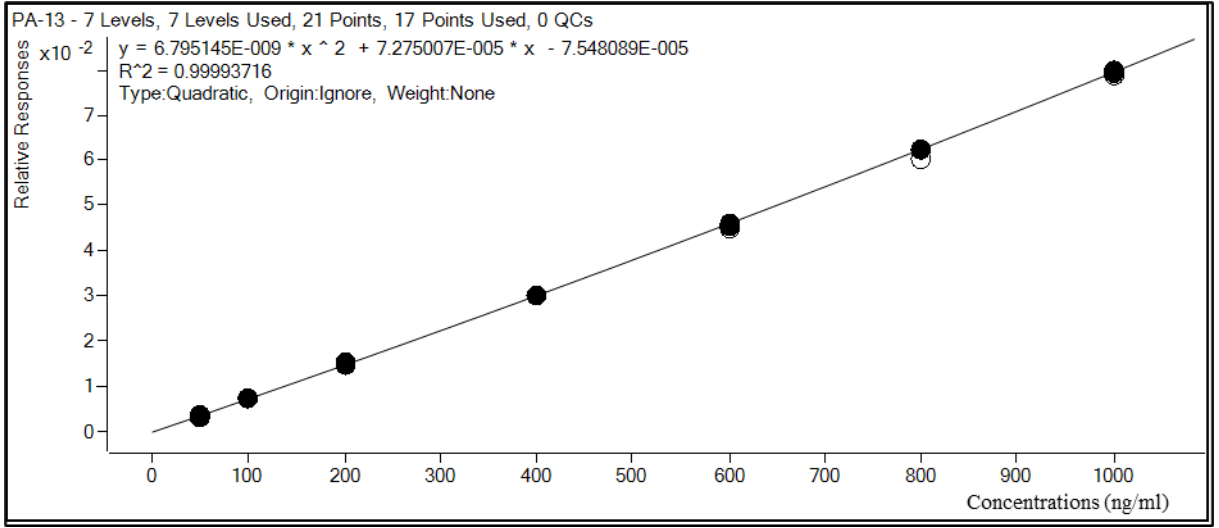


Şekil 37. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irgafos 168'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irgafos 168'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 13'de verildi.

Tablo 13. Irgafos 168'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 2.595974E^{-007}x^2 + 0.001257x - 0.007610$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

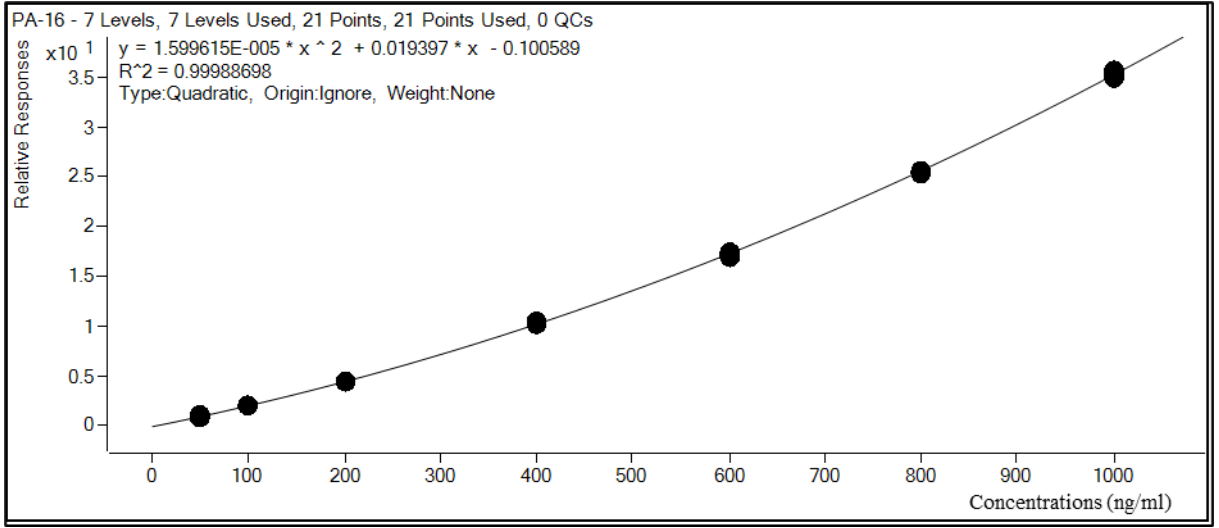


Şekil 38. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox 3114'ün kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox 3114'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 14'de verildi.

Tablo 14. Irganox 3114'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 6.795145E-009x^2 + 7.275007E-005x - 7.548089E-005$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

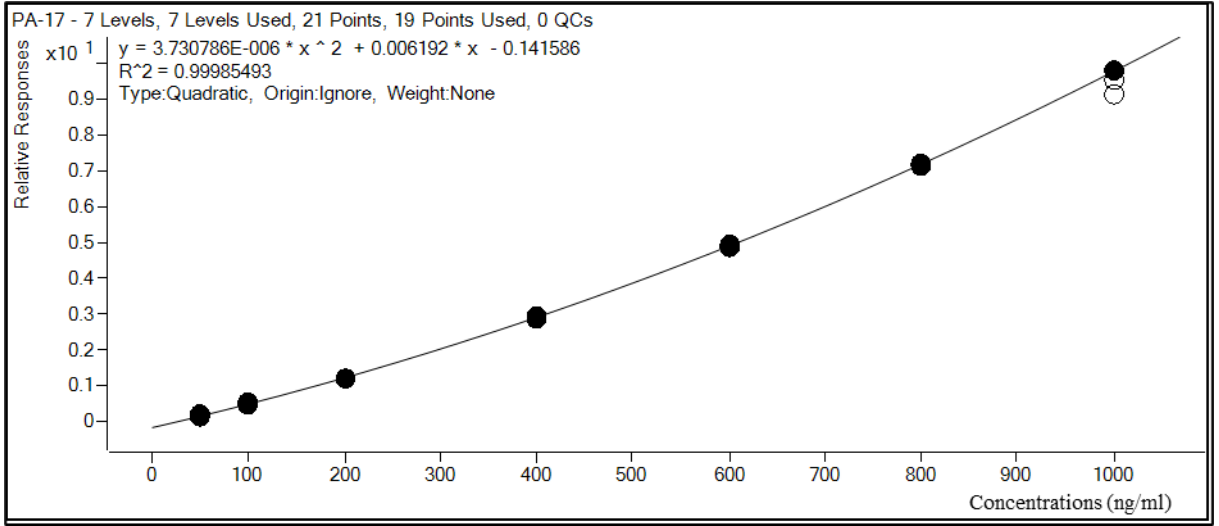


Şekil 39. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox PS 800'ün kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox PS 800'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 15'de verildi.

Tablo 15. Irganox PS 800'ün kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 1.599615E^{-005}x^2 + 0.019397x - 0.100589$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

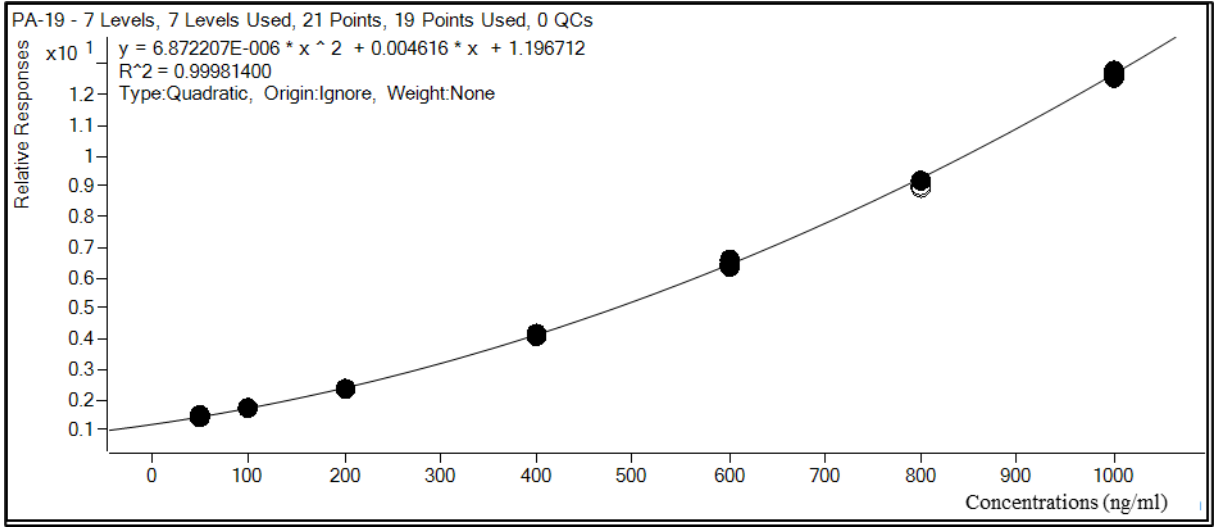


Şekil 40. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Irganox PS 802'nin kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Irganox PS 802'ye ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 16'da verildi.

Tablo 16. Irganox PS 802'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 3.730786E^{-006}x^2 + 0.006192x - 0.141586$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998

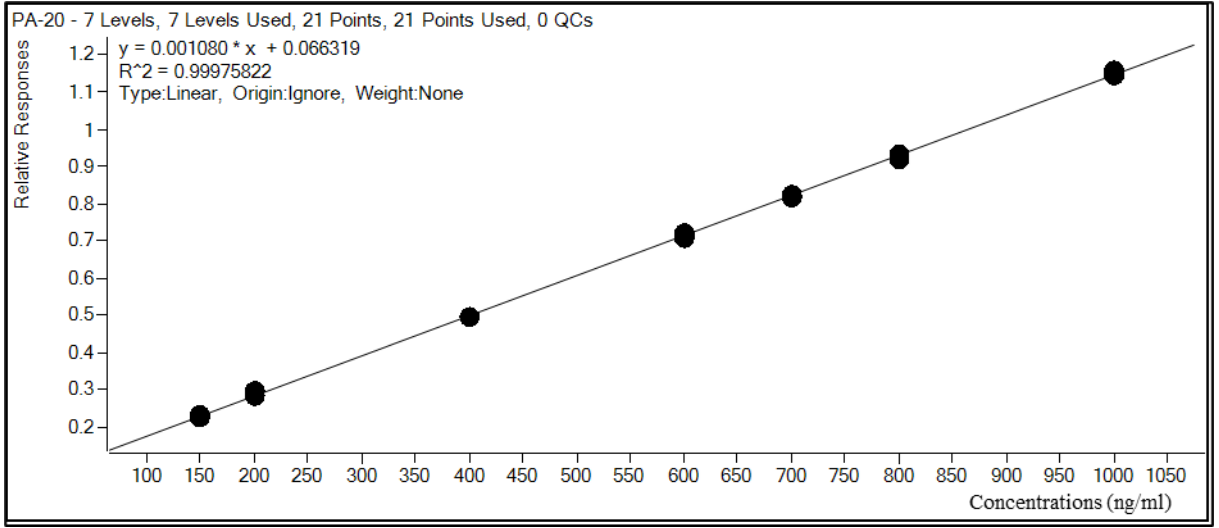


Şekil 41. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Stearik asit'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Stearik asit'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 17'de verildi.

Tablo 17. Stearik asit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 6.872207E^{-006}x^2 + 0.004616x + 1.196712$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998

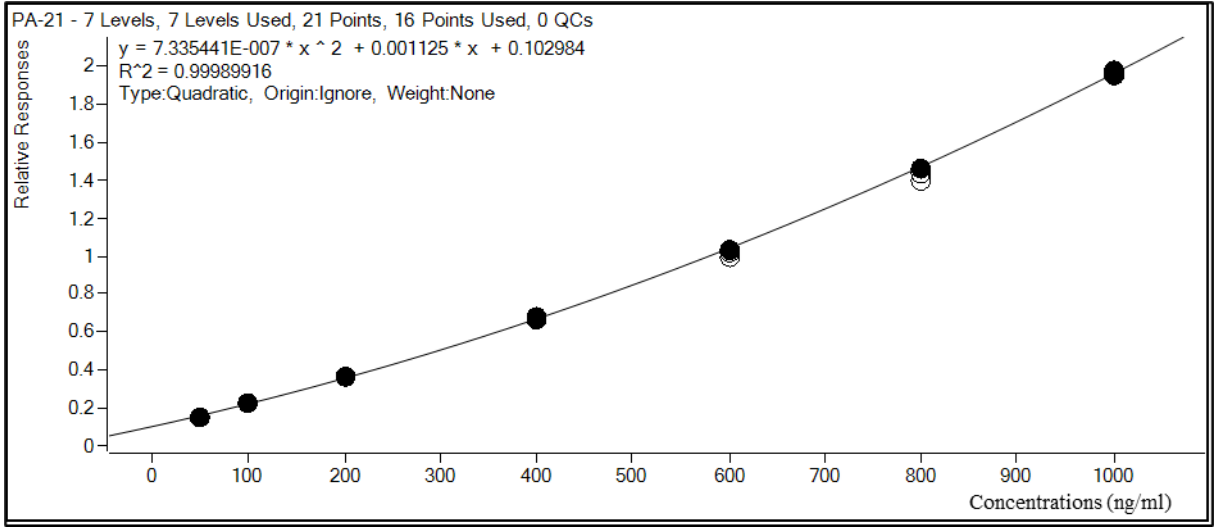


Şekil 42. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Oleamit'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Oleamit'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 18'de verildi.

Tablo 18. Oleamit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	150-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 0.001080x + 0.066319$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9997

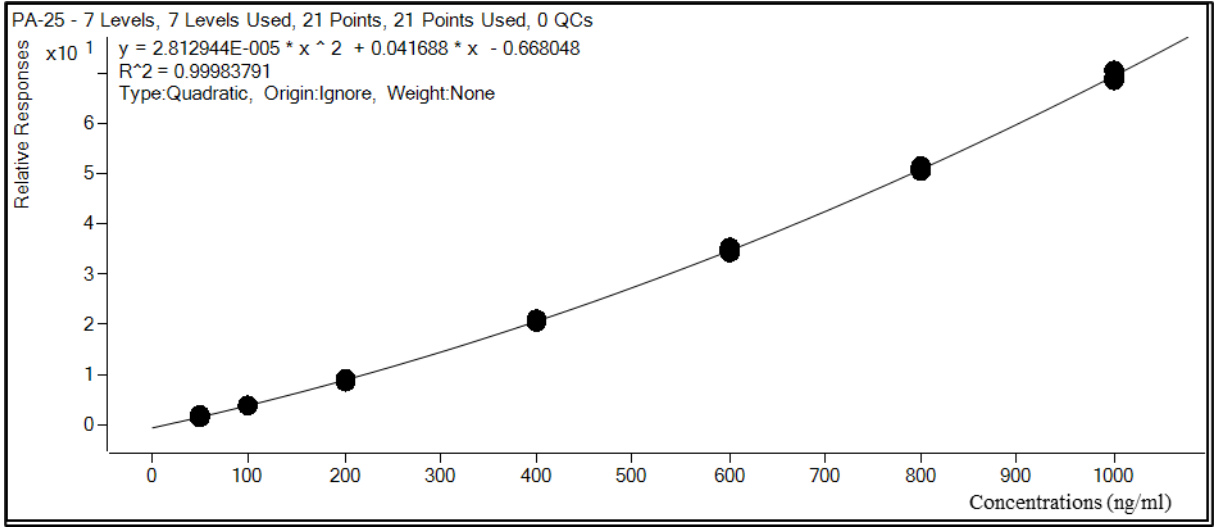


Şekil 43. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan Erukamit'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde Erukamit'e ait kalibrasyon eğrisinin regrasyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 19'da verildi.

Tablo 19. Erukamit'in kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$y = 7.335441E^{-007}x^2 + 0.001125x + 0.102984$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9999

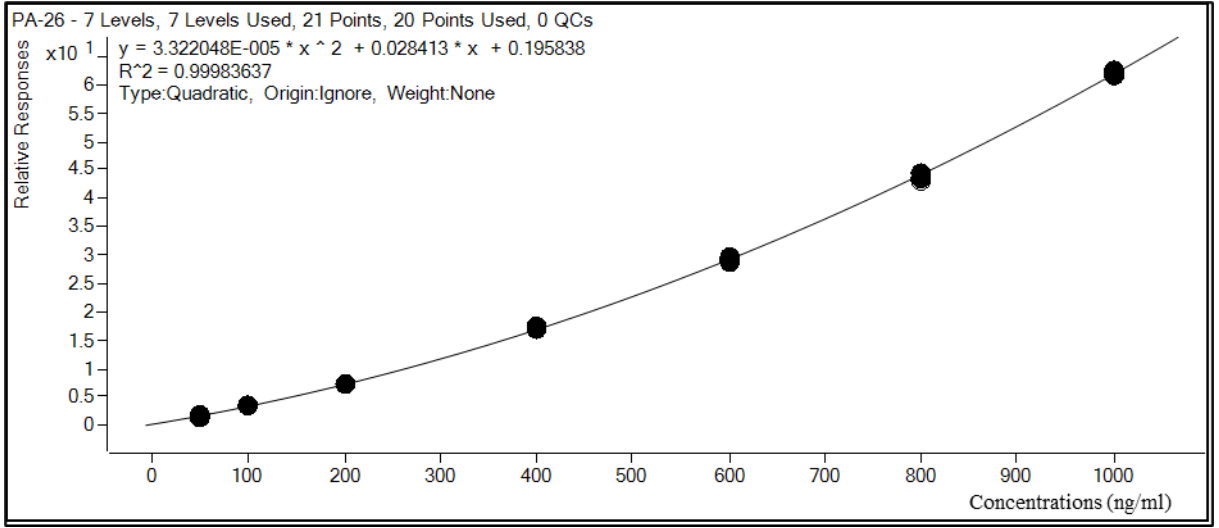


Şekil 44. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan BTC'nin kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde BTC'ye ait kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 20'de verildi.

Tablo 20. BTC'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regresyon Eğrisi Denklemi	$y = 2.812944E^{-005}x^2 + 0.041688x - 0.668048$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998



Şekil 45. LC-MS/MS sisteminde hazırlanan TEHM'nin kalibrasyon eğrisi

LC-MS/MS sisteminde TEHM'ye ait kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 21'de verildi.

Tablo 21. TEHM'nin kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS/MS Yöntemi
Doğrusal Aralığı (ng/ml)	50-1000 ng/ml
Regresyon Eğrisi Denklemi	$y = 3.322048E^{-005}x^2 + 0.028413x + 0.195838$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9998

En Düşük Miktar Tayin Alt Limiti (LLOQ)

Plastik katkı maddelerinin ortamdan bulaşmasını engelleyecek hiçbir teknik bulunmamaktadır. Bu çalışmada kalibrasyon eğrilerinin en alt noktası plastik katkı maddelerinde en düşük miktar tayin alt limiti 50 ng/ml (LLOQ, Lower Limit of Quantification) olarak belirlendi. Sadece Oleamit için kalibrasyon eğrisinin en alt noktası olan 150 ng/ml en düşük miktar tayin alt limiti olarak belirlendi.

Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrileri içine düşen üç farklı (60, 500 ve 900 ng/ml) derişimde hazırlanan plastik katkı maddelerinin kalite kontrol çözeltileri gün içi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) yapılan analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Kalite kontrol çözeltileri düşük, orta ve yüksek derişimlerde belirlenmiştir. Kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da yüzde bağıl hatayla (% BH) verildi. Elde edilen gün

İçerik ve günler arası kesinlik-doğruluk değerleri her bir plastik katkı maddesi için tablolar halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo 22. DEHP için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	61,25				63,08			
	61,36				63,10			
	61,21	61,24±0,36	0,59	2,07	63,04	63,46±0,60	0,95	5,77
	61,67				63,71			
	61,33				64,57			
	60,59				63,25			
500	495,24				514,66			
	497,57				514,69			
	495,96	500,55±5,54	1,11	0,11	514,41	515,58±2,16	0,42	3,12
	500,32				516,07			
	504,90				519,74			
	509,29				513,91			
900	883,84				925,79			
	883,03				919,64			
	873,82	879,59±4,56	0,52	-2,27	918,64	918,41±4,07	0,44	2,05
	878,38				915,12			
	883,67				915,93			
	874,82				915,32			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 23. BHT için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	59,66				59,24			
	60,68				59,49			
	57,76	59,39±1,05	1,77	-1,02	57,04	60,12±2,17	3,61	0,20
	58,55				61,06			
	59,86				60,28			
	59,82				63,58			
500	505,46				502,19			
	503,21				501,31			
	496,28	495,80±7,43	1,50	-0,84	507,61	500,15±5,31	1,06	0,03
	491,29				501,67			
	492,61				492,70			
	485,96				495,45			
900	895,79				904,42			
	882,81				911,47			
	889,62	891,77±5,68	0,64	-0,91	901,53	904,03±4,24	0,47	0,45
	889,36				899,26			
	898,65				902,16			
	894,41				905,35			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 24. Hostanox 03 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	58,69				64,08			
	61,21				63,20			
	59,77	59,81±0,93	1,55	-0,32	62,51	63,07±0,59	0,94	5,12
	60,51				63,16			
	59,08				63,01			
	59,59				62,46			
500	488,08				503,50			
	491,50				501,08			
	492,33	493,64±3,63	0,74	-1,27	505,48	504,72±2,55	0,51	0,94
	495,61				508,63			
	497,08				503,83			
	497,26				505,81			
900	889,97				904,28			
	880,01				904,86			
	879,12	882,97±4,20	0,48	-1,89	900,01	901,51±5,90	0,65	0,17
	883,36				893,49			
	879,92				909,65			
	885,42				896,79			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 25. Irganox 1010 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	54,72				61,64			
	55,50				62,34			
	55,74	55,19±0,75	1,36	-8,02	61,18	60,77±1,45	2,39	1,28
	56,24				60,11			
	54,44				58,21			
	54,48				61,14			
500	485,45				464,70			
	484,06				467,05			
	473,60	487,33±9,89	2,03	-2,53	458,68	465,75±4,00	0,86	-6,85
	488,84				466,20			
	487,84				467,07			
	504,19				470,80			
900	848,27				854,54			
	858,20				866,96			
	884,31	881,37±22,80	2,59	-2,07	867,43	861,74±5,35	0,62	-4,25
	897,48				861,28			
	898,37				856,48			
	901,59				863,73			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 26. Irganox 1330 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	58,78				61,14			
	59,87				58,34			
	57,11				62,14			
	59,40	58,53±1,57	2,68	-2,45	60,09	60,96±1,52	2,49	1,60
	59,90				61,75			
	56,11				62,31			
500	506,81				471,87			
	508,93				469,08			
	507,34				479,52			
	508,09	507,55±1,54	0,30	1,51	492,56	477,48±8,36	1,75	-4,50
	504,99				478,30			
	509,12				473,56			
900	903,11				849,49			
	899,73				841,26			
	901,27				855,24			
	902,30	901,32±1,48	0,16	0,15	845,59	846,37±5,30	0,63	-5,96
	902,12				841,51			
	899,41				845,11			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 27. Irganox 1076 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	60,94				60,36			
	56,86				70,65			
	63,85	60,93±2,26	3,71	1,55	64,16	62,73±4,33	6,90	4,55
	61,15				60,27			
	61,49				58,60			
	61,28				62,32			
500	502,41				468,57			
	502,79				467,15			
	500,44	502,67±4,30	0,86	0,53	473,28	465,22±5,45	1,17	-6,96
	497,43				462,82			
	502,52				458,52			
	510,42				461,00			
900	901,55				863,82			
	893,36				858,89			
	895,79	897,35±2,81	0,31	-0,29	847,12	851,29±11,09	1,30	-5,41
	898,92				832,11			
	897,88				855,19			
	896,57				850,59			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 28. Irgafos 168 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	55,95				66,53			
	56,43				67,21			
	57,75				65,67			
	56,19	56,63±0,69	1,22	-5,62	66,64	65,93±1,05	1,59	9,88
	56,29				65,01			
	57,17				64,49			
500	501,08				501,61			
	507,12				497,50			
	504,30				517,20			
	504,03	503,93±2,02	0,40	0,79	509,95	508,04±7,22	1,42	1,60
	504,45				512,27			
	502,62				509,69			
900	898,55				874,76			
	899,19				912,17			
	894,58				887,01			
	890,13	893,66±5,81	0,65	-0,70	885,72	892,64±13,47	1,51	-0,82
	883,82				903,88			
	895,68				892,28			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 29. Irganox 3114 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	58,11				57,21			
	55,37				58,21			
	55,02	56,62±1,43	2,53	-5,63	56,35	57,30±1,00	1,75	-4,50
	58,55				58,82			
	56,16				56,60			
	56,54				56,63			
500	460,44				482,65			
	468,88				470,90			
	477,99	463,37±9,47	2,04	-7,33	471,20	475,83±6,13	1,29	-4,83
	449,62				478,97			
	461,92				482,19			
	461,36				469,08			
900	857,90				871,45			
	827,01				885,79			
	791,41	877,17±6,51	0,74	-2,54	876,59	879,46±6,40	0,73	-2,28
	861,01				886,17			
	857,96				873,64			
	848,67				883,09			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 30. Irganox PS 800 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	58,71				62,17			
	59,58				62,10			
	59,66	59,33±0,76	1,28	-1,12	62,54	62,00±0,38	0,61	3,33
	60,55				62,05			
	58,43				61,69			
	59,04				61,47			
500	499,39				458,87			
	500,04				459,41			
	501,95	502,41±3,78	0,75	0,48	459,67	459,37±1,37	0,30	-8,13
	498,92				461,45			
	506,35				457,22			
	507,79				459,62			
900	889,84				846,02			
	888,88				846,63			
	884,70	887,72±3,59	0,40	-1,36	835,77	841,66±4,96	0,59	-6,48
	892,21				836,48			
	888,34				839,70			
	882,33				845,39			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 31. Irganox PS 802 için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	57,85				64,73			
	58,67				64,68			
	57,71				64,88			
	57,93	57,73±0,59	1,02	-3,78	65,20	65,03±0,31	0,48	8,38
	57,25				65,22			
	56,98				65,44			
500	518,74				508,92			
	523,31				509,37			
	522,35				504,67			
	526,58	523,59±2,83	0,54	4,72	507,36	507,62±2,02	0,40	1,52
	525,70				509,56			
	524,87				505,85			
900	903,97				940,10			
	899,87				944,88			
	898,95				913,95			
	890,62	895,56±6,28	0,70	-0,49	911,79	923,00±15,21	1,65	2,56
	892,15				914,83			
	887,78				912,48			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 32. Stearik asit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	56,94				62,48			
	57,51				63,33			
	60,96	60,07±2,33	3,87	0,12	62,86	63,38±1,17	1,85	5,63
	60,49				65,67			
	62,03				62,65			
	62,51				63,29			
500	503,36				487,49			
	499,39				484,20			
	504,55	502,01±3,77	0,75	0,40	494,13	491,34±4,87	0,99	-1,73
	496,28				501,59			
	501,67				493,45			
	506,80				495,31			
900	905,33				852,43			
	894,95				844,47			
	877,74	891,60±9,25	1,04	-0,93	851,12	850,73±7,49	0,88	-5,47
	886,96				851,06			
	894,87				866,38			
	889,72				854,70			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 33. Oleamit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
500	495,22				485,11			
	495,23				492,52			
	489,79				491,83			
	500,64	496,83±4,24	0,85	-0,63	486,76	488,80±3,25	0,66	-2,24
	500,04				485,89			
	500,08				490,68			
900	912,10				910,72			
	902,47				919,46			
	911,85				904,05			
	903,33	908,02±4,23	0,47	0,89	899,97	908,74±7,03	0,77	0,97
	908,02				905,29			
	910,33				912,94			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 34. Erukamit için LC-MS/MS yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	58,53				60,19			
	59,77				58,46			
	59,36	59,09±0,88	1,49	-1,52	55,27	58,68±1,89	3,22	-2,20
	60,29				60,44			
	57,91				58,29			
	58,67				59,43			
500	501,26				475,02			
	498,76				484,16			
	481,70	496,51±9,49	1,91	-0,70	483,34	483,48±5,61	1,16	-3,30
	494,37				479,79			
	492,83				487,83			
	510,13				490,77			
900	906,02				878,75			
	889,63				887,47			
	899,23	897,39±7,64	0,85	-0,29	879,24	880,56±4,19	0,48	-2,16
	887,49				879,54			
	904,86				875,29			
	897,10				883,05			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Tablo 35. BTC için LC-MS/MS yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	56,83				62,74			
	57,89				64,04			
	57,51				63,94			
	58,37	57,74±0,52	0,90	-3,77	63,83	63,64±0,47	0,74	6,07
	57,97				63,56			
	57,84				63,71			
500	487,41				458,17			
	494,46				469,90			
	492,57				467,33			
	490,70	494,02±5,07	1,03	-1,20	468,51	466,77±4,34	0,93	-6,65
	497,03				467,39			
	501,93				469,33			
900	889,34				882,20			
	897,68				887,09			
	889,12				870,64			
	890,23	891,61±4,62	0,52	-0,93	869,32	876,14±8,18	0,93	-2,65
	896,96				867,07			
	886,33				880,50			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma, BH: Bağlı Hata

Tablo 36. TEHM için LC-MS/MS yönteminin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml)	Gün içi			Bulunan (ng/ml)	Günler Arası		
		SS	% BSS	% BH		SS	% BSS	% BH
60	59,67	59,97±0,96	1,60	-0,05	59,17	58,83±0,24	0,41	-1,95
	60,42				58,66			
	59,42				58,82			
	61,14				58,80			
	60,68				58,50			
	58,49				59,03			
500	503,89	508,63±5,04	0,99	1,73	462,21	466,61±3,00	0,64	-6,68
	508,35				467,16			
	502,88				466,70			
	508,58				471,57			
	511,53				465,89			
	516,56				466,10			
900	890,27	892,63±4,24	0,48	-0,82	822,73	853,74±3,40	0,40	-5,14
	900,83				826,28			
	889,28				810,72			
	892,00				811,20			
	893,08				825,94			
	890,34				813,31			

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Kararlılık (Stabilite)

Plastik katkı maddelerinin referans çözeltilerinden hazırlanan 75, 250 ve 950 ng/ml derişimdeki çözeltiler 3 farklı saklama koşulunda (+20 °C, +4 °C, -20 °C) 1 s, 12 s, 24 s, 48 s, 72 s, 1 h, 2 h ve 3 h boyunca bekletilerek gösterdikleri kararlılıkları (stabilitesi) izlenildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik alanları hesaplandı ve bu değerler yeni hazırlanan çözeltilerin analizinden elde edilen pik alanlarıyla mukayese edildi. Sonuçlar yüzde geri kazanım olarak tablolar halinde verildi.

Tablo 37. DEHP için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	108,93±0,31	104,43±2,73	108,46±1,37	111,39±1,96	103,12±0,55	106,74±0,14	110,39±0,90	102,30±0,08	106,85±0,09
	12	113,93±2,40	108,59±1,00	109,97±0,59	111,07±1,47	107,84±1,57	109,38±1,90	115,59±2,32	107,65±1,19	108,13±0,17
	24	119,25±0,43	117,89±0,71	114,47±0,85	118,04±0,72	116,11±0,54	113,43±1,48	119,75±0,17	116,12±1,97	112,07±0,69
	48	119,44±0,77	116,83±0,97	110,94±0,90	119,04±0,22	113,41±3,29	112,41±0,25	118,81±0,87	113,42±1,45	109,68±0,13
	72	119,10±0,35	114,86±0,08	108,70±0,71	117,32±0,07	113,20±0,95	109,64±0,93	118,06±0,84	113,76±0,91	106,18±0,44
Hafta	1	118,20±0,66	108,54±0,96	107,77±0,96	119,41±0,51	116,72±1,73	106,23±0,84	118,99±0,87	115,70±1,67	105,27±1,12
	2	203,57±0,67	132,63±1,45	112,35±1,37	182,07±1,30	121,03±0,31	107,81±0,30	172,99±0,89	116,93±1,71	99,70±0,23
	3	211,00±3,29	134,32±0,92	106,93±1,13	191,46±2,08	123,74±0,56	99,25±0,65	183,08±1,30	121,90±1,62	92,53±1,05

Tablo 38. BHT için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	101,81±1,13	99,90±2,15	100,29±0,61	101,77±3,30	102,63±0,96	100,33±1,05	97,17±6,90	100,40±1,21	100,28±0,62
	12	101,34±1,81	99,79±0,77	99,67±0,56	102,06±0,64	109,73±1,50	100,40±0,45	102,15±1,49	100,05±0,45	99,52±1,35
	24	98,14±4,67	99,24±1,67	99,30± 2,28	99,26±5,60	97,20±0,92	100,77±0,86	99,15±3,88	98,13±1,67	99,12±0,74
	48	101,33±2,63	98,29±4,28	99,56±0,43	95,29±1,70	100,25±0,97	101,06±0,14	102,80±2,18	99,97±0,38	99,96±0,62
	72	98,58±3,93	103,05±1,43	100,25±0,85	101,21±2,72	101,60±0,84	100,01±0,54	103,96±0,85	102,78±1,00	100,67±0,43
Hafta	1	100,20±3,38	103,68±2,45	100,84±1,15	101,96±3,71	103,58±0,46	100,63±1,13	101,60±2,10	103,89±2,81	101,00±0,06
	2	101,75±1,18	101,38±1,78	102,20±0,91	100,01±2,33	96,15±6,94	96,24±6,36	97,70±0,26	98,26±1,58	104,49±0,65
	3	95,51±0,79	105,90±2,97	101,38±1,83	99,01±5,07	102,10±3,02	99,58±0,43	98,70±5,63	99,94±1,39	100,44±1,33

Tablo 39. Hostanox 03 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	108,17±2,47	111,19±0,20	109,33±1,98	112,70±0,69	108,60±0,35	107,49±0,82	113,58±1,41	107,19±0,83	106,33±0,28
	12	112,77±2,08	110,24±1,72	110,83±0,53	104,59±1,32	110,63±0,55	106,26±2,44	118,51±1,15	107,69±0,60	107,99±1,48
	24	119,22±0,67	117,59±1,41	119,67±0,34	104,43±1,55	114,51±0,94	112,96±0,57	118,39±1,00	109,52±2,08	115,40±1,17
	48	124,95±1,28	114,12±0,96	117,58±2,62	97,72±0,67	116,53±3,93	110,05±1,85	118,44±3,30	108,19±1,42	114,96±1,12
	72	119,14±0,47	115,77±1,57	118,05±0,73	100,26±0,97	118,72±0,54	108,99±2,04	119,12±0,28	109,75±0,86	116,78±0,71
Hafta	1	119,40±0,07	114,20±2,19	115,95±1,45	119,08±0,35	118,76±1,02	112,79±1,65	118,95±0,19	109,91±3,65	113,28±1,20
	2	119,26±3,41	103,44±0,87	110,03±1,77	93,41±1,76	107,71±1,80	100,56±0,35	101,00±0,24	96,64±0,52	121,71±0,20
	3	86,12±0,72	76,33±0,41	91,00±0,51	67,50±0,40	79,69±0,34	79,22±0,47	74,66±0,73	72,07±1,28	125,67±0,71

Tablo 40. Irganox 1010 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	99,82±2,15	103,59±0,40	100,88±0,48	105,80±1,18	101,67±0,46	99,77±1,59	107,87±0,17	101,33±0,81	99,66±0,16
	12	93,43±1,89	101,10±2,41	102,59±0,13	85,18±2,04	100,94±2,09	99,42±2,28	104,15±3,34	98,66±2,37	97,88±2,00
	24	83,51±1,22	96,54±4,25	106,08±1,14	68,13±0,72	94,37±1,08	98,91±1,65	84,98±1,18	92,37±1,65	99,65±1,31
	48	74,48±0,43	86,50±1,32	92,44±0,54	55,66±1,78	85,44±2,95	89,28±1,31	79,82±0,69	84,35±1,80	92,45±2,09
	72	79,69±3,05	85,32±1,54	91,90±1,58	54,98±1,96	88,34±2,00	84,82±1,79	80,98±1,61	81,42±1,44	90,20±1,78
Hafta	1	74,88±1,31	77,20±1,33	85,92±1,31	56,69±0,66	80,40±0,37	82,87±1,35	79,81±0,67	77,34±0,64	84,67±2,18
	2	54,61±2,18	63,44±0,36	68,19±1,00	41,61±1,03	67,82±1,33	65,24±1,12	55,24±0,72	63,11±1,39	79,52±1,10
	3	12,22±1,06	28,90±0,14	36,65±1,36	5,82±1,82	31,53±1,09	33,93±0,99	14,78±2,18	31,22±0,71	54,34±0,92

Tablo 41. Irganox 1330 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
		Süre	75	250	950	75	250	950	75	250
Saat	1	93,67±6,35	101,52±3,16	99,33±1,05	94,68±7,57	95,97±3,38	97,74±0,71	96,99±5,21	96,01±4,44	96,13±2,07
	12	91,98±3,08	92,81±3,78	100,21±1,51	90,29±0,73	91,64±0,75	96,46±1,56	94,19±1,04	93,11±3,32	98,04±1,06
	24	100,05±2,04	103,89±2,34	99,45±0,57	100,87±1,65	102,57±1,64	99,99±0,57	101,84±2,34	103,14±0,44	100,60±0,63
	48	108,29±4,48	112,48±5,95	106,91±1,45	90,89±3,08	111,66±3,18	106,14±0,91	116,68±3,03	112,00±3,19	108,75± 1,58
	72	112,80±0,36	108,80±3,77	106,61±2,02	95,91±3,35	113,93±4,11	99,65±0,57	113,60±3,91	108,73±3,48	104,70±0,60
Hafta	1	110,07±4,72	102,76±3,78	94,04±2,01	94,07±3,32	108,31±1,13	90,71±2,05	108,09±5,38	101,30±1,96	93,63±1,36
	2	74,67±5,03	82,63±1,09	80,71±0,01	71,94±3,42	85,28±4,16	76,74±2,28	71,12±5,46	79,69±0,73	86,96±2,48
	3	54,05±3,16	50,46±3,86	60,28±1,84	41,36±3,83	53,91±4,60	53,30±0,57	53,93±8,41	53,29±3,07	76,72±1,04

Tablo 42. Irganox 1076 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	95,28±5,32	90,69±4,04	96,92±2,44	100,18±4,70	93,40±6,39	95,59±1,49	96,00±8,58	93,69±2,64	95,96±1,40
	12	101,07±5,88	91,52±4,37	96,65±1,13	93,56±3,77	96,09±4,69	96,60±1,25	101,58±10,11	93,63±1,44	96,20±0,77
	24	115,36±2,03	104,74±2,51	100,53±1,05	108,15±3,40	101,73±2,29	98,03±1,30	110,71±9,04	108,12±4,31	100,10±2,33
	48	102,85±9,93	102,65±1,54	95,09±1,27	99,08±5,33	101,38±6,95	95,69±1,63	101,23±1,94	100,57± 0,47	93,30±3,10
	72	117,53±1,12	99,39±1,64	89,88±2,45	100,84±4,98	97,68±0,98	92,81±4,63	98,50±7,26	95,15±3,06	93,21±1,92
Hafta	1	118,57±1,64	91,67±6,91	88,96±1,24	97,16±10,23	97,91±3,44	86,16±1,27	99,92±6,67	90,84±4,42	87,91±1,22
	2	109,15±2,72	95,38±6,67	89,70±1,64	106,17±3,28	93,43±3,37	85,29±1,27	107,62±5,96	95,50±3,23	100,73±3,23
	3	93,00±14,54	76,99±3,92	75,24±1,33	70,89±5,75	73,22±3,07	67,87±0,85	75,36±4,08	69,36±6,47	104,75±0,60

Tablo 43. Irgafos 176 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
		Süre	75	250	950	75	250	950	75	250
Saat	1	118,12±0,33	114,06±1,17	110,15±0,35	118,06±0,57	112,49±1,05	109,32±0,84	118,48±0,17	110,06±1,20	109,15±3,37
	12	107,92±2,14	100,29±4,03	95,37±0,67	106,85±10,66	103,89±0,87	101,48±0,59	110,13±1,92	103,97±1,94	100,82±0,91
	24	87,93± 2,30	77,87±4,01	51,42±1,10	80,94±2,27	85,33±1,67	70,77±0,52	88,23±4,35	86,46±1,58	80,40±1,06
	48	100,45±3,36	84,16±3,70	37,95±1,18	94,26±3,40	96,85±2,44	67,67±0,77	108,06±2,79	100,68±1,59	80,71±0,72
	72	115,42±1,90	81,76±0,50	26,75±0,31	101,90±2,53	101,79±3,13	59,18±1,02	118,62±1,03	105,12±2,01	79,58±1,17
Hafta	1	91,61±0,81	46,15±0,79	3,29±0,12	103,10±4,89	89,76±1,51	32,83±0,83	108,51±0,54	107,28±0,48	75,21±0,49
	2	66,23±3,19	16,04±1,13	0,85±0,10	79,48±0,45	61,59±1,36	10,59±0,53	102,59±0,90	89,59±0,43	62,63±0,88
	3	78,65±3,14	9,05±0,75	0,83±0,09	98,12±1,24	77,05±1,24	5,67±0,11	117,42±1,53	118,18±0,45	86,31±1,65

Tablo 44. Irganox 3114 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
		Süre	75	250	950	75	250	950	75	250
Saat	1	92,94±2,34	102,09±2,96	101,50±1,80	102,01±1,96	98,71±2,22	98,55±2,79	94,58±6,76	94,97±1,85	97,84±5,56
	12	90,91±0,83	95,56±2,52	99,09±0,60	90,50±3,76	86,69±5,91	97,69±3,55	94,75±4,15	92,35±0,88	94,70±0,59
	24	113,09±3,91	109,12±3,83	101,42±0,57	105,52±5,65	108,90±4,17	100,58±0,65	113,82±5,57	107,64±5,07	100,94±0,48
	48	110,15±3,60	109,95±8,11	117,11±3,29	90,33±1,03	111,18±2,50	110,99±1,27	114,29±1,34	109,28±5,08	117,52±4,14
	72	109,78±8,35	101,94±8,31	110,84±5,53	84,06±7,84	109,72±6,27	102,19±7,15	108,46±2,03	109,76±5,03	116,60±4,65
Hafta	1	114,79±0,75	112,65±0,23	105,38±0,97	106,14±4,01	118,74±0,14	97,82±3,94	115,79±0,41	112,11±1,30	102,55±1,46
	2	91,28±6,58	91,27±3,42	94,42±2,90	86,69±5,52	84,60±3,27	83,04±2,06	87,21±5,06	86,95±0,11	99,73±0,56
	3	45,85±13,87	44,87±2,32	59,85±1,02	45,98±4,12	48,58±3,77	55,59±2,99	42,60±6,21	49,11±3,11	75,60±4,29

Tablo 45. Irganox PS 800 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

	Süre	+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	84,76±1,10	92,03±1,00	99,63±1,08	87,31±1,59	90,74±0,94	98,09±0,82	87,70±0,83	90,13±0,64	97,52±0,81
	12	86,62±1,67	92,83±1,35	98,86±0,22	86,23±1,03	91,43±0,83	98,46±1,37	88,80±1,60	91,03±0,28	96,49±0,16
	24	93,40±0,85	99,96±0,98	102,21±0,61	93,69±0,24	96,29±0,44	103,54±0,80	93,73±1,19	98,00±1,08	101,60±0,37
	48	91,90±0,52	96,45±0,99	97,29±0,89	90,70±2,69	92,86±2,08	101,82±0,19	91,24±0,53	94,47±2,10	97,35±0,42
	72	92,35±0,20	94,74±0,41	94,50±0,76	91,30±0,96	91,11±0,80	98,35±0,72	91,27±0,48	92,92±0,81	92,77±0,58
Hafta	168	93,86±1,08	95,21±0,61	90,69±1,09	90,63±0,57	88,36±0,52	89,78±0,68	90,83±0,23	92,18±1,60	89,25±0,81
	336	113,21±1,97	116,64±1,82	104,15±1,68	110,46±1,87	102,11±1,09	101,01±0,08	108,41±1,24	105,05±1,08	90,89±0,12
	504	103,02±1,69	106,39±0,40	97,81±0,59	95,12±1,08	91,78±0,40	92,07±0,20	95,15±0,39	92,97±0,83	86,24±0,74

Tablo 46. Irganox PS 802 için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	89,64±1,51	83,22±2,78	100,29±0,30	88,19±1,66	86,25±1,94	100,52±0,30	91,55±0,82	86,18±1,77	100,34±0,27
	12	99,06±0,34	92,77±1,00	100,45±0,72	97,45±0,94	90,75±1,55	98,85±1,06	100,87±2,29	90,24±0,72	97,69±1,80
	24	99,80±0,48	89,52±0,54	89,14±1,02	101,21±1,44	86,68±0,74	65,05±0,72	99,31±1,72	80,76±1,24	45,73±0,79
	48	106,73±0,73	99,07±0,72	93,41±0,76	107,97±0,20	92,70±1,14	52,48±0,72	108,47±1,13	95,56±0,77	44,27±0,48
	72	108,59±1,18	102,92±0,54	93,54±0,89	111,62±0,86	95,92±2,03	46,17±0,39	114,01±1,29	89,19±1,52	35,75±0,56
Hafta	1	95,24±0,40	105,53±0,22	90,78±1,52	99,75±1,42	94,88±0,54	15,76±0,42	108,45±0,86	91,84±0,53	40,85±0,99
	2	113,39±1,70	105,63±1,32	91,14±0,46	113,65±0,60	94,31±1,62	24,23±0,38	113,25±1,97	96,92±1,30	47,82±0,27
	3	148,25±1,82	142,83±1,64	108,90±1,19	150,77±1,91	120,04±1,38	32,16±0,56	141,79±2,45	129,29±1,29	53,24±0,97

Tablo 47. Stearik asit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	117,41±1,17	110,82±2,51	101,18±1,41	111,80±2,32	118,73±1,04	99,75±0,50	113,03±0,74	105,53±1,94	97,97±0,85
	12	545,09±13,61	192,04±2,84	122,62±1,18	260,88±77,34	193,97±1,22	105,60±1,80	354,45±8,74	148,32±1,44	110,13±0,46
	24	930,20±9,06	297,54±5,48	141,36±2,91	481,32±24,98	267,08±3,86	118,94±1,44	604,49±14,78	214,21±5,26	123,01±0,63
	48	1056,74±1,56	317,70±3,42	143,42±0,55	475,96±9,31	286,80±7,63	120,31±0,53	665,75±5,14	236,10±3,27	126,38±0,60
	72	1308,56±27,12	335,51±3,31	151,41±2,14	538,60±10,08	325,01±3,43	122,49±0,72	747,19±1,68	258,61±2,86	130,44±0,75
Hafta	1	1466,83±20,18	370,66±2,65	155,28±1,00	957,91±2,50	406,87±0,92	137,08±1,55	892,60±11,24	301,60±11,41	135,15±1,62
	2	1602,15±3,25	421,35±2,70	173,54±0,42	1134,36±7,38	457,47±2,94	147,73±0,82	1117,09±8,09	368,56±5,53	195,14±1,47
	3	2151,66±41,40	581,88±7,16	212,26±2,28	1618,11±28,88	614,96±31,61	196,91±9,81	1688,63±97,57	517,29±9,38	210,51±4,03

Tablo 48. Oleamit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C		+4 °C		-20 °C	
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)					
	Süre	250	950	250	950	250	950
Saat	1	92,96±1,72	111,11±2,13	107,31±1,17	116,54±1,52	85,12±1,43	112,69±0,79
	12	97,53±3,75	113,82±1,25	111,59±1,94	116,73±2,56	88,10±1,71	115,23±0,35
	24	106,76±3,20	117,04±0,51	117,55±0,66	117,89±1,50	93,26±3,40	118,51±0,88
	48	113,28±0,80	117,70±0,44	128,74±4,86	119,30±0,30	98,88±2,54	117,02±0,26
	72	118,81±3,18	125,61±1,24	145,10±3,00	125,77±0,58	107,07±0,86	125,06±1,15
Hafta	1	135,61±3,21	133,61±2,01	163,64±1,90	132,78±1,34	123,64±2,63	133,42±3,20
	2	139,84±4,80	137,65±0,63	160,23±2,06	131,04±0,72	117,80±0,95	156,18±1,48
	3	159,42±2,06	158,72±2,43	171,17±3,53	143,70±2,22	136,39±4,61	225,32±2,11

Tablo 49. Erukamit için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen stabilite değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	108,16±2,01	100,92±1,51	102,02±2,17	108,46±4,95	104,19±4,15	102,84±0,68	113,11±1,13	100,44±1,26	102,21±1,58
	12	107,38±5,13	108,54±1,95	103,14±1,26	115,73±2,30	112,44±0,10	105,34±2,45	110,14±2,58	106,90±0,48	104,56±0,63
	24	149,99±8,60	104,98±1,49	102,12±1,47	106,96±0,48	110,85±1,41	101,87±2,32	135,87±3,09	100,17±1,70	101,46±0,66
	48	157,15±4,43	112,83±1,92	102,96±0,62	104,37±7,20	118,05±4,67	102,25±0,17	154,15±4,56	110,68±1,89	101,62±0,95
	72	182,04±0,27	115,65±2,05	104,30±0,45	110,27±0,97	128,81±2,06	103,17±0,68	181,20±5,56	112,90±0,89	104,02±0,40
Hafta	1	209,09±7,33	124,65±1,12	107,39±0,87	163,93±0,57	140,70±2,11	106,13±1,11	190,32±11,61	125,52±4,72	108,28±0,61
	2	233,12±12,02	140,71±2,69	115,73±2,73	182,51±9,10	155,93±7,05	109,81±1,16	211,90±19,03	134,19±3,02	127,39±2,75
	3	303,84±18,18	160,84±0,61	125,97±0,60	224,89±9,33	163,61±2,21	116,70±0,45	275,16±6,02	153,08±3,61	158,60±2,54

Tablo 50. BTC için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	91,60± 1,21	91,67±0,41	101,58±1,42	94,52±0,78	90,40±0,38	100,02±0,85	95,44±0,57	89,76±1,08	99,46±0,63
	12	89,60±2,10	90,98±1,66	101,16±0,58	90,80±0,70	90,47±0,98	100,71±1,67	93,23±1,97	90,01±0,45	98,78±0,16
	24	97,92±0,78	98,13±0,83	105,84±0,97	97,75±0,83	96,17±0,94	107,01±0,38	99,21±0,68	97,39±0,34	104,68±0,43
	48	94,58±0,25	93,69±0,81	98,97±0,51	94,50±1,42	90,65±2,25	103,82±0,69	95,75±1,13	92,47±1,59	99,82±0,53
	72	96,00±0,60	92,38±0,43	95,88±1,02	94,55±0,75	89,18±1,15	100,83±0,64	96,15±0,75	90,98±0,48	95,07±0,69
Hafta	1	98,72±2,07	94,80±0,48	92,24±1,45	97,51±0,31	88,51±0,52	91,30±0,95	97,71±0,50	91,82±1,28	89,86±0,68
	2	106,47±1,68	104,81±1,16	98,69±0,53	107,43±0,26	91,17±0,77	98,79±0,62	106,40±0,37	95,60±1,99	89,90±0,28
	3	108,38±0,52	103,55±0,38	99,33±1,09	100,26±0,62	90,58±0,33	92,33±0,47	100,98±0,30	91,13±0,87	87,07±0,51

Tablo 51. TEHM için LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

		+20 °C			+4 °C			-20 °C		
		Eklenen Madde Miktarı (ng/ml)								
Süre		75	250	950	75	250	950	75	250	950
Saat	1	69,02±0,40	81,98±0,68	88,73±1,39	69,23±1,26	81,62±1,33	87,94±0,43	69,61± 0,69	81,81±0,21	88,49±0,58
	12	68,51±1,79	82,59±1,56	86,47±0,56	72,89±0,71	81,43±0,99	89,06±1,32	69,79±1,73	82,21±0,13	85,96±0,34
	24	61,06±0,62	74,25±1,18	80,27±0,70	65,35±1,53	72,68±0,64	84,10±0,65	61,67±0,47	76,32±0,84	80,26±0,18
	48	65,53±0,73	76,33±0,59	78,93±0,24	65,80±0,84	73,15±1,66	83,13±0,67	64,12±0,48	74,43±1,47	78,04±0,41
	72	70,32±0,42	76,78±0,76	78,12±0,78	66,74±0,48	74,38±0,57	80,98±0,94	67,51±1,32	75,58±0,55	76,22±0,27
Hafta	1	72,74±1,94	77,25±0,57	77,15±0,79	68,18±0,83	74,26±0,37	75,62±0,55	68,91±0,62	74,58±0,22	75,28±0,70
	2	87,48±2,41	88,17±1,48	83,13±0,92	78,08±1,46	80,89±1,44	79,30±0,41	77,34±1,26	80,22±0,44	79,07±0,59
	3	92,43±0,66	100,62±0,81	87,90±0,55	88,27±0,87	85,25±0,47	82,95±0,19	83,73±1,05	86,93±0,39	74,47±0,69

Sistem Uygunluk

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin sistem uygunluk parametresi için yapılan çalışmada, kalibrasyon eğrisi içine düşen 450 ng/ml derişimde hazırlanan plastik katkı maddelerinin kalite kontrol çözeltileri gün içi aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 6 tekrarlı analizler ile yapıldı. Analiz sonuçlarının ortalamaları alındıktan sonra her bir plastik katkı maddesi için SS, %BSS ve %BH'ları belirlendi. Elde edilen sistem uygunluk değerleri Tablo 52'de verildi.

Tablo 52. Plastik katkı maddeleri için LC-MS/MS sisteminde elde edilen sistem uygunluk analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Eklenen (ng/ml)	Bulunan (ng/ml±SS)	%BSS	%BH
DEHP	450,00	456,14±2,80	0,61	1,36
BHT	450,00	447,00±7,50	1,68	-0,67
Hostanox 03	450,00	448,68±4,41	0,98	-0,29
Irganox 1010	450,00	435,57±5,14	1,18	-3,21
Irganox 1330	450,00	447,92±2,73	0,61	-0,46
Irganox 1076	450,00	438,74±7,64	1,74	-2,50
Irgafos 168	450,00	445,41±3,60	0,81	-1,02
Irganox 3114	450,00	421,76±7,77	1,84	-6,28
Irganox PS 800	450,00	441,28±7,81	1,77	-1,94
Irganox PS 802	450,00	451,90±4,40	0,97	0,42
Stearik asit	450,00	456,29±3,01	0,66	1,40
Oleamit	450,00	442,63±2,23	0,50	-1,64
Erukamit	450,00	443,87±5,61	1,26	-1,36
BTC	450,00	436,89±4,16	0,95	-2,91
TEHM	450,00	444,60±5,24	1,18	-1,20

*SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

Farmasötik Preparatlarda E&L Çalışmaları: Plastik Katkı Maddelerinin Tayini

Farmasötik preparatlarda kullanılan ambalaj malzemelerindeki plastik katkı maddelerinin tayini için çeşitli ekstraksiyon metotları kullanıldı. Yukarıda belirtilen (Extractables Çalışmalarının Hazırlanması) ekstraksiyon yöntemlerine göre hazırlanan numuneler LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Tablo 53, Tablo 54, Tablo 55 ve Tablo 56’da verildi.

Tablo 53. Polipropilen torbaya uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Ekstraksiyon Metodları				LLOQ (ng/ml)
	Soxhlet	Reflüks	Ultrasonik Banyo	Etüv	
DEHP	52,53 ng/g	119,88 ng/g	101,70 ng/g	<LLOQ	50
BHT	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Hostanox 03	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1010	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1330	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1076	2,56 µg/g	1,45 µg/g	439,28 ng/g	1,24 µg/g	50
Irgafos 168	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 3114	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 800	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 802	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Stearik asit	137,48 ng/g	111,50 ng/g	116,02 ng/g	225,68 ng/g	50
Oleamit	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	720,94	150
Erukamit	825,31 ng/g	271,20 ng/g	258,44 ng/g	1,14 µg/g	50
BTC	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
TEHM	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

Tablo 54. Tek kullanımlık göz damlasına uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Ekstraksiyon Metodları				LLOQ (ng/ml)
	Soxhlet	Reflüx	Ultrasonik Banyo	Etüv	
DEHP	180,62 ng/g	112,82 ng/g	108,07 ng/g	132,05 ng/g	50
BHT	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Hostanox 03	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1010	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1330	68,50 ng/g	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1076	5,54 µg/g	200,36 ng/g	296,45 ng/g	161,02 ng/g	50
Irgafos 168	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 3114	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 800	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 802	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Stearik asit	295,38 ng/g	225,99 ng/g	247,64 ng/g	234,88 ng/g	50
Oleamit	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	150
Erukamit	1,29 µg/g	73,76 ng/g	56,91 ng/g	57,27 ng/g	50
BTC	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
TEHM	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

Tablo 55. LDPE plastik flakona uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Ekstraksiyon Metodları				LLOQ (ng/ml)
	Soxhlet	Reflüx	Ultrasonik Banyo	Etüv	
DEHP	114,30 ng/g	113,62 ng/g	106,80 ng/g	90,23 ng/g	50
BHT	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Hostanox 03	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1010	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1330	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1076	144,57 ng/g	4,24 µg/g	183,50 ng/g	155,81 ng/g	50
Irgafos 168	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 3114	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 800	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 802	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Stearik asit	303,94 ng/g	416,34 ng/g	249,14 ng/g	373,09 ng/g	50
Oleamit	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	150
Erukamit	52,33 ng/g	66,65 ng/g	53,58 ng/g	59,57 ng/g	50
BTC	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
TEHM	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

Tablo 56. Bromobütil tıpayı uygulanan ekstraksiyon sonucu LC-MS/MS sisteminde elde edilen analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Ekstraksiyon Metodları				LLOQ (ng/ml)
	Soxhlet	Reflüx	Ultrasonik Banyo	Etüv	
DEHP	<LLOQ	115,10 ng/g	113,88 ng/g	<LLOQ	50
BHT	51,65 ng/g	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Hostanox 03	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1010	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1330	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1076	2,00 µg/g	4,35 µg/g	187,60 ng/g	67,74 ng/g	50
Irgafos 168	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 3114	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 800	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 802	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Stearik asit	329,30 ng/g	597,83 ng/g	337,27 ng/g	379,08 ng/g	50
Oleamit	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	150
Erukamit	<LLOQ	50,86 ng/g	61,58 ng/g	<LLOQ	50
BTC	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
TEHM	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

LC-MS/MS sisteminde gerçek numunelerde plastik katkı maddelerinin Leachables analiz sonuçları Tablo 57’de verildi.

Tablo 57. Gerçek numunelerde plastik katkı maddelerinin Leachables analiz sonuçları

Plastik Katkı Maddesi	Gerçek Numuneler				LLOQ (ng/ml)
	Novaqua	Dryex	Ronkotel	%0.9 İzotonik Sodyum Klorür	
DEHP	92,87 ng/g	<LLOQ	117,41 ng/g	81,23 ng/g	50
BHT	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Hostanox 03	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1010	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1330	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 1076	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irgafos 168	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox 3114	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 800	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Irganox PS 802	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
Stearik asit	2,02 µg/g	446,31 ng/g	793,67 ng/g	744,61 ng/g	50
Oleamit	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	150
Erukamit	321,77 ng/g	195,49 ng/g	357,69 ng/g	220,69 ng/g	50
BTC	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50
TEHM	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	50

*Novaqua %1,4+%0,6 Tek Dozluk Göz Damlası

*Dryex %0,15 Göz Damlası (LDPE Konteyner)

*Ronkotel 2.5mg/2.5ml Nebulizasyon için İnhalasyon Çözeltisi içeren tek dozluk flakon

*%0.9 İzotonik Sodyum Klorür I.V. İnfüzyon Çözeltisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

E&L analizleri dünyada ilk defa 20.yüzyılın sonlarından 21. yüzyılın başlarına doğru ortaya çıkmıştır. FDA, EMA ve ICH gibi düzenleyici otoriteler tarafından, E&L analizlerinin değerlendirilmesi konusunda çalışmalar yapılmıştır (Wakankar *et al.* 2010). Farmasötik bir ürün için ambalaj malzemesi ve üretim prosesinden geçebilecek olan plastik katkı maddelerinin analizi insan sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Yapılan literatür taramalarına göre üretim proseslerinden ve plastik ambalaj malzemesinden son ürüne geçebilecek olan plastik katkı maddeleri EP'ye göre tanımlanmıştır (EP 2019). Bu safsızlıkların kaynağı üretim prosesinde veya plastik ambalaj malzemelerinde kullanılan birçok plastik katkı maddesinden gelebilir. Kullanılan bu plastik katkı maddeleri aslında plastiği daha kullanışlı hale getirmek içindir. Fakat bu kimyasallar EP'de tanımlanan limitlerin üzerinde kullanıldıklarında insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedirler (EP 2019).

Bu doktora tezinin amacı; ilaç endüstrisinde bir ilacın üretim aşamasından başlayıp, raf ömrünün sonuna kadar izlenmesi gereken süreçte EP'de belirlenen ve ilaca kontamine olabilecek 15 adet plastik katkı maddesinin analizi için yeni bir LC-MS/MS yöntemini geliştirip, valide etmektir. Sonrasında valide edilmiş olan bu metot ile farmasötik preparatlarda plastik katkı maddelerinin E&L analizlerini yapmaktır.

Literatürde plastik katkı maddelerinin analizleri için birçok analitik metot kullanılmıştır. Uçucu veya yarı uçucu plastik katkı maddelerinin analizleri için GC-MS sistemleri kullanılırken (Singh *et al.* 2018; Jenke *et al.* 2017), uçucu olmayan plastik katkı maddelerinin analizleri için ise HPLC (Chang *et al.* 2013; Marcato *et al.* 2003; Petruševski *et al.* 2016; Legrand *et al.* 2018; Demertzis and Franz 1998; El Mansouri *et al.* 1998; Li *et al.* 2015; Gao *et al.* 2011; Simoneau *et al.* 2012; Nerin *et al.* 2003; Demertzis and Franz 1998), LC-MS/MS (Block *et al.* 2006; Vargo and Olson 1985; Ito *et al.* 2005; Jenke *et al.* 2017; Liu *et al.* 2023; Pouech *et al.* 2014) ve LC-QTOF/MS (Ballesteros-Gómez *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016; Reiter *et al.* 2011) sistemleri kullanılmıştır.

Bu tez çalışmalarında LC-MS/MS yöntemi, kompleks matrikslerde düşük dedeksiyon değerlerine ulaşmasından ve sonuçların daha güvenilir olmasından dolayı tercih edildi. Ayrıca çalışılan plastik katkı maddelerinin de LC-MS/MS yöntemi için uygun olduğu belirlendi.

LC-MS/MS ile yapılan çalışmalarda genellikle APCI iyonlaştırma kaynağı kullanılmıştır (Lee and Gioia 2008; Block *et al.* 2006; Buchalla and Begley 2006). Metod geliştirirken APCI iyonlaştırma başlığıyla yapılan denemelerde yeterli kantitatif hassasiyete

ulaşılamadı. Sonrasında ESI iyonlaştırma kaynağı kullanıldı. APCI iyonlaştırma kaynağına göre ESI iyonlaştırma kaynağı kıyaslandığında plastik katkı maddelerinin ve IS'ın daha iyi iyonlaştığını, bunun sonucunda daha yüksek hassasiyetin elde edildiği görüldü.

Yapılan çalışmalarda plastik katkı maddelerinin HPLC, LC-MS, LC-MS/MS ve LC-QTOF/MS ile yapılan kromatografik ayırımları için sabit faz olarak ters faz C₁₈ kolon ve ters faz C₈ kolon kullanıldığı görüldü (Block *et al.* 2006; Marcato *et al.* 2003; Petruševski *et al.* 2016; Demertzis and Franz 1998; Gao *et al.* 2011; Simoneau *et al.* 2012; Nerin *et al.* 2003; Demertzis and Franz 1998). Metot geliştirirken sabit faz olarak ters faz SB C₁₈ kolon (3.0 x 100mm, 2.7 µm), XDB C₁₈ kolon (4.6 x 150 mm, 5 µm), XDB C₈ kolon (4.6 x 150mm, 5 µm) ve C₁₈ kolon (Inert Sustain Phenyl (3.9 x 150mm, 4µm) kullanılarak en iyi ayırım hedeflenmiştir. Burada çalışmış olduğumuz 15 adet plastik katkı maddesi ve IS için pik keskinliği ve rezölüsyon değerlerine bakılarak en iyi ayırımın C₁₈ kolon (Inert Sustain Phenyl (3.9 x 150mm, 4µm) ile yapıldığı belirlendi. Hareketli faz olarak farklı organik çözücüler farklı oranlarda denendi. Bu denemelerin sonuçlarına göre; hareketli faz olarak %0.1 formik asit içeren ACN ve su (gradient olarak) ile çalışıldığında özellikle negatif iyonlaşan plastik katkı maddelerinde kuyruklanmalar ve simetrik olmayan pikler gözlemlendi. Kuyruklanmaları ve simetrik olmayan pikleri düzeltmek için akış hızında ve formik asit oranında belirli değişiklikler yapıldı. Fakat kromatografik olarak istenilen sonuçlar alınamadı. Daha sonra organik çözücü olarak ACN yerine MeOH kullanıldı. Negatif modda iyonlaşan plastik katkı maddelerinde kuyruklanmalar gözlemlendi. Bu kuyruklanmaları gidermek için formik asit yerine 5 mmol Amonyum asetat içeren metanol ve su karışımı kullanıldı (gradient olarak). Yapılan denemelerden sonra en iyi kromatografik ayırımın belirtilen mobil faz sistemi ile olduğu görüldü. Bu metotta 0.7 ml/dk. akış hızı, 5 µl enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı 35°C olarak belirlendi. Her bir enjeksiyon için toplam analiz süresi 15 dk.'dır. İlaç analizlerinde kısa analiz süresi hem çözücü maliyeti hem de analizin zaman tasarrufu açısından oldukça önemlidir. Diğer metotlar ile kıyaslandığında analiz süresinin kısa olması metodun avantajıdır (Pouech *et al.* 2014; Nerin *et al.* 2003; Li *et al.* 2015; Marcato *et al.* 2003; Petruševski *et al.* 2016; Legrand *et al.* 2018; El Mansouri *et al.* 1998; Block *et al.* 2006; Buchalla and Begley 2006; Vargo and Olson 1985; Ballesteros-Gómez *et al.* 2016)

Bu çalışmada IS olarak DFF seçildi. Kimyasal yapısının ftalat türevi olması sebebiyle plastik katkı maddelerinin analizi için geliştirilen kütle ve kromatografi şartlarına uyumlu bir moleküldür. Ayrıca EP'de tanımlanan plastik katkı maddelerinden olmadığı için ilaçlarda aranan plastik katkı maddeleri ile girişim yapma ihtimali bulunmamaktadır. DFF'ın alıkonma

zamanının plastik katkı maddelerinin alıkonma zamanlarından sonra olmaması analiz süresini uzatmaması açısından tercih sebebi olmuştur.

E&L çalışmalarında en kritik parametrelerden birisi yöntemin hassasiyetidir. LC-MS/MS sistemleri kantitatif analizlerde bilinen en hassas yöntemlerdendir. Her ne kadar HPLC sistemlerine göre maliyetli ve yetişmiş insan gücüne ihtiyaç duyulsa da özellikle hassasiyet açısından ilaç analizlerinin altın standartıdır. Yapılan diğer plastik katkı maddeleri ile ilgili çalışmalarla mukayese edildiğinde çalıştığımız plastik katkı maddeleri için en düşük tayin alt limiti (LLOQ) 50 ng/ml olarak belirlenirken sadece PA 20 için 150 ng/ml olarak belirlendi. Literatürde var olan diğer metotlar ile mukayese edildiğinde (Petruševski *et al.* 2016; Legrand *et al.* 2018; El Mansouri *et al.* 1998; Li *et al.* 2015; Nerin *et al.* 2003; Moreta and Tena 2015; Vargo and Olson 1985) metodun daha hassas olduğu görüldü.

14 adet plastik katkı maddesinin pik alanlarının IS'ın (100 ng/ml) pik alanına oranlanmasıyla kalibrasyon eğrileri kuadratik olarak elde edildi. Sadece PA 20'nin pik alanının IS'ın (100 ng/ml) pik alanına oranlanmasıyla kalibrasyon eğrisi lineer olarak elde edildi. Literatürden daha iyi bir doğrusalılık elde edildi (Her bir plastik katkı maddesi için $r^2 > 0,9997$)

Yapılan çalışmada bütün plastik katkı maddeleri için kesinlik değeri %6,91'den küçük olarak bulundu. Doğruluk değeri bütün plastik katkı maddeleri için %9,89'dan küçük olarak bulundu.

Yapılan literatür taramalarına göre, bu tez kapsamında çalışılan 15 adet plastik katkı maddesinin +20, +4, -20 °C'de ve farklı zaman aralıklarında (1 s-3 h) stabilitelerine yönelik herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için elde edilen veriler referans olarak kullanılabilir.

Metot farmasötik preparatlarda Ekstractables çalışmalarına başarılı bir şekilde uygulandı. Farklı türdeki ambalaj malzemeleri (Polipropilen torba, tek kullanımlık göz damlası, LDPE konteyner ve Bromobütil tıpa) ekstractables çalışmaları için seçildi. Her bir ambalaj malzemesi için yukarıda (Extractables Çalışmalarının Hazırlanması) ayrıntılı olarak anlatılan soxhlet metodu, reflüx metodu, etüv metodu ve ultrasonik banyo metodu kullanıldı. Çözücü olarak her bir metot için %50:50 İPA:USS kullanılarak çalışılan plastik ambalaj malzemelerinin plastik katkı maddeleri belirlendi. Plastik katkı maddeleri için hazırlanan her ekstractables örneği LC-MS/MS sistemine enjekte edilerek analizi yapıldı. Tespit edilen plastik katkı maddelerinin ICH M7 (R2) tarafından belirlenen limitlerin altında olduğu belirlendi. Leachables çalışmalarında ise gerçek numunelerden 0.9 ml filtrelenerek alındı ve üzerine 0.1 ml IS eklendi. LC-MS/MS'de yapılan analiz sonuçlarına göre Leachables numunelerinde de

tespit edilen plastik katkı maddelerinin ICH M7 (R2) tarafından belirlenen limitlerin altında olduğu görüldü.

Plastik ambalaj malzemesinden farmasötik preparata geçebilecek olan 15 adet plastik katkı maddesini belirlemek için hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve güvenilir olan yeni bir LC-MS/MS metodu geliştirildi. Geliştirilen metod ICH (Validation of Analytical Procedures: Q2(R1))'e göre valide edildi. Metot plastik ambalaj malzemelerine ve son ürüne başarılı bir şekilde uygulandı. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için referans olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Anonim, 2023a. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Plastik> (25.11.2023).
- Anonim, 2023b. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Polietilen> (25.11.2023).
- Anonim, 2023c. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Polipropilen> (25.11.2023).
- Anonim, 2023d. https://tr.wikipedia.org/wiki/Polietilen_tereftalat (25.11.2023).
- Anonim, 2023e. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Poliamid> (25.11.2023).
- Anonim, 2023f. https://tr.wikipedia.org/wiki/Polivinil_klorür (25.11.2023).
- Anonim, 2023g. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Polikarbonat> (25.11.2023).
- Anonim, 2023h. <https://www.winally.com/ilac-uretiminde-extractables-ve-leachables> (15.11.2023).
- Anonymous, 2023a. <https://www.bsef.com/the-unique-physical-and-chemical-properties-of-bromobutyl-rubber> (15.11.2023).
- Ball, D., Blanchard, J., Jacobson-Kram, D., McClellan, R. O., McGovern, T., Norwood, D. L., Nagao, L. (2007). Development of safety qualification thresholds and their use in orally inhaled and nasal drug product evaluation. *Toxicological sciences*, 97(2), 226-236.
- Ballesteros-Gómez, A., Jonkers, T., Covaci, A., de Boer, J. (2016). Screening of additives in plastics with high resolution time-of-flight mass spectrometry and different ionization sources: direct probe injection (DIP)-APCI, LC-APCI, and LC-ion booster ESI. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 2945-2953.
- Block, C., Wynants, L., Kelchtermans, M., De Boer, R., Compernelle, F. (2006). Identification of polymer additives by liquid chromatography–mass spectrometry. *Polymer degradation and stability*, 91(12), 3163-3173.
- Bolívar-Subirats, G., Cortina-Puig, M., Lacorte, S. (2020). Multiresidue method for the determination of high production volume plastic additives in river waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 41314-41325.
- Buchalla, R., Begley, T. H. (2006). Characterization of gamma-irradiated polyethylene terephthalate by liquid-chromatography–mass-spectrometry (LC–MS) with atmospheric-pressure chemical ionization (APCI). *Radiation Physics and Chemistry*, 75(1), 129-137.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 209-242.
- Chang, L. C., Kang, J. J., Gau, C. S. (2016). Development of the risk-based, phased-in approach for the international harmonization of the regulation of container closure systems for drugs in Taiwan. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 77, 252-256.
- Chang, L., Bi, P., Liu, Y., Mu, Y., Nie, F., Luo, S., & Wei, Y. (2013). Simultaneous analysis of trace polymer additives in plastic beverage packaging by solvent sublation followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(29), 7165-7171.
- Commision of the European Communities, Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures, 1995.

- Çığman FB. Kan ve idrar örneklerinde LC/MS/MS ile AB-CHMINACA ve metabolitlerinin tayini. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, 2019.
- Demertzis, P. G., & Franz, R. (1998). A systematic study on the stability of selected polymer antioxidants in EU official aqueous and alternative food simulants using HPLC. *Food Additives & Contaminants*, 15(1), 93-99.
- Demertzis, P. G., & Franz, R. (1998). Development of an HPLC method for measurements of the stability of Irganox-type polymer antioxidants in fatty food simulants. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 206, 193-198.
- E. Verette, in *Encyclopedia of Separation Science*, 2000.
- El Mansouri, H., Yagoubi, N., & Ferrier, D. (1998). Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. *Chromatographia*, 48, 491-496.
- European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011.
- European Medicines Agency (EMA). Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials. 2005.
- European pharmacopoeia. (2019). *Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare* (pp. 441–445).
- Feilden, A. (2011). *Update on undertaking extractable and leachable testing*. Smithers Rapra.
- Gao, Y., Gu, Y., & Wei, Y. (2011). Determination of polymer additives–antioxidants and ultraviolet (UV) absorbers by high-performance liquid chromatography coupled with UV photodiode array detection in food simulants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 12982-12989.
- Guideline, I. H. (2014, June). Assessment and control of dna reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7. In *International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH): Geneva*.
- Gündüz T. *İnstrümental Analiz, Altıncı Baskı*. Ankara: Gazi Kitapevi, 2002.
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis*. Macmillan.
- Ito, R., Seshimo, F., Miura, N., Kawaguchi, M., Saito, K., Nakazawa, H. (2005). High-throughput determination of mono-and di (2-ethylhexyl) phthalate migration from PVC tubing to drugs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 39(5), 1036-1041.
- Jenke, D. (2007). Evaluation of the chemical compatibility of plastic contact materials and pharmaceutical products; safety considerations related to extractables and leachables. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(10), 2566-2581.
- Jenke, D. (2018). Identification, analysis and safety assessment of leachables and extractables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 101, 56-65.
- Jenke, D. R. (2014). Extractables and leachables considerations for prefilled syringes. *Expert opinion on drug delivery*, 11(10), 1591-1600.
- Jenke, D., Egert, T., Hendricker, A., Castner, J., Feinberg, T., Houston, C., Markovic, I. (2017). Simulated leaching (migration) study for a model container-closure system applicable to parenteral and ophthalmic drug products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 71(2), 68-87.

- Leachables, P.Q.R.I. (2006). Safety thresholds and best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products. Submitted to the PQRI Drug Product Technical Committee, PQRI Steering Committee, and US Food and Drug Administration.
- Lee, P.J. and Gioia, A.J. Di (2008) Rapid Analysis Of 25 Common Polymer Additives. Available at: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002488en.pdf> (Accessed: 9 September 2023).
- Legrand, P., Desdion, A., Boccadifuoco, G., Wojcicki, A. D., Worsley, A., Boudy, V., & Dufay, S. G. (2018). Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 298-305.
- Li, B., Wang, Z. W., Lin, Q. B., Hu, C. Y., Su, Q. Z., & Wu, Y. M. (2015). Determination of polymer additives-antioxidants, ultraviolet stabilizers, plasticizers and photoinitiators in plastic food package by accelerated solvent extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 53(6), 1026-1035.
- Liu, Z., Yu, H., Lu, L., Lv, X., Ju, G., Zhao, J., ... & Yu, W. (2023). Simultaneous Determination and Exposure Assessment of Antioxidants in Food Contact Plastic Materials by HPLC-MS/MS. *Journal of Food Protection*, 100121.
- Marcato, B., Guerra, S., Vianello, M., & Scalia, S. (2003). Migration of antioxidant additives from various polyolefinic plastics into oleaginous vehicles. *International journal of pharmaceutics*, 257(1-2), 217-225.
- Marturano, V., Cerruti, P., & Ambroggi, V. (2017). Polymer additives. *Physical Sciences Reviews*, 2(6), 20160130.
- Moreta, C., & Tena, M. T. (2015). Determination of plastic additives in packaging by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1414, 77-87.
- National Measurement RSC Analytical Methods Committee (AMC). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. 2013.
- Nerín, C., Fernández, C., Domeño, C., & Salafranca, J. (2003). Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(19), 5647-5653.
- Niessen, W. M. (2006). *Liquid chromatography-mass spectrometry*. CRC press.
- Norwood, D. L., Jenke, D., Manolescu, C., Pennino, S., Grinberg, N. (2009). HPLC and LC/MS analysis of pharmaceutical container closure system leachables and extractables. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®*, 32(11-12), 1768-1827.
- Paskiet, D., Jenke, D., Ball, D., Houston, C., Norwood, D. L., Markovic, I. (2013). The Product Quality Research Institute (PQRI) leachables and extractables working group initiatives for parenteral and ophthalmic drug product (PODP). *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 67(5), 430-447.
- Petruševski, V., Jolevska, S. T., Ribarska, J. T., Chachorovska, M., Petkovska, A., & Ugarković, S. (2016). Development of complementary HPLC-DAD/APCI MS methods for chemical characterization of pharmaceutical packaging materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 124, 228-235.

- Pouech, C., Lafay, F., Wiest, L., Baudot, R., Léonard, D., & Cren-Olivé, C. (2014). Monitoring the extraction of additives and additive degradation products from polymer packaging into solutions by multi-residue method including solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 1493-1507.
- Reiter, S. M., Buchberger, W., & Klampfl, C. W. (2011). Rapid identification and semi-quantitative determination of polymer additives by desorption electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400, 2317-2322.
- Roškar, R., Lušin, T. T. (2012). Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples. *Chromatography–The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, 79-126.
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452-474.
- Simal-Gándara, J., Damant, A. P., Castle, L. (2002). The use of LC-MS in studies of migration from food contact materials: a review of present applications and future possibilities. *Critical reviews in analytical chemistry*, 32(1), 47-78.
- Simoneau, C., Van den Eede, L., & Valzacchi, S. (2012). Identification and quantification of the migration of chemicals from plastic baby bottles used as substitutes for polycarbonate. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(3), 469-480.
- Singh, G., Gollapalli, R., Blinder, A., Patel, M. (2018). Identification of leachable impurities in an ophthalmic drug product originating from a polymer additive Irganox 1010 using mass spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 197-203.
- Skoog D.A., Holler FJ, Timothy A.N. Principles of Instrumental Analysis. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F., Yılmaz H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998.
- Spector, P. E., Fox, S., Penney, L. M., Bruursema, K., Goh, A., Kessler, S. (2006). The dimensionality of counterproductivity: Are all counterproductive behaviors created equal. *Journal of vocational behavior*, 68(3), 446-460.
- Subramanian, M. N. (2013). *Plastics additives and testing*. John Wiley & Sons.
- Sweetman, L. (2001). Newborn screening by tandem mass spectrometry: gaining experience. *Clinical chemistry*, 47(11), 1937-1938.
- Şengül, M., Topdaş, E. F. (2019). Katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan modern teknikler ve bu teknikler arasında ultrason yardımlı ekstraksiyonun yeri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(2), 201-216.
- Trimpin, S., Wijerathne, K., McEwen, C. N. (2009). Rapid methods of polymer and polymer additives identification: multi-sample solvent-free MALDI, pyrolysis at atmospheric pressure, and atmospheric solids analysis probe mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 654(1), 20-25.
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Bioanalytical Method Validation*. 2013.
- U.S. Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Code of Federal Regulations 21CFR211.94*.
- U.S. Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Current FDA Perspective on Leachable Impurities in Parenteral and Ophthalmic Drug products*, 2011

- US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (US FDA). Guidance for Industry: Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics-chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. 1999.
- Vandenburg, H., Clifford, A., Bartle, K., Garden, L., Dean, J., Costley, C. (1997). Critical review: analytical extraction of additives from polymers. *Analyst*, 122(9), 101R-116R.
- Vargo, J. D., & Olson, K. L. (1985). Identification of antioxidant and ultraviolet light stabilizing additives in plastics by liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 57(3), 672-675.
- Wakankar, A. A., Wang, Y. J., Canova-Davis, E., Ma, S., Schmalzing, D., Grieco, J., Martin-Moe, S. (2010). On developing a process for conducting extractable-leachable assessment of components used for storage of biopharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(5), 2209-2218.
- Wiberg K., Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, 2004
- Yavuz, O., Aksoy, A. (2006). Örnek Hazırlamada Kati Faz Ekstraksiyonu Metodu. *FÜ Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 1-26.
- Zhang, Y., Sun, S., Xing, X., Du, Z., Guo, Q., & Yu, W. (2016). Detection and identification of leachables in vaccine from plastic packaging materials using UPLC-QTOF MS with self-built polymer additives library. *Analytical chemistry*, 88(13), 6749-6757.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: İbrahim Hakkı DEMİRCİOĞLU
Doğum tarihi	
Doğum Yeri	
Uyruğu	
Adres	
E-mail	
Eğitim	
Lise	: İzzet Ünver Lisesi
Lisans	: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek lisans	: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Bilim Dalı (2015-2019)
Doktora	: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens. Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Bilim Dalı (2019-2023)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
SCI Kapsamındaki Yayınlar	
Tokalı, F. S., Demir, Y., Demircioğlu, İ. H., Türkeş, C., Kalay, E., Şendil, K., & Beydemir, Ş. (2022). Synthesis, biological evaluation, and in silico study of novel library sulfonates containing quinazolin-4 (3 H)-one derivatives as potential aldose reductase inhibitors. <i>Drug Development Research</i> , 83(3), 586-604.	
Tokalı, F. S., Taslimi, P., Demircioğlu, İ. H., Karaman, M., Gültekin, M. S., Şendil, K., & Gülçin, İ. (2021). Design, synthesis, molecular docking, and some metabolic enzyme inhibition properties of novel quinazolinone derivatives. <i>Archiv der Pharmazie</i> , 354(5), 2000455.	
Tokalı, F. S., Taslimi, P., Demircioğlu, İ. H., Şendil, K., Tuzun, B., & Gülçin, İ. (2022). Novel phenolic Mannich base derivatives: synthesis, bioactivity, molecular docking, and ADME-Tox Studies. <i>Journal of the Iranian Chemical Society</i> , 19(2), 563-577.	