



**LUMATEPERONUN PLAZMADAN VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN UPLC-MS/MS YÖNTEMİ İLE
TAYİNİ**

Mehmet Cem KUŞOĞLU
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK

Yüksek Lisans Tezi-2024



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**LUMATEPERONUN PLAZMADAN VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN UPLC-MS/MS YÖNTEMİ İLE
TAYİNİ**

Mehmet Cem KUŞOĞLU

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK**

**ERZURUM
2024**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Şizofreni.....	4
2.1.1. DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) Kriterleri.....	5
2.1.2. ICD-11 Kriterleri (International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics).....	6
2.1.3. Şizofrenide Tedavi Yöntemleri.....	7
2.1.4. Antipsikotik İlaçlar (Farmakolojik Yaklaşım).....	8
2.2. Lumateperon.....	14
2.2.1. Lumateperon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	15
2.2.2. Farmakokinetik Özellikler.....	16
2.2.3. Farmakodinamik Özellikler.....	18
2.2.4. Klinik Çalışmalar.....	20
2.2.5. Endikasyonlar ve Kontrendikasyonlar, Yan Etkiler.....	23
2.3. Kromatografi.....	25
2.3.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	27
2.3.2. Pratik Temellere Dayalı Sınıflandırma.....	27

2.3.3. Teorik Temellere Dayalı Sınıflandırma.....	28
2.3.4. Hareketli ve Sabit Faz Türlerine Dayalı Sınıflandırma.....	37
2.3.5. Sıvı Kromatografisi.....	37
2.3.6. Hareketli Faz.....	38
2.3.7. Sabit Faz.....	38
2.3.8. Sıvı Kromatografisi Türleri.....	39
2.3.9. Sıvı Kromatografi Sistemlerinin Başarısını Ortaya Koyan Temel Parametreler..	50
2.3.9.1. Alıkonma Zamanı	50
2.3.9.2. Alıkonma/Kapasite Faktörü	51
2.3.9.3. Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı.....	51
2.3.9.4. Seçicilik/Ayrım Faktörü.....	52
2.3.9.5. Rezolüsyon/Çözünürlük	52
2.3.9.6. Basınç.....	54
2.3.9.7. Van Deemter Eğrileri.....	54
2.3.9.8. Plaka Yüksekliği (HETP).....	55
2.3.9.9. Gradient Denklemi.....	55
2.3.9.10. Mobil Faz Akış Hızı.....	55
2.3.9.11. Sıcaklık.....	56
2.3.9.12. Pik Asimetri Faktörü.....	56
2.4. Kütle Spektrometrisi	58
2.4.1. İyonizasyon Teknikleri.....	61
2.4.1.1. Elektron Darbesi İyonizasyonu	61
2.4.1.2. Kimyasal İyonizasyon	61
2.4.1.3. Desorpsiyon Teknikleri.....	62
2.4.1.4. Alan İyonizasyonu.....	62

2.4.1.5. Atmosfer Basıncı Kimyasal İyonizasyonu.....	63
2.4.1.6. İndüktif Olarak Bağlı Plazma (ICP) İyonizasyonu.....	63
2.4.1.7. Elektrospray İyonizasyonu	63
2.5. Kütle Spektrometrisi Sistem Parçaları.....	63
2.5.1. Kütle Analizörleri.....	64
2.5.2. Dedektörler.....	66
2.6. Analitik Yöntem Validasyonu.....	67
2.6.1. Tipik Validasyon Parametreleri.....	68
2.6.1.1. Doğruluk.....	68
2.6.1.2. Kesinlik.....	69
2.6.1.3. Seçicilik.....	69
2.6.1.4. Teşhis Sınırı/Tespit Limiti	70
2.6.1.5. Tayin Alt Sınırı/Kantitatif Tespit Limiti	71
2.6.1.6. Doğrusallık.....	71
2.6.1.7. Duyarlılık.....	73
2.6.1.8. Sağlamlık.....	74
2.6.1.9. Stabilité.....	75
3. MATERYAL VE METOT.....	76
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler.....	76
3.2. Cihazlar.....	76
3.3. Yöntemler	77
3.3.1. UPLC-MS/MS Yöntem Şartları.....	77
3.4. Lumateperonun Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi.....	77
3.5. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması.....	78
3.6. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	78

4. BULGULAR.....	80
4.1. UPLC-MS/MS Farmasötik Preparat Çalışması.....	80
4.1.1. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	81
4.1.2. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	85
4.1.3. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon).....	86
4.1.4. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması.....	91
5. TARTIŞMA.....	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR.....	104
EKLER.....	118
Ek-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu.....	118
Ek-2. Etik Kurul Onay Formu.....	119

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında kıymetli bilgi ve görüşlerini, sonsuz yardımlarını, tüm ihtiyaç duyduğum anlarda vaktini esirgemeyen, bana akademik bilgisi ve görgüsüyle ilham veren ve akademik çalışmanın ne olduğunu öğreten kıymetli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK’a, TYL- 2022-9927 numaralı proje ile verdikleri desteklerden dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, akademik yardımlarından dolayı Serkan Tanas ve Karsten Werner’e, özellikle tüm varlığım, biricik oğluma en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

Mehmet Cem KUŞOĞLU

ÖZET

Lumateperonun Plazmadan ve Farmasötik Preparatlardan UPLC-MS/MS

Yöntemi ile Tayini

Amaç: Farmasötik preparatlarda ve plazmada, anti-psikotik bir ilaç olan lumateperonun, miktar tayini için hassas, hızlı ve basit bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilerek, geçerlilik testlerinin yapılması ve insan plazmalarında uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır

Materyal ve Metot: UPLC-MS/MS yöntemi, Agilent 1200 cihazı ve Agilent 6460 Triple Quadrupole kütle spektrometresinden oluşmaktadır. Yöntem, 40 °C' de, ters faz kolonda (InertSustain Phenyl, 3.9×150 mm, 4 μ m), 5 mM amonyum asetat içeren su (A) ve %1 formik asit içeren metanol (B) ile oluşturulmuş mobil fazda gradient elüsyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Akış hızı 0.5 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 5 μ L olarak ayarlandı. Pozitif elektrospray iyonizasyon ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak lumateperone için kütle/yük (m/z) geçişleri 394.1→122.9, internal standart (IS) olarak kullanılan haloperidol için 376→164.9 olarak belirlendi

Bulgular: Lumateperonun alıkonma zamanı 7.80 dakika, haloperidolün ise 6.35 dakika olarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisinin, plazma çalışmasında 0.5 ile 150 ng/mL, standart çözeltiler çalışmasında ise 0.25-200 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu görüldü. Korelasyon katsayıları sırasıyla 0.99918 ve 0.9997 olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri, standart çözeltilerle yapılan çalışmada 0.20 ve 0.25 ng/mL; plazma çalışmasında 0.25 ve 0.5 olarak ve geri kazanım oranları %100.55 ve 96.12 olarak hesaplanmıştır

Sonuç: Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan UPLC-MS/MS yönteminin hassas, doğru, basit ve kesin bir yöntem olduğu görülmüştür. Yöntemin, gerçek numunelere başarılı bir şekilde uygulanması, kalite kontrol ve klinik çalışmalarda da kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, UPLC-MS/MS yöntemi ile insan plazmasında ve farmasötik preparatlarda lumateperonun miktar analizi için geliştirilmiş ve valide edilmiş ilk ve tek yöntemdir

Anahtar Kelimeler: Analitik yöntem validasyonu, farmasötik preparat, ICH Q2 (R1) yönergesi, insan plazması, lumateperon, UPLC-MS/MS

ABSTRACT

Detection of Lumateperone in Plasma and Pharmaceutical Formulations by

UPLC-MS/MS Method

Aim: The aim of this study is to develop a precise, rapid, straightforward UPLC-MS/MS method for the quantification of lumateperone, an antipsychotic drug, in pharmaceutical formulations and plasma, to conduct validation tests, and to demonstrate its applicability in human plasma samples.

Materials and Methods: The UPLC-MS/MS method utilized an Agilent 1200 system coupled with an Agilent 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer. The method was performed using a gradient elution technique in a mobile phase composed of water containing 5 mM ammonium acetate (A) and methanol acidified with 1% formic acid (B), at a temperature of 40 °C on a reverse-phase column (InertSustain Phenyl, 3.9 × 150 mm, 4 µm). The flow rate was set to 0.5 mL/min, and the injection volume was 5 µL. Positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode were employed, with mass-to-charge (m/z) transitions of 394.1 → 122.9 for lumateperone and 376 → 164.9 for the internal standard (IS), haloperidol.

Results: The retention times were determined to be 7.80 minutes for lumateperone, 6.35 minutes for haloperidol. The calibration curve exhibited linearity in the concentration range of 0.5 to 150 ng/mL for plasma samples and 0.25 to 200 ng/mL for standard solutions. The correlation coefficients were established as 0.99918 and 0.9997, respectively. LOD and LOQ values were calculated as 0.20 and 0.25 ng/mL for standard solutions and 0.25 and 0.5 ng/mL for plasma samples, with recovery rates of 100.55% and 96.12%, respectively

Conclusion: The developed UPLC-MS/MS method, which underwent thorough validation testing, has proven to be a precise, accurate, simple, and robust technique. The successful application of the method to real samples indicates its potential utility in quality control and clinical studies. This study represents the first and only validated method for the quantification of lumateperone in human plasma and pharmaceutical formulations using UPLC-MS/MS

Keywords: Analytical method validation, human plasma, ICH Q2 (R1) guideline, lumateperone, pharmaceutical formulations, UPLC-MS/MS

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
5HT _{2A}	: Seratonin reseptör alt türü
Å	: Angstrom
ADME	: Absorpsiyon, dağılım, metabolizasyon, eliminasyon
AKT	: Aldo-keto redüktaz enzimi
AMU	: Atomik kütle birimi
APA	: Amerikan psikiyatri derneği
APCI	: Atmosferik basınçla iyonizasyon
AUC	: Eğri altında kalan alan
BH	: bağıl hata
BSS	: Bağıl standart sapma
CDSS	: Calgary depresyon ölçeği
CGI	: Klinik genel izlenim ölçeği
CI	: Kimyasal iyonizasyon
Cm	: Santimetre
C _{max}	: Maksimum plazma derişimi
CYP	: Sitokrom P450 enzimi
ÇA	: Çalışma aralığı
D ₁	: Dopamin reseptörü tip 1
D ₂	: Dopamin Reseptörü Tip 2
D _{2Ri}	: D ₂ reseptör işgali
D ₄	: Dopamim reseptörü tip 4

DAD	: Diyod array dedektör
Dk	: Dakika
DSM	: Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı
ED	: Elektrokimyasal dedektör
EI	: Elektron darbesi iyonizasyonu
ESI	: Elektro spre y iyonizasyon
eV	: Elektro volt
FAB	: Hızlı atom bombardımanı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FPP	: Tamamen gözenekli partikül
G	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GFC	: Jel filtrasyon kromatografisi
GK	: Geri kazanım
Glu-N2B	: Glutamat reseptörü alt birimi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
GSK3	: Glikojen sentaz kinaz 3 enzimi
h/h	: Hacim/hacim
HETP	: Teorik plaka yüksekliği
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
ICD	: Uluslararası hastalık sınıflandırılması
ICH	: Uluslararası harmonizasyon konferansı
ICP	: İndüktif olarak bağlı plazma iyonizasyonu

IS	: İnternal (İç) standart
ITI-007	: Lumateperon
ITI-722	: Lumateperon
k'	: Kapasite katsayısı
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
LC	: Sıvı kromatografisi
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LIT	: Doğrusal iyon tuzağı
LOD	:Teşhis sınırı
LOQ	:Tayin alt sınırı
m/z	: Kütle/yük
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MS	: Kütle spektrometrisi
N	: Teorik plaka sayısı
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NMDA	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NP-LC	: Normal faz partisyon kromatografisi

PANSS	: Pozitif ve negatif sendrom ölçeği
QC	: Kalite kontrol çözeltileri
R	: Korelasyon katsayısı
RP-LC	: Ters faz partisyon kromatografisi
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S/G	: Sinyal/Gürültü Oranı
SAE	: Ciddi advers etki
SANS	: Negatif belirtileri değerlendirme ölçeği
SCP	: Katı çekirdek partikülü
SEC	: Boyut ayırım/eleme kromatografisi
SERT	: Seratonin taşıyıcı proteini
SS	: Standart sapma
Ssa	: Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
Ssb	: Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması
T	: Geçirgenlik
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
UDP	: Uridindifosfat enzimi
UGT	: Glukuronil transferaz enzimi
UPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UPLC-MS/MS	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
Vd	: Dağılım hacmi
WHO	: Dünya sağlık örgüt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Lumateperonun kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.2. k' faktörü hesaplamasında kullanılan kavramlar.....	51
Şekil 2.3. Çözünürlük/Rezolüsyon grafiği.....	53
Şekil 2.4. Rs değerlerine göre piklerin ayrılması.....	53
Şekil 2.5. Van deemter eğrileri.....	54
Şekil 2.6. Pik asimetri (As) faktörü.....	57
Şekil 2.7. Piklerde kuyruklanma faktörü.....	58
Şekil 2.8. Çeşitli kuyruklanma faktörü değerlerine göre piklerin değişimi.....	58
Şekil 4.1. Hazırlanan tüm lumateperon standart çözeltilerine ait kromatogram	80
Şekil 4.2. Lumateperonun kütle spektrumu	80
Şekil 4.3. Haloperidolun kütle spektrumu	81
Şekil 4.4. Lumateperon standart çözeltilerinin UPLC-MS sistemine uygulanması ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	81
Şekil 4.5. 6 ng/mL ilaç çözeltisi ile LQC kromatogramı.....	84
Şekil 4.6. 6 ng/mL ilaç çözeltisi ile MQC kromatogramı.....	84
Şekil 4.7. 6 ng/mL ilaç çözeltisi ile HQC kromatogramı.....	84
Şekil 4.8. 25 ng/ mL haloperidol (IS) ihtiva eden lumateperonun plazmadaki tüm çözeltilerinin UPLC-MS / MS kromatogramı	85
Şekil 4.9. İlaç içermeyen plazmaya ait UPLC-MS/MS kromatogramı.....	86
Şekil 4.10. UPLC-MS/MS yönteminin lumateperonun plazma çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	87
Şekil 4.11. 2 numaralı gönüllüye ait boş plazma + IS kromatogramı.....	92

Şekil 4.12. 3 numaralı gönüllüye ait boş plazma+IS kromatogramı.....	93
Şekil 4.13. Gönüllü plazmalarındaki lumateperon derişimleri grafiğı.....	93



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Plazma analizleri için lumateperon stok çözeltileri ile hazırlanan standartlar ve QC çözeltileri.....	78
Tablo 3.2. Farmasötik preparat analizleri için lumateperon stok çözeltisinden elde edilen standart ve QC çözeltileri	79
Tablo 4.1. Yönteme ait kesinlik ve doğruluk değerleri	82
Tablo 4.2. Yöntemin analitik geri kazanım ölçümleri (Farmasötik preparatlarda).....	83
Tablo 4.3. Lumateperonun plazmadan UPLC-MS/MS yöntemi ile analizinde kesinlik ve doğruluk değerleri.....	88
Tablo 4.4. Plazma testlerinde tespit edilen analitik geri kazanım değerleri.....	89
Tablo 4.5. Lumateperonun plazmadan analizinde stabilite	90
Tablo 4.6. Tespit edilen matriks etkisi.....	91
Tablo 4.7. Sağlıklı gönüllülere ait kan örneklerindeki lumateperon derişimleri.....	92

1. GİRİŞ

Analitik yöntemler, kimyasal ve biyolojik bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kritik roller oynarlar. Bu yöntemler, özellikle farmasötik ve biyomedikal alanlarda, ilaçların kalitesini, saflığını ve etkinliğini belirlemek için kullanılırlar. Bu bağlamda, analitik yöntemlerin validasyonu, yöntemlerin belirli performans kriterlerini karşılayıp karşılamadığını sistematik olarak değerlendirmek amacıyla yapılan süreçlerdir denebilir (International Conference on Harmonization, 2005). Validasyon süreci, bir analitik yöntemin doğruluğunu, hassasiyetini ve güvenilirliğini sağlamak ve kanıtlamak için gereklidir ve bu süreç, uluslararası standartlar ve kılavuzlar doğrultusunda yürütülmelidir (U.S. Food and Drug Administration, 2018).

Farmasötik ürünlerin kalite kontrolü, sağlık alanında kritik bir öneme sahiptir. İlaçların etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için kullanılan analitik yöntemler, doğru sonuçlar vermeli ve testlerde yüksek performans göstermelidirler. İşte validasyon süreci, bu yöntemlerin güvenilirliğini ve geçerliliğini sağlamak yahut kanıtlamak için yapılan bir dizi testtir. Bu testler doğruluk, hassasiyet, seçicilik, duyarlılık ve stabilite v.b birçok parametreyi kapsamaktadır (European Medicines Agency, 2011). Bu kriterlerin her biri, yöntemin başarısını değerlendirmede ve güvenilir sonuçlar elde etmede önemli birer rol oynar.

Lumateperone (ITI-007), antipsikotik ilaçlar arasında yenilikçi ve önemli avantajlar barındıran bir seçenek olarak öne çıkmaktadır. Intra-Cellular Therapies tarafından geliştirilen bu ilaç, şizofreni ve diğer bir takım nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde endikedir (Intra-Cellular Therapies, 2020). Lumateperone, özellikle benzersiz farmakolojik profili ile dikkat çekmektedir. İlacın etki mekanizması, dopamin ve serotonin sistemlerini hedefleyen karmaşık ve etkili bir yapıya sahiptir. Dopamin D2 reseptörlerinde hem presinaptik parsiyel agonist hem de postsinaptik antagonist olarak

işlev görmektedir (Greenwood ve ark., 2021). Bu mekanizma, lumateperonun antipsikotik etkilerini sağlarken yan etkilerini minimumda tutmasını sağlar (Correll ve ark., 2020). Ayrıca, ilacın 5-HT_{2A} reseptörlerine karşı gösterdiği güçlü antagonistik etki ve glutamat sistemindeki dolaylı etkileri, onun klinik etkinliğini artıran faktörler arasında yer almaktadır (Titulaer ve ark., 2022). Lumateperone'un bu özellikleri, onu şizofreni ve diğer nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisinde umut verici bir seçenek haline getirmiştir.

Lumateperone'un farmasötik formülasyonlarda doğru bir şekilde analiz edilmesi, ilacın etkinliğini ve güvenliğini sağlamak ve denetlemek için son derece önemlidir, bu nedenle söz konusu analizler yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlamak zorundadır. Bu bağlamda, Ultra Performans Sıvı Kromatografisi-Tandem Mass Spektrometrisi (UPLC-MS/MS) gibi modern analitik teknikler, yüksek performanslı ve güvenilir sonuçlar elde etmek için sıkça tercih edilmektedir (Rathod ve ark., 2019).

Geliştirilen analitik yöntem, lumateperonun farmasötik formülasyonlardaki varlığını ve miktarını doğru bir şekilde belirlemek için tasarlanmıştır. Bu yöntem, hem kalite kontrol hem de klinik araştırmalarda kullanılmak üzere optimize edilmiştir. Validasyon süreci, uluslararası standartlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir ve yöntemlerin doğruluk, hassasiyet, seçicilik, duyarlılık ve stabilite gibi performans kriterlerini kapsamaktadır (ICH, 2021).

Geliştirilen UPLC-MS/MS yöntemi, lumateperonun farmasötik formülasyonlardaki analizinde yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Bu yöntem, pozitif elektrosprey iyonizasyonu (ESI) teknolojisi ile analiz edilip ve yüksek duyarlılık sağlamak için optimize edilmiştir (Banerjee ve Mazumdar, 2012). Kalibrasyon eğrisi, çalışılan konsantrasyon aralığında doğrusal bir ilişki göstermektedir ve tespit edilebilir en düşük limitin belirlenmesi, yüksek hassasiyetin sağlanmasına ayrıca olanak tanımaktadır.

Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, çeşitli kalite kontrol çözeltilerinde yapılan testlerle değerlendirilmiştir. Bu testler, hem gün içi hem de günler arası sonuçların tutarlılığını belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, yöntem geniş bir konsantrasyon aralığında etkin ve güvenilir sonuçlar sağlamaktadır (Ravisankar ve ark., 2015).

Geliştirilen UPLC-MS/MS yöntemi, lumateperonun farmasötik formülasyonlarındaki analizi için etkili ve güvenilir bir araç sunmaktadır. Yöntemin validasyon süreci, yüksek doğruluk, hassasiyet ve güvenilirlik sağlamak amacıyla titizlikle yapılmıştır. Gelecekte, ilacın çeşitli klinik uygulamaları ve potansiyel yeni terapötik alanları üzerine daha fazla araştırma yapılması önem arz etmektedir. Ayrıca, analitik yöntemlerin sürekli olarak optimize edilmesi ve geliştirilmesi, ilaç analizi ve kalite kontrolü açısından büyük bir öneme sahiptir. Dolayısıyla bu çalışmaya konu olan lumateperon, ilerleyen dönemde daha fazla çalışmanın temel konusu olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Şizofreni

Yüzlerce farklı bir o kadar da benzer tanımlar arasından şizofreni hastalığını kronik seyirli, ciddi yeti yitimine neden olabilen, yaşam kalitesi ve işlevselliği olumsuz etkileyen (Jauhar ve ark., 2022), toplumun %1'lik bir kesiminde görülen, sanrılar ve varsanılar gibi pozitif belirtiler ile duygusal yüzeysellik, sosyal izolasyon, konuşma azlığı ve düşünce içeriğinde daralma gibi negatif belirtiler ile birlikte, dikkat, bellek ve yürütücü işlevlerde bozulmaların gözlendiği, duyguları, düşünceleri, algıyı ve davranışları etkileyen, çeşitli klinik görünümle kendini gösterebilen bir psikiyatrik hastalık (Ertuğrul, 2010) olarak tanımlayabiliriz. Farklı bir ifadeyle şizofreni hastalığını, bireylerin gerçeklik algılarının azalmış olduğu, sanrı, varsanı gibi farklı durumların ortaya çıktığı, işlevsel olma durumu ve rutin günlük hayat performanslarının düşüşü ile süregiden, son derece ağır ruhsal bir bozukluk olarak tanımlayabiliriz. Etiyolojisinde genetik, çevresel, nörobiyolojik, nörogelişimsel ve nörodejeneratif birçok faktör gözlenmektedir (Uyan ve ark., 2023). Bu alanda yapılan çok sayıdaki çalışmalarda, son derece güçlü kanıtlar elde edilmiş olsa da şizofreninin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış, ortaya çıkış nedenleri genel geçer şekilde kategorize edilememiş ve hastalığın radikal biçimde tedavisine dair kesin bir yöntem belirlenememiştir. Yine de günümüz itibarıyla bilimin ilk ve en önemli karşı silahı ilaç tedavisi hatta psikofarmakolojik tedaviler gibi görünmektedir.

Şizofreninin tanı ve teşhisi, çeşitli klinik kılavuzlar ve tanı sistemlerine dayanır. Bu sistemler, semptomların doğası, süresi ve şiddeti ile ilgili belirli kriterleri içerir. Günümüzde en yaygın kullanılan tanı kılavuzları, Amerikan Psikiyatri Derneği (APA) tarafından yayımlanan Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayımlanan International Classification of

Diseases (ICD) sistemleridir. DSM-5 ve ICD-11 gibi modern tanı kılavuzları, şizofreninin teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, klinik pratiğe rehberlik ederken, semptomların değerlendirilmesinde daha objektif ve sistematik bir yaklaşım sunmaktadır. Özellikle DSM-5, tanı kriterlerini daha ayrıntılı bir şekilde tanımlayarak, şizofreninin farklı alt tiplerini ve semptomlarını dikkate almaktadır.

2.1.1. DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

Kriterleri

DSM-5, şizofreni tanısının konabilmesi için aşağıdaki kriterlerin var olması gerektiğini belirlemektedir (Tandon ve ark., 2013):

Semptomlar: Şizofreni tanısının konulabilmesi adına, şu semptomlardan en az iki veya daha fazlası gerekli görülmüştür:

- Sanrılar (Delüzyonlar): Gerçek dışı, sabit ve yanlış inançlar.
- Halüsinasyonlar: Gerçek dışı algılar; genellikle seslerin duyulması.
- Dağınık ve Düzensiz Konuşma: Konuşma sırasında anlamlı ve organize bir yapıda stabil olarak kalamama, sapmalar gösterme.
- Çok Düzensiz veya Katatonik Davranışlar: Davranışların anlamlı bir amaç taşımadan düzensiz olması veya hareketsizlik, katatonik durumlar.
- Negatif Semptomlar: Duygusal düzeyde azalma, sosyal geri çekilme, düşünme ve duyguların azalması gibi belirtiler.
- **Semptomların Süresi:** Belirtilen semptomların en az 6 ay süresince devam etmesi gerekir ve bu sürenin en az 1 ayında aktif semptomların mevcut olması gerekmektedir.
- **İşlevsellikte Bozulma:** Semptomların, bireyin sosyal, mesleki veya diğer önemli işlevsellik sergilediği alanlarında belirgin bir bozulmaya yol açması gerekir.

- **Diğer Bozuklukların Hariç Tutulması:** Şizofreninin tanısı koyulmadan önce, diğer mental bozukluklar, madde kullanım bozuklukları veya tıbbi durumlar dışlanmalıdır.

2.1.2. ICD-11 Kriterleri (International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics)

Uluslararası Hastalık Sınıflandırmasının 11. revizyonu, şizofreniyi "Şizofreni ve Şizofreni Benzeri Bozukluklar" başlığı altında ele alır ve tanı koymak için belirli kriterler sunar. Şizofreni teşhisi koyabilmek için, bireyde aşağıdaki kriterlerin belirgin bir şekilde mevcut olması gerekir (World Health Organization, 2022):

Belirgin Psikotik Semptomlar Hastalığın şizofreni olarak isimlendirilebilmesi için hastada gözlenmesi gereken temel semptomlar arasında aşağıdakiler yer alır:

- Sürekli sanrılar (örneğin, büyüklük sanrıları, referans sanrıları, zulme uğrama sanrıları).
- Sürekli halüsinasyonlar (en yaygın olarak işitsel, ancak herhangi bir duyuusal modalitede olabilirler).
- Dağınık düşünce (formel düşünce bozukluğu) (örneğin, dolaylılık ve gevşek bağlantılar, alakasız konuşma, yeni kelimeler oluşturma). Ciddi durumlarda, kişinin konuşması o kadar tutarsız hale gelebilir ki anlaşılmaz olabilir (kelime salatası).
- Etki, pasiflik veya kontrol deneyimleri. Yani, kişinin hislerinin, dürtülerinin, eylemlerinin veya düşüncelerinin kendisi tarafından üretilmediği, başkaları tarafından zihnine yerleştirildiği veya zihninden alındığı deneyimi ya da kişinin düşüncelerinin başkalarına iletildiği deneyimi.
- Duygusal düzleşme, aloji veya konuşmada azlık, avolitasyon, asosyallik ve anhedoni gibi olumsuz belirtiler.

- Hedefe yönelik etkinliği engelleyen aşırı dağınık davranış (örneğin, garip veya amaçsız görünen, öngörülemez veya uygunsuz duygusal tepkilerin, davranışı organize etme yeteneğini engellediği durumlar).
- Katatoniye bağlı huzursuzluk veya ajitasyon, pozisyon alma, mum gibi esneklik, negativizm, dilsizlik veya stupor gibi psikomotor bozukluklar.

Semptomların Sürekliliği ve Ciddiyeti: Şizofreni teşhisinin kesin olarak konulabilmesi için belirtilen semptomların en az 6 ay süreyle mevcut olması ve bu süre zarfında işlevsellikte (özellikle günlük işlevleri bozucu biçimde) belirgin bir bozulmanın yaşanması gerekmektedir. Bu 6 aylık dönem içinde semptomların en az 1 ay boyunca aktif olarak gözlenmiş olması beklenir.

Diğer Bozuklukların ve Durumların Dışlanması; Yok Sayılması: Şizofreni teşhisi koyabilmek için, semptomların başka bir mental bozukluk (örneğin, bipolar bozukluk, majör depresyon) ya da tıbbi bir durum (örneğin, nörolojik hastalıklar, madde kullanımı) ile açıklanamıyor olması gerekir.

Fonksiyonel Bozulma: Şizofreninin teşhisinde bireyin sosyal, mesleki veya kişisel işlevselliğinde belirgin bir bozulma yaşaması da önemli bir kriterdir.

2.1.3. Şizofrenide Tedavi Yöntemleri

Bireylerin gerçeklik algısını etkileyen karmaşık ve kronik bir mental bozukluk olan şizofreni hastalığının tedavisinde çeşitli yaklaşımlar kullanılmakta olup, tedavi stratejileri antipsikotik ilaçlar, psikoterapi, sosyal rehabilitasyon ve destekleyici hizmetleri içermektedir. Bu bölümde, şizofreninin tedavi yöntemlerinden antipsikotik ilaçlarla tedavi yöntemine (farmakolojik yaklaşım) değinilecek ve ilaç gruplarına göre avantaj, dezavantaj, etkinlik v.b. konular güncel bilimsel literatür çerçevesinde kısaca değeriendirilecektir.

2.1.4. Antipsikotik İlaçlar (Farmakolojik Yaklaşım)

Antipsikotik ilaçlar, şizofreninin tedavisinde temel taşlardan ve en sık tercih edilen en güçlü silahlardan birisidir. Bu ilaçlar genellikle pozitif semptomları, yani sanrılar, halüsinasyonlar ve diğer bozulmuş düşünce süreçlerini yönetmek için kullanılırlar. Antipsikotik ilaçlar genel olarak iki ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar geleneksel (tipik) ve atipik antipsikotikler olarak adlandırılmaktadır

Tipik Antipsikotikler (Birinci Nesil)

Tipik antipsikotikler, genellikle şizofreninin pozitif semptomlarını hedef alan ve bunları ortadan kaldırma amacıyla kullanılan ilk nesil antipsikotik ilaçlar olarak tanımlanır. Bu ilaçlar, dopamin D2 reseptörlerini antagonize ederek etki gösterir, fakat genellikle rahatsız edici düzeyde ekstrapiramidal yan etkilerle ilişkilendirilirler.

Tipik antipsikotikler, beyindeki dopamin D2 reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin aktivitesini bloke ederler. Dopamin bilindiği üzere, beyin işlevlerinin birçok yönünü düzenleyen bir nörotransmitterdir ve şizofreninin pozitif semptomları (halüsinasyonlar, sanrılar) dopamin aktivitesinin artışı ile ilişkilidir. Bu ilaçlar, dopaminin bu reseptörlerle etkileşimini engelleyerek şizofreninin semptomlarını azaltırlar (Kapur ve Remington, 2001). Ancak, bu etkileri aynı zamanda motor sistem üzerindeki dopaminerjik aktiviteyi de etkilemekte ve bu durum ekstrapiramidal yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Stegmayer ve ark., 2018).

Tipik Antipsikotiklerin Farmakokinetik Özellikleri

Tipik antipsikotikler, şizofreni ve diğer psikotik bozuklukların tedavisinde önemli bir yer tutar. Bu ilaçların etkinliğinin yanı sıra güvenliği de, farmakokinetik (ADME) özelliklerine bağlıdır. ADME, Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım aşamalarını ifade eder ve bu aşamaların her biri, antipsikotiklerin klinik uygulamalarında kritik birer rol oynarlar.

Absorbsiyon

Tipik antipsikotiklerin absorpsiyonu, genellikle oral yolla alındıklarında gastrointestinal sistemde başlar. Klorpromazin ve flufenazin gibi ilaçlar, asidik ortamda artmış çözünürlükler gibi özelliklere sahiptirler. Araştırmacılar, klorpromazinin pH a bağlı olarak çözünürlük özelliklerini incelemiş ve bu durumun emilim üzerinde radikal etkilere sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (DeVane, 1995). Ek olarak, bazı antipsikotiklerin yağda çözünürlüklerinin emilim süreçlerini etkileyeceği göz ardı edilmemesi gereken bir gerçektir. Özellikle, lipofilik moleküller, mukoza zarından daha iyi geçiş yaparak biyoyararlanımı artırabilir (de Araújo ve ark., 2012).

Dağılım

Dağılım aşaması, ilacın sistemik dolaşıma girdikten sonra vücutta nasıl dağıldığını belirten bir süreçtir. Tipik antipsikotikler, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanma eğilimindedirler; klorpromazin %90'dan fazla, flufenazin %95 oranında plazma proteinlerine bağlanarak vücuda dağılırlar (Berić ve ark., 2017). Bu durum, ilacın serbest formunun biyoyararlanımını ve dokulara penetrasyonunu etkileyebilir. Özellikle, antipsikotiklerin merkezi sinir sistemine geçişi, kan-beyin bariyerini aşabilme yeteneklerine bağlıdır. Lipofilik yapılar, kan-beyin bariyerini geçme kapasitesine sahiptir, bu da söz konusu ilaçların etkinliklerini artıracaktır (Pollak ve ark. 2018).

Metabolizma

Tipik antipsikotikler, genellikle karaciğerde metabolize edilirler ve bu süreç, sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Örneğin, klorpromazin, CYP2D6 ve CYP3A4 izoenzimleri tarafından metabolize edilir. Bu metabolik yollar, bireyler arasındaki genetik farklılıklara bağlı olarak değişiklikler gösterebilir, bu da bireysel yanıtların kaçınılmaz olarak farklılıklar göstermesine neden olur. Antipsikotiklerin genetik polimorfizminin tedavi yanıtı üzerindeki etkilerinin incelendiği

bir çalışmada, özellikle, CYP2D6 enziminin polimorfizminin, plazma ilaç düzeylerini ve ilaç etkinliğini önemli biçimde etkilediği gösterilmiştir (Brandl ve ark., 2014).

Eliminasyon (Atılım)

Tipik antipsikotiklerin eliminasyon süreçleri, genellikle böbrekler aracılığıyla gerçekleşir, ancak bazı metabolitlerin safra yoluyla atılması da sıkça karşılaşılan bir durumdur. Örneğin, klorpromazinin %60'ı böbrekler aracılığıyla, %30'u ise safra yoluyla atılmaktadır. Bu durum, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının izlenmesinin önemini artırır. Ayrıca, ilaç etkileşimleri söz konusu eliminasyon süreçlerini etkileyerek toksisite riskini artırabilir (Yeung ve ark., 1993).

Neticede tipik antipsikotiklerin ADME özellikleri, tedavi etkinlikleri, toksisite riskleri ve güvenlik hususlarında son derece önemli etkilere sahiptir denebilir. İlaçların bu süreçlerindeki bireysel farklılıklardan doğan değişikliklerin, klinik uygulamalar için ne denli kritik bir öneme sahip olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle, antipsikotiklerin kullanımı sırasında dikkatli bir farmakokinetik değerlendirme yapılması ve bireysel özelliklerin mutlak suretle göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Tipik Antipsikotiklerin Avantaj ve Dezavantajları

Yeni nesil bir antipsikotik grubunun araştırılıyor olması ve tipik antipsikotiklerin niçin bu yeni nesil muadilleri karşısında tercih edilmez olduklarının anlaşılması adına, bu jenerasyona ait avantaj ve dezavantajların bilinmesi önemlidir.

- **Yüksek Etkinlik:** Tipik antipsikotikler, genellikle şizofreninin pozitif semptomları üzerinde yüksek etkinlik sağlarlar. Bu ilaçlar, halüsinasyonlar ve sanrılar gibi semptomları azaltma konusunda gayet etkili olabilirler (Lieberman ve ark., 2005).
- **Ekstrapiramidal Yan Etkiler:** Tipik antipsikotiklerin, parkinsonizm, tremor ve diskinezi gibi ekstrapiramidal yan etkilerle sıklıkla ilişkili oldukları

bildirilmiştir. Bu yan etkiler, ilaçların dopamin D2 reseptörlerini güçlü bir şekilde antagonize etmeleri nedeniyle ortaya çıkar (Leucht ve ark., 1999).

- Tardif Diskinezi: Uzun süreli kullanımda gelişebilen ve tedaviyi zorlaştıran tardif diskinezi, bu ilaçların en ciddi yan etkilerinden biridir. Tardif diskinezi, istemsiz hareketler ve kas spazmları biçiminde gözlenmektedir (Leucht ve ark., 1999).

Atipik Antipsikotikler (İkinci Nesil)

Atipik antipsikotikler, reseptör afiniteleri, bağlanma dinamikleri, yan etkileri ve yapısal özellikleri açısından son derece heterojen bir grup oluştururlar. Bu ilaçlar, serotonin reseptörlerine, dopamin reseptörlerine kıyasla daha yüksek bir afinite göstermeleri ile karakterizedirler (Summakoglu ve Ertugrul, 2018). Bu sınıfa ait en bilinen ve yaygın olarak tercih edilen ilaçlar arasında klopazin, risperidon, olanzapin, ketiapin, aripiprazol, sülpirid (Işık, 2006) ve son dönemde keşfedilen, bu grubun en yeni üyelerinden birisi olan lumateperon yer almaktadır. Klinik pratikte, bu ilaçlar genellikle daha az ritim bozukluğu oluştururlar ve negatif semptomlar üzerinde tipik antipsikotiklere oranla daha etkilidirler (Mete ve Ünsal, 2004). Atipik antipsikotikler, bilişsel bozulmaları düzeltmekte, dikkat, hafıza, öğrenme ve yönetim becerileri gibi kritik beyin işlevlerini iyileştirmekte ve genel klinik seyri olumlu yönde etkilemekte eski nesil muadillerine oranla daha başarılıdırlar (Summakoglu ve Ertugrul, 2018).

Atipik antipsikotikler, tipik antipsikotiklerden farklı olarak, 5-HT₂ ve D₂ reseptörlerini değişik oranlarda antagonize ederek ayrışmaktadır. Bu farklı etki mekanizmaları, söz konusu reseptörlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ile açıklanabilmektedir. Atipik antipsikotikleri "serotonin-dopamin antagonistleri" olarak adlandırmak mümkündür. Dopamin nöronları üzerindeki düzenleyici etkileri dolayısıyla 5-HT reseptörlerinin blokajı, hedeflenen antipsikotik etkinin gözlemlenmesi için tipik

antipsikotiklere nazaran daha az D2 blokajı gerektirmektedir. Bunun yanı sıra, bu antipsikotiklerin histaminik, adrenerjik, muskarinik ve glutamaterjik (NMDA) reseptörlere farklı oranlarda bağlandığı tespit edilmiştir (Seeman, 2002)

Atipik antipsikotikler ile gerçekleştirilen tedavi süreçlerinde kilo artışı, hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperprolaktinemi gibi metabolik yan etkilerin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Özellikle kilo artışı, hiperglisemi ve hiperlipidemi atipik antipsikotiklerin kullanımı sırasında daha sık gözlemlenirken, hiperprolaktinemi, genellikle tipik antipsikotiklerle daha fazla ilişkilidir (Üçok ve Gaebel, 2008).

Atipik Antipsikotiklerin Farmakokinetik Özellikleri (ADME)

Atipik antipsikotikler, şizofreni ve diğer psikotik bozuklukların tedavisinde sıkça kullanılan ilaçlardır. Tipik antipsikotiklere göre daha geniş bir etki profiline sahip olmaları, bu ilaçların tercih edilme nedenlerinden birisidir. Atipik antipsikotiklerin farmakokinetik özellikleri, yani ADME (Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon) süreçleri, tedavi etkinliği ve güvenliğini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır.

Absorbsiyon

Atipik antipsikotiklerin emilimi, genellikle oral yolla alındıklarında gastrointestinal sistemde başlar. Örneğin risperidon, gastrointestinal sistemde hızla emilir ve maksimum plazma konsantrasyonuna yaklaşık 1 saat içinde ulaşır (DeVane, 1995). Öte yandan, bazı atipik antipsikotiklerin çözünürlükleri, pH ve gıda ile etkileşim gibi faktörlerden etkilenir. Aripiprazol, pH bağımlı bir çözünürlük gösterir ve bu nedenle, emiliminde yiyeceklerin etkisi minimaldir (Ardiana ve ark., 2013).

Dağılım

Atipik antipsikotiklerin dağılımı, genellikle yüksek yağda çözünürlük ve plazma proteinlerine bağlanma ile karakterizedir. Örneğin, klozapin %90 üzeri oranlarda plazma

proteinlerine bağlanırken, renal klirens oranı ihmal edilebilir bulunmuştur (DeVane, 1995). Dağılım hacmi (Vd), bu ilaçların dokulara penetrasyonunu belirler; yüksek Vd değerine sahip ilaçlar, merkezi sinir sistemine daha fazla geçiş yapabilirler. Aripiprazol ve olanzapin, kan-beyin bariyerini aşma yetenekleri nedeniyle beyin dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir (Ardiana ve ark., 2013).

Metabolizma

Atipik antipsikotiklerin metabolizması, genellikle karaciğerde gerçekleşir ve bu süreç, çeşitli sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından yönetilir (Seeman, 2002). Örneğin, aripiprazol, CYP2D6 ve CYP3A4 ile metabolize edilirken, olanzapin daha çok CYP1A2 tarafından metabolize edilir. Bu enzimlerdeki genetik polimorfizm, bireysel metabolizma hızlarını etkileyerek tedavi sonuçlarını değiştirebilir. Örneğin, CYP2D6'daki polimorfizm, aripiprazolun etkinliğini ve yan etkilerini etkiler (Ardiana ve ark., 2013; Seeman, 2002).

Eliminasyon

Atipik antipsikotiklerin atılımı, genellikle böbrekler aracılığıyla gerçekleşir. Örneğin, risperidon, öncelikle ve büyük oranda idrar aracılığıyla atılırken, bir kısmı da safra ile atılmaktadır (Sheehan ve ark., 2010). Bu atılım yolları, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarının tedavi sürecindeki önemini vurgular. Ayrıca, ilaç etkileşimleri, atılım sürecini etkileyerek toksisite riskini artırabilir.

Atipik antipsikotiklerin ADME özellikleri, tedavi etkinliği ve güvenliği açısından kritik öneme sahiptir. Bu ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım aşamalarındaki bireysel farklılıklar, klinik uygulamalar için dikkate alınması gereken unsurlardır. Dolayısıyla, atipik antipsikotiklerin kullanımı sırasında, farmakokinetik özelliklerin göz önünde bulundurulması ve bireysel hasta faktörlerinin dikkate alınması önemlidir.

2.2. Lumateperon

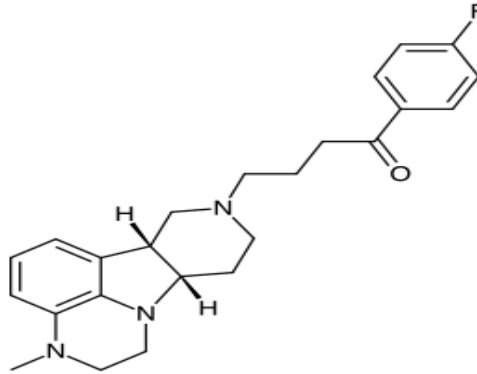
Lumateperon (Caplyta®), Intra-Cellular Therapies tarafından geliştirilen ve Bristol-Myers Squibb'den lisanslı olan, ITI-007 veya ITI-722 olarak da anılan, şizofreni ve diğer nöropsikiyatrik ve nörolojik hastalıkların tedavisi için tasarlanmış yenilikçi bir atipik antipsikotik ajandır. Lumateperon, nöropsikiyatrik hastalıklarda rol oynayan üç temel nörotransmitter olan serotonin, dopamin ve glutamatin seçici ve eşzamanlı modülatörüdür (Blair, 2020). Lumateperone, serotonin 5-HT_{2A} reseptörleri üzerinde güçlü antagonistik aktiviteye sahiptir ve serotonin taşıyıcı (SERT) inhibitörü olarak işlev görür (Vanover ve ark., 2019). Serotonin 5-HT_{2A} antagonizması, SERT inhibitörlüğünün antidepresan etkisini artırır (Davis ve ark., 2015). Lumateperon dopamin reseptörleri üzerinde bir fosfoprotein modülatörü olarak presinaptik kısmi agonist ve postsinaptik antagonist olarak hareket eder. Ayrıca dopamin D₁ reseptörü dolaylı modülatörü olarak glutamaterjik N-metil-D-aspartat (GluN2B) reseptörleri üzerinde de etkilidir (Vanover ve ark., 2019).

Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA), 2017 Kasım ayında şizofreni tedavisi için lumateperona hızlı erişim (fast track) statüsü vermiştir (Intra-Cellular Therapies, 2017) ve bundan sonra 20 Aralık 2019 tarihinde ABD'de şizofreni tedavisi için ilk küresel onayını almıştır (Intra-Cellular Therapies, 2019). Ruhsat süreci, ilacın etkinliğini ve güvenliğini destekleyen kapsamlı klinik çalışmaların sonuçlarına dayanır (FDA, 2019).

Lumateperonun bipolar depresyon, demans ve alzheimer hastalığı ile ilişkili davranışsal bozukluklar, uyku bozuklukları ve majör depresif bozukluklar için klinik geliştirilmesi dünya genelinde devam etmektedir. Ayrıca, şizofreni için uzun etkili enjekte edilebilir bir formülasyonunun prelinik geliştirilmesi de ABD' de devam etmektedir (Longo ve ark., 2023).

2.2.1. Lumateperon'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Lumateperonun kimyasal yapısı, ilacın farmasötik profilini belirleyen önemli bir özelliktir. Lumateperon, kimyasal olarak, $C_{24}H_{28}FN_3O$ ve açık olarak 1-BUTANON, 1-(4-FLOROFENİL)-4-((6BR,10AS)-2,3,6B,9,10,10A-HEKSAHİDRO-3-METİL-1H-PİRİDO(3',4':4,5)PİROLO(1,2,3-DE)KİNOKSALİN-8(7H)-İL)] formülü ile tanımlanır ve 393,506 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Bu kompleks yapısı, ilacın etkili bir antipsikotik tedavi seçeneği olarak kullanılmasını sağlar. Farmasötik preparatında (Caplyta TM) tosilat tuzu halinde bulunur. Bu haldeki etken maddenin formülasyonu ise $C_{24}H_{28}FN_3O.C_7H_8O_3S$ ve açık formülü ise 1-Butanon,1-(4-florofenil)-4-[(6bR,10aS)-2,3,6b,9,10,10a-heksahidro-3-metil-1H-pirido[3',4':4,5]pirolo[1,2,3-de]kinoksalin-8(7H)-yl]-, 4-metillbenzensulfonat dır ve moleküler ağırlığı 565.71 g/mol' dür (Global Substance Registration System, 2024).



Şekil 2.1. Lumateperonun kimyasal yapısı

Lumateperon beyazdan açık sarıya kadar değişen renklerde kristalize toz formunda bulunur. İlacın çözünürlük özellikleri, biyoyararlanımı etkileyen önemli bir faktördür, suda çözünürlük oranı düşüktür ve bu, farmasötik formülasyonlarda çözünürlük iyileştirme tekniklerinin kullanılmasını gerektirir.

Lumateperon, Amerika Birleşik Devletleri pazarında geniş bir kabul görmüştür. Klinik kullanımda, şizofreni tedavisinde tek başına veya diğer tedavi yöntemleriyle kombine halde kullanılmaktadır. Ayrıca ilacın diğer psikotik ve depresif bozukluklar

üzerindeki potansiyel etkilerini araştıran çalışmalar devam etmektedir (McIntyre ve ark., 2023; Naguy ve ark., 2024). Bu genişletilmiş endikasyonlar, ilacın tedavi yelpazesini artırabilir ve daha fazla hasta grubuna ulaşabilir.

2.2.2. Farmakokinetik Özellikler

Absorpsiyon

Lumateperonun oral uygulamasından sonra T_{max} 3–4 saat içinde gerçekleşir. Oral uygulamadan 8 saat sonra, plazmada 0.05–50 ng/ml lumateperone ve 0.2–100 ng/ml metabolitleri tespit edilmiştir (Blair, 2020; Intra-Cellular Therapies Inc. Caplyta prospektüs, 2024). Lumateperon pik plazma konsantrasyonuna yaklaşık 1–2 saat içinde ulaşır. Denge durumu konsantrasyonları ise yaklaşık 5 günde sağlanır; denge durumu maruziyeti, 21–56 mg aralığında birden fazla dozla, yaklaşık dozla orantılı bir şekilde artar.

Lumateperonun farmakokinetiği bireyler arasında değişkenlik göstermektedir; denge durumunda C_{max} ve konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) %68 ile %97 arasında değişmektedir.

Bu ilacın mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %4.4'tür. Lumateperon yüksek yağ içeren bir öğünle birlikte verildiğinde, C_{max} %33' a artmakta, AUC %9' a kadar artabilmekte ve C_{max}'a ulaşma ortalama süresi yaklaşık 1 saat ertelenebilmektedir (aç karnına 1 saat, yağlı yiyecekler ile 2 saat) (Blair, 2020; Vanover ve ark., 2011; Orsolini ve ark., 2020; Vyas ve ark., 2020).

Dağılım

Intravenöz uygulama sonrası lumateperonun dağılım hacmi yaklaşık 4.1 L/kg olarak ölçülmüştür (Intra-Cellular Therapies Inc. Caplyta capsules package insert, 2024) ve 5 µM konsantrasyonda plazma proteinlerine %97.4 oranında bağlıdır (terapötik konsantrasyonların yaklaşık 70 katı).

Lumateperon, özellikle beynin mezokortikal ve mezolimbik bölgelerinde etkili bir şekilde çalışır. Medial prefrontal kortekste, dopamin salgısını teşvik ederken, nigrostriyatal yollar ve motor sistem üzerinde dopamin salgısı oluşturmaz (Snyder ve ark., 2015). Oral olarak 10, 20, 30 ve 40 mg dozlarında uygulandıktan 30 ila 60 dakika sonra, ilaç, verilen doza orantılı olarak striyatal dopamin D2 reseptörlerini işgal eder (Li ve ark., 2014; Davis ve Correll, 2016), ayrıca düşük dozlarda (10 mg) kortikal serotonin 5-HT_{2A} reseptörlerinde belirgin bir işgal oluşturur ve prefrontal kortekste ortalama %88 işgal sağlar. Daha yüksek dozda (40 mg) ise striyatal SERT işgali %31 ile maksimum seviyeye ulaşır. Nucleus accumbenste, GluN2B alt birimlerinin N-metil-D-aspartat reseptörleri (NMDAR'ler) fosforilasyonunun artışından sonra dopamin D1 yolu aracılığıyla glutamat nörotransmisyonunu modüle eder (Mazza ve ark., 2020). Prefrontal korteks ve nucleus accumbenste ayrıca glikojen sentaz kinaz 3'ün (GSK3) fosforilasyonunu teşvik eder (Blair, 2020; Vyas ve ark., 2020).

Metabolizma

Lumateperon farklı enzimler tarafından metabolize edilerek 20'den fazla metabolit üretir. Bu enzimler arasında üridin difosfat (UDP), glukuronil transferaz (UGT)1A1, UGT1A4, UGT2B15, aldo-keto redüktaz (AKR) 1C1, AKR1B10, AKR1C4, CYP3A4, CYP2C8 ve CYP1A2 bulunmaktadır (Blair, 2020; Vyas ve ark., 2020).

Eliminasyon

Bir tek doz radyoaktif işaretli lumateperon sonrası, lumateperon ve glukuronide olmuş metabolitler, toplam plazma radyoaktivitesinin sırasıyla yaklaşık %2.8 ve %51'ini teşkil etmişlerdir. Radyoaktivitenin yaklaşık %58'i idrarla, <%1'i değişmemiş ilaç olarak idrarla ve %29'u dışkı ile atılmaktadır. Intravenöz uygulamanın ardından terminal yarı ömrü yaklaşık 18 saattir ve temizlenme oranı yaklaşık 17.9 L/saat'tir (Blair, 2020; Orsolini ve ark., 2020; Vyas ve ark., 2020).

Toksikokinetik

Yaş, cinsiyet veya ırk, farmakokinetiği klinik olarak anlamlı bir şekilde etkilememektedir. Lumateperon orta veya güçlü CYP3A4 inhibitörleri ve UGT inhibitörleri ile birlikte verilmemelidir. Bu tür bir birlikte uygulama toksisite riskini artırır CYP3A4 indüktörleri ve inhibitörlerinin konsantrasyonu artırması nedeniyle, bu bileşiklerin birlikte uygulanması kontrendikedir. Yüksek plazma protein bağlanması (%97.4) insanlarda bu bileşenin vücutta uzun süre kalabilmesini mümkün kılmaktadır (Intra-Cellular Therapies, 2019; Vanover ve ark., 2011).

2.2.3. Farmakodinamik Özellikler

Lumateperone, serotonin 5-HT_{2A} reseptörleri için yüksek, dopamin D₁, D₂ reseptörleri ve serotonin taşıyıcıları için ise orta düzeyde bağlanma afinitesi gösterir. Ayrıca, dopamin D₄, α -1A ve α -1B adrenerjik reseptörleri için orta, muskarinik ve histaminerjik reseptörler için ise düşük bağlanma afinitesi sergiler (Blair, 2020; Snyder ve ark., 2011; Vanover ve ark., 2015).

Lumateperon dopamin D₂ reseptörlerine ($K_i = 32$ nM) mezolimbik ve mezokortikal bölgelerde yüksek afinitesi olan bir bileşiktir (Snyder ve ark., 2015). İlaç, postsinaptik dopamin D₂ reseptör antagonisti ve presinaptik kısmi agonist olarak hareket eder; dozajı, D₂ reseptör işgali ile iyi bir korelasyon gösterir (Blair, 2020). Sağlıklı gönüllülerde (n = 16) hızlı bir şekilde beyne nüfuz etmiş ve uzun süreli, doz ile ilişkili ve plazma konsantrasyonu ile ilişkili striyatal dopamin D₂ reseptör işgali sergilemiştir (Davis ve ark., 2015; Vanover ve ark., 2019). 10 mg dozundaki lumateperon, striyatal dopamin D₂ reseptörlerinde düşük bir işgal (%12 civarında) gösterirken, 40 mg dozunda ise, striyatal dopamin D₂ reseptörlerinde %39'a kadar yüksek işgal gösterir. Bir faz II pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışmasında (NCT02288845), günlük 60 mg lumateperone alan şizofreni hastalarında, doz sonrası 1 saat içinde dorsal striyatal

dopamin D2 reseptörlerinde (ortalama %39) pik işgal gözlenmiştir (Vanover ve ark., 2019).

Lumateperon, dopamin D1 reseptörleri üzerinde doz bağımlı yüksek afinitesi ($K_i = 52$ nM) ile hareket eder ve NMDA reseptörünün GluN2B (NR2B) alt birimini fosforile eder (Snyder ve ark., 2015).

Dopamin taşıyıcısının inhibisyonu, şizofrenide faydalı etkiler sağlayabilecek özel bir özelliğidir (Vanover ve ark., 2019).

Lumateperon güçlü bir serotonin 5-HT_{2A} reseptör antagonisti olarak hareket eder ($K_i = 0.54$ nM) (Snyder ve ark., 2015). Ortalama yaşları 30.7 yıl olan ve ortalama bazal metabolik indeksleri 24.6 ± 3.0 olan 16 sağlıklı erkek üzerinde yapılan bir çalışmada, 10 mg kadar düşük oral dozlar ile 5-HT_{2A} reseptörleri tamamen (>%80) doymun hale getirilmiştir. 40 mg dozda striyatal serotonin taşıyıcılarında %33'e kadar işgal göstermiştir (Davis ve ark., 2015)

Orta dozlarda, lumateperone etkili bir serotonin taşıyıcı inhibitörü olarak hareket eder ($K_i = 62$ nM). 5-HT_{2A} reseptör antagonizması, serotonin taşıyıcı inhibisyonu ile sinerjik bir etki gösterir ve bu, antidepresan etkinliği artırır (Blair, 2020).

Lumateperon hedef dışı reseptörler, iyon kanalları, nörotransmitter taşıyıcıları ve enzimler için minimal afinite gösterir. Ancak bu afinite her ne kadar minimal olsa dahi, diğer antipsikotik ilaçların genellikle neden olduğu yan etkilerden kilo alımı, sedasyon ve ortostatik hipotansiyon gibi olumsuzlukların görülme ihtimali vardır (Syed, Brašić, 2021). Dopamin D₄ ve α -1A ve α -1B adrenerjik reseptörleri için orta düzeyde bağlanma afinitesi gösterir ($K_i < 100$ nM), muskarinik ve histaminerjik reseptörler için ise düşük bağlanma afinitesi gösterir (100 nM'de %50'den az inhibisyon) ki bu durum düşük yan etki insidansı olarak hastaya geri dönmektedir.

2.2.4. Klinik Çalışmalar

Faz I Çalışmaları

Faz I çalışmaları, lumateperonun sağlıklı erkek gönüllülerde tek dozda güvenli olduğunu göstermiştir; bu çalışmada ciddi advers olaylara rastlanmamıştır. Bunun ardından, sağlıklı gönüllüler ve şizofreni hastalarında 5 gün boyunca günlük dozlarda ITI-007 verilmiş ve bu tedavi iyi tolere edilmiştir. Klinik olarak önemli yan etkiler rutin vital muayenelerde gözlemlenmemiştir (Vyas ve ark., 2020).

Faz II Çalışmaları

Faz II çalışmaları, lumateperonun hem sağlıklı gönüllüler hem de şizofreni hastalarında güvenliğini ve etkinliğini ortaya koymuştur (Blair, 2020; Intra-Cellular Therapies, 2017; Vyas ve ark., 2020). Faz II klinik denemesi NCT01499563 (ITI-007-005) kapsamında, 335 akut psikotik şizofreni hastası, rastgele lumateperon 60 mg veya 120 mg, risperidon 4 mg (aktif kontrol) veya plasebo almak üzere gruplara ayrılmıştır. 60 mg lumateperonun güvenli bir doz olduğu ve iyi tolere edildiği bulunmuş ve hem risperidon hem de lumateperon, plasebo ile karşılaştırıldığında, PANSS (Pozitif ve Negatif Sendrom Ölçeği) değerlendirmelerine göre şizofreni semptomlarını anlamlı şekilde iyileştirmişlerdir.

120 mg lumateperon için PANSS skorunda ekstra anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 60 mg dozunda lumateperon, plasebo ile karşılaştırıldığında PANSS pozitif semptom skorunu da azaltmıştır (LS ortalama değişim -5.1 puan; -2.7 puan plasebo).

Negatif semptomlar gösteren bir hasta alt grubunda, 60 mg lumateperon, plasebo ile karşılaştırıldığında PANSS negatif semptom alt ölçek puanlarını azaltmıştır (LS ortalama değişim -3.0 puan; -1.3 puan plasebo, etki büyüklüğü = -0.34,); risperidon ise,

plasebo ile karşılaştırıldığında negatif semptomları biraz artırmıştır (LS ortalama değişim +1.2 puan; -1.3 puan plasebo, etki büyüklüğü = +0.02).

45 hasta üzerindeki ek analizler, CDSS (Calgary Depresyon Ölçeği) ile ölçülen negatif semptomlar ve depresyon semptomlarında iyileşme göstermiştir. NCT02288845 çalışmasında, 18–60 yaşları arasındaki şizofreniden muzdarip 10 hasta, 60 mg lumateperonu günde bir kez 2 hafta boyunca almış ve D2 reseptör işgali 11C-raclopride kullanılarak pozitron emisyon tomografisi ile incelenmiştir. 60 mg lumateperon için pik işgal düzeyi %39 olarak bulunmuştur ki bu, etkili dozlarda diğer ikinci nesil antipsikotiklerden daha düşüktür ve lumateperonun güvenli ve tolere edilebilir profilinin ortaya çıkışında pay sahibidir. Klinik olarak anlamlı değişiklikler, vital bulgular, kardiyometabolik ölçümler ve hareket bozuklukları ile hiperprolaktinemi riski hiç gözlemlenmemiştir (Blair, 2020; Kane ve ark., 2019; Longo ve ark., 2023; Vyas ve ark., 2020)

Faz III Çalışmaları

Üç kollu, plasebo kontrollü faz III klinik denemesi NCT02282761 (ITI-007-301) kapsamında, 450 hasta ITI-007 (60 mg veya 40 mg) veya plasebo almak üzere rastgele gruplara ayrılmıştır. Lumateperon (60 mg), PANSS skoru ile plasebo üzerinde daha büyük bir antipsikotik etki göstermiştir (LS ortalama değişim bazal durumdan -14.5 puan, etki büyüklüğü = -0.30, plasebo ile -10.3 puan). 40 mg dozunda, çalışmanın bitiş noktasında plasebo ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir puan azaltımı göstermemiştir. Ancak, hem 60 mg hem de 40 mg dozları, Klinik Genel İzlenim Ölçeği (CGI) için hastalık şiddetinde iyileşme, PANSS pozitif alt ölçek puanlarında azalma ve PANSS Prososyal Semptom Faktörü'nde iyileşme göstermiştir (Corponi ve ark., 2019).

Başka bir faz III klinik denemesi NCT02469155 (ITI-007-302) kapsamında, 696 hasta ITI-007 60 mg veya 20 mg, risperidon 4 mg (aktif kontrol) veya plasebo almak

üzere rastgele gruplara ayrılmıştır. Bu çalışmada, aktif kontrol risperidon, PANSS toplam skoru üzerinde bazal durumdan -20.5 puan değişim göstermiştir; 60 mg ve 20 mg lumateperon sırasıyla -14.6 puan ve -15.0 puan değişim göstermiştir, ancak bu çalışmada yüksek plasebo yanıtı gözlemlenmiştir (PANSS toplam skoru üzerinde bazal durumdan -15.1 puan, NCT01499563 ve NCT02282761 çalışmalarında bu puanlar sırasıyla -7.4 puan ve -10.3 puan idi. Bu çalışmada yüksek plasebo yanıtı gözlemlenmiş olmasına rağmen, risperidon kolu plasebodan ayrılırken, lumateperone ayrılmamıştır. Bu durum, ilacın uzun dönem terapötik ajan olarak etkinliğini değerlendirmek için daha ileri çalışmalarda ele alınmalıdır (Greenwood ve ark., 2021).

Bir açık etiketli güvenlik geçiş denemesi (ITI-007-303), sürekli semptomları olan 302 şizofreni hastası ile gerçekleştirilmiş ve bu hastalar mevcut standart tedavilerinden ayrılarak 60 mg lumateperonu günlük olarak 6 hafta boyunca kullanmışlar, ardından tekrar mevcut tedavilerine dönmüş ve 2 hafta sonra değişimler analiz edilmiştir. Lumateperona geçiş yapıldığında, hastalarda mevcut antipsikotik ilaçlarla gözlemlenen kardiyovasküler veya motor bozukluklar görülmemiş ve endokrin, kilo alımı ve kardiyometabolik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı iyileşmeler gözlenmiştir. Bu iyileşmeler, hastalar mevcut tedaviye geri döndüğünde tersine dönmüştür.

Başka bir klinik çalışma NCT03817528, açık etiketli çalışma ITI-007-303'ün ikinci bölümü olarak, şizofreni ve sürekli semptomları olan hastalarda 60 mg lumateperonun uzun dönem (1 yıla kadar) maruziyetini değerlendirmektedir. Lumateperon 60 mg tedavisi, standart bakım bazal durumdan kilo alımı, total kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol, prolaktin ve komorbid depresyonda (CDSS skoru ile değerlendirilen) klinik olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ve çalışmanın tamamında PANSS toplam skorunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu verilerde yer alan 693 hastadan 107'si 1 yıl tedaviyi tamamlamıştır, bu nedenle PANSS

skoru üzerindeki etkileri değerlendirmek için daha büyük bir örneklem boyutu gerekmektedir. Devam eden uzun dönem çalışmasının temel odak noktası güvenlidir. 1 yıl tedavi süresince yaygın tedaviye bağlı yan etkiler arasında ağız kuruluğu (%7.6), baş ağrısı (%5.1) ve ishal (%7.0) bulunmaktadır. Sadece %5.3 hastada akatizi dahil ekstrapiramidal semptomlar gelişmiştir. Somnolans, tedavi grubunun %20'sinde gözlemlenmiş olup, dozlama sabah yerine akşam yapıldığında plasebo seviyelerine düşmüştür (Blair, 2020; Davis ve Correll, 2016; Intracellular Therapies, 2024; Vanover ve ark., 2018; Vyas ve ark., 2020).

2.2.5. Endikasyonlar ve Kontrendikasyonlar, Yan Etkiler

Lumateperon yetişkinlerde şizofreni tedavisinde kullanılan atipik bir antipsikotiktir, ayrıca bipolar I veya II bozukluklara (bipolar depresyon) sahip yetişkinlerde, monoterapi ve lityum yahut valproat ile yapılan tedavilere yardımcı olarak kullanılır (McIntyre ve ark., 2023).

Lumateperona karşı hipersensitivite öyküsü bulunan hastalarda kontrendikedir. Hipersensitivite reaksiyonları, kaşıntı, döküntü (örneğin, alerjik dermatit, papiler döküntü ve genel döküntü) ve ürtiker gibi belirtileri içerebilir.

Aşağıdaki yan etkiler, lumateperonun piyasada bulunan tek farmasötik preparatı olan Caplyta™ isimli ilacın “Uyarılar ve Önlemler” kısmında değinilenlerdir:

- Yaşlılarda Demans ile İlişkili Psikozda Artmış Ölüm
- İntihar Düşünceleri ve Davranışları
- Yaşlılarda Demans ile İlişkili Psikozda Beyin Kanamalı Yan Etkiler[
- Nöroleptik Malign Sendrom
- Tardif Diskinezi
- Metabolik Değişiklikler
- Lökopeni, Nötropeni ve Agranülositoz

- Ortostatik Hipotansiyon ve Senkop
- Düşmeler
- Nöbetler
- Bilişsel ve Motor Bozukluk Potansiyeli
- Vücut Sıcaklığı Düzenleme Bozukluğu
- Yutma Güçlüğü (Intra-Cellular Therapies Inc. Caplyta prospektüs, 2024).

Lumateperonun uzun dönem kullanımındaki etkinliği ve güvenliği üzerine daha fazla araştırma yapılmalıdır. Mevcut veriler, ilacın uzun vadeli tedavi için uygun olduğunu göstermektedir. Ancak, ilacın uzun dönem etkilerini ve yan etkilerini daha iyi anlamak için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Uzun süreli etkinlik ve güvenlik verileri, ilacın tedavi stratejilerinde nasıl kullanılacağı konusunda önemli bilgiler sağlar.

Lumateperonun şizofreni tedavisindeki potansiyeli, daha geniş araştırma alanları ve yeni uygulama stratejileri geliştirilmesini gerektirmektedir. İlacın bipolar bozukluklar, depresyon ve diğer psikotik bozukluklardaki etkinliği üzerine yapılacak çalışmalar, tedavi potansiyelini genişletebilir. Ayrıca, farklı genetik profillere sahip hasta gruplarında ve çeşitli yaş gruplarında ilacın etkinliği ve güvenliği üzerine daha fazla veri toplanmalıdır.

Lumateperonun gelecekteki araştırmaları, ilacın daha geniş hasta popülasyonları üzerindeki etkilerini, uzun dönem güvenlik verilerini ve kombine tedavilerdeki potansiyelini incelemeyi hedeflemelidir. Ayrıca lumateperonun genetik, biyomarker ve çevresel faktörler ile olan etkileşimlerinin anlaşılması, kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Bu tür çalışmalar lumateperonun etkinliğini ve güvenliğini daha da artırabilir ve şizofreni tedavisinde önemli bir yenilik sağlayabilir.

2.3. Kromatografi

Kromatografi, karmaşık karışımların, kendilerini oluşturan bileşenlerine ayrılmasını sağlamak amacıyla kullanılan bir ayırıştırma tekniğidir. 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirilen bu yöntem, kimyasal analizlerin temellerini atmıştır denilebilir. Tswett, bitki pigmentlerini ayırmak için cam bir kolonda ince öğütülmüş kalsiyum karbonat kullandığı deneyinde, çeşitli pigmentlerin farklı hızlarda hareket ettiğini ve renkli bantlar oluşturduklarını gözlemlemiştir. Bu gözlemler, yöntem adının "kromatografi" olarak belirlenmesine yol açmıştır; "kroma" Yunanca'da "renk" anlamına gelirken, "graphine" "yazmak" anlamına gelir (Ettre, 2003).

Tswett'in çalışmalarının ardından kromatografi, analitik kimyanın önemli bir aracı haline gelmiş ve çeşitli uygulama alanları bulmuştur. İlk uygulamalar genellikle pigmentlerin ayrılması ile sınırlıyken zamanla kromatografi teknikleri, biyomoleküller, ilaçlar ve bileşenleri, çevresel kirleticiler ve daha fazlasının ayrılmasında kullanılabilmeleri doğrultusunda geliştirilmiştir. Özellikle 1950'lerde ve 1960'larda, kromatografinin gelişimi, çeşitli yeni tekniklerin ortaya çıkmasına ve mevcut yöntemlerin iyileştirilmesine yol açmıştır (Ahuja, 2003).

Kromatografi, genel olarak bir karışımın bileşenlerini iki farklı faz arasında taşımak suretiyle ayırım gerçekleştiren bir ayırıştırma tekniğidir. Bu yöntem, temelde iki ana fazı içerir: hareketli faz ve sabit faz. Hareketli faz, çözeltinin taşındığı ve bileşenlerin ayrılmasında etkin rol oynayan akışkandır. Sabit faz ise genellikle katı veya sıvı formda olup, bileşenlerle etkileşime giren kısımdır. Bileşenlerin hareketli faz ile sabit faz arasındaki farklı düzeylerde gerçekleşen etkileşimleri, ayrılma sürecinin temelini oluşturur (Gündüz, 2002).

Başka bir ifadeyle, kromatografik ayırım işlemleri, gaz, sıvı veya süperkritik akışkan olarak kullanılan hareketli bir fazın, sabit faz boyunca taşınması yoluyla

gerçekleştirilir. Bu süreçte, bileşenlerin farklı hareket hızları nedeniyle ayrılmaları sağlanır. Kromatografik ayırmada, sabit faz ile hareketli fazın birbirine karışmaması gerektiği vurgulanmalıdır.

Kromatografinin daha ayrıntılı bir tanımında teknik, bir karışımdaki bileşenlerin sabit bir ortamda, belirli bir hareketli faz aracılığıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değişimi ve boyut ayırma gibi özelliklere dayanarak ayrılmasını sağlayan bir yöntem olarak tanımlanır. Karışımdaki bileşenler, genellikle analitler olarak adlandırılır, hareketli faz içinde moleküler seviyede dağılır ve bu sayede hareketli ve sabit fazlarla etkileşime girerler. Hareketli faz ile sabit faz arasındaki arayüzün geniş yüzey alanı, karışımdaki analitlerin ayrıştırılması açısından büyük önem taşır hatta kilit bir rol oynar. Diğer ayrıştırma yöntemleri, kromatografik yöntemler kadar etkili değildir ve uygulamada yaygın olarak kullanılmazlar. Bu nedenle kromatografi, özellikle araştırma amaçlı olarak tercih edilir ve geniş bir uygulama alanına sahiptir (Giddings, 2017).

Kromatografi sürecinde, bir çözeltideki bileşenler hareketli faz ile taşınırken sabit faz ile etkileşimlerde bulunurlar. Analit molekülleri, hareketli faz ile sabit faz yüzeyi arasında birçok kez faz geçişi gerçekleştirirler. Moleküllerin sabit faz yüzeyinde geçirdiği ortalama süre, etkileşim enerjisine bağlı olarak değişir. Etkileşim enerjileri arasındaki fark çok küçük olan farklı moleküller için, geniş bir yüzey alanının bulunması kritik öneme sahiptir; çünkü analit moleküllerinin kromatografik kolon boyunca hareket ederken geçirdiği faz geçişlerinin sayısı arttıkça, geri kalma, tutulma süreleri arasındaki fark da doğal olarak büyür. Sabit ve hareketli fazların doğası ile kolon boyunca taşıma yöntemi, kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmasının temelini oluşturur (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Watson, 2005).

2.3.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi teknikleri, kullanılan fazların türüne, uygulama prensiplerine ve ayrılma mekanizmalarına göre geniş bir sınıflandırma yelpazesine sahiptir. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması genel olarak üç ana başlık altında incelenebilir: fiziksel temasa dayalı sınıflama (Pratik Temelli), denge türüne dayalı sınıflama (Teorik Sınıflama) ve faz türüne dayalı sınıflama (Skoog ve ark., 2007).

2.3.2. Pratik Temellere Dayalı Sınıflandırma

Bu sınıflandırma hareketli ve sabit fazların birbirleriyle fiziksel temasa geçiş yöntemine göre yapılır.

Kolon Kromatografisi: Bu yöntemde, sabit faz dar bir kolon içerisine sabitlenmiştir ve hareketli faz bu kolondan basınç altında geçirilir. Kolon içindeki sabit faz genellikle bir dolgu maddesi şeklinde bulunur ve hareketli fazın bu dolgu maddesi ile farklı biçimlerde etkileşime girmesi suretiyle analitlerin ayrıştırılmasını sağlar (Ahuja, 2003).

Düzlemsel Kromatografi: Statik (sabit) fazın düz bir yüzeyde veya kağıt üzerinde desteklendiği yöntemdir. Mobil (hareketli) faz, kapiller etki veya yerçekimi ile hareket eder. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ve kağıt kromatografisi olarak iki ana türe ayrılır. İnce tabaka kromatografisi, hızlı ve basit ayrılma yöntemleri sunarken, kağıt kromatografisi düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir bir teknik olarak avantajlar sunmaktadır (Ahuja, 2003).

2.3.3. Teorik Temellere Dayalı Sınıflandırma

Kromatografi yöntemlerinin bir diğer sınıflandırması, çözeltideki analitlerin fazlar arasındaki transfer dengelerine dayanır (Ismail ve Nielsen, 2010):

Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon, moleküllerin bir yüzey üzerinde tutulması sürecidir ve bu etkileşim, genellikle fiziksel veya kimyasal bağlarla gerçekleşir. Bu yöntem analitlerin, statik fazın yüzeyine adsorbe olması prensibine dayanır. Adsorpsiyon kromatografisi, gaz-katı ve sıvı-katı adsorpsiyonunu içerir. Bu yöntemde, analitlerin ayrılması, sabit fazın yüzeyindeki aktif gruplarla analitlerin etkileşimine bağlı olarak gerçekleşir (Straw, 1985). Adsorpsiyon kromatografisi, geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ve normal faz ve ters faz kromatografisi olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır

Normal Faz Adsorpsiyon

Normal faz adsorpsiyon kromatografisinde, apolar sabit fazlar kullanılırken, hareketli faz genellikle polar bir çözücüdür. Bu yöntem, apolar bileşenlerin ayrılması için uygundur çünkü apolar sabit faz, apolar moleküllerle daha güçlü etkileşimler kurar. Polar hareketli faz, polar analitlerin çözünmesini sağlar ve böylece apolar bileşenlerin sabit faz üzerinde tutulmasını artırır (Gündüz, 2002).

Normal faz kromatografisinde kullanılan apolar sabit fazlar genellikle silika jel veya alüminyum oksit gibi maddeler içerir. Bu materyaller, yüzeylerinde birçok apolar gruptan oluşan aktif alanlar barındıracak biçimde dizayn edilirler. Polar hareketli fazlar ise su, metanol veya asetonitril gibi çözücüler olabilir. Bu çözücüler, polar analitlerin çözünmesini ve taşınmasını sağlar, böylece apolar bileşenler sabit fazda daha uzun süre kalır (Giddings, 2017).

Normal faz adsorpsiyon kromatografisi, özellikle apolar bileşenlerin ayrılması gerektiği durumlarda etkili bir yöntemdir. Örneğin, doğal ürünlerin bileşenlerinin ayrılması veya lipidlerin analizi için kullanılır. Apolar bileşenlerin daha uzun süre sabit fazda tutulması, onların daha iyi ayrılmasını sağlar. Ayrıca, bu yöntem, polar analitlerin hızlı bir şekilde hareketli faza geçmesini sağlar, bu da ayırma verimliliğini artırır (Straw, 1985).

Ters Faz Adsorpsiyon

Ters faz adsorpsiyon kromatografisinde, polar sabit fazlar ve apolar hareketli fazlar kullanılır. Bu yöntem, polar bileşenlerin ayrılması için uygundur çünkü polar sabit fazlar, polar moleküllerle güçlü etkileşimler kurar. Apolar hareketli faz, apolar analitlerin çözünmesini ve taşınmasını sağlar, böylece polar bileşenler sabit fazda daha uzun süre kalır (Ahuja, 2003).

Ters faz kromatografisinde kullanılan polar sabit fazlar genellikle silika jelin yüzeyine bağlanmış uzun zincirli polar gruplar içerir. Bu gruplar, polar moleküllerle etkileşime girerek onların sabit fazda tutulmasını sağlar. Apolar hareketli fazlar ise genellikle metanol, asetonitril veya etanol gibi çözücülerdir. Bu çözücüler, apolar analitlerin çözünmesini ve kolon boyunca taşınmasını sağlar.

Ters faz adsorpsiyon kromatografisi, biyomoleküller, peptitler, proteinler ve diğer biyolojik moleküllerin ayrılması için yaygın olarak kullanılır. Polar analitlerin uzun süre sabit fazda tutulması, yüksek çözünürlük ve hassasiyet ile ayırım sağlar. Ayrıca, bu yöntem, çok çeşitli apolar çözücülerle kullanılabildiği için esneklik sağlar (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Watson, 2005).

Partisyon/Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi, analitlerin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dağılma farklarına dayanarak ayrılması prensibine dayanan bir kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde, sabit faz sıvı formunda olup, bir inorganik destek materyali üzerinde tutulur. Hareketli faz ise sıvı (sıvı-sıvı dağılma kromatografisi) veya gaz (gaz-sıvı dağılma kromatografisi) olabilir. Kağıt kromatografisi, sabit faz olarak kağıt üzerinde adsorbe olmuş su tabakasının kullanıldığı bir dağılma kromatografisi türüdür (Straw, 1985).

Normal Faz Dağılma Kromatografisi (NP-LC)

Normal faz sıvı kromatografisi, analitlerin sabit fazdaki polar etkileşimlerinin farklılıklarına dayanarak ayırım gerçekleştirir. Bu yöntemde, polar bir sabit faz ile apolar bir hareketli faz kullanılır. Polar sabit fazlar, polar moleküllerle güçlü etkileşimler kurarak, bu moleküllerin tutulmasını artırır; apolar bileşenlerin ise hareketli fazda çözünmesini sağlar.

Normal faz sıvı kromatografisinde, mobil fazlar genellikle apolar çözücüler içerir (örneğin, heksan, heptan), ancak küçük miktarda polar modifikatörler (örneğin, metanol, etanol) ile değiştirilebilir. Mobil fazdaki polar modifikatörlerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler, analitlerin kolon üzerindeki tutulmasını kontrol etmede önemli bir rol oynar. Polar modifikatörlerin mobil faza düşük miktarlarda eklenmesi, analitlerin tutulma süresinde önemli değişiklikler oluşturabilir; örneğin, metanol veya etanol gibi alkol bazlı modifikatörlerin yalnızca %1 (h/h) varyasyonu, analitlerin tutulma süresinde belirgin değişiklikler sağlayabilir.

NP-LC’de kullanılan klasik paketlenme materyalleri genellikle gözenekli oksitler, özellikle silika (SiO_2) veya alümina (Al_2O_3) içerir. Bu sabit fazların yüzeyleri, OH grupları ile yoğun bir şekilde kaplanır, bu da yüzeyleri oldukça polar hale getirir. Silika, trimetoksigidoksipropil silanlar ile kimyasal olarak modifiye edilebilir ve bu, yüzey polaritesini azaltır. Diol fazı ve düşük polariteli eluent modifikatörlerinin kullanımı (örneğin, alkol yerine esterler) ayırma dayanıklılığını ve tekrar edilebilirliğini artırır.

NP-LC genellikle analitlerin spesifik mobil fazlarda çözünürlükleri ile ilişkilidir. Bu yöntem, özellikle hidrofobik bileşenler için, polar veya sulu çözücülerde çözünmeyen apolar çözücülerle ayırım yapmaya olanak tanır.

Ters Faz Dağılıma Kromatografisi (RP-LC)

Ters faz sıvı kromatografisi, polar ve apolar fazların yer değiştirdiği bir yöntemdir. Bu yöntemde, sabit faz genellikle hidrofobik bir yüzeye sahip olup, hareketli faz ise polar bir czcdr ve genellikle su bazlı czeltiller kullanılır (Snyder ark., 2012).

RP-LC, sıvı kromatografi uygulamalarında en yaygın kullanılan yöntemdir. Ters faz kromatografisinin yaklaşık %90'ı, düşük moleküler ağırlığa sahiprneklerin analizi için uygulanmaktadır. Bu yöntem,çok yakınzelliklerdeki bileşenleri ayırt edebilme yeteneği ve tutulma süresi ile seçiciliğin kolayca değiştirilebilmesi gibi avantajlar sunar. Bu avantajlar, enerjik bir bakış açısıyla açıklanabilir: Dispersif kuvvetler, en zayıf intermoleküler kuvvetlerdir ve bu, kromatografik sistemde arka plan etkileşim enerjisinin diğer ayırma tekniklerine greok düşük olmasını sağlar. Bu düşük arka plan enerjisi, yakından ilişkili analitlerin moleküler etkileşimlerindeok küçük farklılıkların ayırt edilmesini mümkün kılar (Watson, 2005).

RP-LC'de kullanılan adsorbanlar genellikle hidrofobik yüzeylere sahip gözenekli sert materyallerdir. Bu yöntemde yüksek adsorban yüzey alanı, analitlerin tutulma süresini uzatır veoğu durumda daha iyi ayırma sağlar. RP-LC'de kullanılanoğu paketleme materyali kimyasal olarak modifiye edilmiş gözenekli silikadır. Silikanınzellikleri uzun yıllardır incelenmiş ve kontrol edilebilen boyut ve gözenekliliğe sahip küresel paracıklarınretim teknolojisi geliştirilmiştir. Silika yüzeyinin kimyasal modifikasyonu da son 30 yılda yoğun bir şekilde araştırılmıştır, bu da RP-LC'nin poplerliğinden kaynaklanmaktadır (Snyder ve ark., 2012). Ancak, farklı fonksiyonel gruplara sahipeşitli bileşenlerin seçici analizi için optimum RP sabit fazınınzellikleri konusunda hâlâ bir uzlaşma sağlanmamıştır (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Snyder ve ak., 2012; Watson, 2005)

Boyut Eleme Kromatografisi

Boyut eleme kromatografisi (SEC), moleküllerin boyutlarına göre ayrımını gerçekleştiren bir kromatografi yöntemidir. Adından da anlaşılacağı üzere, bu yöntem moleküllerin gözenekli bir sabit fazdan dışlanmasına dayanarak ayrılmalarını sağlar. Moleküllerin bu gözenekli alanlara girmekte karşılaştıkları sterik engeller, ayrılma sürecinin temelini oluşturur. Analit molekülünün hidrodinamik yarıçapı, onun kolon boyunca kalış süresini belirleyen ana faktördür. Genel bir kural olarak, hidrodinamik yarıçap ne kadar büyükse, molekülün kolon boyunca kalış süresi o kadar kısa olur (Baker ve ark., 2003).

SEC yöntemi tarihsel olarak iki farklı isimle anılmıştır. 1959 yılında, biyokimyasal polimerlerin ayrıştırılması amacıyla moleküler eleme prensibi kullanılmış ve bu yöntem jel filtrasyon kromatografisi (GFC) adı verilmiştir. GFCde su bazlı elüsyonlar ve tuzlar kullanılır. 1961 yılında, aynı prensip sentetik polimerlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde uygulanmış ve bu bağlamda jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) adı popülerlik kazanmıştır. GPC, genellikle organik çözücüler, örneğin tetrahydrofuran (THF) kullanır ve polimer kimyacıları arasında yaygın olarak kullanılmıştır (Spatorico ve Coulter, 1973).

SEC, analitlerin sabit faz ile pozitif etkileşimlerinden kaçınılması gereken tek kromatografik ayrıştırma yöntemidir, çünkü bu teknik daha önce de belirtildiği üzere moleküllerin moleküler ağırlığı ile hidrodinamik yarıçapı arasındaki ilişkiye dayanır. Daha yüksek moleküler ağırlığa sahip moleküller, daha büyük bir hidrodinamik yarıçapa sahip olduklarından, daha hızlı elüe edilirler. Ancak, bir analit molekülü sabit faz ile (istenmeyen) etkileşime girerse, bu durum büyük moleküllerin tutulma süresini artırabilir ve bu da moleküllerin yalnızca hidrodinamik yarıçaplarına göre ayrılmasını zorlaştırabilir (Semetz, 1993).

Bu bağlamda, kolon paketleme materyali ve hareketli fazın seçimi kritik bir öneme sahiptir. Hareketli faz molekülleri, sabit fazın yüzeyiyle polimer moleküllerinden daha güçlü bir etkileşim sergilemelidir. Bu, polimerin yüzeyle etkileşimini önler ve istenmeyen etkileşimleri azaltır.

Polimer moleküler ağırlıklarının belirlenmesi, moleküllerin hidrodinamik yarıçapı ile moleküler ağırlıkları arasındaki ilişkiye dayanır. Hidrodinamik yarıçap, kabaca moleküler ağırlığın kübik kökü ile orantılıdır. Bu nedenle, moleküler ağırlığın kübik kökü, analitin tutulma hacmi ile orantılı olarak kabul edilir. Bu ilişki, polimer moleküllerinin adsorbent gözenekli alanında tamamen dışlanma ve tamamen geçiş bölgelerinde gözlemlenir. Moleküler ağırlık belirleme için pratik olarak yararlı bölge, analit moleküllerinin adsorbent gözenekli alanında kısmi geçiş gösterdiği bölgedir. Bu bölgede, adsorbent gözenek boyut dağılımı, molekülleri moleküler ağırlıklarına göre ayırt etme kapasitesinde belirleyici bir rol oynar. Bu bölgede, analitin moleküler ağırlığının logaritması ile tutulma hacmi arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (Baker ve ark., 2003).

Polimerlerin hidrodinamik yarıçapı, analitin çözücü ile etkileşiminden de etkilenir. Polimerin konformasyonu ve çözünme derecesi, çözücünün özelliklerinin değişmesiyle değişir. Bu durum, moleküller arası etkileşimlerin ayrıştırma sonuçlarını etkileyebileceği anlamına gelir (Baker ve ark., 2003; Sparatorico ve Coulter, 1973; Semetz, 1993).

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, analitlerin iyonik etkileşimlerini kullanarak ayrılmasını sağlayan bir ayrıştırma yöntemidir. Bu teknik, özellikle su arıtımı, biyomoleküllerin analizleri ve farmasötik ürünlerin kontrolü gibi alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi sunar. İyon değişim kromatografisi, analitlerin pozitif veya negatif

yüklü iyonlar arasında gerçekleştirilen etkileşimlere dayanarak ayrılmasını temel alır. (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Watson, 2005).

Pozitif İyon Değişimi

Pozitif iyon değişimi, pozitif yük taşıyan analitlerin ayrılmasını sağlar ve bu süreçte genellikle katyon değişim reçineleri kullanılır. Katyon değişim reçineleri, sabit fazda bulunan negatif yüklü gruplarla analitlerin etkileşime girerek, pozitif yüklü iyonları adsorbe eder. Bu tür reçineler genellikle sulfonik asit grupları içerir ve bu gruplar, katyonları bağlayarak ayrılmayı sağlar. Katyon değişim kromatografisi, özellikle metal iyonlarının ayrılması, suyun deiyonizasyonu ve çeşitli biyomoleküllerin analizi gibi uygulamalarda önemli bir rol oynar.

Negatif İyon Değişimi

Negatif iyon değişimi, negatif yük taşıyan analitlerin ayrılmasını sağlar ve bu amaçla genellikle anyon değişim reçineleri kullanılır. Anyon değişim reçineleri, sabit fazda bulunan pozitif yüklü gruplarla analitlerin etkileşime girerek, negatif yüklü iyonları adsorbe eder. Bu tür reçineler genellikle amin grupları içerir ve bu gruplar, anyonları bağlayarak ayrılmayı sağlar. Negatif iyon değişim kromatografisi, organik asitlerin, amino asitlerin ve çeşitli biyomoleküllerin analizi gibi uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Watson, 2005).

İyon değişim kromatografisi, analitlerin ayrılmasını sağlayan iyonik etkileşimler aracılığıyla yüksek çözünürlük ve hassasiyet sunar. Bu metodun etkinliği, kullanılan reçinenin seçiciliğine ve mobil fazın özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, analiz sırasında reçine ve mobil faz seçiminde dikkatli bir değerlendirme yapılması gereklidir. İyon değişim kromatografisinin başarılı uygulanabilmesi için, reçinenin ve mobil fazın etkileşim parametreleri dikkate alınmalıdır (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Watson, 2005).

İyon-Eşleme Kromatografisi

İyon çiftlerinin kullanıldığı bir ayırıştırma yöntemidir; iyon değişim kromatografisinin bir varyasyonudur.

Kirallik Kromatografisi

Optik olarak aktif moleküllerin özellikle kiral bileşenlerin ayrılmasında kullanılır ve farmasötik endüstride önemli bir rol oynar.

Kiral kelimesi, sağ ve sol arasında bir ayna görüntüsüne sahip olduğu için, kökenini insan elinden alır. İnsan ellerinin parmaklarının karşılıklı duruşu nedeniyle, iki elin tam olarak üst üste gelmesi mümkün değildir yani rotasyonel hareketle elde edilemeyen bir ayna yansımasına sahiptirler. Kimyada, benzer özellikler sergileyen moleküller, enantiyomer olarak adlandırılırlar. Sarmallar, kiralite özellikleri ve simetri kavramları esasen ayna görüntüsü ile yani sağ ve sol el sistemiyle ilişkilidir. (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Prelog, 1976; Watson, 2005).

Enantiyomerlerin ayrılması, kiral fazların dikkatli bir şekilde kullanımı yoluyla gerçekleştirilir. Hareketli faz, gaz veya sıvı olabilir ve buna göre kiral gaz kromatografisi ya da kiral sıvı kromatografisi uygulanabilir.

Kirallik seçiciliği genellikle kiral sabit fazlar kullanılarak sağlanır. Kiral sıvı kromatografisinde ise kiral hareketli fazlar da başarılı bir şekilde kullanılabilir. Kiral ayrımların elde edilebilmesi için, sabit fazın seçimi önemlidir; sabit fazın atomlarının uzaysal düzenlemesi, ayrılacak iki enantiyomer arasında belirgin bir etkileşim farkını veya etkileşim olasılığını artıracak şekilde tasarlanmalıdır. Bu tasarım, enantiyomerlerin ayrılmasını mümkün kılar ve kiral ayırıştırılmalarda yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağlar ve farmasötik ürünlerin saflığını sağlamak için kritik bir tekniktir (Ahuja, 2003; Giddings, 2017; Gündüz, 2002; Prelog, 1976; Watson, 2005).

Afinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi, proteinlerin, bir kromatografik matrise bağılı belirli bir ligand ile geri dönüşümlü etkileşimlerine dayanarak ayrılmasını sağlayan bir ayırıştırma yöntemidir. Bu yöntem, proteinleri bağlanma spesifitelerine göre ayırır (Ahuja, 2003).

Affinite kromatografisinde, kolon üzerindeki proteinler, yalnızca boncuklara çapraz bağlanmış liganda özgül olarak bağlanan proteinlerdir. Diğer, özgül olmayan proteinler kolonun içinden yıkanarak uzaklaştırılır. İlgili çekici protein, serbest ligand içeren bir çözeltinin uygulanması ile elüe edilir. Bu teknik, yüksek seçicilik ve dolayısıyla yüksek çözünürlük sunar ve genellikle ilgili çekici protein(ler) için yüksek kapasite sağlar. Saflaştırma işlemi genellikle birkaç bin kat kadar olabilir ve aktif materyalin geri kazanımı genellikle çok yüksektir (Urh ve ark., 2009).

Affinite kromatografisi, biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonlarına veya bireysel kimyasal yapılarına dayalı olarak saflaştırılmasını sağlayan tek tekniktir. Diğer yöntemlerle zaman alıcı, zor veya neredeyse imkansız olan saflaştırma işlemleri, genellikle affinite kromatografisi kullanılarak kolayca gerçekleştirilebilir. Bu teknik, aktif biyomoleküllerin denatüre olmuş veya fonksiyonel olarak farklı formlarından ayrılmasını sağlamak, düşük konsantrasyonda bulunan saf maddeleri büyük ham örneklerin içinden izole etmek ve belirli kirleticileri uzaklaştırmak için kullanılabilir. Bu yöntem, sadece spesifik biyomoleküllerin ayrılması değil, aynı zamanda bu moleküllerin biyolojik aktivitelerinin korunmasını da sağlar. Bu özellikleri sayesinde, affinite kromatografisi, biyomoleküler analizlerin ve saflaştırma işlemlerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesinde kritik bir rol oynar. (Ahuja, 2003; Gündüz, 2002; Urh ve ark., 2009).

2.3.4. Hareketli ve Sabit Faz Türlerine Dayalı Sınıflandırma

Kromatografi yöntemleri, hareketli ve sabit fazların niteliklerine bağılı olarak şu şekilde sınıflandırılır (Ahuja, 2003):

Sıvı Kromatografisi

Mobil fazın sıvı olduğu kromatografi yöntemleridir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC), sıvı kromatografisinin modern formlarıdır. UPLC ve HPLC, yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağlar ve karmaşık karışımların ayrılması ve analizi için tercih edilirler. Bu teknikler, özellikle ilaç ve biyomolekül analizi gibi yüksek hassasiyet gerektiren uygulamalarda kullanılırlar.

Gaz Kromatografisi

Mobil fazın gaz olduğu kromatografi yöntemleridir. Gaz kromatografisi, uçucu bileşenlerin ayrılması ve analizi için kullanılır. Bu teknik, genellikle gazın statik faz ile etkileşime girerek analitlerin ayrılmasını sağlar. Gaz kromatografisi, özellikle çevresel analizler ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır.

Süperkritik Akışkan Kromatografisi

Mobil fazın süperkritik durumda bulunan bir sıvı olduğu yöntemdir. Süperkritik sıvılar, hem gaz hem de sıvı fazlarının özelliklerini taşıdıkları için, bu teknik karmaşık karışımların ayrılmasında etkili bir yöntem sunar. Bu yöntem, özellikle yüksek çözünürlük ve ayırım gücü gerektiren uygulamalar için uygundur.

2.3.5. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi (LC), analitik kimyada kompleks karışımların ayrıştırılması ve bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan temel bir tekniktir. Bu metodoloji, çeşitli kimyasal ve biyomoleküler analizlerde vazgeçilmez bir araçtır. Bu kromatografi türünde analitik ayırım, analitlerin iki faz arasındaki farklı etkileşimlerine dayalı olarak gerçekleşir. Bu iki fazdan birisi hareketli faz, diğeri ise sabit faz olarak adlandırılır. Analitlerin ayrılması, hareketli fazın sabit fazla girdiği etkileşimlerin gücüne ve çeşidine

ve analitlerin her iki fazda geçirdiği süreye bağlı olarak sabit fazdan ayrılma zamanlarına bağlıdır (Snyder ve ark., 2012).

2.3.6. Hareketli Faz

Hareketli faz, analitleri taşıyan ve ayırıştırma işlemini gerçekleştiren sıvıdır. Bu fazın seçimi, analitin çözünürlük özelliklerine, çözeltinin pH değerine ve viskoziteye bağlı olarak değişir. Dolayısıyla sabit faz seçiminde, araştırmacı incelediği numunenin özelliklerine hakim olmalı, tercihini yaparken bu özellikleri göz önünde bulundurmalıdır. Hareketli faz çeşitleri basitçe su bazlı ve organik olanlar olarak ikiye ayrılabilir (Snyder ve ark., 2012).

Su Bazlı Fazlar

Su bazlı hareketli fazlar, polar analitlerin ayrıştırılması için idealdir. Su, yüksek dielektrik sabiti ve geniş çözünürlük kapasitesi ile bu tür analizlerde yaygın olarak kullanılır. Örneğin, ters faz kromatografisinde su bazlı çözücüler kullanılarak polar ve apolar bileşenlerin ayrıştırılması sağlanır (Weston ve Brown, 1997).

Organik Fazlar

Organik çözücüler, özellikle apolar bileşenlerin ayrılmasında kullanılır. Metanol, asetonitril, dimetilsülfonilüre ve etanol gibi çözücüler, düşük polariteye sahip analitlerin çözünürlüklerini artırır ve genellikle normal faz kromatografisinde tercih edilirler (Weston ve Brown, 1997).

2.3.7. Sabit Faz

Sabit faz, analitlerin ayrımını, etkileşim farklılıklarına bağlı farklı tutulum süreleriyle gerçekleştiren katı veya sıvı formdaki materyaldir. Sabit fazın özellikleri, analitlerin hareketli faza göre etkileşim derecelerini belirler. Yaygın olarak kullanılan sabit faz materyalleri arasında silika jel, alümina, polimerler bulunur. Türlerine kısaca

göz attığımızda katı ve sıvı kaplı olarak iki farklı sabit faz çeşidi vardır diyebiliriz (Snyder ve ark., 2012):

Katı Sabit Fazlar

- *Silika Jel*: Normal faz kromatografisinde kullanılan en yaygın sabit fazlardan biridir. Silika jel, polar gruplara sahip olup polar analitlerin ayrılmasında kullanılır. Çeşitli pH aralıklarında stabilite gösterir ve geniş bir çözünürlük aralığı sunar.
- *Alumina*: Apolar bileşenlerin ayrılması için tercih edilen bir sabit fazdır. Alumina, adsorpsiyon süreçlerinde etkili olup bazı özel uygulamalarda kullanılır (Snyder ve ark., 2012).

Sıvı Kaplı Sabit Fazlar

- *Ters Faz Kaplama*: Apolar sabit fazlar ve polar hareketli fazlar kullanılarak gerçekleştirilen ayrıştırmalardır. Ters faz kromatografisi, biyomoleküller ve polar bileşenlerin ayrılmasında yüksek çözünürlük sağlar ve dolayısıyla efektifir denebilir.
- *Normal Faz Kaplama*: Polar sabit fazlar ve apolar hareketli fazlar kullanılarak yapılan ayrıştırmalardır. Bu tür kromatografi, apolar bileşenlerin ayrılmasını sağlar ve genellikle polar analitlerin analizinde kullanılır (Skoog ve ark., 2007).

2.3.8. Sıvı Kromatografisi Türleri

Sıvı kromatografisi, birçok farklı teknik ve yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Bu farklılıklardan doğan farklı sıvı kromatografisi türlerine göz atılması, konunun daha detaylı olarak anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Sıvı kromatografisinin başlıca güncel ve önemli türleri şu şekildedir;

Yüksek Performanslı (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisinin yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağlayan bir türüdür. HPLC, yüksek basınç altında çalışır ve daha küçük partiküller kullanarak daha yüksek çözünürlük sağlar (Snyder ve ark., 2012).

HPLC Uygulama Türleri

- Ters Faz Kromatografisi: Apolar sabit fazlar ve polar hareketli fazlar kullanılarak yapılan ayrıştırmalardır. Bu tür kromatografi, biyomoleküller ve polar bileşenlerin analizi için uygundur. Ters faz kromatografisi, yüksek çözünürlük ve hassasiyet sağladığı için geniş bir uygulama alanına sahiptir.
- Normal Faz Kromatografisi: Polar sabit fazlar ve apolar hareketli fazlar kullanılarak yapılan ayrıştırmalardır. Bu, apolar bileşenlerin ayrılması için uygundur (Snyder ve ark., 2012).

Preparatif Sıvı Kromatografisi

Preparatif sıvı kromatografisi, büyük miktarlarda bileşenlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması amacıyla kullanılır. Endüstriyel ölçekli uygulamalarda özellikle biyomoleküller ve ilaçların saflaştırılmasında kritik bir tekniktir.

İlaç Üretimi alanında preparatif sıvı kromatografisi, ilaç bileşenlerinin saflaştırılması ve yüksek saflıkta ürünlerin elde edilmesi için kullanılır. Bu, endüstriyel üretimde kritik bir adımdır ve ilaç formülasyonunda büyük bir rol oynar. Ayrıca proteinler, peptitler ve diğer biyomoleküllerin büyük miktarlarda saflaştırılması için preparatif kromatografi kullanılır. Bu uygulama, biyoteknolojik üretim süreçlerinde önemlidir ve yüksek saflıkta biyomoleküller elde edilmesini sağlar. (Issaq, 2002; Skoog ve ark., 2007; Snyder, Kirkland, Dolan, 2012; Snyder, Kirkland, Glajch, 2012; Weston ve Brown, 1997)

Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)

1960’larda ilk HPLC sistemlerinin ortaya çıkması, analitik kimyanın birçok alanında devrim yaratmıştır. HPLC, yüksek çözünürlük ve ayrıştırma kapasitesi sunan, son derece efektif bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu tekniğin gelişiminde rol alan önemli etkenlerden biri, ayrıştırma işlemleri için kullanılan dolgu materyallerindeki evrimdir. Bu evrimin temel prensipleri, Van Deemter denklemi ile belirlenmiştir. Van Deemter denklemi, lineer hız (akış hızı) ve plaka yüksekliği (HETP veya kolon verimliliği) arasındaki ilişkileri tanımlayan ampirik bir formüldür. Parçacık boyutları gibi değişkenlerin etkisiyle Van Deemter eğrisi, kromatografik performansın değerlendirilmesinde kullanılır olmuştur. Ancak, zamanla çözünürlük, hız ve basınç gibi faktörlerde sınırlamalar yaşanmıştır. Küçük parçacık boyutlarının sağladığı verimlilik uzun zamandır tanınmış olsa da, bu bilimsel prensiplere dayalı tekniklerin geliştirilmesi, 2 µm altı parçacıklarla doldurulmuş kolonlara, mobil fazın pompalanması ile karşılaşılan yüksek geri basınçlar nedeniyle karmaşıktır. Geleneksel HPLC sistemleri, küçük parçacıklı kolonlar nedeniyle ortaya çıkan yüksek geri basınçlarla çalışamaz. İşte bu noktada UPLC, geleneksel HPLC sistemlerine kıyasla önemli bir ilerleme vaad etmektedir. Bunun temel sebebi, 2 mikrondan daha küçük partiküllerle doldurulmuş sabit fazlar ile ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografi sistemlerinin kullanılmasıdır. HPLC genellikle 3,000 ila 6,000 psi arasında basınçlarda çalışırken, UPLC sistemleri 15,000 psi yi aşan basınçlarda faaliyet gösterebilmektedir. Bu radikal basınç artışı, UPLC'nin daha hızlı kütle transfer kinetikleri ve azalan analit difüzyonu sayesinde daha yüksek verimlilik ve çözünürlük elde etmesine olanak tanımıştır (Fountain ve Iraneta, 2012)

UPLC, sıvı kromatografisinin evrimsel bir aşamasıdır. 2004 yılında Waters Corporation tarafından tanıtılan UPLC, HPLC kullanımında gözlenen sınırlamaları aşmak amacıyla geliştirilmiştir. Ayrıca, UPLC'nin sabit fazda daha küçük partikül

boyutları kullanması, yüzey alanını artırarak analitlerle daha güçlü etkileşimler sağlamış; bu durum, ayırım verimliliğini ve çözüm gücünü anlamlı biçimde artırmıştır (Swartz, 2005).

Tipik bir UPLC sistemi, hassas pompalar, enjektörler, kolonlar, dedektörler ve veri toplama modülleri gibi birkaç temel bileşenden oluşur. İşleyişinin merkezinde, 15,000 psi'yi aşan basınçlarda hassas gradyanlar sunan ultra yüksek basınçlı pompalar yer almaktadır. Mikro hacimli örnek döngüleri ile donatılmış enjektörler, bant genişlemesini en aza indirecek kesin enjeksiyon hacimleri sağlamaktadır. 2 mikron altı partiküllerle doldurulmuş yüksek çözünürlüklü kolonlar, karmaşık analit karışımlarının verimli ayırımını mümkün kılarken, fotodiyot dizisi (PDA) veya kütle spektrometresi (MS) gibi hassas dedektörler, gerçek zamanlı algılama ve kantifikasyon imkanı sunar (Ahmed ve ark., 2023; Patil ve ark., 2024).

UPLC, analitik kimya alanında yüksek verimlilik ve çözünürlük sunan devrim niteliğinde bir teknik olarak öne çıkmaktadır. Özellikle karmaşık örneklerin ayırımında sağladığı avantajlar, bu teknolojiyi modern laboratuvarların vazgeçilmez bir aracı haline getirmiştir. UPLC'nin sunduğu gelişmiş özellikler, analitik yöntemlerin doğruluğunu ve hassasiyetini artırmakta, böylece bilimsel araştırmaların kalitesini önemli ölçüde yükseltmektedir (Ahmed ve ark., 2023; Swartz, 2005).

UPLC Sistemlerinin Önemli Bileşenleri ve İşlevleri

1. Solvent Yönetici
2. Numune Yönetici
3. Kolon Isıtıcı
4. Kolon
5. Dedektör
6. Otomatik Temizleme Ünitesi

Solvent Yöneticisi (Solvent Transfer Pompası)

Solvent yöneticileri, UPLC sistemlerinin performansını büyük ölçüde artırır. UPLC'nin temel avantajlarından birisinin, düşük partikül boyutlu dolgu materyallerinin kullanılması olduğunu belirtmiştik. Bu, daha yüksek akış hızları ve daha düşük basınç düşüşleri ile daha iyi ayırım sağlar. İşte solvent yöneticisi, bu yüksek basınç altında çalışabilme yeteneği sayesinde, analitik uygulamalarda optimum performansı garanti eder.

İkili (binary) solvent yöneticisi, iki farklı çözücünün yüksek basınç altında karıştırılmasını sağlayan parçadır. Bu sistem, gradient elüsyon için gerekli olan çözücü karışımını hassas bir şekilde hazırlar ve mobil fazın kompozisyonunu dinamik olarak değiştirme imkanı sunar. Yüksek çözünürlük ve analitik performans için çözücülerin degaze edilmesini sağlar ve dört farklı çözücüye kadar kullanabilme seçeneği sunar. Genellikle 1000 bar (yaklaşık 15000 psi) basınca kadar dayanıklıdır, bu da 2 µm' den küçük partiküller içeren kolonların etkili bir şekilde kullanılmasını mümkün kılar. Günümüzde Waters Corporation (ACQUITY UPLC), Agilent Technologies (1290 Infinity II), Thermo Fisher Scientific (Vanquish), Shimadzu (Nexera X2) firmaları üretimlerini yapmaktadır. (Taleuzzaman ve ark., 2015)

Solvent yöneticisi, rezervuarlardan çözeltileri çekmekte görevli iki ayrı solvent pompası ile çalışan bir sistemdir. Bu sistem, çözücü akışını kontrol ederek, belirli bir zaman diliminde bu çözücülerin oranlarını değiştirme yeteneği sağlar. Bu değişiklikler, analitlerin ayrılması sırasında daha iyi bir seçicilik ve duyarlılık sağlar.

Bu sistem temelde rezervuar ve degazer parçalarından ve daha önce bahsettiğimiz solvent pompalarından oluşmaktadır. Bu parçalara da ayrı ayrı kısaca göz atalım:

Rezervuarlar

UPLC sistemleri genellikle bir veya daha fazla cam veya paslanmaz çelik rezervuara sahiptir. Bu rezervuarlar, her biri 500 ml veya daha fazla sıvı içerebilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu sıvılar genellikle çeşitli çözücülerdir ve analitlerin ayrılması için mobil faz olarak kullanılır. Paslanmaz çelik, kimyasal dayanıklılığı ve sağlamlığı nedeniyle daha sık tercih edilir.

Degazerler (Gaz Giderme Sistemleri)

UPLC sistemlerinde, çözücülerde çözünmüş gazların ve tozların giderilmesi için özel önlemler alınmaktadır. Bu gazlar, kolonda kabarcık oluşumuna neden olabilir ve bu da bant yayılmasına yol açar. Ayrıca, hem kabarcıklar hem de tozlar dedektör performansını olumsuz etkileyeceklerdir. Degazerler, aşağıdaki yöntemlerden birini veya birkaçını içerebilir:

- Vakum Pompa Sistemi: Çözücülerdeki çözünmüş gazları etkili bir şekilde çıkarmak için vakum oluşturur.
- Damıtma Sistemi: Sıvının kaynatılmasıyla gazların ayrılmasını sağlar.
- Isıtma ve Karıştırma Cihazı: Sıvıyı ısıtarak gazların çıkmasını kolaylaştırır ve sürekli karıştırma ile homojen bir çözüm sağlar.
- Sparging Sistemi: İnert bir gaz (örneğin azot) kullanarak, ince kabarcıklar oluşturularak çözünmüş gazların sıvıdan uzaklaştırılmasını sağlar. Bu yöntem, mobil fazda çözünmeyen gazların kullanılması nedeniyle etkilidir.

Örnek Yöneticisi (Sample Manager)

UPLC de, numune tanıtımı kritik öneme sahiptir. Geleneksel enjeksiyon valfleri, otomatik ya da manuel olarak, aşırı basınçta çalışmak üzere tasarlanmamışlardır ve bu nedenle dayanıklı değildir. Kolonu aşırı basınç dalgalanmalarından korumak için enjeksiyon süreci, nispeten darbesiz ve hatta hareketsiz bir ortamda olmalı ve cihazın

tarama hacmi de potansiyel bant yayılmasını azaltmak için minimumda tutulmalıdır. UPLC nin sağladığı hızdan tam anlamıyla yararlanmak için hızlı bir enjeksiyon döngü süresi gerekmekte ve bu da yüksek bir numune kapasitesini zorunlu kılmaktadır. Düşük hacimli enjeksiyonlar, duyarlılığı artırmak için minimum kalıntı ile yapılmalıdır. Ayrıca biyolojik numuneler için doğrudan enjeksiyon yaklaşımları da mevcuttur.

Örnek yöneticisi, örneklerin otomatik olarak kolona enjekte edilmesini ve analiz sürecinin kontrolünü sağlar. Yüksek hassasiyetli ve düşük dispersiyonlu örnek enjeksiyonu için “needle-in-needle” (iğne-içinde-iğne) teknolojisi kullanır. Bu sistem ayrıca örneklerin sıcaklık kontrollü bir ortamda saklanmasını ve işlenmesini sağlar. HPLC sistemlerinde kullanılan yöntemlerin 1500 psi gibi yüksek basınçlarda çalışamaması nedeniyle bu yenilikçi yönteme ihtiyaç duyulmuştur (Taleuzzaman ve ark., 2015)

Enjeksiyon Döngüsü, sadece birkaç saniye olup, iki aşamalı bir temizleme işlemi ile carry-over etkisi (önceki analiz edilen numune kalıntılarının sistemde kalması durumu) azaltılabilir.

Kolon Isıtıcısı (Column Heater)

Kolon ısıtıcılar, UPLC sistemlerinde önemli bir bileşen olarak yer alır. Kolon ısıtma, analitik süreçlerin kalitesini ve verimliliğini ve tekrarlanabilirliğini artırarak daha doğru sonuçlar elde edilmesine olanak tanır. Sıcaklık kontrolü, analitlerin ayrılmasında ve kolondaki reaktiflerin stabilitesinde kritik bir rol oynar. Kolon sıcaklığının optimize ve stabilize edilmesi, çözünürlük ve ayırım gücünü artırarak daha etkili bir analiz sağlar.

Kolon ısıtıcı, elektrikli ısıtma elemanları veya sıcak hava akışı gibi yöntemlerle ısı üretir. Bundan sonra entegre sıcaklık sensörleri, kolondaki sıcaklığı sürekli izler ve istenen sıcaklık değerine ulaşıldığında otomatik olarak sıcaklığın artışı önler. Ve son olarak ısı kaybını minimize etmek için kolon çevresinde yalıtım sağlanır, böylece

sıcaklığın sabit kalması sağlanır. Dahili ve harici olmak üzere 2 farklı tipi mevcuttur. Dahili kolon ısıtıcıları, kromatografi sisteminin bir parçası olarak entegre edilirler. Harici ısıtıcılar ise, kolonların sıcaklığını kontrol etmek için ayrı bir cihaz olarak kullanılır. Genellikle daha fazla esneklik sunar, çünkü farklı kolonlar için de kullanılabilirler (Fountain ve Iraneta, 2012).

Kolon

İlk ticari UPLC kolonları, 1.7 µm partiküllerle doldurulmuş olup, boyutları 2.1 x 50 mm ve 2.1 x 100 mm olarak tasarlanmıştı. Bu partiküller tamamen gözenekli bir yapıya sahip olup, ortalama gözenek boyutu 130 Å idi ve C18 grupları ile modifiye edilmiş etilen köprülemeli organik/inorganik hibrit malzemelerden üretilmiştir. Bu kolonlar, yaklaşık 5 kDa moleküler ağırlığın altındaki analitlerin ters faz ayrımları için öngörülmüştü. Sistem dağılımı düzeltilmesi yapıldığında, bu kolonların maksimum verimlilik için 280,000 plaka içermelerinin ideal olduğu rapor edilmişti. Son on yıllık süreçte, hem hibrit hem de 2 µm altı silika partiküller üzerinde birçok yeni yüzey teknolojilerinin geliştirilmesi neticesinde, ters faz moduna ek olarak, hidrofilik etkileşim, normal faz, boyut dışlama ve iyon değişimi kromatografileri için de uygun hale getirilmiş ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür (Mazzeo ve ark., 2005)

UPLC kolonları, biyopolimerler ve endüstriyel polimerler dâhil olmak üzere yaklaşık 2 MDa'ya kadar analitlerin ayrılması için tasarlanmışlardır ve 0.075–4.6 mm aralığında iç çap seçenekleriyle üretilmektedirler. Seçicilik yelpazesi ve uygulama çeşitliliği önemli ölçüde genişlemiş olmasına rağmen, UPLC kolonlarının birim uzunluğa göre verimliliklerinin artırılmasında sınırlı ilerleme kaydedilmiştir; bu, kolonun dar pikler üretebilme kabiliyetinin temel bir ölçüsüdür. Ancak, 2 µm altı katı çekirdek partiküller (SCP) içeren kolonların üretimiyle bu durum değişmiştir (Walter ve Andrews, 2014; Fountain ve Iraneta, 2012; Mazzeo ve ark., 2005).

Tamamen gözenekli partiküller (FPP) geleneksel HPLC kolonlarında yaygın olarak kullanılmasına karşın, katı çekirdek partikülleri (SCP) gözenekli bir kabuğun, gözeneksiz bir çekirdeği tamamen sarmalaması ile meydana gelmiştir. Uzun bir süre boyunca minimal aktivitenin ardından, SCP teknolojisi 2007 yılında 2.7 µm katı çekirdek silika partikülleri ile doldurulmuş kolonların tanıtılmasıyla öne çıkmıştır. Bu partiküllerle doldurulmuş 4.6 mm iç çaplı kolonların HPLC cihazlarında kullanımı, daha yüksek basınç gerektirmeden yüksek verimlilik sunan bir UPLC alternatifi olarak tanımlanmıştır.

Benzer boyuttaki FPP lerle kıyaslandığında, SCP lerin daha yüksek kolon verimlilikleri sağladığı, optimum akış hızının üzerindeki hızlarda verimliliğin daha yavaş bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. 4.6 mm iç çaplı kolonlarda 2.6–2.7 µm SCP ler için 250,000–300,000 plaka verimliliği elde edilmiştir. Ancak, 2.1 mm çapındaki kolonlarda bu partiküller için önemli ölçüde daha düşük verimlilikler (160,000–220,000 plaka/m) sağlanmıştır; bu durum, ek kolon dağılımı düzeltilmesine rağmen ortadan kaldırılamamıştır. Bunun, optimal olmayan kolon doldurma nedeniyle olduğu düşünülmektedir zira markalar arası kolon verimlilikleri önemli değişkenlikler sergilemektedir (Walter ve Andrews, 2014).

2.6–2.7 µm SCP lerle doldurulmuş kolonları UPLC için bir alternatif olarak görmek yerine, UPLC sistemlerinde kullanılmak üzere özel olarak 2 µm altı SCP lerle doldurulmuş kolonlar geliştirilmiştir. Bu kolonlar kullanılarak çok daha yüksek verimlilik ve analiz hızları mümkün kılınmıştır. Ancak, daha yüksek verimliliklerin elde edilmesi, bu partiküllerin optimize edilerek doldurulmaları ile mümkün olmuştur. İlk ticari 1.7 µm SCP lerle doldurulmuş kolon, yüksek girdap dağılımı etkisinden (optimum olmayan dolgu sonucu) dolayı en iyi 1.7 µm FPP kolonlarından tutarlı bir şekilde daha yüksek verimlilik göstermemiştir (Mazzeo ve ark., 2005; Sanchez ve ark., 2013; Walter ve Andrews, 2014).

2013 yılında, 1.3 μm SCP lerle doldurulmuş 2.1 x 50 mm kolonlar üretilmiş ve bu kolonlar için 435,000–510,000 plaka/m maksimum verimlilik ölçülmüştür. Ancak, bu kolonların 1.7 μm SCP lerle doldurulmuş kolonlardan çok daha yüksek basınçlara sahip olduğu bildirilmiştir. 1.3 μm partiküller içeren bir kolonun spesifik geçirgenliği, 1.7 μm SCP ler içeren bir kolonunkinden %45 daha düşük bulunmuştur. Bu durum, sabit akış hızı ve kolon uzunluğu için 1.7 μm SCP ler içeren kolonların basıncının iki katından fazlasına yol açmaktadır. Sonuç olarak, maksimum 1200 bar basınçlı bir UPLC sistemi kullanarak optimum akış hızında yalnızca 50 mm uzunluğundaki bir kolon çalıştırılabilmektedir. Buna karşın, 1.7 μm partiküllerle doldurulmuş kolonlar için 150 mm uzunluğuna kadar kolonlar kullanılabilmektedir (Sanchez ve ark., 2013;Walter ve Andrews, 2014)

2013 yılında, 1.6 μm SCP lerle doldurulmuş kolonlar da tanıtılmıştır. Sistem dağılımı düzeltilmesi yapılmış şekilde, bu kolonlar için maksimum verimlilikler 330,000–420,000 plaka/m olarak ölçülmüştür. Daha küçük partikül boyutuna rağmen, bu kolonlar 1.7 μm FPP lerle doldurulmuş kolonlarla benzer basınçlara sahiptir. Bunun nedeni, SCP lerle doldurulmuş kolonların daha yüksek interstisyel gözenekliliği ve daha dar partikül boyutu dağılımıdır.

Analit özelliklerinin ve mobil faz bileşiminin kolonların kinetik performansını etkileyebileceği; örneğin protonlu bazlar gibi pozitif yüke sahip analitlerin geniş ve kuyruklu pikler verdikleri gözlenince, bu etkiyi azaltmak için özellikle %0.1 formik asit gibi düşük iyonik güçteki asidik mobil faz etkisine sahip kolonlar, yani kısaca partikül yüzeyine düşük düzeyde pozitif yük eklenmiş kolonlar denenmiştir. Bu teknolojiye sahip kolonlar, başlangıçta 1.7 μm FPP hibrit partiküllerle tanıtılmıştır. Bu partikülleri içeren kolonların, peptitlerin ayrılması için özellikle faydalı olduğu gösterilmiştir. Yakın zamanda bu teknoloji 1.6 μm SCP lerde de kullanılabılır hale gelmiştir. Bu partikülleri

içeren kolonların, çok boyutlu LC-MS/MS sistemlerinde kullanılarak insan insülini ve rekombinant analoglarının plazmada kantitatif olarak belirlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (Walter ve Andrews, 2014).

Sonuç olarak günümüzde sürekli küçültülen hibrit parçacıklarla dolu ve analit özelliklerine göre modifiye edilebilen kolon üretimleri mevcuttur. Bu durum analizlerin hassas, hızlı, tekrarlanabilir, seçici ve yüksek doğrulukta gerçekleşmesini mümkün kılmaktadır.

Dedektör

Her ne kadar HPLC sistemlerinde hali hazırda kullanılmakta olan dedektörler UPLC sistemlerinde de kullanılabilirler de, araştırmacıların UPLC sistemleri ile yaptıkları çalışmalarda en sık tercih ettikleri ve verimli oldukları gösterilen dedektör türleri, kütle spektrometresi (MS) ve diyot dizisi spektrofotometre dedektörleridir. UPLC sistemlerinin HPLC sistemlerinden ayrılmasını sağlayan avantajları, MS dedektörlerinin performanslarını anlamlı biçimde artırmaktadır.

UPLC analizinde kullanılan dedektörler yukarıda da ifade edildiği üzere genellikle UV/Görünür dedektörleridir. Analitlerin tespiti geleneksel olarak absorbansa dayanır ve bu dedektörler konsantrasyon duyarlılığına sahiptir. UPLC'de akış hücresi hacminin azaltılması, konsantrasyonu ve sinyali korumak için gereklidir. Beer Kanunu'na göre, daha küçük hacimli geleneksel akış hücreleri de sinyal gücünün bağlı olduğu yol uzunluğunu azaltır. Kesit alanındaki bir azalma, ışık yolunu kısaltır ve iletim, gürültü arttıkça düşer. Bu nedenle, geleneksel bir HPLC akış hücresi kullanılırsa, UPLC duyarlılığı tehlikeye girebilir. ACQUITY ayarlanabilir UV/Görünür dedektör hücresi, bir optik fiber ile eşdeğer bir ışık yönlendiren akış hücresine sahiptir. Işık, akış hücresinin içinde etkili bir şekilde iletilir ve hâlâ 10 mm akış hücresi yol uzunluğunu korurken yalnızca 500 µL hacimle çalışır. Sistemdeki borular ve bağlantılar, düşük yayılmayı

korumak için etkili bir şekilde yönlendirilmiştir ve yazılımla etkileşime giren sızıntı dedektörlerinin avantajından yararlanarak kullanıcıyı potansiyel sorunlar hakkında uyarır (Taleuzzaman ve ark., 2015;

Otomatik Temizleme Sistemi (Autosampler Wash System)

Otomatik temizleme sistemi, örnek yöneticisinin temizliğini sağlar ve carry-over etkisini azaltır. Bu sistem, enjeksiyon döngüleri arasında veya sonrasında otomatik olarak temizlik işlemleri gerçekleştirir

2.3.9. Sıvı Kromatografi Sistemlerinin Başarısını Ortaya Koyan Temel Parametreler

2.3.9.1. Alıkonma Zamanı (tR)

Alıkonma zamanı (tR), bir analitin kromatografik kolondan geçiş süresini ifade eder ve bu süre, analitin kolona enjekte edildiği andan dedektöre ulaştığı yani kolonu terk ettiği zamana kadar geçen süreyi kapsamaktadır. Alıkonma süresi, çeşitli faktörlerden etkilenir, bunlar arasında: (McGuffin, 2004; Swartz, 2005)

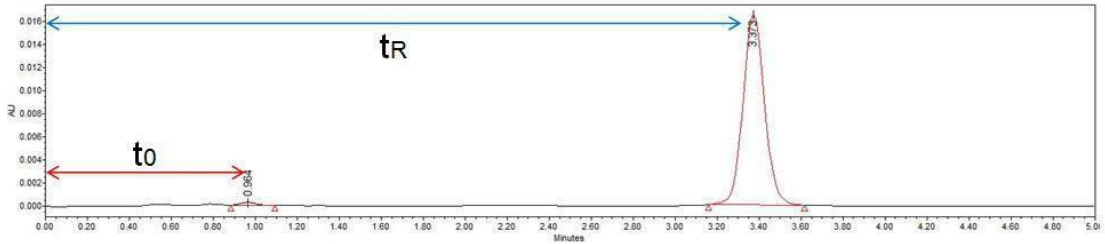
1. Kolon Özellikleri: Kolonun boyutu ve içyapısı analitin alıkonma süresini radikal biçimde etkiler.
2. Kolon Sıcaklığı: Kolon sıcaklığındaki değişiklikler, analitin hareketli fazla etkileşimini ve dolayısıyla alıkonma süresini değiştirebilir
3. Mobil Fazın Bileşimi: Mobil fazın kimyasal bileşimi, analitin kolondaki etkileşimini kaçınılmaz olarak değiştirir
4. Sabit Fazın Tipi ve Özellikleri: Sabit fazın kimyasal doğası, analitin seçiciliğini ve alıkonma süresini etkiler
5. Moleküller Arası Etkileşimler: Sabit faz, hareketli faz ve analit arasındaki moleküler etkileşimler, alıkonma süresini belirleyici bir rol oynar

Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi, bu parametrelerin tümünü dikkate alarak gerçekleştirilmelidir (Ahmed ve ark., 2023).

2.3.9.2. Alıkonma/Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü (k'), analitin kromatografik kolondaki kalıcılığını ölçen önemli bir parametredir ve şu şekilde hesaplanır:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$



Şekil 2.2. k' faktörü hesaplamasında kullanılan kavramlar

Burada, t_0 hareketli faz pikinin alıkonma zamanını, t_R ise analitin alıkonma zamanını ifade eder. Kapasite faktörü akış hızından etkilenmez ve yalnızca mobil fazın gücü ile kontrol edilir. Optimal bir kapasite faktörü genellikle $1 < k' < 10$ aralığında olmalıdır. Küçük k' değerleri, düşük rezolüsyon ile sınırlı iken, yüksek k' değerleri uzun alıkonma süreleri gerektirir (Agilent, 2024; Hamilton ve Sewell, 1982).

2.3.9.3. Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı (N)

Teorik plaka sayısı (N), kolon etkinliğini değerlendirmek ve farklı kolonlar arasında mukayese yapmak için kullanılır. Yüksek N değerleri, daha dar ve keskin pikler üretirken, düşük N değerleri daha geniş ve yayvan piklerin oluşmasına yol açar. Etkinlik kolon uzunluğu, partikül boyutu ve akış hızı gibi faktörlerin bir fonksiyonudur ve bu parametrelerdeki değişiklikler kolon basıncını ve dolayısıyla sistemin başarı düzeyini kaçınılmaz biçimde etkiler (McGuffin, 2004).

Etkinlik, genellikle şu formüllerle hesaplanır:

$$N = 16(tR/wT)^2 \quad \text{veya} \quad N = 5.54\left(\frac{tR}{w_{0.5}}\right)^2$$

Bu formüllerle teorik plaka sayısının (N), retansiyon zamanı (tR), pik genişliği (wT) ve yarı yükseklikteki genişlik (w_{0.5}) kavramlarının bir fonksiyonu olduğu gösterilmiştir

2.3.9.4. Seçicilik/Ayrım Faktörü (α)

Seçicilik (α), iki pikin maksimumu arasındaki zaman farkını veya mesafeyi ölçen bir parametredir ve kapasite faktörlerinin oranıdır:

$$\alpha = \frac{k'2}{k'1}$$

Burada k'1 ve k'2 karşılaştırılan iki analitin retansiyon faktörleridir. Daha yüksek bir seçicilik değeri, iki pik arasındaki daha iyi ayrımı ifade eder ki bu da bileşenlerin doğru bir şekilde nicelendirilmesi ve nitelendirilmesi için gereklidir. Seçicilik, analitlerin sabit ve mobil fazlar ile olan etkileşimleri tarafından belirlenir; hareketli ve sabit faz bileşenleri ile değişebilir ve seçicilik faktöründeki küçük değişiklikler rezolüsyonda büyük etkiler yaratabilir (Agilent, 2024; Swartz, 2005).

2.3.9.5. Rezolüsyon/Çözünürlük (Rs)

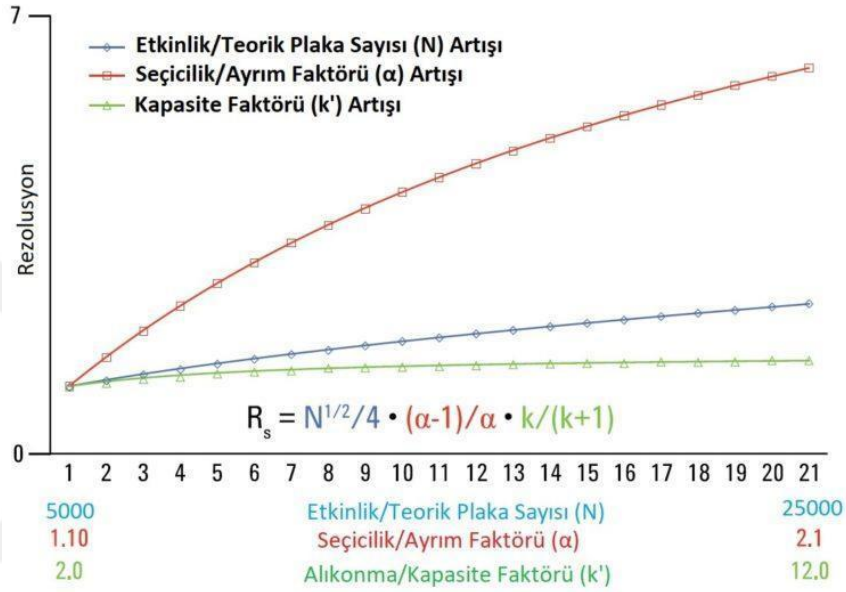
Çözünürlük, bir kromatogramda iki pik arasındaki ayrımı, dolayısıyla işlemin başarı derecesini ve kolonun ayırma kapasitesini nicel olarak ölçen bir parametredir. Şu şekilde tanımlanır:

$$Rs = \frac{2(tR2 - tR1)}{w1 + w2}$$

Burada tR2 ve tR1 karşılaştırılan iki analitin retansiyon zamanları, w1 ve w2 ilgili pikin genişlikleridir. Yüksek çözünürlük, piklerin net bir şekilde ayrılmasını sağlar ve bu da analiz sonuçlarının doğruluğunu artırır. Çözünürlük, kolondaki etkinlik, mobil faz bileşimi ve akış hızı gibi faktörlerden etkilenir (Agilent, 2024; Hamilton ve Sewell, 1982).

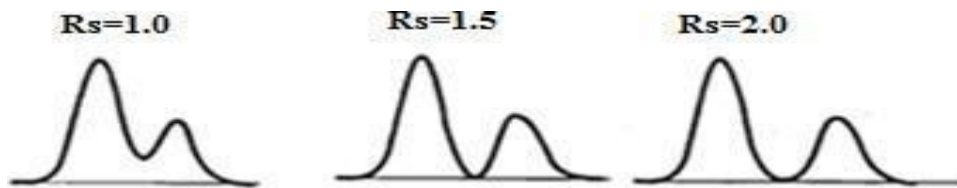
Sıvı kromatografisinde rezolüsyon ayrıca şu formülle de hesaplanabilir (Ravisankar ve ark., 2019) :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} * \frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{k}{k + 1}$$



Şekil 2.3. Çözünürlük/Rezolüsyon grafiği

Buradan ulaşabileceğimiz sonuçlardan birisi R_s değerinin N değerinin karekökü ile doğru orantılı olması sebebiyle, N değerinin artışının R_s değerini sınırlı biçimde artıracaktır. Ancak α değerini doğrudan etkileyen fazların bileşimleri, R_s değerini doğrudan ve önemli biçimde değiştirecektir. Dolayısıyla R_s değerlerinin değiştirilmek istendiği durumlarda hareketli ve sabit fazların içeriklerinde yapılacak değişiklikler direkt amaca yönelik olacaktır (CHROMacademy, 2014).



Şekil 2.4. R_s değerlerine göre piklerin ayrılması

2.3.9.6. Basınç

Basınç UPLC ve HPLC sistemlerinin başarısında kilit rol oynar ve solvent viskozitesi (η), akış hızı (F), kolon uzunluğu (L), kolon yarıçapı (r) ve partikül çapı (d_p) tarafından belirlenir. Basınç denklemi şu şekildedir:

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot F \cdot L}{K_0 \cdot \pi r^2 \cdot d_p^2}$$

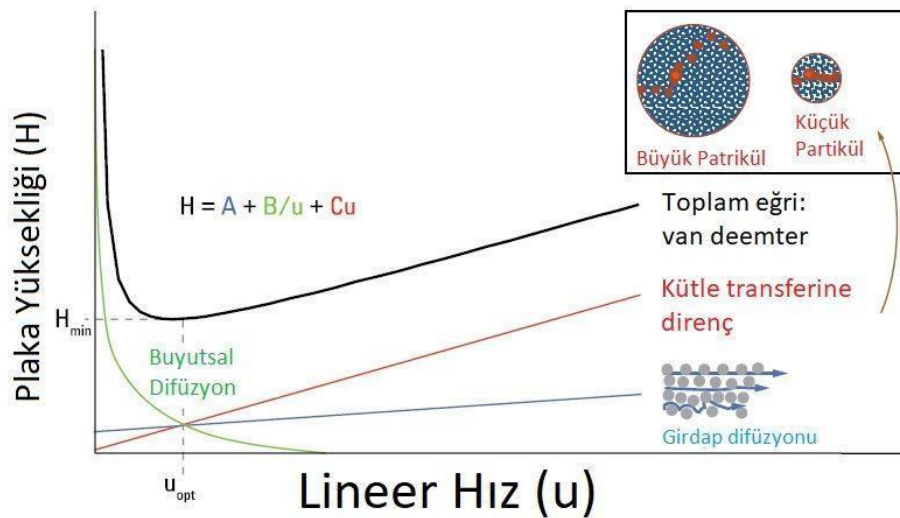
Bu formülden de anlaşılacağı üzere basınç farkları (ΔP) üzerinde, partikül çapındaki, kolon yarıçapındaki (r) küçük değişiklikler bile anlamlı değişimler yaratabilir (Agilent, 2024).

2.3.9.7. Van Deemter Eğrileri

Van Deemter denklemi, plaka yüksekliğini (H) ve lineer hızın (u) bir fonksiyonu olarak değerlendiren bir modeldir ve şöyle formülize edilir:

$$H = (A + B)/u + Cu$$

Burada A, B ve C çeşitli faktörlerin etkisini gösterir ve amaç küçük bir plaka yüksekliği elde etmektir. Parçacık boyutunun küçültülmesi, optimum doğrusal hızların artmasına yol açar (Van Deemter ve ark., 1956; Agilent, 2024).



Şekil 2.5. Van deemter eğrileri

2.3.9.8. Plaka Yüksekliği (HETP)

Plaka yüksekliği veya teorik plaka yüksekliği (HETP), kromatografik kolonun verimliliğini ölçen bir parametredir. Şu şekilde tanımlanır:

$$H = \frac{L}{N}$$

Burada L kolon uzunluğu ve N teorik plaka sayısıdır. Daha düşük HETP değerleri, daha yüksek kolon verimliliği ve daha iyi ayırım kapasitesi anlamına gelir. Plaka yüksekliği, partikül boyutu, kolon kaplaması ve akış dinamikleri gibi faktörlerden etkilenir.

2.3.9.9. Gradient Denklemi

Gradient denklemi, mobil faz kuvvetinin zamanla arttırılmasını ifade eder ve bu, analizlerin hızını artırabilir. Genel denklem şu şekildedir:

$$k^* = \frac{tG \cdot F}{S \Delta \phi V_m}$$

Burada k^* gradient alıkonma faktörünü, tG gradient süresini, F akış hızını, $\Delta \phi V_m$ sırasıyla gradient mobil faz B oranlarındaki değişim ve ölü hacmi ifade etmektedir. Kolon hacmindeki değişiklikler, gradient süresinde veya akış hızında orantılı bir değişiklik ile dengelenmelidir (Agilent, 2024).

2.3.9.10. Mobil Faz Akış Hızı

Mobil fazın akış hızı, ayrıştırma verimliliği, çözünürlük ve analitlerin retansiyon sürelerini etkiler. Genellikle mililitre/dakika (mL/dak) cinsinden ölçülür. Daha yüksek akış hızları, retansiyon sürelerini kısaltabilir ancak çözünürlüğü olumsuz etkileyebilir; daha düşük akış hızları çözünürlüğü artırır ancak analiz süresini uzatır (Chen ve Kord, 2013).

2.3.9.11. Sıcaklık

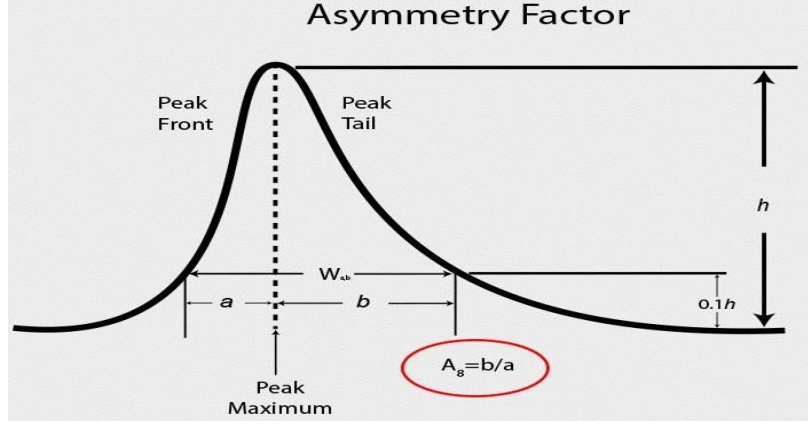
Kromatografik kolondaki sıcaklık, mobil fazın viskozitesini, analitlerin sabit faz ile olan etkileşimlerini ve genel ayırıştırma sürecini etkiler. Sıcaklık kontrolü, tekrarlanabilirlik ve hassasiyet için kritik öneme sahiptir. Yükseltilmiş sıcaklıklar, viskoziteyi düşürerek analiz sürelerini kısaltabilir ve pik şekillerini iyileştirebilir (Chen ve Kord, 2013).

2.3.9.12. Pik Asimetri Faktörü (As)

Kromatografik pikler, ideal koşullar altında Gauss biçiminde mükemmel bir şekle sahip olması beklenen ve elüsyon izoterminin lineer olduğu varsayılan sistemlerdir. İzotermdeki lineerlik, C_s/C_m oranının sabit olması ile tanımlanır; bu durum, tüm kromatografik bantların her konsantrasyon seviyesinde aynı hızda elüe edeceği anlamına gelir. Ancak pratikte, ideal simetrik pikler elde edilememekte, bu durum gerçek bir Gauss pikinden sapma olarak tanımlanan asimetrik pikler ile sonuçlanmaktadır. Pik asimetrisi genellikle iki temel durumda ortaya çıkar: (Fountain ve Iraneta, 2012; Ravisankar ve ark., 2019)

Ön/Öncü/Önleme Piki: Bu durum genellikle analitin kolona aşırı yüklenmesi veya analitin kolon içindeki kanallardan düzensiz akışı sonucunda meydana gelir. Bu koşul altında, kapasite katsayısı (k') artar ve Langmuir izotermine benzer bir durum oluşur; dolayısıyla elüe edilen analitin tutulum zamanı, analit konsantrasyonu arttıkça uzar.

Pik Kuyruklanması: Pik kuyruğu genellikle analitin kolon duvarlarındaki reaktif yüzeylere adsorbe olması ve artan moleküller arası etkileşimlerden kaynaklanır. Bu durumda k' değeri azalır ve anti-Langmuir izotermi gözlemlenir; bu durum, tutulum zamanının daha yüksek konsantrasyonlarla azalmasına yol açar (CHROMacademy, 2014).



Şekil 2.6. Pik asimetri (A_s) faktörü

Asimetri faktörü (A_s) kromatografik piklerin şeklinin değerlendirilmesinde önemli ölçüde kullanılır ve şu şekilde hesaplanır:

$$A_s = \frac{b}{a}$$

- a: Pik merkezine (en yüksek noktaya) en yakın olan soldaki tabanın uzunluğu.
- b: Pik merkezine en yakın olan sağdaki tabanın uzunluğu.

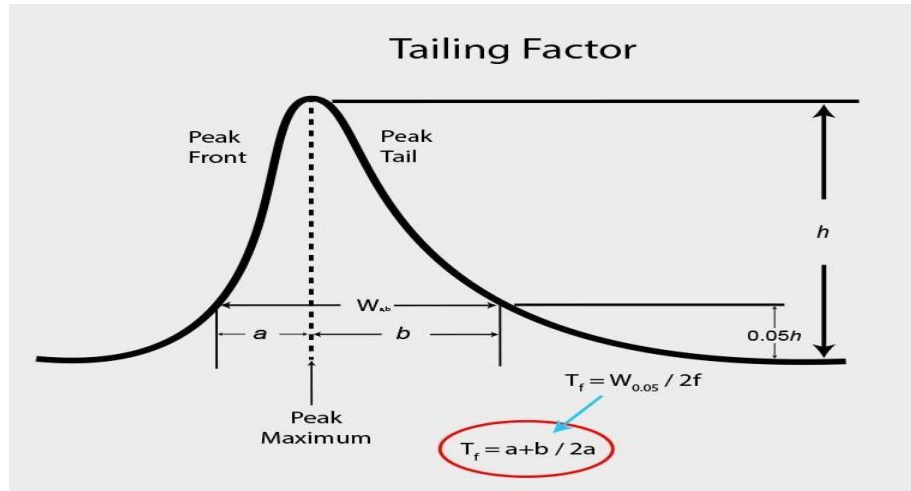
Asimetri faktörünün değerleri:

- 1.0: Mükemmel simetrik pik.
- 1.0'dan büyük: Önlleme piki (asimetrik pik).
- 1.0'dan küçük: Kuyruklu pik (asimetrik pik).

Bu noktada diğer önemli bir faktör de kuyruklanma faktörü (T) dır. Kuyruklanma (Tailing) faktörü, piklerin kuyruklanmasını değerlendirmek için kullanılır ve genellikle aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$T = \frac{w_{0.05}}{2f}$$

$w_{0.05}$ = Pik yüksekliğinin olduğu zeminin %5'i (0.05) pik genişliği olarak belirtilir. f = $w_{0.05}$ 'deki maksimum pik ve ön pik arasındaki mesafe

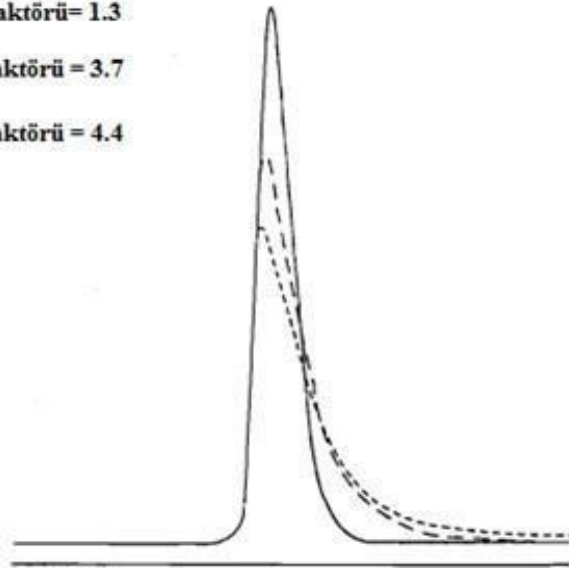


Şekil 2.7. Piklerde kuyruklanma faktörü

Tailing faktörü değerleri:

- 1.0: Mükemmel simetrik pik.
- 1.0'dan büyük: Tailing (kuyruklanma) vardır.
- 1.0'dan küçük: Pik genellikle simetriktir.

— Kuyruklanma faktörü= 1.3
 --- Kuyruklanma faktörü = 3.7
 --- Kuyruklanma faktörü = 4.4



Şekil 2.8. Çeşitli kuyruklanma faktörü değerlerine göre piklerin değişimi

2.4. Kütle Spektrometrisi (MS)

Kütle spektrometrisi, moleküllerin elektron iyonizasyonu ile parçalanmasını ve ardından üretilen iyonların kütle/yük oranını (m/z) ve relatif bolluklarını belirlemeyi

amaçlayan bir analitik tekniktir. Molekül içerisindeki fonksiyonel gruplar parçalanma süreçlerini yönlendirdiğinden, molekül yapısının bilinmesi durumunda parçalanma desenlerinin tahmin edilmesi mümkün olması temeline dayanır (Dass, 2007; Faull ve ark., 2008).

Bir kütle spektrometresi, moleküler fragmentlerin ya yüksek vakum ortamında ya da numunenin yüksek vakum alanına girmeden önce iyonize edilmesiyle çalışır. İyonize edilmiş moleküllerin gaz fazında elde edilmesi gerekmektedir. Analit, termal iyonizasyon, elektrik alanları veya enerjik elektronlar, iyonlar ve fotonlarla iyonize edilebilir. İyonlar, tek atomlar, kümeler, moleküller veya bunların parçaları ve birleşimleri biçiminde olabilir. İyon ayrıştırması, statik veya dinamik elektriksel ya da manyetik alanlar kullanılarak gerçekleştirilir (Dass, 2007; Faull ve ark., 2008).

Kütle spektrometrisi, kimya ve biyokimya alanında çok yönlü ve en kapsamlı analitik tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem, bileşenleri iyonlara dönüştürerek ve bir kütle analizöründe inceleyerek bileşiklerin moleküler kütlelerini hassas bir biçimde ölçer. Bu, kütle spektrometrisinin en basit ama bir o kadar da indirgemeci tanımıdır. Artık organik bileşiklerin basit m/z oranlarının belirlenmesi dönemi geride kalmıştır. Günümüzde kütle spektrometrisi, moleküler yapıların belirlenmesi, reaksiyon dinamikleri ve iyon kimyası üzerine çalışmalar, iyonizasyon enerjisi, görünüm enerjisi, reaksiyon entalpileri, proton ve iyon afiniteleri, gaz fazı asiditeleri gibi termo kimyasal ve fiziksel özelliklerin belirlenmesi için de kullanılabilir.

Kütle spektrometrisinin tarihi, 1898 yılında Wien'in çalışmalarıyla başlamaktadır; Wien, kanal ışınlarının üst üste gelen paralel elektrik ve manyetik alanlardan geçirilerek saptırılabilceğini göstermiştir (Wien, 1898). Bununla birlikte, kütle spektrometrisinin doğuşu, Sir J. J. Thomson'un, modern kütle spektrometrelerinin büyük büyükbabası olan

parabolik kütle spektrofrafisi ile negatif ve pozitif yüklü katot ışınlarının analizine yönelik çalışmalarıyla ilişkilendirilmektedir (Griffiths, 1997).

1960'lar, tandem kütle spektrometrisi ve çarpışma kaynaklı ayırışmaların geliştirilmesine tanıklık etmiştir ve bu durum yapısal analiz alanında, kütle spektrometrisi ile kesin tanımlama ve iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu dönemde kütle spektrometrisi, organik bileşiklerin analizinde standart bir analitik araç haline gelmiştir. Ancak, biyolojik kökenli kırılgan veya uçucu bileşenleri iyonize etmek için uygun yöntemlerin yokluğu nedeniyle, biyobilimlere uygulama alanı sınırlı kalmıştır. 1980'lerde kütle spektrometrisinin uygulama yelpazesi, daha yumuşak iyonizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ile üstel olarak artmıştır. Bu yöntemler arasında 1981'de hızlı atom bombardımanı (FAB) (Barber ve ark., 1981), 1984-1988 yıllarında elektrospray iyonizasyonu (ESI) ve 1988'de matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu (MALDI) bulunmaktadır. ESI ve MALDI'nin geliştirilmesiyle, üst kütle aralığı 100 kDa'nın üzerine çıkmış ve bu durum kütle spektrometrisinin biyoloji ve yaşam bilimlerinde kullanılmasında büyük bir etki yaratmıştır. Bu etki, 2002 yılında John Fenn (ESI üzerindeki çalışmaları için) ve Koichi Tanaka (yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin lazer desorpsiyonu ile iyonize edilebileceğini gösterdiği için) Nobel kimya ödülünü kazandıklarında tanınmıştır (Wikipedia, 2024).

İyonizasyon yöntemlerinin gelişimiyle paralel olarak, yüksek alanlı ve süper hızlı mıknatıslar gibi kütle analizörü teknolojisinde birçok yenilik yapılmış; TOF ve Fourier dönüşüm iyon sirkülasyon rezonansı gibi gelişmeler, duyarlılığı ve üst kütle aralığını artırmıştır. Yeni milenyum, Alexander Makarov'un geliştirdiği orbitrap ve James W. Hager'in tanıttığı lineer dörtlü iyon tuzağı (LIT) gibi iki yeni iyon tuzağının gelişmesiyle yeni ilerlemeler getirmiştir (Hager, 2002; Makarov ve ark., 2009).

HPLC ile kütle spektrometrisinin birleşimi, 1970'lerde ilk kez gösterilmiştir. Ancak atmosferik basınçta iyonizasyon kaynaklarının (APCI) geliştirilmesi ve pazara sunulmasıyla birlikte, sıvı kromatografi ile kütle spektrometrisinin entegrasyonu, rutin analize girmiştir (Dass, 2007; Gross, 2006).

2.4.1. İyonizasyon Teknikleri

İyonizasyon, kütle spektrometrisi (MS) süreçlerinin en kritik aşamasıdır. İyonizasyon, analiz edilen moleküllerin yüklü parçacıklara dönüşmesini sağlar ve bu, kütle analizinde temel bir gerekliliktir. Aşağıda en yaygın iyonizasyon tekniklerine kısaca temas edilecektir (Gross, 2006; Hoffmann ve Stroobant, 2013).

2.4.1.1. Elektron Darbesi İyonizasyonu (EI)

Elektron darbesi iyonizasyonu, kütle spektrometrisinin en eski ve en yaygın tekniklerinden biridir. Bu yöntemde, analit molekülleri yüksek enerjili elektronlarla bombardıman edilir. Moleküller, elektronlar ile çarpışarak radikal katyonlar (moleküler iyonlar) oluşturur:



Bu radikal katyonlar daha sonra parçalanarak daha küçük iyonlar ve parçacıklar oluşturur. EI tekniği genellikle gaz fazındaki örnekler için uygundur ve moleküllerin yapılarını belirlemek için yararlı olan karakteristik parçalanma kalıpları sağlar. Ancak, bu teknik, numunelerin ısıya duyarlılığını artırabilir ve bazı moleküllerde yüksek parçalanmaya yol açabilir (Hoffmann ve Stroobant, 2013).

2.4.1.2. Kimyasal İyonizasyon (CI)

Kimyasal iyonizasyon, EI ye göre daha nazik bir yöntemdir. Bu yöntemde, reaktif gazlar (örneğin metan veya amonyak) kullanılarak analit molekülleri ile etkileşime giren iyonlar üretilir. Bu süreç üç aşamada gerçekleşir:

1. Reaktif Gaz İyonizasyonu: $\text{CH}_4 + e^- \rightarrow \text{CH}_4^{+0} + 2e^-$
2. İkincil İyon Oluşumu: $\text{CH}_4^+ + \text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_5^+ + \text{CH}_3^0$
3. Moleküler Türlerin Oluşumu: $\text{CH}_5^+ + \text{M} \rightarrow \text{MH}^+ + \text{CH}_4$

CI, genellikle düşük moleküler ağırlıklı ve daha az parçalanma gösteren bileşenler için tercih edilmektedir. Bu yöntem, özellikle organik bileşiklerin kütle spektrumlarının elde edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hoffmann ve Stroobant, 2013; Watson ve Sparkman, 2007).

2.4.1.3. Desorpsiyon Teknikleri

Desorpsiyon teknikleri, genellikle katı örneklerin analizinde kullanılır. Bu yöntemler, numunenin ısıtılabilir bir probun ucuna yerleştirilmesi ile başlar ve ardından vakum altında iyonizasyon sağlanır (Dass, 2007).

- Alan Desorpsiyonu: Yüksek potansiyel gradyan uygulanarak moleküller iyonize edilir.
- Lazer Desorpsiyonu: Darbeli lazer ışınları numunenin yüzeyine odaklanarak iyonizasyon sağlanır (Karas ve Hillenkamp, 1988).
- Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu (MALDI): Bu teknikler arasında önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemde, örnek bir matrisle karıştırılır; matris, lazerden enerji emerek protonlu moleküllerin desorpsiyonunu sağlar. MALDI, nazik yapılarıyla karakterize ve minimum parçalanma sergileyen yüksek moleküler kütleye sahip bileşenlerin analizinde özellikle avantajlıdır (Watson ve Sparkman, 2007).

2.4.1.4. Alan İyonizasyonu

Bu teknik yüzey fenomenlerini incelemek için kullanılır. Yüzeyde adsorbe olmuş moleküller ve tuzığa düşmüş örnekler üzerinde çalışmak için uygundur. Ayrıca, büyük lipofilik polar moleküllerin analizinde de faydalıdır (Dass, 2007).

2.4.1.5. Atmosfer Basıncı Kimyasal İyonizasyonu (APCI)

APCI, atmosferik basınçta gaz fazı iyon-molekül reaksiyonları kullanarak iyonizasyon sağlar. Bu yöntemde azot gazı, mobil fazı buharlaştırarak aerosol oluşturur ve ısıtılmış bir bölgeye iletilir. Desolvasyon sonrası iyonizasyon, korona deşarjı ile gerçekleştirilir. Bu teknik, sıvı örneklerin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Byrdwell, 2001; Pramanik ve ark., 2002).

2.4.1.6. İndüktif Olarak Bağlı Plazma (ICP) İyonizasyonu

ICP-MS, analiz edilen moleküllerin iyonizasyonunu plazma ortamında gerçekleştirir. Plazma, bir koni tepe noktasına doğru yönlendirilir ve iyonlar bu ortamda oluşur. ICP-MS, özellikle metal ve metalik bileşiklerin analizi için son derece hassas bir tekniktir (Dass, 2007; Watson ve Sparkman, 2007).

2.4.1.7. Elektrospray İyonizasyonu (ESI)

Bu yöntem, atmosferik basınçta işlev görür ve sıvı mobil fazın bir metal kapiler tüpten bir elektrik alanına doğru püskürtülmesi ile başlar. Elektrik alanı, kapilar tüp ile karşı elektrot arasında bir potansiyel farkı oluşturularak sağlanır. Damlacıklar, yüzeylerinde yük birikimi gerçekleştirirken, buharlaşma sürecinde küçülerek giderek daha küçük yüklü damlacıklar haline gelir. Yük taşımayan solvent molekülleri pompa aracılığıyla uzaklaştırılırken, yüklü iyonlar kütle spektrometrisine yönlendirilir (Bier, 2010; Kebarle ve Verkerk, 2009; Pramanik ve ark., 2002; Whitehouse ve ark., 1985)

2.5. Kütle Spektrometrisi Sistem Parçaları

MS sistemleri, çeşitli bileşenlerden oluşur ve bu bileşenlerin her biri, analitik sürecin bütünlüğü ve doğruluğu için kritik öneme sahiptir. Bu bölümde sistemin en önemli parçaları olan ve henüz değinilmemiş olan analizörler ve dedektörler incelenecektir (Dass, 2007; Faull ve ark., 2008; Hoffmann ve Stroobant, 2013).

2.5.1. Kütle Analizörleri

Kütle spektrometrisi, iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmasını sağlamak amacıyla tasarlanmış bir analiz yöntemi olup, bu işlevi gerçekleştiren temel bileşen kütle analizörleridir. Kütle analizörlerinin çalışma prensibi, iyon kaynaklarında üretilen iyonların, düşük bir vakum ortamında gaz molekülleriyle çarpışmadan hareket etmelerini sağlamaktır. Bu bağlamda, iyonların kinetik enerjileri ve hızları, iyon kaynağındaki hızlandırıcı voltajı (V) ve iyonların yükü (z) ile belirlenmektedir (Dass, 2007; Watson ve Sparkman, 2007).

Manyetik Sektör Kütle Analizörü

Manyetik sektör analizörleri, iyonları, kendileriyle aynı yükteki bir potansiyel ile dışarı iterek, bu iyonları hızlandırmak amacıyla yaklaşık 3-8 kV luk bir elektrik alanından geçirir. İyonlar, dairesel bir manyetik alanda hareket ettiklerinde, m/z oranlarına bağlı olarak farklı yörüngelere sahip olurlar. Büyük iyonlar, manyetik alan tarafından daha az saptırılırlar. Bu analizin temel avantajı, belirli bir manyetik alan gücü altında yalnızca belirli kütlelerin dedektörden geçişine izin vermesidir. Manyetik alanın gücünün değiştirilmesi, geniş bir kütle aralığını kapsayan iyonların tespitini mümkün kılar (Dass, 2007; Watson ve Sparkman, 2007).

Çift Odaklı Kütle Spektrometresi

Çift odaklı kütle spektrometreleri, iyonları m/z değerlerine göre ayırmak için manyetik alan ve enerjiye dayalı elektrik alanı kombinasyonu kullanır. 1970 lerin sonlarına dek, bu analizörler kütle spektrometrisinin ana araçları olarak öne çıkmıştır. Çok küçük m/z farklılıklarına sahip iyonların ayırımı için yüksek hassasiyet sunan bu cihazlar, iyonların elementel bileşimlerinin belirlenmesine olanak tanır (Dass, 2007; Gross, 2006).

Kuadrupol Kütle Analizörü

Kuadrupol kütle analizörleri, manyetik sektör analizörlerine göre daha düşük maliyetli ve duyarlı bir alternatif sunmaktadır. İki dikey elektrik alanı kullanarak, iyonları m/z oranlarına göre ayıran bu analizörler, iyonların geniş bir kinetik enerji aralığında toplanabilme kabiliyeti ile daha yüksek hassasiyet sunmaktadır. Ancak, basit bir kuadrupol kütle spektrometresi, iyonları 0.1 amu dan daha yüksek bir çözünürlükle ayıramazken, manyetik sektör analizörleri 0.0001 amu veya daha fazla hassasiyet sağlayabilmektedir. Bu özellik, bilinmeyen bileşiklerin kesin kütlelerini belirlemek ve elementel bileşimlerini atfetmek açısından kritik bir öneme sahiptir (Dass, 2007; Hoffmann ve Stroobant, 2013).

MALDI-TOF (Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu ile Uçuş Zamanı)

MALDI-TOF, özellikle 200,000 amu dan büyük proteinlerin analizinde etkili bir yöntemdir. Numune, ışık emici bir matris içinde çözülme ve lazer darbesi ile yumuşak iyonizasyon sağlanmaktadır. İyonlar, elektrostatik bir alan ile hızlandırılarak boş alan bölgesine yönlendirilir. İyonların dedektöre ulaşma süreleri ile moleküler ağırlıklarını belirler. Bu yöntem, büyük proteinlerin karakterizasyonu için ideal bir yaklaşımdır. (Bier, 2010; Hoffmann ve Stroobant, 2013; Watson ve Sparkman, 2007).

İyon Tuzaklı Kütle Spektrometresi

Kuadrupol iyon tuzakı, iki uç elektrodu toprak potansiyelinde tutarken, aralarındaki halka elektroda uygulanan RF potansiyeli ile kuadrupol elektrik alanı oluşturur. İyonizasyon genellikle elektron iyonizasyonu ile sağlanmakta ve belirli bir m/z oranına sahip iyonların kararsız yörüngelere yönlendirilmesiyle analiz edilmektedir. Bu yöntem, çeşitli iyonizasyon teknikleri ile geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir (Dass, 2007; Watson ve Sparkman, 2007).

Tandem Kütle Spektrometrisi (MS/MS)

MS/MS, yumuşak iyonizasyon tekniklerinin, özellikle ESI nin, düşük tanısal parçalanma sağladığı durumlarda sıklıkla kullanılmaktadır. İlk kuadropol, molekülün moleküler iyonunu (öncü iyon) seçerken, ikinci kuadropol argon gazı ile doldurulur ve bu gaz, parçalanma işlemini gerçekleştirir. Üçüncü kuadropol ise üretilen parçaları ayırarak analiz eder. Bu yöntem, kromatografik ayırım olmadan da kullanılabilirdiğinden, klinik tarama gibi alanlarda hızlı bir çözüm sunmaktadır (Dass, 2007; Hoffmann ve Stroobant, 2013; Watson ve Sparkman, 2007).

2.5.2. Dedektörler

Kütle analizöründen çıkan iyonlar, dedektöre ulaşarak varlıklarını tespit ettirir. Dedektör, iyonların varlığını belirler ve bu sinyali elektriksel bir formata dönüştürür. En yaygın dedektör türleri şunlardır (Faull ve ark., 2008; Hoffmann ve Stroobant, 2013; Makarov, 2000; Medhe, 2018; Watson ve Sparkman, 2007):

Elektron Çoğaltıcı Dedektörleri (Electron Multiplier, EM)

Elektron çoğaltıcılar, gelen iyonların bir yüzeye çarpması sonucu serbest elektronların üretildiği ve bu elektronların art arda çoğalarak sinyal oluşturduğu dedektörlerdir. Yüksek duyarlılığa sahip olup, düşük yoğunluktaki iyonların tespiti için kullanılır.

Kanal Elektron Çoğaltıcı Dedektörler (Channeltron)

Bu dedektörler iyonların yüzeye etkileşerek serbest elektron üretmesini sağlayan, bir dizi ikincil elektron üreten dedektörlerdir. Yüksek duyarlılık ve geniş dinamik aralıkları ile bilinirler.

Faraday Kapları

Faraday kapları, gelen iyonların elektriksel yüklerini doğrudan ölçer. Bu dedektörler, iyon akışının doğrudan ölçülmesini sağlayarak yüksek doğruluk sunar. Ancak yanıt süreleri daha uzundur.

Uçuş Zaman (TOF) Dedektörleri

TOF dedektörleri, iyonların vakum tüpündeki geçiş sürelerini ölçerek kütle ve yük oranlarına dayalı analiz yapar. Yüksek çözünürlük ve hızlı analiz imkânı sağlar

Çoklu Kanal Dedektörleri (Multi-channel Detectors)

Bu dedektörler, birden fazla iyonun aynı anda tespit edilmesine olanak tanır, bu da karmaşık bileşiklerin eşzamanlı analizini mümkün kılar

İyon Tuzakları (Ion Trap)

İyon tuzakları, iyonları elektriksel ve manyetik alanlarla tuzaklayarak analiz eder. Bu dedektörler, yüksek çözünürlük ve karmaşık biyomoleküllerin analizinde tercih edilir.

Fotoçoğaltıcı Tüpler (PMT)

PMT'ler, iyonlardan yayılan ışığı fotonlara dönüştürerek iyonların tespit edilmesini sağlar. Genellikle UV ve görünür ışık analizlerinde kullanılır.

Dijital Dedektörler

Dijital dedektörler, analog sinyalleri dijitale dönüştürerek yüksek hassasiyetli analizler yapılmasını sağlar. Bu dedektörler, hızlı veri toplama ve işleme yetenekleri ile tercih edilir.

2.6. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntemler, sağlık bilimleri alanlarında ilaç analizleri, biyolojik numunelerin incelenmesi, biyoeşdeğerlik, biyoyararlanım çalışmaları, farmakokinetik veri ve parametrelerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, etken maddelerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde, metabolitlerin analizlerinde sıkça başvurulmuş ve bu uygulamalarda kritik öneme sahip süreçlerdir. Validasyon ise bahsi geçen analitik süreçlerin, uğrunda kullanıldığı amaca uygunluk derecesini ortaya koyar. Bu amaçla bazı parametrelerin kullanılması, yöntemin kimi karakteristiklerinin tespit edilmesi gereklidir.

Bu parametreler, analiz edilecek madde için geliştirilen yöntemlerin seçilen aralıktaki uygunluk, doğruluk, duyarlılık, tekrar edilebilirlik ve sağlamlık gibi niteliklerini belirtir.

Araştırmacılar, yöntemlerinin validasyonu için tüm donanım ve yazılımlarını, yukarıda bahsi geçen parametreler temelinde yöntemlerini, FDA, ICH ve/veya USP tarafından tanımlanmış sistem uygunluk testlerini gerçekleştirmelidirler.

2.6.1. Tipik Validasyon Parametreleri

2.6.1.1. Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntemin ölçülen sonuçlarının, gerçek veya kabul edilen referans değerlere ne kadar yakın olduğunu anlatır. Başka bir deyişle, doğruluk, ölçümün gerçek değere ne kadar yakın olduğunu ve sistematik hataların ne kadar minimize edildiğini gösterir. Yüksek doğruluk, bir analitik yöntemin, bilinen veya kabul edilen analit konsantrasyonlarına yakın sonuçlar verdiğini ifade eder. Bu, özellikle farmasötik, biyolojik ve çevresel analizlerde büyük önem taşır, çünkü doğru sonuçlar, doğru kararların alınmasına olanak tanır.

Doğruluk, genellikle sistematik hata ve rastlantısal hata ile ilişkilendirilir. Sistematik hata, ölçümlerin her zaman belirli bir yönde sapmasına yol açar; bu hata, deneysel tasarımda, cihaz kalibrasyonunda ya da numune hazırlama aşamalarında meydana gelebilir. Sistematik hataların varlığı, ölçüm sonuçlarının gerçek değerden sürekli olarak sapmasına neden olur. Bu nedenle, doğruluğun yüksek olması, sistematik hataların etkisinin en aza indirildiğini gösterir.

Doğruluğun rakamsal tespiti, analitin analiz sonucu hangi oranda geri alınabileceğini gösterir. Teorik olarak buna % geri kazanım denir. Kullanılan cihazlardan yapılan ölçümlere dayalı olarak hesaplanır. Bu doğrultuda 3 farklı derişimde çalışma çözeltileri hazırlanır ve her bir derişim için analiz en az 5 ‘er kez tekrarlanır. Bu analizlerin çoğunun ortalama değerden sapma oranları maksimum % 15 olabilir; yalnızca

tain alt sınırında bir çözelti için %20 kabul edilebilir (Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020; Riley ve Rosanske, 1996).

2.6.1.2. Kesinlik

Aynı numuneye, aynı yöntem kullanarak yapılan aynı işlemlerin sonucunda elde edilen verilerin birbirlerine olan yakınlıklarıdır. Aslında kısaca tekrarlanabilirlik diyebiliriz. Standart sapma, bağıl standart sapma, varyans, varyans katsayısı olarak ifade edilebilir.

Aynı laboratuvarı, aynı cihazlar, aynı kişiler ve aynı yöntemle kısa zamanda gerçekleştirilen testler tekrarlanabilirlik (repeatability), aynı laboratuvarı farklı günlerde farklı kişilerce farklı cihazlar kullanılarak gerçekleştirilen testler orta kesinlik (intermediate precision), farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilen testlerdeki tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) kavramlarıyla valide edilmelidir. (Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020; USP 24, 2000)

Doğruluk, kesinlik (precision) parametresinden farklıdır. Kesinlik, ölçümlerin birbirine ne kadar yakın olduğunu tanımlar; bir başka deyişle, bir analitik yöntemin aynı örnek üzerinde tekrarlandığında ne kadar tutarlı sonuçlar verdiğini gösterir. Ancak, bir yöntem yüksek kesinliğe sahip olsa da, doğruluğu düşük olabilir. Yani, ölçümler birbirine yakın olabilir ancak gerçek değere uzak olabilir. Bu nedenle, hem doğruluk hem de kesinlik bir analitik yöntem için birlikte değerlendirilmesi gereken önemli parametrelerdir.

2.6.1.3. Seçicilik

Seçicilik (Selectivity), bir analitik yöntemin, hedef analitin dışındaki bileşenlere karşı gösterdiği duyarsızlık veya tepkisizlik derecesini tanımlar. Yani, seçicilik, bir analitik yöntemin sadece belirli bir analiti tespit etme kapasitesini ve diğer bileşenlerden (örneğin, matriks bileşenleri, interferanlar veya kirlilikler) ne kadar etkilenmeden doğru

sonuçlar verebileceğini gösterir. Yüksek seçiciliğe sahip bir yöntem, hedef analitin sinyalini, diğer bileşenlerin sinyallerinden ayırt etme yeteneğine sahiptir.

Seçicilik, özellikle karmaşık numunelerde veya çok bileşenli sistemlerde önemli bir parametredir. Örneğin, biyolojik ve farmasötik örneklerde, numune matrisindeki diğer bileşenler hedef analitin tespiti üzerinde etki yapabilir. Yüksek seçiciliğe sahip bir yöntem, bu girişimlerden (interferanslardan) etkilenmeden sadece istenen analitin ölçümünü yapabilir, böylece yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar elde edilme olasılığını en aza indirir.

Bir analitik yöntemin seçiciliği, uygulanan tekniklerin ve kullanılan reaktiflerin türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Seçiciliği artıran faktörler arasında, kullanılan dedektörlerin çözünürlüğü, kromatografik ayırma yeteneği ve analiz sırasında seçilen koşullar yer alır. Ayrıca, rnek hazırlama aşamaları da seçiciliği artırmada önemli bir rol oynar. Örneğin, numune içeriğindeki interferanslar uzaklaştırıldığında, hedef analitin daha doğru bir şekilde ölçülmesi mümkün olur (Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020; Riley ve Rosanske, 1996).

2.6.1.4. Teşhis Sınırı/Tespit Limiti (LOD)

LOD, analitin nicel olarak tayin edilemediği, ancak nitel olarak varlığının tespit edilebildiği en düşük derişimidir. Yani, LOD, bir analitik yöntemin, sistematik hata ve rastlantısal gürültü (yanıltıcı sinyaller) etkisi altında, analit miktarını doğru bir şekilde ayırt edebileceği en düşük seviyeyi belirtir. Bu limit, ölçülen sinyalin, örnekteki analit ile gürültü arasında yeterli bir fark olduğu noktada tanımlanır.

Tespit limiti, genellikle sinyal-gürültü oranı (signal-to-noise ratio, S/N) ile ilişkilidir. Bu oran, analitin tespit edilebilmesi için gerekli olan sinyalin, örnekteki doğal veya rastlantısal gürültüye (yanlış sinyallere) oranını ifade eder. Yüksek bir sinyal-gürültü oranı, düşük konsantrasyonlardaki analitlerin bile güvenilir bir şekilde tespit

edilebileceği anlamına gelir. Tespit limiti genellikle 3:1 sinyal/gürültü oranı ile tanımlanır; yani, analit sinyali, arka plan gürültüsünden üç kat daha büyük olduğunda, analit güvenilir bir şekilde tespit edilebilir. Düşük bir LOD değeri, analitin çok düşük seviyelerdeki konsantrasyonlarını bile tespit etme yeteneğini gösterir. Bu, özellikle

çevresel analizlerde, biyoteknolojik araştırmalarda ve farmasötik testlerde kritik önem taşır. Örneğin, çevresel analizlerde kirleticilerin iz seviyelerindeki varlıkları, biyolojik örneklerde ise düşük seviyelerdeki biyomoleküllerin tespiti, düşük LOD değerlerine sahip yöntemlerle mümkün olur (ICH, 2005; Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020).

2.6.1.5. Tayin Alt Sınırı/Kantitatif Tespit Limiti (LOQ)

LOQ, bir analitik yöntemle hedef analitin konsantrasyonunun doğru ve güvenilir bir şekilde belirlenebileceği en düşük seviyeyi tanımlar. LOQ, yalnızca analitin varlığının tespit edilebildiği LOD ile karıştırılmamalıdır. LOD, bir analitin yalnızca varlığını algılayabilecek minimum seviyeyi ifade ederken, LOQ, bu analitin güvenilir bir şekilde nicel olarak ölçülebileceği en düşük konsantrasyonu belirtir.

LOQ, LOD gibi sinyal-gürültü oranı (signal-to-noise ratio, S/N) kullanılarak belirlenir, ancak LOD de 3:1 olarak kabul edilen sinyal-gürültü oranı LOQ için genellikle 10:1'dir. Bu, ölçülen sinyalin, sistematik ve rastlantısal hatalar sonucu oluşan gürültüden en az on kat daha büyük olduğu durumlarda, analitin güvenilir bir şekilde kantitatif olarak ölçülmesi mümkündür anlamına gelmektedir (ICH, 2005; Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020).

2.6.1.6. Doğrusallık

Doğrusallık, bir analitik yöntemin, analit konsantrasyonundaki değişikliklere orantılı olarak yanıt verme düzeyini belirten bir parametredir. Yani, ölçülen sinyalin, analit konsantrasyonuyla doğrusal bir ilişkisi olması beklenir. Doğrusallık, bir yöntemin geniş bir konsantrasyon aralığında tutarlı ve doğru sonuçlar verebilmesi için önemlidir ve

genellikle kalibrasyon doğrusu kullanılarak değerlendirilir. Kalibrasyon doğrusu, farklı analit konsantrasyonları için elde edilen sinyal verilerinin grafiksel olarak çizildiği ve bu verilerin doğrusal bir ilişkiyi yansıttığı bir yöntemdir (Skoog ve ark., 2013).

Bir analitik yöntem doğrusal olarak kabul edilir, eğer kalibrasyon doğrusu üzerindeki veri noktaları bir doğru üzerinde yer alıyorsa. Bu doğru, aşağıdaki şekilde matematiksel olarak ifade edilir:

$$Y=mX+n$$

Burada:

Y, ölçülen sinyal (örneğin, absorbans veya iyon yoğunluğu),

m, eğim (sinyalin analit konsantrasyonu ile ne kadar değiştiğini gösteren katsayı),

X, analit konsantrasyonu,

n, y-kesiti (genellikle sıfır olmalıdır, ancak bazı durumlarda düşük bir sabit değeri olabilir) temsil eder.

Doğrusallığın değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir istatistiksel parametre, korelasyon katsayısı (R)'dir. Yüksek bir R değeri (genellikle 0.99 ve üzeri), analit konsantrasyonu ile sinyal arasındaki güçlü doğrusal ilişkiyi gösterir (Miller & Miller, 2010). Korelasyon katsayısı, kalibrasyon doğrusu üzerindeki veri noktalarının doğruya ne kadar yakın olduğunu belirler. Eğer veri noktaları doğrusal bir şekilde düzenlenmişse, R değeri yüksek olur ve bu, yöntemin yüksek doğrusal ilişkiye sahip olduğunu gösterir.

Doğrusallık ayrıca hata analizi ile de değerlendirilir. Bu, kalibrasyon doğrusunun üzerindeki sapmaların ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Sapmalar, genellikle standart sapma veya kareler toplamı (sum of squares) gibi istatistiksel ölçütlerle hesaplanır.

Kalibrasyon doğrusundan sapmaların minimum olması, yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini artırır.

Doğrusallık, ayrıca analitik cihazların kalibrasyonu ve sonuçların güvenilirliği için kritik bir parametre olarak kabul edilir. Yüksek doğrusal ilişki, daha geniş bir kalibrasyon aralığının kullanılmasına imkan verir ve bu da daha hassas ölçümler yapılmasını sağlar. Bu özellik, özellikle izleme, çevresel analiz ve farmasötik endüstrilerde yüksek doğruluk gerektiren durumlarda önemlidir (Miller, J. N ve Miller, J. C., 1998; Raposo ve Ibello-Bianco, 2020; Riley ve Rosanske, 1996; Skoog ve ark., 2007).

2.6.1.7. Duyarlılık

Bir analitik yöntemin hedef analitin konsantrasyonundaki küçük değişikliklere ne kadar hassas tepki verdiğini tanımlayan önemli bir parametredir. Başka bir deyişle, duyarlılık bir analitik yöntemin, analitin düşük seviyelerdeki konsantrasyonlarını ne kadar doğru bir şekilde tespit edebildiğini gösterir. Bu, yöntemin hedef analiti tespit etme kapasitesinin bir göstergesidir ve genellikle, ölçülen sinyalin analitin konsantrasyonundaki değişikliklere duyarlılığını ifade eder.

Duyarlılık, genellikle LOD ile doğrudan ilişkilidir. LOD, analitin bir örnekte tespit edilebileceği en düşük konsantrasyonu ifade eder. Yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem, daha düşük LOD değerini mümkün kılar, yani çok düşük miktarda analit bile doğru şekilde tespit edilebilir. Bununla birlikte, duyarlılık, genellikle yanıt/birim konsantrasyon değişim oranı şeklinde ölçülür. Yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemde, analit miktarındaki küçük değişiklikler, sinyali belirgin şekilde değiştirir ve bu da doğru ölçüm yapılmasını sağlar.

Duyarlılıkla ilgili önemli bir diğer faktör, sinyal-gürültü oranı (S/N)'dir. Duyarlılık, sinyalin arka plandaki gürültüye karşı olan oranıyla doğrudan ilişkilidir. Yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem, düşük gürültü seviyesi ve yüksek sinyal üretir, bu da daha güvenilir ve hassas ölçümler elde edilmesini sağlar. Bu, özellikle izleme ve analiz

aşamalarında önemli olup, analitlerin çok düşük seviyelerde bile tespit edilmesini mümkün kılar.

Duyarlılık ayrıca, numune hazırlama teknikleri, dedektör kalibrasyonu ve uygun analiz yöntemlerinin seçilmesi gibi stratejilerle artırılabilir. Analitik cihazlar, örneklerden daha fazla sinyal toplamak için optimize edilebilir, böylece daha düşük konsantrasyonlarda bile analitler tespit edilebilir. Duyarlılık, analitik validasyon süreçlerinde de kritik bir parametredir, çünkü bir yöntem ne kadar hassas çalışıyorsa, analitik sonuçlar o kadar güvenilir olur (Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020).

2.6.1.8. Sağlamlık

Sağlamlık, bir analitik yöntem veya cihazın, çevresel koşullar veya uygulama parametrelerindeki küçük değişimlere karşı gösterdiği dayanıklılığı ifade eder. Başka bir deyişle, bir yöntemin sağlamlığı, sistemdeki dışsal faktörler — örneğin sıcaklık, pH, çözünürlük, reaktif konsantrasyonu gibi — gibi parametrelerdeki küçük değişimlere karşı performansını kaybetmeden güvenilir ve geçerli sonuçlar verebilme kapasitesidir.

Sağlamlık testi, genellikle bir analitik yöntem üzerinde yapılan parametre değişikliklerinin metodun sonuçları üzerindeki etkisinin incelenmesi ile gerçekleştirilir. Bu test sırasında, numune işlemesi, reaktif konsantrasyonları, sıcaklık, pH gibi koşullar değiştirilir ve elde edilen sonuçların doğruluğu ve kesinliği değerlendirilir. Yüksek sağlamlık gösteren bir yöntem, bu tür değişkenler karşısında sonuçlarındaki sapmaları minimumda tutarak güvenilir ölçümler sağlar.

Sağlamlık testleri, doğruluk ve kesinlik parametrelerinin güvenilirliğini artıran ve sistematik hataları minimize eden kritik bir aşamadır. Bir yöntem ne kadar sağlam, laboratuvar dışındaki çeşitli koşullarda da aynı güvenilir sonuçları verme olasılığı o kadar yüksektir (Raposo ve Ibelli-Bianco, 2020).

2.6.1.9. Stabilite

Stabilite, bir analitik yöntemin zaman içindeki performansının ne kadar tutarlı ve değişmez olduğunu ifade eden bir kavramdır; yani analitik bir metodun, belirli bir süre boyunca, çevresel koşullar ve sistematik faktörlerdeki değişimlere rağmen sonuçlarını ne kadar doğru ve güvenilir bir şekilde verebildiğini belirler. Analitik stabilite, özellikle uzun süreli analizlerde, metodun doğruluğunu ve kesinliğini koruyabilme yeteneğini yansıtır.

Stabilite, genellikle metodun zamanla değişen performansı üzerine yapılan testlerle değerlendirilir. Bu testlerde, analitik yöntemin aynı koşullar altında, uzun bir süre boyunca tutarlı sonuçlar verip vermediği kontrol edilir. Örneğin, bir cihazın veya reaktiflerin zaman içinde bozunup bozunmadığı, numune çözeltisinin veya kalibrasyon standartlarının stabil olup olmadığı test edilir. Analitik süreçlerin güvenilirliğini ve metodun etkinliğini belirleyen kritik bir özelliktir (Agilent, 2024; Raposo ve Ibello-Bianco, 2020; Riley ve Rosanske, 1996).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasallar ve Diğer Sarf Malzemeleri

Saf Lumateperon : Sigma-Aldrich (Merck k KGaA, Darmstadt. Almanya);

Caplyta : Amerikada bir serbest eczaneden

Haloperidol : Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.
(TCI EUROPE N.V. Zwijndrecht, Belçika);

Dimetilsülfoksit : Fischer Scientific (İngiltere)

Amonyum Asetat : Sigma-Aldrich (Merck k KGaA, Darmstadt. Almanya)

Metanol : Sigma-Aldrich (Merck k KGaA, Darmstadt. Almanya)

Formik asit : (Merck, Almanya)

Milli Q Saf Su : Merck Millipore Simplicity-UV cihazı ile elde edildi

Sodyum Hidroksit : Sigma-Aldrich (Merck k KGaA, Darmstadt. Almanya)

Plazma : Kızılay- Erzurum Başkanlığı

Deney sürecinde kullanılmış olan diğer tüm cam ve plastik deney gereçleri Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'ne aittir.

3.2. Cihazlar

1.UPLC Pompası : (Agilent Quat. Pump Model: G4204A)

2.MS Dedektör: (Agilent 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer)

3.Otomatik Örnekleyici: (HiP Sampler Model: G4226A)

4.UPLC Kolonu : (InertSustain Phenyl kolon (3.9 x 150 mm, 4-Mikron
(GL Sciences, Japan)

5. UPLC Cihazı : (Agilent 1200)

6.Karıştırıcı : (Vortex, IKA)

7. Hassas Terazî : (Shimadzu AUX-320)

8. Santrifüj : (Hettich, RPM x 100)
9. pH metre : (Mettler Seven Easy)
10. İyon Kaynağı : (ESI+Agilent Jet Stream)

3.3. Yöntemler

3.3.1. UPLC-MS/MS Yöntem Şartları

Uygulanan yöntemde sabit faz olarak InertSustain Phenyl Kolon (3.9 x 150 mm, 4- μ) ve hareketli faz olarak 5 mM Amonyum Asetat içeren Su (A) ve %1 Formik Asit içeren Metanol (B) kullanılmıştır. Bu hareketli fazla 11 dk lık analiz süresince gradient elüsyon uygulanmıştır. Buna göre analizin ilk 5 dk lık bölümünde % 50-50 (A-B), 5-6.1 dk arasında % 10-90 ve 6.1-11 dk arasında %50-50' lik karışım oranları kullanılmıştır. Akış hızı 0.5 mL/dk, enjeksiyon hacmi 5 μ L ve kolon sıcaklığı 40 ° C olarak sabitlenmiştir. İyonizasyon pozitif elektro spray iyonizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kurutma gazı olarak azot, 10 L/dk hızıyla, 350 °C sıcaklıkta ve 45 psi basınç ile kullanılmıştır. Parçalanma voltajı 90 V, kapiler voltaj 2000 V, lumateperon için çarpışma voltajı 26 ve 50 V ve haloperidol için çarpışma voltajı 16 ve 22 V olarak dizayn edilmiştir.

3.4. Lumateperonun Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

1. 100 μ l plazma örneği alındı. Üzerine 1000 ng/ml derişiminde 25 μ l IS (Haloperidol çözeltisi) eklendi. 30 sn vortexlendi.
2. 100 ng/ml derişimindeki lumateperon stok çözeltisinden (gerektiğinde hacmi artırarak uygulama kolaylığı olması açısından seyreltmeler yapılarak) uygun miktarlar eklendi. 30 sn vortexlendi.
3. 2 mM derişiminde 25 μ l NaOH çözeltisi eklendi. 30 sn vortexlendi
4. Son hacim 1000 μ l olacak biçimde MeOH eklendi. 30 sn vortexlendi
5. 10000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Sıvı faz alınıp 0.45 μ m' lik filtreden süzüldü.

6. Bu sıvıdan (Süpernatant) 5 µl UPLC-MS/MS sistemine enjekte edildi.

Tablo 3.1. Plazma analizleri için lumateperon stok çözeltileri ile hazırlanan standartlar ve QC çözeltileri

Konsantrasyon (ng/mL)	Lumateperon (µL* ng/mL)	Plazma (µL)	IS (µL)	2mM NaOH (µL)	MeOH (µL)
0.5	50 (10)	100	25	25	800
1 (LQC)	100 (10)	100	25	25	750
5	50 (100)	100	25	25	800
10	100 (100)	100	25	25	750
25 (MQC)	25 (1000)	100	25	25	825
50	50 (1000)	100	25	25	800
75	75(1000)	100	25	25	775
100 (HQC)	100 (1000)	100	25	25	750
150	150 (1000)	100	25	25	700

3.5. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

1. 42 mg lumateperona eşdeğer 60 mg lumateperon tosilat içeren 10 adet kapsül içeriği tartıldı.
2. 1 kapsülde ortalama olarak 0.2925 gr içerik olduğu tespit edildi ve hassas terazi yardımıyla bu miktar tartıldı ve dimetil sülfoksit (DMSO) de çözülerek 4.2 mg/mL' lik lumateperon stok çözeltisi elde edildi.
3. Bu stoktan MeOH ile seyreltmeler yapılarak 1, 6, 10 ve 100 ng/mL lik ilaç çözeltileri elde edildi.
4. 6ng/mL' lik çözelti standart ekleme yöntemi ile kalite kontrol çözeltilerine eklendi ve % geri kazanım ölçümleri yapıldı.

3.6. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

UPLC-MS/MS ile yapılan çalışmalarda, 0.8 mg saf lumateperon, 0.8 mL DMSO' da çözülerek son derişimi 1 mg/mL olan stok lumateperon çözeltisi elde edildi. Ayrıca 1 mg haloperidol (IS) tartılarak 1 mL DMSO' da çözüldü ve 1 mg/mL derişiminde stok IS çözeltisi elde edildi. Herbir standart çözeltiye 25 µL IS çözeltisi eklenerek 25µg/mL IS

son derişimine ulaşıldı. Çözeltilere uygun miktarlarda MeOH eklenerek seyreltmeler yapıldı ve 1mL son hacim elde edildi ve sisteme 5'er µL'lik hacimlerde enjekte edilerek kromatogramları alındı.

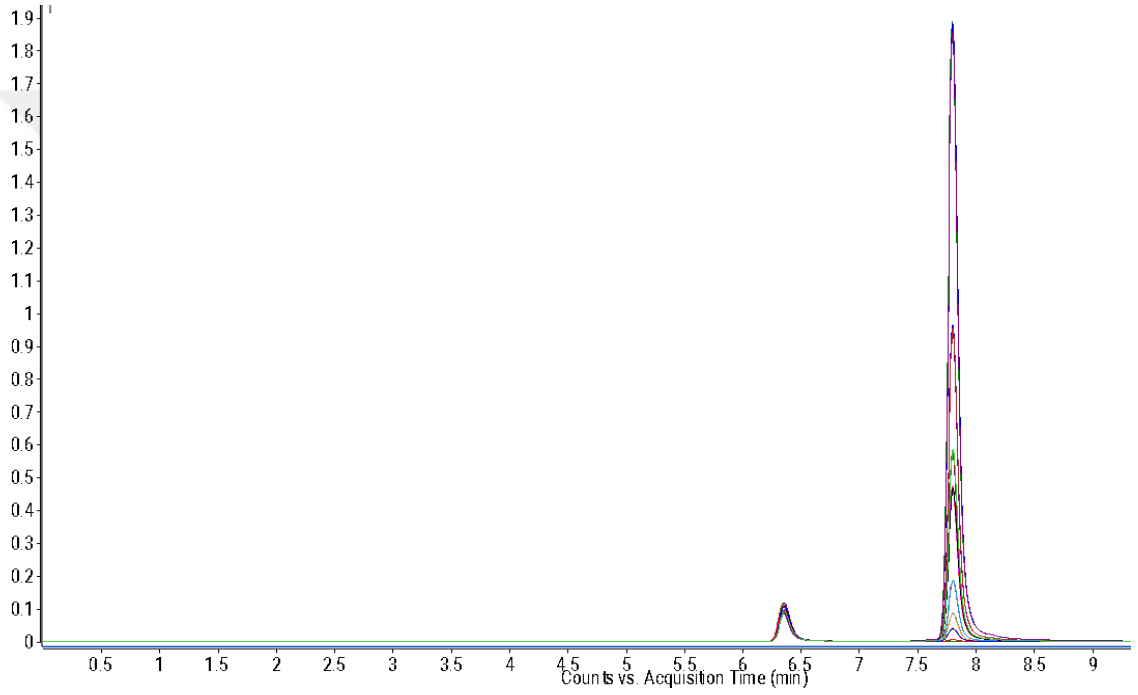
Tablo 3.2. Farmasötik preparat analizleri için lumateperon stok çözeltisinden elde edilen standart ve QC özeltileri

Son Konsantrasyon (ng/mL)	Lumateperon (µL* ng/mL)	IS (µL)	MeOH (µL)
0.25	25 (10)	25	950
0.5 (LQC)	50 (10)	25	925
1	100 (10)	25	875
5	50 (100)	25	925
10	100 (100)	25	875
25	25(1000)	25	950
40 (MQC)	40(1000)	25	935
50	50 (1000)	25	925
75	75 (1000)	25	900
100	100 (1000)	25	875
150(HQC)	150 (1000)	25	825
200	200 (1000)	25	775

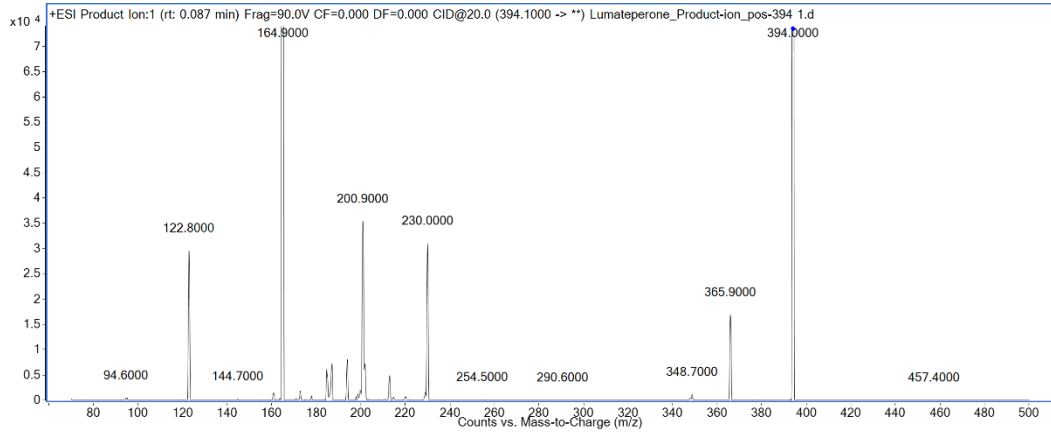
4. BULGULAR

4.1. UPLC-MS/MS Farmasötik Preparat Çalışması

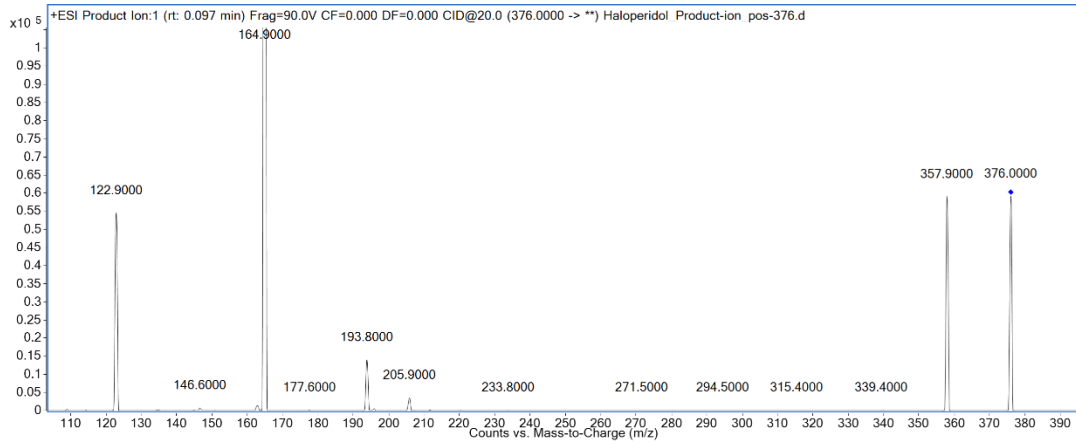
Aşağıda tüm derişimlerdeki standart çözeltilerin sisteme uygulanmaları ile elde edilen, lumateperon ve IS' a ait kromatogram ve lumateperon ile IS' a ait MS spektrumları verilmiştir. Buna göre 11 dakikalık analizler sonucu ölçülen retansiyon zamanları lumateperon ve IS için sırasıyla 7.8 ve 6.35 dk' dır. MS spektrumlarında kütle/yük geçişleri sırasıyla 394.1→122.9 ve 376→164.9 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1. Hazırlanan tüm lumateperon standart çözeltilerine ait kromatogram



Şekil 4.2. Lumateperonun kütle spektrumu



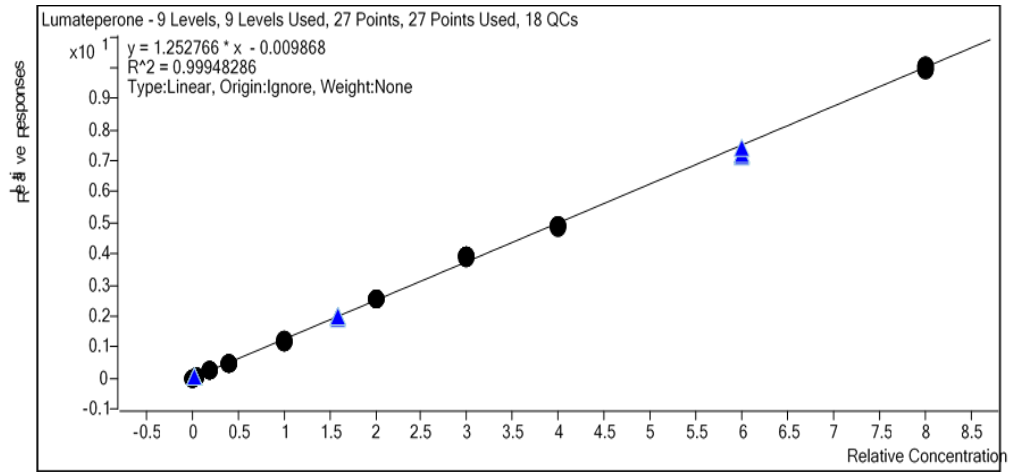
Şekil 4.3. Haloperidolun kütle spektrumu

4.1.1. Validasyon Testleri

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

25 ng/mL konsantrasyonda haloperidol ihtiva eden 0.25-200 ng/mL konsantrasyon bandında toplamda 9 farklı derişim değerine sahip standart lumateperon çözeltileri sisteme uygulandı, derişime karşı pik alanları grafiğe yansıtılarak kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Kalibrasyon eğrisi verilerine bakıldığında lineer regresyon denkleminin $y=1.252766x-0.009868$ ve korelasyon katsayısının (R) 0.9997 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Lumateperon standart çözeltilerinin UPLC-MS sistemine uygulanması ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

Miktar Tayini (LOQ) ve Gözlenebilme Alt Sınırları (LOD)

ICH kılavuzlarının öngördüğü yöntemlerle, UPLC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri tayin edildi. Sinyal ile gürültü arasındaki (S/G) oranı 3 için LOD ve 10 için de LOQ atamaları yapıldı (ICH Conference, 2005). Bu şekilde LOQ değeri 0.25 ng/mL ölçüldü. LOD değerinin tespiti için ise LOQ değerinden daha düşük derişimlerde çözeltiler hazırlandı ve analiz edildi. Bu çözeltilerle gerçekleştirilen denemelerde ilk olarak 0.2 ng/mL lik çözelti ile lumateperon tespiti yapılabilmıştır (LOD).

Doğruluk ve Kesinlik

Aynı günde ve farklı günlerde gerçekleştirilen ölçümlerin ardından, bu ölçümlerin mukayesesi ile UPLC-MS/MS yöntemine ait doğruluk ve kesinlik verileri elde edildi. 0.5, 40 ve 150 ng/mL derişiminde hazırlanmış olan kalite kontrol çözeltileri, aynı laboratuvar şartlarında, aynı yöntem kullanılarak, aynı günde 6 defa ve farklı 6 günde 6'şar kez analiz edildi. Buradan elde edilen sonuçların ortalama, bağıl hata, bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri tespit edilerek sonuçlara ulaşıldı. Bu sonuçlar ışığında % bağıl standart sapma ($\frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ölçülen Değer}} * 100$) ile kesinlik; % bağıl hata

$$\left(\frac{\text{Ölçülen değer} - \text{Eklenen Değer}}{\text{Eklenen Değer}} * 100 \right) \text{ ile doğruluk değerleri ifade edildi.}$$

Tablo 4.1. Yönteme ait kesinlik ve doğruluk değerleri

İlave edilen (ng/mL)	Gün içi			Günler arası		
	Ölçülen±SS (ng/ mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik %BSS	Ölçülen±SS (ng / mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
0.5	0.5597±0,0323	11.93	5.77	0.5514 ± 0.041	10.28	7.435
40	39,415±0,17739	-1.46	0.45	39.201 ± 0.741	-1.998	1.89
150	144.29 ± 1,75233	-3.80	1.21	146.98 ± 1.971	-4.013	1.341

Analitik Geri Kazanım

Standart ekleme ile UPLC-MS/MS yönteminde lumateperonun analitik geri kazanım testleri yapıldı. Bu, bilinen miktarlarda lumateperonun kalite kontrol çözeltilerine (QC) eklenmesini içermektedir; bu çözeltiler 6 ng/mL konsantrasyona sahip ilaç çözeltilisine ilave edildiler.

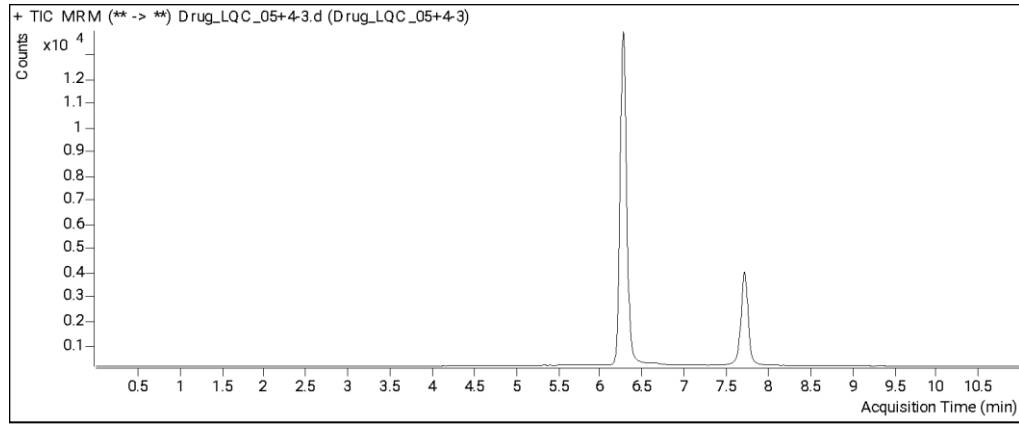
Lumateperonun 6 ng/mL derişimindeki çözeltisi daha önce izah edilen biçimde hazırlandı. Bu çözeltiye 25 ng/mL derişiminde IS çözeltisi eklendi ve sisteme enjekte edilerek kromatogramlar elde edildi, pik alanları tespit edildi. Kapsül içeriği çözeltilerine 150, 0.5, 40 ng/ mL derişimindeki QC çözeltileri eklendikten sonra çözeltiler sisteme enjekte edilerek kromatogramları alındı, pik alanları hesap edildi. Bu son çözeltiler 3'er kopya olarak 3'er kez analiz edildiler. Aşağıdaki tabloda detaylandırılan bulgulara da görülebileceği üzere, ortalama geri kazanım oranı % 100.550 olarak ölçülmüştür. Metodun alt limit tespiti (LOQ) 0.25 ng/mL olarak belirlenmiştir (10 S/G oranı ve % 20'den düşük BSS gösteren kalibrasyon eğrisine göre).

$$\text{Analitik geri kazanım} = \frac{(\text{toplamlar çözeltide bulunan} - \text{ilaç çözeltisinin bulunan})}{\text{eklenen standart çözeltisi}} \times 100$$

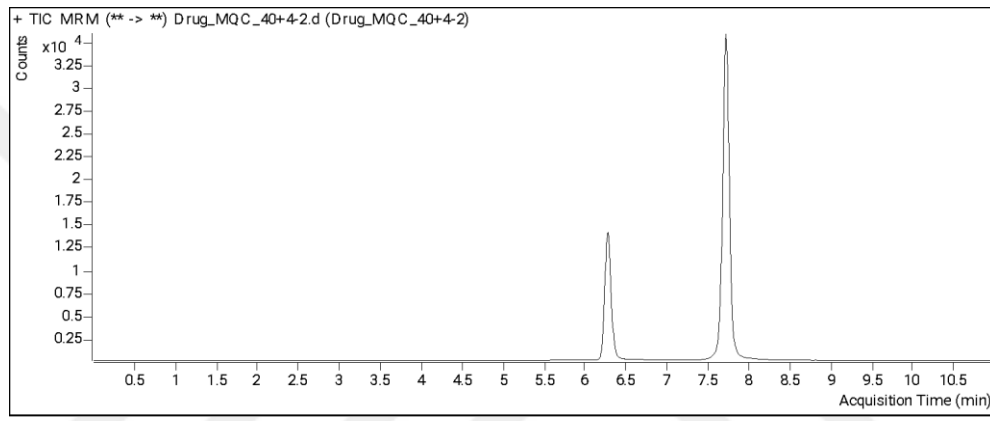
formülü kullanarak hesaplamalar yapıldı ve detaylı sonuçlar ve ölçümlere ait kromatogramlar aşağıda gösterildi.

Tablo 4.2. Yöntemin analitik geri kazanım ölçümleri (Farmasötik preparatlarda)

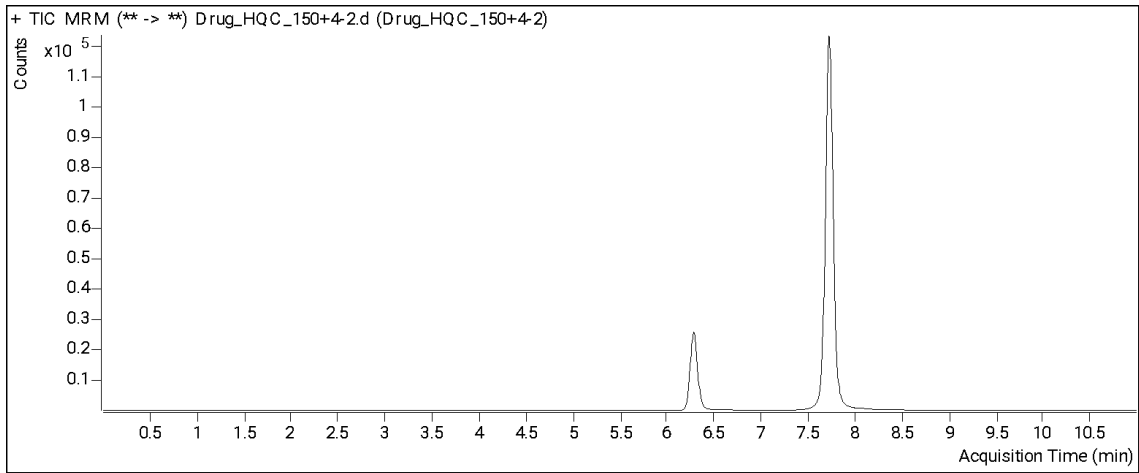
Konsantrasyon (6ng/mL+ QC)	1.sonuç	2.sonuç	3.sonuç	(SS)	% GK
6.5 ng/ml	6.596	6.554	6.597	0.0245	101.266
46 ng/ml	46.566	46.203	46.101	0.2409	100.630
156 ng/ml	155.472	155.265	154.251	0.6534	99.356



Şekil 4.5. 6 ng/mL ilaç çözeltisi ile LQC kromatogramı



Şekil 4.6. 6 ng/ mL ilaç çözeltisi ile MQC kromatogramı



Şekil 4.7. 6 ng/ mL ilaç çözeltisi ile HQC kromatogramı

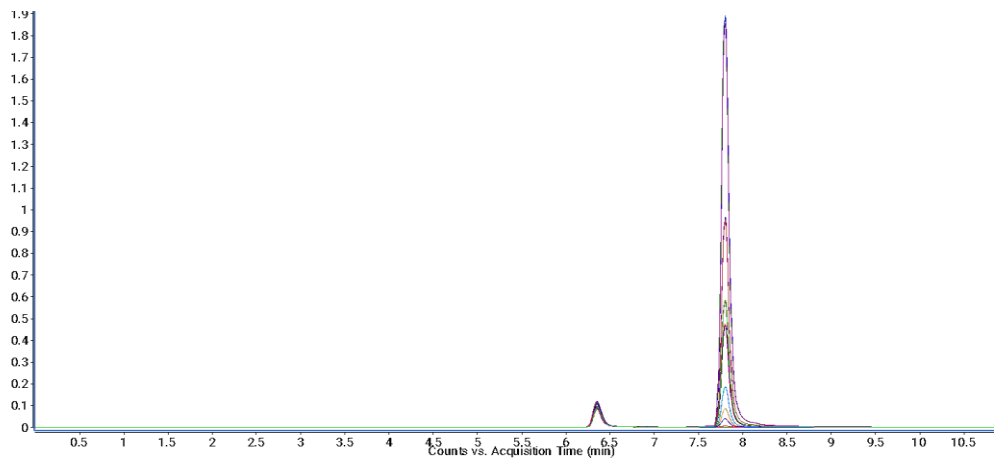
4.1.2. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

4.2 ng/mL lumateperon çözeltisi daha önce belirtilen biçimde IS içerecek biçimde hazırlanmış, geliştirilen UPLC-MS/MS yöntemi kullanılarak üç kopya halinde analiz edilmiştir. Sonuçlar, Caplyta® kapsül formülasyonundaki ortalama lumateperon içeriğinin 4.172 ± 0.047 ng/mL olduğunu göstermiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım oranı %99.33 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen UPLC-MS/MS yönteminin farmasötik formülasyonlarda lumateperonun miktar tayini (kantifikasyonu) için son derece etkili olduğunu doğrulamıştır.

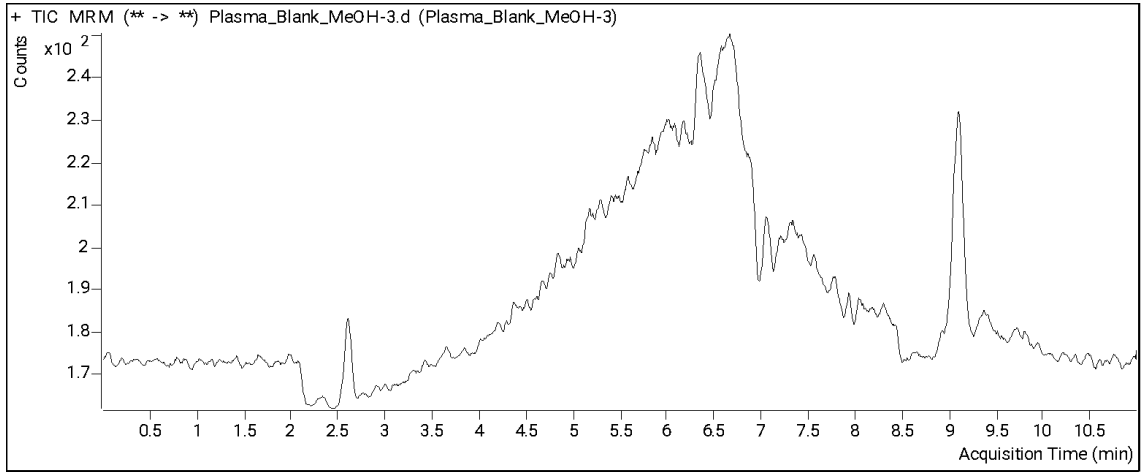
4.2. UPLC-MS/MS Plazma Çalışması

4.2.1. Plazma Çözeltilerinin Hazırlanması

Kızılay Erzurum Kan Merkezi'nden temin edilen boş plazmaların 100 µL' sine 0.5, 1 (LQC), 5, 10, 25 (MQC), 50, 75, 100 (HQC) ve 150 ng/mL derişimlerinde lumateperon çözeltileri ve 1000 ng/mL derişimindeki haloperidol (IS) çözeltilisinden son derişim 25 ng/mL olacak biçimde 25 µL eklenmiştir. Daha önce izah edildiği biçimde ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve UPLC-MS/MS sistemine her ölçüm için 5'er µL enjekte edilmek suretiyle kromatogramlar elde edilmiştir. Aynı yöntemle boş plazma da ekstrakte edilerek kromatogramı alınmıştır (Şekil 4.9.)



Şekil 4.8. 25 ng/ mL haloperidol (IS) ihtiva eden lumateperonun plazmadaki tüm çözeltilerinin UPLC-MS / MS kromatogramı



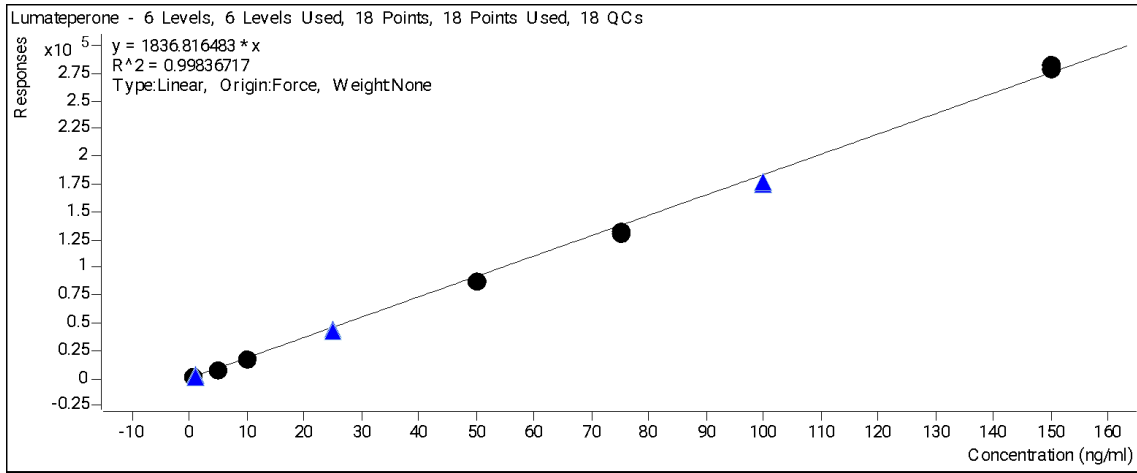
Şekil 4.9. İlaç içermeyen plazmanın UPLC-MS/MS kromatogramı

4.1.3. Validasyon Testleri

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusal Aralık

25 ng/ mL derişimde internal standart çözeltisi ve 0.5-150 ng/ mL bandında birbirinden farklı derişimlere sahip lumateperon standart çözeltileri boş plazma içine eklenmiş, karıştırılmış ve daha önce izah edilen biçimde plazmadan ekstrakte edilerek UPLC-MS/MS sistemine enjekte edilmişlerdir. Elde edilen kromatogramlar üzerinden pik alanları tespit edilmiştir. Lumateperonun derişimlerine (QC çözeltileri hariç) karşı pik alanlarının grafiğe yansıtılması ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

0.5-150 ng/mL çalışma aralığında lineer regresyon denklemi $y=1836.816483x$ ve korelasyon katsayısı (R) 0.9992 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. UPLC-MS/MS yönteminin lumateperonun plazma çözeltilerine uygulanmasıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi

Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Alt Sınırı (LOD)

ICH klavuzlarının (ICH, 2005) öngördüğü yöntemlerle, UPLC-MS/MS yönteminin LOD ve LOQ değerleri tayin edilmiştir. Gözlenebilme alt sınırı için sinyal ve gürültü (S/G) oranı 3 kat, miktar tayini alt sınırı için ise aynı değer için 10 kat atamaları yapılmıştır (ICH, 2005). Bu tespitler için daha önce hazırlanan ilk pikin gözlemlendiği 0.5 ng/mL derişiminden daha seyreltik, farklı yoğunluklarda çözeltiler hazırlanarak LOD ve LOQ değerleri tespit edildi. Bu değerler sırasıyla LOQ için 0.5 ng/ml ve LOD için ise 0.25 ng/mL tespit edilmişlerdir .

Kesinlik ve Doğruluk

Aynı günde (güniçi) ve farklı günlerde (günler arası) ölçümler yapılmasının ardından bu ölçümlerin mukayesesi ile UPLC-MS/MS yöntemine ait doğruluk ve kesinlik verileri elde edilmiştir. 1, 25, 100 ng/mL derişiminde hazırlanmış olan QC çözeltilerinin, plazmadan ekstrakte edilmek suretiyle ortaya çıkan versiyonları, aynı laboratuvar şartlarında, aynı yöntem kullanılarak, aynı günde 3 defa ve farklı 3 günlerde 3'er defa analiz edilmiştir. Burada ortaya konulan sonuçların standart sapma, bağıl standart sapma, ortalama ve bağıl hata değerleri tespit edilerek sonuçlara ulaşılmıştır. Bu sonuçlar ışığında

% bağıl standart sapma ((Standart Sapma)/Ölçülen Değer*100) ile kesinlik; % bağıl hata ((Ölçülen değer-Eklenen Değer)/(Eklenen Değer)*100) ile doğruluk değerleri ifade edilmiştir. Elde edilen kesinlik ve doğruluk sonuçları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Hem günüçi hem de günler arası analizler için doğruluk ve hassasiyet değerleri kabul edilebilir limitler içinde kalmıştır. Yöntem, %7.592 altında bağıl hata (BH) değerleri ile doğruluk için ve %14.236'nın altında bağıl standart sapma (BSS) değerleri ile de kesinlik için belirlenen sınırlar dahilinde kalmıştır.

Tablo 4.3. Lumateperonun plazmadan UPLC-MS/MS yöntemi ile analizinde kesinlik ve doğruluk değerleri

İlave Edilen (ng/ mL)	Gün içi			Günler arası		
	Bulunan± SS (ng/ mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS	Bulunan ±SS (ng/ mL)	Doğruluk % BH	Kesinlik % BSS
1	0.9928 ± 0.134	-0.72	13.49	0.9904 ± 0.141	-0.96	14.236
25	23.3317 ± 0.729	-6.67	3.124	23.102 ± 0.741	-7.592	3.207
100	95.778 ± 0.637	-4.22	0.666	94.974 ± 0.671	-5.026	0.706

Geri Kazanım

1, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarındaki kalite kontrol çözeltileri, daha önce izah edilen biçimde insan plazmasına uygulanmış, ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon sonucu elde edilen veriler ışığında % geri kazanım değerlendirilmiştir. Sonuçlar herbir konsantrasyon için sırasıyla ortalama %99.28, %93.31 ve %95.78 olarak ölçülmüştür. Metodun ortalama geri kazanım değerinin %96.12 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.4. Plazma testlerinde tespit edilen analitik geri kazanım

Ölçüm	LQC (1ng/ mL)	MQC (25ng/ mL)	HQC (100ng/mL)
1	1.2253	24.182	96.25
2	0.8048	24.152	95.2125
3	1.0030	22.680	96.3198
4	0.9717	23.565	96.493
5	0.9803	22.712	95.138
6	0.9717	22.6798	95.254
% Geri Kazanım	% 99.28	%93.31	%95.78

Stabilite (Kararlılık)

Stabilite çalışmaları, lumateperonun plazmada analiz işlemleri sırasında bozunmadan belirli sıcaklıklarda hangi sürelerde belirli oranlarda bozunmadan kalabildiğini belirlemek amacıyla yapılmış ve elde edilen veriler FDA rehberi standartları (ortalama $\pm$ %10) karşısında değerlendirilmiştir.

Lumateperonun 1, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarındaki QC çözeltileri 100µL boş plazma örneklerine eklendi, bu işlemi takiben 72, 48 ve 24 saatlik sürelerde derin dondurucuda (-20 °C), buzdolabında (+ 4 °C) ve oda sıcaklığında (24 °C) bekletilmiştir. Daha önce izah edilmiş olan prosese uygun olarak ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmesini takiben UPLC-MS/MS sistemi ile analiz gerçekleştirilmiş ve henüz hazırlanarak analiz edilen benzerleri ile %geri kazanım (%GK) değerleri üzerinden mukayese edilmişlerdir.

Bununla birlikte donma-çözme (freeze-thaw) dayanıklılık testleri uygulanmıştır. -20C°’de dondurulan plazma-lumateperon solüsyonları, 24 saat aynı sıcaklıkta bekletildikten sonra oda sıcaklığı koşullarında müdahalesiz eritilmiş ve daha sonra ekstraksiyon gerçekleştirilerek UPLC-MS/MS sistemi ile analiz edilmişlerdir. Bu proses

3 kez tekrarlanmış ve henüz hazırlanarak ölçümü yapılmış örneklere ait verilerle karşılaştırılmıştır.

Stabilite deneylerinin bulguları Tablo 9.7’ de gösterilmektedir. Elde edilen verilere göre, insan plazmasındaki yüksek (HQC), orta (MQC) ve düşük derişimli kontrol (LQC) çözeltileri, oda (24 C⁰) sıcaklığı hariç, çeşitli zaman ve sıcaklık koşullarında stabil kalmışlardır. Sonuç olarak, yöntemin alternatif analizler için uygun olduğu doğrulanmıştır.

Tablo 4.5. Lumateperonun plazmadan analizinde stabilite

İlave Edilen (ng/mL)	24 %GK±SS	48 %GK±SS	72 %GK±SS	(saat)
Stabilite -20 C °				
1	97.87 ± 0.13	96.2±2.78	94.9±2.16	
25	94.4±0.81	92.1±1.68	91.3±1.67	
100	95.08 ± 0.915	94.1±1.59	93.5±2.51	
Stabilite +4°C				
1	98.47 ± 0.122	97.85±0.74	97.24±1.37	
25	95.2±1.72	94.8±1.74	93.7±2.39	
100	97.467 ± 0.71	97.2±1.47	96.1±1.63	
Stabilite 24 °C				
1	81.63 ± 1.186	74.96 ± 3.14	69.9±2.25	
25	78.2±5.81	75.5±7.12	71.3±7.51	
100	88.3±1.89	82.3±1.61	77.4±6.37	
Stabilite Donma-Çözme (%GK±SS)				
	Birinci	İkinci	Üçüncü	
1	98.77 ± 0.17	95.8±3.53	91.4±3.34	
25	96.1±0.94	93.1±1.63	92.1±1.46	
100	96.6±2.02	92.4±3.16	90.1±3.75	

Matriks Etkisi

Matriks etkisinin tespiti doğrultusunda, Kızılay Erzurum Kan Merkezinden temin edilen, farklı kişilerden alındığına emin olduğumuz 3 farklı plazma örneği ile çalışılmıştır. Her bir örneğe kalite kontrol çözeltilerinin (1, 25, 100 ng/mL) her biri ayrı

ayrı eklenerek daha önce tarif edildiği biçimde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında numuneler UPLC-MS/MS sistemi ile analiz edilerek % geri kazanım verileri üzerinden mukayese edilmişlerdir. Aynı işlem herbir konsantrasyon ve plazma örneği için 3'er kez tekrar edilmiştir. Çalışma sonuçlarından, eş zamanlı elüsyona uğrayan maddelerin lumateperon ve iç standart (IS) iyonizasyonunu etkilemediği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, plazma matrisinin yöntem üzerindeki etkisi önemsiz olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.6. Tespit edilen matriks etkisi

1. No'lu Plazma		2	3.
İlave Edilen(ng/mL)	%GeriKazanım	%GeriKazanım	%GeriKazanım
1	96.02	95.45	95.64
25	95.09	94.37	94.18
100	95.93	94.29	95.43

4.1.4. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Numunelere Uygulanması

Geliştirilip valide edilen UPLC-MS/MS yöntemi ile sağlıklı gönüllülerden alınan plazmalarda lumateperon seviyeleri belirlenmiştir. Gönüllü kanları Erzurum Şehir Hastanesi Acil Servisinde alınmıştır. İlk kan örneği tok oldukları teyid edilen gönüllülerden, ilaç uygulanmadan hemen önce alınmıştır (0.kan). Daha sonra 42 mg lumateperon içeren (60 mg lumateperon tosilat tuzu halinde) 1 adet Caplyta® kapsül bol su ile oral yoldan uygulanmıştır. 30 dakika gönüllülerin oturarak beklemeleri sağlanmış ve 30. dakikada yeniden kan alınmıştır (1.kan). Bundan sonra sırasıyla 45., 60., 75., 90., 105., 120., 135., ve 150. Dakikalarda hassasiyetle ve kesinlikle dakik olmaya dikkat edilerek kanlar alınmıştır. Tüm alımlar 2' şer ml olarak gerçekleştirilmiştir.

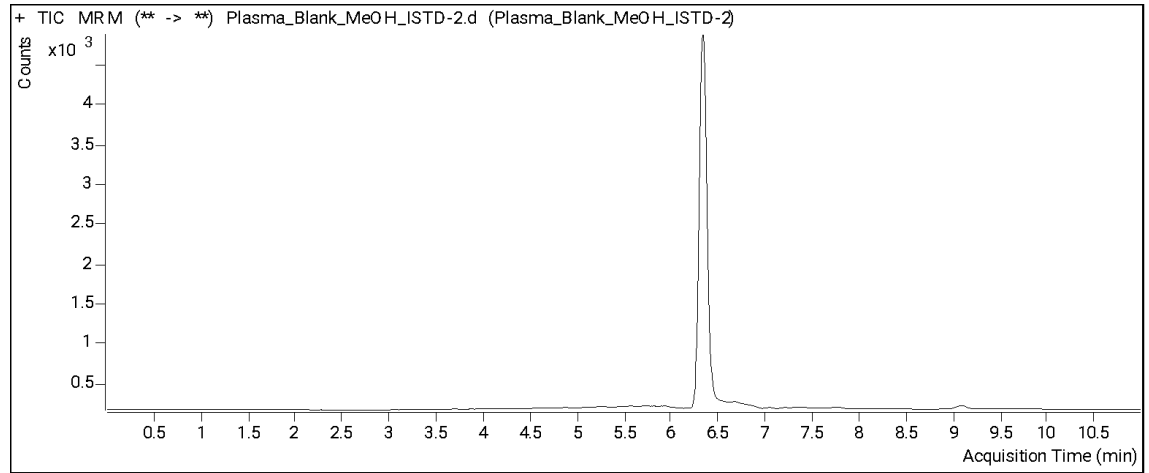
Alınan tüm kan örnekleri EDTA'lı tüplere konulmuş, acil serviste bulunan buzdolabında son kanlar alınana dek uygun biçimde muhafaza edilmiş ve tüm kanların

alınmasını takiben DAYTAM laboratuvarlarına soğuk zincir şartlarına riayet edilerek nakledilmişlerdir.

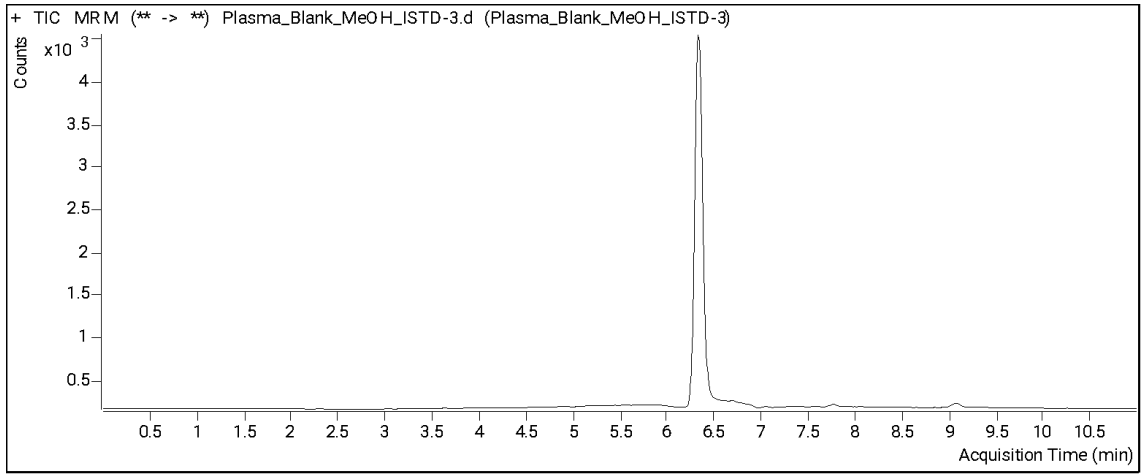
Burada elde edilen plazmalar ependorf (mikrosantrifüj) tüplerine alınmış ve analize dek -80 C° de muhafaza edilmişlerdir.

Tablo 4.7. Sağlıklı gönüllülere ait kan örneklerindeki lumateperon derişimleri

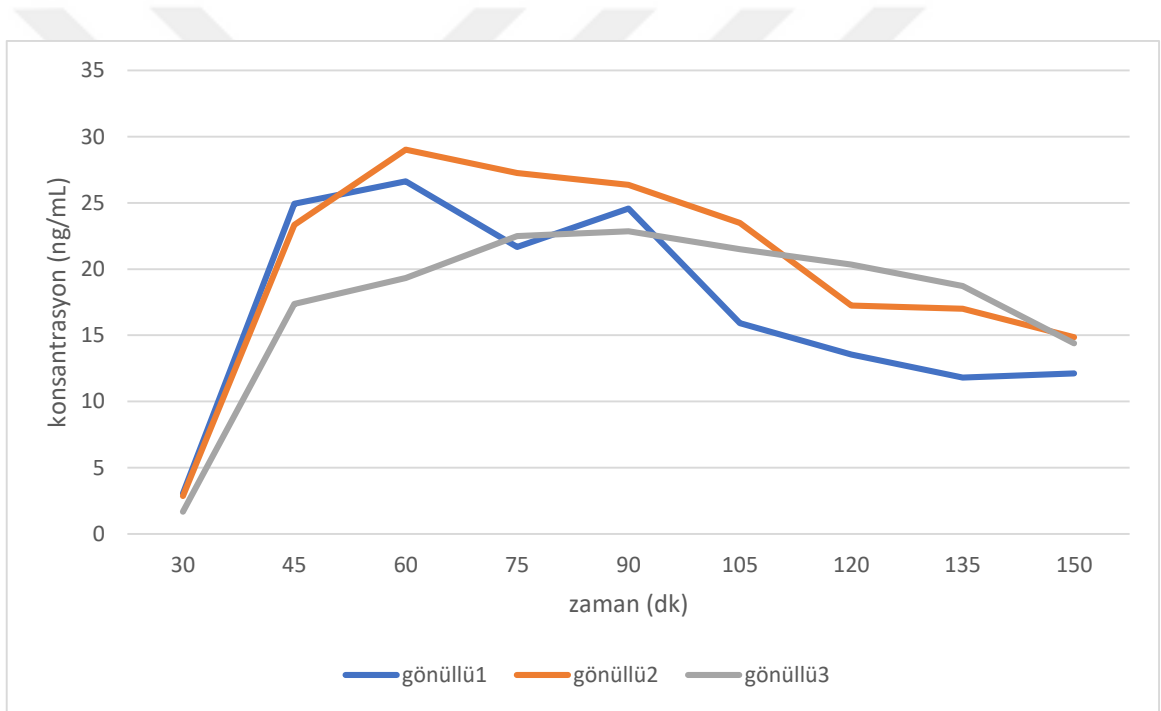
			Lumateperon (ng/mL)								
Gönüllü	Yaş	Cinsiyet	1.Kan	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1	37	E	3,049 ; 24,941; 26.626; 21.663; 24.582;15.912;13.544;11.804; 12.1288								
2	42	E	2.863; 23.328; 29.025; 27.246; 26.356;23.491;17.236;17.014; 14.849								
3	24	E	1.678; 17.360; 19.316; 22.492; 22.864;21.496;20.344;18.718; 14.402								



Şekil 4.11. 2 numaralı gönüllüye ait boş plazma + IS kromatogramı



Şekil 4.12. 3 numaralı gönüllüye ait boş plazma+IS kromatogramı



Şekil 4.13. Gönüllü plazmalarındaki lumateperon derişimleri grafiğı

5. TARTIŞMA

Analitik bir yöntemin performans verilerini, kullanılacak amaçlara uygunluğunu ve daha birçok karakteristik özelliğini belirlemek için uygulanan tüm işlemler validasyon olarak adlandırılabilir. Tüm bu tespitlerin yapılabilmesi adına, araştırmacı kabul edilebilir şartların alt limiti olarak tanımlayabileceğimiz minimum kriterleri tespit etmelidir ve bundan sonra bu kriterleri söz konusu yöntem belirlenen amaçlara ulaşmayı sağlayan bir araca dönüşene dek geliştirmelidir. İşte bu noktada araştırmacının uygulaması beklenen analizler, validasyon yahut geçerlilik testleri olarak anılır. Araştırmacı bir kez analitik yöneme karar verdiğinde, seçtiği yöntemin uygunluğunu, uygulanabilir olduğunu, yani anlamlı bir değer ifade ettiğini kanıtlanabilmesi için, yöneme ait seçicilik, kesinlik, doğruluk, tekrarlanabilirlik, stabilite gibi kilit parametreleri incelemesi elzemdir. Bu incelemeleri içeriğinden nitel ve nicel olarak emin olduğu standart numuneler ile gerçekleştirmelidir. Bu numunelerin içerikleri yöntemin uygulanması planlanan maddeler ile kesinlikle benzer olmalıdır.

Araştırmacı, validasyon sürecine başlamadan önce son derece detaylı ve derinlemesine bir literatür taraması yapmalıdır. Ancak bu sayede üzerinde çalışacağı yöntemin sınırlamalarını, avantaj yahut dezavantajlarını, karşılaşılabileceği olumlu yahut olumsuz durumları önceden tahmin edebilecek, anlayabilecek, ortadan kaldıracabilecek bilgi birikimine sahip olabilir. Zira elde edeceği deney sonuçlarını yorumlayabilmesi ve bu veriler ışığında valide ettiği yöntemi yenileyebilmesi, geliştirebilmesi ancak araştırmacı ciddi bir bilgi birikimine sahip olduğunda gerçekleşebilir.

Yukarıda analizi için bir UPLC-MS/MS yöntemi valide edilmesi vaad edilen lumateperona dair detaylı bir literatür taraması yapılmış ancak ilaca ait özellikle analitik çalışmaların eksikliği dikkat çekmiştir. Bu durum ilacın sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde ve çok yeni bir ruhsata sahip, yeni bir molekül olmasından

kaynaklanmaktadır. Günümüze dek yapılan çoğu çalışmada araştırmacılar lumateperonun yapısını, prelinik çalışmalarını, uzun ve kısa dönemlerde etkinliğini, şizofreni ve bipolar depresyon gibi diğer bazı psikiyatrik hastalıklarındaki tedavi başarısını, etki ve yan etkilerini, etki mekanizmasını, farmakodinamik parametrelerini, güvenilirliğini incelemişlerdir (Calabrese ve ark., 2021; Cooper ve Gupta, 2020; Dutheil ve ark., 2023; Kane ve ark., 2021; Maini ve ark., 2021; Meyer, 2020; Satodiya ve ark., 2022; Snyder, Davis ve ark., 2018; Snyder, Vanover ve ark., 2021; Zhao ve ark., 2024). Bunun yanında kimi araştırmacılar molekülün sentezi için yeni yöntemler (Milen, Berecz ve ark., 2022; Milen, Nyulasi ve ark., 2022) geliştirmek için denemeler yapmışlardır.

Bazı araştırmacılar sadece deneylerinin birer parçası olarak, genellikle HPLC gibi bazı kromatografik yöntemler kullanmışlar, ancak çalışmalarında bu yöntemlere dair herhangi bir detaya yer vermemişlerdir (Dutheil ve ark., 2023; Satlin ve ark., 2020; Vanover ve ark., 2019). Bir analitik yöntem validasyonu için son derece kısıtlı olan bu literatürel birikim, bizi tamamen yenilikçi olmaya yöneltmiştir. Birçok durumda deneme-yanılma, deneme-mukayese etme işlemleri gerçekleştirilerek ilerleme sağlanmıştır.

İç standart olarak kullanılan haloperidol, lumateperonun ait olduğu butirofenon yapısı içeren antipsikotik ilaç ailesinden seçilmiştir. Bu grupta ayrıca pipamperon, melperon, droperidol, benzperidol, azaperon gibi kısıtlı seçenekler vardır. Bu noktada haloperidolün tercih edilmesinin sebebi kolay temin edilebilir ve ucuz olmasıdır. Literatürde lumateperonun kromatografik analizlerine dair zaten sınırlı sayıda çalışma bulunurken, bu çalışmaların çoğunda iç standart kullanılmamış olması (Chavan ve Dolas, 2024; Dhondiram, 2023) nedeniyle seçim için seçenekler tamamen tarafımızca değerlendirilmiş ve neticede haloperidol kullanımının ne kadar doğru bir karar olduğu görülmüştür. Tezimize ait deneysel çalışmalar tamamlandıktan sonra yayınlanan

literatürdeki tek LC-MS/MS çalışmasında IS olarak klozapin kullanılmıştır (Qiu ve ark., 2024).

Çalışmamızda daha önce de belirtildiği üzere mobil faz olarak 5 mM Amonyum Asetat içeren Su (A) ve %1 Formik Asit içeren Metanol (B) ile ilk dakika %50-50; 6.10 dakikaya dek %10-90 ve bundan sonra 11. dakikaya kadar ise yeniden %50-50 gradient elüsyon programı kullanılmıştır. Yakın zamanda yapılmış diğer çalışmalarda 0.02% Formik asit: Metanol (70:30 h/h) (Foram ve Dhudashia, 2021) ; Su: Metanol (90:10 h/h) (Dhondiram, 2023); ve % 0.1 Formik Asit içeren Su (A) ve Asetonitril (B) ile % 95-5 ile başlayan ve % 5-95 ile neticelenen gradient elüsyon programı (Qiu ve ark., 2024); Metanol: %0.1 Orto fosforik asit (45:55 h/h) (Chavan ve Dolas, 2024) kullanıldığı görülmüştür.

Çalışmamızda sabit faz olarak kullanılan kolon, GL Sciences (Tokyo, Japonya) tarafından üretilmiş; yüksek saflıkta ve 2, 3, 5 µm büyüklüğünde ES silika jel parçacıklarından oluşan; 350 m²/g partikül yüzey alanına sahip; 100 Å delik açıklığı ve 0.85 mL/g delik hacmi olan; fonksiyonel grup olarak fenil içeren; 2-7.5 pH aralığında çalışabilen; % 10 karbon yüklü ve USP kodu L11 InertSustain Phenyl Kolon (3.9 x 150 mm, 4-µ) dur (GL Sciences, 2024). Bu kolondan önce Zorbax SB-C18 (4.6x100 mm, 3.5 µm), InfinityLab Poroshell 120 SB-AQ (3.0x150 mm, 2.7 µm), Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6x150 mm, 5 µm), Poroshell 120-SB-C18 (3.0x100 mm, 2.7 µm) kolonları denenmiş ancak optimum sonuçlar çalışmada kullanılan kolon ile elde edilmiştir. Literatür taramasında, araştırmacıların kromatografik analizler için kullandıkları diğer kolonlar şunlardır: Inertsil ODS Column (4.6x150 mm, 5µ) (Foram ve Dhudashia, 2021), Hypersil BDS C18 150 x 4.6mm, 5µ) (Dhondiram, 2023), Phenomenex C18 (Chavan ve Dolas, 2024), Acquity UPLC HSS T3 (2.1×50 mm, 3µm; Waters) (Qiu ve ark., 2024).

Çalışmada kullanılan saf lumateperon Sigma-Aldrich (Merck k KGaA, Darmstadt, Almanya) firmasından satın alındı. 42 mg Caplyta kapsül ise ancak Amerika Birleşik Devletlerinde satışta olduğu için Amerika'da bir serbest eczaneden satın alındı.

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin nitel ve nicel analizleri amacıyla sıkça başvurulan kullanışlı ve kolay bir yöntemler bütünüdür. Bu bütünün en güncel ve gelişmiş üyelerinden birisi UPLC-MS/MS' dir dememiz sanırım yanlış olmayacaktır. Bu yöntem hız, hassasiyet, doğruluk, duyarlılık, kesinlik gibi önemli üstünlüklere sahiptir. Özellikle biyolojik sıvılarda çalışmalar gerçekleştirebilmek için, araştırmacıların kullanacakları yöntemin nanogram düzeylerinde bile hassas nitel ve nicel analizler gerçekleştirebilir olması gereklidir. Örneğin bu durum farmakokinetik çalışmalarda böyledir. Dolayısıyla ilaç analizleri ile ilgilenen bizler için bu yöntem öncelikli başvurulabilecek yöntemlerin ilk sıralarında gelmektedir.

Lumateperonun farmasötik preparatından kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilmesi için uygun bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir. Daha önce belirtilen teknikler ve parametreler kullanılarak şartlar optimize edilmiş ve 0.25-200 ng/mL konsantrasyon aralığında, geliştirilen yöntemin doğrusal sonuçlar ortaya koyduğu izlenmiştir. Hassas biçimde hazırlanan ve 25 ng/mL IS içeren bir dizi standart lumateperon çözeltisi (0.25, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 ng/mL) UPLC-MS/MS sistemine enjekte edilmiş; kromatogramlar elde edilmiş ve konsantrasyonların pik alanlarına karşı grafiğe dökülmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu eğriye ait regresyon denklemi $y=1.252766x -0.009868$ ve korelasyon katsayısı (R) ise 0.9997 olarak tespit edilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile test edilen geri kazanım değeri ortalama % 100.55 bulunmuştur. Yönteme ait % BH (bağıl hata) ve % BSS (bağıl standart sapma) sırasıyla günüçi % 11.93 ve 5.77 den; günler arası %10.28 ve % 7.43 değerlerinden küçük bulunmuştur. Elde edilen yöntem Caplyta kapsül içeriklerinin kantitatif tespiti için

kullanılmış ve başarılı biçimde miktar tespiti yapılmıştır. 4.2 mg/mL olarak hazırlanan kapsül içerikleri yöntem ile analizleri neticesinde 4.172 ± 0.047 (%99.33) olarak ölçülmüş ve başarılı bir yöntem dizayn edildiği gösterilmiştir. Bu yöntem literatürde farmasötik preparatlardan lumateperonun UPLC-MS/MS ile analizinde ilk yöntem olması dolayısıyla herhangi bir başka çalışmayla mukayese edilememiştir. Bunun yanında standart ekleme yöntemiyle elde edilen %100.55 analitik geri kazanım değeri, 0.2 ng/mL'lik LOD ve 0.25 ng/mL LOQ değerleri ve 0.9997 R değeri yöntemimizi son derece başarılı, hassas, seçici, doğru ve eşsiz kılmaktadır.

UPLC-MS/MS yöntemimizin plazma uygulamasının 0.5-150 ng/mL konsantrasyon aralığında lineer olduğu gözlenmiştir. Yine 25 ng/mL IS içeren bir dizi çözelti (0.5, 5, 10, 50, 75, 150 ng/mL) yukarıda belirtilmiş yöntemlerle hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiş ve kromatogramlara ulaşılmıştır. Bundan sonra konsantrasyonların pik alanlarına karşı grafiğe dökülmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu eğriye ait regresyon denklemi $y=1836.816483x$ ve korelasyon katsayısı (R) 0.9992 olarak bulunmuştur. Bu denklem ve değer, diğer bir LC-MS/MS çalışmasında (Qiu ve ark., 2024), $y=0.0393x-0.00235$ ve $R=0.9996$ olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.25 ve 0.5 olarak tespit edilmiştir. Bu noktada bu değerleri mukayese edebileceğimiz tek çalışmada da LOQ değeri 0.5 olarak bulunmuş ancak LOD değeri ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır (Qiu, Guo, Chen, Zhang, Wang, 2024). O halde LOD ile ilgili yapılan ilk tespit bize aittir dememiz yanlış olmayacaktır. Hem günüçi hem de günler arası analizler için doğruluk ve hassasiyet değerleri kabul edilebilir limitler içinde kalmıştır. Yöntem, %7.592 altında bağıl hata (BH) değerleri ile doğruluk için ve %14.236'nın altında bağıl standart sapma (BSS) değerleri ile de hassasiyet için belirlenen sınırlar dahilinde kalmıştır. %BH değeri diğer plazma çalışmasında (Qiu ve ark., 2024) gün içi ve günler arası %8.8 olarak ölçülmüştür. Bu değerlerin bizim çalışmamızda günüçi

%6.73 ve günlerarası % 7.59 olarak bulunduklarını göz önünde bulundurduğumuzda, geliştirdiğimiz yöntemin, literatürdeki muadillerine oranla daha yüksek doğrulukta olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır.

Çalışmamızın literatürdeki benzerleri ile mukayesesinde en radikal üstünlüğün %geri kazanım (% GK) değerleri açısından olduğu söylenebilir. Rat plazmasında yapılmış bir çalışmada (Qiu ve ark., 2024) % GK değeri % 88-90.5 aralığında bulunmuşken, bu değer bizim çalışmamızda % 96.12 dir. Bu ciddi fark, bizim geliştirdiğimiz yöntemin diğerlerine göre üstün olduğunu göstermektedir.

Matriks etkisi çalışmalarında Kızılay Erzurum Kan Merkezinden temin edilen, farklı kişilerden alındıklarına emin olunan 3 farklı plazma örneği ve kontrol çözeltileri (1, 25, 100 ng/mL) ile çalışılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında numuneler UPLC-MS/MS sistemi ile analiz edilerek % geri kazanım verisi üzerinden mukayese edilmiş ve %1.64 den daha az matriks etkisi olduğu saptanmıştır. Ancak bu değer rat plazmalarının kullanıldığı farklı bir çalışmada %8.4 olarak bulunmuştur (Qiu ve ark., 2024). Bu da geliştirdiğimiz yöntemin üstünlüklerinden bir diğeridir.

Lumateperonun plazma çözeltilerindeki stabilitesini ölçmek amacıyla kalite kontrol çözeltileri plazmalara uygulanmış ve yukarıda izahı yapılmış yöntemlerle ekstrakte edilmiştir. 24, +4 ve -20 C° sıcaklıklarında ve donma-çözme durumlarındaki stabil kalabilme kapasitesi FDA' in belirttiği kurallar ve limitler (ortalama± %10) dahilinde değerlendirilmiştir. Oda sıcaklığında 24 saatte stabilitesini kaybeden lumateperon çözeltilerinin, diğer tüm durumlarda en az 72 saat boyunca stabil kalabildiği gözlenmiştir. Qiu ve arkadaşlarının 2024 yılında rat plazması ile yaptıkları çalışmada ulaştıkları stabilite sonuçları, tarafımızca elde edilenlerle paralellikler göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre oda sıcaklığında 1.5 ng/mL derişimideki lumateperon çözeltisi 2 saatte stabilitesini kaybederken 150 ng/mL derişimindeki çözelti

% 10' luk FDA sınırları dahilinde (% 9.6) kalmıştır (Qiu ve ark., 2024). Geri kalan durumlarda plazma çözeltileri stabil kalabilmişlerdir. Ayrıca plazma yerine saf lumateperon ile hazırlanmış çözeltilerin stabilitelerinin incelendiği bir çalışmada (Foram ve Dhudashia, 2021), oda sıcaklığı, -80 °C gibi sıcaklıklarda 48 saat gibi uzun sürelerde bile değişimin %2' yi geçmediği gösterilmiştir.

Plazmadan lumateperon analizi için valide edilen UPLC-MS/MS yönteminin gerçek kişilerden alınan numunelere uygulanması safhasında 3 farklı gönüllüden yardım alınmıştır. 1. gönüllümüz 37 yaşında erkek, 2. gönüllümüz 42 yaşında erkek ve 3. gönüllümüz 24 yaşında erkek idi. Amerika Birleşik Devletlerinde faaliyet göstermekte olan serbest bir eczaneden temin edilen Caplyta 42 mg Kapsül ticari isimli lumateperon içeren ilaç, gönüllülere uygulanmadan önce her birinden Erzurum Şehir Hastanesi Acil Servisinde 2'şer ml kan alınmıştır (0.kan). Takiben her bir hastaya birer Caplyta kapsül oral yolla ve bol suyla uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben her bir gönüllüden, ilki 30.dakikada olmak üzere her 15 dakikada bir, toplamda 9 defa, 2'şer ml kan EDTA' lı tüplere alınmış; acil servis buzdolabında uygun şartlarda saklanmış ve soğuk zincir kurallarına uygun olarak DAYTAM laboratuvarlarına nakledilmiştir. Bu numuneler daha önce izah edildiği biçimde ekstraksiyona tabi tutulmuş ve geliştirilen metod ile analiz edilmişlerdir. Buna göre lumateperon 1. gönüllüde ve 2. gönüllüde 60. dakikada maksimum plazma seviyelerine ulaşırken, 3. gönüllüde ise 90. dakikada maksimum seviye gözlenmiştir. Qiu ve arkadaşlarının 2024 yılında lumateperonu rat plazmalarında incelediği araştırmalarında, bu süre erkek ve dişi ratlar için oral uygulamayı takiben tamamen aynı ve 0.33 ± 0.14 saat olarak ölçülmüştür (Qiu ve ark., 2024). Blair' in yaptığı çalışmada ise, oral uygulamayı takiben 1 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşıldığı ve bunun oral uygulamanın % 68-97' si (C_{max}) kadar olabildiği ancak bu oranın yağlı beslenme ile hem %33 oranına dek azalabildiği hem de

maksimum konsantrasyona çıkma süresinin 2 saate dek uzayabileceği söylenmektedir (Blair, 2020). Bizim çalışmamızda ise bu oranlar gönüllüler için sırasıyla Cmax % 63.4, 64.87, 54.43 ve süreleri 60, 60, 90 dk olarak ölçülmüştür. Hastalarımızın ilaç uygulamasından önceki 1 saat içerisinde yemek yediklerinden emin olmamız ancak ne denli yağlı beslendiklerinden emin olamamamız bu farklılıkları kabul edilebilir kılmaktadır. Dolayısıyla bulduğumuz değerler insan plazması ile yapılmış ve Caplyta isimli ilacın prospektüsünde belirtilmiş değerlerle örtüşmektedir diyebiliriz. İlacın şu anda sadece oral yolla uygulanabilen kapsül formu mevcuttur ve tüm ölçümler ve denemeler bu ilaç formu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle değerlerin tam anlamıyla ve birebir mukayese edilmeleri mümkün olmuştur. Araştırma konusu olarak, lumateperona dair yapılmış çalışmaların literatür taramasını yapan araştırmacılar da bu değerleri tamamen aynı olarak yansıtmaktadır (Greenwood ve ark., 2021).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şizofreni tüm bilimsel ilerlemelere rağmen henüz tam olarak tedavi edilebilmiş bir hastalık değildir. Dolayısıyla bu hastalıkla ilgili yenilikler ve gelişmeler, radikal bir çözüme ulaşılabilmesi adına heyecan verici bulunmaktadır. Bu hastalıkla başa çıkmada günümüzdeki en sık başvuru yöntemini hala ilaç tedavisi olduğunu hatırladığımızda, yeni ilaç moleküllerinin ne denli önem arz ettiğini de anlamış oluruz. İşte bu bağlamdaki son gelişmelerden birisi de lumateperon etkin maddesinin sentezi, hastalarda gösterdiği olumlu etkiler ve azaltılmış yan etkileridir. Farmakolojik olarak kendini kanıtama aşamalarından birer birer geçen lumateperonun analizi için pek fazla analitik çalışmanın yapılmadığı, yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemlerin ise pek de yenilikçi olmadıkları gözlemlendi. Bu doğrultuda ilaç analizlerinde başvurulabilecek kromatografik yöntemlerin belkide en ideali olan UPLC-MS/MS yöntemi ile lumateperonun kalitatif ve kantitatif analizinin gerçekleştirilebilmesini tezimizin konusu haline getirdik. Ancak gerek literatür kısıtlılığı (özellikle analitik kimya alanında), gerekse mukayese edebileceğimiz benzer herhangi bir yöntem geliştirilmemiş olması, bizleri yöntemin geliştirilmesi ve valide edilmesi aşamalarında her ne kadar zorlamış olsa da, ortaya koyduğumuz yöntemin tamamen özgün olmasını da sağlamıştır. Neticede ortaya koyduğumuz, hem farmasötik preparatlarda hem de insan plazmasında lumateperonun UPLC-MS/MS ile analizi yöntemi, analitik kimya alanında ilklerden birisidir. Literatürdeki rat plazmasına uygulanan LC-MS/MS yöntemiyle (Qiu ve ark., 2024) mukayese edildiğinde, geliştirdiğimiz yöntemin % GK, matriks etkisi, doğruluk değerleri, LOD, LOQ değerleri bakımından son derece üstün olduğu söylenebilir. LC-MS/MS yöntemi yerine tercih ettiğimiz UPLC-MS/MS yöntemi, sistemsal üstünlükleri ve hassasiyeti nedeniyle tercih edilmiş ve daha önce hiç çalışılmamış bir alanda, son derece başarılı çıktılar elde edilmiştir. Bu yöntem analitik kimya araştırmacılarının lumateperon ile yapacakları

Çalışmalarda yeni bir ufuk açması, kolaylıklar sağlaması ve bir referans noktası olması açısından son derece önemlidir. Neticede geliştirilerek valide edilen yöntem, analitik kimya alanında ortaya konulan pek çok açıdan en başarılı örnektir.



KAYNAKLAR

- Agilent (2024). The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development.
<https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- Ahmed, F., Eticha, T., Hymete, A., Ashenef, A. (2023). Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.110540.
- Ahuja S. (2003). Chromatography and Separation Science (V.4), USA: Elsevier Science. ISBN: 9780123885364
- Ardiana, F., Lestari, M. L., Indrayanto, G. (2013). Aripiprazole. Profiles of Drug Substances, *Excipients and Related Methodology*, 38, 35-85.
- Baker, J. O., Adney, W. S., Himmel, M. E., & Chen, M. (2003). Size exclusion chromatography of proteins. Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques: *Revised and Expanded*, 91, 444.
- Banerjee, S., Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1, 282574
- Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N. (1981). Fast atom bombardment of solids (FAB): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 325-327.
- Berić, J. D., Jelić, R. M., Nešić, D. M., Trbojević-Stanković, J. B., Odović, J. V. (2017). Estimation of plasma protein binding of selected antipsychotics using computed molecular properties. *Archives of Biological Sciences*, 69(3), 463-468.
- Bier, M. E. (2010). Coupling ESI and MALDI sources to the quadrupole mass filter, quadrupole ion trap, linear quadrupole ion trap, and orbitrap mass analyzers.

- Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, 2, 263-344.
- Blair, H. A. (2020). Lumateperone: first approval. *Drugs*, 80(4), 417-423.
- Brandl, E. J., Kennedy, J. L., Müller, D. J. (2014). Pharmacogenetics of antipsychotics. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 59(2), 76-88.
- Byrdwell, W. C. (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, 36(4), 327-346.
- Calabrese, J. R., Durgam, S., Satlin, A., Vanover, K. E., Davis, R. E., Chen, R., Sachs, G. S. (2021). Efficacy and safety of lumateperone for major depressive episodes associated with bipolar I or bipolar II disorder: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 178(12), 1098-1106.
- Chavan, A., Dolas, R. (2024). Application of Quality by Design Approach for Development and Validation of Rp-Hplc Method for Lumateperone Tosylate Drug in Bulk and its Capsule Dosage Form. *Nanotechnology Perceptions*, 20, 935-968.
- Chen, S., Kord, A. (2013). UHPLC method development. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications*, 1-30.
- Christian G.D. (1994). Analytical Chemistry (5th edition). UK: John Wiley & sons. ISBN-10 : 0471309788
- Scientific, C. (2014). The theory of HPLC. Chromatographic parameters. e-Learning for the Analytical Chemistry Community, LC/GC, Chromacademy, 1-21.
- Cooper D, Gupta V. (2023). Lumateperone. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); PMID: 32809679.
- Corponi, F., Fabbri, C., Bitter, I., Montgomery, S., Vieta, E., Kasper, S., ... & Serretti, A. (2019). Novel antipsychotics specificity profile: A clinically oriented review of

- lurasidone, brexpiprazole, cariprazine and lumateperone. *European Neuropsychopharmacology*, 29(9), 971-985.
- Correll, C. U., Davis, R. E., Weingart, M., Saillard, J., O’Gorman, C., Kane, J. M., Vanover, K. E. (2020). Efficacy and safety of lumateperone for treatment of schizophrenia: a randomized clinical trial. *JAMA psychiatry*, 77(4), 349-358.
- Dass, C. (2007). Fundamentals of contemporary mass spectrometry. John Wiley & Sons.
- Davis RE and Correll CU.(2016). ITI-007 in the treatment of schizophrenia: from novel pharmacology to clinical outcomes. *Expert Review Neurotherapeutics*, 16: 601–614.
- Davis RE, Vanover KE, Zhou Y, et al. (2015). ITI-007 demonstrates brain occupancy at serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors and serotonin transporters using positron emission tomography in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 232(15), 2863–72
- de Araújo, A. N., de Sena, E. P., de Oliveira, I. R., Juruena, M. F. (2012). Antipsychotic agents: efficacy and safety in schizophrenia. *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 173-180.
- DeVane, C. L. (1995). Brief comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the traditional and newer antipsychotic drugs. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 52(suppl_1), S15-S18.
- Dhondiram, R. G. (2023). Development and validation of RP-HPLC method for estimation of Lumateperone drug in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Novel Research and Development*, 8(7), d780-d791.
- Dutheil, S., Watson, L. S., Davis, R. E., Snyder, G. L. (2023). Lumateperone normalizes pathological levels of acute inflammation through important pathways known to be involved in mood regulation. *Journal of Neuroscience*, 43(5), 863-877.

- Ertuğrul A., (2010). Şizofreninin Nörobiyolojisi, *Temel Psikofarmakoloji*, 1: 354, Ankara (2010)
- Ettre, L. S. (2003). MS Tswett and the invention of chromatography: on the occasion of the centenary of the invention of chromatography, Milestone in Chromatography. *LC-GC North America*, 21(5), 458-465.
- European Medicines Agency (EMA). "Guideline on Bioanalytical Method Validation." *European Medicines Agency*, 2011
- Faull, K. F., Dooley, A. N., Halgand, F., Shoemaker, L. D., Norris, A. J., Ryan, C. M., ... Katz, J. E. (2008). An introduction to the basic principles and concepts of mass spectrometry. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 52, 1-46.
- Food and Drug Administration. (2018). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation
- Foram, R.D., Dhudashia M.K. (2021). Development and Validation of UV Spectrophotometric and Rp- Hplc Method for Estimation of Lumateperone In Solid Dosage Form. *International Journal of All Research Education and Scientific Methods (IJARESM)*, 9(5) ISSN: 2455-6211
- Fountain, K. J., Iraneta, P. C. (2012). Instrumentation and columns for UHPLC separations. *UHPLC in Life Sciences*, 16, 29-66.
- Giddings, J. C. (2017). Dynamics of chromatography: principles and theory. CRC Press
- Global SubstanceRegistrationSystem
<https://gsrs.ncats.nih.gov/ginas/app/ui/substances/JIE88N006O>
- Greenwood, J., Acharya, R. B., Marcellus, V., Rey, J. A. (2021). Lumateperone: a novel antipsychotic for schizophrenia. *Annals of Pharmacotherapy*, 55(1), 98-104.
- Gritti, F., & Guiochon, G. (2014). Rapid development of core-shell column technology: accurate measurements of the intrinsic column efficiency of narrow-bore columns

- packed with 4.6 down to 1.3 μm superficially porous particles. *Journal of Chromatography A*, 1333, 60-69.
- Gross, J. H. (2006). Mass spectrometry: a textbook. Springer Science & Business Media.
- Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05
- Guillarme, D., Veuthey, J.-L., & Royal Society of Chemistry (Great Britain). (2012). UHPLC in life sciences. *Royal Society of Chemistry* 29-64
- Gündüz T. (2002). *Enstrümental Analiz*, 6. Baskı. Ankara, Gazi Kitabevi, 101- 1273.
- Hamilton, R.J., Sewell, P.A. (1982). Chromatographic theory. Introduction to high performance liquid chromatography. 13-41. Springer.
https://doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5_2
- Hoffmann, E., Stroobant, V., (2013). Mass Spectrometry: Principles and Applications 15-79. John Wiley & Sons.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)." ICH, 2005.
- Intra-Cellular Therapies Inc. Caplyta (lumateperone) capsules, for oral use (package insert). New York: Intra-Cellular Therapies, Inc.
https://www.intracellulartherapies.com/docs/caplyta_pi.pdf
- Intra-Cellular Therapies, Inc."Lumateperone Product Information." Intra-Cellular Therapies, Inc., 2020
- Intra-Cellular Therapies. FDA approves Intra-Cellular Therapies' novel antipsychotic, CAPLYTA® (lumateperone) for the treatment of schizophrenia in adults [media release]. 23 Dec 2019. [http:// www.intracellulartherapies.com](http://www.intracellulartherapies.com)

- Intra-Cellular Therapies. Intra-Cellular Therapies receives FDA fast track designation for lumateperone for the treatment of schizophrenia [media release]. 20 Nov 2017. <http://www.intracellulartherapies.com>
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2010). Basic principles of chromatography. *Food Analysis*, 27, 473-498.
- Issaq H. J. (2002). A Century of Separation Science. Florida, USA, CRC Press ISBN 9780367396510
- Işık E. (2006). *Güncel Şizofreni*, Format Matbaacılık, s:373.
- Jauhar, S., Johnstone, M., & McKenna, P. J. (2022). Schizophrenia. *Lancet (London, England)*, 399(10323), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01730-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01730-X)
- Kane, J. M., Durgam, S., Satlin, A., Vanover, K. E., Chen, R., Davis, R., & Mates, S. (2021). Safety and tolerability of lumateperone for the treatment of schizophrenia: a pooled analysis of late-phase placebo-and active-controlled clinical trials. *International Clinical Psychopharmacology*, 36(5), 244-250.
- Kane, J. M., Vanover, K. E., Durgam, S., Weingart, M., Davis, R., Satlin, A., & Tamminga, C. (2019). P. 671 Efficacy and safety of lumateperone tosylate 42mg in the treatment of schizophrenia: A pooled analysis of phase 2 and 3 studies. *European Neuropsychopharmacology*, 29, 453-454.
- Kapur, S., & Remington, G. (2001). Dopamine D2 receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biological Psychiatry*, 50(11), 873-883
- Karas, M., & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301.

- Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews*, 28(6), 898-917.
- Leucht, S, Pitschel-Walz, G, Abraham, D, Kissling, W.(1999). Efficacy and extrapyramidal side-effects of the new antipsychotics olanzapine, quetiapine, risperidone, and sertindole compared to conventional antipsychotics and placebo: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Schizophr Research* 35(1),51-68 . [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(98\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(98)00105-4)
- Li P, Zhang Q, Robichaud AJ, et al. (2014). Discovery of a tetracyclic quinoxaline derivative as a potent and orally active multifunctional drug candidate for the treatment of neuropsychiatric and neurological disorders. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 2670–2682.
- Lieberman, J. A., Stroup, T. S., McEvoy, J. P., Swartz, M. S., Rosenheck, R. A., Perkins, D. O., ... & Hsiao, J. K. (2005). Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New England Journal of Medicine*, 353(12), 1209-1223.
- Longo, G., Cicolini, A., Orsolini, L., & Volpe, U. (2023). The novel antipsychotic lumateperone (ITI-007) in the treatment of schizophrenia: a systematic review. *Brain Sciences*, 13(12), 1641.
- Maini, K., Hollier, J. W., Gould, H., Bollich, V., LaForge, J., Cornett, E. M., ... & Kaye, A. D. (2021). Lumateperone tosylate, a selective and concurrent modulator of serotonin, dopamine, and glutamate, in the treatment of schizophrenia. *Health Psychology Research*, 9(1).
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*, 72(6), 1156-1162.

- Makarov, A., Denisov, E., & Lange, O. (2009). Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(8), 1391-1396.
- Mazza M, Marano G, Traversi G, et al. (2020). Evidence on the new drug lumateperone (ITI-007) for psychiatric and neurological disorders. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 19, 243–247.
- Mazzeo, J. R., Neue, U. D., Kele, M., & Plumb, R. S. (2005). A new separation technique takes advantage of sub-2- μm porous particles. *Anal. Chem*, 77(23), 460-467.
- McGuffin, V. L. (2004). Theory of chromatography. In *Journal of Chromatography Library*. 69, 1-93..
- McIntyre, R. S., Durgam, S., Huo, J., Kozauer, S. G., & Stahl, S. M. (2023). The efficacy of lumateperone in patients with bipolar depression with mixed features. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 84(3), 46804.
- Medhe, S. (2018). Mass spectrometry: detectors review. *Chem Biomol Eng*, 3(4), 51-58.
- Mete L., Ünsal P.Ç., (2004). Yeni kuşak antipsikotiklerin metabolik yan etkileri. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 14(3), 168.
- Meyer, J. M. (2020). Lumateperone for schizophrenia. *Current Psychiatry*, 19(2), 33-39.
- Milen, M., Berecz, G., Nyulasi, B., Simig, G., & Volk, B. (2022). Manufacturing synthesis of lumateperone tosylate based on a new resolution process of a key intermediate. *Tetrahedron*, 120, 132862.
- Milen, M., Nyulasi, B., Nagy, T., Simig, G., & Volk, B. (2022). New synthesis of a late-stage tetracyclic key intermediate of lumateperone. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 18(1), 653-659.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (1998). Statistics and chemometrics for analytical chemistry. *Signal*, 100, 95.

- Miller J.M. (2005). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. (2nd Ed) New Jersey: John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-53025-2
- Naguy, A., Pridmore, S., Abuzeid, M. Y., ElSORI, D., & Alamiri, B. (2024). Lumateperone monotherapy for treatment-resistant obsessive-compulsive disorder in an adolescent. *CNS spectrums*, 29(1), 4-5.
- Orsolini L, De Berardis D and Volpe U. (2020). Up-to-date expert opinion on the safety of recently developed antipsychotics. *Expert Opin Drug Safety*, 19, 981–998.
- Özgür, D. Y. (2011). Anjiyotensin II reseptör blokeri bazı ilaçların hidroklorotiyazid ile kombinasyonlarının UPLC yöntemi ile aynı anda tayini ve validasyonu. (Tez no: 282215) (Yüksek Lisans Tezi; Ankara Üniversitesi). Ulusal Tez Merkezi
- Patil, D. R., Patil, K. P., & Patil, S. A. (2024). A Review on UHPLC Method. *Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics*, 16(2), 123-126.
- Pollak, T. A., Drndarski, S., Stone, J. M., David, A. S., McGuire, P., & Abbott, N. J. (2018). The blood–brain barrier in psychosis. *The Lancet Psychiatry*, 5(1), 79-92.
- Pramanik, B. N., Ganguly, A. K., & Gross, M. L. (2002). Nanospray Electrospray Ionization Development: LC/MS, CE/MS Application. In *Applied Electrospray Mass Spectrometry*. 111-150. CRC Press.
- Prelog, V. (1976). Chirality in chemistry. *Science*, 193(4247), 17-24.
- Qiu, Y., Guo, J., Chen, J., Zhang, W., & Wang, W. (2024). Metabolic profiling of lumateperone in vitro and in vivo by UPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS, and its pharmacokinetic study in rat plasma by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 246, 116221.
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 129, 115913.

- Rathod, R. H., Chaudhari, S. R., Patil, A. S., & Shirkhedkar, A. A. (2019). Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, 1-26
- Ravisankar, P., Anusha, S., Supriya, K., & Kumar, U. A. (2019). Fundamental chromatographic parameters. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 55(2), 46-50.
- Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., & Sri, D. N. (2015). A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR J Pharm*, 5(10), 7-19.
- Riley, C. M., & Rosanske, T. W. (1996). Development and validation of analytical methods. 8-12. Elsevier.
- Sanchez, A. C., Friedlander, G., Fekete, S., Anspach, J., Guillarme, D., Chitty, M., & Farkas, T. (2013). Pushing the performance limits of reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with 1.3 μm core-shell particles. *Journal of Chromatography A*, 1311, 90-97.
- Satlin, A., Durgam, S., Vanover, K. E., Davis, R. E., Huo, J., Mates, S., & Correll, C. (2020). M205. Long-term safety of lumateperone (ITI-007): metabolic effects in a 1-year study. *Schizophrenia Bulletin*, 46(Supplement_1), 214
- Satodiya, R. M., Brown, V. R., Njuguna, S. W., & Bied, A. M. (2022). A systematic review of clinical trials on lumateperone and its effects on body weight. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 42(5), 495-499.
- Seeman, P. (2002). Atypical antipsychotics: mechanism of action. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 47(1), 27-38.
- Semetz, M. (1993). Fractal structure of gels determined by size exclusion chromatography or equilibrium techniques. In *Macromolecules 1992: Invited*

Lectures of the 34th IUPAC International Symposium on Macromolecules. 423-429.

Sheehan, J. J., Sliwa, J. K., Amatniek, J. C., Grinspan, A., & Canuso, C. M. (2010). Atypical antipsychotic metabolism and excretion. *Current Drug Metabolism*, 11(6), 516-525.

Skoog D.A., Holler, F. J., Crouch S.R., (2007). Principles of Instrumental Analysis(5th Ed.) Brooks Cole.

Snyder G.L., Vanover K.E., Zhu H, et al. (2015). Functional profile of a novel modulator of serotonin, dopamine, and glutamate neurotransmission. *Psychopharmacology*, 232(3), 605–621

Snyder, G. L., Vanover, K. E., Davis, R. E., Li, P., Fienberg, A., Mates, S. (2021). A review of the pharmacology and clinical profile of lumateperone for the treatment of schizophrenia. *Advances in pharmacology*, 90, 253-276.

Snyder, G.L., Davis, R., Dutheil, S., Hendrick, J., Zhang, L., Wennogle, L., ... & Svensson, T. (2018). S81. Unique Pharmacology and Clinical Evidence Supporting the Antidepressant Therapeutic Potential of Lumateperone. *Biological Psychiatry*, 83(9), S378.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2012). Introduction to Modern Liquid Chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-470-16754-0.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (2012). Practical HPLC method development. John Wiley & Sons.

Spatorico, A. L., & Coulter, B. (1973). Molecular weight determinations by gel-permeation chromatography and viscometry. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 11(6), 1139-1150.

- Stegmayer, K., Walther, S., & van Harten, P. (2018). Tardive dyskinesia associated with atypical antipsychotics: prevalence, mechanisms and management strategies. *CNS drugs*, 32(2), 135-147.
- Straw, W. A. (1985). Principles of Chromatography and Separative Techniques- Adsorption and Partition Chromatography. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 101(12), 409-416.
- Summakoğlu, D., & Ertuğrul, B. (2018). Şizofreni ve tedavisi. *Lectio Scientific*, 2(1), 43-61
- Swartz, M. E. (2005). UPLC™: an introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253-1263.
- Syed, A. B., & Brašić, J. R. (2021). The role of lumateperone in the treatment of schizophrenia. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 11, 20451253211034019.
- Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S. J., Imam, S. S., & Hafeez, A. (2015). Ultra performance liquid chromatography (UPLC)-a review. *Austin Journal of Analytical Pharmacy and Chemistry*, 2(6), 1056.
- Tandon, R., Gaebel, W., Barch, D. M., Bustillo, J., Gur, R. E., Heckers, S., ... & Carpenter, W. (2013). Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophrenia research*, 150(1), 3-10.
- Titulaer, J., Radhe, O., Danielsson, K., Dutheil, S., Marcus, M. M., Jardemark, K., ... & Konradsson-Geuken, Å. (2022). Lumateperone-mediated effects on prefrontal glutamatergic receptor-mediated neurotransmission: A dopamine D1 receptor dependent mechanism. *European Neuropsychopharmacology*, 62, 22-35.
- U.S. Food and Drug Administration (2019).

- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology*, 463, 417-438.
- Uyan, T.T., Köroğlu, A., & Hocaoglu, C. (2023). Şizofreni: Etiyoloji, tanı ve tedavi yaklaşımlarında güncel durum. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 10(1), 19-35.
- Üçok, A. L. P., & Gaebel, W. (2008). Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry*, 7(1), 58
- Van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., & Klinkenberg, A. V. (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, 5(6), 271-289.
- Vanover KE, Davis RE, Ereshefsky L, et al.(2011). Safety, pharmacokinetics and early signals for efficacy with ITI-007, a novel investigational new drug for the treatment of schizophrenia and related disorders. *Schizophrenia Bulletin*, 37, 325.
- Vanover KE, Davis RE, Zhou Y, et al. (2019). Dopamine D2 receptor occupancy of lumateperone (ITI-007): a positron emission tomography study in patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 44(3), 598–605.
- Vanover, K.E., Dmitrienko, A., Glass, S., Kozauer, S., Saillard, J., Weingart, M., ... & Davis, R. (2018). S44. Lumateperone (ITI-007) for the treatment of schizophrenia: placebo-controlled clinical trials and an open-label safety switching study. *Schizophrenia Bulletin*, 44(suppl_1), 341
- Vyas P, Hwang BJ and Brašić JR. (2020). An evaluation of lumateperone tosylate for the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Pharmacother*, 21, 139–145.
- Walter, T. H., & Andrews, R. W. (2014). Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63, 14-20.

- Watson D.G. (2005). *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists USA*: Elsevier Science. ISBN-10: 0443074453
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons.
- Weston A., Brown P.R.. (1997). *HPLC and CE: Principals and Practice*. San Diego: Academic Press
- Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical chemistry*, 57(3), 675-679.
- Wikipedia,(2024.)
https://tr.wikipedia.org/wiki/Nobel_Kimya_%C3%96d%C3%BCl%C3%BC_sahipleri_listesi
- World Health Organization. (2022). *International Classification of Diseases (11th ed.)*. Geneva: World Health Organization
- Yeung, P. F., Hubbard, J. W., Korchinski, E. D., & Midha, K. K. (1993). Pharmacokinetics of chlorpromazine and key metabolites. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 45, 563-569.
- Zhao, D., Zhang, W., Liu, Y., & Yan, Z. (2024). Post-marketing safety concerns with lumateperone: a pharmacovigilance analysis based on the FDA adverse event reporting system (FAERS) database. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1389814.

EKLER

Ek-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences		
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Mehmet Cem Kuşoğlu	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Analitik Kimya	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 2	% 35
III. Materyal ve Metod	% 6	% 35
IV. Bulgular	% 2	% 15
V. Tartışma	% 2	% 20
<i>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.</i>		

Ek-2. Etik Kurul Onay Formu



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Lumateperonun Plazmadan ve Farmasötik Preparatlardan UPLC-MS/MS Yöntemi ile Tayini
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı sayısı: 04 Karar No:55	Tarih:27.05.2021
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir, Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	