

SİTARABİNİN POLAROGRAFİK DAVRANIŞLARININ
İNCELENMESİ.

Ecz. Dilek DOĞRUKOL

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğrenim Yönetmeliği Uyarınca
Analitik Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

Ağustos 1989

ÖZET

Akut löseminin sağaltımında kullanılan sitarabinin polarografik olarak indirgenmesinde nötr ve hafif bazik ortamda çok iyi beliren tek polarografik dalga elde edilmiştir.

Çalışma koşullarının optimize edilmesi için pH, civa rezervuarına uygulanan basınç, damlama süresi, potansiyel değişme hızı ve derişim gibi parametrelerin, uygun taşıyıcı elektrolit çözeltisi içerisindeki sitarabinin sınır akımına olan etkisi incelenmiştir. Damlayan civa elektrodu yüzeyinde meydana gelen indirgenmenin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmış ve reaksiyonun tersinirliği araştırılmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda ampul şeklinde bulunan farmasötik preparattaki sitarabin miktar tayini duyarlı ve çabuk olarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sitarabin, ara-C, Sitarabin miktar tayini, Polarografi, Sitarabinin doğru akım polarografisi, Sitarabinin diferensiyel puls polarografisi, Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi.

SUMMARY

Cytarabine which is used in the treatment of acute leukemia gives well defined polarographic waves in neutral and weak basic media.

In order to optimize the conditions, the effect of pH, applied pressure to the mercury tank, dropping time, changing the potential rate and concentration on the limiting current were examined. The reaction mechanism of cytarabin depending on the reduction on the surface of mercury was proposed and the reversibility of the reaction was elucidated.

The determination of cytarabine in a pharmaceutical preparation was carried out with a good accuracy using the method progressed in this study.

Key words: Cytarabine, ara-C, Determination of cytarabine, Polarography, Direct current polarography of cytarabine, Increasing amplitude pulse polarography of cytarabine, Diferential pulse polarography of cytarabine.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince göstermiş olduğu yardım ve desteklerinden dolayı Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Hocam Prof. Dr. İhsan Sarıkardaşoğlu'na,

Değerli fikirleri ile beni yönlendiren, yapıcı eleştirileri ile çalışmalarımı destekleyen, anlayış ve hoşgörüsü ile yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Muzaffer Tunçel'e,

Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi'nin olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. K.Hüsnü Can Başer'e,

Değerli bilgilerinden yararlandığım Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Hocam Yard. Doç. Dr. Şeref Demirayak'a,

Ampul şeklindeki farmasötik preparatların sağlanmasında değerli yardımlarını esirgemeyen Haydarpaşa Gülhane Askeri Tıp Akademisi Uygulama Hastanesi Dahili Bilimler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Necdet Üskent'e,

Büyük yardımlarını gördüğüm Analitik Kimya Anabilim Dalı çalışma arkadaşlarıma ve çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen diğer arkadaşlarıma,

Sonsuz maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme,
En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	2
2.1. Sitarabinin Fiziksel Özellikleri	2
2.2. Sitarabinin Kimyasal Özellikleri	2
2.3. Sitarabinin Farmakolojik Özellikleri	3
2.4. Sitarabinin Miktar Tayini Yöntemleri	4
2.5. Sitarabinin Ekstraksiyon Yöntemleri	10
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	10
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	10
3.2. Kullanılan Aletler	11
3.3. Analitik İşlemler	11
3.3.1. Stok çözelti	11
3.3.2. Tampon çözeltiler	11
3.3.3. Taşıyıcı elektrolit çözeltisi	12
3.3.4. Test çözeltisi	12
3.4. Polarografik Koşullar	12
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	14
4.1. Sitarabinin Polarografik Davranışlarının İncelenmesi	14
4.2. Sınır Akımı ve Yarı Dalga Potansiyellerinin pH ile İlişkisinin İncelenmesi	14
4.3. Civa Rezervuarına Uygulanan Basıncın Etkisi	17
4.4. Damlama Süresinin Sınır Akımına Olan Etkisi- nin İncelenmesi	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5. Potansiyel Değişme Hızının Sınır Akımına Olan Etkisinin İncelenmesi	21
4.6. Reaksiyonun Tersinirliğinin İncelenmesi	21
4.7. Elektrokapiler Eğrinin İncelenmesi	21
4.8. Sitarabinin Elektrot Yüzeyindeki İndirgenme Mekanizması	23
4.9. Çeşitli Polarografik Teknikler Kullanılarak Derişim-Sınır Akımı İlişkisinin İncelenmesi.	24
4.9.1. Doğru akım polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi	24
4.9.2. Aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi	26
4.9.3. Artan amplitütlü puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi	28
4.9.4. Diferensiyel puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi	31
4.10. Farmasötik Preparattaki Miktar Tayini	33
KAYNAKLAR DİZİNİ	34
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sitarabinin kimyasal formülü	2
2.2. Hücre çekirdeği ve ribozomlarda DNA, RNA ve protein sentezi ile ilgili basamaklar ve sitarabinin etki yeri	4
4.1. Sitarabinin sınır akımı ve yarı dalga potansiyellerinin pH ile ilişkisi	16
4.2. Sitarabinin pH 5.5-9.4 aralığında elde edilen orijinal polarogramları.....	16
4.3. Sitarabin için sınır akımı ile civa rezervuarına uygulanan basınç ilişkisi	18
4.4. Sitarabin için sınır akımı ile $\tau^{2/3}$ ilişkisi ...	20
4.5. Sitarabinin katodik ve anodik yönlerdeki polarizasyon eğrileri	22
4.6. Sitarabinin ve taşıyıcı elektrolit çözeltisinin elektrokapiler eğrisi	22
4.7. Sitarabinin damlayan civa elektrodu yüzeyindeki indirgenme mekanizması	23
4.8. Sitarabinin doğru akım polarografik ile elde edilen polarizasyon eğrileri	25
4.9. Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği	25
4.10. Sitarabinin aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri	27
4.11. Sitarabinin aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği	27
4.12. Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri	29
4.13. Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği	30
4.14. Diferensiyel puls polarografisi ile sitarabin için elde edilen polarizasyon eğrileri	31
4.15. Diferensiyel puls polarografisi ile sitarabin için elde edilen kalibrasyon grafiği	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Polarografik eğrilerin kayıt koşulları	13
4.1. Yarı dalga potansiyellerinin pH ya bağımlı de- ğişimi	15
4.2. Sitarabinin basınç-sınır akımı ilişkisi	17
4.3. Sınır akımının $\tau^{2/3}$ e karşılık aldığı değerler.	20
4.4. Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değer- lendirme sonuçları	26
4.5. Sitarabin için aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirme sonuçları	28
4.6. Artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel de- đerlendirme sonuçları	30
4.7. Sitarabin için diferensiyel puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistik- sel değerlendirme sonuçları	32
4.8. Ampul içerisinde bulunan yüzde sitarabin miktar- ları	33

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sitarabin, akut lösemnin sağaltımında kullanılan ilaçlardan biridir. Akut lösemnin erken dönemlerinde terapotik yararlanımının oldukça fazla olduğu bilinmektedir. Sitarabinin etkisi, DNA sentezinin oluşumunda rol oynayan DNA polimeraz enziminin aktivitesine engel olarak DNA sentezini inhibe etmesinden ve DNA ya da bağlanarak yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır (9).

Sitarabin sulu çözeltilerinde oldukça az stabl olduğundan kolaylıkla deaminasyona uğrayarak urasil arabinozite dönüşebilmektedir (14). Etkili sağaltımın sağlanması, uygulanan ilacın kan düzeyinin belli bir miktarı üzerinde tutulması ile mümkündür. Böyle kolay deaminasyona uğrayan bir ilaçta hem aktif madde, hem de dönüşüm ürününün bir arada tayini önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılan miktar tayini çalışmaları gerek sitarabin gerek urasil arabinozit tayinine yönelik yöntemler üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Sitarabin ve metabolitleri için vücut sıvıları örneklerinde ve farmasötik preparatlarda yapılan miktar tayini çalışmaları, UV spektrofotometrik (7), radyoimmunolojik (15, 17, 18), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kombinasyonu (2), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (3, 4, 6, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21) ve türev spektroskopisi (22) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Sitarabinin elektrokimyasal yöntemle tayini konusunda yapılan literatür araştırmasında elektrokimyasal tayin yöntemlerine rastlanmamıştır.

Bu çalışmada elektrokimyasal tayin yöntemi olarak polarografi seçilmiştir. Damlayan civa elektrodu yüzeyinde sitarabinin indirgenmesi belirlendikten sonra çeşitli parametrelere bağlı olarak miktar tayini konusunda optimizasyon koşulları araştırılmıştır. Çalışmanın diğer bölümünde sitarabinin damlayan civa elektrot yüzeyindeki indirgenme mekanizması aydınlatılmaya çalışılmış ve reaksiyonun tersinirliği araştırılmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile saptanan optimum koşullarda değişik polaro-

grafik tarzlarda tayin aralıkları ve tayin duyarlılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemin uygulaması farmasötik preparatlardaki sitarabinin miktar tayini yapılarak gösterilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Sitarabinin Fiziksel Özellikleri

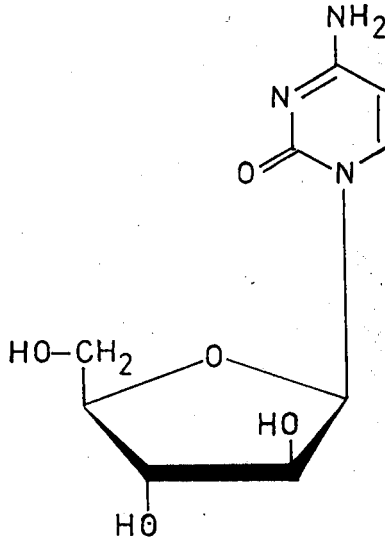
Sitarabin, beyaz, kokusuz kristalize bir tozudur. 212-213°C'de erime noktasına sahiptir. Suda kolayca, alkol ve kloroformda güç çözünür.

2.2. Sitarabinin Kimyasal Özellikleri

Sitarabin bir pirimidinon türevi olarak ilk kez 1959 yılında Walwich ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. 1963'de Upjohn Co. (USA) tarafından patentlenmiştir.

$C_9H_{13}N_3O_5$ kapalı formülünde, 4-amino-1-β-D-arabino-furanozil-2 (1H)-one yapısındadır (Şekil 2.1).

Molekül ağırlığı 243.22'dir.



Şekil 2.1 Sitarabinin kimyasal formülü

2.3. Sitarabinin Farmakolojik Özellikleri

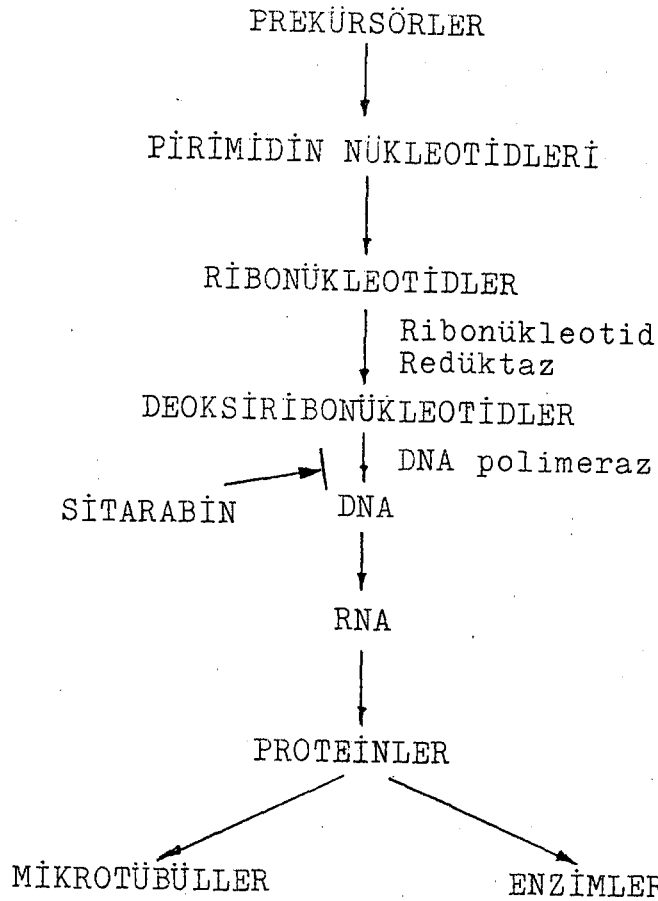
Sitarabin, neoplazmların tedavisinde kullanılan pirimidin antimetabolitlerinden biridir. Antimetabolitler, DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez zincirinin değişik basamaklarında substrat ve koenzim olarak rol oynayan çeşitli doğal metabolitlerin analoglarıdır. Sitarabin doğal bir pirimidin metaboliti olan deoksisitidine yapıca benzer (9).

Sitarabin vücutta deoksisitidin kinaz ve diğer iki kinazın ardışık etkilemesi ile aktif metaboliti olan arabino-furanozilsitozin trifosfat'a (Ara-CTP) dönüşür. Bu metabolit, DNA polimeraz enzimini inhibe ederek DNA sentezini, ayrıca DNA'ya katılarak onun yapısını da bozmaktadır. Etki mekanizması Şekil 2.2 de görülmektedir.

Sitarabinin en önemli kullanılış yeri akut myelojen lösemidir. Ayrıca kronik myelojen lösemnin blastik krizinin ve akut lenfositer lösemnin tedavisinde de kullanılmaktadır.

Sitarabin vücutta pirimidin nükleosit deaminaz (siti-din amino hidrolaz) enziminin etkisi ile inaktif metaboliti olan arabinofuranosilurasil'e (Ara-U, Urasil arabinozit) dönüştürüldükten sonra glomerüler filtrasyon ile elimine edilmektedir.

Sitarabin, mide-bağırsak kanalında iyi absorbe edilmediği için sadece intravenöz yoldan kullanılır. Yan etki olarak kemik iliğini güçlü bir şekilde deprese eder. Sık olarak bulantı ve kusma oluşturur. Enjeksiyon yerinde flebit oluşumuna neden olur. Fötusa, gebeliğin her döneminde zararlı etkisi olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.2 Hücre çekirdeği ve ribozomlarda DNA, RNA ve protein sentezi ile ilgili basamaklar ve sitarabinin etki yeri.

2.4. Sitarabinin Miktar Tayini Yöntemleri

Furner ve arkadaşları (7), insan, maymun ve farelerin serum ve plazmalarındaki siklositidin, sitarabin ve urasil arabinozid tayini için bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada tek bir UV spektrumu üzerinde kurulan üç lineer eşitliğin çözümü ile siklositidin, sitarabin ve urasil arabinozitin miktarına geçilebildiği belirtilmektedir. Radyoaktif materyal kullanılmadan ve ön ayırma işlemleri uygulamaya gerek duyulmadan tayinler yapılabilmektedir. Bu yöntem ile maymun ve köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda siklositidin azalışının izlenmesi ve biyolojik yarı ömürlerin belirlenmesi de gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemin duyarlılık sınırı 2 g/ml olarak verilmektedir.

Van Prooijen ve arkadaşları (23), insanda sitarabinin farmakokinetik çalışmaları için bir biyolojik tayin yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada, sıçan kemik iliği hücrelerinde DNA sentezinde rol alan timidinin, döteryumlanmış halde verildiğinde, DNA'ya bağlanışının sitarabin tarafından inhibe edilmesi incelenmiş; radyoaktifliği ölçmek için sıvı sintillasyon sayıcısı kullanılmıştır. Bu yöntem ile sitarabinin 0.003 mg/ml plazma derişiminde duyarlı olarak ölçülebileceği gösterilmiştir. Ayrıca 100 mg/m² dozda intravenöz injeksiyondan sonra sitarabinin plazmadaki azalışının bifazik olduğu bulunmuştur. Akut lösemili iki hasta üzerinde yapılan incelemelerde her bir fazda elde edilen yarı ömür zamanlarının değişik olduğu saptanmış, ilk fazdaki sitarabinin yarı ömrü 1.8 ve 1.4 dakika, ikinci fazda ise 16.0 ve 9.2 dakika olarak bulunmuştur.

Okabayashi ve arkadaşları (15), plazmada sitarabinin tayini için basit ve güvenilir bir radyoimmünojenik yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla tavşanlarda üretilen antikolar, [³H] sitarabin ve bir milipor filtrasyon tekniği kullanılmıştır. Bu yöntem ile 0.02 m/ml sitarabinin plazmada saptanabildiği belirtilmektedir. Deoksisitidin, sitidin, urasil arabinozot ve diğer nükleositlerin yapılan tayinleri pratik olarak etkilemediği de gösterilmiştir.

Boutagy ve Harvey (2), insan plazmasındaki sitarabini azota duyarlı detektör ile gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kombinasyonu ile tayin etmişlerdir. Azota duyarlı FID detektörlü gaz kromatografisi çalışmalarında sitidin; gaz kromatografisi-kütle spektrometresi çalışmalarında tek iyon izlemeli detektör kullanıldığında sitidin, çok iyon izlemeli detektör ile uçuculuğun sağlanması için asetil ve metil türevlendirilmiş sitarabin iç standartları kullanılmıştır. Plazmada bulunan sitarabin için azota duyarlı detektörlü gaz kromatografisi ile 40-70 ng/ml, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kombinasyonu ile 1 ng/ml düzeyinde, saf sitarabin için ise her iki

teknik ile 50 pg düzeyinde tayinlerin yapılabilceği gösterilmiştir.

Bury ve Keary (4), insan plazmasındaki sitarabinin tayinini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirmişlerdir. Analizler, katyon değiştirici kolonda 0.01 M amonyum format hareketli fazı kullanılarak yapılmıştır. Yöntemin çabuk, basit ve 20 ng/ml düzeyinde duyarlı olduğu bildirilmektedir.

Piall ve arkadaşları (17), sitarabinin tayini için radyoimmünojenik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada sitarabin monofosfat-ovalbumin konjugatının koyunda üretilmesi ile hazırlanan antiserum kullanılmıştır. Antikorların sitotoksik ilaçlar, antibakteriyeller, endojen nükleosit ve nükleotidler ile % 0.023; urasil arabinozot ile % 0.008; sitarabin monofosfat ile % 125 ve sitarabin trifosfat ile % 109 düzeyinde çapraz reaksiyonlar verdiği gösterilmiştir. Bu yöntem ile sitarabinin plazmada, serumda, idrarda ve beyin-omurilik sıvısında ön ekstraksiyon işlemleri gerekmez 1 ng/ml derişimde tayin edilebileceği saptanmıştır.

Pallavicini ve Mazrimas (16), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile biyolojik örneklerde sitarabin ve metabolitlerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada iki analitik teknik önerilmektedir. Birinci teknikte kuaterner amonyum tipi anyon değiştirici reçineler kullanılarak 1 saatten daha az sürede isokratik ayrılmaların gerçekleştirildiği belirtilmektedir. İkinci teknikte boranat türevlendirilmiş poliakrilamit kolonda sitozin ve urasilin seçici olarak cis-diol bağlanması sırasında arabinoz bileşiklerinin % 100 verimle elüe edildiği bildirilmektedir. Elüe edilen bileşiklerin C₁₈ kolonda miktar tayini kolaylıkla yapılabilmiştir. Her iki analitik yöntemle 2.5 ng sitarabin ve 10 ng urasil arabinozitin duyarlı olarak tayin edilebildiği gösterilmiştir.

Breithaupt ve Schick (3), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yaptıkları çalışmada insan plazmasında ve be-

yin-omurilik sıvısında sitarabin ve urasil arabinozitin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Endojen bileşiklerin tümüyle uzaklaştırılması için pH 7.0 fosfat tamponu içeren ortamda isokratik ters faz tekniğini kullanmışlardır. Bu yöntem ile 50 ng/ml duyarlılıkta tayinlerin yapılabilirdiği gösterilmiştir. Plazma ve beyin-omurilik sıvısındaki farmakokinetik çalışmalar ve tedavinin izlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar için hızlı, basit ve seçici bir yöntem olduğu belirtilmektedir.

Linssen ve arkadaşları (12), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yaptıkları çalışmada sitarabin ve urasil arabinozitin tayini için duyarlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmişlerdir. Plazma proteinlerinin çöktürülmesinden sonraki ayırımlar ters faz sıvı kromatografisi tekniği ile sağlanmıştır. Sitarabin için 280 nm'de 0.002 mg/L, urasil arabinozit için 264 nm'de 0.01-0.1 mg/L derişimlerdeki tayinlerin yapılabilirdiği belirtilmektedir. Tüm işleme ilişkin varyans katsayısı 0.005 mg/L sitarabin ve 0.1 mg/L urasil arabinozit için % 6 dolayında bulunmuştur.

Tunçel ve arkadaşları (21), siklositidin, sitarabin ve bunların metaboliti olan urasil arabinozitin stabilite çalışmalarında kullanılabilecek bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada isokratik teknikle, C₁₈ kolon kullanarak pH 2.9'da l-heptan sülfonik asit ve % 3 metanol hareketli fazı ile urasil arabinozit, iç standart olan timidin, siklositidin ve sitarabin için sırası ile gelen bir ayırım sağladıklarını belirtmektedirler. Yaptıkları stabilite çalışmaları ile siklositidin, sitarabin ve urasil arabinozit dönüşümünün ardışık bir reaksiyon verdiğini, bu reaksiyonda bir başka ürünün meydana gelmediğini göstermişlerdir.

Sinkule ve Evans (20), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yaptıkları çalışmada sitarabin, urasil arabinozit, sitidin ve deoksisitidin tayini için seçici bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu amaçla ters faz çift kolonlu katyon değiştirme tekniğini ve adenin arabinozit iç

standartını kullanmışlardır. Yöntemin duyarlılık sınırını 25 ng/ml olarak saptamışlardır. Uygulanan normal ve yüksek dozlardaki sitarabin için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde doğrusal olduğu, işleme ilişkin varyans katsayısının % 9.1'den büyük olmadığı bulunmuştur. Bu derişim sınırlarında doğruluğun \pm % 3-9 dolayında olduğu belirtilmektedir. Bu yöntem ile farmakokinetik ve farmakodinamik karşılaştırmalı çalışmalarda hem normal doz hem de yüksek dozlarda uygulanmış sitarabin içeren örneklerde sitarabin, urasil arabinozot ve nükleositlerin birlikte tayin edilebileceği gösterilmiştir.

Liversidge ve arkadaşları (13), biyolojik örneklerdeki sitarabin, urasil arabinozot ve sodyum salisilatın tayini için hızlı ve tam ayırmalı bir ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak sodyum sefmetazol kullanılmıştır. 2 $\mu\text{g/ml}$ sitarabin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ urasil arabinozot ve 20 $\mu\text{g/ml}$ sodyum salisilat içeren serum örnekleri için pH 3.0 amonyum hidroksit-formik asit hareketli fazı ile en iyi ayırımların elde edildiği belirtilmektedir. Her üç madde için çizilen kalibrasyon eğrisinde oldukça iyi korelasyonlar ile doğrusallık ve yüksek tekrar edilebilirlik elde edilmiştir. Yöntem, rektal yol ile verilen sitarabinin farmakokinetiğinin incelenmesinde de kullanılmıştır. Sodyum salisilatın süpozituarlara rektal absorpsiyona yardımcı olarak katıldığı bildirilmektedir. İntravenöz yol ile uygulanan sitarabin ve metaboliti urasil arabinozitin biyolojik ortamdaki düzeylerinin izlenmesi için de yöntemin yeterli duyarlılıkta olduğu belirtilmektedir.

Sato ve arkadaşları (18), plazmada sitarabin ve urasil arabinozitin tayinini radyoimmünojenik yöntem ile gerçekleştirmişlerdir. Antiserum insan albuminine konjuge edilmiş sitarabin ve urasil arabinozot ile bağışıklık kazandırılmış tavşanlar kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada [^3H] Ara-C ve anti-Ara-C antiserum veya [^3H] Ara-U ve anti-Ara-U antiserum kullanılmıştır. Kan plazmasındaki

2.5 ng/ml (0.01 μ M) sitarabin ve 5 ng/ml (0.02 μ M) urasil arabinozitin bu yöntem ile tayin edilebileceği gösterilmiştir. Sitarabin ve urasil arabinozit ile yapısal olarak ilgili bileşiklerin antiserum ile verdiği çapraz reaksiyonların oldukça düşük olduğu, nükleositlerin herhangi bir saflaştırma işlemi uygulamaksızın tayin edilebildiği belirtilmektedir. 100 mg/kg dozda sitarabin-5'-stearil fosfat veya 48 mg/kg dozda sitarabinin farelere oral yol ile verilmişinden sonra sitarabin ve urasil arabinozitin plazma derişimleri bu yöntem ile saptanmıştır. Sitarabin-5'-stearil fosfatın kanda sitarabine oranla 24 saat daha fazla süreyle kaldığı gösterilmiştir.

Schilsky ve Ordway (19), yaptıkları çalışmada sitarabinin, nükleotidlerinin ve metabolitlerinin birlikte tayini için yeni bir iyon çifti yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Biyolojik örneklerde yaptıkları çalışmada, yöntemin sitarabin için 5 pmol, sitarabin trifosfat için 10 pmol düzeyinde duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Tek basamakta gerçekleştirilen ayırımların farmakokinetik çalışmalara uygulanabilen hızlı ve çok yönlü bir teknik olduğu belirtilmektedir. Yöntemin kullanılış örnekleri, yüksek dozda timidin tedavisi gören hastalardaki plazma nükleosit düzeylerinin analizinde ve göğüs kanseri kültürü yapılmış hücrelerdeki sitarabinin hücre içi farmakokinetik çalışmalarında gösterilmiştir.

Kissinger ve Stemm (10), ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniği ile sitarabin, azasitidin ve bunların parçalanma ürünlerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir. İç standart olarak p-toluik asit, hareketli faz olarak metanol-pH 7.0 fosfat tamponu kullanılmış ve ayırımlar oktadesilsilan kolonda sağlanmıştır. Yöntemin uygulanabilirliği farmasötik preparatlarda incelenmiştir. Sitarabin ve azasitidinin analogları ve parçalanma ürünleri için yöntemin seçici olduğu belirtilmekte ve bu bileşiklerin tümü için çeşitli analizlerde kullanılabil-

cek UV dalga boyları sunulmaktadır. Ayrıca bu çalışmada sitarabinin parçalanma hız sabiti 25°C 'de $2.2 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ olarak bulunmuş ve azasitidinin parçalanma kinetiği de açıklanmıştır.

2.5. Sitarabinin Ekstraksiyon Yöntemleri

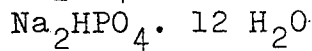
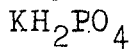
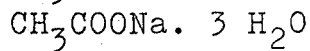
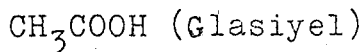
Sitarabinin biyolojik örneklerden ekstraksiyonu çeşitli yöntemlerle yapılmıştır. Biyolojik örnekler, heparinlenmiş ve kan deaminaz inhibitörü olan tetrahidrouridin içeren tüplerde toplanmıştır. Yapılan çalışmalarda absöü etanol (2, 3, 19), asetönitriil (13), perklorik asit (12, 19), trikloroasetik asit (2, 3, 4) ile veya sadece ultrasantrifüj (2, 3, 12, 20, 22) kullanılarak ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bazı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniklerinde çeşitli tiplerde iyon değiştirici kolonlar (6, 16, 19) kullanılmıştır.

Analize hazır hale getirilmiş örnekler -4 ile -70°C arasında saklanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Standart madde olarak kullanılan sitarabin Sigma (St. Louis, MO, USA) firmasından sağlanmıştır. Diğer kimyasal maddeler Merck firmasının üretimidir. Deneyler sürecinde kullanılan su iki kez distillenmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar aşağıdadır.



3.2. Kullanılan Aletler

Deneyler sürecinde PRG-5 Model Tacussel Polaropulse polarograf, Tacussel EGMA hücre standı ve hepsi Tacussel olan damlayan civa çalışma elektrodu, doymuş gümüş/gümüş klorür referans elektrodu ve platin tel karşılaştırma elektrodu sistemi kullanılmıştır. Polarografik eğriler BBC Goerz Metrawatt SE 790 model kaydedici ile kaydedilmiştir. Çözeltilerin pH larını ölçmek için kombine cam elektrotlu Consort P 114 model pH metre kullanılmıştır.

Sitarabinin indirgenme mekanizmasının aydınlatılmasında elektroliz ürünlerinin belirlenmesi için UV-görünür alan spektrofotometre-240 model (Shimadzu) ve OPI-4 model integratör(Shimadzu) kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeler Apple-Macintosh SE bilgisayar kullanılarak yapılmıştır.

3.3. Analitik İşlemler

Sitarabin, sulu çözeltilerinde molekül içi ve moleküller arası etkileşim ile birinci derece reaksiyon kinetiğine uyarak deaminasyon sonucu urasil arabinozite dönüşmektedir (14). Bu nedenle stabilite açısından hafif asidik ortamda hazırlanmış stok çözeltilerin kullanılması öngörülmüştür.

3.3.1. Stok çözelti

Standart sitarabinden 24 mg dolayında tam tartımlar alınmış, bir miktar suda çözüldükten sonra 1 damla derişik hidroklorik asit ilave edilerek ölçülü kaplarda 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.3.2. Tampon çözeltiler

Nötr ve bazik ortamdaki çalışmalarda Sörensens tamponu kullanılmıştır. Bu amaçla 0.12 M disodyum hidrojen fos-

fat derişimine karşılık gelen miktarlar alınarak gerekli asit ve baz ilaveleri ile fosfat tamponu hazırlanmıştır.

Asidik bölgedeki çalışmalarda asetat tamponu kullanılmıştır. 0.25 M sodyum asetat çözeltisi hazırlanarak istenilen pH değerlerine ayarlamalar yapılmıştır.

Tampon çözeltilerin istenilen pH değerlerinde olması için % 10 luk hidroklorik asit ve % 10 luk sodyum hidroksit çözeltileri kullanılmıştır.

3.3.3. Taşıyıcı elektrolit çözeltisi

0.2 M potasyum klorür ve % 50 (h/h) pH sı istenilen değere ayarlanmış tampon çözelti içermektedir.

3.3.4. Test çözeltisi

Yukarıda belirtilen stok çözeltisi belirtilen taşıyıcı elektrolit çözeltisi ile seyreltilmiştir. Bu şekilde test çözeltisi ve taşıyıcı elektrolit çözeltisinin bileşimi ve oranları değişmemiştir.

3.4. Polarografik Koşullar

Sitarabinin polarografik davranışlarının incelenmesi; çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu, doymuş gümüş/gümüş klorür referans elektrodu ve platin tel karşılaştırma elektrodundan oluşan elektrot sisteminde değişik polarografik tarzlar (mode) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tayin duyarlılıkların karşılaştırılması amacıyla doğru akım polarografisi, aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi, artan amplitütlü puls polarografisi ve diferensiyel puls polarografisi kullanılırken sınır akımı üzerine etkisi olan parametreleri incelenmesinde sadece doğru akım polarografisi kullanılmıştır. Polarogramların kaydedildiği koşullar Çizelge 3.1 de toplu olarak verilmiştir.

Hazırlanan çözeltiler içersindeki çözünmüş oksijenin tümü azot gazı geçirilerek uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3.1 Polarografik eğrilerin kayıt koşulları

Kullanılan Tarz	Doğru Akım Polarografisi	Aşırı Yüklenmiş Sabit Amplitütlü Puls Polarografisi	Artan Amplitütlü Puls Polarografisi	Diferensiyel Puls Polarografisi
Başlangıç Potansiyeli (-mV)	1400	1500	1500	1500
Potansiyel Değişim Hızı (mV.s ⁻¹)	4	4	4	4
Kağıt Hızı (s.cm ⁻¹)	10	10	10	10
Duyarlılık Aralığı (μA)	12.5	5	12.5	1.25
Damlama Süresi (s)	1	0.8	0.8	0.8
Uygulanan Basınç (Bar)	1	1	1	1
Damla Büyütme (s)	0.5	-	-	-
Damping	6	6	6	6

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sitarabinin Polarografik Davranışlarının İncelenmesi

2.03×10^{-4} M derişiminde sitarabin çözeltilisinin 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 fosfat tamponu taşıyıcı elektrolit çözeltilisi içerisinde -1000 mV potansiyelden başlayarak katodik yönde $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ hız ile 1 bar basınç uygulayarak 0.5 s damla büyütmeli ve 1 s civa damlamalı, tüm ölçeğin (250 mm) $5 \mu\text{A}$ ve $12.5 \mu\text{A}$ duyarlılığındaki polarografik kayıt koşullarında doğru akım polarogramları kaydedilmiştir. Kayıt işlemine başlamadan önce, ortamda çözülmüş halde bulunabilecek oksijeni uzaklaştırmak amacıyla sistemden 10 dakika saf azot gazı geçirilmiştir. Polarografik koşullarda bazı değişiklikler yapılarak aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi, artan amplitütlü puls polarografisi ve diferensiyel puls polarografisi ile polarogramlar kaydedilmiştir.

Belirtilen polarografik koşullarda damlayan civa elektrodu yüzeyinde sitarabinin tek bir polarografik dalga-ya karşılık gelen indirgenmeye uğradığı gözlenmiştir.

4.2. Sınır Akımı ve Yarı Dalga Potansiyellerinin pH ile İlişkisinin İncelenmesi

Sitarabinin sınır akımı ve yarı dalga potansiyelinin pH ile ilişkisi incelenirken sitarabin derişiminin sabit tutulması gerekmektedir. Bu nedenle 2.03×10^{-4} M sitarabin içeren elektrolit çözeltililerinin 2.98 ile 9.88 pH aralığında doğru akım polarogramları incelenmiş, pH ın sınır akımına ve yarı dalga potansiyeli üzerine etkisi araştırılmıştır. pH 2.98 ile 5.50 aralığında asetat, pH 5.96 ile 9.88 aralığında ise fosfat tamponları kullanılmıştır. Asetat tamponunun hazırlanışında 0.25 M sodyum asetat, fosfat tamponunun hazırlanışında 0.12 M disodyum hidrojen fosfat alınmış ve % 10 luk hidroklorik asit ve % 10 luk sodyum hidroksit ile pH ları istenilen değerlere ayarlanmıştır.

Belirtilen 2.98-9.88 pH aralığında sabit derişimli

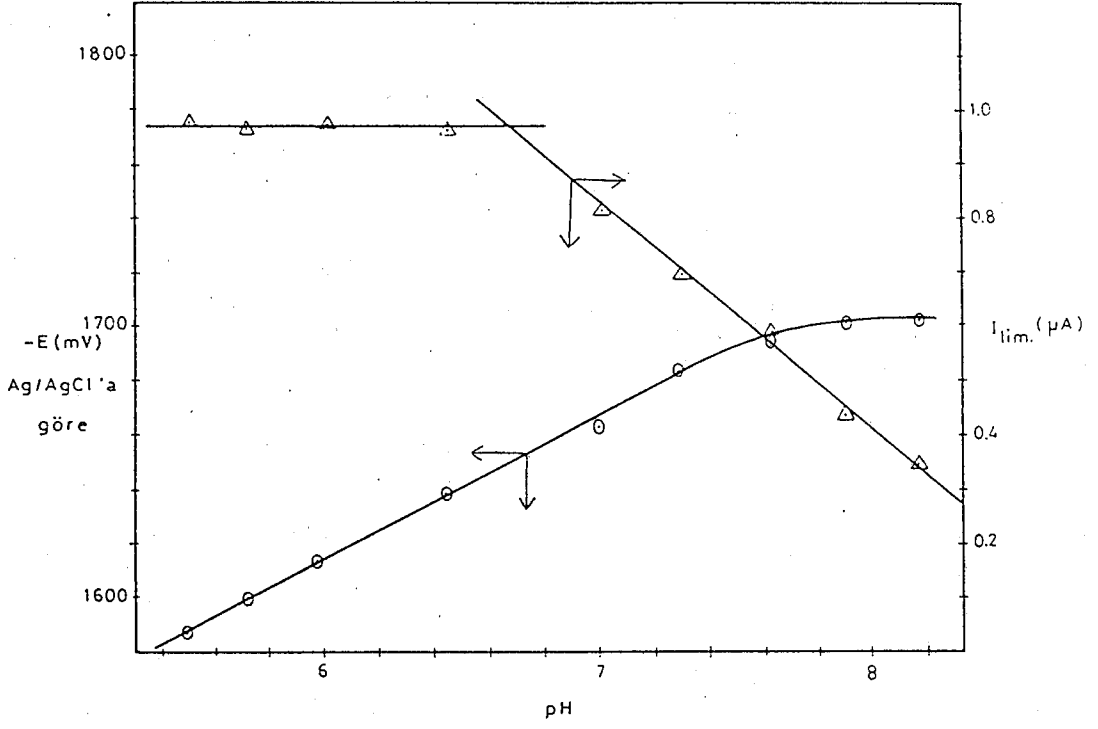
sitarabin çözeltilerinin polarografik kayıtlarından her bir pH daki test çözeltilerinin, artık akımlar düşüldükten sonra sınır akımları ve $\log(I/I_s - I)$ ile potansiyel ilişkisinden yararlanılarak hesaplanan yarı dalga potansiyelleri bulunmuş ve sonra pH ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.1) Grafikte sınır akımları pH 6.6 ya kadar sabit değerler almakta, pH 6.6 dan sonra lineer bir azalma göstermektedir. Yarı dalga potansiyelleri 2.98 ile 7.40 dolaylarına kadar pH ın artması ile anodiye kayan lineer bir ilişki sağlamaktadır. pH 8.0 dolaylarında bu ilişki ortadan kalkmaktadır. Yarı dalga potansiyellerindeki bu kayma hidrojen iyonlarının molekülü protonlamasına bağlanabilir. Çizelge 4.1 de yarı dalga potansiyellerinin pH ya bağımlı olarak değişimi görülmektedir.

pH 5.5 in altındaki pH larda polarizasyon egrileri elde edilmesine karşın morfolojik yönden uygunluk sağlamadığı için değerlendirmelerde dikkate alınmamıştır.

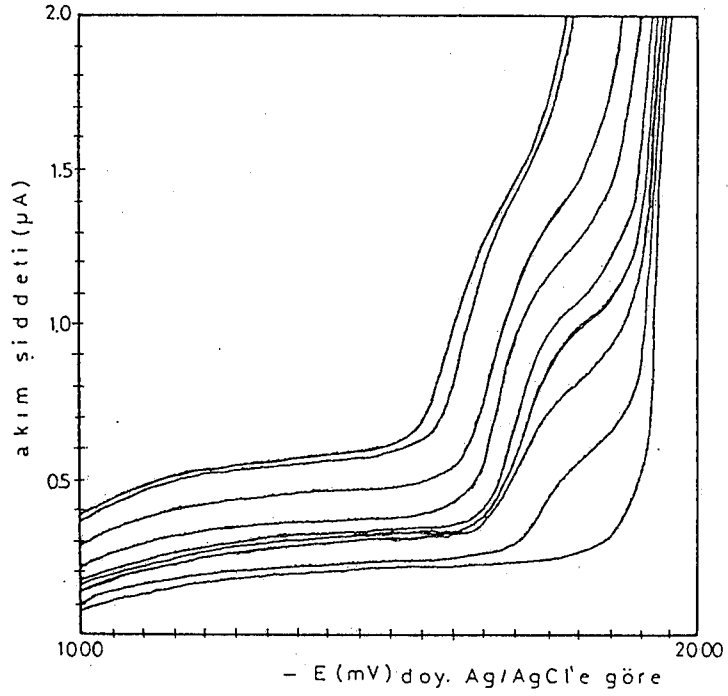
pH 5.5 ile 9.4 aralığında elde edilen orijinal polarogramlar Şekil 4.2 de verilmektedir.

Çizelge 4.1 Yarı dalga potansiyellerinin pH ya bağımlı değişimi.

pH	$E_{1/2}$
5.50	-1585
5.96	-1631
6.43	-1640
7.02	-1664
7.31	-1684
7.63	-1696
7.91	-1717
8.20	-1718



Şekil 4.1 Sitarabinin sınır akımı ve yarı dalga potansiyellerinin pH ile ilişkisi.



Şekil 4.2 Sitarabinin pH 5.5-9.4 aralığında elde edilen orijinal polarogramları.

4.3. Civa Rezervuarına Uygulanan Basıncın Etkisi

2.03×10^{-4} M sitarabin, pH 6.0 elektrolit çözeltisi içerisinde civa rezervuarına değişen basınçlar uygulanarak incelenmiştir. Diğer tüm polarografik koşullar sabit tutulmuştur. Uygulanan basınçlar ve bu basınçlardaki sınır akımı değerleri Çizelge 4.2 de verilmiştir.

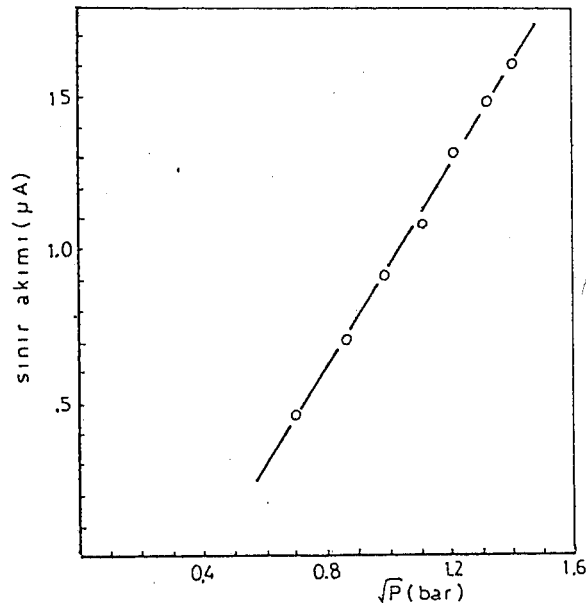
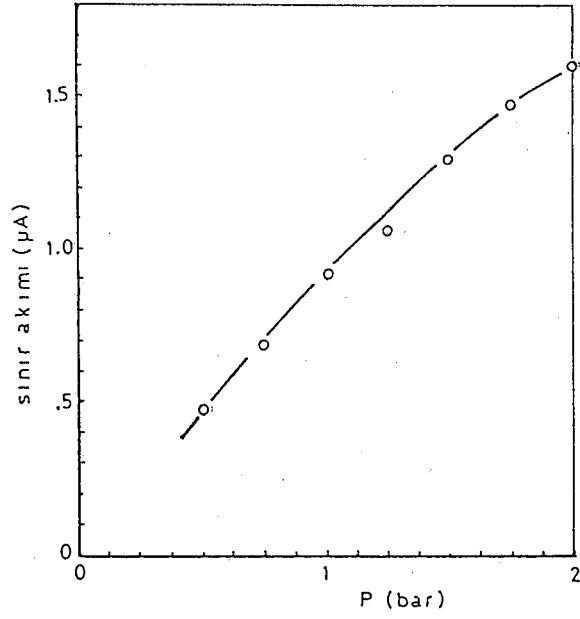
Çizelge 4.2 Sitarabinin basınç-sınır akımı ilişkisi.

P(Bar)	\sqrt{P}	$I_s (\mu A)$
0.50	0.70	0.46
0.75	0.87	0.68
1.00	1.00	0.90
1.25	1.12	1.06
1.50	1.22	1.30
1.75	1.32	1.48
2.00	1.41	1.60

Civa rezervuarına uygulanan basınç polarografik akımı kontrol eden faktörlerin incelenmesinde önemli bir ölçüttür ve bu üç ayrı faktörün incelenmesinde kullanılmaktadır (1). Bilindiği gibi bu parametreler difüzyon, adsorpsiyon ve katalitik akımlardır.

Çizelge 4.2 deki veriler kullanılarak P ye karşı I_s ve \sqrt{P} ye karşı I_s ilişkili grafikler Şekil 4.3 de görülmektedir.

Şekil 4.3 de görüldüğü gibi P ye karşı I_s grafiğinin tam doğrusal olmadığı söylenebilir. \sqrt{P} ye karşı I_s ilişkisi ise iyi bir korelasyonla bir doğru meydana getirmektedir. Bu durum, polarografik akımı kontrol eden faktörün difüzyon karakterli olduğu, bununla birlikte doğrunun orijinden geçmemesi nedeni ile az da olsa adsorpsiyon kontrollü olduğu şeklinde açıklanabilir.



Şekil 4.3 Sitarabin için sınır akımı ile civa rezervuarına uygulanan basınç ilişkisi.

4.4. Damlama Süresinin Sınır Akımına Olan Etkisinin İncelenmesi

2.03×10^{-4} M sitarabin ve 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 taşıyıcı elektrolit sistemi içerisinde diğer polarografik koşullar değiştirilmeksizin damlama süresinin sınır akımına olan etkisi incelenmiştir. Damlama süresi 0.6 s ile 2.8 s aralığında incelenmiştir.

$t^{2/3}$ difüzyon kontrollü yürüyen polarografik akımlarda sınır akımının lineer bir fonksiyonudur ve sınır akımına damlayan civa elektrodunun etkisini gösterir. Kılcal sabiti olarak nitelendirilen $t^{2/3}$ değeri, kılcal içerisinden saniyede mg cinsinden damlayan civanın akış hızı ile damlama süresi kullanılarak hesaplanır (1).

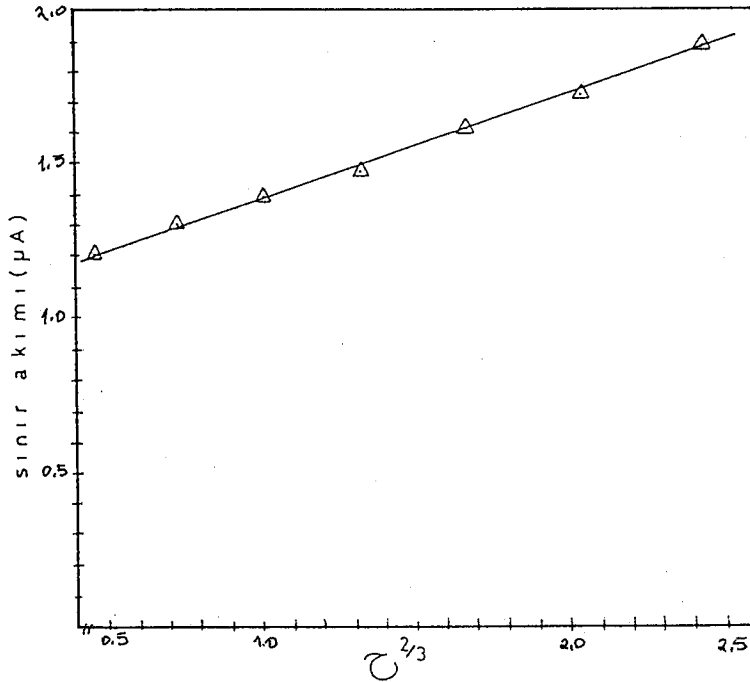
Kılcaldan saniyede mg cinsinden damlayan civanın akış hızının bulunması için civa rezervuarına 1 Bar sabit basınç uygulayarak 1.0 ile 2.8 s damlama süresi aralığında 20 civa damlası bir kaba alınmış ve tartılmıştır. Çeşitli damlama sürelerine karşılık gelen toplam civa ağırlıkları bulunduktan sonra 1 s de damlayan civanın bir damlasının ortalama ağırlığı hesaplanmıştır. Bu değer $1.60144 \pm 0.0303 \text{ mg.s}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Belirtilen damlama sürelerinde elde edilen polarogramlarda damlama sürelerinin artımı ile sınır akımının aldığı değerler Çizelge 4.3 de toplanmıştır. Çizelge 4.3 de damlama süresi yerine kılcal sabiti olan $t^{2/3}$ değerleri hesaplanmış ve kullanılmıştır.

Çizelge 4.3 deki $t^{2/3}$ değerleri sınır akımına karşı grafiğe geçirildiğinde doğrusal bir ilişkinin olduğu bulunmuştur. Bu ilişki Şekil 4.4 de gösterilmiştir. Bu da polarografik akımı kontrol eden faktörlerin daha çok difüzyon karakterli olduğunu doğrulamaktadır.

Çizelge 4.3 Sınır akımının $\tau^{2/3}$ e karşılık aldığı değerler

$\tau^{2/3}$	$I_s (\mu A)$
0.46	1.24
0.71	1.32
1.00	1.38
1.32	1.44
1.66	1.62
2.04	1.72
2.43	1.90
2.85	2.36



Şekil 4.4 Sitarabin için sınır akımı ile $\tau^{2/3}$ ilişkisi.

4.5. Potansiyel Değişme Hızının Sınır Akımına Olan Etkisinin İncelenmesi

2.03×10^{-4} M sitarabin ve 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 taşıyıcı elektrolit çözeltisi içerisinde diğer polarografik koşullar sabit tutularak potansiyel değişme hızının 2 mV.s^{-1} ile 20 mV.s^{-1} aralığında değiştirilmesinin sınır akımına olan etkisi incelenmiştir.

Bu çalışma koşullarında potansiyel değişme hızının polarogramların morfolojisini etkilemediği sonucuna varılmıştır.

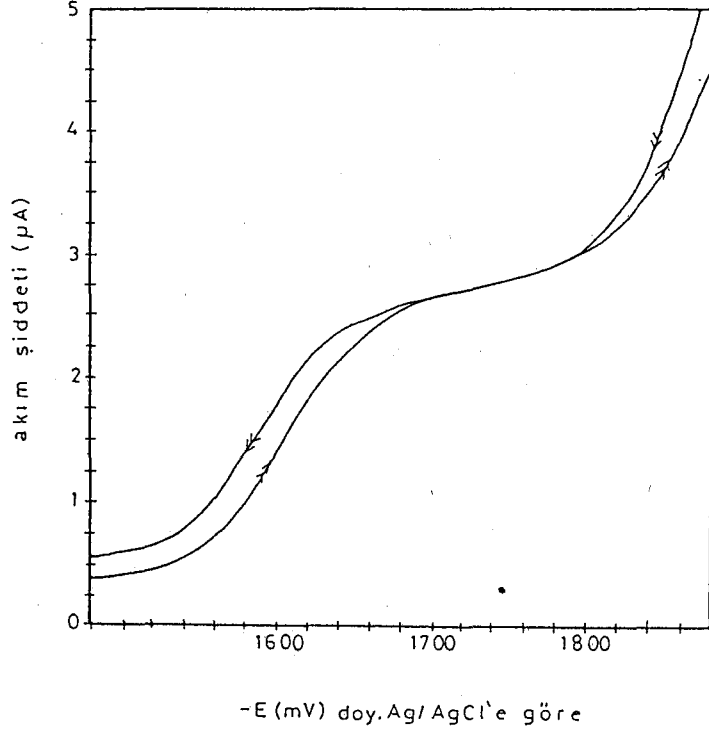
4.6. Reaksiyonun Tersinirliğinin İncelenmesi

5.075×10^{-4} M sitarabin ve 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 taşıyıcı elektrolit çözeltisinde -1000 mV dan başlayarak katodik yönde ve -1900 mV dan başlayarak anodik yöndeki doğru akım polarogramları Şekil 4.5 de gösterilmiştir. Diğer polarografik koşullarda değişiklik yapılmamıştır.

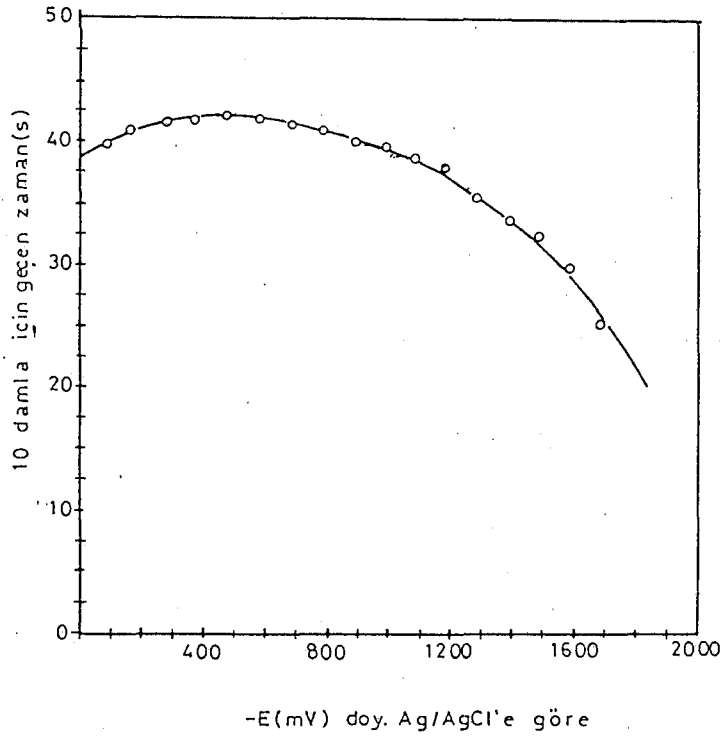
Bu polarizasyon eğrilerinden yararlanılarak sitarabinin katodik yönde tarama ile elde edilen yarı dalga potansiyelinin -1605 mV, anodik yöndeki tarama ile elde edilen yarı dalga potansiyelinin ise -1590 mV olduğu bulunmuştur. Aradaki -15 mV luk potansiyel farkı sitarabinin bu çalışmadaki koşullarda hayli reversibl davrandığını göstermektedir.

4.7. Elektrokapiler Eğrinin İncelenmesi

0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 taşıyıcı elektrolit çözeltisinin ve aynı taşıyıcı elektrolit çözeltisi içerisindeki 2.03×10^{-4} M sitarabin çözeltisinin oksijeni uzaklaştırıldıktan sonra civa rezervuarına 1 Bar sabit basınç uygulayarak 100 mV aralıkla 0.0 mV dan -1800 mV a değin 10 civa damlasının düşmesi için geçen süre kronometre ile ölçülmüştür. Taşıyıcı elektrolit çözeltisinin ve sitarabinin bu koşullarda elde edilen elektrokapiler eğrisi Şekil 4.6 da görülmektedir.



Şekil 4.5 Sitarabinin katodik ve anodik yöndeki polarizasyon eğrileri.

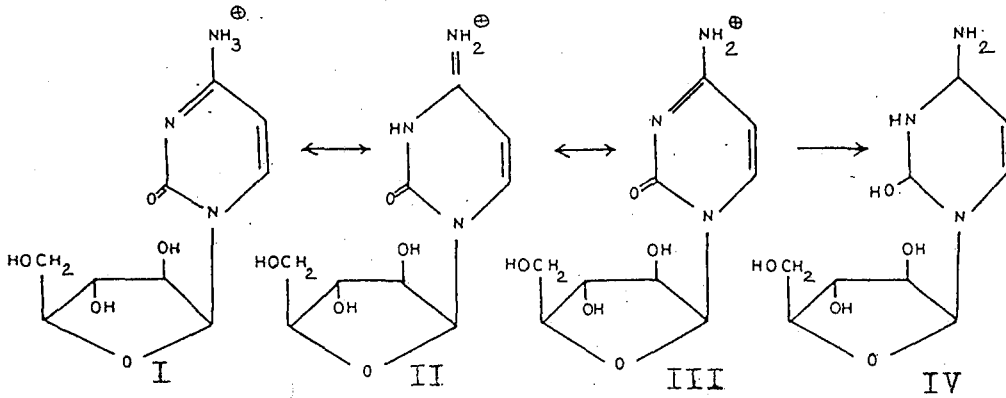


Şekil 4.6 Sitarabinin ve taşıyıcı elektrolit çözeltisinin elektrokapiler eğrisi.

Şekil 4.6 da görüldüğü gibi elektrolit çözeltisi ile 2.03×10^{-4} M sitarabin içeren çözelti egrileri çakışık düzende elde edilmiştir. Bu 2.03×10^{-4} M sitarabin içeren çözeltinin elektrolit çözeltisi ile aynı kinematik viskoziteye sahip olduğu adsorpsiyonla ilgili olayların ya az veya hiç oluşmadığı şeklinde açıklanabilir.

4.8. Sitarabinin Elektrot Yüzeyindeki İndirgenme Mekanizması

Sitarabinin damlayan civa elektrodu yüzeyindeki indirgenmesi Şekil 4.7 de görülmektedir.



Şekil 4.7 Sitarabinin damlayan civa elektrodu yüzeyindeki indirgenme mekanizması.

Sitarabin molekülü (I) asidik ortamda protonlanmış haldedir (5, 6, 11, 24). Molekül protonlandıktan sonra molekül bir iç değişime uğrayarak (II) ve (III) totomerleri dengesi meydana gelmektedir. Molekülün indirgenebilmesi için mutlaka protonlanması gerekmektedir. Bu durum, pH - sınır akımı ilişkisi incelenirken elde edilen grafik ile doğrulanmaktadır. Şöyle ki, sınır akımı pH 3.0 ile 7.0 dolaylarına kadar maksimum olmakta, molekülün protonlanmasının daha az olduğu bazik bölgelerde sınır akımının düştüğü gözlenmektedir. (III) molekülü 3 elektron vererek (IV) molekülüne indirgenmektedir. Bu çalışma ile sitarabin elektrot yüzeyindeki indirgenmesi ile ilgili reaksiyona yeni

bu öneri getirilmektedir.

Yapılan bir çalışmada elektroliz sırasında indirgenen maddenin miktarına eşdeğer miktarda ürün açığa çıktığı belirtilmektedir (8). Civa havuz elektrot kullanılarak ve sitarabinin indirgenme potansiyeli olan -1640 mV da gümüş/gümüş klorüre karşı uzun süre sitarabin molekülü elektroliz edilerek deaminasyon olup olmadığı araştırılmış, UV spektrumlarında deaminasyon ürünü olan Ara-U ya rastlanmamıştır.

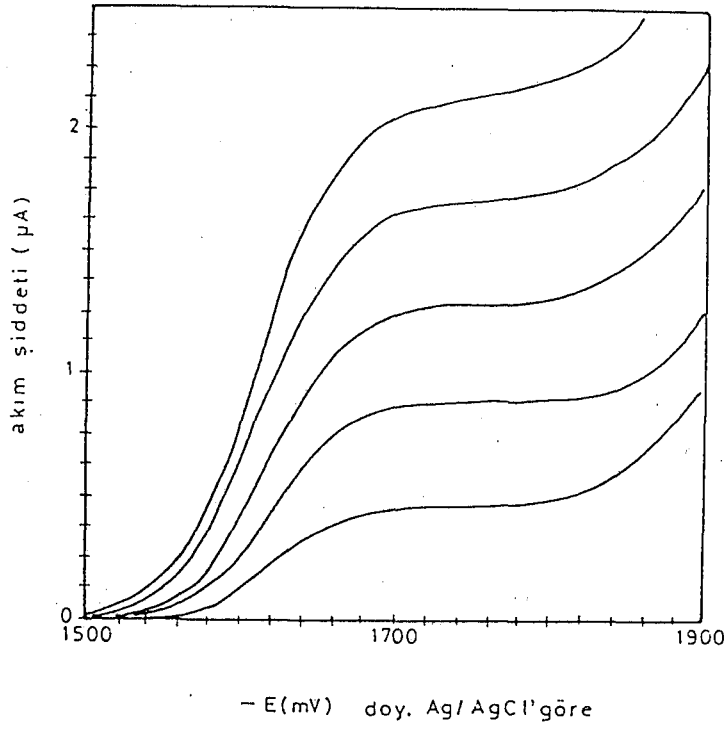
4.9. Çeşitli Polarografik Teknikler Kullanılarak Derişim-Sınır Akımı İlişkisinin İncelenmesi

Sitarabinin derişim-sınır akımı ilişkisinin incelenmesi ve kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesi polarografik optimizasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra gerçekleştirilmiştir. Polarizasyon eğrilerinin en iyi belirlediği 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 fosfat tamponu taşıyıcı elektrolit sistemi kullanılmıştır. Kullanılan optimum koşullar Çizelge 3.1 de verilmektedir. Sitarabinin 1.015×10^{-4} M ile 5.075×10^{-4} M derişim aralığında doğru akım polarografisi, aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi, artan amplitütlü puls polarografisi ve diferensiyel puls polarografisi teknikleri ile derişim-sınır akımı ilişkisi incelenmiştir.

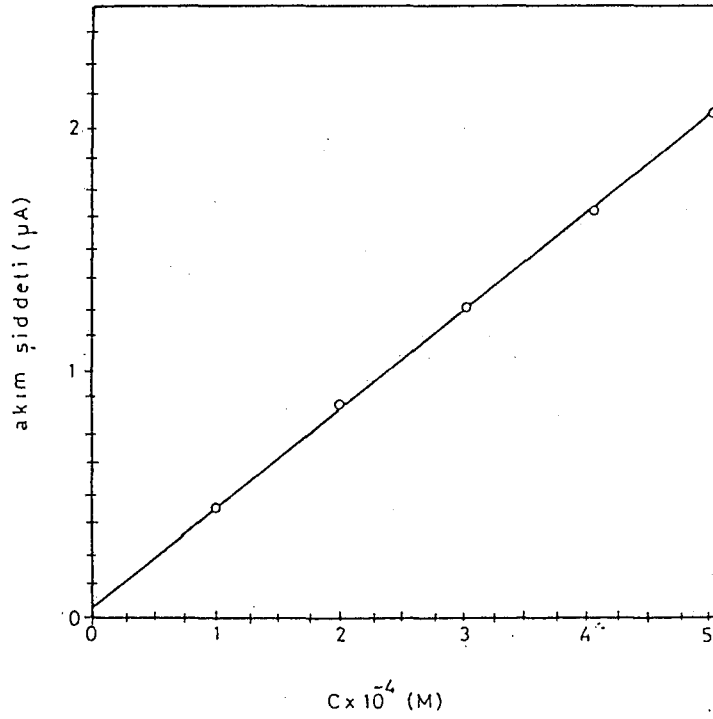
4.9.1. Doğru akım polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi

Sitarabinin belirtilen derişimler ve Çizelge 3.1 deki kayıt koşullarında doğru akım polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi incelenmiştir. Şekil 4.8 de elde edilen polarizasyon eğrileri görülmektedir.

Sitarabinin çeşitli derişimleri için -1720 mV daki sınır akımı değerlerinden yararlanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.9 da görülmektedir.



Şekil 4.8 Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri.



Şekil 4.9 Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen kalibrasyon denklemi ile ilgili değerlendirmeler Çizelge 4.4 de verilmektedir. Noktalar arasında 0.9998 gibi oldukça iyi bir korelasyonun olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4 Sitarabinin doğru akım polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirme sonuçları.

DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:
4	.99985	.00913	.7188

Beta Coefficient Table				
Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:
INTERCEPT	.055	.00957	.00009	5.74456
SLOPE	3990.14778	28.4409	808.88479	140.29612

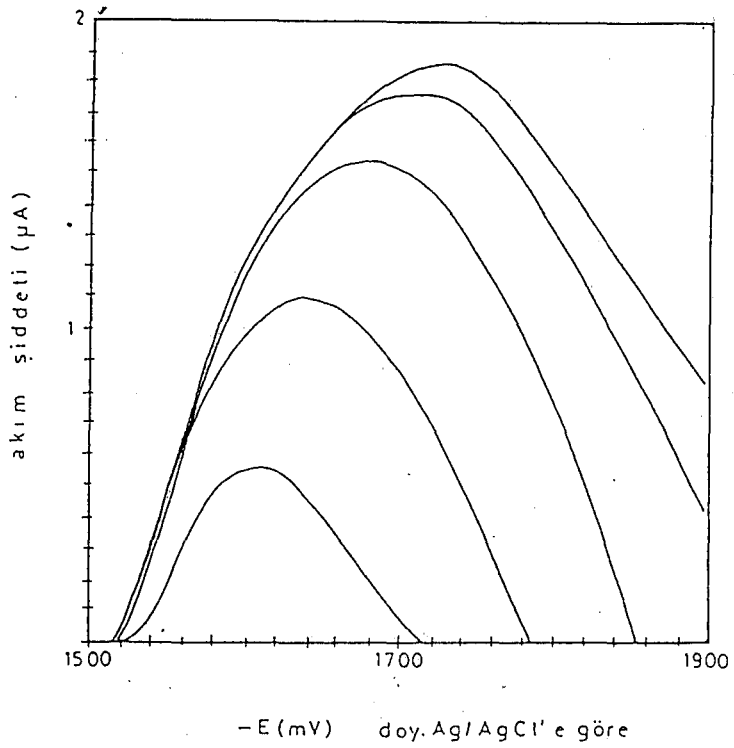
Analysis of Variance Table				
Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	1.64025	1.64025	19663
RESIDUAL	3	.00025	.00008	p < .0001
TOTAL	4	1.6405		

Residual Information Table			
SS(e(i)-e(i-1)):	e ≥ 0:	e < 0:	DW-test:
.00047	3	2	1.9

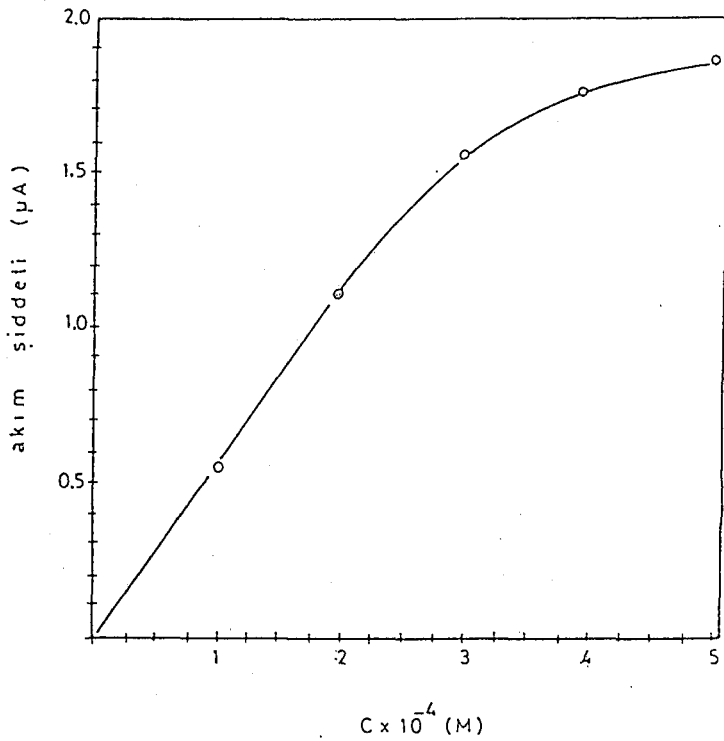
4.9.2. Aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi.

Belirtilen sitarabin derişimleri ve Çizelge 3.1 de belirtilen polarografik koşullarda aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi tekniği ile sitarabin için elde edilen polarizasyon eğrileri Şekil 4.10 da görülmektedir.

Şekil 4.10 daki polarizasyon eğrilerinde maksimum sınır akımları değerlerinin elde edildiği potansiyeller kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.11 de verilmektedir.



Şekil 4.10 Sitarabinin aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri.



Şekil 4.11 Sitarabinin aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Sitarabinin aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon denklemi ile ilgili değerlendirmeler Çizelge 4.5 de verilmektedir. Noktalar arasında 0.9179 gibi bir korelasyonun olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5 Sitarabin için aşırı yüklenmiş sabit amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirme sonuçları

DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:
4	.91798	.17519	12.71303

Beta Coefficient Table				
Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:
INTERCEPT	.415	.18374	.03376	2.25867
SLOPE	3116.50485	537.85006	289282.68451	5.79437

Analysis of Variance Table				
Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	1.03041	1.03041	33.57478
RESIDUAL	3	.09207	.03069	.01 < p < .025
TOTAL	4	1.12248		

Residual Information Table			
SS[e(i)-e(i-1)]:	$e \geq 0$:	$e < 0$:	DW test:
.1278	3	2	1.38812

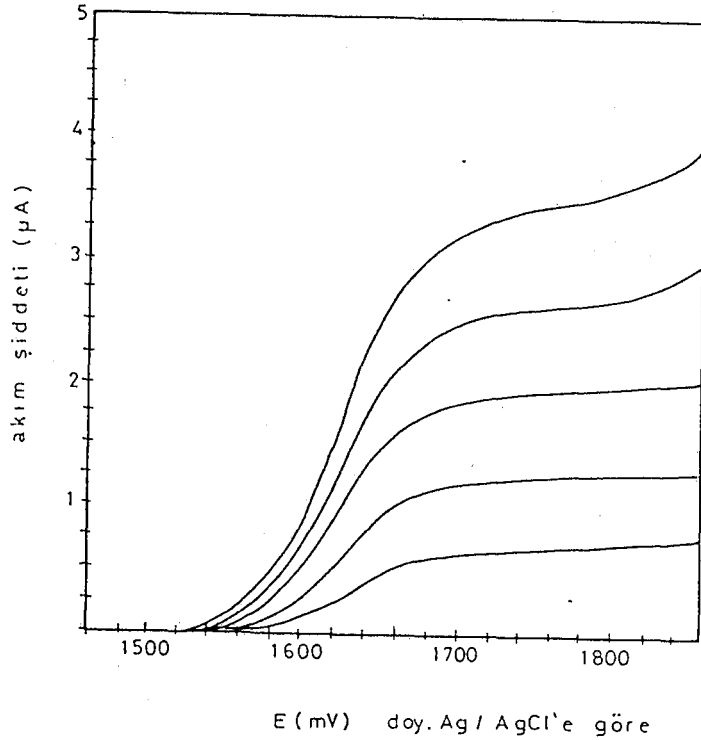
Sitarabinin bu teknikle elde edilen kalibrasyon grafiği artan derişimlerde doğrusallıktan sapmaktadır. Bu yüzden miktar tayinlerinin 2.5×10^{-4} M derişime kadar yapılabileceği söylenebilir.

4.9.3. Artan amplitütlü puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi

Belirtilen sitarabin derişimleri ve Çizelge 3.1 de belirtilen polarografik koşullarda artan amplitütlü puls polarografisi ile sitarabin için elde edilen polarizasyon eğrileri Şekil 4.12 de görülmektedir.

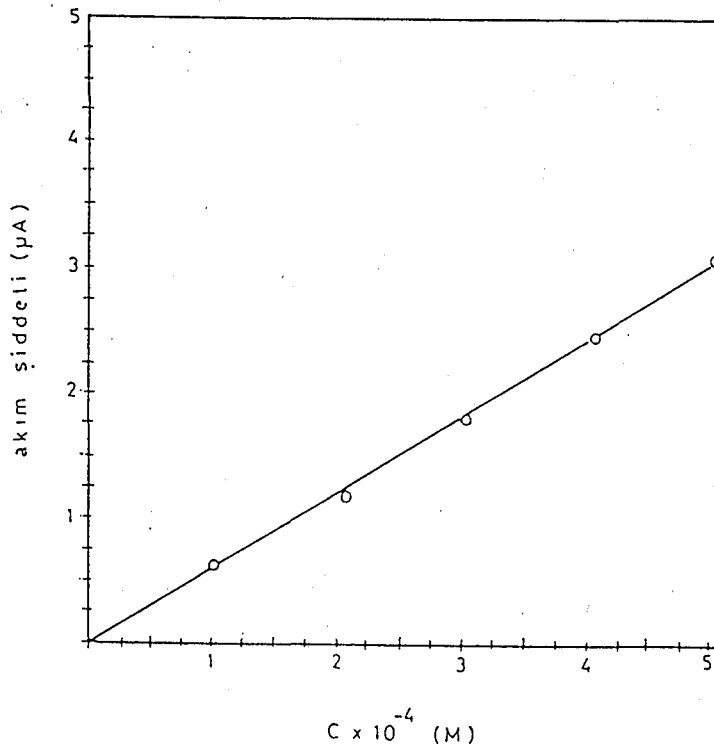
Bu teknik ile elde edilen polarizasyon eğrilerinde

-1700 mV daki sınır akımı değerleri kullanılarak derişimlere karşı çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.13 de verilmektedir.



Şekil 4.12 Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri.

Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon denklemi ile ilgili değerlendirmeler Çizelge 4.6 da verilmektedir. Noktalar arasında 0.9986 gibi iyi bir korelasyonun olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13 Sitarabinin artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Çizelge 4.6 Artan amplitütlü puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirme sonuçları.

DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:
4	.99861	.07188	2.32997

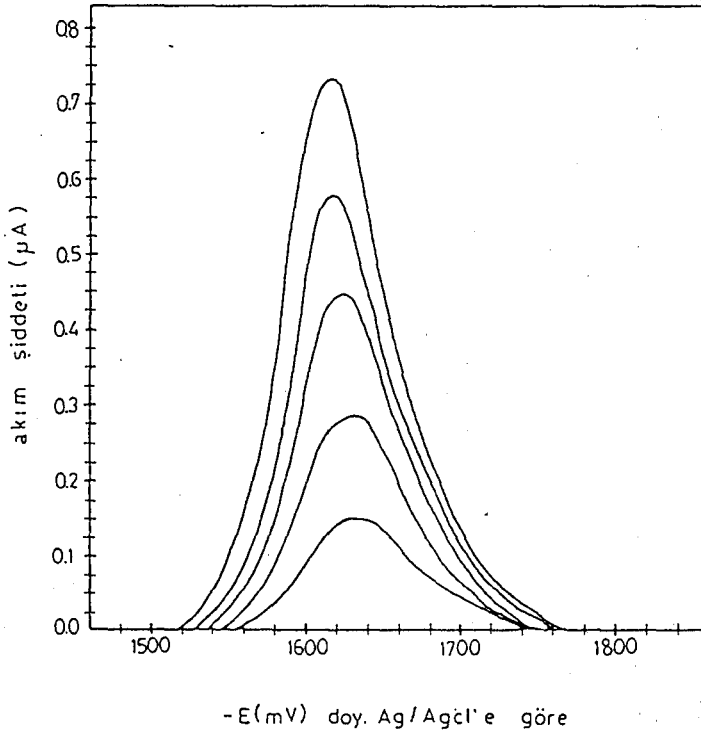
Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:
INTERCEPT	-.08	.07539	.00568	-1.06118
SLOPE	10242.71845	220.68255	48700.78864	46.41381

Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	11.13025	11.13025	2154.24194
RESIDUAL	3	.0155	.00517	p < .0001
TOTAL	4	11.14575		

SS[e(i)-e(i-1)]:	e ≥ 0:	e < 0:	DW test:
.02385	2	3	1.53871

4.9.4. Diferensiyel puls polarografisi ile derişim-sınır akımı ilişkisi

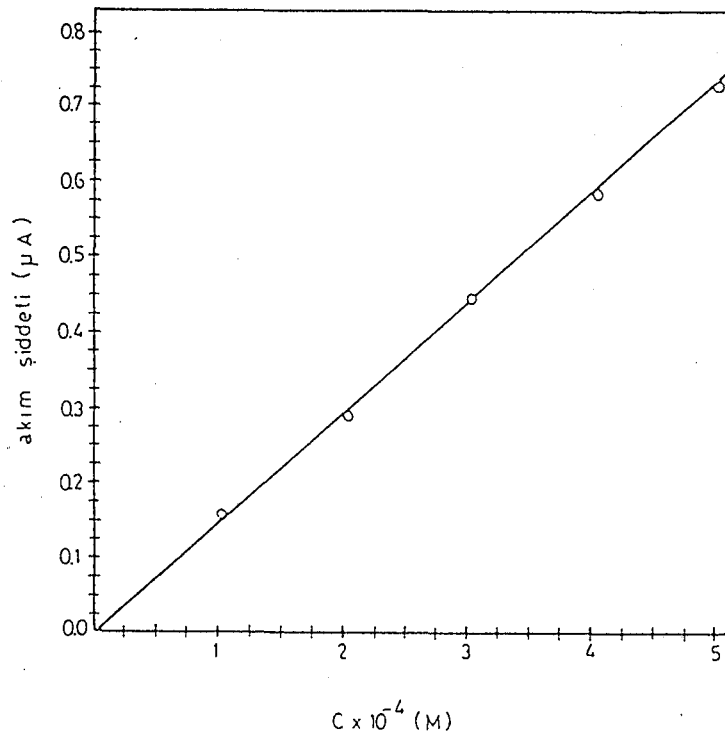
Belirtilen sitarabin derişimleri ve Çizelge 3.1 de belirtilen polarografik koşullarda diferensiyel puls polarografisi ile elde edilen polarizasyon eğrileri Şekil 4.14 de görülmektedir.



Şekil 4.14 Diferensiyel puls polarografisi ile sitarabin için elde edilen polarizasyon eğrileri.

Bu teknik kullanılarak elde edilen polarizasyon eğrilerinde maksimum sınır akımları değerlerinin elde edildiği potansiyeller kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.15 de görülmektedir.

Sitarabinin diferensiyel puls polarografisi ile elde edilen kalibrasyon denklemi ile ilgili değerlendirmeler Çizelge 4.7 de verilmektedir. Noktalar arasında 0.9992 gibi iyi bir korelasyon elde edilmiştir.



Şekil 4.15 Diferensiyel puls polarografisi ile sitarabin için elde edilen kalibrasyon grafiği.

Çizelge 4.7 Sitarabin için diferensiyel puls polarografisi ile elde edilen regresyon analizi ve istatistiksel değerlendirme sonuçları.

DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:
4	.99923	.00723	1.61053

Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:
INTERCEPT	.02075	.00758	.00006	2.73593
SLOPE	1385.92233	22.20133	492.89911	62.42519

Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	.20378	.20378	3896.90438
RESIDUAL	3	.00016	.00005	p < .0001
TOTAL	4	.20393		

SS(e(i)-e(i-1)):	e ≥ 0:	e < 0:	DW test:
.00044	3	2	2.80637

Sitarabinin kullanılan teknikler ile yüksek duyarlılık ve tekrar edilebilir eğriler verdiği saptanmıştır.

4.10. Farmasötik Preparattaki Miktar Tayini

Sitarabinin ülkemizdeki farmasötik preparatı olan ampul içerisindeki sitarabin miktar tayini geliştirilen doğru akım polarografisi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Ampul içerisinde bildirilen sitarabin miktarı 20 mg/ml dir.

2.5×10^{-4} M sitarabin içeriğine karşılık gelen miktarlar 0.2 M potasyum klorür içeren pH 6.0 taşıyıcı elektrolit çözeltisi içerisinde seyreltilmiştir. Çizelge 3.1 de doğru akım polarografisi için belirtilen koşullarda doğru akım polarogramları kaydedilmiştir. -1720 mV daki sınır akımı değerleri okunarak bulunan değerler kalibrasyon denkleminde çözüldükten sonra sitarabin miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra ampul içerisindeki yüzde sitarabin miktarına geçilmiştir. Ampul içerisinde bulunan yüzde sitarabinin miktarları Çizelge 4.8 de verilmektedir.

Çizelge 4.8 Ampul içerisinde bulunan yüzde sitarabin miktarları.

Deney No	Bulunan miktar %
1	99.16
2	100.95
3	100.07
4	100.07
5	98.31
6	99.19

Ortalama : 99.63
Standart sapma: 0.8452
Varyans : 0.7144

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Bauer, H.H., Christian, G.D., and O'Reilly, J.E.: Instrumental Analysis. Allyn and Bacon Chemistry Series, Boston, 1978, pp. 53-60.
2. Boutagy, J. and Harvey, D.J.: Determination of cytosine arabinoside in human plasma by gas chromatography with a nitrogen sensitive detector and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 146: 283-287, 1978.
3. Breithaupt, H. and Schick, J.: Determination of cytarabine and uracil arabinoside in human plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 225: 99-106, 1981.
4. Bury, R.W. and Keary, P.J.: Determination of cytosine arabinoside in human plasma by high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 146: 350-353, 1978.
5. Christensen, J.J., Rytting, J.H. and Izatt, R.M.: Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. VIII. pK , ΔH° and ΔS° values for proton ionization from several pyrimidines and their nucleosides at 25°C. *J. Phys. Chem.*, 71(8): 2700-2705, 1967.
6. Evans, J.E., Tieckelmann, H., Naylor, E.W. and Guthrie, R.: Measurement of urinary pyrimidine bases and nucleosides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 163: 29-36, 1979.
7. Furner, R.L., Gaston, R.W., Strobel, J.D., El Dareer, S. and Mellett, L.B.: Differential analysis of cyclocytidine, 1- β -D arabinofuranosylcytosine and 1- β -D arabinofuranosyluracil by ultraviolet spectrophotometry. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52(5): 1521-1528, 1974.
8. Janik, B. and Palecek, E.: Polarographic behavior of cytosine and some of its derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.*, 105: 225-236, 1964.
9. Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji Üçüncü baskı, Ulucan Matbaası, Cilt I, 1984, s. 921-927.
10. Kissinger, L.D. and Stemm, N.L.: Determination of the antileukemia agents cytarabine and azacitidine and their respective degradation products by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 353: 909-918, 1986.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

11. Lewin, S. and Humphreys, D.A.: Reactions of nucleic acids and their components. Part IV. Thermodynamic constants of the ionisations of cytosine and cytidine. *J. Chem. Soc. (B)*: 210-213, 1966.
12. Linssen, P., Drenthe-Schonk, A., Wessels, H. and Haanen, C.: Determination of 1- β -D arabinofuranosylcytosine and 1- β -D arabinofuranosyluracil in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 223: 371-378, 1981.
13. Liversidge, G.G., Nishitata, T., Higuchi, T., Shaffer, R. and Cortese, M.: Simultaneous analysis of 1- β -D arabinofuranosylcytosine, 1- β -D arabinouracil and sodium salicylate in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 276: 375-385, 1983.
14. Notari, R.E., Chin, M.L. and Cardoni, A.: Intermolecular and intramolecular catalysis in deamination cytosine nucleosides. *J. Pharm. Sciences*, 59(1): 28-32, 1970.
15. Okabayashi, T., Mihara, S., Repke, D.B. and Moffatt, J.G.: A radioimmunoassay for 1- β -D arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, 37: 619-624, 1977.
16. Pallavicini, M.G. and Mazrimas, J.A.: High-performance liquid chromatographic analysis of cytosine arabinoside and metabolites in biological samples. *J. Chromatogr.*, 183: 449-458, 1980.
17. Pfall, E.M., Aherne, G.W. and Marks, V.M.: A radioimmunoassay for cytosine arabinoside. *Br. J. Cancer*, 40: 548-556, 1979.
18. Sato, T., Morozumi, M., Kodama, K., Küninaka, A. and Yoshino, H.: Sensitive radioimmunoassay for cytarabine and uracil arabinoside in plasma. *Cancer Treat.*, 68(11): 1357-1366, 1984.
19. Schilsky, R.L. and Ordway, F.S.: Simultaneous determination cytosine arabinoside, its nucleotides and metabolites by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 337: 63-71, 1985.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

20. Sinkule, J.A. and Evans, W.E.: High-performance liquid chromatographic assay for cytosine arabinoside, uracil arabinoside and some related nucleosides. *J. Chromatogr.*, 274: 87-93, 1983.
21. Tunçel, M., Notari, R.E. and Malspeis, L.: A rapid stability-indicating HPLC assay for the arabinosylcytosine prodrug, cyclocytidine. *J. Lig. Chromatogr.*, 4(5): 887-896, 1981.
22. Tunçel, M., Doğrukol, D. ve Fıçıcıoğlu, S.: Sitarabinin türev spektroskopisi ile miktar tayini. I. Eczacılık Bilimleri Sempozyumu, Ankara, 1989.
23. Van Prooijen, H.C., Vierwinden, G., Van Egmond, J., Vessels, J.M.C. and Haanen, C.: A sensitive biossay for pharmacokinetic studies of cytosine arabinoside in man, *Europ. J. Cancer*, 12: 899-905, 1976.
24. Webb, J.W., Janik, B. and Elwing, P.J.: Cytosine nucleoside-nucleotide series. Electrochemical study of reduction mechanism, association and adsorption. *J. Amer. Chem. Soc.*, 95(4): 991-1003, 1972.

