

116042

**MİTOMİSİN C' NİN SÜREKLİ AKIŞ
ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE
FLAKONLARINA UYGULANMASI**

ARIN GÜL DAL
Yüksek Lisans Tezi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Eylül 2002

116042


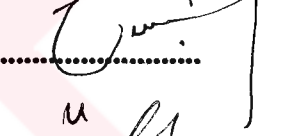
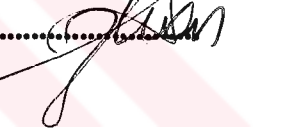
**Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Proje No: 010354

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Arın Gül Dal' ın "MİTOMİSİN C' NİN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE FLAKONLARINA UYGULANMASI" başlıklı Analitik Kimya Anabilim Dalı' ndaki Yüksek Lisans Tezi .12.9.2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Dilek Doğruel AK	
Üye	: Prof. Dr. M. Tuncel	
Üye	: Doç. Dr. A. Sibel Özkan	
Üye	:
Üye	:

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun .05.09.2002 tarih ve17....sayılı kararıyla onaylanmıştır.



ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**MİTOMİSİN C' NİN SÜREKLİ AKIŞ ENJEKSİYON ANALİZİ İLE
MİKTAR TAYİNİ, VALİDASYONU VE
FLAKONLARINA UYGULANMASI**

ARIN GÜL DAL

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman:Doç. Dr. Dilek Doğrukol-Ak
2002**

Bu çalışmada mitomisin C' nin farmasötik flakonlarında miktar tayini için sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi tarif edilmektedir. Taşıyıcı çözelti olarak Britton-Robinson tampon sistemi kullanılmıştır ve akış hızı 1.0 mL/dk' dır. Mitomisin C sinyalleri UV-spektrofotometrik detektör kullanılarak 363 nm' de kaydedilmiştir. Miktar tayini için pik alanı ve pik yüksekliği sinyalleri kullanılmıştır. Yöntemin kesinliği ve doğrusallığı bu sinyallerle gösterilmiştir. Sinyal/gürültü oranı 3 kriterine göre yöntemin saptama sınırı olarak 1.93×10^{-8} M ve tayin sınırı olarak 6.45×10^{-8} M değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin uygulanması ile elde edilen sonuçlar standart yöntemler olan UV-spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemlerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Pik alanı sinyalleri ile standart yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada geliştirilen sürekli akış enjeksiyon analizinin kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler: Mitomisin C, Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi,
Validasyon, Flakon**

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**A VALIDATED METHOD FOR THE DETERMINATION OF
MITOMYCIN C BY FLOW-INJECTION ANALYSIS
AND ITS APPLICATION TO FLACONS**

ARIN GÜL DAL

**Anadolu University
Institute of Health Sciences
Department of Analytical Chemistry**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dilek Doğrukol-Ak
2002**

A flow injection analysis (FIA) method is described for the determination of mitomycin C in the pharmaceutical flacons in this study. Britton-Robinson buffer at pH 7.0 was used as carrier solvent at 1.0 mL/min of flow rate. Mitomycin C signals were detected at 363 nm using UV-spectrophotometric detector. Peak area and peak height signals were used for quantification of mitomycin C and the precision and linearity of the FIA were shown with these signals. The detection limit and determination limit of the method according to criteria of signal to noise 3 were 1.93×10^{-8} M and 6.45×10^{-8} M, respectively. The results obtained with the application of the method were compared to those of high performance liquid chromatography and UV spectrophotometry as standard methods. It was found that the difference of the standard methods and FIA was not statistically significant by using peak area response of FIA. It can be concluded that FIA developed with this study is a precise, accurate, sensitive and cheap method.

Keywords: Mitomycin C, Flow-injection analysis, Validation, Flacon.

TEŞEKKÜR

Özgür ve laik bir Türkiye' de bilimsel araştırma olanağını bize kazandıran yüce önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK' e,

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili annem Nuray DAL ve babam Ahmet DAL' a,

Bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendiren değerli hocam Eczacılık Temel Bilimler Bölümü Başkanı Prof.Dr.Muzaffer TUNÇEL' e,

Tezim süresince beni sabırla yönlendiren, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.Dilek DOĞRUKOL-AK' a,

İlgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan Analitik Kimya Anabilim Dalı' ndaki değerli hocalarım Yrd.Doç.Dr.Göksel ALTIOKKA ve Doç.Dr.Zeki ATKOŞAR' a ve sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Ve sevgili kardeşlerim Özden ve Özgün Esin DAL' a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Mitomisin C' nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.2. Mitomisin C' nin Stabilesi.....	2
2.3. Mitomisin C' nin Farmakolojik Özellikleri.....	3
2.4. Mitomisin C Tayini ile İlgili Çalışmalar.....	4
3. DENEYSEL BÖLÜM.....	8
3.1. Kimyasal Maddeler.....	8
3.2. Aletler.....	8
3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	9
3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanışı.....	10
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	11
4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi.....	11
4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu.....	11
4.1.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Kesinliği.....	13
4.1.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı.....	14
4.1.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama ve Tayin Sınırı.....	16

4.1.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile Mitomisin C	
İçeren Flakonlarda Miktar Tayini.....	16
4.2. Mitomisin C' nin UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi..	17
4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile	
Flakonlarda Mitomisin C Tayini.....	18
4.4. Flakon İçerisindeki Mitomisin C Miktar Tayini	
Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	22
4.5. Sonuç ve Değerlendirme.....	23
5. KAYNAKLAR.....	24
ÖZGEÇMİŞ.....	26



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. Mitomisin C' nin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 4.1.1.1. Standart mitomisin C (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 200-500 nm aralığındaki UV spektrumu.....	11
Şekil 4.1.1.2. Akış hızının mitomisin C sinyallerine etkisi.....	12
Şekil 4.1.2.1. Standart mitomisin C (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 1 mL/dk akış hızında ve 363 nm' deki sinyallerinin tekraredilebilirliği.....	13
Şekil 4.1.3.1. Mitomisin C' nin 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığındaki çözeltilerinin 1 mL/dk akış hızında ve 363 nm' deki sinyalleri.....	14
Şekil 4.3.1. Standart mitomisin C (5.86×10^{-6} M) çözeltisinin IS varlığında kromatogramı.....	21
Şekil 4.3.2. Mitomisin C' nin flakon çözeltisinin (5.86×10^{-6} M) IS varlığında kromatogramı.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.2.1. Mitomisin C' nin günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.....	14
Çizelge 4.1.3.1. 1 mL/dk akış hızında, 363 nm' de, 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığında mitomisin C' nin pik alanı sinyallerinin doğrusallığı..	15
Çizelge 4.1.3.2. 1 mL/dk akış hızında, 363 nm'de, 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığında mitomisin C'nin pik yüksekliğı sinyallerinin doğrusallığı.....	15
Çizelge 4.1.5.1. Pik alanlarına göre mitomisin C' nin flakonlardaki miktar tayini değerlendirmeleri.....	16
Çizelge 4.1.5.2 Pik yüksekliklerine göre mitomisin C' nin flakonlardaki miktar tayini değerlendirmeleri.....	17
Çizelge 4.2.1. UV-spektrofotometrik yöntemle flakonlarda mitomisin C tayini.....	18
Çizelge 4.3.1. Mitomisin C ve IS (4-aminoasetofenon) için kromatografik veriler	19
Çizelge 4.3.2. YPSK ile flakonlardaki mitomisin C tayini.....	20
Çizelge 4.4.1. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV-spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması.....	22
Çizelge 4.4.2. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin karşılaştırılması.....	22

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mitomisin C, klinik kemoterapide özellikle göğüs, mide, prostat ve kolon kanserlerinin tedavisinde yaygın kullanılan antineoplastik antibiyotik bir ilaçtır. Antikanser aktivitenin kimyasal ya da enzimatik olarak indirgendikten sonra, DNA' ya kovalent bağlanması ile ortaya çıktığı bilinmektedir [1-4].

Mitomisin C' nin biyolojik sıvılardaki miktar tayini için çoğunlukla sıvı kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerde genellikle UV-görünür alan, diferansiyel puls polarografik, kulometrik ve voltametrik detektörler kullanılmış ve serum ve idrardaki miktar tayini uygulamaları gösterilmiştir [5-8].

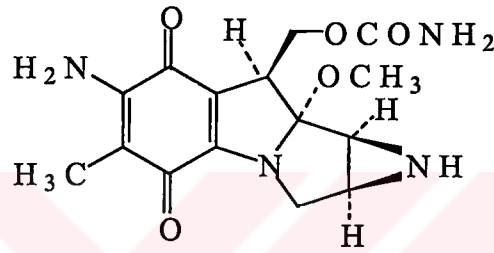
Sürekli akış enjeksiyon analizi, detektörün önünden akan taşıyıcı çözeltiye numunenin enjeksiyonu ile, numunenin sistemde sürüklenmesi sırasında karşılık gelen sinyallerinin kaydedilmesini temel alan bir yöntemdir ve analitik kimyanın çok önemli bir metodolojik uygulamasıdır. Önemi, basit bir kimyasal işlem, ucuz cihaz, fazla el becerisi gerektirmeyen çalışma koşulları ve iyi kalitede sonuçlar elde edebilme olanağından kaynaklanmaktadır. Farmasötik preparatlardaki etken madde miktarını tayin etmek için sürekli akış enjeksiyon sistemlerinin kullanımı çabuk gerçekleştirilen işlemlerle oldukça iyi kalitedeki sonuçlar elde edilmesine olanak sağlar [9-11].

Bu çalışmanın amacı, mitomisin C' nin sürekli akış enjeksiyon analizi ile farmasötik flakonlarında miktar tayini için çabuk sonuç alınabilen, kesin, doğru, duyarlı ve ucuz bir yöntem geliştirmektir. Flakonlarda mitomisin C miktar tayini sonuçları, UV-spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu ve kesinliği incelenmiştir. Bulunan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Mitomisin C' nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Mitomisin C kimyasal olarak [1aS-(1α, 8β, 8α, 8β)]-6-amino-8-[[[(amino karbonil) oksil] metil]-1, 1a, 2, 8, 8a, 8b-hekza hidro-8a-metoksi-5-metil azirino [2',3':3,4]pirolo[1,2-a]-indol-4,7-dion şeklinde adlandırılır. C₁₅H₁₈N₄O₅ kapalı formülüne sahiptir [12]. Açık kimyasal formülü Şekil 2.1.1' de görülmektedir.



Şekil.2.1.1. Mitomisin C' nin kimyasal yapısı

Mitomisin C' nin molekül ağırlığı 334.33'tür. Mavi-lacivert kristaller halindedir. 360 °C' nin üzerinde erir. pK_a değeri 3.2' dir. Suda, metanolde, asetonda kolay, benzen, karbontetraklorür ve eterde zor çözünür [12].

2.2. Mitomisin C' nin Stabilesi

Mitomisin C' nin asidik çözeltilerde stabilite problemi nedeniyle miktarında azalma olur [13]. Bazı literatürlerde mitomisin C' nin %5 glikoz içeren enjeksiyonluk preparatının, % 0.9 NaCl içeren preparatına oranla daha az stabil olduğu belirtilmiştir [14,15].

Chen ve arkadaşları [16] yaptıkları bir çalışmada mitomisin C' nin 1 µg' ını 5.0 mL 20 mmol sodyumfosfat tamponunda çözerek pH 3.0-10.0 aralığında ve farklı sürelerde 20 °C' de saklayarak stabilesini incelemişlerdir. pH 7.0' de 24, 72, 168 saatlik sürelerde mitomisin C miktarındaki kayıp sırasıyla %3, %5 ve %8

olarak bulunmuştur. Fakat bu kayıplar pH 3.0' te sırasıyla %43, %50 ve %73; pH 10.0' da ise %13, %22 ve %31 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak mitomisin C' nin bazik ve özellikle asidik çözeltilerinde stabil olmadığını bulmuşlardır.

Yapılan bazı çalışmalarda mitomisin C' nin pH 5-8 aralığı dışındaki zayıf stabilitesini göz önünde bulundurularak deneyler nötral pH' ta gerçekleştirilmiştir [3,4].

2.3. Mitomisin C' nin Farmakolojik Özellikleri

Mitomisin C ilk defa 1958' de S.Wakiki ve arkadaşları tarafından *Streptomyces caespitosus*' dan izole edilen ve biyoredüktif alkilleyici özellikte olan antineoplastik bir antibiyotiktir [17].

Mitomisin C' nin antineoplastik aktivitesi enzimatik ya da kimyasal indüktif aktivasyondan sonra DNA' ya kovalent bağlanmasına dayanır. Bu indüktif aktivasyon, kinon grubunun indirgenmesi ve aziridin halkasının açılması ile ilgili kompleks bir işlemdir [4].

Mitomisin C' nin farmakokinetik özellikleri incelendiğinde intravenöz enjeksiyondan sonra kandan 17 dakika sonra kaybolduğu görülmektedir. Büyük oranda parçalanır fakat kan-beyin bariyerini aşamaz. Tamamen olmamakla birlikte büyük ölçüde karaciğerde metabolize olur. Normal doz takip edildiğinde, bir dozun % 10' u değişmeden idrarla atılır. Düşük miktarlarda feçeste ve safrada görülür. Artan dozlarda metabolik yollar doygunluğa erişir ve daha fazla miktardaki ilaç değişmeden idrarla atılır [18].

Antikanser ve antiproliferatif özelliği nedeniyle mitomisin C' nin, göğüs ve prostat kanserlerinde, hepatik metastazların tedavisinde kemoterapötik amaçla geniş kullanımı vardır. Mesanenin yüzey kanserlerinde tedavi için ilk tercih edilen ilaçtır. Mide ve pankreasın diğer tedavi şekillerine yanıt vermeyen adenokarsinomlarında teskin edici tedavi için kullanılır. Oftalmolojide, trabekulektomi ve glokom hastalıklarında tedaviye yardımcı ajan olarak kullanılmaktadır [1].

Mitomisin C' nin kinon grubunun indirgenmesi sonucunda üç ana metabolit üretilir. Bunlar 2,7-diaminomitosen [2,7-DM] ve stereoizomer yapıları olan 1,2-cis-1-hidroksi-2,7-diamino mitosen ve 1,2-trans-1-hidroksi-2,7-diamino mitosen' dir [19]. Metabolitlerin oluşumu, ilaç aktivasyonu sırasında kinon methid ara ürününün meydana gelmesine bağlıdır. Kinon methid yapısı, 2,7-DM' yi üretebilecek nükleofilik karakteri ve cis- ve trans-hidro'yu verecek elektrofilik karakteri üzerinde taşır [20]. Üretilen temel metabolitlerin oranları in vitro inkubasyonda pH' a oldukça bağımlıdır; in vivo koşullarda ise, oksijen gerilimi, enzimoloji, serbest radikalleri yok eden enzimlerin ve scavengerların (serbest radikallere bağlanarak reaksiyona giren maddeler) düzeyi gibi diğer bir çok faktörün oranları etkilediği bildirilmektedir [21].

5-Flourourasil, doksorubisin, vinblastin, bleomisin, vinkristin ve sisplatin gibi diğer antineoplastik ilaçlarla birlikte kemoterapide kullanımı bulunmaktadır [3]. Ancak mitomisin C' nin klinik olarak yararlılığı, ciddi kemik iliği supresyonu başta olmak üzere yan etkileri nedeniyle sınırlıdır [18,22].

2.4. Mitomisin C Tayini ile İlgili Çalışmalar

Xiong ve ark. [1], mitomisin C' nin tayini için antiglokoma ilaçları olan alfagan ve timolol varlığında bir kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Ters faz C₁₈ kolon ve su:metanol:trifloroasetik asit (65:35:0.01, v/v)' ten oluşan mobil faz sistemi kullanılarak yapılan ayırmalarda mitomisin C 10 - 1000 µg aralığında 360 nm' de tayin edilmiştir. Yöntem glokoma hastalarının Tenon ve trabekulum dokularındaki mitomisin C tayini için uygulanmış ve validasyonu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların mitomisin C tayini için seçici ve duyarlı olduğu bildirilmektedir.

Barbhaiya ve ark. [2], plazma ve idrarda mitomisin C tayini için normal-faz yüksek performanslı sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde mitomisin C' nin plazma ve idrardan etilasetat:2-propanol:kloroform (70:15:15)' la ekstraksiyonu tarif edilmektedir. Miktar tayini, porfiromisin iç standardı varlığında pik yüksekliği oranı kullanılarak yapılmıştır. Geliştirilen

yöntemin mitomisin C' nin köpeklerdeki farmakokinetik verilerini elde etmek amacıyla uygulandığı bildirilmiştir.

Marin ve ark. [3], mitomisin C' yi tek başına ve 5-florourasil ve sisplatin varlığında tayin etmek için asılı cıva damla elektrodunun çalışma elektrodu olduğu sıyırma voltametri tekniğini kullanmışlardır. Mitomisin C, diğer ilaçların varlığında kısa birikme zamanlarında mikromolar düzeyin altındaki derişimlerde tayin edilmiştir. Birikme işlemi mitomisin C' nin indirgenme potansiyelinde yapıldığı takdirde, indirgenmiş mitomisin C elektroda kuvvetli bir şekilde adsorbe olarak mitomisin C-modifiye elektrodun hazırlanmasına olanak vermiştir ve bu elektrot yüzeyinden mitomisin C' yi voltametri ile tayin etmek üzere taşıyıcı elektrolite aktarmak mümkün olmuştur. Transfer sıyırma voltametri (TSV) isimli bu prosedürün, girişimleri azaltmaya yardımcı olduğu ve idrardaki mitomisin C' nin tek başına ya da diğer ilaçlarla doğrudan tayini için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Tayinin çok çabuk yapılabilir olduğu ve TSV analizinden önce idrar numunelerinde ön işlem gerektirmediği belirtilmiştir.

Marin ve ark. [4], aynı yıl mitomisin C ile yaptıkları bir başka voltametrik çalışmada transfer sıyırma voltametri yönteminin tanıtılmasına ve uygulanmasına yönelik detaylı bir çalışma tarif etmektedirler. Yöntemin uygulaması için mitomisin C' nin 5-florourasil ve sisplatin varlığında idrardaki tayini yapılmıştır. Yöntemin doğrusallığının 3-70 ng/mL derişim aralığında, saptama limitinin ise 3 ng/mL olduğu bildirilmektedir.

Chen ve ark. [16], tavşan okular dokusunda mitomisin C tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi tarif etmektedirler. Optimum koşulların izokratik sistemde 1 mL/dk akış hızı ve 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH:7.0):metanol (70:30)' den oluşan mobil faz sistemi olduğu belirlenmiştir. Yöntemin saptama limiti conjunctive ve sciera için 0.02 µg/g ve aköz humor için 0.02 µg/mL olarak bulunmuştur.

Joseph ve ark. [17], plazmadaki mitomisin C için yüksek performanslı sıvı kromatografik analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Tayin, temel olarak asetonitril ile plazma proteinlerinin çöktürülmesi, süpernatanın liyofilizasyonu ve ODS 5 µm kolonda 0.01 M NaH₂PO₄ tamponu (pH:6.5)-metanol (70:30, v/v) kullanarak ters faz kromatografik koşullarda ayırmaların sağlanması basamaklarından

oluşmaktadır. Porfiromisin iç standart olarak kullanılmış ve UV deteksiyon 365 nm' de yapılmıştır. Tayin sınırı 5 µg/L ve saptama sınırı 1 µg/mL' dir. Geri kazanımın %100 ve derişim aralığının 1-500 µg/mL olduğu bildirilmektedir.

Cummings ve ark. [21], mitomisin C ve metabolitleri olan 2,7-diaminomitosen, 1,2-cis-1- hidroksi-2,7-diaminomitosen(cis-hidro) ve 1,2-trans-1- hidroksi-2,7-diaminomitosen(trans-hidro)' in tümör dokusunda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem tarif etmektedirler. Metil mitomisin (porfiromisin)' in iç standart olarak kullanıldığı bu yöntemde metabolitlerin ayrılması için pH ve tamponun iyonik şiddetinin kritik faktörler olduğu bildirilmektedir. Ayırmaların ODS-2 kolonda, 40 °C kolon sıcaklığında, 1 mL/dk akış hızında ve 18 mM sodyum fosfat (pH:5.8)-metanol (74:26) hareketli faz sistemi kullanılarak sağlandığı belirtilmektedir. Tümör dokularında sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürü tarif edilmektedir. 450 µg mitomisin C ile intra-tümoral muamele edilmiş meme karsinomunun analizi için söz konusu yöntem uygulandığında 'metabolit' piklerinin saptandığı bildirilmektedir.

Song ve Au [22], insan plazmasında mitomisin C tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi tarif etmektedirler. Numuneler, mitomisin C ekstraksiyonu yapılmaksızın kromatografik sisteme doğrudan enjekte edilmiştir. Sabit fazın, silikon kaplı silikaya kovalent bağlı hidrofilik ve hidrofobik fonksiyonel gruplardan oluştuğu belirtilmektedir. Hareketli faz olarak %100 su kullanılmıştır. 365 nm' de yapılan deteksiyonda mitomisin C' nin 5. dakikada ayrıldığı ve analizin toplam süresinin 6 dakika olduğu bildirilmektedir. Plazma içerisindeki standart eğrinin 20-5000 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Yöntemin validasyonu gösterilmiştir.

Van Bennekom ve Tjaden [23], insan kan plazması ve idrarında mitomisin C tayini için diferansiyel puls polarografi yöntemi kullanmışlardır. Tayin sınırının, ön işlem yapılmamış numunelerde 200 ng/mL, Amberlite XAP-2 ile izole edildiği zaman 25 ng/mL olduğu bildirilmektedir. Yöntem farmakokinetik deneyler için uygulanmıştır; mitomisin C' nin metabolitlerinin idrar veya plazmada gözlenmediği gösterilmiştir.

Li ve ark. [24], insan aköz humor ve serumunda mitomisin C' nin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi tarif etmektedirler. 4-aminoasetofenon iç standart olarak kullanılmıştır. 50 mm C₁₈ ters faz kolona aköz humorun doğrudan enjeksiyonu yapılmış ve ayrılma yeterli duyarlık ve ayırım gücü ile gösterilmiştir. Yöntemin serum numunelerindeki mitomisin C tayini için 150-250 mm analitik kolonlar ile ve YPSK' ye enjeksiyondan önce katı faz ekstraksiyonu yapıldıktan sonra uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Yöntemin validasyonu gösterilmiştir. Doğrusal aralığın aköz humorda 6.25-50 ng/mL ve serumda 10-50 ng/mL olduğu bildirilmektedir.

Yamazoe ve ark. [25], mitomisin C, karboplatin ve epirubisin HCl' in birlikte tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu tayin, intra-arterial enjeksiyonluk bir Lipiodol emülsiyonda ve bu emülsiyonun ilaç salınım testi ortamında yapılmıştır. Hareketli faz olarak 0.01 M fosfat tamponu (pH:3.0)-asetonitrilli bir gradient sistem kullanılmıştır. Bu çalışmada mitomisin C' nin pK_a değeri 3.2 olarak bildirilmektedir. Mitomisin C' nin saptama sınırı emülsiyonda 0.1 µg/mL, ilaç salınım ortamında ise 0.02 µg/mL olarak bulunmuştur.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kimyasal Maddeler

Standart Mitomisin C Sigma (St.Louis, MO) 'dan temin edilmiştir. Asetik asit, fosforik asit, borik asit, etanol, metanol, N,N-dimetilformamit ve iç standart (IS) olarak kullanılan 4-aminoasetofenon Merck (Darmstadt, Almanya)' ten temin edilmiştir ve analitik ölçülerde saftır. Deneyler sırasında kullanılan bidistile su laboratuvarımızda tümü pyrex camdan yapılmış cihazlarda üretilmiştir.

3.2. Aletler

Spektrofotometrik deneyler sırasında Shimadzu marka UV-2401 PC spektrofotometre kullanılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde, LC 6A marka sıvı kromatograf ve pompa, SPD-10A marka UV detektörle yapılan deneylerde elde edilen verilerin işlenmesi CR-7A marka integratör ile gerçekleştirilmiştir (hepsi Shimadzu, Japonya). Numune enjeksiyonları Rheodyne (Cotati, ABD) marka enjeksiyon tablasına 22 gauge enjektör ucu ile yapılmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi deneyleri, hepsi Shimadzu olan LC 10AT Liquid Chromatograph, LCV-10AL VP gradient donanımlı pompa, SPD-M10A diode array detektör , CBM-10A communication bus module , 20 µL hacimli loop cihazları ile yapılmış, Pentium 75 işletim sistemli Accura marka bilgisayar bağlantılı Class LC10A programı altında çalışan veri işletim sisteminde değerlendirilmiştir. 365 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Ayırma ve miktar tayini işlemlerinde, Luna 3µ tanecik çapında, oktadesil silan (C₁₈) kolon materyali içeren 100 x 4.60 mm Phenomenex marka kolon kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dk' dır.

Tüm çözeltilerdeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için B-220 (Branson, ABD) model ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin pH' ları Elekromag M822 model pH metre ile ölçülmüştür.

3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Mitomisin C' nin standart çözeltisinin hazırlanması için bir flakon içeriği 25 ml pH sı 7.0 olan Britton Robinson (BR) tamponunda çözülmüştür. Standart flakon içeriğinin 2 mg Mitomisin C ve 48 mg NaCl içerdiği bildirilmektedir. Bu şekilde hazırlanan çözeltinin derişimi 2.4×10^{-4} M' dir. Daha sonraki seyreltmeler yine BR tamponu ile yapılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra içinde çözünmüş olabilecek gazları uzaklaştırmak için ultrasonik banyoda tutulmuştur.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde taşıyıcı çözelti olarak kullanılan BR tamponunun hazırlanması için 0.04 M CH_3COOH , 0.04 M H_3PO_4 ve 0.04 M H_3BO_3 çözeltileri hazırlanıp karıştırıldıktan sonra NaOH' la pH 7.0' ye ayarlanmıştır.

Mitomisin C' nin UV spektrumu için 1×10^{-5} M' lik çözeltisi kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler için hazırlanan BR pH 7.0 tamponu içerisindeki son derişimler 9.6×10^{-6} , 1.44×10^{-5} , 1.92×10^{-5} , 2.40×10^{-5} , 2.88×10^{-5} ve 3.36×10^{-5} M' dir. Bu çözeltilerin absorbsansları 0.2-0.8 aralığındadır. 200-800 nm dalga boyu aralığında, kuartz küvetler kullanılarak tarama yapılmıştır. Kör olarak aynı BR tamponu kullanılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi deneyleri için önce 2.4×10^{-4} M' lik stoktan hareketle 1×10^{-5} M' lik yeni stok çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen pik alanları doğrultusunda 2, 4, 6, 8×10^{-6} ve 1×10^{-5} M' lik çözeltiler kalibrasyon seti oluşturmak üzere belirlenmiştir. Tekraredilebilirlik çalışmalarında 1×10^{-5} M' lik mitomisin C çözeltisi kullanılmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi deneyleri için standart mitomisin C çözeltisi 10 mL N,N-dimetilformamid (DMF) içerisinde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltinin derişimi 5.98×10^{-4} M' dir. Gerekli seyreltmeler bu çözeltiden BR tamponu ile yapılmıştır.

Kromatografik yöntemde kullanılan hareketli faz 10 mM fosfat tamponu (pH:7.0)-metanol (75:25, v/v)' den oluşmaktadır. IS, etanolde çözümlenerek 4.37×10^{-3} M' lik çözeltisi hazırlanmıştır. YPSK' ye son derişimi 4.28×10^{-5} M olacak şekilde seyreltikten sonra enjekte edilmiştir.

3.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanışı

Mitomisin C' nin farmasötik preparatı, Kyowa Hakko Kogyo (Tokyo, Japonya) firmasının üretimi olan Mitomycin-C® adlı flakon olup 2 mg Mitomisin C içerdiği bildirilmektedir. Yerel eczanelerden sağlanan flakon üzerine 10 mL DMF ilave edilerek stok numune çözeltisi hazırlanmıştır [26].

Sürekli akış enjeksiyon analizi ve UV-spektrofotometrik yöntemde standart mitomisin C için tarif edildiği şekilde BR içerisinde seyreltilen numune çözeltisinin 363 nm' de yanıt sinyalleri ve absorpsiyon değerleri ölçülerek kalibrasyon eşitliklerinde çözüldükten sonra flakon içindeki mitomisin C miktarı hesaplanmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografik deneylerde numune çözeltisine iç standart eklendikten ve hareketli faz ile uygun şekilde seyreltikten sonra kolona uygulanmıştır. Numune çözeltisine karşılık gelen yanıt pikler, pik alan oranına karşılık gelen kromatografik kalibrasyon eşitliğinde çözüldükten sonra flakondaki mitomisin C miktarı hesaplanmıştır.

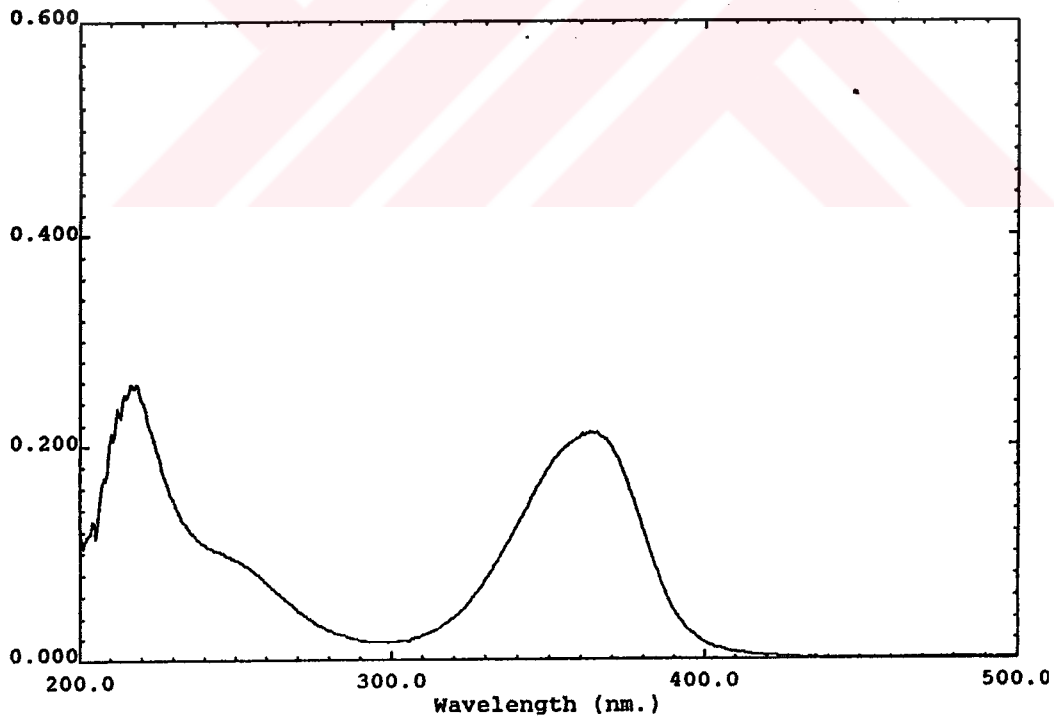
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi

4.1.1. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi Optimizasyonu

Mitomisin C' nin pH 7.0' de ve 20 °C' de bir hafta süreyle dayanıklı olduğu bilinmektedir [23]. Bu nedenle, pH 7.0 olan Britton-Robinson tampon sistemi (BR) çözücü olarak seçilmiştir ve deneyler süresince tüm seyreltme işlemleri BR ile yapılmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi sinyalleri UV detektör ile algılandığı için çalışma dalga boyunu belirlemek gereklidir. Bu amaçla, deneysel kısımda tarif edilen şekilde hazırlanan standart mitomisin C çözeltisi kullanılarak 200-800 nm dalga boyu aralığında mitomisin C' nin UV spektrumu kaydedilmiştir. Mitomisin C' nin 1×10^{-5} M' lik çözeltisinin spektrumu Şekil 4.1.1.1.'de görülmektedir.

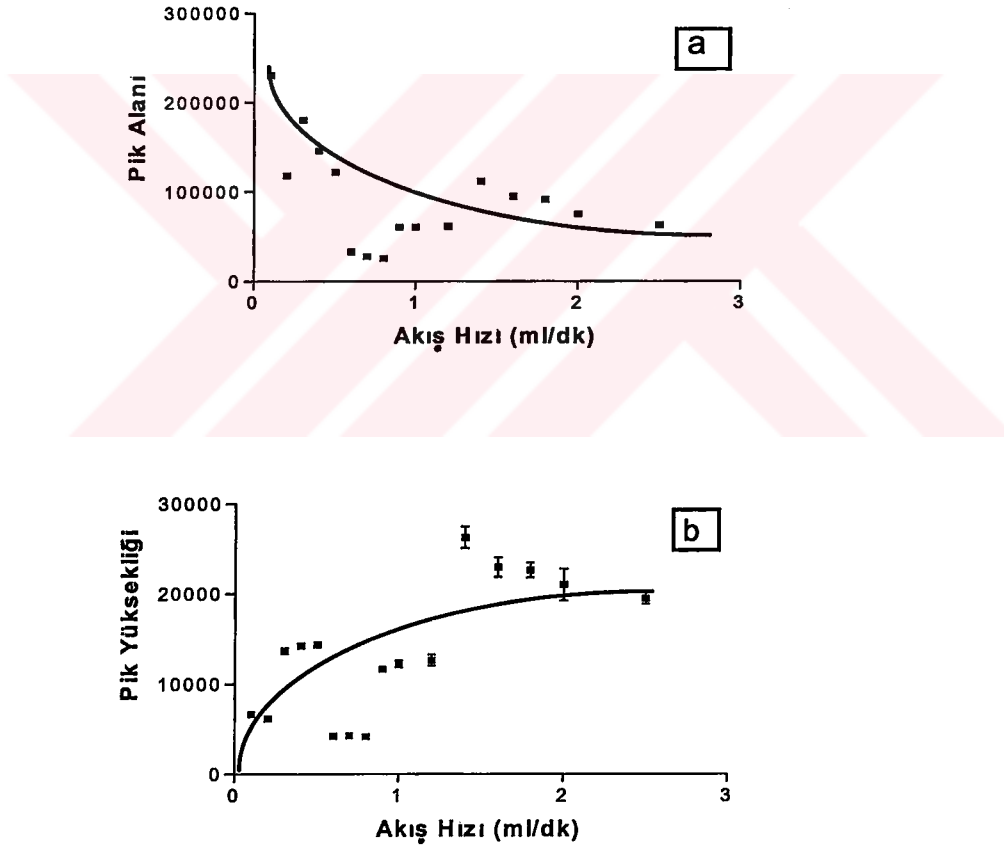


Şekil 4.1.1.1. Standart mitomisin C (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 200-500 nm aralığındaki UV spektrumu.

Belirtilen koşullarda mitomisin C' nin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu 363 nm olarak gözlenmiş ve sürekli akış enjeksiyon analizi deneylerinde kullanılacak dalgaboyu değeri olarak 363 nm seçilmiştir.

Sürekli akış enjeksiyon analizinde en uygun pik sinyallerinin elde edildiği akış hızı değerinin belirlenmesi önemlidir. Akış hızının piklere olan etkisi 0.1-2.5 mL/dk akış hızı aralığında incelenmiştir. Düşük akış hızlarında büyük pik alanları ve keskin olmayan pikler belirmiştir. Yüksek akış hızlarında ise pikler simetrik şeklini kaybetmiş ve pik alanları oldukça düşük bulunmuştur.

Belirtilen akış hızı aralığında elde edilen pik alanı ve pik yüksekliği değerleri akış hızına karşı grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.1.1.2. elde edilmiştir.



Şekil 4.1.1.2. Akış hızının mitomisin C sinyallerine etkisi pik alanı (a) ve pik yüksekliği (b).

Şekil 4.1.1.2.' de görüldüğü gibi akış hızı 1.4 mL/dk' ya kadar arttırıldığında pik yüksekliği aynı şekilde artmakta buna karşılık pik alanı azalmakta, ancak bu değerden yüksek akış hızlarında ise hemen hemen sabit kalmaktadır. Pik alanının tersi ile akış hızı arasında

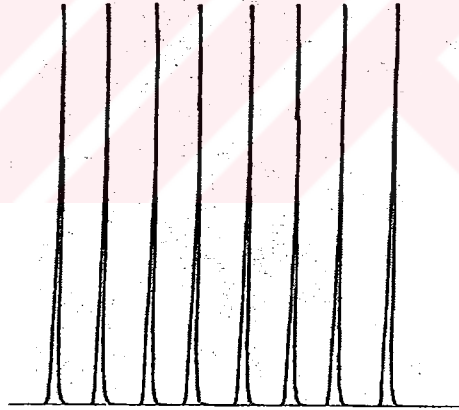
$$1/\text{Pik Alanı} = 4.086 \times 10^{-6} \text{ Akış Hızı} + 4.57 \times 10^{-6}, r = 0.9603$$

eşitliğine uyan doğrusal bir ilişki bulunmuştur.

Akış hızının incelenmesinde elde edilen tüm veriler göz önünde bulundurularak optimum koşulları sağlayan akış hızı değerinin 1mL/dk olduğuna karar verilmiştir.

4.1.2. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Kesinliği

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla mitomisin C' nin 1×10^{-5} M derişimli çözeltisi ile 8 ayrı enjeksiyonla ve birbirini takip eden 3 günde sürekli akış enjeksiyon sinyalleri kaydedilmiştir.



Şekil 4.1.2.1. Standart mitomisin C (1.0×10^{-5} M) çözeltisinin 1.0 mL/dk akış hızında ve 363 nm' deki sinyallerinin tekraredilebilirliği.

Pik alanları ve pik yükseklikleri olarak elde edilen sinyaller istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.2.1.' de verilmektedir.

Çizelge 4.1.2.1. Mitomisin C' nin günüçi ve günlerarası tekraredilebilirlik sonuçları.

	Günüçi kesinlik						Günlerarası kesinlik	
	1.gün (n=8)		2.gün (n=8)		3.gün (n=8)		(n=24)	
	Alan	Yükseklik	Alan	Yükseklik	Alan	Yükseklik	Alan	Yükseklik
Ortalama	142806	32975	142013	32755	142735	32933	142518	32888
Standart sapma	860	564	1475	623	1080	562	1173	566
% Bağlı standart sapma	0.602	1.710	1.038	1.902	0.756	1.707	0.823	1.722

Çizelge 4.1.2.1.' den de görüldüğü gibi, pik alanı sinyallerinin tekraredilebilirliğinin değerlendirilmesi ile % 1 dolayında % bağlı standart sapma bulunmuştur. Pik yüksekliği sinyallerinin ise % 2' den az % bağlı standart sapma değerlerini veren yüksek tekraredilebilirlik sonuçları elde edilmiştir.

4.1.3. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Doğrusallığı

Mitomisin C' nin 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığında beş ayrı çözeltisi deneysel bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla sürekli akış sistemine enjekte edilmiştir. Günüçi ve günlerarası tekraredilebilirliği göstermek için belirtilen konsantrasyon aralığında, üç ayrı set çözelti hazırlanarak birbirini takip eden 3 günde pik sinyalleri kaydedilmiştir. Elde edilen sinyaller Şekil 4.1.3.1.' de görülmektedir.



Şekil 4.1.3.1. Mitomisin C' nin 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığındaki çözelti-lerinin 1 mL/dk akış hızında ve 363 nm' deki sinyalleri.

Doğrusallık deney sonuçları ise Çizelge 4.1.3.1.' de pik alanlarına ve Çizelge 4.1.3.2.' de pik yüksekliklerine göre olmak üzere sunulmaktadır.

Çizelge 4.1.3.1. 1.0 mL/dk akış hızında, 363 nm' de ve 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığında mitomisin C' nin pik alanı sinyallerinin doğrusallığı.

	Güniçi			Günlerarası
	1.gün (n=5)	2.gün (n=5)	3.gün (n=5)	Tüm günler (n=15)
Eğim, a	1.40×10^{10}	1.39×10^{10}	1.41×10^{10}	1.40×10^{10}
Kesim, b	783	1000	232	672
Korelasyon katsayısı, r	r =0.9998	r =0.9997	r =0.9997	r =0.9998
Regresyon denkleminin standart sapması, \pm Sr	1.75×10^3	1.99×10^3	2.15×10^3	3.55×10^3
Eğimin % bağıl standart sapması	1.97	2.26	2.41	2.31
Güven Aralığı (p<0.05)	$\pm 2.64 \times 10^8$	$\pm 3.01 \times 10^8$	$\pm 3.23 \times 10^8$	$\pm 1.47 \times 10^8$

Çizelge 4.1.3.2. 1.0 mL/dk akış hızında, 363 nm' de ve 2×10^{-6} - 1×10^{-5} M derişim aralığında mitomisin C' nin pik yüksekliği sinyallerinin doğrusallığı.

	Güniçi			Günlerarası
	1.gün (n=5)	2.gün (n=5)	3.gün (n=5)	Tüm günler (n=15)
Eğim, a	3.27×10^9	3.17×10^9	3.21×10^9	3.22×10^9
Kesim, b	265	855	572	564
Korelasyon katsayısı, r	r =0.9988	r =0.9985	r =0.9996	r =0.9993
Regresyon denkleminin standart sapması, \pm Sr	1.01×10^3	1.1×10^3	5.22×10^2	1.64×10^3
Eğimin % bağıl standart sapması	4.87	5.45	2.56	4.65
Güven Aralığı (p<0.05)	$\pm 1.52 \times 10^8$	$\pm 1.65 \times 10^8$	$\pm 7.86 \times 10^8$	$\pm 6.88 \times 10^7$

Pik alanlarına ve pik yüksekliklerine göre yapılan istatistiksel hesaplamalarda mitomisin C' nin flakonlarındaki miktar tayinine izin verecek ölçüde, oldukça iyi korelasyon katsayılı kalibrasyon eşitlikleri elde edilmiştir.

4.1.4. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizinin Saptama ve Tayin Sınırı

Mitomisin C' nin sürekli akış analizi yöntemiyle saptama sınırı (Limit of detection, LOD) değerinin belirlenmesi amacıyla sinyal/gürültü = 3 (S/N=3) için pik yüksekliği sinyali dikkate alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Tayin sınırının (Limit of quantification, LOQ) belirlenmesi için ise sinyal/gürültü = 10 (S/N=10) eşitliğine göre pik yüksekliği sinyali dikkate alınmıştır. Belirtilen koşullarda yöntemin saptama sınırı 1.93×10^{-8} M ve tayin sınırı 6.45×10^{-8} M olarak hesaplanmıştır.

4.1.5. Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile Mitomisin C İçeren Flakonlarda Miktar Tayini

Burada geliştirilen yöntem daha sonra Mitomisin C' nin farmasötik preparatı olan flakonlarındaki (Mitomycin-C[®], 2 mg Mitomisin C ve 48 mg NaCl içeren) miktar tayini için uygulanmıştır.

Sürekli akış enjeksiyon analizi uygulamaları için flakon çözeltisi, standart çözeltiyle aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Flakon içeriği 25 mL BR içerisinde çözülerek hazırlanan stoktan hareketle son derişimi 1×10^{-5} M olan yeni stok hazırlanmıştır. Standart çözeltinin kalibrasyon setinin orta değerine denk gelecek şekilde hazırlanan 6 yeni çözeltiyle enjeksiyonlar yapılmıştır. Okunan pik alan ve yükseklikleri kalibrasyon denkleminde çözülerek çözeltilerin içerdiği mitomisin C miktarları hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.1.5.1. ve Çizelge 4.1.5.2.' de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1.5.1. Pik alanlarına göre mitomisin C' nin flakonlardaki miktar tayini değerlendirmeleri.

	Bulunan Mitomisin C(mg)	% Mitomisin C
	2.08	103.90
	2.07	103.55
	2.08	104.05
	2.06	103.05
	2.03	101.60
	2.00	100.13
Ortalama	2.05	102.71
Standart Sapma	0.03	1.54
% Bağlı Standart Sapma	1.50	1.50
Güven Aralığı (p=0.05)	0.02	1.24

Çizelge 4.1.5.2. Pik yüksekliklerine göre mitomisin C' nin flakonlardaki miktar tayini değerlendirmeleri.

	Bulunan Mitomisin C(mg)	% Mitomisin C
	2.13	106.60
	2.12	106.00
	2.06	103.08
	2.07	103.55
	2.10	105.00
	2.14	107.45
Ortalama	2.11	105.40
Standart Sapma	0.03	1.56
% Bağlı Standart Sapma	1.48	1.48
Güven Aralığı (p=0.05)	0.02	1.25

Çizelge 4.1.5.1. ve 4.1.5.2.' den görüldüğü gibi % bağlı standart sapma değerleri % 2 nin altında olan ve flakonlarda pik alanı sinyallerine göre % 102, pik yüksekliğine göre % 105 oranında mitomisin C içeriği bulunmuştur.

USP XXIV' te mitomisin C' nin enjeksiyonluk preparatlarında % 90-120 aralığında etken madde içermesi gerektiği belirtilmektedir [26]. Burada elde edilen sonuçlar içerik gereklerini sağlamaktadır.

4.2. Mitomisin C' nin UV Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Spektrofotometri, ilaç içerisindeki etken madde tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir [27-34]. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile yapılan flakon içerisindeki mitomisin C tayini sonuçlarının doğruluğunu ve kesinliğini karşılaştırmak için UV spektrofotometrik yöntemin kullanılabilceği koşullar araştırılmıştır.

Spektrofotometrik yöntemin uygulanması için Mitomisin C' nin BR tamponu içerisinde hazırlanmış olan çözeltisi kullanılmıştır. Maddenin spektrumu 200-800 nm dalga boyu aralığında kuartz kuvvetler kullanılarak kaydedilmiştir. Kör olarak BR tamponu kullanılmıştır. Mitomisin C' nin iki ayrı dalga boyunda 216 nm ve 363 nm' de maksimum absorban verdiği bulunmuştur. 250 nm altındaki dalga boyu değerlerinde absorban veren maddelerin girişim etkisi artığı için 363 nm çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir. Yapılan pek çok çalışmada da 300-365 nm kullanıldığı bilinmektedir [1,17,22].

Kalibrasyon eğrisini hazırlamak ve kalibrasyon eşitliğinin belirlenmesi için 9.6×10^{-6} , 1.44×10^{-5} , 1.92×10^{-5} , 2.40×10^{-5} , 2.88×10^{-5} ve 3.36×10^{-5} M' lik

standart mitomisin C çözeltileri hazırlanarak 363 nm' deki absorbans değerleri okunmuştur. Belirtilen derişimler ile karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirildiğinde

$$A = 19560 \cdot C (M) + 0.018, r = 0.9997$$

eşitliği elde edilmiştir. Korelasyon katsayısı yüksek doğrusal kalibrasyon eğrisi ile mitomisin C içeren flakonlarda miktar tayininin yapılabileceğine karar verilmiştir.

Flakon numunesi deneysel kısımda tarif edildiği şekilde kalibrasyon doğrusunun orta noktasına karşı gelecek derişimde hazırlanarak 363 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Bulunan numune absorbansları kalibrasyon eşitliğinde çözüldükten sonra mitomisin C içeriği hesaplanmıştır.

Spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.1.' de sunulmaktadır.

Çizelge 4.2.1. UV-spektrofotometrik yöntemle flakonlarda mitomisin C tayini.

	Bulunan Mitomisin C (mg)	% Mitomisin C
	2.09	104.65
	2.01	100.65
	2.07	103.55
	2.01	100.90
	2.00	100.40
Ortalama	2.04	102.03
Standart sapma	0.04	1.94
% Bağlı standart sapma	1.90	1.90
Güven aralığı (p<0.05)	0.03	1.70

Çizelgeden de görüldüğü gibi flakonlardaki ortalama mitomisin C miktarı % 102 bulunmuştur ve yöntemin % bağılı standart sapması % 2' nin altındadır.

4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Flakonlarda Mitomisin C Tayini

Li ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntem [24] temel alınarak deneysel kısımda tarif edildiği şekilde uygulanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi yönteminde 5.86×10^{-6} M mitomisin C çözeltisi için elde edilen kromatogram Şekil 4.3.1.' de verilmektedir. Bu yöntem, mitomisin C içeren flakon şeklindeki farmasötik preparattaki sürekli akış enjeksiyon analizi ile bulunan sonuçları

karşılaştırmak amacıyla uygulanmıştır. Fosfat tamponu (pH 7.0)-metanol (70:30, v/v) hareketli faz sisteminin, fosfat tamponu derişimi değişik olmakla birlikte, bir çok çalışmada kullanıldığı görülmüştür [16,17,21]. Kullanılan 10 mM fosfat tamponu (pH 7.0)-metanol (70:30, v/v) hareketli faz sisteminde iç standart olarak kullanılan 4-aminoasetofenon 4.6 dk dolayında, mitomisin C ise 5.1 dk dolayında keskin pikler vererek ayrılmıştır. Validasyonu ayrıntılı bir şekilde Li ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olan bu yöntemin kesinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan çalışmada elde edilen veriler Çizelge 4.3.1.'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.3.1. Mitomisin C ve IS (4-aminoasetofenon) için kromatografik veriler.

	IS' nin Alıkonma Zamanı	Mitomisin C' nin Alıkonma Zamanı	Alan (IS)	Alan (Mitomisin C)	Pik Alan Oranı	Normalize Pik Alanı Oranı
	4.677	5.199	22840	75113	3.28	2.96
	4.585	5.063	23103	75393	3.26	2.96
	4.530	4.977	22449	70767	3.15	2.86
	4.585	5.058	23606	72394	3.06	2.78
	4.595	5.070	23382	75630	3.23	2.93
	4.656	5.129	24178	76552	3.17	2.87
Ortalama	4.605	5.082	23260	74308	3.19	2.89
Standart sapma	0.0535	0.0748	605	2228	0.082	0.069
% Bağıl Standart Sapma	1.16	1.47	2.60	2.99	2.56	2.39

Çizelge 4.3.1.'de pik alan oranı değerleri mitomisin C için elde edilen pik alanlarının iç standart için elde edilen pik alanlarına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Normalize pik alanı oranları ise, alanların alıkonma zamanlarına bölündükten sonra pik alan oranında olduğu gibi oranlanması ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3.1.' de görüldüğü gibi standart mitomisin C çözeltisinin, iç standart varlığında 6 defa analizi sonucunda pik alan oranı ve normalize pik alanı oranı şeklinde yapılan değerlendirmede % bağıl standart sapma değerleri bu yöntemin kullanılmasına izin verecek şekilde düşük bulunmuştur.

5.92×10^{-7} – 5.86×10^{-6} M derişim aralığında farklı derişimlerdeki standart mitomisin C çözeltileri ile yapılan çalışmada derişim ile pik alanı oranı ve

normalize pik alanı oranı arasındaki doğrusallık ilişkisi araştırılmıştır. Belirtilen derişim aralığında derişim ile pik alan oranı arasında

$$\text{Pik Alan Oranı} = 1.31 \times 10^{-8} + 504738.62 \text{ Derişim (M)}; r = 0.9998$$

ve derişim ile normalize pik alanı oranı arasında

$$\text{Normalize Pik Alan Oranı} = -2.75 \times 10^{-3} + 462415.54 \text{ Derişim (M)};$$

$$r = 0.9998$$

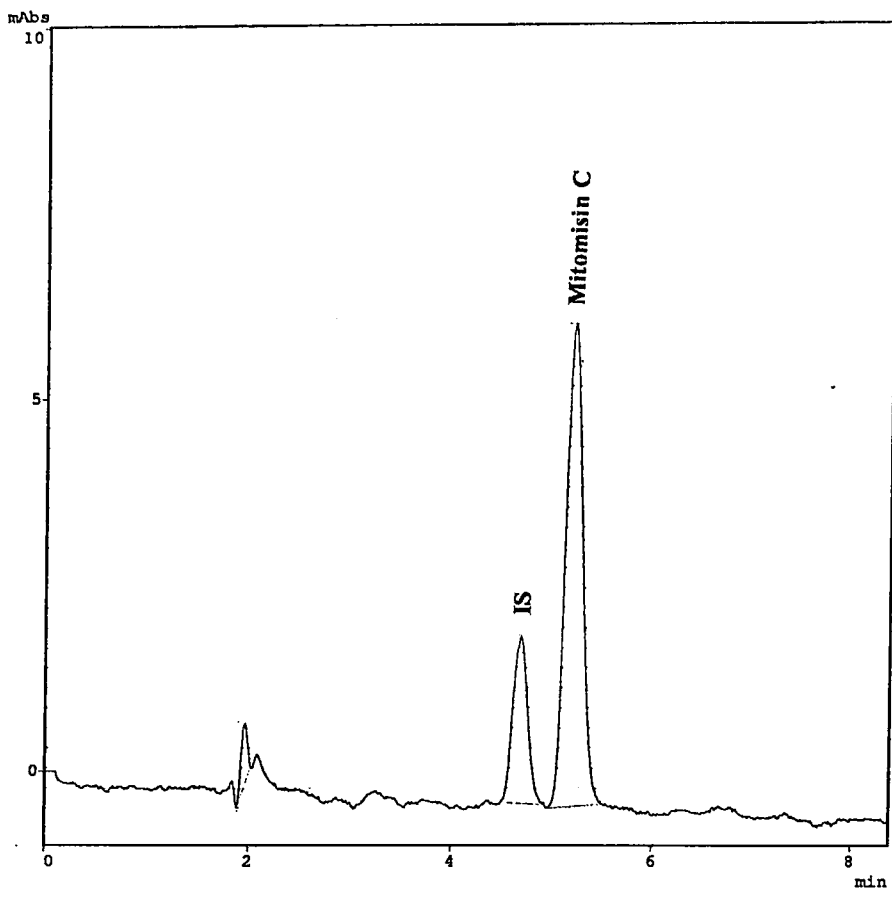
eşitlikleri elde edilmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile derişim ile iç standart varlığında alan oranları arasındaki doğrusal ilişki yüksek korelasyon katsayılı eşitlikler ile gösterildikten sonra flakon şeklindeki mitomisin C içeren farmasötik preparattaki miktar tayini işlemine geçilmiştir. Bunun için, 2 mg mitomisin C içerdiği bildirilen flakon içine 10 mL DMF ilave edilerek mitomisin C' nin numune stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden uygun şekilde yapılan seyreltme işlemlerinden sonra iç standart eklenerek kromatografik analiz gerçekleştirilmiştir. Numune mitomisin C çözeltisi için elde edilen kromatogram Şekil 4.3.2.' de ve analiz sonuçları Çizelge 4.3.2.'de görülmektedir.

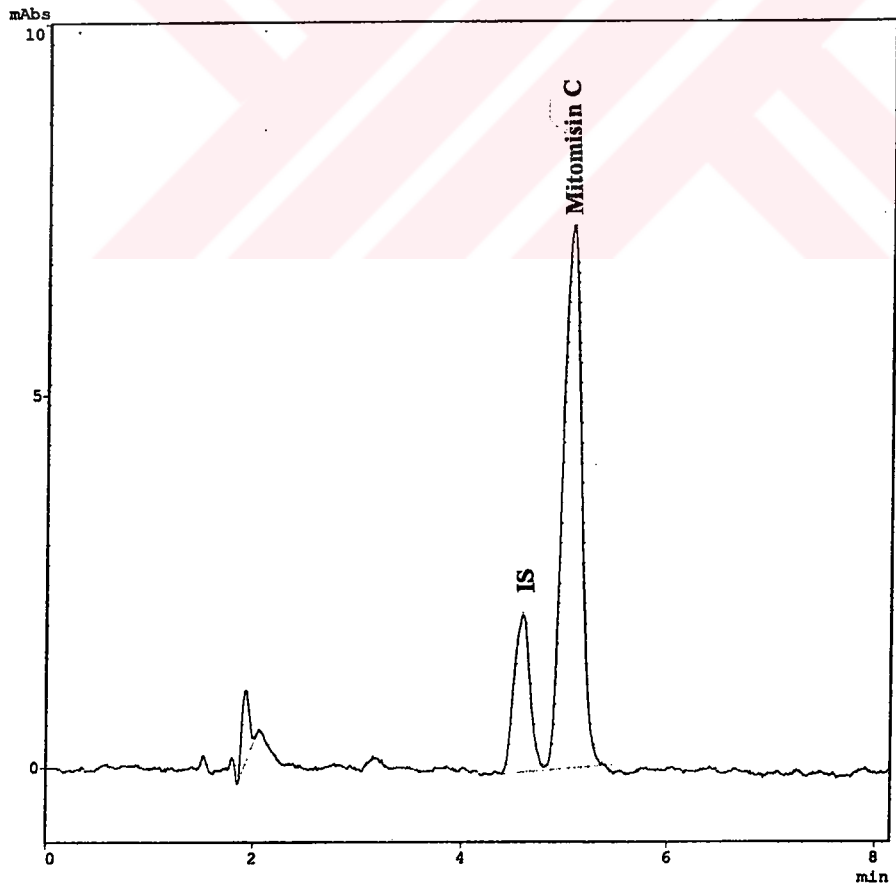
Çizelge 4.3.2. YPSK ile flakonlardaki mitomisin C tayini.

	Bulunan Mitomisin C (mg)	% Mitomisin C
	2.07	103.62
	2.09	104.66
	2.07	103.69
	2.03	101.40
	2.02	100.96
	1.98	99.18
Ortalama	2.04	102.25
Standart Sapma	0.04	2.07
% Bağıl Standart Sapma	1.99	2.03

Çizelge 4.3.2.'de görüldüğü gibi yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile mitomisin C içeren flakonda yapılan analiz sonucunda preparatın ortalama % 102 mitomisin C içerdiği bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen bağıl standart sapma değerleri % 2' dir.



Şekil 4.3.1. Standart Mitomisin C ($5.86 \times 10^{-6} \text{M}$) çözeltisinin IS varlığında kromatogramı



Şekil 4.3.2. Mitomisin C' nin flakon çözeltisinin ($5.86 \times 10^{-6} \text{M}$) IS varlığında kromatogramı

4.4. Flakon İçerisindeki Mitomisin C Miktar Tayini Sonuçlarının Karşılaştırılması

Sürekli akış enjeksiyon analizi, standart yöntemler olarak uygulanan UV-spektrofotometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri uygulanarak elde edilen flakon analizi sonuçları GraphPad Prism version 3.0 veri işletim programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sürekli akış enjeksiyon analizinin pik alanı ve pik yüksekliği şeklinde elde edilen sinyal yanıtlarının standart yöntemlerle ayrı ayrı değerlendirildiğinde bulunan istatistiksel veriler Çizelge 4.4.1. ve Çizelge 4.4.2.' de verilmektedir.

Çizelge 4.4.1. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile UV-spektrofotometri yönteminin karşılaştırılması.

	Sürekli akış enjeksiyon analizi (n=6)		UV-
	Alan	Yükseklik	Spektrofotometri (n=5)
Ortalama	2.05	2.11	2.04
Standart sapma	0.03	0.03	0.04
% Bağlı standart sapma	1.50	1.48	1.90
t-testi (p<0.05)	0.653	3.204	Tablo $t_{0.05} = 2.57$
F testi (p<0.05)	1.578	1.545	Tablo $F_{0.05} = 5.05$

Çizelge 4.4.2. Sürekli akış enjeksiyon analizi ile yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminin karşılaştırılması.

	Sürekli akış enjeksiyon analizi (n=6)		Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (n=6)
	Alan	Yükseklik	
Ortalama	2.05	2.11	2.04
Standart sapma	0.03	0.03	0.041
% Bağlı standart sapma	1.50	1.48	1.99
t-testi (p<0.05)	0.524	3.084	Tablo $t_{0.05} = 2.57$
F testi (p<0.05)	1.751	1.715	Tablo $F_{0.05} = 5.05$

Çizelge 4.4.1. ve Çizelge 4.4.2.' de görüldüğü gibi t-testi uygulandığında pik yüksekliği sinyalleri ile bulunan mitomisin C miktarının yüksek performanslı sıvı kromatografik ve UV-spektrofotometrik analiz ile bulunan miktar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Pik alanı sinyalleri ile bulunan mitomisin C miktarları ile standart yöntemlerle elde edilen miktarlar arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur.

Sürekli akış enjeksiyon analizi yöntemi ile standart yöntemlerin kesinlikleri arasındaki fark F- testi uygulanarak % 95 önem düzeyinde

incelenmiştir. Yöntemlerin kesinlikleri açısından farkı, pik yüksekliği sinyallerinin değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar dışında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur.

İkiden fazla seri ya da yöntemin varyanslarının karşılaştırılması amacıyla kullanılan varyans analizi (ANOVA) testi, elde edilen verilerin değerlendirilmesi için uygulanmıştır. ANOVA testinde de pik yüksekliği ile standart yöntemler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($F_{2,14} = 6.157, p < 0.05$). Pik alanı ile standart yöntemler arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli değildir ($F_{2,14} = 0.219, p < 0.05$).

4.5. Sonuç ve Değerlendirme

Sürekli akış enjeksiyon analizi, son yıllarda basitliği, hızlı oluşu, az miktarda numune gerektirmesi ve ucuz olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay otomasyonu, duyarlılığı, yüksek tekrar edilebilirliği ve kısa analiz süresi sağlaması nedenleriyle daha çok tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Bu çalışmada, sürekli akış enjeksiyon analizi geçerli yöntemler olan UV-spektrofotometri ve YPSK yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu % 95 güvenle söylenebilir. Her üç yöntemle de elde edilen % mitomisin C miktarları USP XXIV' te [26] belirtilen içerik koşullarını sağlamaktadır.

Burada önerilen yöntem basit, hızlı, ucuz ve kesindir. Bu nedenle mitomisin C' nin laboratuvarlardaki rutin analizi için önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. XIONG, X., LIM, B.A., LAT-LUNA, M., CHEW, P., TAN, D., *J. Chromatogr. B.*, **755**, 65-72, 2001.
2. BARBHAIYA, R.H., PAPP, E.A., VAN HARKEN, D.R., SMYTH, R.D., *J. Pharm. Sci.*, **73** (9), 1220-1223, 1984.
3. MARIN, D., PEREZ, P., TEIJEIRO, C. PALECEK, E., *Anal. Chim. Acta*, **358**, 45-50, 1998.
4. MARIN, D., PEREZ, P., TEIJEIRO, C. PALECEK, E., *Biol. Proc. Online*, **1** (2), 100-106, 1998.
5. VAN BENNEKOM, W.P., TJADEN, U.R., DE BRUJIN, E.A., VAN OOSTEROM, A.T., *J. Chromatogr.*, **156**, 289, 1984.
6. OHKUBO, T., NAMBARA, T., *J. Chromatogr.*, **527**, 441, 1990.
7. TJADEN, U.R., LANGENBERG, J.P., ENSING, K., VAN BENNEKOM, W.P., DE BRUJIN, E.A., VAN OOSTEROM, A.T., *J. Chromatogr.*, **232**, 355, 1982.
8. PATTYN, G., VAN OOSTEROM, A.T., DE BRUJIN, E.A., TJADEN, U.R., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **564**, 352, 1991.
9. BARROS, F.G., TUBINO M., *Analyst*, **117**, 917-919, 1992.
10. GONZALES, F., TARÍN, P., MASPOCH, S., BLANCO, M., *Arch. Pharm.* **321**, 725-728, 1988.
11. NOBREGA, J.A., FATÍBELLO-FILHO, O., CRUZ VIEIRA, I., *Analyst*, **119**, 2101-2104, 1994.
12. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Eleventh edition, Published by Merck & Co., Inc., N.J., ABD, 1989, s: 979.
13. BEIJNEN, J.H., UNDERBERG, W.J.M., *Int. J. Pharmaceutics*, **24**, 219-229, 1985.
14. BENVENUTO, J.A., *Am. J. Hosp. Pharm.*, **38**, 1914-1918, 1981.
15. QUEBBERMAN, E.J., *Am. J. Hosp. Pharm.*, **42**, 1750-1754, 1985.
16. CHEN, B-M., XIA, L-W., XIA, X-B., *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **19** (16), 2659-2667, 1996.

17. JOSEPH, G., BIEDERBICK, W., WOSCHEE, U., THEISOHN, M., KLAUS, W., *J. Chromatogr. B.*, **698**, 261-267, 1997.
18. Martindale, The Complete Drug Reference, 32 edition, Published by the Pharmaceutical Press, London SE1 7JN, UK, 1999, s: 552,553.
19. PAN, S.-S., ANDREWS, P.A., GLOVER, C.J., *J. Biol. Chem.*, **259**, 959, 1984.
20. PETERSON, D.W., FISCHER, J., *Biochemistry*, **25**, 4077, 1986.
21. CUMMINGS, J., CHIRREY, L., WILLMOT, N., HALBERT, G.W., SMYTH, J.F., *J. Chromatogr.*, **612**, 105-113, 1993.
22. SONG, D., AU, J.L.S., *J. Chromatogr. B.*, **676**, 165-168, 1996.
23. VAN BENNEKOM, W.P., TJADEN, U.R., *Anal. Chim. Acta.*, **156**, 289-294, 1984.
24. LI, W.Y., SEAH, S.K.L., KODA, R.T., *J. Chromatogr.*, **619**, 148-153, 1993.
25. YAMAZOE, K., HORIUCHI, T., SUGIYAMA, T., KATAGIRI, Y., *J. Chromatogr. A.*, **726**, 241-245, 1996.
26. The United States Pharmacopeia XXIV, Marck Printing Co., Easton, 2000, s: 1119-1121.
27. TUNÇEL, M., YAZAN, Y., DOĞRUKOL, D., ATKOŞAR, Z., *Analytical Letters*, **24 (10)**, 1837-1846, 1991.
28. DOĞRUKOL, D., TUNÇEL, M., *Portugaliae Electrochimica Acta*, **9**, 331-338, 1991.
29. TUNÇEL, M., DOĞRUKOL, D., *Analytical Letters*, **25 (6)**, 1087-1094, 1992.
30. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **49 (12)**, 928-929, 1994.
31. DOĞRUKOL-AK, D., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **50 (10)**, 701-702, 1995.
32. TUNÇEL, M., DOĞRUKOL-AK, D., *Pharmazie*, **52 (1)**, 73-74, 1997.
33. DOĞRUKOL-AK, D., GÖKÖREN, N., TUNÇEL, M., *Analytical Letters*, **31 (1)**, 105-116, 1998.
34. DOĞRUKOL-AK, D., TUNALIER, Z., TUNÇEL, M., *Pharmazie*, **53 (4)**, 272-273, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

Arın Gül Dal 1978 yılında Konya' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya' da tamamladıktan sonra 2000 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nden mezun oldu. Aynı yıl Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı' nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Eylül 2001' de aynı bölüme araştırma görevlisi olarak atandı. Halen bu bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

