

**T.C.
HİTİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI
İLAÇLARIN İYONLAŞMA SABİTLERİNİN SU-
ORGANİK ÇÖZÜCÜ İKİLİ KARIŞIMLARINDA,
SPEKTROSKOPİK VE YPSK YÖNTEMLER İLE
BELİRLENMESİ VE BU İLAÇLARIN YPSK
YÖNTEMLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

Pınar CANİTEZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI

ŞUBAT 2012

ÇORUM

Pınar Canitez tarafından hazırlanan "Lösemi Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların İyonlaşma Sabitlerinin Su - Organik Çözücü İkili Karışımlarında Spektroskopik ve Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemler İle Belirlenmesi ve Bu İlaçların Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Eş Zamanlı Tayini" tez çalışması 10. /02 2012 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel A. Özkan

Doç. Dr. Faruk Gökmeşe

Yrd. Doç. Dr. Senem Şanlı


.....
.....
.....

Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 22.02.2012 tarih ve ...2012/04.....sayılı kararı ile Pınar Canitez'in Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans derecesi alması onaylanmıştır.



Prof. Dr. Ali Kılıçarslan
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.



PINAR CANİTEZ

**LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN İYONLAŞMA
SABİTLERİNİN SU- ORGANİK ÇÖZÜCÜ İKİLİ KARIŞIMLARINDA
SPEKTROSKOPİK VE YPSK YÖNTEMLER İLE BELİRLENMESİ VE BU
İLAÇLARIN YPSK YÖNTEMLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ**

Pınar Canıtez

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2012

ÖZET

Bu çalışmada, kanser hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan ve yurdumuzda da sıklıkla görülen lösemi hastalığının tedavisinde kullanılan doksorubisin, vinkristin, tioguanin ve daunorubisinin iyonlaşma sabitleri su ve su-organik çözücü karışımlarında ters faz sıvı kromatografik ve spektroskopik yöntemler ile tayin edilmiştir. Spektrofotometrik metot, nötral ve iyonik türlerin farklı absorbans özelliklerine sahip olması prensibine dayanır. Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu kriterler sağlandığında elde edilen sonuçların kesinliği oldukça iyidir. Buna ilave olarak, iyonlaşma sabitleri iyonlar arası etkileşimler olmaksızın doğrudan ölçülebilir. HPLC ile iyonlaşma sabitlerinin tayini, günümüzde sıvı kromatografik yöntemle ayrılmaları istenen bileşiklerin ayırmalarının optimizasyonunda ilk aşamadır. İyonlaşma sabitlerinin hesaplanmasında gerekli grafikler yanı sıra bu amaç için geliştirilmiş bilgisayar programlarından yararlanılmıştır. HPLC yöntemlerinde elde edilen veriler ile ayırmanın optimizasyonu sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), İyonlaşma sabitleri, daunorubisin, doksorubisin, 6- tioguanin, vinkristin.

**DETERMINATION OF DISSOCIATION CONSTANTS OF SOME DRUGS,
USED IN THE TREATMENT OF LEUKEMIA, BY SPECTROSCOPIC AND
HPLC METHODS AND OPTIMIZATION OF METHOD FOR
SIMULTANEOUS DETERMINATION OF THESE DRUGS BY HPLC**

Pınar CANITEZ

HITIT UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

FEBRUARY 2012

ABSTRACT

In this study, the ionization constants of doxorubicin, vincristine, daunorubicin and tioguanin used in the treatment of the leukemia which has important place among the cancer diseases and often seen in our country were determined reverse-phase liquid chromatographic and spectroscopic methods in water and water-organic solvent mixtures. Spectrophotometric method is based on the principle that neutral and ionic species have different spectra. If this criteria is met, the precision of results will be good enough. Moreover, the dissociation constants can be measured directly without inter-ionic effects having to be considered. Determination of ionization constants by HPLC is the first step of optimization of a liquid chromatographic method. For calculation of ionization constants, graphics and computer programs developed for this purpose were used. Optimization of separation was set up by the data obtained from HPLC methods.

Keywords: Antineoplastic drugs, HPLC, ionization constants, UV

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın süresince engin fikir ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmalarımı yönlendiren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar çalışmamda destek veren çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Senem Şanlı'ya çok teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Nurullah Şanlı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Bediha Akmeşe ve arkadaşım Aliye Kaşarcı'ya çok teşekkür ederim.

Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümündeki bütün hocalarıma ve Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Akbaş'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 111T627 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmamızı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç biliriz.

Sonsuz bir sabırla bugünlere kadar gelmemi sağlayan, desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, değerli işverenim Edip Dölek'e ve arkadaşım Mesut Baysarı'ya teşekkür etmeyi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Kaynak Araştırması.....	28
2.2. Materyal ve Yöntem.....	29
2.2.1. Kullanılan cihazlar.....	29
2.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	30
2.2.3. Kullanılan çözeltiler.....	31
2.2.3.1. Spektroskopik titrasyonlar.....	31
2.2.3.2. Kromatografik çalışmalar.....	32
2.2.4. Yöntem.....	34
2.2.4.1. Spektroskopik titrasyonlar.....	34
2.2.4.2. HPLC yönteminin optimizasyonu.....	35
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36

3.1. Çalışılan Bileşiklerin ACD-Lab ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri.....	36
3.2. İlaçların Spektroskopik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini.....	39
3.3. HPLC Yöntemiyle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini.....	48
3.4. Doksorubisin, Daunorubisin ve Vinkristin için Geliştirilen HPLC-DAD Yöntemine Ait Analiz Bulgular.....	56
3.4.1.HPLC Sisteminin Optimizasyonu.....	56
4. SONUÇ.....	60
4.1. İlaçların pK _a Değerlerinin Spektroskopik ve HPLC Yöntemi İle Tayini.....	60
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Asetonitril-su karışımında 0,05 M KHP için pHs değerleri.....	27
Çizelge 2.2.Çalışılan bileşikler ve özellikleri.....	30
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	31
Çizelge 3.1. Çalışılan bileşiklerin çeşitli ACN-H ₂ O ortamları için kromatografik verileri.....	58
Çizelge 3.2.Çalışılan bileşiklerin çeşitli ACN-H ₂ O ortamları için kromatografik verileri.....	58
Çizelge 4.1. Su, %10 ve %20 ACN- su (v/v) karışımına ait spektroskopik titrasyon verileri.....	60
Çizelge 4.2. Daunorubisin, doksorubisin ve vinkristinin iyonlaşma sabiti değerleri.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Daunorubisinin kimyasal formülü.....	8
Şekil 2.2. Doksorubisinin (adriamisin) kimyasal formülü.....	9
Şekil 2.3.Vinkristinin kimyasal formülü.....	10
Şekil 2.4. 6- Tioguanininkimyasal formülü.....	11
Şekil 2.5. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda/nm$ ve (b) log absorbands farkı – pH grafikleri (A' :moleküler türün absorbandsı; A'' : iyonik türün absorbandsı)...	13
Şekil 2.6. Zayıf asidik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	16
Şekil 2.7. Zayıf bazik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	16
Şekil 2.8. Amfoterik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	17
Şekil 2.9. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi.....	18
Şekil 2.10.Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT.....	20
Şekil 2.11. Sıvı kromatografide bir kromatogram.....	21
Şekil 2.12.Ayırma gücü (R_s) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi.....	23
Şekil 3.1.Protonlanmış 6-Tioguanin iyonlaşma şeması.....	36
Şekil 3.2.Protonlanmış Vinkristinin iyonlaşma şeması.....	37
Şekil 3.3.Protonlanmış Daunorubisin iyonlaşma şeması.....	38
Şekil 3.4.Protonlanmış Doksorubisinin iyonlaşma şeması.....	38
Şekil 3.5.Su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-Mv grafiği.....	39
Şekil 3.6. Su ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği.....	40
Şekil 3.7. Su ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği.....	41
Şekil 3.8. Su ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	41
Şekil 3.9. Su ortamında doksorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	42
Şekil 3.10. % ACN-su 10 (v/v) ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği.....	43
Şekil 3.11. %10 ACN-su (v/v) ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği..	43
Şekil 3.12.%10 ACN-su (v/v) ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği.....	44
Şekil 3.13.%10 ACN-su (v/v) ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	44
Şekil 3.14.%10 ACN-su (v/v) ortamında doksorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	45
Şekil 3.15. % 20 ACN-su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-mV grafiği.....	46
Şekil 3.16.%20 ACN-su (v/v) ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği..	46

Şekil 3.17. %20ACN-su (v/v) ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği.....	47
Şekil 3.18.%20 ACN-su (v/v) ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	48
Şekil 3.19.%20 ACN-su (v/v) ortamında doksorubisin için elde edilen STAR grafiği.....	48
Şekil 3.20. Vinkristinin %45 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	49
Şekil 3.21. Vinkristinin %45 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	49
Şekil 3.22. Doksorubisinin %45 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	50
Şekil 3.23. Daunorubisinin %45 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	50
Şekil 3.24. Vinkristinin %50 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	51
Şekil 3.25. Vinkristinin %50 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	51
Şekil 3.26. Daunorubisinin %50 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	52
Şekil 3.27. Doksorubisinin %50 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	52
Şekil 3.28. Vinkristinin %55 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	53
Şekil 3.29. Vinkristinin %55 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	53
Şekil 3.30.Daunorubisinin %55 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	54
Şekil 3.31. Doksorubisinin %55 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	54
Şekil 3.32. Vinkristinin %60 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	55
Şekil 3.33. Vinkristinin %60 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	55
Şekil 3.34.Daunorubisinin %60 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....	56

- Şekil 3.35. Doksorubisinin %60 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği.....56
- Şekil 3.36. Doksorubisin (2 µg/ml), daunorubisin (2 µg/ml) ve vinkristin (8 µg/ml) analizi için elde edilen kromatogram. (50:50 (v/v) ACN-su; 20 mM H₃PO₄ pH=9,50; akış hızı 1,5 ml/dk, kolon sıcaklığı 30°C). Görüntüleme 254ve 276 nm'de yapılmıştır.....59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
k	Kapasite faktörü
R	Korelasyon katsayısı
R_s	Ayırma gücü
t_R	Alıkonma zamanı
α	Seçicilik
Kisaltmalar	Açıklama
DAD	Diode Array Dedektör
YPSK	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
NLREG	Nonlinear Regression
ODS	Oktadesilsilika
SPARC	“Performs Automated Reasoning in Chemistry”
UV- Vis	Ultraviyole ve Görünür Işık
UV	Ultraviyole

1.GİRİŞ

Bu öngörülen çalışmada incelenmek üzere kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan dört tanesi seçilmiştir.Çalışmanın temel amacı, yurdumuzda görülen kanser hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan lösemi tedavisinde yer alan doksorubisin, vinkristin, tioguanin ve daunorubisinin iyonlaşma sabitlerini su ve su-organik çözücü karışımlarında ters faz sıvı kromatografik (YPSK) ve spektroskopik yöntemler ile tayin edilmesidir. pK_a değerleri tayin edilen bu maddelerin, YPSK yöntemi ile bir arada tayinleri içinde yeni bir metot geliştirilmiştir.Günümüzde ters faz sıvı kromatografi giderek önem kazanan teknikler arasındadır. Bu yöntemde ayırmanın optimizasyonunda maddelerin iyonlaşma sabitlerinin bilinmesi gereklidir. Su-organik çözücü karışımlarında YPSK veya spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini, elektrot kalibrasyonunun yapılabilmesi, bu amaçla geliştirilmiş çeşitli grafik programların mevcut olması, hatta bu hesaplamalarda kullanılacak bilgisayar programlarının geliştirilmiş olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu konu ile ilgili kaynaklar incelendiğinde lösemi tedavisinde kullanılan bu etken maddelerin su organik çözücü karışımlarındaki pK_a değerleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu çalışma ile lösemi tedavisinde kullanılan bu ilaçların pK_a sabitleri geniş bir aralıkta tayin edilmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin YPSK yöntemi ile analizlerinde optimum koşul belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Kanser

Normal hücrelerin olgunlaşma, çoğalma özelliklerinde ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün ve programlanmasının kaybolması ile beliren bir hastalıktır. Çocukluk çağındaki kanser vakalarının % 35'ini lösemiler oluşturur ve birinci sıradadır.

Kanser sebebi neye bağlı olursa olsun, esas olarak, hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını idare eden kontrol sistemindeki bir bozukluk nedeniyle hücrelerin başıboş bir şekilde çoğalması, çevre dokulara invazyon göstermesi ve de uzak-yakın organlarda metastaz (yayılma) yapması ile karakterize olan bir hücreler hastalığıdır (Yıllar, 2006).

Kan Kanseri

Kan hücrelerinin özellikle akyuvarların (vücudu mikroplara karşı korur) normalin üzerinde çoğalması ile kendini gösteren kanser türüdür. Yüksek sayıdaki olgunlaşmamış hücrelerin normal ilik hücrelerinin yerini alması ile iliklerde hasar meydana gelir. Böylece kan pıhtılaşmasında rol oynayan plateletler ve savunmada rol oynayan lökositlerin sayısı azalmaya başlar. Bu da lösemi hastalarında zedelenmelerin ve kanamaların yoğun görülmesine hastaların kolay enfeksiyon kapmasına neden olur. Bir başka tanımla; damarlarımızda dolaşan kanın yapım yeri olan kemik iliğinin normal olmayan, kök hücrelerinin doğurduğu blast isimli kök hücrelerce istila edilerek kan yapımının duraklamasıdır. Bir hastalık grubu olarak adlandırılan lösemnin diğer adı kan kanseridir. Çünkü bu hastalıklar, vücuttaki tüm büyük kemiklerin iç kısmını döşeyen ve kan yapımını sağlayan kemik iliğinde gelişir. Diğer kanser türleri ile benzer etkiler gösterir.

Lösemnin kemik iliğiyle ilişkisi

Kan hücrelerinin ana yapım yeri kemik iliğidir. Buradaki ana hücrelerden çoğalırlar. Kök hücrelerdeki bir bozulma sonucu blast isimli kök hücreler kan dolaşımıyla yayılırlar. Kemik iliğinde üretilen blastlar normal kan hücrelerinin üretilmesine engel olur ama normal kan hücrelerinin yaptığı işlevi yapamazlar.

Lösemi tipleri

Lösemi bir hastalık grubu olduğu için birçok farklı tipi vardır. Fakat bütün lösemilerin ortak özelliği vücudu mikroplara karşı savunan lökositlerin (akyuvarlar) kontrol edilemeyecek düzeyde çoğalmasıdır. Bu lökositlerin kontrolsüz çoğalması

sonucu bunlar vücudu savunamayacak hale gelir ve eritrosit(alyuvarlar)ve trombosit gibi diğer kan hücrelerinin görevini aksatmasına yol açar. Normalde 1mm^3 kanda beş milyon alyuvar ve dört bin ila on bir bin arasında lökosit bulunur. Lösemide ise lökosit(akyuvar) sayısı 1mm^3 kanda bir milyona kadar çıkabilir. Lösemi tipleri hangi alyuvar türü aşırı miktarda çoğalıyor ve kanserleşme gösteriyorsa hastalık o alyuvar adı ile tanımlanır. Mesela lenfosit (ya da lenfositik) lösemisi, alyuvarların bir çeşiti olan ve lenf sistemindeki lenf hücrelerini etkiler. Diğer tip ise myeloid lösemi denilen, myeloblastların (olgunlaşmamış kan hücreleri) aşırı çoğalmasıdır (Anonim, 2010). Lösemi:

- 1.) Akut lenfositik (lenfoblastik) lösemi (ALL)
- 2.) Akut miyelojenöz (miyeloid) lösemi (AML)
- 3.) Kronik lenfositik lösemi (KLL)
- 4.) Kronik miyelojenöz lösemi (KML)

olarak adlandırılan 4 farklı tip kan kanseri için kullanılan genel kavramdır.

Her lösemi tipinde hastanın nasıl etkilendiğini ve nasıl tedavi edileceğini bilmek gereklidir. Bu 4 değişik lösemi tipinde ortak olan kemik iliğindeki bir hücreden başlamalarıdır. Hücre değişime uğrar ve bir çeşit lösemi hücresi haline gelir.

Kemik iliği kemiklerde kan hücreleri ve lenfositlerin yapıldığı süngerimsi merkezdir. Kan hücreleri kök hücreler olarak başlar. Kemik iliğinde yapılan değişik tipteki hücreler, kırmızı küreler, plateletler, lenfositler ve diğer birçok beyaz küre tipidir. Bu hücreler oluşuktan sonra kemik iliğini terk eder ve kana karışırlar.

Kemik iliği tek bir organda iki organ olarak görev yapar. Birincisi kan yapan organdır. Burası miyelojenöz lösemisinin başladığı yerdir. İkincisi lenfosit yapan organdır ve immün sistemin bir parçasıdır. Burası da lenfositik lösemisinin başladığı yerdir. Lenfositleri oluşturan kemik iliği hücresinde kanseröz değişim meydana gelirse, lösemi lenfositik veya lenfoblastik olarak isimlendirilir. Normalde kırmızı küreler, bazı tür beyaz küreler ve plateletleri oluşturan kemik iliği hücresinde hücre değişikliği olursa lösemi miyelojenöz veya miyeloid olarak adlandırılır. Hastaların hastalığa yakalanmaları ve tedavileri her lösemi tipinde farklılık gösterir. Akut lenfositik lösemi ve akut miyelojenöz lösemi, lenfoblastlar veya miyeloblastlar olarak bilinen genç hücrelerden meydana gelmektedir. Bu hücreler bazen blast olarak adlandırılır. Tedavi edilmeyen akut lösemiler hızlı ilerler. Kronik lösemilerde blast

hücreleri ya çok azdır ya da hiç yoktur. Kronik lenfositik lösemi ve kronik miyeloid lösemi akut lösemilere göre genellikle yavaş ilerler.

Akut lenfositik lösemi

Lenfosit, lenfoblast olarak adlandırılan olgunlaşmamış kan hücrelerinin dönüşümü ile oluşur. Lenfoblastlar bu kanser türünde çok fazla artmıştır. Bunlar lenf düğümlerinde birikir ve şişliğe yol açar. Bu lösemi çocukluk çağında en sık görülen lösemidir (Anonim, 2010).

Akut myeloid lösemi

Olgunlaşmamış kan hücresi olan myeloblastların aşırı çoğalması ile karakterizedir. Bu hücrelerin kemik iliğinde çoğalması sonucu kan hücreleri üretilmez yada az üretilir. Bu hücreler üretilmezse enfeksiyonlar artar kansızlık gelişir (Anonim, 2010).

Kronik lenfositik lösemi

Olgun lenfositler gibi görülmelerine rağmen vücudu savunmaktan acizdirler. Bu hücreler kemik iliğinde çok fazla üretilir. Fakat koruyucu rolleri yoktur. Erişkinlerde görülür yavaş yavaş gelişir ve ilerler. Hasta yıllarca yaşayabilir. Elli yaşlardan sonra görülme sıklığı artar. Hastalık yavaş seyreder (Anonim, 2010).

Kronik myeloid lösemi

KLL(kronik lenfositik lösemi) gibi olgun görülen fakat görevini gerçekleştiremeyen hücrelerin anormal artışı vardır. Bütün normal hücreler bitene kadar bu hücre artışı sürer. Erişkin çağındaki lösemilerin % 25-60'ını oluşturur. En çok 25-60 yaşlarında görülür. Erkeklerde daha sık görülür (Anonim, 2010).

Lösemnin nedenleri

Tam olarak kanıtlanmış olmasa da genetik bozulmalara yol açan günlük hayatta karşılaştığımız kimyasal maddeler, gıdalardaki katkı maddeleri, kullanılan ilaçlar, radyasyonla karşılaşma öyküsü, zehirli gazlar suçlanan faktörler arasındadır. Özellikle kronik lenfositik lösemide ırk faktörünün önemli olduğu saptanmıştır. Beyaz ırkta fazla, sarı ırkta az görülmektedir (Anonim, 2010).

Lösemnin tanısı

Lösemi tanısında ilk yapılacak işlem kan sayımıdır. Sıklıkla parmak ucundan bazen damardan alınan kandaki hücre sayıları özel yöntemlerle saptanır. Ayrıca bir damla kan lam denen camlara yayılıp boyanarak mikrosapla incelenir. Uzman bir doktor bu

kan hücrelerini inceleyerek belli bir sonuç çıkartılabilirse de esas tanı kemik iliği incelenmesi ile konur. Kemik iliğini alma işlemi kısa ve zararsız bir olaydır. Ağrı olmasını önlemek için yapıldığı bölge özel ilaçlarla uyuşturulur ve hasta uyutulur. Hasta yüzükoyun yatırılır, kalça bölgesi uygun maddelerle temizlenir ve mikroplardan arındırılır, uyuşturulur. Daha sonra özel bir iğne ile kalça kemiğinden çok az miktar kemik iliği emilir ve aynen kan gibi cam üzerine yayılır, boyanır ve mikroskoptan incelenir. Bu incelemede hem lösemnin olup olmadığı hem de tipi belirlenir.

Lösemi tedavisi

Hastalığın tedavisi mümkündür. Ancak mutlak olarak anne, baba, çocuk ile doktor, hemşire, psiko-sosyal ekibin işbirliği şarttır. Tedavide çeşitli yöntemler:

- 1.) Kemoterapi (ilaç tedavisi)
- 2.) Radyoterapi (ışın tedavisi)
- 3.) Destekleme tedavisi
- 4.) Kemik iliği naklidir.

İlaç dışı tedavi(Radyoterapi)

İşın tedavisi 2-3 hafta sürer. Artık hasta normal yaşama döner. Bazı ilaçları sürekli ağızdan uygularken diğerlerini aylık ziyaretlerde hastanede alır. Bu dönem 2-3 yıl sürer ve sonuçta her şey yoluna girerse şifaya ulaşır. Ancak her şey bu kadar düzenli gitmez ve uyuyan lösemi blastları bazen kemik iliğinde bazen beyinde bazen yumurtalıkta yeniden uyanır. Buna relaps (tekrarlama) dönem denir. O zaman kemoterapi yanında kemik iliği nakli gibi başka yöntemlere de yönelmek gerekir. Kemoterapi ile birlikte uygulandığında tedavinin başarı şansı artacaktır. Son yılların en büyük keşfi basit olarak sağlam bir kişiden alınan kemik iliğinin iyice tedavi edilmiş hastaya verilerek onun hasta kemik iliğinin yerini almasını sağlamaktır. Böylece artık kemik iliğinde lösemik blastlara yer kalmaz ve hasta şifaya kavuşur. Kemik iliği nakli için öncelikle bir verici bulunmalıdır. Bu verici ideal olarak kardeştir. Ancak doku uygunluğu testi yapılır. Uygun verici bulunur.

İdeal şartlarda risk grubuna bağlı olarak çocuk çağında kemoterapi ile iyileşme oranları %85 ile %60 arasında değişir. Fakat ne yazık ki bazen hastalık tamamen iyileştikten sonrada tekrarlayabilir. Özellikle hastalığın ilk 3 yılda tekrarlama riski fazladır. Eğer hastalık tekrarlar ise tekrar kemoterapi ilaçlarına başlanır. Bir yanda da

seçilmiş hastalarda kemik iliği nakli için uygun donör ve merkez aranır. Eğer kemoterapi ile kemik iliğinde tam iyileşme sağlanır ve uygun donör varsa hasta kemik iliği nakli tartışılır.

Kemoterapi (İlaç tedavisi)

Lösemi tedavisinde kullanılan ilaçlar kemoterapi olarak adlandırılır.Bu tedavide amaç remisyon denen kemik iliğinde mikroskop ile görülen lösemi hücrelerin temizlenmesidir. Kemoterapi sırasında birçok ilaç birlikte kullanılır. Bu ilaçlar tüm dünyada kullanılan ve etkinliği ispatlanmış ilaçlardır. Kemoterapi ilaçları etkinlik ve yan etkileri çok yakın olan ilaçlardır. Bu yüzden kemoterapi alırken doktorun izni olmadan başka ilaç veya ilaç benzeri madde kullanılmamalıdır. Hastanın yaşına, vücut ağırlığına,vücut yüzey alanına, lösemi tipine,risk gurubuna göre ilaçlar değişir.Damar yolu sorunu ciddi boyutlarında olan hastalara izin alınarak kateter uygulanabilir. Kemoterapi ilaçların çoğu böbreklerden atıldığı için tedavi sırasında bol sıvı almak gerekir. Kemoterapi ilaçları hızlı çoğalan hücrelerde ölüme yol açarlar. Kanser hücrelerinin yanı sıra kıl kökleri, sindirim sistemini kaplayan hücrelerde ilaçlara çok duyarlıdır (Anonim, 2007).

Tedavinin uygun bir merkezde yapılması, temiz ve steril ortamın sağlanması, iyi ve dengeli beslenme ve psikolojik destekler tedavinin başarılı olmasında çok önemlidir.Dikkat edilmesi gereken en önemli nokta temiz ve hijyenik bir ortam sağlanmasıdır. Örneğin, temiz iyi pişirilmiş katkı maddesi içermeyen organik besinlerle beslenme, kalabalık ortamlardan kaçınma, hastalık bulaştırabilecek kişilerle temasın engellenmesi, ağız ve vücut temizliği, hijyenik ortamdır.

Beslenme çok büyük önem taşımaktadır. Kemoterapinin yan etkileri nedeniyle ağızdan beslenme bozulmaktadır. Ayrıca mide bağırsak sistemini koruyan mukoza hücreleri de yok olmaktadır. Ağız yaraları yüzünden hasta yeteri kadar beslenemez ise özel sıvılar yardımı ile damardan beslenmeye geçilir. Lösemi hastasının yediği her şey mutlaka çok temiz olmalıdır. Mümkün olduğunca pastanelerde satılan özellikle kremalı ürünlerden kaçınmak gerekir. Pastörize paket sütler kullanılmalıdır. Tedavi sırasında sebzeler çiğ yerine pişmiş veya komposto tarzında tüketilmelidir. Kemoterapi sırasında ekşili ve baharatlı yiyeceklerden uzak durulmalıdır. Gıdalar evde pişirilerek hazırlanmalıdır. Verilen ilaçlar kemik zayıflatıcı etkisi olduğu için hastalara kola gibi gazlı içecekler yasaklanır. Günlük en az 250 gr yoğurt veya süt

tüketilmeleri önerilir. Mevsim dışı sebze ve meyvelerden kaçınılmalıdır. Kuru incir, kuru kayısı, fındık, ceviz içi gibi iyi B vitamini kaynakları ve antioksidanlar yararlıdır (Anonim,2007).

Lösemi tedavisinde kullanılan ilaçlar

Antineoplastik ilaçlar

Kanser sağaltımında kullanılan maddelere antineoplastik ilaçlar ve bu maddeler ile yapılan tedaviye de kanser kemoterapisi denir. Antineoplastik ilaçların büyük bir kısmının emniyet aralığı dar olduğundan toksisite kaygıları nedeni ile olabildiğince küçük dozlarda verilmeleri gerekir. Böyle bir durumda doz kısıtlayıcı toksik etkileri engelleyerek daha yüksek dozda ilaç kullanılması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Örneğin, ilaç tümörün yerleşmiş olduğu bölgeye lokal olarak yüksek konsantrasyonda verilebilir. Ya da ilacın antineoplastik etkinliğini azaltmadan toksisitesini azaltan bir antidotla birlikte verilebilir (folinik asit). Antineoplastik ilaçların hemen hepsi güçlü teratojenik ilaçlardır. Deformiteli bebek doğmasına ya da düşüklere neden olur. Özellikle alkilleyici ilaçlar karsinojenik etkiye sahiptir. Kullanımlarını izleyen bir kaç yıl içinde sekonder kanserlere neden oldukları gösterilmiştir (Gacar, 2009). Antineoplastik ilaçlar kendi aralarında gruplara ayrılırlar: Bunlar

Alkilleyici ilaçlar

Antimetabolitler

Bitkisel kaynaklı ilaçlar

Antibiyotikler

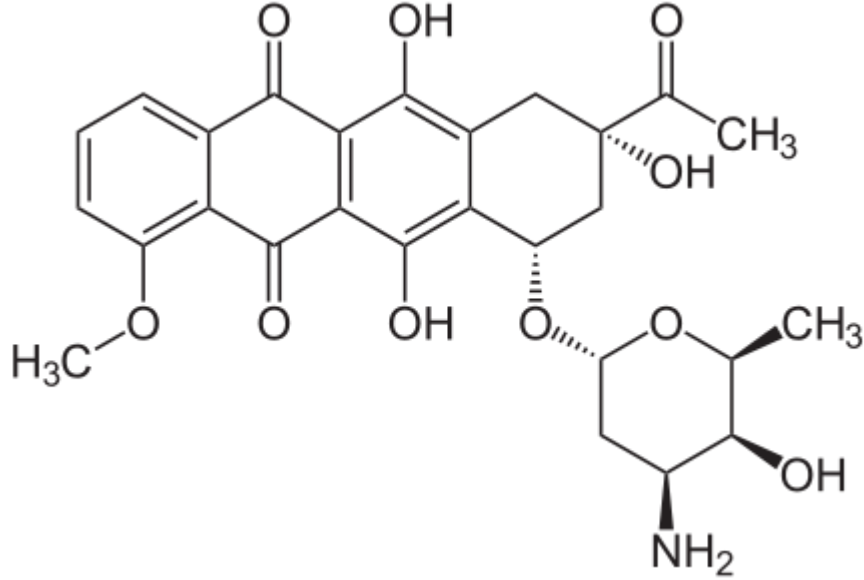
Hormonlar

Çeşitli ilaçlardır.

Çalışmada Kullanılan Maddelerin Farmokolojik ve Farmokinetik Özellikler

Daunorubisin

Formül



Şekil 2.1.Daunorubisinin kimyasal formülü

Kapalı formül

$C_{27}H_{29}NO_{10}$

Sistemik Adı

(8S,10S)-8-acetyl-10-[(2S,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxy-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-9,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione.

Farmokolojik Özellikleri

Daunorubisin güçlü bir antilösemik ajandır.Etki mekanizması DNA'ya bağlanma ve nükleik asit sentezini inhibe etme kapasitesinden kaynaklanır.Daunorubisin ayrıca hafif bir antibakteryel aktivite de gösterir.Hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar,maddenin hücreyesüratle geçtiğini ve yoğun olarak perinuklede kromatinde toplandığını göstermiştir.Nükleikasit sentezinin,mitotik aktivitenin süratle inhibe olduğu,kromozomlarda bir sapma görüldüğü de rapor edilmiştir.Daunorubisin farede deneysel olarak oluşturulan hem katı hem de askitik tümörlerin büyümesini inhibe etmekte ve hayvanların yaşam süresini geniş ölçüde uzatmaktadır.Radyoaktif hale getirilen atomlarla işaretlenmiş, daunorubisin kullanılarak yapılan farmokinetik araştırmalarda intravenöz uygulamayı takiben süratli bir plasma klirensi saptanmıştır.Bu süratli düşüşten sonra uzun bir süre

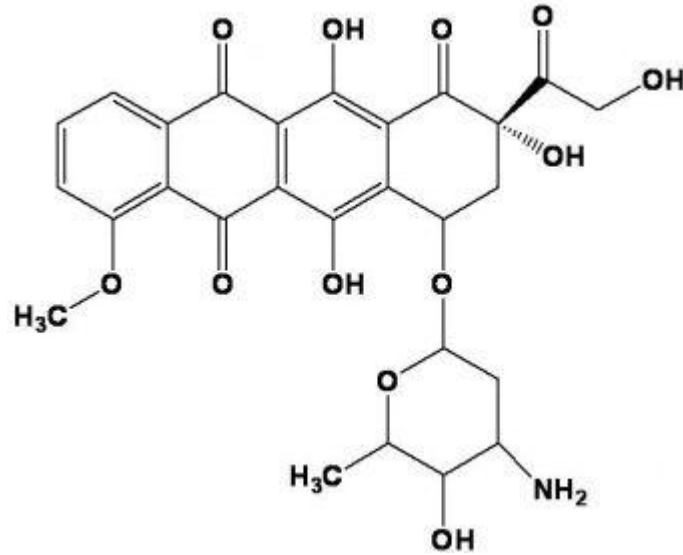
plazma konsantrasyonları sabit kalmaktadır. Daunorubisin özellikle nükleik asitten yana zengin dokulara süratle bağlanır ve bu dokulardan dolaşıma verilir. Florometrik metolarla yapılan tayinlere göre 7 günlük bir sürede verilen dozun yaklaşık % 15'i idrarla itrah edilir. Eliminasyon büyük ölçüde safra ile olur. Karaciğer fonksiyonunun bozuk olması itrahin yavaşlamasına ve sonuç olarak antibiyotiğin plasma ve dokularda birikmesine yol açar.

Farmokokinetik Özellikleri

Daunorubisin en yüksek düzeyde dalakta, böbreklerde, akciğerde ve kalpte erişerek vücut dokularına yaygın biçimde dağılmaktadır. İlaç hücrelerin içine girmekte ve hücre elemanlarına özellikle de nükleik asitlere bağlanmaktadır. Daunorubisinin kan-beyin engelini geçebildiğine ilişkin herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak ilacın plasentayı geçtiği görülmektedir. İlaç, esas olarak, sitoplazmik aldo-keto redüktaz tarafından karaciğerde ve diğer dokularda hızla ve yaygın bir şekilde metabolize edilmektedir.

Doksorubisin (Adriamisin)

Formül



Şekil 2.2. Doksorubisinin (adriamisin) kimyasal formülü

Kapalı Formülü:

$C_{27}H_{29}NO_{11}$

Sistemik Adı:

(8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahyfro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione

Farmakolojik Özellikleri

Doksorubisin, Streptomyces peucetius türlerinden caesioides tarafından üretilen sitotoksik antrasiklin grubundan antibiyotik bir ilaçtır. Doksorubisin, anti-infektif özelliklere sahip olmasına rağmen, sitotoksitesi anti-infektif ajan olarak kullanılmasını engellemektedir.

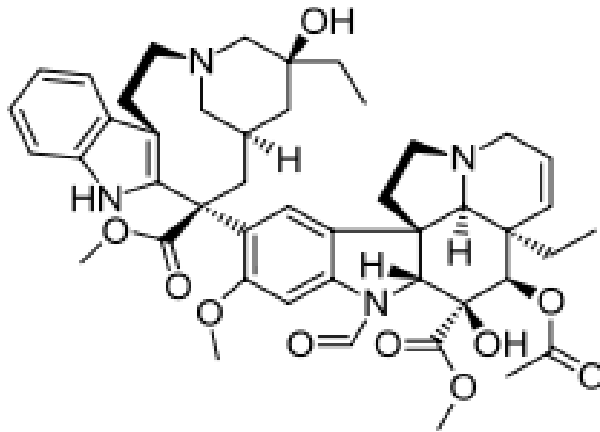
Doksorubisin, Ayrıca doksorubisin topoizomera II ile etkileşime girerek enzimi inhibe eder ve DNA'nın tamir etme mekanizmasını engeller. DNA'ya bağlanma ve topoizomera II inhibisyonu DNA ve RNA sentezini inhibe ederek, DNA'nın parçalanmasına yol açar. Doksorubisin ayrıca demir ile güçlü bir şekilde şelat oluşturup DNA'ya ve hücre membranlarına bağlanabilir ve DNA'yı ve hücre membranlarını kolayca parçalayabilen serbest radikaller üretebilir.

Farmakokinetik Özellikler

Doksorubisin hidroklorür, gastrointestinal yoldan absorbe edilmez ve sadece parenteral yolla uygulanır. Dokuları aşırı tahriş ettiği için intravenöz olarak uygulanmalıdır. Doksorubisin, karaciğer ve diğer dokularda metabolize olur. En önemli metaboliti antineoplastik aktiviteye sahip doksorubisinoldür.

Vinkristin

Formül



Şekil 2.3. Vinkristinin kimyasal formülü

Kapalı Formülü

$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$

Sistemik Adı

Methyl(1R,9R,10S,11R,12R,19R)-11-(acetyloxy)

Farmakolojik Özellikleri

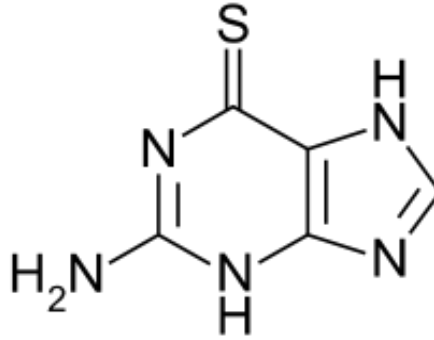
Vinkristinin etki mekanizması tam bilinmemektedir.İğ şeklindeki mitotik cismin mikrotübüler proteinlerine bağlanarak uygun şekilde polimerize olmalarını engeller ve metafazın durmasına neden olur.Yüksek konsantrasyonlarda ilacın nükleik asit ve protein sentezine kompleks etkileri de vardır. Vinkristin immüno supresif etki gösterir.

Farmokokinetik Özellikleri:

Vinkristinin oral yoldan emilimi iyi değildir.Terminal faz yarı ömrü 15-155 saat arasındadır.Dolayısıyla ilacın haftada birden daha sık doze etmek gereksizdir. Vinkristinin başlıca atılma yolu safradır.

6-Tioguanin

Formül



Şekil 2.4.6-Tioguanin kimyasal formülü

Kapalı Formülü

C₅H₅N₅S

Sistemik Adı

2-amino-7H-purine-6-thiol

Farmakolojik Özellikler

Kalsiyum folinat 5-formil tetrahidrofolik asidin kalsiyum tuzudur.Folinikasidin etkin bir metabolitidir.Sitotoksik tedavide nükleik asit sentezinde önemli bir koenzimdir.Kalsiyum folinar folat antagonistlerinin örneğin,metotreksatin etkisine karşı çıkarak bunların toksisitesini ortadan kaldırır.

Farmokokinetik Özellikleri

Adale içi uygulamayı takiben sistemik yararlanım damar içi uygulama sonucu meydana gelen ile aynıdır.Folinik asidin dağılım hacmi bilinmemektedir.Ana

maddenin doruk serum düzeyleri i.v. uygulamadan 10 dakika sonra oluşur. Etkin olmayan metabolitlerin %80-90'ı idrarla ve %5-8'i feçesle atılır.

Su-Organik Çözücü Karışımlarında pK_a Tayini

Su-organik çözücü karışımları, suda çözünmeyen bileşiklerin asitlik ve bazlık sabitlerinin tayinlerinde tercihli olarak kullanılmaktadır. Bu ortamların sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik ayırmalarda kullanılması ve bileşiklerin ayırmadaki davranışlarında iyonlaşma sabitlerinin etkin olmasından dolayı su-organik çözücü karışımlarındaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İyonlaşma sabitlerinin tayininde alternatif yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar:

- 1) Potansiyometrik yöntemler
- 2) Spektroskopik yöntemler
- 3) Sıvı kromatografik yöntemler
- 4) Elektroforetik yöntemlerdir.

Spektroskopik Yöntemler

İyonlaşma sabitleri spektrofotometrik ölçümler ile de tayin edilebilir (Polster ve Lachmann, 1989). Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu tayinde aşağıdaki bağıntı esas alınmaktadır:

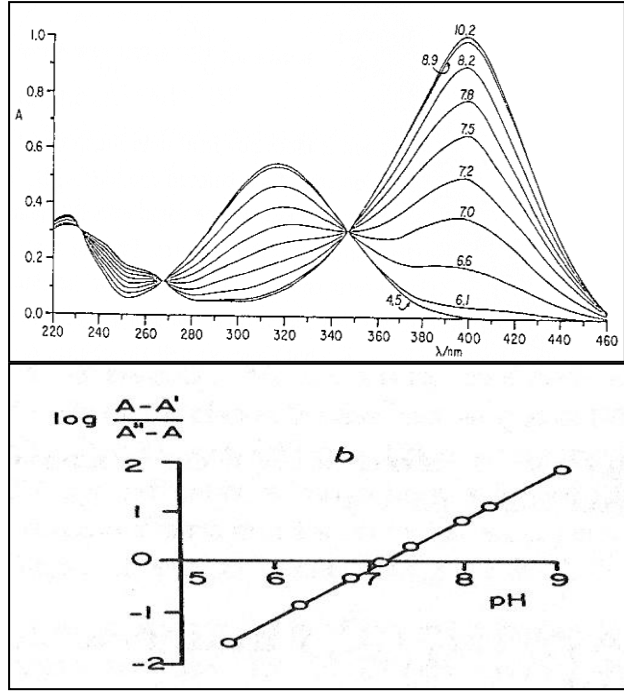
$$pK_a = pH + \log \frac{A_{obs} - A_M}{A_I - A_{obs}} \quad (2.1.)$$

Bu bağıntıda A_M moleküler formun, A_I iyonlaşmış türlerin absorbans değerlerini ifade etmektedir. Absorbans pH a karşı grafiğe geçirilerek veya log ((A-A')/(A''-A)) pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından pK_a değerleri bulunabilir. (Şekil 2.5.)

Spektrofotometrik yöntemin avantaj ve dezavantajları şunlardır:

- 1) Yöntemin doğruluğu ve kesinliği yeterlidir.
- 2) 10⁻⁵ – 10⁻⁶ M derişim çalışma için uygundur.
- 3) Çalışılan bileşikler saf olmalıdır.
- 4) Yapıda en az bir tane kromofor grubun bulunması ve bunun absorbans özelliklerinin yeterli olması gereklidir.

Nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir.



Şekil 2.5. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda/\text{nm}$ ve (b) log absorbans farkı - pH grafikleri (A' : moleküler türün absorbansı; A'' : iyonik türün absorbansı)

Spektroskopik yöntemle tayinde günümüzde DAD sistemleri kullanılmakta ve bu sistemler LC-DAD ve CE-DAD olarak ayırma yöntemleri ile kombine olarak kullanılmaktadır (Beltran ve ark., 2003). Absorbanstaki en büyük değişme, pH' nın pK_a civarında olduğu koşulda gözlenir. Bu yaklaşımla suda az çözünen ilaçların pK_a değerleri tayin edilebilmektedir (Akay ve ark., 2002). Bu amaçla geliştirilmiş bilgisayar programları, pH ile dalga boyu ve absorbans arasındaki ilişkiyi temel alır (Ando ve Heimbach, 1997; Allen ve ark., 1998; Mitchell ve ark., 1999). Spektroskopik yöntemle elde edilen veriler, potansiyometrik yöntemle elde edilen verilerle uyumludur.

Sıvı Kromatografik Yöntemle pK_a Tayini

Yöntem, özellikle sıvı kromatografik ayırmada yararlanılan organik çözücü-su karışımlarına uygulanabilmektedir. Çalışılan bileşiklerin alıkonma davranışları ile hareketli faz pH'sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir (Poole ve Poole, 1997; Hardcastle ve Jano, 1998). Ayrıca asidik veya

bazik bileşiklerin pK_a sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir.

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır:

- 1) Bileşiğin saf olması gerekmez.
- 2) ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- 3) Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır.
- 4) Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

Kromatografide Horvath – Melander – Molnar Bağlıntıları

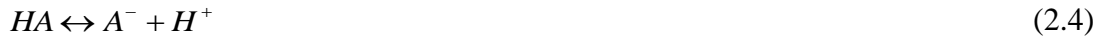
Kromatografik ayırma, çözünen (S) ile ODS gibi hidrokarbon ligand (L) arasında oluşan kompleksin davranışıyla gerçekleşir (Horvath et al., 1977). Bu denge aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir:



Bu dengeye ait denge sabiti 2.3 eşitliği ile verilir:

$$K = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (2.3)$$

Zayıf bir monoprotonik asit (HA) hareketli fazda kısmen iyonlaşır.



Buna özgü denge sabiti, K_{a_m} , aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir.

$$K_{a_m} = \frac{[H^+]_m [A^-]_m}{[HA]_m} \quad (2.5)$$

Bu bağıntıda $[H^+]_m$, $[A^-]_m$ ve $[HA]_m$ türlerin hareketli fazdaki derişimleridir.

Bir kromatografik ayırmada zayıf asitin sabit faz ile etkileşmesi ve buna özgü denge sabiti, K_{LHA} , aşağıdaki eşitlikler ile ifade edilir.



$$K_{LHA} = \frac{[LHA]_s}{[HA]_m [L]_s} \quad (2.7)$$

Burada $[LHA]_s$ ve $[L]_s$ oluşan kompleks ve sabit gazın derişimlerini göstermektedir.

Oluşan anyonik tür ile kolondaki etkileşim ve buna özgü denge sabiti şu şekilde verilir.



$$K_{LA^-} = \frac{[LA^-]_s}{[A^-]_m [L]_s} \quad (2.9)$$

Bir çözünenin alıkonması kapasite faktörü ile ifade edilir. ϕ verilen bir kolonda sabit faz ve hareketli fazın hacim oranlarıdır ve sabittir.

$$k = \phi \frac{[LHA]_s + [LA^-]_s}{[HA]_m + [A^-]_m} \quad (2.10)$$

Bu son bağıntı 2.3, 2.5, 2.7 bağıntılarından yararlanılarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$k = \phi \frac{K_{LHA} [L]_s + K_{LA^-} [L]_s \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}}$$

(2.11)

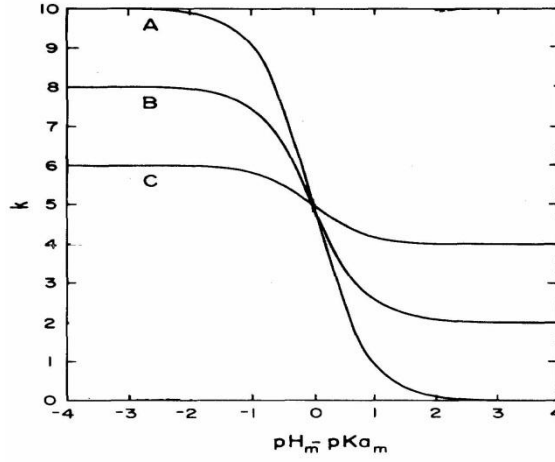
Moleküler formun kapasite faktörü ve iyonlaşan formun kapasite faktörü sırasıyla

$$k_o = \phi [L]_s K_{LHA} \text{ ve } k_{-1} = \phi [L]_s K_{LA^-} \quad (2.12)$$

olarak verilebilir. Bu bağıntılar genel eşitlikte (2.10) yerine yazılırsa son denklem elde edilir.

$$k = \frac{k_o + k_{-1} \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}} \quad (2.13)$$

Bu bağıntı, hareketli faz pH sı ve kapasite faktörlerini kullanarak zayıf asitin iyonlaşma sabiti hesaplanabilir.



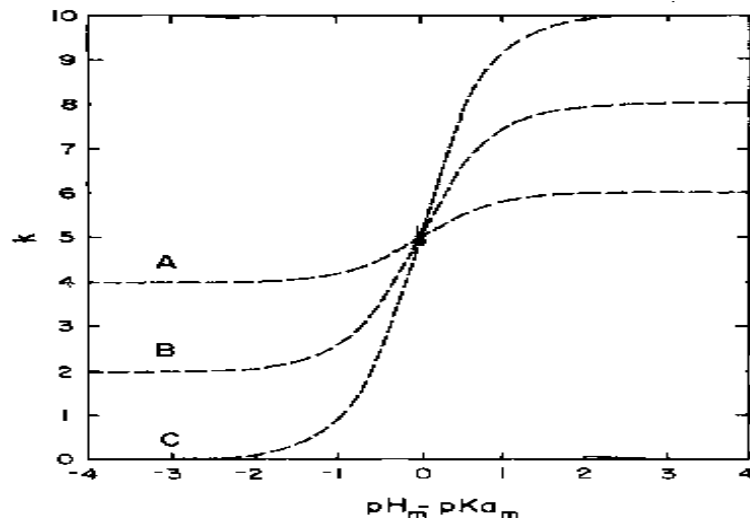
Şekil 2.6. Zayıf asidik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

Zayıf monoproitik bir bazın hareketli fazda iyonlaşma dengesi için verilen eşitlik elde edilir.



Monoproitik zayıf bazlar için verilen denklem ve eşitlikler düzenlenirse yandaki bağıntı elde edilir. Burada k_0 nötral ve k_1 protonlanmış bazın kapasite faktörleridir.

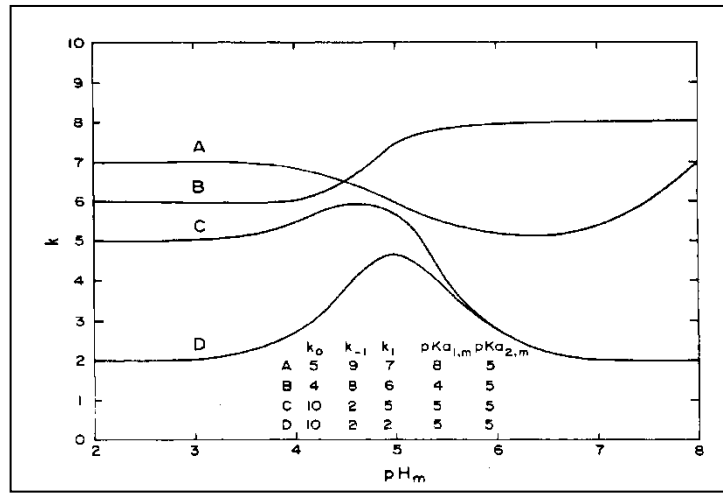
$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{[H^+]_m}{K_{a_m}}}{1 + \frac{[H^+]_m}{K_{a_m}}} \quad (2.15)$$



Şekil 2.7. Zayıf bazik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

Benzer olarak verilen eşitlikler amfolit bileşikler için düzenlenirse yandaki eşitlik elde edilir. Burada k_0 , k_{-1} ve k_1 sırasıyla nötr, anyonik ve katyonik türlere ait kapasite faktörleridir.

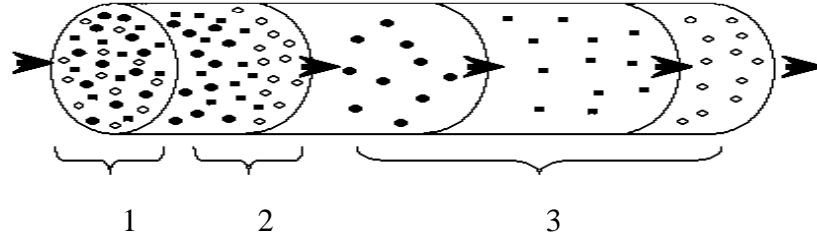
$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{K_{a1,m}}{[H^+]_m} + k_1 \frac{[H^+]_m}{K_{a2,m}}}{1 + \frac{K_{a1,m}}{[H^+]_m} + \frac{[H^+]_m}{K_{a2,m}}} \quad (2.16)$$



Şekil 2.8. Amfoterik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

Kromatografi

Kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbirini ile karışmayan, hareketli bir faz ile (gaz veya sıvı) sabit bir faz (katı veya sıvı) arasındaki partiyon (dağılım) dengelerine dayanarak ayrılmasını ve aynı zamanda bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizini sağlayarak geniş kullanım alanı bulan bir ayırma yöntemidir (Yenilmez, 2006). Yüzlerce maddenin karışımı bile kromatografi yöntemiyle analiz edilebilir.



1 Karışım kolona yüklenir. 2 Ayrılma başlar 3 Ayrılma bitmiştir. Maddeler dedektöre ayrı olarak gider

ayrı olarak gider

Şekil 2.9. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinde geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler. Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareket etmesi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengeleri dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır (Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992). İyonik etkileşimler, İyonlar arasında kolombik kuvvetler, İyon-indirgenmiş iyon etkileşimleri, Dipol-dipol etkileşimleri, Dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri, Nötral atom ya da moleküller arası kuvvetlerdir.

Dipol-dipol etkileşimleri, dipol-indirgenmiş dipol etkileşimleri ve nötral atom ya da moleküller arası kuvvetler Van der Waals kuvvetleri olarak da tanımlanmaktadır. Ayrıca en iyi koşulların sağlanabilmesi için, sabit faz yapısı, hareketli faz bileşimi ve sıcaklığın dağılıma etkisi ayarlanabilir.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği temel olarak iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da hareketli faz adı verilir. Hareketli fazın

içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşmeleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun bir biçimde ölçülür ve zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir.

Sıvı kromatografik teknikler içinde ters- faz sıvı kromatografisi en yaygın kullanılanıdır. Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda tutunmaları farklı olan türlerin ayırımında kullanılır. Kimyasal olarak bağlı alkil zincirlerinin sabit faz olarak kullanıldığı ters faz sıvı kromatografisinde, ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesil silan) en fazla kullanılan sabit fazdır. Ayrıca C8 ve daha kısa alkil zincirleri, sikloheksil ve fenil bağlanmış sabit fazlar da kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde hareketli fazlar genellikle su veya sulu tampon çözeltileri ile suyla karışabilen organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır.

YPSK’ nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

YPSK kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.

Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.

Nitel ve nicel analiz amaçları için kullanılabilir.

Analiz süresi oldukça kısadır.

Duyarlık çok yüksektir. 10 µg’lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

Normal ve Ters Faz Dolguları

Hareketli ve sabit fazların polarlıkları söz konusu olduğu zaman, dağılma kromatografisi ikiye ayrılır. Eskiden sıvı-sıvı kromatografisinde sabit faz olarak silikaya veya alüminaya bağlanmış su, trietilen glikol gibi oldukça polar, hareketli faz olarak da heksan, i-propil eter gibi daha az polar olan maddeler kullanılırdı. Geçmiş çalışmalara bir hürmetin ifadesi olarak, günümüzde bunlara normal faz kromatografisi denilmektedir. Ancak, günümüzde daha çok ters-farz kromatografisi kullanılmaktadır. Ters-faz kromatografisinde sabit faz polar olmayan bir hidrokarbon, hareketli faz ise su, metanol, asetonitril, alkilamin, gibi polar maddedir. Normal faz kromatografisin

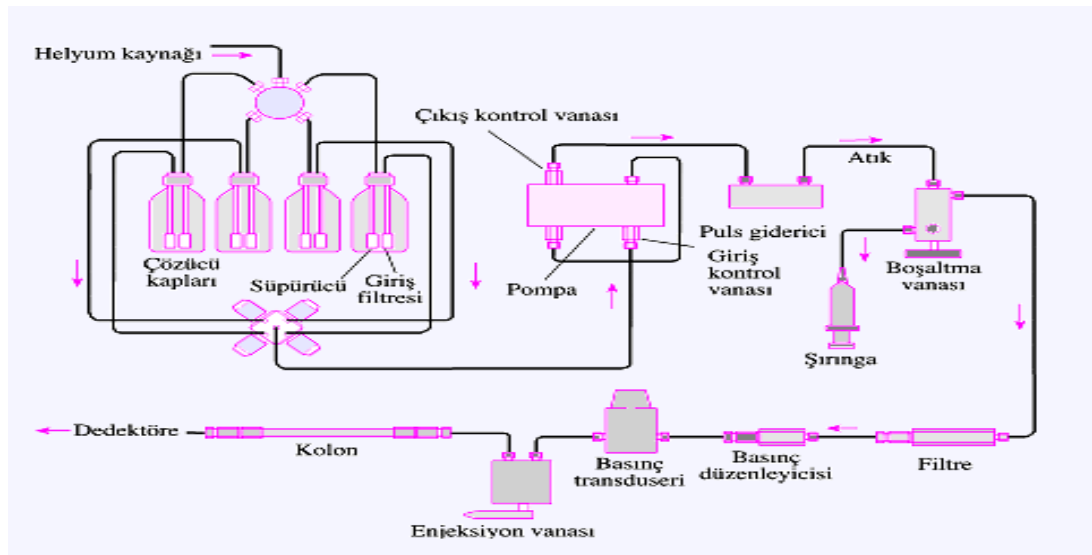
depolarlıkları $A > B > C$ olan üç maddeden önce C elüe olur. Onu B ve A takip eder. Çünkü, polarlığı daha az olan C, polarlığı az olan hareketli fazda, polarlığı çok olan sabit faza göre, daha çok çözünür ve dolayısıyla kolondan daha kısa zamanda çıkar.

Ters-faz kromatografisindeyse, normal faz kromatografisindekinin tam tersi olur. Polarlığı en yüksek olan A maddesi ilk önce elüe olur. Çünkü çözücü polardır (Gündüz, 2007).

İlaç analizlerinde genel olarak ters-faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni, ilaçların genellikle daha apolar yapıda olmaları, ters-faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

Sıvı Kromatografi Cihazları

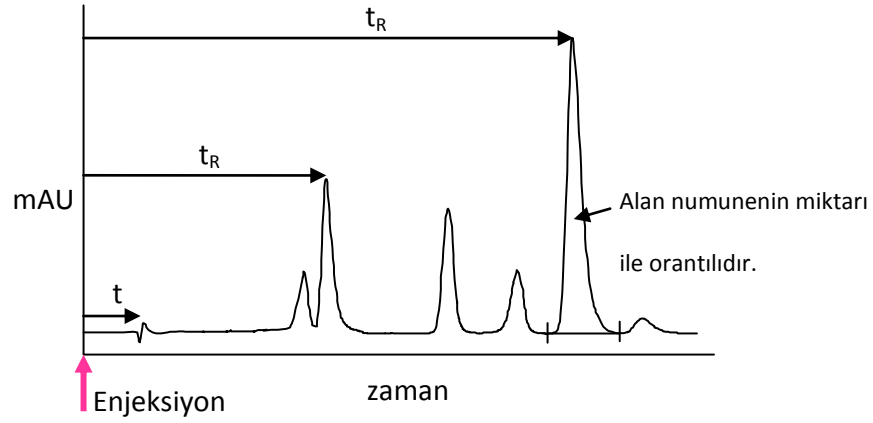
Modern sıvı kromatografi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve tanecik boyutu 1,7 ile 10 μm arasında olan dolgu maddeleri ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lik pompa basınçlarına gerek vardır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak YPSK için gerekli donanım, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalıdır. Şekil 2.10'da tipik bir yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının çeşitli kısımları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü(PerkinElmer Corporation, Norwalk, CT)

Kromatografide Temel Kavramlar

Bir kromatografik sisteminde verilerin yorumlanmasında esas alınan kromatogramdır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafikdir. Sekil 2.11’de iki bileşenli bir örneğe ait kromatogram ve kromatografik gösterimler belirtilmiştir.



Şekil 2.11. Sıvı kromatografide bir kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler şunlardır:

1. Alıkonma zamanı, t_R
2. Kapasite faktörü, k
3. Seçicilik, α
4. Etkin tabaka sayısı, N
5. Ayırma gücü, R_s

1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü: Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı, t_R , ile tanımlanır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen, k , yararlanır. Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.17)$$

Burada t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. YPSK ayırmalarında k , mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır. k çok küçükse, bileşik, çözücü

pikinden ayrılamaz; k çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

Kapasite faktörü uygulanan yöntemde, her maddenin kendi fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir.

2. Seçicilik (α): Seçicilik, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de, seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eşitlik 2.18'de gösterilmiştir. Burada kolonda daha uzun süre tutunan maddeye ait kapasite faktörünün kolonda daha kısa süre tutunan maddeye ait kapasite faktörüne oranlanması ile hesaplanır. Bu tanıma göre seçicilik daima 1'den büyüktür.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (2.18)$$

3. Teorik Tabaka Sayısı (N): Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ 'dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (2.19)$$

Burada;

N :Teorik tabaka sayısı

t_R :Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$:Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

4.Ayırma Gücü (R_s): Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta, $R=1,325$ iken maddelerden biri diğeri içine %0,3 oranında girmiş durumda, $R=1$ iken, maddelerden

biri diğeri içine % 4 oranında girmiş durumda ve $R=0,75$ 'de ayırım olmamaktadır. Ayırma gücü için geliştirilen bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}} \quad (2.20)$$

Burada;

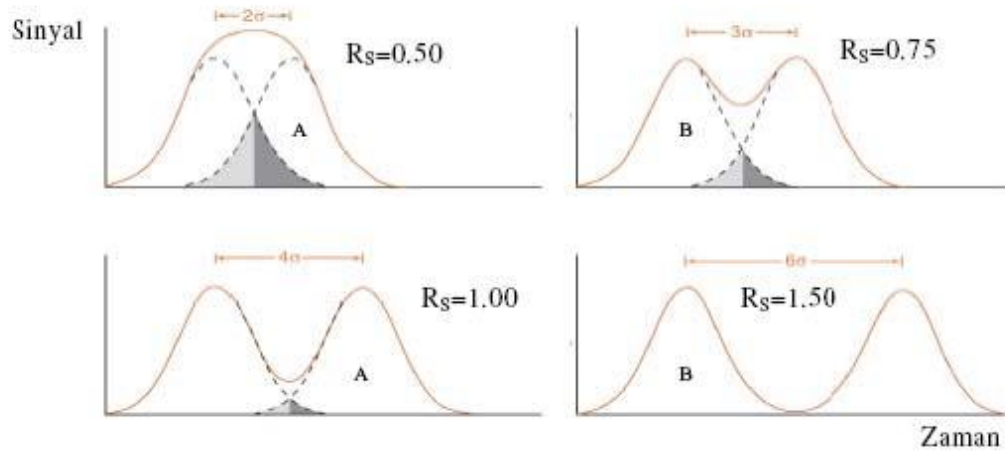
R_S :Pik çifti için ayırma gücü,

t_1 :Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

t_2 :İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0,5}$:Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği,

$W_{p0,5}$:İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliğidir.



Şekil 2.12. Ayırma gücü (R_s) değerinin piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

Dedektörler

Sıvı kromatografik yöntemlerin gelişmesinde yaşanan en büyük güçlüklerden biri ideal dedektör bulabilmektedir. Bir dedektörde bulunması gerekli önemli karakteristikler;

Duyarlılık,

Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,

İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,

Üniversal ve akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,

Doğru cevap, koşulların değişiminden etkilenmeme,

Numuneyi tahrip etmeme,

Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacim,

Ucuzluk ve kolay kullanımdır.

Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 başlık altında toplanabilir.

a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

b) Analit Özellikli Dedektörler: UV absorbanı, floresans şiddeti, vb. analitin sahip olduğu ama hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Bu çalışmada UV/Görünür Bölge Diode Array Dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

Ultraviyole-Görünür Bölge Dedektörü

Absorbans ölçen dedektörler olup YPSK'de kullanılan dedektörlerin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadırlar. Lambert-Beer yasası geçerlidir. DAD dedektörün en büyük avantajı; spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak olduğu söylenebilir.

Hareketli faz, UV/VIS fotometre ya da spektrofotometrenin bulunduğu Z şeklindeki küçük bir akış hücresinden geçirilir. Kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için, bu gibi hücrelerin hacimleri mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır. Hacimler 1-10 μL ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sınırlandırılmıştır. Bu tip hücreler, yaklaşık 600 psi'den büyük basınçlarda çalışmazlar. Bunun sonucu olarak, bir basınç düşürme düzeneği genellikle gereklidir.

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ışınını absorblar ve dedektör tarafından bu absorpsiyona bağlı olarak bir sinyal oluşturulur. Bu sinyal, analit derişimi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bileşene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV-görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV-ışınlarını absorbladığı dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalışma dalga boyu çözücünün absorpsiyon yaptığı dalga boyu değerinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle düşük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler

için son derece önemlidir. Ayrıca elue edicinin pH değerinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyod-dizili cihazlardır. Bu cihazlar, spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yaklaşık bir saniyede toplayabilmektedir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, analit kolondan çıkarken toplanıp saklanabilir. Türlerin teşhisine ve kantitatif tayin için şartların seçimine yardımcı olan bu spektrum şekli, üç boyutlu grafik olarak verilebilmektedir.

İdeal UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.

Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.

Band genişletme etkisi küçüktür.

Çok güvenilirdir.

Örnek çözeltiyi bozmaz.

Ters-Faz Sıvı Kromatografide pH ve Seçicilik

Ters-faz sıvı kromatografi metoduyla analizi yapılan maddelerin çoğu, karboksilik asit, sülfonik asit veya amino grupları gibi, iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Maddelerin alıkonma zamanı, büyük ölçüde fonksiyonel grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Aynı analitin iyonlaşmış ve nötral şeklinin alıkonma zamanı arasında yaklaşık 30 kat farklılık olabilmektedir. İyonlaşma derecesi hareketli fazın pH'sıyla belirlenir. Eğer iyi bir kromatografik seçicilik ve tekrarlanabilir alıkonma isteniyorsa, iyonlaşma derecesini etkileyen faktörleri anlamak gereklidir. Bu faktörlerden en önemlilerine aşağıda değinilmiştir.

İyonlaşma ve pH

İyonlaşan analitlerin alıkonması iyonlaşma derecesine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide, analitin iyonlaşmamış türü, iyonlaşmış türünden daha yüksek alıkonma zamanına sahiptir. Eğer analit birden fazla iyonlaşma basamağına sahipse; daha yüksek iyonlaşma derecesi basamağında, daha düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin iyonlaşma derecesi, çözeltinin pH'sına ve iyonlaşma basamaklarındaki pK değerine bağlıdır. Ters-faz sıvı kromatografide iyonlaşmış tür daima düşük alıkonma zamanına sahiptir. Bu yüzden, bazik türler için, asidik ortamda, asidik türler için ise bazik ortamda alıkonma en düşüktür. Diğer yandan, yüksek alıkonma zamanı analit

nötral formdayken de gözlenir. Analitlerin kapasite faktörleri ve iyonlaşma dereceleri arasındaki bağıntı,

$$k = k_0 + k_1 \cdot d / (1 + d) \quad (2.21)$$

olarak verilmektedir. Burada k, analitin kapasite faktörünü, k_0 ve k_1 protonlanmış ve nötral formun kapasite faktörünü, d ise deprotonasyon derecesini ifade eder. d;

$$d = 10^{pH - pK} \quad (2.22)$$

olarak ifade edilir. Bu eşitlikte pH, hareketli fazın pH değeri ve pK_a bileşiğin iyonlaşma basamağına ait pK değeridir. İki değerlikli bileşikler için eşitlik benzer şekilde yazılabilir. Asit, baz veya zwitter iyon için eşitlik,

$$k = (k_0 + k_1 \cdot d_1 + k_2 \cdot d_1 \cdot d_2) / (1 + d_1 + d_1 \cdot d_2) \quad (2.23)$$

olarak yazılabilir. Çalışılan bileşiklerin hareketli fazdaki pK değerlerinin doğru olarak bilinmesi, alıkonmanın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bileşiğin pK_a 'sının ± 2 pH biriminde, yapı yaklaşık % 99 iyonlaşmış veya moleküler formdadır. Bu pH aralığının dışında alıkonma pH değişimi ile fazla değişmez. Bundan dolayı pH kontrolü tekrarlanabilir alıkonma zamanlarının elde edilmesinde oldukça önemlidir.

Hareketli Fazda pH Standardizasyonu

Kromatografik ayırmada hareketli faz pH'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmalarında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin hareketli fazda bu formların mol kesirlerine göre ağırlıklı ortalamasıdır.

Sıvı kromatografide kullanılan hareketli fazların pH'sı, önceleri sulu çözeltinin pH'sı olarak alınmıştır. Oysa YPSK çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına hareketli faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önüne almak gerekir (Roses ve ark., 1996; Augiar de ve ark., 1997). YPSK hareketli fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Barbosa ve ark., 1999; Barbosa ve Sanz-Nebot, 1995; Covington ve ark., 1985). Sulu faz pH'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözüneneye göre değişir. Bu nedenle YPSK hareketli fazına ve su ortamına ait pK_a değerleri farklıdır.

(Bosch ve ark., 1998). Organik çözücü-su karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nın sudaki pH yerine hareketli fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

Su-organik çözücü karışımlarında elektrot kalibrasyonu için referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat (KHP) çözeltisi kullanılmaktadır (Rondinini ve ark., 1987). Asetonitril-su ortamında (% 70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir ve değerler Çizelge 2.1'de verilmiştir (Rondinini ve Nese, 1987).

Çizelge 2.1. Asetonitril-su karışımında 0,05 M KHP için pHs değerleri

t, °C	Asetonitrilin ağırlıkça yüzdesi, % w/w ve mol kesri, x				
	5; 0,0226	15; 0,0719	30; 0,1583	50; 0,3050	70; 0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

Asetonitril-su ve metanol-su gibi çözücü karışımlarında standart referans tampon çözeltilerinin bu ortamlara ait pH değerleri, pH_s, bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g} \quad (2.24)$$

Burada pH_x, X çözeltisinin pH değeri, pH_s, referans standart çözeltinin pH değeri, E_s ve E_x sırasıyla referans standart çözeltinin ve X çözeltisinin e.m.k değerleri ve g, Nerst sabitidir (g = (ln10)RT/F).

Hareketli fazın pH'sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Hareketli faz pH'sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve hareketli faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Hareketli fazın pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha komplikedir. Zira pH'nın değişmesi ile sadece iyonlaşan çözünen yapıların seçicilik ve alıkonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişliği ve pik simetrisi de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik simetrisinin de göz önüne alınması gerekir.

2.1. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yang (2007); fare kanında daunorabisinin LC-MS yöntemi ile tayini için metot geliştirmiştir. Analiz için, çeşitli asetonitril-su-formik asit karışımları kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Thermofinnigan Beta Basic Phenyl (3 µmX5 cmX2,1 mm) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 ml/dk, kolon sıcaklığı 35 °C, enjeksiyon hacmi ise 15 µl'dir. 0,25 ng/ml-100 ng/ml derişim aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiş, geri kazanma değeri % 93,2 olarak bulunmuştur.

Madsen ve arkadaşları (2010); insan kanında sitozin arabinozid, daunorabisin ve etoposidin eş zamanlı analizi için yöntem geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak çeşitli asetonitril-KH₂PO₄ (pH= 2) karışımları kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk, kolon sıcaklığı 30 °C, örnek hacmi ise 50 µl'dir.

Abd ve arkadaşları (2009); farelerin dokularında ve plazmalarında doksorubisin tayini için YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Luna™ kolonu (150X4,6 mm, C8, 5 mm) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında çeşitli asetonitril-heptansülfonik asit (pH=4) karışımları kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır.

Zhao ve arkadaşları (1999); doksorubisinin analizi için mikro çaplı kolon kullanarak YPSK metodu geliştirmişlerdir. C₁₈Luna mikro çaplı kolon kullanılmıştır. Mobil faz bileşimi; su-asetonitril-asetik asit (80:19:1 v/v/v pH=3) kullanılmıştır. Akış hızı 0,1 ml/dk' dır. Gözlenebilme sınırı 0,02 ng bulunmuştur. Kalibrasyon aralığı 0,01-0,1 µg/ml aralığında çizilmiştir. Bağlı standart sapma gün içinde % 4, gün arasında ise % 3,2 olarak bulunmuştur.

Buehler ve arkadaşları (1999); insan plazmasında doksorubisinin tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Prodigy ODS kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz bileşimi 0,28 M format tamponu pH=3,55-aseton-propanol karışımı (60:32:8 v/v/v) kullanılmıştır. Akış hızı 1,1 ml/dk'dır. Kalibrasyon aralığı 1 ng/ml-100 ng/ml'dir. Kalibrasyon grafiğinin r² değeri 0,9973, eğim ise 0,02545 olarak bulunmuştur.

Erb ve arkadaşları (2003); kılçak kanda tioguanin ve merkaptopürinin YPSK ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Nükleosil 120, C18 (3 µmX70 mmX3 mm) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 ml/dk, enjeksiyon hacmi ise 25 µl'dir. Hareketli faz bileşimi sodyum dihidrojen fosfat (0,01 M) ve % 2.4 asetonitril karışımı; hareketli fazın pH'sı ise fosforik asit ile 2,7'ye ayarlanmıştır. Tioguaninin tayin sınırı 0,5 nmol/mL olarak bulunmuştur.

Zakrzewski (2009); tioguaninin belirlenmesi için ters faz sıvı kromatografisinde tayini için yöntem geliştirmişlerdir. C18 kolonu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril-su-sodyum azit çözeltisi (% 1,5, pH=6,5) 16:34:50 v/v/v karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 ml/dk'dır. Kalibrasyon grafiği 8-100 nM derişim aralığında çizilmiş, r^2 değeri ise 0,9988 olarak bulunmuştur. Bağıl standart sapma %42,3, geri dönüşüm ise % 96 olarak bulunmuştur.

Chen ve arkadaşları (2011); vinkristinin tayini için YPSK'de yöntem geliştirmişlerdir. Dikma Dimonsil C18 kolonu (200 mmX4,6 mm) kullanılmıştır. Hareketli faz bileşimi 0,02 M sodyum dihidrojen fosfat-metanol (36:64 v/v pH=4,7) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk'dır. Kalibrasyon aralığı 0,05 -5 µg/ml'dir. Gün içi % 93,48-107,74, gün arası % 92,61-96,58 olarak bulunmuştur.

Tassin ve arkadaşları (1997), YPSK ile insan hücrelerinde vinkristin, adramisin ve verapamilin eş zamanlı tayini için yöntem geliştirmişlerdir. RP 18 Hibar LiChrocant kolonu (250X4,6 mm, 7 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 0,2 M potasyum dihidrojen fosfat, ortofosforik asit (650 ml) ve asetonitril (350 ml) karışımı kullanılmıştır.

2.2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin spektroskopik ve YPSK yöntemiyle tayininde ve bu bileşikler için ayırmanın optimizasyonunda kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

2.2.1. Kullanılan Cihazlar

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve iyonlaşma sabitlerinin tayininde, Shimadzu marka YPSK cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Dizi), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır. Çalışmada kolon fırını kullanılarak çeşitli sıcaklıklarda çalışılmıştır. Optimum koşul 25°C olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada, Synergy Max-RP (5 µm, 150 mm x 4,6 mm ID), C-12, Symmetry Shield C-8 (5 µm, 150 mm x 3,9 mm ID) ve X Terra C-18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) kolonları kullanılmıştır. Ayırma X Terra C-18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu kolon

bazik bileşikler için sıklıkla kullanılan pH aralığı 1–12 olan, end-capped yeni kuşak bir kolondur.

pH / İyon Metre

Spektrofotometrik titrasyonlarda ve YPSK hareketli fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık su banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak, $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, çalışılmıştır.

UV Spektrofotometresi

Spektroskopik titrasyonlar, Perkin Elmer Lambda 25 model cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya YPSK saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşikler Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2.Çalışılan bileşikler ve özellikleri

Bileşik Adı	Kapalı Formül ve Mol Kütlesi	Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu
Vinkristin	$\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}$ 824,96 g/mol	UV@ 276nm
6-Tioguanin	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{S}$ 167,19 g/mol	UV@ 350nm
Daunorubisin HCl	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{10} \cdot \text{HCl}$ 563,99g/mol	UV@ 254 nm
Doksorubisin HCl	$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} \cdot \text{HCl}$ 579,98 g/mol	UV@ 254 nm

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3.Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum hidroksit	Hareketli faz pH'sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam	Merck , YPSK saflığında
Hidroklorik asit	Hücre kalibrasyonu, baz çözeltisinin ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidroksit	Titrant	Merck, ayarlı çözelti (Titrisol)
Potasyum klorür	İyonik şiddet ayarlayıcı	Merck, analitik saflıkta
Fosforik asit	Hareketli faz pH'sının ayarlanmasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta

2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

2.2.3.1. Spektroskopik Titrasyonlar

Su Ortamı

30 mL'lik stok ortam için 27 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ilave edilmiştir.

%10 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

30 mL'lik stok ortam için 24 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ve 3 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

%20 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

30 mL'lik stok ortam için 21 mL saf su alınmış, üzerine 3 mL 1 M KCl çözeltisinden ve 6 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

İyonik Şiddet Ayarlayıcı

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda hazırlanışı belirtilen çözücü karışımına 0,1 M derişimi sağlayacak şekilde 1 M'lık KCl çözeltisinden ilave edilmiştir.

Asit Çözeltisi

1 M standart hidroklorik asit (Titrisol) çözeltisi, ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M'a seyreltilmiştir.

Baz Çözeltisi

1 M standart KOH (Titrisol) çözeltisi, çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,025 M olacak şekilde seyreltilerek, asit çözeltisi ile ayarlanmış ve titrant olarak kullanılmıştır.

Potasyum Asit Fitalat Çözeltisi

2×10^{-3} M KHP çözeltisi çalışılan ortama uygun şekilde hazırlanmış ve KOH ayarında kullanılmıştır.

İlaç Çözeltileri

Çalışmada kullanılan tüm ilaç çözeltileri, yaklaşık 1×10^{-5} M olacak şekilde çalışılan ortamda hazırlanmıştır.

2.2.3.2. Kromatografik Çalışmalar

Çalışılan Bileşiklerin YPSK Ayırımında Kullanılan Çözeltileri

Çalışılan bileşiklerin her birinden 0,0050 g, 10 mL asetonitrilde çözülerek 500 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir stok çözeltiliden 100 ppm olacak şekilde hareketli faz ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için üçer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

%45 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 450 mL asetonitril alınmış ve üzerine 650 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 20 mM derişimde olacak şekilde

H₃PO₄(%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su- asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

%50 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 500 mL asetonitril alınmış ve üzerine 500 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 20 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

%55 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 550 mL asetonitril alınmış ve üzerine 450 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 20 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su- asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

%60 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 600 mL asetonitril alınmış ve üzerine 400 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 20 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,685 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

Urasil Çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 (a/h) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t₀ alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 254 nm'dir.

Potasyum Hidrojen Fitalat Çözeltisi

C₆H₄(COOK)(COOH), primer standart pH referans çözeltisi olarak kullanılmıştır. 2 saat 110°C'da kurutulmuştur. 0,05 molal derişimde hazırlanmış ve çalışılan ortamlara özgü pH referans değerleri kullanılmıştır.

Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

2.2.4. Yöntem

2.2.4.1. Spektroskopik Titrasyonlar

Spektroskopik çalışmalarda;

Potasyum asit fitalat çözeltisi kullanılarak KOH çözeltisinin ayarı,

HCl çözeltisinin ayarlı baz ile titrasyonu ve böylece elektrodun E_0 ve eğim değerlerinin hesaplanması

$1,0 \times 10^{-5}$ M'lık Çalışılan bileşiğin su, %10 (v/v), % 20 (v/v) asetonitril-su ikili karışımında hazırlanan çözeltilerinin titrasyonu,

Titrasyonla ilgili verilerin değerlendirilmesi ve STAR programı ile pK_a değerinin tayini, (Araştırma bulgularında verilmiştir) yapılmıştır.

Bileşiklerin protonasyon sabitlerinin spektroskopik yöntemle tayininde su, % 10 (v/v) ve % 20 (v/v) asetonitril-su ikili karışımında çalışılmıştır. Bu ortamlarda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. KCl derişimi 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışılan ortamlarda kullanılan çözücükarışımında, önce KHP çözeltisi ile KOH derişimi ayarlanmış ve bu ayarlı baz ile asit çözeltisi titre edilmiştir. Bu titrasyonlar ile, mV değerlerinden pH değerlerine geçebilmek için E_0 standart potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla kuvvetli asitlere özgü Gran fonksiyonu kullanılmıştır.

Bileşiklerin protonlanmış $1,0 \times 10^{-5}$ M'lık çözeltilerinden 30 mL, çift cidarlı hücreye konulmuş ve çeşitli pH' larda spektrum taramaları alınmıştır. Spektrumlar tek tek kaydedilmiş ve STAR programı ile pK_a değerleri hesaplanmıştır.

2.2.4.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu

YPSK sistemine bileşikleri enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve kanallarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla hazırlanan hareketli faz kanallardan geçirilir. Böylece kolon şartlandırılır ve sistem basıncı uygun hale getirilir.

Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla vinkristin, doksorubisin, ve daunorubisinin ters-faz sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, hareketli faz organik düzenleyici oranı (asetonitril oranı; % 45, 50, 55, 60 (v/v), hareketli fazın pH seçimi (3,0-11,00 arası), ve hareketli fazın akış hızının (1,0; 1,5 ml/dk) etkileri incelenmiştir.

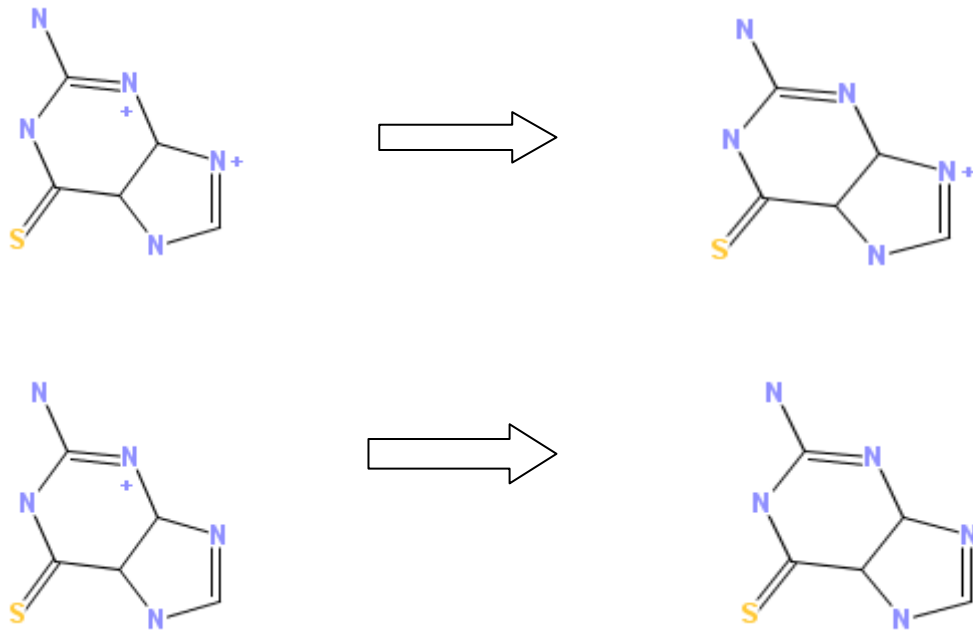
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Çalışılan Bileşiklerin ACD-Lab ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Çalışılan bileşiklerin pK_a değerlerinin hesaplanmasında ACD Lab (ACD/ pK_a) (Sherrod, 2003) ve SPARC programı kullanılarak molekülün yapısına bağlı olarak beklenen değerler hesaplanmıştır. Bu hesap programı, substitue grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını vermektedir. Ancak bilindiği gibi elde edilen veriler su ortamı içindir.

6-Tioguanin İçin İyonlaşma Sabiti

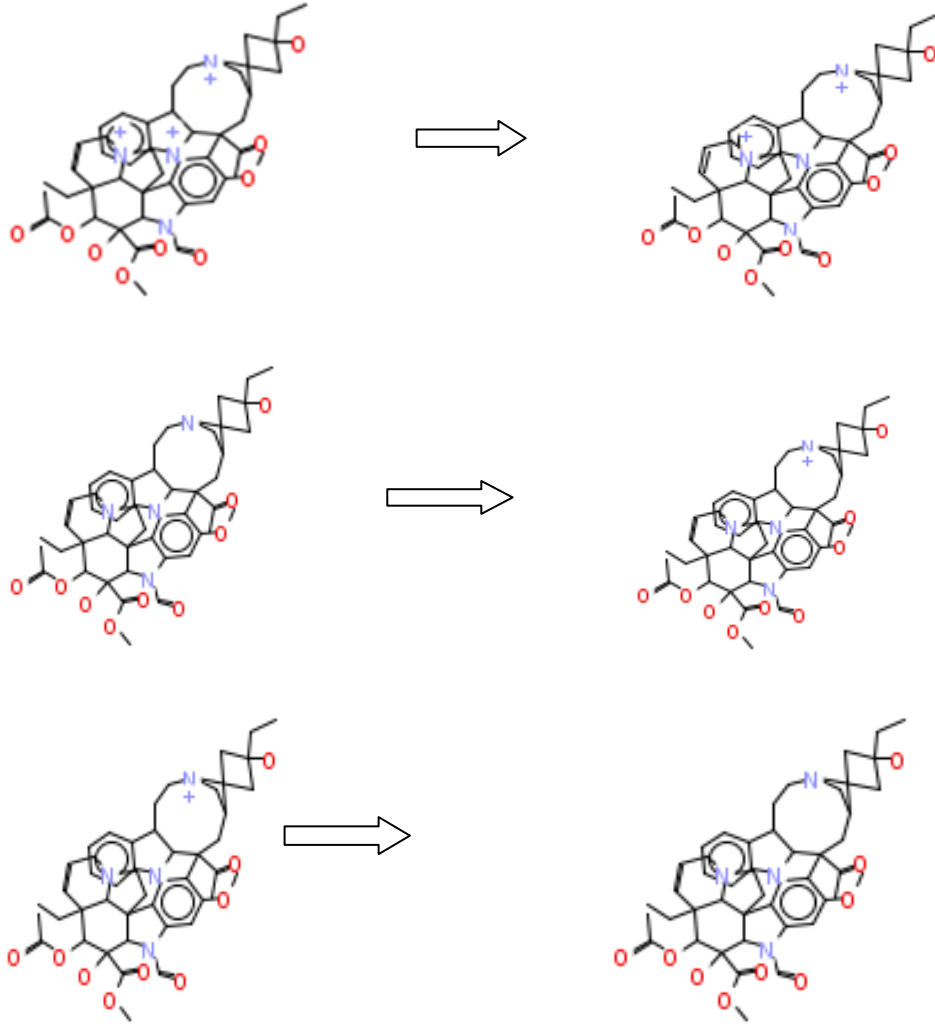
6-Tioguanin için iyonlaşma şeması Şekil 3.1’de iki aşamalı olarak verilmiştir.6-Tioguaninin SPARC programı ile hesaplanan pK_a değerleri 2,45 ve 8,87 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 2,93’tür.



Şekil 3.1. Protonlanmış 6-Tioguaninin iyonlaşma şeması

Vinkristin İçin İyonlaşma Sabiti

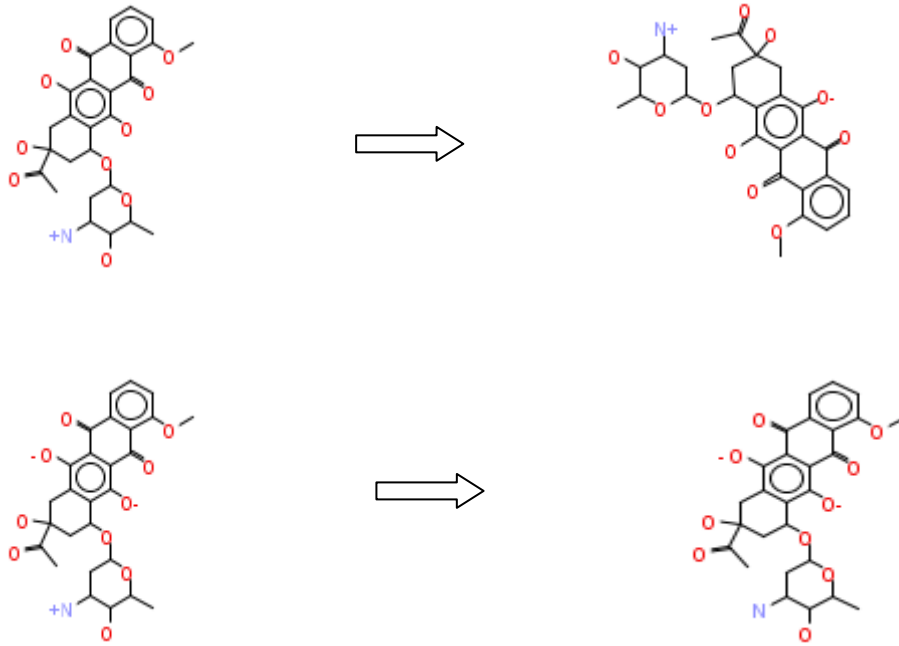
Vinkristin için iyonlaşma şeması Şekil 3.2’de üç aşamalı olarak verilmiştir. Vinkristinin SPARC programı ile hesaplanan pK_a değerleri 2,59, 6,70 ve 8,42 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 5,84 ve 7,59’ dur.



Şekil 3.2. Protonlanmış vinkristinin iyonlaşma şeması

Daunorubisin İçin İyonlaşma Sabiti

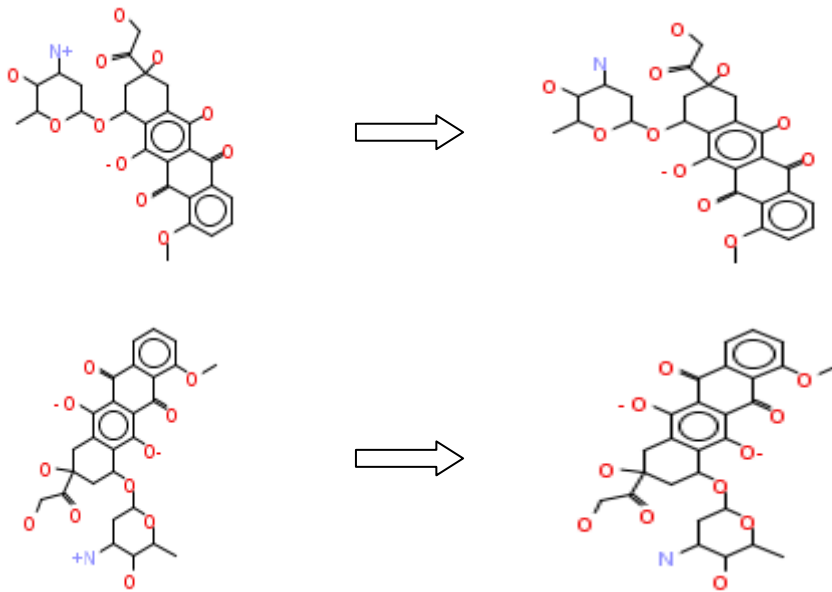
Daunorubisin için iyonlaşma şeması Şekil 3.3’de iki aşamalı olarak verilmiştir. Daunorubisinin SPARC programı ile hesaplanan pK_a değerleri 7,36 ve 9,48 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 7,15 ve 8,68’dir.



Şekil 3.3. Protonlanmış daunorubisin iyonlaşma şeması

Doksorubisin İçin İyonlaşma Sabiti

Doksorubisin için iyonlaşma şeması Şekil 3.4’de tek aşamalı olarak verilmiştir. Doksorubisinin SPARC programı ile hesaplanan pK_a değerleri 7,36 ve 9,48 olarak verilmiştir. ACD Lab değeri ise 7,15 ve 8,68’dir

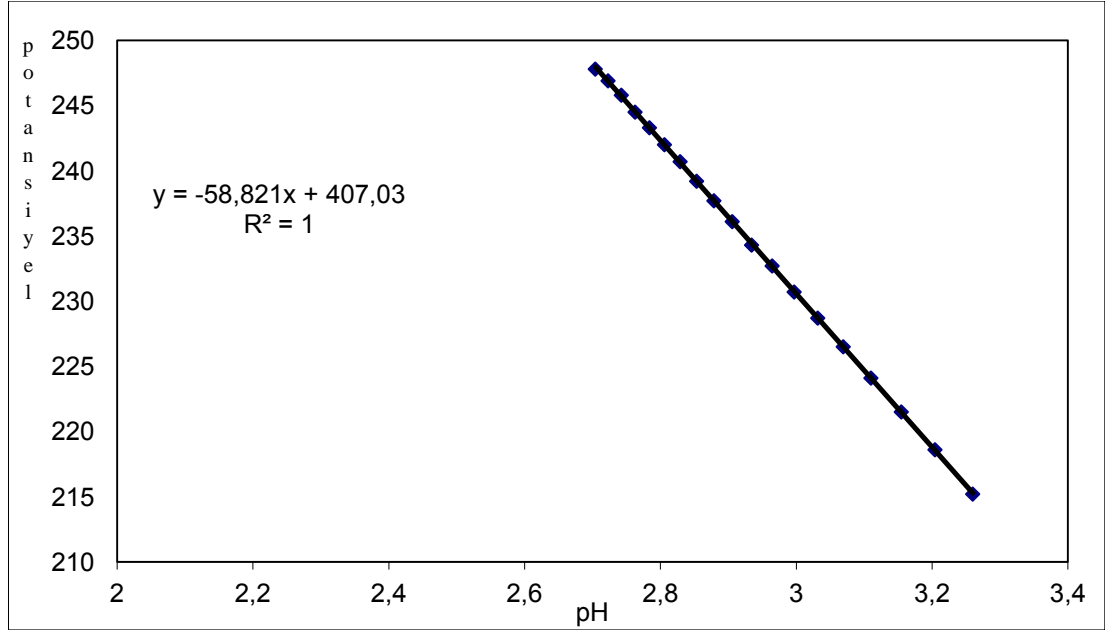


Şekil 3.4. Protonlanmış doksorubisinin iyonlaşma şeması

3.2. İlaçların Spektroskopik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Su Ortamında Titrasyonlar

Vinkristin, doksorubisin, daunorubisin ve 6-tioguanininsu ortamında spektroskopik titrasyonları yapılarak pK_a değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için 2×10^{-3} M potasyum asit fitalat çözeltisi su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek E_0 ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 58,82; E_0 ise 407,03' dir.



Şekil 3.5. Su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-potansiyel grafiği
Spektrofotometrik yöntemde bileşikler pH 3-11 arası titre edilmiş ve yaklaşık 25 (0,3 pH birimi aralığı ile) spektrum taraması alınmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde STAR (Beltran vd., 1993) programı kullanılmıştır. Bu program, her bir spektrum ve dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbans değerleri arasında minimum farkı elde edene kadar, Gauss-Newton algoritmasını kullanarak, iyonlaşma sabitlerini hesaplar. Kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

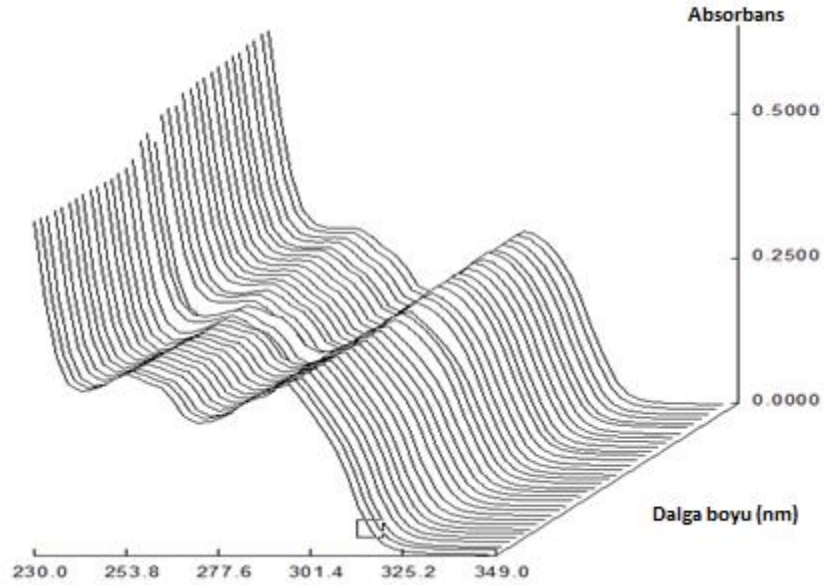
ns nw

$$U_{\text{abs}} = \sum_{i=1} \sum_{j=1} (A_{i,j,\text{exp}} - A_{i,j,\text{calc}})^2 \quad (3.1)$$

i=1 j=1

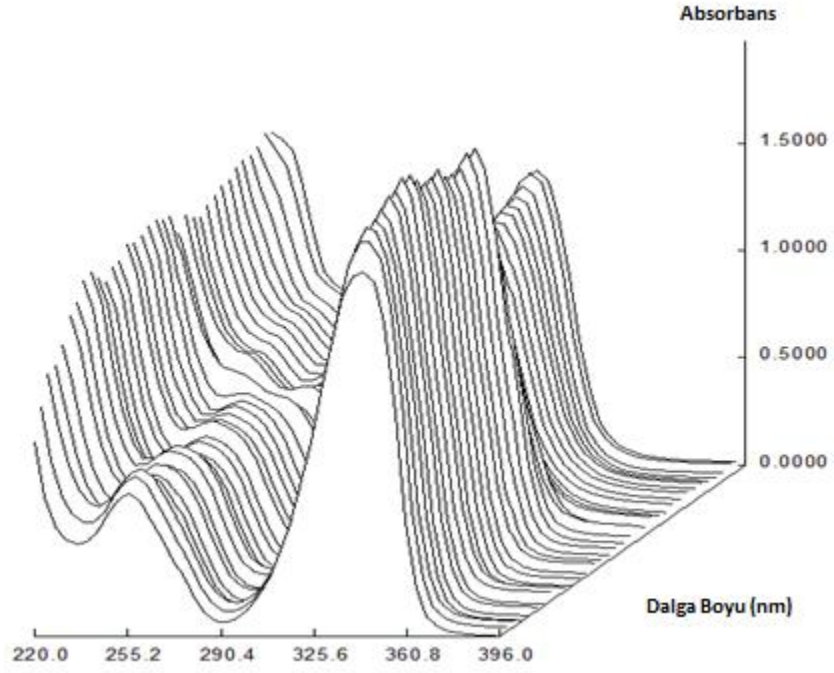
Burada ns ve nw sırasıyla spektrum ve dalga boyunun sayısını, $A_{i,j,\text{exp}}$ ve $A_{i,j,\text{calc}}$, spektrum i' deki j dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbans değerlerini gösterir. Hesaplanan absorbans değerleri üç basamakla elde edilir: Program önce tahmin edilen iyonlaşma sabiti ve deneysel şartlara göre her bir spektrum için kütle denkliklerini çözer. Sonra çoklu lineer regresyon prosedürü, her bir bilinmeyen türün molar absorbansını tayin eder ve son olarak da absorbans değerleri, tahmin edilen türlerin derişimi ve ilgili olan molar absorbanlardan tekrar hesaplanır.

Vinkristin için STAR programı ile açılan grafiği Şekil 3.6' daverilmiştir.

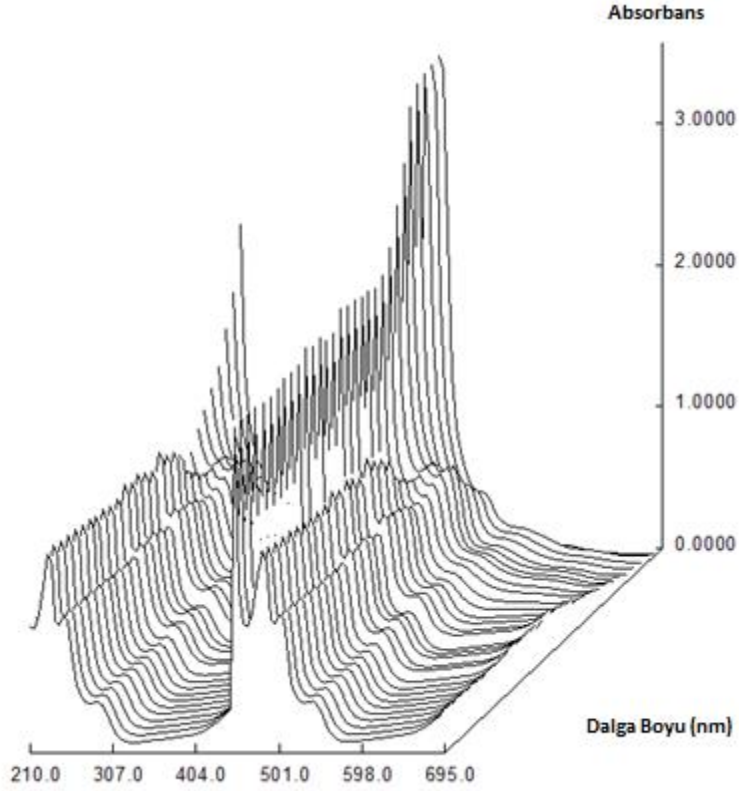


Şekil 3.6. Su ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği

6-tioguanin için STAR programı ile açılan grafiği Şekil 3.7' de verilmiştir.

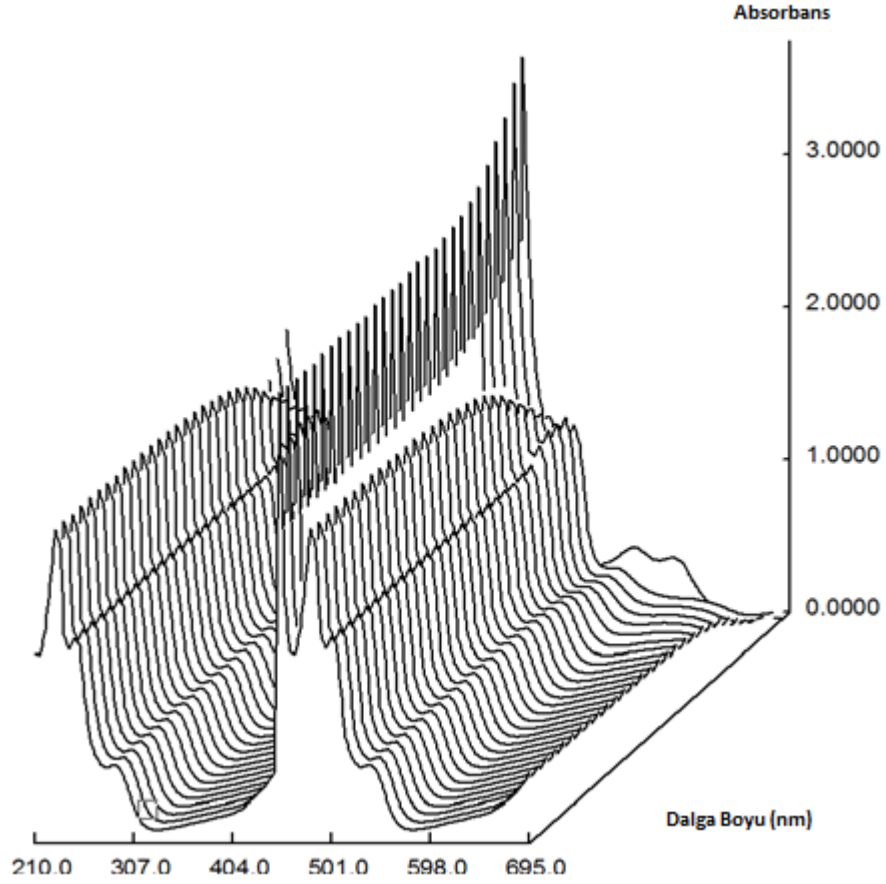


Şekil 3.7. Su ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği
Daunorubisin için STAR programı ile açılan grafiği Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Su ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği

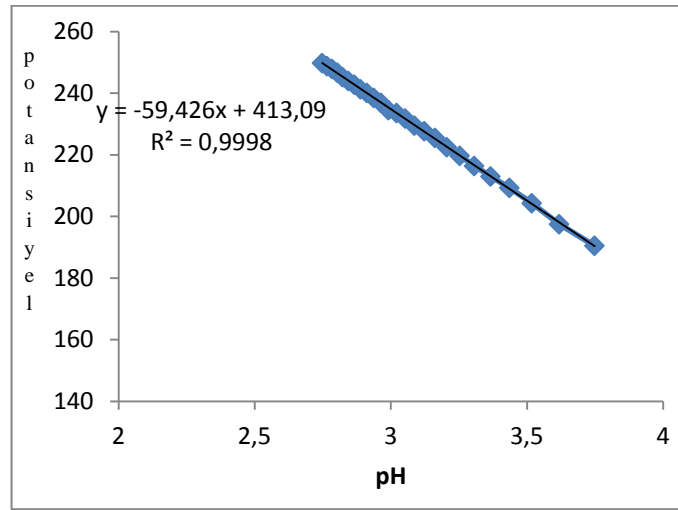
Doksorubisin için STAR programı ile açılan grafik Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.9. Su ortamında doksorubisin için elde edilen STAR grafiği

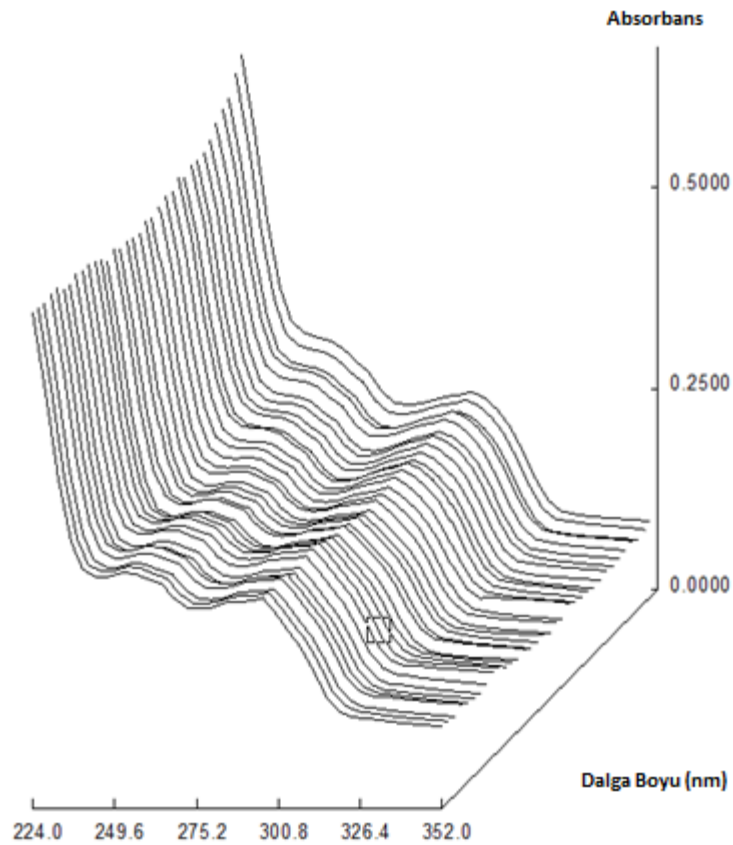
% 10 ACN-su (v/v) Karışımında Titrasyonlar

Vinkristin, doksorubisin, daunorubisin ve 6-tioguaninin % 10 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında spektroskopik titrasyonları yapılarak su-asetonitril karışımında pK_a değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için $2 \times 10^{-3} M$ potasyum asit fitalat çözeltisi % 10 ACN-su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek E_0 ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 59,43; E_0 ise 413,09' dır.

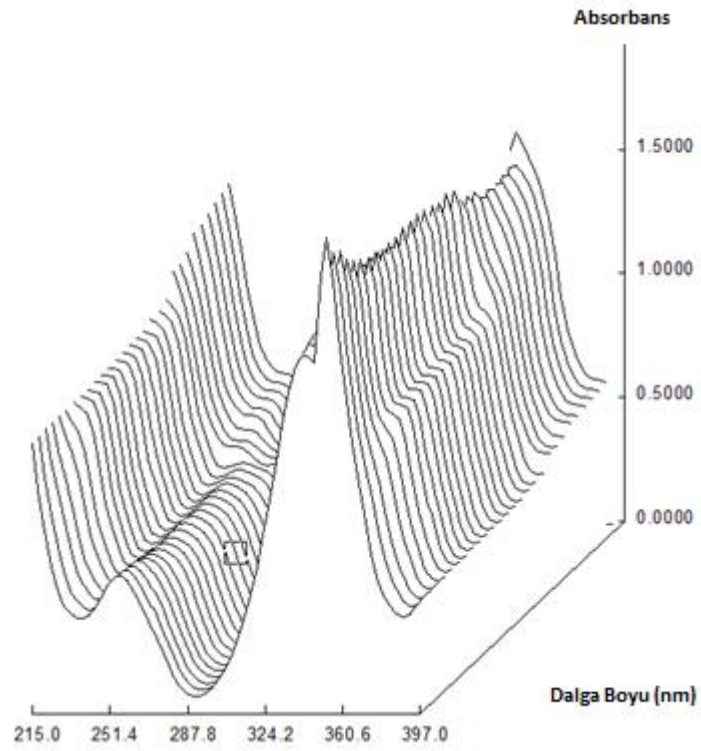


Şekil 3.10. % 10ACN-su (v/v) ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-potansiyel grafiği

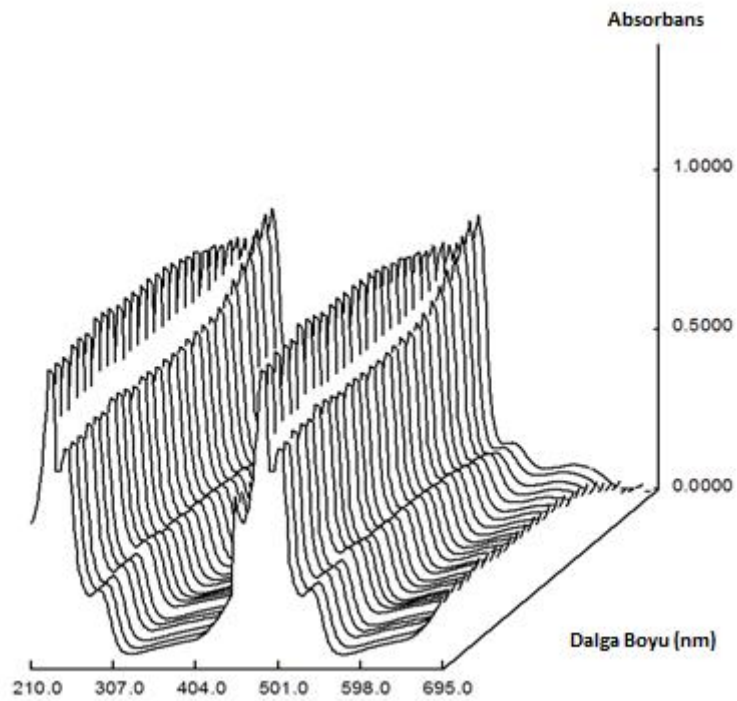
STAR programı ile çizilen grafikler sırası ile aşağıda verilmiştir.



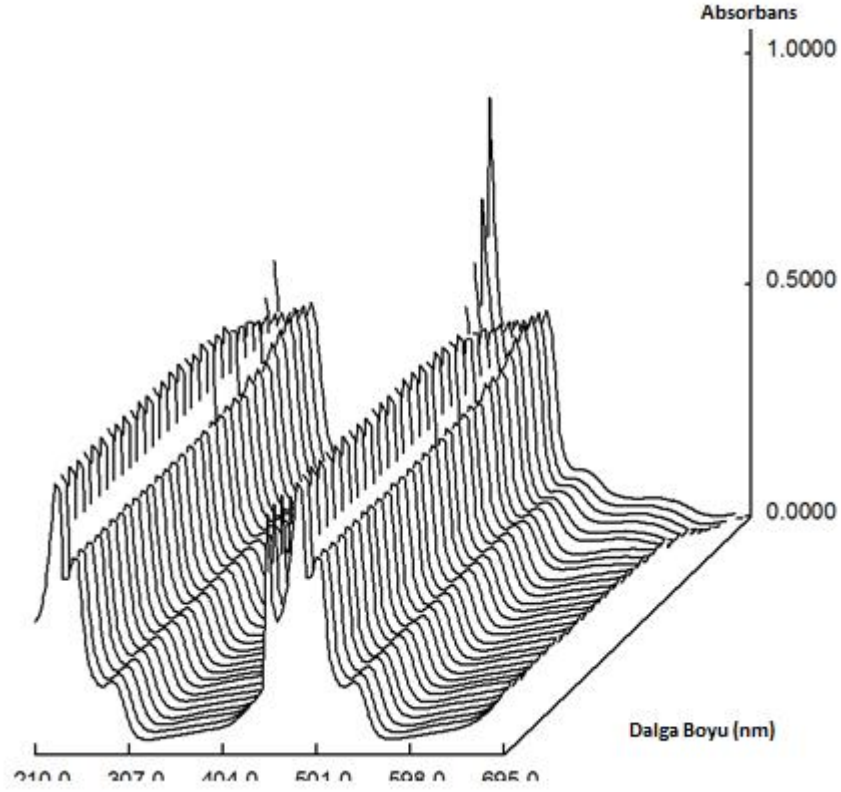
Şekil 3.11. % 10 ACN-su (v/v) ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği



Şekil 3.12. % 10 ACN-su (v/v) ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği

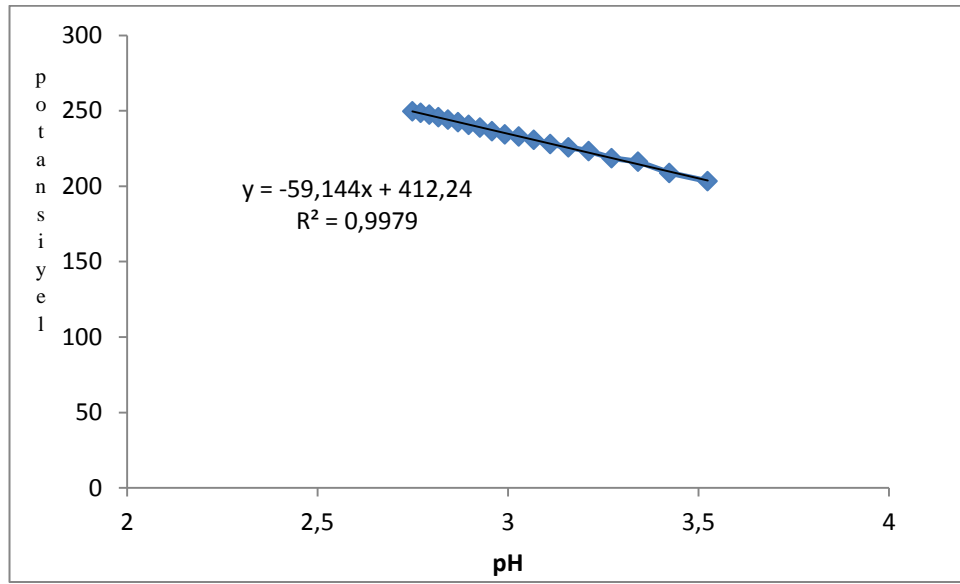


Şekil 3.13. % 10 ACN-su (v/v) ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği



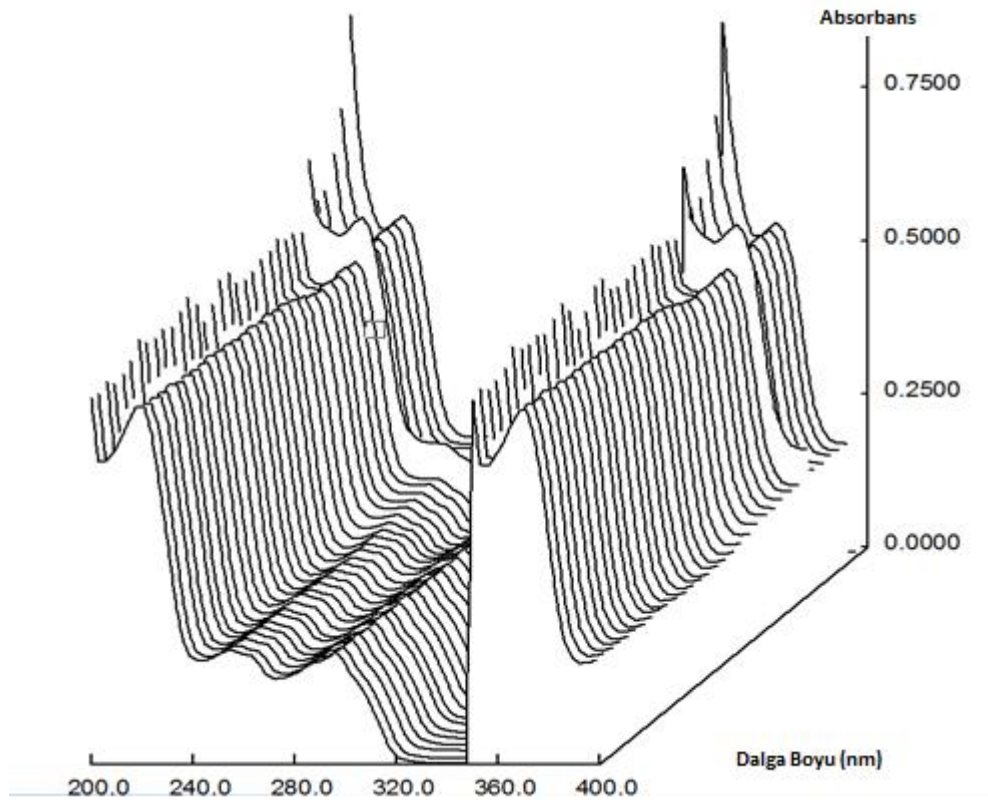
Şekil 3.14. %10 ACN-su (v/v) ortamında dokсорubisin içinelde edilen STAR grafiği
% 20 ACN-su (v/v) Karışımında Titrasyonlar

Vinkristin, dokсорubisin, daunorubisin ve 6-tioguaninin% 20 (v/v) su-asetonitril ikili karışımında spektroskopik titrasyonları yapılarak su-asetonitril karışımında pKdeğerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon için 2×10^{-3} M potasyum asit fitalat çözeltisi % 20 ACN-su ortamında hazırlanarak 0,025 M KOH ile titre edilerek ayarlanmıştır. Ayarlı KOH çözeltisi ile HCl (30 mL) çözeltisi (0,1 M KCl) titre edilerek E_0 ve eğim değerleri hesaplanmıştır. Bu deney üç kez tekrar edilerek üç deneyin ortalaması alınmıştır. Aşağıda, örnek olarak KOH-HCl titrasyonu için çizilen pH- mV grafiği verilmiştir. Bu grafikten görüleceği üzere eğim 59,144; E_0 ise 412,24' dir.

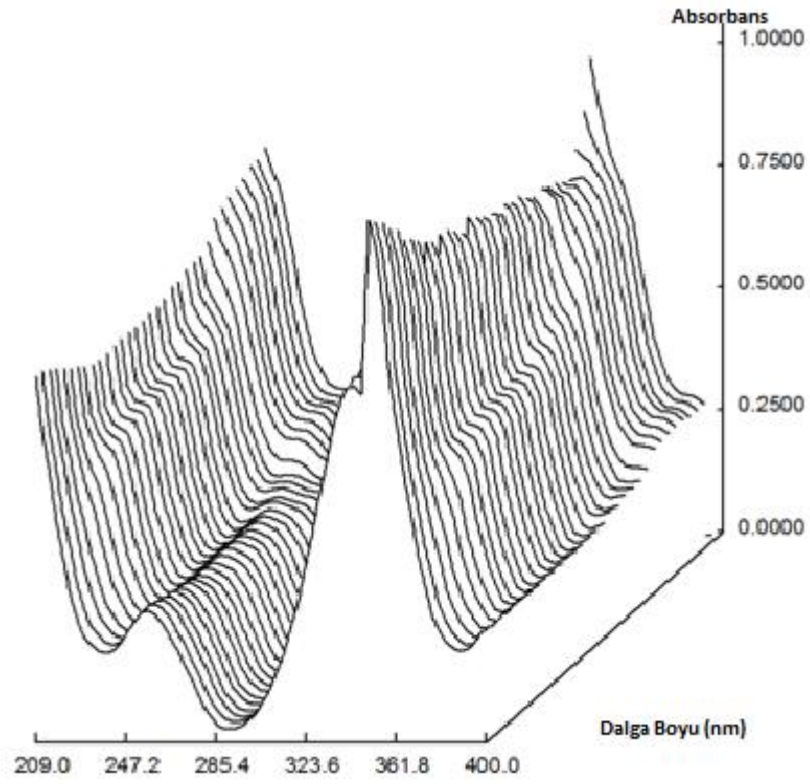


Şekil 3.15. % 20 ACN-su ortamında HCl-KOH titrasyonu için çizilen pH-potansiyel grafiği

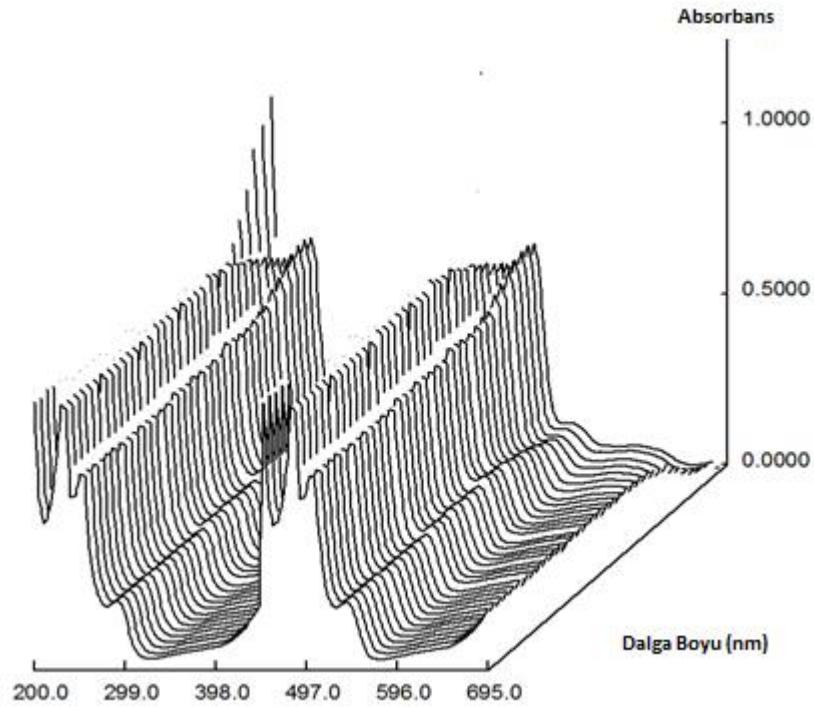
STAR programı ile çizilen grafikler sırası ile aşağıda verilmiştir.



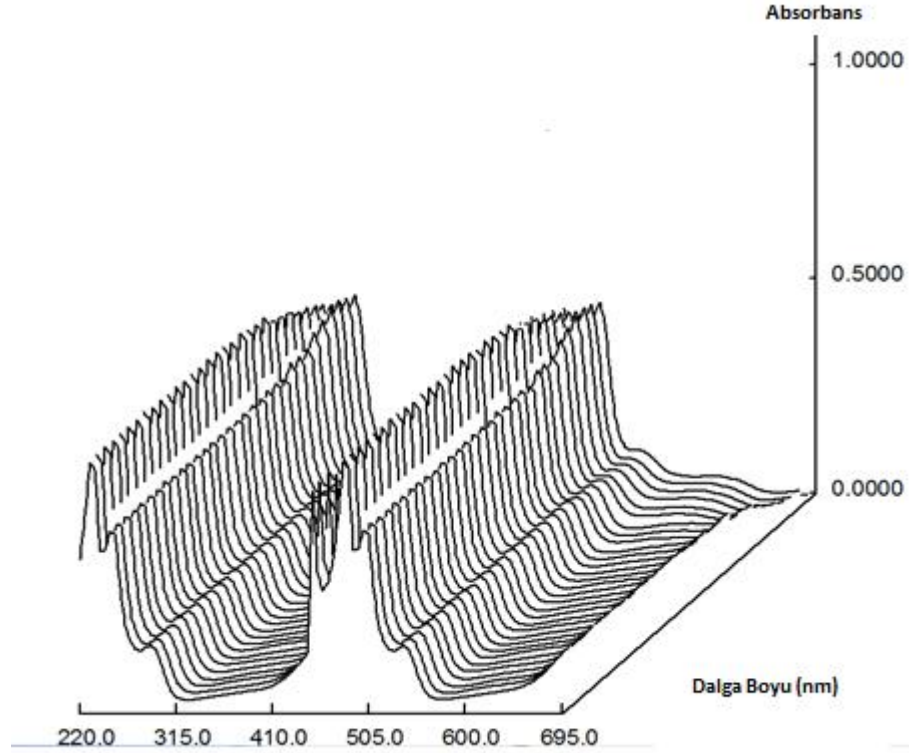
Şekil 3.16. % 20 ACN-su (v/v) ortamında vinkristin için elde edilen STAR grafiği



Şekil 3.17. % 20ACN-su (v/v) ortamında 6-tioguanin için elde edilen STAR grafiği



Şekil 3.18. %20 ACN-su (v/v) ortamında daunorubisin için elde edilen STAR grafiği



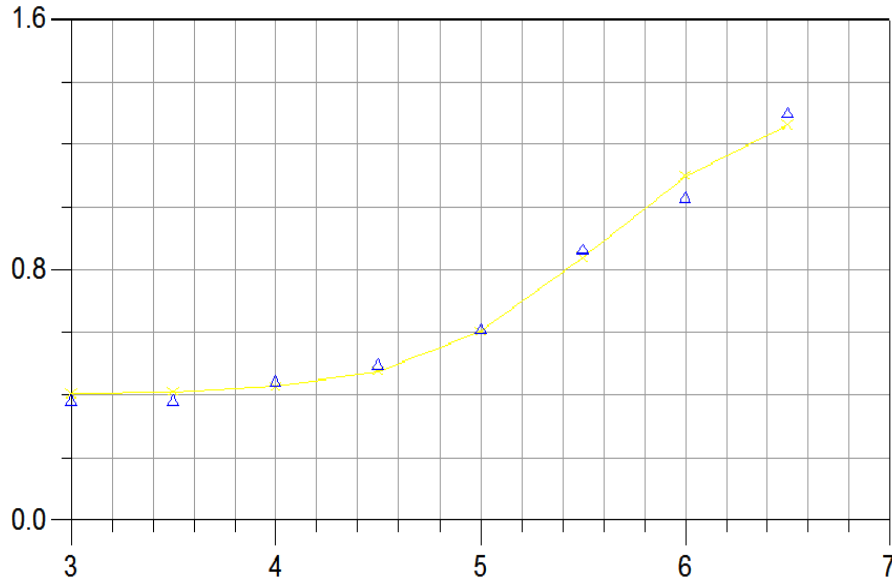
Şekil 3.19. % 20 ACN-su (v/v) ortamında dokсорubisin için elde edilen STAR grafiği

3.3. YPSK Yöntemiyle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

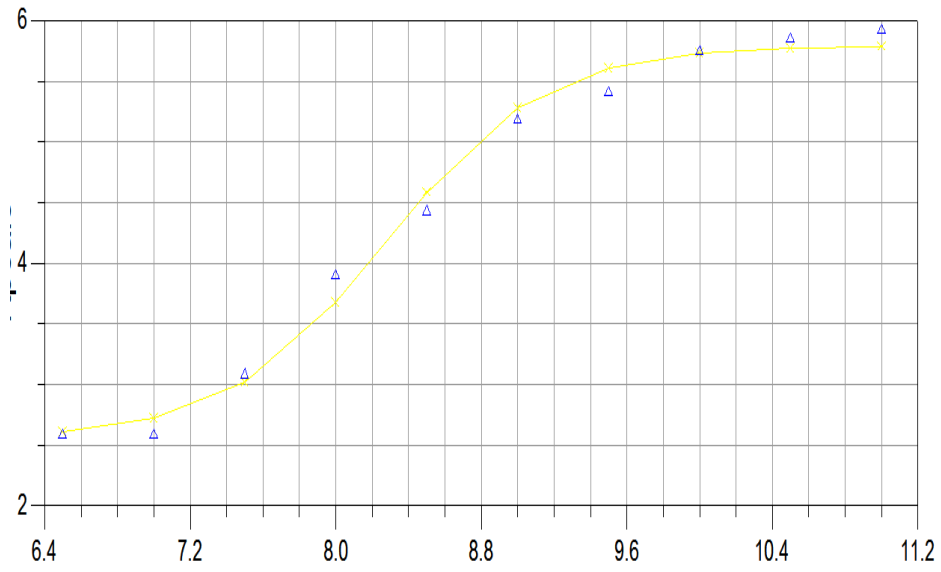
Bu bölümde vinkristin, dokсорubisin ve daunorubisin su-asetonitril ikili karışımları kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografik çalışmalarında hareketli fazın pH'sına karşı kapasite faktörlerinin grafikleri aşağıda verilmiştir. 6-tioguanin kolonda tutunmadığı için pK_a tayini YPSK metodu ile gerçekleştirilememiştir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde NLREG programı kullanılmıştır (Sherrod, 2003). Çalışılan bileşiklerin NLREG grafikleri, % 45, % 50, % 55 ve % 60 (v/v) asetonitril-su karışımında elde edilmiştir. Çalışmada kolonun da pH sınırlaması göz önüne alınarak pH 3,0-12,0 aralığı seçilmiştir.

Çalışılan Bileşiklerin % 45(v/v) Asetonitril - Su İkili Karışımında YPSK Yöntemi İle Tayini

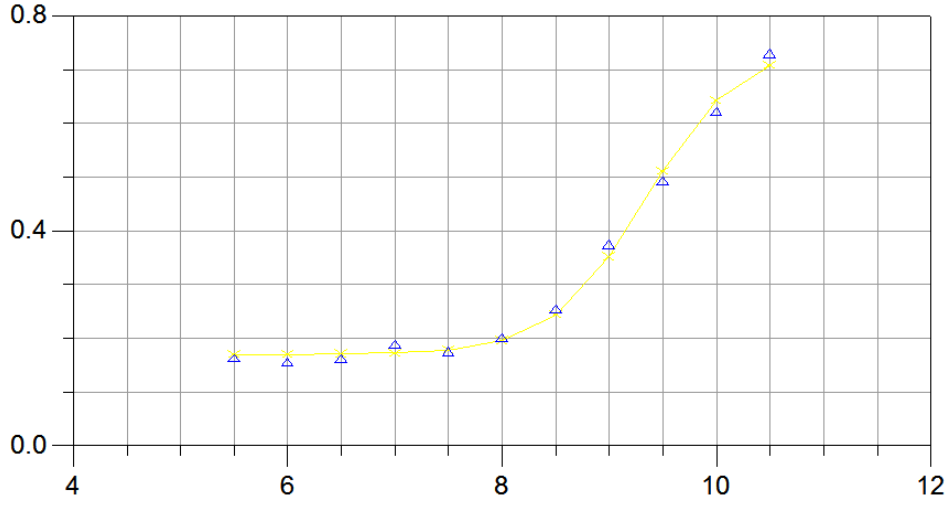
Vinkristin, dokсорubisin ve daunorubisin için % 45 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-12,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22, ve Şekil 3.23'de verilmektedir.



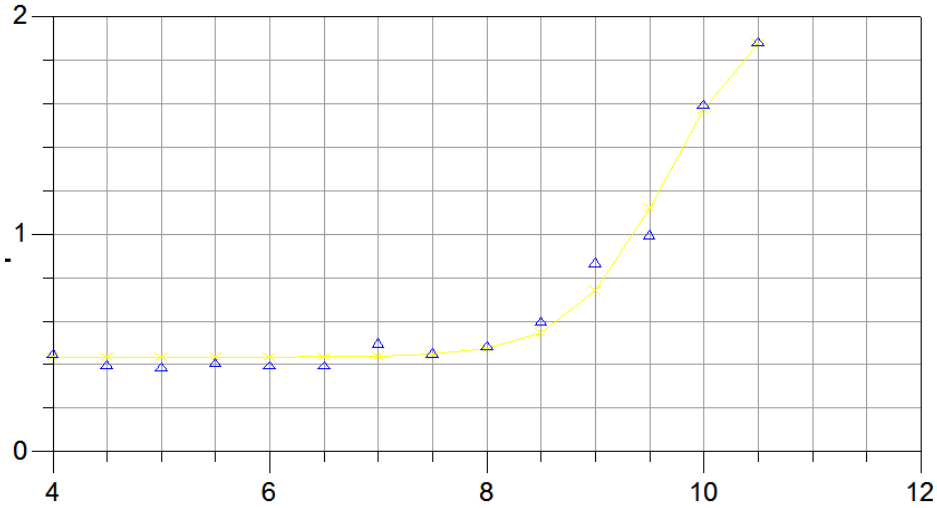
Şekil 3.20. Vincristinin % 45 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.21. Vincristinin % 45 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



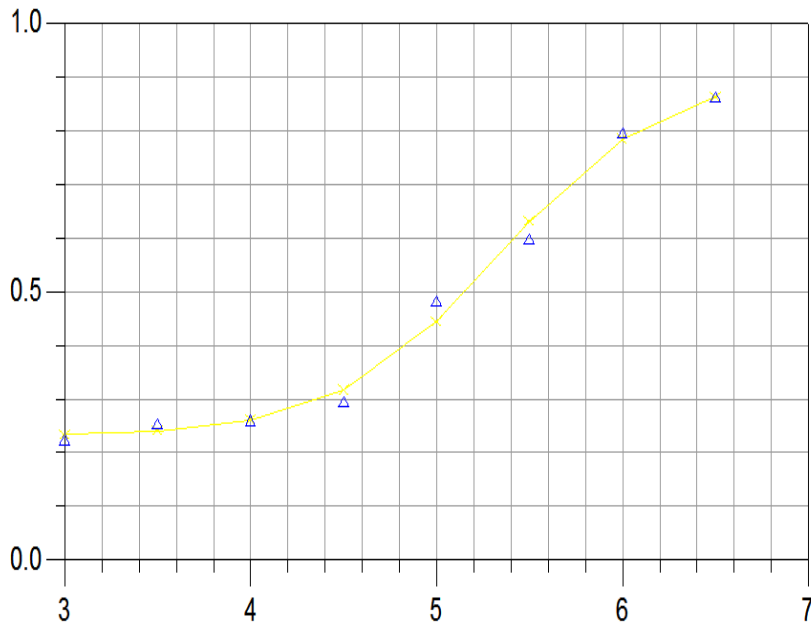
Şekil 3.22. Dokсорubisinin % 45 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiğı



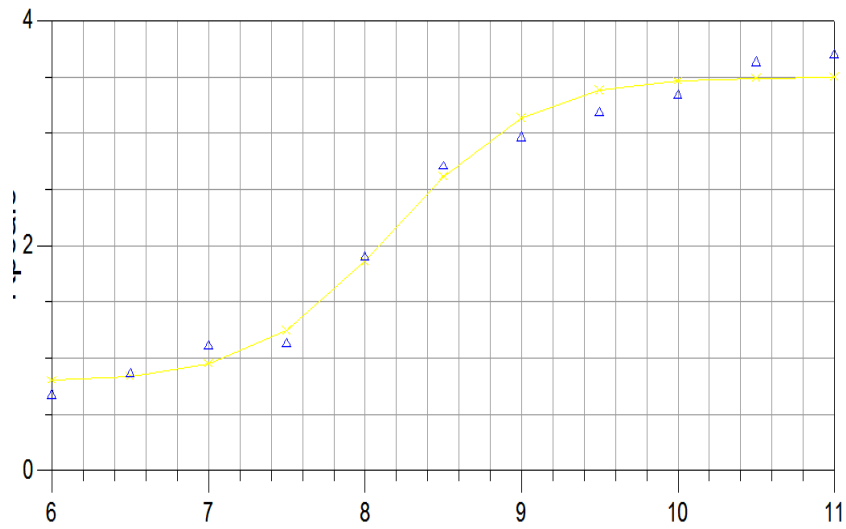
Şekil 3.23. Daunorubisinin % 45 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiğı

Çalışılan Bileşiklerin % 50(v/v) Asetonitril - Su İkili Karışımında YPSK Yöntemi İle Tayini

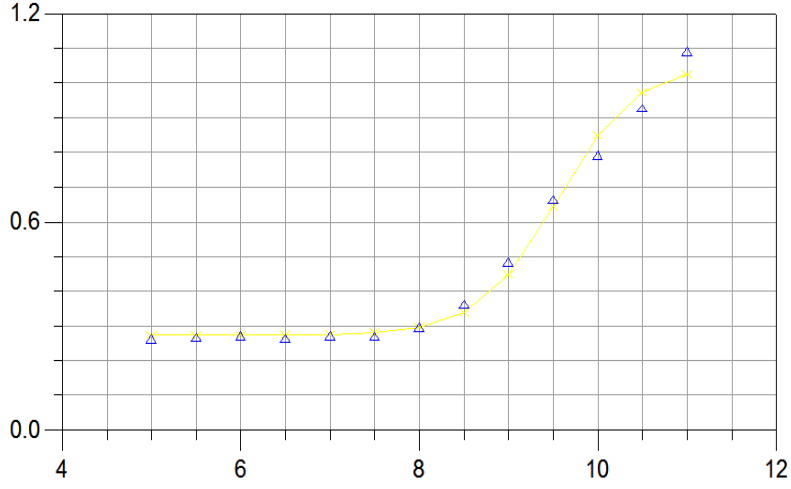
Vinkristin, daunorubisinve dokсорubisin için % 50 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-12,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26 ve Şekil 3.27’de verilmektedir.



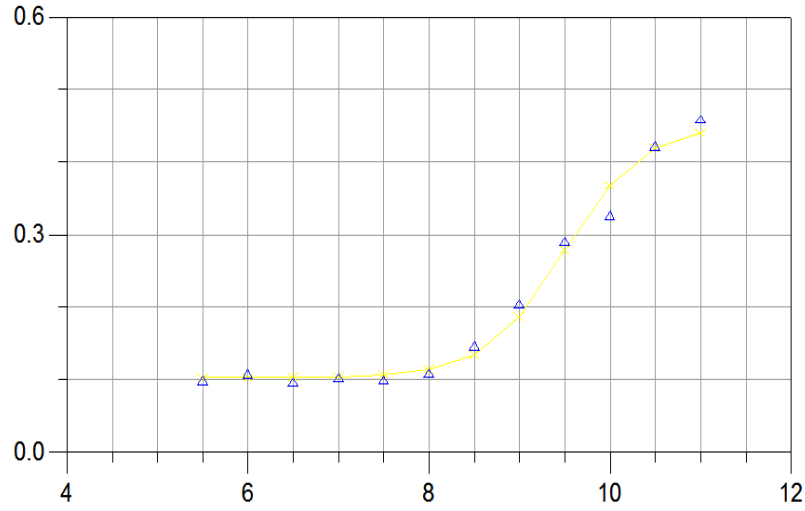
Şekil 3.24. Vinkristinin % 50 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.25. Vinkristinin % 50 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



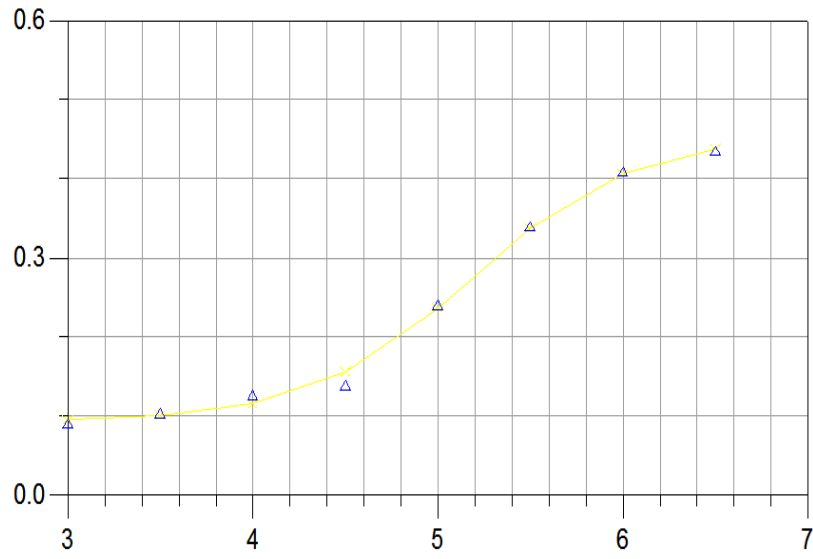
Şekil 3.26. Daunorubisin'in % 50 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



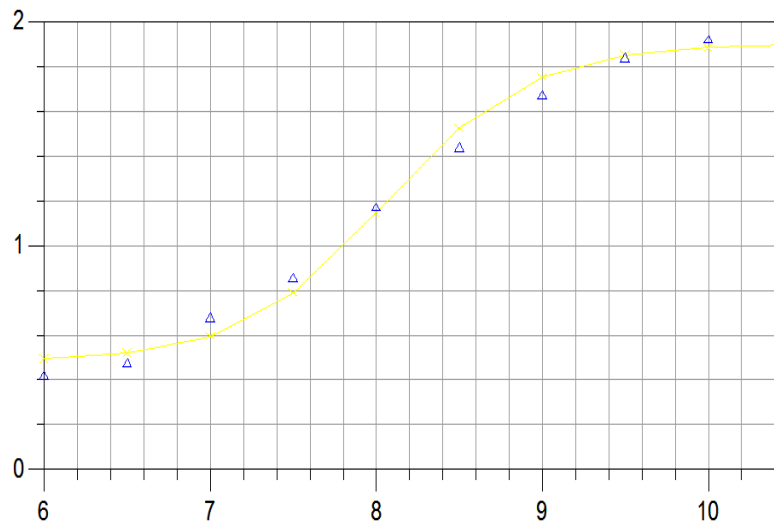
Şekil 3.27. Doksorubisin'in % 50 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

Çalışılan Bileşiklerin % 55(v/v) Asetonitril - Su İkili Karışımında YPSK Yöntemi İle Tayini

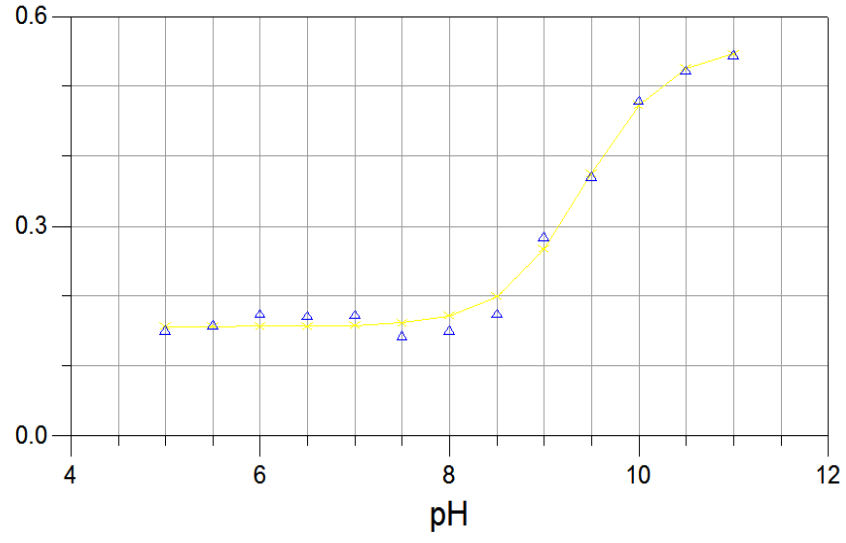
Vinkristin, daunorubisin ve doksorubisin için % 55 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-12,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'de verilmektedir.



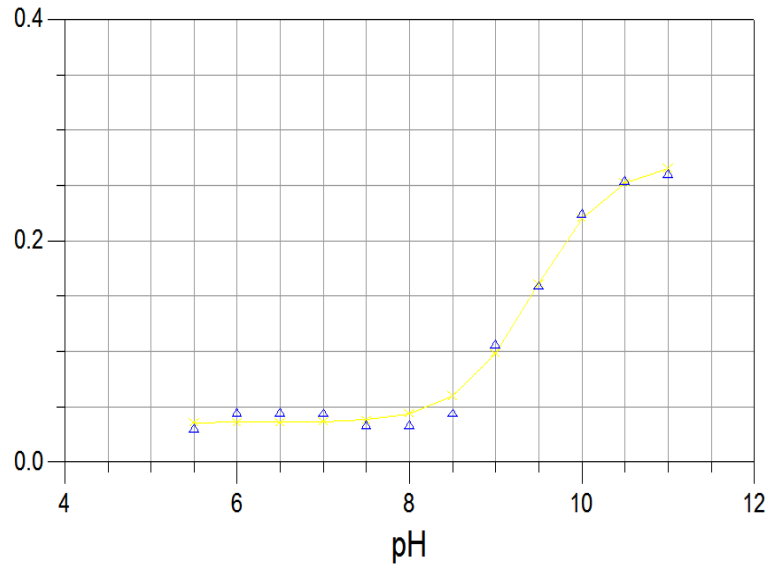
Şekil 3.28. Vincristinin % 55 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.29. Vincristinin % 55 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



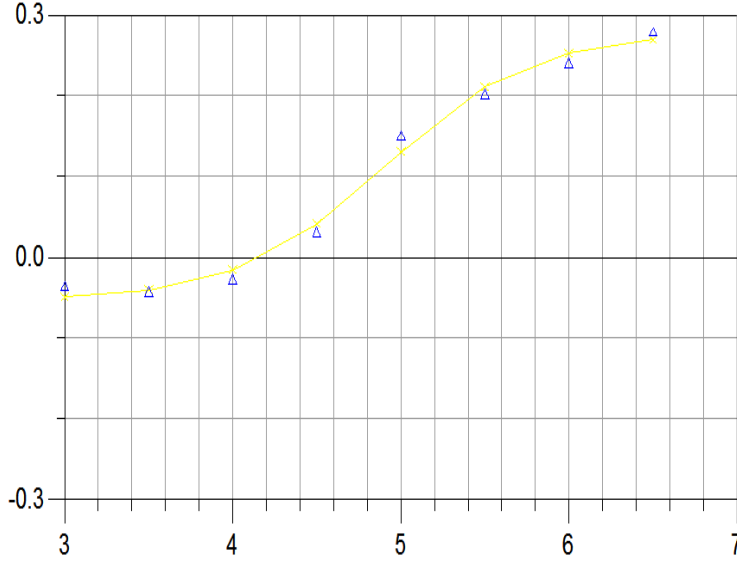
Şekil 3.30. Daunorubisinin % 55 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



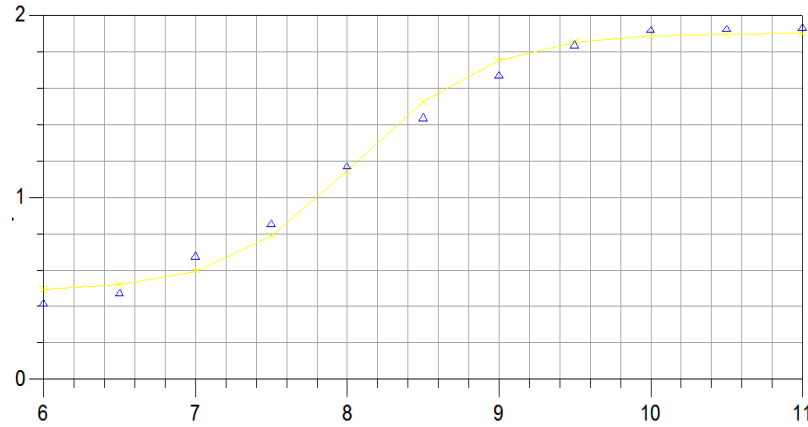
Şekil 3.31. Doksorubisinin % 55 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

Çalışılan Bileşiklerin % 60 (v/v) Asetonitril - Su İkili Karışımında YPSK Yöntemi İle Tayini

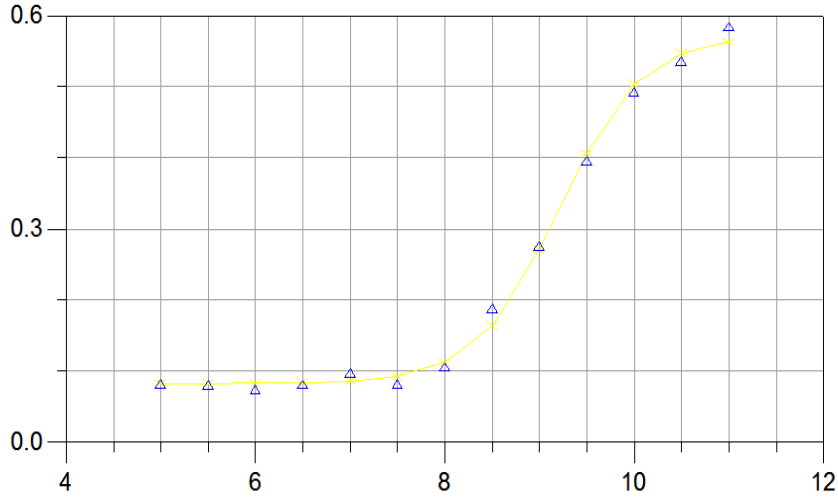
Vinkristin, daunorubisin ve doksorubisin için % 60 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında pH 3,0-12,0 aralığında elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 3.32, Şekil 3.33, Şekil 3.34 ve Şekil 3.35’de verilmektedir.



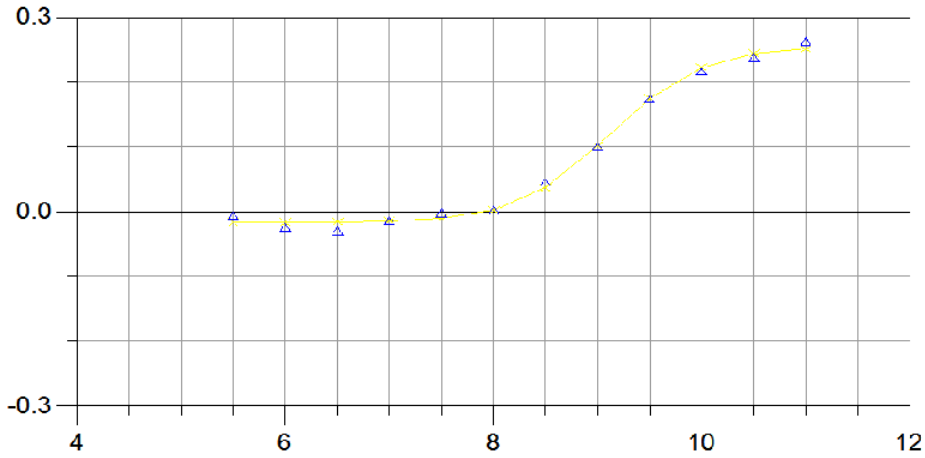
Şekil 3.32. Vinkristinin % 60 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 1. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.33. Vinkristinin % 60 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen 2. iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.34. Daunorubisin'in % 60 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği



Şekil 3.35. Doksorubisin'in % 60 (v/v) ACN-H₂O ortamında elde edilen iyonlaşma basamağına ait NLREG grafiği

3.4. Doksorubisin, Daunorubisin ve Vinkristin için Geliştirilen YPSK-DAD Yöntemine Ait Analiz Bulgular

3.4.1. YPSK Sisteminin Optimizasyonu

Çalışılan ilaçların YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin

seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. 6-tioguanin kolonla yeterli etkileşime girmediği için değerlendirilmeye alınmamıştır.

Sabit Faz Seçimi

Geliştirilen yöntemde YPSK ile analiz için dört farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak fosforik asit (pH 9,5), hareketli faz olarak asetonyitril:su, 50:50 (v/v) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C, hareketli faz akış hızı 1,5 ml/dk olarak belirlenmiştir.

Daunorubisin, doksorubisinin ve vinkristinin yukarıda verilen şartlarla kullanılan kolonlar sırasıyla Synergy Max-RP (5 µm, 150 mm x 4,6 mm ID), Symmetry Shield C-8 (5 µm, 150 mm x 3,9 mm ID), YMC Pack ODS-AM (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) ve X Terra C-18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) dir. Bu bileşikler için elde edilen alıkonma zamanları, pik şekilleri ve kuyruklanma faktörleri dikkate alınarak X Terra C-18 kolon tercih edilmiştir. Bu kolonda silanol grupları polar kapatılmış olup bazik bileşikler için özellikle kullanılmaktadır.

Hareketli Fazın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik çözücü oranının etkisi, hareketli fazın pH'sı, akış hızı ve kolon sıcaklığının etkileri incelenmiştir.

Hareketli Fazın Organik Çözücü Yüzdesinin Belirlenmesi

İyi bir ayırım için en uygun asetonyitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği hacimce % 45, 50, 55 ve 60 olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, 20 mM, H₃PO₄ (pH=9,5) içeren hareketli faz (1,5 ml/dk) 30°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır. Hareketli fazın doksorubisin, daunorubisin ve vinkristinin alıkonmasındaki etkileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan bileşiklerin çeşitli ACN-H₂O ortamları için kromatografik verileri

Bileşik adı	%45			%50			%55			%60		
	t _R	k	α	t _R	k	α	t _R	k	α	t _R	k	α
Doksorubisin	2,302	0,422		2,069	0,289		1,871	0,159		1,940	0,174	
Daunorubisin	3,190	0,970	2,299	2,669	0,663	2,294	2,212	0,371	2,333	2,306	0,395	2,270
Vinkristin	9,923	5,129	5,288	6,308	2,932	4,422	4,581	1,838	4,954	3,799	1,296	3,281

Doksorubisin, daunorubisin ve vinkristinin karışımlarının ayrı ayrı analizlerinde toplam analiz süresi göz önüne alınarak % 50 (v/v) ACN-su karışımı çalışmalarda hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Hareketli Faz pH'sı, Akış Hızı ve Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Bu çalışmanın ilk aşamasında bileşiklerin pK_a değerlerinin belirlenmesi bize pik şekillerinin en düzgün ve ayırmanın en net olduğu pH'nın seçilmesi için yardımcı olmuştur. Diğer koşullar sabit tutulup (% 50 ACN, 20 mM H₃PO₄; 1,5 ml/dk) hareketli faz pH'sı 8,0 8,5, 9,0 ve 9,5 değerlerine ayarlanmıştır. Pik simetriteri incelenerek pik şekillerinin en düzgün ve alıkonma zamanlarının uygun olduğu pH değeri 9,5 olarak seçilmiştir. Bu pH değerinde çalışılan bileşikler için, etkin tabaka sayısı, ayırma gücü ve kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

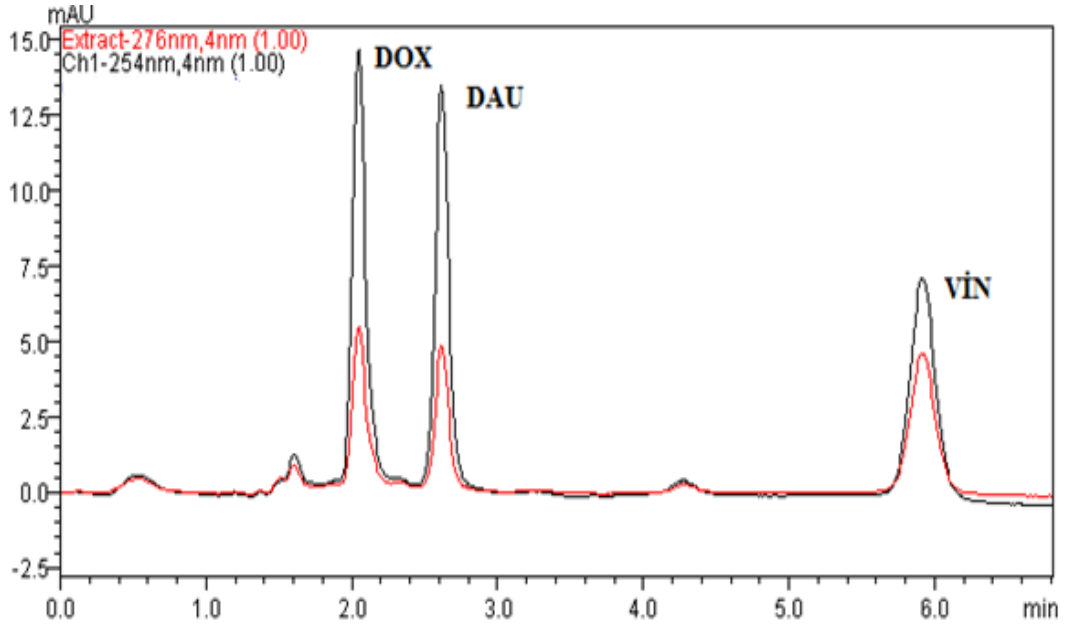
Çizelge 3.2. Çalışılan bileşiklerin çeşitli ACN-H₂O ortamları için kromatografik verileri

Bileşik Adı	Kolon Etkinliği (N)	Ayırma Gücü (R _s)	Kuyruklanma Faktörü
Doksorubisin	2473	3,310	1,362
Daunorubisin	3120	3,135	1,237
Vinkristin	5009	10,209	1,056

Doksorubisin, daunorubisin ve vinkristinin karışımlarının analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve 20 mM H₃PO₄ (50 :50 v/v ; pH =9,5) içeren hareketli faz, 30°C kolon sıcaklığında farklı

akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Sistemin basıncı da göz önüne alınarak akış hızı 1,0 ve 1,5ml/dk olarak değiştirilmiştir. Hareketli faz, YPSK sistemine 1,0 ml/dk akış hızı ile verildiğinde alıkonma sürelerinin uzun olduğu saptanmıştır. Çalışılan bileşiklerin belirlenen optimum koşullarında sıcaklığın bileşiklerin alıkonmasına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kolon sıcaklığı 25°C'den 30°C'ye çıkarılmıştır. Beklendiği gibi sıcaklığın artması bileşiklerin alıkonma sürelerini azaltmıştır. Analiz süresi kısaldığından dolayı 30°C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Bu şartlar göze alınarak optimum akış hızı 1,5 ml/dk olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir. Şekil 3.36'da bu koşullarda elde edilen kromatogram verilmiştir.



Şekil 3.36. Doksorubisin (2 µg/ml), daunorubisin (2 µg/ml) ve vinkristin (8µg/ml) analizi için elde edilen kromatogram. (50:50 (v/v) ACN-su; 20 mM H₃PO₄ pH=9,50; akış hızı 1,5 ml/dk, kolon sıcaklığı 30°C). Görüntüleme 254ve 276 nm'de yapılmıştır.

4. SONUÇ

4.1. İlaçların pK_a Değerlerinin Spektroskopik ve YPSK Yöntemi İle Tayini

Bu çalışmada, daunorubisin, 6-tioguanin, doksorubisin ve vinkristinin iyonlaşma sabitleri, spektroskopik yöntemle tayin edilmiştir. Spektroskopik metot, çözünürlüğü çok düşük olan maddelerin pK_a tayini için ideal bir yöntemdir ve bu yöntem ile bileşiklerin su ortamlarında pK_a tayinleri yapılabilmektedir. Çözücü etkisini inceleyebilmek amacı ile % 10 ve % 20 (v/v) ACN-su ikili karışımlarında da çalışılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde STAR programı kullanılmıştır. Her bir bileşik için 3 titrasyon yapılmış olup değerler standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Su, % 10 ve % 20 ACN-su (v/v) karışımına ait spektroskopik titrasyon verileri

Bileşikler	Su ortamı	% 10 ACN –su	% 20 ACN-su
Vinkristin	5,951 (0,091)	5,801 (0,052)	5,677 (0,097)
	8,307 (0,066)	8,181 (0,012)	8,098 (0,086)
Daunorubisin	7,477(0,035)	7,277 (0,073)	7,161 (0,053)
	9,678(0,027)	9,556 (0,059)	9,436 (0,088)
Doksorubisin	7,835 (0,066)	7,740 (0,075)	7,567 (0,064)
	10,035 (0,013)	9,931 (0,030)	9,693 (0,025)
6-Tioguanin	3,021 (0,09)	2,905 (0,050)	2,801 (0,050)
	8,270 (0,010)	8,076 (0,020)	7,945 (0,020)

Bu tez çalışmasında, daunorubisin, doksorubisin ve vinkristinin iyonlaşma sabitleri % 45, % 50, % 55 ve % 60 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarında sıvı kromatografi yöntemi ile tayin edilmiştir. Tayin edilen pK_a değerleri, hareketli fazın pH değerini belirlemede oldukça önemlidir. Bileşiklerin alıkonmaları, kapasite faktörü (k)–pH grafikleri ile değerlendirilmiştir. Beklenildiği gibi sigmoidal davranış gözlenmiş ve pK_a değerlerinin hesaplanmasında NLREG programı kullanılmıştır. Çalışılan bileşiklerin tayin edilen pK_a ve asidik-bazik ortamda program ile hesaplanan kapasite faktörü değerleri standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Daunorubisin, doksorubisin ve vinkristinin iyonlaşma sabiti değerleri

Bileşikler	% 60 ACN-su $pK_{a_{k_{BH}^+}k_B}$	%55 ACN-su $pK_{a_{k_{BH}^+}k_B}$	%50 ACN-su $pK_{a_{k_{BH}^+}k_B}$	% 45 ACN-su $pK_{a_{k_{BH}^+}k_B}$
Vinkristin	4,997(0,08) -0,051(0,01) 0,307(0,013) 7,825(0,09) 0,266(0,05) 1,575(0,035)	5,179(0,05) -0,092(0,01) 0,454(0,01) 8,059(0,08) 0,480(0,04) 1,897(0,033)	5,337(0,08) 0,230(0,015) 0,905(0,029) 8,189(0,094) 0,784(0,099) 3,500(0,082)	5,583(0,099) 0,40(0,023) 1,367(0,059) 8,274(0,080) 2,552(0,112) 5,786(0,080)
Daunorubisin	9,203(0,044) 0,082(0,001) 0,570(0,001)	9,417(0,065) 0,156(0,001) 0,557(0,013)	9,540(0,077) 0,273(0,013) 1,05(0,031)	9,645(0,084) 0,435(0,021) 2,075(0,095)
Doksorubisin	9,200 (0,074) -0,016(0,001) 0,273 (0,01)	9,438(0,065) 0,035(0,001) 0,270(0,001)	9,491(0,086) 0,102(0,001) 0,450(0,015)	9,339(0,057) 0,169(0,007) 0,745(0,019)

KAYNAKLAR

- Adami, G.R., Buehler, P.W., Gajee, R., Negrusz, A., Robles, S.J., May1999. Analysis of Doxorubicin in Cell Culture Media and Human Plasma Using Solid Phase Extraction and HPLC. *Chromatographia*, 49(9/10), 557-561
- Adamovics, J.A., 1997. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, New York.
- Adams,D.J., 2005. The Impact of Tumor Physiology on Camptothecin-Based Drug Development. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 5,1-13.
- Akay, M., A., Canel, E., Kılıç, E., Köseoğlu, F., 2002. Determination of the protonation constants of some substituted salicylideneanilines by the spectrophotometric method in ethanol-water mixtures. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 37-44.
- Al-Abd, A.M., Kim, N.H., Kuh, H.J., Song, S.C., 2009. A Simple HPLC Method for Doxorubicin in Plasma and Tissues of Nude Mice. *Arch Pharm Res*, 32(4), 605-611.
- Al-ABD, A.M., Kim, N.H., Song, S.C., Lee, S.J., Kuh, H.J., 2009 .A Simple HPLC Method for Doxorubicin in Plasma and Tissues of Nude Mice.*Arch Pharm Res*. 32, 605-611.
- Allen, R., I., Box, K., J., Comer, J., E., A., Peake, C., Tam, K., Y., 1998. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 699 – 712.
- Ando, H., Y., Heimbach, T., 1997. pK_a determination by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 31 – 37.

Anonim, 2007. Çocukluk Çağı Akut Lösemileri, <http://sakur.uludag.edu.tr/dosya/FR-HYE-04-416-03.pdf> (18.10.2011).

Anonim, 2010. Lösemi, <http://www.saglik.net/losemi.html> (17.10.2011).

Anonim, 2011. Daunorubisin, Doxorubisin, 6-thioguanine, Vincristine, <http://www.ilacpedia.com> (17.10.2011).

Augiar de, P.F., Bourguignon, B., Massart, D.L., 1997. Comparison of models and desings for optimisation of the pH and the solvent strength in HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 356, 7-18.

Badea, I., Laz̃ar, L., Moja, D., Nicolescu, D., Tudose, A., 2005. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 305–309.

Badea, I., Lazar, L., Moja, D., Nicolescu, D., Tudose, A., 2005. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 305-309

Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., I., Toro, 1999. Chromatographic behaviour of ionizable compounds in liquid chromatography. Part 2. Standardization of potentiometric sensors and effect of pH and ionic strength on the retention of analytes using acetonitrile-water mobile phases. *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.

Beltran, J., L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barron, D., Ozkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Analitica Chimica Acta*, 484, 253-264.

- Beltran, J.L., Codony, R., Prat, M.D., 1993. Evaluation of stability constants from multi-wavelength absorbance data: program STAR. *Analitica Chimica Acta*, 276, 441-454.
- Bidlingmeyer, B.A., 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 69-200.
- Boos, J., Flege, S., Hempel, G., Laubrock, N., Westhoff, P.S., Würthwein, G., July 2000. The Stability of Doxorubicin and Idarubicin in Plasma and Whole Blood. *Chromatographia*, 52(1/2), 9-13.
- Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M., 1998. Retention of ionizable compounds on high Performance liquid chromatography. III Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146.
- Bosslet, K., Fritz, P., Kroemer, H.K., Mürdter, T.E., Sperker, B., 1998. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of a glucuronyl prodrug of doxorubicin, doxorubicin and its metabolites in human lung tissue. *Journal of Chromatography B*, 289-295.
- Buehler, P.W., Robles, S.J., Adami, G.R., Gajee, R., Negrusz, A., 1999. Analysis of Doxorubicin in Cell Culture Media and Human Plasma Using Solid Phase Extraction and HPLC. *Chromatographia*, 49, 557-561.
- Checa, A., Hernandez-Cassou, S., Saurina, J., Soto, V.G., 2005. Fast determination of pK_a values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 177-183.
- Checa, A., Soto, V.G., Hernández-Cassou, S., Saurina, J., 2005. Fast determination of pK_a values of reverse transcriptase inhibitor drugs for AIDS treatment by using

pH-gradient flow-injection analysis and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 554 ,177–183.

Covington, A.K., Bates, R.G., Durst, R.A., 1985. Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurements of pH and related terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.

Dong, L., Huang, J., 2007. Effect of Temperature on the Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High Purity Silica Using Reversed-Phase Solvents. *Chromatographia*, 65, 519–526.

Fang, Y., Hu, G., Hu, @., Zhou, T., 2003. Determination of dissociation constants of anthrocyline by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 679 – 684.

Gacar, M.N.,2009. Antineoplastik İlaçlar ve Kanser Kemoterapisi, <http://www.mnejatgacar.com/imx /ANTİNEOPLASTİK%20İLACLAR.ppt> (12.10.2011).

Greig, N.H., [Soncrant](#), T.T., [Shetty](#), H.U., [Momma](#), S., [Smith](#), Q.R., [Rapoport](#), S.I, 1990. Brain uptake and anticancer activities of vincristine and vinblastine are restricted by their low cerebrovascular permeability and binding to plasma constituents in rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*,26,263-268.

Gündüz, T., 2007. *İnstrümental Analiz*.10. Baskı. Gazi Kitabevi, Ankara.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. *Introduction to HPLC*. 2nd edition, Chapman and Hall, New York, 1-160.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. *Introductipn to HPLC*, 2nd ed, Chapman and Hall, New York, 1-160.

- Hardcastle J., Jano I., 1998. Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data. *Journal of Chromatography B*, 71, 739-756.
- Huang, J., Dong, L., 2007. Effect of Temperature on the Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High Purity Silica Using Reversed-Phase Solvents. *Chromatographia*, 65(9/10), 519-526.
- Laubrock, N., Hempel, G., Schulze-Westhoff, R., Worthwein, G., Flege, S., Boos, J., 2000. The Stability of Doxorubicin and Idarubicin in Plasma and Whole Blood. *Chromatographia*, 52, 9-13.
- Meda, N., Murthy, R.R., Reddy, L.H., 2005. Rapid and sensitive HPLC method for the estimation of doxorubicin in dog blood – The silver nitrate artifact. *Acta Pharm*, 81-91.
- Mitchell, R. C., Salter, C., J., Tam, K., Y. 1999. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. Part III, resolution of multi-protic ionization systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20, 289 - 295.
- Murdter, T.E., Sperker, B., Bosslet, K., Fritz, P., Kroemer, H.K., 1998. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of a glucuronyl prodrug of doxorubicin, doxorubicin and its metabolites in human lung tissue. *Journal of Chromatography B*, 709, 289–295.
- Polster J., Lachmann H., 1989. Spectrometric titrations: Analysis of chemical equilibria. VCH, Weinheim, pp 433, Germany.
- Poole, C.P., Poole, S.W., 1997. *Chromatography Today*. Fifth impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.

- Reddy, L.H., Meda, N., Murthy, R.R., 2005. Rapid and sensitive HPLC method for the estimation of doxorubicin in dog blood – The silver nitrate artifact. *Acta Pharm.* 55, 81–91.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water+Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (11), 1549-1560.
- Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. *Electrochimica Acta*, 2(10), 1499-1505.
- Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E. 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on retention of weak acids. *Analytical Chemistry*, 68, 4094-4100.
- Sherrod, P.H. NLREG. Version 4.0–nonlinear regression analysis and curve fitting program.
- Skoog–Holler–Niemann, 1998. Principles of Instrumental Analysis, 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA, 673-766.
- Şanlı, N., 2007. Bazı sülfonamidlerin sıvıkromatografi yöntemi ile tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Isparta.
- Şanlı, S., 2009. Makrolid kalıntılarının sütte analizi için sıvı Kromatografik yöntemin optimizasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. Isparta.

Yenilmez, L., 2006. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve ilaç analizindeki uygulamaları. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Yıllar, O. 2006. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan İlaçlar, http://www.ctf.edu.tr/ana_bilimdallari/pdf/259/Kanser_Kemoterapisi.pdf (11.10.2011).

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Soyadı,Adı : CANITEZ, Pınar
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : 31.07.1983 – Çorum
Medeni Hali : Bekar
Telefon No : 05064848580
Email : pinarkimya2005@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lise	Eti Lisesi	2000
Lisans	Ondokuz Mayıs Üni.	2005
Tezsiz Yüksek Lisans	Selçuk Üni.	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-	Saray Dölek Un Fab.	Kimyager

Yabancı Dil

İngilizce