

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ETKİN MADDELERİN AYNI ANDA MİKTAR TAYİNİ
İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK VE KROMATOGRFİK
ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Betül AYAR

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2024- ANKARA

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı etkin maddelerin aynı anda miktar tayini için Spektrofotometrik ve Kromatografik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Betül AYAR

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında Betül AYAR tarafından hazırlanan “Bazı etkin maddelerin aynı anda miktar tayini için Spektrofotometrik ve Kromatografik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/01/2024

İmza

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nevin ERK

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Gizem TIRIS

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bazı etkin maddelerin aynı anda miktar tayini için Spektrofotometrik ve Kromatografik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Antineoplastik ilaçlar kanser tedavisinde, malign hücrelerin büyümesini durdurma ya da geriletme amacıyla kullanılan farmakolojik ajanlardır.

Tez projemiz kapsamında antineoplastik etki gösteren Sorafenib etkin maddesinin kantitatif analizlerine olanak sağlayan hem UV spektrofotometrik hem de kromatografik yöntemler geliştirilecek ve yöntemler optimize edilecektir.

YBSK ile yapılan deneylerde kolon seçiminde, Luna® C8;(2) 5µm 4,6x50 mm kolonu kullanılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz ve çözücüdeki tampon ve asetronitril oranları; pH 3,8 Amonyum Asetat Tamponu:asetonitril (40:60; h/h) olarak belirlenmiş; akış hızı da 1,0 mL/dk seçilmiştir ve absorbans maksiması olan 260 nm dalga boyunda çalışılmasına karar verilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir.

Deney şartları belirlendikten, kalibrasyon eğrisinin ve çalışma denkleminin oluşturulması için 1,0 - 200,0 µg/mL çalışma aralığında 8 adet standart çözeltisi kullanılmıştır.Yöntem için hesaplanan yakalama sınırının 1,4 µg/mL, tayin alt sınırının 4,5 µg/mL ve korelasyon katsayısının 0,9998 olması, geliştirilen yöntemin duyarlılığını ispatlamaktadır. Sorafenib için hesaplanan %geri kazanım oranları Çizelge 3.5.'de görüldüğü gibi, % 97,3, % 98,0 ve % 95,4 oranlarında bulunmuştur.

Spektrofotometrik analizlerde ise doğrudan UV ve birinci türev spektrofotometrik yöntemleri kullanılmıştır. Stok sorafenib çözeltisi metanolde çözülmüş ve yine metanol içerisinde daha seyreltik çözeltiler hazırlanmıştır. Çalışmada Beer-Lambert yasası göz önünde bulundurularak absorbans değerlerinin 0,8'i aşmaması hedeflenmiş böylelikle 2-8 µg/mL aralığında çalışılmasına karar verilmiştir. Doğrudan UV spektrofotometrik analiz için kalibrasyon eğrisinin ve çalışma denkleminin oluşturulması için 2,0 - 8,0 µg/mL çalışma aralığında 7 adet standart çözeltisi kullanılmıştır. Yöntem için hesaplanan yakalama sınırının 0,38 µg/mL, tayin alt sınırının 1,1 µg/mL ve korelasyon katsayısının 0,998 olması, geliştirilen yöntemin duyarlılığını ispatlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sorafenib; yüksek basınçlı sıvı kromatografi; miktar tayini; farmasötik preparatlar, doğrudan UV spektrofotometri, birinci türev spektrofotometri.

SUMMARY

Development of Spectrophotometric and Chromatographic Analysis Methods for the simultaneous quantification of some active substances.

Antineoplastic drugs are pharmacological agents used in cancer treatment to stop or regress the growth of malignant cells. Sorafenib is a new antineoplastic drug that exerts its effect by inhibiting both cell proliferation and angiogenesis in tumor cells and tumor feeding vessels.

Within the scope of our thesis project, both UV spectrophotometric and chromatographic methods that allow quantitative analysis of the active substance Sorafenib, which has antineoplastic effects, will be developed and the methods will be optimized.

In the column selection for the experiments carried out with YBSK, it was decided to use the Luna® C8;(2) 5µm 4.6x50 mm column. The ratios of buffer and acetonitrile as mobile phase and solvent were determined as 40% pH 3.8 Ammonium Acetate Buffer and 60% acetonitrile; The flow rate was chosen as 1.0 mL/min and it was decided to work at a wavelength of 260 nm, which is the absorbance maximum. Column temperature was determined as 30°C.

After the experimental conditions were determined, 8 standard solutions in the working range of 1.0 - 200.0 µg/mL were used to create the calibration curve and working equation. The fact that the detection limit calculated for the method is 1.4 µg/mL, the lower limit of detection is 4.5 µg/mL and the correlation coefficient is 0.9998 prove the sensitivity of the developed method. The % recovery rates calculated for Sorafenib were found to be 97.3%, 98.0% and 95.4%, as seen in Table 3.5.

Direct UV spectrophotometry and first derivative spectrophotometry methods were used in spectrophotometric analyses. The stock sorafenib solution was dissolved in methanol and more dilute solutions were prepared in methanol. Considering the Beer-Lambert law in the study, it was aimed for the absorbance values not to exceed 0.8, so it was decided to work in the range of 2-8 µg/mL. 7 standard solutions in the working range of 2.0 - 8.0 µg/mL were used to create the calibration curve and working equation for direct UV spectrophotometric analysis. The fact that the detection limit calculated for the method is 0.38 µg/mL, the lower limit of detection is 1.1 µg/mL and the correlation coefficient is 0.998 prove the sensitivity of the developed method.

Key Words: Sorafenib; high pressure liquid chromatography; quantification; pharmaceutical preparations, direct UV spectrophotometry, first derivative spectrophotometry.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	İii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xiv

1.GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Sorafenib'in Fizikokimyasal Özellikleri	4
1.2.1. Kimyasal Yapı ve Moleküler Yapı	4
1.2.2. Sorafenib'in Farmakolojik Özellikleri	5
1.2.2.1. Sorafenib'in Farmakodinamik Özellikleri	5
1.2.2.2. Sorafenib'in Farmakokinetik Özellikleri	6
1.2.2.3. Sorafenib'in Kullanımı	8
1.2.2.4. Sorafenib'in Yan Etkiler	9
1.2.2.5. Sorafenib'in Kontrendikasyonları	9
1.3. Sorafenib Tayini İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	9
1.4. Tez Çalışmasında Gerçekleştirilen Yöntemler	11
1.4.1. Kromatografik Yöntemler	11
1.4.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Temel İlkeleri	11
1.4.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	13
1.4.1.2.1. YBSK Yönteminin Avantajları	16
1.4.1.2.2. YBSK Yönteminin Dezavantajları	16
1.4.2. Spektrofotometrik Yöntem	17
1.4.2.1. Spektrofotometrik Yöntemlerin Temel Prensipleri ve Beer-Lambert Yasası	17
1.4.2.2. (UV-VIS) Mor ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi	19
1.4.2.3. UV-VIS Spektrofotometrenin Temel Bileşenleri	20
1.4.2.4. Türev Spektrofotometri	21
1.4.2.4.1. Türev Spektrofotometrinin Avantajları ve Dezavantajları	22

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Piyasada Ticari Olarak Mevcut Olan Farmasötik Preparatlar	23
2.2. Tez Kapsamındaki Kullanılan Cihaz ve Gereçler	23
2.3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
2.4. Tez Kapsamında Kullanılan Standartlar ve Referans Maddeler	23
2.5. YBSK Yöntemi ile Sorafenib Miktar Tayini	24
2.5.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu	24
2.5.2. Deneysel Süreç	24
2.5.2.1. Kalibrasyon Grafiği için Çözeltiler	24

2.5.2.2. Tekrarlanabilirlik (Gün-içi ve Günler- arası Çalışmalar)	25
2.5.2.2.1. Gün-içi Çalışmalar	25
2.5.2.2.2. Günler Arası Çalışmalar	25
2.5.2.2.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	26
2.5.2.3. YBSK Yönteminin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması	26
2.5.2.3.1. Miktar Tayini	26
2.5.2.4. Zorlanmış Bozulma Çalışmaları	26
2.5.2.4.1. Termal Bozunma	26
2.5.2.4.2. Asit Bozunma	27
2.5.2.4.3. Alkali Bozunma	27
2.5.2.4.4. Oksidatif Bozunma	27
2.6. Spektrofotometrik Yöntem ile Sorafenib Miktar Tayini	27
2.6.1. Doğrudan UV Spektrofotometrik Analiz	27
2.6.1.1. Deneysel Koşullar	27
2.6.1.2. Deneyin Yapılışı	28
2.6.1.2.1. Kalibrasyon Grafiği ve Doğru Denklemi	28
2.6.1.2.2. Tekrarlanabilirlik (Gün İçi ve Günler Arası Çalışmalar)	28
2.6.1.2.2.1. Gün İçi Çalışmalar	28
2.6.1.2.2.2. Günler Arası Çalışmalar	28
2.6.1.2.3. Spektrofotometrik Yöntemin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması	29
2.6.2. Birinci Türev UV Spektrofotometrik Yöntem	29
2.6.2.1. Deneyin Yapılışı	29
2.6.2.1.1 Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	29
2.6.2.1.2. Tekrarlanabilirlik Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası Çalışmalar)	29
2.6.2.1.3. Birinci Türev Spektroskopisi Yönteminin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması	30
3. BULGULAR	31
3.1. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin YBSK Analiz Bulguları	31
3.1.1. Etken Madde Spektrumları	31
3.1.2. Kalibrasyon Eğrisi Denklemi Verileri Eldesi	32
3.1.3. Kesinlik	33
3.1.3.1. Metot Kesinliği	33
3.1.3.2. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler	33
3.1.4. Doğruluk	36
3.1.5. Miktar Tayini Verileri	37
3.1.6. Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları Verileri	37
3.2. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Doğrudan UV Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları	38
3.2.1. Çalışma Verileri	38
3.2.2. Kesinlik	39
3.2.2.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler	39
3.2.3. Miktar Tayini Verileri	40
3.3. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları	41

3.3.1. Çalışma Denklemi	41
3.3.2. Kesinlik	43
3.3.2.1. Gün İçi Çalışmalar	43
3.3.2.2. Günler Arası Deneyler	44
3.3.3. Miktar Tayini Verileri	45
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	52



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezi kapsamında, bir antineoplastik etkili etken madde olan sorafenibin tablet formundaki preparatlarından miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografik ve UV-VIS spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin Türkiye ilaç piyasasına giren preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında değerli katkılarıyla çalışmalarına yön veren sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e; yüksek lisans eğitimim için destek olan ve yaptığım çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen Bil. Uzm. Kim. Soner BAY' a, teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince tavsiyeleri, öngörülleri ve destekleri için Dr. Ecz. Betül Seyrekbasan'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen kızıma ve aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa, seçicilik (Kromatografik yöntem)
a	Absorbtivite ($L.g^{-1}.cm^{-1}$)
A	Absorbans değeri
ACN	Asetonitril
ASCO	Amerikan Klinik Onkoloji Derneği
b	Işığın örnek içinde adığı yol (cm)
c	Işık hızı ($3 \times 10^{-8} m.s^{-1}$)
cd	Kandela
cm	Santimetre
C	Konsantrasyon ($g.L^{-1}$)
$^{\circ}C$	Derece Celsius
$C_2H_4O_2$	Asetik Asit
CYP	Sitokrom P
D_2	Döteryum
DAD	Diode-array dedektör
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
ϵ	Epsilon, molar absorptivite değeri ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
E	Bir molekülün iç enerjisi (J)
EAA	Elzem aminoasitler
Ed	Bir molekülün dönme enerjisi (J)
Ee	Bir molekülün elektronik enerjisi (J)
E_0	Bir molekülün ötelenme enerjisi (J)
EPR	Elektron paramagnetik rezonans
ESR	Elektron spin rezonansı
Et	Bir molekülün titreşme enerjisi (J)
$^{\circ}F$	Derece Fahrenheit
FDA	Gıda Güvenliği ve Beslenme Merkezi
g	gram
h	Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34} J.s$)
H	Teorik tabaka yüksekliği (Kromatografik yöntem)
H_2	Hidrojen
HCC	Karaciğer kanseri
HCl	Hidroklorik asit
HILIC-MS	Kütle spektrofotometreli hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi
HSK	Hepatoselüler kanser hastaları

I	Örnekten çıkan ışımanın şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
I ₀	Örneğe gelen ışımanın şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
IR	İnfrared (Kızılötesi)
J	Joule
İTK	İnce tabaka kromatografi
K	Dağılma katsayısı (Kromatografik yöntem)
k'	Kapasite faktörü (Kromatografik yöntem)
KD	Kabul değeri
λ	Lamda, Işımanın dalga boyu (nm)
L	(i) Kolon uzunluğu (Kromatografik yöntem); (ii) Litre
LC-FTIR	Likit Kromatografi - Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi
LC-MS	Kütle spektrometre likit kromatografi
μ	Mikron
m	Metre
M	Molar
Ma	Molekül ağırlığı (g)
MADRS	Montgomery-Csberg Depression Rating Scale
MeOH	Metanol
μg	Mikrogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
√	Nü, Işımanın frekansı (s ⁻¹)
N	Teorik plaka sayısı (Kromatografik yöntem)
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezolüsyon spektrofotometre
ppm	Milyonda bir birim
r	Korelasyon katsayısı
R	Rezolüsyon (Kromatografik yöntem)
R _f	Alıkonma faktörü (Kromatografik yöntem)
RHK	Renal hücreli karsinom
RSD	Bağıl standart sapma
s	Saniye
SS	Standart sapma
Sor	Sorafenib
T	Transmittans (Geçirgenlik)

TGA	Büyük damarların transpozisyonu
THF	Tetrahidrofur
t_0	Ölü zaman (Kromatografik yöntem)
TAS	Tayin alt sınırı
t_R	Alıkonma zamanı (Kromatografik yöntem)
t_w	Pik taban genişliği (Kromatografik yöntem)
UPLC	Ultra performans likit kromatografi
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-GB	Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopi
VH	Ölü Hacim (Kromatografik yöntem)
VR	Alıkonma hacmi (Kromatografik yöntem)
Vss	Ortalama dağılım hacmi (Kromatografik yöntem)
W	Tungsten
Xe	Ksenon
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
YS	Yakalama sınırı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Temel bileşenleri ile tipik bir YBSK Cihazı	13
Şekil 1.2. Beer-Lambert yasasından sapmalar.	19
Şekil 1.3. Temel bileşenleri ile çift ışık yollu spektrofotometre cihazı	20
Şekil 1.4. Tipik bir UV-Vis spektrum	22
Şekil 3.1. Tampon:asetonitril (50:50; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akış ile elde edilen kromatogram ve spektrum.	31
Şekil 3.2. Tampon:asetonitril (40:60; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akış ile elde edilen kromatogram ve spektrum.	31
Şekil 3.3. Tampon:asetonitril (30:70; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akış ile elde edilen kromatogram ve spektrum.	31
Şekil 3.4. YBSK yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği	32
Şekil 3.5. Metanol içerisinde hazırlanmış sorafenib çözeltilerinin 200-400 nm aralığında elde edilen doğrudan UV spektrumları	38
Şekil 3.6. Doğrudan UV Spektrofotometri verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği	38
Şekil 3.7. Metanol içerisinde hazırlanan Sorafenib a) 2,0 µg/mL; b) 3,0 µg/mL; c) 4,0 µg/mL; d) 5,0 µg/mL; e) 6,0 µg/mL; f) 7,0 µg/mL; g) 8,0 µg/mL konsantrasyonlarına ait, 200-400 nm aralığındaki birinci türev UV spektrumları	41
Şekil 3.8. Birinci Türev UV Spektrofotometri verilerinden 259,7 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği	41
Şekil 3.9. Birinci Türev UV Spektrofotometri verilerinden 281,9 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği	42

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Sorafenib Kalibrasyon Hazırlığı	25
Çizelge 3.1. Sorafenib etken maddesinin YBSK yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi verileri (260 nm, n=7)	32
Çizelge 3.2. YBSK yöntemi ile sorafenib orta konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltinin altı ardıl enjeksiyonundan elde edilen alanlar ve hesaplanan standart sapma ve bağıl standart sapma verileri	33
Çizelge 3.3. 20°C Karanlıkta Yapılan Gün İçi Çalışma sonuçları	34
Çizelge 3.4. 20°C ve 5°C Karanlıkta Yapılan Günler Arası Çalışma sonuçları	35
Çizelge 3.5. YBSK yöntemi ile elde edilen geri kazanım değerleri	36
Çizelge 3.6. YBSK yöntemi ile Nexavar® 200 mg Film Tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri	37
Çizelge 3.7. YBSK yöntemi ile her birinde 100 µg/mL Sorafenib içeren çözeltilerle elde edilen hızlandırılmış degradasyon çalışma verileri.	37
Çizelge 3.8. Doğrudan UV Spektrofotometri ile sorafenib için elde edilen kalibrasyon eğrisi verileri (264 nm, n=7)	39
Çizelge 3.9. Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile Sorafenib etken maddesinin üç farklı derişimi için elde edilen gün içi deneysel veriler	39
Çizelge 3.10. Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile Sorafenib etken maddesinin üç farklı derişimi için elde edilen günler arası deneysel veriler	40
Çizelge 3.11. Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile Nexavar® 200 mg film kaplı tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri	40
Çizelge 3.12. Sorafenib etken maddesinin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 259,7 nm'de elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi verileri (n=7)	42
Çizelge 3.13. Sorafenib etken maddesinin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 281,9 nm'de elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi verileri (n=7)	42
Çizelge 3.14. Birinci türev UV spektrofotometri yöntemi ile 259,7 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen gün içi deneysel veriler	43
Çizelge 3.15. Birinci türev UV spektrofotometri yöntemi ile 281,9 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen gün içi deneysel veriler	43
Çizelge 3.16. Birinci türev UV spektrofotometri yöntemi ile 259,7 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen günler arası deneysel veriler	44
Çizelge 3.17. Birinci türev UV spektrofotometri yöntemi ile 281,9 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen günler arası deneysel veriler	44
Çizelge 3.18. Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 259,7 nm'de Nexavar® 200 mg film tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri	45

Çizelge 3.19. Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 281,9 nm’de Nexavar® 200 mg
film tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri

46



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Hücrelerin normal olmayan hızla bölünmesi ve bir diğer doku ve organlara yayılarak onları istila etmesiyle meydana gelen kapsamlı bir hastalık grubuna kanser denir. 200'den fazla kanser çeşidi tanımlanmıştır. Hızla büyüyen kanser hücreleri tümör oluşumuna neden olarak vücudun işleyişini de bozar. Hücrelerin hızlı bir şekilde büyümesi nedeniyle oluşan tümörler iyi huylu, kötü huylu ve prekanseröz (premalign) olarak tanımlanabilir (Medical Park Yayın Kurulu, 21.01.2023, erişim tarihi: 20.11.2023)

Sağlıklı ve normal hücreler yenilenmek için bölünme yeteneklerini kullanır, bu şekilde ölü hücrelerin yerleri doldurulur ve doku hasarları onarılır. Bölünme ve çoğalma aktiviteleri DNA aracılığıyla kontrol edilmektedir ve düzen içerisinde. Ancak DNA'nın bir nedenle tahrip olması sonucu bazı hücreler kontrol edilemez bir şekilde bölünür ve çoğalır. Bu kontrol edilemez bölünme ve çoğalmaya maruz kalan hücreler "kanserli hücreler" olarak adlandırılır. Bu tip hücrelerin bir araya gelmesi ile "Tümör"ler oluşur. Vücudumuzdaki farklı doku ve organlarda oluşan tümörler "iyi huylu-benign" ve "kötü huylu-malign" olarak sınıflandırılır. Malign tümörler zamanla büyüyerek tümörden etkilenmemiş olan dokulara da zarar verirler ve böylelikle kişide kanser şeklinde tanımlanan hastalıklar görülür. Bazen kanserli hücreler var oldukları dokudan damar yolu ve lenf yolu vasıtasıyla sağlıklı dokulara ulaşarak kanserin vücudun başka bölümlerine de ulaşmasına sebep olur. Bu durum "Metastaz" olarak adlandırılır. (Medical Park Yayın Kurulu, 21.01.2023, erişim tarihi: 20.11.2023)

Yapısal nedenlerle birlikte kansere neden olan durumlar arasında genetik faktör, çevresel faktörler, yoğun güneş ışını, sigara-alkol tüketimi, kanserojen maddeye maruz kalma, kötü beslenme ve stres yer alır.

Kanserin nedenleri şu başlıklar altında toplanabilir:

- Genetik faktör
- Çevre ile ilişkili faktörler
- Aşırı sigara ve/veya alkol tüketimi
- Güneş ışığına fazla maruziyet
- Kanseröjen maddeye maruz kalma
- Radyasyon
- Obezite
- Stres

- Hareket azlığı
- Hormon ilaçları
- Bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar
- Hava kirliliği

Kanser çeşitleri ve sıklıkları:

Kanser çeşitleri, meydana geldikleri organ, bölge ve mikroskobik yapısına göre gruplandırılırlar. Bilinen yaklaşık yüz çeşit kanser türü olmasına rağmen bazıları daha fazla ortaya çıkmaktadır. En çok ortaya çıkan kanser türleri aşağıda verilmiştir:

- Akciğer kanseri
- Meme kanseri
- Beyinde oluşan tümörler
- Ağızda görülen kanserler
- Kolon kanseri
- Yemek borusu kanseri
- Ciltte ortaya çıkan kanserler
- Rahim ve rahim ağzında görülen kanserler
- Yumurtalıkta görülen kanserler
- Prostat dokusu kanserleri
- Testis bölgesinde görülen kanserler
- Midede oluşan kanserler
- Renal doku kanserleri
- Karaciğer görülen kanserler
- Pankreas dokusunda görülen kanserler
- İdrar kesesi kanserleri
- Gırtlakta oluşan kanserler
- Genizde ortaya çıkan kanserler olarak sayılabilir. (Memorial Tıbbi Yayın Kurulu 20 Eylül 2023, erişim tarihi: 20.11.2023)

Kanser belirtileri:

Kanser, farklı bireylerde farklı birtakım belirtilerle tespit edilse de yaygın olarak aşağıdaki belirtiler eşlik eder;

- Sebebi belli olmayan kilo kaybı
- Yüksek ateş
- Sürekli halsizlik
- Şiddetli ağrılar
- Koltukaltı, meme veya vücudun başka kısımlarında ortaya çıkan sert ve hareketsiz kitleler
- Ciltte, özellikle siğil ve benlerde görülen değişiklikler
- Ağız ve diş etinde gözlenen yoğun kanamalar
- Balgam ile birlikte kan gelmesi ve sürekli öksürük
- Adet döngüsü ile uyumsuz vajinal kanamalar
- Dışkıda kan gözlemesi ve dışkılamanın uzun sürmesi gibi şikayetler
- İdrarda kan gözlenmesi ve idrara çıkma periyodunun farklılaşması (Medical Park Yayın Kurulu, 21.01.2023, erişim tarihi: 20.11.2023)

Kanserin tanısı ve tedavisi:

Belirtiler ortaya çıktıktan sonra kanserin tanılanması için birkaç tanı yöntemi mevcuttur. Kanda yapılan testler, görüntüleme teknikleri (MRI, bilgisayarlı tomografi vb.) ile yapılan testler ve şüphelenilen dokudan alınan örneğin patolojik incelenmesi bu yöntemlerin başlıcalarıdır.

Kanser türleri farklı mikroskobik yapılar ve yayılma hızları sergilerler. Bu sebeple farklı kanser türleri için farklı tedaviler uygulanmalıdır. Genellikle uygulanan tedavi yöntemleri; farklı ilaçlarla gerçekleştirilen kemoterapiler, radyoaktif ışınlar ile gerçekleştirilen radyoterapi kürleri, girişimsel cerrahi yöntemleri ve hastaların yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla uygulanan alternatif tıp teknikleri olarak sınıflandırılabilir. Uygulanan tedavi yöntemleri, gelişen teknoloji ve yeni bilimsel çalışmalar doğrultusunda zamanla farklılaşmakta ve pozitif gelişmeler kaydedilmektedir. Uygulanan tedavi yöntemlerine ilaveten kanser hastalarının moral ve motivasyonun iyileştirilmesi de tedaviye yardımcısı olmaktadır. Hastalara verilecek psikolojik destek uygulanan tedavinin etkisine katkı sağlamaktadır. (Medical Park Yayın Kurulu, 21.01.2023, erişim tarihi: 20.11.2023)

Sorafenib, yeni bir antineoplastik ilaç olarak, tümörlü hücrelerde ve tümörlü hücreleri besleyen damarlar üzerinde etkisini, hem hücre bölünmesini hem de yeni kan damarlarının gelişmesini engelleyerek ederek gösterir. Bu etki, hem tümörlü hücreler hem de vazküler

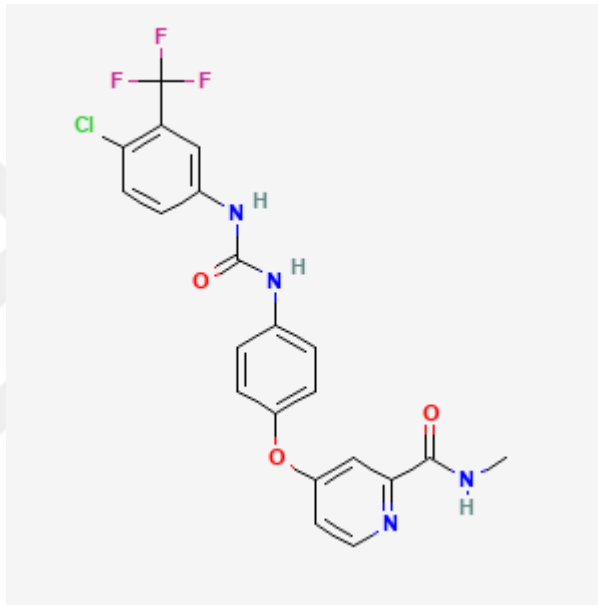
yatakta 'serin / treonin ve tirozin reseptör kinazları' hedef alan bir multi-kinaz inhibitör olarak faaliyet göstermesi ile gerçekleşir.

Sorafenib, FDA tarafından öncelikle olarak böbrek hücrelerinde görülen karsinoma, daha sonra da HCC tedavisi için onaylanmış, ve metastatik diferansiyel tiroid karsinomada kullanılmak üzere de onay almıştır.

1.2. Sorafenib'in Fizikokimyasal Özellikleri

1.2.1. Kimyasal Yapı ve Moleküler Yapı

Sorafenib'in Moleküler Yapısı:



Kapalı formül: $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$

Açık formül: 4-[4-[[4-chloro-3-triflorometil)fenil]karbamoylamino]fenoksi]-N-metilpiridin-2-karboksamid

Molekül ağırlığı: 464.8 g/mol

IUPAC isimlendirmesi: 4-[4-[[4-chloro-3-triflorometil)fenil]karbamoylamino]fenoksi]-N-metilpiridin-2-karboksamid **Görünüş:** Sorafenib beyazdan kırık beyaza kristal yapılı toz halindedir.

Saklanması: 25 °C (77 °F)'de, hava geçirmeyen ambalajlarda saklanmalıdır.

Erime Noktası: 205,6 °C

Çözünürlük: Suda çözünürlüğü 0.00171 mg/mL, DMSO'de çözünürlüğü 60 mg/mL'dir.

Log P: 3,8

pK_a = Öngörülen pK_a değerleri 3,03 ve 11,55'tir.

1.2.2. Sorafenib'in Farmakolojik Özellikleri

1.2.2.1. Sorafenib'in Farmakodinamik Özellikleri

Sorafenib'in ATC kodu: L01XE05'dir. Bu nedenle etkin maddenin farmako terapötik sınıfı; antineoplastik ilaçlar - protein kinaz inhibitörü şeklinde belirtilebilir.

Etki mekanizmasının açıklanması; In vitro koşullar altında sorafenib, tümörlü hücrelerin çoğalmasını inhibe eden bir multikinaz inhibitörüdür, T-hücrelerine sahip olmayan farelerde tümörlü neovaskülarizasyonda azalma ve insan tümör ksenograflarının geniş bir yelpazesinde tümörlerin gelişmesini engellemektedir. Tümörlü hücrelerde sorafenib, '(CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, ve FLT-3)' ve tümör vaskülatüründe (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3 ve PDGFR- β) bulunan hedeflerin aktivitelerini azaltmaktadır. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Böbrek kanseri tedavisinde Ocak 2007'de yayınlanan klinik araştırma sonuçları, plaseboyla karşılaştırıldığında sorafenib tedavisinin, önceki tedavinin başarısız olduğu ilerlemiş şeffaf hücreli renal hücreli karsinomu olan hastalarda progresyonsuz sağkalımı uzattığını gösterdi. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

American Society of Clinical Oncology tarafından 2007'de düzenlenen sempozyumda, sorafenibin hepatoselüler karsinom vakalarında etkinliğini gösteren bir SHARP çalışmasına dair sonuçlar sunulmuş olup, birincil sonlanım noktası medyan, genel sağ kalım şeklindeydi ve bu sonuçlar plaseboya kıyasla sorafenib kullanan hastaların %44'lük bir iyileşme gösterdiğine işaret etmekteydi. Sorfenib kullanımı ile hem medyan sağ kalım hem de hastalığın seyri ile ilgili 3 aylık iyileşme bulguları sunuldu; ancak semptomatik progresyona kadar geçen süre arasında anlamlı bir fark yoktu. Hastaların yaşam kalitesine ait ölçümlerde, sorafenibin toksisitesine dair ya da karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilgili semptomlara bağlanabilecek bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sadece Child-Pugh Sınıf A (yani en hafif) sirozu olan hastaları içermesi dikkate şayandır. Tüm bu bulgular ışığında, Kasım 2007'de ileri hepatoselüler karsinomun tedavisi için sorafenib Food and Drug Administration (FDA) onayı almıştır. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Sorafenib ile doksorubisin bir arada kullanıldığı random, çift kör, bir faz II çalışmasında, ileri düzeyde hepatoselüler karsinoma sahip hastalarda tek başına doksorubisin kullanımı ile karşılaştırıldığında ortalama progresyon süresi önemli miktarda gecikmemiştir. Ortalama

genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalım süreleri, sorafenib ile birlikte doksorubisin kullanan hastalarda, tek başına doksorubisin kullanan hastalara göre anlamlı olarak daha uzundu. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Avustralya'da bu, sorafenib'in "Pharmaceutical Benefits Scheme" (Farmasötik Fayda Programı) yer aldığı tek endikasyondur, bundan dolayı sorafenib devlet tarafından sadece bu kullanım amacına yönelik sübvansé edilmektedir. Avustralya'da resmi otorite olan TGA (Therapeutic Goods Administration), sorafenibin böbrek hücrelerinde gözlenen karsinom ile birlikte hepatoselüler karsinom için kullanımına onay vermiştir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Sorafenib, FDA tarafından 22 Kasım 2013 tarihinde, tiroid kanseri vakalarında, radyoaktif iyot tedavisine dirençli, lokal olarak yeniden ortaya çıkan veya metastatik, ilerleyici diferansiye tiroid karsinomunun (DTC) tedavisi için de onaylanmıştır. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Faz III karar çalışması, progresyonsuz sağ kalımda önemli bir iyileşme gösterdi, ancak genel sağ kalımda önemli bir iyileşme göstermedi. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

1.2.2.2. Sorafenib'in Farmakokinetik Özellikleri

Sorafenibin Emilimi: Tablet formundaki sorafenib uygulamasını takiben elde edilen bağıl biyoyararlanım, oral çözeltiye kıyasla ortalama %38-49' düzeyindedir. Oral uygulamayı yoluyla, sorafenibin plazmadaki maksimum seviyesine yaklaşık 3 saat içerisinde ulaşılır. Orta seviyede yağlı bir öğün ile alındığında ise elde edilen biyo yararlanım değeri ile aç karna alındığında elde edilen değerler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak yağ açısından zengin bir öğün ile alındığında, sorafenib için elde edilen biyo yararlanım değeri aç karna alınmaya kıyasla %30 azalmıştır. Çoklu sorafenib dozlarının uygulandığı yedi gün sürelik bir çalışma ise tekli doz uygulamaya kıyasla 2,5 - 7 kat fazla bir birikim ile sonuçlanmıştır. Sorafenibin kararlı hal plazma konsantrasyonlarına yedi günde ulaşılmıştır ve ortalama derişimlerinin tepe-vadi oranı ikiden küçük olarak bulunmuştur. Tiroid karsinoma, RHK ve HSK hastalarına günde iki kez 400 mg sorafenib verilmiş ve kararlı hal farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Maruz kalmadaki değişkenlik tüm tümör türleri için fazla olmasına rağmen, maksimum ortalama maruziyet tiroid kanserli deneklerde görülmüştür. Ancak tiroid

kanseri şikayetine sahip deneklerde gözlenen EAA'daki artışa ait klinik anlam çözülememiştir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Soreafenibin Dağılımı: Yapılan in vitro çalışmalarda sorafenibin insan plazma proteinlerine bağlanması %99,5 seviyesinde ölçülmüştür. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Soreafenibin Biyotransformasyonu: Başlıca karaciğerde metabolize olan sorafenib CYP3A4 enziminin öncülük ettiği bir oksidatif reaksiyon ile yıkılır ve UGT1A9 enziminin öncülüğüyle de glukuronik aside yıkılır. Sindirim sistemi içerisinde bakteri kaynaklı glukuron aktivitesi ile de sorafenib konjugatları yıkılabilir. Böylelikle konjuge olmayan sorafenib tekrar emilmiş olur. Sorafenib alınmasına eşlik eden neomisin verilmesi bu süreci engeller ve ortalama sorafenib biyoyararlanımı %54 oranında düşer. Kararlı haldeki sorafenib, plazmada mevcut olan kendisi ve türevlerinin toplamının yaklaşık %70-85'ini oluşturur. Sorafenibe ait sekiz farklı metabolit tanımlanmış olup bunlardan beşine plazmada rastlanmıştır. Plazmada yer alan esas metabolit, olup sorafenibe benzer bir in vitro potens göstermektedir. Piridin N-oksit metaboliti kararlı durumda metabolitlerin ortalama %9-16'sını oluşturur. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Soreafenibin Eliminasyonu: Oral yolla alınan çözelti formundaki 100 mg sorafenibin, alımından 14 gün sonra %96 oranında vücuttan atıldığı, bu miktarın %77'sinin gaita, %19'unun ise idrar yolu vasıtasıyla, glukuronize metabolitler şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Alınan sorafenib miktarının %51'i oranındaki metabolize olmamış sorafenib, gaitada bulunmasına rağmen idrarda bulunmamaktadır. Bu durum, metabolize olmamış sorafenibin atılımının safra yolu ile de gerçekleştiğine işaret etmektedir. Sorafenibin atılım yarı-ömrü 25 ila 48 saat aralığındadır. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

Hastalarda gözlenen karakteristik özellikler:

Yaşlılarda:

65 yaş üzeri hastalarda yaşa bağlı doz ayarlamasına gerekli değildir.

Böbrek ve/veya karaciğer fonksiyon bozukluğuna sahip hastalarda:

Hafif, orta seviyede böbrek fonksiyon yetersizliği olan ya da diyaliz gerekli olmayan ancak ağır böbrek yetmezliği çeken hastalarda doz ayarlamasına gerek duyulmadığı gösterilmiş olmakla birlikte diyaliz tedavisi alan hastalarda sorafenib alımına dair bulgu mevcut değildir.

Böbrek fonksiyonlarında bozukluk riski taşıyan hastalarda sorafenib alımı sonrası sıvı dengesinin ve elektrolit düzeylerinin kontrol edilmesi önerilmektedir.

‘Child-Pugh-A veya B’ seviyesinde karaciğer fonksiyon yetersizliğine sahip hastalar için doz ayarlamasına gerek olmadığı gösterilmiştir ancak ‘Child-Pugh-C’ seviyesinde fonksiyon yetersizliğine sahip hastalara ait bulgu mevcut değildir. Şiddetli karaciğer yetmezliği olan hastalarda, atılımın temel olarak karaciğer yoluyla gerçekleşmesinden dolayı, ilaca karşı gösterilen sistemik maruziyet artabilir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

CYP3A4 gen tipleri:

CYP3A4 indükleyicileri: 5 gün süreyle rifampisin uygulanmasını takiben tek doz sorafenib uygulanması sorafenibin EAA değerinde yaklaşık %37’lik bir düşüşe sebep olmuştur. ‘CYP3A4’ aktivitesinde veya glukuronidasyonda artışa sebep olabilecek diğer indükleyiciler de (örn. ‘Sarı kantaron bitkisi ekstesi, Phenytoin, Carbamazepine, Phenobarbital ve Dexamethasone), sorafenibin yıkımını artırarak dolaşımdaki sorafenib konsantrasyonlarında düşüşe sebep olabilirler. ‘CYP3A4 inhibitörleri:’ Sağlıklı erkek deneklerde yapılan bir çalışmada etkili CYP3A4 inhibitörü olan ketokonazolun 7 gün, günde bir sefer deneklere uygulanması sonucu, deneklere verilen 50 miligram sorafenibin sonrası EAA değerinin ortalamasını değiştirmedeği gözlenmiştir. Bu çalışma sorafenib ve ‘CYP3A4’ inhibitörleri arasında klinik farmakokinetik bir etkileşim olmadığını göstermektedir. ‘CYP2B6, CYP2C8 ve CYP2C9’ substratları: in vitro ortamda yapılan çalışmada ‘CYP2B6, CYP2C8 ve CYP2C9’ sorafenib tarafından benzer şekilde inhibe edilmiştir. Buna ilaveten yapılan klinik farmakokinetik çalışmalarda 400 mg sorafenibin günde iki doz alımına ilaveten siklofosfamid (CYP2B6 substratı) veya paklitaksel (CYP2C8 substratı) uygulaması klinik olarak anlamlı bir inhibisyon göstermemiştir. Elde edilen veriler, sorafenibin önerilen dozu olan günde iki kez 400 mg alımının ‘CYP2B6 veya CYP2C8’in’ in vivo inhibitörü olmayabileceğine işaret etmektedir. İn vitro koşullarda Sorafenib ‘CYP2B6’yı 6 ve CYP2C8’i’ ise 1-2 µM Ki değerleri ile inhibe ettiği gösterilmiştir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

1.2.2.3. Sorafenib’in Kullanımı:

‘İnterferon alfa ve interlökin-2’ tedavisine cevap alınamayan veya bu etken maddeleri içeren tedavilerin yan etkiler sebebiyle uygulanamadığı durumlarda, metastatik renal hücreli karsinoma (mRHK) tedavisinde sorafenib kullanılması endikedir. Daha önceki tedevide

VEGF-TKİ gibi hedefe yönelik bir tedavi uygulanmamış cerrahi ve radyoterapi gibi lokal tedavi edilemeyen veya bu tedaviler sonrası progresyon gösteren, radyoaktif iyot tedavisine dirençli lokal relaps veya metastatik diferansiye tiroid kanserlerinde monoterapi olarak progresyona kadar kullanımı endikedir. Progresyon sonrasında kombinasyon veya monoterapi olarak kullanımı uygun değildir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

1.2.2.4. Sorafenib'in Yan Etkileri:

Sorafenib kullanımına eşlik eden en önemli zararlı ve istenmeyen etkiler, 'miyokard enfarktüsü/iskemisi', gastrointestinal perforasyon, sorafenib kullanımının tetiklediği hepatit, hemoraji, yüksek tansiyon ve buna bağlı ataklar olarak listelenebilir. Daha geniş kapsamıyla bu reaksiyonlar ishal, halsizlik, saçkıran, çeşitli enfeksiyonlar, el ve ayaklarda gözlenen deri reaksiyonları ve döküntüler, kilo kayıpları ve iştah kaybı, mide bulantısı, gastrointestinal ve abdominal ağrı, yüksek tansiyon ve hemoraji olarak tanımlanabilir. Yapılan klinik çalışmalarda veya ilacın piyasaya verilmesi sonrasında kullanıcılardan gelen geri dönüşler ile saptanan tüm istenmeyen etkiler, sistem-organ sınıfı (MedDRA) ve sıklık derecesine göre listelenmiştir.) (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

1.2.2.5. Sorafenib'in Kontrendikasyonları:

Sorafenib, bu etken maddeye karşı ciddi aşırı duyarlılığı olduğu tespit edilen hastalarda kontrendikedir. Karboplatin ve paklitaksel ile kombine edilmiş Sorafenib kullanımı, skuamöz hücreli akciğer kanseri olan hastalarda kontrendikedir. (RX Media Pharma®, 2023; RxList, erişim tarihi: 20.11.2023)

1.3.Sorafenib Tayini İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri:

Gabriela Wiergowska ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada, YBSK ters faz metodu, 40 °C sıcaklıkta bir oktadesil silika kolon (3 µm gözenek çapı, 50 mm kolon boyu ve 4,6 mm iç çapa sahip) kullanılmıştır. 0,02 M 'sodyum dihidrojen fosfat' ve 'asetonitrilden' (35:65, h/h) oluşan izokratik hareketli faz, 0,45 µm'luk bir filtreden süzülerek kullanılmıştır. Hareketli faz 1,5 mL/dakika akışla sisteme verilmiş ve standart ve numune çözeltilerinden 5 µL sisteme enjekte edilmiştir. Tespit dalga boyu 266 nm ve alıkonma süresi 2 dakikadır. Tespit dalga boyunun seçimi, sorafenib'in (266 nm) UV spektrumundaki en uzun dalga boyundaki absorpsiyon bandının maksimum konumuna dayanmıştır. Kromatografik yöntem, (ICH) Q2(R2) Kılavuzu, Tanım ve Metodoloji'ye göre numunelerin eş zamanlı analiziyle doğrulanmış ve doğrulama parametreleri özgüllük, doğrusallık ve kararlılık olarak

değerlendirilmiştir. Doğrusallık regresyon verileri ve yanıt faktörlerinden (pik alanların ve analit konsantrasyonlarının oranları) BSS (bağıl standart sapma) belirlenmiş ve değerlendirilmiştir. Standart eğriye ait korelasyon katsayısı 0,997 ve BSS %1,2 olarak saptanmıştır. Maksimum formda çözücülerden veya filtrelerden sorafenib etkileşimi gözlenmemiştir.

İsmail Khan ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, YBSK sistemi; bir pompa, on-line vakumlu gaz giderici, otomatik numune alıcı, kolon fırını, bir UV/VIS dedektör ile donatılmıştır. Sorafenib ve paklitaksel analizi, kartuş ön koruyucu kolon RP18 (30 cm, 4,6 mm ve 10 µm) ve Discovery HS C18 kolonu (25 cm, 4,6 mm ve 5 µm) kullanılarak yapılmış ve analitler 245 nm'de tespit edilmiştir. Analiz 25°C kolon fırın sıcaklığında, izokratik olarak (35:65, h/h) oranında TFA (%0,025) ve Asetonitril karışımı kullanılarak, 1,0 ml/dakika akışla ayırım sağlanmıştır. Piroksikam (0,1 mg/mL), Sorafenib ve paklitaksel tayini için iç standart olarak kullanılmıştır ve enjeksiyon hacmi 50 µl olarak belirlenmiştir. Önerilen analiz yönteminin, hem analitlerin hem de iç standardın tepe noktaları iyi çözüldüğünden oldukça seçici ve spesifik olduğu gözlenmiştir. Yöntemin doğrusallığı, standart karışımların ve eklenmiş plazma numunelerinin kalibrasyon eğrisinden belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu saptanmıştır. Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bazında değerlendirilmiş olup gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik açısından ara kesinlik belirlenmiştir.

Ahmed A. Abdelgalil ve ark. (2017), tarafından yapılan çalışmada metanol içinde çözülmüş sorafenib serbest bazının UV absorpsiyon spektrumları gösterilmektedir. Spektrumlar, 10 mm eşleştirilmiş kuvars hücreler ve Shimadzu UV-1601PC- çift ışık yollu UV-VIS spektrofotometre kullanılarak kaydedilmiştir. Absorpsiyon spektrumları, orta tarama hızı ve 2 nm yarı genişliği kullanılarak 200 ila 400 nm arasında kaydedilmiştir. Bulk olarak ve tablet dozaj formlarında sorafenib'in belirlenmesi için bir UV-Spektrofotometrik yöntem rapor edilmiştir. Bu yöntemde, sorafenib 265 nm'de doğrudan absorbans yöntemi ile tayin edilmiş ve asetonitril içinde molar absorptivitesi 5.254 olarak tespit edilmiştir.

Miki Shimada ve ark. (2014), tarafından yapılan çalışmada, kromatografik sistem (Agilent 1100), degazer üniteli pompa, otomatik numune alıcı ve bir UV detektörden oluşmuştur. Ayırım 'inertsil ODS-3' kolonda (2,1 mm iç çap, 150 mm kolon boyu ve 5 µm parçacık büyüklüğüne sahip) 20 mM amonyum asetat tamponu (pH 4,0)/asetonitril (30,0:70,0, h/h), hareketli faz bileşimi ile sağlanmış, akış hızı 200 µL/dk, tespit dalga boyu 265 nm ve analiz süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. IS olarak tolnaftat kullanıldığında, sorafenib ve

sorafenib N-oksidin bağıl geri kazanımlarının yaklaşık %100 olduğu, doğrusallık değerlendirmesi için en iyi ağırlıklandırma faktörü 1/(tepe alan oranı) olduğu, altı standart eğrinin, 0.03-30 µg/mL'lik bir konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, tüm lineer regresyon çizgilerinin korelasyon katsayıları 0,998 ile 1,000 arasında değişmekte olduğu, tüm konsantrasyonlarda, testler arası kesinlik sorafenib için %3,8'den ve sorafenib N-oksit için %9,3'ten düşük olduğu, test içi ve testler arası doğruluğun, sorafenib için -7,6 ile %5,8 ve sorafenib N-oksit için -%6,9 ile -3,3 arasında değiştiği gözlenmiştir.

B. Blanchet ve ark. (2009) tarafından, 10 kanser hastasından ve ciddi böbrek veya karaciğer yetmezliği olan 10 hastadan alınan plazmada YBSK kullanılmıştır. Hastanede yatan 30 hastadan ve 10 kanser hastasından alınan plazmada ilaçlara bağlı hiçbir etkileşim olmaksızın mükemmel bir kromatografik özgüllük gözlenmiştir. Doğrusallık değerlendirmesi için Levene istatistik testi, her konsantrasyon standardının varyansları arasında önemli bir fark ($P < 0.05$) göstermiştir. Varyans, konsantrasyonla orantılı olarak büyüdüğünden, en iyi ağırlıklandırma faktörü 1/(tepe alan oranı) olarak, altı standart eğri, 10.38 ± 0.87 ($CV = \%8.4$) ortalama eğim ve kesişme noktası olarak 0.94 ± 0.34 olan, 0.5–20 mg/L'lik bir konsantrasyon aralığında doğrusal olarak ve ortalama korelasyon katsayısı 0.997 ± 0.002 olarak saptanmıştır. Tüm seviyelerde, testler arası kesinlik sırasıyla %7 ve %10'dan düşük olarak gözlenmiş, test içi ve testler arası doğruluk sırasıyla -%2,7 ila %2 ve -%3,1 ila %4,0 aralığında belirlenmiştir. TAS, en düşük kalibrasyon standart değerine ayarlanmıştır (0,5 mg/L, $CV = \%9,6$). Test edilen bir sonraki konsantrasyon olan 0,25 mg/L, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile belirlenememiştir. Sorafenib'in 0,5, 3 ve 20 mg/L'deki mutlak geri kazanımları sırasıyla %68,1 $\pm$ %6,1, %81,8 $\pm$ %3,9 ve %87,6 $\pm$ %5,5 olarak saptanmış ve internal standartın mutlak geri kazanımı, kullanılan konsantrasyonda (5 mg/L) %87,9 $\pm$ 4 olduğu gözlenmiştir.

1.4. Tez Çalışmasında Gerçekleştirilen Yöntemler

1.4.1. Kromatografik Yöntemler

1.4.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Temel İlkeleri

Kromatografik yöntemler birden fazla karışmayan fazlar arasındaki dağılım yardımıyla bileşenlerin ayrılması prensibine dayanır. Kromatografik yöntemlerde karışmayan gaz, sıvı ve katı fazların farklı kombinasyonları kullanılabilir. Burada birbirlerinden ayrılacak türlerin farklı fazlarda farklı hızlarda hareket etmesi ayrımı sağlar. Bu sayede birbirlerine yakın fiziksel ya da kimyasal özelliğe sahip bileşenler de birbirlerinden ayrılabilir. 11

Dağılma Katsayısı:

Dağılma katsayısı, bileşenlerin hangisinin sistemden daha önce ya da sonra ayrılacağı hakkında bilgi verir. Matematik diliyle ifade edildiğinde, yüksek K değerine sahip bileşen sabit fazda daha yüksek derişime sahip olacak, bundan dolayı kromatografik kolonda daha yavaş yol alacaktır. Bu durumun tersi düşünöldüğünde daha küçük K değerine sahip bileşen ise hareketli faz içerisinde daha yüksek konsantrasyona sahip olacak ve kromatografik kolonu daha önce terk edecektir. Bileşenlerden kromatografik kolonu erken terk eden keskin bir pik gözlenmesine, geç terk eden ise yayvan pike sebep olur. Ancak karışım içindeki bileşenler, sahip oldukları K değerlerinin farklı olmasıyla kromatografik kolondan farklı zamanlarda elüe olurlar. Bu durum kromatografik ayırımın temelini teşkil eder.

$$K = C_{X_s} / C_{X_h}$$

K: Dağılma katsayısı

C_{X_s} : Sabit fazdaki konsantrasyon

C_{X_h} : Hareketli fazdaki konsantrasyon (Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Kapasite Faktörü:

İncelenen bileşenin fazlar içerisinde bulunan mol sayılarının oranıdır ve matematiksel ifadesi aşağıdaki gibidir:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_h} = \frac{K V_s}{V_h}$$

V_s : Kolonda bulunan sabit faz hacmi

V_h : Kolonda bulunan hareketli faz hacmi

Kapasite faktörünü alıkonma zamanları ile de hesaplayabiliriz;

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

(Erdik ve ark.,2001, s:99; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

Teorik Plaka Sayısı:

Piklerin kolondan ayrılma zamanları uzadıkça keskinliklerinin düşmektedir. Tayinde piklerin olabildiğince dik ve simetriye sahip olması beklenmektedir. Pikler ne kadar dik ve keskin ise kolonun o kadar iyi ve etkin çalışmaktadır, bu etkinlik, teorik plaka sayısı (N) olarak ifade edilir ve aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{t_w} \right]^2$$

t_w : Pik taban genişliği

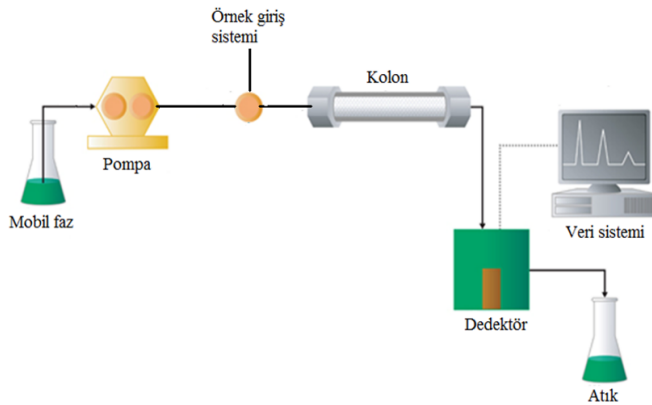
Teorik tabaka sayısı, kolon uzunluğu (L) arttıkça artmaktadır. Ama kolon uzunluğunun artması, tayin süresini uzatmaktadır.

Teorik tabaka sayısı (N) ile teorik tabaka yüksekliği (H) arasında matematiksel olarak ters bir ilişki söz konusudur. Kolonun verimi için H değeri olabildiğince düşük olmalıdır.

$$H = \frac{L}{N} = \frac{1}{16} \left[\frac{t_w}{t_R} \right]^2$$

(avesis.gazi.edu.tr, erişim tarihi: 22.11.2023) (Erdik ve ark., 2001, s:94-95; Yıldız ve ark., 1993, Bölüm 21)

1.4.1.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi



Şekil 1.1. Temel bileşenleri ile tipik bir YBSK Cihazı (Kalkır F (2022), erişim tarihi: 22.11.2023)

Bir karışımdaki maddelerin birbirlerinden ayrılarak, nitel ve nicel analizlerinin yapıldığı bir analiz yöntemidir. Bu yöntemde genellikle silikadan imal edilmiş, yüzeyinde farklı kimyasal modifikasyon işlemleri uygulanmış katı faz (sabit faz) içeren bir kolon ve kolondan yüksek basınç yardımı ile geçirilen ve sıvı bir faz (hareketli faz) içermektedir. Yöntemde birbirlerinden ayrılması beklenen molekülleri içeren çözelti hareketli faz ile birleştirilerek kolona iletilir, bu bileşenlerden her biri sabit faz ile moleküler etkileşime girer ancak etkileşim seviyesi (alınma) her bir bileşen için farklı olacaktır. Böylelikle farklı kimyasal özelliklere sahip bileşenler kolon içerisinde farklı hızla ilerleyerek kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Birbirlerinden farklı kimyasal özelliklerine göre ayrılan bu bileşenler kolondan hemen sonra yer alan dedektörde bir yanıt oluştururlar. Dedektör seçimi analizi yapılan bileşene yanıt verme prensibine dayanır. Örneğin ışık absorplayabilen türler için UV-Vis ya da DAD/PDA dedektör kullanılırken elektrokimyasal yanıt oluşturan bir analit ECD dedektörde, floresan özellik gösteren bir analit de floresan dedektörde analiz edilir. Polarize ışığı kıran analitler refraktif indeks dedektörü (RID) ile analiz edilirken bileşenler sadece basit iyonlar ise dedektör olarak iletkenliği ölçen bir sistem de seçilebilir. (dergipark.org., erişim tarihi: 23.11.2023)

YBSK cihazı ile yoğun koşullar sağlanarak farklı bileşenleri içeren örneklerin nitel ve nicel analizleri yapılır, bu analizlerde referans/standart maddeler kullanılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanır ve daha sonra analizi yapılacak molekülü de içeren test numunesi çözeltileri hazırlanarak sisteme enjekte edilir. Daha sonra dedektörde oluşan yanıtlar değerlendirilir.

Tipik bir YBSK cihazı;

- Hareketli faz içeren şişeleri taşıyan bir rezervuar,
- Hareketli faz şişelerden sisteme akışını sağlayan pompa ünitesi,
- Referans ve numune çözeltilerini sisteme aktaran bir oto örnekleyici sistem veya enjektör ünitesi,
- Kromatografik ayırımın gerçekleştiği bir analitik kolon ve bu kolonu sabit sıcaklıkta tutan bir kolon fırını,
- Analite duyarlı dedektör/ler,
- Dedektörde üretilen sinyallerin işleneceği ve elde edilen verilerin depolanacağı yazılımı içeren bilgisayar sisteminden oluşur.

Pompa: Pompanın ana görevi hareketli fazları yüksek basınçla sisteme göndermektir. Pompa bu işlemi sabit ya da değişken akış hızları ile yapar. YBSK pompaları çekebildiği hareketli faz adedi ve bu fazları karıştırma yeteneklerine göre de izokratik (tek kanallı), ikili gradyen (çift kanallı ve karıştırıcı) ve dörtlü gradyen (dört kanallı karıştırıcı/karıştırıcısız) üretilir.

İzokratik çalışmada hareketli faz bileşenleri belirli oranda önceden karıştırılıp hazırlanır, gradyen çalışmada ise mobil faz oranları zaman içerisinde değiştiği için pompa bu oranları ayarlamakla da yükümlüdür. Bu yaklaşım özellikle farklı zaman aralıklarında ayırmada farklılık istendiğinde kullanılır. (acikders.ankara.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

Örnekleyici: Örnekleyici ya da oto örnekleyici analit içeren çözeltilerin akış sistemine dahil olarak ayırımın gerçekleşeceği kolona iletilmesini sağlar. Örnekleyici sistemi manuel olabildiği gibi tamamen otomatize de olabilir. Manuel örnekleyici analit içeren çözeltinin bir şırınga ve valf yardımıyla sisteme gönderilmesini sağlar. Oto-örnekleyici ise bu işlemleri yazılımdan aldığı komutlar ile kendisi yapmaktadır. Bazı oto örnekleyicilerin analit bileşenlerini içeren çözeltileri ısıtma, soğutma, bu çözeltileri reaktif ya da hareketli faz ile seyreltme ve/vaya karıştırma özellikleri vardır.

Kolon ve Kolon Fırını: Sabit fazı muhafaza eden kolon, analit moleküllerinin farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri yardımıyla birbirlerinden farklı sürelerde sistemi terk ederek ayırt edilmelerini sağlar. Kolonlar içerdikleri sabit fazdan bağımsız olarak paslanmaz çelik, PEEK ve camdan imal edilebilir, ancak ayırımın niteliği içerdiği dolgu maddesine bağlıdır. En yaygın kolon dolgu malzemesi belirli çap ve gözenek büyüklüğüne sahip silika partiküllerdir, bu partiküller üretimlerinden sonra yüzeydeki hidroksi grupları üzerinden farklı fonksiyonel grupların bağlanması ile son hallerini alırlar. Kolon fırını ise hem kolonu muhafaza etmek hem de analiz boyunca kolon sıcaklığını sabit tutmak için kullanılan bir birimdir. Kolon fırınları blok ısıtıcılı, bir rezistans ve fan ile çalışan ve peltier sistemi ile sıcaklığı ayarlayan sistemler olarak üretilirler. (acikders.ankara.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

Detektörler: Başlıca detektör tipleri ve çalışma prensiplerine aşağıda ifade edilmiştir.

UV detektör, kolondan çıkan hareketli faz ve analitleri içeren çözeltinin içerisinde geçerek absorbansın ölçüldüğü bir detektör türüdür. UV (veya VIS) ışık ölçüm hücresi içerisinde geçtikten sonra şiddetinde bir azalmaya uğrayarak detektörün sinyal yanıtı oluşturan bileşenine ulaşır. Prensip olarak spektrofotometre ile benzerlik gösterir.

Refraktif indeks detektörü ise detektöre ulaşan tüm bileşenlerin toplam refraktif indisini ölçer. Bundan dolayı bu detektör en az hassas detektörlerden biri olarak değerlendirilir. Ayrıca çevre sıcaklığı, basınç, akış hızında gerçekleşen değişiklikler de detektörün ürettiği sinyal üzerinde etkilidir.

Flüoresans detektör ise oldukça hassas bir detektördür ancak oluşturduğu yanıt dar bir derişim aralığında doğrusaldır. Ayrıca bu detektör flüoresans özelliğe sahip olmayan analitler için kullanım kısıtlamasına sahiptir. (acikders.ankara.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

Ultra performanslı sıvı kromatografi (UPLC); teorisi ve çalışma prensibi, içerdği departmanlar açısından YBSK ile çok büyük benzer özellikler gösterir ancak farklı boy ve partikül büyüklüğüne sahip kolon, daha ileri seviyede pompa ve iç akış hattına sahiptir. UPLC cihazları kendilerine özel üretilen kolonlardan dolayı çok daha yüksek basınç altında çalışırlar, bu yüzden pompa ve hatları bu basınçta çalışacak şekilde dizayn edilmiştir. Nispeten daha kısa ve küçük parçacık içeren kolonlar ile analiz sürelerinde ve düşük çalışma akışı nedeniyle kullanılan çözücü ve kimyasal madde miktarında tasarruf sağlarlar. (acikerisim.sakarya.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

1.4.1.2.1. YBSK Yönteminin Avantajları

- Yeni nesil detektörlerin kullanılmasından dolayı duyarlılık fazladır.
- Tayin süresi diğer dolaylı analizlere göre kısadır,
- Kullanıcı hataları minimize edilmiştir,
- Bir YBSK kolonu birden farklı molekül türleri için ayırım seçenekleri sunabilir ve uygun şekilde kullanıldığı ve saklandığında yenisini edinmeye gerek duymaksızın defalarca kullanılabilirler.

Gaz kromatografi ile kıyaslandığında hareketli fazın sıvı olması ve ayırma katkı sağlaması açısından ve de daha düşük sıcaklıklarda çalışılması gerektiğinden (yaygın şekilde kullanılan asetonitril ve metanolün kaynama sıcaklıkları sırası ile 82 °C ve 64,7 °C'dir), avantajlar sunar. (acikerisim.sakarya.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

1.4.1.2.2. YBSK Yönteminin Dezavantajları

- Nitel analiz için tek başına yeterli olmayabilir,
- Tüm analitleri birbirlerinden ayırmak her zaman mümkün olmayabilir,
- Düşük sıcaklıklarda gaz fazına geçen analitler için uygun değildir,
- Ekipmanda yıpranan parçalar olduğu için bakım maliyetine ihtiyaç duyar, bu durum bazen analizi de olumsuz etkileyebilir,
- UPLC metoduna göre daha uzun analiz süreleri ve daha fazla kimyasal madde tüketimi söz konusudur. (acikerisim.sakarya.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)

1.4.2. Spektrofotometrik Yöntem

Çözelti içerisindeki türlerin farklı oranlarda ışık absorplamasına dayanan bir yöntemdir. Teknik olarak ışık elektromanyetik bir radyasyon olarak tanımlanabilir ve bir frekans (ν) veya dalga boyuna (λ) sahiptir.

Işığın sahip olduğu kinetik enerji aşağıdaki formül ile ifade edilir;

$$E = h \cdot \nu \text{ veya } E = h \cdot c / \lambda \text{ burada;}$$

$$h = 6,626 \times 10^{-27} \text{ erg x s}$$

$$c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s (acikders.ankara.edu.tr, erişim tarihi: 23.11.2023)}$$

1.4.2.1. Spektrofotometrik Yöntemlerin Temel Prensipleri ve Beer-Lambert

Yasası

Belirli bir dalga boyundaki ışığın çözelti içerisindeki bir tür tarafından absorplanması bu türün enerjiyi absorbe etme yeteneğine sahip olduğunu gösterir, absorplanan ışık miktarı ise bu türün ışık absorplama yeteneği, çözelti içindeki bu türün derişimi ve ışığın bu türle etkileşme miktarına bağlıdır. Işığın çözelti içerisindeki türler tarafından absorplanan kısmının dalga boyuna karşılık bir fonksiyon olarak grafiğe geçirilmesi ile de spektrum elde edilir.

UV ve görünür bölge spektrumunda dalgaboyuna karşılık absorbans değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen spektrumda absorbansın en yüksek olduğu dalgaboyu değeri $\lambda_{\max}$ olarak adlandırılır ve bir girişim söz konusu değilse analitik çalışmalar bu dalgaboyunda gerçekleştirilir. Benzer şekilde kızılötesi spektrumunda ise % geçirgenlik değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilir ancak absorpsiyonun en fazla olduğu dalgaboyunda geçirgenlik minimum bir değer alır.

Bu yaklaşımla, ışığın absorplanması prensibine dayanarak spektrofotometre adı verilen cihazlar geliştirilmiştir. Bu cihazlarda ölçüm ışık absorplayan türler içeren çözeltilerden geçirilen ışığın başlangıçtaki şiddeti (I_0) ile çözelti içerisinde geçtikten sonraki şiddeti (I) arasındaki farkın ölçümü ve bu bilginin işlenmesine dayanır. (Kılıç ve ark., 2004, Bölüm 24.)

Geçirgenlik (Transmittans):

% Geçirgenlik: $T = I/I_0$ şeklinde ifade edilir,

Spektrofotometrik çalışmalar Beer ve Lambert tarafından ifade edilen bazı prensipler doğrultusunda yapılır ve bu prensipler Beer-Lambert- yasası olarak adlandırılır. Bu yasa absorbans ile derişim arasındaki ilişkiyi açıklar. Beer-Lambert yasası, aşağıdaki şekildedir:

$$A = \log I_0/I = a \times b \times C$$

A: Ölçülen absorbans değeri

I_0 : Numuneye gönderilen ışığın şiddeti

I: Örnekten geçerek detektöre ulaşan ışığın şiddeti

a: Absorpsiyon katsayısı

b: Işığın örnek çözeltisi boyunca aldığı yol, cm

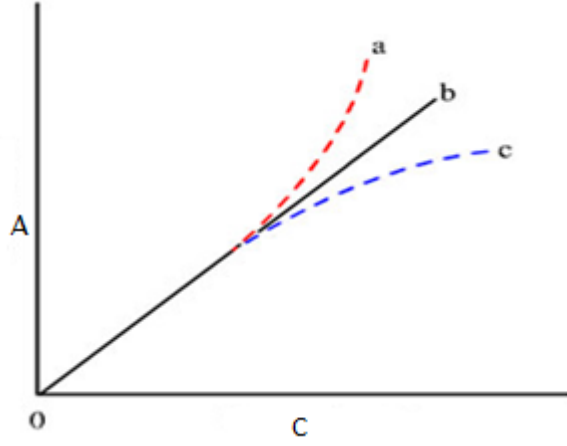
C: Derişim (g/L veya M)

Absorpsiyon katsayısı ya da absorptivite; bir atom, iyon veya molekül için ışık absorplanması belirli bir dalga boyunda gerçekleştirildiğinde absorplanan ışık miktarı ile derişim arasında bir ifade oluşur ve burada sabit bir sayı gözlenir. Eğer formülde derişim değeri olarak molarite kullanılıyorsa molar absorptivite adını alır ve ϵ ile ifade edilir. Dolayısı ile absorpsiyon katsayısı ve molar absorptivite arasında aşağıdaki formülle ifade edilen bir ilişki vardır.

$$\epsilon = a.MA$$

MA: İlgili molekülün moleküler ağırlığıdır.

Beer-Lambert- yasası, ölçülen absorbans değerlerine karşılık konsantrasyonun grafiğe geçirilmesi elde edilen bir doğru olduğunu, yani absorplanan ışık miktarının doğrudan derişimle orantılı olduğunu ifade eder. Ancak bu doğrusal ilişkiden sapmalar mevcuttur. Bu sapmaların çeşitli sebepleri ve analize negatif (c) ya da pozitif (a) katkıları vardır. Sapmalar başlıca; ışık absorplayan türün çözücüyle etkileşimi, çözücü içerisinde zamanla bozunması ya da diğer türlerle reaksiyona girmesi gibi kimyasal sebeplerden kaynaklanabildiği gibi çözelti içerisinde çözünmemiş, asılı parçacıklar bulunması, çözücünün zamanla buharlaşması nedeniyle derişimin zamanla değişmesi gibi fiziksel sebeplerden de kaynaklanabilir. Ayrıca absorbans ile derişim arasındaki doğrusal ilişki artan derişimle son bulmaktadır. Bu yüzden spektrofotometrik çalışmada bu ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığını bulmak ve bu aralıkta çalışmak gerekmektedir. (Kılıç ve ark., 2004, Bölüm 24.)



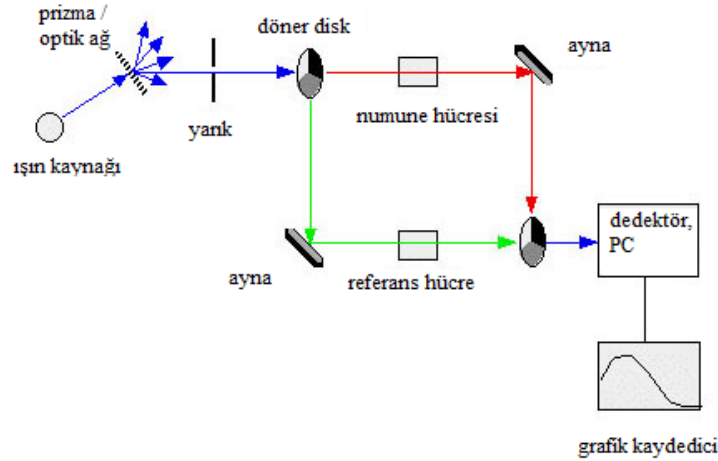
Şekil 1.2. Beer- Lambert yasasından sapmalar.

1.4.2.2. (UV-VIS) Mor ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

UV-VIS bölge spektroskopisi, diğer adıyla elektronik spektroskopisi, elektronik geçiş spektrumlarının gözlemlendiği, 200 -4 00 nm aralığındaki UV bölge ve 400 -7 00 nm aralığındaki görünür bölgeyi ifade eder. Adından da anlaşılacağı üzere görünür bölgede absorpsiyon yapan türler renklidir ve absorpladığı dalga boyuna karşılık gelen renk bileşiğinin sahip olduğu rengin tamamlayıcı rengindedir.

UV-VIS bölge spektroskopisinde, ışık ile uyarılan elektronlar, ışığın enerjisinin bir kısmını soğurarak bir elektronik seviyeden diğerine geçerler. Bu davranış atomlar ve iyonlar için karakteristik ve belirli bir düzende gerçekleşir ve bu şekilde elde edilen pikler keskindir ancak moleküller için elektronik emilimin yanı sıra molekülde gözlenen dönme ve titreşme hareketleri de ışık emilmesine katkıda bulunarak elde edilen piklerin keskinliği azalmasına neden olur. Işık absorplanması nedeniyle oluşan pik ışık absorplayan türde mevcut elektronun bulunduğu yörüngeyi terk ederek daha üst enerji seviyesindeki bir yörüngeye çıkması nedeniyle oluşmaktadır. Bu olay genellikle molekülün belirli bir fonksiyonel grubuna ait bir davranıştır ve bu fonksiyonel gruplar **kromofor** olarak adlandırılır. Aynı molekülde birden fazla kromofor grup var ise ölçülen absorpsiyon bu grupların her birinden kaynaklı absorpsiyon değerlerinin toplamına eşit olacaktır, bu davranış **toplanabilirlik kuralı** olarak isimlendirilir. Bu kural birden fazla ışık absorplayan tür içeren çözeltiler için de geçerlidir. (Erdik ve ark., 2001, s:735-736)

1.4.2.3. UV-VIS Spektrofotometrenin Temel Bileşenleri



Şekil 1.3. Temel bileşenleri ile çift ışık yollu spektrofotometre cihazı (Clark, 2006, erişim tarihi: 23.11.2023).

Basit bir Spektrofotometre cihazı aşağıdaki bileşenleri içerir;

Işık kaynağı: UV-VIS bölge için sürekli ışıma yapan kaynaklar kullanılmaktadır. UV bölge için Hidrojen (H_2) ve Döteryum (D_2) ve elektriksel boşalım lambaları yaygın olarak kullanılan ışık kaynaklarıdır ve 180 - 380 nm arasında ışık üretme kabiliyetine sahiptirler. Ancak, UV-VIS bölgenin tümünde (150-700 nm) iş görebilen Ksenon (Xe) ve Civa (Hg) buhar lambaları da kullanılmaktadır. IR bölge (320-3000 nm) için ise Tungsten (W) flaman lambası kullanılır. (biyokure.org, erişim tarihi: 23.11.2023)

Monokromatör: Prizma ve optik ağ yardımı ile çoklu dalgaboyuna sahip ışığı tek dalgaboyuna döndürmek amacıyla dizayn edilmiş düzeneklerdir. (biyokure.org, erişim tarihi: 23.11.2023)

Yarık (Slit): Monokromatörde elde edilen ışık tayfında istenilen dalgaboyundaki ışığın geçmesine izin verecek şekilde dizayn edilmiş yarıktır. Yarığın düzgün çalışması elde edilen spektrumun şekli, pikin yapısı ve keskinliği ve ölçüm duyarlılığı, sinyal/gürültü oranı gibi parametreleri doğrudan etkiler. (Clark, 2006, erişim tarihi: 23.11.2023).

Ayna: Çift ışın yollu (double beam) cihazlarda, monokromatörden gelip yarıktan geçen ışığı eşit şiddette iki parçaya bölerek ışık absorblayan türlere sahip numune/standart içeren hücreden ve çözücü ya da kör içeren referans hücreden aynı anda geçmelerini sağlayan düzeneklerdir. (İnce, 2012)

Ölçüm Küvetleri: Çalışılması düşünülen bölgeye göre seçilen, farklı maddelerden yapılmış, ışık yolu uzunluğu belirli ve sabit olan içerisine numune, standart, kör çözeltileri konulan kaplardır. Görünür bölgede çalışılacak ise bu bölgedeki ışığın geçmesine izin veren cam küvet kullanımı yeterli olurken hem UV, hem görünür hem de IR bölgedeki ışığı geçiren kuvartz hücreler diğer çalışmalar için daha uygundur. (İnce, 2012)

Çalışma Hücresi: Numune ya da standart içeren küvetlerin konduğu kısımdır. (İnce, 2012)

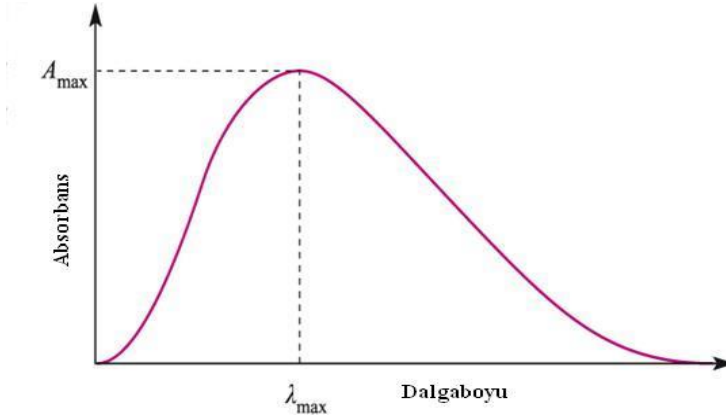
Referans hücre: Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, analiz boyunca çözücü ya da örnek körü içeren bir küvet ikinci hücrede tutularak dedektörün buradan gelen absorbanı sürekli ölçülen absorbanstan çıkarması sağlanır. Bu hücreye referans hücresi adı verilir. (İnce, 2012)

Dedektör: Işın kaynağından gelen ışığın başlangıç ve küvet içerisinden geçtikten sonraki şiddetini ölçerek çözeltinin ne kadar ışığı absorpladığını veya ışığın ne kadarını geçirdiğini ölçen kısımdır.

Dedektörler üzerine gelen ışığa karşı duyarlı, ışığın yoğunluğu ile orantılı sinyal üretme yeteneğine sahip ve kararlı olmalı, mümkün olduğunca kısa sürede cevap oluşturabilmelidir. (Gündüz, 1990; Bölüm 5)

1.4.2.4. Türev Spektrofotometri

Türev spektroskopi ışık absorplayan türlerin UV-Vis bölgede elde edilen spektrumlarının bir fonksiyon gibi düşünülerek türevlerinin alınması ilkesine dayanmaktadır. Bilindiği gibi bir fonksiyonun türevi; "fonksiyon artımının değişken artımına oranının bağımsız değişken artımı değiştiği ve sıfıra bir Limit olarak yaklaştığı zamanki limitinden oluşur" diye tarif edilir. Bu ifade türev spektrofotometrisinde orijinal spektrumlar bu mantıkla oluşturulan türev spektrumlarının kullanılmasına olanak sağlar. Türev eğrilerinin hazırlanması matematiksel işlemler gerektirdiğinden bu işlem cihaz yazılımı üzerinden ve bilgisayar desteği ile yapılır. Orijinal spektrumu oluşturan her bir noktadaki doğrusal davranışın türevinin hesaplanması ve bulunan sonuçların grafiğe geçirilmesi yani türev eğrilerinin oluşturulması oldukça zorlu bir süreçtir.



Şekil 1.4. Tipik bir UV-Vis spektrum

Yukarıda verilen grafik için, matematiksel bir “ $A = f(\lambda)$ ” fonksiyonu yazılabilir, ki fonksiyon asıl spektruma ait olan fonksiyondur. Daha sonra bu fonksiyonu ifade eden eğrinin herhangi bir noktasında alınan teğet eğimi, fonksiyonun bu nokta için oluşan türevi olacağından her nokta için elde edilen değerler tekrar grafiğe geçirildiğinde fonksiyonun her noktasında türev alınmış olur ve elde edilen yeni spektrum birinci türev spektrumu adını alır. (İnce, 2012)

Absorbansın λ değerlerine göre türevi alınırsa aşağıdaki gibidir:

$A = a \cdot b \cdot C$ (Beer-Lambert-Yasası)

$dA / d\lambda = -C \cdot b \cdot da/d\lambda$ (1. Derece için elde edilen türev eğrisi)

$d^2A / d^2\lambda = -C^2 \cdot b^2 \cdot (da/d\lambda)^2 - C \cdot b \cdot (d^2a/d\lambda^2)$ (2. Derece için elde edilen türev eğrisi)

$d^3A / d^3\lambda = -C \cdot b \cdot (d^3a/d\lambda^3) + 3 \cdot C^2 \cdot b^2 \cdot (da/d\lambda) \cdot (d^2a/d\lambda^2) - C^3 \cdot b^3 \cdot (da/d\lambda)^3$

(3. Derece için elde edilen türev eğrisi). ((Onur ve Yücesoy, 1983)

1.4.2.4.1. Türev Spektroskopinin Avantajları

Elde edilen türev eğrileri, orijinal spektrumda zor gözlenen ya da gözlenemeyen farklılıkları gün yüzüne çıkarır, böylelikle analizi yapılan madde ile ilgili kalitatif ve kantitatif yeni veriler elde edilebilir.

Türev spektrumları özgün spektrumlara kıyasla daha karakteristiktirler ancak bu yöntemle elde edilen spektral verilerin bir bölümü indirgenir, Örneğin bir çözeltinin spektrumunun türevi alındıkça veya türev derecesi artırıldıkça bazı karakteristik davranışların kaybolduğu görülür. Ancak bu bir dezavantaj değildir, çünkü türev spektrumları orijinal spektrumda görülmeyen yeni karakteristik maksima bölgeleri oluşmasına da neden olur, bu özellikle benzer bölgelerde absorbans veren türleri içeren karışım çözeltilerinin analizinde kolaylık sağlanabilir. Bu da yapılacak analiz işlemlerinde bir üstünlük sağlar. (İnce, 2012; Uyguner, 2010)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Piyasada Ticari Olarak Mevcut Olan Farmasötik Preparatlar

- “Nexavar® 200 mg Film Kaplı Tablet” (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti.)
- “Sofexan® 200 mg Film Kaplı Tablet” (Nobel İlaç San. ve Tic. A.Ş.)

2.2. Tez Kapsamındaki Kullanılan Cihaz ve Gereçler

-YBSK:

Cihaz: Dionex Ultimate Focused 3000, Diode Array Dedektör

Kolon: Phenomenex Luna® C8;(2) 5µm 4,6x50 mm

Analitik Terazi: Sartorius MSU224S-000-DU/2013

pH metre: Seven Compact pH/Ion S220

Ultrasonik ve Isıtmalı Su Banyosu: Ultrasonic LC 60 H

Manyetik Karıştırıcı: Wisestir Multi Hot plate

-Spektrofotometri:

Cihaz: Shimadzu UV 1601

Analitik Terazi: Sartorius MSU224S-000-DU/2013

Manyetik Karıştırıcı: Wisestir Multi Hotplate

2.3. Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler

-YBSK:

- Asetonitril (CH_3CN) Sigma-Aldrich Catalog No:34851
- Amonyum Asetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) Sigma-Aldrich Catalog No: A7262
- Asetik Asit (NH_4OH) (Merck) Sigma-Aldrich Catalog No:695092

-Spektrofotometri:

- Metanol (MeOH) Sigma-Aldrich Catalog No:34860

2.4. Tez Kapsamında Kullanılan Standartlar ve Referans Maddeler

- Sorafenib Tosylate (200 mg) USP Reference Standard Catalog No:1615876

2.5. YBSK Yöntemi ile Sorafenib Miktar Tayini

2.5.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

YBSK yöntemi için, yaklaşım olarak sorafenib'in izoelektrik noktası olan pH:3,8 için uygun tampon bileşenleri araştırılarak amonyum fosfat tamponu hazırlanmasına karar verilmiştir. Derişim olarak 0,02 M seçilmiştir. İlk denemeler tampon çözeltisi ve asetonitril (50:50; h/h) karışımının hareketli faz olarak kullanıldığı C8 ve C18 kolonlarda gerçekleştirilmiş, analiz süresini kısaltmak ve ideal pik şekline ulaşılabilmesi nedeni ile C8 kolon tercih edilmiştir. İlk denemede elde edilen pik ve pike ait spektrum Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Daha sonra hareketli fazda pH: $3,8 \pm 0,05$ olan amonyum asetat tampon: asetonitril (40:60; h/h) kullanılmış olup izokratik metotla bir deneme daha yapılmış, alıkonma zamanında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Elde edilen kromatogram ve sorafenib pikine ait spektrum Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Son olarak hareketli faz oranı amonyum asetat tamponu: asetonitril (30:70; h/h) olarak denenmiş ancak elde edilen kromatogramda sorafenib pikinin çözücü pikine çok yaklaşması ve spektrumun bozulmaya başlamasından dolayı bu orandan vazgeçilmiştir. Elde edilen kromatogram ve sorafenib pikine ait spektrum Şekil 3.3.'de verilmiştir.

Tüm bu denemelerden sonra dedektör dalga boyu 260 nm olarak belirlenmiş, akış hızı ise 1,0 mL/dk'dır. Kolon sıcaklığı 30°C'dir. Sorafenib Tosylate standardı hareketli faz içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmış, daha sonra stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak doğrusal olarak yanıt veren derişim aralığı belirlenmiştir. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinde de hareketli faz kullanılmıştır, bu çözeltiler YBSK viallerine 0,22 mikrometre naylon filtreden süzöldükten sonra konulmuştur. Çözeltiler, buzdolabı içerisinde ve karanlıkta ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) saklanmıştır.

2.5.2. Deneysel Süreç

2.5.2.1. Kalibrasyon Grafiği için Çözeltiler

Ticari preparat Nexavar 200 mg film tabletin 200 mg Sorafenib'e eşdeğer (274 mg) "Sorafenib Tosilat" içermesinden hareketle, 50 mg Sorafenib' e eşdeğer Sorafenib Tosilat (68,5 mg)* 100

mL'lik balon jojeye alınmış, dilüent olarak seçilen 40:60 (h/h) tampon:asetonitril karışımında çözünerek hacmine tamamlanmıştır, elde edilen stok çözeltinin derişimi 500 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

*: MA Sorefanib: 464,825 g/mol, MA Sorefanib Tosilat: 637,03 g/mol

Daha sonra aşağıdaki tabloda verildiği gibi Sorafenib derişiminin 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200µg/mL olduğu sekiz adet standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. Sorafenib Kalibrasyon Hazırlığı

No	1	2	3	4	5	6	7	8
Stoktan alınan, µL	100	100	500	1000	1000	2000	2000	4000
Final Hacim, mL	50	25	50	50	25	20	10	10
Final Derişim, µg/mL	1	2	5	10	20	50	100	200

Hazırlanan çözeltiler öne sürülen analiz koşullarında sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen pik alanları ilgili enjeksiyonlara karşılık gelen derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş, bu grafikten elde edilen doğru denklemi üzerinden hesaplamalar yapılmıştır.

2.5.2.2. Tekrarlanabilirlik (Gü İçi ve Günler Arası Çalışmalar)

2.5.2.2.1. Gün İçi Çalışmalar

50, 100 ve 150 µg/mL Sorafenib içeren üç tane çözelti hazırlanmış ve 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerdeki pik alanları okunmuştur. Elde edilen alanlar kalibrasyon eğrisi çalışmasından oluşturulan denklemde yerine konarak hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

2.5.2.2.2. Günler Arası Çalışmalar

50, 100 ve 150 µg/mL Sorafenib içeren üç tane iki tekrarlı çözelti hazırlanmış, bu çözeltiler 25°C'de ve 5°C'de karanlıkta bekletilerek başlangıç (0. Gün) ile 5. Gün arasında her gün, aynı saatte pik alanları okunmuştur. Elde edilen pik alanları kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denkleminde yerine konarak hesap yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.4.'de sunulmuştur.

2.5.2.2.3. % Geri Kazanım Çalışmaları

Geri kazanım çalışmaları için öncelikle dilüent içerisinde bir plasebo çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, ticari preparat Nexavar® 200 mg Film Kaplı Tablet içerisinde bulunan yardımcı maddelerin aynı oranda tartılması ile elde edilmiştir. Daha sonra plasebo çözeltisi kullanılarak 80, 100 ve 120 µg/mL sorafenib içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen pik alanları kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denklemde yerine konarak hesap yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.5.'de sunulmuştur.

2.5.2.3. YBSK Yönteminin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması

2.5.2.3.1. Miktar Tayini:

Tablet başına 200 mg sorafenib içeren 20 adet tablet numunesi analitik terazide tartılarak ortalama ağırlık hesaplanmıştır. Tartılan tabletler bir havan içerisinde ezilerek homojen bir toz karışım elde edilmiş ve bu homojen karışımdan bir tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu tartılmış, 100 ml'lik balon jöjeye konularak metanol il ve ultrasonik banyo, manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. (2000 µg/ml). Sonrasında 1 ml bu çözeltiden alınarak 20 ml'lik balon jöjeye konmuş, hacmine yine hareketli faz karışımıyla tamamlanmıştır. (100 µg/ml sorafenib). YBSK cihazına enjekte edilen numuneye ait pik alanlarının ortalaması kalibrasyon eğrisi çalışmasından elde edilen denklemde yerlerine konarak numune içerisindeki sorafenib miktarı bulunmuş ve sonuç Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

2.5.2.4. Zorlanmış Bozulma Çalışmaları

Zorlanmış bozulma çalışmaları için orta konsantrasyondaki sorafenib çözeltisi çeşitli şartlar altında incelenmiştir. Yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

2.5.2.4.1. Termal Bozunma

100 µg/ml Sorafenib içeren çözeltiden 2 ml alınarak 50°C'de bir saat ve iki saat bekletilerek sisteme enjekte edilmiş ve pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak gözlenen derişimler hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.7.'de sunulmuştur.

2.5.2.4.2. Asit Bozunma

100 µg/mL Sorafenib içeren çözeltiden 2 mL alınarak 1 mL 0,1 M HCl çözeltisi eklenerek çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiş, 1. ve 2. saatte sisteme numune enjekte edilmiş ve pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak derişimler gerçekleşen seyrelme de hesaba katılarak hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.7.'de sunulmuştur.

2.5.2.4.3. Alkali Bozunma

100 µg/mL Sorafenib içeren çözeltiden 2 mL alınarak 1 mL 0,1 M NaOH çözeltisi eklenerek çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiş, 1. ve 2. saatte sisteme numune enjekte edilmiş ve pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak derişimler gerçekleşen seyrelme de hesaba katılarak hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.7.'de sunulmuştur.

2.5.2.4.4. Oksidatif Bozunma

100 µg/mL Sorafenib içeren çözeltiden 2 mL alınarak üzerine 1 mL %3 hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiş, çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiş, 1. ve 2. saatte sisteme numune enjekte edilmiş ve pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak derişimler gerçekleşen seyrelme de hesaba katılarak hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.7.'de sunulmuştur.

2.6. Spektrofotometri ile Sorafenib MiktarTayini

2.6.1. Doğrudan UV Spektrofotometrik Analiz

2.6.1.1. Deneysel Koşullar

Spektrofotometrik yöntem ile yapılması planlanan analiz için öncelikle çeşitli denemeler yapılmış ve sonuç olarak numune ve standart çözeltilerinin metanol içerisinde hazırlanmasına karar verilmiştir. Analitik donanım olarak Shimadzu UV 1601 model çift ışık yollu spektrofotometre kullanılmış ve hazırlanan çözeltilerin UV bölgede (200-400 nm) spektrumları alınmıştır. Spektrumlar incelenmiş ve 264 nm'de etkin maddenin absorbansının maksimum değer gösterdiği görülmüştür. Potensi belli olan Sorafenib tosilat standardı metanol

içerisinde çözülerek stok bir çözelti hazırlanmış ve daha sonra yine metanol kullanılarak daha seyreltik çözeltiler hazırlanarak analitik olarak doğrusallık gösterecek derişim aralıkları tespit edilmiştir. Bu aralıkta hazırlanan kalibrasyon çözeltileri ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş, en küçük kareler yöntemi ile doğru denklemi oluşturularak regresyon katsayısı irdelenmiştir. Hazırlanan tüm çözeltiler 0,22 µm naylon filtrelerden süzöldükten sonra tayin edilmiş ve tayin süresince karanlık ve oda sıcaklığında (20±1°C) saklanmıştır.

2.6.1.2. Deneyin Yapılışı

2.6.1.2.1. Kalibrasyon Grafiğı ve Doğru Denklemi

Sorafenib etken maddesinin metanolde çözölerek hazırlanan stok çözeltisinden yine metanol ile seyreltilmesi ile 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µg/mL derişimde yedi tane standart çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin 200-400 nm'deki spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlardaki absorbans maksimalarındaki değerler karşılık gelen konsantrasyonlara karşı grafik oluşturulmuştur ve doğru denklemi oluşturulmuştur. (Şekil 3.5. ve 3.6.).

2.6.1.2.2. Tekrarlanabilirlik (Gün İçi ve Günler Arası Çalışmalar)

2.6.1.2.2.1. Gün İçi Çalışmalar

Sorafenib etken maddesinin metanolde çözölerek hazırlanan stok çözeltinin yine metanol ile seyreltilmesi ile 2, 5 ve 8 µg/mL derişimde üç adet standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin 0 (başlangıçta), 1, 3 ve 5. saatteki spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlardaki absorbans maksimalarındaki değerler kalibrasyon grafiğınden elde edilen denklemde yerine konarak hesaplanmış, bulunan sonuçlar Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

2.6.1.2.2.2. Günler Arası Çalışmalar

Sorafenib'in metanol çözeltisinde çözölerek hazırlanan stok çözeltinin yine metanol ile seyreltilmesi ile 2, 5 ve 8 µg/mL derişimde üç adet standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerin 0 (başlangıçta), 1, 2, 3, 4 ve 5. gündeki spektrumları kaydedilmiştir. Elde edilen spektrumlardaki absorbans maksimalarındaki değerler kalibrasyon grafiğınden elde edilen denklemde yerine konarak hesaplanmış, bulunan sonuçlar Çizelge 3.10.'da verilmiştir.

2.6.1.2.3. Spektrofotometrik Yöntemin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Ankara’da yerel bir eczaneden alınan ve tablet başına 200 mg sorafenib içeren 20 adet tablet numunesi analitik terazide tartılarak tabletlerin ortalama ağırlığı hesaplanmıştır. Tartılan tabletler bir havanda ezilerek homojen bir toz karışım elde edilmiş ve bu homojen karışımdan bir tablet ağırlığı kadar tablet tozu tartılmış, 100 ml’lik balon jojeye alınarak MeOH ile ve ultrasonik banyo, magnetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında 1 ml bu çözeltiden alınıp 20 ml’ye yine metanol ile tamamlanmıştır (100 µg/ml sorafenib). Final seyreltme işlemi için 1 ml bu çözeltiden alınarak 20 ml’lik balon jojeye eklenmiş, metanol ile tamamlanmıştır. Beş adet numune çözeltisi hazırlanarak 200-400 nm arasında spektrumları kaydedilmiş ve absorbans maksimalarından elde edilen değerler kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak hesaplanmış, hesaplanan içeriğe dair sonuçlar Çizelge 3.11.’de sunulmuştur.

2.6.2. Birinci Türev UV Spektrofotometrik Yöntem

2.6.2.1. Deneyin Yapılışı

2.6.2.1.1. Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

Doğrudan UV Spektrofotometri yönteminde kaydedilen yedi adet standart çözeltisine (2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µg/ml sorafenib) ait kayıtlı spektrumlar cihaz hafızasından çağırılmış ve birinci türev eğrileri oluşturulmuştur. Birinci türev spektrumlarında pozitif ve negatif bölgede oluşan iki adet maksimadaki (259,7 ve 281,9 nm) absorbanslar kaydedilerek konsantrasyona karşı grafik çizilmiş ve bu grafikten faydalanılarak doğru denklemleri oluşturulmuştur. (Çizelge 3.12. ve 3.13.)

2.6.2.1.2. Tekrarlanabilirlik Araştırılması (Gün - İçi ve Günler - Arası Çalışmalar)

Gün içi ve günler arası deneyler için oluşturulan spektrumlar, doğrudan UV spektrofotometri metodu ile, cihazda açılarak birinci türev eğrileri hesaplatılmıştır. Birinci türev eğrilerinde 259,7 ve 281,9 nm’deki türev sinyalleri okunmuştur. Okunan bu sinyaller konsantrasyon değerlerine karşı grafik oluşturulmuş ve gün içi ve günler arası (Çizelge 3.14., 3.15., 3.16 ve 3.17) değerler hesaplanmıştır.

2.6.2.1.3. Birinci Türev Spektroskopisi Yönteminin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanması

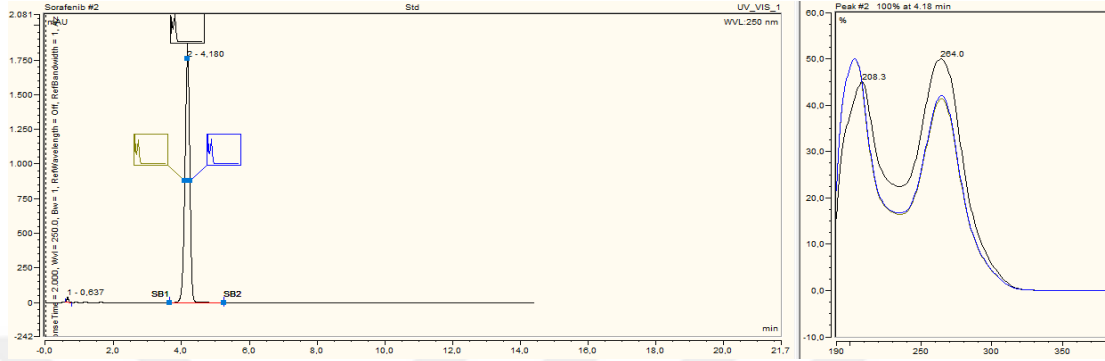
Doğrudan UV Spektrofotometrik metotla “ticari farmasötik preparatlara uygulanması” deneylerinden elde edilen spektrumların birinci türev eğrileri çizdirilmiş, pozitif ve negatif bölgede oluşan iki adet maksimumdaki absorbanslar aynı şekilde elde edilen kalibrasyon grafiği denkleminde yerine konarak (Çizelge 3.18. ve 3.19.) numune çözeltilerindeki sorafenib miktarları hesaplanmıştır.



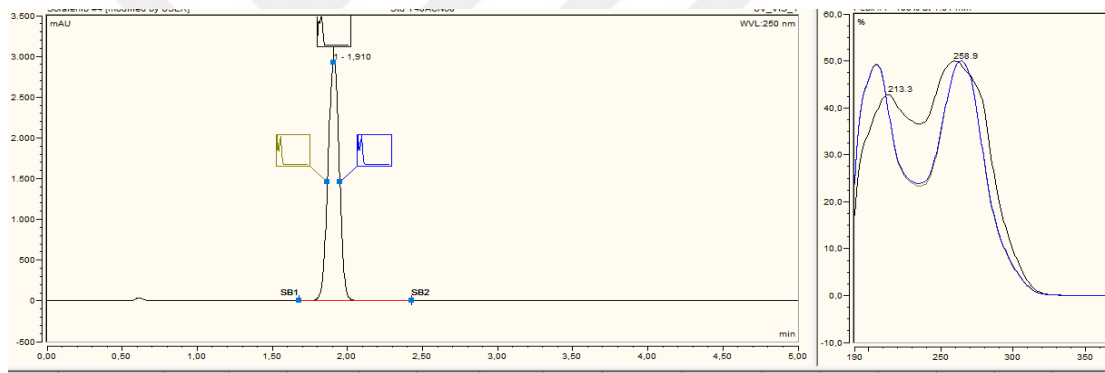
3. BULGULAR

3.1. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin YBSK Analiz Verileri

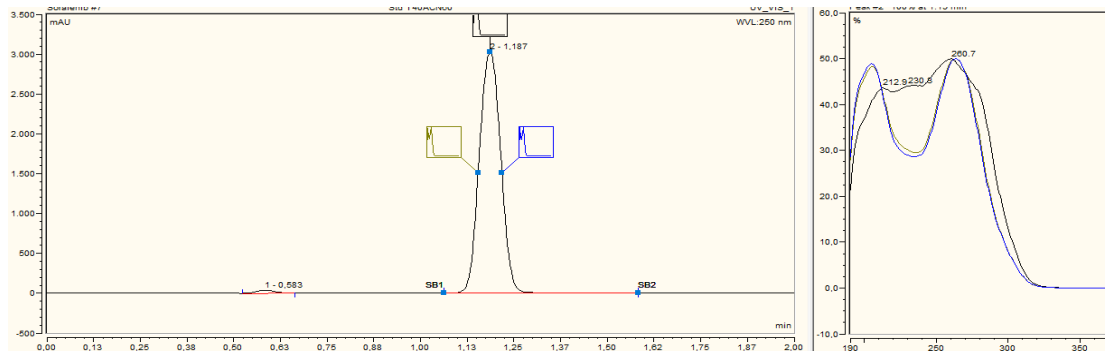
3.1.1. Etkin Madde Spektrumları



Şekil 3.1. pH: $3,8 \pm 0,05$ amonyum asetat tampon:asetonitril (50:50; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akışla elde edilen kromatogram ve spektrum.



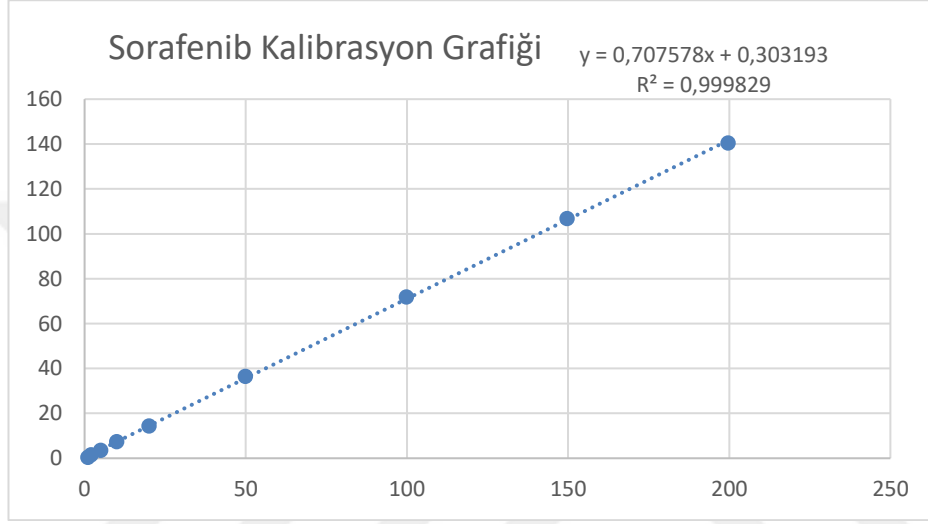
Şekil 3.2. pH: $3,8 \pm 0,05$ amonyum asetat tampon:asetonitril (40:60; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akışla elde edilen kromatogram ve spektrum.



Şekil 3.3. pH: $3,8 \pm 0,05$ amonyum asetat tampon:asetonitril (30:70; h/h) hareketli faz oranı ve 1,0 mL/dak. akışla elde edilen kromatogram ve spektrum.

3.1.2. Kalibrasyon Eğrisi Denklemi Verileri Eldesi

Standart sorafenib çözeltilerinin 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin 10 µL'lik enjeksiyonları ile elde edilen, 260 nm'de kaydedilen kromatogramlardan elde edilen pik alanlarına karşı ilgili çözeltilerin derişimleri geçirilmiş; Şekil 3.4.'de verilen kalibrasyon grafiğı, Çizelge 3.1.'de sunulan çalışma grafikleri denklem verileri bulunmuştur.



Şekil 3.4. YBSK yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiğı

Çizelge 3.1. Sorafenib etken maddesinin YBSK yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi verileri (260 nm, n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
1,0 - 200,0 µg/mL	0,707578	0,303193	0,9998	0,3195	1,4	4,5

a: Doğrunun eğimi

b: Doğrunun y- eksenini kestiğı nokta

r: Korelasyon katsayısı

SS: Kesimin noktasına ait standart sapma (%95 güven aralığında)

YS: Yakalama Sınırı (3SS/a)

TAS: TAYin alt sınır (10 SS/a)

3.1.3. Kesinlik

3.1.3.1. Metot Kesinliği:

Sistem kesinliği orta konsantrasyondaki standardın ardıl 6 enjeksiyonu ile test edilmiştir. Elde edilen veriler ve hesaplanan bağıl standart sapma değeri izelge 3.2. de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. YBSK yöntemi ile sorafenib orta konsantrasyonunda hazırlanan standart çözeltinin altı ardıl enjeksiyonundan elde edilen alanlar ve hesaplanan standart sapma ve bağıl standart sapma verileri

Sistem Kesinliği		Alan
1	100 µg/mL Sorafenib Standart	70,6319
2		70,6602
3		70,5023
4		70,2499
5		70,0005
6		69,823
ORT		70,3113
SS		0,35
BSS		0,5

3.1.3.2. Gün - İçi ve Günler - Arası alışmalar

Önerilen metodun kesinliğini belirlemek için orta konsantrasyonun %50, %100 ve %150'sinde sentetik çözeltiler hazırlanmış, gün içi alışmalar 20°C' de ve karanlıkta gerçekleştirilmiş, günler arası ise 20°C' de ve 5°C' de ve karanlıkta bekletilen çözeltiler ile yapılmıştır. Elde edilen deney sonuçları izelge 3.3. ve 3.4.'de belirtilmiş olup BSS değerleri %2'nin altında bulunmuştur.

Çizelge 3.3. 20°C Karanlıkta Yapılan Gün İçi Çalışma sonuçları

20°C Karanlıkta Yapılan Gün İçi Çalışma								
Sorafenib %50			Sorafenib %100			Sorafenib % 150		
Zaman / Saat	Alan	%	Zaman / Saat	Alan	%	Zaman / Saat	Alan	%
0	36,5301	101,8	0	71,8668	100,3	0	106,7704	99,4
2	36,6197	102,1	2	71,1861	99,4	2	106,4434	99,1
4	36,4671	101,6	4	70,9208	99,0	4	105,6435	98,3
6	36,4795	101,7	6	70,3230	98,1	6	104,8583	97,6
8	36,5046	101,8	8	69,8529	97,5	8	104,5279	97,3
12	36,4571	101,6	12	70,0594	97,8	12	104,2402	97,0
16	36,3469	101,3	16	69,3237	96,8	16	105,9386	98,6
20	36,9506	103,0	20	69,3410	96,8	20	108,9185	101,4
24	37,1250	103,5	24	69,4409	96,9	24	108,784	101,3
ORT		102,4	ORT		98,0	ORT		98,9
SS		0,72	SS		1,26	SS		1,59
BSS		0,70	BSS		1,28	BSS		1,61

Çizelge 3.4. 20°C ve 5°C Karanlıkta Yapılan Günler Arası Çalışma sonuçları

Günler Arası 20°C Karanlık % 50			Günler Arası 5°C Karanlık % 50		
	Numune	%		Numune	%
1.Gün	37,12497	103,5	1.Gün	36,40170	101,5
2.Gün	36,66720	102,2	2.Gün	36,56583	101,9
3.Gün	37,06417	103,3	3.Gün	37,34697	104,1
4.Gün	37,28147	103,9	4.Gün	37,13183	103,5
5.Gün	37,36573	104,2	5.Gün	37,07600	103,4
Ort		103,4	Ort		102,9
SS		0,8	SS		1,1
BSS		0,7	BSS		1,1

Günler Arası 20°C Karanlık % 100			Günler Arası 5°C Karanlık % 100		
	Numune	%		Numune	%
1.Gün	69,44090	96,9	1.Gün	72,05983	100,6
2.Gün	70,77120	98,8	2.Gün	72,99177	101,9
3.Gün	70,86723	98,9	3.Gün	73,93580	103,2
4.Gün	71,48340	99,8	4.Gün	74,12893	103,5
5.Gün	71,49773	99,8	5.Gün	73,85603	103,1
Ort		98,8	Ort		102,4
SS		1,2	SS		1,2
BSS		1,2	BSS		1,2

Günler Arası 20°C Karanlık % 150			Günler Arası 5°C Karanlık % 150		
	Numune	%		Numune	%
1.Gün	108,78463	101,3	1.Gün	108,63570	101,1
2.Gün	109,36143	101,8	2.Gün	108,73217	101,2
3.Gün	110,20797	102,6	3.Gün	108,73217	101,2
4.Gün	110,22207	102,6	4.Gün	109,93960	102,3
5.Gün	109,66707	102,1	5.Gün	109,45220	101,9
Ort		102,1	Ort		101,6
SS		0,6	SS		0,5
BSS		0,6	BSS		0,5

3.1.4. Doğruluk

Önerilen YBSK metodunun doğruluğu yapılan geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiş olup bu amaçla hazırlanan plasebo çözeltisi ile sorafenib orta konsantrasyonuna göre %80, %100 ve %120 derişiminde sentetik çözeltiler hazırlanarak analiz edilmiştir. Veriler Çizelge 3.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. YBSK metodu ile elde edilen geri kazanım değerleri

Plasebo +Std (%80) - Sorafenib			
	Alan	Hesaplanan Kons. (µg/mL)	% Geri Kazanım
1	55,823	77,878072	97,3
2	55,976	78,092199	97,6
3	55,607	77,575192	97,0
Ortalama	55,8	77,848488	97,3
% BSS	0,33	0,33	0,33
Plasebo +Std (%100) - Sorafenib			
	Alan	Hesaplanan Kons. (µg/mL)	% Geri Kazanım
1	70,159	97,915558	97,9
2	70,420	98,279937	98,3
3	70,142	97,891937	97,9
Ortalama	70,2	98,029144	98,0
% BSS	0,22	0,22	0,22
Plasebo +Std (%120) - Sorafenib			
	Alan	Hesaplanan Kons. (µg/mL)	% Geri Kazanım
1	82,4162	115,046958	95,9
2	82,611	115,319649	96,1
3	81,048	113,134353	94,3
Ortalama	82,0	114,500320	95,4
% BSS	1,0	1,0	1,0

3.1.5. Miktar Tayini Verileri

Çizelge 3.6. YBSK yöntemiyle Nexavar® 200 mg Film Tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri

Sorafenib Standart		Nexavar Sorafenib İçeriği		
Tartım (mg)	68,5	Tartım (mg)	572,3	
Kons. (µmg/mL)	100,0	Kons. (µmg/mL)	100,0	
	Alan		Alan	%
1	70,6319	1	70,280	100,0
2	70,66020	2	70,605	100,4
3	70,50230	3	70,337	100,0
4	70,24990	4	70,357	100,1
5	70,00050	5	70,220	99,9
6	69,82300	6	70,026	99,6
Ortalama	70,31	Ort	70,30	100,0
SS	0,35	SS	0,2	0,2
BSS	0,5	BSS	0,3	0,2
		p: 0.05 için G.A.	100,0 ± 0,16	

P: Hata (0.05)

G.A.: Güven Aralığı ($\bar{X} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

t = 1,98 (Serbestlik derecesi; n – 1 = 5 için)

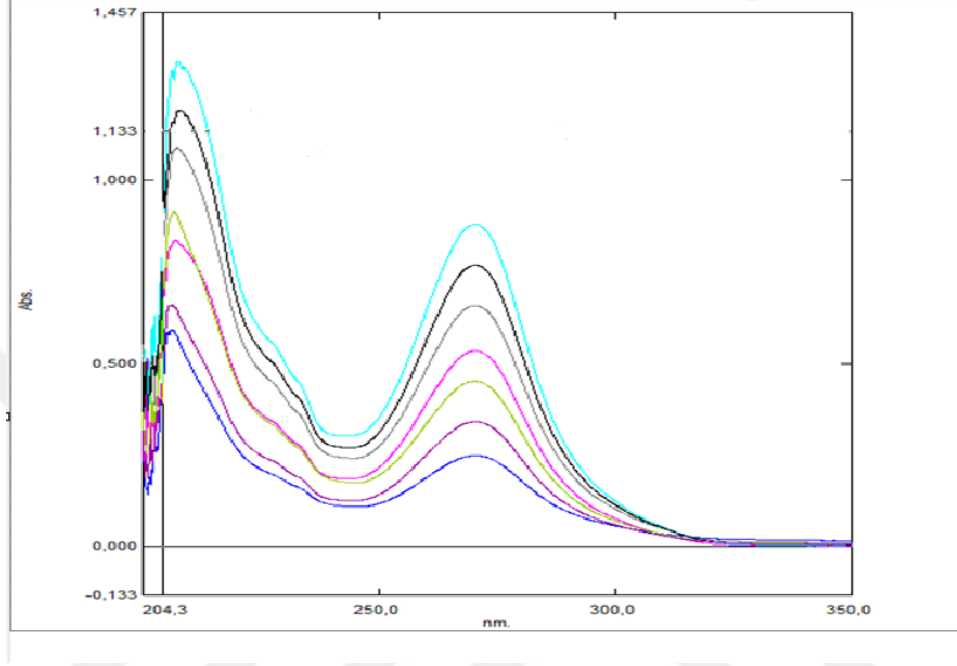
3.1.6. Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları Verileri

Çizelge 3.7. YBSK yöntemiyle her birinde 100 µg/ml Sorafenib içeren çözeltilerle oluşturulan hızlandırılmış degradasyon sonuçları.

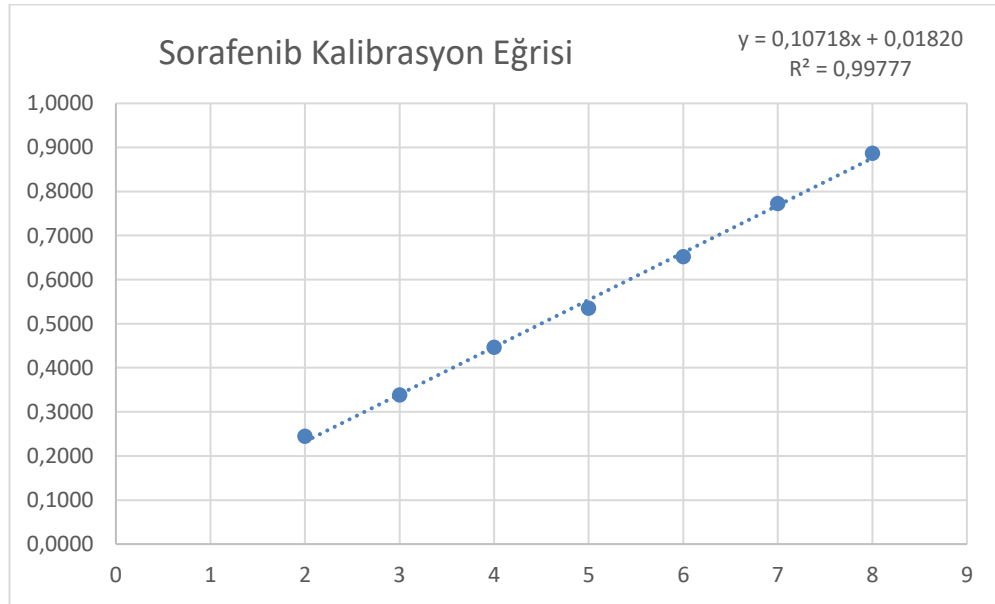
Bozunma Şartları	Sıcaklık (°C)	Süre (Saat)	Bozunma (%)
Termal Bozunma	50	1	+1,2
Asit Bozunma	25	1	-0,9
Alkali Bozunma	25	1	-0,3
Oksidatif Bozunma	25	1	-2,0
Termal Bozunma	50	2	-2,25
Asit Bozunma	25	2	-1,5
Alkali Bozunma	25	2	-2,2
Oksidatif Bozunma	25	2	-2,5

3.2. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Doğrudan UV Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Verileri

3.2.1. Çalışma Verileri



Şekil 3.5. Metanol içerisinde hazırlanmış sorafenib çözeltilerinin 200-400 nm aralığında elde edilen doğrudan UV spektrumları



Şekil 3.6. Doğrudan UV Spektrofotometri verilerinden elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.8. Doğrudan UV Spektrofotometri ile sorafenib için kalibrasyon eğrisi verileri (264 nm, n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	R	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
2,0 - 8,0 µg/mL	0,107518	+0,0182	0,998	0,01222	0,38	1,14

a: Doğrunun eğimi

b: Doğrunun y- eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

SS: Kesimin noktasına ait standart sapma (%95 güven aralığında)

YS: Yakalama Sınırı (3SS/a)

TAS: Tayin alt sınır (10 SS/a)

3.2.2. Kesinlik

3.2.2.1. Gün İçi ve Günler Arası Deneyler

Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile deney kesinliğini belirlemek amacıyla yapılan gün içi deney verileri Çizelge 3.9.'da, günler arası deney verileri ise Çizelge 3.10'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Doğrudan UV Spektrofotometri metodu ile Sorafenib etken maddesinin üç farklı derişimi için elde edilen gün içi deneysel veriler

20°C Karanlık Doğrudan UV Deneyleri								
Sorafenib %40			Sorafenib %100			Sorafenib %160		
Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%
0	0,245	105,80	0	0,536	96,56	0	0,887	101,33
1. Sa	0,233	100,36	1. Sa	0,540	97,37	1. Sa	0,931	106,46
3. Sa.	0,248	107,36	3. Sa.	0,547	98,68	3. Sa.	0,932	106,57
5. Sa.	0,246	106,43	5. Sa.	0,511	91,96	5. Sa.	0,953	109,02
ORT	0,243	104,987	ORT	0,533	96,141	ORT	0,926	105,845
SS	0,007	3,150	SS	0,016	2,922	SS	0,028	3,237
BSS	2,776	3,000	BSS	2,935	3,039	BSS	2,998	3,058

Çizelge 3.10. Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile Sorafenib etken maddesinin üç farklı derişimi için elde edilen günler arası deneysel veriler

Günler Arası 20°C Karanlık								
Sorafenib % 40			Sorafenib % 100			Sorafenib % 160		
Gün	Abs	%	Gün	Abs	%	Gün	Abs	%
1.Gün	0,249	107,8	1.Gün	0,577	104,3	1.Gün	0,892	101,9
2.Gün	0,235	101,3	2.Gün	0,530	95,4	2.Gün	0,834	95,1
3.Gün	0,217	92,7	3.Gün	0,526	94,7	3.Gün	0,820	93,6
4.Gün	0,227	97,3	4.Gün	0,514	92,5	4.Gün	0,844	96,3
5.Gün	0,231	99,3	5.Gün	0,524	94,3	5.Gün	0,868	99,1
Ort		99,7	Ort		96,2	Ort		97,2
S.D		5,5	S.D		4,6	S.D		3,3
% BSS		5,6	% BSS		4,8	% BSS		3,4

3.2.3. Miktar Tayini Verileri

Çizelge 3.11. Doğrudan UV Spektrofotometri yöntemi ile Nexavar® 200 mg film kaplı tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri

Doğrudan UV ile Sorafenib İçeriği		
Wn (mg)		205,6
Kons. (µg/ml)		100,000
	Abs	%
1	0,556	100,4
2	0,545	98,3
3	0,559	100,9
4	0,584	105,6
5	0,546	98,5
Ort	0,56	100,7
SS		2,9
BSS		2,6
P: 0,05 için G.A. : 3,6		100,7±3,6

P: Hata (0,05)

G.A: Güven Aralığı ($X_{ort} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

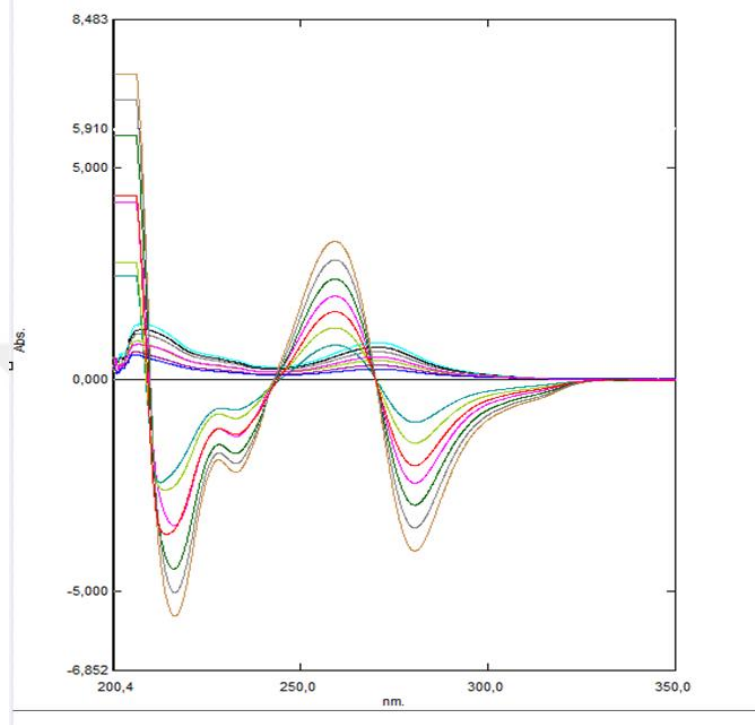
SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

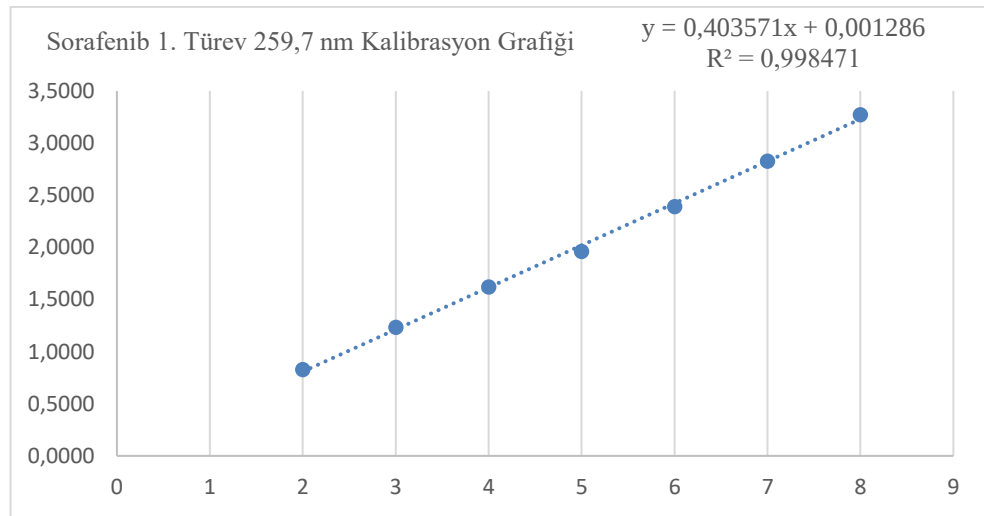
t = 2,776 (Serbestlik derecesi; n –1 =4 için)

3.3. Sorafenib İçeren Farmasötik Preparatlar İçin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile Elde Edilen Analiz Bulguları

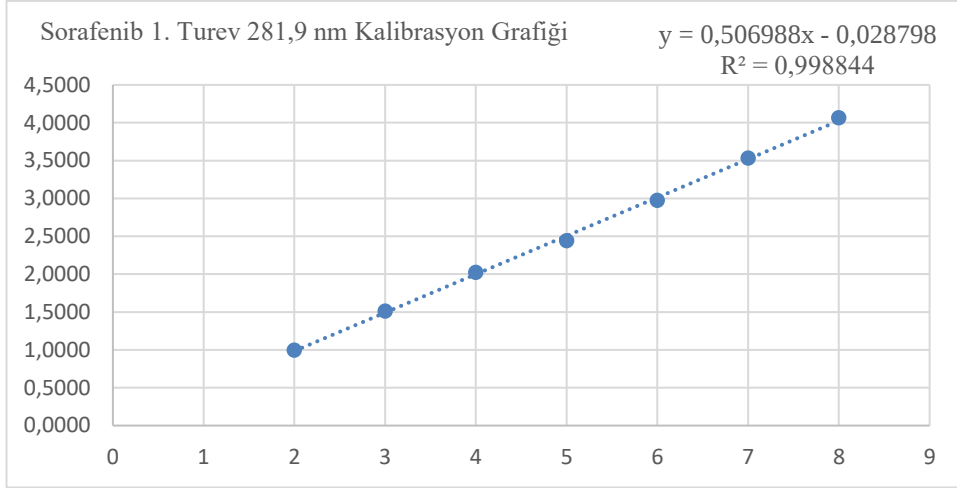
3.3.1. Kalibrasyon Denklemi



Şekil 3.7. Metanol içerisinde hazırlanan Sorafenib a) 2,0 µg/mL; b) 3,0 µg/mL; c) 4,0 µg/mL; d) 5,0 µg/mL; e) 6,0 µg/mL; f) 7,0 µg/mL; g) 8,0 µg/mL konsantrasyonlarına ait, 200-400 nm aralığındaki birinci türev UV spektrumları



Şekil 3.8. Birinci Türev UV Spektrofotometri verilerinden 259,7 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 3.9. Birinci Türev UV Spektrofotometri verilerinden 281,9 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.12. Sorafenib etken maddesinin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 259,7 nm’de elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi verileri (n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
2,0 - 8,0 µg/mL	0,403571	0,001286	0,998	0,0381	0,311	0,942

Çizelge 3.13. Sorafenib etken maddesinin Birinci Türev UV Spektrofotometri ile 281,9 nm’de elde edilen verilerle oluşturulan kalibrasyon eğrisi verileri (n=7)

Çalışma Aralığı (µg/mL)	a	b	r	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
2,0 - 8,0 µg/mL	0,506988	-0,028798	0,998	0,0415	0,270	0,819

a: Doğrunun eğimi

b: Doğrunun y- eksenini kestiği nokta

r: Korelasyon katsayısı

SS: Kesimin noktasına ait standart sapma (%95 güven aralığında)

YS: Yakalama Sınırı (3SS/a)

TAS: Tayin alt sınır (10 SS/a)

3.3.2. Kesinlik

3.3.2.1. Gün - İçi Çalışmalar

Birinci türev UV spektrofotometri metodu ile deney kesinliğini belirlemek için elde edilen gün içi deney sonuçları 259,7 nm için Çizelge 3.14.'de, 281,9 nm için ise Çizelge 3.15.'de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Birinci türev UV spektrofotometri metodu ile 259,7 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen gün içi deneysel veriler

20°C Karanlık 1. Türev 259,7 nm								
Sorafenib %40			Sorafenib %100			Sorafenib %160		
Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%
0	0,827	102,34	0	1,961	97,12	0	3,273	101,34
1. Sa	0,802	99,24	1. Sa	1,950	96,56	1. Sa	3,225	99,84
3. Sa.	0,820	101,47	3. Sa.	1,959	97,04	3. Sa.	3,278	101,49
5. Sa.	0,837	103,50	5. Sa.	1,964	97,27	5. Sa.	3,390	104,95
ORT		101,640	ORT		96,995	ORT		101,904
SS		1,799	SS		0,307	SS		2,163
BSS		1,770	BSS		0,317	BSS		2,122

Çizelge 3.15. Birinci türev UV spektrofotometri ile 281,9 nm'de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen gün içi deneysel veriler

20°C Karanlık 1. Türev 281,9 nm								
Sorafenib %40			Sorafenib %100			Sorafenib %160		
Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%	Zaman / Saat	Abs	%
0	0,996	101,10	0	2,443	97,50	0	4,065	100,93
1. Sa	1,011	102,55	1. Sa	2,447	97,68	1. Sa	4,105	101,92
3. Sa.	1,016	103,07	3. Sa.	2,455	97,97	3. Sa.	4,125	102,41
5. Sa.	1,029	104,29	5. Sa.	2,448	97,72	5. Sa.	4,244	105,36
ORT		102,75	ORT		97,72	ORT		102,66
SS		1,32	SS		0,19	SS		1,90
BSS		1,29	BSS		0,20	BSS		1,85

3.3.2.2. Günler Arası Deneyler

Çizelge 3.16. Birinci türev UV spektrofotometri ile 259,7 nm’de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen günler arası deneysel veriler

20°C Karanlık 1. Türev 259,7 nm								
Sorafenib %40			Sorafenib %100			Sorafenib %160		
	Abs	%		Abs	%		Abs	%
1.Gün	0,860	106,4	1.Gün	2,087	103,4	1.Gün	3,277	101,4
2.Gün	0,809	100,0	2.Gün	1,971	97,6	2.Gün	3,067	95,0
3.Gün	0,734	90,8	3.Gün	1,921	95,2	3.Gün	3,073	95,1
4.Gün	0,725	89,7	4.Gün	1,862	92,2	4.Gün	3,114	96,4
5.Gün	0,751	92,8	5.Gün	1,915	94,8	5.Gün	3,209	99,3
Ort		96,0	Ort		96,6	Ort		97,5
S.D		7,1	S.D		4,2	S.D		2,8
% BSS		7,4	% BSS		4,4	% BSS		2,9

Çizelge 3.17. Birinci türev UV spektrofotometri ile 281,9 nm’de sorafenib etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile elde edilen günler arası deneysel veriler

20°C Karanlık 1. Türev 281,9 nm								
Sorafenib %40			Sorafenib %100			Sorafenib %160		
	Abs	%		Abs	%		Abs	%
1.Gün	1,085	109,8	1.Gün	2,629	104,8	1.Gün	4,100	101,8
2.Gün	0,994	100,8	2.Gün	2,442	97,5	2.Gün	3,822	94,9
3.Gün	0,926	94,2	3.Gün	2,436	97,2	3.Gün	3,825	95,0
4.Gün	0,938	95,3	4.Gün	2,366	94,5	4.Gün	3,913	97,2
5.Gün	0,963	97,8	5.Gün	2,423	96,7	5.Gün	4,027	100,0
Ort		99,6	Ort		98,1	Ort		97,8
S.D		6,3	S.D		3,9	S.D		3,0
% BSS		6,3	% BSS		4,0	% BSS		3,1

3.3.3. Miktar Tayini Verileri

Çizelge 3.18. Birinci Türev UV Spektrofotometri yöntemi ile 259,7 nm’de Nexavar® 200 mg film tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri

Sorafenib İçeriği 259,7 nm		
Wn (mg)	205,6	
Kons. (mg/ml)	0,097	
Numune		
	Abs	%
1	1,955	96,8
2	1,947	96,4
3	1,965	97,3
4	1,987	98,4
5	1,974	97,8
Ort	1,97	97,3
SS		0,7
BSS		0,7
p:0,05 için GA		0,9
Sonuç %	97,3±0,9 %	

P: Hata (0,05)

G.A.: Güven Aralığı ($\bar{X} \pm t \cdot SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

t = 2,776 (Serbestlik derecesi; n-1 =4 için)

Çizelge 3.19. Birinci Türev UV Spektrofotometri yöntemi ile 281,9 nm’de Nexavar® 200 mg film tablet bileşiminde bulunan Sorafenib miktar tayini analiz verileri

Sorafenib İçeriği 281,9 nm		
Wn (mg)	205,6	
Kons. (mg/ml)	0,097	
Numune		
	Abs	%
1	2,477	98,9
2	2,457	98,1
3	2,468	98,5
4	2,493	99,5
5	2,462	98,3
Ort	2,47	98,6
SS		0,5
BSS		0,5
p:0,05 için GA		0,6
Sonuç %	98,6±0,6 %	

P: Hata (0,05)

G.A.: Güven Aralığı ($\bar{X} \pm t.SS / \sqrt{n}$)

SS: Standart sapma

n: Deney sayısı

t = 2,776 (Serbestlik derecesi; n-1 =4 için)

4. TARTIŞMA

Yüksek lisans çalışmalarında kullanılmak üzere, “Nexavar ® 100 mg Film Kaplı Tablet” farmasötik preparatta bulunan antineoplastik etkili Sorafenib etken maddesinin analizi için spektrofotometrik ve kromatografik metotlar geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Sorafenib etken maddesine ait referans, Amerikan Farmakopesi (USP)’nden tedarik edilmiştir (<https://store.usp.org/product/1615876>). YBSK analizleri için Avrupa Farmakopesi ve Amerikan Farmakopesi tampon çözelti reçetelerinden faydalanılmış, daha önce yapılan az sayıda çalışma incelenerek, asidik bölgede hazırlanan tamponlar denenmiştir. Tampon pH’sına karar verildikten sonra, Tampon:Asetonitril (50:50 h/h) karışımı ile YBSK analizi geliştirme aşamasına geçilmiştir. Spektrofotometrik analizlere başlarken, kolay ve kararlı bir çözücü olması, spektrumunun temiz olması açısından ideal bir çözücü olan metanol seçilmiş ve metanolde çözünen etken madde çözeltisinin spektrumu alınmıştır (Şekil 3.1.). Edinilen absorbans değerleri, çalışmaların yapılacağı dalga boylarının belirlenmesini sağlamıştır.

Çalışmalar YBSK yöntemi ile başlamış, tampon ve asetonitril karışımından oluşan hareketli fazlar denenmiştir. Kolaylık sağlaması açısından numune ve standart çözeltilerinin hazırlanması için de hareketli faz seçilmiştir. Tampon seçimi gerçekleştirilirken farklı tamponlar denenmiş, fakat çalışılan dalga boylarında pik vermemesi ve hazırlama, kullanım kolaylığından dolayı amonyum asetat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

Kolon seçimi yapılırken en yaygın kolon türü olan ve analitin ayrımı için uygun olan C₈ ve C₁₈ kolonlar denenmiş olup ve Şekil 3.2.’de görüldüğü gibi, sorafenib piki için analiz süresinin düşük olmasını ve uygun asimetri faktörü ve teorik plaka sayısı sağlayan, Luna® C8;(2) 5µm 4,6x50 mm kolonu kullanılmasına karar verilmiştir.

Kolon ve tampon seçimini takiben hareketli faz oranının belirlenmesi için farklı oranlarda karışımlar denenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda 40:60 (h/h) karışım oranında ve absorbans maksiması olan 260 nm dalga boyunda çalışılmasına karar verilmiştir.

Kolon, dalga boyu ve tampon seçimi tamamlandıktan, analiz zamanının kısalması için ayarlamalar yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir. Hareketli faz ve çözücüdeki tampon, asetonitril oranları; pH 3,8 Amonyum Asetat Tamponu:asetonitril (40:60; h/h) olarak belirlenmiş; akış hızı da 1,0 mL/dk seçilmiştir.

Deney şartları belirlendikten sonra ise kalibrasyon standartları için doğrusal aralık tespit edilmeye çalışılmış, hem hassasiyet sınırlarını zorlayan küçük derişimlerde hem de oldukça yüksek konsantrasyona sahip 15 adet çözelti oluşturulmuş, doğrusallığı sağlayan ve oldukça geniş derişim aralığına sahip 1,0 - 200,0 µg/mL çalışma aralığında 8 farklı konsantrasyon ile

çalışılmasına karar verilmiştir. Böylelikle valide edilen metot çok fazla dilüsyon gerektirmeyen ya da çok düşük derişimlerde çalışmaya izin verebilen bir hale getirilmiştir. Çalışma grafiğı sonuçları Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Metot için hesaplanan yakalama sınırının 1,4 µg/mL, tayin alt sınırının 4,5 µg/mL ve korelasyon katsayısının 0,9998 olması, geliştirilen yöntemin duyarlılığını ispatlamaktadır. Sorafenib için hesaplanan %geri kazanım oranları Çizelge 3.5.'de görüldüğü gibi, % 97,3, % 98,0 ve % 95,4 oranlarında bulunmuştur.

Gerçekleştirilen zorlanmış/hızlandırılmış bounma çalışmaları için literatürdeki reçetelerden faydalanılmış, bu amaçla sorafenib çözeltisi ısısal, asidik, bazik ve fotokimyasal ve oksidatif stres şartlarında incelenmiştir

YBSK çalışmalarının ardından doğrudan UV spektrofotometri ve birinci türev spektrofotometri yöntemlerinin araştırılmasına başlanmıştır. Stok sorafenib çözeltisi metanol içerisinde çözülerek hazırlanmış ve tüm seyreltme işlemleri de metanol ile gerçekleştirilmiştir. Deney şartlarının oluşturulması ve çalışma aralığının belirlenmesinde Beer-Lambert yasası ve kısıtlamaları da dikkate alınarak elde edilecek absorbans değerlerinin 0,8'i aşmaması amaçlanmış, böylelikle 2-8 µg/mL aralığında çalışılmasına karar verilmiştir.

Deney şartlarına karar verildikten sonra, doğrudan UV spektrofotometrik yöntem gerekli kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak, 2,0 - 8,0 µg/mL çalışma aralığında 7 adet standart çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiğine ait istatistiksel veriler Çizelge 3.8.'de sunulmuştur. Doğrudan UV Spektrofotometrik yöntem için hesaplanan YS 0,38 µg/mL, TAS ise 1,1 µg/mL ve korelasyon katsayısının 0,998 olarak bulunmuş olup elde edilen bulgular geliştirilen yöntemin duyarlı ve doğrusal yanıt üreten bir yöntem olduğunu ispatlamaktadır.

Daha sonra cihaz yazılımı vasıtasıyla bu yöntemle oluşturulan tüm spektrumların birinci dereceden türev spektrumları alınmış, incelenen türev spektrumlarında maksimum absorbansları belirlenmiştir. Bu amaçla 259,7 ile 281,9 nm'deki değerler kullanılarak yeni çalışma grafikleri ve doğru denklemleri oluşturulmuştur. Bu grafiklere ait veriler sırasıyla Şekil 3.8. ve 3.9.'da verilmiştir. Elde edilen yeni denkleme ait veriler ve korelasyon katsayısının 1'e yakınlığı, bu yöntemin de duyarlı ve doğrusal alternatif bir yöntem olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geliştirilen kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler, Nexavar®¹⁰⁰ mg Film Kaplı Tablet adlı preparatın miktar tayini için başarıyla kullanılmıştır.

Gereç ve Yöntem kısmında (Bölüm 2.) anılan kromatografik koşullar preparatlara uygulandığında, hesaplamalar sonucunda preparatlarda bulunan Sorafenib miktarı %95 güven aralığında ($p:0,05$) $100,0 \pm 0,16$ oranında ($200,0 \pm 0,32$ mg/tablet) bulunmuştur. Yine aynı bölümde bahsedilen spektrofotometrik koşullar preparatlara uygulandığında; doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile Sorafenib miktar tayini $100,7 \pm 3,6$ oranında ($201,4 \pm 7,2$ mg/tablet) hesaplanmıştır. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar ise; 259,7 nm için $p:0,05$ güven aralığında $194,6 \pm 1,8$ mg/tablet olarak ve 281,9 nm için $p:0,05$ güven aralığında $197,2 \pm 1,2$ mg / tablet olarak bulunmuştur.

Tablet muhteviyatında yer alan yardımcı maddelerin ve çekirdek film kaplama materyalinin içerdiği maddelerin önerilen hiçbir yöntemi etkilemediği gözlenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında ve gün içi ve günler arası çalışmaların da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar üretmesi neticesinde, geliştirilen kromatografik yöntem ve alternatif olarak spektrofotometrik yöntemlerin ticari bir preparat olan “Nexavar® 100 mg Film Kaplı Tablet” isimli preparatta, Sorafenib etken madde miktarının tayini için kolay, hızlı, ucuz ve pratik bir yöntem olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir. Oldukça kısa analiz süresi, ucuz ve yaygın bir analitik kolona sahip olması, hareketli faz bileşenlerinin temin edilmesi ve hazırlanmasının ucuz ve pratik olması da YBSK yöntemi için avantaj sağlamaktadır. Benzer şekilde öne sürülen spektrofotometrik yöntem de hızlı, ucuz, duyarlı ve kolay bir yöntem olarak dikkat çekici bir avantaja sahiptir.

Yukarıda belirtilen sebepler doğrultusunda geliştirilen analitik yöntemlerin tüm kalite güvence ve Ar-Ge laboratuvarlarında kolaylıkla ve zahmetsiz bir şekilde uygulanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Ahmed A. Abdelgalila,*, Hamad M. Alkahtanib, Fahad I. Al-Jenoobib (2009), Sorafenib, Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, **44**:239-266.

Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri (2023) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.
Erişim:
[https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/78812/mod_resource/content/0/HPLC.pdf]
Erişim tarihi: 23.11.2023

Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri (2023) UV Spektroskopisi.
Erişim:
[https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51384/mod_resource/content/0/UV%20Spektroskopisi.pdf]
Erişim tarihi: 23.11.2023

avesis.gazi.edu.tr (2023). (Kromatografik Yöntemlerin Temel İlkeleri)
Erişim: [<https://avesis.gazi.edu.tr/resume/mkaracan>]
Erişim tarihi: 22.11.2023

B. Blanchet, B. Billemondb, J. Cramarda, A.S. Benichoua, S. Chhund,E, L. Harcouet A, S. Ropertb, A. Dauphina, F. Goldwasserb, M. Toda (2009), Validation of an HPLC-UV method for sorafenib determination in human plasma and application to cancer patients in routine clinical practice, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **49**: 1109–1114.

biyokure.org (2011). HPLC (UV Görünür Bölge Spektroskopisi)
Erişim:[http://biyokure.org/2011/10/07/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/#google_vignette]
Erişim Tarihi: 23.11.2023

Clark J (2006). A Double Beam UV-Visible Absorption Spectrometer
Erişim: [<http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/spectrometer.html>]
Erişim Tarihi: 23.11.2023)

dergipark.org. (2023) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.
Erişim: [<https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/666394>]
Erişim tarihi: 23.11.2023

Erdik E, Obalı M, Yüksekışık N, Öktemer A, Pekel T (2001). Genel Organik Kimya; 4. Baskı: D Bölümü.

Gabriela Wiergowska, Anna Stasiłowicz, Andrzej Miklaszewski, Kornelia Lewandowska, And Judyta Cielecka Piontek (2021), Structural Polymorphism of Sorafenib Tosylate as a Key Factor in Its Solubility Differentiation, *Pharmaceutics*, **13(3)**: 384

Gündüz T (1990). Enstrümental Analiz. 2. Baskı.

Ince T (2012). Farmasötik Preparatlarda Metformin'in Spektrofotometrik Yöntemlerle Miktar Tayini; Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Giriş Bölümü.

Ismail Khan Zafar Iqbal Meritorious Professor Abad Khan Muhammad Hassan Fazle Nasir Abida Raza Lateef Ahmad Amjad Khan Muhammad Akhlaq Mughal (2016), A simple, rapid and sensitive RP-HPLC-UV method for the simultaneous determination of sorafenib and paclitaxel in plasma and pharmaceutical dosage forms: Application to pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **15**;1033-1034:261-270.

Kalkır F (2022). Bazı antikanser ilaç etken maddelerinin iyonlaşma davranışının ters faz sıvı kromatografik yöntemle belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

Kılıç E., Yılmaz H. Analitik Kimya Temel İlkeler 8. Baskı 2. Cilt, Bölüm 24.

Medical Park Yayın Kurulu (21.01.2023)

Erişim: [https://www.medicalpark.com.tr/kanser/hg-1716]

Erişim tarihi: 20.11.2023

Memorial Tıbbi Yayın Kurulu (20.09.2023)

Erişim: [https://www.memorial.com.tr/hastaliklar/kanser-nedir-kanser-belirtileri-ve-tedavi-yontemleri]

Erişim tarihi: 20.11.2023

Miki Shimada, Hoshimi Okawa, Takahiro Maejima, Toshiki Yanagi, Kanehiko Hisamichi, Masaki Matsuura, Kazutoshi Akasaka, Masami Tsuchiya, Yasuteru Kondo, Tooru Shimosegawa, Masaru Mori, Masamitsu Maekawa, Hiroyuki Suzuki, Nariyasu Mano (2014), A Quantitative HPLC-UV Method for Determination of Serum Sorafenib and Sorafenib N-Oxide and Its Application in Hepatocarcinoma Patients, *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **233**(2), 103-112.

Onur F, Yücesoy C (1983). Türev Spektrofotometrisi. *Fabad J. Pharm . Sci.*, 13:462.

Rx List- The Internet Drug Index (2023) Nexavar, Drug Description.

Erişim:[http://www.rxlist.com/nexavar-drug.htm]

Erişim Tarihi: 20.11.2023

Rx List- The Internet Drug Index (2023) Sofexan, Drug Description.

Erişim:[http://www.rxlist.com/sofexan-drug.htm]

Erişim Tarihi: 20.11.2023

Sakarya Üniversitesi Açık Akademik Arşiv Sistemi (2023)

Erişim:

[https://acikerisim.sakarya.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12619/79944/T06192.pdf?sequence=1&isAllowed=y]

Erişim tarihi: 23.11.2023

Uyguner N (2010). Eprosartan ve hidroklorotiazit'in tabletlerde türev spektrofotometri ile miktar tayini, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans dönem projesi, Giriş Bölümü.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Betül AYAR

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (2004-2008)

Ortaöğretim: Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (1997-2004)

YABANCI DİL VE DÜZEYİ

- İngilizce (YDS – 61,5)

MESLEKİ TECRÜBELER

- Kilis Devlet Hastanesi - Eczacı (2009-2010)
- Şanlıurfa İl Sağlık Müdürlüğü (2010-2011)
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Analiz ve Kontrol Laboratuvarları Dairesi başkanlığı, İlaç Laboratuvarlar Birimi – Eczacı (2013- devam ediyor)

SERTİFİKALAR VE KATILIM BELGELERİ

- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “İyi Eczacılık Uygulamaları / Klinik Eczacılık / Farmasötik Bakım” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “Adli Eczacılık” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “Kozmetik / Dermakozmetik” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “Danışman Eczacı” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “Eczane Yönetimi” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi “Eczacılık İşaret Dili” Meslek İçi Eğitim Katılım Belgesi
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu İş Sağlığı ve İş Güvenliği Eğitimi Sertifikası
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Örgütsel Değişim Ve Gelişim Yönetimi Eğitimi Sertifikası
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu / TSE Kurumu ISO 9001:2015 Kalite Yönetimi Eğitimi Sertifikası
- Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu / Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi Sertifikası

- Atomika Teknik Malvern Panalytical Marka Spraytech Model Cihazın Teorik ve Uygulamalı Eğitimi Sertifikası

