



**T.C.**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**İLAÇ ARAŞTIRMA VE GELİŞTİRME ANA BİLİM DALI**

**BAZI ANTİKANSER İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN**  
**İYONLAŞMA DAVRANIŞININ TERS FAZ SIVI**  
**KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE BELİRLENMESİ**

**Fatmanur KALKIR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-8314 nolu proje ile  
desteklenmektedir.**

**ISPARTA – 2022**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İlaç Araştırma ve Geliştirme Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: .././....

Danışman : Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY  
Süleyman Demirel Üniversitesi.  
Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma ve Geliştirme  
Ana Bilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Zehra ÜSTÜN  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Atayalvaç Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu  
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri

Üye : Doç. Dr. Tuğba SARDOHAN KÖSEOĞLU  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi  
Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY  
Enstitü Müdürü

## BEYAN

“Bazı Antikanser İlaç Etken Maddelerinin İyonlaşma Davranışının Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hazırlayan

**Fatmanur KALKIR**

Danışman

**Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ilgisini, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen, sabırlı, anlayışlı, hoşgörölü yaklaşımıyla beni yüreklendiren, tükenmez enerjisi ile yol gösteren, ufkumu açan, bakış açımı değiştiren, mesai mefhumu gözetmeksizin her an ulaşabilmeme imkan sağlayan, güzel bir çalışma ortamı sunarak laboratuvarın tüm imkanlarını kullanmama izin veren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ebru Çubuk Demiralay'a sonsuz saygı, teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sürecinde gece gündüz demeden tüm sorularımı cevaplayarak çözüm bulan, samimiyeti, yardım severliği, pratikliği ile her zaman yanımda olan, destekleyen ve motive eden çok kıymetli Dr. Öğr. Üyesi Zehra Üstün'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans yapmama imkan sağlayıp her aşamada anlayış gösteren Selçuk Ecza Deposu Şube Müdürü Cemil Akçay'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TYL-2021-8314 nolu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, teşvik eden, kendimi geliştirmem için her türlü imkanı sunan aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### Bazı Antikanser İlaç Etken Maddelerinin İyonlaşma Davranışının Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Belirlenmesi

Sunulan bu tezde Lapatinib ve Tamoksifen antikanser ilaç etken maddelerinin iyonlaşma/protonasyon ( $pK_a$ ) sabitlerinin tayini için Ters Faz Sıvı Kromatografi (RPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Hidroorganik çözücü karışımlarında organik modifiyer olarak seçilen asetonitrilin, bileşiklerin  $pK_a$  değeri ve kromatografik ayırmadaki etkileri incelenmiştir. Hidrofobik özellikteki bileşiklerin su ortamındaki  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi için asetonitrilin makroskopik sabitleri (mol kesri, dielektrik sabiti) kullanılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde mol kesri- $pK_a$  yaklaşımı ile Tamoksifen için  $pK_a$  değeri 8,733; Lapatinib için  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerleri sırasıyla 5,461 ve 7,114 olarak hesaplanmıştır.

Metot optimizasyon çalışmasında bileşiklerin seçilen mobil faz pH'sında hesaplanan kapasite faktörü, seçicilik faktörü ve ayırma gücü verileri değerlendirildiğinde, optimum ayırma koşulu pH'sı 6 olan %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımı seçilmiştir. Geliştirilen metot bu ilaç aktif bileşiklerin aynı anda ayırımı ve onların ticari ilaç dozaj formlarında tayini için uygulanmıştır. Metotun dedeksiyon limiti sırasıyla Lapatinib için 0,842  $\mu\text{g/mL}$ , Tamoksifen için 1,114  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kanser, Kemoterapötik ilaç, Kromatografik davranış, RPLC, Metot Geliştirme, Metot Validasyonu

## ABSTRACT

### Determination of Ionization Behavior of Some Anticancer Drug Active Substances by Reverse Phase Liquid Chromatographic Method

In this present thesis, Reverse Phase Liquid Chromatography (RPLC) method was developed for the determination of ionization/protonation ( $pK_a$ ) constants of Lapatinib and Tamoxifen anticancer active ingredients. The  $pK_a$  value of the compounds of acetonitrile selected as an organic modifier in hydroorganic solvent mixtures and its effects on chromatographic separation were investigated. Macroscopic constants (mole fraction, dielectric constant) of acetonitrile were used to determine the  $pK_a$  values of hydrophobic compounds in the water. When the data obtained were evaluated, the  $pK_a$  value for Tamoxifen was 8,733 when the mole fraction- $pK_a$  approach was used; The  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  values for Lapatinib were calculated as 5,461 and 7,114, respectively.

In the method optimization study, when the capacity factor, selectivity factor and resolution factor calculated at the selected mobile phase pH of the compounds were evaluated, acetonitrile-water mixture containing 50% (v/v) acetonitrile with pH 6 was chosen as the optimum separation condition. The developed method has been applied for simultaneous separation of these drug active compounds and their determination in commercial drug dosage forms. The detection limit of the method was calculated as 0.842  $\mu\text{g/mL}$  for Lapatinib and 1.114  $\mu\text{g/mL}$  for Tamoxifen, respectively.

**Key words:** Cancer, Chemotherapeutic drug, Chromatographic behavior, RPLC, Method Development, Method Validation

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Kanser.....	1
1.2. Meme Kanseri Tedavisine Farmakolojik Yaklaşım .....	2
1.3. Asit-Baz İyonlaşma Sabiti.....	4
1.4. pK <sub>a</sub> Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	5
1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	8
1.4.2. HPLC Çalışma Basamakları ve Kullanılan Temel Kavramlar .....	10
1.4.3. HPLC Yöntemiyle pK <sub>a</sub> Tayini.....	13
1.4.4. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Sudaki pK <sub>a</sub> Değerinin Belirlenmesi .....	15
1.4.4.1. Mol Kesri-pK <sub>a</sub> İlişkisi.....	15
1.4.4.2. Dielektrik Sabiti-pK <sub>a</sub> İlişkisi.....	15
1.5. RPLC Metot Geliştirme ve Validasyon Parametreleri .....	16
1.6. Tezin Amacı .....	19
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>20</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>28</b>
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve İlaç Preparatları .....	28
3.2. Cihazlar .....	28
3.3. Kromatografik Metot Geliştirme.....	29
3.3.1. Kolon Seçimi .....	29
3.3.2. Bileşiklerin Dalga Boyları .....	29

3.3.3. Çalışılan Kromatografik Koşullar .....	29
3.3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	30
3.3.5. Ayırma İçin En Uygun Koşulun Belirlenmesi .....	31
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>32</b>
4.1. Tamoksifen İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler.....	32
4.1.1. Tamoksifen'in Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması .....	34
4.1.1.1. Mol Kesri - pK <sub>a</sub> Metodu .....	34
4.1.1.2. Dielektrik Sabiti - pK <sub>a</sub> Metodu.....	35
4.2. Lapatinib İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler.....	36
4.2.1. Lapatinib'in Su Ortamında pK <sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması .....	39
4.2.1.1. Mol Kesri - pK <sub>a</sub> Metodu .....	39
4.2.1.2. Dielektrik Sabiti - pK <sub>a</sub> Metodu.....	40
4.3. Metot Optimizasyonu .....	42
4.4. Metot Validasyonu .....	43
4.4.1. Sistem Uygunluk Testleri .....	44
4.4.2. Doğrusallık ve Duyarlılık .....	44
4.4.3. Kesinlik.....	46
4.4.4. Doğruluk.....	46
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>58</b>

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.1.</b> Tamoksifen ve Lapatinib'in kimyasal yapıları .....	4
<b>Tablo 1.2.</b> Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması .....	7
<b>Tablo 3.1.</b> Kimyasallar ve ilaç preparatları .....	27
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan cihazlar .....	28
<b>Tablo 4.1.</b> Tamoksifen'in %50, %55 ve %60 (h/h) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri .....	31
<b>Tablo 4.2.</b> Asetonitrilin %50, %55, %60 (v/v) derişimlerindeki $X_{ACN}$ değerleri (37°C) .....	33
<b>Tablo 4.3.</b> Asetonitrilin %50, %55,%60 (v/v) derişimlerindeki $1/\epsilon$ değerleri (37°C) .....	34
<b>Tablo 4.4.</b> Lapatinib'in %50, %55 ve %60 (h/h) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri.....	35
<b>Tablo 4.5.</b> Belirlenen optimum koşulda hesaplanan kromatografik veriler .....	41
<b>Tablo 4.6.</b> Sistem uygunluk testlerinden elde edilen sonuçlar .....	43
<b>Tablo 4.7.</b> Kalibrasyon verileri.....	44
<b>Tablo 4.8.</b> Lapatinib ve Tamoksifen'e ait kesinlik çalışması sonuçları .....	45
<b>Tablo 4.9.</b> Tablet formülasyonlarının içerdikleri etken madde miktarları ve hesaplanan geri kazanım değerleri .....	45
<b>Tablo 5.1.</b> Tamoksifen için %50, %55, %60 (v/v) ikili karışımlarında hesaplanan $pK_a$ değerleri.....	48
<b>Tablo 5.2.</b> Lapatinib için %50, %55, %60 (v/v) ikili karışımlarında hesaplanan $pK_a$ değerleri.....	49
<b>Tablo 5.3.</b> Bileşiklerin su ortamındaki $pK_a$ değerleri.....	50

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Türkiye’de 2020 yılında erkeklerde görülen kanser vaka sayısı .....	1
Şekil 1.2. Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda görülen kanser vaka sayısı .....	2
Şekil 1.3. HPLC cihazının kısımları .....	9
Şekil 1.4. Tipik bir HPLC kromatogram örneği .....	11
Şekil 1.5. Bazik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi .....	14
Şekil 1.6. Asidik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi .....	14
Şekil 1.7. Amfiprotik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi..	15
Şekil 1.8. Örnek kalibrasyon grafiği .....	18
Şekil 2.1. Lapatinib’in iyonlaşma sabitinin tayini .....	20
Şekil 2.2. Tamoksifen’in farklı formülasyonlardaki kromatogramları .....	24
Şekil 2.3. MRM kromatogramları (A) 1,68 dakika Foretinib (B) 3,5 dakika Lapatinib (C) 0,56 dakika Masitinib .....	25
Şekil 4.1. Tamoksifen’in %50, %55, %60 asetonitril- su karışımlarındaki tR-pH ilişkilerini gösteren grafikler .....	32
Şekil 4.2. Tamoksifen’in $X_{ACN}$ - $pK_a$ ilişkisini gösteren grafik .....	34
Şekil 4.3. Tamoksifen’in $1/\epsilon$ - $pK_a$ ilişkisini gösteren grafik .....	35
Şekil 4.4. Lapatinib’in %50, %55, %60 asetonitril- su karışımlarındaki pH-t <sub>R</sub> ilişkilerini gösteren grafikler .....	37
Şekil 4.5. Lapatinib’in $X_{ACN}$ - $pK_a$ ilişkisini gösteren grafik .....	39
Şekil 4.6. Lapatinib’in $1/\epsilon$ - $pK_a$ ilişkisini gösteren grafikler .....	40
Şekil 4.7. Standart karışım kromatogramı 1) Simvastatin (I.S) 2) Tamoksifen 3) Lapatinib .....	42
Şekil 4.8. Lapatinib ve Tamoksifen’e ait kalibrasyon grafikleri .....	44
Şekil 4.9. Lapatinib içeren Tykerb® 250 mg tablette gerçekleştirilen numune analiz kromatogramları. 1) Katkısız tablet numune kromatogramı, 1-IS (2 µg/mL); 2-LPT (6 µg/mL) 2) Katkılandırılmış tablet numune kromatogram-, 1-IS (2 µg/mL); 2-LPT (12 µg/mL) .....	46
Şekil 4.10. Tamoksifen sitrat içeren Tamoxifen® 10 mg tablette gerçekleştirilen numune analiz kromatogramları. 1)Katkısız tablet numune kromatogramı, 1-IS (2 µg/mL); 2- TMX (10 µg/mL); 2) Katkılandırılmış tablet numune kromatogram-, 1-IS (2 µg/mL); 2- TMX (20 µg/mL).....	47

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>ER</b>	Östrojen Reseptörü
<b>TKI</b>	Tirozin Kinaz İnhibitörü
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>pK<sub>a</sub></b>	İyonlaşma Sabiti
<b>T</b>	Sıcaklık
<b>I</b>	İyonik Şiddet
<b>ε</b>	Dielektrik Sabiti
<b>γ</b>	Aktivite Katsayısı
<b>CE</b>	Kapiler Elektroforez
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
<b>RPLC</b>	Ters Faz Sıvı Kromatografi
<b>k</b>	Kapasite Faktörü
<b>t<sub>R</sub></b>	Alıkonma Zamanı
<b>α</b>	Seçicilik Katsayısı
<b>N</b>	Teorik Tabaka Sayısı
<b>R<sub>s</sub></b>	Ayırma Gücü
<b>r</b>	Korelasyon Katsayısı
<b>LOD</b>	Tayin Limiti
<b>LOQ</b>	Miktar Tayini Limiti
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>ICH</b>	Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
<b>NLREG</b>	Non Lineer Regresyon Programı
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>IS</b>	İç Standart
<b>USP</b>	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi

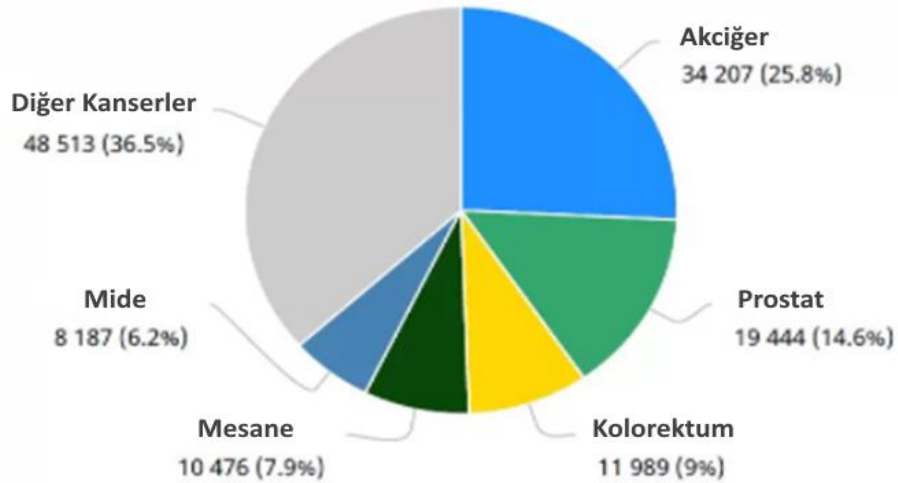
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kanser

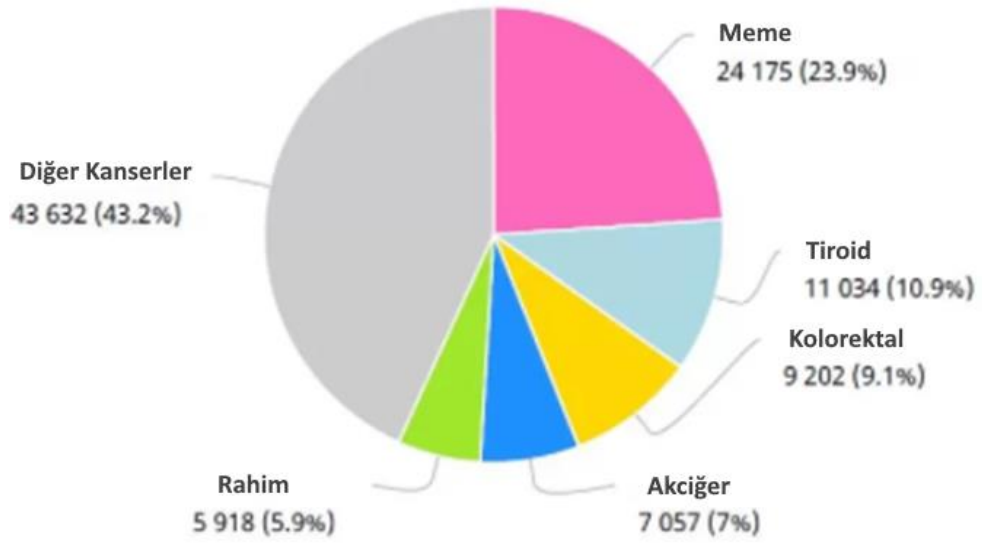
Kanser, dünyanın her ülkesinde başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır ve artan yaşam beklentisinin önünde önemli bir engel oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 yılı verilerine göre kanser; 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş öncesi ölümlerin birinci veya ikinci; 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır.

Kanser insidansı ve mortalite yükü dünya çapında hızla artmakta, bu da nüfusun yaşlanmasını ve büyümesini olumsuz yönde etkilemektedir. 2020'de dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon yeni vaka ve 10 milyon kansere bağlı ölüm tespit edilmiştir. 2040 yılına kadar da %47'lik bir artış ile dünya genelinde yaklaşık 28,4 milyon yeni kanser vakası olacağı öngörülmektedir (1).

Türkiye'de ise nüfus 84.339.067 iken, yıllık yeni kanser vaka sayısı 233.834 ve kansere bağlı yaşam kaybı sayısı 126.335 olarak bildirilmiştir (2). Akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen ve ölümlerin önde gelen nedeni olan kanser türüdür (Şekil 1.1), bunu insidans açısından prostat kanseri ve kolorektal kanser; mortalite açısından karaciğer ve kolorektal kanser izlemektedir. Kadınlarda ise meme kanseri en sık teşhis edilen kanserdir (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Türkiye'de 2020 yılında erkeklerde görülen kanser vaka sayısı (2)



**Şekil 1.2.** Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda görülen kanser vaka sayısı (2)

2020 yılında yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası bildirilmiş ve 685.000 ölümlle dünya çapında kanser ölümlerinin beşinci önde gelen nedeni haline gelmiştir. Kadınlar arasında meme kanseri, her dört kanser vakasının ve her altı kanser ölümünün birinden sorumlu olmakla birlikte ülkelerin büyük çoğunluğunda (185 ülkenin 159'unda) insidans açısından ilk sırada ve 110 ülkede mortalite açısından birinci sıradadır (1).

### 1.2. Meme Kanseri Tedavisine Farmakolojik Yaklaşım

Erken teşhis, güncel tedavi uygulamaları ve meme kanseri biyolojisinin moleküler temelini anlaşılması gibi gelişmelere rağmen, erken evre meme kanserli tüm hastaların yaklaşık %30'unda, çoğu durumda metastatik olarak hastalık tekrarlamaktadır. Meme kanseri hormona bağlı bir tümördür ve östrojenin hastalığın başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Östrojenin biyolojik etkilerine östrojen reseptörü (ER) aracılık eder ve meme tümörlerinin yaklaşık %70'i östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve/veya östrojene duyarlı ve ER'ye bağlı gen ürünlerini ifade eder. Bu nedenle, ER antagonistleri veya antiöstrojenler kullanarak ER'yi hedeflemek, hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası kadınlarda hastalığın tüm aşamaları için güvenilir bir terapötik önlem olmuştur (3).

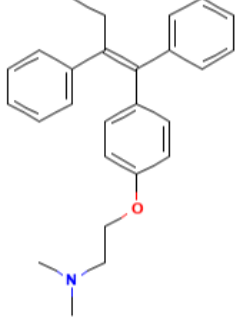
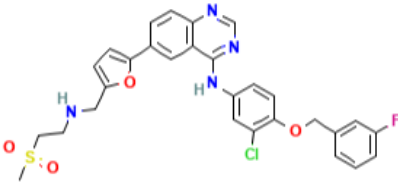
Meme kanseri hücreleri üzerindeki güçlü antiöstrojenik etkileri nedeniyle Tamoksifen; erken evre hormona duyarlı meme kanseri için adjuvan tedavinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Ayrıca, meme kanserinin kemoprevensiyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (4).

Tamoksifen, farmakolojik olarak uterusu bir agonist ancak memede bir antagonist olarak hareket eden seçici bir ER modülatörü olarak sınıflandırılan bir trifeniletilen türevidir (Tablo 1.1). Tamoksifen, reseptöre bağlanmak için östrojen ile rekabet ederek ER fonksiyonunu bozan parsiyal agonist gibi davranır. Tamoksifen'e bağlı ER kompleksi, genlerin östrojen tarafından açılmasını önleyerek, kanser hücresinin büyümesi veya çoğalmasından sorumlu olan östrojenik etkileri inhibe eder (3). Tamoksifen tedavisinin başlatılmasından sonra yaklaşık 4 hafta sonra kararlı durum konsantrasyonlarına ulaşılır, bu da eliminasyon yarı ömrünün 7 gün olduğunu gösterir. Tamoksifen metabolitleri safrada salgılanır ve enterohepatik dolaşıma girer. Fekal atılım, eliminasyonun birincil yoludur (4).

Lapatinib, bir ikili tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI) (Tablo 1.1), HER1 ve HER2 tirozin kinaz aktivitesini reseptörün hücre içi alanının ATP-bağlanma bölgesine bağlanarak bloke eder. Bu, tümör hücresi büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanır (5). 2007 yılında FDA tarafından metastatik HER2 pozitif meme kanseri için onaylanan Lapatinib; Trastuzumab, antrasiklinler ve taksan ile tedavi edilen meme kanseri hastalarının tedavisinde kemoterapötik ajan olan Kapesitabin ile kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bir aromataz inhibitörü olan Letrozol ile birleştirilen bileşik, hormon reseptörlerini ve HER2'yi birlikte eksprese eden metastatik meme kanseri için birinci basamak tedavi olarak kabul edilmiştir (6).

Lapatinib öncelikle karaciğer tarafından daha sonra da böbrekler tarafından <2% elimine edilmektedir. Serum Lapatinib konsantrasyonu uygulamadan 4 saat sonra pik noktasına ulaşır, günlük dozla birlikte yaklaşık iki kat birikir ve 6 ila 7 gün içinde kararlı duruma ulaşır bu da 24 saatlik etkili bir yarılanma ömrü olduğunu göstermektedir (7,8).

**Tablo 1.1.** Tamoksifen ve Lapatinib'in kimyasal yapıları (9)

Kimyasal Yapı	Molekül Formülü	Kimyasal Adı
 <p>Tamoksifen</p>	$C_{26}H_{29}NO$	2-[4-[(Z)-1,2-diphenylbut-1-enyl]phenoxy]-N,N-dimethylethanamine
 <p>Lapatinib</p>	$C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$	N-[3-chloro-4-[(3-fluorophenyl)methoxy]phenyl]-6-[5-[(2-methylsulfonyl)ethylamino)methyl]furan-2-yl]quinazolin-4-amine

### 1.3. Asit-Baz İyonlaşma Sabiti

Bir molekülün asit-baz iyonlaşma sabiti, genellikle negatif logaritması veya  $pK_a$  olarak rapor edilen, yeni ilaçların geliştirilmesi sırasında dikkate alınması gereken önemli bir fiziksel özelliktir. Dünya İlaç Endeksi'ndeki ilaçların yaklaşık %63'ü pH 2-12 aralığında iyonlaşabilir ve sırasıyla ~%43 ve ~%12'si tek bir bazik veya asidik fonksiyonel grup içermektedir (10).

Yeni moleküllerin başarılı bir şekilde ilaca dönüştürülmesi için uygun absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) özelliklerine ihtiyaç duyulmaktadır. İyonlaşabilen ilaçların bu farmakokinetik özellikleri  $pK_a$  değerlerinden büyük ölçüde etkilenir (11).

İyonlaşan formlar genellikle suda daha fazla çözünürken, nötr form daha lipofiliktir ve daha yüksek membran geçirgenliğine sahiptir. İyonlaşmayan kısımlar hücre zarından kolaylıkla geçebilirken iyonlaşan formlar geçemez. İyonlaşma derecesi, ilaçların vücudun farklı bölgelerine nüfuz etme davranışıyla ilgili önemli bilgiler taşır. Bir ilaç molekülünün asit-baz özelliği yani  $pK_a$  değeri biyolojik sistemlerdeki lipofilikliği, çözünürlüğü, hücreler arası geçirgenliği, hedef hücrelerle etkileşimleri, yan etkilerin indüklenmesi gibi fizikokimyasal özellikleri etkiler. Bu da sırasıyla absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) gibi ilacın farmakokinetik özelliklerini doğrudan etkiler. Ayrıca bileşiklerin iyonlaşma sabitini bilmek, ilacın farmakolojik aktivitelerini ve farmakodinamik özelliklerini tahmin edebilmek için gereklidir ve  $pK_a$  değeri, ilaç molekülü için analiz yöntemleri geliştirilirken optimum koşulların seçilmesinde de önemli bir parametredir (12-15).

İlacın  $pK_a$  değerine yakın pH değerinde, ilaç molekülü iyonlaşmış ve iyonlaşmamış formlarda eşit miktarlarda bulunur. İlacın  $pK_a$  değerinin bilinmesi çok önemlidir çünkü ilaç molekülleri gastrointestinal kanalda emildiğinde geniş bir pH aralığına (midede pH 2'den ince bağırsakta pH 8'e kadar) maruz kalacaklardır. Bunun için  $pK_a$  değerinin bilinmesiyle ilacın nerede daha iyi emileceği konusunda daha fazla bilgi sahibi olmak mümkündür. Ayrıca ortamın pH'sını değiştirerek ilacın çözünürlüğü de değiştirilebilir. İlaç suda çözünür (genellikle tuz formunda) veya yağda çözünür olabilir (16).

Evrensel olarak bir sabit olarak adlandırılmasına rağmen, iyonlaşma sabiti yani  $pK_a$  aslında gerçekten sabit değildir; sıcaklığa (T), iyonik şiddete (I) ve çözücü dielektrik sabitine ( $\epsilon$ ) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.  $pK_a$  değerleri çözeltinin iyonik şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Farklı iyonik türlerin aktivite katsayıları ( $\gamma$ ), iyonik şiddete bağlıdır (Debye-Hückel teorisi) (17).

#### **1.4. $pK_a$ Tayininde Kullanılan Yöntemler**

Asit-baz iyonlaşma sabitlerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler vardır. Geleneksel olarak potansiyometri ve UV-Vis absorpsiyon spektrometrisi, doğrulukları ve tekrarlanabilirlikleri nedeniyle iyonlaşma sabitlerinin belirlenmesi için yaygın kullanılan tekniklerdendir. Son 20 yılda ise sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi bazı teknikler bu parametrenin tayininde güçlü bir alternatif haline gelmiştir. Bu

yöntemlerin çoğunda, analitin fiziksel bir özelliği, bir çözeltinin pH'sının bir fonksiyonu olarak ölçülür ve elde edilen veriler, iyonlaşma sabitlerinin belirlenmesi için kullanılır. Ayrıca,  $pK_a$  değerleri, moleküler yapı kullanılarak tahmini hesaplama yapan metotlarla da elde edilebilir.

**Potansiyometrik Titrasyon:** Doğruluğu ve hızlı olması, cihazların ticari olarak bulunabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle  $pK_a$  değerlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (12-17).

Bir potansiyometrik titrasyonda, bir numune, pH elektrotu kullanılarak asit veya baz ile titre edilir. Potansiyometrik titrasyonda, titre edilen çözeltinin pH'sındaki bir değişikliğin neden olduğu elektriksel potansiyel değişimi, bir cam elektrot kullanılarak izlenmektedir. pH değişimine karşı belirlenen potansiyel değişimi grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidalın orta noktası, analizlenen bileşiğin  $pK_a$  değerini verir. Bu değişim, pH'sı bilinen standart çözeltiler kullanılarak doğrusal bir grafiğe dönüştürülebilir. İyonlaşma sabitleri sıcaklığa göre değiştiğinden sıcaklığın titrasyon sırasında mutlaka kontrol edilmesi gerekmektedir. Titrasyon eğrilerinden  $pK_a$  değerini hesaplamak için gran grafiği, ikinci türev ve doğrusal olmayan regresyon yöntemleri kullanılmaktadır (12).

**Spektrofotometrik Titrasyon:** Bu yöntem potansiyometrik titrasyona alternatif olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde çok daha düşük çözünürlüğe ve daha düşük numune konsantrasyonlarına sahip bileşiklerle çalışılabilir. Spektrofotometrik yöntemin başlıca avantajı; uygun molar absorpsiyon katsayılarına sahip bileşiklere karşı daha yüksek hassasiyet göstermesidir (12).

Bir molekülün iyonlaşmış ve iyonlaşmamış biçimlerinin spektrumları farklı olduğundan  $pK_a$ 'yı belirlemek için UV/Vis spektrofotometrisi kullanılabilir (18). Numunenin absorpsiyon spektrumu, titrasyon sırasında nötr ve iyonlaşmış türlerin konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Absorbanstaki en büyük değişiklik,  $pK_a$  değerine karşılık gelen pH'da meydana gelir. Spektrofotometrik yöntemler, potansiyometrik yöntemlerde olduğu gibi hassasiyeti oldukça yüksek yöntemlerdir (12).

**Kapiler Elektroforez (CE):** Kapiler elektroforez yöntemi (CE) ile  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi, iyonlaşan bir bileşiğin sabit iyonik şiddete ve çeşitli pH'lara sahip bir dizi elektrolit çözeltisindeki etkin hareketliliğinin gözlemlenmesine dayanır. Yüksüz durumda, çözünen sıfır hareketliliğe sahipken, tamamen iyonize hali maksimum hareketliliğe sahiptir. Bu hareketlilik, analitin deneysel olarak belirlenen göç süresinden ve farklı pH değerlerinde elektroozmotik akıştan yararlanılarak hesaplanır.

Oldukça hassas bir ayırma tekniği olarak CE,  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi için saf olmayan numuneler üzerinde çalışma imkanı, düşük miktarda numune üzerinde çalışma, analitlerin konsantrasyonlarını dikkate almadan sadece göç sürelerini kullanma, oldukça kısa çalışma süreleri gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır (12).

**Kromatografi:** Kromatografi, ayrılması istenen bileşiklerin bir mobil fazın içerisinde yer alarak belirli bir yönde sabit bir fazın içerisinden geçme prensibine dayanan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Kromatografi ilk olarak 1906'da Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin ayırımında kullanılmıştır. İlk modern cihaz ise 1965 yılında Yale Üniversitesi, Csaba Horvath tarafından geliştirilmiştir. A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge 1952 yılında, Fenn J. B. ve Tanaka K. 2002 yılında bu alanda çalışmış ve Nobel Bilim Ödülü almışlardır (19).

Kromatografik yöntemler ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz biçimlerine göre sınıflandırılır (Tablo 1.2).

**Tablo 1.2.** Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (19)

<b>Kromatografi Çeşitleri</b>	<b>Uygulama Biçimine Göre</b>	<b>Faz Tiplerine Göre</b>
Adsorpsiyon Kromatografisi	a)Düzlemsel Kromatografi	a) Sıvı Kromatografisi
Partisyon Kromatografisi	Kağıt Kromatografisi	Sıvı-Katı Kromatografisi
İyon Değişirme Kromatografisi	İnce Tabaka Kromatografisi	Sıvı-Sıvı Kromatografisi
Jel Filtrasyon Kromatografisi	b) Kolon Kromatografisi	b) Gaz Kromatografisi
	Gaz Kromatografisi	Gaz-Katı Kromatografisi
	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	Gaz-Sıvı Kromatografisi

#### 1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

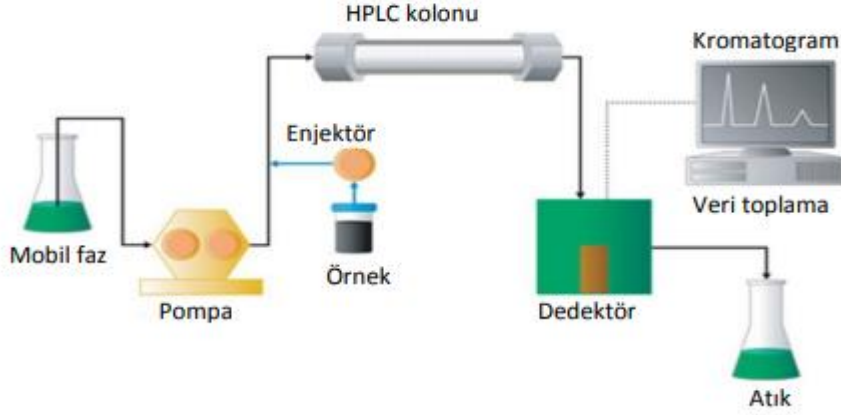
HPLC, duyarlılığının yüksek olması, kantitatif analizlerde kullanılabilir olması, uçucu olmayan/sıcaklıkta kolayca bozulabilen maddeleri ayırmaya olanak sunması, geniş derişim aralıklarında çalışabilmesi, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, çok yüksek duyarlılığa sahip olması ve çok geniş kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle analitik ayırma yöntemleri arasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir (20).

Benzer kromatografik polariteye sahip moleküller birbirlerini çekme eğilimindedir; farklı polariteye sahip olanlar çok daha zayıf bir çekim sergilerler ve hatta birbirlerini itebilirler. Kromatografik ayırmanın temeli bu polariteye dayalıdır. HPLC yöntemi polarite esasına göre ikiye ayrılır.

Normal Faz Sıvı Kromatografisi'nde, sabit faz mobil fazdan daha polardır. Silika veya alümina partiküller üzerine tutturulmuş sabit faz; hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımı gibi az polar çözücü mobil fazlar kullanılır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla  $-CN$ ,  $-NO_2$  veya  $-NH_2$  gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk etmektedir, böylece ayırım gerçekleşmektedir (21).

Ters Faz Sıvı Kromatografisi (RPLC) yönteminde hareketli faz sabit faza kıyasla daha polardır. Bu sebeple polar bileşiklerin yanı sıra özellikle apolar maddelerin ayırımında bu yöntem tercih edilir. İlaçların çoğunlukla apolar yapıda olmasından dolayı ilaç analizlerinde Ters Faz Kromatografisi sıklıkla kullanılmaktadır. Genellikle oktadesilsilan gibi sabit fazlar en çok kullanılmakla beraber, kısa zincirli ( $C_2$ ,  $C_8$  vb.) fonksiyonel gruplar taşıyan, fenil bağlı veya siyano bağlı sabit fazlar da kullanılabilir. Polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha çok tutunurken, apolar maddeler ise kısa alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar. Bundan dolayı uzun alkil zincirli sabit fazlar ( $C_{18}$ ) apolar maddelerin ayırımında, kısa alkil zincirli sabit fazlarda ( $C_8$ ,  $C_4$ ,  $C_2$ ) polar maddelerin ayırımında kullanılmaktadır. Mobil faz bileşeni olan tampon çözeltiler oldukça önemlidir, genellikle su, metanol, tetrahidrofur veya asetonitril gibi çözücüler kullanılır (20).

HPLC cihazı temel olarak şu bölümlerden oluşmaktadır: Mobil faz haznesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. HPLC cihazının kısımları (19)

**Mobil Faz (Çözücü) Haznesi:** HPLC cihazında bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplar kullanılır. Çalışmada farklı polaritede çözücüler seçilebildiği için bu kapların kalitesi önem arz etmektedir. Kolonu ve numuneyi etkileyerek hatalara sebebiyet vermemesi için kullanılan çözeltiler saf olmalıdır.

**Degazer:** Mobil faz içerisindeki gazların giderilmesi için kullanılır. Kullanılmadan önce hazırlanan mobil fazın gazının alınması gereklidir. Mobil fazda hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda sorunlara yol açabilmektedir (pik genişlemesi veya alıkonma zamanının değişmesi).

**Pompa:** Sistemde numune ve mobil fazın enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan en önemli kısımlardan biridir. Pompa, sıvının belli bir akış hızı ile sistem içerisinde dolaşımını sağlar. Bu akış hızı dakika/mL cinsinden ifade edilir. Yüksek basınçta çalışabilmesi, basınç dalgalanmasının düşük olması, doğruluk ve tekrarlanabilirliğinin iyi olması, kendi üzerinden ayarlanabilir seçeneği olması bu yöntemin en büyük avantajlarındandır.

**Enjektör:** HPLC sisteminde enjekte edilen numune basınç yardımıyla mobil faza karışır ve sonrasında HPLC kolonuna mobil faz yardımıyla ulaşır.

**Kolon Fırını:** Çalışmanın kalitesi açısından kolonun ortam sıcaklığının sabit olması gerekir. Kolon fırını, sistemin sıcaklığını istenilen seviyede tutmak için kullanılır.

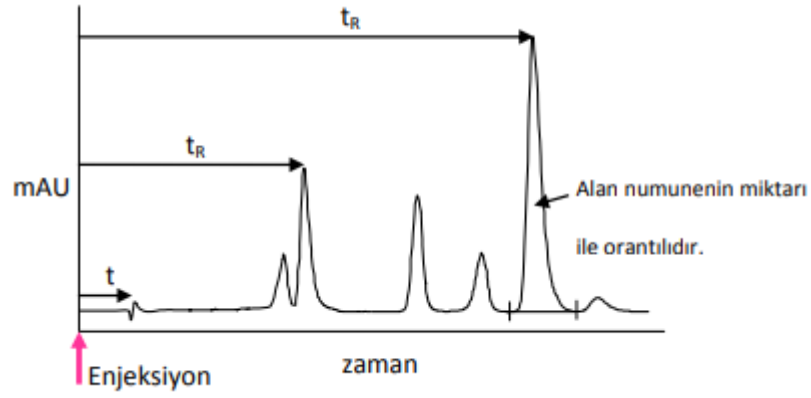
**Kolon:** HPLC donanımının en önemli bölümlerinden birisi olan kolon yani sabit faz, bileşenlerin ayırımından sorumludur. Kolon iç yüzeyinde kullanılan malzemeler kimyasal ve fiziksel özellikleri açısından çok çeşitlidir ve kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC yönteminin özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığındadır. Kolonların uzunluğu genelde 30-300 mm arasındadır. Kolon uzunluğu arttıkça bileşenler daha iyi ayrılmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz kullanılmaktadır.

**Dedektör:** Kolondan çıkan bileşenlerin ayrımları ve miktarlarının belirlenmesi için gereklidir. Işın enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren, fiziksel ve kimyasal büyüklükleri gösteren veya kaydeden cihazlardır. Zamana karşı dedektör cevabına ait bir grafik oluşturulur ve bu grafiğe de kromatogram denir (22).

#### **1.4.2. HPLC Çalışma Basamakları ve Kullanılan Temel Kavramlar**

Analiz edilecek madde, uygun çözünürlüğe bağlı olarak bir çözücüde çözülür. Bileşenlerin ayrımı sabit faz olarak isimlendirilen kolonda gerçekleşir. Çözünen karışım kolona enjekte edilir. Kolonda, mobil faz yardımıyla bu karışımın hareketini sağlamak için bir basınç uygulanır. Bu basınçla birlikte farklı bileşenler, kolonu farklı hızlarda terk ederler. Böylece bileşenler farklı zamanlarda kolondan ayrılırlar. Bileşenler ayrıldıktan sonra miktar tayini yapabilmek için dedektörlerden yararlanır. Bunun için numunelerin özelliklerine göre UV, floresans, iletkenlik, kütle gibi farklı detektörler kullanılabilir. Dedektörden elde edilen kromatogramlar yorumlanır (22).

Kromatogram, tayini yapılan numunenin her bir bileşeni için belirli zamanlardaki derişim değerine karşı elde edilen yanıtın uygun bir dedektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafiğe verilen isimdir. Veriler, kromatogram sayesinde yorumlanabilir. Şekil 1.4'te iki bileşenli bir numune için kromatogram örneği yer almaktadır.



**Şekil 1.4.** Tipik bir HPLC kromatogram örneği (23)

Numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra cevap sinyali olan pikin dedektöre gelmesine kadar geçen süre alıkonma zamanını gösterir. Kromatografide pikin alıkonma zamanı  $t_R$  ile gösterilir. Numunedeki her bir analit için farklıdır. Kromatografik karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen de ( $k$ ) faydalanılır. Kapasite faktörü, kolondaki maddenin ilerleme hızıdır. Kapasite faktörü seçilen yöntemde, bileşenlerin kendi fiziksel ve kimyasal yapısına göre farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Optimizasyonda dikkat edilmesi gereken parametrelerden biridir.

Kapasite faktörü aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.1)$$

$t_R$ : Bileşenin alıkonma zamanı

$t_0$ : Kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanı

$k$  değerinin büyük olması, bileşenin sabit fazda iyi tutunduğundan kolon boyunca yavaş ilerlediğini;  $k$  değerinin küçük olması ise bileşenin hareketli faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolonda hızlı ilerlediğini ifade etmektedir.  $k$ , 1-10 arasında olmalıdır.  $k$  çok küçükse bileşik çözücü pikinden ayıramaz;  $k$  çok büyük olursa ise ayırma işlemi uzun sürer.  $k$  değerlerinin bu aralıkta tutulması için, mobil faz ve sabit faz bileşimlerinin değiştirilmesi gerekir.

Seçicilik ( $\alpha$ ), kolonda daha uzun süre tutunan maddenin kapasite faktörünün, daha kısa tutunan maddenin kapasite faktörüne oranıdır. Daima 1'den büyük olmalıdır. Sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterir, mobil faz bileşimi de seçiciliği kısmen etkilemektedir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (1.2)$$

Teorik tabaka sayısı (N), kolondan çıkan pikin simetrik olmasıyla ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgili olan bir parametredir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin özelliklerine ve deney koşullarına (akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi) da bağlıdır. Tavsiye edilen değer  $N > 2000$  olmalıdır. Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.3)$$

N: Teorik tabaka sayısı

$t_R$ : Bileşenin alıkonma zamanı

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

Ayırma gücü ( $R_s$ ) hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik faktörü kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pikin  $R_s$  değerinin  $\geq 1,5$  olması ayırmanın tam olarak gerçekleştiğini gösterir. Ayırma gücü için geliştirilen bağıntı aşağıda yer almaktadır:

$$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{P0,5}} \quad (1.4)$$

$R_s$ : ayırma gücü,

$t_1$ : Birinci pikin alıkonma zamanı,

$t_2$ : İkinci pikin alıkonma zamanı,

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

$W_{P0,5}$ : İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliğidir.

Ayırma gücü; alıkonma, seçicilik ve etkinlik olmak üzere üç temel faktöre bağımlı olarak Purnell eşitliğiyle de ifade edilir.

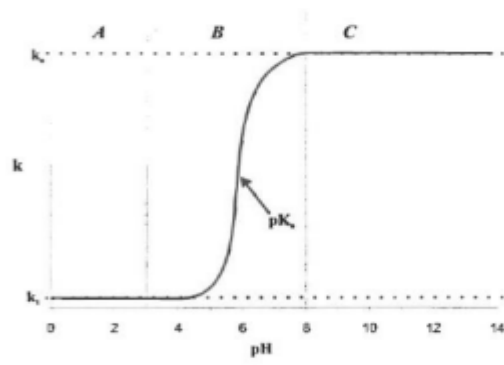
$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) \sqrt{N} \left[\frac{k_2}{1+k_2}\right] \left[\frac{\alpha-1}{\alpha}\right] \quad (1.5)$$

Kuyruklanma faktörü (T), kromatogramda görülen piklerin simetrisini ifade eder. Her zaman simetrik olan pikler çalışmalarda tercih edilmelidir. Pik taban yüksekliğinin %5'lik kısmından ölçülerek hesaplama yapılır. Simetrik olmayan pikler seçilirse; yanlış tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları, yanlış miktar tayini, tespit edilemeyen pik kuyruklanmaları ve düşük alıkonma tekrarlanabilirliği gibi problemler oluşabilir. Kolonlar uzun süre kullanıldığında kuyruklanma sık görülür ve alınan sonuçlar doğru olmayabilir (23,24).

### 1.4.3. HPLC Yöntemiyle pK<sub>a</sub> Tayini

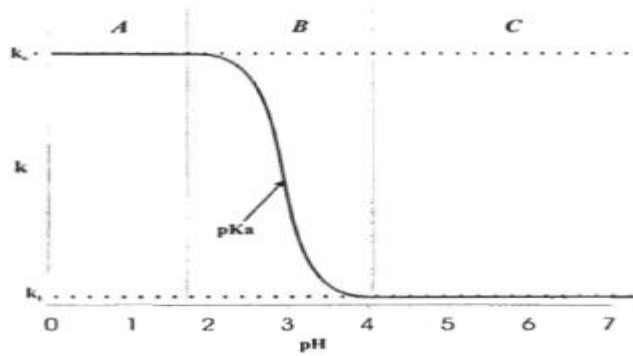
İyonlaşan analitin alıkonması mobil fazın pH değerine bağılı olarak değişmektedir ve bazik bileşenler için alıkonma sigmoidal davranış göstermektedir. Bazik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağılı olarak değişimi 3 bölgede incelenebilir:

Tamamen protonlanmış bölge olan A bölgesinde; analit düşük alıkonma gösterir. Analit daha çok hidrofilik formdadır. Kısmi protonlanmış bölge olan B bölgesinde; protonlanmış ve protonlanmamış iki analit formu gözlenir ve kötü pik şekillerine, stabil olmayan alıkonmaya sebep olur. Analitin nötral formu protonlanmış formuna göre daha güçlü alıkonmaya sahip olduğu için, moleküller sabit faz ile daha fazla etkileşim gösterirler. pH değerindeki küçük değişimler alıkonmayı büyük oranda değiştirir. Analitin nötral formda olduğu bölge C bölgesi ise en hidrofobik olduğu için en uzun alıkonma gösterir (Şekil 1.5) (25).



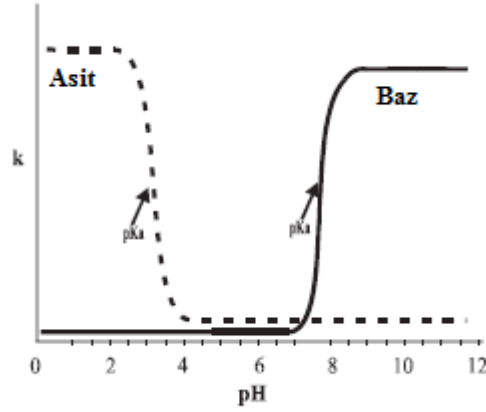
**Şekil 1.5.** Bazik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi (25)

Asidik bileşikler için aynı tarzda bir alıkonma gözlenir, fakat alıkonmaları bazik davranışın aynadaki simetrik görünüşü gibidir. A bölgesinde bazik analitler oldukça düşük alıkonma gösterir (iyonik formdaki analit) iken asidik analitler (nötral formdaki analit) uzun alıkonma davranışı gösterir. B bölgesinde pikler yaygındır ve bazen kuyruklanma durumu gösterebilir. Stabil olmayan alıkonma görülür, pH değerindeki ya da mobil fazdaki küçük değişiklikler alıkonmayı büyük oranda etkiler. C Bölgesinde ise asidik analitler için oldukça kısa alıkonma davranışı görülür (Şekil 1.6) (25).



**Şekil 1.6.** Asidik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi (25)

Amfiprotik bileşikler yapısında hem asidik hem de bazik fonksiyonel grup bulundurlar. Bu tip bileşiklerin  $pK_a$  değerleri arasındaki farka bağlı olarak biri asidik gruba diğeri de bazik gruba ait olan iki ayrı sigmoidal gözlenir (25).



**Şekil 1.7.** Amfiprotik bileşiklerin mobil faz pH değerine bağlı olarak değişimi (26)

#### **1.4.4. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Sudaki $pK_a$ Değerinin Belirlenmesi**

Ters Faz Sıvı Kromatografi yönteminde su ortamında çözünürlüğü zayıf olan bileşiklerin  $pK_a$  değerinin belirlenebilmesi için mobil faz ortamına bir miktar organik çözücü ilave edilmesi gerekmektedir. Mobil fazda organik modifiyerin bulunması analitin  $pK_a$ ' sını doğrudan etkilemektedir. Bir bileşiğin su ortamında çözünmese de su ortamındaki  $pK_a$  değeri hesaplanabilir. Bileşiğin su-organik çözücü karışımında elde edilen  $pK_a$  verileri kullanılarak farklı metotlarla bileşiğin sudaki değeri bulunabilir.

##### **1.4.4.1. Mol Kesri- $pK_a$ İlişkisi**

Bu metotta mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık, kullanılan çözücünün mol kesri değerlerinin çalışılan sıcaklık için bilinmesi gerekmektedir. Mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı, mobil fazdaki  $pK_a$  değerleri grafiğe geçirildiğinde doğrusal grafikten elde edilen fonksiyonun kesim noktası, analitin su ortamındaki  $pK_a$  değerini verir (27).

##### **1.4.4.2. Dielektrik Sabiti- $pK_a$ İlişkisi**

Bu metotta mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık kullanılan çözücünün dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) değerlerinin çalışılan sıcaklık için bilinmesi gerekmektedir. Bu yaklaşımda  $1/\epsilon$ -  $pK_a$  ilişkisini kullanarak doğrusal bir grafik elde

edilir. Doğrusal fonksiyonda çalışılan sıcaklıktaki su ortamında  $1/\varepsilon$  değerinin bilinmesi gerekmektedir (27).

### **1.5. RPLC Metot Geliştirme ve Validasyon Parametreleri**

RPLC yönteminde analizlenen bileşiklerin kromatografik davranışını kontrol eden parametreler kolon sıcaklığı ve mobil fazın özellikleridir. Kolon sıcaklığı ve mobil fazın içerdiği organik çözücü derişimi ve mobil faz pH'sının alıkonma zamanına etkisi incelenerek optimum deneysel parametrelerin belirlenmesi sağlanır. Yapılacak çalışma ile ilgili detaylı kaynak taraması, referans metot ve makale araştırması yapılarak bu özelliklere uygun mobil faz, kolon vb. seçilebilmektedir (22).

Bu yöntemde optimum kromatografik koşullar belirlendikten sonra analizlenecek bileşiklerin öncelikle kalitatif tayini yapılır. Kalitatif tayinde, bileşiklerin kapasite ve seçicilik faktörü değerleri 1'in üzerinde; ayırma gücü değeri 1,5'un üzerinde olmalıdır. Bu koşullar sağlandıktan sonra geliştirilen metot için sistem uygunluk testleri gerçekleştirilir. Sonrasında metot validasyonu işlemine geçilir.

Metot validasyonu, sistemin amaçlanan kullanım için gerektiği gibi çalışıp çalışmadığı, doğru, kesin ve güvenilir analitik veriler sağlayarak önceden belirlenmiş spesifik referansları karşılayıp karşılamadığı gibi konular hakkında bilgi veren prosedürdür. Bir metotun geçerliliği, analiz edilecek bilinmeyen moleküle benzer numuneler veya standartlar kullanılarak laboratuvar deneylerinde gösterilmelidir. Kromatografik metotların ilk rutin kullanımdan önce valide edilmesi gerekir. Bunun için de resmi kuruluşlar tarafından yayınlanan kılavuzlar dikkate alınır. En doğru sonuçları elde etmek için, numune alma, numune hazırlama, kromatografik ayırma, saptama ve veri değerlendirmesi gibi metotun tüm değişkenleri, amaçlanan numune ile aynı matrisi kullanarak dikkate alınmalıdır.

Validasyon çalışmaları; metot performans verilerini belirli kriterlerle karşılaştırarak, değerlendirilen yöntemin geçerli bir şekilde performans gösterip göstermediğinin kesin olarak belirlemesini sağlar (28).

### **Sistem Uygunluk Testleri**

Sistem uygunluk testleri, metot ve sistemin birbiri ile olan uyumunu ölçmek ve analizlerin beklendiği gibi gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermeyi sağlayan testlerdir. Bu testler kalite kontrol çalışmalarının önemli bir bölümünü oluşturmakta, buna ek olarak analizi yapılan bileşiklerin ayrımının ve metotun tekrarlanabilirliğinin sistemle uyumlu olduğunu doğrulamak için kullanılmaktadır. Sistem uygunluk testlerinde kolon verimliliği, pik simetrisi ve ayırma gücü kontrol edilerek referans değerlerle olan uyumu ölçülmektedir (29).

### **Doğruluk**

Doğruluk, analiz sonuçlarının gerçek değere veya kabul edilen referans değere yakınlığı olarak tanımlanmaktadır. Doğruluk belirlenirken mevcut referans değer ile deneysel sonuç karşılaştırılmakta, referans değer olmadığı durumlarda ise doğruluk ölçümü geri kazanım deneyleri ile yapılmaktadır. Bir matriks ortamına derişimi bilinen numune ile farklı derişimlerde katkılandırma yapılarak elde edilen sonuçlardan geri kazanım değerleri hesaplanabilmektedir (30).

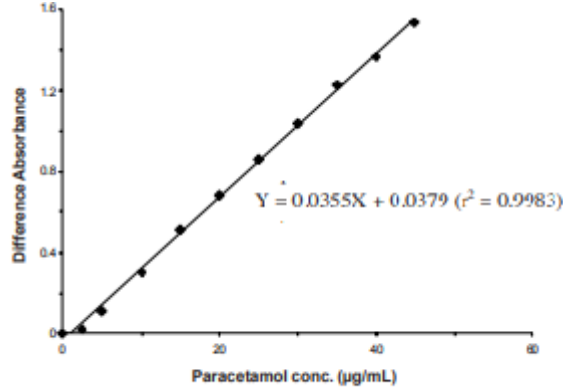
### **Kesinlik**

Kesinlik, bir numunenin farklı ölçümler sonucunda elde edilen verilerinin birbirlerine yakınlığı (tekrarlanabilirliği) olarak açıklanabilmektedir. Bir metotun kesinliği ise varyans, standart sapma, bağıl standart sapma veya varyasyon katsayısı gibi parametrelerle ifade edilmektedir. Kesinlik tayini, gün içi ve günler arası çalışmaların yapılmasıyla da belirlenebilmektedir. Tekrarlanabilirliğin ölçülmesi için en uygun seçeneklerden biri olan gün içi çalışmalar; aynı gün, aynı araştırmacı, aynı laboratuvar ve aynı koşullar altında en az beş tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmelidir (30).

### **Doğrusallık**

Geliştirilen yöntemin doğrusallığı, analitin konsantrasyonu ile dedektör cevabının orantılı olarak elde edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Neredeyse bütün analitik metotlar için kalibrasyon işleminin yapılması gerekmektedir. Doğrusallığın belirlenebilmesi için en az beş farklı nokta olacak şekilde kalibrasyon grafiği

oluşturulmalıdır. Oluşturulan kalibrasyon grafiklerinde korelasyon katsayısı (r) 0.99 ve üzerinde olan bir doğru elde edilmesi, geliştirilen metotun doğrusallığının yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 1.6) (31).



Şekil 1.8. Örnek kalibrasyon grafiği (32)

### **Tayin Limiti (LOD) ve Miktar Tayini Limiti (LOQ)**

LOD (tayin limiti) ve LOQ (miktar tayini limiti) parametreleri, geliştirilen metotun validasyonunda kullanılan önemli hesaplamalardır. Bu iki parametre arasındaki temel fark ise LOD; tayin edilebilen en küçük analit konsantrasyonu, LOQ ise kabul edilebilir tekrarlanabilirlik ve doğrulukla belirlenebilecek en küçük analit konsantrasyonu şeklinde tanımlanabilir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim (m) ve standart sapma (SS) değerleri kullanılarak bu iki parametrenin hesaplanması Eşitlik 1.6 ve Eşitlik 1.7'de gösterilmektedir (33).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SS} / m \quad (1.6)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SS} / m \quad (1.7)$$

## 1.6. Tezin Amacı

Dünya’da ve Türkiye’de hızla gelişmeye devam eden ilaç sektörüne bakıldığında, bir ilacın bulunuşundan etkinliği kanıtlanarak piyasaya sürülüşüne kadar oldukça zahmetli ve uzun bir süreç gerekmektedir. Tüm bu süreçte ilaçların bütün klinik, fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri detaylı olarak incelenmeli ve mutlaka raporlanmalıdır.

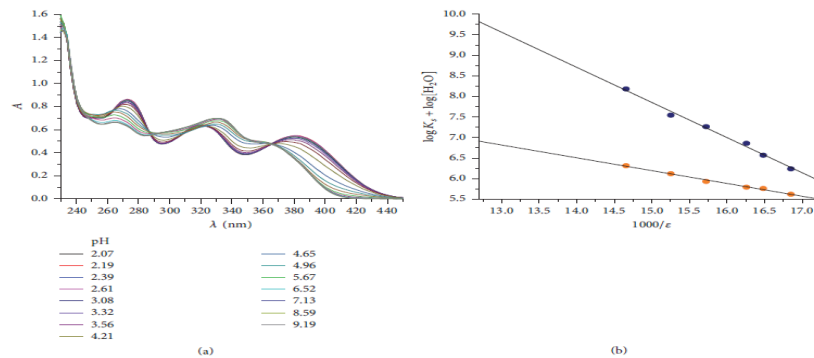
Bu tezde öncelikle meme kanserinin tedavisinde kullanılan Tamoksifen ve Lapatinib’in, özellikle ilaç sektöründe, ilaç etken maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça yaygın bir kullanım alanına sahip olan Ters Faz Sıvı Kromatografi (RPLC) yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin ( $pK_a$ ) tayini amaçlanmıştır.  $pK_a$  tayininden sonra ise deneme-yanılma metotundan uzak, bileşikler için  $t_R$ -pH ilişkisi kullanılarak optimum ayırma koşulu belirlenmesi ve bu koşullarda metot validasyonunun yapılarak Tamoksifen ve Lapatinib’in farmasötik formülasyonlardaki kantitatif tayini amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında, meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar olan Tamoksifen ve Lapatinib'in RPLC metoduyla  $pK_a$  değerlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışılan mobil faz pH değerlerinde elde edilen alıkonma zamanı ve kapasite faktörü değerleri kullanılarak bileşiklerin optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Geliştirilen metotun validasyonu yapılarak bileşiklerin ticari preparatlarda tayini RPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Lapatinibin  $pK_a$  değerlerinin tayinine yönelik detaylı literatür taraması sonucunda bileşiğe ait  $pK_a$  değerinin deneysel olarak belirlendiği tek bir makaleye rastlanmıştır. UV-Vis spektrofotometrik yöntemle yapılan bu çalışmanın özeti aşağıda sunulmuştur.

Tóth vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada Lapatinib'e ait  $pK_a$  değeri UV-pH titrasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Numune çözeltisi ( $I=0,15M$  KCl) 7mM derişiminde dimetilsülfoksitte çözülerek hazırlanmıştır. UV-pH titrasyonu azot atmosferi altında sabit sıcaklıkta ( $t=25,0 \pm 0,5^\circ C$ ) gerçekleştirilmiştir. Lapatinib'in su ortamında çözünürlüğü düşük olduğundan altı farklı metanol-su ikili karışımında (23-43% (w/w))  $pK_a$  değerleri belirlenmiştir. Titrasyon, pH'sı 2,5-9 arasında değişen çözeltilerle gerçekleştirilmiştir. 200-700 nm arasında her bir pH değerinde kaydedilen spektral veriler Şekil 2.1'de görülmektedir. Metanol'ün dielektrik sabiti değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky eşitliği ile su ortamındaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır.



Şekil 2.1. Lapatinib'in iyonlaşma sabitinin tayini

Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon metodu ile bileşimin  $pK_{a1}$  değeri  $7,72 \pm 0,07$ ;  $pK_{a2}$  değeri  $5,08 \pm 0,05$  olarak hesaplanmıştır(34).

Tamoksifen'in  $pK_a$  değerlerinin tayinine yönelik detaylı literatür taraması sonucunda bileşiğe ait  $pK_a$  değerinin deneysel olarak belirlendiği tek bir makaleye rastlanmıştır. Potansiyometrik titrasyon yöntemiyle yapılan bu çalışmanın özeti aşağıda sunulmuştur.

Knoop ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında; Tamoksifen ve klorlu türevi olan Toremifen'in suda ozonla oksidasyonu ile pH'a bağlı reaksiyon kinetiği, reaksiyon yolu, transformasyon ürün oluşumu ve  $pK_a$  değerinin bulunması için araştırma yapılmıştır. Tamoksifen'e ait  $pK_a$  değeri potansiyometrik titrasyon metodu ile belirlenmiştir. Cam elektrot, pH 4 ve pH 9 tampon çözeltileri kullanılarak kalibre edilmiştir.  $pK_a$  tayini için kullanılan tüm çözeltiler, 0,3'lük sabit bir iyonik gücü korumak için 0,15 M KCl içermektedir ve titrasyonlar,  $21,1 \pm 1,1$  °C ortam sıcaklığında, nitrojen atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Titrant NaOH'yi standardize etmek için 0.01 M HCl kullanılmıştır. 0.01 M fosforik asidin  $pK_a$  doğruluğu  $\pm 0,22$  olarak belirlenmiştir. Titrasyon için, analitin 0.05 mM katyonik türlerini içeren %20 (v/v) asetonitril-su karışımı kullanılmıştır.  $pK_a$ , ikinci türev kullanılarak belirlenmiştir ve daha sonra sudaki  $pK_a$  değeri Völgyi ve diğerlerine göre hesaplanmıştır. Buna göre Tamoksifen ve Toremifen'in  $pK_a$  değerleri sırasıyla  $8,96 \pm 0,11$  ve  $9,04 \pm 0,10$  olarak bulunmuştur. Ayrıca Sekiz dönüşüm ürünü tanımlamak için LC/MS kullanılmıştır. Deneysel pH 2, 7 ve 11'de yapılmıştır. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 ve 30 uM'lik konsantrasyonlar elde etmek için ozon çözeltisi eklenmiştir. Çözücü olarak metanol (+%0.1 (h/h) formik asit)/su (+0.1% (h/v) formik asit) karışımı seçilmiş ve bir Kinetex C8 kolonu (50 x 2.1 mm; 5 um; 100 Å; Phenomenex, Aschaffenburg) kullanılarak analiz yapılmıştır. Criegee reaksiyonu ve hidroksilasyonun yanı sıra N-oksit oluşumundan türetilen ürünler gözlemlenmiştir. Toksik etkiler, pH 7'de Tamoksifen'in ozonlanmasından önce ve sonra aliivibrio fischeri'nin biyoluminesansına dayalı bir biyo-tahlil ile araştırılmıştır (35).

Tezde çalışılan ilaç etken maddelerinin farmasötik preparatlarda ve biyolojik numunelerde kantitatif tayinlerine yönelik çalışmalara literatürde rastlanmıştır. Bu

çalışmaların hepsi deneme yanılma yöntemiyle yapılmıştır. Sistematik bir çalışma yoktur. Mevcut olan literatürler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Santana ve arkadaşlarının (2008), köpek plazmalarında tek oral doz uygulaması sonrası Tamoksifen'in Ters Faz Sıvı Kromatografi yöntemi ile tayinine yönelik yaptıkları çalışmada, Waters CN Nova-Pak 60 Å, 4 µm (6 x 75 mm) kolon kullanılmış, çalışma şartları 0,3 mL/min akış hızı ve 35°C olarak belirlenmiştir. Bileşikler 280 nm'de UV dedektör kullanılarak tayin edilmiş ve iç standart olarak klomifenin seçilmiştir. Bileşiklerin alıkonma zamanlarını belirlemek için metanol ve asetik asit (99:1) içerisine %1,%0,05, %0,035, %0,025, %0,01 oranlarında amonyum asetat tampon çözeltisinden eklenerek çeşitli mobil fazlar hazırlanmıştır. Geri kazanım değerleri %97,35 ile %103,64 arasında bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,981 ng/mL ve 2,97 ng/mL olarak bulunmuştur. Valide edilen HPLC metotunun, Tamoksifen'in klinik farmakokinetik çalışmalarında kullanılabilir basit, hızlı, güvenilir, seçici ve duyarlı bir metot olduğu kanıtlanmıştır (36).

Hauola vd. (2009) çalışmalarında, kullanımda olan Tirozin kinaz inhibitörlerinin (Ibatinib, Dasatinib, Sunitinib, Nilotinib, Sorafenib, Lapatinib) eş zamanlı tayini için, bir Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) metodu geliştirmiştir. Hastalardan alınan plazma örneği, protein çöktürme ile saflaştırılmış ve süpernatant kısmı, 20mM (pH 4,0) 1:2 amonyum format içinde seyreltilmiştir. Kapiler sıcaklık: 350°C, tüp lens voltaj aralığı: 86-129 V, püskürtme voltajı: 4 kV ve yardımcı gaz (nitrojen) akış hızı: sırasıyla 60 psi ve Q2 çarpışma gazı (argon) basıncı 1 mTorr (0,13 Pa)'dir.

Tirozin kinaz inhibitörlerinin Ters Faz Sıvı Kromatografik yöntemle ayırımı için; mobil faz pH'sı formik asit çözeltisi ile 2,2'ye ayarlanmış, 20 mM amonyum format ve asetonitril karışımı olarak seçilmiştir. Mobil faz, 0,3 mL/dakikalık bir akış hızında, gradient program kullanılarak uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin kesinliği (günlerarası % CV:% 1,3-9,4), doğruluğu (-9,2 ila + % 9,9) ve hassaslığı (1 ile 10 ng/mL) kabul edilen limitler arasındadır. Bu çalışmanın özellikle klinikte bazı spesifik durumlarda (toksikite, ilaç etkileşimleri vb.) ilaç plazma seviyesini optimize etmek için kullanılabilirliği kanısına ulaşılmıştır. Antikanser ilaçların sistemik doz

ayarlamasının yapılarak, ilaçların major olumsuz etkilerini en aza indirmeye katkıda bulunabileceği, ayrıca etkili ve uzun süreli terapötik yanıt olasılığını da arttırabileceği düşünülmektedir (37).

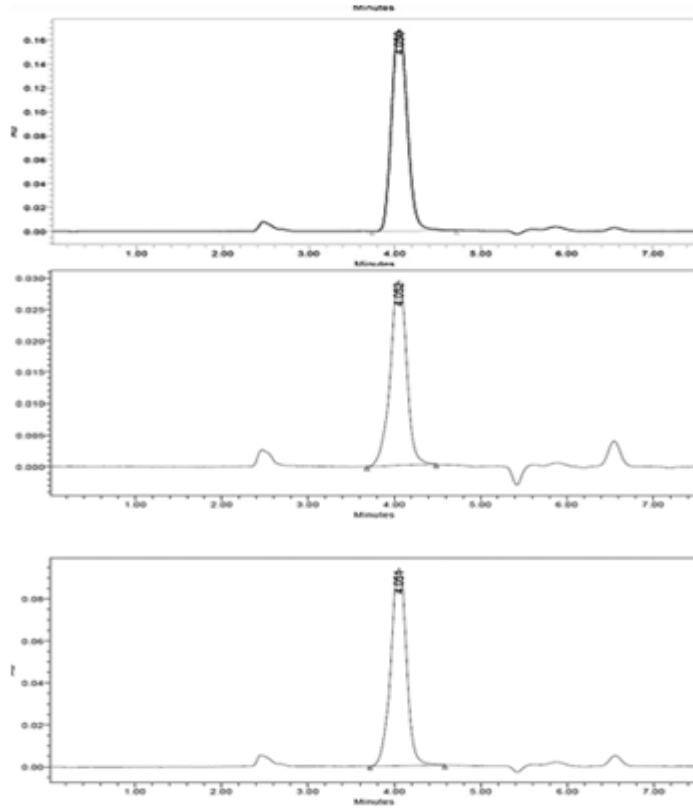
Kumar vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada tabletlerde Lapatinib'in tayini için basit, seçici, hızlı, hassas ve ekonomik Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril- su karışımının (50:50 v/v) kullanıldığı çalışma 1,0 ml/dakika akış hızında yürütülmüştür. İç standart olarak Gemsitabin Hidroklorür tercih edilen deneyde ODS C18 RP kolon (4.6 mm ID×250 mm) kullanılmıştır. Bileşiğin maksimum absorbands değeri 232 nm olarak belirlenmiştir. Lapatinib ve Gemsitabin Hidroklorür için alıkonma süreleri sırasıyla 4,25±0,05 ve 6,10±0,05 dakika olarak tespit edilmiştir. Yöntem, 2-60 µg/mL derişim aralığında doğrusaldır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,265 ve 0,884 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, elde edilen geri kazanım değerleri, yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu; düşük RSD yüzdesi ise Lapatinib dozaj formlarında yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir (38).

Escudero-Ortiz vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada; insan plazmasında Lapatinib'in kantitatif tayini için HPLC-UV yöntemi geliştirilmiştir. Bileşiklerin ayrımı Ultrabase C18 kolon (5 µm; 4.6 x 150 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 0,02 M amonyum asetat ve asetonitril karışımından %47:53 oluşan karışım kullanılmış ve akış hızı 1,2 mL/dakika olacak şekilde sabitlenmiştir. Kolon 25°C'de tutulmuş ve elüentler 260 nm dalga boyunda izlenmiştir. Lapatinib ve Sorafenib için alıkonma süreleri sırasıyla 3,2 ve 10,6 dakika olarak belirlenmiştir. Kanser hastalarından alınan 6 plazma örneğinde biyolojik bileşiklerle hiçbir etkileşim gözlenmediğinden geliştirilen yöntemin spesifik ve seçici olduğu kanısına varılmıştır. Metot validasyonu, Gıda ve İlaç İdaresi ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından yayınlanan Biyoanalitik Metot Doğrulaması kılavuzları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Lapatinib'in plazmadan 0,3, 1 ve 7,5 µg/mL konsantrasyonlarında mutlak geri kazanım değerleri sırasıyla %118,3 ± 4,5, %104,4 ± 6,5 ve %86,7 ± 3,9 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma Lapatinib'in insan plazmasındaki ölçümü için geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında ise bu ilacı

oral yoldan alan hastalarda klinik uygulamada bu metotun rahatlıkla kullanılabilceği sonucuna ulaşılmıştır (39).

Saadad vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada, HPLC yöntemi ile ilaçlarda Lapatinib'in nicel analizini gerçekleştirmiş ve yöntemin validasyonunu yapmışlardır. Örnekler, OSD-3 ön kolon ve C18 MZ-Analitik kolon (5 mm, 150 4,6 mm, OSD-3) kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz, %70:30 (v/v) oranında asetonitril-su karışımından oluşmuş ve akış hızı 1,5 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Örnekler, 227 nm dalga boyunda izlenmiştir. Kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmış ve 20 mL'lik numuneler her 15 dakikada bir HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Mobil faz, kullanımdan önce bir politetrafloroetilen filtre ile filtrelenmiştir (0,45 mm). Metot; doğrusallık, LOD, LOQ, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve sağlamlık parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Korelasyon katsayıları 0,99'dan büyük olarak bulunmuş ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri % 0.26 ile% 2,7 arasında olacak şekilde elde edilmiştir. Lapatinib için LOQ = 5 mg/mL, LOD = 1 mg/mL olarak bulunmuştur. Bozunma çalışmaları, Lapatinib'in asit ve alkali stres koşulları altında daha az kararlı olduğunu göstermiştir. Geliştirilen metotun geçerliliği ve sağlamlığına bakılarak ilaç sektöründe doğru ve kesin bir analiz prosedürü olarak kullanılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır (40).

Sandhu ve arkadaşları (2016); Tamoksifen tayini için QbD odaklı HPLC metot geliştirme ve validasyon çalışması yapmışlardır. Geliştirilen metot kendi kendine nanoemülsifiye edici ilaç dağıtım sistemleri (SNEDDS), katı lipid nanopartiküller (SLN) ve nanokarışık miseller gibi çeşitli nanoyapılı farmasötik formülasyonlarda uygulanmıştır. Kromatografik ayırma, 0,7 mL/dakika akış hızı, 40°C fırın sıcaklığı ve 256 nm'de UV dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 250 x 4.6 mm, partikül boyutu 5,0 um olan bir ters fazlı C18 kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril ve fosfat tamponu (pH 3,5) karışımı 52:48 v/v seçilmiştir. Çeşitli formülasyonlarda hazırlanmış Tamoksifen'e ait kromatogramlar Şekil 2.2'de verilmiştir.

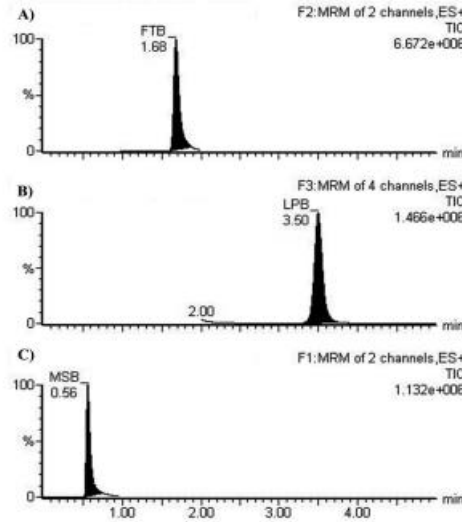


**Şekil 2.2.** Tamoksifen'in farklı formülasyonlardaki kromatogramları

Validasyon çalışması ICH kılavuzuna göre yapılmıştır. 1 ile 200 ng/mL arasında değişen konsantrasyonda Tamoksifen için doğrusal kalibrasyon grafiği, 0,999'lük korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) değeriyle oldukça yüksek doğrusallık göstermiştir. Geri kazanım %96,7 ile %98,8 aralığında bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,067 ve 0,205 ng/mL olarak ölçülmüştür. Geliştirilen QbD metotunun validasyonu, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sistem uygunluk ve sağlamlık parametreleri ile desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer ilaç etken maddeleri için de etkili bir yaklaşım olan QbD yaklaşımının uygulanabilirliğini doğrulamaktadır (41).

Alanazi vd. (2019) çalışmalarında, Foretinib ve Lapatinib'in eş zamanlı tayinini gerçekleştirmiş ve metabolik stabilite çalışmaları için Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi metotunu geliştirerek valide etmişlerdir. Foretinib, Lapatinib ve Masitinib'in (iç standart) kromatografik ayrımı ters faz C18 kolonu kullanılarak izokratik yöntemle yapılmıştır. Foretinib, Lapatinib ve iç standardın kütle analizinde

çoklu reaksiyon izleme (MRM) algılama modu kullanılmıştır. Şekil 2.3'te görüldüğü üzere bileşiklerin 5 dakika gibi kısa bir sürede kromatografik ayrımı sağlanmıştır.



**Şekil 2.3.** MRM kromatogramları (A) 1,68 dakika Foretinib (B) 3,5 dakika Lapatinib (C) 0,56 dakika Masitinib

Analit ekstraksiyonları, metabolik stabilite deneyleri için standart bir teknik olan ACN protein çöktürmesi kullanılarak yapılmıştır. Filtrelenen numuneler 1,5 mL'lik şişelere aktarılmış, her numuneden 5 mL alınarak analiz için LC-MS/MS'ye enjekte edilmiştir. Oluşturulan yöntemin doğrusallığını belirlemek için lineer regresyon kullanılmış ve eğim, kesim ve korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) değerleri hesaplanmıştır. Doğrusal aralık 5–500 ng/mL olacak şekilde belirlenmiştir ( $r^2 > 0,9999$ ). Çalışma Foretinib için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,2 ve 3,64 ng/mL; Lapatinib için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,66 ve 8,051 ng/mL olarak hesaplanmıştır (42).

Biswal ve Mondal (2019) yapmış oldukları çalışmada, tablet dozaj formundaki Lapatinib tayini için; ICH kriterlerine uygun, yeni, basit, hızlı ve hassas bir sıvı kromatografik (UPLC) yöntem geliştirip, valide etmişlerdir. Kullanılan kolon 0,25 mL/dk (izokratik) akış hızına sahip BHEL UPLC kolonudur. Kullanılan mobil faz, izokratik modda % 0.1 OPA tamponu 300 ml (% 30) ve 700 ml asetonitrilin (% 70) karıştırılması ile elde edilmiştir ve elüentler PDA detektörü kullanılarak 309 nm'de tayin edilmiştir. Toplam analiz süresi 3 dakika olarak belirlenen çalışmada Lapatinib'in alıkonma süresi 0,516 dakika olarak bulunmuştur. Doğrusallık çalışması sonucunda Lapatinib için korelasyon katsayısı 0,999, eğim 2223 ve kesim 8380

olarak elde edilmiştir. Doğrusallık aralığı Lapatinib için 10-50 ug/ml olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin doğruluğu, standart ekleme metodu ile geri kazanım değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Lapatinib için ortalama geri kazanım değeri %99,69 olarak bulunmuştur. LOD değerinin 0,06 µg/ml ve LOQ değerinin 0,18 µg/ml olarak bulunmuş olması önerilen yöntemin duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir (43).

Mangla vd. (2020) yapmış oldukları çalışmada Tamoksifen ve Sülforafan'ın nanolipidik formülasyonlardan eş zamanlı tayini için RP-HPLC metodu geliştirmişlerdir. Ayrırma, C18 kolonda (4,6 x 250 mm, 5 µm) ve pH'sı 3,5 olan metanol:su karışımında (70:30) gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C'de sabit tutulmuş, akış hızı dakikada 0,8 mL olacak şekilde ayarlanmış ve toplam analiz süresi yaklaşık 25 dakika olarak ölçülmüştür. Box-Behnken deneysel tasarımı ile geliştirilen yöntemin validasyonu; sistem uygunluk testleri, spesifiklik, doğruluk, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, dayanıklılık ve sağlamlık parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği; katı lipid nanopartiküller, lipozomlar, nanoyapılı lipid taşıyıcılar gibi nanoformülasyonlar üzerinde değerlendirilmiştir. Bileşiklere ait kalibrasyon grafikleri 6-24 µg/mL arasında doğrusal olarak belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları sonucunda bağıl standart sapma değerleri (%RSD) %2'nin altında bulunmuştur. Üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen doğruluk deneyleri sonucunda Tamoksifen ve Sülforafan'a ait geri kazanım oranları sırasıyla %97,07 ve %99,65 olarak tayin edilmiştir. Duyarlılığında belirlenmesi amacıyla hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Tamoksifen ve Sülforafan için sırasıyla 0,5 µg/mL - 0,9 µg/mL ve 0,44 µg/mL - 1,1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, deneysel tasarım yaklaşımının kullanımının hem deney sayısını azaltması hem de daha kısa sürede mümkün olduğunca fazla bilgi üretilebilmesi açısından ucuz ve çok yönlü bir yöntem olduğunu göstermiştir. Geliştirilen yöntemin, ICH yönergelerine göre validasyonu sonucunda hızlı, kolay, oldukça hassas, güvenilir ve etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntem, bileşiklerin nano formülasyonlarda eş zamanlı tayini için oldukça pratik kullanım göstermiştir. Son olarak, önerilen RP-HPLC yaklaşımının, Tamoksifen ve Sülforafan'ın farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmaları için uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (44).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Lapatinib ve Tamoksifen'in iyonlaşma Davranışları Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntem ile belirlenmiş, kromatografik optimizasyon ve geliştirilen RPLC metotunun ticari preparatlarda validasyon işlemi yapılmıştır. Tezin bu bölümünde kullanılan kimyasallar, cihazlar ve çözeltiler hakkında bilgi verilmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar ve İlaç Preparatları

Tezde kullanılan tüm kimyasallar ve ticari preparatların bilgileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Kimyasallar ve ilaç preparatları

Kimyasal / İlaç Preparatları	Üretici Firma
Lapatinib	Sigma Aldrich
Tamoksifen	Tocris Bioscience
Simvastatin	Sigma Aldrich
Asetonitril	Sigma Aldrich
Sodyum Hidroksit	Sigma Aldrich
Amonyak	Merck
Amonyum klorür	Merck
Urasil	Sigma Aldrich
Orto-fosforik Asit	Sigma Aldrich
Potasyum Hidrojen Ftalat	Merck
Tamoxifen (10 mg)	DEVA®
Tykerb (250 mg)	NOVARTIS®

#### 3.2. Cihazlar

Lapatinib ve Tamoksifen'in  $pK_a$  değerlerinin tayininde ve metot validasyonunda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı kullanılmıştır. Gerekli cihaz bilgileri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** Kullanılan cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Firma</b>
LC-20AD Pompa	Shimadzu
CTO-10AS HPLC Kolon Fırını	Shimadzu
DGU-20A <sub>3</sub> HPLC Degazer Ünitesi	Shimadzu
SPD-20A HPLC UV-Vis Dedektör	Shimadzu
Saf Su (Ultra) Cihazı	Direct Q-3 UV
MA 235 pH Metre	Mettler Toledo
Inlab Expert Pro pH Elektrot	Mettler Toledo
Vortex VM-10 WiseMix	NetLab
Ultrasonik karıştırıcı	HydraUltrasonic
HR250AZ Hassas Terazî	A&D Company

### **3.3. Kromatografik Metot Geliştirme**

#### **3.3.1. Kolon Seçimi**

Kolon seçimi, sıvı kromatografik ilaç analizlerinde analiz sonuçlarının kesinliği için oldukça önemlidir. Kolon seçimi, analitin moleküler ağırlık, çözünürlük, iyonlaşma durumu gibi özelliklerine bağlı olarak yapılır. Lapatinib asidik ve bazik; Tamoksifen bazik fonksiyonel grup içeren bileşiklerdir ve çalışmada analiz için geniş pH aralığı ve kararlılığını sağlayan bir kolon olan XTerra C18 kolon (Waters®) seçilmiştir. Partikül boyutu 5 µm, iç çapı 4,6 mm, uzunluğu ise 25 cm olan bu kolon pH 2-12 aralığında iyi bir pik simetrisine sahip pikler ve kesinliği yüksek analiz sonuçları verdiği için amfolit ve bazik özellikteki bu ilaç etken maddelerin analizleri için seçilmiştir.

#### **3.3.2. Bileşiklerin Dalga Boyları**

Asetonitril-su ortamında hazırlanan bileşiklerin spektrofotometrik özellikleri incelenerek maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyları; Lapatinib için 210 nm, Tamoksifen için 235 nm ve kantitatif analizde iç standart olarak seçilen Simvastatin (IS) için 238 nm olarak belirlenmiştir.

#### **3.3.3. Çalışılan Kromatografik Koşullar**

Çalışmada düşük viskoziteye sahip, polar aprotik bir çözücü olan asetonitril organik modifiyer olarak seçilmiş ve mobil faz olarak asetonitril oranı %50, %55 ve %60

(v/v) olan asetonitril-su ikili karışımları kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı dakikada 1 mL olacak şekilde ayarlanmış ve çalışma boyunca kolon sıcaklığı 37°C’de sabit tutulmuştur. Enjeksiyonlar 20 µL sabit hacimde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.3.4. Kullanılan Çözeltiler

Tezde analizi yapılan bileşikler günlük olarak hazırlanmıştır. Çalışılan su-asetonitril karışımlarında bileşiklerin 100 µg/mL derişiminde çözeltileri hazırlanmış ve +4°C’de saklanmışlardır. Mobil fazların, ticari ilaç formülasyon numunelerinin ve validasyon aşamasında kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanma aşamaları aşağıda verilmiştir.

**Mobil Fazlar:** Farklı hacimlerde asetonitril içeren (50, 55 ve 60, v/v) 100 mL mobil faz hazırlamak için 50, 45 ve 40 mL saf su alınarak üzerine sırasıyla 50, 55 ve 60 mL asetonitril ilavesi yapılmıştır. Ortam pH’sını sabit tutmak için pH 3-8 arasında hazırlanan mobil faza 25 mM o-fosforik asit eklenmiş ve çalışmada istenen pH değerleri, 1M NaOH çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Aynı şekilde ortam pH’sını sabit tutmak için pH 8,5-11 arasında hazırlanan mobil faza 25 mM amonyum klorür eklenmiş ve çalışmada istenen pH değerleri, derişik amonyak çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Mobil fazlar, pH değerleri Lapatinib için 3-11 arasında, Tamoksifen için de 5-11 arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. Mobil fazlar kullanılmadan önce ultrasonik karıştırıcıda degaze edilmiştir.

**İlaç Formülasyon Numune Çözeltileri:** Çalışmada Lapatinib ve Tamoksifen’in ilaç formülasyonlarından kantitatif tayinlerinin yapılabilmesi için tablet numuneleri analize hazırlanmıştır. Bunun için Tamoksifen içeren ezilmiş ve homojen hale getirilmiş Tamoksifen® tabletlerinden 0,182 g alınarak 100 mL mobil fazda çözülmüştür. Benzer şekilde ezilmiş ve homojen hale getirilmiş Lapatinib içeren Tykerb® tabletlerinden 0,937 g alınarak 100 mL mobil fazda çözülmüştür. İç standart Simvastatin kantitatif çalışma boyunca 2 ppm olacak şekilde kalibrasyon çözeltilerine numune ortamına ilave edilmiştir. Derişimleri belirlenen bu numune çözeltileri, içerdikleri etken madde miktarlarının tayini için belirlenmiş doğrusal kalibrasyon derişim aralıklarına girecek şekilde seyreltilmiştir. Çözeltiler

kullanılmadan önce beyaz bant süzgeç kağıdından (Ø125 mm, 640 m) süzölmüş ve 0,45 µm Millipore filtreden geçirilerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

**Kalibrasyon Çözeltileri:** Çalışmanın doğrusal aralığının belirlenmesi amacıyla iki bileşik için de kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. İç standart yöntemi kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri için Lapatinib ve Tamoksifen'in 100 µg/mL stok çözeltileri hazırlanmış ve çalışılan su-asetonitril karışımlarında seyreltilmiştir. Lapatinib için 3-15 µg/mL, Tamoksifen için 5-25 µg/mL arasında değişen beş farklı derişimde çözeltiler hazırlanmıştır. İç standart her iki bileşik için Simvastatin seçilmiş ve Tamoksifen analizinde 3 µg/mL, Lapatinib analizinde ise 2 µg/mL olarak kalibrasyon çözeltileri ve numune ortamlarına ilave edilmiştir.

**Sistem Uygunluk Testi Çözeltileri:** Sistem uygunluk testleri, yapılan analizlerde elde edilen değerlerin referans değerlere uygunluğunun belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Sistem uygunluk testleri, belirlenen optimum ayırma koşulunda pH'sı 6 olan %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımında yapılmıştır. Bu koşulda, Lapatinib için 9 µg/mL, Tamoksifen için 15 µg/mL derişimlerde hazırlanan çözeltiler enjekte edilmiştir.

### **3.3.5. Ayırma İçin En Uygun Koşulun Belirlenmesi**

Geliştirilen metotun validasyonunun yapılabilmesi için farklı hacimlerdeki asetonitril-su karışımlarında gerçekleştirilen analizlerden elde edilen veriler değerlendirilmiş ve optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Ayırım için en uygun koşulun belirlenmesinde her bir mobil fazdaki ayırma gücü değerleri, kapasite faktörleri ve seçicilik faktörü değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Tüm koşullar ve parametreler incelendiğinde bileşikler için en uygun ayırma koşulu pH'sı 6 olan ve %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımı olarak seçilmiştir.

## 4. BULGULAR

Tez çalışmasında kullanılan Tamoksifen ve Lapatinib bileşiklerinin pK<sub>a</sub> değerlerinin tayini hacimce üç farklı derişimde %50, 55 ve 60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarında ve 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Her bir bileşik için alıkonma zamanı t<sub>R</sub>-pH tablosu, alıkonma zamanı t<sub>R</sub>-pH grafikleri ve non-lineer regresyon programı NLREG programı kullanılarak t<sub>R</sub>-pH ilişkisini gösteren grafikler aşağıda yer almaktadır.

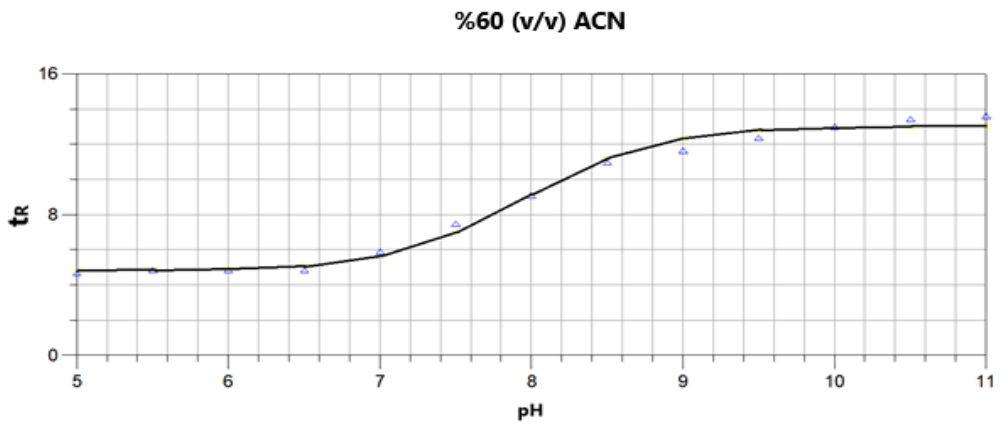
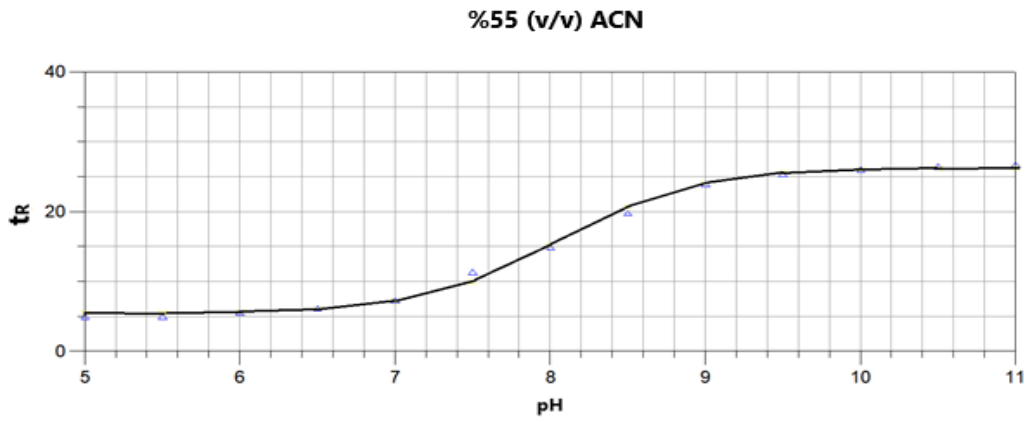
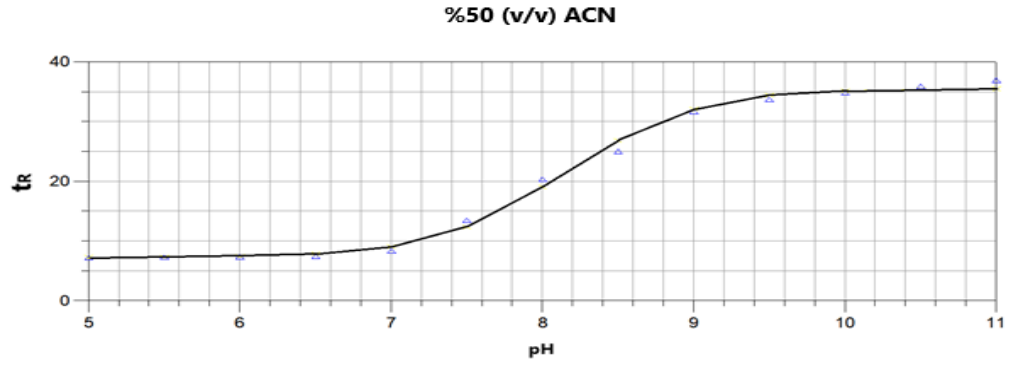
### 4.1. Tamoksifen İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler

Tamoksifen bileşiği için %50, %55, %60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında pH’sı 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00 8,50; 9,00; 9,50; 10,00; 10,50; 11,00 olan mobil fazlar hazırlanmıştır ve alıkonma zamanı değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Tamoksifen’in %50, %55 ve %60 (h/h) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri

	<b>%50 (v/v) ACN</b>	<b>%55 (v/v) ACN</b>	<b>%60 (v/v) ACN</b>
<b>pH</b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>t<sub>R</sub></b>
5	7,149	4,991	4,676
5,5	7,237	4,983	4,867
6	7,33	5,582	4,859
6,5	7,409	6,134	4,836
7	8,375	7,262	5,874
7,5	13,480	11,303	7,468
8	20,352	14,873	9,087
8,5	25,002	19,767	10,989
9	31,730	23,945	11,649
9,5	33,649	25,341	12,365
10	34,804	26,001	13,007
10,5	35,898	26,398	13,425
11	36,908	26,706	13,606

%50, %55, %60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımı koşullarındaki  $t_R$ -pH ilişkisini gösteren, non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilen grafikler Şekil 4.1’de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Tamoksifen’in %50, %55, %60 asetonitril- su karışımlarındaki  $t_R$ -pH ilişkilerini gösteren grafikler

Tablo 4.1’de görüldüğü üzere mobil fazda bulunan asetonitril oranı arttıkça alıkonma zamanı azalmıştır. Ayrıca Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de mobil faz pH değeri arttıkça alıkonma zamanının da artış gösterdiği ve bileşiğin bazik özellikte olduğu görülmüştür.

#### 4.1.1. Tamoksifen’in Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması

Bazik özellikteki Tamoksifen oldukça hidrofobik bir bileşiktir. SWISS ADME programından alınan veriye göre bileşiğin logS: -6,59 ( $2,57 \cdot 10^{-7}$  mol/L) değeri çözünürlüğün çok az olduğunu göstermektedir. Ayrıca yine SWISS ADME programından alınan veriye göre logP: 5,12 değeri de bileşiğin hidrofobik olduğunu göstermektedir. Bu verilere göre bileşiğin %100 su ortamında çözünmesi mümkün değildir. Bunun için bileşiğin su-asetonitril ortamında çözünürlüğü sağlanmıştır. Bileşiğin su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerinin belirlenmesi deneysel olarak mümkün olmadığından, kullanılan hidroorganik çözeltilerdeki asetonitrilin makroskopik parametreleri ( $\epsilon$ , X<sub>ACN</sub>) kullanılmıştır.

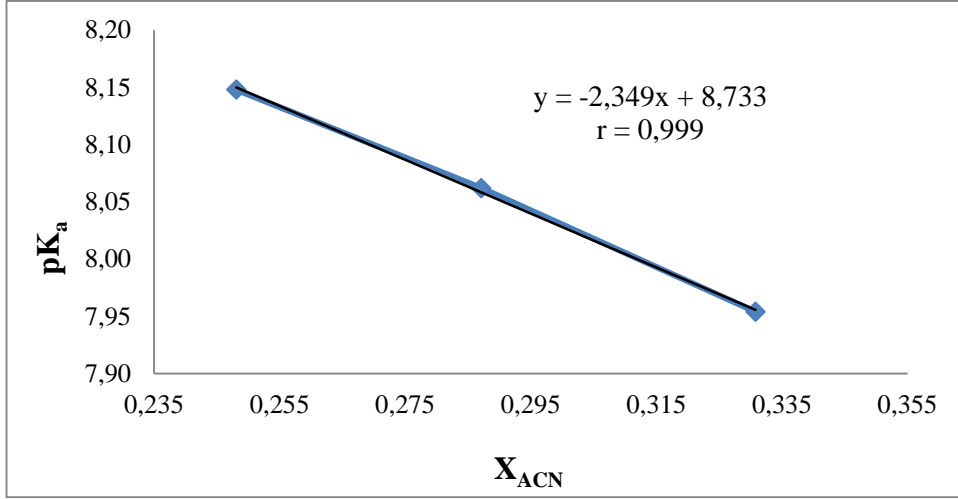
##### 4.1.1.1. Mol Kesri - pK<sub>a</sub> Metodu

Tamoksifen için 37°C’de, %50, %55 ve %60 (v/v) derişiminde asetonitrilin mol kesri (X<sub>ACN</sub>) değerlerine (Tablo 4.2) karşı çalışılan mobil fazlarda hesaplanan pK<sub>a</sub> değerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim noktası, yapıda bulunan bazik fonksiyonel gruba ait su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerini vermiştir.

**Tablo 4.2.** Asetonitrilin %50, %55, %60 (v/v) derişimlerindeki X<sub>ACN</sub> değerleri (37°C)

%ACN (v/v)	Mol Kesri (X <sub>ACN</sub> )
50	0,248
55	0,287
60	0,331

Tamoksifen’in asetonitrilin %50, %55, %60 (v/v) derişimindeki mol kesri değerlerine karşı çalışılan su-asetonitril ikili karışımlarında hesaplanan pK<sub>a</sub> değerlerinin ilişkisini gösteren grafik Şekil 4.2’de verilmiştir.



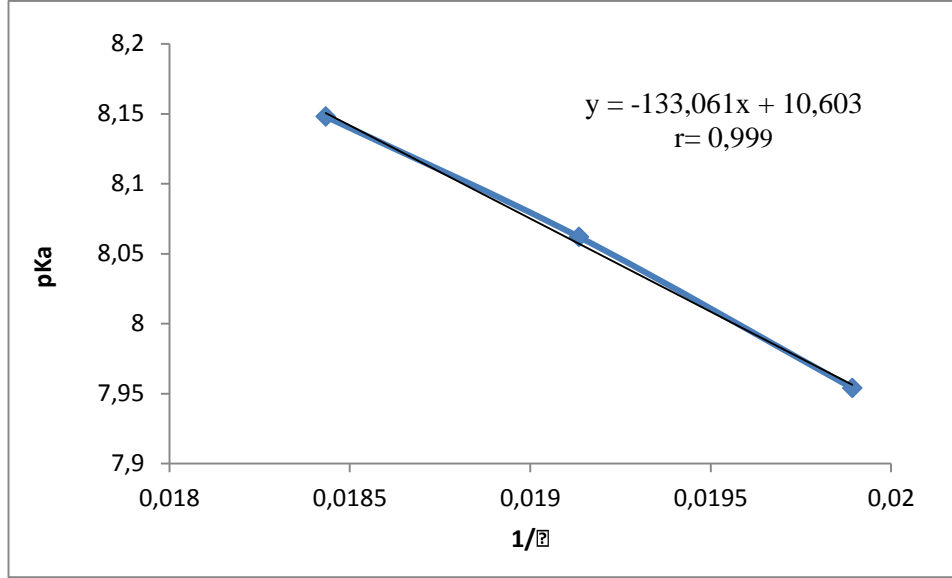
Şekil 4.2. Tamoksifen'in  $X_{ACN}$ -  $pK_a$  ilişkisini gösteren grafik

#### 4.1.1.2 Dielektrik Sabiti - $pK_a$ Metodu

Tamoksifen'in  $37^{\circ}C$ ' de %50, %55 ve %60 (v/v) derişiminde asetonitrilin  $1/\epsilon$  değerlerine (Tablo 4.3) karşı çalışılan mobil fazlarda hesaplanan  $pK_a$  değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrusal fonksiyonda ( $y=mx+n$ ) su ortamındaki  $1/\epsilon$  değeri yerine koyulduğunda tamoksifenin su ortamındaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır (Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Asetonitrilin %50, %55,%60 (v/v) derişimlerindeki  $1/\epsilon$  değerleri ( $37^{\circ}C$ )

%ACN (v/v)	$\epsilon$	$1/\epsilon$
50	54,250	0,018433
55	52,260	0,019135
60	50,270	0,019893



**Şekil 4.3.** Tamoksifen'in  $1/\epsilon$ - $pK_a$  ilişkisini gösteren grafik

Tamoksifen'in su ortamındaki  $pK_a$  değerini hesaplamak için su ortamındaki sabit  $\epsilon$  değeri (74,18) bilindiğinden,  $1/\epsilon$  değeri 0,013481 olarak hesaplanmış ve grafikten elde edilen fonksiyonda yerine konulmuştur.

#### 4.2. Lapatinib İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler

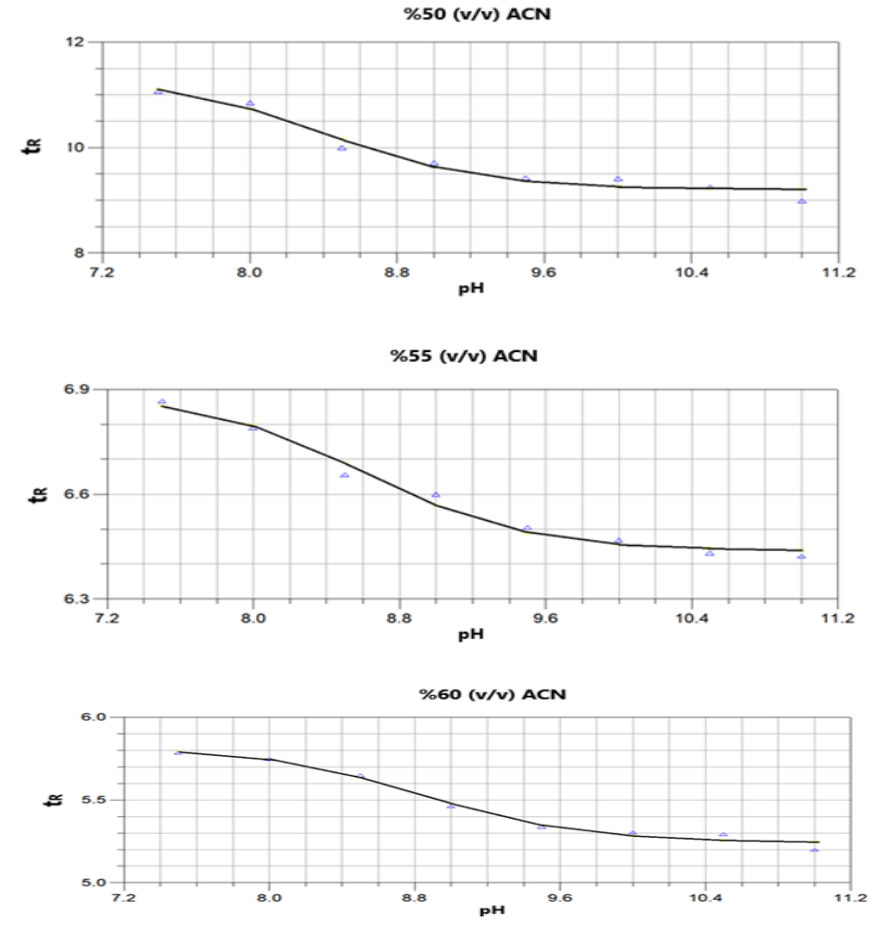
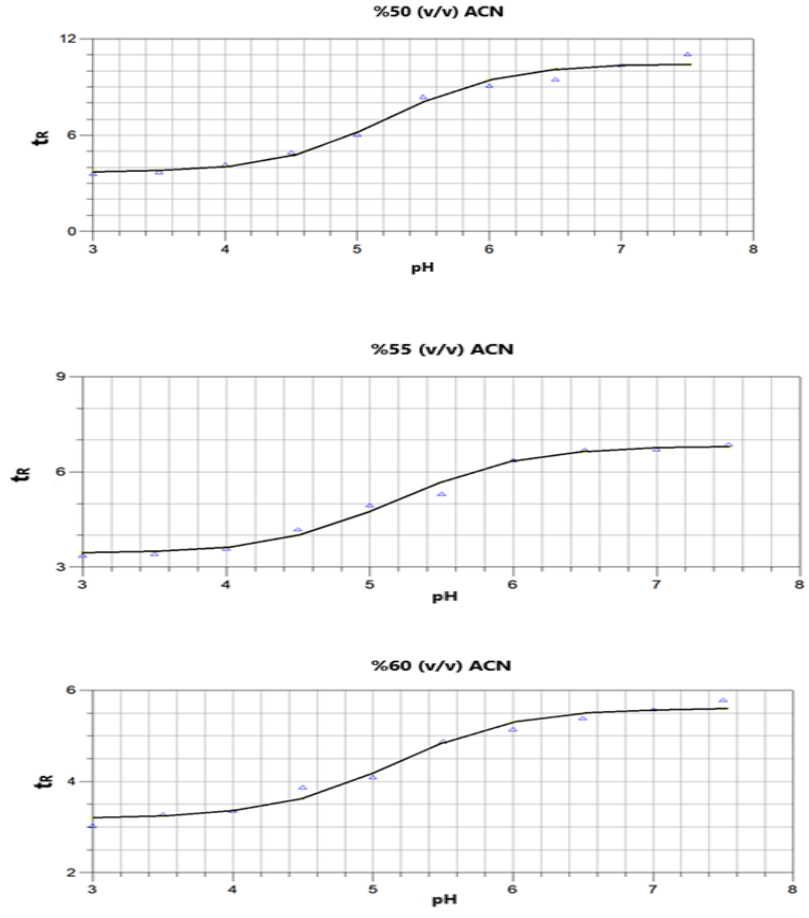
Lapatinib bileşiği için %50, %55, %60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında pH'sı 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00 8,50; 9,00; 9,50; 10,00; 10,50; 11,00 olan mobil fazlar hazırlanmıştır ve alıkonma zamanı değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Lapatinib'in %50, %55 ve %60 (h/h) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri

	%50 (v/v) ACN	%55 (v/v) ACN	%60 (v/v) ACN
pH	tr	tr	tr
3	3,603	3,366	3,031
3,5	3,729	3,420	3,286
4	4,170	3,580	3,356
4,5	4,931	4,197	3,870
5	6,066	4,957	4,100
5,5	8,405	5,314	4,881

6	9,070	6,365	5,150
6,5	9,501	6,700	5,384
7	10,361	6,718	5,586
7,5	11,054	6,866	5,787
8	10,850	6,790	5,746
8,5	10,000	6,656	5,648
9	9,709	6,600	5,462
9,5	9,420	6,505	5,338
10	9,411	6,468	5,303
10,5	9,255	6,432	5,293
11	8,987	6,422	5,199

%50, %55, %60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımı koşullarındaki  $t_R$ -pH ilişkisini gösteren, non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilen grafikler Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Lapaninib'in %50, %55, %60 asetonitril- su karışımlarındaki pH-tr ilişkilerini gösteren grafikler

Tablo 4.4'te görüldüğü üzere mobil fazda bulunan asetonitril oranı arttıkça alıkonma zamanı azalmıştır. Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'te mobil fazın pH'sı 3'den pH 7,5'a kadar arttıkça alıkonma zamanının arttığı, pH 7,5'dan pH 11'e kadar alıkonma zamanının azaldığı görülmüştür. Lapatinibin bu kromatografik davranışı bileşiğin amfoterik özellikte olduğunu göstermektedir.

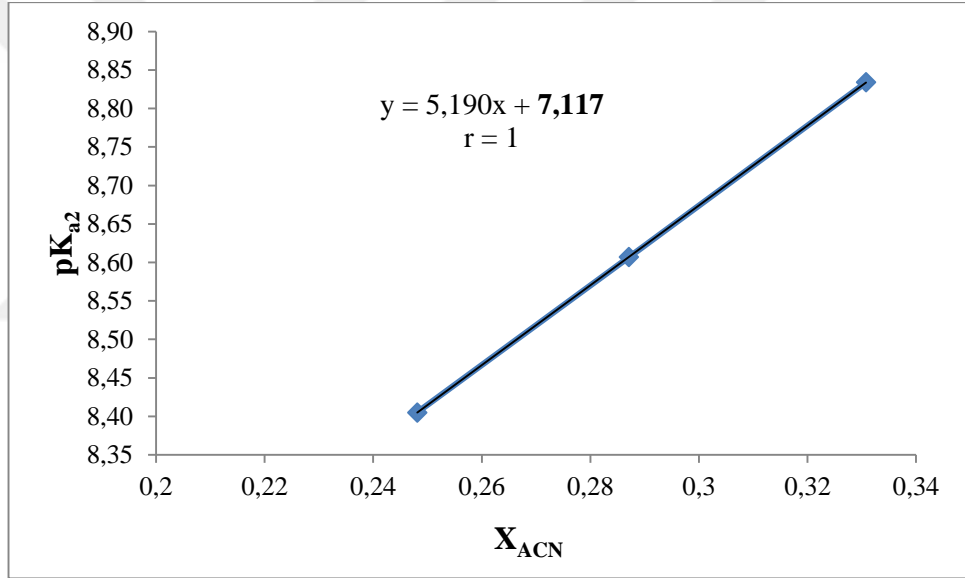
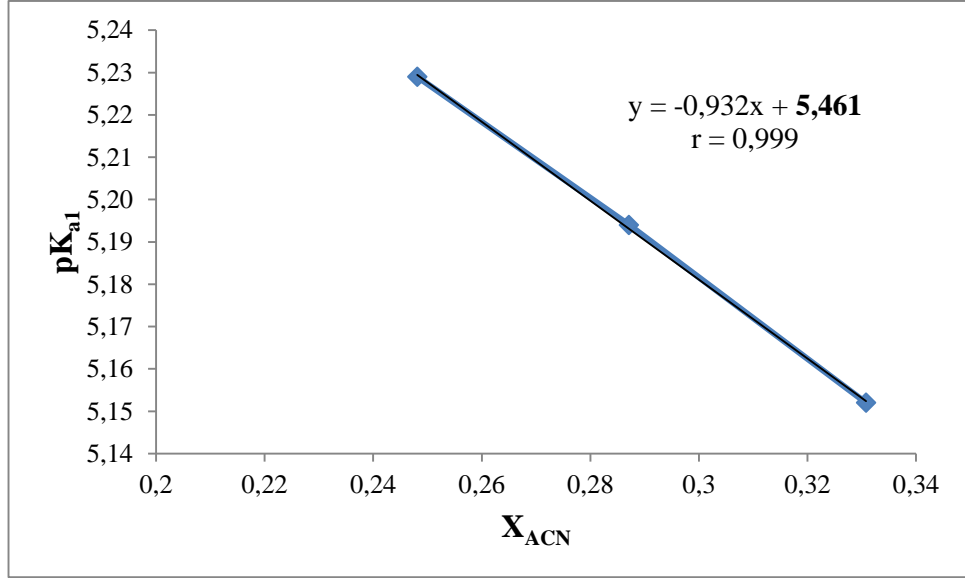
#### **4.2.1. Lapatinib'in Su Ortamında pK<sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması**

Amfoterik özellikteki Lapatinib de Tamoksifen gibi hidrofobik bir bileşiktir. SWISS ADME programından alınan veriye göre bileşiğin logS: -6,44 ( $3,63 \cdot 10^{-7}$  mol/L) değeri çözünürlüğünün çok az olduğunu göstermektedir. Ayrıca yine SWISS ADME programından alınan veriye göre logP: 6,0 değeri de bileşiğin hidrofobik olduğunu göstermektedir. Bu verilere göre bileşiğin %100 su ortamında çözünmesi mümkün değildir. Bunun için bileşiğin su-asetonitril ortamında çözünürlüğü sağlanmıştır. Bileşiğin su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerinin belirlenmesi deneysel olarak mümkün olmadığından, kullanılan hidroorganik çözeltilerdeki asetonitrilin makroskopik parametreleri ( $\epsilon$ , X<sub>ACN</sub>) kullanılmıştır.

##### **4.2.1.1. Mol Kesri - pK<sub>a</sub> Metodu**

Lapatinib için 37°C' de, %50, %55 ve %60 (v/v) derişiminde asetonitrilin mol kesri (X<sub>ACN</sub>) değerlerine (Tablo 4.5) karşı çalışılan mobil fazlarda hesaplanan pK<sub>a</sub> değerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim noktası, yapıda bulunan asidik/bazik fonksiyonel gruplara ait su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerlerini vermiştir. Hesaplama Tablo 4.2'de verilen mol kesri değerleri kullanılmıştır.

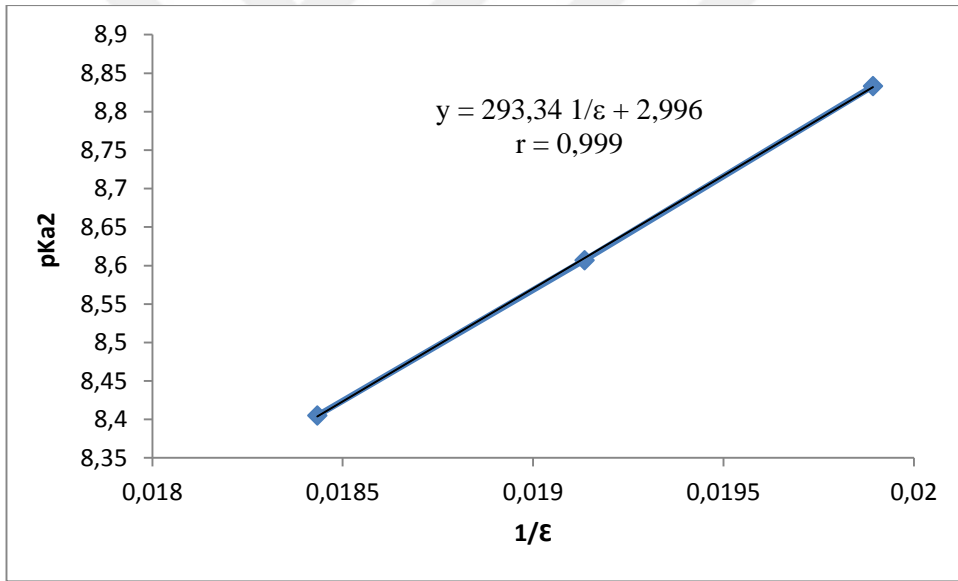
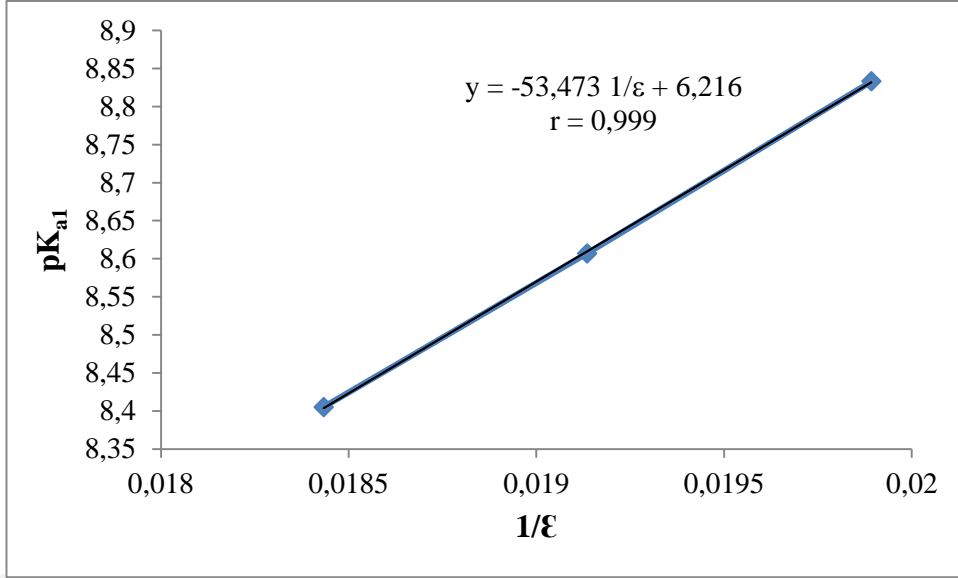
Lapatinib'in ,asetonitrilin %50, %55, %60 (v/v) derişimindeki mol kesri değerlerine karşı çalışılan su-asetonitril ikili karışımlarında hesaplanan pK<sub>a</sub> değerlerinin ilişkisini gösteren grafikler Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Lapatinib'in  $X_{ACN}$ -  $pK_a$  ilişkisini gösteren grafik

#### 4.2.1.2. Dielektrik Sabiti - $pK_a$ Metodu

Lapatinib'in  $37^{\circ}C$ ' de %50, %55 ve %60 (v/v) derişiminde asetonitrilin  $1/\epsilon$  değerlerine (Tablo 4.3) karşı çalışılan mobil fazlarda hesaplanan  $pK_a$  değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrusal fonksiyonlarda ( $y=mx+n$ ) su ortamındaki  $1/\epsilon$  değeri yerine koyulduğunda Lapatinib'in su ortamındaki  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Lapatiniib'in  $1/\epsilon$ - $pK_a$  ilişkisini gösteren grafikler

Lapatiniib'in su ortamındaki  $pK_a$  değerlerini hesaplamak için su ortamındaki sabit  $\epsilon$  değeri (74,18) bilindiğinden,  $1/\epsilon$  değeri 0,013481 olarak hesaplanmış ve grafiklerden elde edilen fonksiyonda yerine konulmuştur.

### 4.3. Metot Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında meme kanseri için kullanılan Tamoksifen ve Lapatinib bileşiklerinin RPLC yöntemiyle pK<sub>a</sub> değerlerinin tayini yapılmıştır. Çalışmada bileşiklerin yapısı alıkonma zamanı ve pik davranışları dikkate alınarak pH aralığı geniş (1-12), yeni jenerasyon X Terra C18 (250mm x 4,6 mm ID, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Mobil faz organik modifiyeri olarak asetonitril seçilmiştir. Tamoksifen ve Lapatinib bileşiklerinin pK<sub>a</sub> değerleri 37 °C'de %50, %55 ve %60 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ortamı kullanılarak tayin edilmiştir.

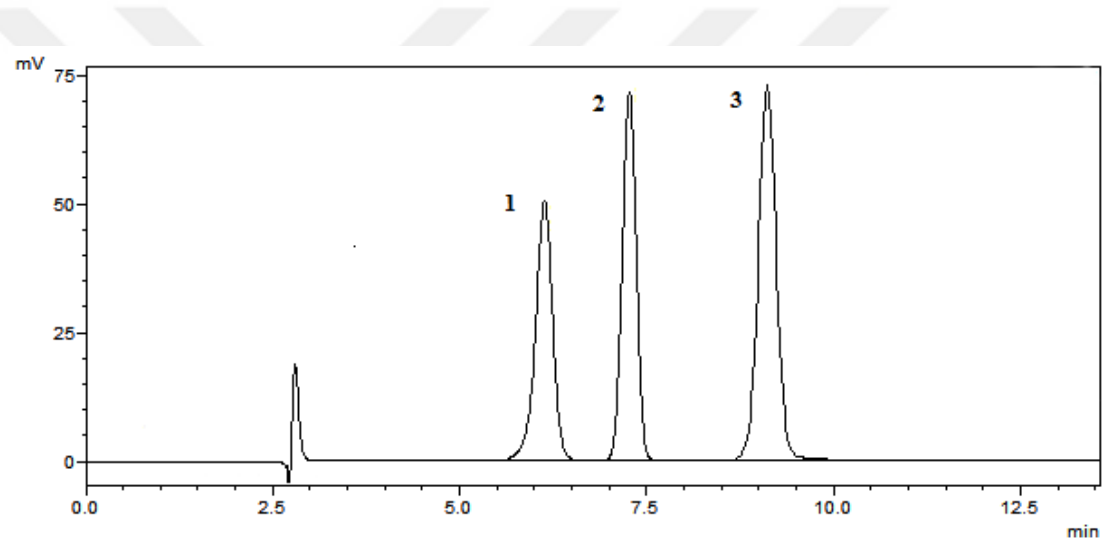
Kromatografik tayin yaparken çalışılan bileşiklere ait optimum ayırma koşullarının belirlenebilmesi için bazı önemli kriterler dikkate alınmaktadır. Piklerin birbirinden tam olarak ayrılabilmesi için kapasite faktörü değerinin  $\geq 1$ , seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) değerinin  $\geq 1,15$ , ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin  $\geq 1,5$  olması gerekmektedir. Çalışılan asetonitril-su ikili karışımları için bileşiklerin alıkonma zamanlarının yanısıra kolonda tutulmayan bileşik olarak seçilen Urasil'in  $t_R$  değerleri de kalitatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değerler Eşitlik 1.1'de yerine konulduğunda çalışılan mobil faz pH değerlerindeki kapasite faktörü değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca Eşitlik 1.2 ve 1.5'de kullanılarak ayırmanın seçicilik faktörü ve ayırma gücü değerleri hesaplanmıştır.

Her bir mobil faz pH değerindeki bu veriler değerlendirildiğinde optimum ayırma koşulu, pH'sı 6 olan %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımı olarak seçilmiştir. Bileşiklerin ilaç formülasyonlarında kantitatif tayinlerinin yapılabilmesi için iç standart metodu kullanılarak kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Optimum ayırma koşulu için uygun iç standart (I.S) olarak statin grubu bileşiklerden Simvastatin seçilmiştir. Optimum koşulda Purnell eşitliği (Eşitlik 1.5) ile hesaplanan değerler Tablo 4.5'de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Belirlenen optimum koşulda hesaplanan kromatografik veriler

Bileşik	$t_{Rort}$	$k$	$\alpha$	$N_{ort}$	$(\alpha-1)/\alpha$	$k_2/(k_2+1)$	$1/4\sqrt{N}$	$R_s$
Simvastatin (I.S)	6,20	1,13		3546			59,55	
Tamoksifen	7,40	1,54	1,36	2351	0,27	0,61	48,49	7,86
Lapatinib	9,12	2,13	1,38	2902	0,28	0,68	53,87	10,16
Urasil ( $t_0$ )	2,908							

Bu optimum ayırma koşulunda bileşiklerin standart karışımında elde edilen kromatogram Şekil 4.7’de verilmiştir.



**Şekil 4.7.** Standart karışım kromatogramı 1) Simvastatin (I.S) 2) Tamoksifen 3) Lapatinib

#### 4.4. Metot Validasyonu

Bu çalışmada geliştirilen ters faz sıvı kromatografik metotun geçerliliğinin kanıtlanması için metot validasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için ICH tarafından belirlenen doğrusallık, kesinlik ve doğruluk parametrelerine göre veriler değerlendirilmiştir.

#### 4.4.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk testi, kromatografik sistemin uygunluğunu ve etkinliğini belirlemek için yapılan bir testtir. Herhangi bir kromatografik sistemin performansı, analitik sonuçların güvenilirliğini etkileyebilecek düzenli kullanım esnasında sürekli olarak değişebilir.

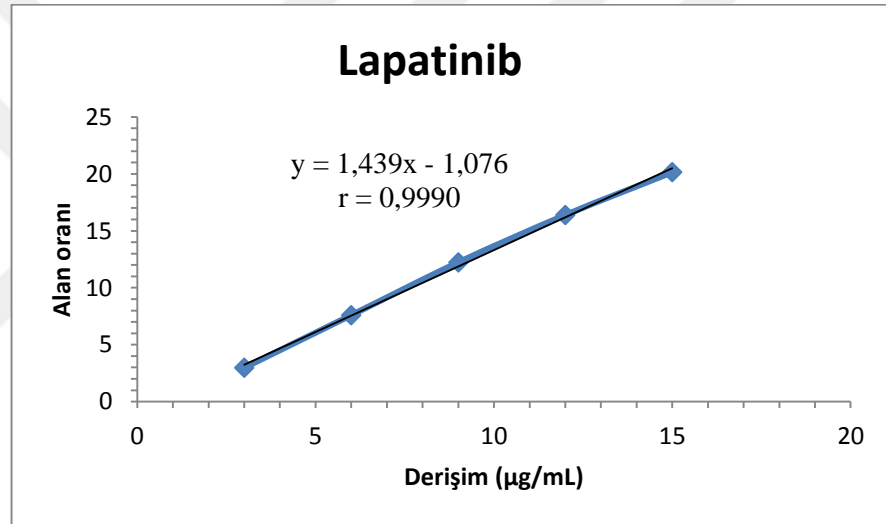
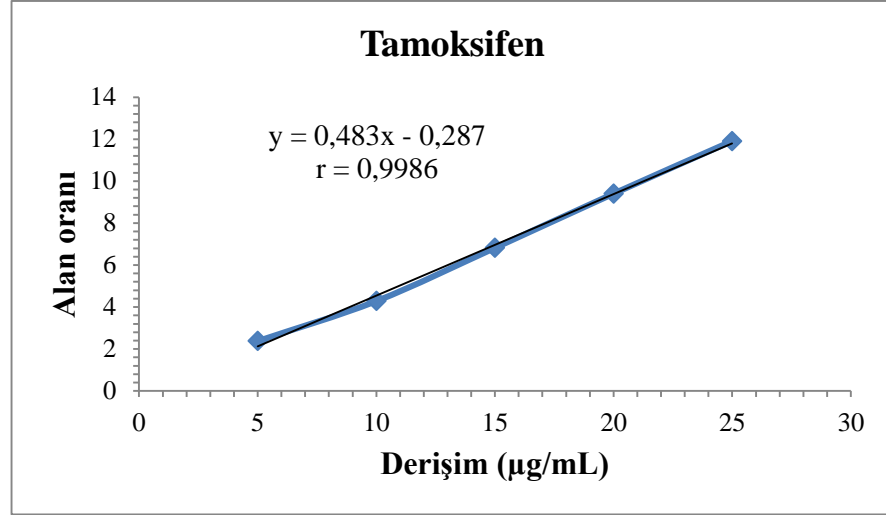
Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) ve Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) tarafından belirlenmiş sistem uygunluk testi parametreleri; belirli bir analizin yeterliliğini sağlamak, bir kromatografik sistemin ayırma gücünü, kolon verimliliğini ve tekrarlanabilirliğini doğrulamak için yaygın olarak kullanılır. Optimum koşulda yapılan sistem kararlılık testleri sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.6.** Sistem uygunluk testlerinden elde edilen sonuçlar

Parametre	Simvastatin (I.S)	Tamoksifen	Lapatinib	Önerilen Değerler
<b>t<sub>R</sub></b>	6,22	7,39	9,09	
<b>T<sub>F</sub></b>	1,207	1,199	1,050	≤ 2
<b>k</b>	1,14	1,54	2,12	≥ 1
<b>α</b>	-	1,35	1,38	> 1
<b>R<sub>s</sub></b>	-	7,73	10,11	≥ 2
<b>N</b>	3624	2381	2924	> 2000
<b>RSD (t<sub>R</sub>)</b>	0,173	0,134	0,232	≤ 1
<b>RSD (alan)</b>	0,678	0,458	0,642	≤ 1

#### 4.4.2. Doğrusallık ve Duyarlılık

Çalışmada bileşiklerin doğrusal derişim aralıklarının belirlenmesi amacıyla bileşiklerin 100 µg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler kullanılarak kalibrasyon için beş farklı derişimdeki çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulmasında iç standart metodu kullanılmıştır. Metotun duyarlılığının belirlenmesi amacıyla da her iki bileşik için tayin limiti (LOD) ve miktar tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.9'da, kalibrasyon grafiklerine ait veriler ile LOD ve LOQ değerleri ise Tablo 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Lapatinib ve Tamoksifen'e ait kalibrasyon grafikleri

Tablo 4.7. Kalibrasyon verileri

Bileşik	Kalibrasyon Fonksiyonu	SD	Doğrusal Aralık ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Lapatinib	$y=1,439x-1,076$	0,367	3-15	0,842	2,551
Tamoksifen	$y=0,483x-0,287$	0,163	5-25	1,114	3,376

#### 4.4.3. Kesinlik

Yapılan validasyon çalışmasında geliştirilen metotun kesinliğinin belirlenebilmesi için gün içi ve günler arası çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar her iki bileşik için doğrusal çalışma aralığında iki ayrı derişimde yapılmıştır. Gün içi çalışmalar aynı gün ve aynı koşullar altında, günler arası çalışmalar ise üç gün sonra aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler Tablo 4.8’de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Lapatinib ve Tamoksifen’e ait kesinlik çalışması sonuçları

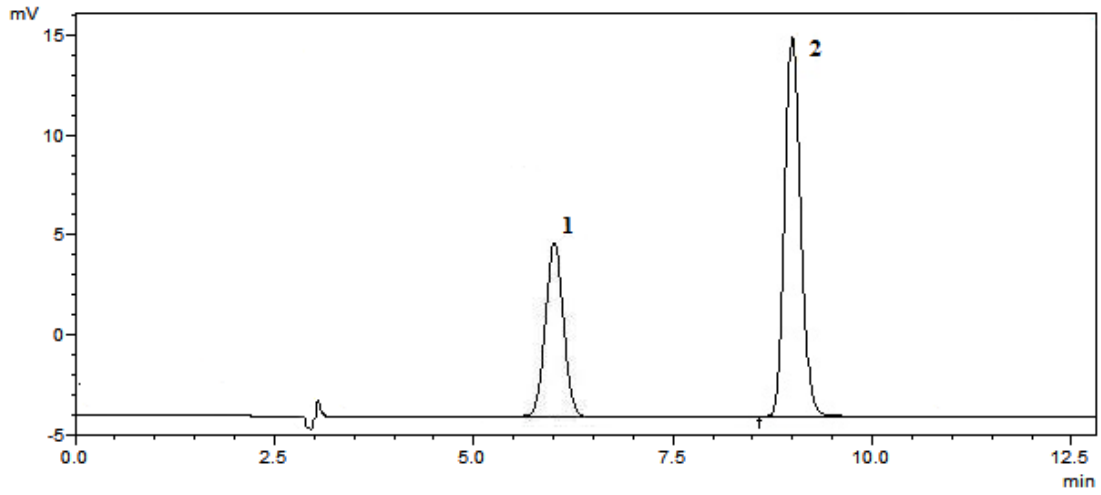
Bileşik	Derişim (µg/mL)	Gün İçi Derişim Ortalaması (µg/mL)	%RSD	Günler Arası Derişim Ortalaması (µg/mL)	%RSD
Lapatinib	6	5,983	0,595	6,084	0,808
	12	12,198	0,513	12,401	0,517
Tamoksifen	10	9,462	0,231	9,229	0,538
	20	19,670	0,675	19,337	0,801

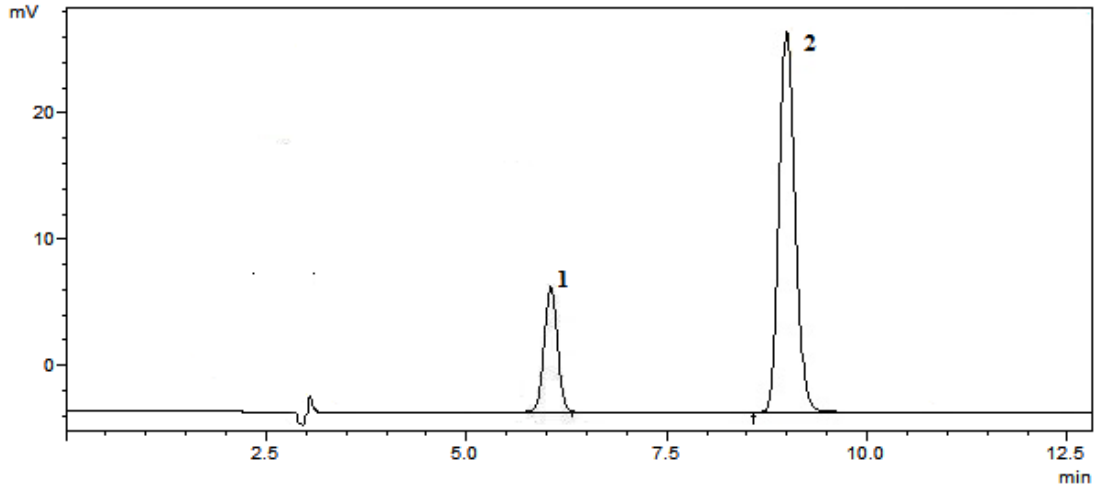
#### 4.4.4. Doğruluk

Tez çalışmasında geliştirilen metotun doğruluğunun belirlenmesi amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım deneyleri, ticari formülasyonlara katkı yapılarak gerçekleştirilmiştir. 250 mg Lapatinib etken maddesini içeren Tykerb® ve 10 mg Tamoksifen sitrat etken maddesini içeren Tamoxifen® tablet formülasyonlarında kantitatif tayin ve geri kazanım çalışması üç tekrarlı olarak yapılmıştır (Tablo 4.9). Lapatinib ve Tamoksifen’e ait ilaç formülasyon numunesi ve standart ilavesi ile katkılandırılmış numune kromatogramları sırasıyla Şekil 4.9’da ve Şekil 4.10’de verilmiştir.

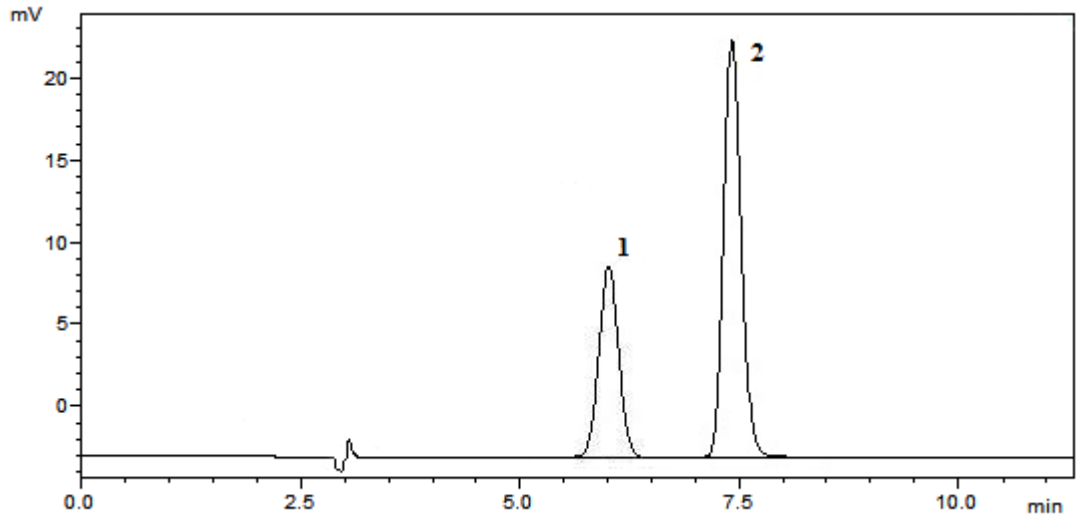
**Tablo 4.9.** Tablet formülasyonlarının içerdikleri etken madde miktarları ve hesaplanan geri kazanım değerleri

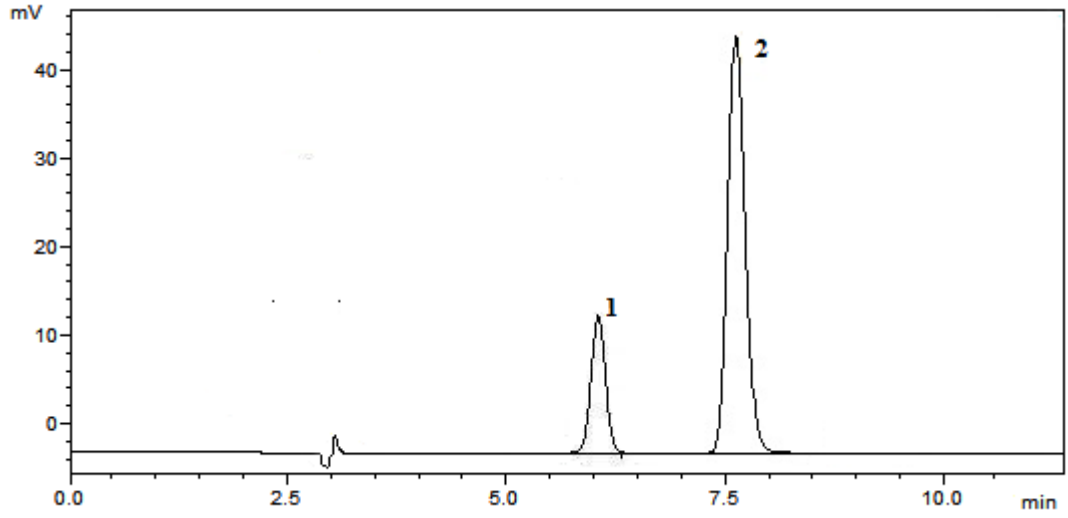
Numune No	Lapatinib %Geri Kazanım	Tamoksifen %Geri Kazanım
1	99,304	98,682
2	98,526	99,258
3	99,381	98,327
$\bar{X}_{ort} \pm GS$	$99,071 \pm 1,174$	$98,755 \pm 1,166$
SD	0,473	0,470
%RSD	0,477	0,475
Tablette bulunan miktar (mg)	$247,676 \pm 2,936$	$9,876 \pm 0,117$
%Hata	0,930	1,248





**Şekil 4.9.** Lapatinib içeren Tykerb® 250 mg tablette gerçekleştirilen numune analiz kromatogramları. 1) Katkısız tablet numune kromatogramı, 1-IS (2 µg/mL); 2-LPT (6 µg/mL) 2) Katkılandırılmış tablet numune kromatogram-, 1-IS (2 µg/mL); 2-LPT (12 µg/mL)





**Şekil 4.10.** Tamoksifen sitrat içeren Tamoxifen® 10 mg tablette gerçekleştirilen numune analiz kromatogramları. 1)Katkısız tablet numune kromatogramı, 1-IS (2 µg/mL); 2- TMX (10 µg/mL); 2) Katkılandırılmış tablet numune kromatogram-, 1-IS (2 µg/mL); 2- TMX (20 µg/mL)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tamoksifen ve Lapatinib meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan sırasıyla bazik ve amfoterik özellikte bileşiklerdir. Bu moleküllerin RPLC yöntemiyle biyolojik numunelerde, ilaç formülasyonlarında tayinine yönelik makaleler mevcuttur. Bu çalışmaların çoğunda bileşikler deneme-yanılma metoduyla analizlenmiştir. Bu tezde Tamoksifen ve Lapatinib'in tablet formülasyonunda analizi için ters faz sıvı kromatografik metot geliştirilmiştir. Metotta optimum koşulların belirlenmesinde, çalışılan su-asetonitril hidroorganik karışımlarda hazırlanan mobil faz pH'sı ve bileşiklerin alıkonma zamanı ilişkisi esas alınmıştır. Elde edilen doğrusal olmayan ilişki kullanılarak literatürde bileşiklerin kromatografik bir yöntemle tayini yapılmamıştır, sadece UV-Vis spektrofotometrik ve potansiyometrik metotla belirlenmiş pK<sub>a</sub> değerlerine yer verilmiştir. Çalışma, asetonitril yüzdesi %50, %55 ve %60 (v/v) olan asetonitril-su ikili karışımlarında tayin edilmiştir. Çalışmadaki mobil faz pH aralıklarında hesaplanan kapasite faktörü değerleri esas alınarak bileşiklerin optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Bu metot optimizasyon işleminden sonra metot validasyonu çalışması da gerçekleştirilmiştir.

X Terra C18 kolonda, %50, %55 ve %60 (v/v) asetonitril içeren hidroorganik karışımlarda ve seçilen mobil faz pH aralığında 37°C'de RPLC metoduyla belirlenen t<sub>R</sub> değerleri kullanılarak doğrusal olmayan ilişki esas alınarak hesaplama yapan NLREG programıyla Tamoksifen'in pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır (Tablo 5.1).

**Tablo 5.1.** Tamoksifen için %50, %55, %60 (v/v) ikili karışımlarında hesaplanan pK<sub>a</sub> değerleri

%ACN (v/v)	pK <sub>a</sub>
50	8,148 (0,052)*
55	8,062 (0,043)
60	7,954 (0,073)
*Standart Sapma	

Tamoksifen tersiyer dimetil amino fonksiyonel grubunu içermektedir. Yapılan bu tez çalışması ile bu gruptaki azota ait  $pK_a$  değeri tayin edilmiştir. Hesaplanan bu veriler  $37^\circ C$ 'de tayin edilen ilk değerlerdir. Bazik özellikteki Tamoksifenin  $pK_a$  değerleri mobil fazdaki asetonitril oranı arttıkça azalmaktadır. Knoop vd. (2018) tarafından potansiyometrik metotla  $25^\circ C$ 'de yapılan tayinde  $pK_a$  değeri  $8,96 \pm 0,11$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Chemicalize ile  $pK_a$  değeri 8,76 olarak tahmin edilmiştir.

Tamoksifen için verilen aynı deneysel koşullarla Lapatinib'in yapısında bulunan kinazolin grubundaki azota ait  $pK_{a1}$  değeri ve 2- (metilsülfonil)etil amino grubundaki sekonder amine ait  $pK_{a2}$  değeri hesaplanarak Tablo 5.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.2.** Lapatinib için %50, %55, %60 (v/v) ikili karışımlarında hesaplanan  $pK_a$  değerleri

%ACN (v/v)	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
<b>50</b>	5,230 (0,097)*	8,405 (0,165)*
<b>55</b>	5,194 (0,092)	8,607 (0,119)
<b>60</b>	5,152 (0,107)	8,833 (0,104)
*Standart Sapma		

Lapatinib amfoterik bir bileşiktir. Kinazolin grubundaki azota ait bazik  $pK_{a1}$  değeri mobil faz pH'sı 3-7.5 arasında; 2- (metilsülfonil)etil amino grubundaki sekonder amine ait asidik  $pK_{a2}$  değeri mobil faz pH'sı 7.5-11 arasında belirlenmiştir. Mobil fazdaki asetonitril yüzdesi arttıkça  $pK_{a1}$  değeri azalmakta,  $pK_{a2}$  değeri ise artmaktadır. Tóth vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada Lapatinibe ait  $pK_a$  değeri UV-Visible spektrofotometrik yöntemle metanol-su ortamlarında belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon metodu ile bileşiğin  $pK_{a1}$  değeri  $7,72 \pm 0,07$ ;  $pK_{a2}$  değeri  $5,08 \pm 0,05$  olarak hesaplanmıştır.

Tamoksifen ve Lapatinib hidrofobik özellikte bileşikler olduğundan sadece su ortamında  $pK_a$  değerini belirlemek mümkün değildir. Bunun için hidroorganik karışımdaki asetonitrilin makroskopik sabiti değerleri ( $X_{ACN}$ ,  $\epsilon$ ) kullanılarak çizilen grafiklerin doğrusal fonksiyonları kullanılarak su ortamındaki  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır (Tablo 5.3)

**Tablo 5.3.** Bileşiklerin su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler		X <sub>ACN</sub> -pK <sub>a</sub>	1/ε-pK <sub>a</sub>
Tamoksifen	pK <sub>a</sub>	8,733	8,809
Lapatinib	pK <sub>a1</sub>	5,461	5,495
	pK <sub>a2</sub>	7,117	6,951

Sunulan bu tez çalışmasında asetonitril-su karışımlarında ve farklı mobil faz pH değerlerinde hesaplanan k değerleri ve mobil faz pH ilişkisi incelenerek metot optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin kromatografik verilerinden  $k \geq 1$ ;  $\alpha \geq 1,15$  ve  $R_s \geq 1,5$  koşulları incelenmiş ve optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Kantitatif tayin için iç standart metodu kullanılmış ve Simvastatin iç standart olarak seçilmiştir. Validasyon işlemi öncesinde sistem uygunluk testleri yapılarak ICH ve USP tarafından önerilen değerlere uygun olduğu belirlenmiştir. İç standart metoduyla kalibrasyon işleminde doğrusal çalışma aralıkları belirlenmiştir ( $r > 0,999$ ). Gün içi ve günler arası çalışmalarda geliştirilmiş metotun kesinliği belirlenmiş ve %RSD değerlerinin %1'in altında olması bu metotun kesinliğinin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Tablet formülasyonlarında yapılan kantitatif çalışmada hesaplanan miktarların, formülasyonun etiket değerine yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan geri kazanım çalışmalarından hesaplanan veriler  $> \%98,5$  olarak belirlenmiştir. Metotun doğruluğunu ifade eden % hata değeri de %2'nin altında hesaplanmıştır.

Bu tez çalışması ile meme kanseri tedavisinde etkin kullanılan Tamoksifen ve Lapatinib için sınırlı veri bulunan pK<sub>a</sub> değerleri belirlenmiş böylece literatüre önemli bir katkıda bulunulmuştur. Ayrıca yapılan metot optimizasyonu çalışması da ilk defa bu tezde yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249.
2. GLOBOCAN 2020 Database. <https://gco.iarc.fr/> Erişim tarihi: 17.12.2021 12:50.
3. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)* 2012; 20(3): 256–267.
4. Braems G, Denys H, Wever OD, Cocquyt V, Broeckea RV. Use of tamoxifen before and during pregnancy. *Oncologist* 2011; 16(11): 1547–1551.
5. Nolting M, Schneider-Merck T, Trepel M. Lapatinib. In: *Small Molecules in Oncology*. Martens UM, Eds. vol 201, 2nd Ed., Berlin: Springer, 2014: p. 125-143.
6. Segovia-Mendoza M, González-González ME, Barrera D, Díaz L, García-Becerra R. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of HER2-positive breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Am J Cancer Res* 2015; 5(9): 2531–2561.
7. Burris III HA, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O’Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, Harris JL, Smith DA, Koch KM, Stead A, Mangum S, Spector NL. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(23): 5305-5313.
8. Opdam FL, Guchelaar HJ, Beijnen JH, Schellens JHM. Lapatinib for advanced or metastatic breast cancer. *Oncologist* 2012; 17(4): 536–542.
9. PubChem (nih.gov). Erişim tarihi: 10.12.2021 19.20
10. Settimo L, Bellman K, Knegt RMA. Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. *Pharmaceutical Research* 2014; 31: 1082-1095.

11. Comer J, Box K. High-throughput measurement of drug pKa values for ADME screening. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 2003; 8(1): 55-59.
12. Babić S, Horvat AJM, Mutavdžić -Pavlović D, Kashtelan-Macan M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26(11): 1043-1061.
13. Gupta JK, De B, Saravanan VS. Correlation between the pKa and pharmacological properties of some imidazolin-5(4*H*)-ones, their precursors and Schiff's bases. *Indian Journal of Chemistry* 2006; 45(B): 2580-2582.
14. Bezençon J, Wittwer MB, Cutting B, Smieško M, Wagner B, Kansy M, Ernst B. pKa determination by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy – An old methodology revisited. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014; 93: 147-155.
15. Narin İ, Sarıoğlan S, Anılanmert B, Sarı H. pKa determinations for montelukast sodium and levodropropizine. *Journal of Solution Chemistry* 2010; 39: 1582-1588.
16. Angelov T. HPLC determination of pKa value of benfotiamine. *Journal of Liquid Chromatography&Related Technologies* 2021; 1-7.
17. Dardonville C. Automated techniques in pKa determination: low, medium and high-throughput screening methods. *Drug Discovery Today: Technologies* 2018; 27: 49-58.
18. Eser B, Sepici Dinçel A. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education* 2018; 2(2): 51-57.
19. Nane İD. Piperazin grubu içeren antihistaminik ilaçların su-organik ikili karışımlarında kromatografik davranışlarının belirlenmesi ve metod validasyonu. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ebru Çubuk Demiralay), 2019; 13-16.
20. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, Çeviri. 5. Baskı: Bilim yayıncılık, 2000, s:725-.765.
21. Meyer VR. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 5th Ed., West Sussex: John Wiley&Sons, 2010, p. 106.
22. Eser B, Sepici Dinçel A. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education* 2018; 2(2): 51-57.

23. Canitez P. Lösemi tedavisinde kullanılan bazı ilaçların iyonlaşma sabitlerinin su-organik çözücü ikili karışımlarında, spektroskopik ve YPSK yöntemler ile belirlenmesi ve bu ilaçların YPSK yöntemle eş zamanlı tayini. Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çorum (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Senem Şanlı), 2012; 21-24.
24. Civelek Z. Antifungal etkili naftifin hidroklorürün spektrofotometrik ve HPLC yöntemleriyle kantitatif analizi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (Tez Danışmanı: Dr. Öğr.Üyesi Saadet Dermiş), 2021;26-41.
25. Söğüt O. Seftibuten, sefalekssin, sefdinir ve sefadroksilin pKa değerlerinin ters faz sıvı kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta (Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Güleren Alsancak), 2016;21-26.
26. Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientist. New Jersey: : John Wiley&Sons, 2007.
27. Rosés M, Bosch E. Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. Journal of Chromatography A 2002; 982(1): 1-30.
28. Papadoyannis IN, Samanidou VF. Validation of HPLC instrumentation. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2004; 27(5): 753-783.
29. McPolin O. Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis. United Kingdom: Mourn Training Services, 2009: p.141.
30. Shoyama Y. Quality Control Of Herbal Medicines And Related Areas. Kalra K Ed., Croatia: InTech, 2011.
31. Green JM. Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation. Analytical chemistry, 1996; 68(9): 305A-309A.
32. Ahmida NHS, Abu-Naja MS, Doghman YSA. Determination of paracetamol in tablet by difference spectrophotometric method. Asian Journal of Chemistry 2009; 21(3): 2233.
33. Rosing H, Man WY, Doyle E, Bult A, Beijnen JH. Bioanalytical liquid chromatographic method validation. A review of current practices and procedures. Journal of Liquid Chromatography&RelatedTechnologies 2000; 23(3): 329-354.

34. Tóth G, Jánoska A, Völgyi G, Szabó ZI, Orgován G, Mirzahosseini A, Noszál B. Physicochemical characterization and cyclodextrin complexation of the anticancer drug lapatinib. *Journal of Chemistry* 2017.
35. Knoop O, Hohrenk LL, Lutze HV, Schmidt TC. Ozonation of tamoxifen and toremifene: reaction kinetics and transformation products. *Environmental Science & Technology* 2018; 52: 12583-12591.
36. Santana DP, RMC Braga, Strattman R, Albuquerque MM, Bedor DCG, Leal LB, Silva JA. Reversed phase HPLC determination of tamoxifen in dog plasma and its pharmacokinetics after a single oral dose administration. *Quim. Nova* 2008; 31(1): 47-52.
37. Haouala A, Zanolari B, Rochat B, Montemurro M, Zaman K, Duchosal MA, Ris HB, Leyvraz S, Widmer N, Decosterd LA. Therapeutic drug monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2009; 877(22): 1982-1996.
38. Kumar KK, Nagoji KEV, Nadh RV. A validated RP-HPLC method for the estimation of lapatinib in tablet dosage form using gemcitabine hydrochloride as an internal standard. *Indian J Pharm Sci* 2012; 74(6): 580-583.
39. Escudero-Ortiz V, Pérez-Ruixo JJ, Valenzuela B. Development and validation of a high-performance liquid chromatography ultraviolet method for lapatinib quantification in human plasma. *Therapeutic Drug Monitoring* 2013; 35(6): 796-802.
40. Saadat E, Kelishad PD, Ravar F, Kobarfard F, Dorkoosh FA. Development and validation of rapid stability-indicating RP-HPLC-DAD method for the quantification of lapatinib and mass spectrometry analysis of degraded products. *Journal of Chromatographic Science* 2015; 53(6): 932-939.
41. Sandhu PS, Beg S, Katare OP, Singh B. QbD-driven development and validation of a HPLC method for estimation of tamoxifen citrate with improved performance. *Journal of Chromatographic Science* 2016; 54(8): 1373-1384.
42. Alanazi MM, Alkahtani HM, Almehizia AA, Attwa MW, Bakheit AH, Darwish HW. Validated liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of foretinib and lapatinib, and application to metabolic stability investigation. *Royal Society of Chemistry* 2019; 9: 19325-19332.

43. Biswal S, Mondal S. Analytical method validation report for assay of lapatinib by UPLC. *Pharm Methods* 2019; 10(1): 9-14.
44. Mangla B, Beg S, Alam O, Ahsan W, Haque A, Patel KS, Almalki WH, Alrobaian M, Kohli K. Systematic development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of tamoxifen and sulphoraphane with specific application for nanolipidic formulations. *Arabian Journal of Chemistry* 2020; 13: 7909-7920.



# ÖZGEÇMİŞ

## **Kişisel Bilgiler**

Adı ve Soyadı : Fatmanur KALKIR

## **Eğitim Durumu**

Lisans Öğrenimi : Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2018

## **Yabancı Dil(ler) ve Düzeyi**

1. İngilizce, Okuma (İyi), Yazma(İyi), Konuşma (İyi)

## **İş Deneyimi**

1. Selçuk Ecza Deposu Antalya Şubesi, Mesul Müdür, 2019-Halen
2. Memorial Sağlık Grubu Özel Medstar Antalya Hastanesi, Eczacı, 2018-2019