

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**CİSPLATİN o-FENİLENDİAMİN KOMPLEKSİNİN OLUŞUM
KOŞULLARININ İNCELENMESİ VE OLUŞAN KOMPLEKS
YARDIMIYLA İDRARDA SPEKTROFOTOMETRİK
YÖNTEMLE CİSPLATİN MİKTAR TAYİNİ**

Eczacı BERİL ANILANMERT

T 91504

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. GÜLER YALÇIN

İSTANBUL, 1999

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
SUMMARY	
1. GİRİŞ.....	6
1. 1. CDDP HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	7
1. 1. 1. CDDP NİN KİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	7
1. 1. 2. CDDP NİN KARARLILIĞI	8
1. 1. 3. CDDP NİN İDRARDAKİ KARARLILIĞI.....	11
1. 1. 4. CDDP NİN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	11
1. 2. o-FENİLENDİAMİN.....	17
1. 3. CDDP TAYİNİNE İLİŞKİN YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR.....	17
1. 4. İDRARIN BİLEŞİMİ VE CDDP NİN İDRARDAKİ BAZI BİLEŞENLERLE ETKİLEŞİMİ.....	22
1. 4. 1. CDDP NİN VÜCUTTA BAĞLANDIĞI BİLİNEREN AMİNOASİTLER VE DİĞER ORGANİK MOLEKÜLLER.....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2. 1. KİMYASAL MADDELER.....	24
2. 2. GEREÇLER.....	25
2. 3. STOK ÇÖZELTİLER.....	25
2. 4. ÖN DENEMELER.....	27
3. BULGULAR.....	32

3. 1. CDDP NİN OPDA İLE TÜREVLENDİRİLMESİ YOLUYLA	
SPEKTROFOTOMETRİK TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ.....	32
3. 1. 1. REAKSİYON SICAKLIĞI VE SÜRESİNİN İNCELENMESİ.....	32
3. 1. 2. REAKSİYON pH ININ İNCELENMESİ.....	33
3. 1. 3. BELİRTEÇ KONSANTRASYONUNUN İNCELENMESİ.....	35
3. 1. 4. KLORÜR İYONU KONSANTRASYONUNUN ÜRÜN	
OLUŞUMUNA ETKİSİ.....	36
3. 1. 5. $1,0 \cdot 10^{-5}$ M KLORÜR KONSANTRASYONUNDA HAZIRLANAN	
ÖLÇÜ EĞRİSİ.....	38
3. 1. 6. ÖLÇÜ EĞRİSİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN	
İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	39
3. 2. İDRARDA CDDP TAYİNİ.....	41
3. 2. 1. İDRARDAKİ BİLEŞENLERİN OPDA İLE REAKSİYONUNUN	
İNCELENMESİ.....	41
3. 2. 2. ÖN DENEMELER.....	42
3. 2. 3. $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KLORÜR KONSANTRASYONUNDA VE İDRARDA	
REAKSİYON ÖNCESİ VE SONRASINDA GÖZLENEN pH DEĞERLERİ....	42
3. 2. 4. İDRARDA CDDP TAYİNİNDE pH IN DENETLENMESİ.....	44
3. 2. 5. FARKLI KLORÜR KONSANTRASYONLARINDA VE İDRARDA	
OLUŞTURULAN ÜRÜNE İLİŞKİN ABSORBANS DEĞERLERİ.....	45
3. 2. 6. CDDP NİN KREATİNİNE BAĞLANMASI.....	47
3. 2. 7. STANDART KATMA YÖNTEMİ İLE İDRARDA CDDP MİKTAR	
TAYİNİ.....	49
3. 2. 8. ÖLÇÜ EĞRİLERİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN	
İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	51

4.SPEKTRUMLAR.....	57
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	60
6. KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	72





Beni büyük bir özveriyle bu günlere getiren annem, anneannem ve dedeme ...

ÖNSÖZ

Maddi, manevi her konuda olduğu gibi, bilimsel alanda ve tezimde de büyük desteğini gördüğüm ve biz öğrencilerine çok keyifli bir çalışma ortamı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Güler YALÇIN'ın danışman hocam olması sebebiyle kendimi şanslı buluyor, kendisine en derin şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca tezim de dahil her konuda değerli bilgilerinden ve fikirlerinden pek çok ilham aldığım ve çalışmamdaki sorunların üstesinden gelebilmemde önemli yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Emre DÖLEN'e, her konuda değerli desteklerinden ve anlayışından dolayı Prof. Dr. Mürşit PEKİN'e, manevi destekleri için Dekanımız Prof. Dr. Meral Keyer UYSAL, Prof. Dr. Ünal YARS ve Prof. Dr. Elçin GÜRKAN, Prof. Dr. Turay YARDIMCI ve Prof. Dr. Betül DORTUNÇ'a, çalışmamda hem deneysel aşamada hem de yazım aşamasında büyük emeği geçen Dr. Filiz ARIÖZ'e, yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Serap KARADERİ, Arş. Gör. Şebnem YILMAZ, Arş. Gör. Dilek BİLGİÇ, Arş. Gör. Gülbin ERDOĞAN ve Dr. Ali Kemal YEŞİLALTAY'a, ayrıca yaklaşım ve destekleri için Yrd. Doç. Dr. Ayşen CÜCÜ, Yrd. Doç. Dr. Hülya DEMİR, Öğr. Gör. Nur YARS'a, fakültemiz Araştırma Laboratuvarı Sorumlusu Nuray YÜKTAŞ'a, en sıkıştığım anlarda yardımına koşan fakültemiz II. Sınıf öğrencisi Seda KANMAZ'a ve en ihtiyaç duyduğum bir anda maddi destekleriyle yanımda olan Onko & Koçsel A.Ş.'ye ve diğer bölümlerden yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım ve arkadaşlarıma da çok teşekkür ederim.

CİSPLATİN – o-FENİLENDİAMİN KOMPLEKSİNİN OLUŞUM KOŞULLARININ İNCELENMESİ VE OLUŞAN KOMPLEKS YARDIMIYLA İDRARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE MİKTAR TAYİNİ

ÖZET

Cisplatin (CDDP), dozun iyi ayarlanamaması durumunda ciddi toksik etkileri olabilen, yaygın kullanımlı, antitümöral bir ilaç etken maddesidir. Kişiyeye göre doz ayarlaması ve nefrotoksisitesinin önlenmesi açısından kan ve idrarda izlenmesi önemlidir. Moleküler spektrofotometrik tayin yönünden ele alındığında molar sönüm katsayısı düşüktür. Tayinin duyarlılığını arttırmak için bir türevlendirme reaksiyonuna gerek duyulmaktadır. Bu çalışmada cisplatinin o-fenilendiamin (OPDA) ile verdiği ürünün optimum oluşum koşulları; çözücü, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, reaktif ve klorür iyonu konsantrasyonu açısından incelenmiş ve oluşturulmuş olan bu tayin yöntemi, idrara uyarlanmıştır.

Cisplatin ile OPDA'nın verdiği reaksiyon ürününün maksimum absorpsiyonu; OPDA'nın, idrardaki bileşiklerin ve cisplatinin absorpsiyon verdiği dalga boyu aralığından oldukça uzak olan 705 nm de gözlenmektedir. Yüksek klorür konsantrasyonlarında reaksiyonun baskılanmasına rağmen, reaktifin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasıyla bu dezavantajın ve idrardan ileri gelen diğer girişimlerin üstesinden gelinmiştir. Mavi – yeşil renkli ürünün oluşumu pH \approx 6,20

de, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M klorür çözeltisinde, cisplatin konsantrasyonununun 60 katı konsantrasyonda, $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikada tamamlanmaktadır. İdrarda ve $1,5 \cdot 10^{-1}$ M klorür çözeltisinde, aynı koşullarda, 600 katı konsantrasyonda OPDA kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde klorür girişiminin ve idrardan ileri gelen girişimlerin de üstesinden gelinmiştir. Yukarıda belirlenen her iki koşulda da aynı konsantrasyon için absorbands değerleri değişmediğinden oluşan ürünün molar sönüm katsayısı yaklaşık olarak $91\ 000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir.

$1,0 \cdot 10^{-5}$ M klorür çözeltisinde gerçekleştirilen reaksiyon sonucu konsantrasyon ve absorbands arasında $0,30 - 3,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında, idrarda ise $0,42 - 3,58 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında doğrusallık bulunmuştur. Bu durumda bu yöntemin idrarda tayin sınırı $8,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ olmaktadır. Standart katma yöntemiyle $8,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $16,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $28,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda cisplatin katılmış olan idrarlarda % 76,19, % 76,19 ve % 78,61 i bulunmuştur.

İdrarda cisplatin tayini için geliştirilmiş olan bu yöntem, ön işleme gerek duyulmadan, idrarda basit bir türevlendirme reaksiyonu sonucu elde edilen mavi-yeşil rengin görünür bölge spektroskopisi yardımıyla doğrudan tayinine dayanan kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ayrıca yüksek klorür konsantrasyonlarında bile değişmeden kalan cisplatin tayinine olanak vermektedir.

INVESTIGATION OF THE FORMATION CONDITIONS OF CISPLATINUM – o-PHENYLENEDIAMINE COMPLEX AND THE DETERMINATION OF CISPLATIN THROUGH THIS COMPLEX

SUMMARY

Cisplatin (CDDP) is an antitumoral drug with a wide therapeutical use, that may have serious toxicity when the dose is not regulated properly. CDDP monitoring in urine has an importance in regulating dosage and investigating its nephrotoxicity. Its molar extinction coefficient is quite low when the optical detection is sought. Therefore a derivatizing reaction is required to provide the sensitivity of its detection. In this study, the optimum formation conditions of cisplatinum / o-phenylenediamine complex was determined in terms of the effect of the solvent, temperature, pH, reaction time, reactant and chloride ion concentration and the method that is developed in aqueous medium was applied and modified to urine medium.

The maximum absorption of the reaction product of cisplatin and OPDA is at 705 nm, which is far beyond the wavelengths of the absorption of cisplatin itself, o-phenylenediamine and the biomolecules in urine. Although the reaction was inhibited in high chloride ion concentrations, this disadvantage and the other interferences from urine matrix were overcome by using the high concentration of the reactant. The formation of the blue - green product was completed at 90 °C in 30 minutes in the presence of o-phenylenediamine in the concentration of

60 times of CDDP concentration in $1,0 \cdot 10^{-5}$ M chloride ion and 600 times of CDDP concentration in $1,5 \cdot 10^{-1}$ M chloride ion at $\text{pH} \cong 6,20$. Its extinction coefficient was found approximately about $91\,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in above conditions. A linear relationship was found between concentration and absorbance in $0,30 - 3,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range in about $1,0 \cdot 10^{-5}$ M chloride ion. The quantification method developed, was finally applied to urine and the linearity between concentration and absorbance was found in $0,42 - 3,58 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration range. The determination limit of cisplatin in urine with this method was $8,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and the percentages of spiked cisplatin detected by this method were 76,19 %, 76,19 %, 78,61 % in $8,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $16,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and $28,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP spiked urines, in order.

This method, developed for the determination of cisplatin in urine, allows an easy and a very cheap quantification of the blue-green product obtained by a simple derivatization in urine, through visible spectrophotometry without any sample pretreatment. It is also possible to determine the intact CDDP selectively in high chloride concentrations by this method.

Adsorptif Sıyırma Voltametri	ADSV
Alevsiz Atomik Adsorpsiyon Spektrometri	AAAS
Grafit Fırın Atomik Adsorpsiyon Spektrometri	GFAAS
Heksadesiltrimetilamonyum bromür	HTAB
Intravenöz	i.v.

1. GİRİŞ

Cisplatin (CDDP) tedavisi gören hastaların kan ve idrarlarında ilaç düzeyinin izlenmesi, kişiye göre doz ayarlanması ve CDDP yi nefrotoksisitesinin önlenmesi açısından çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı, CDDP yi OPDA ile türevlendirerek kolay ve ucuz bir spektrofotometrik miktar tayini yöntemi geliştirmek ve bu yöntemi idrara uyarlayarak tıbbi laboratuvarlarda kolayca uygulanabilecek bir yöntem geliştirmektir.

Geliştirilen bu yöntemle CDDP nin idrarda türevlendirmesi sonucu elde edilen mavi - yeşil renkli ürünün, ön işlemlere gerek kalmaksızın, 705 nm de verdiği absorbansın doğrudan ölçümüyle, CDDP tayini mümkün olmaktadır. İdrardaki bileşenlerin, ürünün 705 nm deki absorpsiyonuna girişim yapmaması ve OPDA nın idrarda bulunan kükürt taşıyan ligand molekülleri ile karşılaştırıldığında platin ile daha zayıf kompleks yapıcı bir ligand olması, idrarla atılan serbest CDDP nin seçici olarak tayin edilebileceği düşüncesini desteklemektedir.

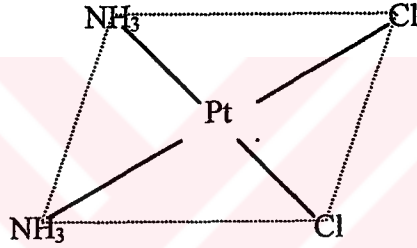
Geliştirilen yöntem, atomik absorpsiyon, HPLC ve elektrokimyasal yöntemlerin kullanılmadığı laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecektir .

1. 1. CDDP Hakkında Genel Bilgiler

1. 1. 1. CDDP nin kimyasal özellikleri

Kısaca cisplatin olarak anılan cis-diklorodiaminplatinat (II) (CDDP), geometrik yapısı kare düzlem olan anorganik bir platin kompleksidir. Molekül ağırlığı $300,05 \text{ g mol}^{-1}$ olup [1], moleküler yapısı Şekil – 1 de verilmiştir [2] .

CDDP: $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$



Şekil - 1: CDDP nin moleküler yapısı

CDDP; N, N – dimetilformamid (DMF), N, N - dimetilasetamid (DMA) ve dimetilsülfoksit (DMSO) dışındaki organik çözücülerde pratikçe çözünmez (Tablo - 1) [3].

CDDP, nükleofilik süstitüsyon sonucu solvatasyona uğrar. Hidrolize bağlı olarak, cisplatinin sudaki çözünürlüğü zamanla artar. Klorür iyonu aşırısında çözeltideki platinin % 99 u değişmeden CDDP olarak kalır ve çözünürlüğü de zamanla artar.

Tablo - 1: CDDP nin değişik çözücülerdeki çözünürlüğü [3]

Çözücü	Çözünürlük	
	CDDP ($\times 10^{-2}$ M)	CDDP (g/ 100 mL)
DMF	6,67	2,00
DMA	6,00	1,80
DMSO	116,67	35,00
H ₂ O (24 h)	0,77	0,23
(72 h)	0,83	0,25
% 0,9 NaCl	0,80	0,15

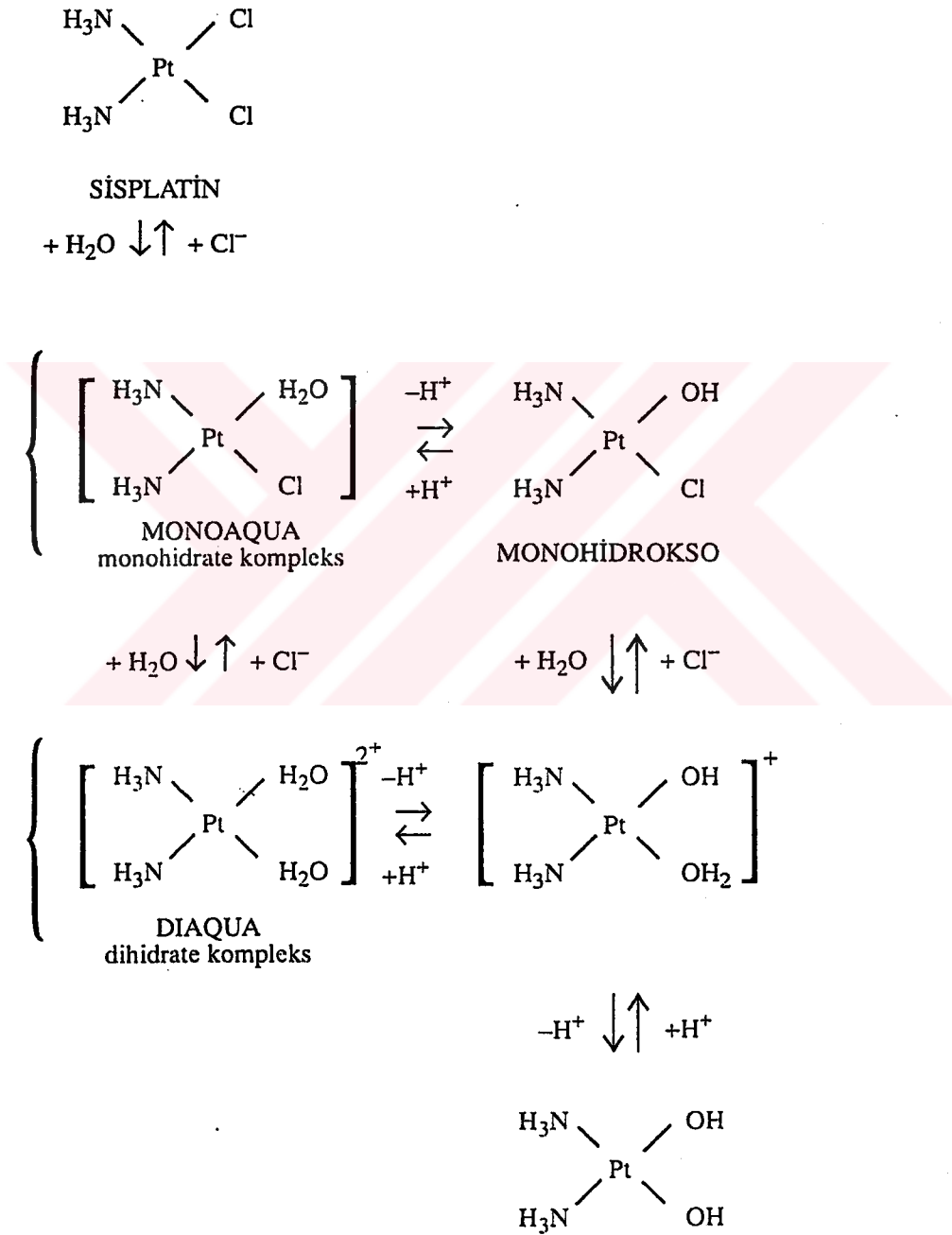
1. 1. 2. CDDP nin kararlılığı

CDDP nin, katı halde oda sıcaklığında ışık ve havaya karşı kararlı olduğu bildirilmiştir, ancak molekül 270 °C de bozunur. Metal yüzeylerle teması bozulmasına neden olur. Paslanmaz çelikle olan etkileşimi bilinmemektedir. Çözeltisinde alüminyum ile geçimsiz olup, siyah bir çökelti vermektedir. Mannitol, dekstroz, benzil alkol ve parabenlerde kararlıdır. $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde CDDP 25 °C de 12 saat (% 99 u CDDP olarak bulunur) kararlıdır [3].

Buzdolabında saklandığında çökmesinin önlenmesi için konsantrasyonu $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ den az olmalıdır. Kararlılığı NaHCO_3 varlığında azalmaktadır.

Platin (II) komplekslerinin reaksiyonlarının yavaş olduğu bilinmektedir [4]. CDDP nin sulu çözeltisine klorür ilavesi, bozunma hızını ve daha da önemlisi, dengedeki madde konsantrasyonunu etkiler. Asidik ve klorür içermeyen ortamda, CDDP nin bozunma hızı ve dengedeki konsantrasyonu, başlangıç konsantrasyonuna bağılıdır.





Şekil - 2: CDDP nin sulu çözeltisindeki denge reaksiyonları

1. 1. 3. CDDP nin idrardaki kararlılığı

Kinoshita ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada CDDP içeren idrar, deneyden önce $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır [5]. Andersson ve Ehrsson'un yaptıkları bir çalışmada ise CDDP nin idrarda $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmasıyla tam olarak kararlı kalmadığı, $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren bir idrar örneğinde 48 saat sonra % 40 ının kaybolduğu gösterilmiştir. CDDP $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ de katı karbondioksitte bozunmadan korunabilir [6]. Riley ve arkadaşları, CDDP nin oda sıcaklığında ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) sağlıklı gönüllülerin idrarlarında 6 – 8 saatin üzerinde kararlı olmadığını ve % 40 – 80 oranında azaldığını belirtmişlerdir [8]. Ayrıca idrarda CDDP nin bozunma hızı, konsantrasyondan bağımsızdır. Aynı çalışmada tayine başlanmadan önce $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklanmış olan örnekler hemen çözülüp, 2 dakika sonike edilmiş $3\text{ }\mu\text{m}$ lik Millipore filtrelerden süzülüp, hemen kromatografiye edilmiştir.

İdrar toplanması gereken çalışmalarda idrarın $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklanması gerekir. Çalışmamızda idrar alınır alınmaz ön işlem gerekmeden tayine ilişkin reaksiyon gerçekleştirilmektedir.

1. 1. 4. CDDP nin farmakolojik özellikleri

Sulu çözeltide platin elektrodlar aracılığı ile oluşturulan elektriksel alanın E. coli'nin çoğalması üzerine etkisi incelenirken, elektrottan çözeltiye geçen platin türevlerinin antibakteriyel ve antikanserojen etkileri tesadüfen farkedilmiş ve bu gözlem sayesinde CDDP nin etkili olduğu bulunmuştur [9].

CDDP nin etki mekanizmasının tam olarak bilinmemesine rağmen, DNA sarmalına çapraz bağlanma sonucu DNA fonksiyonuna girişim yaptığı ve buna karşılık RNA üzerindeki etkisinin az olduğu düşünülmektedir [9, 10].

CDDP nin vücutta dağılımını en fazla böbrekler, rahim, karaciğer, deri, adrenal korteks, yumurtalıklar, dalak, pankreas, akciğerler, kaslar, testisler ve beyne olmaktadır [11]. Tedavide tek başına veya testis, yumurtalık, rahim boynu, idrar kesesi ve baş / boyun tümörlerinde diğer bazı ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır [9, 10]. Amerikan Farmakopesi'nde kabul görmüş kullanım alanları idrar kesesi, yumurtalık, testis, adrenal korteks, meme, rahim boynu, endometrium, mide, akciğer, prostat kanserleri, nöroblastom, baş / boyun tümörleri, yumurtalık tümörleri ve osteosarkomdur [10].

Ayrıca CDDP nin karsinojenik etki potansiyeline de sahip olduğu bildirilmiştir [12].

CDDP, mide - barsak kanalından absorbe olmayıp sadece i.v. uygulanabilmektedir [9]. Plazma proteinlerine % 90 oranında ve kısmen geri dönüşümsüz olarak bağlanmakla beraber dokulara da bağlanmaktadır. Verilişinden sonra 4 ay süre ile böbrek dokusunda CDDP saptanabilmektedir. Kan - beyin bariyerini kolaylıkla geçemez. CDDP vücutta enzimsiz çevrimlerle inaktif metabolitlerine dönüştürülmektedir.

Eliminasyonu: Uygulanmasından sonra ancak 3 saat içinde diyalizle uzaklaştırılabilmektedir [9].

Etki süresi: Uygulanmasını takiben DNA inhibisyonu günlerce sürer. Kanseri baskılayıcı etkisinin orta derecede olması sebebiyle ve yan etkilerini azaltmak amacıyla, daha ziyade diğer kanser ilaçlarıyla birlikte kullanılır [9]. Örneğin “Siklofosfamid – Doksorubisin – CDDP”, “Vinblastin – CDDP – Bleomisin” bu kombinasyonlara örnek olarak verilebilir.

Yetişkin ve genç dozu: i.v. olarak, 20 mg / m² den 120 mg / m² ye kadar değişen bir doz aralığında kullanılabilir [10]. Bir uygulamada toplam CDDP dozu 120 mg / m² yi geçmemelidir.

Yan Etkileri: En ciddi yan etkisi, doza bağlı olarak akut tübüler nekroz yapması ve ayrıca glomerüler filtrasyonu bozmasıdır [9]. Hastaya önceden bol su verilerek diürez oluşturulursa, bu yan etki önemli ölçüde önlenir. Aminoglikozid ilaçlar, CDDP nin böbreklere toksisitesini arttırabilirler. CDDP, iç kulakta hasar oluşturabilir. Diğer yan etkileri ; bulantı ve kusma, lökopeni, trombositopeni, anemi, idrar artışı, böbrek, göz ve sinirlere toksisite ve stomatit ve uygunsuz ADH salgılama sendromudur (kafa karışıklığı, yorgunluk, zayıflık) [10].

i.v. verilen ilaçların absorpsiyon basamağı sözkonusu olmadığından vücutta iki fazlı bir davranış gösterirler. Dağılım fazı olan birinci faz α -fazı, ikinci faz olan eliminasyon fazı da β -fazı olarak adlandırılmıştır.

CDDP yarılanma ömrü α -fazı için; 25 - 49 dakika olup β -fazı için ; normalde 58 - 43 saat, anüri durumunda ise 240 saate kadardır [10, 12].

Kanda bir ligand-değişim reaksiyonu sonucunda proteine bağlı sabit metabolitine dönüşür [10, 12]. Ayrıca kanda pek çok nükleofilik fonksiyonel grupla kompleksleşmiş ve ultrafiltreden geçebilen platin türleri ve değişmemiş CDDP olarak da bulunur.

İlk 24 saatte CDDP nin idrarla atılımı hızlıdır, ama daha sonra uzun bir periyod boyunca çok yavaş atılır [7, 15, 18]. İdrarla atılan platin komplekslerinin % 75 - % 95 i değişmemiş CDDP dir [8]. Nitekim bu çalışmada da idrara katılan CDDP nin yaklaşık % 76 -78 i tayin edilebilmiştir. İnfüzyonu takip eden 4. ve 5. saatlerde serbest serum platini, kandaki toplam platinin % 2 - 3 ünden daha azını teşkil etmektedir [13]. Verilen dozun sadece % 10 - 30 u ilk 2 saatte idrarla atılmaktadır. Verilmiş olan toplam CDDP dozunun % 17 sinin ilk 4 saat içinde, % 23 ünün ilk 24 saatte ve % 43 ünün 5 günde idrarla atıldığı bildirilmiştir [10, 12].

Hızlı enjeksiyon yerine infüzyon ile verildiği zaman plazma yarılanma ömrü kısaltmakta, idrarla atılan CDDP miktarı artmaktadır [14]. Klinik sonuçlar, uygulamadan sonraki iki saat içinde büyük miktarlarda değişmemiş CDDP atıldığını göstermektedir. Önceki çalışmalarda idrarda düşük oranlarda CDDP görülmesi, bir yandan CDDP nin vücuttaki toplam metabolizmasına, diğer yandan idrar kesesinde veya örnek toplanmasından sonraki beklemeden dolayı bozulmasına bağlanmaktadır. Riley ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada elde edilen nispeten yüksek CDDP konsantrasyonlarının, idrar

kesesi kanserlerinin tedavisindeki yararlılığı konusundaki klinik bulgularla ilgili olabileceği belirtilmiştir [8]. CDDP nin vücuda verilmiş şekli, idrarda bulunan miktarını belirlemektedir. Hastalarda i.v. enjeksiyon ve i.v. infüzyon içindeki CDDP uygulamalarında diüretik mannitolün etkisi araştırılmış, mannitol ile beraber verildiği ve verilmediği durumlarda yarılanma zamanı değişmemiştir. Ancak mannitol çözeltisi ile beraber verildiğinde, plazmada daha yüksek ultrafiltre edilebilen platin seviyeleri elde edilmiştir. Üriner klerens ise düşmüştür: 100 mg / m² doz için; mannitol olmadan i.v. injeksiyonda 24 saatte % 40, 6 saatlik i.v. infüzyonda % 75 iken, mannitol varlığında bu değerler i.v. yükleme dozu için % 18 e ve infüzyon sonrası da % 22 ye düşmüştür [11].

Proteine bağlanma süresi ligand değişimi süresiyle aynıdır [15]. Kandaki platin plazma düzeyleri, uygulamadan sonraki 1-2 saat içinde bilinen yöntemlerin tayin sınırının altına düşer. 24 saatte hemen hemen kandaki tüm platin proteinlere bağlanır. Uygulamadan bir hafta sonra bile dokularda azalmakta olan platin tayin edilebilmektedir. Bir dozluk CDDP birkaç defada verilince, bir defada verildiğine oranla daha fazla platin vücutta alıkonur. CDDP uygulamasından sonra platinin hücrede en çok biriktiği organeller; çekirdek, mikrozomlar ve sitozoldür. CDDP nin biyolojik olarak aktifleşmesi için bazı ürünlerine bozunması gerektiği bildirilmiştir. CDDP taşıyıcı çözeltideki klorür konsantrasyonunun artmasıyla, kemirgenlerde CDDP kaynaklı ölümün ve böbrekteki platin konsantrasyonunun azalması da bu bilgiyi desteklemektedir .

CDDP nin vücutta birikme özelliği vardır. Shierl ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada tedaviden 8 yıl sonra bile idrarda CDDP bulunduğu belirtilmektedir [16].

Perfüze edilmiş izole sıçan böbreğinde (Daley-Yates ve Mc Brien, 1982) ve insanda yapılan çalışmalarda (Jacobs ve arkadaşları, 1980) CDDP ile dozlamadan sonra böbrekte tübüler sekresyon olduğu gösterilmiştir [17].

Bertolero ve Litterst, çalışmalarında CDDP nin idrarla atılımının idrar hacminden ziyade idrar pH ına bağlı olduğunu göstermişlerdir [18].

Hastaya bol su verilmesinin platin plazma seviyesine göre üriner olarak atılan toplam platin miktarına etkisi yoktur, ancak dozlamadan sonraki ilk saatlerde platin atılım hızının artmasını sağlamaktadır [15]. Bu ilaçla tedavi edilen hayvanlarda böbrek hasarı meydana geldiği durumlarda, böbrekteki CDDP konsantrasyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Metal toksisitesinin önlenmesinde kükürt donörlerinin yaygın bir kullanımı olup [11, 19] özellikle tiyokarbonil ligandlar, platin grubu ilaçların nefrotoksik etkilerine karşı koruyucu etki gösterir [19]. CDDP nin nefrotoksik etkilerinin tiyol grubu içeren proteinlere bağlanmak suretiyle azaldığı bildirilmiştir [20]. Bilindiği gibi idrarda da kükürt donörü içeren çok sayıda amino asit ve oligopeptid mevcuttur. Bu durumda nefrotoksisite açısından idrarda serbest CDDP nin tayini daha da önem kazanmaktadır.

1. 2. o-fenilendiamin

(1,2 – benzendiamin; o – diaminobenzen) $C_6H_8N_2$

Molekül ağırlığı $108,14 \text{ g mol}^{-1}$ olan o – fenilendiamin, kahverengi – sarı kristaller görünümündedir [1]. Erime noktası $103 - 104 \text{ }^\circ\text{C}$, kaynama noktası $256 - 258 \text{ }^\circ\text{C}$ dir. Suda az çözünürken, alkol, kloroform ve eterde iyi çözünür . $pK_b = 5,34$ tür.

1. 3. CDDP tayinine ilişkin yapılmış çalışmalar

Platin komplekslerinin çeşitli tümörlerin tedavisindeki yararlılıklarının keşfi, bu komplekslerin farmasötik formülasyonda ve biyolojik sıvılardaki analizlerine artan bir ilginin doğmasına neden olmuştur.

Riley ve arkadaşlarının klinik çalışmalarında CDDP (1 mg / min) yavaş i.v. infüzyon ile 50 mg / m^2 dozda verilip, idrar örnekleri 30 dakika sonra alınmıştır [8]. İdrarda değişmeden kalan CDDP konsantrasyonunun $16,3 - 96,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında değiştiği gözlemlenmiştir .

Platin (II) değişik materyallerden oluşan elektrotlarda yükseltgenmekte ve indirgenmektedir [18]. Ancak bu reaksiyonlar, platine koordine olan ligandların özelliklerine de bağlı olup, elektrot yüzeyinde birikme sorunu vardır. Analitik açıdan uygun olmayan elektrot reaksiyonlarından ötürü, voltametrik yöntemler platin tayini için pek tercih edilmemektedir [3]. Adsorptif sıyırma voltametri

(ADSV)'nin uygulanmasında da adsorpsiyon ile elektrot yüzeyinde birikme sorunu vardır [3].

Shearan ve Smyth ise anorganik platin için etilendiaminle kompleks oluşturulması sonrası ADSV uygulamasını incelemişler ve idrardaki endojen maddelerin miktarına bağlı olarak, Pt (II) nin doğrudan tayininin uygulanabilirliğinin kısıtlı olduğunu bulmuşlardır [21]. Aynı çalışmada Diferansiyel Puls Polarografisi ve GFAAS nin düşük verim gösterdiği belirtilmektedir.

Bahsedilen bu yöntemlerin CDDP için seçici olmamalarının yanısıra, matriks etkisi gibi dezavantajları da vardır.

1995 yılında Shierl ve arkadaşları tarafından yapılan, idrarda voltametik yöntemle platin tayininde 2 pg tayin limitine ulaşılmış olmasına rağmen, bu yöntem de idrardaki serbest CDDP değil toplam platin tayinine yöneliktir [16].

Alevsiz Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi (AAAS), özellikle biyolojik örneklerdeki toplam platin tayinleri için en çok kullanılan yöntemdir [3]. Girişim olmadığı durumda, AAAS ile sulu örneklerde platin 1 ng mL⁻¹ ye kadar tayin edebilmektedir. Bununla beraber uçucu olmayan bir element olan platinin atomize olması için gerekli olan yüksek fırın sıcaklıkları, tayinde yanlışlıklara neden olabilmektedir. Ayrıca biyolojik örneklerdeki bileşenler, platinin atomlaşmasında fiziksel girişim yapmaktadır. AAAS de ön işlem sözkonusudur.

X-ışını Emisyon Spektrometresi de biyolojik sıvılarda platin tayini için kullanılmıştır [3]. Fakat, örnek hazırlama işleminin zahmetli olmasından dolayı klinik incelemelerde pek kullanımı olmamıştır.

HPLC, CDDP tayininde son zamanlarda en çok tercih edilen yöntemdir. İdrarda HPLC ile pek çok tayin yöntemi bildirilmiştir [8, 22, 23]. Bu yöntemlerin kiminde matriks girişimleri vardır, kiminde ise işlemin karmaşık olması sözkonusudur.

1982 yılında Riley ve arkadaşları çözücü içinde oluşturulan anyon değiştirici HPLC tekniğini kullanarak bir tayin yöntemi geliştirmişlerdir [8]. Bu tayin yönteminde heksadesiltrimetilamonyum bromür (HTAB) kolon dolgu maddesine absorplandırılmış ve CDDP tayini yapılmıştır. Bu çalışmada mobil faz olarak $1,0 \cdot 10^{-4}$ M HTAB (10^{-2} M, pH = 8 sitrat tamponunda) kullanılmış, ancak anyonik karakterde olmalarından dolayı pek çok idrar bileşeninin kolonda fazlaca tutulması problem oluşturmuştur. Bu problemin üstesinden gelebilmek için çift kolon sistemi kullanılmıştır. Bu ise pahalı ve karmaşık, ayrıca tekrarlanabilirliği düşük bir yöntemdir .

Baldew ve arkadaşları, idrarda HPLC sistemi içinde radyoaktif etiketleme yoluyla CDDP ve türevlerini ayrı ayrı tayin edip, 10 ng mL^{-1} tayin sınırına ulaşmışlardır [24]. Ancak CDDP ile tedavi edilen hastalarda bu yöntemle CDDP izlenmesi her tıbbi laboratuvarında mümkün olamamaktadır ve maliyeti yüksektir .

1983 yılında in - vitro ve in - vivo olarak yapılmış olan bir başka çalışmada CDDP ile plazma ve idrardaki bazı metabolitler iyon çifti

tekniki kullanılarak HPLC ile ayrılmıştır, ancak dimetiyonin – kompleksi dışında metabolitlerin tanısı yapılamamıştır [17]. Bu tayinde ön işlem gerekmektedir ve yöntem, her tıbbi laboratuvarında uygulanamayacak bir yöntemdir.

CDDP nin idrar ve plazmada tayini için 1985 yılında yayınlanmış bir başka yöntem; 85 / 15 su / metanol (v / v) de hazırlanmış, 10 mM NaCl çözeltisinden oluşan hareketli faz kullanılarak HPLC ile ayrılması sonrasında doğrudan UV detektörle saptanmasına dayanmaktadır [25]. Bu yöntemde de ön işlem sözkonusudur ve bu ön işlem prosedürü zorlaştırmaktadır.

Bannister ve arkadaşları, CDDP yi sodyum dietilditiyokarbamat (Na – DDTC) ile türevlendirip, organik bir çözücü ile ekstraksiyondan sonra HPLC yi takiben UV detektörle tayin etmişlerdir [22]. 254 nm de 25 ng mL^{-1} tayin sınırına ulaşılmıştır. İdrara CDDP katıldıktan sonra, 36 saat işlem görmeden bekletilmiş CDDP içeren idrar ile bekletilmeden işlem görmüş idrarda elde edilen değerler aynı bulunmuştur. Bu veri Na - DDTC nin yapısındaki kükürt atomunun platin için kuvvetli bir donör atom olduğu göz önüne alınırsa, platini idrardaki diğer bileşenlerden kopardığını veya bu kükürt atomunun idrardaki diğer platin türevlerine de bağlanabildiğini göstermektedir. Ayrıca Na – DDTC nin plazmada glutatyona bağlı CDDP yi dahi kopardığı rapor edilmiştir. Dolayısıyla bu da seçiciliği olmayan bir yöntem olup, organik çözeltiliye ekstraksiyon sırasında idrar ve organik fazın emülsiyon oluşturması da yöntemin dezavantajıdır.

Sodyum hidrojen sülfid ile birlikte aktifleyici olarak $K_2Cr_2O_7$ nin kullanıldığı çalışmalarda yöntem, kükürt donör atomu nedeniyle yine serbest CDDP tayini için seçici değildir [26, 27]. Sözü edilen yöntemler, kullanımını uygun olmayan, pahalı yöntemlerdir. Ayrıca gerek Na – DDTC, gerek sodyum hidrojen sülfitle türevlendirilmiş CDDP nin maksimum absorptans verdiği dalga boyunda, biyolojik sıvılardaki bazı makromoleküller de absorptans vermektedir. CDDP nin N, N - bis - (-3 - merkapt - 2 - quinoksalinil) -1, 3 - propandiamin ile reaksiyonu kullanılarak türev spektroskopisi ile tayini yapılmıştır [28]. Ancak ürün oluşumu için 24 saat ısıtma koşulu vardır. OPDA [29], bis - (salisilaldehid) [30] UV-VIS alanda ilacın tayin edilebildiği bileşikler vermektedirler ve bu bileşikler yardımıyla HPLC ile CDDP tayini yapılabilmektedir.

Bu çalışmanın birinci aşamasında Golla ve Ayres'in çalışması temel alınmıştır [31]. İkinci aşama olan yöntemin idrara uyarlanması ise Inagaki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ışığında gerçekleştirilmiştir [28]. Yöntemimizin bu çalışmaya olan üstünlüğü, ısıtma süresinin çok daha az olması, pratik olması ve idrardaki serbest CDDP nin doğrudan tayinine olanak vermesidir. Inagaki ve arkadaşlarının yaptıkları bis - (dimetilamin) tiyo-benzofenon ile türevlendirmeye dayanan çalışmalarında 24 saat ısıtmadan sonra türev spektrofotometrisi ile tayin yapılmaktadır [28]. Kullanılan ligantta platin tarafından tercih edilen kükürt donör atomunun bulunması, idrardaki serbest CDDP nin yanısıra diğer platin türevlerini de bağlamakta olduğunu ve bu nedenle seçiciliğin sağlanamadığını göstermektedir. Yukarıda bahsedilen farmakolojik ve farmakokinetik çalışmaların da ortaya çıkardığı gibi toksisite

araştırmasında ve ilaç dozunun ayarlanmasında idrarla atılan serbest CDDP miktarı önem kazanmaktadır.

1. 4. İdrarın bileşimi ve CDDP nin idrardaki bazı bileşenlerle etkileşimi

İdrarın pH ı 4,8 – 7,5 arasındadır [32, 33]. İdrardan bir günde atılan klorür miktarı yaklaşık 6,3 g dır. Bir günde atılan ortalama idrar hacmi yaklaşık 1200 mL olarak belirtilmektedir [33]. Atılan günlük klorür miktarı bir günlük idrar hacmine bölüldüğünde, klorür konsantrasyonu yaklaşık $1,5 \cdot 10^{-1}$ M olarak gözükmektedir. Bu miktar diyetle değişmektedir [33].

İdrarda bulunan diğer bileşenler; NH_4^+ , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- ve SO_4^{2-} iyonları, aminoasitler, kreatinin, üre ve ürik asittir [33, 34, 35]. İdrarda temel aminoasitlerin tümü ve etanolamin bulunur [36]. İdrardaki kükürdün büyük bölümü sülfat ve geri kalanı da organik kükürt biçiminde bulunmaktadır. İdrarla atılan kreatinin miktarı erkekte 1,0 - 2,0 g / gün, kadınlarda ise 0,8 - 1,8 g / gün'dür [33]. Ayrıca idrarla bir günde atılan toplam aminoasit miktarı yaklaşık 0,8 g dır [35].

1. 4. 1. CDDP nin vücutta bağlandığı bilinen aminoasitler ve diğer organik moleküller

CDDP biyolojik moleküllerle kelatlaşma eğilimi taşımaktadır [11]. Basit aminoasitler, bir veya iki donör merkez kullanarak CDDP ye koordine olabilmektedirler. X - ışını ile kristal yapı tayinleri platin ile

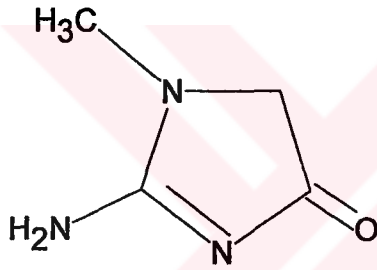
[N, O] kelatlaşmalarının mümkün olduğunu göstermektedir. Pt – N bağının yüksek bir kararlılığı vardır. CDDP nin klorür ligandları hareketli olup, Pt - N bağı ise nükleofilik süstitüsyonlara karşı daha kararlıdır . Platinin koordine olabildiği üç tip kükürt donörü; disülfidler, tiyoeterler ve tiyollerdir. Metiyonin, platine altı üyeli kelat halkası oluşturarak bağlanır [37]. Metiyonin ligandının platine bağlanabilecek üç fonksiyonel grubu mevcuttur: tiyoeter, amin ve karboksilik asit grupları. Platin (II) – metiyonin kompleksleri için rapor edilmiş olan iki tip kelatlaşma, (a) S,O üzerinden ve (b) S, N üzerinden kelatlaşmadır. Sadece kükürt üzerinden bağlanabilen metiyonin kompleksleri ve türevleri de sentez edilmiştir [37]. CDDP metiyoninle çeşitli ürünler oluştururken amonyak çıkışı olmaktadır [38, 41].

S – metil – L – sistein, metiyoninden zincirde bir metilen grubunun eksik olması ile ayrılır ve tüm platin kompleksleri ile koordinasyona uygundur [11, 20]. Sisteinde bulunan tiyol kükürdü, bir tiyoeter kükürdüne göre platin (II) iyonlarının bağlanması için daha elverişlidir. Sistein içeren peptidler, platine tiyol gruplarından bağlanmaktadır.

Kükürt, aminoasit zincirindeki N ve O donörleriyle yarışabilecek tek donör değildir [11]. Platin (II), oksijenden daha çok azota yatkın olduğundan azot içeren yan zincirler kararlı kompleks oluşturabilmektedir. Histidin iki imidazol azotu taşır. Amin azotu ile imidazol azotu genellikle platin için önemli donörlerdir. Glisin ise platine azottan ziyade oksijen donörü ile bağlanmakta, ancak bu yapı stabil olmayıp saatlerce bekletildikten, ısıtıldıktan veya pH arttırıldıktan sonra daha kararlı bir yapı oluşturan [N, O] kelatlaşması meydana

gelmektedir. Asparajin ve glutaminin amin azotları da platine bağlanmaktadırlar.

Kreatinin de önemli bir biyoligandır [Şekil - 3]. Ana tautomerik formlarında pek çok donör grubu vardır [39]. Buna karşın bugüne değin CDDP kreatinin etkileşmesine ilişkin gerek in - vivo gerek in - vitro çalışma yapılmamıştır. Ancak, $PtCl_4^{2-}$ iyonunun kreatinin ile yaptığı komplekslere ilişkin bir çalışmada bu bileşiklerin oluşumunun reaksiyon koşullarına çok fazla bağlı olduğu bildirilmiştir .



Şekil - 3: Kreatininin moleküler yapısı

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Kimyasal maddeler

CDDP ve USP standardı Bristol Myers Squibb firmasından başlı olarak, o-fenilendiamin (OPDA), etanol, KCl, NaOH ve HCl ve asetik asit Merck firmasından, HPLC grade DMF, asetonitril ve metanol Lab-Scan firmasından sağlanmıştır.

2. 2. Gereçler

Tartımlar için Shimadzu AEG 220 Libror terazi, pH ölçümleri için Metrohm 654 pH – metre ve Sensorex 120C pH elektrodu pH-metrenin kalibrasyonu için pH = 4,00 ve pH = 7,00 Metrohm AG CH 9100 tampon çözeltileri kullanıldı. Küçük hacimleri ölçmek için Gilson p20, p200 ve Eppendorf (1000 µL) pipetler kullanıldı. Reaksiyon Elektromag termostatlı su banyosunda gerçekleştirildi. Oluşan ürünün çözeltisi ölçümden önce Hettich Universal 30 RF santrifüj cihazında santrifüj edildi. Spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu 2100S model spektrofotometre ve 1 cm geçiş yollu kuarz küvetler, ayrıca distile su için de (GFL – 2004) distile su cihazı kullanıldı. Volumetrik kaplar, tartım yoluyla standardize edildi.

2. 3. Stok çözeltiler

CDDP stok çözeltisi (1): 15,0 mg CDDP, $1,0 \cdot 10^{-4}$ M HCl çözeltisinde çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı. Her çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı .

CDDP stok çözeltisi (2): 30,0 mg CDDP, $1,0 \cdot 10^{-4}$ M HCl çözeltisinde çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı. Her çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı .

CDDP stok çözeltisi (3): 20,0 mg CDDP, $1,0 \cdot 10^{-4}$ M HCl çözeltisinde çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı. Her çalışmadan önce taze olarak hazırlandı.

CDDP stok Çözeltisi (4): 15,0 mg CDDP, $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı. 4° C de en fazla 15 gün saklandı.

CDDP stok Çözeltisi (5): 30,0 mg CDDP, $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde çözülüp 100,00 mL ye tamamlandı. 4° C de en fazla 15 gün saklandı.

CDDP / idrar stok çözeltisi (1): 15,0 mg CDDP, sağlıklı gönüllülerden aç karnına sabah alınan 2. idrarda çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı. Her çalışma için taze olarak hazırlandı.

CDDP / idrar stok çözeltisi (2): 30,0 mg CDDP, sağlıklı gönüllülerden sabah aç karnına alınan 2. idrarda çözülüp 100,00 mL ye tamamlandı. Her çalışma için taze olarak hazırlandı

CDDP / idrar stok çözeltisi (3): 30,0 mg CDDP, sağlıklı gönüllülerden sabah aç karnına alınan 2. idrarda çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı.

CDDP / idrar stok çözeltisi (4): 60,0 mg CDDP, sağlıklı gönüllülerden sabah aç karnına alınan 2. idrarda çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı.

CDDP / idrar stok çözeltisi (5): 28,0 mg CDDP, sağlıklı gönüllülerden sabah aç karnına alınan 2. idrarda çözülerek 100,00 mL ye tamamlandı.

Belirteç stok çözeltisi (1): 14,0 mg OPDA, DMF te çözülerek 10,00 mL ye tamamlandı. Her çalışmadan önce taze hazırlandı.

Belirteç stok çözeltisi (2): 64,9 mg OPDA, DMF te çözülerek 10,00 mL ye tamamlandı. Her çalışmadan önce taze hazırlandı.

Belirteç stok çözeltisi (3): 386,0 mg OPDA, DMF te çözülerek 50,00 mL ye tamamlandı. Her çalışmadan önce taze hazırlandı.

2. 4. Ön denemeler

$1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl çözeltisinde CDDP nin OPDA ile verdiği ürünün oluşum koşulları incelenirken Golla ve arkadaşlarının çalışması temel alındı [31] ve bu çalışmadaki gibi OPDA konsantrasyonu, CDDP konsantrasyonunun 260 katı olarak alındı.

Bu amaçla CDDP stok çözeltisi (1), 1 : 10 (v / v) oranında suyla seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 1,00 mL, belirteç stok çözeltisi (1) den alınan 1,00 mL ile karıştırılarak kahverengi balon jodede 90 °C de 30 dakika ısıtıldıktan sonra 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış referans çözeltisine karşı absorpsiyon spektrumu alındı ve maksimum absorpsiyonunun 705 nm de olduğu gözlemlendi.

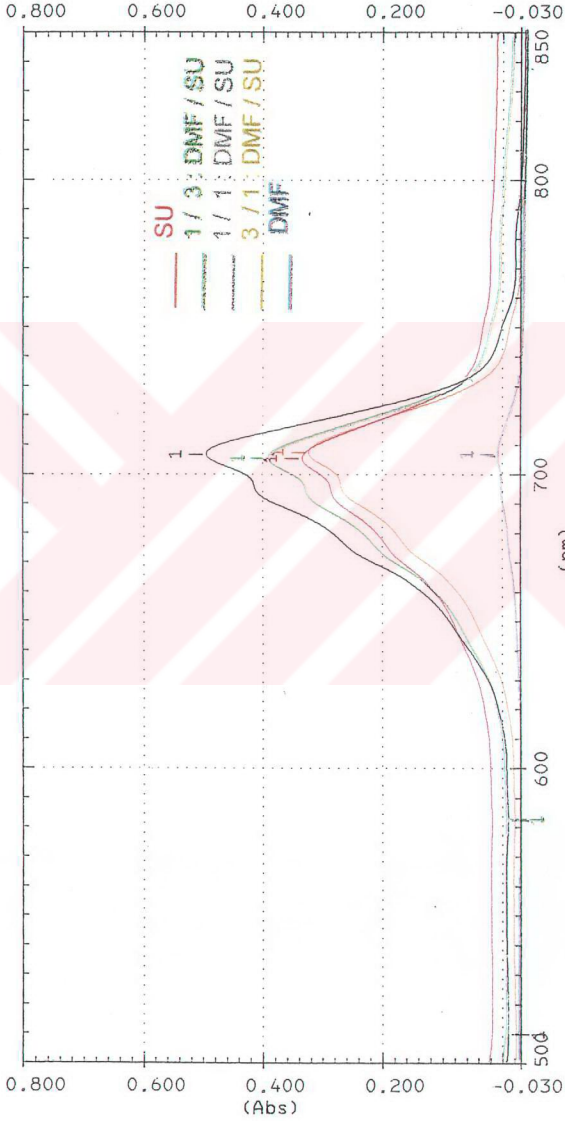
Çözücü oranını belirlemek üzere yapılan denemeler sonucu, CDDP – OPDA reaksiyon ürününün, en iyi 1 / 1 DMF / su (v / v) çözeltisinde olduğu saptandı. Bu nedenle yukarıdaki denemede izlenen

deney koşulu sabit tutuldu. Ürünün oluşumu sırasında bu oranın değiştirilmesinin, örneğin; DMF oranının veya su oranının attırılmasının absorbands değerini düşürdüğü gözlemlendi [Şekil - 4].

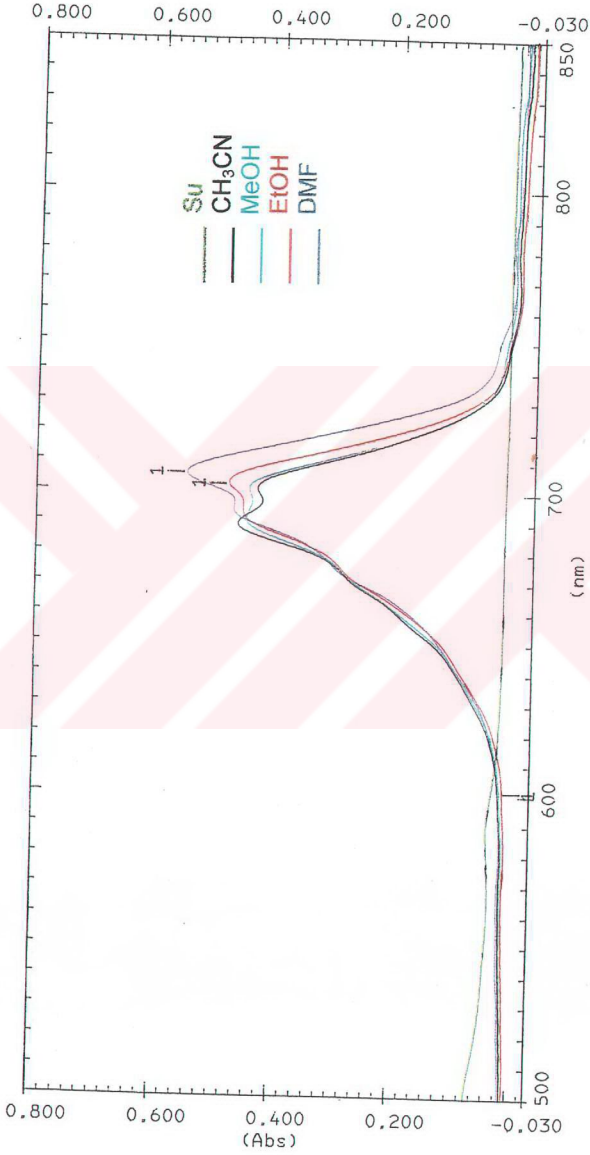
Oluşan ürünün kararlı olduğu çözücü sisteminin saptanması için 1 / 1 DMF / su (v / v) çözücü sisteminde oluşturulan ve su banyosunda kuruluğa kadar bekletilen ürünler; su, asetonitril, metanol, etanol ve DMF de çözülüp 10,00 mL ye tamamlandıktan sonra absorbandsları ölçüldü. En yüksek absorbands, DMF çözücüsü ile elde edildi [Şekil - 5].

Başka bir denemede ürünün 10,00 mL ye tamamlanmasında 3 / 7 DMF / su (v / v), 1 / 1 DMF / su (v / v), 7 / 3 DMF / su (v / v) ve saf DMF kullanıldığında en yüksek absorbands değerleri DMF ve 7 / 3 DMF / su (v / v) ile elde edildi. DMF oranı daha az olduğu için ve aradaki absorbands farkı çok küçük olduğundan 7 / 3 DMF / su (v / v) karışım çözücüsü, tamamlama çözeltisi olarak seçildi [Şekil - 6].

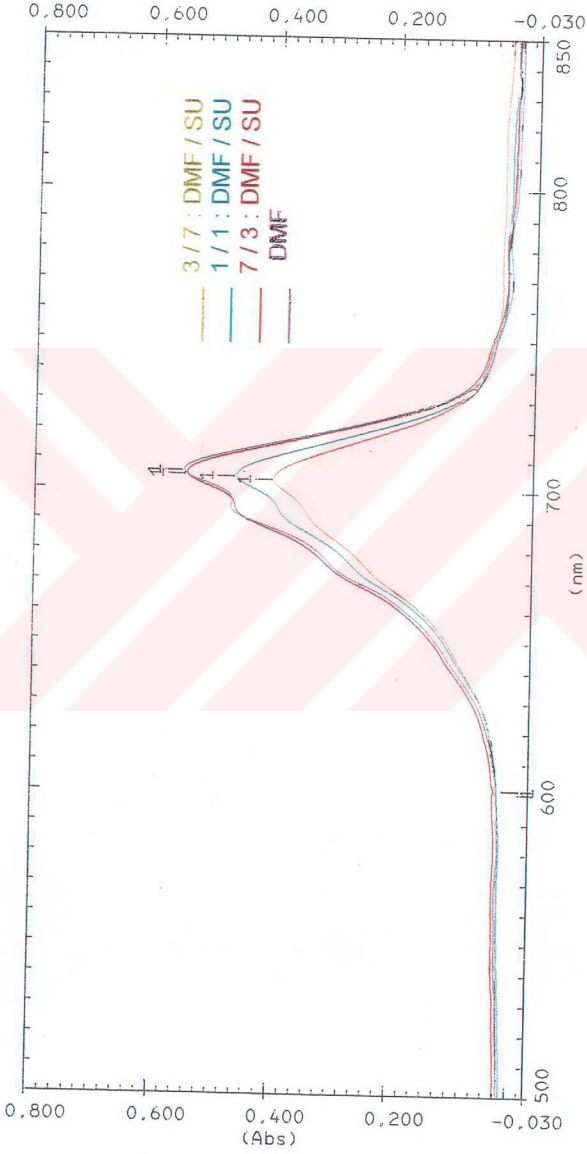
600 – 900 nm dalgaboyu aralığında girişim yapabilecek herhangi bir absorbands gözlenmediğinden, bundan sonraki absorbands değerleri distile suya karşı ölçüldü.



Şekil -4: CDDP / OPDA ürünün oluşumu üzerine DMF / su oranının etkisi



Şekil 5: Tamamlamada kullanılan çeşitli çözücülerin, CDDP / OPDA türünün kararlılığı üzerine etkisi



Şekil 6: Tamamlamada kullanılan DMF / su oranının CDDP / OPDA ürününün kararlılığı üzerine etkisi

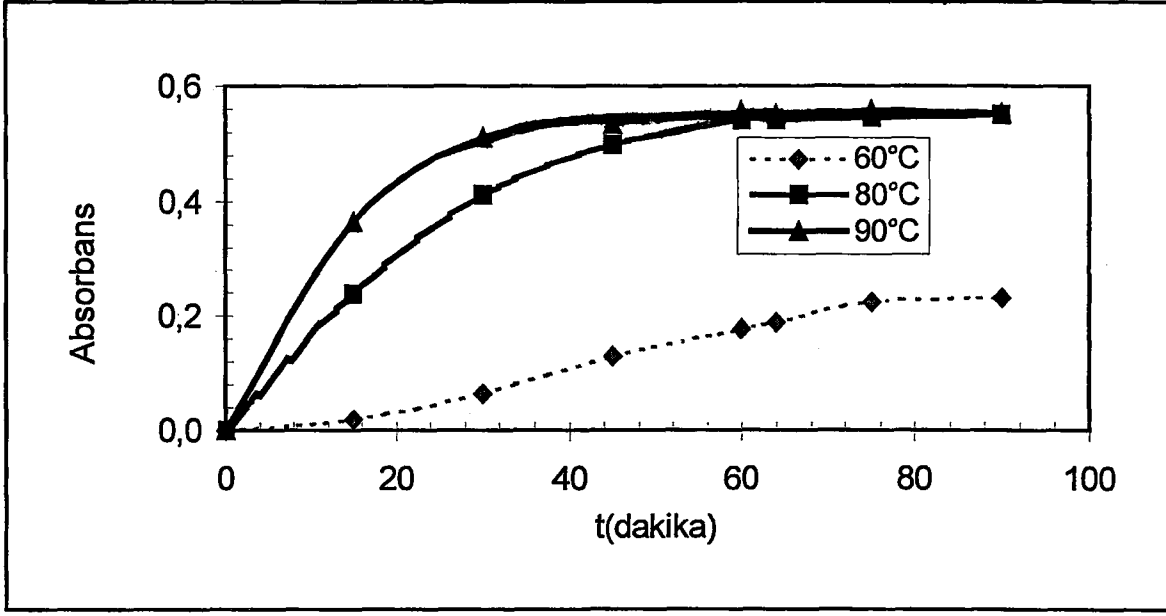
3. BULGULAR

3. 1. CDDP için sulu çözeltilerde spektrofotometrik tayin yöntemi geliştirilmesi

3. 1. 1. Reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresinin incelenmesi

10 mL lik renkli balon jöjelere; 1 : 10 (v / v) oranında su ile seyreltilmiş olan CDDP stok çözeltisi (1) den 1,00 er mL, belirteç stok çözeltisi (1) den de 1,00 er mL konulup karıştırıldıktan sonra 20 °C de 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika bekletildi. Her karışımın tek tek 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisiyle 10,00 mL ye tamamlanmasından sonra absorbanları okundu. Aynı işlem 40 °C, 60 °C, 80 °C ve 90 °C lerde yukarıda belirtilen sürelerde tekrarlandı. Her sıcaklık için üçer deneme yapıldı.

En uygun sıcaklık 90 °C ve bu sıcaklıktaki en uygun reaksiyon süresi de 30 dakika olarak saptandı. Sonuçlar Şekil – 7 de verilmiştir. 20 °C ve 40 °C lerde elde edilen değerler ihmal edilebilecek düzeyde olduğundan grafikte verilmemiştir.



Şekil - 7: Isıtma süresi ve sıcaklığının ürün oluşumuna etkisi

3. 1. 2. Reaksiyon pH ının incelenmesi

pH denetlenmesi için gerekli asit ve baz hacimlerinin bulunması için aşağıdaki ön deneme gerçekleştirilmiştir:

CDDP stok çözeltisi (3), 1 : 10 (v / v) oranında suyla seyreltildi. Bu çözeltiden alınan her bir 750 μL lik hacim üzerine 1,00 er mL OPDA çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Karışımların pH ları değişik konsantrasyonlardaki HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak pH : 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 ve 9,00 a ayarlandı. Daha sonra $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl çözeltisi ile 2,00 mL ye tamamlanan karışımların pH larının değişmediği gözlemlendi.

Her karışımın pH ının istenen değere getirilmesi için yukarıdaki ön deneme ile bulunmuş ve kaydedilmiş olan asit ve baz hacimleri yine

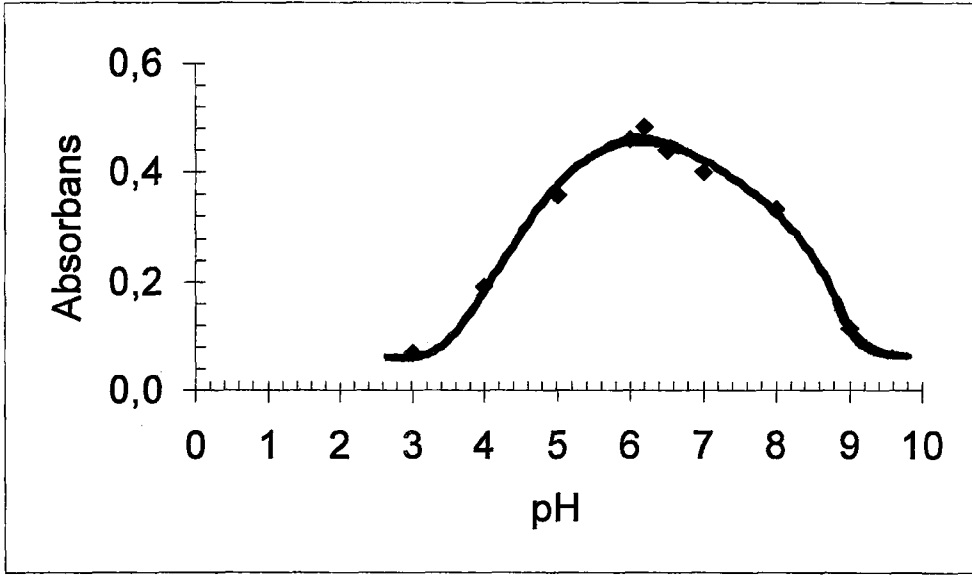
yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan 1,75 mL lik karışımlara sırasıyla ilave edildi. Bu şekilde pH ları istenen değerlere getirilmiş olan karışımların her biri, $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl çözeltisiyle 2,00 mL ye tamamlandıktan sonra 90°C de 30 dakika ısıtıldı. Soğutulan karışımlar, 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile ayrı ayrı 10,00 mL ye tamamlandı. Elde edilen ürünlerin 705 nm deki absorbansları distile suya karşı okundu. En yüksek absorbans değeri pH = 6,00 – 6,50 arasında bulundu. Daha dar pH aralığında çalışıldığında optimum pH in yaklaşık 6,20 olduğu saptandı. Bu pH karışımın kendi pH ı olduğundan, bundan sonraki çalışmalarda pH ayarlaması yapılmadı. pH in ürün oluşumuna etkisine ilişkin absorbans değerleri Tablo – 2, Tablo – 3 de, grafiği Şekil – 8 de verilmiştir.

Tablo - 2:Çeşitli pH larda oluşturulan ürünlerin absorbans değerleri

pH	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00
A	0,069	0,190	0,358	0,460	0,402	0,334	0,113

Tablo - 3: pH : 6,00 – 7,00 arasında oluşturulan ürünlerin absorbans değerleri

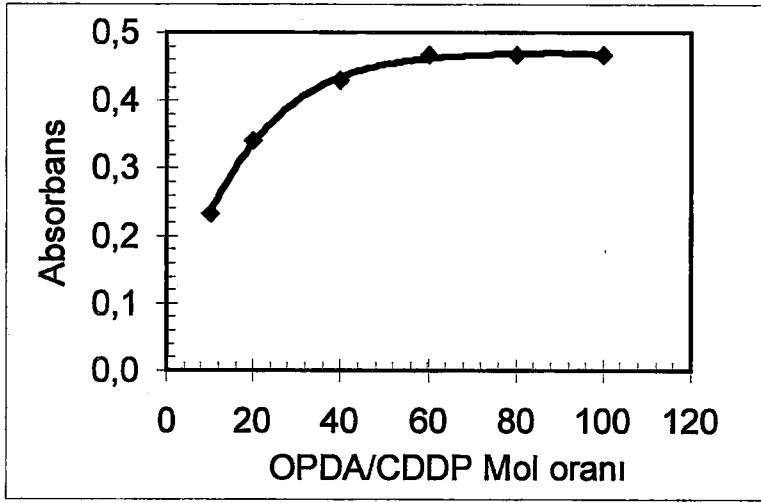
pH	6,00	6,20	6,50	7,00
A	0,450	0,484	0,441	0,402



Şekil - 8: Ürün oluşumu üzerine pH in etkisi

3. 1. 3. Belirteç konsantrasyonunun incelenmesi

CDDP stok çözeltisi (1), 1 : 10 (v / v) oranında suyla seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 1,00 er mL lik hacimler üzerine, CDDP konsantrasyonunun 10 – 100 katı arasında değişen konsantrasyonlarda uygun şekilde hazırlanmış OPDA çözeltilerinden ilave edildi. Yukarıda belirtilen deney prosedürü uygulandıktan sonra karışımların 705 nm deki absorbans değerleri ölçüldü ve bulunan değerlerin OPDA / CDDP mol oranına karşı grafiği çizildi [Şekil - 9]. Grafikte görüldüğü gibi; $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl içeren ortamda belirteç konsantrasyonu CDDP konsantrasyonunun 60. katı olduğu durumda, ürünün absorbansı maksimuma ulaşmaktadır. Daha fazla belirteç ilavesinde absorbansta artış görülmemektedir.

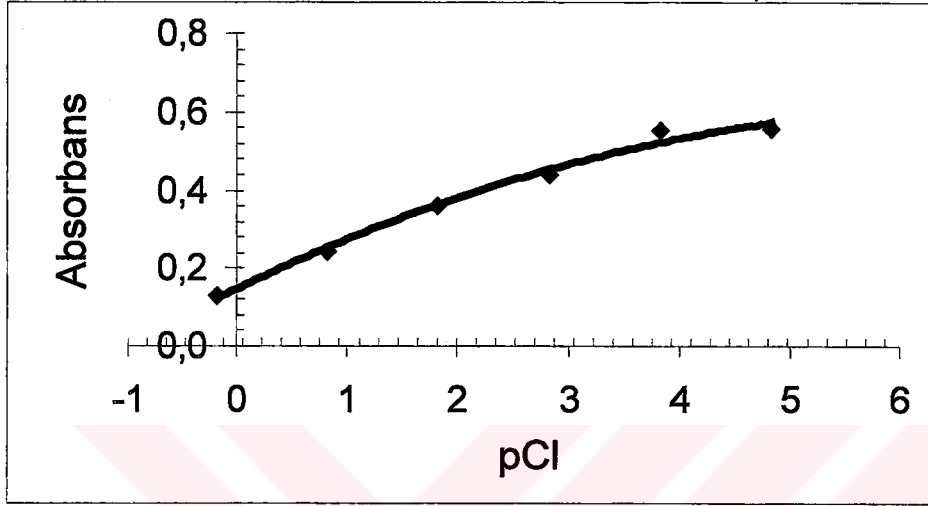


Şekil - 9: Belirteç konsantrasyonunun ürün oluşumu üzerine etkisi

3. 1. 4. Klorür iyonu konsantrasyonunun ürün oluşumuna etkisi

Yukarıda bulunan deney koşulları (sıcaklık, süre, pH, belirteç konsantrasyonu) sabit tutuldu. 15,0 mg CDDP, 1,5 M KCl çözeltisinde çözülerek aynı çözelti ile 100,00 mL ye tamamlandı. Buna paralel olarak aynı işlem sırasıyla $1,5 \cdot 10^{-1}$ M; $1,5 \cdot 10^{-2}$ M; $1,5 \cdot 10^{-3}$ M; $1,5 \cdot 10^{-4}$ M ve $1,5 \cdot 10^{-5}$ M KCl çözeltilerinde de gerçekleştirildi. Elde edilen 6 CDDP çözeltisinden sırayla alınan 1,00 er mL lik hacimlerin her biri, hazırlanmalarında kullanılan KCl çözeltileriyle 10,00 ar mL ye tamamlandı. Bu çözeltilerden alınan 1,00 er mL, 1,00 er mL belirteç stok çözeltisi (1) ile karıştırıldıktan sonra pH ları 0,10 M HNO₃ ile yaklaşık 6,20 ye ayarlanıp reaksiyona sokuldu. Son olarak 7 / 3 DMF / su (v / v) karışımı ile 10,00 ar mL'ye tamamlandı ve böylece

son klorür konsantrasyonları $1,5 \cdot 10^{-1}$ M – $1,5 \cdot 10^{-6}$ M arasında değiştirilmiş oldu [Şekil - 10].



Şekil - 10: CDDP – OPDA ürününün absorbans değerinin pCl değerlerine karşı değişimi

Çalışılan her klorür konsantrasyonu için oluşan ürünün molar sönüm katsayısı hesaplandı. En yüksek klorür konsantrasyonunda molar sönüm katsayısı $2,58 \cdot 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹, en düşük klorür konsantrasyonunda $1,12 \cdot 10^5$ L mol⁻¹ cm⁻¹ olarak bulundu [Tablo - 4].

Tablo - 4: Değişik klorür konsantrasyonlarında CDDP – OPDA

ürününün 705 nm deki absorbens değerleri ve buna karşılık gelen molar sönüm katsayıları (CDDP konsantrasyonu : $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Cl ⁻ konsantrasyonu	Absorbans	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
1,5	0,129	$2,58.10^4$
$1,5.10^{-1}$	0,276	$5,52.10^4$
$1,5.10^{-2}$	0,343	$6,86.10^4$
$1,5.10^{-3}$	0,439	$8,78.10^4$
$1,5.10^{-4}$	0,554	$1,11.10^5$
$1,5.10^{-5}$	0,558	$1,12.10^5$

Yukarıda saptanan optimum reaksiyon koşullarında oluşan mavi - yeşil renkli ürün bir hafta $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ de saklandığında, absorpsiyon spektrumunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

3. 1. 5. $1,0.10^{-5}$ M klorür konsantrasyonunda hazırlanan ölçü eğrisi

CDDP stok çözeltisi (2), 1 : 10 (v / v) oranında su ile seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 100 μL , 300 μL , 500 μL , 700 μL , 900 μL 'lik 5 değişik hacim 10,00 mL lik balon jodelere konuldu ve bu çözeltiler tek tek $1,0.10^{-5}$ M HCl çözeltisi ile 1,00 mL ye seyreltildi. Daha sonra belirteç stok çözeltisi (1) den 1,00 er mL alınıp bu çözeltilere ilave edildi ve

önceki koşullar sabit tutularak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda 10,00 mL ye tamamlanan çözeltilerin absorbanları, ölçüldü [Şekil - 11]. Her konsantrasyon için 5 deneme gerçekleştirildi.

Ölçü eğrisinden de görüldüğü gibi, CDDP nin $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl ortamında bu metod ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon $0,300 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir.

3. 1. 6. Ölçü eğrisinden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo - 5: CDDP nin $0,30 - 3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında değişen konsantrasyonlarda, OPDA ile verdiği ürünün $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl çözeltisinde oluşturulmasıyla çizilen ölçü eğrilerine ait absorban ve standart sapma değerleri

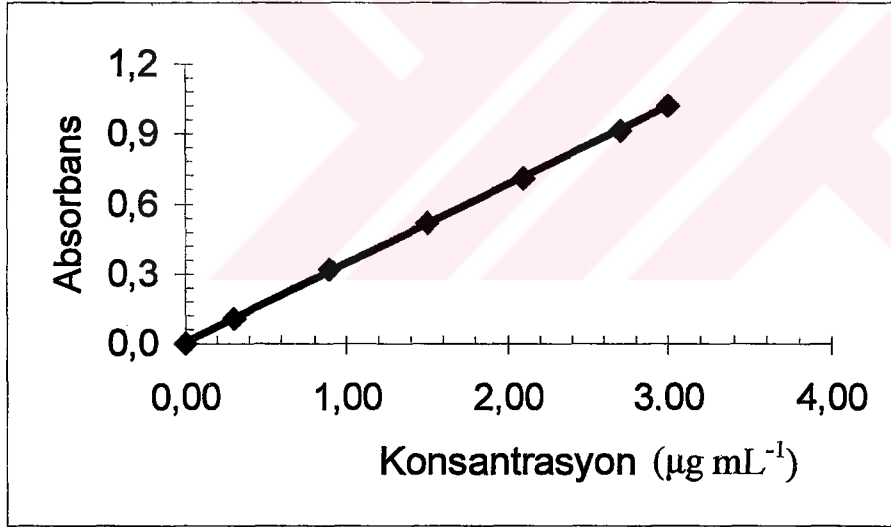
C($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	\bar{A}	S	S / $\bar{A} \times 100$
0,30	0,106	0,104	0,102	0,105	0,108	0,104	0,002	2,40
0,90	0,319	0,316	0,310	0,320	0,340	0,321	0,011	3,43
1,50	0,519	0,512	0,502	0,527	0,534	0,519	0,005	1,02
2,10	0,721	0,704	0,672	0,721	0,735	0,710	0,022	3,10
2,70	0,910	0,906	0,897	0,915	0,943	0,914	0,016	1,75
3,00	1,030	1,010	1,000	1,030	1,020	1,020	0,013	1,27

Tablo - 6: Tablo - 5 teki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	\bar{A}
a	0,334	0,335	0,330	0,340	0,342	0,338
b	0,006	0,006	0,002	0,008	0,014	0,009
r	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999

$$A = 0,338x + 0,006$$

$$r = 0,999$$



Şekil - 11: $1,0 \cdot 10^{-5}$ M HCl çözeltisinde oluşturulan CDDP – OPDA ürünü yardımıyla çizilen ölçü eğrisi

3. 2. İdrarda CDDP tayini

3. 2. 1. İdrardaki bileşenlerin OPDA ile reaksiyonunun incelenmesi

Bu bölümde, İnağaki ve arkadaşlarının çalışması temel alınmıştır [28]. İdrardaki herhangi bir bileşenin bu reaksiyon için uygulanan işlemler sırasında OPDA ile reaksiyon vererek, tayin işlemine girişim yapıp yapmadığı aşağıdaki şekilde araştırıldı.

Bu amaçla iki çözelti hazırlandı:

Referans 1: 1,00 mL idrar, 1,00 mL DMF ile 90 °C de 30 dakika ısıtıldı. Bu karışım, üzerine 1,40 mg OPDA içeren 5,00 mL 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ilave edildikten sonra 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlandı.

Referans 2: 1,00 mL idrar, 1,40 mg OPDA içeren 1,00 mL DMF ile karıştırıldı. 90 °C'de 30 dakika ısıtıldı ve 7 / 3 DMF / su (v / v) çözücüsüyle 10,00 mL ye tamamlandı.

Her iki çözelti 3000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. referans 2 çözeltisinin referans 1 çözeltisine karşı spektrumu alındı. 400 – 900 nm arasında, OPDA ile idrardaki herhangi bir bileşenin reaksiyon verdiğini gösteren hiçbir pike rastlanmadı.

3. 2. 2. Ön denemeler

Bölüm 3.1. de geliştirilmiş olan yöntem, öncelikle idrarda uygulanıp oluşan ürünün absorbanı, aynı şartlarda idrarda hazırlanmış boş çözeltiliye karşı ölçüldü. İşlem şu şekilde gerçekleştirildi: CDDP / idrar stok çözeltisi (1), su ile 1 : 5 (v / v) oranında seyreltikten sonra, buradan alınan 1,00 mL çözelti 1,00 mL OPDA çözeltisi ile karıştırıldı. Karışımın 90 °C de 30 dakika ısıtılıp, soğutulmasından sonra 7 / 3 DMF (v / v) çözeltisiyle 10,00 mL ye tamamlanması sonucu $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP konsantrasyonuna karşılık 0,262 gibi bir absorban değeri elde edildi. Bu değer beklenenin çok altında olup, yöntemin idrarda modifiye edilmesi gerektiğini göstermektedir. Absorbansın düşük olmasının, pH ın denetlenememesinden ve idrardaki yaklaşık $1,5 \cdot 10^{-1}$ M klorür konsantrasyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülerek aşağıdaki denemeler gerçekleştirildi.

3. 2. 3. $1,0 \cdot 10^{-5}$ M klorür konsantrasyonunda ve idrarda reaksiyon öncesi ve sonrasında gözlenen pH değerleri

Sulu ortamdaki tayinde ölçülen pH lar

- $1,0 \cdot 10^{-4}$ M HCl çözeltisinde hazırlanmış CDDP stok çözeltisi (1) in $\text{pH}_1 = 3,85$ (CDDP konsantrasyonu: $150 \mu\text{g mL}^{-1}$)
- Reaksiyondan önce 1,00 mL 1 : 5 (v / v) oranında su ile seyreltilmiş CDDP stok çözeltisi (1) ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve 1,00 mL belirteç stok çözeltisi (1) karışımının $\text{pH}_1 = 6,20 - 6,30$

- Bu karışımın 90 °C'de 30 dakika ısıtılmasından sonra pH = 6,40
- Isıtılmış karışımın 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlanmasından sonra pH = 6,70 – 6,80 olarak saptanmıştır.

İdrar ortamında uygulamada ölçülen pH lar

- İdrar pH₁ = 7,33
- CDDP / idrar stok çözeltisi (1) (150 µg mL⁻¹) pH = 7,32
- 1 : 5 (v / v) oranında suyla seyreltilmiş CDDP / idrar stok çözeltisi (1) den (30 µg mL⁻¹) 1,00 mL alınıp, 1,00 mL OPDA çözeltisiyle karıştırıldığı zaman pH = 9,19
- Bu karışımın 90 °C'de 30 dakika ısıtılmasından sonra pH = 9,22
- Isıtılmış karışımın 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlanmasından sonra pH = 9,60 – 9,65

Bu çalışma sonuçları, idrarda alınan düşük absorbansın büyük oranda pH tan kaynaklandığını göstermektedir.

3. 2. 4. İdrarda CDDP tayininde pH ın denetlenmesi

İdrarda taze olarak hazırlanan CDDP / idrar stok çözeltisi (1), 1 : 5 (v / v) oranında su ile seyreltildi. Buradan alınan 1,00 mL lik hacim, 1,00 mL belirteç stok çözeltisi (1) ile karıştırılıp pH ayarlaması yapılmadan 90 °C de 30 dakika ısıtıldıktan sonra 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisiyle tamamlandı. Bu çözeltinin absorbanı, kendi referans çözeltisine karşı ölçüldüğünde 0,261 olarak bulundu (CDDP son konsantrasyonu: 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). İkinci denemede aynı konsantrasyonda CDDP içeren 2,00 mL lik karışımın pH ı 0,10 M HNO₃ ile 6,17 - 6,20 ye getirildi. Karışım belirtilen koşullarda ısıtılıp, 100 mL sinde 8 μL 0,45 N HNO₃ içeren 7 / 3 DMF / su (v / v) tamamlama çözeltisi ile tamamlandıktan sonra referans çözeltisine karşı ölçülen absorbanın yaklaşık 0,454 e çıktığı gözlemlendi. Görüldüğü gibi ölçülmüş olan bu absorban değeri, pH ayarlanmadan ölçülmüş olan absorban değerinin yaklaşık iki katıdır.

İkinci bir denemede CDDP / idrar stok çözeltisi (1), su yerine idrar kullanılarak 1 : 5 (v / v) oranında seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 1,00 mL, 1,00 mL belirteç stok (1) çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra yukarıdaki prosedür aynen uygulandı. Sonuç olarak pH denetlenmediğinde ölçülen absorban yaklaşık 0,007 iken, pH ayarlanıp 100 mL sinde 8 μL 0,45 N HNO₃ içeren tamamlama çözeltisi kullanıldığında absorban 0,324 olarak bulunmuştur (CDDP son konsantrasyonu: 3,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Burada bulunan absorban değerinin düşük olmasının matris girişimine bağlı olabileceği düşünüldü.

CDDP stok çözeltisi (4), 1 : 5 (v / v) oranında seyreltildi ve yukarıdaki koşullar sağlanıp, reaksiyon idrar yerine $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. pH denetimi yapılmadığında (HNO_3 kullanılmadan) absorbans değeri yaklaşık 0,454 iken, HNO_3 ile pH denetimi yapıldığında yaklaşık 0,610 olarak ölçülmüştür (CDDP son konsantrasyonu: $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$). Bu denemede de pH ın denetlenmesi absorbansı önemli ölçüde arttırmıştır.

3. 2. 5. Farklı klorür konsantrasyonlarında ve idrarda oluşturulan ürüne ilişkin absorbans değerleri

1,0. 10^{-5} M HCl çözeltisinde yürütülen referans reaksiyon

CDDP stok çözeltisi (2) su ile 1 : 10 (v / v) oranında seyreltildi. Bu çözeltinin 1,00 mL si, 1,00 mL belirteç stok çözeltisi (1) ile karıştırıldı. pH ayarlanmasına gerek olmadığından, asit kullanılmadı. 90°C de 30 dakika bekletilen karışım, 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlandı ve absorbans distile suya karşı 0,905 olarak ölçüldü.

1,5. 10^{-1} M KCl çözeltisinde ve idrarda yürütülen reaksiyonlar

Deneme 1: CDDP stok çözeltisi (2), $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisi ile 1 : 10 (v / v) oranında seyreltikten sonra bu çözeltiden alınan 1,00 mL, belirteç stok çözeltisi (1) in 1,00 mL si ile karıştırıldı. 0,1 M HNO_3 ile pH 6,17 - 6,20 ye ayarlandıktan sonra yukarıdaki işlem tekrarlandı. Absorbansı distile suya karşı 0,495 olarak ölçüldü.

Aynı yöntem, sağlıklı gönüllülerden alınan taze idrarda çözülmüş CDDP ile ölçü eğrisi çizilmesinde kullanıldı. Ancak lineer bir doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemediğinden, bundan sonra pH ayarlamaları asetik asit ile yapıldı.

Deneme 2: Deneme 1 deki gibi çalışıldı. Ancak bu kez pH, 1 : 1 (v / v) oranında seyreltilmiş asetik asit (% 100, $d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) ile 6,17 - 6,20 ye ayarlandı. Absorbans değerlerinin 0,578 – 0,625 arasında değiştiği ve tekrarlanabilir olmadığı gözlemlendi.

Deneme 3: Deneme 2 deki işlemler uygulandı. Ancak tamamlamada kullanılan çözücü sistemi yerine 100,00 mL sinde 20,0 μL 1 : 1 (v / v) oranında seyreltilmiş asetik asit (% 100, $d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) içeren 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi kullanıldı. Absorbans değerlerinin 0,614 civarında ve tekrarlanabilir olduğu gözlemlendi.

Deneme 4: Deneme 3 teki işlemler, OPDA konsantrasyonu CDDP konsantrasyonunun 600 katına çıkarılarak tekrarlandı. Absorbansların 0,905 civarında ve tekrarlanabilir olduğu gözlemlendi. Bu koşulda $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ HCl çözeltisinde elde edilen maksimum absorbans değerine ulaşılmıştır.

Deneme 5: Deneme 4 teki işlem idrarda uygulandı. Absorbans ölçülmeden önce 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Absorbans değeri, referans çözeltisine karşı 0,636 olarak ölçüldü.

3. 2. 6. CDDP nin kreatinine bağlanması

60 kilo olan bir insanın idrarla günde yaklaşık 1500 mg kreatinin atmaktadır [35]. Bir yetişkin tarafından günde atılan ortalama idrar hacmi 1200 mL dir [33, 35]. Buna göre idrarla bir günde $\sim 1500 \text{ mg} / \sim 1200 \text{ mL} \cong 1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ kreatinin atılmaktadır. Yaklaşık $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ konsantrasyonda kreatininin CDDP ye in - vitro olarak bağlanmasını incelemek üzere üç paralel deneme gerçekleştirildi (Aşağıdaki üç denemede de CDDP son konsantrasyonu : $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ dir.).

- I. **$1,5 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ çözeltisinde:** CDDP stok çözeltisi (5), $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ çözeltisi ile 1 : 10 (v / v) oranında seyreltildi. Bu çözeltiden alınan 1,00 mL, 1,00 mL belirteç stok çözeltisi (2) ile karıştırıldı ve pH ı 6,17 – 6,20 ye ayarlandı. Su banyosunda $90 \text{ }^\circ\text{C}$ de 30 dakika ısıtıldıktan sonra 100 mL sinde, 1 : 1 (v / v) oranında seyreltilmiş $20,0 \mu\text{L}$ asetik asit ($\% 100, d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) içeren 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlandı. Distile suya karşı absorbansı ölçüldü.
- II. **Kreatinin içeren $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ çözeltisinde:** 125,0 mg kreatinin $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ çözeltisinde çözülüp 10,00 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden alınan 1,00 mL, CDDP stok çözeltisi (5) ten alınan 1,00 mL lik hacim üzerine ilave edilir edilmez karışım, $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ M KCl}$ çözeltisi ile 10,00 mL ye seyreltildi ve iyice karıştırıldı (kreatinin: $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Bu çözeltinin 1,00 mL si, belirteç stok çözeltisi (2) nin 1,00 mL

si ile belirtilen optimum koşullarda reaksiyona sokuldu ve 100 mL sinde 20,0 μL , 1 : 1 (v / v) oranında seyreltilmiş asetik asit (% 100, d = 1,05) içeren 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 mL ye tamamlandı. Aynı koşullarda hazırlanmış olan referans çözeltiliye karşı absorbanı ölçüldü.

III. İdrarda: CDDP / idrar stok çözeltisi (2), 1 : 10 (v / v) oranında aynı idrarla seyreltildi. Belirteç stok çözeltisi (2) ile belirtilen koşullarda reaksiyona sokulduktan sonra 10,00 mL ye tamamlandı ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi. Aynı koşullarda hazırlanmış olan referans çözeltiliye karşı absorbanı ölçüldü.

I., II. ve III. işlemler sonucu oluşan ürün çözeltilerinin absorbanı değerleri Tablo - 8 de verilmiştir.

Tablo - 8: Kreatinin varlığında CDDP - OPDA ürününe ilişkin absorbanı değerleri

Reaksiyon ortamı	A
$1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde	0,855
Kreatinin içeren $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde	0,734
İdrarda CDDP	0,631

3. 2. 7. Standart katma yöntemi ile idrarda CDDP miktar tayini

CDDP / idrar stok çözeltisi (3) ve CDDP / idrar stok çözeltisi (4) ten alınan 700 μL lik hacimler alınıp hazırlanmalarında kullanılan idrarlarla 25,00 mL ye tamamlandı. CDDP / idrar stok çözeltisi (5) ten alınan 1 mL lik hacim, aynı idrarla 10,00 mL ye seyreltildi. Bu üç çözeltideki CDDP konsantrasyonları sırasıyla 8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 16,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dir. Bu çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra kullanıldı.

Standart CDDP çözeltileri

20,0 mg CDDP $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde çözülüp 25,00 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden alınan 0, 160, 260, 370, 470, 580, 680 ve 790 μL lik hacimlerin herbiri aynı KCl çözeltisiyle 10,00 mL ye tamamlandı.

Standart katma yöntemi ile ölçü eğrilerinin çizilmesi

8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrar çözeltisinden alınan 20,0 mL ve belirteç stok çözeltisi (3) ten alınan 40,0 mL bir beherde karıştırıldı. Bu karışıma 150 μL 1 : 1 oranında suyla seyreltilmiş asetik asit (% 100, $d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) ilave edilerek pH ı 6,17 – 6,20 ye getirildikten sonra iyice karıştırıldı. Bu karışımdan 1,50 mL lik hacimler alınarak 10,00 mL lik renkli balon jöjelere aktarıldı ve üzerlerine hazırlanmış

olan standart çözeltilerden sırasıyla 500 er μL ilave edildi. Bir seri için 8 örnek hazırlandı. $90\text{ }^\circ\text{C}$ de 30 dakika ısıtılan karışımlar, 100,00 mL sinde 1 : 1 oranında suyla seyreltilmiş olan 20,0 μL asetik asit (% 100 , $d = 1,05\text{ g mL}^{-1}$) içeren 7 / 3 DMF / su (v / v) çözeltisi ile 10,00 ar mL'ye tamamlandı. 705 nm deki absorbanları, referans çözeltisine karşı ölçüldü. Bu işlemler 3 seri için aynı idrarla tekrarlandı ve absorban değerleri, standart CDDP konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi. Örneklerdeki CDDP son konsantrasyonlarına karşılık gelen 0,42 – 3,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında, standart katma eğrisinin doğrusal olduğu bulundu (Şekil - 12).

16,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrardan alınan 10,0 mL lik hacim, 10,0 mL $1,5 \cdot 10^{-1}\text{ M}$ KCl çözeltisi ile seyreltildi. Daha sonra bu 20,0 mL lik karışım; belirteç stok çözeltisi (3) ün 40,0 mL si ile karıştırıldı. 8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrarda uygulanan prosedür aynen tekrarlandı (Şekil - 13).

28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda CDDP içeren idrardan alınan 6,0 mL, 14,0 mL $1,5 \cdot 10^{-1}\text{ M}$ KCl çözeltisi ile seyreltildi. Elde edilen 20,0 mL lik karışım, belirteç stok çözeltisi (3) ün 40,0 mL si ile karıştırıldı. Bu denemede de 8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrarda uygulanan prosedür aynen tekrarlandı (Şekil - 14).

Bu denemelerde elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeleri Bölüm 3. 2. 8. de verilmiştir. Şekil 15, 16 ve 17 de $1,0 \cdot 10^{-5}\text{ M}$, $1,5 \cdot 10^{-1}\text{ M}$ klorür çözeltilerinde ve idrarda oluşturulmuş olan CDDP – OPDA ürününün absorban spektrumları, Şekil - 18 de ise

CDDP – OPDA ürününün absorbands spektrumları, Şekil 18 de ise idrarda oluşturulan ürünün, OPDA çözeltilisinin ve boş idrarın absorbands spektrumları verilmiştir.

3. 2. 8. Ölçü eğrilerinden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Tablo - 9: 8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda CDDP içeren idrarda tayin için, standart katma yöntemi uygulanarak çizilen ölçü eğrilerine ait absorbandslar ve standart sapma değerleri

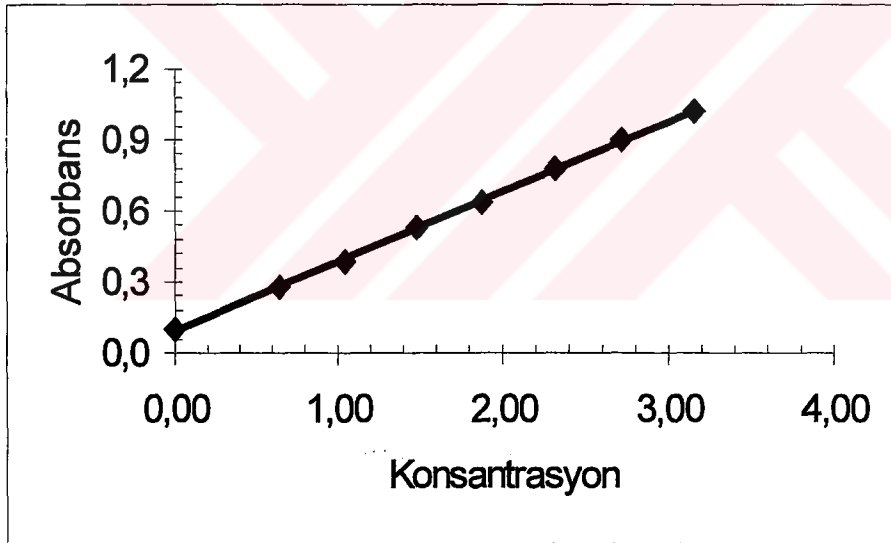
C($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	S	S/ $\bar{A} \times 100$
0,00	0,091	0,113	0,104	0,103	0,011	10,7
0,64	0,265	0,297	0,288	0,280	0,017	6,07
1,04	0,358	0,419	0,397	0,388	0,031	7,99
1,48	0,477	0,552	0,559	0,529	0,045	8,51
1,88	0,582	0,684	0,680	0,636	0,060	9,43
2,32	0,711	0,810	0,826	0,782	0,062	7,93
2,72	0,824	0,938	0,942	0,901	0,067	7,44
3,16	0,915	1,060	1,070	1,020	0,087	8,53

Tablo - 10: Tablo - 9 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	A ₁	A ₂	A ₃	A
a	0,265	0,303	0,311	0,294
b	0,090	0,108	0,094	0,093
r	0,999	0,999	0,999	0,999

$$A = 0,294x + 0,093$$

$$R = 0,999$$

**Şekil - 12:** 8,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrarda tayin için, standart

katma yöntemiyle çizilen ölçü eğrisi

Tablo - 11: 16,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda CDDP içeren idrarda tayin için, standart katma yöntemiyle çizilen ölçü eğrilerine ait absorpsiyonlar ve standart sapma değerleri

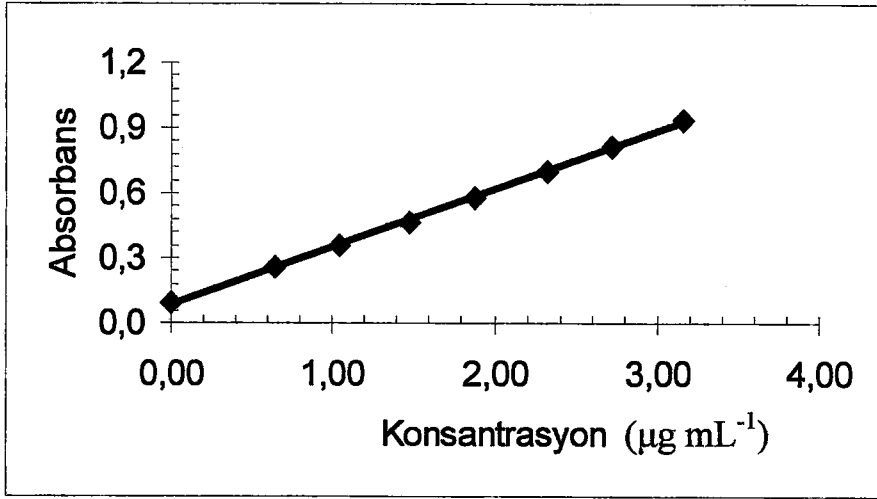
C($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	S	S/ $\bar{A} \times 100$
0,00	0,095	0,094	0,097	0,095	0,002	2,32
0,64	0,248	0,258	0,265	0,257	0,009	3,30
1,04	0,349	0,344	0,374	0,356	0,016	4,49
1,48	0,462	0,444	0,496	0,467	0,026	5,57
1,88	0,576	0,548	0,603	0,576	0,028	4,86
2,32	0,701	0,664	0,730	0,698	0,033	4,73
2,72	0,799	0,777	0,859	0,812	0,042	5,17
3,16	0,915	0,902	0,991	0,936	0,048	5,12

Tablo - 12: Tablo - 11 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	A ₁	A ₂	A ₃	A
a	0,263	0,253	0,283	0,266
b	0,084	0,085	0,084	0,084
r	0,999	0,998	0,999	0,999

$$A = 0,266x + 0,084$$

$$r = 0,999$$



Şekil - 13: $16,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrarda tayin için, standart katma yöntemiyle çizilen ölçü eğrisi

Tablo - 13: 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda CDDP içeren idrarda tayin için, standart katma yöntemiyle çizilen ölçü eğrilerine ait absorbanlar ve standart sapma değerleri

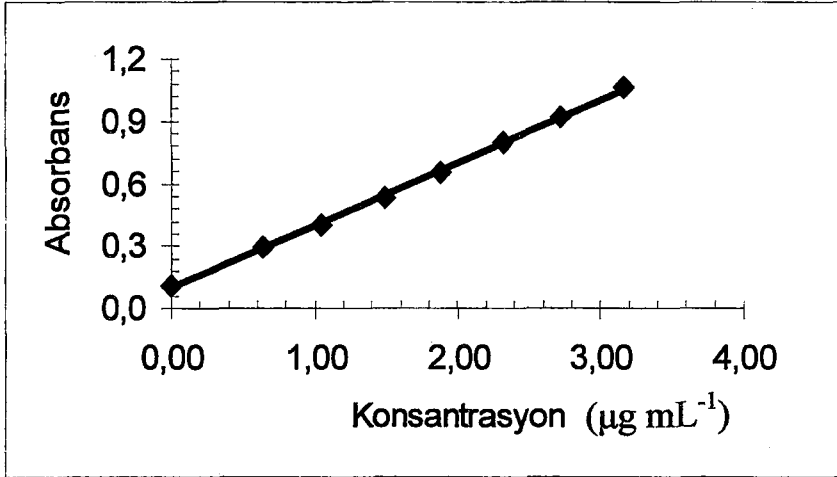
C($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	S	S/ $\bar{A} \times 100$
0,00	0,114	0,114	0,106	0,111	0,005	4,14
0,64	0,300	0,300	0,288	0,296	0,007	2,33
1,04	0,401	0,418	0,391	0,403	0,014	3,47
1,48	0,523	0,552	0,521	0,532	0,019	3,57
1,88	0,646	0,677	0,644	0,655	0,019	2,90
2,32	0,791	0,817	0,776	0,795	0,021	2,64
2,72	0,914	0,938	0,904	0,919	0,001	0,19
3,16	1,06	1,07	1,04	1,06	0,016	1,51

Tablo - 14: Tablo - 13 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	A ₁	A ₂	A ₃	A
a	0,299	0,305	0,296	0,300
b	0,100	0,107	0,094	0,099
r	0,998	0,999	0,999	0,999

$$A = 0,300x + 0,099$$

$$r = 0,999$$

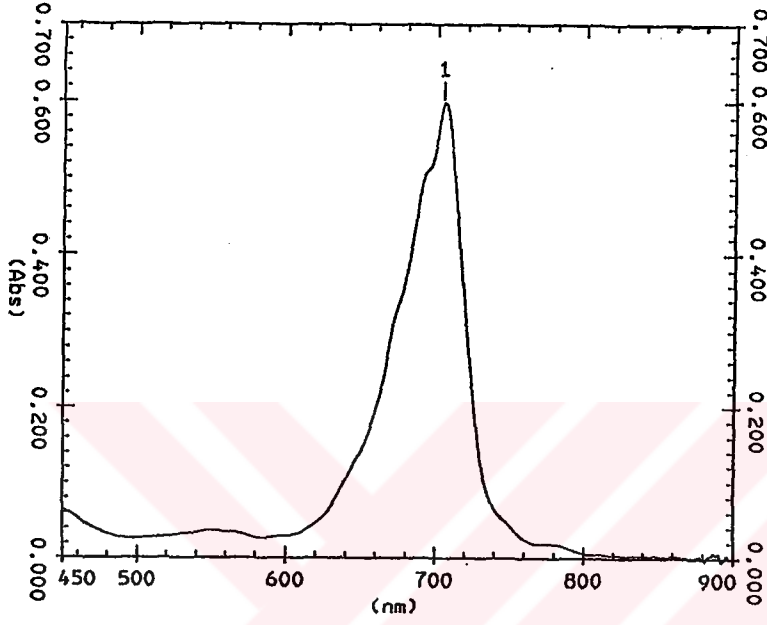


Şekil - 14: 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP içeren idrarda tayin için, standart katma yöntemiyle çizilen ölçü eğrisi

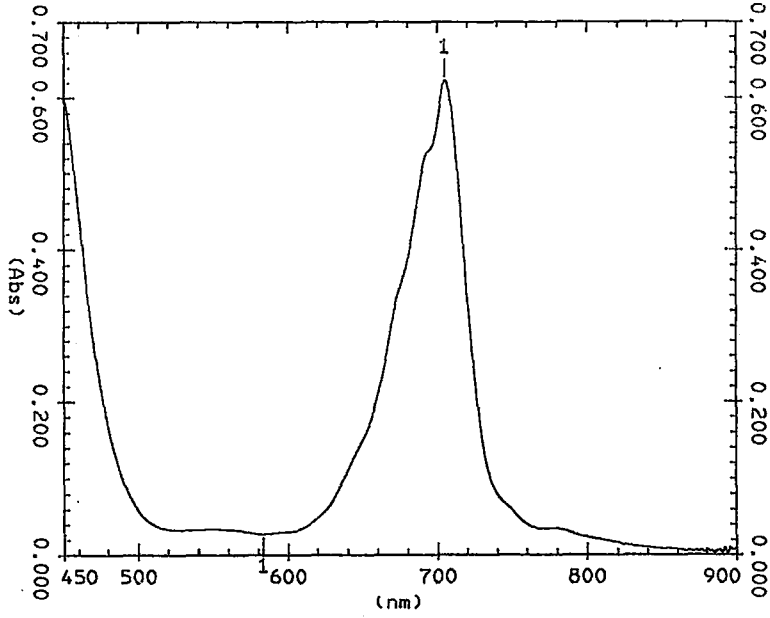
Tablo - 15: 8,40, 16,8 ve 28,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda CDDP katılmış idrarda bu yöntem ile bulunan CDDP konsantrasyonları ortalamaları
*Seyreltme faktörü

İdrara katılmış CDDP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İdrara katılmış CDDP nin son konsantrasyonu ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan son CDDP konsantrasyonu ortalama değeri ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İdrarda bulunmuş olan CDDP konsantrasyonu ortalama değeri ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	İdrara katılan cisplatin konsantrasyonuna göre OPDA nın bağlayabildiği CDDP yüzdesinin ortalaması
8,40	0,42	0,32	$0,32 \times 20^* = 6,32$	76,19
16,8	0,42	0,32	$0,32 \times 40^* = 12,64$	76,19
28,0	0,42	0,33	$0,33 \times 66,7^* = 22,01$	78,61

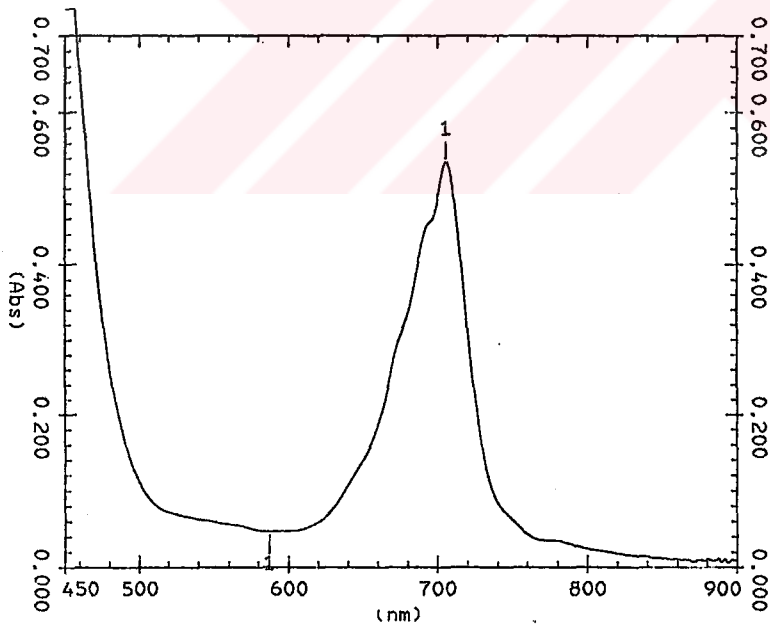
4. SPEKTRUMLAR



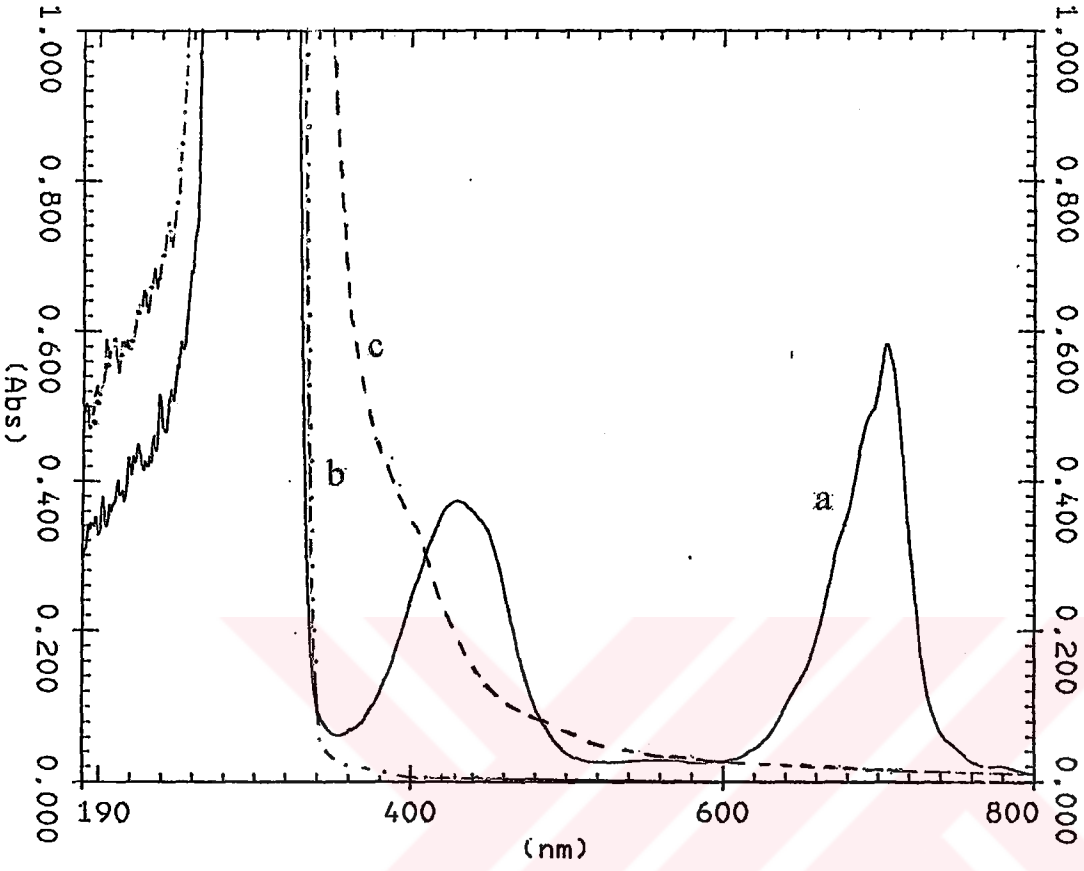
Şekil - 15: $1,0 \cdot 10^{-5}$ M klorür konsantrasyonunda oluşturulmuş CDDP - OPDA ürününün absorpsiyon spektrumu (CDDP konsantrasyonu= $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ OPDA konsantrasyonu=CDDP konsantrasyonunun 600 katı)



Şekil - 16: $1,5 \cdot 10^{-1}$ M klorür konsantrasyonunda oluşturulmuş CDDP - OPDA ürününün absorpsiyon spektrumu
(CDDP konsantrasyonu= $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$
OPDA konsantrasyonu=CDDP konsantrasyonunun 600 katı)



Şekil - 17: İdrarda oluşturulmuş CDDP - OPDA ürününün absorpsiyon spektrumu
(CDDP konsantrasyonu= $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$
OPDA konsantrasyonu=CDDP konsantrasyonunun 600 katı)



Şekil - 18: a) İdrarda; $2,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP ve CDDP nin 600 katı konsantrasyondaki OPDA'nın reaksiyon ürünü
b) DMF teki OPDA çözeltisi
c) Boş idrarın spektrumu

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

CDDP nin sulu çözeltisinde moleküldeki klorür iyonları su ile yer değiştirir [40]. Ancak yaklaşık $1,5 \cdot 10^{-1}$ M klorür çözeltisinde ligand değişimi çok yavaştır ve molekül daha stabildir. Bu çözeltide ve 25°C de 12 saat sonra CDDP nin % 99 unun tayin edilebildiği görülmüştür [3, 41]. Diğer yandan, idrarla toplam CDDP atılımının idrar hacminden ziyade idrar pH ı ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir [18]. Başka bir çalışmada da CDDP, sağlıklı gönüllülerden alınan idrarda çözülüp 22°C de inkübe edildiğinde 6 – 8 saatten fazla kararlı kalmadığı rapor edilmiştir [8]. Bu süreden sonra zamana karşı değişimi incelenmiş ve CDDP bozulma oranının % 40 – 80 arasında değiştiği gözlenmiştir .

CDDP $1,5 \cdot 10^{-1}$ M klorür çözeltisinde daha stabil olmasına rağmen, idrar çok karmaşık bir matrikstir ve günden güne, saatten saate değişen pek çok molekül ve iyon içerir. Ayrıca CDDP nin stabilitesi idrarda iyi değildir. Platin kompleksleri sistein ve metiyonin gibi azot ve kükürt donör ligantlarıyla [42] ve serum albumin [15] ve fumaraz enzimi [43] gibi tiyol içeren biyomoleküllerle hızlı reaksiyon vermektedir. CDDP idrarda bu tür ligandlara hızla bağlanabilmektedir.

İdrarda CDDP tayin örnekleri çok az sayıdadır. Bunun yanısıra, HPLC ile yapılan tek bir çalışma dışında, bu çalışmalarda idrara başlangıçta katılan CDDP nin yapılan çeşitli tayinler sonunda bulunan miktarları katılanın % 90 – 100 ü gibi oldukça farklı değerlerdir ve CDDP türevlendirme reaksiyonlarının tümünde kükürt donör ligandları kullanılmıştır. Na – DDTC , N, N – bis – (3 – merkapto – kinoksalinil) –

1,2 – propandiamin, potasyum dikromat varlığında sodyum hidrojen sülfid gibi reaktifler CDDP ile reaksiyona girmekte ve idrarda cisplatine bağlanacak ligandları da koparmaktadırlar. Na – DDTC nin ilavesinden önce idrarda bekletilen CDDP örneklerinin de , CDDP ilavesinden sonra bekletilmeden Na – DDTC katılan örneklerin de aynı standard eğrileri verdikleri gösterilmiştir [22]. Bu yüzden önceki çalışmalardaki tayinlerin sonucunda bulunan CDDP miktarlarının, idrara baştan katılan CDDP miktarları ile hemen hemen aynı olması, muhtemelen reaktiflerin idrarda bulunan çeşitli CDDP türevleriyle reaksiyonlarından dolayıdır. Diğer tarafta, kükürt donörleri içeren ligandların sadece azot donörleri olan ligandlardan daha hızlı reaksiyona girdikleri düşünülmektedir. CDDP ve OPDA arasındaki reaksiyon çok hızlı değildir, ancak muhtemelen seçicidir. Bu çalışmada, idrarda bulunan ve CDDP ye bağlanmış diğer ligandları sökmeden, değişmemiş serbest CDDP tayininin yapılmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bölüm 3. 2. 5. te deneme 4 ve deneme 5 teki sonuçlardan da görüldüğü gibi $3,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ CDDP konsantrasyonunda; $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl ortamındaki CDDP tayininde absorbans 0,905 olarak bulunmuşken, CDDP katılmış idrarda absorbans 0,636 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların da bu savı desteklediği söylenebilir.

Doğrusallık

Ölçü eğrilerinin doğrusallıkları, $8,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, $16,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $28,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ olmak üzere üç değişik konsantrasyonda CDDP içeren üç farklı idrarda iki seri hazırlanarak incelendi. Her konsantrasyon için üçer deneme gerçekleştirildi. Ölçü eğrileri $0,42 - 3,58 \mu\text{g mL}^{-1}$

konsantrasyon aralığında doğrusal bulundu. İlgili istatistiksel veriler Bölüm 3. 2. 8. de verilmiştir.

Seçicilik

CDDP atılımı idrar pH na ve muhtemelen de idrar içeriğine bağlıdır. Bu parametreler diyetle ilgili olarak değişkenlik gösterirler. Bu tip matriks etkileri idrarın $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisiyle seyreltilmesi ve standart katma metodunun uygulanmasıyla minimuma indirilmiştir. Dahası ürünün 705 nm deki maksimum absorbanstaki aldığı alan, CDDP, OPDA ve idrardaki diğer biyomoleküllerin absorbanstaki verdikleri alanın oldukça uzağındadır. Bu durum, ilacın idrarda herhangi bir girişim olmaksızın tayin edilmesine olanak tanımaktadır.

Doğruluk ve Duyarlık

CDDP'nin iki farklı konsantrasyondaki verimleri Tablo-15 te görülmektedir. $8,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, $16,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $28,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda CDDP katılmış olan idrarlarda bu yöntem ile bu katılan konsantrasyonların sırasıyla ; % 76,19; % 76,19 ve % 78,61 i tayin edilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada , bir nitrojen donör atomu olan OPDA reaktifi ile seçici bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. En önemlisi; geliştirilmiş olan metod; tekrarlanabilir, ucuz ve hastaların idrarlarında

rutin CDDP izlenmesi için yeterince hassas, uygulanması kolay bir yöntemdir.

Tüm bu bilgilere göre önerilen tayin reçetesi şudur:

20,0 mg CDDP $1,5 \cdot 10^{-1}$ M KCl çözeltisinde çözülüp 25,00 mL ye tamamlanır. Bu çözeltiden alınan 0, 160, 260, 370, 470, 580, 680 ve 790 μ L lik hacimlerin herbiri aynı KCl çözeltisiyle 10,00 mL ye tamamlanarak standart çözeltiler hazırlanır.

CDDP ile tedavi gören hastadan, infüzyon veya enjeksiyondan 30 dakika sonra alınan idrarın 1,00 mL si $7,72 \text{ mg mL}^{-1}$ konsantrasyonda OPDA / DMF çözeltisinden alınan 1,00 mL ile renkli balon jodede karıştırıldıktan sonra bu karışımın pH 1 : 2 oranında suyla seyreltilmiş glasiyel asetik asit ($d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) ile 6,17 – 6,20 olarak ayarlanır ve su banyosunda 90°C de 30 dakika ısıtılır. Glasiyel asetik asit ($d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) su ile 1 : 100 oranında seyreltilir. Seyreltilmiş asetik asit çözeltisi ile 70 / 26 / 4 oranında DMF / su / asetik asit çözeltisi (v / v / v) hazırlanır. 1 – 2 dakika soğumaya bırakılan örnek bu karışım ile 10 mL ye tamamlanır. Aynı şartlarda hazırlanan referans çözeltisine karşı 705 nm deki absorbands değeri ölçülür. Ölçülen bu değere göre orantı kurularak hastadan alınan idrar, absorbands değeri yaklaşık 0,100 olacak şekilde $1,5 \cdot 10^{-5}$ M KCl çözeltisiyle seyreltilir. Seyreltilmiş idrardan alınan 20,0 mL, $7,72 \text{ mg mL}^{-1}$ konsantrasyonda OPDA / DMF çözeltisinden alınan 40,0 mL ile bir beherde karıştırılır. Bu karışımın pH 1, 1 : 1 oranında suyla seyreltilmiş glasiyel asetik asit ($d = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$) ile 6,17 – 6,20 ye ayarlanır. Bu karışımdan alınan 1,50 mL lik hacimler 10,00 mL lik renkli balon jodelere aktarılır ve üzerlerine

yukarıda belirtilen standart çözeltilerden sırasıyla 500 er μL ilave edilir. Bir seri için 8 örnek hazırlanır. Su banyosunda $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 30 dakika ısıtılan karışımlar yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış olan 70 / 26 / 4 DMF / su / asetik asit çözeltisi (v / v / v) ile 10,00 ar mL ye tamamlandıktan sonra 705 nm deki absorbansları, referans çözeltisine karşı ölçülür. Bu işlemler 3 seri için aynı idrarla tekrarlanıp ortalamaları alınır ve absorbans değerleri, standart CDDP konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilir. Doğrunun denkleminde seyreltilmiş idrardaki CDDP konsantrasyonu hesaplanır ve seyreltme faktörü ile çarpılarak idrarda bulunan CDDP konsantrasyonuna geçilir.



6. KAYNAKLAR

1. The Merck Index, 11 th Edition, Merck & Co. Inc., New Jersey, 1157, 1989.
2. Apak, R. : Koordinasyon Kimyasına Giriş, İstanbul Üniversitesi Yayınları, no : 3337, İstanbul, 19 – 21, 1994.
3. Riley, C. M. , Sternson, L. A. : Cisplatin, In : Florey, K. , Analytical Profiles of Drug Substances, Academic Press, Orlando, 14 : 77 – 105, 1985.
4. Andersson, A., Ehrsson, H. : Determination of cisplatin and cisdiammineaquachloroplatinum (II) ion by liquid chromatography using post – column derivatization with diethyldithiocarbamate. J. Chromatogr. B, Biomed. Appl., 652 : 203 – 210, 1994.
5. Kinoshita, M. , Yoshimura, N. , Ogata, H. , Tsujino, D. , Takahashi, T. , Takahashi, S. , Wada, Y. , Someya, K. , Ohno, T. , Masuhara, K. , Tanaka, Y. : High – performance liquid chromatographic analysis of unchanged cis – diamminedichloroplatinum in plasma and urine with post – column derivatization. J. Chromatogr. Biomed. Appl., 529 : 462 – 467, 1990.
6. Andersson, A., Ehrsson, H. : Stability of cisplatin and its monohydrated complex in blood, plasma and ultrafiltrate implications

for quantitative analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 13 (4 / 5) : 6389 – 644, 1995.

7. Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 th Edition, The Mc Graw Hill Companies, 1270 – 1271, New York, 1996.
8. Riley, C. M. , Sternson, L. A. , Repta, A. J. , Siegler, R. W. : High Performance Liquid Chromatography of platinum complexes on solvent generated anion exchangers , *J. Chromatogr.*, 229 : 373 – 386, 1982.
9. Kayaalp, O. : Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Ankara,1015 – 1016, 1991.
10. USP Drug Information for the Health Care Professional, 15 th Edition, The United States Pharmacopoeia Convention, Inc., Rockville, Maryland, 1 : 851-855, 1996.
11. Hartley, F. R. : Studies in Inorganic Chemistry 11, Chemistry of The Platinum Group Metals Recent Developments, Elsevier, Cranfield, Bedford, 9 – 30, 531 – 564, 1991.
12. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 1147, 1990.
13. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 30 th Edition, The Pharmaceutical Press, 463 - 465, 1993.

14. Nagai, M. , Kinoshita, M. V. , Ogata, H. , Tsujino, D. , Wada, Y. , Someya, K. , Ohno, T. , Musahara, K., Tanaka, Y. , Kato, K. , Nagai, H. , Yokoyama, A., Kurita, Y. : Relationship between pharmacokinetics of unchanged cisplatin and nephrotoxicity after intravenous infusions of cisplatin to cancer patients., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39 : 131 – 137, 1996
15. Litterst, C. L. : Cisplatinum : a review with special reference to cellular and molecular interactions. *Agents and Actions*, 15 (5 / 6) : 520 – 524, 1984.
16. Shierl, R. , Rohrer, B. , Hohloser, J. : Long-term platinum excretion in patients treated with cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36 (1) : 75 – 8, 1995.
17. Daley Yates, P. T. , Mc Brien, D. C. H. : Cisplatin metabolites : A method for their separations and for measurement of their renal clearance in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 32 (1) : 181 – 184, 1983.
18. Bertolero, F. , Litterst, C. L. , Changes in renal handling of platinum in cisplatinum – treated rats following indication of metabolic acidosis or alkalosis. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 36 : 273 – 285, 1982.
19. Faraglia, G. , Barbaro, F. : Mixed platinum (II) Halide complexes with sulfur donors, *J. Coord. Chem.*, 19 : 349 – 357, 1989

20. Appleton, T. G. , Conor, J. W. , Hall, J. R. : S, O – versus S, N – chelation in the reaction of the cis – diaminediaquaplatinum (II) cation with methionine and S – methylcysteine. *Inorg. Chem.*, 27 (1) :130 – 137, 1988.
21. Shearan, P. , Smyth, M. R. : Comparison of voltammetric and graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the direct determination of inorganic platinum in urine, *Analyst*, 113 (4) : 609 – 612, 1988.
22. Bannister, S. J. , Sternson, L. A. , Repta, A. J. : Urine analysis of platinum species derived from cis – dichlorodiammineplatinum (II) by high – performance liquid chromatography following derivatization with sodium diethyldithiocarbamate, *J. Chromatogr.*, 173 : 333 – 342, 1979.
23. Riley, C. M. , Sternson, L. A. , Repta, A. J. : High performance liquid chromatography of cisplatin, *J. Pharm. Sci.*, 72 (4) : 351-355, 1983.
24. Baldew, G. S. , Volkers, K. J. , De Goeij, J. J. M. : Determination of cisplatin and related platinum complexes in plasma ultrafiltrate and urine by high performance liquid chromatography with on - line radioactivity detection. *J. Chromatogr.* , 491 : 163 – 174 , 1989.
25. Kizu, R. , Higashi, S. , Miyazaki, M. : A method for determining, cis – dichlorodiammineplatinum (II) in plasma and urine by high performance liquid chromatography with direct U.V. detection. *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (10) : 4614 – 4617 , 1985.

26. Hussain, A. A. , Haddadin, M. , Iga, K. : Reaction of cisplatinum with sodium bisulfite. *J. Pharm. Sci.* , 69 (3) : 364 – 365 , 1980.
27. Kizu, R. , Yamamota, T. , Yokoyama, T. , Tanaka, M. , Miyazaki, M. : Sensitive post – column derivatization - U.V. detection system for HPLC determination of antitumour divalent and quadrivalent platinum complexes . *Chem. Pharm. Bull.* , 43 (1) : 108 – 114, 1995.
28. Inagaki, K. , Yonehara, S. , Kidani, Y. : Direct determination of cis - diamminedichloroplatinum (II) in urine by derivative spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (9) : 3369 – 3374 , 1985.
29. Warshawsky, A. , Hasson, H. : High – performance liquid chromatographic determination of cis – diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) as the o-phenylenediamine complex. *J. Chromatogr.*, 530 : 219 – 221, 1990.
30. Zhang, X. , Lin, C. , Liu, L. , Qiao, G. : Determination of platinum by ion – pair reversed – phase high performance liquid chromatography with 4,4 – bis (dimethylamino) thiobenzophenone . *J. Chromatogr. A.* , 684 : 354 – 359, 1994.
31. Golla, E. D. , Ayres, G. H. : Spectrophotometric determination of platinum with o – phenylenediamine . *Talanta.* 20 : 199 – 210 , 1973.
32. İmren, A. H. : Klinik Tanıda Laboratuvar, Menteş Matbaası, İstanbul, 344 – 354, 1977.

33. Bloomfield, M. M. , Stephens, L. J. : Chemistry and the living organism. 16 th Edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 564 – 567, 1996.
34. Christian, G. D. : Analytical Chemistry, Xerox College Publishing, Waltham, Massachusetts, 475 – 479, 1971.
35. Lehninger, A. L. : Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 703, 1982.
36. Pesce, A. J. , Kaplan, A. L. : Methods in Clinical Chemistry, The C.V., Mosby Company, 150, 1987.
37. Grochowsky, T. , Samochocka, K. : Structural characterization of platinum (II) – methionine complexes in aqueous solution . J. Chem. Soc. Daltons Trans., 1145 – 1149, 1992.
38. Norman, R. E. ; Sadler P. J. : ^{14}N NMR Studies of Amine Release from Platinum Anticancer Drugs : Models and Human Blood Plasma . Inorg. Chem. , 27 : 3583 – 3587, 1988.
39. Bontchev, P. R. , Mitewa, M. , Gentcheva, G. : New platinum (II) and platinum (III) complexes of creatinine. Pure & Appl. Chem., 61 (5) : 897 – 902, 1989.
40. Lippard, S. J. : New chemistry of an old molecule : cis – $(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2)$. Science, 218, 1075 - 1082, 1982.

41. Hincal, A. A., Long, D. F., Repta, A. J. : Cisplatin stability in aqueous parenteral vehicles. *Par. Drug Assoc.* , 33, 107 - 116, 1979.
42. Teuben, J. M., van Boom, S. S. G. E., Reedijk, J. , J. : Intramolecular migration of co-ordinated platinum from a sulfur to N7 in the nucleopeptide Met - d (TpG) (5' - o - methioninate - n - ylcarbonylthymidine) 2' - deoxyguanosine monosulfate. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* , 3979, 1997.
43. Yalçın, G. : Studies on cis - DDP, [Pt (Dach) (MePhSO) Cl] and [Pt (NH₃)₂ n - Py) Cl] binding to fumarase, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 12 (2), 105, 1995.

ÖZGEÇMİŞ

28.12.1974 İstanbul doğumluyum. İlk öğrenimimi 1985 yılında Sancaktar Hayrettin İlkokulu'nda, orta öğrenimimi 1992 yılında Özel Akasya Koleji'nde tamamladım.

1996 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. 1997 yılı Şubat ayında Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programı'na girdim.

Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yüksek Lisans öğrencisi Beril ANILANMERT'in, çalışması jürimiz tarafından Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Güler YALÇIN
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Emre DÖLEN
Üniversitesi : Marmara


Üye : Prof.Dr.Mürşit PEKİN
Üniversitesi : Marmara

Üye : Yrd.Doç.Dr.Ayşen CÜCÜ
Üniversitesi : Marmara

Üye : Yrd.Doç.Dr.Bahar GÖKER
Üniversitesi : Marmara

ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 25/08/1999 tarih ve 03... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Sevim ROLLAS
Müdür