

SİKLOSİTİDİN, ARABINOZİLSİTOSİN VE ARABINOZİLURASİL İÇİN HIZLI BİR ANALİZ YÖNTEMİ

Muzaffer TUNÇEL*

ÖZET:

Bu araştırmada, siklositidin, arabinozilsitosin ve arabinozilurasil karışımları için programsız (isocratic) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak hızlı bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Analizde; pH 2.9 da % 3 metanol ve 0.005 m 1-heptan sulfonik asit çözeltisi içeren hareketli faz olarak ve 4.6 cm boyunda oktadesil silan kolon materyelli kolon kullanılmıştır. Tayinler, 254 nm ye ayarlı UV detektörü ile 2.0 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak timidin kullanılmış ve kantitatif değerlendirmelerde pik yükseklikleri oranları tekniği izlenmiştir. İlgili maddelerin kolon karakteristikleri bulunmuş ve kalibrasyon eğrileri analitik olarak değerlendirilmiştir.

A RAPID ANALYSIS METHOD FOR CYCLOCYTIDINE, ARABINOSYLCYTOSINE AND ARABINOSYLURACIL

SUMMARY:

In this study, a rapid analysis for cyclocytidine, arabinosylcytosine and arabinosyluracil mixture was developed using isocratic high pressure liquid chromatographic assay. An aqueous solution which contains 3% methanol and 0.005 m 1-heptane sulfonic acid pH 2.9 was mobil phase and a 4.6 cm length column which contains octadecylsilane as column material was used in the analysis. These analysis were realized in the 2.0 ml/min flow-rate and an UV detector fixed at 254 nm. Thymidine has been employed as internal standard and peak height ratios were used in the quantitative evaluations. The column characteristics of the related compounds were found and the calibration curves of those compounds were analytically evaluated.

GİRİŞ:

Arabinozilsitosin (ara-C) akut miyelöjen lösemi tedavisinde kullanılan aktif kemoterapötik ilaçlardan biridir. Bu madde-

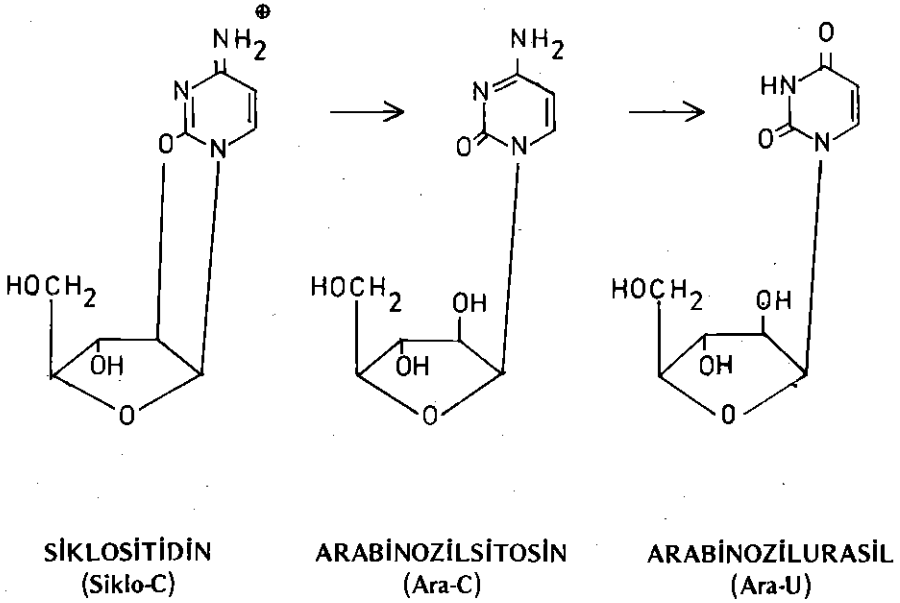
nin dayanıksızlığı nedeniyle organizmada kalış süresi oldukça kısadır. Halbuki, ara-C nin kanserli hücre içerisinde daha uzun süre kalması ile tedavide iyi sonuç alınması arasında bir ilişki bulunmaktadır. Etkili

(*) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tandoğan-ANKARA
Geliş Tarihi : 2.11.1984

bir tedavi sağlayabilmek için ara-C'nin prodrogu olan siklositidin'den (siklo-C) yararlanılması düşünülmüş ve çalışmalar bu madde üzerinde yoğunlaştırılmıştır(1).

Siklo-C yalnızca kimyasal yolla ara-C'

ye, ara-C ise hem kimyasal hem de pirimidin nükleozit deaminaz enzimi ile hidrolytik deaminasyona uğrayarak inaktif bir madde olan arabinozilurasil'e (ara-U) dönüşmektedir(2,3). Bu dönüşüm Şema I'de verilmektedir.



Şema I

Siklo-C, ara-C ve ara-U'nun dönüşüm, biyolojik dönüşüm ve vücut sıvılarındaki düzeylerinin incelenmesi için geliştirilen tayin yöntemlerine rastlanmıştır. Bunlardan, ara-C'nin gaz kromatografi-kütle spektrometri yöntemi(4) ile plazmada, yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi(5,6) ile plazma ve idrarda, ara-C ve ara-U karışımları spektrofotometrik yöntemle(7) tayinleri ilginçtir.

Bu araştırmada, birarada bulunan siklo-C, ara-C ve ara-U'nun kısa sürede tayinlerinde kullanılacak bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için ileri bir teknik olan yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi kullanılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER:

Kimyasal Maddeler:

Arabinozilurasil (1- D-ribofuranozilurasil, ara-U) ve 2,2-anhidro (1- D-arabinozilfuranozil) sitosin HCl (siklo-C) (ICN Nutritional Biochemicals), arabinofuranozilsitosin HCl (ara-C) (The Upjohn Co.) ve timidin (P-L Biochemicals) maddeleri kullanılmıştır. Metanol (Burdick and Jackson Labs) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde kullanılacak ölçüde saflıktadır. Bütün çözeltiler iki kez distillenmiş su ile hazırlanmıştır.

Alet:

Altex Marka Sıvı Kromatografında (model 1332) programsız ayırma (isocratic) tekniği yeğlenmiştir. 20 µl hacimli spiral (loop) içeren enjeksiyon tablası (model 210) ve 254 nm ye ayarlı 8 µl kü-

vedü UV detektöründen (model 10) yararlanılmıştır. 4.6 cm boyunda 4.2 mm çapında ve oktadesilsilan, ODS C₁₈ kolon materyeli içeren kolon kullanılmıştır.

Hareketli Faz:

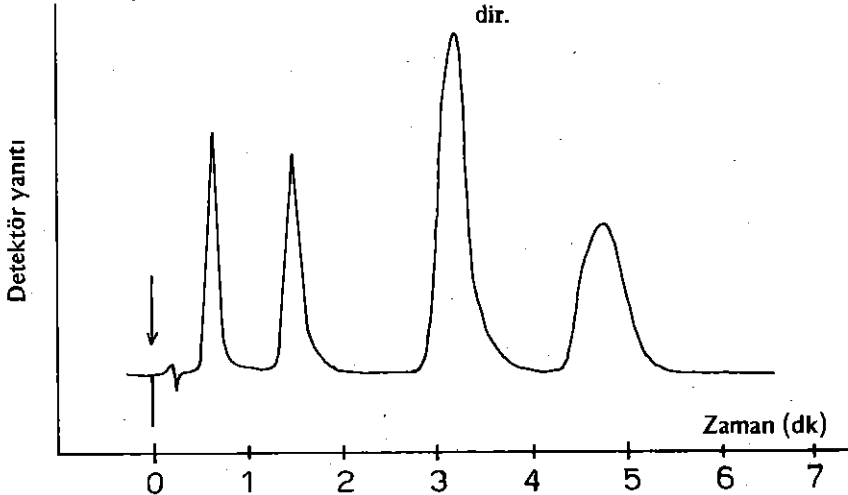
0.005 mol 1-heptan sulfonik asit yaklaşık 900 ml suda çözülmüş, çözelti HA 0.45 µm Millipor Membran Filtreden süzlmüştür. Bu çözeltiye daha sonra 30 ml metanol katılmış, gaz çıkarma işlemi yapılmış ve çözeltinin pH sı 2.9 a glasiyel asetik asit ile ayarlanmıştır. Bütün bu işlemlerden sonra hacim 1000 ml ye tamamlanmıştır.

Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanışı:

1.13×10^{-3} M derişiminde timidinin metanollü çözeltisi hazırlanmış ve mikro büretle tüplere 0.30 ml çözelti alınmış, daha sonra çözücü metanol vakum desikatöründe uçurulmuştur. Timidin'in her tüpdeki derişimi böylece sabit tutulmuştur.

Yukarıda hazırlanışı anlatılan timidin içeren tüplere, derişimleri bilinen siklo-C, ara-C ve ara-U çözeltilerinden belli hacimler konularak standartlar hazırlanmış ve bu standart çözeltiler 20 µm lik spirali dolduracak şekilde enjekte edilmiştir. Ayırmalar 2.0 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar analitik açıdan değerlendirilmiştir.

Şekil 1. Kolondan geliş sırasına göre ara-U, timidin, siklo-C ve ara-C'nin kromatogramları



SONUÇ ve TARTIŞMA:

Bu araştırmaya konu olan maddelerin ayrılmaları dağılıma (partition) kromatografisinin bir dalı olan ters faz (reversed phase) kolon materyeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Siklo-C, ara-C ve ara-U, bu çeşit ayırmadaki temel karakter olan polarlık yönünden birbirlerinden çok farklı yapıdadır. Siklo-C tümüyle iyonlaşabilen, ara-U non-polar, ara-C ise pK_a 4.2 ye sahip maddelerdir. Ayırımında başarılı olabilmek için, ayrılması istenen maddelerin polaritelerini birbirine yaklaştıracak ve onların ayrılmalarını sağlayacak bir hareketli faz sistemi geliştirilmiştir. Bu hareketli faz sisteminde; iyon çifti olarak 1 heptan sulfonik asit kullanılarak siklo-C'nin polaritesi azaltılmış ve kolonda çok tutulması önlenmiş, pH sı 2.9 a ayarlanarak ara-C'nin uygun süre ahkonulması sağlanmış, metanol yüzdesi düşük tutularak ara-U'nun çözücü ile beraber gelmesine engel olunmuştur. Hareketli faz içerisindeki metanol yüzdesinin ara-C'nin ahkonulması üzerine etkili olmadığı, % 4'ün üzerinde metanol kullanıldığında ara-U'nun çözücü ile beraber geldiği bulunmuştur.

Ayırım, oktadesilsilan kolon materyeli içeren 4.6 cm boyunda ve 4.2 mm çapında kolon ve yukarıda hazırlanışı anlatılan hareketli faz kullanılarak, 254 nm dalgaboyuna ayarlı detektör ile 0.08 detektör duyarlılığında ve 2.0 ml/dk akış hızında yapılmıştır. Bu koşullarda elde edilen bir kromatogram Şekil 1'de görülmektedir.

Kantitatif değerlendirmelerde iç standart yontemi kullanılmıştır. İç standart olarak, yapı ve polaritesi araştırma konusu maddelere benzeyen timidin seçilmiştir. Bu madde aynı ayırma koşullarında Şekil 1'de grldği gibi diğerlerinden tümüyle ayrılmaktadır.

Kantitatif değerlendirmeler için i standardın derişimi değişmez tutulmuş, siklo-C, ara-C ve ara-U'nun değişik derişimlerinden oluşan standart czelttiler ha-

zırlanmış ve alete enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar analitik açıdan değerlendirilmiştir. Tablo 1 hazırlanan derişimleri, ölçülen pik yüksekliklerini, bu pik yüksekliklerinin derişimi değişmez tutulan 0.339×10^{-4} M timidinin 28 mm pik verdiğinden hareketle bulunan pik yükseklikleri oranlarını, kolon karakteris-tiklerinden kapasite faktörlerini ve göreceli pik yükseklikleri oranlarını içermektedir.

Tablo I. Standart ara U, siklo-C ve ara C czeltilerinin derişimlerini, ölçülen pik yüksekliklerini, i standarda göre pik yüksekliği oranlarını, kapasite faktörlerini, göreceli pik yüksekliği oranlarını göstermektedir.

	Tp No.	Derişim ($10^{-4} \times M$)	Pik Yüksekliği (mm)	Pik Yüksekliği oranı*	Kapasite faktörü (k')	Göreceli pik yüksek- liği oranı
ara-U	1	0.083	17	0.607	1.1	2.47
	2	0.365	74	2.643		
	3	0.532	108.5	3.875		
	4	0.884	181	6.464		
siklo-C	1	0.273	14.5	0.518	8.2	0.64
	2	1.092	58.5	2.089		
	3	1.640	86.5	3.089		
	4	2.718	144	5.143		
ara-C	1	0.72	4	0.143	17	0.19
	2	0.087	17	0.607		
	3	1.631	25.5	0.911		
	4	2.788	43	1.535		
timidin	1,2,3,4	0.339	28			

* (Pik yüksekliği)_x /Pik yksekliği_{i.s.}

$$k' = \frac{(V - V_0)}{V}, \quad V = \text{alıkonma hacmini}, \quad V_0 = \text{l hacmi}$$

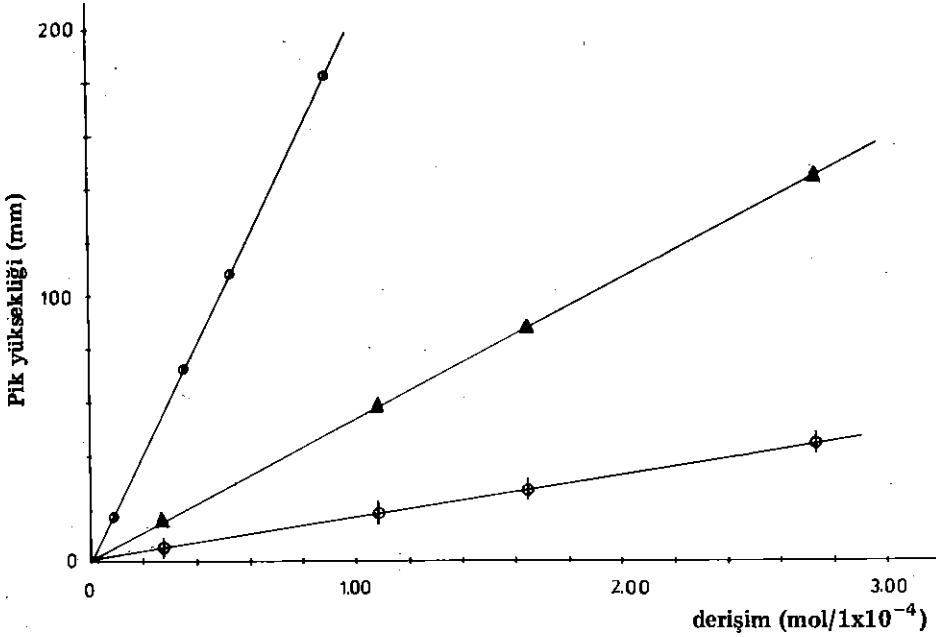
$C_x / C_{i.s.}$, C_x ve $C_{i.s.}$ eşdeğer molar miktarlarının pik boylarını simgelemektedir.

Derişim ile kromatogram eğrisi altında kalan alan arasında doğrusal bir bağılık bulunmaktadır. Bu ilişki çeşitli yollarla bulunabilmektedir. Kromatogramlarda eğri altında kalan alanların bulunmasında çok duyarlı fakat pahalı aletlerden yararlanılabildiği gibi basit ölçümlerden de yararlanılabilmektedir. Bu tür değerlendirmelerde planimetre ile bulunan alanlar ve pik yüksekliği kullanılarak elde edilen sonuçlar arasında duyarlık yönünden fark olmadığı belirtilmektedir(6). Bu çalışmada, kantitatif bağıntıların bulunmasında ölçümlerin çok daha kısa sürede yapılabilmesi nedeniyle pik yükseklikleri ölçümleri yolu yeğ tutulmuştur.

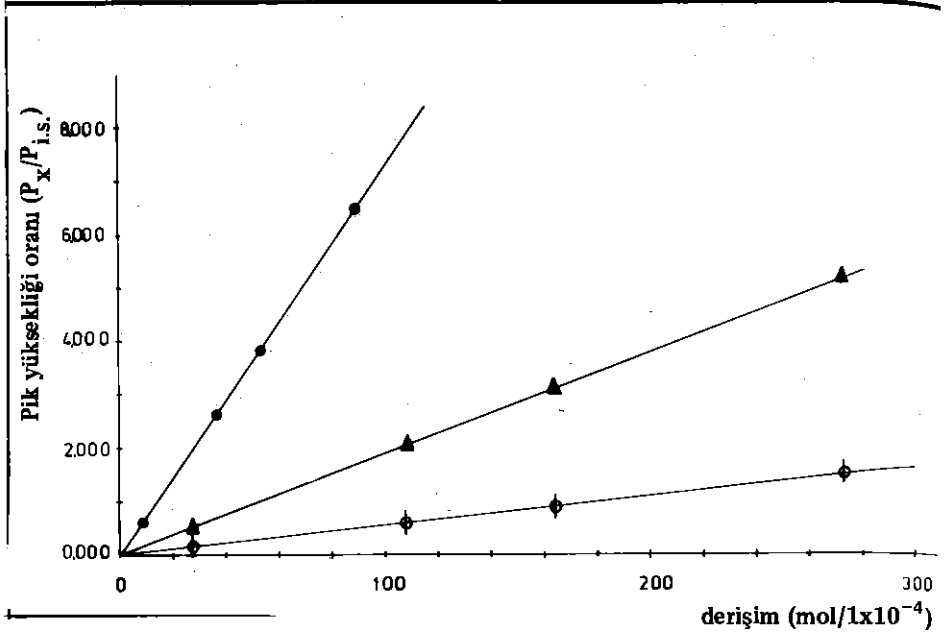
Gaz ve sıvı kromatografik yöntemlerle yapılan kantitatif tayinlerde iç standardın

kullanımı çalışmalara duyarlılık ve süre yönünden yarar sağlamaktadır. Bu tür çalışmalarda kullanılan kolonların karakteristikleri; zamanla, sıcaklıkla, hareketli fazın bileşimindeki çok küçük farklılıklarla değişebilmektedir. Bu değişiklikler de pik boylarına yansımaktadır. Buna engel olmak için pik boyları oranları kullanılmaktadır çünkü pik boyları oranları kolon karakteristiklerine bağı olmayan bir değerdir.

Tablo I'den yararlanılarak ara-U, siklo-C ve ara-C'nin kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Şekil 2; ara-U, siklo-C ve ara-C'nin derişimlere karşı pik yükseklikleri, Şekil 3 ise aynı derişimlere karşı pik yükseklikleri oranları ilişkili eğrilerini göstermektedir.



Şekil 2. ○ Ara-U, △ siklo-C ve ◻ ara-C'nin derişim-pik yüksekliği ilişkili kalibrasyon eğrileri



Şekil 3. ○ Ara-U, △ siklo-C ve ϕ ara-C'nin derişim-pik yüksekliği oranı ilişkili kalibrasyon eğrileri

Tablo I'deki ara-U, siklo-C ve ara-C'nin derişim-pik yüksekliği oranı değerleri ista-

tistiksel analize göre değerlendirilmiş, elde edilen değerler Tablo II'de toplanmıştır.

Tablo II. Ara-U, siklo-C ve ara-C kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

	Derişim-pik yüksekliği oranı ilişkili kalibrasyon eğrileri		
	ara-U	siklo-C	ara-C
Eğim	7.32	1.89	0.57
Eğimin standart hatası	0.02	0.007	0.0008
Eğimin % 95 olasılıklı güvenilirlik sınırları	7.23 — 7.40	1.86 — 1.92	0.56 — 0.57
Kesim	-0.012	0.008	-0.011
Kesimin standart hatası	0.011	0.012	0.001
Kesimin % 95 olasılıklı güvenilirlik sınırları	-0.057 — 0.033	-0.044 — 0.060	-0.016 — 0.004
Determinasyon katsayısı	0.9999	0.9999	0.9999

Tablo II'de görüldüğü gibi tüm eğriler başlangıca çok yakın geçmektedir ve değerler arasında iyi determinasyon katsayıları elde edilmektedir.

Derişim aralığı yönünden yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında şu sonuçlar çıkmaktadır. Ara-C düzeyinin bulunması konusunda gaz-kütle spektrometresi ile yapılan tayinde(4) en düşük tayin sınırının 40-70 ng/ml dolayında, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile plazmada yapılan tayinde (5,6) 20-250 ng/ml derişim aralığında çalışılabildiğı belirtilmektedir. Bu araştırmada; ara-C tayini için kullanılan derişimlerin, yukarıda belirtilen derişimlere göre oldukça büyük olduğı farkedilmektedir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yapılan tayinde araştırmacıların(6), 100 µl enjeksiyon spirali, 20 µl lik analitik UV küveti kullandığı, 0.005 detektör duyarlılığında çalıştıkları göz önüne alınırsa, bu tayinlerde kullanılan 0.08 detektör duyarlılığının artırılması ile daha düşük düzeylerde tayinlerin yapılabilceğı sonucu çıkmaktadır.

Geliştirilen bu yöntem her üç madde nin tayini için hızlı bir yöntem olup, 6-7 dakikada kantitatif tayinlerin yapılmasında, bu tayinlerden hareketle siklo-C, ara-C ve ara-U dönüşümlerinin kinetik ve farmakokinetik incelemelerinde, vücut sıvılarında bu madde düzeylerinin tayinlerinde, kalite kontrol laboratuvarlarında, ara-C preparatlarında dönüşüm ürünlerinin araştırılmasında bu yöntemden yararlanılabileceğı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR:

1. Ho, D.H.W., Rodriguez, V., Loo, T.L.,

et. al.: Clinical Pharmacology of 0,2-Cycloctidine, Clin, Pharmacol, Therap., 17, 66-72, 1975

2. Ho, D.H.W.: Biochemical Studies of a New Antitumor Agent, O², 2-Cycloctidine, Biochem. Pharmacol., 23, 1235-1239, 1974
3. Notari, R.E., Lue Chin, M., Wittebort, R.: Arabinosylcytosine Stability in Aqueous Solution: pH Profile and Shelf-Life Predictions. J. Pharm. Sci., 61, 1189-1193, 1972
4. Boutay, J.: Determination of Cytosine Arabinoside in Human Plasma by Gas Chromatography with Nitrogen-Sensitive Detector and by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. J.Chromatogr., 146, 283-296, 1978
5. Evans, J.E., Tieckelmann, H.: Measurement of Urinary Pyrimidine Bases and Nucleosides by High-Performance Liquid Chromatography. J.Chromatogr., 163, 29-36, 1979
6. Bury, R.W., Keary, P.J.: Determination of Cytosine Arabinoside in Human Plasma by High Pressure Liquid Chromatography. J. Chromatogr., 146, 350-353, 1978
7. Notari, R.E., Lue Chin, M., Cardoni, A.: Intermolecular and Intramolecular Catalysis in Deamination of Cytosine Nucleosides, J. Pharm. Sci., 59, 28-32, 1970
8. Brown., P.R.: Liquid Chromatography. Biochemical and Biomedical Application, Academic Press, New York, 1973