

## Merkezi Kompozit Dizayn Kullanılarak Kapesitabin Tayini için RPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Yaşar Doğan DALDAL\*<sup>1</sup>, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 32200, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32000, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 27.06.2019, Kabul / Accepted: 23.10.2019, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2020)

### Anahtar Kelimeler

Kapesitabin,  
Rivastigmin,  
Merkezi kompozit dizayn,  
Metot validasyonu

**Özet:** Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi, merkezi kompozit dizayn (CCD) kullanılarak kapesitabinin analizi için geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Metot üç faktörle (mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığı) Minitab programı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum kromatografik koşullar, Derringer'in istenebilirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. CCD'nin yardımıyla tayin edilen ayırmanın optimum koşulları: (1) Mobil faz: asetonitril-su ikili karışımı oranı 40:60 (%h/h), (2) kolon sıcaklığı 32°C ve mobil fazın pH'sı 7,5'dur. Çalışma, YMC triart C18 (150x4,6 mm I.D, 3µm) kolonda ve 1 mL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin ICH parametrelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiştir.

## Development and Validation of a RPLC Method for the Determination of Capecitabine using Central Composite Design

### Keywords

Capecitabine,  
Rivastigmine,  
Central composite design,  
Method validation

**Abstract:** A reversed phase liquid chromatographic (RPLC) method was developed and validated for analysis of capecitabine using central composite design (CCD). The method was optimized using Minitab software with three factors (mobile phase organic modifier concentration, pH of the mobile phase and column temperature). The optimum chromatographic conditions were determined using Derringer's desirability function. The optimum conditions of separation (optimum values of significant factors) determined with the aid of CCD were: (1) mobile phase: The acetonitrile:water binary mixture ratio is 40:60 (% v/v), (2) column temperature 32°C and (3) pH of the mobile phase is 7.5. The study was carried out on a YMC triart C18(150x4.6 mm I.D, 3µm) column and at a flow rate of 1 mL/min. The validation of the developed liquid chromatographic method according to ICH parameters was performed.

### 1. Giriş

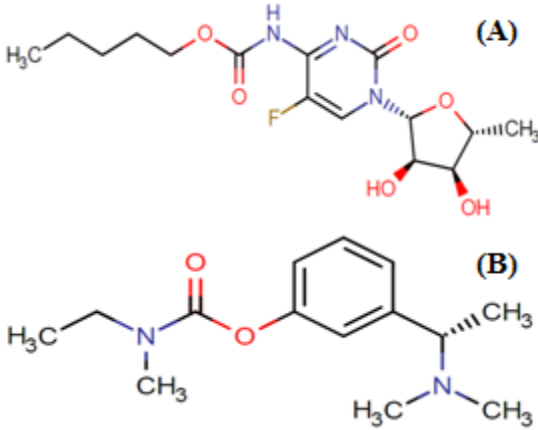
Kanser hücre büyümesini ve gelişmesini sağlayan normal genlerin, regülasyon bozukluğu veya düzenleyici mekanizmalardan sapması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser, ilaçla tedavisi kemoterapi olarak adlandırılır. Kanser, organizmada yer alan herhangi bir hücrenin farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan hastalık olduğu için, neoplastik hastalıklar sınıfına girmektedir. Neoplastik hastalıkların tedavisinde, antineoplastik ilaçlar kullanılır. Antineoplastik ilaçlar, hücre bölünmesini ve dolayısıyla, çoğalmasını inhibe ederler fakat, kanser hücresine karşı olan selektiflikleri azdır. Kendi içerisinde 6 alt gruba ayrılan antineoplastikler içerisinde, antimetabolitler

sık tercih edilen ilaçlardandır. Bu ilaçlar, DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan doğal metabolitlerin analoglarıdır [1-3]. Bir antimetabolit bileşik olan pirimidin antimetaboliti kapesitabin, kanser hücresinde pirimidin sentezini durdurur ve hücrede DNA sentezi için gerekli yapı taşlarından birinin eksilmesine yol açar (Şekil 1). Ayrıca bu bileşik, 5-Fluorourasil'in analogudur. Başta meme ve kolorektal kanser olmak üzere tümör dokusunun büyümesini de yavaşlatır [3,4].

Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) doğruluğu, kesinliği ve spesifikliğı gibi birçok avantajlardan dolayı başta ilaç analizleri olmak üzere, birçok alanda tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde, farklı deneysel

koşullara göre, seçilen sabit fazla analitin güçlü etkileşimi daha uzun alıkonmaya sebep olurken, sabit fazla analitin zayıf etkileşimi kısa alıkonma zamanına sebep olmaktadır [5]. RPLC metot geliştirmede, makul bir zamanda tayin edilen bileşiklerin yeterli ayrımı amaçlanmaktadır. Bu durumu sağlamak için, bileşiklerin alıkonma zamanı ( $t_R$ ) ve kapasite faktörü değerleri belli kurallara göre kontrol altına alınmaya çalışılır [6]. Bileşiklerin bu değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen deneysel değişkenlerin optimize edilmesi bazı yaklaşımlarla gerçekleştirilebilir [5,7].

Genellikle, yapılan sıvı kromatografik çalışmalarda optimum ayırma koşullarını tayin etmek için, bileşiklerin  $t_R$  değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen parametrelerin incelenmesi temeline dayanan deneme-yanılma yaklaşımı tercih edilir. Ancak, bu yaklaşımın aşırı zaman kaybı ve maliyete sebep olması yanında, çalışılan bileşiklerin birbirinden ayrılmasını sağlayan sıvı kromatografik koşula ulaşamaması gibi dezavantajları vardır. Bu gibi sorunları aşmak için, günümüzde, belirli bir istatistiksel temele dayanan, birden fazla parametrenin aynı anda incelenmesine imkân sağlayan daha sistematik yaklaşımlar olan deneysel tasarım metotlarının kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [8-10].



**Şekil 1.** Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapısı: (A) Kapesitabin, (B) rivastigmin (I.S)

Deneysel tasarım metotlarından birisi olan merkezi kompozit dizayn (CCD), seçilen deneysel değişkenler ve bu değişkenlere karşı elde edilen cevap değerleri arasındaki ilişkiyi yorumlamak için çok kullanışlı bir yöntemdir [9]. CCD bu ilişkiyi seçilen deneysel değişkenlerle belirlenen bölge içerisinde, 2. dereceden bir denklem ile ifade eder:

$$y = \begin{pmatrix} b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \\ +b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \\ +b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \end{pmatrix} \quad (1)$$

Eşitlik 1'de  $b_0$  kesim değerini;  $x_1, x_2, x_3$  seçilen değişkenlerin temel etkilerini;  $x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3$  seçilen değişkenlerin birbirleriyle etkileşimlerini;  $x_1^2, x_2^2, x_3^2$  'de eşitliğin star noktalarını ifade etmektedir [11,12].

Bu denklem aracılığıyla, seçilen deneysel değişkenlerin cevap olarak belirlenen değer üzerine etkisi olup olmadığı, varsa, ne düzeyde etkisi olduğu belirlenebildiğinden, CCD metodu sıvı kromatografik ayırmanın optimizasyon çalışmalarında çok tercih edilmektedir.

Pirimidin fonksiyonel grubu taşıyan antimetabolitlerden kapesitabin için gerçekleştirilen literatür taramasında, bileşiğin  $pK_a$  tayini [13], kararlılık çalışmaları [14-16], biyolojik sıvılarda, dokularda ve tablet tayiniyle ilgili [17-21] çalışmalar bulunmuştur. Bileşiğin sıvı kromatografik tayini için deneysel tasarım metodu kullanılarak yöntem geliştirmeyle alakalı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmaların tamamında deneme-yanılma kullanılmış, herhangi bir optimizasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bunun için, bu çalışmada CCD metodu kullanılarak, kapesitabin ve iç standart (I.S) olarak seçilen rivastigminin alıkonma davranışlarıyla, analitlerin alıkonmalarına en çok etkisi olduğu bilinen mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığı parametreleri arasındaki ilişkinin belirlenip, mümkün olan en iyi sıvı kromatografik ayırma koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada geliştirilen optimum ayırma koşullarının, ICH parametrelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiş ve kapesitabinin insan idrarından geri kazanımına yönelik çalışmada gerçekleştirilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kapesitabin (analit), rivastigmin (I.S), urasil (kolonda tutunmayan bileşik) ve asetonitril (mobil fazda organik modifiyer) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Amonyum klorür ve amonyak (mobil fazda tampon bileşimi), potasyum hidrojen fitalat (elektrot kalibrasyonunda referans standart madde) Merck firmasından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safliktadır.

### 2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde, Shimadzu marka yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, pompa (LC-20AD), UV-Visible dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20A) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A<sub>3</sub>) bulunmaktadır. HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde, Mettler Toledo MA 235 pH/iyon analiz cihazı ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrot kullanılmıştır. IUPAC'ın tavsiye ettiği gibi, asetonitril-su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için potasyum hidrojen fitalat, referans standart madde olarak seçilmiştir. Mobil faz pH'sının ayarlanması esnasında, sıcaklık  $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Deneysel çalışmalarda

kullanılan ultra saf su Millipore Direct Q3-UV (Merck) saflaştırma sistemiyle elde edilmiştir. Tüm RPLC çalışmalar, YMC Triart C18 kolonda (150 mm X 4,6 mm, 3µm) gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. Yöntem

Çalışmada CCD ile belirlenen hacimce % 24,887, % 30, % 37,5, % 45 ve % 50,113 asetonyril içeren asetonyril-su ikili karışımı mobil fazlar hazırlanmıştır. pH 6,477-11,523 aralığında hazırlanan her bir mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde katı NH<sub>4</sub>Cl ilave edilmiştir. Bu ortama su-asetonyril oranını bozmayacak şekilde derişik amonyak ilave edilerek, mobil fazın pH'sı çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerlerine getirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. Çalışılan her bir mobil fazda kapesitabin ve rivastigmin (I.S)'in t<sub>R</sub> değerleri üç tekrarlı enjeksiyonların ortalaması olarak kullanılmıştır. Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörü (k) değerlerinin hesaplanabilmesi için gerekli t<sub>0</sub> değerleri, urasil çözeltisinin 3 tekrarlı enjeksiyonlarının ortalaması olarak kullanılmıştır. Çalışma boyunca akış hızı, 1 mL/dakika'da sabit tutulmuştur. Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) tayini için UV dedektör sırasıyla 240 ve 210 nm'ye ayarlanmıştır.

### 2.4. Çalışılan bileşiklerin çözeltileri

Kromatografik çalışmada kapesitabin 200 µg/mL ve rivastigmin 50 µg/mL olacak şekilde mobil fazda çözümlenerek hazırlanmıştır. Sonrasında kapesitabin için 50 µg/mL olacak şekilde ara stok hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına analitler 20 µL enjekte edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler, günlük hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 2.5. İdrar numune çalışması

Sağlıklı bir insandan alınmış idrar numunesi 1:20 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş idrardan 2 mL alınmış, üzerine 3 mL asetonyril eklenerek numune içerisindeki proteinler çöktürülmüştür. Böylelikle proteinlerin bozucu etki oluşturması önlenmiştir. Bu 5 mL'lik idrar üzerine kapesitabinin farklı derişimleri, rivastigmin (I.S) 2,5 ppm'de sabit kalacak şekilde çözeltilere eklenerek karışım 10 mL'ye tamamlanmıştır. Bu 10 mL'lik karışım 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Filtreden geçirilen çözeltiler yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir.

## 3. Bulgular

### 3.1. Kapesitabin ve rivastigmin için RPLC ayırmasının optimizasyonu

Çalışılan bileşiklerin optimum ayırma koşullarını tayin etmek için, CCD metodu ile seçilen bağımsız parametrelerin sınırlarının belirlenmesine gerek

duyulur. Bu nedenle, ilk olarak deneysel değişkenler olarak seçilen parametrelerin, alt ve üst seviyelerinin belirlenmesi gereklidir. Bu çalışmada, bileşiklerin k değerlerine etkisi olduğu bilinen mobil fazdaki asetonyril derişimi, pH'sı ve kolon sıcaklığı çalışılacak parametreler olarak seçilmiştir. Bu parametrelerin çalışma aralığı belirlenirken, kapesitabin (pK<sub>a</sub>:9,360) [22] ve rivastigminin (pK<sub>a</sub>:9,019) (I.S) [23] protonasyon sabitlerinden (pK<sub>a</sub>) ve az sayıda ön denemeden yararlanılmıştır. Parametre seviyelerinin seçiminde, k değerlerinin 0,5 ile 5 aralığında olması; mobil faz pH'larının bileşiklerin iyonik ve moleküler formlarının olduğu pH değerlerini içermesi amaçlanmıştır. Kolon sıcaklığı parametresinin seviyelerinin de vücut sıcaklığı olan 37°C'yi içine alması amaçlanmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışılan bileşikler için seçilen parametrelerin alt, orta, üst ve alfa (α) seviyeleri

Bağımsız parametreler	(-α)	Alt nokta (-)	Orta nokta (0)	Üst nokta (+)	(+α)
(x <sub>1</sub> ) asetonyril (%h/h)	24,887	30,000	37,500	45,000	50,113
(x <sub>2</sub> ) mobil faz pH'sı	6,477	7,500	9,000	10,500	11,523
(x <sub>3</sub> ) sıcaklık (°C)	31,591	35,000	40,000	45,000	48,409

Seçilen üç bağımsız parametre için oluşturulan merkezi kompozit dizayn, merkez noktasında yapılan 6 tekrarlı birlikte toplamda 20 farklı deney gerektirmektedir. Merkezi kompozit dizaynda çalışılan bu her koşulda kapesitabin ve rivastigminin alıkonma zamanı değerlerinden bileşiklerin k değerleri hesaplanmıştır. Bu k değerlerini kullanarak, bileşikler için deneysel tasarımda cevap değerleri olarak belirlenen logk ve seçicilik değerleri (α) hesaplanmıştır. (Tablo 2).

Tablo 2'de merkezi kompozit tasarımda belirlenen deney koşulları, incelenecek parametrelerin ana etkilerine ve parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerine göre elde edilen logk ve α değerlerini göstermektedir. Bu deneylerin sonuçlarından hangi parametrenin ve/veya parametre etkileşimlerinin cevap olarak seçilen değerlere etkisinin olup olmadığını yada varsa ne ölçüde etkilediğini belirlemek için elde edilen tüm cevap değerlerine göre MİNİTAB 17 programıyla çoklu regresyon analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda, logk ve α değerine göre elde edilen eşitlikler, parametre veya etkileşimlerin önemini belirten p değerleriyle birlikte Tablo 3'de verilmiştir.

ANOVA tablosunda 0,05'den küçük p-değeri, % 95 güven seviyesinde, ait olduğu katsayının cevap değerine etkisinin önemli olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca, ANOVA tablosundaki model uygunsuzluğu (lack of fit, LOF), CCD ile geliştirilen matematiksel modelin cevap olarak belirlenen değerleri tahmin edebilme yetisindeki hatayı ifade etmektedir. Eğer,

LOF değeri 0,05'den büyükse, matematiksel modelin cevap değerlerini tahmin edebilme yetisindeki hata önemsizdir.

**Tablo 2.** Kodlanmış parametre seviyeleri ve bu seviyelerde elde edilen logk ve  $\alpha$  değerleri

Dny.No	$x_1$	$x_2$	$x_3$	logk		$\alpha$ (seçicilik)
				Kapesitabin	Rivastigmin	$\alpha$ Rivastigmin/ Kapesitabin
1	-	-	-	0,472	0,673	1,587
2	+	-	-	-0,133	0,312	2,790
3	-	+	-	-0,245	1,180	26,612
4	+	+	-	-0,563	0,601	14,565
5	-	-	+	0,421	0,603	1,519
6	+	-	+	-0,200	0,250	2,824
7	-	+	+	-0,184	1,166	22,434
8	+	+	+	-0,618	0,591	16,186
9	$-\alpha$	0	0	0,492	1,204	5,144
10	$+\alpha$	0	0	-0,317	0,404	5,266
11	0	$-\alpha$	0	0,137	0,111	0,943
12	0	$+\alpha$	0	-0,779	0,824	40,064
13	0	0	$-\alpha$	0,037	0,790	5,657
14	0	0	$+\alpha$	-0,036	0,736	5,910
15	0	0	0	0,023	0,763	5,503
16	0	0	0	0,011	0,763	5,657
17	0	0	0	0,018	0,765	5,583
18	0	0	0	0,023	0,765	5,520
19	0	0	0	0,024	0,765	4,974
20	0	0	0	0,021	0,773	5,642

Tablo 3'de kapesitabin ve rivastigminin logk değerleri için verilen regresyon sonuçlarına göre; parametrelerin ana etkilerinden, kapesitabin için sıcaklığın önemsiz olduğu; rivastigmin için üç parametrenin önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, parametrelerin ana etkilerinin yanında, birbirleriyle ikili etkileşimleri de incelendiğinde kapesitabin için ACN\*ACN; ACN\*t°C ve pH\*t°C değerlerinin önemsiz, diğerlerinin önemli olduğu görülmektedir. Rivastigmin için bu ikili etkileşimlerden t°C\*t°C ve ACN\*t°C değerlerinin önemsiz, diğer etkilerin ise önemli olduğu görülmektedir.

Parametrelerin iki bileşimin seçicilik ( $\alpha$ ) cevap değerleri üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan regresyon analizine göre, mobil faz pH'sının ve pH\*pH ve ACN\*pH ikili etkileşimlerinin önemli; diğer

ana etkilerin (ACN ve t°C) ve ikili etkileşimlerin önemsiz olduğu görülmektedir.

Yapılan regresyon analizi sonuçlarının parametrelerin her iki cevap değeri üzerindeki etkisini değerlendirerek, optimum ayırma koşulunu yorumlamadaki zorluklar nedeniyle, istenebilirlik fonksiyonundan faydalanılmıştır. Bu fonksiyonda, ilk başta her bir cevap değeri için istenen hedefler belirlenmiştir (Tablo 4).

Kapesitabin için hedef logk değeri 0,079 olarak, bileşimin kapasite faktörü değerini 1,2 yapan k değerinden belirlenmiştir. Rivastigmin için logk değeri 0,380 olarak, kapesitabin piki ile rivastigmin pikinin arasındaki  $\alpha$  değerini 1,15 yapan k değerinden belirlenmiştir. Daha sonra bu hedefler doğrultusunda, tasarımdaki tüm noktalar istenebilirlik skalasındaki 0 ile 1 arasındaki değerlere dönüştürülmüştür (Tablo 5). İstenebilirlik skalasına çevrilen değerler ( $d_{logk}$  ve  $d_{\alpha-1}$ ), geometrik ortalama formülü kullanılarak tek bir cevap değerine dönüştürülmüştür.

$$D = (d_1^{w_1} x d_2^{w_2} x \dots x d_n^{w_n})^{1/(w_1+w_2+\dots+w_n)} \quad (2)$$

Eşitlik 2'de,  $d_i$  değeri her deneyin cevap değerinin istenebilirlik fonksiyonuna dönüştürülmüş halini;  $w_i$  cevapların ağırlıklarını;  $n$  cevap sayısını ifade etmektedir.

Tablo 5'deki  $D_{hepsi}$  değerlerini kullanarak, ayırmanın en iyi olduğu optimum ayırma koşulları, 3D yüzey yanıt diagramlarına göre belirlenmiştir (Şekil 2). Şekil 2'de verilen 3D yüzey diyagramlarında dikkate alınarak yapılan değerlendirme neticesinde, optimum RPLC ayırma koşulları, 40 (%v/v) asetonitril-su ikili karışımı, mobil faz pH'ı 7,5 ve kolon sıcaklığı 32°C olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu optimum ayırma koşullarında elde edilen kromatogram, Şekil 3'de verilmiştir. Optimum ayırma koşulunda hesaplanan sıvı kromatografik parametreler, Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 3.** Çalışılan bileşiklerin logk ve  $\alpha$  değerleri için regresyon analizi sonuçları

Faktör etkileri	Katsayılar kapesitabin		Katsayılar rivastigmin		Katsayılar Rivastigmin/Kapesitabin	
		P		P		P
	logk				$\alpha$	
sabit	0,029	<b>0,058</b>	0,764	<b>0,000</b>	5,472	<b>0,000</b>
ACN	-0,245	<b>0,000</b>	-0,235	<b>0,000</b>	-1,141	<b>0,071</b>
pH	-0,272	<b>0,000</b>	0,212	<b>0,000</b>	10,022	<b>0,000</b>
t°C	-0,017	<b>0,081</b>	-0,018	<b>0,000</b>	-0,159	<b>0,785</b>
ACN*ACN	0,011	<b>0,221</b>	0,014	<b>0,000</b>	-0,042	<b>0,941</b>
pH*pH	-0,133	<b>0,000</b>	-0,105	<b>0,000</b>	5,367	<b>0,000</b>
t°C* t°C	-0,019	<b>0,050</b>	-0,001	<b>0,603</b>	0,163	<b>0,773</b>
ACN* pH	0,060	<b>0,000</b>	-0,055	<b>0,000</b>	-2,600	<b>0,005</b>
ACN*t°C	-0,016	<b>0,189</b>	0,002	<b>0,376</b>	0,738	<b>0,341</b>
pH * t°C	0,015	<b>0,217</b>	0,014	<b>0,000</b>	-0,315	<b>0,678</b>
LOF		<b>0,073</b>		<b>0,661</b>		<b>0,050</b>

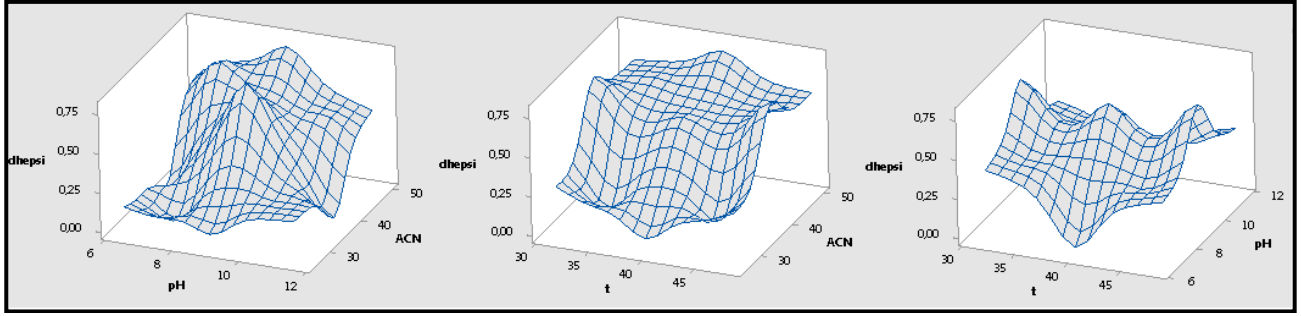
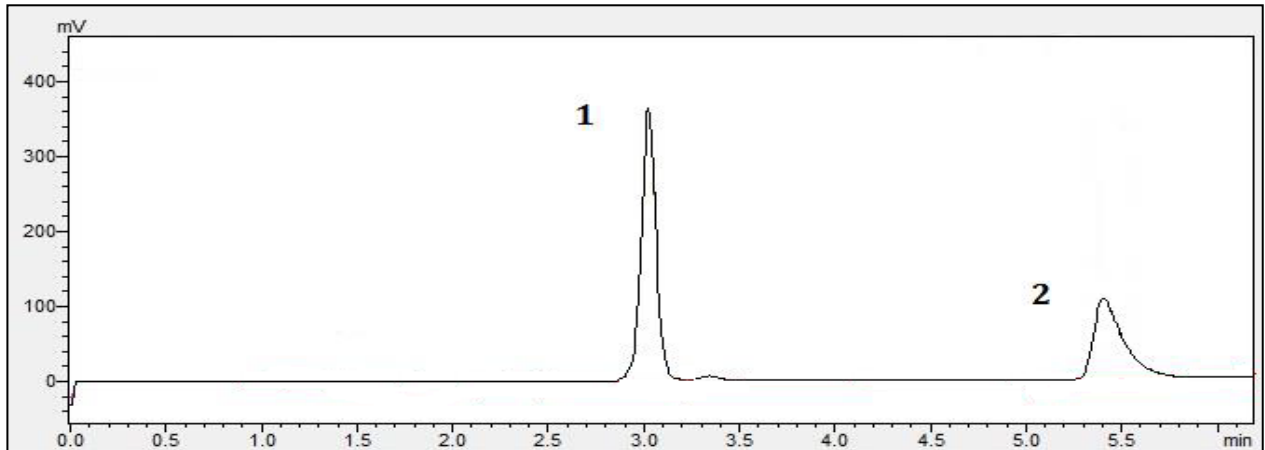
**Tablo 4.** Cevapların optimizasyonu için belirlenen kriterler

Bileşik	Cevap	Amaç	Alt seviye	Üst seviye	Hedef	Ağırlık
Kapesitabin	$\log k$	Hedef	-0,779	0,472	0,079	1
	$\alpha_{2,1}$	Hedef	0,943	40,064	1,150	1
Rivastigmin	$\log k$	Hedef	0,111	1,204	0,380	1

**Tablo 5.** Cevap değerlerinin istenebilirlik skalasına göre karşılıkları

Dny No	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$d_{\log k}$ kapesitabin	$d_{\log k}$ rivastigmin	$d_{\alpha_{2,1}}$ Rivastigmin/ kapesitabin	$D_{hepsi}$
1	-	-	-	0,031	0,691	0,000	<b>0,000</b>
2	+	-	-	0,801	0,613	0,989	<b>0,786</b>
3	-	+	-	0,663	0,029	0,362	<b>0,191</b>
4	+	+	-	0,268	0,790	0,592	<b>0,500</b>
5	-	-	+	0,108	0,777	0,000	<b>0,000</b>
6	+	-	+	0,686	0,428	0,943	<b>0,652</b>
7	-	+	+	0,697	0,045	0,425	<b>0,237</b>
8	+	+	+	0,225	0,798	0,579	<b>0,470</b>
9	$-\alpha$	0	0	0,048	0,006	0,841	<b>0,062</b>
10	$+\alpha$	0	0	0,503	0,914	0,939	<b>0,756</b>
11	0	$-\alpha$	0	0,917	0,000	0,930	<b>0,000</b>
12	0	$+\alpha$	0	0,000	0,495	0,066	<b>0,000</b>
13	0	0	$-\alpha$	0,917	0,535	0,869	<b>0,753</b>
14	0	0	$+\alpha$	0,849	0,614	0,882	<b>0,772</b>
15	0	0	0	0,947	0,572	0,887	<b>0,783</b>

$d_{\alpha_{2,1}}$ : Seçiciliğin istenebilirliği,  $d_{\log k}$ : logk değerinin istenebilirliği;  $D_{hepsi}$ : tüm cevap değerlerinin toplam istenebilirliği.

**Şekil 2.** Çalışılan bileşikler için çizilen 3D yüzey diyagramları**Şekil 3.** Standart karışımın optimum koşulda elde edilen kromatogramı 1) kapesitabin(185 µg/mL), 2) rivastigmin(I.S)(50 µg/mL)**Tablo 6.** Çalışılan bileşikler için optimum ayırma koşullarına göre elde edilen alıkonma zamanı, seçicilik ve ayırma gücü değerleri

Bileşikler	$t_R$	$k$	$\alpha$	$(a - 1)/a$	$k_2/k_2 + 1$	$\left(\frac{1}{4}\right)\sqrt{N}$	$R_s$
Kapesitabin	3,021	1,105					
Rivastigmin	5,400	2,763	<b>2,500</b>	0,600	0,734	18,971	<b>8,358</b>
Urasil ( $t_0$ )	1,435						



### 3.2. Geliştirilen metodun validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla, ICH validasyon parametrelerine göre geliştirilen yöntem test edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğruluk, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çalışmada metod validasyonu çalışması için iç standart metodu uygulanmıştır. Bunun için rivastigmin iç standart olarak seçilmiştir. Rivastigmin kapesitabin gibi bazik fonksiyonel grup taşıyan bir bileşiktir. Belirlenen optimum ayırma koşullarında kapesitabinin alıkonma zamanına yakın bir değerde pik vermiş ve kapesitabinden ayrılmıştır. Bunun için rivastigmin iç standart olarak bu çalışmada tercih edilmiştir.

#### 3.2.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık

Kapesitabinin yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın belirlenmesi için 2. bölümde anlatılan idrar numunesine 2 µg/mL ile 12 µg/mL aralığında farklı derişimlerde kapesitabin ve 2,5 µg/mL derişimde sabit tutulan iç standart rivastigmin eklenerek kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu, kapesitabinin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının I.S.'ın pik alanına oranının, kapesitabin derişimi değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem kapesitabin için 2 µg/mL ile 12 µg/mL arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Kapesitabin analizi için hesaplanan kalibrasyon verileri, Tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7.** Kapesitabinin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

Regresyon Denklemi*	y = 0,539x -0,059
Eğimin Standart Hatası	0,010
Kesimin Standart Hatası	0,074
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	2,000-12,000
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,490
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	1,484

\*y = bx + a ; x : µg/mL biriminde derişim; y : Kapesitabin/I.S alan oranı değerleri

#### 3.2.2. Sistem uygunluk testi sonuçları

Sistem uygunluk testleri (SST), geliştirilen RPLC yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için uygulanan testlerdir. Bu testler, tekrarlanan enjeksiyonlar için pik alanı ve t<sub>R</sub> değerlerinin bağlı standart sapması (% BSS), seçicilik (α), kuyruklanma faktörü (TF), alıkonma zamanı (t<sub>R</sub>), teorik tabaka sayısı (N), ayırma gücü (R<sub>s</sub>) ve kapasite faktörü (k), parametrelerin değerlendirilmesinden oluşmaktadır. Bu test uygulamasında kapesitabin için 6 µg/mL, rivastigmin için 2,5 µg/mL derişimlerde hazırlanan

çözeltiler sisteme 5 tekrarlı olarak enjekte edilmiş ve verilerin ortalaması alınarak, kromatografik parametreler hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, Tablo 8'de verilmiştir. Sistem kararlılık parametrelerine göre gerçekleştirilen değerlendirmede, geliştirilen RPLC yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmektedir.

**Tablo 8.** Kapesitabin ve rivastigmin için sistem uygunluk parametreleri

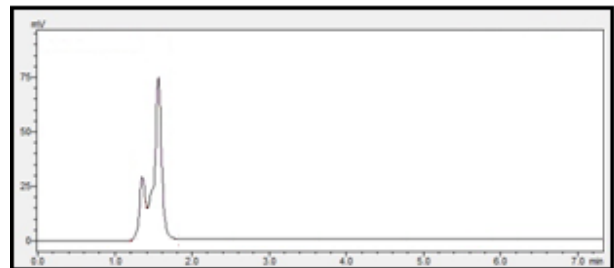
Param.	Kapesitabin	Rivastigmin (IS)	Önerilen değerler
t <sub>R</sub>	3,176	5,450	
TF	1,023	1,217	0,95-1,20
k	2,710	3,837	>1
R <sub>s</sub>		11,507	>2
N	6605	12173	>2000
α		2,478	>1
RSD (t <sub>R</sub> )	0,094	0,090	≤1
RSD(alan)	0,040	0,018	≤1

#### 3.2.3. Kesinlik sonuçları

Kapesitabin tayini için kesinlik çalışmaları için gün içi ve günler arası testleri uygulanmıştır. Gün içi çalışmaları iki farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde; günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır. Bu testler sonucunda elde edilmiş veriler, Tablo 9'da verilmiştir.

#### 3.2.4. Geri kazanım sonuçları

Geliştirilen RPLC yönteminin doğruluğunu ve idrar numunesi içerisinde bulunan proteinlerin yonteme bir etkisinin olup olmadığını belirlemek için, kapesitabinin idrar numunesinden geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Normal şartlarda, sağlıklı bir insanda vücuda alınmadıkça, bu bileşikler bulunmaz. Kapesitabin ve rivastigminin bulunmadığı idrara ait kromatogram, Şekil 4'de verilmiştir.



**Şekil 4.** Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) bulunmayan idrar kromatogramı

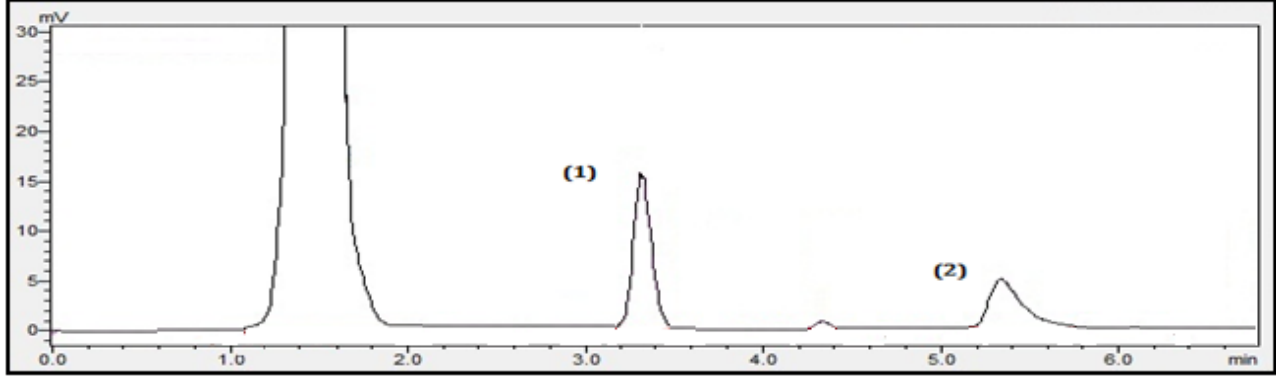
Bu çalışmada, idrara kapesitabin çözeltilerinden 4µg/mL ve 8 µg/mL; rivastigmin (I.S) çözeltilerinden idrarda 2,5 µg/mL derişimde olacak şekilde katkı yapılmıştır. Bu işlem birbirinden bağımsız 3 kez ayrı ayrı yapılmıştır.

**Tablo 9.** Kapesitabinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analizi bulguları

	Teorik Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gün içi derişim ortalaması	% BSS ( $\mu\text{g/mL}$ )	Günler arası derişim ortalaması	% BSS ( $\mu\text{g/mL}$ )
Kapesitabin	4	3,974	0,540	3,931	0,782
	10	10,077	0,080	9,957	0,280

**Tablo 10.** İnsan idrarında kapesitabinin RPLC analizi için geri kazanım sonuçları

Bileşik	Teorik Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	N	Ortalama bulunan derişim (konsantrasyon ort. ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ güven aralığı)	Geri kazanım (%) (yüzde ort. $\pm$ güven aralığı)	SS	BSS (%)
Kapesitabin	4	3	3,971 $\pm$ 0,013	99,269 $\pm$ 0,256	0,103	0,731
	8	3	8,094 $\pm$ 0,012	101,175 $\pm$ 0,899	0,050	0,124

**Şekil 5.** Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) ile katkılandırılmış idrar numunesi; 1) kapesitabin (8  $\mu\text{g/mL}$ ) 2) rivastigmin (I.S) (2,5  $\mu\text{g/mL}$ )

Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan oranı değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konularak, idrar numunelerinin içerdiği kapesitabin miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Tablo 10'da verilmiştir. Kapesitabin ve rivastigmin (I.S) ile katkılandırılmış idrar numunesinin analizi sonucu elde edilmiş kromatogram, Şekil 5'de verilmiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma, kapesitabinin RPLC yöntemiyle tayini için yapılan optimizasyon çalışmasında merkezi kompozit dizayn metodu kullanılarak gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Farklı kromatografik davranışa sahip olan bileşiklerin, eş zamanlı kromatografik tayininde mümkün olan en iyi sıvı kromatografik ayırma koşulu, Derringer'in istenebilirlik fonksiyonuyla belirlenmiştir. Bu fonksiyon sayesinde CCD'den elde edilen veriler, 3D yüzey yanıt diyagramlarıyla değerlendirilerek tek bir ayırma koşuluna karar verilmiştir. Geliştirilen RPLC yöntemin ICH parametrelerine göre gerçekleştirilen çalışma verileri yöntemin rutin uygulamalar için uygun olduğunu göstermiştir.

#### Teşekkür

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı 4581-D2-16 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamızı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkür ederiz.

#### Kaynakça

- [1] Tozkoparan, B., Aytac, S.P., 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 27(2), 139-64.
- [2] Domaç, M. (Ed.) 2005. Kemoterapötikler. Fersa Matbaacılık Ltd., Ankara, 96s.
- [3] Kayaalp, O. 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, 880s.
- [4] Süzer, Ö. (Ed.) 2009. Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2017s.
- [5] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, Canada, USA, 1135s.
- [6] ICH Expert Working Group, 2005, April. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland.
- [7] Meyer, V.R. 2010. Practical High-Performance Liquid Chromatography. John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom, 428s.
- [8] Uysal, R., Daldal, Y.D., Üstün, Z., Çubuk Demiralay, E. 2017. Optimization of RPLC

- Method for Separation of Some Acetylcholinesterase Inhibitors by using Central Composite Design. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(1), 23-43.
- [9] Gündoğan, B., Çubuk Demiralay, E., Daldal, Y.D., Üstün, Z. 2017. Determination of Optimum Separation Condition for Some Carbapenem Antibiotics Using RPLC with the Aid of Central Composite Design and Desirability Function. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13,100-109.
- [10] Çubuk Demiralay, E. 2012. An Experimental Design Approach to Optimization of the Liquid Chromatographic Separation Conditions for the Determination of Metformin and Glibenclamide in Pharmaceutical Formulation. *Acta Chimica Slovenica*, 59(2), 307-314.
- [11] Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2002. *Response Surface Methodology*. Wiley, New York, 798s.
- [12] Montgomery, D.C. 2005. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons, Westford, 757s.
- [13] Meloun, M., Zuzana Ferenčíková, Vrána, A. 2011. Determination of The Thermodynamic Dissociation Constant of Capecitabine Using Spectrophotometric and Potentiometric Titration Data. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43, 930-937.
- [14] Łaszcz, M., Trzcińska, K., Filip, K., Szyprowska, A., Mucha, M., Krzeczyński, P. 2011. Stability Studies of Capecitabine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 105, 1015-1021.
- [15] Pujeri, S.S., Khader, A. M. A., Seetharamappa, J. 2012. Stability Study of Capecitabine Active Pharmaceutical Ingredient in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35, 40-49.
- [16] Wang, X.J, You, J.Z. 2016. Study on The Thermal Decomposition of Capecitabine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123, 2485-2497.
- [17] Farkouh, A., Ettlinger, D., Schueller, J., Georgopoulos, A., Scheithauer, W., Czejka, M. 2010. A Rapid and Simple HPLC Assay for Quantification of Capecitabine for Drug Monitoring Purposes. *Anticancer Research*, 30, 5207-5212.
- [18] Deenen, M.J., Rosing, H., Hillebrand, M.J., Schellens, J.H.M., Beijnen, J. H. 2013. Quantitative Determination of Capecitabine and Its Six Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 913, 30- 40.
- [19] Deng, P., Ji, C., Daia, X., Zhong, D., Ding, L., Chen, X. 2015. Simultaneous Determination of Capecitabine and its Three Nucleoside Metabolites in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 989, 71-79.
- [20] Jacobs, B. A.W., Rosing, H., de Vries, N., Meulendijks, D., Henricks, L. M., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. 2016. Development and Validation Of A Rapid and Sensitive UPLC-MS/MS Method for Determination of Uracil and Dihydrouracil in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 126, 75-82.
- [21] Stashkevich, M.A., Khomutov, E.V., Dumanskii, Y.V., Matvienko, A.G., Zinkovich, I.I. 2016. Effect of 5-Fluorouracil on Thymidine Phosphorylase Activity in Model Experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160(5), 646-647.
- [22] Daldal, Y.D. 2018. Kemoterapide kullanılan bazı antimetabolit ilaçların sıvı kromatografik tayininde merkezi kompozit dizayn tekniğinin uygulanması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 233s, Isparta.
- [23] Daldal, Y.D., Demiralay, E.Ç., Ozkan, S.A. 2016. Effect of Organic Solvent Composition on Dissociation Constants of Some Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 493-499.