

FABAD Farm. Bil. Der.
16, 195 - 201, 1991

FABAD J. Pharm. Sci.
16, 195 - 201, 1991

SİTARABİN'İN İKİNCİ TÜREV ULTRAVİYOLE SPEKTROFOTOMETRİSİ İLE MİKTAR TAYİNİ

Muzaffer TUNÇEL(*) Dilek DOĞRUKOL(*)
Samiye FIÇICIOĞLU(**) Zühre ŞENTÜRK(***)

Özet: Bu çalışmada, sitarabinin ikinci türev spektroskopisi yöntemi ile tayini tanıtılmaktadır. Molekülün stabilite problemi bulunduğundan, sitarabinin metaboliti olan ara-U nun ortamda bulunabileceği gözönüne alınarak incelenmiş ve ikinci türevin 299.4 nm de ara-U tarafından etkilenmediği bulunmuştur. Derişim-absorbans değişkenleri $A = -0.00009 + 803 C (M)$ ($r = 0.99988$) eşitliğine uyaktadır ve $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5} M$ derişimleri arasında lineerlik sergilemektedir. En düşük tayin limiti $2 \mu g. mL^{-1}$ dir. Sitarabin içeren bir ampulün analizinde; 1 mL sinde sitarabin içeriği, yüzde bağıl standart sapmaları ile $19.96 \pm 0.84 \%$ (ikinci türev spektroskopik) ve $19.80 \pm 0.78 \%$ (uv-spektrofotometrik) bulunmuştur. Burada önerilen yöntemin çabuk, duyarlı ve pratik olduğu sonucuna varılmıştır.

THE DETERMINATION OF CYTARABINE BY THE SECOND DERIVATIVE ULTRAVIOLET SPECTROPHOTOMETRY

Summary: The determination of cytarabine using second-derivative spectrophotometric method is described in this study. Since seems to be stability problem of the molecule, the determination conditions were examined considering the metabolite of cytarabine which is ara-U would be in the determination media and it was found that the second-derivative curve of cytarabine was not effected by ara-U at 299.4 nm. The concentration-absorbance variables fit with $A = 0.00009 + 803 C (M)$ equation ($r = 0.99988$) a linearity exhibits in the range of $1 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-5} M$. The minimum determination limit of cytarabine is $2 \mu g mL^{-1}$. In the analysis of a single ampoules which contain cytarabine, the contents in the 1 mL were found as with their percent relative standard deviations $19.96 \pm 0.84 \%$ (second-derivative spectrophotometric) and $19.80 \pm 0.78 \%$ (uv-spectrophotometric) It was concluded that the method proposed here is rapid, accurate and practical.

Key words : *Determination of Cytarabine, Second-Derivative Spectrophotometry, Pharmaceutical Application.*

Başvuru Tarihi : 15.3.1991

Kabul Tarihi : 20.6.1991

(*) Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir.

(**) Anadolu Üniversitesi, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi (TBAM), Eskişehir.

(***) Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

GİRİŞ:

Sitarabin [cytoccine arabinoside; 1 - β -D arabinofuranosly cytoccine; ara - C] akut lösemının sağaltımında kullanılan ilaçlardan biridir. Etkisi; DNA sentezinin oluşumunda rol oynayan DNA polimeraz enziminin aktivitesine engel olarak DNA sentezini inhibe etmesinden ve DNA ya bağlanarak yapısını bozmasından kaynaklanmaktadır (1).

Sitarabin sulu çözeltilerinde oldukça az stabildir ve enzimlerin bulunmadığı ortamlarda kimyasal kinetik çerçevesinde in vivo koşullarında ise kimyasal bozunmaya ek olarak enzimlerin etkisi ile deamine olarak inaktif bir ürün olan urasil arabinozite (ara-U) dönüşmektedir (2, 3). Sulu çözeltilerinde stabil olmaması ve oral yoldan inaktif olması, ortaya farmasötik açıdan yeni problemler çıkarmaktadır. Bu nedenle, miktar tayini çalışmaları gerek sitarabin gerekse ara-U üzerinde yoğunlaştırılmaktadır. Vücut sıvıları ve farmasötik preparatlarda yapılan miktar tayini çalışmaları uv-spektrofotometrik (2-4) polarografik (5) radyoimmünoojik (6-8), GC - MS (9), yüksek basınçlı sıvı kromatografik (10-14) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, sitarabinin farmasötik preparatının kalite kontrollerinde ve miktar tayinlerinde kullanılabilcek bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ortamda sitarabin ve ara-U'nun bulunabileceği gözönünde tutularak bu iki maddenin ikinci türev uv-spektrofotometrik özellikleri incelenmiş, tayin koşulları araştırılmış, yapılabilecek tayinlerin analitik açıdan kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araç ve Gereç: Spektrofotometrik kayıtlar için Shimadzu OPI - 4 Model Graphic Printer kaydedicisi ile sistem oluşturan Shimadzu UV 240 Graphicord Model uv-vis. spektrofotometre kullanılmıştır.

Kimyasal Maddeler: Standard madde olarak sitarabin (Sigma), urasil arabinozit (ICN Pharmaceuticals) ve sitarabinin farmasötik şekli olarak mililitresinde 20 mg. sitarabin içeren 2 ml'lik Alexan Ampul (Mack Illert) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerin tümü E. Merck Firmasının üretimidir. Deneylerde iki kez distillenmiş su kullanılmıştır.

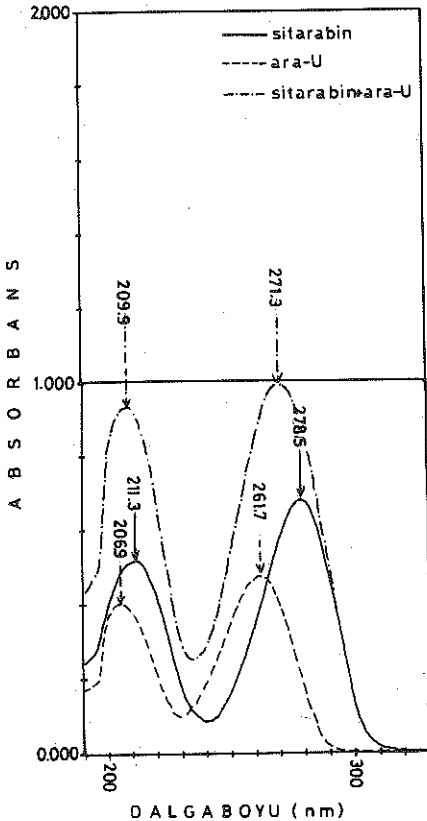
Çözeltiler: Sitarabin ve ara-U standart maddelerinin 0.05 M HCl içerisindeki 1×10^{-3} M çözeltileri hazırlanmış ve seyrelmelerde bu stok çözeltiler kullanılmıştır.

Spektrofotometrik Koşullar: Spektrofotometrik çalışmalarda normal ultraviyole alanı olan 190-360 nm ler arası taranmıştır. Absorbans spektrumunda 0 ile 2, birinci türevde - 0.200 ile + 0.200, ikinci türevde -0.040 ile + 0.040 absorbans aralıkları kullanılmıştır. Alete $\Delta \lambda$ değeri olarak 2 nm verilmiştir. Çözeltilerin spektrumları kuvarz küvetler içerisinde alınmış, maddelerin çözüldürüldüğü ortam olan 0.05 M HCl'den kör olarak yararlanılmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi: İstatistiksel değerlendirmeler IBM PS/2 Model 30 ile Statgraph programı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Son yıllarda, absorpsiyon spektrumlarının türevlerini alan integratörlerin yaygınlaşmasına paralel olarak, türev spektroskopisi kimya ve eczacılıkla ilgili dalların ilgisini çekmiştir. Bu ilginin kaynaklarından biri de türev eğrilerinin absorpsiyon eğrilerinden daha çok bilgi içermesidir (15). Analitik çalışmalar arasında türev spektroskopisi ile ilgili çarpıcı tayinlere rastlanmaktadır (16).



ŞEKİL 1 : $5,15 \cdot 10^{-5}$ M sitarabin (a) ve $5,10 \cdot 10^{-5}$ M ara-U'nun (b) bireysel, aynı derişimli fakat sitarabin ve ara-U'nun ikili karışımlarının (c) absorpsiyon spektrumları

Sitarabin ile ara-U ikili karışımlarının türev spektroskopisi yöntemiyle tayinlerini araştırmak için; $5,15 \cdot 10^{-5}$ M sitarabin ile $5,10 \cdot 10^{-5}$ M ara-U çözeltilerinin önce bireysel, daha sonra aynı derişimlerdeki karışımlarının 190-350 nm ler arasında absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 1).

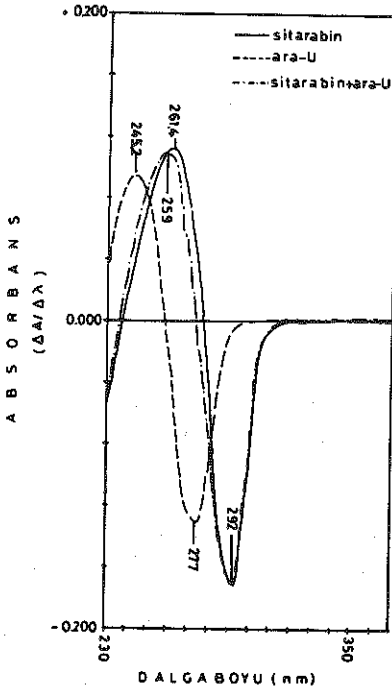
Spektrumlarda, sitarabinin 278.5 ve 211.3 nm, ara-U'nun 261.7 ve 206.9 nm ikili karışımlarının 271.3 ve 209.9 nm lere maksimum absorbans verdiği görülmektedir. Bireysel spektrumlardan kolayca izlendiği gibi, her iki spektrumun da maksimumunda diğerrinin çok eğimli eğri vermesi, çift dalgaboyu kullanılarak yapılan tayinler için bir risk oluşturmaktadır.

Absorbans spektrumu başlangıç eğrisi olduğu, türev eğrilerindeki herbir noktanın ana eğride karşı geldiği dalgaboyundaki noktaların özelliklerini taşıdığından, öncelikle çalışılan derişim aralığında sitarabin ve ara-U'nun kendi başlarına buldukları çözeltileri kullanılarak doğrusal ilişkinin incelenmesi gerekmektedir. Sitarabinin $1,03 \cdot 10^{-5}$ ile $5,15 \cdot 10^{-5}$ M, ara-U'nun $1,02 \cdot 10^{-5}$ ile $5,10 \cdot 10^{-5}$ M derişimleri arasında 278.5 nm ve 261.7 nm de derişim absorbans ilişkileri incelenmiş, iyi bir doğrusallık elde edilmiştir. Bu sonuçtan sonra türev eğrilerindeki ilişkilerin incelenebileceğine karar verilmiş ve karışıklıklardan kaçınmak için 260-320 nm ler arasında spektrumlar değerlendirilmiştir.

Aynı derişimle çözeltilerin birinci türev eğrileri kaydedildiğinde sitarabinin 292 nm de minimum, 261.4 nm de maksimum; ara-U nun 277 nm de minimum,

245.2 nm de maksimumu gözlenmektedir (Şekil 2).

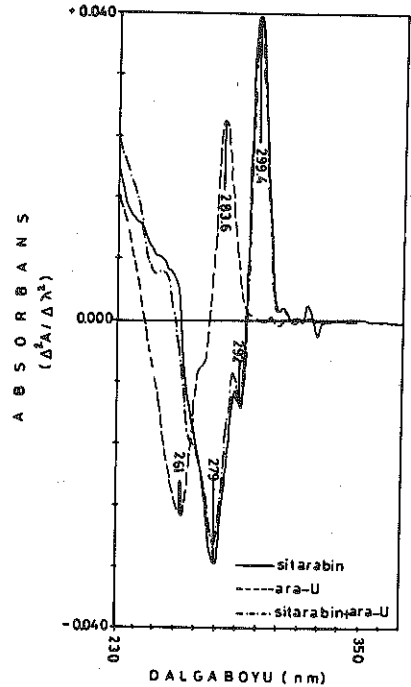
Sitarabinin 292 nm deki minimumunda, ara-U'nun birinci türev eğrisinin sıfır çizgisinden (base line) geçtiği, 277 nm de ara-U'nun minimumunda ise sitarabinin yüksek eğimli eğriye sahip olduğu görülmektedir.



ŞEKİL 2: $5,15 \cdot 10^{-5}$ M sitarabin (a) ve $5,10 \cdot 10^{-5}$ M ara-U'nun (b) bireysel, aynı derişimli fakat sitarabin ve ara-U'nun ikili karışımının (c) birinci türev spektrumları

İkinci türev eğrilerinde sitarabinin 299.4 nm de maksimum, 279 nm de mini-

mum; ara-U'nun 283.6 nm de maksimum, 261 nm minimum verdiği görülmektedir (Şekil 3.) Eğriler üst üste konulduğunda 299.4 nm de sitarabinin maksimum verdiği dalgaboyunda ara-U'nun eğrisinin sıfırdan geçtiği gözlenmektedir. İkili karışım eğrileri incelendiğinde 299.4 nm deki sitarabin ile ilgili eğrinin ara-U eğrisinden etkilenmediği, buna karşın diğer dalgaboylarındaki eğrilerin, absorbanların toplanabilirliği kuralına göre birbirlerini etkilediği Şekil 3 de kolayca görülmektedir.



ŞEKİL 3: $5,15 \cdot 10^{-5}$ M sitarabin (a) ve $5,10 \cdot 10^{-5}$ M ara-U'nun (b) bireysel, aynı derişimli fakat sitarabin ve ara-U'nun ikili karışımının (c) ikinci türev spektrumları.

Türev eğrilerinden elde edilen sonuçlara göre; birinci türev eğrilerinde 292 nm deki, ikinci türev eğrilerinde 299,4 nm deki dalgaboylarında yalnızca sitarabinin kantitatif tayininden söz edilebilir. Yapılan değerlendirmelere göre ara-U'nun kolay tayininin gerçekleşebileceği bir olasılığa rastlanamamıştır.

Yukarıda sitarabinin birinci türev eğrilerinde 292 nm, ikinci türev eğrilerinde 299,4 nm de, ortamda ara-U bulunsa da derişim-absorbans ilişkisinin doğrusal olabilirliliği tartışılmıştır. İkili karışımlarda bu savın geçerliliğinin kanıtlanması için sitarabin ve ara-U'nun birlikte artan derişimlerinde standart çözeltileri hazırlanmış sitarabinin derişim-absorbans bağılığına uyan eşitliklerinin; birinci türev için $A = 0.0004 + 1773 C (M)$; ($r = 0.99987$), ikinci türev için $A = 0.00009 + 803 C (M)$; ($r = 0.99988$) olduğu bulunmuştur. Bu eşitlikler, tek başına sitarabin kullanılarak elde edilen sitarabin standard eğrileri ile de uyusmaktadır. Çift dalgaboyunda ölçümle absorpsiyon spektrumlarını kullanarak sitarabin ve ara-U tayinleri gerçekleştirilmiştir (2-4). Sitarabinin dayanıksızlığı gözönüne alınırca, sitarabinin tayini sürecinde ara-U oluşabilirliliği endişesi ile çift dalgaboyu ölçümleri yapılarak miktar tayinin yapılması gerekir. Geliştirilen yöntemle tek bir dalgaboyu kullanılarak yapılan tayinlerde süre ve hesaplama işlemleri kısaltılmakta ve kolaylık sağlanmaktadır. Deneylerde ara-U'nun farmasötik preparatlarda bulunabileceği miktarların çok üzerindeki derişimleri kullanılmış ve bu yüksek ara-U derişimleri dahi sitarabinin birinci ve ikinci türev eğrilerini etkilemediği

gözlenmiştir. Böyle bir sonuç, sitarabinin ara-U tarafından kesinlikle etkilenmiyeciğini gösterir.

Bu bulgulardan hareketle, önerilen yöntem ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen uv-spektrofotometrik yöntemiyle (2) Alexan Ampullerin bir mL sindeki sitarabin içerikleri incelenmiştir. Gerekli seyreltmeler 0.05 M HCl ile yapılmıştır. Çalışmaya duyarlık kazandırabilmek için pik yükseklikleri uzunluk olarak ölçülmüş, bu değerler, hesaplama yoluyla absorbans değerlerine çevrilerek düzeltilmiştir. Bulunan değerler ve istatistiksel değerlendirilmeleri Tablo I de verilmektedir.

Tablo I. Sitarabin içeren ampullerde sitarabin miktarlarının ikinci türev spektroskopik ve uv-spektrofotometrik tayin sonuçları.

Deney No	İkinci Türev	Spektroskopik uv-spektrofotometrik	
		mg/mL	mg/mL
1		19.78	19.66
2		19.98	19.61
3		19.98	19.66
4		19.78	19.92
5		20.18	19.87
6		19.98	19.92
7		19.78	19.71
8		20.18	20.02
ortalama		19.96	19.80
varyans		0.03	0.02
stand. sapma		0.17	0.15
% bağıl stand sapma		0.84	0.78

SONUÇ

Değerlendirmelerden görüldüğü gibi, yöntemler arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunmamaktadır. Yalnız ikinci türev spektroskopik yöntemin uv-spektrofotometrik yöntemle üstünlüğü, ortamda ara-U bulunsa da tayin duyarlılığının etkilenmediğidir. Elde edilen sonuçlara göre; bu çalışma ile önerilen yöntemin çabuk, duyarlı ve pratik bir yöntem olduğu ve kalite kontrol laboratuvarlarında emniyetle kullanılabileceği söylenebilir.

TEŞEKKÜR: Bu çalışmanın gerçekleşmesi için Anadolu Üniversitesi, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezinin olanaklarını açan Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer'e teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Ho, D.H.W., Rodriguez, V., Loo, T.L., Bodey G.P., Freireich, E.J., "Clinical Pharmacology of O,2'-Cyclocytidine", *Clin. Pharmacol. Therap.*, 17, 66, 1975.
2. Notari, R.E., Lue Chin, M.L., Cardoni, A.: "Intermolecular and Intramolecular Catalysis in Deamination Cytosine Nucleosides", *J. Pharm. Sciences*, 59 (1), 28-32, 1970.
3. Ho, D.H.W., "Biochemical Studies of a New Antitumor Agent, O,2'-Cyclocytidine", *Biochem. Pharmacol.* 23, 1235, 1973.
4. Furner, R.L., Gaston, R.W., Strobel, J.D., El Dareer, S., Mellett, L.B., "Differential Analysis of Cyclocytidine, 1-b-D arabinofuranosylcytosine and 1-b-D arabinofuranosyluracil by ultraviolet spectrophotometry", *J. Natl. Cancer Inst.*, 52 (5), 1521-1528, 1964.
5. Doğrukol, D., Tunçel, M.: "Electrochemical Behaviour and Determination of Cytarabine", 41 st Meeting of International Society of Electrochemistry, *Proceedings I*. Tu-31, 1990.
6. Okabayashi, T., Mihara., Repke, D.B., Moffatt, J.G., "A Radioimmunoassay for 1-b-D arabinofuranosylcytosine" *Cancer Res.*, 37, 619-624, 1977.
7. Piall, E.M., Aherne, G.W., Marks, V.M., "A Radioimmunoassay for Cytosine arabinoside" *Br. J. Cancer*, 40, 548-556, 1979.
8. Sato, T., Morozumi, M., Kodama, K., Kuninaka, A., Yoshin, H., "Sensitive Radioimmunoassay for Cytarabine and Uracil Arabinoside in Plasma", *Cancer Treat.* 68 (11), 1357 - 1366, 1984.
9. Boutagy, J. Harvey, D.J., "Determination of Cytosine Arabinoside in Human Plasma by Gas Chromatography with a Nitrogen Sensitive Detector and Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *J. Chromatogr.* 146, 283-287, 1981.
10. Tunçel, M., Notari, R.E., Malspeis, L., "A Rapid Stability-Indicating HPLC Assay for the Arabinosylcytosine Prodrug, Cyclocytidine", *J. Liq. Chromatogr.*, 4 (5), 887-896, 1981.
11. Kissinger, L.D., Stemm N.L., "Determination of the Antileukemic Agents Cytarabine and Azacytidine

- and Their Respective Degredation Products by High-Performance Liquid Chromatography" *J. Chromatogr.* 353, 909-918, 1986.
12. Pallavicini, M.G., Mazrimas, J.A., "High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Cytosine Arabinoside and Metabolites in Biological Samples", *J. Chromatogr.* 183, 449-458, 1980.
 13. Schilsky, R.L., Ordway, F.S., "Simultaneous Determination of Cytosine Arabinoside, Its Nucleotides and metabolites by Pair High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.* 337, 63-71, 1985.
 14. Sinkule, J.A., Evans, W.E., "High Performance Liquid Chromatographic Assay for Cytosine Arabinoside, Uracil Arabinoside and Some Related Nucleotides", *J. Chromatogr.*, 274, 87-93, 1983.
 15. Owen T.: "Advances in UV-VIS. Spectroscopy: Derivative Spectroscopy", *Int. Lab.*, 17 (8), 58-65, 1987.
 16. Tunçel M.: "Morötesi ve Görünür Alan Spektroskopisinin Yeni Çehresi: Türev Spektroskopisi", *Pharmacia - JTPA.*, 28: 62 (3), 114-118, 1988.

Çıkarlar, gözü en tatlı şekilde kör eden bir araçtır.

Blaise Pascal