

ECE MERVE YILMAZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**REGORAFENİBİN PLAZMADA TAYİNİ İÇİN YENİ BİR
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ**

ECE MERVE YILMAZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZEYNEP AYDOĞMUŞ**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora öğrencisi Ece Merve Yılmaz tarafından Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş'un danışmanlığında hazırlanan "REGORAFENİBİN PLAZMADA TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Armağan Önal
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Gülcemal Yıldız
İ.T.Ü., Fen Edebiyat Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı



Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özdemir
Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Analitik Kimya Anabilim Dalı

BEYAN

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

Ece Merve Yılmaz



İTHAF

Babama ve oğullarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan, her konuda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sıdika Toker'e,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Aydoğmuş'a,

Bana her türlü yardımlarıyla destek olan Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Hayvan deneylerinde bana yol gösteren Prof. Dr. Alper Okyar'a ve büyük bir özveriyle yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Narin Öztürk'e,

Her zaman her koşulda bana desteğini esirgemeyen sevgili eşime, Kerem Alp'ime, henüz dünyaya gözlerini açmamış olan Yiğit Emir'ime ve canım aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İV
İTHAF	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XII
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Regorafenib Monohidrat	4
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	4
2.1.2. Farmakolojisi	5
2.1.2.1. Farmakodinamik etkiler.....	5
2.1.2.2. Farmakokinetik	5
2.1.2.3. Doğrusallık.....	6
2.1.2.4. Yan etkiler.....	7
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	7
2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri	7
2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri	10
2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi	10
2.2.1. HPLC Dedektörleri	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler	13
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	13
3.1.2. Çözeltiler	14
3.2. Aletler ve Gereçler.....	14
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar.....	15

3.3.1. Kolon ve Dedektör Dalga Boyu Seçimi	15
3.3.2. Hareketli Faz Seçimi	15
3.3.3. İç Standart Seçimi	16
3.3.4. Sulu Çözeltilerde Ölçü Eğrisi Hazırlanması.....	16
3.3.5. Regorafenibin Plazmadan Ekstraksiyonu.....	16
3.3.6. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması	17
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	18
3.4.1. Seçicilik	18
3.4.2. Doğrusallık	18
3.4.3. Doğruluk, Kesinlik ve Geri Kazanım.....	18
3.4.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD), Tayin Sınırı (LOQ)).....	19
3.4.5. Sağlamlık.....	19
3.4.6. Stabilite.....	19
3.5. Plazmada Regorafenib Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması	19
4. BULGULAR.....	21
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar.....	21
4.1.1. Kolon ve Dedektör Dalga Boyu Seçimi	21
4.1.2. Hareketli Faz Seçimi	21
4.1.3. İç Standart Seçimi	21
4.1.4. Sulu Çözeltilerde Ölçü Eğrisi Hazırlanması.....	22
4.1.5. Regorafenibin Plazmadan Ekstraksiyonu.....	25
4.1.6. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması	25
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	28
4.2.1. Seçicilik	28
4.2.2. Doğrusallık	29
4.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Geri Kazanım.....	29
4.2.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD), Tayin Sınırı (LOQ)).....	31
4.2.5. Sağlamlık.....	32
4.2.6. Stabilite.....	32
4.3. Plazmada Regorafenib Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması	34
5. TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	42
ETİK KURUL KARARI	46

.....	47
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	48
ÖZGEÇMİŞ	49



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisine ait $\bar{A}$ değerleri ve istatistiksel verileri	22
Tablo 4-2 : Tablo 4.1'deki ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler	23
Tablo 4-3: Regorafenibin plazmadan ekstraksiyonu denemelerinde elde edilen pik alanı oranları.....	25
Tablo 4-4: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisine ait $\bar{A}$ değerleri ve istatistiksel verileri	26
Tablo 4-5: Tablo 4.3'teki ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler	26
Tablo 4-6 : Aynı gün içerisinde yapılan regorafenib analizlerinin tekrarlanabilirliği	30
Tablo 4-7 : Farklı günler içerisinde yapılan regorafenib analizlerinin tekrarlanabilirliği	31
Tablo 4-8: Akış hızı değişimi sonuçları	32
Tablo 4-9: Dalga boyu değişimi sonuçları.....	32
Tablo 4-10: +4 °C'de karanlıkta bekletilen 15 ng/mL regorafenibin stabilitesi	33
Tablo 4-11: +4 °C'de karanlıkta bekletilen 400 ng/mL regorafenibin stabilitesi	33
Tablo 4-12: Plazma örneklerinde regorafenibin stabilitesi.....	34
Tablo 4-13: Plazmada regorafenib konsantrasyonunun zamana karşı değişimi	35
Tablo 4-14: 5 mg/kg doz regorafenib uygulanmasından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Regorafenib monohidratın kimyasal formülü	4
Şekil 2-2: Regorafenib monohidratın metanolde 200-400 nm aralığında UV spektrumu	4
Şekil 2-3: HPLC Cihazının Kısımları	12
Şekil 4-1: Nilotinibin kimyasal formülü.....	21
Şekil 4-2: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	24
Şekil 4-3: Boş sulu çözelti ve sulu çözeltide regorafenib (500 ng/mL) ve IS (200 ng/mL) örneklerine ait kromatogramlar	24
Şekil 4-4: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi.....	27
Şekil 4-5: Boş plazma, plazmada regorafenib (500 ng/mL) ve IS (200 ng/mL) örneklerine ait kromatogramlar	27
Şekil 4-6: Mobil faz kromatogramı (%80 Metanol-su).....	28
Şekil 4-7: Sadece regorafenibe ait kromatogram (500 ng/mL)	28
Şekil 4-8: Sadece nilotinibe ait kromatogram (400 ng/mL)	29
Şekil 4-9: Boş sıçan plazmasına ait kromatogram	29
Şekil 4-10: Sıçan plazmasında regorafenib ve iç standarda ait kromatogram.....	36
Şekil 4-11: Plazmada regorafenib konsantrasyonunun zamana karşı değişimi.....	37

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

RP-HPLC	: Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MS	: Kütle spektrometrisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi
UPLC-MS/MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi –Tandem Kütle Spektrometrisi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
UV	: Ultraviole
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
GİST	: Gastrointestinal stromal tümör
HCC	: Hepatosellüler kanser
REG	: Regorafenib
NIL	: Nilotinib
MeOH	: Metanol
KH_2PO_4	: Potasyum fosfat
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	: Amonyum karbonat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
IS	: İç standart
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
HLB	: Hidrofilik-Lipofilik Denge
rpm	:Revolutions per Minute (sabit bir ekseninde, 1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı)
AUC	: Plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan

C	: Konsantrasyon
C _{max}	: En yüksek plazma konsantrasyonu
t _{max}	: En yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı
t _{1/2}	: Eliminasyon yarılanma ömrü
A	: Pik alanı
$\bar{A}$	: Pik alanları ortalaması
SD	: Standart sapma
%RSD	: Bağıl standart sapma
SEM	: Ortalamanın standart hatası
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
H	: Saat
M	: Molar
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
V	: Hacim
G	: Gram
Ağ	: Ağırlık
Mg	: Miligram
μ g	: Mikrogram

L	: Litre
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
Nm	: Nanometre
Cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetre küp
M	: Eğim
N	: İntersept
r ²	: Korelasyon katsayısı
Dk	: Dakika
TIE2	: Transmembrane tyrosine-protein kinase receptor
VEGFR1	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 1
c-Kit	: Bir tirozin kinaz reseptörü
RET	: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş bir tirozin kinaz reseptörü (rearranged during transfection)
RAF	: RAF proto-onkojen serin / treonin-protein kinaz
BRAF	: B-Raf adlı bir proteini kodlayan bir insan geni

ÖZET

Yılmaz EM. Regorafenibin plazmada tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul 2019.

Regorafenib ileri lokal metastatik kolorektal kanser, metastatik gastrointestinal stromal tümör (GİST) ve hepatoselüler kanser (HCC) tedavisinde etkili olan bir oral multikinaz inhibitörüdür.

Bu çalışmada, regorafenibin sıçan plazmasında tayini için hızlı, doğru ve hassas bir ultraviyole (UV) dedeksiyonlu ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi geliştirildi. Plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve regorafenibin plazmadan ekstraksiyonu için basit, tek aşamalı çöktürme yöntemi ile metanol kullanarak gerçekleştirildi. HPLC ile analizi için C18 kolon seçildi. Mobil faz sistemi olarak (80:20, v/v) MeOH-su karışımı uygun bulundu. Dedektör 258 nm dalgaboyuna ayarlandı. İç standart olarak nilotinib ilaç maddesi kullanıldı. Regorafenibin pik alanları iç standardın pik alanlarına oranlanarak, konsantrasyona karşı pik alanları oranları grafiğe döküldü ve maddenin sulu çözelti ve plazmada 5-500 ng/mL aralığında doğrusal ölçü eğrileri elde edildi. Maddenin sulu çözeltide gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 1,23 ng/mL ve 3,73 ng/mL; plazmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,55 ng/mL ve 4,70 ng/mL bulundu. Plazmada %93,82 geri kazanım elde edildi. İlaç 10 adet sağlıklı Sprague Dawley türü erkek sıçanlara 5 mg/kg olacak şekilde uygulandı. Hayvanlardan alınan plazma örneklerinde ilacın tayini gerçekleştirildi ve regorafenibin plazma konsantrasyon-zaman grafiği elde edilerek farmakokinetik parametreleri C_{max} : 364,41 ng/mL, t_{max} : 4 saat, $t_{1/2}$: 11,8 saat, $AUC_{(0-48)}$: 5654,39 ng.saat/mL ve $AUC_{(0-\infty)}$: 6015,62 ng.saat/mL olarak hesaplandı. Geliştirdiğimiz yöntem kolay, hassas, seçici ve tekrarlanabilir olup regorafenibin biyolojik sıvılarda tayini ve klinik laboratuvarlarında rutin analizlerinde başarı ile kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Regorafenib, HPLC-UV, sıçan plazması, validasyon, farmakokinetik çalışma

ABSTRACT

Yılmaz EM. A new high performance liquid chromatography method for the determination of regorafenib in plasma. Istanbul University, Institute of Health Science, Analytical Chemistry Department. PhD Thesis. İstanbul 2019.

Regorafenib is an oral multikinase inhibitor which is effective in the treatment of advanced local metastatic colorectal cancer, metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST) and hepatocellular cancer (HCC).

In this study, a rapid, accurate and precise reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method with ultraviolet (UV) detection was developed for the determination of regorafenib in rat plasma. A simple, one-step precipitation method was developed for protein precipitation and methanol was used for extraction of regorafenib from plasma. A C18 column was selected for HPLC analysis. MeOH-water mixture (80:20, v/v) was found suitable as mobile phase system. The detector was set to a wavelength of 258 nm. The nilotinib drug substance was used as the internal standard. The peak areas of the regorafenib were divided to the peak areas of the internal standard, and these ratio of peak values were plotted against the concentration and linear calibration curves in the aqueous solution and plasma were obtained. The linearity of regorafenib in both standard solutions and plasma was 5-500 ng / mL. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) values of the drug in aqueous solution were 1.23 ng / mL and 3.73 ng / mL, respectively; LOD and LOQ values in plasma were 1.55 ng / mL and 4.70 ng / mL, respectively. 93.82% recovery was obtained in plasma. The drug was administered to 10 healthy Sprague Dawley male rats at a dose of 5 mg / kg. Determination of the drug was performed in plasma samples of animals and the plasma concentration-time graph of regorafenib was obtained. Their pharmacokinetic parameters were C_{max} : 364.41 ng / mL, t_{max} : 4 hour, $t_{1/2}$: 11.8 hour, $AUC_{(0-48)}$: 5654.39 ng.hour / mL and $AUC_{(0-\infty)}$: 6015.62 ng.hour / mL. The developed method is easy, sensitive, selective and repeatable and can be used in clinic laboratories and for the determination of regorafenib in biological fluids.

Key Words: Regorafenib, HPLC-UV, rat plasma, validation, pharmacokinetic study.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sindirim sisteminin bir bölümünü oluşturan kalın bağırsak, kolon ve rektum olarak adlandırılan iki kısımdan oluşur. Bu bölgelerden kolon olarak adlandırılan kısmı kalın bağırsağın büyük bir bölümüne denk gelirken rektum kısmı ise anüsten önceki yaklaşık 10 cm'lik kısımdır (1).

Yemeklerle alınan sindirilmiş besinler ince bağırsaktan kalın bağırsağa geçerler ve burada su ile besin maddeleri emilerek kan yoluyla vücuda alınması sağlanır. Diğer kısım ise rektuma doğru gider ve nihayetinde dışkı şeklinde vücuttan atılır (1).

Kanser gelişimi sadece kolonda yani kalın bağırsak kısmında olursa kolon kanseri olarak adlandırılır. Eğer kanser oluşumu rektum kısmında görülürse rektum kanseri olarak isimlendirilir. Dolayısı ile genel olarak hem kolon kanseri hem de rektum kanseri birlikte kolorektal kanser olarak isimlendirilir. Dünya'da her yıl 1 milyondan fazla bireyde kolorektal kanser gelişmektedir. Hastalığa özgü olan mortalite ya da ölüm oranı yaklaşık %33 civarındadır (1).

Tüm kanserlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır ve hastaların yaklaşık beşte birinde tanı aşamasında metastaz vardır (2).

Kolorektal kanser geliştikten sonra bu hücreler bazen kalın bağırsak dışına (kolon + rektum) yayılabilir. Böyle bir yayılma durumunda öncelikle kanser hücreleri kalın bağırsağa yakın olan lenf düğümlerine yerleşirler. Kanser hücreleri bu şekilde lenf düğümlerine eriştiklerinde başka lenf düğümlerine yayılabilecekleri gibi diğer organlara da yayılabilirler. Başka bir ifade ile metastaz yapabilirler. Kolorektal kanser hücrelerinin çoğunlukla karaciğere metastaz yaptığı bilinmektedir (1).

Kanser hücresi esas köken aldığı dokudan başka bir dokuya yayılması durumunda yeni dokuda oluşan tümör hücreleri ilk dokudaki hücrelerin özelliğini gösterirler ve aynı şekilde isimlendirilirler. Örneğin, karaciğere yayılmış veya metastaz yapmış olan kolorektal kanser hücreleri, aslında karaciğer dokusuna yerleşmiş olan kalın bağırsak kanser hücreleridir. Bu durumda hastalık karaciğer kanseri değil

“metastatik kolon kanseri” ya da metastatik kolorektal kanser olarak adlandırılır. Ayrıca karaciğere metastaz yapmış olan bu kanser hücrelerinin tedavisi karaciğer kanseri olarak değil kolorektal kanseri dikkate alınarak yapılır (1).

Gastrointestinal stromal tümör (GİST)'ler, gastrointestinal sistemin en sık görülen mezenkimal tümörleri olup tüm gastrointestinal sistem tümörlerinin %1'den azını oluşturmaktadır. GİST'ler, gastrointestinal sistemin herhangi bir yerinde bulunabilirler, ancak en sık mide (%50-60) olmak üzere sırasıyla ince bağırsak (%30-35), kolon ve rektumda (%5) görülürler. GİST'ler her yaşta görülebilmektedir ve ortalama tanı yaşı 63 olarak saptanmıştır. GİST'lerin esas tedavisi cerrahi olup, metastatik ve lokal ileri GİST'lerin tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır ve bunlar hem hastalıksız sağ kalım hem de genel sağ kalımı anlamlı olarak uzatmaktadır (3).

Hepatosellüler kanser (HCC) en sık görülen primer karaciğer kanseridir. HCC Dünya'da 5. sırada görülme sıklığında ve 2. sırada en ölümcül kanser türü olarak bulunmaktadır. Tüm kanserlerin %5'i HCC olup, %90'ı siroz zemininde gelişmektedir. Dünya'da en sık kronik viral hepatit zemininde gelişen siroz vakalarında oluşmakta olup, alkolik ve nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ise giderek artan sebepler arasında yer almaktadır. Dünya'da artan obezite nedeni ile HCC'de beklenmeyen bir artış izlenmektedir. Beş yıllık sağ kalımı ortalama %11 olup, sağ kalımı altta yatan siroz evresi ve HCC evresine bağlı olarak değişmektedir. Küratif tedavisi karaciğer nakli veya bir kısmının alınması olup tümöre erken evrede tanı konulmasına bağlıdır (4).

Regorafenib bir oral multikinaz inhibitörüdür. İlaç etkisini vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR-1-2 ve 3), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR alfa-beta ve TIE2) ve onkojenik kinazlar c-KIT, REF ve BRAF gibi anjiyogenezi ve tümör büyümesini teşvik eden tirozin kinazları inhibe ederek gösterir. Regorafenib ileri lokal metastatik kolorektal kanser, metastatik gastrointestinal stromal tümör (GİST) ve hepatoselüler kanser tedavisinde endikedir. ABD'de FDA tarafından metastatik kolorektal kanser tedavisi için Eylül 2012'de, gastrointestinal stromal tümör (GİST) tedavisi için Şubat 2013'te ve hepatoselüler kanser tedavisi için Nisan 2017'de onaylanmıştır (5).

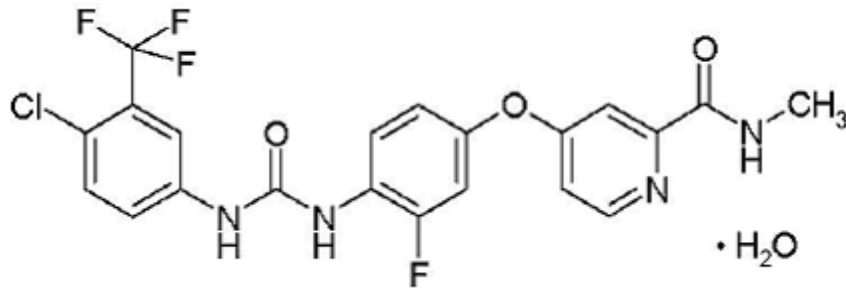
Regorafenib ilaç etken maddesinin analizi ile ilgili bildiğimiz kadarıyla farmakopelerde herhangi bir kayıt yoktur. Yapılan literatür çalışmalarında regorafenibin biyolojik sıvılarda tayini için sadece bir adet yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) -Ultraviyole-görünür bölge (UV-vizibl) ve çok az sayıda HPLC-tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) yöntemleri kayıtlıdır. Bildirilen HPLC-UV yönteminde plazmadan geri kazanım düşük bulunmuş ve nispeten zaman alıcı katı faz ekstraksiyonu metodu kullanılmıştır. Bu nedenle bu ilaç maddesinin biyolojik sıvılardaki tayini için doğru, seçici, hassas, kolay ve güvenilir yeni yöntemlere ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, regorafenibin sıçan plazmasında tayini için hassas, doğru, güvenilir ve seçici bir UV dedeksiyonlu RP-HPLC analiz yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntem Sprague Dawley türü erkek sıçanlara başarı ile uygulanmış ve farmakokinetik çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem rutin ilaç laboratuvarlarında ve biyolojik sıvılarda regorafenib tayininde başarı ile kullanılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

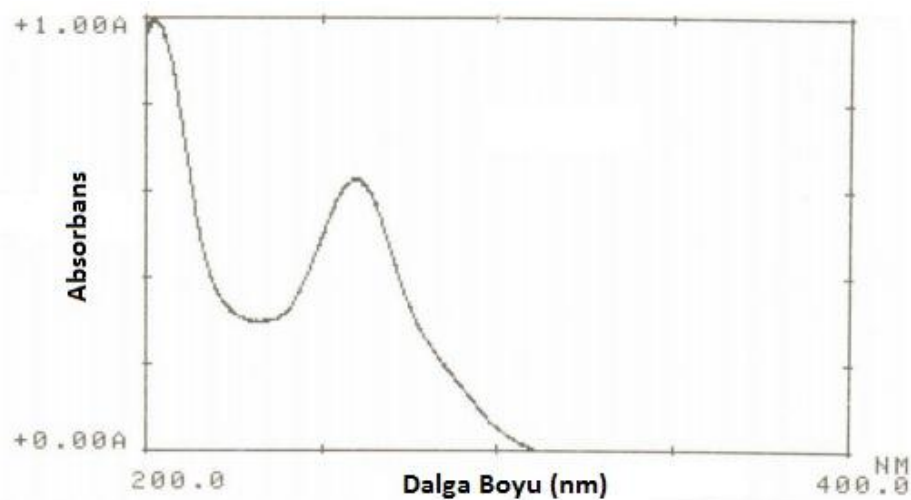
2.1. Regorafenib Monohidrat

2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-1 : Regorafenib monohidratın kimyasal formülü

Regorafenib monohidratın kimyasal adı IUPAC'a göre 4-[4-[[4-kloro-3-(triflorometil)fenil]karbamoilamino]-3-florofenoksi]-N-metilpiridin-2-karboksamid; hidrat'tır (Şekil 2-1). Kapalı formülü $C_{21}H_{15}ClF_4N_4O_3$ olan regorafenibin molekül ağırlığı 482,82 g/mol, monohidrat olarak 500,835 g/mol'dür (6). Regorafenib monohidrat, dimetilformamid ve dimetilsülfoksitte çok iyi (30 mg/mL), etanol (14mg/mL), metanol, asetonitril, ve etil asetatta ise orta derecede çözünen, suda hemen hemen hiç çözünmeyen (<1 mg/mL) kırık beyaz renkte toz halinde bir bileşiktir (7,8,9). pK_1 'i 2,02 ve pK_2 'si yaklaşık 10,52 dir (10). Erime derecesi 204-206°C ve kaynama derecesi 513,4°C'dir. Yoğunluğu 1,5 g/cm³'tür. Kırılma indisi 1,616'dır (11).



Şekil 2-2: Regorafenib monohidratın metanolde 200-400 nm aralığında UV spektrumu

2.1.2. Farmakolojisi

2.1.2.1. Farmakodinamik etkiler

Regorafenib, tümör anjiyogenezinde (VEGFR1, -2, -3, TIE2), onkogeneze (KIT, RET, RAF-1, BRAF) ve tümör mikro ortamına dahil olan kinazlar dahil, birden fazla protein kinazını güçlü şekilde bloke eden oral bir anti-tümör ajanıdır. Klinik olmayan çalışmalarda regorafenib, hem anti-anjiyojenik hem de anti-proliferatif etkilerin aracılık ettiği varsayılan in vivo tümör modellerinin geniş bir yelpazesinde anti-tümör aktivitesini göstermiştir. Ek olarak, regorafenib in vivo olarak meme kanseri modellerinde anti-metastatik etkiler göstermiştir. Başlıca insan metabolitleri M-2 (N-oksit) ve M-5 (N-oksit ve desmetil), in vitro ve in vivo modellerde regorafenib için benzer etkiler göstermiştir (12).

2.1.2.2. Farmakokinetik

İlacın plazma konsantrasyonlarındaki değişimlerini içine alan farmakokinetik parametreleri olarak absorpsiyon, eliminasyon, dağılım ve metabolizma incelenir.

Absorpsiyon

Hastalara verilen tek bir 160 mg dozu takiben en yüksek plazma konsantrasyonu (C_{max}) = 2,5 µg/mL; en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı (T_{max}) = 4 saat; plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) = 70,4 µg*h/mL; C_{max} , kararlı durum = 3,9 µg/mL; AUC, kararlı durum = 58,3 µg*h/mL; tabletlerin bir oral çözeltiye kıyasla ortalama nispi biyoyararlanımı %69 ila %83 arasındadır (10).

Eliminasyon

Literatür çalışmaları regorafenib ve plazmada metaboliti M-2 için ortalama eliminasyon yarı ömrü oral uygulamayı takiben farklı çalışmalarda 20 ila 30 saat arasında değiştiğini göstermektedir. Metabolit M-5 için ortalama eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 60 saattir (40 ila 100 saat arasındadır) (12).

Radyoaktif dozun yaklaşık %90'ı uygulamadan sonraki 12 gün içinde geri kazanılmıştır, dışkıda dozun yaklaşık %71'i (ana bileşik olarak %47, metabolitler olarak %24) ve idrarda glukuronitler olarak atılan dozun yaklaşık %19'u geri kazanılmıştır. Glukuronidlerin idrarla atılımı sabit durum koşullarında %10'un altına düşmüştür.

Dışkıda bulunan ana bileşik, emilmeyen ilaçtan, glukuronidlerin intestinal bozunmasından veya metabolit M-2'nin indirgenmesinden elde edilebilir (12).

Regorafenib ve ana farmakolojik olarak aktif metabolitleri M-2 (N-oksit) ve M-5 (N-oksit ve N-desmetil) konsantrasyonu, düşük yağlı (hafif) bir kahvaltının ardından en yüksek seviyededir. Regorafenibe maruz kalma, yüksek yağlı bir kahvaltı ile uygulandığında %48, düşük yağlı bir kahvaltı ile uygulandığında perhiz ile karşılaştırıldığında %36 artmıştır. Metabolit M-2 ve M-5'in maruziyetleri, regorafenibin açlık durumuna kıyasla düşük yağlı bir kahvaltı ile verildiğinde daha yüksek, açlık ile karşılaştırıldığında yüksek yağlı bir yemekle verildiğinde daha düşük bulunmuştur (12).

Dağılım

Regorafenib ve ayrıca ana dolaşım metabolitleri için plazma konsantrasyon-zaman profilleri, 24 saatlik dozaj aralığı boyunca çoklu tepe noktaları göstermiştir ve enterohepatik dolaşım ile ilişkilendirilebilir. Regorafenibin insan plazma proteinlerine in vitro protein bağlanması yüksektir (% 99,5) (12).

Metabolizma

Regorafenib, öncelikle karaciğerde, CYP3A4'ün aracılık ettiği oksidatif metabolizmanın yanı sıra UGT1A9'un aracılık ettiği glukuronidasyon ile metabolize edilir. Plazmada, iki ana ve altı küçük regorafenib metaboliti tanımlanmıştır. İnsan plazmasındaki regorafenibin dolaşımdaki ana metabolitleri, farmakolojik olarak aktif olan ve kararlı halde regorafenib ile benzer konsantrasyonlara sahip olan M-2 (N-oksit) ve M-5'tir (N-oksit ve N-desmetil). M-2 ve M-5'in in vitro protein bağlanması regorafenibden daha yüksektir (sırasıyla % 99.8 ve % 99.95) (12).

2.1.2.3. Doğrusallık

Regorafenibin kararlı halde sistemik maruziyeti, 60 mg'lık dozlara kadar orantılı bir şekilde artar ve 60 mg'den büyük dozlarda daha az orantılıdır. Regorafenibin düzenli kullanımı süresince birikmesi, eliminasyon yarı ömrü ve dozaj sıklığı ile tutarlı olan plazma konsantrasyonlarında yaklaşık 2 kat artışla sonuçlanır.

Kararlı durumda 160 mg regorafenibin ağızdan tatbik edilmesinden sonra, ilacın ortalama pik plazma seviyesi yaklaşık olarak 3,9 mg/L (8,1 mikromolar) tespit edilmiştir (12).

2.1.2.4. Yan etkiler

En sık görülen reaksiyonlar uzun süreli yorgunluk, diyare, iştah azalması, el-ayak derisi reaksiyonu, hipertansiyon, mukozit, disfoni (ses değişikliği veya kısıklığı), enfeksiyon, ateş ve bulantı, kilo kaybı, gastrointestinal ve karın ağrısıdır. Ciddi ve bazen ölümcül olabilen karaciğer sorunlarına neden olabilir (13).

2.1.3. Analiz Yöntemleri

2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Erp N.P. ve ark. regorafenib, imatinib, sunitinib, nilotinib, dasatinib ve pazopanibin insan serumunda tayinini UPLC-MS/MS yöntemi ile yapmışlardır. Kantitatif analiz için insan serumuna, standartlara ve kontrol numunelerine üç kararlı izotop eklenmiş ve daha sonra metanol ile proteinler çöktürülmüştür. Kalan çözelti su ile seyreltildikten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Ayrılma C18 kolonda, 0,4 mL/dakika akış hızında gerçekleşmiştir. Regorafenib için tayin sınırı 0,1-4 µg/mL aralığındadır (14).

Hafner F.T. ve ark. regorafenib ve iki ana metabolitini izotop seyreltme kütle spektrometresi yöntemiyle insan plazmasında tayin etmişlerdir. Konsantrasyon aralığı her biri için 2-2000 µg/L olup, ayrılma C18 kolonda 1 mL/dakika akış hızında amonyum format ve asetonitril içeren mobil faz ile gradient elüsyonla gerçekleşmiştir (15).

Weiping J.I. ve ark. sıçan plazmasında regorafenib tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirmiş ve bunu farmakokinetik çalışmaya uygulamışlardır. Proteinlerin çöktürülmesi internal standart ilavesinin ardından Asetonitril: Metanol (9:1, v/v) karışımı ile yapılmıştır. Kromatografik ayrılma Zorbax C18 kolonda, asetonitril-%0,1 formik asitli su karışımı ile gradient elüsyonla gerçekleşmiştir. Lineer kalibrasyon aralığı 8-5000 ng/mL'dir. Regorafenibin sıçanlarda biyoyararlanımı %92,3 bulunmuştur (16).

Luethi D. ve ark. regorafenibin fare plazmasında tayini için 25-25000 ng /mL konsantrasyon aralığında lineer olan bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Sorafenibin internal standart olarak kullanıldığı bu çalışmada, plazma proteinleri asetonitril ile çöktürülmüştür. Kalan çözelti %25 lik metanol ile seyreltildikten sonra 2 µm partiküllü etilsilika köprülü hibrit üç fonksiyonlu bağlı C18 kolona enjekte

edilmiştir. 0,6 mL/ dakika akış hızında izokratik %0,02 formik asit içeren metanol su karışımı ile ayrılma gerçekleşmiş, farmakokinetik çalışma vahşi tip FVB farelerde uygulanmıştır (17).

Alam M.A. ve ark. plazmada regorafenib tayini için üçlü kuadropol kütle spektrometrisi dedektörlü bir UPLC yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde C18 kolon ve mobil faz olarak % 0,1 formik asit içeren metanol-su karışımı (85:15, v/v) kullanılmıştır. Lineer kalibrasyon aralığı 50-2500 ng/mL'dir. Plazmadan geri kazanım % 82,53 ile % 105,66 aralığındadır (18).

Fu Q. ve ark. regorafenib ve metabolitlerinin fare plazmasında tayini için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Her biri için gözlenebilir sınırları 5 ng/mL'dir. C18 kolonda akış hızı 0,4 mL/dakika, toplam akış süresi 5 dakikadır. Mobil faz olarak % 0,1 formik asit içeren metanol, asetonitril ve sudan oluşan bir karışım gradient elüsyonda kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin konsantrasyon aralığı 5-1000 ng/mL'dir (19).

Merienne C. ve ark. 17 tane tirozin kinaz inhibitörünün LC-MS/MS ile yüksek verimli tayinini geliştirmişlerdir. İlaçlar, plazma konsantrasyon aralıklarına göre, 0.1-200 ng/mL, 1-200 ng/mL, 4-800 ng/mL ve 25-5000 ng/mL olarak dört grup halinde analiz edilmiştir. Ayırma için katı faz ekstraksiyonu ve C18 kolonlu bir HPLC sistemi kullanılmış, iyonlar üçlü kuadropol kütle spektrometrisi ile tespit edilmiştir. Regorafenib için doğrusallık aralığı 25-4000 ng/mL'dir (20).

Pang Y.Y. ve ark. insan plazma albümin seviyelerinin regorafenib kaynaklı hepatotoksisite üzerindeki etkisini, valide ettikleri bir LC-MS/MS yöntemi kullanarak tespit etmişlerdir. Konsantrasyon aralığı 2–1000 ng/mL'dir. Sorafenibin iç standart olarak kullanıldığı çalışmada proteinlerin çöktürülmesi işlemi asetonitrille yapılmıştır. Ayrılma C18 kolonda gerçekleşmiştir. Valide edilen yöntem plazmada albumin seviyelerinin regorafenibin protein bağlanma derecesi üzerindeki etkisini belirlemek için uygulanmıştır (21).

Cardoso E. ve ark. yeni nesil oral anti-tümör ilaçları dabrafenib, trametinib, vemurafenib, kobimetinib, pazopanib, regorafenib ve insan plazmasındaki iki metabolitinin LC-MS/MS ile tayinini yapmışlardır. Her bir analiz için 100 µL plazma kullanılmış ve plazma proteinleri metanol ile çöktürülmüştür. Kromatografik ayrılma

0,3 mL/dakika akış hızında gradient elüsyonla gerçekleşmiş ve regorafenib için 20-10000 ng/mL aralığında doğrusallık saptanmıştır (22).

Herbrink M. ve ark. sekiz adet antikanser ilacının insan plazmasında yanyana tayini için bir LC-MS/MS metodu geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Analitler ve iç standartlar (kararlı izotop olarak işaretlenmiş analitler) asetonitril ile ekstre edilmiş, ekstraktı elde etmek için üst faza eşit miktarda 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ilave edilmiştir. Bu ekstraktın 2 μL 'lik kısmı C18 kolona enjekte edilmiş, gradient elüsyon uygulanarak pozitif iyon modunda üçlü kuadropol kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Regorafenib için lineer konsantrasyon aralığı 50-5000 ng/mL olarak bulunmuştur (23).

Allard M. ve ark. regorafenib, sorafenib ve bunların üç metabolitinin insan plazmasındaki yanyana tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde dedeksiyon pozitif modda elektrosprey iyonizasyonlu üçlü kuadropol kütle spektrometrisine dayanmaktadır. Regorafenib için 50-5000 ng/mL doğrusallık aralığında çalışılmıştır (24).

Dyk M. ve ark. 18 küçük moleküllü kinaz inhibitörlerinin insan plazmasında yanyana analizlerini yapmışlardır. Analitler C18 kolonda gradient elüsyonla uçuş zamanlı kütle spektrometrisi ile ayrılmışlardır. 50-5000 ng/mL aralığında regorafenib doğrusallık göstermiştir. 18 analitin ayrılması 0,25 mL/dakika akış hızında 15 dakikada sona ermiştir (25).

Fei Z. ve ark. regorafenibin sıçan plazmasında tayini için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Örnek hazırlamada asetonitril ile proteinler çöktürülmüş ve kromatografik ayrılma C18 kolonda 0,40 mL/ dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. Regorafenibin 100-1000 ng/mL konsantrasyon aralığında lineer olduğu bulunmuştur (26).

Esteve R.J. ve ark. regorafenib, dabrafenib ve pazopenibin plazmada tayini için misellar sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Plazma örnekleri miseller çözelti ile 5 kat seyreltildikten sonra direkt olarak enjekte edilmiştir. İlaçlar 18 dakikadan kısa bir sürede C18 kolonda 260 nm'de dedeksiyon yapılmış ve ayrılmıştır. Geliştirilen metod klinik çalışmalar için uygun bulunmuştur (27).

Fujita K. ve ark. regorafenib ve iki ana metabolitinin insan plazmasında kantitatif tayinini HPLC-UV metoduyla yapmışlardır. Plazmadan ekstraksiyon katı faz

ekstraksiyonu ile 100 µL plazma kullanılarak yapılmıştır. İç standart olarak sorafenib ve mobil faz olarak % 0,5 KH₂PO₄ ve asetonitril içeren çözelti kullanılmıştır. Analiz süresi 20 dakikadır. 260 nm de, 10-10000 ng/mL aralığında lineer kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Regorafenib için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2 ng/mL ve 10 ng/mL'dir. Her biri için %81'den yüksek geri kazanım sağlanmıştır (28).

2.1.3.2. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Albayrak M. regorafenibin saf madde ve tablette analizi için bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Bu yöntem 261 nm de, 0,5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermiştir ($r^2 = 0,999$). Gözlenebilme ve tayin sınırları sırasıyla 0,11 ve 0,29 µg/mL'dir (29)

2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi

HPLC olarak adlandırılan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) analitik ayırma teknikleri için en yaygın kullanılan cihazlardan birisidir.

1970'lerden günümüze kadar gelen HPLC tekniği çeşitli maddelerin saflaştırma, ayırma ve tayinlerinde vazgeçilmez cihaz olmuştur.

HPLC'nin Kısımları;

Hareketli faz rezervuarı: Hareketli faz içeriği cam çözücü kaplarında tutulur. HPLC'de mobil faz genellikle bir veya daha fazla çözücü karışımlarından oluşan polar veya apolar çözücü sistemleridir. Kullanılan çözücü sistemine ve sabit faza bağlı olarak normal faz veya ters faz HPLC olarak adlandırılırlar.

Pompa: Hareketli fazı çözücü rezervuarından yüksek basınçla çeker ve sistemin kolon ve dedektörüne ulaşmasını sağlar.

Enjektör: Örnekler HPLC'ye enjeksiyon ünitesinden enjekte edilir. Enjektör manuel enjeksiyon ya da autosampler denilen otomatik enjeksiyon sistemi olabilir.

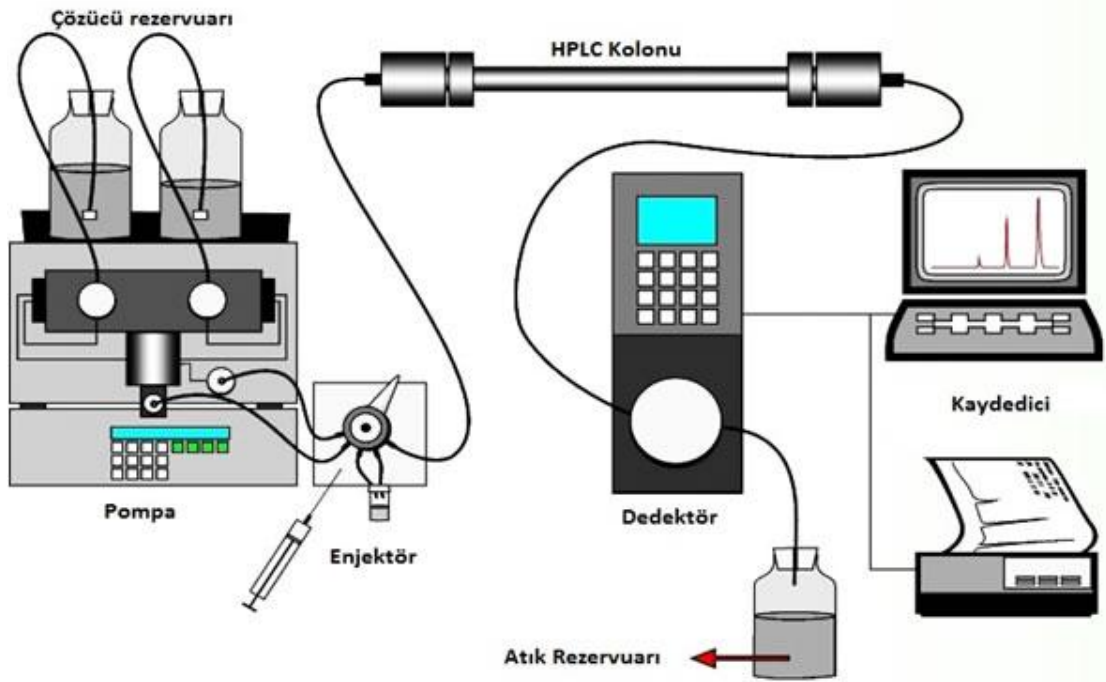
Kolon: Kolonlar genellikle parlak paslanmaz çelikten imal edilmiş olup maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Farklı analitik amaçlara göre, silika dolgu maddeleri C8, C18 gibi fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek elde edilen pek çok kolon çeşidi bulunmaktadır.

Dedektörler: Kolondan elue olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlar. Günümüzde kullanılan dedektör çeşitleri Bölüm 2.2.1’de verilmiştir.

Veri toplama cihazları: Dedektörden gelen sinyaller, kromatografik verilerin işlenmesi, depolanması ve tekrar işlenebilmesi özelliklerine sahip olan grafik kaydediciler olarak bilgisayarlar kullanılır (30).

2.2.1. HPLC Dedektörleri

1. UV, VIS ve PDA Dedektörleri
2. Kırılma İndisi Dedektörü
3. Kütle Spektrometresi Dedektörü
4. Fluoresans Dedektörü
5. İletkenlik Dedektörü
6. Elektrokimyasal Dedektör
7. Çok Açılı Işık Saçılma Dedektörü
8. Evaporatif Işık Saçılma Dedektörü
9. Kemilüminesans Dedektörü
10. Optik Rotasyon Dedektörü (31)



Şekil 2-3: HPLC Cihazının Kısımları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 2013-2019 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki gibidir.

Regorafenib¹

Nilotinib²

Metanol³

Asetonitril³

Ortofosforik asit (% 85 ağı/ağı) (Analitik saflıkta)³

Glasiyal asetik asit (Analitik saflıkta)³

Etil asetat³

Ultra saf su (HPLC saflığında)

İzofluran⁴

Propilen glikol³

1 Bayer AG

2 Novartis Pharma AG

3 Merck

4 Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler San. Ve Tic. A.Ş.

3.1.2. Çözeltiler

1. Regorafenib Çözeltileri

Stok çözelti I:

5,20 mg regorafenib (5 mg regorafenib baza eşdeğer) tam olarak tartıldıktan sonra 10 mL'lik bir balonjojede metanol ile çözündürüldü ve hacmine tamamlandı (0,5 mg/mL, Stok I).

Stok çözelti II:

Stok I çözeltisinden uygun miktarda alınıp %80'lik MeOH - su ile seyreltilmesi sonucu 1 µg/mL regorafenib çözeltisi hazırlandı. Analiz koşullarının belirlenmesinde ve ölçü eğrilerinin hazırlanmasında 1 µg/mL standart regorafenib çözeltisi kullanıldı.

2. Nilotinib Çözeltisi

Ölçü eğrilerinin hazırlanması amacıyla iç standart olarak 0,5 mg/mL nilotinib stok çözeltisi metanolde hazırlandı ve 1 µg/mL'ye mobil faz ile seyreltilti. Sulu çözelti ve plazma örneklerine konsantrasyonu 200 ng/mL olacak şekilde bu çözeltiden ilave edildi.

3.2. Aletler ve Gereçler

1. Kısımları aşağıda verilen Thermo Separation Products (San Jose, CA) HPLC sistemi kullanıldı.
 - Sistem Kontrol Ünitesi (Thermo SN 4000)
 - Pompa (Thermo P 4000)
 - UV Dedektör (Thermo UV-6000 LP)
 - Otomatik örnekleyici (Thermo AS 3000)
 - Software (ChromQuest 5.0)
 - C18 Analitik Kolon (Waters Symmetry, 5 µm, 250 x 4,6 mm)
 - C18 Analitik Kolon (Sepax GP, 5 µm, 250 x 4,6 mm)
2. Ultra saf su cihazı (Purelab Option)
3. Girdap karıştırıcı (Tetra)
4. Santrifüj (VWR Compact Star CS4)

5. Terazı (Denver Instrument)
6. Otomatik pipetler (Eppendorf 100-1000 μ L ve 10-100 μ L)
7. Balonjojeler (Isolab 5 ve 10 mL)
8. Reaksiyon tüpleri (Vıdalı, kapaklı, 12 mL'lik)
9. Cam Vialler (DAC Chromatography Glass&Accessories)
10. EDTA'lı tüp (Kapaklı 10 mL'lik)
11. Kapaklı Eppendorf tüp (2mL'lik)
12. Pastör pipetler
13. Katı Faz Ekstraksiyonu Manifoldu
14. Vakum Pompası (Gast Manufacturing)
15. C18 SPE Kartuş (Chromabond octadecyl-modified silica 500 mg/3mL)
16. HLB SPE Kartuş (Waters Oasis HLB 30 mg/3 mL)
17. Su Banyosu (Termal Laboratuvar Aletleri)

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

3.3.1. Kolon ve Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Yapılan literatür çalışmalarında regorafenib analizi için hemen hemen hepsinde C18 kolonun kullanıldığı görüldü ve bu çalışmada da iki farklı (Waters ve Sepax) C18 kolonda denemeler yapıldı. Analizlerde Sepax C18 kolon kullanıldı.

Regorafenibin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu seçimi için önce spektrofotometri yöntemiyle 200-800 nm aralığında tarama yapıldı. Daha sonra DAD-UV dedektörlü HPLC sisteminde mobil faz koşullarında çıkan piklerin UV dalga boyu taraması yapılarak en uygun dalga boyu belirlendi.

Sonuçlar Bölüm 4.1.1'de verilmiştir.

3.3.2. Hareketli Faz Seçimi

Hareketli faz seçimi için 80:20, 75:25, 70:30 (v/v) oranlarında metanol-su ve asetonitril su karışımları, 80:20 (v/v) oranında metanol - 20 mM fosforik asit karışımı ve 80:20 (v/v) oranında metanol - 1 M asetik asit karışımları ile denemeler yapıldı. Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi.

Sonuçlar Bölüm 4.1.2’de verilmiştir.

3.3.3. İç Standart Seçimi

Ön işlemlerden ve enjeksiyondan kaynaklanan hataları en aza indirmek amacıyla regorafenibe benzer molekül yapısında olan tirozin kinaz inhibitörü nilotinib hidroklorür monohidrat iç standart olarak kullanıldı.

Nilotinibin kimyasal formülü ve molekül yapısı Bölüm 4.1.3’te verilmiştir.

3.3.4. Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisi Hazırlanması

Stok çözeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 1 µg/mL konsantrasyondaki regorafenib çözeltisinden 25, 50, 75, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 ve 2500 µL hacimlerde 5 mL’lik balonjojeye alındı, 1000 µL iç standart çözeltisi eklendi. 1 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Çözeltinin 1 mL’si HPLC viallerine aktarıldı.

20 µL enjeksiyon yapılarak pik alanları hesaplandı. Elde edilen pik alanları iç standart pik alanına oranlanarak ölçü eğrisi hazırlandı.

Sonuçlar Bölüm 4.1.4’te verilmiştir.

3.3.5. Regorafenibin Plazmadan Ekstraksiyonu

Plazma proteinlerinden gelebilecek girişimleri en aza indirebilmek ve plazmadan geri kazanımı en yüksek elde edebilmek için plazma proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu yöntemleri denendi.

Çöktürme Yöntemi:

İlacın suda çözünürlüğü olmadığından dolayı plazma proteinleri için öncelikle metanol, asetonitil ve 1 M asetik asitli metanol ile çöktürme yöntemi denendi. Bunun için 100’er µL plazma örneğine 200 µL (1 µg/mL) regorafenib ve 200 µL (1 µg/mL) iç standart ilave edilerek 1 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Tüplerden ikisine yalnızca 500 µL metanol ve 500 µL asetonitril, diğerine ise 50 µL asetik asit ve 450 µL metanol ilave edildi ve toplam hacim 1 mL’ye tamamlandı. Tekrar girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Çöktürmeden kalan üstteki çözelti pastör pipeti yardımıyla dikkatlice alındı ve HPLC sistemine enjekte edildi.

Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu:

Bu denemede etil asetat ile sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi denendi. 100 µL plazma örneğine 200 µL (1 µg/mL) standart madde, 200 µL (1 µg/mL) iç standart ve 50 µL asetik asit eklendikten sonra karıştırıldı ve 1 mL etil asetat ilave edildi. 1 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Çöktürmeden kalan etil asetatlı çözelti azot gazı altında uçurulduktan sonra 1 mL mobil fazda çözüldü ve HPLC sistemine verildi.

Katı Faz Ekstraksiyonu:

Chromabond C18 ve Oasis HLB (Hidrofilik-Lipofilik Denge) kartuş kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yöntemleri denendi. Kartuşlardan her birinden önce 3 mL metanol ve 3 mL deiyonize su geçirilerek şartlandırıldı. Daha sonra 200 µL regorafenib ve 200 µL iç standart madde içeren 100 µL sıçan plazması kartuştan geçirildi. Kartuşlar %5 metanol içeren 1 ml deiyonize su ile yıkandı. 2 dakika kurutulduktan sonra kirli çözelti içeren tüpler atıldı. Regorafenib ve iç standart çözeltisi 2 kez 1 mL metanol ile elue edilerek temiz cam tüplere alındı. Bu işlemler bir vakum pompası ve kartuştan geçirilen sıvıların toplandığı cam tüplerin konulduğu bir cam kavanoz içinde gerçekleştirildi. Metanollü çözeltiler azot gazı altında uçurulduktan sonra 1 mL mobil fazda çözüldü ve HPLC sistemine verildi.

Metanol ile protein çöktürme yöntemiyle en yüksek geri kazanım elde edildiğinden çalışmaya çöktürme yöntemiyle devam edildi.

Tüm denemelerin sonuçları 4.1.5'te verilmiştir.

3.3.6. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması

-20°C'den alınıp su banyosunda 30°C'de çözdürülen sıçan plazmaları ilk önce santrifüjlenerek kirlilikleri uzaklaştırıldı. Daha sonra 100 µL plazma üzerine regorafenibin metanoldeki 1 µg/mL çözeltisinden 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 µL hacimlerde ilave edildi ve 1 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı. 200 µL (1 µg/mL) iç standart çözeltisi eklendi. Tekrar 1 dakika girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Son hacim 1 mL olacak şekilde metanol çözeltisi ile plazma proteinleri çöktürüldü. 1 dakika daha girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Çöktürmeden kalan çözelti pastör pipeti yardımıyla dikkatlice viallere alındı ve

HPLC cihazına 20 µL enjeksiyon yapılarak pik alanları hesaplandı. Aynı koşullarda boş deney yapıldı. Elde edilen pik alanları iç standart pik alanına oranlandı ve çıkan değerler konsantrasyonlara karşı işaretlenerek ölçü eğrisi hazırlandı.

Sonuçlar Bölüm 4.1.6'da verilmiştir.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansında (ICH, *International Conference Harmonization*) belirlenen parametreler incelendi (32).

3.4.1. Seçicilik

Geliştirdiğimiz yöntemin seçiciliğini tayin etmek amacıyla, sulu çözelti ve plazmadaki çalışmalar için ön denemeler yapıldı. Hareketli fazdan gelebilecek girişim olup olmadığı incelendi.

Kromatogramlar bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

3.4.2. Doğrusallık

Regorafenib içeren sulu çözelti ve plazma örneklerinin doğrusallığını belirlemek için sulu çözeltide Bölüm 3.3.4'de anlatıldığı gibi, plazmada Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi 5-500 ng/mL aralığında 10 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Regorafenib pik alanları iç standart pik alanlarına oranlandı ve konsantrasyona karşı ölçü eğrileri çizilerek elde edilen değerler Bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

3.4.3. Doğruluk, Kesinlik ve Geri Kazanım

Üç farklı konsantrasyonda (5, 200, 500 ng/mL) regorafenib çözeltileri alındı ve bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 2 hafta içinde 5 farklı günde (günler arası) yapıldı. Her konsantrasyon için analizler en az 5 kez tekrarlandı. Sonuçlar ölçü eğrisi denkleminde yararlanarak konsantrasyon, ortalama, SD ve %RSD değerleri hesaplandı.

Regorafenibin plazmadan geri kazanım oranının saptanması için, plazmada elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimi, sulu çözeltide elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimine oranlanarak hesaplama yapıldı.

Sonuçlar Bölüm 4.2.3'te verilmiştir.

3.4.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD), Tayin Sınırı (LOQ))

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır (32).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SD}/a$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/a$$

SD: Ölçü eğrisindeki kesim noktalarının standart sapması

a: Ölçü eğrilerinin eğimlerinin ortalaması

Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.4’de verilmiştir.

3.4.5. Sağlamlık

Geliştirilen yöntemin sağlamlığını test etmek amacıyla yöntemin akış hızında ($\pm 0,1$ mL) ve kullanılan dalga boyunda (± 2 nm) küçük değişiklikler yapılarak pik alanları oranlarındaki değişim incelenmiştir. Ayrıca analizler oda sıcaklığında gerçekleşmiş olup, olası sıcaklık değişimlerinde önemli bir farklılık görülmemiştir.

Sonuçlar Bölüm 4.2.5’te verilmiştir.

3.4.6. Stabilité

Regorafenibin sulu çözeltide stabilitesinin tayini için 15 ve 400 ng/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda $+4^{\circ}\text{C}$ ’de karanlıkta 6, 12, 24, 48 ve 72 saat bekletilerek çalışmalar yapılmıştır.

Plazmada stabilitesi için ise oda sıcaklığında ve $+4^{\circ}\text{C}$ ’de karanlıkta 6 saat, -20°C ’de 14 gün ve 3 kez dondurma çözündürme işleminden sonra analiz edilmiştir.

Sonuçlar Bölüm 4.2.6’da verilmiştir.

3.5. Plazmada Regorafenib Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması

Deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı’ndan temin edilmiştir. Deneyler İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 28.12.2015 tarihli, 2015/102 no.lu Etik Kurul kararına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Geliştirdiğimiz yöntemin pre-klinik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla, 10 tane Sprague Dawley türü 260-340 g ağırlığa sahip 14 haftalık erkek sıçanlara propilen glikol - su (50:50, v/v) karışımında çözünmüş 5 mg/kg doz regorafenibin gavaj yoluyla

uygulanmasını takiben 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde orbital venden yaklaşık 0,6 mL kan örnekleri toplandı. Örnekleri toplama öncesinde sıçanlara izofluran ile hafif anestezi uygulandı. Toplanan kan örnekleri 4000 rpm de 10 dakika santrifüjlendi ve plazmaları ayrıldı. Örnekler analiz edilene kadar -20°C’de buzdolabında saklandı. Analizleri Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı gibi yapıldı.

Sıçan plazmasında 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48. saatlerdeki regorafenib konsantrasyonları katkılı plazma için hazırlanan ölçü eğrisinin regresyon denkleminde hesaplandı. Plazma konsantrasyon-zaman grafiği elde edilerek bu eğri yardımıyla farmakokinetik parametreleri; plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan AUC, en yüksek plazma konsantrasyonu C_{max} , en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşma zamanı t_{max} ve eliminasyon yarılanma ömrü $t_{1/2}$ hesaplandı. Eğri altında kalan alan AUC_{0-48} lineer trapezoidal yöntem (yamuklar yöntemi) kullanılarak hesaplandı. C_{max} ve t_{max} değerleri eğrideki maksimum noktalardan tespit edildi.

Sonuçlar Bölüm 4.3’te verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar

4.1.1. Kolon ve Dedektör Dalga Boyu Seçimi

Analizler için Sepax marka C18 kolon kullanıldı.

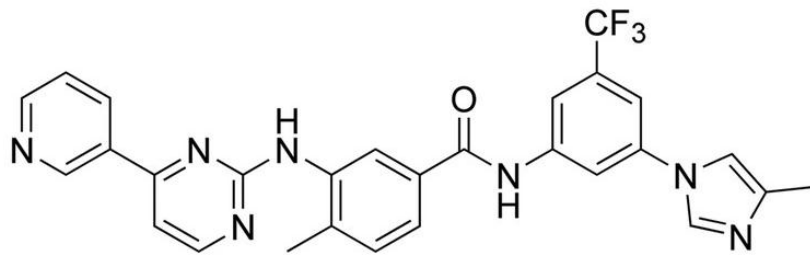
Regorafenibin metanol ve %80'lik metanol çözeltilerinde 200-800 nm dalga boyu aralığında spektrumları alındı ve maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunun 260 nm olduğu görüldü. Ayrıca DAD-UV dedektörlü HPLC sisteminde maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyunu tam olarak belirlemek için analiz koşullarında 260 nm ve buna yakın dalga boyları tarandı ve bütün ölçümlerde 258, 260 ve 262 nm dalga boyları kullanıldı. Fakat tayinlerde 258 nm'deki veriler esas alındı.

4.1.2. Hareketli Faz Seçimi

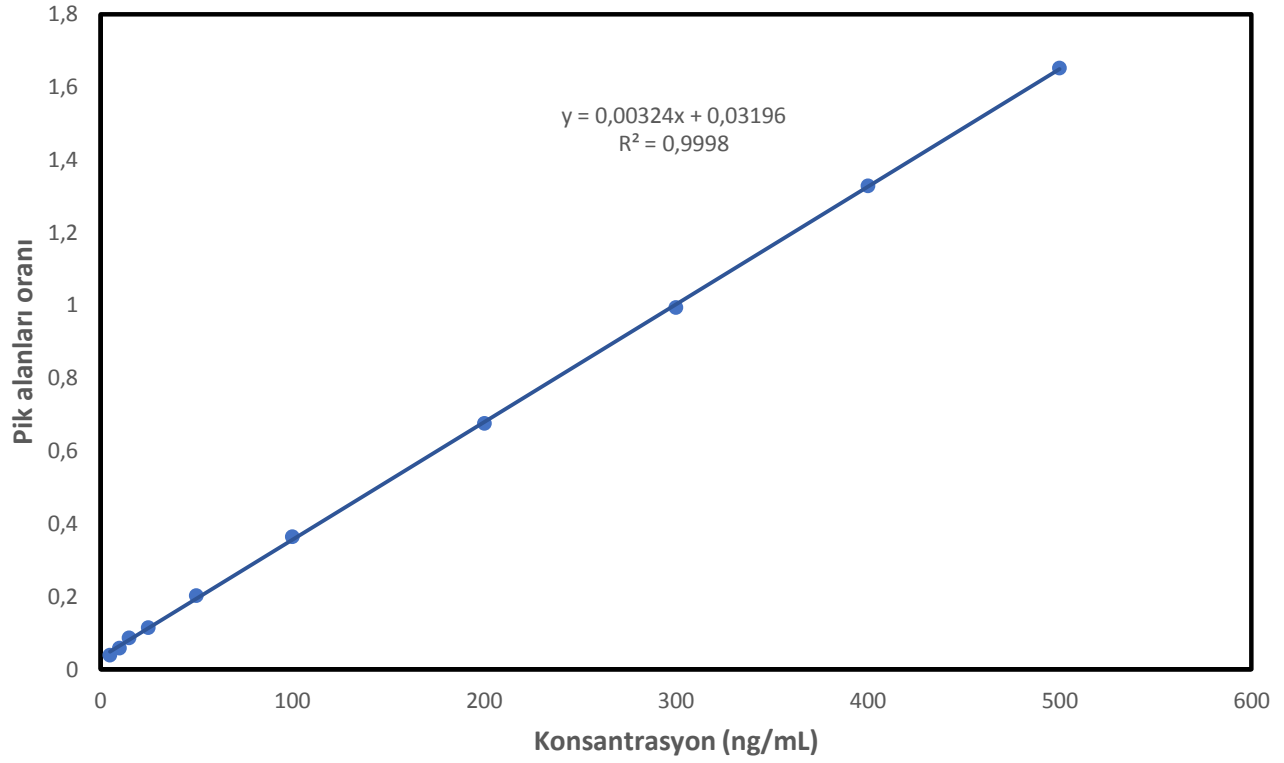
Hareketli faz denemelerinde öncelikle metanol-su ve asetonitril-su karışımları denenerek metanolde pik şiddeti ve ayrılma kapasitesi daha iyi olduğu gözlemlendi. Metanol- su karışımına asetik asit ve fosforik asit ilave edilerek pik alanları oranları kıyaslandı. Yöntem için en uygun hareketli faz 80:20 (v/v) metanol:su olarak belirlendi. 1 mL/dk akış hızında çalışıldı.

4.1.3. İç Standart Seçimi

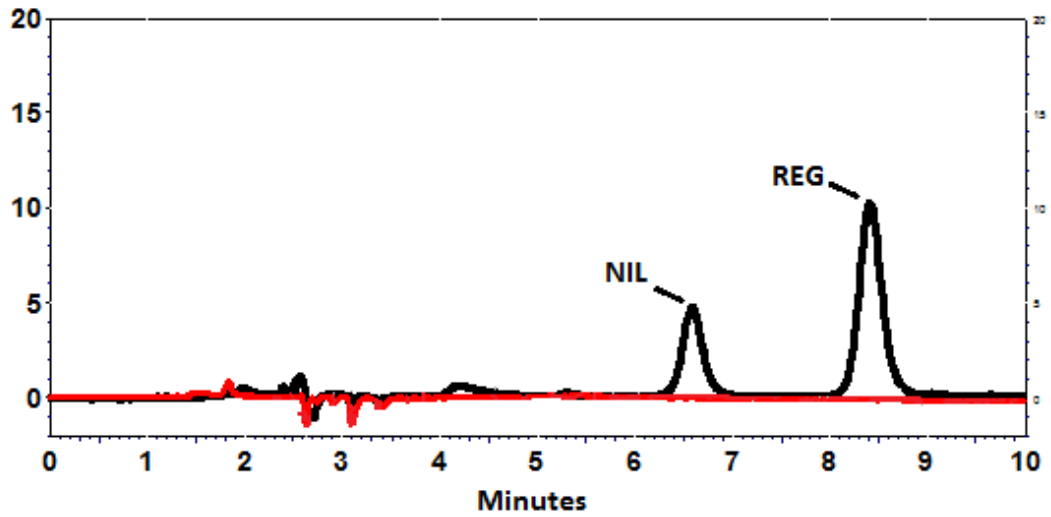
Regorafenibe benzer moleküler yapıya sahip olan tirozin kinaz inhibitörü nilotinib hidroklorür monohidrat iç standart olarak uygun bulundu. Nilotinibin IUPAC'a göre kimyasal adı 4-metil-N-[3-(4-metilimidazol-1-yl)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-piridin-3-yl)pirimidin-2-yl]amino]benzamid'dir.



Şekil 4-1: Nilotinibin kimyasal formülü



Şekil 4-2: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4-3: Boş sulu çözelti ve sulu çözeltide regorafenib (500 ng/mL) ve IS (200 ng/mL) örneklerine ait kromatogramlar

4.1.5. Regorafenibin Plazmadan Ekstraksiyonu

Bölüm 3.3.5'te anlatıldığı gibi çeşitli yöntemlerle plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve regorafenibin plazmadan ekstre edilmesi için çalışıldı ve en yüksek geri kazanım metanol ile çöktürme yöntemiyle elde edildi. Çöktürme yöntemi aynı zamanda diğer yöntemlere göre zaman, kolaylık ve maliyet açısından daha avantajlıdır.

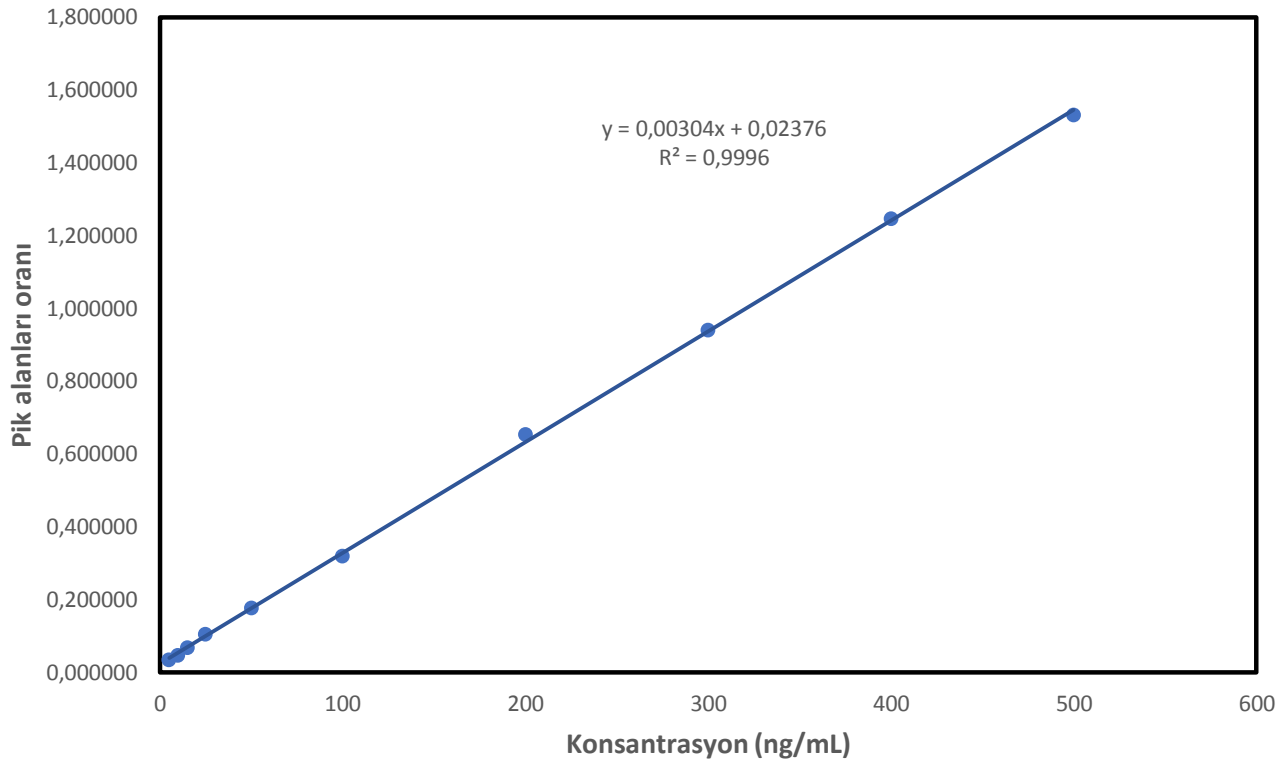
Tablo 4-3: Regorafenibin plazmadan ekstraksiyonu denemelerinde elde edilen pik alanı oranları

Kullanılan Yöntem	Metanol ile çöktürme	Asetonitril ile çöktürme	1 M asetik asitli Metanol ile çöktürme	%5 asetik asitli Metanol ile sıvı sıvı ekstraksiyon	C18 kartuş ile Katı Faz Ekstraksiyonu	HLB kartuş ile Katı Faz Ekstraksiyonu
Ekstraksiyon çözücüsü	Metanol	Asetonitril	Metanol	Etil asetat	Metanol	Metanol
Pik alanı oranları	0,654212	0,601457	0,512474	0,425785	0,305855	0,326156

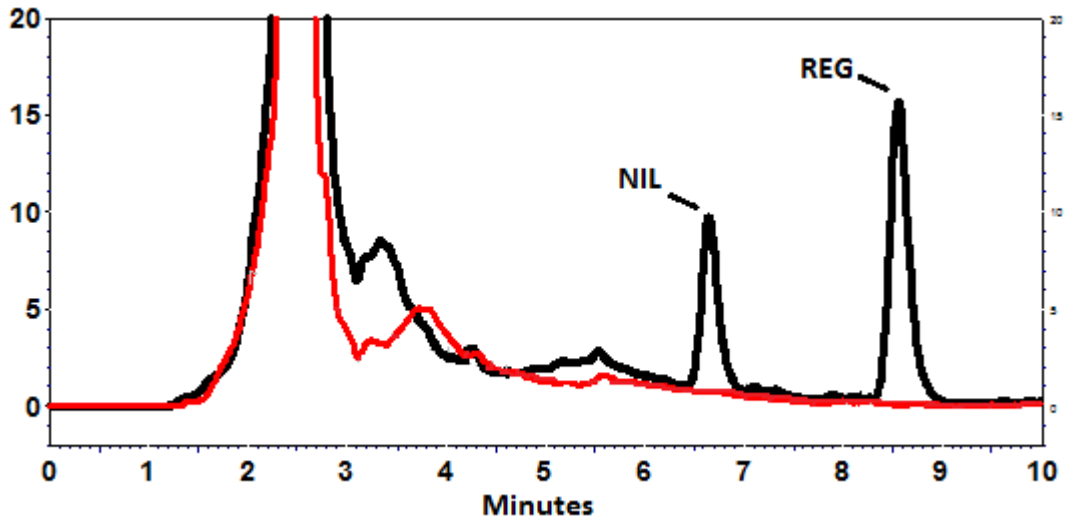
4.1.6. Plazmada Ölçü Eğrisi Hazırlanması

Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 ng/mL konsantrasyonlarında beş kez çalışıldı. Her bir konsantrasyon için elde edilen pik alanları iç standardın pik alanına oranlandı. Ölçü eğrisi, konsantrasyona karşı iç standarda oranlanmış pik alanları grafiğe dökülerek elde edildi.

Pik alanları ortalaması ($\bar{A}$), standart sapma (SD), ve bağıl standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Tablo 4.5'te ise ölçü eğrisinin regresyon analizinden elde edilen parametreler verilmiştir. Şekil 4.4'te ise regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi bulunmaktadır. Şekil 4.5'te Boş plazma, plazmada regorafenib (500 ng/mL) ve IS (200 ng/mL) örneklerine ait kromatogramlar görülmektedir.



Şekil 4-4: Regorafenibin 5-500 ng/mL konsantrasyon aralığında plazmada hazırlanan ölçü eğrisi

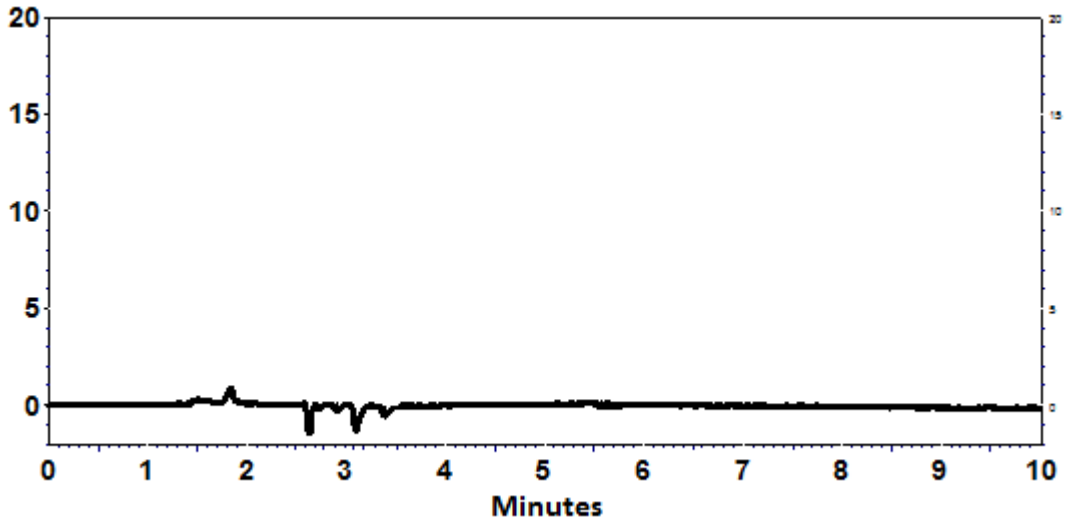


Şekil 4-5: Boş plazma, plazmada regorafenib (500 ng/mL) ve IS (200 ng/mL) örneklerine ait kromatogramlar

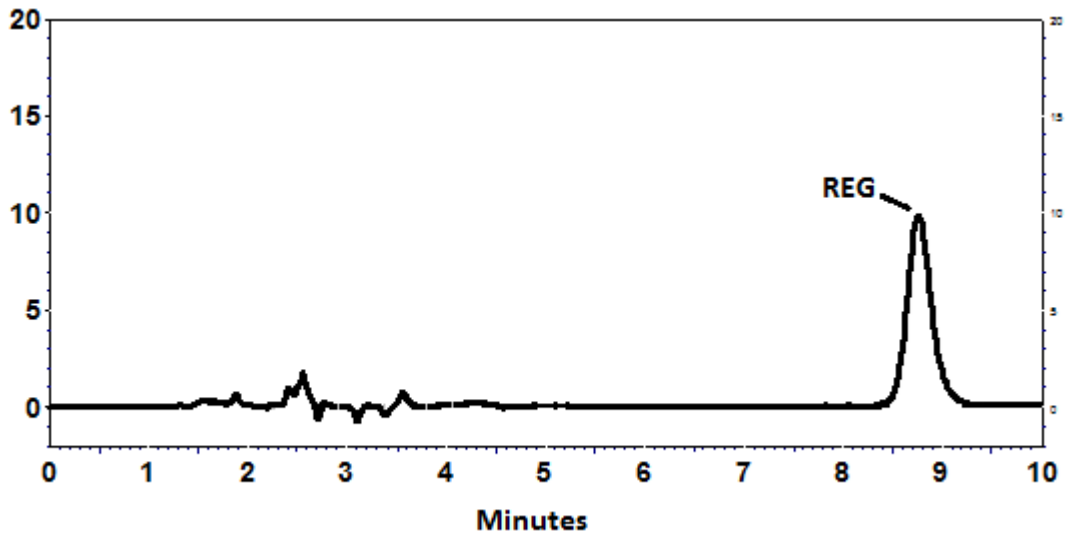
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

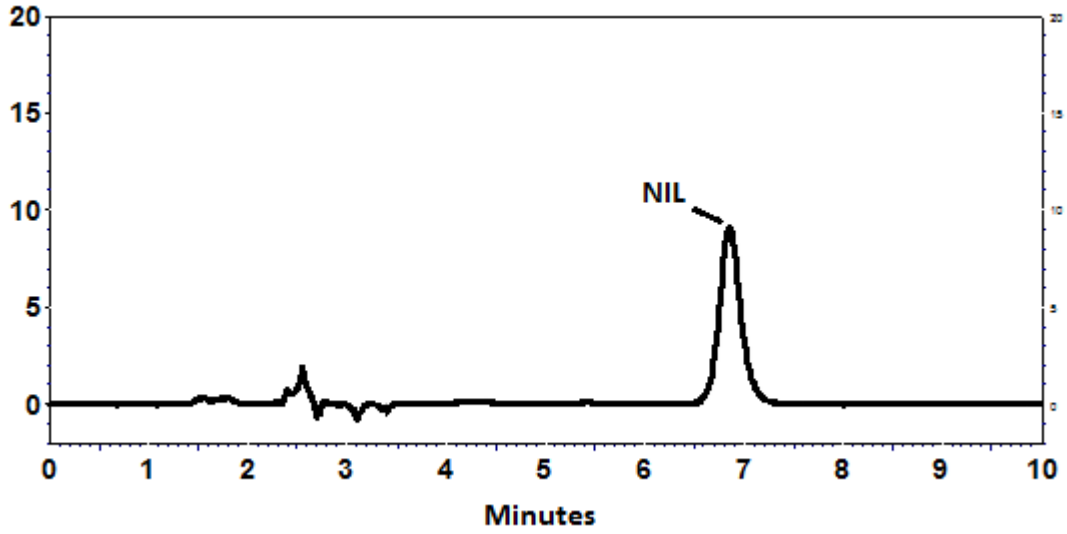
Şekil 4.6' da görüldüğü gibi mobil fazdan gelen herhangi bir girişim yoktur. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de regorafenib ve nilotinib iç standardın birbiriyle girişim yapmadığı görülmektedir. Şekil 4.9'da plazmadan gelen kirliliklerin regorafenib ve iç standardın alıkonma zamanlarında pik vermediği görülür ki bunlar yöntemimizin seçici olduğunu ispatlar.



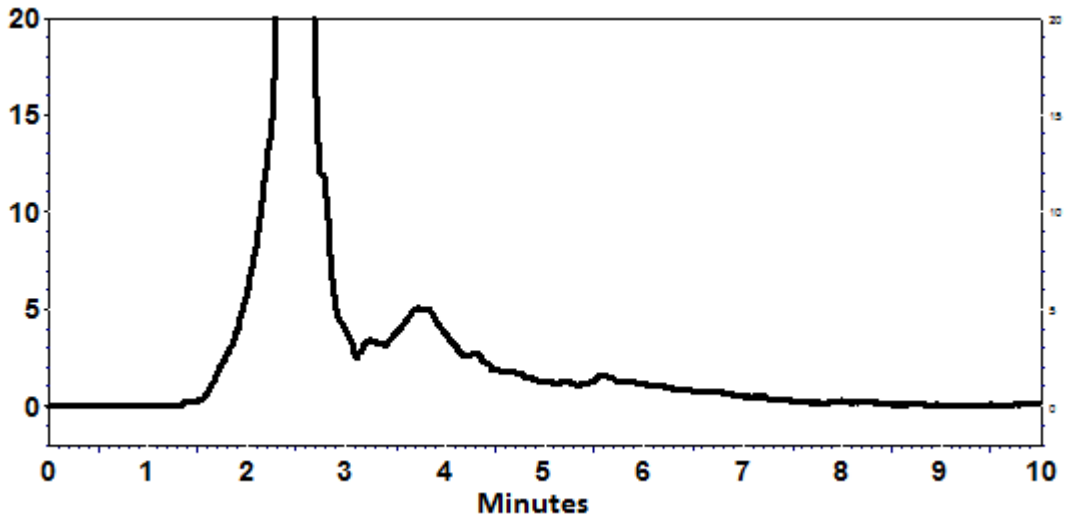
Şekil 4-6: Mobil faz kromatogramı (%80 Metanol-su)



Şekil 4-7: Sadece regorafenibe ait kromatogram (500 ng/mL)



Şekil 4-8: Sadece nilotinibe ait kromatogram (400 ng/mL)



Şekil 4-9: Boş sıçan plazmasına ait kromatogram

4.2.2. Doğrusallık

Sulu çözeltide (Tablo 4.1) ve plazmada (Tablo 4.3) hazırlanan ölçü eğrilerinin regresyon analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r^2) değerleri sırasıyla 0,9998 ve 0,9996 olarak bulundu. Bu değerler ölçü eğrilerinin oldukça doğrusal olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Geri Kazanım

Üç farklı konsantrasyonda (5, 200, 500 ng/mL) regorafenib içeren çözeltilerle Bölüm 3.3.6'da anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içerisinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma (%RSD) değerleri % 0,20-1,98 arasında hesaplandı (Tablo 4.6).

Farklı günler içerisinde yapılan analizler sonucunda elde edilen %RSD değerleri ise % 0,94-2,06 arasında hesaplandı (Tablo 4.7).

Regorafenibin plazmada geri kazanım oranının bulunması için Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı gibi, plazmada elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimi ($A = 0,00304 C + 0,02376$) sulu çözeltiden elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimine ($A = 0,00324 C + 0,03196$) oranlandığında geri kazanım oranı % 93,82 olarak hesaplandı.

Tablo 4-6 : Aynı gün içerisinde yapılan regorafenib analizlerinin tekrarlanabilirliği

Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	5,0	200,0	500,0
Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	4,88 5,01 4,92 4,81 5,05	200,91 199,71 201,46 199,23 201,74	500,47 499,98 502,23 499,73 501,20
Ortalama	4,94	200,61	500,73
SD	0,09	1,09	3,65
RSD (%)	1,98	0,54	0,20
Geri Kazanım (%)	98,72	100,31	100,15

Tablo 4-7 : Farklı günler içerisinde yapılan regorafenib analizlerinin tekrarlanabilirliği

Alınan Konsantrasyon (ng/mL)	5,0	200,0	500,0
Bulunan Konsantrasyon (ng/mL)	5,25	206,13	508,98
	5,49	204,31	513,56
	5,38	206,19	502,83
	5,39	199,09	509,73
	5,54	200,95	502,48
Ortalama	5,41	203,34	507,52
SD	0,11	3,18	4,76
RSD (%)	2,06	1,56	0,94
Geri Kazanım (%)	108,29	101,67	101,50

4.2.4. Duyarlılık (Gözlenebilme Sınırı (LOD), Tayin Sınırı (LOQ))

Gözlenebilme ve tayin sınırları Bölüm 3.4.4’de verilen formüller yardımıyla sulu çözeltide ve plazmada hesaplanmıştır. Sulu çözeltide LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,23 ng/mL ve 3,73 ng/mL; plazmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,55 ng/mL ve 4,70 ng/mL bulunmuştur.

4.2.5. Sağlamlık

Akış hızı değişimi sonuçları Tablo 4.8’de, dalga boyu değişimi sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir. Sonuçlarda görüldüğü gibi akış hızı ve dalga boyunda yapılan ufak değişiklikler sonucunda önemli bir fark olmadığından yöntemimizin sağlam olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma boyunca oda sıcaklığında gerçekleşen analizleri incelediğimizde kolon sıcaklığından etkilenmediği de gözlenmiştir.

Tablo 4-8: Akış hızı değişimi sonuçları

Akış Hızı (mL/dk)	Pik Alanı Oranı	NIL Retansiyon Zamanı	REG Retansiyon Zamanı
0,9	1,630777	7,650	9,795
1,0	1,602644	6,910	8,848
1,1	1,630435	6,288	8,043

Tablo 4-9: Dalga boyu değişimi sonuçları

Dalga Boyu (nm)	Pik Alanı Oranı
256	1,629294
258	1,635145
260	1,632438

4.2.6. Stabilite

Regorafenibin sulu çözeltide stabilitesinin tayini için +4°C’de karanlıkta 6, 12, 24, 48 ve 72 saat bekletilerek yapılan çalışmalar sonucunda, +4 °C’de karanlıkta 72 saat dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 4.10 ve Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4-10: +4°C’de karanlıkta bekletilen 15 ng/mL regorafenibin stabilitesi

15 ng/mL REG için Ortam Koşulları		Bulunan Konsantrasyon (ng/mL) ± SD	Geri Kazanım (%)	%RSD
+4°C’de karanlıkta	Başlangıçta	14,98 ± 0,03	99,87	0,19
	6 saat sonra	14,86 ± 0,26	99,09	1,75
	12 saat sonra	14,71 ± 0,22	98,07	1,55
	24 saat sonra	14,64 ± 0,14	97,58	0,94
	48 saat sonra	14,38 ± 0,11	95,90	0,76
	72 saat sonra	14,32 ± 0,23	95,47	1,60

Tablo 4-11: +4°C’de karanlıkta bekletilen 400 ng/mL regorafenibin stabilitesi

400 ng/mL REG için Ortam Koşulları		Bulunan Konsantrasyon (ng/mL) ± SD	Geri Kazanım (%)	%RSD
+4°C’de karanlıkta	Başlangıçta	398,55 ± 4,95	99,64	1,24
	6 saat sonra	394,30 ± 0,91	98,57	0,23
	12 saat sonra	391,59 ± 4,36	97,89	1,11

	24 saat sonra	388,33 ± 5,43	97,08	1,39
	48 saat sonra	384,94 ± 6,00	96,23	1,55
	72 saat sonra	383,92 ± 2,84	95,98	0,74

Plazma örneklerinde regorafenibin stabilitesini belirlemek için oda sıcaklığında ve +4°C’de karanlıkta 6 saat, -20 °C’de 14 gün ve 3 kez dondurma çözündürme işleminden sonra analizler yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4-12: Plazma örneklerinde regorafenibin stabilitesi

400 ng/mL REG için Ortam Koşulları	Bulunan Konsantrasyon (ng/mL) ± SD	Geri Kazanım (%)	%RSD
Oda sıcaklığında 6 saat	395,29 ± 0,68	99,82	0,69
4°C’de karanlıkta 6 saat	397,41 ± 2,49	99,35	0,63
-20 °C’de 14 gün	390,35 ± 0,17	97,59	0,17
3 kez dondurma çözündürme işleminden sonra	394,05 ± 1,61	98,51	0,41

4.3. Plazmada Regorafenib Miktar Tayini ve Farmakokinetik Uygulaması

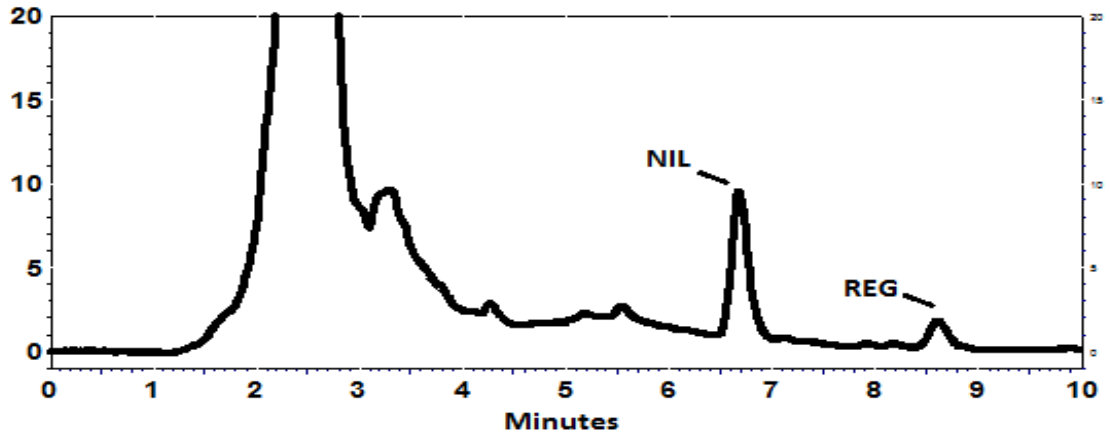
10 adet Sprague Dawley türü erkek sıçanlara 5 mg/kg doz regorafenibin gavaj yoluyla uygulanmasını takiben Bölüm 3.5’te belirtilen zaman aralıklarında alınan plazma örnekleri Bölüm 4.1.6’da anlatıldığı gibi analiz edilerek konsantrasyonları plazmada regorafenib ölçü eğrisine ait doğru denklemden hesaplandı (Tablo 4.13). Plazmada regorafenib konsantrasyonunun zamana karşı değişimini gösteren grafik çizildi (Şekil 4.11). Bu grafikten yararlanarak hesaplanan parametreler Tablo 4.14’te verildiği üzere; C_{max} : 364,41 ng/mL, t_{max} : 4 saat, $t_{1/2}$: 11,8 saat, $AUC_{(0-48)}$: 5654,39 ng.saat/mL ve $AUC_{(0-\infty)}$: 6015,62 ng.saat/mL olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-13: Plazmada regorafenib konsantrasyonunun zamana karşı değişimi

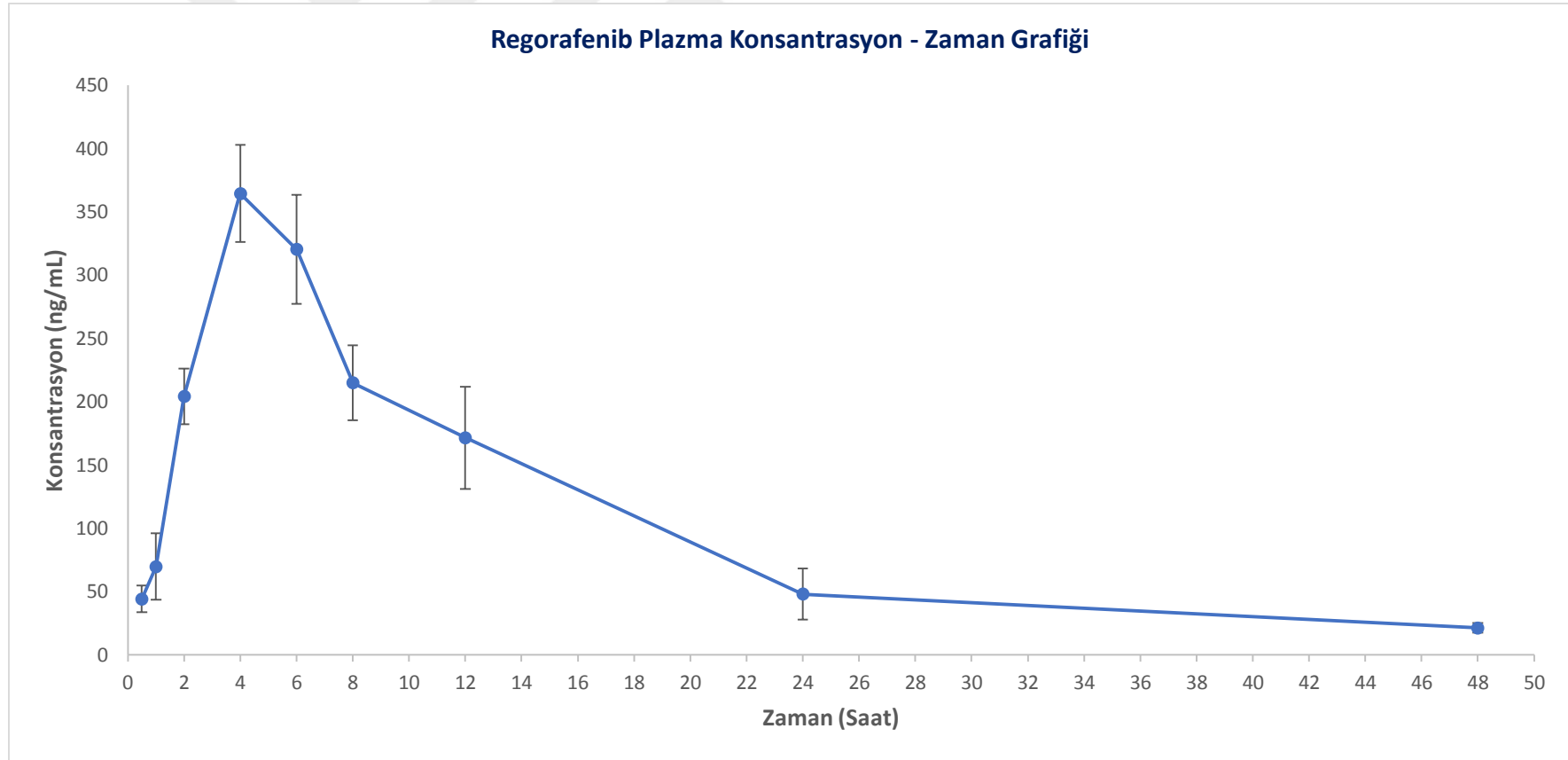
Zaman (saat)	Plazmada REG konsantrasyonu (ng/mL)	SD	SEM*
0,5	43,99	10,54	4,72
1	69,68	26,12	11,68
2	204,08	22,06	9,87
4	364,41	38,36	17,16
6	320,14	43,13	19,29
8	214,80	29,54	13,21
12	171,37	40,27	18,01
24	47,96	20,05	8,97
48	21,17	3,72	1,66
*SEM: Ortalamanın standart hatası= $SD/\sqrt{n}$			

Tablo 4-14: 5 mg/kg doz regorafenib uygulanmasından sonra hesaplanan farmakokinetik parametreler

C_{max} (ng/mL)	364,41
t_{max} (saat)	4
t_{1/2} (saat)	11,8
AUC₍₀₋₄₈₎ (ng.saate/mL)	5654,39
AUC_(0-∞) (ng.saate/mL)	6015,62



Şekil 4-10: Sıçan plazmasında regorafenib ve iç standarda ait kromatogram



Şekil 4-11: Plazmada regorafenib konsantrasyonunun zamana karşı değışimi

5. TARTIŞMA

Kanser, vücudumuzun çeşitli bölgelerinde, organ veya dokulardaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü huylu tümörlere denir (33). ABD’de FDA tarafından metastatik kolorektal kanser, gastrointestinal stromal tümör ve hepatoselüler kanser tedavisi için onaylanan regorafenib, bir oral multikinaz inhibitörü olup, etkisini vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR-1-2 ve 3), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR alfa-beta ve TIE2) ve onkojenik kinazlar c-KIT, REF ve BRAF gibi anjiyogenezi ve tümör büyümesini teşvik eden tirozin kinazların aktivitesini inhibe ederek gösterir (5).

Regorafenib kanser tedavisinde 2012 yılından beri kullanılan yeni bir ilaç etken maddesi olduğundan, yaptığımız literatür araştırmalarında ilacın biyolojik sıvılardaki miktar tayini için hali hazırda az sayıda geliştirilmiş yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu, her kalite kontrol laboratuvarında bulunmayan yüksek maliyetli kütle spektrometresi dedektörüne sahip HPLC yöntemleridir (14-27). Bildirilen yöntemlerden sadece biri HPLC-UV cihazında ve insan plazmasında gerçekleştirilmiştir (28). İlacın farmasötik preparatlarda tayini için ise bir adet spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir (29).

Bu çalışmada regorafenib ilaç maddesinin sıçan plazmasında tayini için yeni bir RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Aşağıdaki ön denemeler yapılarak HPLC analizi için en uygun koşullar denenmiş ve sıçan plazmasına uygulanmıştır:

Suda çözünürlüğü çok düşük olan regorafenibin çeşitli organik çözücülerde çözünürlüğü incelendi ve metanolde iyi çözündüğü görüldü. İlacın maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunun tespiti için uygun koşullarda spektrofotometre (200-800 nm) ve DAD-UV-HPLC yöntemleri ile test edildi ve analizler en yüksek absorbands gösterdiği 258 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

RP-HPLC sisteminde C18 Sepax kolon kullanıldı. En uygun hareketli faz sisteminin tespiti için metanol-su ve asetonitril-su çeşitli oranları denendi. Pik alanları ve retansiyon zamanları değerlendirildiğinde metanolde ayrılmanın daha iyi olduğu

bulundu. Bununla beraber, değişik oranlarda 20 mM fosforik asit ve 1 M asetik asit içeren su- metanol hareketli faz sistemlerinde de analizler yapıldı. Piki yüksekliği, genişliği, simetrisi ve retansiyon zamanları değerlendirildiğinde, tayinlerde en uygun mobil faz sistemi olarak 80:20 (v/v) metanol-su çözeltisi bulundu. HPLC elüsyonu 1 mL/dk izokratik akışda ve 10 dakikada gerçekleştirildi.

İç standart madde olarak olarak bir tirozin kinaz inhibitörü olan nilotinib kanser ilaç etken maddesi seçildi. Regorafenibe benzer molekül özelliklerine sahip olması nedeniyle retansiyon (alıkonma) zamanı da analiz süresine etki etmeyecek şekilde uygun bulundu.

Geliştirilen yöntemin sıçan plazmasına uygulanabilmesi için sağlıklı sıçanlardan alınan kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve analizler için -20°C’de saklandı. Katkılı plazma çalışmalarında bu plazmalar kullanıldı.

Plazma proteinlerinin çöktürülmesi ve regorafenibin plazmadan en yüksek verimle ekstraksiyonu için uygun yöntemler araştırıldı. ktrme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu yöntemleri denendi. Metanol ile çöktürme yöntemi ile en yüksek geri kazanım elde edildi. Bu yöntem katı faz ekstraksiyonu gibi ekstra maliyet gerektiren SPE kartuş, vakum pompası, vakum manifoldu gibi sarf malzemelere gerek duyulmadan ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi ekstra toksik çözücüler kullanılmadan tek aşamada, hızlı ve kolay bir şekilde uygulandı.

Koşulları belirlenen yntemimizle regorafenibin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığı sulu çözelti ve plazmada 5-500 ng/mL arasında bulundu.

Geliştirdiğimiz yöntemin validasyonu ICH Q2(R1)’e göre yapılmıştır. Buna göre öncelikle yöntemin seçiciliği araştırılmış, regorafenib ve i standardın piklerinin retansiyon zamanlarında mobil fazdan ve katkısız plazma örneklerinden kaynaklanan herhangi bir girişimin olmadığı saptandı.

Ölçü eğrilerinin regresyon analizleri sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı (r^2) değerleri sulu çözelti ve plazmada sırasıyla 0,9998 ve 0,9996 olarak bulundu. Bu değerler ölçü eğrilerinin oldukça doğrusal olduğunu göstermektedir.

Regorafenibin plazmadan geri kazanım oranının bulunması için plazmada elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimi ($A = 0,00304 C + 0,02376$) sulu çözeltiden elde edilen ölçü eğrisi denkleminin eğimine ($A = 0,00324 C + 0,03196$) oranlandı. Geri kazanım oranı % 93,82 olarak hesaplandı.

Yöntemin hassasiyetini belirleyen LOD ve LOQ değerleri sulu çözelti ve plazmaya ait ölçü eğrisindeki kesim noktalarının standart sapması ve ölçü eğrilerinin eğimlerinin ortalaması kullanılarak hesaplandı. Sulu çözeltide LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,23 ng/mL ve 3,73 ng/mL; plazmada LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,55 ng/mL ve 4,70 ng/mL bulundu.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla düşük (5 ng/mL), orta (200 ng/mL) ve yüksek (500 ng/mL) konsantrasyonlarda regorafenib içeren plazma örnekleri ile çalışıldı. Aynı gün içerisinde yapılan analizlere ait %RSD değerleri % 0,20-1,98 arasında hesaplandı. Farklı günler içerisinde yapılan analizler sonucunda elde edilen %RSD değerleri ise % 0,94-2,06 arasında hesaplandı. Yöntemin tekrarlanabilir olduğu görüldü.

Sağlamlığın tespiti için akış hızı ve dalga boyunda küçük değişiklikler yapılarak yöntemin bu değişikliklerden önemli derecede etkilenmediği görüldü.

Regorafenibin sulu çözelti ve plazmada stabilitesi için çeşitli koşullar incelendi. Sulu çözeltide +4°C’de karanlıkta 72 saat, plazmada -20°C’de 14 gün stabil olduğu belirlendi.

Geliştirilen yöntem pre-klinik olarak 10 adet sağlıklı Sprague Dawley türü erkek sıçana 5 mg/kg dozda uygulandı ve çeşitli zaman aralıklarında toplanan kan örneklerinin plazmaları ayrıldıktan sonra analiz edildi. Elde edilen pik alanları oranlarından plazmada regorafenib konsantrasyonları bulundu. Zamana karşı grafiğe dökülerek farmakokinetik parametreleri C_{max} : 364,41 ng/mL, t_{max} : 4 saat, $t_{1/2}$: 11,8 saat, $AUC_{(0-48)}$: 5654,39 ng.saat/mL ve $AUC_{(0-\infty)}$: 6015,62 ng.saat/mL olarak hesaplandı.

Bu çalışmada regorafenibin plazmada tayini için geliştirilen RP-HPLC yöntemi literatürde kayıtlı olan çalışmalarla kıyaslandığında hassasiyet ve doğrusal aralık (14-18,20,22-26,28,29), analiz süresi (25,28), kolay örnek hazırlama (20,23,28) bakımından üstünlük sağlamaktadır.

Özetle, bu çalışmada sıçan plazmasında regorafenib tayini için oldukça hassas, seçici, doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir bir HPLC yöntemi geliştirilmiş olup ilacın rutin analizlerinde, klinik laboratuvarlarında ve biyolojik sıvılarda ilaç takibinde kullanılabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kolorektal Kanser Nedir? Erişim 26.03.2019 <http://kolonkanseri.blogspot.com/p/kolorektal-kanser-nedir.html>
- [2] Kolorektal Kanser, Erişim 26.03.2019 <http://www.rocheilac.com.tr/home/faaliyet- alanlari/onkoloji---hematoloji/solid-kanserler/kolorektal-kanser.html>
- [3] Gastrointestinal Stromal Tümörlerde Tedavi Yaklaşımları, Şendur M.A.N, Yıldırım Özdemir N., Zengin N., *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology-Special Topics* 2014; **7(1)**:40-47.
- [4] Hepatosellüler Kanserde Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Klinik, Banzragch M., Özdoğan O.C. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology-Special Topics* 2014; **7(4)**:1-7.
- [5] RX Media Pharma 2019.
- [6] Regorafenib Monohydrate, Erişim: 28.03.2019 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/regorafenib_monohydrate
- [7] Product information for AusPAR Stivarga Regorafenib Bayer Australia Ltd PM-2012-02342-3-4 Date of Finalisation 7 February 2014. Erişim: 28.03.2019 <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-regorafenib-140207-pi.pdf>
- [8] Coated Pharmaceutical Composition Containing Regorafenib, Canadian Patent Application, CA2883767, 13.03.2014. <https://patents.google.com/patent/CA2883767A1> Erişim: 18.04.2019
- [9] Cayman Chemical Product Information of Regorafenib, <https://www.caymanchem.com/product/18498> Erişim: 18.04.2019
- [10] Regorafenib, Erişim: 28.03.2019 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB08896>
- [11] Regorafenib, Erişim: 28.03.2019 <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9342697.html>
- [12] Australian Public Assessment Report for Regorafenib Proprietary Product Name: Stivarga Sponsor: Bayer Australia Ltd. February 2014. Erişim: 28.03.2019 <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-regorafenib-140207.pdf>

- [13] Stivarga Side Effects Drug Center, Erişim 28.03.2019
<https://www.rxlist.com/stivarga-side-effects-drug-center.htm>
- [14] Erp N.P., Wit D., Guchelaar, H.J., Gelderblom, H., Hessing, T.J., Hartigh, J. A validated assay for the simultaneous quantification of six tyrosine kinase inhibitors and two active metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2013; **937**:33-43.
- [15] Hafner F.T., Werner D., Kaiser M. Determination of regorafenib (BAY 73-4506) and its major human metabolites BAY 75-7495 (M-2) and BAY 81-8752 (M-5) in human plasma by stable-isotope dilution liquid chromatography–tandem MS. *Bioanalysis* 2014; **6(14)**:1923–1937.
- [16] Weiping J.I., Qingwei Z., Lufeng H.U. Development of a simple LC-MS assay for determination of regorafenib in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Latin American Journal of Pharmacy* 2014; **33 (4)**: 607-612.
- [17] Luethi D., Durmus S., Schinkel A.H., Schellens H.M., Beijnen J.H., Sparidan R.W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the multikinase inhibitor regorafenib in plasma. *Biomedical Chromatography* 2014; **28**: 1366–1370.
- [18] Alam M.A., Al-Jenoobi F.I, Abdelgalil A.A., Al-Mohizea A.M Rapid UPLC tandem triple quadrupole mass spectrometry method for determination of regorafenib in plasma. *Current Analytical Chemistry* 2018; **14 (6)**: 634-640.
- [19] Fu Q., Chen M., Hu S., McElroy C.A., Mathijssen R.H., Sparreboom A., Baker S.D. Development and validation of an analytical method for regorafenib and its metabolites in mouse plasma. *Journal of Chromatography B* 2018; **1090**: 43-51.
- [20] Merienne C., Rousset M., Ducint D., Castaing,N., Titier K., Molimard M., Bouchet S. High throughput routine determination of 17 tyrosine kinase inhibitors by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018; **150**: 112–120.
- [21] Pang Y.Y., Tan Y.L., Ho H.K. Investigation of the effect of plasma albumin levels on regorafenib-induced hepatotoxicity using a validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* 2017; **1061–1062**: 220–224.
- [22] Cardoso E., Mercier T., Wagner A.D., Homicsko K., Michielin O., Ellefsen-Lavoie K. ve ark. Quantification of the next-generation oral anti-tumor drugs dabrafenib, trametinib, vemurafenib, cobimetinib, pazopanib, regorafenib and two metabolites in

- human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2018; **1083**: 124–136.
- [23] Herbrink M., Vries N., Rosing H., Huitema A. D. R., Nuijen B., Schellens J. H. M., Beijnen J. H. Development and validation of a liquid chromatography– tandem mass spectrometry analytical method for the therapeutic drug monitoring of eight novel anticancer drugs. *Biomedical Chromatography* 2018; **32**: 4147-4155.
- [24] Allard M., Khoudour N., Rousseau B., Joly C., Costentin C., Blanchet B. ve ark. Simultaneous analysis of regorafenib and sorafenib and three of their metabolites in human plasma using LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017; **142**:42–48.
- [25] Dyk M., Miners J.O., Kichenadasse G., McKinnon R.A., Rowland A. A novel approach for the simultaneous quantification of 18 small molecule kinase inhibitors in human plasma: A platform for optimised KI dosing. *Journal of Chromatography B* 2016; **1033–1034**:17–26.
- [26] Fei Z.L., Yang M.A., Shen Y.C., Wang Y.H., Qiu F., Lou J. Determination of novel multikinase inhibitor regorafenib by UPLC-MS/MS in rat plasma. *Latin American Journal Of Pharmacy* 2016; **35 (6)**: 1415-1419.
- [27] Romero J.E., Chiva, J.A., Peris-Vicente J., Ochoa-Aranda E. Development and validation of a micellar liquid chromatographic method to determine three antitumorals in plasma. *Bioanalysis* 2017; **9 (10)**: 799-812.
- [28] Fujita K., Miura M., Shibata H. Quantitative determination of regorafenib and its two major metabolites in human plasma with high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Biomedical Chromatography* 2016; **30**: 1611–1617.
- [29] Albayrak M. Development and validation of a new spectrophotometric method for the determination of regorafenib in pure and tablet dosage form. *Latin American Journal Of Pharmacy* 2018; **37(7)**: 1349-1353.
- [30] HPLC Nedir? Erişim: 19.04.2019 <https://www.tech-worm.com/hplc-yukse-performansli-sivi-kromatografisi-nedir/>
- [31] Detectors for HPLC, Erişim 23.04.2019 <https://www.shodex.com/en/kouza/f.html>
- [32] ICH Guidelines, Q2 (R2)/Q14, Analytical Procedure Development and Revision of Q2 (R1) Analytical Validation, 2018.

- [33] Kanser nedir? Erişim: 18.04.2019 <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri>



ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2015/ 102

28/12/2015

Sayın Prof. Dr. Zeynep AYDOĞMUŞ
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Karar No 2015/ 102

Başvuru : 04.12.2015

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Araştırma Görevlisi Ece Merve YILMAZ**'a ait "Regorafenibin plazmada tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	10
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	15 Ocak 2016/15 Ocak 2018	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKİLİÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak. Yük. Müh.
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Tarih ve Sayı: 28/09/2018-280571



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı :35980450-050.01.99-
Konu :Araştırma Görevlisi Ece Merve
YILMAZ'a ait çalışmaya ek süre
verilmesi Hk.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(Eczacılık Fakültesi Dekanlığı)

İlgi :20.04.2018 tarihli 150030 sayılı yazınız.

Kurulumuzca 28.12.2015 tarih ve 2015/102 sayılı karar ile onaylanan; Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Zeynep AYDOĞMUŞ'un sorumluluğunu üstlendiği, Araştırma Görevlisi Ece Merve YILMAZ'a ait " Regorafenibin plazmada tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi" başlıklı çalışmaya yönelik ilgede kayıtlı yazınız ekleri incelenmiş olup, ilgi yazınız eki dilekçede ileri sürülen gerekçeler dikkate alınarak proje süresinin altı (6) ay süre ile uzatılması uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmza
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEKR0R882>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Canan SÖNMEZTÜRK
İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık
nolu oda Avcılar/İSTANBUL
Tel : (212) 473 7070 Faks : (212) 440 03 77
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

REGORAFENİBİN PLAZMADA TAYİNİ İÇİN YENİ BİR YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 8	% 2	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 3
2	kolonkanseri.blogspot.com İnternet Kaynağı	% 3
3	www.tech-worm.com İnternet Kaynağı	% 1
4	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	% 1
5	www.ilacskoru.com İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	baadalsg.inflibnet.ac.in İnternet Kaynağı	<% 1
8	orca.cf.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ece Merve	Soyadı	Yılmaz
Doğ.Yeri	Kadıköy	Doğ.Tar.	31.05.1988
Email	ece.misirci@istanbul.edu.tr	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Devam Ediyor
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi	2010
Lise	Maltepe Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2012 - Devam

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		66,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	84,73665	81,57090	69,62318

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Windows	Çok iyi
MS Office (Word, Excel, Power Point)	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınları:

Yilmaz E.M., Aydoğmuş Z., Aboul-Enein H., "Determination of nilotinib in spiked plasma, urine, and capsules by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection", ACTA CHROMATOGRAPHICA, vol.28, pp.313-331, 2016

Cherbal A., Kebieche M., Yilmaz E.M., Aydoğmuş Z., Benzaouia L., Benguessoum M., et al., "Antidiabetic and hypolipidemic activities of Algerian Pistachia lentiscus L. leaves extract in alloxan-induced diabetic rats", SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY, vol.108, pp.157-162, 2017

Aydoğmuş Z., Yıldız G. , Yilmaz E.M., Aboul-Enein H., "Determination of eugenol in plants and pharmaceutical form by HPLC with amperometric detection at graphene-modified carbon paste electrode", graphene technology, vol.3, pp.1-9, 2017

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., Sağlık Aslan S., Taş Z.E., Üner M., "RP-HPLC method for the simultaneous determination of carbamazepine and nilotinib: Application solubility studies", The Pharmaceutical and Chemical Journal, vol.3, pp.1-10, 2016

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., Yörüşün S., Akpınar S., "Development of Simultaneous Derivative Spectrophotometric and HPLC Methods for Determination of 17-Beta-Estradiol and Drospirenone in Combined Dosage Form.", Int Sch Res Notices, vol.2015, no.1, pp.1-7, 2015

Bildirileri:

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., Yıldız G., "Spectrofluorimetric Determination of Pomalidomide in Spiked Plasma and Urine", 2. International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy 2018, Frankfurt, ALMANYA, 5-7 Kasım 2018, pp.100-100

Yilmaz E.M., Aydoğmuş Z., "A Spectrophotometric Method For Simultaneous Determination of Nilotinib and Regorafenib", International Conference: 10th Aegean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, 29 Eylül - 2 Ekim 2016, pp.243-243

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., Üner M., "RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Carbamazepine and Nilotinib: Application to Interaction Studies", 6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, Valencia, İSPANYA, 1-3 Eylül 2015, pp.124-124

Yilmaz E.M., Aydoğmuş Z., "A New High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Nilotinib in Spiked Plasma and Urine", 5th EuCheMS Chemistry Congress, İSTANBUL, TÜRKİYE, 31 Ağustos - 4 Eylül 2014, pp.1314-1314

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., "Simultaneous Determination of 17 Beta-estradiol and Drospirenone in Pharmaceutical Preparation by High Performance Liquid Chromatography", 30th International Symposium on Chromatography, Salzburg, AVUSTURYA, 14-18 Eylül 2014, pp.101-101

Aydoğmuş Z., Yilmaz E.M., "Yüksek Performanslı Sıvı Kromatograifisi Kolon Öncesi Türevlendirme ile Nilotinibin Tayini", Kromatografi 2011 Kongresi, DİYARBAKIR, TÜRKİYE, 7-10 Eylül 2011, ss.77-77

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Seyahat, müzik, tiyatro, pilates.