

Düzce Üniversitesi
Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Sıvı Kromatografisi Sıralı Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Tekniği İle Noskapin Ve İlgili Stres Bozunma Bileşiklerinin İncelenmesi Ve Tayini İçin Metot Optimizasyonu

Süleyman GÖKCE[a,*], İbrahim BULDUK[b], Hüseyin ENGİNAR[c]

[a] *Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi TR 64200, Uşak, Türkiye*
[b] *Uşak Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu TR 64100, Uşak, Türkiye*
[c] *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi TR 03000, Afyonkarahisar, Türkiye*
** Sorumlu yazarın e-posta adresi: suleyman.gokce@usak.edu.tr*

ÖZET

Oral kullanım için uygun bitkisel kaynaklı bir öksürük baskılayıcı alkaloid olan noskapinin tübülin bağlanma anti-kanser aktivite özelliği son zamanlarda tespit edilmiştir. Noskapin kan, meme, akciğer, yumurtalık, beyin ve prostat orijinli insan ksenograftları taşıyan çıplak farelerde tümör büyümesinin gelişmesini engellemiştir,. Bu çalışmada bir alkaloit türevi ve ilaç etken maddesi olan Noskapinin, Beşeri İlaçların Ruhsatlandırma Teknik Gereksinimleri İçin Uluslararası Uyum Konseyinin (ICH) , belirlediği şartlar doğrultusunda, farklı zorlanmış koşullar altındaki davranışı-bozunma ürünleri, LC-MS/MS tekniği ile belirlenip bozunma mekanizması önerilmiştir. Noskapin asidik, bazik, oksidatif, fotolitik ve sıcaklık gibi farklı stres koşullarında işleme tabi tutulmuştur. Bozunma ürünlerinin belirlenmesinde ultra performanslı sıvı kromatografi sistemi 40 C0 de C18 kolon, mobil faz olarak %0,1 lik formik asit içeren Metanol: Su (50:50 v/v) karışımı, kolon akış hızı 1.2 mL/dk, dedeksiyon dalga boyu 310 nm ile optimize edilmiştir. Kütle spektrometresi ile pozitif iyon modda çalışılıp, Noskapinin kütle spekturumu 414.1 m/z olarak gözlemlenmiş ve diğer parçalanma ürünleride açık bir şekilde belirlenmiştir. Böylece UPLC ve MS birlikte optimize edilerek etken maddenin parçalanma ürünlerinin belirlenmesi için LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bozunma ürünleri, LC-MS/MS, Noskapin*

Investigation And Method Optimization For The Determination Of Noscapine And Related Stress Degradation Compounds By Lıquid Chromatography Coupled To Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ABSTRACT

The tubuline-binding anticancer activity of noscapine, an orally-available plant-derived anti-tussive alcaloide, has been recently identified. Noscapine inhibits tumor growth in nude mice bearing human xenografts of hematopoietic,breast, lung, ovarian, brain and prostate origin. In this study, Noscapine is alkaloit derivative and pharmaceutical active substance. Objective was to investigate the degradation behavior of Noscapine under

Geliş: 28/10/2016, Düzeltme: 12/12/2016, Kabul: 18/12/2016

different recommended stress conditions according to International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) by LC-MS/MS. The forced degradation testing of Noscapine was carried out for acidic, basic, photolysis, oxidative, and thermal degradation. The degradation appeared using a reserved-phase C18 column at 40 C0 with a mobile phase comprised of methanol:H2O (50:50, v/v) with formic acid %0,1, having a flow rate of 1,2 ml min-1 and a detection wavelenght at 310 nm. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode for detection. The precursor to product ions selected for Noscapine qualitative optimization were m/z 414.1 respectively. The LC-MS/MS method was also adopted for he characterization of degradation products. Based on the m/z values and fragmentation patterns, the degradation pathway of the Noscapine has been proposed.

Keywords: *Degradation products, LC-MS/MS, Noscapine*

I. GİRİŞ

ÖKSÜRÜK baskılayıcı bir ajan olan noskapinin kemik iliği kanserinin tedavisi için faz I/II denemelerinde anti kanser ilaç olduğu keşfedilmiştir. Noskapin tübülinin kararlı hal monomer/polimer oranını değiştirmez [1-2-3]. Bu sayede, noskapin kan, bağışıklık ve nöronal toksisiteye neden olmaz [2]. Bu şu anda mevcut mikrotübülleri hem aşırı bir şekilde polimerleştiren hem de polimerleri monemerlere parçalayan anti-mikrotübül ilaçlar üzerinde eşsiz bir özelliktir [4-5]. Kapsamlı çalışmalar lenfoma, melanom, prostat, akciğer kanserlerinin tedavisinde noskapinin potansiyel yararını bildirmiştir [6-7] Noskapin oral olarak uygulandığında 2-3 saat içinde plazmada en yüksek düzeye çıktığını, 6 saat sonra tespit edilemediğini ve sistemde kısa sürede sirküle olduğunu gösteren farmakokinetiği de belirlenmiştir. [8, 9, 10].

Alkaloitler, genellikle kuvvetli fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren, halka içinde bir veya birden fazla azot taşıyan, bazik karakterli maddelerdir. Diğer sekonder metabolitler gibi alkaloitler de herbivorlar ve patojenlere karşı savunmada görev alan bileşiklerdir [11]. Bu çalışmada seçilen bir alkaloit çeşidi olan Noskapin (3S)-6,7-Dimethoxy-3-[(5R)-5,6,7,8-tetrahydro-4-methoxy-6-methyl-1,3-dioxolo(4,5-g)isoquinolin-5-yl]-1(3H)-isobenzofuranone (Şekil 1);, bağımlılık yapmayan, ağrı kesici ve uyuşturucu özelliği bulunmayan bir ilaç etken maddesidir. Öksürük yatıştırıcı etkisinden dolayı baz yada tuz halinde kullanılır. Benzilizokinolinlerin üyesidir ve antitussif (öksürük kesici) özellikleri nedeniyle ilaç olarakta kullanılmaktadır [12]. İlaçlar vücuda alındıktan sonra metabolizmada biyodönüşüme uğrayarak elimine (emilim ve dağılım) edilmektedirler. Bu eliminasyon fiziksel ve kimyasal açıdan birçok farklı ortamlarda olmaktadır. Emilim ve dağılım farklı pH ve ortamlarda gerçekleşmektedir ve bu sırada etken madde bozunup farklı ürünler oluşabilmektedir. Bu bozunurluk ürünleri özellikle ilaçlarda ciddi yan etkiler ve yaşam kalitesindeki düşüş gibi genellikle olumsuz sonuçlar meydana getirmektedir [13]. Noskapinin stres testleri, oluşabilecek ürünlerin tayini ile ilgili literatürde LC-MS/MS tekniği ile elde edilmiş veri bulunmamaktadır. Oysa ilaç aktif maddesinin rahat ve güvenli olarak kullanılabilmesi için bu analizlerin yapılması gereklidir.

Bu çalışmada, Noskapin ve bozunma ürünleri, LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla etken maddenin asidik, bazik, oksidative, termal ve fotolitik koşullarda stres testleri yapılmıştır. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak, ilacın olası bozunma mekanizmaları ve bozunma ürünlerinin ne olduğu önerilmiştir [14, 15, 16, 17].

II. MALZEME ve YÖNTEM

A. KİMYASALLAR

Tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta kullanılmıştır. Noskapin Alfa Easer (USA) firmasından elde edilmiştir. Metanol, formik asit LC-MS saflıkta MERCK Kimyasal Türkiye firmasından elde edilmiştir. Hidroklorik asit, Sodyumhidroksit, Hidrojenperoksit MERCK Kimyasal Türkiye firmasından temin edilmiştir. Ultra saf su laboratuarımızda bulunun Thermo marka ultra saf su cihazından temin edilmiştir.

B. STOK ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI, KALİBRASYON GRAFİĞİ

Noskapinin LC-MS saflıkta metanolde derişimi 100 ppm olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon standartları stok çözeltiden mobil faz ile (%0.1 formik asit içeren, 50:50 v/v, Metanol/Su) seyretilip 5 noktalı (1-3-5-10-20 ppm) kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur, R^2: 0.999 olarak hesaplanmıştır. Tüm çözelti ve standartlar +4 C^0 de muhafaza edilmiştir.

C. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİ- KÜTLE SPEKTROMETRESİ KOŞULLARI

Ultra performanslı sıvı kromatografi analizleri Agilent 1200 İnfinity UPLC sistemi kullanılmıştır. UPLC sistemi oto örnekleyici, yüksek basınç pompası, degazör, kolon fırını, DAD dedektör ve soğutucu kısımları içermektedir. Noskapin için 310 nm de sistem optimize edilmiştir. Kolon olarak ACE-C18 (250×4.6 mm, 5µ), kolon sıcaklığı 40 C^0 de sabit tutulmuştur. Enjeksiyon hacmi 1 µL, mobil faz akış hızı 1.2 mL olarak metod oluşturulup uygulanmıştır. Analitik metodun validasyonu için Noskapin standardından 100 mg bir beher içerisinde bir miktar su içerisinde çözünmesi sağlandı. 100 mL lik balonjojeye aktarıldı. Hacim 100 mL ye suyla tamamlandı. Hazırlanan bu 1000 ppm konsantrasyondaki stok standart solüsyondan seyreltme yolu ile 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm ve 20 ppm konsantrasyonlarında (Tablo 1) 5 standart solüsyon hazırlandı. Hazırlanan standart solüsyonlar her biri beşer kez olmak üzere üç gün boyunca UPLC cihazına enjekte edildi. Tüm çözelti ve standartlar +4 ^{0}C de muhafaza edilmiştir.

LC-MS/MS analizleri Agilent 6460 triple quad kütle spektrometresiyle yapılmıştır. Elektrospray iyonlaştırma tekniği kullanılarak pozitif iyon mod'ta bozunurluk ürünleri belirlenmiştir. Tarama sonucunda Noskapinin kütle spektrumu 414.1 m/z olarak gözlemlenmiştir. Kütle spektrometresi koşulları Tablo 2. de verilmiştir.

Tablo 1. *Validasyon için kullanılan Noskapin standartlarının konsantrasyonları*

Validasyon İçin Kullanılan Noskapin Standartlarının Konsantrasyonları (ppm)				
1	3	5	10	20

Tablo 2. *Kütle spektrometresi koşulları*

Genel Ayarlar	Değerler	Analiz Parametreleri	Değerler
Gaz Sıcaklığı	325 C^0	Ana Kütle	414.1 *g/mol*
Gaz Akış Hızı	11 *L/dk*	Tanınma Ürünleri Kütleleri	353.1-220.1 *g/mol*
Püskürtme Basıncı	45 *psi*	Kütle İzleme Süresi	45 *ms*
Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı	400 C^0	Çapışma Enerjisi	30 *eV*
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	12 *L/dk*	Alıkonma Süresi	3.15 *dk*

D. UPLC ANALİZ METODUNUN VALİDASYONU

Kesinlik

Pik alanının ölçümü ve numune uygulamanın tekrarlanabilirliği aynı nuumunenin beş kez kullanılmasıyla gerçekleştirildi ve %RSD olarak ifade edildi.

Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz edilen numunelere Noskapin stok solusyonundan % 80, %100, %120 oranında ilave edildi ve karışım tekrar analiz edildi. Noskapinin numunelerdeki farklı düzeylerinde Noskapin geri kazanımını kontrol etmek için deney beş kez yapıldı.

Özgünlük

Metodun özgünlüğü standart Noskapini analiz ederek tespit edilmiştir. Numunelerdeki Noskapin piki standardın alıkonma zamanı ile standardın alıkonma zamanının kıyaslanması ile teyit edilmiştir. Noskapin pikinin saflığı, pik başlangıç ve bitiş pozisyonları olmak üzere iki düzeyde tayflarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Kalibrasyon eğrisi beş konsantrasyon seviyesi (1, 3, 5, 10, 20 ppm) ile karşılık gelen pik alanlarından elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Noskapinin 1-20 ppm aralığında mükemmel bir doğrusallık gösterdi. Kalibrasyon eğrisi için doğru denklemi R2= 0.999 korelasyon katsayısı ile y = 30,944x – 0.4785 idi. Şekil 2. Noskapin için 310 nm de kalibrasyon eğrisini göstermektedir.

Kesinlik

Beş farklı konsantrasyondaki Noskapin standart solusyonu beş kez art arda UPLC Cihzına enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kaydedildi ve %RSD değeri her bir konsantrasyon için hesaplandı. %

RSD değerlerinin en yüksek % 1 olduğu gözlendi. Pik alanları ve % RSD değerleri Tablo 3. Te verilmiştir.

Tablo 3. *Noskapin Standartlarının Konsantrasyonları ve Pik Alanları*

ENJEKSİYON	1 ppm	3 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
1	0,14	0,46	0,83	1,70	3,36
2	0,12	0,46	0,83	1,69	3,32
3	0,14	0,48	0,83	1,68	3,36
4	0,13	0,47	0,84	1,68	3,31
5	0,13	0,48	0,82	1,71	3,35
ORTALAMA	0,13	0,47	0,83	1,69	3,34
SD	0,0084	0,0100	0,0071	0,0130	0,0235
%RSD	6,3383	2,1277	0,8519	0,7706	0,7022

Geri Kazanım Çalışmaları

Analiz edilen numunelere Noskapin stok solusyonundan % 80, %100, %120 oranında ilave edildi ve karışım tekrar analiz edildi. Noskapinin numunelerdeki farklı düzeylerinde Noskapin geri kazanımını kontrol etmek için deney beş kez yapıldı. Geri Kazanım sonuçları yüksek verim göstermiştir. Noskapin geri kazanımı %98.02-%99.10 aralığında değişmekedir. Bu önerilen metodun Noskapin analizi için kullanılabileceğini doğrulamaktadır.

Özgünlük

Metodun özgünlüğü standart Noskapini analiz ederek tespit edilmiştir. Numunelerdeki Noskapin piki standardın alıkonma zamanı ile standardın alıkonma zamanının kıyaslanması ile teyit edilmiştir. Noskapin pikinin saflığı, pik başlangıç ve bitiş pozisyonları olmak üzere iki düzeyde tayflarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir. Noskapin pik saflığı mükemmeldir.

Sonuçlar göstermektedir ki sistem uygunluğu gereklilikleri geçmiştir ve sonuç olarak sistemin ileri kromatografik parametreleri incelenebilir. Sistem uygunluk solüsyonunun ve resolüsyon solüsyonunun tekrarlı enjeksiyonları validasyon prosesi süresince yapıldı.

Hazırlanan standart solüsyonlar her biri beşer kez olmak üzere üç gün boyunca UPLC cihazına enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kaydedildi. Enjeksiyonlarda elde edilen pik alanları Tablo 3 te verilmiştir. 1 ppm-20 ppm aralığında pik alanlarına karşılık konsantrasyon grafiği çizildi. Doğrusallığı

değerlendirmek üzere korelasyon katsayısı kullanıldı. Doğrusallık grafiği Şekil 2 de verilmiştir. Noskapin için Tayin limiti (LOD) ve Ölçüm limiti (LOQ) sinyal/gürültü (S/N) oranı ile saptandı. Validasyon süresince farklı test parametrelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 4 te verilmiştir.

Tablo 4. *UPLC Analiz Metodu Validasyon Verileri İstatistiksel Değerlendirilmesi*

Parametreler		**Noskapin**
Doğrusallık	**Konsantrasyon Aralığı (ppm)**	1-20
	Korelasyon Katsayısı	0,9998
	Kayma	-0,025
	Eğim	0,1689
LOD Teşhis Limiti (ppb)		16
LOQ Tayin Limiti (ppb)		47
Alıkonma zamanı (dk)		3,09

Tablo 5. *Tekrarlanabilirlik Sonuçları*

	% RSD 1 ppm	**% RSD 3 ppm**	**% RSD 5 ppm**	**% RSD 10 ppm**	**% RSD 20 ppm**
1. GÜN	3,205	0,785	0,516	0,345	0,136
2. GÜN	3,280	0,821	0,610	0,350	0,127
3. GÜN	3,150	0,810	0,580	0,360	0,142

ICH kılavuzuna göre tekrarlanabilirlik testlerinin uygun olabilmesi için % RSD değerlerinin 2'den küçük olması istenir. Yukarıdaki tabloda görülen rakamların tümü 1'in altındadır.

III. BULGULAR ve TARTIŞMA

A. NOSKAPİNİN BOZUNMA PROSEDÜRÜ

Noskapinin bozunma ürünleri tayini ICH prosedürüne uygun olarak farklı koşullar (asidik, bazik, oksidatif, termal, UV ışık) altındaki davranışının LC-MS/MS tekniği ile incelenmesi ile belirlenmiştir. Bu şartlar; 1 M HCI 100 C0 -30 dk, 1M NaOH 100 C0 -30 dk, %3-%30 H2O2 100 C0 -30 dk, 6-24 saat 100 C0 de termal bozunma, 6-24 saat 254 nm dalga boyunda-oda sıcaklığında UV ışık altında bozunma şartlarında, ICH prosedürü uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bozunma prosüdürü uygulanarak elde edilen MS pikleri ve Noskapinin çarpışma enerjisi altında elde edilen parçalanma ürünleri Şekil 3. ve Şekil 4.'te gösterilmiştir. Uygulanan şartlarda MS piklerindende anlaşıldığı üzere Noskapin asidik, oksidatif ve termal şartlar altında parçalanmış, bazik şartlar altında birleşme ürünü vererek bozunmuştur. Fotolitik koşulda ise stabil kalmıştır.

B. NOSKAPİNİN ASİDİK KOŞULLARDAKİ BOZUNMASI

Noskapinin 100 ppm olarak hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmm'e 1 M HCI ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C0 de 30 dakika boyunca etüv içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Noskapinin tümüyle bozunmuş olduğu ve 2.2 dakikada gelen kromatogramdan ve 220.1 m/z kütle pikinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürün Şekil 5.'de şematize edilmiştir.

C. NOSKAPİNİN ASİDİK KOŞULLARDAKİ BOZUNMASI

Noskapinin 100 ppm olarak hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmm'e 1 M NaOH ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C0 de 30 dakika boyunca etüv içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Noskapinin NaOH ile birleşme ürünü oluşturduğu ve bozunduğu ve 4.0 dakikada gelen kromatogramdan ve 432.2 m/z kütle pikinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürün Şekil 6.'de şematize edilmiştir.

D. NOSKAPİNİN OKSİDATİF KOŞULLARDAKİ BOZUNMASI

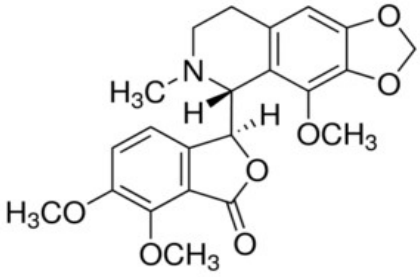
Noskapinin 100 ppm olarak hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmm'e %3 ve %30 luk H2O2 ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C0 de 30 dakika boyunca etüv içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Noskapinin %3 lük H2O2 şartında stabil kaldığı, %30 luk H2O2 şartında tümüyle bozunduğu 2.2 dakikada gelen kromatogramdan ve 220.1-102.1 m/z kütle piklerinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürün Şekil 7.'de şematize edilmiştir.

E. NOSKAPİNİN OKSİDATİF KOŞULLARDAKİ BOZUNMASI

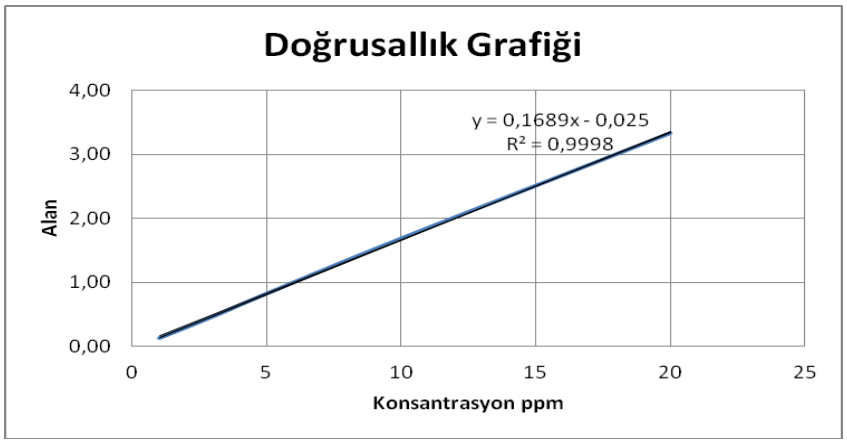
Noskapinin 100 ppm olarak hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmm'e mobil faz ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C0 de 24 saat boyunca etüv içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Noskapinin tümüyle bozunduğu 2.2 dakikada gelen kromatogramdan ve 220.1 m/z kütle pikinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürün Şekil 8.'de şematize edilmiştir.

F. NOSKAPİNİN TERMAL KOŞULLARDAKİ BOZUNMASI

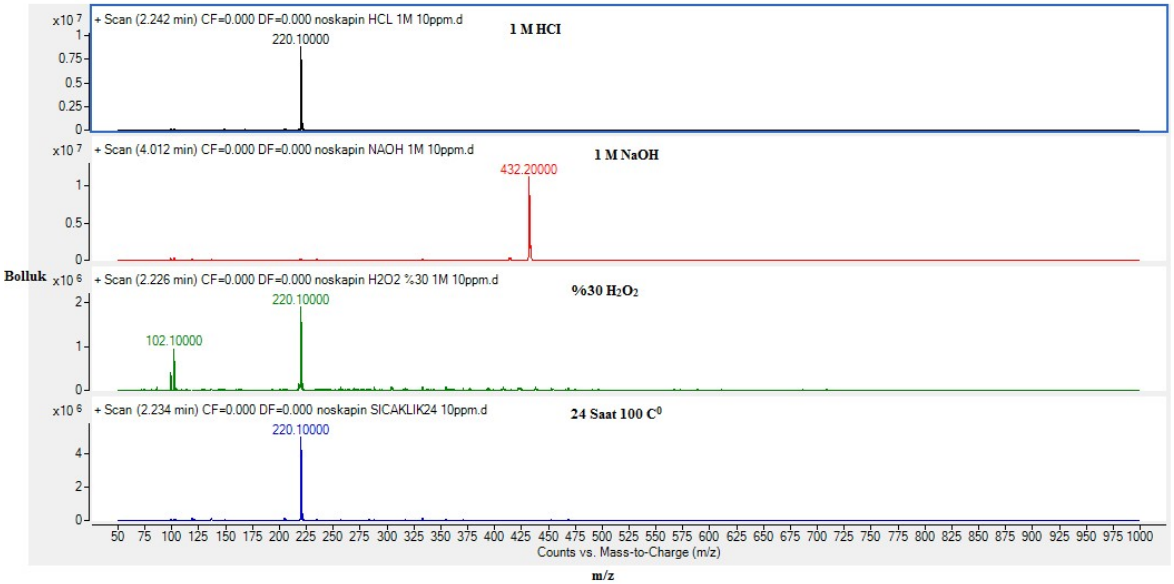
Noskapinin 100 ppm olarak hazırlanan stok çözeltisinden 10 pmm'e mobil faz ile seyreltme yapıldı. Şeffaf viale alınan bu çözelti 254 nm'de 24 saat boyunca UV kabin içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Noskapinin tamamiyle stabil kaldığı ve bozunma göstermediği gözlemlendi.



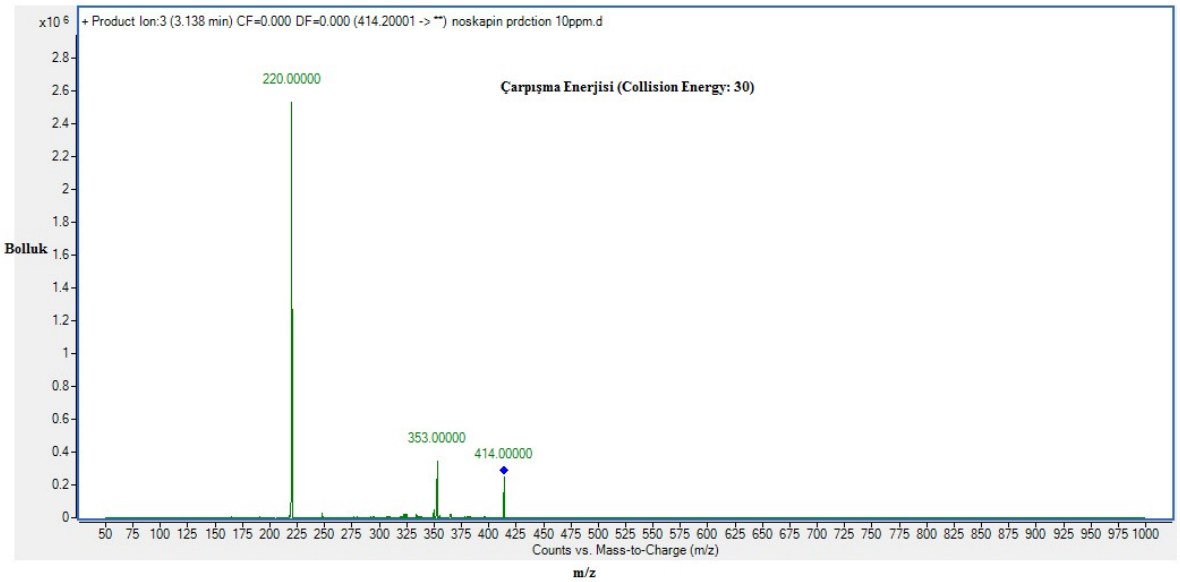
Şekil 1. *Noskapin*



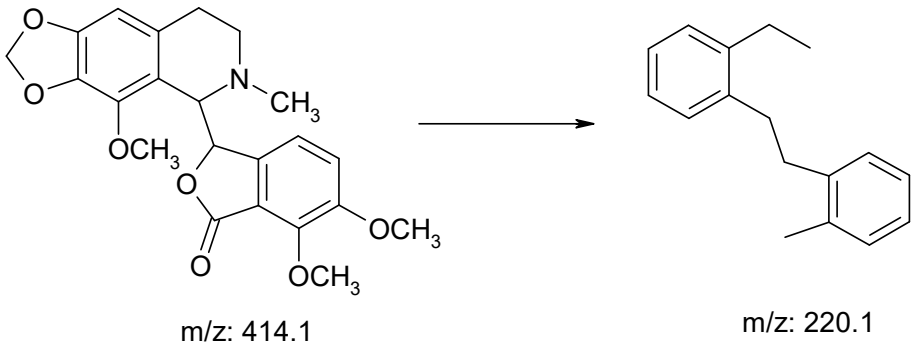
Şekil 2. *Noskapin Standart Solüsyonlarının Doğrusallık Grafiği*



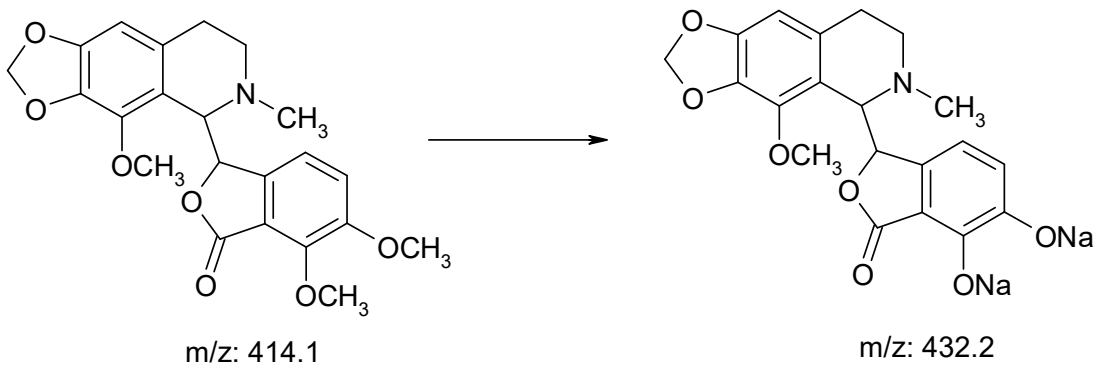
Şekil 3. *Stres testi bozunma ürünleri MS pikleri*



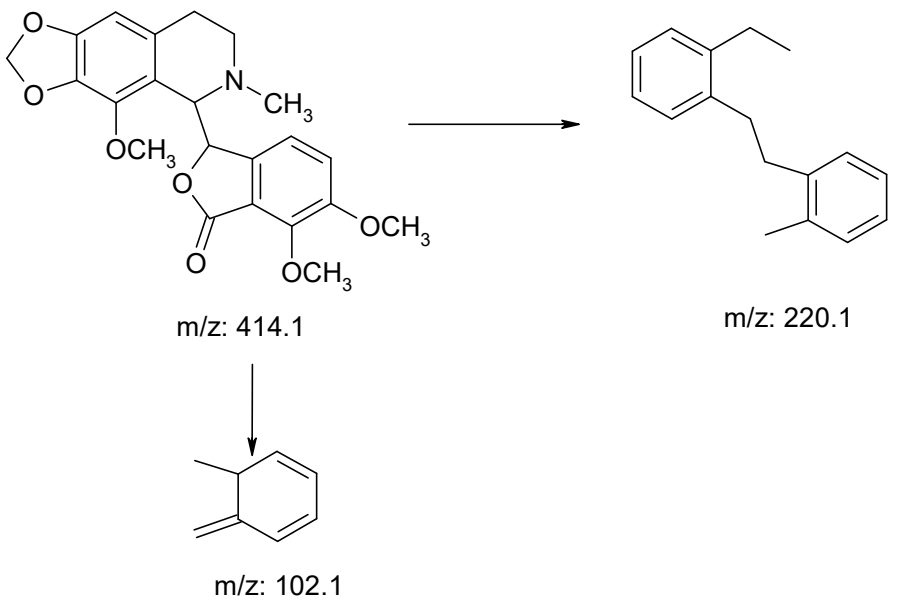
Şekil 4. *Çarpışma enerjisiyle elde edilen Noskapinin parçalanma sonucu oluşan MS pikleri*



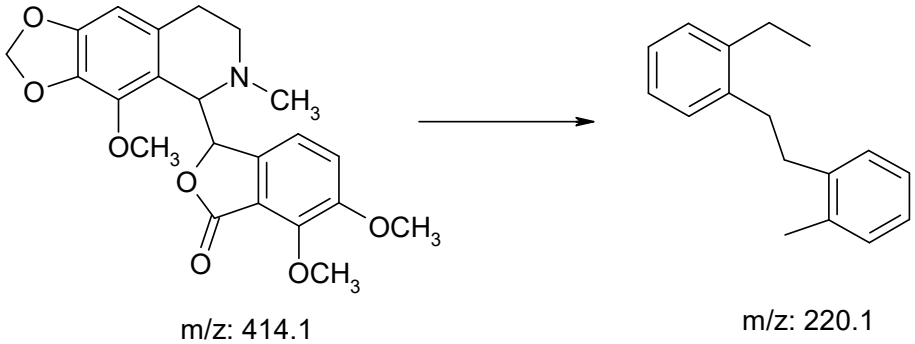
Şekil 5. *Noskapinin asidik şartlardaki bozunurluk ürünleri*



Şekil 6. *Noskapinin bazik şartlardaki bozunurluk ürünleri*



Şekil 7. *Noskapinin oksidatif şartlardaki bozunurluk ürünleri*



Şekil 8. *Noskapinin termal şartlardaki bozunurluk ürünleri*

IV. SONUÇ

Bir ilaç etken maddesinin safsızlık profili ve kararlılığı, güvenlik değerlendirmesi ve üretim sürecinde çok önemlidir. Bu konu ile ilgili literatürler ve kaynaklar incelendiğinde Noskapin ve ilgili bozunma ürünlerinin LC-MS/MS tekniği yardımıyla analitik tespiti ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden çalışma kapsamında yer alan Noskapin ve bozunma ürünleriyle ilgili elde edilen bilgiler, ilacın farklı metabolik biyokimyasal dönüşüm mekanizmaları ve davranışları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır.

Deneyler sonucunda Noskapinin ultraviole ışık altındaki stres koşullarında oldukça kararlı olduğu ve stabil kaldığı gözlenmiş ancak asidik, bazik, oksidatif ve termal bozunmaya daha hassas olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kütle spektrumlarında m/z değerleri kullanılarak majör pikler değerlendirilmiş ve yapıdan olası koptuğu şekilde çizilerek Şekillerde sunulmuştur. Bu bozunurluk ürünleri özellikle kemoterapi ilaçlarında ciddi yan etkiler ve yaşam kalitesindeki düşüş gibi genellikle olumsuz sonuçlar meydana getirebilmektedir.

TEŞEKKÜR: Bu çalışma 2014 MF 001 Numaralı Uşak Üniversitesi BAP Projesi kapsamında yapılmıştır. Katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi ve Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezine teşekkür ederiz.

V. KAYNAKLAR

[1] M.O. Abdalla, P. Karna, H.K. Sajja, H. Mao, C. Yates, T. Turner, R. *Journal of Controlled Release* **149(3)** (2011) 314-322.

[2] J.W. Landen, V. Hau, M. Wang, T. Davis, B. Ciliax, B.H. Wainer, E.G. Van Meir, J.D. Glass, H.C. Joshi, D.R. Archer *Clinical Cancer Research* **10** (2004) 5187-5201.

[3] K. Ye, Y. Ke, N. Keshava, J. Shanks, J.A. Kapp, R.R. Tekmal, J. Petros, H.C. Joshi *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95(4)** (1998) 1601-1606.

[4] C. Sioka, A.P. Kyritsis *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **63(5)** (2009) 761-767.

[5] S.B. Park, A.V. Krishnan, C.S. Lin, D. Goldstein, M. Friedlander, M.C. Kiernan *Current medicinal chemistry* **15(29)** (2008) 3081-3094.

[6] Y. Ke, K. Ye, H.E. Grossniklaus, D.R. Archer, H.C. Joshi, J.A. Kapp *Cancer Immunology Immunotherapy* **49(4-5)** (2000) 217-225.

[7] T. Jackson, M. Chougule, N. Ichite, R. Patlolla, M. Singh *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **63(1)** (2008) 117-126.

[8] E. Bitoun, A. Micheloni, L. Lamant, C. Bonnart, A. Tartaglia-Polcini, C. Cobbold, T. Al Saati, F. Mariotti, J. Mazereeuw-Hautier, F. Boralevi, D. Hohl, J. Harper, C. Bodemer, M. D'Alessio, A. Hovnanian *Human molecular genetics* **12(19)** (2003) 2417-2430.

[9] B. Dahlstrom, T. Mellstrand, C.G. Lofdahl, M. Johansson *European journal of clinical pharmacology* **22(6)** (1982) 535-539.

[10] M.O. Karlsson, B. Dahlstrom, S.A. Eckernas, M. Johansson, A.T. Tufvesson Alm *European journal of clinical pharmacology* **39(3)** (1990) 275–279.

[11] T. Gürkök, İ. Parmaksız, G. Boztepe, E. Kaymak *Electronic Journal of BioTechnology* **1(2)** (2010) 31-45.

[12] Y. Arslan, D. Katar, F. Kayaçetin, İ. Subaşı *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* **17** (2008) (1-2).

[13] E.C. Nicolas, T.H. Scholz *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16(5)** (1998) 825-836.

[14] ICH. Stability testing of new drug substances and products, Q1A(R2), International Conference on Harmonisation, http://www.ich.org/home.html 2003.

[15] A. Masia, M. Ibanez, C. Blasco, J.V. Sancho, Y. Picoa, F. Hernandez. *Analytica Chimica Acta* **761** (2013) 117-127.

[16] R. M. Borkar, B. Raju, P. S. Devrukhakar, N. Tondepu, A. B. N. Rao, R. Srinivas *Journal of Mass Spectrometry* **27** (2013) 369.

[17] B. Raju, M. Ramesh, R. Srinivas, S. S. Raju, Y. Venkateswarlu *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **56**(3) (2011) 560-568.