

175560

T. C.
CETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**TÜRKİYE'DE SENTEZ EDİLEN AMPİSİLİN'DEN
HAZIRLANAN BAZI MÜSTAHZARLARIN
BİYOYARARLANIM YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

FARMAKOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

ECZ. SERDAR UMA

ANKARA - 1982

T.C.
HACETTEPE UNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

TÜRKİYE'DE SENTEZ EDİLEN AMPİSİLİN'DEN
HAZIRLANAN BAZI MÜSTAHZARLARIN BİYİYARARLANIM
YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

FARMAKOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz. SERDAR UMA

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ-DOÇ. Dr. GÜL AYANOĞLU

ANKARA - 1982

Ö N S Ö Z

Çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm H. Ü. Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. S. Oğuz Kayaalp'e, rehber öğretim üyesi Doç. Dr. Gül Ayanoğlu'na, Dr. Meral Tuncer'e; çalışmamın mikrobiyolojik yöntemleri kapsayan kısmında yakın ilgi gösteren Mikrobiyoloji Bölümü asistanlarından Dr. Hasan Çolak'a teşekkür ederim.

İnsanlar üzerinde yürütülen çalışmalar süresince denek olmayı kabul eden arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

BÖLÜM I.	GİRİŞ	1
BÖLÜM II.	ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER	9
II. 1.	Araştırmada kullanılan ampisilin müstahzar- ları.	9
II. 2.	Standart ampisilin dilüsyonlarının hazırlanması.	9
II. 3.	Bakteri süspansiyonunun standardize edilmesi.	10
II. 3. 1.	Stok bakteri süspansiyonunun hazırlanması.	10
II. 3. 2.	Standart bakteri süspansiyonunun hazırlanması.	11
II. 4.	İn vivo deneyler.	12
II. 4. 1.	Kan örneklerinin alınması.	13
II. 4. 2.	Plazma ampisilin konsantrasyonlarının ölçümü.	13
II. 5.	İn vitro deneyler.	14
II. 6.	Deney sonuçlarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında kullanılan yöntemler.	14
BÖLÜM III.	BULGULAR	16
III. I.	Standart ampisilin konsantrasyonları ile elde edilen inhibisyon.	16
III. 2.	İn vivo olarak biyoyararlanımın değerlendirilmesi.	16

III. 2. 1. İlaçların maksimum plazma konsantrasyon- ları.	16
III. 2. 2. İlaçların maksimum plazma konsantrasyo- nuna ulaşmaları için geçen süre.	17
III. 2. 3. İlaçların plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan değerleri. ...	17
III. 2. 4. İlaçların plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri yönünden karşılaştırılması.	17
III. 3. İn vitro test sonuçlarının değerlendirilme- si.	19
BÖLÜM IV. TARTIŞMA.....	27
BÖLÜM V. ÖZET.....	31
BÖLÜM VI. KAYNAKLAR.....	32

B Ö L Ü M I

G İ R İ Ő

Aynı aktif maddeyi belirli bir farmasötik Şekil içinde eşit miktarlarda içeren iki veya daha fazla müstahzar birbirleriyle kimyasal yönden eşdeğer olarak kabul edilebilirler. Ancak bu, söz konusu ilaçların biyolojik yönden de eşdeğer olduklarını gösterecek yeterli bir ölçüt olmamaktadır. Nitekim tıpta tedavi veya diğer tıbbi amaçlarla hastada ilacı kullanan hekimin üzerinde durduğu esas nokta o ilacı içeren müstahzarların insandaki etkilerinin de aynı olmasıdır ki bu kavram müstahzarlar arasında biyolojik eŐdeęerlik olarak bilinmektedir.

Biyolojik eŐdeęerlięin ideal Şekilde gösterilmesi müstahzarların klinik etkinliklerinin tam olarak ölçülebilmesi ile mümkündür. Ancak, bunun pratik olarak bazı zorlukları vardır.

Örneğin, klinik testler belirli bir hastalığı aynı şiddette taşıyan oldukça geniş bir hasta popülasyonunda yapılmalıdır. Bazı hastalıklarda ilaca verilen klinik cevabın ölçülmesi ya çok zordur, ya da ölçüm testleri yeterince duyarlı olmamaktadır. Ayrıca ilaçların oluşturduğu farmakolojik etki, bireyler arasında çok fazla değişkenlik gösterebilir. Klinik testlerin bir diğer dezavantajı da karmaşık ve pahalı olmalarıdır (Dittert, 1973).

Bütün bu hususlar göz önünde bulundurulduğunda ilacın klinik etkinliğinin tayininde diğer yaklaşımın ilacın kan düzeylerinin saptanması olduğu görülmektedir. Etki yerinden örnek alınarak ilacın konsantrasyonunun saptanması pratik olarak mümkün değildir. Ancak difüzyon dengesi nedeniyle, ilacın kandaki ve diğer vücut sıvılarındaki düzeyleri genellikle birbirine paraleldir. Bu nedenle ilacın kandaki minimum etkin konsantrasyonu, etki yerindeki minimum etkin konsantrasyonunu yansıtmaktadır. (Kayaalp, 1981).

Kişinin, genellikle oral yoldan verilen belli bir doz ilaçtan ne oranda ve ne hızda faydalandığını açıklayan bir terim olan "biyoyararlanım"ı belirleyen iki önemli parametre vardır. i) İlacın absorpsiyon oranı,

ii) İlacın absorpsiyon hızı (Dittert ve DiSilva, 1973).

Biyoyararlanım çalışmalarında bu iki parametre şu yöntemlerle değerlendirilir (Koch-Weser, 1974).

I) İlacın kan düzeyi profilinin belirlenmesi: İlacın sağ-

lam gönüllülere verilmesini takiben belirli aralıklarla kan örnekleri alınıp bu örneklerdeki ilaç konsantrasyonu ölçülerek kandaki ilaç konsantrasyonu-zaman eğrisi çizilir. Bu eğrilerin ilaçların biyolojik eşdeğerliğini saptama yönünden üç önemli özellikleri vardır.

- i) Maksimum ilaç konsantrasyonu
- ii) Maksimum ilaç konsantrasyonuna ulaşmak için geçen süre
- iii) Eğrinin altında kalan alan (absorbe edilen total ilaç miktarının ölçüsüdür).

İlk iki özellik absorpsiyon hızını, üçüncü özellik ise absorpsiyon oranını belirlemektedir. İdeal durum, karşılaştırılan müstahzarların her üç özelliğinin de birbirine eşit olmasıdır.

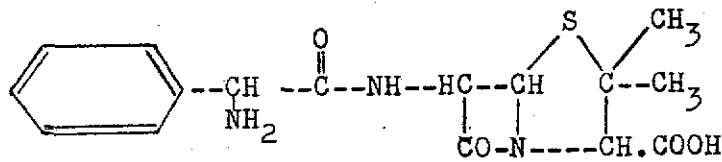
II) İdrarla atılan kümülatif ilaç miktarının ölçülmesi: Deneklere ilaç verildikten sonra idrar, ilacın biyolojik yarılanma ömrünün 5 - 10 katı kadar bir süre boyunca toplanır ve atılan ilacın kümülatif miktarının zamana göre eğrisi çizilir. Bu eğriler eriştikleri maksimum miktar ve eğimleri bakımından değerlendirilirler. Eğrinin eğimi absorpsiyon hızını, eriştiği maksimum miktar ise absorpsiyon oranını yansıtmaktadır.

Belirli ilaçların çeşitli formülasyonlarına karşı gözlenen klinik cevabın değişkenlik göstermesi, ileri ülkelerin biyoyararlanım çalışmalarına verdiği önemi artırmıştır.

Birçok ilacın değişik formülasyonlu farmasötik şekillerinin biyoyararlanım yönünden farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmaların tüm ilaçlar için uygulanamamasının en önemli nedeni bazı etken maddelerin biyolojik sıvılar içindeki miktarlarının yeterli duyarlılıkta ölçülememesidir. Antibiyotikler ise biyolojik sıvılarda antibakteriyel aktivitenin tesbitine dayanan mikrobiyolojik ölçüm yöntemleri ile saptanabilmektedirler. Bu nedenle antibiyotiklerin büyük çoğunluğu biyoyararlanım yönünden incelenmiştir (Chodos ve DiSanto, 1973).

Ampisilin, bu amaçla üzerinde en fazla araştırma yapılan antibiyotiklerdendir. İlk olarak MacLeod ve diğ., (1972) aynı miktar ampisilin içeren üç ayrı kapsül müstahzarının biyoyararlanımlarının eşit olmadıklarını göstermişlerdir. Bu farklılık nedeniyle ampisilin klinik kullanımda yeterli etkinliği sağlayamayacağı düşünülmüş ve ampisilin üzerinde biyoyararlanım çalışmaları hız kazanmıştır.

Ampisilin (alfa-aminobenzil penisilin) 1961'de sentezlenmiş ve bu tarihten beri geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ampisilin açık formülü aşağıda sunulmuştur.



Ampisilin

Ampisilinin gastrointestinal absorpsiyonu düşük olup kişiler arasında büyük değişkenlik göstermektedir (Loo, 1974; Jusko, 1975; Ehrnebo, 1979). Böbrek fonksiyonu normal olan kişilerde süratli bir şekilde vücuttan elimine edilmektedir (eliminasyon yarılanma ömrü 1.1 - 1.3 saat)(Dittert, 1969; Jusko, 1973). Plazma proteinlerine % 18 gibi oldukça düşük oranda bağlanan ampisilinin (Ehrnebo, 1978), 0.5 g lık tek bir dozunun oral yoldan verilmesinden sonra 2 saat içinde yaklaşık 3 µg/ml'lik maksimum plazma düzeyine ulaştığı bildirilmektedir (Mandell, 1980).

Intravenöz verilmesini takiben ilacın % 90'ı idrarla değişmeden atılmaktadır. Kalan % 10'un büyük kısmı karaciğerden safraya salgılanmakta ve çok az miktarda da biyotransformasyon ürünleri oluşmaktadır. Absorbe olan total dozun % 90'ı böbrekler yoluyla değişmeden atıldığına göre, idrarda saptanan ampisilin miktarı absorpsiyon oranını yansıtabacaktır. Ayrıca, ilacın eliminasyon hızının yüksek olması da biyoyararlanım çalışmalarında kan ve/veya idrar örneklerinin alınma süresinin kısılması gibi bir avantaj sağlamaktadır.

Ampisilinin biyoyararlanım yönünden sorun olabileceğinin dikkati çekmesi üzerine buna neden olabilecek çeşitli faktörler incelenmiştir. Besinlerin ampisilin absorpsiyonu üzerine etkisi konusunda gelişkili yayınlar vardır. Bazı araştırmacılar midenin dolu olması halinde absorpsiyonun geciktiğini fakat total absorbe olan miktarda değişme olmadığını ileri sürmüşlerdir (Foltz ve

diğ., 1970). Bazı araştırıcılar ise absorpsiyon oranının da besin varlığında azaldığını bildirmişlerdir (Welling, 1971; Neuvonen, 1977). Ampisilin absorpsiyonunun her iki parametre yönünden besinlerle etkileşmediğini ileri süren araştırıcılar da vardır (Toothaker ve diğ., 1980).

Amfoterik özellikte bir bileşik olan ampisilin, trihidrat veya anhidr formlar halinde oral dozaj şekilleri içinde formüle edilmektedir. Anhidr ampisilinın dissolüsyon hızının trihidrat şekline göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Poole, 1968). Buna karşılık diğeri bir araştırmada dissolüsyon hızları arasında fark olmadığı saptanmıştır (Hill, 1972). Fakat bu in vitro testlere in vivo biyoyararlanım çalışmalarını ilave edildiğinde anhidr formundan yararlanımın gerek yetişkinlerde (Hill, 1972), gerekse çocuklarda (Silverio, 1973) trihidrat şekline göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Jusko (1975) biyoyararlanımdaki bu farklılığın, kristal yapı özelliğinden çok farmasötik formülasyon faktörlerinden ileri gelebileceğini bildirmiştir.

Ampisilinın renal klerensinin kişiler arasında değışkenlik göstermesi, ilacın idrarla atılan kümülatif miktarını veya plazma konsantrasyonu verileri üzerinden biyoyararlanımın hesaplanması bakımından sakıncalıdır. Bunu ortadan kaldırmak ancak ilacın intravenöz yoldan verilip tam yararlanım sağlandıktan sonra oral farmasötik şeklin uygulanması ve böylece her iki verililiş yolu ile elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri-

nin karşılaştırılması ile mümkündür. Bu çeşit çalışmalar literatürde oldukça azdır. Genellikle başvurulan yöntem, iki veya daha fazla oral dozaj şeklinin aynı deneklerde çapraz inceleme yöntemiyle relatif biyoyararlanımlarına bakılması şeklindedir (Jusko, 1975).

Ampisilin kapsülleri ile ilgili ilk biyoyararlanım çalışmasında (MacLeod ve diğ., 1972) absorpsiyon denekler arasında büyük değişkenlik göstermiştir. Araştırmalarında kullandıkları üç kapsül müstahzarına ait plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinden hesapladıkları alan değerleri karşılaştırıldığında ilaçlar arasında biyoyararlanım yönünden anlamlı farklılık olduğunu bulmuşlardır.

A. B. D.'de ampisilin ile ilgili olarak yapılan en geniş kapsamlı biyoyararlanım çalışmasında (Whyatt ve diğ., 1976) 17 ayrı kapsül müstahzarı incelenmiş ve aralarında anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır. Aynı miktar ampisilin içeren bir kapsül ile oral süspansiyon müstahzarının biyoyararlanım yönünden araştırıldığı bir diğer çalışmada (Poole ve diğ., 1968) süspansiyondan biyoyararlanımın daha fazla olduğu bulunmuştur.

Bütün bu incelemelere karşın araştırmacılar, ampisilin her hangi bir oral dozaj şekli ile elde edilen kan ve idrar düzeylerinin otitis media, üst solunum yolları ve idrar yolları enfeksiyonları gibi çeşitli endikasyonlarda yeterli olduğu ve müstahzarların klinik yönden birbirlerine üstünlük sağlamadığı

görüşünde birleşmişlerdir (Jusko, 1975). Ancak, müstahzarın özelliğinden veya kişiye ait intrinsek faktörlerden dolayı ilacın absorpsiyonunun yetersiz olması gastrointestinal kanalda absorbe olmamış ilaç miktarının artmasına neden olacaktır. Bu da, normal barsak florasının değişmesine bağlı olarak süperenfeksiyon, diyare gibi ampisiline ait çeşitli yan tesirlerin şiddetlenmesinde önemli rol oynayabilir.

Halen Türkiye'de biyoyararlanım incelemeleri başlangıç dönemindedir ve kısıtlı sayıda yapılmaktadır. Ülkemizde pazarlanmakta olan müstahzarların yararlılıklarının saptanması için sadece in vitro dağılma ve çözünme testleri yapılmakta ve bunların sonuçları uygunsa piyasaya sunulmaktadırlar. Oysa, in vivo yararlanımı tam olarak yansıtan ideal bir in vitro test henüz bulunmamaktadır (Swarbrick, 1970) ve in vitro sonuçlar nadiren in vivo biyoyararlanım testleri ile korelasyon göstermektedir. Bu nedenle ülkemizde pazarlanmakta olan bir çok ilacın in vivo biyoyararlanım yönünden araştırılması gerekmektedir.

Sunulan çalışmanın amacı, ülkemizde yaygın olarak kullanılan ampisilinin üç kapsül müstahzarının biyoyararlanım yönünden incelenmesidir.

B Ö L Ü M II

A R A Ç G E R E Ç V E Y Ö N T E M L E R

II. 1. Araştırmada kullanılan ampisilin müstahzarları:

Eczanelerden alınan kapsül şeklindeki ampisilin müstahzarları aşağıda sunulmuştur.

A: 500 mg anhidr ampisiline eşdeğer ampisilin trihidrat kapsülü. Seri No. 1L 1690 (Fako)

B: 500 mg anhidr ampisiline eşdeğer ampisilin trihidrat kapsülü. Seri No. 1H 273 (Squibb)

C: 250 mg anhidr ampisilin içeren ampisilin anhidr kapsülü
Seri No. 1B 09685 (Wyeth)

II. 2. Standart ampisilin dilüsyonlarının hazırlanması:

Standart ampisilin dilüsyonlarının hazırlanması için 1 mg'ı

910 µg baz ampisiline eşdeğer olan ampisilin trihidrat kullanılmıştır. Önce distile su ile ml'de 1 mg ampisilin trihidrat olacak şekilde stok solüsyon hazırlanmış, daha sonra test için kullanılan standart dilüsyonlar 0.5, 1, 2 ve 4 µg/ml olacak şekilde bu stok çözeltinin seyreltilmesiyle elde edilmişlerdir. Seyreltici olarak pH'sı 7.4'e ayarlı distile su kullanılması sonucu elde edilen inhibisyon zonları ile plazma veya serum kullanılması halinde elde edilen zonlar arasında anlamlı bir fark bulunmadığının gösterilmesi (Jalling ve diğ., 1972) nedeniyle çalışmamızda standart dilüsyonların hazırlanmasında distile su, çözücü olarak kullanılmıştır.

II. 3. Bakteri süspansiyonunun standardize edilmesi:

Bu amaçla, ampisiline duyarlılığı yüksek olduğundan (Bennet ve diğ., 1966) *Bacillus subtilis* 6633 liyofilize suşu kullanılmıştır.

II. 3. 1. Stok bakteri süspansiyonunun hazırlanması:

Önce *Bacillus subtilis* 6633 suşu pH'sı 7.4'e ayarlanmış 2 ml steril fizyolojik tuzlu su içinde sulandırılmıştır. Oluşan süspansiyondan alınan 0.5 ml'lik örnekler adi, buyyon ve kanlı agar gibi besi yerlerine ayrı ayrı ekilmiş ve 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılarak yeterince bakteri üretilmiştir. Daha sonra bu bakteri kültürleri üzerine tekrar pH'sı ayarlı fizyolojik tuzlu su ilave edilip tamamen karıştıncaya kadar oda temperaturünde bekletilmiştir. Petri kutusunun hafifçe çalkalan-

masıyla oluşturulan süspansiyon derhal steril bir tüp içine alınmıştır. Böylece bakteri konsantrasyonu yoğun olan bir stok süspansiyon elde edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan standart bakteri süspansiyonu bölüm II. 3. 2.'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır.

II. 3. 2. Standart bakteri süspansiyonunun hazırlanması:

Bu amaçla ilk olarak stok süspansiyondan Bausch and Lomb 20 Spektrofotometresinde 550 m μ dalga boyunda (Bennet ve diğ., 1966) 0.20, 0.25, 0.27, 0.30, 0.33, 0.35, 0.40 ve 0.45 optik dansite verecek şekilde bakteri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinden alınan 0.1, 0.2 ve 0.3 ml'lik örnekler steril tüpler içindeki 10'ar ml hacminde (kaynar su banyosunda eritilmiş ve 45 - 50°C'ye soğutulmuş) besi yerlerine (Difco I) ayrı ayrı ilave edilip karıştırıldıktan sonra 9 cm çapındaki petri kutularına dökülmüştür. Dökülen bu besi yerleri donduktan sonra her bir petri kutusuna yerleştirilen 4 adet steril, üniform porselen silindir içine bölüm II. 2.'de açıklandığı şekilde hazırlanan 0.5, 1, 2 ve 4 μ g/ml konsantrasyonlarındaki standart ampisilin solüsyonlarından 50'şer μ L uygulanmıştır. Böylece her farklı ampisilin konsantrasyonunun, çeşitli absorbanlardaki bakteri süspansiyonlarının her birinden alınan 0.1, 0.2 ve 0.3 ml'lik örnekler için ayrı ayrı olmak üzere 4'er kez uygulanması sağlanmıştır.

Ekim yapılan petri kutuları kapakları kapatılarak 30°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 16 - 20 saatlik inkübasyon döneminden sonra porselen silindirlerin çevresine difüze olan ampisilinin oluşturduğu üreme inhibisyon zonlarının çapı ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucuna göre 550 m μ dalga boyunda 0.30 optik dansite verecek şekilde seyreltilmiş olan bakteri süspansiyonundan, 10 ml'lik besi yerine 0.1 ml ilave edilmesi halinde ampisilin konsantrasyonlarına karşı en duyarlı inhibisyon zonlarının elde edileceği saptanmıştır. Bu optik dansitedeki bakteri süspansiyonunun ml'sinde 6×10^7 adet bakteri bulunduğu Mc Farland metoduna göre saptanmıştır. Bölüm II. 3. 2.'de bildirilen Difco I besi yerinin içeriği aşağıda sunulmuştur.

Bacto-sığır ekstresi	1.5 g
Bacto-maya ekstresi	3.0 g
Bacto-kasiton	4.0 g
Bacto-pepton	6.0 g
Bacto-dekstroz	1.0 g
Bacto-ağar	15.0 g
Distile su	1000 ml

Besi yeri pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra 120°C'de 30 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

II. 4. In vivo deneyler:

Sunulan çalışma, sağlıklı, 25 - 38 yaşları arasında (ortalama 31) 11'i erkek, 5'i kadın olmak üzere 16 denek üzerinde yapılmıştır.

İlaçlar deneklere rastgele çapraz inceleme metoduna göre ve iki ilaç alımı arasında en az bir hafta olacak şekilde verilmiştir. Denekler, deney gününden en az bir hafta önce her türlü ilaç alımını bırakmışlardır. İlaçlar deneklere sabahleyin aç karına saat 8.30 - 9.00 arasında 500 mg dozunda 150 ml su ile birlikte verilmiştir. İlaç verilmesini takiben denekler iki saat süre ile aç kalmışlardır.

II. 4. 1. Kan örneklerinin alınması:

Kan örnekleri ilaç verilmeden hemen önce ve verilmesini takiben 1., 2., 3., 4. ve 6. saatlerde alınmıştır. Kan örnekleri parmak ucundan heparinize hematokrit tüplerine alındıktan sonra 6 dakika süre ile 2500 devir/dak'da santrifüje edilerek plazma ayrılmıştır. Örnekler, analiz edilinceye kadar 4°C'de bekletilmiştir. Kan örneklerinin alınması ile analiz arasındaki sürenin 24 saati geçmemesine dikkat edilmiştir.

II. 4. 2. Plazma ampisilin konsantrasyonlarının ölçümü:

4°C'de bekletilmekte olan hematokrit tüpleri plazma ile şekilli elemanların ayrıldığı düzeyden kesilmiş ve plazma kısmı steril koşullarda 50 µL'lik otomatik pipet aracılığıyla besiyeri üzerine yerleştirilen porselen silindirler içine uygulanmıştır. Daha sonra petri kutuları, kapakları kapatılarak 30°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 16 - 20 saatlik inkübasyon dönemi sonunda porselen silindirlerin çevresinde oluşan üreme inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüş ve standartlarla elde

edilen eğri üzerinden ekstrapolasyonla konsantrasyonlar saptanmıştır.

II. 5. İn vitro deneyler:

Bu amaçla her üç müstahzara ait 5'er adet kapsülün içerikleri tartılmış ve bunların biyolojik aktiviteleri aşağıda sunulduğu şekilde saptanmıştır.

Kapsül içeriği 1 µg/ml ve 2 µg/ml olacak şekilde sulandırılmış ve her dilüsyondan 4 kez olmak üzere 50 şer µL, porselen silindireler içine uygulanmıştır. Biyolojik aktivitesi bilinen standart ampisilinin aynı dilüsyonlarla oluşturduğu eğri üzerinden bilinmeyenlerin biyolojik aktiviteleri saptanmıştır.

II. 6. Deney sonuçlarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında kullanılan yöntemler:

Deney sonuçları ortalama \pm standart hata olarak sunulmuştur. Ortalamalar arası farkın istatistiksel değerlendirilmesi " eşler arası farkın önemlilik testi "ne göre yapılmıştır. $P/0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Müstahzarlar arasında biyoyararlanım açısından fark olup olmadığının saptanması için ilaçların plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri altında kalan alanlar (EAA) trapezoid kaidesine göre hesaplanmıştır (Gibaldi, 1975). Buna göre alan hesabı şu formülle yapılmaktadır.

$$EAA: \Delta t/2 (C_0 + 2C_1 + 2C_2 \dots + 2C_{n-1} + C_n) + C_n / K$$

Δt : İki kan örneğinin toplanması arasındaki zaman.

C_0 : Sıfır zamanında plazmadaki ilaç konsantrasyonu.

C_1, C_2 : Çeşitli zamanlarda plazmadaki ilaç konsantrasyonları.

C_n : Son saatte alınan plazma örneğindeki ilaç konsantrasyonu.

K: İlacın eliminasyon yarılanma ömrü.

B Ö L Ü M III

B U L G U L A R

III. 1. Standart ampisilin konsantrasyonları ile elde edilen inhibisyon:

0.5, 1, 2, ve 4 µg/ml konsantrasyonlarındaki standart ampisilin solüsyonları Bacillus subtilis ekimi yapılmış besi yerine uygulandığında konsantrasyona bağımlı olarak farklı çaplarda inhibisyon zonları oluşturmuştur. Ampisilin konsantrasyonları ile, oluşan inhibisyon arasında lineer bir ilişki saptanmıştır (Şekil 1)

III. 2. İn vivo olarak biyoyararlanımın değerlendirilmesi:

İN vivo biyoyararlanımın değerlendirilmesinde esas olarak alınan 4 parametreye ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

III. 2. 1. İlaçların maksimum plazma konsantrasyonu:

Her üç ilacın deneklerde oluşturduğu maksimum plazma kon-

santrasyonları Tablo I'de sunulmuştur. Ortalama plazma konsantrasyonları A ilacı için 2.98 ± 0.21 $\mu\text{g/ml}$, B ilacı için 2.75 ± 0.22 $\mu\text{g/ml}$ ve C ilacı için 3.20 ± 0.18 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Her üç ilaç için saptanan maksimum plazma konsantrasyonları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

III. 2. 2. İlaçların maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşması için geçen süre:

Ortalama değer olarak A ilacının 2.00 saat, B ilacının 2.06 ± 0.06 ve C ilacının da 2.06 ± 0.11 saat içinde plazmada maksimum konsantrasyonlara ulaştıkları saptanmıştır (Tablo I). İlaçların maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşmaları için geçen süreler arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

III. 2. 3. İlaçların plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan değerleri:

A ilacı için plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan değeri 8.49 ± 0.69 $\mu\text{g/ml/saat}$ iken bu değer B ilacı için 7.78 ± 0.62 $\mu\text{g/ml/saat}$ ve C ilacı için 9.49 ± 0.59 $\mu\text{g/ml/saat}$ olarak saptanmıştır. Her üç ilaç için plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altındaki kalan ortalama alan değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Tablo I, Şekil 2).

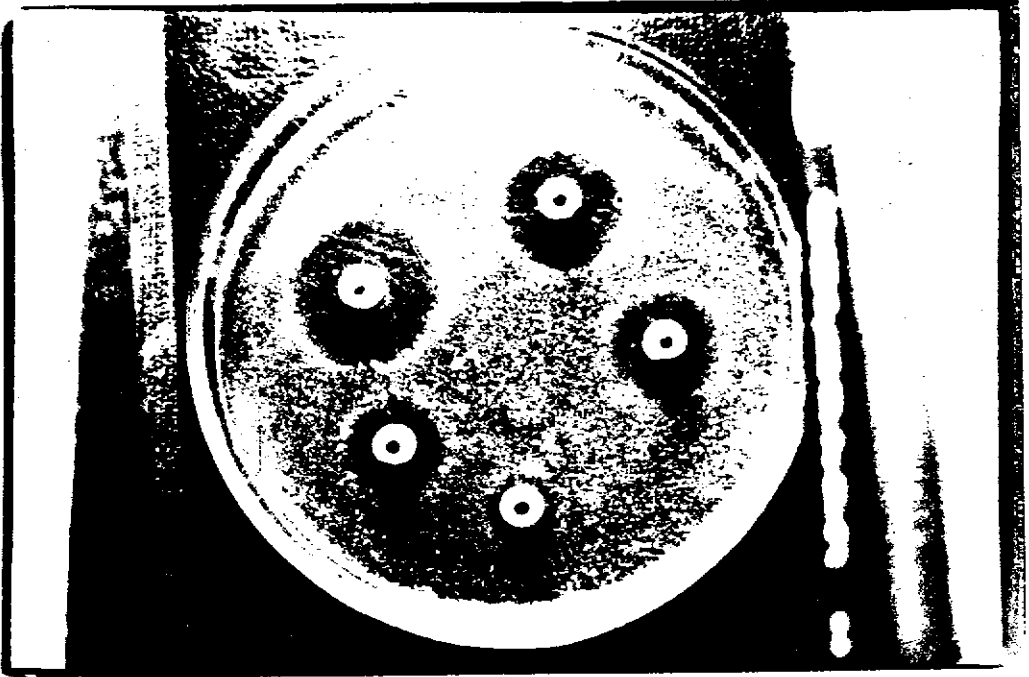
III. 2. 4. İlaçların plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri yönünden karşılaştırılması:

A ilacının 1. saatte ulaştığı ortalama plazma konsantrasyonu 1.62 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$, B ilacınıninki 1.59 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ ve C ilacınıninki de 2.05 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Şekil 3).

C ilacın 1. saatte ulaştığı ortalama plazma konsantrasyonu diğer iki ilaca göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P/ 0.05).

A ilacının 2. saatte ulaştığı ortalama plazma konsantrasyonu 2.99 ± 0.21 µg/ml, B ilacının 2.61 ± 0.15 µg/ml ve C ilacının da 3.13 ± 0.18 µg/ml olarak bulunmuştur. 2. saatte ulaşılan ortalama plazma konsantrasyonları arasındaki farklılık B ve C ilaçları için istatistiksel yönden anlamlı bulunmuş, A ile B ve A ile C ilaçları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

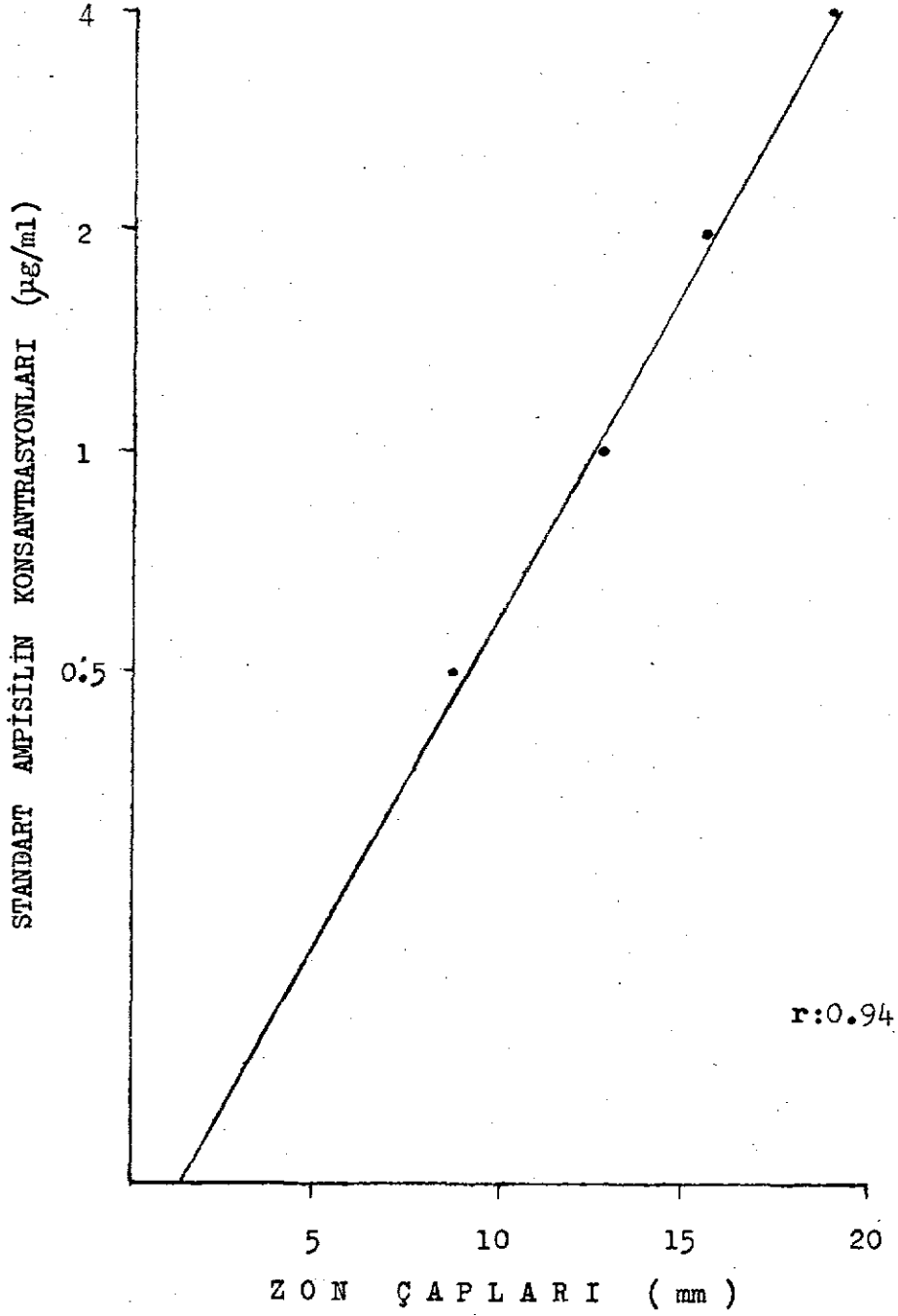
3., 4. ve 6. saatlerde her üç ilacın oluşturduğu plazma konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil 3). Tek bir deneğe ait çeşitli saatlerdeki plazma örnekleriyle elde edilen inhibisyon zonları Şekil 4'de görülmektedir.



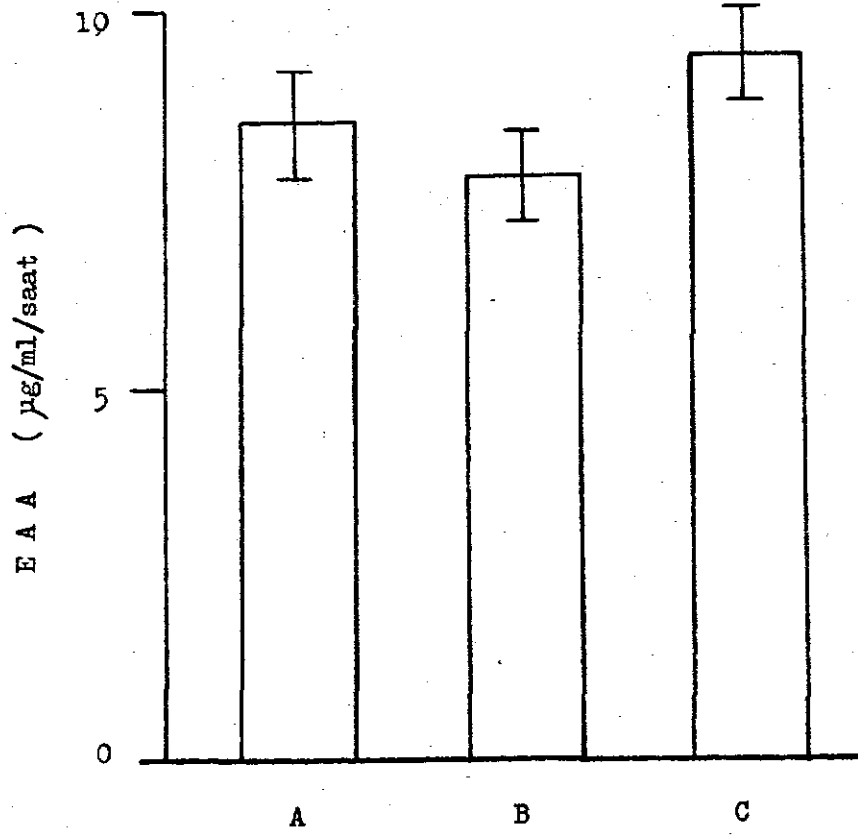
Şekil 4: Bir denekte, Bacillus subtilis ekilen plakta, plazma ile elde edilen inhibisyon zonları.

III.3.İn vitro test sonuçlarının değerlendirilmesi:

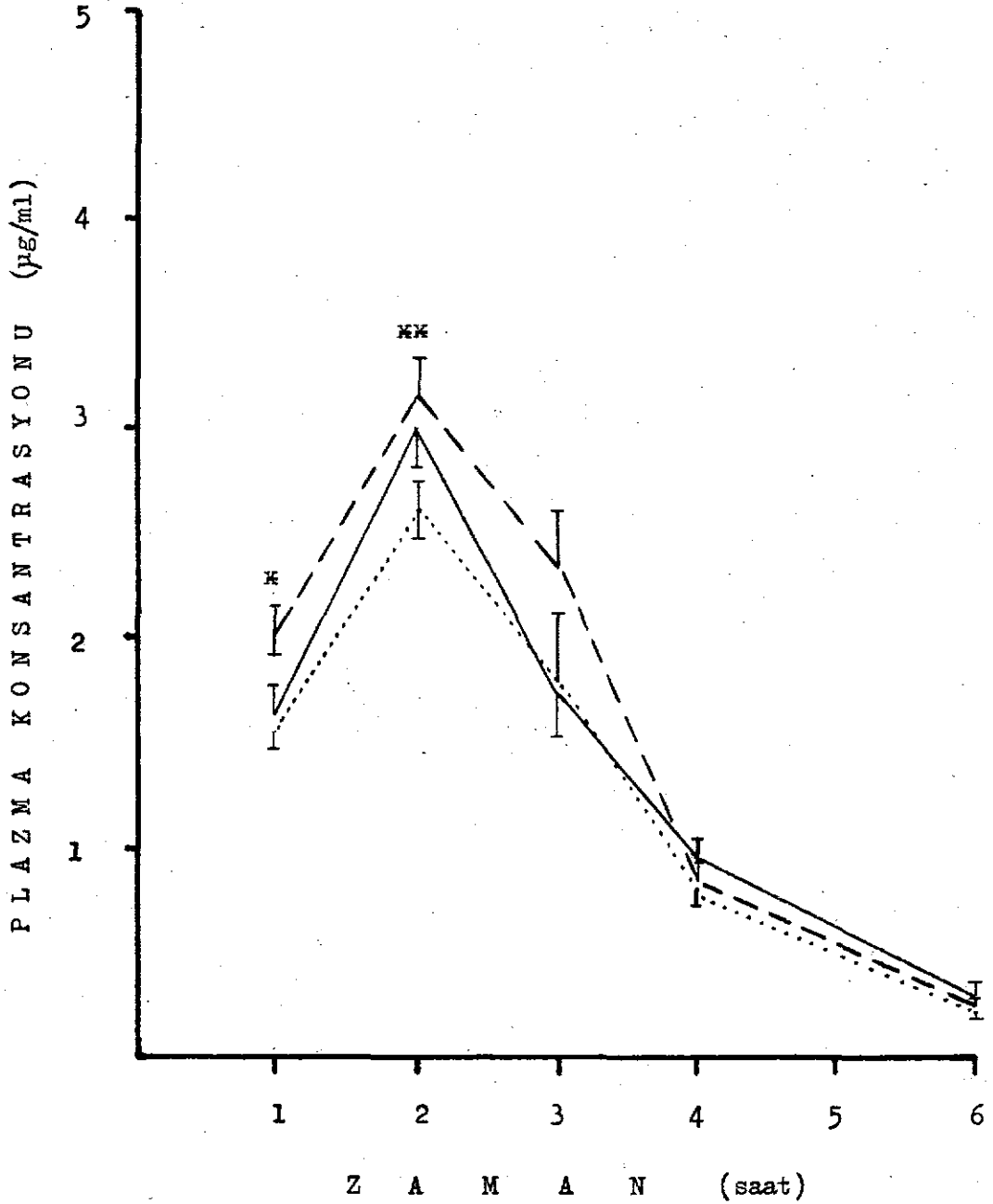
İn vitro testler kapsül içeriğinin tartılması ve bu içeriğin biyolojik aktivitesinin saptanması şeklinde yapılmıştır. Kapsül içerikleri A ilacı için 638.6 ± 8.39 mg, B ilacı için 590.0 ± 5.68 mg ve C ilacı için de 298.0 ± 4.29 mg olarak saptanmıştır. Her üç ilacın biyolojik aktiviteleri (% olarak) sırasıyla A ilacı için 97.29 ± 0.86 , B ilacı için 98.12 ± 1.07 ve C ilacı için 96.26 ± 1.13 olarak saptanmıştır. Aralarında anlamlı farklılık bulunmamıştır.



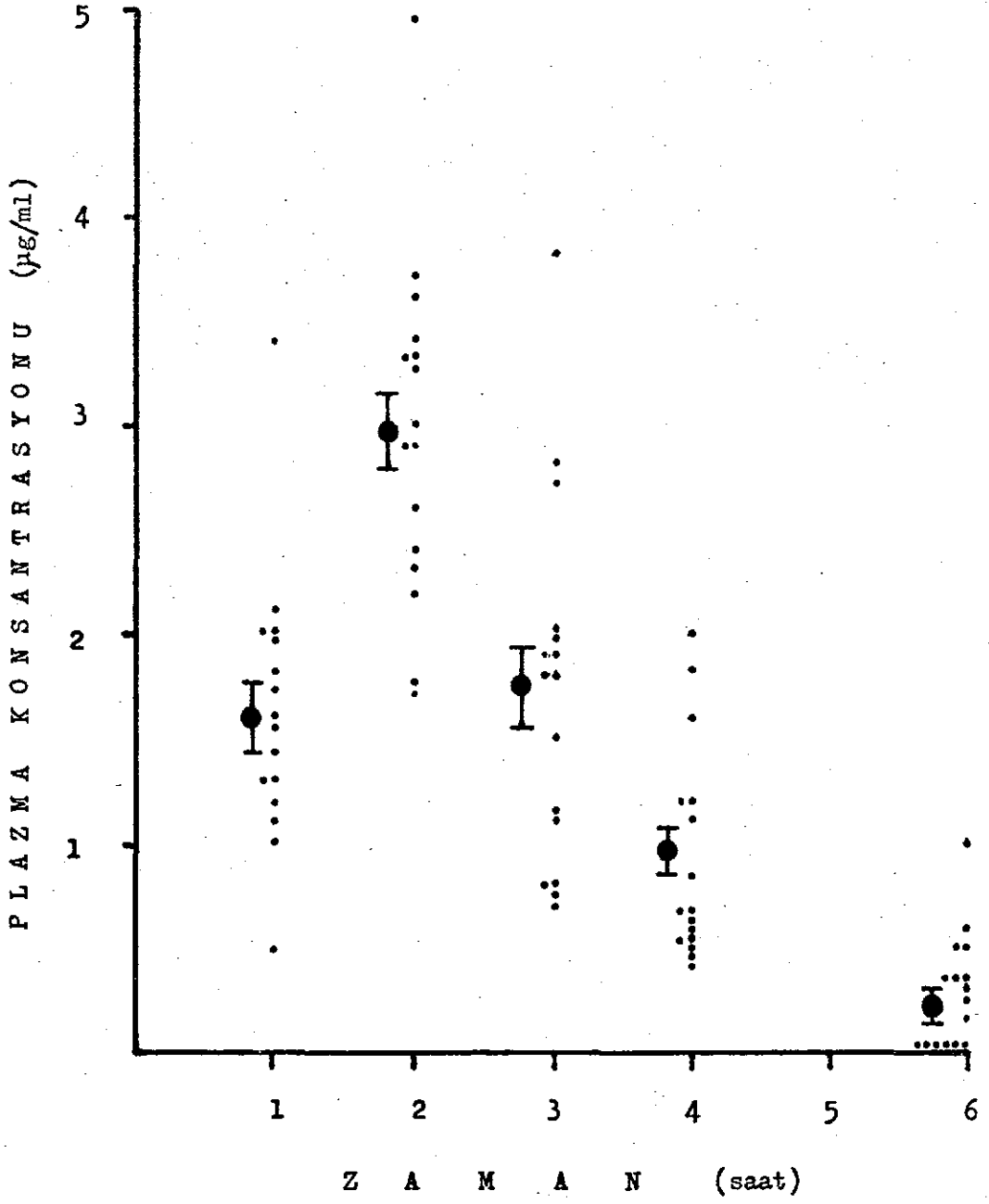
Şekil 1: Standart ampisilin konsantrasyonları ve bunlarla elde edilen inhibisyon arasındaki ilişki.



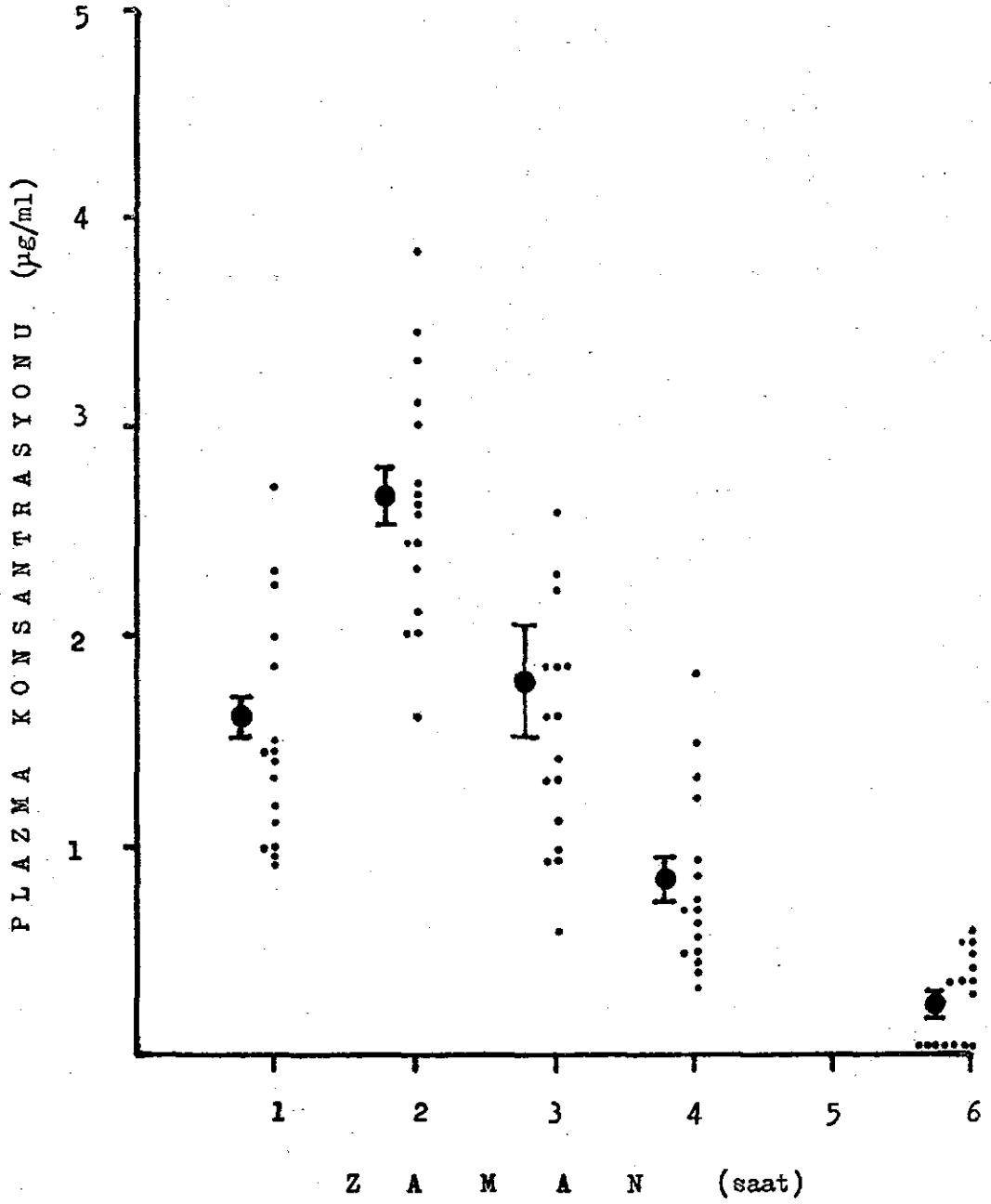
Şekil 2: İncelenen üç müstahzara ait plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA) değerleri (ortalama±S.H.).



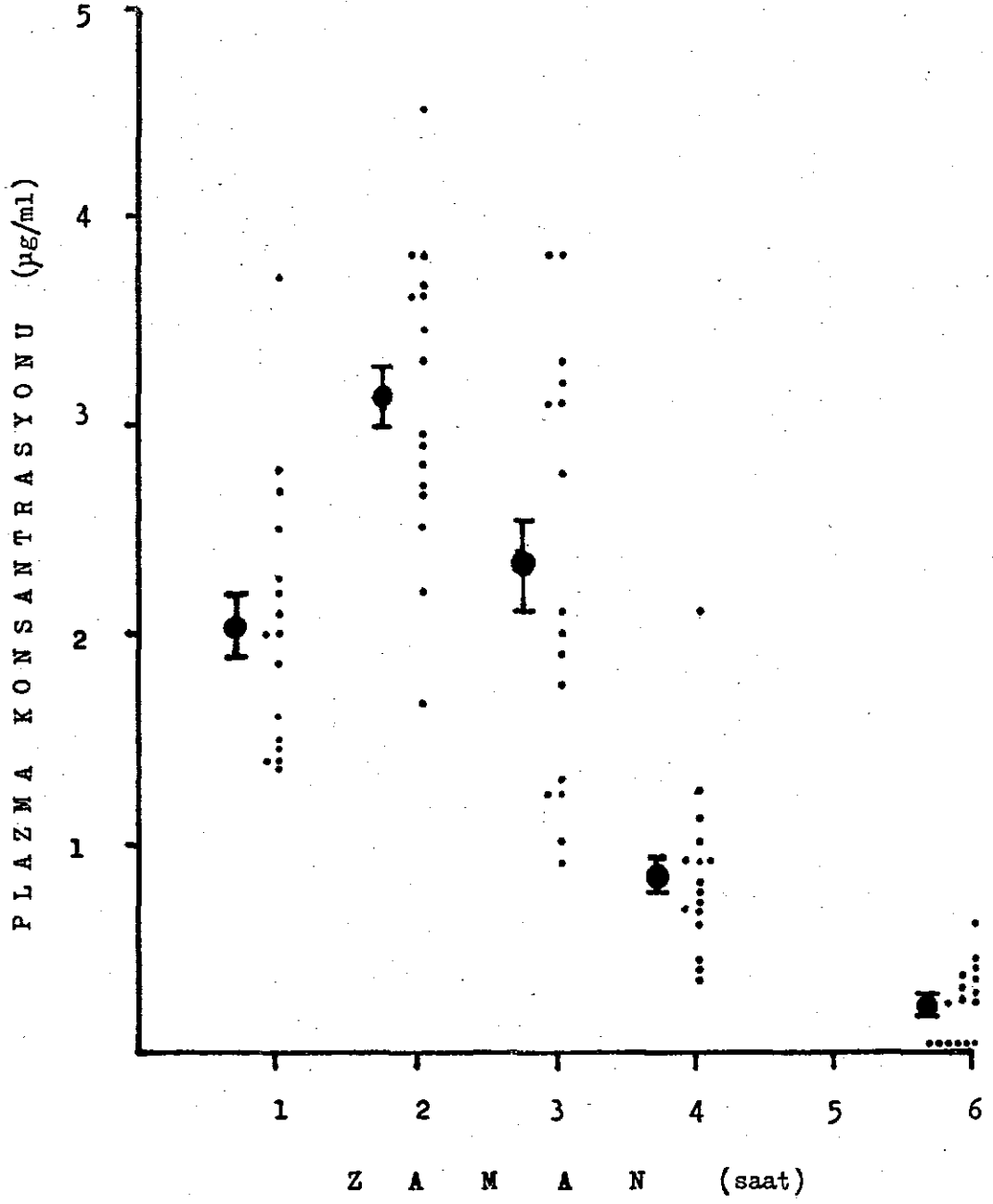
şekil 3: İncelenen üç müstahzara ait plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri. — A ilacı (n=16), B ilacı (n=16), - - - - C ilacı (n=16). (*) C ile A ve B'ye ait ortalamaların farkı anlamlıdır. (**) C ve B'ye ait ortalamaların farkı anlamlıdır. P/ 0.05.



Şekil 5: A ilacı ile onaltı denekte elde edilen plazma konsantrasyonlarının dağılımı.



Şekil 6: B ilacı ile onaltı denekte elde edilen plazma konsantrasyonlarının dağılımı.



Şekil 7: C ilacı ile onaltı denekte elde edilen plazma konsantrasyonlarının dağılımı.

Tablo 1: Deneklere ait yaş, ağırlık, boy özellikleri ve her üç müstahzarın eliminasyon yarılama ömrü ($t_{1/2}$), plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA), maksimum plazma konsantrasyonu (C_{maks}) ve maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için geçen süre (t_{maks})'ler. A=Ampisilin trihidrat (Fako), B=Ampisilin trihidrat (Squibb), C=Anhidr ampisilin (Wyeth).

DENEK	YAŞ	AĞIRLIK (kg)	BOY (cm)	$t_{1/2}$ (saat)			EAA ($\mu\text{g/ml/saat}$)			C_{maks} ($\mu\text{g/ml}$)			t_{maks} (saat)		
				A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Ş.O.	27	43	155	1.15	1.05	0.70	16.50	14.70	10.00	5.10	5.50	3.65	2	3	2
M.T.	38	70	166	0.90	0.68	0.75	5.85	5.26	6.21	1.85	2.40	2.20	2	2	2
R.O.	35	80	175	0.80	0.68	0.71	5.43	7.53	4.88	1.80	2.95	1.65	2	2	2
O.A.	25	60	175	1.22	1.40	0.68	9.88	6.57	10.23	3.60	2.10	3.45	2	2	2
A.O.	22	57	174	1.30	1.23	1.27	9.24	9.49	11.67	3.40	2.55	3.80	2	2	2
N.A.	22	60	175	0.80	0.60	1.25	8.69	4.44	13.02	3.35	1.60	3.80	2	2	3
S.U.	26	72	181	0.70	1.50	1.02	6.78	8.45	7.04	2.60	2.60	2.50	2	2	2
T.V.	35	62	178	0.93	0.66	0.95	7.38	7.59	11.19	2.30	3.42	3.80	2	2	2
Y.S.	32	83	176	1.08	0.73	0.75	7.58	6.50	6.18	3.70	2.60	2.65	2	2	2
S.M.	29	60	170	2.13	0.75	1.30	9.83	7.50	9.55	2.90	2.50	2.80	2	2	2
M.İ.	36	77	170	2.00	1.00	1.75	8.04	6.35	9.20	2.20	2.00	3.70	2	2	1
A.B.	34	82	189	0.73	1.25	1.25	5.57	7.83	8.20	2.40	2.70	2.70	2	2	2
A.O.	29	57	171	1.00	1.63	1.18	7.36	10.33	9.86	3.35	3.10	3.30	2	2	2
N.E.	29	82	182	1.50	1.05	0.95	8.87	6.91	10.63	3.00	2.40	3.60	2	2	2
N.K.	29	76	168	2.38	1.05	0.75	11.91	5.36	9.81	2.90	2.30	3.10	2	2	3
O.H.	30	64	175	0.58	1.25	1.00	6.90	9.71	12.73	3.28	3.30	4.50	2	2	2
Ort. \pm S.H.				1.20	1.03	1.02	8.49	7.78	9.40	2.98	2.75	3.20	2.00	2.06	2.06
				± 0.14	± 0.08	± 0.08	± 0.69	± 0.62	± 0.59	± 0.21	± 0.22	± 0.18	± 0.0	± 0.1	± 0.1

B Ö L Ü M IV

T A R T İ Ş M A

Antibiyotikler ülkemizde yüksek oranda tüketilen ilaçların başında gelmekte ve bu grup ilaçlarla ilgili biyoyararlanım çalışmaları yeterli düzeyde bulunmamaktadır. Sunulan çalışmada ampisilin Türkiye'de pazarlanmakta olan oral kapsül müstahzarlarından üç tanesi çapraz inceleme metoduna göre 16 deneğe verilmiş ve biyoyararlanım yönünden incelenmiştir. Sonuçlar, ilaçların maksimum plazma konsantrasyonları ile maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için geçen süreler arasında farklılık bulunmadığını göstermiştir. Bu müstahzarların plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri altında kalan alan değerleri arasında da anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu bulgular Whyatt ve diğ., (1977) tarafından yapılan 17 ayrı ampisilin müstahzarı ile

elde ettikleri sonuçlara uygunluk göstermektedir. Ancak, MacLeod ve diğ., (1972) inceledikleri 3 ampisilin kapsül müstahzarı arasında biyoyararlanım yönünden farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar her üç ilaca ait buldukları alan değerleri arasında anlamlı farklılık saptamışlar, fakat, bu farklılığın nedenine değinmemişlerdir.

İncelenen ampisilin kapsüllerinden biri anhidr ampisilin (C ilacı) diğer ikisi ise ampisilin trihidrat (A ve B ilaçları) içermektedir. İn vitro çözünürlük testlerinin yapıldığı bir araştırmada anhidr ampisilin 37°C'de sudaki çözünürlüğü 12 mg/ml, ampisilin trihidratın ise 8 mg/ml olarak saptanmıştır (Poole ve diğ., 1968). Anhidr ampisilin 37°C'de sudaki çözünürlüğünün trihidrat şekline göre daha düşük olduğu da bildirilmektedir (Windholz, 1976).

Sunulan çalışmada, her üç ampisilin müstahzarınının 1. saatte ulaştıkları ortalama plazma konsantrasyonları karşılaştırıldıklarında anhidr ampisilin 37°C'de sudaki çözünürlüğü 12 mg/ml, ampisilin trihidratın ise 8 mg/ml olarak saptanmıştır (Poole ve diğ., 1968). Anhidr ampisilin 37°C'de sudaki çözünürlüğünün trihidrat şekline göre daha düşük olduğu da bildirilmektedir (Windholz, 1976). Sunulan çalışmada, her üç ampisilin müstahzarınının 1. saatte ulaştıkları ortalama plazma konsantrasyonları karşılaştırıldıklarında anhidr ampisilin 37°C'de sudaki çözünürlüğü 12 mg/ml, ampisilin trihidratın ise 8 mg/ml olarak saptanmıştır (Poole ve diğ., 1968). Absorpsiyon hızındaki bu farklılık büyük olasılıkla anhidr şeklin çözünürlüğünün trihidrat şekle göre yüksek olmasından ileri gelmektedir. Nitekim bu farklılık 2. saatte de B ilacı ile karşılaştırıldığında yine anlamlı olarak anhidr ampisilin için yüksek bulunmuştur. Özellikle 1. saatte absorpsiyon hızları arasındaki farklılık Poole ve diğ., (1968) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla uyum göstermektedir.

C ilacının plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan değerinin A ve B ilaçlarının alan değerlerine oranı sırasıyla 1.107 ve 1.208 olarak bulunmuştur. Bu değerler daha önceki araştırmalarda saptanan 1.08 (Loo ve diğ., 1976) ve 1.17 (Poole ve diğ., 1968) değerleriyle yakınlık göstermektedir.

Her üç ilacın maksimum plazma düzeylerine ulaşmaları için geçen sürenin yaklaşık 2 saat olarak bulunması Mac Leod ve diğ., (1972), Vitti ve diğ., (1974) ile Lode ve diğ., (1974) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Plazma konsantrasyonu-zaman eğrilerinden hesaplanan eliminasyon yarı-ömürleri her üç ilaç için ortalama 1.1 (1.02 - 1.20) saat olarak bulunmuştur (Tablo I). Bu bulgu çeşitli araştırmacılar tarafından elde edilen sonuçlara uygunluk göstermektedir. Jusko ve diğ.; (1973) ampisilinin eliminasyon yarılanma ömrünü 1 saat, Kirby ve diğ., (1974) 1.3 saat ve Whyatt ve diğ., (1976) 1.37 saat olarak bildirmişlerdir.

Ampisilinin absorpsiyon düzeyinde bireyler arasında büyük değişkenlik gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Mac Leod ve diğ., 1972; Jusko ve diğ., 1973; Whyatt ve diğ., 1976; Ehrnebo ve diğ., 1979). Bu değişkenliğin nedenleri arasında ampisilinin absorpsiyon aşamasında besinlerle etkileşmesinin rolü olabileceği vurgulanmıştır. Bu çalışmada böyle bir etkileşme olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla ilaçlar

deneklere aç karnına verilmiştir. Buna rağmen absorpsiyonun kişiler arasında değişkenlik göstermesi (Şekil 5,6,7), bu durumun deneklere bağlı intrinsek faktörlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, Jusko (1975) ampisilin eliminasyonunun önemli bir göstergesi olan renal klerensinin bireyler arasında farklılık göstermesinin bu değişkenlikte rol oynayabileceği üzerinde durulduğunu bildirmektedir. Sunulan çalışmada da her ilaç için eliminasyon yarılanma ömrü bakımından denekler arasında farklı değerler saptanmıştır.

Müstahzarların biyolojik aktivite yönünden farklılık gösterebilecekleri ve bu farklılığın da deneklere ait absorpsiyon düzeyindeki değişkenlikte rol oynayabileceği düşünüldüğünden her üç ilacın in vitro biyolojik aktiviteleri saptanmıştır. Elde edilen bulgular FDA'nın kabul etmiş olduğu biyolojik aktivite sınırları içindedir.

Kapsül içeriklerinin biyolojik aktivite yönünden anlamlı farklılık göstermemesine karşılık plazma ampisilin düzeylerinin denekler arasında değişkenlik göstermesi ampisilin biyoyararlanımında biyolojik faktörlerin formülasyon faktörlerine kıyasla daha önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

B Ö L Ü M V

Ö Z E T

Bu çalışmada, Türkiye'de pazarlanmakta olan ampisilin oral kapsül müstahzarlarından üç tanesi biyoyararlanım yönünden incelenmiştir. Bu müstahzarların biri anhidr ampisilin, diğer ikisi ampisilin trihidrat içermektedir.

İlaçlar 16 sağlıklı denek üzerinde çapraz inceleme metoduna göre uygulanmış ve 1., 2., 3., 4. ve 6. saatlerde alınan kan örneklerinde ampisilin konsantrasyonları mikrobiyolojik yöntemle saptanmıştır. İn vitro testlerle de aynı müstahzarların aktif maddesinin kitlesine göre biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir.

Ampisilin müstahzarlarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri altında kalan alan değerleri ile maksimum plazma konsantrasyonları ve maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşmak için geçen süreler arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. 1. saatte ortalama plazma düzeyleri karşılaştırıldığında anhidr ampisilin, diğer iki trihidrat müstahzarından anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu farklılık anhidr şeklin çözünürlüğünün diğerine göre yüksek olması ile açıklanmaktadır. İn vitro testlerle müstahzarların biyolojik aktivite yönünden anlamlı farklılık göstermedikleri bulunmuştur. Bu da bireyler arasında gözlenen plazma ilaç düzeylerindeki değişkenlikte biyolojik faktörlerin etken olduğuna işaret etmektedir.

Sonuçlar, incelenen üç ampisilin kapsül müstahzarı arasında biyoyararlanım yönünden farklılık olmadığını göstermektedir.

B Ö L Ü M VI
K A Y N A K L A R

- Bennet, J. V., Brodie, J. L., Benner, E. J., Kirby, W. M. M.: Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl. Microbiol.*, 14, 170, 1966.
- Chodos, D. J. ve Disanto, A. R.: Basics of bioavailability. Upjohn Co. Calamazo, Michigan, 1973.
- Dittert, L. W., Griffen, W. O., Jr., La Piana, J. C., Schainfeld, F. J., Doluisio, J. T.: Pharmacokinetic interpretation of penicillin levels in serum and urine after intravenous administration. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9, 42, 1969.
- Dittert, L. W. ve DiSanto, A. R.: The bioavailability of drug products. *J. Am. Pharmaceut. Assn.*, 13, 421, 1973.
- Ehrnebo, M.: Distribution of ampicillin in human whole blood. *J. Pharm. Pharmacol.*, 30, 730, 1978.
- Ehrnebo, M., Nilsson, S., Boreus, L. O.: Pharmacokinetics of ampicillin and its prodrugs Bacampicillin and Pivampicillin in man. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 7, 429, 1979.
- Foltz, E. L., West, J. W., Bresow, J. H., Wallick, H.: Clinical pharmacology of Pivampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17, 442, 1970.
- Gibaldi, M. ve Perrier, D.: Pharmacokinetics. Dekker, New York, N. Y., 293, 1975.
- Hill, S. A., Seager, H., Taskis, C. B.: Comparative dissolution rates of the anhydrous and trihydrate forms of ampicillin.

J. Pharm. Pharmacol., 24, 152 P, 1972.

Jalling, B., Malmborg, A. S., Lindman, A., Boreus, L. O.: Evaluation of a micromethod for determination of antibiotic concentrations in plasma. Eur. J. Clin. Pharmacol., 4, 150, 1972.

Jusko, W. J., Lewis, G. P.: Comparison of ampicillin and Heta-cillin pharmacokinetics in man. J. Pharm. Sci., 62, 69, 1973.

Jusko, W. J.: The bioavailability of drug products. J. Ann. Pharmaceut. Assn., 15, 591, 1975.

Kayaalp, S. O.: Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 1, 145, 1981.

Kirby, W. M. M., Gordon, R. C., Regamey, C.: The pharmacology of orally administered amoxicillin and ampicillin. J. Infect. Dis., 129, 154, 1974.

Koch-Weser, J.: Bioavailability of drugs. N. Eng. J. Med., 291, 233, 1974.

Lode, H.: Comparative clinical pharmacology of three ampicillins and amoxicillin administered orally. J. Infect. Dis., 129, 156, 1974.

Loe, J. C. K., Foltz, E. L., Wallick, H., Kwan, K. C.: Pharmacokinetics of pivampicillin and ampicillin in man. Clin. Pharmacol. Ther., 16, 35, 1974.

MacLeod, C., Rabin, H., Ruedy, J., Caron, M., Zarowny, D., Davies, R. O.: Comparative bioavailability of three brands of ampicillin. Can. Med. Assn. J., 107, 203, 1972.

- Mandell, G. L., Sande, M. A.: Penicillins and cephalosporins. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. Goodman ve Gillman, 6. Baskı 1144, 1980.
- Neuvonen, P. J., Elonen, E., Pentikainen, P. J.: Comparative effect of food on absorption of ampicillin and pivampicillin. J. Int. Med. Res. 5, 7, 1977.
- Poole, J. W., Owen, G., Silverio, J., Freyhof, J. N., Rosenman, S. B.: Physicochemical factors influencing the absorption of the anhydrous and trihydrate forms of ampicillin. Curr. Ther. Res., 10, 292, 1968.
- Poole, J. W., Bahal, C. K.: Dissolution behaviour and solubility of anhydrous and trihydrate forms of ampicillin. J. Pharm. Sci., 57, 1945, 1968.
- Silverio, J., Poole, J. W.: Pharmacology for the pediatrician, serum concentrations of ampicillin in newborn infants after oral administration. Pediatrics, 51, 578, 1973.
- Swarbrick, J.: Current concepts in pharmaceutical sciences: Biopharmaceutics. 1970.
- Toothaker, R. D., Welling, P. G.: The effect of food on drug bioavailability. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 20, 173, 1980.
- Vitti, T. G., Gurwith, M. J., Ronald, A. R.: Pharmacologic studies of amoxicillin in nonfasting adults. J. Infect. Dis., 129, 149, 1974.

Welling, P. G., Huang, H., Koch, P. A., Craig, W. A., Madsen, P. O.: Bioavailability of ampicillin and amoxicillin in fasted and nonfasted subjects. J. Pharm. Sci., 66, 549, 1977.

Whyatt, P. L., Slywka, G. W. A., Melikian, A. P., Meyer, M. C.: Bioavailability of 17 ampicillin products. J. Pharm. Sci., 65, 652, 1976.

Windholz, M., Budavari, S., Stroumtsos, L. Y., Fertig, M. N.: The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 9. Baski, Merck Co. Inc., Rahway, N. J. 622, 1976.