

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANTİVİRAL İLAÇLARDAN OSELTAMİVİR FOSFAT'IN İNTESTİNAL
PERMEABİLİTESİNİN HPLC VE KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMLERİ İLE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLPembe HALAY

**ARALIK 2015
UŞAK**

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANTİVİRAL İLAÇLARDAN OSELTAMİVİR FOSFAT'IN İNTESTİNAL
PERMEABİLİTESİNİN HPLC VE KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMLERİ İLE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLPEMBE HALAY

ARALIK 2015
UŞAK

Gülpembe HALAY tarafından hazırlanan "Antiviral İlaçlardan Oseltamivir Fosfat'ın İntestinal Permeabilitesinin HPLC ve Kapiler Elektroforez Yöntemleri ile Tayini" adlı bu tezin Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI

Tez Danışmanı, Fen Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI

(Fen Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Prof. Dr. Cengiz SOYKAN

(Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği, Uşak Üniversitesi)

Doç. Dr. Erol ŞENER

(Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi)

Tarih: 23/12/2015

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans / Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Lütfullah TÜRKMEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülpeembe HALAY



**ANTİVİRAL İLAÇLARDAN OSELTAMİVİR FOSFAT'IN İNTESTİNAL
PERMEABİLİTESİNİN HPLC VE KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMLERİ İLE TAYİNİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Gülpembe HALAY

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
Aralık 2015**

ÖZET

Terapötik aktivitesi kanıtlanmış yeni keşfedilmiş bir ilaç molekülünün, bir dozaj şekli içerisinde, orijinal ilaç olarak piyasaya sunulması 800 milyon ile 1,2 milyar dolar gibi oldukça fazla bir maliyet ile birlikte 20 yıllık uzun bir süre gerektirir. Bunun için sağlık harcamalarını düşürmek isteyen ülkeler, orijinal ilacın patent koruma süresi dolması ile orijinal ilaçların biyoeşdeğerliği kanıtlanmış jenerik ilaçlarını kullanarak önemli oranda tasarruf sağlamaktadır. Türkiye, Avrupa Eşdeğer İlaç Birliği'nin (EGA) 2006 yılında yaptığı araştırmaya göre % 51,7'lik pazar payı ile 797 milyon TL tasarruf sağlayarak bu ülkelerin başında gelmektedir.

Avrupa İlaçlar Dairesince, sınıf 1 ve sınıf 3 (BCS, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre) ilaçların, vücuda alınmasıyla beraber hızla çözünmesi ve bu bağlamda biyoyararlanım sorunu oluşturmaması nedeniyle biyoeşdeğerlik çalışmasından muaf olarak piyasaya sunulabileceğini belirtmiştir. İlaçların biyoeşdeğerlikten muafiyetinde önemli rol oynayan BCS'ndeki sınıfının tayin edilebilmesi için öncelikle ilaçların bağırsak dokularından permeasyon katsayılarının tayin edilmesi ve yine aynı klavuza göre yüksek ya da düşük permeabl ilaç olarak sınıflandırılması gerekmektedir. İlgili çalışmada, permeabilite tayini amacıyla "Single Pass Intestinal Perfüzyon" (SPIP) tekniği kullanılmış olup, test ilacı (oseltamivir) ile referans ilaç (metoprolol tartarat) ve intestinal geçişi olmayan bir marker (fenol kırmızısı) aynı anda sıçanlara uygulanmıştır. Bu sebeple bu üç bileşeni aynı anda, doğru ve güvenilir biçimde analiz yapan analitik yöntemler gereklidir.

Tez çalışmamızda amaç; antiviral ilaç etkeni olan oseltamivir fosfatın intestinal permeabilitesinin tayinine ilişkin yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) çalışması olmaması sebebi ile ilgili HPLC ve CE yöntemlerinin geliştirilmesi ve yöntem geçerliliğinin sağlanması için doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve doğrusallık gibi validasyon parametrelerinin incelenmesidir. Geliştirilen HPLC ve CE yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak oseltamivir fosfatın permeabilitesi biyofarmasotik sınıflandırma sistemine göre değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oseltamivir, HPLC, Kapiler Elektroforez, İntestinal Permeabilite
Sayfa Adedi: 114
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI



**DETERMINATION OF THE INTESTINAL PERMEABILITY OF
OSELTAMIVIR PHOSPHATE FROM THE ANTIVIRAL DRUGS BY
HPLC AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHODS
(M.Sc. Thesis)**

Gülpembe HALAY

**UŞAK UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December 2015**

ABSTRACT

It requires too long time (about 20 years) and too much cost (800 million-1.2 billion dollars) for a newly discovered molecule with the proven therapeutic activity to be released in markets as a original drug in a dosage form. For this reason, countries that want to reduce their health expenditures get significant savings by using generic drugs which were proven for their bioequivalence by means of original drugs with expired patent protection. According to the survey of the European Generic Medicines Association (EGA) in 2006, Turkey takes the first place among European countries with the supply of 797 milion TL and 51,7 % market share.

European Medicines Agency pointed out that class 1 and class 3 drugs (according to the BCS, Biopharmaceutical Classification System) may be introduced to the markets without considering bioequivalence study because of fast dissolving as soon as getting inside the body and creating no bioavailability problems. In order to determine the classes of drugs in the BCS that play an important role in the exemption from bioequivalence, it is primarily necessary for the drugs to determine permeation coefficient from intestinal tissue and then to be classified as high or low permeable drug according to the same guidelines. In related work, "Single Pass Intestinal Perfusion" (SPIP) technique was used for the permeability determination and the test drug (oseltamivir), the referance drug (metoprolol tartrate) and a marker without intestinal transit (phenol red) were implemented to the rats. Therefore, analytical methods are necessary for the accurate, reliable and simultaneous analysis of these three components.

The aim of our thesis work is to develop some high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) methods for the determination of intestinal permeability of an antiviral drug active substance, oseltamivir phosphate and investigate some validation parameters such as accuracy, precision, sensitivity and linearity to ensure the method validity due to the lack of work about the intestinal permeability evaluation of related compound by HPLC and CE. The permeability of oseltamivir phosphate was evaluated according to the Biopharmaceutical Classification System by comparing the results obtained via the developed HPLC and CE methods.

Key Words: Oseltamivir, HPLC, Capillary Electrophoresis, Intestinal Permeability

Page Number: 114

Supervisor: Asst. Prof. Senem ŞANLI

TEŞEKKÜR

İlk olarak, tez alıőmalarım süresince benden ilgi, alaka ve desteklerini esirgemeyerek kıymetli vakitlerini ayıran danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI'ya en derin teőekkürlerimi sunarım.

Yine çalıőmalarım boyunca değerli tecrübelerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Nurullah ŞANLI'ya ve permeabilite çalıőmalarındaki desteklerinden ötürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a teőekkürü bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, her türlü destek ve emekleri ile beni bu günlere getiren sevgili aileme ve başta bu süreç olmak üzere hayatımın her anında verdiği maneviyat ve yaptığı fedakârlıklardan ötürü sevgili eşim Erkan HALAY'a teşekkür etmek için söylenebilecek sözlerin kifayetsiz kalacağını belirtmek isterim.

Son olarak, 211T007 No'lu Proje ile tez sürem boyunca sağladığı burs imkanı ve desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Gülpembe HALAY

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sistemi.....	3
1.1.1 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sisteminde Temel Alınan Parametreler....	6
1.1.2 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sistemine Dayalı Biyomuafiyet	7
1.2 Virüsler	9
1.2.1 Virüslerin Morfolojisi	9
1.2.2 Virüslerin Sınıflandırılması.....	11
1.2.3 Virüslerin Organizmaya Girişi ve Konakçıda Yayılımı.....	13
1.2.4 İnfluenza Virüsü.....	14
1.2.5 Oseltamivir	17
1.3 Kromatografi.....	22
1.3.1 Kromatografide Temel Parametreler.....	24
1.3.2 Kromatografinin Sınıflandırılması	29
1.3.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	30
1.4 Elektroforez	39
1.4.1 Kapiler Elektroforez	40
1.4.2 Kapiler Elektroforezin Temel İlkeleri	41
1.4.3 Elektroosmotik Akış (EOF)	43
1.4.4 Band Genişlemesi.....	46
1.4.5 Joule Isınması.....	46
1.4.6 Kapiler Elektroforez Türleri.....	47
1.5 Oseltamivir ve Permeabilite ile İlgili Bilimsel Çalışmalar	53
1.5.1 Oseltamivir ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar	53
1.5.2 Permeabilite ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar	55

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa No</u>
2 MATERYAL ve METOT	57
2.1 Materyal	57
2.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	57
2.1.2 Kullanılan Kimyasallar	58
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler	59
2.2 Metot	60
2.2.1 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Belirlenmesi için Yapılan Perfüzyon Çalışmaları	60
2.2.2 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Tayini için HPLC Koşullarının Belirlenmesi	62
2.2.3 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Tayini için Kapiler Elektroforez Koşullarının Belirlenmesi	63
3 BULGULAR	66
3.1 Oseltamivir Fosfat, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için HPLC ile Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve İstatiksel Değerlendirilmesi	66
3.2 HPLC ile Elde Edilen Verilere Göre Bileşikler İçin Permeabilite Değerleri	72
3.3 Oseltamivir Fosfat, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için CE yöntemi ile Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve İstatiksel Değerlendirilmesi	74
3.4 CE ile Elde Edilen Verilere Göre Bileşikler İçin Permeabilite Değerleri..	80
4 SONUÇ ve YORUM	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	94

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. İlaçların BCS'ne göre sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2. BCS'ne göre etkin maddelerin sınıflandırılması	5
Çizelge 1.3. DNA virüsleri	12
Çizelge 1.4. RNA virüsleri	12
Çizelge 1.5. HPLC dedektörleri ve özellikleri.....	38
Çizelge 1.6. Bazı kromatografik terimlerin elektroforezdeki karşılıkları.....	41
Çizelge 1.7. EOF'e etki eden faktörler	45
Çizelge 1.8. Kapiler elektroforez türleri	48
Çizelge 1.9. CE'de kullanılan dedektörler	51
Çizelge 3.1. Bileşiklerin HPLC yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)	66
Çizelge 3.2. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular.....	68
Çizelge 3.3. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular.....	68
Çizelge 3.4. Oseltamivirde kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama±SD).....	73
Çizelge 3.5. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama ± SD)	73
Çizelge 3.6. Bileşiklerin CE yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)	74
Çizelge 3.7. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının CE yöntemi ile analizine ait gün içi bulgular	76
Çizelge 3.8. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının CE yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular.....	76
Çizelge 3.9. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama ± SD)	81

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Virüslerin yapısı	10
Şekil 1.2. Tam bir virüsün morfolojisi.....	11
Şekil 1.3. Oseltamivir fosfat'ın kimyasal yapısı	18
Şekil 1.4. Kromatografik ayırımın gösterimi.....	23
Şekil 1.5. HPLC kromatogramı	24
Şekil 1.6. Teorik tabaka sayısı hesabını gösteren bir kromatogram	26
Şekil 1.7. Ayırma gücünün kromatogramlara göre değişimi.....	27
Şekil 1.8. Elüsyon izotermleri ve pik şekilleri.....	28
Şekil 1.9. Kuyruklanma faktörünün kromatogram üzerinde gösterilişi (Tf= W0,05/2f).....	28
Şekil 1.10. Pik asimetri oranının hesaplanması	29
Şekil 1.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü .	32
Şekil 1.12. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şekilsel görünümü	33
Şekil 1.13. Elektroferogram.....	42
Şekil 1.14. Kapiler yüzeyinde oluşan çift tabaka ve elektroosmotik akış	43
Şekil 1.15. Kapiler kolonda EOF ve parabolik akış	44
Şekil 1.16. Kapiler Zone Elektroforez	48
Şekil 1.17. CE cihazının kısımları	49
Şekil 3.1. Oseltamivir fosfatın HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği	66
Şekil 3.2. Fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ...	67
Şekil 3.3. Metoprolol'ün HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.....	67
Şekil 3.4. Oseltamivir fosfat için HPLC yöntemi ile elde edilen zamana karşı derişim grafiği(n=6).....	69
Şekil 3.5. Metoprolol için HPLC yöntemi ile elde edilen zamana karşı derişim grafiği (n=6).....	69
Şekil 3.6. Fenol kırmızısı için HPLC yöntemi ile elde edilen zaman karşı derişim grafiği (n=6).....	70
Şekil 3.7. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 0.dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	70

ŞEKİLLERİN LİSTESİ (devam)

Sayfa No

Şekil 3.8. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	70
Şekil 3.9. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	71
Şekil 3.10. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	71
Şekil 3.11. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	71
Şekil 3.12. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	72
Şekil 3.13. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm).....	72
Şekil 3.14. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama \pm SD) ($p<0.0001$)	73
Şekil 3.15. Oseltamivir fosfatın CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.....	74
Şekil 3.16. Fenol kırmızısının CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği	75
Şekil 3.17. Metoprolol'ün CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.....	75
Şekil 3.18. Oseltamivir fosfat için CE yöntemi ile elde edilen zamana karşı- derişim grafiği (n=6).....	77
Şekil 3.19. Metoprolol için CE yöntemi ile elde edilen zaman karşı-derişim grafiği (n=6)	77
Şekil 3.20. Fenol kırmızısı için CE yöntemi ile elde edilen zamana karşı-derişim grafiği (n=6).....	78
Şekil 3.21. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	78
Şekil 3.22. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	78
Şekil 3.23. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	79

ŞEKİLLERİN LİSTESİ (devam)

Sayfa No

Şekil 3.24. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	79
Şekil 3.25. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	79
Şekil 3.26. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	80
Şekil 3.27. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)	80
Şekil 3.28. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama \pm SD).	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge/Kısaltma

Açıklama

AgCl	Gümüş klorür
ANDA	Kısaltılmış yeni ilaç başvurusu
AR-GE	Araştırma-Geliştirme
BCS	Bakır katalizli azit-alkin siklokatalıma
BE	Biyoeşdeğerlik
BSD	Bağıl standart sapma
BY	Biyoyararlanım
°C	Santigrat derece
CDC	Amerika hastalık kontrol ve korunma merkezi
CE	Kapiler elektroforez
CECK	Kapiler elektrokinetik kromatografi
CGE	Kapiler jel elektroforez
CI	Kimyasal iyonlaşma
CM	Hareketli fazdaki denge derişimi
CMV	Cytomegalovirüs
CS	Sabit fazdaki denge derişimi
CZE	Kapiler zone elektroforez
DAD	Diyot dizi dedektörü
DNA	Deoksiribonükleik asit
ϵ	Dielektrik sabiti
EI	Elektron impakt iyonizasyon
EMA	Avrupa ilaç dairesi
FDA	Amerikan ilaç ve gıda dairesi
FEN	Fenol kırmızısı
fg	Femtogram
GC	Gaz kromatografisi
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HA	Hemaglütinin
HCE-1	Karboksil esteraz-1

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Simge/Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
HCl	Hidroklorik asit
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSV	Herpes simplex virüs
HVD	Yüksek değişkenlik gösteren ilaçlar
IACUC	Hayvan sağlığı ve kullanımı komitesi
IgA	İmmunglobulin A
ITP	İzotakoforez
IVIVK	İn vitro -in vivo korelasyon
K	Dağılma katsayısı
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
kV	Kilovolt
LC-MS	Sıvı kromatografi-Kütle spektrometresi
LLOQ	Düşük tayin alt sınır
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
M	Molar
MECK	Misel elektrokinetik kromatografisi
MET	Metoprolol
mL	Mililitre
mbar	Milibar
mM	Milimolar
µA	Mikroamper
µg	Mikrogram
µe	Elektroforetik hareketlilik
µEOF	Elektroosmotik hareketlilik
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Simge/Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
MS	Kütle spektrometresi
η	Çözelti viskozitesi
N	Normal
NaOH	Sodyum hidroksit
NA	Nöraminidaz
ng	Nanogram
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
ODS	Oktadesilsilan
OF	Oseltamivir fosfat
OK	Oseltamivir karboksilat
PAO	Pik asimetri oranı
PEEK	Polietereter keton
Peff	İntestinal permeabilite
PEPT-1	Peptit taşıyıcı 1
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
RNA	Ribonükleik asit
RP-HPLC	Ters faz-Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
R_s	Ayırım gücü
RSV	Respiratuar sinsiyal virüs
SD	Standart sapma
SiO^-	Silanoat
SiOH	Silanol
SPIP	Single pass intestinal perfüzyon
SSS	Santral sinir sistemi
SUT	Sistem uygunluk testleri

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

Simge/Kısaltma

Açıklama

TLC

İnce tabaka kromatografisi

ULOQ

Üst tayin sınırı

UV-GB

Morötesi-Görünür bölge

USP

Amerikan farmakopesi

VK

Varyasyon katsayısı

W

Watt

ν EOF

Elektroosmotik akış hızı

ζ

Zeta potansiyeli

1 GİRİŞ

Yeni bir kimyasal molekülün sentezlenip ilaç şeklinde piyasaya sunulması, 10-12 yıllık yoğun araştırma-geliştirme çalışmalarını gerektiren zorlu bir süreçtir. Bu süreci başarıyla tamamlayarak ruhsatlandırılan ve patenti alınan ilaçlara "orijinal ilaç" denilmektedir. Bu ilaçlar, güçlü yasalarla, patent ve veri koruma hakları altında dünyanın birçok ülkesinde belirli süreler boyunca korunurlar. Başka bir ilaç şirketinin, bu süre içinde, bu ilacın benzerini üretmesine izin verilmez [1]. Bu süre ülkemizde 20 yıl olarak belirlenmiştir.

Orijinal ilacın yasal koruma süresinin dolması ile birlikte, ilaç şirketleri orijinal ilacın benzerlerini, "jenerik ilaç" olarak adlandırarak piyasaya sürebilirler. Bu ilaçlar, orijinal ilaç ile dozaj şekli, dozu, uygulama yolu, kalitesi ve kullanım amacı (endikasyonu) açısından karşılaştırılabilen ilaçlardır. "Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi'nden [Food and Drug Administration (FDA)]" jenerik ilaç başvuruları, "kısaltılmış yeni ilaç başvurusu [Abbreviated new drug applicaton (ANDA)]" şeklinde gerçekleştirilir. Kısaltılmış başvuru olarak adlandırılmasının sebebi, başvuru sırasında genellikle ilacın etkinlik ve güvenilirliğini kanıtlamak amacıyla prelinik ve/veya klinik çalışmalar gerek duyulmamasıdır. Bunun yerine, başvuru ilacın orijinal ilaca biyoeşdeğer olduğunun kanıtlanması gerekmektedir. Orijinal ürünle biyoeşdeğerliliği kanıtlanmış jenerik ilaçlar, yüz milyonlarca dolarlık araştırma harcaması yapmak zorunda kalmadan, orijinal ilaçların kanıtlanmış etkinlik ve güvenilirliğine dayanılarak piyasaya sunulur.

Dünya sağlık harcamalarını düşürmek isteyen ülkeler, eşdeğer ilaç kullanımıyla önemli oranda tasarruf sağlamaktadır. Çünkü AR-GE maliyeti olmayan eşdeğer ilaçlar, orijinal ürünün fiyatından ortalama %20-80 daha ucuzdur [1].

Biyoeşdeğerlik (BE), "aynı etkin madde veya maddelerin, aynı miktarını içeren iki müstahzarın, aynı molar dozda verilişinden sonra biyoyararlanımlarının (absorbsiyon hız ve derecesi) ve böylece etkilerinin hem etkinlik hem güvenilirlik bakımından esas olarak aynı olmasını sağlayacak derecede benzer olması" olarak tanımlanmaktadır. BE, iki ilacın birbirine bağlı biyoyaralanımıdır ve ilaçların performansını karşılaştırmalı olarak tanımlar [2].

BE dökümanları orjinal ilaç başvuruları için bazı durumlarda yararlı olabilir. Bu dökümanlar:

- Erken ve geç dönem klinik çalışma formulasyonlarının karşılaştırılmasında,
- Klinik ve kararlılık çalışmalarında kullanılan formulasyonların karşılaştırılmasında (eğer farklı ise),
- Klinik çalışma formulasyonu ve piyasaya sunulan formulasyonun karşılaştırılmasında fayda sağlayabilmektedir [2].

İlaçların biyoyararlanımları ve ilaç ürünlerinin biyoeşdeğerlik gösterip göstermediği in vitro ve in vivo yöntemlerle değerlendirilir. BE başvurularının zorunlu olduğu başvurular ise kısaltılmış başvurulardır. Test ve referans ürünün biyoeşdeğerliliği karşılaştırılırken en sık kullanılan biyolojik gösterge ilaç-plazma profilleridir. BE karşılaştırması için başvuru in vivo çalışmalar genellikle " altın standart" olarak görülmektedir; ancak bu genel varsayım değerlendirildiğinde, in vitro çalışmaların bazen in vivo çalışmaların yerine geçebileceği gösterilmiştir [3].

Bu durum birkaç yönden ele alınabilmektedir:

- İnsan çalışmaları yerine in vitro çalışmalar maliyeti önemli ölçüde azaltmaktadır,
- İn vivo çalışmalar ile ürünün performansının vücuttan bağımsız olarak değerlendirilemeyeceği açıktır. Özellikle birey içi ve bireyler arası varyasyonlar nedeni ile ürünün kalitesi ve performansından çok net sonuç alınamayabilir. David ve arkadaşları, 2003-2005 yılları arasında FDA'da kayıtlı 180 farklı ilaç üzerinde yapılan 1000'in üzerindeki in vivo BE çalışmasını incelemiştir. Bu ilaçların % 31'i olan HVD'lerin %51'i, %10'u ve % 39'u, sırasıyla, sürekli, belirsiz ve tutarsız değişkenlik göstermiştir. Yüksek değişkenlik nedeni olarak etkin maddenin farmakokinetik özellikleri ve bitmiş ürünün çözünme özellikleri incelenmiştir. Bu ilaçların %60'ının etkin maddenin farmokinetik özelliğine bağlı olarak yüksek değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Formülasyona bağlı değişkenliğin yalnızca %20 olduğu belirlenmiştir [4]. Bu nedenle yüksek değişkenlik gösteren ilaçlar için formülasyon performansının daha net incelenebilmesi için in vitro BE çalışmaları önerilmiştir [3].

- Hayvan Sağlığı ve Kullanımı Komitesi (IACUC) hayvan çalışmaları yerine canlıların kullanılmadığı çalışmaların yapılmasını desteklemektedir. Etik açıdan canlılarla çalışmanın minimize edilmesi savunulmaktadır. Bu nedenle in vivo koşullara alternatif yöntemler önem kazanmıştır [3].

- İn vitro çalışmalar gerçekleştirildiğinde daha hızlı sonuç alınmaktadır [3].

İn vitro çalışmaların geliştirilmesinde, ilaçların biyofarmasotik özelliklerine göre sınıflandırılması yol gösterici olmaktadır [5].

1.1 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sistemi

İlaçların spesifik özellikleri temel alınarak gruplandırılması, geliştirilecek olan in vitro yöntemin standardize edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla 1995 yılında Amidon ve arkadaşları tarafından özel bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir [5]. Biyofarmasotik Sınıflandırma Sistemi [Biopharmaceutic Classification System (BCS)] olarak adlandırılan bu sistem, ilaçların çözünme özellikleri ile etkin maddenin çözünürlük ve permeabilite özelliklerine dayanan bilimsel bir yaklaşımdır [5]. Hızlı salımlı [immediate release (IR)] katı oral dozaj şekillerini kapsar. Salım özelliği değiştirilmiş ilaçlar için uygun bir sınıflandırma sistemi değildir. Sistemin amacı, çözünürlük ve permeabilite ölçümlerinden hareketle ilacın in vivo performansını tahmin etmek, in vitro çalışmaları artırıp, in vivo çalışmaları en aza indirmek, in vitro in vivo korelasyonu (IVIVK) sağlamak ve biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik (BY/BE) çalışmalarından vazgeçme kriterlerini belirlemektir.

BCS'ne göre ilaçlar çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre 4 grup altında toplanmaktadır (Çizelge 1.1.) [5].

Çizelge 1.1. İlaçların BCS'ne göre sınıflandırılması

	<u>Yüksek çözünürlük</u>	<u>Düşük çözünürlük</u>
Yüksek permeabilite	Sınıf 1	Sınıf 2
Düşük permeabilite	Sınıf 3	Sınıf 4

Sınıf 1 ilaçlar, yüksek çözünürlük, hızlı çözünme ve yüksek permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu sınıftaki ilaçların emiliminde hız sınırlayıcı basamak çözünmedir veya ilaç çok hızlı çözünme gösteriyorsa hız sınırlayıcı basamak mide boşalmasıdır. Bu durumda çözünme profilleri iyi tanımlanmalı ve tekrarlanabilir olmalıdır [5]. Bu gruptaki ilaçlar bazı gereklilikleri sağladığı takdirde in vivo biyoeşdeğerlik çalışmalarından muaf tutulabilmektedir [6]. Buna göre;

- İlaç gastrointestinal kanalda dayanıklı olmalı,

- Formülasyonda kullanılan diğer yardımcı maddeler ilacın emilim hızı ve miktarını etkilememeli,
- İlacın terapötik indeksi dar olmamalı,
- İlacın emilimi ağızda gerçekleşmemelidir.

Tüm bu koşulların sağlanması durumunda ilaç, katı dozaj şekli gibi değil, daha çok oral çözelti gibi davranmaktadır. İki ilacın biyoeşdeğerliğinin saptanması için in vivo çalışmaya gerek duyulmadan in vitro çözünme hızı profilleri karşılaştırılır. Elde edilen çözünme hızı profilleri kandaki konsantrasyon-zaman profillerinin yerini tutar ve böylece test ve referans ilacın biyoeşdeğerlik durumu in vitro testlerle belirlenir.

Sınıf 2 ilaçlar, düşük çözünürlük ve yüksek permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu sınıftaki ilaçların emiliminde hız sınırlayıcı basamak ilacın çözünmesidir. Çözünme profilleri farklı pH'larda ve en az 4-6 nokta ile tanımlanmalıdır. İyi tasarlanmış in vitro koşullar sağlanarak IVIVK kurulabilir.

Sınıf 3 ilaçlar, yüksek çözünürlük gösterir ve emilimleri genellikle formülasyondan bağımsızdır. Eğer Sınıf 3 ilaçlar için çözünme tüm fizyolojik pH'larda çok hızlıysa (15 dakika içinde %85 veya daha fazla çözünme), in vivo ortamda adeta oral çözelti gibi davranırlar. Oral çözeltiler ise genellikle in vivo biyoeşdeğerlik çalışmalarından muafırlar. Sınıf 3 ilaçlar, formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ile etkileşme özelliklerine göre iki gruba ayrılabilir [7]:

1) Sınıf 3a: Yüksek çözünürlük /Düşük permeabilite/Hızlı çözünme /Yardımcı maddelerden etkilenmeme

2) Sınıf 3b: Yüksek çözünürlük/Düşük permeabilite/Hızlı çözünme/Yardımcı maddelerden etkilenme

Buna göre Sınıf 3a ilaçlar in vivo biyoeşdeğerlik çalışmalarından muaf tutulabilir [8].

Sınıf 4 ilaçlar, düşük çözünürlük ve düşük permeabiliteye sahip ilaçlardır. Bu grupta yer alan ilaçların hem çözünmesinde hem de emilmesinde belirgin problemler bulunmaktadır. BCS'ne göre bazı etkin maddelerin sınıflandırılması Çizelge 1.2.'de görülmektedir [9].

Çizelge 1.2. BCS'ne göre etkin maddelerin sınıflandırılması

		Yüksek çözünürlük			Düşük çözünürlük		
		<u>Sınıf 1</u>			<u>Sınıf 2</u>		
Yüksek permeabilite	Abakavir	Atipirin	Lidokin	Amidaron	Glipizit	Fenitoin	
	Ergonovin	İmipramin	Klorfeniramin	Atorvastatin	Gliburit	Piroksikam	
	Knidin	Teofilin	Lomefloksasin	Azitromisin	Griseofulvin	Raloksifen	
	Asetaminofe	Atropin	Siklofosfamid	Karbamazepin	İbuprofen	Ritonavir	
	Etambutol	Ketoralak	Meperidin	Karvedilol	İndinavir	Sakinovir	
	Primakin	Verapamil	Desipramin	Klorpromazin	İndometazin	Sirolimus	
	Asiklovir	Buspiron	Metoprolol	Sisaprit	İtrakonazol	Spirinolakton	
	Promozin	Labetolol	Diazepam	Siprofloksasin	Ketokonazol	Takrolimus	
	Amiloirt	Zidovudin	Metronidazol	Siklosporin	Lansoprazol	Talinolol	
	Fluksetin	Kafein	Diltiazem	Danazol	Lovastatin	Tamoksifen	
	Prednisolon	Levodopa	Midazolom	Dapson	Mebendazol	Terfenadin	
	Amitriptilin	Kaptiril	Mİnosiklin	Diklofenak	Naproksen	Varfarin	
	Glukoz	Levofloksasin	Disopiramid	Diflunisal	Nelfinavir		
	Rosiglitazone	Klorokin	Misoprostol	Digoksin	Ofloksasin		
	Doksepin	Nifedipin	Fenobarbital	Eritromisin	Oksaprozin		
	Doksisilin	Enalapril	Fenilalanin	Flurbiprofen	Fenazopridin		
Düşük permeabilite	<u>Sınıf 3</u>			<u>Sınıf 4</u>			
	Asiklovir	Eritromisin	Nadolol	Amfoterisin B			
	Amilorid	Famotidin	Pravastatin	Klortalidon			
	Amoksisilin	Sefazolin	Penisilinler	Klorotiyazid			
	Atenolol	Setirizin	Ranitidin	Kolitsin			
	Atropin	Simetidin	Tetrasiklin	Mebendazol			
	Bifosfonatlar	Feksofenadin	Trimetoprim	Neomisin			
	Bidisomit	Folinik asit	Valsartan	Furosemid			
	Kaptopril	Gansiklovir	Zalkitabin				
	Kloksasilin	Lisiniprol					
Diklolsasilin	Metformin						

1.1.1 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sisteminde Temel Alınan Parametreler

1.1.1.1 Etkin Maddenin Çözünürlüğü

BCS kapsamında sağlık otoritelerince kabul gören çözünürlük kriterleri oluşturulurken mide-bağırsak kanalının fizyolojik pH değerleri dikkate alınmıştır. FDA’da kabul gören çözünürlük kriterine göre, ilacın piyasadaki en yüksek dozu 37°C’de, pH 1,0-7,5 aralığında, 250 mL veya daha az miktardaki ortamda çözünebiliyorsa ilaç yüksek çözünürlük gösterir [6]. EMA (Avrupa İlaç Dairesi) 2010 yılında güncellediği kılavuzda pH aralığını 1,0-6,8 olarak belirtmiştir [8].

1.1.1.2 Dozaj Şeklinin Çözünme Hızı

FDA, fizyolojik değerleri göz önüne alarak, in vitro çözünme hızı ortamı için pH 1,0-7,5 aralığını tercih etmektedir [6]. EMA 2010 yılında güncellediği kılavuzda çözünme ortamları için pH aralığını 1,0-6,8 olarak önermiştir [8].

BCS’ye göre, Amerikan Farmakopesi (USP)’nde belirtilen çözünme hızında kullanılan aletlerden USP cihaz I (doner sepet yöntemi) ile 100 rpm hızda veya USP cihaz II (doner palet yöntemi) ile 50 rpm hızda, 900 mL pH 1.2 (0.1 N HCl veya enzimsiz mide sıvısı), pH 4,5 ve pH 6,8 tamponu (veya bağırsak sıvısı) ortamlarının her birinde, ortama herhangi bir yüzey etkin madde eklenmeden etkin maddenin en az %85’i 30 dakika içerisinde çözünüyorsa ilaç hızlı çözünme özelliğine sahiptir. Eğer %85’i 15 dakika içerisinde çözünüyorsa ilacın çok hızlı çözünme gösterdiği belirtilir [5]. Örnek alma aralıkları için 10, 15, 20, 30 ve 45. dakikalar önerilmektedir [8].

1.1.1.3 Etkin Maddenin Permeabilitesi

Etkin maddenin permeabilitesi dolaylı olarak emilme oranına bağlıdır. BCS’ne göre ilacın mide-bağırsak kanalında dayanıklı olması koşulu ile ölçülen emilim oranının FDA’ya göre %90’a eşit veya daha büyük olması gerekmekte iken EMA’da bu değer %85’e eşit veya daha büyük olarak belirtilmektedir [6,8].

Bir etkin maddenin permeabilite değerlerinin BCS'ne göre hangi sınıfta yer aldığını belirlemek amacı ile metoprolol tartarat referans madde olarak seçilir [10].

Terapötik aktivitesi kanıtlanmış yeni keşfedilmiş bir ilaç molekülünün ,bir jenerik ürünün, biyoeşdeğerlik çalışmasından muaf olarak piyasaya çıkabilmesi için bu sınıflandırmadaki yerinin tespiti ve bunun için de bağırsak permeabilitesinin tayini önemlidir. Bir ilacın

permeabilitesi, bağırsak membranının bütünlüğü, yapısı, ilacın fizikokimyasal özellikleri (hidrojen bağı yapabilme kapasitesi, molekül büyüklüğü vb.) ve spesifik transport mekanizmaları gibi faktörelere bağlıdır [11]. Bir ilacın permeabilite sınıfı,

- Mutlak biyoyararlanım çalışmaları,
- Kütle denge çalışmaları,
- Bağırsak perfüzyonu çalışmaları,
 - İnsanda in vivo bağırsak perfüzyonu,
 - İnsan ya da hayvanda bağırsak dokuları kullanarak in vitro permeasyon
 - Uygun hayvan modeli kullanılarak in vivo yada in situ bağırsak perfüzyonu,
 - Tek tabakalı epitel hücre (ör. CaCo-2) kültüründen permeasyon,

çalışmaları ile belirlenebilir Böyle yöntemlerle % 90 emilme saptanırsa, o etkin maddeye, yüksek oranda permeabl madde denir. Absorbsiyon derecesinin intravenöz referans doza oranla %90'dan fazla olması durumunda etkin maddenin permeabilitesinin yüksek olduğu kabul edilir. Yüksek permeabilitenin bir göstergesi olarak kabul edilen doğrusal ve tam absorbsiyon durumlarında biyoyararlanımın etkilenme olasılığının az olduğu belirtilmiştir [12].

1.1.2 Biyofarmasotik Sınıflandırma Sistemine Dayalı Biyomuafiyet

Bir etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olduğu biliniyorsa, ürünün vücuda alınması sonrasında, karşılaşıcağı pH aralığında dozaj sisteminin dağılmasının ardından hızla çözünmesi ve permeabilitesinin de bilinmesi koşuluyla ilacın herhangi bir biyoyararlanım sorunu oluşturmayacağı beklenmektedir. Bu durumda çözünme hızı profillerinin benzerliğine dayanarak in vivo biyoeşdeğerlik çalışması zorunluluğu kaldırılabilir [6].

BCS'ye dayanan biyomuafiyet kavramı in vivo biyoeşdeğerlik çalışmalarını azaltmak amacıyla geliştirilmiş bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım terapötik indeksi dar olmayan, yüksek çözünürlük gösteren ve emilimi bilinen ilaçları kapsamakta ve ayrıca oral yoldan alınan hemen salım gösteren katı dozaj şekillerini içermektedir [8]. Otoriteler, sadece Sınıf 1 ve Sınıf 3 ilaçlar için gerekli koşullar sağlandığında biyomuafiyeti kabul etmektedirler.

BCS'ye dayalı Sınıf 1 ilaçlar için biyomuafiyet:

- Etkin madde yüksek çözünürlük ve tam emilim gösteriyorsa (BCS Sınıf 1),
 - Test ve referans ürün in vitro çözünme hızı testlerinde çok hızlı çözünme ($\geq\%85/15$ dakika) veya hızlı çözünme ($\geq\%85/30$ dakika) gösteriyorsa,

▪ Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler biyoyararlanımı kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebileceğinden her iki formülasyonda genellikle aynı veya benzer yardımcı maddeler kullanılıyorsa sağlanabilir.

BCS'ye dayalı Sınıf 3 ilaçlar için biyomuafiyet:

- Etkin madde yüksek çözünürlük ve sınırlı emilim gösteriyorsa (BCS Sınıf 3),
- Test ve referans ürün in vitro çözünme hızı testlerinde çok hızlı çözünme (\geq %85/15 dakika) veya hızlı çözünme (\geq %85/30 dakika) gösteriyorsa,
- Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler biyoyararlanımı kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebileceğinden her iki formülasyonda genellikle aynı veya benzer yardımcı maddeler kullanılıyorsa sağlanabilir.

Biyomuafiyet kararının uygunluk riski Sınıf 3 ilaçlarda spesifik bölgeden emilim, taşıyıcı-protein etkileşimi, yardımcı madde kompozisyonu ve terapötik risk gibi nedenlerle Sınıf 1'den daha kritik olmaktadır [8].

Biyomuafiyet için yapılan in vitro çözünme hızı profillerinin karşılaştırılmasında benzerlik etkeni yani f_2 değerinin hesaplanması önerilmektedir. f_2 değeri 50-100 arasında ise iki ilacın benzer olduğu yorumu yapılmaktadır. f_2 değeri aşağıdaki Eş.1.1 ile hesaplanabilmektedir:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=r} [\bar{R}(t) + \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right] \quad (1.1)$$

Eşitlikte,

n : Örnek alınan noktaların sayısı

$R(t)$: Çözünen referans yüzdesinin ortalaması

$T(t)$: Çözünen test yüzdesinin ortalaması

Benzerlik faktörü değerlendirmelerinde varyasyon katsayısının (%VK) ilk zamanlarda %20'den fazla olabileceği, ancak daha sonraki zamanlarda %10'u geçmemesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca ard arda gelen iki zaman noktasının ortalamasının standart sapması %10'u geçmemelidir. İlk 15 dakika içerisinde ilacın % 15'den fazlasının çözünmesi

durumunda f_2 hesaplanması yapılmaksızın çözünme profilleri benzer kabul edilmektedir [6].

1.2 Virüsler

Virüs, hücre çekirdeği, metabolizması ve organelleri olmayan, nanometrik düzeyde ölçülebilen ve çoğalabilmesi için canlı hücreye ihtiyaç duyan mikroorganizmadır [13]. Virüslerde genetik bilgiyi taşıyan nükleik asitin yapısı oldukça farklılık ve çeşitlilik gösterir. Tüm diğer canlılardan farklı olarak virüsler tek tip nükleik asit (DNA ya da RNA) taşırlar [14]. Ayrıca virüsler ile diğer tek hücreli mikroorganizmalar arasındaki temel farklılıklar başlıca; büyüklük, besi yerinde veya hücre dışında üreme, ikiye bölünerek çoğalma, DNA ve RNA'yı birlikte içermeme, nükleik asitin infeksiyöz oluşu, yapıda ribozom oluşu ve antibiyotiklere duyarlılık olarak değerlendirilmektedir.

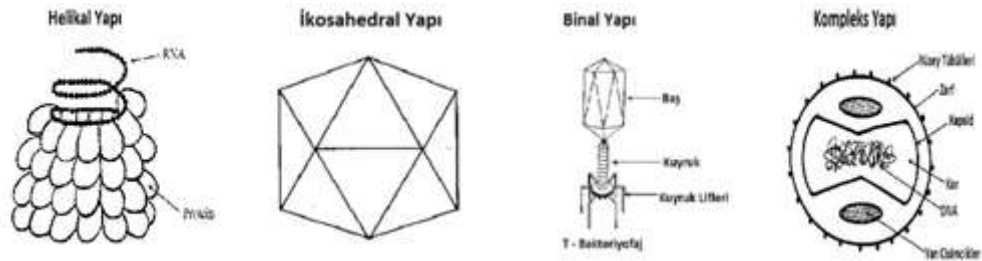
1892 yılında Rus bilgin Dimitri Ivanowsky virüslerin porselen süzgeçlerden geçtiğini ispatlamış (bakteriler geçemez), 1898 yılında Hollandalı mikrobiyolog Martinus Beijerinck de tütün bitkisindeki hastalık faktörünü "*contagium vivum fluidum*" (bulaşan canlı sıvı) olarak adlandırmıştır. Wendell Stanley aslında bulaşan etkenin bir partikül olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda Friedrich Loeffler ve Paul Frosch şap hastalığı virüsünü filtrelerden geçirmişlerdir. Latince zehir anlamına gelen virüs kelimesi ilk olarak Louis Pasteur tarafından kullanılmıştır. Virüsler ilk olarak elektron mikroskopu ile 1931 yılında Alman mühendisler Ernst Ruska ve Max Knoll tarafından görüntülenmiştir. D. Baltimore ise viral DNA ve RNA'ya dayalı sınıflandırma çalışmalarında bulunmuştur [13].

Günümüze kadar 5000'den fazla virüs bulunmuş ve daha keşfedilmeyi bekleyen binlercesi olduğu düşünülmektedir [15].

1.2.1 Virüslerin Morfolojisi

Virüslerin morfolojisi elektron mikroskop ve X-ray teknikleriyle incelenmektedir. Işık mikroskopuyla sadece çiçek virüsü hakkında sınırlı bir görünüm elde edilebilir. Virüsler en küçük infeksiyöz etkenlerdir. Genel olarak büyüklükleri 20 ile 300 nm arasında değişir. En küçük RNA virüsü (*Rous sarkoma*) 80 nm, en küçük DNA virüsü (*hepatit B*) 10-26 nm'dir. Virüsün en basit şekli olan virion, tek bir nükleik asit molekülü ile bunu çevreleyen bir protein tabakasından oluşmuştur. Virionun protein tabakasına "kapsid" denilir. Kapsid, içindeki nükleik asit ile birlikte "nükleokapsit" adını alır. Bazı virüslerde, kapsid lipoprotein yapıda bir zarfla çevrili olabilir.

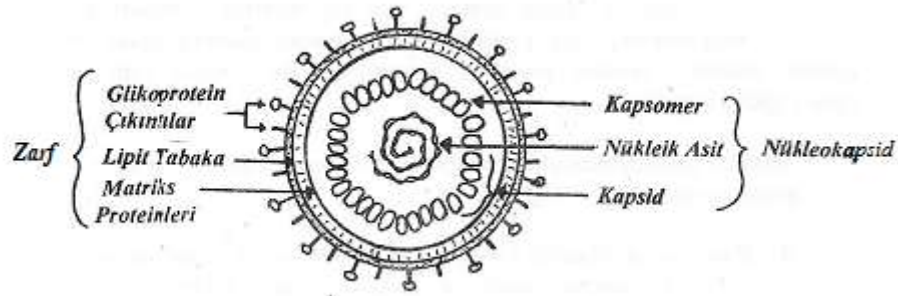
Kapsid, "kapsomer" denilen, çok küçük ve basit yapılı, belli sayıdaki morfolojik ünitelerin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. İnfekte hücre içinde kapsomerler ayrı ünite olarak sentezlenir ve sonra bir araya gelerek birleşirler ve kapsidi oluştururlar. Kapsidin fonksiyonu, hücreden hücreye nükleik asiti taşımasıdır. Nükleik asidi hücrenin nükleaz enzimlerinden korur, konak hücrede spesifik reseptöre bağlanır (zarfsız virüslerde) ve antijeniteyi belirler. Sentezlenen kapsomerlerin bir araya gelmeleri ve belli bir düzen içinde birleşmeleri kapsidinin kendisine özel bir simetri kazandırır. Birleşmede, her bir kapsomerdeki 'bağ'ların yapısı rol oynar. Her virüs türü için farklı olan kapsomer birleşmesine göre virionlar değişik şekil alırlar. Genel olarak kapsid yapılarına göre virüsler iki grupta incelenirler. Birinci grup virionlar küp şeklindedir. Oluşan küp 20 yüzlüdür (her bir yüz eşkenar bir üçgendir). İkinci grup virionlar çubuk şeklinde, düzgün veya külah gibi bir ucu daralan borular halinde görülürler. Küp şeklindeki virionlara, ikosahedral simetrlili, boru şeklindeki virionlara ise helikal simetrlili virionlar denilir. Bu iki simetri dışında, çiçek virüsleri değişik bir yapı gösterir. Çiçek virüslerinde hem ikosahedral hem de helikal simetri ile bir araya gelen kapsomerler virüse tuğla şekli vererek kompleks (kompleks simetri) bir yapı oluştururlar. Ayrıca fajları infekte eden virüslerde binal yapı mevcuttur.



Şekil 1.1. Virüslerin yapısı

Virüsler, genomunu hücre dışında taşıyan, kendini olumsuz koşullardan koruyan, konak hücreyi tanıyarak ona tutunan ve genomun konak hücre içine girmesini sağlayan protein kılıflara sahiptirler ve çok az sayıda protein türünün tekrarlı şekilde düzenlenip bir araya gelmesiyle oluşur. Virion, konak hücreden tomurcuklanarak ayrılırken önceden kendi proteinlerini de ekledikleri hücre zarından bir parçayı protein kılıfı üzerine alarak hücreden ayrılır. Protein kılıfın üzerindeki bu yapı "zarf" olarak isimlendirilir [14]. Bazı virüslerin zarflı, bazılarının da zarfsız olduğunu belirtmek gerekir. Zarfın kaynağı aslında hücre

membranıdır. Zarf lipid ve protein yapıdadır. Zarf, peplomer veya spike'lar hücre reseptörlerini tanırlar, virüsün hücreden kurtulmasına yardımcı olur, segmentli genomlarda segmentin bir arada tutulmasına yani parçalanmamasını sağlar [13]. Zarflı virüsler çevresel koşullara karşı çok daha hassaslar. Diğer yandan zarflı virüsler konak hücreden tomurcuklanarak birer birer çıktıkları için konağın ölümüne yol açmaz ve çok daha uzun süreli ve dirençli hastalıklara neden olurlar [14].



Şekil 1.2. Tam bir virüsün morfolojisi

1.2.2 Virüslerin Sınıflandırılması

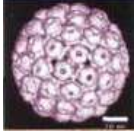

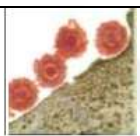
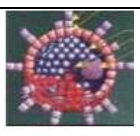
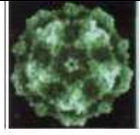
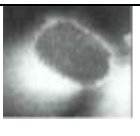
Virüslerin sınıflandırılmasında dikkat edilen en önemli nokta virüslerin DNA veya RNA içermesidir. Kısaca virüsün bulundurduğu nükleik asit, sınıflandırmada önemli rol oynar. Bu noktadan çıkarak virüsler familyalara bölünmüştür. Sadece bununla kalmayıp nükleik asitlerin tek iplik veya çift iplik olması da önemli kriterlerdendir. Nükleik asitlere göre sınıflandırma Baltimore adında bir araştırmacı tarafından önerilmiş ve hala kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmaya Baltimore sınıflandırması da denmektedir. Virüslerin sınıflandırılmasında, hangi canlıyı infekte ettiği (bitki, hayvan, insan) ve hangi dokuya ilgi gösterdiği (nöyrotropik) gibi özellikler sınıflandırmada dikkate alınmaktadır. Virüsün yapısı (zarflı, zarfsız, ikosahedral, helikal) da sınıflandırmada dikkate alınan bir başka özelliktir [13].

Virüs sınıflandırılması virüslerin üç özelliğinden yararlanılarak yapılmaktadır:


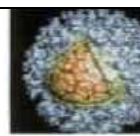

- 1) Morfoloji (büyüklük, şekil, nükleokapsid simetrisi ve kapsomerlerin sayısı)
- 2) Zarf varlığı
- 3) Viral nükleik asidin tipi, yapısı (DNA veya RNA; tek veya çift iplikli; tek molekül veya parçacıklı) ve replikasyon stratejisi [16].







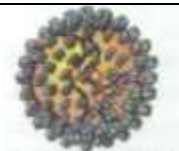


Fakat günümüzde virolojide en çok kullanılan sınıflandırma nükleik asit tipine göre yapılmaktadır. Çizelge 1.3. ve Çizelge 1.4.'de virüslerin nükleik asit tipine göre sınıflandırılması ve bu virüslerin morfolojik özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. DNA virüsleri

	<p>Papovavirüsler</p> <p>45-55 nm boyutlarında, çift iplikli çembersel DNA, zarfsız, ikozahedral protein kılıf, kopyalama hücre çekirdeğinde gerçekleşir. Örneğin; siğil hastalığına neden olurlar.</p>
	<p>Adenovirüsler</p> <p>65-70 nm boyutlarında, çift iplikli çizgisel DNA, zarfsız, ikozahedral protein kılıf, kopyalama hücre çekirdeğinde gerçekleşir.</p>
	<p>Herpetovirüsler</p> <p>180-250 nm boyutlarında, çift iplikli çizgisel DNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf, kopyalama hücre çekirdeğinde gerçekleşir. Örneğin; <i>Herpes simplex</i> (uçuk virüsü).</p>
	<p>Hepadnavirüsler</p> <p>42 nm boyutlarında, % 70 çift iplikli % 30 tek iplikli çembersel DNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf, DNA'sı hücre DNA ile birleşme yeteneğinde. Örneğin; <i>Hepatit B</i> virüsü.</p>
	<p>Parvovirüsler</p> <p>22 nm boyutlarında, tek iplikli çizgisel DNA, zarfsız, ikozahedral protein kılıf, kopyalama ve protein kılıf oluşumu hücre çekirdeğinde gerçekleşir.</p>
	<p>Poxvirüsler</p> <p>225-300 nm boyutlarında, çift iplikli çizgisel DNA, kopyalama hücre sitoplazmasında gerçekleşir. Örneğin; deride hastalık oluşturan virüsler.</p>

Çizelge 1.4. RNA virüsleri

	<p>Picornavirüsler</p> <p>25-30 nm boyutlarında, tek iplikli artı kutuplu RNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf.</p>
	<p>Togavirüsler</p> <p>60-70 nm boyutlarında, tek iplikli artı kutuplu RNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf, Örneğin; kızamıkçık virüsü.</p>
	<p>Flavivirüsler</p> <p>45-55 nm boyutlarında, tek iplikli artı kutuplu RNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf, sitoplazmada replike olur. Örneğin; sarı humma virüsü.</p>

	<p>Coronavirüsler</p> <p>120 nm boyutlu, tek iplikli artı kutuplu RNA, zarflı, sarmal protein kılıf. Örneğin; SARS virüsü, soğuk algınlıklarının % 10-30'undan sorumlu.</p>
	<p>Reovirüsler</p> <p>75 nm boyutunda, 10-12 parçalı çift iplikli RNA, zarfsız, ikozahedral protein kılıf çift tabakalı, RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi taşır.</p>
	<p>Rhabdovirüsler</p> <p>180x75 nm mermi biçimli, tek iplikli eksi kutuplu RNA, sarmal protein kılıf, zarflı. Örneğin; kuduz virüsü.</p>
	<p>Filovirüsler</p> <p>80 nm boyutunda filament biçimli, zarflı, sarmal protein kılıf. Örneğin; ebola virüsü.</p>
	<p>Paramyxovirüsler</p> <p>150 nm boyutunda, tek iplikli eksi kutuplu RNA. Örneğin; kızamık virüsü.</p>
	<p>Orthomyxovirüsler</p> <p>80-120 nm boyutlarında, 8 parçalı tek iplikli eksi kutuplu RNA, zarflı, sarmal protein kılıf. Örneğin; grip virüsü.</p>
	<p>Bunyavirüsler</p> <p>100 nm boyutunda, zarflı, sarmal protein kılıf. Örneğin; tatarcık ateşi virüsü.</p>
	<p>Arenavirüsler</p> <p>110-130 nm boyutlarında, zarflı, sarmal protein kılıf, viral zarf içinde hücresel ribozomlar bulunur.</p>
	<p>Retrovirüsler</p> <p>100 nm boyutlarında, artı kutuplu birbirinin aynı iki RNA, zarflı, ikozahedral protein kılıf. Virion içinde reverse transkriptaz enzimi taşırlar. Örneğin; HIV RNA tümör virüsleri.</p>

1.2.3 Virüslerin Organizmaya Girişi ve Konakçıda Yayılımı

Virüslerin en önemli yayılma yolu dolaşım sistemidir. Bu bağlamda virüs, serbest virüs ya da enfeksiyon oluşturmadan eritrositlere tutunarak kan dolaşımında ilerlerler. Virüsler lenf sistemi yoluyla da yayılabilirler. Bazı virüsler bağırsakta replike olur ve bağırsak

mukozasındaki peyer plakları yardımıyla lenfoid sisteme girerler. Lenfositik hücreler enfekte olduktan sonra enfeksiyöz virüsü saçabilirler. Sinir sistemi, virüslerin yayılmasında diğer önemli bir yoldur. Genellikle periferik sinir hücrelerinden merkezi sinir sistemine yayılırlar. Virüs değişik yollarla konakçıya girdikten sonra virüs ile hedef hücrenin proteinleri arasında bir etkileşim olur. Viral proteinlerin bir ya da bir kaç hücredeki spesifik molekülleri tanırlar. Virüsler çoğalır ve enfeksiyon (semptomlar) oluşur [13].

Virüslerin organizmaya giriş yolları 6 farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar; deriden direkt inokulasyon, gastrointestinal kanal, ürogenital sistem, konjunktiva ve solunum sistemi şeklindedir [13].

1.2.3.1 Solunum Yolu

Mukozal yüzeylerde virüsün girişinin engellendiği konakçının doğal defans sistemleri vardır. Mukozadan salgılanan mukus epitel hücreleri kaplar ve virüsün tutulumunu engeller. Ayrıca IgA mukozal immunitede çok önemli rol oynar. Alveollerde makrofaj ve diğer fagositik hücreler vardır. Bazı virüsler (*Herpesvirus, adenovirus, orthomyxovirüs, paramyxovirüs ve rhinovirüsler*) bu bariyerleri geçerek organizmaya girebilir [13].

Bu virüsler solunum yolundan damlacık ya da salya ile girerler. Öksürme ve aksırma ile çok sayıda virüs saçılır. 5 µm'den küçük virüsler havada uzun süre asılı kalırlar. Büyük partiküller genellikle burun türbinatlarında doğal filtrelelere yakalanır ve atılırlar, ancak 5 µm'den küçük partiküller alveollere kadar ulaşabilirler[13].

Çoğu solunum yolu ajanları akut üst solunum yolu enfeksiyonları üretirken bazıları da zatürre, pnemonitis ve bronşit hastalıklarına neden olurlar. Solunum yolu virüsleri; rhinovirüs, influenza virüsü, parainfluenza virüsleri, RSV, adenovirüsler, coronavirüsler, coxsackievirüsler ve echovirüsler'i içerir. Bunlara ek olarak herpes simplex virüsleri (HSV), varicella-zoster virüsü (VZV) ve cytomegalovirüs (CMV) solunum yolu hastalıklarına neden olabilirler [17].

1.2.4 İnfluenza Virüsü

İnfluenza virüs, grip denilen akut solunum yolu hastalığının etkenidir. İnfluenza virüsü yüzyıllardır büyük kayıplara yolaçmaktadır. Neden olduğu epidemilerden en önemlisi, 1918-1919'da meydana gelen ve "İspanya gribi" olarak adlandırılan ve bütün dünyada yaklaşık 20-40 milyon insanın ölümüne yol açan grip salgınıdır. 1918-1919 pandemisinin

neden olduğu zarar ve kayıplar, grip etkenine yönelik araştırmaların hızlanmasına neden olmuştur [18,19]. 1920'li yılların sonlarında Richard E.Shope, olası grip etkeni olarak filtre edilmiş mukus salgısından elde ettiği domuz influenza virüsünün insana geçebileceğini tespit etmiştir. 1933'de ise Londra'daki Ulusal Tıp Araştırma Enstitüsü'nde Wilson Smith ve Sir Patrick Laidlaw influenza virüsünü izole etmeyi başarmışlardır [18,20]. Ayrıca influenza B 1939 yılında Francis tarafından, influenza C virüsü ise 1956'da Taylor tarafından izole edilmiştir [21].

1957-1958 yıllarında Asya gribi (influenza A H2N2) ve 1968-1969 yıllarında Hong Kong gribi (influenza A H3N2) geçen yüzyılın diğer pandemileridir. Ayrıca 1977-1978 yıllarında daha önce ortaya çıkan influenza A H1N1 virüsleri Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına yol açmıştır. 2009 yılı şubat-mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan, nisan ayında ABD'de tanımlanan ve hızla dünyaya yayılan "domuz kaynaklı influenza A (H1N1)" virüsü yeni bir pandemiye neden olmuştur [22].

Gribin etkeni olan influenza virüsü, her yıl dünyada 500000 civarı kişinin ölümüyle sonuçlanan mevsimsel epidemilere sebep olmasının yanı sıra pandemiler oluşturması sebebiyle de insan sağlığı için son derece önemli ve tehlikeli bir virüstür. İnfluenza, soğuk algınlığı gibi diğer solunum yolu enfeksiyonlarının aksine, pek çok insanda ciddi hastalık ve hayatı tehdit eden pulmoner komplikasyonlara sebep olur. Bütün yaş grupları influenzaya duyarlı olmakla birlikte, küçük çocuklar, ileri yaşta olanlar ile kalp, akciğer, böbrek ve şeker hastalığı gibi kronik hastalığı olanlar ve immun sistemi baskılanmış kişilerde influenza virus enfeksiyonlarından kaynaklanan komplikasyonlar ve ölüm riski daha yüksektir. Erişkinlerin %10'u, çocukların yaklaşık %20'si dünya çapında her sene influenza enfeksiyonu geçirmektedir [23]. Bu enfeksiyonların oranını aşılama ile azaltmak ve erken tanısını sağlamak, antibiyotik kullanımının azaltılmasını sağlamaktadır. Ağır klinik durumlarda bu hastalığın erken tanısını koymak, uygun antiviral terapinin uygulanmasını imkan vermektedir [24].

1.2.4.1 Morfolojik ve Antijenik Özellikleri

İnfluenza virüsü Orthomyxovirüs ailesinden, zarflı, negatif polariteli, tek sarmallı, 80-120 nm çapında bir RNA virüsüdür. Nükleokapsid ve matrix proteinlerine göre influenza A, B ve C olmak üzere üç antijenik tipi vardır. Yapısında hemaglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) olarak adlandırılan zarf glikoproteinleri bulunur. HA virüsün hücreye bağlanmasında, NA ise; mûsin tabakayı uzaklaştırarak bu bağlanmayı kolaylaştırmada

görev alır. İnfluenza A virüsleri HA ve NA glikoproteinlerine göre alt tiplere ayrılırlar. İnsanda üç tip HA (HA-1, 2, 3) ve iki tip NA (NA-1, 2) saptanmıştır. İnfluenza B ve C'nin HA ve NA alt tipleri yoktur [25-27].

İnfluenza A virüsü, HA ve NA moleküllerinin antijenik özellikleri esas alınarak alt tiplere ayrılmış ve sınıflandırılmıştır. Günümüze kadar toplam 16 HA ve 9 NA alt tipi tanımlanmıştır. Bunlar değişik kombinasyonlar halinde memelilerde bulunmaktadır [23].

İnfluenza virüsünün A, B ve C diye adlandırılan üç değişik tipi üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Değişik niteliklerde olan bu virüslerden B ve C tipi, insanda grip enfeksiyonuna neden olurken; A tipinin kanatlı hayvanlarda "Avian" adı verilen bir çeşit gribe neden olduğu bilinmektedir [28].

1.2.4.2 Epidemiyolojik Özellikler

Hastalık, toplumda genellikle sonbahar mevsiminin sonlarından ilkbahar aylarına kadar sık olarak görülmektedir. Havalarda soğuk ve nem oranının düştüğü dönemlerde hastalığın görülme sıklığı artar. Bu duruma çevresel faktörler de katkıda bulunmaktadır. Daha fazla soğuk havalarda, kalabalık, havalandırmanın iyi yapılmadığı kapalı alanlar hastalığın yayılımını tetiklemektedir [29]. İnfluenza virüsü; domuz, at, vizon, su samuru ve balinalarda da solunum yolu hastalıklarına yol açabilir [30-35].

Her yaşta görülen, en sık öksürme ve hapsirme ile ortama saçılan damlacıklar yoluyla insandan insana bulaşan influenza enfeksiyonları, bebek, çocuk ve yaşlılarda daha öldürücü seyretmektedir. Kronik hastalıkları olanlar (kronik akciğer hastalıkları, romatizmal ve koroner kalp hastalıkları, diabetes mellitus, kronik nefrit Parkinson, multipl skleroz gibi nörolojik hastalıklar, maligniteler, anemi), sigara kullananlar ve gebe olanlar için influenza enfeksiyonuna yakalanıldığı durumda ölümle sonuçlanması açısından risk taşımaktadır [36,37]. Kuluçka süresi 1-4 gündür. Hastalık sporadik vakalar, bölgesel epidemiler veya pandemiler şeklinde görülmektedir [29,38].

1.2.4.3 Tedavi

İnfluenza virüslerinin oluşturduğu enfeksiyonun tedavisinde, grip aşılı ve FDA onayı almış antiviral ilaçlar[Adamantenler (Amantadine ve Rimantadine), Oseltamivir ve Zanamivir gibi nöraminidaz inhibitörleri] kullanılmaktadır. Adamantenler influenza A virüsüne karşı aktiftir, nöraminidaz inhibitörleri ise influenza A ve B'nin her ikisine karşı aktiftir.

İnfluenza A'nın tedavisi ve profilaksisinde Amantadin ve Rimantadin önerilen antiviral maddelerdir. Her iki antiviral de virüsün konak hücreye bağlanmasını engeller. Her iki ilaç da iyon kanalı oluşturmasını engellemek için virüsün M2 proteinine bağlanır. Hastalığın başlamasından 24-48 saat geçmeden kullanıldıklarında enfeksiyonun tablosu hafif seyrederek. Son yıllarda bu preparatlara karşı direnç geliştiği bildirilmektedir.

Zanamivir ve oseltamivir, nöraminidaz oluşumunu inhibe ederler. Zanamivir, intranazal ve intravenöz olarak kullanılabilir. İntravenöz zanamivir hastalığın hafif geçmesini sağlar ve süresini kısaltır.

Oseltamivir 1 yaş ve üstü bireylerde tedavi ve kemoprofilaksi amacı ile kullanılmaktadır. Oseltamivir ve Zanamivir, sağlıklı erişkin ve çocuklara profilaktik olarak verildiğinde influenza A ve influenza B virüs enfeksiyonlarında hastalıktan korunmada % 70-90 etkilidir [39,40].

Oseltamivir ağız yoluyla alınır. CDC, bir grip salgını sırasında, oseltamivir ile zanamiviri tedavide, amantadin ve rimantadini kemoprofilaksiste önermektedir [41,42].

1.2.5 Oseltamivir

Oseltamivir piyasada Tamiflu, Oseflu ve Enfluvir ticari adlarıyla kapsül ve süspansiyon tozu halinde (12 mg/ml dozlarında) bulunmaktadır. Oseltamivir, nöraminidaz inhibitörü olup influenza A ve B virüsünün profilaksi ve tedavisi amacıyla kullanılan spesifik antiviral bir ajan olarak etki etmektedir. Nöraminidaz enzimi, yeni oluşan tüm katmanlı virüslerden sialik asit kalıntılarının ayrılmasından sorumlu olmakla birlikte virüs döllerinin serbest kalması ve yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır. İnfluenza virüsleri, oseltamivire maruz kaldıkları durumda, konak hücre yüzeyinde kümeleşerek mukozal sekresyonlar ile birlikte enfeksiyon derecesini sınırlarlar ve viral enfeksiyon riski azaltılmış olur [43].

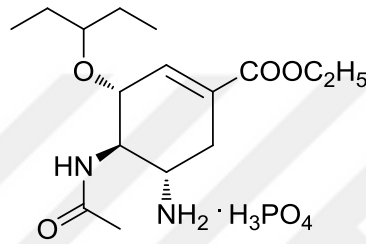
Oseltamivir, influenza profilaksisinde ve influenza nedeniyle 1 yaş üzeri bireylerde, belirtileri en fazla 2 günlük olan, komplike olmayan akut hastalıkların tedavisinde endikedir. İnfluenza A (H5N1) virüsü genellikle oseltamivire karşı duyarlıdır ancak klinik etkinliği üzerine herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Oseltamivir'in keşfi, influenza virüs nöraminidazının aktif bölgesine bağlı sialik asit analoglarının tasarımı sırasında X-ray kristal tekniğinin kullanılması ile mümkün olmuştur [44]. İlgili ilacın geliştirilmesi, ilacın oral kullanımını mümkün kılan, sialik asit iskeletinde

yapılan modifikasyonlar (lipofilik yan zincir ilave edilmesi de dahil olmak üzere) doğrultusunda gerçekleştirilmiştir [45].

1.2.5.1 Kimyasal yapı

Bir etil ester olan oseltamivir fosfat [etil(3R,4R,5S)-4-asetamido-5-amino-3-(3 pentaniloksi)-1-sikloheksen-1-karboksilat fosfat], hepatik karboksilesterazlar tarafından hızlı bir şekilde metabolize edilen ve aktif hali oseltamivir karboksilaza (RO 64-0802, OK), dönüşen bir ön ilaçtır. Enfekte olmamış konak hücrelerin içine viral girişi bloke ederken, enfekte hücrelerden virion salınımını engeller [46].



Şekil 1.3. Oseltamivir fosfat'ın kimyasal yapısı

1.2.5.2 Farmakokinetik

1.2.5.2.1 Emilim

Bağırsak epitel hücrelerinde çeşitli ilaçların emilimini sağlayan membran taşıyıcıları vardır. Özellikle ince bağırsağın fırçamsı kenarında bulunan peptid taşıyıcı 1'in (PEPT-1), bir ön ilaç olan oseltamivir fosfatın emiliminde önemli role sahip olduğu tespit edilmiştir [47]. Bazı çalışmalarda PEPT-1 substratlarının emiliminin yemeklerden etkilendiği belirtilmektedir. Erişkin çalışmalarında yağlı yemek alımı ile oseltamivirin farmakokinetik profilinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir. Ancak tam tersine ilacın yemeklerle birlikte alındığında maksimum serum konsantrasyonunun %20 daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Ogihara ve arkadaşlarının 8 haftalık ratlarla yaptıkları bir in vivo çalışmada, süt ile birlikte oseltamivir alındığında absorpsiyonun azaldığı görülmüştür. Bu bulgularla özellikle yenidoğan ve infantlarda ilacın anne sütü ya da formula mamalarla birlikte alındığında biyoyararlanımının azalabileceği söylenebilir [48]. PEPT-1 düzeyi çeşitli hormonlar, parazitler enfestasyonlar, bağırsakların fonksiyonel durumundan etkilenebilir. P-

glikoprotein gibi diğer taşıyıcılar ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin de rolü olabileceği bildirilmektedir.

1.2.5.2.2 Dağılım

Hayvan çalışmalarında OK'ın akciğer, orta kulak, nazal mukus ve tükürükteki birikiminin kandaki konsantrasyondan daha yüksek olduğu belirtilmiştir [49]. İnsan çalışmalarında da ilacın tüm vücut bölgelerine iyi dağıldığı ve penetre olduğu bildirilmektedir [50]. Oseltamivir fosfat kanda dolaşan proteinlere büyük ölçüde bağlanmamakla birlikte (yaklaşık %42), ilgili değer aktif metaboliti için daha da düşüktür (OK için yaklaşık %3) [49]. İlacın albumin ve alfa-1-asit glikoprotein gibi plazma proteinlerinin düzeylerinden etkilenmemesi yenidoğan ve infantlar için avantaj sağlamaktadır [51].

Oseltamivirin kan-beyin bariyerinden aktif transportunda membran proteinlerinin rolü kanıtlanmıştır. İmmatür hayvanlarda ilaç santral sinir sistemine (SSS) daha yüksek oranlarda geçer bu da ilgili taşıyıcıların uygun olmayan ekspresyonu ile ilgilidir [52]. Taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu ve aktivasyonunu etkileyen genetik varyasyonlarda, ilacın SSS toksisitesi değiştirebilmektedir, bu durum bazı bölge ve vakalardaki SSS toksisitesi oranındaki farklılığı açıklayabilir [53].

1.2.5.2.3 Metabolizma ve Atılım

Oseltamivir fosfatın aktif metaboliti olan OK'a dönüşümü, insan karboksil esteraz-1 (HCE-1) adlı karaciğer enzimi tarafından sağlanmaktadır [53]. Aktif metabolit böbreklerden glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon yoluyla atılmaktadır. Doğum sonrası ilk bir yılda HCE-1 ekspresyonu hızlı bir şekilde artar, yenidoğanlarda HCE-1 seviyesi düşük olduğundan aktif metabolitin düşük miktarları bile etkilidir. Yenidoğan ve infantlarda renal atılımın azlığı ilaç toksisitesi riskini de artırmaktadır. Yaşa göre hem HCE-1 ekspresyonu hem de renal atılım değiştiğinden doz ayarlaması için yaş önemli hale gelmektedir. Acosta ve arkadaşları, 37 hafta altındaki yenidoğanlara oseltamiviri 1 mg/kg, term yenidoğanlara da 3 mg/kg dozunda önermiştir. Aynı çalışmada standart erişkin dozu ise 75 mg (yaklaşık 1 mg/kg) olarak bildirilmiştir [54]. İnfantlarda erişkinlere göre renal klirens daha yüksek olduğundan mg/kg bazlı oseltamivir dozu 3 kat daha fazladır.

Renal fonksiyon bozukluğu olanlarda ilacın eliminasyonu azaldığından ilaca maruziyet artar. Son dönem böbrek yetmezliği olanlarda (kreatinin klirensi <10 mL/dakika) ilacın kullanılması önerilmemektedir. İn vitro çalışmalarda orta düzeyde karaciğer fonksiyon

bozukluğu olanlarda oseltamivir fosfatın aktif metabolitine dönüşmede ciddi bir etkilenme olmadığı belirtilmektedir [55]. Bu nedenle son rehberlerde ilacın hafif-orta karaciğer yetmezliği olanlarda doz ayarlamasına gerek olmadan kullanılabilceği bildirilmektedir [56].

Oseltamivirin çeşitli ilaçlarla etkileşimi ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İlacın parasetamol, aspirin, antiasitler ve amoksisilin ile birlikte kullanımında, farmakokinetiğinin etkilenmediği tespit edilmiştir [49, 57-59]. Benzer şekilde böbrek nakli yapılan hastalarda kullanılan siklosporin, mikofenolat mofetil veya takrolimus gibi immunsupresif ajanlarla da etkileşim görülmemişir [60]. Diğer taraftan probenesid, oseltamivirin plazma konsantrasyonunu artırmaktadır, bu durum oseltamivirin tübüler sekresyonu üzerine olan inhibitor etkisi ile açıklanmıştır [50, 59].

1.2.5.3 Etkililik

1.2.5.3.1 Tedavi

Oseltamivir influenza A ve B'ye karşı etkili bir tedavidir, ancak tedavinin, semptomların başlangıcı itibari ile ilk 48 saat içinde başlanması önerilmektedir [61]. Randomize kontrollü, 1-3 yaş arasındaki 408 çocuğun dahil edildiği bir çalışmada, oseltamivirin ilk 24 saat içinde başlanması ile kontrollere göre hastalık süresinin 3,5 gün kısaldığı rapor edilmiştir [62]. Ancak son yıllarda yayınlanan bir meta-analizde oseltamivirin çocuklarda hastalık süresini sadece 0,5-1,5 gün azalttığı belirtilmiştir [63]. Semptomların başlangıcından 2 gün sonra verilen antiviral tedavinin minimal etkili olduğu veya fayda sağlamadığı bildirilmiştir [62, 63]. Ceyhan ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada, influenza virüsü belirlenen hastalarda oseltamivir verilenlere göre ateş süresinin 1,7 gün, öksürük süresinin 1,1 gün, burun akıntısı süresinin 1,2 gün, burun tıkanıklığı süresinin 1 gün kısaldığını rapor etmişlerdir [64].

Oseltamivir'in semptomların başlangıcının erken döneminde verilmesi ile sağlanan faydanın, viral replikasyonun ilk 24-72 saatte pik yapmasına bağlı olduğu bildirilmekte ve bir çok çalışmada viral yük ile hastalık ciddiyetinin korele olduğu gösterilmektedir [65, 66]. Bununla birlikte erken başlanan oseltamivirin, influenza ilişkili komplikasyonların azaltılmasında da etkili olduğu; sekonder pnömoni gelişimini %15, solunumsal hastalık gelişimini %20, otitis media gelişimini de %31 oranında azalttığı saptanmıştır [67]. Sonuç

olarak, kuvvetle influenza düşünölen vakalarda laboratuvar sonuçları beklenmeden erken dönemde başlanan oseltamivir oldukça etkili olmaktadır.

1.2.5.3.2 Profilaksi

Sağlık alışanları ve olası influenza vakaları ile temas eden kişilere influenzaya bağlı komplikasyonların önlenmesinde profilaktik oseltamivir verilmesi oldukça etkili bir yaklaşımdır. Son yayınlanan rehberlerde 1 yaş üzerindeki çocuklarda influenza pozitif kişi ile temastan sonraki ilk 48 saat içinde oseltamivir başlanması önerilmektedir. Çocuklarda temas sonrası verilen profilaksinın influenza A'ya karşı %49, influenza B'ye karşı da %60 oranında koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Temas sonrası profilaksi 10 günden daha uzun süre verilmemelidir [68].

1.2.5.4 Tolerans ve Güvenlilik

Oseltamivir, plasebo ile karşılaştırıldığında genel olarak iyi tolere edilen bir ilaçtır. Tüm yaş gruplarında en sık görölen, ishal ve kusma gibi gastrointestinal yan etkilerdir. Dört çalışmanın dahil edildiği, oseltamivirin günde iki kez beş gün süreyle 2 mg/kg dozda verildiği ve toplam 1032 çocuğun bir analizde, plasebo grubuna göre kusma ve karın ağrısının daha yüksek oranda göröldüğü belirtilmiştir [56]. Bu yan etkilerin de genellikle ilacın başlandığı ilk günlerde ortaya çıktığı ve ilacın kesilmesi ile birlikte düzeldiği vurgulanmıştır. Japonya'da 1 yaş altındaki 771 infantın dahil edildiği retrospektif bir çalışmada ishali en sık karşılaşılan yan etki olduğu ve bunun dışında ciddi herhangi bir yan etki ile karşılaşılmadığı vurgulanmıştır. Ancak pandemi sezonu süresince 74 infant ile yapılan bir çalışmada, 107 yan etki bildirilmiş, bunların 24'ünün döküntü ve ikisinin konvulsiyon olduğu rapor edilmiştir [69]. Bu grupta sadece menenjit tanısı ile kabul edilen 6 aylık bir infant kaybedilmiş, bu vakada influenza virüsü tespit edilirken, ölüm nedeninin akut solunum sıkıntısı ve viral pnömoni olduğu belirtilmiştir. İlginç bir şekilde bu çalışmada anne sütü alan 9 infantta cilt yan etkilerinin daha fazla olduğu, beşinde döküntü, birinde dermatitis bülloza geliştiği görölmüştür.

Oseltamivir piyasaya sunulduktan sonra özellikle Japonya'da adolesan ve erişkinlerde geçici nöropsikiatrik olaylar bildirilmiştir [70]. Daha sonra ABD ve Japonya'da çocuk ve genç adolesan vakalarda da benzer durumlar görölmüştür. Ancak bu yan etkilerin oseltamivir kullanımı ile mi, yoksa influenza'nın kendisine mi bağlı olduğu kesin olarak

belirlenememiştir [71]. Bu bağlamda, oseltamivir kullanılan hastalar, gösterdikleri anormal davranışlar ve nörolojik yan etkiler bakımından yakinen izlenmelidir [72].

1.2.5.5 Direnç

Nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç, hemaglutinin veya nöraminidazda mutasyona bağlı gelişmektedir. Ana direnç mekanizmalardan biri viral nöraminidazın aktif bölgesindeki inhibitörlere bağlanma afinitesinde değişikliklere sebep olan mutasyonlardır. En sık gösterilen mutasyon H275Y (nöraminidaz alt tipi olan N1'in 275. pozisyonunda tirozinin histidin ile yer değiştirmesi)'dir. 2009 yılında oseltamivir dirençli influenza A (H1N1)'da H275Y mutasyonu ilk kez Galler'de tespit edilmiştir [73]. H5N1 gibi diğer tiplerde de mutasyonlar bildirilmiştir. Oseltamivir direnci gösterilen vakaların geneline bakıldığında direnç oranlarının çocuklarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Pediatrik çalışmalarda, oseltamivir kullanımı ile direnç oranlarının arttığı; influenza A H1N1 için tedavi öncesi ve sonrasındaki direnç oranı % 27 ve % 37, influenza A H3N2 için % 3 ve % 18 olduğu saptanmıştır [65]. Direnç oranındaki artışın klinikteki önemi influenza ilişkili komplikasyonların artışıdır. Bu nedenle tedavi verilen ancak komplikasyon gelişen vakalarda direnç olasılığı hesaba katılmalıdır.

1.3 Kromatografi

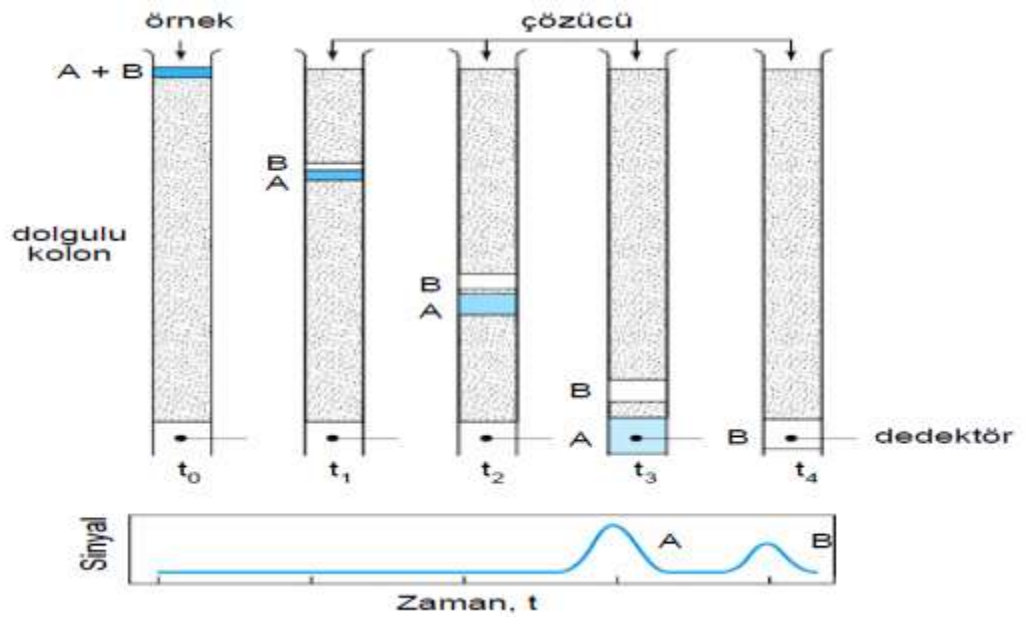
Kromatografi, karmaşık (kompleks) karışımları birbirinden ayırmak amacı ile kullanılan fizikokimyasal bir ayırım tekniği olarak ilk kez Rus Botanikçi M. S. Tswett tarafından yirminci yüzyılın başlarında keşfedilmiş olup, kendisi 1903 yılında bazı bitki pigmentlerini birbirinden ayırmıştır. Bu ayırımın farklı renkler vermesinden dolayı adsorpsiyon temelli ayırım teriminin yerini "kromatografi" terimi almıştır [74,75]. Kromatografinin Tswett tarafından sıvı-katı kromatografisi olarak keşfinden sonra 50 yıl içinde önce gaz kromatografisi ardından, ince tabaka kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir [74]. 1940'lı yılların başlarında Martin ve Synge sıvı-sıvı kromatografisi yöntemini tanıtmayı ve kullanılabilir hale getirmeyi başarmışlardır [74-76]. Bu yöntemlerin bilime büyük katkılar yapması sonucu bu alandaki buluşlarına karşılık 1952 yılında A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge'ye Nobel ödülü verilmiştir.

Son yıllarda hem birçok yeni kromatografik teknik geliştiği hem de bilimcilerin karmaşık karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik metotlar çok büyük oranda artmıştır. Günümüzde ise en önemli kromatografik metotlar;

gaz kromatografisi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC) dir. Buna ilaveten daha yeni metotlardan bazıları süper kritik akışkan kromatografisi, kapiler elektroforez ve çok-boyutlu kromatografik tekniklerdir [77].

Kromatografi yönteminin uygulandığı sistemler çok çeşitli olmakla beraber, tümünün ortak özelliği, sistemde bir hareketli faz ile bir sabit faz kullanılmasıdır. Bu yöntemlerde genellikle belli uzunluktaki bir kolon, bir dolgu maddesiyle doldurulmakta ve bu madde sabit faz adını almaktadır. Örnek, kolona verildikten sonra gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz ile kolonun bir ucundan öteki ucuna kadar sürüklenerek taşınmaktadır. Karışımdaki bileşenlerin ayrılması, bunların kolon içinde ilerleme hızlarının farklı olması sonucu gerçekleşmektedir. Şekil 1.4.'te kromatografik ayırımın bir örneği görülmektedir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan örnek bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, örnek bileşenleri birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak tayin edilebilen farklı bantlar şeklinde ayrılırlar.

Farklı fizikokimyasal özelliklere sahip maddelerin, biri sabit diğeri hareketli iki faz arasında birbirlerinden ayrılmaları ve saflaştırılmaları kromatografinin esasını oluşturmaktadır. Buna dayanarak maddeler birbirinden ayrılmakta ve teşhis edilmektedir [74,78].



Şekil 1.4. Kromatografik ayırımın gösterimi

1.3.1 Kromatografide Temel Parametreler

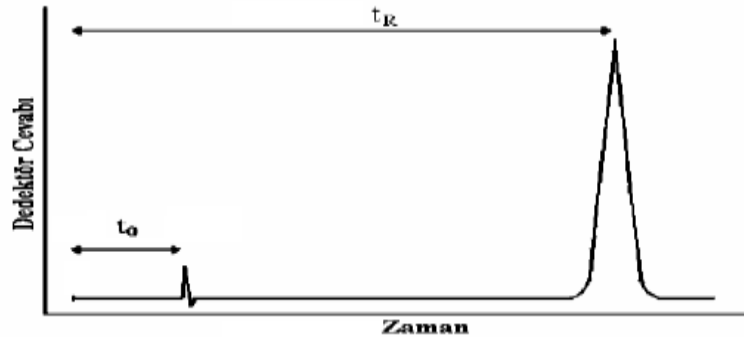
Kromatogram, tayini yapılacak numunenin içerdiği bir ya da birden fazla bileşenin belirli bir zaman diliminde, belirli derişim değerlerine karşı elde edilen cevabın uygun bir dedektör aracılığı ile saptanmasıyla elde edilen grafikdir. Kromatografide elde edilen piklerin yorumu kromatogramlarla yapılmaktadır. Bir kromatogram aşağıdaki parametrelerle yorumlanabilir.

- 1) Alıkonma zamanı ve Kapasite faktörü
- 2) Seçicilik
- 3) Kolon etkinliği(Tabaka yüksekliği ve Teorik tabaka sayısı)
- 4) Ayırım gücü
- 5) Pik asimetri oranı
- 6) Kuyruklanma faktörü

Bu parametreler sistem uygunluk testleri (SUT) olarak da adlandırılır. Sistem uygunluk testleri, kromatografik yöntemlerin doğru olarak işlediğini göstermek için yapılır.

1.3.1.1 Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numune enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı (t_R) denir. Şekil 1.5.'de iki analit içeren tipik bir kromatogram verilmiştir. Burada t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_0 ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar.



Şekil 1.5. HPLC kromatogramı

Kromatografik karşılaştırmalarda kapasite faktörü "k", çözünen maddelerin kolonda geç hızlarını tanımlamakta kullanılan önemli bir parametredir ve alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen yararlanılır. Kapasite faktörü, Eş.1.2 ile hesaplanır.

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1.2)$$

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve kromatografik parametrelerin optimizasyonu esnasında dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden bir tanesidir. Bir kromatografik ayırimda, hesaplanan kapasite faktörü değerinden yararlanarak ayırım hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1 ile 10 arasında olması gerekmektedir. Burada k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutunduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması ise bileşenin mobil faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz; k çok büyükse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, mobil faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

1.3.1.2 Seçicilik

Seçicilik, bir kolonun, kolon içerisindeki analitleri (bileşenleri) ne kadar iyi ayıracağıının bir ölçüsüdür. Kolonda daha uzun süre tutulan bileşene ait kapasite faktörünün, daha kısa süre tutulan bileşenin kapasite faktörüne oranı seçiciliği verir ve α sembolü ile gösterilir. Bir kolonda ayrılmaya çalışılan ve aynı karışımda bulunan A ve B maddeleri için seçicilik faktörü (α), Eş.1.3 aracılığı ile hesaplanır;

$$\alpha = k_A/k_B = (t_{RA} - t_0) / (t_{RB} - t_0) \quad (1.3)$$

Bu tanıma göre, α 'nın daima 1'den büyük olması beklenir. Seçiciliği etkileyen esas faktör sabit fazdır. Ancak hareketli fazın bileşimi ve az da olsa sıcaklık da seçiciliği etkilemektedir.

1.3.1.3 Kolon Etkinliği

Kolon etkinliği, kolonun en önemli parametresidir ve pik genişliği ile alakalıdır. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. Başarılı bir kromatografi çalışmasının amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik pik elde

etmektedir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıklıkla kullanılır. Bunlar; tabaka yüksekliği (H) ve teorik tabaka sayısı (N)' dir. Tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı kromatografik kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak kullanılan, birbiriyle ilişkili terimlerdir. İki terim arasındaki bağıntı Eş.1.4 ile ifade edilmektedir.

$$N = l / H \quad (1.4)$$

Burada, l kolon dolgu uzunluğudur.

Kromatografik kolonun etkinliği eşdeğer teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağlı olarak kolon etkinliği değişmektedir.

Eşdeğer teorik tabaka sayısı Eş.1.5 ve Eş. 1.6 ile hesaplanabilir:

$$N=5,54(t_R/W_{0,5})^2 \quad (1.5)$$

$$N= 16 (t_R/W)^2 \quad (1.6)$$

Bu bağıntıda;

N : Teorik tabaka sayısı

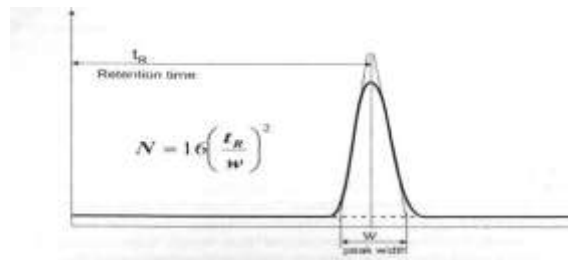
t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

W: Elde edilen pikin taban genişliği

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına (akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi gibi), dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Tavsiye edilen değer $N>2000$ dir. Teorik tabaka sayısı hesabını gösteren bir kromatogram Şekil 1.6.'da verilmiştir [74].



Şekil 1.6. Teorik tabaka sayısı hesabını gösteren bir kromatogram

1.3.1.4 Ayırma Gücü

Kromatografideki nihai hedef karışım içindeki maddelerin ayırımıdır. Ayırma gücü (RS) hedefe ne derece yaklaşıldığının bir ölçüsüdür. Ayırma gücü genel olarak aşağıdaki Eş.1.7 ile tanımlanmaktadır.

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2) \quad (1.7)$$

Burada,

Rs: Pik çifti için ayırma gücü

W: Kromatogramdaki pikin kenarından çizilen teğetlerle taban çizgisi arasında kalan uzaklık

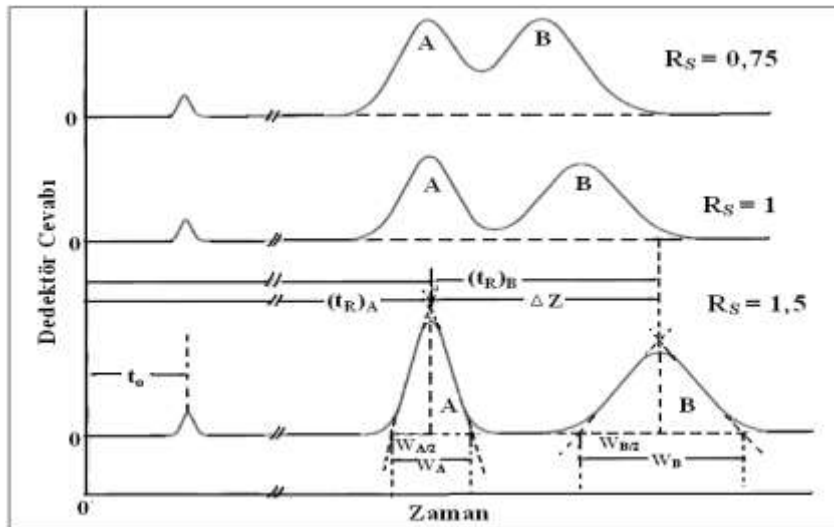
t_{R2} : 2. bileşik için alıkonma zamanı

t_{R1} : 1. bileşik için alıkonma zamanıdır.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Eş.2.5'e göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k) ile ayırma gücü arasındaki bağıntı Eş.1.8 ile verilmiştir.

$$R_s = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k / (k+1)] N/2 \quad (1.8)$$

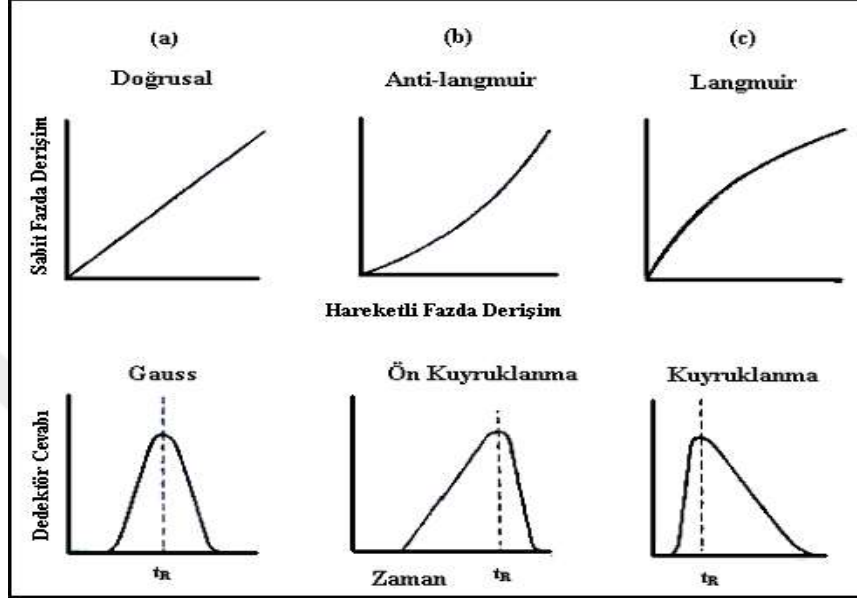
$R_s = 1,5$ olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır. Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın 1.5'den büyük ($R_s \geq 1.5$) olması önerilmektedir (Şekil 1.7.) [79].



Şekil 1.7. Ayırma gücünün kromatogramlara göre değişimi

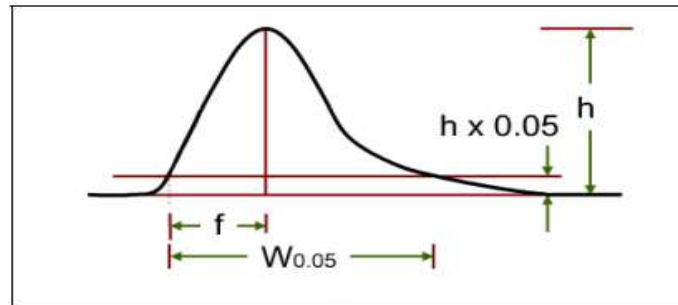
1.3.1.5 Pik Asimetri Oranı ve Kuyruklanma Faktörü

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (CM) sabit fazdaki denge derişimine (CS) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. Şekil 1.8.'deki izoterm doğrusal olup eğimi dağılma katsayısını (K) verir.



Şekil 1.8. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri

Bütün CM değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir. Simetrik bir pikte bu faktör 1'e eşittir. Rakamın 1'den farklı olması kuyruklanmayı gösterir. Şekil 1.9.'da kromatogram üzerinde kuyruklanma gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Kuyruklanma faktörünün kromatogram üzerinde gösterilişi ($T_f = W_{0.05}/2f$)

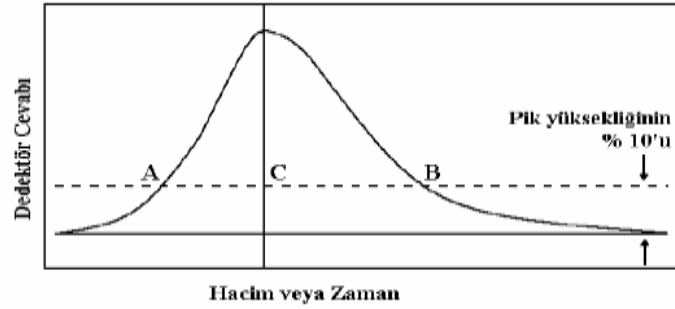
Kromatografide teorik olarak kolondan ayrılan maddelere ait bantların normal dağılım (Gauss dağılımı) göstermesi beklenmektedir. Ancak bu durum her zaman mümkün

olmayabilir. Maddeler kolonda tutunmasına göre Langmuir ve Antilangmuir davranışlar gösterebilmektedir. Langmuir izotermi sabit fazda fazla miktarda madde olduğunu, Antilangmuir izotermi ise sabit fazda az miktarda olduğunu göstermektedir. Bu durumlarda elüsyon eğrisinin önünde ve arkasında bir alan oluşur ve bu durum madde pikinde öne kayma (fronting) veya kuyruklanma (tailing) şeklinde gözlemlenir. Sabit fazdaki derişim ile hareketli fazdaki derişim arasında doğrusal bir ilişki olduğu durumlarda, K dağılma sabiti sabittir, alıkonma zamanı madde derişimine bağlı değildir ve gözlenen pik çan (Gauss) eğrisi şeklindedir.

Pik asimetri oranı (PAO), Eş.1.9 ile hesaplanabilir.

$$PAO = (CB/AC) \quad (1.9)$$

CB ve AC uzunlukları Şekil 1.10.'da tanımlanmıştır. Tam bir simetri elde etmek için PAO=1 olmalıdır. İyi bir ayırma işleminde kabul edilebilir. PAO<1,5'dur.



Şekil 1.10. Pik asimetri oranının hesaplanması

1.3.2 Kromatografinin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alındığında, başlıca iki ana grupta sınıflandırılabilir. Bunlar; kolon ve düzlemsel kromatografidir. Birincisinde sabit faz ince bir kolonda tutulur ve mobil faz basınç altında bu sabit faz içerisinden geçmeye zorlanır. İkincisinde ise sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda mobil faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder.

Kromatografi, kaynaklarda farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. En genel sınıflandırma şu şekilde verilmektedir;

A. Ayrılma Mekanizmalarına Göre;

- 1) Adsorpsiyon Kromatografi
- 2) Partisyon (Dağılma Kromatografi)
- 3) İyon değiştirme Kromatografi
- 4) Jel geçirgenlik veya Jel süzme (Molecular-Exclusion/Size-Exclusion) Kromatografi
- 5) Afinite Kromatografisi
- 6) Zone Elektroforez
- 7) Kiral Kromatografi

B. Hareketli Faza Göre

- 1) Sıvı Kromatografi
- 2) Gaz Kromatografi

C. Uygulanan Tekniğe Göre

- 1) Kolon Kromatografi
- 2) Düzlem Kromatografi (İnce Tabaka Kromatografi, Kağıt Kromatografi,)

D. Kullanım amacına Göre

- 1) Analitik Kromatografi (Kalitatif Kromatografi; Kantitatif Kromatografi)
- 2) Preparatif Uygulamalar (Karışımlardan Saf madde Elde Etme)

Çalışmamızda da kullanmış olduğumuz yüksek performanslı sıvı kromatografisini (HPLC) ayrılma mekanizmalarına göre adsorpsiyon; hareketli faza göre sıvı; uygulama tekniğine göre kolon; kullanım amacına göre de analitik kromatografi olarak sınıflandırabiliriz.

1.3.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türünde sabit faz bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş sıvı film ise bu kromatografi türüne sıvı-sıvı kromatografisi denir. 1969'da Kirkland, daha iyi ayırım yapılabilmesi amacı ile kritik faktörler olarak kanıtlanmış küçük partikülleri ve yüksek basıncı önermiştir. Kirkland'ın bu nerisi daha sonra sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisinin (HPLC) gelişimini sağlamıştır [76].

HPLC ile yapılan kimyasal tayinler günümüzde, veterinerlik uygulamalarından vre kimyasına, tarımdan biyomedikal ve klinik uygulamaları ile toksikolojik tayinlere kadar bir çok bilimsel çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır [80-82]. Bu kimyasal ayırım tekniği ile tayin süresi kısalmış, ayırım için kullanılan kolon boyutu metrelerce uzunluktaki sarmal

kolonlardan 5-10 cm'lere kadar düşmüş, ayırım için gerekli çözünürlük oldukça yükselmiştir. Söz konusu teknik çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir.

HPLC ile yapılan ayırımda amaç, analizi yapılacak olan karışımı taşıyan mobil fazın yüksek basınç eşliğinde gözenekli (porlu) yapıda olan sabit faz ortamından (kolon) sıkıştırılarak geçirilmesi ve buna bağlı olarak numune içinde bulunan değişik yapıdaki maddelerin sabit faz-hareketli faz ara yüzeyi ile değişik etkileşimlere girmesi sonucu farklı alıkonma zamanlarının elde edilmesidir. Kolona karışım şeklinde verilen numuneden iyi bir ayırım elde edebilmek için sabit faz-hareketli faz arasındaki arayüzey yüzeye ait alanının büyük olması tercih edilir [74,75].

HPLC'de kolonda kullanılan silikanın polaritesine göre normal faz ve ters faz kromatografi uygulamaları bulunmaktadır. Sıvı kromatografi çalışmalarının %90 kadarı ters faz sıvı kromatografi modunda gerçekleştirilir. Ters faz sıvı kromatografi (RP-HPLC), hidrofobik karakterli kimyasal bağlı durgun faz ve bundan daha polar mobil faz ile gerçekleştirilen bir dağılma/adsorpsiyon kromatografisi türüdür. Mobil faz olarak metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi çözücüler ile bunların sulu karışımları kullanılır. Bu tip bir çalışmada, durgun faz apolardır. Dolayısı ile apolar bileşikler, bu tip durgun fazla daha etkin etkileşerek daha yavaş hareket ederler. Daha polar bileşikler, kolonu hızla terk ederler.

İlaç analizlerinde genel olarak ters faz sıvı kromatografisi normal faz sıvı kromatografisine göre tercih edilir. Bunun nedeni ilaçların genellikle daha polar yapıda olmaları, ters faz sıvı kromatografisinin uygulamasının ve sistem kontrolünün daha kolay olması, hareketli faz bileşiminde kullanılan organik çözücülerin daha ucuz olması ve sulu tampon çözeltilerinin oranının yüksek tutulmasıdır.

Bu avantajlar, yeni geliştirilen bir ilacın piyasaya sunumuna kadar geçen süreçte, analizini ve bünyesinde bulundurabileceği safsızlıkların teşhisini mümkün kılar [83].

1.3.3.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Sistemi

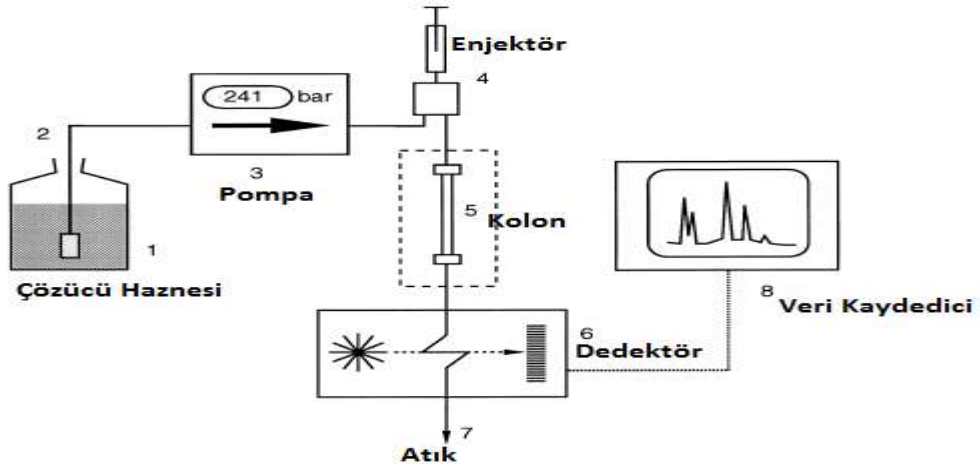
HPLC çalışma prensipleri açısından basit, pratik ve bir o kadar da yüksek çözünürlüklü bir tayin yöntemidir. Yüksek basınç altında (100-200 bar) gerçekleştirilen bu kromatografi yönteminde örnek, pompa ile kolon girişi arasında bir enjektör yardımıyla uygulanmaktadır. Örnek enjeksiyonu esnasında, pompa çözücüyü kolon boyunca belli bir hızda iterek çözücü enjeksiyon bloğundan geçer ve örneği kolona taşır. Kolonda

birbirinden ayrılan maddeler taşıyıcı faz ile birlikte ölçüm birimi olan dedektöre gelirler burada bileşenlerin tayini gerçekleşir.

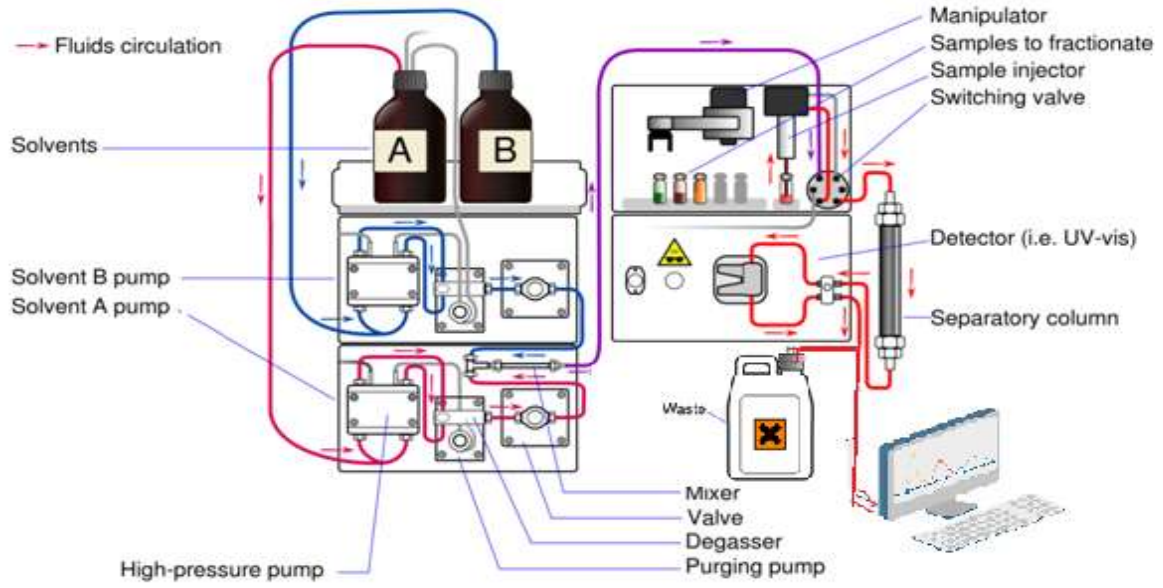
Doğru bir tayin için piklerde görülen hatalardan başlayarak hareketli faz içeriği, kolon, kolon malzemesi ve doğru dedektör seçimine kadar tüm özellikler sırayla ele alınmalıdır. Ayrıca tayine etki edebilecek olan tüm parçalar için en uygun şartların araştırılması ile uygulanacak olan yöntemler verimli hale getirilmelidir [78].

Şekil 1.11.'de şematik olarak gösterilen bir HPLC sistemi aşağıdaki bileşenlerden oluşur [84]:

- Çözücü haznesi
- Hareketli faz pompalama sistemi (Pompa)
- Örnek enjeksiyon sistemi (Enjektör ve/veya otomatik örnekleyici)
- Kolon
- Dedektör
- Veri kaydededici



Şekil 1.11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü



Şekil 1.12. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şekilsel görünümü

1.3.3.1.1 Çözücü Haznesi

Hareketli faz sisteminde kullanılan çözücülerin muhafaza edildiği yer olan çözücü haznesi materyalinin hareketli faz ile etkileşmemesi, sistemde oksitlenmeye veya korozyona sebep olmaması gerekmektedir. HPLC sisteminde hacimce 250-1000 mL hareketli faz barındırabilecek cam veya paslanmaz çelikten yapılmış en az iki tane hareketli çözücü haznesi bulunmalıdır. Pompaya giden hareketli fazda herhangi bir kabarcık, toz, tanecik vs. olmamalıdır. HPLC’de karşılaşılan problemlerden biri, mobil faz içindeki hava kabarcıklarıdır. Oluşan hava kabarcıkları, kolonun içine yayılabilir. Bu kabarcıklar, dedektörden geçtiklerinde, ciddi ve kabul edilemez bir gürültüye ve akış hızında azalmaya neden olurlar. Bu yüzden çözülmüş gazlar, helyum veya azot gazıyla, ya da ultrasonik banyo aracılığı ile uzaklaştırılmalıdır.

Çözücü haznelerinde bulunan hareketli faz HPLC sistemine iki farklı şekilde uygulanabilir. Bunlar; izokratik ve gradient elüsyondur. İzokratik elüsyonda, çözücü bileşimi ayırma boyunca değişmez. Daha kısa analiz süresinde daha iyi ayırma, genellikle eluent bileşiminin analiz boyunca aşamalı olarak değiştiği gradient elüsyon kullanılarak elde edilir. Gradient elüsyonda, polaritede farklılık gösteren iki veya daha fazla çözgen sistemi kullanılır [77].

1.3.3.1.2 Hareketli Faz Pompalama Sistemi (Pompa)

Pompalar, sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan, aletlerdir.

- Sürgülü Pompalar (Şırınga Tip Pompalar):

Sürgülü pompalar, bir motor yardımıyla elektriksel olarak çalışan şırınga tipi bir pistondan oluşur. Yaklaşık 200 mL hacmi içine çeker ve sonra vuruntusuz olarak HPLC sistemine verir [77]. Bu pompalar da, viskozite ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretir. Avantajı vuruntusuz çıktı vermesidir. Dezavantajı sınırlı solvent kapasitesidir. Bu tip pompalar, ayırım için küçük mobil faz hacimleri gerektiren, mikrogözenekli kolonlara mobil faz sağlamak için kullanılır [85,86].

- Piston Pompalar:

Tek pistonlu pompalarda piston paslanmaz çelikten yapılmış bir mil üzerinde ileri-geri hareket ettirilir. Pistonun geri hareketinde piston yataklarına dolan hareketli faz pistonun ileri hareketinde tek yönlü valfler yardımı ile sisteme itilir. Ancak işlem sırasında pompa puls oluşur ve bu istenmeyen bir durumdur.

Çift pistonlu pompalarda pistonlardan biri hareketli fazı çekerken diğeri çekilen hareketli fazı sisteme itmektedir. Bu avantajının yanında en büyük dezavantajı maliyetinin yüksek olmasıdır [76,78].

1.3.3.1.3 Otomatik Örnekleyici

Sıvı kromatografisinde analiz edilecek örneğin sisteme doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde gönderilmesi önemlidir. Otomatik örnekleyici, vialde bulunan numunenin (örneğin, analitin) yüksek basınç altında kolona aktarılmasını sağlamaktadır.

Sisteme örnek enjeksiyonunda şırınga enjektörler, vana-sarım (valve-loop) enjektörler ve şırınga-sarım (syringe-loop) enjektörler kullanılmaktadır. Enjeksiyon sırasında sistem basıncını düşürmeden ve hareketli faz akışını durdurmadan ya da akış hızını değiştirmeden örneğin sisteme gönderilmesi gerekir. Şırınga enjektörler 100 bar basınca kadar sisteme örnek enjeksiyonu yapabilmektedirler. Ancak bu enjektörlerde hareketli faz akışı bir süre durdurulur. Bu nedenle şırınga enjektörlerde sistem tekrarlanabilirliği düşüktür ve kolay kullanılabilir olmalarına karşın tercih edilmemektedir. Vana-sarım enjektörler 480 bar basınca kadar kullanılabilir. Belirli hacim kapasiteli sarım kullanılarak sisteme gönderilecek örnek hacmi standartlaştırılmıştır. Örnek sisteme gönderilirken hareketli faz akışında duraksama veya akış hızında bir değişiklik meydana gelmez. Sarım hacimleri 10-

1000 µL arasında değişmektedir. Yüksek hacimde örnek enjeksiyonu, tayin edilen madde için alt tayin sınırını daha düşük değerlere indirebilmeyi sağlarken, sisteme yani kolona aşırı madde yüklenmesine, dolayısıyla bant genişlemesine ve pik keskinliğinin kaybolmasına neden olabilir. Bu sebeple, düşük hacimde örnek enjeksiyonunun yapılması daha avantajlıdır. Bu tip enjektörlerde sistem tekrarlanabilirliği yüksektir, çalışma basınç üst sınırı yüksektir, otomatik örnekleyicilerle kullanımı mümkün olduğu için birim zamandaki standart enjeksiyon sayısı daha fazladır. Şırınga enjektörler ise, vanasız enjektörlerle aynı çalışma prensibine sahip olmakla birlikte daha düşük hacimde örnek enjeksiyonlarını da yapabilmektedir. 0,5- 5 µL arasında enjeksiyonlara olanak sağlayan mikro örnek enjektörleri mevcuttur. Örnek kaybı olmaksızın sıfır ölü hacimle enjeksiyon yapılabilir, küçük hacimlerde dahi kesinlik ve doğruluk değerleri yüksektir [87].

Otomatik örnekleyicilerde kullanılan vialler değişik boyut, şekil ve materyallerden yapılmış olabilir. Bu vialler 300 µL-25 mL arası hacimlerde olabilirler, ancak analitik amaçla kullanılan viallerin hacmi genellikle 1-4 mL arasındadır. Vialler genellikle borosilikattan üretilmektedir. Amber (koyu) renkli vialler ise ışığa duyarlı maddeler için kullanılmaktadır. Bazı maddeler vial camı ile etkileşebildikleri için bu gibi istisnai durumlarda polimer (polipropilen vb.) yapı vialler de kullanılabilir [78].

1.3.3.1.4 Kolon

Kolon (sabit faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. HPLC'de kullanılan kolon tipleri aşağıda verilmiştir. Üretim materyallerine göre; kolon yapımında paslanmaz çelik, cam veya PEEK kullanılmaktadır. LC çalışmalarında önce cam kolonlar kullanılmıştır. Günümüzde HPLC kolonlarının çoğu paslanmaz çelikten yapılmakta olup yüksek basınçta, ayrıca düşük pH'lı ortamların kullanıldığı çalışmalarda kimyasal aşınmaya karşı dayanıklı olacak şekilde imal edilmektedirler.

Boyutlarına göre; analitik, preparatif, kapiler ve nano kolon olarak ayrılmaktadır. Günümüzde analiz işlemlerinde genellikle 2-5 mm iç çaplı, uzunluğu 50-250 mm olan analitik kolonlar tercih edilmektedir. Kolon uzunluğu ve iç çapı kolonun etkinliğini ve hassasiyetini, analiz süresini ve basıncını etkilemekte, bu bağlamda daha uzun kolonlar daha iyi ayırımların yapılmasını sağlamaktadır. Fakat kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı için geçen süre arttığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır.

Dolgu materyeline göre; kolon dolgu maddeleri film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Film dolgular, gözenekli olmayan cam veya polimer tanelerinden oluşmaktadır. Gözenekli dolgular, slika, alümina, zirkonyum ve iyon değiştirici reçineden yapılıdır. Farklı tipte ve farklı tanecik boyutunda yüzlerce tip kolon geliştirilmiştir. Gerektiğinde seri bağlanarak uzunlukları ve bir diğer deyimle etkin tabaka sayıları arttırılmaya çalışılmaktadır.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma verimi ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir, açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Ayırım şekillerine göre; ters faz, normal faz, iyon değişim ve moleküler eleme kromatografisi olarak temelde dört yöntem kullanılmaktadır. Normal faz kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Sabit faz genellikle silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar ise hekzan, metilen klorür, kloroform, dietil eter ve bunların karışımıdır. Silika jelin üzerine kimyasal bağlarla –CN, -NO₂ veya –NH₂ gibi polar fonksiyonel gruplar bağlanarak farklı normal faz sabit fazları elde edilir. Normal faz ayırımlarında polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terketmektedir [88].

Ters faz kromatografisinde ise, sabit fazın mobil fazdan daha polar olduğu durumları açıklamak için kullanılır. Genelde sabit faz hidrokarbondur. 18 karbonlu bir n alkan olan kimyasal bağlı oktadesilsilan (ODS) en yaygın olarak kullanılan sabit fazdır. Bunun yanı sıra C8 ve kısa alkil zincirleri ve aynı zamanda sikloheksil ve fenil grupları alternatif olarak kullanılmaktadır. Hareketli (mobil) faz genellikle su karışımları veya suda çözülebilir çeşitli sulu tamponlardan oluşmaktadır. Başlıca tercih edilen solventler; metanol, asetonitril, etanol, propanol ve tetrahidrofurandır [88].

Ters faz sıvı kromatografisinde genellikle polar maddelerin ayırımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C18) polaritesi yüksek maddelerin; kısa zincirli sabit fazlar (C8, C2) ise polaritesi düşük bileşenlerin ayrılmasında kullanılır [87].

İyon değiştirme kromatografisi, iyonik veya iyonize olabilme özelliği olan maddelerin sabit fazdaki aynı yükteki iyonlarla karşılıklı yer değiştirme ilkesine dayanan kromatografi

çeşidedir. İyonik yapılar (K^+ , Na^+ , SO_4^{2-}) veya belirli pH değerinde iyon ve iyonik yapı veren moleküller (organik asit veya organik bazlar), iyon değiştirme kromatografisi ile ayrılabilir. Sabit faz ile ayrılacak madde arasındaki iyonik bağ ne kadar kuvvetli ise maddenin alıkonma süresi o kadar uzundur. Dolgu maddeleri pozitif yüklü fonksiyonel gruba sahip ise anyon değiştiriciler, negatif yüklü fonksiyonel gruba sahip ise katyon değiştiriciler olarak adlandırılır [87].

Moleküler eleme kromatografisi diğer kromatografik yöntemlere kıyasla biraz daha farklıdır. Ayırımı yapılmak istenen moleküllerin molekül ağırlıklarının farklı olmasından dolayı birbirlerinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Molekül ağırlığı büyük olan maddeler poröz yapıya tutunamadıkları için daha çabuk ayrılıp teşhis edilirler. Daha küçük molekül ağırlıklı maddeler ise porlu yapılarda tutundukları için daha geç pik verirler. Temelde iki farklı moleküler eleme kromatografi yöntemi vardır.

- Jel filtrasyon kromatografisi
- Jel geçirgenlik kromatografisi.

Jel filtrasyon kromatografisinde sulu mobil faz ve hidrofilik sabit faz eşliğinde biyolojik makromoleküllerin ayırımı gerçekleştirilir. Jel geçirgenlik kromatografisinde ise hareketli faz olarak organik bir solvent ve hidrofobik sabit faz kolon materyali ile organik polimer yapıya maddelerin ayırımı gerçekleştirilir [74,78].

1.3.3.1.5 Dedektör

Hareketli faz ile taşınarak kolon çıkışına gelen numune sinyallerinin elektrik enerjisine çevrilip tanınmasına yardımcı olan kısımdır. HPLC için ideal dedektör; geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine ve belirli seçiciliğe sahip olmalıdır.

Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Yığın dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti ve yoğunluğu gibi analit tarafından değiştirilen özelliklere cevap veren dedektörlerdir. Bunun tersine analit dedektörleri, analitin UV absorbanansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir. Çizelge 1.5.'de HPLC de kullanılan dedektörler ve özellikleri verilmiştir [89].

Çizelge 1.5. HPLC dedektörleri ve özellikleri

Dedektör	Analit/Özellikler	Duyarlılık
UV-GB absorbans	Spesifik: UV kromofor gruplu bileşikler	ng
Diyot dizisi	Spesifik: UV-GB dedektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar.	ng
Floresans	Spesifik: Doğal floresans maddeler veya floresans etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indeksi	Genel: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler	0,1-10 µg
Evaporatif ışık saçma	Genel: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradient elüsyona uyumludur	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Spesifik: Elektro-aktif bileşikler	pg
İletkenlik	Spesifik: Anyonlar ve katyonlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radyoaktivite	Spesifik: Radyoaktif-etiketlenmiş bileşikler	Düşük düzeyler
Kütle spektrometre	Hem genel hem spesifik: Kesin tespit	fg-pg-ng

Ultraviyole/Görünür Bölge Dedektörü: En fazla kullanılan dedektörlerdir Absorbans ölçülür. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür.

Tipik bir UV-GB absorbans dedektörü, döteryum lambası ve küçük bir akış hücresine ışığı odaklamak için bir monokromatörden oluşur [89].

Diyot Dizi Dedektörü: Diyet dizi dedektörü, çok kanallı bir dedektördür. UV kaynağından çıkan ışık akış hücresinden geçene kadar dalgaboyu bileşenlerine ayrılmaz. Akış hücresinden geçtikten sonra her bir dalgaboyunda ışığın şiddetini ölçen diyet dizisi üzerinde dağılır. DAD tek bir analizle farklı dalgaboylarında eşzamanlı kromatogramların toplanmasına imkan sağlar. Bilgi, absorbansın alıkonma zamanı ve dalgaboyuna bağlı olarak kaydedilmesiyle üç boyutlu gösterim şeklinde elde edilir [89].

Floresans Dedektörü: UV dedektörlere göre 1000 kat daha yüksek hassasiyete sahiptirler. Bir floresans dedektörü, civa buhar lambası veya ksenon yüksek basınç lambası, uyarma ve emisyon dalgaboylarını seçmek için uyarma ve emisyon monokromatörü, kare akış hücresi ve yayılan ışığı güçlendirmek için bir foto-çoğaltıcıdan oluşur [89].

İletkenlik Dedektörü: İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa, oluşan gürültü de o denli düşük olur.

Kırılma İndisi Dedektörü: Bir kırılma indisi dedektörü, saf eluent ile örnek bileşenini içeren eluent arasındaki kırılma indisi farkını ölçer. Hemen hemen bütün maddelere cevap verir. Fakat bu dedektörler diğer dedektörlere göre daha düşük hassasiyete sahiptirler. Sıcaklığa büyük ölçüde bağımlıdırlar ve bu yüzden sabit sıcaklık sağlanmalıdır ($\pm 0,001^{\circ}\text{C}$). Mobil faz içindeki değişimlere duyarlı olduğundan, gradient elüsyon için uygun değildir. Kırılma indisi tayini; şeker, trigliserit, organik asit, farmasötik katkı maddeleri ve polimerler gibi düşük kromoforik aktivite gösteren bileşikler için kullanılır [77,86,89].

Elektrokimyasal Dedektör: Günümüzde çeşitli tipteki elektrokimyasal dedektörler amperometri, polarografi, kulometri ve kondüktometri esasına göre çalışmaktadır. Bu dedektörler duyarlılık, basitlik, kullanılabilirlik ve yaygın kullanım alanı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır.

Kütle Dedektörü: Kütle spektrometre dedektörleri son zamanlarda peptitler ve nükleotitler gibi uçucu olmayan ve termal olarak kararlı, geniş bir madde grubu için spektrumlar veren dedektörlerdir. Bu dedektörler kullanıldığında gözlenebilme sınırının 1-10 pg'a kadar düştüğü rapor edilmiştir. Son zamanlarda hem elektron impakt (EI) hem de kimyasal iyonlaşma (CI) spektrumu elde etmeyi mümkün kılan yeni tip bağlantılar piyasaya çıkmıştır.

1.3.3.1.6 Veri Kaydedici

Kaydedici, dedektörden gelen sinyali zamana göre kaydeder.

1.4 Elektroforez

Elektroforez İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından geliştirilen, yüklü moleküllerin akışkan sıvı ortamında elektrik alanı uygulanarak ayrılması yöntemidir. Yüklü moleküllerin elektroforetik hızlarının farklılığı ayırımı sağlar [90]. Elektroforez birçok analitik ayırma problemlerine uygulanmaktadır. Elektroforezin en önemli özelliği, biyoteknoloji endüstrisinde biyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda yüklü moleküllerin başarılı bir şekilde ayrılmasını sağlamasıdır. Elektroforetik ayırma oldukça farklı iki formatta gerçekleştirilir: birincisi tabaka (slab) elektroforez ve ikincisi kapiler elektroforezdir. Tabaka yönteminde ayırma, gözeneklerinde tampon çözeltisi bulunan yarı katı, gözenekli bir ince jel tabakası kullanılarak yapılmaktadır. Analiz edilecek numune, bir damla veya bant şeklinde tabaka üzerine ilave edilir, doğru akım potansiyeli belli bir süre uygulanır. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra potansiyel kesilir [91].

1.4.1 Kapiler Elektroferez

Partiküllerin göçü esasına dayanan ilk elektroforetik metot, protein araştırmaları için Tisellus tarafından 1937 yılında kullanılmış ve Tisellus bu buluşuyla nobel ödülü almıştır. Daha sonra yöntem geliştirilmiş ve günümüzde çok çeşitli türleri kullanıma sunulmuştur. Kapiler elektroferez bu türlerden birisidir. 1981 yılında Jongerson ve Lukacs 75 µm iç çaplı kapilerde ayırma yaparak yöntemin teorisini ortaya koymuşlardır [92].

Kapiler elektroferez (CE), küçük hacimdeki örneklerde bulunan yüklü parçacıkların hızlı ve etkili şekilde ayrılmalarını sağlayan modern bir analitik tekniktir. Ayırım, kapiler içindeki elektroforetik ortamda bulunan yüklü parçacıkların elektroforetik hızlarındaki farklılığa dayanmaktadır [93].

CE yöntemi, klasik elektroforezin ayırma tekniği ile kromatografik yöntemlerin aletsel tasarımıının birleşmesinden oluşmaktadır. CE büyük bir hızla gelişim gösteren güvenilir bir ayırma tekniğidir. Bu yöntem ile inorganik katyon ve anyonlar gibi en küçük iyonlardan, DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllere kadar çeşitli maddelerin kantitatif ve kalitatif olarak tayini mümkündür. Ayrıca başta inorganik anyon ve katyonlar olmak üzere aminoasitler, ilaçlar, vitaminler, karbohidratlar, peptitler, proteinler ve başka birçok türler analiz edilebilmektedir. Bu yöntem, karmaşık olmayan basit düzeneği, yüksek ayırma gücü, analiz hızı, küçük hacimde numune gereksinimi, düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı gibi daha birçok üstünlüğe sahiptir [94]. Bu tekniğin en önemli özelliklerinden biri, son yıllarda ziraat, adli tıp, genetik, biyolojik, tarım gibi çok geniş uygulama alanına sahip olmasıdır. Bu nedenlerden dolayı, CE tekniğinin ileriki yıllarda birçok yöntemin yerini alacağı düşünölmektedir.

CE bir çok açıdan kromatografiye benzerdir ve kromatografide kullanılan bir çok terim CE'de de kullanılır. Örneğin, çözünürlük ve ayırma verimliliği her iki teknikte de kullanılır ve tanımları aynıdır. Ancak, terminolojide mevcut bazı farklılıklar Çizelge 1.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 1.6. Bazı kromatografik terimlerin elektroforezdeki karşılıkları

<u>Kapiler Elektroforez</u>	<u>Kromatografi</u>
Elektroferogram	Kromatogram
Potansiyel	Akış hızı
Elektrolit çözelti	Hareketli faz
Enjeksiyon modu (Hidrostatik veya elektrokinetik)	Enjektör
Göç zamanı	Alıkonma zamanı
Elektroforetik hareketlilik	Kolon kapasite faktörü
Yüksek voltaj güç kaynağı	Pompa
Kapiler	Kolon

1.4.2 Kapiler Elektroforezin Temel İlkeleri

Elektroforetik ayırma, elektrik alan uygulanan bir kapiler kolon içerisindeki iyonların hızlarındaki farklılıklara bağlıdır. Kapiler kolon içerisindeki bir iyonun hızı şu Eş.1.10 ile verilebilir;

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1.10)$$

$$E = V/L \text{ (Volt/cm)} \quad (1.11)$$

Bu denklemde v iyon hızı, μ_e elektroforetik hareketlilik ve E uygulanan elektrik alan (V/cm) olarak tanımlanır [95]. Elektrik alan; Eş.1.11'de görüldüğü üzere kullanılan kapiler boyu (L) ve uygulanan voltaja (V) göre değişir. Elektroforetik hareketlilik (μ_e), iyonun özelliğine ve bulunduğu ortama bağlıdır. Bir başka deyişle μ_e her iyon için karakteristiktir. Elektroforetik hareketlilik, uygulanan elektrik kuvvet ile doğru (F_E) ve ortamın sürtünme kuvveti (F_F) ile ters orantılıdır. Bu iki kuvvetin μ_e 'ye etkisi Eş.1.12 gösterildiği gibidir.

$$\mu_e \propto \frac{\text{Elektrik kuvveti } (F_E)}{\text{Sürtünme kuvveti } (F_F)} \quad (1.12)$$

Uygulanan elektrik kuvvetine ve iyonun sürtünme kuvvetine ait Eş.1.13 ve Eş.1.14'de verilmiştir.

$$FE = q.E \quad (1.13)$$

$$FF = -6.\pi.\eta.r.v \quad (1.14)$$

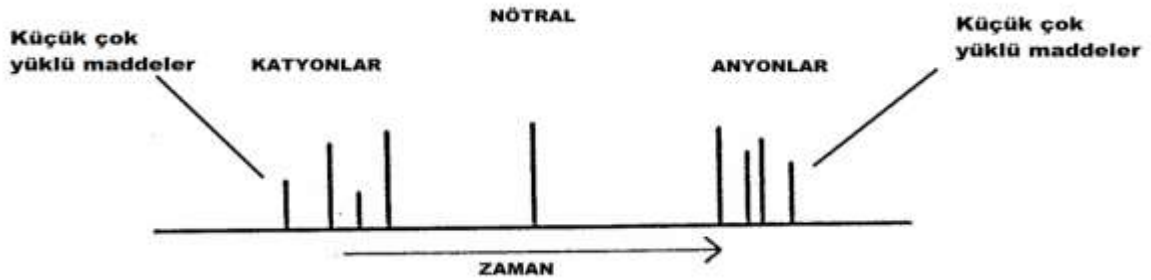
Eşitliklerdeki q iyon yükü, η çözelti viskozitesi, r iyon yarıçapı ve v iyon hızı olarak tanımlanır. Sabit elektrik alan uygulandığında elektroforez süresince FE ve FF kuvvetleri dengeye gelerek sabit bir durum oluşturur. Bu noktada bu iki kuvvet birbirine eşit fakat zıt yönlüdür, bu duruma ait Eş.1.15'de verilmiştir.

$$FE = FF \text{ ise, } q.E = 6.\pi.\eta.r.v \quad (1.15)$$

Elde edilen Eş.1.15 ifadesi Eş.1.10'da yerine konduğunda elektroforetik hareketliliği veren son Eş. 1.16 elde edilmektedir.

$$\mu_e = \frac{q}{6.\pi.\eta.r} \quad (1.16)$$

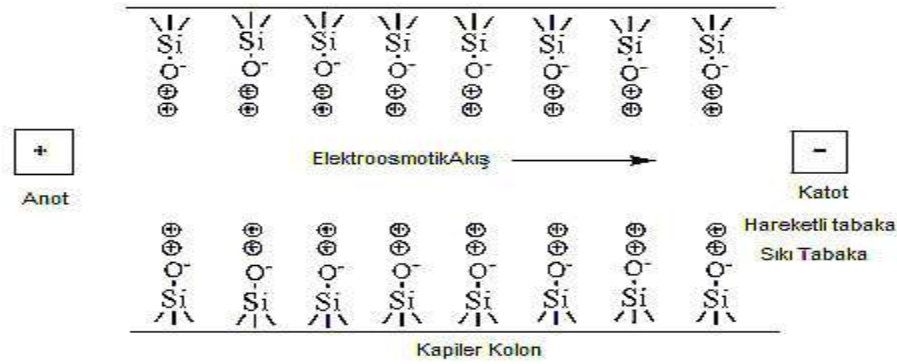
Viskozite sabit olduğunda, ayırmada q ve r oranı (q/r) etkili olacaktır. Analitler bu orana bağlı olarak elektrik alanda farklı hıza sahip olurlar. Küçük ve çok yüklü türler yüksek mobiliteye sahipken, büyük ve az yüklü türler düşük mobiliteye sahiptir [96]. Yüklü çözünen maddeler, farklı elektroforetik mobilitelere sahip oldukları için birbirlerinden ayrılırlar. Nötral çözünen maddeler, birbirlerinden değil, yüklü çözünen maddelerden ayrılırlar. Yüksek hareketliliğe sahip, daha fazla yüklü ve boyut olarak daha küçük kationlar kapilerden ilk olarak geçerler. Kapilerden en son, fazla yüklü küçük anyonlar geçerler. Şekil 1.13.'de bir elektroferogram görülmektedir [97]. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden farklı tip kapiler elektroforez teknikleri kullanılarak ayrılırlar.



Şekil 1.13. Elektroferogram

1.4.3 Elektroosmotik Akış (EOF)

Elektroosmotik veya elektroendoosmotik akış (EOF), CE uygulamasının temel bir unsurudur [96]. Kapiler elektroforezde genellikle eritilmiş silika kapiler kullanılır. Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır. Kapiler iç yüzeyindeki silanol gruplarının NaOH ve KOH ile muamele edilmesi neticesinde SiO⁻'a iyonize olurlar. Konvansiyonel CZE çalışmalarında iyonların göç hareketinde EOF'un baskın olması için silanol gruplarının iyonize olduğu pH ≥ 3 tamponlar önerilir. Kapiler kolon, çalışma tamponu ile doldurulduğunda eksi yüklü kapiler duvarı, çalışma tamponundaki katyonları çeker. Böylece kapiler duvarının yakınında elektriksel bir çift tabaka ve bu tabaka neticesinde bir potansiyel farkı (zeta potansiyeli) oluşur. Şekil 1.14.'de gösterildiği gibi çepere çok yakın artı yüklü iyonlar hareketsizken çeperden uzaklaştıkça çeperle artı yüklü tanecikler arasındaki elektrostatik çekim kuvveti zayıflayarak kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın hale gelir ve artı yüklü iyonlar topluca katoda doğru göç ederler. Bu toplu göç kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir [98,99].



Şekil 1.14. Kapiler yüzeyinde oluşan çift tabaka ve elektroosmotik akış

Kısaca tampon çözelti içeren bir kapiler tüpe yüksek bir potansiyel uygulandığında, genellikle bir elektroosmotik akış oluşur. Bu akış nedeniyle çözücü katot veya anoda doğru göç eder. Şekil 1.14.'de görüldüğü gibi elektroosmotik akışın sebebi silika ile çözelti ara yüzeyinde meydana gelen elektriksel çift tabakadır [100].

Elektroosmotik akışın hızı, v_{EOF} , Eş. 1.17 ile hesaplanır.

$$v_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF} \quad (1.17)$$

v_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı (cm/sn)

E : Elektriksel alan (V/cm)

μ_{EOF} : Elektroosmotik hareketlilik (cm²/ V.sn)

Ayrıca elektroosmotik akışın hızı, v_{EOF} , Eş.1.18 ile de hesaplanabilir.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (1.18)$$

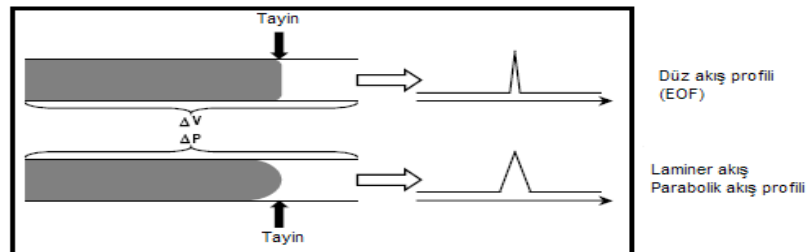
Eşitliğin sol tarafındaki değişkenler elektroosmotik akışta da değişikliklere sebep olurlar. Burada ϵ tamponun dielektrik sabiti, ζ zeta potansiyeli, E (volt/cm) elektrik alanı ve η tamponun viskozitesidir.

Elektroosmotik hareketlilik,

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (1.19)$$

Elektroosmotik hareketlilik; dielektrik sabiti, Eş.1.19'da görüldüğü üzere viskozite, pH ve konsantrasyon (zeta potansiyelinden etkilenir) gibi tamponların karakteristik özelliklerine bağlıdır ve uygulanan elektrik alanından bağımsızdır.

Kapiler elektroforezde EOF; kullanılan tampon çözeltinin özelliklerine, ayırım yapıldığı sıcaklığa ve uygulanan potansiyele göre değişiklik göstermektedir [101]. Elektroosmotik akış, kapiler içinde parabolik olmayan düz kesitli bir yığın çözelti akışına neden olur. Oysa sıvı kromatografide basıncın etkisi altında oluşan akış parabolik kesitlidir (Şekil 1.15.). Bu nedenle elektroosmotik akış, sıvı kromatografisinden farklı olarak bant genişlemesine önemli bir derecede etki etmemektedir ve CE'de bu nedenle dar bantlı ve dik pikler elde edilmektedir [96].



Şekil 1.15. Kapiler kolonda EOF ve parabolik akış

1.4.3.1 Elektroosmotik Akışı Etkileyen Faktörler

Kapiler elektroforez yönteminde elektroosmotik akış, kullanılan tampon çözeltilerin özelliklerine (dielektrik sabiti, viskozitesi ve dolayısıyla zeta potansiyeli büyüklüğü) ve ayırımın yapıldığı sıcaklığa göre değişim göstermektedir (Çizelge 1.7.). Kapiler kolonda kullanılan her tampon çözelti, kendi kimyasal özelliklerine göre değişik hareketliliğe sahiptir. Bu nedenle kolon içerisinde en uygun akışı sağlamak için çözelti karışımları da kullanılabilir [96].

Çizelge 1.7. EOF'e etki eden faktörler

Ayrırma sistemindeki değişiklik	EOF'e etkisi
Tamponun pH değeri arttığında	EOF artar, EOF 'u değiştirmek için en iyi yoldur
Tampon konsantrasyonu arttığında	Zeta potansiyeli azalır dolayısıyla EOF azalır
Sıcaklık arttığında	Viskoziteyi değiştirir EOF artar
Organik çözücü ilavesi ile	Zeta potansiyelini ve viskoziteyi değiştirir genellikle EOF azalır
Yüzey aktif maddesi ile	Katyonikler EOF'u tersine çevirir veya azaltabilir. Anyonik yüzey aktifler EOF'u arttırabilirler
Elektrik alan arttığında	EOF ile orantılı artar

EOF üzerindeki en önemli etkilerden biri de tampon pH'ıdır. Tampon pH'ının artması ile kapiler iç duvarında bulunan SiOH yapılarının SiO⁻ 'a iyonizasyonu yüksek miktardadır. Kapiler yüzey yükünde artış, zeta potansiyelinin dolayısıyla EOF'ın artmasına neden olur. Tamponun iyonik gücünde veya derişiminde artış zeta potansiyelini düşüreceğinden EOF'ı azaltır. Düşük tampon derişimi, analiz süresinin kısa olmasına sebep olur ancak tampon derişimi numune derişiminden fazla değilse elektriksel iletkenlikte problem oluşturur. Sıcaklık artışı, tampon viskozitesinin azalmasına, dolayısıyla da EOF'nin artmasına neden olur. Sıcaklık sürekli kontrol altında tutulmalıdır, çünkü sıcaklıktaki artış numunenin bozulmasına, pik genişlemesine, tampon kaynamasına ve tekrarlanamayan göç zamanlarına neden olur [98,99]. Potansiyeldeki artış elektroosmotik akışı artırır ve alıkonma zamanını azaltır bu da kısa sürede analiz edilmesini sağlar.

1.4.4 Band Genişlemesi

Ayrırma etkinliği HPLC de olduğu gibi CE’de de teorik plaka sayısı ile gösterilir. Eş. 1.20’de görüldüğü üzere band genişliğinin artması ayırma etkinliğini düşürür.

$$N = 5,54 \cdot (t / w_{1/2})^2 \quad (1.20)$$

Band genişlemesine neden olan etkenlerden en önemlisi difüzyondur. Kapillerin çapı küçük olduğu için, kapiller çapı boyunca difüzyon ihmal edilebilir, ancak kapiller boyunca difüzyon oluşabilir. Difüzyon ve N arasındaki eşitlik (1.21) şöyledir:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DIL / \mu_e \cdot V \quad (1.21)$$

Eş.1.20 ve 1.21 yardımıyla teorik plaka sayısı ve difüzyon arasında bir eşitlik (1.22) verilebilir.

$$N = \mu_e \cdot V \cdot I / 2DL = \mu_e \cdot E \cdot L / 2D \quad (1.22)$$

Bu eşitlikten de görüleceği gibi teorik plaka sayısı difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Büyük molekül ağırlığına sahip maddeler daha küçük difüzyon katsayılarına sahip oldukları için daha yüksek plato sayıları ile ayrılabilirler. Ayrıca Eş 1.21’de görüldüğü gibi analiz süresi kısaldıkça difüzyon nedeniyle pik genişlemesi azalacaktır. Kapiller elektroforezde yüksek voltaj altında ayırmalar genellikle çok kısa sürede tamamlandığından pikler dik ve simetrikdir. Band genişlemesine neden olan diğer parametreler; termal etkiler, tampon viskozitesinde lokal değişimler nedeniyle pik genişlemesi, enjeksiyon hacmi, büyük hacimlerde difüzyon nedeniyle pik genişlemesi, örneklerin duvara adsorpsiyonu, pik şekillerinde kuyruklanma, elektrodispersiyon (örnek ve tampon çözelti arasındaki iletkenlik farklılıkları) ve pik şekillerinin üçgen halinde görülmesidir [102].

1.4.5 Joule Isınması

Yüksek voltaj ve bunun sonucu olarak yüksek akım kapillerin ısınmasına neden olur. Joule ısınması olarak isimlendirilen bu durum kapiller elektroforez çalışmalarında istenmeyen bir durumdur. Çünkü kapiller içindeki sıvı çabuk soğutulamazsa, sıcaklık kapiller içinde artar ve bu artış da pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç zamanına, numune bozunması veya

tamponun kaynaması sonucu elektriksel iletkenliğin bozulmasına neden olur. Bu nedenle çalışmalarda en uygun potansiyel değeri belirlenmelidir [99,103].

1.4.6 Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforezin en sık kullanılan türü Kapiler Zone (Kuşak) Elektroforez (CZE)'dir. CZE'de ayırım, elektrolit çözeltisi ile dolu olan kapilerde, uygulanan elektrik akım altında, maddelerin farklı göç zamanlarına sahip olmasına dayanır.

Kapilerin bir polimer veya jel çözeltisi ile dolu olduğu CE türü ise Kapiler Jel Elektroforez (CGE)'dir. CGE'de ayırım makromoleküllerin moleküler büyüklüklerine göre gerçekleşmektedir.

Yüksüz maddelerin ayırımı için kullanılan CE türleri genel olarak kapiler elektrokinetik kromatografi (CEKC) ismini alır. En yaygın elektrokinetik kromatografi türü Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)'dir. MEKC'de ayırımın esası, elektrolit çözeltisine katılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu misel adı verilen kümeler ile çözücü arasında yüksüz maddelerin paylaşım farklılıklarına dayanır.

İzoelektrik odaklanma kapiler elektroforez yöntemi proteinlerin ayırımında kullanılır. Bu yöntemde ayırım, proteinlerin farklı pH'larda izoelektrik noktaya sahip olmalarından yararlanarak yapılır.

Kapiler elektrokromatografi tam bir kromatografidir. Kapilerin içi yaklaşık 1 µm çaplı sabit fazla doldurulur. Analitler uygulanan elektrik voltaj altında sabit fazda tutunmalarına göre ayrılırlar.

Bir diğer CE yöntemi izotakofrez (ITP)'dir. ITP'de örnek farklı iyon mobilitesine sahip iki elektrolit çözeltisi arasında enjekte edilir.

Kapiler elektroforez türleri Çizelge 1.8.'de gösterilmiştir [97,104]. Bu çalışmada bu türlerden, kapiler zone (kuşak) elektroforez yöntemi kullanılmış ve bu yöntemle ilgili genel bilgilere yer verilmiştir.

Çizelge 1.8. Kapiler elektroforez türleri

Kapiler Elektroforez Türü

- Kapiler Zone (Kuşak) Elektroforez
- Kapiler İzotakoforez
- Kapiler İzoelektrik Odaklama
- Kapiler Jel Elektroforez
- Susuz Ortam Kapiler Elektroforez
- Afinite Kapiler Elektrokromatografi
- Kapiler Elektrokromatografi
- Mikroçip Kapiler Elektroforez
- Basınçlı Kapiler Elektrokromatografi
- İmmunoafinite Kapiler Elektroforez
- Nano Kapiler Elektroforez
- Mikrolit Kapiler Elektroforez
- Kapiler Elektrokinetik Kromatografi
- 1) Miseller Elektrokinetik Kromatografi
- 2) Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi

1.4.6.1 Kapiler Zone (Kuşak) Elektroforez

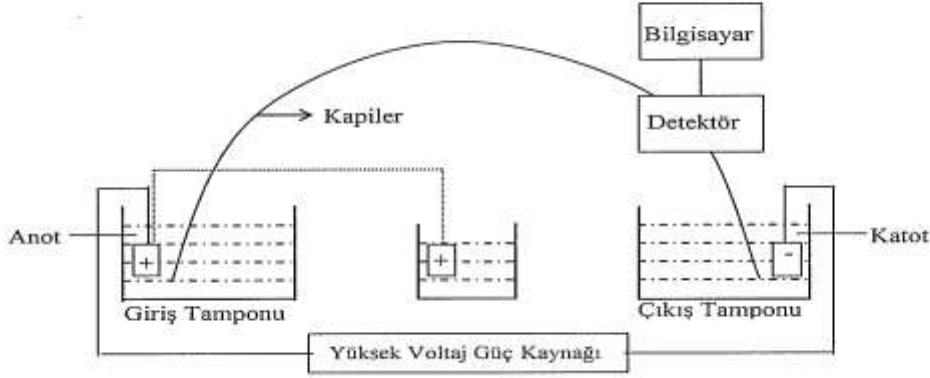
Kapiler kuşak elektroforez oldukça geniş kullanım sahasına sahip ve basit bir tekniktir. Bu teknikte tampon, kapiler kolonun her bölgesinde aynıdır. Potansiyel uygulaması ile kapiler kolondaki parçacıklar kendi hareketliliklerine göre zonlara ayrılır. Bu zonlar tamamen ayrılabilirler gibi kısmen örtüşme olasılıkları da vardır. Tamamen ayrılmış zonlar arasında tampon bulunur [79]. Kapiler kolon içerisinde meydana gelen bu zonlar kolon içerisinde ilerleyerek dedektöre ulaşırlar ve ayırma gerçekleşir. Şekil 1.16.'da bu uygulamanın şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.16. Kapiler Zone Elektroforez

1.4.6.1.1 Kapiler Elektroferez Cihazının Bölümleri

CE sistemi; kapiler, dedektör, yüksek voltaj güç kaynağı, numune vialı, giriş ve çıkış vialleri ve bilgisayardan oluşur. Tipik bir CE cihazının bölümleri Şekil 1.17.'de görülmektedir [97].



Şekil 1.17. CE cihazının kısımları

Kapiler başlangıcı örnek vialinin içerisine konular, örnek içeri verilir, daha sonra kapiler girişi kaynak vialine yerleştirilir ve kaynak ve hedef vialleri arasında bir elektrik alanı uygulanır. Çözünen maddeler kapilerden göç ettikleri için, bunlar dedektör tarafından dedekte edilirler ve bunun çıktısı bilgisayara gönderilir. Çıktı, dedektör yanıtının zamana karşı belirtildiği ve pikler halinde görüldüğü elektroferogram olarak verilir. Bir elektroferogram, zamana karşı dedektör yanıtlarının grafiğidir. Farklı çözünen maddeler, kapilerden farklı oranlarda göç ettikleri için, dedektörden farklı zamanlarda geçerler. Bir elektroferogramda ayrılan bileşenler pik olarak farklı göç zamanları ile belirirler. Göç zamanları piklerin maksimum yaptığı yerde ölçülür ve genellikle dakika olarak verilir.

1) Yüksek Voltaj Güç Kaynağı:

Güç kaynağının amacı kapiler üzerinde bir elektrik alanı oluşturmaktır. Pek çoğu ya sabit potansiyel, ya sabit akım yada sabit güç modunda çalışır ve polariteyi tersine çevirme vasfına sahiptir. Gerilimler 30 kV'a kadar, akımlar 300 μ A'e kadar ve güçte 6 W'a kadar çıkabilir.

Yapılan çalışmanın güvenilirliği, uygulanan voltajın kararlılığıyla yakından alakalıdır. Eş.1.11'den de görülebileceği gibi voltaj değişimiyle elektrik alan da değişir. Elektrik

alanın değişimi, g zamanından alan tekrarlanırlığına bir çok önemli parametrenin değişmesine neden olur.

2) Kapiler:

CE'de kullanılan kapilerlerin i çapı 25-100 μm ; dış çapı 150-520 μm arasında değişir. Kapilerin boyu en sık 50-75 cm arasında kullanılır. Eritilmiş silika günümüzde en sık kullanılan kapiler materyalidir. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır.

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi amaya gerek göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında alışılmama sakıncasına sahiptir. Teflon kapilerde homojen i çap elde edilemez ve ısı iletkenliği düşük olduğundan yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha sık kullanılan bir kapilerdir. Genelde i çapı 25-100 μm olan eritilmiş silika kapiler kullanılmaktadır. Büyük çaplı kapilerde yüksek ısı açığa çıkmakta ve kapilerin i duvarıyla merkezi arasındaki ısı farkı çok büyük olmaktadır. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV-GB absorbans veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun küçülmesinden dolayı absorbans düşmekte ve pik yüksekliliği azalmaktadır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı oldukça yüksektir.

Kapilerin i çapının ve boyunun değişmesi; g zamanı, sıcaklık, adsorpsiyon, dedeksiyon limiti, enjeksiyon hacmi ve ayırma etkinliğinin değişmesine neden olur.

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işleminin uygulanması gerekmektedir. Silika yüzeyinin durumu, CE'de parçacıkların hızlarına etki eden iki kuvvetten biri olan elektroosmotik akış (EOF) zerinde etkilidir. şartlandırmayla kapilerin i çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Kapiler yeni ise 1 N NaOH, takiben 0,1 N NaOH, su ve en son olarak da çalışma tamponu geçirilerek şartlandırılır. Ayrıca her analizden önce 0,1 N NaOH, su ve çalışma tamponu geçirilerek kapilerin mümkün olduğunca aynı şartlanması sağlanır. Çalışma bitiminde su geçirilmelidir. Eğer birkaç gün çalışma yapılmayacaksa kapiler içinde mikroorganizma reyeceği göz önünde bulundurularak hava çekilmesi ve kurutulmuş olarak bırakılması yararlı olur.

3) Dedektörler:

Çizelge 1.9.'da CE'de kullanılan dedektör çeşitleri verilmiştir [96]. En sık kullanılan dedektörler UV-GB ve floresans dedektörlerdir. Absorbans dedektörleri CE'e uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Gözlenebilme sınırı genellikle 10^{-5} - 10^{-7} M aralığındadır. Tek bir dalga boyunda veya dizi diyot dedektör kullanılarak bir çok dalga boyunda absorbans alınabilir. Absorbans dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100 μ m) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun artırılması için "z" şeklinde veya baloncuk şeklinde dedektör hücresine sahip kapilerler kullanılarak duyarlılık artırılabilir.

Çizelge 1.9. CE'de kullanılan dedektörler

Dedektör	LOD(mol/L)
UV absorbsiyon	10^{-5} - 10^{-8}
İndirekt UV	10-100 kat<UV
Floresans	10^{-7} - 10^{-9}
Lazer indüklenmiş floresans	10^{-14} - 10^{-16}
Amperometri	10^{-10} - 10^{-11}
Kütle spektrometresi	10^{-8} - 10^{-9}

4) Kaynak ve Hedef Vialler:

Kaynak viali dendiğinde, bazen giriş viali veya giriş rezervuarı anlaşılır ve hedef viali dendiğinde çıkış viali veya çıkış rezervuarı anlaşılır. Normalde kaynak viali, kapiler ve hedef viali aynı tampon ile doldurulur. Tamponun oluşturulması CE'de en önemli değişkenlerden biridir. Tamponun pH'ındaki veya konsantrasyonundaki küçük değişiklikler, çözünen madde göçü oranları ve göç zamanlarında önemli değişikliklere yol açar. Bu nedenle tampon değiştiğinde; kaynak vialini, hedef vialini ve kapileri çok iyi bir biçimde çalkalamak önemlidir.

5) Enjeksiyon:

Enjeksiyon, örneği kapiler içerisine almak anlamına gelir. Örnekler genellikle birkaç μ L'den birkaç mL'ye kadar hacime sahip örnek viallerine doldurulur. Enjeksiyon hacmi 2-20 nL arasında değişir. Kapilere yalnızca birkaç nL enjekte edildiği için küçük hacimde bir

örnek yeterlidir. Aşırı hacimlerde çalışmak pik şeklinin bozulmasına, band genişlemesine, rezolüsyonun azalmasına sebep olur. Örnek enjeksiyonu, kapilerin girişine yerleştirilmesi ile yapılır. Kapilerin pozitif elektrottaki tarafı örnek vialine yerleştirilir. Örnekler kapilere 2 farklı teknikte enjekte edilir. Bunlar hidrodinamik ve elektrokinetik enjeksiyonlardır.

Hidrodinamik enjeksiyon, en çok kullanılan enjeksiyon yöntemi olup üç şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1 ile 5 saniye arası basınç uygulanır. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune viali kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde ise, sifon etkisinden yararlanır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune viali, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Elektrokinetik enjeksiyon ise, örnek kabı ile çıkış tampon kabı arasında çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak yapılır. Elektrokinetik enjeksiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik enjeksiyona göre daha azdır. Enjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır [105]. Hidrodinamik enjeksiyonlar jel ile doldurulmuş kapilerlerde çalışmaz. Bu nedenle bu tür durumlarda elektrokinetik enjeksiyon kullanılır. Ticari olarak kullanıma hazır olan pek çok aygıt, pek çok vialin yüklenebileceği oto örnekleme sistemi içerir. Bu sayede örnekler yukarıda listelenen enjeksiyon tekniklerinden bir yada bir kaçını kullanarak enjekte edilebilmektedir.

6) Dataların Oluşturulması ve Değerlendirilmesi:

Kromatografi gibi CE mükemmel bir kantitatif tekniktir. Zira pik yükseklikleri ve pik alanları konsantrasyonla orantılı haldedir. Kantitatif analiz, ilgili bileşiklerin her birinin bilinen konsantrasyonlarını içeren standardın enjeksiyonu veya sonuç piklerinin her birinin yüksekliklerinin veya alanlarının ölçülmesi ile yapılır. Daha sonra örnek bileşenlerinin bilinmeyen konsantrasyonlarını içeren bir örnek enjekte edilir ve pik alanları veya yükseklikleri ölçülür. Standarttan elde edilen alan ve yüksekliklerin örneklerden elde edilenler ile karşılaştırılmasıyla örnekteki bileşenlerin konsantrasyonları tayin edilebilir.

1.5 Oseltamivir ve Permeabilite ile İlgili Bilimsel Çalışmalar

1.5.1 Oseltamivir ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Chabai ve arkadaşları (2011), kapsül içerisindeki oseltamivir fosfatın tayini için monolitik silika kolon kullanarak basit, seçici, doğrusal, kesin ve hassas bir HPLC metodu geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İzokratik elüsyonda akış hızı 3 mL/dakika olarak belirlenmiş ve kolon olarak ters faz C18 (100x4,6 mm, Merck) kullanılarak oda sıcaklığında ayırım gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanı, plaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametreler ölçülerek uygun analiz koşulları belirlenmiştir. Mobil faz asetonitril-fosfat tamponu (100 mM, pH 4) (80:20, v/v)'dur. Analiz DAD dedektör ile 220 nm'de yapılmıştır. Metot farmasötik dozaj formlarına uygulanmış ve metodun oseltamivir fosfatın rutin analizlerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [106].

Thatte ve grubu (2011), farmasötik dozaj formlarında oseltamivir fosfatın tayini için kolay, duyarlı, hızlı, ekonomik bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Absorbsiyon ölçümleri Shimadzu 1800 UV ile spektrofotometrisi ile 221 nm'de yapılmıştır. Kalibrasyon grafiği 20-70 µg/mL aralığında çizilmiş ve kalibrasyon denklemi $y = 0,020x + 0,168$ ve korelasyon katsayısı 0,999 bulunmuştur. Önerilen yöntem için tabletteki yardımcı maddelerin girişimine rastlanmadan tabletteki ilacın % geri kazanımı 99,228-99,532 ± 0,1670 arasında belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem için doğrusallık, kesinlik ve LOD, LOQ değerleri hesaplanarak valide edilmiştir [107].

Kummer ve arkadaşları (2009), tamiflu içerisindeki oseltamivirin belirlenmesi için hızlı kapiler elektroforez yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Ayırma; 60,2 cm (etkin uzunluğu 10 cm) x 7,5 µm ID kapiler kolon, 15 kV potansiyel uygulanarak, 25 °C'deki kolon sıcaklığı koşullarında, 50 mM fosfat tamponu (pH 6,3) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve UV dedektör ile 226 nm'de ölçümler yapılmıştır. Bu koşullarda analiz süresi 1,5 dakikadan kısadır. Tekrarlanabilirlik ve orta hassasiyet için RSD değerleri sırasıyla % 0,94 ve % 0,98'dir. Geri kazanım %98,64-%100,26 arasında, RSD ise %0,38 olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ sırasıyla 0,97 ve 3,24 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Valide edilen yöntem, içerisinde oseltamivir içeren 3 kapsülde (tamiflu, saiflu, fulfy) başarıyla uygulanmıştır [108].

Raut ve arkadaşları (2010), Fluvir tabletlerindeki oseltamivir fosfatın UV spektrofotometre ile tayini için metot geliştirmişlerdir. Önerilen metot UV dedektör ile 208,5 nm'de oseltamivir fosfatın farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır. Bu amaçla Shimadzu 1700

UV-görünür bölge spektrofotometre ile analizler gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği 4-24 µg/mL arasında çizilmiştir. SD 0,01125 ve RSD 0,0210 olarak hesaplanmıştır. Önerilen yöntem için ilaçların tabletlerdeki geri kazanımı %99,32-99,97 arasında değişmektedir. Tabletlerin analizinde metot validasyonu için LOD, LOQ ve doğruluk kabul edilebilir değerlerde bulunmuştur [109].

Heinig ve arkadaşları (2008), oseltamivir ve oseltamivir karboksilatın insan kanı ve idrarı ile fare kanı ve beyin-omurilik sıvısı içerisindeki hassas tayinine yönelik sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS) yöntemi kullanılarak metot geliştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonunu takiben perklorik asit ile protein çöktürmesi yapılmış ve ardından terz faz kolon ile gradient ayırma gerçekleştirilmiştir. MS kısmında bileşikler pozitif iyonları şeklinde gözlemlenmiştir. LLOQ değerleri, fare kanında yapılan çalışmada 0,1 ng/ml ve beyin-omurilik sıvısında 0,5 ng/g, insan kanında ve idrarında 1,0 ng/mL olarak bulunmuştur. Fare numuneleri için gün içi ve günler arası kesinlik ve bağlı hata sırasıyla % 10,2 ve % 13,9'un altındadır. İnsan matrislerindeki gün içi ve günler arası kesinlik ve bağlı hata ise sırasıyla %11,7 ve %8,9' un altındadır. Geri kazanım %100'e değerdedir. İlgili metot fare örneklerine ilişkin çalışmalarda başarı ile uygulanmıştır [110].

Charles ve grubu (2007), Tamiflu kapsüllerinin içerisindeki oseltamivir fosfatın kalite kontrolünün sağlanması amacı ile basit, seçici, doğrusal, hassas ve kesin bir HPLC metodu geliştirmiş ve metot validasyonunu sağlamışlardır. Çalışmalar Zorbax CN (150mm x 4,6mm, 5µm) kolon kullanılarak 1,2 mL/dakika akış hızında izokratik elüsyon tekniği ile, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 50:50 (v/v) oranında 0,04 M formik asit (pH 3) - metanol kullanılmıştır. Örnek enjeksiyonu 20 µl ve çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir. İç standart olarak sotalol hidroklorür kullanılmış ve alıkonma süreleri oseltamivir ve sotalol hidroklorür için sırasıyla 3,40 ve 2,25 dakika olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır. Önerilen metodun, oseltamivir fosfatın rutin analizleri için uygulanabilir olmakla birlikte hali hazırda satışa sunulan tamiflu takliti ilaçların kalite kontrollerinin yapılmasında da kullanılabileceğini belirtmişlerdir [111].

Lindegardh ve grubu (2007) gerçekleştirdikleri çalışmada; insan kanı, idrar ve tükürüğündeki oseltamivir ve oseltamivir karboksilatın tayini için sıvı kromatografik-ardışık kütle spektrofotometrik metot geliştirmişler ve validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ayırma ZIC-HILIC (50mm×2,1 mm) kolon kullanılarak, 10 mM asetonitril:amonyum

asetat ihtiva eden tampon çözelti (pH=3,5) ile gradient sistemde , 500 µL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiştir. OF tespitinde LLOQ değeri kan, tükürük ve idrar için sırası ile 1, 1 ve 5 ng/mL olarak tespit edilirken, OK tespitinde LLOQ değerleri aynı sıra ile 10, 10 ve 30 ng/mL olarak belirlenmiştir. OF tayini için üst tespit sınırı (ULOQ) kan, tükürük ve idrar için sırası ile 600, 300 ve 1500 ng/mL iken OK için aynı sıra ile 10,000, 10,000 ve 30,000 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Gün içi ve günler arası relatif standart sapma bütün örnekler için % 5'in altında tespit edilmiştir [112].

1.5.2 Permeabilite ile Yapılan Bilimsel Çalışmalar

Milani ve arkadaşları (2005) naproksen, ketoprofen ve fenol kırmızısının fare örneklerinde intestinal permeabilitelerinin eş zamanlı tayini için ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Mobil faz olarak % 20 metanol, % 28 asetonitril, % 52 su ve 0,04 mL trietilamin (ortofosforik asit ile pH 4' e ayarlanmış) kullanılmıştır. Analiz UV dedektör ile 270 nm'de, 1,5 mL/dakika akış hızında 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği ($r > 0,999$) 3 bileşik için 15,6–250 µg/mL konsantrasyon aralığında çizilmiş ve LOQ değerleri naproksen, ketoprofen ve fenol kırmızısı için sırası ile 0,3, 0,25, ve 0,2 ng/mL bulunmuştur. Kullanılan single pass intestinal perfüzyon tekniği ve önerilen HPLC metodu ile yapılan çalışmalar sonucu naproksen ve ketoprofenin permeabilite değerleri sırası ile $1,17 \times 10^{-4} (\pm 0,28)$ cm/s ve $0,97 \times 10^{-4} (\pm 0,2)$ cm/s elde edilmiştir [113].

Milani ve grubu (2007), 14 adet bileşiğin insan bağırsak geçirgenliğinin tayini için farelerde single-pass intestinal perfüzyon (SPIP) tekniğini kullanarak bir metot geliştirmişlerdir. Anestezi edilmiş sıçanlarda geçirgenlik katsayısı, ilgili bileşikler için belirlenmiştir. Fosfat tampon içerisine ilave edilen ilaç çözeltileri 0,21 mL/dakika akış hızında SPIP tekniği ile 90 dakika süreyle perfüze edilmiş ve farklı dakikalarda çıkış borusundan örnek alınmıştır. Örnekteki ilaç konsantrasyonları HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve geçirgenlik katsayıları (P_{eff}) hesaplanmıştır. İncelenen bileşikler için sıçanlarda bağırsak geçirgenliğinin kendi aralarında yaklaşık 12,5 kat farklılığı tespit edilmiştir. Bu değerler makalede yayınlanmış insan permeabilite değerleri ile karşılaştırılmış, $P_{eff (rat)}$ ve $P_{eff (human)}$ değerleri arasında güçlü bir korelasyon bulunmuş ($P_{eff (human)} = 11,04 P_{eff (rat)} - 0,0003; R^2 = 0,93, P < 0,0001$) ve akabinde insanlarda absorbe olan fraksiyon dozları tahmin edilmiştir [114].

Song ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada single-pass intestinal perfüzyon (SPIP) tekniği ile erkek Waster cinsi sıçanlarda bağırsağın izole edilmiş 3 ayrı segmentinde (dodenum, jejenum, ileum) metforminin intestinal permeabilite değerlerini ters faz sıvı kromatografik yöntemle hesaplamışlardır. Perfüzyon çözeltisine 50 µg/mL metformin ilavesi ile perfüze edilen jejenum, ileum ve doedonum segmentlerinden elde edilen permeabilite değerleri sırasıyla $3,26 \pm 0,73 \times 10^{-5}$, $2,96 \pm 0,36 \times 10^{-5}$ cm/s ve $4,51 \pm 1,08 \times 10^{-5}$ cm/s olarak bulunmuştur. Ayrıca doedonumdan 10µg/mL ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında metformin perfüze edilmesiyle 10 µg/ml için permeabilite değeri $4,71 \pm 0,86) \times 10^{-5}$ cm/s, 200 µg/mL metforminin doedonumdan perfüzyonu ile permeabilite değeri $2,70 \pm 0,63 \times 10^{-5}$ cm/s olarak hesaplanmıştır [115].

2 MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

- HPLC Cihazı (Agilent Technologies 1260 Infinity); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- HPLC Kolonu (X Terra RP18 Column (4,6 × 250mm, 5µm); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- HPLC Dedektörü (UV); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- Kapiler Elektroforez Cihazı (Agilent Technologies G7100A); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- Kapiler Dedektörü (DAD); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- Kapiler Kolonu (55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID Column); İntestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmıştır.
- Saf Su Cihazı (Millipore Direct-Q 3UV ; 0,22 µm); Kullanılan saf suyun temini için kullanılmıştır.
- Hassas Terazı (Mettler Toledo); Katı maddelerin tartılmasında kullanılmıştır.
- Manyetik Karıştırıcı (Falc R.P.M.); Mobil fazın ve çözeltilerin hazırlanması ve homojenizasyonun sağlanması amacı ile kullanılmıştır.
- pH Metre ve elektrot(Mettler Toledo, Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrot, Hanna Ins); Mobil fazın pH'ının ayarlanmasında ve bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
- Vorteks (IKA Genus 3); Enjeksiyon öncesinde örneklerin homojenizasyonun sağlanması amacı ile kullanılmıştır.
- Ultrasonik Banyo (P Selecta Ultrasons H-D, Bandelin); Mobil fazın ve çözeltilerin hazırlanması aşamasında hava kabarcıklarının giderilmesi ve homojenizasyonun sağlanması amacı ile ve bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
- Derin Dondurucu (İlshin Lab. Co. Ltd.); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
- Membran Filtre (Alltech Ass. Inc.; 0,45µm); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
- Peristaltik Pompa (Gilson); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

- Tubingler (Gilson); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar

- Oseltamivir Fosfat (Sigma); İntestinal permeabilite ölçümlerinde standart madde olarak kullanılmıştır.
- Metoprolol (Merck); ilacın permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla referans madde olarak kullanılmıştır.
- Fenol Kırmızısı (Merck); Perfüzyon deneylerinde su dengesine ulaşıp ulaşılmadığını tayin etmek amacıyla referans madde olarak kullanılmıştır.
- Asetonitril (Merck, HPLC saflığında); HPLC ile yapılan permeabilite çalışmalarında mobil faz hazırlamada kullanılmıştır.
- 20 mM Borat tampon çözeltisi (Agilent Technologies); Kapiler elektroforez ile yapılan permeabilite çalışmalarında tampon olarak kullanılmıştır.
- 1M Sodyum Hidroksit Çözeltisi (Agilent Technologies); Kapiler elektroforez cihazının elektrolit dengesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır.
- Urasil (Merck, analitik saflıkta); Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede kullanılmıştır.
- Sodyum hidroksit (Merck, analitik saflıkta); Mobil faz pH'ının ayarlanmasında kullanılmıştır.
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck, analitik saflıkta); HPLC ile yapılan permeabilite çalışmalarında mobil faz hazırlamada kullanılmıştır.
- Potasyum hidrojen fitalat (Merck); pH metre için kalibrasyon çözeltisi olarak kullanılmıştır.
- Sodyum Klorür (Sigma, analitik saflıkta); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisi hazırlamada kullanılmıştır.
- Potasyum Klorür (Sigma, analitik saflıkta); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisi hazırlamak amacı ile kullanılmıştır.
- Sodyum sülfat (Sigma, analitik saflıkta); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisi hazırlamak amacı ile kullanılmıştır.
- Sodyum Bikarbonat (Sigma, analitik saflıkta); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisi hazırlamak amacı ile kullanılmıştır.
- Mannitol (Sigma, analitik saflıkta); Bağırsak perfüzyonu çalışmalarında perfüzyon çözeltisi hazırlamak amacı ile kullanılmıştır.

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler

Oseltamivir Fosfat çözeltisi; Oseltamivir fosfatdan 0,005 g tartım kabının içine hassas olarak tartılıp, üzerine 50 mL su eklenir ve ultrasonik bonyada tamamen çözündürülerek hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiden istenilen derişimde su ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çözeltiler, +4 °C buzdolabında saklanarak ve kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenilmiştir.

Metoprolol çözeltisi; 0,005 g metoprolol tartım kabının içerisine hassas olarak tartılıp üzerine 50 ml su ilave edilip ultrasonik bonyada tamamen çözündürülmüş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homejen bir çözelti hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiden istenilen derişimde su ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çözeltiler, +4 °C buzdolabında saklanarak ve kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenilmiştir.

Fenol Kırmızısı çözeltisi; 0,005 g fenol kırmızısı tartım kabının içerisine hassas olarak tartılıp üzerine 50 ml su ilave edilip ultrasonik bonyada tamamen çözündürülmüş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homejen bir çözelti hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiden istenilen derişimde su ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çözeltiler, +4 °C buzdolabında saklanarak ve kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenilmiştir.

Urasil çözeltisi; çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 olacak şekilde suda hazırlanmıştır.

Potasyum Hidrojen Ftalat çözeltisi; 2 saat 110 °C'da kurutulmuştur. 0,05 molal derişimde hazırlanmış ve çalışılan ortamlara özgü pH referans değerleri kullanılmıştır.

%30 (h/h) Asetonitril/20 mM KH_2PO_4 ikili karışımı; 1 litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 300 mL asetonitril alınmış ve üzerine 700 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 20 mM derişimde olacak şekilde tartılarak ilave edilip ultrasonik bonyada tamamen çözündürülmüş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homejen bir çözelti hazırlanmış ve pH 5'e ayarlamak için NaOH'den (1 M) ve H_3PO_4 'den ilaveler yapılmıştır. Mobil faz çözeltileri günlük olarak hazırlanmıştır.

Perfüzyon çözeltisi; tüm perfüzyon çalışmalarında perfüzyon ortamı olarak Golytely olarak adlandırılan izo-ozmotik çözelti kullanılmıştır. Kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi; sodyum klorür (25 mmol/L), potasyum klorür (10 mmol/L), sodyum sülfat (40 mmol/L), sodyum bi karbonat (20 mmol/L) ve mannitol (80 mmol/L)'dür.

2.2 Metot

2.2.1 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Belirlenmesi için Yapılan Perfüzyon Çalışmaları

Perfüzyon deneylerinde single pass intestinal perfüzyon tekniği kullanılmıştır. Perfüzyon deneylerinde 200-250 g ağırlığındaki Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izinle gerçekleştirilmiştir.

Deneyden bir gece önce içme suları kısıtlanmadan aç bırakılan hayvanların deney süresince vücut sıcaklığı 37 °C'de sabit tutulmuştur. Anestezi ketamin (90 mg/kg) ve ksilazinin (5 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu yoluyla sağlanmıştır. Anestezi altında karın duvarı kesilerek jejunum çıkarılmıştır. Perfüze edilecek segment uzunlukları jejunum için 4,0-10,0 cm olarak ayarlanarak izole edilen bağırsak segmentlerinin proksimal ve distal uçlarına silikon tüpler yerleştirilip cerrahi iplikle sabitlenmiştir. İzole segment serum fizyolojik (37°C) ile yıkanarak temizlenmiş ve temizlenme göstergesi olarak çözeltilinin berrak gelmesi esas alınmıştır. Peristaltik pompa aracılığıyla akış hızı 0,2 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmış ve deney süresinde perfüzyon yapılmıştır. Perfüze edilen segmentin kurumasını önlemek için üzerleri parafilm ile kapatılmıştır. Deney sonunda hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülmüştür ve her deney sonunda perfüze edilen bağırsak segmenti çıkarılarak uzunluklar tekrar ölçülmüştür.

Oseltamivir fosfatın bağırsaklardan absorpsiyonunun incelenmesi için izole segment serum fizyolojikle yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltilisiyle dengeye ulaşana kadar (yaklaşık 30 dakika) perfüze edilmiştir. Perfüze edilen bağırsak segmentleri dengeye ulaştıktan sonra yapılan çalışmalar aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Taze olarak hazırlanan perfüzyon çözeltilisine literatürdeki verilerden yararlanılarak 0,394 mg/mL oseltamivir fosfat, referans madde olarak bağırsak permeabilitesi oldukça yüksek olan metoprolol tartarat 0,400 mg/mL konsantrasyonda ve su dengesine ulaşıp ulaşılmadığını tayin etmek amacıyla fenol kırmızısı 0,250 mg/mL konsantrasyonda ilave edilmesinin ardından gerekli hacme tamamlanıp iyice karıştırılmıştır. Uygun konsantrasyonda oseltamivir fosfat perfüzyon çözeltilisine eklendikten sonra bağırsak segmenti 60 dakika süreyle perfüze edilmiş ve her 10 dakikada bir örnek toplanmıştır.

Toplanan örneklerin, oseltamivir fosfatın intestinal permeabilitesinin (P_{eff}) belirlenmesi amacı ile belirlenen uygun HPLC ve CE koşullarında analizi gerçekleştirilmiştir. Oseltamivir fosfatın permeabilite değeri (P_{eff}) hesaplanmasında Eş.3.1 kullanılmıştır.

$$P_{eff} = \frac{Q \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)^t}{2 \cdot \pi \cdot R \cdot L} \quad (3.1)$$

- Q : Akış hızı (mL/s)
 C_{out} : Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu
 C_{in} : Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu
R : Perfüze edilen bağırsak segmentinin yarıçapı (cm)
L : Perfüze edilen bağırsak segmentinin uzunluğu (cm)

Segmentlerin ortalama yarıçapları jejunum ve ileum için 0,18 cm, kolon için 0,2 cm olarak kabul edilmiştir [116].

Formülde verilen $(C_{out}/C_{in})^t$ oranı (C_{out}/C_{in} düzeltilmiş) Eş.3.2 ile hesaplanmıştır.

$$\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)^t = \left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)_{ilaç} \times \left(\frac{C_{in}}{C_{out}}\right)_{fenolred} \quad (3.2)$$

Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyon değerleri kullanılarak net water flux (NWF) net su akışı değeri Eş.3.3 ile hesaplanmıştır [116]:

$$NWF = \frac{Q \cdot \left[1 - \left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)_{fenolred}\right]}{L} \quad (3.3)$$

Yapılan hesaplamalar sonucunda net su akışı değerinin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı olduğunu ifade etmektedir. Bu değer pozitif çıkması ise mukozal bölgeye sıvı girişi olduğunu ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda hesaplanan net su akışı değerleri bu doğrultuda değerlendirilmiştir.

Elde edilen bütün veriler ortalama (Ortalama) \pm standart sapma (SD) olarak tablolanmıştır. Konsantrasyon-zaman profillerinin karşılaştırılmasında yapılan istatistiksel analizlerde güven aralığı en az % 95 olarak seçilmiştir. Grup içi verilerin istatistiksel

karşılaştırılmasında non-parametrik bir test olan eşleştirilmiş t-testi kullanılmıştır. Analizler GraphPad Prism 5,01 for Windows programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemliliği elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p > \alpha$; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p < \alpha$; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir. Analitik yöntem için ise validasyon ölçütlerinin varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

2.2.2 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Tayini için HPLC Koşullarının Belirlenmesi

2.2.2.1 Metot Optimizasyonu

HPLC sistemine oseltamivir fosfat, fenol kırmızısı ve metoprolol enjekte edilmeden önce, sistemin dengeye gelmesi ve kanallarda (varsa) havanın giderilmesi amacıyla HPLC sisteminden öncelikle deiyonize su ve HPLC saflıkta asetonitril geçirilmiştir. Sonra da hareketli fazın kolondan geçirilmesi sağlanmıştır. Böylece kolon ve sistem uygun hale getirilmiştir.

Oseltamivirin permeabilite tayin deneyleri için HPLC optimum kromatografik koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla 250 x 4,6 mm boyunda ve 5 μ m partikül iç çapına sahip X Terra RP18 marka bir C18 kolonu uygulamalarda kullanılmıştır. İlk aşamada izokratik yöntem denenmiş uygun ayırma şartları elde edilmiş ve mobil faz olarak 30:70(v/v) oranında asetonitril-20 mM KH_2PO_4 içeren ikili karışımı (pH 5.00) kullanılmıştır. Bu şartlarda 1 mL/dakika akış hızında, 30⁰C'de, UV dedektör ile 226 nm'de analizlerin yapılmasına karar verilmiştir. HPLC'de metot geliştirilirken bileşiklerin kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri önemlidir. Bu amaçla urasilin sudaki %0,01 (w/v) derişimindeki çözeltisi kullanılmış, urasil için t_0 2,522 dakika olarak bulunmuştur. Bileşiklerin kapasite faktörleri bu koşullar için hesaplanmış ve sistemin uygunluğuna karar verilmiştir.

2.2.2.2 Metot Validasyonu

HPLC yönteminin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra kalibrasyon grafiği çizilerek kalibrasyon aralığı belirlenmiş ve yöntem geçerliliğini göstermek amacı ile doğrusallık, kesinlik, doğruluk, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı için hesaplamalar yapılmıştır.

Doğrusallık ve kalibrasyon aralığı

Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının; 10, 20, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve en az beş kez enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Belirlenen derişimlerde doğrusallık elde edilerek ölçüm aralığı belirlenmiş ve kalibrasyon grafiğine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Kesinlik ve Doğruluk

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının bir göstergesi olan doğruluk ve kesinlik için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır.

Günler arası çalışmalarda, OF, MET ve FEN'sinin 20 ve 50 mg/L konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltileri 3 farklı günde 5 tekrarlı sisteme enjekte edilmiştir.

Gün içi çalışmalar için 2 farklı derişimde (20 ve 50 mg/L) hazırlanan OF, MET ve FEN aynı gün içerisinde 5 kez enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda doğruluk yüzde bağıl hata ve yüzde ortalama geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Kesinlik sonuçları ise, bağıl standart sapma (% BSD), ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

Duyarlılık

Oseltamivir tayininde, kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen LOD ve analitin kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak metot koşullarında belirlenebilen LOQ değerleri hesaplanmıştır.

2.2.3 Oseltamivir Fosfat'ın Permeabilite Değerinin Tayini için Kapiler Elektroferez Koşullarının Belirlenmesi

2.2.3.1 Metot Optimizasyonu

CE ile en iyi ayırma ve duyarlılık sağlayan koşulların tespiti için kapiler uzunluğu, tampon derişimi ve pH'sı, sıcaklık, enjeksiyon modu ve süresi ve ayırma voltajı taranarak optimize edilmiştir.

Tampon olarak 20 mM borat ve 55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID kapiler kolon seçilmiştir. Koşullar optimize edilmediği için cihaz parametreleri olarak, enjeksiyon süresi 100 mBar basınç altında 7sn, kolon sıcaklığı 25°C, uygulanan voltaj +22 kV ve DAD dedektör ile 226 nm'de başlanmıştır. Tampon pH'sı için yapılan optimizasyon çalışmalarında, bazik pH'lar (9, 9,3 ve 9,5) incelenmiş, 9,3 optimum pH olarak

belirlenmiştir. Analitler üzerinde uygulanan gerilimin etkisi, +18, +20 ve +22 kV olarak incelenmiş ve analitlerin birbirinden en iyi ayrımın gözlemlendiği +20 kV optimum olarak seçilmiştir. Ayrıca enjeksiyon sürecini belirlemek amacı ile 100 mbar basınç uygulayarak 3, 5 ve 7 sn enjeksiyon süreleri denenmiş ve analitler için en iyi ayrımın ve pik şeklinin olduğu 3 sn enjeksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda OF'ın CE ile permeabilite tayin deneyleri için optimum kromatografik koşullar; 55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID kapiler kolon, pH=9,3 20 mM borat tamponu, kapiler sıcaklığı 25°C, uygulanan voltaj +20 kV ve enjeksiyon süresi 100 mbar basınç altında 3 sn olarak belirlenmiştir.

2.2.3.2 Metot Validasyonu

CE yönteminin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra kalibrasyon grafiği çizilmiş ve yöntem geçerliliğini göstermek amacı ile doğrusallık, kesinlik, doğruluk, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı için hesaplamalar yapılmıştır.

Doğrusallık ve kalibrasyon aralığı

Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının; 10, 20, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve optimize edilen koşullarda beşer kez enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen elektroferogramlardaki pik alanlarının ortalamaları alınarak her bir analit için kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Belirlenen derişimlerde doğrusallık elde edilerek kalibrasyon aralığı belirlenmiş ve kalibrasyon grafiğine ait regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Kesinlik ve Doğruluk

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının göstergesi olan doğruluk ve kesinlik için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda, MET, FEN ve OF 'ın 20 ve 50 mg/L konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin aynı gün için de 5 tekrarlı enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Günler arası çalışmalarda, bileşiklerin 2 farklı konsantrasyonda (20 ve 50 mg/L) çözeltileri hazırlanarak 3 farklı günde 5 tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlarda doğruluk yüzde bağıl hata ve yüzde ortalama geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Kesinlik sonuçları ise, bağıl standart sapma (% BSD), ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

Duyarluluk

CE yönteminin duyarlılığını belirlemek amacı ile doğrusallık çalışmasında belirlenen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edebildiği en düşük derişimleri saptayabilmek amacıyla, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır.



3 BULGULAR

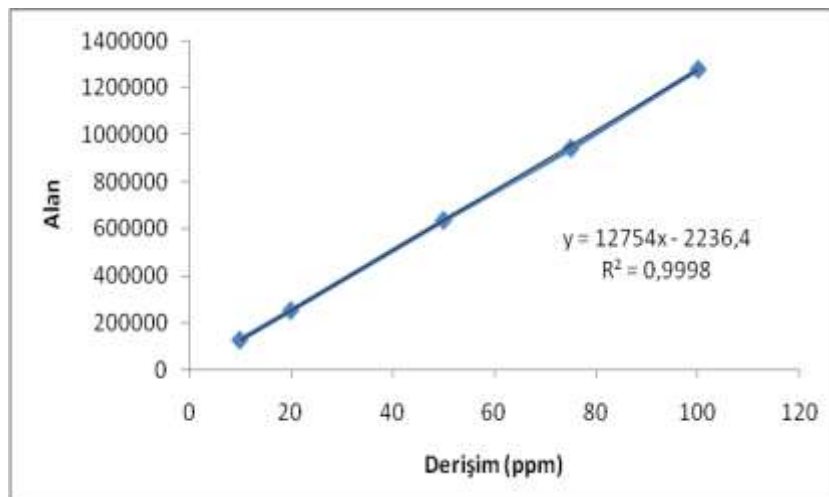
3.1 Oseltamivir Fosfat, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için HPLC ile Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

Geliştirilen HPLC yönteminin doğrusal aralığının belirlenmesi amacı ile bölüm 2.2.2.2'de anlatıldığı gibi OF, MET ve FEN için kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve bileşiklerin kalibrasyon grafiğine ait veriler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

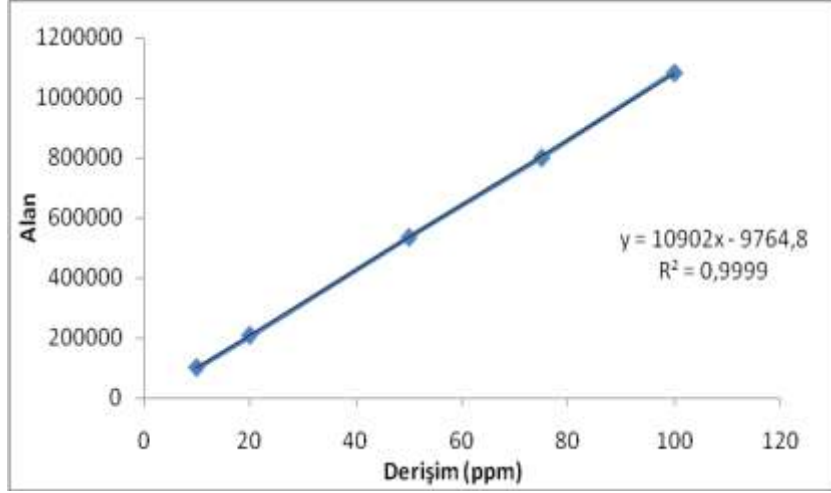
Çizelge 3.1. Bileşiklerin HPLC yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)

	Oseltamivir fosfat	Metoprolol	Fenol kırmızısı
Regresyon denklemi	$y = 12754x - 2236,4$	$y = 15360x + 5121,4$	$y = 10902x - 9764,8$
Korelasyon katsayısı	0,999	0,999	0,999
Kalibrasyon aralığı	10 -100,00 mg/L	10 -100,00 mg/L	10 -100,00 mg/L
LOD(mg/L)	0,023	0,067	0,063
LOQ (mg/L)	0,070	0,201	0,192

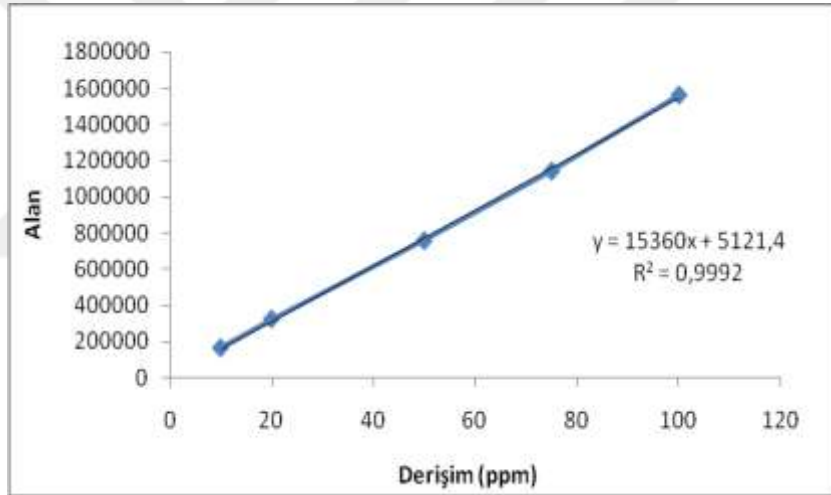
Çizelge 3.1.'de belirtildiği üzere bileşikler için belirlenen aralıkta yüksek korelasyonlu doğrular elde edilmiş ve her bir analit için konsantrasyona (ppm) karşı ortalama pik alanı değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 3.1., Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Oseltamivir fosfatın HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2. Fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği



Şekil 3.3. Metoprololün HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği

OF, MET ve FEN'sının HPLC ile tayini için yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmaları için gün içi ve günler arası çalışmalar bölüm 2.2.2.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve bileşiklere ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular

Çalışılan bileşiklerin derişimleri(mg/L)		$\bar{x}(n=5)$	% ort. geri kazanım	% bağıl hata	SD	%BSD
Oseltamivir fosfat	20	20,0271	100,1355	0,1355	0,1126	0,5623
	50	50,0294	100,0588	0,0588	0,0046	0,0092
Metoprolol	20	20,0955	100,4775	0,4775	0,1136	0,5656
	50	50,1292	100,2584	0,2584	0,1945	0,3881
Fenol kırmızısı	20	19,9911	99,9555	0,0445	0,0135	0,0672
	50	50,1168	100,2336	0,2336	0,0984	0,1962

x: ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSD: % Bağıl standart sapma

Çizelge 3.3. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının HPLC yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular

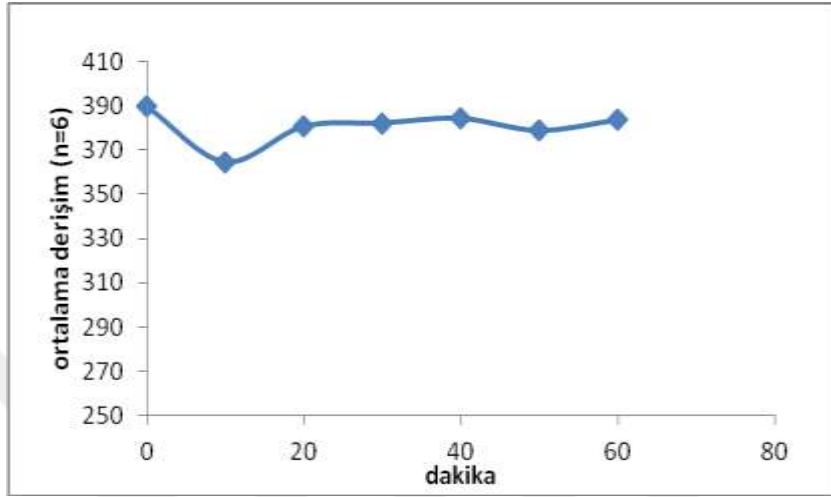
Çalışılan bileşiklerin derişimleri(mg/L)		$\bar{x}(n=15)$	% ort. geri kazanım	% bağıl hata	SD	%BSD
Oseltamivir fosfat	20	20,1001	100,5005	0,5005	0,1744	0,8677
	50	49,9039	99,8078	0,1922	0,0871	0,1745
Metoprolol	20	20,1544	100,7720	0,7720	0,0941	0,4668
	50	50,1575	100,3150	0,3150	0,2302	0,4590
Fenol kırmızısı	20	20,0264	100,1320	0,1320	0,0339	0,1692
	50	50,2578	100,5156	0,5156	0,1593	0,3169

x: ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSD: % Bağıl standart sapma

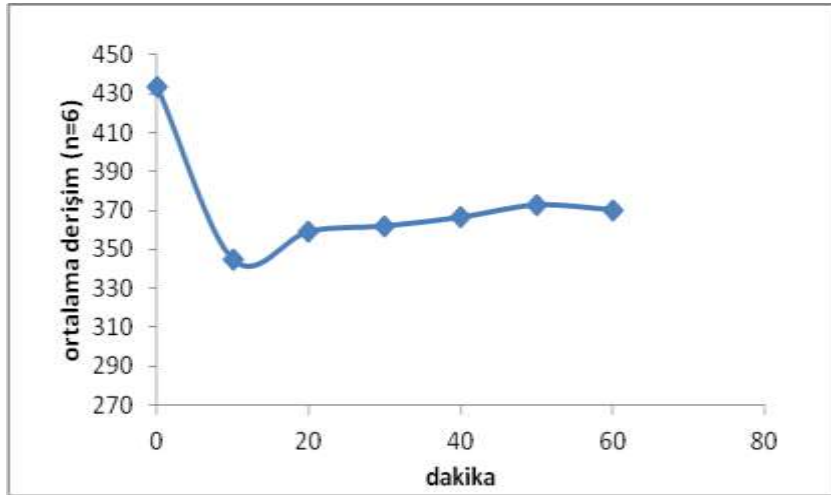
Oseltamivir fosfat tayini için optimize edilen HPLC yönteminde OF, MET ve FEN için alıkonma zamanları sırasıyla 5,20, 4,00, ve 3,85 dakika olarak bulunmuştur.

6 kez tekrar edilmiş intestinal permeabilite deneyleri sonucunda, sıçanların bağırsaklarından elde edilen 0-10-20-30-40-50 ve 60. dakikalara ait perfüzyon çözeltileri, enjeksiyon öncesinde 1/10 oranında su ile seyreltilerek optimize edilen HPLC şartlarında

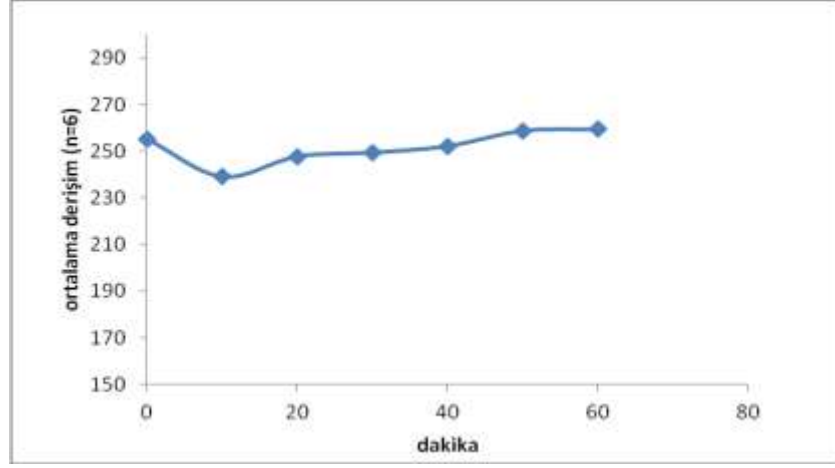
enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının ortalama derişimlerinin (ppm) bağırsaktaki absorpsiyonuna bağı olarak zamanla değişimi Şekil 3.4., Şekil 3.5., ve Şekil 3.6.'da gösterilmiş ve her bir dakikaya ait çözeltilerin kromatogramları örnek olarak verilmiştir.



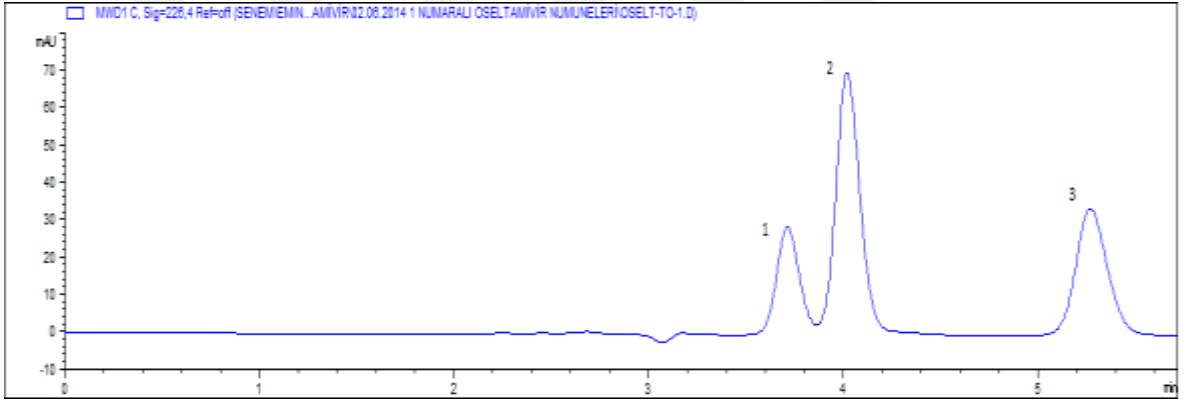
Şekil 3.4. Oseltamivir fosfat için HPLC yöntemi ile elde edilen zamana karşı derişim grafiği(n=6)



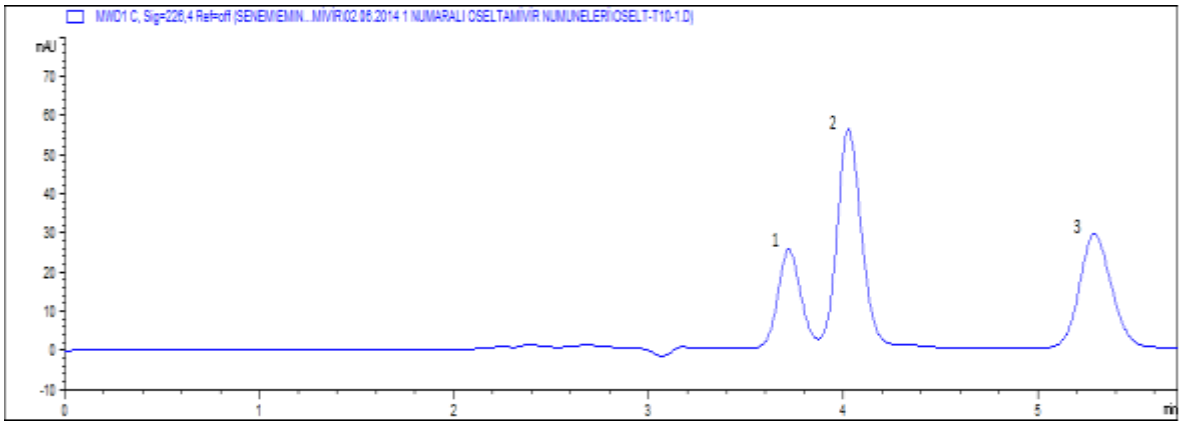
Şekil 3.5. Metoprolol için HPLC yöntemi ile elde edilen zamana karşı derişim grafiği (n=6)



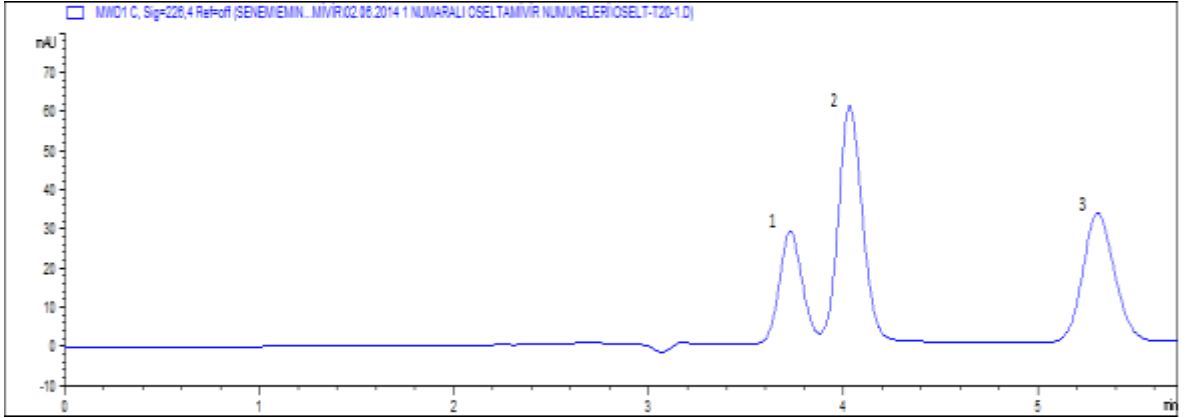
Şekil 3.6. Fenol kırmızısı için HPLC yöntemi ile elde edilen zaman karşı derişim grafiği (n=6)



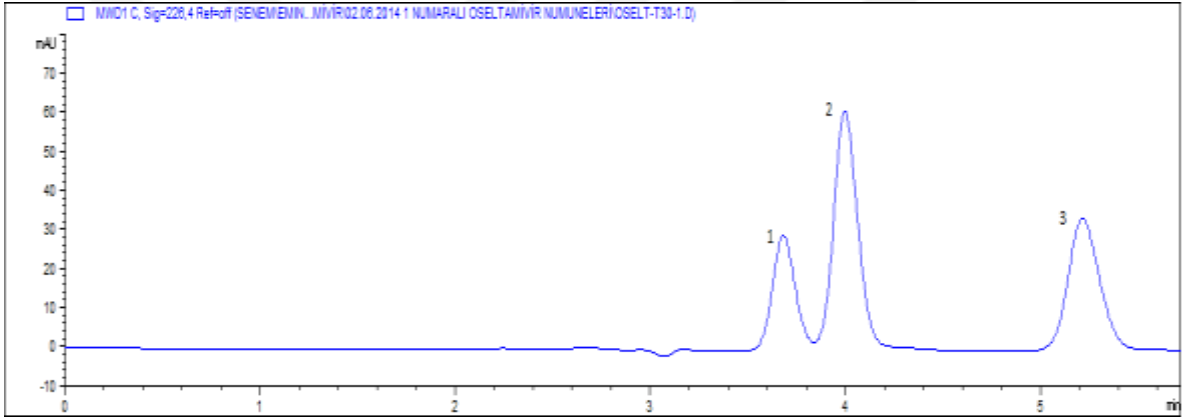
Şekil 3.7. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 0. dakika perfüzyon çözeltilisine ait kromatogram (226 nm)



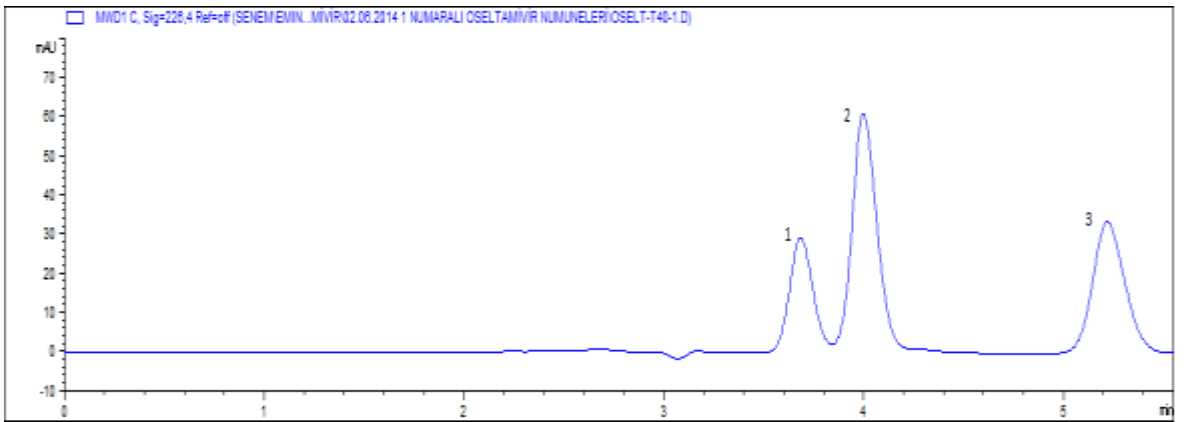
Şekil 3.8. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 10. dakika perfüzyon çözeltilisine ait kromatogram (226 nm)



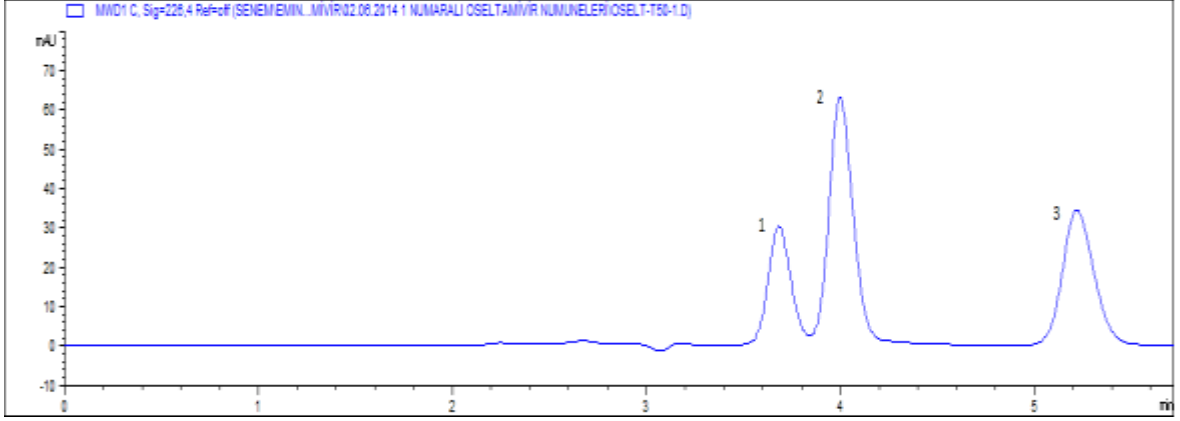
Şekil 3.9. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



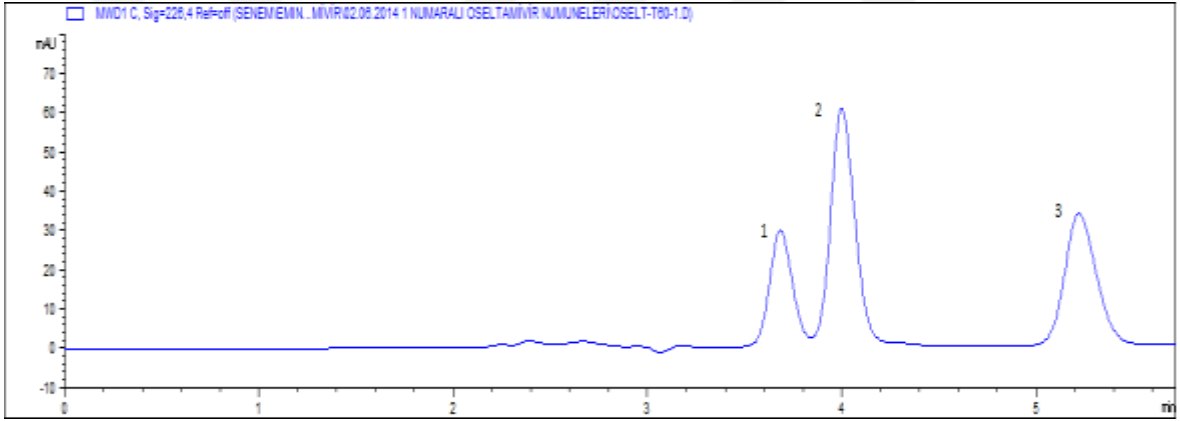
Şekil 3.10. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



Şekil 3.11. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



Şekil 3.12. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



Şekil 3.13. Oseltamivir fosfat (3), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (1) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

3.2 HPLC ile Elde Edilen Verilere Göre Bileşikler İçin Permeabilite Değerleri

Perfüzyon çalışmalarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler oseltamivir fosfat için Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

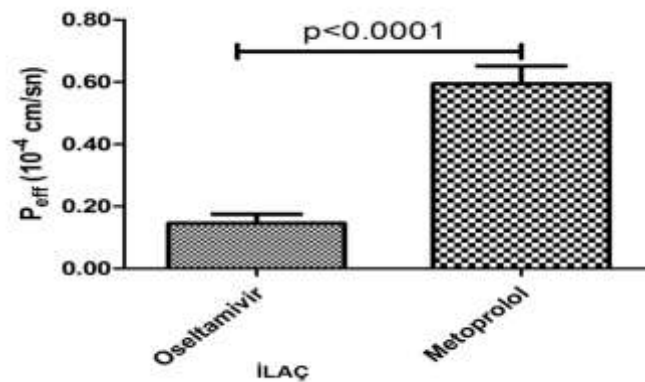
Çizelge 3.4. Oseltamivirde kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama±SD)

oseltamivir fosfat (n = 6)	
• Sıçan Ağırlığı (g)	330,8 ± 23,8
• Akış Hızı (mL/dakika)(0,2)	0,219 ± 0,010
• Perfüze Edilen Segment (Jejunum) Uzunlukları (cm)	10,43 ± 2,14

Perfüzyon çalışmalarında oseltamivir fosfat ve metoprolol için HPLC yönteminden elde edilen verilere göre hesaplanan permeabilite değerleri Çizelge 3.5.'de özetlenmiş ve P_{eff} değerlerindeki değişimler Şekil 3.14.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama ± SD)

Hayvan no	Oseltamivir Fosfat* P_{eff} (* 10^{-4} cm/s)	Metoprolol Tartarat P_{eff} (* 10^{-4} cm/s)
1	0,24 ± 0,18	0,59 ± 0,09
2	0,06 ± 0,06	0,38 ± 0,02
3	0,16 ± 0,08	0,59 ± 0,09
4	0,11 ± 0,05	0,58 ± 0,06
5	0,22 ± 0,05	0,59 ± 0,04
6	0,10 ± 0,06	0,62 ± 0,56
Ort	0,14 ± 0,06	0,55 ± 0,08



Şekil 3.14. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama ± SD) ($p < 0.0001$)

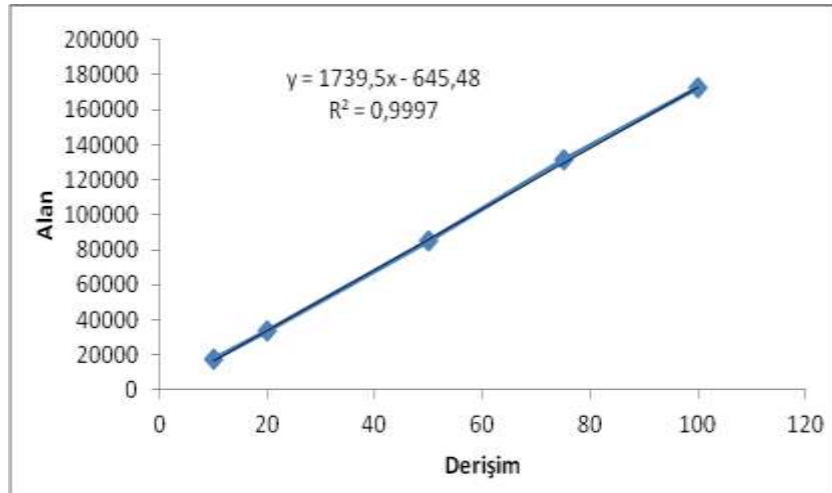
3.3 Oseltamivir Fosfat, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için CE yöntemi ile Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve İstatiksel Değerlendirilmesi

Geliştirilen CE yönteminin doğrusal aralığın belirlenmesi için bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı gibi kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve herbir bileşik için CE yönteminde oluşturulan kalibrasyon grafiğine ait değerler Çizelge 3.6.'da görülmektedir.

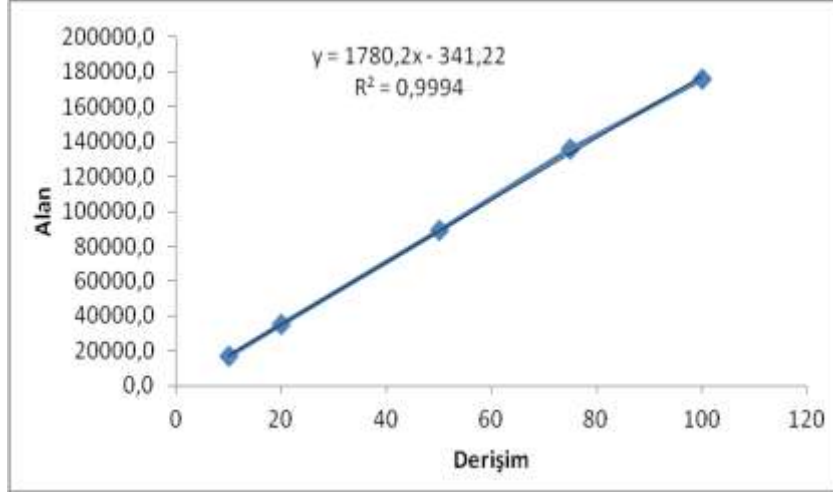
Çizelge 3.6. Bileşiklerin CE yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)

	Oseltamivir fosfat	Metoprolol	Fenol kırmızısı
Regresyon denklemi	$y = 1739,5x - 645,48$	$y = 2281,4x + 3787,6$	$y = 1780,2x - 341,22$
Korelasyon katsayısı	0,999	0,999	0,999
Kalibrasyon aralığı	10 -100,00 mg/L	10 -100,00 mg/L	10 -100,00 mg/L
LOD(mg/L)	0,63	0,68	0,62
LOQ (mg/L)	1,90	2,07	1,89

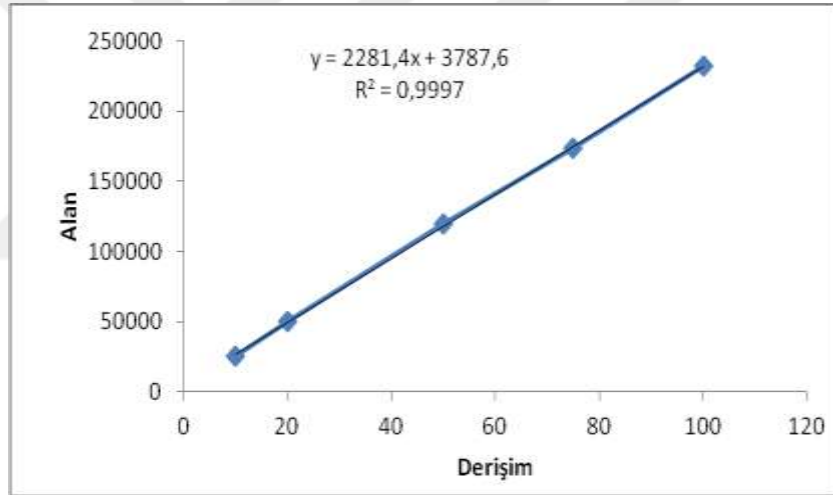
Çizelge 3.6.'da belirtildiği üzere bileşikler için belirlenen aralıktaki yüksek korelasyonlu doğrular elde edilmiş ve her bir analit için konsantrasyona (ppm) karşı ortalama pik alanı değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.15., Şekil 3.16. ve Şekil 3.17.'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Oseltamivir fosfatın CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği



Şekil 3.16. Fenol kırmızısının CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği



Şekil 3.17. Metoprololün CE ile oluşturulan kalibrasyon grafiği

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının göstergesi olan doğruluk ve kesinlik için gün içi ve günler arası çalışmalar bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve bileşiklere ait gün içi ve günler arası bulgular Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının CE yöntemi ile analizine ait gün içi bulgular

Çalışılan bileşiklerin derişimleri(mg/L)		$\bar{x}(n=5)$	% ort. geri kazanım	%bağıl hata	SD	%BSD
Oseltamivir fosfat	20	20,1749	100,875	0,8745	0,0300	0,1489
	50	50,4951	100,990	0,9902	0,3514	0,6959
Metoprolol	20	20,0501	100,251	0,2505	0,0999	0,4982
	50	50,3825	100,765	0,765	0,0600	0,1190
Fenol kırmızısı	20	19,9754	99,877	0,123	0,0559	0,2799
	50	50,1072	100,214	0,2144	0,1234	0,2462

x: ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSD: % Bağıl standart sapma

Çizelge 3.8. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının CE yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular

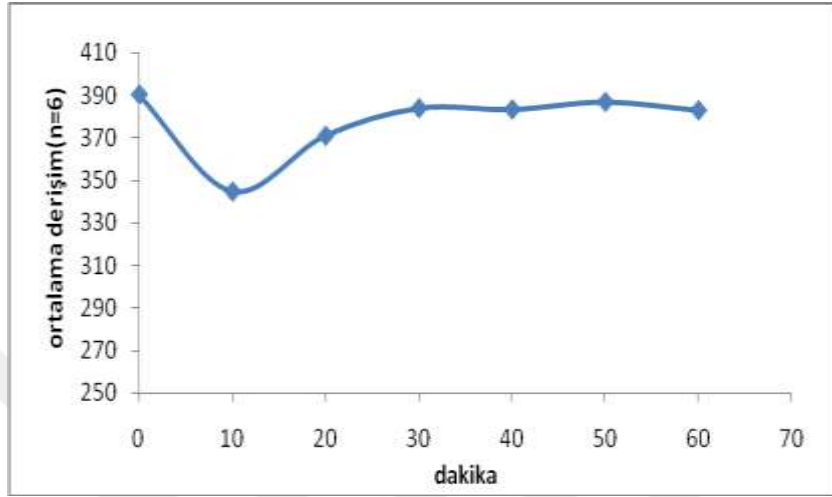
Çalışılan bileşiklerin derişimleri(mg/L)		$\bar{x}(n=15)$	% ort. geri kazanım	%bağıl hata	SD	%BSD
Oseltamivir fosfat	20	20,1309	100,655	0,645	0,1332	0,6614
	50	50,7568	101,514	1,514	0,3025	0,5960
Metoprolol	20	19,9948	99,974	0,026	0,0931	0,4655
	50	50,8647	101,729	1,729	0,2270	0,4463
Fenol kırmızısı	20	19,8597	99,294	0,702	0,0747	0,3762
	50	50,3933	100,787	0,787	0,2844	0,2843

x: ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSD: % Bağıl standart sapma

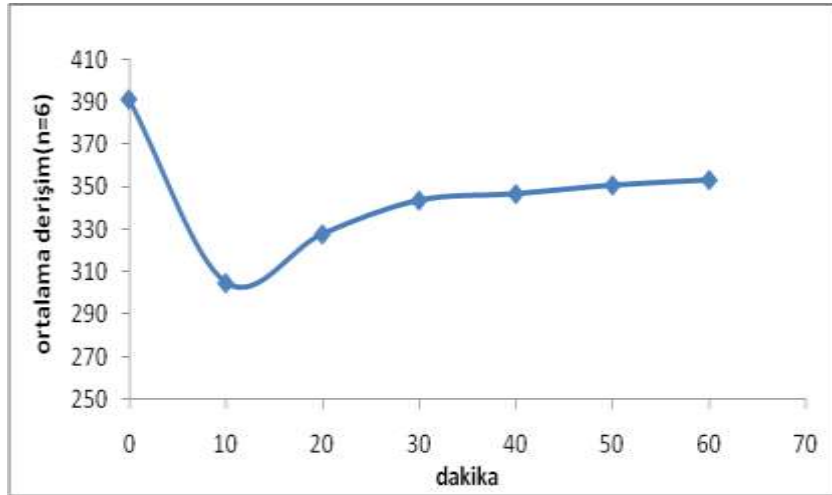
Oseltamivir fosfat tayini için optimize edilen CE yönteminde oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısı için göç zamanları sırasıyla 2,793, 2,406, ve 5,908 dakika olarak bulunmuştur.

6 kez tekrar edilmiş intestinal permeabilite deneyleri sonucunda, sıçanların bağırsaklarından elde edilen 0-10-20-30-40-50 ve 60. dakikalara ait perfüzyon çözeltileri, enjeksiyon öncesinde 1/10 oranında su ile seyreltilerek optimize edilen CE yöntemi

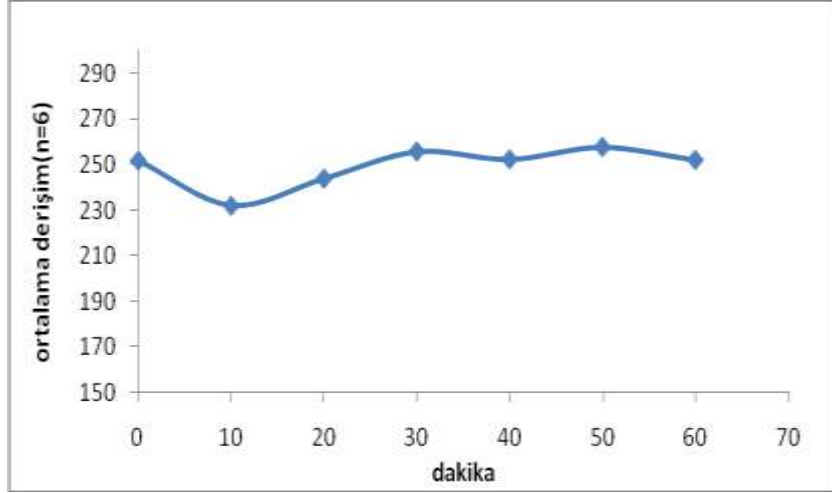
kullanılarak enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının ortalama derişimlerinin (ppm) bağırsaktaki absorpsiyonuna bağı olarak zamanla değişimi Şekil 3.18., Şekil 3.19., ve Şekil 3.20.'de gösterilmiş ve her bir dakikaya ait çözeltilerin elektroferogramları örnek olarak verilmiştir.



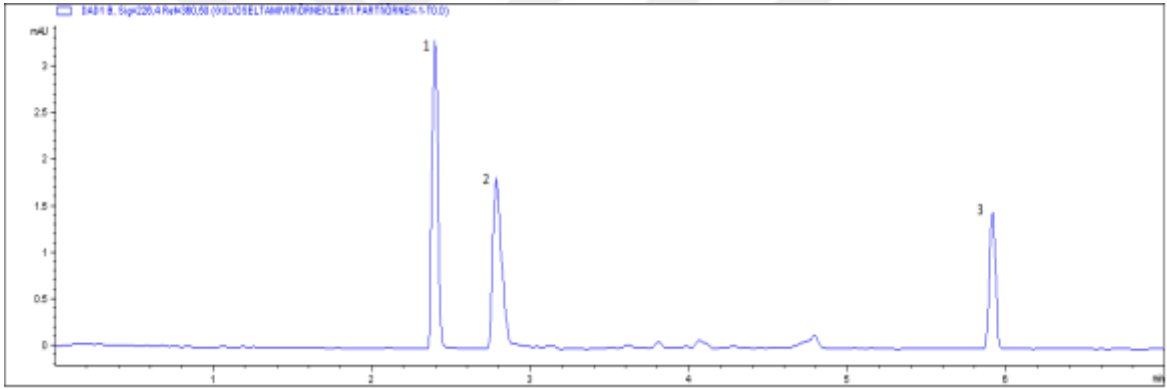
Şekil 3.18. Oseltamivir fosfat için CE yöntemi ile elde edilen zamana karşı- derişim grafiği (n=6)



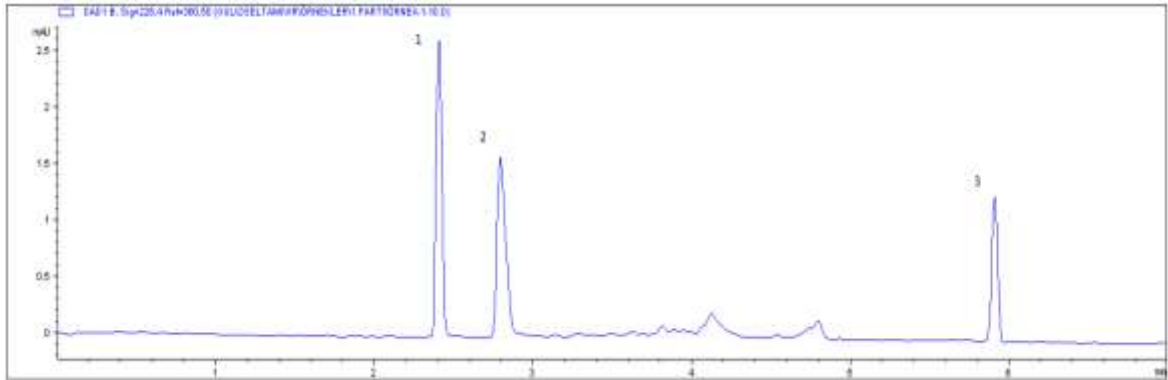
Şekil 3.19. Metoprolol için CE yöntemi ile elde edilen zaman karşı-derişim grafiği (n=6)



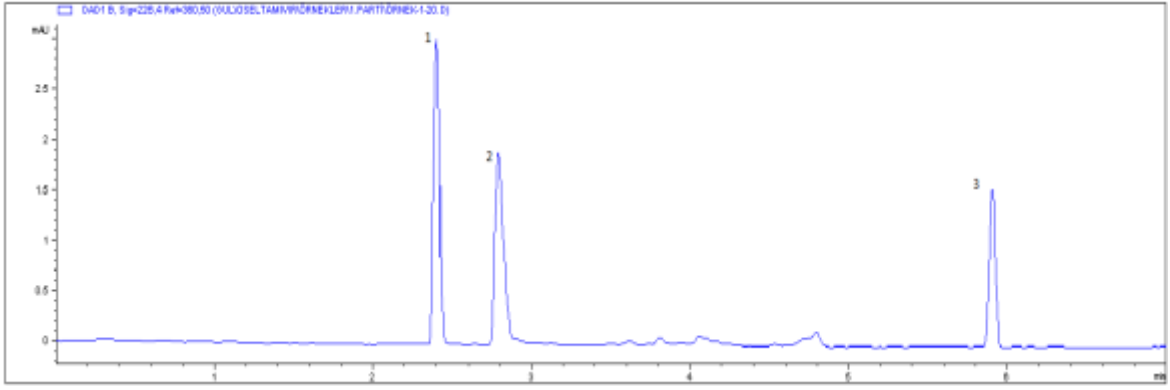
Şekil 3.20. Fenol kırmızısı için CE yöntemi ile elde edilen zamana karşı-derişim grafiği (n=6)



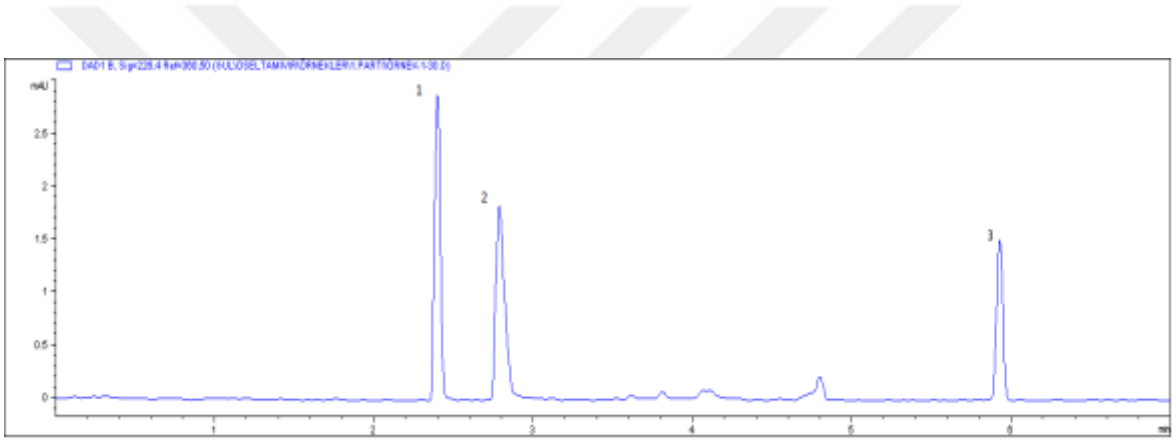
Şekil 3.21. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



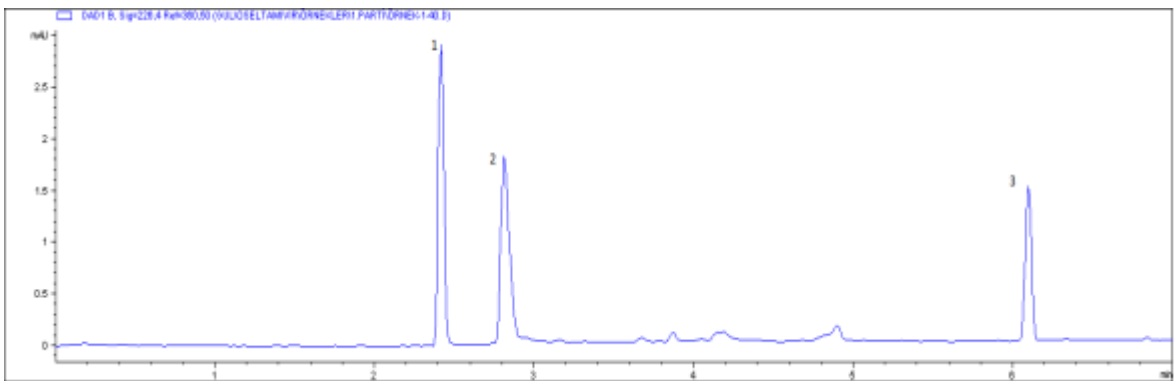
Şekil 3.22. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



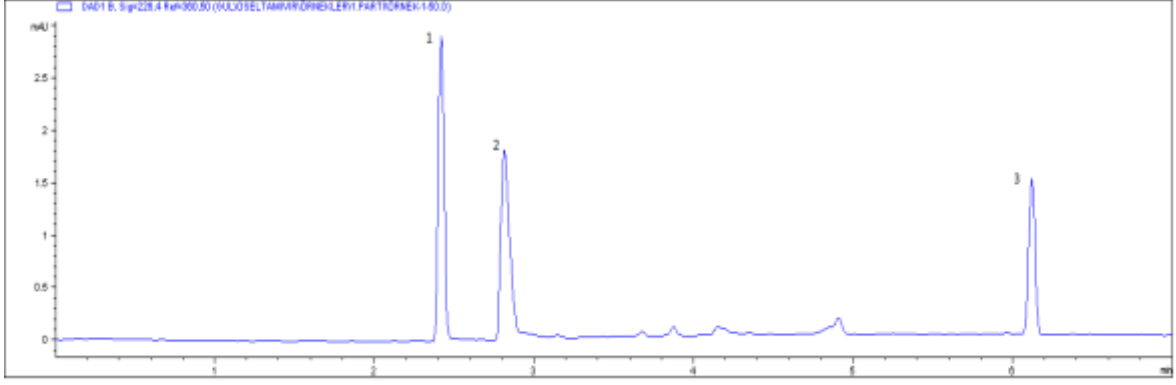
Şekil 3.23. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



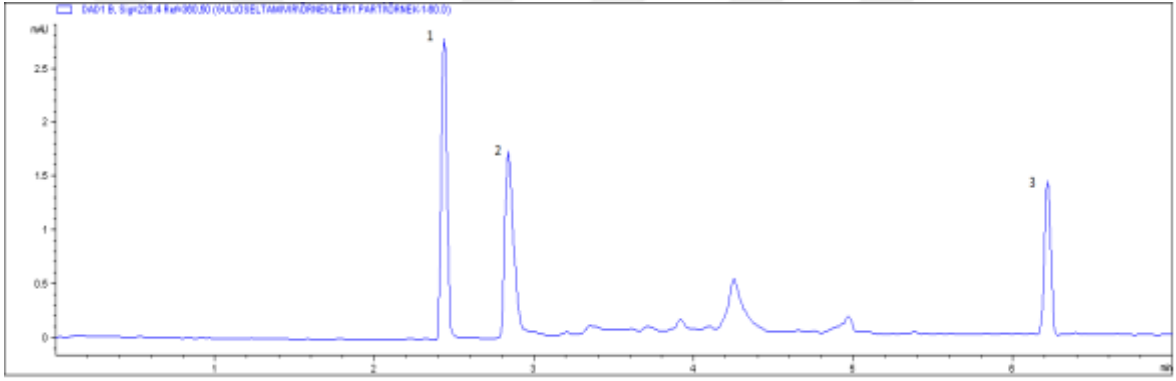
Şekil 3.24. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



Şekil 3.25. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



Şekil 3.26. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)



Şekil 3.27. Oseltamivir fosfat (2), metoprolol (1) ve fenol kırmızısı (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait elektroferogram (226 nm)

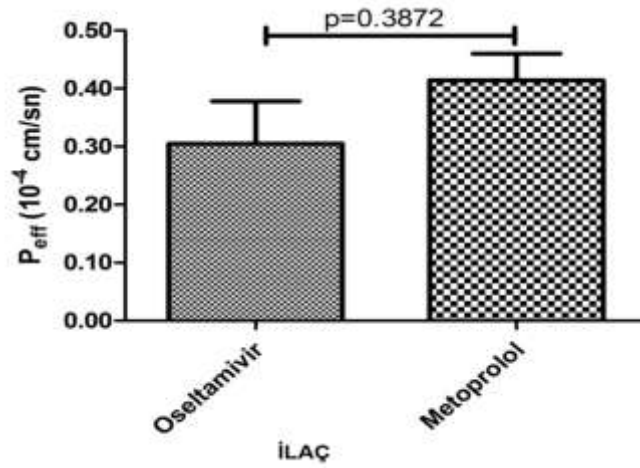
3.4 CE ile Elde Edilen Verilere Göre Bileşikler İçin Permeabilite Değerleri

Oseltamivir fosfat için perfüzyon çalışmalarında kullanılan sıçanlara ait bilgiler için Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

CE yönteminden elde edilen verilere göre oseltamivir fosfat ve metoprolol için hesaplanan permeabilite değerleri Çizelge 3.9.'da özetlenmiş ve P_{eff} değerlerindeki değişimler Şekil 3.28.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama \pm SD)

Hayvan no	Oseltamivir Fosfat* P_{eff} ($\cdot 10^{-4}$ cm/s)	Metoprolol Tartarat P_{eff} ($\cdot 10^{-4}$ cm/s)
1	0,13 \pm 0,26	0,45 \pm 0,13
2	0,59 \pm 0,02	0,21 \pm 0,04
3	0,46 \pm 0,47	0,40 \pm 0,12
4	0,23 \pm 0,15	0,39 \pm 0,11
5	0,27 \pm 0,13	0,47 \pm 0,12
6	0,16 \pm 0,31	0,55 \pm 0,08
Ort	0,30 \pm 0,18	0,41 \pm 0,11



Şekil 3.28. Oseltamivir fosfat ve metoprolol tartarat için tayin edilen P_{eff} değerleri (ortalama \pm SD).

4 SONUÇ ve YORUM

Bu çalışmada lümeden kayıp esasına dayanan, bağırsak segmentinin (jejunum) simultane olarak sirküle edilmeden perfüze edildiği single pass intestinal perfüzyon tekniği kullanılarak oseltamivir fosfatın bağırsak dokularından absorpsiyonu incelenmiş ve bu amaçla örneklerin analizi için valide edilen HPLC ve CE yöntemleri kullanılmış ve her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Perfüzyon deneylerinde perfüzyon çözeltisi olarak nötr pH değerine sahip, izo-ozmotik bir çözelti olan Golytely çözeltisi kullanılmıştır. Oseltamivir fosfat ile ilgili literatür verileri incelenerek perfüzyon çözeltisine 394 mg/L oseltamivir fosfat, 400 mg/L metoprolol ve 250 mg/L fenol kırmızısı ilave edilmiştir. Çalışmada, metoprolol sıçanlarda oseltamivir fosfatın permeabilitesinin BCS'ne göre hangi sınıfta yer aldığını değerlendirmek amacı ile referans madde olarak kullanılmıştır. Permeabilitesi metoprolol tartarattan daha düşük olan ilaçların düşük permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Yapılan perfüzyon çalışmaları İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izinle gerçekleştirilmiştir.

Oseltamivir fosfatın perfüzyon deneylerinden elde edilen örnekler Uşak Üniversitesi Analitik Kimya Laboratuvarı'nda geliştirilen HPLC ve CE cihazları ile çalışılmıştır.

Oseltamivir fosfatın HPLC ile permeabilite tayin deneyleri için X Terra RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak UV dedektör ile 226 nm 30 °C'de analizler gerçekleştirilmiştir. 1 mL/dakika akış hızında 30:70 (v/v) oranında asetonitril-20 mM KH₂PO₄ içeren karışımı (pH 5,00) mobil faz olarak kullanılmıştır. Oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısı için alıkonma zamanları sırasıyla 5,20, 4,0 ve 3,85 dakikadır. Bir diğer yöntem olan CE ile oseltamivir fosfatın permeabilite tayin deneyleri için optimum kromatografik koşullar; 55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID kapiler kolon, pH=9,3 20 mM borat tamponu, kolon sıcaklığı 25°C, uygulanan voltaj +20 kV ve enjeksiyon süresi 100 mbar basınç altında 3 sn olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda HPLC yöntemi ile oseltamivir fosfatın ve metoprololün jejunumda tayin edilen permeabilite değeri sırasıyla $0,14 \pm 0,06 \times 10^{-4}$ cm/s, $0,55 \pm 0,05 \times 10^{-4}$ cm/s olarak bulunmuştur. Geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi ile ise oseltamivir fosfatın ve metoprololün jejunumda tayin edilen permeabilite değeri sırasıyla $0,30 \pm 0,18 \times$

10^{-4} cm/s, $0,41 \pm 0,11 \times 10^{-4}$ cm/s olarak bulunmuştur. Her iki yöntemde de oseltamivir fosfat için bulunan permeabilite değerleri metoprolol için bulunan permeabilite değerlerinden düşük olduğu gözlemlenmiş ve biyofarmasötik sınıflandırma sistemi esas alınarak kıyaslandığında oseltamivir fosfatın düşük permeabilite değerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar veri çifti t testi ile karşılaştırılmış ve % 95 güven seviyesinde iki yöntem arasında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen HPLC ve CE yöntemlerinin validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve yüksek doğruluk ve kesinlik elde edilmiş, LOD ve LOQ kabul edilebilir değerlerde bulunmuştur. Bu bağlamda oseltamivir fosfat, metoprolol ve fenol kırmızısının HPLC ve CE yöntemleri ile eş zamanlı tayinine ve oseltamivir fosfatın permeabilite tayini için yöntemlerin geçerliliğine karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Çetin, M. and Arıcıoğlu, F., 2009, "Upon the original drug and generic drug discussions", *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 19(3): 211-213.
- [2] Chen, M. L., Shah, V., Patnaik, R., Adams, W., Hussain, A., Conner, D., Mehta, M., Malinowski, H., Lazor, J., Huang, S. M., Hare, D., Lesko, L., Sporn, D. and Williams, R., 2001, "Bioavailability and bioequivalence: an FDA regulatory overview", *Pharm. Res.*, 18(12): 1645-50.
- [3] Polli, J. E., 2008, "In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms", *AAPS J.*, 10(2): 289-299.
- [4] Davit, B. M., Conner, D. P., Fabian-Fritsch, B., Haidar, S. H., Jiang, X., Patel, D. T., Seo, P. R. H., Suh, K., Thompson, C. L., Yu, L. X., 2008, "Highly variable drugs: observations from bioequivalence data submitted to the FDA for new generic drug applications", *AAPS J.* 10(1): 148-156.
- [5] Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., Crison, J. R., 1995, "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability", *Pharm. Res.*, 12(3): 413- 420.
- [6] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, 2000, "Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System", *CDER Food and Drug Administration, Rockville*, 1-13.
- [7] Blume, H. H., Schug, B. S., 1999, "The biopharmaceutics classification system (BCS): class III drugs - better candidates for BA/BE waiver?", *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9(2): 117-121.
- [8] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products , Committee for Medicinal Products for Human Use, 2010, "Guideline on the Investigation of Bioequivalence", *EMA/ CHMP, London*, 1-25.
- [9] Wu, C. Y. and Benet, L. Z., 2005, "Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system", *Pharm. Res.*, 22(1): 11-23.

- [10] Takagi, T., Ramachandran, C., Bermejo, M., Yamashita, S., Yu, L. X., Amidon, G. L., 2006, "A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan", *Mol. Pharmaceut.*, 3(6): 631-643.
- [11] Takamatsu, N., Welage, L. S., Idkaidek, N. M., Liu, D. Y., Lee, P. I. D., Hayashi, Y., Rhie, J. K., Lennernas, H., Barnett, J. L., Shah, V. P., Lesko, L., Amidon, G. L., 1997, "Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion", *Pharm. Res.*, 14(9): 1127-32.
- [12] US Food and Drug Administration, 2000 August, "Waiver of In Vivo Bioavailability Bioequivalence Studies For Immediate-Release Solid Oral Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System", *FDA, Rockville*.
- [13] Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., Studdert, M. J., 1999, "Veterinary Virology 3rd edition", *Elsevier Science*, USA, 3-260
- [14] Gülsaçan, M., 2003, Kasım, "Virüsler", *Bilim ve Teknik*, 432: 56-59.
- [15] Heeney, J. L., Dagleish, A. G. and Weiss, R. A., 2006, "Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS", *Science*, 313(5786): 462-66.
- [16] Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M., "İnfeksiyon hastalıkları", 1996, *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 3-685.
- [17] Şimşek, G. D., 2007, "Viral Enfeksiyonlar", Bitirme Tezi, *Ege Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi*, İzmir, 2-8.
- [18] Wright, P. F. and Webster, R. G., 2001, "Orthomyxoviruses", *Fields Virology*, Editors: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S. E., *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 1533-79.
- [19] Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V., Taubenberger, J. K., 1999, "Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(4): 1651-56.
- [20] Potter, C. W., 2001, "A history of influenza", *J. Appl. Microbiol.*, 91(4): 572-579.
- [21] Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A., Klimov, A., 2006, "Evolution of receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses", *Virology*, 344(2): 432-438.
- [22] Morens, D. M., Taubenberger, J. K., Harvey, H. A., and Memoli, M. J., 2010, "The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future", *Crit. Care Med.*, 38(4): e10-20.

- [23] Cox, N. J., Ziegler, T., 2003, "Influenza Viruses", Manual of Clinical Microbiology 1st ed., Editors: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., Tenover, R. C., ASM Press, Washington, 1360-67.
- [24] Aslan, S. S., 2006, "İnfluenza Virusunun Tanısında Hücre Kültürü, Hızlı Test, Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve İzole Edilen Virüslerin Tiplendirilmesi", Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 7-50.
- [25] Badur, S., 2007, "İnsanlarda kuş gribi tanısı", *Flora*, 12(1): 22-25.
- [26] Tumpey, T. M., 2005, "Characterization of the reconstructed 1918: Spanish influenza pandemic virus", *Science*, 310(5745): 77-80.
- [27] World Health Organization, 2001, "Influenza pandemic preparedness and response", WHO, EB115/ 44/20.01.2001, Switzerland.
- [28] Hien, T. T., de Jong, M., Farrar, J., 2004, "Avian influenza- A challenge to global health care structures", *N. Engl. J. Med.*, 351(23): 2363-65.
- [29] Johnson, N. P. and Mueller, J., 2002, "Updating the accounts: global mortality of the 1918- 1920 'Spanish' influenza pandemic", *Bull. Hist. Med.*, 76(1): 105-115.
- [30] Cox, N. J., Subbarao, K., 1999, "Influenza", *Lancet*, 354(9186): 1277-82.
- [31] Glezen, W. P., 1982, "Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics", *Epidemiol. Rev.*, 4: 25-44.
- [32] Murphy, B. R., 1996, "Orthomyxoviruses", Fields Virology, Editors: Fields, K. D., Howley, P. M., *Lippincott*, Philadelphia, 1397-1445.
- [33] Oxford, J. S., 2000, "Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: virology, pathology and epidemiology", *Rev. Med. Virol.*, 10(2): 119-133.
- [34] Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., 1998, "Structure and function of the haemagglutinin", Textbook of Influenza, Editors: Nicholson, K. G., Webster, R. G., Hay, A. J., *Blackwell Science*, Oxford, 54-64.
- [35] Whittaker, G. R., Helenius, A., 1998, "Nuclear import and export of viruses and virus genomes", *Virology*, 246(1): 1-23.

- [36] World Health Organization, 1999, "Influenza Pandemic Preparedness Plan. The role of WHO and Guidelines for national and regional planning", *WHO*, WHO/CDS/CSR/EDC/99.1, Switzerland, 34-66.
- [37] Kobasa, D., 2004, "Enhanced Virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus", *Nature*, 431(7009): 703-707.
- [38] Beishe, R. B., Swierkosz, E. M., Anderson, E. L., Newman, F. K., Nugent, S. L., Massab, H.F., 1992, "Immunization of infants and young children with live attenuated trivalent cold-recombinant influenza A/H1N1, H3N2 and B vaccine", *J. Infect. Dis.*, 165(4): 727-732.
- [39] Smith, J. R., Rayner, C. R., Donner, B., Wollenhaupt, M., Klumpp, K., Dutkowski R., 2011, "Oseltamivir in seasonal, pandemic, and avian influenza: a comprehensive review of 10-years clinical experience", *Adv. Ther.*, 28(11): 927-959.
- [40] Das, K., 2012, "Antivirals targeting influenza A virus", *J. Med. Chem.*, 55(14): 6263-77.
- [41] Johnston, S. L. and Siegel, C. S., 1990, "Evolution of direct immuno fluorescence, enzyme immunoassay centrifugation culture and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus", *J. Clin. Microbiol.*, 28(11): 2394-97.
- [42] Yen, H. L., Monto, A. S., Webster, R. G., Govorkova, E. A., 2005, "Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice", *J. Infect. Dis.*, 192(4): 665-672.
- [43] McNicholl, I. R., McNicholl, J. J., 2001, "Neuraminidase inhibitors: zanamivir and oseltamivir", *Ann. Pharmacother.*, 35(1): 57-70.
- [44] Lew, W., Chen, X., Kim, C. U., 2000, "Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor", *Curr. Med. Chem.*, 7(6): 663-672.
- [45] Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Wu, H., Zhang, L., Chen, X., Escarpe, P. A., Mendel, D. B., Laver, W. G. And Stevens, R. C., 1998, "Structure-activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors", *J. Med. Chem.*, 41(14): 2451-60.
- [46] Oxford, J., 2005, "Oseltamivir in the management of influenza", *Expert Opin. Pharmacol.*, 6(14): 2493-2500.

- [47] Saito, H., Okuda, M., Terada, T., Sasaki, S., Inui, K., 1995, "Cloning and characterization of a rat H⁺/peptide cotransporter mediating absorption of betalactam antibiotics in the intestine and kidney", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275(3): 1631-37.
- [48] Ogihara, T., Kano, T., Wagatsuma, T., Wada, S., Yabuuchi, H., Enomoto, S., Morimoto, K., Shirasaka, Y., Kobayashi, S., Tamai, I., 2009, "Oseltamivir (tamiflu) is a substrate of peptide transporter 1", *Drug Metab. Dispos.*, 37(8): 1676-81
- [49] He, G., Massarella, J., Ward, P., 1999, "Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802", *Clin. Pharmacokinet.*, 37(6): 471-484.
- [50] Wattanagoon, Y., Stepniewska, K., Lindegårdh, N., Pukrittayakamee, S., Silachamroon, U., Piyaphanee, W., Singtoroj, T., Hanpithakpong, W., Davies, G., Tarning, J., Pongtavornpinyo, W., Fukuda, C., Singhasivanon, P., 2009, "Pharmacokinetics of high-dose oseltamivir in healthy volunteers", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53(3): 945-952.
- [51] Kearns, G. L., Abdel-Rahman, S. M., Alander, S. W., Blowey, D. L., Leeder, J. S., Kauffman, R. E., 2003, "Developmental pharmacology: the impact of ontogeny on drug disposition and action", *N. Engl. J. Med.*, 349(12): 1157-67.
- [52] Ose, A., Kusuhara, H., Yamatsugu, K., Kanai, M., Shibasaki, M., Fujita, T., Yamamoto, A., Sugiyama, Y., 2008, "P-glycoprotein restricts the penetration of oseltamivir across the blood-brain barrier", *Drug Metab. Dispos.*, 36(2): 427-434.
- [53] Abdel-Rahman, S. M., Newland, J. G., Kearns, G. L., 2011, "Pharmacologic considerations for oseltamivir disposition: focus on the neonate and young infant", *Paediatr. Drugs*, 13(1): 19-31.
- [54] Acosta, E. P., Jester, P., Gal, P., Wimmer, J., Wade, J., Whitley, R. J., Kimberlin, D. W., 2010, "Oseltamivir dosing for influenza infection in premature neonates", *J. Infect. Dis.*, 202(4): 563-566.
- [55] Snell, P., Dave, N., Wilson K, Rowell, L., Weil, A., Galitz, L., Robson, R., 2005, "Lack of effect of moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of oral oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate", *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 59(5): 598-601.
- [56] Dutkowski, R., Thakrar, B., Froehlich, E., Suter, P., Oo C., Ward, P., 2003, "Safety and pharmacology of oseltamivir in clinical use", *Drug Safety*, 26(11): 787-801.
- [57] Oo, C., Barrett, J., Dorr, A., Liu, B., Ward, P., 2002, "Lack of pharmacokinetic interaction between the oral anti-influenza prodrug oseltamivir and aspirin", *Antimicrob. Agents Ch.*, 46(6): 1993-95.

[58] Snell, P., Oo, C., Dorr, A., Barrett, J., 2002, "Lack of pharmacokinetic interaction between the oral anti-influenza neuraminidase inhibitor prodrug oseltamivir and antacids", *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 54(4): 372-377.

[59] Hill, G., Cihlar, T., Oo, C., Ho, E. S., Prior, K., Wiltshire, H., Barrett, J., Liu, B., Ward, P., 2002, "The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion: correlation of in vivo and in vitro studies", *Drug. Metab. Dispos.*, 30(1): 13-19.

[60] Aoki, F., Lam, H., Jeffrey, J. R., 2005, "Oseltamivir does not interact pharmacokinetically with cyclosporine, mycophenolate or tacrolimus in renal transplant patients", *Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America*, San Francisco, 522.

[61] Fiore, A. E., Fry, A., Shay, D., Gubareva, L., Bresee, J. S., Uyeki, T. M., 2011, "Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)", *MMWR Recommend. Rep.*, 60(1): 1-24.

[62] Heinonen, S., Silvennoinen, H., Lehtinen, P., Vainionpaa, R., Vahlberg, T., Ziegler, T., Ikonen, N., Puhakka, T., Heikkinen, T., 2010, "Early oseltamivir treatment of influenza in children 1–3 years of age: a randomized controlled trial", *Clin. Infect. Dis.*, 51(8): 887-894.

[63] Shun-Shin, M., Thompson, M., Heneghan, C., Perera, R., Harnden, A., Mant, D., 2009, "Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials", *BMJ*, 339: b3172.

[64] Ceyhan, M., Karadag Oncel, E., Badur, S., Akcay Ciblak, M., Alhan, E., Sızmaz Celik, U., Kurugol, Z., Saz, E. U., Ozsurekci, Y., Celik, M., Ozkaya Parlakay, A., 2012, "Effectiveness of a new bioequivalent formulation of oseltamivir (Enfluvir®) on 2010-2011 seasonal influenza viruses: an open phase IV study", *Int. J. Infect. Dis.*, 16(4): e273-e278.

[65] Moscona, A., 2005, "Neuraminidase inhibitors for influenza", *N. Engl. J. Med.*, 353(13): 1363-73.

[66] Lee, N., Chan, P. K. S., Hui, D. S. C., Rainer, T. H., Wong, E., Choi, K. W., Lui, G. C. Y., Wong, B. C. K., Wong, R. Y. K., Lam, W. Y., Chu, I. M. T., Lai, R. W. M., Cockram, C. S., Sung, J. J. Y., 2009, "Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza", *J. Infect. Dis.*, 200(4): 492-500.

[67] Dutkowsky, R., 2010, "Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high risk patients", *J. Antimicrob. Chemother.*, 65(2): 11-24.

- [68] Hayden, F. G., Belshe, R., Villanueva, C., Lanno, R., Hughes, C., Small, I., Dutkowsky, R., Ward, P., Carr, J., 2004, "Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis", *J. Infect. Dis.*, 189(3): 440-4499.
- [69] Donner, B., Bader-Weder, S., Schwarz, R., Peng, M. M., Smith, J. R., Niranjana, V., 2011, "Safety profile of oseltamivir during the 2009 influenza pandemic", *Pharmacoepidem. Dr. S.*, 20(5): 532-543.
- [70] Anonymous, 2007, "New concerns about oseltamivir", *Lancet*, 369(9567): 1056.
- [71] Morishima, T., Togashi, T., Yokota, S., Okuno, Y., Miyazaki, C., Tashiro, M., Okabe, N., 2002, "Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan", *Clin. Infect. Dis.*, 35(5): 512-517.
- [72] Roche Laboratories Inc., 2009, "Tamiflu (oseltamivir phosphate) capsules and oral suspension", http://www.roche-australia.com/content/dam/internet/corporate/roche/en_AU/files/anti_virals/tamiflu-pi.pdf
- [73] Gulland, A., 2009, "First cases of spread of oseltamivir resistant swine flu between patients are reported in Wales", *BMJ*, 339: b4975.
- [74] Kazakevich, Y., Lobrutto, R., 2007, "HPLC for Pharmaceutical Scientists 1st edition", *John Wiley & Sons Inc.*, New Jersey, 4-10.
- [75] Scott, R. P. W., 2003, "Principles and Practice of Chromatography Book 1", *Library for Science*, 12-15.
- [76] Scott, R.P.W., 2007, "Liquid Chromatography Book 3", *Library for Science*, 37-47.
- [77] Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M., Valcarcel, M., Widmer, H. M., 2004, "Analytical Chemistry: a modern approach to analytical science 2nd edition", *Wiley-WCH*, Germany, 65-79
- [78] Weston, A., Brown, P. R., 1997, "HPLC and CE: Principle and Practice 2nd edition", *Academic Press*, San Diego, 24-79.
- [79] Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., 1998, "Enstrümental Analiz İlkeleri birinci baskı", Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., *Bilim Yayıncılık*, Ankara.
- [80] Todoroki, K., 2011, "Development of novel fluorescence-derivatization-HPLC methods enabling highly sensitive and selective analysis of biological compounds", *Yakuga. Zasshi*, 131(8): 1207-11.

- [81] Kakinuma, M., Watanabe, Y., Hori, Y., Oh-i, T., Tsuboi, R., 2005, "Quantification of hydroxyproline in small amounts of skin tissue using isocratic high performance liquid chromatography with NBD-F as fluorogenic reagent", *J. Chromatogr. B*, 824(1-2), 161-165.
- [82] Inoue, H., Kohashi, K., Tsurata, Y., 1998, "Simultaneous determination of serum and urinary hydroxyproline and proline by liquid chromatography using two fluorescent labeling reagents", *Anal. Chim. Acta*, 365(1-3), 219-226.
- [83] Ahuja, S., Rasmussen, H., 2007, "HPLC Method Development for Pharmaceuticals 8th edition", *Elsevier Science*, North Carolina, 32-40.
- [84] Meyer, V. R., 2004, "Practical High Performance Liquid Chromatography 4th edition", *John & Wiley Sons*, Switzerland, 9.
- [85] Cazes, J., 2005, "Ewing's Analytical Instrumentation Handbook 3rd edition", *Marcel Dekker*, New York, 15-45.
- [86] Skoog, D. A., Holler E. J., Crouch, S. R., 2007, "Principles of Instrumental Analysis 6th edition", *Brooks & Cole*, Canada.
- [87] Sewell, P. A., Clarke, B., Kealey, D., 1987, "Chromatographic Separations", *John Wiley & Sons*, London, 13-80.
- [88] Skoog, D., Holler, E. J., Neiman, T. A., 1999, "Enstrümantal Analiz İlkeleri 5.Basım", *Bilim Yayıncılık*, Ankara, 739-741.
- [89] Ahuja, S., Dong, M. W., 2005, "Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC 6th edition", *Elsevier*, New York, 19-30.
- [90] Weinberger, R., 2004, "Practical Capillary Electrophoresis 2nd edition", *Academic Pres*, San Diego, 125.
- [91] Pico, Y., Fekete, A., Kopplin, P. S., 2007, "Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments", *Elsevier*, Amsterdam, 561.
- [92] Jongerson, J. W., and Lukacs, K. D., 1981, "Zone Electrophoresis in Open- Tubular Glass Capillaries", *Anal. Chem.*, 53(8), 1298-1302.
- [93] Li, S. F. Y., 1992, "Capillary Electrophoresis 1st edition", *J.of Chrom. Library vol 52*, *Elsevier*, Netherland.

- [94] Jorgenson, J. W., 1986, "Electrophoresis", *Anal. Chem.*, 58(7), 743A-760A.
- [95] Lunte, S. M., Radzik, D. M., 1996, "Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis", vol 2, *Elsevier*, England, 5-30.
- [96] Heiger, D. N., 1992, "High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction", *Hewlett-Packard Company*, France, 136.
- [97] Baker, D. R., 1995, "Capillary Electrophoresis 1st edition", *John Wiley & Sons Inc.*, New Jersey, 1-51.
- [98] Smith, N. W., Evans, M. B., 1994, "Capillary Zone Electrophoresis in Pharmaceutical and Biomedical Analysis", *J. Pharmaceut. Biomed.*, 12(5): 579-611.
- [99] Ahuja, S., Jimidar, M., 2008, "Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis", *Elsevier*, USA, 18-30.
- [100] MacTaylor, C. E., Ewing, A. G., 1997, "Critical review of recent developments in fluorescence detection for capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 18(12-13): 2279-90.
- [101] Chen, D. Y., Dovichi, N. J., 1994, "Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. B*, 657(2): 265-69.
- [102] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., 1994, "Capillary Electrophoresis", Vieweg, Braunschweig, 8.
- [103] Tang, G. Y., Yang, C., Gong, H. Q., Chai, J. C., Lam, Y. C., 2006, "Numerical Simulation of Joule Heating Effect on Sample Band Transport in Capillary Electrophoresis", *Anal. Chim. Acta*, 561(1-2): 138-149.
- [104] Altria, K. D., 1999, "Overview of Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography", *J. Chromatogr. A*, 856(1-2): 443-463.
- [105] Bjerregaard, C. and Michaelsen, S., 1999, "Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis", *Paston Prepress*, Denmark.
- [106] Chabai, H., Ouarezki, R., Guermouche, S., Guermouche, M. H., 2011, "Rapid determination of oseltamivir phosphate in pharmaceutical preparation using monolithic silica HPLC column", *J. Liq. Chromatogr.*, 34(17): 1913-24.
- [107] Thatte, A. A., Kadam, R. J., Pramila, T., Bhoi, U. A., Deshpande, K. B., 2011, "Development, validation and application of UV-spectrophotometric method for the

determination of oseltamivir phosphate in bulk and pharmaceutical dosage form", *Int. J. ChemTech Res.*, 3(2): 569-573.

[108] Laborde-Kummer, E., Gaudin, K., Joseph-Charles, J., Gheyouche, R., Boudis, H., Dubost, J. P., 2009, "Development and validation of a rapid capillary electrophoresis method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu and generic versions", *J. Pharmaceut. Biomed.*, 50(3): 544-546.

[109] Raut, C. S., Gharge, D. S., Dhabale, P. N., Gonjari, I. D., Hosmani, A. H., Hosmani, A. H., 2010, "Development and validation of oseltamivir phosphate in fluvir by UV-spectrophotometer", *Int. J. PharmTech Res.*, 2(1): 363-366.

[110] Heinig, K., Bucheli, F., 2008, "Sensitive determination of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in plasma, urine, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. B*, 876(1): 129-136.

[111] Joseph-Charles, J., Geneste, C., Laborde-Kummer, E., Gheyouche, R., Boudis, H., Dubost, J. P., 2007, "Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu and generic versions", *J. Pharmaceut. Biomed.*, 44(4): 1008-1013.

[112] Lindegardh, N., Hanpithakpong, W., Wattanagoon, Y., Singhasivanon, P., White, N. J., Day, N. P. J., 2007, "Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate in plasma, saliva and urine", *J. Chromatogr. B*, 859(1): 74-83.

[113] Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H., 2005, "Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation", *J. Pharmaceut. Biomed.*, 39(3-4): 624-630.

[114] Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S., Barzegar-Jalali, M., 2007, "Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat", *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 10(3): 368-379.

[115] Song, N. N., Li, Q. S., Liu, C. X., 2006, "Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats", *World J. Gastroenterol.*, 12(25): 4064-70.

[116] Wagner, D., Spahn-Langguth, H., Hanafy, A., Koggel, A., Langguth, P., 2001, "Intestinal Drug Efflux: Formulation and Food Effects", *Adv Drug Deliv Rev.*, 50: 13-31.

ÖZGEÇMİŞ

GÜLPEMBE HALAY

gulpembecoban_85@hotmail.com

Doğum Tarihi / Yeri: 04.01.1985 / KONYA

Medeni Durum: Evli

Uyruğu: T.C.

Eğitim Geçmişi:

2014 Şubat- Yüksek Lisans, Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı

2004-2010 Lisans, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

1999-2003 Akşehir Selçuklu Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Süper Lise Bölümü)

Gerçekleştirilen Projeler:

- TÜBİTAK 211T007 no'lu proje (Bazı Antiviral İlaçların Permeabiliteleri ile Dozaj Formlarından Tayini için Ters Faz Sıvı Kromatografik Metodun Geliştirilmesi)- Araştırmacı Bursiyer
- TÜBİTAK 114Z135 no'lu proje (Sıvı Kromatografisi Sıralı Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) Tekniği ile Pazopanib ve ilgili Stres Bozunma Bileşiklerinin İncelenmesi ve Tayini için Metot Optimizasyonu)- Araştırmacı Bursiyer

Kongre ve Konferanslar:

- XV. Ulusal Kromatografi Kongresi, “Oseltamivir Fosfat'ın İntestinal Permeabilitesinin Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini”, 08-10 Nisan 2015, Uşak, TÜRKİYE.
- XV. Ulusal Kromatografi Kongresi, “Diet Kolada Bulunan Aspartam, Sakkarin, Fenil Alanin, Asesülfam K ve Kafeinin Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntem ile Tayini”, 08-10 Nisan 2015, Uşak, TÜRKİYE.
- XV. Ulusal Kromatografi Kongresi, Yerel Organizasyon Komitesi, 08-10 Nisan 2015, Uşak, TÜRKİYE.
- VII. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, “Lamivudin'in İntestinal Permeabilitesinin Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntem ile Tayini”, 01-05 Eylül 2014, Kahramanmaraş, TÜRKİYE.
- VII. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, “Oseltamivir Fosfat'ın İntestinal Permeabilitesinin Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntem ile Tayini”, 01-05 Eylül 2014, Kahramanmaraş, TÜRKİYE.
- II. Ulusal Organik Kimya Kongresi, 24-26 Eylül 2014, Ankara, TÜRKİYE.

Sertifikalar:

- HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) cihazı kullanım sertifikası
- Kapiler Elektroforez cihazı kullanım sertifikası
- TS-EN ISO 9001-2008 Kalite Yönetim Sistemi
- Kuruluş İçi Kalite Denetçisi
- OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi
- TS-EN ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi

Burslar:

- TÜBİTAK-Proje Bursu, 2014-2015 (10 ay)
- TÜBİTAK-Proje Bursu, 2015 Ocak (6 ay)

