

**T.C.  
U AK ÜN VERS TES  
FEN B L MLER ENST TÜSÜ**

**K MYA ANAB L M DALI**

**VALGANS KLOV R VE LAM VUD N N PERMEAB L TE VE BOZUNMA  
ÜRÜNLER N N TAY N Ç N METOT OPT M ZASYONU**

**YÜKSEK L SANS TEZ**

**EM NE ERTÜRK  
Kimyager**

**DANI MAN  
YRD. DOÇ. DR. SENEM ANLI**

**ARALIK 2014  
U AK**

Emine ERTÜRK tarafından hazırlanan "Valgansiklovir ve Lamivudinin Permeabilite ve Bozunma Ürünlerinin Tayini için Metot Optimizasyonu " adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

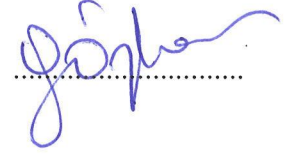
Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI



Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. A.Güleren ALSANCAK



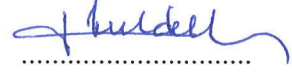
(Kimya Anabilim Dalı, Süleyman Demirel Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI



(Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK




(İş Sağlığı ve İş Güvenliği Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. Pınar TÜZÜM DEMİR



(Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. Selahattin BOZKURT



(Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Tarih: 26/12/2014

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans 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.



Emine ERTÜRK

# VALGANS KLOVİR VE LAMİVUDİNİN PERMEABİLİTE VE BOZUNMA ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ ÇİN METOT OPTİMİZASYONU

## ÖZET

İlaçların uygulama yolları ilacın özelliklerine ve tedavi amacına göre belirlenmektedir. Bu uygulama yolları enteral, parenteral ve diğer uygulama yolları olarak üç temel gruba ayrılmaktadır. Oral (enteral) uygulama, en güvenli ve en kolay uygulama olduğu için sistemik etki etmek amacıyla en çok tercih edilen uygulama yoludur.

Oral yolla verilen ilaçların absorpsiyonu ve biyoyararlanımı üzerine ilacın fizikokimyasal özellikleri, dozaj ekline ait faktörler ve fizyolojik faktörler önemli derecede etki etmektedir. Oral yolla uygulanan ilaçların gastrointestinal kanaldan absorpsiyonlarının kısıtlı olması düşük biyoyararlanım nedenlerinden biridir.

Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BCS) ilaçların çözünürlük ve permeabilitelerine göre sınıflandırıldığı, Amidon ve ark. tarafından ortaya atılmış, bilimsel bir çerçevedir. Bu tez çalışmasında, antiviral ilaçlardan olan lamivudine ve valgansiklovirinin intestinal permeabiliteleri, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)'ne göre değerlendirilmiştir. Bunun için ters faz sıvı kromatografik yöntem kullanılmıştır.

Stress testleri, etkin maddelerin zorlanmış koşullardaki parçalanma ürünleri ve parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için yapılır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, lamivudine ve valgansiklovirin bozunma ürünleri LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla etken maddenin asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullarda stress testleri yapılmıştır. LC-MS yöntemi ile elde edilen m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak, ilacın olası bozunma mekanizmaları ve bozunma ürünlerinin ne olduğu tahmin edilmiştir.

**Bilim Kodu** :

**Anahtar Kelimeler** : Lamivudin, Valgansiklovir, intestinal permeabilite, Bozunma ürünleri, YPSK, LC-MS/MS

**Sayfa Adedi** : 77

**Tez Yöneticisi** : Yrd. Doç. Dr. Senem ANLI

# **METHOD OPTIMIZATION FOR DETERMINATION OF PERMEABILITY AND DEGRADATION PRODUCTS OF VALGANCYCLOVIR AND LAMIVUDINE**

## **ABSTRACT**

The types of application of drugs are determined by the drug properties and therapeutic purposes of these drugs. These types of applications are divided into three basic groups as enteral, parenteral and the other types of applications. Orally (enternal) type is the most preferred because of its safety and easier application.

The physicochemical properties of drugs, the factors about the phsigological and dosage forms are affected to absorption and bioavailability of orally administered drugs. The reason of low absorption of the drugs which are orally used from gastrointestinal tract, is low bioavailability.

Biopharmaceutical Classification System (BCS) is a scientific framework according to the solubility and permeability of drugs put forward by Amidon et al. In this study, lamivudine and valgancyclovir's intestinal permeability were evaluated according to Biopharmaceutical Classification System (BCS). For this purpose reverse phase liquid chromatographic method was used.

The stress tests are performed to learn about the forced degradation products in terms of active substances and degradation mechanisms. In the second part of these study, degradation products of lamivudine and valgancyclovir were determined by LC-MS/MS method. For this purpose, the active ingredient stress tests were performed in the acidic, basic, thermal and photolytic conditions. According to m/z values and decomposition products, possible drug degradation mechanisms and decomposition products were estimated.

**Science Code** :

**Key Words** : Lamivudine, Valgancyclovir, Intesinal permeability, Decomposition products, HPLC, LC-MS/MS

**Page Number** : 77

**Adviser** : Yrd. Doç. Dr. Senem ANLI

## TE EKKÜR

Çalı malarım süresince de erli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, anlayı mı ve gülüyüzünü benden hiçbir zaman esirgemeyen danı man hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Senem ANLI'ya te ekkür ederim.

Çalı malarım boyunca her zaman bana yardımcı olan hocam Sayın Doç. Dr. Nurullah ANLI'ya te ekkür ederim.

Bana analitik kimyayı sevdiren hocam Sayın Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a te ekkür ederim.

ntestinal permeabilite çalı malarımında yardımcı olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan Kaynak'a te ekkür ederim.

Laboratuvar çalı malarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen arkadaş larım Gülpembe HALAY ve Süleyman GÖKÇE'ye te ekkür ederim.

Verdi im her kararda beni destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme te ekkür ederim.

Bu çalı manın gerçekle tirilmesinde maddi destek, 211T007 Tübitak projesi (kullanılan cihazların alımı) ve 2014/TP004 numaralı U ak Üniversitesi Bilimsel Ara tırma Projesi ile sa lanmı tır. Bu nedenle te ekkürü borç biliriz.

ntestinal permeabilite çalı maları nönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izinle gerçekle tirilmi tir. Bu nedenle te ekkürü bir borç biliriz.

## Ç NDEK LER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TE EKKÜR	vi
Ç NDEK LER	vii
EK LLER N L STES	x
Ç ZELGELER N L STES	xiii
S MGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. G R	1
1.1. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BSS-BCS)	1
1.1.1. Çözünürlük	2
1.1.2. Permeabilite	2
1.2. Membranlardan Geçi Mekanizmaları	3
1.2.1. Transselüler Absorpsiyon Mekanizmaları	4
1.3. Paraselüler Absorpsiyon	6
1.4. Enfeksiyon	6
1.4.1. Hepatit B Enfeksiyonu	8
1.4.1.1. HBV Enfeksiyonunun Belirtileri	9
1.4.1.2. HBV Enfeksiyonunun Tedavisi	9
1.4.2. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) Enfeksiyonu	9
1.4.2.1. HIV Enfeksiyonunun Belirtileri	10
1.4.2.2. HIV Enfeksiyonunun Tedavisi	10
1.4.3. Sitomegalovirüs (CMV) Enfeksiyonu	10
1.4.3.1. CMV Enfeksiyonunun Belirtileri	11
1.4.3.2. CMV'nin Tedavisi	11
1.5. Lamivudin	12

1.6. Valgansiklovir	13
1.7. Kromatografi	14
1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	15
1.7.1.1. YPSK Donanımı	16
1.7.1.1.1. Pompa	16
1.7.1.1.2. Enjektör	18
1.7.1.1.3. Kolon	18
1.7.1.1.4. Dedektörler	18
1.7.1.1.4.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Dedektörü	19
1.7.1.1.5. Kaydedici	21
1.7.1.2. YPSK'da Yöntem Geliştirme	22
1.7.1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi	22
1.7.2. Sıvı Kromatografik Analizler için Saptanması Gereken Validasyon Parametreleri	24
1.8. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS)	28
1.8.1. İyonizasyon Bölümü	30
1.8.2. Kütle Analizörleri	30
1.8.3. Dedektörler	31
1.9. Literatür Taramaları	31
1.9.1. Lamivudine ile yapılan çalışmalar	31
1.9.2. Valgansiklovir ile yapılan çalışmalar	32
2.GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Genel Bilgi	34
2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	34
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	35
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. İntestinal Permeabilite Çalışmaları	38
2.2.2. Bozunma Çalışmaları	42



2.2.2.1. LC-MS/MS Yönteminin Optimizasyonu	42
3. BULGULAR	44
3.1. İntestinal Permeabilite Çalışmaları	44
3.1.1. Lamivudin, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için	
Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve Statiksel Değerlendirilmesi	44
3.1.2. Valgansiklovir, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için	
Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve Statiksel Değerlendirilmesi	51
3.1.2. Perfüzyon DeneYleri	59
3.1.2.1. Lamivudin Grubuna Ait Bulgular	61
3.1.2.2. Valgansiklovir Grubuna Ait Bulgular	63
3.2. Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi DeneYleri	64
3.2.1. Lamivudinin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi DeneYleri	64
3.2.2. Valgansiklovirin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi DeneYleri	66
4. TARTI MA	69
5. SONUÇLAR	71
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇM	77

## EK LER N L STES

<b>ekil</b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
ekil 1.1. ntestinal absorpsiyon yolları	4
ekil 1.2. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü	8
ekil 1.3. Lamivudin'ın yapısı	12
ekil 1.4. Valgansiklovir'in yapısı	13
ekil 1.5. Kromatografik ayırımın ematik olarak gösterilmesi	14
ekil 1.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının ematik görünümü	16
ekil 1.7. YPSK için pistonlu pompa	17
ekil 1.8. YPSK'da kullanılan bir UV dedektörü	21
ekil 1.9. Agilent marka bir LC-MS/MS cihazı	29
ekil 3.1. Lamivudin analizi için kalibrasyon grafi i	44
ekil 3.2. Fenol kırmızısı analizi için kalibrasyon grafi i	45
ekil 3.3. Metoprolol analizi için kalibrasyon grafi i	45
ekil 3.4. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	47
ekil 3.5. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	47
ekil 3.6. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	47
ekil 3.7. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	48
ekil 3.8. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	48
ekil 3.9. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	48
ekil 3.10. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3)	
30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	49

ekil 3.11. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	49
ekil 3.12. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	49
ekil 3.13. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	50
ekil 3.14. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	50
ekil 3.15. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	50
ekil 3.16. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	51
ekil 3.17. Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)	51
ekil 3.18. Valgansiklovir analizi için kalibrasyon grafi i	52
ekil 3.19. Fenol kırmızısı analizi için kalibrasyon grafi i	52
ekil 3.20. Metoprolol analizi için kalibrasyon grafi i	53
ekil 3.21. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	54
ekil 3.22. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	54
ekil 3.23. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	55
ekil 3.24. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	55
ekil 3.25. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	55
ekil 3.26. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	56

ekil 3.27. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	56
ekil 3.28. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	56
ekil 3.29. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	57
ekil 3.30. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	57
ekil 3.31. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	57
ekil 3.32. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	58
ekil 3.33. Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)	58
ekil 3.34. Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)	58
ekil 3.35. Gruplara göre hayvan a ırlıkları	60
ekil 3.36. Gruplara göre akı  hızları	60
ekil 3.37. Gruplara göre segment uzunlukları	61
ekil 3.38. Lamivudin ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ de  erleri	62
ekil 3.39. Valgansiklovir ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ de  erleri	63
ekil 3.40. Lamivudinin asidik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu	65
ekil 3.41. Lamivudinin bazik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu	65
ekil 3.42. Lamivudinin oksidatif strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu	66
ekil 3.43. Valgansiklovirin asidik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrum	67
ekil 3.44. Valgansiklovirin oksidatif strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu	68

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa No
Çizelge 1.1. Permeabilite tablosu	3
Çizelge 1.2. Membranlardan geçiş mekanizmaları	4
Çizelge 1.3. Enfeksiyon etkenlerinin gruplandırılması	7
Çizelge 1.4. Çözücülerin fiziksel özellikleri	23
Çizelge 2.1. Kullanılan cihazlar ve gereçler	34
Çizelge 2.2. Çalışılan bileşimler ve özellikleri	36
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	36
Çizelge 2.4. Lamivudin için uygulanan gradient program	38
Çizelge 2.5. Valgansiklovir için uygulanan gradient program	38
Çizelge 2.6. Bağırsak perfüzyonu çalışmaları için kullanılan perfüzyon çözeltisinin bileşimi	39
Çizelge 3.1. Lamivudinün YPSK yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi	46
Çizelge 3.2. Lamivudin, metoprolol ve fenol kırmızısının YPSK yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları	46
Çizelge 3.3. Valgansiklovirin, metoprolol ve fenol kırmızısının YPSK yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları	53
Çizelge 3.4. Valgansiklovirin, metoprolol ve fenol kırmızısının YPSK yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları	54
Çizelge 3.5. Grup 1’de kullanılan sıçanlara ait bilgiler	59
Çizelge 3.6. Grup 2’de kullanılan sıçanlara ait bilgiler	59
Çizelge 3.7. Lamivudin ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	62
Çizelge 3.8. Valgansiklovir ve metoprolol tartarat için tayin edilen $P_{eff}$ değerleri	63
Çizelge 3.9. Lamivudin ve valgansiklovire uygulanan stres koşulları	64
Çizelge 3.10. Lamivudinün olası bozunma ürünleri	66
Çizelge 3.11. Valgansiklovirin olası bozunma ürünleri	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\text{\AA}$	Angstrom
$dQ / dt$	Difüzyon hızı
<b>D</b>	Difüzyon katsayısı
$C_{GI}$	Gastrointestinal kanaldaki ilaç konsantrasyonu
	Hildebrand çözünürlük parametresi
<b>b</b>	Hücre yol uzunluğu
<b>r</b>	Korelasyon katsayısı
<b>h</b>	Membran kalınlığı
<b>A</b>	Membran yüzey alanı
	Molar absorptivite
<b>c</b>	Numune derinliği
<b>I</b>	Numune ışık şiddeti
<b>K</b>	Partisyon katsayısı
$C_P$	Plazmadaki ilaç konsantrasyonu
<b>P'</b>	Polarite indeksi, Rohrschneider's verileriyle hesaplanan
$I_0$	Referans ışık şiddeti
$^{\circ}C$	Santigrat derece
$r^2$	Tayin katsayısı

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>AIDS</b>	Kazanılmı immün yetmezlik sendromu
<b>APCI</b>	Atmosferik basınçta kimyasal iyonla tırma
<b>APPI</b>	Atmosferik basınçta foto iyonla tırma
<b>atm</b>	Atmosfer
<b>BCS</b>	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
<b>BSS</b>	Ba ıl standart sapma
<b>CB cut-off</b>	Görünür bölge, bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz
<b>cccDNA</b>	Kovalent olarak kapalı DNA
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Metil siyanür
<b>NWF</b>	Net su akı 1
<b>cm</b>	Santimetre
<b>CMV</b>	Sitomegalovirüs
<b>CN</b>	Siyanür
<b>DAD</b>	Diode Array Dedektör
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>ESI</b>	Elektrosprey iyonla tırma
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GCV</b>	Ganciclovir
<b>HBV</b>	Hepatit B virüsü
<b>HBeAg</b>	Hepatit B e antijeni

<b>HBsAg</b>	Hepatit B yüzey antijeni
<b>Hg</b>	Civa
<b>IFN</b>	interferon
<b>IFN- 2</b>	interferon alfa 2
<b>kb</b>	Kilobit
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KHB</b>	Kronik Hepatit B
<b>KN</b>	Kaynama noktası
<b>LC-MS</b>	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi
<b>LC-MS/MS</b>	Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
<b>LOD</b>	Te his sınır
<b>LOQ</b>	Tayin alt sınırı
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mRNA</b>	Mesajcı RNA
<b>MS</b>	Kütle spektrometresi
<b>MS/MS</b>	Tandem kütle spektrometresi
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ODS</b>	18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan
<b>peg IFN-</b>	Pegile interferon-
<b>pgRNA</b>	Pregenomik RNA



<b>pH</b>	Bir çözeltilinin asitlik veya bazlık derecesinin ölçü birimi
<b>rcDNA</b>	Kısmi çift zincirli halkasal viral genom
<b>RI</b>	Kırılma indeksi
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>UV/GB (UV/VIS)</b>	Ultraviyole/görünür bölge
<b>VK</b>	Validasyon katsayısı
<b>YPSK</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

## 1.G R

Farmosötik maddeler organik kimya biliminin geli mesine paralel olarak 20. yüzyılda insan hayatına yaygın bir ekilde girmeye ba lamı ve günümüze kadar kullanılan miktar ve çe itleri de sürekli artı göstermektedir [1].

Te his, tedavi ve profilaktik amaçla kullanılan ilaçlar farklı yollarla uygulanmaktadır [2]. Bunlar arasında en yaygın olarak kullanılan uygulama yolu oral yoldur. Oral yolla verilen ilaçların absorpsiyonu ve biyoyararlanımı üzerine ilacın fizikokimyasal özellikleri (partikül büyüklü ü, kristal ekli, polimorfizm, tuz-ester yapısı gibi), dozaj ekline ait faktörler (dozaj eklinin tipi, üretim de i kenleri, formülasyondaki di er bile enler ve kullanılma oranları) ve fizyolojik faktörler (mide-ba ırsak kanalından geçi süresi, pH'sı, gastrointestinal membranın kalınlı ı, kan akı hızı, bireysel farklılıklar gibi) önemli derecede etki etmektedir [3]. Dolayısıyla biyolojik sıvılarda dü ük çözünürlük ve dü ük çözünme hızı, fizyolojik pH'larda çözünmü ilacın stabilite problemi, biyolojik membranlardan dü ük permeasyon, a ırı presistemik metabolizasyon ve gastrointestinal kanaldan absorpsiyonun kısıtlanması oral yolla kullanılan ilaçlar için biyoyararlanımın azalmasına neden olmaktadır. Biyoyararlanımla ilgili problemleri giderebilmek için farklı yakla ımlar bulunmaktadır. Genel olarak bu yakla ımlar farmasötik, farmakokinetik ve biyolojik olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır [4]. İlaç ürününün fizikokimyasal özellikleri ve üretim yöntemi de i tirilerek, formülasyonda de i iklikler yapılarak farmasötik yakla ımla, kimyasal yapı de i iklikleriyle ilacın absorpsiyon, metabolizasyon ve eliminasyonu düzenlenerek farmakokinetik yakla ımla veya ilacın uygulama yolu de i tirilerek biyolojik yakla ımla biyoyararlanım de i tirilebilir. BCS ilaçların çözünürlük ve permeabilitelerine göre sınıflandırıldı ı, Amidon ve ark. Tarafından ortaya atılmı , bilimsel bir çerçevedir.

### 1.1. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)

Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi Amidon ve ark. (1195) tarafından önerilmi ve FDA ( Food and Drug Administration) tarafından uygulamaya konulmu bir sistemdir. Bu kavram, tedavide kullanılan etkin maddelerin sudaki çözünürlükleri ile ba ırsaktan geçebilme yetenekleri (permeabiliteleri) üzerine kurulmu tur. Bu etkin maddeleri kullanarak, oral katı ilaç ekilleri (tablet, kapsül, v.b.) ile formülasyonları yapıldıktan sonra bu ekillerden olu an

Çözünme hızları ile beraber de erlendirilmesine dayanır. Özetlenirse BCS, oral katı ilaç ekillerinden olu an biyoyararlanımı üç etken ile de erlendirir:

- 1- Sudaki özünürlük,
- 2- Ba ırsak permeabilitesi,
- 3- Dozaj eklinden olu an özünme.

BCS, etken maddeleri a a ıdaki ekilde sınıflar:

Sınıf 1 : Yüksek özünürlük - yüksek permeabilite

Sınıf 2 : Dü çük çözünürlük - yüksek permeabilite

Sınıf 3 : Yüksek özünürlük - dü çük permeabilite

Sınıf 4 : Dü çük çözünürlük - dü çük permeabilite

Bu sınıflandırmaya ilaveten, dozaj ekilleri yava veya hızlı çözünme olu turmalarına göre de ayrılırlar [5].

### **1.1.1. Çözünürlük**

İlacı piyasaya çıkartacak firmanın hazırladı ı, en yüksek dozlu dozaj ekindeki bir birim (sözgelimi 100, 200 ve 400 mg'lık tabletlerinden 400 mg olanı), 250 mL veya üç farklı ortamda özünebilmelidir. Bu ortamların pH'sı genellikle 1,2, 4,5 ve 7,5'tir. Bu ortamlarda tamamen eriyebiliyorsa, o etkin maddenin yüksek çözünürlük gösterdi i kabul edilir.

### **1.1.2. Permeabilite**

Bir etkin maddenin permeabilitesi, dolaylı olarak insanlarda emilme oranına ba lıdır. Bu, farmakokinetik çalı malarla saptanır. Di er bir yol da, in vitro hücre kültürü (sözgelimi Caco-2) alı malarıdır. Böyle yöntemlerle % 90 emilme saptanırsa, o etkin maddeye, yüksek oranda permeabl madde denir. Bir maddenin ba ırsaklardan emilebilmesi için önce ba ırsak sıvısında çözünmü olması gerekir. Bu amaca yönelik olarak çözünme sayısı (dissolution number) tanımlanmı tır.

Çizelge 1.1'de bazı etkin maddelerin permeabiliteleri verilmi tir:

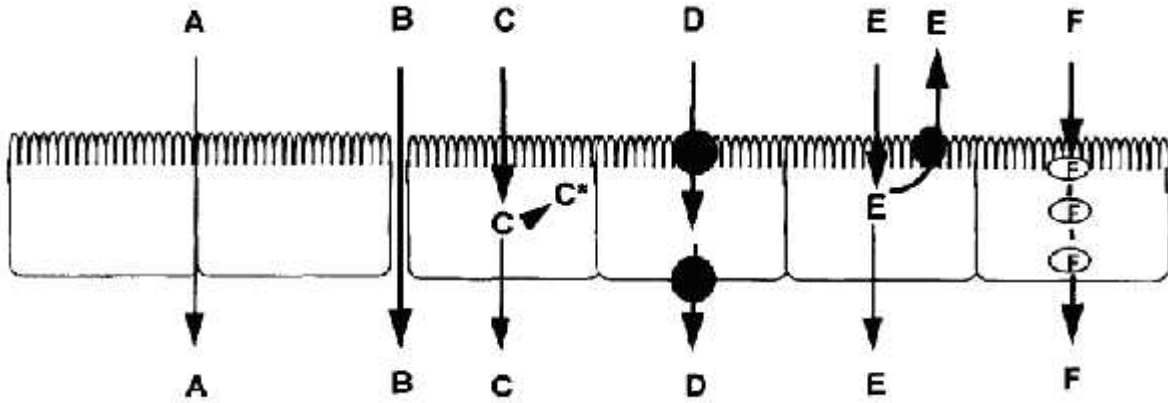
**Çizelge 1.1.** Permeabilite tablosu

Etkin madde	Permeabilite sınıfı
Antipirin	Yüksek
Kafein	Yüksek
Karbamazepin	Yüksek
Filuvastatin	Yüksek
Ketoprofen	Yüksek
Metoprolol	Yüksek
Naproksen	Yüksek
Propranolol	Yüksek
Teofilin	Yüksek
Verapamil	Yüksek
Amoksisilin	Dü ük
Atenolol	Dü ük
Furosemid	Dü ük

Yeni geli tirilmi bir jenerik ürünün biyoe de erlik çalı masından muaf olarak piyasaya çıkabilmesi için bu sınıflandırmadaki yerinin tespiti ve bunun için de ba ırsak permeabilitesinin tayini önemlidir. n-Situ intestinal permeabilite çalı maları ilaçların ba ırsak permeabilitelerinin tayini için literatürde en sık kullanılan yöntemdir.

## **1.2. Membranlardan Geçi Mekanizmaları**

İlaçlar ba ırsak epitelinden transselüler veya paraselüler yollarla absorbe olmaktadır. ( ekil 1.1). Transselüler absorpsiyon epitel hücre membranından, paraselüler absorpsiyon ise epitel hücreler arasındaki sıkı kav aklardan absorpsiyonu ifade eder [5-7]. Her iki absorpsiyon yolunda da farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Çizelge 1.2.).



BAZAL

**ekil 1.1.** ntestinal absorpsiyon yolları (A) Paraselüler difüzyon, (B) Sıkı kav akları düzenleyici maddeler tarafından artırılmış paraselüler difüzyon, (C) transselüler pasif difüzyon (C\* hücre içi metabolizasyon), (D) taşıyıcı aracılı transselüler taşıma, (E) Apikal yüzeydeki polarize eksozitoz (efflux) mekanizmasıyla düzenlenen transselüler difüzyon, (F) transselüler veziküler taşıma

**Çizelge 1.2.** Membranlardan geçiş mekanizmaları

Transselüler absorpsiyon mekanizmaları	Paraselüler absorpsiyon mekanizmaları
Pasif Difüzyon Aktif Taşıma Kolaylaştırılmış Difüzyon Veziküler Taşıma	Pasif Difüzyon

**1.2.1. Transselüler Absorpsiyon Mekanizmaları**

Pasif Difüzyon

Birçok ilaç molekülü, bağırsak membranlarından taşınırken yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru hareket etmektedir. Bu olay pasif difüzyon olarak adlandırılmaktadır. Bu taşıma olayı için enerjiye gereksinim olmayıp, kendiliğinden gerçekleşmektedir. Hücre membranının her iki tarafındaki ilaç konsantrasyonu pasif difüzyon olayını belirleyen faktördür. Fick'in difüzyon kuralına göre ilaç moleküllerinin hareketi gerçekleşir.

$$dQ / dt = D.A.K (C_{GI}-C_P) / h$$

(1.1)

$dQ / dt$  : Difüzyon hızı

D : Difüzyon katsayısı

A : Membran yüzey alanı

K : Partisyon katsayısı

$C_{GI}$  : Gastrointestinal kanaldaki ilaç konsantrasyonu

$C_P$  : Plazmadaki ilaç konsantrasyonu

h : Membran kalınlığı

### Aktif Taıma

Aktif taıma, düük konsantrasyon olan bölgeden yüksek konsantrasyon olan bölgeye do ru konsantrasyon farkına kar ı ta ınımı ifade eder. Ta ıyıcı aracılı membran geçi i olarak da tanımlanmakta olup enerji gerektirir. Bu ta ıyıcılar ilaç molekülleri ile kompleks olu turarak membrandan geçerler. Membranın di er tarafında ilaç molekölünü serbest bırakırlar. Aktif ta ımada belli miktarda ta ıyıcı mevcut oldu u için yüksek ilaç konsantrasyonunda ta ıyıcılar doygunlu a ula ca ından ilaç absorpsiyonu belli bir süre sonra de i meyecektir.

### Kolayla tırılmı Difüzyon

Kolayla tırılmı difüzyon da aktif taıma gibi ta ıyıcı aracılı absorpsiyonu ifade etmektedir. Ancak bu absorpsiyon mekanizmasındaki fark, yüksek konsantrasyondan düük konsantrasyona do ru konsantrasyon gradyanı ile aynı yönde ta ınım olmasıdır. Bu nedenle enerji gerektirmez. Fakat aktif ta ımada oldu u gibi doygunluk söz konusudur. Benzer yapıdaki ilaçlar ta ıyıcıya ba lanmak için yarı ırlar.

### Veziküler Taıma

Partiküllerin hücre içine çekildi i veya hücre tarafından çözündürüldü ü bir taıma yoludur. Pinositoz ve fagositoz veziküler taıma çe itleridir. Pinositoz küçük çözünmü maddelerin ve sıvıların, fagositoz ise daha büyük moleküllerin veya makromoleküllerin makrofajlar tarafından hücre içine alınmasını ifade etmektedir. Endositoz ve ekzositoz ise sırasıyla makromoleküllerin hücre içine ve hücre dı ına ta ınması i lemidir. Endositoz ve ekzositoz esnasında hücre membranı ta ınacak olan molekülün etrafını sararak vezikül veya vakuol

eklinde yapılar oluşur. Veziküler taşıma çetli büyük moleküllerin ve proteinlerin absorpsiyonuna olanak sağlamaktadır [8].

### 1.3. Paraselüler Absorpsiyon

Paraselüler yol, komşu hücreler (enterositler) arasındaki alan boyunca uzanan sulu bir ortam olarak tanımlanmaktadır. Paraselüler boşluğun boyutu 10 ile 30-50 Å arasında olup, molekül büyüklüğü 3.5 kDa (molekül yarıçapı 15 Å)'nu aşmayan moleküllerin geçişine olanak sağlar [9]. Paraselüler yolun sulu bir ortam olması nedeniyle suda çözünmüş besin, iyon gibi küçük maddelerin pasif difüzyon aracılığı ile geçişini kolaylaştırmaktadır. Paraselüler taşıma, küçük hidrofilik moleküller ve bazı ilaçların ana absorpsiyon yolu olup paraselüler boşlukta yer alan su akımındaki değişimler maddelerin taşınmasını etkilemektedir. Paraselüler permeabilite hücrelerin apikal yüzeylerinde yer alan ve absorpsiyon için hız sınırlayıcı bariyerler olarak değerlendirilen sıkı kavaklar tarafından düzenlenmektedir [10-11].

### 1.4. Enfeksiyon

Enfeksiyon, mikroorganizmaların vücut dokularına invazyonu ve burada çoğalması sonucunda bulgularla birlikte immünolojik bir yanıtın meydana gelmesidir. Enfeksiyon etkenlerinin çoğunu mikroorganizmalar oluşturur. Bunun yanında, bazı piroplar insanlarda çoğalarak enfeksiyon etkeni olmalarına karşın, klasik mikroorganizma grubuna girmemektedir. Hastalık oluşturabilen birçok helmint insanda çoğalmadığı ve gözle görülebilecek kadar büyük oldukları halde insanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir.

Enfeksiyon etkenleri konakta çoğaldıktan sonra immünolojik, inflamatuvar ve dejeneratif olaylar gibi çetli yanıtlara neden olmaktadır; bu yanıtlar özgül etkene göre değişkenlik göstermektedir. Enfeksiyon etkenlerinin konakta olduğu türden immünolojik yanıt örnek olarak romatizmal ateş ve otoimmün demiyelinize hastalıklar verilebilir. Romatizmal ateş grup A streptokokların membran antijenleri ile kalp miyofibrilleri arasındaki moleküler benzerlik nedeniyle, çapraz reaksiyon sonucunda meydana gelmektedir. Bunun yanında, otoimmün demiyelinize hastalıklar ise bir enfeksiyon sonrası ya da inaktif virüsle aşılaması sonucu sinir dokularına karşı olumsuz yanıtı immünolojik yanıtı olarak oluşmaktadır.

Enfeksiyon etkenlerine karşı gelişen diğer yanıt inflamasyondur. Özellikle bakterilerle oluşan enfeksiyonlarda, enfeksiyon bölgesinde biriken polimorfonükleer lökositlerin çetli ürünlerine bağlı olarak hastada ateş ve halsizlik gibi olgular ortaya çıkmaktadır.

Enfeksiyonlara karşı geli en dejenerasyon (ölüm/azalma) ise daha çok viral enfeksiyonlarda görülmektedir. Örneğin poliomiyelit olgularında özellikle ön boynuzi pons ve medulanın motor ve otonom sinir hücrelerinde dejenerasyon gelişmektedir. Ayrıca kazanılmı immün yetmezlik sendromunda (AIDS) konakta virüs miktarı arttıkça CD<sub>4</sub>+T lenfosit sayısında dikkat çekici bir azalma meydana gelmektedir.

Günümüzde doğada kaç çeşit enfeksiyon etkeninin bulunduğu ve bunların konakta hastalık oluşturabilmesi için enfektif dozlarının ne olması gerektiği kesin olarak bilinmemektedir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi de her geçen gün yeni etkenlerin mikroorganizma dünyasına katılmasıdır. Üstelik, mikrop dünyasında isimlendirme ve sınıflandırmada da hızla değişimlik yapılmakta; bu da gerek etkenlerin gerekse yol açtıkları enfeksiyonların önlenilmesinde zorluklara yol açmaktadır.

Enfeksiyon hastalıkları etkenlerinin tanımlanması, hastalığın patogenezinde, teşhis ve tedavisinde en önemli basamağı oluşturmaktadır. Bu etkenler belirli özellikleriyle birbirinden ayrılmaktadırlar (Çizelge 1.3) [12-13].

### **Çizelge 1.3.** Enfeksiyon etkenlerinin gruplandırılması

#### *Asellüler*

- Prionlar (< 5 nm)
- Viroidler (< 5 nm)
- Virüsler (20-30 nm)

#### *Tek hücreliler*

##### Prokaryotikler (200-2000 nm)

- Bakteriler
- Klamidyalar
- Mikoplazmalar
- Riketsiyalar

##### Ökaryotikler (> 2000nm)

- Mantarlar (maya)
- Protozoonlar

#### *Çok hücreliler*

- Mantarlar (küf)
- Helminthler
- Artropotlar

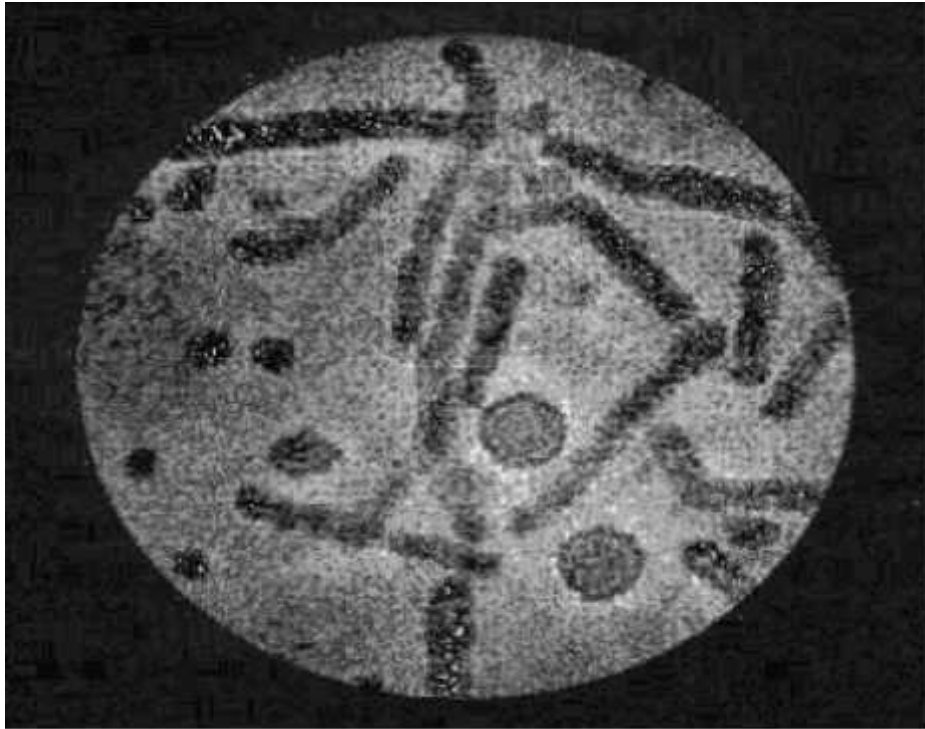


### 1.4.1. Hepatit B Enfeksiyonu

Hepatit B dünyadaki en yaygın karaciğer enfeksiyonudur. Karaciğere doğrudan nüfuz ederek hasar veren hepatit B virüsünün neden olduğu bir hastalıktır. Kan, cinsel ilişki, paylaşılan ya da tekrar tekrar kullanılan iğneler yoluyla, hamilelik ve doğum sırasında hepatitli anneden bebeğe geçer.

Vücut Hepatit B virüsü ile ilk kez karşılaşılıyorsa "Akut Hepatit B", diğer kan testlerinde 6 aydan uzun bir süredir Hepatit B virüsü çıkıyorsa "Kronik Hepatit B" olarak adlandırılır [16].

Kronik hepatit sirotik evrede olabilir veya siroza ilerleyebilir. Kronik hepatitler kronik viral hepatit, otoimmün hepatit, ilaçla bağlı kronik hepatit ve kriptojenik (sebebi bilinmeyen) kronik hepatit olmak üzere 4 gruba ayrılır [14].



**ekil 1.2** HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü

Elektron mikroskop görüntüleri ile HBV ile enfekte bir hastanın serumundan izole edilen örneklerde 42-47 nm çapında çift katmanlı "Dane partikülleri"nin yanı sıra, 20 nm çapında küre ve tübüler yapılarında bulunduğu 3 tip HBV partikülü gözlemlenmiştir (ekil 1.3.). Bu partiküllerin hepsinin yüzeyinde Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak adlandırılan ortak

bir antijenin dolaımdaki yüksek titresinin HBV enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilmesi i takip eden yıllarda kefedilmiştir [15].

#### **1.4.1.1. HBV Enfeksiyonunun Belirtileri**

Yenidoğan bebekler hepatit B ile ilgili belirgin olarak herhangi bir belirti vermez. Belirtiler yaşıyla birlikte belirginleşir. Yaş ilerledikçe yapılan araştırmalar belirtilerin arttığını göstermiştir. Hepatit B'nin hastalık belirtileri; tüm vücutta ağrı, halsizlik, ateş, baş ağrısı, iştah kaybı, bulantı, özellikle karaciğer bölgesinin üzerinde ağrı ve hassasiyet, kabızlık veya ishal, kas ve eklemlerde ağrı ve deride kızarıklık.

Bunlar bir çok hastalıkta görülebilir. Fakat karaciğerin olduğu yerde ağrı, yapılan kan testlerinde karaciğerdeki enzim miktarlarının artması ve sarılık bu hastalığın belirtilerindedir.

#### **1.4.1.2. HBV Enfeksiyonunun Tedavisi**

Akut HBV enfeksiyonu erişkinlerde %90-95 oranında kendiliğinden iyileşmektedir. Diğer viral hepatitlerde olduğu gibi olguların büyük bir bölümünde hastane tedavisine gerek yoktur. Az sayıda hastada akut dönem klinik olarak ağır geçer ve uzun süreli olur. Hastanede izlenen akut HBV enfeksiyonlarında tedavi genel olarak destekleyicidir. HBV enfeksiyonunun kronikleşmesi söz konusu olduğunda antiviral ilaçlarla tedaviler denir.

Kronik HBV enfeksiyonlarında çok sayıda antiviral ajanın HBV'ye karşı etkinliğini in vitro ve hayvanlarda in vivo deneylerde araştırılmaktadır. Başta interferonlar (IFN) özellikle de IFN-2 HBV'nin replikasyonunu baskılamakta ve hastalığın remisyonunu sağlamada belli bir düzeyde etkinlik göstermektedir [16].

#### **1.4.2. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) Enfeksiyonu**

Enfeksiyonun etkeni olan virüs (HIV), lentivirus ailesine mensup bir retrovirüstür. Retrovirüsler, tek sarmallı RNA içeren zarflı virüslerdir. Reverse transkriptaz enzimi aracılığıyla genetik materyallerini çift sarmallı DNA'ya çevirip konakçı kromozomuna entegre etme özelliklerine sahiptir. İnsan lenfositlerinin yüzeyinde, hücre aktivitesi ve fonksiyonunda rol alan spesifik glikoproteinler mevcuttur. CD4 hücre yüzey antijeni taşıyan lenfositler, immünolojik reaksiyonlara yardım eden hücrelerdir. CD4 + lenfositler aynı zamanda HIV enfeksiyonunun primer hedefleridir. HIV enfeksiyonunun seyri boyunca CD4 +T hücre sayısı giderek azalır, buna bağlı olarak da AIDS için karakteristik fırsatçı enfeksiyonlar ve kanserler ortaya çıkar [17].

### **1.4.2.1. HIV Enfeksiyonunun Belirtileri**

HIV'nin vücuda girmesinden 2 ila 4 hafta sonra, ki ide grip veya mononükleoz-benzeri belirtiler ortaya çıkabilir. Genellikle yüksek ate , lenfadenopati (lenf bezlerinin şişmesi), faranjit, ciltte yaygın döküntüler ve kırmızı lekeler, kas ağrısı, halsizlik, baş ağrısı, mide bulantısı ve kusma, karaciğer büyümesi, kilo kaybı, pamukçuk ve nörolojik belirtiler görülür. Enfekte olan kişilerde bu belirtilerin tümü, bir kısmı veya hiçbiri ortaya çıkmayabilir.

### **1.4.2.2. HIV Enfeksiyonunun Tedavisi**

HIV enfeksiyonunda virüsü ortadan kaldıran bir tedavi henüz yoktur, ancak virüsün çoğalmasını kontrol eden ilaçlar vardır. Bu ilaçların genel adı Antiretroviral ilaçlardır. Bu ilaçlarla yapılan tedavi de antiretroviral tedavidir. Tedavide CD4 + hücre sayısının yükseldiği ve özellikle yoğun tedavi ile yaşam süresinin uzadığı tespit edilmiştir. Antiretroviral tedavide gündeme gelen ilk ilaçlar, "Reverse Transcriptaz" inhibitörleridir. Reverse Transcriptaz enzimi, virüs RNA'sından DNA sentezlenmesinde rol oynayan enzimdir. HIV ile istenmeyen teması maruz kalan sağlık personeli ve HIV ile enfekte gebe kadınlar tedavi edilmelidir [17].

### **1.4.3. Sitomegalovirüs (CMV) Enfeksiyonu**

Sitomegalovirüs enfeksiyonu, CMV virüsünün neden olduğu bir enfeksiyondur. CMV, herpesvirus ailesinden çift zincirli DNA'ya sahip bir virüstür [18]. İmmün sistemi normal olan konaklarda hiç belirti vermeyen CMV enfeksiyonu, acquired immune deficiency syndrome: kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS) ve transplant hastaları gibi immün sistemi bozulmuş bireylerde ciddi sorunlara neden olmaktadır [19].

CMV orofarengeal sekresyonda, tükürükte, idrarda, servikal ve vajinal sekresyonda, spermatik sıvıda, anne sütünde, ter ve kanda rezerve olur ve bireylerin direkt ya da indirek temasıyla bulaşır [20].

### **1.4.3.1. CMV Enfeksiyonunun Belirtileri**

CMV'nin primer enfeksiyonu genellikle subklinik seyreder. Çocuklarda ve erişkinlerde virüs ile ilk temastan sonra 4-8 haftalık bir kuluçka döneminin ardından enfeksiyöz mononükleazis benzeri bir hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık halsizlik, bitkinlik, kas ağrıları, ateşin yükselmesi ve karaciğer fonksiyon değerlerinde yükselme ile belirlenir. Hastalık iyileştikten sonra virüs vücuttan uzaklaşmamakta ve diğer herpes virüsleri gibi yaşam boyu vücutta kalmaktadır. Günümüzde AIDS'in giderek artmasına bağlı olarak erişkinlerde görülen CMV enfeksiyonları her gün biraz daha fazla saptanmaktadır.

Organ nakli sonrası gelişen CMV enfeksiyonunun en önemli etkilerinden gram negatif basiller, *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis Jiroveci* ve mantarları içeren mikrobiyal ajanların yaşamı tehdit edici süperenfeksiyonların gelişmesidir.

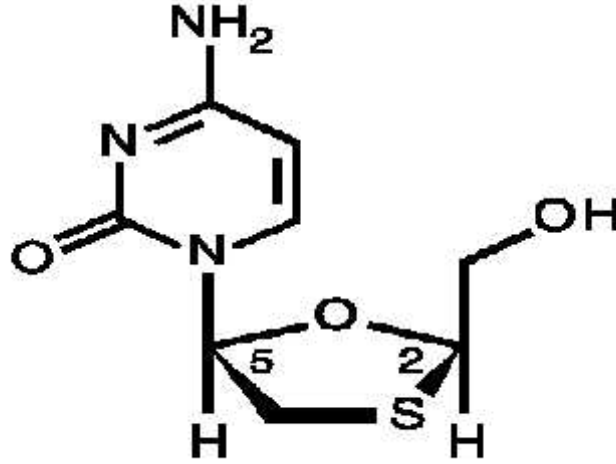
CMV aynı zamanda koryoretinitis, çeşitli gastrointestinal hastalıklar, santral sinir sistemi hastalıkları ve bazı tiplerdeki ateroskleroza da neden olabilmektedir [21].

### **1.4.3.2. CMV'nin Tedavisi**

Sitomegalovirüs enfeksiyonlarının tedavisinde mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır. Etkili antiviral ajanlar ganciclovir (GCV), valganciclovir, cidofovir, foskarnet ve fomivirsen olarak bilinmektedir. Bu ilaçlar birçok hastada klinik düzelme sağlamakla birlikte oral yoldan kötü emilimleri, düşük etki gücünde olmaları, zamanla oluşan direnç gelişimi, doza bağlı yan etkileri bulunması ve hospitalizasyona ihtiyaç duyulması gibi bazı dezavantajları mevcuttur [22].

## 1.5. Lamivudin

*Formülü*



ekil 1.3. Lamivudin'in yapısı

*Kapalı formülü*



*Sistemik Adı*

4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]-1,2-dihydropyrimidin-2-one

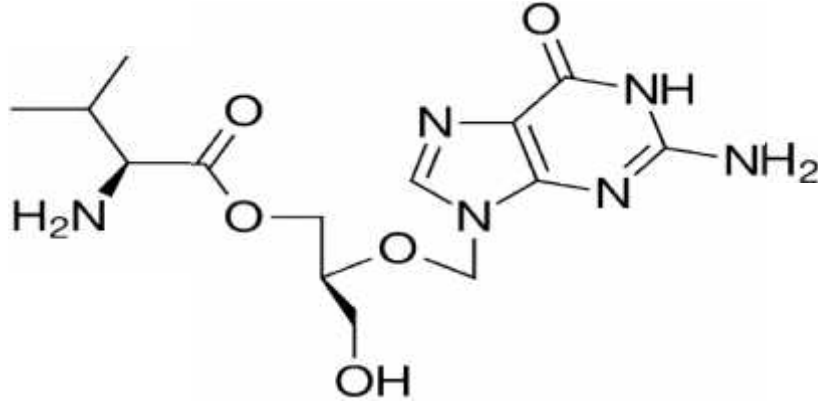
Lamivudine, 1998 yılında kronik hepatit B tedavisinde ruhsat alarak kullanılmaya başlanılan ilk L-nükleozit analogudur [23]. Lamivudin virüslere karşı savaşan (antiviral) bir ilaçtır. Lamivudin HIV hücrelerinin vücutta çoğalmasını engelleyerek çalışır.

Lamivudin'in sıvı formu ve 150 mg'lık formu AIDS'e sebep olan HIV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılır. Lamivudin HIV veya AIDS için kökten bir tedavi değildir.

Lamivudin'in 100 mg'lık formu ise kronik hepatit B tedavisinde kullanılır [24].

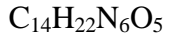
## 1.6. Valgansiklovir

*Formülü*



**ekil 1.4.** Valgansiklovir'in yapısı

*Kapalı formülü*



*Sistemik Adı*

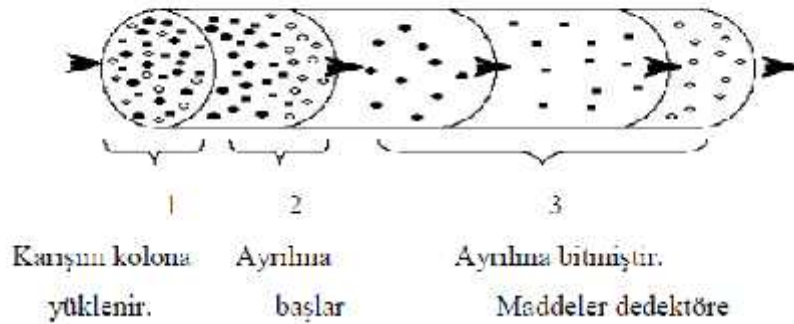
2-[(2-amino-6-oxo-6,9-dihydro-3H-purin-9-yl)methoxy]-3-hydroxypropyl-(2S)-2-amino-3-methylbutanoate

Valgansiklovir virüslere karşı savaşan (antiviral) bir ilaçtır. Valgansiklovir virüslü hücrelerin vücutta çoğalmasını engelleyerek çalışır. Valgansiklovir sitomegalovirüsü (CMV) tamamen ortadan kaldırmaz, ancak enfeksiyonun kontrol edilmesine yardımcı olur. Valgansiklovir AIDS hastası olan kişilerdeki CMV kökenli göz enfeksiyonlarını tedavi eder, ayrıca organ nakli (böbrek, kalp veya pankreas) olan kişilerde CMV enfeksiyonunu önler [23].

## 1.7. Kromatografi

Ayrılmaları çok güç oldu undan, di er metotlarla yapılamayan maddelerin ayrılmaları kromatografi metotlarıyla yapılır [26]. Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan yöntemlerin genel adıdır [27].

Kromatografik ayırmalar, biri sabit öteki hareketli olan iki faz arasında gerçekleştirilir. Ayrılması istenen madde veya maddeler çözünmüş halde hareketli faza ilave edilir. Hareketli faz sıvı, gaz veya süperkritik bir akı kan olabilir. Hareketli faz bir kolon içinde ya normal gravitasyon kuvvetiyle ya da basınçla kolondaki sabit faz içinden aşağıya doğru indirilir. Bu indirme esnasında hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Bundan dolayı hareketli faz, sabit faz içinden veya yüzeyinden aşağıya doğru ilerlerken içinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit faz arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde en hızlı yol alırken, sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan en yavaş yol alır. Kolona aynı anda enjekte edilen maddeler kolon çıkışına farklı zamanlarda ulaşırlar. Bu esnada her maddenin tanecikleri kendi aralarında kümeler meydana getirerek kolondan aşağıya doğru bantlar halinde yol alırlar [25].



**ekil 1.5.** Kromatografik ayırımınematik olarak gösterilmesi

### 1.7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), biyoteknoloji ve farmasötik endüstri alanında ara tırma ve geli tirmeden kalite güvenli inden ve validasyona uzanan i lemlerin her basama ındaki molekülleri te his etmek, karakterize etmek ve safla tırmak için kullanılan en önemli yöntemlerden birisidir. Çözelti halinde, çözünür durumdaki moleküllerin ayrılması ve safla tırılması için uygun bir yöntemdir.

Günümüzde YPSK, aminoasitler, peptitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve lipitleri kapsayan biyomoleküllerin birçok sınıfının analizinde kullanılan bir tekniktir ve 40 yıldan fazla zamandır kullanılmasına ra men yerini alacak çok az teknik mevcuttur [28].

#### Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde kullanılan hareketli ve sabit fazlar

Kromatografide hareketli sıvı faz olarak su dahil bütün organik çözücüler ve bu çözücülerin çe itli oranlardaki karı ımları kullanılabilir. Bu karı ımlar da dikkate alındı ında kromatografide kullanılan hareketli sıvı fazların, dolayısıyla çözücülerin sayısı çok fazladır.

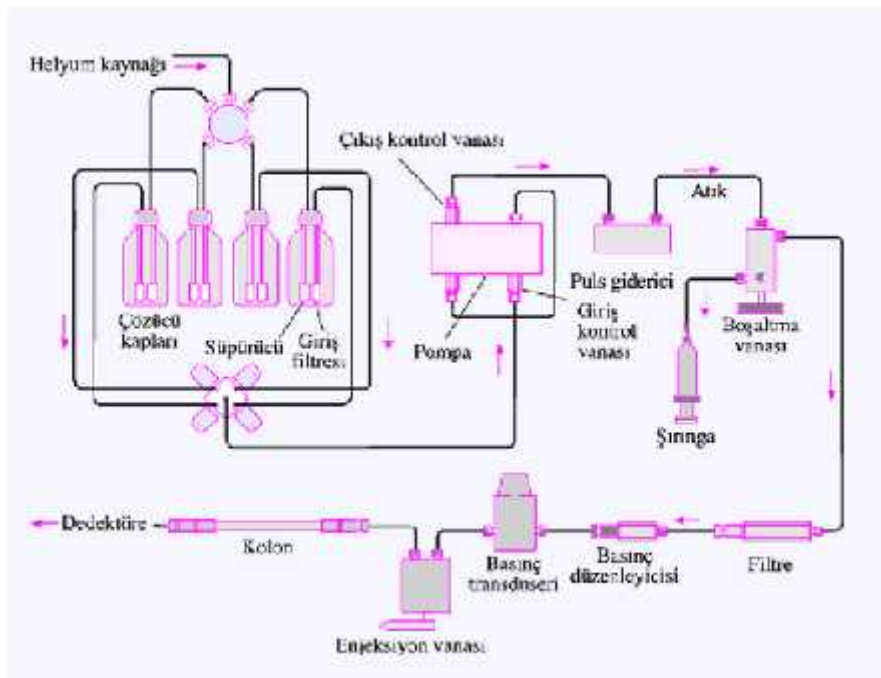
Sabit faz olarak da oldukça çe itli maddeler kullanılır. Bunlardan bazıları [26]:

- Silikajel
- Alümina
- Kömür
- Florisil
- Kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit
- Magnezyum karbonat ve magnezyum oksit
- Diatome toprakları
- Poliamitler
- Ni asta
- Toz eker
- Talk



### 1.7.1.1. YPSK Donanımı

YPSK sistemi, Şekil 1.6'da görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici birimlerinden oluşmaktadır. Analiz, çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılır. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve kaydediciye aktarılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır [29].



Şekil 1.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünümü

#### 1.7.1.1.1. Pompa

Bir YPSK sisteminde pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akmasını sağlamaktır. Bir YPSK pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

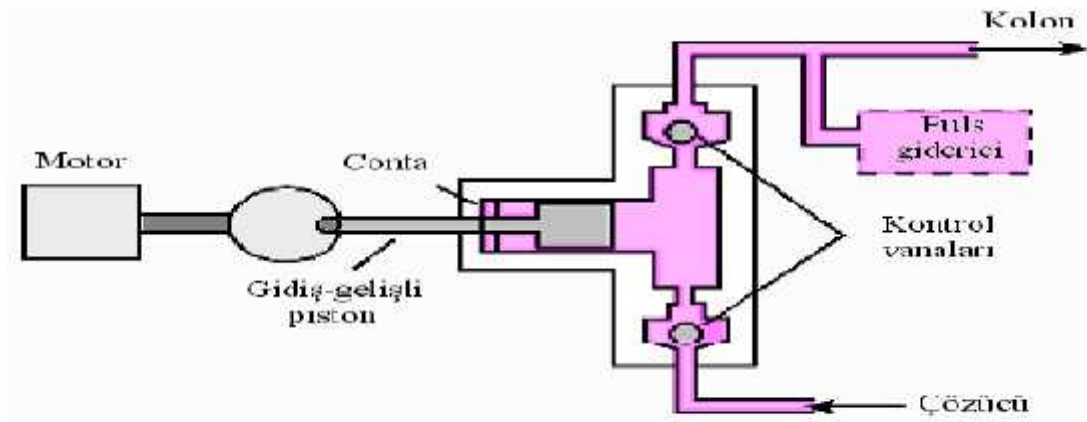
1. Üst basınç sınırının 400 atm ( 400bar 6000 lb<sub>f</sub>/in<sup>2</sup>) olması gerekmektedir,
2. Normal çalışma basıncı 100-200 atm olmalıdır,
3. "Pulsuz" veya "puls" giderici ile birlikte kullanılmalıdır,
4. Sinyal/gürültü oranı düşük olmalıdır,

5. Analitik uygulamalar için 1-10 mL/dakika aralığında akışa elverişlidir,
6. Kullanılan çözeltilere karşı eylemsiz olmalıdır,
7. Sistem ölü hacmi düşük olmalıdır,
8. Çözelti de i tirmek kolay olmalıdır,
9. Bakımı ve tamiri kolay olmalıdır,
10. Conta, halka, valf gibi kolay erişilebilir parçaların dayanıklı ve yedek parçalarının kolay bulunabilir olması gerekir.

Bir YPSK sisteminde kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Çalışma farklılıklarına bağlı olarak ise; pistonlu pompalar, ıringa pompalar ve pnömatik pompalar olmak üzere üçe ayrılırlar [30-31].

### Pistonlu pompalar

Pistonlu pompalarda, pistonun geri hareketinde giriş kontrol vanası açılır ve silindire hareketli faz dolar. Pistonun ileri hareketinde hareketli faz kolona aktarılır.



**ekil 1.7.** YPSK için pistonlu pompa

### ıringa tipi pompalar

1960 yıllarında geliştirilmiş ve yaygın kullanılan YPSK pompaları içinde en basit tasarıma sahiptir. Motor sürümlü bir piston (plunger) rezervuarda (ıringa) bulunan sıvıyı aktarır. Bu sistemin başlıca üstünlüğü çok düşük akış hızlarında bile çözücünün doğru aktarılmasıdır. En önemli sakıncası ise bu pompalarda ıringanın hacminin sınırlı olmasıdır [28].

### Pnömatik pompalar

En basit pnömatik pompalarda sıvı, sıkı tırlımı bir gaz ile basınçlandırılabilen bir kap içine yerleştirilmi , portatif bir kap içine konur. Bu tip pompalar pulssuzdur. Ancak kapasitesi düşük olup, çıkı basıncı düşüktür ve çıkı hızı çözücü viskozitesi ile kolon geri basıncına bağlıdır [27].

#### **1.7.1.1.2. Enjektör**

YPSK analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliği dir. Ayrı numune yüklenmi kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir. Temel olarak, el ile (manuel) ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır [27].

#### **1.7.1.1.3. Kolon**

Tipik YPSK kolonları 10, 15, 25 cm uzunluğunda, küçük boyutlu partikül içeren (3, 5 veya 10 µm) ve iç çapı 4, 4,6 ya da 7,8 mm olan yüksek basınca dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayanlardır. Kolonun küçük çaptaki partiküllerle doldurulması ve verimli bir şekilde çalıştırılması deneyim, beceri ve özel cihazlar gerektiren bir çalışmadır. Bu yüzden çoğu YPSK kullanıcısına hazır doldurulmuş kolonları kullanmaları önerilir [29].

#### **1.7.1.1.4. Dedektörler**

YPSK sisteminde anahtar bileşen dedektördür. Kromatografi ile ayrılan herhangi bir molekül nitel veya nicel olarak anlamlı sonuçlar almak için analiz edilir. Dedektörün işlevi numune derinliği ile orantılı elektriksel bir sinyal üretmektir ve bu sinyal derinlikteki artışla doğrusal olarak artmalıdır. Ideal bir dedektörün bant yayılmasına katkısının olmaması sıcaklıktan, etkilenmemesi, kullanılan sürükleyiciler için sinyal üretmemesi ve numunedeki tüm analitler için derinlik aralığının tamamında cevap üretmesi gereklidir. Preparatif uygulamalarda dedektör numuneye zarar vermemeli, numunenin geri kazanımına olanak sağlamalıdır [28].

Bir dedektörde bulunması gereken önemli özellikler şunlardır [27]:

- Duyarlılık,
- Geni bir dolaşım aralığı,
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- Üniversal ve akı hızından bağımsız küçük cevap zamanı,
- Doğru cevap, koulların değişiminden etkilenmeme,
- Numuneyi tahrip etmeme,
- Bant genişliğini azaltmak amacıyla, minimum iç hacim,
- Ucuzluk ve kolay kullanımı.

YPSK'da en çok kullanılan dedektör tipleri şunlardır [27-28]:

- Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared)Kırılma indisi,
- Floresans,
- Elektrokimyasal,
  - a) Amperometrik,
  - b) Kulometrik,
  - c) İletkenlik,
- Radyoaktivite,
- Işık saçılması,
- Kütle spektrometri dedektörleri.

Bu çalışmada UV/Görünür Bölge (DAD) dedektörü kullanıldığından, sadece bu dedektörden bahsedilecektir.

#### **1.7.1.1.4.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Dedektörü**

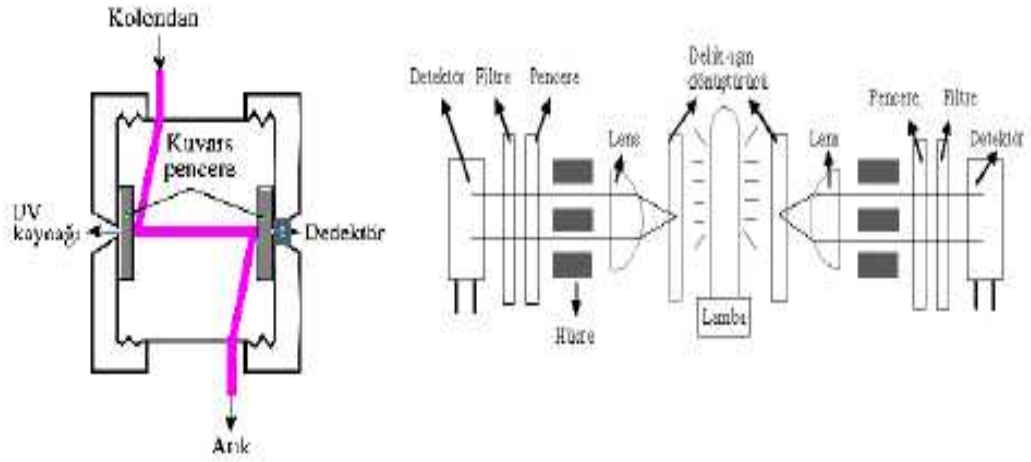
YPSK için en çok kullanılan dedektörler ultraviyole (UV) ve görünür bölge (VIS) spektrofotometrelere dayanır. Bunlar seçici dedektörler olarak sınıflandırılır çünkü sadece uygun spektral karakteristiklere sahip bileşikler saptanır. UV/VIS dedektörler Lambert-Beer yasasına uyan cevap üretir. Absorbans, geçen ışığın fraksiyonu ile orantılıdır.

$$A = bc = \log \frac{I_0}{I}$$

(1.2)

Bu e itlikte molar absorptivite veya molar ekstinksiyon katsayısı, b cm olarak hücre yol uzunlu u, c mol/litre olarak numune deri imi,  $I_0$  referans ık iddeti ve I numune ık iddetidir [28].

Hücreden geçen analit, bir miktar UV ı ınımı absorblar ve dedektör tarafından bu absorbsiyona ba lı olarak bir sinyal olu turulur Bu sinyal, analit deri imi ile orantılıdır. Tek bir dalga boyunda çalı an dedektörler kullanılabilir i gibi bir monokromatör ile çe itli dalga boylarını seçerek çalı an dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalı an dedektörlerde ık kayna ı olarak genellikle 254 nm'de ık ıma yapan Hg lambası, çe itli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır. Dalga boyunun her bir bile ene göre ayarlanabilmesi nedeni ile seçimli bir dedektör türü olan UV-görünür bölge dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV ı ınlarını absorpladı ık dalga boylarına dikkat edilmeli ve seçilen çalı ma dalga boyu çözücünün absorpsiyon yaptı ık dalga boyu de erinden yüksek olmalıdır. Bu durum özellikle dü ük dalga boylarında absorpsiyon yapan örnekler için son derece önemlidir (CH<sub>3</sub>OH 205 nm, CH<sub>3</sub>CN 190 nm, v.b.). Ayrıca elue edicinin pH de erinin UV-görünür bölge spektrumunu etkileyece i de göz önünde bulundurulmalıdır. En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyod-dizili cihazlardır. Bu cihazlar, spektrumun tamamı için gerekli olan verileri yakla ık bir saniyede toplayabilmektedir. Böylece, her bir kromatografik pik için spektral veriler, analit kolondan çıkarken toplamı saklanabilir. Türlerin te hisine ve kantitatif tayin için artların seçimine yardımcı olan bu spektrum ekli, üç boyutlu grafik olarak verilebilmektedir [27].



**ekil 1.8.** YPSK'da kullanılan bir UV dedektörü

### UV/VIS dedektörün üstünlükleri

- Yüksek duyarlılık ( $10^{-10}$ -  $10^{-11}$ ),
- Yüksek seçicilik,
- 200 nm'nin altındaki dalga boylarında universale yakın özellik göstermesi,
- Birçok YPSK çözücüsü ile düşük zemin sinyali üretmesi, bu yüzden gradient sürüklenmeye uygun olması,
- Numuneyi tahrip etmemesi,
- Kolay çalıştırılabilirliği.

### UV/VIS absorban dedektörlerinin sınırlamaları

- Analitin absorbanının UV veya görünür bölgede olması gerekliliği,
- Çözücülerin UV gözlemlenebilir bölgedeki dalga boylarında çalıştırılmaması,
- Belirli bir dalga boyunda moleküllerin absorptivitesine bağlı olarak yanıtın değişmesidir. [28].

#### **1.7.1.1.5. Kaydedici**

Mikroi lemciler ve bilgisayarların kullanıldığı sistemlerde hareketli faz akı hızı, enjektör, kolon fırını, örnek alma sistemi, dedektör ve veri kaydı sistemi merkezi bir veri kayıt cihazı ile kontrol edilmektedir. Mikroi lemciler ve bilgisayarların kullanılması kromatografik sistemde

tekrarlanabilirli i arttırmakta, sistem validasyon parametrelerinde daha do ru de erler elde edilmesine olanak sa lamaktadır [27].

### **1.7.1.2. YPSK'da Yöntem Geli tirme**

- Numune hakkında bilgiler ve ayırma amacının tanımlanması,
- Özel bir YPSK tekni i veya numune ön i emine gerek olup olmadığı,
- Dedektör ve ilgili ayarların seçimi,
- Ayırma ko ullarının optimizasyonu,
- Özel bir yöntem için problem ve ko ulların kontrolü,
- Safla tırılmı materyalin geri kazanımı,
- Nitel ayar,
- Nicel yöntem,
- Rutin uygulamalar için yöntemin validasyonu.

### **1.7.1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi**

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz sabit faza göre daha fazla polardır. En çok kullanılan, kimyasal olarak ba lanmı fonksiyonel grup ta ıyan sabit fazlardan biri ODS (18 karbon atomu zincirinden olu an oktadesilsilan)'dir. Bunun yanı sıra fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirli (C8, C2 gibi), fenil ve siyano (CN) ba lanan sabit fazlar da kullanılır.

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz bile eni olan tampon çözeltiler önemlidir. Bu çözeltileri hazırlarken suyun oldukça saf olması gerekir. Di er önemli hareketli faz bile enleri ise, suyla karı abilen organik çözücülerdir. Hareketli fazlarda kullanılan organik çözücüler ile polariteleri ve elütropik dizili leri Çizelge 1.4'de verilmi tir.

Ters-faz sıvı kromatografisinde genellikle apolar maddelerin ayrımı gerçekte tirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C18) daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C8, C2) ise polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Buna göre polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddeler de kısa zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar [31-34].

**Çizelge 1.4.** Çözücülerin fiziksel özellikleri

Çözücü	RI	GB (nm) Cut- off	Viskozite (cP)	KN (°C)		P'
n-Pentan	1,358	210	0,23	36,0	7,1	0,0
n-Hegzan	1,375	210	-	68,7	7,3	0,0
n-Heptan	1,388	210	0,41	98,4	7,4	0,0
Siklohegzan	1,427	210	1,00	81,0	8,2	0,0
zopropil eter	1,368	220	0,37	69,0	7,0	2,2
2-kloropropan	1,378	225	0,33	34,8	-	-
Toluen	1,496	285	0,59	110,6	8,9	2,3
1-kloropropan	1,389	225	0,35	46,6	8,3	-
Klorobenzen	1,525	280	0,80	132,0	9,6	2,7
Benzen	1,501	280	0,65	80,1	9,2	3,0
Bromoetan	1,424	225	0,41	38,4	8,8	3,1
Etil eter	1,353	220	0,23	34,6	7,4	2,9
Kloroform	1,443	245	0,57	61,2	9,1	4,4
Diklorometan	1,424	245	0,44	41,0	9,6	3,4
Tetrahidrofuran	1,408	222	0,55	65,0	9,1	4,2
Metil etil keton	1,381	330	0,43	79,6	-	4,5
Aseton	1,359	330	0,32	56,2	9,4	5,4
Dioksan	1,422	220	1,54	104,0	9,8	4,8
Etil asetat	1,370	260	0,45	77,1	-	4,3
Metil asetat	1,362	260	0,37	57,1	9,2	-
Dimetil sülfoksit	1,478	270	2,24	190,0	12,8	6,5
Anilin	1,586	325	4,40	184,0	-	6,2
Nitrometan	1,394	380	0,67	100,8	11,0	6,8
Asetonitril	1,344	210	0,37	80,1	11,8	6,2
Propan-2-ol	1,380	210	2,30	82,4	10,2	4,3
Etanol	1,361	210	1,20	78,5	11,2	5,2
Metanol	1,329	210	0,60	65,0	12,9	6,6
Etilen glikol	1,427	210	1,90	198,0	14,7	5,4
Asetik asit	1,372	251	1,26	118,5	12,4	6,2
Su	1,333	<190	1,00	100	23,3	9,0



RI	: Kırılma indeksi
CB cut-off	: Görünür bölge, bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz
Viskozite	: Viskozite
KN	: Kaynama noktası
	: Hildebrand çözünürlük parametresi
P'	: Polarite indeksi, Rohrschneider's verileriyle hesaplanan

### 1.7.2. Sıvı Kromatografik Analizler için Saptanması Gereken Validasyon Parametreleri

1. Sistem uygunluk testi parametrelerinin tayini
2. Doğruluk
3. Keskinlik
  - Tekrarlanabilirlik (enjeksiyonlar arası)
  - Orta keskinlik
  - Tekrar edilebilirlik
4. Seçicilik
5. Tespit sınırı (LOD)
6. Tayin alt sınırı (LOQ)
7. Doğrusallık
8. Aralık
9. Duyarlılık
10. Samsamlilik
11. Tutarlılık
12. Kararlılık

#### Sistem uygunluk testi parametrelerinin tayini

Cihazın validasyonu ve geliştirilen analitik yöntemin diğer validasyon parametrelerinin hesaplanmasından önce en başta yapılabulması gereken diğerlerdir.

### Do ruluk

Analizler sonucu elde edilen değerlerin do ru veya gerçek de ere yakınlı ının ölçüsü do ruluk olarak tanımlanır. Do ruluk herhangi bir sistemik hata veya geli tirilen yöntemle elde edilen değerlerin do ru de erden sapmaları hakkında fikir verir. Do ruluk, numunenin hazırlanma ının etkisini ölçer. Geri kazanımın hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon e itli inin, esas analizde do rusallık olarak verilen e itlikle aynı olması gereklidir. Ortama ilave edilen analitin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildi ini gösterir.

### Kesinlik

Analiz için geli tirilen sıvı kromatografik yöntemin gerçek çalı ma ko ullarındaki tekrarlanabilirli inin ölçüsüdür. Analizi yapılan ilaç etken maddesinin geli tirilen sıvı kromatografik yöntemle elde edilen sonuçlarının birbirine yakınlı ının ölçüsüdür. Sonuçlar %BSS veya %VK (validasyon katsayısı) olarak ifade edilirler.

Ölçüm yapılan her bir deri im düzeyi için en az 5-6 tayin yapılmalıdır. Elde edilen sonuçların en az 5 tanesinin sonucunun %BSS'sı teorik de erin %15'inden daha fazla sapmamalıdır. Kesinlik üç kısımda hesaplanır.

*Tekrarlanabilirlik (enjeksiyon arası) :* Kısa zaman dilimindeki aynı i lem ko ulları altındaki (aynı anda hazırlanma çözeltili, hareketli faz, kolon artları vb.) kesinli i ifade eder.

*Orta kesinlik:* Aynı günde, farklı çözeltiler hazırlanıp analiz edilerek saptanan bir kesinlik derecesidir.

*Tekrar edilebilirlik:* Geli tirilen sıvı kromatografik yöntemin farklı artlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinli ini belirtir.

### Seçicilik

Sıvı kromatografik bir yöntemin seçicili i, analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle giri im yapabilecek di er bile enlerin yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir. Seçicili i olmadı ı veya yeterli olmadı ı bir kromatografik analiz yönteminin di er performans parametreleri de anlamsızdır.

### Te his sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirdiği ama miktar tayini sınırları içerisinde girmeyen en alt derimidir. Birkaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$$LOD = \frac{3.3 \times t}{m} \quad (1.3)$$

### Tayin alt sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturduğu derimidir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$$LOQ = \frac{10 \times t}{m} \quad (1.4)$$

### Do rusallık

Derime karşı analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değişmesi ve çizilen grafikte cevabın düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon (r) ve tayin (r<sup>2</sup>) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Değişik derimdeki analitin kromatogramlarından elde edilen cevap değerlerine karşı derim miktarları regresyon analizi ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık analit cevap değerleri çizilen doğru üzerinde ne kadar yer alıyorsa ve r veya r<sup>2</sup> değerleri 1'e ne kadar yakınsa sağlanmıştır demektir.

### Aralık

Aralık yeterli doğruluk ve duyarlılıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derim aralığıdır.

### Duyarlılık

Duyarlılık, do rusallı ın geçerli oldu u aralıktaki do ru denkleminin e imidir.

### Sa lamlık

Geli tirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak de i imlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler, hareketli faz kompozisyonunda bulunabilen organik çözücünün yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık vb. etkenlerdir.

### Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım ko ulları altında tekrar edilebilirli inin bir ölçüsüdür. Bunun için geli tirilen bir çalı manın, aynı laboratuvarda farklı analizciler tarafından, farklı laboratuvarda benzer cihazlarda, reaktif ve çözücülerin markaları de i tirilerek, farklı günlerde, farklı sıcaklıklarda yapılması gibi normal test parametrelerinin de i tirilmesi, YPSK yönteminde kolon de i imi ile deneylerin tekrarlanması sonucunda saptanır.

### Kararlılık

Kararlılık, Amerikan Farmakopesi tarafından yapılması zorunlu bir validasyon parametresi olarak tanımlanmakla birlikte, tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için tavsiye edilen bir validasyon basama ıdır. Kararlılıklarını belirli bir süre koruyabilen numune, standart madde ve çözücülerle tekrarlanabilen, do ru ve kesin sonuçlar elde edilir. Kararlılık çalı ması için ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa (1 gün, 1 hafta, 1 ay, 1 yıl) o kadar süre içerisinde gerçekte tirilmelidir [28].

## 1.8. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS)

Kütle spektroskopisi tekni i 1950'li yıllardan beri kullanılan bir tekniktir. İyon, elektriksel alan ve vakum olarak özetlenebilecek üç ana esas üzerinde çalışır. Tekni in temeli gaz fazında, üzerinde elektriksel yük taşıyan bileşenlerin vakumlanmış bölgede uygulanan elektriksel veya manyetik alanda uçurulmasına dayanır. Bileşenler kütle/yük oranlarına göre elektriksel alanda uçma farklılıkları göstermekte ve bu farktan yararlanılarak birbirlerinden ayrılabilir. Birbirinden ayrılan iyonlar uygulanan elektriksel veya manyetik alan ile yönlendirilip bir yüzeye çarptırılarak elektrik sinyali oluştururlar. Böylece iyonik bileşenler hem birbirinden ayrılma hem de miktarlarıyla doğru orantılı olarak sinyale çevrilmiş olurlar [28].

LC-MS birçok amaç için kullanılan yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip güçlü bir tekniktir. Genellikle belli bir karışım içerisinde bilhassa uçucu olmayan karmaşık organik ve biyokimyasal karışımlardaki kimyasal maddenin miktarını belirlemek için kullanılır [35].

Bir kütle spektrometresi ile ikinci bir kütle spektrometresi birbirine bağlanarak birlikte kullanılabilir (MS/MS). Bu yöntemde birinci kütle spektrometresinde yumuşak iyonlaştırma yoluyla belli bir maddenin molekül iyonu bol miktarda üretilir ve ikinci kütle spektrometresinde bu molekül iyonunun parçalanma ürünleri daha duyarlı bir biçimde saptanır. Ayrıca, iki kütle spektrometresini ardarda bağlamakla birinci spektrometreyi belli bir (m/e) değerine ayarlayarak örnekte bulunan maddeleri birbirinden hızlı bir şekilde ayırmak ve ikinci spektrometre ile de ayrılan bu iyonu veya parçalanma ürünlerini izlemek mümkün olur. Böylece, LC-MS yöntemlerinde kullanılan kromatografi aletlerinde olduğu gibi, örnekteki bileşenlerin kromatografi kolonundan çıkışını belli bir süre beklemek gerekmez [36].



**ekil 1.9** Agilent marka bir LC-MS/MS cihazı

LC-MS sistemlerinde atmosferik basınçta bile enleri sıvı fazdan gaz fazına geçiren ve bir yandan da iyonla tıran birtakım teknikler uygulanmaktadır. API odacıkları kullanılan iyonla tırma tekniğine göre elektrosprey iyonla tırma (ESI), atmosferik basınçta kimyasal iyonla tırma (APCI) ve atmosferik basınçta foto iyonla tırma (APPI) olarak çeşitlenmektedir. ESI yönteminde MS'ten çıkan maddeleri taşıyan hareketli faz elektriksel bir alanda azot gazı yardımıyla spreylenmektedir. Sprey aamasında sıvı hareketli faz damlacıklara dönüşmekte ve bu damlacıklar giderek küçülerek içerisindeki iyonlar Coulomb patlamasıyla sıvı fazdan kurtulup uygulanan elektrik alanı yardımıyla kütle ayrıtıcıya doğru hızlandırılmaktadır. Kütle ayırıcısına gelmeden iyonun etrafındaki olası çözücüyu uçurmak için çözücü uçurma (desolvatizasyon) ünitesi bulunur. Bu bölümde iyonlara karıdan sıcak azot verilir ve çözücünün tamamen buharlaarak iyonun tamamen gaz fazına geçmesi sağlanır.

APCI yönteminde MS'den çıkan hareketli faz püskürtme aamasında 120°C'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. Gaz fazına dönüşen hareketli faz elektrik yüklü bir iyonla taşıyıcıya doğru püskürtülür. Gaz fazındaki hareketli faz iyonları ya da püskürtücü gazın oluşturduğu iyonlar ile hareketli fazın taşıdığı maddeler arasında proton aktarımı ya da

birbirlerine eklenme yolu ile iyonla tırma gerçekleştirilir. Akabinde oluşan iyon, kütle analizörüne girmeden desolvatizasyon ünitesine geçer.

APPI yönteminde APCI yönteminde olduğu gibi MS'den çıkan hareketli faz püskürtme aamasında 120°C'ye ısıtılır ve sıvı hareketli fazın gaz fazına dönüşmesi sağlanır. APPI yönteminde APCI'daki yüklü iyon yerine UV radyasyonu yayan bir UV lambası kullanılır [28].

### LC-MS sisteminde kullanılan hareketli fazlar

LC-MS sisteminde iyonla tırma püskürtme yöntemiyle yapıldığından hareketli fazın akı hızı püskürtme sırasında oluşan damlacık büyüklüğüne, dolayısıyla analizöre giren iyon miktarını da etkilemektedir. Bu nedenle bilinen YPSK analizlerinde kullanılan akı hızlarından daha düşük akı hızları (0,1-0,2 mL/dakika) tercih edilmektedir. Yavaş akı hızı, iyonla tırma odacığındaki püskürtmenin verimini arttırmaktadır.

Kullanılan hareketli faz bakımından da konvaksiyonel YPSK çözümlerinden farklılık göstermektedir. LC-MS çözümlerinde kullanılan hareketli faz içeriklerinde uçucu olmayan bileşenler kullanılmamalıdır [28].

LC-MS çözümlerinde iyonla tırma odacığında bileşenlerin iyonlaşmasını sağlamak için hareketli faza uçucu özellikteki H<sup>+</sup> ya da OH<sup>-</sup> kaynakları eklenmelidir. Genellikle asetik asit, formik asit ve amonyak çözeltileri bu amaçla kullanılır [37].

### **1.8.1. Yonizasyon Bölümü**

Bir molekül, atom veya iyonun bir elektron uzaklaşması olayına iyonizasyon denir. İyonla tırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısıl kararlılığına bağlı olarak seçilir [38].

### **1.8.2. Kütle Analizörleri**

Kütle analizörleri bileşenlerin gaz fazında uçurularak m/z oranlarına göre birbirlerinden ayrıldığı bölümdür. LC-MS sistemlerinde sıklıkla kullanılan kütle analizörleri dört çubuklu (quadropole), iyon tuzağı ve uçucu zamanlı kütle analizörleri ile seri bağlanmış quadropole kütle analizörlerinden oluşan tandem-üçlü quadropole analizörleridir [39].

### 1.8.3. Dedektörler

Kütle analizörlerinde ayrılma iyonların çarparak elektriksel sinyal ürettikleri kısımdır. Genel olarak üç farklı tip dedektör kullanılır. Birincisi elektron çö altıdır. Bu tip dedektörlerde iyonlar bir dinota çarparak elektron koparılır, kopan elektron boynuz ekindeki çö altıcıya girerek elektrik sinyali oluşur.

İkinci tip dedektör, dinotlu foto çö altıcıdır. Bu dedektörde iyonlar dinota çarparak bir elektron koparılır. Kopan elektron bir fosfor kaynağına çarparak foton emisyonu yaratır ve foton katoda ulaşır. Ardından da bir çö altıcı tarafından elektrik sinyaline çevrilir. Bu tip dedektörler elektron çö altıcı dedektörden daha uzun ömürlüdür.

Üçüncü tip dedektör ise mikro kanallı yüzeydir. Bu dedektörler çok hızlı sinyal üretirler. Duyarlılıkları diğer dedektörlerden üstündür [28].

## 1.9. Literatür Taramaları

### 1.9.1. Lamivudin ile yapılan çalışmalar

Bedse ve arkadaşları (2009), lamivudinün bozunma ürünlerini ICH Klavuz Q1A(R<sub>2</sub>)'ye uygun olarak (asidik, bazik-nötr ortamlarda, oksidatif, fotolitik ve termal stres koşullarında) tayin etmişlerdir. Yapılan deney sonuçları sonucu, maddenin nötr ortamda, ılık ve termal stres altında kararlı olduğu fakat, asit, oksidatif ve alkali ortamlarında ise bozunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca özellikle oksidatif ortamda ilacın bozunma yüzdesinin oldukça fazla olduğu belirtilmiştir. Sıvı kromatografik deneyler sonucu, 5 bozunma ürünü tespit edilmiş ve bu ürünlerinin belirlenmesinde LC-MS/TOF yöntemi kullanılmıştır [40].

Balasekarreddy ve arkadaşları (2010), lamivudin ve stavudinin eş zamanlı tayini için basit, hızlı, hassas ve doğru izokratik ters faz kararlılığı gösteren RP-HPLC metodu geliştirmişlerdir. Ayırmada YMC Pack C8 (150mm × 4,6mm, 5µ) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak 90:10 (v/v) su-metanol ve tampon çözelti olarak amonyum asetat (pH 3,5) kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dakikadır. Bu koşulda alıkonma süreleri, lamivudin için 3,087 ve stavudin için ise 6,09 olarak bulunmuştur. Çalışma dalga boyu olarak 265 nm seçilmiştir. Kalibrasyon grafiği lamivudine için 20-220µg/mL (r=0,99997), stavudine için ise 5-50µg/mL (r=0,99989) aralığında çizilmiştir [49]. Geliştirilen yöntem farmasötik dozaj formlarına uygulanmıştır. İkinci amaçta ilaçlar, asit, baz, peroksit, termal, fotolitik ve nem stres



testlerine tabi tutulmu tur. Yüzdesel olarak hesaplamalar sonucu, en fazla bozunma asidik ortamda, en az ise peroksit ortamında bozunma gözlenmi tir [41].

Krishnareddy ve arkadaşları (2011), lamivudinin tabletlerde analizi için basit, hızlı ve hassas ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geli tirmi lerdir. Kolon olarak C18 (250mm × 4,6mm, 5µm) kullanılmı tir. %0,1 orto fosforik asit, asetonitril ve metanol 20:45:35 (v/v/v) içeren mobil faz kullanılmı tir. Akı hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmı ve UV dedektör ile 271 nm'de ölçüm gerçekleştirilmi tir. Bu ko ullarda analiz süresi 6 dakikadır. Kalibrasyon do rusu 0,1mg/mL-0,5mg/mL aralı nda çizilmi tir ve tespit limiti 20ng bulunmu tur. Geri kazanma standart ilave metodu ile %91,3 olarak hesaplanmı tir [42].

Kumar ve arkadaşları (2013), zidovudin, lamivudin, ve nevirapinenin insan plazmasından e zamanlı tayini için LC-MS/MS yöntemi geli tirmi lerdir. Mobil faz olarak %0,1 formik asit (suda) ve metanol karı ımı (15:85, v/v) kullanılmı tir. Konsantrasyon aralı ı zidovudin ve lamivudin için 5-1500ng/mL, nevirapinen için 10-3000ng/mL olarak belirlenmi tir. Numune hazırlık a masında katı faz ekstraksiyonu kullanılmı tir [43].

### **1.9.2. Valgansiklovir ile yapılan çalı malar**

Sawant ve arkadaşları (2014), valgansiklovirin bozunma ürünlerini LC/MSMS yöntemi ile tayin etmi lerdir. Çalı mada Hypersil Gold C-18 (4,6×250mm, 5µm) kolon kullanılmı tir. Mobil faz 95:5 (v/v) oranınd potasyum dihidrojen orto fosfat tamponu (pH 5):asetonitrildir. Akı hızı 0,6mL/dakika ve çalı ma dalga boyu 252nm olarak belirlenmi tir. Yöntem ilaç formülasyonuna uygulanmı tir. Bozunma ürünlerinin tayini için ilaç asidik, bazik-nötr, oksidatif, fotolitik ve termal strese tabi tutulmu tur. İlacın sadece asidik ve foto asidik ko ullar altında bozunma göstermi tir. Asidik stres bozunma ürünü LC-MS/MS ile karakterize edilip mekanizma önerilmi tir. [44].

Annapuma ve arkadaşları (2013), tablet dozaj formlarında valgansiklovir belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geli tirmi lerdir. C18 (250mm×4,6mm, 5µm) kolon kullanılarak, 0,8 mL/dakika akı hızında çalı ılmı tir. Dalga boyu 254nm'dir. Do rusallık 1,0-200µg/mL konsantrasyon aralı nda, regresyon denklemi  $y=50968x+86374$  ve korelasyon katsayısı 0,999 bulunmu tur. Geli tirilen yöntem farmasötik dozaj formlarına

uygulanmı tır. Daha sonra valgansiklovir asidik, bazik, oksidatif, fotolitik ve termal bozunmalar maruz bırakılmı tır [45].

Do an ve arkada ları (2007), tablet ve insan serum numunelerinde valgansiklovir analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geli tirmi lerdir. Analizde fluvastatin iç standart olarak seçilmi tir. Hareketli faz asetonitril:metanol:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0,02M)(40:20:40; v/v/v)(pH5) olarak belirlenmi tir. Akı hızı 1,0mL/dakikadır ve dalga boyu 255nm'dir. Alıkonma süresi valgansiklovir ve fluvastatin için sırasıyla 3,41 ve 5,60 dakika olarak bulunmu tur. Kalibrasyon grafi i ( $r^2 > 0,99$ ), mobil faz ve serumda 10-30,000ng/mL aralı nda çizilmi tir. Geli tirilen yöntem valide edilmi tir. Tespit ve tayin sınırı sırasıyla mobil fazda 2,95 ve 9,82ng/mL, insan serumunda 1,73 ve 5,77ng/mL olarak bulunmu tur [46].

Rao ve arkada ları (2012), tabletlerde valgansiklovir belirlenmesi için bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geli tirmi lerdir. Symmetry C18 (4,6 × 150mm, 5µm) kolon kullanılmı tır. zokratik metotla çalı ılmı tır ve mobil faz 60:40 (v/v), asetonitril: 0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-fosforik asit (pH 4,0) tir. Akı hızı dakikada 0,8mL/dakika ve çalı ma dalga boyu 254nm'dir. Alıkonma süresi 2,6 dakika olarak bulunmu tur. Kalibrasyon do rusu 0,01-60 µg/mL aralı nda çizilmi tir. Geri kazanım %98,64-%100,91 bulunmu tur. Önerilen yöntem farmasötik dozaj formlarına uygulanmı tır [47].

Kumar ve arkada ları (2012), valgansiklovirin analizi için ters faz sıvı kromatografik yöntem geli tirmi lerdir. Ayırma Zorbax SB C18 kolon kullanılarak yapılmı tır. Optimum ko ulların tespiti için merkezi kompozit tasarıma uygulanmı tır. Gradient elüsyonda, %0,1 trifloro asetik asit ve metanol vardır [48].

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Genel Bilgi

Bu bölümde lamivudin ve valgansiklovirin intestinal permeabilitelerinin ve bozunma ürünlerinin tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çizelge 2.1'de çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan cihazlar ve gereçler

Adı	Kullanım Amacı	Açıklama
YPSK Cihazı	intestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmaktadır.	Agilent Technologies 1260 Infinity
YPSK Kolonu	intestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmaktadır.	X Terra RP18 Column (4,6 × 250mm, 5µm)
YPSK Dedektör	intestinal permeabilite ölçümlerinde kullanılmaktadır.	1260 MWD VL
Ultrasonik Banyo	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmaktadır.	P Selecta Ultrasons H-D
Hassas Terazî	Katı maddelerin ölçümünde kullanılmaktadır.	Mettler Toledo
pH Metre ve elektrot	Mobil fazın pH'sının ayarlanmasında kullanılmaktadır.	Mettler Toledo

<b>Adı</b>	<b>Kullanım Amacı</b>	<b>Açıklama</b>
Saf su cihazı	Kullanılacak saf suyun temini için kullanılmı tır.	Millipore Direct-Q 3UV (0,22µm)
Derin Dondurucu	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Ishin Lab. Co. Ltd.
Membran Filtre (0,45µm)	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Alltech Ass. Inc.
Ultrasonik Banyo	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Bandelin
pH Metre	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Hanna Ins.
Peristaltik Pompa	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Gilson
Tubingler	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Gilson
LC-MS/MS Cihazı	Bozunma ürünleri tayininde kullanılmı tır.	Agilent 6460 Triple Quad.
LC-MS/MS Kolonu	Bozunma ürünleri tayininde kullanılmı tır.	ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Dolution HD (2,1 × 50mm, 1,8µ)

### 2.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu çalı mada kullanılan bile ikler Çizelge 2.2 'de verilmi tır.

### Çizelge 2.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri

Bileşik özellikleri	Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu
Lamivudine (Sigma)	UV@ 270 nm
Valgancyclovir (Sigma)	UV@ 254 nm
Metoprolol Tartarat(Merck)	UV@ 226 nm
Fenol Kırmızısı (Merck)	UV@ 226 nm

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri Çizelge 2.3'de belirtilmiştir.

### Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum hidroksit	Hareketli faz pH'sının ayarlanmasında kullanılmıdır.	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam, hareketli faz.	Merck, HPLC saflığında
Orto fosforik asit	Hareketli faz pH'sının ayarlanmasında kullanılmıdır.	Merck, analitik saflıkta
Metanol	Standart çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıdır.	Merck, HPLC saflığında
Sodyum klorür	Baırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıdır.	Sigma, Analitik Saflıkta
Potasyum klorür	Baırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıdır.	Sigma, Analitik Saflıkta
Sodyum sülfat	Baırsak perfüzyonu çalışmalarında kullanılmıdır.	Sigma, Analitik Saflıkta

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum bikarbonat	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Sigma, Analitik Saflıkta
Mannitol	Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılmı tır.	Sigma, Analitik Saflıkta
Formik asit	LC-MS/MS çalı malarında	Merck, Analitik Saflıkta

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler

Çalı ılan bile iklerden lamivudin 0,0050 g, 50 mL metanolde çözümlenerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmı ve +4°C'de muhafaza edilmi lerdir. Valgansiklovir ise aynı miktarda suda çözümlenerek hazırlanmı tır. Her bir stok çözeltiden istenilen deri imde hareketli faz ile seyreltmeler yapılmı ve hazırlanan çalı ma çözeltilerinden 10 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmi tır.

#### Potasyum Hidrojen Ftalat Çözeltisi

$C_6H_4(COOK)(COOH)$ , primer standart pH referans çözeltisi olarak kullanılmı tır. 2 saat 110°C'de kurutulmu tur. 0,05 molal deri imde hazırlanmı ve çalı ılan ortamlara özgü pH referans de erleri kullanılmı tır.

#### Fosfat Tamponu

20 mM  $NaH_2PO_4$  çözeltisi suda hazırlanarak istenilen pH de erine  $H_3PO_4$  ile ayarlanmı tır. Çalı malarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmı lardır.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1 İntestinal Permeabilite Çalışmaları

YPSK sistemine bileşikler enjekte edilmeden önce kanallarda bulunan havanın giderilmesi ve kolonun artlanması için hazırlanan hareketli faz yaklaşık 30 dakika kanallardan geçirilir ve böylece kolon artlanır, sistem basıncı uygun hale gelir.

Lamivudin ve valgansiklovirin intestinal permeabilite tayin deneyleri için optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla ilk amaçta izokratik yöntem denenmiştir fakat uygun ayırma sonuçları elde edilememiştir. Bu nedenle ilaç, fenol kırmızısı ve metoprolülün ayırımında gradient metod kullanılmıştır. Uygulanan gradient programlar Çizelge 2.4'de ve Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Pompa A'da 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren saf su (pH 5), pompa B'de ise asetonyitril vardır.

**Çizelge 2.4.** Lamivudin için uygulanan gradient program (30°C)

Dakika	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0	%90	%10
6	%70	%30
8	%60	%40
15	%60	%40

Pompa A'da 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren saf su (pH 3), pompa B'de ise asetonyitril vardır.

**Çizelge 2.5.** Valgansiklovir için uygulanan gradient program(25°C)

Dakika	Mobil Faz A	Mobil Faz B
0	%98	%2
0,5	%80	%20
5	%70	%30
6,5	%60	%40

Lamivudin ve valgansiklovir için belirlenen kromatografik ko ulla rda intestinal permeabilite deneyleri için kalibrasyonları çizilmi ve sıçanlardan elde edilen numunelerin analizi yapılmı tır.

Tüm perfüzyon deneylerinde in situ ba ırsak perfüzyon tekni i kullanılmı tır.

Perfüzyon deneylerinde 200-250g a ırlı ındaki Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmı tır. Yapılan çalı malar nönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınan izinle gerçekleştirilmi tir.

Deneyden bir gece önce içme suları kısıtlanmadan aç bırakılan hayvanların deney süresince vücut sıcaklı ı 37°C'de sabit tutulmu tur. Anestezi ketamin (90 mg/kg) ve ksilazinin (5 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu yoluyla sa lanılmı tır. Anestezi altında karın duvarı kesilerek ileum çıkarılmı tır. Perfüze edilecek segment uzunlukları ileum için 4.0-10.0 cm olarak ayarlanarak izole edilen ba ırsak segmentlerinin proksimal ve distal uçlarına silikon tüpler yerle tirilip cerrahi iplikle sabitlenmi tir. zole segment serum fizyolojik (37°C) ile yıkanarak temizlenmi ve temizlenme göstergesi olarak çözeltinin berrak gelmesi esas alınılmı tır. Peristaltik pompa aracılı ıyla akı hızı 0,2 mL/dakika olacak ekilde ayarlanılmı ve deney süresinde perfüzyon yapılmı tır. Perfüze edilen segmentin kurummasını önlemek için üzerleri parafilm ile kapatılmı tır. Deney sonunda hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülmü tür ve her deney sonunda perfüze edilen ba ırsak segmenti çıkarılarak uzunluklar tekrar ölçülmü tür.

Tüm perfüzyon çalı malarında perfüzyon ortamı olarak Golytely (Çizelge 2.6) olarak adlandırılan izo-ozmotik çözelti kullanılmı tır. Taze olarak hazırlanan perfüzyon çözeltisine test maddeleri (lamivudin, valgansiklovir) ilavesinin ardından gerekli hacme tamamlama yapılarak iyice karı tırılmı tır. Perfüzyon çözeltisine eklenen madde konsantrasyonlarına literatürdeki verilerden yararlanılarak karar verilmi tir (lamivudin: 1200 mg/mL, valgansiklovir: 1800 mg/mL). Ba ırsak permeabilitesi oldukça yüksek olan metoprolol tartarat referans madde olarak 400 mg/mL konsantrasyonda, su dengesine ula ılıp ula ılmadı ını tayin etmek amacıyla referans madde olarak fenol kırmızısı 250 mg/mL konsantrasyonda perfüzyon çözeltisine eklenmi tir.



**Çizelge 2.6.** Ba ırsak perfüzyonu çalı malarında kullanılan perfüzyon çözeltilisinin bile imi

Madde	Konsantrasyon (mmol/L)
NaCl	25
KCl	10
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40
NaHCO <sub>3</sub>	20
Mannitol	80

Lamivudin ba ırsaklardan absorpsiyonunun incelenmesi için izole segment serum fizyolojikle yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltilisiyle dengeye ula ana kadar (yakla ık 30 dakika) perfüze edilmi tir. Perfüze edilen ba ırsak segmentleri dengeye ula tıktan sonra yapılan çalı malar a a ıda belirtildi i ekilde gerçeikle tirlmi tir.

**Grup 1:** Uygun konsantrasyonda lamivudin perfüzyon çözeltilisine eklenerek ba ırsak segmenti (ileum) 60 dakika süreyle perfüze edilmi ve her 10 dakikada bir örnek toplanmı tir.

Valgansiklovirin ba ırsaklardan absorpsiyonunun incelenmesi için izole segment serum fizyolojikle yıkandıktan sonra perfüzyon çözeltilisiyle dengeye ula ana kadar (yakla ık 30 dakika) perfüze edilmi tir. Perfüze edilen ba ırsak segmentleri dengeye ula tıktan sonra yapılan çalı malar a a ıda belirtildi i ekilde gerçeikle tirlmi tir.

**Grup 2:** Uygun konsantrasyonda valgansiklovir perfüzyon çözeltilisine eklenerek ba ırsak segmenti (ileum) 60 dakika süreyle perfüze edilmi ve her 10 dakikada bir örnek toplanmı tir.

Veri analizi için, ba ırsak perfüzyonu çalı malarında zamanın fonksiyonu olarak toplanan örneklerdeki madde miktarları hazırlanan standart do ru denklemleri kullanılarak konsantrasyon olarak ifade edilmi tir. Tayin edilen konsantrasyon de erleri rezervuardaki madde konsantrasyonuna oranlanarak normalize edilmi tir. Normalize edilen bu konsantrasyon de erleri zamana kar ı grafiklenerek ba ırsak segmentinin (ileum) lümeninden zamanın fonksiyonu olarak absorpsiyonu gösteren konsantrasyon zaman profilleri elde edilmi tir.

Test maddeleri (lamuvidin ve valgansiklovir) ve metoprolol tartaratin permeabilite de erleri ( $P_{eff}$ ) hesaplanmasında a a ıdaki e itlik kullanılmı tır [49].

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

- Q : Akı hızı (mL/s)  
 $C_{out}$  : Segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu  
 $C_{in}$  : Segmente giren perfüzyon çözeltisindeki ilaç konsantrasyonu  
R : Perfüze edilen ba ırsak segmentinin yarıçapı (cm)  
L : Perfüze edilen ba ırsak segmentinin uzunlu u (cm)

Segmentlerin ortalama yarıçapları jejunum ve ileum için 0,18 cm, kolon için 0,2 cm olarak kabul edilmi tir [50].

Formülde verilen  $(C_{out}/C_{in})^t$  oranı  $(C_{out}/C_{in}$  düzeltilmi ) a a ıda verilen denklem ile hesaplanmı tır:

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

Segmente giren ve segmentten çıkan perfüzyon çözeltisindeki fenol kırmızısı konsantrasyon de erleri kullanılarak (net water flux (NWF)) net su akı ı de eri hesaplanmı tır [51]:

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

Yapılan hesaplamalar sonucunda net su akı ı de erinin negatif çıkması mukozal bölgeden (lümen) serozal bölgeye (kan) sıvı kaybı oldu unu ifade etmektedir. Bu de erin pozitif

çıkması ise mukozal bölgeye sıvı giri i oldu unu ifade etmektedir. Yapılan deneyler sonucunda hesaplanan net su akı ı de erleri bu do rultuda de erlendirilmi tir.

Elde edilen bütün veriler ortalama (Ortalama)  $\pm$  standart sapma (SS) olarak tablolanmı tir. Konsantrasyon-zaman profillerinin kar ıla tırılmasında yapılan istatistiksel analizlerde güven aralı ı en az % 95 olarak seçilmi tir. Grup içi verilerin istatistiksel kar ıla tırılmasında non-parametrik bir test olan e le tirilmi t-testi kullanılmı tir. Analizler GraphPad Prism 5.01 for Windows programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekte tirilmi tir. Gruplar arasındaki farkın önemlili i elde edilen p de erinin yanılma düzeyinden büyük ( $p >$  ; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ( $p <$  ; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre de erlendirilmi tir. Analitik yöntem için ise validasyon ölçütlerinin varyasyon katsayısı (VK) de erleri hesaplanmı tir.

## **2.2.2. Bozunma Çalı maları**

### **2.2.2.1. LC-MS/MS Yönteminin Optimizasyonu**

Kullanılan cihaza ait optimize edilmi analiz ko ulları a a ıda verilmi tir.

Enjeksiyon hacmi : 1  $\mu$ L

Akı hızı : 0,5 mL/dakika

Süre : 2 dakika

Lamivudinin bozunma ürünleri tayin deneyleri için optimum LC-MS/MS ko ulları saptanmı tir. Bu amaçla izokratik yöntem denenmi , sıcaklık 30 °C, akı hızı 0,5 mL/dakika olarak ayarlanmı tir. Hareketli faz olarak ACN-su karı ımı kullanılmı ve bu çözeltiye 1/1000 oranında formik asit eklenmi tir.

Öncelikle mobil faz olarak %5 ACN-su çözeltisi denenmi tir fakat lamivudin kolondan çok kısa sürede elue oldu u için %2 ACN-su çözeltisinde çalı malar yapılmı tir.

Lamivudinin bozunma ürünlerinin tayini için madde; asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik ortamlarda stres testlerine tabi tutulmu tir.

Valgansiklovirin bozunma ürünleri tayin deneyleri için optimum LC-MS/MS ko ulları saptanmı tir. Bu amaçla izokratik yöntem denenmi , sıcaklık 25 °C, akı hızı 0,5 mL/ dakika olarak ayarlanmı tir. Bu çalı ma için hareketli faz organik düzenleyici oranının (%10-%5-%2

ACN-su(h/h)), mobil faza eklenen formik asit miktarının ve sıcaklı ın etkileri incelenmi tir.  
Bu amaçla a a ıdaki ortamlar denenmi tir:

1. %10'luk ACN-su mobil faz çözeltisine sırasıyla 1/1000, 10/1000 ve 20/1000 (v/v) oranlarında formik asit eklenmi ve her ko ul için 25, 30 ve 40°C sıcaklık denemeleri de yapılmı fakat pik yarılması görülmü tür.
2. %2'lik ACN-su mobil faz çözeltisine sırasıyla 1/1000, 10/1000 ve 20/1000 (v/v ) oranlarında formik asit eklenmi ve her ko ul için 25, 30 ve 40°C sıcaklık denemeleri de yapılmı fakat pik yarılması görülmü tür.
3. %5'lik ACN-su mobil faz çözeltisine sırasıyla 1/1000, 10/1000 ve 20/1000 (v/v ) oranlarında formik asit eklenmi ve her ko ul için 25, 30 ve 40°C sıcaklık denemeleri de yapılmı tir.

Optimum ko ul, 25°C'de %5 ACN-su mobil faz çözeltisi (1/1000 (v/v ) formik asit) olarak bulunmu tur.

Valgansiklovirin bozunma ürünlerinin tayini için madde; asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik ortamlarda stres testlerine tabi tutulmu tur.

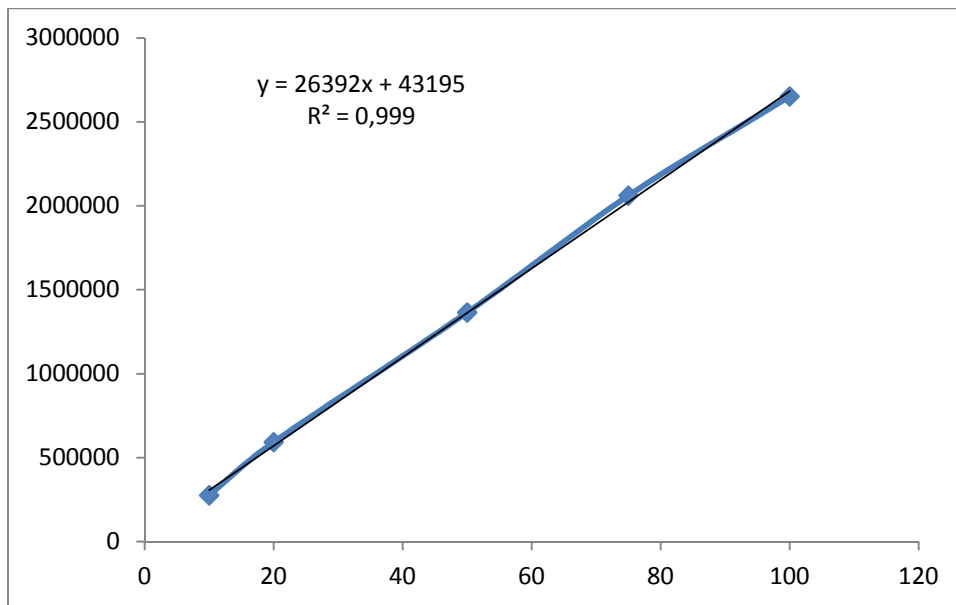
### 3. BULGULAR

#### 3.1. İntestinal Permeabilite Çalışmaları

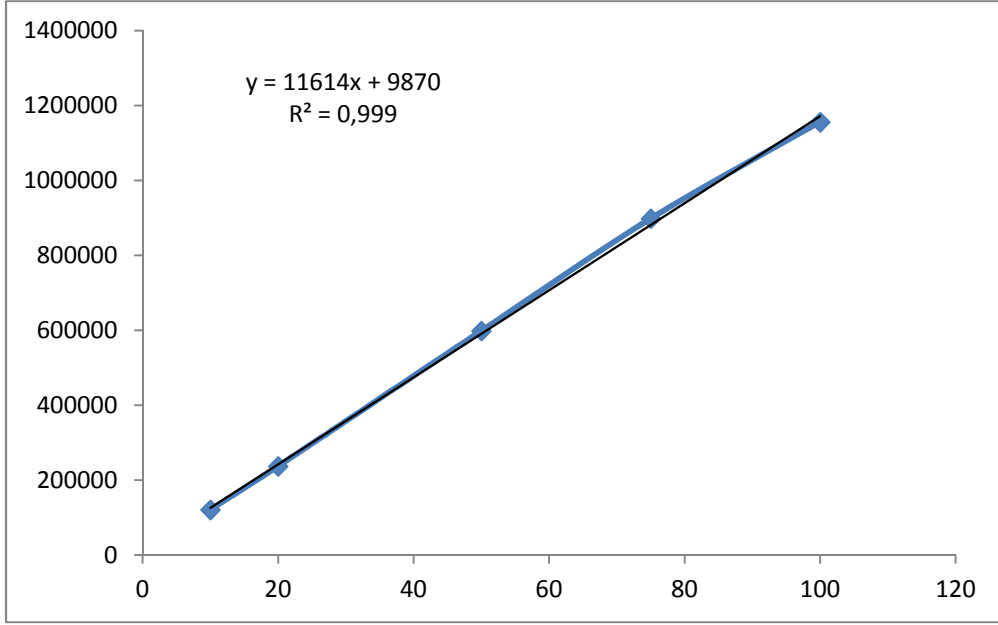
##### 3.1.1. Lamivudin, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve Statiksel Değerlendirilmesi

Lamivudinin intestinal permeabilitesinin YPSK yöntemi ile tayini için dozausal aralığın ve kalibrasyon dozasının saptanmasında, lamivudin, metoprolol ve fenol kırmızısının, 10 µg/mL ile 100 µg/mL arasında farklı konsantrasyonlarda çözeltileri mobil faz ile hazırlanmış ve en az üç kez enjekte edilmiştir.

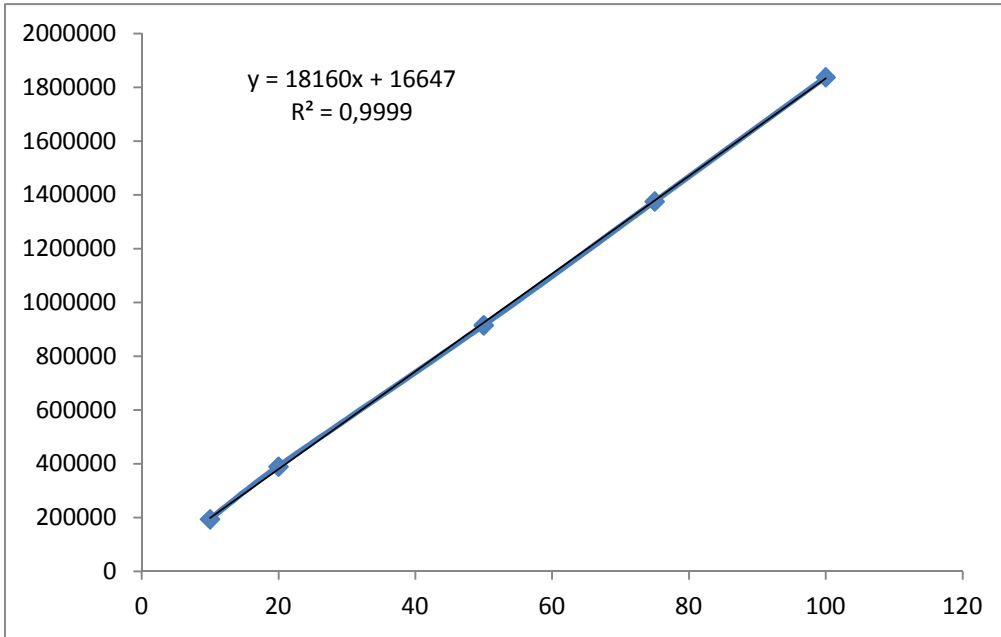
Kalibrasyon dozası, her bir deri imden elde edilen pik alanlarının, deri imden erine karışım grafiğine geçirilmesiyle elde edilmiştir. Geliştirilen YPSK yönteminde çalışılan bileşikler için 10 µg/mL ile 100,00 µg/mL deri imleri arasında dozaallık saptanmıştır. Lamivudin analizi için optimize edilen YPSK yönteminde kalibrasyon fonksiyonu  $y = 26392x + 43195$ ;  $R^2 = 0,999$  (ekil 3.1), fenol kırmızısı için  $y = 11614x + 9870$ ;  $R^2 = 0,999$  (ekil 3.2) ve metoprolol için de  $y = 18160x + 16647$ ;  $R^2 = 0,999$  (ekil 3.3) olarak saptanmıştır.



ekil 3.1. Lamivudin analizi için kalibrasyon grafiği



**ekil 3.2.** Fenol kırmızısı analizi için kalibrasyon grafiği



**ekil 3.3.** Metoprolol analizi için kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.1.** Lamivudinin YPSK yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)

Regresyon Denklemi*	$y = 26392x + 43195$
Regresyon Katsayısı ( $R^2$ )	0,999
Kalibrasyon Aralığı ( $\mu\text{g/ml}$ )	10,00-100,00
Te his Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,028
Tayin Alt Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,085

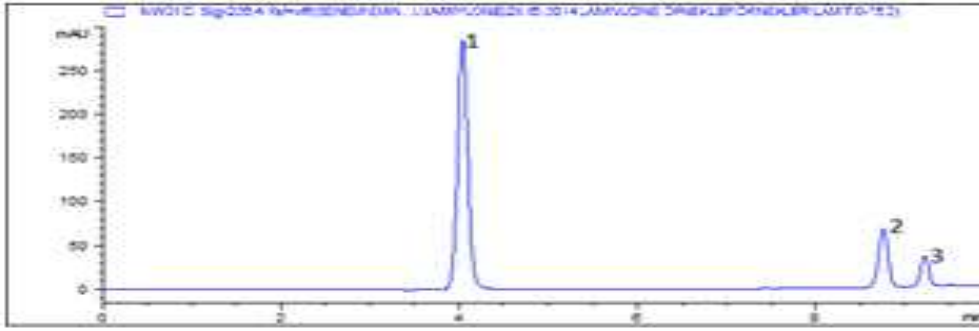
\*  $y = ax + b$ ; x :  $\mu\text{g/ml}$  biriminde deri im, y: lamivudinin pik alanı değerleri, a : e im, b :kesi im.

Gün içi çalışmaları iki farklı deri im düzeyinde ve bebaımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmaları ise yine iki farklı deri im düzeyinde bebaımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

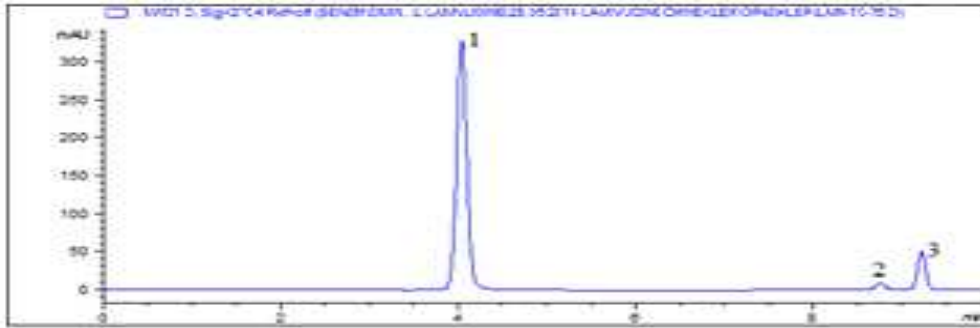
**Çizelge 3.2.** Lamivudin, metoprolol ve fenol kırmızısının YPSK yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları

Çalışılan bileşimlerin deri imleri ( $\mu\text{g/ml}$ )		Gün içi		Günler arası	
		% Ortalama Kazanım $\pm$ %BSS	Geri	% Ortalama Kazanım $\pm$ %BSS	Geri
Lamivudin	20	99,547 $\pm$ 0,193		99,765 $\pm$ 0,439	
	50	100,059 $\pm$ 0,009		99,808 $\pm$ 0,174	
Metoprolol	20	99,547 $\pm$ 0,193		100,047 $\pm$ 0,078	
	50	99,765 $\pm$ 0,439		99,961 $\pm$ 0,132	
Fenol Kırmızısı	20	99,986 $\pm$ 0,057		100,033 $\pm$ 0,176	
	50	99,956 $\pm$ 0,097		100,211 $\pm$ 0,320	

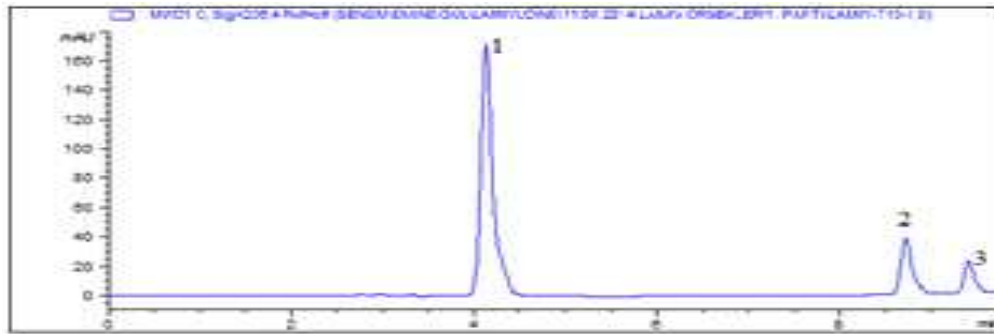
Ayrıca lamivudin için gerçekleştirilen intestinal permeabilite deneylerinden sonra elde edilen numunelerden 0-10-20-30-40-50 ve 60. dakika perfüzyon çözeltilerinin kromatogramları örnek olarak verilmiştir.



**ekil 3.4.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

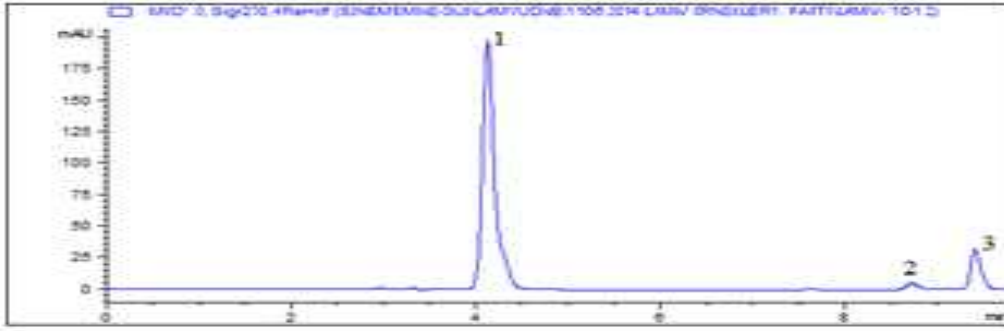


**ekil 3.5.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 0. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)

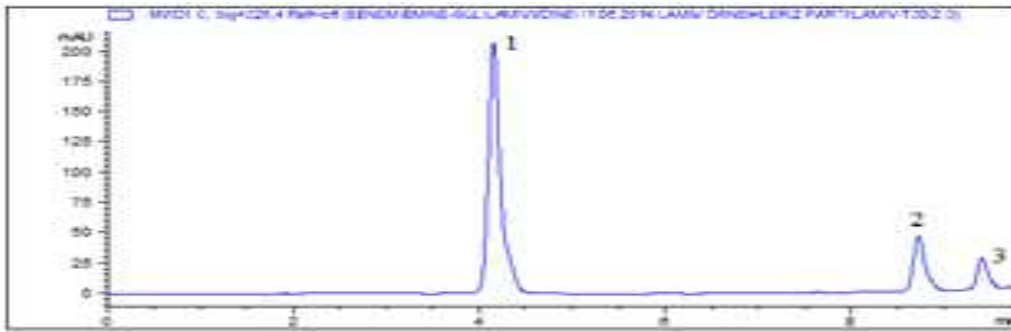


**ekil 3.6.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

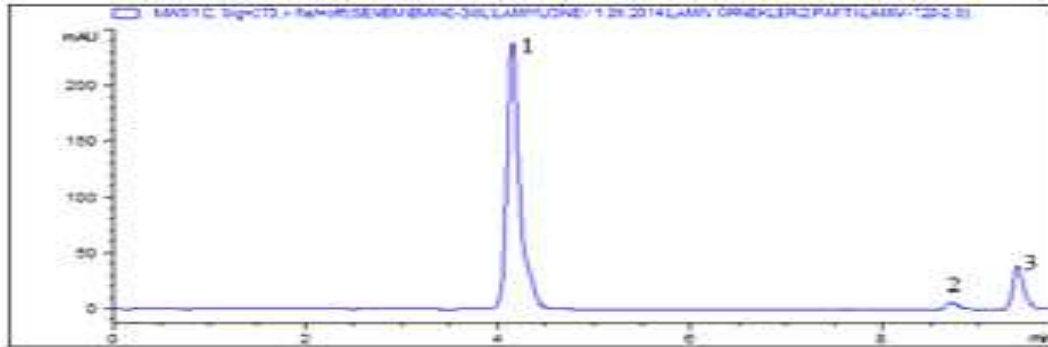




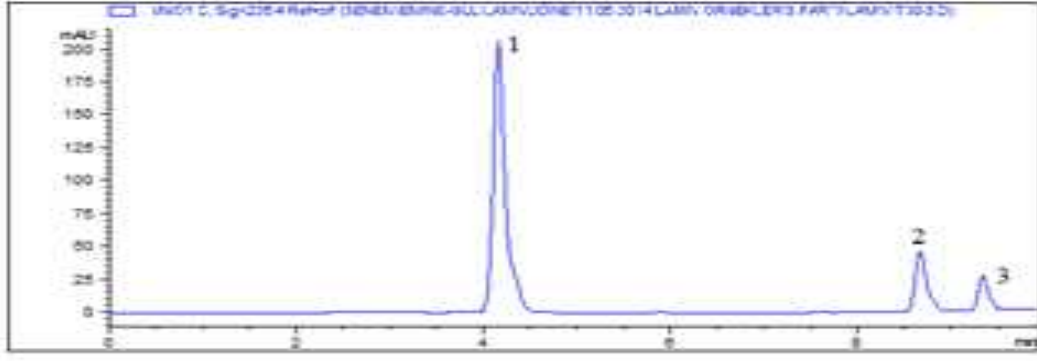
**ekil 3.7.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)



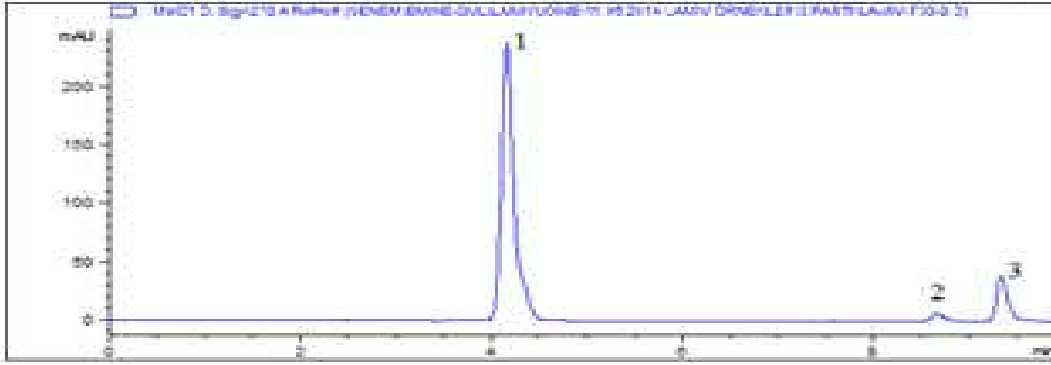
**ekil 3.8.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



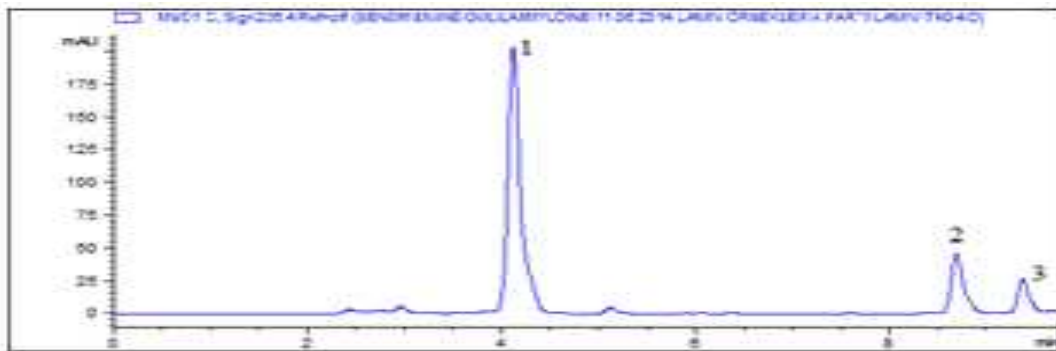
**ekil 3.9.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)



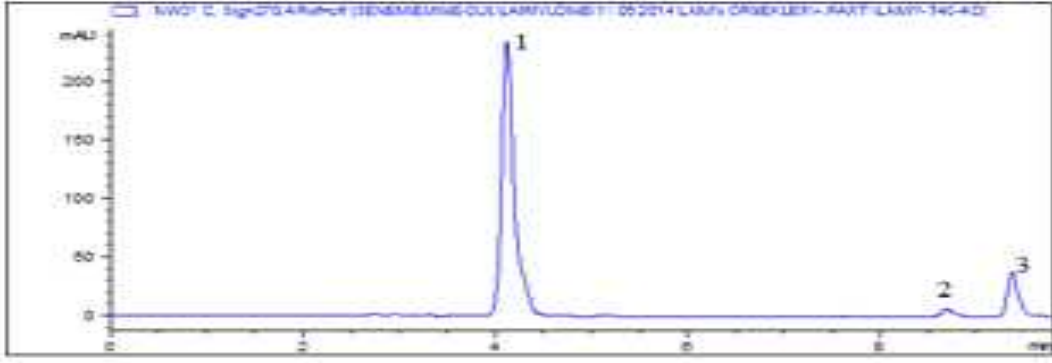
**ekil 3.10.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



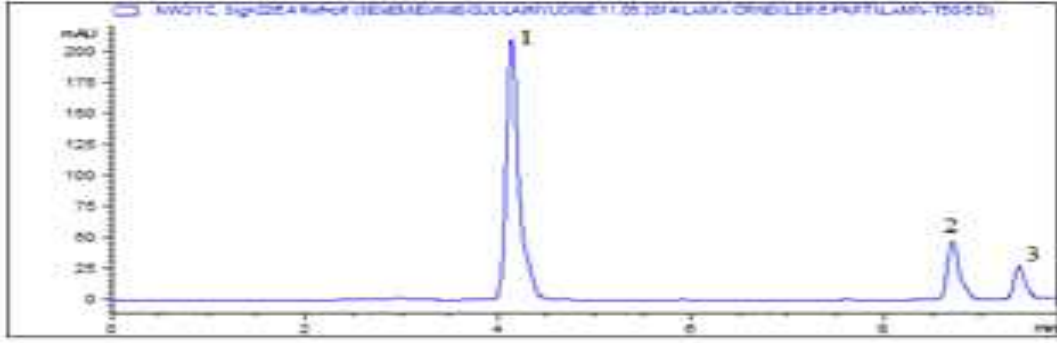
**ekil 3.11.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)



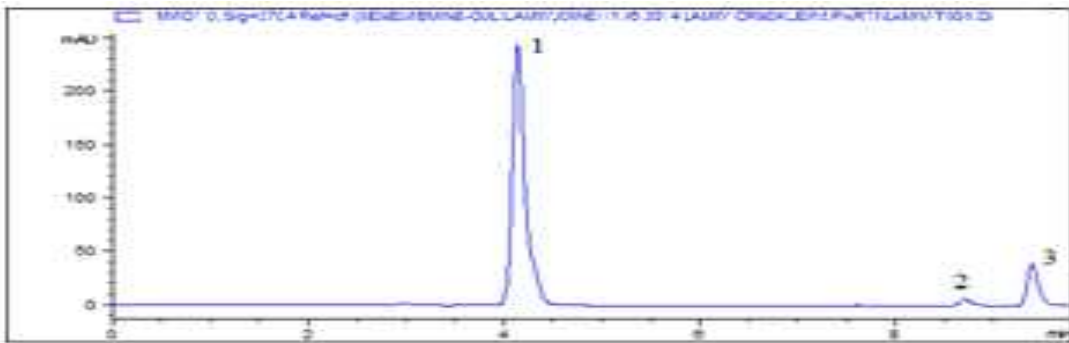
**ekil 3.12.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



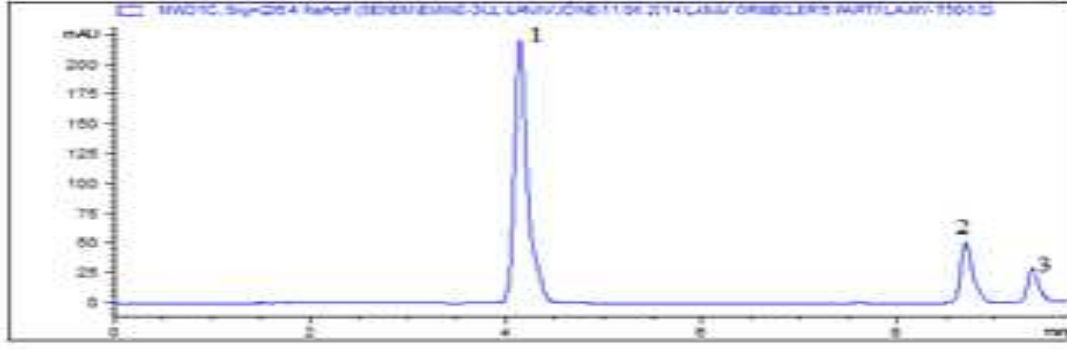
**ekil 3.13.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)



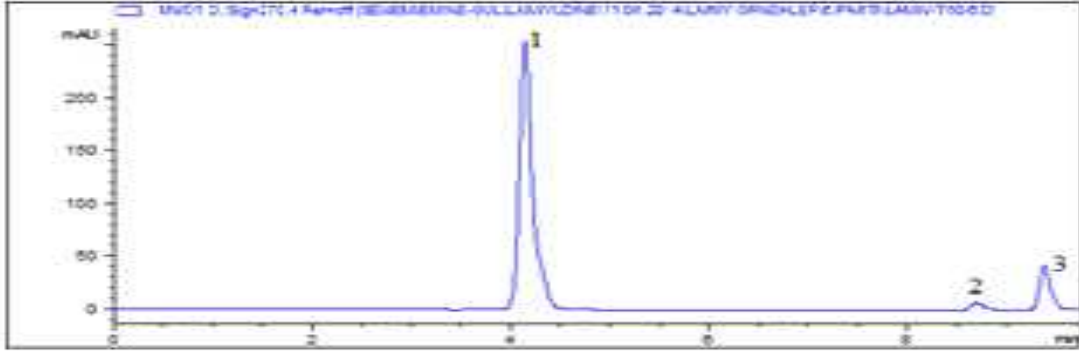
**ekil 3.14.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



**ekil 3.15.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)



**ekil 3.16.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

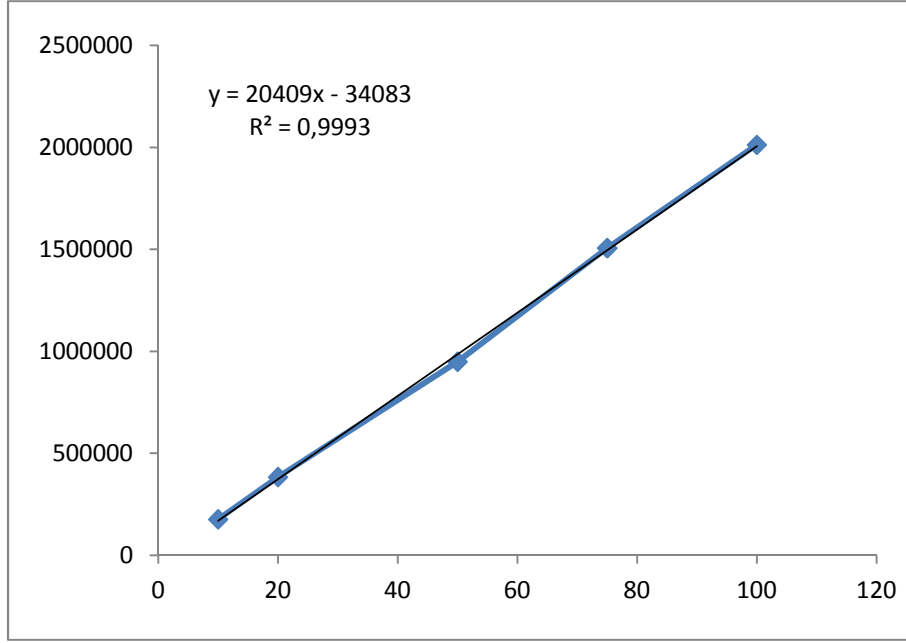


**ekil 3.17.** Lamivudin (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) dakika. dk perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (270 nm)

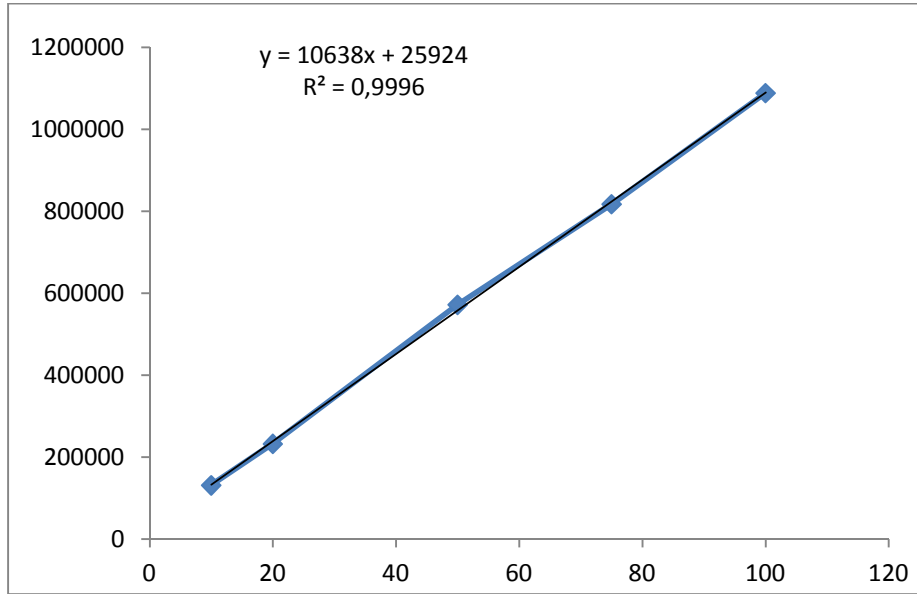
### 3.1.2. Valgansiklovir, Metoprolol ve Fenol Kırmızısı için Çizilen Kalibrasyon Grafikleri ve statiksel De erlendirilmesi

Valgansiklovirin intestinal permeabilitesinin YPSK yöntemi ile tayini için do rusal aralı ın ve kalibrasyon do rusunun saptanmasında, valgansiklovir, metoprolol ve fenol kırmızısının, 10 µg/mL ile 100 µg/mL arasında farklı konsantrasyonlarda çözeltileri mobil faz ile hazırlanmı ve en az üç kez enjekte edilmi tir.

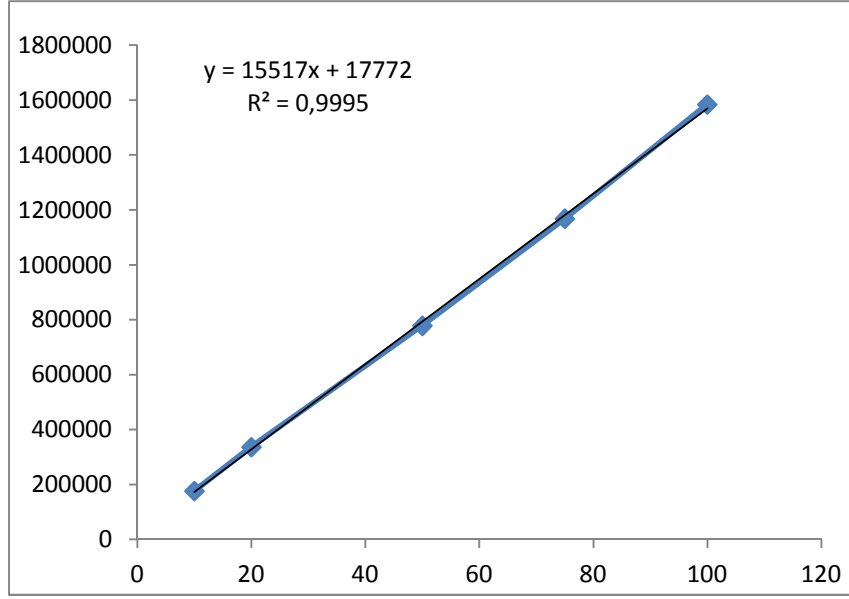
Kalibrasyon do rusu, her bir deri im de eri için elde edilen pik alanlarının, deri im de erine kar ı grafi e geçirilmesiyle elde edilmi tir. Geli tirilen YPSK yönteminde çalı ılan bile ikler için 10 µg/mL ile 100,00 µg/mL deri imleri arasında do rusalık saptanmı tır. Valgansiklovir analizi için optimize edilen YPSK yönteminde kalibrasyon fonksiyonu  $y = 20409x - 34083$ ;  $R^2=0,999$  ( ekil 3.18), fenol kırmızısı için için  $y=10638x+25924$ ;  $R^2=0,999$  ( ekil 3.19) ve metoprolol için de  $y=15517x+17772$  ;  $R^2=0,999$  ( ekil 3.20) olarak saptanmı tır.



**ekil 3.18.** Valgansiklovir analizi için kalibrasyon grafiği



**ekil 3.19.** Fenol kırmızısı analizi için kalibrasyon grafiği



**ekil 3.20.** Metoprolol analizi için kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.3.** Valgansiklovirin YPSK yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)

Regresyon Denklemi*	$y = 20409x - 34083$
Regresyon Katsayısı ( $R^2$ )	0,999
Kalibrasyon Aralığı ( $\mu\text{g/ml}$ )	10,00-100,00
Teşhis Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,831
Tayin Alt Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	2,518

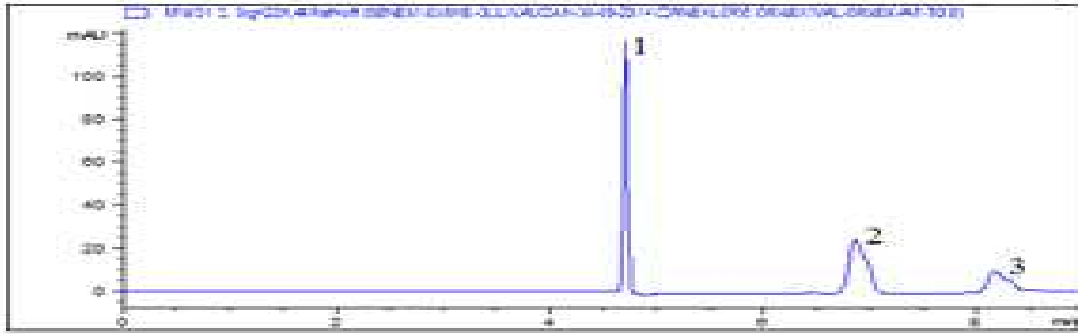
\*  $y = ax + b$ ; x :  $\mu\text{g/ml}$  biriminde deri miktarı, y: valgansiklovirin pik alanı değerleri, a : eğilim, b : kesim.

Gün içi çalınmaları iki farklı deri miktarı düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalınmalar ise yine iki farklı deri miktarı düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

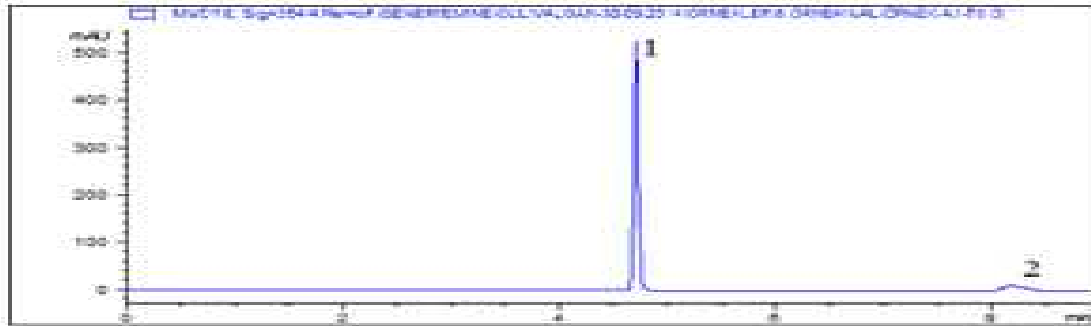
**Çizelge 3.4.** Valgansiklovir, metoprolol ve fenol kırmızısının YPSK yöntemi ile analizine ait gün içi ve günler arası bulguları

Çalışılan bileşimlerin deri imleri ( $\mu\text{g/ml}$ )	Gün içi	Günler arası	
		% Ortalama Kazanım $\pm$ %BSS	Geri % Ortalama Kazanım $\pm$ %BSS
Valgansiklovir	20	100,137 $\pm$ 0,286	100,409 $\pm$ 0,881
	50	100,080 $\pm$ 0,229	99,923 $\pm$ 0,282
Metoprolol	20	100,670 $\pm$ 0,159	99,518 $\pm$ 0,346
	50	100,133 $\pm$ 0,091	100,215 $\pm$ 0,694
Fenol Kırmızısı	20	99,956 $\pm$ 0,067	100,233 $\pm$ 0,196
	50	99,956 $\pm$ 0,067	100,516 $\pm$ 0,319

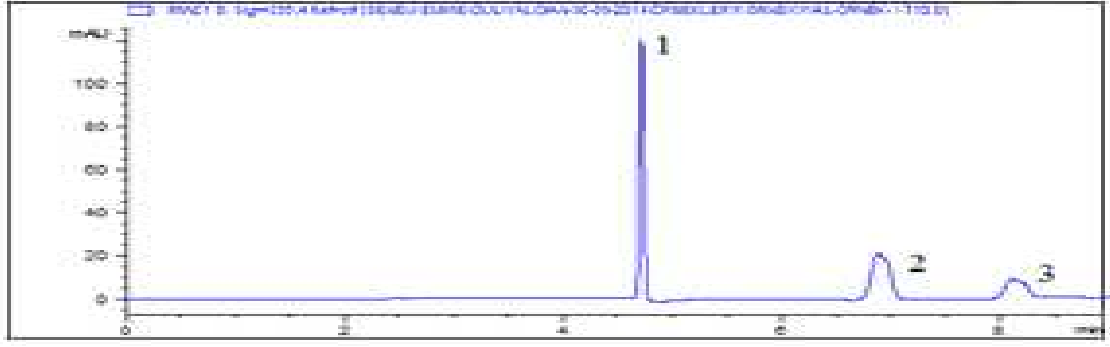
A a ıda valgansiklovir için gerçekleştirilen intestinal permeabilite deneylerinden sonra elde edilen numunelerden 0-10-20-30-40-50 ve 60. dakika perfüzyon çözeltilerinin kromatogramları örnek olarak verilmiştir.



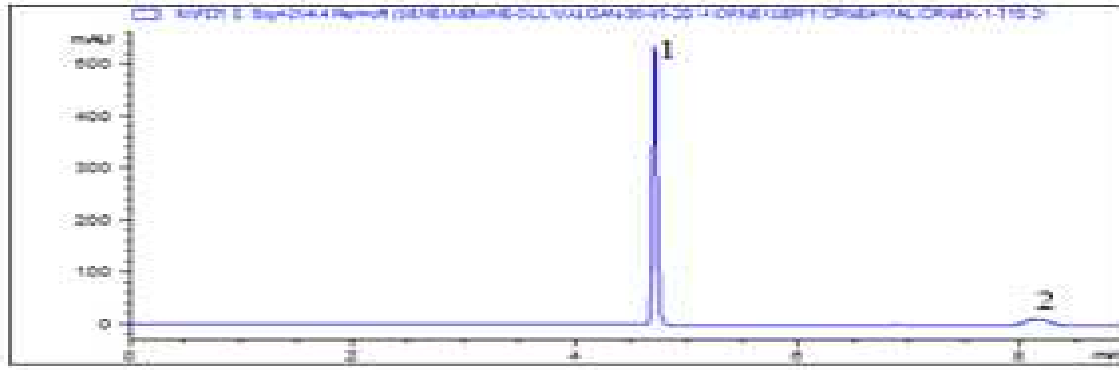
**ekil 3.21.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 0. dakika perfüzyon çözeltilisine ait kromatogram (226 nm)



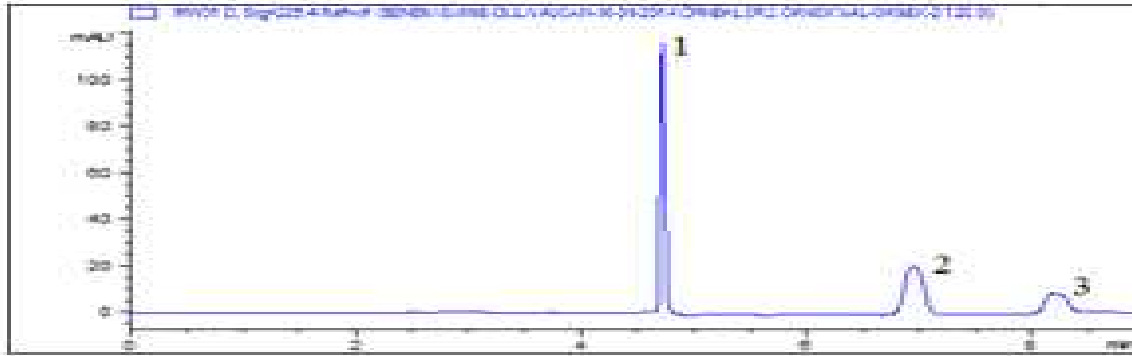
**ekil 3.22.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 0. dakika perfüzyon çözeltilisine ait kromatogram (254 nm)



**ekil 3.23.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

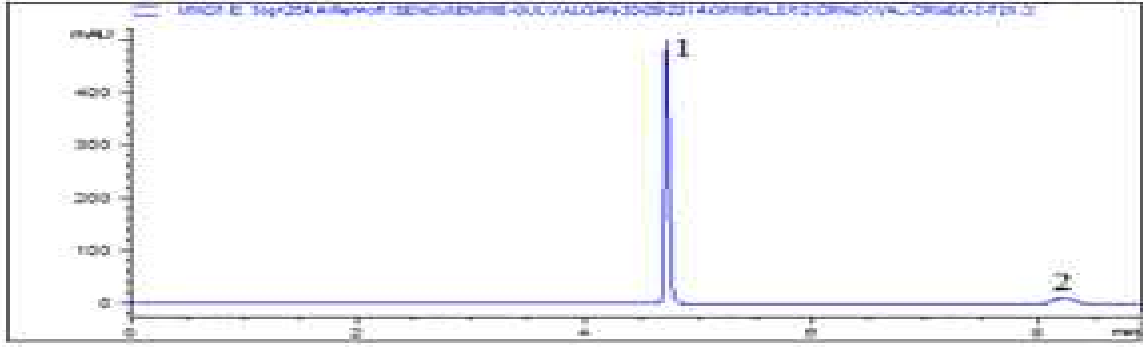


**ekil 3.24.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 10. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)

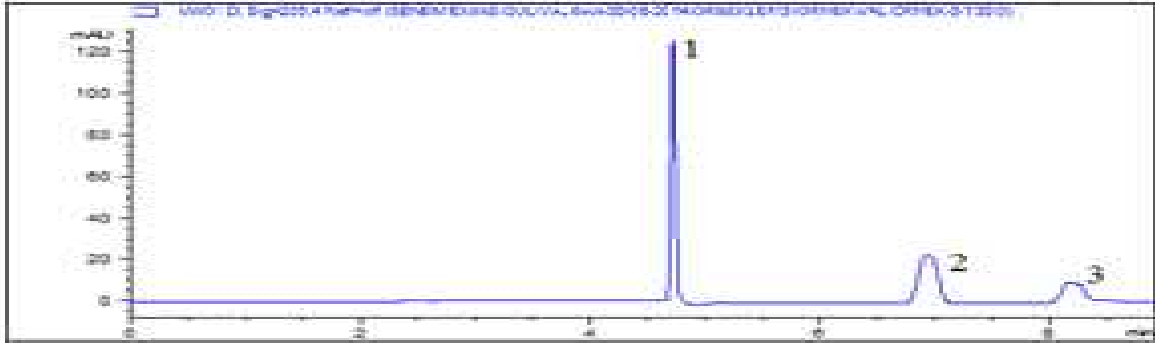


**ekil 3.25.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)

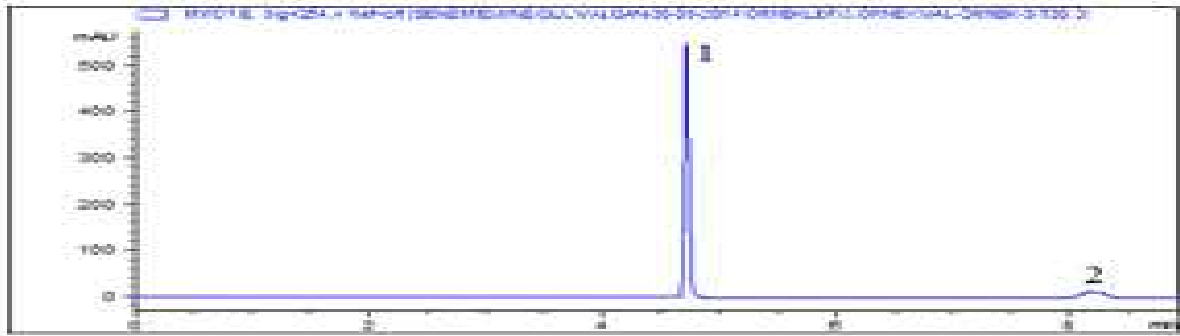




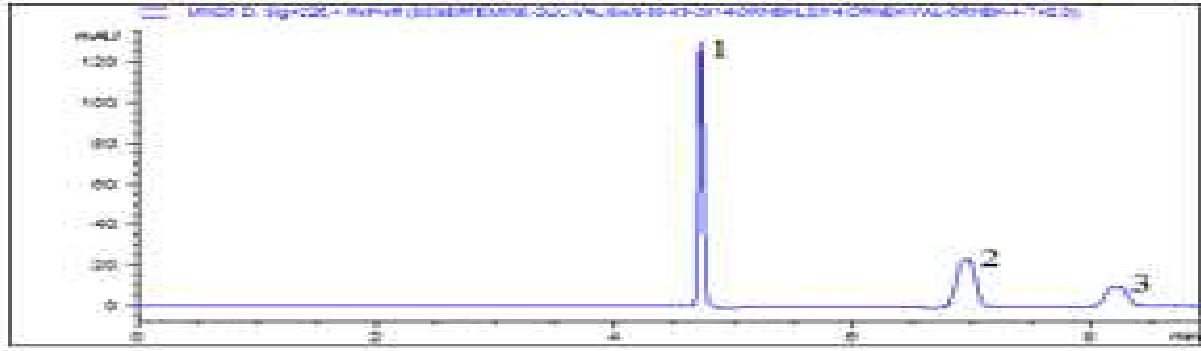
**ekil 3.26.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 20. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)



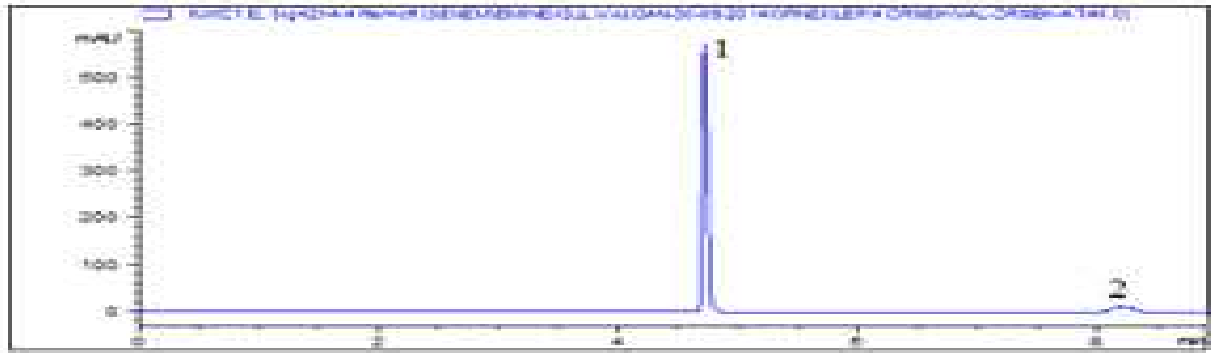
**ekil 3.27.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



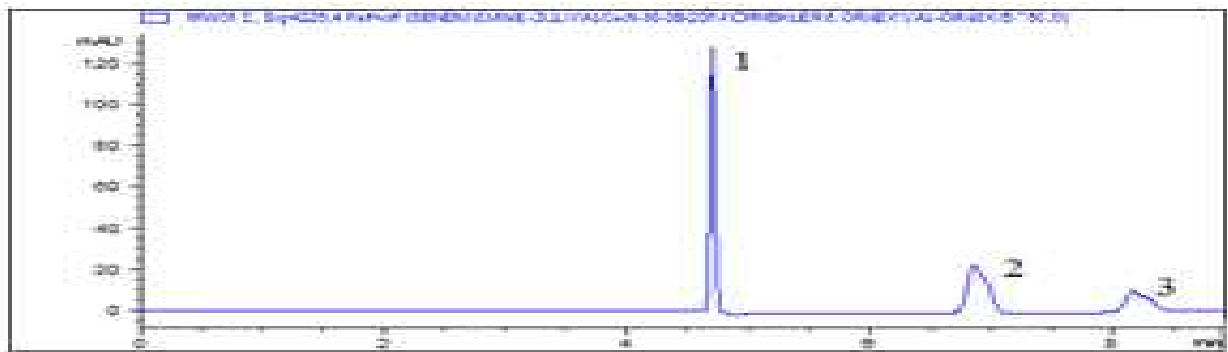
**ekil 3.28.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 30. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)



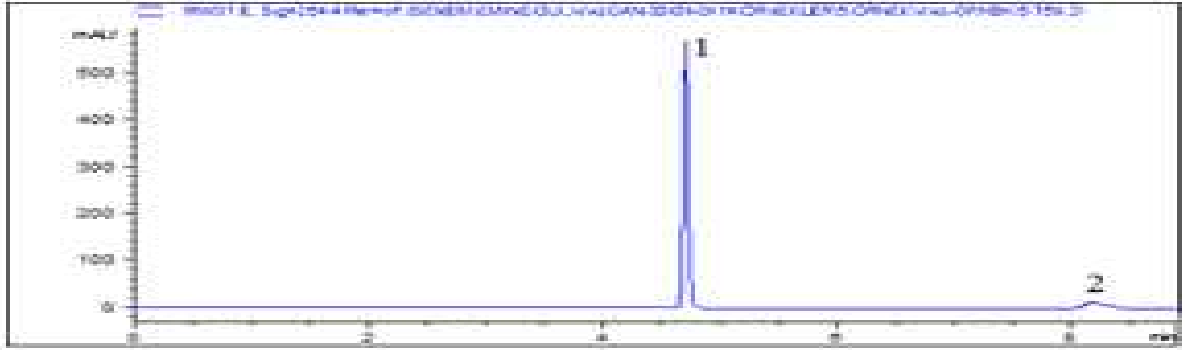
**ekil 3.29.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



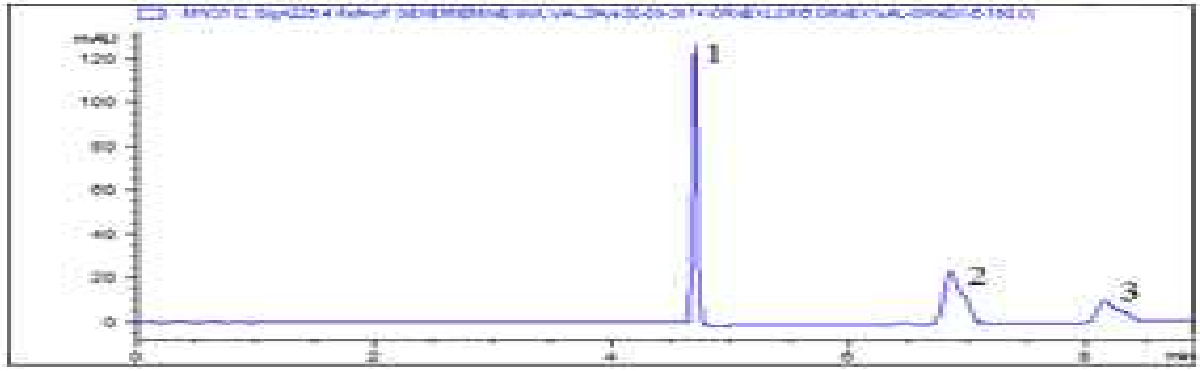
**ekil 3.30.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 40. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)



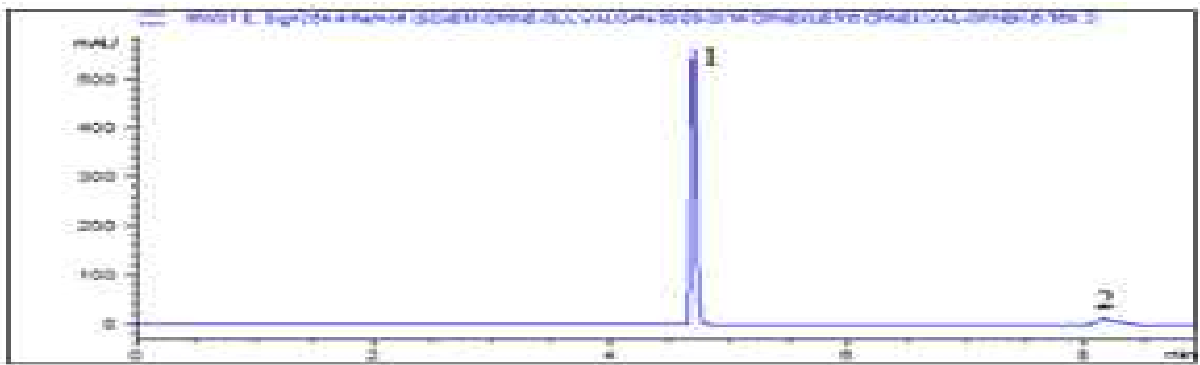
**ekil 3.31.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



**ekil 3.32.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 50. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)



**ekil 3.33.** Valgansiklovir (1), metoprolol (2) ve fenol kırmızısının (3) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (226 nm)



**ekil 3.34.** Valgansiklovir (1) ve fenol kırmızısının (2) 60. dakika perfüzyon çözeltisine ait kromatogram (254 nm)

### 3.1.2.Perfüzyon Deneyleri

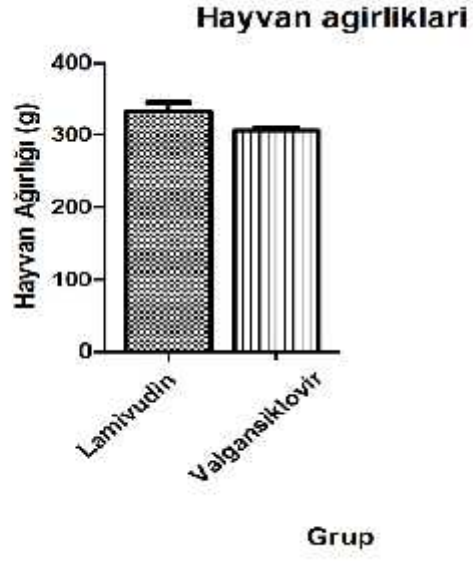
Tüm perfüzyon çalışmaları için kullanılan sıçanlara ait bilgiler lamivudin (Grup 1) ve valgansiklovir (Grup 2) grupları için sırasıyla Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da verilmiştir ( ekil 3.35- ekil 3.37).

**Çizelge 3.5.** Grup 1'de kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama±SS)

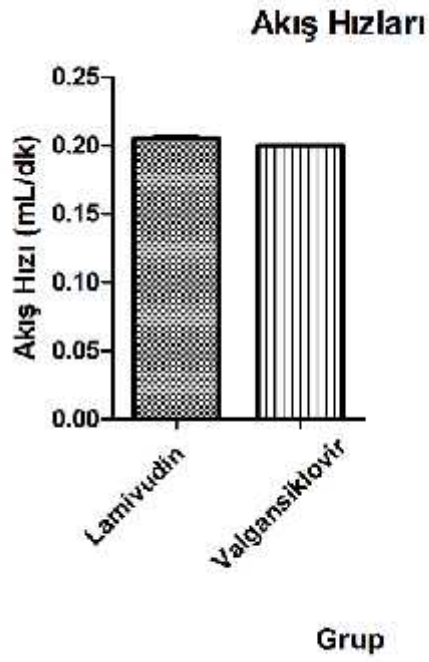
<b>Grup 1 (lamivudin) (n = 6)</b>	
Sıçan Ağırlığı (g)	332,5±30,0
Akış Hızı (mL/dakika) (0,2)	0,205±0,003
Perfüze Edilen Segment Uzunlukları (cm)	10,60±2,31
leum	

**Çizelge 3.6.** Grup 2'de kullanılan sıçanlara ait bilgiler (Ortalama±SS)

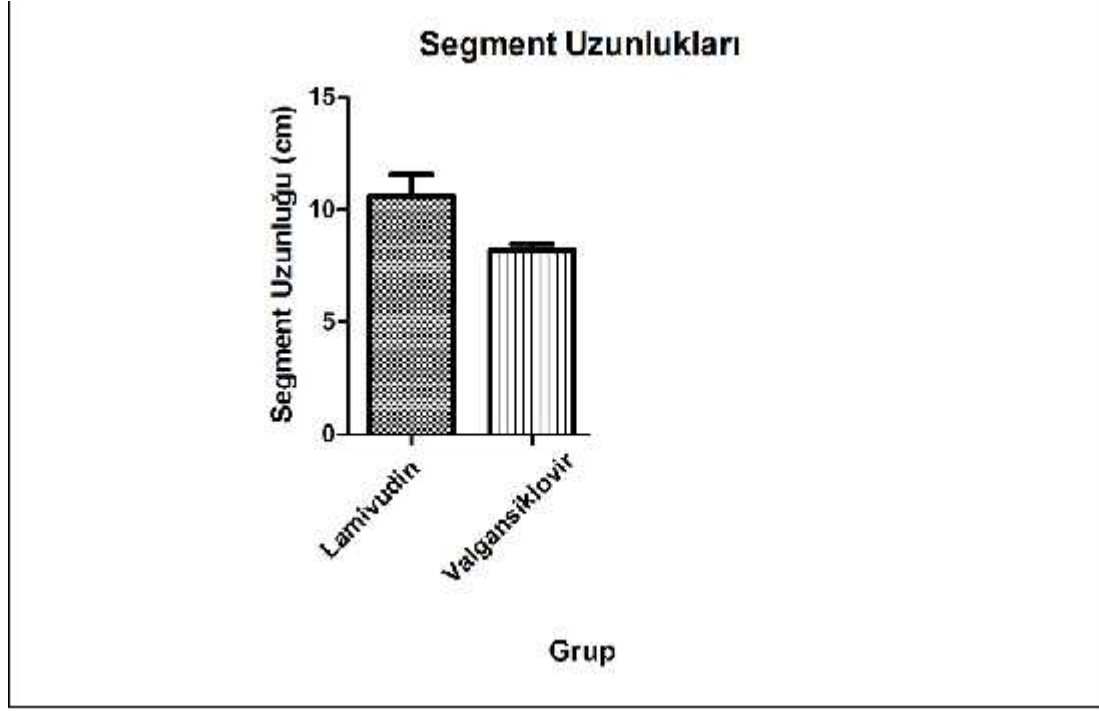
<b>Grup 2 (Valgansiklovir) (n = 6)</b>	
• Sıçan Ağırlığı (g)	305,8±11,92
• Akış Hızı (mL/dakika)(0.2)	0,20±0,00
• Perfüze Edilen Segment Uzunlukları (cm)	8,20±0,65
leum	



ekil 3.35. Gruplara göre hayvan ağırlıkları



ekil 3.36. Gruplara göre akış hızları



ekil 3.37. Gruplara göre segment uzunlukları

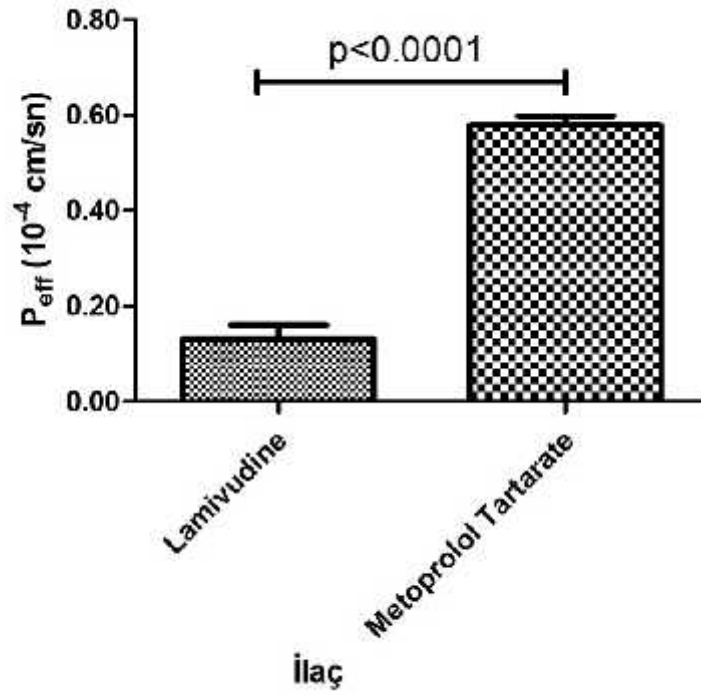
Her grupta perfüzyon çözeltisine; test maddesi (lamivudin veya valgansiklovir), metoprolol ve fenol kırmızısı eklenmiştir. Test maddelerinin Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre hangi sınıfta yer aldığı belirlenmesi için referans madde olarak metoprolol tartarat kullanılmıştır.

### 3.1.2.1. Lamivudin Grubuna Ait Bulgular

Perfüzyon çalışmaları lamivudin ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite değerleri Çizelge 3.7'de özetlenmiştir ve  $P_{eff}$  değerlerindeki değişimler ekil 3.38'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Lamivudin ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama  $\pm$  SS)

Hayvan no	Lamuvidin*	Metoprolol Tartarat
	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/sn)	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/sn)
1	0,16 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,14
2	0,24 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,07
3	0,02 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,06
4	0,15 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,05
5	0,09 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,08
6	0,12 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,10
Ort $\pm$ SS	0,13 $\pm$ 0,07	0,58 $\pm$ 0,05



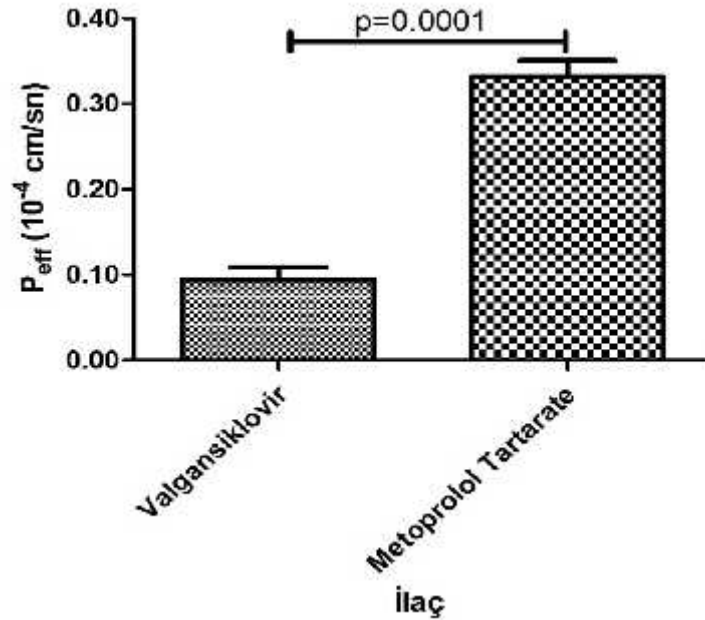
**ekil 3.38.** Lamivudin ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  değerleri (ortalama  $\pm$  SS).

### 3.1.2.2. Valgansiklovir Grubuna Ait Bulgular

Perfüzyon çalı malarında valgansiklovir ve metoprolol tartarat için hesaplanan permeabilite de erleri Çizelge 3.8’de özetlenmi ve  $P_{eff}$  de erlerindeki de i meler ekil 3.39’da gösterilmi tir.

**Çizelge 3.8.** Valgansiklovir ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  de erleri (ortalama  $\pm$  SS) (\* $p < 0.0001$ )

Hayvan no	Valgansiklovir*	Metoprolol Tartarat
	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/sn)	$P_{eff}$ ( $\times 10^{-4}$ cm/sn)
1	0,10 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,10
2	0,15 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,17
3	0,12 $\pm$ 0,09	0,33 $\pm$ 0,09
4	0,06 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,03
5	0,06 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,09
6	0,07 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,12
Ort $\pm$ SS	0,09 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,05



**ekil 3.39.** Valgansiklovir ve metoprolol tartarat için tayin edilen  $P_{eff}$  de erleri (ortalama  $\pm$  SS)



### 3.2. Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi Deneyleri

Lamivudin ve valgansiklovirin LC-MS/MS yöntemi ile olası bozunma ürünlerinin önerilmesi amacıyla tabi tutuldukları stres koşulları çizelge 3.9 'da verilmiştir.

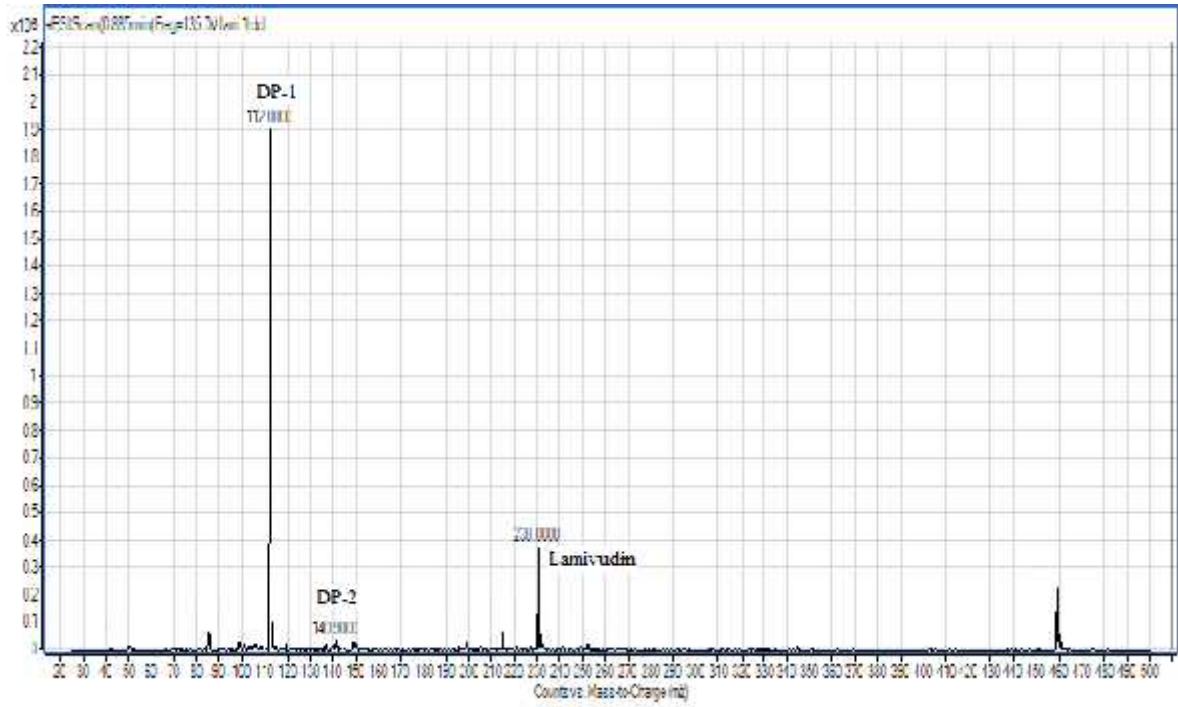
**Çizelge 3.9.** Lamivudin ve valgansiklovire uygulanan stres koşulları

Uygulanan Stres Koşulu	Bekleme Süresi
1M HCl	30dk (80°C'de)
1M NaOH	30dk (80°C'de)
%30 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30dk (80°C'de)
Sıcaklık	24 saat (100°C'de)
UV	24 saat

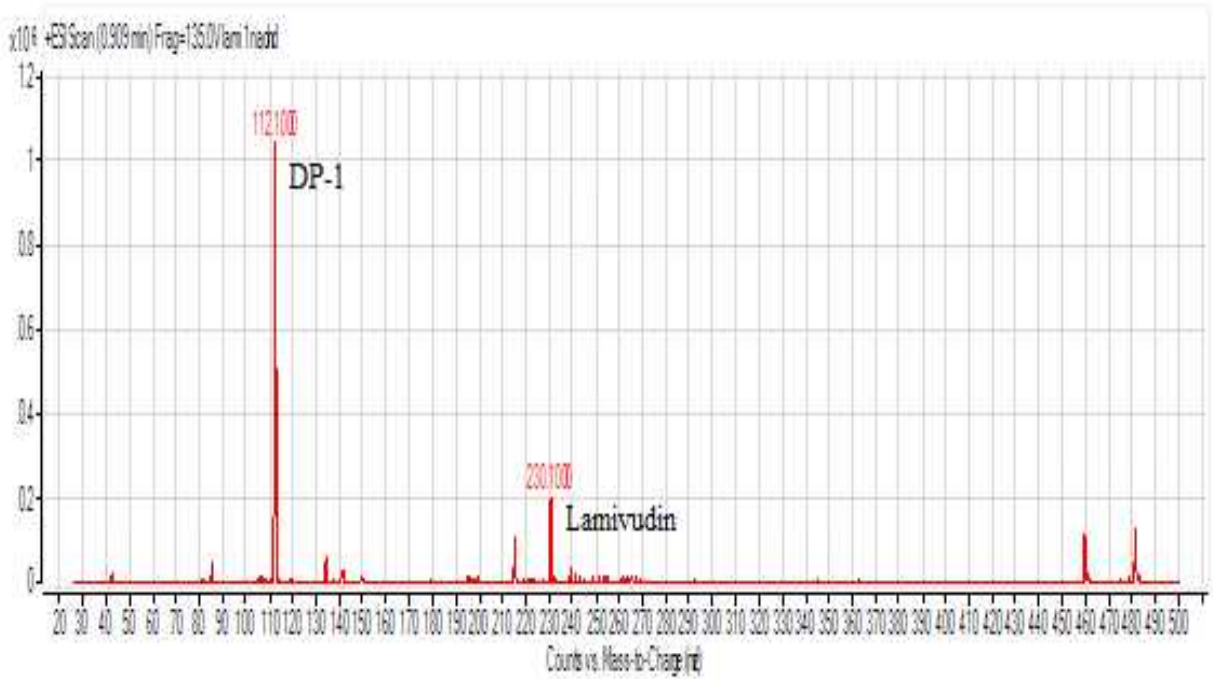
#### 3.2.1. Lamivudinin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi Deneyleri

Lamivudinin bozunma ürünlerinin tayini için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla etken madde asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullarda stres testlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla 100 µg/mL etken madde mobil faz ile 10 µg/mL'ye seyreltilmiştir. Deneyler sonucunda lamivudinin asidik, bazik ve oksidatif stres koşullarında bozunmaya uğramadığı, termal ve fotolitik stres koşullarında stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca oksidatif koşulda ise madde tamamen bozunmaya uğramamıştır ve lamivudinin kütle spektrumu gözlemlenmemiştir.

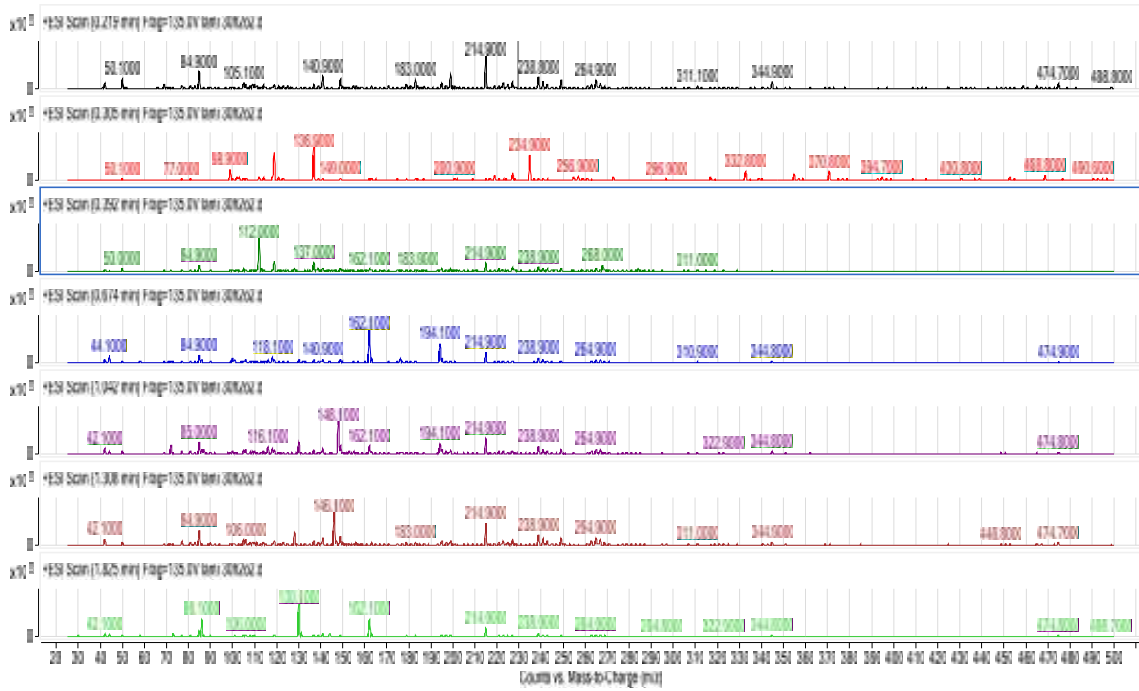
Ekil 3.40, 3.41 ve 3.42'de sırasıyla asidik bazik ve oksidatif stres testleri sonucundaki kütle spektrumları verilmiştir.



**ekil 3.40.** Lamivudinin asidik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu (DP-1 ve DP-2 bozunma ürünleridir)



**ekil 3.41.** Lamivudinin bazik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu (DP-1 bozunma ürünüdür)



ekil 3.42. Lamivudinin oksidatif strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu

Çizelge 3.10'da lamivudinin olası bozunma ürünleri önerilmiştir.

Çizelge 3.10. Lamivudinin olası bozunma ürünleri

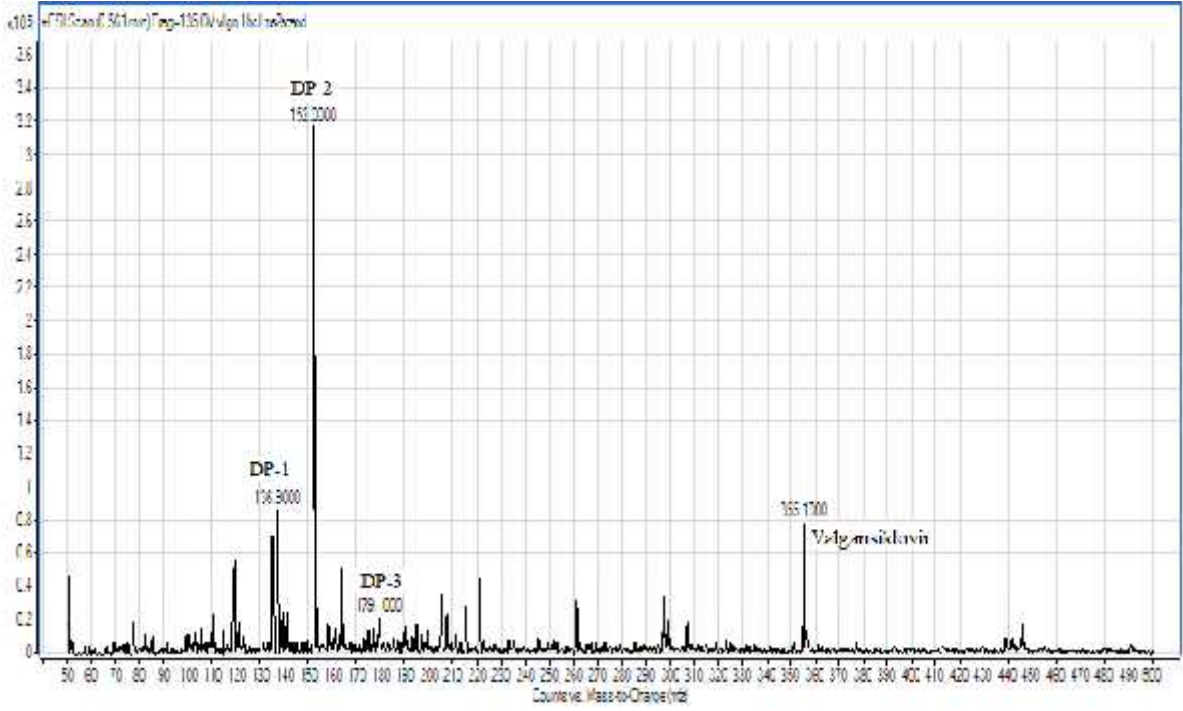
Ürün	Teorik Kütle	Molekül Formülü
DP-1	112,000	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O
DP-2	140,900	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Lamivudin	230,000	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S

### 3.2.2. Valgansiklovirin Bozunma Ürünlerinin Belirlenmesi Deneyleri

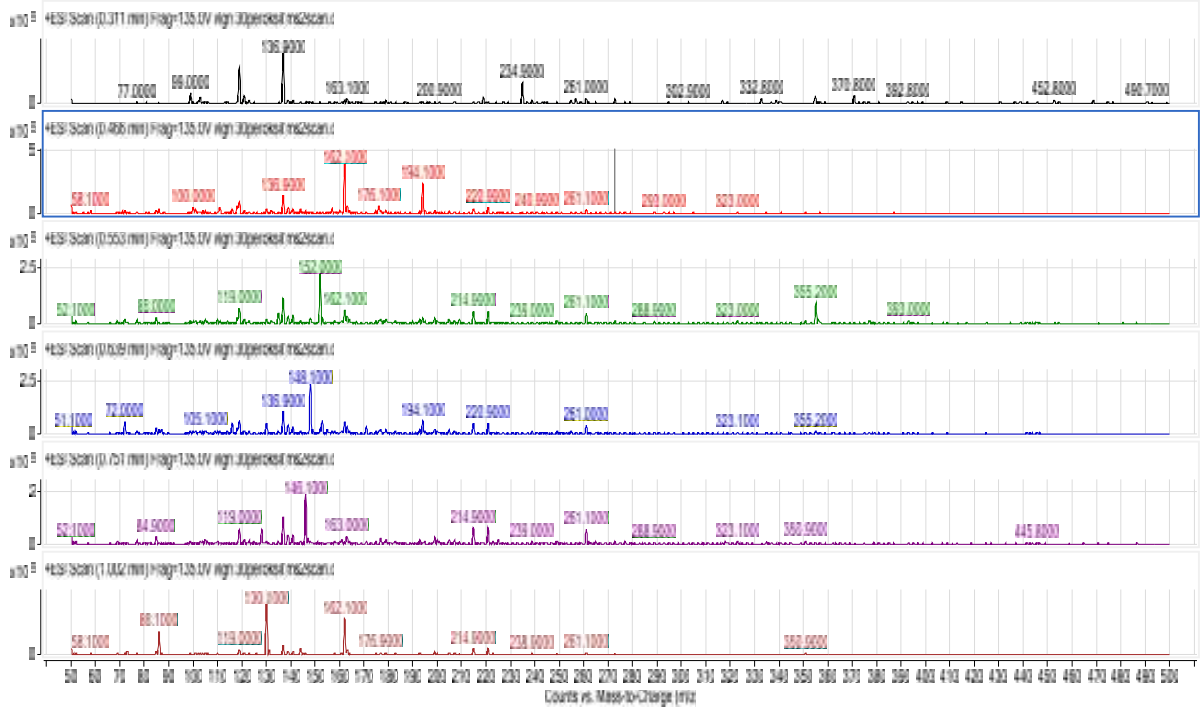
Valgansiklovirin bozunma ürünlerinin tayini için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla etken madde asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullarda stres testlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla 100 µg/mL etken madde mobil faz ile 10 µg/mL'ye seyreltilmiştir. Deneyler sonucunda valgansiklovirin asidik ve oksidatif stres koşullarında bozunmaya

u radı 1, bazık, termal ve fotolitik stres ko ullarında stabil kaldı 1 gözlenmi tir. Ayrıca oksidatif ko ulda madde tamamen bozunmaya u ramı ve valgansiklovirin kütle spektrumu gözlenememi tir.

ekil 3.43 ve 3.44'de sırasıyla asidik ve oksidatif stres testleri sonucundaki kütle spektrumları verilmi tir.



**ekil 3.43.** Valgansiklovirin asidik strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu (DP-1, DP-2 ve DP-3 bozunma ürünleridir)



**ekil 3.44.** Valgansiklovirin oksidatif strese tabi tutulması sonucundaki kütle spektrumu Çizelge 3.11’de valgansiklovirin olası bozunma ürünleri önerilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Valgansiklovirin olası bozunma ürünleri

Ürün	Teorik Kütle	Molekül Formülü
DP-1	136,900	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O
DP-2	152,000	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O
DP-3	179,100	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Valgansiklovir	355,100	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>

#### 4. TARTI MA

Bir ilacın dahil oldu u permeabilite sınıfının tayin edilmesi amacıyla kütle-denge çalı maları, mutlak biyoyararlanım çalı maları veya intestinal perfüzyon çalı maları kullanılmaktadır. ntestinal permeabilitenin tayini için ba ırsak perfüzyonu, dokulardan permeasyon ve tek tabakalı epitel hücre kültüründe permeasyon çalı malarının yapılması önerilmektedir.

Ba ırsaklardan absorpsiyon ve permeabiliteyi incelemek amacıyla perfüzyon çözeltisinin tek geçi li (single pass) [52-53] veya sirkülasyonlu (recirculation) [54] olarak gerçekleştirildi i yöntemler mevcuttur. Yapılan çalı malarda perfüzyon çözeltisinin sirküle edildi i yöntemin en büyük dezavantajının zamanın fonksiyonu olarak perfüzyon çözeltisinden eksilen kısım ölçüldü ü için, absorpsiyonu dü ük olan maddelerle çalı ıldı ında hatalı sonuçlara yol açması oldu u belirtilmi tir [55].

Bu çalı mada bazı antiviral ajanların ba ırsaklardan absorpsiyonu incelemek amacıyla lümeninden kayıp esasına dayanan, ba ırsak segmenti (jejunum)'nin simultane olarak sirküle edilmeden perfüze edildi i in situ single pass perfüzyon tekni i kullanılmı tır [50]. Bu yöntemin seçilme nedenleri; cerrahi yöntemin kolay olması, farklı ba ırsak segmentlerinin e zamanlı olarak perfüzyonunun gerçekleştirilebilmesi ve in vivo ko ullara yakın bir teknik olmasıdır. Yöntemin dezavantajları ise; perfüzyon çözeltisi sirküle edilmedi i için daha fazla miktarlarda çözeltiliye ihtiyaç duyulması, cerrahi i lem esnasında ba ırsakların iyi temizlenememesi ve perfüze edilen segmentlerden kan sızıntısının olmasına ba lı olarak numunelerin lümen içeri i ile kontamine olmasıdır.

Perfüzyon deneylerinde deney hayvanı olarak sıçan kullanılmı tır. Perfüzyon çözeltisi olarak nötr pH de erine sahip, izo-ozmotik bir çözeltili olan Golytely çözeltisi kullanılmı tır [56].

Perfüzyon çözeltisine ilave edilecek madde miktarları literatür verileri kullanılarak belirlenmi tir. Bu çalı mada test ilacı olarak kullanılan lamivudin ve valgansiklovir için konsantrasyon sırasıyla 1200 ve 1800 mg/mL olarak seçilmi tir. Test ilaçlarının ba ırsaklardan absorpsiyonu ve permeabilitesinin de erlendirilmesinde referans madde olarak kullanılan metoprololün konsantrasyonu 400 mg/mL olarak seçilmi tir.

Bu grupta yapılan çalı malar sonucunda lamvudin için ileumda tayin edilen permeabilite de eri  $0.13 \pm 0.07 \times 10^{-4}$  cm/s olarak belirlenmi tir. Lamivudinin ba ırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesini belirlemek için referans madde olarak metoprolol kullanılmı tır. Metoprolol

tartarat için tayin edilen bu değer ileumda  $0.58 \pm 0.05 \times 10^{-4}$  cm/s olarak bulunmuştur.

Metoprolol tartarat bir ilacın permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla referans madde olarak kullanılmaktadır. Permeabilitesi metoprolol tartarattan daha düşük olan ilaçların düşük permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu değerler biyofarmasötik sınıflandırma sistemi esas alınarak kıyaslandığında lamivudinin düşük permeabilite değerine sahip olduğu ( $p < 0.0001$ ) gözlenmiştir. [57-58]. Lamivudinin permeabilitesi tartışmalıdır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde yüksek veya düşük permeabiliteye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2006 yılında yayımladığı listede yüksek permeabiliteye sahip olduğu bildirilmektedir [57]. Ayrıca Patel ve ark. 2012 yılında yayımladıkları bir çalışmada da yüksek permeabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [58]. Ancak buna karşın iki farklı çalışmada ise düşük permeabiliteye sahip ilaç olarak tanımlanmıştır [59-60].

Valgansiklovir grubunda yapılan çalışmalar sonucunda valgansiklovir için ileumda tayin edilen permeabilite değeri  $0,09 \pm 0,03 \times 10^{-4}$  cm/s olarak belirlenmiştir. Valgansiklovirin bağırsaklardan absorpsiyon ve permeabilitesini belirlemek için referans madde olarak metoprolol kullanılmıştır. Metoprolol tartarat için tayin edilen bu değer ileumda  $0,27 \pm 0,06 \times 10^{-4}$  cm/s olarak bulunmuştur. Metoprolol tartarat bir ilacın permeabilite sınıfını tayin etmek amacıyla referans madde olarak kullanılmaktadır. Permeabilitesi metoprolol tartarattan daha düşük olan ilaçların düşük permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu değerler biyofarmasötik sınıflandırma sistemi esas alınarak kıyaslandığında valgansiklovirin düşük permeabilite değerine sahip olduğu ( $p=0,0001$ ) gözlenmiştir [57,60].

Çalışmanın ikinci aşamasında, antiviral ilaçların (lamivudin ve valgansiklovir) bozunma ürünleri test edilmeye çalışılmıştır.

Lamivudinin asidik, bazik ve oksidatif stres koşullarında bozunmaya uğradığı, termal ve fotolitik stres koşullarında stabil kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca oksidatif koşulda ise madde tamamen bozunmaya uğramış ve lamivudinin kütle spektrumu gözlenmemiştir.

Valgansiklovirin ise asidik ve oksidatif stres koşullarında bozunmaya uğradığı, bazik, termal ve fotolitik stres koşullarında stabil kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca oksidatif koşulda madde tamamen bozunmaya uğramış ve valgansiklovirin kütle spektrumu gözlenmemiştir.

## 5. SONUÇLAR

1. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS)' ne göre Sınıf I'de (yüksek çözünürlük yüksek permeabilite) yer alan metoprolol tartarat referans olarak kullanıldı ında lamivudinin permeabilitesinin dü ük oldu u tayin edilmis tir.
2. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ne göre Sınıf I'de (yüksek çözünürlük yüksek permeabilite) yer alan metoprolol tartarat referans olarak kullanıldı ında valgansiklovirin permeabilitesinin dü ük oldu u tayin edilmis tir.
3. Deneyler sonucunda lamivudinin asidik, bazik ve oksidatif stres ko ullarında bozunmaya u radı 1, termal ve fotolitik stres ko ullarında stabil kaldı ı gözlenmis tir.
4. Deneyler sonucunda valgansiklovirin asidik ve oksidatif stres ko ullarında bozunmaya u radı 1, bazik, termal ve fotolitik stres ko ullarında stabil kaldı ı gözlenmis tir.



## KAYNAKLAR

- [1] Richardson, M.L. And Bowron, J.M., 1985, "The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment", *J. Pharm. Pharmacol*: 1–12.
- [2] Kayaalp, S.O., 1987, "Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji", *Toraman ve Ulucan Matbaası*, Ankara, 34-36.
- [3] Martinez, M.N. And Amidon, G.L., 2002, "A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals", *J. Clin. Pharmacol*, 42: 620-643.
- [4] Bajaj, H., Bisht, S., Yadav, M. And Singh, V., 2011, "Bioavailability enhancement: a review", *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 2: 202-216.
- [5] Lobenberg, R. And Amidon, G.L., 2000, "Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards", *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 50: 3-12.
- [6] Hillgren, K.M., Kato, A. And Borchardt, R.T., 1995, "In vitro systems for studying intestinal drug absorption", *Med. Res. Rev.*, 15: 83-109.
- [7] Kararlı, T.T., 1989, "Gastrointestinal Absorption of Drugs", *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6: 39-86.
- [8] Shargel, L. And Yu, A.B.C., 1993, "Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics", *Prentice-Hall Int. Editions*, London, 111-118.
- [9] Salama, N.N., Eddington, N.D. And Fasano, A., 2006, "Tight junction modulation and its relationship to drug delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58: 15-28.
- [10] Anderson, J.M. And Itallie, C.M.V., 1995, "Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability", *Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 269: 467-475.
- [11] Artursson, P., Palm, K. And Luthman, K., 2001, "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46: 27-43.
- [12] Longworth, I.D., "nfeksiyon hastalıkları el kitabı", 2003, Prof. Dr. Emin Tekeli, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 2
- [13] Topçu, A.W., Söyletir, G. And Do anay, M., "nfeksiyon hastalıkları", 1996, *Nobel Tıp Kitapevleri*, stanbul, 3-685.
- [14] Çakalo lu, Y., 2000, *Ankem Dergisi*, 14(3): 416-422.
- [15] Karataylı, E., 2011, "Lamivudine, adefovir dipivoksil ve entecavir'e direnç gösteren HBV varyantlarının tanımlanması ve bu mutantların de i ik antivirallere kar ı direnç profillerinin

in vitro fenotipleme yöntemi ile karakterizasyonu", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara, 2-3.

[16] Topçu, A.W., Söyletir, G. And Do anay, M., " nfeksiyon hastalıkları", 1996, *Nobel Tıp Kitapevleri*, stanbul, 3-685.

[17] nternet: Hacettepe Üniversitesi HIV/AIDS Tedavi ve Ara atırma Merkezi, "HIV Enfeksiyonunun Klinik Özellikleri ve Tedavisi"  
<http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/klinik.shtml>

[18] Dalgıç, N., 2007, *Uluda Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(1): 33.

[19] Gaytant, M.A., Steegers, E., Semmekrot, B.A., Merkus, H., And Galama, J., 2002, "Congenital cytomegalovirus infection: Review of the epidemiologyand outcome", *Obstet Gynecol Surv.*, 57(4): 245.

[20] Alford, C.A. And Britt, W.J., 1990, "Cytomegalovirus", *Virology*, 2: 70.

[21] Erdem, E.N., 2007, "Hamilelik Gingivitisinde Subgingival Plakta Sitomegalovirüs ve Epstein-Barr Virüs Varlı ının Klinik Parametreler le li kisinin Ara tırılması", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-29.

[22] Evcil, G., 2009, "Riskli Gebelerde Sitomegalovirüs nfeksiyonlarının Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Ara tırılması", Uzmanlık Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Aydın, 38.

[23] Yamazhan, T., 2011, *Ankem Dergisi*, 25(2): 234- 237.

[24] nternet: lacpedia  
<http://www.ilacpedia.com/etken-madde/lamivudin>

[25] nternet: lacpedia  
<http://www.ilacpedia.com/etken-madde/valgansiklovir>

[26] Gündüz, T., 2002, " nstrümental analiz, 6", *Gazi Kitapevi*, Ankara, 1115-1117.

[27] Gümü ta , M., 2009, " ADE inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların YPSK yöntemi ile aynı anda analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı*, Ankara, 39-61.

[28] Do rukol D. "Kromatografik yöntemler", Doç. Dr. Lütfi Genç, *Bibam Yayınları*, Eski ehir, 1-132.

[29] Ha imi, D., 2013, "Yeni amid-silika dolgu maddesi kullanılarak sitokinlerin HPLC ile ayrılması ve pptimizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Dicle Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı*, Diyarbakır, 1-4.

[30] Skoog, Holler And Nieman, 1998, "Principles of instrumental analysis, 5", *Brooks/Cole Thompson Learning*, USA, 673-766.

- [31] Hamilton, R.,J. And Sewel, P.,A., 1982, "Introductipn to HPLC, 2," *Chapman and Hall*, New York, 1-160.
- [32] Sewel, P.A., Clarke, B. And Kealey, D., 1987, "Chromatographic seperations", *John Wiley and Sons*, London, 13-80.
- [33] Bidlingmeyer, B.,A., 1992, "Practical HPLC methodology and applications", *John Wiley and Sons*, New York, 69-200.
- [34] Meyer, R.,V., 1988, "Practical HPLC", *John Wiley & Sons*, Toronto, 35-42.
- [35] Suelter, C. H. And Watson, J.T., 1990, "Practical aspect of gas chromatography- mass spectrometry", *John Wiley and Sons*, New York, 2.
- [36] Yıldız, A., Genç, Ö. And Bekta , S., 1997, "Enstrümental analiz yöntemleri, 2", *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 975.
- [37] Kostainer, R., And Kauppila, T.,J., 2009, "Effect of eluent on the ionization on process in liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatography A*, 1216: 699.
- [38] Anderson, R.A., And Al-Asmari, A.I., 2007, "Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry", *J. Anal. Toxicol.*, 31: 394–395.
- [39] McMaster, M.,C., 2005, "LC/MS a practical user's guide", *John Willey and Sons*, New Jersey.
- [40] Bedse, G., Kumar, V. And Singh, S., 2009, " Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MSn", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49: 55-63.
- [41] Balasekarreddy, CH., Awen, B.Z., Babu Rao, CH., Sreekanth, N., And Ramalingam, P., 2010, "Valited HPLC method for determination of lamivudine and stavudine in their formulations", *An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 1(1): 22-28.
- [42] Krishnareddy, NV., Phani, R.S.Ch, And Ramesh Raju, R., 2011, " New RP - HPLC method development for analysis and assay of lamivudine in formulation", *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(1): 220-223.
- [43] Kumar, VR., Reddy, BP., Kumar, BR., Sreekanth, K. And Babu, KN., 2013, " High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine and nevirapine in human plasma", *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 15: 921-922.
- [44] Sawant, S. And Barge, V., 2014, "A validated stability indicating RP-HPLC method for valganciclovir, identification and characterization of forced degradation products of valganciclovir using LC-MS/MS", *Acta Chromatographica*, 26(1): 29-42.

- [45] Mathrusri Annapuma, M., Lakshmi Sai Tulasi, K. And Sirichandra, M., 2013, "Stability indicating liquid chromatographic method for the quantitative determination of valganciclovir in pharmaceutical dosage forms", *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(3): 64-70.
- [46] Do an-Topal, B., Uslu, B. And Özkan, S.A., "Development and validation of an RP-HPLC method for determination of valganciclovir in human serum and tablets", *Chromatographia*, 66: 97-101.
- [47] Manikaya Rao, T., Prabhakar, T., Girija Sankar, G. And Jyothi, N., 2012, "Development and validation of new stability indicating HPLC method for the determination of valganciclovir in tablet dosage forms", *International Journal of Pharma Sciences*, 2(4): 101-104.
- [48] Suresh Kumar, R., Hariram, B., Divya, G., Srinivasu, M.K., Srinivas, K. And Sagyam, R.R., 2012, "Development of a RP-LC method for a diastereomeric drug valganciclovir hydrochloride by enhanced approach", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70: 101-110.
- [49] Kim, J.S., Mitchell, S., Kijek, P., Tsume, Y., Hilfinger, J. And Amidon, G.L., 2006, "The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: Utility for BCS class I biowaiver requests", *Mol. Pharm.*, 3: 686-694.
- [50] Wagner, D., Spahn-Langguth, H., Hanafy, A., Koggel, A. And Langguth, P., 2001, "Intestinal drug efflux: Formulation and food effects", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 50: 13-31.
- [51] Zakeri-Milani, P., Valizadeha, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S. And Barzegar-Jalali, M., 2007, "Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat", *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 10: 368-379.
- [52] Berggren, S., Hoogstraate, J., Fagerholm, U. And Lennernas, H., 2004, "Characterization of jejunal absorption and apical efflux of ropivacaine, lidocaine and bupivacaine in the rat using in situ and in vitro absorption models", *Eur. J. Pharm. Sci.*, 21: 553-560.
- [53] Lindahl, A., Frid, S., Ungell, A.L. And Lennern, H., 2000, "No evidence for the involvement of the multidrug resistance-associated protein and/or the monocarboxylic acid transporter in the intestinal transport of fluvastatin in rats", *AAPS Pharm. Sci.*, 2: 26.
- [54] Grassi, M. And Cadelli, G., 2001, "Theoretical considerations on the in vivo intestinal permeability determination by means of the single pass and recirculating techniques", *Int. J. Pharm.*, 229: 95-105.
- [55] Barr, W.H., 1991, "The role of intestinal metabolism on bioavailability", *Pharm. Bioequivalence*: 149-168.
- [56] Edgecombe, S.C., Stretch, G.L. And Hayball, P.J., 2000, "Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine", *J. Nutr.*, 130: 2996-3002.

[57] WHO (World Health Organization) Technical Report Series, 2006, Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate-release, solid oral dosage forms, No:937.

[58] Patel, J. R., Barve And Kalyani H., 2012, "Intestinal permeability of lamivudine using single pass intestinal perfusion", *Indian J. Pharm. Sci.*, 74(5): 478-481.

[59] Kasım, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernas, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P. And Amidon, G.L., 2004, "Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification", *Mol. Pharm.*, 1: 85-96.

[60] 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: 11-23.

## ÖZGEÇM

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Emine Ertürk  
Uyru u : T.C.  
Do um tarihi ve yeri : 13.09.1989 U AK  
Medeni hali : Bekar  
e-mail : [emine.erturk@hotmail.com](mailto:emine.erturk@hotmail.com)

### E itim Derece

Lisans

### E itim Birimi

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Kimya Bölümü

### Mezuniyet tarihi

2011

Lise

Özel Üftade Koleji

2006

### Deneyimi

### Yıl

2011-

### Yer

Ömer Ertürk Madencilik

### Görev

Kimyager

### Yabancı Dil

İngilizce (Orta Seviye)