T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE METODUYLA FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ANALİZİ

Mohammad AHMADBİK

Yüksek Lisans Tezi

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA – 2018

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE METODUYLA FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ANALİZİ

Mohammad AHMADBİK

Yüksek Lisans Tezi

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202067 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA – 2018

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübeleri, yol göstericiliği ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük bir keyif aldığım her zaman yanımda olan ve destek veren, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum çok değerli arkadaşlarım Oğuzhan TOK ve Duygu ERYAVUZ ve Karam GHARAB'a sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman ve her durumda yanımda olup, destek veren, varlıkları sayesinde kendimi çok şanslı hissettiğim canım aileme, Fadime KARAMAN'a ve isimlerini burada sayamadığım herkese sonsuz teşekkür ederim.

İÇERİKLER Sayfa

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
SİMGELER ve KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Pulmoner Hipertansiyon 3
2.1.1. Pulmoner Hipertansiyon Epidemiolojisi 3
2.2. Fosfodiesterazlar 4
2.3. Sildenafil 4
2.3.1 Sildenafil'in Tarihi 4
2.3.2. Sildenafil'in Fizikokimyasal Özellikleri 5
2.3.3.Sildenafilin Etki Mekanizması 5
2.3.4.Sildenafilin Metabolizması 6
2.3.5.Sildenafilin Eliminasyonu 6
2.3.6.Sildenafilin Yan Etkileri 6
2.4. Bosentan 7
2.4.1. Bosentanın Tarihi 7
2.4.2. Bosentanın Farmakolojisi 7
2.4.3. Bosentanın Fiziko-Kimyasal Özellikleri 7
2.4.4. Bosentanın Etki Mekanizması 8
2.4.5. Bosentanın Metabolizması 8
2.4.6. Bosentanın Yan Etkileri 9
2.5. Metot Validasyonu 9
2.5.1. Validasyon (CLSI ve ISO) 9
2.5.2. Doğruluk 9
2.5.3. Analitik Aralık (Linearite) 9
2.5.4. Analitik Ölçüm Limitleri 10
2.5.5. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) 10
2.5.6. Geri Kazanım 10
2.5.7. İnterferans (Girişim) 10
2.5.8. Taşıma (Carryover) 10
2.5.9. Matriks Etkisi 11

3. GEREÇ VE YÖNTEM 12
3.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler 12
3.1.1. Cihazlar 12
3.1.2. Kimyasallar 12
3.2. Metot ve Materyal 13
3.2.1. Metot optimizasyonu 13
3.2.2. LC-MS/MS Parametreleri 14
3.2.3. Akış Gradienti 15
3.2.4. LC-MS/MS Pikler 16
3.2.5. Çalışma Prosedürü 17
3.3. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 18
3.3.1. Standartların Hazırlanması 18
3.3.2. İnternal standart hazırlama prosedürü 18
3.4. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri 19
3.4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması 19
3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri 19
3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması 19
3.4.4. Geri Elde Çalışması 20
3.4.5. İnterferans Çalışması 20
3.4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması 21
3.4.7. Dondurma Ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi 22
3.4.8. Matriks Etkisi 22
4. BULGULAR 24
4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması 24
4.2. Analitik Ölçüm Limitleri 27
4.2.1. Limit Of Detection 27
4.2.2. Limit Of Quantitation 28
4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması 29
4.3.1. Çalışma İçi Çalışması 29
4.3.2 Gün İçi Çalışmalar Arası 33
4.3.3 Günler arası 37
4.4. Geri Kazınım 41
4.5. İnterferans 42
4.6. Taşıma 44

4.7. Dondurma Çözme Etkisi 46
4.8. Matriks Etkisi 47
5. TARTIŞMA 49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 52
KAYNAKLAR 53
EKLER 54
ÖZGEÇMİŞ 55

SİMGELER ve KISALTMALAR

PAH	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
ERA	Endotelin reseptör antagonistleri
PDE-5	Fosfodiesteraz tip 5
PDE5I	Fosfodiesteraz tip 5 inhibitörleri
PDE	Fosfodiesteraz
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
NO	Nitrik oksit
SLD	Sildenafil
BST	Bosentan
ETA	Endotelin A-tipi
ETB	Endotelin B-tipi
ABD	Amerika Birleşik Devleti
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
CTEPH	Kronik Thromboembolik Pulmoner Hipertansiyon
CLSI	Clinical Laboratory Standard İnstitute
CV	Coefficient Of Variation
ESI	Elektro Sprey İyonizasyon
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
SD	Standart Sapma
ppb	Parts Per Billion
ppm	Parts Per Million
ACN	Asetonitril

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE METODUYLA FOSFODİESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ANALİZİ

Mohammad AHMADBİK

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA–2018

Fosfodiesterazlar, siklik nükleotidleri hidrolize eden ve böylece ikinci haberciler cAMP ve cGMP'nin hücre içi seviyelerini düzenlemesinde önemli bir rol oynayan çeşitli enzimler ailesidir. PDE'ler 11 alt aileden oluşmaktadır. Sildenafil sitrat seçici bir fosfodiesteraz 5 (PDE5) inhibitörüdür, kan damarlarını rahatlatan ve böylece pulmoner kan akışını geliştiren PAH tedavisi için terapötik bir seçenektir. Bosentan (BOS), hem endotelin A hem de endotelin B reseptörleri için afinitesi olan güçlü bir nonpeptid çift endotelin reseptör antagonisti (ERA) 'dır. Hem pulmoner hem de sistemik vasküler rezistansı azaltır, böylece kalp hızını arttırmadan kalp debisini arttırır. İlaç seviyesinin analizi önemlidir çünkü bu ilaçların doz aşımında ciddi yan etkileri vardır. Bu ilaçları ölçmek için yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olan bir yöntem gerekmektedir.

Bu çalışmada Sildenafil ve Bosentan analizinde, CLSI kurallarına göre yeni Sıvı Kromatografi Tandem Mass Kütle Spektrometre metodu geliştirilmiştir. Metod validasyon parametreleri içinde linearite, analitik ölçüm limitleri, tekrarlanabilirlik, geri elde, interferans, taşıma, matriks etkisi ve dondurma çözmenin etkisi çalışmaları

yapılmıştır.

Linearite çalışmasında yöntemimiz sildenafil için 1000 ve 0.975 µg/L aralığında, Bosentan için 3125 ve 3.05 µg/L aralığında lineer olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen en düşük ve en yüksek %CV değerleri sildenafil için sırasıyla 4.7 ile 6.3, bosentan için sırasıyla 4.2 ile 6.3 bulunmuştur. Sildenafil ve bosentan için yapılan geri elde çalışmasında elde edilen sonuçlar %103, Bosentan için %106.6 bir geri elde sağlanmıştır.

Numune aktarım miktarı sildenafilde -14.8, bosentan ise -13.6 olarak tespit edilmiştir. CLSI tarafından belirlenen yöntemin kabul edilebilirlik kuralları göz önüne alınarak yapılan performans değerlendirmesinde LC-MS/MS yöntemi kabul edilebilir bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Sildenafil, Bosentan, LC-MS/MS, PAH.

ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

ANALYSİS OF PHOSPHODİESTREASE INHİBİTORS BY LİQUİD CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD

Mohammad AHMADBİK

Department of Medical Biochemistry

MASTER'S THESIS / KONYA-2018

Phosphodiesterases are a diverse family of enzymes that hydrolyze cyclic nucleotides and thus play a key role in regulating intracellular levels of the second messengers cAMP and cGMP. PDEs comprise 11 subfamilies. Sildenafil citrate is a selective phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor, it is a therapeutic option for the treatment of PAH which relaxes the blood vessels and thereby improves pulmonary blood flow. Bosentan (BOS) is a potent nonpeptide dual endothelin receptor antagonist (ERA) with an affinity for both endothelin A and endothelin B receptors. It decreases both pulmonary and systemic vascular resistance, thereby increasing cardiac output without increasing the heart rate. Analysis of the drug level is important because these drugs have serious side effects in excess of dose. Measuring these drugs should have high specificity and sensitivity.

In this study, new Liquid Chromatography-Tandem Mass Mass Spectrometer method has been developed according to CLSI rules for Sildenafil and Bosentan analysis. Within the method validation parameters, linearity, limits of analytical measurement, repeatability, recovery, interference, transport, matrix effect and the effect of freezing resolution were applied.

In the linearity, our method was found the linearity between 1000 and 0.975 μg/L for sildenafil and 3175 and 3.05 μg/L for Bosentan. The lowest and highest %CV values obtained from the repeatability study were 4.7 and 6.3 respectively for sildenafil and 4.2 and 6.3 respectively for bosentan. The results obtained in the recovery study for 103% for sildenafil and 106.6% for Bosentan.

The amount of sample transfer was determined as -14.8 in sildenafil and -13.6 in bosentan. The LC-MS / MS method was found acceptable in the performance evaluation based on the acceptability rules of the method determined by CLSI.

KEY WORDS: Sildenafil, Bosentan, LC-MS/MS, PAH.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH) sağ kalp yetmezliğine neden olan ciddi ve ölümle sonuçlanan ilerleyici bir hastalıktır. Endotelin, prostasiklin ve nitrik oksit yolakları olmak üzere üç ana mekanik yolun PAH patogenezinde rol aldığı bilinmekte ve bu yolları hedefleyen terapiler mevcuttur. Birden fazla yolu hedefleyen maddelerin birleştirilmesi, PAH'ın tedavisi için çekici bir seçenektir ve monoterapiyle karşılaştırıldığında ek uzun vadeli faydalar sağlayabilmektedir (Vallerie McLaughlin1, 2015). Endotelin reseptör antagonistleri (ERA) ve fosfodiesteraz 5 inhibitörleri (PDE5I) ile kombinasyon tedavisi, PAH terapisinin etkinliğini artırmaktadır (Yeliz Enderlea, 2017). Fosfodiesteraz (PDE)'lar, siklik nükleotidleri hidrolize eden ve ikinci haberci cAMP ve cGMP'nin hücre içi seviyelerinin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynayan çeşitli enzimlerdir (Victoria Boswell-Smith, 2006).

Sildenafil (SLD)(Viagra ve Revatio), insan siklik guanozin monofosfat (cGMP) spesifik fosfodiesteraz tip 5 enziminin (PDE-5) inhibitörleridir. Sildenafil erektil disfonksiyon tedavisinde de kullanılır. Ayrıca PDE-5 akciğer kan damarlarında da bulunduğu için, inhibisyonu selektif pulmoner vazodilatasyona yol açmaktadır. Bu nedenle, sildenafil (Revatio) ve tadalafil (Adcirca) PAH tedavisinde de kullanılabilmektedir (Rust, et al., 2012). Cinsel bir uyarı için korpus kavernozum içine nitrik oksit (NO) salınması gerekmekte ve ardından cGMP birikimi ile vazodilatör etkilerini göstermektedir. Bu düz kas gevşemesi ile ereksiyona yol açmaktadır. PDE-5 inhibitörleri cGMP'yi parçalayarak PDE-5 aktivitelerini önlemekte ve daha sonra NO'nun vazodilatör etkilerini artırmaktadır (Mathieu Duez, 2014).

Bosentan (BST), bir çift endotelin reseptör antagonistidir. PAH tedavisinde kullanılmaktadır. ERA'lar, endotelin ve düz kas hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlerine [endotelin A-tipi (ETA) ve/veya B tipi (ETB)] endotelin-1'in bağlanmasını bloke ederek endotelin yolağında rol oynamaktadır (Md. Sabir Azim, 2012). BST, pulmoner ve sistemik vasküler direnci azaltır, böylece kalp atış hızını artırmadan kalp debisini artırır. BST, 2001'de ABD FDA tarafından onaylanmış ve PAH'ın başarılı bir şekilde tedavisi için kullanılan ilk oral ilaçtır (Jignesh M. Parekha, 2012).

Fosfodiesteraz inhibitörlerinden sildenafil sitrat ve bosentan PAH, impotans gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların doz fazlalığında ciddi yan etkiler olduğu için düzeyinin analizi önem arz etmektedir. Fazla miktardaki düzeylerin ciddi kardiovasküler toksisitesi bulunmaktadır. Bu ilaçları ölçecek analizlerin spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olmalıdır. Analitik interferansın azaltılması, doğruluğun arttırılması ve analiz süresinin kısaltılması amacıyla idrar ve serumda sildenafil sitrat ve bosentan düzeylerinin ölçümü için Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS)' de yeni bir ölçüm metodu geliştirerek, rutin ölçümlerde analiz istenirse kullanmayı planlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pulmoner Hipertansiyon

Pulmoner hipertansiyon, idiyopatik bir hastalıktır. Pulmoner vasküler dirençteki artış, pulmoner arter kan akımındaki artış ve/veya yüksek sol kalp dolum basınçları gibi diğer dolaşım koşullarının bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre pulmoner hipertansiyon, klinik özelliklerdeki benzerliklere, patofizyolojik ve histolojik bulgulara dayanarak beş ana gruba ayrılmıştır (Nadel's, 2010).

- **Grup 1:** Pulmoner Arter Hipertansiyonu (PAH)
- **Grup 2:** Sol Kalp Hastalığına Bağlı Pulmoner Hipertansiyon
- **Grup 3:** Akciğer Hastalıklarına ve/veya Hipoksine Bağlı Pulmoner Hipertansiyon
- **Grup 4:** Kronik Thromboembolik Pulmoner Hipertansiyon (CTEPH)
- **Grup 5:** Belirsiz Multifaktöryel Pulmoner Hipertansiyon

2.1.1. Pulmoner Hipertansiyon Epidemiolojisi

Pulmoner Hipertansiyon genel olarak sık görülen bir hastalıktır; ABD hastanelerinden taburcu edilen tüm hastaların % 2'sinden fazlasında ve bir topluluk ortamında yapılan ekokardiyogramların % 9'unda teşhis edilmektedir. Pulmoner Hipertansiyon tanılarının çoğunluğu, sol kalp hastalığı veya akciğer hastalığı ile ilişkilidir, fakat PAH (grup 1) ve Kronik Tromboembolik Pulmoner Hipertansiyon (grup 4) için küçük bir fraksiyona sahiptir. İdiopatik PAH nadirdir, milyonda yaklaşık 1 vaka yaygınlığı vardır. İdiyopatik PAH olarak adlandırılan hastalık ilk olarak 1891'de Romberg tarafından otopside tanımlanmıştır. 60 yıl içinde nedeni bilinmeyen Pulmoner Hipertansiyonu olan hastalar nadir olarak bildirilmiştir, ancak 1940'larda kardiyak kateterizasyonun gelişmesinden sonra daha yaygın olarak fark edilmeye başlanmıştır(Nadel's, 2010).

2.2. Fosfodiesterazlar

Fosfodiesterazların (PDE'ler) homeostatik rolünü cAMP ve cGMP'nin hücre içi seviyeleri ile ilgili olduğu ilk olarak Sutherland tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle 1971'de Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü almıştır. Bu enzimler fosfodiester bağını hidrolize ederek cAMP ve cGMP'nin inaktif 5-AMP ve 5-GMP formuna dönüştürüyor. cAMP ve cGMP'nin hücre içi seviyelerini optimize ederek bozulma sentezi üzerinde baskındır. PDE'ler, amino asit sekansı, substrat spesifitesi, farmakolojik özellikler ve allosterik regülasyon bazında karakterize edilen 11 alt familyaya sahiptir. Bu alt familya içinde, 40'tan fazla izoform ifade edilir, ya farklı genler tarafından ya da alternatif ekleme yoluyla aynı geni ifade etmektedir. Substrat spesifiteleri cAMP hidrolizi, cGMP hidrolizi ve her ikisini de hidrolize eden enzimleri içerir. PDE'lerin, sinyalizasyon düzenleyici olarak önemi; astım, obstrüktif akciğer hastalığı, nörolojik bozukluklar, erektil disfonksiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kalp yetmezliği ve aterosklerotik periferik hastalıklarda ilaç hedefleri olarak gelişmelerinden açıkça anlaşılmaktadır. Tüm PDE'ler arasında, sildenafil ve diğer klinik kullanım inhibitörlerinden etkilenen PDE5, yoğun araştırma konusu olmuştur. Üç PDE5 izoformu, PDE5 A1, A2 ve A3 olarak tanımlanmıştır. PDE5 A1 ve A2 izoformları, beyin, akciğer, kalp, böbrek, mesane, prostat, üretra, penis, uterus ve iskelet kası dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilir. A3 izoformu, kardiyak veya düz kas bileşeni olan dokular gibi kalp, mesane, prostat, üretra, penis, uterus ve iskelet kası gibi dokularda bulunur (Marco Guazzi, 2008).

2.3. Sildenafil

2.3.1 Sildenafil'in Tarihi

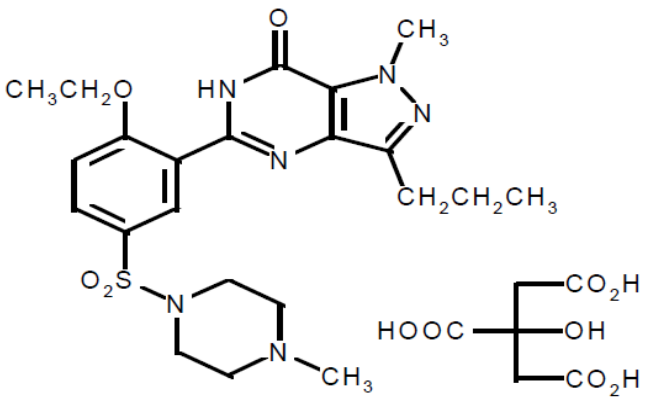
Sildenafil başlangıçta erektil disfonksiyon tedavisi için geliştirilmemiştir. Daha ziyade, 1985'te Pfizer'in İngiltere Avrupa Araştırma Merkezi'nde başlayan ve nitrik oksit (NO)/siklik guanozin monofosfat (cGMP) için fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) seçici bir inhibitörünü geliştirmeyi amaçlayan bir keşif programının sonucuydu.

1991 ve 1992 yıllarında yapılan erken faz I çalışmalarında sildenafil'in sağlıklı gönüllülerde basit lineer kinetiğe sahip olduğu ve sadece mütevazi olarak kan basıncını (plaseboya kıyasla 6-8 mmHg) düşürdüğü gösterilmiştir.

Sildenafil sitrat, bir fosfodiesteraz tip 5 (PDE5) inhibitörüdür. 1998 yılında Viagra ticari adıyla erektil disfonksiyon için onaylanmıştır. Pulmoner Hipertansiyon patolojisinde PDE5 ve nitrik oksit (NO)/siklik guanozin monofosfat (cGMP) yolunun rolü, PAH tedavisinde sildenafil sitratın güvenliğini ve etkinliğini araştıran bir gelişim programının başlamasına yol açmıştır. Daha sonra Haziran 2005'te ABD'de Revatio ticari adıyla sildenafil sitrat, PAH'ın tedavisi için onaylanmıştır (G. JACKSON, 2005).

2.3.2. Sildenafil'in Fizikokimyasal Özellikleri

Sildenafil sitrat kimyasal olarak 1 - [[3- (6,7-dihidro-1-metil-7-okso-3-propil-1Hpirazolo [4,3-d] pirimidin-5-il) -4-etoksifenil] sülfonil] -4-etilpiperazin sitrat olarak adlandırılır.ve aşağıda Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sildenafilin kimyasal açık formülü.

Sildenafil sitrat, suda 3.5 mg/mL çözünürlüğe ve 666.7'lik bir moleküler ağırlığa sahip, beyazımsı kristal bir tozdur. REVATIO (sildenafil sitrat), oral uygulama için 20 mg sildenafile eşdeğer beyaz, film kaplı yuvarlak tabletlerdir. Sildenafil sitratın aktif bileşenine ek olarak, her bir tablet aşağıdaki aktif olmayan bileşenleri içerir: mikrokristal selüloz, anhydrous dibazik kalsiyum fosfat, kroskarmeloz sodyum, magnezyum stearat, hipromelloz, titanyum dioksit, laktoz monohidrat ve triasetin(Pfizer, 2007).

2.3.3.Sildenafilin Etki Mekanizması

Sildenafil, pulmoner vaskülatörün düz kasındaki cGMP spesifik fosfodiesteraz tip-5'in (PDE5) bir inhibitörüdür. Burada PDE5, cGMP'nin

bozulmasından sorumludur. Bu nedenle Sildenafil, pulmoner vasküler düz kas hücreleri içinde cGMP'nin gevşemesine neden olur. Bu da Pulmoner Hipertansiyonu olan hastalarda pulmoner vasküler yatağın vazodilatasyonuna ve daha az derecede sistemik dolaşımda vazodilasyona yol açabilir. İn vitro çalışmalar, sildenafilin PDE5 için seçici olduğunu göstermiştir. Etkisi diğer bilinen fosfodiesterazlara göre PDE5 üzerinde daha etkilidir (DrugBank, 2005).

2.3.4.Sildenafilin Metabolizması

Sildenafil, karaciğerde 16 metaboliteye metabolize eder. Metabolizmasına esas olarak sitokrom P450 mikrozomal izozimler 3A4 (ana yol) ve 2C9 (minör yol) aracılık eder. Devasa dolaşan metabolit, sildenafilin N-desmetilasyonundan kaynaklanır. Bu metabolit, sildenafil'e benzer bir fosfodiesteraz seçicilik profiline ve ana ilacın yaklaşık% 50'sine PDE5 için in vitro bir güce sahiptir. Hem sildenafil hem de aktif metabolitin yaklaşık 4 saatlik terminal yarı ömürleri vardır. Potansiyel sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) inhibitörlerinin yanı sıra nonspesifik CYP inhibitörünün eş zamanlı kullanımı, artan plazma seviyeleri olan sildenafil ile ilişkilidir (Pfizer, 2007).

2.3.5.Sildenafilin Eliminasyonu

Sildenafil, ağızdan veya intravenöz uygulamadan sonra çoğunlukla dışkıda (uygulanan oral dozun yaklaşık olarak %80'i) ve idrarda daha az oranda (uygulanan oral dozun yaklaşık %13'ü) metabolitler olarak atılır.(Pfizer, 2007).

2.3.6.Sildenafilin Yan Etkileri

- Epistaksis
- Baş ağrısı
- Hazımsızlık
- Kızarma
- Uykusuzluk
- Eritem
- Dispne alevlenir
- Rinit

- İshal
- Kas ağrısı
- Pireksiya
- Gastrit
- Sinüzit
- Parestezi (Pfizer, 2007)

2.4. Bosentan

2.4.1. Bosentanın Tarihi

1994'te Martine Clozel ve Hoffman-La-Roche'de (Basel, İsviçre) grubu, Bosentan'ın keşfedildiğini bildirdi. Bosentan, non-peptid, oral yoldan aktif, çift endotelin reseptör antagonisti olup, Pulmoner Arter Hipertansiyonunun (PAH) tedavisinde başarıyla kullanılacak ilk endotelin reseptör antagonistidir (ERA). Endotelin reseptör antagonizması, Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonda (PAH) önemli bir terapötik yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Md. Sabir Azim, 2012).

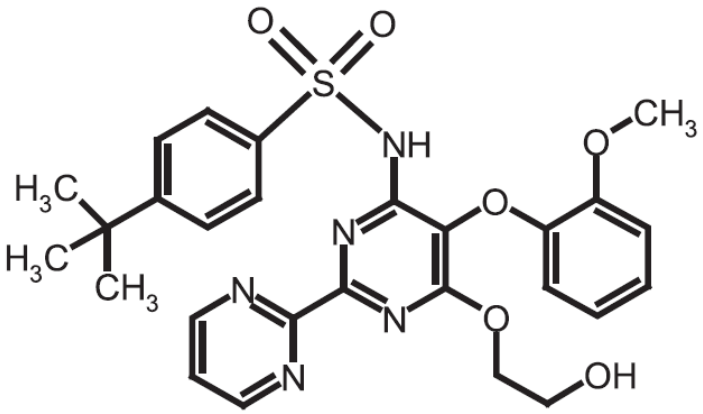
2.4.2. Bosentanın Farmakolojisi

Bosentan, hem sitokrom P450 (CYP) 3A4 hem de CYP2C9 enzimlerini indüklediği bildirilen bir endotelin-reseptör antagonistidir. Hem de warfarin metabolizmasına karışmaktadır. Non-selektif oral ET-1 reseptör antagonisti Bosentan, semptomatik Pulmoner Arteriyel Hipertansiyonlu hastalarda pulmoner arter basıncını ve vasküler direncini düşürmekte ve egzersiz kapasitesini veya yaşam kalitesini geliştirmektedir. Bosentan'ın farmakokinetiği günde 600 mg (tek doz) ve 500 mg (çoklu doz) doza orantılıdır. İlk 4 haftada günde iki kez 62.5 mg ve sonradan günde iki defa 125 mg dozda verilmektedir (Md. Sabir Azim, 2012).

2.4.3. Bosentanın Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Bosentan, 4-tert-bütil-N- [6- (2-hidroksietoksi) -5- (2-metoksifenoksi) -2- (pirimidin-2-il) pirimidin-4-il] benzen-1-sülfonamiddir (Şekil 2.2). kimyasal formülü $C_{27}H_{29}N_5O_6S$. Moleküler ağırlık 551.61 g/mol. Soluk Sarı-Koyu-Beyaz Katıdır. Bosentan'ın erime noktası 107-110 ° C'dir. Suda az çözünür (1.0 mg / 100 ml) ve düşük pH'da sulu solüsyonlarda (pH 1.1 ve 4.0'da 0.1 mg / 100 ml, pH 5.0'de 0.2 mg

/ 100 ml) çözünmekte ve yüksek pH değerlerinde çözünürlüklüğü artar (pH 7.5'te 43 mg / 100 ml) (Md. Sabir Azim, 2012).



Şekil 2.2 Bosentan'ın kimyasal açık formülü.

2.4.4. Bosentanın Etki Mekanizması

Endotelin-1 (ET-1), etkileri endotel ve vasküler düz kasında ETA ve ETB reseptörlerine bağlanarak aracılık edilen bir nöro hormondur. ET-1 konsantrasyonları, pulmoner arteriyel hipertansiyonlu hastaların plazma ve akciğer dokularında yükselir ve bu hastalıkta ET-1 için patojenik bir rol önermektedir. Bosentan, endotelin reseptör tipleri ETA ve ETB'de spesifik ve rekabetçi bir antagonisttir. Bosentan, ETA reseptörleri için ETB reseptörlerine göre biraz daha yüksek bir afiniteye sahiptir (DrugBank, 2005)

2.4.5. Bosentanın Metabolizması

Bosentan, yüksek düzeyde proteine bağlanmaktadır. Yaklaşık %98 oranında albumin ile bağlanmaktadır. Hepatik sitokrom P450 (CYP) enzimleri CYP3A4 ve CYP2C9 tarafından metabolize edilmektedir. Bosentan ve metabolitlerinin eliminasyonu öncelikle safra sistemi ile yapılmakta ve %3'ten daha azı böbrekten atılmaktadır. Bosentanın yarılanma ömrü 5-8 saattir. Sitokrom P450 enzimleri ile olan etkileşiminden ötürü, karaciğer hastalığı olan hastalarda bosentana veya bazal karaciğer transaminazlarının normal üst sınırın 3 katından fazla olması kaçınılmalıdır. Bosentan karaciğer tarafından yoğun şekilde metabolize edilmektedir (Md. Sabir Azim, 2012).

2.4.6. Bosentanın Yan Etkileri

- Ciddi doğum kusurları: Bosentan hamilelikte kullanıldığında ciddi doğum kusurlarına neden olur.
- Sıvı tutma ve ayak bilekleri ve bacaklarda şişme: Bosentan (Tracleer) vücutta çok fazla su tutulmasına ve ayak bileği ve bacakların şişmesine neden olabilir.
- Düşük Sperm Sayısı
- Düşük eritrosit seviyeleri (anemi).

Bosentanın en sık görülen yan etkileri:

- Mide bulantısı
- Kusma
- Ateş
- Yorgunluk
- Karın ağrısı
- Sarılık (Md. Sabir Azim, 2012)

2.5. Metot Validasyonu

2.5.1. Validasyon (CLSI ve ISO)

Bir işlem, süreç, sistem, donanım ya da yöntemin beklendiği şekilde çalıştığını ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya sürecidir.

2.5.2. Doğruluk

Doğruluk, bir analitin ölçülen seviyelerinin gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. Hata (bias) ise iki değer arasındaki farkı gösterir. Sistematik hata ve rastgele hataların toplamı, toplam hatayı oluşturmaktadır (Tietz, 2006). Doğruluk yöntem karşılaştırma, geri elde etme ve interferans çalışmaları ile belirlenmektedir.

2.5.3. Analitik Aralık (Linearite)

Analitik aralık, örnekte hiç modifikasyon yapılmadan yöntemin doğru bir şekilde ölçelebildiği konsantrasyon aralığıdır. Linearite sınırları kalibrasyon eğrisi

çizilerek saptanmaktadır. Bir yöntemin analitik aralığı, beklenen değerin % 95-99'unu dilüsyon işlemi yapılmadan ölçebilmesidir (Tietz, 2006).

2.5.4. Analitik Ölçüm Limitleri

2.5.4.1. Limit Of Dedection (LOD)

Saptanabilen en düşük analit miktarıdır (Tietz, 2006).

2.5.4.2. Limit Of Quantitation (LOQ)

Belli bir presizyon ve doğruluk değerinde kantitatif olarak ölçülebilen en küçük analit miktarıdır (Tietz, 2006).

2.5.5. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Bir analitik yöntemin aynı numunenin ard arda analiz sonuçlarını aynı şekilde analiz edebilme gücüdür. Bu yöntemin kesinliğini gösterir ve rastgele hatayı belirlemek amacıyla kullanılır (Tietz, 2006).

Klinik Anlamlılık: İnterferans oluşturan bir analitik etki, ne kadar büyük olursa o kadar klinik anlamlı olmaktadır.

2.5.6. Geri Kazanım

Bir analitik yöntemin konsantrasyonu, bilinen miktarda eklenen analiti doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğidir. Geri kazanım ölçümleri, bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgiyi vermektedir. Çünkü içeriği bilinen numunenin matriksinde bulunan tüm bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğünü göstermektedir (Tietz, 2006).

2.5.7. İnterferans (Girişim)

Analitten başka bir bileşiğin etkisi veya örneğin özelliği nedeniyle, ölçülen analit konsantrasyonunda klinik olarak anlamlı bir Bias'ın oluşmasıdır (Tietz, 2006).

2.5.8. Taşıma (Carryover)

Otomatize çalışan sistemlerde, ard arda gelen numuneler arasında aktarım olup olmadığını, oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermek için yapılır. Yüksek ve düşük konsatrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek

okutulur. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenir (Westgard, 2008)

2.5.9. Matriks Etkisi

Matriks etkisi, standart solüsyon içindeki analit ile plazma gibi biyolojik matriksteki aynı analitin LC-MS/MS analizlerinde farklı cevaplar oluşturmasıdır. Eş zamanlı salınan endojen fosfolipitler ve pek çok farklı bileşikten kaynaklanır. Çok değişken olabilir, bu yüzden matriks etkisini tahmin etmek zordur. Hedef analitin iyonizasyonunu etkilemektedir (Chambers ve ark, 2007). İyonizasyon etkileri teorik olarak çözelti fazında ya da gaz fazında oluşabilir. Biyolojik ekstraklarda ESI ile yapılan çalışmalar, iyon süpresyonunun temel sebebini, uçucu olmayan ya da daha az uçucu çözünenden kaynaklanan sprey damlacığı özelliklerinin değişimi olarak göstermektedir. Bu uçucu olmayan materyaller (tuzlar, ilaçlar ve metabolitleri, iyon eşleştirme ajanları, endojen bileşikler) damlacık buharlaşma verimliliğini ya da damlacık oluşumunu değiştirerek gaz fazında dedektöre ulaşan yüklü iyon miktarını etkilemektedir (Annesley, 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler

3.1.1. Cihazlar

- Tandem MS (Abscıex API 3200) (Singapur)
- HPLC { (Shımadzu UFLC; dgu-20 a3 (degasser), LC-20 ad (A pompası) LC20 ad (B pompası) ve sıl-20 AC HT (oto sampler) }(Japonya)
- Vortex (dragon lab, almanya)
- Santrifüj (beckman coulter allegratm x-2212) (kazlauskaite ve ark)
- Evaporator (teknosem teb 40-wel wt, türkiye)
- Ultrasonik Banyo
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (brand, almanya)

3.1.2. Kimyasallar

- HPLC kolonu (phenomenex luna 5u c18, 50x4.6mm, part no: 00b-4041-e0)
- Nitrojen tüpü (habaş)
- İnternal standart {asetaminofen (parol)} atabay kimya san. ve tic. A.ş.
- Revatio 20 mg (Sildenafil sitrat tableti)
- Tracleer 62.5 mg (Bosentan tableti)
- Asetonitril { merck 2.5l (lot: 1.00030.2500) darmstadt, almanya) }
- HPLC grade su {chemsolute,(bach no: q2a085192a) almanya) }
- Formik asit {hcooh){sigma aldrich, lot no: 81420 }
- Etil asetat {merck: 2,5l (lot: 1.00868.2500) darmstadt, almanya) }
- NaOH {merck: k40124804 919, darmstadt, almanya}

3.2. Metot ve Materyal

3.2.1. Metot optimizasyonu

Optimum parametreleri bulabilmek ve en yüksek intensiteye sahip piklere elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirildi. Uygun mobil fazı belirlemek için çalışmamızda Sildenafil için %100'lük su, Bosentan için %100 Etanol ile hazırlanan standartlar kullanıldı. İlk hazırladığımız mobil faz A % 0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B % 0.1'lik formik asit içeren % 100'lük asetonitril ile yapıldı. İkinci denemede mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B % 0.1'lik formik asit içeren % 100'lük asetonitril ile yapıldı. Üçüncü denemede izokratik olarak % 0.1'lik formik asit içeren % 50 su/asetonitril ile yapıldı. Uygun mobil fazı bulabilmek için formik asitin iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalanarak en uygun intensiteyi mobil faz A % 0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B % 0.1'lik formik asit içeren %100'lük asetonitril ile elde edildi.

Cihaz ayarları ile ilgili olarak süre denemeleri 50 milisaniye, 100 milisaniye, 150 milisaniye, 200 milisaniye; enjeksiyon volümü 20 µl, 30 µl , 40 µl 50 µl; sıcaklık denemeleri 350°c, 400°c, 450°c, ile çalışmalar gerçekleştirildi. İonspray voltaj (ıs) ile ilgili denemeler, 4000v, 4500v, 5000v ve 5500v ile gerçekleştirildi.

Akış gradientini belirlemek için yaptığımız deneme çalışması sonucunda total akış hızı 1ml/dk olarak belirlendi. Çalışmada total akışta pompa B'nin yüzdesini belirlemek için %50, %60 ve %70 ile deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Sonuç olarak çalışmada kullanılan akış gradienti Çizelge 3.1'te gösterilmiştir.

Su ve etanol ile hazırlanmış standartlar uygun gaz ayarları ve potansiyel ayarlarının çalışmaları deneyerek yapıldı. Gaz ayarları ve potansiyel ayarları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen deneme çalışmaları sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde edilen koşullar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

3.2.2. LC-MS/MS Parametreleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

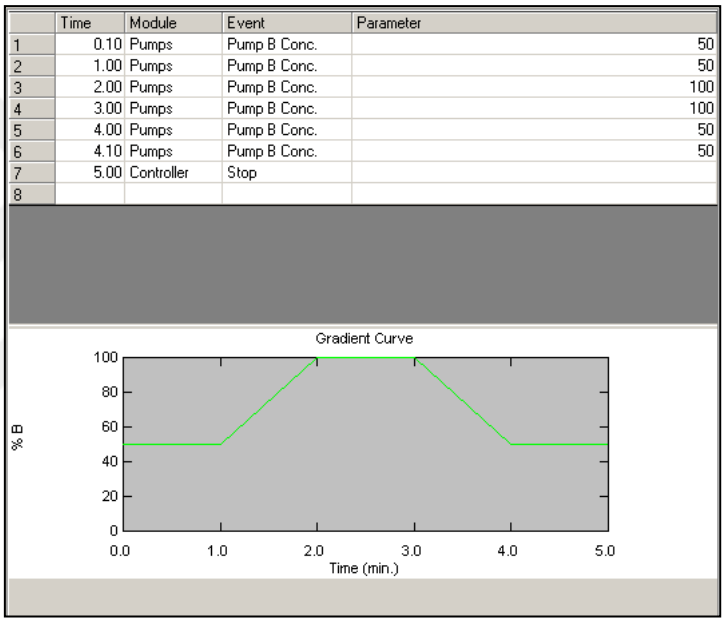
Çizelge 3.1 LC-MS/MS parametreleri.

Declustering potential (dp)	40
Entrance potential	10
Collision energy (ce)	35
Collision cell exit potential (cxp)	4
Curtain gas (porter ve ark)	20
Collision gas (cad)	6
Ionspray voltage (ıs)	5000 v
Temperature (tem)	350ºc
Ion source gas1 (gs1)	40
Ion source gas2 (gs2)	60
Interface heater	Off
Ionisation mode	Elektro sprey iyonizasyon
Ionisation source	Turbo sprey
Collision gas	N_2
Dwell time	100 milisaniye
Pompa modu	Binary flow
Total akış	1 ml/dk
Enjeksiyon volume	40 µl
Analiz süresi	5 dk
Kolon	HPLC kolonu (phenomenex luna 5u c18, 50x4.6mm)
Mobil faz A	% 0,1'lik formik asit içeren HPLC grade su
Mobil faz B	% 0,1'lik formik asit içeren asetonitril

Sildenafil standartları %100 suda, Bosentan standartları %100 etanolde çözdürüldü. Q_1 ve Q_3 iyonlarının tayini absciex API 3200 tandem mass spektrometri cihazında autotune algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. En yüksek intensiteye sahip Q_1 ve Q_3 iyonları Sildenafil için 475.200 ve 58.000 , Bosentan için 552.200 ve 202.100 olarak belirlendi. İnternal standart (asetaminofen) için ise en yüksek intensiteye sahip iyonlar (Q1-Q3) 152.100-65.100 olarak belirlendi. Piklerin çıkış süresi Sildenafil için: 0.95 dk, Bosentan için 3.15 dk'dır.

3.2.3. Akış Gradienti

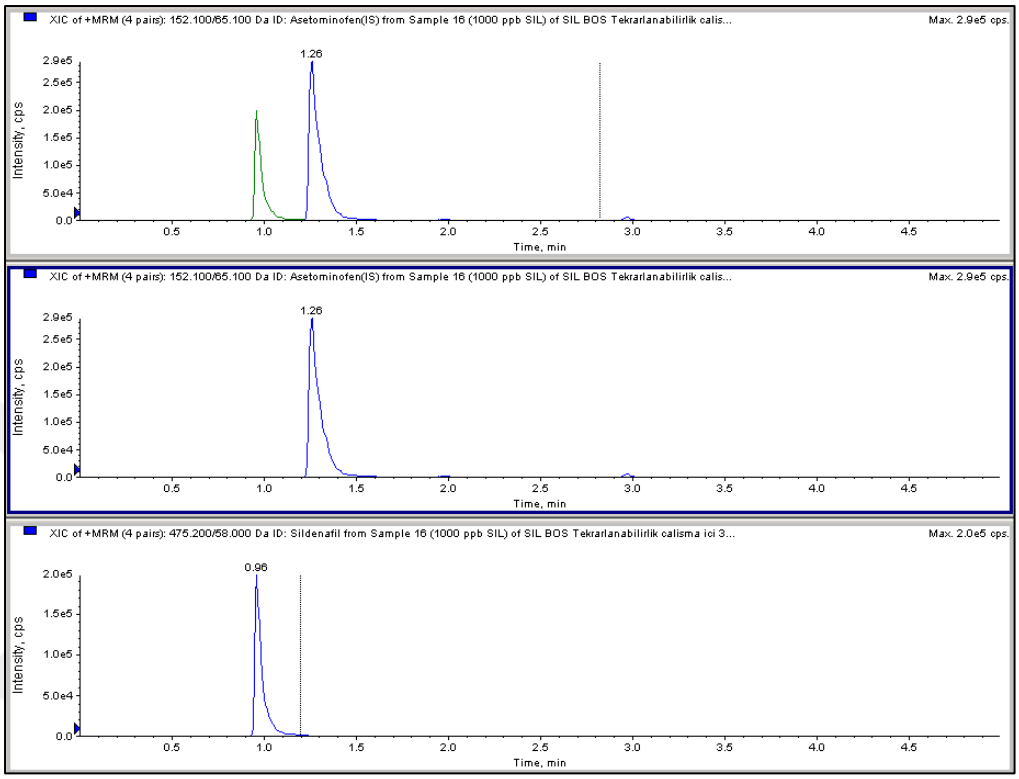
Çalışmada kullanılan akış gradienti Şekil 3.1'de verilmiştir.



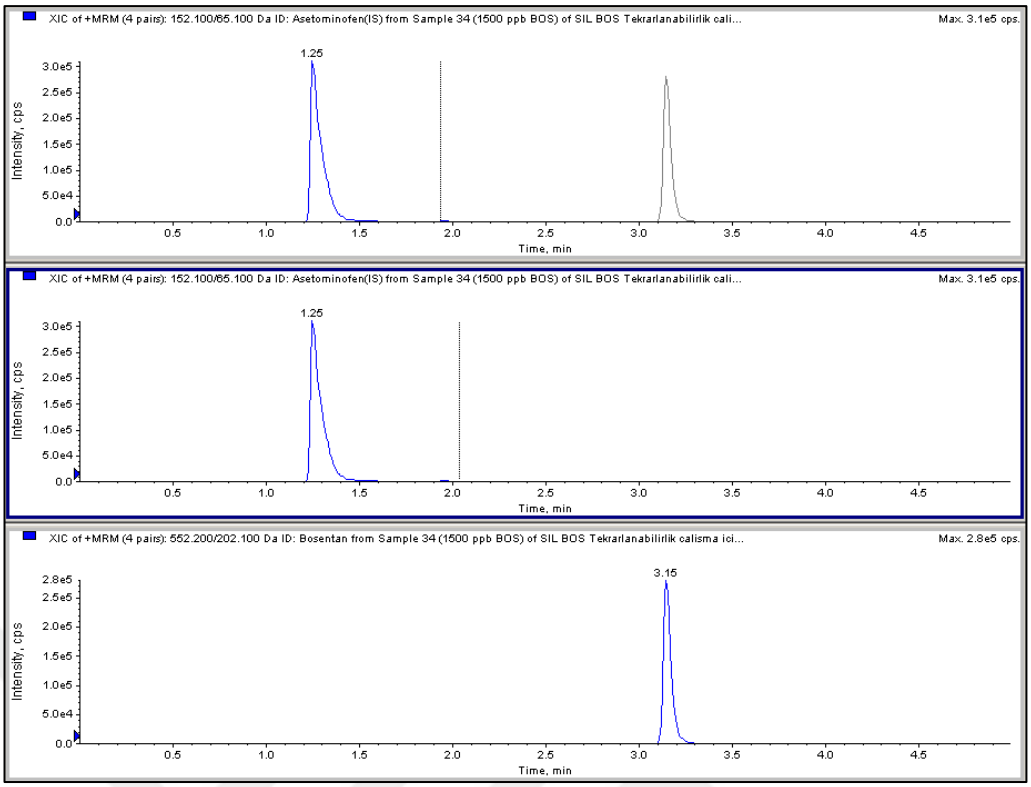
Şekil 3.1 Akış gradienti.

3.2.4. LC-MS/MS Pikler

Çalışmada elde edilen Sildenafil-internal standartlarına ait LC-MS/MS pikleri Şekil 3.2'de ve Bosentan-internal standartlarına ait LC-MS/MS pikleri Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Sildenafil-internal standart (asetaminofen) pikleri.



Şekil 3.3 Bosentan-internal standart (asetaminofen) pikleri.

3.2.5. Çalışma Prosedürü

250 µl örnek ya da standart alınıp üzerine 250 µl internal standart ve 500 µl pH'sı 8-9 arası olan NaOH eklendi. 30 sn vortekslendi. 1,5 ml etil asetat eklenerek 2 dk vortekslendi. 3500×rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz temiz bir tüpe alındı. Üst fazı alınmış tüpe tekrar 1,5 ml etil asetat ilave edilip tekrar 2 dk vortekslendi. 3500×rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bunun üst fazı da tekrar üst fazı alınan temiz tüpe ilave edildi. Azot gazı altında uçurularak kurutulan tüplere %50'lik asetonitrilden 100 µl ilave edilerek çözüldü. 100 µl viallere enjekte edilip viallerin kapakları kapatıldı ve spore yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi.

3.3. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Standartların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Sildenafil ve Bosentan standartları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyo Vasküler Cerrahi bölümünden tablet olarak alındı.

Sildenafil için hazırlanan stoklar:

Stok 1: tablet haldeki Sildenaif standartı 200 mg/L olacak şekilde %100 su ile çözüldü.

Stok 2: stok 1'den 1/100 dilüsyon yapılarak 2 mg/L = 2000 µg/l'lik standart elde edildi.

Stok 3: stok 2'den %50 dilüsyon yapılarak 1000 µg/L'lik standart elde edildi.

Bosentan için hazırlanan stoklar:

Stok 1: tablet haldeki Bosentan standartı 625 mg/L olacak şekilde %100 etanol ile çözüldü.

Stok 2: stok 1'den 1/100 dilüsyon yapılarak 6.25 mg/L = 6250 µg/l'lik standart elde edildi.

Stok 3: stok 2'den %50 dilüsyon yapılarak 3125 µg/L'lik standart elde edildi.

3.3.2. İnternal standart hazırlama prosedürü

Bulunan asetaminofen ana stoktan (10 mg/mL) 1/1000 dilüsyon yapılarak 10000 µg/L'lik standart elde edildi.

3.4. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri

3.4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Metot validasyonu kapsamında gerçekleştirilen linearite çalışmaları CLSI EP6-A protokolüne göre çalışıldı. Bu çalışma ile kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemek amaçlandı.

Bu protokol doğrultusunda serum ile Sildenafil için 2000 µg/L'den, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.95 ve 0.975, µg/L'lik ve Bosentan için 6250 µg/L'den 3125, 1562.5, 781.25, 390.625, 195.3, 97.65, 48.8, 24.4, 12.2, 6.1, 3.05, 1.5 ve 0,75 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde seri dilüsyon yapıldı.

3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri

Limitler CLSI EP17 protokolüne göre belirlendi. (westgard ve ark, 2008).

3.4.2.1. Limit Of Detection (LOD)

Kromatografik yöntemlerde alt limitlerin sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi.

3.4.2.2. Limit Of Quantitation (LOQ)

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlendi.

3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması

Kesinlik çalışması CLSI EP5-A protokolüne göre gerçekleştirildi. CLSI EP5-A protokülüne uyularak serum havuzu ile Sildenafil için 1000 ve 200 µg/L'lik, Bosentan için 1500 ve 300 µg/L'lik çalışma içi ve gün içi çalışmalar arası 20 ölçüm çift çalışılarak, günler arası ise 5 ölçüm 4 gün çalışılarak tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi.

3.4.4. Geri Elde Çalışması

Geri elde çalışmasında Sildenafil için 1000, 500 ve 200 µg/L'lik, Bosentan için 1500, 750 ve 300 µg/L'lik standartlar kullanıldı.

Sildenafil ile geri elde çalışması için:

- Her bir tüp totalde 1000 µl olacak şekilde hazırlandı.
- 1. Tüpe 1000 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
- 2. Tüpe 500 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
- 3. Tüpe 200 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.

Bosentan ile geri elde çalışması için:

- Her bir tüp totalde 1000 µl olacak şekilde hazırlandı
- 1. Tüpe 1500 µg/l'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
- 2. Tüpe 750 µg/l'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
- 3. Tüpe 300 µg/l'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.

Ön işlemler tamamlanarak okutuldu ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplandı.

3.4.5. İnterferans Çalışması

Çalışmamızda kullanılmak üzere Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuarına rutin tahlil için gelen işlemi tamamlanmış artakalan numunelerden lipemik ve hemolizli serumlar alındı. Sildenafil ve bosentandan 1000-

250 µg/L'lik konsantrasyonlarda serum havuzu oluşturuldu.. interferan madde eklemek için her iki ilacın her düzeyi için üçer tüp alındı.

Her iki ilacın yüksek düzeyli 1.tüplerine 1000 µl interferan madde, 2.tüpülerine 500 µl interferan madde ile 500 µl saf serum ve 3.tüplerine 250 µl interferan madde ile 750 µl saf serum alınarak her birinin üzerine 1000 µl yüksek düzey serum havuzundan eklendi. Her iki ilacın düşük düzey konsantrasyonları için de aynı işlemler tekrarlandı.

Böylece her iki düzey için %100, %50 ve %25´lik konsantrasyonlarda interferan madde içeren tüpler elde edildi.

1. Tekrar interferan konsantrasyonu azalan sırada, 2. Tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada, 3. Tekrar interferan konsantrasyonu azalan sırada olacak şelikde gerçekleştirildi. Tüm konsantrasyonlarda ve interferanlarda aynı işlem tekrarlanmıştır.

3.4.6. Taşıma (Carryover) Çalışması

Taşıma çalışmasında yüksek ve düşük konsatrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutuldu. Düzenleme şekli aşağıda verilmiştir.

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

Grup 1: D2-D3-D6-D7-D8

Grup 2: D4-D5-D9-D10-D11

Grup 1 düşüklerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, grup 2 yükseklerden sonra gelen düşük numuneleri içerir. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen hatadan küçük olması durumun da taşıma hatasının olmadığı söylenir (westgard ve ark, 2008).

Taşıma çalışmasında Sildenafil için kullanılan konsantrasyonlar;

Düşük konsantrasyon: 200 µg/L

Yüksek konsantrasyon: 1000 µg/L'dir.

Taşıma çalışmasında Bosentan için kullanılan konsantrasyonlar;

Düşük konsantrasyon: 300 µg/L

Yüksek konsantrasyon: 1500 µg/L'dir.

Sildenafil ve Bosentan için yukarıdaki konsantrasyonları kullanarak taşıma çalışması için gerekli tüpler standart ön işlemlerden geçirildi ve yukarıdaki sıraya göre analiz edildi.

3.4.7. Dondurma Ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi

Dondurma ve çözme işleminin Sildenafil ve Bosentan ölçümüne etkisini belirlemek amacıyla düşük ve yüksek düzey olmak üzere farklı konsantrasyonlarda serum havuzu oluşturuldu. 4 defa dondurup çözme işlemi gerçekleştirildi. Çözdürülen numuneler standart ön işlemlerden geçirilerek analiz edildi ve ölçüm sonuçları kaydedildi.

3.4.8. Matriks Etkisi

Matriks etkisi çalışması, Chambers ve arkadaşlarının yaptığı çalışma protokülüne uygun olarak Sildenafil ve Bosentan için gerçekleştirildi ve çalışma sonuçları yaptıkları % matriks etkisi hesaplamasına göre hesaplandı. Sildenafil için 1000, 500 ve 250 µg/L'lik standartlar, Bosentan için ise 781, 390 ve 195 µg/L'lik standartlar kullanılarak gerçekleştirildi. Numune hazırlama protokülüne göre bir serum havuzundan Sildenafil ve Bosentan için 3'er tüp olmak üzere 6 tüp hazırlanarak ön işlemlerden geçirildi.

Sildenafil için ön işlemden geçirilen 3 tüpe 250 µl ilaç içermeyen serum eklendi, ön işlemler yapılarak azot gazın altında kurutulduktan sonra 100 µl %50'lik ACN ile çözülüp, sırayla 100 µl 1000, 500 ve 250 µg/l'lik Sildenafil standartı eklenerek iyice karıştırıldı ve 100 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi. Aynı

analiz içinde Sildenafil için herhangi bir ön işlem yapılmadan 3 tüpe 100 %50'lik ACN ve sırayla 100 µl 1000, 500 ve 250 µg/L'lik Sildenafil standartı eklenerek iyice karıştırıldı ve 100 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi.

Bosentan için ön işlemden geçirilen 3 tüpe 250 µl ilaç içermeyen serum eklendi, ön işlemler yapılarak azot gazın altında kurutulduktan sonra 100 µl %50'lik ACN ile çözülüp, sırayla 100 µl 781, 390 ve 195 µg/l'lik Bosentan standartı eklenerek iyice karıştırıldı ve 100 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi. Aynı analiz içinde Bosentan için herhangi bir ön işlem yapılmadan 3 tüpe 100 µl %50'lik ACN ve sırayla 100 µl 781, 390 ve 195 µg/L'lik Bosentan standartı eklenerek iyice karıştırıldı ve 100 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi. Sildenafil ve Bosentan için ön işlem uygulanan ve ön işlem uygulanmayan aynı konsantrasyondaki standartların pik alanlarından matriks etkisi hesaplaması yapıldı.

4. BULGULAR

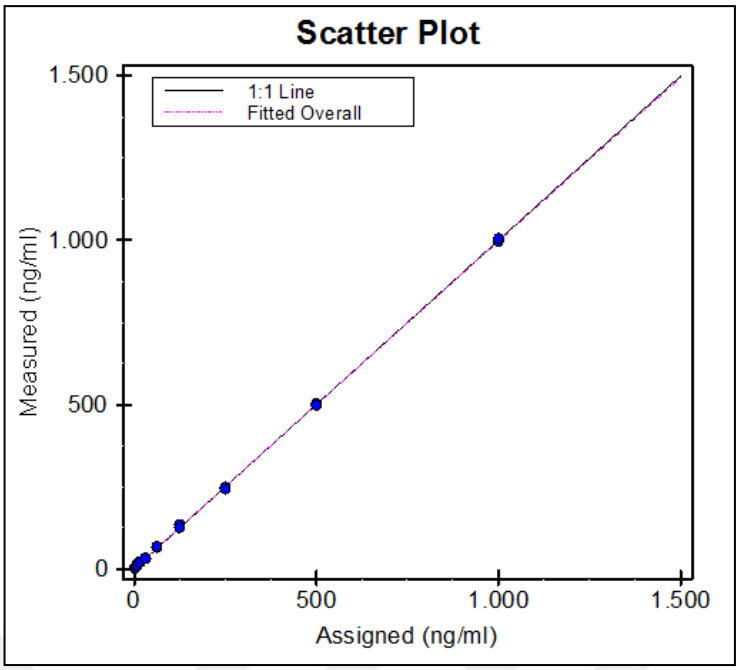
4.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Sildenafil için linearite souçları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Sildenafil linearite verileri.

Dilüsyon No	Sildenafil µg/l	Sildenafil 1.ölçüm	Sildenafil 2.ölçüm	Sildenafil 1. Ve 2. Ölçüm ortalaması	Uygunluk %
1	1000	997	1005	1001	100.1
2	500	504	498	501	100.2
3	250	249	244	246.5	98.6
4	125	135	125	130	104
5	62.5	65.2	68.4	66.8	106.9
6	31.25	33.2	32.1	32.65	104.5
7	15.625	22	20.6	21.3	136.4
8	7.812	14.8	11.6	13.2	169.2
9	3.9	5.5	3.4	4.45	114.1
10	1.95	5.1	2.9	4	205.1
11	0.975	3.3	1.9	2.6	268

Çizelge 4.1'de sildenafilin serum ile 1000 µg/L'den başlayıp 0.975 µg/L'ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları gösterilmiştir. Her bir konsantrasyon çift ölçülüp, ortalamaları alınmıştır. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edilmiştir.



Grafik 4.1 Sildenafil linearite grafiği ve sonuçların dağılımı.

Y=0.000299

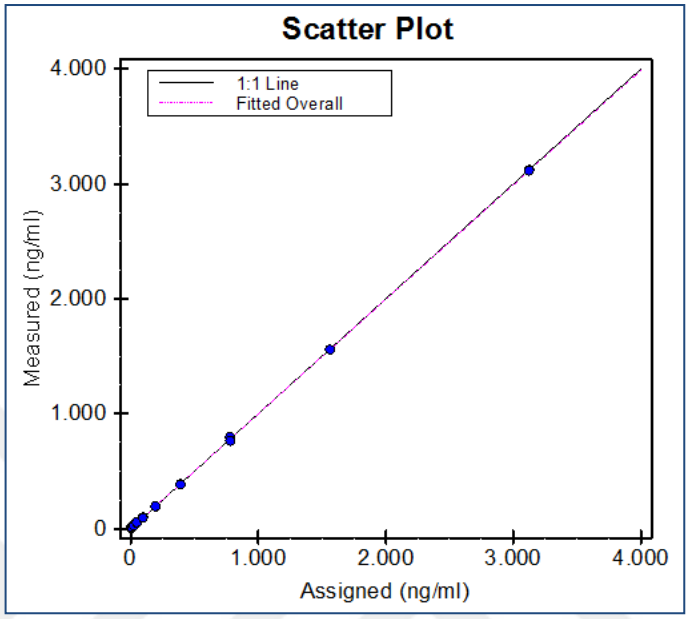
R2 =0.9999

Bosentan için linearite souçları Çizelge 4.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Bosentan linearite verileri.

Dilüsyon No	Bosentan µg/L	Bosentan 1.ölçüm	Bosentan 2.ölçüm	Bosentan 1. ve 2. Ölçüm ortalaması	Uygunluk %
1	3125	3122	3126	3119	99.8
2	1562.5	1560	1558	1559	99.8
3	781.25	798	765	781.5	100
4	390.625	389	385	387	99.1
5	195.3	192	196	194	99.3
6	97.65	98	95	96.5	98.8
7	48.8	52	57	54.5	111.7
8	24.4	32	28	30	123
9	12.2	18.4	15.7	17.05	139.8
10	6.1	7.9	8.1	8	131.1
11	3.05	4.1	4.6	4.35	142.6
12	1.5	2.7	2.9	2.8	186.6
13	0.76	1.8	2.2	2	263

Çizelge 4.2'de Bosentanın serum ile 3125 µg/L'den başlayıp 0.76 µg/L'ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları gösterilmiştir. Her bir konsantrasyon çift ölçülüp, ortalamaları alınmıştır. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edilmiştir.



Grafik 4.2 Bosentan linearite grafiği ve sonuçların dağılımı.

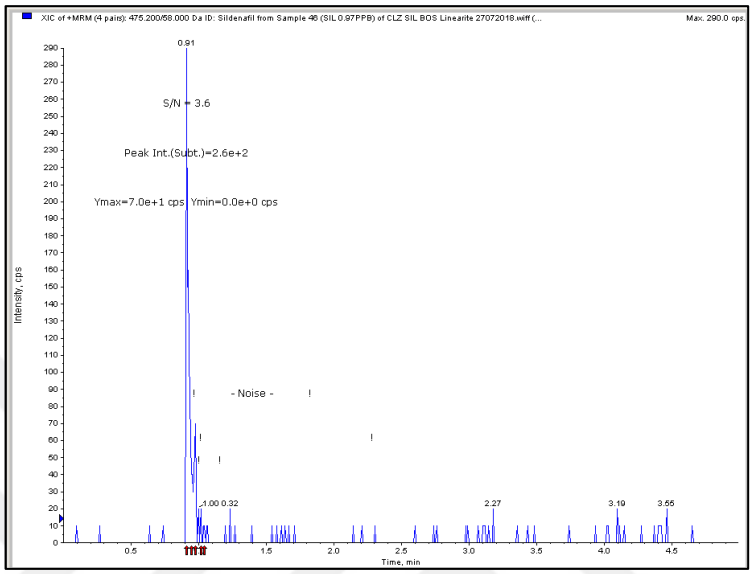
Y=0.00041

R2 =0.9998

4.2. Analitik Ölçüm Limitleri

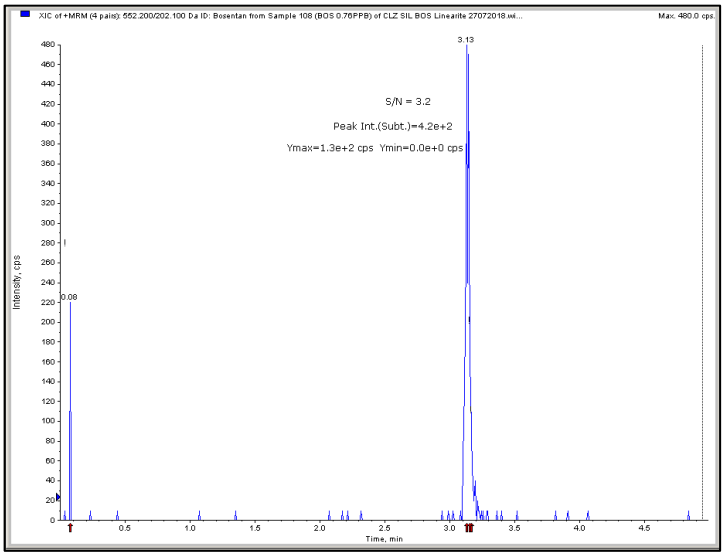
4.2.1. Limit Of Detection

Sildenafil için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD Grafik 4.3'de gösterilmiştir



Grafik 4.3 Sildenafil için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD 0,97 µg/l olarak tespit edilmiştir.

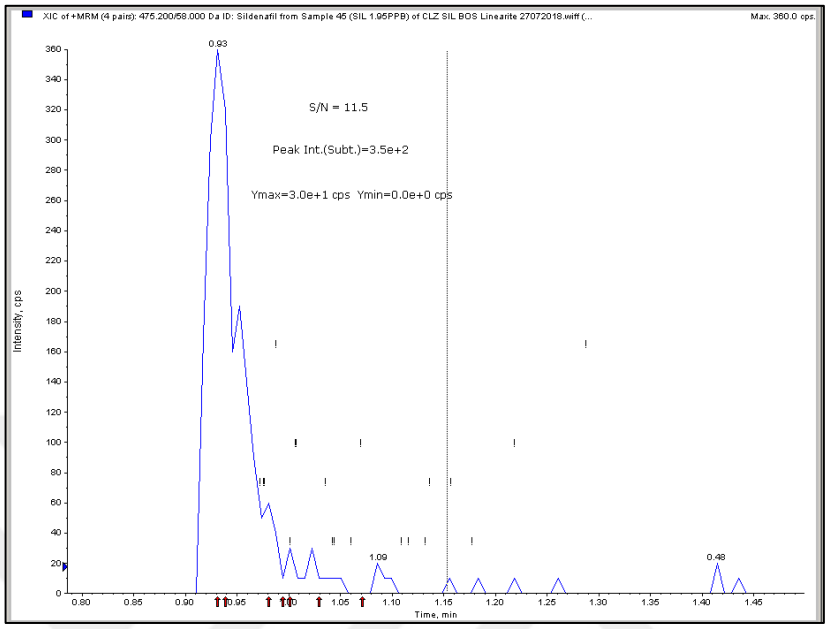
Bosentan için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD Grafik 4.4'de gösterilmiştir.



Grafik 4.4 Bosentan için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD 0.76 µg/l olarak tespit edilmiştir.

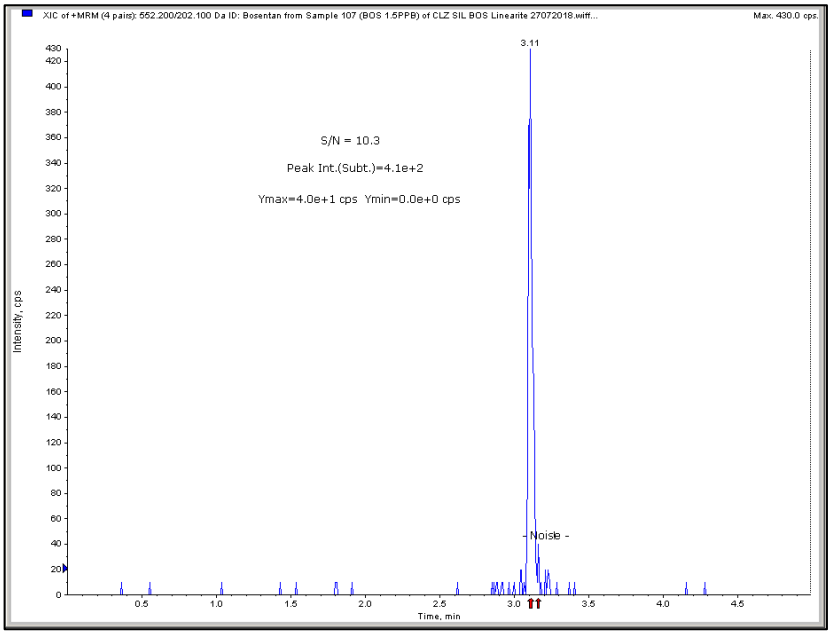
4.2.2. Limit Of Quantitation

Sildenafil için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ Grafik 4.5' te gösterilmiştir.



Grafik 4.5 Sildenafil için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ 1.95 µg/l olarak tespit edilmiştir.

Bosentan için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ Grafik 4.6 'de gösterilmiştir.

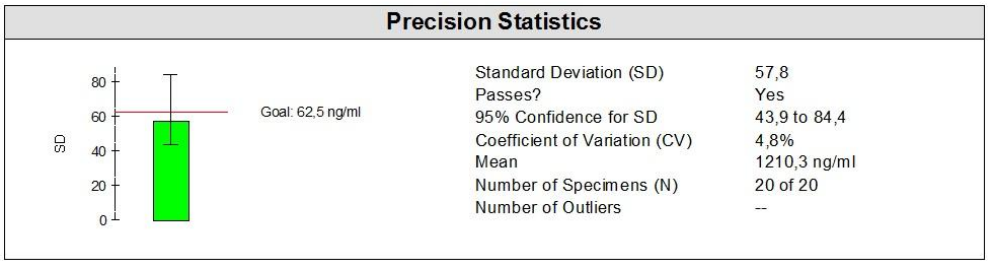


Grafik 4.6 Bosentan için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ 1.5 µg/l olarak tespit edilmiştir.

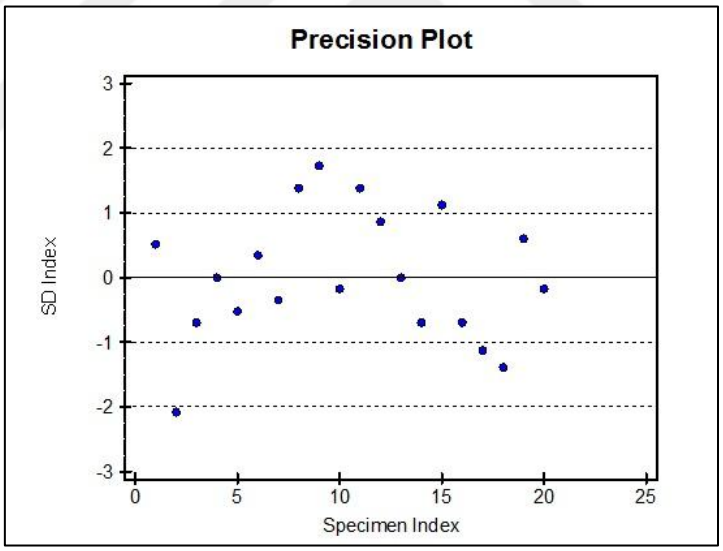
4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması

4.3.1. Çalışma İçi Çalışması

Sildenafil için 1000 ile 200 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ard arda 20 defa okutuldu. 1000 µg/L'lik sildenafil konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.1'de gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.7'de gösterilmiştir.

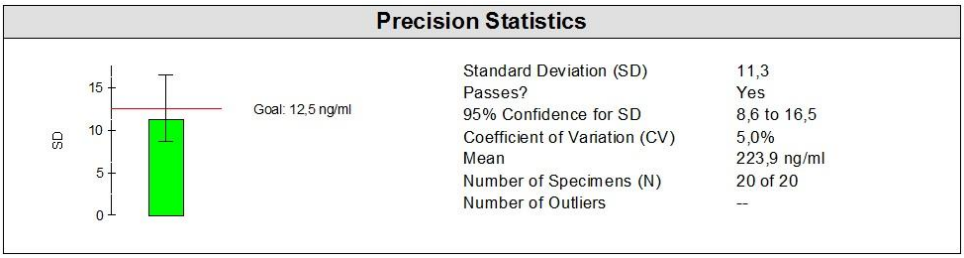


Şekil 4.1 1000 µg/l sildenafil çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

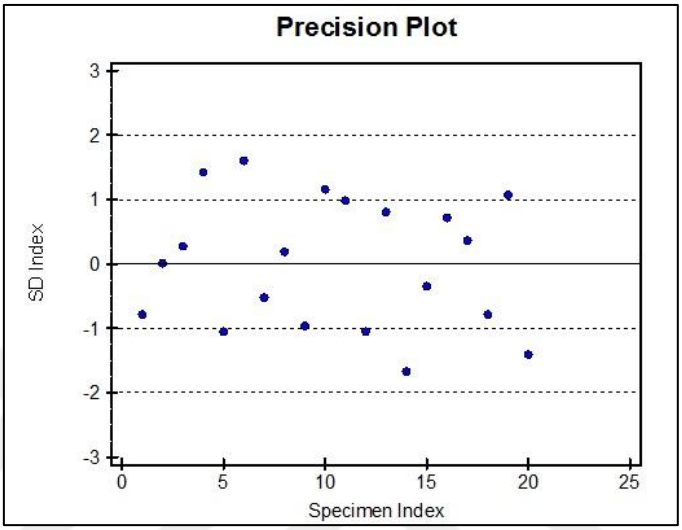


Grafik 4.7 1000 µg/L Sildenafil çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik Sildenafil konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.2'de gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 200 µg/L Sildenafil çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.8 200 µg/L Sildenafil çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.3. Sildenafil çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

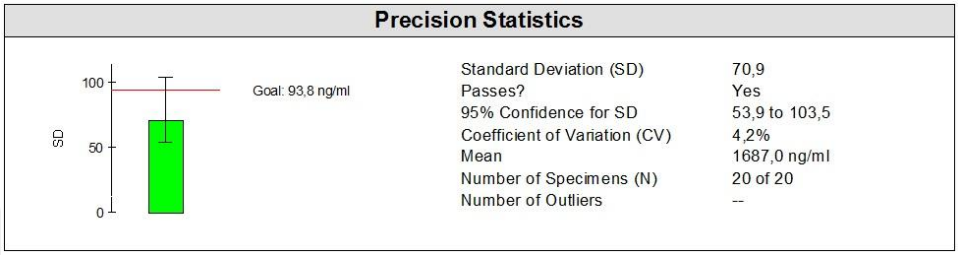
Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1000	1210.3	57.8	4.8
200	223.9	11.3	5

Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında Sildenafil 1000 µg/L'lik konsantrasyonunda elde edilen SD değeri 57.8, %CV 4.8 ve 200 µg/L'lik konsantrasyonunda elde edilen SD değeri 11.3, %CV 5'dir.

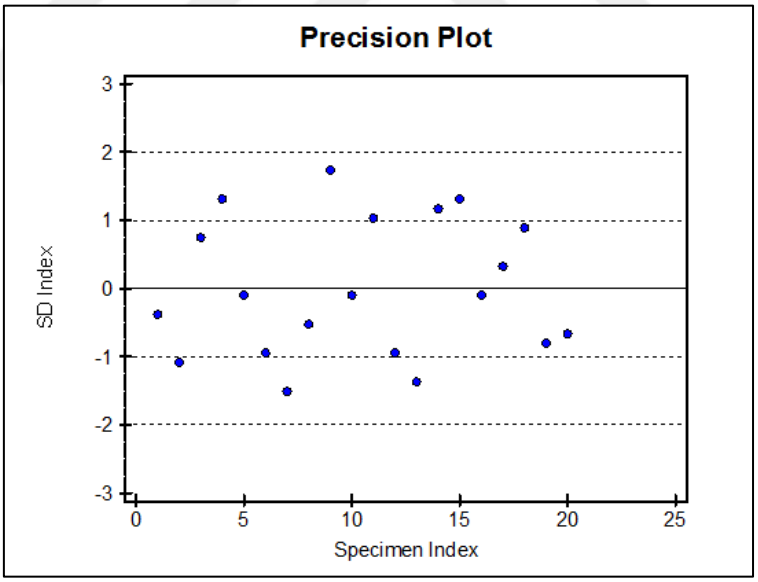
Westgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata %25 olarak verilmiştir. 1000 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1000×0.25=250 µg/L'dir. İzin verilen sd: 250÷4=62.5'dir. 57.8<62.5 olduğu için, 1000 µg/l'lik konsantrasyonda çalışmalar içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.25=50 µg/L'dir. İzin verilen sd: 50÷4=12.5'tir. 11.3<12.5 olduğu için 200 µg/L'lik konsantrasyonda çalışmalar içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

Bosentan için 1500 ile 300 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ard arda 20 defa okutuldu. 1500 µg/L'lik Bosentan konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.3'te gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.9'da gösterilmiştir.

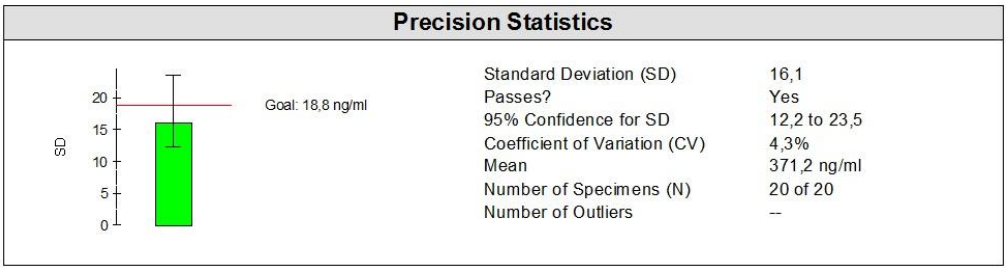


Şekil 4.3 1500 µg/L Bosentan çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

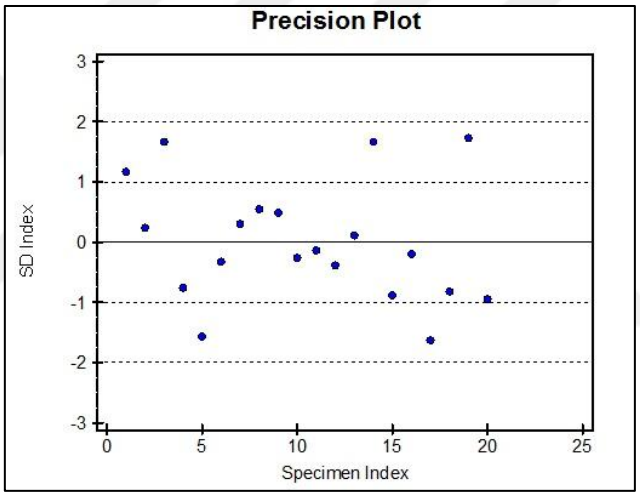


Grafik 4.9 1500 µg/L Bosentan çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

300 µg/L'lik Bosentan konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.4'te gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4 300 µg/L Bosentan çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.10 300 µg/L Bosentan çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.4 Bosentan çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1500	1687	70.9	4.2
300	371.2	16.1	4.3

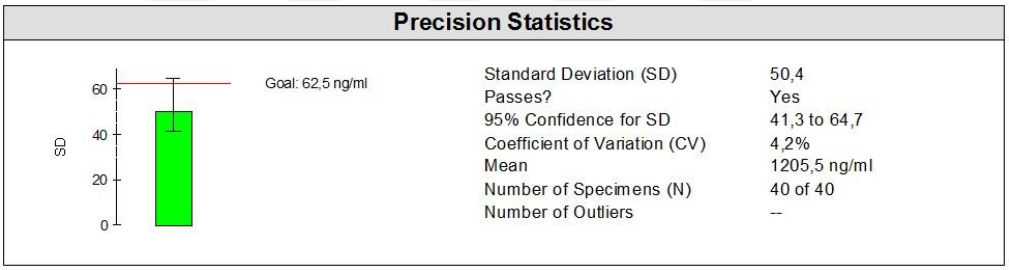
Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında Bosentan 1500 µg/L'lik konsantrasyonunda elde edilen SD değeri 70.9, %CV 4.2 ve 300 µg/L'lik konsantrasyonunda elde edilen SD değeri 16.1, %CV 4.3'dür.

Westgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata %25 olarak verilmiştir. 1500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1500×0.25=375 µg/L'dir. İzin verilen sd: 375÷4=93.75'dir. 70.9<93.75 olduğu için, 1500 µg/l'lik konsantrasyonda çalışmalar içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

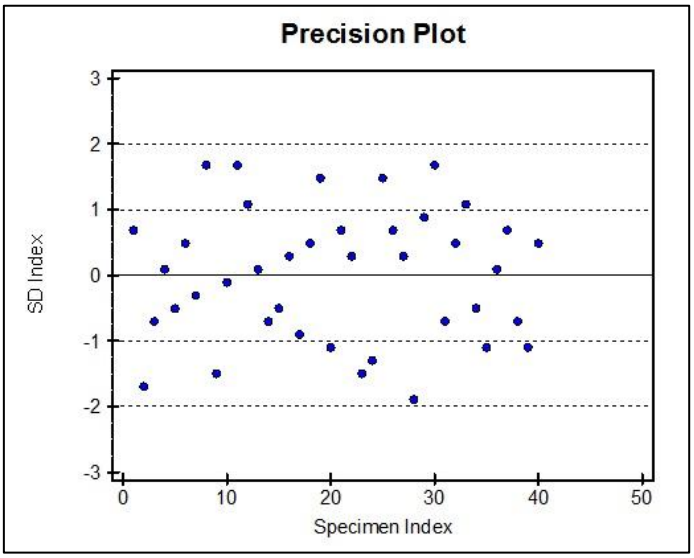
300 µg/l'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 300×0.25=75 µg/L'dir. İzin verilen sd: 75÷4=18.75'tir. 16.1<18.75 olduğu için 300 µg/L'lik konsantrasyonda çalışmalar içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.2 Gün İçi Çalışmalar Arası

Sildenafil için 1000 ve 200 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı gün içerisinde iki kez ard arda 20'şer defa okutulmuştur. 1000 µg/L'lik Sildenafil konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.5'te gösterilmiştir. Aynı numunenin 2 SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.11'de gösterilmiştir.

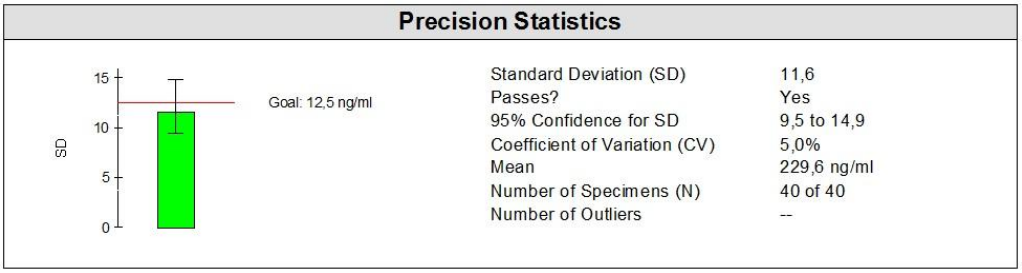


Şekil 4.5 1000 µg/L Sildenafil gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

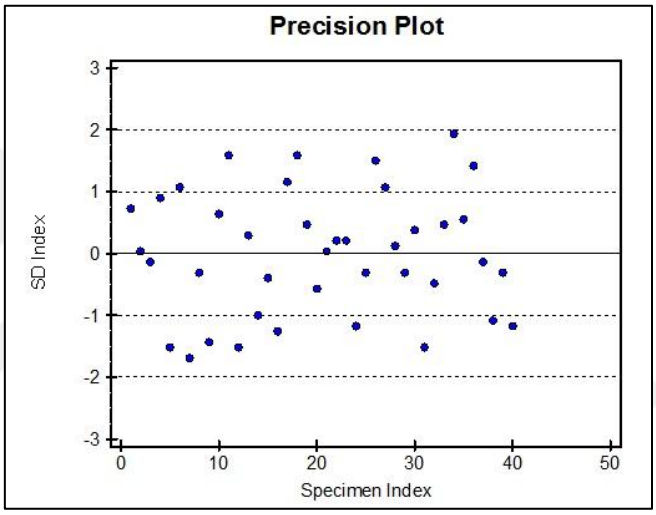


Grafik 4.11 1000 µg/L Sildenafil gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik Sildenafil konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.6'da gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.12'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 200 µg/L Sildenafil gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.12 200 µg/L Sildenafil gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.5 Sildenafil gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

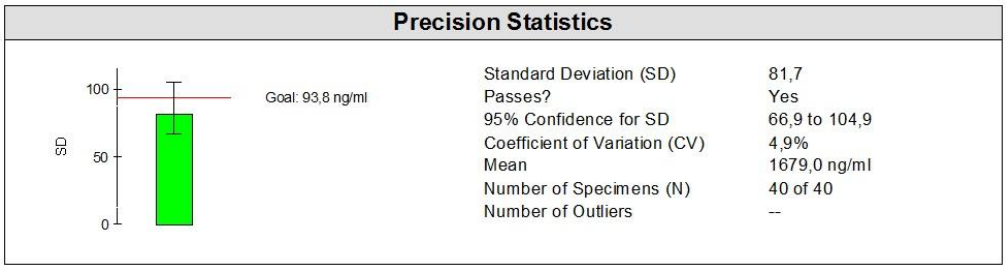
Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1000	1205.5	50.4	4.2
200	229.6	11.6	5

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında 1000 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 50.4, %CV 4.2 ve 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 11.6, %CV 5'tir.

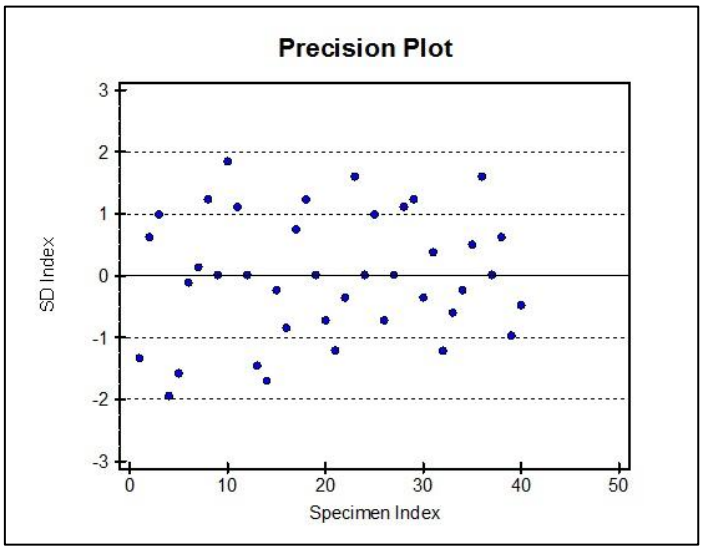
Wesgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 1000 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1000×0.25=250 µg/L'dir. İzin verilen SD 250÷4=62.5'tir. 50.4<62.5 olduğu için, 1000 µg/l'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.25=50 µg/l'dir. İzin verilen SD 50÷4=12.5'tir. 11.6<12.5 olduğu için 200 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

Bosentan için 1500 ve 300 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı gün içerisinde iki kez ard arda 20'şer defa okutulmuştur. 1500 µg/l'lik Bosentan konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.7'de gösterilmiştir. Aynı numunenin 2 SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.13'te gösterilmiştir.

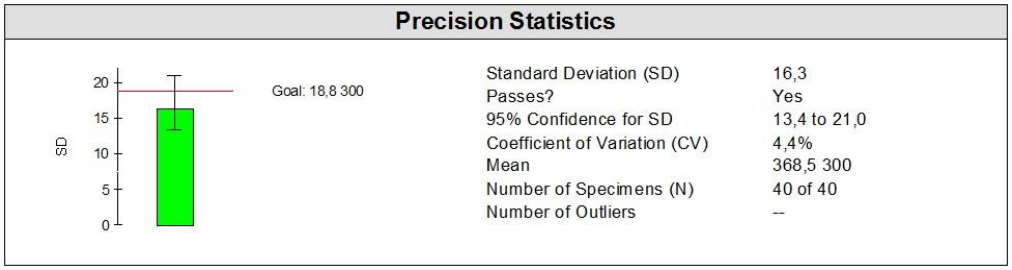


Şekil 4.7 1500 µg/L Bosentan gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

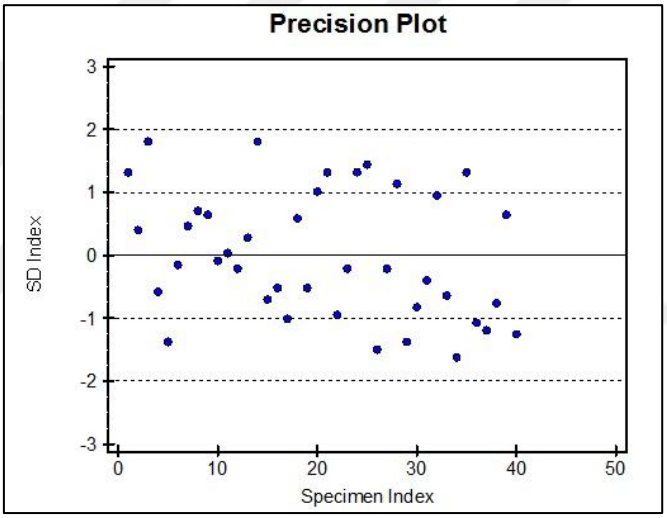


Grafik 4.13 1500 µg/L Bosentan gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

300 µg/L'lik Bosentan konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.8'de gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.8 300 µg/L Bosentan gün içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.14 300 µg/L Bosentan gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.6 Bosentan gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1500	1679	81.7	4.9
300	368.5	16.3	4.4

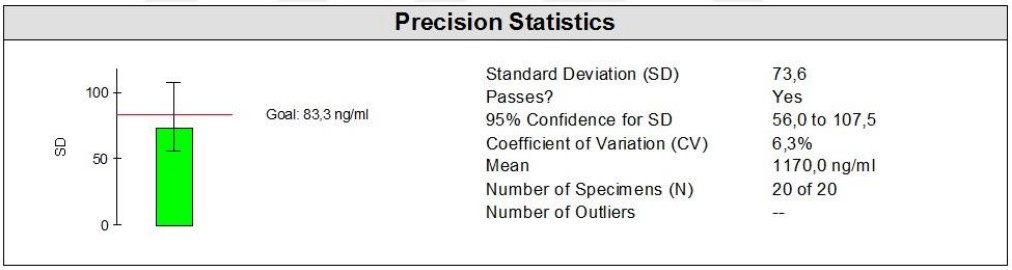
Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında 1500 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 81.7, %CV 4.9 ve 300 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 16.3, %CV 4.4'tür.

Wesgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 1500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1500×0.25=375 µg/l'dir. İzin verilen SD 375÷4=93.75'tir. 81.7<93.75 olduğu için, 1500 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

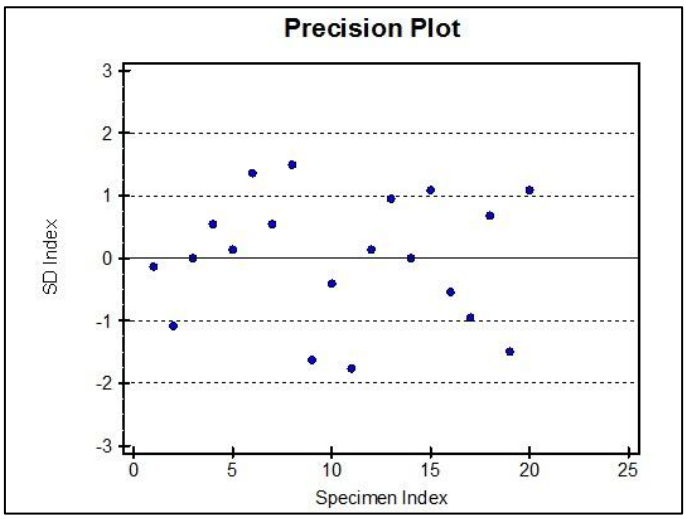
300 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 300×0.25=75 µg/l'dir. İzin verilen SD 75÷4=18.75'tir. 16.3<18.75 olduğu için 300 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.3 Günler arası

Sildenafil için 1000 ve 200 µg/L'lik konsantrasyonlarda 5 farklı numune 4 gün boyunca günde birer kez okutuldu. 1000 µg/L'lik Sildenafil konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.9'da gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.15'te gösterilmiştir.

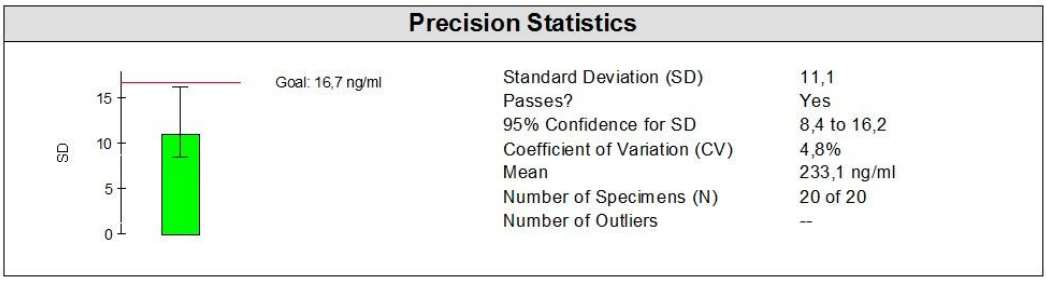


Şekil 4.9 1000 µg/L Sildenafil günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

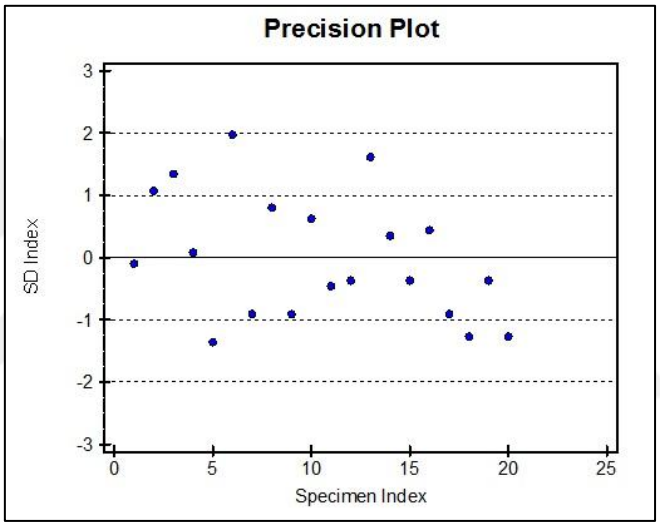


Grafik 4.15 1000 µg/L Sildenafil günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik Sildenafil konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.10'da gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 200 µg/L Sildenafil günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.16 200 µg/L Sildenafil günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.7 Sildenafil günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1000	1170	73.6	6.3
200	233.1	11.1	4.8

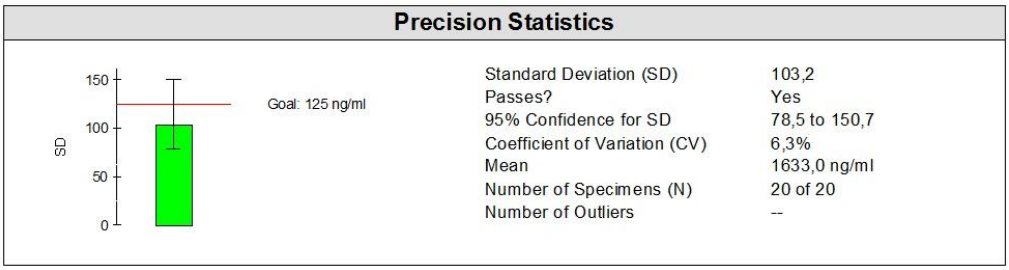
Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında 1000 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 73.6, %CV 6.3 ve 200 µg/l'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri: 11.1, %CV: 4.8'dir.

Wesgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 1000 µg/L'lik

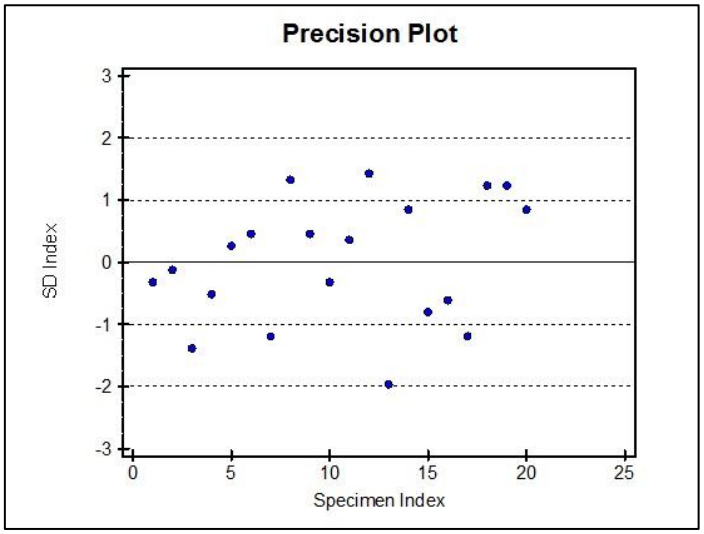
konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1000×0.25=250 µg/L'dir. İzin verilen SD: 250÷3=83.333'tür. 73.6<83.333 olduğu için, 1000 µg/l'lik konsantrasyonda günler arası tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.25=50 µg/L'dir. İzin verilen SD: 50÷3=16.666'dır. 11.1<16.666 olduğu için 200 µg/L'lik konsantrasyonda günler arası tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

Bosentan için 1500 ve 300 µg/L'lik konsantrasyonlarda 5 farklı numune 4 gün boyunca günde birer kez okutuldu. 1500 µg/L'lik Bosenatn konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.11'de gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.17'de gösterilmiştir.

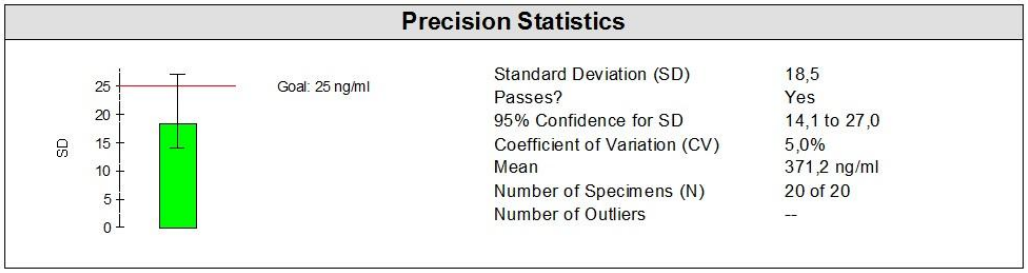


Şekil 4.11 1500 µg/L Bosentan günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

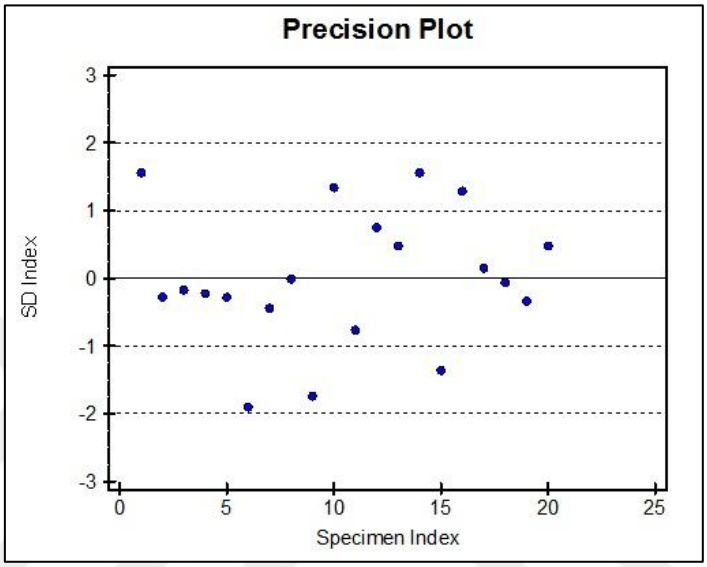


Grafik 4.17 1500 µg/L Bosentan günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

300 µg/L'lik Bosentan konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları şekil 4.12'de gösterilmiştir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 300 µg/L Bosentan günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.



Grafik 4.18 300 µg/L Bosentan günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Çizelge 4.8 Bosentan günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konstrasyon	Ortalama	SD	CV
1500	1633	103.2	6.3
300	371.2	18.5	5

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında 1500 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 103.2, %CV 6.3 ve 300 µg/L'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri: 18.5, %CV:5'tir.

Wesgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre karbamazepin için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 1500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 1500×0.25=375 µg/L'dir. İzin verilen SD: 375÷3=125'tir. 103.2<125 olduğu için, 1500 µg/l'lik konsantrasyonda günler arası tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

300 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 300×0.25=75 µg/L'dir. İzin verilen SD: 75÷3=25'tir. 18.5<25 olduğu için 300 µg/L'lik konsantrasyonda günler arası tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.4. Geri Kazınım

Sildenafil için 1000, 500 ve 200 µg/L'lik standartlarıyla yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. 100'de geri elde edilen oran ise geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8 Sildenafil geri elde çalışma sonuçları.

	Konstrasyon µg/L	Geri elde edilen µg/L	% recovery
100 µl Sildenafil (1000 µg/L'lik) + 900 µl serum	1000 µg/L	1150 µg/L	%115
100 µl Sildenafil (500 µg/L) + 900 µl serum	500 µg/L	556 µg/L	%111.2
100 µl Sildenafil (200 µg/L) + 900 µl serum	200 µg/L	211 µg/L	%105.5

Bosentan için 1500, 750 ve 300 µg/L'lik standartlarıyla yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Bosentan geri elde çalışma sonuçları.

	Konstrasyon µg/l	Geri elde edilen µg/l	% recovery
100 µl Bosentan (1500 µg/L'lik) + 900 µl serum	1500 µg/L	1768 µg/L	%117.8
100 µl Bosentan (750 µg/L'lik) + 900 µl serum	750 µg/L	788 µg/L	%105
100 µl Bosentan (300 µg/L'lik) + 900 µl serum	300 µg/L	291 µg/L	%97

4.5. İnterferans

Sildenafil, lipemik ve hemolizli serum ile yaptığımız interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 Sildenafil, lipemik ve hemolizli serum ile interferans çalışma.

Numune numarası	Düşük düzeyler (lipemik) µg/L	Düşük düzeyler (hemolizli) µg/L	Numune numarası	Yüksek düzeyler (lipemik) µg/L	Yüksek düzeyler (hemolizli) µg/L
Serum	233	242	Serum	1210	1150
D1	226	276	Y1	1090	1410
D1	202	264	Y1	972	1080
D1	215	269	Y1	1055	1120
D2	248	284	Y2	1310	1210
D2	250	276	Y2	1270	1100
D2	244	278	Y2	1300	1160
D3	290	268	Y3	1620	1390
D3	294	288	Y3	1440	1230
D3	288	275	Y3	1510	1250

Düşük ve yüksek serum havuzundaki en yüksek interferan içeren tüp okumalarının ortalaması alınıp % biasları hesaplandı. Lipemik Y3 için %25.8, D3 için %24.4, hemolizli Y3 için %12.1, D2 için %15.4 olarak tespit edilmiştir.

Bosentan, lipemik ve hemolizli serum ile yaptığımız interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.11'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 Bosentan, lipemik ve hemolizli serum ile interferans çalışma.

Numune numarası	Düşük düzeyler (lipemik) µg/l	Düşük düzeyler (hemolizli) µg/l	Numune numarası	Yüksek düzeyler (lipemik) µg/l	Yüksek düzeyler (hemolizli) µg/l
Serum	244	276	Serum	1240	1120
D1	224	222	Y1	1390	1160
D1	230	208	Y1	1390	1180
D1	235	211	Y1	1360	1120
D2	240	250	Y2	1220	1620
D2	238	226	Y2	1290	1690
D2	244	234	Y2	1250	1520
D3	264	198	Y3	1430	1470
D3	290	250	Y3	1440	1340
D3	280	234	Y3	1350	1350

Düşük ve yüksek serum havuzundaki en yüksek interferan içeren tüp okumalarının ortalaması alınıp % biasları hesaplandı. Lipemik Y3 için %13.4, D3 için %9.8, hemolizli Y2 için %43.7, D2 için %-14.2 olarak tespit edilmiştir.

4.6. Taşıma

Sildenafil için yaptığımız taşıma çalışma sonuçları şekil 4.13'te gösterilmiştir.

Carryover Analysis

High-Low Mean	235,6	Error Limit	63,5
Low-Low Mean	250,4	Passes?	Yes
Carryover	-14,8		

Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	256		
L2	229	229	
L3	227	227	
H1	1020		
H2	1050		
L4	222		222
H3	1270		
H4	1180		
L5	235		235
L6	267	267	
L7	272	272	
L8	257	257	
H5	1260		
H6	1180		
L9	263		263
H7	1250		
H8	1210		
L10	227		227
H9	1270		
H10	1190		
L11	231		231
Mean		**250,4**	**235,6**
SD		**21,2**	**16,1**

Supporting Data

Units:	ng/ml
Analyst:	SIL
Expt. Date:	17 Eyl 2018
Low Conc:	200
High Conc:	1000
Comment:	

Şekil 4.13 Sildenafil taşıma çalışmasının sonuçları.

Sildenafil için yaptığımız taşınma çalışması ep-evaluator release 8 analizi ile değerlendirilip -14.8 olarak tespit edilmiştir.

Bosentan için yaptığımız taşıma çalışma sonuçları şekil 4.14'te gösterilmiştir.

Carryover Analysis

High-Low Mean	376,2	Error Limit	77,6
Low-Low Mean	362,6	Passes?	Yes
Carryover	13,6		

Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	315		
L2	324	324	
L3	354	354	
H1	1630		
H2	1570		
L4	359		359
H3	1630		
H4	1660		
L5	375		375
L6	366	366	
L7	393	393	
L8	376	376	
H5	1560		
H6	1550		
L9	374		374
H7	1610		
H8	1670		
L10	387		387
H9	1630		
H10	1540		
L11	386		386
Mean		**362,6**	**376,2**
SD		**25,9**	**11,3**

Supporting Data

Units:	ng/ml
Analyst:	SIL
Expt. Date:	17 Eyl 2018
Low Conc:	300
High Conc:	1500
Comment:	

Şekil 4.14 Bosentan taşıma çalışmasının sonuçları.

Bosentan için yaptığımız taşınma çalışması ep-evaluator release 8 analizi ile değerlendirilip 13.6 olarak tespit edilmiştir.

4.7. Dondurma Çözme Etkisi

Sildenafil için dondurma çözmenin etkisini belirlemek üzere yaptığımız çalışmanın sonuçları ve ölçümleri arasında ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 Sildenafil dordurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümleri arası % biaslar.

Verilen konstrasyonu	1.okuma	2.okuma	3.okuma	4.okuma
1000 µg/L	1860	1810	1760	1740
200 µg/L	527	395	362	343
1000 µg/L %bias	-	-2.68	-5.37	-6.45
200 µg/L %bias	-	-25.04	-31.3	-34.9

Bosentan için dondurma çözmenin etkisini belirlemek üzere yaptığımız çalışmanın sonuçları ve ölçümleri arasında ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar Çizelge 4.13'de görsterilmiştir.

Çizelge 4.13 Bosentan dordurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümleri arası % biaslar.

Verilen konstrasyonu	1.okuma	2.okuma	3.okuma	4.okuma
1500 µg/L	1640	1630	1620	1590
300 µg/L	483	462	459	448
1500 µg/L %bias	-	-0.6	-1.2	-3.04
300 µg/L %bias	-	-4.34	-4.96	-7.24

4.8. Matriks Etkisi

Sildenafil için yapılan matriks etkisi çalışma sonuçları Çizelge 4.44' te gösterilmiştir.

$$\%\ \text{matriks etkisi} = \left(\frac{\text{Ektrakte edilen numunenin pik alanı}}{\text{Ektrakte edilmeyen numunenin pik alanı}} - 1\right) \times 100$$

Sildenafil ve Bosentan için % matriks etkisi yukarıdaki formül kullanılarak aşağıda hesaplaması gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 Sildenafil matriks etkisi çalışma sonuçları.

	Pik alanı	%Matriks Etkisi
Mobil faz+1000 µg/L Sildenafil standartı	1.64×10^5	-17.68
Serum havuzu +1000 µg/L Sildenafil standartı	1.35×10^5	
Mobil faz+ 500 µg/L Sildenafil standartı	6.01×10^4	6.32
Serum havuzu + 500 µg/L Sildenafil standartı	6.39×10^4	
Mobil faz+250 µg/L Sildenafil standartı	3.83×10^4	-5.22
Serum havuzu+250 µg/L Sildenafil standartı	3.63×10^4	

Sildenafil için % matriks hesabı;

$$1000\ \mu g/L \text{ için } \%\ \text{matriks etkisi} = \left(\frac{1.35 \times 10^5}{1.64 \times 10^5} - 1\right) \times 100 = -17.68$$

$$500\ \mu g/L \text{ için } \%\ \text{matriks etkisi} = \left(\frac{6.39 \times 10^4}{6.01 \times 10^4} - 1\right) \times 100 = 6.32$$

$$250\ \mu g/L \text{ için } \%\ \text{matriks etkisi} = \left(\frac{3.63 \times 10^4}{3.83 \times 10^4} - 1\right) \times 100 = -5.22$$

Çizelge 4.15 Bosentan matriks etkisi çalışma sonuçları.

	Pik alanı	%Matriks Etkisi
Mobil faz+781 µg/L Bosentan standartı	1.45×10^5	-18.6
Serum havuzu +781 µg/L Bosentan standartı	1.18×10^5	
Mobil faz+ 390 µg/L Bosentan standartı	5.84×10^4	-3.59
Serum havuzu + 390 µg/L Bosentan standartı	5.63×10^4	
Mobil faz+195 µg/L Bosentan standartı	4.16×10^4	-13.22
Serum havuzu+195 µg/L Bosentan standartı	3.61×10^4	

Bosentan için % matriks hesabı;

$$781\ \mu g/L \text{ için \% matriks etkisi} = \left(\frac{1.18 \times 10^5}{1.45 \times 10^5} - 1\right) \times 100 = -18.6$$

$$390\ \mu g/L \text{ için \% matriks etkisi} = \left(\frac{5.63 \times 10^4}{5.84 \times 10^4} - 1\right) \times 100 = -3.59$$

$$195\ \mu g/L \text{ için \% matriks etkisi} = \left(\frac{3.61 \times 10^4}{4.16 \times 10^4} - 1\right) \times 100 = -13.22$$

5. TARTIŞMA

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan Kardiyo Vasküler Cerrahi bölümü tarafından Sildenafil ve Bosentan ilaç düzeyleri talep edilmektedir. Bu ilaçlar düzey ölçümü önemli olan ilaç grubuna girmektedir.

Sildenafil ve Bosentanın yüksek düzeyleri ciddi kardiovasküler toksisiteye ve yan etkilere sahip olduğundan dolayı idrar ve serum ilaç düzeyleri önemlidir.

İlaç düzeyi ölçümünde hassasiyet ve doğrusallık çok önemli olduğundan dolayı kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olmalıdır. Analitik interferansın azaltılması, doğruluğun arttırılması ve analiz süresinin kısaltılması amaçlanmıştır. Serum Sildenafil ve Bosentan düzeylerinin ölçümü için, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS)'de yeni bir ölçüm metodu geliştirerek rutin ölçümlerde kullanmayı hedeflemekteyiz.

Çalışmamızda LC-MS/MS'de Sildenafil ve Bosentan metot validasyonu CLSI kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Suda çözülmüş Sildenafil tabletleri ve etanolde çözülmüş Bosentan tabletleri serum ile seri dilüsyon yapılarak ilaçların düzeyleri belirlendi.

Metot validasyonu çalışmasında en yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırayla Sildenafil için 475.200 ve 58.000, Bosentan için 552.200 ve 202.100 ve internal standart (asetaminofen) için 152.100 ve 65.100 olarak belirlenmiştir. Ionspray voltage (ıs) 5000 volt, sıcaklık 350 ºc, total flow 1.000 ml/dk en yüksek intensitenin elde edildiği cihaz parametreleridir.

Metot validasyon çalışmasında Sildenafil için 1000-0.975 µg/l aralığı lineer bulunup, linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (r^2) değeri 0,9999 olarak hesaplanmıştır. Bosentan için 3125–0.76 µg/L aralığı lineer bulunup, linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (r^2) değeri 0,9998 olarak hesaplanmıştır. Sildenafil için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0.97 µg/L , kantitasyon limiti 1.95 µg/L, Bosentan için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0.76 µg/L , kantitasyon limiti 1.5 µg/L olarak ölçülmüştür.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 1000-200 µg/L'lik Sildenafil ve 1500-300 µg/L'lik Bosentan serum standartları ile gün içi çalışma içi, gün içi çalışma arası ve günler arası tekeralanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen Sildenafil için %CV'ler sırasıyla %4.8, %5.0 ve Bosentan için %CV'ler sırasıyla %4.2, %4.3 olarak bulunmuştur ve bu değerler için tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir. Gün içi çalışma arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen Sildenafil için %CV'ler sırasıyla %4.2, %5.0 ve Bosentan için %CV'ler sırasıyla %4.9, %4.4 olarak bulunmuştur ve bu değerler için tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen Sildenafil için %CV'ler sırasıyla %6.3, %4.8 ve Bosentan için %CV'ler sırasıyla %6.3, %5.0 olarak bulunmuştur ve bu değerler için tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir.

Geri elde çalışmasında Sildenafil için 1000, 500 ve 200 µg/L konsantrasyonunda üç Sildenafil serum standardı kullanılmıştır. Geri elde % değerleri sırasıyla %115, %111.2, %105.5'tir. Bosentan için 1500, 750 ve 300 µg/L konsantrasyonunda üç Bosentan serum standardı kullanılmıştır. Geri elde % değerleri sırasıyla %117.8, %105, %97'dir.

Sildenafil ve Bosentan, interferans çalışmasını lipemik ve hemolizli serum ile yapılmıştır. Sildenafil ve Bosentanın iki farkli düzeyleri 1000 ve 200 µg/L elde edilen bias değerleri sırayla Sildenafil için %-4.85 % 4.87 Bosentan için %-4.85 % 4.87 dir.

Taşıma çalışması sonucu ep-evaluator analiz programı ile değerlendirildiğinde Sildenafil -14.8 Bosentan ise 13.6 olarak tespit edilmiştir

Dondurma-çözme etkisini belirlemek için sildenafil 1000 ve 200 µg/L iki farklı konsatrasyonlar ile yapıtığımız çalışmada ilk ölçüme göre hesaplandı, 1000 µg/L hesaplanan % biaslar 2. don-çöz analiz için %-2.68, 3. don-çöz analiz için %-5.37 ve 4. don-çöz analiz için %-6.45 olarak tespit edilmiştir, 200 µg/L ise hesaplanan % biaslar 2. don-çöz analiz için %-25.04, 3. don-çöz analiz için %-31.3 ve 4. don-çöz analiz için %-34.9 olarak tespit edilmiştir.

Bosentan ise 1500 ve 300 µg/L konsatrasyonlar ile don-çöz çalışması yapıldı, 1500 µg/L hesaplanan % biaslar 2. don-çöz analiz için %6.0, 3. don-çöz analiz için

%-1.2 ve 4. don-çöz analiz için %-3.04 olarak tespit edilmiştir, 300 µg/L ise hesaplanan % biaslar 2. don-çöz analiz için %-4.34, 3. don-çöz analiz için %-4.96 ve 4. don-çöz analiz için %-7.24 olarak tespit edilmiştir.

Sildenafil martiks etkisi çalışması için 1000, 500 ve 250 µg/L standartları kulanılarak gerçekleştirildi. Sildenafilin % matriks etkisi sırasıyla -17.68, 6.32 ve -5.22 olarak bulunmuştur.

Bosentan martiks etkisi çalışması için 781, 390 ve 195 µg/L standartları kulanılarak gerçekleştirildi. Bosentanın % matriks etkisi sırasıyla -18.6, 3.59 ve -13.22 olarak bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada sildenafil ve bosentanın serum miktarlarının tespiti için yeni bir metot geliştirildi. Sildenafil ve bosentan, Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon tedavisinde kullanılan önemli rol oynayan ilaçlardır.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında, Westgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre ilaç düzeyi için izin verilen total hata %25 olarak verilmiştir. Bu yüzden çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda izin verilen hata düzeyinin tekrarlanabilirliği kabul edilebilir düzeydedir. Çalışmada elde ettiğimiz linearite, taşıma ve tekrarlanabilirlik sonuçlarının analizi için kullandığımız EP Evaluator Release 8 programına göre bulunan değerler kabul edilebilir düzeydedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sildenafil ve bosentan analizlerinde analitik interferansın azaltılması ve doğruluğun arttırılması amacıyla LC-MS/MS tabanlı yöntemler tercih edilmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada serum sildenafil ve bosentan miktarlarını belirlemek için ortaya konulacak yeni yöntem için, CLSI kuralları çerçevesinde metot validasyonu tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LC-MS/MS yönteminin uygulanabilir olduğu ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

Carl Burtis, D. B., 2007. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.* s.l.:s.n.

DrugBank, 2005. *Mechanism of action of Bosentan,* s.l.: s.n.

DrugBank, 2005. *Mechanism of action of sildenafil,* s.l.: s.n.

G. JACKSON, H. G. I. .. O., 2005. Past, present, and future: sildenafil citrate. p. 680–691.

Jignesh M. Parekha, D. K. S. M. S. M. Y. P. S. S., 2012. Development of an SPE-LC–MS/MS method for simultaneous quantification of bosentan and its active metabolite hydroxybosentan in human plasma to support a bioequivalence study .. *ournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis ,* p. 70 462– 470.

Jignesh M. Parekha, D. K. S. M. S. M. Y. P. S. S., 2012. Development of an SPE-LC–MS/MS method for simultaneous quantification of bosentan and its active metabolite hydroxybosentan in human plasma to support a bioequivalence study .. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis ,* p. 462– 470.

Marco Guazzi, M. P., 2008. Clinical Use of Phosphodiesterase-5 Inhibitors in Chronic Heart Failure. *Advances is Heart Failure,* pp. 272-280.

Mathieu Duez, M. E. N. K. a. V. C., 2014. Synthetic phosphodiesterase-5-inhibitors use/abuse and interest of hair testing: reporting ofa rape case. *Drug Testingand Analysis,* p. DOI 10.1002/dta.1638.

Md. Sabir Azim, A. H. M. M. P. S. B., 2012. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Bosentan: A Review. *American Journal Of Pharmtech reaserch,* pp. 2249-3387.

Nadel's, M. &., 2010. *Textbook of Respiratory Medicine.* s.l.:s.n.

Pfizer, 2007. *Viagra,* s.l.: s.n.

Rust, K. Y. et al., 2012. Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in Human Blood Plasma by LC-MS/MS–Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases. *Therapeutic Drug Monitoring,* p. 729–735.

Vallerie McLaughlin1, R. N. C. H.-A. G. J.-C. L. R. N. M. P. R. S. V. F. T. J. T. H. A. H. G. M. a. M. M. H., 2015 . Bosentan added to sildenafil therapy in patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J. ,* pp. 46(2):405-13. doi: 10.1183/13993003.02044-2014..

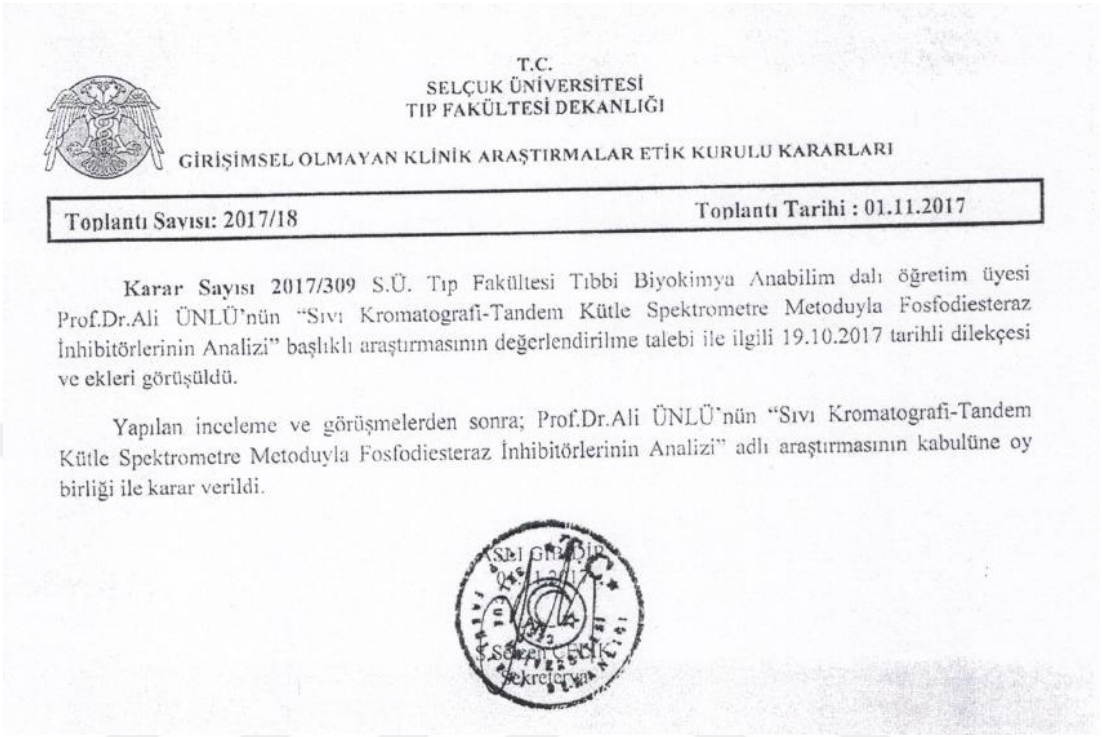
Victoria Boswell-Smith, D. S. a. C. P. P., 2006. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology,* pp. 147, S252–S257..

Westgard, 2008. *Westgard QC,* s.l.: s.n.

Yeliz Enderlea, 1. L. W. H. W. E. G. W. E. H. B., 2017. Simultaneous quantification of endothelin receptor antagonists and phosphodiesterase 5 inhibitors currently used in pulmonary arterial hypertension.. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* p. 291–298.

EKLER

EK A: Etik Kurul Raporu



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2017/18	Toplantı Tarihi : 01.11.2017

Karar Sayısı 2017/309 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ali ÜNLÜ'nün "Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre Metoduyla Fosfodiesteraz İnhibitörlerinin Analizi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 19.10.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Ali ÜNLÜ'nün "Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre Metoduyla Fosfodiesteraz İnhibitörlerinin Analizi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.

Sekreter

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Mohammad AHMADBİK

Doğum Yeri : Mekke/SUUDİ ARABİSTAN

Medeni Hali : Bekar

E-posta : mo.bik881@gmail.com

Tel : +905530446975

Adresi : Kosova Mahallesi, Coşandere Caddesi, Stüdyo Babil, Selçuklu/ Konya

Eğitim

Lise : Abdullah Elkholayfi Lisesi, Mekke

Lisans : Inaya Medical Collage, Clinical Laboratory Science, Riyadh

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

Yabancı Dil

Arapça, İngilizce ve Farsça

Katıldığı Kurslar & Eğitimler

- Tıbbi Bilimlerde Lisansüstü Öğrencilere Yönelik Bilimsel Araştırma ve Proje Hazırlama Eğitimi
- Ulusal CPR Kursu

Katıldığı Sempozyum & Kongreler

- Kök Hücre Bölge Toplantıları-1
- XXVIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- VII. Diyabet Mellitus ve Endokrinolojide Göncelleme Konferansı, Cidde, Suudi Arabistan
- Hematolojide Göncelleme Sempozyumu, Alqunfudah, Suudi Arabistan