

İnsan İdrarında Valasiklovirin Tayini için RPLC Yöntemin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Development and Validation of the RPLC Method for the Determination of Valaciclovir in Human Urine

Y. Doğan DALDAL ^{1*} 

¹ Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Kahramanmaraş, Türkiye



Ö Z

Sunulan çalışmada, herpes ve megalovirüslerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercihli olarak kullanılan ilaçlardan valasiklovirin katkılanmış idrarda ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayini için yöntem geliştirilmiştir. Yöntem geliştirmede, valasiklovirin sistematik olarak pH-kapasite faktörü ilişkisini değerlendirilip, mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İnceleme sonunda, optimum ayırma koşulu %4 asetonitril-su (h/h), pH 5,0 ve 37°C kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Sonrasında, belirlenen optimum koşulun Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) yönergelerine göre validasyonu gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem 2-12 µg/mL derişim aralığında muhteşem doğrusallık göstermiştir ve idrar ortamında gerçekleştirilen geri kazanma sonuçları (%) valasiklovirin iki farklı derişimi için 100,147±0,800 ve 100,208±0,604 olarak bulunmuştur. Ayrıca, geliştirilen yönteme sağlamlık testleri de uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar t-testiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen validasyon ve sağlamlık testleri sonucunda, geliştirilen yöntemin hassas, tekrar edilebilir, doğru, kesin ve sağlam olduğu bulunmuştur. Bundan dolayı, geliştirilen yöntemin rutin analizler için uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antiherpes, valasiklovir, metot geliştirme, pKa, RPLC

Alınış / Received: 07.06.2023 Kabul / Accepted: 05.08.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

In the present study, a method has been developed for the determination of valaciclovir, one of the preferred drugs for the treatment of infections caused by herpes and megaloviruses, in spiked urine by reversed-phase liquid chromatographic method. In developing the method, the pH-capacity factor relationship of valaciclovir was systematically evaluated and mobile phase optimization was performed. At the end of the examination, the optimum separation condition was determined as 4% acetonitrile-water (v/v), pH 5.0, and 37°C column temperature. Subsequently, the determined optimum condition was validated according to the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH). The developed method showed excellent linearity in the concentration range of 2-12 µg/mL, and the recovery results (%) performed in urine were found to be 100.147±0.800 and 100.208±0.604 for two different concentrations of valaciclovir. In addition, robustness tests were also performed for the developed method and the results were evaluated using the t-test. The results of the validation and robustness tests showed that the developed method is sensitive, reproducible, accurate, precise and robust. Therefore, the developed method was found to be suitable for routine analysis.

Keywords: Antiherpes, Valaciclovir, method development, pKa, RPLC



1. Giriş

Asiklik guanin nükleozitinin bir analogu olan valasiklovir, asiklovirin L- valil ester ön ilacıdır [1-3]. Bu bileşik ve diğer antiherpes ajanları, 1990'lardan beri herpesvirüs ve megalovirüsün sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygınca kullanılan ilaçlardır [1,2]. Bu nedenle, bu bileşiklerin tayini için analitik yöntemlerin geliştirilmesi çok önem arz etmektedir.

İlaçların tayininde kullanılan analitik metotlar içerisinde, geliştirilen yöntemin doğruluğu, kesinliği, kullanım kolaylığı ve tekrarlanabilen sonuçlar gibi sahip olduğu birçok avantajdan dolayı, ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi, analiz laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde en çok tercih edilen yöntemdir [5]. Bu yöntemde ana tanımlayıcı parametre, bileşiğin sıvı kromatografik kolonda elde edilen alıkonma zamanıdır ve bu parametre, çeşitli deneysel değişkenler ve çalışılan kolonun kimyasal yapısına göre farklılaşmaktadır [6-8]. Seçilen kolonun çalışma boyunca sabit kalacağı düşünüldüğünde, bileşiklerin alıkonma değerleri üzerine etkisi olduğu bilinen en önemli parametreler, mobil faz organik modifiyer derişimi, mobil faz pH'sı ve kolon sıcaklığıdır [5-9].

RPLC yöntemle gerçekleştirilen bileşiklerin eş zamanlı tayinlerinde, bileşiklerin alıkonma değerleri üzerine etkisi olan deneysel değişkenlerin çeşitli kombinasyonlarına göre, belli kurallar dahilinde elde edilen bileşiklerin alıkonma değerlerinin kontrol altına alınarak, onların birbirinden ayrılmasını sağlamak ve analizi mümkün olan en kısa sürede gerçekleştirmek amaçlanmaktadır [6,8]. Bu amaç için birçok araştırmacı, bileşiklerin eş zamanlı sıvı kromatografik tayinde optimum ayırma koşulunu elde etmeye çalışırken, genellikle alıkonma üzerine etkisi olduğu bilinen deneysel değişkenleri tek tek ve rastgele bir şekilde değiştirerek optimum ayırma koşulunu elde etmeye çalışmaktadır [6,8,9]. Deneme – yanılma adı verilen bu yaklaşım, herhangi bir sistematik temele dayanmadığı için birçok deneysel kombinasyonu içermektedir ve özellikle polar bileşiklerin tayini olmak üzere, optimum ayırma koşulunu belirlemek oldukça zorlaşmaktadır [6-10]. Literatürde valasiklovir tayininde de deneme-yanılma yaklaşımının tercih edildiği görülmektedir [11-21]. Valasiklovir için literatürde bulunan çalışmaların çoğu RPLC yöntemle ve izokratik modda gerçekleştirilmesiyle beraber, bileşiğin tablet formülasyonunda [11-17] ve biyolojik sıvılardaki tayiniyle alkalıdır [18-21]. Valasiklovirin tayini için literatürdeki çalışmaların çoğunda mobil fazda organik modifiyer olarak asetonyril (ACN)-su ikili karışımı tercih edilmiştir [13,14,17,20,21]. Literatürde valasiklovir tayini için metanol (MeOH)-su [11,12,16] ve ACN-MeOH-su [18] karışımlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Son olarak, bu çalışma boyunca literatürde valasiklovir tayini için rastlanan en güncel çalışma, Morgan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmadır [17]. Bu çalışmada

araştırmacılar, valasiklovirin analizi için ince tabaka sıvı kromatografi ve RPLC yöntemlerinden oluşan kromatografik yöntemler ile kolorimetrik yöntemin seçiciliklerini kıyaslamak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir ve sonuç olarak çalışılan metotların benzer sonuçlar verdiğini ifade etmişlerdir. Kolorimetrik yöntem, valasiklovirin ferri hidroksamat ile renkli kompleksi oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik yöntemle valasiklovirin tayini için geliştirilen yöntem 0,20-1,60 mg.mL⁻¹ aralığında doğrusal iken, RPLC yöntem için geliştirilen yöntem 2,00-5,00 mg.mL⁻¹'de, ince tabaka sıvı kromatografisi için geliştirilen yöntem ise 10,00-900,00 ng/band aralığında doğrusaldır. Çalışmada geliştirilen yöntemler, ICH parametrelerine göre valide edilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran valasiklovir ve iç standart madde olarak kullanılan valgansiklovirin, sabit organik modifiyer derişimi ve kolon sıcaklığında, mobil faz pH'sı ve kapasite faktörü (k) ilişkisini değerlendirerek optimum sıvı kromatografik ayırma yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH)'nin yönergelerine göre validasyonu ve sağlamlık testleri gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir için geliştirilen yöntemin geri kazanma çalışmaları insan idrarında gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan valgansiklovir hidroklorür ve valasiklovir hidroklorür, Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. Valasiklovir hidroklorür (2-[(2-amino-6-okso-1H-purin-9-il)metoksi]etil (2S)-2-amino-3-metilbutanoat;hidroklorür) ve valgansiklovir hidroklorür ([2-[(2-amino-6-okso-1H-purin-9-il)metoksi]-3-hidroksipropil](2S)-2-amino-3-metilbutanoat;hidroklorür), sırasıyla, 124832-27-5 ve 175865-59-5 CAS numarasına sahip bileşiklerdir. Valasiklovir hidroklorürün moleköl ağırlığı 360,80 g.mol⁻¹; valgansiklovir hidroklorürün moleköl ağırlığı 390,82 g.mol⁻¹'dür. Valasiklovir hidroklorür ve valgansiklovir hidroklorür, sırasıyla, -0,41 ve -0,72 log P değerleriyle oldukça polar ve sudaki çözünürlükleri yüksek bileşiklerdir. Organik modifiyer olarak kullanılan asetonitril (ACN) ve pH metre kalibrasyonu için kullanılan potasyum hidrojen ftalat, Merck (Darmstadt, Almanya)'den tedarik edilmiştir. Mobil faz tamponunu hazırlamak için kullanılan o-fosforik asit ve sodyum hidroksit, Sigma Aldrich'ten (Almanya) satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safıktadır.

Kullanılan Cihazlar

Sıvı kromatografik çalışmada, gaz giderme ünitesi, kolon fırını, UV Visible dedektör ve bir pompadan oluşan Shimadzu yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mobil fazların pH ayarlamalarında, Mettler Toledo MA pH/iyon analiz cihazı ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrot (Schwerzenbach, İsviçre) kullanılmıştır. İncelenen bileşiklerin çözeltilerinin ve mobil fazların hazırlanmasında kullanılan ultra saf su, Millipore Direct Q3-UV (Merck) su saflaştırma sistemiyle elde edilmiştir.

Kromatografik Çalışma

Bu çalışmada, valasiklovir ve iç standart madde (I.S) olarak kullanılan valgansiklovir için optimum ayırma koşulunu geliştirmede içerisinde 30 mM o-fosforik asit içeren ve ACN derişimi %4 (h/h) olan ACN-su ikili karışımında çalışılmıştır. Hazırlanan mobil fazların çalışma pH aralığı 5,0-8,0'dır. Tüm kromatografik çalışmalar YMC Triart C18 (3µm, 150 × 4.6mm I.D.) kolonda, 37°C'de, 1 mL.dak⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin analizi için UV dedektör 254 nm'ye ayarlanmıştır.

Standart Çözeltilerin ve Mobil Fazın Hazırlanması

Sıvı kromatografik çalışma için valasiklovir ve valgansiklovir 0,0010 g tartılmış, 10 mL çalışılan mobil fazda çözülmüştür. Böylece, bileşiklerin 100 µg.mL⁻¹ 'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır. Sonrasında, bileşiklerin kalibrasyon doğrusunda belirtilen derişimleri, bu standart çözeltilerin mobil fazla seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Mobil fazların hazırlanmasında, 100 mL' lik stok ortam için 96 mL saf su alınmış ve üzerine 4 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak, asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. pH 5,0-8,0 aralığında hazırlanacak her bir mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde o-fosforik asit (o- H₃PO₄) ilave edilmiştir. Mobil fazların pH değerleri çalışılacak değerlere, mobil fazlara 1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek

getirilmiştir. Hazırlanan her mobil faz, ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm çözeltiler günlük taze hazırlanıp, kullanımına kadar 4 °C'de saklanmıştır.

İdrar Örneklerinin Hazırlanması

Sağlıklı ve herhangi bir ilaç kullanmayan gönüllü bir bireyden alınan idrar örnekleri, 1:20 oranında seyreltilmiş ve 2 mL seyreltilmiş idrar örneği alınmıştır. Sonrasında, alınan idrar örneklerinin üzerine idrar proteinlerini çöktürebilmek için 3 mL ACN ilave edilmiştir. Hazırlanan bu 5 mL idrar-ACN karışımının üzerine, valgansiklovir (I.S) çözeltide sabit 1 µg.mL⁻¹ derişimde, valasiklovir ise kalibrasyon noktalarındaki derişim değerlerinde olacak şekilde katkılanırılıp çözelti 10 mL'ye tamamlanmıştır. En son olarak hazırlanan 10 mL çözeltiler, 0,45 µm boyutundaki filtreden geçirildikten sonra HPLC cihazına enjekte edilmiştir [22].

Kalibrasyon Doğrusu

Bu çalışmada valasiklovir için kalibrasyon verileri, idrar çözeltilerine valgansiklovir (I.S) sabit derişimde (1 µg.mL⁻¹) ve Valasiklovir değışen derişimlerde (2,0; 4,0; 6,0; 8,0;10,0 ve 12,0 µg.mL⁻¹) olacak şekilde hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinden elde edilmiştir. Valasiklovirin kalibrasyon doğrusu ise, valasiklovirin derişimine karşı, valasiklovirin alanının I.S'ın alanına oranının işaretlenmesiyle elde edilmiştir.

Geri Kazanım Çalışması

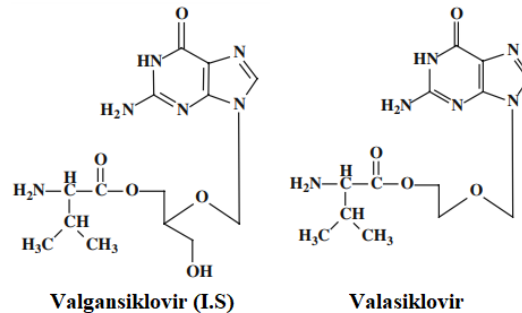
Geri kazanım çalışmaları, valasiklovir tayini için geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini test etmek için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, I.S'nin sabit derişimi için valasiklovirin 4,0 ve 8,0 µg.mL⁻¹ olmak üzere 2 iki farklı derişimine uygulanmıştır. Geri kazanım çalışmaları, valasiklovirin idrardaki gerçek derişimi üzerine eklenen standart derişimin kıyaslanmasıyla hesaplanmıştır.

Sağlamlık Testi

Yöntemin sağlamlığı, çalışılan bileşiklerin akış hızı (± 0,2), organik modifiyer içeriği (± % 3), mobil fazın pH'sı (± 0,5) ve kolon sıcaklığı (± 2 °C) değıştirildikten sonra analiz edilerek, optimum ayırma koşulunda elde edilen verilere göre t-testi uygulanarak değeriendirilmiştir.

3. Bulgular

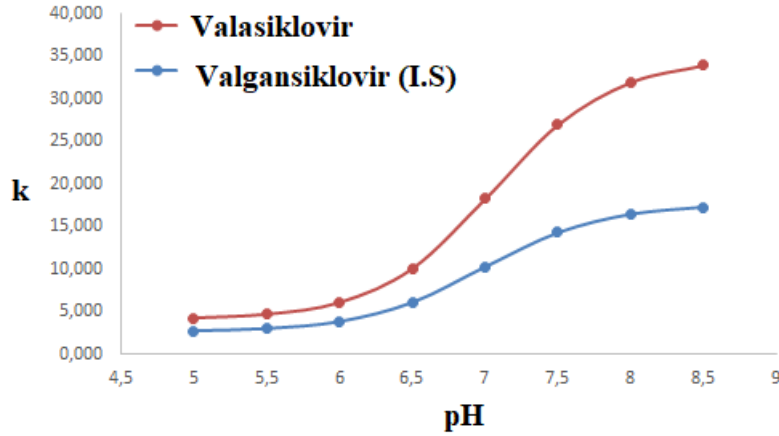
Valasiklovir ve valgansiklovir (I.S) guanin halkasından türetilmiş bileşiklerdir (Şekil 1). Bundan dolayı da bu bileşikler oldukça polardır (Valasiklovir: logP -0,41; log S -1.28, valgansiklovir: logP -0,72; logS -0.98) [10,24,25]. Polar yapıdaki bileşiklerin RPLC analizi, bileşiklerin geleneksel C18 kolonlarda çok erken elue olmasından dolayı zordur. Bu zorluklar, yüksek karbon yüklemesine sahip, yeni nesil kolonların kullanılmasıyla aşılmaktadır. Bu nedenle, yüksek karbon yüklemesiyle polar bileşiklerle çalışmak için uygun, geniş pH çalışma aralığına sahip kolon olan YMC Triart C18 (15 × 0,46 cm I.D., 3 µm), bu çalışma için tercih edilmiştir. Elde edilen simetrik pik şekilleri ve teorik tabaka sayıları, seçilen kolonun doğru seçim olduğunu göstermektedir [26].



Şekil 1: Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapısı

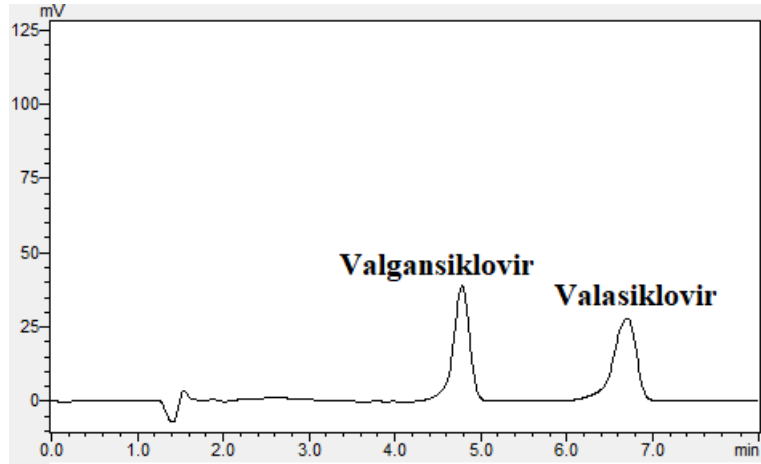
Bu çalışmada, valasiklovirin kantitatif tayini RPLC yöntemle gerçekleştirilmiştir ve yöntem geliştirilmesinde, sistematik olarak mobil faz optimizasyonu uygulanmıştır. Bunun için, sabit mobil faz derişimi ve kolon sıcaklığında, yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran valasiklovir ve valgansiklovirin (I.S), değişen mobil faz pH değerlerine karşı kapasite faktörü (k) değerlerindeki değişim incelenmiştir. Mobil faz pH çalışma aralığı olarak bileşiklerin moleküler ve iyonik formlarda olduğu pH aralığı olan pH 5,0 ve pH 8,0 aralığı belirlenmiştir. Bu aralığın belirlenmesinde bileşiklerin pK_a değerlerinden yararlanılmıştır. Bu değerlerin yaklaşık 1,5 pH birimi altı bileşiğin iyonik formunu ifade ederken, 1,5 pH birim üstü bileşiğin moleküler halde olduğu formu ifade etmektedir [7].

Çalışmada ön deneme olarak bileşiklerin k değerleri, bileşiklerin moleküler ve iyonik türde olduğu pH değerlerinde, 37°C kolon sıcaklığında, yapısında %4, %6 ve %8 ACN-su (h/h) içeren mobil fazlarda hesaplanmıştır. Bileşiklerin k değerleri, %4 ACN-su (h/h) ikili karışımında, %6 ACN-su (h/h) ikili karışımındakilerden daha büyüktür. Ayrıca %8 ACN-su (h/h) ikili karışımında, valgansiklovirin k değerleri 1'in altına düşmüştür. Bundan dolayı, valasiklovirin optimum ayırma koşulu için mobil faz organik modifiyer derişimi %4 ACN-su (h/h) ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Bu oranda ACN-su içeren ikili karışımlarda ve pH 5-8 aralığında sistematik olarak değişen pH'larda, bileşiklerin alıkonma değerleri (t_R) ve kolonda tutulmayan tür olan urasil çözeltisinin alıkonma değeri (t₀) elde edilmiş ve bu değerler kullanarak, valasiklovirin ve valgansiklovirin k değerleri hesaplanmıştır [5,7]. Bileşiklerin %4 ACN-su ikili karışımlarında, farklı pH değerlerine karşı hesaplanan k değerleri grafiğe geçirildiğinde, bir sigmoidal davranış elde edilmektedir (Şekil 2). Bu sigmoidal davranış, bileşiklerin yapılarında bulunan metil bütanoat kısmına bağlı amino grubuna ait azotun protonasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 2: Çalışılan bileşiklerin %4 ACN-su (h/h) ortamında elde edilen pH-k ilişkisi

Şekil 2'de gösterilen sigmoidal grafiklerin yaklaşık olarak orta noktaları, çalışılan %4 ACN-su ikili karışımı için bileşiklerin pK_a değerlerinin olduğu bölgeyi belirtmektedir. Bir bileşiğin pK_a değeri, onun %50'sinin iyonlaşmış %50'sinin iyonlaşmadan kaldığı andaki pH değeri olarak ifade edilir. RPLC yöntemle bileşiklerin eş zamanlı tayinlerinde, bileşiklerin yaklaşık olarak pK_a değerlerinin olduğu pH bölgesi, küçük pH değişimlerinden bileşiğin alıkonma değerlerinin çok fazla etkilendiği bir bölgedir. Ayrıca, bileşiğin iyonik ya da moleküler formunun birbirlerine baskın olmadığı bu bölgede, bileşiklerin kromatogramlarında kantitatif tayinlerde istenmeyen kuyruklanma görülmektedir [5,7]. Bu nedenle bileşiklerin ayrılması için optimum koşulu belirlerken bileşiğin tamamen iyonik ya da moleküler formda olduğu pH değerleri tercih edilir [5,7]. Ayrıca, bileşiklerin tayini için optimum koşulun belirlenmesinde, bileşiklerin k değerlerinin 1 ila 10 arasında (1 ≤ k ≤ 10) olması, iki pik arasındaki seçicilik faktörü (α) değerinin 1,15 veya bu değerden büyük olması ve iki pik arasındaki ayırma gücü (R_s) değerlerinin 1,5'den büyük olması gerekmektedir. Bu şartları sağlayan ve mümkün olan en kısa zamanda gerçekleşen sıvı kromatografik koşul, optimum koşul olarak belirlenir. Bu çalışmada, bu şartları sağlayan koşul, yapısında %4 ACN-su içeren ve pH değeri 5,0 olan ACN-su ikili karışımı olarak belirlenmiştir. Çalışmanın vücut sıcaklığında gerçekleştirilmesi istendiğinden, tüm kromatografik analizler 37°C'de yapılmıştır. Purnell bağıntısıyla hesaplanan kromatografik parametrelere göre belirlenen optimum koşul, istenilen kromatografik şartları sağlamaktadır (Valgansiklovir için k: 2,162; Valasiklovir için k: 3,283; valgansiklovir/Valasiklovir için α: 1,519, R_s: 6,072'dir.) Belirlenen optimum koşula göre elde edilmiş bileşiklerin standart kromatogramı Şekil 3'de, verilmiştir.



Şekil 3: Çalışılan bileşiklerin optimum koşula göre elde edilmiş standart kromatogramı

Geliştirilen Analitik Metodun Validasyonu

Valasiklovir tayini için optimum ayırma koşulu belirlendikten sonra, geliştirilen metodun doğrusalılık, hassaslık, kesinlik, geri kazanım ve tekrarlanabilirlik testlerinden oluşan ICH yönergelerindeki parametrelere göre validasyonu gerçekleştirilmiştir [27]. Valasiklovirin kantitatif tayini gerçekleştirilirken, iç standart (I.S) metodundan faydalanılmıştır. Bu metod, bileşiklerin enjeksiyonlarında meydana gelen rastgele ve sistematik hataların bertaraf edilmesi için tercih edilen bir metottür.

Yapılan analiz için kromatografik sistemin tekrarlanabilirliği, sistem kararlılık parametreleriyle test edilmiştir. Sistem kararlılık testleri, tekrarlanan enjeksiyonlar için alıkonma süresi (t_R), kapasite faktörü (k), teorik tabaka sayısı (N) ve % Bağıl start sapma (% BSS) (pik alanı ve t_R için)'dan oluşur. Bu çalışmada belirlenen optimal koşulda, valasiklovir ve valgansiklovir (I.S) için sistem uygunluk testleri yapılmıştır [6]. Valgansiklovir (IS) ve valasiklovir ve için alıkonma zamanları sırasıyla 4,935 ve 6,231 olarak belirlenmiştir. Valgansiklovir için teorik tabaka sayıları (N) 6421; valasiklovir için 8700 olarak hesaplanmıştır. Seçicilik faktörleri valgansiklovir (IS)/valasiklovir için 1,518, ayırma gücü (R_s) 6,096 olarak belirlenmiştir. Taze hazırlanmış çözeltiler belirli konsantrasyonlarda sisteme üç kez enjekte edildikten alıkonma zamanlarının (t_R) bağıl standart sapma değerleri sırasıyla valgansiklovir (IS) için %0,060, Valasiklovir için %0,044 olarak hesaplanmıştır. Valgansiklovir ve valasiklovir için kuyruklanma faktörü (t_f) değerleri sırasıyla, 0,940 ve 0,947 olarak belirlenmiştir. Sistem kararlılık testine göre elde edilen sonuçlar, sistem kararlılık sonuçlarının önerilen değer aralıkları içinde olduğunu göstermektedir. Bu da geliştirilen RPLC yönteminin, rutin farmasötik uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir [27].

Geliştirilen metodun doğrusallığını tayin etmek için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında doğrusaldır. Kalibrasyon doğrusu, derişime karşı valasiklovirin alanının I.S olarak kullanılan valgansiklovirin alanına oranlanmasıyla elde edilen değerlerin işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Elde edilen doğrusal regresyon sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 3'de verilen tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri, sırasıyla, 3,3:1 ve 10:1 sinyal/gürültü oranlarına göre hesaplanmıştır [27].

Tablo 1: Valasiklovirin kalibrasyon eğrisi verileri

Parametreler	Valasiklovir
Doğrusallık aralığı ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2-12
Regresyon Denklemi	$y = 0,906x + 0,018$
Eğimin standart Hatası	0,003
Kesimin Standart Hatası	0,023
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Tayin limiti (LOD) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,083
Kantitatif tayin limiti (LOQ) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,251

Geliştirilen sıvı kromatografik metodun doğruluğunu ve kesinliğini test etmek için gün içi-günler arası çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gün içi çalışmaları aynı gün, iki farklı konsantrasyon ve üç bağımsız valasiklovir çözeltilisiyle gerçekleştirilirken, günler arası çalışmaları, üç farklı günde ve iki farklı konsantrasyonda, valasiklovirin üç bağımsız çözeltilisiyle gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir tayininin kesinliği ve doğruluğuna ilişkin gün içi ve günler arası çalışmalarının sonuçları, Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'de sunulan sonuçlar, geliştirilen RPLC yönteminin yeterli hassasiyete ve doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

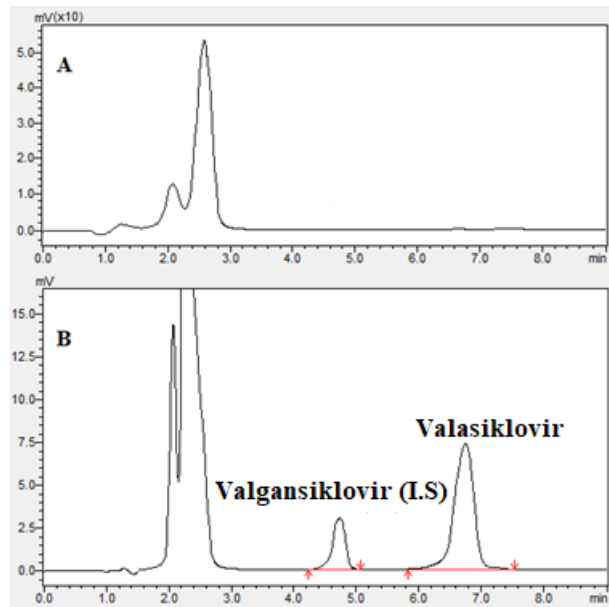
Tablo 2: Valasiklovirin gün içi-günler arası

Bileşik	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Gün İçi Konsantrasyon Ortalaması ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% BSS	Günler Arası Konsantrasyon Ortalaması ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% BSS
Valasiklovir	4,0	4,009	0,388	4,026	0,608
	10,0	10,008	0,126	10,030	0,350

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini doğrulamak ve idrar örneğindeki proteinlerin geliştirilen yöntemle etkileşime girip girmediğini anlamak için önerilen yöntem geri kazanım testleri ile değerlendirilmiştir. Valasiklovir için önerilen yöntemin doğruluğu, katkılандırılmış insan idrarında geri kazanım testleri ile belirlenmiştir. Geri kazanım çalışmaları, valasiklovir için 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Valasiklovir için geri kazanım sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Ayrıca, optimum ayırma koşulunda valasiklovirin ve valgansiklovirin (I.S) idrar ortamında gerçekleştirilen geri kazanım çalışmasına göre elde edilen kromatogramlar Şekil 4'de verilmiştir. Şekil 4'de A ile belirtilen kromatogram ortamda valasiklovir ve valgansiklovirin olmadığı idrar kromatogramını; B ile belirtilen kromatogram ise idrar ortamında valasiklovir ve valgansiklovirin olduğu kromatogramı göstermektedir.

Tablo 3: İdrarda valasiklovirin RPLC analizi için geri kazanım sonuçları

Teorik konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	N	Bulunan ortalama konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Standart Hata	BSS (%)	Geri Kazanım (%)	Standart Hata	BSS (%)
4	3	4,006 \pm 0,032	0,013	0,322	100,147 \pm 0,800	0,323	0,322
8		8,017 \pm 0,048	0,019	0,243	100,208 \pm 0,604	0,244	0,243



Şekil 4: Geri kazanım çalışmasından elde edilen kromatogramlar: (A) Çalışılan bileşiklerin olmadığı idrar kromatogramı, (B) Valgansiklovir (I.S) ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve valasiklovir ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) içeren kromatogram

Gerri kazanım sonuçlarına göre, önerilen yöntemin yeterli doğruluk ve kesinliğe sahip olduğu ve ayrıca idrar proteinlerinin önerilen yöntemle etkileşime girmediği bulunmuştur.

Geliştirilen optimum ayırma koşulunun sağlamlığını belirlemek için sağlamlık testleri gerçekleştirilmiştir. Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntemden elde edilen kantitatif sonuçların metod parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmeyip değişmeden kalabilmesi olarak ifade edilmektedir [6]. Bu çalışma için optimum koşula göre kurulan deney seti ve sonuçları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4: Geliştirilen metodun sağlamlık testi sonuçları

Parametreler	Valasiklovir	
	Pik Alanı ($8\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Kuyruklanma Faktörü
Optimum Koşul (%4 ACN; pH 5; 37°C)	74874	0,947
Artırılmış Organik Modifiyer (7:93)	74636	0,950
Azaltılmış Organik Modifiyer (1:99)	74860	0,949
Artırılmış Mobil Faz pH'sı (pH: 5,5)	74707	0,944
Azaltılmış Mobil Faz pH'sı (pH: 4,5)	74857	0,968
Azaltılmış Akış Hızı (0,8 mL/dakika)	74788	0,955
Artırılmış Sıcaklık (39°C)	74815	0,950
Azaltılmış Sıcaklık (35 °C)	74796	0,940

Bu çalışmada, kantitatif tayinler için çok önemli olan kuyruklanma faktörü ve sistem kararlılık testlerinde de kullanılan $8\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimdeki valasiklovirin pik alanı değerleri sağlamlık testleri için incelenmiştir. Elde edilen verilerin optimum koşulda elde edilen verilerle uyumu Minitab 17 programı aracılığıyla tek örnek t-testi uygulanarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen inceleme neticesinde, pik alanı için ortalama alan 74770; T_r değeri için ortalama t_r değeri 0,953 olarak belirlenmiştir. t testi sonucunda pik alanı için -2,4; t_r için 1,520 değeri elde edilmiştir. Minitab 17 programıyla gerçekleştirilen t-testinde p değerleri 0,05'den büyük bulunmuştur. p değerlerinin 0,05'den büyük olması, optimum koşulda elde edilen verilerle, sağlamlık testi sonucu elde edilen veriler arasındaki farkların önemsiz olduğu şeklinde yorumlanır. Tüm bu verilere göre, optimum ayırma koşulunu oluşturan deneysel parametrelerdeki küçük değişiklikler, valasiklovirin kantitatif sonuçlarında herhangi bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Böylece, geliştirilen yöntemin sağlamlığı kanıtlanmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, valasiklovirin idrarda ters faz sıvı kromatografik olarak tayini gerçekleştirilmiştir. Bu tayin için optimum ayırma koşulunun belirlenmesinde, valasiklovirin pH-k ilişkileri değerlendirilerek sistematik olarak mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mobil faz optimizasyonu gerçekleştirilirken bileşiklerin pK_a değerleri dikkate alınmıştır. Valasiklovir ve diğer antiherpes grubu ilaçlar için literatürde mevcut olan sıvı kromatografik tayin çalışmalarının çoğunda deneme-yanılma yaklaşımından yararlanıldığı görülmektedir [11-21]. Antiherpes grubu ilaçlar yapılarındaki guanin halkasından kaynaklanan yüksek polarlıklarından dolayı, deneme-yanılma yaklaşımıyla bu bileşiklerin tayinleri çok uğraş gerektiren çalışmalardır ve bundan dolayı gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda, tek bir bileşiğin kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda da bileşiklerin çözücü pikinden tamamen ayrıldığı $k \geq 1$ kriterinin dikkate alınmadığı görülmektedir.

Sunulan bu çalışmada tüm kriterleri sağlayacak şekilde belirlenen optimum ayırma koşulunun validasyonu, ICH yönergesindeki kriterlere göre gerçekleştirilmiştir. Validasyon sonuçlarına göre geliştirilen yöntemin hassas, doğrusal, doğru ve kesin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, geliştirilen yöntem sağlamlık testleri de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar t-testiyle değerlendirilmiş, değerlendirme sonunda optimum koşulda elde edilen veriler ile sağlamlık testine göre elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, geliştirilen yöntem sağlamdır. Geliştirilen yöntem için tüm elde edilen validasyon ve sağlamlık testi sonuçlarına göre, geliştirilen yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2021/3-1 BAP).

Etik Beyanı

Bu çalışmada, “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederim.

Kaynakça

- [1] Kayaalp, O. 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9th, edition. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, 880s.
- [2] Hilal-Dandan, R., Laurence, L. B. 2017. Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli. 2nd, edition. Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 1205s.
- [3] Katzung, B. G. 2011. Basic & Clinical Pharmacology. 12th, edition. The McGraw-Hill Companies, San Francisco, 1245s.
- [4] Dar, B. P. W., Öksüz, Z., Algül, Ö. 2019. Antiviral İlaçlardaki Gelişmeler ve Değerlendirilmesi. Lokman Hekim Dergisi, 9(2),160-170.
- [5] Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. 1st, edition. Wiley-Interscience, Canada, 1135s.
- [6] Uysal, R., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Demiralay, E. Ç. 2017. Optimization of RPLC Method for Separation of Some Acetylcholinesterase Inhibitors by Using Central Composite Design. Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 2(1), 23-43.
- [7] Kuzucanli, E., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Konçe, İ., Alsancak, G. 2022. Development and Validation of RPLC Method for The Simultaneous Analysis of ACE Inhibitors in Tablet Formulations. Turkish Journal of Chemistry, 4(2),103–110.
- [8] Gündoğan, B., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z. 2017. Determination of Optimum Separation Condition for Some Carbapenem Antibiotics Using RPLC with the Aid of Central Composite Design and Desirability Function. Current Pharmaceutical Analysis, 13, 100-109.
- [9] Demiralay, E. Ç. 2012. An Experimental Design Approach to Optimization of the Liquid Chromatographic Separation Conditions for the Determination of Metformin and Glibenclamide in Pharmaceutical Formulation. Acta Chimica Slovenica, 59(2), 307-314.
- [10] Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., Ojeda C. B. 2009. Ganciclovir: A Review of its Analytical Determination. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 4(4),254-264.
- [11] Sheetal Ramya Lahari, N. A. 2013. Method Development and Validation of Valacyclovir in Bulk & Tablet Dosage Form by RPHPLC Method. IOSR journal of pharmacy, 5(1), 56-75.
- [12] Ganesh, M., Bhagiyalakshmi, M., Hemalatha, P., Rao, C. V. N., Jang, H. T., Rajasekar, K. 2011. RP-HPLC Estimation of Valacyclovir HCl in Tablet Formulation. Asian Journal of Chemistry, 23(3), 1317-1320.
- [13] Rasool, S. K., Naik, D. V., Babu, D. P., Nalluri, B. N. 2012. RP-HPLC Method for The Estimation of Valacyclovir in Bulk and Pharmaceutical Formulations. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(1), 214-218.
- [14] Patil, G. D., Yeole, P. G., Puranik, M., Wadher, S. J. 2009. A Validated Specific Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for the Determination of Valacyclovir in the Presence of its Degradation Products in Bulk Drug and in Tablet Dosage Form. International Journal of ChemTech Research, 1(1), 16-26.
- [15] Prasad Reddy, D.V., Gurupadayya, B.M., Manohara, Y.N., Vijaya Bhaskar, V. 2007. Spectrophotometric Determination of Valacyclovir Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Formulations. Asian Journal of Chemistry, 19(4), 2797-2800.
- [16] Palacios, M.L., Demasi, G., Pizzorno, M.T., Segall, A.I. 2005. Validation of an HPLC Method for the Determination of Valacyclovir in Pharmaceutical Dosage. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28(5), 751-762.

- [17] Morgan, E.M., Lotfy, H.M., Fayez, Y.M., Abdelkawy, M. 2022. Comparative Study of the Selectivity Power of Colorimetric Method Over Chromatographic Methods for the Analysis of Valaciclovir Hydrochloride. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 105(3), 717–726.
- [18] Caglar, S. 2014. Determination of Valacyclovir Hydrochloride in Tablets and Spiked Plasma Samples by Spectrofluorimetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69, 362–366.
- [19] Savaşer, A., Özkan, C.K., Özkan, Y., Uslu, B., Özkan, S.A. 2003. Development and Validation of an RP-HPLC Method for the Determination of Valacyclovir in Tablets and Human Serum and Its Application to Drug Dissolution Studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(11), 1755-1767.
- [20] Darville, J. M., Lovering, A. M., MacGowan, A.P. 2007. Development, Evaluation and Application of An Isocratic High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Assay for The Simultaneous Determination of Aciclovir and its Metabolite 9-Carboxymethoxymethylguanine in Human Serum and Cerebrospinal Fluid. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 30–33.
- [21] Kasiari, M., Gikas, E., Georgakakou, S., Kazanis, M., Panderi, I. 2007. Selective and Rapid Liquid Chromatography/Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Method for The Quantification of Valacyclovir and its Metabolite in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, 864, 78–86.
- [22] Çubuk Demiralay, E., Koç, D., Daldal, Y.D., Alsancak, G., Ozkan, S.A. 2014. Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine. *Biomedical Chromatography*, 28(5), 660-666
- [23] Rajeswari, K. R., Nageswararao, P., Sankar, G. G., Rao, A. L., Raju, D. B., Rao, J. L. N. S. 2006. Estimation of Valacyclovir in Tablets and Human Serum by RP-HPLC Method. *Asian Journal of Chemistry*, 18(4), 2515-2518.
- [24] Chemicalize program. <http://www.chemicalize.org> (Erişim Tarihi: 02.06.2023).
- [25] SwissADME program. <http://www.swissadme.ch> (Erişim Tarihi: 04.08.2023).
- [26] Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J. 2017. RP-HPLC Determination of Dissociation Constant Using Solely Aqueous Mobile Phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 143–148.
- [27] ICH Validation of Analytical Procedures, Text and methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonization, 2005.