

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSUVASTATİNİN KERSETİN VARLIĞINDA PROTEİN
BAĞLANMA KAPASİTESİNİN HPLC İLE İNCELENMESİ**

Ecz. Kerem DAŞTAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2025**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROSUVASTATİNİN KERSETİN VARLIĞINDA PROTEİN
BAĞLANMA KAPASİTESİNİN HPLC İLE İNCELENMESİ**

Ecz. Kerem DAŞTAN

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER**

**ANKARA
2025**

ONAY SAYFASI**Rosuvastaninin Kersetin Varlığında Protein Bağlanma Kapasitesinin HPLC ile
İncelenmesi****Öğrenci: Ecz. Kerem Daştan****Danışman: Prof. Dr. Mustafa Çelebier**

Bu tez çalışması 03.01.2025 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. İsmail Murat Palabıyık*
(Ankara Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Mustafa Çelebier*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. İncilay Süslü*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Ayşegül Doğan*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Tuba Reçber*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

29 Ocak 2025

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir

..... / /

Ecz. Kerem DAŞTAN

i

¹ “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Kerem DAşTAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, sahip olduğu değerli bilgi ve tecrübeleri ile bana destek ve yol gösterici olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm Saygıdeğer Hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarımnda sağladıkları destek için Ecz. Duygu ENEŞ ve Kim. Müh. Büşra UÇAR'a,

Tüm hayatım boyunca sonsuz özverileri beni destekleyen sevgili annem, babam ve kardeşime,

Eğitim ve tez sürecim boyunca desteği, sabrı ve ilgisi ile her zaman yanımda olan sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Daştan, K. Rosuvastatinin Kersetin Varlığında Protein Bağlanma Kapasitesinin HPLC İle İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2025. Bu çalışmada, statin grubu bir etkin madde olan rosuvastatin (ROS)'in, bir fitokimyasal bileşik olan kersetin (QUE) varlığında plazma proteinine bağlanma (PPB) kapasitesindeki değişiminin tespit edilebilmesi için, ultrafiltrasyon tekniği kullanılarak plazmadan serbest ROS miktarının tayin edilebileceği ve ROS-QUE ayırımının yapılabileceği bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu'nda yer alan validasyon parametrelerine göre valide edilmiştir. Çalışma kapsamında yapılan analizlerin tümü ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) analitik kolon ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım için hareketli faz olarak, 45:55 h/h oranında asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0) karışımı kullanılmış, akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. UV dedektör kullanılarak 250 nm dalga boyundaki sinyaller kaydedilmiştir. Bu kromatografik koşullarda ROS ve QUE için alıkonma zamanları sırasıyla 6.84 ve 4.29 dakikadır. ROS için 0.04-2.00 µg/mL, QUE için ise 0.10-2.00 µg/mL doğrusallık aralığında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem valide edilerek, ROS ve QUE'nin eklendiği ticari plazma ve ticari serum albumininden (BSA) analizine uygulanmıştır. Geliştirilen yöntemin ROS için ve de QUE varlığında ROS için ticari BSA'dan geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Tek başına ROS içeren çözelti için %85.38±1.44 bulunan geri kazanım değeri QUE ile birlikte iken %83.79±3.91 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerler istatistiksel olarak QUE varlığında ROS'in protein bağlanma kapasitesinin etkilenmediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, ultrafiltrasyon, PPB, Rosuvastatin, Kersetin

ABSTRACT

Daştan, K. Evaluation of Protein Binding Capacity of Rosuvastatin in the Presence of Quercetin by HPLC, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program Master's Thesis, Ankara, 2025. In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine the change in plasma protein binding (PPB) capacity of rosuvastatin (ROS), an active ingredient in the statin group, in the presence of quercetin (QUE), a phytochemical compound. The method allows the quantification of free ROS in plasma and the separation of ROS and QUE using an ultrafiltration technique. The developed method was validated according to the validation parameters outlined in the FDA Bioanalytical Method Validation Guidance. All analyses conducted within the scope of this study were performed using an ACE C18 (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm) analytical column. For chromatographic separation, a mobile phase consisting of acetonitrile and 20 mM phosphate buffer (pH 4.0) in a 45:55 v/v ratio was used, with a flow rate set at 1 mL/min. A UV detector recorded signals at a wavelength of 250 nm. Under these chromatographic conditions, the retention times for ROS and QUE were determined as 6.84 and 4.29 minutes, respectively. The method was tested for linearity within the range of 0.04–2.00 µg/mL for ROS and 0.10–2.00 µg/mL for QUE. Following validation, the developed method was applied to analyze ROS and QUE in commercial plasma and commercial bovine serum albumin (BSA). The recovery values of ROS from commercial BSA, both in the absence and presence of QUE, were calculated. The recovery value for ROS alone was determined as 85.38±1.44%, while in the presence of QUE, it was found to be 83.79±3.91%. The obtained values statistically demonstrated that the protein binding capacity of ROS was not affected by the presence of QUE.

Key words: HPLC, ultrafiltration, PPB, Rosuvastatin, Quercetin

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hiperlipidemi	3
2.1.1. Hiperlipidemide Farmakolojik Tedavi	4
2.1.2. Hiperlipidemide Bitkisel Tedavi	6
2.2. Hipertansiyon	11
2.2.1. Hipertansiyonda Farmakolojik Tedavi	13
2.2.2. Hipertansiyonda Bitkisel Tedavi	13
2.3. Plazma Protein Bağlanması	19
2.4. Ultrafiltrasyon Tekniğine Genel Bakış	21
2.4.1. Ultrafiltrasyon Tanımı	21
2.4.2. Ultrafiltrasyonun Kullanım Alanları	23
2.4.3. Ultrafiltrasyonun Tarihçesi ve Gelişimi	25
2.4.4. Ultrafiltrasyonun Avantaj ve Dezavantajları	26
2.4.5. Ultrafiltrasyonun Esası ve Uygulanışı	27
2.5. Denge Diyalizi	28
2.6. Kaynaklarda Yer Alan Ultrafiltrasyon Analiz Yöntemlerinden Bazıları	30
2.7. Kromatografi	45
2.7.1. Kromatografinin Farklı Sınıflandırmaları	46

2.7.2. Kromatografi Parametreleri	47
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış	50
2.8.1. HPLC Prensibi	51
2.8.2. HPLC Türleri	51
2.8.3. HPLC Bölümleri	52
3.GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Tez Çalışması Kapsamında Gerçekleştirilen İşlemler, Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	55
3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar	57
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	57
3.2.2. Çalışma Standartlarının Hazırlanması	59
3.2.3. Kullanılan Ultrafiltrelerin Doyurulması	60
3.2.4. ROS ve QUE İçeren BSA ve Plazma Numunelerinin Hazırlanması	60
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	61
3.3.1. HPLC Deneyinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması	61
3.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Çalışmaları	61
4. BULGULAR	65
4.1. Ölçüm Dalga Boyunun Belirlenmesi	65
4.2. HPLC Sisteminin Optimizasyonu	67
4.2.1. Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi	68
4.3. Kullanılan Ultrafiltrenin Doyurulması	73
4.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	74
4.4.1. Sistem Uygunluk Testi	74
4.4.2. Seçicilik	75
4.4.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	77
4.4.4. Doğruluk ve Kesinlik	79
4.4.5. Duyarlılık	81
4.4.6. Geri Kazanım	81
4.4.7. Tutarlılık	81
4.5. ROS ve QUE İçeren BSA Numunelerinin ve Standart Çözeltilerin Geliştirilen Yöntem ile Analizi	83
5. TARTIŞMA	84
5.1. Yöntem Optimizasyonu	86

5.1.1. Organik Çözücü Oranının Ayırma Etkisi	87
5.1.2. Tampon Çözeltinin pH'sının Ayırma Etkisi	88
5.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	88
5.2.1. Seçicilik (Özgünlük)	89
5.2.2. Doğrusallık	89
5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	89
5.2.4. Duyarlılık	90
5.2.5. Geri Kazanım	90
5.2.6. Tutarlılık	90
5.3. Yöntemin ROS ve QUE İçeren BSA Numunelerine ve Standart Çözeltilerine Uygulanması	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR	94
8. EKLER	
EK 1. Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü	
EK 2. İstatistiksel Hesaplamalar	
EK 3. t-Testi	
EK 4. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

% BH	Yüzde Bağlı Hata
μ	Evren Ortalaması
μm	Mikrometre
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACN	Asetonitril
BSA	Bovine Serum Albumin
BSS	Bağlı Standart Sapma
Da	Dalton
dk	Dakika
dL	Desilitre
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GA	Güven Aralığı
H	Eşdeğer Teorik Tabaka Yüksekliği
H₃PO₄	Fosforik Asit
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HILIC	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IDL	Orta Dansiteli Lipoprotein
k'	Kapasite Faktörü
kDa	Kilodalton
L	Kolonun Dolgu Boyu
LC	Sıvı Kromatografisi
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	Gözlenebilirlik Sınırı
LOQ	Alt Tayin Sınırı
M	Molar

mg	Miligram
mL	Mikrolitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre Cıva
MS	Kütle Spektroskopisi
n	Numune sayısı
N	Teorik Tabaka Sayısı
Na₂HPO₄.2H₂O	Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PAO	Pik Asimetri Oranı
PDA	Fotodiyot dizisi (Photodiode array)
pg	Pikogram
PPB	Plazma Proteinine Bağlanma
QC	Kalite Kontrol
QUE	Kersetin(Quercetin)
R	Korelasyon Katsayısı
R²	Tanımlayıcılık Katsayısı
RED	Hızlı Denge Diyalizi
ROS	Rosuvastatin
RP	Ters Faz(Reverse Phase)
Rs	Ayırıcılık
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
t_R	Alıkonma Zamanı
UF	Ultrafiltrasyon
UPLC	Ultra performanslı sıvı kromatografisi (Ultra performance liquid chromatography)
UV	Ultraviyole (Mor Ötesi)

VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
W	Pik Zemin Genişliği
$\bar{X}$	Aritmetik Ortalama
α	Seçicilik
μg	Mikrogram
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Pık asimetri oranının hesaplanması.	50
2.2. Ters faz kromatografisinin esasının şematik gösterimi.	52
2.3. HPLC cihazının şematik gösterimi.	53
3.1. Tez çalışmasının esasını gösteren şema.	55
3.2. pH 3.0; 4.0; 5.0; 6.0'da ROS için UV spektrumları.	67
3.3. pH 3.0; 4.0; 5.0; 6.0'da QUE için UV spektrumları.	67
4.1. ROS için asetonitril oranı ile k' değişimi.	69
4.2. QUE için asetonitril oranı ile k' değişimi.	70
4.3. ROS ve QUE için asetonitril oranı ile k' değişiminin karşılaştırmalı grafiği.	70
4.4. ROS için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişimi.	72
4.5. QUE için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişimi.	72
4.6. ROS ile QUE için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişiminin karşılaştırmalı grafiği.	73
4.7. Ultrafiltre doygunluk yüzdesel değişim grafiği.	74
4.8. 1/20 BSA kromatogramı.	75
4.9. Hareketli faz kromatogramı.	76
4.10. 25 µg/mL ROS ve 2.5 µg/mL QUE içeren standart çözeltilerinin kromatogramı.	76
4.11. 25 µg/mL ROS içeren BSA çözeltisinin kromatogramı.	77
4.12. 25 µg/mL ROS ve 2.5 µg/mL QUE içeren BSA çözeltisinin kromatogramı.	77

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Ultrafiltrasyon ile gerçekleştirilmiş analiz yöntemlerinden bazıları.	30
2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.	47
3.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.	56
3.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.	57
3.3. Sistem uygunluğu test parametreleri.	64
4.1. ROS ve QUE'nin UV spektrumları.	66
4.2. Organik çözücü miktarının ROS kromatografik parametreleri üzerine etkisi.	68
4.3. Organik çözücü miktarının QUE kromatografik parametreleri üzerine etkisi.	69
4.4. ROS ve QUE için hareketli fazdaki tampon çözeltinin pH'ının kromatografik parametrelere etkisi.	71
4.5. ROS ve QUE analizi için elde edilen sistem uygunluğu parametreleri.	75
4.6. ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü.	78
4.7. QUE için elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü.	78
4.8. ROS ve QUE analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular.	79
4.9. Yöntemin günler arası ve gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları.	80
4.10. ROS için geri kazanım değerleri.	81
4.11. Geliştirilen yöntemin ROS ile gerçekleştirilen tutarlılık testi bulguları.	82
4.12. Geliştirilen yöntemin QUE ile gerçekleştirilen tutarlılık testi bulguları.	82
4.13. ROS ve QUE içeren BSA numunelerinin ve standart çözeltilerin geliştirilen yöntem ile analizi.	83

1. GİRİŞ

Hiperlipidemi, yüksek seviyelerdeki total kolesterol ve trigliseridin önemli role sahip olduğu bir metabolizma hastalığıdır (1). Kaynaklarda kötü kolesterol olarak da bilinen düşük dansiteli lipoprotein seviyelerinin yüksek olmasının ve/veya iyi kolesterol olarak bilinen yüksek dansiteli lipoprotein seviyelerinin düşük olmasının kalp hastalıkları riskini arttırdığı ve genel bir ifadeyle kolesterol metabolizmasında meydana gelen sıkıntıların, kardiyovasküler hastalık potansiyelini ciddi ölçüde arttırdığı belirtilmiştir (1-3). Anormal seviyelerdeki kolesterol seviyelerini ifade eden bir hastalık olan dislipideminin ise hem ülkemiz, hem de dünyadaki yetişkin nüfusun büyük çoğunluğunu tehdit eden bir hastalık olduğu bilinmektedir (4, 5).

Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan ilaç grupları statinler, nikotinik asit grubu ilaçlar, safra asidi bağlayıcı reçineler, fibrat grubu ilaçlar, HMG-KoA redüktaz inhibitörleri olsa da, hastanın kolesterol seviyesini düşürmede ve buna bağlı olarak kardiyovasküler olay oluşumunda düşüş sağladığı gözlenmiş olan ilaç grubu statinler birincil ilaç grubu olarak öne çıkmaktadır (1, 2). Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ilaç kullanımının yanı sıra, hiperlipidemi ve hipertansiyon tedavisi için birçok tıbbi bitki ve dolayısıyla fitokimyasallar, hem geleneksel olarak hem de son yıllarda artan “sağlıklı olma” kaygısının da etkisi ile geniş kullanıma sahiptir (6-8). Ancak bu ilaçları kardiyovasküler hastalığı dolayısıyla kullanan bireylerin, tedavilerini desteklemek niyetiyle fitokimyasal takviyesi kullanımları da söz konusudur. Bu durumda, plazma proteinine bağlanmanın (PPB) önemi öne çıkmaktadır. Kan plazmasında yer alan proteinler ile ilaçlar tersinir bağlanmalar oluşturabilmektedir. Plazma proteinlerine bağlı olan ile bağlanmamış form arasında bir denge mevcut olup, bu durum ilacın farmakokinetiği ve farmakodinamiği açısından oldukça önemli bir yere sahiptir (9, 10). İlaç tedavisinde farmakolojik etkiyi, plazma proteinine bağlı olmayan ilacın sağladığı bilinmektedir. Bağlı ve serbest ilaç arasındaki dengenin, serbest ilaç derişimini arttırıcı yönde değişmesi, potansiyel bir toksisite durumuna sebep olabilmektedir (11). Dolayısıyla plazma proteinine bağlı olan ilacın afinite açısından rekabet halinde olduğu fitokimyasal ile yer değiştirebilmesi, ilacın ve/veya fitokimyasalın serbest kan derişimindeki anormal artışı sonucu toksisite oluşturabilmesi (11) gibi durumların oluşabileceği de düşünülmelidir.

Bu bağlamda statin grubu bir ilaç grubu olan ROS'in, başta soğan olmak üzere, sarımsak, çay, domates, ıspanak, çilek gibi birçok bitkide yer alan, tansiyon düşürücü ve lipoprotein peroksidasyonunu önleyici etkileriyle bilinen bir flavonoid bileşik olan QUE varlığında plazma proteinine bağlanma kapasitesindeki değişimin izlenmesi gerekmektedir (12-15). Bu değişimin izlenebilmesi için ise, plazmada ROS ile QUE tayininin yapılabileceği hassas bir analitik yöntem gereklidir. Kaynaklarda ROS (16-19) ve QUE (20-23) maddelerinin ayrı ayrı analizi için sıvı kromatografisi gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur. Ancak ROS ve QUE maddelerinin ayırımının sağlandığı HPLC yöntemine, özellikle de serbest ROS miktarının tayini için proteini uzaklaştırma ve örnek hazırlama metodu olarak ultrafiltrasyonun kullanıldığı herhangi bir yönteme kaynaklarda rastlanılmamıştır. Dolayısıyla ROS ve QUE içeren plazma numunesinden, öncelikle ultrafiltrasyon ile proteinlerin uzaklaştırılıp, ardından HPLC ile kromatografik ayırımın gerçekleştirileceği, bu şekilde serbest ROS miktarının tayin edilebileceği bir analiz yöntemi geliştirilecektir. Geliştirilen yöntem, rutin araştırmalarda kullanılabilmesi için valide edilecektir. Aynı zamanda çalışma neticesinde, ROS tedavisi alan hastalar için, fitokimyasal takviyesi olarak QUE kullanımının güvenli olup olmadığı konusunda önemli bilgiler edinilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Gün geçtikçe önemi daha fazla anlaşılan ve kullanımı yaygınlaşan fitokimyasallar, takviye edici gıda olarak birçok insan tarafından kullanılmaktadır. Fitokimyasallar, birçok farmakolojik etkiye sahip olsalar da, biyoyararlanımları ve dolayısıyla kullanımları ile ortaya çıkabilecek etkileri konusunda henüz kesin bilgilere ulaşılmamıştır. Bunun yanı sıra, ilaç kullanan hastaların fitokimyasal kullanımı da bilinen bir gerçektir. Bu bağlamda kullanılan ilaçların, fitokimyasallar ile olan etkileşimleri, riskler ve ortaya çıkabilecek olumsuz sonuçlar gibi hususlar hala aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

2.1. Hiperlipidemi

Kolesterol, diyet ile alınabilen, karaciğer ve farklı birçok vücut hücresi tarafından da sentezlenebilen, hücre zarlarının temelini oluşturan bileşendir. Ayrıca kolesterolün steroid hormonları ve safra asitlerinin ön molekülü olduğu bilinmektedir (2). Kolesterolün arterin duvar kısımlarında birikerek arterin sertleşmesine sebep olması, bu sertleşme neticesinde de arterde daralmaya sebep olması durumuna ateroskleroz denir (24). Dislipidemi ise, plazmada yer alan lipid miktarının, anormal seviyelerde olmasını ifade eden bir kavramdır (4). Plazmadaki triasilgliserol ve kolesterol düzeyinin artması durumuna ise hiperlipidemi denir. Hipertrigliseridemi ve hiperkolesteroleminin beraber seyrettiği duruma ise kombine hiperlipidemi denir. Genel olarak seviyelerinin incelendiği lipid çeşitlerine ek olarak, apolipoprotein A-1 ve apolipoprotein B seviyeleri de ateroskleroid kalp hastalığının belirteçleri arasında yer almaktadır (4, 25).

Hiperlipidemi, meydana gelmesinde trigliserit ve total kolesterol seviyelerinin yüksek olmasının önemli bir role sahip olduğu metabolizma hastalığıdır. Hastalık seyrinde tipik olarak yüksek dansiteli lipoprotein(HDL) seviyesinin düşük olduğu, trigliserit, serbest yağ asidi akışı, düşük dansiteli lipoprotein(LDL) ve apolipoprotein B seviyesinin görece olarak artmış olduğu görülmektedir (1). Lipidler plazmada, apoproteinlere bağlanarak oluşturmuş oldukları lipoprotein adı verilen yapılar ile taşınmaktadır. Bu lipoproteinlerden en bilinenleri HDL ile LDL'dir. Literatürde kötü kolesterol olarak bilinen LDL-C'nin yüksek olmasının kalp hastalığı riskini önemli ölçüde artırdığı, yapılan popülasyon çalışmalarıyla gözlenmiştir. Bu durum tüm yaş

gruplarını, çeşitli etnik gruplarını ve cinsiyet gruplarını kapsamaktadır. İyi kolesterol olarak bilinen HDL-C düzeyinin düşük olması ise koroner kalp hastalığı potansiyelini artırma açısından büyük risk teşkil etmektedir. HDL-C seviyesinin düşük olması genellikle trigliserit seviyesinin artmış olmasıyla beraber görülmektedir (2).

Yapılan pek çok çalışma sonucunda, kolesterol metabolizmasında oluşan sorunların, kardiyovasküler hastalık potansiyelini ciddi ölçüde artırdığı gözlenmiştir (3). Lipid düzeylerindeki yükseklik, kendini damar sertliği veya ateroskleroz şeklinde gösterebilmektedir. Koroner hastalığı teşhisi konmuş bireylerde genellikle kendisini kalp krizi ve/veya göğüs ağrısı şeklinde gösteren, sertleşmiş ve kalınlığı artmış arterler görülmektedir. Hiperlipidemi tedavisi alan hastalara devamlı bir şekilde bu tip riskler hakkında bilgi aktarımı yapılmaktadır (2). Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık(ASKVH), dünyadaki birçok ülkede gerçekleşen ölümlerin primer nedenidir. Bu hastalık için en ciddi ve önlenabilir risk kaynağı ise ateroskleroz patogenezinde temel rol oynayan etken olan dislipidemidir. Türkiye’de yaşayan yetişkin nüfusun %80’i, Kuzey Amerika ve Avrupa’da yaşayan yetişkin nüfusun ise yaklaşık yarısında dislipidemi bulunduğu bilinmektedir (5). Genel olarak anormal derecede yağ alımının sebep olduğu bilinen dislipideminin en çok rastlanılan varyasyonları kombine dislipidemi ve izole dislipidemidir. Dislipideminin özellikle bu türleri, ateroskleroz oluşumu için büyük risk oluşturmaktadır (26).

Hiperlipideminin, primer hiperlipidemi ve sekonder hiperlipidemi olmak üzere iki adet alt varyasyonu mevcuttur. Primer hiperlipidemi çoğunlukla genetik ve çevresel sorunlardan kaynaklanmakla birlikte, sedanter yaşam, beslenme tarzı gibi faktörler de primer hiperlipideminin sebepleri arasında sayılabilmektedir. Ayrıca tüm hiperlipidemi vakalarının %98’lik kısmını oluşturan primer hiperlipidemi, en sık rastlanılan hiperlipidemi türü olma özelliği taşımaktadır. Sekonder hiperlipideminin ise genel olarak kronik alkolizm, diyabet, kortikosteroid ve beta blokör grubu ilaç kullanımı, miksödem gibi sebeplerden kaynaklanabildiği bilinmektedir (2, 26).

2.1.1. Hiperlipidemide Farmakolojik Tedavi

İskemik kalp hastalığı, dünya ve spesifik olarak da gelişmekte olan ülkeler için ölüm ve sakatlık vakaları açısından en ciddi sebepler arasında sayılmaktadır. Beslenme

ve yaşam tarzının, ilerleme hızını artırdığı bu hastalığın sebepleri arasında hiperlipidemi birincil faktörlerden biridir (27).

Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan ilaç grupları, statinler, nikotinic asit grubu ilaçlar, safra asidi bağlayıcı reçineler, fibrat grubu ilaçlar, HMG-KoA redüktaz inhibitörleri, kolesterol emilimini inhibe edici ilaçlar şeklinde sıralanmaktadır. Lovastatin, rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin gibi statin grubu ilaçlar, hiperlipidemi tedavisinde öncelikli olarak tercih edilen ilaçlardır. Yaygın olarak kullanılan ismi statinler olan bu ilaçlar, nanoteknolojik ve geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler ile üretilmiş olan formları şeklinde kullanılmakta olup, kardiyovasküler hastalık tedavisi için kullanılan ilaçlar arasında en önemli yere sahip olan ilaçlardır (1, 2). Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan bu ilaç gruplarından statinler, kolesterol düzeyini düşürme, fibrat grubu ilaçlar ise trigliserid düzeyini düşürme özellikleri açısından öne çıkmakta olup, yan etkileri ve düşük tolerabilite gibi özellikleri sebebiyle safra asidi bağlayıcı ilaçlar ile nikotinic asit grubu ilaçlar geri planda kalmaktadır (1).

Statin grubu ilaçlar, birincil ve ikincil koruma ve tolerabilite açısından öne çıkan özellikleriyle kardiyovasküler olayları önlemede ve aynı zamanda inme, akut miyokard enfarktüsü, kardiyovasküler mortalite gibi sebeplerle gerçekleşen ölüm riskinde ciddi bir düşüş sağlayabilmesiyle kardiyovasküler hastalık tedavisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalarda, statinlerin oluşturabildiği bu etkilerin, LDL-C seviyelerinde düşüş sağlanmasına bağlı olmaksızın da görülebildiği sonucuna ulaşılmıştır (28).

Statinler, kolesterol biyosentezinde yer alan HMG-KoA redüktaz enziminin inhibitörü olup, bu inhibisyon işlemi tersinirdir. Aynı zamanda statin grubu ilaçlar, LDL-C seviyesinin yüksek olduğu hastalarda uygulanan tedavilerin ilk basamağında yer almaktadır. Statin grubu ilaçlar, tek başına kullanımları açısından ele alındığında LDL ve total kolesterolün düşürülmesinde en etkili ilaç grubu olup, tolerabiliteleri de oldukça yüksektir. Statinler etki mekanizması itibarıyla, LDL, VLDL ve IDL gibi apolipoprotein B100 içeren lipoproteinlerin miktarının azaltılmasında görev alan, hepatosit hücrelerinin zarlarında bulunan LDL reseptörlerinin miktarının artmasını sağlamaktadır. Bu reseptörlerin artması sayesinde dolaşımda olan LDL ve VLDL'nin karaciğer tarafından alınmasını sağlayarak trigliserid ve LDL seviyelerinin düşmesini

sağlamaktadır. Ayrıca statinler, kolesterol üretimi azaltır ve HDL üretimini artırarak dolaşımdaki HDL seviyesinin yükselmesini sağlar. Statin tedavisi, beslenme planlaması ile birlikte uygulandığında LDL ile total kolesterol seviyesinin %30 veya daha fazla düşmesini sağlamaktadır. Statinler üzerine yapılan birçok çalışma neticesinde, LDL-C seviyesini düşürmenin, felç, miyokard enfarktüsü, ölüm vb. kardiyovasküler olay sonuçlanmalarında ciddi bir azalma sağladığı gözlenmiştir (2, 29). Statinlerin en ciddi yan etkileri rabdomiyoliz, hepatotoksisite ve ilaç etkileşimleri olduğu bilinmekle birlikte statinler üzerine yapılan pek çok çalışma, statin grubu ilaçların güvenilir olduğunu bildirmektedir (2).

2.1.2. Hiperlipidemide Bitkisel Tedavi

Yüksek kolesterol tedavisinde kullanılan ilaçlar ateroskleroz durumunda da tamamlayıcı olarak tercih edilmekle birlikte bu ilaçların bazı olumsuz etkileri de mevcuttur. Bunlardan biri tipik bir örnek olarak atorvastatinin advers etkilerinden biri olan, pankreatite sebep olabilmesidir. Bu bağlamda tıbbi bitkiler, tolerabilite, istenilen etkinlik seviyesi ve toksisite açısından avantajlı bir konuma sahip olduğu gibi bu avantajları sebebiyle günümüzde birçok ülkede kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi bitkilerin, içerdikleri bazı etken maddeler sebebiyle kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanımı da mevcuttur (8).

Geleneksel tıpta tıbbi bitkilerin oldukça önemli bir yeri olduğu bilinmekle birlikte, hiperlipidemi tedavisi için de çeşitli ilaçların kullanılmasının yanı sıra 200'ü aşkın sayıda bitki üzerine çalışma yürütülmüş ve kullanılmıştır. Yapılan son çalışmaların sonucunda, geleneksel tıpta kullanımı olan bazı tıbbi bitki ve takviyelerin içeriğinde yer alan, antioksidan, flavonoid, vitamin vb. bileşiklerin, lipid seviyelerini düşürücü ve okside LDL oluşumunu engelleyici etki sergilediği gözlenmiştir (30, 31).

Hiperlipidemi tedavisindeki etkinliği incelenmek üzere sarımsak, berberin, enginar, bergamot ve yeşil çay bitkileri ile yapılmış pek çok sayıda çalışma mevcuttur (32).

Tarçın (*Cinnamomum verum*)

Lauraceae familyasına ait bir bitki olan *Cinnamomum verum*, dünyanın birçok ülkesinde hastalıkların tedavisinde ve aynı zamanda gıdalara tat vermesi amacıyla

kullanılan bir tıbbi bitki ve baharat olup, içeriğinde bulunan öjenol, linoleik asit, sinamik asit, oleik asit, esansiyel yağ ve polifenolik bileşikler sayesinde antifungal, antibakteriyel, antikanser etkilere sahiptir. Dislipidemi açısından da iyileştirici etkilerinin olduğu bilinen tarçın, hepatik antioksidan enzim aktivitesini ve lipolitik etkiyi artırabilmesi ve aynı zamanda 5-lipoksijenaz ve HMG-KoA redüktaz enzimlerini inhibe etmesi ile trigliserid düzeyini düşürücü bir etki sergileyebilmektedir (33, 34).

Tarçının hiperlipidemik etkisinin deney fareleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, alloksan uygulaması ile diyabetik hale getirilen farelerde plazma lipid seviyelerinde yükselme meydana gelmiştir. Ardından diyabetik farelere yapılan tarçın uygulaması sonucunda farelerin trigliserid ve total kolesterol seviyelerinde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (35). Diğer bir çalışmada ise hiperlipidemik erkek farelere 35 gün boyunca tarçın tozu uygulanmış ve elde edilen bulgular deneyde kullanılan diğer fare grupları ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş olup, deney sonucunda tarçın tozu uygulanan hiperlipidemik farelerin trigliserid seviyelerinde %11, total kolesterol seviyelerinde %12 ve LDL-C seviyelerinde ise %14 kadar düşüş gözlenmiştir (36).

Sarımsak (*Allium sativum*)

Sarımsak ismi ile bilinen *Allium sativum*, *Alliaceae* familyasına ait tıbbi bir bitki olup, karakteristik bir tada sahiptir. Sarımsak, yağ, ekstrakt vb. çeşitli dozaj formları şeklinde kullanılabilir. Aynı zamanda sarımsağın içeriğinde bulunan dialil disülfür, allin, S-alilsistein ve allisin gibi organosülfür bileşikler sayesinde lipid seviyelerinin kontrol altına alınabildiği ve hiperlipidemi ve ateroskleroz oluşumunun engellenmesi için kullanılabildiği bilinmektedir.

Sarımsak, trigliserid ve kolesterol sentezinde yer alan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi çok sayıda enzimi inhibe ederek etkili bir şekilde lipid düşürücü etki gösterebilmektedir. Sarımsağın trigliserid düşürücü etkisi üzerine olan insan çalışmaları 1975 yılında başlamıştır ve günümüze kadar olan süreçte yapılmış olan çok sayıda çalışma sonucunda bu farmakolojik etki kanıtlanmıştır (33, 37).

Sarımsağın tip 2 diyabetli hastalardaki dislipidemi üzerinde gösterdiği etkinin incelendiği bir çalışmada, tip 2 diyabet hastası 70 birey 2 gruba ayrılarak, bir gruba

plasebo, diğer gruba ise günde 2 defa 300 mg allisin tableti uygulanmıştır. 12 haftalık sürenin sonunda, sarımsak tableti uygulaması yapılan 33 kişiden oluşan grubun toplam kolesterol seviyesinde yaklaşık %12, LDL kolesterol seviyesinde yaklaşık %18 düşüş gözlenmiş olup, HDL kolesterol seviyesinde ise yaklaşık %8 kadar artış gözlenmiştir. Trigliserid düzeyleri için kayda değer herhangi bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir (38).

Yapılan diğer bir çalışmada, 3 gruba ayrılan hiperlipidemik 150 hastadan, 50 kişilik bir hasta grubuna günde 2 kez 1 mg allisin eşdeğerinde olan sarımsak tozu tableti uygulanmış ve 6 hafta sonra yapılan kontrollerde katılımcıların total kolesterol seviyelerinde %12.1 ve LDL kolesterol seviyelerinde %17.3 kadar düşüş, HDL kolesterol seviyelerinde ise %15.7 artış gözlenmiştir. Trigliserid seviyelerinde ise ciddi bir düşüş gözlenmemiştir (39).

Safran (*Crocus sativus*)

Crocus sativus, en çok bilinen adıyla safran, *Iridaceae* familyasına ait, kırmızı renkteki stigmalarının genellikle kurutulmuş baharat olarak kullanımının yanı sıra geleneksel tıpta ilaç olarak ve renklendirici olarak da kullanılan çok yıllık bir bitkidir. Safran bitkisinin birçok faydasının olması sebebiyle 2500 yıldır ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Safranın en çok üretildiği ülkeler İran, Hindistan ve Yunanistan'dır.

Safran bitkisinin ekstraktında bazı farmakolojik etkilerinin olduğu düşünülen etken maddeler bulunmaktadır. Bu etken maddeler, ekstrakt içeriğinin %10'unu oluşturan krosinler, safranal ve pikrokrosindir. Safran bitkisinin yüksek kalitede olanlarının içeriğinde ise krosin %30, pikrokrosin %5 ile %15 arasında, içinde safranalin da yer aldığı uçucu bileşikler ise %2.5 oranında bulunmaktadır (33, 40, 41).

Safranın hipolipidemik, antiaterosklerotik, hipotansif, antiinflamatuvar, antikanser vb. birçok faydasının bulunduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalarında safran, anksiyolitik ve antikonvülsan etki göstermesi sayesinde hafıza ve bilişsel durum üzerinde iyileştirici bir etki sergilemektedir (42). Ayrıca safranın kolesterol düzeyini düzenleyici ve düşürücü etki gösterdiği, genel lipid profili üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğu, yapılan hayvan çalışmaları, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda doğrulanmıştır (41).

Yapılan bir çalışmada, tip 2 diyabet hastası 70 birey 2 gruba ayrılmış, bir gruba plasebo, diğer gruba ise günde 100 mg safran 8 hafta boyunca uygulanmış olup, safran uygulamasının yapıldığı hasta grubunun trigliserid seviyesinin %22.72, toplam kolesterol seviyesinin %9.68 ve LDL kolesterol seviyesinin %13.17 kadar düştüğü gözlenmiştir (43).

Çörek otu (*Nigella sativa*)

Ranunculaceae familyasına ait tıbbi bir bitki olan *Nigella sativa* (Çörek otu), Ayurveda, Çin gibi farklı geleneksel tıp sistemlerinde ve birçok ülkedeki yaygın kullanımı ile önemli bir yere sahiptir (44).

Nigella sativa bitkisinin farmakolojik etkisinin çoğundan sorumlu olan etken maddesi timokinondur (44). Çörek otu genellikle tümör meydana gelmesi ve büyümesini engelleme, süt üretimi, bronşiyal astım ve bronşit romatizma tedavisi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (45).

Çörek otu bitkisinin antioksidan, hipoglisemik ve hipokolesterolemik vb. çok sayıda farmakolojik etkiye sahip olduğu ve içeriğinde yer alan ana etken maddesi timokinonun özellikle hiperlipidemi ve hiperglisemi üzerinde yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda çörek otunun lipid düzeyi düşürücü ve ateroprotektif etki sergilemesi, bitkinin sahip olduğu koleretik etki ile açıklanmaktadır. Çörek otunun tohum yağının ve toz formunun tedavi amacıyla verildiği hiperkolesterolemik bir tavşan üzerindeki etkisinin incelendiği çalışma sonucunda, aterosklerotik plak boyutunda küçülme ve LDL ve total kolesterol seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Aynı zamanda LDL kolesterol seviyesindeki bu düşüşün HDL kolesterol seviyesindeki yükselme ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (46).

Toplam kolesterol seviyesi >200 mg/dl olan 88 birey ile yürütülen plasebo kontrollü bir çalışmada ise, katılımcılara 4 hafta boyunca günde 2 g *N.sativa* uygulanmış ve 4 haftalık sürenin sonunda yapılan kontrollerde *N.sativa* uygulaması yapılan bireylerin trigliserid seviyesinde %16.65, LDL kolesterol seviyesinde %7.6 ve toplam kolesterol seviyelerinde %4.78 kadar düşüş gözlenmiş olup, HDL kolesterol seviyelerinde anlamlı bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir (47).

Zerdeçal (*Curcuma longa*)

Zerdeçal olarak da bilinen *Curcuma longa*, *Zingiberaceae* familyasına ait bir bitkidir. Zerdeçaldan ekstrakte edilerek elde edilen ve kurkumin adıyla bilinen sarı renkteki biyoaktif madde, bağışıklık sistemini düzenleyici, tümör oluşumunu ve gelişimini önleyici, antioksidan ve aynı zamanda karaciğer koruyucu etkileri ile bilinmektedir. Kurkumin, göstermiş olduğu antiinflamatuvar ve antioksidan etkileriyle hiperlipidemi ve aterosklerotik oluşumu önleyen antiaterojenik bir bileşendir. Ayrıca kurkumin, safra asidi biyosentezinde yer alan hız sınırlayıcı enzim olan kolesterol-7 α -hidroksilazı yukarı yönde regüle ederek kolesterolün bağırsaklardan emilimini inhibe edici, trigliserid ve kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde düşürücü farmakolojik etkiye sahiptir (33, 48).

Genellikle Asya'da tüketilen ve içeriğinde bol miktarda bulunan kurkumin ihtiva eden bir baharat olan zerdeçal, ilgili çalışmalardan elde edilen bulgular neticesinde hiperlipidemi tedavisi için önem arz ettiği şeklinde kabul görmüştür (37).

Metabolik sendrom hastası olan 65 birey ile yürütülen bir çalışmada katılımcılara plasebo kontrollü bir şekilde 12 hafta boyunca günde 3 kez 630 mg kurkumin özü kapsülü uygulanmış ve 12 haftalık sürenin sonunda hastaların LDL kolesterol seviyesi 120.55 $\pm$ 36.81'den 106.51 $\pm$ 25.02 mg/dL'ye düşmüş, HDL kolesterol seviyesi 40.96 $\pm$ 8.59'dan 43.76 $\pm$ 2.79 mg/dL'ye yükselmiş olduğu ve trigliserid seviyelerinde de 65 mg/dL kadar düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (49).

Koroner arter hastası 33 birey ile yapılan diğer bir çalışmada ise, hastalara 500 mg kurkumin kapsülleri günde 4 kez plasebo kontrollü bir şekilde uygulanmıştır. Ardından yapılan kontrollerde katılımcıların toplam kolesterol seviyelerinde %19.18, LDL kolesterol seviyelerinde %28.87 kadar düşüş ve HDL kolesterol seviyelerinde ise %5.3 kadar artış gözlenmiştir (50).

Karamuk (*Berberis aristata*)

Berberidaceae familyasına ait bir bitki olan *Berberis aristata*, diğer adıyla karamuk olarak da bilinmektedir. *Berberis aristata*'nın sahip olduğu farmakolojik etkiler, içeriğinde yer alan berberin, berbamin, palmatin ve oksiakantin bileşenleri ile ilişkili olsa da, bu bileşenlerden berberin çok sayıda farmakolojik etkiye sahiptir. Bitkinin sahip olduğu antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antipiretik, antikanser ve

antilipidemik vb. özellikleri ile farklı geleneksel tıp sistemlerindeki kullanımı yıllar boyunca devam etmiştir. Günümüzde *Berberis aristata* ekstreleri çeşitli kozmetik ve farmasötik preparatlarda kullanılmaktadır (33, 51, 52).

Birçok farmakolojik etkisi bulunan ve protoberberin alkaloidi olan berberinin, antiaterosklerotik ve antidiyabetik etkileri de mevcut olup, diyabetik hastalarda hiperlipidemiye glukoz intoleransı, açlık kan şekeri seviyelerini azalttığı, ilgili raporlarda bildirilmiştir (48). Karamuk bitkisi LDL reseptörlerinin ekspresyonunu ciddi oranda artırmasının yanı sıra, HDL kolesterol düzeylerini yükseltip, LDL kolesterol, trigliserid düzeylerinde düşüş olmasını sağlayabilmektedir (33). Geleneksel tıpta birçok farmakolojik faydası ile kullanımı devam eden berberinin, günümüzde yapılan araştırmalar ile birlikte spesifik olarak hiperkolesteroleminin tedavi edilmesinde berberin ile yapılabilecek yeni uygulamalara dikkat çekilmiştir (53).

Yapılan bir çalışmada, lipid düşürücü herhangi bir ilaç almayan 32 bireye günde 2 kez olmak üzere 500 mg berberin 3 ay boyunca uygulanmış ve hastalara bu uygulamanın yapılmaya başlandığı tarihten itibaren toplam kolesterol seviyelerinde %29, trigliserid seviyelerinde %35, LDL kolesterol seviyelerinde ise %25 kadar düşüş tespit edilmiştir.

63 birey ile yürütülen 2 aylık bir çalışmada ise, katılımcılara günde 2 kez 500 mg berberin uygulanması neticesinde LDL kolesterol seviyelerinde %23.8 kadar azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (54).

2.2. Hipertansiyon

Hipertansiyon, hekimler tarafından 18 yaş üstü yetişkin bireylerde yapılan, birbirini tekrar eden klinik ölçümler sonucunda, diastolik kan basıncının 90 mmHg'den ve sistolik kan basıncının ise 140 mmHg'den yüksek olması ile karakterize bir durumdur (55, 56). Birçok hastadaki hipertansiyon tanısının temelini oluşturan sistolik basınç seviyesinin, 80 yaş ve üzeri hastalarda 150 mmHg düzeyine kadar sorun teşkil etmediği bilinmektedir (57).

Hipertansiyon, toplumda en sık karşılaşılan kronik hastalıklardan biri olup, kan basıncının sürekli yüksek olması ile belirti vermektedir. Hasta üzerinde yarattığı komplikasyonların ciddiyeti ve toplumdaki yaygınlığının fazla olması sebebiyle küresel ölçekte önemi yüksek olan bir sağlık sorunudur (56, 58).

Primer hipertansiyon, diğer adıyla esansiyel hipertansiyon, başka bir hastalık sebebiyle oluşmamış ve mekanizması tam olarak bilinmeyen, sistemik arteriyel kan basıncının sürekli olarak yüksek olması durumudur ve bütün hipertansiyon vakalarının %80-90'lık kısmını oluşturmaktadır. Sekonder hipertansiyon ise, bu vakaların %10-20'lik kısmını oluşturmakta olup, hipertiroidi, uyku apnesi, Cushing sendromu vb. ikincil bir hastalık ile ilişkili olarak meydana gelmektedir (58).

Hipertansiyon hastalığında artmış olan kan basıncına metabolik, kazanılmış ve genetik faktörler de eşlik etmektedir (57). Hipertansiyon, diyabet, koroner arter hastalığı, inme vb. birçok hastalığın meydana gelmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nden elde edilen bilgiye göre, hipertansiyonun yaygınlık oranı %20 ile %50 arasında değişmekle beraber, dünyada en sık görülen ve aynı zamanda epidemiyolojik olarak etkisi en yaygın olan kardiyovasküler hastalıktır (57, 59). Hipertansiyonun yaygınlığının bu derecede yüksek olması, dünyadaki ülkeler genelinde insanların gelir durumundan bağımsız olarak da tutarlıdır. Aynı zamanda hipertansiyon hastalığı, bireylerin yaşı arttıkça görülme sıklığı artmakta olup, 60 yaşın üzerindeki bireyler arasında %60'tan yüksek bir yaygınlıkta görülmektedir (60). 2025 yılında dünya nüfusunun yaklaşık $\frac{1}{3}$ 'lük kısmında obezite ve yaşlanma sebebiyle hipertansiyon gözlenebileceği tahmin edilmektedir (57).

Hipertansiyon hastalarının %95'lik kısmında, hastalığın sebebi kesin olarak tanımlanamamakta ve engellemek üzere başka bir faktör tespit edilememektedir. Esansiyel hipertansiyon veya primer hipertansiyon olarak adlandırılan bu durumun kaynağı tanımlanamasa da, hipertansiyonun bazı risk etmenleri bağlantılı olduğu bilinmektedir. Sedanter yaşam, sigara kullanımı, alkol tüketimi, aile öyküsü, tuz tüketimi, stres, bu risk etmenlerine örnek olarak verilebilir (57). Ayrıca bireylerdeki total kardiyovasküler riskin öngörülebilmesi amacıyla bazı bilgisayarlı metotlar geliştirilmiş ve son zamanlarda bu metottaki sınırlama ve değerler kontrol edilmiştir. Sistemik Koroner Risk Değerlendirmesi(SCORE) adı verilen bu metot, total kolesterol düzeyi, cinsiyet, yaş, sigara tüketimi ve sistolik kan basıncı etmenlerine bağlı olarak, bireyin 10 sene içinde kardiyovasküler hastalık sebebiyle ölme riskini öngörmektedir (61).

2.2.1. Hipertansiyonda Farmakolojik Tedavi

Hipertansiyon tedavisinde genel olarak, kan basıncı seviyelerinin yüksek olmasının oluşturabileceği bazı renal, kardiyovasküler olayların, potansiyel organ hasarlarının ve bütün bunların sonucunda oluşabilecek morbidite ve ölüm vakalarının önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Aynı zamanda hastanın diyastolik kan basıncının 90 mmHg, sistolik kan basıncının ise 140 mmHg seviyesinin altında kalması ve hastanın sahip olduğu diğer kardiyovasküler risk etmenlerinin kontrol altında olması gerektiği bildirilmiştir (57, 62). Yüksek tansiyon seviyelerinin düşmesinin sağlanmasında, kilo vermek, fiziksel aktivitenin artırılması, sigarayı bırakmak ve daha az tuz tüketmek vb. günlük alışkanlıklardaki bazı değişikliklerin yardımcı olabileceği bilinmektedir (63). Ancak birçok hipertansiyon hastasında kan basıncını en uygun şekilde kontrol altında tutabilmek amacıyla, bu değişikliklere ilave olarak ilaç tedavisi de uygulanmaktadır (60).

Hipertansiyon tedavisi için, beta blokörler, anjiotensin reseptör blokörleri, ACE inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri ve diüretikler olmak üzere beş ana ilaç grubu tavsiye edilmektedir. Bu ilaç gruplarından diüretikler için furosemid, indapamid, beta blokörler için metoprolol, atenolol, ACE inhibitörleri için kaptopril, ramipril, kalsiyum kanal blokörleri için amlopidin, diltiazem, anjiotensin reseptör blokörleri için ise valsartan ile kandesartan örnek olarak verilebilir (60, 64). Tek ajanla tedavi alan hipertansiyon hastalarının %40 kadarı, 140/90 mmHg kan basıncı seviyelerinin altına ulaşabiliyorken, diğer hastaların da bu seviyelerin altına ulaşabilmesi için, diğer %40'lık kesim iki ajan ile tedaviye, kalan %20'lik kesim ise 3 veya daha çok antihipertansif ajan ile tedaviye gereksinim duymaktadır (65).

2.2.2. Hipertansiyonda Bitkisel Tedavi

Hipertansiyon hastalarının sadece %34'ünde yüksek tansiyon seviyelerinin kontrol altına alınabildiği bilinmektedir. Hipertansiyon hastalığında kullanılan ilaçların yan etkileri, uyuncu sorunu, hipertansiyon ilaçlarının pahalı olması, ulaşılabilirlik vb. sorunların varlığı sebebiyle, bilhassa kırsal kesimde yaşayan bireyler, hipertansiyon ve diğer hastalıkların tedavisi için bitkisel tedavi gibi farklı tedavi yolları arayışı içindedir (66). Hipertansiyon tedavisinde fiziksel aktivitenin artırılması ve günlük alışkanlıklardaki bazı değişikliklere ilave olarak, tansiyon

düşürücü farmakolojik etkileri ile bilinen bitkisel ilaçların kullanımının, sentetik ilaçlarla sağlanan tedavi yerine etkili bir seçenek olabileceği düşünülmektedir (7).

Hipertansiyon tedavisinde sıklıkla kullanılan bitkiler için sarımsak, zencefil, çay, alıç, ginkgo biloba, civanperçemi örnek olarak verilebilir (67).

Sarımsak (*Allium sativum*)

Allium sativum, diğer adıyla sarımsak, gıdalardaki yaygın kullanımının yanı sıra tıpta ve hipertansiyon da dahil olmak üzere birçok kardiyovasküler hastalığın tedavisindeki kullanımı ile de bilinmektedir. Sarımsağın sahip olduğu çeşitli yararlı etkilerinin birçoğunu ve kendine özgü kokusunu sarımsağın ana etken maddelerinden biri olan allisin sağlamaktadır (64, 68).

Alil 2-propentiyosülfanat, yani allisin, allinin(S-alil sistein-S-oksit) parçalanması ile meydana gelmekle beraber, allisinin en çok kükürt içeren biyoaktif bileşikler arasında yer aldığı konusunda bazı görüşler mevcuttur. Sarımsağın soğan kısmının, bitkinin içerdiği kükürtlü bileşiklerin üretiminin ve aynı zamanda bitkinin gösterdiği hipotansif etkinin kaynağı olduğu düşünülmektedir (55). Sarımsağın nitrik oksit üretimini artırma yoluyla vazodilatör etki sağladığı düşünüldüğünün yanı sıra allisinin, vazokonstriktör etkisiyle bilinen anjiyotensinin üretiminde yardımcı bir rolü olan anjiyotensin dönüştürücü enzimi inhibe ederek hipertansif bireylerin kan basıncı seviyelerinde düşüş sağladığı doğrulanmıştır (55, 64).

Kontrolsüz hipertansiyon hastaları(≥ 140 mmHg) ile yapılan bir çalışmada ise, sarımsak verilen hasta grubunun sistolik kan basıncının, 12 haftalık bir tedavinin ardından kontroller ile yapılan kıyaslamada yaklaşık 10.2 ± 4.3 mmHg daha düşük olduğu gözlenmiştir (69).

Alıç (*Crataegus spp.*)

Crataegus spp., diğer adıyla alıç, yaklaşık 300 türü bulunan, eski çağlardan beri geleneksel tıpta ve aynı zamanda çok sayıda ülkede gıda endüstrisinde kullanımı bulunan yabani bir meyvedir (66, 70). QUE ise, alıç bitkisinde içeriğinde yer alan, vazodilatör, antioksidan ve antiinflamatuvar farmakolojik özellikleri olan temel bileşiktir (71). Alıç bitkisi kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde 17.yy'dan beri kullanıldığı bilinmektedir (66).

Alıçın hipertansiyon üzerindeki etkisi hakkında evre 1 hipertansiyon hastası olan bireyler ile yapılan bir çalışmada katılımcılara 12 hafta boyu 450 mg alıç uygulanmıştır. Tedavinin 4.haftasında yapılan kontrollerin neticesinde, katılımcıların ortalama sistolik kan basınçlarında 153.95 ± 3.14 'ten 144.79 ± 2.07 'ye, diyastolik kan basınçlarında ise 93.8 ± 2.19 'dan 89.6 ± 1.43 seviyelerine düşüş gözlenmiştir (72). Alıç ile yapılan bir diğer çalışmada ise, 500 mg alıç ekstresinin 10 hafta boyunca uygulandığı hafif hipertansiyon hastalarının diyastolik kan basınçlarında 13.1 mmHg düşüş gözlenmiştir (71). *Crataegus curvisepala*'dan elde edilen hidro-alkollü çiçek özlerinin plasebo kontrollü şekilde 3 ay boyunca uygulandığı çalışmada ise sistolik kan basıncında yaklaşık 13 mmHg, diyastolik kan basıncında ise yaklaşık 8 mmHg düşüş gözlenmiştir (7).

Çörek Otu (*Nigella sativa*)

Ranunculaceae familyasına ait bir tıbbi bitki olan *Nigella sativa*, çörek otu olarak da bilinmektedir. Dünyanın birçok ülkesinde yetiştirilmekte olan *Nigella sativa*'nın, 2000 yılı aşkın süredir tıbbi bitki olarak kullanımı mevcuttur. Çörek otunun faydalı ve değerli olduğu düşünülen kısmı, siyah renkteki tohumları barındıran meyvesidir. Birçok geleneksel tıp sisteminde de oldukça önemli bir yeri olan çörek otunun yağı ve tohumları farklı hastalıkların tedavisinde geniş bir kulanıma sahiptir (73-75).

Çörek otu, analjezik, antihipertansif, antioksidan, antihelmintik, karaciğer koruyucu, antiinflamatuvar vb. birçok farmakolojik etkiye sahiptir. Aynı zamanda parazit, ishal, astım, bronşit gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmakta olup, çörek otunun faydalı etkilerinin büyük kısmının, temel etken maddelerinden olan timokinon kaynaklı olduğu bilinmektedir (73).

Yapılan bir kontrollü çalışmada, diyabet hastası 57 bireye 1 yıl boyunca günlük olarak 2 g *Nigella sativa* uygulanması sonucunda hastaların kalp hızı, ortalama arteriyel basınç, diyastolik ve sistolik kan basınçlarında ciddi bir düşüş gözlenmiştir. Diğer bir kontrollü çalışmada ise hipertansiyon hastası ve yaşlı olan 76 bireye günde 2 kez olmak üzere 300 mg *Nigella sativa* tohum ekstraktı, 4 hafta boyunca uygulanması neticesinde hastaların diyastolik ve sistolik kan basınç seviyelerinde küçük bir düşüş görülmüştür (76).

Zencefil (*Zingiber officinale*)

Zingiber officinale, *Zingiberaceae* familyasına ait, birçok ülkede bitkisel ilaç, baharat ve aroma verici olarak geniş kullanımının yanı sıra tıp, geleneksel tıp ve gıda alanında da önemli bir yeri olan bir bitkidir (77). Zencefil bitkisinin en az 115 türü olduğu bilinmekte olup, Çin, Ayurveda gibi geleneksel tıp sistemlerinin birçoğunda ağrı, iştah kaybı, astım, öksürük vb. rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (77, 78).

Zencefilin antihipertansif, antihiperlipidemik, diyabet gelişimi ve oluşumunu önleyici, antikanser ve antioksidan başta olmak üzere birçok farmakolojik etkisi mevcut olmakla birlikte bitkinin sağladığı faydalar genel olarak içeriğinde yer alan fenolik bileşikler, özellikle de gingerol ve shogaol bileşenleri ile ilişkilendirilmektedir (7). Zencefil bitkisinin rizom kısmı gingeronlar, shogaoller, gingeroller, çeşitli fenolik bileşikler ve paradoller gibi etken maddeleri içermekte olup, rizom kısmı Ayurveda geleneksel tıp sisteminde kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (79).

Zencefil ile yapılan bir çalışmada, 60 sağlıklı bireye plasebo kontrollü bir şekilde 50 mg/kg ve 100 mg/kg zencefil uygulaması yapılmış olup, 100 mg/kg doz uygulaması yapılan bireylerde iki saatlik bir süre içinde diyastolik kan basıncının 73.3 ± 3.35 mmHg'den 70.5 ± 3.39 mmHg'ye, sistolik kan basıncının ise 114.3 ± 3.22 mmHg'den 105.5 ± 3.13 'e düştüğü gözlenmiştir (80). Zencefil bitkisinin toz formu ile yapılan bir çalışmada ise, tip 2 diyabet hastası bireylere günde 3 g olmak üzere 8 hafta boyunca zencefil tozu kapsülü uygulaması yapılmasının neticesinde katılımcıların sistolik ve diyastolik basınçlarında düşüş gözlenmiştir (81).

Kereviz (*Apium graveolens*)

Umbelliferrae familyasına ait bir bitki olan kereviz, çeşitli kısımlarından elde edilen, yağ, tohum, sap vb. ürünlerinin gıdalara tat vermesi ve idrar söktürücü, antihelmintik ve antispazmodik vb. tıbbi amaçlarla kullanıldığı, aynı zamanda tansiyon düşürücü, inflamasyon giderici, antimikrobiyal ve antikanser gibi birçok özelliği ile bilinen bir bitkidir (7, 82).

Kereviz, terpenoidler, fenolik asitler, flavonoidler, ftalidler gibi faydalı çok sayıda biyoaktif madde içermekte olup, özellikle ftalid grubu bileşenlerden

sedanenaloidin sağlığa yararlı birçok etkisi mevcuttur (82, 83). Kerevizin içeriğindeki sodyum miktarı fazla olsa da, 3-n-bütil flalidin vazodilatör etkisi sayesinde hipotansif etkiye sahiptir (82).

Bir çalışmada, 52 katılımcıya 4 hafta boyunca plasebo kontrollü bir şekilde, günde 1.34 gram kereviz tohumu ekstresi kapsülü verilmiştir. Kereviz tohumu ekstraktı uygulamasının yapıldığı grupta ortalama diyastolik kan basıncı 92.2 ± 5.74 'ten 84.2 ± 4.87 mmHg'ye, ortalama sistolik kan basıncının ise 141.2 ± 5.91 'den 130.0 ± 4.38 mmHg'ye düştüğü tespit edilmiştir (84).

Kişniş (*Coriandrum sativum*)

Coriandrum sativum, diğer adıyla kişniş, *Umbelliferae* familyasına ait, dünya genelinde yetiştiriciliğinin yapıldığı bir bitki olup, gıda olarak tüketiminin yanı sıra ishal, hazım problemleri, kusma vb. gastrointestinal rahatsızlıklarda kullanılmaktadır (85).

Kişniş bitkisi, tohum, meyve, tohum ve kök gibi her kısmında çeşitli bileşikler içermekte ve bu bileşikler sayesinde inflamasyon giderici, tansiyon düşürücü, kas gevşetici ve antiseptik gibi çok sayıda özellik göstermektedir. Bu bileşiklerden biri olan linalool ise bir terpen alkolü olarak anksiyolitik, analjezik ve antikonvülsan farmakolojik etkilere sahip olması nedeniyle, kişnişin tedavi edici temel etken maddesi olarak bildirilmiştir (85, 86). Aynı zamanda kişnişin, içerdiği fenolik asitler, terpenler ve fitosteroller gibi bazı fitokimyasallar sayesinde kardiyometabolik hastalıkları önleyici, antihiperlipidemik ve anjiyotensin dönüştürücü enzimi inhibe edici farmakolojik etkilere sahip olduğu doğrulanmıştır (86).

Kişniş tohumlarının sulu metanolik ekstraktının intravenöz uygulanması ile sistolik ve diyastolik basınçta düşüş sağladığı bildirilmiş olup, bu durumun kişnişte bulunan bileşenlerin kalsiyum kanalını bloke edici ve kolinerjik etkilere sahip olması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (71, 86). Ayrıca kişnişin sahip olduğu idrar söktürücü etki, bitkinin tansiyon düşürücü özelliğini desteklemektedir (85).

Soğan (*Allium cepa*)

Allium cepa, soğan olarak da bilinen, *Amaryllidaceae* familyasına ait tıbbi bir bitkidir. S-metil sistein sülfoksit, S-propil sistein sülfoksit, sikloalliin, sülfidler,

kaempferol ve aynı zamanda oldukça önemli bir antioksidatif bileşen olan QUE, bitkideki temel bileşenlerdir (87, 88).

Soğanın ihtiva ettiği bileşenler farklı farmakolojik etkiler göstermektedir. Antik uygarlıklar döneminden beri, örneğin Antik Mısır'da antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve diğer faydalı etkileri sebebiyle, Çin tıbbında ise dizanteri, baş ağrısı, soğuk algınlığı vb. rahatsızlıklar için kullanılmış olduğu bilinmektedir. Soğan, içerdiği etken maddeler ile antidiyabetik, tansiyon düşürücü, lipid düşürücü, platelet ve tümör oluşumunu engelleyici ve aynı zamanda antioksidan olmak üzere oldukça geniş spektrumlu farmakolojik özelliklere sahiptir (87, 89).

Soğanın fruktoz ile beslenen ve anestezi altında olan normotansif sıçanlar ile yapılan çalışmada, sıçanların kan basıncında düşüş gözlenmiştir. Ayrıca QUE'in, diyabetik sıçanlarda hepatosit apoptozunu azalttığı ve aldehit oksidaz üzerinde önemli bir antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Hipertansiyon hastası 41 birey ile yapılan diğer bir çalışmada ise, günde 730 mg QUE, aralıksız bir şekilde 28 gün boyu uygulanmış ve hastalar arasında sadece 1.evre hipertansiyon hastalarının diyastolik kan basıncında 5 mmHg, sistolik kan basıncında ise 7 ± 2 mmHg düşüş gözlenmiştir. QUE, oksidatif stres seviyesini azaltarak kan basıncında yaklaşık 5 mmHg düşüş sağlayabilmektedir. Birçok farklı çalışma neticesinde QUE ile soğanın tansiyon düşürücü etkisi doğrulanmıştır (71, 87, 88).

Roselle (*Hibiscus sabdariffa*)

Malvaceae familyasına ait bir bitki olan *Hibiscus sabdariffa*, diğer adıyla roselle, bitkinin çeşitli kısımları geleneksel olarak bazı içeceklerde ve gıdalarda, endüstriyel olarak ise bitkisel ilaç ve aroma verici olarak kullanılmakta olup, halk tıbbında ise ateş, hipertansiyon gibi rahatsızlıklarda kullanımının olduğu bilinmektedir (66, 90).

Roselle bitkisinin çiçek kısmındaki temel bileşikler lifler, glikozitler, organik asitler, flavonoid ve antosiyaninler olup, bitki hakkında yapılan çalışmalarda diüretik, antikolesterol, kanser oluşumu ve gelişimini önleyici, antioksidan ve özellikle de içerdiği antosiyaninler sayesinde antihipertansif farmakolojik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (91-93).

Roselle bitkisinin hipertansiyon üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, 2 g roselle dekoksiyon çayının 1 hafta boyunca her gün uygulanması sonucunda, roselle uygulamasının yapıldığı grup katılımcılarının ortalama sistolik basınçlarında 12.64 mmHg, diyastolik basınçlarında ise 11.58 mmHg düşüş meydana geldiği bildirilmiştir (93). Siyah çay ile roselle çayının, hafif hipertansiyonu olan tip 2 diyabetik 60 birey üzerindeki etkisinin incelendiği bir kontrollü çalışmada, 1 aylık süre sonunda roselle infüzyon çayı grubundaki bireylerin sistolik kan basınç ortalamasının 134.4 ± 11.8 mmHg'den 112.7 ± 5.7 mmHg'ye düştüğü, diyastolik kan basıncı üzerinde ise herhangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir (94).

Safran (*Crocus sativus*)

Crocus sativus, diğer adıyla safran, *Iridaceae* familyasına ait, renklendirici ve gıdalarda tat vermesi amacıyla kullanılan ve genellikle Avrupa ve Asya ülkelerinde yetiştiriciliğinin yapıldığı, altın renginde tıbbi bir bitkidir (95, 96). Safran, krosetin, pikrokrosin, krosin ve ana etken maddesi olan safranal içermekte olup, bu sayede antitussif, iskemi önleyici, antikonvülsan, antioksidan ve antianksiyetik ve aynı zamanda antihipertansif etkilere sahip olduğu ilgili çalışmalarda tespit edilmiştir (96, 97). Safranın içerdiği temel bileşenleri olan safranal ve krosinin sağlıklı bireylerde tansiyon düşürücü etki gösterdiği ve safran bitkisinin antihipertansif etkisi açısından safranalın en önemli bileşen olduğu, yapılan araştırmalar sonucunda doğrulanmıştır (98, 99).

Yapılan bir çalışmada ise, sağlıklı bireylere 7 gün boyunca yapılan 400 mg safran tableti uygulaması sonucunda, sistolik kan basıncında 11 mmHg, ortalama arter basıncında ise 5 mmHg düşüş gözlenmiştir (66).

2.3. Plazma Protein Bağlanması

Plazma proteinine bağlanma (PPB), farmasötikleri farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan etkileyen, ilaç tedavisinde çok önemli bir yeri olan çift yönlü bir durumdur (100). İlaç geliştiricilerinin hedef bölgelerde etkili farmasötik derişimin sağlanması üzerine olan çalışmalarında, plazmada yoğun bir şekilde bulunan proteinler ve bu proteinlerin birçok ilaçla olan bağlanma eğilimleri, araştırmacıların

PPB adı verilen durumun bu çalışmalar için büyük bir öneme sahip olduğunu anlamalarını sağlamıştır (11).

Farmasötikler, plazmada proteinlere bağlı halde yani kompleks oluşturarak bulunabilir ve bu bağlanmaların geneli tersinirdir. İlaçların plazma proteinine bağlanmamış formu ile bağlı olan formu bir denge içerisinde ve temeli itibarıyla albümin, alfa-1-asit glikoprotein, lipoproteinler ve kırmızı kan hücreleri gibi plazma proteinlerine bağlansa da serum albümini ve α 1-asit glikoprotein plazmada yoğun bir şekilde bulunur ve çok sayıda ilaç ile yeterince kuvvetli bağlanmalar oluşturabilme eğilimindedirler (9, 101). Plazmada görece olarak daha az bulunan diğer plazma proteinleri ise, ilaçların farmakokinetikleri açısından pek büyük bir öneme sahip değildir (102).

PPB, bir ilacın farmakokinetiği ve farmakodinamiği açısından oldukça büyük bir etkiye sahiptir (10). Plazmada serbest halde bulunan ilacın derişimi, vücut dokularında yer alan serbest halde bulunan ilaç derişimine eşit olup, ilacın hedef bölgesindeki reseptör etkileşimi ve buna bağlı olarak gerçekleşmesi beklenen farmakolojik etkiyi sadece dokularda yer alan serbest halde bulunan ilaç sağlamaktadır (11). Genellikle farmakolojik etkiyi plazmadaki toplam ilaç derişimi yerine serbest ilaç derişiminin sağladığı bilinmektedir. Dolayısıyla proteine bağlı bir ilacın, plazma proteinine afinite açısından rekabet halinde olduğu diğer ilaç ile yer değiştirmesi, plazmadaki serbest halde bulunan ilaç derişimini önemli derecede değiştirebilmesi, plazma proteinlerine afinitesi yüksek olan ilaçlar ve birden fazla ilaç kullanan hastaların tedavileri açısından büyük öneme sahiptir (10, 11, 100, 103). Plazmada bulunan ilaç derişiminin bu şekilde artışının potansiyel bir toksisiteye yol açabileceği bu gibi durumlarda doz ayarlamasına ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu bağlamda PPB açısından elde edilen bilgiler ve serbest halde bulunan ilaç derişimi, ilaçların kullanımındaki etkili doz aralıklarının ve güvenli kullanım sınırlarının belirlenmesinde çok önemli bir role sahiptir (11).

İlacın plazma proteinine bağlanması açısından incelenmesi ve analiz edilmesi, ilaç araştırma ve geliştirme yolundaki ilk adımlardan biridir ve oldukça önemlidir. Dolayısıyla plazma proteinine bağlanmanın tespiti için güvenilir sonuçlar verebilecek bir analiz metodunun mevcut olması gerekmektedir (100). Bir ilacın serbest halde bulunan kısmını veya plazma proteinine bağlanmasını ölçmek amacıyla

ultrafiltrasyon, ultrasantrifüjleme, denge diyalizi vb. metotlar kullanılmaktadır. Bunların arasından denge diyalizi, plazma proteinine bağlanma tespiti için en çok tercih edilen metottur. Deneysel koşullara ve materyallere bağlı olarak, 3 ile 24 saat arası süren görece olarak uzun bir dengeleme süresine sahip olduğundan, kararsız bileşiklerle çalışmaya elverişli bir metot değildir. Ultrafiltrasyon ise santrifüjleme yoluyla serbest halde bulunan ilaç ile proteine bağlı olan ilacı, boyuta bağlı ayırım yapan zardan geçmeye zorlayarak birbirinden ayıran hızlı ve basit bir metottur. Dolayısıyla çok sayıda araştırmacı tarafından plazma protein bağlanması çalışmalarında ultrafiltrasyon tekniği kullanılmıştır (10).

2.4. Ultrafiltrasyon Tekniğine Genel Bakış

2.4.1. Ultrafiltrasyon Tanımı

Ultrafiltrasyon, basıncın oluşturduğu kuvveti kullanarak, çözücünün ve çözünmüş halde bulunan, ağırlığı görece düşük olan maddelerin cihazda kullanılan zardan geçmesine olanak tanırken, geneli itibariyle 2-100 nm boyutunda gözeneklere sahip zardan ortalama 1-50 nm aralığında bir boyuttaki, partiküller, yağlar, bakteriler ve proteinler gibi daha büyük moleküllerin geçmesine izin vermeyerek ayırımın sağlandığı bir işlemdir (104-106). Ultrafiltrasyon tekniğinde gerçekleştirilen derişim gradyanı esasına bağlı filtre işlemi, kullanılan zarın gözenekli yapısı, zara uygulanan basınç ve zarın moleköl büyüklüğüne göre eleme özelliğine bağlı olarak meydana gelmektedir (105). Ultrafiltrasyon tekniğinde kullanılan zarların 0.01-0.1 µm arasında yer alan gözenek boyutları mikrofiltrasyon ile nanofiltrasyonda kullanılan zar gözenek boyutlarının arasında yer almaktadır (106).

Ultrafiltrasyon zarları geneli itibariyle asimetrik bir zar yapısına sahip olup, iki katmandan oluşmaktadır. Bu iki katman, zarın ayırım gücünü belirleyen ince bir üst katman ve gözenekçe zengin bir alt katmandan meydana gelmektedir (107). Ultrafiltrasyon işleminde kullanılan zarların tümü elek filtrasyon zarları olarak ifade edilmekle beraber bu zarlar, moleköl ağırlık kesme değerleri(MWCO) ile sınıflandırılmaktadır (108). Ultrafiltrasyon işleminde kullanılan zarların moleköl ağırlık kesme değerleri, zardan geçebilecek maddenin boyutunun sahip olabileceği en yüksek değeri ifade etmekle birlikte bu geçişi, molekölün sahip olduğu yük ve konfigürasyon da etkilemektedir. Örnek olarak poliakrilonitril malzemedan yapılmış

bir zardan, çok yüklü fakat boyut olarak küçük olan bir molekül gentamisin geçememektedir (109).

Ultrafiltrasyon kullanım açısından yarı geçirgen zarlarla gösterdiği benzerlik dolayısıyla ultrafiltrasyonda kullanılan zarların özelliklerinin geneli, membran temelli filtrasyonda kullanılan zarların özelliklerine benzemektedir. Ultrafiltrasyon yönteminde kullanılan zarların farklı birçok çeşidi mevcuttur (110). Ultrafiltrasyon işleminde kullanılan zarlar günümüze kadar 150’yi aşkın farklı inorganik maddelerden ve polimerlerden imal edilmiştir fakat bunların çok az bir kısmı yaygın bir kullanıma sahip olmuştur (111). Bu membranlar, kullanılan malzemenin konfigürasyonu açısından, asimetrik gözenekli filmler, plaka ve çerçeve sistemleri, kompozit bileşenler, içi boş fiber membranlar, spiral sargılı veya boru şeklindeki modüller olarak sınıflandırılırken, malzeme açısından polimerik membranlar ve inorganik membranlar olarak sınıflandırılmaktadır (105). Membranlarda kullanılan malzemelerden sıklıkla tercih edilenler ise polisülfon, poliakrilonitril, polietersülfon, polivinilidin diflorür, selüloz asetat, zirkonya ve rejenere selüloz gibi polimerler ve alümina ve titanya olarak sıralanabilecek inorganik malzemelerdir (111).

Ultrafiltrasyon tekniğinden geneli itibariyle makromolekül içeren, özellikle de protein içeren çözeltilerin ayrımında, saflaştırılması amacıyla araştırmalarda ve endüstriyel alanda yararlanılmaktadır (112). Ultrafiltrasyon tekniği, kullanılan zarların moleküler ağırlık kesme özelliğinin sağladığı avantajlar sayesinde araştırmalardaki kullanımının yanı sıra endüstriyel ayırmda kullanılan teknolojiye büyük öneme sahiptir (105). Bunun yanı sıra ultrafiltrasyon tekniği, protein plazmasına bağlı olmayan ilacın miktar tayini çalışmaları için oldukça kolay ve hızlı bir tekniktir. Dolayısıyla klinik çalışmalarda kullanılmaya çok elverişlidir (11).

Ultrafiltrasyon membranları, çapraz akış(cross flow) ve çıkmaz(dead-end) modları ile kullanılabilir. Modların kullanım alanları açısından, çapraz akış modu çoğunlukla endüstriyel alanda tercih edilirken, çıkmaz modu genellikle laboratuvar çalışmalarında tercih edilmektedir (113). Ultrafiltrasyon metodu uygulamasının basit olması ve özellikle plazma proteinine bağlanmamış ilacın tayinini inceleyen çalışmalar için hızlı bir yöntem olması gibi avantajlarıyla, günümüze kadar altın standart olarak kabul edilen denge diyalizi yönteminin karşısında popülerliğini

arttırmaya devam etmektedir. Aynı zamanda bu gibi avantajları sayesinde klinik çalışmalarında kullanılmaya elverişli bir yöntemdir (100).

Ultrafiltrasyon metodunun diğer özelliklerinden biri de, bir basınç kaynağı oluşturularak ultrafiltrasyon membranından geçen suyun bakteri ve virüslerden arındırılabilmesidir. Bu sayede gelişmekte olan ülkelerde milyonlarca can kaybına sebep olan, sudan bulaşabilen hastalıklar kaynaklı ölümlerin önüne geçilebilmesi sağlanabilmektedir ve düşük maliyetle bu işlem yapılabilmekte olup arındırma işlemi için kimyasal kullanımı da azaltılabilmektedir. Ayrıca maliyet açısından ultrafiltrasyonla yapılan arındırma işlemleri ters ozmoz ve nanofiltrasyona kıyasla çok daha düşük maliyetle gerçekleştirilebilmektedir (114).

2.4.2. Ultrafiltrasyonun Kullanım Alanları

Son zamanlarda, çözünmüş halde bulunan moleküllerin ayrılması işlemleri için ultrafiltrasyon metodunun tercih edilmesi konusuna olan ilgi artmıştır (107). Ultrafiltrasyon metodu spesifik olarak gıda sektöründe olduğu gibi protein ve benzeri makromoleküllerin saflaştırılması, ayrıştırılması üzerine olan alanlarda tercih edilmektedir. Ultrafiltrasyonun oldukça yaygın olarak kullanıldığı diğer alanlar ise atık suların arıtılması, boyaların arıtılarak geri kazanımı gibi uygulamalar ve metal, tekstil, süt, kağıt ve biyoteknolojik endüstrisindeki çeşitli uygulamaları olarak sıralanabilir (107, 115).

Ultrafiltrasyon işlemlerinin geneli, düşük enerji sarfiyatına sahip olması ve nispeten daha az kirletici olması sayesinde hali hazırda gelişmekte olan ülkeler tarafından daha fazla rağbet görmekte olup, ilerleyen süreçte de konvansiyonel metodların yerine kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir. Örnek olarak, Kuzey Amerika'da 2008 yılında yapılan ultrafiltrasyon temelli bir su arıtma tesisinde elde edilen temiz içme suyunun miktarı günde 380 milyon litreye çıkmış olup, bu gibi tesislerin sayısı yıllar içerisinde çok artmıştır (105, 114). Dolayısıyla oldukça hızlı bir şekilde yaygınlaşan bir metot olan ultrafiltrasyon, içme suyu elde edilmesinde de kritik öneme ulaşmıştır (114). Bunun yanı sıra ultrafiltrasyon metodundan, belediyeler tarafından atık suların arıtılarak, boşaltılabilmesi için uygun duruma getirilmesi amacıyla da yararlanılmaktadır (116).

Ultrafiltrasyon metodunun gıda endüstrisindeki uygulamaları içecek endüstrisi, süt endüstrisi, balık ve kümes hayvanları şeklinde üç gruba ayrılmaktadır. Bu gruplandırma, ultrafiltrasyon uygulamalarının gıda sektöründe edindiği geniş kullanımı ve genel olarak ultrafiltrasyonun kullanım alanlarının sektörel çeşitliliğini yansıtır niteliktedir (117).

Ultrafiltrasyon yönteminin gıda endüstrisindeki uygulamaları büyük oranda süt endüstrisinde olup, peynir altı suyu elde edilmesi, sütlerin içerdiği protein miktarını artırma, proteinin peynir altı suyundan ayrılıp konsantre edilmesi ve saflaştırılması, taşıma masraflarını azaltma amacıyla işlenmemiş sütün hacmini azaltma gibi uygulamalarda ultrafiltrasyon metodundan yararlanılmaktadır (116, 118). Peynir üretiminin aşamalarından olan sütü çöktürme sonucunda elde edilen lor, peynir yapımında değerlendirilirken, üst kısmında toplanan protein, laktoz ve mineral açısından zengin bir ürün olan peynir altı suyu da ultrafiltrasyon metodu kullanılarak saflaştırılıp ve tuzlarından arındırılıp, gıda takviyelerine ve/veya hayvan yemlerine takviye olarak eklenebilen bir ürüne dönüştürülebilmektedir (119). Ultrafiltrasyon yönteminin içecek endüstrisindeki kullanım amacı kalite ve verim artırma üzerinedir. Ultrafiltrasyon yönteminin içecek endüstrisinde kullanıldığı ürünler yoğunluklu olarak meyve suyu ve şarap olup, üretim aşamasındaki ürünlerin içeriğindeki pigmentlerin ayrıştırılması, ürünün berraklaştırılması vb. amaçlarla bu yöntemden yararlanılmaktadır (116, 119).

Metal ve otomotiv endüstrilerinde de ultrafiltrasyondan yararlanılmakta olup, metallerin kaplanması ve otomotiv üretim işlemlerinde kullanılan boyaların geri kazanılması amacıyla ultrafiltrasyon yöntemine başvurulmaktadır (118). Ultrafiltrasyon metodu biyolojik ürün üretiminde de önemli bir yere sahiptir. Üretim aşamasındaki ürünlerin içeriklerindeki solventi uzaklaştırma, oldukça seyrek halde bulunan çözeltilerde bulunan bazı biyomoleküllerin geri kazanılması, monoklonal antikorlar gibi bazı biyolojik moleküller barındıran hücresiz fermantasyon sıvılarının konsantre edilmesinde ve aynı zamanda protein ve aşı üretiminde virüslerin ortamdan uzaklaştırılması işleminde ve antibiyotik geri kazanımında ultrafiltrasyon yöntemi kullanılmaktadır (116). Ultrafiltrasyonun petrol endüstrisindeki kullanımı ise genel olarak poliimid ve polisülfondan imal edilmiş membranlar kullanılarak, yağlardaki

mumun arındırılması işleminde kullanılan çözücülerin, işlem sonrasında yağlardan uzaklaştırılması üzerinedir (118).

Ultrafiltrasyon yöntemi, işlem sırasında diğer yöntemlere kıyasla daha az kimyasala ihtiyaç duyulması veya hiç ihtiyaç duyulmaması, enerji sarfiyatının az olması, yüksek sıcaklıklarla çalışılmaması, çok kontrol edilmeye ihtiyaç duyulmaması ve filtreleme işleminin kalitesinin yüksek olması gibi artılarıyla geleneksel ayırma yöntemleri yerine tercih edilmektedir. Bu şekilde hem endüstrideki madde geri kazanımını hem de atık geri dönüşümünü desteklemekte ve endüstrilerin doğayı ve çevreyi kirletmesini azaltma yolunda katkı sunmaktadır (115). Dolayısıyla ultrafiltrasyon metodu günlük hayatımızdaki birçok ürünün elde edilmesinde oldukça kritik bir rol oynayabilecek, güncel bir ayırma tekniği olarak değerlendirilebilir (105).

2.4.3. Ultrafiltrasyonun Tarihçesi ve Gelişimi

Ultrafiltrasyon yöntemine dair ilk adım olduğu düşünülen çalışma, 1856 yılında Willibald Schmidt tarafından yazılan bir makaledir. Bu çalışmada arap sakızını ve yumurtanın protein içeriğini ayırtırmak için bir hayvandan elde edilen zarlar kullanılmış olup, zardan süzülerek elde edilen çözeltilerde her iki madde de küçük derişimlerde tespit edilmiştir (104). *In vivo* ultrafiltrasyonun mikrodializ yerine kullanılabilecek bir örnekleme yöntemi olabileceğini konu alan, Janle-Swain ve diğerleri tarafından yapılmış olan çalışma 1987 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışma, *in vivo* ultrafiltrasyon hakkındaki ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. *In vivo* ultrafiltrasyon üzerine yapılan ilk çalışmalarda örnek toplamak için köpekler tercih edilmiş olup, günümüze kadar olan sürede domuzlar, fareler, atlar, tavşanlar ve insanlar da *in vivo* ultrafiltrasyon uygulamalarına dahil edilmiştir (109). Ultrafiltrasyonun sistematik çalışmalarının ilkinin ise 1907 yılında Bechhold gerçekleştirmiştir (120).

20.yy'ın ilk yıllarında ultrafiltrasyon işlemlerinde malzemenin mekanik ve kimyasal özellikleri açısından oldukça elverişsiz olan kolodyon membranlar kullanılmıştır ve bu membranların endüstriyel işlemlerdeki ayırma performansı oldukça düşük kalmıştır. 1960'larda, Loeb ve Soirajan'ın ters ozmoz için kullanılmak üzere selüloz asetattan imal edilmiş asimetrik membranlarla alakalı çalışmalar yürütmesi ve akabinde bu çalışmalarda elde edilen verilerle ultrafiltrasyon

membranlarının üretimi için çalışmalar yürütmeleriyle ultrafiltrasyon yönteminde kullanılmak üzere geliştirilen membranlarla alakalı esas atılım gerçekleştirilmiştir (104).

Membran pazarında uzun ömürlülük, seçicilik, verim ve düşük maliyet kriterlerine göre şekillenen arayışlar, son yıllarda pazardaki ilginin ultrafiltrasyona yönelmesini sağlamıştır. Aynı zamanda dünyada azalan su kaynakları ve buna ilişkin yürütülen politika ve düzenlemeler, özellikle atık su arıtma konusu etrafında büyüyen çevre duyarlılığı, ultrafiltrasyonun sahip olduğu pazar payının gitgide artmasını sağlamıştır. Bu artan talepler ve küresel endişelerin neticesi olarak ultrafiltrasyon, küresel membran pazarında %65’lik pay sahibi olmuştur (115). Böylece, 30 yılı aşkın süredir analitik kimya alanında başarıyla kullanılmış olan ve membran bazlı uygulamalar için bir alternatif olan ultrafiltrasyon, günümüzde de gıda, kimya, atık su arıtma ve su üretimi endüstrilerinde çeşitli uygulamalara sahiptir (115, 120).

2.4.4. Ultrafiltrasyonun Avantaj ve Dezavantajları

Ultrafiltrasyon metodu, başka saflaştırma ve ayırma yöntemlerine kıyasla pek çok avantaja sahiptir. İşlem sırasında çözücünün fazında herhangi bir değişim oluşturulmadığı için enerji sarfıyatı görece olarak düşüktür. Aynı zamanda yüksek sıcaklıklarla çalışılan bir yöntem olmadığından, ısıya karşı hassas maddelerle çalışılabilir, ısı kaynaklı herhangi bir hasar oluşmadan ultrafiltrasyon ile saflaştırma işlemi gerçekleştirilebilir. Ultrafiltrasyonda kullanılan membranların gözenekleri, çözünmüş haldeki asitlerin, tuzların ve bazların geçişine engel olmayacak kadar büyüktür ve dolayısıyla işlem sonucunda, ortamda çözünmüş halde bulunan bu mikro bileşenlerin çoğunda herhangi bir değişim görülmemektedir (111).

Ultrafiltrasyon metodunun avantajlarından bir diğeri ise dengelenme süresinin oldukça kısa olmasıdır, genellikle işlem 37°C sıcaklıkta 30 dakika sürmektedir. Denge diyalizi yönteminde ise serbest haldeki maddenin birbirinden yarı geçirgen bir zarla ayrılmış olan iki diyaliz hücresi arasında geçen dengelenme işlemi birkaç saat sürmektedir (121). Aynı zamanda ultrafiltrasyon metodunda kullanılan alet ve cihazların basit olması, nicel analiz yapılabilmesi, işlem sonucu elde edilen verilerin doğruluğunun yüksek olması, yöntemin uygulanabilirliğinin kolay olması da ultrafiltrasyon metodunun diğer avantajları arasında yer almaktadır (11).

Ultrafiltrasyon tekniğinin birçok avantajı olsa da çözüm üretilmediği durumlarda işlemi kısıtlayabilen bazı dezavantajları mevcuttur. Ultrafiltrasyon ile yapılan bir işlemde kullanılan maddelerin, kullanılan membranlara ve ultrafiltrasyon cihazının hücrelerine spesifik olmayan şekilde bağlanabilmesi bu dezavantajların başında yer almaktadır. Bu durum, lipofilik özelliği fazla olan bazı bileşikler ile gerçekleştirilen plazma protein bağlanması çalışmalarında engel oluşturabilmektedir (100). Aynı zamanda ultrafiltrasyon ile yapılan çalışmalarda filtre işlemi esnasında plazma protein derişiminde bir artış olup, bu durum ilgili ilacın proteine bağlanımını etkileyebilmekte ve plazma proteinine bağlanma yüzdesinde değişim gözlenebilmektedir. Ancak ultrafiltrasyon işleminde filtrelenen hacim küçük olduğundan bu bağlanma dengesinde gözlenebilen bozulma ve bu bozulma neticesinde oluşan hata da oldukça küçüktür (121). Filtrasyon işlemi sırasında cihazın membran yüzeyinde proteinlerin birikerek membran gözeneklerinin küçülmesine sebep olması, işlem sırasında sıcaklık ve pH kontrolünün gerekli olması, Gibbs-Donnan etkisi ve membranlardan protein sızıntısı, ultrafiltrasyon metodunun diğer dezavantajları arasında yer almaktadır (11, 121).

2.4.5. Ultrafiltrasyonun Esası ve Uygulanışı

Ultrafiltrasyon metodu, moleküllerin yarı geçirgen bir membrandan geçerken boyutlarına göre elenmesi esasına dayanmaktadır (122).

Plazma proteinine bağlanma çalışmaları için oldukça basit bir yöntem olan ultrafiltrasyon yönteminde, 3 ile 30 kDa arasında moleküler ağırlık kesimi olan bir membran ile iki bölmeye ayrılmış olan cihazın üstte kalan bölmesine plazma örneği yerleştirildikten sonra santrifüjlenir. Ardından, elde edilen ultrafiltratta yer alan plazma proteinine bağlanmamış ilacın derişimi immünoanaliz veya uygun kütle spektrometresi ile kombine edilmiş sıvı kromatografisi yöntemleri(LC-MS/MS) ile tayin edilebilmektedir (123, 124). Ultrafiltrasyon esnasında uygulanan santrifüjleme işlemi, proteinler ve proteinlere bağlı diğer bileşikler yarı geçirgen membrandan geçemezken, küçük moleküllerin geçişi için gerekli gücün sağlanması amacıyla uygulanmaktadır (122). Ayrıca bağlanmamış ilacın derişiminin belirlenmesinde, uygulanan santrifüjleme işleminin süresi büyük öneme sahiptir (124).

Ultrafiltrasyon cihazlarının tek üniteli olanları birkaç mililitreden 100 µL'ye uzanan birçok hacim seçeneğine sahip iken, özellikle plazma proteinine bağlanma çalışmalarında kullanılan 96 oyuklu 2 plakaya sahip ultrafiltrasyon cihazları da mevcuttur (103).

2.5. Denge Diyalizi

Denge diyalizi yöntemi, plazma proteinine bağlı olan ilaç ile serbest haldeki formunun yarı geçirgen ve farklı molekül ağırlık kesimlerine sahip zarlardan difüzyon aracılığıyla geçişi sağlanarak ayırım yapılması esasına dayanan bir metottur (125).

Klinik çalışmalarda kullanımı en yaygın olan yöntem ultrafiltrasyon olmasına rağmen, denge diyalizi yöntemi özellikle plazma proteinine bağlanmamış ilaç derişimi çalışmaları için hala en uygun yöntem olarak tanınmakla birlikte, diğer pek çok araştırma alanında tercih edilmektedir (126). Denge diyalizi yöntemi ile çalışılırken dışarıdan herhangi bir kuvvet uygulanmadığı için proteinin içinde bulunduğu etkileşimlerin temelini gözlemlene imkanı sunar ve dolayısıyla denge diyalizi yöntemi, bu çalışmalar için altın standart olarak ifade edilmektedir (125). Aynı zamanda denge diyalizi metodu, plazma proteinlerine ilaçların bağlanmasının tespit edildiği ve incelendiği çalışmalarda en çok yararlanılan yöntemlerdendir (127, 128).

Denge diyalizi metodu temel olarak, yarı geçirgen membranın çalışılan numune ile tampon çözeltiyi birbirinden ayırdığı bir düzenekte, numune içerisinde yer alan ilacın difüzyon aracılığıyla membrandan geçmesine dayanmaktadır (126). Denge diyalizinde kullanılan cihaz, iki bölmeden oluşmakta olup bu bölmeler birbirinden yarı geçirgen, ancak kendi moleküler ağırlık kesiminden düşük ağırlığı olan moleküllerin geçmesini sağlayan bir zarla ayrılmaktadır. Denge diyalizi çalışması yapılırken, bu cihazın bölmelerinden birinde incelenen ilacın bulunduğu plazma numunesi, diğer bölmesinde ise bir tampon çözelti bulunmaktadır (129). Cihazda kullanılan membran, plazma proteinlerinin geçişine izin vermezken, ilacı geçirebilmelidir. Cihazda denge sağlanana kadar inkübasyon işlemi uygulanmasının ardından tampon çözeltide yer alan bağlanmamış ilaç miktarı tayin edilir (126). Denge diyalizi çalışması, cihaz ortamında *in vivo* koşullarını sağlayabilmek amacıyla 37°C sıcaklıkta yapılmakta olup, aynı zamanda pH kontrolünün sağlanabilmesi amacıyla karbondioksit kontrollü bir etüv içerisinde yapılmaktadır (125).

Denge diyalizi metodunun avantajları, pH ve sıcaklığın, çalışmanın bir CO₂ inkübatöründe gerçekleştirilmesiyle kontrol altında tutulabilmesi, proteinlerin içinde bulunduğu etkileşimlerin temelini inceleme imkanı sunması, spesifik olmayan bağlanmanın nispeten az olması olarak sıralanmaktadır. Aynı zamanda hızlı denge diyalizi cihazlarının (RED) 96 kuyucuklu bir versiyonu da mevcut olup, cihazın bu versiyonu ile çok daha düşük bir örnek hacmiyle, basit bir uygulama ve düşük maliyetle çalışılabilmektedir (125). Ayrıca denge diyalizinin genel olarak uğraştırıcı ve zor bir yöntem olarak bilinmesinin aksine denge diyalizinin 96 kuyucuklu versiyonunun kullanıldığı yüksek verim odaklı çalışmaların başarılı bir şekilde tamamlandığı, bazı makalelerde ifade edilmiştir (130).

Denge diyalizi yönteminin ana dezavantajlarından biri cihazla yapılan çalışmalarda 2 güne kadar uzayabilen dengeleme süresine sahip olmasıdır. Sürenin bu denli uzun olması plazma pH'ında bozulma potansiyeli oluşturmaktadır (126, 129). Bu uzun dengelenme süresi, RED cihazları kullanılarak ancak 6 saate kadar düşürülebilmiş olup, dengelenmenin hızlandırılmış olması çalışmada kullanılan örneğin kaybı veya cihazda kullanılan zardan sızıntı ile sonuçlanma potansiyeli oluşturmaktadır (126). Diğer bir dezavantaj ise denge diyalizi çalışmalarında kullanılan cihazın tampon çözelti bölgesindeki çözeltinin, plazma proteinlerinin yarattığı ozmotik basınç sebebiyle plazma örneğinin bulunduğu bölmeye kaymasıdır. Bu hacim kayması gerçekleştiğinde ise, plazma örneğindeki proteinlerin bağlanma dinamiklerini tahmin edilemez bir biçimde değiştirebilmektedir (129).

Denge diyalizi metodunun sahip olduğu bir diğer dezavantaj da Gibbs-Donnan etkisidir. Bu durum, yüklü olan proteinlerin zardan geçememelerinin düşük molekül ağırlığına sahip iyonların eşit olmayan bir şekilde dağılmasına sebep olması ile gerçekleşmektedir (129). Aynı zamanda yüklü proteinler veya ilaçlar sebebiyle protein sızıntısı oluşabilmesi, plazma proteinine bağlanmamış ilaç derişimini etkilemediği düşünülen spesifik olmayan adsorpsiyon ve çalışmada yer alan bazı bileşiklerin sudaki çözünürlüğünün düşük olmasının sebep olduğu sorunlar da denge diyalizi yönteminin diğer dezavantajları olarak ifade edilmektedir (125, 126). Dezavantajlarına rağmen avantajları daha baskın olan denge diyalizi yöntemi, ilaç-protein bağlanması çalışmalarında en çok tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir (130).

2.6. Kaynaklarda Yer Alan Ultrafiltrasyon Analiz Yöntemlerinden Bazıları

Kaynaklarda yer alan ultrafiltrasyon tekniği kullanılarak yapılan analiz yöntemleri incelenmiş ve bazıları seçilerek incelenmiştir. Seçilen çalışmalardaki yöntemler, geliştirilecek olan yöntemin temelini oluşturması bağlamında dikkate alınmıştır. İncelenen yöntemler ve çalışma koşulları Tablo 2.1’de detaylı şekilde sunulmuştur.

Tablo 2.1. Ultrafiltrasyon ile gerçekleştirilmiş analiz yöntemlerinden bazıları.

Çalışma Numarası	Çalışmanın Amacı	Çalışmada Kullanılan Kolon	Çalışmada Kullanılan HPLC Cihazı	Çalışmada Kullanılan UF Cihazı	Çalışma Yılı
#1	Plazmadaki toplam ve bağlanmamış takrolimus(immunosupresif ajan) derişimlerinin ölçümüne yönelik bir yöntem geliştirilmesi	Thermo Scientific HyPurity C18 (50 × 2.1 mm, 3 µm)	Thermo Scientific (Waltham, MA) Quantiva LC-MS/MS sistemi	Centrifree filtre ünitesi	2016
#2	İnsan plazmasındaki traneksamik asidin miktarının belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmesi ve doğrulanması	Luna C18 Mercury (20 mm × 4 mm, 3 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France), BEH Amide (50 mm × 2.1 mm, 1.7 µm) (Waters) ve Kinetex HILIC (30 mm × 3 mm, 2.6 µm) (Phenomenex).	Acquity ultraperformans LC sistemi	Vivaspin 500, 3000 Da	2014
#3	İnsan plazmasındaki Lorazepam, Oxazepam ve Temazepam'ın toplam ve bağlanmamış derişimlerini ölçmek için yöntem geliştirilmesi	Allure PFP Propyl (2.1 × 50 mm, 5 µm), Allure PFP (2.1 × 10 mm)	UltiMate 3000 RS (Dionex, CA, USA), 4000 QTRAP LC-MS/MS	Ultrafree-MC	2011

Tablo 2.1. –devam

#4	Plazmadaki toplam ve bağlanmamış docetaxel ilaç derişimlerini ölçmek için hassas ve spesifik bir sıvı kromatografisi/tandem kütle spektrometrik (LC-MS/MS) yöntem geliştirilmesi	Belirtilmedi	Belirtilmedi	Belirtilmedi	2017
#5	Kardiyopulmoner bypass ile kalp ameliyatı geçiren hastalarda toplam ve bağlanmamış hidromorfonun plazma düzeylerini belirlemeye yönelik bir yöntem geliştirilmesi	Kinetex C18 Core-Shell HPLC, (150 mm × 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	Waters Alliance HPLC sistemi	Centrifree filtre ünitesi	2012
#6	Vankomisin tedavisi alan hastalardaki serbest ve toplam derişim arasındaki korelasyonun incelenmesi	Atlantis dC18 (150 mm × 4.6 mm) ve Symmetry Shield RP18 (150 mm × 4.6 mm)	Waters 2690 Separations Module	Centrifree 30 kDa	2009
#7	İnsan plazma örneklerinden propofolün bağlanmamış ve toplam derişimlerini ölçmek için analitik bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemin, propofolün koroner arter baypas ameliyatından sonra sedasyon için kullanıldığı bir klinik çalışmaya uygulanması	Kinetex C18, (50 × 2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	Waters Alliance HPLC sistemi (Waters, Eschborn, Germany)	Centrifree filtre ünitesi	2016

Tablo 2.1. –devam

#8	Proteine bağlı bileşenin ayrılmasından sonra bağlanmamış amprenavir derişimlerini ölçmek için bir yöntem geliştirilmesi	Licrocart 125-4 mm (licrospher phase 100 RP-18 encapped 5 mm, Merck)	Waters 717 plus otoörnekleyici, 515 HPLC pompası, 996 PDA dedektörü, Waters Millenium 32 Chromatograph System Manager	Amicon Centrifree YM-300 filtre sistemi (Millipore Corp. Bedford, MA)	2006
#9	Lopinavir plazma derişimlerini belirlemek için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmesi ve doğrulanması	Kinetex C18 (100 mm × 2.1 mm, 5 µm) (Phenomenex, Le Pecq Cedex, France)	Accela sıvı kromatografi sistemi (Fisher Scientific, Les Ulis, France)	Amicon Centrifree filtre sistemi 30 kDa	2014
#10	Sufentanil'in hem toplam hem de bağlanmamış plazma derişimlerini belirlemek için hassas ve spesifik bir analitik yöntem geliştirilmesi	Kinetex C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 µm, 100 Å) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)	Waters Alliance HPLC sistemi (Waters, Eschborn, Germany)	Centrifree filtre ünitesi	2012
#11	Ultrafiltratta toplam derişimler ile birlikte R- ve S-varfarinin serbest derişimlerinin miktarının belirlenmesi için yeni, hassas bir yöntem geliştirilmesi ve doğrulanması	Chirobiotic V (150 × 2.1 mm, 5 µm) (Astec, Supelco, USA)	Ultimate 3000 HPLC sistemi	Centrifree 30 kDa (Millipore, MA, USA)	2011

Çalışma #1

Stienstra, N. A. ve arkadaşlarının 2016'da yapmış olduğu bu çalışmada (131) takrolimusun plazmadaki total ve serbest derişimlerinin ölçümüne ilişkin yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Thermo Scientific Quantiva LC-MS/ MS sistemi, HPLC kolonu olarak Thermo Scientific HyPurity C18 50 x 2.1 mm, 3 µm kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree marka UF cihazı kullanılmıştır. Deney süresince otomatik örnekleyicinin sıcaklığı 10°C olarak

sabitlenmiş olup, kolon sıcaklığı 60°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 500 µL/dk olarak belirlenmiştir.

Analiz sonucunda boş insan plazmasında ve ultrafiltrattaki takrolimusun ekstraksiyon geri kazanım yüzdeleri ise %105 ve %107 olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda matriks faktörü değeri ultrafiltrattaki ve boş insan plazmasındaki takrolimus için 1.0 olarak bulunmuş olup, dolayısıyla da bu değere göre matriks etkisinin oldukça düşük olduğu anlaşılmıştır. Yöntem stabilite, yani kararlılık, açısından da incelenmiş olup, bu bağlamda çalışma içi ve çalışmalar arası meydana gelen değişimlerin %15’in altında olduğu ve dolayısıyla bu kriter açısından uygun olduğu tespit edilmiştir.

2016 yılında yapılan bu çalışmanın sonucunda, spesifik olarak organ nakli hastalarında kullanılan ve kandaki derişiminin takibinin oldukça önemli olduğu bir etken madde olan takrolimusun miktar tayininin oldukça hassas ve hızlı şekilde yapılabileceği bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Bu çalışma, terapötik aralığı dar olan ilaçların kandaki derişiminin takibinin yapılmasında da ultrafiltrasyon yönteminin kullanımının varlığını ve önemini göstermekle birlikte, ultrafiltrasyon yönteminin geçmişte olduğu gibi günümüzde de kullanımının yoğun şekilde devam ettiğine dair örnek teşkil etmektedir.

Çalışma #2

Traneksamik asit (trans-4-(aminometil) sikloheksankarboksilik asit), bir cerrahi operasyon sonrasında oluşabilecek herhangi bir kanamayı azaltmak veya önlemek amacıyla kullanılan lizin analogu bir antifibrinolitik bileşik olup, bu etkisini lizin reseptörlerini bloke etmesiyle göstermektedir. Traneksamik asidin lizin reseptörleri ile bağ oluşturabilmesinin bu reseptörleri taşıyan başka proteinlerle de bağ oluşturabileceği düşüncesini doğurması üzerine bu ilacın farmakokinetiği hakkında daha fazla veri edinmek, insan plazmasındaki traneksamik asit miktarının belirlenmesi için bir yöntem geliştirmek ve doğrulama amacıyla Delavenne X., Montbel A., Hodin S., Zufferey P. ve Basset T. tarafından 2014’te bu çalışma (132) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Acquity ultra-performance LC sistemi, HPLC kolonu olarak Luna C18 Mercury 20 mm×4 mm, 3 µm, BEH Amide 50 mm×2.1 mm, 1.7 µm ve Kinetex HILIC 30 mm×3 mm, 2.6 µm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Vivaspin 500 UF cihazı kullanılmıştır. Geliştirilen

yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda insan plazmasındaki traneksamik asit için LOD 0.38 mg/L ve LOQ 0.76 mg/L olarak tespit edilmiş olup, bazı benzer çalışmalara kıyasla bu yöntem LOQ açısından oldukça büyük bir ilerleme gösterdiği anlaşılmıştır. Gün içi ve günler arası yapılan çalışmalarda traneksamik asidin gün içi ve günler arası kesinliği sırasıyla %8 ve %11.5'in altında olduğu ve gün içi doğruluk yüzdeleri %4.2 ile %9.6 arasında, günler arası doğruluk ise %6.9 ile %11.5 arasında olduğu tespit edilmiştir. Ultrafiltrasyon açısından yapılan incelemede ise plazmadaki proteinlerin çöktürülmesinden sonra yapılan traneksamik asit derişiminin, ultrafiltrasyon işleminin ardından yapılan ölçümlerde tespit edilen derişimden %3 kadar fazla olduğu gözlenmiş olup, bu veriler deneyde traneksamik asidin toplam derişiminin ölçülebildiğini doğrulamaktadır.

Sonuç olarak çalışma neticesinde, insan plazmasında traneksamik asit miktarının belirlenmesi için tandem kütle spektrometresini de kullanan bir yöntem geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntem, daha önceden yayınlanan yöntemlere göre LOQ açısından üstünlüğe sahiptir. Ayrıca deney esnasında traneksamik asit analizinde ters faz kromatografisinin uygun bir yöntem olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra traneksamik asit için 3 hasta üzerinde yapılan farmakokinetik çalışmada elde edilen verilerin FDA ürün bilgisi ile uyduğu görülmesi de geliştirilen yöntemin ve ultrafiltrasyonun farmakokinetik çalışmalarda başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

Çalışma #3

Lorazepam, oksazepam ve temazepam, temel olarak anksiyolitik ve hipnotik amaçla kullanılan 1,4-benzodiazepin türevi ilaçlardır. Bu ilaçların diğer bir ortak özelliği ise yaklaşık %90-95 oranda plazma proteinine bağlanabilmeleridir. Bu bağlamda bu benzodiazepin türevi üç ilacın serbest fraksiyon derişiminin ölçümü için herhangi bir LC-MS yöntemi bulunmamasının yanı sıra, benzodiazepinlerin insanlarda proteine bağlanmasının yaşa bağlı değişiminin, ilacın serbest derişiminin tayin edilmesi ile inceleyen bir analize duyulan ihtiyaca istinaden, Larsen, H. S., Chin, P. K., Begg, E. J., ve Jensen, B. P., 2011 yılında, insan plazmasındaki lorazepam, oksazepam ve temazepam'ın toplam ve serbest derişimlerini ölçmek için kolay, yeni ve hızlı bir yöntem geliştirmeyi temel alan bu çalışmayı (133) yapmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak UltiMate 3000 RS ,4000 QTRAP LC–MS/MS sistemi , HPLC kolonu olarak Allure PFP Propyl 2.1×50 mm, 5 µm, Allure PFP 2.1×10 mm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Ultrafree-MC UF cihazı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda protein çöktürülmüş plazmadaki matriks faktörleri tüm analitler için %100'e yakın olarak gözlenmiştir. Ultrafiltratta ortalama matriks faktörleri lorazepam için %68, oksazepam için %76 ve temazepam için %66 olarak bulunmuştur. 60 gönüllüden alınan örneklerden elde edilen lorazepam, oksazepam ve temazepam için ölçülen protein bağlanmanın mutlak değerleri (ortalama±SD) sırasıyla 0.87±0.01, 0.89±0.01 ve 0.92±0.01 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler literatürde daha önce yayınlanan çalışmalardaki değerler lorazepam için 0.88-0.91, oksazepam için 0.87-0.98 ve temazepam için 0.97 olarak bildirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen değerler lorazepam ve oksazepam için önceki değerler ile paralellik gösterse de temazepam için elde edilen değerlerin daha düşük olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak toplam derişimlerin ölçümü için numune hazırlama ve bağlanmamış derişimlerin ölçümleri için ultrafiltrasyonun da kullanılarak protein çöktürmesi yapıldığı, lorazepam, oksazepam ve temazepam için hızlı ve hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir ve başarılı bir şekilde doğrulanmıştır. Bu çalışma lorazepam, oksazepam ve temazepamın serbest ilaç derişimlerinin LC-MS/MS ve ultrafiltrasyon kullanılarak tayin edilmesinde bir ilki temsil etmesi açısından büyük öneme sahiptir. Aynı zamanda bu çalışma oldukça duyarlı bir yöntem olan LC-MS/MS yönteminin, hızlı bir metot olan ultrafiltrasyon ile tek bir yöntemde birleştirilmesinin, plazma proteinine bağlanma oranı yüksek olan benzodiazepin grubu bu ilaçların serbest derişimlerinin hızlı ve duyarlı bir şekilde ölçümüne olanak sağlaması açısından oldukça faydalı bir örnektir.

Çalışma #4

Dosetaksel, antineoplastik etkiye sahip bir ajan olup, boyun, baş, meme, akciğer kanserlerinde sahip olduğu etki ile ön plana çıkmaktadır. Sheu M. T. ve arkadaşlarının 2017'de yapmış olduğu bu çalışmada (134) ise, küçük hacimli numune ile daha kısa bir çalışma süresinde serbest ve toplam dosetaksel derişiminin tayin

edilebilmesi için yüksek hassasiyetli bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır.

Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda ise dosetakselin alıkonma süresi 1.58 dk, iç standardın ise 1.63 dk olarak gözlenmiştir. Boş matristeki endojen piki, iç standart piki ve dosetaksel piki birbirilerinden oldukça belirgin şekilde ayrılmış şekilde gözlenmiştir. Aynı zamanda toplam plazma ve ultrafiltrenilmiş plazma için 0.108 ng/mL LOQ ile 0.108-10.8 ve 0.54-216 ng/mL aralıklarında r^2 değerinin >0.99 olduğu ve dolayısıyla doğrusallık ve hassasiyet açısından uygun olduğu gözlenmiştir. Matris etkisi açısından yapılan incelemede ise, ilgili değerler toplam plazma için 111.5 ile 99.4 arasında, ultrafiltrenilmiş plazma için 103.5 ile 87.7 arasında tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlara göre, matris bileşenlerinin, safsızlıkların dosetakselin iyonlaşmasına etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Dosetakselin farmakokinetik özellikleri için yapılan diğer bir çalışmada ise sıçanlara yapılan intravenöz dosetaksel uygulamasının sonucunda plazma derişimlerinin zamana karşı profilleri incelenmiştir. Misel olarak verilmeyen dosetakselin farmakokinetik profili ile karşılaştırılmış olup, misel olarak uygulanan dosetakselin plazma derişiminin aniden düşmediği, yavaş yavaş azaldığı ve dolayısıyla dosetakselin misel olarak uygulamasının daha stabil, yavaş salınarak uzun süre boyunca dolaşımda kalmasını sağlayan bir yöntem olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, dosetakselin serbest ve toplam derişimlerinin tayininde kullanılabilecek seçici, yüksek hassasiyete sahip bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirilerek doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntem 4.5 dakikalık oldukça kısa bir çalışma süresi ve 500 μ L'lik küçük bir numune hacmi ile çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Çalışmada ilacın misel formda verilmesinin ilacın farmakokinetiğinde büyük bir farklılık oluşturabildiği ve misel formda olmayan ilaç uygulamalarına kıyasla, tedavi seyrinde önemli değişiklikler sağlayabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda çalışmada serbest dosetaksel derişiminin tayininde ve farmakokinetik özelliklerinin incelendiği aşamada ultrafiltrasyonun kullanılmış olması, ultrafiltrasyonun plazma proteinine yüksek oranda bağlanan ilaçların kandaki derişimlerinin incelenmesinde büyük bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışma #5

Hidromorfon (4,5-a-epoksi-3-hidroksi-17-metil morfinan-6-on), fenantren türevi bir opioid analjezik olup, orta ve şiddetli derecedeki ağrıların azaltılmasında kullanılmaktadır. Hidromorfon, postoperatif ağrı için geniş bir kullanıma sahip olsa da ilaç üzerine bu hasta grubunda farmakokinetik çalışma yapılmamıştır ve daha önceden hidromorfon tayini için geliştirilmiş olan analitik yöntemlerin duyarlılığının az olması ve klinik çalışmalarda kullanımı konusunda metodolojik kısıtlamalarının olması gibi bazı eksiklikler de mevcuttur. Dolayısıyla Saari, T. I., Fechner, J., Ihmsen, H., Schüttler, J., & Jeleazcov, C. tarafından kardiyopulmoner bypass ile kalp ameliyatı geçiren hastalarda toplam ve bağlanmamış hidromorfonun plazma düzeylerini belirlemeye yönelik bir yöntem geliştirmek amacıyla 2012 yılında bu çalışma (135) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Waters Alliance HPLC sistemi , HPLC kolonu olarak Kinetex C18 Core-Shell HPLC, 150 mm×2.1 mm, 2.6 µm, 100 Å kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree UF cihazı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 24°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 500 µL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda 78.15, 1000 ve 5000 pg/mL’lik üç QC derişim seviyesinde belirlenen hidromorfonun ekstraksiyon geri kazanımları sırasıyla %99.6±%5.2, %97.9±%2.7 ve %100.4±2.6 (n=5) olarak tespit edilmiş olup, hidromorfonun geri kazanım verilerinde herhangi bir tutarsızlık gözlenmemiştir. Kalibrasyon analizinde, toplam ve bağlanmamış hidromorfon derişimi aralığı için 78.15 ila 5000 pg/mL arasında doğrusal kalibrasyon eğrisi tespit edilmiş olup, r^2 değeri 0.9998 şeklinde bulunmuştur. Ayrıca çalışma içi ve çalışmalar arası kesinlik ve doğruluk 78.15, 1000 ve 5000 pg/mL’lik 3 QC seviyesi ile değerlendirilmiş ve kesinliğin kabul edilebilir sınırlarda olduğu ve doğruluk için de %10’dan küçük sapmalar gözlenmiştir. Matris etkisinin ise 78.15 pg/mL QC derişim seviyesindeki matris etkisinin %100.1±0.1 olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu değer hiçbir ortak elüsyon maddesinin analitlerin iyonizasyonunu etkilemediğini göstermektedir. Hidromorfonun farmakokinetik özelliği üzerine yapılan çalışmada ise hastaların toplam ve bağlanmamış hidromorfonun plazma derişimleri sırasıyla 166-8624 pg/mL ve 131-8105 pg/mL aralığında değiştiği gözlenmiştir. Kalp cerrahisinde

tedavi gören bu hastalarda serbest hidromorfonun kandaki derişiminin, toplam kan derişimlerinin %85.6'sını oluşturduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, hidromorfonun hem toplam hem de serbest plazma derişimlerinin tayini amacıyla hassas ve özgül bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, postoperatif hastaların analjezi tedavisi sırasında ve eş zamanlı olarak birden fazla ilaç kullanan kalp cerrahisi hastalarında hem toplam hem de bağlanmamış hidromorfon plazma derişimini belirlemek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Aynı zamanda günümüzde kullanımı giderek artan ve farmakokinetik çalışmalarda tercih edilme sıklığının oldukça arttığı bir yöntem olan ultrafiltrasyonun da çalışmada aktif bir şekilde kullanılmış olması, ultrafiltrasyonun farmakokinetik çalışmalarda ve plazma proteinine bağlanma çalışmalarındaki önemli rolüne dikkat çekmektedir.

Çalışma #6

Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve diğer β -laktam dirençli Gram-pozitif kok kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde geniş kullanıma sahip bir etken maddedir. Vankomisin tedavisi alan hastalarda hedef bölge ilaç derişiminin sağlanması ve toksisiteye sebep olabilecek seviyelere ulaşmasının önlenmesi için, ilacın kan derişiminin uygun şekilde ayarlanması büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla doz ayarlamasının oldukça önemli olduğu bir ilaç olan vankomisin tedavisi alan hastaların serbest ve toplam serum derişimleri arasındaki korelasyonun incelenmesi amacıyla Berthoin, K., Ampe, E., Tulkens, P. M., ve Carryn, S. tarafından 2009 yılında bu çalışma (136) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Waters 2690 Separations Module HPLC sistemi , HPLC kolonu olarak Atlantis dC18 150 mm×4.6 mm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree UF cihazı kullanılmıştır. Akış hızı da 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda vankomisin geri kazanımı 10, 20 ve 40 mg/L olmak üzere üç ayrı derişimde analiz edilmiş, nominal değerin %98.2'si ile %103.9'u arasında olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda analiz edilen örneklerin genelinde girişim piki neredeyse hiç gözlenmemiştir. Vankomisinin plazma proteinine bağlanma profiline pH'ın etkisinin incelenmesi amacıyla, öncelikle örneklerin tümünün pH değerleri ölçülmüş, 7.4 ile 8.1

arasında pH değerlerine sahip olan sekiz klinik örnek için tespit edilen serbest fraksiyon değerleri karşılaştırılmıştır. Ancak bu karşılaştırma sonucunda plazma proteinine bağlanma ile pH arasında anlamlı bir korelasyon kurulamamıştır.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen veriler ışığında, serbest formdaki vankomisin derişiminin yalnızca tedavi gören hastalar arasında değil, yalnızca tek bir hastanın tedavi sürecinde dahi değişkenlik gösterebildiği gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda bu değişkenlik, vankomisinin plazma protein bağlanmasındaki %7.9 ile %71, %23 ile %59 ve %3.7 ile %47 arasında değişen varyasyonların bildirimi ile gösterilse de bu çalışmada buna ek olarak, bu değişkenlik durumunun düşünülenden daha fazla olabileceği, toplam ilaç derişiminin serbest ilaç derişimi ile zayıf bir ilişkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda çalışmada birçok analitik metot kullanılmış olsa da derişim tayininin örnek hazırlama aşamasında kullanılan ultrafiltrasyon metodunun, endüstriyel alanda olduğu gibi klinik çalışmalardaki kullanımı da hızla yaygınlaşmakta ve önem kazandığı görülmektedir.

Çalışma #7

Propofol (2,6-di-izopropil-fenol), sedatif ve anestezik etkilere sahip bir alkil fenol türevi etken madde olup, plazma proteinlerine yaklaşık %98 oranında bağlanmaktadır. Propofolün serbest form derişimi üzerine literatürde oldukça az sayıda çalışma mevcut olması ve spesifik olarak yoğun bakımda tedavi gören hastalar ile yapılan hiçbir çalışma olmaması sebebiyle, Eisenried, A., Wehrfritz, A., Ihmsen, H., Schüttler, J., & Jeleazcov, C. tarafından insan plazma örneklerinden propofolün bağlanmamış ve toplam derişimlerini ölçmek için, ultrafiltrasyon metodunun da kullanıldığı bir analitik yöntem geliştirmek ve bu yöntemin, propofolün koroner arter bypass ameliyatından sonra sedasyon için kullanıldığı bir klinik çalışmaya uygulanması amacıyla 2016 yılında bu çalışma (137) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Waters Alliance HPLC sistemi, HPLC kolonu olarak Kinetex C18, 50 mm×2.1 mm, 1.7 µm, 100 Å kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree marka UF cihazı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 400 µL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda propofolün ekstraksiyon geri kazanımları, derişim aralığı başına 3 QC numunesinde belirlenmiş ve 1, 10,

50 ng/mL ile 110.0 ± 5.1 , 102.0 ± 4.4 , 103.0 ± 7.5 ve 50, 1000, 20000 ng/mL ile 101.4 ± 2.4 , 103.2 ± 3.4 ve 106.0 ± 5.0 şeklinde bulunmuştur. Dolayısıyla deney esnasında gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işleminde 68 ± 0.6 kadar spesifik olmayan bağlanma nedeniyle propofol kaybı yaşanmış olduğu bildirilmiş olsa da yöntem validasyonu için elde edilen geri kazanım verilerinin uygun olduğu görülmüştür. Sinyal yanıt oranlarının, analiz edilen tüm bileşikler için kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, matris etkisi için yapılan incelemede ise 1.0 ng/mL QC derişim seviyesindeki matris etkisi 100 ± 0.1 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu değer hiçbir ortak elüsyon maddesinin analitlerin iyonizasyonunu etkilemediğini göstermektedir. Serbest formdaki propofol derişimlerinin yüzdesel değerlerinin ortalaması 0.98 olup, 0.86 ile 1.25 arasında 90 güven aralığı ile genel olarak önceki çalışmalarda bildirilen aralıkta olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda hastaların kan plazmasındaki propofolün serbest formunun derişiminin vücut sıcaklığı, pH gibi faktörlerden etkilendiği saptanmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada, propofolün hem toplam hem de serbest plazma derişimlerini belirlemek için hassas ve oldukça duyarlı ve özgün bir analitik yöntem geliştirilerek doğrulanmıştır. Geliştirilen yöntem, yoğun bakımda tedavi gören ve eş zamanlı olarak başka ilaçlar alan hastalarda toplam ve serbest propofol plazma derişimini belirlemek için başarıyla kullanılmış olup, yapılan çalışma plazma proteinine bağlanma oranı yaklaşık 98 olan propofolün farmakokinetik profilini aydınlatmak, farmakokinetiği etkileyen faktörler hakkında bilgi edinilmiş olması açısından oldukça değerlidir.

Çalışma #8

Amprenavir farmakolojik olarak HIV-1 proteaz inhibitörü etkisiyle bilinen ve plazma proteinlerine, özellikle de $\alpha 1$ -asit glikoproteinlere, yaklaşık 90 oranında bağlanan bir etken maddedir. Güncel olarak proteaz inhibitörlerinin virolojik aktiviteleri farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Günümüze kadar olan süreçte ilacın serbest formunun etkiyi sağlayan kısım olduğu düşünülmüş olsa da, plazma proteinine bağlanmanın proteaz inhibitörlerinin farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerine olan etkisi ile alakalı oldukça az sayıda bilgi mevcuttur. Dolayısıyla Barrail, A., Le Tiec, C., Paci-

Bonaventure, S., Furlan, V., Vincent, I., & Taburet, A. M. tarafından proteine bağlı bileşenin ayrılmasından sonra serbest amprenavir derişimlerini ölçmek için bir yöntem geliştirmek amacıyla 2006 yılında bu çalışma (138) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Waters 717 plus otoörnekleyici, 515 HPLC pompası, 996 PDA dedektörü, Waters Millenium 32 Chromatograph System Manager kullanılmış olup, HPLC kolonu olarak Licrocart 125-4 mm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Amicon Centrifree YM-300 UF cihazı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda plazmadaki amprenavir geri kazanım oranının %77 olduğu tespit edilmiştir olup, bu değerin geri kazanım kriterinin doğrulanması açısından uygun olduğu gözlenmiştir. Hastalarda amprenavir-ritonavir kombinasyonuna lopinavir eklendiğinde serbest amprenavirin serbest derişiminin 8.6 ± 2.1 'den (lopinavir eklenmemiş), 11 ± 2.6 'ya yükseldiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, plazmadaki serbest amprenavir derişiminin tayin edilmesi için hassas bir ultrafiltrasyon metodu geliştirilerek doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda, kullanılan örnek hazırlama metotlarının ikisinde de serbest amprenavir derişimi aynı oranlarda bulunmuştur. Farmakokinetik çalışma sonucunda ise amprenavir tedavisinde, farmakolojik etkiyi güçlendirme amacıyla tedaviye eklenen ritonavirin serbest amprenavir derişimini arttırmadığı, fakat lopinavir ve nelfinavirin serbest amprenavir derişimini arttırdığı gözlenmiştir. Bunun nedeni tam olarak bilinmese de, çalışılan etken maddelerden lopinavir ve nelfinavirin plazma proteinine olan afinitesinin, amprenavirinkinden fazla olduğu ve bu nedenle yer değişimi gerçekleştiği düşünülmektedir.

Çalışma #9

Lopinavir, HIV tedavisindeki kullanımı ile bilinen bir HIV proteaz inhibitörü etken madde olup, plazma proteinlerine, özellikle de $\alpha 1$ -asit glikoproteine yaklaşık %98-99 oranında bağlanmaktadır. Illamola, S. M., ve arkadaşları lopinavir plazma derişimlerini belirlemek için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmek, doğrulamak ve geliştirilen yöntemin, lopinavirin serbest formunun tayin edilmesinde uygulanabilmesi amacıyla 2014 yılında bu çalışmayı (139) yürütmüştür.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Accela sıvı kromatografi sistemi, HPLC kolonu olarak Kinetex C18 100 mm×2.1 mm, 5 µm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Amicon Centrifree UF cihazı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 350 µL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda plazmadaki ekstraksiyon geri kazanımının çalışılan bütün derişim seviyelerinde %80’i aşan yüzdelere yüksek olduğu gözlenmiştir. Ultrafiltratta ve plazmada herhangi bir matris etkisi saptanmamıştır. Lopinavir için LOQ plazmada 0.1 µg/mL ve ultrafiltratta 0.01 µg/mL olarak belirlenmiş olup, kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayısı olan r^2 , 0.99’den fazla bir değerde bulunmuştur. Klinik örnekler üzerinde yapılan inceleme kapsamında, 69 hamile kadın örneğinden elde edilen ortalama toplam ve serbest derişimleri sırasıyla 4.43 ± 2.95 µg/mL ve 0.068 ± 0.051 µg/mL olarak bulunmuştur. Ortalama lopinavir serbest fraksiyonu $\%1.52 \pm 0.25$ şeklinde tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilerin hamileliğin üçüncü trimester aşaması için daha önceden %0.87, %0.97 ve %3 olarak bildirilmiş olan serbest derişim yüzde değerleri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışma kapsamında lopinavir toplam ve serbest derişimlerinin tayini için benzer yöntemlere kıyasla daha düşük bir numune hacmi çalışılabilen ve daha basit bir ekstraksiyon sürecine sahip olan bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Bu çalışma kapsamında aynı zamanda ultrafiltrasyon cihazı kaynaklı spesifik olmayan bağlanmanın azaltılması için yapılan incelemede önceki bir benzer çalışmanın bulguları ile paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışma #10

Sufentanil, analjezi ve anesteziye geniş kullanıma sahip bir sentetik opioiddir. En güçlü sentetik opioid olarak bilinen sufentanilin, fentanilden 5-10 kat civarı daha güçlü olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda sufentanil, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanan bir ilaç olmakla birlikte, ilacın plazma proteinine bağlanma profilinin farmakodinamiğine etkileri ile alakalı yeterli veri bulunmamaktadır. Sufentanil gibi plazma proteinine bağlanma oranı yüksek ilaçlar ile yapılan farmakodinamik ve farmakokinetik incelemelerde serbest formdaki ilacın derişiminin kullanılması önerilmiş olsa da, literatürde insan plazmasında bağlı ve bağlı olmayan sufentanilin

derişim tayinini açıklayan bir çalışmanın varlığı bilinmediğinden, Saari, T. I., Fechner, J., Ihmsen, H., Schüttler, J., & Jeleazcov, C. tarafından sufentanilin hem toplam hem de bağlanmamış plazma derişimlerini belirlemek için hassas ve spesifik bir analitik yöntem geliştirme amacıyla 2012 yılında bu çalışma (140) yapılmıştır.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Waters Alliance HPLC sistemi, HPLC kolonu olarak Kinetex C18, 50 mm×2.1 mm, 1.7 µm, 100 Å kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree UF cihazı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 20°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 500 µL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda 5, 250 ve 2500 pg/mL olmak üzere 3 QC derişim seviyesinde analiz edilen sufentanilin ekstraksiyon geri kazanım değerleri sırasıyla %87±%10, %77±%12 ve %81±%4 (n=3) olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda deneyde plazmanın ultrafiltrasyon filtresinden geçişinin ardından %17.5 kadar sufentanil, spesifik olmayan bağlanma nedeniyle kaybedilmiş olsa da, yöntem validasyonu için elde edilen geri kazanım verilerinin uygun olduğu gözlenmiştir. Toplam ve serbest sufentanil derişimi için 5-2500 pg/mL aralığında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş olup, r^2 değeri 0.99987 olarak bulunmuştur. LOD değeri 0.375 pg/mL, LOQ ise 5 pg/mL olarak belirlenmiştir. Matris etkisi ise 5 pg/mL’lik QC derişim seviyesinde %100±9 (n=6) olarak tespit edilmiş olup, bu değer ortak elüsyon maddesinin analitlerin iyonizasyonunu etkilemediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, plazma proteinlerine bağlanma yüzdesi yüksek bir sentetik opioid olan sufentanilin toplam ve serbest derişimlerinin hassas ve seçici bir şekilde tespit edilebilmesine olanak sağlayan bir analitik yöntem geliştirilmiş olup, daha önceden geliştirilmiş olan yöntemlere kıyasla bu yöntemde iç standart olarak döteryumlanmış sufentanil kullanılmış olması sayesinde, doğruluk ve kesinlik kriteri açısından önemli derecede gelişme kaydedilmiştir. Aynı zamanda geliştirilen yöntemin 5 pg/mL seviyesine kadar olan düşük derişimleri tayin edebilmesi, sufentanilin analjezik amaçla intraoperatif kullanımındaki süreçte yapılan derişim takibini gerçekleştirmek için yeterli olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada sufentanilin serbest derişimlerinin analizinde ultrafiltrasyon metodu başarılı bir şekilde kullanılmış olup, plazma proteinine bağlanma oranı yüksek ve kan derişiminin sıkı şekilde takip edilmesi gereken ilaçlar ile yapılan çalışmalarda özellikle hassasiyet

ve zaman açısından sağlamış olduğu avantajlarla ön plana çıkmakta, bu alandaki kullanımının her geçen gün daha da arttığı görülmektedir.

Çalışma #11

Varfarin, (RS)-4-hidroksi-3-(3-okso-1-fenilbütıl)-2H-krom-2-on, kumarin grubu antikoagölan bir ilaçtır. Varfarin esasen plazma proteinlerine yaklaşık %99 gibi çok yüksek bir oranda bağlanmakta ve bu sebeple serbest ilaç derişim oranı oldukça düşüktür. Bir ilacın farmakolojik etkisinin serbest derişime bağlı olduğu düşünöldüğünde, S- ve R-varfarinin serbest derişimlerinin belirlenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Toplam derişimlerle birlikte R- ve S-varfarinin serbest derişimlerinin miktarının belirlenmesi için yeni, oldukça hassas bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve doğrulanması amacıyla Jensen, B.P., Chin, P. K. L., ve Begg, E. J. tarafından 2011 yılında bu çalışma (141) gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sırasında HPLC cihazı olarak Ultimate 3000 HPLC sistemi, HPLC kolonu olarak Chirobiotic V, 150×2.1 mm, 5 µm kolonu kullanılmış olup, ultrafiltrasyon cihazı olarak da Centrifree UF cihazı kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 38°C’de tutulmuştur. Akış hızı da 300 µL/dk olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin doğrulanması için yapılan çalışmalarda serbest formdaki varfarin için LOQ değeri 0.5 ng/mL olarak, toplam varfarin için ise düşük derişimlerin tayinine ihtiyaç olmadığından 20 ng/mL gibi nispeten daha büyük bir derişim seviyesi belirlenmiştir. Matris etkisi varfarin için %97±3 olarak bulunmuş olup, analiz edilen üç ayrı derişim için matris etkileri arasında fark gözlenmemiştir. Geri kazanım açısından yapılan incelemede, ortalama değeri %68±4 olarak bulunmuş olup, bu değeri kabul edilebilirlik standartları açısından nispeten düşük bir geri kazanım değeri olsa da çalışma sürdürölmüştür.

Serbest ve toplam derişimin belirlenmesi amacıyla yapılan analiz için 72 hastadan edinilen plazma örneklerinde, toplam konsantasyonlar R-varfarin 300-1690 ng/mL, S-varfarin 130-1020 ng/mL olarak bulunmuş olup, ultrafiltrattaki serbest derişim ise R-varfarin için 2.2-17.5 ng/mL, S-varfarin için 0.8-6.5 ng/mL olarak bulunmuştur. Örneklerden elde edilen proteine bağlanma yüzdeleri, R-varfarin için %99.1, S-varfarin için %99.4 olarak bulunmuştur. Bu değeri literatürde yer alan,

önceden gerçekleştirilen varfarinin plazma proteinine bağlanma çalışmalarında elde edilen bağlanma oranları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, insan plazmasındaki R- ve S-varfarinin toplam ve serbest derişimlerinin miktarının belirlenmesi için hassas bir analiz geliştirilerek doğrulanmıştır. Çalışmada ultrafiltrasyon cihazlarının spesifik olmayan bağlanma oranları üzerine de inceleme yapıp, ultrafiltrasyon metodu klinik çalışmadaki analizde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Aynı zamanda ultrafiltrattaki varfarin derişimlerinin analiz edildiği bir metot olarak bir ilk olma niteliği taşıması nedeniyle oldukça değerlidir.

2.7. Kromatografi

Kromatografi, herhangi bir karışımda yer alan farklı bileşenlerin, iki ayrı faz arasında kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre ayrıldığı ve bu esnada bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinin de yapılabildiği ayırma işlemidir. Kromatografi kelimesi, Grekçe’de renk anlamına gelen “chromatus” kelimesi ile yazmak anlamına gelen “graphein” kelimelerinden oluşmakta olup, “renk yazımı” anlamına gelmektedir.

Kromatografi tekniğinin ortaya çıkışı, 1848 yılında Wal ve Thompson’ın katı formdaki maddeler arasında iyon değişimi gerçekleştirebileceğini belirtmesine kadar uzamaktadır. Alman bir kimyacı olan Runge’nin ise 1850-1900 yıllarında, farklı renklerdeki boyaların ayrılması amacıyla bir solvent ve filtre kağıdı kullandığı bilinmektedir. 1892 yılına gelindiğinde ise Reed, ilk kez bir kolon aracılığıyla çeşitli ayrımlar yapılabileceğini belirtmiş ve kaolin içeren kolonlar ile demir-3-klorür’ün bakır sülfattan ayrımını sağlamıştır. Kromatografi tanımı ise ilk defa, Micheal Tsweet isimli bir Rus Botanikçisi tarafından 1906’da yapılmış ve klorofillerin diğer bitki pigmentlerinden ayrıştırılmasında kullanılmıştır. M.Tsweet tarafından geliştirilen bu teknik günümüzde sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisi olarak sınıflandırılmakta olup, günümüze kadar olan süreçte kromatografi, biyokimyasal moleküllerin nicel ve nitel analizi için oldukça etkili bir teknik olarak öne çıkmaktadır (142, 143).

Kromatografi sistemi temel olarak üç bölümden meydana gelmektedir. Bunlar; katı veya katı bir destek materyaline adsorbe haldeki sıvı bir katmandan oluşan bir

sabit faz, gaz veya sıvı formdaki bir madde olan hareketli faz ve ayrılmış moleküllerdir (144).

Kromatografi işlemi esasen, bir hareketli faz aracılığıyla bir sabit faz üzerinde hareket eden karışım bileşenlerinin, moleküler özellikler, molekül ağırlıkları, afinite, adsorpsiyon ve dağılım gibi parametrelere bağlı olarak, farklı hızlarda hareket etmeleri ve bu sayede ayrılmaları temeline dayanmaktadır. Uygulanan karışım bileşenlerinin bazıları sistem içerisinde daha düşük hızlarla sürüklenirken, bazıları daha yüksek hızlarla hareket etmekte ve sistemden daha çabuk çıkmaktadır (143, 144).

2.7.1. Kromatografinin Farklı Sınıflandırmaları

Kromatografi işleminde moleküllerin dağılma, adsorpsiyon vb. farklı özellikleri rol oynamakta ve kromatografik yöntemler, moleküllerin bu farklı özelliklerine bağlı olarak faz çeşitleri, uygulanış, ayrılma tipi açısından çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (143).

Tablo 2.2. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması (145).

Genel Sınıflandırma	Özel Yöntem	Sabit Faz	Denge Türü
Gaz Kromatografisi	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
	Gaz-sıvı	Katı yüzeye bağlı veya adsorbe sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
Sıvı Kromatografisi	Sıvı-sıvı dağılma	Katı yüzeye bağlı veya adsorbe sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	Afinite	Katı yüzeye bağlı grup-spesifik sıvı	Yüzey sıvısı ile mobil faz arasında dağılma
	İyon değişim	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Süperkritik Akışkan Kromatografisi		Katı yüzeye bağlı organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

2.7.2. Kromatografi Parametreleri

Bu bölümde, kromatografinin temel parametrelerinin tanımlamaları yapılmış ve bu parametrelere ait eşitlikler ilgili kaynaklardan(145-147) edinilerek sunulmuştur.

Alıkonma zamanı

Bir numunenin enjeksiyonunun sağlandığı andan, enjeksiyonu yapılan numunenin dedektöre ulaştığı veya numune için pik noktalarının elde edildiği ana kadar geçen süreye alıkonma zamanı(t_R) adı verilir. Alıkonma zamanı saniye veya

dakika zaman birimleri ile ölçülmektedir. Alıkonmayan türlerin dedektöre ulaşma süreleri ise “ölü zaman” olarak isimlendirilmekte olup, bu parametre, analizi yapılan maddelerin pik noktalarının tespit edilmesinde ve hareketli fazın ortalama hızının belirlenmesi açısından oldukça önem arz etmektedir (145, 148).

Alıkonma faktörü(Kapasite faktörü)

Alıkonma faktörü, analizi yapılan numunedeki bir maddenin hareketli fazda geçirdiği sürenin esas alınarak sabit fazda kaldığı sürenin belirlenmesidir ve “k” ile ifade edilir. Bu değer, alıkonma süresi ile ölü zaman kullanılarak elde edilmekte olup, akış hızı ve kolon geometrisine bağlı bir faktör değildir.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.1)$$

Numunedeki çözünmüş halde bulunan bileşenlerin alıkonma faktörü değerlerinin ayırma işlemleri için en uygun değer aralığı 1-10 arasındadır. Bu değeri 20 ile 30'dan yüksek olduğunda elüsyon süresi çok uzamaktadır. Aynı zamanda bir bileşenin alıkonma faktörü değerinin 1'den çok küçük olması, ölü zamana çok yakın bir zaman diliminde kolonu terk ettiğini bildirmektedir. Ayırma işlemlerinin optimize edilmesi, alıkonma faktörünün(k') optimize edilmesi yoluyla yapılmaktadır (145, 146).

Seçicilik

Çözünmüş halde bulunan iki maddeden fazla alıkonulan maddenin alıkonma faktörü değerinin, daha az alıkonulan maddenin alıkonma faktörü değerine oranı seçicilik olarak ifade edilir. Dolayısıyla seçicilik değeri(α), daima 1'den büyük olmalıdır. Aynı zamanda seçicilik değeri sabit faz, mobil faz veya sıcaklık gibi parametrelerden etkilenmektedir (145, 146).

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (2.2)$$

Kolon etkinliği

Kolon etkinliği, bir kolonun dar piklerin birbirinden ayrılmasını sağlama yetisinin bir ölçüsü olup, kolonun performansının değerlendirilmesinde de, farklı

kolonların performans kıyaslamasının yapılmasında da sıkça kullanılan bir parametredir (146, 149).

Kolon etkinliği, teorik plaka sayısı(N) ve plaka yüksekliği(H) ile ifade edilmekte ve bu iki terimin arasındaki ilişki aşağıda belirtildiği şekilde formüle edilmiştir (145).

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.3)$$

L, kolon uzunluğunu ifade etmektedir. Bu denkleme göre kolon etkinliği, kolon uzunluğu arttıkça ve plaka yüksekliği azaldıkça artmaktadır. Teorik tabaka sayısı ise aşağıdaki belirtilen formül ile elde edilmektedir (145, 149).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.4)$$

Aynı zamanda bu formüle alternatif olarak, pik genişliğinin, pik yüksekliğinin yarısı seviyesinde ölçülmesine olanak sağlayan, aşağıdaki formül ile de teorik tabaka sayısı değerini elde etmek mümkündür. Bu formülün avantajı ise, gürültülü bir taban çizgisinin bulunduğu durumda da teorik tabakası sayısının elde edilmesine olanak sağlamasıdır (146).

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.5)$$

Kromatografi işlemi ile yapılan ayırmaların optimizasyonundaki temel amaç, en yüksek verimliliği elde etmektir, yani diğer bir ifadeyle metre başına en fazla plaka sayısına sahip bir kolona sahip olmaktır (149).

Ayırıcılık

Ayırıcılık(R_s), bir kolonun incelenen pik noktalarını ayırabilme yetisi ve ölçüsü olarak ifade edilmektedir. Ayırıcılık değeri arttıkça pik noktalarının birbirinden ayrılması da o ölçüde kolaylaşmaktadır. Ayırıcılık(R_s) değeri 1.5'tan büyük ise komşu piklerin alan örtüşmelerinin ihmal edilebilir derecede olduğu anlaşılmaktadır (146, 147). Ayırıcılık değeri aşağıda belirtilen formül ile elde edilmektedir:

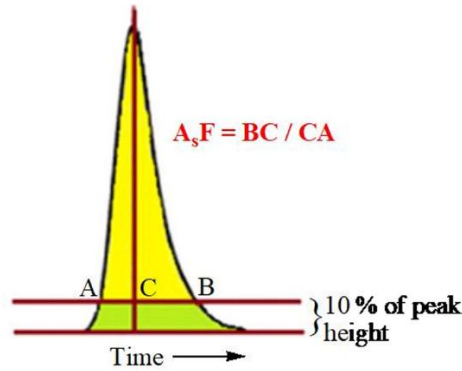
$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad (2.6)$$

Pik Asimetri Oranı (PAO)/Pik Simetrisi

Ayırma işlemi bazen uygun koşullar altında yapılmadığında, simetrik olmayan ayırma pikleri elde edilebilmektedir. Bu asimetriklik durumları kolonda bozulmalar, büyük enjeksiyon hacimleri, sabit fazın doygun olması gibi sebeplerden kaynaklanabilmektedir. Bu asimetrinin hesaplanması ise kullanılan kromatografi sisteminin kontrolü ve karakterizasyonunun sağlanması açısından fayda sağlamaktadır.

Pik asimetri oranı, pik yüksekliğinin %10'undan yapılan ölçüm ile hesaplanmaktadır. Pik yüksekliğinin %10'luk kısmında, pikin başlangıç kısmından pikin orta noktasına kadar olan kısım AC ve pikin bitiş noktasından pikin orta noktasına kadar olan kısım CB olarak ifade edildiğinde, pik asimetri oranı “ $As = CB/CA$ ” şeklinde formüle edilmektedir.

Simetrik bir pikin pik simetri oranı değeri 1 olup, 0.9-1.2 arasındaki değerler simetriklik açısından yeterli kabul edilmektedir (146, 148, 149).



Şekil 2.1. Pik asimetri oranının hesaplanması (146).

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine Genel Bakış

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(HPLC), biyolojik ve kimyasal ortamlardan edinilen molekül karışımlarını ayırmada, tanımlamada ve miktarını belirlemede oldukça yaygın şekilde kullanılan, spesifik olarak ilacın nicel ve nitel analizleri için en uygun kolon kromatografisi tekniğidir.

HPLC tekniği ilk olarak 1960'lı yılların sonlarında geliştirilmiş olup, 1980 yılında çoklu ilaç analizleri için kullanımına başlanmıştır. Günümüzde ise, ilaç araştırma-geliştirme ve üretim aşamalarında, yeni formülasyonların incelenmesinde, kimyasalların saflık kontrollerinin yapılmasında, sentez çalışmalarında ve bitmiş ürün için yapılan kalite kontrol çalışmalarında sıklıkla kullanılmasının yanı sıra, çevre, gıda, biyoteknoloji vb. sektörlerde de kullanımı mevcuttur (148, 150-152).

2.8.1. HPLC Prensibi

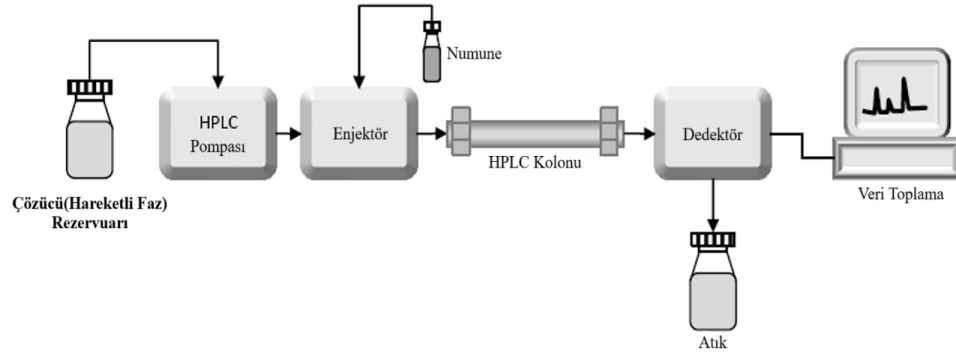
HPLC tekniğinde esasen sıvı formdaki bir numune, içinde 3-5 mikron çapındaki küçük parçacıklar ile doldurulmuş(sabit faz) ve gözenekli bir yapıya sahip olan kolona enjekte edilmekte ve bir pompa aracılığıyla sağlanan, 400 atmosfere kadar ulaşabilen basınç yardımıyla, numune ile beraberinde kolona aktarılan sıvı(hareketli faz), kolon içerisinde hareket ettirilmektedir. Numunede yer alan bileşenler ise, sabit faz ve kolonda beraber sürüklendikleri hareketli faz ile spesifik kimyasal ve/veya fiziksel etkileşimlere sahip olmakla birlikte, bu etkileşimler nedeniyle alıkonma sürelerinde oluşan farklılık sayesinde birbirinden ayrırmakta ve ayrıran bu bileşenlerin miktarları bir dedektör yardımıyla kolon çıkışında tayin edilmektedir. Örneğın, sabit faza afinitesi numunedeki diğer moleküllere kıyasla yüksek olan bir molekülün kolonda ilerleme hızı görece olarak yavaş ve alıkonma zamanı, numune örneğindeki diğer moleküllere kıyasla fazla olacaktır (148, 150, 153).

2.8.2. HPLC Türleri

HPLC tekniği çalışma modlarına göre normal faz kromatografisi ve ters faz kromatografisi olarak iki başlıkta sınıflandırılmaktadır (150).

Normal Faz Kromatografisi

Normal faz kromatografisinde polar bir sabit faz ile apolar bir hareketli faz kullanılmakta, yüksek polaritedeki çözünmüş moleküllerin sabit fazda tutulmasını ve elüsyon işleminin daha uzun sürmesini sağlamaktadır. Sabit faz olarak diol, aminopropil ve siyanopropil gibi silika türevi materyallerden imal edilmiş bir sabit faz kullanılır. Genellikle bu kromatografide kullanılan kolonların uzunluğu 150-250 mm arasında, iç çapı ise 4.6 mm kadardır (150, 153).



Şekil 2.3. HPLC cihazının şematik gösterimi (155).

Mobil faz rezervuarları: HPLC sisteminin kesintisiz şekilde çalışabilmesi için çözücü sıvının depolanması amacıyla kullanılmaktadır (156). Bu çözücü sıvı, cam materyalden imal edilmiş rezervuarlarda muhafaza edilmekte ve sistem içerisinde herhangi bir kirlenme kaynaklı tıkanıklığa sebep olmaması için analiz öncesinde süzülmemektedir (148, 157).

Degasser: Kolonda ve cihazda problemlere yol açabilen, alıkonma zamanında sapma ve pik genişlemesi gibi durumlara sebep olabilen, mobil fazda çözünmüş halde bulunan gazların uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (143).

Pompa: HPLC sisteminde kullanılan çözücü sıvının mobil faz rezervuarından çekilerek belli bir akış hızında kolondan zorla geçirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu esnada akış hızı ve basıncın sabit tutulması, numunenin analiz süresinin etkilenmemesi ve buna bağlı herhangi bir hata oluşmaması açısından önem arz etmektedir (148).

Enjektör: Analizi yapılacak olan numunenin, HPLC sisteminde kolona ulaşmadan önce mobil faza enjekte edilmesinde kullanılmakta olup, elle kontrol edilen manuel enjektörler ve fazla miktarda numunenin cihaz tarafından kendi kendine enjekte edilebildiği otomatik enjektörler olmak üzere 2 çeşidi mevcuttur (143, 157).

Kolon Fırını: Genellikle analizlerden nispeten daha tekrarlanabilir ve uygun kromatogramlar elde edilebilmesi için kolon sıcaklığının sabit tutulması gerekmektedir ve dolayısıyla kolon fırını bu amaçla kullanılmaktadır. Kolon fırınlarının blok ısıtıcılı ve hava sirkülasyonlu olmak üzere 2 çeşidi mevcuttur (143, 148).

Kolon: HPLC sisteminin kolon kısmı, analiz esnasında numune içerisinde yer alan bileşenlerin ayrımını sağlayan sabit faz olarak kullanılmaktadır. Çoğunlukla kolonlar cilalı paslanmaz çelik materyalden imal edilmekte olup, iç çapı 2-5 mm arasındadır ve 3-10 µm arasındaki parçacık boyutlarındaki sabit faz ile doldurulmaktadır (143, 148).

Dedektör: HPLC sisteminin bir parçası olan dedektör, analizi yapılmakta olan numunenin bileşenlerini kolondan çıktığı esnada algılayarak bu moleküllerin ve miktarlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda dedektörün verdiği cevabın zamana karşı oluşturulan grafiğine de “kromatogram” adı verilmektedir (143, 148).



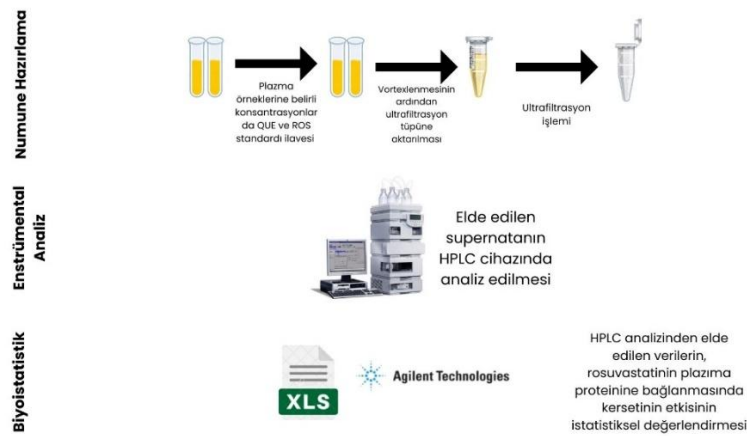
3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışması Kapsamında Gerçekleştirilen İşlemler, Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Bu bölümde, tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, cihazlar, yazılımlar ve uygulanan yöntemler ayrıntılı olarak açıklanacaktır. Tez çalışması esnasında gerçekleştirilen işlemlerden doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlara erişilebilmesi için doğru ve uygun malzeme seçimi ve bunların doğru tanımlanması oldukça önemlidir. Dolayısıyla çalışmanın her aşamasında kullanılan malzemeler ve uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde belirtilmiştir.

Tez çalışmasında esasen, ROS etken maddesinin plazma proteinine bağlanma kapasitesi üzerinde, QUE varlığının meydana getirdiği değişikliğin, HPLC sistemi ve ultrafiltrasyon metodu kullanılarak *in vitro* ortamda tespit edilebildiği bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, belirli derişimlerde ROS ve QUE'in spike edildiği BSA örneklerine, ultrafiltrasyon uygulanmış ve ardından supernatanın HPLC sistemine enjekte edilmesi ile eşzamanlı olarak analiz edilmiş olup, elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının esasını şematize şekilde açıklayan görsel Şekil 3.1.'de sunulmuştur. Bu şekilde, tez çalışmasının başlangıç kısmından sonuna kadar uygulanan işlemler görsel şekilde özetlenmiştir. Şemada analiz edilen örneğin hazırlanması, uygulanan işlemler, bu esnada kullanılan malzeme ve cihazlar da detaylı biçimde görselleştirilmiş ve açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Tez çalışmasının esasını gösteren şema.

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasallar, cihazlar ve yazılımlar ayrıntılı şekilde Tablo 3.1.'de ve Tablo 3.2.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka	Kullanım Amacı
Rosuvastatin	Sigma	Etken Madde
Kersetin	Sigma	Fitokimyasal
İzotonik Solüsyon %0.9	Polifarma	BSA çözeltisi hazırlama
Metil Alkol (CH ₃ OH)	ISOLAB Chemicals(LOT: LR0913303ANQ, CAS: 67-56-1)	HPLC hareketli fazı
Asetonitril (C ₂ H ₃ N)	VWR Chemicals(LOT: 16C141177 , CAS: 75-05-8)	HPLC hareketli fazı
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Merck	HPLC hareketli faz tamponu hazırlama
Disodyum hidrojen fosfat 2-hidrat (Na ₂ HPO ₄ .2 H ₂ O)	Riedel-de Haën(LOT: 21770, CAS: 10028-24-7)	HPLC hareketli faz tamponu hazırlama

Tablo 3.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan cihaz ve yazılımlar.

Cihaz, Yazılım ve Sarf Malzemeleri	Kullanım Amacı
Milipore (10 kDa)	Ultrafiltrasyon Tüpü
ACE C18 (250 x 4.6 mm, 5 µM)	HPLC kolonu
HP Agilent 1100 Series HPLC System	HPLC cihazı
Agilent ChemStation	HPLC Data Analizörü
ISOLAB (10-100 µl/100-1000 µl)	Otomatik mikropipet
HANNA Instruments HI-2211	pH metre
Mettler Toledo AG285	Hassas terazi
Bandelin, Sonorex, RK514 BH	Ultrasonik banyo
IKA Vorteks Genius 3	Vortex karıştırıcı
Hotplate Stirrer	Manyetik karıştırıcı
Labonco Refrigerated CentriVap Concentrator	Santrifüj cihazı
Hettich Universal 320R Masaüstü Soğutmalı Santrifüj	Santrifüj cihazı
Barnstead NanoPure Diamond	Saf su sistemi
Agilent-8453	UV/Vis Spektrofotometre Cihazı

3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

ROS stok çözeltisi (1000 µg/mL): 10 mg ROS hassas terazide tartılıp 10 mL'lik balon jöjeye aktarılmış, bir miktar metanol ile çözüldükten sonra hacmi metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS stok çözeltisi (500 µg/mL): 1000 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 5 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözündükten sonra hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS standart çözeltisi (250 µg/mL): 500 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 5 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözündükten sonra hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS standart çözeltisi (100 µg/mL): 1000 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS standart çözeltisi (25 µg/mL): 250 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS standart çözeltisi (10 µg/mL): 100 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

ROS standart çözeltisi (2 µg/mL): 10 µg/mL ROS stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE stok çözeltisi (500 µg/mL): 5 mg QUE hassas terazide tartılıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar metanol ile çözündükten sonra hacmi metanol ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (100 µg/mL): 500 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (50 µg/mL): 500 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (25 µg/mL): 250 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (10 µg/mL): 100 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (2.5 µg/mL): 10 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2.5 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

QUE standart çözeltisi (2 µg/mL): 10 µg/mL QUE stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi ilgili deneyde gerekli olan pH'deki tampon ile su karışımı(50:50, h/h) ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

20 mM Fosfat tamponu: 0.89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ tartılıp 250 mL'lik balon jojeye aktarılmasının ardından bir miktar saf suda çözündürülüp, hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. Fosforik asit kullanılarak bu tamponların deneylerde gerekli olan pH değerlerine sahip olması sağlanmıştır.

1/20 Bovine Serum Albumin(BSA) çözeltisi: 400 mg BSA hassas terazide tartılarak, üzerine 8 mL %0.9 izotonik solüsyon eklenip vortexlenmiştir. Ardından elde edilen karışım ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilmesinin ardından hacmi %0.9 izotonik solüsyon ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 1/20 oranına seyreltme işlemi izotonik solüsyon ile yapılmıştır.

3.2.2. Çalışma Standartlarının Hazırlanması

QUE ve ROS standartları, hazırlanmış olan stok çözeltilerden gereken miktarlarda alınıp, hareketli faz ile 1000 µL'ye seyreltilerek hazırlanmıştır. Ardından viallere aktarılarak analiz edilmiştir.

3.2.3. Kullanılan Ultrafiltrelerin Doyurulması

Hazırlanmış olan 1/20 BSA'dan 475 μL kadarı Ependorf tüpe alınarak üzerine, toplam hacim 500 μL ve son derişim 25 μL olacak şekilde ROS standart çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika boyunca vortexlenmiştir. Bu çözelti 1 adet ultrafiltrasyon tüpü için 5 adet hazırlanmıştır. Hazırlanan beş çözelti sırayla ultrafiltrasyon tüpüne eklenerek +4 °C sıcaklıkta ve 10000 devir/dk'da 30 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen süzüntülerin her birinden 250 μL kadarı alınarak toplam hacmi hareketli faz ile 1 mL'ye tamamlanmış ve viallere aktararak analiz edilerek, ultrafiltrenin doygunluk durumu değerlendirilmiştir.

3.2.4. ROS ve QUE İçeren BSA ve Plazma Numunelerinin Hazırlanması

1/20 BSA'ya, QUE için 2.5 $\mu\text{g/mL}$, ROS için 25 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde uygun miktarlarda alınarak, son hacim 500 μL olacak şekilde 1/20 BSA içerisine eklenmiş ve 1 dakika boyunca vortexlenmiştir. Daha sonra elde edilen çözelti, 5 kez şartlandırılmış olan ultrafiltrasyon tüpüne eklenerek 4 °C sıcaklıkta ve 10000 devir/dakika'da 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süzüntülerden 250 μL kadar miktarlar alınarak toplam hacim hareketli faz ile 1 mL'ye tamamlanmış ve viallere aktararak analiz edilmiştir.

Plazma numunelerinin hazırlanması için ise, ticari olarak satın alınan insan plazmasından 200 μL alınarak, toplam hacim 250 μL ve son derişim 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ ve 40 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde üç farklı derişim için ROS standart çözeltisi eklenmiş ve 1 dakika boyunca vortexlenmiştir. Ardından elde edilen çözeltiye 1 mL ACN ilave edilip, 10000 devir/dk'da 10 dakika boyunca santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen santrifüjatlardan 1000 μL kadarı santrifüj tüplerine alınıp, uçurulmuştur. Uçurma işleminin ardından 500 μL hareketli faz çözeltisi ile çözülüp, viallere aktararak analiz edilmiştir.

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

3.3.1. HPLC Deneyinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması

Geliştirilen kromatografik yöntemin optimizasyonu için, tampon çözeltinin pH değeri, hareketli fazda yer alan organik çözücü oranı gibi değişkenler üzerinde değişiklikler yapılarak incelenmiştir. UV dedektörde elde edilen spektrumlar incelenmiş, hem ROS hem de QUE için en yüksek absorbans değerinin elde edildiği dalga boyu değeri belirlenerek çalışma dalga boyu olarak seçilmiştir. HPLC analizleri ACE C18 (250 x 4.6mm i.ç., 5 µm) kolonu ile, oda sıcaklığında (22-25°C) gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hareketli faz bileşimi ACN:fosfat tamponu (45:55, h/h) olarak kullanılarak ayırım yapılmıştır. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm analizlerden önce HPLC sisteminden 1 saat boyunca ve 1 mL/dk akış hızında, HPLC sistemine uygun kalitede su geçirilmiştir. Ardından 20 dakika boyunca hareketli faz geçirilerek, kromatogramda gözlemlenen gürültünün en az olup sabit kaldığı bir zemin çizgisi elde edildiğinde analizlere başlanmıştır.

Hareketli fazın organik çözücü bileşeni olan ACN oranının belirlenebilmesi için, hacimce 40:60, 45:55, 50:50 ve 55:45 oranlarında hazırlanan ACN:fosfat tamponu(20 mM) karışımları denenmiştir. Diğer bir bileşen olan fosfat tamponunun pH değerinin seçilmesi için ise, 3.0, 4.0, 5.0 ve 6.0 pH değerlerinde tampon çözeltiler ile çeşitli denemeler yapılmıştır. Yöntemin optimizasyonu için gerekli parametreler kabul kriterlerine göre test edilmiş, elde edilen verilere göre en uygun kromatografik koşullar tespit edilmiştir.

3.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Çalışmaları

Geliştirilen yöntemin validasyonu için doğrusallık ve aralık, duyarlılık, tutarlılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve geri kazanım parametreleri ile sistem uygunluk testi için çalışmaları (158-162) gerçekleştirilmiş olup, elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (163).

Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı

Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılık parametresine uygunluğu için gözlemlenebilirlik sınırı(LOD) ve alt tayin sınırı(LOQ) değerleri belirlenmiştir.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması için Eşitlik 3.1 ve 3.2 kullanılmıştır.

$$LOD = 3.3 (SS/S) \quad (3.1)$$

$$LOQ = 10 (SS/S) \quad (3.2)$$

Bu denklemler için,

SS: Elde edilen kalibrasyon grafiklerindeki y-kestirimlerinin standart sapması,

S: Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin eğimlerinin ortalamasıdır.

Seçicilik

Geliştirilen yöntemin seçicilik parametresine uygunluğunun saptanması amacıyla, BSA, hareketli faz, QUE ve ROS standart çözeltilerini içeren karışım enjekte edilmiştir. Plazma proteinine bağlanma çalışması kapsamında ise, 2.5 µg/mL QUE ve 25 µg/mL ROS içeren BSA, ultrafiltre edilerek elde edilen ultrafiltrat sisteme enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık ve Aralık

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen QUE ve ROS analizi için doğrusallık aralığı, ROS için 0.04-2.00 µg/mL, QUE için 0.1-2.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri ROS için 0.04, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 µg/mL olarak, QUE için 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 µg/mL olarak ayrı ayrı olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon çözeltileri sisteme enjekte edilip, derişim miktarına karşı elde edilen cevap değerlerinden kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiklerden elde edilen kalibrasyon doğrularının regresyon denklemleri, korelasyon katsayıları incelenmiş ve istatistiksel olarak incelemeleri yapılmıştır.

Doğruluk

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları, 0.04, 0.20, 0.50, 1.50 µg/mL derişimlerindeki ROS standart çözeltilerinin 6 tekrarlı olacak şekilde

hazırlanıp analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen cevap değerlerinin %bağıl hata(BH) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları, 0.04, 0.20, 0.50, 1.50 µg/mL derişimlerdeki ROS standart çözeltilerinin 6 tekrarlı olacak şekilde hazırlanıp analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen cevap değerlerinin %bağıl standart sapma(BSS) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmalarında ise düşük (10 µg/mL), orta (25 µg/mL) ve yüksek (40 µg/mL) olarak belirlenmiş 3 farklı derişimde ROS'in spike edildiği, plazma ve suda hazırlanan çözeltiler, HPLC sistemine doğrusallık aralığında olacak şekilde seyreltilerek enjekte edilmiş, 3 tekrarlı analizleri gerçekleştirmiştir. Plazmada hazırlanan çözeltiler için elde edilen derişim değerlerinin, suda hazırlanan çözeltiler için elde edilen ortalama derişim değerlerine göre geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Tutarlılık

Yöntemin tutarlılığı için gerçekleştirilen çalışmada ise, 0.5 µg/mL QUE ve ROS çözeltileri(n=6) farklı iki analizci tarafından analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek, aralarında anlamlı bir fark olup olmadığı test edilmiştir.

Sistem Uygunluk Testi

Geliştirilen yöntemin, analiz için belirli kromatografik parametreler açısından kabul sınırları içerisinde sonuçlar üretebilmesinin değerlendirilmesi için, FDA kılavuzunda yer alan(161) kriterler temel alınarak sistem uygunluğu testi gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluğunun testi için standart çözeltinin 6 tekrarlı analizi sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır.

Tablo 3.3. Sistem uygunluğu test parametreleri (161).

Test edilen parametre	Sınır değeri
Enjeksiyon kesinliği	$BSS \leq \% 1, n \geq 5$
Kapasite faktörü	$k' > 2$
Ayırıcılık	$R_s > 2$
Pik asimetri oranı	≤ 2
Teorik tabaka sayısı	$N > 2000$

(BSS: Bağıl standart sapma, k' : Kapasite faktörü, n : Enjeksiyon sayısı, R_s : Ayırıcılık, N : Teorik tabaka sayısı)

ROS ve QUE İçeren BSA Numunelerinin ve Standart Çözeltilerin Geliştirilen Yöntem ile Analizi

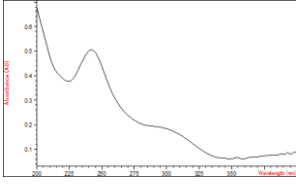
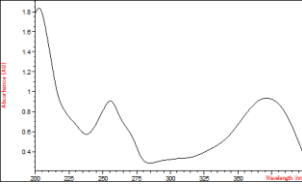
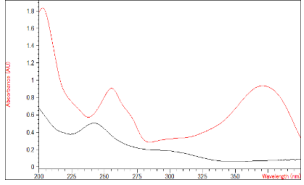
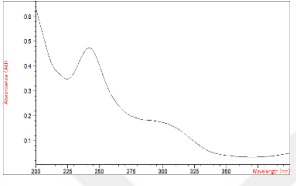
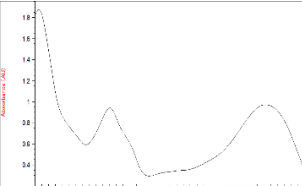
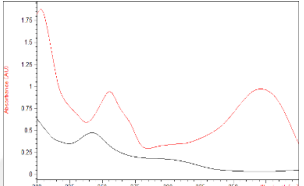
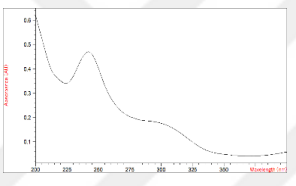
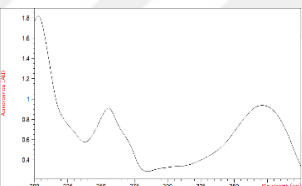
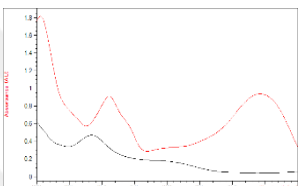
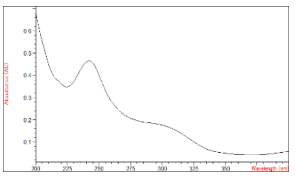
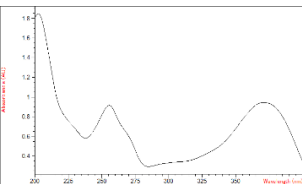
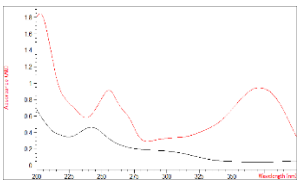
ROS ve QUE için standart stok çözeltilerinden gereken miktarlarda alınarak hazırlanan standart ve BSA çözeltileri geliştirilen yöntem ile analiz edilmiştir. Yöntem uygulanışında kullanılan ultrafiltrasyon tüpünün filtre kısmı, analiz edilen madde ile doyurulmadığında adsorpsiyon kaynaklı madde kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle analiz için ultrafiltrasyon işlemleri gerçekleştirilmeden önce, 25 µg/mL derişimde hazırlanmış ROS standart çözeltisi, çalışmada kullanılan ultrafiltrasyon filtresi ile 5 kez ultrafiltre edilmiştir. Bu doyurma işleminin ardından, önce 25 µg/mL ROS içeren BSA çözeltisi, ardından 2.5 µg/mL QUE ve 25 µg/mL ROS içeren BSA çözeltisi ve son olarak 25 µg/mL ROS standart çözeltisinin ultrafiltre edilmesi ile elde edilen ultrafiltratlar, HPLC sistemine enjekte edilerek kromatografik analiz gerçekleştirilmiştir.

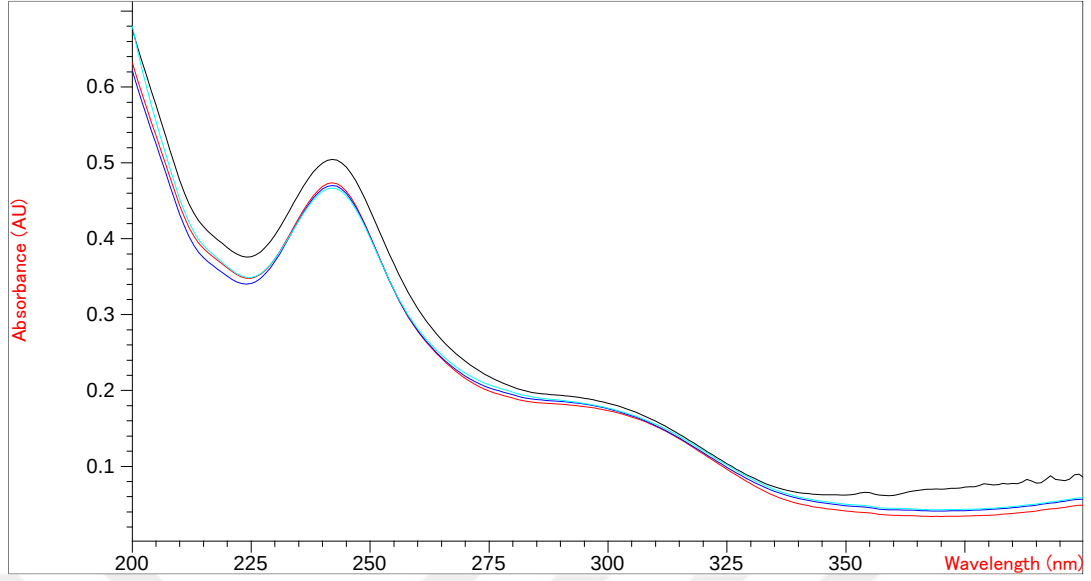
4. BULGULAR

4.1. Ölçüm Dalga Boyunun Belirlenmesi

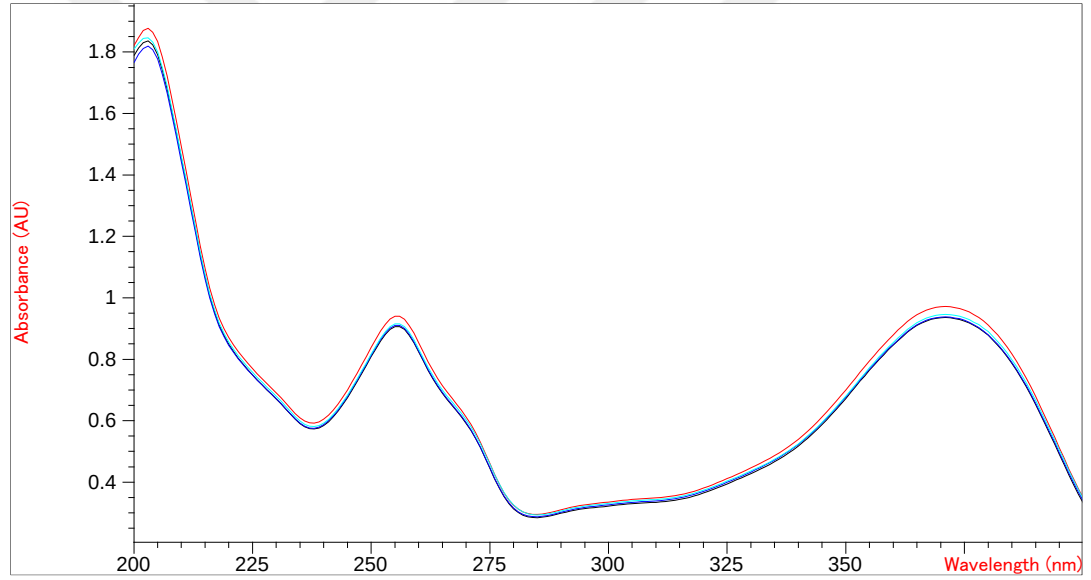
ROS ve QUE'nin HPLC cihazı ile yapılan analizinde kullanılacak olan dalga boyunun belirlenmesinde, analiz edilen karışımlarda yer alan tamponun pH değerine bağlı olarak elde edilen maksimum absorbans değerleri incelenmiştir (Tablo 4.1). Harici bir UV spektrofotometre cihazında gerçekleştirilen inceleme kapsamında analiz edilen karışımlardaki ROS ile QUE derişimi, stok çözeltilerden uygun miktarlarda alınarak 10 µg/mL 'lik olarak, değişen pH değerlerindeki 20 mM fosfat tamponu-ACN karışımlarında(50:50, h/h) hazırlanmıştır. ROS ve QUE için yapılan analiz neticesinde çalışma dalga boyu 250 nm olarak seçilmiştir.

Tablo 4.1. ROS ve QUE'nin UV spektrumları.

	ROS	QUE	ROS-QUE
pH 3.0			
pH 4.0			
pH 5.0			
pH 6.0			



Şekil 3.2. pH 3.0; 4.0; 5.0; 6.0'da ROS için UV spektrumları.



Şekil 3.3. pH 3.0; 4.0; 5.0; 6.0'da QUE için UV spektrumları.

4.2. HPLC Sisteminin Optimizasyonu

Tez çalışmasının bu bölümünde QUE ve ROS maddelerinin HPLC ile eş zamanlı analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesi için, hareketli faz bileşiminde yer alan organik çözücü oranının ve kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin, ayırma ve kromatografik parametreler üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

4.2.1. Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi

Organik Çözücü Oranının Ayırma Etkisi

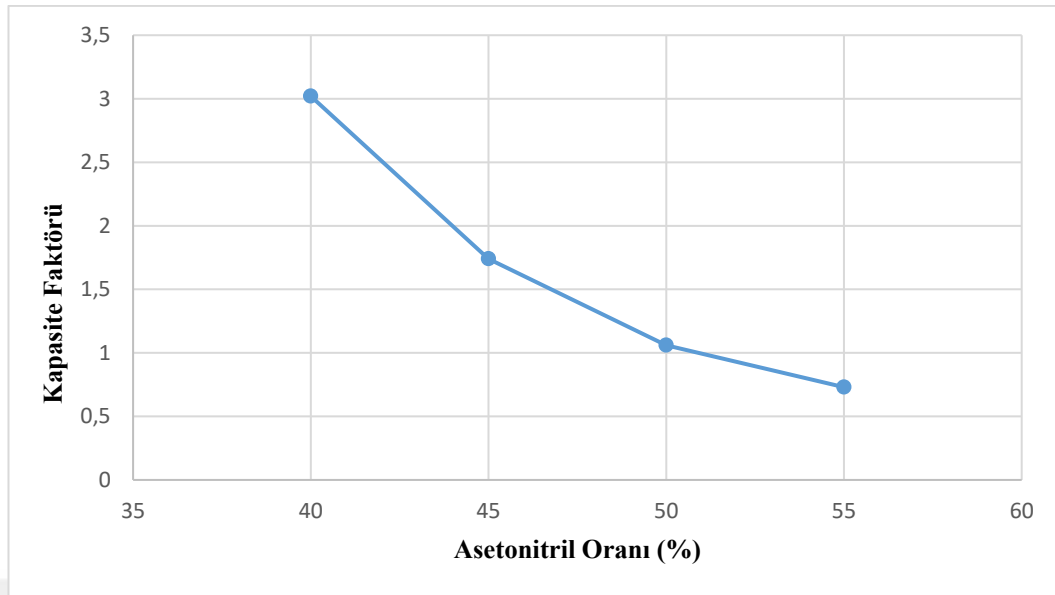
ROS ve QUE'nin HPLC analizinde kullanılacak olan hareketli faz için organik çözücünün oranının kromatografik ayırma etkisi incelenmiştir. İnceleme kapsamında sisteme enjekte edilen ROS ve QUE karışımları(50:50, h/h), ayrı ayrı pH 4.0 fosfat tamponu:distile su(50:50, h/h) karışımlarında hazırlanmış olup, hareketli faz olarak ACN:fosfat tamponu karışımı tercih edilerek pH 4.0 değeri için ayrı ayrı, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, oranlarında(h/h) sisteme aktarılmıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Tablo 4.2. Organik çözücü miktarının ROS kromatografik parametreleri üzerine etkisi.

ACN(%)	t _R (dk)	k'	PAO*	N	Rs
40	10.01	3.02	1.29	14013	8.57
45	6.84	1.74	1.00	12832	4.45
50	5.14	1.06	1.57	11817	2.55
55	4.32	0.73	1.23	11052	1.59

(ACN: Asetonitril, t: Alikonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik Asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı, Rs: Ayırıcılık)

*Pik Asimetri Oranı(PAO) manuel olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. ROS için asetonitril oranı ile k' değişimi.

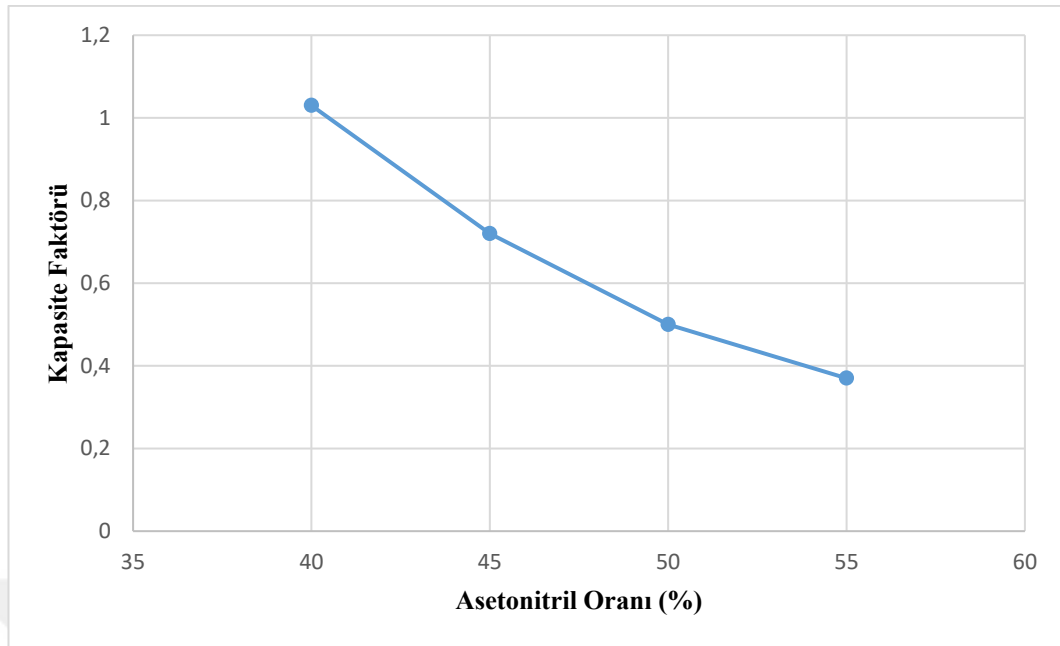
(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)

Tablo 4.3. Organik çözücü miktarının QUE kromatografik parametreleri üzerine etkisi.

ACN(%)	t_R (dk)	k'	PAO*	N	R_s
40	5.07	1.03	1.50	10592	12.40
45	4.29	0.72	2.00	10214	10.83
50	3.73	0.50	1.48	9805	3.11
55	3.40	0.37	1.90	9455	2.21

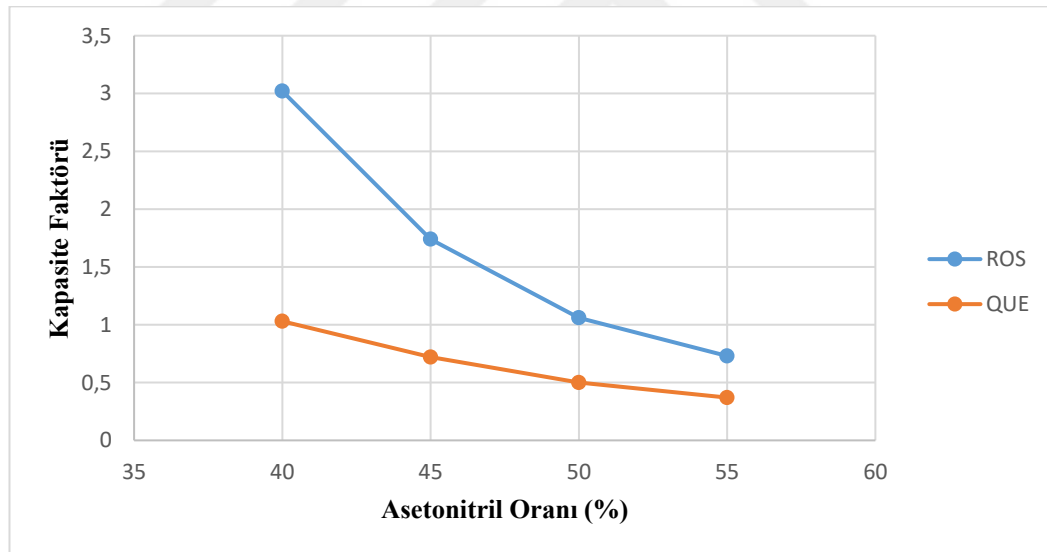
(ACN: Asetonitril, t : Alıkonma zamanı, k' : Kapasite faktörü, PAO: Pik Asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R_s : Ayırıcılık)

*Pik Asimetri Oranı(PAO) manuel olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.2. QUE için asetonitril oranı ile k' değişimi.

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



Şekil 4.3. ROS ve QUE için asetonitril oranı ile k' değişiminin karşılaştırmalı grafiği.

(Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)

Tampon Çözeltinin pH' sının Ayırma Etkisi

ROS ve QUE'nin örnek hazırlama aşamasından sonra HPLC'de yapılacak analizinde kullanılacak hareketli fazın pH değerinin kromatografik ayırma olan

etkilerinin incelenmesi amacıyla ACN:20 mM fosfat tamponu (45:55, h/h), akış hızı 1.0 mL/dk olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. En uygun pH değerinin belirlenebilmesi için hareketli fazın pH değeri sırasıyla 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 şeklinde ayarlanmış, kromatografik parametreler hesaplanmıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

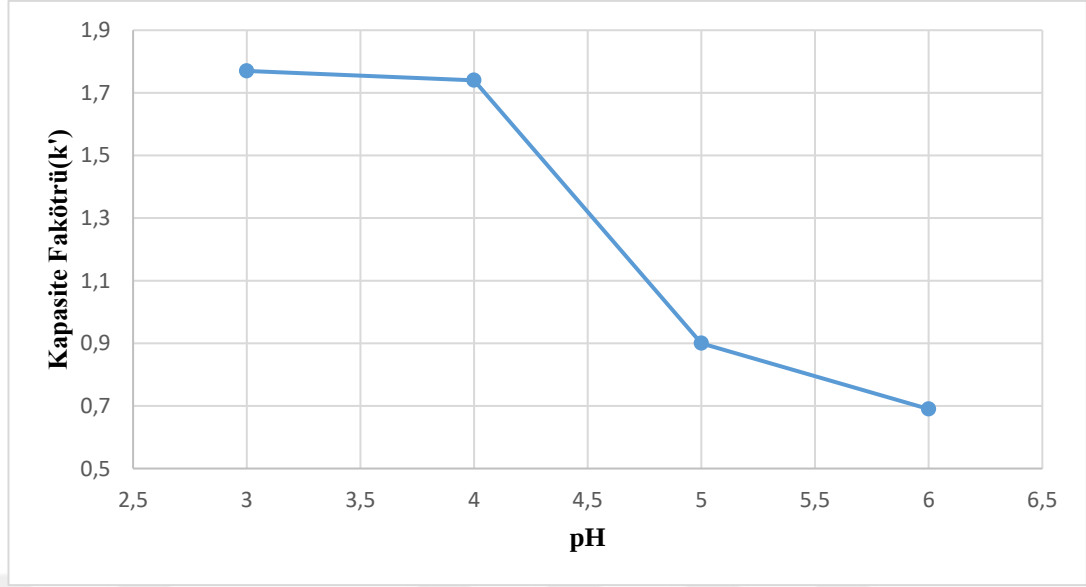
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, pH değeri arttıkça N değerinde önce azalma olup sonra arttığı ve her iki maddenin de kapasite faktörlerinin ve alıkonma zamanlarının azalarak birbirine ayrımı güçleştirecek şekilde yaklaştığı tespit edilmiştir. Test edilen pH değerleri arasından, en uygun N değerleri ve alıkonma değerlerine sahip olması sebebiyle pH 4.0 optimum pH olarak seçilmiştir.

Tablo 4.4. ROS ve QUE için hareketli fazdaki tampon çözeltinin pH'ının kromatografik parametrelere etkisi.

	ROS					QUE				
pH	t _R (dk)	k'	PAO*	N	R _s	t _R (dk)	k'	PAO*	N	R _s
3.0	6.90	1.77	1.00	11871	4.65	4.28	0.72	1.48	9418	2.82
4.0	6.84	1.74	1.00	12832	4.45	4.29	0.72	2.00	10214	10.83
5.0	4.74	0.90	0.94	8212	2.40	4.26	0.71	1.60	7677	1.60
6.0	4.20	0.69	1.67	7819	1.82	3.88	0.56	1.35	9021	3.66

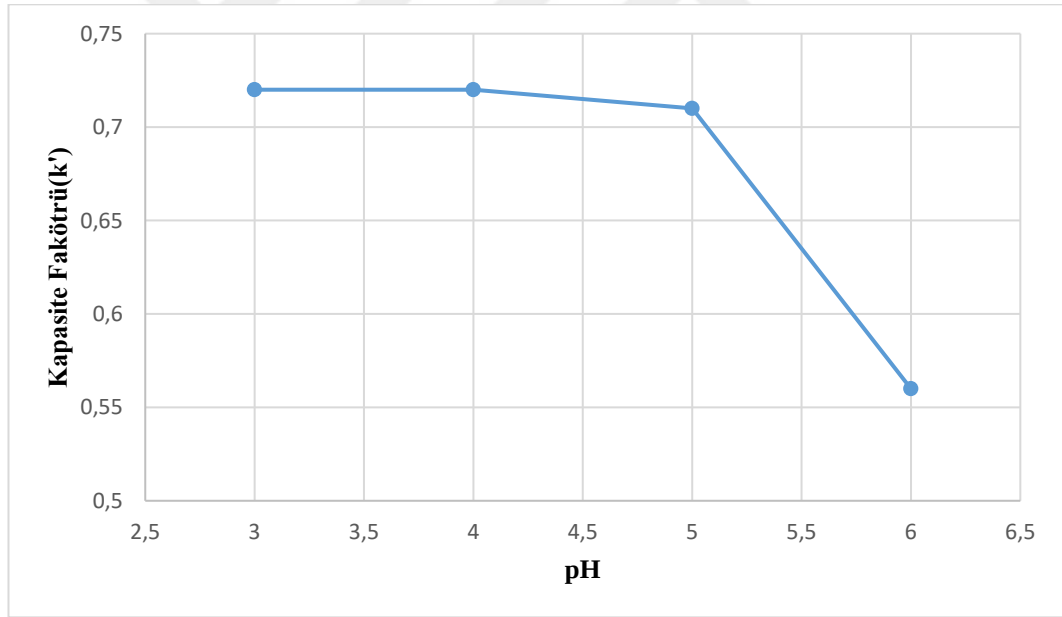
(t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik Asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R_s: Ayırıcılık)

*Pik Asimetri Oranı(PAO) manuel olarak hesaplanmıştır.



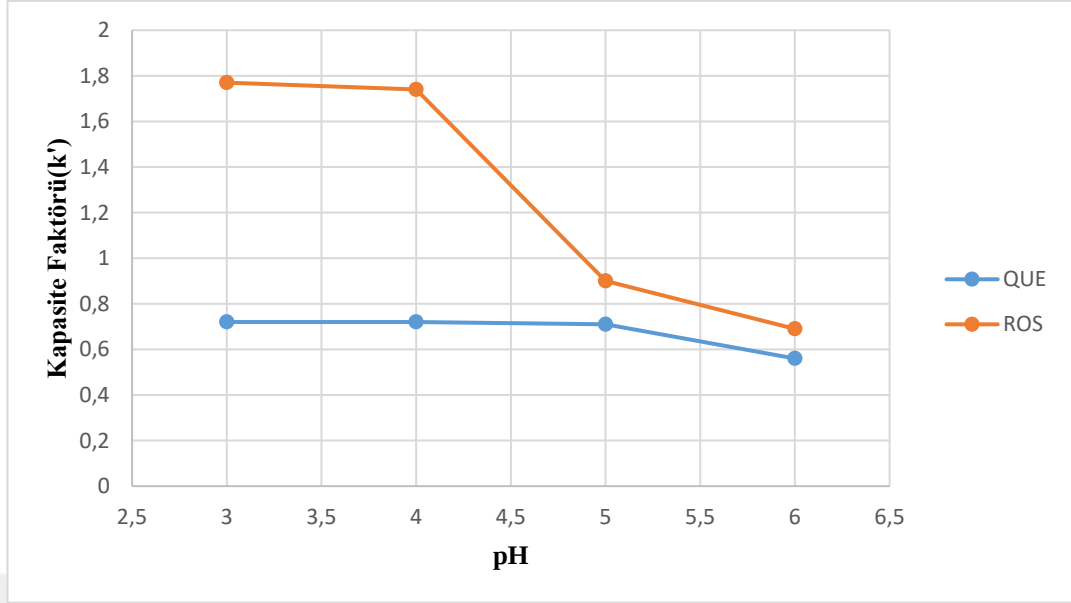
Şekil 4.4. ROS için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişimi.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



Şekil 4.5. QUE için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişimi.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



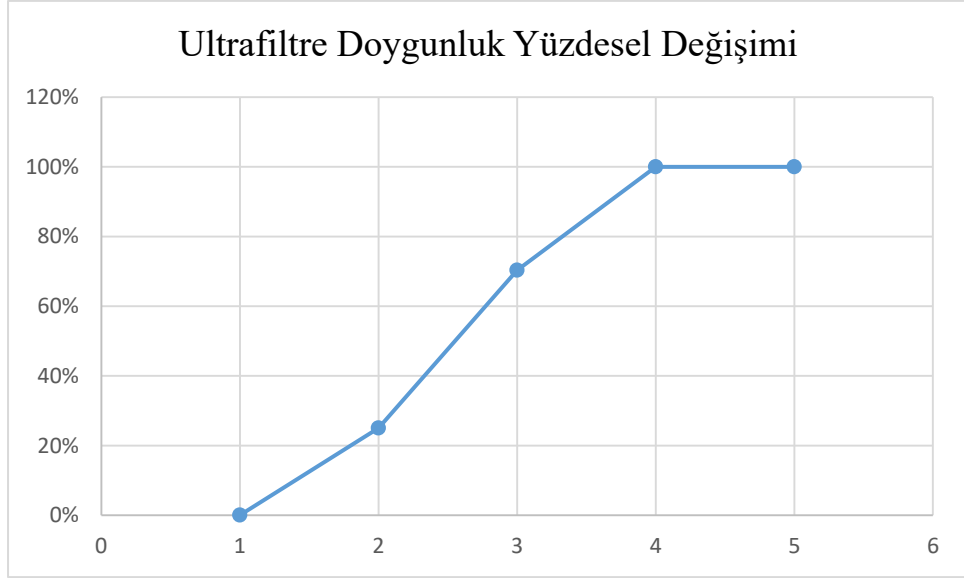
Şekil 4.6. ROS ile QUE için tampon çözeltinin pH'sı ile k' değişiminin karşılaştırmalı grafiği.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler kromatografik açıdan değerlendirilmiş, tez çalışmasında kullanılmak üzere en uygun kromatografik koşulların, hareketli fazda yer alan organik çözücü miktarı açısından ACN:fosfat tamponu(20 mM) (45:55, h/h) olduğu ve hareketli fazda kullanılacak tampon çözeltinin pH'sı açısından, pH 4.0 olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın validasyon aşamasındaki kromatografik analizler de bu koşullara göre gerçekleştirilmiştir.

4.3. Kullanılan Ultrafiltrenin Doyurulması

Tez çalışmasında kullanılan ultrafiltrenin doyurulması için gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işlemlerinden elde edilen ultrafiltratlar analiz edilerek, elde edilen derişim değerleri hesaplanmıştır. Ultrafiltrattaki serbest ROS derişimine göre ultrafiltrenin doygunluk durumu yüzdesel grafik olarak sunulmuştur (Şekil 4.7.). Grafiğe göre ultrafiltrenin ROS ile doyurulması için 5 kez ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilmesinin yeterli olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla çalışmadaki ultrafiltrasyon işlemlerinden önce ultrafiltreden 5 kez 25 µg/mL ROS standart çözeltisi geçirilerek doyurulmasının ardından analiz edilecek numune ultrafiltre edilmiştir.



Şekil 4.7. Ultrafiltre doygunluk yüzdesel değişim grafiği.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)

4.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

ROS ve QUE maddelerinin plazmadan aynı anda analizi için geliştirilen yöntem, FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu(162) standartlarına göre valide edilmiştir.

4.4.1. Sistem Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi çalışması ROS ve QUE içeren standart çözeltisinin 6 tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiş, FDA'ya ait kılavuzda yer alan(161) tanımlamalara göre hesaplanmıştır (Tablo 4.5.).

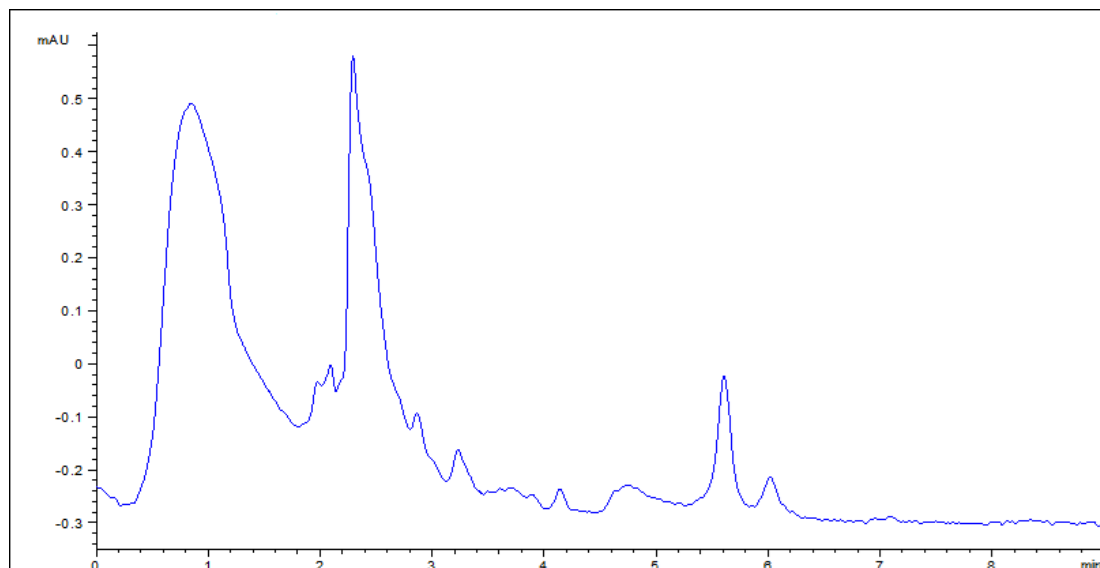
Tablo 4.5. ROS ve QUE analizi için elde edilen sistem uygunluğu parametreleri.
(n=6)

Parametre	ROS	QUE
Enjeksiyon kesinliği (%)	0.39	0.59
Kapasite faktörü	2.10	0.76
Pik Asimetri Oranı*	1.03	1.92
Teorik tabaka sayısı (N)	13048	5606
Ayırıcılık (Rs)	3.51	5.25

*Pik Asimetri Oranı(PAO) manuel olarak hesaplanmıştır.

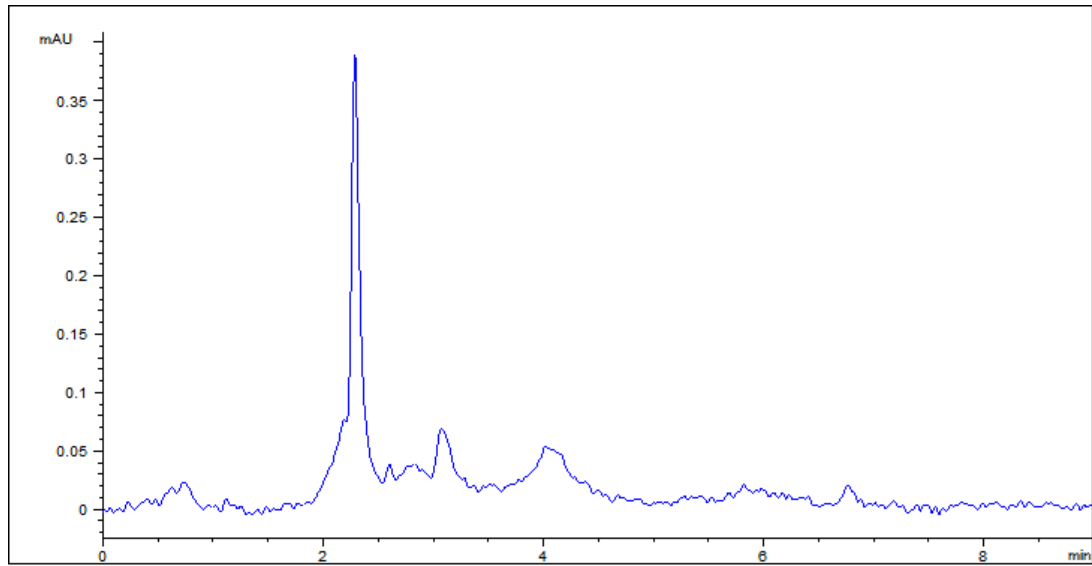
4.4.2. Seçicilik

Geliştirilen yöntemin seçiciliğinin(özgünlüğünün) doğrulanması için çalışmalarda kullanılan 1/20 BSA, hareketli faz, 25 µg/mL ROS ve 2.5 µg/mL QUE içeren BSA ve standart çözeltileri analiz edilerek elde edilen kromatogramlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.). Kromatogramlarda görüldüğü üzere, ultrafiltrasyon ile ekstraksiyonu ve HPLC ile analizi yapılan ROS ve QUE maddelerine ait piklerin, herhangi bir matriks bileşeninden etkilenmediği tespit edilmiştir.



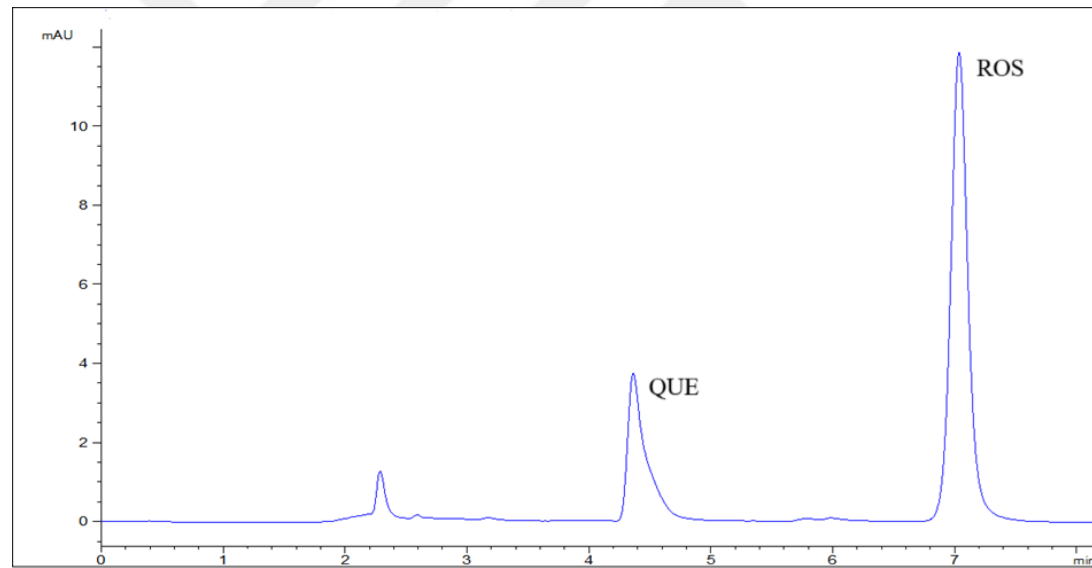
Şekil 4.8. 1/20 BSA kromatogramı.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



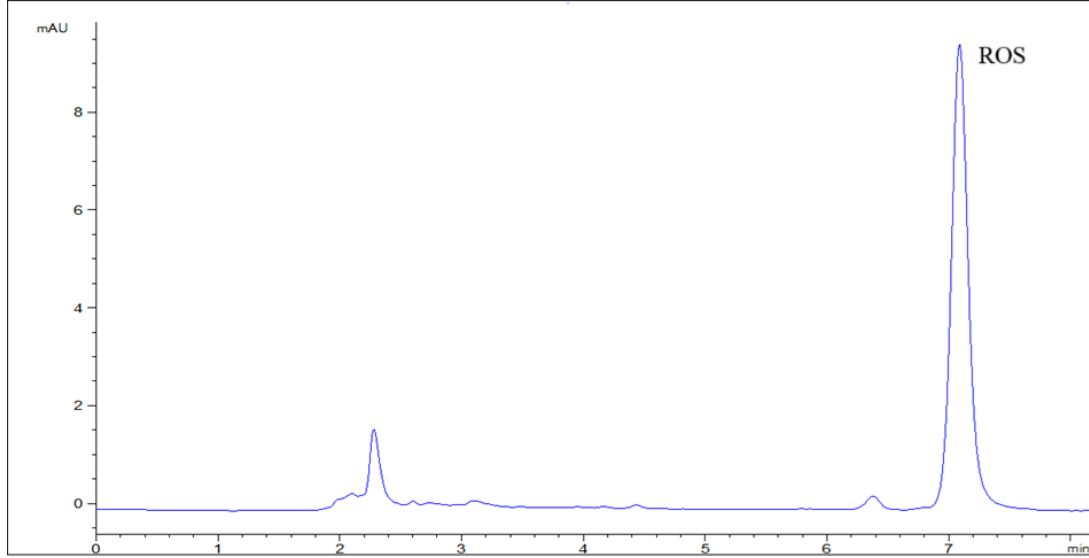
Şekil 4.9. Hareketli faz kromatogramı.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



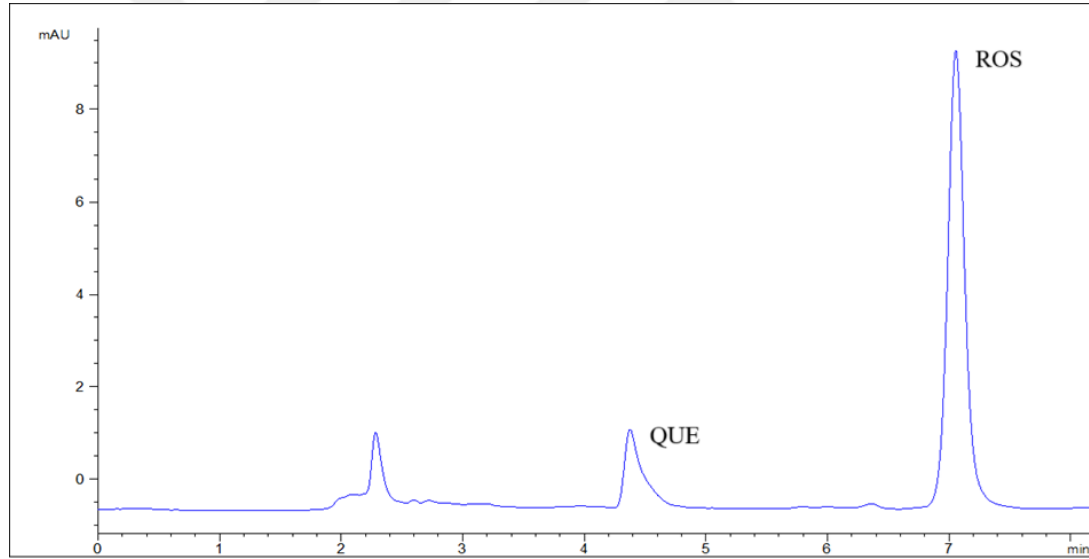
Şekil 4.10. 25 µg/mL ROS ve 2.5 µg/mL QUE içeren standart çözeltilerinin kromatogramı.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



Şekil 4.11. 25 µg/mL ROS içeren BSA çözeltisinin kromatogramı.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)



Şekil 4.12. 25 µg/mL ROS ve 2.5 µg/mL QUE içeren BSA çözeltisinin kromatogramı.

Kromatografik Koşullar: Asetonitril:20 mM fosfat tamponu (pH 4.0), Akış hızı: 1.0 mL/dk, Kolon: ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) Kolon sıcaklığı: 25 °C, Dedektör: UV 250 nm)

4.4.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Çalışma standartları kullanılarak yapılan analizlerde QUE ile ROS için elde edilen pik alanları, derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilerek, ROS için 0.04-2.00 µg/mL, QUE için 0.10-2.00 µg/mL doğrusallık aralığında kalibrasyon eğrileri elde

edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü ve korelasyon katsayısı önem kontrolü istatistiksel olarak test edilmiştir (Tablo 4.6., Tablo 4.7.).

Tablo 4.6. ROS için elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü.

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü				
N	R	S _r	t _H	t _T
6	0.9996	0.0141	70.84	2.78
t _T <t _H : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p<0.05).				

İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1

Tablo 4.7. QUE için elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü.

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü				
N	R	S _r	t _H	t _T
6	0.9994	0.0158	63.09	2.78
t _T <t _H : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p<0.05).				

İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1

ROS ve QUE için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular Tablo 4.8’de sunulmuştur.

Tablo 4.8. ROS ve QUE analizi için elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait bulgular.

	ROS	QUE
Regresyon denklemi	*y=19.144x + 0,1278	y = 57.904x - 0,6975
Eğimin standart hatası	0.035	0.0828
Kesişimin standart hatası	0.034	0.0258
Korelasyon katsayısı (R)	0.9996	0.9994
Tanımlayıcılık katsayısı (R ²)	0.9993	0.999
Aralık	0.04-2.00 µg/mL	0.10-2.00 µg/mL
Gözlenebilme sınırı (µg/mL)	0.01 µg/mL	0.01 µg/mL
Tayin alt sınırı (µg/mL)	0.04 µg/mL	0.01 µg/mL

*y = ax + b; x: µg/mL biriminde derişim, y: Pik alanları, a: Eğim, b: Kesişim

4.4.4. Doğruluk ve Kesinlik

0.04, 0.20, 0.50 ve 1.50 µg/mL olmak üzere 4 farklı derişimde 6 farklı seride hazırlanan ROS çözeltileri ile günler arası ve gün içi doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılmış, elde edilen bulgular Tablo 4.9’da sunulmuştur. Bu bağlamda doğruluk için % BH verileri, kesinlik için % BSS değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.9. Yöntemin günler arası ve gün içi doğruluk ve kesinlik bulguları. (n=6)

Eklenen ROS Derişimi($\mu\text{g/mL}$)	GÜNLER ARASI ¹		GÜN İÇİ ²	
	Bulunan Miktar	% Bağlı Hata	Bulunan Miktar	%Bağlı Hata
0.04	0.04	4.81	0.04	1.07
	0.04	2.57	0.04	9.17
	0.03	14.30	0.03	16.64
	0.04	6.64	0.04	6.52
	0.03	13.69	0.04	8.02
	0.04	9.29	0.04	6.28
$\bar{x}\pm\text{SH}$	0.04 $\pm$ 0.00		0.04 $\pm$ 0.00	
SS	0.0019		0.0032	
BSS	5.21		8.55	
0.20	0.21	3.35	0.20	1.13
	0.20	1.92	0.20	0.90
	0.20	1.02	0.19	3.87
	0.19	3.29	0.19	3.80
	0.20	1.55	0.20	1.08
	0.20	2.28	0.20	2.39
$\bar{x}\pm\text{SH}$	0.20 $\pm$ 0.00		0.20 $\pm$ 0.00	
SS	0.0052		0.0028	
BSS	2.60		1.41	
0.50	0.50	0.06	0.51	1.05
	0.50	0.67	0.50	0.73
	0.51	1.12	0.51	1.29
	0.50	0.44	0.50	0.41
	0.52	3.19	0.52	3.17
	0.51	2.72	0.51	2.25
$\bar{x}\pm\text{SH}$	0.51 $\pm$ 0.00		0.51 $\pm$ 0.00	
SS	0.0074		0.0068	
BSS	1.46		1.35	
1.50	1.54	2.53	1.54	2.39
	1.54	2.34	1.56	3.68
	1.54	2.38	1.53	1.95
	1.54	2.50	1.55	3.15
	1.53	2.24	1.53	2.17
	1.53	2.20	1.57	4.59
$\bar{x}\pm\text{SH}$	1.54 $\pm$ 0.00		1.54 $\pm$ 0.01	
SS	0.0020		0.0152	
BSS	0.13		0.99	

¹Günler arası çalışmalar; dört derişim seviyesinde 6 ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

²Gün içi çalışmalar; dört derişim seviyesinde 6 ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır. $\bar{X}$: Ortalama $\pm$ standart hata, SS: Standart sapma, BH: Bağlı Hata, BSS: Bağlı standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

4.4.5. Duyarlılık

Geliştirilen yöntemin belirli derişimlerdeki QUE ve ROS ile uygulandığı analizlerin sonucunda gözlenebilme sınırı (LOD) QUE için 0.01 µg/mL, ROS için 0.01 µg/mL olarak; alt tayin sınırı (LOQ) ise QUE için 0.01 µg/mL, ROS için 0.04 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.4.6. Geri Kazanım

ROS etken maddesinin geri kazanımının incelenebilmesi için düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı derişimde ROS'ın spike edildiği, plazmada ve suda hazırlanmış çözeltiler hazırlanarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, plazmada hazırlanan çözeltilerden elde edilen derişim, suda hazırlanan çözeltilerden elde edilen derişim ve geri kazanım olarak Tablo 4.10.'da sunulmuştur.

Tablo 4.10. ROS için geri kazanım değerleri. (n=3)

Düşük Derişim			Orta Derişim			Yüksek Derişim	
	%Geri Kazanım		%Geri Kazanım			%Geri Kazanım	
10 µg/mL	106.89	25 µg/mL	97.61	40 µg/mL		97.63	
	90.57		95.37			97.86	
	89.76		100.03			112.62	
$\bar{x}$	95.74	$\bar{x}$	97.67	$\bar{x}$		102.70	
$\bar{x} \pm SH$	95.74 ± 5.58	$\bar{x} \pm SH$	97.67 ± 1.37	$\bar{x} \pm SH$		102.70 ± 4.97	
SS	7.89	SS	1.90	SS		7.01	
BSS	8.24	BSS	1.95	BSS		6.83	

$\bar{X}$: Ortalama ± Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (İstatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2).

4.4.7. Tutarlılık

Geliştirilen yöntemin tutarlılığının değerlendirilmesi amacıyla iki farklı analizci tarafından ROS ve QUE ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen veriler istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir (Tablo 4.11., Tablo 4.12.).

Tablo 4.11. Geliştirilen yöntemin ROS ile gerçekleştirilen tutarlılık testi bulguları.
(n=6)

Eklenen ROS Miktarı (µg/mL)	1. Analizci		2. Analizci	
	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)
0.5	0.51	101.05	0.52	104.13
	0.50	99.27	0.50	99.62
	0.51	101.29	0.50	99.31
	0.50	100.41	0.49	98.66
	0.52	103.17	0.50	99.06
	0.51	102.25	0.50	99.52
$\bar{x} \pm SH$	0.51 ± 0.00	101.24 ± 0.56	0.50 ± 0.00	100.05 ± 0.83
SS	0.01	1.37	0.01	2.03
BSS	1.35	1.35	2.03	2.03
İki analizcinin bulguları için iki örnekli eşit varyans T testi sonucunda elde edilen p değeri: 0.26 (p>0.05).				

Tablo 4.12. Geliştirilen yöntemin QUE ile gerçekleştirilen tutarlılık testi bulguları.
(n=6)

Eklenen QUE Miktarı (µg/mL)	1. Analizci		2. Analizci	
	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)	Bulunan Miktar	Geri Kazanım (%)
0.5	0.49	98.45	0.50	99.22
	0.50	99.02	0.50	100.14
	0.51	101.45	0.50	100.21
	0.51	102.69	0.50	100.82
	0.52	103.33	0.50	100.02
	0.52	103.13	0.50	100.32
$\bar{x} \pm SH$	0.51 ± 0.00	101.34 ± 0.87	0.50 ± 0.00	100.12 ± 0.21
SS	0.01	2.13	0.00	0.52
BSS	2.11	2.11	0.52	0.52
İki analizcinin bulguları için iki örnekli eşit varyans T testi sonucunda elde edilen p değeri: 0.20 (p>0.05)				

$\bar{X}$: Ortalama±standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma (Bkz. Ek 2).

İki analizcinin bulguları iki örnekli eşit varyans t-testi ile karşılaştırılmıştır. p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek 3).

4.5. ROS ve QUE İçeren BSA Numunelerinin ve Standart Çözeltilerin Geliştirilen Yöntem ile Analizi

Geliştirilen yöntem ile, ROS ve QUE içeren BSA’da hazırlanmış numuneler ile aynı derişimlerde hazırlanmış standart çözeltilerin analizleri gerçekleştirilmiştir. BSA’da hazırlanmış olan çözeltilerin geri kazanım değerleri, 25 µg/mL ROS standart çözeltisi için elde edilen ortalama alan değerine göre hesaplanmış, elde edilen veriler Tablo 4.13.’te sunulmuştur.

Tablo 4.13. ROS ve QUE içeren BSA numunelerinin ve standart çözeltilerin geliştirilen yöntem ile analizi. (n=9)

	ROS Standart Çözeltisi	BSA’da Hazırlanmış ROS Çözeltisi	BSA’da Hazırlanmış ROS ile QUE Çözeltisi
	Geri Kazanım(%)	Geri Kazanım(%)	Geri Kazanım(%)
	99.82	80.03	83.21
	99.95	79.69	83.27
	100.46	80.22	83.36
	100.40	86.00	97.80
	99.84	86.04	97.42
	99.84	87.37	97.56
	101.44	90.08	70.60
	99.19	89.55	70.52
	99.06	89.47	70.33
$\bar{x}$	100.00	85.38	83.79
$\bar{x} \pm SH$	100.00 $\pm$ 0.24	85.38 $\pm$ 1.44	83.79 $\pm$ 3.91
SS	0.71	4.31	11.74
BSS	0.71	5.05	14.02
G.A.	99.45-100.55	82.06-88.70	74.77-92.81

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek 2).

5. TARTIŞMA

Hiperlipidemi, kandaki yüksek toplam kolesterol ve trigliserit seviyelerinin önemli ölçüde sebep olduğu bir hastalıktır (1). Hiperlipidemi gibi kolesterol metabolizması ile alakalı hastalıkların ise, dünyadaki birincil ölüm sebebi olan aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklara yol açtığı bilinen bir gerçektir. Bu bağlamda, Türkiye’deki yetişkin nüfusunun %80’inin de, aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklara aterosklerotik plak oluşumu yoluyla sebep olan, dislipidemi hastası olması açısından ülkemiz için önemli derecede risk oluşturmaktadır (3, 5).

Hiperlipidemi için ilaç tedavisi açısından statinler, nikotinik asit grubu ilaçlar, safra asidi bağlayıcı reçineler, fibrat grubu ilaçlar, HMG-KoA redüktaz inhibitörleri gibi birçok ilaç grubu seçeneği mevcut olsa da, statin grubu ilaçlar birincil olarak tercih edilen ilaç grubudur. Diğer ilaç gruplarına kıyasla tolerabilite ve etkisinin oldukça yüksek ve yan etkisinin nispeten düşük ve güvenilir olması gibi avantajlarıyla ön plana çıkmaktadır (1, 2, 29). Buna karşın ilaç tedavisinde her ne kadar etkili sonuçlar alınsa da, atorvastatinin pankreatite yol açabilmesi gibi istenmeyen etkilerin ortaya çıkabilmesi de mümkündür. Bu tez çalışmasında ise günümüz piyasasındaki en etkili ve en güncel statin grubu etken madde olması, aynı zamanda diğer statin grubu etken maddelere kıyasla LDL seviyelerinde daha iyi bir düşüş ve HDL seviyelerinde daha iyi bir artış sağlaması sebebiyle statin grubu etken madde olarak ROS seçilmiştir (12, 13).

Son yıllarda, hasta olma endişesi ve sağlıklı olma konusundaki bilinçlenme neticesinde gıda takviyelerine, yani “doğal ilaçlara” olan rağbet giderek artmıştır ve her yıl artmaya devam etmektedir (6). Tıbbi bitkiler, etki, tolerabilite ve toksisite gibi parametreler açısından avantajlı olması sebebiyle günümüzde birçok ülkede ve hiperlipidemisinin de içinde olduğu birçok hastalığın tedavisi için geleneksel olarak kullanılmaktadır (8). Geçmiş yıllar için bu durum bir şüphe yaratmamış olsa da, tıbbi bitkilerin ve günümüzde formülasyon şeklinde kullanılan gıda takviyelerinin kullanımındaki bu denli artış, toksisite ve kronik hastalığı için ilaç tedavisi alan bireyler için ilaç-gıda etkileşimi açısından meydana gelebilecek sıkıntıları akıllara getirmektedir. Bu bağlamda PPB’nin kritik önemi ön plana çıkmaktadır. Kan plazmasında yer alan proteinler ile ilaçlar tersinir bağlanmalar oluşturmaktadır. Bu

bağlanmalar bir ilacın farmakokinetiği ve farmakodinamiği açısından oldukça önemlidir. İlacın farmakolojik etkisi serbest halde bulunan kısım ile sağlanmakta olup, proteine bağlı olan ve bağlanmamış formlar bir denge içerisinde (9-11). Bu dengenin, proteine bağlı bir ilacın plazma proteinine afinite açısından rekabet içinde olunan başka bir ilaç ve/veya fitokimyasal ile yer değiştirmesi suretiyle serbest ilaç derişimini arttırıcı yönde hareket etmesi halinde, serbest ilaç derişiminin artması ve buna bağlı olarak da toksisite oluşabilme(11) riski söz konusudur. Dolayısıyla kronik hastalığı için ilaç kullanan hastaların, fitokimyasal kullanımları halinde oluşabilecek olası PPB kapasite değişimlerinin takip ve tespit edilmesi oldukça büyük öneme sahiptir.

Tez çalışması için seçilen fitokimyasal olan QUE ise, başta soğan olmak üzere, sarımsak, çay, domates, ıspanak, çilek gibi birçok bitkide yer alan bir flavonoid bileşiktir. Farmakolojik olarak antioksidan, tansiyon düşürücü, inflamasyon giderici ve düşük yoğunluklu lipoprotein peroksidasyonunu önleyici etkileriyle kardiyovasküler hastalıkları önlemede oldukça etkili bir fitokimyasal bileşiktir (14, 15). Özellikle kardiyovasküler hastalık bağlamında dislipidemi konusunda düzenleyici etkiye olduğu bilinmekle beraber, yağ asidi sentezini de inhibe edebileceği, kandaki lipid seviyelerini azaltabildiğinin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (164). Bu bağlamda kardiyovasküler hastalığı olan ve bunun için ROS kullanan bireyler, fitokimyasal takviye kullanımı ile de tedavi süreçlerine katkıda bulunmak isteyebilirler. Ancak ilaç ile kullanılan fitokimyasalın eşzamanlı olarak vücudumuzda bulunmasının, farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan nasıl etkileşimler oluşturabileceği veya bireyde nasıl etkiler yaratabileceği tüm kesinliğiyle bilinmemektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasının konusu olarak, kardiyovasküler hastalıklara karşı etkileriyle bilinen fitokimyasal molekül olan QUE'in, güncel ve etkili bir statin grubu ilaç olan ROS'in plazma proteinlerine bağlanmasında değişim yaratıp yaratmadığının tespit edilebileceği bir analitik yöntem geliştirilmesi ihtiyacına binaen ilgili çalışma yürütülmüştür.

Çalışmanın ana hedefini oluşturan bu değişimin tespit edilebilmesi için denge diyalizi, ultrafiltrasyon, ultrasantrifüj gibi birçok yöntem mevcuttur. Fakat örnek çalışmalar ve bu konuda yapılmış incelemeler göz önüne alındığında(165, 166) serbest ilaç miktarının tespitinde kullanılmak üzere en hızlı ve kolay, aynı zamanda

farmakokinetik ve farmakodinamik açıdan yapılan çalışmalar için en uygun yöntem olması sebebiyle ultrafiltrasyon yöntemi seçilmiş ve uygulanmıştır. Örnek hazırlama yöntemi olarak ultrafiltrasyon seçilmiş olsa da, çalışma kapsamında ROS ile QUE'in, BSA ve plazmadan da ayrımını yapabilecek bir analiz metodu gerekli idi. Bu bağlamda UV spektroskopisi yönteminin kullanımı değerlendirilmiş, ROS ve QUE'in plazmada girişim yapması sebebiyle HPLC yönteminin daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Çalışma öncesinde ROS ve QUE'in HPLC ile ayrımının sağlandığı çalışma örnekleri için kaynaklar taranmış, fakat örnek bir çalışma bulunamamıştır. Bu sebeple deney çalışmalarına başlamadan önce test amacıyla standart çözeltiler ile çeşitli denemeler yapılmış, sonuçlar değerlendirilerek yöntem optimize edilmiştir. Çalışmada C18 kolon kullanılarak ters faz kromatografisi ile ayırım sağlanmak istenmiştir. Bunun sebebi ise, konu hakkında yapılan kaynak taramasında ROS'in HPLC ile analizi için; Shah Y. ve arkadaşlarının 2011 yılında Brownlee C18 kolonu (150×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) ve pH 3.0 trifloroasetik asit tamponu kullanarak ters faz kromatografisi ile gerçekleştirdiği çalışma(17), Donthula S. ve arkadaşlarının 2011 yılında Luna C18 kolonu (4.6 mm $\times$ 250 mm, $5 \mu\text{m}$) ve pH 4.5 fosfat tamponu kullanarak ters faz kromatografisi ile gerçekleştirdiği çalışma(167), Beludari M.I., Prakash K.V. ve Mohan G.K. tarafından 2013 yılında Water's C18 kolonu (250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) ve pH 8.0 fosfat tamponu kullanılarak ters faz kromatografisi ile gerçekleştirdiği çalışma(168) ve Pandya C.B. ve arkadaşları tarafından 2010 yılında Thermo Hypersil C18 kolonu, (100×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) ve pH 3.0 fosfat tamponu kullanılarak ters faz kromatografisi ile gerçekleştirdiği çalışma(169) göz önünde bulundurulmuş, tez çalışmasında C18 kolon kullanılarak ters faz kromatografisi ile ayırım sağlanmıştır. Buna ek olarak ROS'in HPLC ile gerçekleştirilecek olan analizleri için çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla yapılan kaynak taraması sonucunda, ROS'in insan plazmasındaki maksimum derişiminin $0.06 \mu\text{g/mL}$ olduğu(170) görülmüştür. Dolayısıyla ROS ile yapılan deneyler için kullanılacak derişim değerlerinin belirlenmesinde bu derişim seviyesi göz önünde bulundurulmuştur.

5.1. Yöntem Optimizasyonu

HPLC, analizi yapılacak numunenin hareketli faz aracılığıyla bir sabit faz üzerinde hareket ettirilerek çeşitli karışımların, numunelerin içeriğinin ve miktarının

belirlenebildiği oldukça etkili bir sıvı kromatografisi tekniğidir. Tez çalışması kapsamında yapılan HPLC analizlerinde güvenilir ve doğru sonuçlar elde edilebilmesi için, en uygun kromatografik koşulların tespit edilmesi ve bu koşullar doğrultusunda analizler gerçekleştirilmelidir. Bu bağlamda HPLC analizleri için en uygun kromatografik koşulların sağlanması açısından hareketli faz bileşiminde yer alan organik çözücü oranının ve kullanılan tampon çözeltinin pH değerinin, kromatografik parametrelere ve ayırma olan etkisi araştırılmış, elde edilen veriler değerlendirilmiştir. HPLC analizleri, ROS ve QUE için en yüksek absorbans değerine ulaşılan dalga boyu 250 nm’de(Tablo 4.1., Şekil 3.2., Şekil 3.3.) gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Organik Çözücü Oranının Ayırma Etkisi

HPLC analizlerinde kullanılacak olan hareketli faz içeriğindeki organik çözücü oranının belirlenmesi için %40, %45, %50 ve %55 şeklinde değişen oranlarda ACN ve sabit derişimlerde ROS ve QUE içeren hareketli faz (pH 4.0) sisteme enjekte edilerek, organik çözücü oranının kromatografik parametrelere ve ROS ve QUE’nin alıkonma zamanlarına etkisi incelenmiştir (Tablo 4.2., Tablo 4.3., Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3.). Elde edilen veriler incelendiğinde organik çözücü ACN oranı arttıkça teorik tabaka sayısının da her iki etken madde için de düştüğü ve her oran değeri için >2000 olduğu gözlenmiştir. PAO değerleri açısından incelendiğinde, QUE için 1.48-2.00 arasında değişen değerler elde edilmiş olsa da, ROS için %45 oranında ACN kullanıldığında 1.00 PAO değerine sahip simetrik sayılabilecek ROS pikleri elde edilmiştir. Ayırıcılık açısından hiçbir oran değeri için kabul kriteri değeri olan 2 sınırının altına düşülmediği gözlenmiştir. Bu noktada belirleyici olan kısım alıkonma zamanı ve kapasite faktörü olmuştur. %40 oranında ACN kullanılarak kapasite faktörü için 2’den büyük değer elde edilmiş olsa da ROS’in alıkonma zamanını oldukça fazla arttırarak analiz süresinin uzamasına sebep olacaktır. Dolayısıyla kapasite faktörü için sınır değeri olan 2’ye yakın olması, ROS pikleri için PAO’nun 1.00 olarak tespit edildiği ve ROS ile QUE’nin alıkonma sürelerinin en uygun şekilde olduğu oran değeri olan %45 ACN oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

5.1.2. Tampon Çözeltinin pH'sının Ayırma Etkisi

Ayırırda kullanılan hareketli fazda yer alan tampon pH'sı, ayırımı yapılacak olan maddelerin alıkonma zamanlarını ve kromatografik parametreleri etkileyen bir faktördür. Hareketli fazın pH değeri düştükçe analiz edilen maddelerin iyonizasyonu artacağı için özellikle alıkonma zamanı için ciddi değişiklikler yaratabilmesi açısından oldukça önemlidir. Hareketli fazın farklı pH'lara sahip olmasının kromatografik parametreler ve ROS ile QUE maddelerinin alıkonma süreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 olmak üzere dört farklı değerinde hazırlanan ACN:20 mM fosfat tamponu (45:55, h/h) ile analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogram ve parametreler en uygun pH değerinin seçilmesi için incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Hareketli fazın pH değeri arttıkça teorik tabaka sayısı azalma eğilimi göstermiş olup, en yüksek değer pH 4.0 için elde edilmiştir. Alıkonma zamanı açısından pH 5.0 ve 6.0 için elde edilen kromatogramlar ve değerler incelendiğinde, ROS ile QUE piklerinin birbirine fazlaca yaklaşmış olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla pH 5.0 ve 6.0 değerleri elenmiş, pH 3.0 ve 4.0 için alıkonma sürelerinin daha uygun olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda kapasite faktörü için kabul sınırı 2'ye en yakın değerlerin pH 3.0 ve 4.0'da elde edildiği gözlenmiştir. PAO açısından ise, QUE için 1.35-2.00 arasında kabul kriterlerine uygun değerler elde edilmiş olsa da, pH 3.0 ve 4.0'da ROS pikleri için PAO değerleri 1.00 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla pH 3.0 ve 4.0'da elde edilen PAO değerleri, pH 5.0 ve 6.0'da elde edilen PAO değerlerine kıyasla daha uygundur. Ayırıcılık için ise en yüksek değerler pH 4.0 için elde edilmiş olup, sonuç olarak tespit edilen üstünlükleri sebebiyle çalışılacak pH değerinin 4.0 olmasına karar verilmiştir (Tablo 4.4., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

5.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Tez çalışması kapsamında geliştirilen HPLC yönteminin validasyonu için öncelikle sistem uygunluğu parametreleri incelenmiştir ($k' > 2$, $N > 2000$, $BSS \leq \%1$, $PAO \leq 2$, $Rs > 2$). Sistem uygunluğunun test edilmesi için aynı standart çözeltinin 6 tekrar ile yapılan enjeksiyonundan elde edilen veriler değerlendirilmiş, kabul sınırları içerisinde olduğu görülmüştür (Tablo 4.5.). Sistem uygunluğu test edilen yöntemin validasyonu için FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu'nda(162) yer alan

kriterler esas alınarak, doğrusallık ve aralık, seçicilik, doğruluk ve kesinlik, geri kazanım, duyarlılık ve tutarlılık parametreleri araştırılmıştır.

5.2.1. Seçicilik (Özgünlük)

Seçicilik, geliştirilen yöntemin ROS ve QUE maddelerini, ortamda bulunan diğer maddelerden etkilenmeden analiz edebilmesidir. Analiz edilen ROS ve QUE standart içeren çözeltisine ait kromatogram, BSA, hareketli faz ve ROS ve QUE içeren BSA çözeltisi kromatogramları ile karşılaştırılmış olup, ROS ile QUE piklerinin BSA piklerinden, hareketli faz piklerinden veya matrikste bulunan diğer maddelerden etkilenmediği gözlenmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.).

5.2.2. Doğrusallık

Geliştirilen HPLC yönteminde ROS ve QUE için elde edilen pik alanları derişime karşı grafiğe geçirilmiş, kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin ROS için 0.04-2.00 µg/mL aralığında, QUE için 0.10-2.00 µg/mL aralığında doğrusal olduğu ve korelasyon katsayılarının önemli olduğu istatistiksel değerlendirme yapılarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6., Tablo 4.7., $p < 0.05$). Aynı zamanda ROS ve QUE için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin tanımlayıcılık katsayılarının 1.0000'a çok yakın bir değer olarak 0.999 bulunması, kalibrasyon eğrilerinin doğrusal olduğunu göstermektedir (Tablo 4.8.).

5.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk çalışması kapsamında ROS standart çözeltileri 0.04, 0.20, 0.50 ve 1.50 µg/mL olmak üzere 4 farklı derişimde hazırlanarak 6 tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiştir. Gün içi doğruluk için yapılan analizlerin sonucunda elde edilen % BH sonuçları 0.41-16.64 arasında değişmektedir. Günler arası doğruluk çalışmasından elde edilen % BH sonuçları ise 0.06-14.30 arasında değişmektedir (Tablo 4.9.). Elde edilen bağıl hata değerlerinin, kabul kriteri olan %20 sınırını aşmaması koşulunu sağlaması ile geliştirilen yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (162).

Yöntemin günler arası gün içi ve günler arası kesinlik çalışması kapsamında ise 0.04, 0.20, 0.50 ve 1.50 µg/mL olmak üzere 4 farklı derişimde hazırlanarak 6

tekrarlı analizleri gerçekleştirilmiştir. Yöntemden elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğini ifade eden kesinlik parametresi % BSS değeri ile ifade edilmektedir. Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen verilere göre, gün içi kesinlik % BSS değerleri 0.99-8.55 aralığında olup, günler arası kesinlik çalışmalarından elde edilen % BSS değerleri ise 0.13-5.21 aralığındadır (Tablo 4.9.). Elde edilen bağıl standart sapma değerlerinin, kabul kriteri olan %20 sınırını aşmaması koşulunu sağlaması ile geliştirilen yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır (162).

5.2.4. Duyarlılık

ROS ile QUE'nin HPLC yöntemi ile analizi için gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri, ROS için 0.01 µg/mL, QUE için 0.01 µg/mL olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı (LOQ) değerleri ise ROS için 0.04 µg/mL, QUE için 0.01 µg/mL olarak bulunmuştur. Buna göre geliştirilen yöntemin, ROS ve QUE'nin BSA'da analiz edilmesi için uygun duyarlılıkta olduğu görülmüştür (158, 160).

5.2.5. Geri Kazanım

Geri kazanım çalışması kapsamında suda ve plazmada hazırlanan ROS çözeltileri geliştirilen yöntem ile analiz edilmiştir. Plazmada hazırlanan çözeltilerden elde edilen ROS miktarları, suda hazırlanan çözeltilerden elde edilen ortalama derişim değeri ile kıyaslanarak geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Analiz için üç farklı derişimde, her derişim için 3 ayrı ROS çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir. Üç ayrı derişim için geri kazanım değerleri sırasıyla 95.74 ± 5.58 , 97.67 ± 1.37 , 102.70 ± 4.97 olarak bulunmuştur (Tablo 4.10.).

5.2.6. Tutarlılık

Yöntemin tutarlılık çalışması kapsamında iki farklı analizcinin belirli bir derişimde hazırladığı altı farklı çözeltinin analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Yapılan t-testi sonucunda ROS ve QUE maddelerinin her ikisi için de $p > 0.05$ olarak bulunmuştur. Dolayısıyla iki analizci arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.11., Tablo 4.12.).

5.3. Yöntemin ROS ve QUE İçeren BSA Numunelerine ve Standart Çözeltilerine Uygulanması

Geliştirilen yöntem ile belirli derişimlerde ROS ve QUE içeren BSA ve standart çözeltileri analiz edilmiştir. Analiz edilen çözeltilerin geri kazanım değerleri ROS içeren standart çözeltide bulunan ROS derişimi değerlerinin ortalamasına göre hesaplanmıştır (Tablo 4.13.). ROS geri kazanım değerleri, BSA’da hazırlanmış ROS çözeltisi için 5.05 % BSS ile 85.38 ± 1.44 , BSA’da hazırlanmış ROS ve QUE içeren çözelti için ise 14.02 % BSS ile 83.79 ± 3.91 olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde geliştirilen yöntem kullanılarak, BSA’daki ROS ve QUE’nin yüksek geri kazanım ile analiz edilebildiği gözlenmiştir. Ayrıca ROS etken maddesinin, aynı BSA çözeltisinde yer alan QUE fitokimyasalı sebebiyle geri kazanımında ciddi bir değişiklik gözlenmemiş olup, ROS maddesinin serum albüminine bağlanmasını düşük bir oranda arttırdığı veya girişim kaynaklı bir sapma yaşanmış olabileceği düşünülmektedir. Geliştirilen yöntem FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu’na göre valide edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kardiyovasküler hastalıklar için ciddi bir risk faktörü olan hiperlipideminin tedavisinde kullanılan statin grubu ilaçlardan ROS ile tansiyon düşürücü, inflamasyon giderici ve lipid peroksidasyonunu önleyici etkileriyle bilinen fitokimyasal QUE'in BSA'dan analizi için yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, rutin analizlerde kullanılabilmesi için FDA Biyoanalitik Yöntem Validasyon Kılavuzu'na göre valide edilmiştir. Çalışmada yapılan tüm kromatografik analizlerde ACE C18 (250 × 4.6 mm i.ç., 5 µm) kolon kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için hareketli faz olarak 20 mM derişimde fosfat tamponu (pH 4.0) ve ACN 55:45 h/h oranında karıştırılmış, akış hızı 1.0 mL/dk olarak belirlenmiştir. UV dedektör kullanılarak 250 nm dalga boyunda tespit edilen sinyaller kaydedilmiştir. Geliştirilen yöntem FDA kılavuzuna göre, doğrusallık ve aralık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, tutarlılık, seçicilik ve duyarlılık parametrelerine göre valide edilmiş, yöntemin doğruluk ve güvenilirliği ispatlanmıştır.

Geliştirilen yöntem, endüstrideki yaygınlığının yanında proteini uzaklaştırma ve saflaştırmada da giderek popülerliğini arttıran bir teknik olan ultrafiltrasyon kullanılarak, plazmadan ilaç ve fitokimyasal analizinin yapılabileceğinin gösterilmesi açısından kaynaklara katkı sağlamıştır. Ayrıca bu tez çalışması ile, dünyada çeşitli sağlık endişeleri ile kullanımı oldukça artan ve yaygınlaşan fitokimyasallardan biri olan QUE'nin, dünyada kullanımı oldukça yaygın olan hiperlipidemi ilaçlarından biri olan ROS'un plazma proteinine bağlanma kapasitesini azaltmadığı, birbirlerinin serbest plazma derişimlerini önemsenecek ölçüde arttırmadıkları kanıtlanmıştır. Dolayısıyla tez kapsamında belirtilen derişim aralıklarındaki ROS ve QUE'nin birlikte kullanımının güvenli olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın bu çalışma, ilaçlar ile fitokimyasalların beraber kullanımlarında meydana gelebilecek olumsuzluklar ile alakalı farkındalık yaratma konusunda da kaynaklara katkı sunmuştur. Aynı zamanda tez çalışması sonucunda elde edilen kazanımlardan bir diğeri de, ultrafiltrasyon tekniğinin uygulanışında kullanılan ultrafiltrasyon membranının adsorpsiyon nedeniyle madde kaybına yol açtığı gözlenilmiş, bu olumsuzluğun etkisinin membranın doyurulması ile makul seviyelere indirgenmiş olduğudur. Bu bağlamda elde edilen bu bilgi, ultrafiltrasyon yönteminin kullanılacağı başka çalışmalar için yol gösterici nitelik taşımaktadır.

Tez çalışması sonucunda, ultrafiltrasyon kullanılarak plazmadan ilaç ve fitokimyasal analizi için kullanılabilir, basit ve hızlı bir yöntem sunulmuştur. Bu yöntem esas alınarak farklı ilaç ve fitokimyasallar ile çalışmalar yapılması, ilaç-fitokimyasal etkileşimi konusunda kaynakların zenginleştirilmesi ve halk sağlığına katkı sunulması açısından önerilir.



7. KAYNAKLAR

1. Akkaya G. Hiperlipidemik hastalarda kullanılmak üzere rosuvastatin içeren solid disperpsiyon formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu [Yüksek Lisans Tezi]. Mersin: Mersin Üniversitesi; 2019.
2. Çınar İ. Deneysel hiperlipidemi oluşturulmuş sıçanlarda isoproterenol ile indüklenen miyokard infarktüsü modelinde 5-HT7 reseptör agonist ve antagonistlerinin olası koruyucu etkilerinin araştırılması [Doktora Tezi]. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2018.
3. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, ve ark. Atherosclerosis. Nature Reviews Disease Primers. 2019;5(1):1-18.
4. Sarı SÖ. Statin grubu ilaç kullanan hiperlipidemili hastalarda hasta eğitimi ve hiperlipidemi tedavisinin izlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2004.
5. Bayram F, Satman İ, Sabuncu T, Sönmez A, Cesur FM, Şahin İ, ve ark. Dislipidemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. 2021.
6. Gómez-Garduño J, León-Rodríguez R, Alemón-Medina R, Pérez-Guillé BE, Soriano-Rosales RE, González-Ortiz A, ve ark. Phytochemicals that interfere with drug metabolism and transport, modifying plasma concentration in humans and animals. Dose-Response. 2022;20(3):1-4.
7. Verma T, Sinha M, Bansal N, Yadav SR, Shah K, Chauhan NS. Plants Used as Antihypertensive. Natural Products and Bioprospecting. 2020;11(2):155-184.
8. Rauf A, Akram M, Anwar H, Daniyal M, Munir N, Bawazeer S, ve ark. Therapeutic potential of herbal medicine for the management of hyperlipidemia: latest updates. Environmental Science and Pollution Research. 2022;29(27).
9. Deb PK, Al-Attaqchi O, Prasad MR, Tekade RK. Protein and Tissue Binding: Implication on Pharmacokinetic Parameters. Dosage Form Design Considerations. 2018.
10. Lee K-J, Mower R, Hollenbeck T, Castelo J, Johnson N, Gordon P, ve ark. Modulation of Nonspecific Binding in Ultrafiltration Protein Binding Studies. Pharmaceutical Research. 2003;20(7):1005-21.
11. Bohnert T, Gan L-S. Plasma protein binding: from discovery to development. Journal of pharmaceutical sciences. 2013;102(9):2953-94.
12. Efthimiadis A. Rosuvastatin and Cardiovascular Disease: Did the Strongest Statin Hold the Initial Promises? Angiology. 2008;59(2):62S-4S.
13. Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH. Rosuvastatin: A Review of the Pharmacology and Clinical Effectiveness in Cardiovascular Disease. Clinical Medicine Insights: Cardiology. 2012;6:17-33.
14. Carrillo-Martinez EJ, Flores-Hernández FY, Salazar-Montes AM, Nario-Chaidez HF, Hernández-Ortega LD. Quercetin, a Flavonoid with Great Pharmacological Capacity. Molecules. 2024;29(5):1000.
15. Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA, ve ark. Therapeutic potential of quercetin: new insights and perspectives for human health. ACS Omega. 2020;5(20):11849-72.

16. Kumar TR, Shitut NR, Kumar PK, Vinu MC, Kumar VVP, Mullangi R, ve ark. Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: validation and its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. 2006;20(9):881-7.
17. Shah Y, Iqbal Z, Ahmad L, Khan A, Khan MI, Nazir S, ve ark. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(9-10):557-63.
18. Kaila H, Ambasana M, Thakkar R, Saravaia H, Shah A. A new improved RP-HPLC method for assay of rosuvastatin calcium in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;72(5):592.
19. Koçak E, Çelebier M, Altınöz S. Application of RP-HPLC for determination of the dissociation constants of rosuvastatin calcium. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2012(2):133-44.
20. Kulevanova S, Stefova M, Panovska TK, Stafilov T. HPLC identification and determination of myricetin, quercetin, kaempferol and total flavonoids in herbal drugs. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 2002;48(1):2.
21. Jones D, Lim C, Ferry D, Gescher A. Determination of quercetin in human plasma by HPLC with spectrophotometric or electrochemical detection. *Biomedical Chromatography*. 1998;12(4):232-5.
22. Desmiaty Y, Alatas F, editors. Determination of quercetin in *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*; 2008.
23. Abdelkawy KS, Balyshev ME, Elbarbry F. A new validated HPLC method for the determination of quercetin: Application to study pharmacokinetics in rats. *Biomedical Chromatography*. 2017;31(3).
24. Shattat GF. A review article on hyperlipidemia: types, treatments and new drug targets. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2015;7(1):399-409.
25. Bruss ML. Chapter 4 - Lipids and Ketones. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 ed2008. p. 81-115.
26. Pedersen BK. Physical Exercise in Chronic Diseases. *Nutrition and Skeletal Muscle*. 2019:217-66.
27. Rouhi-Boroujeni H, Rouhi-Boroujeni H, Heidarian E, Mohammadizadeh F, Rafieian-Kopaei M. Herbs with anti-lipid effects and their interactions with statins as a chemical anti-hyperlipidemia group drugs: A systematic review. *ARYA Atherosclerosis*. 2015;11(4):244.
28. Hobbs FR, Banach M, Mikhailidis DP, Malhotra A, Capewell S. Is statin-modified reduction in lipids the most important preventive therapy for cardiovascular disease? A pro/con debate. *BMC Medicine*. 2016;14(1).
29. Toth PP. Drug Treatment of Hyperlipidaemia. *Drugs*. 2012;70(11):1363-79.
30. Bahmani M, Mirhoseini M, Shirzad H, Sedighi M, Shahinfard N, Rafieian-Kopaei M. A Review on Promising Natural Agents Effective on Hyperlipidemia. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2015;20(3):228-38.
31. Rouhi-Boroujeni H, Heidarian E, Rouhi-Boroujeni H, Khoddami M, Gharipour M, Rafieian-Kopaei M. Use of lipid-lowering medicinal herbs during pregnancy: A systematic review on safety and dosage. *Arya Atherosclerosis*. 2017;13(3):135.

32. Akyıldız Zİ. Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan bazı fitoterapötiklerin antioksidan ve pro-oksidan özelliklerinin değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi; 2019.
33. Mollazadeh H, Mahdian D, Hosseinzadeh H. Medicinal plants in treatment of hypertriglyceridemia: A review based on their mechanisms and effectiveness. *Phytomedicine*. 2019;53:43-52.
34. Hu Y, Chen X, Hu M, Zhang D, Yuan S, Li P, ve ark. Medicinal and edible plants in the treatment of dyslipidemia: advances and prospects. *Chinese Medicine*. 2022;17(1):113.
35. Beji RS, Khemir S, Wannes WA, Ayari K, Ksouri R. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant influences of the spice cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) in experimental rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54(2):1-6.
36. Rahman S, Begum H, Rahman Z, Ara F, Iqbal J, Yousuf AKM. Effect of cinnamon (*Cinnamomum cassia*) as a lipid lowering agent on hypercholesterolemic rats. *Journal of Enam Medical College*. 2013;3(2):94-8.
37. Đurić L, Milanović M, Milošević N, Stojanoska M, Milić N. Herbs for Treatment of Hyperlipidemia: What is the Evidence? *Current Topics in Nutraceutical Research*. 2021(2):1-11.
38. Ashraf R, Aamir K, Shaikh AR, Ahmed T. Effects of garlic on dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*. 2005;17(3):60-4.
39. Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids in Health and Disease*. 2007;6(1):1-5.
40. Giannoulaki P, Kotzakioulafi E, Chourdakis M, Hatzitolios A, Didangelos T. Impact of *Crocus sativus* L. on Metabolic Profile in Patients with Diabetes Mellitus or Metabolic Syndrome: A Systematic Review. *Nutrients*. 2020;12(5):1424.
41. Rahim INA, Kasim NAM, Isa MR, Nawawi H. A Systematic Review on the Effect of Saffron Extract on Lipid Profile in Hyperlipidaemic Experimental Animal Models. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*. 2022;29(4):14.
42. Hatziaepi K, Lambrou GI. The Protective Role of *Crocus Sativus* L. (Saffron) Against Ischemia-Reperfusion Injury, Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Nature Opposing Cardiovascular Diseases. *Current Cardiology Reviews*. 2018;14(4):272-89.
43. Tajaddini A, Roshanravan N, Mobasseri M, Al-qaim ZH, Hadi A, Aeinehchi A, ve ark. The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on glycemia, lipid profile, and antioxidant status in patients with type-2 diabetes mellitus: A randomized placebo-controlled trial. *Phytotherapy Research*. 2023;37(2):388-98.
44. Al-Naggar RA, Osman MT, Mohamed IN, Aripin KNBN, Abdulghani MAM. Effect of *Nigella sativa* supplementation on human lipids: systematic review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017;7:213-19.
45. Majeed A, Naveed AK. Comparative evaluation of *Nigella sativa* (Kalonji) and simvastatin for the treatment of hyperlipidemia and in the induction of hepatotoxicity. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2015;28(2):493-98.
46. Asgary S, Ghannadi A, Dashti G, Helalat A, Sahebkar A, Najafi S. *Nigella sativa* L. improves lipid profile and prevents atherosclerosis: Evidence from an experimental study on hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(1):228-34.

47. Sabzghabaee AM, Dianatkah M, Sarrafzadegan N, Asgary S, Ghannadi A. Clinical evaluation of *Nigella sativa* seeds for the treatment of hyperlipidemia: a randomized, placebo controlled clinical trial. *Medical archives*. 2012;66(3):198.
48. Wang Z-C, Machuki JO, Li M-Z, Li K-X, Sun H-J. A narrative review of plant and herbal medicines for delaying diabetic atherosclerosis: an update and future perspectives. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2021;22(4):1361-81.
49. Yang Y-S, Su Y-F, Yang H-W, Lee Y-H, Chou JI, Ueng K-C. Lipid-Lowering Effects of Curcumin in Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytotherapy Research*. 2014;28(12):1770-7.
50. Mirzabeigi P, Mohammadpour AH, Salarifar M, Gholami K, Mojtahedzadeh M, Javadi MR. The effect of curcumin on some of traditional and non-traditional cardiovascular risk factors: a pilot randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2015;14(2):479.
51. Razzaq FA, Khan RA, Feroz Z, Afroz S. Effect of *Berberis aristata* on lipid profile and coagulation parameters. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011;5(7):943-7.
52. Potdar D, Hirwani RR, Dhulap S. Phyto-chemical and pharmacological applications of *Berberis aristata*. *Fitoterapia*. 2012;83(5):817-30.
53. Bertuccioli A, Moricoli S, Amatori S, Rocchi MBL, Vici G, Sisti D. Berberine and Dyslipidemia: Different Applications and Biopharmaceutical Formulations Without Statin-Like Molecules—A Meta-Analysis. *Journal of Medicinal Food*. 2020;23(2):101-13.
54. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, ve ark. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nature Medicine*. 2004;10(12):1344-51.
55. Stabler SN, Tejani AM, Huynh F, Fowkes C. Garlic for the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012(8):1-23.
56. Aydoğdu S, Güler K, Bayram F, Altun B, Derici Ü, Abacı A, ve ark. Türk Hipertansiyon Uzlaş Raporu. *Türk Kardiyol Dern Ars*. 2019;47(6):535-46.
57. Özpancar N. Hipertansiyonda Kanıta Dayalı Bakım Uygulamaları. *Turkish Journal of Cardiovascular Nursing*. 2016;7(1):2-11.
58. Aydoğdu A, Atlı T, Bayram F, Can AS, Cesur M, Eren MA, ve ark. Hipertansiyon Tanı ve Tedavi Kılavuzu: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği; 2022.
59. Öztürk Z. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesine başvuran hipertansiyon hastalarının bitkisel ürün kullanım alışkanlıkları [Yüksek Lisans Tezi]. Hatay: Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi; 2021.
60. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, ve ark. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *European Heart Journal*. 2018;39(33):3021-3104.
61. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, ve ark. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*. 2013;31(7):1281-1357.

62. Özer A. Türkiye'de NUTS TR 5 bölgesinde esansiyel hipertansiyon tedavisinde sosyal güvenlik kurumu açısından ilaç kullanımı ve tedavi maliyetinin retrospektif veri tabanı analizi [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2014.
63. Organization WH. Hypertension [Internet]. 2023 [11.09.2023]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>.
64. Tabassum N, Ahmad F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5(9):30-40.
65. Ried K, Fakler P. Potential of garlic (*Allium sativum*) in lowering high blood pressure: mechanisms of action and clinical relevance. *Integrated blood pressure control*. 2014;71-82.
66. Al-Disi SS, Anwar MA, Eid AH. Anti-hypertensive Herbs and their Mechanisms of Action: Part I. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;6:323.
67. Patten GS, Abeywardena MY, Bennett LE. Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin II Receptor Blocking, and Blood Pressure Lowering Bioactivity across Plant Families. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(2):181-214.
68. Edwards QT, Colquist S, Maradiegue A. What's Cooking with Garlic: Is This Complementary and Alternative Medicine for Hypertension? *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*. 2005;17(9):381-5.
69. Ali A, Kouvari M, Riaz S, Naumovski N, Liao L, Khan A, ve ark. Potential of *Allium sativum* in blood pressure control involves signaling pathways: A narrative review. *Food Frontiers*. 2023;4(4):1666-80.
70. Güney M, Kafkas S, Keles H, Aras S, Ercişli S. Characterization of hawthorn (*Crataegus* spp.) genotypes by SSR markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2018;24(6):1221-30.
71. Kamyab R, Namdar H, Torbati M, Ghojzadeh M, Araj-Khodaei M, Fazljou SMB. Medicinal Plants in the Treatment of Hypertension: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2021;11(4):601-17.
72. Cloud A, Vilcins D, McEwen B. The effect of hawthorn (*Crataegus* spp.) on blood pressure: a systematic review. *Advances in Integrative Medicine*. 2020;7(3):167-75.
73. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, ve ark. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3(5):337-52.
74. Leong X-F, Mustafa MR, Jaarin K. *Nigella sativa* and Its Protective Role in Oxidative Stress and Hypertension. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013(1):1-9.
75. Dehkordi FR, Kamkhah AF. Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2008;22(4):447-52.
76. Maideen NMP, Balasubramanian R, Ramanathan S. *Nigella Sativa* (Black Seeds), A Potential Herb for the Pharmacotherapeutic Management of Hypertension : A Review. *Current Cardiology Reviews*. 2021;17(4):1-7.
77. Dhanik J, Arya N, Nand V. A review on *Zingiber officinale*. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*. 2017;6(3):174-84.
78. Garza-Cadena C, Ortega-Rivera DM, Machorro-García G, Gonzalez-Zermeño EM, Homma-Deñas D, Plata-Gryl M, ve ark. A comprehensive review on Ginger (*Zingiber officinale*) as a potential source of nutraceuticals for food formulations: Towards the polishing of gingerol and other present biomolecules. *Food Chemistry*. 2023;413:1-15.

79. Micucci M, Bolchi C, Budriesi R, Cevenini M, Maroni L, Capozza S, ve ark. Antihypertensive phytocomplexes of proven efficacy and well-established use: Mode of action and individual characterization of the active constituents. *Phytochemistry*. 2020;170:112222.
80. Torabi M, Naeemzadeh F, Ebrahimi V, Taleschian-Tabrizi N, Pashazadeh F, Nazemie H. 133: The Effect of *Zingiber Officinale* (Ginger) on Hypertension; A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *BMJ Open*. 2017;7(Suppl 1).
81. Talaei B, Mozaffari KH, Bahreini S. The effect of ginger powder supplementation on blood pressure of patients with type 2 diabetes: A double-blind randomized clinical controlled trial. *Nutrition and Food Sciences Research*. 2014;1(Suppl. 1):254.
82. Sowbhagya HB. Chemistry, Technology, and Nutraceutical Functions of Celery (*Apium graveolens* L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014;54(3):389-98.
83. Yan J, Yang X, He L, Huang Z, Zhu M, Fan L, ve ark. Comprehensive Quality and Bioactive Constituent Analysis of Celery Juice Made from Different Cultivars. *Foods*. 2022;11(18):2719.
84. Rad MS, Moohebat M, Mohajeri SA. Effect of celery (*Apium graveolens*) seed extract on hypertension: A randomized, triple-blind, placebo-controlled, cross-over, clinical trial. *Phytotherapy Research*. 2022;36(7):2889-907.
85. Jabeen Q, Bashir S, Lyoussi B, Gilani AH. Coriander fruit exhibits gut modulatory, blood pressure lowering and diuretic activities. *Journal of ethnopharmacology*. 2009;122(1):123-30.
86. Mahleyuddin NN, Moshawih S, Ming LC, Zulkifly HH, Kifli N, Loy MJ, ve ark. *Coriandrum sativum* L.: A Review on Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Cardiovascular Benefits. *Molecules*. 2021;27(1):209.
87. Galavi A, Hosseinzadeh H, Razavi BM. The effects of *Allium cepa* L. (onion) and its active constituents on metabolic syndrome: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021;24(1):3-16.
88. Upadhyay RK. Nutraceutical, pharmaceutical and therapeutic uses of *Allium cepa*: A review. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*. 2016;10(1):1-19.
89. Marefati N, Ghorani V, Shakeri F, Boskabady M, Kianian F, Rezaee R, ve ark. A review of anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Allium cepa* and its main constituents. *Pharmaceutical Biology*. 2021;59(1):285-300.
90. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L.-A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*. 2014;165:424-43.
91. Jalalyazdi M, Ramezani J, Izadi-Moud A, Madani-Sani F, Shahlaei S, Ghiasi SS. Effect of *hibiscus sabdariffa* on blood pressure in patients with stage 1 hypertension. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2019;10(3):107-11.
92. Hopkins AL, Lamm MG, Funk JL, Ritenbaugh C. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: a comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*. 2013;85:84-94.
93. Harmili H, Fadlilah S, Sucipto A. Effectiveness of *hibiscus sabdariffa* on blood pressure of hypertension patients. *Jurnal Keperawatan Respati Yogyakarta*. 2021;8(2):99 - 102.

94. Mozaffari-Khosravi H, Jalali-Khanabadi B-A, Afkhami-Ardekani M, Fatehi F, Noori-Shadkam M. The effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on hypertension in patients with type II diabetes. *Journal of Human Hypertension*. 2008;23(1):48-54.
95. Ebrahimi F, Aryaeian N, Pahlavani N, Abbasi D, Hosseini AF, Fallah S, ve ark. The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) supplementation on blood pressure, and renal and liver function in patients with type 2 diabetes mellitus: A double-blinded, randomized clinical trial. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2019;9(4):322.
96. Zamani M, Zarei M, Nikbaf-Shandiz M, Gholami F, Hosseini AM, Nadery M, ve ark. The effects of saffron supplementation on cardiovascular risk factors in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9:1-47.
97. Imenshahidi M, Razavi BM, Faal A, Gholampoor A, Mousavi SM, Hosseinzadeh H. The effect of chronic administration of safranin on systolic blood pressure in rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2015;14(2):585.
98. Ghaffari S, Roshanravan N. Saffron; An updated review on biological properties with special focus on cardiovascular effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:21-7.
99. Hooshmand-Moghadam B, Eskandari M, Shabkhiz F, Mojtahedi S, Mahmoudi N. Saffron (*Crocus sativus* L.) in combination with resistance training reduced blood pressure in the elderly hypertensive men: A randomized controlled trial. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;87(8):3255-67.
100. Toma C-M, Imre S, Vari C-E, Muntean D-L, Tero-Vescan A. Ultrafiltration Method for Plasma Protein Binding Studies and Its Limitations. *Processes*. 2021;9(2):382.
101. Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2007;2(1):51-64.
102. Damre AA, Iyer KR. The Significance and Determination of Plasma Protein Binding. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. 2012.
103. Zhang J, Musson DG. Investigation of high-throughput ultrafiltration for the determination of an unbound compound in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*. 2006;843(1):47-56.
104. Zydney AL. Ultrafiltration. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000.
105. Kammakakam I, Lai Z. Next-generation ultrafiltration membranes: A review of material design, properties, recent progress, and challenges. *Chemosphere*. 2023;316:1-17.
106. Khan A, Ali J, Jamil SUU, Zahra N, Tayaba TB, Iqbal MJ, ve ark. Removal of micropollutants. *Environmental Micropollutants*. 2022.
107. Moslehiani A, Ismail AF, Matsuura T, Rahman MA, Goh PS. Recent Progresses of Ultrafiltration (UF) Membranes and Processes in Water Treatment. *Membrane Separation Principles and Applications*. 2019.
108. Baker RW. Membrane Separation. *Encyclopedia of Separation Science*. 2000.
109. Leegsma-Vogt G, Janle E, Ash SR, Venema K, Korf J. Utilization of in vivo ultrafiltration in biomedical research and clinical applications. *Life sciences*. 2003;73(16).
110. Hussain CM, Paulraj MS, Nuzhat S. Source reduction, waste minimization, and cleaner technologies. *Source Reduction and Waste Minimization*. 2022.
111. Cheryan M. Membrane Separations: Ultrafiltration. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2013.

112. Youcai Z. Physical and Chemical Treatment Processes for Leachate. Pollution Control Technology for Leachate from Municipal Solid Waste. 2018.
113. Pabby AK, Rizvi SSH, Requena AMS. Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications: CRC press; 2008.
114. Gao W, Liang H, Ma J, Han M, Chen Z-l, Han Z-s, ve ark. Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: A review. Desalination. 2011;272(1-3).
115. Aani SA, Mustafa TN, Hilal N. Ultrafiltration membranes for wastewater and water process engineering: A comprehensive statistical review over the past decade. Journal of Water Process Engineering. 2020;35:1-11.
116. Singh R. Introduction to Membrane Technology. Membrane Technology and Engineering for Water Purification. 2015.
117. Mohammad AW, Ng CY, Lim YP, Ng GH. Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control. Food and Bioprocess Technology. 2012;5(4):1143-56.
118. Lee EK, Koros WJ. Membranes, Synthetic, Applications. Encyclopedia of Physical Science and Technology. 2003.
119. Lutz H. Ultrafiltration: Fundamentals and Engineering. Comprehensive Membrane Science and Engineering. 2010.
120. Spivakov B, Shkinev V. Membrane Techniques: Ultrafiltration. Encyclopedia of Analytical Science: New York: Academic; 2005.
121. Barton P, Austin RP, Fessey RE. In Vitro Models for Plasma Binding and Tissue Storage. Comprehensive Medicinal Chemistry II. 2007;5:321-40.
122. Deventer HEv, Soldin SJ. The Expanding Role of Tandem Mass Spectrometry in Optimizing Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease. Advances in Clinical Chemistry. 2013;61:127-52.
123. Nilsson LB. The Bioanalytical Challenge of Determining Unbound Concentration and Protein Binding for Drugs. Bioanalysis. 2013;5(24).
124. Dasgupta A. Monitoring Free Drug Concentration: Clinical Usefulness and Analytical Challenges. Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring. 2016.
125. Boer Td, Meijering H. Equilibrium Dialysis, Ultracentrifugation, and Ultrafiltration in LC-MS Bioanalysis. Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis. 2019.
126. Musteata FM. Clinical utility of free drug monitoring. Therapeutic Drug Monitoring. 2024;107-32.
127. Curran RE, Claxton CRJ, Hutchison L, Harradine PJ, Martin IJ, Littlewood P. Control and Measurement of Plasma pH in Equilibrium Dialysis: Influence on Drug Plasma Protein Binding. Drug Metabolism and Disposition. 2011;39(3).
128. Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;97(10):4586-95.
129. Eriksson MAL, Gabrielsson J, Nilsson LB. Studies of drug binding to plasma proteins using a variant of equilibrium dialysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005;38(3):381-9.

130. Xu XS, Rose A, Demers R, Eley T, Ryan J, Stouffer B, ve ark. Quantitative Determination of Free/Bound Atazanavir Via High-Throughput Equilibrium Dialysis and LC-MS/MS, and The Application in Ex Vivo Samples. *Bioanalysis*. 2014;6(23).
131. Stienstra NA, Sikma MA, Dapperen ALv, Lange DWd, Maarseveen EMv. Development of a Simple and Rapid Method to Measure the Free Fraction of Tacrolimus in Plasma Using Ultrafiltration and LC-MS/MS. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2016;38(6).
132. Delavenne X, Montbel A, Hodin S, Zufferey P, Basset T. Quantification of total and unbound tranexamic acid in human plasma by ultrafiltration liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;91.
133. Larsen HS, Chin PK, Begg EJ, Jensen BP. Quantification of Total and Unbound Concentrations of Lorazepam, Oxazepam and Temazepam in Human Plasma by Ultrafiltration and LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2011;3(8).
134. Sheu M-T, Wu C-Y, Su C-Y, Ho H-O. Determination of total and unbound docetaxel in plasma by ultrafiltration and UPLC-MS/MS: application to pharmacokinetic studies. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
135. Saari TI, Fechner J, Ihmsen H, Schüttler J, Jeleazcov C. Analysis of total and unbound hydromorphone in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS: Application to clinical trial in patients undergoing open heart surgery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;71:63-70.
136. Berthoin K, Ampe E, Tulkens PM, Carryn S. Correlation between free and total vancomycin serum concentrations in patients treated for Gram-positive infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;34(6).
137. Eisenried A, Wehrfritz A, Ihmsen H, Schüttler J, Jeleazcov C. Determination of total and unbound propofol in patients during intensive care sedation by ultrafiltration and LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016;126:148-55.
138. Barrail A, Tiec CL, Paci-Bonaventure S, Furlan V, Vincent I, Taburet A-M. Determination of Amprenavir Total and Unbound Concentrations in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography and Ultrafiltration. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2006;28(1):89-94.
139. Illamola SM, Labat L, Benaboud S, Tubiana R, Warszawski J, Tréluyer JM, ve ark. Determination of total and unbound concentrations of lopinavir in plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods. *Journal of Chromatography B*. 2014;965:216-23.
140. Saari TI, Fechner J, Ihmsen H, Schüttler J, Jeleazcov C. Determination of total and unbound sufentanil in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS: Application to clinical pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;66:306-13.
141. Jensen BP, Chin PKL, Begg EJ. Quantification of total and free concentrations of R- and S-warfarin in human plasma by ultrafiltration and LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;401(7):2187-93.
142. Emekdaş G, Güngör S, Gün H, Kocabeyoğlu Ö. Chromatographic Methods. *European Journal of Therapeutics*. 1990;1(1):108–18.
143. Eser B, Dınçel AS. Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*. 2018;2(2):51 - 7.
144. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. 2016;3(2):156–60.

145. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis. 7 ed. United States of America: Cengage Learning; 2017.
146. Ravisankar P, Anusha S, Supriya K, Kumar UA. Fundamental chromatographic parameters. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2019;55(2):46-50.
147. Meyer VR. Chromatography: Principles. *Encyclopedia of Analytical Science* 2005. p. 98-105.
148. Ali AH. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry.* 2022;6(1):10-20.
149. Berruex LG, Freitag R. Separation and Purification of Biochemicals. *Encyclopedia of Physical Science and Technology.* 2003:651-73.
150. Sadapha P, Dhamak K. Review article on high-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2022;74(03):23-9.
151. Siddiqui MR, AlOthman ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry.* 2017;10:S1409-S1421.
152. Bhardwaj SK, Dwivedia K, Agarwala D. A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2015;5(4):76-81.
153. Vidushi Y, Meenakshi B. A review on HPLC method development and validation. *Res J Life Sci, Bioinform, Pharm Chem Sci.* 2017;2(6):178.
154. Dong MW. *Modern HPLC for Practicing Scientists*: John Wiley & Sons; 2006.
155. Czaplicki S. *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. Column Chromatography.* 2013.
156. Şenol Y. Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması tedavisinde nano-enkapsüle ilaçların etkinliğinin LC/Q-TOF MS ile gerçekleştirilen metabolomik ve lipidomik çalışmalarla in vitro değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2022.
157. Talay Ç. Metronidazol, mikonazol ve lidokain' in farmasötik preparattan aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin geliştirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2022.
158. Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2001;24(5-6):755-67.
159. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry.* 1996;68(9):305A-9A.
160. Shabir GA, Lough WJ, Arain SA, Bradshaw TK. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of liquid chromatography & related technologies.* 2007;30(3):311-33.
161. Reviewer Guidance: Validation of chromatographic methods. Food Drug Administration. 1994.
162. Administration FD. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2018 [28.01.2025]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
163. Alpar R. *Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik*: Nobel Yayın Dağıtım.

164. Yang D, Wang T, Long M, Li P. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020(1):1-13.
165. Singh SS, Mehta J. Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. *Journal of Chromatography B*. 2006;834(1-2):108-16.
166. Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, McLean MA. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2010;13(2):170-87.
167. Donthula S, Kumar MK, Teja GS, Kumar M, Janapati YK. A new validated RP-HPLC method for determination of rosuvastatin calcium in bulk and pharmaceutical dosage form. *Der Pharmacia Lettre*. 2011.
168. Beludari MI, Prakash KV, Mohan GK. RP-HPLC method for simultaneous estimation of rosuvastatin and ezetimibe from their combination tablet dosage form. *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2013;4(4):205-9.
169. Pandya CB, Channabasavaraj K, Chudasama JD, Mani T. Development and validation of RP-HPLC method for determination of rosuvastatin calcium in bulk and pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010;5(1):82-6.
170. Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Hill SJ, Giles PB, Phillips PJ, ve ark. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clinical therapeutics*. 2003;25(11):2822-35.

8. EKLER

EK 1. Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r = 0$).

2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \sqrt{\left[\frac{1 - r^2}{n - 2} \right]}$$

S_r : Korelasyon katsayısının standart hatası

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

4. Serbestlik derecesi = $n - 2$

5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. maddede bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.

6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p < 0.05$) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p > 0.05$).

EK 2. İstatistiksel Hesaplamalar

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\% BH)} = \frac{|\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}|}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

% Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm (SH \times t) \text{ veya } \bar{X} - SH < \mu < \bar{X} + SH$$

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

SH: Standart hata

t: Seçilen yanılma düzeyi (α) ile $n - 1$ serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer

EK 3. t-Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / [s\sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}]$$

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı, n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması, s_2 : 2. yöntemin standart sapması

$\bar{X}_1$: 1. yöntemin ortalaması, $\bar{X}_2$: 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi= $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.

2. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar:

a) Ortalamalar arasında fark yoktur ($t = \text{Hesaplanan değer}$, $p > 0.05$).

b) Ortalamalar arasında fark vardır ($t = \text{Hesaplanan değer}$, $p < 0.05$).

EK 4. Orjinallik Ekran Çıktısı

Yeni Görünüme git
Kerem Daştan
Kerem Dastan YL_revize
< 1/1 > ?

Eşleşmelere Genel Bakış

%12

12

↓

?

AI

--

1	openaccess.hacettepe...	%3	>
	Internet Kaynağı		
2	openaccess.hacettepe...	%2	>
	Internet Kaynağı		
3	nek.istanbul.edu.tr:4444	%1	>
	Internet Kaynağı		
4	acikbilim.yok.gov.tr	%1	>
	Internet Kaynağı		
5	www.openaccess.hace...	%1	>
	Internet Kaynağı		
6	Tejjo I. Saari, Jörg Fech...	%<1	>
	Yayın		
7	link.springer.com	%<1	>
	Internet Kaynağı		
8	www.mdpi.com	%<1	>
	Internet Kaynağı		
9	Kutucu, Tuğba. "Telmis...	%<1	>
	Yayın		

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ROSUVASTATİNİN KERSETİN VARLIĞINDA PLAZMA

PROTEİN BAĞLANMA KAPASİTESİNİN HPLC İLE

İNCELENMESİ

Ecz. Kerem DAŞTAN

Sayfa: 1 / 113

Kelime Sayısı: 21580

Salt-Metin Raporu

Yüksek Çözünürlük

Açık

EK 5. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Kerem Daştan
 Ödev başlığı: Kerem Daştan YL_v2
 Gönderi Başlığı: Kerem Dastan YL_revize
 Dosya adı: Kerem_Dastan_YL.docx
 Dosya boyutu: 1.18M
 Sayfa sayısı: 113
 Kelime sayısı: 21,580
 Karakter sayısı: 149,350
 Gönderim Tarihi: 29-Oca-2025 11:11ÖÖ (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2574331528



9. ÖZGEÇMİŞ

