

ANTİVİRAL TABLETTE ASİKLOVİR KONSANTRASYONUNUN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ÖLÇÜLMESİ

Haluk TESTERECİ¹ Hülya SAĞMANLIGİL² Ali ERTEKİN¹
Haluk DÜLGER¹ Tahir KAHRAMAN¹

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya -Fizyoloji Anabilim Dalı Van- TÜRKİYE
²Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı , Van - TÜRKİYE

Determination of Acyclovir Concentration in Antiviral Tablet by High Performance Liquid Chromatography

Summary : Acyclovir concentration of commercial preparation has been separated on C8 with 20 mM HClO₄ (pH 2.0) mobile phase containing no organic solvent. Acyclovir has been detected at excitation 260 nm and emission 375 nm against standard. Although differences among 6 tablets were found to be significant (p<0.001), no significances were observed among repetitions. Dilution of Acyclovir tablets was made based on the dose prescribed on the box. Mean acyclovir values of tablets has been found as 170.09ng/ml ±7.01 SE, 166.73ng/ml ± 4.01 SE, 145.2ng/ml ± 14.8 SE, 167.74ng/ml ± 7.6 SE, 58.29ng/ml ± 5.9 SE, 162.09ng/ml ± 2.3 SE . Recovery of acyclovir has been found as 94%. One tablet has the very low concentration and other 5 tablets have the significantly low concentration than prescribed dose on the box (p<0.05).

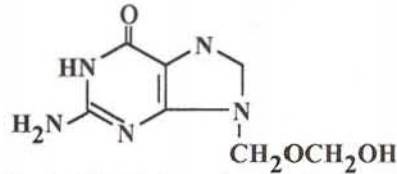
Key words: Acyclovir, Tablet, Dose, HPLC

Özet : Ticari preparatlarda asiklovir konsantrasyonları, C8 kolonu, organik çözücü içermeyen 20 mM HClO₄ (pH 2.0) mobil fazla ayrılmıştır. Asiklovir fluoresan detektörde emisyonu 260 nm ve eksitasyonu 375 nm'ye ayarlanarak standartlara karşı okundu. 6 tablet (T) arasında önemli bir farklılık olduğu tesbit edildiği halde (p<0.0001) , tekrarlar arasında farklılık görülmedi (p<0.24). Asiklovir tabletleri prospektüsteki miktara (200 ng/ml) göre su ile seyreltildi. Tabletlerin ortalama asiklovir değerleri 170.09ng/ml ±7.01 SE, 166.73ng/ml ± 4.01 SE, 145.2ng/ml ± 14.8 SE, 167.74ng/ml ± 7.6 SE, 58.29ng/ml ± 5.9 SE, 162.09ng/ml ± 2.3 SE olarak bulundu. Asiklovir geri alma oranı %94 bulundu. Bir tabletin diğerlerinden oldukça düşük dozda ve diğer 5 tabletinde kutusunda yazılan miktardan önemli düzeyde düşük dozda asiklovir içerdiği saptandı (p<0.05).

Anahtar kelimeler: Asiklovir, Tablet, Doz, HPLC

Giriş

Asiklovir (9-[(2-hydroxyethoxy)methyl] guanine) bir nükleosid derivatıdır ve antiviral potansiyele sahiptir. Özellikle herpes simplex virusu (HSV), varicella zoster virusu (VZV), epstein-Barr virusu (EBV), cytomegalovirus (CMV) ve human herpes virus 6 (HHV-6) na karşı etkili olduğu kaydedilmiştir (1,2,3,4). Aslında asiklovir ilk defa kansere karşı yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılan bir ilaç olması ve onun infectious mononucleosis, chronic hepatitis, papillomatosis, AIDS gibi hastalıklar içinde potansiyeli olabileceğinden bahsedilmesi bu ilacın son zamanlardaki önemini artırıcı niteliktedir (4).



Asiklovir'in antiviral etkisi hem viral DNA polimeraz enzimi için hem substrat hem de inhibitör olarak rol almasından kaynaklanmaktadır. Asiklovir'in asiklovir monofosfata dönüşmesinde viral veya hücrel timidin kinaz enziminin rolü vardır (4, 5, 6, 7).

Asiklovir'in farmakokinetik profilleri serum , plazma, idrar, serebrospinal sıvı, süt, akciğer, karaciğer, kalp, beyin, spinal kord, tükrük, göz yaşı vb de çıkarılmıştır (4). Son zamanlarda insan plazmasında asiklovir'in yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile fluoremetrik tayini bildirilmiştir (8, 9). Bildirilen bu çalışmada C18 (80x4 mm) kolonu kullanılmış ve mobile faz olarak 20 mM HClO₄ kullanılmış ve 3 dakika 20 mM HClO₄ - Asetonitril (55:45, v/v) temizleme safhası kullanılmıştır (8, 9, 10). Asiklovir preparatları göz, topikal, oral ve intravenöz yolla kullanılmak üzere satışa sunulmaktadır (4).

Bu çalışmada bir firmaya ait ticari preparatta asiklovir konsantrasyonunun tayini için sıvı kromatografi metodu laboratuvarımız şartlarına adapte edilerek yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Kimyasal maddeler: Asiklovir standardı (pharm-analyt No.2/89) Dr. H. Mascher (Pharm analyt labor GmbH, Austria) tarafından bu amaçla kullanılmak üzere hediye edilmiştir. Tüm çözücüler ve kimyasallar Sigma (ACS grade) den satın alınmıştır.

Mobil faz: 0.02 M HClO₄ distile su ile % 60 lık stok çözeltiden seyreltme ile hazırlanmıştır. Mobil fazın pH'ının 2.0 olduğu tesbit edilmiştir. Mobil faz her kullanımdan önce süzölmüş (Millipore, 0.45 µm) ve vakum altında çözölmüş gazlarından arındırılmıştır.

Kromatografik şartlar: LC-10AD model yüksek-performanslı sıvı kromatografi pompası (Shimadzu, Japan) mobil fazı izokratik olarak vermek üzere 1.5 ml /dakika akış hızında kullanılmıştır. 20 µl numuneler Rheodyne 7124 injection valve (20-µl loop) vasıtasıyla C8 kolonuna (150x4.6 mm) yüklenmiştir. Oda sıcaklığında ayrılan asiklovir RF-10A model spektrofotometrik detektör (Shimadzu, Japan) vasıtasıyla 260 nm de eksitasyona maruz bırakılıp, 376 nm de yaydığı emisyonu okumakla tanınabilmektedir.

Sonuçlar standarda göre C-R6A model Chromatopac integrator (Shimadzu) vasıtasıyla yükseklik ve alanlar ayrı ayrı hesaplanarak yapılmıştır.

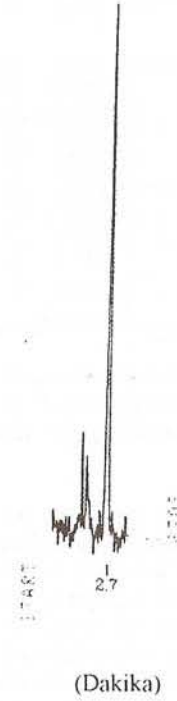
Standart ve numunelerin hazırlanması: Stok asiklovir standardı, 20 mg standard maddenin mobil fazda çözölmüşüyle hazırlandı. Çalışma standardı olan 300 ng/ml dozu yine mobil fazla yapılan su ile seyreltme yapılarak hazırlandı.

200 mg lık oral tablet olarak tanıtılan ticari preparatların, stok solüsyonlarının her biri 100 ml'lik mobil fazda eritildi. Bu stoktan 10 µl alınıp tekrar 100 ml'ye mobil faz ile sulandırıldı. Böylece numunelerde hesaplanan asiklovir sulandırma dozu 200 ng/ml olarak hesaplandı. 6 tablet'ten her biri 5'er defa sıvı kromatografisinde okundu.

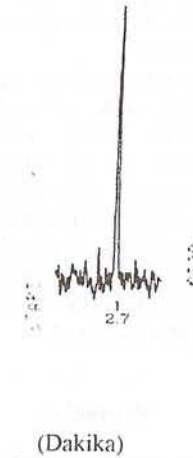
Tartışma ve Sonuç

Akış hızı 1.5 ml/dakika olarak ayarlandığında, asiklovir standartının tutulma zamanı (retention time) 2.7 dakika bulunmuştur (şekil 1). Asiklovir ihtiva eden tabletlerden elde edilen tam kromatogramlarda net asiklovir pikleri elde edildi (şekil 2).

Ekstraksiyon sırasında standardın geri alınmasındaki % 6 lık kayıp göz önünde bulundurularak numunelerde gerekli düzenlemeler yapıldı. Asiklovir içeren tabletlerde yapılan konsantrasyon tayini sonuçları SAS paket programında (11) Genel Linear Modeline (GLM) göre analiz edildi. Modelin genel ANOVA sonuçlarına göre tabletler arasında önemli bir farklılık olduğu tesbit edildiği halde (p<0.0001), tekrarlar arasında farklılık görülmedi (p<0.24). Duncan'ın Multiple Range testine (12) göre tabletler arası farklılık test edildi ve sonuç Tablo 1 de özetlenmiştir.



Şekil 1: Mobil fazda çözölmüş 300 ng/ml asiklovir standartının tam kromatogramı. Ayrılcma C8 kolonunda gerçekleştirilmiştir. Floresan detektörün eksitasyonu 260 nm ve emisyonu 375 nm ye ayarlanmıştır. Mobil faz 20 mM HClO₄ (pH:1.7) ve akış hızı 1.5 ml/dakikadır.



Şekil 2: Mobil fazda çözölmüş ve sulandırılmış 200 ng/ml. Doktor numunesi tabletin tamkromatogramı. Ayrılcma C8 kolonundagerçekleştirilmiştir. Floresan detektörün eksitasyonu 260 nm ve emisyonu 375 nm ye ayarlanmıştır. Mobil faz 20 mM HClO₄ (pH:1.7) ve akış hızı 1.5 ml/dakikadır.

Tablo 1. Tabletlerdeki ortalama asiklovir konsantrasyonları.

Numune	Ortalama Asiklovir* (X ng/ml±SE)
Tablet 1	170.09±7.01 ^a
Tablet 2	166.73±4.01 ^a
Tablet 3	145.2±14.8 ^a
Tablet 4	167.74±7.6 ^a
Tablet 5	58.29±5.9 ^b
Tablet 6	162.1±2.3 ^a
Standart	282.00±4.0

* a,b gibi birbirinden farklı harfleri taşıyan ortalama değerler en az p<0.05 seviyesinde birbirlerinden önemli ölçüde farklıdır.

Asiklovir ortalamaları için tablo 1 de verilen ölçülen değerler t-testi (12) ile tabletler hesaplanan $\mu_1=200$ ve standart $\mu_2=300$ 'e göre test edildi ve hepsinin en az p<0.05 seviyesinde farklılık gösterdiği bulundu.

Altı tablettten en az bir tanesinde ortalama 58.29 ng/ml± 5.9 SE' lik bir asiklovir değeri diğer tabletlerden farklılık göstermiştir. Tablo 1de açıkça diğer 5 tablet arasında önemli bir konsantrasyon farkı olmadığı görülmektedir. Ticari preparatların yaklaşık % 83 'ünün birbiri ile aynı oranda asiklovir dozu ihtiva etmektedir.

Tekrarlanan okumalar arasında önemli bir farklılık bulunamadı (p<0.24). Su ile seyreltme sonucu 300 ng/ml hesap edilen asiklovir 'in %94 lik bir geri alma ile ortalama 282.00ng/ml ± 4.0 SE olarak ölçülebilmektedir.

Tabletlerden yapılan su ile seyreltmeler 200 ng/ml hesaplanmış, fakat ölçülen gerçek değerleri tablo 1 de ortalama değer olarak verilmiştir. Bu su ile seyreltilen tabletler, hesaplanan değerlerinden önemli düzeyde düşük okunmuştur (p<0.05).

Tabletlerdeki okuma ve su ile seyreltme tekrarları arasında önemli bir fark olmamasına rağmen, laboratuvarlar arasında farklı okumalar olduğu bilinmektedir. Standartın % 94' lük bir oranla geri alınabilmesiyle, aynı oranda tabletlerden geri alındığı göz önünde bulundurulsa bile, yukarıda ticari tabletin 1/6 'i diğerlerinden oldukça düşük dozda olduğu ve diğer 5 tabletinde, üzerlerinde yazılan miktardan önemli ölçüde (p<0.05) düşük dozda (yaklaşık %72.6-85) asiklovir ihtiva ettikleri kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- 1.Keeney, R. E., Kirk, L. E and Bridgen D., (1982):Acyclovir tolerance in human. Ame. J. Medicine, 73, 176-181.
- 2.Corey, L., Bendetti J. K., Critchlow, C.W., Remington, M. R. Winter, C. A. Fahlander, A.L., Smith K., Salter D. L. Keeney R. E., Davis, L. G., Hintz M. A. and Holmes K.K.(1982): Double-Blind Controlled Trial of Topical

Acyclovir in Genital Herpes Virus Infections.Ame. J. Medicine, 73, 326-334.

3. Thin , R. N.,(1988): Management of Genital Herpes Simplex Infections, Ame. J. Medicine, 85, 3-6.

4. Wagstaff J. A., Faulds, D. and Goa, K. L.,(1994): Acyclovir: A reappraisal of its antiviral activity, Pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, Drugs, 47(1), 153-205.

5. Blum M. R., Liao, H. T. S and de Miranda, P.,(1982): Overview of Acyclovir Pharmacokinetic Disposition in Adults and Children. Ame. J. Medicine, 73, 106-192.

6.O'Brien, C. R.,(1989): Acyclovir, An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs, 37,233-309.

7.Gnann J. W., Barton, N. H. and Whitley, R. J.,(1983): Acyclovir Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Safety and Clinical Applications. Pharmacotherapy, 3, 275-283.

8. Mascher, H., Kikuta, C., Metz, R. and Vergin, H.,(1992): New, high-sensitivity high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma, using Fluorimetric detection. J. Chromatography, 583, 122-127.

9.Land, G., and Bye A.,(1981): Simple high performance liquid chromatographic method for the analysis of 9-[(2-hidroksiethoxy)methyl] guanine (acyclovir) in human plasma and urine. J. Chromatography, 224, 51-58.

10.Macka M., Borak J., Semenkova L., Popl, M. and Mikes, V.,(1993): Determination of acyclovir in blood serum and plasma by micellar liquid chromatography with fluorimetric detection . J. Chromatography, 16(11), 2359-2386,

11. SAS User's Guide.,(1985): Statistics, Ver. 5 Ed. SAS Institute Inc. Box 8000 Cary, North Carolina USA .

12. Cochran, W.G. and Cox, G.M.,(1950): Experimental Designs, John Wiley & Sons, New York, USA