



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**OPIYAT BAĞIMLILIĞI TEDAVİSİNDE KULLANILAN
BUPRENORFİN/NALOKSON KOMBİNASYONUNUN
ANALİZİ İÇİN YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Elif Pınar BAŞARIR

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPIYAT BAĞIMLILIĞI TEDAVİSİNDE KULLANILAN
BUPRENORFİN/NALOKSON KOMBİNASYONUNUN
ANALİZİ İÇİN YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ

Elif Pınar BAŞARIR

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunmakta olduğum “Opiyat Bağımlılığı Tedavisinde Kullanılan Buprenorfin/Nalokson Kombinasyonunun Analizi için Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi” başlıklı tezim; bilimsel etik ve ahlak ile diğer tüm değerlere uygun olarak tarafımda yazılmıştır. Tezin oluşturulmasıyla ilgili fikir tamamıyla tez danışmanıma ve bana aittir. Tezimde sunulan deneyler ve diğer çalışmalar tarafımda yapılmış olup, bütün analizler ve yorumlar tarafıma aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elif Pınar BAŞARIR

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı

Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Yüksek Lisans Programında

Elif Pınar BAŞARIR tarafından hazırlanan “Opiyat Bağımlılığı Tedavisinde Kullanılan Buprenorfin/Nalokson Kombinasyonunun Analizi için Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi
Danışman

Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Opiyatlar	2
1.2. Opioid Kullanım Bozukluğu (OUD)	3
1.2.1. Opioid Zehirlenmesi	6
1.2.2. Opiyat Bağımlılık Sendromu	7
1.2.3. Opiyat Yoksunluk Durumu	7
1.3. Opiyat Kullanım Bozukluğu Tedavisi	8
1.4. Buprenorfin/Nalokson Fizikokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri	11
1.4.1. Buprenorfin Özellikleri	11
1.4.2. Nalokson Özellikleri	16
1.5. Terapötik İlaç İzleme	24
1.6. Buprenorfin/Naloksonun Analizi için Kullanılan Yöntemler	25
2. GEREÇ ve YÖNTEM	28
2.1. Kromatografi	28
2.1.1. Gaz Kromatografi	29
2.1.2. Kolon Kromatografi	29
2.1.3. İnce Katman Kromatografisi	30
2.1.4. Kâğıt Kromatografisi	30
2.1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	31
2.2. Kullanılan Kimyasallar	31
2.3. Kullanılan Gereçler	33
2.4. Kullanılan Malzemeler	33
2.5. HPLC’de Kullanılan Kolonlar	34
2.6. Yöntem Optimizasyonu	36
2.7. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri	37
2.7.1. Özgüllük/Seçicilik	37
2.7.2. Doğruluk	37
2.7.3. Kesinlik	38
2.7.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı	38
2.7.5. Çalışma Aralığı	39
2.7.6. Doğrusallık	39
2.7.7. Sağlamlık	40
2.7.8. Stabilite	40
2.8. Plazma Hazırlığı	40

3. BULGULAR	41
3.1. HPLC Yöntem Optimizasyonu	41
3.1.1. Kolon Seçimi	41
3.1.2. Hareketli Faz Akış Optimizasyonu	43
3.1.3. Akış Hızı Optimizasyonu	44
3.1.4. Sıcaklık Optimizasyonu	45
3.1.5. Hareketli Faz İçin pH Optimizasyonu	47
3.1.6. İç Standart Çalışmaları	48
3.2. Sistem Uygunluk Testi Parametreleri	49
3.3. HPLC Yöntem Validasyonu	50
3.3.1. Doğruluk	50
3.3.2. Doğrusallık	51
3.3.3. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı	52
3.3.4. Sağlamlık	52
3.3.5. Stabilité	54
3.4. Plazma Çalışmaları	54
3.5. HPLC İçin Geliştirilen Yöntem	56
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	69

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması ile opiyat bağımlılıklarının tedavisinde kullanılan Buprenorfinin ve Naloksonun analizi için numune hazırlamada farklı teknikler kullanarak süreç için harcanan zamanın azaltılması hedeflenmiştir. HPLC için yeni nesil kolonlar kullanılarak hızlı, duyarlı ve hassas bir yöntem yardımıyla hassasiyeti yüksek ve düşük tayin limitlerine cevap veren, doğru ve tekrar edilebilir tamamen valide edilmiş bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem uluslararası validasyon standartlarına uygun olarak test edilmiş; doğruluğu, hassasiyeti ile aynı zamanda literatüre alternatif olarak hızlılığı da kanıtlanmıştır.

Yüksek lisans programına kabulümden tez çalışmalarımın sonuna kadar destek veren değerli hocam Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN'e,

Tez çalışmam süresince bana hep kolaylık sağlayan, sorunlara çözüm önerileriyle yaklaşan ve desteğini hep sürdüren değerli danışmanım Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ'a,

Tez çalışmamda benden desteğini esirgemeyen ve beraber çalışmaktan keyif aldığım Ceren H. BOZMAOĞLU'na,

Hayata başladığım ilk andan itibaren aldığım tüm eğitimlerde beni destekleyen aileme,

Beni hep izlediğini hissettiğim anneanneme,

Desteğinin, sevgisinin, şakalarının ve şarkılarının hayatımda hep olmasını istediğim sevgili Dr. Gözde KARABULUT'a,

Beni en az nane, dereotu veya mandalina kadar sevdiğini bildiğim küçük prensim TARÇIN'a,

teşekkürlerimi sunmak isterim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BSS	Bağıl standart sapma
BUP	Buprenorfin
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
DSM-V	Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın 5. Baskısı
ECD	Elektrokimyasal Dedektör
EMCDDA	Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICD	Uluslararası Hastalık Sınıflandırılması
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
LC	Sıvı Kromatografi
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Alt Sınırı
M	molar
µm	mikrometre
µL	mikrolitre
mg	miligram
mL	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
MOR	mu opioid reseptörleri

MS	Kütle Spektrometresi
NAL	Nalokson
N-BUP	Norbuprenorfin
nm	Nanometre
OD	Opioid Kullanım Bozukluğu
pH	Hidrojen İyon Derişimi
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SS	Standart Sapma
TDM	Terapötik İlaç İzleme
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
USP	Amerikan Farmakopesi
v/v	hacim/hacim (h/h)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Buprenorfinin kimyasal yapısı	12
Şekil 1.2. Buprenorfinin kimyasal yapısı ve metabolizması	14
Şekil 1.3. Naloksonun kimyasal yapısı	17
Şekil 1.4. Naloksonun kimyasal yapısı ve metabolizması	19
Şekil 2.1. Core-Shell yapısı ve tamamen gözenekli silika yapısı	35
Şekil 2.2. Kinetex EVO C18 ve Kinetex F5 kolon yapıları	36
Şekil 3.1. Kinetex EVO C18 kolon	42
Şekil 3.2. Kinetex F5 kolon	42
Şekil 3.3. Gradyent çalışmalara ait denemeler	44
Şekil 3.4. Akış hızı kromatogramları	45
Şekil 3.5. Sıcaklık kromatogramları	46
Şekil 3.6. pH denemelerine ilişkin kromatogramları	47
Şekil 3.7. İç standart uygulamalarına ilişkin kromatogram	48
Şekil 3.8. Buprenorfin kalibrasyon grafiği	51
Şekil 3.9. Nalokson kalibrasyon grafiği	52
Şekil 3.10. Ticari plazmada Buprenorfin kalibrasyon grafiği	55
Şekil 3.11. Ticari plazmada Nalokson kalibrasyon grafiği	55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Uyuşturucu Maddelerin Sınıflandırması	3
Çizelge 1.2. Buprenorfin, metadon ve naltrekson uygulamaları biçimleri	9
Çizelge 1.3. Klinik araştırmalarda ve buprenorfin/naloksonun pazarlama sonrası gözetiminde bildirilen tedaviyle ilişkili yan etkiler	22
Çizelge 1.4 Literatür çalışmaları	26
Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasallar	32
Çizelge 2.2. Kullanılan gereçler	33
Çizelge 2.3. Kullanılan malzemeler	34
Çizelge 2.4. Kullanılan kolonlar	35
Çizelge 3.1. Kolon denemeleri için parametreler	41
Çizelge 3.2. Gradyent Yöntem Parametrelerine ait Denemeler	43
Çizelge 3.3. Gradyent Yöntemde kullanılan sistem parametreleri	43
Çizelge 3.4. Akış hızı optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri	45
Çizelge 3.5. Kolon sıcaklığı optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri	46
Çizelge 3.6. pH optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri	47
Çizelge 3.7. Sistem parametreleri	48
Çizelge 3.8. Sistem Uygunluk Parametreleri	49
Çizelge 3.9. BUP verileri	50
Çizelge 3.10. NAL verileri	51
Çizelge 3.11. Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler	52
Çizelge 3.12. Akış hızı verileri	53
Çizelge 3.13. pH değerlerine ilişkin veriler	53
Çizelge 3.14. Sıcaklık verileri	53
Çizelge 3.15. Dalga boyuna ait veriler	53
Çizelge 3.16. Stabilite çalışmaları	54
Çizelge 3.17. Stabilite çalışmalarına ilişkin ortalama ve değişim değerleri	54
Çizelge 3.18. Yöntem parametreleri	56

1. GİRİŞ

Afyon kullanımında geçmişten günümüze, Sümerler, Mısırlılar ile birçok coğrafyada hüküm süren uygarlıklarda olduğu gibi Çin ve Hint uygarlıklarında da haşhaş ekim dikimi ile afyon üretimi ve afyondan yapılan ilaçlar hakkında yazıların ve kalıntıların bulunduğu dair izler görülmektedir. Dünya çapında klinik ortamlarda kullanılan 20'den fazla farklı opiyat vardır. Eroin, gelişmiş ülkelerde en sık kötüye kullanım ve bağımlılığa neden olan opiyat maddedir. Eroinden farklı opiyat bağımlılığı türleri ilacı tedavi programının bir parçası olarak kullanan kişiler, ilaca kolayca erişebilen sağlık uzmanları ve ilacı sağlayıcılardan ve tedavi merkezlerinden satın alan müşteriler ile oluşur (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2012).

Opiyat afyondan doğal yoldan türetilen bir ilacı ifade etmek için farmakolojide klasik olarak kullanılan bir terimdir.

Opioid beyindeki opioid reseptörlere (antagonistleri dahil olmak üzere) hem doğal hem sentetik olarak bağlanan tüm maddeleri ifade etmek için kullanılan modern bir terimdir.

Opioid kullanımının ilk ve en önemli tehlikesi, semptomları solunum problemleri, kalp yetmezliği, felç ve hatta ölümü içeren merkezi sinir sistemi baskılanmasıdır. Opioidlerle birlikte diğer merkezi sinir sistemi baskılayıcılarının (alkol, benzodiazepinler gibi) kullanımı, etkiyi önemli ölçüde artırır. Aşırı doz terimi, opioid maruziyeti solunum baskısı, morbidite veya mortalite ile sonuçlandığında meydana gelen zehirlenme olayını tanımlamak için kullanılmıştır.

Tüm uyuşturucu sınıfları arasında, eroin, bağımlılık yükümlülüğünde (tütünden sonra) ikinci sıradadır; eroin kullananların yaklaşık dörtte birinde ilaca bağımlılık gelişir ve bu açıdan hiçbir cinsiyet farkı yoktur (Anthony ve ark., 1994). Savaş ortamında daha yüksek kullanım oranları ve bağımlılığa geçişler tespit

edilmiştir (Robins, 1993); ve en yüksek düzeyde bağımlılık eroin enjekte edilmesi ile ilişkilidir (Gossop ve ark., 1992).

Eroin ve kokain gibi maddelere bağımlı olan birçok kişi, damar içi madde kullanımı nedeniyle HIV/AIDS, hepatitler, tüberküloz ve cinsel yolla bulaşan hastalıklar gibi riskler altındadır. Tedavi programları sırasında, bireyler HIV/AIDS, hepatit B ve C, tüberküloz ve diğer bulaşıcı hastalıklar konusunda değerlendirilmeli ve kendileri ve başkaları için risk oluşturabilecek durumları engellemek için danışmanlık hizmetleri almalıdır. Madde bağımlılığı tedavisi, bireyler ve toplum için bir hastalık önleme programıdır.

Günümüzde küresel bir problem haline geldiği belli olan opioid bağımlılığı tedavisinde özellikle Buprenorfin/Nalokson kombinasyonun dil altı hapi olan formunun kullanımı ön plana çıkmaktadır. Ancak kötüye kullanım ya da tedaviyi yarım bırakma gibi durumlar nedeniyle buprenorfinin ve naloksonun tayininde hızlı ve etkin bir analiz yönteminin geliştirilmesi önemlidir.

1.1. Opiyatlar

Opiyatlar, afyon haşhaşından elde edilen doğal ürünleri ve ondan türetilen sentetik bileşikler içeren bir uyuşturucu sınıfıdır. Opiyat terimi, afyon haşhaş bitkisinde doğal olarak bulunan narkotik opiyat alkaloid ürünlerin yanı sıra bunun birçok yarı sentetik kimyasal türevini tanımlar (EMCDDA, 2010). Eroine ek olarak, morfin, kodein, metadon, oksikodon ve fentanil gibi ilaçlar da bu terim altında yer almaktadır (Darke, 2011; King, 2009). Opiyatların da dahil olduğu uyuşturucu maddelere ilişkin genel sınıflandırma Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Uyuşturucu Maddelerin Sınıflandırması.

	Doğal	Sentetik
Merkezi Sinir Sistemini Yavaşlatanlar (Depresanlar)	Afyon, Morfin, Eroin, Kodein	Barbitüratlar, Trankilizanlar, Sedatifler
Merkezi Sinir Sistemini Uyarılar (Stimulanlar)	Koka yaprağı, Kokain, Crack	Amfetaminler
Halusinojenler	Esrar, Likit Esrar, Marihuana, Meskalin	LSD

Opiyatların başlıca klinik özelliklerinden biri analjezi oluşturmalarıdır. Opiyatlar normalde vücudun endojen opiyatı olan endorfin tarafından etkilenen bir grup nöro-alıcı için agonist görevi görmektedir (Berridge, 2009). Analjezi dışında, opiyatlar uyuşukluğa ve uykuya neden olmakta ve bir öfori ve ayrılma duygusu üretmektedir. Bu etkilerin başlangıcı çok hızlı olabilir. Eroin enjeksiyonu takiben kan-beyin bariyerini yaklaşık 20 saniye içinde hızla geçer. Bu hızlı metabolik aktivite, enjeksiyonun genellikle tercih edilen uygulama yolu olmasının ana nedenlerinden biridir ve sıcaklık ve zevk duygularını takiben sedasyon uzun bir süre devam etmektedir (Darke, 2011). Opiyatların klinik açıdan önemli olan başlıca olumsuz etkisi, merkezi sinir sistemi solunum depresanları olmalarıdır (Milroy, 2002). Ölüm genellikle solunum yetmezliğinden kaynaklanmaktadır, ancak miyokardiyal oksijen yoksunluğu nedeniyle kalp durması da meydana gelebilmektedir (Goodman ve Gilman, 1996).

1.2. Opioid Kullanım Bozukluğu (OUD)

Bilindiği üzere opioidler doğal, sentetik veya yarı sentetik olarak elde edilen ve beyindeki ilgili reseptörlere bağlanabilen tüm maddeleri kapsamaktadır. Opioidlerin zaman içinde uzun süreli ve tekrarlı olarak uygulanması (OUD-Opioid Use Disorder), nöronal yapı ve fonksiyon üzerinde kalıcı etkilere neden olur. Bu yaşamı tehdit eden kronik beyin hastalığı, aşırı doz, travma, intihar veya bulaşıcı hastalıklardan (örneğin, Hepatit C, HIV/AIDS) kaynaklanan erken ölümlerde önemli bir artışla ilişkilidir. Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın 5.

Baskısı (DSM-V), OUD'yi, klinik olarak önemli bir bozulma veya sıkıntıya neden olan sorunlu bir yanlış kullanım şekli olarak tanımlar.

DSM'ye göre OUD tanısını doğrulamak için 12 aylık bir süre zarfında aşağıda belirtilenlerden en az ikisinin gözlenmesi gerekir:

- 1) Opioidlerin genellikle amaçlanandan daha çok miktarlarda veya daha uzun bir süre zarfında kullanılması,
- 2) Opioid kullanımını azaltabilmek ya da kontrol altına alabilmek için yoğun bir çaba göstermek ve/veya bu çabaların başarısızlığa uğraması,
- 3) Opioid temin etmek ve/veya kullanmak ya da etkilerini bertaraf edebilmek için fazla zaman harcanması,
- 4) Opioid kullanmak için güçlü bir istek, özlem ve/veya dürtü duyulması,
- 5) Evde, iş yerinde veya okulda sorumluluklarını yerine getirememeyeyle sonuçlanan ve döngüsel olarak opioid kullanımının yinelenmesi,
- 6) Opioid kullanımının ve/veya etkilerinin sebep olduğu veya şiddetlendirdiği, toplumsal ya da bireyler arası sıkıntılara rağmen sürekli ya da yineleyici opioid kullanımı,
- 7) Opioid kullanımı sebebiyle bireyin hayatında önemli yer teşkil eden sosyal, mesleki veya eğlence faaliyetlerinden azaltılması veya tümüyle vazgeçilmesi,
- 8) Fiziksel olarak tehlike arz eden durumlarda bile yineleyen opioid kullanımı,

9) Büyük olasılıkla opioid kullanımının sebep olduğu veya arttırdığı kalıcı veya tekrarlayıcı bir fiziksel ve/veya psikolojik soruna sahip olunduğu bilinmesine rağmen kullanıma devam edilmesi.

10) Tolerans sergilenmesi;

a. İstenilen etkiyi sağlamak için (zehirlenme de dahil) belirgin bir şekilde artan oranlarda opioid ihtiyacı veya,

b. Sürekli aynı oranda opioid kullanmaya devam ederek etkinin belirgin şekilde azalması.

11) Geri çekilme sergilenmesi

Opioid yoksunluk sendromu için özellikle DSM-5 A ve B Kriterlerine başvurulmaktadır:

A. Bu maddede belirtilenlerden herhangi biri:

- Birkaç hafta veya daha uzun süreli opioid kullanımının kesilmesi veya azaltılması,
- Belirli bir kullanım süresinden sonra bir opioid antagonistinin alınması.

B. Bu maddede belirtilenlerden üçü (ya da daha fazlası), A. kriterinden birkaç dakika ila birkaç gün sonra gelişir: disforik ruh hali; mide bulantısı ya da kusma, kas ağrıları, esneme, uykusuzluk, pupiller genişleme, piloereksiyon, terleme, ishal ile ateş.

ODD, bilişsel-davranışçı terapi, acil durum planları, 12 adımlı programlar ve destek grupları gibi farmakolojik ve davranışa dayalı müdahalelerin bir kombinasyonu olan ilaç destekli tedavi kullanılarak etkin bir şekilde yönetilebilmektedir (Arroyo ve ark., 2020).

Opioid kullanımına bağı zihinsel ve davranışsal bozuklukların ICD-10 (Uluslararası Hastalık Sınıflandırmasının 10. Revizyonu) sınıflandırması, üç patolojik sendroma ayrılır: zehirlenme, bağımlılık sendromu ve yoksunluk durumu. Sendromların her biri için ayrıntılı tanı kriterleri aşağıda sunulmaktadır (Dünya Sağlık Örgütü [WHO], 1993).

1.2.1. Opioid Zehirlenmesi

Opioid zehirlenmesi, opioidlerin kullanımı veya yanlış kullanımı sonucu ortaya çıkan zararlı sonuçları ifade eder. ICD-10, tıbbi teşhisler için bir sınıflandırma sunmaktadır. ICD-10'a göre, opioid zehirlenmesi F11.0 kodu altında değerlendirilmektedir. ICD-10'a uygun olarak opioid zehirlenmesinin tanımı, aşağıdakileri içermelidir:

1) Yeterince yüksek doz seviyelerinde psikoaktif madde olduğuna dair açık kanıtlar bulunmalıdır.

2) Klinik öneme sahip bilinç, biliş, algı, duygulanım veya davranış düzeyinde rahatsızlıklar oluşturmaya yetecek şiddette sarhoşluk belirtileri veya bulguları bulunmalıdır.

3) Bu işaretler ve semptomlar başka bir klinik veya zihinsel duruma atfedilemez.

4) Apati, sedasyon, disinhibisyon, psikomotor gerilik, bozulmuş dikkat, bozulmuş muhakeme, kişisel işlevselliğe müdahaleden en az birinin varlığıyla kanıtlanan işlevsiz davranış olmalıdır.

5) Şiddetli akut opioid zehirlenmesinde, solunum depresyonu, hipotansiyon ve hipotermi ile uyuşukluk, geveleyerek konuşma, gözbebeği daralması, bilinç düzeyinde azalma gibi belirtilerden en az birinin olması gerekir.

1.2.2. Opiyat Bağımlılık Sendromu

Aşağıdaki belirtilerden üç veya daha fazlasının en az 1 ay boyunca birlikte olması veya 1 aydan daha uzun süre devam etmesi durumunda 12 aylık bir süre içinde tekrar tekrar birlikte olması ile tanımlanmaktadır.

1) Opiyat almak için güçlü bir istek veya zorlama hissi

2) Başlangıcı, sona ermesi veya kullanım seviyeleri açısından madde alma davranışını kontrol etme kapasitesinde bozukluk

3) Kullanım azaltıldığında veya kesildiğinde fizyolojik bir geri çekilme durumu veya yoksunluk semptomlarını hafifletmek veya bunlardan kaçınmak amacıyla aynı maddenin kullanımı

4) Belirgin etkide belirgin düşüşle birlikte miktarda artış (tolerans)

5) Maddenin etkilerini elde etmek, almak veya etkilerini azaltmak için daha fazla zaman harcanması (meşgul olma)

6) Zararlı sonuçlara dair açık kanıtlar olmasına rağmen ısrarlı opiyat kullanımı.

1.2.3. Opiyat Yoksunluk Durumu

1) Söz konusu maddenin tekrarlanan ve çoğunlukla uzun süreli ve/veya yüksek miktarlarda kullanımının ardından kullanımın son zamanlarda bırakıldığına veya azaldığına dair açık kanıtlar bulunması.

2) Yoksunluk halinin bilinen özellikleriyle uyumlu belirti ve bulgular. Opiyat yoksunluğu durumu için belirtilerden herhangi 3'ünün mevcut olması gerekir: opiyat

ilacı için aşıeme, burun akıntısı veya hapşıрма, göz yaşarması, kas ağrıları veya krampları, karın krampları, mide bulantısı veya kusma, ishal, pupiller genişleme, piloereksiyon, tekrarlayan titreme, taşikardi, hipertansiyon, esneme veya huzursuz uyku.

3) Bu işaretler ve semptomlar başka bir klinik veya zihinsel duruma atfedilemez.

1.3. Opiyat Kullanım Bozukluğu Tedavisi

Opiyat kullanım bozukluğu mortalite ve yüksek bir küresel hastalık yükü ile anılsa da yaygın, kronik, ancak tedavi edilebilir bir hastalıktır (Peacock ve ark., 2018). Opiyat kullanım bozukluğundaki artış ve opiyatla ilişkili doz aşımının küresel yaygınlığı, tedavi hizmetlerinin önceliklendirilmesini zorunlu hale getirmiştir (Marsden ve ark., 2019).

Bağımlılık tedavisinde güçlü bir motivasyon tedavi sürecini hızlandırmakla birlikte tedavi mutlaka gönüllülük esasına dayanmaz. Bazen ailenin, iş yerinin ve yasanın getirdiği zorunluluklar ve baskılar kişinin tedaviye girmesini, tedavide kalmasını ve tedavinin başarısını artırabilir. Bağımlı olan kişiler tedavi konusunda genellikle kararlı olmamaları nedeniyle tedavi için başvurduklarında mutlaka programa alınmalıdırlar. Tedavi, mutlaka kişinin gereksinimlerine uygun biçimde kişiye özel olarak planlanmalıdır.

Eğer tedavinin etkili ve başarılı olması isteniyorsa tedavi kişinin yalnızca madde kullanımına yönelik olmamalıdır. Madde kullanımı dışında ilgili tıbbi, psikolojik, sosyal ve yasal sorunlarına da yönelik girişimlerde bulunulmalıdır.

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2012 yılında yayınladığı Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı'na göre; hastalar tedavi süresince farklı tedavi yöntemlerine gerek duyacakları için tedavi sürekli olarak takip edilmelidir.

Danışmanlık veya psikoterapiye ek olarak bazen hastalar tıbbi tedavi, aile tedavisi, mesleki rehabilitasyona da gerek duyabilirler.

Tedavi etkinliğinde bir diğer önemli etmende tedavinin süresidir. Tedavinin süresi hastanın sorunlarına ve gereksinimlerine bağlıdır. Birçok hastanın tedaviyi erken bıraktığı göz önüne alındığında hastanın tedavide kalması konusunda ek yöntemler uygulanması gerekmektedir.

Terapiler hastanın motivasyonunu artırmaya, madde kullanma konusunda direnç gösterme becerileri geliştirmesine, madde kullandığı etkinliklerin yerine daha yapıcı etkinliklerde bulunmasını sağlamaya, sorun çözme becerilerini artırmaya yönelik olmalıdır. Ayrıca kişilerarası ilişkilerini aile ve toplum içinde işlevselliğini artıracak davranışçı tedavi yöntemleri de uygulanmalıdır.

İlaçlar, hastalar opioid kullanımını bıraktıktan sonra kendilerini daha rahat hissetmelerine yardımcı olmak için yoksunluk belirtilerini hafifletebilir. Opioid bağımlılığının tedavisi için FDA tarafından onaylanan üç ilaç vardır. Bunlar; buprenorfin, metadon ve naltreksondur. Bu ilaçların FDA tarafından önerilen uygulama biçimleri ve formları Çizelge 1.2’de gösterilmiştir. Bu tedavilerin üçünün de danışmanlık ve psikososyal destekle birlikte güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 1.2. Buprenorfin, metadon ve naltrekson uygulamaları biçimleri.

Uygulama Şekilleri	Buprenorfin	Metadon	Naltrekson
Dil altı tablet	✓		
Deri altı kullanım için enjeksiyon	✓		
Deri altı kullanım için implant	✓		
Oral formlar		✓	
Tablet		✓	
Uzun salınımlı kas içi enjeksiyonlar			✓

OD tedavisi için yukarıda bahsedilen ilaçlar üç grupta sınıflandırılabilir: tam agonistler, kısmi agonistler ve antagonistlerdir. Opioid reseptörleri, beyin, omurilik, deri ve mide-bağırsak boyunca dağılmış olarak bulunan G proteinine bağlı reseptörlerdir. Mu, kappa ve delta, beyin devreleri üzerinde ortak bir analjezik etkiye sahip opioid reseptör tipleridir. Eroine benzer metadon, mu opioid reseptörlerini (MOR) hedefleyen bir tam agonisttir. Buprenorfin gibi kısmi agonistler metadona alternatif olarak geliştirilmiştir. Buprenorfin MOR'ları diğer tam agonistler ile aynı derecede uyarmaz bu nedenle, buprenorfin metadon kullanan hastalar ile karşılaştırıldığında, solunum depresyonu ve öfori yaşama olasılığı daha düşüktür. Nalokson ve naltrekson, tüm opioid reseptörü alt tiplerini hedefleyen antagonistlerdir. Antagonistler opioid reseptörüne bağlanmak için agonistler ile rekabet eder ancak uyarmazlar bu nedenle, sedasyon, analjezi, solunum depresyonu ve öfori gibi farmakolojik etkilere neden olmazlar. Nalokson'un afinitesi MOR için en yüksektir ve opioid doz aşımı hastalarında solunum ve zihinsel depresyonu önlemek için kullanılır (Wang, 2019).

İdame tedavileri, aşırma ve yoksunluk semptomlarından kurtulma sağlar ve hastanın hayatlarının geri kalanında yasadışı olarak opiyat bulundurma ve kullanmadan kurtulmasına olanak tanır. Daha önce bağımlılık veya yoksunluk sendromu ile yaşanan tüm olumsuzluklar, artık denetimli, saf ve uzun etkili ikame ilacın günlük tek bir dozunun kullanılmasıyla azalmakta ve zamanla da ortadan kalkmaktadır (Darke, 2011). Stabilité sağlandıktan ve sürdürüldükten sonra opiyat idame dozu yavaş yavaş azaltılabilir ve stabil vakalarda tamamen kesilebilir.

Dil altı kullanılan buprenorfin (BUP; ayrıca nalokson ile 4:1 formülasyonu mevcuttur; BUP/NAL) içeren bir ilaç tedavisi kullanım bozukluğunun tedavisi için birinci basamak farmakoterapiyi oluşturur (WHO, 2009). Kullanım bozukluğunda ilaç tedavilerine uyan hastalarda opiyat kullanımının daha fazla baskılanması ve yoksunluk sürelerinin artması (Darke ve ark., 2007; Larance ve ark., 2015) ve opiyat aşırı doz riskinin azalmasıyla birlikte (White ve ark., 2015) nüksetme riskinde azalma (Tkacz ve ark., 2012) muhtemeldir.

Dilaltı tablet kombinasyonu 4:1 sabit doz oranında buprenorfin ve naloksondan oluşan formülasyonunun, opiyat bağımlılığının tedavisinde etkilidir. 4:1 sabit doz oranında buprenorfin ve nalokson içeren bir kombinasyon tableti (2 mg buprenorfin: 0,5 mg nalokson ve 8 mg buprenorfin:2 mg Nalokson), opiyat bağımlılığını tedavi etmek için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Buprenorfin opiyat bağımlılığı tedavisinde kullanımı Türkiye’de de 2010 yılında onaylanmıştır.

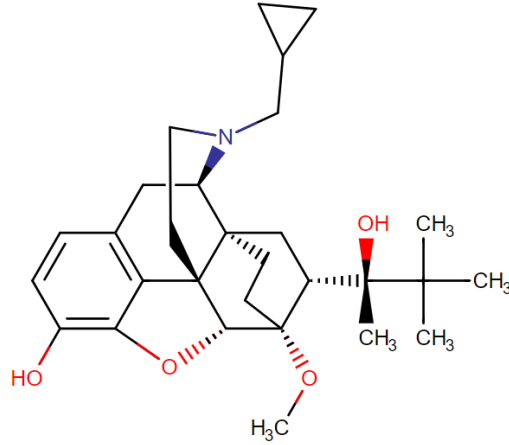
1.4. Buprenorfin/Nalokson Fizikokimyasal ve Farmakolojik Özellikleri

1.4.1. Buprenorfin Özellikleri

Buprenorfin, yüksek dozlarda güçlü opioidler gerektiren durumların tedavisi için onu tercih edilen bir ajan haline getiren bir dizi benzersiz farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahiptir.

Farmakolojik olarak BUP, opioid mu reseptörlerinde düşük içsel aktivite, yüksek afinite ve düşük ayrışma sabiti ile kısmi agonist aktivite sergiler. Bu özellikler tavan etkisinden dolayı etki süresinin ve güvenliğin uzamasına neden olur. Kappa reseptöründe, BUP minimal disfori ile bir antagonist gibi davranır, oysa delta reseptörlerinde hiçbir aktivitesi yoktur (Greenwald ve ark., 2003; Walsh ve ark., 1994).

Buprenorfin, kısmi bir mu-opioid reseptörü agonisti olarak görev yapar, ancak eroin, oksikodon veya metadon gibi diğer tam mu-opioid agonistlerine kıyasla daha düşük içsel aktiviteye sahiptir. Buprenorfin'in kimyasal formülü $C_{29}H_{41}NO_4$ ve ağırlığı 467,6 g/mol'dür. Kristal formda olup suda çözünürlüğü düşük ve 0,0168 mg/mL'dir. Avdeef ve ark. tarafından 1996 yılında yapılan araştırmada, buprenorfinin logP'si 4,98 ve 25°C’de pKa'sı 8,31'dir. Buprenorfin'in kimyasal yapısı Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Buprenorfinin kimyasal yapısı.

1.4.1.1. Emilim

Oral olarak uygulanan BUP, kapsamlı bir ilk geçiş etkisi ve yaklaşık %14 emilim oranı ile zayıf biyoyararlanıma sahiptir. Benzer şekilde, naloksonun oral biyoyararlanım oranı da %10'dur (Mendelson ve ark., 1997). Buna karşılık, BUP dil altı tabletinin biyoyararlanımı %28 ila %51 iken BUP'un dil altı solüsyonun plazmadaki biyoyararlanımı %49 ila %63'tür. BUP tabletlerinin veya solüsyonunun sürekli uygulanması biyoyararlanım verileri için 28 günde bir fark göstermez (Cowan, 2003).

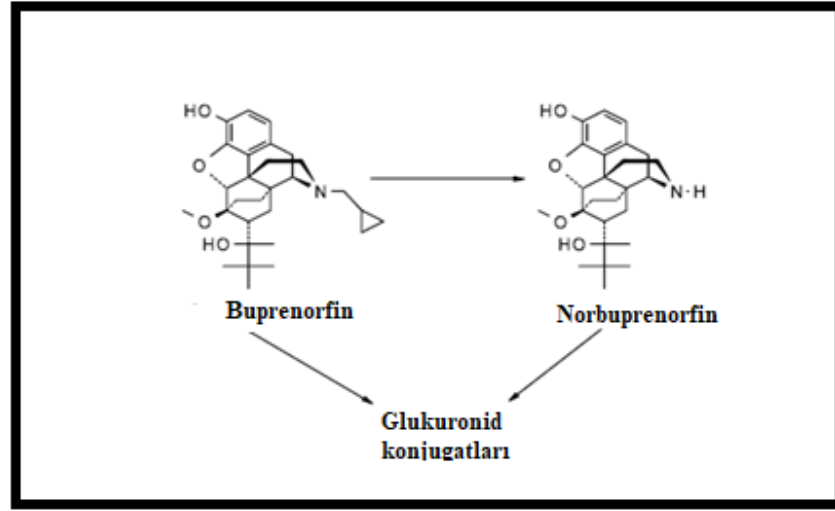
BUP'un plazmada maksimum veya tepe konsantrasyona ulaşması için geçen süre, uygulama yolu ve farmasötik dozaj formu ve formülasyonu ile ilgilidir. Bu tepe plazma konsantrasyonuna ulaşmak için rapor edilen süre dil altı tabletler için 45 dakikadır, çözelti için 30–90 dakika ve film formülasyonu için 40 dakikadır (Elkader ve Sproule, 2005). Tepe konsantrasyon, dozla orantısız olarak artar ve denekler arası büyük değişkenlik, doz ve konsantrasyon için doğru popülasyon tahminleri kurulamayabilir (Chiang ve Hawks, 2003). Gıda tüketimi ayrıca dil altı uygulamasını takiben BUP konsantrasyonunu da etkiler. Elkader ve Sproule (2005) yayınladıkları çalışmada, buprenorfinin fizyolojik pH değerinde hızlı dil altı

absorpsiyonu, ardından sistemik absorpsiyonun kıyasla daha geç olması opioid bağımlılığının tedavisinde faydalı bir uygulama yolu sağlar.

1.4.1.2. Metabolizma

Buprenorfin norbuprenorfine (N-BUP) geniş ölçüde karaciğerde metabolize edilir. Norbuprenorfin, buprenorfinin tahmini analjezik gücünün ellide biri olan aktif bir metabolittir. Bu nedenle, opioid bağımlılığının tedavisinde buprenorfinin genel terapötik etkinliğine katkısının düşük olduğu düşünülmektedir (Elkader ve Sproule, 2005). Karaciğerde, başlıca BUP için metabolik yol, sitokrom 3A4 (CYP 3A4) (%65) enzimidir, bunu CYP 2C8 (%30) takip etmektedir. BUP'un geri kalan %5'i CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 izoformları tarafından metabolize edilir. BUP'un metabolizması Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Bu metabolik yol göz önüne alındığında, karaciğer hastalığı teşhisi konan hastalarda karaciğer fonksiyonunun izlenmesi önemlidir. Aspartat aminotransferaz (AST) ve Alanin aminotransferaz (ALT) yüksekliği BUP alan hepatitli bireylerde başlangıç değerinin üç kat üzerinde vakalar bildirilmiştir (Pettry ve ark., 2000). Bu, viral olmayan hepatiti olan hastalar – muhtemelen alkol kullanımının neden olduğu veya diğer karaciğer fonksiyonunu etkilediği bilinen ajanlardan antipsikotik ve duyudurum dengeleyici kullananlar için özellikle önemlidir (Elkader ve Sproule, 2005; Micromedex, 2011).

Buprenorfin, glukuronidasyon ve N-dealkilasyon ile metabolize edilir, konjugatı norbuprenorfin oluşur. Sitokrom P450 (CYP) 3A4 N-dealkilasyon için birincil metabolize edici enzimdir. Buprenorfinin oral uygulamasından sonra gastrointestinal sistem ve karaciğerde düşük biyoyararlanım ile sonuçlanır.



Şekil 1.2. Buprenorfinin kimyasal yapısı ve metabolizması.

1.4.1.3. Eliminasyon

BUP'un eliminasyonu uygulama yoluna bağlıdır. Örneğin, ortalama bir yarı ömür intravenöz uygulama için 5,2 saat ve dil altı uygulama için 40 saat olarak bildirilmiştir (Elkader ve Sproule, 2005). Tek doz dil altı tablet ve 7 günlük uygulama sonucunda ortalama 20 saatlik bir yarı ömür bildirilmektedir (Ciraulo ve ark., 2006; Elkader ve Sproule, 2005). BUP ve N-BUP'un %30'a kadarı (%10 ila %30) böbrekler yoluyla idrar olarak atılır. Geri kalanı safra yoluyla serbest forma geri hidrolize edildiği bağırsak, ardından enterohepatik sirkülasyon ve fekal atılım ile atılır. Küçük örneklerle ve düşük doza dayalı mevcut raporlara istinaden intravenöz BUP uygulaması, böbrek hastalığı olan hastalar arasında BUP'un önemli bir fizyolojik etkisinin olmadığını göstermektedir (McAleer ve ark., 2003).

Parenteral veya oral uygulamadan sonra dozun çoğunluğu (%50-%70) dışkıyla atılır ve sadece %10-%30'u idrarla atılır. İdrardaki dozun sadece %1,0 ve %2,7'si değişmemiş olarak sırasıyla BUP ve N-BUP şeklinde atılır. Aksine, dozun yarısından fazlası dışkı içinde buprenorfinin konjuge olmayan formlarında (%5konjuge ve %33 konjuge olmayan) ve norbuprenorfin (%2 konjuge vs. %21 konjuge olmayan) vücuttan atıldığı rapor edilmiştir (Chiang ve Hawks, 2003).

BUP'un metaboliti olan N-BUP'a genel sistemik maruziyet, plazma konsantrasyonu/zaman eğrisi (AUC) altındaki alandan tahmin edilen, yaklaşık olarak buprenorfin için olana eşittir. Bununla birlikte, norbuprenorfine beyin maruziyetinin buprenorfine göre çok daha düşük olması beklenir çünkü norbuprenorfin çok polardır ve kan beyin bariyerini buprenorfin kadar kolay geçmez. Norbuprenorfin zayıf bir opiyat agonisti olduğundan ve içsel aktivitesi buprenorfine göre yaklaşık dörtte biri olduğundan, norbuprenorfinin buprenorfinin etkinliğine önemli ölçüde katkıda bulunmadığı varsayılabilir (Chiang ve Hawks, 2003).

İlaç-ilaç etkileşimi: BUP, CYP3A4'ün bir substratı ve güçlü bir inhibitörüdür ve CYP2D6'nın da güçlü inhibitörüdür (ancak ana substratı değil) (Micromedex, 2011). Bu nedenle; BUP, CYP3A4 ve CYP2D6 substratlarının metabolizmasını etkiler ve CYP3A4'ü indükleyen veya inhibe eden bileşiklerden etkilenir (Zhou ve ark., 2007). Bu nedenle, anti-retroviral ilaçlar antidepresanlar, duygudurum dengeleyici ajanlar ve antipsikotikler reçete edilirken dikkatli olunmalıdır. Aksine, BUP benzodiazepinler ve alkol ile farmakodinamik yoluyla ilaç-ilaç etkileşimi sergiler (Gossop ve ark., 2002; Nielsen ve ark., 2007).

BUP, monoterapi olarak (Orman ve Keating, 2009) ve nalokson ile kombinasyon halinde tıbbi gözetim altında opiyat bağımlılığı idame tedavisi sırasında yoksunlukta (detoksifikasyon) ve nüksetmeyi önlemede kullanılır.

1.4.1.4. Buprenorfin Dozu

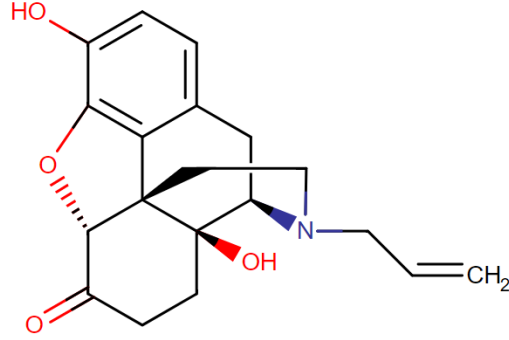
BUP farmakokinetiği ve etkililik çalışmalarında, BUP dozu 16mg/70kg ila 44 mg/70kg olarak incelenmiştir (Chawarski ve ark., 1999). Sağlıklı yetişkinlerde tavan farmakolojik etki gösteren maksimum günlük BUP dozu 32 mg'dır (Walsh ve ark.,1994). Bununla birlikte, BUP/NAL için önerilen maksimum günlük doz (Suboxone®) 24 mg'dır (Reckitt Benckiser, 2012).

21 gün boyunca 4-16 mg'lık günlük stabilize dozlarda alan katılımcılar %64,7'lik oranla daha yüksek idame tedavisi cevabı vermiş ancak 4 mg ile stabilize olan katılımcılarda ise bu oran %24,3'de kalmıştır (Schottenfeld ve ark., 1993). Sistematik bir incelemeye göre, 8-16 mg doz aralığı etkilidir, ancak idame tedavisi için genellikle 12-24 mg aralığı tercih edilir (Mattick ve ark., 2003).

BUP/NAL reçete bilgisine göre, tavsiye edilen sıklık tek bir günlük doz şeklindedir (Suboxone® PI, 2012). BUP'un farmakokinetiği ve farmakodinamik özellikleri göz önüne alındığında doz uygulaması daha düşük (günde bir defadan daha az) önerilmektedir (Orman ve Keating, 2009). 26 kişilik alternatif bir çalışmada günlük dozun değiştiği durumun da günlük dozlamaya eşit derecede etkili olduğu bulunmuştur. İlaç kullanımında, hasta bağlılığında, tedavi bağlılığında ya da yoksunluk belirtileri açısından hasta ve gözlemci değerlendirmesinde fark bulunmamıştır (Amass ve ark., 2000).

1.4.2. Nalokson Özellikleri

Nalokson, özellikle dünya çapında hızla önde gelen ölüm nedenlerinden biri haline gelen aşırı dozda uyuşturucu durumunda, opioid ilaçların etkilerini bloke etmek veya tersine çevirmek için kullanılan bir opioid antagonisti ilaçtır. Daha spesifik olarak, Nalokson, μ -opioid reseptörleri için yüksek bir afiniteye sahiptir ve burada bir ters agonist olarak etki ederek bu reseptörlere bağlı diğer ilaçların hızla uzaklaştırılmasına neden olur. Nalokson'un kimyasal formülü $C_{19}H_{21}NO_4$ ve ağırlığı 327,4 g/mol'dür. FDA tarafından suda çözünürlüğü onaylanmış olup logP'si 2,09'dur (Hansch ve ark., 1995). Nalokson hidroklorür azot üzerindeki proton ve fenolik proton nedeniyle iki tane pKa noktasına sahiptir. Kaufman ve ark. tarafından 1976 yılında yapılan çalışmalarda 20°C'de azot üzerindeki proton için (pKa1) 7,94 fenolik proton için (pKa2) ise 9,44 olarak bulunmuştur. Naloksonun kimyasal yapısı Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.3. Naloksonun kimyasal yapısı.

Nalokson (N-alilnoroksimorfon, N-allil-14-hidroksidihidro-nor-morfinon), eroin ve diğer opioidlerin etkilerine karşı koyan bir panzehirdir. NAL reseptör bölgelerini işgal etme yeteneklerini bloke ederek ve opioidlerin hali hazırda işgal ettiği reseptörleri yerinden ederek opioid agonistlerinin neden olduğu potansiyel olarak yaşamı tehdit eden herhangi bir solunum depresyonunu tersine çevirebilir. Nalokson spesifik bir opioid antagonistidir (Martin, 1976) ve her üç opioid reseptörü için afinitesi $\mu > \kappa \geq \delta$ dır (Rang ve ark., 2012). Afyon haşhaş bitkisinden elde edilen ve doğrudan etkisi olmayan alkaloid bir bileşen olan ve doğrudan terapötik kullanımı olmayan Tebainden yapılmış yarı sentetik bir antagonisttir (EMCDDA, 2016a). Naloksonun başlıca klinik kullanım amacı, opiyat aşırı dozunun neden olduğu solunum depresyonunu tedavi etmektir (Rang ve ark., 2012). Nalokson öfori etkisi olmadığı için suistimal potansiyeli yoktur (Brunton ve ark., 2010) ve sadece küçük bir yan etki oranı ile ilişkilendirilmektedir (Buajordet ve ark., 2004).

İlk opioid antagonisti olmasa da nalokson agonist etkileri olmayan ilk saf opioid antagonisti olarak kabul edilir (Martin, 1976; Rang ve ark., 2012). Bu nedenle, NAL öncülleri olan nalodein ve nalorfine kıyasla daha az yan etkiye sahip daha güvenli ve daha güçlü bir opioid antagonistidir.

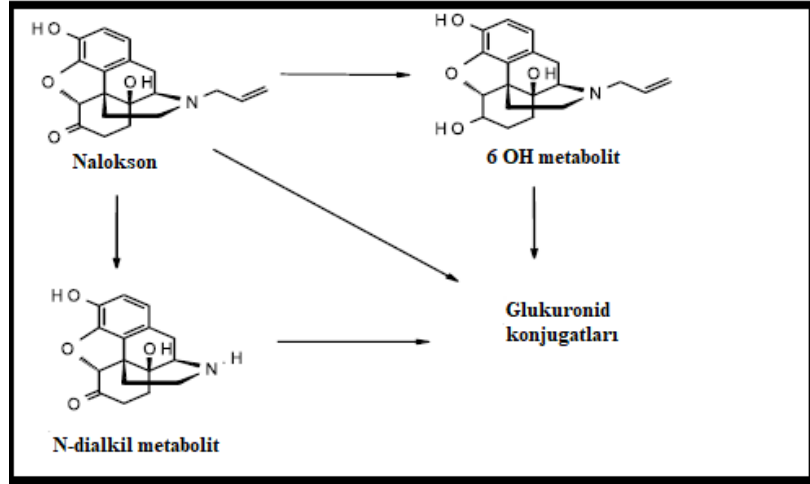
1.4.2.1. Emilim

Rang ve ark., tarafından 2012 yılında yaptıkları çalışma ile NAL oral kullanımdan sonra kolayca emiliyor gibi görünmektedir ancak çok küçük bir kısmı sistemik dolaşıma ulaşır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada, oral olarak uygulanan radyoaktif işaretli naloksonun yoğun ilk geçiş hepatik metabolizmasına maruz kaldığını bulmuştur (Fishman ve ark., 1973). Onun düşük biyoyararlanım oranı ($\leq \%2$), nalokson uygulaması için oral yolu güvenilir hale getirmektedir (Smith ve ark., 2012). Maksimum etkinlik için nalokson yutmayı ve ilk geçiş metabolizmasını atlayan bir yolla verilmelidir (Brunton ve ark., 2010). İntravenöz olarak verildiğinde, nalokson neredeyse en yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşmaktadır. Kas içine uygulandığında ise; pik plazma konsantrasyonu biraz gecikmektedir (yaklaşık 10-12dakika) (WHO, 2014).

1.4.2.2. Metabolizma

Nalokson karaciğere ulaştığında Şekil 1.4'de de gösterildiği gibi hızla iki metabolite; nalokson-3-glukuronid ve 6-alfa-naloksol metabolize olur. Aktif değilken, nalokson-3-glukuronid vücuttaki nalokson düzeylerini ölçerken bir belirteç olarak kullanılabilir (Smith ve ark., 2008). Kemirgenlerle (erkek wistar fareleri) yapılan bir çalışmada, naloksonun opioid yoksunluğunu hızlandırmak için 6-alfa-naloksoldan 65 kat daha güçlü olduğu bulundu (Schulteis ve ark., 2009). 6-alfanaloksol bu nedenle klinik olarak ilgili olarak kabul görmemiştir. Naloksonun yarı ömrü (yani nalokson plazma konsantrasyonunun yarıya düşmesi için geçecek süre) değişkendir ve 30-90 dk civarındadır (Green ve Simkins, 2016).

Nalokson, glukuronidasyon ile hızla metabolize edilir, N-dealkilasyonu ve 6-okso grubunun indirgenmesi, sırasıyla konjuge metabolitler, N-dealkillenmiş ve 6-OH'yi oluşturur. Son iki metabolit ayrıca glukuronik asit ile konjuge edilir ve idrarla atılımı hızlıdır (Chiang ve Hawks, 2003).



Şekil 1.4. Naloksonun kimyasal yapısı ve metabolizması.

Oral veya intravenöz bir dozdan sonra, naloksonun yaklaşık %25-40'ı 6 saat içinde, yaklaşık %50'si 24 saatte ve %60-70'i 72 saatte idrarda metabolitler olarak atılır (WHO/CEC, 1993).

Naloksonun kendi başına önemli bir etkisi yoktur. Bununla birlikte, nalokson uygulaması sırasında vücutta eğer opioidler mevcutsa, nalokson herhangi bir opioid kaynaklı etkiyi (solunum depresyonu ve bilinç azalması dahil) opioid reseptörlerinde opioid metabolitleri ile yarışarak ve yer değiştirerek hızla tersine çevirecektir. Solunum depresyonunun tersine çevrilmesi esas olarak mu-opioid reseptöründe gerçekleşir (Pazos ve Florez, 1984). Bu geri dönüşün boyutu, nalokson dozu ve uygulama yolu ile tüketilen opioidlerin dozu ve reseptör affinitelerine bağlı olmaktadır (EMCDDA, 2016a).

1.4.2.3. Eliminasyon

Nalokson yüksek oranda yağda çözünür (Rang ve ark., 2012). Nalokson emildikten sonra hızla vücutta dağılır ve kan-beyin bariyerini geçer (NIH, 2007a). Sıçanlarda yapılan deneysel bir çalışmada, NAL kan beyin bariyerini morfinden 8-10 kat daha hızlı geçmiştir. Yine yapılan çalışmada, morfin dozundan sonra aralıklarla

yapılan nalokson uygulaması, naloksonun beyne hala daha hızlı girdiğini göstermiştir (Fishman ve ark., 1975).

Naloksonun eliminasyon yarı ömrü belirtildiği gibi nispeten kısadır. Bu durum naloksonun birkaç saat içinde çoğunlukla vücuttan atıldığı anlamına gelmektedir. Naloksonun sistemdeki varlığı, karaciğer fonksiyonu ve alınan diğer ilaçlar gibi bireysel faktörlere bağlı olarak da değişiklik gösterebilmektedir.

Nalokson dağılımının opioid agonistlerinin mevcudiyeti ile tehlikeye girmediği gerçeği; opioid aşırı dozunun tersine çevrilmesi için naloksonun benzersiz uygunluğuna daha fazla destek sağlamıştır.

1.4.2.4. Nalokson Dozlaması

Nalokson rekabetçi bir antagonist olduğundan, spesifik bir opioidin etkilerini tersine çevirmek için gereken doz, opioid dozuna ve özellikle reseptör afinitesi ve etki süresi gibi farmakolojik özelliklerine bağlı olacaktır (Martin, 1976). Opioidlerin yarı ömürleri, 10 dakikadan kısa süre ile 24 saatten fazla süre arasında büyük değişkenlikler göstermektedir. Genel olarak, 0,4-0,8 mg nalokson enjeksiyonu opioid etkilerinin tersine çevrilmesini sağlayabilmektedir. Dozlama yönergeleri farklılık gösterse de, 2014 Dünya Sağlık Örgütü yönergeleri, bu parenteral doz aralığının çoğu vakada, 0,8 mg'ın üzerindeki ilk nalokson dozlarının belirgin yoksunluk belirtilerini ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur (WHO, 2014).

Buprenorfin/nalokson, buprenorfin oral uygulamayı takiben neredeyse tamamen ilk geçiş metabolizmasına uğradığından dilaltı olarak uygulanır. Dilaltı uygulamadan sonra, tablet genellikle 40 saniye içinde parçalanır (yani, çözünmeden önce belirli bir boyutta granüllere ayrılır) (tamamen kaybolması 5-10 dakika sürebilir), buprenorfinin pik plazma konsantrasyonu doz sonrası (C_{max}) $\approx$ 90 dakikaya ulaşır; Naloksonun plazma konsantrasyonları düşüktür ve hızla düşer (Heo ve Scott, 2018).

Suboxone®, buprenorfin-nalokson kombinasyonunun, opiyat bağımlılığını veya opiyatların etkilerini etkili bir şekilde tedavi ettiği ve gözle görülür olumsuz etkilerin olmadığı gösterilmiştir. Özellikle Suboxone için daha düşük kötüye kullanım potansiyeli ve güçlü güvenlik profili ve çok az solunum depresyonuna neden olduğu için opiyat bağımlılığı tedavisine başlamak için birinci basamak ilaç seçeneği olarak kabul edilir (Jones, 2004).

Suboxone tedavisinde bazı yan etkiler rapor edilmiştir. Uykusuzluk, baş ağrısı, kabızlık, mide bulantısı, en yaygın yan etkiler arasında görülmektedir. Yaygın görülenler arasında ise grip, enfeksiyon, faranjit, rinit, kaygı, depresyon, karın ağrısı, ishal, kusma, kaşıntı, döküntü, kas spazmları gibi örnekler mevcuttur (Degenhardt ve ark., 2014a). Bu yan etkiler Çizelge 1.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Klinik araştırmalarda ve buprenorfin/naloksonun pazarlama sonrası gözetiminde bildirilen tedaviyle ilişkili yan etkiler.

Sistem/Organ Sınıfı	Çok yaygın	Yaygın	Yaygın Olmayan	Bilinmeyen
Enfeksiyonlar ve enfestasyon		Grip, Enfeksiyon, Farenjit, Rinit	İdrar yolu enfeksiyonu, vajinal enfeksiyon	
Kan ve lenf sistemi bozuklukları			Anemi, lökositoz, lökopeni, lenfadenopati, trombositopeni	
Bağıışıklık sistemi bozuklukları			Aşırı duyarlılık	Anafilaktik şok
Metabolizma ve beslenme bozuklukları			İştah azalması, hiperglisemi, hiperlipidemi, hipoglisemi	
Psikolojik bozukluklar	Uykusuzluk hastalığı	Kaygı, Depresyon, Libido azalması, Sinirlilik, Sapkın düşünce	Anormal rüyalar, ilgisizlik, duyarsızlaşma, öforik ruh hali, düşmanlık	Halusinasyon
Simir sistemi bozuklukları	Başağrısı	Migren, Baş dönmesi, Hipertoni, Parestezi, Somnolans	Amnezi, Dikkat bozukluğu, hiperkinezi, Nöbetler, Konuşma bozukluğu, titreme	Hepatik ensefalopati, senkop
Göz bozuklukları		Ambliyopi, gözyaşı bozukluğu	konjonktivit, miyoz, bulanık görüş	
Kulak ve labirent bozuklukları				Vertigo

Çizelge 1.3. Klinik araştırmalarda ve buprenorfin/naloksonun pazarlama sonrası gözetiminde bildirilen tedaviyle ilişkili yan etkiler (devam).

Kardiyak bozukluklar		Miyokardiyal enfarktüs, çarpıntı, taşikardi	
Vasküler bozukluklar		hipotansiyon	Ortostatik hipotansiyon
Solunum, göğüs ve mediastinal bozukluklar		Astım, esneme	bronkospazm, solunum depresyonu
Gastrointestinal bozukluklar	Kabızlık, Mide bulantısı	Ağız ülseri, ağız ödemi, ağız ağrısı, dil rengi değişikliği	Dil iltihabı
Hepatobilyer bozukluklar		Karın ağrısı, İshal, dispepsi, Şişkinlik, Oral mukozal eritem, Kusma	
Deri ve deri altı doku bozuklukları	hiperhidroz	Anormal Karaciğer fonksiyonu	Hepatit, akut hepatit, sarılık, karaciğer nekrozu
Kas,iskelet, bağ doku bozuklukları		kaşıntı, Döküntü, Ürtiker	anjyovödem
Böbrek ve idrar bozuklukları		Sırt ağrısı,artralji, Kas spazmları, miyalji	
Üreme sistemi ve meme bozuklukları		idrar anormallığı	
Genel bozukluklar ve uygulama yeri koşulları	İlaç yoksunluğu sendromu	albüminüri, dizüri, hematüri, nefrolitiazis, idrar retansiyonu	
İncelemeler		Erektile disfonksiyon	
Yaralanma, zehirlenme ve prosedürel komplikasyonlar		Asteni, Göğüs ağrısı, Titreme, pireksi, Kırgınlık, Ağrı, periferik ödem	Yemidoğan yoksunluk sendromu
		anormal Karaciğer fonksiyon testi, Ağırılık azalışı	Transaminaz artışı
		Yaralanma	Kalp krizi, zehirlenme

* İngiliz elektronik ilaç özetinden derlenmiştir (2023).

1.5. Terapötik İlaç İzleme

Terapötik İlaç İzleme (TDM), hasta merkezli ve tedavi sonuçlarını optimize etmek için ilaç kan konsantrasyonlarının miktarının belirlenmesini ve yorumlanmasını içerir (Hiemke ve ark., 2017). Nöropsikiyatri sonuçlarını iyileştirmek için anti-epileptiklerde (Stepanova ve Beran, 2015), antipsikotiklerde (Patteet ve ark., 2012), duygudurum dengeleyicilerde (Collins ve ark., 2010) ve ilaç-ilaç etkileşimlerinin izlenmesinde (Paulzen ve ark., 2016) uygulanmaktadır.

TDM, Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından psikiyatrik bozuklukların yönetiminde bir araç olarak kabul edilmektedir ancak henüz hasta yönetimine ilişkin klinik kılavuzlar açısından TDM kullanımı eksiktir (Hiemke ve ark., 2017). TDM'nin klinik uygulamaları şunları içerir; negatif olayların yönetilmesi, tedavi yanıtının optimize edilmesi, ilaç-ilaç etkileşimleri ve bağımlılığın izlenmesidir.

Brunen ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, bağımlılık tedavisinde kullanılan ve mu opioid reseptöründe kısmi agonist aktiviteye sahip yarı sentetik bir opioid olan Buprenorfinin TDM için önemli olduğu tespit edilen ilk özellik; buprenorfinin doğrusal olmayan farmakokinetiği ve sitokrom P450 (CYP) 3A4 substratları ve indükleyicileri ile olası yaygın farmakokinetik etkileşimleridir. Etkililik özellikleri için hiçbir vekil belirteç tanımlanmamıştır. Farmakodinamik açıdan, etkinlik ve ilaç konsantrasyonu arasındaki ilişki, eroine bağımlı hastalarda yoksunluk belirtileriyle ters bir ilişki gösterir ve yoksunluk belirtilerinden kaçınmanın en az 0,8 ng/mL plazma konsantrasyonları gerektirdiği gösterilmiştir. 4 mg/gün ortalama terapötik doz için beklenen plazma konsantrasyonları 0,7 ila 1,6 ng/mL'dir (Chawarski ve ark., 1999). Buprenorfinin, nonopioid kullananlarda kardiyojenik etkileri nedeniyle dar bir terapötik aralığı vardır, ancak idame tedavisinde tolerans gelişiminin bir sonucu olarak 40 kata kadar daha yüksek dozlar gerekebilir.

TDM'yi uygulamak için, tespit yapan ve hedef analitin miktarını doğru bir şekilde belirleyen bir laboratuvar testi zorunludur. BUP tespiti ve miktar tayini, bireysel varyasyonları yansıtan konsantrasyonlarda geniş bir yelpazede yüksek hassasiyet, doğruluk ve seçicilik gerektirir. İdrarda BUP ve N-BUP miktar tayini BUP klerensi idrarda düzensiz olduğundan ve toplam BUP'un %30'undan daha azını açıkladığından idrar doğru olmayabilir. Buna karşılık, BUP kanda lineer kinetik gösterir ve zirve ve dip konsantrasyonlarına ulaşmak için belirlenmiş referans zaman aralığı bulunmaktadır (Elkader ve Sproule, 2005). Toplam kanın yerine plazma veya serum kullanılmasına ilişkin bir saptama yoktur (Hiemke ve ark., 2017). Bu nedenle, plazma veya serum (bir saç gibi karmaşık matris yerine) tercih edilen biyolojik matristir, çünkü diğer girişim yapan matrislerle ilişkisinin az olduğu bildirilmiştir (Marque ve Kintz, 2004).

Dil altı buprenorfin/nalokson, idame tedavisine uyumun izlenmesi için ilaç izlemesi (TDM) de önerilmektedir. Bu yüzden yenilikçi analiz yöntemlerinin geliştirilmesi de büyük önem arz etmektedir.

1.6. Buprenorfin/Naloksonun Analizi için Kullanılan Yöntemler

Literatür araştırmaları BUP/NAL kombinasyonunun analitik yöntemlerle tayininde sıklıkla gaz kromatografi (GC), sıvı kromatografi (LC) ve kütle spektrometrisi (MS) gibi kromatografik yöntemlerin kullanıldığını göstermiştir. Bu çalışmalar arasında sıçan tam kanında LC-MS/MS (Cohier ve ark.,2020), insan plazmasında LC-MS/MS ve LC-ECD (Liu ve ark., 2016, Moody ve ark., 2002, Somaini ve ark., 2011), insan tam kanda UHPLC-HRMS (Feliu ve ark., 2020) ve insan idrarında GC-MS (Gervais ve Hobbs, 2016; Fuller, 2008) gibi biyolojik numune analizlerinin dışında farmasötik tabletlerde RP-HPLC (Mostafavi ve ark., 2009) araştırmalar gerçekleştirilmiştir. 2020 yılında 15 kişi üzerinde BUP standart çözeltisi ile yapılan bir çalışmada plazmada geri kazanım ölçülmüş ve teşhis ve tayin sınırları (LOD) ve (LOQ) sırasıyla 0,02 ve 0,069 ng/mL olarak hesaplanmıştır (Elarabi ve ark., 2020). Bu çalışmalara ilişkin detaylı açıklamalar Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Literatür çalışmaları.

Numune türü	Cihaz	Ön hazırlık yöntemi	Kolon	Hareketli Faz	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Referans
Sıçan tam kanı	LC-MS/MS	Asetonitril ile protein çöktürme	Raptor biphenyl core-shell (100 mm, 3 mm, 2,7 µm)	0,25 mM sulu ammonyum format ile %0,1 formik asit ve metanol	BPN: 1,4 N-BPN: 0,5 BPN- glu: 1,1 N-BPN- glu:0,4 NAL: 0,4 NAL-glu:17,5	BPN: 6,9 N-BPN: 6,2 BPN- glu: 3,6 N-BPN- glu:3,3 NAL: 1,3 NAL-glu:57,7	Cohier ve ark., 2020
İnsan plazması	LC-MS/MS	Sıvı-sıvı ekstraksiyon	YMC ODS-AQ (2,0, 50 mm, 3 µm)	0,1% formik asit su ile ve asetonitril %0,1 formik asit ile		BPN: 0,1 N-BPN:0,1 NAL: 0,1 (LLOQ değerleri verilmiştir)	Moody ve ark., 2002
Tam kan	UHPLC-HRMS	Sıvı-sıvı ekstraksiyon	UHPLC Waters Acquity HSS T3 (50mm, 2,1 mm, 1,8 µm)	Su ile formik asit 0,1% (h/h) ve asetonitril ile formik asit 0,1% (h/h)	BPN: 0,15 N-BPN:0,1 MTD: 0,5 NAL: 0,5	BPN: 0,39 N-BPN:0,2 MTD: 0,98 NAL: 0,98 (LLOQ değerleri verilmiştir)	Feliu ve ark, 2020
Farmasötik tablet	RP-HPLC		Perfectsil Target ODS3 (150mm, 4,6mm, 5µm)	Ortofosforik asit ve asetonitril (17:83, h/h)	NAL: 0,01 NOX: 0,01 BPN: 0,02	NAL: 0,1 NOX: 0,1 BPN: 0,22	Mostafavi ve ark., 2009
İnsan plazması	LC-ECD	Katı faz ekstraksiyonu	Discovery cyano (250 mm, 3,0 mm, 5 µm)	(40:60, h/h) asetonitril ve 2,5 mM, pH 6,4 fosfat tampon	BPN: 0,08 N-BPN:0,08 MTD: 0,90 NAL: 0,4	BPN: 0,25 N-BPN:0,25 MTD: 3,0 NAL: 0,13	Somai ve ark., 2011
İnsan plazması	LC-MS	Sıvı-sıvı ekstraksiyonu	Imtakt Unison UK-C18 (2,1, 50 mm, 3 µm)	2 mM ammonyum bikarbonat (suda) (pH 7,9) ve 5 mM ammonyum bikarbonat (metanolde).		BPN: 0,02 N-BPN: 0,02 NAL:0,001 (LLOQ değerleri verilmiştir)	Liu ve ark., 2016
İnsan İdrarı	GC-MS	Katı faz ekstraksiyonu	ZB-5MS (15 m, 250 µm, 0,25 µm)	Taşıyıcı gaz, 1,0 mL/dakikalık sabit bir akışla He gazıdır.	BPN: 2,3 N-BPN:2,3	BPN: 2,3 N-BPN:2,3	Gervais ve Hobbs,2016
İnsan İdrarı	GC-MS	Sıvı-sıvı ekstraksiyon	HP-1 (12 m, 0,2 mm, 0,33 µm)	1 mL pH 5 asetat tamponu ve 100 µL ham β-glukuronidaz (Helix pomatia) çözeltisi.	BUP: 0,5 N-BUP: 1	BUP: 1 N-BUP: 2	Fuller, 2008

İlgili literatür incelendiğinde; BUP ve NAL tayininde çeşitli analitik yöntemlerin mevcut ancak oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu tez çalışması ile HPLC için yeni nesil kolonlar kullanılarak hızlı, duyarlı ve hassas bir yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen bu yöntemle Buprenorfinin ve Naloksonun kromatografik olarak incelenmesi ve aynı zamanda geliştirilen yöntemin uluslararası geçerliliğinin gösterilmesi için validasyonun yapılması da amaçlanmaktadır. Bunlara ilave olarak organik çözücü tüketiminin azaltılması toksisitesi yüksek bir ürünün mümkün olan en az düzeyde kullanımı ile yeşil gündem çerçevesinde sürdürülebilir çevreci (yeşil) kimya pratiklerine imkân vererek çevre kirliliğinin azaltılmasına katkıda bulunacaktır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki iki veya daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir fazın yardımıyla bir sabit (durağan) faz arasında farklı hızlarda hareketine dayanır. Kromatografik yöntemler ile çok yakın kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip bileşenlerden oluşan karışımları tamamen, kolay ve kısa sürede ayırmak mümkündür.

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerini polarite, kaynama noktası, çözünürlük, boyut, yük ve yapı gibi fiziksel özelliklerine göre ayırmak, ölçmek veya saflaştırmak için kullanılan bir tekniktir. Kromatografide hareketli ve sabit olmak üzere iki faz vardır. Karışımın bileşenleri, sabit faza adsorpsiyon veya bağlanma ve hareketli faz veya gaz durumunda çözünürlük gibi iki faz ile etkileşim güçlerindeki farklılıklardan yararlanılarak ayrılır.

Kromatografinin temel hedefi, numune içerisindeki analitlerin ayrılarak ölçülmesidir. Bu yöntem, analitlerin sabit bir faz üzerinde hareketli bir faz yardımıyla farklı hızlarda hareket ettirilmesi veya sürüklenmesi prensibine dayanmaktadır (Eser ve Dinçel, 2018).

Tıbbi laboratuvarlardan ilaç endüstrisine, gıdadan veterinerlik, tarım, kimya, endüstri ve birçok farklı sektörlerde çok geniş bir kullanım alanı bulunan kromatografi ölçme, ayırma, saflaştırma ve arındırma gibi çeşitli hedeflere hizmet etmek için kullanılır.

Kromatografinin ana amacı yukarıda da bahsedildiği üzere; hedeflenen numunenin ayrımı ve miktarının ölçümüdür. Bu yöntem, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Çözücü hareketlidir ve temel olarak incelenen

karışımı sabit ortam boyunca taşır. Hareketli ya da taşıyıcı faz değişik kromatografi tekniklerine göre sıvıdan gaza kadar, sabit faz da selüloz kağıdından kapiller cam tüplere kadar farklı bir dizi materyalden olabilmektedir.

2.1.1. Gaz Kromatografi

Gaz kromatografi, uçucu malzemeleri kaynama noktalarına ve polaritelerine ve aletin hareketli ve sabit fazlarıyla etkileşimlerine göre ayırmak için kullanılan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Hareketli faz, numuneyi kromatografi kolonunda hareket ettirmek için kullanılan argon, helyum veya nitrojen gibi inert bir gazdır. Gazın akışını kontrol etmek ve ölçmek için gaz basınç göstergeleri, akış ölçerler ve düzenleyiciler kullanılır. Sabit faz, diatomlu toprak gibi inert bir katı üzerinde hareketsiz hale getirilmiş, yüksek kaynama noktasına sahip bir polimer veya mum gibi bir adsorbe edici sıvı içeren ince borulardan oluşan bir kolondur. Bu teknik aynı zamanda gaz-sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır çünkü bir inert katı sabit fazın yüzeyinde hareketsizleştirilmiş gazlı bir hareketli faz ve sıvı kullanılır (Eser ve Dinçel, 2018).

Gaz kromatografi, sıvı ve gaz fazındaki seyreltik numuneler için kullanılabilir. Katılar, uygun bir çözücü içinde çözülmeli ve enjeksiyondan önce filtre edilmelidir. Bazı numunelerin, enjeksiyondan önce uçuculuklarını artırmak için türevlendirilmesi gerekebilir.

2.1.2. Kolon Kromatografi

Kolon kromatografisi, bir tür sıvı kromatografidir (LC). Kolon kromatografisinde, sabit faz, bir ucunda bir filtre veya fiber (örneğin pamuk, yün veya cam) tıpa ve vana ile donatılmış bir plastik veya cam tüp gibi katı bir destek içinde bulunur. Sabit faz tabanı oluşturulduktan sonra, tampon üstten pipetlenir veya anahtarlı musluk açılarak çok yavaş bir şekilde serbest bırakılır. Sütun, istenen yüksekliğe ulaşıncaya veya tüpte sadece yaklaşık 1-5 cm boşluk kalana kadar sabit

faz ile doldurulmaya devam edilir. Tampon veya çözücü hareketli faz, nemli kalması için sabit fazın üstünde kalmalıdır. Numune karışımı, kolon yatağını bozmadan, sabit fazı içeren katı desteğin içine dikkatlice uygulanır ve daha sonra kolon boyunca bileşenler, sabit faz malzemesi ile elenirken, hareketli faz eklenir (Eser ve Dinçel, 2018). Kolon kromatografisi, en yaygın olarak büyük miktarda numune karışımı ayırmak için hazırlık çalışmalarında kullanılır.

2.1.3. İnce Katman Kromatografisi

İnce katman kromatografisi (TLC), numune karışımlarını ayırmak için basit ve ucuz bir yöntemdir. TLC tipik olarak sabit faz olarak silika veya alüminyum oksit kullanır. İnce bir silika veya alüminyum oksit kaplama, istenilen boyut ve boyutlarda kesilebilen cam veya plastik plakalara yayılır. Sabit faz, hareketli fazdan daha kutupsaldır. Silika, polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılır ve alüminyum oksit, daha az polar olan veya polar olmayan bileşikleri ayırmak için kullanılır (Eser ve Dinçel, 2018). Katılar ve sıvılar bu yöntem kullanılarak analiz edilebilir.

2.1.4. Kâğıt Kromatografisi

Kâğıt kromatografisinde, sabit faz, istenen kül ve mukavemette filtre kağıdıdır. Polarite, karışımın bileşenlerini ayırmak için kullanılır. Kâğıt kromatografisi diğer yöntemlere göre daha ucuzdur ve uygulaması basittir.

Birçok farklı amaç doğrultusunda kullanılan kromatografinin etkin, etkili ve önemli çeşitli yöntemlerinin arasında sıklıkla kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisidir (HPLC).

2.1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPLC'de, numune karışımı, yüksek basınçlara dayanabilen ve mevcut birkaç sabit fazdan biriyle paketlenmiş bir kromatografi kolonuyla ayrılır. HPLC cihazları; bir veya daha fazla hareketli faz için kaplar, bir gaz giderici, bir karıştırma kabı, bir yüksek basınç pompası, bir otomatik numune alıcı, basınç göstergeleri, bir koruyucu kolon, bir analitik kolon, kolon sıcaklığını kontrol etmek için kolon termostatları, bir dedektör, bir atık kabı ve bir bilgisayardan oluşmaktadır.

HPLC analizi sadece çözücüler yoluyla çözülebilen numuneler ile gerçekleştirilebilir. HPLC, sıvı bir numunede çözünmüş bileşikleri ayırır ve numunede hangi bileşiklerin ve her bir bileşikten ne kadar bulunduğunun niteliksel ve niceliksel analizini sağlar. HPLC, hedef numunedeki her bir bileşiği, o bileşiklerin kolondaki geçiş hızının farkına göre ayırabilir ve saptayabilir. Bilindiği üzere; HPLC için iki faz sayılabilir, ilki hareketli faz ve diğeri sabit fazdır. Hareketli faz, numuneyi çözen sıvıdır. Sabit faz, kolonda numune ile etkileşime giren kısımdır. Kolonda, numune ile hareketli faz arasındaki çekim güçlüyse, numune kolon boyunca hızlı hareket eder. Diğer taraftan, numunenin sabit faz ile olan çekimi güçlüyse, kolon boyunca yavaş hareket eder.

HPLC yöntemi ile geliştirilecek analiz yöntemine ilişkin; veri yönetiminde, güvenliğinin sağlanmasında, raporlamasında ve yöntem doğrulamasında her aşamada kontrol ve otomasyon sağlaması sebebiyle HPLC diğer kromatografik yöntemlere kıyasla göreceli olarak daha ekonomik, güçlü ve uyarlanabilir. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması esnasında kullanılan kimyasalların listesi Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Formül	Marka	Menşei
Asetonitril (HPLC saflıkta)	CH ₃ CN	Merck	Almanya
Metanol (Kromatografik saflıkta)	CH ₃ OH	Isolab	Türkiye
Orto-fosforik Asit (%80)	H ₂ PO ₄	Mirak Thermolyne	ABD
Perklorik Asit (%60)	HClO ₄	Agilent 1100	ABD
Sodyum Hidroksit	NaOH	Biosan	Litvanya
Sodyum Karbonat	Na ₂ CO ₃	Merck	Almanya
Buprenorfin	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	Sigma Aldrich	ABD
Nalokson Hidroklorür	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	Sigma Aldrich	ABD
Suboxone (BUP/NAL)	8 mg/2 mg dilaltı tablet	Reckitt Benckiser	ABD
Rasajilin	C ₁₂ H ₁₃ N	Clearsynth	Hindistan
Ksilazine	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S	Clearsynth	Hindistan
Klorfeniramin	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₂	Clearsynth	Hindistan
Mirtazapin	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	Clearsynth	Hindistan
Raktopamin	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	Clearsynth	Hindistan
Nifedipin	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	Clearsynth	Hindistan

Bilindiği üzere, HPLC’de hareketli faz solventi, sonuçları etkilemeden durağan faz boyunca analit için bir taşıyıcı görevi görür ve bu çalışma için %0,1 orto-fosforik asit ile metanol veya asetonitril hareketli faz çiftleri kullanılmıştır. Tez çalışmasında tercih edilen hareketli faz çözücüsü ise optimum viskoziteye, iyi UV geçirgenliği ve yeterli elüsyon (sıyırma) kuvvetine sahip olduğu için asetonitril olmuştur. Tamponlar, mobil fazın pH’ını kontrol etmek için kullanılan tampon çözeltiler ise asidik pH için orto-fosforik asit ile bazik pH için 5 M sodyum hidroksit kullanılarak hazırlanmıştır.

Nalokson referans standardı kullanılarak ana stoklar 1 mg/mL konsantrasyonda metanol içerisinde hazırlanmıştır. İç standart denemeleri için Rasajilin, Ksilazine, Klorfeniramin, Mirtazapin, Raktopamin ve Nifedipin ana stokları metanol içerisinde 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüm stok çözeltiler -20°C’de karanlıkta saklanmıştır.

2.3. Kullanılan Gereçler

Tez çalışması esnasında kullanılan gereçlerin listesi Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan gereçler.

Gereç Adı	Kullanım Amacı	Marka	Menşei
HPLC	Analiti tanımlama, ölçme ve kromatografik analizini gerçekleştirme	Agilent 1100	ABD
2-20 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	pipetleme	Brand / Sigma Aldrich	ABD
20-200 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	pipetleme	Brand / Sigma Aldrich	ABD
100-1000 µL Hacim Ayarlı Mikropipet	pipetleme	Brand / Sigma Aldrich	ABD
pH metre	pH ayarlama	Thermo Scientific Orion 3 Star	İngiltere
Saf Su Cihazı	Temizlik, sterilizasyon	Nuve ND8	Türkiye
Ultra Saf Su Cihazı	Temizlik, sterilizasyon	Human Up 900 Scholar-UV	Türkiye
Hassas Terazi	Tartma	Mettler Toledo XS204	Türkiye
Santrifüj	Çöktürme	Heraeus Labofuge 200	Almanya
Vorteks	Çözeltilerin homojen karışımının sağlanması	Velp Scientifica Classic	İtalya
Çoklu Vorteks	Çözeltilerin homojen karışımının sağlanması	Biosan Multi Vortex V-32	Litvanya
Manyetik Karıştırıcı	Çözeltiyi karıştırma	Mirak Thermolyne	ABD
Ultrasonik Su Banyosu	Numunelerin çözünmesi	Bandelin Sonorex TK 100 H / Sigma Aldrich	ABD

2.4. Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması esnasında kullanılan malzemelerin listesi Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan malzemeler.

Malzeme	Marka	Menşei
Borosilikat cam şişe (500/1000 mL), parafilm, spatül, deney tüpü (polipropilen), tıpa (polietilen), 2 mL N9 HPLC vial ve kapağı, İnsert (200 µL), Selüloz Asetat Membran Filtre, Erlen	Isolab	Almanya
Mikropipet Ucu (200 µL, 1000 µL)	Jet Biofil	Çin
Mezür, Balon joje	İldam Cam	Türkiye

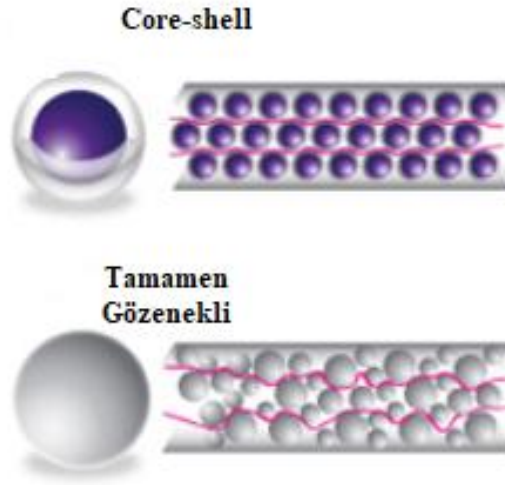
2.5. HPLC’de Kullanılan Kolonlar

HPLC kromatografisinde kolon, numunenin hareketli faz ile sabit fazdan geçirildiği ve numune bileşenlerinin ayrılmasının gerçekleştiği yerdir.

Genel olarak, HPLC için iki farklı silika tipi kolon dolgu malzemesi kullanılmaktadır ve Şekil 2.1’de gösterilmektedir. Tamamen gözenekli silika parçacıklarına sahip kolonlar, temel analiz kriterlerine uygundur ancak bunlar HPLC analizlerinde basınç, kolon uzunluğu gibi sınırlamalar getirmektedir. Bu analitik zorlukların ve sınırlamaların üstesinden gelmek için kolon uzunluğunun azaltılması ve hareketli fazın akış hızının artırılması gerekir; çünkü tamamen gözenekli silika dolgulu kolonlarda hareketli faz akış hızının artırılması karşı basınçta bir artışa neden olur.

Bu sorunu çözmek için tamamen gözenekli parçacıklardan daha az geri basınç oluşturan yüzeysel olarak gözenekli silika dolgulu kolonlar kullanılmaktadır.

Core-shell silika parçacıklar, katı bir çekirdek ve gözenekli bir kabuktan oluşur. Son yıllarda özellikle kullanımı artan core-shell silika parçacıkları HPLC analizlerinde, analiz süresinde belirgin bir azalma ve yüksek oranlı verim alma gibi önemli avantajlar sağlamaktadır (Gümüştas ve ark., 2019).



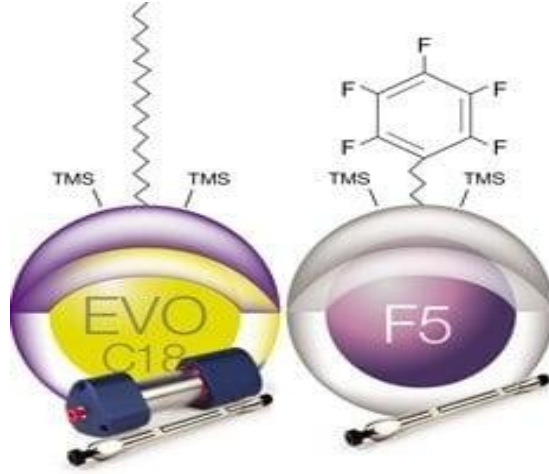
Şekil 2.1. Core-Shell yapısı ve tamamen gözenekli silika yapısı.

Analitik kolonun önüne koruyucu kolon denilen bir kolon eklenebilir. Bu koruyucu kolonun amacı sıvı bileşiğin cihaz için kullanılan asıl kolondan geçmeden önce bir tür filtrasyon yapması ve süzme görevi görmesidir. Bu çalışmada kullanılan koruyucu kolon Trident Level 3 LC (Restek, ABD) dir.

Tez çalışması esnasında kullanılan kolonların özellikleri ve yapıları Çizelge 2.4 ile Şekil 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Kullanılan kolonlar.

Kolon Adı	Teknoloji	Özelliği	Markası	Menşei
Kinetex EVO C18	Core-Shell	Ters fazlı sistemlerde alkali koşullarda bile dirençli, geliştirilmiş pik şekli ile polar bazik bileşikler için kullanılır.	Phenomenex	ABD
Kinetex F5	Core-Shell	Polar, hidrofobik, aromatik ve şekil seçiciliğinin benzersiz bir kombinasyonunu sunan yüksek oranda tekrarlanabilir pentaflorofenil propil fazıdır.	Phenomenex	ABD
Trident Level 3 LC	3 aşamalı koruma	Birden fazla kurulumda geliştirilmiş tasarım ve dayanıklılık sağlarken aynı kromatografik performansı verir. İstenilen koruma düzeyini sağlar ve hızlı ve kolay filtre değişimine imkan verir.	Restek	ABD



Şekil 2.2. Kinetex EVO C18 ve Kinetex F5 kolon yapıları (Phenomenex, ABD).

2.6. Yöntem Optimizasyonu

Bir yöntemin optimizasyonu, uygulamanın amacına uygun çözünürlük üretmek için seçicilik, hız ve verimlilik arasındaki dengedir. İdeal şartlar altında optimize edilmiş bir yöntem, laboratuvara enjeksiyon başına düşük bir toplam fiyat ve sonuç olarak uygun maliyetli bir tahlil sağlamak amacıyla geliştirilen bir yöntemdir.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen yöntemin optimizasyonuna ilk olarak HPLC’de kullanılan kolonların denemeleriyle başlanmıştır. Kolona karar verildikten sonra hareketli faz akış denemeleri çalışılmış ve birçok tekrarlı yapılan denemelerden sonra hareketli faz için optimum akışın gradiyent yöntemle olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bir sonraki aşamada, akış hızı için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Temiz ve net bir dedektör yanıtı ile pik şekilleri ve alanlarının istenilen düzeyde karşılanmasını teminen optimizasyon çalışmalarına kolon sıcaklığı ve hareketli faz pH denemeleri ile devam edilmiş ve nihai hale getirilmiştir.

2.7. Analitik Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Analitik yöntem validasyonu, kimyasal analizin değerlendirilmesini gerçekleştirmek için temel bir gerekliliktir. Yöntem doğrulama prosedürü, bir analitik test sisteminin amaçlanan nedene uygun olduğunu ve faydalı ve meşru analitik veriler sağlayabildiğini doğrulamak için tasarlanmış çok sayıda değerlendirmenin gerçekleştirilmesini içerir (Rao, 2018).

Uygulamada, deneysel çalışma, uygun doğrulama testlerinin uygulanabileceği şekilde tasarlanmalı ve analitik prosedürün performansına ilişkin sağlam, genel bilgi sağlamak için özgülük/seçicilik, doğruluk, kesinlik, teşhis sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ), çalışma aralığı, doğrusallık ve sağlamlık gibi parametreler kullanılır (Sharma ve ark., 2018).

2.7.1. Özgülük/Seçicilik

Analitik bir yöntemin seçiciliği, numune matrisinde bulunması beklenebilecek girişimlerin varlığında da bir analiti doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğidir.

Diğer bir anlatımla; seçicilik/özgülük, yöntemin analiti bozundurucular, müdahaleler, safsızlıklar gibi diğer bileşiklerin olası varlığında bile tespit etme becerisidir. Analitler ve ilgili maddeler arasındaki farklılaşma gücüdür (Gumustas ve ark., 2013).

2.7.2. Doğruluk

Analitik bir yöntemin doğruluğu, yöntem tarafından üretilen test sonuçlarının gerçek değerle uyuma derecesidir.

Doğruluk, ilgilenilen numune matrisine bilinen bir analit standardı konsantrasyonu eklenerek ve numunenin "doğrulan yöntem" kullanılarak analiz edilmesiyle ölçülür. Doğruluk parametresi genellikle çalışılan örnekteki geri kazanım oranı ile belirtilir (Sharma ve ark., 2018).

$$\% \text{ Geri kazanım} = (C_u / C_s) \times 100$$

C_u = Çalışma sonucunda bulunan konsantrasyon

C_s = Bilinen ya da standart çalışma sonucunda elde edilen konsantrasyon

2.7.3. Kesinlik

Analitik bir yöntemin validasyon çalışmalarında kesinlik parametresi ile ölçülen, prosedür birden fazla numuneye tekrar tekrar uygulandığında, bireysel test sonuçları arasındaki uyuşma derecesidir.

Kesinlik, bir dizi standart enjekte edilerek veya homojen bir partiden alınan çoklu numunelerden alınan numune serilerinin analiz edilmesiyle ölçülür. Ölçülen standart sapma (SS) ve Ortalama değerlerin birbirlerine oranlanmasıyla, bağıl standart sapma (% BSS) olarak kesinlik hesaplanır (ICH,2022).

2.7.4. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı

Teşhis Sınırı (LOD), cihazın tespit edebildiği ancak ölçemediği en düşük konsantrasyondur. Tayin Sınırı (LOQ), cihazın tespit edip ölçebildiği en düşük konsantrasyondur.

Diğer bir deyişle; LOD veya LOQ, sırasıyla analitin güvenilir bir şekilde algılandığı ve miktarının belirlenebildiği minimum konsantrasyonlardır. 3:1'lik bir sinyal-gürültü oranı, algılama sınırını tahmin etmek için genellikle kabul edilebilir

olarak kabul edilir. Kantitasyon limiti için en az 10:1'lik bir oran kabul edilebilir belirtilir (ICH, 2022).

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{m}$$

m

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m}$$

m

σ = standart sapma

m = kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.7.5. Çalışma Aralığı

Analitik bir prosedürün çalışma aralığı, numunedeki analitin üst ve alt konsantrasyonları arasındaki aralık olarak, uygun bir kesinlik, doğruluk ve doğrusallık düzeyiyle tanımlanabilir (Gumustas ve ark., 2013).

2.7.6. Doğrusallık

Analitik bir yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıktaki analitlerin konsantrasyonu ile orantılı olarak kontrol sonuçlarını ortaya çıkarmayı hedefler.

Bu aynı zamanda, bir yöntemin numunelerdeki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı test sonuçları elde etme yeteneğidir.

Doğrusallık, beklenen konsantrasyon aralığının %50 ile %150'si arasında 5 veya daha fazla düzeyde en az 3 tekrarlanan ölçüm serisi tarafından kullanılmalıdır (Gumustas ve ark., 2013).

2.7.7. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, aynı numunenin farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı cihazlar, farklı sıcaklıklar vb. gibi çeşitli test koşulları altında elde edilen test sonuçlarını tekrar üretilebilirlik derecesidir.

Diğer bir anlatımla sağlamlık parametresi, yöntem parametrelerindeki varyasyonlara (pH, akış hızı, sıcaklık, farklı analist vb.) bağlı olarak elde edilen sonuçların prosedürün güvenilirliğini gösterir.

2.7.8. Stabilité

Bir yöntemin stabilitesine ilişkin test ilgili numunenin saklanma koşullarındaki fiziksel değişikliklere ilişkin özelliklerin tespitine imkân sağlamalıdır.

Stabilite gösteren bir testin özgüllüğünü ve/veya seçiciliğini göstermek için, geliştirilen yöntemde uygun gerekçelerle birlikte çeşitli fiziksel ve kimyasal stres koşullarına maruz kalmış numuneler ya da eskimiş veya daha yüksek sıcaklık ve/veya nemde saklanmış gerçek ürün numunelerini içeren bir test kombinasyonu gerçekleştirilmelidir.

2.8. Plazma Hazırlığı

Plazma hazırlığında ilk aşamada protein çöktürme süreci ile başlamıştır. İlk başta 1 mL ticari plazma üzerine 800/200 ppm buprenorfin/nalokson ana stoktan 1 mL eklenmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Çöktürme sürecinin son aşamasında 3 mL asetonitril eklenmiştir. Daha sonra 30 sn vortekslenmiştir ve dilute-shot süreci için 5 dk boyunca 5300 rpm ile santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant yeni tüpe alınmış ve doğrudan seyreltilerek cihaza enjekte edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. HPLC Yöntem Optimizasyonu

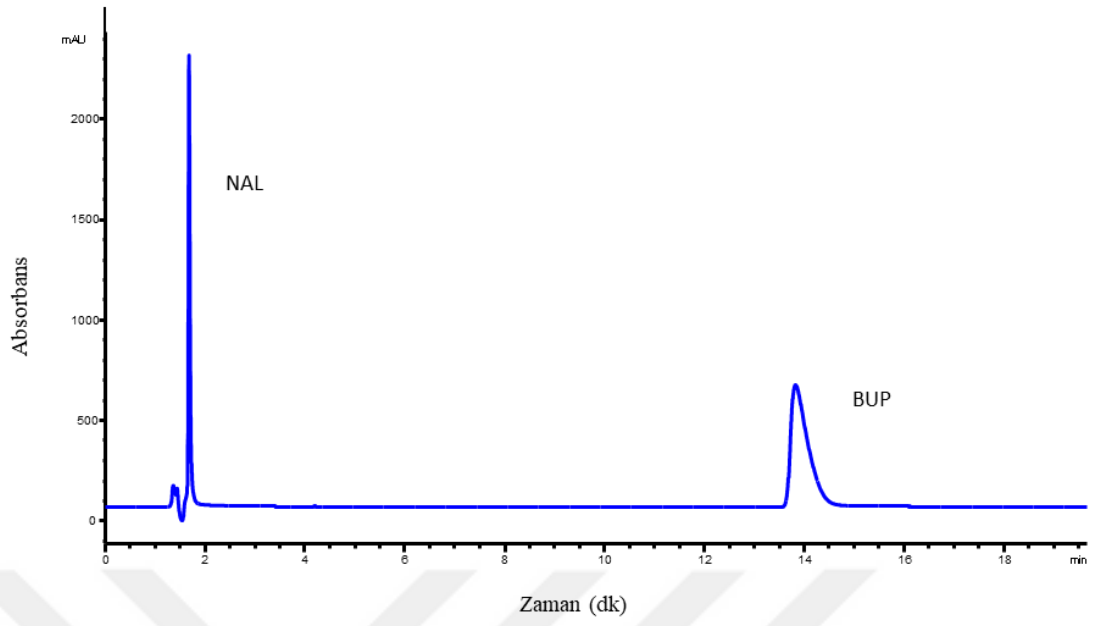
3.1.1. Kolon Seçimi

Optimizasyon çalışmalarına Kinetex EVO C18 kolon (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm) ve izokratik akış yöntemi ile başlanmıştır. Hareketli faz hacimlerinde ve akış yönteminde (izokratikten gradiyent akışa değişim) de çeşitli değişikliklerin denendiği çalışmalarda bir türlü Nalokson'un ölü zaman ve diğer girişimlerden ayrışması istenen seviyede sağlanamamış, aynı zamanda taban çizgisi stabilitesi de kabul edilebilir seviyenin üst sınırlarında gözlemlendiği için (gradiyent akış yönteminde) ve Buprenorfin'in yüksek tutulumu nedeniyle kolon değişikliğine gidilmiştir. HPLC'de kullanılan Kinetex EVO C18 kolondan (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm) Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm) kolona değişim sağlanmıştır. Kolon deneme çalışmaları için parametreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

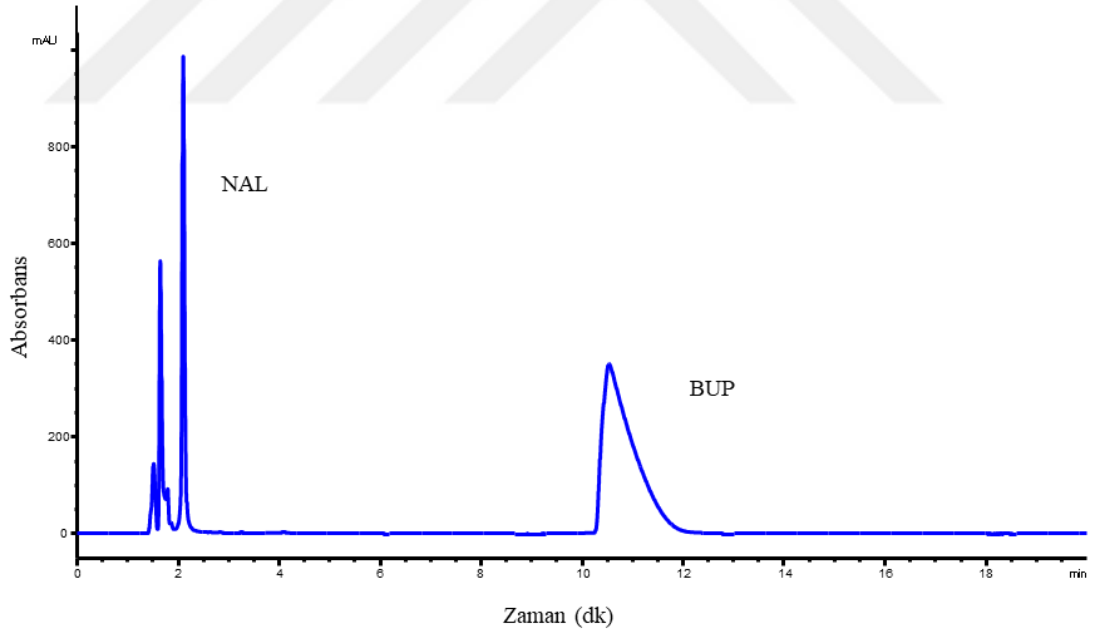
Çizelge 3.1. Kolon denemeleri için parametreler.

Parametreler	Özellikleri	
Kolon	Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)
Hareketli Faz	Asetonitril ve tampon çözelti olarak da % 0,1 fosforik asit 30:70 (v/v)	
Akış hızı	1 mL/dk	
Enjeksiyon hacmi	20 µL	
pH	4	
Sıcaklık	40°C	
UV dedektör	210 nm	

Kinetex EVO C18 kolon ve Kinetex F5 kolon için elde edilen kromatogramlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kinetex EVO C18 kolon.



Şekil 3.2. Kinetex F5 kolon.

3.1.2. Hareketli Faz Akış Optimizasyonu

Hareketli faz optimizasyon çalışmalarında izokratik yöntem ve gradiyent yöntem kullanılmıştır. Gradiyent yöntemde zamana bağlı olarak organik fazda yaşanan artış ve azalışların kolondaki tutulumlar ile UV dedektör cevaplarının istenen kuyruk ve pik yapılarında daha başarılı olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalara ilişkin parametreler Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

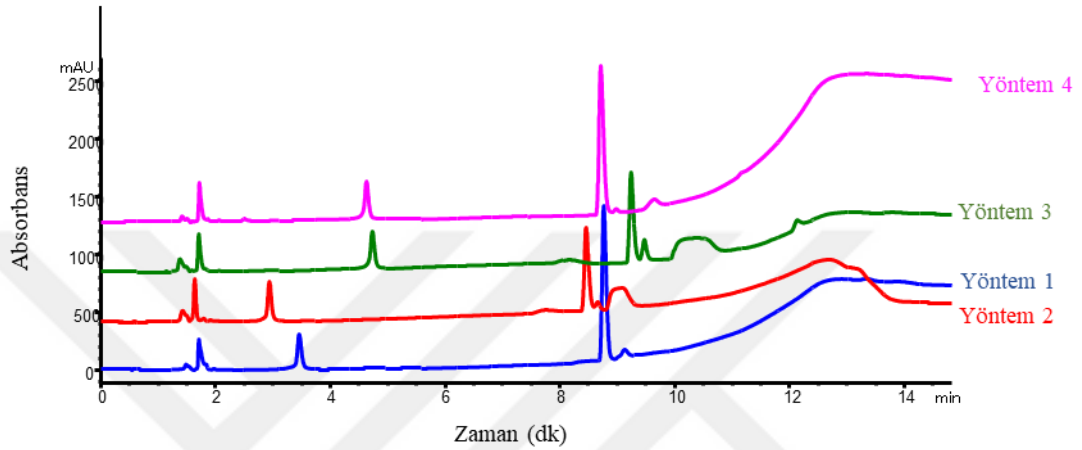
Çizelge 3.2. Gradiyent Yöntem Parametrelerine ait Denemeler.

Yöntem	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Tampon Çözelti (% 0,1 Fosforik asit)
Yöntem 1	0	15	85
	10	70	30
	15	70	30
Yöntem 2	0	20	80
	10	70	30
	15	70	30
Yöntem 3	0	10	90
	10	80	20
	15	80	20
Yöntem 4	0	10	90
	10	90	10
	15	90	10

Çizelge 3.3. Gradiyent Yöntemde kullanılan sistem parametreleri.

Parametreler	
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)
Akış hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL
pH	4
Sıcaklık	40°C
UV dedektör	210 nm

Geliştirilen yöntem için optimizasyon çalışmaları yapılan gradiyent akış denemelerine ilişkin kromatogram Şekil 3.3’de verilmiştir. Kinetex F5 kolon ile 40°de 10 µL enjeksiyon hacmi ve 1 mL/dk akış hızı ile pH=4 de denenmiş yöntemlere ait parametreler Çizelge 3.3 ile belirtilmiştir. Yöntem 4 için NAL tutulum zamanı 4,5 dakika ve BUP tutulum zamanı 8,5 dakikadır.

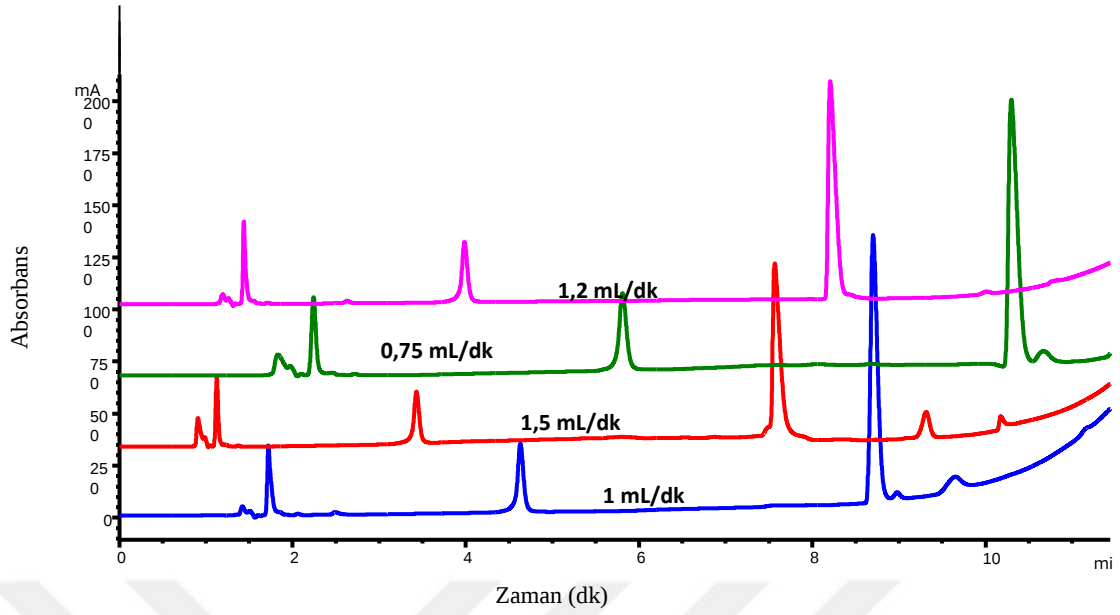


Şekil 3.3. Gradiyent çalışmalara ait denemeler.

3.1.3. Akış Hızı Optimizasyonu

Yüksek bir akış hızı, analite durağan faz ile etkileşime girmesi için yeterli zaman vermeyebilir ve düşük bir akış hızı da analitin dedektör yanıtını zamansal açıdan öteleyebilir. Bu noktadan hareketle, akış hızı optimizasyon çalışmalarında 0,75 mL/dk, 1 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,5 mL/dk akış hızları denenmiştir. 0,75 mL/dk’lık akış hızında NAL için tutulum zamanı 5,8 dakika ve BUP için de 10,5 dakikadır.

Geliştirilen yöntem için çalışılmış akış hızı denemelerine ait kromatogramlar Şekil 3.4’de ve sistem parametreleri ise Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Akış hızı kromatogramları.

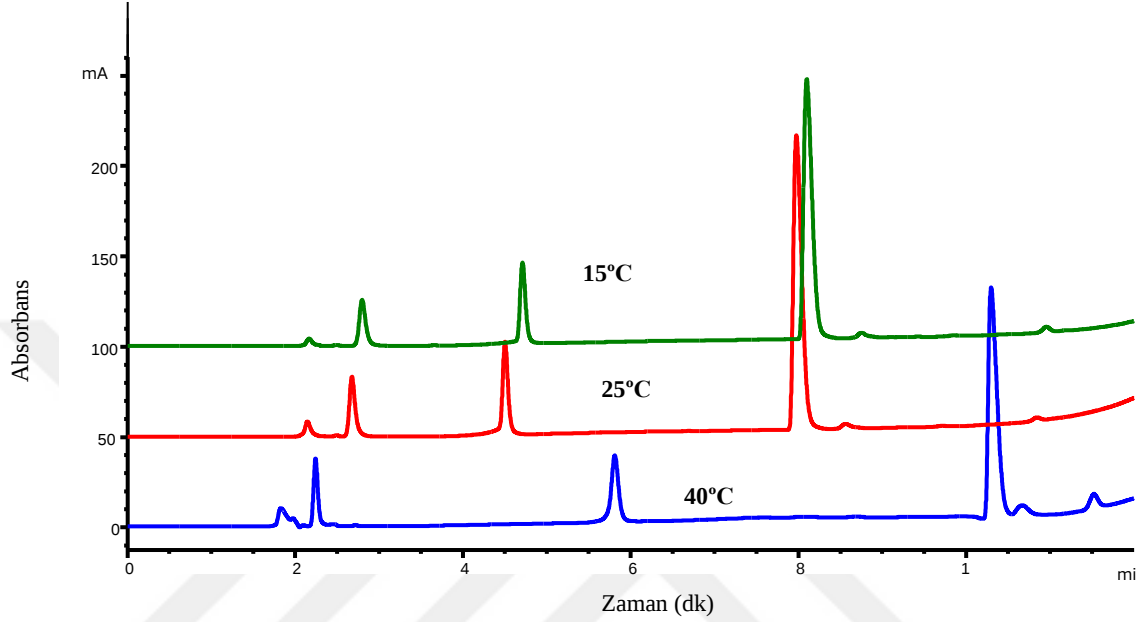
Çizelge 3.4. Akış hızı optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri		
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)		
Hareketli faz	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Tampon çözelti
	0	10	90
	10	90	10
	12	10	90
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
pH	4		
Sıcaklık	25°C		
UV dedektör	210 nm		

3.1.4. Sıcaklık Optimizasyonu

HPLC için birçok uygulama örneğinde ayırmanın yaklaşık 40°C kolon sıcaklığında yapıldığı görülmektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda tutulum azalır ve daha hızlı ayırım mümkündür. Daha düşük sıcaklıklarda ise, tutulum genellikle artar ve buna bağlı olarak dedektör yanıtı da daha geç olur. Buna bağlı olarak; geliştirilen yöntem için uygun sıcaklık derecesinin belirlenmesine yönelik 15°C, 25°C ve

40°C’lerde çalışmalar yapılmıştır. Bu denemelere ilişkin kromatogram görüntüleri Şekil 3.5’de ve sistem parametreleri ise Çizelge 3.5’de verilmiştir. 25°C’de NAL için tutulum zamanı 4,4 dakika ve BUP için de 8,3 dakikadır.



Şekil 3.5. Sıcaklık kromatogramları.

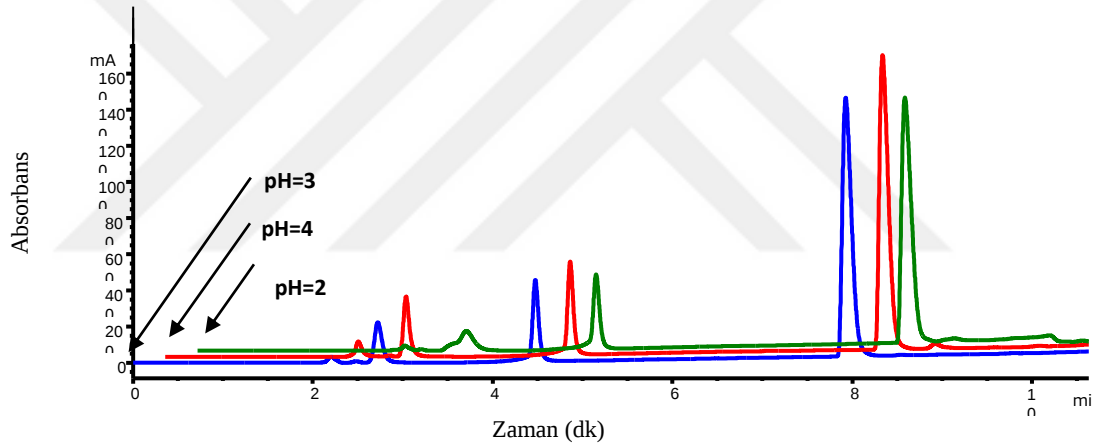
Çizelge 3.5. Kolon sıcaklığı optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri		
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)		
Hareketli faz	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Tampon çözelti
	0	10	90
	10	90	10
	12	10	90
Akış hızı	0,75 mL/dk		
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
pH	4		
UV dedektör	210 nm		

3.1.5. Hareketli Faz İçin pH Optimizasyonu

Hareketli fazın pH'ı, kromatografik analizi çeşitli şekillerde etkileyebilir. Analiz edilen bileşiğe bağlı olarak pH, seçiciliği, pik şeklini ve tutulumu etkileyebilir. Bu çalışmada sulu faz çiftinde 15 mM fosfat tamponu kullanılarak asidik ortamda pH 2, pH 3 ve pH 4 çalışmaları yapılmıştır. pH 4'de NAL için tutulum zamanı 4,4 dakika ve BUP için de 8,3 dakikadır.

Bu çalışmalara ait kromatogramlar Şekil 3.6'da ve sistem parametreleri ise Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. pH denemelerine ilişkin kromatogramları.

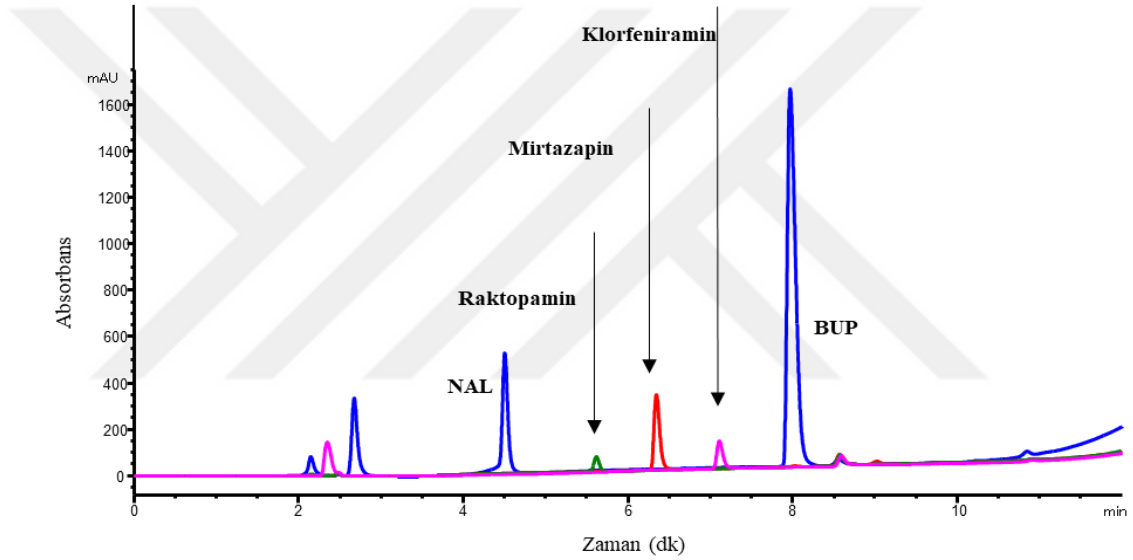
Çizelge 3.6. pH optimizasyonunda kullanılan sistem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri		
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)		
Hareketli faz	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Tampon çözelti
	0	10	90
	10	90	10
	12	10	90
Akış hızı	0,75 mL/dk		
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
Sıcaklık	25°C		
UV dedektör	210 nm		

3.1.6. İç Standart Çalışmaları

Bir iç standart, analiz yönteminin doğruluğunu, kesinliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermek için kullanılır ve iç standart analiz edilen her numunede bulunan bir maddenin bilinen konsantrasyonudur.

Bu tez çalışmasında; raktopamin, mirtazapin ve klorfeniramin iç standart olarak denenmiştir. Bu denemelere ilişkin kromatogram Şekil 3.7’de ve sistem parametreleri ise Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. İç standart uygulamalarına ilişkin kromatogram.

Çizelge 3.7. Sistem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri		
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)		
Hareketli faz	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Tampon çözelti
	0	10	90
	10	90	10
	12	10	90
Akış hızı	0,75 mL/dk		
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
pH	4		
Sıcaklık	25°C		
UV dedektör	210 nm		

Raktopamin alıkonma zamanı 5,6' dakikadır. Optimize edilen yöntemde Raktopamin alıkonması, Nalokson ve Buprenorfin alıkonmalarının arasında belirleyici olarak gözükmemektedir.

3.2. Sistem Uygunluk Testi Parametreleri

Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Amerikan Farmakopesi'ne (USP) göre, sistemin doğruluğunu ve kesinliğini kanıtlamak için HPLC yöntemlerinde sistem uygunluk testleri yapılmalıdır (USP, 1994). Bu testler, HPLC yöntemlerinin bir parçasıdır ve bu testler, yöntemin validasyonu öncesinde veya sırasında gerçekleştirilebilir. Eğer yöntemde bir değişiklik olursa sadece validasyon değil sistem uygunluk testleri de tekrar yapılmalıdır. Sistem uygunluk parametreleri olmayan bir yöntem uygun kabul edilemez. Çözünürlük ($R_s > 2,0$), kuyruklanma faktörü ($T \leq 2$), alıkonma zamanı (t_R), teorik plaka sayısı ($n > 2,000$), seçicilik faktörü ($\alpha > 1$) ve kapasite faktörü ($k' = 2-10$) raporlanması gereken ana sistem uygunluk parametreleridir (Gumustas ve ark., 2013). Geliştirilen yönteme ilişkin sistem uygunluk parametreleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Sistem Uygunluk Parametreleri.

Parametre	Nalokson	Buprenorfin
Alıkonma Zamanı (dk)	4,42	8,298
Kapasite Faktörü (k)	1,273	3,267
Kuyruk Faktörü	1,018	1,359
Çözünürlük (R_s)	29,57	
Seçicilik (α)	2,566	
Kolon Etkinliği (Plaka/Kolon)	22244	53655
Kolon Etkinliği (Plaka/Metre)	1565280	1885400

3.3. HPLC Yöntem Validasyonu

Analitik ölçümlerin amacı güvenilir, kesin, tutarlı ve doğru veriler elde etmektir. Geliştirilmiş bir analitik yöntemin validasyonu bu amaca ulaşılmasında büyük rol oynamaktadır (Gumustas ve ark., 2013).

HPLC yöntem validasyonunun amacı, geliştirilen yöntemin amaçlanan amaca uygunluğunun gösterimidir (ICH, 2022). Bu tez çalışması ile HPLC’de yeni nesil analitik kolon kullanımı ile farklı sıcaklık, hareketli faz kompozisyonu ve kullanılan tampon çözeltinin pH’si gibi parametre denemeleri yapılarak optimize edilen son yöntemin, literatürde yer alan çalışmalara kıyasla daha düşük maliyete ve daha hassas tayin limitlerine sahip olduğunu gösterebilmek adına aşağıda verilen parametreler temelinde validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler İnsan Kullanımına Yönelik İlaç Malzemeleri için Teknik Gereksinimler Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) (ICH, 2022) ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) (FDA, 1987) tarafından önerilen testleri içermektedir.

3.3.1. Doğruluk

Bu çalışmada BUP ve NAL için dört farklı kalite kontrol noktası belirlenmiş ve beş tekrarlı olarak olacak şekilde gün içinde ve farklı günlerde analizler yapılmıştır. Kesinlik ve doğruluk verileri BUP ve NAL için Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. BUP verileri.

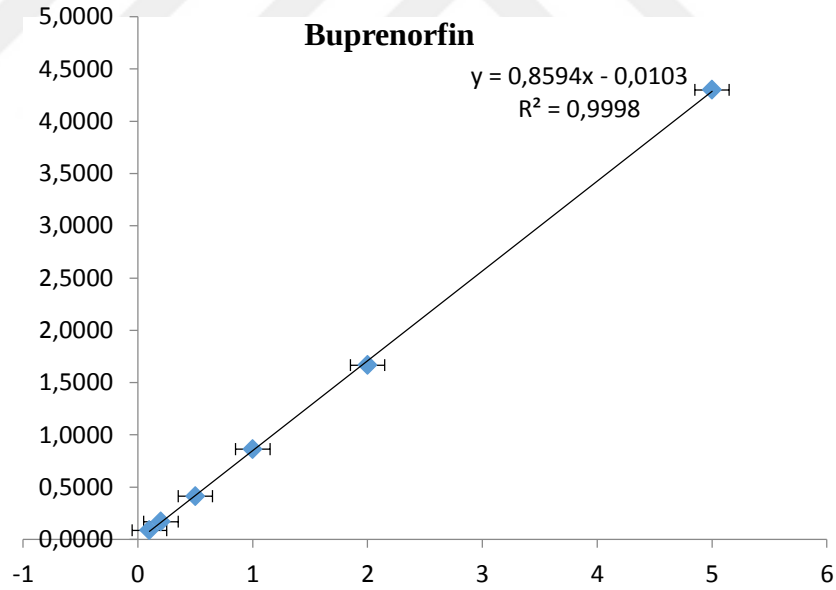
BUP (µg/L)	Gün içi				Günler arası			
	Standart Sapma	% BSS	Bulunan konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk	Standart Sapma	% BSS	Bulunan konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk
0,2	0,0019	1,1054	0,21	104,21	0,0021	1,2533	0,21	104,89
0,6	0,0025	0,4571	0,64	106,22	0,0161	2,8855	0,66	109,91
1,5	0,0130	0,9877	1,55	103,13	0,0267	1,9834	1,58	105,26
7,5	0,0652	0,9882	7,69	102,58	0,1787	2,6554	7,84	104,55

Çizelge 3.10. NAL verileri.

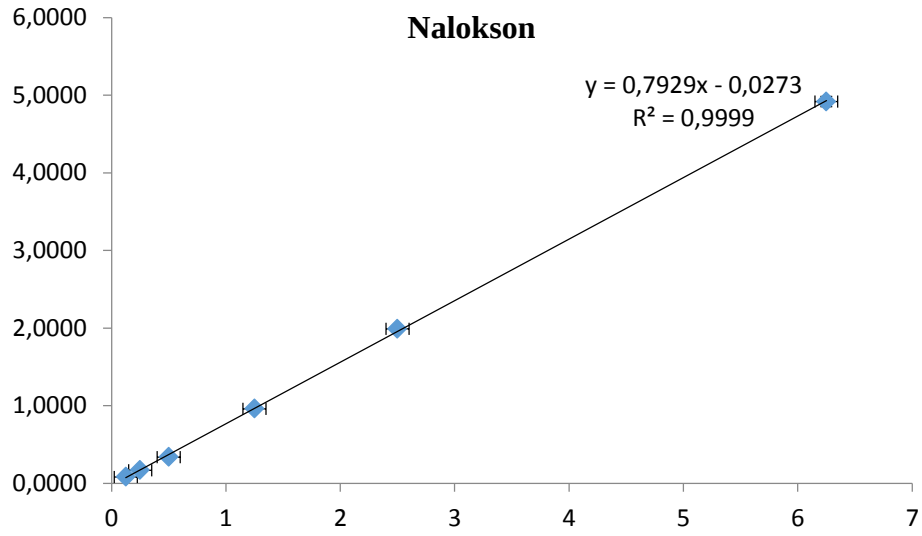
NAL (µg/L)	Gün içi				Günler arası			
	Standart Sapma	% BSS	Bulunan konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk	Standart Sapma	% BSS	Bulunan konsantrasyon (µg/L)	Doğruluk
0.125	0,0019	2,29	0,13	104,00	0,0017	2,03	0,13	106,79
0.15	0,0019	1,7352	0,1425	94,99	0,0040	3,8076	0,17	111,84
0.375	0,0067	2,2329	0,333	88,70	0,0140	4,9662	0,39	103,73
1.875	0,0112	0,7650	1,497	79,83	0,0515	3,6899	1,80	95,76

3.3.2. Doğrusallık

Bu tez çalışmasında miktar tayini çalışmaları için HPLC-UV kullanılarak dedektör cevabına göre BUP ve NAL için 6 adet farklı derişim noktası ile kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Bu grafikler Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. Buprenorfin kalibrasyon grafiğı.



Şekil 3.9. Nalokson kalibrasyon grafiği.

3.3.3. Teşhis (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı

Kalibrasyon eğrisi için belirlenen konsantrasyonların 5 tekrarlı analizi sonrasında elde edilen veriler Çizelge 3.11’de raporlanmıştır.

Çizelge 3.11. Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler.

Parametre	BUP (n=5)	NAL (n=5)
Doğrusallık (µg/L)	0,1-5	0,125-6,25
Eğim (m)	0,8594	0,7929
Kesişim (n)	-0,0103	-0,0273
Belirleme Katsayısı (R ²)	0,9998	0,9999
LOD (µg/L)	0,023	0,033
LOQ (µg/L)	0,070	0,098

3.3.4. Sağlamlık

Sağlamlık testleri için yapılan denemelere ilişkin sonuçlar Çizelge 3.12, Çizelge 3.13, Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15’te verilmiştir.

Çizelge 3.12. Akış hızı verileri.

Akış Hızı						
Parametreler	0,7 mL/dk		0,75 mL/dk (Yöntem)		0,8 mL/dk	
	BUP	NAL	BUP	NAL	BUP	NAL
Kolon Etkinliği (Plaka/Kolon)	55625	28113	53655	22244	54930	22764
Kuyruk Faktörü	1,488	1,388	1,359	1,018	1,364	1,217
Alıkonma Zamanı	8,875	4,926	8,298	4,42	8,155	4,161

Çizelge 3.13. pH değerlerine ilişkin veriler.

pH						
Parametreler	3,8		4 (Yöntem)		4,2	
	BUP	NAL	BUP	NAL	BUP	NAL
Kolon Etkinliği (Plaka/Kolon)	58751	28256	53655	22244	52849	27255
Kuyruk Faktörü	1,875	1,227	1,359	1,018	1,42	1,168
Alıkonma Zamanı	8,371	4,528	8,298	4,42	8,769	4,808

Çizelge 3.14. Sıcaklık verileri.

Sıcaklık						
Parametreler	24,5°C		25°C (Yöntem)		25,5°C	
	BUP	NAL	BUP	NAL	BUP	NAL
Kolon Etkinliği (Plaka/Kolon)	57720	28934	53655	22244	57660	29869
Kuyruk Faktörü	1,375	1,203	1,359	1,018	1,42	1,176
Alıkonma Zamanı	8,545	4,647	8,298	4,42	8,541	4,632

Çizelge 3.15. Dalga boyuna ait veriler.

Dalga boyu						
Parametreler	208 nm		210 nm (Yöntem)		212 nm	
	BUP	NAL	BUP	NAL	BUP	NAL
Kolon Etkinliği (Plaka/Kolon)	56774	28843	53655	22244	58356	29184
Kuyruk Faktörü	1,419	1,197	1,359	1,018	1,378	1,142
Alıkonma Zamanı	8,536	4,64	8,298	4,42	8,567	4,667

3.3.5. Stabilit 

Stabilit  testlerine ilişkin olarak; numuneler 24 saat boyunca 25°C’de oda sıcaklığında, 4°C’de soğutucuda ve -20°C’de dondurucuda muhafaza edilerek yapılmıştır. Bu çalışmalara ilişkin veriler izelge 3.16’da ve izelge 3.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.16. Stabilit  alışmaları (Alan değerleri).

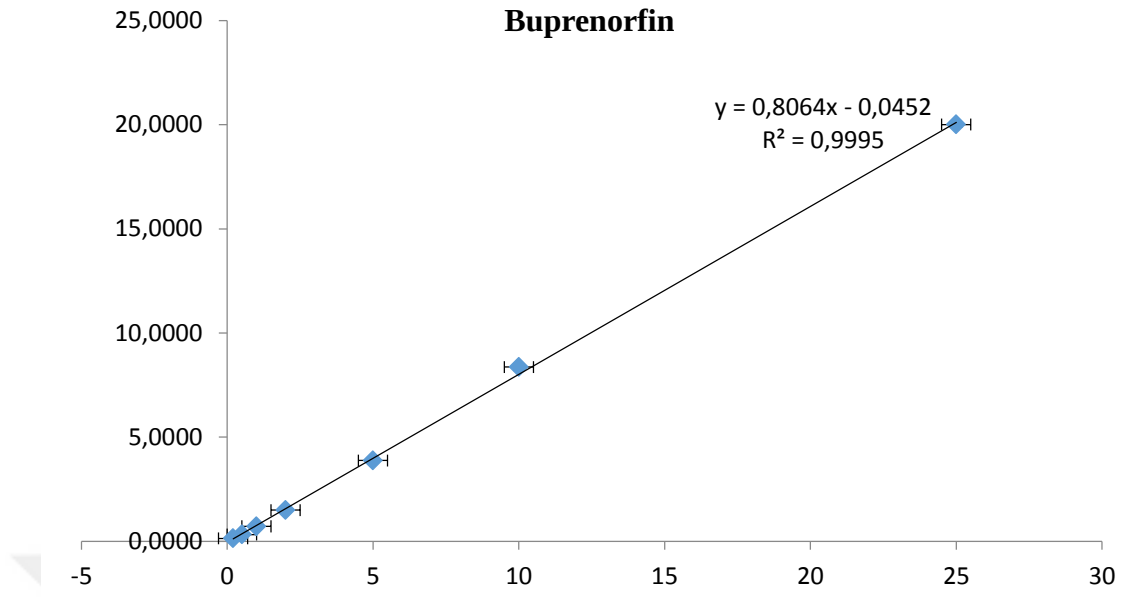
Alan �l�leri	Yöntem	-20°C			4°C			25°C		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
BUP	555,6	562,8	523,3	523,5	584,1	546,6	547,4	557,6	549	550,6
NAL	121	121,9	120,7	120,6	119,2	121,5	119,9	120,5	121,5	120,5

izelge 3.17. Stabilité alışmalarına ilişkin ortalama ve değişim değerleri.

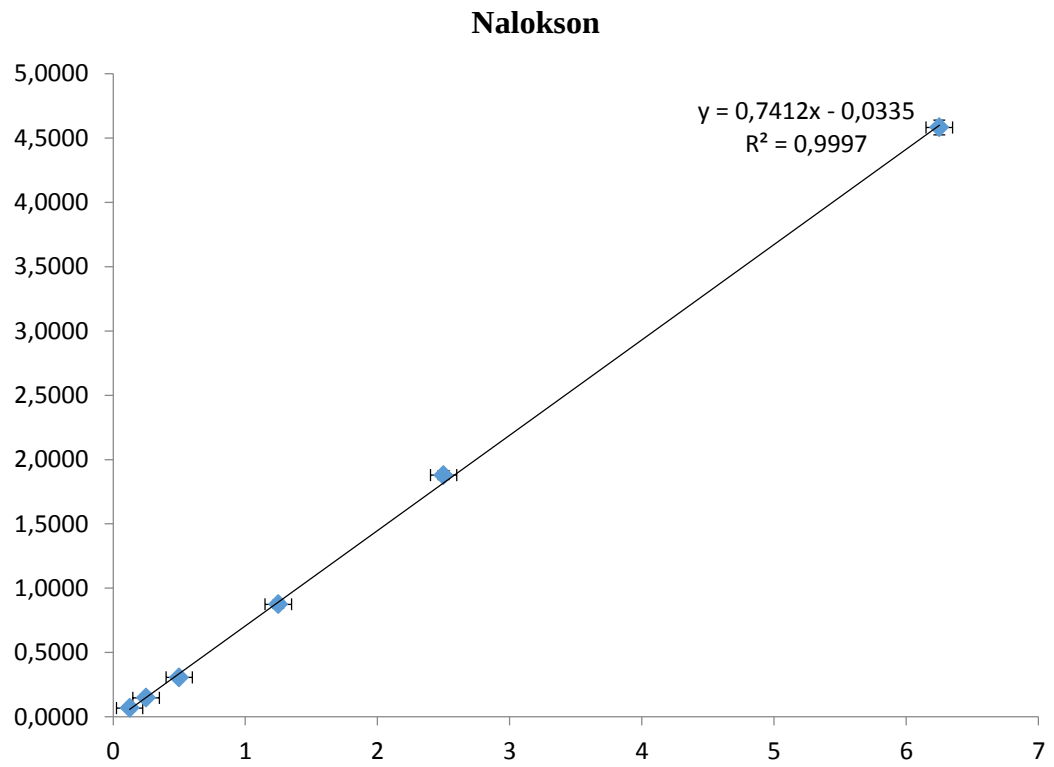
	Yöntem	-20°C		4°C		25°C	
		Ortalama	% Değişim	Ortalama	% Değişim	Ortalama	% Değişim
BUP	555,6	536,53	96,57	559,37	100,68	552,4	99,42
NAL	121	121,07	100,06	120,2	99,34	120,83	99,86

3.4. Plazma alışmaları

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem ile ilgili ticari plazma çalışmaları için HPLC-UV kullanılarak dedektör cevabına göre BUP için 7 adet ve NAL için 6 adet farklı derişim noktası ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu grafikler şekil 3.10 ve şekil 3.11’de gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Ticari plazmada Buprenorfin kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.11. Ticari plazmada Nalokson kalibrasyon grafiği.

3.5. HPLC İçin Geliştirilen Yöntem

Validasyon test parametreleri ile de doğruluğu temin edilmiş HPLC için geliştirilen yönteme ait parametreler izelge 3.18’de verilmiştir.

Çizelge 3.18. Yöntem parametreleri.

Parametreler	Özellikleri		
Kolon	Kinetex F5 (150 x 4,6 mm i.d, 5 µm)		
Hareketli faz	Zaman (dk)	Asetonitril Oranı	Fosforik asit oranı (0,1%)
	0	10	90
	10	90	10
	12	10	90
Akış hızı	0,75 mL/dk		
Enjeksiyon hacmi	10 µL		
pH	4		
Sıcaklık	25°C		
UV dedektör	210 nm		

4. TARTIŞMA

HPLC yönteminin diğer kromatografik tekniklere göre birçok avantajı vardır. Bu avantajlar; göreceli olmakla birlikte yüksek çözünürlük, tekrarlanabilir yanıtlar ve analiz hızı olarak sayılabilir. HPLC kolonları, ayırım verimliliğini etkileyen parametrelerin daha iyi kontrol edilmesini, veri analizinin kolay gerçekleşmesini ve büyük ölçekli prosedürlere kolaylıkla uyarlanabilirliği sağlar. Ayrıca çok küçük partikül boyutlarını ve geniş yüzey alanlarını destekler ve solvent akışına yüksek basınç uygulanmasına izin verir (Gumustas ve ark., 2013). Diğer taraftan özellikle ilgili literatür incelendiğinde karşımıza çıkan GC-MS yönteminde analitlerin uçucu malzemeler olması gerekliliği ve/veya yeteri kadar uçucu hale getirmek için türevlendirme uygulanması gerekliliği numune hazırlama sürecinde HPLC yöntemine kıyasla hem daha fazla zaman hem de daha fazla finansman gerektirmektedir.

HPLC yöntemi ile bir maddenin çok küçük miktarları algılanabilir ve ölçülebilir, bu da onu iz safsızlıkları veya kirleticileri saptamak için ideal bir teknik haline getirir. Bununla birlikte; HPLC, LC-MS/MS gibi analitik tekniklerle karşılaştırıldığında daha uygun maliyetlidir ve bu da onu birçok laboratuvar için erişilebilir kılar ve ilaçlar, proteinler ve çevresel kirleticiler dahil olmak üzere çok çeşitli maddeleri analiz etmek için kullanılabilir. Bu tez çalışmasında da ortaya konan yöntem vasıtasıyla da gösterilmeye çalışıldığı gibi zamana duyarlı araştırma veya analiz için oldukça faydalıdır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yönteme yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında ilk olarak core-shell partiküllü EVO C18 kolon kullanılmıştır. Klasik tamamen gözenekli silika içeren kolonların keskin olmayan pik şekli, etkin olmayan ayrımları ve uzun çalışma sürelerine alternatif olarak geliştirilen core-shell kolon, aşırı düşük ve yüksek pH değerlerinde bile performans avantajlarına sahiptir. pH sağlamlığı ve oldukça çok yönlü seçicilik özelliklerine sahip yeni nesil core shell teknoloji kolonlar bu çalışmada tercih edilen yeni nesil

HPLC kolonları olmuştur. Ancak yapılan deneme çalışmalarında Kinetex EVO C18 kolonu istenilen alıkonma zamanı ve kabul edilebilir taban çizgisi stabilitesinde beklenen performansı gösterememiştir. Bu nedenle core shell partiküllü bir diğer kolon olan Kinetex F5 kolonu ile çalışmalar devam ettirilmiştir.

Kinetex F5 kolonu ise hidrojen bağı, elektrostatik, hidrofobik, aromatik ve sterik/düzlemsel mekanizmalar dahil olmak üzere polar ve polar olmayan etkileşimlerin kombinasyonu ile HPLC de yöntem geliştirme çalışmaları için ideal bir çözümdür. Daha iyi çözünürlük, daha yüksek verimlilik, kolay yöntem transfer edilebilirliği ve azaltılmış solvent tüketiminden kaynaklanan maliyet tasarrufu gibi özellikleriyle Kinetex F5 kolonu hem geliştirilen yöntemin optimizasyonunda hem de bahse konu tez çalışmasının hedeflerine ulaşmasında önemli ölçüde katkı sağlamıştır.

İzokratik akış yöntemi ile devam eden optimizasyon çalışmalarında pik görüntülemesi ölü zamandan ve girişimlerden kurtarılamamıştır. Bu nedenle diğer aşamada yapılan optimizasyon denemesi hareketli faz gradiyent akış yöntemine göre içeriğinin belirlenmesine yönelik olmuştur. Bu aşamada, organik madde içeriğinin analiz süresinin sonuna kadar artarak devam etmesi ve daha sonrasında iki dakikalık sürede ilk başlangıç seviyesine inmesine izin verecek şekilde geliştirilen gradiyent akış yöntemi ile kuyruk ve pik yapılarında UV dedektör yanıtlarının daha başarılı olduğu görülmüştür.

Bilindiği üzere HPLC analizlerinde yüksek bir akış hızı, analitin durağan faz ile etkileşime girmeden hızlı bir dedektör yanıtı vermesine neden olurken, düşük bir akış hızı da analitin dedektör yanıtını zamansal açıdan öteleyebilir. Bu şartlar göz önünde bulundurularak yapılan akış hızı optimizasyon denemelerinde, Naloksonun çözeltide yer alan ancak tanımlanamayan kirlilik girişiminden ayrılmasını ve aynı zamanda kolonu daha geç terk eden Buprenorfinin de alıkonma süresinin de geliştirilen yöntemin on dakikadan kısa sürede tamamlanmasına imkan verecek şekilde olması hedeflenmiştir. Bu noktada belirlenen 0,75 mL/dk lık akış hızı bahsedilen her iki koşulu da sağlamıştır.

HPLC uygulamalarının sıcaklık denemesi 40°C'de yapılmış ve sıcaklık etkilerini görebilmek amacıyla 15°C ve 25°C denenmiştir. Bilindiği üzere, yüksek sıcaklıklarda vizkosite kaynaklı olarak analiz süreleri genellikle kısalmaktadır. Daha düşük sıcaklıklarda ise, tutulum oranı artar. Ancak yapılan optimizasyon çalışmalarında 40°C'de Nalokson ve Buprenorfin tutulumlarının beklenenin aksine ötelendiği görülmektedir. Bu durum NAL ve BUP'un kimyasal yapılarının artan sıcaklık ile etkileşime girmeye yatkınlığı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle BUP ve NAL piklerinin kuyruklanması ve yapılarının 25°C'de diğer sıcaklıklara göre daha düzgün olduğu ve bahse konu iki analitin ayrımlarının da en iyi 25°C de olduğunu göstermiştir. Bu durum aynı zamanda geliştirilen yöntemin oda sıcaklığında optimum çalışması ile ekstra fırın sıcaklığı ile ortaya çıkabilecek maliyet ve kirlilik gibi konularda tasarruf sağlar ve geliştirilen yöntemin literatüre olan etkinlik, yenilik ve etkililik gibi katkılarını perçinlemektedir.

Hareketli faz pH'si üzerinde yapılan denemelerde ise; pH'nin analiz sonuçlarına etkisinin çok olmadığı görülmüştür. En keskin pik şeklinin görüldüğü ve ayrımın kabul edilebilir olduğu pH değeri optimum olarak seçilmiştir.

Geliştirilen analizin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini arttırmak adına iç standard denemeleri yapılmıştır. İç standard olarak mirtazapin, raktopamin ve klorfeniramin denenmiştir. İç standard seçiminde hem analiz süresini uzatmayacak hem de biyolojik çalışmalar düşünülerek potansiyel hastaların kullanmayacağı maddelerden seçilmelidir. Bu kapsamda mirtazapinin antidepresan ilaçlarda ve klorfeniraminin de antihistaminik ilaçlarda olabileceği düşünüldüğünde veterinerlik ilaçlarında bulunabilen raktopamin bu çalışma için iç standard olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda raktopaminin tutulum zamanı da NAL ve BUP tutulumları arasında olması da seçim için önemli bir faktör olmuştur.

Geliştirilen yöntem ICH klavuzlarında belirtilen parametreler doğrultusunda valide edilmiş ve LOD ile LOQ değerleri BUP ve NAL için sırasıyla; 0,023 ve 0,070; 0,033 ve 0,098 µg/L'dir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, afyon bağımlılığı tedavisinde kullanılan buprenorfin/nalokson kombinasyonunun analizi için yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesi, bu önemli terapötik müdahalenin anlaşılmasını ve etkinliğini geliştirmede büyük umut vaat etmektedir.

Bu yenilikçi yaklaşımlardan elde edilen önemli bulgulardan biri, buprenorfin/nalokson tedavisi için optimal dozlama stratejilerinin belirlenmesidir. Araştırmacılar, hasta numunelerindeki uyuşturucu konsantrasyonlarını analiz ederek, yan etki veya yoksunluk semptomları riskini en aza indirirken etkili afyon bağımlılığı tedavisi sağlayan terapötik aralıklar oluşturabilmektedirler. Bu bilgiler, klinisyenlere dozaj ayarlamaları konusunda bilinçli kararlar almalarında rehberlik edebilir, böylece tedavi sonuçlarını ve hasta güvenliğini iyileştirebilir.

Ayrıca yenilikçi yaklaşımlar, hastanın buprenorfin/nalokson tedavisine bağlılığına ve uyumuna ışık tutmaktadır. Araştırmacılar, bu tez çalışmasında geliştirilen HPLC için yeni analiz yöntemiyle, hastanın reçete edilen tedavi rejimine bağlılığını hızlı, güvenilir ve objektif olarak değerlendirebilirler. Bu bilgi, tedavi başarısını garantilemek için ek destek veya müdahalelere ihtiyaç duyabilecek hastaların belirlenmesine yardımcı olabilir ve nihayetinde afyon bağımlılığıyla mücadele eden bireyler için uzun vadeli sonuçları iyileştirebilir.

Bu çalışma ile HPLC kullanılarak geliştirilen yöntemle eş zamanlı olarak BUP ve NAL başarıyla tespit ve tayin edilmiştir. Aynı zamanda yeni nesil core-shell teknolojiye sahip kolonların üstünlüğü gösterilmiştir. 10 dakikadan daha kısa sürede, seçici, etkin, doğru, kesin ve hassas bir yöntem geliştirilmiştir.

ÖZET

Opiyat Bağımlılığı Tedavisinde Kullanılan Buprenorfin/Nalokson Kombinasyonunun Analizi için Yenilikçi Yaklaşımların Geliştirilmesi

Opiyatların zaman içinde uzun süreli ve tekrarlı olarak kullanılmasının (OUD) yaygınlığı son on yılda benzersiz sayılara ulaşmış, aşırı doz ölüm oranlarını ve buna bağlı olarak da sosyoekonomik yükü artırmıştır. Dilaltı buprenorfin/nalokson tablet kombinasyonu opiyat bağımlılığı için etkili bir tedavi sağlamaktadır. Kısmi m-opioid reseptör agonisti olan buprenorfinin 4: 1 oranında kombinasyon halinde antagonist nalokson ile formüle edilen dil altı tablet, opioid bağımlı hastalar için etkili bir çekilme ve idame tedavisi sunmakta ve aynı zamanda farmakodinamik özelliklerinin iyi tolere edilmesi ile daha düşük kötüye kullanım potansiyeline sahip olması gibi avantajlar taşımaktadır. Bununla birlikte buprenorfin/nalokson için kullanılan yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri ve analiz teknikleri halen çok sınırlıdır. Bu çalışma kapsamında buprenorfin/nalokson için yüksek hassasiyete sahip, hızlı ve düşük tayin sınırlarına ulaşılabilen HPLC bazlı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bağımlılık, Buprenorfin, HPLC, kromatografik yöntem, Nalokson, opiyat.

SUMMARY

Development of Innovative Approaches for Analysis of Buprenorphine/Naloxone Combination Used in Opiate Addiction Treatment

The prevalence of long-term as well as repeated use of opioids (OUD) has reached unprecedented levels over the past decade, increasing overdose mortality, and thus resulting socioeconomic burden. A combination of buprenorphine and naloxone sublingual tablet is an effective treatment for opiate addiction. Sublingual tablet containing the antagonist naloxone at a ratio of 1 to 4 of buprenorphine, an m-opioid receptor partial agonist, provides effective withdrawal and maintenance therapy for opioid-dependent patients, while its pharmacodynamic properties are well tolerated. Although, extraction methods and analytical techniques for buprenorphine/naloxone are still very limited, it offers benefits such as reduced potential for abuse. The aim of this study was to develop his HPLC-based method with high sensitivity, speed and low detection limit for buprenorphine/naloxone.

Keywords: Addiction, Buprenorfine, chromatographic method, HPLC, Naloxon, opioid.

KAYNAKLAR

- AMASS L, KAMIEN JB, & MIKULICH SK. (2000). Efficacy of daily and alternate-day dosing regimens with the combination buprenorphine–naloxone tablet. *Drug and Alcohol Dependence*, **58**(1–2), 143–152.
- ANTHONY JC, WARNER LA, & KESSLER RC. (1994). Comparative Epidemiology of Dependence on Tobacco, Alcohol, Controlled Substances, and Inhalants: Basic Findings From the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psycho Pharmacology*, **2**(3), 244–268.
- ARROYO SEGUÍ H, MELÍN K, SANTIAGO QUIÑONES D, DUCONGE J. (2020). A review of the pharmacogenomics of buprenorphine for the treatment of opioid use disorder. *J Transl Genet Genom*; **4**, 263-77.
- AVDEEF A., BARRETT D. A., SHAW P. N., KNAGGS R. D., DAVIS S. S. (1996). Octanol-, chloroform-, and propylene glycol dipelargonat-water partitioning of morphine-6-glucuronide and other related opiates. *Journal of medicinal chemistry*, **39**(22), 4377–4381.
- BERRIDGE V. (2009). Heroin prescription and history. *The New England Journal of Medicine*, **361**(8), 820–1. <http://doi.org/10.1056/NEJMe0904243>.
- BRUNEN S, VINCENT P, BAUMANN P, HIEMKE C. (2011). Therapeutic drug monitoring for drugs used in treatment of substance-related disorders: Literature review using a Therapeutic Drug Monitoring Appropriateness Rating Scale. *Therapeutic Drug Monitoring*, **33**, 561–572.
- BRUNTON L, CHABNER B, KNOLLMAN B. (2010). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (12 ed.). New York: McGraw Hill.
- BUAJORDET I, NÆSS AC, JACOBSEN D, BRØRS O. (2004). Adverse events after naloxone treatment of episodes of suspected acute opioid overdose. *European Journal of Emergency Medicine*, **11**(1), 19-23.
- CHAWARSKI MC, SCHOTTENFELD RS, O'CONNOR PG, & PAKES J. (1999). Plasma concentrations of buprenorphine 24 to 72 hours after dosing. *Drug and Alcohol Dependence*, **55**(12), 157–163.
- CHIANG CN, HAWKS RL. (2003). Pharmacokinetics of the combination tablet of buprenorphine and naloxone. *Drug Alcohol Depend*, **70**(2 Suppl), 39-47.
- CIRAULO DA, HITZEMANN RJ, SOMOZA E, KNAPP CM, ROTROSEN J, SARID-SEGAL O, CIRAULO AM, GREENBLATT DJ, CHIANG CN. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple sublingual buprenorphine tablets in dose-escalation trials. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **46**(2), 179–192.
- COHIER C, SALLE S, FONTOVA A, MÉGARBANE B, ROUSSEL O. (2020). Determination of buprenorphine, naloxone and phase I and phase II metabolites in rat whole blood by LC-MS/MS, *J Pharm Biomed Anal.*, 180,113042.
- COLLINS N, BARNES TR, SHINGLETON-SMITH A, GERRETT D, and PATON C, “Standards of lithium monitoring in mental health trusts in the UK,” *BMC Psychiatry*, vol. **10**, no. 1, 2010.
- COWAN A. (2003). Buprenorphine: New pharmacological aspects. *International Journal of Clinical Practice Supplement*, **133**, 3–8.

- DEGENHARDT L, LARNEY S, KIMBER J, GISEV N, FARRELL M, DOBBINS T, BURNS L. (2014a). The impact of opioid substitution therapy on mortality post-release from prison: retrospective data linkage study. *Addiction*, **109**(8), 1306–1317. <http://doi.org/10.1111/add.12536>
- DARKE S. (2011). The life of the heroin user: typical beginnings, trajectories and outcomes. Cambridge University Press.
- DARKE S, ROSS J, MILLS J, WILLIAMSON A, HARVARD A, & TEESSON M. (2007). Patterns of sustained heroin abstinence amongst long-term, dependent heroin Users: 36 months findings from the Australian Treatment Outcome Study (ATOS). *Addictive Behaviors*, **32**(9), 1897–1906.
- ELARABİ HF, HASAN N, MARSDEN J, RADWAN, D, ADEM A, ALMAMARİ S, & ELRASHEED A. (2020). Therapeutic Drug Monitoring in Buprenorphine/Naloxone Treatment for Opioid Use Disorder: Clinical Feasibility and Optimizing Assay Precision. *Pharmacopsychiatry*, **53**(3), 115–121.
- ELKADER A, & SPROULE B. (2005). Buprenorphine: Clinical pharmacokinetics in the treatment of opioid dependence. *Clinical Pharmacokinetics*, **44**(7), 661–680.
- EMCDDA. (2016a). EMCDDA Insights: Preventing Overdose Deaths from Heroin and other Opioids: Pre-provision of Emergency Naloxone (Take-Home Naloxone). Lisbon: EMCDDA.
- ESER B, DİNÇEL AS (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları, *Journal of Health Services and Education*; **2**(2), 51-57.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2015). EMCDDA Heroin profile. Retrieved from <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/heroin>. [Date of retrieval 05January2017]
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2010). Annual report on the state of the drugs problem in Europe. Lisbon. Retrieved from <http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2010> [Date of retrieval 05January2017].
- FDA (1987). Guidelines for Submitting Samples and Validation Data for Methods Validation US Food and Drug Administration (1987) Center for Drug and Biologics Department of Health and Human Services.
- FELIU C, KONECKI C, BINET L, VAUTIER D, HAUDECOEUR C, OGET O, FOULEY A, MARTY H, GOZALO C, CAZAUBON Y, DJERADA Z. (2020), Quantification of methadone, buprenorphine, naloxone, opioids, and their derivatives in whole blood by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Analysis of their involvement in fatal forensic cases, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1152,122226.
- FISHMAN J, HAHN EF, & NORTON BI (1975). Comparative invivo distribution of opiate agonists and antagonists by means of double isotope techniques. *Life Sciences*, **17**(7), 1119-1125.
- FISHMAN J, ROFFWARG H, & HELLMAN L. (1973). Disposition of naloxone-7, 8-3H in normal and narcotic-dependent men. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **187**(3), 575-580.

- FULLER DC (2008), A Simple Gas Chromatography–Mass Spectrometry Procedure for the Simultaneous Determination of Buprenorphine and Norbuprenorphine in Human Urine, *Journal of Analytical Toxicology*, **32**, 626–630.
- GERVAIS JR & HOBBS GA, (2016), Use of an Acetyl Derivative to Improve GC–MS Determination of Norbuprenorphine in the Presence of High Concentrations of Buprenorphine in Urine, *Journal of Analytical Toxicology*, **40**(3), 208–212.
- GOSSOP M, STEWART, D, TREACY S, & MARSDEN J. (2002). A prospective study of mortality among drug misusers during a 4-year period after seeking treatment. *Addiction*, **97**(1), 39–47.
- GOSSOP M, GRIFFITHS P, POWIS B, & STRANG J. (1992). Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *British Journal of Addiction*, **87**(11), 1527–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1458032>
- GOODMAN L, & GILLMAN AG. (1996). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. (9th editio). New York, USA: McGraw Hill.
- GREEN TC, DOE-SIMKINS M. (2016). Opioid overdose and naloxone: The antidote to an epidemic? *Drug and Alcohol Dependence* **163**, 265–271.
- GREENWALD MK, JOHANSON CE, MOODY DE, WOODS JH, KILBOURN MR, KOEPPE RA, SCHUSTER CR, ZUBIETA JK. (2003). Effects of buprenorphine maintenance dose in mu opioid receptor availability, plasma concentrations, and antagonist blockade in heroin-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology*, **28**(11), 2000–2009.
- GUMUSTAS M, ZALEWSKI P, OZKAN S, USLU B (2019). The History of the Core–Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography, *Chromatographia*, **82** (1).
- GUMUSTAS M, KURBANOGU S, USLU B, OZKAN S. (2013). UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* **76**, 1365–1427.
- HANSCH C, LEO A, HOEKMAN D. (1995) Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, steric constants. ACS, Washington, DC.
- HEO Y.-A., SCOTT LJ. (2018). Buprenorphine/Naloxone (Zubsolv®): A Review in Opioid Dependence. *CNS Drugs*.
- HIEMKE C, BERGEMANN N, CLEMENT HW, CONCA A, DECKERT J, DOMSCHKE K, ECKERMANN G, EGBERTS K, GERLACH M, GREINER C, GRÜNDER G, HAEN E, HAVEMANN-REINECKE U, HEFNER G, HELMER R, JANSSEN G, JAQUENOUD E, LAUX G, MESSER T, MÖSSNER R, MÜLLER MJ, PAULZEN M, PFUHLMANN B, RIEDERER P, SARIA A, SCHOPPEK B, SCHORETSANITIS G, SCHWARZ M, GRACIA MS, STEGMANN B, STEIMER W, STINGL JC, UHR M, ULRICH S, UNTERECKER S, WASCHGLER R, ZERNIG G, ZUREK G, BAUMANN P. (2017). Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, **51**(01/02), 9–62. doi: 10.1055/s-0043-116492.
- ICH Guideline Q2 (R2) (2022). Validation of analytical procedures: text and methodology, March 2022.
- İNGİLİZ ELEKTRONİK İLAÇ ÖZETİ (2023). Erişim: [\[https://www.medicines.org.uk/emc/product/11650/smpc\]](https://www.medicines.org.uk/emc/product/11650/smpc) Erişim Tarihi: 13. Şubat. 2022.

- JONES HE. (2004). Practical considerations for the clinical use of buprenorphine. *Science & practice perspectives*, **2**(2), 4–20.
- KAUFMAN JJ, SEMO NM, KOSKI WS. (1976). Microelectrometric Titration Measurement of the p-KVs and Partition and Drug Distribution Coefficients of Narcotics and Narcotic Antagonists and Their pH and Temperature Dependence. *Journal of Medicinal Chemistry*, **18**(7), 647-55.
- KING L. (2009). Forensic Chemistry of Substance Misuse. RSC Publishing.
- LARANCE B, MATTICK R, ALI R, LINTZERIS N, JENKINSON R, WHITE N, KIHAS I, CASSIDY R, DEGENHARDT L. (2015). Diversion and injection of buprenorphine-naloxone film two years post-introduction in Australia. *Drug And Alcohol Review*, **35**(1), 83-91. doi: 10.1111/dar.12344.
- LIU Y, LI X, XU A, NASSER AF, HEIDBREDE C. (2016) Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine and naloxone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.*, **120**, 142-52.
- MARQUE P, & KINTZ P. (2004). Therapeutic drug monitoring of high-dose buprenorphine: Why and how? *Annales de Toxicologie Analytique*, **16**(4), 275-79.
- MARSDEN J, TAI B, ALI R, HU L, RUSH A, & VOLKOW N. (2019). Measurement- based care using DSM- 5 for opioid use disorder: can we make opioid medication treatment more effective? *Addiction*, **114**(8), 1346-1353. doi: 10.1111/add.1454.
- MARTIN WR. (1976). Drugs five years later: Naloxone. *Annals of Internal Medicine*, **85**(6), 765-768.
- MATTICK RP, ALI R, WHITE J, O'BRIEN S, WOLK S, & DANZ C. (2003). Buprenorphine versus methadone maintenance therapy: A randomised double blind with 405 opioid dependent participants. *Addiction*, **98**(4), 441–452.
- MCALDER SD, MILLS RJ, POLACK T, HUSSAIN T, ROLAN PE, GIBBS AD, HUSSEIN Z. (2003). Pharmacokinetics of high-dose buprenorphine following single administration of sublingual tablet formulations in opioid naïve healthy male volunteers under a naltrexone block. *Drug and Alcohol Dependence*, **72**(1), 75–83.
- MENDELSON J, UPTON R, EVERHART T, JACOB P, & JONES R. (1997). Bioavailability of sublingual buprenorphine. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **37**(1), 31–37.
- MICROMEDEX Buprenorphine/naloxone ® Healthcare Series, Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado Copyright © 1974–2011.
- MILROY C. (2002). Karch's Pathology of Drug Abuse. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **95**(5), 262–263.
- MOODY DE, SLAWSON MH, STRAIN EC, LAYCOCK JD, SPANBAUER AC, FOLTZ RL. (2002), A liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies, *Anal Biochem.*, **306**(1), 31-9.
- MOSTAFAVI A, ABEDI G, JAMSHIDI A, AFZALI D, TALEBI M. (2009), Development and validation of a HPLC method for the determination of buprenorphine hydrochloride, naloxone hydrochloride and noroxymorphone in a tablet formulation. *Talanta.*, **77**(4), 1415-9.

- NIELSEN S, DIETZE P, LEE N, DUNLOP A, TAYLOR D. (2007). Concurrent buprenorphine and benzodiazepine use and self-reported opioid toxicity in opioid substitution treatment. *Addiction*, **102**(4), 616–622. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01731.x.
- NIH (2007). Naloxone Hydrochloride Injection. Retrieved from <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=76f7eee1-d524-43a4-a868-ffa9f29638a6>.
- ORMAN J, & KEATING G. (2009). Buprenorphine/naloxone: A review of its use in the treatment of opioid dependence. *Drugs*, **69**(5), 577–607.
- PATTEET L, MORRENS M, MAUDENS KE, NIEMEGEREERS P, SABBE B, and NEELS H, “Therapeutic drugmonitoring of common antipsychotics,” *Therapeutic Drug Monitoring*, vol. **34**, no. 6, pp. 629–651, 2012.
- PAULZEN M, EAP CB, GRÜNDER G, and KUZIN M, “Pharmacokinetic interaction between valproic acid, meropenem, and risperidone,” *Journal of Clinical Psychopharmacology*, vol. **36**, no. 1, pp. 90–92, 2016.
- PAZOS A, & FLOREZ J. (1984), A comparative study in rats of the respiratory depression and analgesia induced by mu- and delta-opioid agonists’, *European Journal of Pharmacology*, **99**, 15–21.
- PEACOCK A, LEUNG J, LARNEY S, COLLEDGE S, HICKMAN M, REHM J, GIOVINO GA, WEST R, HALL W, GRIFFITHS P, ALI R, GOWING L, MARSDEN J, FERRARI AJ, GREBELY J, FARRELL M, DEGENHARDT L. (2018). Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*, **113**(10), 1905-1926. doi: 10.1111/add.14234.
- RAO TN. (2018). Validation of Analytical Methods. InTech. doi: 10.5772/intechopen.72087.
- RANG HP, DALE MM, RITTER JM, FLOWER RJ, & HENDERSON G. (2012). Rand and Dale's Pharmacology (7th ed.). London: Churchill Livingstone.
- Reckitt Benckiser. (2012). Suboxone Prescribing Information. Retrieved from <https://www.suboxone.com/content/pdfs/prescribing-information.pdf>
- ROBINS LN. (1993). Vietnam veterans’ rapid recovery from heroin addiction: a fluke or normal expectation? *Addiction*, **88**(8), 1041–1054.
- SCHOTTENFELD RS, PAKES J, ZIDONIS D, & KOSTEN T. (1993). Buprenorphine: Dose-related effects on cocaine and opioid use in cocaine-abusing opioid-dependent humans. *Biol Psychiatry*, **34**, 66–74.
- SCHULTEIS G, CHIANG D, & ARCHER C. (2009). Relative potency of the opioid antagonists naloxone and 6-alpha-naloxol to precipitate withdrawal from acute morphine dependence varies with time post-antagonist. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **92**(1), 157-163.
- SHARMA S, GOYAL S, CHAUAN K. (2018). A Review on Analytical Method Development and Validation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, **10**(6), 8-15.
- SOMAINI L, SARACINO MA, MARCHESELLI C, ZANCHINI S, GERRA G, RAGGI MA. (2011), Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients, *Anal Chim Acta.*, **702**(2),280-7.

- SMITH K, HOPP M, MUNDIN G, BOND S, BAILEY P, WOODWARD J, & BELL D. (2012). Low absolute bioavailability of oral naloxone in healthy subjects. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **50**(5), 360-367.
- SMITH K, HOPP M, MUNDIN G, LEYENDECKER P, BAILEY P, GROTHE B, REIMER K. (2008). Single- and multiple-dose pharmacokinetic evaluation of oxycodone and naloxone in an opioid agonist/antagonist prolonged-release combination in healthy adult volunteers. *Clinical Therapeutics*, **30**(11), 2051-2068.
- STEPANOVA D. and BERAN RG. (2015). "The benefits of antiepileptic drug (AED) blood level monitoring to complement clinical management of people with epilepsy," *Epilepsy & Behavior*, vol. **42**, pp. 7–9.
- STRANG J, BABOR T, CAULKINS J, FISCHER B, FOXCROFT D, HUMPHREYS K, LIU LM. (2012). Drug policy and the public good: evidence for effective interventions. *Lancet* (London, England), 379(9810), 71–83. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61674-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61674-7).
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı (2012).
- THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA USP 23 (1994). Validation of compendial methods, General information <1225>. The United States Pharmacopoeial Convention Inc, Taunton, MA
- TKACZ J, SEVERT J, CACCIOLA J, RUETSCH C. (2012) Compliance with buprenorphine medication-assisted treatment and relapse to opioid use. *Am J Addict*; **21**: 55–62.
- WALSH SL, PRESTON KL, STITZER ML, CONE EJ, & BIGELOW GE. (1994). Clinical pharmacology of buprenorphine: Ceiling effects at high doses. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **55**(5), 569–580.
- WANG S. (2019), Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors, *Cell Transplantation*, **28**(3), 233–238.
- WHITE M, BURTON R, DARKE S, EASTWOOD B, KNIGHT J, MILLAR T, MUSTO V, MARSDEN J. (2015). Fatal opioid poisoning: a counterfactual model to estimate the preventive effect of treatment for opioid use disorder in England. *Addiction*, **110**(8), 1321-1329. Doi: 10.1111/add.12971.
- World Health Organisation (2009). Guidelines for the Psychosocially Assisted Pharmacological Treatment of Opioid Dependence. Retrieved February 10, 2017, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547543>.
- WHO. (2014). Community Management of Opioid Overdose. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137462/1/9789241548816_eng.pdf?ua=1&ua=1
- World Health Organization. (1993). The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Diagnostic criteria for research. Geneva.
- ZHOU SF, XUE CC, YU XQ, LI C, WANG G. (2007). Clinically Important Drug Interactions Potentially Involving Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 and The Role of Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* **29** (6), 687-710.