

**ANTI-HİPERTANSİF BİR İLAÇ OLAN LOSARTAN
POTASYUMUN FARMASÖTİK PREPARATLARDA
VE TAVŞAN PLAZMASINDA BİYOANALİTİK
YÖNTEM VALİDASYONU**

Mehmet Emrah YAMAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU

Yüksek Lisans Tezi - 2012

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

**ANTI-HİPERTANSİF BİR İLAÇ OLAN LOSARTAN
POTASYUMUN FARMASÖTİK PREPARATLARDA VE
TAVŞAN PLAZMASINDA BİYOANALİTİK YÖNTEM
VALIDASYONU**

Mehmet Emrah YAMAN

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU**

**ERZURUM
2012**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

ANTI-HİPERTANSİF BİR İLAÇ OLAN LOSARTAN
POTASYUMUN FARMASÖTİK PREPARATLARDA VE TAVŞAN
PLAZMASINDA BİYOANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Mehmet Emrah YAMAN

Tez Savunma Tarihi : 14.08.2012

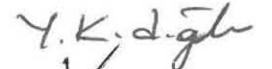
Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU



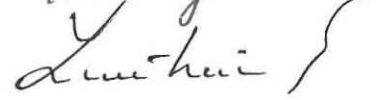
Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU



Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Zühal GÜVENALP



Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2012

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hipertansiyon ve Kardiyovasküler Hastalıklar	3
2.2. RAAS ve Anjiyotensin Antagonistleri	6
2.3. Anjiyotensin Reseptör Antagonistlerinin Bulunuşu ve Gelişim Süreci.....	10
2.4. Losartan Potasyum (LP)	11
2.4.1. LP'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	11
2.4.2. LP'nin Farmakolojik Özellikleri.....	12
2.4.3. LP'nin Farmakokinetik Özellikleri.....	12
2.4.4. LP'nin Güvenlik ve Tolerebilitesi	13
2.4.5. Losartan ve Diğer ARA II Ajanlarının Karşılaştırılması.....	13
2.4.6. LP'nin Kullanım Şekli ve Dozu.....	15
2.4.7. LP İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri	16
2.5. LP Analizi için Analitik Yöntemler.....	16
2.6. Spektroskopik Yöntemler	29
2.6.1. Spektroskopi	29
2.6.2. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri.....	30

2.6.3. Elektromanyetik Spektrum	30
2.6.4. Işığın Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu	31
2.6.5. Lambert - Beer Kanunu	33
2.6.6. Lüminesans	35
2.6.7. Fotolüminesansın Esasları	36
2.6.8. Jablonski Diyagramı	36
2.6.9. Fosforesans	38
2.7. Floresans	39
2.7.1. Floresansa Etki Eden Faktörler	39
2.7.2. Floresansa Maddenin Yapısının Etkisi	40
2.7.3. Floresansa Maddenin Yapısal Rijiditenin Etkisi	41
2.7.4. Floresansa Çözücü ve Sıcaklık Etkisi	41
2.7.5. Floresansa pH Etkisi	42
2.7.6. Floresansa Çözünmüş Oksijen Etkisi	42
2.7.7. Floresansa Derişimin Etkisi	43
2.7.8. Floresansa Moleküldeki Süstitüentlerin Etkisi	43
2.7.9. Floresansa Gelen Işığın Dalga Boyunun ve Şiddetinin Etkisi	43
2.7.10. Fotolüminesans Teorisi	44
2.7.11. Stokes Kanunu	47
2.7.12. Stern Volmer Eşitliği	48
2.7.13. Uyarılma (Eksitasyon) ve Emisyon Spektrumları	48
2.7.14. Floresans Spektroskopisi için Cihazlar	49
2.7.15. Florometre ve Spektrofluorometrelerin Bileşenleri	49
2.8. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	51
2.8.1. Yöntem Geliştirme	51

2.8.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)	52
3. MATERYAL VE METOT.....	58
3.1. Kullanılan Materyaller	58
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	58
3.1.2. Cihazlar	58
3.2. Yöntem.....	59
3.2.1. Spektrofluorometre Yöntem Şartları	59
3.2.2. LP'nin Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi	59
3.2.3. LP'nin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi	59
3.2.4. LP için Uyarma ve Emisyon Dalga Boyunun Belirlenmesi	60
3.2.5. LP için Standart Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2.6. LP için Biyoanalitik Yöntem Validasyonu	61
3.2.7. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	63
3.2.8. Numune Alımı Protokolü ve Deney Hayvanlarına Ait Özellikler.....	63
3.2.9. Farmakokinetik Hesaplamalar	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. LP'nin Floresans Şiddetine Çözücü ve pH'ın Etkisi	65
4.2. LP için Geliştirilen Spektrofluorometri Yöntem Geçerlilik Testleri	67
4.2.1. Özgünlük (Belirleyicilik)	67
4.2.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı	69
4.2.3. Doğruluk/ Kesinlik	70
4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	71
4.2.5. Geri Kazanım	71
4.2.6. Stabilite (Kararlılık).....	73
4.3. Gerçek Numunelere Uygulama	75

4.3.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	75
4.3.2. Tavşanlarda LP'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	78
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92
KAYNAKLAR	93
EK-1.ÖZGEÇMİŞ	104
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	107
EK-3. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI.....	108

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D.'da gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimimin başlangıcından bu yana bana güvenen, başarılı olacağıma inanan, değerli bilgi, deneyim ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim dalı başkanımız, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU başta olmak üzere,

Tez sürecindeki ve öncesindeki tüm çalışmalarında beni yönlendiren, bana her konuda yardımcı olan, en yoğun olduğu zamanlarda dahi yardım edebilmek adına değerli vakitlerini harcayan tez danışmanım, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'na,

Çalışmalarımın her aşamasında büyük emeği olan ve her konuda bana destek veren değerli çalışma arkadaşım Sayın Araş. Gör. Onur ŞENOL'a

Tavşan kanlarının alınmasında yardımcı olan değerli arkadaşlarım Sayın İrfan ÇINAR'a, Sayın Araş. Gör. Beyzagül POLAT'a, Sayın Araş. Gör. Ahmet Gökhan AĞGÜL'e, Sayın Araş. Gör. Elif DOĞAN'a ve Sayın Araş. Gör. Zerrin KUTLU'ya,

Çalışma süresinde bana her konuda yardımcı olan tüm değerli hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma,

Her zaman beni destekleyen, sevgi ve ilgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erzurum, 2012

Mehmet Emrah YAMAN

ÖZET

Anti-hipertansif bir ilaç olan losartan potasyumun farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında biyoanalitik yöntem validasyonu

Amaç. Bu çalışmada, farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında losartan potasyumun (LP) belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntemin geliştirilmesi ve geçerlilik testlerinin yapılması; uygulama aşamasında hem farmasötik prepatlarda hem de oral olarak LP verilen tavşan plazmasında LP miktar analizinin gerçekleştirilmesi ve LP farmakokinetik parametrelerin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot. Farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında LP'nin belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesinde farklı çözücülerde LP'nin 200 nm ile 800 nm dalga boyları arasında taraması yapılarak floresans spektrumu alındı. Uyarma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 248 nm ve 410 nm olarak belirlendi. Çalışmalarda metanol-sülfüröz asit (pH:2) çözücü karışımı kullanıldı. Tavşan plazması çalışmalarında, plazma asidik ortamda metil-tertiyer-bütül eter (MTBE) ile karıştırılıp organik faz ayrıldıktan sonra LP organik fazdan NaOH ile geri ekstrakte edildi.

Bulgular. Hem standart hemde plazma çözeltileri için 0.025-0.5 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlendikten sonra bu derişim aralığında kalibrasyon eğrileri çizildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Yöntemin kesinlik ve doğruluk değerleri sırasıyla % 6.52 ve %5.68 den küçük olarak tespit edildi. Ayrıca, tavşanlara tek doz 10 mg/kg LP olacak şekilde verildikten sonra önceden belirlenen zamanlarda toplanan plazma örneklerinde LP'nin miktar analizi yapıldı. Elde edilen verilerden plazma derişim-zaman grafiği çizilip farmakokinetik parametreleri tayin edildi.

Sonuç. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan spektrofotometrik yöntem, Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen ve Sarvas isimli farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında LP miktar tayini için başarı ile uygulandı. Tavşan çalışmalarında, modelden bağımsız yöntem ile farmakokinetik parametrelerden maksimum plazma derişimi (C_{max}), maksimum derişime erişebilmek için geçen zaman (t_{max}), yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), klirensi (CL) ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0-\infty}$) parametre değerleri sırasıyla, 0.395 µg/mL, 1.0 saat, 1.31 saat, 3.83 L/saat ve 2.61 µg saat/mL olarak tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Losartan Potasyum, spektrofotometre, farmakokinetik, farmasötik preparat

ABSTRACT

The Bioanalytic Method Validation of an Anti-hypertensive Drug, Losartan Potassium, in Pharmaceutical Formulations and Rabbit Plasma

Aim. It is aimed to develop and validate a new spectrofluorometric method in order to determine LP in pharmaceutical formulations and rabbit plasma and also make analysis for both pharmaceutical formulations including LP and investigating the pharmacokinetic data of LP after oral administration to rabbit in application step in this study.

Material and Method. Spectrofluorometric method was developed and validated to determine the concentration of LP in pharmaceutical formulations and plasma and in order to do that spectra of LP was taken by trying different solvents in wavelengths between 200 and 800 nm. Excitation and emission wavelengths were found to be 248 nm and 410 nm, respectively. Methanol-sulphurous acid (pH: 2) solution mixture was used in this study. LP was extracted from rabbit plasma by methyl-tertiary-butyl-eter (MTBE) in acidic media and then back extracted with NaOH.

Results. After determining the linearity of method in concentration range of 0.025-0.5, calibration curves were plotted and validation tests were done in this concentration range. Precision and accuracy values of the method were calculated as lower than % 6.52, 5.68. Furthermore, after oral administration of LP to rabbit in the amount of 10 mg/kg, amount of LP was determined on plasma samples that were collected in accordance with a timetable, Plasma concentration graph was plotted from these obtained data and pharmacokinetic parameters were calculated.

Conclusion. Developed and validated method was successfully applied on pharmaceutical formulations (Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen and Sarvas). by free to model. In the rabbit studies, using a method is independent of the model, values of some parameters which were maximum plasma concentration (t_{max}), half life ($t_{1/2}$), Clearance (CL) and area under curve ($AUC_{0-\infty}$) were calculated as 0.395 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 hour, 1.31 hour, 3.83 L/hour and 2.61 $\mu\text{g}\cdot\text{hour/mL}$, respectively.

Keyword: Losartan Potassium, spectrofluorometry, pharmacokinetic, pharmaceutical formulation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	: Angiyotensin-Dönüştürücü Enzim
AT ₁	: Anjiyotensin-I
AT ₂	: Anjiyotensin-II
ARA II	: Anjiyotensin II Antagonisti
RAAS	: Renin-Anjiyotensin-Aldesteron Sistemi
LP	: Losartan Potasyum
EXP 3174	: Losartan karboksilik asit (Losartan Potasyumun Aktif Metaboliti)
HCTZ	: Hidroklorotiazid
BSS	: Bağlı Standart Sapma
GK	: Geri Kazanım
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOD	: Gözlenebilme Sınırı
LOQ	: Tayin Alt Sınırı
MTBE	: Metil Tersiyer Bütil Eter

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hipertansiyonun yaş aralıklarına göre görülme sıklığı	4
Şekil 2.2. RAAS'ın şematik gösterimi	6
Şekil 2.3. RAAS üzerinde ACE inhibitörleri ve ARA II 'ler için eylem mekanizmaları .	8
Şekil 2.4. LP'nin molekül yapısı	11
Şekil 2.5. Elektromanyetik dalga.....	30
Şekil 2.6. Elektromanyetik spektrum	30
Şekil 2.7. Enerji seviyeleri arasındaki geçişler.....	37
Şekil 2.8. Jablonski diyagramı.....	37
Şekil 2.9. Nanal ve panafin kimyasal yapıları	40
Şekil 2.10. Floren ve bisfenilin kimyasal yapısı.....	41
Şekil 2.11. pH değişikliklerin molekül yapısını değiştirmesi.....	42
Şekil 2.12. Derişimin floresans şiddeti ile değişimi	43
Şekil 2.13. Bir spektrofotometrenin başlıca kısımları.....	50
Şekil 4.1. Metanol-sülfüröz asit çözeltisinde hazırlanan LP çözeltisinin (0.5 µg/mL) floresans spektrumu	66
Şekil 4.2. Metanol-sülfüröz asit çözeltisinin floresans spektrumu	66
Şekil 4.3. LP'nin standart çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu.....	68
Şekil 4.4. LP'nin plazma çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu.....	68
Şekil 4.5. Boş plazmanın floresans spektrumu	69
Şekil 4.6. LP'nin $\lambda_{uy} = 248$ nm ve $\lambda_{em} = 410$ nm'de çizilen kalibrasyon eğrileri	70
Şekil 4.7. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Cozaar (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	76
Şekil 4.8. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Eklips (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	77

Şekil 4.9. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Loxibin (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	77
Şekil 4.10. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Sarilen (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	78
Şekil 4.11. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Sarvas (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	78
Şekil 4.12. Coozar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşan plazmalarının floresans spektrumu.	79
Şekil 4.13. Coozar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşan plazmasında LP'nin derişim-zaman grafiği.....	80

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. AT ₁ ve AT ₂ reseptörlerinin aracılık ettikleri AT ₂ etkileri	8
Tablo 2.2. Anjiyotensin reseptör antagonistlerinin farmakokinetik parametreleri	9
Tablo 3.1. LP için spektrofloreometre yöntem şartları	59
Tablo 4.1. LP'nin floresans şiddetine çözücü ve pH'ın etkisi (0.5 µg/mL).....	67
Tablo 4.2. LP standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri.....	70
Tablo 4.3. LP standart ve plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	71
Tablo 4.4. Farmasötik preparatlara katım yapılan LP çözeltilerinin geri kazanım değerleri	72
Tablo 4.5. Tavşan plazmasına katım yapılan LP çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri.....	73
Tablo 4.6. LP standart çözeltilerin stabilitesi.....	73
Tablo 4.7. LP plazma çözeltilerinin stabilitesi	75
Tablo 4.8. LP içeren farmasötik prepratların spektrofloreometri yöntemi ile miktar tayini	78
Tablo 4.9. Coozar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşanda LP'nin farmakokinetik parametreleri	80

1. GİRİŞ

Hipertansiyon, damardaki kan basıncının normalden yüksek olduğu kronik bir hastalıktır. Kan basıncı yerleşmiş uygulamaya göre, kalbin kasılması sırasında oluşan en büyük basınç (sistolik) ve kalbin kasılması sırasında oluşan en küçük basınç (diyastolik) olarak ölçülür. Hipertansiyon, kalp ve böbrek rahatsızlıkları riskini hem bir arada hem de sıklıkla göstermesi nedeniyle dünya genelinde bir halk sağlığı problemidir.

Losartan potasyum (LP), hipertansiyon tedavisinde kullanılan Anjiyotensin II reseptör antagonistlerinden (ARA-II) birisidir. Renin anjiyotensin aldesteron sistemine katılarak, aldosteron sekresyonu ve sempatik aktivasyona neden olan fizyolojik olarak aktif olan Anjiyotensin-II (AT₂) reseptörünü inhibe ederek antihipertansif etki gösterir.

Hipertansiyonun tanı ve tedavisinde önemli bir ilerleme olmasına rağmen, kan basıncı kontrolü dünya genelinde yetersiz kalmaktadır. Hipertansiyonun yaygınlığı, hastalığın doğru bir şekilde teşhis edilememesi ve hastaların bilinçsizliği ile birleşerek yetersiz tedavinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

Hipertansiyon tedavisinde nonfarmakolojik önlemlere ek olarak ilaç tedavinin önemli bir yeri vardır. Fakat ilaçlar her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen yine de hastaya verildiğinde etkisi yetersiz olabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç ya da diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi veya ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin analizi bilimsel açıdan önemli çalışmalardır.

Miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi gibi kalitatif ve kantitatif analizlerde çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. Uygulanacak analitik yöntemin nasıl seçilmesi gerektiği hususunda net bir şey söylemek mümkün değildir. Genel olarak yöntem seçiminde ilk adım analiz sırasında ölçülmek istenen değerlerin belirlenmesi ve buna ulaşmak için en hızlı ve güvenli yolun araştırılmasıdır.

Spektroskopi, genel anlamda ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanır ve spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Floresans ve fosforesansın her ikisi de, ışın enerjisini absorplayarak uyarılmış hale gelen bir molekül, iyon veya atom tarafından absorplanan ışın enerjisinin ışın yayılması şeklinde geri verilmesi anlamına gelen lüminesans çeşididir. Yayılan ışınlar bir florometrede veya spektroflorometrede kaydedilir. Spektroflorometri yöntemi, derişimleri 10^{-6} - 10^{-9} M arasında olan maddeleri çok büyük bir kesinlik, doğruluk ve seçicilikle tayin etme özelliğinden dolayı, ultraviyole spektroskopisi ve atomik absorpsiyon spektroskopisi gibi diğer spektroskopik yöntemlere göre bazı üstün özelliklere sahip olduğu, kromatografik yöntemlere göre ise daha kolay ve ucuz olduğu görülmektedir.

LP'nin yapısındaki imidazol halkasına bağlı ve yapının elektron yoğunluğunu arttıran klor (-Cl), süstitüe olmamış benzen halkası ve bileşiğın yapısal rijitlik özelliğı ile LP asidik ortamda lüminesans özellik gösterir. LP'nin yapısal uygunluğı nedeniyle çalışmamızda spektroflorometri yöntemi seçilmiştir.

LP'nin farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda spektrofotometrik, spektroflorometrik ve HLPC yöntemleri ile analizinin yapılabileceğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Fakat tavşanlarda LP'nin oral uygulaması sonrası spektroflorometri yöntemi ile yapılan bir farmakokinetik çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma da, farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında LP'nin belirlenmesi için spektroflorometrik bir yöntem geliştirilmesi; geliştirilen yöntemin geçerlilik testlerinin yapılması; yöntemin uygulama aşamasında ise hem LP içeren farmasötik prepatlarda LP'nin miktar analizinin gerçekleştirilmesi hem de tavşanlara oral olarak verilen LP preparatının plazma derişimlerini ve farmakokinetik verilerin incelenmesi amaçlanmaktadır.

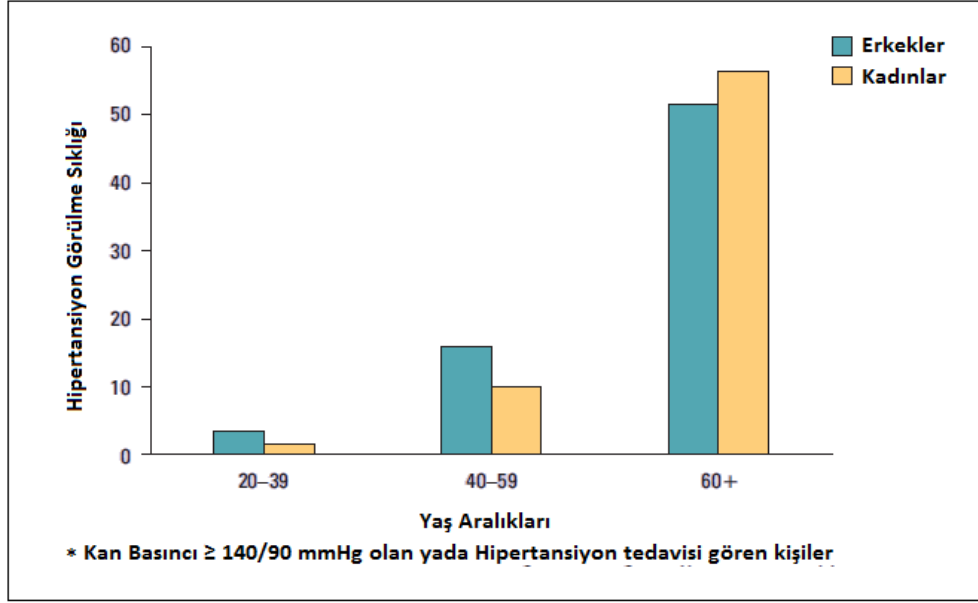
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Hipertansiyon kan basıncının¹ devamlı olarak 140/90 mm-Hg değerinin üzerinde olması anlamına gelir. Sigara ve kötü beslenmeden sonra başlıca ölüm ve sakatlanma nedenlerinden biri ve kardiyovasküler hastalıklar için en büyük risk faktörü olarak dünya çapında bir halk sağlığı problemidir²⁻⁴. Son yıllarda teşhis ve tedavi konusunda önemli ilerlemeler olsa da dünya çapındaki hipertansif hastaların üçte birinin kan basıncı normalize edilebilmekte, söz konusu hastalarda çok ciddi sağlık sorunları gözlenmektedir. Dünya genelinde hastalığı teşhis edilemediği için hiçbir şey söylenemeyen milyonlarca hipertansif hasta bulunmaktadır⁵.

Hipertansiyon dünya genelinde 600 milyon insanda görülen ve her yıl 3 milyon insanın ölümüne neden olan yaygın bir hastalıktır⁶. Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişkin popülasyonunun (43 milyon kişi) % 24'ünde hipertansiyon görülmektedir⁷. Birleşik Krallık'ta bu rakamın çok daha yüksek olduğu, 16 yaş üzeri yetişkinlerin % 37'sinde hipertansiyon olduğu bildirilmektedir⁸. Hipertansiyon hastalığının görülme sıklığı ilerleyen yaşlarla belirgin şekilde artar (Şekil 2.1)^{4,9}. İngiltere'de 60-79 yaş arası 4286 kadında yapılan araştırmada % 50'sinin hipertansiyon hastası olduğu belirlenmiştir¹⁰. Ayrıca ilerleyen zamanlarda nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak hipertansiyon görülme sıklığının artacağı öngörülmektedir.

Hipertansiyonun tanı ve tedavisinde önemli bir ilerleme olmasına rağmen, kan basıncı kontrolü dünya genelinde yetersiz kalmaktadır. Hipertansiyonun yaygınlığı, hastalığın doğru bir şekilde teşhis edilememesi ve hastaların bilinçsizliği ile birleşerek yetersiz tedavinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Yetersiz tedavinin temel nedeni ise klinik uygulamalarda monoterapinin yaygın olmasıdır⁸.



Şekil 2.1. Hipertansiyonun yaş aralıklarına göre görülme sıklığı

Sonuç olarak, yeni hipertansiyon yönergeleri hastalarda hedef kan basıncı değerlerine ulaşmak için kombine ilaç tedavisinin önemini vurgulamaktadırlar.

Hipertansiyonun tedavi edilmemesi durumunda, hastalara çok büyük zararlar verebilmektedir. Kontrol altına alınamayan hipertansif hastalarda;

- Kalp, beyin, göz ve böbreklerde hasar oluşabilir,
- Kroner kalp rahatsızlıkları ve ateroskleroz (damar çeperinde kalınlaşma ve damar yolunda daralma) görülebilir^{3,9,11}.
- Kalp krizi riski artabilir.¹²

Hipertansiyon gelişiminin kesin nedenleri bilinmese de çeşitli risk faktörleri gelişim olasılığını arttırmaktadır. Hipertansiyon gelişiminde;

- Birinci derece akrabalarda hipertansiyon varlığı,
- Afrikalı olmak,
- Erkek olmak,
- İleri yaşlarda olmak (erkeklerde 55 yaş ve üzeri, kadınlarda 65 yaş ve üzeri),
- Fazla miktarda alkol tüketmek,

- Sedanter ve inaktif bir yaşam biçimine sahip olmak, riski arttıran parametrelerdir^{4,13,14}.

Hipertansiyonun patofizyolojisi, bireyler arasında farklı etkilere neden olan, birbiri ile ilişkili muhtemel faktörlerin hastalığa katkısı nedeniyle belirsizdir¹³. Sekonder hipertansiyon olarak adlandırılan hipertansiyon bireylerin yaklaşık % 5'inde görülür. Sekonder hipertansiyonun başlıca nedenleri şunlardır;

- Böbrek hastalıkları
- İlaçlar (östrojen kontraseptifler, kortikosteroidler, meyan kökü, carbenoxelone, sempatomimetikler ve non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar)
- Endokrin rahatsızlıkları (akromegali, Cushing sendromu (hiperkortisizm), primer hiperaldosteronizm, konjenital hiperplazi, feokromositoma, tiroid hastalığı, hiperparatiroidizm)
- Aort koarktasyonu (aorttaki daralma sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır)
- Hamilelik¹⁵.

Hipertansiflerin kalan % 95'inde ise hastalığın gerçek nedeni net olarak tanımlanamamaktadır. Bu gibi durumlar, primer ve esansiyel hipertansiyon olarak bilinir.

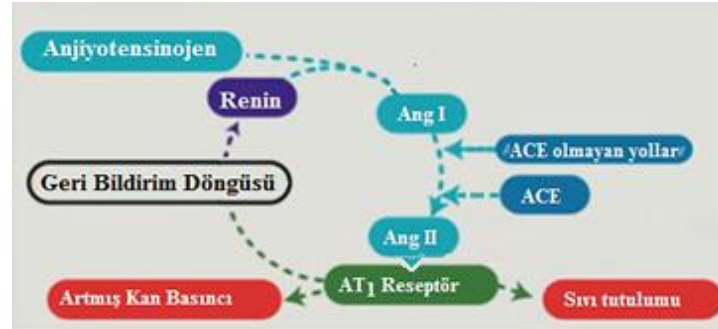
Vücuttaki bir takım fizyolojik mekanizmalar normal kan basıncının sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu tip sistemlerin bir rahatsızlığı hipertansiyonun oluşmasında rol oynayabilir. Kardiak debi (kalbin bir dakikada periferik sirkülasyona pompaladığı kan miktarıdır) ve periferik direnç (damar iç çeperine yapılan basınç) kan basıncı kontrolü ile direkt olarak ilişkilidir. Fakat bunun dışında etkili olan birkaç sistem daha vardır;

- Renin-anjiyotensin sistemi
- Otonom sinir sistemi

- Endotelin (dolaşım sisteminin tüm yapılarının iç yüzünü örten ince katman), bradikinin peptidleri, artiyal natriüretik peptid (kuvvetli bir damar genişletici hormon), ouabain (kalp üzerinde uyarıcı etkiye sahip bir glikozid)¹³.

2.2. Renin Anjiyotensin Aldesteron Sistemi (RAAS) ve Anjiyotensin Antagonistleri

RAAS, sıvı hacmi elektrolit dengesi ve kan hacmi üzerine etki ederek hipertansiyon patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. Renin, öncelikli olarak böbrekteki jukstaglomerüler hücreleri tarafından üretilen bir enzimdir, anjiyotensijenin inaktif bir madde olan anjiyotensin I (AT₁) reseptöre dönüşümünü katalize eder. Daha sonra Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) AT₁'i kuvvetli bir vazokonstriktör etkiye, aldosteron sekresyonu ve sempatik aktivasyona neden olan fizyolojik olarak aktif olan anjiyotensin II (AT₂) reseptörüne dönüştürür(Şekil 2.2). Bu dönüşüm mekanizması sonucu hipertansiyon gelişimi görülür¹⁶⁻¹⁸.



Şekil 2.2. RAAS'ın şematik gösterimi.

AT₁ ve AT₂ sadece % 34'lük bir homolojiyi paylaşırlar ve farklı sinyal iletim yolları vardır¹⁹⁻²².

AT₁ reseptörleri, böbrek, kalp, damar düz kas hücreleri, beyin, böbrek üstü bezleri, trombositler, adipositler ve plasentada bulunmaktadır. AT₂ reseptörleri fetusun

gelişimi sırasında önemlidir fakat doğum sonrası dönemde sayıları azalır²². Yetişkin dokularında, bu reseptörler özellikle uterus, böbreküstü bezleri, merkezi sinir sistemi, kalp ve böbrekte düşük seviyelerde mevcuttur. Deneysel olarak, kalp hipertrofisi, miyokard infarktüsü ve vasküler yara iyileşmesi gibi durumlarda AT₂ reseptörleri yeniden ortaya çıkar ya da sayılarında artış görülür²³.

AT₂ reseptörünün bilinen bütün klinik etkilerine AT₁ reseptörleri aracılık eder (Tablo 2.1). AT₂ reseptörlerinin fizyolojik rolü kısmen anlaşılabilmiştir. AT₂ reseptörlerinden kaynaklandığı düşünülen fonksiyonlar hücre büyümesinin inhibisyonu, hücre farklılaşmasının artışı ve apoptosistir^{24,25}. Yani AT₂ reseptörlerinin, AT₁ reseptörlerinin aracılığıyla oluşan bazı AT₂ etkilerini dengeleyici bir rolü olabilir. Ancak bu konu halen tartışmalıdır^{26,27}. Üreter ve renal toplayıcı sistemin gelişiminde AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin bir rolü olduğuna dair kanıtlar da bulunmaktadır. AT₂ geninin bozukluğun da böbrek ve idrar yollarda doğumsal anomaliler görülmüştür^{28, 29}

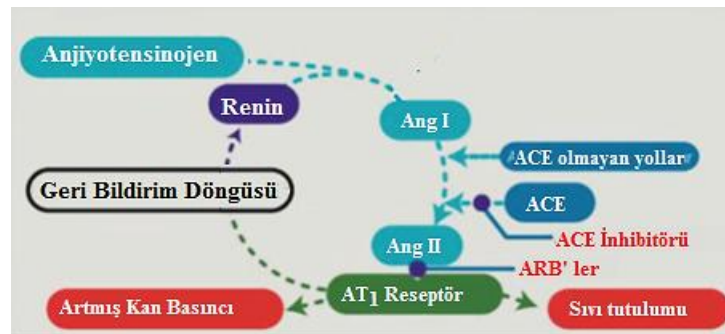
RAAS, renin inhibitörleri (β -blokerler), ACE inhibitörleri, AT₂ reseptör blokerleri ve aldosteron inhibitörleri tarafından bloke edilebilir³⁰. Dünya Sağlık Örgütü–Uluslararası Hipertansiyon Derneği (WHO-ISH) raporunda antihipertansif olarak kullanılacak 6 grup ilaç vardır. Bunların ikisi ACE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör antagonisti (ARA-II)'dir³¹.

AT₂ reseptörünün etkisinin azaltılmasında, ARA-II grubu bileşiklerin ACE inhibitörlerine nazaran daha etkili olması beklenir. Çünkü AT₂ adrenal medulla, rahim, yumurtalık ve diğer beyin bölgelerinde bulunur, ancak kardiyovasküler homeostazi ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir³². ARA-II'ler düz kas kasılması, sempatik presör mekanizması ve aldosteron salgılanması gibi AT₂ reseptörü kaynaklı biyolojik aktiviteleri bloke ederler¹⁸. Böylece hipertansiyonla ilişkili AT₂ aktivitelerini de inhibe

etmiş olurlar^{17,18,32}. ACE inhibitörleri ve AT₂ reseptör blokerleri için eylem mekanizmaları Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmektedir.

Tablo 2.1. AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin aracılık ettikleri AT₂ etkileri

AT ₁ Reseptörleri	AT ₂ Reseptörleri
<ul style="list-style-type: none"> • Vazokonstriksiyon (serebral, renal, koroner) • Sodyum retansiyonu (anjiotensin, aldosteron üretimi) • Su tutma (vazopressin sürüm) • Renin-bastırma (negatif geri besleme) • Miyositler ve düz kas hücre hipertrofisi • Vasküler ve miyokardiyal fibrozis uyarılması • İnotropik / kontraktıl (kardiyomiyosit) • Kronotropik / aritmojenik (kardiyomiyosit) • Plazminojen etkinleştirici inhibitörü-1 uyarılması • Superanoxide oluşumunun stimülasyonu • Sempatik sinir sisteminin aktivasyonu • Artmış endotelin salgılanması 	<ul style="list-style-type: none"> • Antiproliferation / hücre büyümesinin inhibisyonu • Hücre farklılaşması • Doku onarımı • Apoptozis (vazodilatasyon) • Böbrek ve idrar yolları geliştirilmesi



Şekil 2.3 RAAS üzerinde ACE inhibitörleri ve AT₂ reseptör blokerleri için eylem mekanizmaları

ACE inhibitörleri ve ARA-II aracılığıyla renin anjiyotensin sistemi üzerinde önemli etkileri vardır (Şekil 2.2). Basamaklı reaksiyon decapeptid AT₁'in oluşturulması

ile başlar. AT₁, tonin ya da katepsin gibi renin olmayan bir enzim aracılığıyla da oluşturulabilir. Daha sonra AT₁, ACE kinaz II enzimi ile AT₂'ye dönüştürülür. Diğer anjiyotensin peptidleri biyolojik etkilere sahip olmalarına rağmen AT₂ sistemin son ürünüdür. ACE için tripsin, katepsin veya kalp kimaz gibi alternatif enzimatik yollarla da AT₁ dönüştürülebilir, ancak bu gibi diğer enzimatik yolların AT₂ üretimine ne kadar katkıda bulunacağı net değildir. Bu alternatif yollar aslında ACE inhibitörlerinin, AT₂ plazma derişimini tamamen bastıramadıklarını açıklar. Bununla birlikte ne derece etkili oldukları tam olarak bilinmemektedir. Uzun süreli ACE inhibisyonu sırasında ACE aktivitesi artış gösterir ve uyarılan renin salgılanması nedeniyle plazma AT₁ seviyesi yüksektir³³. Böylece plazma AT₂ seviyesi, ACE inhibisyonu sırasında ölçülemez hale gelir. Bradikininin inaktif peptidlere yıkımına katıldığı için ACE aynı zamanda kinaz II olarak adlandırılır. ACE inhibisyonu plazma bradikinin seviyesinde artışa neden olur³⁴.

Onaylanmış ARA-II grubu ilaçların farmakokinetik özellikleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir³⁵. Bu ilaçların antihipertansif etkileri, tedavi başladıktan 2-4 hafta içinde ortaya çıkar. Tansiyon düşürücü etkiyi artırmak için ARA-II dozajı arttırılabileceği gibi, hidroklorotiazid gibi bir diüretik düşük dozlarda eklenebilir. Hidroklorotiyazid, hafif natriürez ve kan damarlarının vazodilatasyonu gibi mekanizmalarla kan basıncı azalmasını sağlar³⁶.

Tablo 2.2. Anjiyotensin reseptör antagonistlerinin farmakokinetik parametreleri

İlaç	Maksimum derişim zamanı (saat)	Mutlak biyoyararlanım	Yiyecek ile kullanım	Yarılanma ömrü (saat)	Proteine bağlanma
Losartan EXP3174	1saat 3-4	~ % 33	%10 düşürücü	2 6-9	%98.7
Valsartan	2-4	~ %25	%40-%50 düşürücü	6	%95.0
İrbesartan	1.5-2	%60- %80	Etki yok	11-15	%90.0
Kandesartan	3-4	~ %15	Etki yok	9	> %99.0
Telmisartan	0.5-1	%42-%58	%6-%20 düşürücü	24	%99.5

2.3. Anjiyotensin Reseptör Antagonistlerinin Bulunuşu ve Gelişim Süreci

Anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB), vücutta AT₂ hormonunun etkilerini bloke ederek kan basıncını düşüren anti-hipertansif bir ilaç grubudur. Yapıları ARA-II'ler ile benzerdir ve ARA II reseptörlerine inhibitör olarak bağlanırlar. ARA-II blokörleri günümüzde klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır³⁷.

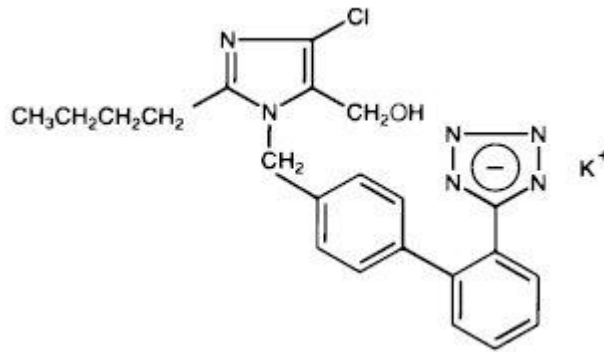
1898'de fizyolog Robert Tigerstedt ve öğrencisi Ara II'leri tavşanlar ve böbrek ekstreleri üzerine enjekte etmişler ve deney sonucunda "Renin" adını verdikleri böbreklerde üretilen bir proteinin kan basıncında yükselmeye sebep olduğu sonucuna varmışlardır³⁸. 1930'larda Globat, köpeklerde renal kan akışının kısıtlandığı deneyler yürütmüş ve iskemi böbreklerin gerçekte vazokonstriksiyona neden olan bir kimyasal salgıladığını bulmuştur⁴². Yine 1930 yılında, reninin kendisinin kan basıncını düşürmediği ama bu reaksiyonu kataliz eden Anjiyotensin I ve Anjiyotensin II isimli enzimlerin oluşumundan sorumlu olduğu bulmuştur³⁸. 70'li yıllarda bilim adamları, anjiyotensin II'nin kalp ve böbreklere zarar verdiğini ve bununda plazma renin aktivitesi yüksek olan bireylerde miyokardiyal enfarktüs ve inme riskine neden olduğunu ortaya koymuşlardır³⁰. Aynı yıllarda, Anjiyotensin dönüştürücü enziminin (ACE) tanınmasıyla birlikte ARA II'lerin kan basıncı, elektrolit ve sıvı dengelerinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı teyid edilmiştir³⁹.

Başlangıçta, ARA II antagonistlerinin geliştirilmesinden önce anjiyotensin peptid analogları olan saralasin ve diğer anjiyotensin analoglarının güçlü birer ARA II reseptör blokörleri olarak görülmüştür. Fakat bunlarda biyoyararlanım düşük olduğu belirtilmiştir⁴⁰. 80'li yılların başında bir seri imidazol-5-asetik asit ile farelerde kan basıncı azaldığı görülmüştür. S-8307 ve S-8308 olarak adlandırılan non-peptid ARA II bileşikleri bulunmuş ve Anjiyotensin II reseptörlerine daha benzer hale gelmeleri için moleküler modelleme yapılmış ve oral olarak aktif, güçlü ve seçici non-peptid AT₁

reseptör blokeri olan “Losartan” geliştirilmiştir. Losartan 1995 yılında yapılan klinik çalışmalarla klinik kullanım için onaylanmıştır. Bu tarihten itibaren benzer altı adet ARA II bileşiği daha onaylanmıştır^{41,46}.

2.4. Losartan Potasyum (LP)

LP, [(2-bütül-4-kloro-1-{[2-(1H-tetrazol-5-il) bifenil-4-il]metil}-1H-imidazol-5-il) metanol monopotasyum] yapısında olup kapalı formülü $C_{22}H_{23}ClKN_6O$ şeklinde gösterilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. LP'nin molekül yapısı

2.4.1. LP'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

1. LP beyaz veya kirli beyaz-grimsi renkte, kristal yapıda bir tuzdur¹³.
2. Suda ve alkoldeki çözünürlüğü yüksektir, etil asetat, bütül asetat ve sikloheksandaki çözünürlüğü oldukça düşüktür⁴².
3. Erime noktası 183.5 – 184.5°C aralığındadır.
4. pH değeri 7.0-8.5 aralığındadır.
5. Molekül ağırlığı 461.00 g/mol'dür.
6. Kurutulduğunda ağırlık kaybı maksimum % 5'dir.

2.4.2. LP'nin Farmakolojik Özellikleri

LP, ilk tanımlanan ARA-II grubu ilaçtır. Son derece seçici bir AT₁ reseptör antagonisti prototipinde olan losartan, zayıf ARA-II olan bir dizi 1-benzilimidazol-5-asetik asit serilerinden elde edilmiştir.

LP'nin günde bir kez 50-150 mg dozajı ile elde edilen ortamala kan basıncı azalması sistolik basınç için 5.5-10.5 mm Hg, diastolik basınç için 3.5-7.5 mm Hg'dır. Hipertansiyon tedavisinde LP'nin etkinliği ve güvenilirliğinin incelendiği bir çalışmada, tedavinin ilk birkaç haftasında kan basıncının azaldığı gösterilmiştir. Çift-kör çalışmalarına göre LP, kan basıncını düşürmede iyi tolere edilir ve enalapril ve nifedipin kadar etkilidir⁴³⁻⁴⁵. Rat vasküler düz kasında yapılan bir çalışmada, LP medyan inhibitör derişimi 20 nmol/L olan AT₂'nin AT₁ reseptörlerine bağlanması olayı ile yarıştığı ve AT₂ reseptörleri için özel bir afiniteye veya kısmi bir agonist özelliğe sahip olmadığı belirlenmiştir. LP'nin aktif metaboliti EXP 3174'tür. LP ile karşılaştırıldığında, aktif metaboliti (EXP 3174) daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve plazma derişimine bağlı olarak daha uzun antihipertansif etki gösterir¹⁷. Yapılan çalışmada intravenöz uygulamada, EXP 3174, LP'ye göre 10-20 kat daha güçlü ve daha uzun bir aktivite zamanına sahip olduğu gösterilmiştir¹⁷.

2.4.3. LP'nin Farmakokinetik Özellikleri

Oral uygulama sonrasında LP'nin sadece üçte biri absorbe olur ve karaciğerde sitrokrom P450, 2C9 ve 3A4 enzimleri tarafından aktif metaboliti olan EXP 3174'e dönüştürülür⁴⁶⁻⁴⁸. LP'ye göre daha yüksek etki gösteren ve daha uzun yarılanma ömrüne sahip olan (6-7 saat EXP 3174 için ve 2 saat Losartan için) bu metabolit, ilacın hipertansif etkisinden daha çok sorumludur^{49,50}.

Losartan, oral olarak alındıktan sonra kandaki en yüksek derişimine 1 saat içinde ulaşır, EXP-3174 için bu süre 3-4 saattir⁴⁶. Maksimum plazma derişimi yaklaşık olarak

eşit olduğu halde, derişim-zaman eğrisinin altında kalan alan (EAA), EXP-3174'de LP'ye göre dört kat daha fazladır^{43, 46-51}.

LP safra kesesi yoluyla ve % 4'lük kısmı değişime uğramadan idrar yoluyla vücuttan atılır⁴⁶.

2.4.4. LP'nin Güvenlik ve Tolerebilitesi

Bir sınıf olarak ARA II grubu ilaçlar mükemmel bir güvenlik ve tolerebilite profiline sahiptirler. ARA II'lerin klinik yan etki insidansı oldukça düşüktür ve yan etkiler çoğunlukla hafif ve geçici nitelikte olup tedavinin kesilmesini gerektirmez. Bu yan etkiler diğer antihipertansif ilaçlarda görülen yan etkilerden (ACE II inhibitörlerinde görülen öksürük⁵² veya dihidropridin kalsiyum blokerlerinde meydana gelen ödem^{44, 53, 54}) genellikle farklıdır. Klinik çalışmalarda, ARA II ile tedavi edilen hastalarda en sık görülen yan etkiler baş dönmesi, baş ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyonu, öksürük ve gastrointestinal bozukluklar olmuştur. Bu olaylar plasebo alan hastalarda da aynı oranda gözlenmiştir⁵⁵. Anjiyoödem riski vardır ama bu ARA II'lerde çok nadiren görülen bir yan etkidir. ACE inhibitörleri gibi ARA II'ler de hiponatremik ve sıvı kaybı, böbrek yetmezliği veya böbrek arter darlığı olan hastalarda dikkatle kullanılmalıdır^{56,57}.

2.4.5. Losartan ve Diğer ARA II Ajanlarının Karşılaştırılması

ARA II grubunun antihipertansif etkileri üzerindeki çalışmalarda tam olarak yapılamamasına rağmen aradaki küçük farklılıklar kısa dönem karşılaştırmalı çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır⁵⁸⁻⁶⁰, ancak bu bulguların klinik etkileri halen belirsizliğini korumaktadır. Örneğin LP ve valsartan için yapılan çift-kör esaslı karşılaştırmalı bir çalışmada, 1369 hipertansif hasta valsartan (80 mg), LP (50 mg) veya placebo ilaçları almak üzere rastgele ayrılmış ve ilaçları 4 hafta boyunca günde iki doz olarak

almışlardır⁶⁰. Tedaviye cevap veren hasta sayısı valsartan grubunda biraz daha yüksek olmasına rağmen, hem LP hemde valsartan grubunda sistolik ve diastolik basınçta benzer şekilde önemli azalmalar görülmüştür. 24 saat boyunca kan basıncı ölçümünün yapıldığı 187 hastalık bir diğer çalışmada ise, LP (50 mg) ve valsartan (80 mg) kullanan hastalarda 24 saatlik ölçümlerin tamamında benzer şekilde kan basıncının düştüğü görülmüştür⁶¹. Kan basıncındaki düşüşte ve tedaviye cevap veren hasta sayısında LP sayısal olarak biraz daha etkili olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

LP ve diğer ARA II grubu ilaçlar arasında yapılan karşılaştırmalar bazı anlamlı farklılıklar gösterse de meta-analiz sonuçları bu farklılıkların klinik ve istatistiksel açıdan önemli olmadığını ortaya koymaktadır^{62,63}. ARA II grubundan LP, valsartan ve irbesartan ile yapılan klinik çalışmalarda elde edilen veriler ajanlar arasında antihipertansif etki bakımından önemli örtüşmeler gözlenmiştir⁶². Bu çalışmanın meta-analizinde 24 saatlik doz aralığının sonundaki kan basınçları karşılaştırılmış ve hem sistolik hemde diastolik kan basınçlarındaki değişimlerin benzer olduğu görülmüştür. Tavsiye edilen dozlarında, her üç ajan da sistolik kan basıncında 16.1 - 20.6 mm-Hg ve diastolik kan basıncında 9.9-13.6 mm-Hg arasında bir düşüş elde edilmiştir ve doz miktarı izin verilen ölçülerde arttırıldığında bütün ARA II'lerin basınç düşürücü etkileri yaklaşık olarak %5 oranında arttığı gözlenmiştir.

LP, valsartan ve irbesartanın AT₁ reseptör blokajının karşılaştırıldığı bir çalışmada irbesartanın 150 mg'lık tek dozunun AT₁ reseptörleri üzerinde LP ve valsartana göre daha büyük ve daha uzun ömürlü bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur⁶⁴. Çalışmaya göre, uygulamadan 4 saat sonra, AT₂ reseptörü kaynaklı sistolik basınç artışını LP % 43, valsartan % 51 ve irbesartan % 88 oranında bloke etmiştir. İlaç etkisinin uygulamadan 24 saat sonra her üç etken madde için de gözlendiği ancak

sadece irbesartanın 30'uncu saatte reseptör blokajına dair sinyaller verdiği belirlenmiştir. Reseptör bloke etme gücünden dolayı irbesartanın diğerlerine göre daha güçlü antihipertansif etki gösterdiği anlamına geldiği söylenebilir.

ARA-II'lerin farmakolojik özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada ise, kandesartanın diğerlerinden daha güçlü etki gösterdiği bildirilmiştir^{65,66}. Ancak bu, kandesartanın devamlı olarak diğerlerinden daha yüksek bir antihipertansif etkinlik içinde olduğu anlamına gelmemektedir.

2.4.6. LP'nin Kullanım Şekli ve Dozu

LP için başlangıç dozu 50 mg'dır. Bu doz için aktivite süresi 24 saattir. Beklenen antihipertansif etki görülmez ise günde iki doz kullanılabilir⁶⁷. Ayrıca yapılan bir çalışmada, LP'nin günde bir kez 100 mg'lık doz kullanımını günde iki kez 50 mg'lık doz kullanımını ile karşılaştırılmış ve her iki dozaj şeklinde aynı antihipertansif etki gösterdiği tespit edilmiştir⁶⁸.

LP ve hidroklorotiazidin bir arada olduğu kombinasyonlar da mevcuttur. Bu kombinasyonlar 12.5 mg hidroklorotiazid ve 50 mg LP içerir. Bazı araştırmacılar doza bağlı yan etkilerin görülme olasılığını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Dozaj artırılması yerine bu kombinasyonunun kullanılmasını önermektedirler. Dozaj günde bir veya iki kez olmalıdır⁴⁴.

Sağlıklı gönüllülerde yapılan tek ve çoklu doz çalışmaları ile LP'nin AT₂ reseptörlerini inhibe ettikleri kanıtlanmıştır^{51,69,70}. Bu çalışmalarda, LP'nin uygulamadan 24 saat sonra inhibitör etkisini koruduğunu, iyi tolere edilebildiği için LP'nin güçlü bir ARA-II olduğu ve günde tek dozun yeterli olduğu gösterilmiştir. Hipertansif hastalarda yapılan bir tekrarlayan doz (7 gün boyunca) çalışmasında ise LP'nin yedinci günde antihipertansif etkisinin ilk güne göre daha fazla olduğu

gösterilmiştir. Bu nedenle tek doz yerine LP'nin çoklu dozlar halinde uygulanmasının daha yararlı olacağı sonucuna varılmıştır⁷¹.

2.4.7. LP İçeren Ticari Preparatlar ve İçerikleri

1. Cozaar 100 mg, Cozaar 50 mg - Merck Sharp & Dohme İlaç Sanayi
2. Eklips 100 mg, Eklips 50 mg - Sanovel İlaç Sanayi
3. Fellow 100 mg, Fellow 50 mg - Munir Sahin İlaç Sanayi
4. Hilos 100 mg, Hilos 50 mg –Nobel İlaç Sanayi
5. Losartil 100 mg, Losartil 50 mg - D rogsan İlaç Sanayi
6. Loxibin 100 mg, Loxibin 100 mg - Biofarma İlaç Sanayi
7. Sarilen 100 mg, Sarilen 50 mg - Ali Raif İlaç Sanayi
8. Sarvas 100 mg, Sarvas 50 mg - Zentiva İlaç Sanayi

2.5. LP Analizi için Analitik Yöntemler

Lastra ve ark.⁷² farmasötik preparatlarda LP'nin belirlenmesi için 1. Türev Spektrofotometri yöntemi geliştirmişlerdir. LP'nin 1. türev spektrumunda 234 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirilmiş olup 0.9938 korelasyon katsayısı ile 4-6 mg/L derişim aralığında yöntemin doğrusal ve geri kazanımının % 100.79±1.1 olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca pH 2-9 değerleri arasında hazırlanan tampon çözelti ile pH'ın 1.türev değerine olan etkisi araştırılmış ve 1.türev değerini önemli ölçüde değiştirmediği için pH değerinin sabitlenmesine gerek olmadiğı sonucuna varmışlardır. Ayrıca geliştirdikleri türev spektrofotometri yönteminin hidroklorotiyazid içermeyen farmasötik preparatlarda LP'nin analizi için uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Ansari ve ark.⁷³ tabletlerde LP'nin belirlenmesi için 1. Türev Spektrofotometri ve HPLC yöntemleri geliştirmişler ve doğrusallık, seçicilik, geri kazanım, kesinlik, doğruluk ve hassasiyet parametreleri ile spektroskopik yöntemin geçerlilik testlerini

gerçekleştirmişlerdir. 1. türev spektrumunda 232.5 nm dalga boyunda, HPLC kromatogramında 254 nm dalga boyunda ölçümler alınmış olup her iki yöntemde 2-50 µg/L derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. HPLC yönteminde, ODS-1 kolonu, asetonitril fosforik asit (pH:3) (60:40 h/h) hareketli faz karışımı ve 1 mL/dak akış hızı çalışma parametreleri kullanılmıştır. 1. türev spektrofotometri yönteminin düşük % CV değerleri (% 2.1 ve % 2.9) ile yüksek kesinlikte ve % 98 geri kazanım değeri ile yüksek doğrulukta olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca hazırlanan LP çözeltilerinin 1 ay boyunca stabil kaldığını tespit etmişlerdir. Geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem ile tabletlerde yapılan analizlerde % 85-% 115 aralığında sonuçlar elde edilmiş ve yöntemin bir farmasötik prepatlarda yapılan analiz yöntemi olarak kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

El-Shaboury ve ark.⁷⁴ farmasötik preparatlarda LP, irbesartan, valsartan ve kandesartanın spektrofluorometri yöntemi ile belirlenmesi için en uygun pH, çözücü ve sıcaklık koşullarını araştırmışlardır. 10 mg LP standart çalışma çözeltileri değişik polaritelere sahip çözücülerde (su, asetonitril, etanol, metanol ve propan-2-ol), değişik asit çözeltilerinde (HCl, sitrik asit, asetik asit, sülfirik asit, nitrik asit, okzalik asit ve fosforik asit), farklı pH değerlerinde ve farklı sıcaklıklarda ölçülerek en yüksek floresans şiddeti veren optimum koşulları belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, LP analizinde kullanılan çözücünün polaritesi arttıkça ölçüm hassasiyeti artmış ve en uygun çözücünün su olduğu tespit edilmiştir. Tampon çözelti içerisindeki asit derişiminin (0.1 M – 1 M) etkili olmadığı gözlenmiştir. Kullanılan asit çözeltileri arasında sitrik asit çözeltisinin en ideal asit olduğunu belirlenmiştir ve 0.1 M sitrik asit çözeltisi ile pH 2-7 arasında yapılan denemelerde pH 2-2.5 arasının floresans hassasiyetin % 10 civarında arttığı ve daha sonra pH 7 değerine kadar kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. 0.9982-0.9991 arasında değişen korelasyon katsayısı ile

0.006-1.7 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğu belirlenmiş ve yöntemin hidroklorotiyazid içeren veya içermeyen farmasötik preparatlarda LP'nin analizi için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir.

Erk .⁷⁵ farmasötik prepratlarında LP ve hidroklorotiazidin birlikte belirlenmesi için HPLC ve spektrofotometri yöntemlerini geliştirmiştir. HPLC yöntemi ile kromatografik ayırım, C18 ters faz kolonunda sodyum dihidrojen fostat (pH 5.5), metanol ve asetonitril (8:2:1, h/h/h) hareketli fazı karışımı kullanılarak başarılmıştır. UV esaslı dedektörde LP ve hidroklorotiaziti 265 nm dalga boyunda belirlemiş ve sırasıyla analitlerin 1-30 µg/mL ve 2-20 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğunu tespit etmiştir. Spektrofotometri yöntemi ile ise LP ve hidroklorotiazidin standart çalışma çözeltileri, asetonitril ve su (1:1, h/h) çözücü karışımında hazırlanmıştır. Sırasıyla 238.3 nm ve 230.4 nm dalga boylarında birbirlerinin 1. türev spektrum oranlarına katkılarının olmadığını belirtmiş ve 238.3 nm dalga boyunda LP'nin ikili karışım içinde analiz edilebileceğini göstermiştir. Yöntemin LP ve hidroklorotiazit için sırasıyla 10-50 µg/mL ve 2-30 µg/mL derişim aralığında doğrusal ve 0.64 µg/mL ve 0.088 µg/mL gözlenebilir sınıra sahip oldukları bildirilmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen yöntemlerin farmasötik preparatlarda LP'nin analizi için uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Carlucci ve ark.⁷⁶ HPLC yöntemi ile tabletlerde LP ve hidroklorotiazid (HCTZ) analizine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Kromatografik ayırım asetonitril ve fosfat tamponu çözeltisi (pH 4.0; 0.1 M) (35:65, h/h) kullanılarak C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. LP için 3.0-7.0 µg/mL ve HCTZ için 0.5-2.0 µg/mL derişim aralığında yöntemin doğrusal olduğunu tespit edilmiştir. LP ve HCTZ için LOQ değerleri sırasıyla 0.08 µg/mL ve 0.05 µg/mL olarak belirlenmiştir. İç standart olarak furprofenin kullanılmış olup LP, HCTZ ve iç standanın alıkonma zamanları sırasıyla 1.8,

4.3 ve 7.2 dak olarak belirlenmiş ve kromatogramlarda herhangi bir interfere pike rastlanmadığı belirtilmiştir. Yöntemin kesinliğinin LP için 0.03-3.0% ve HCTZ için % 0.3-3.8 aralığında değiştiği görülmüştür. Elde edilen verilere dayanarak yöntemin LP ve HCTZ içeren farmasötik preparatlarda LP ve HCTZ analizi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Prabhakar ve ark.⁷⁷ ilaç ve sentetik karışım halindeki dozaj formu içinde LP'nin belirlenmesi için asidik ortamda (pH 1.2), Calmagite (CT) ve Orange-II (O-II) ile ayrı ayrı reaksiyona sokularak sırasıyla 491 nm ve 486 nm'de renkli kompleks ve iyon çiftlerinin oluşumu esasına dayanan kinetik yöntemler geliştirmişlerdir. Sırasıyla turuncu-kırmızı ve turuncu oluşan kompleks ve iyon çiftleri kloroform ile ekstrakte edildikten sonra spektrofotometri yöntemi ile spektrumları alınmıştır. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerin 10-100 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, LP'nin kompleks bileşikleri için pH değerinin spektrofotometrik ölçümlerde son derece önemli olduğu belirtilmiştir. pH tampon çözeltisi ile pH 1.2-10 aralığında yapılan çalışmada, pH 1.2-3 aralığında absorbansın yükseldiğini, pH 4-10 aralığında ise hiç absorbans göstermediği tespit edilmiştir. Geçerlilik tesleri ile önerilen yöntemin, LP'nin katı hal ve dozaj formunda LP'nin miktar analizi için rutin kalite kontrol teslerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Bonfilio ve ark.⁷⁸ farmasötik kapsülde LP analizi için bir UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada en uygun analiz koşullarını belirlemek amacıyla Doehlert dizaynı yöntemi (analiz sonuçlarını etkileyen faktörlerin belirli ölçülerde değiştirilmesi sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel analizi ile en uygun koşulların hesaplandığı matematiksel bir yöntem) kullanılmıştır. Değişken faktörler olarak çözeltinin pH'ı (2.0, 3.25, 4.5, 5.75 6.2 ve 7.0) ve fosfat tamponunun mobil faz içerisindeki oranı (% 60, % 65 ve % 70) seçilmiştir. Optimum kromatografik ayırım,

potasyum fosfat tamponu (pH 6.2; 58 mmol/L) ve asetonitril (65:35, h/h) hareketli faz karışımı kullanılarak 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin 0.998 korelasyon katsayısı ile 30-70 mg/L derişim aralığında doğrusal olduğu ve üç farklı farmasötik preparat için geri kazanımın % 95'den büyük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak yöntemin farmasötik preparatlarda LP analizi için uygun olduğu bildirilmiştir.

Özkan⁷⁹, tabletlerde ve insan plazmasında LP ve HCTZ'nin birlikte belirlenmesi için bir RP-HPLC yöntemi geliştirmiştir. C₁₈ ters faz kolon, 0.01 M KH₂PO₄: asetonitril (65:35, h/h) (pH:3.1) hareketli faz karışımı ve 232 nm dalga boyu çalışma parametreleri kullanarak kromatografik ayırımı gerçekleştirmiştir. Yöntemin doğrusallığı LP ve HCTZ için sırasıyla 25-10000 ng/mL ve 50-10000 ng/mL derişim aralığında elde edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri ise LP için 1.02 ng/mL ve 3.39 ng/mL, HCTZ için 4.49 ng/mL ve 14.96 ng/mL olarak bulunmuştur. Plazmadan LP ve HCTZ, asetonitril kullanılarak ekstrakte edilmiş ve geri kazanımın her iki analit için de % 97.7'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak yöntemin farmasötik preparatlarda ve plazmada LP ve HCTZ analizlerinde kullanılabilir olduğu vurgulanmıştır.

Zhao ve ark.⁸⁰, bozundurmaya uğramış (40°C, % 75 nem oranı, 3 yıl) LP tabletlerini LC-MS ve LC-MS/MS yöntemleri ile analiz etmişler ve bu şartlar altında LP'nin bozunmasını ve oluşan yeni moleküllerin kimyasal yapılarını incelemişlerdir. Hem LC-MS hemde LC-MS/MS yöntemi için tabletler asetonitril:metanol (1:1, h/h) içerisinde çözülerek çözeltileri hazırlanmış ve LP'nin dimerik türevleri ve aldehit olan üç adet eser miktarda bozunma ürünü tespit edilmiştir. Bozunma ürünleri özgün maddelerin tandem kütle spektrumları ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

Hertzog ve ark.⁸¹ tabletlerde LP'nin belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. C₈ kolon, 1.0 mL/dk akış hızı, 20 µL enjeksiyon hacmi, 20 mM fosfat tamponu (pH: 7) ve asetonitril hareketli faz karışımı, gradiyent elüsyon ve 280 nm dalga

boyu çalışma parametreleri kullanılarak kromatografik ayırım sağlanmıştır. Doğruluk, doğrusallık, geri kazanım ve hassasiyet gibi parametreler kullanılarak geliştirilen yöntemin geçerlilik testleri yapılmıştır. Sonuç olarak sunulan yöntemin ilaç maddelerinin kantitatif analizi için uygun olduğu bildirilmiştir.

Ritter ve ark.⁷⁷ insan plazmasında LP ve aktif metabolitini (EXP 3174) belirlemek için floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan analitler, 1.0 M fosforik asit ile asitlendirilmiş ortamda MTBE ile ekstraksiyonun ardından 0.05 M NaOH çözeltisi ile geri ekstraksiyon sonrası elde edilmiştir. Çözeltinin pH değerinin floresans dedektör cevabındaki hassasiyet üzerinde son derece etkili olduğunu bildirmişler ve en uygun pH değerini araştırdıklarını belirtmişlerdir. Optimum pH'ın 2.5 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yüzden elde edilen plazma ekstraktları 0.5 M sitrat tamponu ile asitlendirildikten sonra analiz edilmiş ve LP ve EXP 3174 için elde ettikleri geri kazanımın her ikisi için de % 90'ın üzerinde olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca analitlerin hareketli fazdaki çözünürlüğünü arttırmak amacıyla 10 µL isopropanol çözeltisi eklemiştirler. Kromatografik ayırım, 1.25 mL/dak. akış hızında, 0.015 M fosforik asit (pH 2.3;)-asetonitril (75:25, h/h) hareketli faz karışımının izokratik elüsyonu ile başarılı ve analitler floresans dedektör (λ_{eks} : 250 nm , λ_{em} : 370 nm) ile saptanmıştır.

Cagigal ve ark.⁸² insan idrarında LP ve valsartanın spektrofotometrik analizi için en uygun pH, çözücü, sıcaklık ve slit aralığını belirlemek için deneysel dizayn metodolojileri geliştirmişlerdir. İlaç içermeyen idrar örnekleri 20-50 yaş aralığında sağlıklı bireylerden, ilaç içeren örnekler ise tedavi altındaki hipertansiyon hastalarından alınmış olup elde edilen idrar örnekleri C₁₈ kartuşlarının kullanıldığı katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar uçurularak optimal koşullar olarak kabul edilen asetonitril-0.05 M fosfat tamponu (pH:2) (5:95 h/h) çözücü

karışımında farklı sıcaklık ve dalga boyu aralıklarında spektrofloretrade ölçülmüştür. Yapılan ölçümler ile LP ve valsartan için 20 ± 5 °C’de ve 5 nm slit aralığında ve 247 nm uyarma ve 387 nm emisyon dalga boylarında en yüksek floresans şiddette sahip spektrumlar elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Yeung ve ark.⁸³ insan plazmasında LP ve aktif metabolitinin (EXP 3174) birlikte belirlenmesi için bir UV dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan analitler, C₂ bağlı silika jel kullanılan katı faz ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Kromatografik ayırımı, C₁₈ ters faz kolonunda % 0.02 sodyum azid ve 0.01 M amonyum fosfat (pH 3.2), asetonyril ve metanol (6:3:1, h/h/h) hareketli faz karışımı kullanarak 254 nm dalga boyunda başarılmıştır. Yöntemin tayin alt sınır değerinin her iki analit için 10 ng/mL’den küçük olduğunu ve günüçi ve günler arası kesinlik değerlerinin ise LP için % 10 ve EXP 3174 için % 15’den küçük olduğunu belirtmişlerdir. LP ve EXP 3174 için mutlak geri kazanımın % 70’den büyük olduğunu ve yöntemin 10-300 ng/mL derişim aralığında iyi bir doğrusallık gösterdiğini belirtmişlerdir. Geliştirilen yöntem, günlük 50-100 mg dozlarda LP içeren film tablet kullanan 135 hastanın plazma örneğinde LP ve EXP 3174 derişimlerinin belirlenmesi için uygulanmıştır. LP dozundan 3 saat sonra alınan plazma örneklerinde LP ve EXP 3174 derişimlerini sırasıyla 29 ± 20 ng/mL ve 65 ± 46 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Del Rosario Brunetto ve ark.⁸⁴ insan idrarında LP, telmisartan, ve valsartanın birlikte belirlenebilmesi için floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. 25 microm C₁₈ alkil-diol (ADS) destekli kolon ve % 2 metanol-5mM fosfat tamponu (pH 3.8) içeren elüsyon çözücüsü kullanılan katı faz ekstraksiyonu ile idrar örneklerinden analitler ekstrakte edilmiştir. Her üç analit için de geri kazanımın % 93’den büyük olduğunu; günüçi ve gün arası kesinliğin % 3.7’den küçük değerler ile kabul edilebilir kesinliğe sahip olduğunu; iyi bir doğrusallık (0.001-2.5 µg/mL) gösterdiğini ve

gözlenebilme sınırının LP, telmisartan ve valsartanın için sırasıyla 0.002, 0.0002 ve 0.001 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir.

Gavrilin ve Kuleshova⁸⁵ ratlarda LP içeren yerli ve yabancı farmasötik ilaç formlarının (Cozaar tablet (50 mg) ve Brozaar tablet (50 mg)) farmakokinetik ve biyoşdeğerlik özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla, ratlara her iki ilaç 200 mg/kg olacak şekilde oral olarak uygulanmıştır. Kan örnekleri 0, 15, 30, 60, 120, 240 ve 360'ncü dakikalarda alınmış ve plazmaları ayrılmıştır. Elde edilen plazma örnekleri 50 µL buzlu asetik asit ve 950 µL asetonitril çözeltisi ile karıştırılmış ve santrifüj sonrası oluşan süpernantanın 10 µL'si sıvı kromatografisi (LC) sistemine enjekte edilmiştir. Kromatografik yöntem ile LP, C₁₈ kolonu ve asetonitril, su ve asetik asit (55: 49.9: 0.1, h/h/h) hareketli faz karışımı kullanılarak 260 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Cozaar ve Brozaar tabletin maksimum derişimi (C_{max}) ve maksimum derişime ulaşma zamanları (t_{max}) birbirinden farklı olarak bulunmuş (p<0.05) ve sırasıyla elde edilen C_{max} değerleri 290.5 ± 49.3 ve 177.5 ± 26.6 µg/mL ve t_{max} değerleri 30 dak. ve 120 dak. olarak tespit edilmiştir. Bu değerlere bakılarak her iki ilacın sistematik kan akışına giren ana bileşik miktarı açısından aynı oldukları, ancak Cozaar'ın hızlı bir şekilde emilime uğrayarak maksimum derişime ulaştığı ve hızlı elimine edildiği, Brozaar'ın ise daha aşamalı olarak absorbe olduğu sonucuna varılmıştır.

Polinko ve ark.⁸⁶ insan idrar ve plazmasında LC/MS/MS yöntemi kullanarak LP ve EXP 3174'in birlikte analizini gerçekleştirmişlerdir. Plazma ve idrar örneklerinde proteinler % 0.5'lik formik asit, metanol/su (50:50 h/h) karışımı ile çöktürülmüş ve analitler MTBE ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstratlar isopropanol: % 0.2 formik asit (25:75, h/h) çözücü karışımında çözülmüş ve LC/MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntemde iç standart olarak losartan-H kullanılmış olup plazmadan LP, EXP 3174 ve iç standartın geri kazanımları sırasıyla % 87.3, % 104.7 ve % 80.3 olarak tespit

edilmiştir. Her iki analit için, yöntemin plazmada 1-500 ng/mL idrarda 2-1000 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve LOQ değerleri her iki analit için plazmada 1 ng/mL idrarda 2 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca stabilite çalışması yapılmış olup analitlerin 48 saat boyunca kararlı kaldığı bildirilmiştir. Yöntem 7 gün boyunca 0.71 mg/kg günlük doz ile hipertansif hastalara verilen LP preparatının plazma derişimi-zaman profillerini elde etmek için uygulanmış ve geliştirilen yöntemin LP'nin klinik çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Jia ve ark⁸⁷. insan plazmasında LP ve EXP 3174'in birlikte belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişler ve LP içeren yeni bir jenerik ilacın farmakokinetik verilerini ve biyoyararlanımını incelemişlerdir. Bu amaçla, sağlıklı gönüllülere 50 mg LP içeren tablet oral olarak verilmiş ve kan örnekleri 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.33, 1.67, 2, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, 24 ve 36'ıncı saatlerde elde edilmiş ve plazmaları ayrılmıştır. Plazma örnekleri HCl çözeltisi (1 M) ile karıştırılmış ve ardından etil eter ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstratlar % 80'lik asetonitril çözeltisinde çözülmüş ve LC/MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. LP ve EXP 3174'ün 5-500 ng/mL derişim aralığında kalibrasyon eğrileri elde edilmiş olup plazmadan ekstraksiyon geri kazanımın sırasıyla % 53.33-55.27 ve % 55.90-59.52 aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Geliştirilen yöntem ile LP içeren piyasa ve jenerik preparatların farmakokinetik verileri incelenmiş ve jenerik ilaçta LP ve EXP 3174 için sırasıyla C_{max} değerini 214.44 µg/mL ve 391.08 µg/mL olarak t_{max} değerini ise 1.05 ve 3.54 saat olarak bulunmuştur.

Ohtawa ve ark.⁸⁸ sağlıklı erkek gönüllülerde tek ve çoklu oral doz sonrası LP'un farmakokinetiğini ve biyokimyasal etkinliğini araştırmışlardır. Tek doz uygulamalarında (25, 50, 100 ve 200 mg LP tabletleri halinde) ilaç uygulamadan önce 4 saat boyunca gönüllüler aç bırakıldıktan sonra; çoklu doz çalışmasında ise 1. ve 7. günlerde bir gece boyu açlığı takiben ve diğer günler kahvaltıdan 30 dakika sonra ilaç

uygulanmıştır. Kan örnekleri tek doz uygulamasında 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ve 30 saat sonra, çoklu doz uygulamasında doz alınmadan önce ve 4 ve 24 saat sonra olarak, 1. ve 7. günlerde ise doz uygulamasından 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ve 30 saat sonra alınmıştır. Örnekler katı faz ekstraksiyonu sonrası HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntemin LOD değeri LP için 10 ng/mL iken EXP 3174 için 20 ng/mL'dir. Tek doz uygulamalarında maksimum plazma derişimi LP için 25, 50, 100 ve 200 mg dozajlarında sırasıyla 84.5 ± 40.9 ng/mL, 197.6 ± 108.5 ng/mL, 800.5 ± 330.9 ng/mL ve 1394.9 ± 513.1 ng/mL, EXP 3174 için 25, 50, 100 ve 200 mg dozajlarında sırasıyla 188.9 ± 47.3 ng/mL, 462.5 ± 108.5 ng/mL, 1210.8 ± 271.4 ng/mL ve 2219.0 ± 484.9 ng/mL olarak bulunmuştur. Çoklu doz uygulamasında maksimum plazma derişimi LP için 1. ve 7. günde sırasıyla 639.8 ± 251.7 ng/mL ve 655.0 ± 381.4 ng/mL, EXP 3174 için 1. ve 7. günde sırasıyla 1227.7 ± 400.3 ng/mL ve 1074.3 ± 344.8 ng/mL olarak bulunmuştur.

Soldner ve ark.⁸⁹ insan ve ratların biyolojik sıvılarında LP ve EXP 3174'in birlikte belirlenmesi için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Analitlerin biyolojik sıvılardan ekstraksiyonu için hem katı faz hemde sıvı-sıvı faz ekstraksiyon yöntemi önermişler ve bu yöntemleri birbirlerine alternatif olarak sunmuşlardır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde, plazma 1 M HCl çözeltisi ile asitledirildikten sonra MTBE ile ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstratlar % 85 fosforik asit çözeltisi (pH: 3.1) ile geri ekstrakte edilmiştir. Kromatografik analizde, analitler 3 µm analitik siyano kolonda ayrılmış ve 245 nm dalga boyunda UV dedektör ile belirlenmiştir. Yöntemin, LP ve EXP 3174 için LOD değeri sırasıyla plazmada 5 ng/mL idrarda 10ng/mL olarak bulunmuş ve yöntemin insan ve hayvan biyolojik sıvılarında ARA-II analizi için uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Farthing ve ark.⁹⁰ insan plazması, idrarı ve diyaliz çözeltilerinde LP ve EXP 3174'in birlikte belirlenmesi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Floresans dedektörlü HPLC yöntemi ile fenil analitik kolon, potasyum fosfat (pH:2.2) ve asetonitrilden oluşan hareketli faz (60:40 h/h) çalışma parametrelerini kullanarak LP ve EXP 3174'in birlikte analizi gerçekleştirmişlerdir. Plazmadan ve idrardan analitlerin eldesi için sırasıyla asetonitril ve deiyonize su eklenmiş ve santrifüj sonrası elde edilen süpernatant analiz edilmiştir. Yöntemin 10 ile 1000 ng/mL derişim aralığında doğrusal olduğu ve her iki analit için de LOD değerinin 1 ng/mL olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca plazmadan geri kazanımın oldukça yüksek olduğunu (% 99) belirtmişler ve yöntemin önemli metodolojik problemler yaşamaksızın farmakokinetik çalışmalarda kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Prasaja ve ark.⁹¹ LP ve ve aktif metabolitinin (EXP 3174) insan plazmasında LC-MS/MS yöntemi ile analiz etmişlerdir. İç standart olarak irbesartanı kullanmışlardır. Plazmadan analitlerin ekstrakte edilebilmesi için plazmaya asetonitril eklenmiş ve elde edilen süpernatant analiz edilmiştir. Kromatografik ayırım C₁₈ kolonda gerçekleştirilmiştir. 2.0-400 ng/mL ve 1.85-370 ng/mL derişim aralığında sırasıyla LP ve EXP 3174'in doğrusal olduğunu ve yöntemin oldukça hassas olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak çalışmada kullanılan ekstraksiyon prosesinin basit ve hızlı oluşuna dikkat çekilmiş ve bu yönüyle rutin analizler için kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Jalalizadeh ve ark.⁹² plazmada LP analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Plazma örneğinden analit, kloroform ile ekstrakte edildikten sonra 0.05 M NaOH çözeltisi ile geri ekstrakte edilerek elde edilmiştir. Yöntemin kalibrasyon eğrileri, plazma içerisine farklı derişimlerde (2, 5, 30, 50, 80, 100 ve 200 ng/mL) hazırlanan örneklerin analizi ile elde edilmiştir. Yöntemin $r^2 > 0.99$ korelasyon katsayısı ile

doğrusal olduğu ve 2 ng/mL LOQ değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın ekstraksiyon çözücüsü olarak kloroform kullanılması yönüyle özgün olduğu, elde edilen doğruluk ve kesinlik verileriyle de biyolojik sıvılarda ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Iwasa ve ark.⁹³ LP ve aktif metaboliti EXP 3174'ün insan plazmasında birlikte analizi için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Plazma örneklerinden LP, EXP 3174 ve iç standart (DUP-167), fosforik asit çözeltisi ile asitlendirildikten sonra Oasis HLB kartuşu kullanılan katı faz ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmişlerdir. Elde edilen elüentin 40 µL'lik hacmi C₁₈ ters faz kolonu kullanılan LC-MS/MS sisteminde enjekte edilmiş ve (% 0.1 trietilamin içeren % 0.1 asetik asit çözeltisi (pH 7.1))-asetonitril (65:35, h/h) hareketli faz karışımının izokratik elüsyonu ile analit ve iç standartın kromatografik ayırım sağlanmıştır. Geliştirilen bu analiz yönteminin hem LP hem de aktif metaboliti için 1-1000 ng/mL aralığında doğrusal olduğu ve LOQ değerinin 1 ng/mL olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, literatürdeki benzer çalışmalara kıyasla bu analiz yönteminin, yüksek seçicilikte olması ve düşük plazma hacminde işlem yapılabilmesi bakımından avantajlı olduğunu belirtmişlerdir.

Cagigal ve ark.⁹⁴ LP'yi içeren bazı ARA II grubu bileşiklerin asitlik sabitlerini spektrofotometri yöntemi kullanarak hesaplamışlardır. Bu amaçla uyarılma ve emisyon dalga boylarının her ikisi için birisi değiştirilerek diğerinin maksimum pik verdiği noktanın bulunması yöntemi ile yapılan ölçümlerde LP için 247 nm uyarılma ve 387 nm emisyon dalga boylarında en yüksek floresans şiddette sahip spektrumlar elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada floresans şiddetleri üzerine pH'ın etkisi araştırmak amacıyla ARA II grubu bileşikler için farklı pH değerlerinde çözeltiler hazırlanarak ölçümler yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre, LP'nin pH 2.0 civarlarında yüksek floresansa sahip olduğunu ve ortam bazikleştikçe floresans şiddetinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

LP için pKa değerinin bileşikte bulunan tetrozol halkasının protonunun uzaklaştırılması ile alakalı olduğu belirtilmiştir. 0.5 M iyonik şiddette LP'nin pKa değerini 3.15 ± 0.07 olarak tespit etmişlerdir.

Yang ve ark.⁹⁵ ratlarda LP ve aktif metaboliti EXP-3174 farmakokinetiği üzerinde 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörlerinin (atorvastatin, pravastatin ve simvastatin) etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 9 mg/kg oral ve intravenöz yollarla verilen LP sonrasında, LP ve aktif metabolitinin farmakokinetik özellikleri, HMG-CoA redüktaz inhibitörleri olmaksızın ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri (1 mg/kg) ile birlikte uygulanarak gözlemlenmiştir. Çalışmada 270-300 g ağırlığındaki fareler kullanılmış ve 1, 2, 4, 8, 12 ve 24'üncü saatlerde kan örnekleri alınmıştır. Maksimum plazma derişimleri LP için 19.2 ± 3.7 ng/mL ve EXP 3174 için 17.3 ± 3.0 ng/mL olarak bulunmuştur. Simvastatin ile birlikte verildiğinde LP için toplam klirens değeri (Cl) % 25.7 değerinde azalmış ve bu verinin ışığında simvastatinin LP'yi bir ölçüde inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

Rao ve ark.⁹⁶ LC-MS/MS yöntemi ile kurutulmuş rat kan örneklerinde LP ve aktif metabolitinin (EXP 3174) birlikte belirlenmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kan örneklerin analizden önce oda sıcaklığında kurutulmuştur. LP ve EXP 3174, önce kuru kan örneğinden metanol: su (1:1, h/h) çözücü karışımı ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra C₁₈ kolon ve mobil faz olarak % 40 asetonitril: % 60 sulu amonyum asetat (10 nM) hareketli faz karışımı kullanılarak HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Kurumuş kan örneklerinde LP'nin geri kazanımı % 89 ve % 97 arasında bulunmuştur. Yöntemin kalibrasyon eğrileri LP için 1-200 ng/mL ve EXP 3174 için 5-1000 ng/mL derişim aralığında elde edilm iş olup LOQ değerleri LP için 1.0 ng/mL ve EXP 3174 için 5.0 ng/mL olduğu belirlenmiştir.

2.6. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Bu yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca molekül yapılarının aydınlatılması alanında da en sık başvurulmuş yöntemlerdir⁹⁸.

2.6.1. Spektroskopi

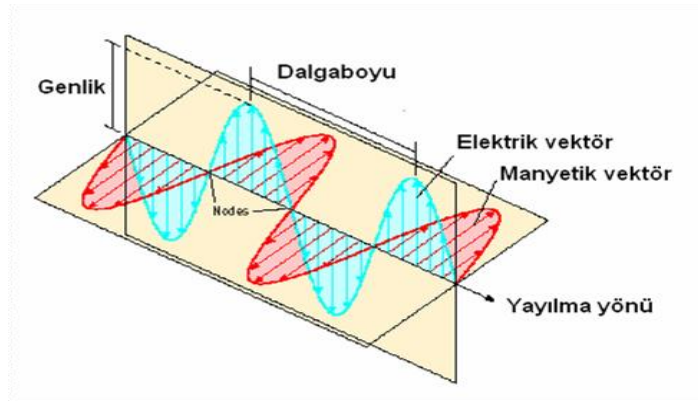
Spektroskopi, genel anlamda ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanır. Bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının, ölçülmesi ve yorumlanmasına “spektroskopi” denir. Atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışımaya ile etkileşimi sonucu dönme, titreşim ve elektronik enerji seviyelerinde değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.

Spektroskopi çalışmaları, 1665 yılında Newton’un üçgen bir cam prizma kullanarak beyaz ışığın belirli bir aralık içinde çeşitli renklere dağıldığını gösteren ünlü deneyi ile başlamıştır. 1860 yılında Bunsen ve Kirchhoff, analitik bir cihaz olarak entegre bir birim olan prizma spektroskopunu geliştirmişlerdir. Yapılan ilk çalışmalar, alev üzerinde çeşitli numunelerin emisyon spektrumlarının gözlenmesi, çeşitli elementler için alev deneylerinin başlangıcı ve güneş ışınları üzerine yapılan deneylerdir⁹⁷.Günümüzde spektroskopik çalışmalarda incelenen ışın kaynakları tanımı değiştirilmiş, görünür bölge ışınları, X ışınları, ultraviyole (mor ötesi), infrared (kızıl ötesi), mikro dalgalar, radyo dalgaları ve ses dalgalarını da içine alacak şekilde kapsamı genişletilmiştir.

2.6.2. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri

Işın veya elektromagnetik ışın (radyasyon) uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji şeklidir. Işının uzaydaki hareketi dalgalar halinde olur. Elektromanyetik ışın dalgalar ve tanecik olarak davranmaktadır. Elektromanyetik ışının dalga boyu, frekansı, periyodu, hızı, dalga sayısı, kırınımı ve genliği gibi parametreleri de içeren birçok özelliği ışının klasik sinüs dalga modeliyle açıklanabilir. Işın enerjisinin absorpsiyonu ve emisyonuyla ilgili olayların açıklanmasında dalga modeli başarılı olamamıştır. Bu olayların anlaşılabilmesi için, bir parçacık modeli geliştirilmiştir. Bu modelde elektromanyetik ışın, enerjileri ışın frekansı ile orantılı ve foton adı verilen parçacıklar veya dalga paketlerinden oluşmuş olarak görülür.

Elektromanyetik ışın, hem elektrik alan vektörü hem de magnetik alan vektörüne sahiptir. Bu iki alan sinüsoidaldır ve ışının yayılma yönüne ve birbirlerine diktir. Bir ışının maddeyle ilişkisi, bu iki alan vektörü ile olur (Şekil 2.5)⁹⁸.

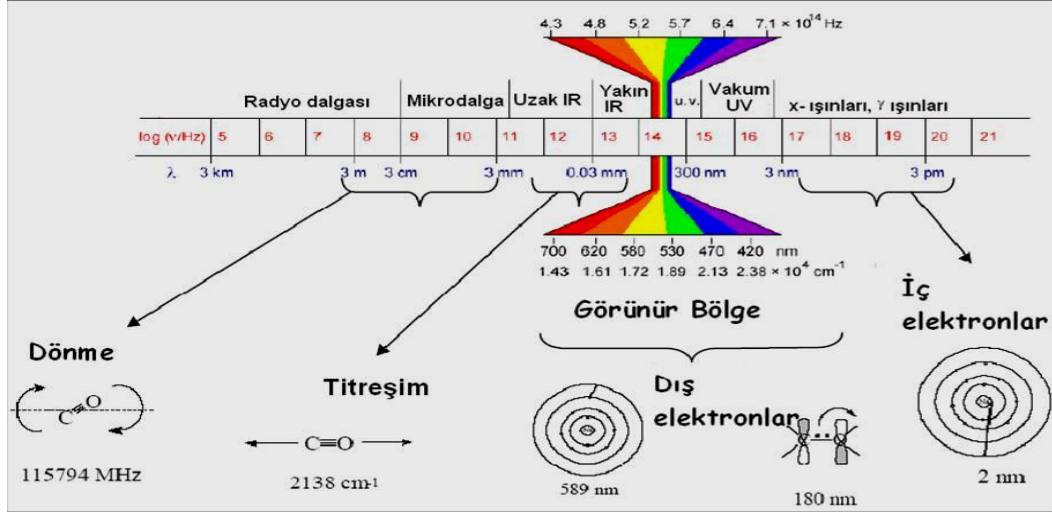


Şekil 2.5. Elektromanyetik dalga

2.6.3. Elektromanyetik Spektrum

Şekil 2.6'te görüldüğü gibi elektromanyetik spektrum, çok geniş bir dalga boyu ve frekans (enerji) aralığını içine almaktadır. Aynı şekil üzerinde, başlıca spektral

bölgeler de gösterilmiştir. Spektral bölge ayrıntıları, her bölgedeki ışınları elde etme ve bu ışınları belirleme yöntemlerini esas almaktadır⁹⁸.



Şekil 2.6. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri

2.6.4. Işının Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam veya şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna “ışının absorplanması” denir.

Kuantum teorisine göre atom, molekül veya iyonlar yalnız belli değer ve sayıda enerji düzeyinde bulunabilir. Bu şartlarda, fotonun enerjisi ilgili atom, molekül veya iyonla aktarılır, onu uyarılmış hal adı verilen daha yüksek enerjili hale geçirilir. Kısa bir süre (10^{-6} - 10^{-9} saniye) sonra, uyarılmış tür, fazla enerjisini ortamdaki başka türlere aktararak temel haline döner ki, buna “durulma” (relaksasyon) denir. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde çok az ısınır. Bazı maddeler ise absorpladığı ışın enerjisini kısa süreli olmak üzere, daha uzun

dalga boylu ışınlar halinde yayar. Buna “lümnesans” olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olmasına floresans, daha uzun olmasına da fosforesans denir⁹⁸.

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları atomik absorpsiyon ve moleküler absorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılır.

1) Atomik Absorbsiyon

Atomik absorpsiyonda uyarılma, yalnızca atomda bir veya birden çok elektronun üst enerji düzeylerine yükseltildiği elektronik bir süreçle meydana gelir. Örneğin sodyum buharı üzerinden beyaz ışın demeti geçirilirse, sodyum atomu sarı ışını absorblar. Sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorblayarak 3p enerji seviyesine uyarılır ve bu bölgede sarı ışın 589 nm ve 589,6 nm dalga boyunda olmak üzere iki adet keskin absorpsiyon piki gösterir.

2) Moleküler Absorbsiyon

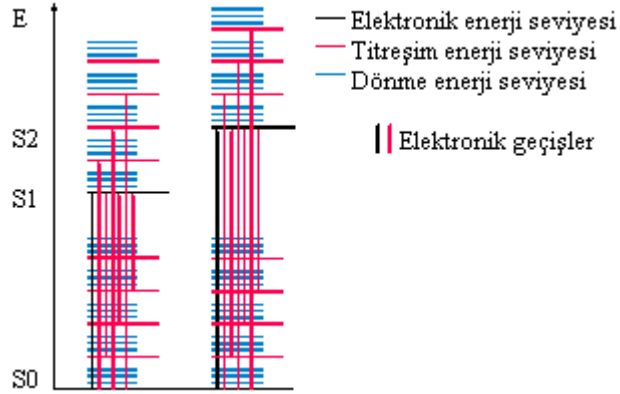
Molekülün düşük enerjili atomik ve moleküler orbitallerinin, UV, görünür bölge ve infrared ışınları ile daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucunda gerçekleşir. Moleküler, ışınla uyarıldıklarında gerçekleşen kuantlaşmış üç tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir (Şekil 2.7).

$$E_{\text{Toplam}} = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

Burada “ $E_{\text{elektronik}}$ ”, molekülde bağ yapan birkaç elektrona ait enerji düzeyinden kaynaklanan elektronik enerjidir (200-800 nm). “ $E_{\text{titreşim}}$ ” ise, moleküler türlerde çok sayıda bulunan atomlararası titreşimlerin toplam enerjisini gösterir. Genel olarak bir moleküldeki kuantlaşmış titreşim enerji düzeylerinin sayısı, elektronik düzey

sayısından çok daha fazladır (1000-15000 nm IR). “ $E_{\text{dönme}}$ ” ise, molekül içindeki çeşitli dönme hallerinden oluşan enerjidir; dönme enerji düzeylerinin sayısı da titreşim enerji düzey sayısından çok daha fazladır (10000-100000 nm IR)⁹⁷.

Bu enerjiler arasındaki büyüklük sırası; $E_{\text{elektronik}} > E_{\text{titreşim}} > E_{\text{dönme}}$ şeklindedir.



Şekil 2.7. Enerji seviyeleri arasındaki geçişler

2.6.5. Lambert - Beer Kanunu

Bir molekül tarafından absorbe edilen ışımın cinsi ve miktarı, molekülün yapısına ve ışıma ile etkileşen molekül sayısına bağlıdır. Işıma ile molekül arasındaki bu etkileşim Lambert-Beer kanunu ile ifade edilir.

Beer kanununa göre, bir çözelti içinden geçen ve çözelti tarafından absorplanan ışın demetinin şiddeti, çözeltinin derişimi ile logaritmik olarak orantılıdır. Lambert' e göre ise bir çözeltilerden geçen ışın demetinin şiddeti çözeltinin derinliğı yani ışığın aldığı yol ile logaritmik olarak orantılıdır.

Yukarıda izah edilen iki kanun birleştirilirse, bir çözeltilerden geçen monokromatik ışımın şiddeti, çözeltinin derinliğı (ışımın çözelti içinde aldığı yol) ve derişimi ile logaritmik ve üstel olarak azalır. Buna göre;

$$I = I_0 10^{-\epsilon bc}$$

ifadesi yazılır. Bu eşitliğe “Lambert-Beer kanunu” denir. Eşitlikte I_0 gelen ışın demetinin şiddeti, I çözülden çıkan ışın demetinin şiddeti, b çözümlerin kalınlığı, c ise çözümlerin derişimidir. Eşitliğin eksi logaritması alınırsa;

$$\text{Log} I_0/I = a.b.c$$

şeklindedir. $\log I_0/I$ ya “absorbans” denir. A ile gösterilir.

$$\log I_0/I = A = a.b.c$$

A ile c arasında bu basit doğrusal ilişkidenden analitik uygulamalarda yararlanılır. Eşitlikte derişim c , gr/L, örnek kabının kalınlığı b ise cm birimindedir. Buradaki orantı katsayısı a 'ya “absorpsiyon katsayısı” veya “absorbivite” denir ve birimi L/gr.cm'dir. Eğer derişim mol/L cinsinden ise, a yerine ϵ yazılır ve ϵ 'ye “molar absorpsiyon katsayısı” veya “molar absorbivite” adı verilir. Birimi L/mol cm' dir ve bağıntı;

$$A = \epsilon.b.c$$

şeklinde gösterilir.

Bu bağıntıda A değeri c ye karşı grafiğe geçirilirse orijinden geçen ve eğimi ϵb olan bir doğru elde edilir. Ancak her zaman muntazam bir doğru elde edilemez. Bu durum Lambert-Beer kanunundan sapmalarla açıklanabilir. Lambert-Beer kanunundan sapmaların sebepleri üç madde altında toplanabilir. Bunlar gerçek sapmalar, cihazdan kaynaklanan sapmalar ve kimyasal sapmalardır. Ölçme yapılırken I_0 ve I şiddetleri ayrı

ayrı ölçülmez. Onun yerine söz konusu dalga boyundaki çözelti ve saf çözücünden geçen ışın demeti şiddetleri ölçülür. Saf çözücünden geçen ışın demetinin şiddeti I_0 olarak kabul edilir. Buna göre;

$$A = \log I_0 / I = \log(I_{0\text{çözücü}}) / (I_{\text{çözelti}})$$

eşitliği yazılır. Bir ışın demetinin çözeltilerden geçen kısmının çözücünden geçen kısmına oranına “geçirgenlik” denir ve T ile gösterilir.

$$T = I / I_0$$

Bu iki eşitlikten;

$$A = - \log T$$

şeklinde bir bağıntı yazılabilir⁹⁸.

2.6.6. Lüminesans

Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır ve fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak “lüminesans” denir. Kısaca lüminesans bir atom ya da iyon elektronunun yüksek (uyarılmış) enerji düzeyinden daha düşük bir enerji düzeyine geçtiği zaman ısı oluşturmadan yayılan ışımaya denir.

Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen luminesans olayına “kemiluminesans” adı verilir. Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen luminesans olayına “elektroluminesans” veya “elektrokemiluminesans” adı verilir. Biyolojik sistemlerde gözlenen luminesansa “biyoluminesans” denir. Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışık emisyonuna “fotoluminesans” denir.

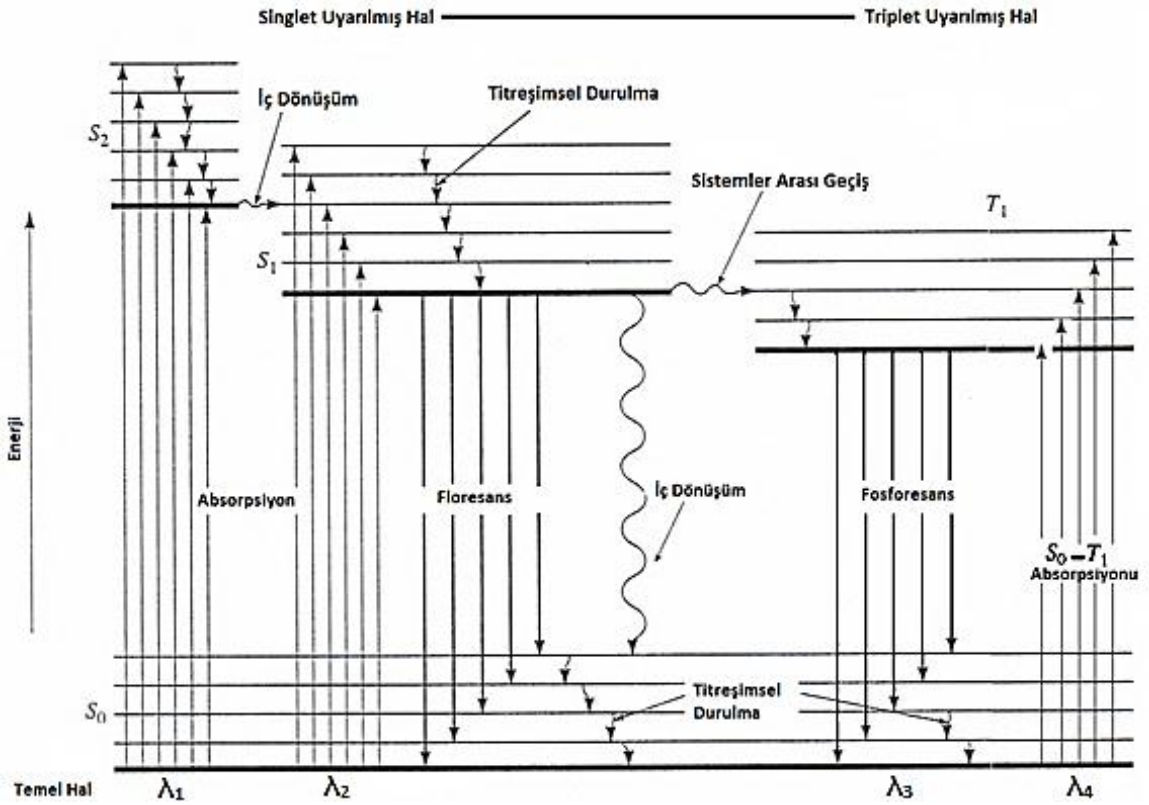
2.6.7. Fotoluminesansın Esasları

Floresans ve fosforesansın her ikisi de, ışın enerjisini absorplayarak uyarılmış hale gelen bir molekül, iyon veya atom tarafından absorplanan bu ışın enerjisinin ışın yayılması şeklinde geri verilmesi anlamına gelen fotoluminesans’ın çeşitleridir, bu da basitçe luminesans olarak ifade edilir.

Fotouyarılmış türlerde uyarılmış elektronun spini değişmeksizin, uyarılmış halden temel hale bir geçiş olduğunda, fotoluminesans “floresans” olarak adlandırılır. Spinde bir değişim varsa, o zaman fotoluminesansa “fosforesans” adı verilir. Genelde, türler uyarılmış hale eriştikten sonra, floresans emisyonu çok çabuk (10^{-9} – 10^{-6} s) meydana gelir. Bunun için ultraviyole ışımalarının kaynağı uzaklaştırıldığı anda floresant bir maddeyi gözle sezmek imkânsızdır. Fosforesans emisyonu çok daha yavaştır ($>10^{-4}$ s) ve fosforesans emisyonunun ömründe daha büyük bir değişimle meydana gelir. Böylece, birçok organik moleküllü fosforesant madde, ultraviyole kaynağı uzaklaştırıldığı anda gözle sezilir ve ultraviyole uyarılması durduktan sonra fosforesans ışımaları devam etmektedir.

2.6.8. Jablonski Diyagramı

Işının madde tarafından absorpsiyonu sonucunda molekül orbitallerinde meydana gelebilecek değişiklikler Jablonski diyagramı üzerinde gösterilmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Jablonski diyagramı

Şekilde görüldüğü gibi bir molekülün S_0 ile gösterilen temel hali, bunun üstünde S_1 , S_2 ile gösterilen uyarılmış halleri vardır. Her halin en altında bulunan kalın çizgiye, o halin “elektronik seviyesi”, üstündeki ince çizgilere de o halin “titreşim seviyeleri” denir. Temel halin en alt elektronik seviyesinde bulunan bir molekül üzerine, dalga boyları λ_1 ve λ_2 olan iki ışın gönderilecek olursa, λ_1 grubu ışınlarla uyarılan (eksite edilen) molekülün bağ elektronlarında biri ışının dalga boyuna bağlı olarak S_1 uyarılma seviyelerinden birine fırlar. Uyarılan bu elektron, bulunduğu halin elektronik seviyesinden temel hale (S_0) doğrudan geçebileceği gibi, öteki titreşim seviyelerinde birine S_0 geçebilir. Böyle bir geçiş sonucunda ortamda ışın yayılır ve buna “ S_1 - S_0 geçişi” veya “temel hale dönme” denir. Temel hale dönme sırasında elektron temel halin (S_0) herhangi bir titreşim seviyesine geçerse ortama farklı dalga boylarında ışınlar yayılır ve bunlara floresans ışınları (λ_3 ışınları) denir. Bu olay floresans özellik gösteren moleküller için geçerli bir durumdur. Temel halin herhangi bir titreşim seviyesine geçen

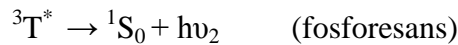
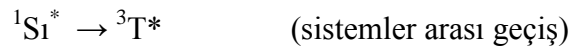
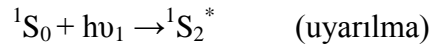
elektron titreşim seviyelerinden, ışın yaymaksızın basamak basamak aşağıya inebilir (dalgalı oklar). Bu şekilde elektro yada elektronun sahibi olan molekül, enerjisini çözücüye (ortama) ısı olarak verir. Buna titreşimsel durulma denir.

Molekül dalga boyu daha düşük enerjisi daha yüksek bir λ_2 ışını ile uyarılırsa S_2 uyarılma halindeki durum elde edilir. İkinci uyarılma seviyesine (S_2) geçen bir elektron direkt olarak temel hale dönemez. Önce ikinci halin en alt titreşim seviyesine, oradan “iç geçiş” denilen bir mekanizma ile birinci uyarılmış halin (S_1) üst titreşim seviyelerinden birine geçer. S_2 seviyesinde bile olsa elektronun geri dönüşü S_1-S_0 geçişiyle tamamlanır.

S_1 uyarılmış halinin herhangi bir titreşim seviyesinde bulunan bir elektronun enerji seviyesi, Şekil 2.8’de gösterilen triplet halin enerji seviyelerinden birisi ile çakışırsa, elektron fosforesans titreşim seviyelerinden birine geçer ve spini değişir. Singlet halden triplet hale geçer. Fosforesans hal basamağından da temel halin bir enerji basamağına iner ve bu esnada fosforesans ışınları yayılır.

2.6.9. Fosforesans

Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışına “fosforesans” ($h\nu_2$) adı verilir.

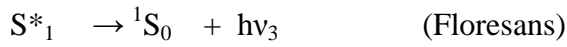


Denemeler ile fosforesans gösteren bir maddenin daima aynı derecede floresans göstereceği bulunmuştur. Enerji düzeyleri diyagramında, fosforesans emisyonunun floresansdan daha düşük bir frekansta veya daha uzun bir dalga boyunda meydana

geldiği görülmektedir. Floresans ve fosforesans ömürleri farklı olduğundan iki emisyon uygun mekanik aletler kullanılarak ayrılabilir.

2.7. Floresans

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans ($h\nu_3$) denir.



Şekil 2.8’de gösterilen diyagramdaki açıklamalardan da görüldüğü gibi verilen bir emisyon spektrumu, bir miktar enerjinin iç dönüşümlerde harcanması veya ışısız dönüşümlerle harcanması nedeniyle daima uyarıcı olarak görev yapan absorpsiyon spektrumlarından daha düşük frekans bölgesinde (veya daha uzun dalga boyu bölgesinde) meydana gelir.

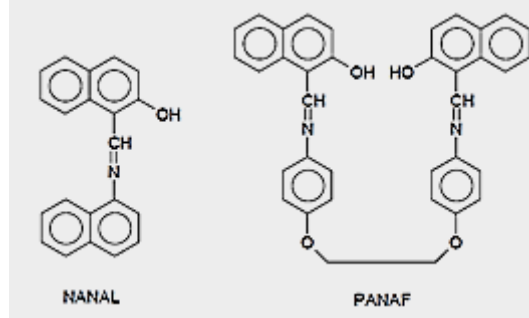
2.7.1. Floresansa Etki Eden Faktörler

Yayılan foton sayısının, absorblanan foton sayısına oranı, o molekülün “fotoluminesans kuantum verimi(ϕ)” olarak tanımlanır.

Uyarılmış singlet molekülün enerjisi ile temel haldeki molekülün enerjisi birbirinden ne kadar farklı ise, iç dönüşüm olayının olasılığı o kadar azalır ve dolayısıyla floresans verimi artar. Benzer biçimde bir molekülün uyarılmış triplet hallerinin enerjileri ne kadar farklı ise sistemler arası geçiş olasılığı o kadar azalır ve floresans verimi artar. Uyarılmış singlet ve uyarılmış triplet hallerinin enerjileri birbirlerine yaklaşırsa, sistemler arası geçiş olasılığı o kadar artar ve fosforesans verimi artar.

2.7.2. Floresansa Maddenin Yapısının Etkisi

NANAL (N,N'-bis(2-hidroksinaftalin-1-karbaldehiden) ve PANAF (N,N'-bis(2-hidroksinaftalin-1-karbaldehiden)-1,2-bis-(p-aminofenoksi)etan) molekülleri yapılarındaki konjugasyon nedeniyle floresans özellik göstermektedirler (Şekil 2.9).



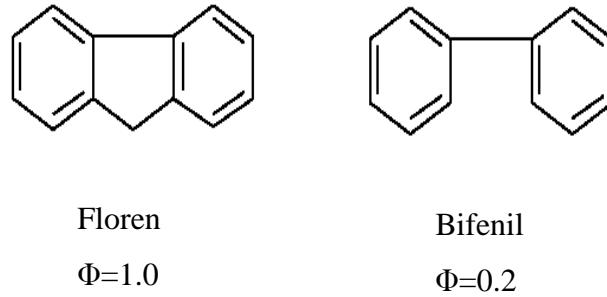
Şekil 2.9. Nanal ve panafin kimyasal yapıları

Halkalı bir organik molekülde halkanın elektron yoğunluğunu arttıran sübstitüentler molekülün floresans veriminin artmasını sağlar. Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin pi (π) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışın geçişini arttırır. Bu sonuç floresansı da arttırır. Genellikle orto ve para pozisyonundaki sübstitüentler halkaya elektron verir ve muhtemel oluşacak floresansı arttırır. Meta pozisyonundaki sübstitüentler halkadan elektron çeker ve muhtemel floresansı azaltır. Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimi, dolayısıyla fosforesansı arttırır.

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırır.

2.7.3. Floresansa Maddenin Yapısal Rijiditenin Etkisi

Bir molekülün yapısının rijit olması onun floresans özelliğini artırır. Çünkü rijit yapılarda kuantum verimi yüksektir ve iç dönüşüm hızı daha düşüktür. Örneğin, florenin floresans özelliği bis fenilden daha fazladır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Floren ve bisfenilin kimyasal yapısı

Rijit olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan, ışımsız enerji kaybı olasılığı çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi, floresans şiddetini azaltır. Bundan başka rijit olmayan bir molekülün bir tarafı, öteki tarafına göre daha zayıf enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans emisyonunu azaltan bir etkendir.

Floresans özelliği gösteren boya, bir yüzeyde adsorbe edilince emisyon şiddeti daha da artar. Bunun nedeni boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditesinin artmasıdır.

2.7.4. Floresansa Çözücü ve Sıcaklık Etkisi

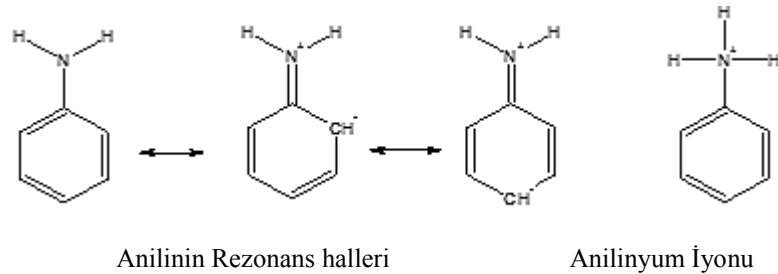
Uyarılmış molekül, temel haline oranla daha polar ise, çözücünün polaritesinin artması ile uyarılmış enerji düzeyi daha kararlı hale geleceği için, uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı azalır ve floresans dalga boyu artar. Bu durum, uyarılma ve emisyon olayları π ve π^* orbitalleri arasında gerçekleştiğinde ortaya çıkar. $n \rightarrow \pi^*$ türü bir uyarılma için ise, çözücünün polaritesinin artması ile n orbitalinin daha

kararlı hale gelmesi, yani enerjisinin azalması söz konusudur. Böylece, bu tür moleküllerde çözücü polaritesi arttıkça uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı artar ve floresans dalga boyu azalır.

Sıcaklığın artması ile uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığı da artacağından iç dönüşüm olayının verimi artar ve floresans verimi azalır. Zn komplekslerinin farklı sıcaklıklardaki kinetikleri ölçüldüğünde en düşük sıcaklıkta (50°C) maksimum floresans gösterdiği gözlenmiştir. Fosforesans verimi, sıcaklık azalması ile önemli ölçüde artar.

2.7.5. Floresansa pH Etkisi

Ortamin pH'sındaki değişimler, hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyeceği için pH, bir molekülün floresans verimini etkileyen bir faktör olabilir. Asit veya baz grubu içeren maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin floresans ışımlarının dalga boyları ve şiddetleri birbirlerinden farklıdır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. pH değişikliklerin molekül yapısını değiştirmesi

2.7.6. Floresansa Çözünmüş Oksijen Etkisi

Çözücü ile hidrojen bağı yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışını absorplayabilecek bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımalarının

şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramanyetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır.

2.7.7. Floresansa Derişimin Etkisi

Floresans ışımalarının şiddeti, maddenin derişimi ile orantılıdır. Floresans, derişim arttıkça artar, ancak belli bir noktada derişim çok fazla arttırıldığında artık derişimle orantılı olarak artmaz ve hemen hemen sabit kalır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Derişimin floresans şiddeti ile değişimi

2.7.8. Floresansa Moleküldeki Sübstitüentlerin Etkisi

Süstitüsyon, maddenin absorpsiyon dalga boyunu ve şiddetini değiştirir. Buna bağlı olarak maddenin floresans dalga boyu ve şiddeti de değiştir. Elektron donörü olan $-NH_2$, $-OH$ gibi gruplar floresansı arttırdığı halde, elektron akseptörü olan $-NO_2$, $-X$ (halojenürler), $-COOH$, $-CHO$, $-N=N-$ gibi gruplar floresansı azaltır ve bazen de ortadan kaldırır. Örneğin; benzen UV bölgede floresans yapar. Bu moleküle ($-NH_2$) grubu süstitüe edilirse floresansı artar ve yüksek dalga boyuna kayar. ($-NO_2$) ile süstitüe edilirse floresans özelliği tamamen kaybolur.

2.7.9. Floresansa Gelen Işının Dalga Boyunun ve Şiddetinin Etkisi

Gelen ışının şiddetinin (yoğunluğunun) artması floresansı arttırır. Bu nedenle emisyon dalga boyu daima uyarma dalga boyundan büyüktür.

Lüminesans verimi, sadece iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve enerji aktarımı gibi fiziksel olaylarla değil, uyarılmış düzeylerde ortaya çıkabilecek bağ kopması (fotoayırışma) ve ürün oluşması (fotokimyasal reaksiyon) gibi olaylar yüzünden de azalabilir.

2.7.10. Fotolüminesans Teorisi

Belirlenen deney şartlarında belli bir maddenin kuantum verimi (ϕ) sabittir. Yayılan ışının şiddeti I_L , kuantum veriminin ve absorplanan ışının şiddeti I_0 cinsinden, denklemde aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$I_L = \phi \cdot (I_0 - I)$$

Absorplanan ışının şiddeti, gelen ışının şiddeti I_0 , ve geçen ışının şiddeti I , arasındaki farka eşittir. Geçen ışının şiddeti Beer yasasından hesaplanabilir;

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c = -\log (I/I_0)$$

Geçen ışının şiddetine göre Beer yasasının çözümü verilirse;

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c} = I_0 \cdot e^{-2.303 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c}$$

şeklinde düzenlenir. I 'nın değeri baştaki formülde yerine konursa aşağıdaki eşitlik elde edilir;

$$I_L = \phi \cdot (I_0 - I_0 e^{-2.303 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c}) = \phi \cdot I_0 (1 - e^{-2.303 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c})$$

Bu eşitlikte ki üstel ifadeler,

$$e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \dots +$$

şeklinde yazılarak, x yerine (-2.303) ifadesi konursa,

$$I_L = \varphi \cdot I_0 \cdot [1 - 1 + 2.303 - \varepsilon \cdot l \cdot C + \dots] = \varphi \cdot I_0 \cdot [2.303 - \varepsilon \cdot l \cdot C + \dots]$$

elde edilir. Seyreltik çözeltiler için absorptans ($\varepsilon \cdot l \cdot C$) küçüktür. $\varepsilon \cdot l \cdot C$, 0.05'e eşit ise, son eşitlikteki serilerin ikinci terimi, birinci terimin % 2.5'u kadardır ve bunu takip eden terimler daha küçüktür. Analitin derişimi düşük tutularak absorptans 0.05'den daha az olduğunda, serilerdeki terimlerin tümü, birinci terim hariç ihmal edilir ve eşitlik şöyle basitleştirilebilir;

$$I \cdot L = \varphi \cdot I_0 \cdot 2.303 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Eşitlikte görüldüğü gibi seyreltik çözeltiler için (10^{-8} - 10^{-5} M) yayılan fotoluminesansın şiddeti, kuantum verimi, gelen veya absorplanan ışının şiddeti ve analitin derişimiyle orantılıdır. Çoğu laboratuvar cihazlarında yalnızca dedektöre gelen toplam lüminesansın sabit kesri, f, ölçülür ve eşitliğe, dedektörün cevabı için de bir değerin (R) ilave edilmesi gerekir. Bu iki faktörün ilavesiyle eşitlik şu aşağıdaki şekle dönüşür;

$$I \cdot L = 2.303 \cdot f \cdot R \cdot \varphi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot C$$

Belirli bir analit, hücre ve cihaz için f, R, φ , ε , ve l sabit olduğundan;

$$I.L = K.I_0.C$$

yazılır veya burada, I_0 da sabit yapılırsa, derişimden (C) başka hepsi sabit olacağından bunlar, K'sabitiyle gösterilebilir. Sonuç olarak, floresans ışın şiddetiyle derişim arasında eşitlik;

$$I.L = K'.C$$

şeklinde verilir. K' sabiti, derişimi düşük ve bir seri çözeltilerin IL floresansı ölçülmek suretiyle hesaplanır. Absorbansı küçük ($A < 0.05$) çözeltilerde floresans şiddeti derişimle doğru orantılıdır ve doğrunun eğimi K' değerini verir. Ancak derişim arttıkça eğride sapma görülür. Yani floresans derişimle orantılı olarak artmaz. Bunun nedeni self-söndürme ve self-absorpsiyondur.

Self-söndürme; fluorescent moleküllerin birbirlerine çarparak enerjilerini birbirlerinin enerjice daha düşük olan taraflarına aktarmaları ve böylece radyasyonsuz bir enerji kaybı olmasıdır. Bu fluorescent taneciklerle çözücü molekülleri arasında meydana gelen dış dönüşmeye benzer ve bu olay, derişimin artmasıyla artar.

Self-absorpsiyon; fluorescent moleküllerin yaydıkları ışının dalga boyu, bu moleküllerin absorpladıkları ışının dalga boyuyla aynıysa, fluorescent bir molekülün yaydığı ışın çözelti içinden geçerken öteki fluorescent moleküller tarafından absorplanır. Absorbans yaklaşık 0.05'den çok daha büyük olduğunda lüminesans şiddeti ile derişim

arasında doğrusal olmayan bir bağıntı söz konusudur. Absorbans çok büyük olduğu zaman eşitlik,

$$I.L = \phi \cdot I_0$$

şeklinde verilir ve lüminesans şiddeti böylece derişimden bağımsız olmaktadır. Ondan önceki eşitliğin esası, gelen ışının şiddetinin hücrenin her yerinde aynı olduğunu kabul eder. Seyreltik çözeltiler için bu kabul uygundur, ancak yüksek derişimlerde absorpsiyon (absorbans 2'den daha büyük) hücrenin içerisinden geçen ışının şiddetini büyük ölçüde azaltır ve gözlenen lüminesans da bir azalmaya sebep olur.

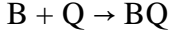
Sonuç olarak, seyreltik çözeltilerde kantitatif analiz, kalibrasyon eğrisi oluşturularak veya standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirilir. Çözeltide bulunan bir madde, lüminesant bir maddenin yaydığı ışını söndürüyor yani azaltıyorsa, lüminesansı önleyen bu maddenin de kantitatif analizi yapılabilir. Lüminesansdaki azalma genellikle, bu önleyici maddenin miktarı ile doğru orantılıdır. Buna göre, lüminesans şiddetinin azalmasının, lüminesansı önleyici madde derişimine karşı ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilebilir veya standart ekleme yönteminden yararlanılabilir.

2.7.11. Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, floresansın dalga boyu, uyaran ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Çünkü emisyonu sağlayan geçiş, bir kısım titreşim enerjisinin çevreye atılmasından sonra meydana gelir. Absorpsiyona göre emisyonunun daha büyük dalga boylarına doğru kaymasına "Stokes Shift" denir.

2.7.12. Stern Volmer Eşitliği

Floresans özellik gösteren bir madde üzerine floresan olmayan bir madde ilave ettiğimiz zaman fluorescent maddenin floresansında sönme meydana gelir.



B, Q' nun ortamda bulunmasıyla oluşan floresan olmayan BQ kompleksine çevrilen kısmı, α floresan maddenin toplam derişimidir. Q, uyarılmış durumdaki B' yi tek başına söndüremiyorsa veya Q ya da BQ iç filtreler gibi görev yapıyorsa gözlenen floresans şiddet (F) daima kompleksleşmeyen B' nin derişimi ile orantılıdır⁹⁹.

$$F = k(1-\alpha)B$$

$$F_0 = k.B$$

$$(F_0-F)/F = \alpha / (1-\alpha)$$

2.7.13. Uyarılma (eksitasyon) ve Emisyon Spektrumları

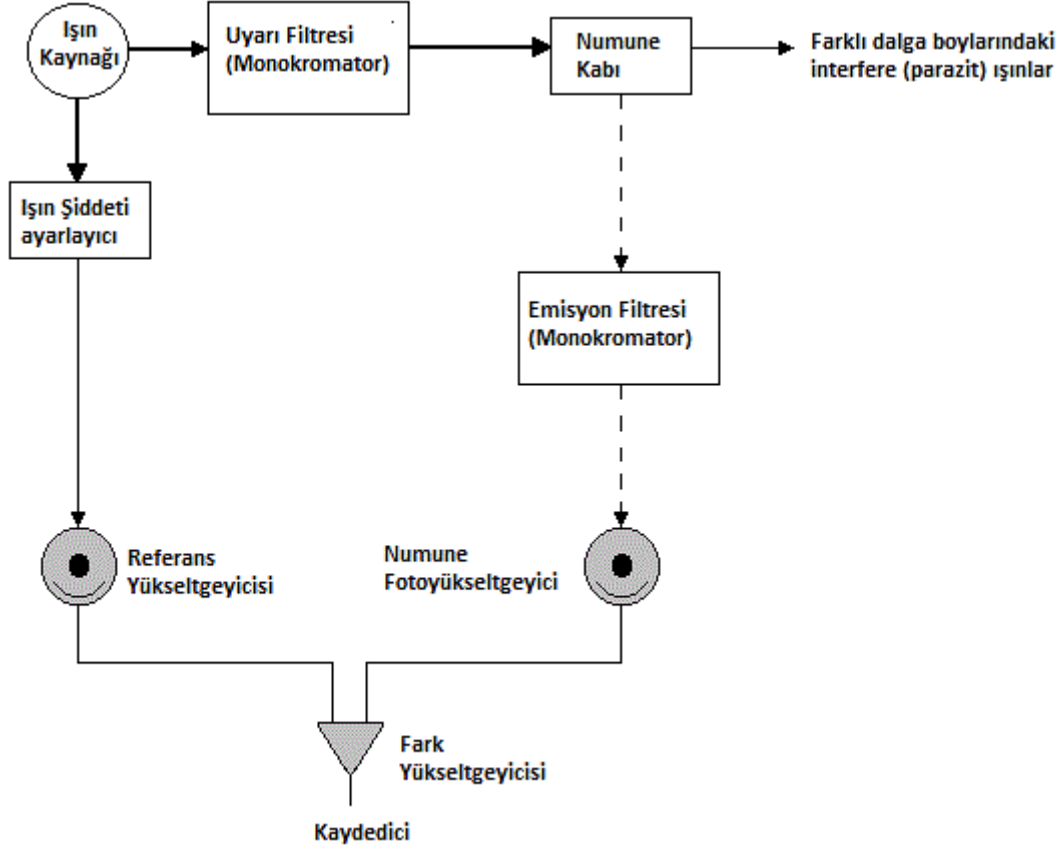
Floresans özelliğe bağlı olarak yapılan analizlerde ölçümü yapılacak olan maddenin belirli derişimlerde çözeltileri hazırlanır ve absorpsiyon spektrumu alınır. Bu spektrumdan maddenin en çok absorpsiyon yaptığı dalga boyu tespit edilir. Bundan sonra bu dalga boyundaki ışınla (monokromatik) madde devamlı olarak ışınlanır. Yayılan ışınlar bir florometrede (veya spektroflorometrede) kaydedilir. Böylece maddenin emisyon spektrumu elde edilir.

2.7.14. Floresans Spektroskopisi için Cihazlar

Floresans ölçümlerinde iki tip cihaz kullanılır. Bunlar filtreli florometreler ve spektroflorometrelerdir. Filtreli florometrelerde, gelen ışının içinden floresans ışınları izole etmek için filtre kullanılır. Spektroflorometrelerde ise gelen ışın ve floresans ışınları ayırmak için optik kırınım ağına sahip monokromatörler kullanılır⁹⁹.

2.7.15. Florometre ve Spektroflorometrelerin Bileşenleri

Floresans ölçüm cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaları önlemek için çift ışın yollu spektroflorometreler kullanılır. Şekil 2.13'de çift ışın yollu bir spektroflorometrenin blok diyagramı gösterilmektedir. Işın kaynağından çıkan ışınlar, uyarı (eksitasyon) filtresine veya monokromatörüne gelir. Monokromatörden sadece numuneyi uyarda kullanılacak ışınlar geçer ve numuneye ulaşır. Bu ışınla uyarılan numune çeşitli dalga boylarında floresans ışınlar yayar. Bir kısmı emisyon filtresi (monokromatörü) yönünde ilerler. Monokromatör bu ışınlardan istenilen dalga boyunda olanları geçirecek şekilde ayarlanır. Bu nedenle emisyon filtresine floresans monokromatörü de denir. Emisyon filtresinden geçen tek dalga boyundaki ışınlar numune fotoyükseltgeyiciye gelerek elektrik enerjisine dönüştürülür. Bu esnada ışın kaynağından çıkan ve uyarı filtresine giden ışın demetine dik yönde bir ışın demeti de (referans ışın demeti) ışın şiddeti ayarlayıcısına gelir ve ışının şiddeti yaklaşık olarak floresans ışının şiddetine eşit olacak şekilde ayarlanır. Bunun için, referans ışının şiddeti yaklaşık 100 defa düşürülür. Buradan referans ışın yükseltgeyiciye gelerek elektrik enerjisine çevrilir. Fark yükseltgeyici cihaz iki enerjinin farkını alıp yükselterek kaydedici cihaza gönderir¹⁰⁰.



Şekil 2.13. Bir spektrofloreometrenin başlıca kısımları

Işın kaynağı olarak lazerler, fotodiodlar, ksenon ve civa buharlı lambalar kullanılmaktadır.

Monokromatörler ayarlanabilir bir hassasiyet ile ayarlanabilir dalga boyunda ışın göndermek için kullanılırlar. Paralel olarak gelen ışının, farklı açılarda ayarlanabilen bir kırınım ağı içerisinde istenilen dalga boyunda çıkmasını sağlarlar.

Floresans ışınları uyarılma yönüne dik (90°) açıyla ölçülürler. Bunun sebebi ışın kaynağından gelen interfere (parazit) ışınların iletimini önlemektir. Çünkü monokromatörler bazen hedef dalga boyu dışındaki dalga boylarına sahip ışınları da

iletebilirler. Dik açı kullanılarak örnek tarafından yayılan interfere ışınlar dışındaki parazit ışınlar önlenmiş olur¹⁰¹.

Spektroflorometrelerde, tek kanallı ve çok kanallı olmak üzere iki tip dedektör kullanılır. Tek kanallı dedektör bir kerede sadece bir dalga boyunun şiddetini tespit edebilirken, çok kanallı dedektör aynı anda bütün dalga boylarındaki şiddeti ölçebilir ve monokromatör kullanımını gereksiz kılar. Her iki tip dedektör için çeşitli avantaj ve dezavantajlar vardır.

Floresans ölçümü sırasında, tercihen yüksek bir absorpsiyon dalga boyu olmak üzere, eksitasyon ışını belli bir dalga boyunda sabit tutulur ve emisyon monokromatörü spektrum taraması yapar. Eksitasyon dalga boyu ölçülürkende emisyon dalga boyu sabit tutularak, eksitasyon monokromatörü spektrum taraması yapar. Floresans şiddeti absorpsiyon ile orantılı olduğundan, eksitasyon spektrumu, absorpsiyon spektrumu ile genellikle farksızdır⁹⁹.

2.8. Yöntem Geliştirme ve Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Uygun zamanda doğru ve güvenilir veri sağlama kabiliyetinde analitik kimyanın rolü çok fazladır. Analitiksel verilerin niteliği, yöntem geliştirme ve yöntem geçerlilik testleri (validasyon) kalitesi üzerinde direk bir etkiye sahiptir. Burada ilk adım yöntem için kabul edilebilir şartlar olan minimum kriterleri belirlemektir.

2.8.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme basamakları aşağıda belirtilmektedir;

1. Yöntemin amacını, kapsamını ve uygulaması tanımlanmalıdır.
2. Yöntemin performans parametreleri ve kabul kriterleri tanımlanmalıdır.
3. Cihazın performans karakterleri tanımlanmalıdır.
4. Çalışılan materyaller nitelenmelidir.

5. Son olarak yöntem geliştirilip belgelenmelidir

2.8.2. Yöntem Geçerlilik Testleri (Validasyon)

Yöntem problemlerini minimize etmenin yolu tam bir validasyon deneyleri yapmaktan geçer. Geçerlilik testi (validasyon) bir analitik uygulamada, bir analiz yönteminin performans özelliklerinin, tasarlanmış amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemler bütünüdür. Uluslararası kabul edilen çeşitli geçerlilik (validasyon) kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, ICH, US EPA, US FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır. Analitik yöntem validasyonunun gerekli olduğu durumlar aşağıda sıralanmaktadır.

1. Herhangi bir yöntemin laboratuvarında ilk defa kullanılacağı zaman,
2. Bir analiz için yeni yöntem geliştirildiğinde,
3. Kullanılmakta olan yöntemde değişiklik yapıldığında,
4. Valide bir yöntemin başka bir laboratuvarında kullanılacağı durumlarda,
5. Yeni personel tarafından yöntemin ilk defa kullanılması durumunda,
6. Temel kimyasallarda önemli bir değişiklik yapıldığında (yöntem modifiye edildiğinde),
7. Uzun süredir kullanılmamış bir valide yöntemin yeniden kullanıma alınması durumunda,
8. Laboratuvarında yapılan ve sonuçları etkileyebileceği düşünülen değişiklikler olduğunda,
9. İki yöntemin karşılaştırılması amacıyla
10. Kalite kontrol testleri sonucunda yöntemin performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında yöntem validasyonu yapılır.

2.8.3. Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

- 1) Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity)
 - 2) Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)
 - 3) Doğruluk (Accuracy)
 - 4) Kesinlik (Precision)
 - a. a-Tekrarabilirlik (Repeatability)
 - b. b-Arakesinlik (Intermediate Precision)
 - c. c-Yenilenebilirlik (Reproducibility)
 - 5) Duyarlılık Limiti (Sensitivity)
 - a. a-Teşhis Limiti (Gözlenebilme Sınırı) (LOD)
 - b. b-Miktar alt Tayini (Tayin Alt Sınırı) (LOQ)
 - 6) Geri kazanım (Recovery)
 - 7) Sağlamlık /Dayanıklılık (Robustness/ Ruggedness)
 - 8) Özgünlük (Matriks Etkisi)
 - 9) Örneklerin Kararlılığı, Stabilitate (Stability)
- 1) Belirleyicilik/ Seçicilik (Specificity/ Selectivity)**

FDA rehberine göre, belirleyicilik/seçicilik, örnek içinde bütün komponentlerin varlığında analitin cevabını doğru bir şekilde ölçmektir. ICH rehberine göre, belirleyicilik tek bir analit için cevabı sağlayan yöntem için, seçicilik ise birden fazla analit için cevabı sağlayan yöntem için kullanılır.

2) Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma aralığı (Range)

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisinin analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür. Çalışma aralığı ise kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği analit derişim genişliğidir.

3) Doğruluk (Accuracuy)

Doğruluk, deneysel olarak belirlenmiş değerin, kabul edilebilir değere veya gerçek değere olan yakınlığıdır. Bağıl ya da mutlak hata ile verilir. Yöntemin doğruluğu;

a. Bilinen derişimlere sahip bir seri örneğin analiz sonucunun gerçek değerle karşılaştırılması ile gösterebilir.

b. Sonuçların daha önce belirlenen doğru bir yöntemle alınmış sonuçlarla karşılaştırması ile gösterilebilir.

c. Hedef derişim üzerinde üç düzeyde üç deney yapılarak katım yapılmış numune üzerinde çalışılarak gösterilebilir.

4) Kesinlik (Precision)

Kesinlik, aynı şartlarda ve aynı yöntemle elde edilen sonuçların yakınlığını, diğer bir deyişle ölçümlerin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Bağıl standart sapma (% BSS) veya varyasyon katsayısı (% VK) ile verilir. Analitik bir işlemin veya ölçümün kesinliği yaygın olarak 3 terimle ifade edilmektedir.

a. Tekrarlanabilirlik: Aynı çalışma şartlarında kısa bir zaman aralığında olacak tekrarlanan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Güniçi kesinlik olarakta adlandırılır.

b. Ara kesinlik: Değişik gün, operatör ve cihazda yapılan deneyin sonuçlarının kesinliğini göstermektedir. Günlerarası kesinlik, gün değişkenliği kullanılarak yapılan ara kesinlik çalışmasıdır ve aynı çalışma şartlarında numunelerin farklı günler (en az üç gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsü olarak tanımlanır.

c. Yenilenebilirlik: Laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder.

5) Duyarlılık Limiti (Sensitivity)

Bir cihazın ve yöntemin hasaslığı, tayini yapılacak maddenin derişiminde meydana gelecek en küçük değişiklikleri bile fark edebilme özelliğidir ve analitik yöntemin en düşük derişimlerdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

a. Teşhis Limiti (Gözlenebilme Sınırı) (LOD): Bir analitik işlemin teşhis limiti, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer değildir. Tipik olarak LOD pik boyunun gürültü oranına 3 olduğu veya bağıl standart sapma değerinin % 20'den küçük olduğu derişimdir.

b. Miktar Tayin Limiti (Tayin Alt Sınırı) (LOQ): Kalibrasyon eğrisinde ya da cihazın tayin edebileceği analitin en düşük derişimine miktar tayin limiti denilmektedir. Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Tayin alt sınırı değeri, pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranın 10 olduğu veya bağıl standart sapma değerinin % 10'dan küçük olduğu derişimdir.

6) Geri kazanım (Recovery)

Kimyasal ölçümlerde gerçek değer in ölçülmesi uygulanan yöntem e bağımlı olarak değişim gösterir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle bir kayıp oluşur.

Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarı yöntemin geri kazanım oranı olarak ifade edilir. Analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranına “geri kazanım” denir.

7) Sağlamlık /Tutarlılık (Robustness/Ruggedness)

Bir yöntemin sağlamlığı, onun yüzde organik madde içeriği, hareketli fazın pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık ve enjeksiyon hacmi gibi parametrelerdeki küçük değışikliklerden etkilenmeme yeteneğidir. Bir yöntemin tutarlılığı ise, gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bu parametrelerin etkileri üzerinde veri elde etmek, son yöntem prosedüründe yer alacak kabul edilir değerlerin bir dağılımına izin verebilir. Örneğın, zamanla kolon performansı değışiyorsa, kolondaki değışimleri telafi etmek (gözardı) için hareketli faz kuvveti ayarlamaya izin verilebilir. Yöntem sağlamlığı; farklı ya da aynı laboratuarda farklı kişiler, farklı cihazlar, farklı kimyasallar ve farklı zamanlarda yapılan analizlerin değerlendirilmesi ile de ölçülür.

9) Örneklerin Kararlığı, Stabilite (Stability)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Stabilite işlemleri numune toplama ve taşıma, uzun süreli çalışma sonrası (arzu edilen depolama sıcaklığında dondurma) ve buzdolabı, dondurucu ve analitik işlemler sonrasında yapılmalıdır. Stabilite deneylerinde kullanılan şartlar çalışma esnasında kullanılan numunelendirme ve analizdeki bütün şartları içermelidir. İşlem aynı zamanda çalışmada kullanılan stok çözeltinin stabilitesini de içermelidir. Bütün stabilite çalışmalarında, analitin standart çözeltisi, kullanılan matriks ortamında ve stok çözeltilerin tümünü içeren bir deney prosödürünü kullanmak gerekir. Stabilite çalışmaları için analitin stok çözeltisi bilinen derişimde uygun bir çözücü ile hazırlanmalıdır. Biyolojik ortamda analit stabilitesi

depolama şartlarının, analitin kimyasal özelliklerinin, matriksin ve kullanılan kapların bir fonksiyonudur. Stabilite çalışması aşağıdaki beş basamakta gerçekleştirilmelidir.

a-Donma ve erime stabilitesi: Çalışılan analit stabilitesinin üç donma ve erime turlarından sonra belirlenmesidir. Analit ayarlanmış depolama sıcaklığında stabil değilse, stabilite örneği üç donma ve erime turu boyunca -20°C'de dondurulmalıdır.

b. Kısa-dönem stabilitesi: Çalışılan analit stabilitesinin oda sıcaklığında 2 ile 24 saat arasında belirlenmesidir.

c. Uzun dönem stabilitesi: Uzun dönem bir stabilite değerlendirmesinde depolama zamanı son örneğin analiz tarihi ile ilk örneğin toplanma tarihi arasındaki zamanı aşmayacak şekilde bu zaman diliminde çalışılan analit stabilitesinin belirlenmesidir.

d. Stok çözeltinin stabilitesi: Çalışılan analitin ve iç standartın stok çözeltilerinin stabilitesi en az 6 saatlik oda sıcaklığında stabil olduğunun değerlendirilmelidir. Ayrıca eğer stok çözeltiler uygun periyotlarda dondurulur ya da buzdolabında tutulursa, stabilite belgelenmelidir.

e. Hazırlama sonrası stabilite: Oto örnekleyici içindeki bekleme zamanını içeren işlenmiş örneklerin stabilitesinin belirlenmelidir.

8) Özgünlük (Matriks Etkisi)

Çalışılan biyolojik örneklerde bulunan analiz edilmeyen analitler veya interferans maddelerin varlığından dolayı cevapta interferans veya direk veya indirek değişikliklerin belirlenmesidir^{102, 103}

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan Losartan potasyum (LP) standart maddesi Sigma-Aldrich'den (Germany) temin edildi. Milli-Q saflıkta su kullanılmış olup kimyasal çözücü olarak kloroform (Merck, Germany), sülfüröz asit (Sigma-Aldrich, Germany) ve hidroklorik Asit (Merck, Germany) analitiksel saflıkta, metanol (Merck, Germany), asetonitril (Merck, Germany) ve metil-terciyer-bütil eter (MTBE) (Sigma-Aldrich, Germany) HPLC saflıkta kullanıldı.

Biyolojik matriks olarak kullanılan tavşan plazması ve New Zealand türü Beyaz sağlıklı tavşanlar Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından temin edildi.

LP içeren, Cozaar, Eklips, Loxibin, Sarilen ve Sarvas isimli ticari farmasötik preparatlar eczanelerden temin edildi.

Çalışmada kullanılan otomatik pipetler (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL ve 1000-5000 µL) ve kuvartz küvet (USA) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

Çalışmada floresans ölçümler Spektrofluorometre cihazı (Perkin Elmer LS 45 Spektrofluorometre cihazı, Xenon deşarjlı lamba, Monk-Gillieson tipi monokromatör (dalga boyu aralığı 200-800 nm) ve bilgisayar (Vestel)) ile yapıldı. Ayrıca çalışmada pH metre (Schott), santrifüj (Hettich, RPM x 100), terazi (Metler Toledo Ad 104-5), karıştırıcı vorteks (IKA), su banyosu (GFL), etüv (Memmert) ve Ultrasonik Banyo (Elma LC30) cihazları kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Spektroflorometri Yöntemi Şartları

LP'nin standart çözeltileri, plazma ekstraksiyonu sonucu elde edilen çözeltileri ve gerçek numuneler için spektroflorometrik yöntem şartları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. LP için spektroflorometre yöntem şartları

Yöntem Şartları	Uyarma	Emisyon
Start Lamba (nm)	210	300
Stop Lamba (nm)	310	500
Tarama Hızı(nm/dak)	400	400
Uyarma Monokromotörün Slit Aralığı	10.0	10.0
Emisyon Monokromotörün Slit Aralığı	10.0	10.0
Referans Dalgaboyu (nm)	410 (Emisyon)	248 (Uyarma)

3.2.2. LP'nin Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

Deney tüpüne 0.5 mL plazma örneği koyuldu. Plazma üzerine uygun derişimlerde 0.1 mL LP çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım 0.15 mL 1 M HCl çözeltisi ile asitlendirilip 1 dak. vortekslendi ve 5 mL MTBE ilave edildi. Ağzı kapatılarak 5 dak. vortekslendi. 3000 rpm de 5 dak. santrifüj edildi. Daha sonra organik faz, içinde 0.2 mL 0.05 M NaOH çözeltisi bulunan santrifüj tüpüne alındı ve 5 dak vortekslenip 3000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Organik faz dekantasyon ile ayrıldı. LP'nin bulunduğu sulu faz üzerine 2.8 mL 0.01 M sülfüröz asit çözeltisi (pH:2) ilave edilip vortekslendi ve daha sonra uyarma ve floresans emisyon spektrumları LP katımı yapılmamış plazma örneğinin ekstraksiyonu ile elde edilen köre karşı alındı.

3.2.3. LP'nin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

LP'nin belirlenmesinde kullanacağımız uygun çözücü, pH ve uygun asit veya tampon çözeltisi belirlemek amacıyla, derişimi 0.5 µg/mL olacak şekilde LP'nin çeşitli organik çözücüde (su, etanol, metanol, kloroform, eter, hekzan ve aseton), çeşitli asit ve

tampon çözeltisi kullanarak (HNO_3 , H_2SO_4 , HCl ve $\text{H}_2\text{SO}_3/\text{NaHSO}_3$ (pH:2)) çeşitli pH'larda (1, 1.5, 2, 2.5 ve 3) çözeltileri hazırlandı. Spektroflorimetrede uyarma dalga boyu 200 nm'den başlayarak 10 nm aralıklarla 900 nm'ye kadar uyarma ve emisyon spektrumları alındı. Ayrıca kullandığımız çözücü ortamında uyarma ve emisyon spektrumları aynı dalga boyları arasında tarandı. Spektrumlardan, uygun koşulları belirlemek için, çözücü ortamının floresans emisyonunun etkin maddenin floresans emisyonunu en az etkilediği dalga boyları göz önüne alındı. LP'nin en iyi bağlı floresans yoğunluğunu elde etmek için belirtilen değişkenler incelendi.

3.2.4. LP için Uyarma ve Emisyon Dalga Boyunun Belirlenmesi

İlaç etkin maddesinin (LP) spektroflorometrik analizlerini yapabilmek amacı ile öncelikle çeşitli pH ve çözücülerde uyarma ve emisyon dalga boyları belirlendi. Bunun için bu etkin maddenin 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimde çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin uyarma ve emisyon spektrumları alınarak incelendi. LP için uyarma ve floresans emisyon piklerinin net bir şekilde gözlemlendiği ve floresans şiddetinin en yüksek olduğu dalga boyları göz önüne alınarak en uygun uyarma dalga boyu (λ_{uy}) ve emisyon dalga boyu (λ_{em}) belirlendi.

3.2.5. LP için Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1 mg/mL derişimde metanolde hazırlanan stok çözelti 0.01 M sülfüröz asit çözeltisi (pH:2) ile seyreltilerek 0.025-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bölüm 3.2.2'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle plazmadan LP'nin ekstraksiyonu yapılarak yine 0.025-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişim aralığında plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltiler $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

3.2.6. LP için Biyoanalitik Yöntem Validasyonu

a. Belirleyicilik (Seçicilik)

LP'nin hazırlandığı çözücü karışımının ve boş plazma çözeltilerinin LP'nin floresans şiddeti üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin olup olmadığı saptandı. Bu uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücünün emisyon piki LP emisyon pikininden farklı dalga boyunda olduğu görüldü.

b. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

LP'nin 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri ve yine aynı derişimlerde plazmadan ekstraksiyonla elde edilen plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. En uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında floresans şiddetleri kaydedildi. Elde edilen floresans şiddetleri kullanılarak derişime karşı $y=ax+b$ regresyon eşitliğine sahip kalibrasyon eğrileri elde edildi. Korelasyon katsayısı, regresyon eğrisindeki kaymanın ve eğimin standart sapması hesaplandı.

c. Doğruluk/ Kesinlik

0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde hazırlanan standart LP çözeltileri ve yine aynı derişimlerde plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma çözeltilerinden gün içi analizleri için 6'şar adet hazırlandı ve aynı gün floresans spektrumları alındı. Günler arası analizleri için ise 2'şer kere hazırlandı ve 3 gün boyunca floresans spektrumları alındı. Elde edilen analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi. Doğruluk, bağıl hatayla $[(\text{bulunan-eklenen}/\text{eklenen})\times 100]$ ve kesinlikte bağıl standart sapma $[\% \text{ BSS} = \text{standart sapma}/\text{ortalama}\times 100]$ ile verildi.

d. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

LP'nin standart ve plazma çözeltileri ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin en küçük derişiminden daha küçük derişimlere inilerek bir seri standart çözeltileri hazırlandı ve altı kez floresans şiddetleri okundu. Okunan değerlerin bağıl standart

sapmaları (% BSS) belirlendi. Bağıl standart sapma değeri % 20'den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı ve % 10'dan küçük olan derişim de tayin alt sınırı değeri olarak belirlendi.

e. Geri Kazanım

Farmasötik preparatlarda ve plazmada geri kazanım çalışması standart ekleme yöntemi ile yapıldı. 0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde hazırlanan LP çözeltileri farmasötik preparatlara ve plazmaya eklendi ve floresans spektrumları alındı. Geri kazanım [(bulunan/eklenen)x100] formülü ile hesaplandı.

f. Örneklerin Kararlılığı, Stabilite

LP'nin standart çözeltilerinin stabilitesini belirlemek amacıyla LP'nin düşük orta ve yüksek derişimleri (0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL) hazırlanarak oda sıcaklığında 6, 24, 48 ve 60 saat, buzdolabında (+4 °C) ve derin dondurucuda (-20 °C) 24, 48 ve 60 saat boyunca bekletildi. Floresans spektrumları alındı ve floresans şiddetleri ölçüldü. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin floresans şiddetleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak verildi.

LP'nin plazma çözeltilerinin stabilitesini belirlemek amacıyla donma-erime stabilitesi, uzun dönem stabilitesi, kısa dönem stabilitesi ve hazırlama sonrası stabilite çalışıldı. Bu amaçla, donma erime stabilitesini belirlemek için 0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde hazırlanan LP çözeltisi boş plazmaya eklenip -20°C depolama sıcaklığında 24 saat bekletildi ve oda sıcaklığında yardımsız eritildi. Donma erime turları 3 kez tekrarlandı ve her donma erime turundan sonra floresans spektrumları alındı ve floresans şiddetleri ölçüldü. Yine 0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde hazırlanan LP çözeltisi boş plazmaya eklenip uzun dönem stabilitesi için -20°C de 24, 48 ve 60 saat bırakıldıktan sonra kısa dönem stabilitesi için oda sıcaklığında 6, 24 ve 48 saat bırakıldıktan sonra ve hazırlama sonrası stabiliteyi belirlemek için ekstraksiyonları

gerçekleştirildikten sonra plazma çözeltileri santrifüj tüplerine alınarak 6 ve 24 saat bekletildikten sonra floresans spektrumları alındı ve floresans şiddetleri ölçüldü. Bulunan değerler, yeni hazırlanıp analiz edilen standart çözeltilerin floresans şiddetleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak verildi.

3.2.7. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

LP içeren tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparattan (Cozaar 50 mg, Eklips 50 mg, Loxibin 50 mg, Sarilen 50 mg ve Sarvas 50 mg) her biri için 10 adet tablet alınıp tartılarak ortalamaları alındı. Tabletler havanda ezilerek toz haline getirildikten sonra her biri için yaklaşık 1 tablet miktarı (50 mg LP) alınarak 40 mL metanol eklendi. 15 dak boyunca sonike edildi ve oda sıcaklığında soğutuldu. Hacim 50 mL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti süzülerek, istenilen derişimleri 0.01 M sülfüröz asit çözeltisi (pH:2) ile seyreltilerek elde edildi.

3.2.8. Numune Alımı Protokolü ve Deney Hayvanlarına Ait Özellikler

Çalışma, 25.03.2011 tarih ve 2011/38 etik kurul kararı ile Atatürk Üniversitesi Tıbbi Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ATADEM) gerçekleştirildi ve çalışmada kullanılan tavşan bu merkezden temin edildi. Tavşanın izlemi, tavşana yapılan tüm girişimler yine bu merkezde gerçekleştirildi. Çalışmamızda ağırlıkları 3.5 kg olan 1 adet New Zealand cinsi beyaz sağlıklı tavşan kullanıldı. Hayvan, herhangi bir ilaç uygulamasını önlemek amacıyla, çalışmaya başlamadan 10 gün önce özel kafese alındı. Tavşan, standart tavşan yemi ile beslendi ve su verildi. Deney gününde ilaç uygulama saatinden 12 saat önce tavşan aç bırakıldı (sadece su verildi). Deney boyunca ise sadece su ve ilaç uygulamasından 3 saat sonra yemi verildi. LP içeren ve türk ilaç piyasasından temin edilen COZAAR® ticari tabletin su içerisinde süspansiyonu hazırlandı. 10 mg/kg dozda New Zealand cinsi beyaz sağlıklı tavşana gavaj yardımı ile oral yoldan uygulandı.

Uygulanan doz literatür verileri göz önünde tutularak saptandı^{83, 87, 88, 104}. İlaç verilmeden önce ve verildikten 0,25, 0.5, 0.75, 1, 1.33, 1.67, 2, 4, 6, 10, 12, 24, ve 48 saat) sonra tavşanın kulak veninden 1 mL kan örneği alındı ve EDTA'lı tüplere aktarıldı. 3000 rpm de santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazmalar analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

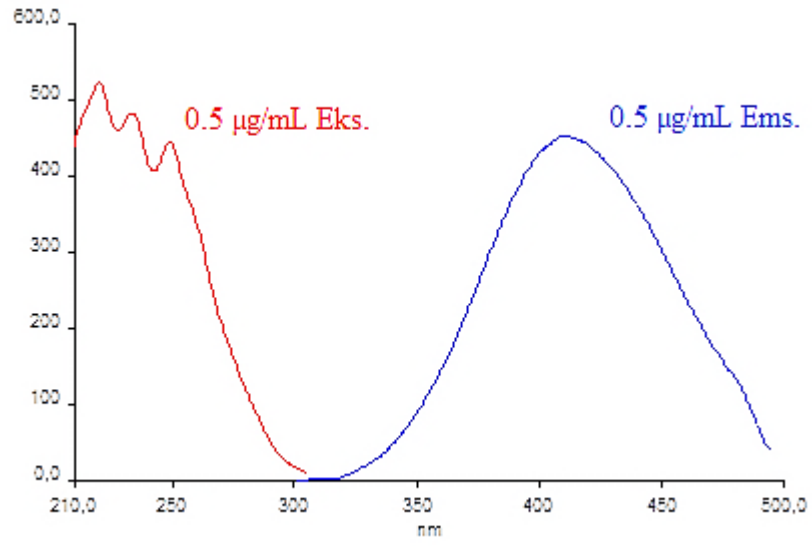
3.2.9. Farmakokinetik Hesaplamalar

Farmakokinetik verilerin analizi non-kompartmental farmokinetik model temel alınarak gerçekleştirildi. 0-48 saat için plazma derişimi- zaman eğrisi çizildi ve eğrinin altındaki alan (EAA)₀₋₄₈ trapezoid kuralı ile belirlendi. Maksimum plazma derişimi (C_{max}) ve bu derişime ulaşma zamanı (t_{max}) çizilen derişim zaman grafiklerine bakılarak belirlendi. EAA_{48-∞} = C_t/K_{el} formülü ile hesaplandı. EAA_{0-∞} ise (EAA)₀₋₄₈ ve EAA_{48-∞} değerlerinin toplamı ile elde edildi. (C_t: 48. saatte ölçülen derişim). LP'nin eliminasyon hız sabiti (k_{el}) plazma verilerinden hareketle hesaplandı. Eliminasyon yarılanma ömrü (t_{1/2}) ise $t_{1/2} = \ln(2)/k_{el}$ formülü ile hesaplandı.

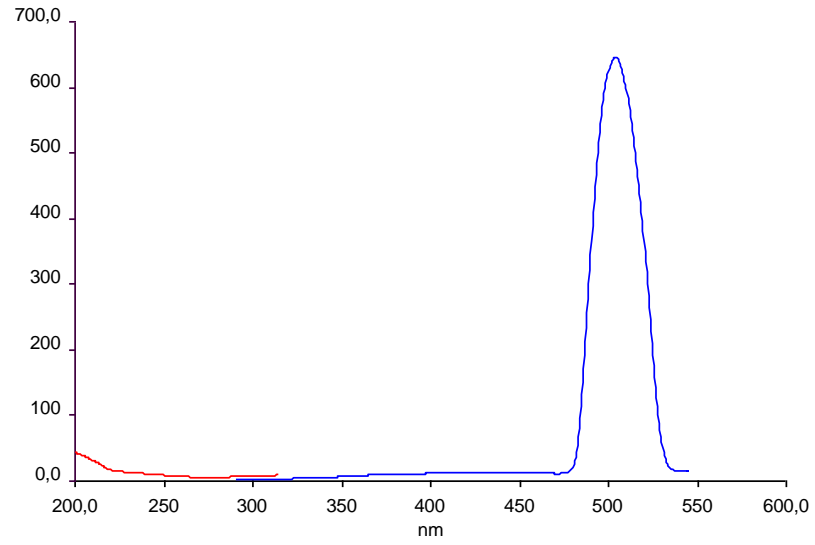
4. BULGULAR

4.1. LP'nin Floresans Şiddetine Çözücü ve pH'ın Etkisi

LP'nin en yüksek floresans şiddeti verebileceği çözücü belirlemek için su, etanol, metanol, kloroform, eter, hekzan ve asetonda 1mg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlandı. LP' nin su, etanol ve metanolde iyi bir şekilde çözüldüğünü asetonytril, kloroform, eter, hekzan ve aseton gibi organik çözücülerde ise kısmen çözüldüğü gözlemlendi. Nötr ortamda LP'nin floresans şiddeti çok düşük olup bu çözücüler arasında en yüksek floresans şiddetinin metanol ile elde edildiği görüldü. LP için asitlik sabiti pKa: 3.15 olup losartanın asit türlerinin (pH: 5 den daha düşük olduğu zaman) floresan olduğu literatür de bildirilmiştir¹⁰⁵. Bu bilgiler ışığında metanolde hazırlanan LP'nin stok çözeltilisi Tablo 4.1 de verilen asit ve tampon çözeltilisi kullanarak seyreltilip 0.5 µg/mL derişimde LP çözeltilisi hazırlandı ve çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları kaydedildi. Sülfüröz asit ile hazırlanmış çözeltili için elde edilen floresans spektrumu Şekil 4.1'de verildi. Elde edilen uyarma ve emisyon spektrumlarından yararlanılarak en yüksek floresans şiddetinin elde edildiği uyarma ve emisyon dalga boyları belirlendi. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi LP'nin metanolde çözülüp 0.01 M sülfüröz asit çözeltilisi (pH:2) ve HCl (pH:2) ile seyreltilerek elde edilen çözeltilisinin en yüksek floresans şiddetine sahip olduğu görüldü. Metanol-sülfüröz asit çözeltilisi kullanmamızın nedeni LP için seçtiğimiz uyarma dalga boyunda emisyon pikinin bulunmamasıdır (Şekil 4.2). Bundan sonraki tüm çalışmalarımız, bu çözücü karışımı ortamında yapıldı ve aynı dalga boyunda çözücü emisyonunun olmaması bu çözücü karışımının avantajıdır.



Şekil 4.1. Metanol-sülfüröz asit çözeltisinde hazırlanan LP çözeltisinin (0.5 µg/mL) floresans spektrumu



Şekil 4.2. Metanol-sülfüröz asit çözeltisinin floresans spektrumu

Tablo 4.1. LP'nin floresans şiddetine çözücü ve pH'ın etkisi (0.5 µg/mL)

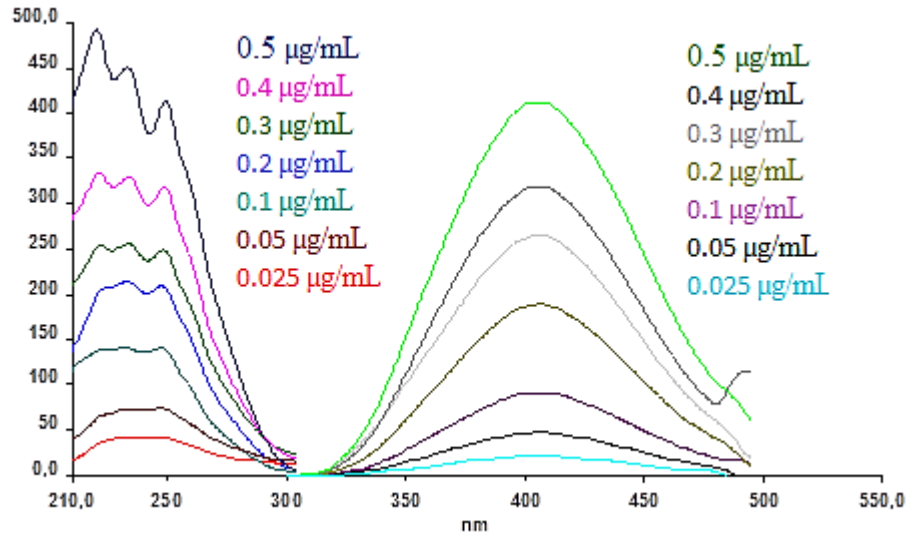
Çözücü	pH	Kullanılan Asit veya tampon çözelti	λ_{uy}	λ_{em}	Floresans Şiddeti	
					Çözücü	LP
Su	2	0.01 M HCl	247.81	387.56	35	428
Metanol	2	0.01 M HCl	251.08	274.82	43	448
Etanol	2	0.01 M HCl	247.75	377.65	65	385
Asetonitril	2	0.01 M HCl	279.15	369.12	44	381
Metanol	2	0.01 M HNO ₃	252.35	381.70	42	400
	2	0.01 M H ₂ SO ₄	249.53	383.45	47	372
	2	0.01 M H ₂ SO ₃	284.12	410.09	16	484
Metanol	1.5	0.01 M H ₂ SO ₃	249.33	385.15	56	425
	2	0.01 M H ₂ SO ₃	284.12	410.09	16	484
	2.5	0.01 M H ₂ SO ₃	248.80	379.77	25	318
	3	0.01 M H ₂ SO ₃	246.48	409.20	54	309

4.2. LP için geliştirilen Spektroflorometri Yöntem Geçerlilik Testleri

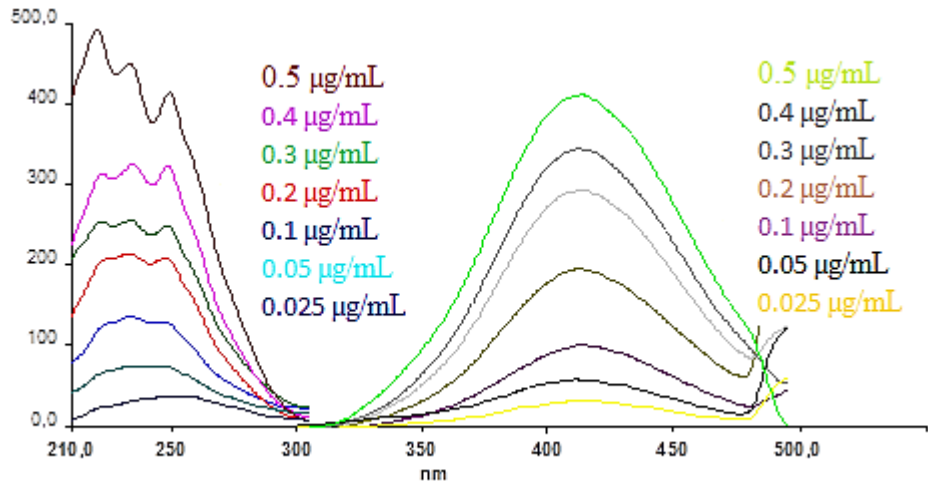
4.2.1 Belirleyicilik / Seçicilik

Metanolde çözülerek 1 mg/mL çözeltisi hazırlanan LP, pH 2.0'deki 0.01 M sülfüröz asit çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanan 0.025-0.5 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerin 210-310 nm dalga boyu aralığında uyarma ve 300-500 nm dalga boyu aralığında emisyon taraması yapıldı ve spektrumları alındı. bu ortamda en uygun uyarma dalga boyunun 248 nm ve buna karşılık gelen uygun emisyon dalga boyunun 410 nm olduğu tespit edildi (Şekil 4.3). Bu uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücünün emisyon piki LP emisyon pikininden farklı dalga boyunda olduğu görüldü (Şekil 4.2).

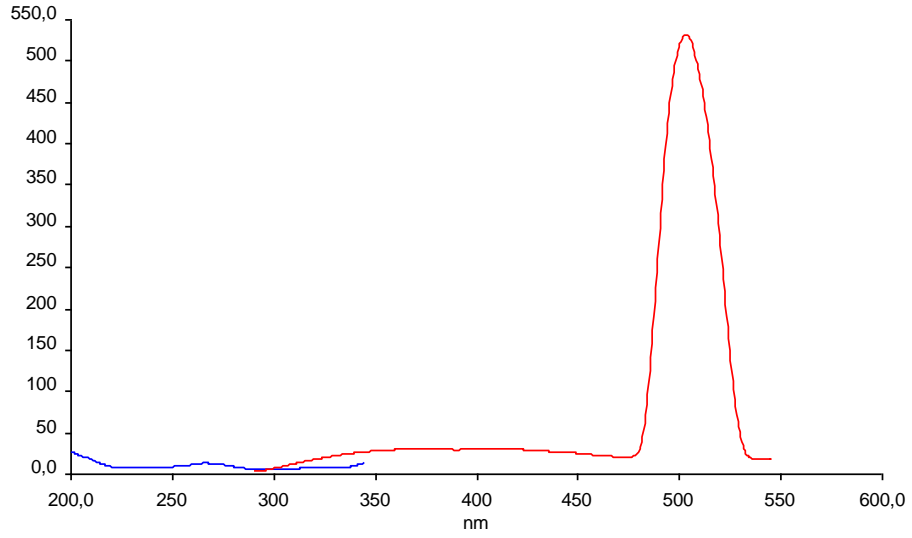
Ekstraksiyon ile elde edilen plazma çözeltilerinde de 248 nm uyarma dalga boyunda ve buna karşılık gelen 410 nm emisyon dalga boyunda maksimum pik gösterdi. (Şekil 4.4). Plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı ve yine kör plazma çözeltinin emisyon piki analit için elde edilen pikten farklı dalga boyunda geldiği tespit edildi (Şekil 4.5) .



Şekil 4.3. LP'nin standart çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.4. LP'nin plazma çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.5. Boş plazmanın floresans spektrumu

4.2.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

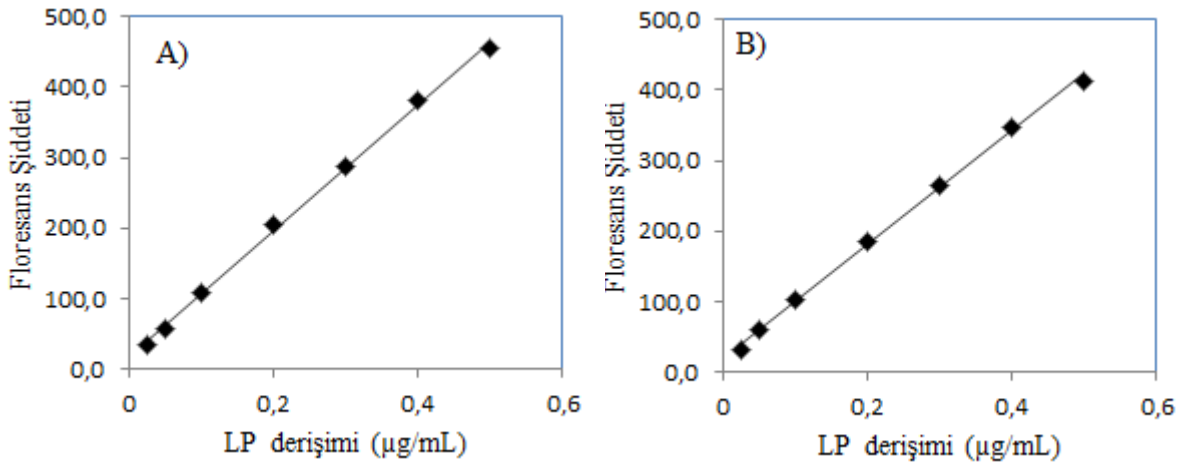
Metanol kullanılarak hazırlanan LP'nin stok çözeltisi, 0.01 M sülfüröz asit (pH:2) çözeltisi ile seyreltilerek 7 farklı derişimde (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 µg/mL) standart çalışma çözeltileri hazırlandı. En uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında floresans şiddetleri kaydedildi. LP derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.6A). Her bir eğrinin istatistik değerlendirmesi yapıldı (Tablo 4.2) .

Plazmaya spike edilip ve plazmadan Bölüm 3.2.2'de verilen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen 7 farklı derişimde (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 µg/mL) LP plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. En uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında floresans şiddetleri kaydedildi. LP derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.6B). Her bir eğrinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2. LP standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Çözelti Türü	ÇA ($\mu\text{g/mL}$)	LR ^a	Sa	Sb	R	
Standart	Uyarma	0.025-0.5	$Y=876.54x + 17.02$	0.560	1.397	0.9966
Standart	Emisyon	0.025-0.5	$Y=893.77x + 16.77$	5.682	18.00	0.9993
Plazma	Uyarma	0.025-0.5	$Y=819.98x + 7.683$	2.122	10.676	0.9983
Plazma	Emisyon	0.025-0.5	$Y=807.16x + 19.55$	0.994	2.366	0.9991

ÇA: çalışma aralığı, ^a: n=6, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R: korelasyon katsayısı



Şekil 4.6. LP'nin $\lambda_{uy}= 248 \text{ nm}$ ve $\lambda_{em}= 410 \text{ nm}$ 'de çizilen kalibrasyon eğrileri: A) standart çözeltileri B) plazma çözeltileri

4.2.3. Doğruluk/ Kesinlik

LP'nin stok çözeltisinden sülfüroz asit ile yapılan seyreltmelerle yüksek orta ve düşük derişimleri temsil eden 0.05, 0.2 ve 0.4 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde LP standart çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı labaratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) floresans spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi ve değişim katsayıları hesaplandı.

Plazma çözeltileri için, yine yüksek orta ve düşük derişimleri temsil eden 0.05, 0.2 ve 0.4 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde LP içeren tavşan plazma örnekleri hazırlandı ve bölüm

3.2.2.'deki ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) floresans spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması ve standart sapmaları belirlendi ve değişim katsayıları hesaplandı.

LP için standart ve plazma çözeltilerinden spektrofotometri yöntemi ile elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.3'de verildi.

Tablo 4.3. LP standart ve plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Ortam	Eklenen (µg/mL)	Günüçi			Günler Arası		
		Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	%BSS	Ortalama±SS (µg/mL)	Doğruluk	%BSS
Standart	0.05	0.053 ± 0.002	6.52	4.95	0.050 ± 0.003	0.21	6.51
	0.2	0.212 ± 0.004	6.49	2.23	0.214 ± 0.005	7.06	2.73
	0.4	0.425 ± 0.010	6.44	2.57	0.422 ± 0.008	5.54	1.98
Plazma	0.05	0.049 ± 0.001	-1.29	2.75	0.049 ± 0.002	-1.69	4.97
	0.2	0.206 ± 0.001	3.26	0.80	0.192 ± 0.005	-3.83	2.85
	0.4	0.407 ± 0.003	1.83	0.75	0.422 ± 0.015	5.68	3.59

SS: standart sapma (n=6), doğruluk:(bulunan-eklenen)/eklenenx100, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama x100)

4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Spektrofotometri yöntemine göre LP'nin hem standart ve hem de plazma çözeltilerinde gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri sırasıyla 1 ng/mL ve 3 ng/mL olarak tespit edildi.

4.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. LP içeren, film tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparat (Cozaar® (50 mg), Eklips (50 mg), Loxibin (50 mg), Sarilen (50 mg) ve Sarvas (50 mg)) Bölüm 3.2.7'de verildiği gibi metanolde çözülerek 1 mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Daha

sonra pH 2.0'deki 0.01 M sülfüröz asit çözeltiyle seyreltilerek her biri için 0.1 µg/mL'lik çözeltiler hazırlandı ve belirtilen dalga boylarında floresans spektrumu alındı. Sonra bu çözeltiler üzerine LP'nin 3 farklı derişimde hazırlanan standart çözeltileri (0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL) eklendi ve floresans spektrumu alındı. Belirlenen floresans şiddeti aynı derişimdeki standart çözeltilerinin floresans şiddeti ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.4'de verildi.

Tablo 4.4. Farmasötik preparatlara katım yapılan LP çözeltilerinin geri kazanım değerleri

Ticari Preparat	Eklene (µg/mL)	Ortalama±SS (µg/mL)	Geri Kazanım	% BSS
Cozaar 0.1 µg/mL	0.05	0.042 ± 0.0006	85.50	1.63
	0.20	0.184 ± 0.001	92.47	0.84
	0.40	0.364 ± 0.003	91.09	0.84
Eklips 0.1 µg/mL	0.05	0.046 ± 0.003	91.78	6.86
	0.20	0.193 ± 0.001	96.44	0.70
	0.40	0.366 ± 0.005	91.70	1.38
Loxibin 0.1 µg/mL	0.05	0.045 ± 0.002	89.95	5.66
	0.20	0.185 ± 0.0006	92.50	0.33
	0.40	0.362 ± 0.005	90.48	1.64
Sarilen 0.1 µg/mL	0.05	0.045 ± 0.001	91.32	2.03
	0.20	0.188 ± 0.004	94.25	2.34
	0.40	0.371 ± 0.006	92.71	1.69
Sarvas 0.1 µg/mL	0.05	0.044 ± 0.003	87.74	6.52
	0.20	0.187 ± 0.002	93.49	1.29
	0.40	0.366 ± 0.003	91.67	0.83

SS: standart sapma (n=6), % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama×100)

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, LP'nin kalibrasyon standart çözeltileri plazmaya eklendi. Karıştırıldı ve sırasıyla Bölüm 3.2.3'de verilen ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların floresans spektrumu alındı. Aynı zamanda standart çözeltilerin de floresans spektrumu alındı. Plazma çözeltilerinin floresans şiddeti standart çözeltilerden elde edilen floresans şiddeti ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.5'de verildi.

Tablo 4.5. Tavşan plazmasına katım yapılan LP çözeltilerinin ekstraksiyon geri kazanım değerleri

Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım \pm SS	% BSS
0.025	96.31 \pm 6.45	6.70
0.05	93.46 \pm 2.03	2.17
0.1	95.35 \pm 7.49	7.85
0.2	91.12 \pm 1.04	1.15
0.3	92.55 \pm 0.65	0.70
0.4	91.55 \pm 0.67	0.74
0.5	91.13 \pm 0.71	0.78

SS: standart sapma (n=6), % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama \times 100)

4.2.6. Stabilite (Kararlılık)

a. LP'nin Standart Çözeltilerinin Stabilitesi

0.05, 0.2 ve 0.4 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde hazırlanan LP'nin standart çözeltilerinin oda sıcaklığı (+20°C), +4°C ve -20°C'de 60 saate kadar floresans şiddetleri değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6. LP standart çözeltilerin stabilitesi

Stabilite	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	6 Saat (%GK \pm SS)	24 Saat (%GK \pm SS)	48 Saat (%GK \pm SS)	60 Saat (%GK \pm SS)
(+20°C) (%GK \pm SS)	0.05	101.76 \pm 1.237	105.67 \pm 0.665	110.53 \pm 1.723	104.67 \pm 1.433
	0.2	98.94 \pm 1.001	100.80 \pm 0.716	103.69 \pm 0.500	98.16 \pm 2.495
	0.4	99.87 \pm 0.491	100.62 \pm 1.748	100.19 \pm 2.239	100.30 \pm 1.997
(+4°C) (%GK \pm SS)	0.05	-	102.35 \pm 0.562	101.38 \pm 1.558	103.63 \pm 7.707
	0.2	-	97.74 \pm 0.342	97.35 \pm 1.294	96.85 \pm 1.581
	0.4	-	100.54 \pm 0.789	98.66 \pm 1.669	98.90 \pm 1.859
(-20°C) (%GK \pm SS)	0.05	-	96.31 \pm 0.343	97.97 \pm 1.502	98.04 \pm 2.376
	0.2	-	95.61 \pm 1.874	96.35 \pm 1.276	95.48 \pm 2.132
	0.4	-	96.87 \pm 10.909	101.30 \pm 0.208	99.96 \pm 0.291

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

b. LP'nin Plazma Çözeltilerinin Stabilitesi

1) LP'nin Kısa Dönem Stabilitesi

0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde boş plazmaya eklenerek ekstrakte edilen LP'nin plazma çözeltilerinin oda sıcaklığında (+20°C), 48 saate kadar floresans şiddetleri değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.7'de verildi.

2) LP'nin Uzun Dönem Stabilitesi

0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde boş plazmaya eklenerek ekstrakte edilen LP'nin plazma çözeltilerinin -20°'de 60 saate kadar floresans şiddetleri değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.7'de verildi.

3) LP'nin Donma ve Erime Stabilitesi

0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde boş plazmaya eklenerek ekstrakte edilen LP'nin plazma çözeltilerinin -20°C'de 24 saat aralıklarla 3 kez donma-erime turu sonrası floresans şiddetleri değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.7'de verildi.

4) LP'nin Hazırlama Sonrası Stabilitesi

0.05, 0.2 ve 0.4 µg/mL derişimlerde boş plazmaya eklenerek ekstrakte edilen LP'nin plazma çözeltilerinin ekstraksiyon sonrası banko üzerinde oda sıcaklığında (+20°C) 24 saate kadar floresans şiddetleri değerlendirilerek yapılan stabilite çalışmasının analiz sonuçları Tablo 4.7'de verildi

Tablo 4.7. LP plazma çözeltilerin stabilitesi

Zaman (ssat)	Eklene (µg/mL)	Donma Erime Stabilitesi (%GK±SS)	Kısa Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Uzun Dönem Stabilitesi (%GK±SS)	Hazırlama Sonrası Stabilitesi (%GK±SS)
6	0.05	-	77.01 ± 1.811	-	100.49 ± 2.338
	0.2	-	86.90 ± 0.548	-	106.31 ± 1.089
	0.4	-	112.72 ± 1.406	-	111.57 ± 0.257
24	0.05	114.86 ± 1.577	93.78 ± 1.414	99.35 ± 0.562	95.77 ± 2.962
	0.2	103.89 ± 1.057	93.23 ± 0.830	94.40 ± 3.081	99.80 ± 1.129
	0.4	107.60 ± 1.076	108.64 ± 0.576	109.83 ± 0.500	107.95 ± 0.920
48	0.05	113.86 ± 1.321	91.90 ± 1.074	97.61 ± 0.490	-
	0.2	117.99 ± 1.111	91.37 ± 0.745	121.96 ± 2.354	-
	0.4	110.50 ± 0.665	113.21 ± 0.891	122.00 ± 0.763	-
60	0.05	98.45 ± 2.612	-	87.38 ± 4.140	-
	0.2	98.05 ± 2.159	-	106.66 ± 5.362	-
	0.4	104.35 ± 0.813	-	105.31 ± 1.042	-

SS: standart sapma (n=3), %GK: yüzde geri kazanım, (-): analiz yapılmadı

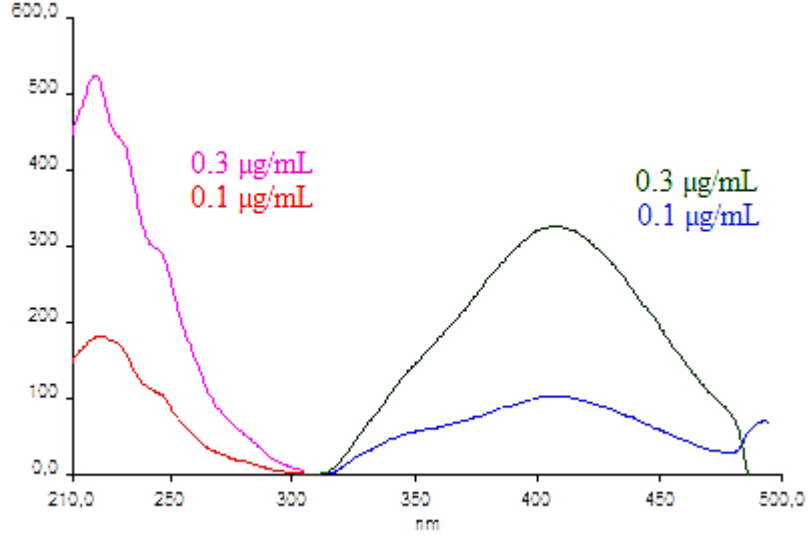
4.3. Gerçek Numunelere Uygulama

4.3.1. Geliştirilen Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

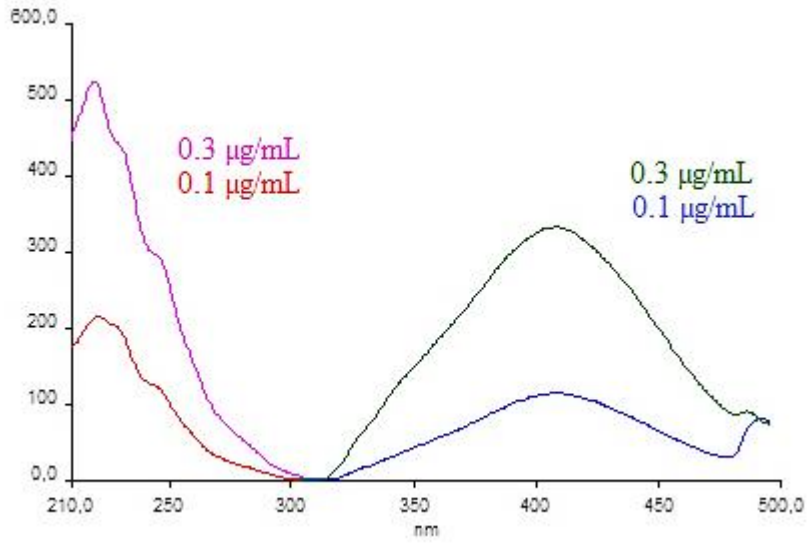
Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan spektrofotometrik yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla, LP içeren farmasötik preparatlarda LP'nin kalibrasyon grafiklerinden doğrudan tayinini yapıldı ve Şekil-4.6A'da verilen kalibrasyon grafiğinden yararlanıldı.

LP içeren, film tablet formundaki beş adet ticari farmasötik preparat (Cozaar (50 mg), Eklips (50 mg), Loxibin (50 mg), Sarilen (50 mg) ve Sarvas (50 mg)), Bölüm 3.2.7'de verildiği gibi metanolde çözülerek 1mg/mL'lik çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiler 0.01 M sülfüroz asit çözeltisi (pH:2) ile seyreltilerek 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimdeki çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin floresans spektrumu alındı (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) ve floresans şiddetleri

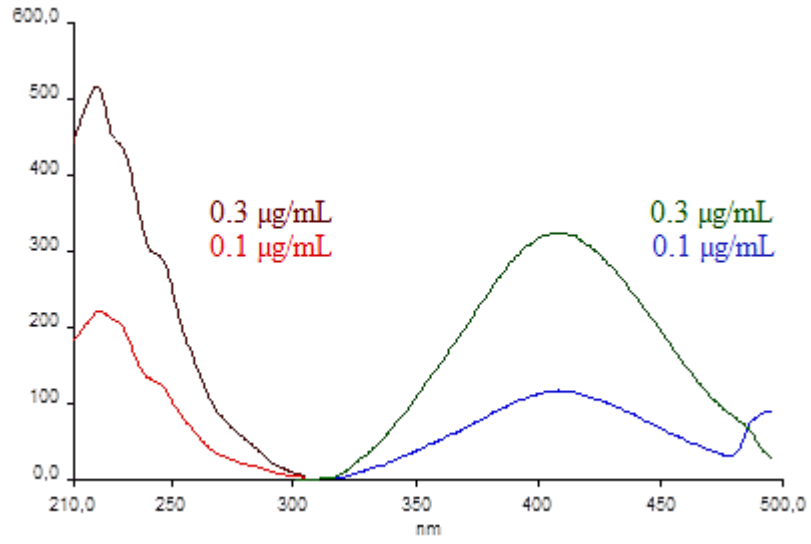
ölçülerek standart kalibrasyon grafiğinden (Şekil 4.6) yararlanılarak LP derişimi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de verildi.



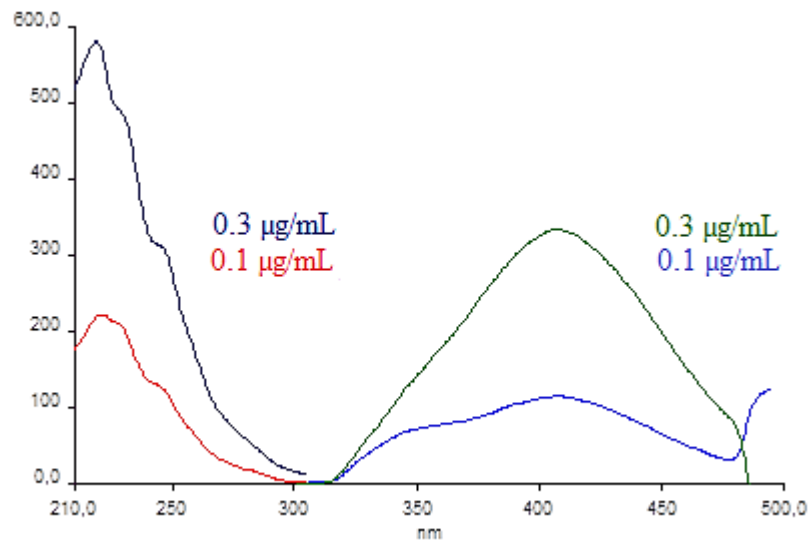
Şekil 4.7. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Cozaar (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu



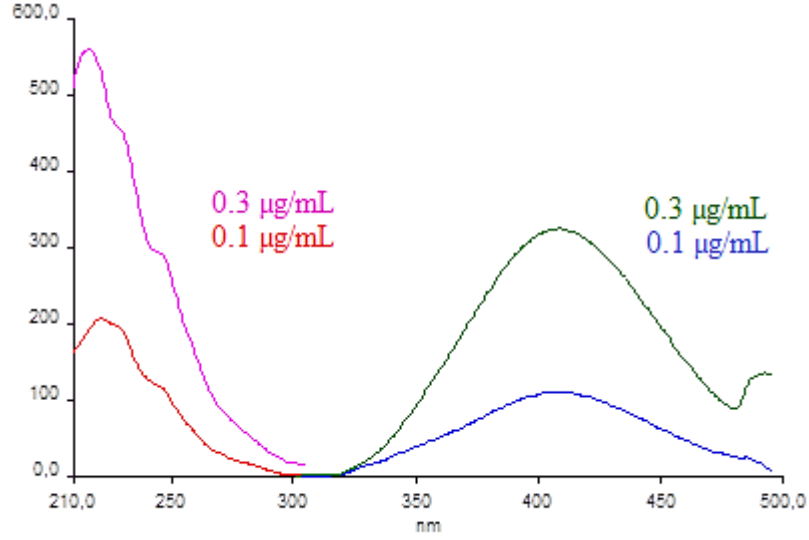
Şekil 4.8. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Eklips (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.9. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Loxibin (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.10. 0.1 ve 0.3 µg/mL derişimlerde Sarilen (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.11. 0.1 ve 0.3 µg /mL derişimlerde Sarvas (50 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu

Tablo 4.8. LP içeren farmasötik prepratların spektrofotometri yöntemi ile miktar tayini

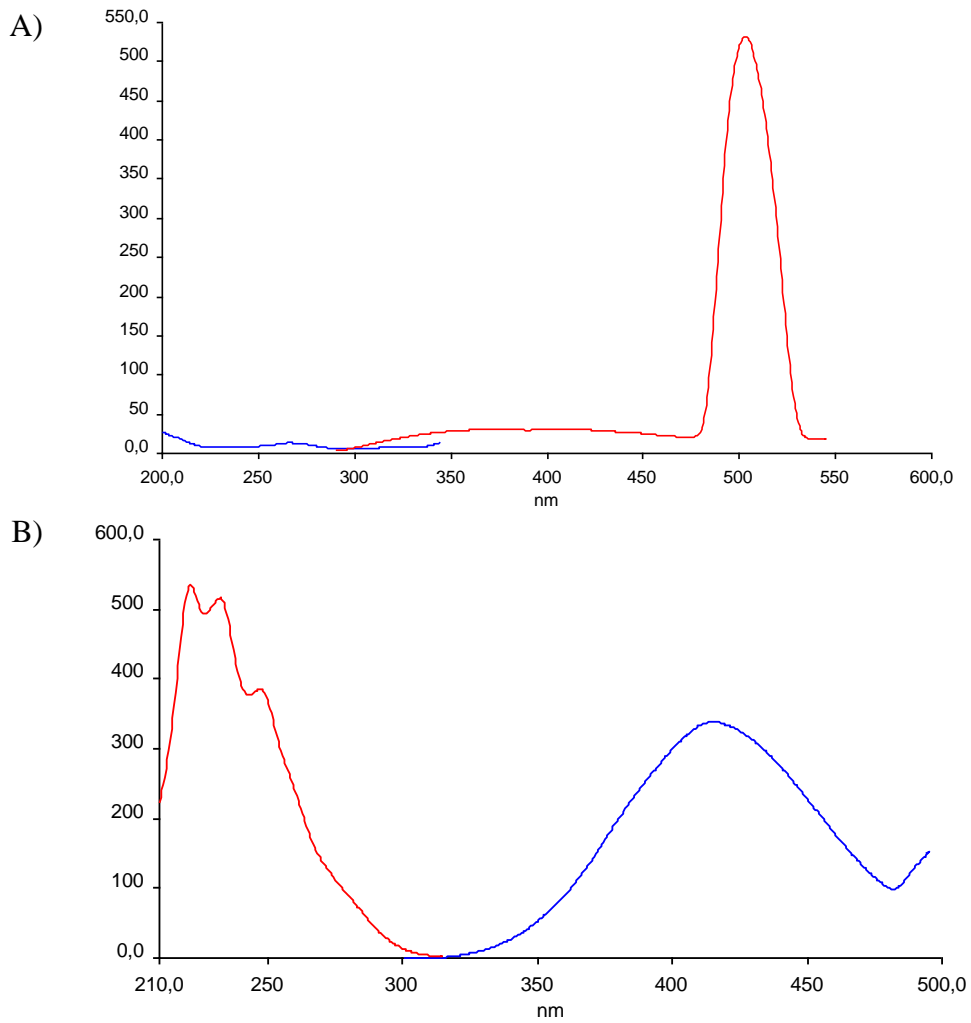
Ticari Preparat	n	Ortalama±SS (mg)	%Geri kazanım	% BSS	Güven Aralığı
Cozaar (50 mg)	24	50.99±2.95	101.9	5.79	94.2-109.2
Eklips (50 mg)	24	51.88±1.74	103.8	3.35	97.0-110.7
Loxibin (50 mg)	24	52.39±1.84	104.8	3.51	98.1-110.4
Sarilen (50 mg)	24	51.71±1.67	103.4	3.23	96.3-106.8
Sarvas (50 mg)	24	51.55±2.23	103.1	4.32	96.6-109.5

SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma (SS/ortalama×100)

4.3.2. Tavşanlarda LP'nin Farmakokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Tavşan plazma çalışmasında geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan spektrofotometrik yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacı ile LP etkin maddesini içeren farmasötik preparat (Cozaar) New Zealand cinsi beyaz sağlıklı tavşana Bölüm 3.2.8 de belirtildiği gibi 10 mg/kg dozda oral yoldan uygulandı. Belirli sürelerde

alınan kan örnekleri alınıp plazmaları ayrıldı. Ayrı saklama tüplerine alınan tavşan plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -20°C 'de depolandı ve plazma örnekleri Bölüm 3.2.7'de belirtildiği şekilde ekstrakte edildi. Elde edilen çözeltilerin floresans spektrumu alındı (Şekil 4.12 A ve B) ve floresans şiddetleri ölçülerek plazma kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak LP derişimi belirlendi ve derişim-zaman eğrisi elde edildi (Şekil 4.13). Elde edilen derişim-zaman eğrisinden ilacın farmakokinetik parametreleri belirlendi (Tablo 4.9).

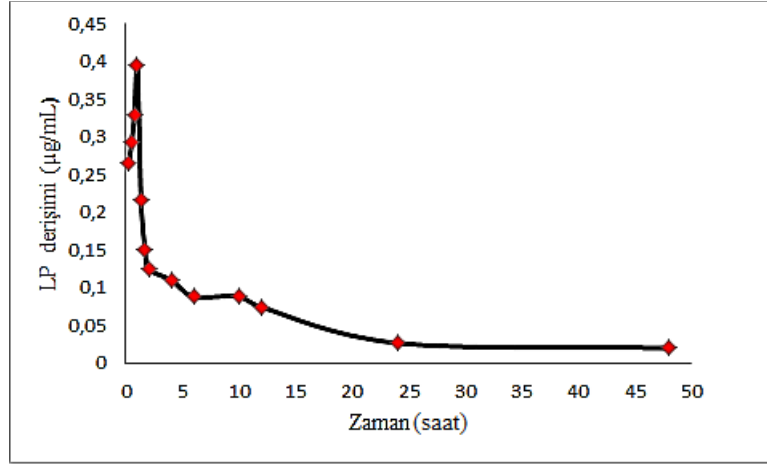


Şekil 4.12. Coosar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşan plazmalarının floresans spektrumu A) ilaç uygulanmadan önce B) ilaç uygulandıktan 1 saat sonra

Tablo 4.9. Coozar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşanda LP'nin farmakokinetik parametreleri

Farmakokinetik Parametreler	Tavşan
T_{max} (saat)	1.000
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.395
CL (L/saat)	3.836
$T_{1/2}$ (saat)	1.311
k_{el} (sa^{-1})	0.528
AUC_{0-48} ($\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$)	2.568
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{saat/mL}$)	2.606

t_{max} : maksimum zaman, C_{max} : maksimum derişim, AUC_{0-48} : eğri altındaki alan (0-48 saat arası), $AUC_{0-\infty}$: eğri altındaki alan (0- ∞ saat arası) $t_{1/2}$: yarı ömür, CL: klerens, k_{el} : eliminasyon sabiti



Şekil 4.13. Coozar ilacı (10 mg/kg) verilen tavşan plazmasında LP'nin derişim-zaman grafiği

5. TARTIŞMA

Hipertansiyon kan basıncının devamlı olarak 140/90 mm-Hg değerinin üzerinde olması anlamına gelir ve dünya genelinde 600 milyon insanda görülen ve her yıl 3 milyon insanın ölümüne neden olan yaygın bir hastalıktır⁶. Hipertansiyonun tanı ve tedavisinde önemli bir ilerleme olmasına rağmen, kan basıncı kontrolü dünya genelinde yetersiz kalmaktadır. Hipertansiyonun yaygınlığı, hastalığın doğru bir şekilde teşhis edilememesi ve hastaların bilinçsizliği ile birleşerek yetersiz tedavinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır⁸. LP hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir non-peptid ARA-II'dir³. ARA-II'ler, hipertansiyon ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde etkili ajanlardır. Losartan vücutta dönüştüğü aktif metaboliti ile birlikte selektif olarak AT₁ metabolitine bağlanarak AT₂'nin vazokonstriktör ve aldosteron salgılatıcı etkilerini bloke eder ve bu yolla antihipertansif etki gösterir⁴.

Günümüzde muhtelif maksatlarla çok çeşitli ilaç kullanılmakta ve bunlara her geçen gün yenileri eklenmektedir. İlaçların etkili olan kısımları ilaçların etkin maddeleridir. Bir farmasötik preparat her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen yine de hastaya verildiğinde etkisi yetersiz olabilir. İlaçların biyolojik sıvılarda analizi ile ilacın vücut içerisindeki davranışı incelenebilir ve elde edilen profillerden ilacın biyolojik etkisiyle ilişkisi saptanabilir ve daha tutarlı ve verimli tedavilere gidilmesine olanak sağlanabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç ya da diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi bilimsel açıdan önemli çalışmalardır¹⁰⁶. Bu bilgilere göre, plazma LP derişiminin belirlenebilmesi, hipertansiyonun tedavisinde yardımcı bir faktör olabilir.

Ayrıca gerek imalat ve gerekse piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın kullanımı açısından çok önemlidir. Eksik etkin madde içeren ilaçlar gereken yararı göstermemekte ve ilaçların

yan etkileri dikkate alındığında, fazla ilaç etkin maddeli olanlar ise pek çok zararlı etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle ilaç etken maddeleri farklı ilaçlarda farklı biyolojik matrislerde bulunduğunda belirlenebilmesi önemlidir¹⁰⁷.

Miktar analizi, teşhisi ve belirlenmesi gibi kalitatif ve kantitatif analizlerde çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. Analizlerde kullanılacak iyi bir yöntem seçimini yapabilmek için analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanıma sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak konu hakkında iyi bir literatür bilgisine de sahip olmak gerekmektedir. Tabii ki uygulanacak analitik tekniğin nasıl seçilmesi gerektiği hususunda net bir şey söylemek mümkün değildir, çünkü her türlü koşullar altında en iyi yol sadece bir tane değildir. Genel olarak yöntem seçiminde ilk adım analiz sırasında ölçülmek istenen değerlerin belirlenmesi ve buna ulaşmak için en hızlı ve güvenli yolun araştırmasıdır¹⁰⁸.

Etrafımızda, canlı cansız çeşitli yapılar bulunur. Bu yapılar, birbirinden oldukça farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip atom ve molekül gibi daha küçük parçacıkların, belirli bir düzen içerisinde bir araya gelerek oluşturdukları makro sistemlerdir. Bu sistemleri oluşturan parçacıklar birbirleri ve doğada bulunan radyasyon gibi çeşitli formlarla etkileşim halindedirler. Bir sistemi oluşturan parçacığın kalitatif ve kantitatif analizi, parçacığın etrafındaki bu formlarla olan etkileşimine dayanır. Bu etkileşimleri inceleyen bilim dallarından bir tanesi de maddenin, elektromanyetik radyasyon, ses dalgaları, iyon ve elektron gibi formlarla olan etkileşmesini inceleyen spektroskopidir⁹⁸. Moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesans maddenin bir birine yakın üç fiziksel özelliğidir. Bu özelliklere lüminesans da denir. Anılan özelliklerin her biri üzerine bir spektroskopi geliştirilmiştir. Moleküler floresans ve fosforesans yöntemlerinde, maddenin çözeltisi üzerine ışık enerjisi gönderilerek madde uyarılır (eksite edilir) ve sistemin atom ve moleküllerinde enerji artışı meydana

gelir. Bu enerji artışıyla atomlarda elektronik geçişler, moleküllerde titreşim ve dönme gibi çeşitli değişiklikler meydana gelir. Enerji artışı sistemin kararlılığında istenen bir durum olmadığından, sistem kararlı hale tekrar geri dönebilmek için bu fazla enerjiyi çeşitli şekillerde geri bırakır. Enerjiyi geri bırakma olayına “durulma” denir. Işımalı ve ışımasız olmak üzere durulma iki farklı türde olur. Bunlardan ışmalı durulma floresans ve fosforesans diye ayrılan iki farklı şekilde meydana gelir. Bu iki durulma türü arasındaki temel farklılık elektron spinlerinde soğurulma sırasında değişiklik olup olmadığına dayanır. Durulma sırasında spinde değişiklik meydana geliyorsa fosforesans, değişiklik meydana gelmiyorsa floresans diye adlandırılır. Floresans ve fosforesans maddenin yapısı, yapısal rijidite, numunenin çözücüsü, sıcaklık, pH ve absorblanan ışının dalga boyu gibi iç ve dış etkilerden dolayı her madde için farklılık gösterir. Bir maddenin floresans ve fosforesansını ölçmek için “spektrorometre” adı verilen cihazlar kullanılmaktadır. Spektrorometreler genel olarak; sürekli bir ışık kaynağı, monokromatör, örnek kabı, ışın enerjisini ölçülebilir bir sinyale çeviren bir ışın dedektörü ve bir sinyal işleyicisinden oluşur. Spektrorometre, spesifikliği, düşük tayin sınırı, yüksek duyarlılığı ve kullanım kolaylığı gibi üstünlükleri sebebiyle farmakolojide miktar analizlerinde oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Florometri yönteminin, derişimleri 10^{-6} - 10^{-9} M arasında olan maddeleri çok büyük bir kesinlik, doğruluk ve seçicilikle tayin etme özelliğinden dolayı, ultraviyole spektroskopisi ve atomik absorpsiyon spektroskopisi gibi diğer spektroskopik yöntemlere göre bazı üstün özelliklere sahip olduğu görülmektedir⁹⁸. İlaç etkin maddelerinin pek çoğu molekül yapıları nedeniyle karakteristik lüminesans özelliği gösterirler. Yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı çalışmamızda spektrorometrik yöntem seçilmiştir.

Analitik yöntem seçimi yapıldıktan sonra da bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için doğruluk, kesinlik, doğrusallık, seçicilik, spesifiklik ve

hassaslık gibi parametreleri içeren geçerlilik testlerinin yapılması gerekmektedir. Geçerlilik testlerinde bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Kullanılan standart maddeler, analizi yapılacak analit ile aynı ya da kimyasal özelliklerinin birbirine yakın olması gerekir¹⁰⁹. Geçerlilik testleri yapıldıktan sonra belirlenen yöntemin uygulanabilir olduğu, gerçek numunelerde (farmasötik preparatlar ve biyolojik sıvılar (plazma, serum v.s.)) analit veya analitlerin analiz yapılarak gösterilir¹¹⁰.

Bu çalışma da, farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında LP'nin belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesi; geliştirilen yöntemin geçerlilik testlerinin yapılması; yöntemin uygulama aşamasında ise hem LP içeren farmasötik prepatlarda LP'nin miktar analizinin gerçekleştirilmesi hem de tavşanlara oral olarak verilen LP preparatının plazma derişimlerini ve farmakokinetik verilerin incelenmesi amaçlanmaktadır.

LP'nin yapısındaki imidazol halkasına bağlı ve yapının elektron yoğunluğunu arttıran klor (-Cl), süstitüe olmamış benzen halkası ve bileşiğin yapısal rijitlik özelliği ile LP asidik ortamda limünesans özellik gösterir.

Spektrofotometrik analizlerde, çözücü seçimi, çözücülerin floresans sinyaline etkileri bakımından önemlidir. Teorik olarak polar çözücüler $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri için gerekli enerjiyi düşürerek floresans dalga boyunu azaltır ve lümünesans şiddetini artırır ve bu nedenle polar çözücüler tercih edilir. Ayrıca kullanılan çözücü ve çözücü karışımının analit ile aynı dalga boyunda emisyonunun olmaması gerekmektedir⁹⁹.

Ortamın pH'ındaki değişimler ortamdaki proton aktarımı tepkimeleri nedeniyle hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyeceği için pH, floresans verimini etkileyen faktörlerden biridir⁹⁸. LP'nin asitlik sabitinin pKa: 3.15 olduğu ve losartanın asit türlerinin (pH 5 den daha düşük olduğu zaman) floresans etkili olduğu literatürde

bildirilmiştir⁷⁴. Cagigal ve ark.⁹⁴ yaptıkları çalışmada LP'nin floresans şiddetleri üzerine pH'nin etkisini araştırmış ve elde ettikleri sonuçlara göre pH 2.0 civarlarında yüksek floresans şiddete sahip olduğu ve ortam bazikleştikçe floresans şiddetinin düştüğünü ortaya koymuşlardır. Yine bu çalışmayı destekleyen çalışmalar mevcuttur. El-Shaboury ve ark.⁷⁴ pH 2-2.5 arasında floresans şiddetinin %10 civarında arttığını ve daha sonra pH:7 değerine kadar kademeli olarak azaldığını gözlemlemişlerdir. Ritter ve ark.⁷⁷ ise çalışmalarında çözeltinin pH değerinin floresans dedektör cevabındaki hassasiyet üzerinde son derece etkili olduğunu belirtmiş ve en uygun pH değerini araştırdıklarını ve optimum pH'ın 2.5 olduğunu tespit etmişlerdir. Cagigal ve ark.⁸² yaptıkları diğer bir spektrofotometrik çalışmada da pH:2'de ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Floresans dedektörlü HPLC yöntemlerinde de asidik pH'da (Ritter ve ark.⁷⁷ (pH:2.5), Del Rosario Brunetto ve ark.⁸⁴ (pH:3.8) mobil faz kullanarak LP analizleri yapılmıştır.

Yapılan literatür araştırmasında, LP'in standart çözeltileri farklı polariteye sahip çözücülerde (su, asetonitril^{76,77}, etanol, metanol ve propan-2-ol⁷⁴) hazırlanmış ve pH'yı ayarlamak için ise değişik asit ve tampon çözeltileri (HCl, sitrik asit, asetik asit, sülfirik asit, nitrik asit, okzalik asit ve fosforik asit) ekleyerek yüksek floresans şiddetleri verdiği dalga boylarında (260/390 nm⁷⁴, 247/387 nm^{82,92,105}, 250/370 nm¹¹¹ ve 259/399 nm⁷⁸) floresans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda yukarıda belirtilen bilgiler ışığında, LP'nin en yüksek floresans şiddeti verebileceği çözücüyü belirlemek için su, etanol, metanol, kloroform, eter, hekzan ve asetonda çözeltileri hazırlandı. Nötr ortamda LP'nin floresans şiddeti çok düşük olup bu çözücüler arasında en yüksek floresans şiddetinin metanol ile elde edildiği görüldü. Daha sonra LP'nin stok çözeltisi Tablo 4.1 de verilen asit ve tampon çözeltisi kullanarak seyreltilip çeşitli pH'larda (1, 2, 2.5 ve 3) 0.5 µg/mL derişimde LP çözeltisi hazırlandı ve çeşitli dalga boylarında uyarılarak emisyon spektrumları

kaydedildi ve en yüksek floresans şiddeti verdiği dalga boyları ($\lambda_{uy}/\lambda_{em}$) 248/410 nm olarak belirlendi. Sülfüröz asit ile hazırlanmış çözelti için elde edilen floresans spektrumu Şekil 4.1’de verildi. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi LP’nin metanolde çözülüp 0.01 M sülfüröz asit çözeltisi (pH: 2) ile seyreltilerek elde edilen çözeltisinin en yüksek floresans şiddetine sahip olduğu görüldü. Ayrıca metanol-sülfüröz asit çözücü karışımının emisyon pikinin analit piki ile aynı dalga boyunda gelmediği ve interfere etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 4.2). Bu durum kullanıldığımız çözücü karışımının en büyük avantajıdır. Ayrıca ölçüm yapılan dalga boyunun yükselmesi ile ölçüm hassasiyetinin arttığı göz önünde bulundurulursa çalışmamızda daha hassas bir ölçüm yapıldığı söylenebilir. Ölçüm dalga boylarındaki bu farklılıklar kullanılan çözücü tipi ve çözeltinin pH’ından kaynaklanmaktadır.

Yapılan literatür taramasında, farmasötik preparatlarda LP’nin belirlenmesine yönelik, spektrofotometri⁷², türev spektrofotometri⁷⁵, HPLC^{73,84,85,86,90,91,104} ve spektrofluorometri^{74,94,105} yöntemlerinin geliştirildiği gözlenmiştir.

Spektrofotometrik yöntemler ile farmasötik preparatlarda LP’yi, Lastra ve ark.⁷² ve Ansari ve ark.⁷³ ve Erk⁷⁵ sırasıyla 234 nm, 232.5 nm ve 238.3 nm dalga boyunda 1.türev spektrumlarını alarak; LP’nin Calmagite (CT) ve Orange-II (O-II) ile ayrı ayrı reaksiyona sokularak oluşan 491 nm ve 486 nm’de güçlü bir absorbanlar veren renkli kompleks oluşturarak belirlemişlerdir.

HPLC yöntemi ile farmasötik preparatlarda LP’yi, Erk C₁₈ kolonu ve sodyum dihidrojen fostat (pH: 5.5), metanol ve asetonitril (8:2:1, h/h/h) hareketli faz karışımı kullanarak; Ansari ve ark.⁷³ ODS-1 kolonu ve asetonitril ve fosforik asit (pH:3) (60:40, h/h) hareketli faz karışımını kullanarak; Carlucci ve ark.⁷⁶ C₁₈ kolonu ve asetonitril ve fosfat tamponu (pH 4.0; 0.1 M) (35:65, h/h) hareketli faz karışımını kullanarak; Bonfilio ve ark.⁸⁸ fosfat tamponu (pH 6.2; 58 mmol/L) ve asetonitril (65:35, h/h) hareketli faz

karişimini kullanarak; Özkan, C₁₈ kolonu, fosfat tamponu (0.01 M) ve asetonitril (pH:3.1, 65:35, h/h) hareketli faz karişimini kullanarak; Hertzog ve ark⁹⁴. C₈ kolonu ve fosfat tamponu (pH: 7) ve asetonitril hareketli faz karişimini kullanarak analiz etmiştir.

Farmasötik preparatlarda LP'yi spektrofotometrik yöntem ile El-Shaboury ve ark.⁷⁴ belirlemiş ve pH 2-2.5 aralığında 0.1 M sitrik asit çözeltisi ile LP'yi hazırlamış ve 399 nm dalga boyunda emisyon spektrumlarını almışlardır.

Çalışmada, LP'nin farmasötik preparatlarda miktar analizi için çözücü olarak pH: 2 de sülföröz asit çözeltisinin kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı.

Literatürde bulunan spektroskopik yöntemlerin 4-6 mg/L⁷⁰, 2-50 µg/mL⁷¹, 10-50 µg/mL⁷³ ve 10-100 µg/mL⁷⁵ derişim aralıklarında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemler arasında en yüksek LOQ değerinin 0.228 µg/mL⁷³ olduğu belirtilmiştir. Literatürde bulunan HPLC yöntemlerinde ise 2-50 µg/mL⁷¹, 1-30 µg/mL⁷³, 3-7 µg/mL⁷⁴, 30-70 mg/L⁷⁶ ve 25-10000 ng/mL⁷⁷ derişim aralığında doğrusal olduğu ve belirtilen yöntemler arasında en yüksek LOQ değerinin 0.08 µg/mL⁷⁵ olduğu belirtilmiştir. Literatürde bulunan spektrofotometrik yöntemlerde ise derişim aralıkları 0.006-1.7 µg/mL⁷² ve 0.5-5 µg/mL⁸⁰, LOQ değerleri 0.072 µg/mL⁷² ve 0.5 µg/mL⁸⁰ olarak rapor edilmiştir.

0.025-0.5 µg/mL derişim aralığı ve 3 ng/mL LOQ değeri ile geliştirdiğimiz yöntemin literatürlerdeki spektroskopik yöntemlerden daha hassas, HPLC yöntemlerinden daha kolay, hızlı ve hassas ve spektrofotometrik yöntemden daha hassas bir yöntem olduğu söylenebilir.

Yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla da seçilen 5 adet film tablet formundaki ticari farmasötik preparat Bölüm 3.2.7' de anlatıldığı gibi hazırlanarak iki farklı derişimleri halinde geliştirilen yöntem ile emisyon spektrumları alındı. Analiz

bulguları etiketli miktarlarla uyumlu olarak bulundu. Ayrıca beş farklı farmasötik preparat için yapılan geri kazanım çalışmasında % 85.50-96.44 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi ve bu da yöntemin doğruluğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Sonuç olarak, geliştirilen spektrofotometrik yöntemin ilaç endüstrisinde kalite kontrol çalışmalarında başarı ile uygulanabilir olduğu söylenebilir.

Yapılan literatür taramasında, insan^{79,83,85-88,91-93,105} ve rat plazmasında^{89,96} ve insan ve rat idrarında^{90,111} LP'nin belirlenmesi yönelik HPLC, LC/MS/MS ve spektrofotometri⁷⁸ yöntemlerine rastlandı. Fakat tavşan plazmasında LP'nin spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sebeple LP'nin plazmada miktar tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi.

Plazmadan LP'nin ekstraksiyon yönteminin araştırılması sırasında zaman alıcı işlemleri gerektirmeyen, LP'nin plazmadan gelen kirliliklerden arınmış bir şekilde floresans özelliklerinden yararlanılarak tayinine imkân veren duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntem seçilmesi amaçlandı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3'de verilen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak LP tavşan plazmasından ekstrakte edildi.

LP'nin plazma proteinlerine % 98.7 oranında bağlandığı literatürde bildirilmiştir⁹⁴. Plazma proteinlerinin çöktürülerek ayrılmasında LP tam olarak serbest hale geçemediği için geri kazanım verimini düşürmektedir. Bu yüzden plazmadan LP'yi elde etmek için asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyonu, ekstrakte edilen çözünenin çözünürlüğüne dayanarak yapılır. Asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyonunda ekstrakte edilecek olan molekül farklı bir yapıya dönüştürülür. Böylece moleküle yeni bir çözünürlük özelliği kazanmış olur. Sulu fazın pH'ının değiştirilmesiyle dağılım katsayısı önemli ölçüde değişir. Böylelikle moleküller organik faz ya da sulu fazdan istenilen bir tanesine çekilebilir.

LP, losartan asitinin tuzu olarak pH 7.0-8.5 aralığında iyonik yapılu bir bileşik olduğu için asidik ortamda losartan asitine dönüştürülerek organik fazdaki çözünürlüğü artırıldı ve plazma proteinlerine bağlı LP serbest hale geçirildi. Asidik yapıdaki LP, MTBE eklenerek organik faza çekildi ve sonra tekrar sulu faza LP'yi çekebilmek için 0.2 mL 0.05 M NaOH çözeltisi eklendi. Bu şekilde LP geri ekstrakte edildi. Daha sonra pH:2 ortamını sağlamak amacıyla elde edilen ekstreye 0.01 M sülföröz asit çözeltisi eklendi ve spektrofotometri yöntemi ile floresans spektrumları alındı.

Literatürde plazmada LP'nin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, katı faz^{76,78,82} ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Katı faz ekstraksiyonunda C₁₈^{76,78}, C₂⁷⁷ ve Oasis HLB⁹¹ kartuşları kullanılmış ve bütün yöntemler için geri kazanım değerinin % 70'den yüksek olduğu belirtilmiştir. Uygulanılan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde ise, Jia ve ark.⁸¹, plazma örneklerini HCl çözeltisi (1 mol/L) ile karıştırmış ve ardından etil eter ile ekstrakte etmiştir. Sonuçta % 53 geri kazanım değeri elde etmiştir. Prasaja ve ark.⁸⁵, plazmaya asetonitril eklemiş ve direk elde edilen süpernatantı analiz etmiştir. Rao ve ark.⁹⁶ ise kuru kan örneğinden LP'yi metanol ve su (1:1, h/h) çözücü karışımı ile ekstrakte etmişler ve geri kazanımı % 89 ile % 97 arasında tespit etmişlerdir. Literatürde plazmadan ve diğer biyolojik sıvılardan LP için önerilen diğer ekstraksiyon yöntemleri ise asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleridir^{77,79,80,82}. Ritter ve ark⁷⁷ ve Soldner ve ark⁸⁹ plazmadan LP'yi 1.0 M fosforik asit ile asitlendirilmiş ortamda MTBE ile ekstraksiyonun ardından 0.05 M NaOH çözeltisi ile geri ekstraksiyon sonrası etmiştir. Ekstraksiyon çözücü olarak MTBE'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada,⁸⁶ LP içeren plazma ve idrar örnekleri MTBE ile karıştırılmış ve sonra santrifüj edilerek organik faz ayrılmıştır. Organik faz azot gazı altında uçurulmuş ve kalıntı isopropanol ve formik asit (25:75, h/h) ile çözümlenerek analiz edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda literatürde belirtilen asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri modifiye edilerek kullanıldı. Kullanılan ekstraksiyon yöntemi Bölüm 3.2.2’de anlatıldı ve bu yöntem ile ortalama % 91’in üzerinde geri kazanım değeri elde edildi. Literatürde belirtilen çalışmalar arasında insan idrarında LP’nin spektrofotometrik yöntem ile belirlenmesine yönelik sadece bir çalışmaya rastlandı ve bu çalışmada da katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılarak LP’nin idrardan ayrıldığı gözlemlendi. Çalışmamızda plazmadan LP, asit/baz sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ayrılıp spektrofotometrik yöntem ile analiz edildi. Bu yönüyle de yaptığımız çalışmanın literatürde başka bir benzeri bulunmamaktadır. Ayrıca geliştirilen ekstraksiyon yönteminin, zaman alıcı bir yıkama veya uzun süreli bir kurutma işlemine gerek duyulmaması diğer avantajlarıdır.

Plazmadan Bölüm 3.2.2’de belirtilen yöntem ile ekstrakte edilen LP’nin spektrofotometrik analizi için optimum çalışma koşulları belirlendi ve bu çalışma şartlarında LP’nin floresans spektrumları alındı ve yöntemin geçerlilik testleri yapıldı.

Literatürde bulunan HPLC yöntemlerinde 0.5-500 ng/mL⁷⁷, 0.5-5 µg/mL⁷⁶, 10-300 ng/mL⁷⁷, 0.001-2.5 µg/mL⁷⁸ ve 2-1000 ng/mL⁸⁹, 5-500 ng/mL⁸¹, 5-3200 ng/mL⁸³, 2-400 ng/mL⁸⁴, 3.0-7.0 µg/ mL⁸⁶, 30-70 mg/mL⁸⁷ ve 25-10000 ng/mL⁸⁹ derişim aralığında doğrusal olduğu ve en düşük LOQ değerinin ise 1 ng/mL olduğu belirtilmiştir.

0.025-0.5 µg/mL derişim aralığı ve 3 ng/mL LOQ değeri ile geliştirdiğimiz yöntemin literatürlerdeki HPLC yöntemlerinden daha kolay ve hızlı olduğu ve farmakokinetik verilerin elde edilebileceği kadar hassas olduğu söylenebilir.

Çalışmanın son kısmında, geçerlilik testleri yapılan spektrofotometrik yöntem ile tavşan plazmasında LP’nin farmakokinetik verilerinin araştırılması amaçlandı. Literatürde tavşanlar üzerinde yapılan ve LP’nin farmakokinetik verilerinin

belirlenmesine yönelik bir çalışmaya ulaşamadı. Fakat insan ve ratlarda LP'nin farmakokinetik verilerinin incelendiği çalışmalara ulaşıldı^{81,82,104} ve bu çalışmalarda LP'nin maksimum derişiminin düşük seviyelerde olduğu ve maksimum derişim zamanlarının (t_{max}), değişlik gösterdiği (1.05-2.0 saat arasında) gözlendi^{83,87,88}. t_{max} değerinin değişken olmasının nedeninin vücut kitle indeksi, dağılma hacmi, yaş, kilo, diyet gibi faktörlerin değişken olmasından ve denekler arasındaki varyansının yüksek olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir.¹¹². Çalışmamızda Cozaar ilacı New Zealand cinsi beyaz sağlıklı tavşana Bölüm 3.2.8 de belirtildiği gibi 10 mg/kg dozda oral yoldan uygulandı ve t_{max} değerinin değişkenliği göz önünde tutularak kan örneği alınma zamanlarını 1.saat ve civarında yoğunlaştırılarak tasarlandı. Plazma örnekleri Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde ekstakte edildi. Tavşan plazmasından elde edilen ekstraktlar geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile analiz edilerek floresans spektrumları alındı. Elde edilen verilerden maksimum derişim zamanı (t_{max}) 1 saat, maksimum derişim (C_{max}) 0.395 µg/mL, klerens (CL) 3.836 L/saat, yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 1.311 saat, eliminasyon sabiti (k_{el}) 0.528 1/saat, derişim zaman grafiğinde eğrinin altında kalan alan 0-48 saat arası (AUC_{0-48}) 2.568 µg saat/mL ve eğrinin altında kalan alan 0-∞ saat arası ($AUC_{0-∞}$) 2.606 µg saat/mL olarak bulundu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'de 18 milyon civarında hipertansiyon hastasının olduğu ve hipertansiyonun toplumsal boyutlara ulaşan ölümcül sonuçlar doğurabilecek bir sağlık sorunu haline geldiği bilinmektedir. Son yıllarda hipertansiyon tedavisinde ilaçla tedavide büyük atılımlar olmuştur. Hipertansiyon ilaçlarının belirtilen sistemik dolaşımdaki anlaşılabilir davranışlarının aydınlığa kavuşabilmesi için yeni hayvansal modeller ve analitiksel yöntemler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma, farmasötik preparatlarda ve tavşan plazmasında antihipertansif bir ilaç olan LP'nin belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesi, geçerlilik testlerinin yapılması ve geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduklarını göstermek amacıyla yapılmıştır.

Çalışma sonucunda LP'nin analizinde geliştirilen yöntemin hızlı, hassas ve basit olduğu, farmasötik preparatların kalite kontrol ve farmakokinetik çalışmalarda uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, elde edilen verilerin LP'nin sistemik dolaşımındaki davranışlarının belirlenmesine yönelik yapılacak incelemelere yol göstereceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Brunner LA, Powell ML, Degen P, Flesch G. A semiautomated analytical method for the determination of potential antihypertensive agents (CGP 48933 and/or CGP 48369) in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Laboratory Robotics and Automation*, 1994, 6: 171-180.
2. Murray CJL, Lopez AD. Evidence-based health policy—lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*, 1996, 274: 740-743.
3. Dustan HP, Roccella EJ, Garrison HH. Controlling hypertension: a research success story. *Archives Of Internal Medicine*, 1996, 156: 1926.
4. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*, 2003, 42: 1206-1252.
5. Waeber B. Achieving blood pressure targets in the management of hypertension. *Blood Pressure*, 2001, 10: 6-12.
6. America N. Guidelines set new definitions, update treatment for hypertension. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77.
7. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*, 1995, 25: 305-313.
8. Colhoun HM, Dong W, Poulter NR. Blood pressure screening, management and control in England: results from the health survey for England 1994. *Journal Of Hypertension*, 1998, 16: 747.
9. Brown CD, Higgins M, Donato KA, Rohde FC, Garrison R, Obarzanek E, Ernst ND, Horan M. Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. *Obesity*, 2000, 8: 605-619.
10. Lawlor D, Bedford C, Taylor M, Ebrahim S. Geographical variation in cardiovascular disease, risk factors, and their control in older women: British Women's Heart and Health Study. *Journal Of Epidemiology And Community Health*, 2003, 57: 134-140.

11. Wilson PWF, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 1998, 97: 1837-1847.
12. Klungel OH, Stricker BHC, Paes AHP, Seidell JC, Bakker A, Vokó Z, Breteler MMB, de Boer A. Excess stroke among hypertensive men and women attributable to undertreatment of hypertension. *Stroke*, 1999, 30: 1312-1318.
13. Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *Bmj*, 2001, 322: 912-916.
14. Montani J, Antic V, Yang Z, Dulloo A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *International Journal Of Obesity And Related Metabolic Disorders: Journal Of The International Association For The Study Of Obesity*, 2002, 26: S28.
15. Adcock B, Ireland Jr R. Secondary hypertension: a practical diagnostic approach. *American Family Physician*, 1997, 55: 1263.
16. Messerli FH, Weber MA, Brunner HR. Angiotensin II receptor inhibition: a new therapeutic principle. *Archives Of Internal Medicine*, 1996, 156: 1957.
17. Wood AJJ, Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *New England Journal of Medicine*, 1996, 334: 1649-1655.
18. Bauer JH, Reams GP. The angiotensin II type 1 receptor antagonists: a new class of antihypertensive drugs. *Archives Of Internal Medicine*, 1995, 155: 1361.
19. Smith RD, Timmermans PB. Human angiotensin receptor subtypes. *Current Opinion In Nephrology And Hypertension*, 1994, 3: 112.
20. Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Aiyar N. Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1992, 183: 989.
21. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau V. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 24539-24542.
22. Timmermans PB, Wong P, Chiu A, Herblin W, Benfield P, Carini D, Lee R, Wexler R, Saye J, Smith R. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 1993, 45: 205-251.
23. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circulation research*, 1998, 83: 1182-1191.

24. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95: 651.
25. Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 1996, 122: 59-67.
26. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*, 1998, 31: 487-492.
27. Cao Z, Dean R, Wu L, Casley D, Cooper ME. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension*, 1999, 34: 408-414.
28. Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K, Miyazaki Y, Ma J, Hunley TE, Yoshida H, Ichiki T, Threadgill D, Phillips JA. Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Molecular cell*, 1999, 3: 1-10.
29. POPE IV JC, BROCK III JW, Adams MC, Stephens FD, Ichikawa I. How They Begin and How They End: Classic and New Theories for the Development and Deterioration of Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract, CAKUT. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999, 10: 2018-2028.
30. Burnier M, Brunner H. Angiotensin II receptor antagonists. *The Lancet*, 2000, 355: 637-645.
31. Chalmers J, MacMahon S, Mancina G, Whitworth J, Beilin L, Hansson L, Neal B, Rodgers A, Ni MC, Clark T. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines subcommittee of the World Health Organization. *Clinical And Experimental Hypertension (New York, NY: 1993)*, 1999, 21: 1009.
32. Velasquez MT. Angiotensin II receptor blockers. A new class of antihypertensive drugs. *Archives Of Family Medicine*, 1996, 5: 351.
33. Nussberger J, Waeber B, Brunner HR. Clinical pharmacology of ACE inhibition. *Cardiology*, 1989, 76: 11-22.
34. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *The Lancet*, 1998, 351: 1693-1697.
35. Brunner HR. The new angiotensin II receptor antagonist, irbesartan. *American Journal Of Hypertension*, 1997, 10: 311S-317S.

36. Smith D, Neutel J. E061: Once daily telmisartan as compared to enalapril in the treatment of hypertension. *American Journal Of Hypertension*, 1998, 11: 111A-111A.
37. Aulakh G, Sodhi R, Singh M. An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators. *Life Sciences*, 2007, 81: 615-639.
38. Van Epps HL. Harry Goldblatt and the discovery of renin. *The Journal Of Experimental Medicine*, 2005, 201: 1351-1351.
39. Nicolai E, Cure G, Goyard J, Kirchner M, Teulon J, Versigny A, Cazes M, Virone-Oddos A, Caussade F, Cloarec A. Synthesis and angiotensin II receptor antagonist activity of C-linked pyrimidine derivatives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 1995, 30: 365-375.
40. Adam M. Integrating research and development: the emergence of rational drug design in the pharmaceutical industry. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 2005, 36: 513-537.
41. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. Bask1. McGraw-Hill New York, 2006.
42. Guo K, Yin Q, Yang Y, Zhang M, Wang J. Solubility of losartan potassium in different pure solvents from (293.15 to 343.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2008, 53: 1467-1469.
43. Gradman AH, Arcuri KE, Goldberg AI, Ikeda LS, Nelson EB, Snaveley DB, Sweet CS. A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel study of various doses of losartan potassium compared with enalapril maleate in patients with essential hypertension. *Hypertension*, 1995, 25: 1345-1350.
44. Weir MR, Elkins M, Liss C, Vrecenak AJ, Barr E, Edelman JM. Efficacy, tolerability, and quality of life of losartan, alone or with hydrochlorothiazide, versus nifedipine GITS in patients with essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, 1996, 18: 411-428.
45. McIntyre M, Caffè S, Michalak R, Reid J. Losartan, an orally active angiotensin (AT1) receptor antagonist: a review of its efficacy and safety in essential hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 74: 181-194.
46. Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1995, 58: 641-649.

47. Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R, Chiu S. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metabolism And Disposition*, 1995, 23: 207-215.
48. Yun CH, Lee HS, Lee H, Rho JK, Jeong HG, Guengerich FP. Oxidation of the angiotensin II receptor antagonist losartan (DuP 753) in human liver microsomes. Role of cytochrome P4503A (4) in formation of the active metabolite EXP3174. *Drug Metabolism And Disposition*, 1995, 23: 285-289.
49. Wong PC, Price Jr WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PB. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1990, 255: 211-217.
50. Sweet CS, Bradstreet DC, Berman R, Jallard N, Saenz A, Weidler D. Pharmacodynamic activity of intravenous E-3174, an angiotensin II antagonist, in patients with essential hypertension. *American Journal Of Hypertension*, 1994, 7: 1035.
51. Munafo A, Christen Y, Nussberger J, Shum LY, Borland RM, Lee RJ, Waeber B, Biollaz J, Brunner HR. Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1992, 51: 513-521.
52. Townsend R, Haggert B, Liss C, Edelman JM. Efficacy and tolerability of losartan versus enalapril alone or in combination with hydrochlorothiazide in patients with essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, 1995, 17: 911-923.
53. Oparil S, Barr E, Elkins M, Liss C, Vrecenak A, Edelman J. Efficacy, tolerability, and effects on quality of life of losartan, alone or with hydrochlorothiazide, versus amlodipine, alone or with hydrochlorothiazide, in patients with essential hypertension. *Clinical Therapeutics*, 1996, 18: 608-625.
54. Wilson T, Lacourciere Y, Barnes C. The antihypertensive efficacy of losartan and amlodipine assessed with office and ambulatory blood pressure monitoring. *Canadian Medical Association Journal*, 1998, 159: 469-476.
55. Dina R, Jafari M. Angiotensin II-receptor antagonists: an overview. *American Journal Of Health-System Pharmacy*, 2000, 57: 1231-1241.

- 56.** Howes LG, Tran D. Can angiotensin receptor antagonists be used safely in patients with previous ACE inhibitor-induced angioedema? *Drug Safety*, 2002, 25: 73-76.
- 57.** Weber M. Clinical safety and tolerability of losartan. *Clinical Therapeutics*, 1997, 19: 604-616.
- 58.** Kassler-Taub K, Littlejohn T, Elliott W, Ruddy T, Adler E. Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan, in mild-to-moderate hypertension. *American Journal Of Hypertension*, 1998, 11: 445-453.
- 59.** Mallion J, Siche J, Lacourciere Y. ABPM comparison of the antihypertensive profiles of the selective angiotensin II receptor antagonists telmisartan and losartan in patients with mild-to-moderate hypertension. *Journal Of Human Hypertension*, 1999, 13: 657.
- 60.** Hedner T, Oparil S, Rasmussen K, Rapelli A, Gatlin M, Kobi P, Sullivan J, Oddou-Stock P. A comparison of the angiotensin II antagonists valsartan and losartan in the treatment of essential hypertension. *American Journal Of Hypertension*, 1999, 12: 414-417.
- 61.** Monterroso VH, Chavez VR, Carbajal ET, Vogel DR, Martinez GJA, Garcia LH, Cuevas JHB, LaraTeran J, Hitzenberger G, Neves PL. Use of ambulatory blood pressure monitoring to compare antihypertensive efficacy and safety of two angiotensin II receptor antagonists, losartan and valsartan. *Advances In Therapy*, 2000, 17: 117-131.
- 62.** Conlin PR, Spence JD, Williams B, Ribeiro AB, Saito I, Benedict C, Bunt AMG. Angiotensin II antagonists for hypertension: are there differences in efficacy? *American Journal Of Hypertension*, 2000, 13: 418-426.
- 63.** Conlin PR. Angiotensin II antagonists in the treatment of hypertension: more similarities than differences. *Journal Of Clinical Hypertension-Greenwich*, 2000, 2: 253-257.
- 64.** Mazzolai L, Maillard M, Rossat J, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: a direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension*, 1999, 33: 850-855.
- 65.** Belz GG, Breithaupt-Grögler K, Butzer R, Fuchs W, Hausdorf C, Mang C. The pharmacological potency of various AT1 antagonists assessed by Schild regression technique in man. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 2000, 1: 336-341.
- 66.** Fridman KUB, Elmfeldt D, Wysocki M, Friberg PR, Andersson OK. Influence of AT 1 Receptor Blockade on Blood Pressure, Renal Haemodynamics and Hormonal

Responses to Intravenous Angiotensin II Infusion in Hypertensive Patients. *Blood Pressure*, 2002, 11: 244-252.

67. Smith R, Sweet C, Goldberg A, Timmermans P. Losartan Potassium (Cozaar (R)): A Nonpeptide Antagonist of Angiotensin II. *Drugs of Today*, 1995, 31: 463-498.

68. Weber MA, Byyny RL, Pratt JH, Faison EP, Snavely DB, Goldberg AI, Nelson EB. Blood pressure effects of the angiotensin II receptor blocker, losartan. *Archives Of Internal Medicine*, 1995, 155: 405.

69. Christen Y, Waeber B, Nussberger J, Porchet M, Borland R, Lee R, Maggon K, Shum L, Timmermans P, Brunner H. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation*, 1991, 83: 1333-1342.

70. Christen Y, Waeber B, Nussberger J, Lee R, Timmermans P, Brunner H. Dose-response relationships following oral administration of DuP 753 to normal humans. *American Journal Of Hypertension*, 1991, 4: 350S.

71. Sasaki M, Fujimura A, Harada K, Sunaga K, Ebihara A. Clinical pharmacology of multiple-dose losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in patients with essential hypertension. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1996, 36: 403-408.

72. Lastra OC, Lemus IG, Sanchez HJ, Perez RF. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2003, 33: 175-180.

73. Ansari M, Kazemipour M, Khosravi F, Baradaran M. A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, 52: 1166-1170.

74. El-Shaboury SR, Hussein SA, Mohamed NA, El-Sutohy MM. Spectrofluorimetric method for determination of some angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2011.

75. Erk N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2001, 24: 603-11.

76. Carlucci G, Palumbo G, Mazzeo P, Giovanna Quaglia M. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid

chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2000, 23: 185-189.

77. Ritter, M.A., Furtek, C.I., Lo, M.W. An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997, 15: 1021-1029

78. Bonfilio R, Tarley CRT, Pereira GR, Salgado HRN, de Araújo MB. Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules. *Talanta*, 2009, 80: 236-241.

79. Özkan S.A. Simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and human serum by RP-HPLC. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2001, 24: 2337-2346.

80. Zhao ZZ, Wang Q, Tsai EW, Qin XZ, Ip D. Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 1999, 20: 129-136.

81. Hertzog DL, McCafferty JF, Fang X, Tyrrell RJ, Reed RA. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2002, 30: 747-760.

82. Cagigal E, Gonzalez L, Alonso RM, Jimenez RM. Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine. *Talanta*, 2001, 54: 1121-33.

83. Yeung PKF, Pollak PT, Jamieson A, Smith GJ, Fice D. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *International Journal Of Pharmaceutics*, 2000, 204: 17-22.

84. del Rosario Brunetto M, Contreras Y, Clavijo S, Torres D, Delgado Y, Ovalles F, Ayala C, Gallignani M, Estela JM, Martin VC. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2009, 50: 194-199.

85. Gavrilin M, Kuleshova S. A Comparative Study of the Pharmacokinetics and Bioaccessibility of Potassium Losartan in Various Medicinal Forms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2002, 36: 227-228.

- 86.** Polinko M, Riffel K, Song H, Lo MW. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2003, 33: 73-84.
- 87.** Jia JY, Zhang MQ, Liu YM, Liu Y, Liu GY, Li SJ, Lu C, Weng L, Qi YL, Yu C. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two losartan potassium 50-mg tablets: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-way crossover study in healthy Chinese male volunteers. *Clinical Therapeutics*, 2010, 32: 1387-1395.
- 88.** Ohtawa M, Takayama F, Saitoh K, Yoshinaga T, Nakashima M. Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of losartan, an orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in humans. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, 1993, 35: 290.
- 89.** Soldner A, Spahn-Langguth H, Mutschler E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 1998, 16: 863-73.
- 90.** Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TWB. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 704: 374-378.
- 91.** Prasaja B, Sasongko L, Harahap Y, Lusthom W, Grigg M. Simultaneous quantification of losartan and active metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using irbesartan as internal standard. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2009, 49: 862-867.
- 92.** Jalalizadeh H, Souri E, Farsam H, Ansari M. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of losartan in plasma. 2003.
- 93.** Iwasa T, Takano T, Hara K, Kamei T. Method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP-3174, in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, 734: 325-330.
- 94.** Cagigal E, Gonzalez L, Alonso R, Jimenez R. pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2001, 26: 477-486.
- 95.** Yang SH, Choi JS, Choi DH. Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on the Pharmacokinetics of Losartan and Its Main Metabolite EXP-3174 in Rats: Possible Role

of CYP3A4 and P-gp Inhibition by HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Pharmacology*, 2011, 88: 1-9.

96. Rao RN, Raju SS, Vali RM, Sankar GG. Liquid chromatography-mass spectrometric determination of Losartan and its active metabolite on dried blood spots. *Journal of Chromatography B*, 2012.

97. Hollas JM. *Modern spectroscopy*. 4th Baskı. Chichester ; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2004.

98. Skoog DA, West, D.M. *Principles of Instrumental Analysis*. Baskı. 1980.

99. Sharma A, Schulman SG. *Introduction To Fluorescence Spectroscopy*. Baskı. New York, Wiley, 1999.

100. Eisinger J, Flores J. Front-face fluorometry of liquid samples. *Analytical Biochemistry*, 1979, 94: 15-21.

101. Rendell D, Mowthorpe DJ, ACOL (Project). *Fluorescence And Phosphorescence Spectroscopy*. Baskı. Chichester West Sussex ; New York, Published on behalf of ACOL, London by Wiley, 1987.

102. Özden T. *Yöntem Validasyonu*. Baskı. Gazi Üniv Eczacılık Fakültesi. Farmasötik Kimya A.B.D., Ankara, 2006.

103. Guideline ICHHT. Validation of analytical procedures: Methodology. *ICH, Nov*, 1996.

104. Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 204: 17-22.

105. Cagigal E, Gonzalez L, Alonso R, Jimenez R. Experimental design methodologies to optimise the spectrofluorimetric determination of Losartan and Valsartan in human urine. *Talanta*, 2001, 54: 1121-1133.

106. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan C, Cook CE, McDowall R. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: sponsored by the american association of pharmaceutical chemists, US food and drug administration, federation internationale pharmaceutique, health protection branch (Canada) and association of official analytical chemists. *International Journal Of Pharmaceutics*, 1992, 82: 1-7.

107. Görög S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2008, 48: 247-253.

- 108.** Buick A, Doig M, Jeal S, Land G, McDowall R. Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 1990, 8: 629-637.
- 109.** Huber L. Validation of analytical methods. *LC-GC International February*, 1998.
- 110.** Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste B, Massart D. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2001, 24: 723-753.
- 111.** Brunetto MD, Contreras Y, Clavijo S, Torres D, Delgado Y, Ovalles F, Ayala C, Gallignani M, Estela JM, Martin VC. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 2009, 50: 194-199.
- 112.** Matuszewski B, Constanzer M, Chavez-Eng C. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2003, 75: 3019-3030.

EK-1.ÖZGEÇMİŞ




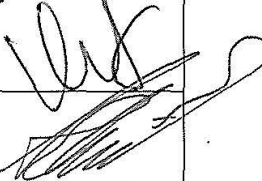





KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	Mehmet Emrah YAMAN
Doğum Tarihi	02.09.1982
Doğum yeri	Erzurum
Medeni hali	Bekar
Uyruğu	T.C.
Adres	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, 25240 ERZURUM
Tel	0442 231 52 51
e-mail	emrahyanan@atauni.edu.tr
EĞİTİM	
Lise	Erzurum Atatürk Lisesi (1999)
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2002-2009)
Yüksek Lisans	Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2010-2012)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	Orta Derece (ÜDS 65.00, Mart 2011)

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

“2011. 2.1/ 5 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 27.04.2011

2.1/ 5- Enstitümüz Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mehmet Emrah YAMAN' ın “ Anti-Hipertansif Bir İlaç Olan Losartan Potasyumun Farmasötik Preparatlarda ve Tavşan Plazmasında Biyoanalitik Yöntem Validasyonu” tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof.Dr.Türkan PASİNLİOĞLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. İsmail CEYLAN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç. Dr. Hakan USLU	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr. Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Raportör	

EK-3. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : B.30.2.ATA.0.23.85-25
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

25.03.2011
ERZURUM


ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 18.03.2011 tarih ve B.30.2.ATA.0.22.02.02/205 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarında yürütülecek olan **“Tavşanlarda HPLC, GC ve Spektroflorometri Yöntemleri İle Oral Olarak Verilen Losartan Potasyum Preparatlarının Farmakokinetik Verilerinin Belirlenmesi”** başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.03.2011 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 12 no'lu kararı ile araştırmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Sn. Yrd. Doç. Dr. F. Demirkaya
28.03.2011


Prof. Dr. Mustafa ATASEVER
Başkan

Toplantı Tarihi : 25.03.2011

Toplantı Sayısı : 3

KARAR NO : 12- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Fatma DEMİRKAYA MİLOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarında yürütülecek olan **“Tavşanlarda HPLC, GC ve Spektroflorometri Yöntemleri İle Oral Olarak Verilen Losartan Potasyum Preparatlarının Farmakokinetik Verilerinin Belirlenmesi”** başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 18.03.2011 tarih ve B.30.2.ATA.0.22.02.02/205 sayılı yazıları ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; **(Yönergenin 5/f maddesi gereğince, Yrd.Doç.Dr.Elif ÇADIRCI oylamaya katılmadı).** karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Kampus/ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr