

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

VALSARTAN-HİDROKLOROTİAZİT İÇEREN TABLETLERDE YENİ MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİ VE VALİDASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Saniye BAYIR

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncel ÖZDEN

ANKARA
Aralık 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : SANİYE BAYIR
ANABİLİM DALI : FARMASÖTİK KİMYA
SINAV TARİHİ : 14.01.2009
TEZ KONUSU : Valsartan- Hidroklorotiazit içeren Tabletlerde
Yeni Hıltar Tayini Yöntemi ve Validasyonu

KARAR

: BAŞARILI

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : (+)
Reddine :

OYBİRLİĞİ / OYÇOKLUĞU ile karar verilmiştir.

GEREKÇE :


Prof. Dr. Nurgün Noyanalpan
JÜRİ BAŞKANI


Prof. Dr. Tuncel Özden
ÜYE


Prof. Dr. İbrahim Göker
ÜYE

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda ve sosyal yaşantımda benden bilgi, ilgi, öneri ve yardımlarını hiç eksik etmeyen sevgili ve saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Tuncel ÖZDEN'e

Hem eğitim hem de meslek hayatımda bana her daim destek olan, bana hep güven ve cesaret veren Sayın Prof. Dr. M. Fethi ŞAHİN'e

Hem lisans hem de yüksek lisans programım boyunca yardımlarından dolayı başta Sayın Prof. Dr. Ningur NOYANALPAN olmak üzere tüm Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına

Yüksek lisans programım için izin veren ve çalışmalarımda olanaklarını kullanmamı sağlayan değerli amirlerime ve yardımlarından dolayı FARGEM çalışanlarına

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans programım süresince de benden emeğini hiç eksiltmeyen canım ablam Dr. Betül BAYIR'a ve canım aileme...

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER TABLOSU

Kabul ve Onay

İçindekiler

Şekiller Tablosu

Tablolar Tablosu

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ANTİHİPERTANSİF İLAÇLARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER	3
2.1.1 Antihipertansif İlaçların Tanımı ve Tarihçesi	3
2.1.2 Anjiyotensin 2 Reseptör Antagonistleri ve Sartanlar	
Hakkında Genel Bilgiler	5
2.1.3 Diüretikler ve Tiyazit Türevi Diüretik İlaçlar	
Hakkında Genel Bilgi	12
2.2 VALSARTAN İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	30
2.2.1 Kimyasal Özellikleri	30
2.2.2 Fiziksel Özellikleri	30
2.2.3 Valsartanın Antihipertansif İlaçlardaki Yeri ve Önemi	30
2.2.4 Elde edilişi	31
2.2.5 Farmakokinetik Özellikleri	32
2.2.6 Farmakolojik Özellikleri	33
2.2.7 Klinik Kullanımı	33
2.3 HİDROKLOROTİAZİT İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	35
2.3.1 Kimyasal Özelliği	35
2.3.2 Fiziksel Özellikleri	35
2.3.3 Hidroklorotiazitin Antihipertansif İlaçlardaki Yeri ve Önemi	36
2.3.4 Elde edilişi	37
2.3.5 Farmakokinetik Özellikleri	37
2.3.6 Farmakolojik Özellikleri	37
2.3.7 Klinik Kullanımı	38
2.4 VALSARTAN-HİDROKLOROTİAZİT KOMBİNE TEDAVİSİNİN	
HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDEKİ ÖNEMİ	38

2.5 VALSARTAN-HİDROKLOROTİAZİT MİKTAR TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	41
2.6 UYGULANAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER	43
2.6.1 Kromatografi ile İlgili Genel Bilgiler	43
2.6.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	46
2.6.1.2. İyon Çifti Kromatografisi	46
2.6.1.3. İyon Değiştirme Kromatografisi	47
2.6.1.4. Boyut Eleme Kromatografisi	47
2.6.1.5. Dağılma Kromatografisi	48
2.6.1.6 Ultra Performans Sıvı Kromatografisi	51
2.6.2 Analitik Metot Geliştirme İle İlgili Bilgiler	55
2.6.3 Analitik Metot Validasyonu İle İlgili Bilgiler	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	67
3.1 KULLANILAN CİHAZ VE EKİPMANLAR	67
3.1.1 Enstrumental Kısım	67
3.1.2 Cam ve Diğer Malzemeler	67
3.1.3 Kimyasal Maddeler	67
3.2 SİSTEMİN HAZIRLANMASI	69
3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması	69
3.2.2 Sistemin Hazırlanması	69
3.3 KROMATOĞRAFİK ŞARTLAR	71
3.4 ANALİZ SERTİFİKALARI	72
4. BULGULAR	77
5.TARTIŞMA	97
6. SONUÇ	103
ÖZET	106
SUMMARY	107
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1; İlaç Geliştirme Fazları	2
Şekil 2; Ras'ta ACE Dışı Enzimlerle Anjiyotensin II Oluşumu.....	7
Şekil 3; Nefronun Yapısı	16
Şekil 4; Proksimal Tübüller	17
Şekil 5; Henle Kıvrımı	17
Şekil 6; Distal Tübüller.....	18
Şekil 7; Toplayıcı Tübüller	18
Şekil 8; Diüretik İlaçların Etki Yerlerine Göre Sınıflandırılması	19
Şekil 9; Diüretik Grupların Nefronda Etkiledikleri Yerler.....	20
Şekil 10; Valsartan'ın Kimyasal Yapısı	29
Şekil 11; Valsartan'ın Elde Ediliş Şeması.....	31
Şekil 12; Hidroklorotiazitin Kimyasal Yapısı.....	35
Şekil 13; Kromatografik Ayırımın Şematik Olarak Gösterilmesi	44
Şekil 14; Kromatografik Sistemin Sınıflandırılması	45
Şekil 15; LOD'de Sinyal/Gürültü Oranı Şekli.....	61
Şekil 16; LOQ'da Sinyal/Gürültü Oranı Şekli.....	62
Şekil 17; Kalibrasyon Doğrusu Eşitliği Ve Grafiği.....	64
Şekil 18; Valsartan Analiz Sertifikası	75
Şekil 19; Hidroklorotiazit Analiz Sertifikası.....	76
Şekil 20; Sistem Uygunluk Kromatogramı.....	79
Şekil 21; Çözücü Kromatogramı	81
Şekil 22; Plasebo Kromatogramı	82
Şekil 23; Geri Kazanım Kromatogramı	84
Şekil 24; Ara Kesinlik Kromatogramı	89
Şekil 25; Valsartan Kalibrasyon Grafiği Ve Denklemi.....	90
Şekil 26; Hidroklorotiazit Kalibrasyon Grafiği Ve Denklemi.....	91
Şekil 27; Doğrusallık Kromatogramı	92

TABLolar TABLOSU

Tablo 1; AT1 ve AT2 Reseptörlerinin Etkileri.....	7
Tablo 2; Diüretik İlaçların Farmakokinetikleri	28
Tablo 3; Ters ve Normal Faz Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması ...	49
Tablo 4; Ters ve Normal Faz Sıvı Kromatografisinde Kullanılan ve Hareketli Fazlar.....	Sabit 50
Tablo 5; Validasyon İçin İstenen Parametreler	58
Tablo 6; Valsartan ve Hidroklorotiazitin Geri Kazanımları	83
Tablo 7; Tablette Bulunan Valsartan ve Hidroklorotiazit Miktarı(Mg)	84
Tablo 8; Valsartan ve Hidroklorotiazitin Cihaz Tekrarlanabilirliğinin Bulguları	85
Tablo 9; Analist 1 Tarafından Yapılan Valsartan ve Hidroklorotiazit Ara Kesinlik Çalışması	87
Tablo 10; Analist 2 Tarafından Yapılan Valsartan ve Hidroklorotiazit Ara Kesinlik Çalışması	88
Tablo 11; Analist 1 ve 2 Tarafından Yapılan Ara Kesinlik Çalışmalarının Karşılaştırılması.....	89
Tablo 12; Valsartanın Ultra performans likit kromatografisi-PDA Dedektörü ile Analiz Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri	91
Tablo 13; Hidroklorotiazitin Ultra Performans Likit Kromatografisi-Pda Dedektörü ile Analiz Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri	92
Tablo 14; Valsartanın Çözelti Stabilesi	93
Tablo 15; Hidroklorotiazitin Çözelti Stabilesi	93
Tablo 16; Valsartan ve Hidroklorotiazitin Sağlamlığı	94
Tablo 17; Valsartan-Hidroklorotiazitin Stabilesi Sonuçları.....	102

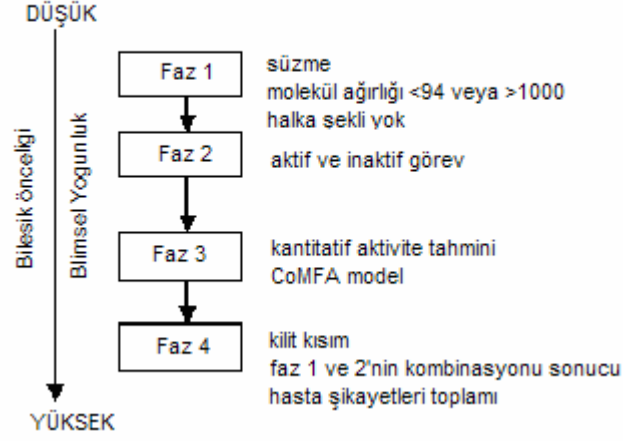
1. GİRİŞ VE AMAÇ

19. yüzyılın sonuna kadar ilaçlar, organik veya inorganik yapıdaki doğal kaynaklı ürünlerdi. Bunlar, genelde kurutulmuş fakat aynı zamanda taze olabilen bitki veya bitki kısımları ve terapötik özelliklere sahip veya toksik etki gösterebilen maddeler içermektedirler¹.

Bir doğal ürünün veya ekstrenin hastalık tedavisi için kullanılması genellikle farklı etkileri olan bir çok maddenin verilmesi ile başlamıştır. Bir çok doğal ürünün etkin maddelerinin farmasötik laboratuvarlarda elde edilmesi F.W. Sertürner'in 1804'te afyondan morfini ekstre etmesi ile başlamıştır¹.

Farmakolojik özelliklerinin daha uygun hale getirilmesi amacıyla orijinal bileşenin türevleri sentez edilmiştir. Böylelikle orijinal bileşenin terapötik yararlılığı geliştirilmiş olan türevleri elde edilmiştir¹.

İlaç geliştirilmesi süreci kimyasal bileşiklerin sentezi ile başlar. Klinik öncesi denemeler yeni maddelerin biyolojik etkileri hakkında bilgi verir. Klinik deneme sağlıklı bireylerde Faz 1 çalışmalarıyla başlar ve hayvan deneylerinde gözlenen etkilerin insanda görülüp görülemeyeceği belirlenmeye çalışılır. Doz-yanıt ilişkisi saptanır. Faz 2'de olası ilaçlar tasarlandıkları hastalık durumlarında hastalarda ilk defa denenir. Faz 3'de daha fazla sayıda hastada yeni ilacın standart tedavilerle terapötik sonucu açısından karşılaştırılır. İlacın onayından sonra Faz 4 çalışmaları başlar. Bu da düzenleyici gözetimi anlamındadır. Böylece yeni ilacın terapötik önemi saptanabilmektedir. Şekil 1'de ilaçların geliştirilme fazları gösterilmiştir¹.



Şekil 1; İlaç Geliştirme Fazları

Bir ilacın onay alabilmesi için ilaç üreticisinin başvuru yapması gereken bir ulusal düzenleme kurumu vardır. Bu da Amerika Birleşik Devletleri'nde "Food And Drug Administration" (FDA), Kanada, İngiltere, Avrupa ve Avustralya'da "The Health Protecting Branch Drugs Directorate" dir. Başvuru yapan firmalar, etkinlik ve emniyet kriterlerini sağladıklarını ve ürün şekillerinin kalite kontrolü genel standartlarını karşıladığını uygun deneme bulgularıyla kanıtlamak zorundadır¹.

Bir ilaç; kalite, güvenilirlik ve etkinlik gibi üç temel şartı sağlamalıdır².

Bu çalışmanın amacı, Valsartan-Hidroklorotiazit içeren ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlarda bu bileşiklerin miktar tayini için yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemin validasyonunun yapılmasıdır. Uygun yöntem bulunduğundan sonra geçerli kurallara göre validasyonunun yapılması ayrıca, yöntemin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla stabilize deneylerinin de yapılması öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANTİHİPERTANSİF İLAÇLARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER

2.1.1 Antihipertansif İlaçların Tanımı ve Tarihçesi

Temel olarak eski Mısırlı annelerin incelenmesiyle eski Mısır İmparatorluğundan beri yüksek kan basıncı bir sağlık problemiydi. Yüksek kan basıncı 1896'da icat edilmiş olmasına rağmen 1950'ye kadar ileri yaş hastalığı olarak bilinmiş, önemi anlaşılmamıştır. Yeni yapılan araştırmalar sonucunda Birleşik Devletlerdeki kadın ve erkeklerin ölümünün önde gelen nedenlerinin arasında yüksek kan basıncı, kalp krizi, konjestif kalp yetmezliği, damar hastalıkları bulunmaktadır³.

Birleşik devletlerde yaklaşık 65 milyon insanda görülen ciddi bir hastalıktır. 'Sessiz Katil' olarak adlandırılır. Çünkü insanlar bu hastalığın farkında değildir⁴.

Hipertansiyon diyastolik kan basıncının sürekli olarak 90 mm/Hg'dan yüksek olması ve buna yüksek sistolik kan basıncının (>140 mm/Hg) eşlik etmesi şeklinde tanımlanır⁵.

Hipertansiyon çeşitli hastalıkların nedenidir. Kalbi zorlayarak kalp yetmezliğine neden olabilir. Ayrıca ateroskleroz ve bunun yol açacağı iskemik kalp hastalığı riskini de önemli ölçüde artırır. Buna ek olarak hipertansiyonlu hastalar kanama ve beyindeki kan damarlarının pıhtıyla tıkanması olayına diğerlerinden daha kolay yakalanırlar. Hipertansiyon ayrıca koroner arter hastalığına da büyük ölçüde neden olur, bu hastalık sanayileşmiş toplumlarda ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bütün bu olgular tedavi edilmeyen hipertansiyonun sonuçları olup hipertansiyona bağlı morbidite veya mortalitenin büyük bölümünü oluşturur⁶⁻⁹.

Hipertansiyon etiyolojik olarak 2 sınıfa ayrılır.

1. Primer

2. Sekonder

Primer hipertansiyonda neden belli değildir ve hastaların %95'ini oluşturur¹⁰.

Sekonder grup daha çok genç yaş grubunda görülür ve hastaların %5'ini oluşturur⁷.

Hipertansiyona ait aile öyküsü olanlarda hipertansiyonun ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir. Primer hipertansiyona beyazlara oranla zencilerde 4 kat daha sık rastlanır ve orta yaştaki erkeklerde aynı yaş grubu kadınlara göre daha yaygındır. Stresli yaşam tarzı, yiyeceklerle bol miktarda tuz alınması, obezite ve sigara gibi çevresel faktörler hipertansiyonun ortaya çıkmasını kolaylaştıran faktörlerdir^{4,5}.

Batı dünyasında yetişkin nüfusun yaklaşık 1/3'ünü hipertansiyonlu hastalar oluşturmaktadır. Böyle büyük bir topluluğun hayat boyu tedavisi çok ciddi boyutta ekonomik harcama yaratır. Amerika'da antihipertansif tedavinin yıllık maliyeti 8-10 milyar dolar civarındadır.

Hipertansiyonun nonfarmakolojik tedavisinde ;

1. Sigara içiminin bırakılması
2. Şişmanlık-zayıflık
3. Tuz kısıtlaması
4. Potasyum alımı
5. Kalsiyum alımı
6. Magnezyum alımı
7. Makrobesinler

8. Alkol kullanımı
9. Fiziksel aktivite
10. Psikolojik stres ve gevşeme teknikleri etkili olmaktadır¹¹.

Farmakolojik tedavisinde ise;

1. Diüretikler
2. Adrenerjik nöron blokerleri
3. α_1 reseptör blokerleri
4. β blokerler
5. Santral etkili sempatotikler (α_2 agonistler)
6. Kalsiyum kanal blokerleri
7. ADE (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) inhibitörleri
8. Potasyum kanal açıcı ilaçlar
9. Direkt vazodilatörler
10. Hipertansif kriz sırasında kullanılanlar¹².

Farmakolojik tedavide; her hasta toplumun bir parçası olarak değil bir birey olarak tedavi edilmeli ve seçilen ilaç hastanın tercihlerine, yaşam biçimine, işine uygun ve ekonomik olmalıdır⁷.

80'den fazla sayıda etkili antihipertansif ilaç ve 40'tan fazla sayıda kombine ilaç vardır⁷.

2.1.2 Anjiyotensin 2 Reseptör Antagonistleri ve Sartanlar Hakkında Genel Bilgiler

Renin Anjiyotensin Sistemi

Renin, böbrekte jukstaglomerüler hücrelerde üretilen proteolitik bir enzimdir. Renin karaciğerde üretilen α_2 globulin yapısındaki

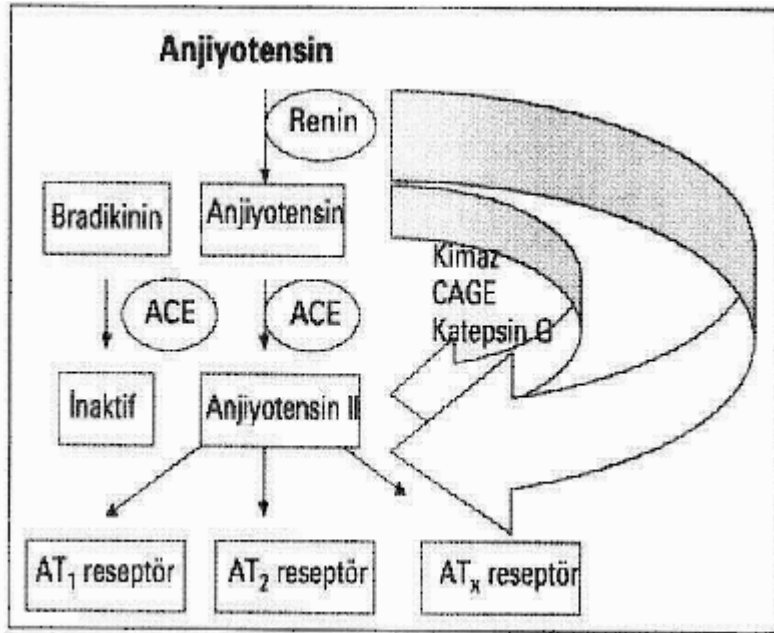
anjiyotensinojenle reaksiyona girerek anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e çevirir. Anjiyotensin I, akciğer dolaşımında bulunan Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ile oktapeptit olan anjiyotensin II (All)'ye dönüşür. All direkt vasküler etki ile vazokonstrüksiyon, aldosteron salgılatıcı etki ile sıvı ve sodyum tutulumuna neden olur. All'nin yarılanma ömrü yaklaşık 1 dakikadır. Anjiyotensinazlar ile yıkılır ve anjiyotensin III, anjiyotensin IV gibi birçok peptit ortaya çıkar^{13,14}.

Renin-Anjiyotensin Sistemi (RAS)'nin tüm komponentlerinin dokuda lokal olarak bulunduğu gösterilmiştir. ADE'in %90'ı dokuda bulunur. Plazmadaki ADE ancak %10'luk bir oranı oluşturur^{15,16}. Vasküler yatakta All üretiminin çoğu doku RAS tarafından gerçekleştirilmektedir^{17,18}. İnsan kalbinde All üretiminin %13'nün Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri (ADEİ) tarafından bloke edildiği gösterilmiştir¹⁹. RAS'nin reseptör seviyesinde bloke edilmesi belirli dokularda ADE'den daha iyi kontrol sağlar²⁰.

All değişik dokuların plazma membranlarındaki protein yapısındaki reseptörlere bağlanarak etkisini gösterir. Bu reseptörler, anjiotensin II tip 1 (AT1) ve anjiotensin II tip 2 (AT2) reseptörleri olarak adlandırılır²¹. AT2 reseptörleri 360 amino asit içeren polipeptit yapısındadır. AT2 reseptörleri fetal dokularda yüksek miktarda bulunur. AT2 reseptörleri'nin erişkin dokularda adrenal medulla, uterus, overler, damar endoteli ve beynin bazı bölgelerinde düşük miktarlarda bulunması, hücre büyümesi ve farklılaşması üzerindeki etkilerinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir^{22,23}. AT2 reseptörlerinin uyarılması sonucu antiproliferatif etki ile endotel hücreleri ve damar düz kas hücrelerinde proliferasyon inhibe olur²⁴. AT2 reseptörleri All'nin damar duvarındaki proliferatif etkisini antogonize ederler. Bu reseptörlerin apoptozis yani programlanmış hücre ölümünü düzenlediği, ayrıca vazodilatasyona yol açtığı belirlenmiştir²⁵. Tablo 1'de AT1 ve AT2 reseptörlerinin etkileri gösterilmiştir.

Tablo 1; AT1 ve AT2 Reseptörlerinin Etkileri

ATI Reseptörleri	AT2 Reseptörleri
Vazokonstrüksiyon	Antiproliferasyon
Aldosteron salınımı	Diferensiasyon
Böbrekte sodyum tutulumu	Apoptosis
Kalp kontraktilitesinde artış	Anjiyogenesis
Kardiyovasküler hipertrofi	Vazodilatasyon
Hücre proliferasyonu	
Sempatik aktivitede artış	
Vazopressin salınımında artış	
Susuzluk hissi	



Şekil 2; RAS'ta ADE Dışı Enzimlerle Anjiyotensin II Oluşumu

Şekil 2’de renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde ADE dışı enzimlerle Anjiyotensin II oluşumu gösterilmiştir²⁶.

Son çalışmalar All'nin ateroskleroz ve tromboz gelişiminde direkt rolü olduğunu göstermektedir²⁶. Hiperkolesterolemi, hipertansiyon, diyabet ve sigara içimi gibi risk faktörleri ile oluşan oksidatif stres endotel disfonksiyonuna ve damarlarda inflamasyona yol açar. Bu durumda lokal

ADE ve All üretimi artar. Nitrik Oksit (NO) düzeyi düşer, oksidatif stres artar, lokal mediatörler aktiveleşir. All lezyondaki farklı tip hücrelerdeki reseptörleri uyararak endotelin, Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1), doku faktörü, Vasküler Hücre Adezyon Molekülü (VCAM), Hücre İçi Adezyon Molekülü (ICAM), sitokinler, büyüme faktörleri, proteolitik enzimler gibi sekonder mediatörlerin oluşumunu sağlar. Bu mediatörler vazokonstriksiyon, trombozis, inflamasyon, plak yırtılması, vasküler lezyon formasyonu ile kardiyovasküler olaylara neden olur. All üretiminin ADE veya Anjiyotensin Reseptör Antagonisti (ARA) ile azaltılması ateroskleroz oluşumu ve gelişimine neden olan faktörleri engelleyebilir²⁷.

Anjiyotensin Reseptör Antagonistleri

AT1 reseptörlerini spesifik olarak bloke etme, vazokonstriksiyon ve kardiyak hipertrofiyi engelleme özelliklerinden dolayı yaygın klinik kullanım alanı bulmuşlardır. Antihipertansif olarak geliştirilen ARA losartan, valsartan, irbesartan, kandesartan, telmisartan, eprosartan, olmesartan medoksomil'dir.

Losartan

Kullanıma ilk giren ilaçtır. AT1 reseptörlerini yarışmalı olarak bloke eder. Losartan'ın oral olarak alınan dozunun %14'ü sitokrom P450 enzimi tarafından karaciğerde aktif metaboliti olan EXP3174'e çevrilir. Losartan'ın ürik asit atılımını arttırdığı gösterilmiştir. Karaciğer fonksiyonları bozuk olan hastalarda doz ayarlaması gerekir. Maksimum plazma seviyesine losartan 1 saatte, aktif metaboliti 3-4 saatte ulaşır. Oral absorpsiyonu yavaştır. Besinler absorpsiyonu %10 azaltır. Yarılma ömrü 6-9 saattir. Başlangıç dozu 50 mg, doz aralığı 25-100 mg'dır²⁸.

Valsartan

Aktif bir metabolite çevrilmesi gerekmez. Maksimum plazma seviyesine 2-4 saatte ulaşır. İlacın %80'i değişmeden atılır, %20'si metabolize edilir. Sitokrom P450 izoenzimleri metabolizması ile ilgili değildir. Besinlerle oral absorpsiyonu %40-50 azalır. Yarılanma ömrü 6 saattir. Başlangıç dozu 80 mg, doz aralığı 80-320 mg'dır²⁹.

Irbesartan

Aktif bir metabolite çevrilmesi gerekmez. Maksimum plazma seviyesine 1,5-2 saatte ulaşır. Besinler emilimini etkilemez. Sitokrom P450 izoform 2C9 ile metabolize olur. Yarılanma ömrü 11-15 saattir. Başlangıç dozu 16 mg, doz aralığı 40- 60 mg'dır³⁰.

Kandesartan

Kandesartan sileksetil formunda kullanır. Gastrointestinal sistemde kısa sürede aktif madde kandesartan'a dönüşerek emilir. Maksimum plazma seviyesine 3-4 saatte ulaşır. Besinler emilimini etkilemez. Metabolize edilmeden karaciğer ve böbrek yoluyla atılır. Yarılanma ömrü 9 saattir. Başlangıç dozu 16 mg, doz aralığı 8-32 mg'dır³¹.

Telmisartan

Maksimum plazma seviyesine 0,5-1 saatte ulaşır. Besinler emilimini %6-20 azaltır. Yarılanma ömrü 24 saattir. Başlangıç dozu 16 mg, doz aralığı 8-32 mg'dır³².

Eprosartan

Maksimum plazma seviyesine 1-2 saatte ulaşır. Yarılanma süresi 5-9 saattir. Başlangıç dozu 400 mg, doz aralığı 400-800 mg'dır. 24 saat antihipertansif etkilidir³³.

Olmesartan Medoksomil

Maksimum plazma seviyesine 2 saatte ulaşır. Yarılanma süresi 15 saattir. Başlangıç dozu 10 mg'dır. Doz aralığı 5-20 mg'dır³⁴.

Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri:

Anjioödem insidansı ARA kullanan hastalarda bulantı, baş ağrısı, halsizlik, diyare, dispespi, nazal konjesyondur. Nadiren karaciğer fonksiyon testlerinde ve serum bilirubin düzeyinde yükselme olabilir.

Valsartanın irbesartan, kandesartan, telmisartan, eprosartan, olmesartan medoksomil ile önemli ilaç etkileşimleri bildirilmemiştir³⁵.

Rifampisin, losartan ve aktif metabolitinin biyoyararlanımını %20 azaltır³⁶. Telmisartan'ın digoksin ile ilaç etkileşimi vardır. Digoksinin maksimum plazma seviyesini %20 yükseltir³⁷. ARA potasyum tutan diüretiklerle birlikte kullanıldıklarında potasyum seviyesini yükseltebilirler. Böbrek yetmezliği, renovasküler hipertansiyon, hipoaldosteronizm'de serum potasyum seviyesi yakından izlenmelidir³⁸. ARA'nin serum glukozu, HbA1c seviyesi, lipit profiline etkisi yoktur^{39,40}. Öksürük komplikasyonu, ARA'nin kullanımında %1,5-3 gibi düşük oranlarda görülür⁴¹.

Klinik Kullanım

Klinik çalışmalar ARA'nin hipertansiyon tedavisinde etkili ve güvenli olduklarını göstermektedir. ARA'nin antihipertansif etkinlikleri arasında farklılık saptanmamıştır⁴². ARA'nin diüretik kombinasyon formları bulunmaktadır. ARA-hidroklortiazid kombinasyonlarının sistolik kan basıncını, ARA'ne göre daha fazla düşürdükleri gösterilmiştir^{43,44}.

Kandesartan'ın sol ventrikül hipertrofisini azaltmada atenolol'den üstün olduğu bulunmuştur⁴⁵. Losartan'ın esansiyel hipertansiyonlu hastalarda atenolol'e göre daha fazla kardiyovasküler

morbidite ve mortaliteyi önlediği, daha iyi tolere edildiği görülmüştür⁴⁶. Kalp yetmezliği olan hastalarda kandesartan ve enalapril'in birlikte kullanımının ejeksiyon fraksiyonu (EF)'nu artırdığı, EF artışının ilaçlarının tek başına kullanılması ile sağlanan artıştan daha fazla olduğu bulunmuştur⁴⁷.

Valsartan ve enalapril'in birlikte kullanıldığı kalp yetmezliği olan hastaların hastanede kalış süreleri azalmış, fakat ölüm oranlarında azalma görülmemiştir⁴⁸. ARA'nin kalp yetmezliği tedavisindeki etkinliği, mortalite ve morbiditeye etkileri üzerine klinik çalışmalar devam etmektedir. ARA'nin tip 2 diabetik nefropatili hastalarda, antihipertansif etkilerinden bağımsız olarak proteinüriyi ve serum kreatininin yükselme hızını azaltıkları, glomerüler filtrasyon oranındaki düşüşü azaltarak son dönem böbrek yetmezliğine gidişi yavaşlattıkları gösterilmiş ama diabetik hastalarda böbrek yetmezliğine bağlı ölüm oranında azalma görülmemiştir^{49,50}.

Anjiotensin Reseptör Antagonistleri'nin Geleceği

Valsartan, losartan ve aktif metaboliti EXP3174'ün trombositler ve endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımını artırarak antiagregan etkili oldukları gösterilmiştir⁵¹. Hipertansiyon bilinçsel fonksiyonlarda gerileme riskini artırmaktadır. Bu durum kan basıncı düşürülerek önlenabilir. Kandesartan'ın yaşlı hipertansif hastalarda demans gelişimini azaltmada potansiyel önemi olduğu düşünülmektedir⁵². AT1 reseptörleri renal karsinoma'larda angiogenezis'ten sorumludurlar. Kandesartan'ın akciğer metastazı olan renal karsinomalı farelerde neovaskülarizasyonu ve tümör büyüme faktörünü engelleyerek akciğer metazlarını gerilettiği gösterilmiştir. Kandesartan metastatik renal karsinoma vakalarının tedavisinde uygun bir ilaç olarak görülmektedir⁵³. All siklosporin'in neden olduğu nefrotoksisitenin patogenezinde rol oynar. Fare deneylerinde, kandesartan sileksetil'in siklosporin nefrotoksisitesinde tedavi edici potansiyeli olduğu gösterilmiştir⁵⁴. Hayvan deneylerinde

ARA'nin beyinde iskemi sırasında kan akımındaki azalmayı önlediği, iskemik alan genişliğini azalttığı, iskemi sonrası nörolojik sonuçları düzelttikleri gösterilmiştir⁵⁵. İnmenin erken döneminin tedavisinde ARA'nin kullanımı ile ilgili yayın yoktur. Devam eden bir çalışmada, inmenin erken döneminin tedavisinde kandesartan kullanımının yararlı olup olmadığının ortaya çıkması beklenmektedir⁵⁶. Kandesartan'ın migren profilaksisinde etkili olduğu bulunmuştur. Fakat bu yararlı etkinin nedeni bilinmemektedir⁵⁷. ARA'nin gelecekte hipertansiyon dışında bir çok klinik kullanım alanı olacağı düşünülmektedir.

Angiotensin II Reseptör Antagonistlerinin Farmakokinetikleri:

1. Yarışmalı AT1 reseptör antagonizmi : Prototip Losartan reseptöre bağlanmak için angiotensin II ile yarışmaya girer. Eprosartan da yarışmalı antagonizm gösterir. Blokaj geçicidir. Böbrekler ve safra yoluyla elimine edilir⁵⁸.

2- Karşı konulamaz AT1 reseptör antagonizmi : Yarışmasız reseptör antagonizmi meydana getirir. Irbesartan, Kandesartan sileksetil, Telmisartan ve Valsartan bu tip antagonizm oluştururlar. Valsartan'ın absorpsiyonu gıda ile %40 oranda azalır. Valsartan, Irbesartan, Eprosartan ve Telmisartan %70-98 oranda safra ile atılırken Kandesartan sileksetil %60 oranda böbreklerden elimine edilir⁵⁹.

2.1.3 Diüretikler ve Tiyazit Türevi Diüretik İlaçlar Hakkında Genel Bilgi

Belirli bir zaman diliminde, böbrek nefronlarında idrar oluşumunu artıran ilaca diüretik adı verilir.

Diüretikler, tedavide sodyum ve bunu izleyen su tutulmasıyla karakteristik ödem ve arteriyel hipertansiyon gibi önemli hastalıklarda öncelikle kullanılan ilaçlardır⁵⁹.

Diüretikler, hipertansiyon tedavisinde 40 yıldan uzun bir süredir kullanılmaktadır. Yeni ilaçların kullanıma girmesiyle önemini kaybetmiş görünse de uzun süreli klinik çalışmaların sonuçları düşük doz diüretik kullanımının hipertansiyon tedavisinde etkili olduğunu, hatta kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltma açısından üstün olabileceğini göstermiştir. Özellikle tiazid diüretikler, ucuz, etkin ve güvenilir olmaları nedeniyle hipertansiyonun uzun dönem tedavisinde ilk tercih edilecek ilaçların başında gelmektedir. Metabolik problemler ve hipokalemi tiazid grubu diüretiklerin en önemli yan etkileridir. Ancak tiazid kullanımına bağlı olarak geliştiği düşünülen yeni diyabet vakalarındaki kardiyovasküler morbidite ve mortalite oranı, zeminde diyabeti olan hastalarda görüldüğü kadar fazla değildir ve alternatif ilaçlardakine benzer sıklıktadır. Hipokalemi ise glukoz intoleransı ile ilişkili olan ve tiazidlerin düşük dozda kullanımıyla az rastlanan bir yan etkidir. Hipokalemi durumunda, potasyum tutucu diüretikler, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü veya anjiyotensin reseptör antagonistleri tedaviye eklenebilir. Zeminde diyabet varlığı ya da böbrek hastalığı gibi problemler bulunmadığı takdirde tiazid ve benzeri diüretikler hipertansiyon tedavisinde ilk seçenek olarak tercih edilmelidir⁵⁸.

Diüretiklerin etkisiyle, Na^+ ve Cl^- iyonlarının reabsorbsiyonundaki azalma, pasif olarak suyun reabsorbsiyonunu da azaltır ve bunun sonucu olarak da idrar hacmi artar.

Vücuttan su ve tuz atılmasının artması, ekstraselüler sıvı hacmini azaltır (anti-ödem etki).

Bazı diüretikler, ilave olarak, membranlarda iyonik değiş-tokuşu değiştirerek, damar düz kaslarının intraselüler sodyum konsantrasyonunu da doğrudan azaltabilir. İntraselüler sodyumun azalması, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun da azalmasına yol

açar ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiş-tokuşu). Sonuçta, vasküler direnci düşürerek antihipertansif etki oluşturlar⁵⁹.

Nefronun 5 aktif kısmı idrar hacmini kontrol eder:

1- Proksimal Tübüller

-Kortekste yer alır.

-Karbonik anhidraz inhibitörü diüretiklerin etki yeridir.

-Glukozun tamamı, aminoasitler, HCO_3^- ve diğer metabolitler geri emilir.

- Na^+ %60-70'i ve beraberinde su ve Cl^- da geri emilir.

-Organik asit ve bazlar (ürik asit, diüretikler, antibiotikler vb.) kandan lümene sekrete olurlar. Diüretiklerin çoğu asit yapıda olup, etkilerini gösterebilmeleri için proksimal tübülün orta kısmından lümen içine salgılanmaları gerekir. Aynı taşıyıcıya bağlanarak salgılanan organik asitler birbirleriyle yarışrlar. Kronik böbrek yetmezliği olan üremili hastalarda, lümende yeterli konsantrasyona ulaşması için, diüretikler yüksek dozlarda verilirler. Furosemid ve klorotiazid gibi diüretiklerle oluşan, kanda ürik asit artışının (hiperüriseminin) nedeni de budur⁵⁹.

2- Henle kıvrımının inen (ince) kolu

- İzotonik filtrat henle kıvrımıyla medullaya girer.

- Na^+ ve Cl^- reabsorbsiyonu olmaz; sadece suya karşı geçirgenlik yüksektir ve medullanın hipertonic olması nedeniyle pasif olarak su reabsorbsiyonu olur. Tübül sıvısının tuz konsantrasyonu 3 katına çıkar⁵⁹.

3- Henle kulbunun çıkan kolunun kalın kısmı

- Önce medulla, sonra korteks içinde seyrederek.
- En güçlü diüretikler olan kıvrım diüretiklerinin etki yeridir.
- Suya geçirgen olmayan özel hücrelerle döşelidir.
- Burada bulunan, sodyum/potasyum/2 klorür ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$) yardımcı taşıyıcı ile Na^+ , K^+ ve Cl^- aktif olarak reabsorbe edilir.
- Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi divalent katyonlar da potansiyel farkı nedeniyle buradan basit difüzyonla reabsorbe edilir.
- Sodyum klorürün %25-30'u interstisyel sıvıya geri dönerek medullanın yüksek osmolaritesini korumasını sağlar. Buraya etki eden diüretikler, böbreğin hem dilüsyon hem de konsantrasyon yeteneğini azaltırken, sadece distal tübüle etki edenler sadece dilüsyon yeteneğini azaltırlar⁵⁹.

4- Distal tübüller

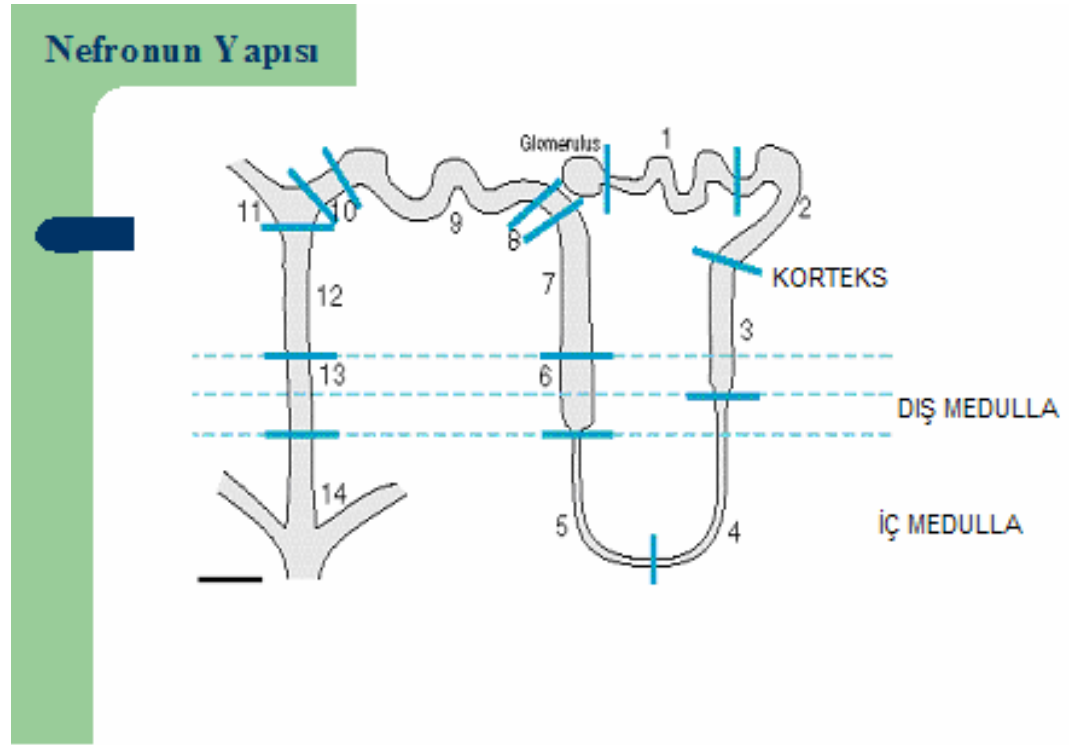
- Hücreleri suya geçirgen değildir.
- Tiazid grubu ve benzeri diüretiklerin etki yeridir.
- Sodyum klorürün %10'u tiazidlere duyarlı Na^+/Cl^- taşıyıcısıyla reabsorbe edilir. Bu mekanizma, aldosteron etkisinden bağımsızdır.
- Bu kısımda parathormon etkisi altında, Ca^{+2} aktif transportla reabsorbe edilir⁵⁹.

5- Toplayıcı tübüller

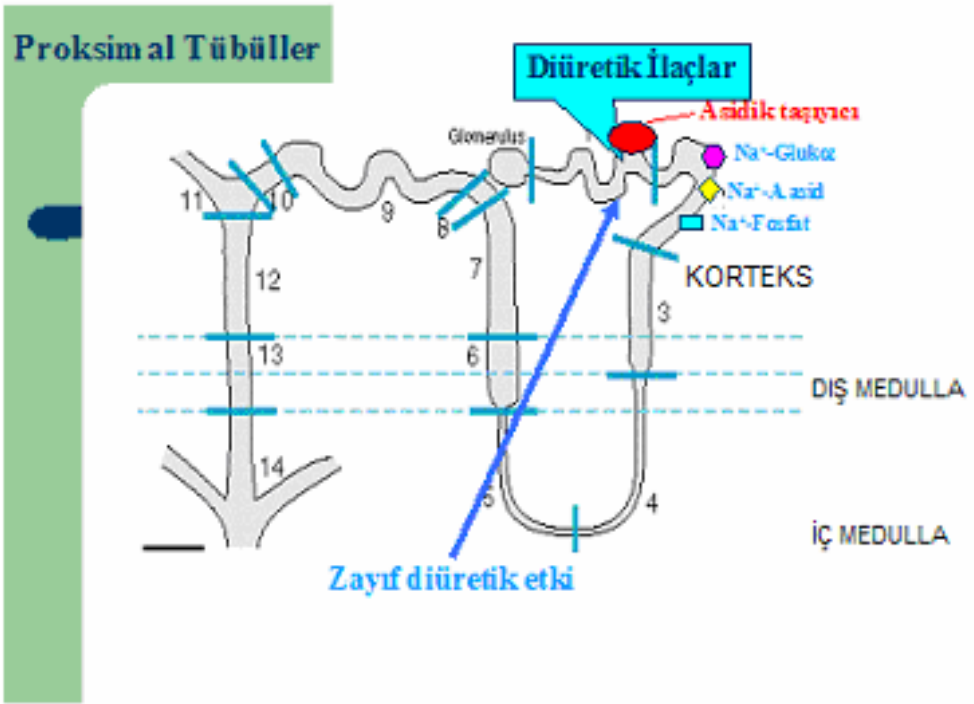
- Özellikle kortikal bölümde olmak üzere, aldosterona bağımlı şekilde Na^+ reabsorbsiyonu ve K^+ sekresyonu (Na^+-K^+ değişimi) olur. Ana hücreler K^+ ve H^+ sekresyonundan, ara hücreler K^+ reabsorbsiyonundan (K^+/H^+ değiş-tokuşu) sorumludur.

- Potasyum tutucu diüretiklerin etki yeridir. Diğer diüretikler ise, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ değiş-tokuşu nedeniyle potasyum kaybına (hipokalemi) neden olurlar.
- ADH (vazopressin), toplayıcı tübüllerden sAMP aracılığıyla suyun reabsorbsiyonuna neden olur⁵⁹.

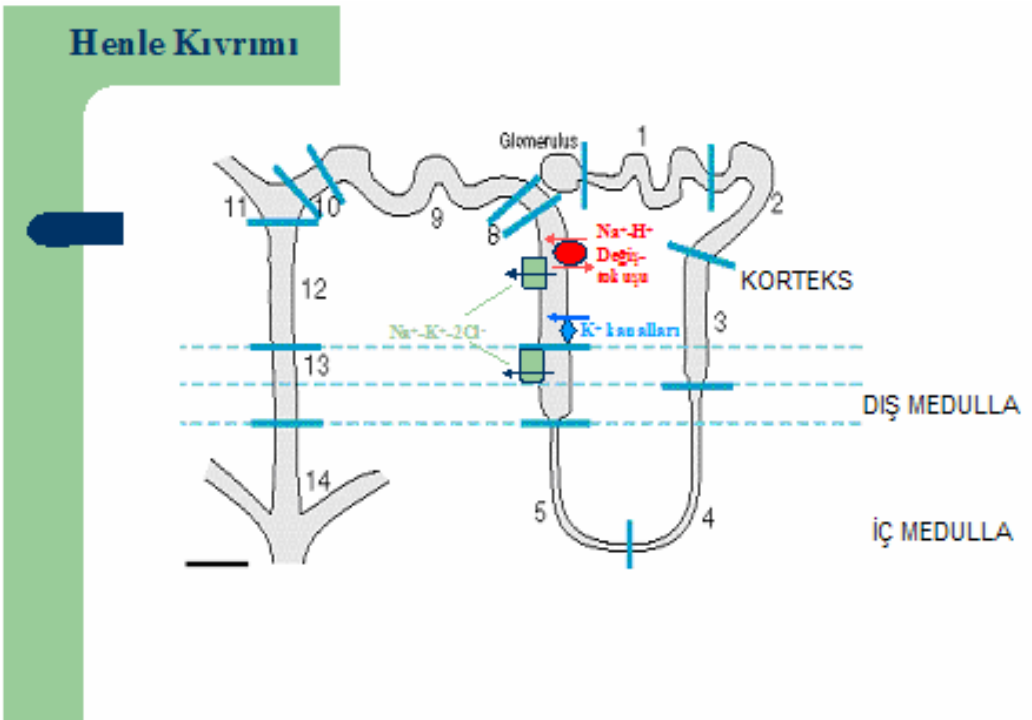
Nefronun yapısı ve idrar hacmini kontrol eden kısımlar Şekil 3,4,5,6,7’de verilmiştir⁶⁰.



Şekil 3; Nefronun Yapısı

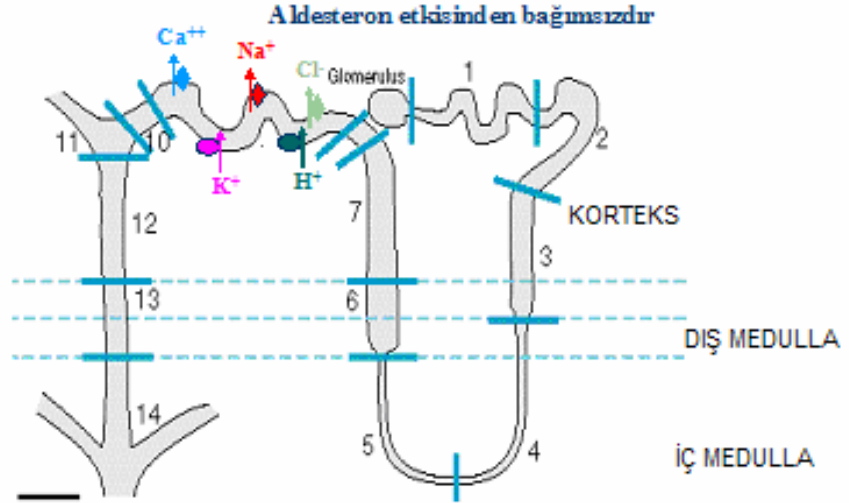


Şekil 4; Proksimal Tübüller



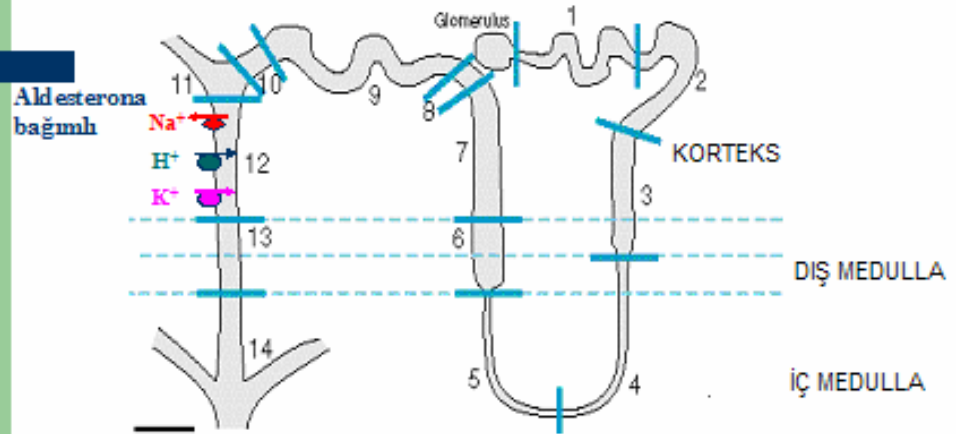
Şekil 5; Henle Kıvrımı

Distal Tübüller



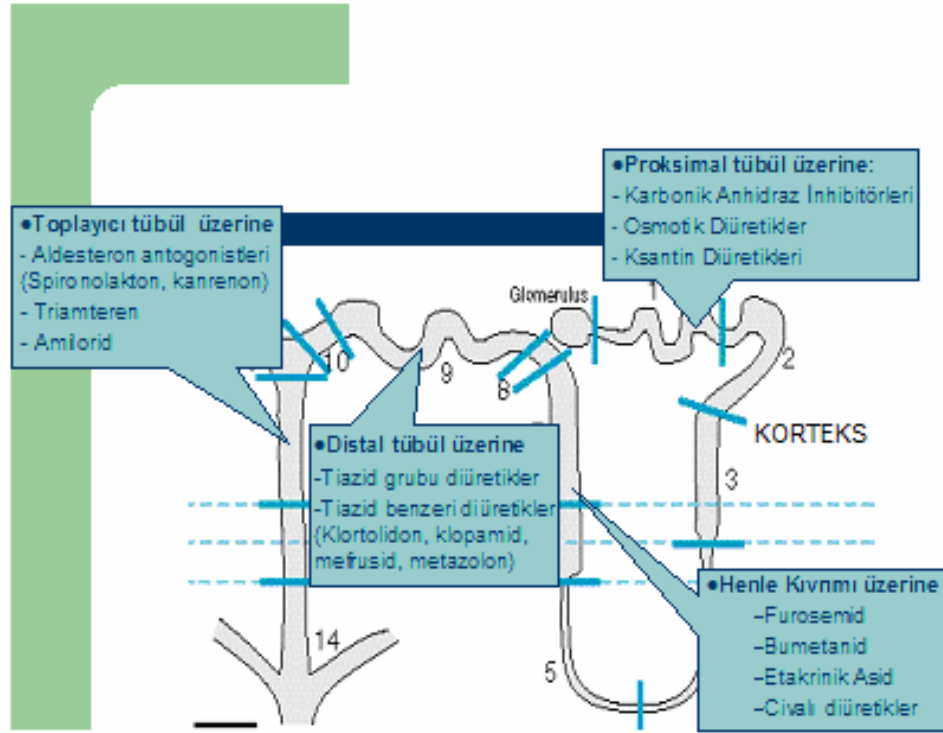
Şekil 6; Distal Tübüller

Toplayıcı Tübüller



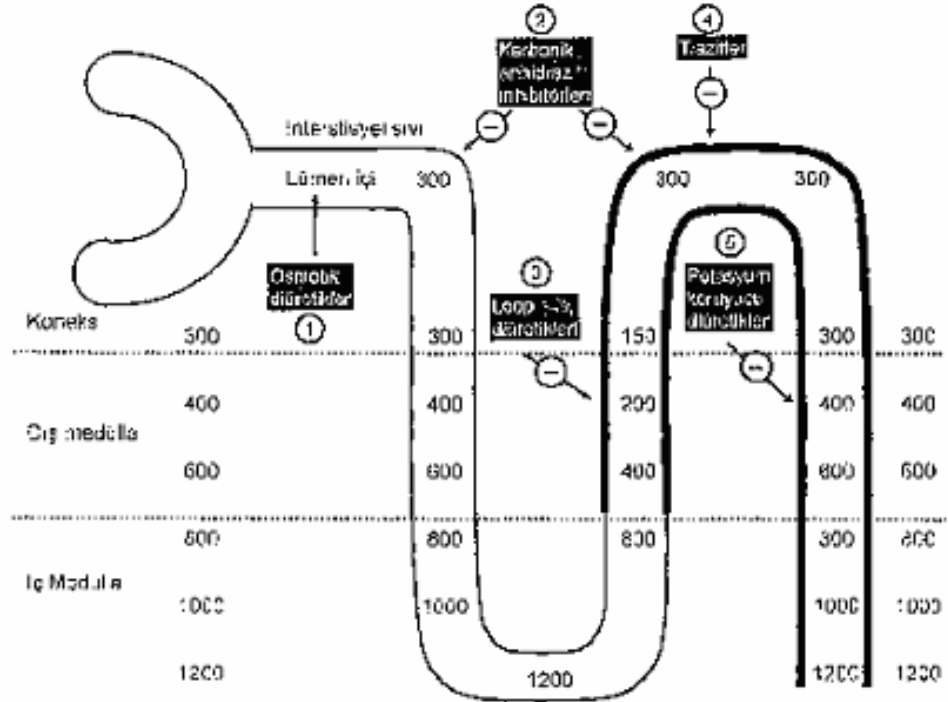
Şekil 7; Toplayıcı Tübüller

Diüretik ilaçlar nefronun çeşitli bölgelerinde etki gösterirler. Şekil 8’de diüretik ilaçların etki yerlerine göre sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 8: Diüretik İlaçların Etki Yerlerine Göre Sınıflandırılması

Şekil 9'da diüretik ilaçların nefronda etkiledikleri yerler gösterilmiştir⁵⁹.



Nefronun temel yapılarının basitleştirilmiş şekli ve interstisyum, lümen osmolariteleri. Diüretik gruplarının nefronda etkiledikleri kısımlar da işaretlenmiştir:

1. Osmotik diüretikler, tüm lümenin içeriğini değiştirirler.
2. Karbonik anhidraz inhibitörleri, NaHCO_3 diürezine neden olurlar.
3. Loop diüretikleri, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportunu inhibe ederler.
4. Tiazidler, Na^+/Cl^- kotransportunu inhibe ederler.
5. Potasyum koruyucu diüretikler, Na^+ reabsorpsiyonu ile K^+ ve H^+ sekresyonunu inhibe ederler.

Şekil 9; Diüretik Grupların Nefronda Etkiledikleri Yerler

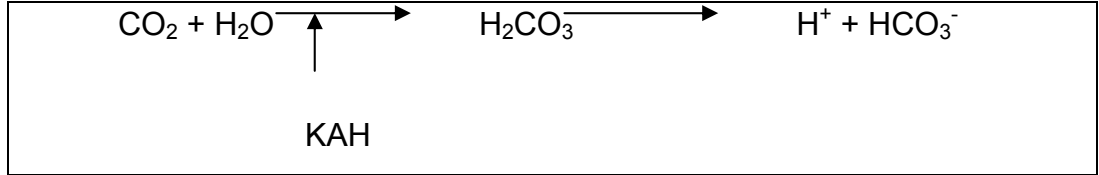
Diüretik ilaçlar

- Karbonik anhidraz inhibitörleri
- Tiazit türevi diüretikler
- Kıvrım diüretikleri
- Potasyum tutucu diüretikler
- Aldosteron reseptör antagonistleri
- Osmotik diüretikler⁶⁰

Karbonik anhidraz inhibitörleri

Bu grupta halen kullanılan ilaç asetazolamiddir.

- Sulfonamid yapıdadır.
- Proksimal tübül epiteli hücre içi ve apikal membranda bulunan Karbonik Anhidraz (KAH) enzimini inhibe eder.



Normal şartlarda KAH enzimi etkisiyle oluşan H^+ lümene atılır ve karşılığında Na^+ reabsorbsiyonu olur (H^+ - Na^+ değiş-tokuşu). KAH enziminin inhibisyonu sonucu, Na^+ reabsorbsiyonu azalacağından, Na^+ ve beraberinde su atılımı sonucu diüretik etki oluşur. Bu etki tübülün ileri kısımlarında telafi edileceğinden KAH inhibitörü ilaçlar zayıf diüretik etkilidirler. H^+ lümene atılmadığında, bununla birleşemeyip lümeninde kalan HCO_3^- idrarla atılır; idrar pH'sı artar ve net HCO_3^- kaybı nedeniyle hiperkloremik metabolik asidoz oluşur. Asidoz sonucu lümendeki H^+ konsantrasyonu yeniden artacağından yaklaşık 24 saatlik kullanımdan sonra diüretik etkilerine tolerans gelişir⁵⁹.

- Tedavide en sık olarak, gözde aköz humor salgılanmasını azaltarak göz-içi basıncını düşürmelerinden dolayı, açık açılı glokomun kronik tedavisinde, diğer ilaçlara ek olarak kullanılırlar. Bu indikasyonda daha çok, asetazolamid yerine, göze lokal olarak daha iyi penetre olan dorzolamid ve brinzolamid tercih edilir.

- Asetazolamid, antineoplastik tedavi esnasında ürik asitin idrar yolunda çökmesini önlemek için kalevi diürez oluşturmak amacıyla,

diğer antiepileptiklerin etkisini artırmak için epilepsi tedavisinde, kronik metabolik alkaloz veya respiratuvar alkaloz tedavisinde ve akut dağ hastalığının profilaksisinde (BOS oluşumunu azaltarak ve respiratuvar alkalozu düzelterek etki gösterir) oral yoldan kullanılabilir. Akut dağ hastalığında, irtifa değişikliğine fizyolojik alıştırmaların (aklimatizasyon) yerine geçmez.

- Hafif metabolik asidoz, K^+ kaybı, nefrolitiazis, sersemlik ve parestezi gibi genelde çok ciddi olmayan yan etkiler görülebilir⁵⁹.

Tiazit Türevi Diüretikler

En sık kullanılan diüretiklerdir. Ağız yolundan kullanılabilimleri, yaptıkları diürezin hızlı ve fazla olmaması, vücuttaki sodyumun fazlasını atmaları fakat aşırı derecede sodyum ve su kaybına neden olmamaları ve belirgin dehidratasyon yapmamaları, toksisitelerinin düşük olması ve antihipertansif etki de göstermeleri başlıca üstünlükleridir⁵⁹.

- Sülfonamid türevidirler ve yapısal olarak Karbonik Anhidraz İnhibitörlerine benzerler. Diüretik etkileri asetozolamidden daha güçlüdür. Vücudun asit baz dengesini bozmazlar ve bozukluğundan da etkilenmezler.

- Distal tübül etkilerler. Distal tübül hücrelerinin lümen tarafındaki Na^+-Cl^- taşıyıcısını inhibe ederek Na^+ , Cl^- ve suyun reabsorbsiyonunu azaltırlar.

-Potasyum salgılanmasını artırır; K^+ kaybı, nadiren tedaviyi gerektirir.

- Ca^{+2} reabsorbsiyonunu artırır. Kıvrım diüretiklerde ise, tersine Ca^{+2} atılımı artar⁵⁹.

Tiazit Türevi Diüretiklerin Endikasyonları

1- Hipertansiyon: Periferik damar direncinde azalmaya neden olurlar.

2- Konjestif kalp yetmezliği

3- Böbrek yetmezliği: Ödemi azaltmak amacıyla, kıvrım diüretiklerine eklenirler.

4- Hiperkalsüri: Üriner kanalda ürik asit taşı oluşumunu azaltırlar.

5- Diyabetes İnsipidus (Dİ): Nefrojenik Dİ'de ADH benzeri etki oluşturarak hiperozmolar idrar oluşumuna neden olurlar. Hastanın günde çıkardığı idrar miktarını düşürürler⁵⁹.

Yan etkileri

Hipokalemi (Dijital kullanan hastalarda aritmilere neden olan en sık yan etkidir ve potasyum tutucu diüretikler ile kombine edilerek önlenebilir), hiponatremi, hipomagnezemi, hiperkalsemi, hiperürisemi (Ürik asitle yarıştığından atılımını azaltır ve kanda ürik asit artar. Gut ataklarını artırabilir), hiperglisemi, hiperlipidemi ve hipersensitivite gözlenebilir. Lityum kullanan hastalarda, lityum intoksikasyonu olasılığı artar⁵⁹.

Kıvrım Diüretikleri

- Bu gruptaki ilaçların prototipi ve en çok kullanılanı, furosemitdir. Doz-yanıt eğrisinin fazla dik olmaması, intravenöz verilış için daha uygun olması, gerek oral gerek intravenöz verildiğinde daha az gastrointestinal yan etki yapması ve daha az ototoksik olması gibi

avantajları vardır. Diğerleri, bumetanid, torasemid ve artık pek kullanılmayan etakrinik asittir.

- Henle kıvrımının çıkan kolunun kalın kısmına etkilidirler. Burada, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ yardımcı taşıyıcısını güçlü şekilde inhibe ederler.

- En etkili diüretik grubudur. Furosemid, fraksiyonel sodyum itrahını %40'a kadar çıkartabilir. Böbrek fonksiyonları bozuk olan veya diğer diüretiklere yanıt vermeyen hastalarda bile etkileri hemen başlar.

- Oral ya da parenteral yoldan uygulanabilirler. Furosemid için, etki yaklaşık 1 saatte başlar, 6 saatte tamamlanır (intravenöz 30 dakikada doruğa çıkar). Günde 2 kez uygulanabilir.

- Böbrek kan akımını, renal vasküler direnci düşürerek artırır. Bu etkilerinin diüretik etkilerine de katkısı vardır ve bu etkiyi böbrekte prostoglandin sentezini artırarak yaparlar.

- İdrardan Ca^{+2} ve Mg^{+2} itrahını artırır.

-Hipovolemi nedeniyle renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini indirekt olarak aktive ederler. Hipokalemi yaparlar⁵⁹.

Potasyum Tutucu Diüretikler

Bu grupta, aldosteron reseptör antagonistleri spironolakton ve kanrenon (spironolaktonun vücuttaki aktif metaboliti) ve Na^+ kanalı inhibitörleri amilorid ve triamteren bulunur.

-Toplayıcı kanalda Na^+ reabsorbsiyonunu, K^+ ve Cl^- sekresyonunu engellerler.

-Tek başına kullanıldıklarında zayıf etkili diüretiklerdir. Potasyum tutulmasını sağladıklarından tiazit ya da kıvrım diüretikleriyle birlikte kullanılırlar. Kombine preparatları mevcuttur.

-Spironolakton (Aldacton tb.) birincil hiperaldosteronizmde de (Conn sendromu) kullanılır.

-Spironolakton, cinsiyet hormonlarına benzerliği nedeniyle, erkeklerde jinekomasti, kadınlarda menstruasyon bozukluğuna neden olabilir.

-Potasyum tutucu diüretiklerle birlikte potasyum eklentileri verilmemelidir. Ayrıca, ADE inhibitörü verilen bir hastaya potasyum tutucu diüretik verilmesinin şiddetli hiperpotasemiye yol açabileceği unutulmamalıdır⁵⁹.

Aldosteron Reseptör Antagonistleri

Spironolakton-reseptör kompleksi inaktiftir ve bu şekilde aldosterona cevap olarak normalde sentez edilen proteinlerin üretimini engeller. Bu mediatör proteinlerin görevi toplayıcı kanallarda Na^+/K^+ değişim yerlerini stimule etmektir. Ortamda aldosteron yok ise etki yoktur. Tiazid veya kıvrım diüretiği ile birlikte K^+ atılımını azaltmak için sekonder hiperaldostrenozimde kullanılır⁶¹.

Osmotik Diüretikler

Glomerüllerden filtre olan basit yapıda hidrofilik kimyasal maddelerdir. Sodyumdan çok suyun sekresyonuna ihtiyaç varsa kullanılırlar.

Akut ilaç intoksikasyonları sırasında veya böbrek itrah fonksiyonunun azaldığı hastalıklarda gelişen oligüriye karşı, glomerüler filtrasyon hızını yeterli düzeyde sürdürmek ve akut böbrek yetmezliğini önlemek amacıyla;

-Beyin ameliyatlarından önce veya sonra BOS basıncını ve beyin hacmini azaltmak; kafa travması ve intrakranial kanama

durumlarında, beynin iskemi, tümör ve infeksiyon gibi hastalıklarında, beyin ödemi gidermek ve artmış olan intrakranial basıncı düşürmek amacıyla kullanılırlar.

-Primer etki yerleri Henle kıvrımının çıkan kalın koludur.

-Plazma proteinlerine ve dokulara bağlanmazlar; glomerüllerden hızlı bir şekilde süzülür ve tübüllerden reabsorbe edilmezler.

-En fazla kullanılanı mannitoldür. İntravenöz infüzyonla %10 veya %20'lik solüsyonu, 0.125-1 g/kg dozunda 15-30 dakikada verilir.

-İzosorbid (izosorbitol) ve gliserol, akut glokom krizi durumunda ve göz-içi cerrahilerden önce ağız yolundan; gliserol ve sorbitol, intrakranial basıncı düşürmek için intravenöz infüzyonla uygulanırlar⁵⁹.

Diüretik İlaçların Yan etkileri ve İlaç Etkileşimleri

Diüretiklerin en önemli yan etkisi hipokalemidir(hipokloremik alkaloz).

Diüretik ilaçlar, proksimal-henle inen kolu-distal tübüllerdeki etkileri ile sodyum emilimini azaltıp, sonuçta toplayıcı tübüllere gelen sıvıda sodyum konsantrasyonunu artırır. Dolayısıyla toplayıcı tübüllere daha fazla oranda gelen sodyumun belli bir kısmı, burada aldosteron etkisi ile reabsorbe edilir. Buna karşılık toplayıcı tübüllere normalden fazla oranda gelen sodyuma karşılık fazla oranda potasyum atılımı olur. Bu olay diüretik ilaçların hipokalemi yapmasının temel nedenidir.

Hipokalemiye bağlı olarak; hipokalemik alkaloz ve ektopek ventriküler atışlar ortaya çıkabilir. Eğer hasta digital alıyorsa ventriküler ektopek atış eğilimi varsa veya trisiklik antidepresan (TAD) kullanıyorsa; potasyum düzeyi dikkate alınmalıdır⁶².

Ayrıca;

- Hiponatremi
- Hipokalsemi
- Hipomagnezemi
- Hiperglisemi
- Hiperlipidemi
- Hiperürisemi
- Azotemi görülür⁶².

İlaç Etkileşimleri

- Dijital Glikozidleri
- Lityum⁶².

Diüretik İlaçların Klinik Kullanımı

En yaygın kullanış yerleri ödemli hastalıkların ve hipertansiyonun tedavisidir.

Ödem, dokularda ve bazen seröz boşluklarda fazla miktarda suyun toplanmasıdır. Ödemin önemli bir nedeni, başta sodyum olmak üzere, elektrolitlerin böbreklerden yeterli derecede itirah edilememesidir. Konjestif kalp yetmezliğine bağlı ödemlerde kardiyotonik glikozidler, ödemi tek başlarına ortadan kaldırırlar. Terapötik etkinliklerini artırmak için çoğu zaman bir diüretikle birlikte kullanılırlar. Akut akciğer ödeminde, intravenöz yoldan etkisi güçlü ve çabuk başlayan furosemid veya etakrinik asit verilir. Konjestif kalp yetmezliğinde akut dönem dışında kıvrım diüretikleri ile tedavi tavsiye edilmez. Konjestif kalp yetmezliğinde potasyum kaybına neden olan diüretikleri kullanırken, kardiyotonik glikozidlerle tedavi edilen hastalarda bu durumun, kendini tehlikeli aritmilerle gösteren akut dijital intoksikasyonunu teşvik ettiği daima hatırd tutulmalıdır. Akut glomerülonefritte diüretiklerin indikasyonları yoktur, su ve elektrolit kontrolü yapılır. Nefrozlardaki ödemlerde daha ziyade kanda protein düzeyini yükseltecek ve onkotik basıncı artıracak önlemlere

başvurulur. Karbonik Anhidraz İnhibitörü diüretikler, karaciğer hastalıklarında görülen ödem ve aside karşı kontrendikedirler. Karaciğer ve böbrek fonksiyonu bozuk hastalarda diüretiklerin kullanılması gerektiğinde, uygulamanın intermitent bir şekilde yapılması uygun olur⁶³.

- Bir veya iki gün diüretik verildikten sonra 2-3 gün ilaç kesilir.
- Diğer bir tedavi düzeni ilacın gūnaşırı verilmesidir.
- Ödemli durumların hemen hepsinde diüretik tedavisi ile birlikte hastanın günlük tuz alımı azaltılmalıdır (düşük sodyum diyeti)⁶³.

Diüretik İlaçların Farmakokinetiği

Tablo 2'de diüretik ilaçların oral biyoyararlanımları ve eliminasyon yarı ömürleri verilmiştir.

Tablo 2; Diüretik İlaçların Farmakokinetikleri

Diüretik	Oral Biyoyararlanımı (%)			ELİMİNASYON YARI ÖMRÜ (saat)	
	NORMAL	KBY*	SİROZ	KKY**	
TIYAZİD GRUBU					
Klortalidon	64	24-55	?	?	?
Klorotiyazid	30-50	1.5	?	?	?
Hidroklorotiyazid	65-75	2.5	Artmış	?	?
İndapamid	93	15-25	?	?	?
Triklormetiyazid	?	1-4	5-10	?	?
Politiyazid	?	26	?	?	?
LOOP DİÜRETİKLER					
Furosemid	10-100	1.5-2	2.8	2.5	2.7
Bumetanid	80-100	1	1.6	2.3	1.3
Torsemid	80-100	3-4	4-5	8	6
POTASYUM TUTUCU AJANLAR					
Spirolakton	Çelişkili	1.5	Değişmez	Değişmez	?
Triamteren	80	2-5	Uzamış	Değişmez	?
Amilorid	Çelişkili	17-26	100	Değişmez	?
*KBY: Kronik böbrek yetersizliği					
**KKY: Konjestif kalp yetersizliği					

- Tiazidlerin çoğu mide-barsak kanalından %50-65 oranında absorbe edilirler.
- Absorbsiyon oranı bireyler arasında değişkenlik gösterir.
- Absorbsiyon oranı hidroflumetiazid ile en az %50, bendroflumetiazid ile yaklaşık %100 ve klortalidon ile %65'tir.
- Bazı tiazidlerin eliminasyonu, fazla değişmeden böbreklerden proksimal tübüllerden salgılanmak suretiyle olur⁶⁰.

2.2 VALSARTAN İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

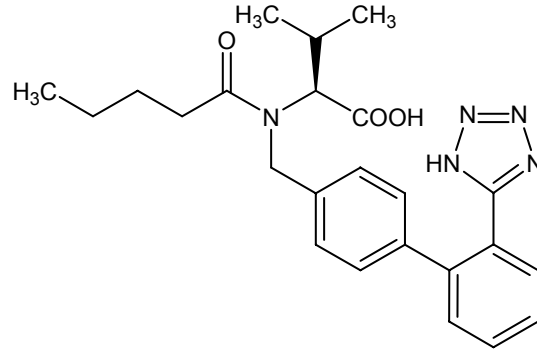
2.2.1 Kimyasal Özellikleri

Valsartan; beyaz renkli bir tozdur⁶⁴.

Kimyasal okunuşu: N-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)benzil]-N-valeril-L-valin; (S)-N-(1-karboksi-2-metilprop-1-il)-N-pentanoil-N-[2'-(1H-tetrazol-5-il)-bifenil-4-ilmetil]amin

Kapalı Formülü: C₂₄H₂₉N₅O₃

CAS No: 137862-53-4



Şekil 10; Valsartanın Kimyasal Yapısı

2.2.2 Fiziksel Özellikleri

Molekül Ağırlığı : 435.52 g⁶⁵.

Erime derecesi 116 -117°C'dir. Etanol ve metanolde çok çözünür. Suda az çözünür⁶⁵.

2.2.3 Valsartanın Antihipertansif İlaçlardaki Yeri ve Önemi

Etki mekanizmaları Anjiyotensin-II Tip 1 reseptör blokajıdır. Etkileri ilaç başlandıktan 1 hafta-10 gün kadar sonra başlar. Maksimum

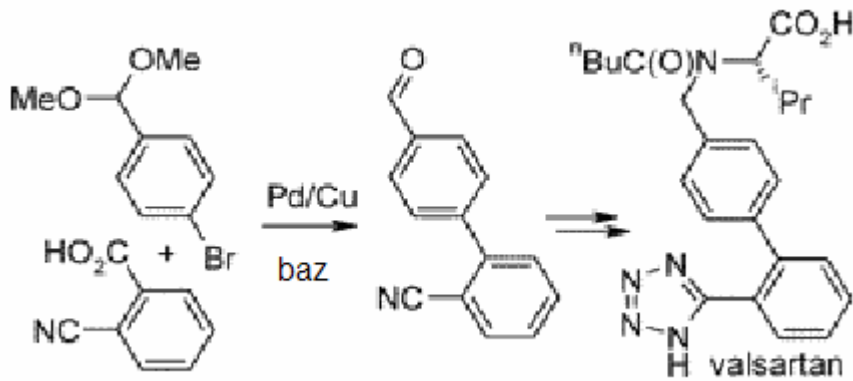
antihipertansif - afterload düşürücü etkilerinin görülmesi için 4 hafta gerekebilir⁶⁶.

Valsartan, oral yolla alındığı zaman aktif olan, spesifik bir anjiotensin II reseptör antagonistidir. Özellikle AT1 reseptör alt tipi üzerinde seçici bir etki gösterir. AT1 reseptöründe hiçbir kısmi agonist etkisi olmayan valsartanın bu reseptöre olan afinitesi, ATII reseptörüne olan etkisinin yaklaşık 20 000 katıdır. Valsartan, aynı zamanda kininaz II adıyla da bilinen, AT1'i anjiotensin II'ye dönüştüren ve bradikininini parçalayan bir enzim olan “Anjiotensin Dönüştürücü Enzimi” inhibe etmez. Valsartan, diğer hormon reseptörlerine veya kardiyovasküler düzenlemede önemli oldukları bilinen iyon kanallarına bağlanmaz ya da onları bloke etmez. Hipertansiyon hastalarına valsartan verilmesi sonucunda, nabız sayısı değişmez ve kan basıncı azalır⁶⁷.

Valsartan özellikle miyokardiyal enfeksiyon sonrasında oldukça etkili bir ilaçtır. Yüksek riskli hipertansiyon hastaları için kalbi koruyucu etkisi vardır⁶⁸.

Valsartan plasebo karşısında morbidite ve mortalite olarak önemli ölçüde azalma göstermektedir⁶⁹.

2.2.4 Elde edilişi



Şekil 11; Valsartanın Elde Ediliş Şeması

Antihipertansif ilaç olan valsartanın sentezi Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi tarafından 2001 de yapılmıştır. DMF’de L-valin benzil ester p-toluensulfonat ile 4'-bromometil-2-siyanobifenil’in sübstitüsyonu ile başlamıştır⁷⁰.

Bakır(II) oksit, 1,10-fenantrolin, ve palladyum(II) bromür, 2-siyanokarboksilik asitle 1-bromo (4-dimetoksimetil) benzen’in %80 verimle ve 4-bromotoluen’in %71 verimle reaksiyona sokulmasıyla meydana gelmiştir⁷¹. Valsartanın elde ediliş şeması Şekil 11’de gösterilmiştir.

2.2.5 Farmakokinetik Özellikleri

Hastaların çoğunda antihipertansif etki, bir tek oral dozun alınmasından sonraki 2 saat içerisinde başlar ve 4-6 saat içerisinde en yüksek düzeye ulaşır. Antihipertansif etki dozun verilmesinden sonra 24 saat boyunca devam eder. Tekrarlanan dozlar kullanıldığı zaman, maksimal kan basıncı azalması, hangi doz kullanılırsa kullanılsın genellikle 2-4 hafta içerisinde elde edilir ve uzun süreli tedavi sırasında aynı şekilde devam eder. Valsartanın hidroklorotiazit ile birlikte kullanılması, kan basıncında önemli bir azalma sağlar⁷².

Ağızdan alınan valsartan hızla emilir, ancak emilen miktar çok değişik olabilir.

Valsartanın farmakokinetiği, test edilen doz aralığında lineerdir. Tekrarlanan kullanımda valsartanın farmakokinetiğinde değişiklik olmaz ve günde tek doz alındığında, pek az birikime neden olur. Erkeklerdeki ve kadınlardaki plazma konsantrasyonlarının benzer olduğu gözlenmiştir.

Valsartan, başlıca serum albümini olmak üzere serum proteinlerine yüksek oranda (%94-97) bağlanır. Kararlı durumdaki dağılım hacmi düşüktür (yaklaşık 17 litre). Plazma klirensi, karaciğerden geçen

kan miktarı (saatte yaklaşık 30 litre) göz önünde tutulduğunda nispeten yavaştır (saatte yaklaşık 2 litre). Emilen valsartan dozunun %70'i dışkı, %30'u idrarla değişikliğe uğramamış şekilde vücuttan atılır. Plazmadaki maksimal valsartan konsantrasyonları, dozdan 2-4 saat sonra elde edilir. Besinler valsartan eğri altında kalan alan (AUC) değerini %40, maksimal plazma konsantrasyonunu (Cmax) %50 oranında azaltır. Klinikte kullanılan doz sınırları arasında kalınması koşuluyla valsartanın AUC ve Cmax değerleri, doz arttıkça lineer artış gösterir.

Tekrarlanan dozlar, valsartanın plazmada önemli ölçüde birikmesine neden olmaz⁷².

2.2.6 Farmakolojik Özellikleri

Valsartanın kimyasal yapısı diğer anjiyotensin reseptör antagonistlerinden irbesartan, kandesartan ve losartanla karşılaştırıldığında benzerlik ve farklılıkları vardır. Valsartan yarışmasız anjiyotensin I antagonizması gösterir. Valsartan oral olarak alındıktan sonra çabuk absorbe olur ve 2 saatte maksimal plazma konsantrasyonuna ulaşır ve %20 biyoyararlanım gösterir. Proteine bağlanma oranı özellikle albumine olmak üzere %94-97'dir. Valsartan genelde değişmeden veya %10 oranında değişerek atılır. Bu eliminasyon hastalarda %5-7 saatte olmaktadır. Sitokrom P450 ile metabolize olur. Günlük alımlardan sonra birikimi azdır. Karaciğer hastalarında dozajlarda düzenleme yapılmalıdır⁷³.

2.2.7 Klinik Kullanımı

Valsartan esansiyel hipertansiyonlu hastalarda sol ventrikül hipertrofisini geriletmektedir⁷⁴.

Kalp yetersizliği ve/veya sol ventrikül disfonksiyonu olan, miyokard infarktüsü (MI) geçirmiş hastalarda:

Valsartan:

-Ölüm riskini azaltmada,

-Kardiyovasküler (CV) ölüm veya nonfatal MI veya kalp yetersizliğinden hastaneye yatış riskini azaltmada en az kanıtlanmış kaptopril dozu kadar etkindir. Valsartan-kaptopril kombinasyonu, mortaliteyi azaltmada herhangi bir ek yarar getirmez (daha fazla yan etki görülür)⁷⁵.

Klinik faydaları:

Bu hastalarda, valsartan en az bir ADE inhibitörü kadar klinik etkinliğe sahiptir⁷⁵.

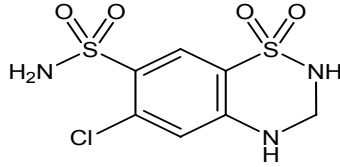
2.3 HİDROKLOROTİAZİT İLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

2.3.1 Kimyasal Özelliği

Hidroklorotiazit beyaz veya hemen hemen beyaz renkli, kokusuz, kristalize tozudur.

Kapalı formülü: $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

CAS No: 58-93-5



Şekil 12; Hidroklorotiazitin Kimyasal Yapısı

Kimyasal okunuşu: 6-kloro-3,4-dihidro-7-sülfamoil-2H-1,2,4-benzotiadin 1,1-dioksit; 6-kloro-7-sülfamil-3,4-dihidro-1,2,4-benzotiadin 1,1-dioksit; 3,4-dihidroklorotiazit; klorsülfonamitdihidrobenzotiadin dioksit; klorosültiadil⁶⁵.

2.3.2 Fiziksel Özellikleri

Molekül ağırlığı: 297,74 g/mol⁶⁵.

Suda az çözünür. Sodyum hidroksit çözeltisinde, n-butilamin ve dimetilformamitte rahatça çözünür. Metanolde çok az çözünür. Eter, kloroform, seyreltik mineral asitlerde çözünmez⁶⁴.

2.3.3 Hidroklorotiazitin Antihipertansif İlaçlardaki Yeri ve Önemi

En sık kullanılan diüretiklerdir. Ağız yolundan kullanılabilimleri, yaptıkları diürezin hızlı ve fazla olmaması, vücuttaki sodyumun fazlasını atmaları fakat aşırı derecede sodyum ve su kaybına neden olmamaları ve belirgin dehidratasyon yapmamaları, toksisitelerinin düşük olması ve antihipertansif etki de göstermeleri başlıca üstünlükleridir.

- Sülfonamid türevidirler ve yapısal olarak karbonik anhidraz inhibitörlerine benzerler. Diüretik etkileri asetozolamitden daha güçlüdür. Vücudun asit baz dengesini bozmazlar ve bozukluğundan da etkilenmezler.

- Distal tübülü etkilerler. Distal tübül hücrelerinin lümen tarafındaki $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ taşıyıcısını inhibe ederek Na^+ , Cl^- ve suyun reabsorbsiyonunu azaltırlar.

- K^+ salgılanmasını artırır; K^+ kaybı, nadiren tedaviyi gerektirir.

- Ca^{+2} reabsorbsiyonunu artırır. Kıvrım diüretiklerde ise, tersine Ca^{+2} atılımı artar⁶³.

Hidroklorotiazitin üstünlükleri

- Ağız yolundan alınabilimleri
- Yaptıkları diürezin fazla olmaması
- Toksisitelerinin düşük olması
- Antihipertansif etkisinin olması⁵⁹.

2.3.4 Elde ediliŖi

0,011 mol paraformaldehit ve 1000 ml’de 109,5 g hidrojen klorür içeren 0,5 ml etil asetat solüsyonu, 15 ml susuz dietilenglikol dimetileter solüsyonunun 2,9 g 5-kloro-2,4-disülfomol-anilin karışımı 80-90°C’ye getirilir ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilir. Sonuç karışım oda sıcaklığına getirilir ve düşük basınç altında suyla seyreltilir ve kristalize edilerek ayrılır. Ürün süzölür ve sudan rekristalize edilir. Erime derecesi 266-268°C ve verim de 1,4 g’dır⁷⁶.

0,84 g 1,1-dimetoksimetanın paraformaldehitte reaksiyonuyla aynı bileşik elde edilir⁷⁶.

2.3.5 Farmakokinetik Özellikleri

Hidroklorotiazitin gastrointestinal kanaldan absorpsiyonu verildiğı farmasötik Ŗekle ve verilen doza bağılı olarak değıŖkenlik gösterir. Sistemik biyoyararlanımı yaklaşık %50-60’tır. Etkisi oral yolla verildikten 2 saat sonra başlar ve doruk etki düzeyine 4 saatte ulaşır. Toplam etki süresi 6-12 saattir. Hidroklorotiazit plasentayı aşmasına rağmen kan-beyin engelini aşamaz. Anne sütüne geçebilir. Hidroklorotiazit metabolize olmaz ve esas olarak idrarla değıŖmeden atılır; verilen dozun %61’i 24 saatte elimine olur⁹.

2.3.6 Farmakolojik Özellikleri

Hidroklorotiazit böbreklerden metabolize olmadan elimine olur. Oral olarak alınan ilacın %61’i değıŖmeden 24 saat içinde atılır. Eliminasyon yarı ömrü 5,8-18,9 saat arasındadır. Kan-beyin bariyerini geçmez ama plasentayı aşar⁶⁴.

2.3.7 Klinik Kullanımı

Hidroklorotiazitin klinik kullanımı hakkında detaylı bir bilgi yoktur. Tiazit grubu diüretikler gibi kullanılır. Klinik kullanımları sayfa 33'de diüretik ilaçların klinik kullanımları alt başlığı içinde anlatılmıştır.

2.4 Valsartan-Hidroklorotiazit Kombine Tedavisinin Hipertansiyon Tedavisindeki Önemi

Tek ilaç ile kontrol edilemeyen hastalarda çeşitli kombinasyonlar kullanılır. En çok tercih edilen kombinasyon seçenekleri aşağıdadır:

Beta bloker + diüretik

ADEİ + diüretik

ATII reseptör antagonisti + diüretik

ADEİ + ATII reseptör antagonisti

Kalsiyum antagonisti + ADEİ

Bazı hasta guruplarında üçlü kombinasyonlar kullanılır.

Diüretik + β bloker + vazodilatatör veya kalsiyum antagonisti

Diüretik + ADEİ + kalsiyum antagonisti veya sempatolitik ilaçlar.

Kalsiyum antagonisti + ADE inhibitörü + sempatolitik veya β bloker⁷⁷.

Hipertansiyonda kan basıncı kontrolü için, genellikle birden fazla ilaç kullanmak gerekir. Tedaviye tek ya da birden fazla ilaçla başlama kararını verirken kan basıncının düzeyi, eşlik eden risk faktörleri ve hedef organ hasarının olup olmadığı gibi faktörler dikkate alınmalıdır. Daha sonra tedaviye alınan yanıtı göre ilaç dozları ya da ilaçlar değiştirilir, ek ilaçlar kullanılır. JNC VII (The Seventh Report of The Joint National

Committee) klavuzunun önerisi, başlangıçtaki kan basıncı düzeyi, hedef kan basıncına göre sistolik 20 mmHg, diyastolik 10 mmHg ya da bunun üzerinde bir değerde ise kombinasyon tedavisiyle başlanması yönündedir. Buna göre, diyabeti ya da böbrek hastalığı olanlarda 150/90 mmHg, olmayanlarda ise 160/100 mmHg ya da üzerindeki kan basıncı değerlerinde kombinasyon tedavisini düşünmek uygun olacaktır⁷⁸.

Kombinasyon tedavisinin prensipleri ağ ile balık avlamaya benzetilebilir⁷⁸.

- Ağ geniş bir alana atılmaktadır. Tedavinin başarı şansı daha yüksektir.

- Ağ fark etmeden daha fazla balık ağa takılır. Yan etkiler daha azdır.

- Ağ daha güçlüdür.

- Ağ beklenenden daha fazla balık yakalar. Farklı ilaç gruplarının birbirlerini tamamlayan ve her birine bağlı advers etkileri nötralize eden özellikleri vardır.

- Ağ farklı türlerden balık yakalar. Farklı ilaçlar spesifik hedef organlar üzerinde birbirini tamamlayan etkilere sahiptir.

- Fakat daha fazla, her zaman daha iyi demek değildir. Birçok yırtık ağ kullanılırsa balık kaçır. Hasta uyumu zorlaşır. Kombinasyon tedavisinde birbirine uygun ilaçların seçimi çok önemlidir⁷⁸.

1996 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan “Hipertansiyonun Kontrolü Raporunda” hastaların %50’sinden fazlasında iki veya daha fazla ilaç ile yapılacak kombinasyon tedavisine gereksinim olduğu bildirilmiştir⁷⁹.

8 ay ile 3 yıl süreyle yapılan günde 1 kez 160 mg /12,5 mg ve 320mg /25 mg valsartan-hidroklorotiazit içeren kombine ilaç verilen hipertansiyonlu hastalarda yapılan çalışmalar göre kan basıncını monoterapiye göre daha etkili bir düşüş olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada sonuç olarak valsartan-hidroklorotiazit kombinasyonu hipertansiyon kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin ilerlemesi sınırlamak açısından oldukça etkilidir⁸⁰.

Günde tek doz verilen çift kör paralel-randomize çalışmada 160 mg valsartan - 12,5 mg hidroklorotiazit ve 160 mg valsartan – 25 mg hidroklorotiazit kombinasyonuna karşı 160 mg valsartan monoterapisi kontrol edilmiştir. Sonuç olarak 4 hafta kontrol edilmiş hipertansiyonlu hastalarda valsartan-hidroklorotiazit kombinasyonunun daha etkin ve tolere edilebilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 65 yaş üstü hastalarda valsatan-hidroklorotiazit (160-25)'nin %70 daha verimli olduğu bulunmuştur⁸¹.

Son antihipertansif tedavi tüzüğüne göre kombinasyon terapileri tavsiye edilir. Örneğin 10 mg amlodipinle yapılan monoterapiye göre 160/25 mg valsartan-hidroklorotiazit kombine tedavisi daha etkilidir. Kardiyovasküler risk faktörü taşıyan veya buna eşlik eden sağlık sorunu olan hipertansiyonlu hastalarda 10 mg amlodipine karşı 160/25 veya 160/12,5 mg valsartan-hidroklorotiazitin damar sistemine daha yararlı ve daha düşük oranla advers etkiye sahip olduğu gösterilmiştir⁸². Kardiyovasküler risk faktörlerinden en yaygın olanı hipertansiyondur. Satış sonrası kesin tanı konmuş hipertansiyonlu hastalarda yapılan çalışmalarda 160/25 mg valsartan-hidroklorotiazitle yapılan kombine terapinin tolerebilitesi ve etkinliği araştırılmıştır. Sonuç olarak 160/25 mg valsartan-hidroklorotiazitin yüksek derecede etkin ve uygun güvenli bir profil çizdiği görülmüştür⁸³.

2.5 Valsartan-Hidroklorotiazit Miktar Tayini ile İlgili Çalışmalar

2000 yılında yapılan bir çalışmada tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiazitin miktar tayinlerini 5-10 µg/ml valsartan için ve 0,5-2,0 µg/ml hidroklorotiazit için kullanılan çalışma aralıklarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile yapmışlardır. Bu analizde ters faz Hypersil ODS kolonu ve asetonitril-asetat tamponu (0,1 M, pH 4,9) (40:60) karışımını hareketli faz olarak kullanmışlardır⁸⁴.

2001 yılında yapılan bir çalışmada kombine valsartan-hidroklorotiazit farmasötik dozaj formları tanımlamada ilk olarak ultraviyole spektrofotometresi ve HPLC kullanılmıştır. Birinci türev büyüklüğü ve ilaç konsantrasyonu arasındaki ilişkiye dayanarak valsartan-hidroklorotiazit için sırasıyla 270,6 ve 335 nm'de çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrisi hidroklorotiazit için 4.0–12.1 µg ml⁻¹, valsartan için 12.0–36.1 µg ml⁻¹ aralığında lineerdir. HPLC çalışması için mobil fazı pH:3,2 0,02 M fosfat tamponu:asetonitril (45:55) karışımı olan ters faz kolon kullanılmıştır. Her bir valsartan-hidroklorotiazit içeren ilaca karşı aynı konsantrasyonda internal standart hazırlanmış ve valsartan-hidroklorotiazit için sırasıyla 0,06-1,8 ve 0,07-0,5 µg ml⁻¹ aralığında lineer olduğu bulunmuştur. Bu yöntem bu ilaçlar için oldukça iyi bir cevap vermiştir⁸⁵.

2002 yılında yapılan bir çalışmada telmisartan, irbesartan, losartan, valsartan ve eprosartan için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde %5'lik metanol ile 5 mM potasyum dihidrojen fosfat, borik asitle 25:75 (h/h) (pH=5.0) oranında karıştırıp kullanılmıştır.

2002 yılında yapılan bir çalışmada losartan, telmisartan, eprosartan, valsartan, irbesartan ve kandesartan için kapiller zon elektroforez yöntemiyle validasyon ve optimizasyon işlemlerini uygulamışlardır. Yöntemde 60 mM sodyum fosfat tamponu (pH=2,0) kullanmışlardır⁸⁶.

2003 yılında yapılan bir çalışmada elektroforetik zon (CZE) ve miseller elektrokinetik kapiller kromatografik sistemde (MEKC) uygunluğu araştırılmıştır. Bu da eş zamanlı hidroklorotiazit ve anjiyotensin II reseptör antagonistlerini (kandesartan, eprosartan mesilat, irbesartan, losartan potasyum, telmisartan ve valsartan) tayin etmede kullanılmıştır. CZE ve MEKC metotları Hidroklorotiazit/ARA-II'nin kimyasal formülasyonlarını miktar ve kalite bakımından karar vermekte kullanılan uygun bir metottur. ARA-II'ye bağlı olarak bu kombinasyonda bu iki metodun en az biri kullanılabilir. Bu iki metodun doğruluğu, doğrusallığı, tekrarlanabilirliği valide edilmiştir⁸⁷.

2005 yılında yapılan bir çalışmada insan plazması ve idrarında anjiyotensin II reseptör antagonistlerinin katı faz mikroekstraksiyonu için bir polimonolitik kapiler (metakrilik asit-etilen glikol dimetakrilat, MAA-EGDMA) kullanmışlardır. HPLC yöntemi floresans dedeksiyon ile kandesartan, losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan miktar tayinlerine uygulanmıştır. Bu bileşikler için yakalama sınırı sırasıyla insan plazmasında ve idrarda 0,1-15,3 ng/mL ve 0,1-15,2 ng/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin uygulamasında doğrusal derişim çalışma aralığı telmisartan için 0,5-200 ng/mL, kandesartan ve irbesartan için 0,005-2 µg/ml, valsartan için 0,01-2 µg/ml ve losartan için 0,05-5 µg/ml olarak verilmiştir⁸⁸.

2006 yılında yapılan bir çalışmada kapiler elektroforez yöntemini insan idrarlarındaki antiotensin II reseptör antagonistlerin kantitatif tayinleri için kullanmışlardır. Bu yöntemde polimonolitik kapiler kolon kullanmışlardır. Yöntemde doğrusal çalışma aralığını 0,08-3,00 µg/ml, alt tayin sınırını ise 0,015-0,020 µg/ml olarak belirlemişlerdir⁸⁹.

2007 yılında yapılan bir çalışmada ise insan plazmasındaki valsartan-hidroklorotiazitin aynı anda kantitatif tayinini hızlı ve duyarlı bir şekilde yapan LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir⁹⁰.

2.6 UYGULANAN YÖNTEMLERLE İLGİLİ GENEL BİLGİLER

2.6.1 Kromatografi ile İlgili Genel Bilgiler

Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır⁹¹. Yüzlerce maddenin karışımı bile kromatografi yöntemiyle analiz edilebilir. Kromatografi terimi ilk olarak Mikhail Tswett tarafından 1906 yılında kullanılmıştır. Daha sonraları analitik çalışmaların birçoğunda kromatografi yer almıştır. Modern gaz ve sıvı kromatografisinin temellerini ise A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge (1941), buhar hareketli fazın sıvı hareketli faz kadar etkili kullanılabileceğini göstererek atmışlardır⁷.

Kromatografik ayırmada örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler. Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareket etmesi, sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengeleri, dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır^{8,9}.

Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adını taşıyan ve kromatografik kolondaki ayırma olaylarını matematiksel olarak tanımlayan bir eşitlik bulmuştur⁹³.

$$H=A+B/u+C$$

Eşitlik 1.1'de;

H: Tabaka yüksekliği(cm)

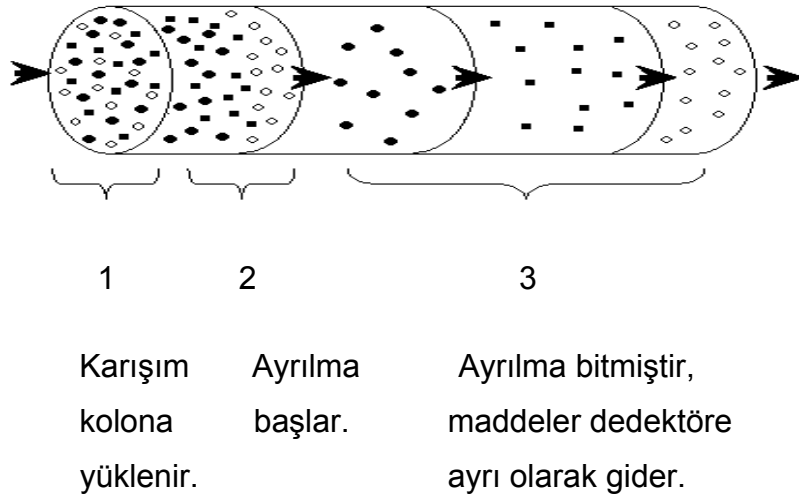
A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı,

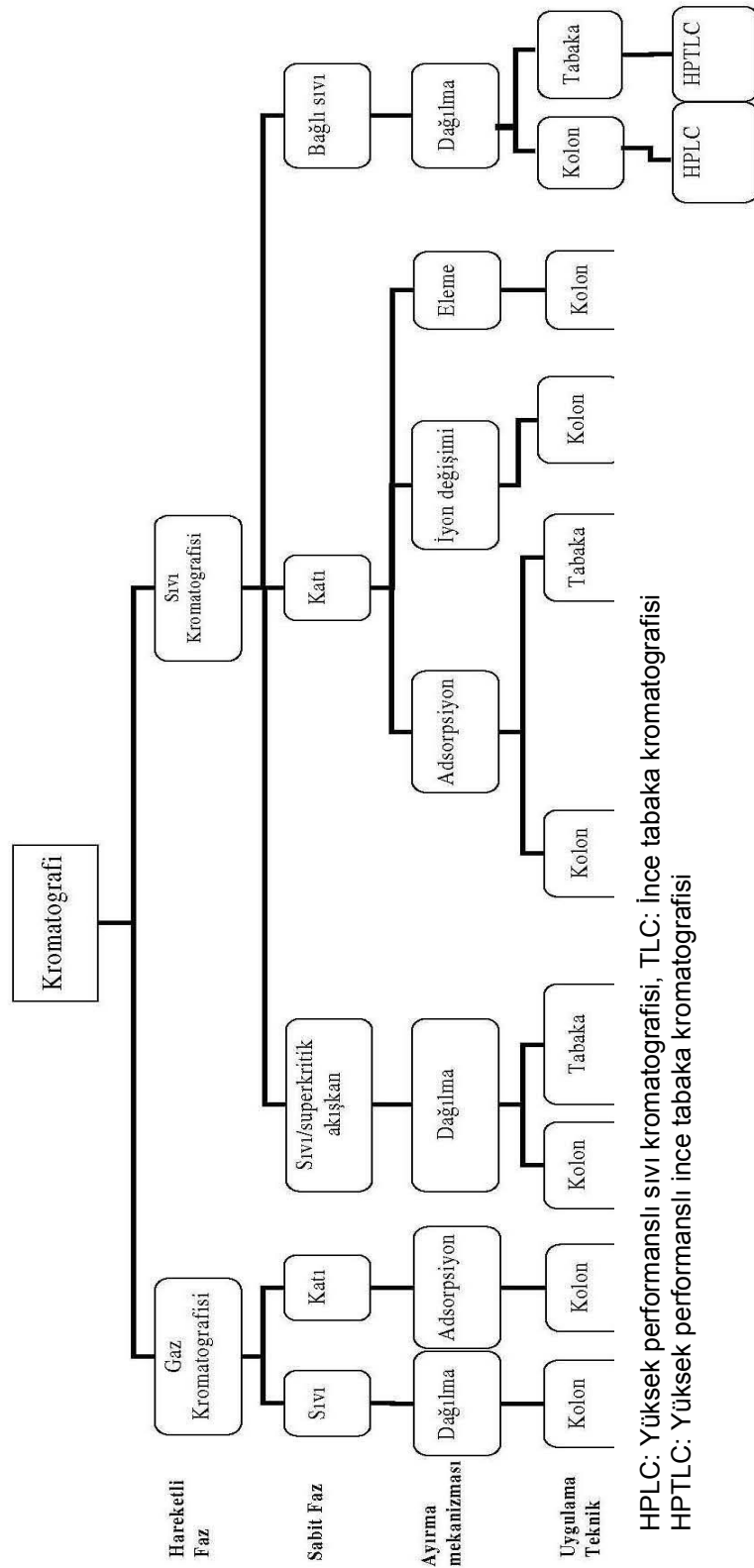
U: Çizgisel hız

Karışımında bulunan maddelerin kolon boyunca ayrılması ve hareketli faz akış hızıyla kolondan geçmesi Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13; Kromatografik Ayırımın Şematik Olarak Gösterilmesi

Kromatografi sistemi iki ana grupta toplanır; hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına bağlı olarak sıvı, süperkritik akışkan ve gaz kromatografisidir. Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına, sabit fazın katı ya da sıvı olmasına, kromatografik ayırımın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre isimlendirilirler⁹⁵.



Şekil 14; Kromatografik Sistemin Sınıflandırılması

2.6.1.1 Adsorpsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon; çözünmüş maddenin katı faz üzerinde tutunmasıdır. Desorbsiyon ise adsorbsiyonun tam tersidir. Bu kromatografi çeşidinde analiz edilen madde gaz halinde ise yöntem gaz-katı, sıvı halde ise sıvı-katı kromatografisidir. Adsorbsiyon özelliği gösteren maddelere adsorban denir ve burada tutunma yüzeyseldir. Adsorpsiyon sırasında çözücü içinde maddeler adsorbe ya da desorbe olabilir. Adsorbsiyon ve desorbsiyon hızlarının farkı toplam adsorbsiyon olarak tanımlanır. Adsorbsiyon ve desorbsiyon hızları birbirine eşit ise denge halindedir ve bu durumda madde kolonda sabit hızla ilerler. Sabit faz ile hareketli faz arasındaki bir A çözüneni için kütle aktarımı şu şekilde ifade edilebilir⁹⁰.

$$A_{\text{hareketli faz}} \Leftrightarrow A_{\text{sabit faz}}$$

Çözünen maddenin adsorbsiyon katsayısı veya dağılma katsayısı K; maddenin adsorbandaki molar derişiminin (C_1), maddenin hareketli fazdaki derişimine (C_2) oranı ile tanımlanır.

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

K değerinin büyük olmasının anlamı, karışım içindeki maddenin adsorban tarafından daha iyi tutunduğunu, karışım halinde olan K değeri daha düşük maddelere göre daha yavaş ilerlediğini gösterir. K değerinin küçük olması ise maddenin hareketli faza daha fazla ilgi duyduğunu göstermektedir⁹².

2.6.1.2 İyon Çifti Kromatografisi

Bu yöntemde dağılma kromatografisiyle ayrılmayan moleküllerin ayrılması sağlanır. İyon-çifti oluşturma kromatografisinde iyonlaşabilen ve iyonik moleküllere, hareketli faza eklenen uygun bir karşı

iyon ile iyon çifti oluşturularak lipofilik karakter kazandırılır ve sabit faza olan ilgi artar.

İyon çifti oluşturulan maddeler pik kuyruklamasını engellemeyi ve pik keskinliğini arttırmayı sabit faz üzerindeki artık silanol gruplarını örterek sağlarlar. Genelde iyon çifti maddesi olarak; tersiyer aminler, kuaterner aminler, alkil sülfonik asitler, alkil sülfonatlar kullanılır⁹⁶.

2.6.1.3 İyon Değişirme Kromatografisi

İyon değişirme kromatografisi tıpkı iyon-çifti kromatografisi gibi iyonik ya da iyonlaşabilen maddelerin ayrılmasında yararlanılan bir tekniktir. Bu kromatografide belirli pH değerlerinde iyon veya iyonik yapı verebilen moleküller (organik baz ya da organik asitler) ya da iyonik yapılar (K^+ , Na^+ , SO_4^{2-}) ayrılır. Sabit faz ile ayrılacak madde arasında iyonik bağ ne kadar kuvvetli ise o kadar güçlü bir alıkonma sağlanır. Sulu tuz çözeltileri ve az miktarda alkol içeren polar hareketli faz çözeltileri ile asitik ya da bazik gruplar bağlanmış sabit fazlar kullanılmaktadır.

Ayırım pK_a 'ya yani analizi yapılacak maddenin iyonik yapısına bağlıdır. Maddenin adsorblanmasından sonra desorbsiyon hareketli fazın pH değerinin ya da hareketli fazdaki tuz çözeltinin bileşiminin değiştirilmesiyle sağlanır. Peptitlerin ve proteinlerin ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir^(90,92-95,97,98).

2.6.1.4 Boyut Eleme Kromatografisi

Eleme kromatografisiyle ayırimda molekülün büyüklüğü önem taşır. Molekülün büyüklüğü hakkında da bilgi edinilebilir. Çözücünün viskozitesi çalışma sıcaklığında düşük olmalıdır ve seçilen hareketli fazın organik bileşiminin analiz edilecek örneği iyi dağıtması gerekir. Çözücü piki ise karışımındaki maddelerden sonra gelir. Çoğunlukla üç çeşit jel kullanılmaktadır; arojeller, zerojeller ve zerojel-arojeller⁽⁹²⁻⁹⁶⁾.

2.6.1.5 Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinir ve temelinde birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması ilkesi yatar. Sabit faz katı yüzey üzerinde kolon dolgu maddesi üzerine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasıyken, diğer sıvı hareketli fazdır. Karışımdaki maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi gerçekleşir. Burada maddelerin sabit fazdaki çözünürlükleri fazla, hareketli faz içerisindeki çözünürlükleri ise az olmalıdır. Yoksa maddelerin ayrımı gerçekleşmez ve hareketli faz ile beraber atılırlar.

Sabit faz ile hareketli faz farklı polariteye sahip olduklarında örnek molekülleri de farklı çözünürlüklere sahip olabilmektedirler. Bu iki fazın polarite farklılığına göre dağılma kromatografisi iki kısımda incelenebilir; bunlar ters-faz sıvı kromatografisi ve normal-faz sıvı kromatografisidir⁽⁹¹⁻⁹³⁾.

Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz sabit faza göre daha fazla polardır. En çok kullanılan kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel grup taşıyan sabit fazlardan biri ODS (18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan)'dır. Bunun yanı sıra fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirli (C₈, C₂ gibi), fenil ve siyano (CN) bağlanan sabit fazlar da kullanılır.

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz bileşeninin bir parçası olan tampon çözeltiler çok önemlidir. Bu çözeltileri hazırlarken suyun oldukça saf olması gerekir. Diğer önemli hareketli faz bileşenleri ise, suyla karışabilen organik çözücülerdir.

Ters-faz sıvı kromatografisinde genellikle apolar maddelerin ayrımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C₁₈) daha apolar

maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C_8 , C_2) ise daha polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Buna göre polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddelerde kısa zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar ⁽⁹²⁻⁹⁷⁾.

Normal-faz Sıvı Kromatografisi

Normal-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polaritesi sabit faz polaritesinden daha düşüktür. Polar sabit fazlar kullanılır. Hareketli faz içerisinde genelde metilen klorür, dietil eter, kloroform veya hekzan gibi polaritesi düşük çözücüler bulunmaktadır. En çok kullanılan sabit fazlar ise; silika ve alüminadır. Ters ve normal-faz sıvı kromatografilerinin farklılıkları Tablo 3’de verilmiştir ^(90,92,93,95-97).

Tablo 3; Ters ve Normal Faz Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması

	Ters-Faz Kromatografi	Normal-Faz Kromatografi
Sabit faz polaritesi Çözücü polaritesi Örnek ayrılma zamanı Çözücü polarite artışının etkisi	-Düşük -Ortadan yükseğe -Polar olanlar önce -Ayrılma zamanını artırır	-Yüksek -Düşükten ortaya -Düşük polarlar önce -Ayrılma zamanını azaltır

İlaçlar genellikle apolar yapıda oldukları için ters-faz sıvı kromatografisi, normal-faz sıvı kromatografisine göre daha çok tercih edilir. Bunun yanı sıra kromatografik ayırmada söz konusu olan karışımdaki maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi olayının etkisi, hareketli faz içerisine konulan çözücülerin ucuz olması, sulu tampon çözeltilerin oranının yüksek tutulması, uygulamanın ve sistem kontrolünün daha kolay olması gibi sebeplerden dolayı ters-faz sıvı kromatografisi tercih edilir.

Ters ve normal-faz sıvı kromatografide kullanılan sabit ve hareketli fazlar Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4; Ters ve Normal Faz Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Sabit ve Hareketli Fazlar

Sabit faz	Hareketli Faz
Normal-Faz Sıvı Kromatografisi	
β , β' -oksidipropionitril	Pentan, siklopentan, hekzan, izooktan, %10-20(v/v) kroroform, tetra hidro furan, asetonitril, dioksan
1,2,3,-Tris(2-siyanoetoksi)propan (Fraktonitril)	
Dimetilsülfoksit	İzooktan
Su-etilen glikol	Hekzan, karbontetraklorür
Etilendiamin	Hekzan
Su	Butanol
Nitrometan	Hekzan, karbontetraklorür
Ters-Faz Sıvı Kromatografisi	
Hidrokarbonlar	Metanol-Su
Dimetilpolisiloksan	Asetonitril-Su
ODS	Asetonitril/ Metanol/Su
CN	Asetonitril/ Metanol/Su
Fenil	Asetonitril/ Metanol/Su
C ₂	Asetonitril/ Metanol/Su
NH ₂	Asetonitril/ Metanol/Su

2.6.1.6 Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

HPLC dünya çapında birçok laboratuvarında 30 yılı aşkın süredir kullanılan ve ispatlanmış bir yöntemdir. Bu tekniği geliştiren öncü kullanımlardan biri de paketleme materyali olarak iyi, etkili bir ayırım sağlamasıdır. Ultra performans likit kromatografisi gelişim prensibi Van Deemter denklemiyle yönetilmiştir. Bu denklem lineer hız (flow rate) ve plate ağırlığı (HEPT veya kolon etkinliği) arasındaki ilişkiyi tanımlar. Bunların bir varyasyonu olan zerre ölçüsü kullanılır, çünkü Deemter eğrisi bunun kromatografik performansını araştırmakta kullanılır.

Van Deemter denklemine göre, zerre ölçüsü 2.5 µm azaldığında sadece etkinliğe önemli bir katkıda bulunur fakat bu etkinlik akış hızının veya lineer hızın azalmasını sağlamaz. Küçük zerreciklerin kullanılmasıyla, hız ve zirve noktası yeni limitlere genişletilmesiyle oluşan bu sistem ultra performans likit kromatografisi olarak adlandırılmıştır. Bu teknoloji kolonları küçük zerrelerle paketlemede ayırıcı olarak çalışan kromatografik prensiplerin tüm avantajını yüksek hızla, yüksek dalga oranı ve/veya süper resolüsyon ve hassaslıkla birlikte almıştır.

Alet teknolojisi, artan hızla güçlü resolüsyon ve küçük zerreciklerin hassaslık avantajları alınmıştır. Standart HPLC teknolojisi 2 µm parçacıklarının tamamen avantajını alma kapasitesine sahip değildirler. Tamamen yeni bir sisteme gereksinim duyulmaktadır. Bu sistem solvente ileri bir teknoloji de basit yönetim, oto örnekleme, dedektör bilgi sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Ultra performans likit kromatografisi küçük sistemler için bütünsel olarak tasarlanmıştır ve hacmi yerleştirip yayılmayı minimize etmek için küçük zerre teknolojisinin tamamen avantajını almıştır.

Terimsel olarak, ultra performans likit kromatografisi bulma oranındaki hassaslık, HPLC'ye oranla 2-3 zaman daha yüksektir. Bunun nedeni olarak da ortaya çıkarma tekniğinden bahsedilmektedir. MS

dedeksiyonu ultra performans likit kromatografisi ile kuvvetlendirilerek, düşük akıntı oranında kromatografik yayılmayı azaltarak zirve yoğunlaşmayı artırmıştır bununla beraber yüzey iyonizasyon etkinliğini hassaslık için de geliştirmiştir.

Ultra performans likit kromatografisi sistemi çift solvent yöneticisi, numune yöneticisi (kolon ısıtıcı dahil), dedektör, isteğe bağlı numune düzenleyicisinden oluşur. Çift solvent yöneticisi iki seri halinde akıntı pompası gibi kullanılır. Bunun nedeni de yüksek basınç altında paralel çift meyilli karışık sisteme iletebilmektir. Solvent seçici subaplar birden dörde kadar solvent seçiminde bulunabilirler. 2 µm zerrelerinden tam yararlanabilmek için burada yaklaşık 15000 psi (bu da 1000 bar civarında bir basınca denk gelmektedir) gereklidir. Numune yöneticisi bir çok teknolojik gelişmeyle de ilişkilendirilebilir. Baskı yardımcı örnek bilgileri kullanılarak enjeksiyon evresinde yayılmanın artması engellenebilir ve basınç tanımları kendi denetlik ve teşhis açısından kolaylık sağlamış olurlar. Enjeksiyon döngüsü yıkama olmadan 25 saniye ve ikili yıkama ile de 60 saniye azalma olur. Numune yöneticisi kolon ısıtıcısında kontrol etmektedir. Bir başka yönüyle de dedektör yeni elektronik dalga frekanslarını kullanarak ethernet iletişimi sağlar ve bu ultra performans likit kromatografisi için çok büyük önem taşımaktadır. Eğer uygun HPLC akıntı hücreleri kullanılırsa bu ultra performans likit kromatografisi hassaslığını sağlayacaktır. Dedektör dalga gösterici ışık hücrelerinden oluşur ve bunu optimal fibere dengelemeye çalışır.

Ultra performans likit kromatografisinin yeniden çözülmedeki hız bakımından önemli artıları bulunmaktadır. Daha kısa zamanda yaptığı resolüsyonla birlikte numune hakkında zarara uğramadan daha fazla bilgiye ulaşmamızı sağlamaktadır.

Kısacası, eğer ürün hakkında yeterli ya da çok bilgiye sahip olmak bize hem zaman kazandırır ve bugünün ilaç sektörünün en büyük

olmazsa olmazlarındandır. Ultra performans likit kromatografisi ilaç bulma başarısının gelişmesine de önemli katkıda bulunmaktadır. Hassaslık ve seçiciliği kuvvetlendirerek, hızlı cinsle ilgili meyil LC-MS baskın bir teknoloji halini almış ve miktar ve kalite bakımından analizlerin sayısının artmasına sebep olmuştur. Fakat artan deneylere ve çeşitliliğe rağmen analiz edilen maddelerin doğası gereği bunları talep edildikleri durumda tutmak gerekir. Beklenmeyen reaksiyon ve toksinler bir an önce fark edilmelidir çünkü bu hayli pahalı bir işlemdir.

Sonuç olarak; ultra performans likit kromatografisi 1,7 µm zerrelere ile birlikte kullanılmakta ve bütünsel olarak dizayn edilen sistem çok fazla ilgi sağlamakta ve aynı zamanda analiz süresini azaltmakta ve analizin birçok parçası için duyarlılığı artırmaktadır. Bir çok bilim adamının da kabul ettiği HPLC'nin ayrılma bariyeri oluşturması bir başka deyişle ayrılmayı yavaşlatması bugünün ultra performans likit kromatografisi tekniği ile kromatografik olarak genişletilmiş ve yayılmıştır. Ultra performans likit kromatografisi kimya ve ilaç sektöründe üretkenliği artırmış ve üretim için daha fazla bilgi, her ürün için daha detaylı bilgi, daha fazla duyarlılık ve çözünürlük hızını artırmıştır⁹⁹.

Ultra performans likit kromatografi sistemi bugünün en hızlı HPLC sisteminden 9 kat daha kısa sürede analiz yapar ve 2 µm altındaki tanecikleri ayırabilir. Bugün kullanılan herhangi bir HPLC sisteminden pik kapasitesi ve çözünürlüğü 2 kat, hassasiyeti 3 kat daha iyidir.

HPLC'de olduğu gibi ultra performans likit kromatografisinde de en önemli kısım kolonlardır. Bu kolonlar ters faz kolonlardır ve ultra performans likit kromatografisinin hassasiyetini, hızını, çözünürlüğünü göz önünde bulundurarak hazırlanmış kolonlardır. Bu kolonların ileri dolgu maddeleri hem organik (silika) hem inorganik (organosiloksan) olan ve hibrit partiküllerin yeni 2. jenerasyonudur¹⁰⁰.

Ultra performans likit kromatografisi kolonları olarak HSS (High Strength Silica) kolonları, BEH (Bridged Ethyl Hybrid) kolonları (C18 ve C8 kolonlar, shield RP18 kolonları, Fenil kolonlar, Hilic kolonlar, 150 mm uzun kolonlar) kullanılmaktadır.

HSS kolonları sadece %100 silika tanecikleri 15000 psi/1000 bar'a kadar ulaşmak niyeti ile test ve dizayn edilmiştir.

BEH kolonları:

C18 ve C8 kolonları ultra performans likit kromatografisi ayrılmasında geniş pH aralığı sağlayan universal kolonlar arasından seçilerek dizayn edilmişlerdir. Bunlar düşük pH stabilitesi üreten ve çok düşük kolon kanama seviyesine sahip olan üç fonksiyonlu ligand dokuları ile birleşmezken, 1,7 µm yüksek pH stabilitesine sahip zerreciklerle birleşerek geniş pH çalışma aralığı elde edilir. Shield RP18 kolonlar, BEH C18 ve C8 kolonlarının parçaları için seçicilik için dizayn edilmişlerdir. Bu seçicilik ve polar büyümesinden alınan mükemmel zayıf şekil, geniş pH aralığı ve BEH zerreciklerinin ultra etkin yapısı ile birleştirildiği zaman ultra performans likit kromatografisi için gerekli ve önemli gelişmeyi sağlayan bir araçtır. Fenil kolonlar seçiciliği, pH stabilitesini ve mükemmel zayıf şekli tamamlayıcı olarak zekice dizayn edilmiş kolonlardır. Bunlar fenil halkası ve silil fonksiyonel arasında kullanılan üç fonksiyonlu C6 alkil tether kolonlardır. Bu kolonlar ultra performans likit kromatografisine resolüsyon ve seçicilikte yeni bir boyut kazandırmıştır. Hilic kolonlar dayanıklı 1,7 µm BEH tanecikleri içerir. Bunları korumak ve ayırımını sağlamak amacıyla dizayn edilmişlerdir. Bu kolonlar optimize edilerek etkin bir şekilde yeniden üretilmek için ultra performans likit kromatografisinde test edilmiştir. Geniş pH aralığında dayanıklıdır ve uzun ömrü vardır. 150 mm uzun kolonlar ise daha sağlam ayrılma ve kararlılığın iletilmesine çözüm olarak üretilmişlerdir¹⁰¹.

En önemli özelliği kromatografik laboratuvarlarda izlenebilirlik özelliğinin olmasıdır. Her bir ultra performans likit kromatografisi kolonu sadece enjeksiyonları kaydetmez ayrıca basıncı, sıcaklığı da kaydeder¹⁰².

HPLC'den ultra performans likit kromatografisine metot transferi olabilmektedir. Başarılı bir likit kromatografisi transferi için arzu edilen seçiciliğin korunması ya da artırılması ile mümkündür. Bu metot transferi için dikkatli düşünme ve konunun anahtar parametreleri hakkında geniş bir bilgi düzeyine sahip olmak gereklidir. Bunlar kolon çeşitliliği, sistem hacmi, enjeksiyon hacmi, analitik moleküler ağırlığı vb¹⁰¹.

2.6.2 Analitik Metot Geliştirme İle İlgili Bilgiler

Yöntem performansı esas olarak işlemin kendi kalitesi ile saptanır. Bir yöntemin saptanmasında en önemli iki faktör seçicilik, geri kazanım ve standardizasyondur¹⁰³.

Bir yöntemin analitik geri kazanımı, bir analitik yöntemin bir analizdeki tüm örnekler için yanıt oluşturup oluşturmadığını ifade eder¹⁰⁴. Matriks ve saf çözücünün deney sonuçları bağıl geri kazanımı; gerçek geri kazanım testlerinin sonuçları ise mutlak geri kazanımı gösterir¹⁰².

Bir analitik metodun geliştirilmesinde atılan ilk adım, aynı veya benzer ekipmanı kullanan var olan metot veya literatür araştırması yapmaktır. Yeni veya ileri bir metodun geliştirilmesinde genellikle var olan yaklaşım; ekipmana, çalışılacak örneğe, hedeflere ve metodun gerekliliklerine göre uygulanır. Metot gerekliliklerinin seçilmesi ve ne tür ekipmanın neden seçileceğine karar verilmesi metot geliştirmedeki ana ilkelerdir. Bunun yanında kolon, hareketli faz, dedektör ve miktar tayini yöntemi de karar verilmesi gereken olgulardır.

Var olan metottan her zaman beklenen sonuçlar alınamayabilir. Var olan metotlar hatalı olabilir veya güvenilirliği düşük

olabilir. Pahalı, uzun zaman ve enerji isteyen veya rutin kullanıma uygun olmayan metotlar olabildiği gibi söz konusu örneklerde yeterli duyarlılık veya örnek seçiciliği göstermeyebilir. Analitik verilerin doğruluğunun ve kesinliğinin yeni ekipman ve tekniklerin ortaya çıkması ile artırılabilceği düşünüldüğünde kısacası daha duyarlı, hassas, kesin, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu, ekonomik ve kısa süren, uygulanabilirliği kolay ve sorunsuz yeni metot geliştirme arayışı her zaman var olacaktır¹⁰⁵.

Gerekli ekipmanlar hazırlandıktan ve analitik parametreler düşünüldükten sonra metodun geliştirilmesinde optimizasyon sağlanabilmesi için standartlar kullanılmalıdır. Duyarlılık dahil olmak üzere ilk analitik sonuçlar araştırılmalı ve enjekte edilen miktara karşılık alınan cevaplar ölçülmelidir. Bunlar teşhis sınırı, tayin sınırı, kalibrasyon noktalarının doğrusallığı, varsa çoklu dedektör oranlarıdır. Metot geliştirmenin yalnızca iyi saptanmış, özellikleri tanımlanmış ve saflığı bilinen analitik standartlar kullanılarak yapılması önemlidir¹⁰⁵.

İlk analiz sonuçlarını elde etmek için metot seçicilik, doğruluk, kesinlik, teşhis ve tayin sınırları, doğrusallık ve aralık açısından optimal düzeye getirilmelidir. Karşılanması gereken başka optimizasyon parametreleri de vardır (dayanıklılık gibi) fakat ölçüm ve değerlendirmeleri metot validasyonunda daha iyi yapılabilir¹⁰⁴.

Analitik yöntem geliştirilirken örneğin sentez yöntemi, saflaştırma yöntemi, çeşitli pH değerlerindeki davranışı, ekstraksiyon çözeltileri ile geçimsizliği, stabilitesi, fonksiyonel grupların reaksiyonları, çözünürlüğü, molekül ağırlığı ve yapısı, spektrumu, benzer yapıda ve özelliklerdeki diğer maddeler, impüritesi, parçalanma ürünleri, metabolitleri, depolanma şartları gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerinin, farmakokinetiğinin iyi bilinmesi gereklidir¹⁰⁶.

2.6.3 Analitik Metot Validasyonu İle İlgili Bilgiler

Sağlık alanında kullanılan analitik yöntemlerden, ilaç analizlerinde, biyolojik numune analizlerinde, biyoeşdeğerlik-biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde yararlanılmaktadır.

Yöntem validasyonu analitik işlemlerin istenilen kullanım için uygunluğunu gösteren parametrelerdir. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon parametrelerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin veya parametrelerinde ufak değişiklikler yapılmış bir yöntemin geçerli olabilmesi için mutlaka gerekli validasyon testlerinin ve ilgili hesapların yapılmış olması gereklidir^{94,104,107-119}.

Validasyonun genel işlemleri;

1. Cihazın kontrolü ve validasyonu (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir),

2. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan validasyon,

3. Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT). Bu testler FDA ve USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir.

Bir analitik yöntemin validasyonu; laboratuvar çalışmaları ile belirlenen ve istenen analitik uygulamaları için gerekli yöntem performans parametrelerinin bulunmasıdır. Bunlar analitik parametreler cinsinden ifade

edilir. Bu parametreler hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir ^{94,106,108,109-120}.

Bir biyoanalitik metodun validasyonunun yapılmasındaki sebep, performans ve güvenilirliğini göstermektir. Eğer biyoanalitik metotların sonuçları yeni ilaç başvurusunda veya formülasyon yenilemede kullanılacak ise mutlaka validasyon yapılmalıdır. Biyoanalitik metot validasyonu, bir örneğin ya da örnek serisinin konsantrasyonunun özel bir biyolojik matrikste nicel olarak saptanması için kullanılan metodun bu amaç için güvenilir olduğunun gösterilmesi için gerekli işlemlerin tümünü içerir ^{121,122}.

Validasyon için istenen parametreler Tablo 5'te verilmiştir ;

Tablo 5; Validasyon İçin İstenen Parametreler

Özgünlük(Specificity)/Seçicilik (Selectivity)	FDA, USP, ICH
Doğruluk (Accuracy)	FDA, USP, ICH
Keskinlik (Precision): Tekrarlanabilirlik (Repeatability) Ara Keskinlik (Intermediate Precision) Yenilenebilirlik (Reproducibility)	FDA, USP, ICH ICH ICH ICH*
Tespit Limiti (LOD)	USP, ICH
Miktar Tayini Limiti (LOQ)	FDA, USP, ICH
Doğrusallık (Linearity)	FDA, USP, ICH
Aralık (Range)	USP, ICH
Tutarlılık (Ruggedness)	USP
Sağlamlık (Robustness)	FDA, USP, ICH*
Stabilite (Stability)	FDA
Gerikazanım (Recovery)	FDA

Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin örnekte bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğerk yardımcı veya etkin maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etkin madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin veya plasebo bileşenlerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan derişimleri arasındaki fark olarak ifade edilir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değılse, yöntemin doğruluğı, kesinliğı ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır⁹⁵.

Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır. Kütle spektroskopisi ile birleştirilmiş yöntemlerin kullanılması durumunda girişimin olmadığı kabul edilir.

Seçicilik 2 yolla saptanır:

i- Tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin girişim yapma oranına veya ayırma yöntemlerinde, “Ayırım Gücü” (R_S) değıerlerine bakılır. Bu değıer ayırma yöntemleri için $R_S \geq 2,0$ olmalıdır.

ii- Ayırma yöntemlerinde duyarlı bir dedektör seçilebilir. İncelenecek bileşiğe cevap verme yeteneğine sahip olan dedektörler Elektrokimyasal veya Radyoaktivite dedektörleridir. Bu dedektörler belli maddelere duyarlıdır ve başka maddelerin girişim yapma ihtimalini yok ederler⁹⁵.

Doğruluk

Bir analitik metodun doğruluğu metot ile elde edilen ortalama test sonuçlarının analitik gerçek değerine (konsantrasyon) yakınlığı ile tanımlanır. Doğruluk, bilinen konsantrasyonda örnek içeren numunenin tekrar analizleri ile tespit edilir. Doğruluk her konsantrasyon için en az beş ölçüm ile belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gerekir. Ortalama değer gerçek değer $\pm$ %15 sınırı içinde olmalıdır. Ölçülebilen en düşük limit için %20'den fazla sapma göstermemelidir. Ortalama değer gerçek değerden sapma oranı doğruluk ölçütüdür¹⁰.

Kesinlik

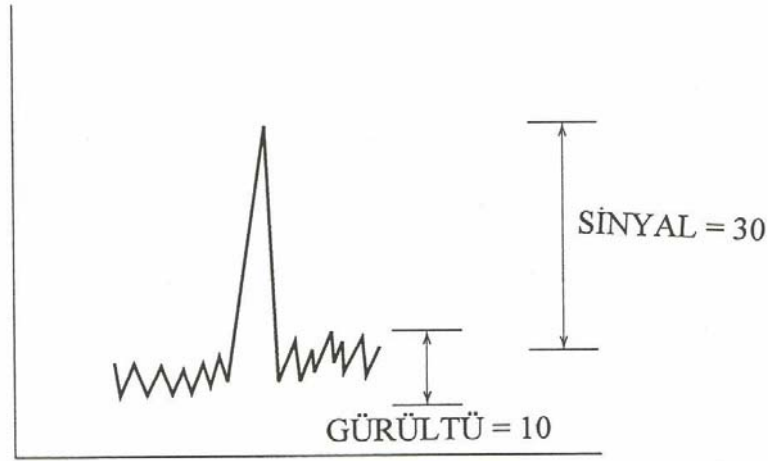
Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında örnek için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. Her konsantrasyon için beş ölçüm belirlenir. Belirlenen aralıkta en az üç konsantrasyon gereklidir. Her konsantrasyon düzeyinde saptanan kesinlik varyasyon katsayısının %15'ini, ölçülebilen en düşük limit için %20'sini geçmemelidir. Kesinlik; tek analiz işleyişi sırasında kesinlik tespitinde gün içi, seriler arası kesinlik ve verimlilik, kesinliğin zamanla belirlenmesi durumunda günler arası, seriler arası kesinlik ve verimlilik alt gruplarına ayrılır ve değişik analistler, ekipmanlar, reajanlar ve laboratuvarlar içerebilir¹²³.

Teşhis Sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin belirttiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan, yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak Sinyal/Gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır. Hesaplama yolu ile teşhis sınırı saptanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılır.

$$LOD = 3.3 \times SS / m$$

Bu eşitlikte SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. LOD sinyal/gürültü oranı Şekil 15'te verilmiştir¹²⁴.



Şekil15; LOD'de Sinyal/Gürültü Oranı Şekli

Miktar Tayini Limiti (LOQ)

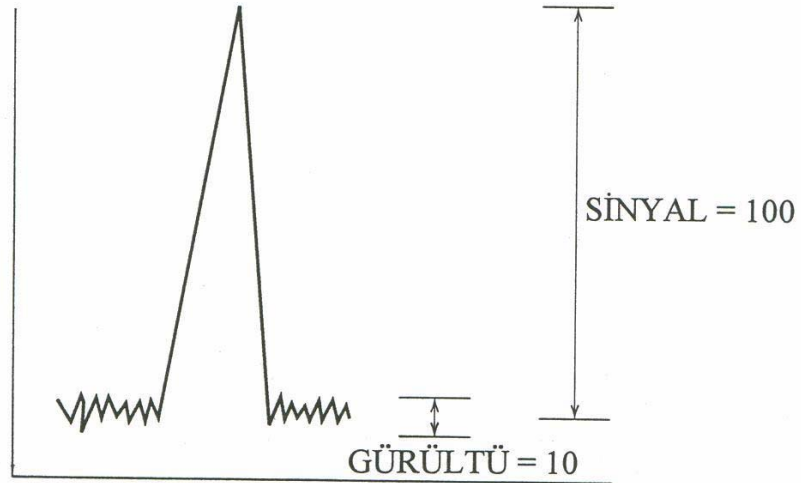
Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesaplama bulunabilir.

Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tespiti için genel olarak Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır. Hesaplama yolu ile tayin alt sınırı saptanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılır.

$$LOQ = 10 \times SS / m$$

Bu eşitlikte; SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. LOQ sinyal/gürültü oranı Şekil 16'da verilmiştir¹²³.

SS ve m değerleri LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.



Şekil16; LOQ'da Sinyal/Gürültü Oranı Şekli

Biyolojik sıvılarla çalışılırken LOQ'yu belirlemek için aşağıdaki şartların yerine gelmesi gerekir:

- a- Örneğin LOQ'daki derişimi için cihazdan ölçülen cevap kör için ölçülen cevabın en az 5 katı olmalıdır.
- b- Örnek için gözlenen pikin veya alınan cevabın tanımlanabilir ve diğer girişim yapma ihtimali bulunan maddelerden

ayrı olması gerekir. Ayrıca % 20 kesinlik ve % 80-120 doğrulukta tekrar edilebilir olmalıdır¹²³.

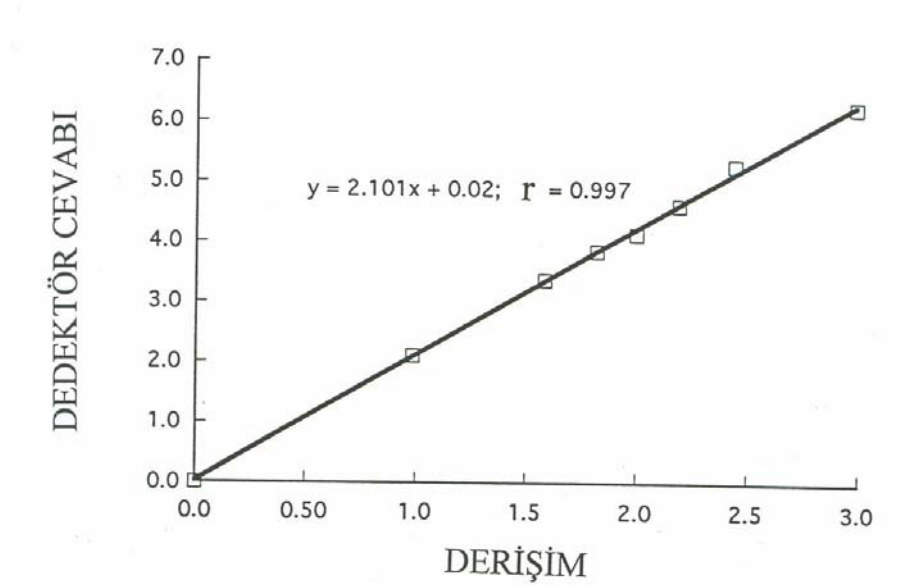
Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğrusal olarak değişmesi ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametredir. Örnek derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı $r = 0,999$ ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz edilmesi gerekir. Bu derişimin alt sınırı hedef seviyenin %50 sinden düşük ve üst sınır da %150 sinden yüksek olacak aralıkta seçilmelidir. Bu 5 değerle yapılan doğrusallığın saptanması işleminin en az 3 defa tekrarlanması gerekir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin %Bağıl Standart Sapmaları (%BSS) veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir¹²³.

Kalibrasyon Eğrisi (Grafığı)

Örneğin bilinen derişimleri ile değişen değişkenin cevapları arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve Tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için (kör hariç) cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur. Kalibrasyon eğrisi Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 17: Kalibrasyon Eğrisi Eşitliği ve Grafiği

Biyolojik sıvılarla çalışılırken kalibrasyon eğrisi oluştururken aşağıdaki kriterlerin yerine gelmesi gerekir:

- a- Tayin alt sınırı derişiminden elde edilen cevaplar arasındaki sapma %20 den fazla olmamalıdır.
- b- Tayin alt sınırı derişiminin dışında seçilen standart derişimlerden elde edilen cevaplardaki sapmalar % 15'den fazla olmamalıdır (FDA regülasyonu).

Tutarlılık

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından; aynı laboratuvarında farklı cihazlar tarafından; farklı laboratuvarında gerçekleştirilmesi; reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi; farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test

şartlarının değiştirilmesi; aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir¹²³.

Sağlamlık

Sağlamlık değerlendirilmesi, daha çok metot geliştirme safhasında göz önünde bulundurulur ve çalışmada kullanılan prosedüre bağlıdır. Bu durum metot parametrelerindeki bilinen varyasyonlara göre analizin güvenilirliğini gösterir.

Analitik koşullardaki ölçümler varyasyonlara duyarlı ise, analitik koşullar uygun şekilde kontrol edilmeli veya prosedürde önlemler yer almalıdır. Sağlamlığın değerlendirilmesinin tek amacı sistem uygunluk parametrelerinin incelenerek analitik yöntem her uygulandığında valide olduğunun kanıtlanmasıdır. Tipik varyasyon örnekleri analitik çözeltilerin stabilitesi ve ekstraksiyon süresidir. Sıvı kromatografide tipik varyasyon örnekleri ise mobil faz bileşimi, pH etkisi, farklı kolonlar, ısı ve akış hızıdır¹²⁵.

Stabilite

Stabilite çalışmaları saklama, nakliye, dağıtım ve kullanım sürecinde etkin maddenin veya ürünün maruz kalabileceği koşullara benzeyen ve önceden belirlenmiş çevre koşullarında yürütülür.

Uzun dönem stabilite çalışmaları için test sıklıkları etkin maddenin stabilite profilini kanıtlamaya yeterli olacak şekilde olmalıdır. İlaç etkin maddesi için önerilen re-test periyodu en az 12 aydır. Uzun dönem saklama koşulları için test sıklığı normalde ilk yıl için her üç ayda bir, ikinci yıl için her altı ayda bir ve sonra önerilen re-test periyoduna kadar yılda bir kezdir.

Hızlandırılmış saklama koşulları için altı aylık çalışma için başlangıç ve son periyot dahil minimum üç kez önerilmektedir.

Hızlandırılmış koşullardaki çalışmaların sonuçlarından beklentilere bağlı olarak, kriterlerde belirgin değişimler bekleniyorsa, test sıklığı artırılabilir, çalışma planında ya son periyoda numune eklenerek iki kez çalışılır ya da bir periyot daha ilave edilir¹²⁶.

Hızlandırılmış saklama koşullarında belirgin değişiklikler olduğu zaman ara dönem saklama koşulları incelenir, başlangıç ve son dahil 12 ayda minimum dört periyot önerilir.

Stabilite çalışmalarının amacı, ilaç etkin maddesinin minimum üç serisine ait yapılmış olan stabilite çalışmalarını esas alarak ve stabilite bilgilerini değerlendirerek (uygun fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik testlerin sonuçlarını içerir), ilaç etkin maddesinin aynı koşullar altında üretildiği zaman, daha sonra üretilecek serilerin tümü için uygun bir re-test periyod belirlemektir. Seriler arasındaki değişkenlik derecesi üretilecek serilerin re-test tarihine kadar belirlenen spesifikasyonlar içerisinde kalma güvenilirliğini etkiler¹²⁶.

Geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; alçak (tayin alt sınırında veya yakın derişiminde), orta (çalışma derişim aralığının ortasında yer alan bir derişimde) ve yüksek (çalışma derişim aralığının üst sınırlarında veya yakınında yer alan bir derişimde) derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır. Bu tayinlerden minimum 3 tanesi ortalama değerin %15'inden daha fazla sapma göstermemelidir. Tayin alt sınırındaki derişim için bu sapma %20'yi geçmemelidir¹¹⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN CİHAZ VE EKİPMANLAR

3.1.1 Enstrumental Kısım

Kısımları aşağıda belirtilen Waters AQUITY UPLC kullanıldı:

- UPLC pompası (Aquity)
- PDA dedektör (Aquity)
- Otomatik örnekleyici (Aquity)
- Kolon (Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 μ m)
- pH metre (WTW pH 526)
- Ultrasonik banyo (Bandalin sonorex)
- Hassas terazi (Mettler)
- Saf su cihazı (Sartorius)
- Software (Empower)

3.1.2 Cam Ve Diğer Malzemeler

- Balon joje (20ml, 100ml) (İsolab)
- Mezur (1000ml, 2000ml) (İsolab)
- Beher (İsolab)
- Enjektör (5ml, 10ml) (Ayset)
- Cam pipet (2ml) (Schott)
- 0.45 μ m PTFE filtre (Wattman)

3.1.3 Kimyasal Maddeler

- Valsartan (Teva)
- Hidroklorotiazit (Unichem)
- Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4 , JT. Baker)
- Fosforik asit (H_3PO_4 , JT. Baker)

- Asetonitril (CH₃CN, JT. Baker)
- Milli-Q saf su

3.2 SİSTEMİN HAZIRLANMASI

3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

pH:2,5 fosfat tamponu= 156 mg sodyum dihidrojen fosfat dihidrat 1 litre saf suda çözülerek pH'sı fosforik asitle 2,5'a ayarlanır. 0,45 µm'lik filtreden süzülür ve degaze edilir.

Hareketli faz A çözeltisi= Asetonitril

Seyreltme çözeltisi= Asetonitril:pH 2,5 fosfat tamponu (60:40)

Standart Çözeltisi= Kesin olarak tartılmış 160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balon jojeye alınır. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklendikten sonra ultrasonik banyoda 10 dk tutulur. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 ml alınarak 20 ml'lik balonjojeye konulur ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 µm'lik teflon filtreden süzülerek vialle alınır.

Test Çözeltisi= Minimum 20 tablet alınır ve toz haline getirilir. 160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazite eşdeğer tablet tozu tartımı 100 ml'lik balonjojeye alınır. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklendikten sonra ultrasonik banyoda 10 dk bekletilir. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 µm'lik teflon filtreden süzülür. Bu çözeltiden 2,0 ml alınarak 20 ml'lik balonjojeye konulur ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. 0,45 µm'lik teflon filtreden süzülerek vialle alınır.

3.2.2 Sistemin Hazırlanması

Ultra performans likit kromatografisi sistemine valsartan-hidroklorotiaziti enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve kanallarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla öncelikle deiyonize su ve kromatografik saflıkta asetonitril geçirilir. Bu işlem aynı zamanda bir önceki

analizden kalan hareketli fazın temizlenmesi amacıyla da yapılır. Daha sonrasında hareketli fazın kolondan geçirilmesi sağlanır. Böylece kolon ve sistem uygun hale getirilir.

Sistem kapatılırken kolonun temizlenmesi için ilk olarak saf su, daha sonra asetonytril ve en son aşamada asetonytril ve saf su birlikte geçirilir.

3.3 KROMATOGRFİK ŞARTLAR

Analitik Kolon	: Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm
Hareketli Faz A	: Asetonitril
Hareketli Faz B	: Sodyum Dihidrojen Fosfat pH:2,5 Tamponu
Akış Hızı	: 0,4 ml/dk
Akış Süresi	: 5 dk
Dedektör	: 280 nm
Kolon Sıcaklığı	:25°C
Numune Sıcaklığı	:25°C
Enjeksiyon Hacmi	:2 µL

Gradient Programı:

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Hareketli faz A	Hareketli faz B
0	0,4	5	95
3	0,4	90	10
3,5	0,4	5	95
5	0,4	5	95

3.4 ANALİZ SERTİFİKALARI

Biyolojik matrikste ilaç ve metabolitlerinin analizi, kalibrasyon standardı ve kalite kontrol numunelerinin kullanımı ile gerçekleştirilir. Bu numunelerin hazırlanmasında kullanılan referans standardın saflığı çalışma standartlarını etkileyebilir. Bu yüzden bilinen konsantrasyonda çözelti hazırlamak için bilinen yapıda ve saflıkta onaylanmış analitik referans standart kullanılmalıdır. Mümkünse referans standart örneğe benzer olmalıdır. Mümkün değilse de bilinen saflıkta ispatlanmış kimyasal formda maddeler kullanılabilir. Genellikle üç tip referans standart kullanılır;

1. Sertifikalı referans standartlar,
2. Ünlü ticari kaynaklardan elde edilen ticari kaynaklı referans standartlar,
3. Analitik bir laboratuvar veya ticari olmayan kurumlar tarafından özel sentezlenen bilinen saflıktaki diğer materyaller.

Her referans standart için kaynak ve lot numarası, son kullanma tarihi varsa analiz sertifikaları ve/veya dahilen ve haricen üretilmiş saflık ve yapı kanıtları bulunmaktadır¹²³. Şekil 18’de valsartanın analiz sertifikası Şekil 19’da ise hidroklorotiazitin analiz sertifikası verilmiştir.

PRODUCT
SPECIFICATIONS
AND
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 1 of 3

Product Name: Valsartan	Order No.: AU80030501
Control No.: 289590008	Customer Name: Nobel Ilac Sanayii ve Ticaret A.S.
Quantity: 20.000 Kg	Original Analysis Date: 20-March-2008
Manufacturing Site: TEVA-TECH	Last Analysis Date: 17-April-2008
Manufacturing Date: January 2007	Re Test date: January 2011

Packaging and storage: Preserve in tight containers ,packed with desiccant.

TESTS AND METHODS	SPECIFICATIONS	RESULTS*
IN-HOUSE for EUROPE TESTS		
Description	White to off-white powder.	Conforms
Identification by IR	The Infrared absorption spectrum of the material exhibits maxima only at the same wavelengths as that of a similar preparation of the reference standard.	Conforms
EP<2.2.24>		
Identification by HPLC	The retention time of the standard preparation is essentially the same as the Assay sample preparation.	Conforms
2895-IH-EUR		
Identification by XRD	Amorphous	Conforms
2895-IH-EUR		
Water (by KF)	Not more than 2.0%	1.2%
EP<2.5.12>		
Assay (by HPLC)	98.0%-102.0%(on anhydrous basis)	99.1%
2895-IH-EUR		
Sulphated Ash	Not more than 0.20 %.	0.02%
(EP<2.4.14>)		
Heavy metals	Not more than 10ppm	Less than 10ppm
(EP<2.4.8>Method C)		
Enantiomeric Purity		
2895-IH-EUR		
D-Valsartan	Not more than 1.0%	Less than 0.3%

PRODUCT
SPECIFICATIONS
AND
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 2 of 3

Product Name: Valsartan	Order No.: AU80030501
Control No.: 289590008	Customer Name: Nobel Ilac Sanayii ve Ticaret A.S.
Quantity: 20.000 Kg	Original Analysis Date: 20-March-2008
Manufacturing Site: TEVA-TECH	Last Analysis Date: 17-April-2008
Manufacturing Date: January 2007	Re Test date: January 2011

Packaging and storage: Preserve in tight containers ,packed with desiccant.

TESTS AND METHODS	SPECIFICATIONS	RESULTS*
IN-HOUSE for EUROPE TESTS		
Chromatographic purity (by HPLC) 2895-IH-EUR Butyryl VLS (Compound B) Iso-Leucine VLS ALA-VLS (RRT=0.58) Any Impurity Total	Not more than 0.15% Not more than 0.15% Not more than 0.15% Not more than 0.10% Not more than 0.50%	0.06% Less than 0.03% 0.04% 0.03% 0.13%
Residual Solvents 2895-RS Total of Ethyl Acetate & Acetone	Not more than 5000 ppm.	4004ppm
IN-HOUSE PHYSICAL PROPERTIES TESTS		
Particle size distribution** "By lazer diffraction"	d(0,1) d(0,5) d(0,9)	0.5µm 3.7µm 12.0µm
Bulk density**		0.218g/cm ³
Tapped density**		0.298g/cm ³

Remarks:

- Conforms to the requirements of the IN-HOUSE for EUROPE and IN-HOUSE PHYSICAL PROPERTIES Specifications.
- None of the Class 1 solvents mentioned in the USP <467>, including Benzene, are used in our process used to manufacture the product.
- ** Specification to be established.

Page 3 of 3	
PRODUCT SPECIFICATIONS AND CERTIFICATE OF ANALYSIS	
Product Name: Valsartan	
Control No.: 289590008	Order No.: AU80030501
Quantity: 20.000 Kg	Customer Name: Nobel Ilac Sanayii ve Ticaret A.S.
Manufacturing Site: TEVA-TECH	Original Analysis Date: 20-March-2008
Manufacturing Date: January 2007	Last Analysis Date: 17-April-2008
	Re Test date: January 2011
Packaging and storage: Preserve in tight containers ,packed with desiccant.	
Released by Quality Control Manager: Carmi Shay	Signature**: PP\Alla Ginzburg 17 April 2008 18:54:55 Print Date: 17 April 2008

(*) Upon completion of the 'Results' column this document becomes a certificate of analysis

End of C.O.A.

(**) This document was signed electronically and this is the manifestation of the electronic signature.

Şekil 18: Valsartan Analiz Sertifikası



UNICHEM
LABORATORIES LTD.

Plot No. 99, M.I.D.C., Dhatav, Roha, Dist. Raigad - 402 116. (India)
Phone : ++91-2194-263561, 62, 49.
Fax : ++91-2194-263545

Certificate Of Analysis

Product : HYDROCHLOROTHIAZIDE Ph. Eur./BP
Batch No. : HCT/50211
Mfg. Date : FEBRUARY 2005
Exp. Date : JANUARY 2010

A. R. No. : FP/50182
Release Date : 18.02.2005
Batch Size : 250.65 Kgs.

Sr. No.	Test	Specification	Results
1.	Characters	A White or almost white, crystalline powder. Very slightly soluble in water, soluble in acetone, sparingly soluble in alcohol. It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides.	Almost white, crystalline powder, Very slightly soluble in water, soluble in acetone, sparingly soluble in alcohol. It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides.
2.	Identification		
B.	By IR	The absorption maxima in the sample spectrum correspond in position and relative intensity to the reference spectra.	The absorption maxima in the sample spectrum correspond in position and relative intensity to the reference spectra.
3.	Acidity or alkalinity	Not more than 0.4 ml of 0.01M HCl is required.	0.20ml of 0.01M HCl is required.
4.	Sulphated ash	Not more than 0.1% w/w	0.05% w/w
5.	Loss on drying	Not more than 0.5% w/w	0.14% w/w
6.	Chlorides	Not more than 100 ppm	Less than 100 ppm
7.	Related Substances (By HPLC)		
	• Impurity A	Not more than 0.2%	0.02%
	• Impurity B	Not more than 0.1%	0.07%
	• Impurity C	Not more than 0.5%	0.22%
	• Any other individual related substance	Not more than 0.1%	0.05%
	• Total related substances	Not more than 1.0 %	0.36%
8.	Assay (On dried basis)	Between 98.0% & 102.0%w/w	100.52% w/w
	Additional Test		
1.	Residual solvents (By GC)		
	• Methanol	Not more than 500 ppm	53.27 ppm.
	• Methyl isobutyl ketone	Not more than 500 ppm	Not detected.

Remarks:- The above product **Complies** with the prescribed standards of quality with respect to Above tests as per Ph.Eur/BP & In-house Specification. (Specification No. RO/FPS/FHCT02 Rev. 08)

Prepared by:
Date: 18.02.2005



Approved By:
Date: 18/02/05



958A101050750001

UNICHEM - A TRUSTED NAME IN PHARMACEUTICALS

RQA/F/007/00

Şekil 19: Hidroklorotiazit Analiz Sertifikası

4. BULGULAR

Sabit Fazın Belirlenmesi

Sabit faz olarak Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm kolonu kullanılmıştır.

Hareketli Fazın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir.

Organik Düzenleyici Türü ve Miktarının Belirlenmesi

Çeşitli hareketli faz oranları hem izokritik hem de gradient olarak denenmiştir. Valsartan ve hidroklorotiazitin aynı yöntemde optimum olarak geldiği koşul seçilmiştir.

Zaman	Asetonitril	pH:2,5 tamponu
0	5	95
3	90	10
3,5	5	95
5	5	95

Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

Çeşitli akış hızları denemiş fakat valsartan-hidroklorotiazitin hem kısa sürede hem de sistem uygunluk koşullarına uyan bir şekilde geldiği akış hızı seçilmiştir. Bu da 0,4 ml/dk'dır.

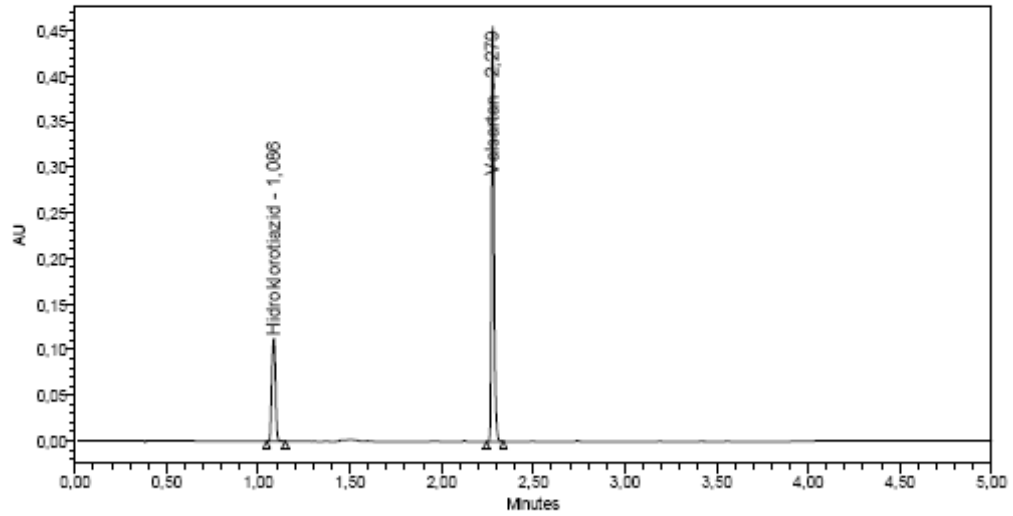
Çözücü Türü ve Oranının Belirlenmesi

Çözücü türünün belirlenme süresi oldukça uzun sürmüştür. Çünkü valsartan ve hidroklorotiaziti aynı yöntemde çıkarmak için her ikisi için de aynı çözücüyle geri kazanımların %98-102 arasında çıkması gerekmektedir. Çözücü olarak pH:2,5 fosfat tamponu ve asetonitrilin (40:60 h/h) oranında karışımı seçilmiş ve geri kazanım sınırlar içinde çıkmıştır.

Sistem Uygunluk Testi Sonuçları

Sistemin uygun olabilmesi için teorik plaka sayısının 2000 ve ya üstünde, resolüsyonun 2 veya üstünde, simetri faktörünün ise 1,5 veya altında olması gerekmektedir. Şekil 20’de valsartan-hidroklorotiazitin sistem uygunluk kromatogramı verilmiştir.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	SEC HMD+PLC+IMP B	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	vafan1 plus mt vld
Vial:	1:A.4	Acq. Method Set:	vfan1 plus mt GRAD1
Injection #:	2	Processing Method:	valsartanplus mt vld 220808
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	280.0nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 280.0 nm
Date Acquired:	20.08.2008 11:54:40 EEST		
Date Processed:	22.08.2008 14:21:52 EEST		



Peak Name	RT	Area	Height	Resolution	Symmetry Factor	USP Plate Count
1 Hidroklorotiazid	1,086	160904	112581		9,485850e-001	1,407305e+004
2 Valsartan	2,279	430110	455505	3,784306e+001	1,293473e+000	1,439956e+005

Şekil 20; Sistem Uygunluk Kromatogramı

Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

Enjeksiyon hacmi olarak çeşitli denemeler yapılmıştır ancak hem enjeksiyon tekrarlanabilirliği açısından hem de konsantrasyon ayarlama açısından en uygun olan enjeksiyon hacmi seçilmiştir. 1 µL yapıldığında enjeksiyon tekrarlanabilirliği sonuçlarının RSD'si 2'den büyük çıkmıştır. 5 µL yapıldığında ise seyreltme oranı düştüğü için hata oranı fazlalaşmıştır. Bu nedenle enjeksiyon hacmi olarak 2 µL seçilmiştir.

Valsartan-Hidroklorotiazitin Ultra Performans Likit Kromatografisi-PDA Dedektör ile Analizi Yönteminin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında ; doğrusallık, seçicilik, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır^{125,127}.

Valsartan-hidroklorotiazit ultra performans likit kromatografisi ile analiz yönteminde Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm kolon, 25°C kolon sıcaklığı ile hareketli faz A olarak asetonitril ve hareketli faz B olarak pH:2,5 NaH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 ml/dk'dır. Hareketli faz akış oranı ise

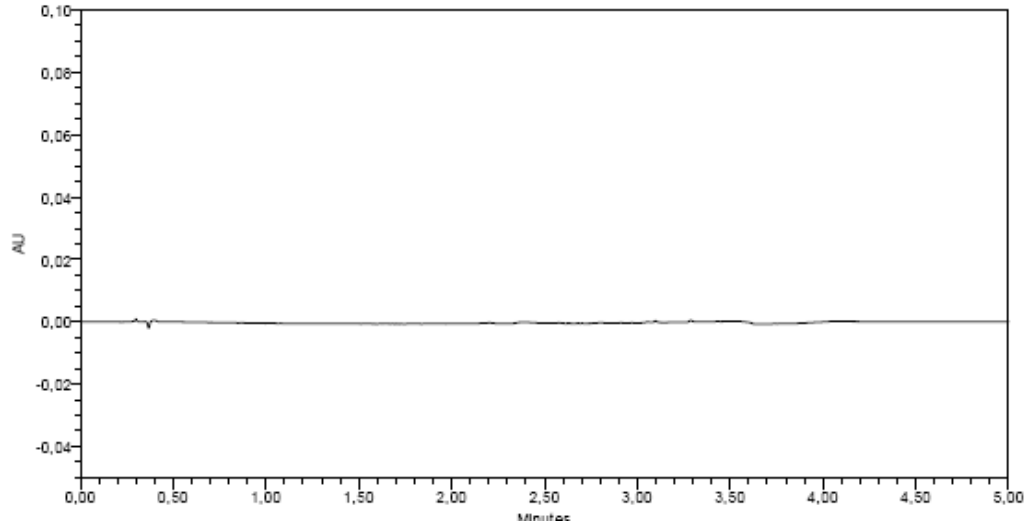
Zaman	Asetonitril	pH:2,5 tamponu
0	5	95
3	90	10
3,5	5	95
5	5	95

şeklindedir.

Özgünlük ve Seçicilik

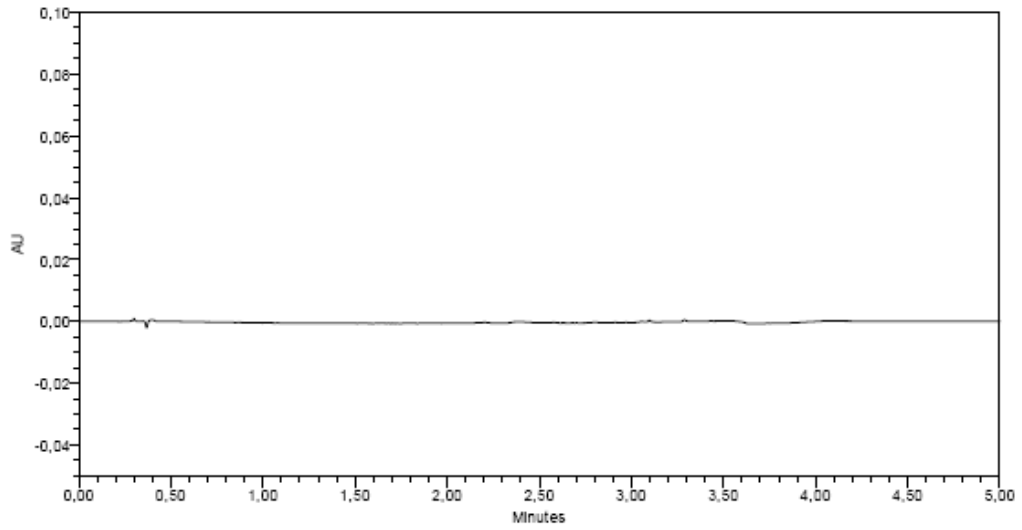
Çözücü ve plasebodan valsartan ve hidroklorotiazitin alıkonma zamanında herhangi bir pik gelmediği Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterilmiştir.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	�����	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	1:A,3	Acq. Method Set:	vfan1 plus mt GRAD1
Injection #:	1	Processing Method:	210808 valsartanplus 280 nm
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	280.0nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 280.0 nm
Date Acquired:	8/12/2008 12:37:13 PM EST		
Date Processed:	8/22/2008 02:21:45 PM EST		



  kil 21:       Kromatogramı

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	PLASEBO	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	1:A,2	Acq. Method Set:	vfan1 plus nt GRAD1
Injection #:	1	Processing Method:	valsartanplus nt vid 220808
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	280.0nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 280.0 nm
Date Acquired:	8/12/2008 12:32:13 PINEEST		
Date Processed:	8/22/2008 02:20:45 PINEEST		



Şekil 22: Plasebo Kromatogramı

Doğruluk ve Geri Kazanım

%80-100-120 oranında valsartan-hidroklorotiazit %100 oranında plasebo ile tartılıp hazırlanır. Bu numunelerin standarda göre okutulduğunda geri kazanımlarının %98-102 arasında gelmesi beklenir. RSD'nin de %2'den düşük olması beklenir. Tablo 6'da valsartan ve hidroklorotiazitin doğruluğu ve geri kazanımları gösterilmiştir. Tablo 7'de ise numunenin içinde bulunan etkin madde miktarı verilmiştir. Şekil 23'de validasyon sırasında yapılan geri kazanım kromatogramı verilmiştir.

Tablo 6;Valsartan ve Hidroklorotiazitin Geri Kazanımları

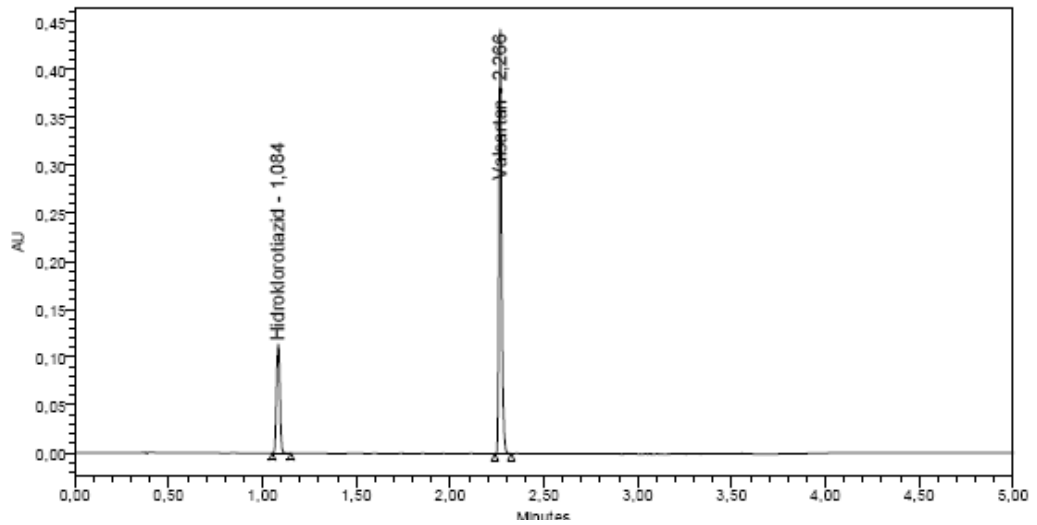
	Ortalama Alan	Konulan Kons	Bulunan Kons	%Geri Kazanım
Valsartan	350923	0,12738	0,12940	101,59
	434600	0,15794	0,16025	101,46
	511082	0,19028	0,18845	99,04
			X_{ort}: 100,49	
			SS:1,714	
			%BSS:1,706	
			G.A:99,170-101,806	

	Ortalama Alan	Konulan Kons	Bulunan Kons	%Geri Kazanım
Hidroklorotiazit	122246	0,00974	0,00961	98,67
	157482	0,01255	0,01238	98,65
	183304	0,01466	0,01441	98,29
			X_{ort}: 98,47	
			SS:0,259	
			%BSS:0,264	
			G.A:98,273-98,672	

Tablo 7; Tablette Bulunan Valsartan ve Hidroklorotiazit Miktarı(Mg)

	Tablette Bulunan Etkin Madde Miktarı (mg)	
Numune No	Valsartan	Hidroklorotiazit
1	162,3401292	12,33067729
2	158,893986	12,27829392
3	161,703962	12,26653696
X _{ort}	160,98	12,29
SS	1,834	0,034
%BSS	1,139	0,278

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	GK %100 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	vfan1 plus mt
Vial:	1:F,2	Acq. Method Set:	vfan1 plus mt GRAD1
Injection #:	2	Processing Method:	valsartan plus mt vld 280 nm
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Date Acquired:	22.08.2008 00:54:06 EEST		
Date Processed:	22.08.2008 07:56:45 EEST		



Şekil 23: Geri Kazanım Kromatogramı

Kesinlik

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği

Kullanılan UPLC-PDA dedektör sisteminin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi için doğrusal aralık içerisinde bir derişiminde hazırlanan standart valsartan-hidroklorotiazit çözeltisinin aynı gün içerisinde 6 tekrarlı analizi yapılmıştır. RSD 0,85'ten küçük olmalıdır. Analiz sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8: Valsartan ve Hidroklorotiazitin Cihaz Tekrarlanabilirliği Bulguları

VALSARTAN

	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	427730	2,279
2	426274	2,279
3	424879	2,28
4	422958	2,279
5	424369	2,28
6	424681	2,279
Ortalama	425148,500	2,279
StdSapma	1651	0,001
RSD	0,388	0,023

HİDROKLOROTİAZİT

	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	155142	1,084
2	154894	1,084
3	154297	1,084
4	153700	1,083
5	153878	1,084
6	154402	1,084
Ortalama	154385,500	1,084
StdSapma	560	0,000
RSD	0,363	0,038

Ara kesinlik

İki ayrı analist tarafından yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 9 ve 10'da gösterilmiştir. Her bir çalışmanın kendi içindeki ve her iki çalışmanın birbirleri arasındaki RSD'si 2'den küçük olmalıdır. Bu sonuç da Tablo 11'de gösterilmiştir. Şekil 24'de validasyon sırasında yapılan herhangi bir kesinlik kromatogramı verilmiştir.

Tablo 9: Analist 1 Tarafından Yapılan Valsartan ve Hidroklorotiazit Ara Kesinlik Çalışması

Ekipman 1

Valsartan	Ortalama Alan	%Geri Kazanım	Bulunan mg/tb
1	449043	100,27	160,44
2	442748	99,29	158,86
3	453418	102,14	163,43
4	446825	100,28	160,45
5	447125	100,03	160,05
6	450643	100,79	161,26
		X _{ort} : 100,47	X _{ort} : 160,75
		SS:0,955	SS:1,528
		%BSS:0,950	%BSS:0,950

Hidroklorotiazit	Ortalama Alan	%Geri Kazanım	Bulunan mg/tb
1	158090	99,20	12,40
2	157614	99,36	12,42
3	159168	100,80	12,60
4	157119	99,12	12,39
5	157304	98,88	12,36
6	158397	99,60	12,45
		X _{ort} : 99,49	X _{ort} : 12,44
		SS:0,685	SS:0,086
		%BSS:0,688	%BSS:0,688

Tablo 10: Analist 2 Tarafından Yapılan Valsartan ve Hidroklorotiazit Ara Kesinlik Çalışması

Ekipman 2

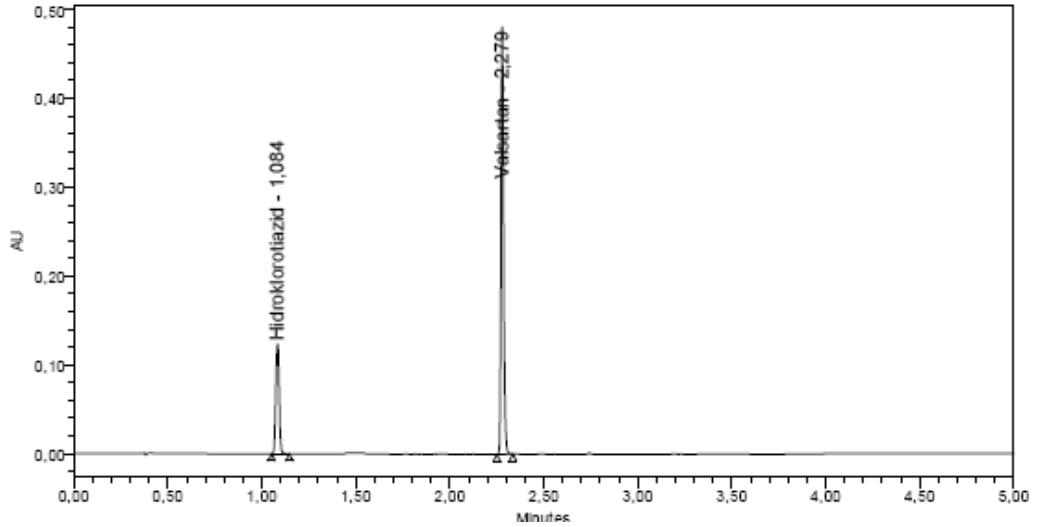
Valsartan	Ortalama Alan	%Geri Kazanım	Bulunan mg/tb
1	445485	100,04	160,07
2	445183	100,35	160,56
3	448891	101,19	161,90
4	441878	100,11	160,18
5	449998	101,41	162,25
6	438628	99,35	158,95
		X _{ort} : 100,41	X _{ort} : 160,65
		SS:0,769	SS:1,231
		%BSS:0,766	%BSS:0,766

Hidroklorotiazit	Ortalama Alan	%Geri Kazanım	Bulunan mg/tb
1	156470	98,88	12,36
2	156525	99,36	12,42
3	157726	100,08	12,51
4	158582	101,13	12,64
5	158831	100,72	12,59
6	157403	100,40	12,55
		X _{ort} : 100,10	X _{ort} : 12,51
		SS:0,844	SS:0,106
		%BSS:0,843	%BSS:0,843

Tablo 11: Analist 1 ve 2 Tarafından Yapılan Ara Kesinlik Çalışmalarının Karşılaştırılması

Valsartan	Hidroklorotiazit
X _{ort} : 160,70	X _{ort} : 12,47
SS:0,07	SS:0,05
%BSS:0,041	%BSS:0,425

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	AK 1 TEST 5	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	vafan1 plus mt vlds
Vial:	1:C,8	Acq. Method Set:	vfan1 plus mt GRAD1
Injection #:	2	Processing Method:	valsartan plus mt vld 280 nm
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Date Acquired:	20.08.2008 20:07:02 EEST		
Date Processed:	21.08.2008 09:34:17 EEST		

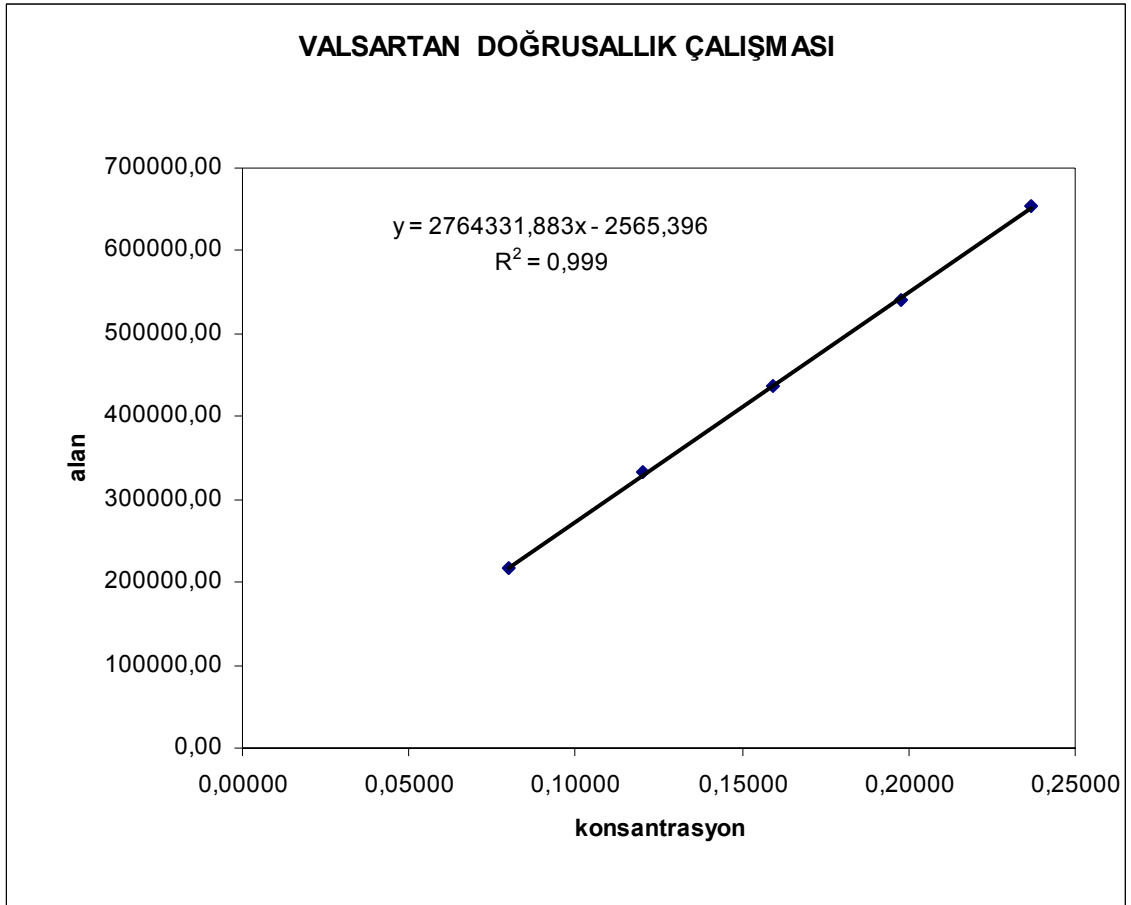


Şekil 24: Ara Kesinlik Kromatogramı

Doğrusallık

%50-75-100-125-150 oranlarında hazırlanan standart çözeltinin aynı oranda alan verip verilmediğine bakılır. r^2 değeri 1'e ne kadar yakınsa yöntem o kadar güvenli demektir. Şekil 25'de valsartanın konsantrasyonunun alanına göre çizilen doğrusallık grafiği Tablo 12'de de

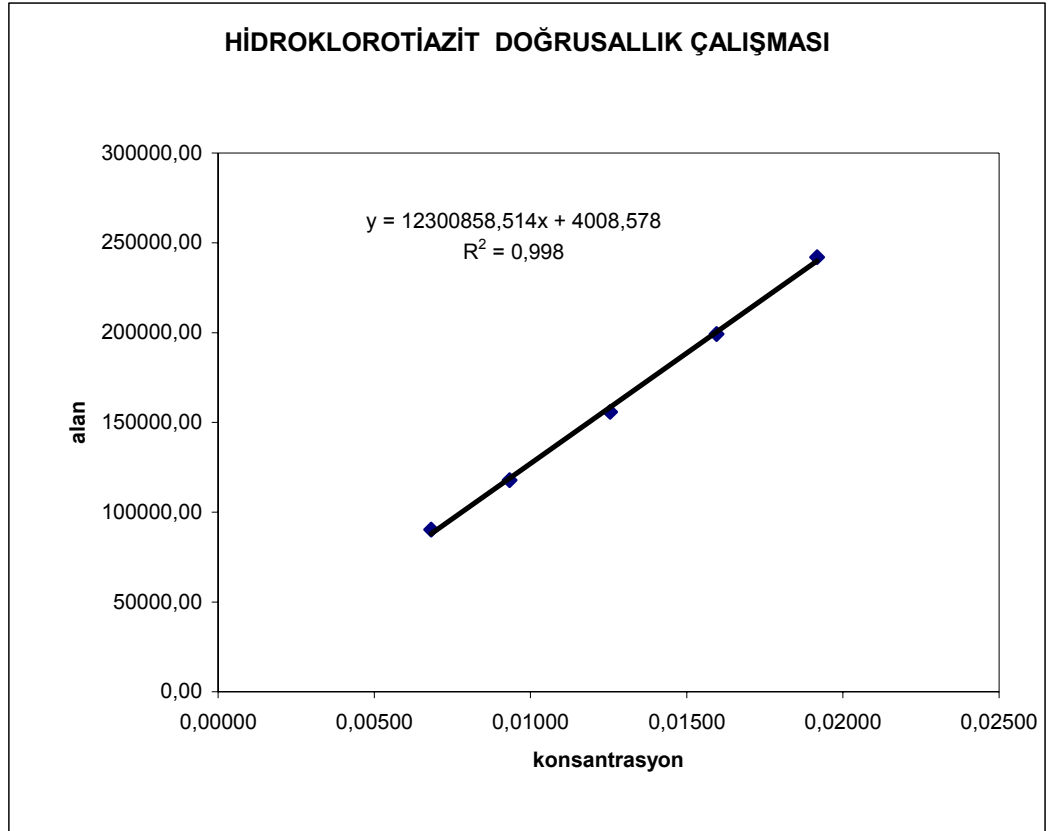
valsartanın kalibrasyon eğrisinin özellikleri verilmiştir. Şekil 26'da ise hidroklorotiazitin konsantrasyonunun alnına göre çizilen doğrusallık grafiği Tablo 13'de de hidroklorotiazitin kalibrasyon eğrisinin özellikleri verilmiştir. Şekil 27'de ise validasyon sırasında yapılan lineerlik çalışması kromatogramı verilmiştir.



Şekil 25: Valsartan Kalibrasyon Grafiği ve Denklemi

Tablo 12: Valsartanın Ultra Performans Likitkromatografisi-PDA Dedektörü ile Analiz Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri

Regresyon Denklemi	$y = 2764331,883x - 2565,396$
Eğimin Standart Hatası	16698,43655
Kesişimin Standart Hatası	2807,595469
Korelasyon Katsayısı (r)	0,99994527
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,999890543

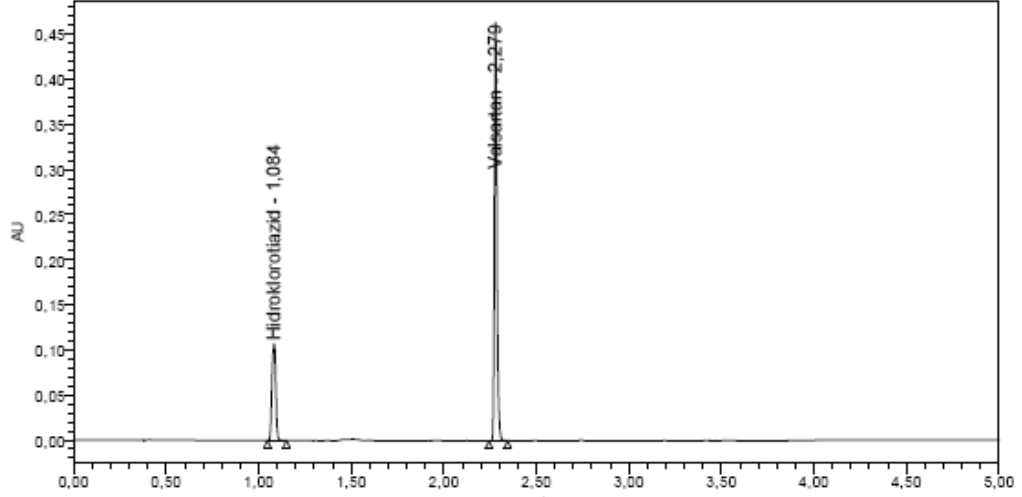


Şekil 26: Hidroklorotiazit Kalibrasyon Grafiği ve Denklemi

Tablo 13: Hidroklorotiazitin UPLC-PDA Dedektörü ile Analiz Yöntemine Ait Kalibrasyon Eğrisi Özellikleri

Regresyon Denklemi	$y = 12300858,514x + 4008,578$
Eğimin Standart Hatası	249357,0451
Kesişimin Standart Hatası	3370,455052
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999384168
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,998768715

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	LIN %100	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	vafan1 plus nt vlds
Vial:	1:C, 1	Acq. Method Set:	vfan1 plus nt GRAD1
Injection #:	3	Processing Method:	valsartan plus nt vld 280 nm
Injection Volume:	2,00 ul	Channel Name:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Run Time:	5,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 280nm@1.2nm
Date Acquired:	20.08.2008 14:59:48 EEST		
Date Processed:	21.08.2008 09:32:00 EEST		



Şekil 27: Doğrusallık Kromatogramı

Çözelti Stabilitesi

Hazırlanan numunelerin ne kadar süre stabil kaldığını ve ne kadar süre içinde analiz yapılması gerektiğini gösteren bir parametredir. 25 derece ve 4 derece sıcaklıkta tutulan numune ve standart arasındaki değişimle ölçülür. Çözeltinin stabil olması için RSD'nin 2'den küçük olması

gereklidir. Tablo 14’de valsartanın numune ve standardının başlangıç, 6. saat, 24. saat, 48. saatlik stabiliteleri gösterilmiştir. Tablo 15’de hidroklorotiazitin numune ve standardının başlangıç, 6. saat, 24. saat, 48. saatlik stabiliteleri gösterilmiştir.

Tablo 14: Valsartanın Çözelti Stabilitesi

Valsartan

	Standart değişimi		Test değişimi	
Başlangıç	4 derece	25 derece	4 derece	25 derece
6. saat	-0,005	0,276	-0,271	0,430
24. saat	0,338	2,248	0,823	0,83
48. saat	-0,450	6,899	-0,325	2,759

Tablo 15: Hidroklorotiazitin Çözelti Stabilitesi

Hidroklorotiazit

	Standart değişimi		Test değişimi	
Başlangıç	4 derece	25 derece	4 derece	25 derece
6. saat	0,136	0,604	0,343	0,529
24. saat	-0,052	2,41	0,816	0,95
48. saat	-0,519	8,059	0,267	3,853

Güvenilirlik

Yöntemin küçük değişiklikler dahilinde de sorunsuz olarak çalışabileceği göstermek amacıyla yapılmış bir parametredir. Farklı sıcaklık, farklı tampon pH’sı, farklı mobil faz oranı gibi küçük değişiklikler uygulanmıştır. Başlangıç şartlarına göre değişime bakılır. RSD’nin %2’den

küçük olması beklenir. Tablo 16'da valsartan ve hidroklorotiazitin sağlamlık parametresi gösterilmiştir.

Tablo 16: Valsartan ve Hidroklorotiazitin Sağlamlığı

	Valsartan % Alan Değişimi	Hidroklorotiazit % Alan Değişimi
Farklı Sıcaklık -1	-0,002	-0,008
Farklı Sıcaklık +1	0,006	0,000
Farklı Tampon pH'sı -0,1	0,071	-0,003
Farklı Tampon pH'sı +0,1	0,023	0,010
Farklı Mobil Faz Oranı	0,001	0,001

Valsartan Hidroklorotiazit İçeren Tabletlerde Yöntem Geçerliliğinin Kanıtlanması

Ultra performans likit kromatografisinde cihaz önce kolon takılmadan ara bağlantı kablosu takılarak önce suyla daha sonra asetonitril-su karışımı ile yıkanır. Daha sonra kanallar belli bir süre hava kalmayacak şekilde purge yapılır. Cihazda birikmiş tuz vb. varsa temizlenir. İğnesi yıkanır. Cihazın sağlıklı analiz sonuçları verebilmesi için gerekli koşullar sağlanır. Mobil fazlar takıldıktan sonra bir de mobil faz kanallardan geçirilir.

Kromatografik şartlar;

Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm kolon

280 nm dalga boyu

0,4 ml/dk akış hızı

2 µL enjeksiyon hacmi

25°C kolon ve numune sıcaklığı

Mobil faz A olarak asetonitril

Mobil faz B olarak pH:2,5 fosfat tamponu

Seyreltme çözeltisi olarak asetonitril:tampon çözelti (60:40) karışımı

Akış oranı

Zaman	Asetonitril	pH:2,5 tamponu
0	5	95
3	90	10
3,5	5	95
5	5	95

şeklinde gradient olarak seçilmiştir. Bu şekilde cihaz ve kolon şartlandırılmıştır.

160/12,5 mg valsartan-hidroklorotiazit içeren tabletlerde miktar tayini analizi için iki tane standart çözelti ve analizi yapılacak altı tane numune çözeltisi hazırlanmıştır.

Standart çözelti hazırlanışı; 160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit standardı 100 ml'lik balonjojeye tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ile çözülür. On dakika ultrasonik banyoda tutulur daha sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 2,0 ml alınır ve 20 ml'ye seyreltilir. 0,45 µm'lik teflon filtreden süzülerek viallenir. Sistemin uygun olup olmadığını anlamak için standart altı kez verilir.

Tablet numunesinin hazırlanışı; 160/12,5 mg valsartan-hidroklorotiazit içeren 20 tablet alınır ve toz edilir. Bu tozdan 160/12,5 mg

valsartan-hidroklorotiazite eşdeğer tablet tozu 100 ml'lik balonjojeye alınır ve seyreltme çözeltisi ile çözülerek on dakika ultrasonik banyoda tutulur. Daha sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltide 2,0 ml alınarak 20 ml'ye seyreltilir ve 0,45 µm'lik teflon filtreden süzülerek viallenir.

Hesaplama işlemi ise: $100(Cs/Cu)(Ri/Rs)$

Cs:standart çözeltisindeki valsartan konsantrasyonu(mg/mL)

Cu:test çözeltisindeki valsartan konsantrasyonu(mg/mL)

Ri:test çözeltisinden saptanan valsartan pik alanı

Rs:standart çözeltisinden saptanan valsartan pik alanı

Şeklinde yapılır. Standart konsantrasyonu hesaplanırken nem değeri ve potensi de hesaba katılır.

Miktar tayini yöntemi 160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit içeren tabletlere uygulanmış ve deney sonucunda tabletlerde bulunan miktarlar aşağıda verilmiştir. (n=6)

Tablet	Teorik Olarak Bulunan Miktar	Deney Sonucunda Bulunan Miktar	Deney Sonucunda Bulunan %miktar
Valsartan	160 mg	162,56 mg	%101,6
Hidroklorotiazit	12,5 mg	12,58 mg	%100,64

Kabul limiti olarak herhangi bir tabletin % miktarı ve tabletlerin ortalama %miktarı %95'in altında veya %105'in üstünde olmamalıdır. Hem valsartan hem de hidroklorotiazit kabul limitleri içindedir.

5.TARTIŞMA

Valsartan yağda çözülebilen, anjiyotensin II (Tip1) reseptör antagonistidir. Diğer benzeri ilaç moleküllerinden daha kuvvetli biçimde kalp, karaciğer ve böbreklerde bulunan AT1 reseptörlerine bağlanarak uzun süreli bir koruma sağlar. Kanda bulunan ve vücuttaki kan basıncını artıran ATII hormonunu daha etkili baskıladığı için daha uzun süreli etki göstermektedir. Hidroklorotiazit ödem ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan tiazit grubu bir diüretiktir. Tiazit grubu diüretikler hipertansiyonun başlangıç tedavisinde tek başlarına veya diğer ilaçlarla kombine kullanılırlar. Tiazit grubu diüretikler böbrek tubulus epitelyumundan sodyum iyon transportunu inhibe ederek sodyum, klor ve suyun atılımını artırır. Tez kapsamında Valsartan ve Hidroklorotiazit'in ultra performans likit kromatografisi yöntemi ile aynı anda analizleri için hızlı, duyarlı ve ekonomik bir analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmış ve gerekli optimizasyonlar ve yöntem geçerlik testleri yapılmaya çalışılmıştır.

Valsartan-hidroklorotiazitin ultra performans likit kromatografisi yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, valsartan-hidroklorotiazitin kromatografik davranışları öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir.

Geliştirilen yöntemde ultra performans likit kromatografisi yöntemi ile analiz için çeşitli şartlar denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Numune ve standardı çözmede kullanılan seyreltme çözeltisi incelenmiştir.

Sabit faz olarak Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm kolonu kullanılmıştır. Acquity UPLC BEH C18 2.1*150 mm 1.7 µm kolonu kullanılsaydı valsartan ve hidroklorotiazitin alıkonma zamanları gecikeceği için baştan hiç denemeye alınmamıştır. 50 mm'lik kolonla sistem uygunluk şartları sağlanmıştır.

İlk olarak 254 nm'de 0,1 mL/dk akışla pH 2,5 tampon ve asetronitril (40:60 h/h) oranında hareketli faz denenmiştir. Ancak ölü hacim gelmemiştir ve valsartan piki de 1,145'de kırık olarak gelmiştir. Onun hemen yanında hidroklorotiazit piki çok kötü bir şekilde gelmiştir.

Daha sonra 254 nm'de 0,4 ml/dk akışla pH:2,5 tampon ve asetronitril (70:30 h/h) oranında hareketli faz denenmiştir. Valsartan pikinin şekli düzelmiş ancak hidroklorotiazit piki yine aynı şekilde ölü hacimle birlikte gelmiştir.

Hareketli faz olarak %99 oranında tampon verildiğinde hidroklorotiazit piki ölü hacimden kurtulmuş ancak bu sefer de valsartan piki çok gecikmiş yaklaşık 15. dakikada gelmiştir. Buradan da anlaşılacağı gibi hidroklorotiazit kolonda tutunamamakta ve bu nedenle ölü hacimle birlikte gelmektedir. Tampon oranı arttıkça hidroklorotiazit kolona tutunarak gelir ve böylece ölü hacimden de kurtulmuş olur. Aynı kromatogramda hem valsartan hem de hidroklorotiazit için optimum alıkonma zamanı elde etmek için isokritik akış değil de gradient akış şeması uygulamak gerekli olmuştur.

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Asetonitril	Tampon
0	0,4	100	0
3	0,4	10	90
3,5	0,4	5	95
5	0,4	5	95

Sadece görmek amacı ile bu şekilde bir akış şeması yaratıldığında tüm pikler 0,5 dakika civarında gelmiştir. Buradan da güçlü olan solventin (asetonitril) etkisinin ne kadar kuvvetli olduğu anlaşılmıştır.

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Asetonitril	Tampon
0	0,4	20	80
2	0,4	20	80
3	0,4	95	5
4	0,4	95	5
5	0,4	20	80

Şeklinde bir gradient programı uygulandığında valsartan piki 3,2 dakika civarında hidroklorotiazit piki ise yine ölü hacimle 0,5 dakika civarında gelmiştir.

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Asetonitril	Tampon
0	0,4	5	95
2	0,4	80	20
2,5	0,4	5	95
4	0,4	5	95

Şeklinde bir gradient programda valsartan piki 2,339'da hidroklorotiazit piki ise 1,030'da gelmiştir. Ancak akışlar arasındaki değişimler için zaman farkı kısa olduğu için başka bir gradient program denenmiştir.

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Asetonitril	Tampon
0	0,4	5	95
3	0,4	90	10
3,5	0,4	5	95
5	0,4	5	95

Şeklinde bir gradient programda hidroklorotiazit piki 1,136'da valsartan piki 2,317'de ölü hacim ise 0,4 civarında gelmiştir. Böylece istenen gradient programı yakalanmıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup asetonyril ile çözülmüş ve tamamlanış daha sonra 2,0 ml alınıp 10 ml'ye su ile seyreltilmiştir. Ancak son çözeltide çözeltiler bulanıklaşmış ve geri kazanım %98-102 arasında çıkmamıştır.

Buradan asetonyrilin çözmeye çok kuvvetli geldiği anlaşılmış ve asetonyril oranı düşürülmüştür. Su ve asetonyril oranı (80:20 h/h) yapılmıştır. Aynı şekilde konsantrasyon ayarlanmıştır. Ancak burada da yine geri kazanım %98-102 arasında çıkmamıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup metanol ve su (50:50 h/h) karışımı ile çözülmüş ve tamamlanış daha sonra 2,0 ml alınıp 10 ml'ye aynı çözelti ile seyreltilmiştir. Aynı şekilde bir de 5,0 ml alınıp 50 ml'ye seyreltilmiştir. Ancak her iki konsantrasyonda da geri kazanım %98-102 arasında çıkmamıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup asetonyril ve su (60:40 h/h) karışımıyla çözülmüş ve hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 2,0 ml alınıp 10 ml'ye (80:20 h/h) oranında su ve asetonyril içeren çözücüyle seyreltilmiştir. Ancak geri kazanım yine %98-102 arasında çıkmamıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup 60:40 oranında su ve asetonyril içeren çözelti eklenmiş daha sonra 2,0 ml alınıp 10 ml'ye su ile seyreltilmiştir. Ancak çözelti bulanıklaşmış ve geri kazanım %98-102 arasında çıkmamıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup 50:50 oranında su ve metanol içeren çözelti eklenmiş daha sonra 2,0 ml alınıp 10 ml'ye su ile seyreltilmiştir. Ancak çözelti bulanıklaşmış ve geri kazanım %98-102 arasında çıkmamıştır.

160 mg valsartan ve 12,5 mg hidroklorotiazit 100 ml'lik balonjojeye konup (40:60 h/h) oranında tampon ve asetonitril içeren çözelti eklenmiş daha sonra 2,0 ml alınıp 10 ml'ye yine aynı çözelti ile seyreltilmiştir. Geri kazanıma bakıldığında %98-102 arasında çıkmıştır. Ancak 2,0 ml alıp 10 ml'ye seyreltiğinde daha konsantre olduğu için pik yükseklikleri 1000 mA'ı geçmiştir ve analizin sağlığı tehlikeye girmiştir. Bu nedenle seyreltme 2/20 şeklinde yapılmıştır. Aslında 2/20 yapılarak onaylanan pik yüksekliği enjeksiyon hacmi 2µL değil de 1µL yapılarak elde edilmiştir. Ancak enjeksiyon tekrarlanabilirliği çok iyi olmadığı için terk edilmiştir.

Dalga boyu içinse ilk olarak 254 nm denenmiştir ancak pik yükseklikleri çok yüksek olduğu için vazgeçilmiştir. Daha sonra 271 nm'ye bakılmıştır. Burada da hidroklorotiazit 0,2 AU valsartan da 0,76 AU yüksekliğinde gelmiştir. 280 nm'de ise hidroklorotiazit 0,14 AU valsartan 0,47 AU gelmiştir ve istenen optimum koşul sağlanmıştır.

Valsartan-hidroklorotiazit 160/12,5 mg film tabletin stabilitesi yapılmıştır. Stabilitesine üç ayrı koşulda bakılmıştır. 25°C %60 bağıl nemde, 30°C %65 bağıl nemde, 40°C %75 bağıl nemde stabilite sonuçları gözlemlenmiştir. Sonuçlar Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17: Valsartan-Hidroklorotiazitin Stabilit  Sonuçları

25�C %60 nem	BAŞLANGIÇ	1.AY	2.AY	3.AY
Valsartan Miktarı	162.56 mg/tablet	160.65 mg/tablet	162.43 mg/tablet	162.21 mg/tablet
Hidroklorotiazid Miktarı	12.58 mg/tablet	12.42 mg/tablet	12.52 mg/tablet	12.35 mg/tablet
30�C %65 nem	BAŞLANGIÇ	1.AY	2.AY	3.AY
Valsartan Miktarı	162.56 mg/tablet	161.32 mg/tablet	162.05 mg/tablet	160.36 mg/tablet
Hidroklorotiazid Miktarı	12.58 mg/tablet	12.61 mg/tablet	12.50 mg/tablet	12.24 mg/tablet
40�C %75 nem	BAŞLANGIÇ	1.AY	2.AY	3.AY
Valsartan Miktarı	162.56 mg/tablet	160.10 mg/tablet	162.16 mg/tablet	159.04 mg/tablet
Hidroklorotiazid Miktarı	12.58 mg/tablet	12.41 mg/tablet	12.55 mg/tablet	12.11 mg/tablet

6. SONUÇ

Bu çalışmanın ilk kısmında anjiyotensin II (Tip1) reseptör antagonisti olan Valsartan ve tiazit grubu diüretik ilaçlardan olan Hidroklorotiazit için en uygun sabit (kolon) ve hareketli faz kompozisyonu (hareketli faz organik düzenleyicisi maddesinin seçimi) ve akış hızının etkisini saptayabilmek için; pH'ın, organik çözücü cinsinin ve oranının, sabit fazın cinsinin (fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü) etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır.

Geliştirilen yöntemde ultra performans likit kromatografisi yöntemi ile analiz için çeşitli hareketli fazlar, hareketli faz oranları, çözücüler denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda hareketli faz olarak tampon ve asetonytrilin gradient olmasının ve akış hızının 0,4 ml/dk olmasının çözücü olarak da tampon ve asetonytril (40:60 h/h) kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak valsartan-hidroklorotiazitin ultra performans likit kromatografisi ile analiz yönteminde Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm kolonu, 25°C kolon sıcaklığı ve 25°C numune sıcaklığı ile asetonytril ve NaH₂PO₄ (pH 2,5) içeren gradient olarak

Zaman	Akış hızı (mL/dk)	Asetonytril	Tampon
0	0,4	5	95
3	0,4	90	10
3,5	0,4	5	95
5	0,4	5	95

şeklinde verilen hareketli faz; 0,4 ml/dk akış hızı ve PDA dedektörü ile valsartan ve hidroklorotiazit için ortak dalga boyu 280 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda; valsartan ve hidroklorotiazit alıkonma zamanları sırasıyla 1,084 dk.; 2,266 dk. olarak saptanmıştır.

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; seçicilik ve özgünlük, doğruluk ve geri kazanım, doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, çözelti stabilitesi vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu parametrelerden doğrusalılık için hem valsartan hem hidroklorotiazitin ultra performans likit kromatografisi ile analiz yönteminde lineer oldukları saptanmıştır. Valsartan analizi için tanımlanan ultra performans likit kromatografisi yönteminde doğrusal aralık doğru denklemi $y=2764331x+2565,396$; $r^2=0,999$ ve hidroklorotiazit için ise $y=12300858,514x+4008,578$; $r^2=0,998$ 'dir. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan yöntem valsartan ve hidroklorotiazit etken maddelerini aynı anda içeren farmasötik dozaj formuna uygulanmış ve her iki maddenin de aynı anda analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Üç aylık stabilitesine bakıldığında ise tabletlerin stabil olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında, valsartan ve hidroklorotiazitin aynı anda analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve piyasa preparatlarından bu maddelerin aynı anda analizine başarılı bir şekilde uygulanabildiği istatistiksel olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, tez

kapsamında valsartan ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan ultra performans likit kromatografisi yöntemi bu iki maddenin farmasötik dozaj formlarının tayini için önerilmektedir.

ÖZET

Valsartan ve hidroklorotiazit'in aynı anda analizi için bir ultra performans likit kromatografi yöntemi sunulmuştur. Bu yöntemde; bir ters-faz kolonu (Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 µm) 0,4 ml/dk akış hızındaki asetonitril NaH₂PO₄ tampon (pH:2,5) gradient karışımından oluşan bir hareketli faz ile 280 nm dalga boyunda iki bileşiğin ayrılması için kullanılmıştır. Kromatografik ayırım 25°C'de yapılmıştır. Geliştirilen yöntem kısa bir süre içerisinde valsartan-hidroklorotiazitin iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Bu şartlar kullanılarak, valsartan için 2,266 dk; hidroklorotiazit için 1,084 dk alıkonma zamanı elde edilmiştir.

Taze hazırlanmış standart çözelti kromatogramında validasyon prosedürünün bir parçası olan ayrışma, seçicilik, asimetri ve teorik plaka sayısı gibi çeşitli parametreleri kontrol etmek için sistem uygunluk testleri yapılmıştır. Geliştirilen yöntem tamamen valide edilmiştir. Valsartan ve hidroklorotiazit için doğrusallık elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Yüksek orandaki geri kazanım; yöntemin, ilaçların formülasyonunda kullanılan katkı maddelerinden ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini göstermektedir.

Geliştirilen ultra performans likit kromatografisi çalışması, hammaddede ve farmasötik formülasyonlarda valsartan ve hidroklorotiazitin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, basit, yüksek kesinlik ve doğruluktadır. Geliştirilen bu yöntem, ekonomik ve zaman kazandırdığı için, kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Valsartan; Hidroklorotiazit; Validasyon; Ultra Performans Likit Kromatografisi

SUMMARY

Ultra performance liquid chromatography method are developed to analyze both valsartan and hydrochlorothiazide at the meantime. This method, one reverse phase column (Acquity UPLC BEH C18 2.1*50 mm 1.7 μ m) and acetonitrile NaH₂PO₄ buffer (pH:2,5) which has 0.4 ml/min flow speed are mixed each other to used separate two compounds under 280 nm wave length. Chromatographic separation were made in 25°C. Developed method succeed effective separation in the short period. In these condition, the retention time is for valsartan 2,266 min, and for hydrochlorothiazide 1,804 min.

In Fresh standard solution chromatography, the system tests are made to control the compatibility with some validation process such as resolution, specificity, asymmetry and theoretical plate counts. This method were validated absolutely. Both valsartan and hydrochlorothiazide were obtained linearity. To illustrate the validity and applicability of the method, accuracy working were made. High rate of accuracy demonstrate the method not influence the other compounds in the formulation process.

Ultra performance liquid chromatography which are developed to separate valsartan and hydrochlorothiazide each other, at the meantime are fast simple and high accuracy. These methods are used in quality control laboratories because these methods gain more times and are more cheaply than other methods.

Key words: Valsartan; Hydrochlorothiazide; Validation; Ultra Performance Liquid Chromatography

KAYNAKLAR

- 1- Lüllman, H., Ziegler, A., Bieger, D., Mohr, K. Renkli Farmakoloji Atlası. Bozkurt, A., Pekiner, C., Tuncer, M., Uma, S., Şahin-Erdemli (çev), 2. Basım, Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
- 2- Çelik, H. Amoksisilin'in İnsan Plazmasında HPLC ile Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007
- 3- McCann, MD. The History of Hypertension; Not a Modern Day Phenomenon. 2001 [24.08.2008].
www.drdonica.com/guests/0002086.htm
- 4- High Blood Pressure (Hypertension). 2007 [23.02.2008].
www.fda.gov/womens/getthefacts/pdfs/hbp.pbf
- 5- Mycek, J.M., Harvey, A.R., Champe, C.P. Lippicott's Illustrated Rewiev Serisinden: Farmakoloji. 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi. 1998.
- 6- O'neil, M.J., The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biolojicals, 13th Ed. New Jersey. Merck and Co. 2001.
- 7- Sweetman, S.C., Mortindale, The Complete Drug Reference, 35th Ed. Pharmaceutical Pres. London. 2007
- 8- Duplay, D., Physicians Desk Reference (PDR), 61th Ed, Published by Thempson Medical Economics Company Inc. Electronic Version, Montvale, NJ. 2007.

- 9- Üstünes, L. Rx Media Pharma, İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Gemaş Yayıncılık. 2008.
- 10- Zungur, M., Yıldız, A. Hipertansif Hastaya Yaklaşım. Sted 2004; cilt no 13 (sayı 8): sayfa 298.
- 11- Büyüköztürk, K. Türk Kardiyoloji Derneği Ulusal Hipertansiyon Tedavi ve Takip Klavuzu. İstanbul. 1999. www.tkd.org.tr/kilavuz/k03/21298.htm
- 12- Uçar, A. Uzmanlar Tus Serisi Farmakoloji. 1. Baskı. Atlas Yayıncılık. 2000.
- 13- Goodfriend, T.L. Anjiyotensin Receptors: History and Mysteries. Am J Hypertens 2000; 13:442-9.
- 14- Kang, P.M., Landav, A.J., Eberhardt, R.T., Frishman, V.H. Angiotensin II Receptor Antagonists: A new approach to blockade of the renin angiotensin system. Am Heart J 1994; 127: 1388-401.
- 15- Dzau, V.J. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. Hypertension 2001; 37:1047.
- 16- Dzau, V.J., Bernstein, K., Celermajer, D., et al. The Relevance of Tissue Angiotensin-Converting Enzyme: Manifestations in Mechanistic and Endpoint Data. Am J Cardiol 2001; 88:1-20.
- 17- Okunishi, H., Oka, N., Shiorta, N., et al. Marked Species Difference in The Vascular Angiotensin II Forming Pathways: Humans Versus Rodents. Jap Pharmacol 1993; 62: 207-10.

- 18- Liao, V., Husain, A. The Chymase-Angiotensin System in Humans: Biochemistry, Molecular Biology and Potential Role in Cardiovascular Disease. *Can J Cardiol* 1995; 11: 13-9.
- 19- Urata, H., Healy, B., Stewart, R.W., et al. Angiotensin II Forming Pathways in Normal and Failing Human Hearts. *Circ Res* 1990; 66: 883-90.
- 20- Johnston, C., Risvanis, T. Preclinical Pharmacology of Angiotensin II Receptor Antagonists, Update and Outstanding Issues. *Am J Hypertens* 1997; 10: 306-10.
- 21- Goodfriend, T.L., Elliott, M.I., Cass, K.T. Angiotensin Receptors and Their Antagonists. *N Eng J Med* 1996; 334: 1649- 54.
- 22- Gibbons, G.H., Dzau, V. The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *N Eng J Med*. 1994; 330: 1431-8.
- 23- Hohle, S., Blume, A., Lebrun, C., Culman, J. Angiotensin Receptors in The Brain. *Pharmacol Rev.* 1993; 45: 205-51.
- 24- Zhang, C., Hein, T.W., Wang, W., Kuo, L. Divergent Roles of Angiotensin II AT1 and AT2 Receptors in Modulating Coronary Microvascular Function. *Circ Res*. 2003; 21:322-9.
- 25- Crikos, T., Chung, O., Unger, T. Receptors and Their Classification: Focus on Angiotensin II and The AT2 Receptor. *J Hum Hypertens* 1998; 12 (5): 311-8.
- 26- Dzau, V.J. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease: A Unifying Hypothesis. *Hypertension* 2001; 37: 1047-52.

- 27- Tulienne, K., Pharm, D. Angiotensin II Receptor Antagonists: Their Place in Therapy. *Am Fam Physician* 1999; 59: 3140-8.
- 28- Burnie, M., Waeber, B., Brunner, H.R. The Advantages of Angiotensin II Antagonism. *J Hypertens* 1994; 12: 7-15.
- 29- Müller, J., Flesch, G., Odeqosparo, M., et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of The Angiotensin II Antagonist Valsartan at Steady State in Healthy, Normotensive Subjects. *Eart Clin Pharmacol* 1997; 52: 441-9.
- 30- Brunner, H.R. A New Angiotensin II Receptor Antagonists Irbesartan. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations. *Am J Hypertens* 1997; 10: 311-7.
- 31- Nishikawa, K., Naka, T., Chatani, F., Yoshimura, Z. Candesartan Cliexetil. A Review of Its Preclinical Pharmacology. *J Hum Hypertens* 1997; 11: 9-17.
- 32- Maudlin, R.K. New Once-Daily Angiotensin II Receptor Blocker Available. *Modern Medicine* 1999; 67: 59-60.
- 33- Cheng, A. Eprosartan: An Angiotensin II Receptor Antagonists For The Management of Hypertension. *Heart Dis* 2002; 4: 54-9.
- 34- Warner, G.T., Jarvis, B. Olmesartan Medoxomil. *Drugs* 2002; 62: 1345-53.
- 35- Rujnsoewer, E.W., Zuiderwijk, W.J., Feenstra, J. Angioneurotic Edema Attributed to The Use of Losartan. *Arch Dntern Med* 1998; 158: 2063–5.

- 36- Schaefer, K.L., Porter, J.A. Angiotensin II Receptor Antagonists: The Prototype Losartan. *Ann Pharmacother* 1996; 30:625–36.
- 37- Neutel, J.M., Smith, D.H. Dose Response and Antihypertensive Efficacy of The AT1 Receptor Antagonists Telmisartan in Patients with Mild to Moderate Hypertension. *Adv Ther* 1998; 15: 206–17.
- 38- Gradman, A.H., Arcuri, K.E., Goldberg, A.I., et al. 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: 1345–50.
- 39- Trenk, P., Lehtovirta, M., Dahl, K. Long Term Treatment with Candesartan Cilexetil does not Affect Glucose Homeostasis or Serum Lipid Profile in Mild Hypertensives with Type II Diabetes. *J Hum Hypertens* 1997; 11: 81–3.
- 40- Moan, A., Hoiegggen, A., Selteflot, I., et al. The Effect of Angiotensin II Receptor Antagonism with Losartan on Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity. *J Hypertens* 1996; 14: 1093–7.
- 41- Chan, P., Tomlinson, B., Huang, T.Y., et. al. Double-Blind Comparison of Losartan, Lisinopril and Metolazon in Elderly Hypertensive Patients with Previous Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Induced Cough. *T Clin Pharmacol* 1997; 37: 253-7.
- 42- Paul, R., Conlin, M., David, S., et al. Angiotensin II Antagonists For Hypertension are There Differences in Efficiency? *Am J Hypertens* 2000; 13: 418–26.

- 43- Melian, E.B., Jarvis, B. Candesartan Cilexetil Plus Hydrochlorothiazide Combination: A Review of Its Use in Hypertension. *Drugs* 2002; 52: 787-816.
- 44- Gradman, A.H., Brady, W.E., Gazdick, L.P., et al. A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, 8-Week Trial of The Efficacy and Tolerability of Once-Daily Losartan 100 mg/hydrochlorothiazide 25 mg and Losartan 50 mg/hydrochlorothiazide 12.5 mg in The Treatment of Moderate to Severe Essential Hypertension. *Clin Ther* 2002; 24:1049-61.
- 45- Malmqvist, K., Kahan, T., Edner, M., et al. Regression of Left Ventricular Hypertrophy in Human Hypertension with Irbesartan. *J Hypertens* 2001; 19: 1167-76.
- 46- Dahlof, B., Devereux, R.B., Kjeldsen, S.E., et al. Cardiovascular Morbidity and Mortality in The Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension Study (LIFE): A Randomised Trial Against Atenolol. *Lancet* 2002; 23: 995-1003.
- 47- Kellum, R.S., Yusuf, S., Pericak, D., et al. Comparison of Candesartan, Enalapril and Their Combination in Congestive Heart Failure Randomized Evaluation of Strategies of Left Ventricular Dysfunction (RESOLVD) Pilot Study. *Circulation* 1999; 100: 1056 – 64.
- 48- Cohn, J.N., Tognoni, G. A Randomized Trial of The Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure. *N Eng J Med*. 2001; 345: 1667-75.

- 49- Doggrell, S.A. Class Benefits of AT1 Antagonists in Type 2 Diabetes with Nephropathy. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 635-8.
- 50- Keane, W.F., Lyle, P.A. Recent Advances in Management of Type 2 Diabetes and Nephropathy: Lessons From The RENAAL Study. *Am J Kidney Dis*. 2003; 41: 22-5.
- 51- Kalinowski, L., Matys, T., Ehabielska, E., et al. Angiotensin II AT1 Receptor Antagonists Inhibit Platelet Adhesion and Aggregation by Nitric Oxid Release. *Hypertension* 2002; 40: 521-7.
- 52- Trenkwalder, P. Potential For Antihypertensive Treatment with An AT1 Receptor Blocker to Reduce Demantia in The Elderly. *J Hum Hypertens* 2002; 16: 71-5.
- 53- Miyanjim, A., Kosaka, T., Asano, T., et al. Angiotensin II Type 1 Antagonist Prevents Pulmonary Metastasis of Murine Renal Cancer by Inhibiting Tumor Angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 4176-9.
- 54- Padi, S.S., Chopra, K. Seletive Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade Ameliorates Cyclosporine Nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 2002; 45: 413-20.
- 55- Culman, J., Blume, A., Gohlke, P., Unger, T. The Renin-Angiotensin System in The Brain: Possible Therapeutic Implications For AT1-Receptor Blockers. *J Hum Hypertens* 2002; 16: 64-70.
- 56- Eguchi, K., Kario, K., Shimada, K. Beneficial Effect of ARB For Ischemic Stroke. *Nippon Rinsh* 2002; 60: 1987-91.

- 57- Tronvik, E., Stovner, L.J., Helde, G., et al. Prop-Hylactic Treatment of Migraine with An Angiotensin II Receptor Blocker: A Randomized Controlled Trial. JAMA 2003; 289: 65-9.
- 58- Gül, H. Hipertansiyon Tedavisinde Diüretikler. Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2007, 3(18):17-27
- 59- Diüretik İlaçlar. 2008 [17.10.2008].
<http://web.inonu.edu.tr/~eolmez/diuretikler.doc>
- 60- Çavun, S. Diüretik İlaçlar. 2008 [17.10.2008].
<http://www.drmurat.com/diuretikler1.ppt#1>
- 61- Gümüşel, B. Diüretikler. 2008 [15.10.2008]
http://www.farma.hacettepe.edu.tr/akademik/meslekbilimleri/farmakoloji/dersnotlari/Diuretik_Ilaclar.pps
- 62- Mycek, J.M., Harvey, A.R., Champe, C.P. Lippicott's Illustrated Rewiev Serisinden: Farmakoloji. 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi. 1999.
- 63- Diüretik İlaçlar. 2008 [10.10.2008].
<http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutf/Donem3/KomiteVEndokrinveUremeSistemleri/Farmakoloji/SerdarSOYDAN/DiuretikIlaclar.ppt#3>
- 64- Diovan HCT. 2008 [14.10.2008].
<http://www.rxlist.com/script/main/art.asp?articlekey=89146>
- 65- The Merck Index. 13th edition. 2004. New Jersey, USA.

- 66- Heper, C. Kalp Yetmezliği İlaçları. 2002 [14.10.2008].
<http://www.kardiyo.net/kitap/kitaplink.shtml>
- 67- Kutucu, T. Telmisartan ve Hidroklorotiazit'in YPSK Yöntemleri ile Aynı Anda Analizi. Yüksek lisans. Ankara; Ankara üniversitesi. 2007.
- 68- Nickenig, G., Östergren, J., Staruijker, H. Clinical Evidence For The Cardiovascular Benefits of Angiotensin Receptor Blookers. JRAAS 2006; cilt no1: 1-7
- 69- Liu, P. Maggiani, A., Velaguez, J. Use of Valsartan in Post-Myocardial Infaction and Heart Failure Patients. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Toronto, Canada. 2007. Volume 7: Supplement 1.
- 70- Zupancic, S., Pecavar, A., Zupet, R. A Process For The Synthesis of Valsartan, Patent EP1661891, WO/2006/058701, 2006.
- 71- Lukas, J. Goossen and Bettina Melzer, Synthesis of Valsartan Via Decarboxylative Biaryl Coupling, J. Org. Chem., 72 (19), 7473 - 7476, 2007. 10.1021/jo701391q S0022-3263 (70)01391-9, June 27, 2007)
- 72- Co-Diovan 160/12,5 mg Tablet Prospektüs. Novartis. BPI: 22.8.2001
- 73- Criscione et al 1993; Markham and Goa 1997; Chiolero and Bernier 1998; Chung et al 1999; Wellington and Faulds 2002.

- 74- Thürmann, P. A., Kendi, P., Schmidt, A., et al. Influence of Angiotensin II Antagonist Valsartan on Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Essential Hypertension. *Circulation* 1998; 98: 2037-42.
- 75- Marc, A., Pfeffer, M.D., John, J.V., McMurray, M.D., Eric, J., Velazquez, M.D., Jean-Lucien Rouleau, M.D., Lars Køber, M.D., Aldo, P., Maggioni, M.D., Scott, D., Solomon, M.D., Karl Swedberg, M.D., Frans, Van de Werf, M.D., Harvey, D., White, D.Sc., Jeffrey, D., Leimberger, Ph.D., Marc, Henis, M.D., Susan Edwards, M.S., Steven Zelenkofske, D.O., Mary Ann Sellers, M.S.N., and Robert M. Califf, M.D., Valsartan in Acute Myocardial Infarction Complicated by Heart Failure , Left Ventricular Dysfunction or Both. *N Engl J Med* 2003-Nov [2004 January 8] ; 350(2):203 : [20 screens]. <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/349/20/1893>
- 76- Stevens, G., Werner, L.H., Summit, N.J. Assignors to Ciba Corporation, New York, N.Y.; A Corporation of Delaware. No Drawing. Filed Sept. 25, 1964,399,132 43 Claims (260-243)
- 77- Önder, R. Hipertansiyonda Kombinasyon Tedavisi. *Journal of Hypertens* 2003;21(6):1032.
- 78- İlerigelen, B. Hipertansiyon Tedavisi. *Klinik Gelişim* 18(2),(33-41) 2005.
- 79- Brookers, L. WHO Expert Committee. Hypertension Control. WHO Technical Report Series 862. Geneva, 1996.

- 80- Wellington, K., Faulds, D.M., Valsartan/Hydrochlorothiazide: A Review of Its Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Place in The Management of Hypertension. *Drugs* 2002; 62(13):(1983-2005).
- 81- Mallion, J.M., Carretta, R., Trenkwalder, P., Martinez, J.F., Tykarski, A., Teitelbaum, I., Oddou, P., Fagan, T. Co-Diovan Study Group, Valsartan/Hydrochlorothiazide is Effective in Hypertensive Patients in Adequately Controlled by Valsartan Monotherapy., *Blood Press Suppl.* 2003 May;1:(36-43)
- 82- Ruilope, L.M., Malacco, E., Khder, Y., Kandra, A., Bönner, G., Heintz, D. Efficacy and Tolerability of Combination Therapy with Valsartan Plus Hydrochlorothiazide Compared with Amlodipine Monotherapy in Hypertensive Patients with Other Cardiovascular Risk Factors: The VAST Study., *Clin Ther.* 2005 May; 27(5):578-87)
- 83- Schühlen, H., Abts, M., Kastrati, D. Intensive Blood Pressure Reduction in Patients with Increased Cardiovascular Risk with High-Dose Combination Therapy of 160 mg Valsartan Plus 25 mg Hydrochlorothiazide. Results of The MACHT II Observational Study , *Herz.* 2007 Aug;32(5):419-25.)
- 84- Carlucci, G., Di Carlo, V., Mazzeo, P. Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* 2000; 33(12): 2491-2500.

- 85- Şatana, E., Altınay, Ş., Günden Göğer, N., Özkan, A.S., Şentürk, Z. Simultaneous Determination of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Tablets by First-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry and LC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2001; 25; 1009-1013

- 86- Hillaert, S., Van Den Bossche, W. Optimization and Validation of A Capillary Zone Electrophoretic Method For The Analysis of A Several Angiotensin II Receptor Antagonists. J Chromatogr.A. 2002; 979 (1-2) : 323-33

- 87- Hillaert, S., Van den Bossche, W. Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Several Angiotensin II Receptor Antagonists by Capillary Electrophoresis. J Pharm Biomed Anal. 2003; 31(2); 329-39.

- 88- Nie, J., Zhang, M., Fan, Y., Wen, Y., Xiang, B., Feng, Y.Q. Biocompatible in-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to HPLC For The Determination of Anjiotensin II Receptor Antagonists in Human Plasma and Urine. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sc.i. 2005; 828 (1-2): 62-9.

- 89- Zhang, M., Wei, F., Zhang, Y.F., Nie, J., Feng, Y.Q. Novel Polymer Monolithic Microextraction Using A Ploy (Methacrylic Acid Ethylene Glycol Dimethacrylate) Monolithic And Its Application to Simultaneous Analysis Of Several Angiotensin II Receptor Antagonists in Human Urine By Capillary Zone Electrophoresis. J Chromatogr.A. 2006; 1102 (1-2) : 294-301.

- 90- Lia, H., Wang, Y., Jiang, Y., Tang, Y., Wang, J., Zahao, L., Gu, J.A. Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method For The Simultaneous Quantification Of Valsartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma. Journal Of Chromatography B. 2007; 852; 436-442.
- 91- Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A. Principles Of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Brooks/Cole Thomson Learning, USA, S. 1998; 673-766.
- 92- White, R. Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications, New York and Basel, Marcel Dekker, Inc. 1990; s. 1-15.
- 93- Hamilton, R.J., Sewel, P.A. Introduction to High Performance Liquid Chromatography, 2nd ed, Chapman and Hall, New York. 1982; s. 1-160.
- 94- Bidlingmeyer, B.A. Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. 1992; s. 69-200.
- 95- Adamovics, J.A., Chromatographic Analysis Of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York, 1997.
- 96- Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D. Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, London, UK. 1987; s. 13-80.
- 97- Meyer, R.V. Practical High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Toronto, Canada. 1988.

- 98- Scott, P.W.R. Techniques and Practice of Chromatography, Marcel Dekker, Nc., New York, USA.1995; b:1-5.
- 99- Swartz, M.E. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. Separation Redefined 2005-May.[26.10.2008] 8-14. Michael_Swartz@Waters.Com
- 100- Shah, V.P., Midha, K.K. Bioanalytical Method Validation-A review with a Decade of Progress, Pharmaceutical Research. 2000; 17(12)
- 101- UPLC Columns. 2007 [26.10.2008]. http://www.environmental-expert.com/STSE_resulteach_product.aspx?cid=8995&idprofile=7026&idproduct=8378
- 102- Waters Corporation Announces Chromatography Breakthrough. 2004[26.10.2008]<http://www.microsep.co.za/News/Product%20News,%20Waters%20Acquity.htm>
- 103- Shah, V.P., Midha, K.K. Bioanalytical Method Validation-A review with a Decade of Progress, Pharmaceutical Research 1998; 17(12)
- 104- Taylor, J.K. Quality Assurance of Chemical Measurements, Lewis, Chelsea, Mich., 1987
- 105- Schwartz, M.E, Krull, I.S. Bioanalytical Method Validation; Bioequivalence/Bioavailability and Pharmacokinetics Studies. Par. Research 1992; 9(4).
- 106- Swartz, M.E, Krull, I.S. Analytical Method Development And Validation, Marcel Dekker, New York. 1997.

- 107- Riley, C.M., Rosanske, T.W. Development and Validation of Methods. Elsevier Science Ltd. , New York. 1996.
- 108- International Conference On Harmonization (ICH 1994); Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals; Availability, Fed.Reg., 59, 9750. 1994.
- 109- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. Practical HPLC Method Development, 2nd Ed., John Wiley and Sons Inc., New York, 1997.
- 110- Ahuya, S., Scypinski, S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, New York. 2001.
- 111- Lunte, S.M., Radzik, D.M. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis, Elsevier Science Ltd, New York. 1996
- 112- Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M. A Strategy For Validation Of Bioanalytical Methods. J. Pharm. Biomed. Anal. 1996;14.375-388.
- 113- Shabir, G.A. Validation High Performance Liquid Chromatography Methods For Pharmaceutical Analysis. Understanding The Differences and Similarities Between Validation Requirements Of The US Food and Drug Administration, The US Pharmacopeia and The International Conference on Harmonization. J.Chromatogr.A. 2003; 987,57-66.
- 114- Papadoyannis, I.N., Samanidou, V.F. Validation of HPLC Instrumentation. J.Liq.Chromatogr.Rel.Tech. 2004; 27,753-783

- 115- Ermer, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part 1: An Intergrated Approach. J.Pharm.Biomed.Anal. 2001; 24,755-767
- 116- McDowall, R.D. The Role of Laboratory Information Management Systems (LIMS) In Analytical Method Validation. Anal.Chim.Acta. 1999; 391:149-158.
- 117- Ermer, J. Miller, J.H. McB. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 1st Ed. Wiley-VCH Pub., Weinheim. 2005.
- 118- De Bievre, P., Gunzler, H. Eds. Validation in Chemical Measurement Spriger Pub. New York. 2005.
- 119- Vessman, J. Selectivity or Specificity: Validation of Analytical Methos From The Persperctive of An Analytical Chemist in The Pharmaceutical Industry. J.Pharm.Biomed.Anal. 1996; 14,867-869
- 120- Riley, C.M., Rosanske, T.W. Development and Validation of Methods. Elsevier Science Ltd. 1996.
- 121- Shah, V.P., Midha, K.K. Bioanalytical Method Validation-Arevist with A Decate of Progress. Pharmaceutical Research. 2000; 17(12).
- 122- Shah, V.P., Midha, K.K. Bioanalytical Method Validation; Bioequivalence/Bioavailability and Pharmacokinetics Studies, Par Research. 1992; 9(4).
- 123- Guidance For Industry Bioanalytical Method Validation. FDA, 2001.
- 124- Haelfinger, P. Limits of The Internal Standart Technique in Chromatography, Journal of Chromatography 1981; 218, 73-81.

- 125- ICH Harmonisation Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. 1996.
- 126- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2). Current Step 4 Version. 2003.
- 127- Eurochem. The Fitness For Purpose Of Analytical Methods, A Laboratory Guide To Method Validation and Related Topics, United Kingdom. 1998.

ÖZGEÇMİŞ

24.10.1985 Torbalı/İZMİR doğumluyum. İlkokulu İncirlioğa İzzet Ayaydın Ali Sarıyörük ilkokulunda, ortaokulu Hürmüs Ayaydın ortaokulunda, liseyi Aydın Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesinde okudum. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesini kazandım. Haziran 2007’de mezun olup Eylül 2007’de Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladım. Aralık 2007’den itibaren Düzce’de Farmasötik Araştırma Geliştirme Merkezin (FARGEM)’de işe başladım hala orada çalışmaktayım.
