

**İRBESARTAN ETKİN MADDESİNİN
PLAZMA VE FARMASÖTİK PREPARATLARDA
MİKTAR TAYİNİ**

İbrahim TURGUT

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi - 2015**

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

**İRBESARTAN ETKİN MADDESİNİN PLAZMA VE
FARMASÖTİK PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ**

İbrahim TURGUT

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**ERZURUM
2015**

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

**İRBESARTAN ETKİN MADDESİNİN PLAZMA VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ**

İbrahim TURGUT

Tez Savunma Tarihi : 03.07.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zühal GÜVENALP (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Bilal YILMAZ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sümeyra T. YILDIRIM (Erzincan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fatma D. MİLOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Onay

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


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2015**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hipertansiyon.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Hipertansiyon Dağılımını Belirleyen Faktörler	5
2.1.2.1. Cinsiyet	5
2.1.2.2. Yaş	6
2.1.2.3. Yerleşim Yeri.....	6
2.1.3. Hipertansiyon Belirtileri	7
2.1.4. Nedenleri.....	7
2.1.5. Hipertansiyonun Oluşmasında Etkili Risk Faktörleri	8
2.1.5.1. Değiştirilemez Faktörler	8
2.1.5.2. Değiştirilebilir Faktörler	9
2.1.6. Hipertansiyonun Vücuda Etkileri	12
2.1.7. Hipertansiyon Tedavisi	12
2.2. Antihipertansif İlaçlar	13
2.2.1. Diüretikler	14
2.2.1.1. Tiyazid Ailesi.....	14
2.2.1.2. Loop Diüretikleri	15

2.2.1.3. Potasyum Tutucu Diüretikler.....	15
2.2.1.4. Aldosteron Reseptör Antagonistleri.....	15
2.2.2. Adrenerjik Sistem Antagonistleri	15
2.2.2.1. Merkezi Etkili Sempatikolitikler	15
2.2.2.2. Periferik Etkili Sempatikolitikler.....	16
2.2.3. Damar Düz Kasında Etkili İlaçlar.....	18
2.2.3.1. Kalsiyum Kanal Blokörleri.....	18
2.2.3.2. Potasyum Kanal Açıcılar	19
2.2.3.3. Doğrudan Damar Düz Kas Gevşeticileri	19
2.2.4. Yeni Geliştirilmekte Olan İlaçlar.....	20
2.2.5. Renin Anjiyotensin Sistemini (RAS) Etkileyen İlaçlar	20
2.2.5.1. ACE İnhibitörleri	22
2.2.5.2. Anjiyotensin II (AII) Reseptör Antagonistleri (Sartanlar).....	23
2.3. İrbesartan	25
2.3.1. Tarih ve Geliştirme	27
2.3.2. Fizikokimyasal Özellikler.....	28
2.3.3. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri.....	29
2.3.4. Terapötik Etkileri.....	29
2.3.5. İrbesartan Sentezi ve Biyotransformasyon Yolağı	31
2.3.6. İrbesartan İle İlgili Yapılan Çalışmalar	32
2.4. Spektroskopik Yöntemler	36
2.4.1. Spektroskopi	36
2.4.2. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri.....	37
2.4.3. Elektromanyetik Spektrum	38
2.4.4. Işının Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu	38

2.4.4.1. Atomik Absorpsiyon.....	39
2.4.4.2. Moleküler Absorpsiyon	39
2.4.5. Lambert - Beer Kanunu	40
2.4.6. Lüminesans	41
2.4.7. Fotolüminesansın Esasları	42
2.4.8. Jablonski Diyagramı	43
2.5. Floresans	45
2.5.1. Floresans’a Etki Eden Faktörler	45
2.5.2. Maddenin Yapısının Etkisi	46
2.5.3. Maddenin Yapısal Rijiditesinin Etkisi.....	47
2.5.4. Çözücü ve Sıcaklık Etkisi	47
2.5.5. pH Etkisi	48
2.5.6. Çözünmüş Oksijen Etkisi.....	48
2.5.7. Derişimin Etkisi	48
2.5.8. Moleküldeki Süstitüentlerin Etkisi	49
2.5.9. Gelen Işının Dalga Boyunun ve Şiddetinin Etkisi	49
2.5.10. Fotolüminesans Teorisi.....	50
2.5.11. Stokes Kanunu	52
2.5.12. Stern Volmer Eşitliği	52
2.5.13. Uyarılma ve Emisyon Spektrumları	53
2.5.14. Floresans Spektroskopisi İçin Cihazlar.....	53
2.5.15. Florometre ve Spektroflorometrelerin Bileşenleri	53
2.6. Kromatografik Yöntemler.....	56
2.7. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması	57
2.7.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografiler	58

2.7.1.1. Dağılma Kromatografisi	58
2.7.1.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	58
2.7.1.3. İyon Değişim Kromatografisi	58
2.7.1.4. Moleküler-Eleme Kromatografisi.....	59
2.8. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)	59
2.8.1. Enjeksiyon Ünitesi	61
2.8.2. Pompalar	61
2.8.3.Dedektörler	61
2.8.3.1. Floresans Dedektörler	61
2.8.4. Kolon	62
2.8.5. Hareketli Faz.....	63
2.9. Kromatografide Temel Kavramlar.....	63
2.9.1. Alıkonma Zamanı	64
2.9.2. Kapasite Faktörü	64
2.9.3. Seçicilik	65
2.9.4. Kolon Etkinliği	65
2.9.5. Kolonun Ayırma Gücü.....	65
2.10. Geçerlilik Testi (Validasyon).....	65
3. MATERYAL VE METOT.....	69
3.1. Kullanılan Materyaller	69
3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	69
3.1.2. Aletler ve Cihazlar	69
3.2. Yöntemler	70
3.2.1. Spektroflorometri Yöntem Şartları	70
3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları.....	70

3.2.3. İrbesartan'ın Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi.....	71
3.2.4. İrbesartan'ın Floresans Özelliklerinin İncelenmesi	71
3.2.5. İrbesartan Standart Çalışma Çözeltileri ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	72
3.2.6. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması	72
4. BULGULAR.....	74
4.1. İrbesartanın Floresans Şiddetine Çözücü ve pH'ın Etkisi	74
4.2. Spektroflorometri Yöntemi.....	74
4.2.1. Spektroflorometri Yöntem Geçerlilik Testleri.....	74
4.2.1.1. Belirleyicilik	75
4.2.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı	76
4.2.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)	77
4.2.1.4. Doğruluk/ Kesinlik	77
4.2.1.5. Geri Kazanım	78
4.2.1.6. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	79
4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi (HPLC-FD)	81
4.3.1. HPLC-FD Yöntem Geçerlilik Testleri.....	81
4.3.1.1. Belirleyicilik	81
4.3.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı	82
4.3.1.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)	83
4.3.1.3. Doğruluk/ Kesinlik	84
4.3.1.4. Geri Kazanım	85
4.3.1.5. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	86
5. TARTIŞMA.....	88
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	93

KAYNAKLAR	94
EKLER	99
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	99
EK-2. ETİK KURUL KARARI.....	100

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez sürecindeki ve öncesindeki tüm çalışmalarımda beni yönlendiren, bana her konuda yardımcı olan, en yoğun olduğu zamanlarda dahi yardım edebilmek adına değerli vakitlerini harcayan Sayın Araş. Gör. Onur ŞENOL'a, çalışmalarımın her aşamasında büyük emeği olan ve bana her konuda destek veren Araş. Gör. Mehmet Emrah YAMAN'a, eğitim hayatımın en başından bu yana maddi ve manevi tüm zorluklara rağmen eğitimimi tamamlamamı sağlayan Babam Yılmaz TURGUT'a ve Annem Tunan TURGUT'a, hayatımın her evresinde koşulsuz, şartsız yanımda olan eşim Yıldız TURGUT ve biricik kızım Eylül TURGUT'a, her zaman destekleyip ve yardımlarını esirgemeyen sevgili kardeşlerim ve onların ailelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim TURGUT

ÖZET

İrbesartan Etkin Maddesinin Plazma ve Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini

Amaç: Çalışmada, tansiyon rahatsızlığı tedavisinde kullanılan ilaçlardan biri olan irbesartan etkin maddesinin farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında miktar tayinine yönelik spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerin geliştirilip, geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: 1 mg/mL derişimde metanolde hazırlanan irbesartan stok çözeltisi 0.01 M HCl çözeltisi (pH:2) ile seyreltilerek 10-300 ng/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlanarak spektrumları alındı ve spektrofotometri çalışma parametreleri belirlendi. Aynı şekilde 5-2000 ng/mL derişim aralığında irbesartan standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin HPLC-FLD kromatogramları alınarak yöntem çalışma parametreleri belirlendi. Daha sonra geliştirilen yöntemler valide edildi. Geliştirilip valide edilen yöntemler ile farmasötik preparatlarda ve eklenmiş insan plazmasında irbesartan miktar tayinleri gerçekleştirildi.

Bulgular: Spektrofotometrik yöntemin 10-300 ng/mL derişim aralığında doğrusal, günüçi ve günler arası doğruluk (bağıl hata) değeri 8.0'dan ve kesinlik (bağıl standart sapma) değerinin 2.0'dan düşük, LOQ değeri 10 ng/mL, LOD değeri ise 3 ng/mL olarak belirlendi. HPLC-FD yönteminin ise 5-2000 ng/mL derişim aralığında doğrusal, doğruluk (bağıl hata) değeri %7.5'ten ve kesinlik (bağıl standart sapma) değerinin %4.5'ten düşük olduğu, LOQ değerinin 5 ng/mL ve LOD değerinin ise 2 ng/mL olarak tespit edildi. Her iki yöntemin hem farmasötik preparat ve plazma için ortalama geri kazanım değeri yaklaşık 98.55 olarak belirlendi. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemler iki farklı ilaç müstahzarına (Karvezide ve Co-İrda) başarıyla uygulandı.

Sonuç: İrbesartan etkin maddesinin plazma ve farmasötik preparatlarda miktar tayinine yönelik uygulanan kromatografik ve spektrofotometri yöntemlerin basit, hızlı, hassas olduğu ve farmasötik preparatların kalite kontrol çalışmalarında ve insan plazmasında in-vitro çalışmalarda uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HPLC, irbesartan, spektrofotometri

ABSTRACT

Determination of Irbesartan in Plasma and Pharmaceutical Formulations

Aim: In this study, it is aimed to develop and validate spectrofluorometric and chromatographic methods in order to determine Irbesartan which is pharmaceutical used in treatment of hypertension, in spiked human plasma and pharmaceutical formulations.

Material and Method: 1 mg/mL of Irbesartan bulk solution which is prepared in methanol is diluted by 0.01 M HCl (pH:2) in order to prepare working solutions in between 10-300 ng/mL. After that prepared samples were measured by spectrofluorometry and spectrum of each concentration were recorded. 5-2000 ng/mL of Irbesartan standard samples were also prepared for HPLC-FD method and their chromatograms were also received. Determination of irbesartan was performed in pharmaceutical formulations and spiked human plasma by developed and validated methods.

Results: In spectrofluorometric analysis, method is found to be linear in 10-300 ng/mL. Precision and accuracy of the method is lower than 8.00 and 2.00, respectively and LOQ of the proposed method is 10 ng/mL while LOD value is 3 ng/mL. Linear range of the HPLC-FD method is measured to be 5-2000 ng/mL. Accuracy of the method is lower than %7.5 and precision of the HPLC-FD method is lower than % 4.5 while LOQ and LOD value of the method is 5 ng/mL and 2 ng/mL, respectively. Developed and validated methods was applied onto two different pharmaceutical formulations (Karvezide and Co-İrda). Average analytical recovery values of Karvezide and Co-İrda for both methods was calculated as % 98.55. Developed and validated methods were successfully applied to two different pharmaceutical formulations (Karvezide ve Co-İrda).

Conclusion: It is noticed that accurate, simple, sensitive proposed chromatographic and spectroscopic methods are applicable for determination of Irbesartan in quality control studies of pharmaceutical preparation and in-vitro human plasma samples.

Key Words: HPLC, irbesartan, spectrofluorometry

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ARB	: Anjiyotensin reseptör blokörleri
AT₁	: Anjiyotensin tip 1
AT₂	: Anjiyotensin tip 2
AT₃	: Anjiyotensin tip 3
AT₄	: Anjiyotensin tip 4
Ang II	: Anjiyotensin II
BKİ	: Beden kitle indeksi
BSS	: Bağlı standart sapma
HPLC	: Yüksek basınç sıvı kromatografisi
LOD	: Gözlemlenebilme sınırı
LOQ	: Miktar tayin sınırı
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
RAS	: Renin anjiyotensin sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kan basıncına göre tansiyonun sınıflandırılması	3
Şekil 2.2. Türkiye’de hipertansiyon farkındalığı.....	5
Şekil 2.3. Türkiye’de cinsiyete göre hipertansiyon prevalansı.....	5
Şekil 2.4. Türkiye’de yaşa bağlı olarak hipertansiyon prevalansı	6
Şekil 2.5. İrbesartan’ın molekül yapısı	25
Şekil 2.6. Elektromanyetik dalga.....	38
Şekil 2.7. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri	38
Şekil 2.8. Enerji seviyeleri arasındaki geçişler	40
Şekil 2.9. Jablonski diyagramı.....	44
Şekil 2.10. Nanal ve Panaf’ın kimyasal yapıları	46
Şekil 2.11. Fluoresin ve fenolftalein’in kimyasal yapısı.....	47
Şekil 2.12. pH değişikliklerin molekül yapısını değiştirmesi.....	48
Şekil 2.13. Derişimin floresans şiddeti ile değişimi	49
Şekil 2.14. Bir spektrofotometrenin başlıca kısımları.....	55
Şekil 2.15. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi.....	56
Şekil 2.16. HPLC cihazının şematik görünüşü.....	60
Şekil 2.17. Kromatogram.....	64
Şekil 4.1. 10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL derişimlerde irbesartan standart çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu	75
Şekil 4.2. 10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL derişimlerde irbesartan plazma çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu	76

Şekil 4.3. Spektrofolorometri yönteminin 10-300 ng/mL derişim aralığında irbesertanın kalibrasyon eğrileri: A) standart çözeltiler; B) plazma çözeltileri	76
Tablo 4.2. Spektroflorometri yöntemi ile elde edilen standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	77
Şekil 4.4. 100 ve 300 ng/mL Karvezide (150 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	80
Şekil 4.5. 100 ve 300 ng/mL Co-ırda (150 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu.....	81
Şekil 4.6. 100 ng/mL derişimde IS içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 ve 2000 ng/mL derişimlerde irbesartan standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları.....	82
Şekil 4.7. 100 ng/mL derişimde IS içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 ve 2000 ng/mL derişimlerde irbesartan plazma çalışma çözeltilerinin kromatogramları.....	82
Şekil 4.8. HPLC-FD yönteminin 5-2000 ng/mL derişim aralığında irbesertanın kalibrasyon eğrileri: A) standart çözeltiler; B) plazma çözeltileri.....	83
Şekil 4.9. Standart ekleme yöntemine göre 100 ng/mL karvezide (150 mg) üzerine eklenmiş 20, 250 ve 1500 ng/mL kalite kontrol numunelerinin kromatogramları.....	87
Şekil 4.10. Standart ekleme yöntemine göre 100 ng/mL co-ırda (150 mg) üzerine eklenmiş 20, 250 ve 1500 ng/mL kalite kontrol numunelerinin kromatogramları.....	87

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Spektroflorometri yöntem şartları.....	70
Tablo 3.2. HPLC-FD yöntem şartları.....	70
Tablo 4.1. İrbesartan'ın floresans şiddetine çözücünün etkisi (50 ng/mL).....	74
Tablo 4.3. İrbesartan standart ve plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6).....	78
Tablo 4.4. Spektroflorometri yönteminin standart ekleme yöntemine göre farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri	79
Tablo 4.5. Spektroflorometri yönteminin plazma yüzde geri kazanım değerleri	79
Tablo 4.6. Spektroflorometri yönteminin farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri	80
Tablo 4.7. HPLC-FD yöntemi ile elde edilen standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri	83
Tablo 4.9. HPLC-FD yönteminin standart ekleme yöntemine göre farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri	85
Tablo 4.10. HPLC-FD yönteminin plazma yüzde geri kazanım değerleri	86
Tablo 4.11. HPLC-FD yönteminin farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri ...	86

1. GİRİŞ

Tansiyonu kısaca kan basıncı olarak tanımlayabiliriz. Kan basıncı; damar içerisindeki kanın dolaşım esnasında damar duvarlarına yaptığı basınçtır. Bu basınç kalp tarafından pompalanan kan miktarı ve damarların bu akıma karşı oluşturduğu dirence bağlıdır. Her bir kalp atımında kalp, kanı önce pompalar, sonra kanın yeniden kalbe dolması için istirahat haline geçer. Kalbin kasılması sırasında ölçülen kan basıncı, büyük tansiyon(sistolik kan basıncı), kalbin gevşemesi esnasında ölçülen kan basıncı ise küçük tansiyondur (diyastolik kan basıncı).

Hipertansiyon damar kan basıncının normal kabul edilen değerlerin üzerinde olması durumudur. Vücuda verdiği zararlar göz önüne alındığında çok önemli bir sağlık problemidir.

İrbesartan, hipertansiyon tedavisinde kullanılan anjiyotensin II (AII) reseptör antagonistlerinden biridir. İrbesartan anjiyotensin reseptörlerinin AT₁ alt tipini selektif olarak bloke ederek, anjiyotensin II isimli polipeptidin bağlanmasını engeller ve vazodilatasyona neden olur. Anjiyotensin II'nin adrenal bezlerdeki reseptörlere bağlanması aldosteron salınımını azalttığından kan basıncının azalmasına neden olmaktadır.

Bir farmasötik preparat her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen hastaya verildiği zaman etki gücü yetersiz olabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç ya da diğer maddelerin miktar tayini, teşhisi ve belirlenmesi, ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin analizi bilimsel açıdan çok önemlidir. Bu bilgiler ışığında, plazmada irbesartan derişiminin belirlenebilmesi, hipertansiyonun tedavisinde yardımcı bir faktör olabilir. Ayrıca gerek imalat ve gerekse piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin miktarlarının doğru olarak belirlenmesi ilacın kullanımı açısından çok önemlidir.

Çalışmamızda, antihipertansif ilaçlardan irbesertan etkin maddesinin standart çözeltilerde, farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar düzeylerinin belirlenmesi için spektrofotometri ve HPLC-FD yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılmış yöntemlerin uygulama aşamasında irbesertan etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda miktar tayinlerinin yapılması düşünülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bilgiler ışığında ilk önce hayvan çalışması ve daha sonra da hipertansiyon hastalarında irbesertan miktar analizleriyle ilgili çalışmalar planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon

Farklı iki günde en az iki kez yapılan ölçümlerde sistolik kan basıncının 140 mmHg ve üzerinde ya da diyastolik kan basıncının 90 mmHg ve üzerinde olmasına hipertansiyon (yüksek tansiyon) adı verilmektedir. Hipertansiyon tanısı için büyük ve küçük tansiyondan herhangi birisinin normalden yüksek olması yeterlidir. Sistolik kan basıncının (büyük tansiyon) 120 mmHg ve diyastolik kan basıncının (küçük tansiyon) 80 mmHg olması en uygun tansiyon değeridir. Kan basıncının 120-129/80-84 mmHg arasında olması normal, 130-139/85-89 mmHg değerleri arasında olması yüksek normal tansiyon olarak adlandırılır.¹⁻³

Kategori	Sistolik	Diastolik
Normal	< 130	< 85
Yüksek Normal	130-139	85-89
Hipertansiyon - 1. derece	140-159	90-99
2. derece	160-179	100-109
3. derece	≥ 180	≥ 110

Şekil 2.1. Kan basıncına göre tansiyonun sınıflandırılması

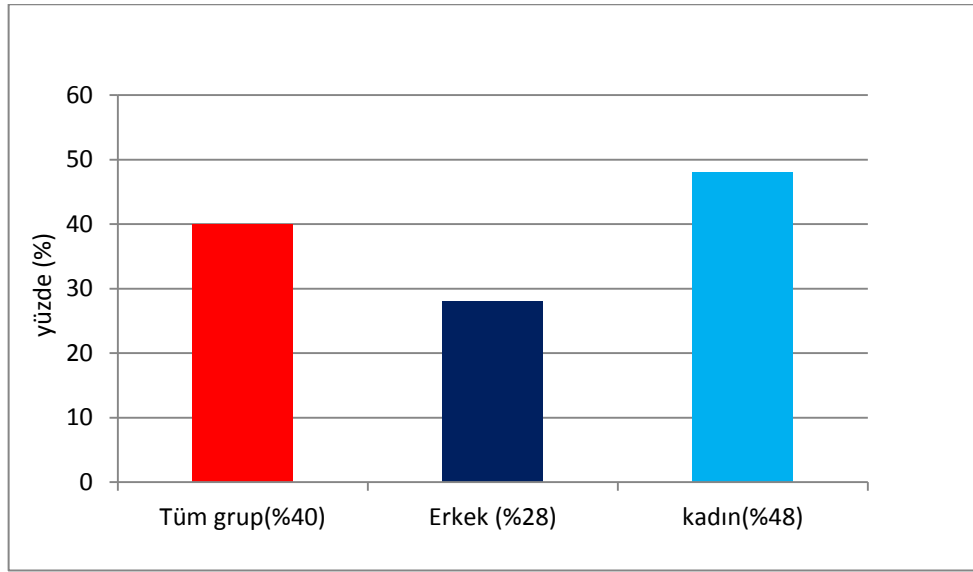
Hipertansiyon uzun yıllar belirtisiz veya komplikasyonsuz olarak seyredebilir. Bu esnada tek somut bulgu kan basıncının yüksek saptanmasıdır. Ciddi komplikasyonlar uzun yıllar sonra ortaya çıkmaktadır. Hipertansiyon hastalarının pek çoğu hipertansif olduklarından haberdar değildirler. Hipertansiyonlu hastaların ancak yarısı tedavi almaktadır ve bu hastaların önemli bir bölümü de öngörülen tedavileri düzenli bir şekilde uygulamamaktadır. Buna bağlı olarak da tedavi alan hastaların yarısından azının kan basınçları kontrol altındadır. Bu durumda, hipertansiyon

hastalarının büyük bölümü yüksek kan basıncının getirebileceği olumsuzluklarla karşı karşıyadır.⁴

2.1.1. Epidemiyoloji

Hipertansiyon, dünyada önlenebilir ölüm nedenleri içerisinde bir numaralı risk faktörüdür. 2000 yılı itibarıyla dünyada erişkin nüfusun % 26'sının hipertansiyona sahip olduğu ve bu oranın 2025 yılında % 29.2'ye çıkacağı öngörülmüştür. Bir diğer deyişle, halen 972 milyon insanın hipertansiyonu bulunmaktadır ve 2025 yılında bu rakamın 1.5 milyarı aşabileceği öngörülmektedir.⁵

Ülkemizde de hipertansiyon oldukça sık görülen bir sağlık problemidir. Ortalama erişkin her 3 kişiden 1'inde hipertansiyon görülmektedir. Türkiye'deki yetişkin nüfusta hipertansiyon prevalansı % 31.8'dir. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere oranla biraz fazladır. Türkiye'de hipertansif hastaların önemli bölümü ekonomik olarak üretken çağ kabul edilen orta yaş grubunda yer almaktadır. Ülkemizde nüfus yapısının daha çok genç olduğu dikkate alındığında, 30 yaş altında görülen hipertansiyon sıklığı da ihmal edilmeyecek düzeydedir. Altmış yaşın üzerinde hipertansiyon görülme sıklığı daha da artmaktadır. Ülkemizde, hipertansiyon görülme oranı yüksek olmasına rağmen hipertansif hastaların sadece % 40'ı bu sinisi hastalığın farkındadır.⁶

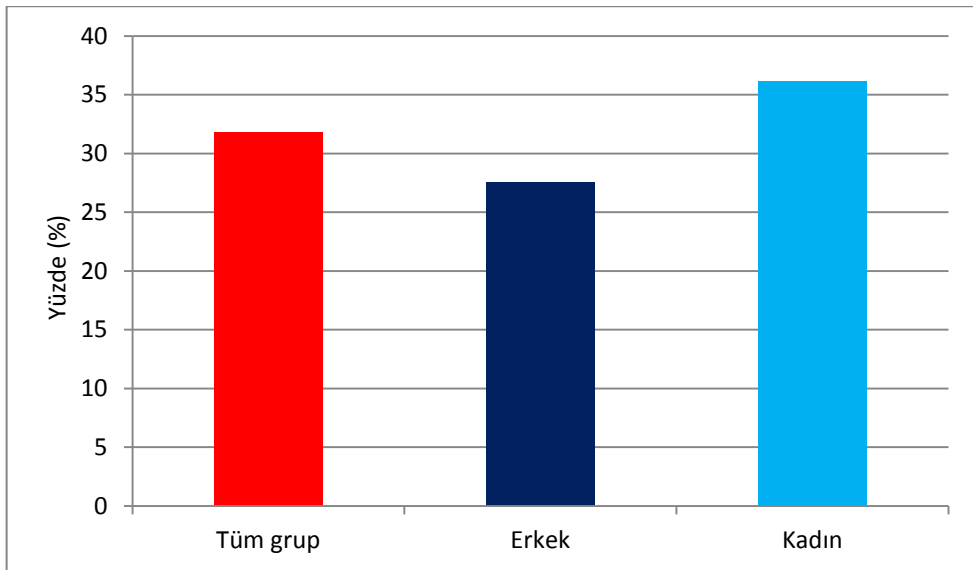


Şekil 2.2. Türkiye’de hipertansiyon farkındalığı

2.1.2. Hipertansiyon Dağılımını Belirleyen Faktörler

2.1.2.1. Cinsiyet

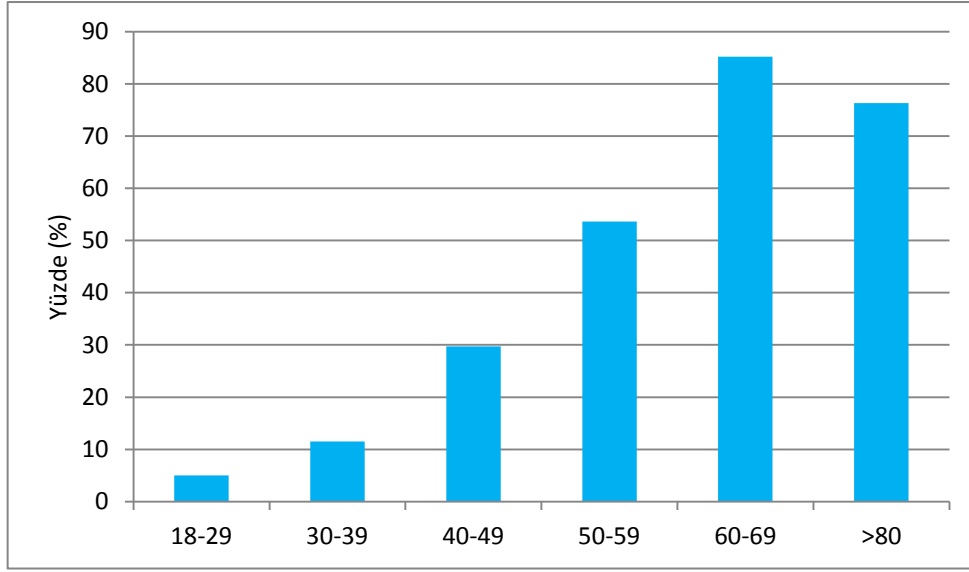
Hipertansiyon görülme olasılığı kadınlarda erkeklere oranla biraz daha fazladır. Ülkemizde 18 yaş üzeri yetişkin bireylerde hipertansiyon görülme sıklığı erkeklerde % 27.5 kadınlarda ise % 36.1’dir.



Şekil 2.3. Türkiye’de cinsiyete göre hipertansiyon prevalansı

2.1.2.2. Yaş

Yaş gruplarına göre ülkemizde hipertansiyon görülme sıklığı 18-29 yaş grubunda %5.0, 30-39 yaş grubunda %11.5, 40-49 yaş grubunda %29.7, 50-59 yaş grubunda %53.6, 60-69 yaş grubunda %85.2 ve 80 yaş ve üzerinde %76.3 olarak saptanmıştır. Buradan kanaatle ülkemizde 50 yaş üzerinde hipertansiyon hastalığı görülme sıklığı artmaktadır.



Şekil 2.4. Türkiye’de yaşa bağlı olarak hipertansiyon prevalansı

2.1.2.3. Yerleşim Yeri

Yapılan araştırmalara göre ülkemizde kırsal kesimlerde yaşayan insanlarda hipertansiyon görülme oranı kentsel bölgede yaşayanlara oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Bu faktörlerin dışında kalıtım, beslenme şekli, alkol, sigara kullanımı ve kişinin aktivite durumları da ülkemizde hipertansiyon prevalansını etkileyen diğer faktörlerdir.⁷

2.1.3. Hipertansiyon Belirtileri

Yüksek tansiyon, 180/110 mmHg düzeyine ulaşmadığı sürece normalde herhangi bir belirti göstermez. Hipertansiyonun başlıca belirtileri baş ağrısı, baş dönmesi, kalp çarpıntısı, nefes darlığı, yorgunluk, burun veya kulaktan kan gelmesi, yol yürüme ve merdiven çıkmada zorluk çekme, bazen çok sık idrara çıkma, gece uyurken uykudan kalkıp idrar yapma ve bacaklarda şişlik görülmesidir. Kan basıncının çok yükseldiği durumlarda, çift görme, dilde peltekleşme, yüzde veya vücutta karıncalanma gibi belirtiler de baş gösterebilir.

2.1.4. Nedenleri

Hipertansiyonun nedeni, %90-95 hastada bilinmemektedir (primer hipertansiyon, esansiyel hipertansiyon). Yani belirli bir hastalığa bağlı oluşmamaktadır. %5-10 hastada ise hipertansiyon başka bir hastalığa bağlıdır (sekonder hipertansiyon).

Primer Hipertansiyon; Henüz tam olarak açıklanamamış nedenlerden dolayı arteriyel kan basıncının sürekli normal kabul edilen değerlerden yüksek seyretmesidir. Hipertansif hastaların % 90 – 95'i primer hipertansiyon sınıfında yer almaktadır.

Sekonder Hipertansiyon; primer hipertansiyondan farklı olarak burada kan basıncını yükselten nedenler mevcuttur. Hipertansiyon başlangıç yaşının 20'den küçük veya 50'den büyük olması, ilaç tedavisine rağmen tansiyonun direnç göstermesi, daha önce kontrol altında tutulan hipertansiyonun kontrolden çıkması, ciddi organ hasarlarının bulunması sekonder hipertansiyon olma olasılığını artıran durumlardır. Ayrıca böbrek parankimal hastalıklar, endokrin hastalıklar, nörojenik hastalıklar, renovasküler hastalıklar, gebelik ve ilaç kullanımı gibi etkenler sekonder hipertansiyonun oluşmasında birincil derecede rol oynamaktadır.⁸

2.1.5. Hipertansiyonun Oluşmasında Etkili Risk Faktörleri

Hipertansiyon; hem toplumda çok sık görülen bir sağlık sorunu olması hem de koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalık bakımından belli başlı risk faktörü olması çok önemli bir sağlık problemidir. Bu risk faktörler kendi aralarında değişmeyen ve değişebilen olarak iki başlıkta incelenmektedir. Hipertansiyonun oluşumunda rol oynadığı çeşitli araştırmalarla ortaya konan risk faktörlerini şu şekilde sıralayabiliriz.⁸

2.1.5.1. Değiştirilemez Faktörler

Genetik Yapı

Çalışmalar genetik faktörlerin hipertansiyon etiyolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Ailesinde yüksek tansiyon hastası bulunan kişilerde hipertansiyon gelişme riski oldukça yüksektir. Esansiyel hipertansiyonlu hastaların %70'inde aile hikâyesi olduğu ve hipertansif kişilerin birinci derece yakınları arasında hipertansiyonun anlamlı derecede yüksek sıklıkta saptandığı görülmüştür. Ancak bu durum, yüksek tansiyonlu hasta yakınlarında da mutlaka yüksek tansiyon gelişeceği anlamına gelmez. Ama bu kişilerin hipertansiyon risk grubunda olduklarını bilip daha dikkatli davranmaları gerekmektedir.

İrk

Çok sayıda epidemiyolojik çalışmanın sonucunda, siyah ırkta hipertansiyonun daha sık görüldüğü, cinsiyete göre farklılık göstermedikleri ve daha erken yaşta başladığı saptanmıştır. Beyaz ırkta ise 50 yaşına kadar erkeklerde, 50 yaşından sonra ise kadınlarda görülme düzeyi daha yüksek seviyededir.

Yaş ve Cinsiyet

Bebeklik ve çocukluk çağından da başlayabilen hipertansiyon en çok 35-60 yaşları arasında görülmektedir. İlerleyen yaşla birlikte hipertansiyon görülme sıklığı artmakta ve her yaş grubunda kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir. Afrika,

Latin Amerika, Okyanusya ve Hindistan gibi pek çok bölgede yapılan araştırmalara göre kan basıncında kadınlarda ve erkeklerde yaşla birlikte artış olduğu görülmüştür. Bu artış kadınlarda 50 yaşından sonra daha belirgin bir hal almaktadır.

Şeker Hastalığı

Şeker hastalarında yüksek tansiyonun ortaya çıkma riski, şeker hastası olmayanlara göre daha fazladır. Şeker hastalarında hipertansiyonun kontrolü çok daha önemlidir. Şeker hastalarında tansiyonun normal kabul edilen sınırları 130/80 mmHg'dır.

2.1.5.2. Değiştirilebilir Faktörler

Sigara

Sigara, yüksek tansiyonun damarlar üzerindeki zararlı etkilerini hızlandırır. Her sigara içiminden sonra 15 – 30 dakika süren akut kan basıncı yükselmesi görülebilir. Ancak sigaranın kan basıncı üzerinde uzun süreli etkisi yoktur. Ayrıca sigara kardiyovasküler riski 2 – 3 kat artıran ve tromboza bağlı inme açısından çok güçlü bir risk faktörüdür. Kardiyovasküler sistem üzerindeki olumlu etkiler tütün içiminin bırakılmasından sonraki bir yıl içinde görülür. Nikotin bantları kan basıncını yükseltmediği için hipertansif hastalar sigarayı bırakmada bu bantları kullanılabilir.⁹

Kafein

Kafein'in kan basıncı üzerindeki etkisi doza ve alım zamanına bağlıdır. Kafeinli içecekler alındığında kan basıncı yükselmekte, nabız artmaktadır. Yalnız kafein alımı üzerinden iki saat geçtikten sonra her ikisi de normal düzeye geri dönmektedir.

Alkol

Aşırı miktarda alınan alkolün damar sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Alkol, hipertansiyon tedavisi için kullanılan ilaçların etkisini azaltmaktadır. Günlük alkol kullanımı; 60 ml viski, 300 ml şarap ve 720 ml bira ile

sınırlandırılmalıdır. Alkol alımının sınırlı düzeyde tutulması önerilmektedir. Hipertansiyon vakalarının %30 kadarının alkolle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.

Fazla Tuz Tüketimi

Yapılan çalışmalar, diyetle alınan sodyum ile kan basıncı düzeyi arasında pozitif bir ilişkinin varlığını göstermektedir. Klinik çalışmalarda hipertansif hastalarda sodyum alımı günde 80 – 100 mmol arasında kısıtlandığında sistolik kan basıncında 1 mmHg, diyastolik kan basıncında 0,7 mmHg düşme görülmüştür. Tuz tüketimi fazla olan kişilerin kan basıncının değerlerinin de yüksek olduğu ortaya çıkmıştır.

Yağ Tüketimi

Hayvansal yağlar ve margarinler doymuş yağ asidi içerirler. Bu yağlar kanda LDL kolesterolü yükselterek koroner kalp hastalığı ve hipertansiyon riskini artırır. Tekli doymamış yağ asidi içeren zeytinyağı ve çoklu yağ asidi içeren diğer sıvı yağlar bu olumsuz etkiyi göstermezler. Yapılan araştırmalarda hayvansal yağ kullanan kişilerde hipertansiyon ve koroner arter hastalığı görülme olasılığı daha yüksektir.⁶

Stres

Aşırı sıkıntılı bir yaşam biçimi, kişilik özellikleri ve stres yüksek tansiyonun ortaya çıkması için zemin hazırlar. Yapılan çalışmada beş yıllık bir dönemde depresyonun hipertansiyon oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada da, Doğu Finlandiya’da ümitsizlik ile hipertansiyon oluşumu arasındaki ilişki 616 bireyde incelenmiştir. Bireylerde hipertansiyon oluşumunu etkileyecek tüm faktörlerin benzer olmasına karşın dört yıl sonrasında ümitsizlik seviyesi yüksek olan bireylerde hipertansiyon görülme oranı ümitsiz olmayan bireylere göre üç katı oranında tespit edilmiştir.⁶

Obezite

Obezite, vücutta aşırı yağ depolanmasına bağlı olarak ortaya çıkan ve hastalık olarak kabul edilen bir durumdur. Genel olarak bir kimsenin ideal beden ağırlığından % 20 fazla olması şeklinde de tanımlanabilir.

Günümüzde kişinin obez olup olmadığını saptamanın iki yöntemi vardır. Bunlar; ideal kilo ölçümleri ile beden kitle endeksi (BKİ) veya Quetelet indeksidir.

Beden kitle endeksi (BKİ), obezitenin sınıflandırılmasında ve tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında kullanılan pratik bir yöntemdir. Vücut ağırlığının boy uzunluğunun karesine oranı BKİ'ni belirler.

BKİ <18.5 kg/m ²	Zayıf
BKİ 18.5 – 24.9 kg/m ²	Normal kilolu
BKİ 25 – 29.9 kg/m ²	Fazla kilolu
BKİ 30 – 34.9 kg/m ²	I. Derece obez
BKİ 35 – 39.9 kg/m ²	II. Derece obez
BKİ >40 kg/m ²	İleri Derece obez

(WHO, 1997; National Institutes of Health, 1998).

Fazla kilolar, kan basıncı üzerinde olumsuz rol oynayarak yüksek tansiyona zemin hazırlar. Erişkinlerde ve çocuklarda diğer potansiyel faktörlerden bağımsız olarak obezite ve hipertansiyon arasında bir ilişki ortaya konmuştur. Kontrollü klinik çalışmalarda 1 kg zayıflamanın sistolik kan basıncında 1.6 mmHg, diyastolik kan basıncında ise 1.3 mmHg düzeyinde düşüşe neden olduğu kanıtlanmıştır. Obez kişilerde hipertansiyon görülme sıklığı %50'lere yaklaşmaktadır. Bu yüzden fazla kiloların verilmesi, kan basıncının normal düzeye indirilmesine büyük ölçüde yardımcı olur.⁹

Fiziksel Aktivite

Hareketsiz yaşam süren kişilerde hipertansiyon görülme sıklığı, düzenli fiziksel

aktivitesi olanlara göre % 20 – 50 daha fazladır. Düzenli yapılan egzersiz ve spor, yüksek tansiyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olur. Hipertansiyonlu hastalara haftada en az 3 kez hafif tempoda yürüyüş, koşu, bisiklet ve yüzme gibi hafif düzeyde aerobik egzersizlerden en az birkaçını yapmaları önerilmektedir. Bu tür hafif egzersizler sistolik kan basıncının yaklaşık 4 – 8 mm/Hg düşmesine yardımcı olabilmektedir.^{6,9}

2.1.6. Hipertansiyonun Vücuda Etkileri

Yüksek tansiyonun en çok etkilediği organlar; kalp, beyin, böbrekler, büyük atardamarlar ve gözlerdir. Hipertansiyon bu organları etkileyerek uzun süre içerisinde kalıcı hasarlara ve ölümlere yol açabilir. Tansiyon yüksekliği kalbin iş yükünü artırır ve atar damarlarda geri dönüşü mümkün olmayan harabiyetlere yol açar. Kalp, böbrek, göz ve beyin damarları bu yüksek basınca uzun yıllar boyunca sessizce direnebilir. Bu nedenle kan basıncındaki yükselmenin yarattığı harabiyeti fark etmek zordur. Ancak bu hastalara zarar vermediği anlamına gelmez. Hipertansiyonun vücuda verdiği başlıca zararları şu şekilde sıralayabiliriz;

- * Kalp yetmezliği, kalp büyümesi, kalbi besleyen damarlarda daralma (koroner arter darlığı), kalbi besleyen damarlarda tıkanma (kalp krizi)
- * Beyin kanaması, felç, beyin damarlarında daralma ve tıkanma
- * Böbrek yetmezliği, böbrek fonksiyonlarında bozulma
- * Görme azalması ve körlük
- * Büyük atardamarlarda genişleme, bu genişlemelere bağlı olarak damar yırtılması ve bu damarlarda tıkanma. Bunların sonucu, kangren veya ani kanamalara bağlı ölüm gelişebilir.

2.1.7. Hipertansiyon Tedavisi

Hipertansiyon tedavisinde temel amaç, hedef organ hasarını önleyerek sakatlık ve ölümleri azaltmaktır. Öncelikle mevcut olan diğer kardiyovasküler risk faktörleri ve

hedef organ hasarları tedavi edilmelidir. Sekonder hipertansiyon olan hastalarda yani hipertansiyonu başka bir hastalığa bağlı olan hastalarda hipertansiyona yol açan hastalığın tedavi edilmesi amaçlanmalıdır.¹⁰

Hipertansiyonun nedeni saptanamaz ise kan basıncı, hastaların yaşam düzeni değiştirilerek veya ilaçla düşürülmelidir. Hastalarda yaşam düzeninin değiştirilmesi (ilaçsız tedavi) kesinlikle ihmal edilmemelidir.¹⁰

İlaçsız tedavi:

Tansiyon yüksekliği olan bütün hastalara yaşam tarzı ile ilgili tavsiyeler şunlardır:

- Tuz tüketimi azaltılmalıdır.
- Hayvansal yağ tüketimi azaltılmalıdır.
- Alkol tüketiminden kaçınılmalıdır.
- Meyve ve sebze tüketimi artırılmalıdır.
- Sigara kullanımına son verilmelidir.
- Stresten uzak bir yaşam tarzı benimsenmelidir.
- Düzenli fiziksel aktivite ve egzersiz yapılmalıdır.¹⁰

2.2. Antihipertansif İlaçlar

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar, diüretikler, adrenerjik sinir sistemi antagonistleri, renin anjiyotensin sistemini (RAS) etkileyen ilaçlar, damar düz kasında etkili ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan ilaçlardır.^{10, 11}

1. Diüretikler

2. Adrenerjik Sinir Sistemi Antagonistleri

A. Merkezi Etkililer

B. Periferik Etkililer

1. Adrenerjik Nöron Blokörleri
2. Gangliyon Blokörleri
3. Adrenerjik Reseptör Blokörleri
 - 3.1. α Reseptör Blokörleri
 - 3.2. β Reseptör Blokörleri
 - 3.3. α ve β Reseptör Blokörleri
3. Damar Düz Kasında Etkili İlaçlar
 - A. Kalsiyum Kanal Blokörleri
 - B. Potasyum Kanal Açıcılar
 - C. Doğrudan Damar Düz Kasını Gevşetici İlaçlar
4. Yeni Geliştirilmekte Olan İlaçlar
5. Renin-Anjiyotensin Sistemini Etkileyen İlaçlar
 - A. ACE İnhibitörleri
 - B. Anjiyotensin II Tip α_1 Reseptör Antagonistleri

2.2.1. Diüretikler

Antihipertansif etki mekanizmaları hala tam olarak bilinmeyen bu ilaçların uzun sürede vazodilatörler gibi davrandığı ya da sempatolitik etki gösterdiği sanılmaktadır.

Farmakolojik özelliklerine göre diüretikler günümüzde 4 grupta toplanmaktadır.¹¹

2.2.1.1. Tiyazid Ailesi

Distal tübülüs kıvrımlarının başlangıç bölgesinde “Na⁺, Cl⁻” transportunu inhibe ederek Na⁺ geri emilimini bozarlar. Siklotiyazid, hidroklorotiyazid, indapamid tiyazid ailesi içerisinde örnek olarak verilebilir. Başlangıç antihipertansif tedavisinde kullanılırlar. Antihipertansif etki gücü yüksek, etki süresi ise uzundur. Buna karşın

tiyazid ailesi yan etki profili en yüksek diüretiklerdir. Hiperürisemi, kas krampları bu grup ilaçların sık görülen yan etkilerindendir.

2.2.1.2. Loop Diüretikleri

Henle kulpunun kalın çıkan kolunda etkilidirler. Bu ilaçların artan dozları ilave bir diürez sağlar. Etki gücü yüksek olmasına karşın etki süresi kısadır. Furosemid, azosemid bu gruba örnek olarak verilebilir. Başlangıç antihipertansif tedavide kullanılmazlar. En sık görülen yan etkileri dehidratasyondur.

2.2.1.3. Potasyum Tutucu Diüretikler

Distal tübülüslerin son bölümü ve toplayıcı kanallarda doğrudan etki ile Na^+ ile K^+ alış verişini duraklatırlar. Na^+ atılımını artırır, K^+ reabsorpsiyonunu çoğaltırlar. Etki gücü ve süresi diğer diüretiklere nazaran düşüktür. Amilorid, triamteren, bu grup üyelerindendir. Yan etki olasılıkları çok düşüktür. Olası görülebilecek yan etkileri hiperkalsemi ve gastrointestinal irritasyondur.

2.2.1.4. Aldosteron Reseptör Antagonistleri

Primer etki yerleri distal tübülüslerin son bölümü ve toplayıcı kanallar olup Na^+ atılımında artma, K^+ reabsorpsiyonunda fazlalaşma meydana getirirler. Bu grup ilaçların da etki gücü ve süresi düşük olmakla birlikte yan etkileri azdır. Nadiren görülebilen yan etkileri jinekomastidir. Spirinolakton bu gruba örnek olarak verilebilir.¹²

2.2.2. Adrenerjik Sistem Antagonistleri

Bu grup ilaçlar, sempatik sinir sistemini etkileyerek, sempatolitik etki yaratarak işlev gösterirler. Merkezi ve periferik etkililer olmak üzere 2 ana grupta toplanırlar.

2.2.2.1. Merkezi Etkili Sempatolitikler

Santral α_2 adrenerjik ya da imidazolin (I_2) reseptör agonistleridir. Klonidin, guanfacin, guanabenz ve α -metildopa santral α_2 adrenerjik agonist, rilmenidin ve moxonidin I_2 reseptör agonistleridir. Bu ilaçlar, beyin sapında postsinaptik α_2

adrenoreseptörleri ve I₂ reseptörleri uyarak vazomotor merkezi deprese ederler. Ayrıca, periferik presinaptik α_2 adrenoreseptörleri selektif olarak uyarak nörepinefrin salınımını inhibe ederler. Sonuçta, sempatik tonusun ve buna paralel olarak periferik damar direncinin düşmesini sağlarlar.¹¹⁻¹³

Kalp hızı ve debisi azalırken plazma hacmi artar. Bu grup ilaçların en önemli özelliklerinden biri de, renal kan akımını bozmamasıdır. Diüretikler dışında diğer antihipertansif ilaçlarla etkileşebildiğinden ve yan etkilerinin fazlalığına bağlı (%30) olarak klinik kullanımları oldukça kısıtlı kalmıştır. İmidazolin-2 (I₂) agonistleri hariç, bu gruptaki ajanların belirgin sedatif etkileri ve rebound hipertansiyona neden olmaları bu kısıtlamadaki en önemli faktörler olmuştur.¹¹⁻¹³

2.2.2.2. Periferik Etkili Sempatikolitikler

I-Adrenerjik Reseptör Bloörleri

Guanedrel, guanethidin, rauwolfia alkaloidleri (rauwolfia serpentina, reserpina), debrisoquin ve betanidin gibi ilaçlar periferik sinir uçlarında katekolamin depolarını boşaltarak ya da katekolaminlerin buralardan salınımını inhibe ederek etki gösterirler. Yarılanma zamanları 2-3 günden 1-2 haftaya kadar değişen sürelerde uzun olan bu ilaçların, guanedrel dışında etkileri geç ve yavaş başlar. Bu sınıf antihipertansifler tüm diğer antihipertansiflere yanıt alınamayan şiddetli refrakter hipertansiyon dışında verilmemelidir. Sık olarak gelişen, ciddi ortostatik hipotansiyon nedeni ile hastaların çoğu tarafından iyi tolere edilmezler. İlaç etkileşimleri çoktur. Periferik damar direncini düşürürken kalp atım sayısını ve debisini azaltırlar. Bunun yanı sıra plazma volümü ve plazma renin aktivitesini arttırırlar. Böbrek kan akımı düşer. Tuz ve su retansiyonuna neden oldukları gibi aritmi ve konvülsiyon eşliğinde düşme, depresyon ve parkinson tablosunda ağırlaşmaya neden olurlar.¹³

II- Gangliyon Bloke Ediciler

Hegzamethonium, mecamilamin, pentolinium ve trimethaptandan oluşan bu ilaçlar sempatik ve parasempatik gangliyonlarda nikotinik reseptörleri kompetitif bir mekanizma ile bloke ederek ganglioplejik etki meydana getirirler. Sempatik ve parasempatik sistem inhibe olur. Arteriyel ve venöz dilatasyon, hipotansiyon, kalp dakika atım hacminde azalma, taşikardi, idrar retansiyonu, konstipasyon, görme bozuklukları oluşur. Şiddetli ortostatik hipotansiyon, ileus gibi önemli yan etkilerin görülmesi nedeni ile pratik hekimlikte kullanılmayan bu ilaçlar arasında günümüzde trimethaptan (iv) acil hipertansiyon tedavisinde yer alır.

III- Adrenerjik Reseptör Antagonistleri

Adrenerjik sinir uçlarında reseptör düzeyinde blokaj etki gösterirler. Üç grupta bulunurlar.

A. α Adrenerjik Reseptör Antagonistleri

Damar düz kas hücre membranında yer alan post sinaptik α -adrenerjik reseptörleri bloke ederler. Selektivitelerine göre 2 grupta toplanırlar.

a. Selektif α_1 Adrenoreseptör Blokörler

Prazosin, terazosin, doxazosin selektif olarak α_1 adrenoreseptörleri bloke ederek etki gösterirler. Arteriyel ve venöz dilatasyona neden olur. En önemli yan etkisi ilk doz senkobudur. Bu nedenle tedaviye düşük dozlarda başlanır ve doz giderek artırılır. Raynaud Sendromu'nda ve benign prostat hipertrofisinde etkilidirler.

b. Nonselektif Adrenoreseptör Blokörler

Hem α_1 hem α_2 adrenerjik reseptörleri bloke ederler. Fentolamin, fenoksibenzamin, tolazolin, dibenamin, ergot alkaloidleri örnek olarak verilebilir. Sonuçta damar düz kaslarında gevşeme, vazodilatasyon ve periferik dirençte düşme sağlarlar. Bu esnada, kalp hızını ve debisini arttırırlar. Plazma hacminde düşme

meydana gelir. Plazma renin aktivitesi ve böbrek kan akımı değişmez. Nonselektif α adrenoseptör blokörler α_2 reseptörünü de bloke ederler. Taşikardi, hipertansif atak gibi sempatik aktiviteye ait semptomlara yol açabilirler. Bu grupta bulunan fentolamin, fenoksibenzamin ve tolazalin feokromasitoma tedavisinde kullanılırlar. Selektif α_1 adrenoseptör blokörlerin aynı zamanda lipid profili üzerine olumlu etkileri vardır. İlk doz (“first dose”) fenomenine neden olabilirler. Bu nedenle doz titrasyonu yapılmalıdır.

B. β Adrenerjik Reseptör Antagonistleri (Beta Blokörler)

Periferik β -adrenerjik reseptörleri, katekolaminler ile kompetitif bir mekanizma ile kapatarak bloke ederler. Böylece arteriyel damar direncini düşürmek suretiyle antihipertansif etki meydana getirirler. Ayrıca, miyokard üzerinde yaptıkları (-) inotrop etki sonucu kalp kontraktilesini azaltarak kalp hızını ve debisini azaltırlar. Renal renin salınımını inhibe ederler. Merkezi sinir sisteminden sempatik akışı azaltırlar. Bunların yanı sıra vasküler dokuda prostaglandin düzeylerini yükseltirler. Böbrek kan akımını ve sempatik inhibisyon yaparak nöradrenalin salınımını azaltırlar.

Bu ajanlar,

Yalnız β_1 reseptörleri bloke edenler (kardiyoselektif beta blokörler)

Hem β_1 hem de β_2 reseptörleri bloke edenler (nonselektif beta blokörler) olarak 2 gruba ayrılır

C. $\alpha + \beta$ Adrenerjik Reseptör Antagonistleri (Mikst Reseptör Blokörleri)

Bu ajanlar kompetitif olarak hem selektif α_1 , hem de nonselektif, $\beta_1 + \beta_2$ adreno reseptör blokajı yaparak vazodilatör etki gösteren bir beta blokör grubudur. Bu gruba örnek olarak karvediol ve labetalol verilebilir.¹³

2.2.3. Damar Düz Kasında Etkili İlaçlar

2.2.3.1. Kalsiyum Kanal Blokörleri

Bu ilaçlar, damar düz kası ve miyokard hücre membranında adrenerjik (α_1 , β_1) ve

anjiyotensin II tip₁ reseptörlerin uyarılması ile çalışan, voltaja bağımlı L-tipi yavaş kalsiyum kanallarını inhibe ederler. Damar düz kası ve miyokard hücrelerine Ca²⁺ girişini azaltır ve böylece sitosolik Ca²⁺ düzeyini düşürerek eksitasyon kontraksiyon ikili ilişkisini bozarlar. Sonuçta vazodilatasyon meydana gelir. Kalsiyum kanal blokörlerinin düz kas hücreesindeki etkisi, venöz yatağa göre arteriyel duvarda çok daha fazladır. Meydana gelen arteriyel dilatasyon sonucu periferik direncin azalması kalsiyum kanal blokörlerinin başlıca antihipertansif etki mekanizmalarıdır. Bu ilaçlardan fenilalkilamin ve benzodiyazepin grubunda olanlar kalp hızını ve ritmini etkileyebilirler. Dihidropiridin grubunda olanlar ise kalp debisini arttırabilirler

2.2.3.2. Potasyum Kanal Açıcılar

Damar düz kas hücre membranında K⁺ kanallarını açarak hücre içine K⁺ girişini arttıran, sonuçta hiper polarizasyon yapan ajanlardır. Aynı zamanda hücreden Ca²⁺ çıkışını da arttırırlar. Meydana gelen vazodilatasyon periferik direncin düşmesine, neden olur. Çoğu henüz faz III ve IV çalışması halinde olan bu ilaçlar arasında pinacidil, nicorandil, diazoxide ve minoxidil sülfat bulunur.

Bu grup ajanlar daha çok, diğer ilaçlar ile yanıt alınamayan refrakter ya da habis hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Diazoxid'in acil hipertansiyon tedavisinde yeri vardır. Refleks taşikardi, su ve tuz tutucu etkileri tedavide sorunlar yaratabilmektedir.

2.2.3.3. Doğrudan Damar Düz Kas Gevşeticileri

Sodyum nitroprussid, hidralazin ve dihidralazinden oluşan bu grup ilaçlar, antihipertansif etkilerini doğrudan arteriyoler düz kas gevşemesi yaparak periferik damar direncini düşürmek suretiyle gösterirler. Arteriyoler düz kasları gevşetme mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu ajanların endotelden nitrik oksit salgılanmasını arttırarak ya da K⁺ kanallarını açarak hiper polarizasyon meydana getirmek suretiyle

etki gösterdiği sanılmaktadır. Bu ilaçlar aynı zamanda baro reseptörleri uyararak kalp hızını ve debisini arttırmalar, katekolamin salınımına yol açarlar. Plazma volümü, plazma renin aktivitesi ve böbrek kan akımını arttırmalar. Su ve tuz retansiyonuna neden olurlar. Bu nedenle beta blokörler, ya da santral alfa agonistler ve diüretikler ile kombinasyon tedavisi biçiminde kullanılabilirler. Diğer antihipertansiflere dirençli (refrakter) hipertansiyonda, habis ve acil hipertansiyonda intravenöz olarak kullanılmaktadır.¹³

2.2.4. Yeni Geliştirilmekte Olan İlaçlar

Neutral endopeptidaz (NEP) inhibitörleri (sinorphan, thiorphan, omapatrilat), endotelin I reseptör antagonistleri (bosentan, fosforamidon), renin inhibitörleri (pepstatin, norstatin, diflorostatin, siklostatin), serotonin antagonistleri, vasopressin antagonistleri, henüz klinik tedaviye girmemiş, geliştirilmekte olan antihipertansif ajanlar olarak sayılabilir. Hipertansiyonda, 1990'lı yıllara kadar 'basamak tedavisi' yaklaşımı uygulanmıştır. Önceleri ilk basamakta diüretikler yer almış, daha sonra beta blokörlere, kalsiyum kanal blokörlere ve ACE inhibitörlerine de birinci basamakta yer verilmiştir. Diğer antihipertansif ilaç gruplarıyla yapılan çok sayıdaki çalışmanın sonuçları 1990'lı yıllarda 'basamak tedavisi' kavramının terk edilmesine ve 'ilk seçenek' kavramının gündeme gelmesine yol açmıştır. Yeni ilaç gruplarının iyi tolere edilmeleri, yan etkilerinin azlığı ve hipertansiyona eşlik eden durumlar üzerindeki olumlu etkileri alternatif 'ilk seçenek' lerin oluşmasına neden olmuştur. Kardiyovasküler risk, bireyselleştirilmiş tedavi ve yaşam kalitesi kavramlarının giderek önem kazanmasıyla birlikte günümüzde çeşitli antihipertansif ilaçlara ilk seçenek olarak yer verilmektedir.¹⁴

2.2.5. Renin Anjiyotensin Sistemini (RAS) Etkileyen İlaçlar

Kan basıncı, birçok sayıda karmaşık ve iç içe geçmiş biyolojik sistemlerin kontrolü altındadır. Renin anjiyotensin sistemi (RAS), kan basıncı düzenlenmesinde yer

alan enzimler zinciridir. Anjiyotensin II, RAS'nin etkin hormonudur. Hipertansiyon gelişiminde vasküler tonusunu, sıvı hacmini ve elektrolit dengesini düzenleyerek önemli rol oynamaktadır. Anjiyotensin II sentezi, karaciğerde bir alfa2 globulin olan anjiyotensinojenin üretimi ile başlar. Anjiyotensinojen, böbrekten salgılanan bir enzim olan renin ile parçalanarak aktif olmayan dekaeptid yapısındaki anjiyotensin I'e dönüşür. Anjiyotensin I ise karboksipeptidaz yapısındaki anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ile RAS'nin etkin molekülü olan oktapeptid yapısındaki anjiyotensin II'ye çevrilir. Anjiyotensin II, AT₁ ve AT₂ olarak adlandırılan iki tip reseptöre bağlanarak etki eder. Anjiyotensin II'nin fizyolojik etkileri çoğunlukla AT₁ üzerinden gerçekleşmektedir. Bu etkiler vazokonstriksiyon, aldosteron salınımı, antidiüretik hormon sentezi, sempatik aktivasyon ve böbrek tübüllerinden tuz emilimi olarak sayılabilir. Tüm bu etkiler, hipertansiyon gelişimine neden olmaktadır. Hipertansiyon gelişiminde en önemli etki, anjiyotensin II'nin arteriyel düz kaslar üzerindeki direkt kontraksiyon etkisidir. Bunlara ek olarak kalp üzerindeki pozitif inotropik etkisi, kan basıncını yükseltmesinde az da olsa katkıda bulunmaktadır. Anjiyotensin II aynı zamanda endotel hücrelerinde düzensizlik, medial hipertrofi ve bağ dokusunda artışa sebep olarak ateroskleroza neden olur. Anjiyotensin II, kalp kasında miyositlerde büyümeye, sol ventrikül hipertrofisine ve kalp yetmezliği gelişimine sebep olur. Böbrek yetmezliği gelişimi, glomerüler dolaşım bozuklukları ile anjiyotensin II ilişkisi yapılan çalışmalarda bildirilmektedir. Yukarıda saydığımız nedenlerden de anlaşılacağı gibi anjiyotensin II'nin aktivasyonunun engellenmesi, kan basıncı tedavisinin ötesinde tüm fizyolojik sistemlerin korunması için anahtar hedeflerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.¹⁴

Anjiyotensin II'nin kan basıncı kontrolündeki önemi RAS inhibitörlerinin keşfinden sonra daha iyi anlaşılmıştır. RAS'ni bloke etmek için kullanılan inhibitörler

iki başlık altında toplanmaktadır. Bunlar;

A. ACE inhibitörleri,

B. Anjiyotensin II reseptör antagonistleri olarak sıralanabilir.

2.2.5.1. ACE İnhibitörleri

Bu grup ajanlar, bir dekaeptid olan anjiyotensin I'in bir oktapeptid olan anjiyotensin II (AII)' ye dönüşümünü katalize eden ACE'i inhibe ederek güçlü bir vazokonstriktör olan AII'nin oluşumunu engellemek suretiyle etki ederler. ACE inhibitörleri, anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümünü engeller. ACE aynı zamanda bir kininaz olarak rol oynamakta ve bradikinin benzeri kininlerin yıkımını sağlamaktadır. ACE inhibitörlerinin kullanımı ile kinin serum düzeyleri yükselmektedir. Kininler vazodilatasyon yaparak kan basıncının düşmesine yardımcı olur. Fakat kinin düzeylerinin artması, alerjik reaksiyonların oluşumuna ve ölümcül anjiyo ödem tablosunun gelişimine neden olabilir. Bu ilaçlar, aynı zamanda bir kininaz olan ve bradikinin parçalayarak inaktive eden bu enzimi ACE' i inhibe ederek vazodilatör bir peptid olan bradikinin düzeylerini yükseltirler. Böylece, vazokonstriksiyon önlenir ve vazodilatasyon sonucu periferik damar direnci düşer. Antihipertansif etki meydana gelir. ACE inhibitörleri bunun yanı sıra, kalp ve damar düz kas hücrelerinde proliferasyonu azaltır. AII'nin aldosteron salınımını uyarıcı etkisi önlenir, natriüretik etki meydana gelir, su ve tuz tutulması azalır. Kaptopril ve lisinopril dışında tüm ACE inhibitörlerinin aktif metabolitleri vardır.¹⁴

Kimyasal yapı özelliklerine göre ACE inhibitörleri

Sülfür içerenler: (kaptopril, alacepril, phentiapril, pivalopril, zofenopril).

Karboksil grubu içerenler: (enalapril, perindopril, trandolapril, ramipril, quinapril, delapril, cilazapril, benazepril, lisinopril, pentopril)

Fosforil grubu içerenler: (fosinopril)

ACE inhibitörleri bilateral renal arter stenozu ve böbrek yetersizliğinde azotemi ve hiperpotasemi yapabilirler. Aldosteron ve aşırı miktarda nitrik oksit (NO) yapımına neden olabilirler. Bu, serbest oksijen radikallerinin artmasına yol açarak endotel harabiyeti meydana getirebilir. Tedavide bir diğer sorun da öksürük ve alerjik reaksiyonlardır.

Halen kullanımda bulunan ACE inhibitörleri şunlardır:

- a. Birinci kuşak ACE inhibitörleri - Kaptopril, enalapril
- b. İkinci kuşak ACE inhibitörleri - Fosinopril, benazepril, perindopril, lisinopril, ramipril

2.2.5.2. Anjiyotensin II (AII) Reseptör Antagonistleri (Sartanlar)

AT₁ reseptör antagonistleri, AT₁ antagonistleri, sartanlar veya anjiyotensin II reseptör blokörleri (ARB) olarak adlandırılmaktadır. ARB'ler, anjiyotensin reseptörlerinin AT₁ alt tipini selektif olarak bloke ederek, anjiyotensin II isimli polipeptidin bağlanmasını engeller ve vazodilatasyona neden olur. Anjiyotensin II'nin adrenal bezlerdeki reseptörlere bağlanması aldosteron salınımını azalttığından kan basıncının azalmasına neden olmaktadır. Anjiyotensin II'nin oluşumunun engellenmesi için substrata yüksek oranda spesifik bir aspartik proteaz olan reninin inhibisyonu ilk akla gelebilecek yoldur. Oral olarak kullanılan renin inhibitörlerinin biyoyararlanımındaki düşüklük ve üretimindeki yüksek maliyet kullanımını güçleştirmektedir.

Birçok klinik çalışma, sol ventrikül hipertrofisi, geçirilmiş miyokard enfarktüsü, kronik kalp yetmezliği, diyabet, renal hastalık gibi ek kardiyovasküler riski olan veya olmayan hafif ve orta derecede hipertansif hastalarda ARB'lerin antihipertansif etkinliklerini kanıtlanmıştır

Anjiyotensin II hipertansif ve diğer olumsuz etkilerinin çoğunu AT₁ reseptörleri

aracılığıyla gösterirler. Anjiyotensin II reseptör antagonistleri AT_1 reseptörlerini selektif olarak bloke eden güçlü ve uzun etkili nonpeptid ajanlardır. Losartan, valsartan, kandesartan, eprosartan, irbesartan, tasosartan, telmisartandan oluşan ve sartan ailesi olarak da anılan bu ilaçlar etkilerini, ekstresek AII dışında, intrensek AII'nin de etkilerini bloke ederek gösterirler. RAS aktivitesini düşürücü etkileri yanı sıra sempatotik ve antiproliferatif etkileri de vardır. Aldosteron üzerine dolaylı etkileri nedeniyle natriürezis sağlarlar.

Anjiyotensin II'nin dört tip reseptörü vardır. Fakat temel olarak iki reseptör üzerinden etkisini gösterir. AT_3 ve AT_4 'ün görevleri kesin olarak bilinmemektedir. AII'nin çoğu etkileri yüksek afiniteli plazma membranı ve G-protein ilişkili reseptörü olan AT_1 aracılığıyla düzenlenir. Kardiyovasküler hipertrofi, hiperplazi ve arteroskleroz gibi patolojik gelişmelere AT_1 reseptörleri sebep olur. Uyarılmaları durumunda AII, aldosteron ve vazopressin salgılatıcı etkisi nedeniyle vazokonstriksiyon, sıvı retansiyonu, süper oksit oluşumlarının artması ve miyokarda sitotoksik etki gibi fonksiyonları vardır.

AT_2 reseptörleri ise AT_1 'in etkilerini dengeleyicidir. AT_2 reseptörlerinin, apoptozis, osmoregülasyon, serebral kan akımının otoregülasyonu, anjiyogenez ve vazokonstriksiyonu inhibe edici birçok özelliği bilinse de aydınlatılamamış yönleri de bulunmaktadır.

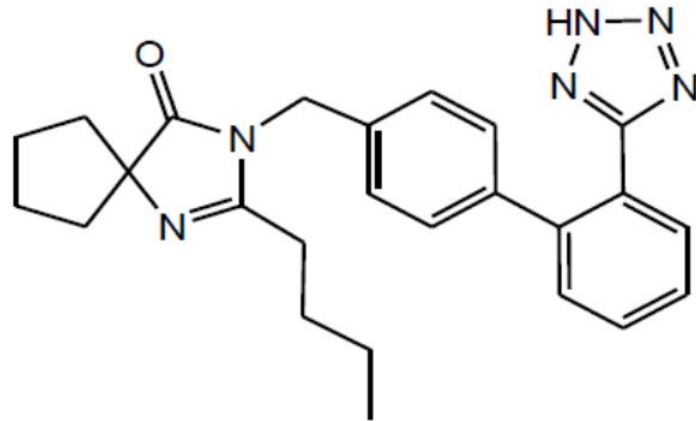
Anjiyotensin, renal ve kardiyovasküler etkilerinin çoğunu AT_1 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. Anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB) AT_1 reseptörünü bloke ederek sistemik ve lokal AII'nin etkilerini azaltır. AT_1 reseptör blokajı AII'nin dolaşımında artmasına ve AT_2 ile diğer reseptörlere bağlanmasına neden olur.

ARB'ler, peptid ve peptid olmayan yapıları, metabolizmaları ve potansiyel etkileri farklılık gösteren analoglardır. Günümüzde klinik kullanımda olan yedi tür ARB

bulunmaktadır. Oral olarak biyoyararlanımı olan ilk ARB losartandır. Birçok diğer ARB losartandan üretilmiştir. ARB'ler; yapısındaki moleküler yapılarına göre bifenil tetrazol türevleri (kandesartan sileksetil, eprosartan, irbesartan, losartan potasyum, olmesartan medoksomil), nonbifenil tetrazol türevleri (telmisartan) ve nonheterosiklik türevler (valsartan) olarak kategorize edilebilir. ARB'leri aynı zamanda AII'yi antagonize etme yeteneklerine göre kompetif (losartan, eprosartan) ve nonkompetif (kandesartan sileksetil, irbesartan, valsartan, telmisartan, olmesartan) olarak sınıflandırılır.¹⁴

2.3. İrbesartan

Bir anjiyotensin II reseptör antagonisti olan irbesartan başlıca hipertansiyon tedavisinde kullanılır. İrbesartan oral olarak aktif bir non peptid tetrazol türevidir ve selektif olarak anjiyotensin II tip₁ reseptörünü inhibe eder. Anjiyotensin II tip₁ reseptör antagonistleri hipertansiyon, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü ve diyabetik nefropati gibi hastalıkların tedavisinde günümüze kadar yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Yüksek geçirgenliğe ve düşük çözünürlüğe sahip bir ilaç olarak sınıflandırılan irbesartan alkol ve metilklorürde az çözünür, suda ise hemen hemen çözünmez. İrbesartan lipofilik bir ilaçtır ve hızlı oral absorpsiyona sahiptir.¹⁵



Şekil 2.5. İrbesartan'ın molekül yapısı

Hipertansiyon, dünyadaki yetişkin nüfusunun büyük bölümünü etkileyen en yaygın kardiyovasküler hastalıklardan biridir. Ayrıca hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür ve artan sayıda inme ve koroner kalp hastalığıyla ilişkilendirilir. Son on yılda tedavide birçok ilerleme olmasına rağmen tüm hipertansif hastaların % 25'den daha azı uygun yöntemlerle kan basınçlarını yeterince kontrol ettirirler. Anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB) daha yeni bir antihipertansif ajan sınıfını temsil ederler. Etki mekanizmaları, ayrıca renin anjiyotensin sistemini de etkileyen anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etki mekanizmasından farklıdır. ARB'ler ACE inhibitörlerinin çeşitli eksikliklerini gidermek için geliştirilmiştir. ACE' nin kompetitif inhibisyonu bloklama etkisini ortadan kaldırılabilen renin de ve anjiyotensin I seviyelerinde reaktif bir artışa yol açar. ACE bradikinin ve diğer takininleri içeren anjiyotensin I'e ilaveten substratlara sahip olan nispeten non spesifisik bir enzimdir. Bu yüzden ACE' nin inhibisyonu bu substratların birikimine yol açabilir. Anjiyotensin II üretimi öncelikli ACE yolunun yanı sıra ACE olmayan yollarla da meydana gelebilir ve bu alternatif yollar ACE inhibisyonundan etkilenmezler. Çeşitli olumsuz etkiler ACE inhibitör etkileriyle ilişkilendirilebilir ve ARB' ler reseptör bölgesiyle seçici şekilde etkileşerek daha iyi bir anjiyotensin II inhibisyonu sunabilirler. Gıda ve ilaç dairesi tarafından bu sınıftaki tüm 7 sartan ya tek başına ya da diğer ilaçlarla kombine olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılması uygun görülmüştür. İrbesartan'ın hipertansiyon, diyabetik nefropati ve konjestif kalp hastalığı tedavisinde de kullanılabilir. Ayrıca irbesartan diyabetik nefropatinin ilerlemesini geciktirir ve tip II diyabet, hipertansiyon, mikroalbuminüri ve proteinüriye sahip olan hastalarda böbrek hastalığının ilerleyişinin azaltılması için de önerilir.¹⁵

2.3.1. Tarih ve Geliştirme

İrbesartan ilk olarak günümüzde Sanofi Aventis'in bir parçası olan Sanofi Research tarafından geliştirildi. APTOVEL, KARVEA ve AVAPRO ticari ismi altında Sanofi Aventis ve Bristol Myers Squibb tarafından birlikte pazarlanmıştır. İrbesartan tek başına ya da diğer antihipertansif ilaçlarla kombine olarak kullanılabilir. Bu yüzden irbesartan, ek bir antihipertansif etki elde etmek için daima hidroklorotiyazid olan düşük doz bir tiyazid bir diüretikli bir kombinasyon formülasyonu içinde mevcuttur. İrbesartan / hidroklorotiyazid kombinasyon preparatları İrda, Colda, Co-Aprovel, Karvezide, Avalide ve Avapro'yu da içeren irbesartan preparatlarının benzer ticari isimlerle pazarlaması mevcuttur.

Renin-anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) kan basıncının düzenlenmesinde esas rol oynar. Bir proteinaz enzimi olan renin, renal kan akışı kan basıncı ya da sodyum derişiminde bir azalma durumunda böbrek tarafından salgılanır. Daha sonra renin karaciğer tarafından salgılanan anjiyotensinojeni dekaeptid anjiyotensin I'e (AI) dönüştürür. AI anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından oktaeptid anjiyotensin II(AII)'ye parçalanır. AII vasküler anjiyotensin reseptörleriyle(AT reseptörleri) etkileşerek güçlü vazokonstriksiyon meydana getirir. AII ayrıca aldosteron salgısını yükseltir ve buna bağlı olarak adrenal kortekste bulunan anjiyotensin reseptörlerinin uyarılmasıyla sodyum tutulmasını da yükseltir. Bu olaylar, vazokonstriksiyona bağlı oluşan yüksek kan basıncına ve sodyum tutulmasına bağlı oluşan yüksek kardiyak outputuna yol açar. Normal düzenleyici rolünün yanı sıra RAAS ayrıca renovasküler hipertansiyon, esansiyel hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği gibi patolojik bulgulara katkıda bulunur. Böylece son otuz yılda yapılan araştırma çalışmaları, renin salınımını önleyerek, ACE inhibisyonu yoluyla AII 'nin oluşumunu engelleyerek ya da AII' nin fizyolojik reseptörlerindeki antagonizm yoluyla

RAAS'ı bastırabilen ilaçlar geliştirmeye yöneltildi. Geçmişte, klinikle alakalı çoğu başarı 1981' de kaptoprilin piyasaya girmesiyle başlayan daha sonra enalapril(Vasotec), lisinopril (Privinil, Zestril), bezanepiril (Lotensin), fosinopril (Monopril), quinapril (Accupril) ve ramipril(Altace), takip edilen ACE inhibitörleri (ACEI)'lerin geliştirilmesini gerektirdi. ACEI' ler konjestif kalp yetmezliğinin yanı sıra çeşitli hipertansiyon türlerinin tedavisinde başarılı bir şekilde günümüze kadar kullanıldı. Fakat ACE bradikinin ve P maddesini içeren diğer peptidlerin parçalanmasını içeren RAAS' ın düzenlenmesiyle alakalı olmayan başka fizyolojik etkilere de sahiptir. Ayrıca bu ek etkiler ACEI'ler tarafından inhibe edilirler ve bu olaylar kuru öksürüğü de içeren bu ilaçların yan etkilerini açıklayabilir. Bu yüzden son yıllarda renin inhibitörleri ve AII reseptör antagonistleri RAAS'ın daha spesifik inhibitörleri ve AII üretiminden bağımsız olan sistemi engelleyecek direkt bir yaklaşım olarak geliştirildi. Bu çabalar, losartan(Coozar) içeren daha sonra da valsartan (Diovan) ve günümüzde de irbesartan tarafından takip edilen son yıllardaki çeşitli non peptid AII antagonistlerinin bulunmasına sebep oldu. İrbesartan oral olarak iyi absorbe edilen, günlük tek doz alınabilecek uzun etkiye sahip bir ilaçtır.^{15, 16}

2.3.2. Fizikokimyasal Özellikler

İrbesartan kimyasal formülü $C_{25}H_{28}N_6O$ ve molekül ağırlığı 428,53 g/mol olan bir bileşiktir. Beyaz kristal toz şeklinde bulunur ve erime sıcaklığı 180-182 °C' dir. Alkollerde ve metilen klorür içinde çözünürken suda çözünmez. İrbesartan bir tetrazol türevidir. Asidik bir grup içerir bu grup sayesinde nötral pH aralığında çözünür. Partisyon katsayısı apolar bir bileşik olarak pH 7.4 te 10.1 dir. Sitokrom P- 450 enzimlerle yapılan irbesartanın in- vitro çalışmaları göstermiştir ki irbesartan 2C9 enzimi ile okside olurken 3A4 oksidasyonu ihmal edilecek düzeydedir. İrbesartan bir enzim tarafından metabolize edilmez veya ilaç metabolizmasıyla ilgili bir enzimi

indüklemez veya inhibe etmez.3A4 enzimi üzerinde herhangi bir indükleme veya inhibisyon tespit edilememiştir. İrbesartan farklı impüritelere sahiptir. Bu impüriteler USP tarafından N1-tritil impüritesi, laktam impüritesi, bromo impürite ve siyano impüriteleridir.^{15,17}

2.3.3. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

İrbesartan aktif formuna dönüşmek için herhangi bir biyotransformasyona ihtiyaç duymayan bir ajandır. Oral emilimi hızlıdır ve toplam ortalama biyoyararlanımı %60 ile 80 arasındadır. En yüksek plazma derişimine dozlamadan 1.5 -2 saat sonra ulaşır. Gıdalar irbesartanın biyoyararlanımını etkilemez. İrbesartan gastrointestinal sistemden diğer AT₁ antagonistlere göre daha yüksek oranda emilir ve en yüksek plazma derişimine 2 saatte ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz ve aktif formuna geçmek için metabolize olmaz. Sadece P4502C9 isimli inaktif bir metaboliti vardır. Diğer anjiyotensin antagonistlerine göre çok daha uzun bir yarılanma süresi vardır (11-15 saat). İrbesartan'ın farmakokinetik özellikleri hidroklorotiyazid gibi parametrelerden önemli derecede etkilenmez. İrbesartan %90 düzeyinde serum proteinlerine bağlanır ve kandaki hücre bileşenlerine bağlanması ihmal edilebilir düzeydedir. Ortalama dağılımı 53-93 L arasındadır. Toplam plazma ve renal kleransı sırasıyla 157-176 ml /dk' dır. İrbesartan klinik olarak herhangi bir ilişkili sorun içermez.^{15, 18}

2.3.4. Terapötik Etkileri

Hafif ve ciddi hipertansiyon hastalarında çift kör plasebo kontrollü rastgele ve çok merkezli yapılan çalışmalarda sistolik ve diyastolik kan basıncını irbesartanın 75 mg veya daha fazla dozlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir. Doz arttıkça düşüşte artmaktadır fakat bu durum 300 mg düzeyine kadardır. Kan basıncını düşürmesi ilk doz alımından sonra gözlenebilir ve maksimum etkiye 4-6 hafta içerisinde ulaşır. Hastanın yaşına, cinsiyetine bağlı olmadan kan

basıncını düşürmede etkili olduğu bulunmuştur fakat siyah ırklarda daha düşük bir etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Karşılaştırmalı testlerde irbesartanın en az hidroklorotiyazit, atenelol, enalapril kadar etkili olduğu görülmüştür. Kombine denemelerde diüretik bir ilaç olan hidroklorotiyazid ile en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan hareketle irbesartanın günlük hipertansiyon tedavisinde tek başına ya da kombine olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. İrbesartan'ın antihipertansif etkileri 7 major plasebo kontrollü hastada 8-12 hafta boyunca tespit edilmiştir. (1-900 mg) aralığındaki dozlar irbesartan dozaj aralığını tespit etmek üzere çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmalar cinsiyet, yaş, ırk günde bir defa veya çift kullanım gibi özelliklerin karşılaştırılmasına imkan tanınmıştır. Bu 7 çalışmadan 2 tanesinde irbesartan ve hidroklorotiyazid birlikte kullanılmıştır. Bu 7 çalışmada 1925 hastaya irbesartan (1-900 mg) uygulanmış ve 611 rastgele hasta ise plasebo kullanmıştır. Günlük 150-300 mg irbesartan dozajları istatistiksel ve klinik olarak sistolik ve diyastolik kan basıncını plasebolara oranla düşürmüşlerdir. 300 mg üzerinde herhangi bir anlamlı etki görülmemiştir. Günlük terapötik doz 3-6 saat içerisinde en yüksek etkiyi gösterir bu özellik hem tek hem de çift günlük doz ayarında görülmüştür. Günlük 150 mg dozlamasının vermiş olduğu etki ve günde iki kere alımla benzer özellikler göstermiştir. Kontrollü denemelerde irbesartana 6.25, 12.5 veya 25 mg hidroklorotiyazid' in eklenmesi sadece irbesartanla yapılan tedaviye oranla daha iyi sonuçlar vermiştir. Yaş cinsiyet ırk alt grupları incelendiğinde kadın erkek ve 65 yaşın altındaki hastalarda benzer cevaplar alınmıştır. İrbesartan'ın kan basıncını düşürmesinde ırksal farklılıkların herhangi bir etkisi yoktur fakat siyah ırklarda küçük bir düşüş vardır. İrbesartan'ın etkisi hemen ilk dozdan gözlenir ve gözlenen bütün etkilerine iki hafta içerisinde yaklaşır (haftalık bir uygulamada antihipertansif etkilerin üçte ikisi son dozdan bir hafta sonra dahi vardır).^{15, 17, 18}

2.3.5. İrbesartan Sentezi ve Biyotransformasyon Yolağı

Anjiyotensin II, Anjiyotensin dönüştürücü enzimi (ACE kinaz II) katalizörlüğünde anjiyotensin I dönüşüm reaksiyonuyla potansiyel vazokonstrüktör olarak sentezlenmiştir. Anjiyotensin II renin anjiyotensin sistemini(RAS) baskılayıcı ajandır ve ayrıca aldosteron sentezini stimüle eder ve adrenal korteks renal olarak sodyumun emilimi ve sempatik sinir sistemi aktivitelerini düzenler. İrbesartan aldosteron salınımını ve vazokonstrüktörleri bloke eder ve bunu AT₁ anjiyotensin II reseptörlerine selektif bir şekilde bağlanarak yapar. Bunlardan ayrı kardiyovasküler hemostaziye katılmayan farklı bir AT₂ reseptörü de çoğu dokuda bulunmaktadır. İrbesartan spesifik olarak AT₁ reseptörlerine bağlanırken agonist aktivitesi olmayan AT₂ reseptörlerine bağlanmaz. AT₁ reseptörlerine bağlanması anjiyotensin II reseptörlerinin negatif özelliği olan AT₂ reseptörlerini inhibe etme dezavantajını ortadan kaldırır. Bu sayede renin aktivitesi artar ve kan basıncı düşer. Sodyum hemostazına ve kan basıncını etki edebilecek herhangi bir hormon reseptörü veya renin, irbesartan tarafından etkilenmez. ACE' leri inhibe etmediği için bradikinin oluşumunu etkilemez. İrbesartan hamilelerde güvenle kullanılabilecek bir ilaçtır. İrbesartan safra kesesinde metabolize olur ve atılır. Glukronit konjugasyonu ve oksidasyonu ile okside olur. Oral ya da intra venöz uygulamayı takiben %80 oranında plazmada değişmeden kaldığı gözlenmiştir. En önemli metaboliti glukronit konjuge metabolitidir(%6). Geri kalan oksidatif metabolitleri herhangi bir farmakolojik etki göstermemektedir. İrbesartan ve metabolitleri safrayla veya renal olarak atılır. İn- vitro çalışmalarda P-450 enzimi ile oksidasyonu işaret etmiştir ki irbesartan 2C9 ile okside olur 3A4 enzimi ile okside olmaz. Hidroklorotiyazid'in digoksin, varfarin ve nifedipin ile yapılan çalışmalarda herhangi bir etkileşimi gözlenmemiştir.¹⁵⁻¹⁷

2.3.6. İrbesartan İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Gupta ve ark.¹⁹ yapmış oldukları çalışmada irbesartan miktar tayini için Britton-Robinson tamponlu ortamda hassas bir volümetrik yöntem geliştirmişlerdir. İrbesartan pH 2.0-12.0 aralığında iyi tanımlanmış katodik pik sergilemiştir. Redüksiyon mekanizması kontrollü potansiyel elektroliz, kolorimetri ve spektral analiz esasına dayanmaktadır. Optimal koşullar altında irbesartan 3.0×10^{-5} , 5.7×10^{-3} ve 5.33×10^{-7} mol/L derişim aralığında doğrusal pik sergilemiştir. İrbesartan'ın Britton -Robinson tamponlu ortamda gösterdiği volümetrik piklere katyonik surfaktanların da etkisini araştırmışlardır.

Tutunja ve ark.²⁰ tarafından insan plazmasında irbesartan ve hidroklorotiyazidin aynı anda tayini için sıvı kromatografisi/kütlespektroskopisi (LC-MS) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Plazma örnekleri asetonitril kullanılarak protein çöktürme yöntemiyle hazırlandıktan sonra %2.5 formik asit, metanol, asetonitril (40:45:15, h/h/h) den oluşan hareketli faz, 0.70 mL/dk akış hızı, C₁₈ (50mm×4mm, 3µm) ters faz kolon ve iç standart olarak losartan kullanılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. İrbesartan ve hidroklorotiyazid negatif iyon modunda ESI kullanılarak tayin edilmiş ve yöntem 300 mg irbesartan ve 12.5 mg hidroklorotiyazid içeren tabletlerin biyo eşdeğerlik çalışmalarına başarıyla uygulanmıştır.

Changa ve ark.²¹ yapmış oldukları çalışmada insan plazması ve idrar örneklerinde bir anjiyotensin II antagonisti olan irbesartanın tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Çalışmada, katı faz ekstraksiyon yöntemiyle irbesartan ekstraksiyon yapıldıktan sonra 250 nm uyarılma dalga boyu, 371 nm emisyon dalga boyu, floresan detektör, ODS analitik kolon, ve 0.8 mL/dk akış hızı, pH'ı 3.5 olan %50 asetonitril ve %50 zayıf fosfat trietilaminden oluşan hareketli faz çalışma parametrelerini kullanarak analizleri

gerçekleştirmişlerdir. 1-1000 ng/mL derişim aralığında hem plazma hem de idrar örneklerinde yöntemin doğrusal, her iki matrikste yöntemin miktar tayin sınırı (LOQ) değerinin 1ng/mL ve gün içi ve günler arası varyasyon katsayısı değerinin %8 olduğu, kalite kontrol örneklerinde yöntemin %95'ten fazla bir doğruluk değerine sahip olduğu tespit edilmiş ve ayrıca irbesartan etkin maddesinin hem plazma hem de idrarda en az yedi ay boyunca 22 °C de stabil olduğu belirlenmiştir.

Albero ve ark.²² yapmış oldukları çalışmada irbesartan ve hidroklorotiyazidin farmasötik preparatlarda miktar tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. İrbesartan 263 nm dalga boyunda hidroklorotiyazid ise 317 nm dalga boyunda spektrofotometrik analizleri gerçekleştirilmiştir. Yöntem irbesartan ve hidroklorotiyazid için sırasıyla 1.0-12.0 mg/L ve 2.0-50.0 mg/L derişim aralığında dorusallık göstermiş ve gözlenebilme sınırı (LOD) ise sırasıyla 0.15 mg/L ve 0.25 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Lua, ve ark.²³ yapmış oldukları çalışmada insan plazmasında irbesartan analizi için matriks destekli basit kütle spektrometresi yöntemi geliştirilmişlerdir. Basit bir mikro sıvı-sıvı ekstraksiyonundan sonra irbesartan hedef bir plaka üzerine uygulanmış, matriksle karıştırılıp daha sonra MS ile terapötik aralıkta klinik olarak tespit edilmiştir. Ayrıca büyük proteinlerin tespiti için ucuz kimyasal analoglar kullanılmıştır. Enzim sindiriminden sonra peptid karışımları nano sıvı kromatografisiyle (nanoLC) tandem kütle spektrometriye enjekte edilmiştir. Protein kimliği ve peptid sıralaması veri tabanı arama sayesinde aynı anda gerçekleştirilmiştir. Protein miktarındaki değişiklik irbesartan ilavesinden önce ve sonra bu yöntem ile tespit edilmiştir. İnsan plazmasına uygulanan bu iki mikro ölçekli MS yöntemi klinik ilaç izleme, protein miktarlarının belirlenmesi ve kimlik tespiti için başarıyla uygulanmıştır.

Erk²⁴, yaptığı çalışmada antihipertansif ilaç olarak tanımlananan irbesartan ve hidroklorotiyazid miktar tayini için plazmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmiştir. Çalışmada C₁₈ (5 µm, 15 cm 4.6 mm) supercocl kolon, pH 2.5' de 10 mM potasyum dihidrojen fosfat, metanol, asetonitril (5:80:15 h/h/h) den oluşan hareketli faz, 1.0 mL/dk akış hızı, 275 nm dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri kullanılmıştır. İrbesartan ve hidroklorotiyazid alı konma sürleri sırasıyla 5.8 ve 7.8 dk olarak tespit edilmiştir. Yöntemin doğrusallık aralığı irbesartan ve hidroklorotiyazid için sırasıyla 10.0-60.0 µg/mL ve 4.0-20.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin farmakokinetik çalışmalarda hastaların tedavi ajanlarını ölçmek ve terapötik olarak izlemek için kullanılabilir olduğu çalışmada belirtilmektedir.

Shakya ve ark.²⁵ yapmış oldukları çalışmada irbesartan tespiti için floresans dedeksiyonlu bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak losartan kullanılmıştır. İnsan plazmasında irbesartan ve losartan dietileter ve diklorometan (7:3 h/h) kullanılarak ekstre edilmiş ve 0.05 M sodyum hidroksit ile geri ekstraksiyonu sağlanmıştır. Nötralize örnekleri 0.01 M potasyum hidrojen fosfat ve asetonitril (66:34, h/h) pik modifiye edici olarak %0.07 trietilamin ihtiva eden ortofosforik asit (pH 3.0' da ayarlanmış)tamponu kullanılarak analiz edilmiştir. Kromatografik ayırma ODS-C₁₈ kolon (100mm,4.6mm i.d,5µm partikül boyutlu) kullanılarak 1.25 mL/dk akış hızında izokratik elüsyon ile 259 nm de uyarılma 385 nm de emisyon dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemde kantitatif miktar aralığı 15-4000ng/mL iken değişkenlik katsayıları %0.75-12.53 arasında belirlenmiştir. Örnek numuneler 60 gün boyunca -70 °C de derin dondurucuda depolanarak bozulmadığı tespit edilmiştir.

Ferreir ve ark.²⁶ kardiyovasküler tedavi altındaki hastalarda dört antihipertansif anjiyotensin II reseptör antagonisti ilacın insan idrar numunelerinde izlemi için bir dizi

fotodiyot algılama ile SPE-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri eprosartan, telmisartan, irbesartan, valsartan için sırasıyla 95, 113, 125 ve 85 µg/mL ve dört etkin maddenin günüçi ve günler arası bağıl standart sapma değerleri (BSS) %11'den küçük olarak belirlenmiştir. İdrar örnekleri üç dondurma eritme döngüsünden sonra oda sıcaklığında 4 saat ve -20 °C de 2 ay boyunca stabil kalabildiği tespit edilmiştir. Bu yöntem irbesartan ve valsartanın 24 saat boyunca renal atılımını izlemek için başarıyla uygulanmıştır.

Bae ve ark.²⁷ insan plazmasında irbesartan etkin maddesinin tespiti için floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. 0.4 mL asetonitril ve 800 ng/mL losartan içeren 0.1 mL plazma örneği basit deproteinizasyon aracılığıyla örnek hazırlama işlemini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, 40°C sıcaklık, Zorbax Xclipse XDB C₁₈(150 × 4.6mm, i.d.5 mm) kolon, izokratik elüsyon, asetonitril ve %0.1 formik asitten (37:63, h/h) oluşan hareketli faz, 1.0 mL/dk akış hızı, 250 nm emisyon dalga boyu ve 370 nm uyarılma dalga boyundan oluşan çalışma parametreleri kullanılmıştır. İrbesartan ve losartan için alı konma zamanları sırasıyla 4.4 ve 5.9 dk olarak tespit edilmiştir. Yöntemin 10-500 ng/mL derişim aralığında doğrusal, hassaslığının %8.48' den az, doğruluğunun %94.4'ten fazla olduğu, irbesartan ve losartan etkin maddelerinin plazmadan yüzde geri kazanım dğerlerinin sırasıyla %98.4 ve %99.1 olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem 300 mg irbesartan içeren tabletlerin oral yoldan 23 yetişkin erkek gönüllü Koreli bireylere verilerek farmakokinetik çalışmalar için de başarıyla uygulanmıştır.

Lia ve ark.²⁸ insan idrar örneklerinde antihipertansif ilaç olan irbesartan ve valsartanın tespiti için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birleştirildiğinde çevre dostu bir iyonik sıvı dağıtıcı sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (IL-DLLME) yöntemi geliştirilmiştir. 1.0 mL/dk akış hızında %0.3 formik asit ve metanol (3:7,h/h) ihtiva eden

hareketli faz ve ters fazlı C₁₈ kolon kullanılarak en az 10 dk içerisinde HPLC ile ayırım gerçekleştirmişlerdir. 236 nm dalga boyunda, 50 µg/mL derişim üzerinde doğrusallık sağlanmıştır. Valsartan ve irbesartan için gözlenebilme sınırı (LOD) sırasıyla 3.3µg/L ve 1.5µg/L olarak tespit edilmiştir. IL-DLLME üzerindeki etkili parametreler: iyonik sıvı tipleri, miktarları dağıtıcı solvent türleri, solvent hacmi, numunenin pH'sı ve çıkma süresi çalışmalarda optimize edilmiştir. Geliştirilen IL-DLLME- HPLC yöntemi oral kapsül alımıyla idrardaki irbesartan ve valsartan takibi, değerlendirilmesi için başarıyla uygulanmıştır.

Gonzalez ve ark.²⁹ anjiyotensin reseptör antagonistleri olan losartan, irbesartan, valsartan, kandesartan silketil ve onun metaboliti kandesartan M₁'in tespiti için yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım oda sıcaklığında Bundapak C₁₈ kolon üzerinden asetronitril ve 0.1 M asetat içeren tamponlu çözelti kullanılarak pH 4.0' da ve farklı akış hızlarında 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası farklılıklar %3 olarak bulunmuş ve bu yöntemi anjiyotensin reseptör antagonistleri için başarıyla uygulanmıştır.

2.4. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. Bu yöntemler; inorganik ve organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca molekül yapılarının aydınlatılması alanında da en sık başvurulmuş yöntemlerdir.³⁰

2.4.1. Spektroskopi

Spektroskopi, genel anlamda ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanır. Bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorblanan veya yayılan elektromanyetik ışımının, ölçülmesi ve yorumlanmasına "spektroskopi" denir. Atom, molekül veya iyonun

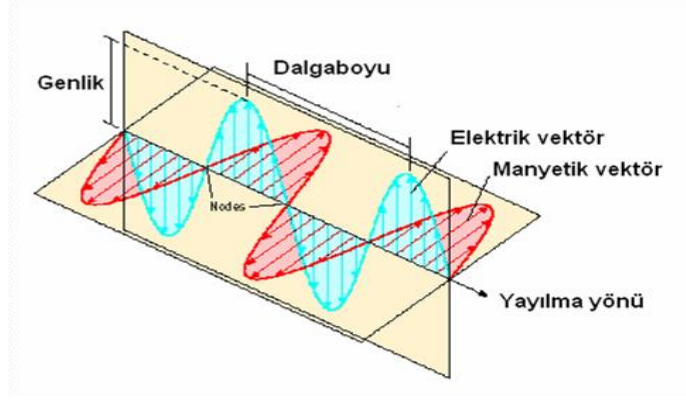
elektromanyetik ışıma ile etkileşimi sonucu dönme, titreşim ve elektronik enerji seviyelerinde değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.³⁰

Spektroskopi çalışmaları, 1665 yılında Newton'un üçgen bir cam prizma kullanarak beyaz ışığın belirli bir aralık içinde çeşitli renklere dağıldığını gösteren ünlü deneyi ile başlamıştır. 1860 yılında Bunsen ve Kirchhoff, analitik bir cihaz olarak entegre bir birim olan prizma spektroskopunu geliştirmişlerdir. Yapılan ilk çalışmalar, alev üzerinde çeşitli numunelerin emisyon spektrumlarının gözlenmesi, çeşitli elementler için alev deneylerinin başlangıcı ve güneş ışınları üzerine yapılan deneylerdir. Günümüzde spektroskopik çalışmalarda incelenen ışın kaynakları tanımı değiştirilmiş, görünür bölge ışınları, X ışınları, ultraviyole (mor ötesi), infrared (kızıl ötesi), mikro dalgalar, radyo dalgaları ve ses dalgalarını da içine alacak şekilde kapsamı genişletilmiştir.³⁰

2.4.2. Elektromanyetik Işıma (Radyasyon) ve Genel Özellikleri

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

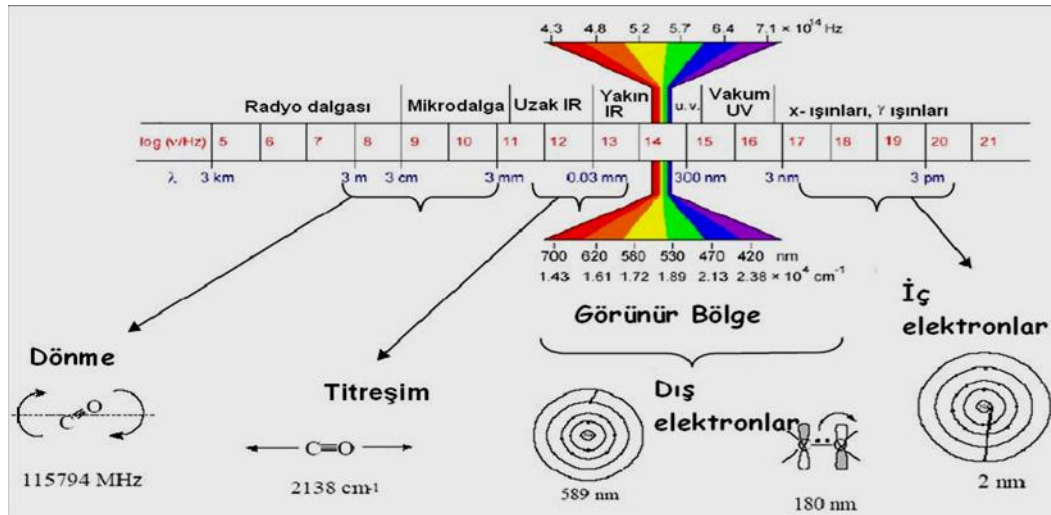
Elektromanyetik ışıma, hem elektrik alan vektörü hem de magnetik alan vektörüne sahiptir. Bu iki alan sinüsoidaldır ve ışının yayılma yönüne ve birbirlerine diktir. Bir ışının maddeyle ilişkisi, bu iki alan vektörü ile olur.³⁰



Şekil 2.6. Elektromanyetik dalga

2.4.3. Elektromanyetik Spektrum

Elektromanyetik spektrum, çok geniş bir dalga boyu ve frekans (enerji) aralığını içine almaktadır. Aynı şekil üzerinde, başlıca spektral bölgeler de gösterilmiştir. Spektral bölge ayrıntıları, her bölgedeki ışınları elde etme ve bu ışınları belirleme yöntemlerini esas almaktadır.



Şekil 2.7. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri

2.4.4. Işının Absorpsiyonu ve Absorpsiyon Spektrumu

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

Kuantum teorisine göre atom, molekül veya iyonlar yalnız belli değer ve sayıda enerji düzeyinde bulunabilir. Bu şartlarda, fotonun enerjisi ilgili atom, molekül veya iyonla aktarılır, onu uyarılmış hal adı verilen daha yüksek enerjili hale geçirilir. Kısa bir süre sonra, uyarılmış tür, fazla enerjisini ortamdaki başka türlere aktararak temel haline döner ki, buna “durulma” (relaksasyon) denir. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde çok az ısınır. Bazı maddeler ise absorpladığı ışın enerjisini kısa süreli olmak üzere, daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayar. Buna “lüminesans” olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olmasına floresans, daha uzun olmasına da fosforesans denir.³⁰

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları atomik absorpsiyon ve moleküler absorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılır.³¹

2.4.4.1. Atomik Absorpsiyon

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

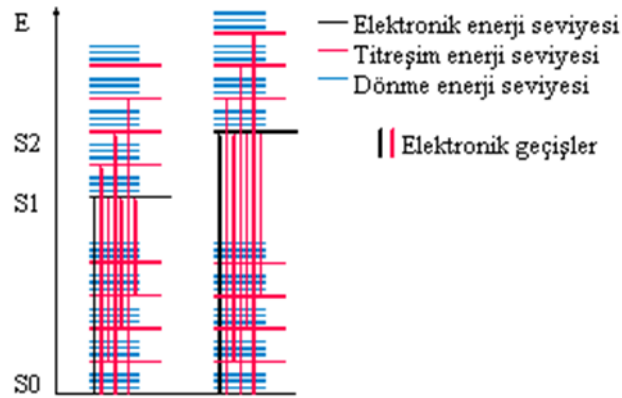
2.4.4.2. Moleküler Absorpsiyon

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

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

Burada “Eelektronik”, molekülde bağ yapan birkaç elektrona ait enerji düzeyinden kaynaklanan elektronik enerjidir (200-800 nm). “Etitreşim” ise, moleküler türlerde çok sayıda bulunan atomlar arası titreşimlerin toplam enerjisini gösterir. Genel olarak bir moleküldeki kuvantlaşmış titreşim enerji düzeylerinin sayısı, elektronik düzey sayısından çok daha fazladır (1000-15000nm IR). “dönme” ise, molekül içindeki çeşitli dönme hallerinden oluşan enerjidir; dönem enerji düzeylerinin sayısı da titreşim enerji düzey sayısından çok daha fazladır. (10000 - 100000 nmIR).³⁰

Bu enerjiler arasındaki büyüklük sırası; E elektronik > Etitreşim > Edönme şeklindedir.³¹



Şekil 2.8. Enerji seviyeleri arasındaki geçişler

2.4.5. Lambert - Beer Kanunu

Bir molekül tarafından absorbe edilen ışımın cinsi ve miktarı, molekülün yapısına ve ışıma ile etkileşen molekül sayısına bağlıdır. Işıma ile molekül arasındaki bu etkileşim Lambert-Beer kanunu ile ifade edilir.³²

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

yol ile logaritmik olarak orantılıdır.

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

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

ifadesi yazılır. Bu eşitliğe Lambert-Beer kanunu denir. Eşitlikte I_0 gelen ışın demetinin şiddeti, I çözeltiden çıkan ışın demetinin şiddeti, b çözeltinin kalınlığı, c ise çözeltinin derişimidir. Eşitliğin eksi logaritması alınırsa;³⁰⁻³²

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

Şeklindedir. $\log I_0/I$ 'ye absorbans denir. A ile gösterilir.

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

A ile c arasında bu basit doğrusal ilişkiden analitik uygulamalarda yararlanılır.

Bu bağıntıdaki Absorbans (A) değeri derişime (C) ye karşı grafiğe geçirilirse orijinden geçen ve eğimi ab olan bir doğru elde edilir. Ancak her zaman muntazam bir doğru elde edilemez. Bu durum Lambert-Beer kanunundan sapmalarla açıklanabilir. Lambert-Beer kanunundan sapmaların sebepleri üç madde altında toplanabilir. Bunlar gerçek sapmalar, cihazdan kaynaklanan sapmalar ve kimyasal sapmalardır. Ölçme yapılırken I_0 ve I şiddetleri ayrı ayrı ölçülmez. Onun yerine söz konusu dalga boyundaki çözelti ve saf çözücünden geçen ışın demeti şiddetleri ölçülür. Saf çözücünden geçen ışın demetinin şiddeti I_0 olarak kabul edilir. Buna göre;

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

eşitliği yazılır.³²

2.4.6. Lüminesans

Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır; fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin

tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak “lümİnesans” denir. Kısaca lümİnesans bir atom ya da İyon elektronunun yüksek (uyarılmış) enerji düzeyinden daha düşük bir enerji düzeyine geçtiğı zaman ısı oluşturmada yayılan ışımaaya denir.

Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lumİnesans olayına “kemilumİnesans” adı verilir. Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lumİnesans olayına “elektrolumİnesans” veya “elektrokemilumİnesans” adı verilir. Biyolojik sistemlerde gözlenen lumİnesansa “biyolumİnesans” denir. Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışık emisyonuna “fotolumİnesans” denir.^{30, 33}

2.4.7. Fotolumİnesansın Esasları

Floresans ve fosforesansın her ikisi de, ışın enerjisini absorplayarak uyarılmış hale gelen bir molekül, İyon veya atom tarafından absorplanan bu ışın enerjisinin ışın yayılması şeklinde geri verilmesi anlamına gelen fotolumİnesans’ın çeşitleridir, bu da basitçe lümİnesans olarak ifade edilir.^{30,33}

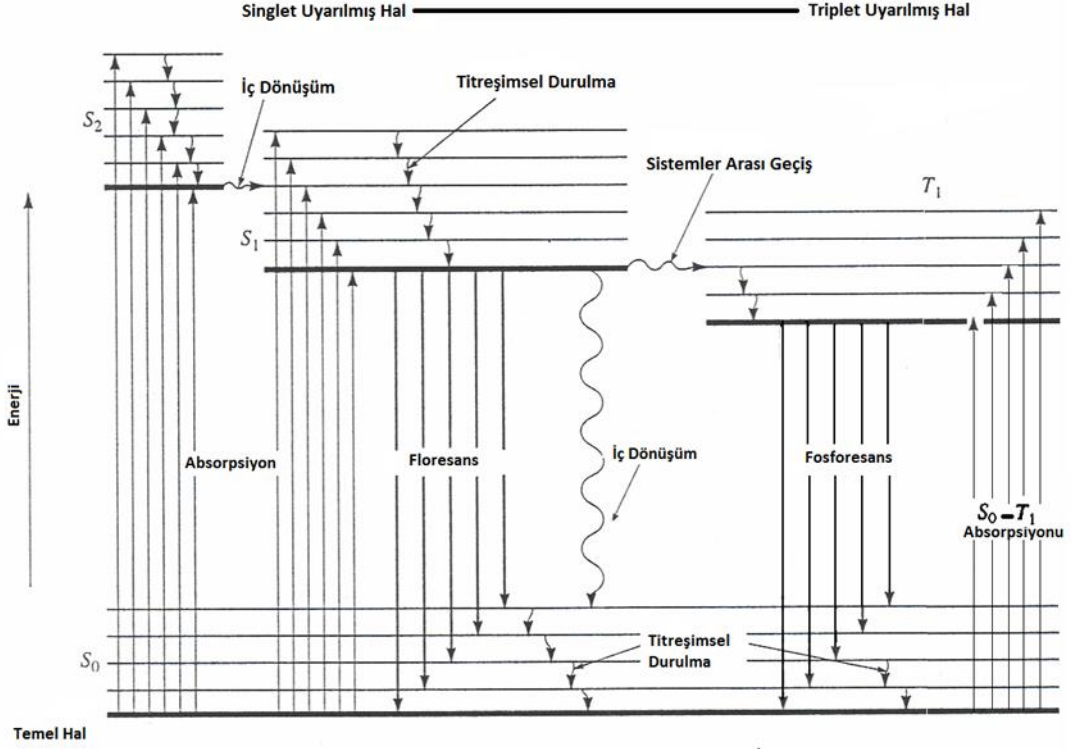
Foto uyarılmış türlerde uyarılmış elektronun spini değışmeksizin, uyarılmış halden temel hale bir geçiş olduğunda, fotolumİnesans “floresans” olarak adlandırılır. Spinde bir değışim varsa, o zaman fotolumİnesansa “fosforesans” adı verilir. Genelde, türler uyarılmış hale eriştikten sonra, floresans emisyonu çok çabuk (10^{-9} – 10^{-6} s) meydana gelir. Bunun için ultraviyole ışımasının kaynağı uzaklaştırıldığı anda floresant bir maddeyi gözle sezmek imkânsızdır. Fosforesans emisyonu çok daha yavaştır ($> 10^{-4}$ s) ve fosforesans emisyonunun ömründe daha büyük bir değışmeyle meydana gelir. Böylece, birçok organik molekül floresans ve fosforesans özellik göstermektedir. Işın

kaynağı uzaklaştırıldığında ışın yayması kesiliyorsa floresans fakat hala ışın yaymaya devam ediyorsa fosforesans özellik gösteren moleküller denir.³³

2.4.8. Jablonski Diyagramı

Işının madde tarafından absorpsiyonu sonucunda molekül orbitallerinde meydana gelebilecek değişiklikler Jablonski diyagramı (Şekil 2.9) üzerinde gösterilmektedir.^{33,34}

Şekilde görüldüğü gibi bir molekülün S_0 ile gösterilen temel hali, bunun üstünde S_1 , S_2 ile gösterilen uyarılmış halleri vardır. Her halin en altında bulunan kalın çizgiye, o halin “elektronik seviyesi” üstündeki ince çizgilere de o halin “titreşim seviyeleri” denir. Temel halin en alt elektronik seviyesinde bulunan bir molekül üzerine, dalga boyları λ_1 ve λ_2 olan iki ışın gönderilecek olursa, λ_1 grubu ışınlarla uyarılan (eksite edilen) molekülün bağ elektronlarında biri ışının dalga boyuna bağlı olarak S_1 uyarılma seviyelerinden birine fırlar. Uyarılan bu elektron, bulunduğu halin elektronik seviyesinden temel hale (S_0) doğrudan geçebileceği gibi, öteki titreşim seviyelerinde birine de geçebilir. Böyle bir geçiş sonucu ortama ışın yayılır ve buna “ S_1 - S_0 geçişi” veya “temel hale dönme” denir.³⁴



Şekil 2.9. Jablonski diyagramı

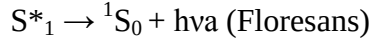
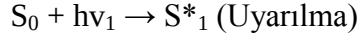
Temel hale dönme sırasında elektron temel halin (S_0) herhangi bir titreşim seviyesine geçerse ortama farklı dalga boylarında ışınlar yayılır ve bunlara floresans ışınları (λ_3 ışınları) denir. Bu olay floresans özellik gösteren moleküller için geçerli bir durumdur. Temel halin herhangi bir titreşim seviyesine geçen elektron titreşim seviyelerinden, ışın yaymaksızın basamak basamak aşağıya inebilir (dalgalı oklar). Bu şekilde elektro ya da elektronun sahibi olan molekül, enerjisini çözücüye (ortama) ısı olarak verir.

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

S_1 uyarılmış halinin herhangi bir titreşim seviyesinde bulunan bir elektronun enerji seviyesi, Şekil 2.9 'da gösterilen triplet halin enerji seviyelerinden birisi ile çakışırsa, elektron fosforesans titreşim seviyelerinden birine geçer ve spini değişir. Singlet halden triplet hale geçer. Fosforesans hal basamağından da temel halin bir enerji basamağına iner ve bu esnada fosforesans ışınları yayılır.^{30,35}

2.5. Floresans

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans (hva) denir.



Şekil 2.9'da gösterilen diyagramdaki açıklamalardan da görüldüğü gibi verilen bir emisyon spektrumu, bir miktar enerjinin iç dönüşümlerde harcanması veya ışımasız dönüşümlerle harcanması nedeniyle daima uyarıcı olarak görev yapan absorpsiyon spektrumlarından daha düşük frekans bölgesinde (veya daha uzun dalga boyu bölgesinde) meydana gelir.³⁵

2.5.1. Floresans'a Etki Eden Faktörler

Yayılan foton sayısının, absorblanan foton sayısına oranı o molekülün fotoluminesans kuantum verimi, ϕ , olarak tanımlanır ve kuantum verimi hem maddenin çevresi, hem de yapısı floresans özelliğini (floresans verimi, emisyon dalga boyu ve ışın şiddetini) büyük ölçüde etkiler.

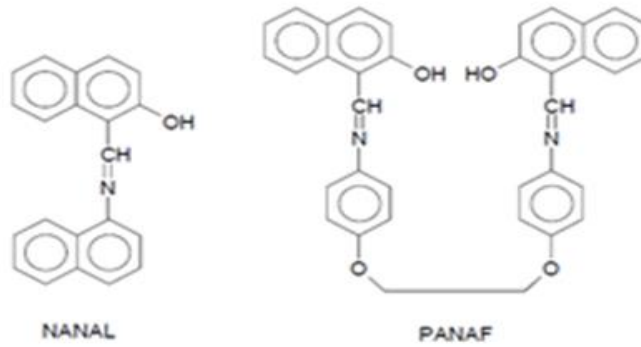
Uyarılmış singlet molekülün enerjisi ile temel haldeki molekülün enerjisi birbirinden ne kadar farklı ise, iç dönüşüm olayının olasılığı o kadar azalır ve dolayısıyla floresans verimi artar. Benzer biçimde bir molekülün uyarılmış triplet hallerinin enerjileri ne kadar farklı ise sistemler arası geçiş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

birbirlerine yaklaşırsa, sistemler arası geçiş olasılığı o kadar artar ve fosforesans verimi artar.^{30,35}

2.5.2. Maddenin Yapısının Etkisi

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

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

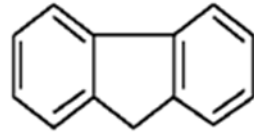


Şekil 2.10. Nanal ve Panaf'ın kimyasal yapıları

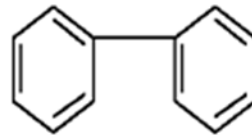
Halkalı bir organik molekülde halkanın elektron yoğunluğunu arttıran sübstitüentler de molekülün floresans veriminin artmasını sağlar. Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin π (π) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışın geçişini artırır. Bu sonuç floresansı da artırır. Genellikle orto ve para pozisyonundaki sübstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta pozisyonundaki sübstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini artırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar.³⁶

2.5.3. Maddenin Yapısal Rijiditesinin Etkisi

Bir molekülün yapısının rijit olması onun floresans özelliğini artırır. Çünkü rijit yapılarda kuantum verimi yüksektir ve iç dönüşüm hızı daha düşüktür. Örneğin, Florenin floresans özelliği bis fenilden faha fazladır (Şekil 2.13).



Floren
 $\Phi=1.0$



Bifenil
 $\Phi=0.2$

Şekil 2.11. Fluoresin ve fenolftalein'in kimyasal yapısı

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

Rijit olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan, ışımasız enerji kaybı olasılığı çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi, floresans şiddetini azaltır. Bundan başka rijit olmayan bir molekülün bir tarafı, öteki tarafına göre daha zayıf enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans emisyonunu azaltan bir etkidir.^{30,36}

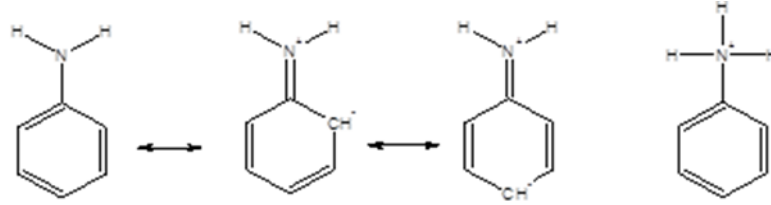
2.5.4. Çözücü ve Sıcaklık Etkisi

Uyarılmış molekül, temel haline oranla daha polar ise, çözücünün polaritesinin artması ile uyarılmış enerji düzeyi daha kararlı hale geleceği için, uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı azalır ve floresans dalga boyu artar. Bu durum, uyarılma ve emisyon olayları π ve π^* orbitalleri arasında gerçekleştiğinde ortaya çıkar. $n \rightarrow \pi^*$ türü bir uyarılma için ise, çözücünün polaritesinin artması ile n orbitalinin daha kararlı hale gelmesi, yani enerjisinin azalması söz konusudur. Böylece, bu tür moleküllerde çözücü polaritesi arttıkça uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı artar ve floresans dalga boyu azalır.^{35,36}

Sıcaklığın artması ile uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığı da artacağından iç dönüşüm olayının verimi artar ve floresans verimi azalır. Fosforesans verimi, sıcaklık azalması ile önemli ölçüde artar. Zn komplekslerinin farklı sıcaklıklardaki kinetikleri ölçüldüğünde en düşük sıcaklıkta (50°C) maksimum floresans gösterdiği gözlenmiştir.³⁶

2.5.5. pH Etkisi

Ortamin pH'sındaki değişimler, hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyeceği için pH, bir molekülün floresans verimini etkileyen bir faktör olabilir. Asit veya baz grubu içeren maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin floresans ışımlarının dalga boyları ve şiddetleri birbirlerinden farklıdır (Şekil 2.12).³⁷



Anilinin Rezonans halleri Anilinyum iyonu

Şekil 2.12. pH değişikliklerin molekül yapısını değiştirmesi

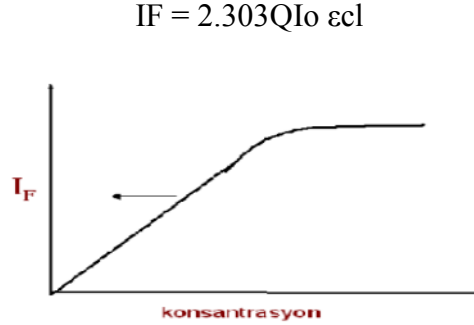
2.5.6. Çözünmüş Oksijen Etkisi

Çözücü ile hidrojen bağı yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışını absorplayabilecek bir başka madde, luminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramanyetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır.³⁷

2.5.7. Derişimin Etkisi

Floresans ışımasının şiddeti, maddenin derişimi ile orantılıdır. Floresans, derişim arttıkça artar, ancak belli bir noktada derişim çok fazla arttırıldığında artık derişimle

orantılı olarak artmaz ve hemen hemen sabit kalır (Şekil 2.13). Seyreltik çözeltiler için aşağıdaki eşitlik geçerlidir.



Şekil 2.13. Derişimin floresans şiddeti ile değışimi

2.5.8. Moleküldeki Sübstitüentlerin Etkisi

Sübstitüsyon, maddenin absorpsiyon dalga boyunu ve şiddetini değıştirir. Buna bağılı olarak maddenin floresans dalga boyu ve şiddeti de değışir. Elektron donörü olan $-NH_2$, $-OH$ gibi gruplar floresansı arttırdığı halde, elektron akseptörü olan $-NO_2$, $-X$ (halojenürler), $-COOH$, $-CHO$, $-N=N-$ gibi gruplar floresansı azaltır ve bazen de ortadan kaldırır. Örneğin; benzen UV bölgede floresans yapar. Bu moleküle $(-NH_2)$ grubu sübstitüe edilirse floresansı artar ve yüksek dalga boyuna kayar. $(-NO_2)$ ile sübstitüe edilirse floresans özelliğı tamamen kaybolur.³⁷

2.5.9. Gelen Işının Dalga Boyunun ve Şiddetinin Etkisi

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

Lüminesans verimi, sadece iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve enerji aktarımı gibi fiziksel olaylarla değil, uyarılmış düzeylerde ortaya çıkabilecek bağ kopması (fotoayırışma) ve ürün oluşması (fotokimyasal reaksiyon) gibi olaylar yüzünden de azalabilir.³⁰

2.5.10. Fotolüminesans Teorisi

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

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

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

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

Geçen ışının şiddetine göre Beer yasasının çözümü verilirse;

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon l c} = I_0 e^{-2,303 \cdot \epsilon l c}$$

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

$$I_L = \phi(I_0 - I_0 e^{-2,303 \cdot \epsilon l c}) = \phi I_0 (1 - e^{-2,303 \cdot \epsilon l c})$$

Bu eşitlikteki üstel ifadeler,

$$e^x = 1 + x + \dots +$$

şeklinde yazılarak, x yerine $(-2,303)$ ifadesi konursa,

$$I_L = \phi I_0 [1 - 1 + 2,303 \cdot \epsilon l c + \dots] = \phi I_0 [2,303 \cdot \epsilon l c + \dots]$$

elde edilir. Seyreltik çözeltiler için absorbans ($\epsilon l c$) küçüktür. $\epsilon l c$, 0,05'e eşit ise, son eşitlikteki serilerin ikinci terimi, birinci terimin % 2,5'u kadardır ve bunu takip eden terimler daha küçüktür. Analitin derişimi düşük tutularak absorbans 0,05'den daha az olduğunda, serilerdeki terimlerin tümü, birinci terim hariç ihmal edilir ve eşitlik şöyle basitleştirilebilir;

$$I_L = \phi I_0 2,303 \cdot \epsilon l c$$

Eşitlikte görüldüğü gibi seyreltik çözeltiler için (10^{-8} - 10^{-5} M) yayılan fotolüminesansın şiddeti, kuantum verimi, gelen veya absorplanan ışının şiddeti ve

analitin derişimiyle orantılıdır. Çoğu laboratuvar cihazlarında yalnızca dedektöre gelen toplam lüminesansın sabit kesri, f , ölçülür ve eşitliğe, dedektörün cevabı için de bir değerin (R) ilave edilmesi gerekir. Bu iki faktörün ilavesiyle eşitlik şu aşağıdaki şekle dönüşür

$$IL = 2,303.f.R\Phi I_0 \varepsilon lc$$

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

$$IL = KI_0C$$

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

$$IL = K' C$$

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

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

Self-absorpsiyon; fluorescent moleküllerin yaydıkları ışının dalga boyu, bu moleküllerin absorpladıkları ışının dalga boyuyla aynıysa, fluorescent bir molekülün yaydığı ışın çözelti içinden geçerken öteki fluorescent moleküller tarafından absorplanır. Absorbans yaklaşık 0.05'den çok daha büyük olduğunda eşitlik parantez içerisinde olan ilk terim dışındaki terimler bir anlam taşır ve lüminesans şiddeti ile derişim arasında

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

$$I_L = \Phi I_0$$

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

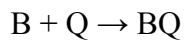
Sonuç olarak, seyreltik çözeltilerde kantitatif analiz, kalibrasyon eğrisi oluşturularak veya standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirilir. Çözeltide bulunan bir madde, lüminesant bir maddenin yaydığı ışını söndürüyor yani azaltıyorsa, lüminesansı önleyen bu maddenin de kantitatif analizi yapılabilir. Lüminesansdaki azalma genellikle, bu önleyici maddenin miktarı ile doğru orantılıdır. Buna göre, lüminesans şiddetinin azalmasının, lüminesansı önleyici madde derişimine karşı ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilebilir veya standart ekleme yönteminden yararlanılabilir.^{30,38}

2.5.11. Stokes Kanunu

Enerjide meydana gelen kayıp nedeniyle, floresansın dalga boyu, uyaran ışığın dalga boyundan daima daha büyüktür. Çünkü emisyonu sağlayan geçiş, bir kısım titreşim enerjisinin çevreye atılmasından sonra meydana gelir. Absorpsiyona göre emisyonda daima daha büyük dalga boylarına doğru bir kayma (Stokes Shift) izlenir.

2.5.12. Stern Volmer Eşitliği

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



B, Q' nun ortamda bulunmasıyla oluşan fluorescent olmayan BQ kompleksine çevrilen kısmı, α ise fluorescent maddenin toplam derişimidir. Q, uyarılmış durumdaki B' yi tek başına söndüremiyorsa veya Q ya da BQ iç filtreler gibi görev yapıyorsa gözlenen floresans şiddet (F) daima kompleksleşmeyen B' nin derişimi ile orantılıdır.³⁸

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

$$F_0 = kb$$

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

2.5.13. Uyarılma ve Emisyon Spektrumları

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

2.5.14. Floresans Spektroskopisi İçin Cihazlar

Floresans ölçümlerinde iki tip cihaz kullanılır. Bunlar filtreli florometreler ve spektroflorometrelerdir. Filtreli florometrelerde, gelen ışının içinden floresans ışınları izole etmek için filtre kullanılır. Spektroflorometrelerde ise gelen ışın ve floresans ışınları ayırmak için optik kırınım ağına sahip monokromatörler kullanılır.³⁸

2.5.15. Florometre ve Spektroflorometrelerin Bileşenleri

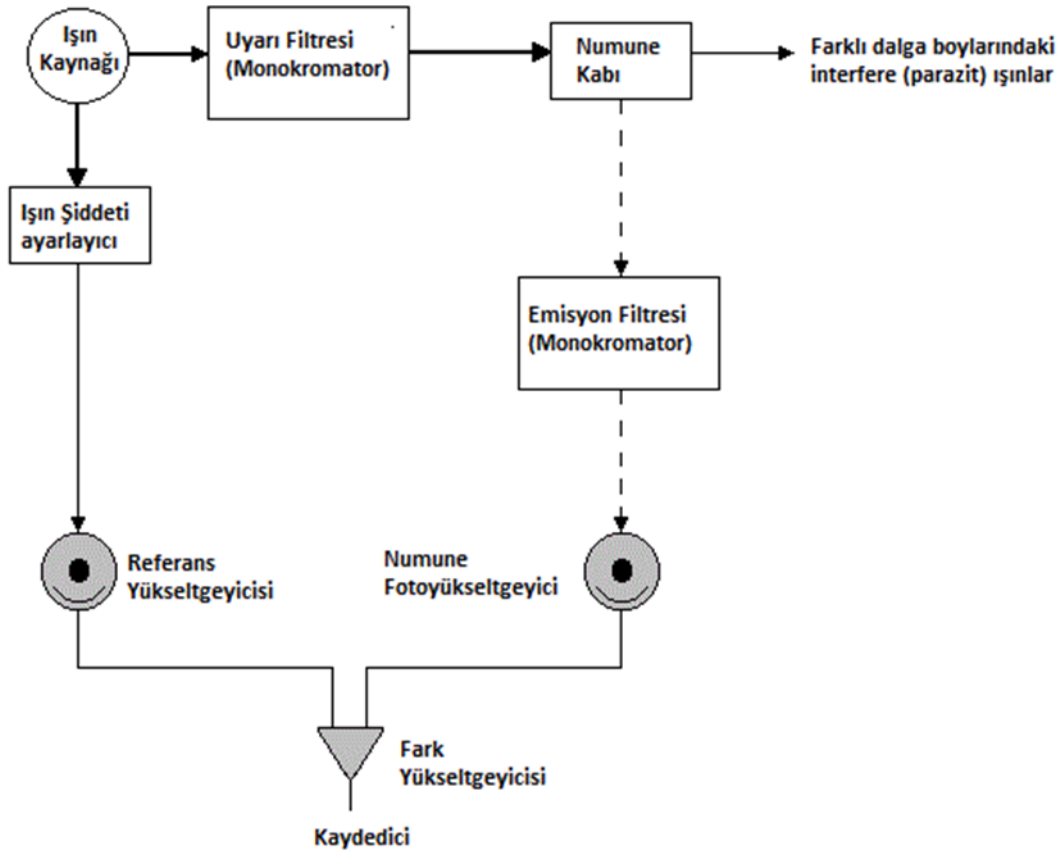
Floresans ölçüm cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaları önlemek için çift ışın yollu spektroflorometreler kullanılır. Şekil 2.14'de çift ışın yollu bir spektroflorometrenin blok diyagramı gösterilmektedir. Işın kaynağından çıkan ışınlar, uyarı (eksitasyon) monokromatörüne gelir. Monokromatörden sadece numuneyi uyarda kullanılacak ışınlar geçer ve numuneye ulaşır. Bu ışınla uyarılan numune

çeşitli dalga boylarında floresans ışınlar yayar. Bir kısmı emisyon filtresi (monokromatoru) yönünde ilerler. Monokromator bu ışınlardan istenilen dalga boyunda olanları geçirecek şekilde ayarlanır. Emisyon filtresinden geçen tek dalga boyundaki ışınlar numune fotoyükseltgeyiciye gelerek elektrik enerjisine dönüştürülür. Bu esnada ışın kaynağından çıkan ve uyarı filtresine giden ışın demetine dik yönde bir ışın demeti de (referans ışın demeti) ışın şiddeti ayarlayıcısına gelir ve ışının şiddeti yaklaşık olarak floresans ışının şiddetine eşit olacak şekilde ayarlanır. Bunun için, referans ışının şiddeti yaklaşık 100 defa düşürülür. Buradan referans ışın yükseltgeyiciye gelerek elektrik enerjisine çevrilir. Fark yükseltgeyici cihaz iki enerjinin farkını alıp yükselterek kaydedici cihaza gönderir.³⁸

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

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

Floresans ışınları uyarılma yönüne dik (90°) açıyla ölçülürler. Bunun sebebi ışın kaynağından gelen interfere (parazit) ışınların iletimini önlemektir. Çünkü monokromatörler bazen hedef dalga boyu dışındaki dalga boylarına sahip ışınları da iletebilirler. Dik açı kullanılarak örnek tarafından yayılan interfere ışınlar dışındaki parazit ışınlar önlenmiş olur.³⁰



Şekil 2.14. Bir spektrofotometrenin başlıca kısımları

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

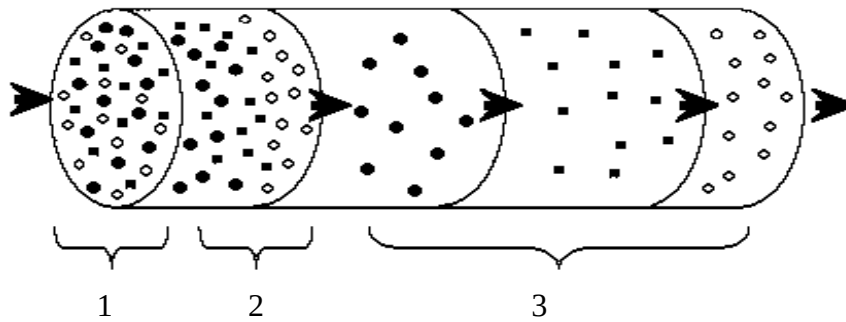
Floresans ölçümü sırasında, tercihen yüksek bir absorpsiyon dalga boyu olmak üzere, eksitasyon ışını belli bir dalga boyunda sabit tutulur ve emisyon monokromatörü spektrum taraması yapar. Eksitasyon dalga boyu ölçülürken de emisyon dalga boyu sabit tutularak, eksitasyon monokromatörü spektrum taraması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

2.6. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlarda bulunan birbirine yakın özellik gösteren bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan birçok farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur. Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

Kromatografi ilk olarak yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adı kullanılmıştır.

Bütün kromatografik ayırmalarda; numune gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olan hareketli faz yardımıyla ile sabit bir faz üzerinden taşınır. Taşınma esnasında bileşenlerin farklı göç hızlarına bağlı olarak ayırma işlemi gerçekleşir. Kromatografik ayırmada seçilen sabit faz ile taşıyıcı fazın birbiri ile karışmaması gerekmektedir.^{38,39}



Şekil 2.15. Kromatografik ayırmanın şematik olarak gösterilmesi

Kromatografik bir sistemde,

1- Karışım kolona yüklenir

2- Ayrılma başlar

3- Ayrılan maddeler detektöre gelerek orada tanınıp bilgisayar sisteminde veriler elde edilir.

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 içerisinde geçerilir. 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.^{30,39}

2.7. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemleri şu şekilde sınıflandırılabiliriz.

Ayrılma Mekanizmalarına Göre

- Partisyon (Dağılma) Kromatografisi
- Adsorpsiyon Kromatografisi
- İyon değiştirme Kromatografisi
- Jel filtrasyon (Moleküler eleme) Kromatografisi

Uygulama Biçimine Göre

- Düzlemsel Kromatografi
- Kağıt Kromatografisi
- İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)
- Kolon Kromatografisi
- Gaz Kromatografisi (GK)

- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

2.7.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografiler

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkili olan mekanizmaları şu şekilde izah edebiliriz.³⁰

2.7.1.1. Dağılma Kromatografisi

En yaygın kullanılan kromatografi yöntemidir. Dağılma çözünen maddenin hareketli faz ile katı faz üzerinde adsorplanmış sıvı fazdaki çözünürlüğüne veya hareketli faz gaz ise uçuculuğuna dayanan bir olaydır. Sıvı-Sıvı ve Bağlı-Sıvı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. Bu teknikler arasındaki fark, destek katısına durgun fazın tutunma farkına dayanır. Sıvı-Sıvı kromatografisinde, sıvı faz sabit bir dolgu maddesinin yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı-Sıvı faz kromatografisinde ise katı destek yüzeye bağlı organik sıvı türler kimyasal olarak tutturulmuştur. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların bağlı polarlıklarına bağlı olarak iki kısma ayrılmaktadır. Sabit faz oldukça polar ve hareketli fazda apolar ise buna Normal-Faz kromatografisi, sabit faz apolar (çoğu zaman bir hidrokarbon) hareketli faz ise nispeten polar (su, asetonytril, metanol) ise buna da Ters-Faz kromatografisi denir.³⁹

2.7.1.2. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. Çözücü ve katı sabit fazın polarlıkları bir kolon boyunca veya bir yüzey boyunca çözünen maddenin hareketinin hızını tayin eder.

2.7.1.3. İyon Değişim Kromatografisi

Bir katı maddenin yapısında bulunan iyonlar, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanan bir

kromatografik yöntemdir. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük molekülü doğal veya yapma maddelerdir. Bunlarda organik ve inorganik diye ikiye ayrılır. Organik iyon değiştiriciler (bunlara reçineler de denir) suda ve birçok organik çözücüde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük molekülü maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon değiştirmede ve hatta selektif iyon değiştirmede kullanılır. İnorganik iyon değiştiricilerde en çok bilineni zeolitlerdir. Bunlar genel olarak; $\text{Na}_2 \text{Al}_2 \text{Si}_4\text{O}_{12}$ formülündedir. İyon değiştirme kromatografisi, ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi birçok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanabilmektedir.³⁹

2.7.1.4. Moleküler-Eleme Kromatografisi

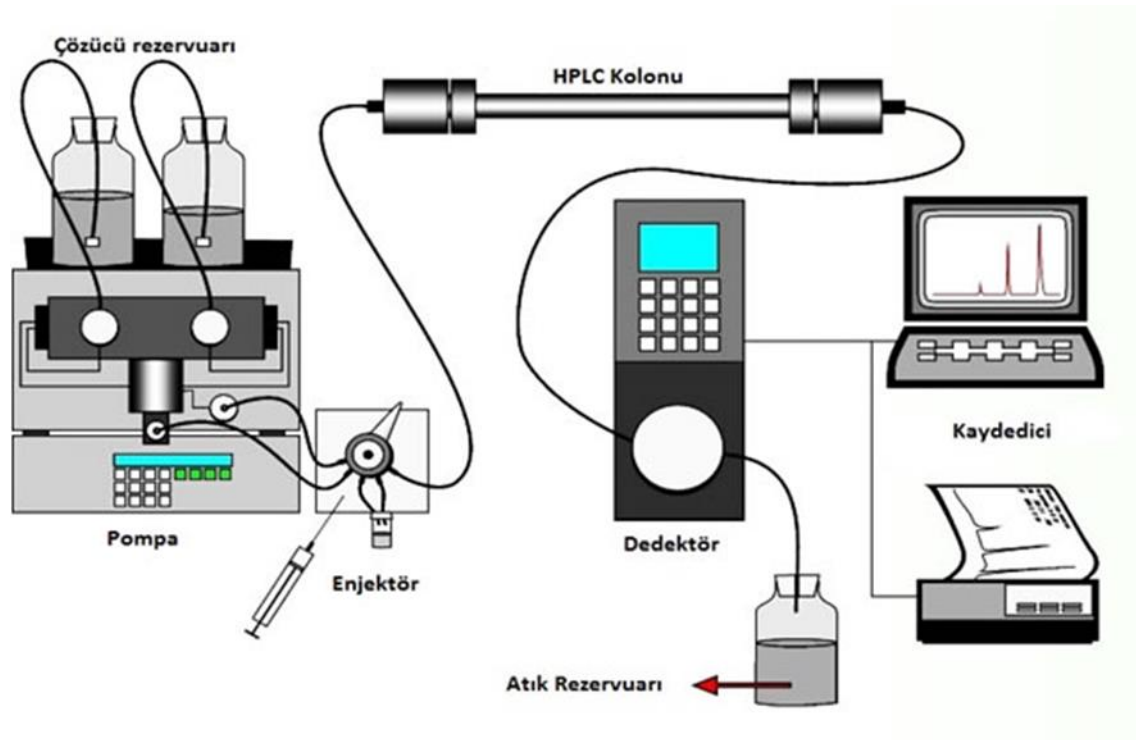
Jel-Filtrasyon veya Jel-Süzme kromatografisi adı da verilen moleküler-eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli maddelere uygulanabilen önemli bir tekniktir. Moleküler-eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde küçük moleküller etkin bir şekilde yakalanabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elüe edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akımı ile yüzeyden kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.³⁹

2.8. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

En yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Kromatografik prosesler, durgun ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanırlar. HPLC; bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı

hareketli fazı kullanır. Bu bileşenler ilk olarak çözücüde çözünürleştirilirler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Yüksek performans yalnız basıncın değil birçok faktörün birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu faktörler dar bir dağılım aralığında çok küçük partiküllerin kullanılması, uniform gözenek boyutu ve dağılımı, yüksek basınçta kolon paketleme, doğru, düşük hacimli örnek enjektörleri, duyarlı dedektörler, iyi pompalama sistemi kullanımı olarak sayılabilir.

HPLC aletleri genelde; hareketli faz rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici (veya veri sistemi) içerirler. Ayırma kolonda gerçekleşir. Durgun faz mikrometre boyutlu poröz partiküllerden oluşur, bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır.³⁹



Şekil 2.16. HPLC cihazının şematik görünüşü

2.8.1. Enjeksiyon Ünitesi

Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyonlar ikiye ayrılır: 1- Manuel Enjeksiyon, 2- Otomatik Enjeksiyon. Enjeksiyon kısımlarında kullanılan enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda loop basınçlı ortamdan izole edilir. Enjeksiyon konumunda loop tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.³⁹

2.8.2. Pompalar

HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından bir tanesidir. Sabit Basınç Pompalar ve Sabit Hacim Pompalar olmak üzere iki tip pompa vardır. Sistemde hareketli fazın ve örneğin enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır.³⁹

2.8.3.Dedektörler

Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan alettir. Dedektörler kolon sonrasına monte edilir. HPLC’ de genel ve özel amaçlı olmak üzere iki tip detektör kullanılır. Genel amaçlı detektörler, hareketli fazın kırma indisini dielektrik sabitini, yoğunluğunu ölçen detektörlerdir. Özel amaçlı detektörle, bir maddenin UV absorpsiyonunu, floresansını ve diffüzeleme akımı ölçülür.³⁰ HPLC’de UV-Görünür Bölge Dedektörü, Floresans Dedektörü, Refraktis İndeks Dedektörü, Elektrokimyasal Dedektörü, Infrared Absorbans Dedektörü, Işın Dağıtma Dedektörü ve Kütle Dedektörü gibi çeşitli dedektörler kullanılmaktadır.^{30,39}

2.8.3.1. Floresans Dedektörler

Floresans dedektörde, uyarıcı ışına 90 derecede yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. Basit dedektörlerde, uyarıcı ışık olarak civa

lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için birkaç filtre kullanılır. Daha gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası ve floresans ışımasını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla kullanılan detektörlerdendir.³⁹

2.8.4. Kolon

HPLC’de kullanılan ayırma kolonları genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Sıklıkla kullanılan kolonlar 4.5 – 5.0 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğundaki kolonlardır. Dolgu maddesini yani sabit fazı taşırlar. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı 5-10µm ile 35-125µm arasında değişir. Kolonların ömrü kullanıma göre değişir. Kolonun ömrünü uzatmak için ön kolon kullanılabilir.

HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılım kromatografisi kullanılır. Dağılım kromatografisinde sistemin ayırım gücü, sabit faz, hareketli faz ve maddenin polaritesine bağlı olarak değişir. Ters-faz ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakınlığına göre kolonu önce terk eder. Ayırabildikleri maksimum madde miktarına göre kolonlar üç farklı tipte sınıflandırılabilir.^{30,39}

1-Mikrobor Analitik: 1-2 mm çapında, 7-30 cm uzunluğunda, 0.01 mg örnek miktarı alabilen, akış hızı 0.1mL/dk olan kolon çeşididir.

2-Standart Analitik: 3-5mm çapında, 7-30cm uzunluğunda, 0,1mg örnek alabilen, 1.0mL/dk akış hızına sahip kolonlardır.

3-Preparatif: 5-20mm çapına sahip, 25-50cm uzunluğunda,10mg örnek miktarı olan ve 10 mL/dk akış hızı olan kolonlardır.³⁹

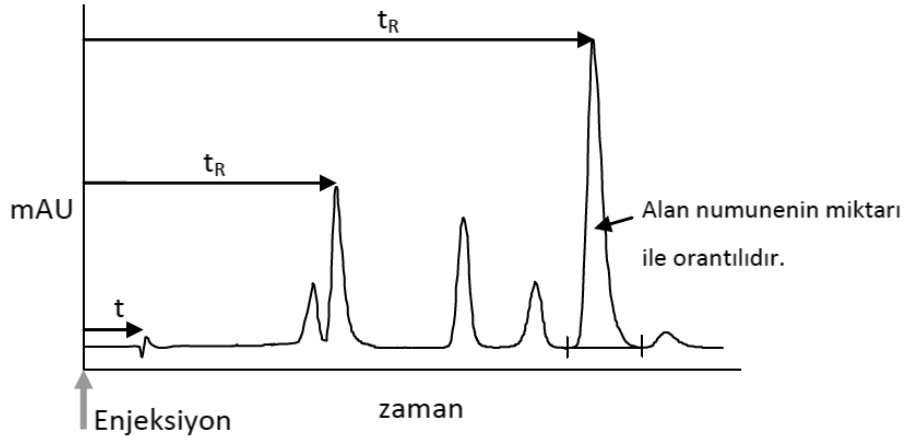
2.8.5. Hareketli Faz

Hareketli fazın bileşimi, alıkonmayı ve seçiciliği en çok etkileyen faktörler ayrımı etkileyen çözücü özellikleri ve işleme bağlı özelliklerdir. Ayrımı etkileyen çözücü özellikleri elüsyon gücü ve seçiciliktir. İşleme bağlı özellikler ise viskozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numuneyle etkileşmeler, saflık ve içinde çözünmüş gaz oranıdır.

Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi gerekir. Süzme işlemi için 0.45-0.60 μm çapında membran veya teflon filtreler kullanılır. Vakumda gerçekleştirilen süzme işlemi hareketli fazda çözünmüş gazların kısmen uzaklaştırılmasını da sağlar. Bütün çözücüler az çok oksijen taşır ve hava kabarcığı oluşumuna neden olur. Bu durum, pompada düzensiz hareketlere ve zemin bozukluklarına, dedektörde girişimlere ve yanlış okumalara neden olur. Çözücüdeki hava kabarcığını yok etmek için ultrasonilatörde bekletme, vakumla gazların arındırılması ve çözücünden inert gaz geçirme işlemleri uygulanır.³⁹

2.9. Kromatografide Temel Kavramlar

Bir kromatografik sisteminde verilerin yorumlanmasında esas alınan kromatogramdır. Kromatogram; tayini yapılan örneğin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör ile saptanmasıyla elde edilmiş pikleri gösteren grafiktir. Aşağıda iki bileşenli bir örneğe ait kromatogram ve kromatografik gösterimler belirtilmiştir.



Şekil 2.17. Kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında kullanılan başlıca parametreler şunlardır;

1. Alıkonma zamanı, t_R
2. Kapasite faktörü, k
3. Seçicilik, α
4. Kolon etkinliği, N
5. Kolon Ayırma gücü, R_s

2.9.1. Alıkonma Zamanı

Numunenin enjeksiyondan sonra detektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir. Alıkonma zamanı t_R terimi yerine alıkonma hacmi V_R de kullanılır. Bir maddenin alıkonma hacmi bir bileşiğin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızı (F)’den hesaplanır.

$$V_R = t_R \cdot F$$

Kolonda hiç tutulmayan bir türün dedektöre varışı arasında geçen zamana ölü zaman (t_0) denir.

2.9.2. Kapasite Faktörü

Kapasite faktörü hareketli fazın derişimi ile kontrol edilir. Uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımındaki her bir bileşen için farklı kapasite

faktörü değerleri elde edilir ve bu değerler ayrılan maddelerin nitel tayini için kullanılır.³⁹ Kapasite faktörü (k), önemli bir deneysel parametredir. Çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta kullanılır.^{30,39}

$$k = (t_R - t_0)/t_0$$

2.9.3. Seçicilik

Kapasite faktörü oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır. Bir kolondaki iki analit için seçicilik katsayısı, bu kolonun söz konusu iki maddeyi ne kadar iyi ayıracağıнын bir ölçüsüdür. Uzun alıkonma zamanlı madde kapasite faktörünün, daha kısa alıkonma zamanlı madde kapasite faktörüne oranlanmasıyla ölçülür.

2.9.4. Kolon Etkinliği

Başarılı bir kromatografinin asıl amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromaografik bant elde etmektir. Kolon etkinliğinin ölçüsü kolonun kuramsal tabaka sayısı (N) dir.

$$N=16.(t_R/W)^2$$

2.9.5. Kolonun Ayırma Gücü

Kolonun ayırma gücü (rezolüsyon, R_s) değeri, kolonun iki analiti ayırma gücünün kantitatif ölçütüdür.

$$R=1/4\sqrt{N.(\alpha-1/\alpha).k/(k+1)}$$

Kromatografik ayırımın başarıyla gerçekleşmesi için $\alpha>1$ olmalıdır. $\alpha=1$ olduğunda iki bileşik ayrılmaz. Genel olarak seçicilik arttıkça ayrılmanın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayrıcalıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilir.³⁰

2.10. Geçerlilik Testi (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem yada yöntemlerin bu analiz işlemlerinde

uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür. Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler şunlardır:

1. Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl hata (% BH) ve yüzde geri kazanım değeriyle verilmektedir.

2. Kesinlik

Kesinlik ise, analitik bir işlemde önceden belirlenmiş koşullar altında aynı homojen örnekten birçok örnekleme yapılır ve bu örneklerin her birinden alınan bir seri ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir. Kesinlikte standart sapma, bağıl standart sapma (% BSS), varyans ve varyans katsayısı ile verilebilmektedir.

i) Gün içi kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı ($n=6$, n : ölçüm sayısı) dır.

ii) Günler arası kesinlik: Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az $n=6$) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumu ifade eder. Kesinlik çalışmasından elde edilen değerler tekrarlanabilirlik çalışması olarak da kabul edilebilmektedir.

4. Saklanan örneklerin kararlılığı (Stabilite)

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Saf analit, analit çözeltileri ya da analit içeren biyolojik örneklerin (kan, plazma, serum, idrar ve doku) normal

laboratuvar şartlarında, nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20°C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında analitin bozunmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir.

5. Doğrusallık ve Kalibrasyon eğrisi

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığın belirlenme işlemine doğrusallık denir. Bu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen yöntem cevaplarının grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve korelasyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür.

6. Duyarlılık

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.⁴⁰

7. Miktar Tayin Sınırı (Limit of Quantification, LOQ)

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin miktar tayin sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir.

8. Gözlenebilme (teşhis) Sınırı (Limit of Dedection, LOD)

Bir analitik işlemin gözlenebilme sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir.

9. Tutarlılık

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analizci, farklı laboratuvar,

farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntemle analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uygunluk derecesidir. Analiz sonuçları birbiriyle uyumlu ise analitik yöntemin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini gösterir.

10. Geri Kazanım

Biyolojik ortamlarda yapılan çalışmalarda, analiz sonucunda bulunan değerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir. Farmasötik preparatlar gibi ortamlarda yapılan çalışmalarda standart ekleme yöntemi kullanılır. Bu yöntem de önce analiti içeren numune analiz edilir. Bu numuneye standart analit numunesi ile hazırlanmış olan kalite kontrol çözeltilerinden uygun derişimlerde ilave edilir ve ölçümler alınır ve yüzde geri kazanım değeri bulunur.⁴¹

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan irbesartan ve valsartan standart maddesi Novagenix'den (Türkiye) temin edildi. Milli-Q saflıkta su kullanılmış olup HPLC saflıkta metanol ve asetonitril Sigma-Aldrich'ten (Almanya) temin edildi. Ayrıca diisopropil eter ve HCl (hidroklorik asit) Sigma-Aldrich'ten (Almanya) temin edildi.

İrbesartan içeren, Karvezide, Karvea, Rebevea ve Co-İrda isimli ticari farmasötik preparatlar eczanelerden temin edildi.

Çalışmada kullanılan otomatik pipetler (10 - 100 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL ve 1000 - 5000 µL) ve kuvartz küvet (USA) , oto örnekleyici vial kitleri (Agilent, 1,8 mL screw cap), mezür, deney tüpü, balon joje Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvar'ından temin edildi.

3.1.2. Aletler ve Cihazlar

Çalışmada floresans ölçümler Perkin Elmer LS 45 Spektrofluorometre cihazı (Xenon deşarjlı lamba, Monk-Gillieson tipi monokromatör (dalga boyu aralığı 200 – 800 nm) ve kromatografik ölçümler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sistemi (Agilent 1200 Series), Floresans Dedektör (FD) (Agilent), Degazer (Agilent), Pompa (Agilent), otoörnekleyici (Agilent) ve bilgisayar (Vestel) ile gerçekleştirildi. Ayrıca çalışmada pH metre (Schott), santrifüj (Hettich, RPM x 100), hassas terazi (Metler Toledo Ad 104-5), vorteks (IKA), su banyosu (GFL), etüv (Mettler), ultrasonik banyo (Elma LC30), vakum pompası (Phenomenex), kolon (C18, 5µm, 250 x 4.6 mm) (USA), cihazlar kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Spektroflorometri Yöntem Şartları

İrbesartan'ın standart çalışma çözeltileri, plazma ekstraksiyon sonucu elde edilen çözeltiler ve farmasötik preparat çözeltilerinin analizi için kullanılan spektroflorometri yöntem şartları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Spektroflorometri yöntem şartları

Yöntem Şartları	Uyarma	Emisyon
Start Lamba (nm)	210	300
Stop Lamba (nm)	310	500
Tarama Hızı(nm/dk)	400	400
Uyarma Monokromotörün Slit Aralığı	10.0	10.0
Emisyon Monokromotörün Slit Aralığı	10.0	10.0
Referans Dalgaboyu (nm)	231	380

3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntem Şartları

HPLC-FD çalışmasında, irbesartan etkin maddesi için uygulanan yöntem şartları Tablo 3.2'de verildi.

Tablo 3.2. HPLC-FD yöntem şartları

Yöntem Şartları	İrbesartan
Kolon	C ₁₈ (250x4,6 mm,5µm)
Dedektör	Floresans Dedektör (FD)
Eksitasyon dalga boyu	231 nm
Emisyon dalga boyu	380 nm
Hareketli Faz	Metanol/Asetonitril/Su (20:50:30, h/h/h)
Kolon Sıcaklığı	Değişken
Kolon Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
İç Standart	Valsartan, 100 ng/mL

3.2.3. İrbesartan'ın Plazmadan Ekstraksiyon İşlemi

1 mL boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu. Plazma üzerine uygun derişimlerde irbesartan standart çalışma çözeltisi ve HPLC çalışmasında iç standart olarak valsartan (100 ng/mL) eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım üzerine 5 mL metil tersiyer bütıl eter (MTBE) ilave edildi. Ağzı kapatılarak 5 dk vortekslendi. 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra organik faz başka bir santrifüj tüpüne alındı ve azot gazı altında 30°C'de buharlaştırıldı. Elde edilen kalıntı üzerine 0.5 mL metanol eklenerek 2 dakika boyunca vortexlendi. Elde edilen çözelti spektrofotometrik ölçümler için 0.02 M HCl içeren 1 mL metanol çözeltisi eklenerek, kromatografik ölçümler için ise HPLC saflıktaki 1 mL metanol eklenerek 2 dk vortexlenerek analiz çözeltileri elde edildi. Plazma çalışma çözeltileri analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.4. İrbesartan'ın Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

İrbesartan'ın belirlenmesinde kullanacağımız uygun çözücü, pH ve uygun asit veya tampon çözeltisi belirlemek amacıyla, derişimi 50 ng/mL olacak şekilde irbesartanın çeşitli organik çözücüde (su, etanol, metanol, kloroform, eter, hekzan ve aseton), çeşitli asit ve tampon çözeltisi kullanarak (HNO₃, H₂SO₄, HCl ve H₂SO₃/NaHSO₃; pH:2) çeşitli pH'larda (1, 1.5, 2, 2.5 ve 3) çözeltileri hazırlandı. Spektrofotometrede uyarma dalga boyu 200 nm'den başlayarak 10 nm aralıklarla 900 nm'ye kadar uyarma ve emisyon spektrumları alındı. Ayrıca kullandığımız çözücü ortamında uyarma ve emisyon spektrumları aynı dalga boyları arasında tarandı. Spektrumlardan, uygun koşulları belirlemek için, çözücü ortamının floresans emisyonunun etkin maddenin floresans emisyonunu en az etkilediği dalga boyları göz önüne alındı. İrbesartan'ın en iyi bağıl floresans yoğunluğunu elde etmek için belirtilen değişkenler incelendi. İrbesartan için uyarma ve floresans emisyon piklerinin net bir

şekilde gözlemlendiği ve floresans şiddetinin en yüksek olduğu dalga boyları göz önüne alınarak en uygun uyarma dalga boyu (λ_{uy}) ve emisyon dalga boyu (λ_{em}) belirlendi.

3.2.5. İrbesartan Standart Çalışma Çözeltileri ve Kalite Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

1 mg/mL derişimde metanolde irbesartan stok çözeltisi hazırlandı. Spektroflorometrik çalışma için stok çözeltiden uygun miktarlarda alınan çözelti 0.01 M HCl çözeltisi ile seyreltilerek 10-300 ng/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Plazma çalışmasında, Bölüm 3.2.3.'de verildiği şekilde irbesartan etkin maddesinin plazmadan ekstraksiyonları yapılarak 10–300 ng/mL derişim aralığında plazma çalışma çözeltileri elde edildi. Aynı şekilde 25, 75 ve 250 ng/mL derişimlerde hem standart hem de plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

HPLC-FD yöntemi için irbesartan stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınan çözeltiler HPLC saflıktaki metanol ile seyreltilerek 5 – 2000 ng/mL derişim aralığında standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Plazmada irbesartan miktar analizi için Bölüm 3.2.3.'de verildiği şekilde ekstraksiyonları yapılarak 5 – 2000 ng/mL derişim aralığında plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. Aynı şekilde 20, 250 ve 1500 ng/mL derişimlerde hem standart hem de plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı.

HPLC çalışmasında iç standart (IS) olarak kullanılan valsartan 100 ng/mL derişimde metanol içerisinde çalışma çözeltisi hazırlandı.

Çözeltiler analiz edilinceye kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.2.6. Tablet Çözeltilerinin Hazırlanması

150 mg irbesertan etkin maddesini içeren iki farklı tablet formunda ticari farmasötik preparatlar (Karvezide ve Co-İrda) eczanelerden temin edildi. Her bir ticari preparattan ayrı ayrı 10 adet tablet alınıp tartılarak ortalamaları kaydedildi. Tabletler havanda ezilerek iyice toz haline getirildi ve iyice karıştırılarak homojenize edildi. Bu

toz numunesinden yaklaşık 1 tablet miktarı (150 mg irbesartan içeren) kadar alınarak balon jojeye konuldu ve metanol eklenip karıştırıldı. Tam çözünmeyi sağlamak için 15 dk boyunca sonike edildi, ısıtıldı ve daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Elde edilen çözelti süzülerek uygun hacme metanol eklenerek tamamlandı ve farmasötik preparat stok çözeltisi elde edildi. Herbir tablet stok çözeltisinden istenilen derişimlerde tablet çalışma çözeltileri metanol ile seyreltilerek hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. İrbesartanın Floresans Şiddetine Çözücü ve pH'ın Etkisi

İrbesartan'ın en yüksek floresans şiddeti verebileceği çözücü belirlemek için su, etanol, metanol ve asetonda 1 mg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlandı. İrbesartan'ın su, etanol ve metanolde iyi bir şekilde çözüldüğünü asetonitril, kloroform, eter, hekzan ve aseton gibi organik çözücülerde ise kısmen çözüldüğü gözlemlendi. Nötr ortamda irbesartanın floresans şiddeti çok düşük olup denenen çözücüler arasında en yüksek floresans şiddetinin metanol ile elde edildiği görüldü. İrbesartan için asitlik sabiti pKa: 4.12 olup irbesartan asit türlerinin (pH: 5 den daha düşük olduğu zaman) floresans özellik gösterdiği literatürde bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında irbesartan floresans ölçümleri 0.01 M HCl içeren metanol çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1. İrbesartan'ın floresans şiddetine çözücünün etkisi (50 ng/mL)

Çözücü	pH	Kullanılan Asit veya tampon çözelti	λ_{uy}	λ_{em}	Floresans Şiddeti	
					Çözücü	İrbesartan
Su	2	0.01 M HCl	247.81	387.56	35	428
Metanol	2	0.01 M HCl	251.08	374.82	43	448
Etanol	2	0.01 M HCl	247.75	377.65	65	385
Asetonitril	2	0.01 M HCl	279.15	369.12	44	381

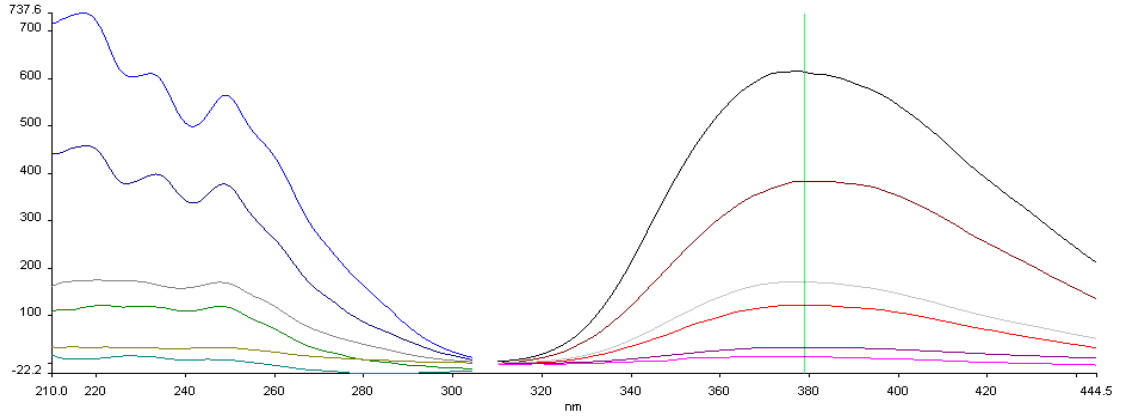
4.2. Spektroflorometri Yöntemi

4.2.1. Spektroflorometri Yöntem Geçerlilik Testleri

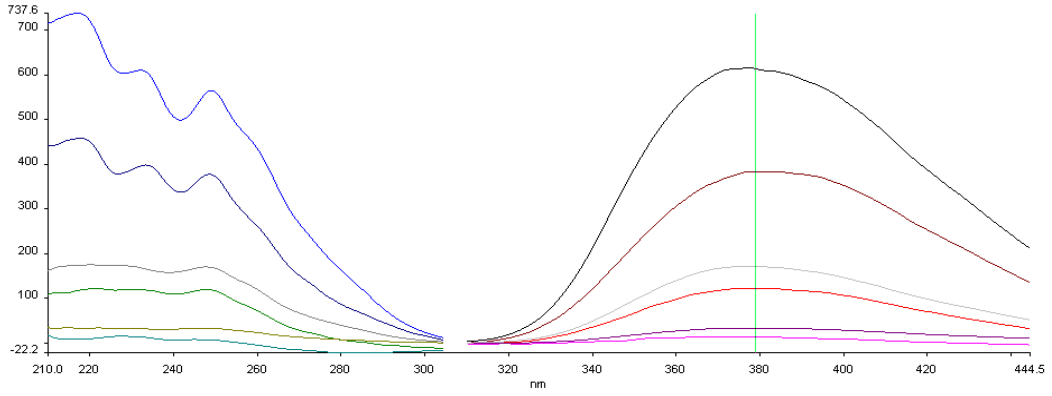
Analitik alanda farklı amaçlara göre düzenlenen kurallar dünyanın farklı bölgelerine göre değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada, irbesartan analizinde kullanılan spektroflorometri yönteminin geçerlilik testi, ICH (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

4.2.1.1. Belirleyicilik

Metanol ve 0.01 M HCl çözeltisi ile hazırlanan 10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL derişimlerdeki irbesartan standart ve Bölüm 3.2.3.'de verilen ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen plazma çalışma çözeltilerinin 210 - 310 nm dalga boyu aralığında uyarma (eksitasyon) ve 300 - 500 nm dalga boyu aralığında emisyon taraması yapılarak spektrumları alındı. Bu ortamda en uygun uyarma dalga boyunun 231 nm ve buna karşılık gelen en uygun emisyon dalga boyunun 380 nm olduğu tespit edildi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Bu uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücünün emisyon spektrumu irbesartan emisyon spektrumundan farklı dalga boylarında olduğu görüldü ve aynı zamanda plazmadan kaynaklanan herhangi bir interferansa rastlanmadı.



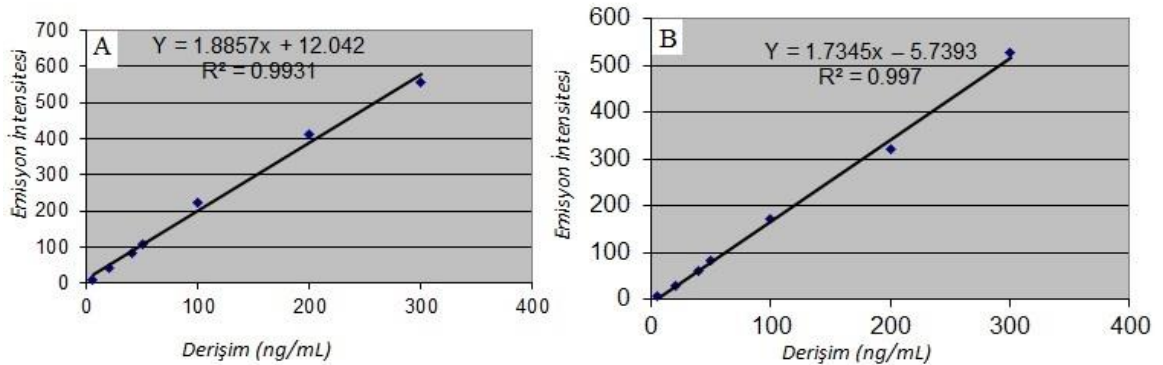
Şekil 4.1. 10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL derişimlerde irbesartan standart çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.2. 10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL derişimlerde irbesartan plazma çalışma çözeltilerinin floresans spektrumu

4.2.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

Spektroflorometri yönteminin çalışma aralığı kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralığı olarak seçildi. Çalışmada, irbesartan stok çözeltisinden Bölüm 3.2.5’de belirtildiği şekilde 7 farklı derişimde (10, 20, 40, 50, 100, 200 ve 300 ng/mL) standart çalışma çözeltileri ve Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde aynı derişimlerde plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin 231 nm dalga boyunda uyarma ve 380 nm dalga boyunda emisyon spektrumları alındı ve floresans şiddetleri kaydedildi. İrbesartan derişimine karşı floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.3 A ve B).



Şekil 4.3. Spektroflorometri yönteminin 10-300 ng/mL derişim aralığında irbesartanın kalibrasyon eğrileri: A) standart çözeltiler; B) plazma çözeltileri

Spektroflorometri çalışmasında irbesertan için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.2’de verildi.

Tablo 4.2. Spektroflorometri yöntemi ile elde edilen standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Numune Tipi	ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
Standart	10-300	Y=2.4706x + 8.8043	0.018	0.653	0.9993
Plazma	10-300	Y=2.2341x + 2.6902	0.003	1.322	0.9991

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 kalibrasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R²: Regresyon katsayısı

4.2.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

Spektroflorometrik yöntem için kalibrasyon eğrisinin en düşük derişiminden (10 µg/mL) daha düşük derişimlerde irbesertan çözeltileri hazırlandı ve spektrumları alınarak altı kez ölçümleri gerçekleştirildi. Okunan değerlerin bağıl standart sapmaları (% BSS) belirlendi. Bağıl standart sapma değeri % 20’den küçük olan derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve % 10’dan küçük olan derişim de miktar tayin sınırı (LOQ) değeri olarak belirlendi.

Yöntemin hem standart ve hem de plazma çözeltilerinde gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 3 ng/mL ve 10 ng/mL olarak tespit edildi.

4.2.1.4. Doğruluk/ Kesinlik

İrbesertan kalibrasyon eğrileri içinde yer alan üç farklı derişimde (20, 75 ve 250 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Ayrıca Bölüm 3.2.3’de verildiği şekilde aynı derişimlerde plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Hem standart hem de plazma kalite kontrol çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) floresans spektrumları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması,

bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk yüzde bağıl hatayla (BH) [% BH= [bulunan değer-eklenen değer/eklenen değer) x 100] ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) [%BSS= (Standart Sapma (SS)/ortalama değer) x 100] ile verildi. Standart ve plazma çözeltilerinden elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.3’de verildi.

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

Numune Tipi	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler arası		
		Bulunan $\pm$ SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Bulunan $\pm$ SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Standard	20	18.51 $\pm$ 1.01	-7.40	1.82	17.30 $\pm$ 0.30	-13.49	0.57
	75	77.29 $\pm$ 1.94	3.06	0.96	74.68 $\pm$ 3.81	-0.41	1.95
	250	252.41 $\pm$ 4.57	0.96	0.71	251.76 $\pm$ 5.28	0.70	0.83
Plazma	20	18.46 $\pm$ 0.87	-7.66	1.91	18.36 $\pm$ 1.99	-8.19	4.41
	75	73.33 $\pm$ 1.47	-2.22	0.88	71.65 $\pm$ 1.90	-4.45	1.15
	250	257.42 $\pm$ 1.03	2.96	0.17	253.91 $\pm$ 3.60	1.56	0.63

SS: standart sapma (n=6), %BH: Bağıl hata, % BSS: Bağıl standart sapma

4.2.1.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparat çalışmalarında standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri de [%GK = (bulunan değer-eklenen değer/eklenen değer)x100] formülünden hesaplandı. Standart ekleme yönteminde ilk önce 100 ng/mL derişimde farmasötik preparat (Karvezide 150 mg, Co-İrda 150mg) çözeltisi hazırlandı ve spektrofotometri yöntemi ile floresans spektrumları alındı. Sonra bu çözeltiye önceden üç farklı derişimde (20, 75 ve 250 ng/mL) hazırlanmış standart çalışma çözeltileri uygun miktarlarda eklendi ve mevcut yöntem ile tekrar floresans spektrumları alındı ve yukarıda verilen formül kullanılarak yüzde analitik geri kazanım değerleri tespit edildi. Elde edilen geri kazanım değerleri Tablo 4.4’de verildi.

Tablo 4.4. Spektroflorometri yönteminin standart ekleme yöntemine göre farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Formülasyon	Eklenen (ng/mL)	Bulunan $\pm$ SS (ng/mL)	% GK	% BSS
Karvezide 100 ng/mL	20	20.06 $\pm$ 0.35	100.3	1.74
	75	76.68 $\pm$ 0.41	102.2	0.53
	250	248.40 $\pm$ 0.58	99.3	0.23
Co-İrda 100 ng/mL	20	21.05 $\pm$ 0.24	105.3	1.14
	75	77.81 $\pm$ 0.75	103.7	0.96
	250	249.30 $\pm$ 0.90	99.7	0.36

SS: standart sapma (n=6). % BSS: bağıl standart sapma, %GK: Geri kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, irbesartanın kalibrasyon standart çözeltileri plazmaya eklendi. Karıştırıldı ve Bölüm 3.2.3’de veridiği şekilde ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların floresans spektrumu alındı. Aynı zamanda standart çözeltilerin de floresans spektrumu alındı. Plazma çözeltilerinde yüzde geri kazanım değerleri [%GK = (plazmadan ekstrakte edilen çözeltiden bulunan değer/standart çözelti değeri)x100] formülünden hesaplandı ve elde edilen değerler Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5. Spektroflorometri yönteminin plazma yüzde geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	% GK $\pm$ SS	% BSS
300	98.9 $\pm$ 1.20	1.21
250	99.1 $\pm$ 1.04	1.04
200	99.9 $\pm$ 2.05	2.09
100	98.0 $\pm$ 1.67	1.70
50	98.8 $\pm$ 1.48	1.50
40	99.9 $\pm$ 1.16	1.16
20	97.8 $\pm$ 0.87	0.88
10	98.1 $\pm$ 0.87	0.89

SS: Standart sapma (n=6), % BSS: Bağıl standart sapma, %GK: Geri kazanım

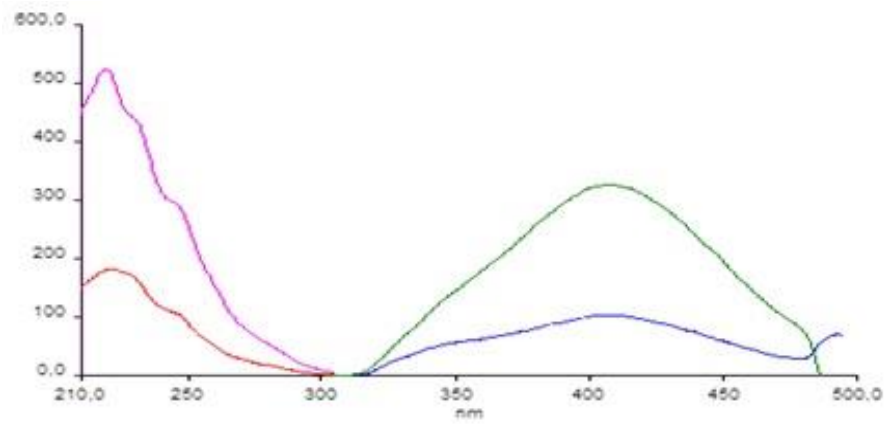
4.2.1.6. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi yapılan spektrofotometri yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla irbesartan etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda etkin madde miktar analizi yapıldı.

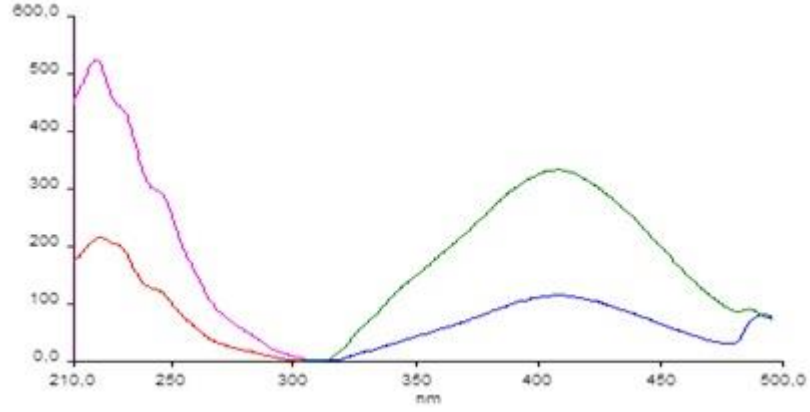
İrbesartan etkin madde içeren, film tablet formundaki iki adet ticati farmasötik preparatlardan (Karvezide 150 mg, Co-irde 150 mg) Bölüm 3.2.6’da verildiği şekilde tablet çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin floresans spektrumları alındı (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) ve floresans şiddetleri ölçülerek kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak irbesartan etkin madde miktar belirlenmesi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6’da verildi.

Tablo 4.6. Spektroflorometri yönteminin farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri

Farmasötik Formülasyon	Etkin Madde Miktarı (mg)	İlaç Çözeltisi Derişimi (mg/mL)	Bulunan (mg/mL)	% GK	Güven Aralığı
Karvezid	150	1.5	1.49	99.3	97.3-101.3
Co-İrda	150	1.5	1.48	98.7	96.5-100.3



Şekil 4.4. 100 ve 300 ng/mL Karvezide (150 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu



Şekil 4.5. 100 ve 300 ng/mL Co-irida (150 mg) ilaç çözeltilerinin floresans spektrumu

4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi (HPLC-FD)

4.3.1. HPLC-FD Yöntem Geçerlilik Testleri

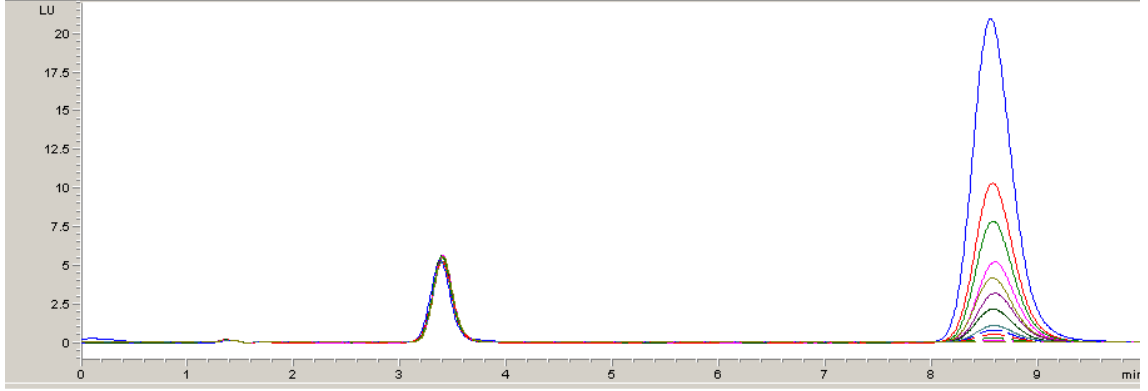
Bu çalışmada, irbesartan analizinde kullanılan HPLC yönteminin geçerlilik testi, ICH (The International Conference on Harmonization) rehberinde kabul edilen analitiksel yöntem geçerlilik parametreleri esas alınarak gerçekleştirildi.

4.3.1.1. Belirleyicilik

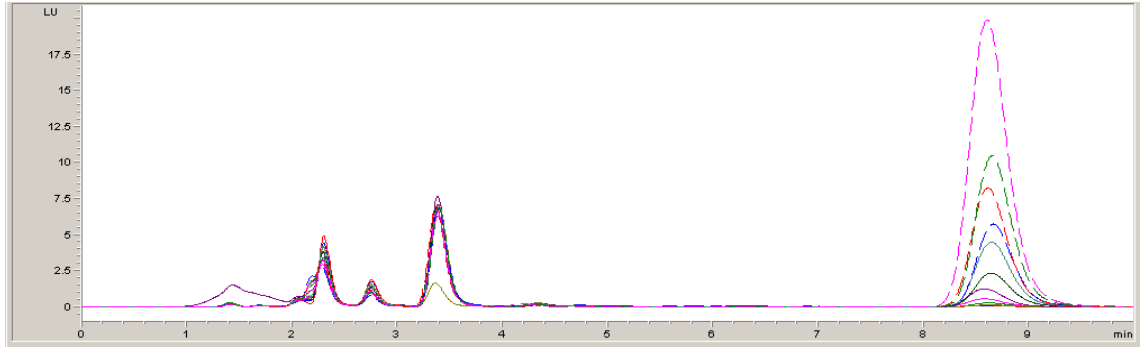
İrbesartan'ın hazırlandığı çözücü karışımının ve boş plazma çözeltilerinin irbesartanın floresans şiddeti üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bu uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücünün emisyon piki irbesartan emisyon pikininden farklı dalga boyunda olduğu saptandı.

HPLC çalışmasında, 100 ng/mL derişimde iç standart olarak valsartan (IS) içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 ve 2000 ng/mL derişimlerde irbesertan standart çalışma çözeltileri ve Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde plazma çalışma çözeltileri hazırlanarak floresans dedektörü kullanılarak kromatogramları alındı (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Standart çözeltiler ile edilen kromatogramların incelenmesinde irbesertanın alıkonma zamanı 8.607 dakika ve internal standart olarak kullanılan valsartanın ise 3.365 dakika (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Kromatogramlardan görüldüğü gibi

irbesartan ve valsartanın sinyal verdiği noktalarda plazmadan kaynaklanan herhangi bir interfere etkiye rastlanmadı.



Şekil 4.6. 100 ng/mL derişimde IS içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 ve 2000 ng/mL derişimlerde irbesartan standart çalışma çözeltilerinin kromatogramları

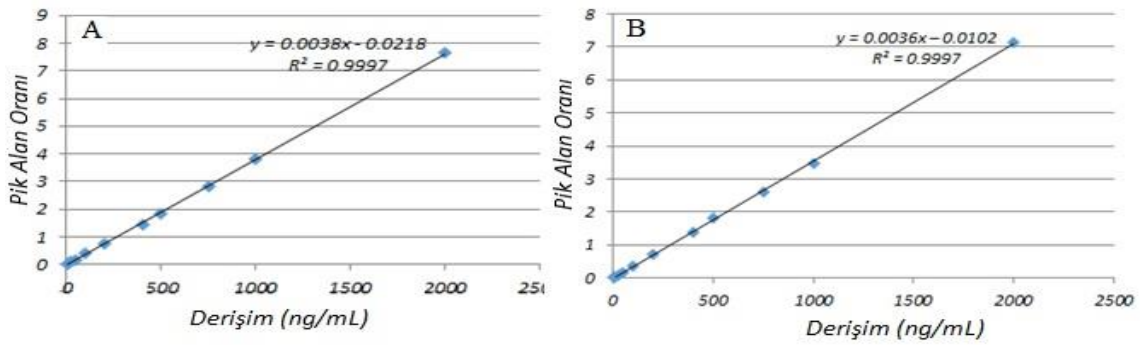


Şekil 4.7. 100 ng/mL derişimde IS içeren 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 ve 2000 ng/mL derişimlerde irbesartan plazma çalışma çözeltilerinin kromatogramları

4.3.1.2. Doğrusallık/Çalışma Aralığı

HPLC-FD yönteminin çalışma aralığı kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın elde edildiği derişim aralığı olarak belirlendi. Bunun için de, irbesartan stok çözeltisinden Bölüm 3.2.5’de belirtildiği şekilde 100 ng/mL derişimde IS (valsartan) içeren 13 farklı derişimde (5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750,

1000 ve 2000 ng/mL) standart çalışma çözeltileri ve Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde aynı derişimlerde plazma çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin floresans dedeksiyonla kromatogramları elde edildi. İrbesertan derişimine karşı IS (valsartan) ve irbesertan pik alan oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.8 A ve B).



Şekil 4.8. HPLC-FD yönteminin 5-2000 ng/mL derişim aralığında irbesertanın kalibrasyon eğrileri: A) standart çözeltiler; B) plazma çözeltileri

HPLC-FD yönteminde irbesertan için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.7. HPLC-FD yöntemi ile elde edilen standart ve plazma çalışma çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel analiz değerleri

Numune Tipi	ÇA (ng/mL)	LR ^a	Sa	Sb	R ²
Standart	5-2000	$Y=0.0038x - 0.0218$	5.682	5.510	0.9997
Plazma	5-2000	$Y=0.0036x - 0.0102$	0.560	1.397	0.9997

ÇA: çalışma aralığı, ^a:6 kalibrasyon eğrisinin ortalaması, LR: lineer regresyon, Sa: regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması Sb: regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması, R²: Regresyon katsayısı

4.3.1.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

HPLC-FD yönteminin LOD ve LOQ değerlerini belirlemek için standart ve plazma çalışma çözeltilerinden elde edilen kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G)

oranın 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 10 olan derişimde miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri olarak belirlendi.

Yöntemin hem standart ve hem de plazma çözeltilerinde gözlenebilme sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 2 ng/mL ve 5 ng/mL olarak tespit edildi.

4.3.1.3. Doğruluk/ Kesinlik

100 ng/mL derişimde IS (valsartan) içeren irbesartan kalibrasyon eğrileri içinde yer alan üç farklı derişimde (20, 250 ve 1500 ng/mL) kalite kontrol çözeltileri ile Bölüm 3.2.3’de verildiği şekilde aynı derişimlerde plazma kalite kontrol çözeltileri hazırlandı. Hem standart hem de plazma kalite kontrol çözeltilerin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 3 günde 6 kez) kromatogramları alınarak analizleri gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hataları belirlendi. Doğruluk yüzde bağıl hatayla (BH) [% BH= [bulunan değer-eklenen değer/eklenen değer) x 100] ve kesinlik bağıl standart sapma (% BSS) [%BSS= (Standart Sapma (SS)/ortalama değer) x 100] ile verildi. Standart ve plazma çözeltilerinden elde edilen doğruluk ve kesinlik değerleri Tablo 4.8’de verildi.

Tablo 4.8. HPLC-FD yönteminde irbesartan standart ve plazma çözeltilerin günüçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (n=6)

Numune Tipi	Eklenen (ng/mL)	Günüçi			Günler arası		
		Ortalama ± SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS	Ortalama ± SS (ng/mL)	Doğruluk %BH	Kesinlik %BSS
Standart	20	18.5 ± 0.35	-7.50	1.89	18.6 ± 0.31	-7.00	1.67
	250	246.2 ± 8.76	-1.52	3.55	244.1 ± 12.27	-2.36	5.02
	1500	1502.3 ± 45.23	0.53	3.01	1476.4 ± 59.49	1.57	4.03
Plazma	20	18.9 ± 0.570	-5.50	3.02	19.1 ± 0.34	-4.50	1.78
	250	238.9 ± 5.56	-4.44	2.33	239.1 ± 7.47	-4.36	3.12
	1500	1488.9 ± 52.51	0.74	3.52	1501.5 ± 60.57	0.10	4.03

SS: standart sapma (n=6), %BH: Bağıl hata, % BSS: Bağıl standart sapma

4.3.1.4. Geri Kazanım

Farmasötik preparat çalışmalarında standart ekleme yöntemine göre analitik geri kazanım değerleri de $[\%GK = (\text{bulunan değer} - \text{eklenen değer} / \text{eklenen değer}) \times 100]$ formülünden hesaplandı. Standart ekleme yönteminde ilk önce 100 ng/mL derişimde farmasötik preparat (Karvezide 150 mg, Co-İrda 150mg) çözeltisi hazırlandı ve spektrofotometri yöntemi ile floresans spektrumları alındı. Sonra bu çözeltiye önceden üç farklı derişimde (20, 250 ve 1500 ng/mL) hazırlanmış standart çalışma çözeltileri uygun miktarlarda eklendi ve mevcut yöntem ile tekrar floresans spektrumları alındı ve yukarıda verilen formül yardımıyla yüzde analitik geri kazanım değerleri tespit edildi. Elde edilen geri kazanım değerleri Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9. HPLC-FD yönteminin standart ekleme yöntemine göre farmasötik preparatlarda analitik geri kazanım değerleri

Farmasötik Formülasyon	Eklenen (ng/mL)	Bulunan $\pm$ SS (ng/mL)	% GK	% BSS
Karvezide 100 ng/mL	20	121.00 $\pm$ 0.65	105.0	0.54
	250	346.16 $\pm$ 0.74	98.5	0.21
	1500	1586.67 $\pm$ 0.33	99.1	0.02
Co-İrda 100 ng/mL	20	119.72 $\pm$ 0.36	98.6	0.30
	250	347.73 $\pm$ 0.46	99.1	0.13
	1500	1582.84 $\pm$ 0.57	98.7	0.07

SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma, %GK: Geri kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, irbesartanın kalibrasyon standart çözeltileri ile birlikte 100 ng/mL IS (valsartan) plazmaya eklendi. Karıştırıldı ve Bölüm 3.2.3’de veridiğı şekilde ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratların kromatogramları alındı. Aynı zamanda standart çözeltilerin de kromatogramları alındı. Plazma çözeltilerinde yüzde geri kazanım değerleri $[\%GK = (\text{plazmadan ekstrakte edilen çözeltiden bulunan değer} / \text{standart çözelti değeri}) \times 100]$ formülünden hesaplandı ve elde edilen değerler Tablo 4.10’da verildi.

Tablo 4.10. HPLC-FD yönteminin plazma yüzde geri kazanım değerleri

Eklenen (ng/mL)	% GK $\pm$ SS	% BSS
2000	99.2 $\pm$ 0.18	0.18
1000	98.6 $\pm$ 2.33	2.36
750	98.1 $\pm$ 1.01	1.03
500	98.5 $\pm$ 1.47	1.49
400	97.4 $\pm$ 2.11	2.16
200	98.2 $\pm$ 2.76	2.81
100	98.9 $\pm$ 2.81	2.84
50	99.5 $\pm$ 2.25	2.26
25	97.6 $\pm$ 2.74	2.81
10	98.2 $\pm$ 1.89	1.92
5	99.8 $\pm$ 1.85	1.85

SS: standart sapma, % BSS: bağıl standart sapma, %GK: Geri kazanım

4.3.1.5. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

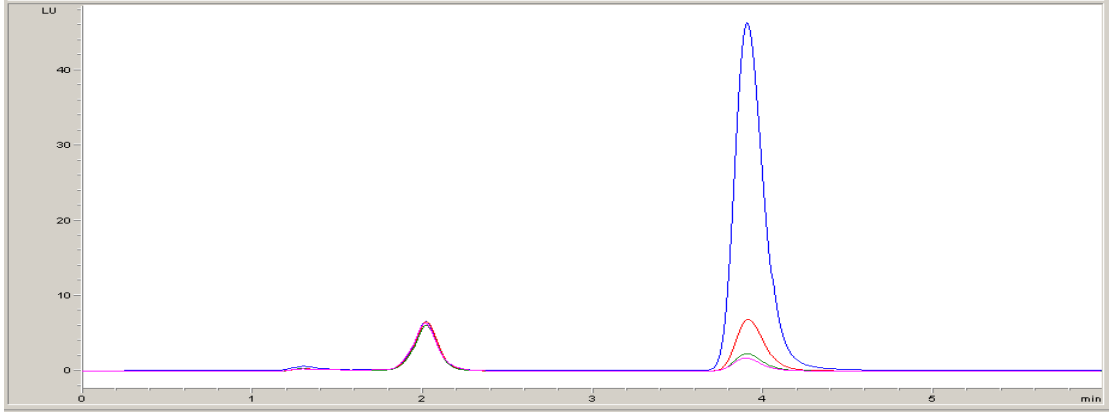
Geliştirilen ve geçerlilik testi yapılan HPLC-FD yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla irbesartan etkin maddesini içeren farmasötik preparatlarda etkin madde miktar analizi yapıldı.

İrbesartan etkin madde içeren, film tablet formundaki iki adet ticari farmasötik preparatlardan (Karvezide 150 mg, Co-irida 150 mg) Bölüm 3.2.6’da verildiği şekilde tablet çözeltileri hazırlandı. Elde edilen çözeltilerin kromatogramları alındı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) ve okunan pik alan oranları değerlerinden kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak irbesartan etkin madde miktar belirlenmesi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10’ da verildi.

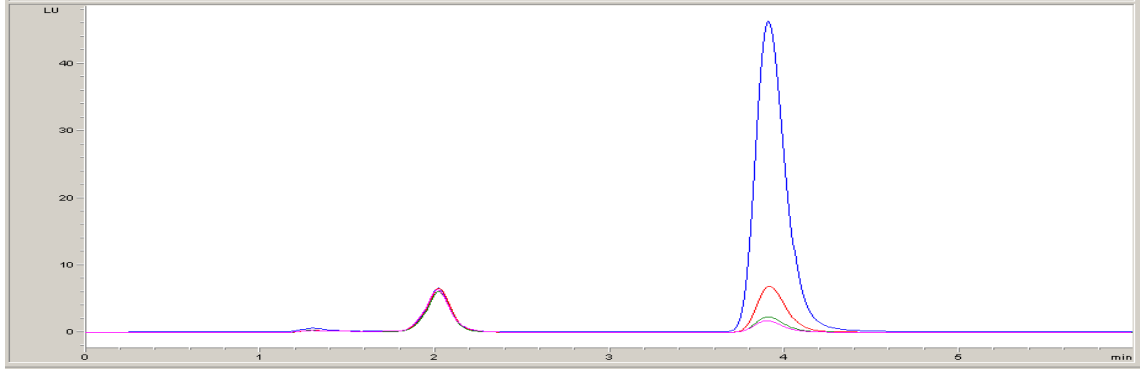
Tablo 4.11. HPLC-FD yönteminin farmasötik preparatlarda geri kazanım değerleri

Farmasötik Formülasyon	Etkin Madde Miktarı (mg)	İlaç Çözeltisi Derişimi (mg/mL)	Bulunan (mg/mL)	% GK	Güven Aralığı
Karvezid	150	1.5	1.48	98.7	96.7-100.7
Co-Irida	150	1.5	1.47	98.0	96.0-100.0

GK: Geri kazanım



Şekil 4.9. Standart ekleme yöntemine göre 100 ng/mL karvezide (150 mg) üzerine eklenmiş 20, 250 ve 1500 ng/mL kalite kontrol numunelerinin kromatogramları



Şekil 4.10. Standart ekleme yöntemine göre 100 ng/mL co-irida (150 mg) üzerine eklenmiş 20, 250 ve 1500 ng/mL kalite kontrol numunelerinin kromatogramları

5. TARTIŞMA

Hipertansiyon vücuttaki kan basıncının normal olan 140/90 mmHg değerinin devamlı olarak üzerinde olması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Dünya genelinde 600 milyon insanda görülmekte ve her yıl 3 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Hipertansiyonun yaygınlığı, hastalığın doğru bir şekilde teşhis edilememesi ve hastaların bilinçsizliği ile birleşerek yetersiz tedavinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. İrbesartan hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir non-peptid anjiyotensin II reseptör antagonistidir. Anjiyotensin II reseptör antagonistleri (ARA-II'ler), hipertansiyon ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde etkili ajanlardır. İrbesartan vücutta dönüştüğü aktif metaboliti ile birlikte selektif olarak AT₁ metabolitine bağlanarak anjiyotensin II'nin vazokonstriktör ve aldosteron salgılatıcı etkilerini bloke eder ve bu yolla antihipertansif etki gösterir.⁴²

Kan basıncı kontrolü günümüzde ilaç sektörünün öncelikli üretim alanlarından birini oluşturmaktadır. Antihipertansif ilaç gruplarında birçok etkin madde kullanılmakta ve bunlara her geçen gün yenileri eklenmektedir. İlaçların etkili olan kısımları ilaçların etkin maddeleridir. Bir farmasötik preparat her türlü kalite kontrolünden geçmesine rağmen yine de hastaya verildiğinde etkisi yetersiz olabilir. İlaçların biyolojik sıvılarda analizi ile ilacın vücut içerisindeki davranışı incelenebilir. Elde edilen profillerden ilacın biyolojik etkisiyle ilişkisi saptanabilir ve daha tutarlı verimli tedavilere gidilmesine olanak sağlanabilir. Bu yüzden biyolojik ortamlarda ilaç ya da diğer maddelerin miktar analizi, teşhisi, belirlenmesi veya ilaç imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etkin maddelerinin analizi bilimsel açıdan önemli çalışmalardır.^{42,43}

İlaçların kimyasal analizlerinde kalitatif ve kantitatif analitik yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal analizin birinci ve en önemli basamağı analizde kullanılacak

yöntemin seçiminin yapılmasıdır. Buda analitik yöntemler hakkında yeterli bir bilgi ve donanıma sahip olmayı gerektirmektedir. Bu bağlamda, çalışılacak konu hakkında iyi bir literatür bilgisinin elde edilmesi, çalışmanın zaman ve aşama olarak planlanmasını gerekir. Uygulanacak analitik tekniklerin seçimi tamamen elde edilmek istenen sonuçların kapsamı, hassasiyeti ve kesinliği gibi parametrelere bağlıdır. Ayrıca her türlü koşullar altında en iyi yol sadece bir tane değildir. Genel olarak yöntem seçiminde ilk adım analiz sırasında ölçülmek istenen değerlerin belirlenmesi, buna ulaşmak için de en hızlı ve güvenli yolun araştırılmasıdır.⁴⁴

Spektroskopide limünesans, maddenin birbirine yakın üç özelliği olan moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesansın ortak adıdır. Bu üç fiziksel özellik birer spektroskopik tekniğin alt yapısını oluştururlar. Moleküler floresans ve fosforesans yöntemlerinde maddenin çözeltisi üzerine ışık enerjisi gönderilerek madde uyarılır (eksite edilir). Sistemin atomun dış yörüngesindeki elektronlar ve moleküllerinde bağ elektronları bir üst enerji seviyesine uyarılırlar. Bu uyarılma hali sistemin kararlılığında istenen bir durum olmadığından, sistem kararlı hale tekrar geri dönme arzusundadır. Geri dönerken bünyesinde bulunan fazla enerjiyi çeşitli şekillerde geri bırakır. Enerjiyi geri bırakma olayına durulma denir. Işımalı ve ışısız olmak üzere durulma iki farklı türde olur. Bunlardan ışısız durulma floresans ve fosforesans diye ayrılan iki farklı şekilde meydana gelir. Bu iki durulma türü arasındaki temel farklılık elektron spinlerinde soğurulma sırasında değişiklik olup olmadığına dayanır. Durulma sırasında spinde değişiklik meydana geliyorsa fosforesans, değişiklik meydana gelmiyorsa floresans olarak adlandırılır. Maddelerin floresans özelliğine dayalı olarak analizlerde kullanılan spektrofotometreler kullanılır. Bu sistemlerin spesifikliği, düşük tayin sınırı, yüksek duyarlılığı ve kullanım kolaylığı gibi üstünlükleri sebebiyle farmakolojide miktar analizlerinde oldukça tercih edilirler.

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çalışma prensibi bu yöntemde dayanan HPLC kolonunun pek çok kez kullanılabilmesiyle, analizcinin yeteneklerine daha az bağılı olmasıyla, tekrarlanabilirliğinin yüksek olmasıyla, kısa sürede analiz edebilmesiyle ve duyarlılığının çok yüksek olmasıyla diğer yöntemlerden daha avantajlı bir yöntemdir. HPLC’de sıcaklık, kolon çeşidi, sabit faz, hareketli faz gibi parametreler numunenin absorbansını ve analiz süresini etkileyebileceğinden her analizden önce bu parametreler optimize edilmelidir. HPLC sistemleri, sistem kullanılan dedektör tipine göre adlandırılırlar. HPLC-FD, floresans detektöre sahip HPLC sistemini ifade eder. HPLC-FD, floresans özellik gösteren moleküllerin için yüksek hassasiyette kantitatif ölçümler yapma imkanı tanımaktadır. İrbesartan etkin maddesinin de floresans özellik gösterdiğinden dolayı çalışmamızda spektrofotometri ve floresans dedeksiyonlu HPLC yöntemleri kullanılmıştır.

Analitik yöntemlerin seçimi yapıldıktan sonra, yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için geçerlilik testlerinin yapılması gerekir. Geçerlilik testleri yapılırken bileşimi tam olarak bilinen standart maddeler kullanılır. Geçerlilik testleri yapıldıktan sonra belirlenen yöntemin uygulanabilir olduğu, gerçek numunelerde (farmasötik preparat, plazma, serum vb.gibi) analit veya analitlerin analizleri yapılarak gösterilir.⁴⁵

İrbesartanın plazmada miktarının belirlenmesine ilişkin kromatografik ve spektroskopik yöntemler literatürde yer almıştır. Ayrıca elektrokimyasal yöntemlere de başvurulmuştur. Yapılan kromatografik ölçümlerde Shakya ve ark.²⁵ hareketli faz olarak 0.01 M fosfat tamponu ve aynı zamanda çalışmalarında katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanarak plazmadan irbesartanın geri kazanımını sağlamışlardır. Erk²⁴ yine potasyum dihidrojen fosfat tamponu içeren bir hareketli faz kullanmıştır. Kyung ve ark.²⁷ 10-500

ng/mL derişim aralığında irbesartan ölçümlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Gonzalz ve ark.²⁹ asetat tamponu içeren bir hareketli faz içerisinden 50 dk'da losartan, valsartan, irbesartan ve candesartanı analiz etmişlerdir. Yapılan bu kromatografik ölçümlemlerle yöntemimiz karşılaştırıldığında geliştirilip geçerlilik testleri yapılan HPLC yöntemle literatürdeki bazı çalışmaların aksine hareketli faz içeriğinde tampon çözeltisi kullanımına gerek duyulmamıştır. Bu sayede kolon ve cihazın zarar görmesi engellenmiş olup analizin daha kolay gerçekleştirilmesi mümkün kılınmıştır. Ayrıca yöntemimiz literatürdeki örneklere göre daha hassas olup 5 ng/mL derişimde dahi analiz yapabilmeye imkân vermektedir. Geliştirilen yöntemin alıkonma zamanı 10 dk'dan daha azdır. Literatürdeki diğer tüm yöntemlerden farklı olarak plazmadan geri kazanım çalışmasında organik faz olarak diizopropil eter kullanılmıştır. Bu sayede ucuz, geri kazanımı yüksek, hassas ve özgün bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi literatüre kazandırılmıştır. Sonuç olarak insan plazmasında irbesartanın miktarının belirlenmesi için basit, hızlı, tekrarlanabilir, özgün ve geri kazanımı yüksek bir yöntem geliştirilip geçerlilik testleri yapılmıştır.

Yapılan spektrofotometrik analiz çalışmasında 10-300 ng/mL aralığında yöntem doğrusal olarak belirlenmiştir. Literatürde irbesartanın insan plazmasında analizine yönelik bir spektrofotometrik yöntemle rastlanmamıştır. Bu yönüyle geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntem özgündür. Güniçi ve günler arası yapılan ölçümlemlerde 20, 75 ve 250 ng/mL derişimlerinde örnekler kalite kontrol çözeltisi olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğruluk ve kesinlik değerleri sırasıyla %8.0 ve %2.0'den küçük ve farmasötik preparatlardan analitik geri kazanım değeri %101.8 ve plazmadan geri kazanım değeri % 98.8 olarak belirlendi. Ve aynı zamanda LOQ değeri 10 ng/mL, LOD değeri ise 3 ng/mL olarak tespit edildi. Tüm parametreler ışığında geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemin hem farmasötik preparatlarda kalite kontrol

analizlerinde hem de insan plazmasında irbesartan etkin madde miktar analizinde kullanılabilir sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, farmasötik preparatlarda ve insan plazmasında antihipertansif bir ilaç olan irbesartanın miktar tayini için spektrofotometrik ve HPLC-FD yöntemleri geliştirilip ve geçerlilik testleri nin yapılması ve geliştirilip geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin uygulanabilir olduklarını göstermek amacıyla yapılmıştır.

Çalışma sonucunda irbesartanın analizinde geliştirilen yöntemlerin hızlı, hassas ve basit olduğu, farmasötik preparatların kalite kontrol ve insan plazmasında in vitro olarak irbesartanın belirlenmesi çalışmalarında uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. SO K. Tıbbi farmakoloji. Ankara: Feryal Matbaası, 1993: 2279-2284.
2. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. Hypertension, 1995, 25: 305-313.
3. Kayaalp O. Tıbbi farmakoloji. Baskı. Hacettepe-Taş, 1996.
4. Göçgeldi E, Babayiğit MA, Hassoy H, Açikel CH, Taşçı İ, Ceylan S. Hipertansiyon tanısı almış hastaların algıladıkları yaşam kalitesi düzeyinin ve etki eden faktörlerin değerlendirilmesi. Gülhane Tıp Dergisi, 2008, 50: 172-179.
5. Phillips C, Cistulli P. Obstructive sleep apnea and hypertension: epidemiology, mechanisms and treatment effects. Minerva medica, 2006, 97: 299-312.
6. Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. Hypertension, 2004, 43: 10-17.
7. Kabakci G, Koylan N, Kozan Ö. Türkiyedeki Hipertansiyon Hastalarının Risk Profüllerinin Belirlenmesine Yönelik Geniş, Ölçekli Bir Çalışma: ICEBERG Calumasi.
8. Jonas BS, Lando JF. Negative affect as a prospective risk factor for hypertension. Psychosomatic Medicine, 2000, 62: 188-196.
9. Ong KL, Cheung BM, Man YB, Lau CP, Lam KS. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999-2004. Hypertension, 2007, 49: 69-75.

10. Whitehurst TK, McClure KH, Thacker JR, McGivern JP. Treatment of hypertension. 2006.
11. Group SCR. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 1991, 265: 3255-3264.
12. Wong PC, Price W, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PB. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1990, 255: 211-217.
13. Scriabine A. Pharmacology of antihypertensive drugs. Baskı. Raven Press (ID), 1980.
14. Wollam GL, Gifford Jr RW, Tarazi RC. Antihypertensive drugs: clinical pharmacology and therapeutic use. Drugs, 1977, 14: 420-460.
15. Adams M, Trudeau L. Irbesartan: review of pharmacology and comparative properties. The Canadian journal of clinical pharmacology= Journal canadien de pharmacologie clinique, 1999, 7: 22-31.
16. Timmermans PB. Pharmacological properties of angiotensin II receptor antagonists. The Canadian journal of cardiology, 1999, 15: 26F-28F.
17. Johnston CI, Risvanis J. Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists update and outstanding issues. American journal of hypertension, 1997, 10: 306S-310S.
18. Li P, Fukuhara M, Diz DI, Ferrario CM, Brosnihan KB. Novel angiotensin II AT1 receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A2-induced

- vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, 292: 238-246.
19. Gupta VK, Jain R, Agarwal S, Mishra R, Dwivedi A. Electrochemical determination of antihypertensive drug irbesartan in pharmaceuticals. *Analytical biochemistry*, 2011, 410: 266-271.
 20. Tutunji LF, Tutunji MF, Alzoubi MI, Khabbas MH, Arida AI. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence studies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2010, 51: 985-990.
 21. Farouk M, EL-Aziz OA, Hemdanb A, Shehata M. Simple novel spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of some anti-hypertensive drugs. *J American Science*, 2011, 7.
 22. Albero I, Rodenas V, Garcia S, Sanchez-Pedreno C. Determination of irbesartan in the presence of hydrochlorothiazide by derivative spectrophotometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2002, 29: 299-305.
 23. Yousheng A, Chuhong X, Huating C. Content Determination of Irbesartan in Serum by HPLC [J]. *China Pharmacist*, 2004, 4: 010.
 24. Erk N. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 2003, 784: 195-201.
 25. Shakya AK, Al-Hiari YM, Alhamami OM. Liquid chromatographic determination of irbesartan in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2007, 848: 245-250.
 26. Li Z, Chen F, Wang X, Wang C. Ionic liquids dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of

- irbesartan and valsartan in human urine. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27: 254-258.
27. Bae SK, Kim MJ, Shim EJ, Cho DY, Shon JH, Liu KH, Kim EY, Shin JG. HPLC determination of irbesartan in human plasma: its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 2009, 23: 568-572.
 28. Zhao J, He L-Y, Zhang K-j, Jiang H-w, Wang M-J. Effects of irbesartan combined with vitamin E on the micro-inflammatory state and erythropoietin dosage in maintenance hemodialysis patients. *Practical Journal of Clinical Medicine*, 2010, 5: 014.
 29. Gonzalez L, Lopez J, Alonso R, Jimenez R. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 2002, 949: 49-60.
 30. Skoog D, Holler F, Nieman T. *Instrumental Analiz. Bilim Yay*, 2001, 931.
 31. Gündüz T. *İnstrümental analiz. Baskı. Gazi Kitabevi*, 1999.
 32. Mergny J-L, Phan A-T, Lacroix L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS letters*, 1998, 435: 74-78.
 33. Stepanov BI, Hrybkoŭski VP. *Theory of luminescence. Baskı. Iliffe*, 1968.
 34. Adams MJ. *Chemometrics in analytical spectroscopy. Baskı. Royal Society of Chemistry*, 2004.
 35. Willard HH, Merritt Jr LL, Dean JA, Settle Jr FA. *Instrumental methods of analysis*. 1988.
 36. Ewing GW. *Instrumental methods of chemical analysis. Baskı. McGraw-Hill*, 1985.
 37. Ingle Jr JD, Crouch SR. *Spectrochemical analysis*. 1988.

38. Skoog DA, West DM. Principles of instrumental analysis. Baskı. Saunders College Philadelphia, 1980.
39. Heftmann E. Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques. Baskı. Elsevier Science, 2004.
40. Wixom RL, Gehrke CW. Chromatography: A Science of Discovery. Baskı. Wiley, 2011.
41. Riley CM, Rosanske TW. Development and validation of analytical methods. Baskı. Elsevier, 1996.
42. Kaplan NM, Victor RG. Kaplan's Clinical Hypertension. Baskı. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
43. Woodrow R, Colbert B, Smith DM. Essentials of Pharmacology for Health Occupations. Baskı. Cengage Learning, 2010.
44. Shabir GA. Validation of 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. Journal of Chromatography A, 2003, 987: 57-66.
45. Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis. Baskı. Wiley Online Library, 2014.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: İbrahim TURGUT Doğum tarihi: 16.09.1985 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Evli Uyruğu: T.C. Adres: Doğu şehir sitesi D Blk.4/16 Kayakyolu/Erzurum Tel: 543 928 80 07 Faks: - E-mail: iey_turgut@hotmail.com
Eğitim
Lise: Erzurum Anadolu Lisesi Lisans: Erzurum Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce (Orta)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Erzurum Eczacılar Odası
İlgi Alanları ve Hobiler
Kitap, Spor

EK-2. ETİK KURUL KARARI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/ 280
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

28/02/2014

Sayın: Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

İlgi : 28.02.2014 tarih ve 237 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 28.02.2014 tarihinde almış olduğu 6'nolu karar ile "İrbesartan Etkin Maddesinin Plazmada ve Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini" başlıklı yüksek lisans öğrenciniz İbrahim TURGUT ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ: 28.02.2014
TOPLANTI SAYISI: 2

Karar -6- Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarlarında yürütülecek olan "İrbesartan Etkin Maddesinin Plazmada ve Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 28.02.2014 tarih ve 237 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.